

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die gepulste alternierende Anregung in der
konfokalen Fluoreszenzspektroskopie
Entwicklung und Anwendungen

Barbara Katrin Müller
aus
Karlsruhe

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Bräuchle betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 23.11.2006

Dissertation eingereicht am 23.11.2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Bräuchle

2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Rädler

Mündliche Prüfung am 19.01.2007

Nicht alles was zählt, kann gezählt werden, und nicht alles was
gezählt werden kann, zählt!

- ALBERT EINSTEIN

Publikationsliste

Teilergebnisse dieser Arbeit sind vorab veröffentlicht bzw. werden zur Veröffentlichung vorbereitet:

- S. Sharma, B.K. Müller, K. Chakraborty, C. Bräuchle, M. Hayer-Hartl, D.C. Lamb, F.U. Hartl, *Observation of Chaperonin-mediated protein folding by single-molecule FRET*, Manuskript in Vorbereitung
- B.K. Müller, A. Reuter, F.C. Simmel, D.C. Lamb, *Single-pair FRET characterization of DNA tweezers*, NANO LETTERS 6 (12): 2814-2820 (2006)
- F. Kukulka, B.K. Müller, S. Paternoster, A. Arndt, C.M. Niemeyer, C. Bräuchle, D.C. Lamb, *A Single-Molecule Förster Resonance Energy Transfer Analysis of Fluorescent DNA-Protein Conjugates for Nanobiotechnology*, SMALL 2 (8-9): 1083-1089 (2006)
- C. Jung, B.K. Müller, D.C. Lamb, F. Nolde, K. Müllen, C. Bräuchle, *A new photostable terrylene diimide dye for applications in single molecule studies and membrane labeling*, Journal of the American Chemical Society 128 (15): 5283-5291 (2006)
- B.K. Müller, E. Zaychikov, C. Bräuchle, D.C. Lamb, *Pulsed Interleaved Excitation*, Biophysical Journal, 89 (5): 3508-3522 (2005)
- D.C. Lamb, B.K. Müller, C. Bräuchle, *Enhancing the Sensitivity of Fluorescence Correlation Spectroscopy by using Time-Correlated Single Photon Counting*, Current Pharmaceutical Biotechnology 6 (5): 405-414 (2005)

Kurzzusammenfassung

Die konfokale Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht die Untersuchung der Struktur und Dynamik von Biomolekülen. Durch die Entwicklung photostabiler Fluoreszenzfarbstoffe und hochempfindlicher Detektoren konnte sich die konfokale Fluoreszenzspektroskopie in den letzten Jahren zunehmend im Bereich der Einzelmolekülspektroskopie etablieren. Gerade im Hinblick auf die steigende Anzahl der *in vivo*-Anwendungen, aber auch bei *in vitro*-Messungen, erfordert die Untersuchung von Biomolekülen auf dem Einzelmolekülniveau, dass die maximale Information aus jedem einzelnen Photon extrahiert werden kann. Mit der gepulsten alternierenden Anregung (*Pulsed Interleaved Excitation*, PIE) konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, bei der die zusätzliche Information zugänglich ist, mit welcher Anregungsquelle das Photon erzeugt wurde. Die weitreichenden Vorteile von PIE konnten sowohl prinzipiell für die verschiedenen Bereiche der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie aufgezeigt werden als auch auf konkrete biologische bzw. nanotechnologische Fragestellungen angewandt werden.

Das Anwendungsspektrum von PIE reicht von der Einbeziehung der Stöchiometrie bei Einzelmolekül-Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (spFRET) über die Eliminierung des spektralen Übersprechens bei Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) sowie *Laser-Scanning-Microscopy*-Bildern bis hin zu quantitativen FCCS-Messungen bei gleichzeitigem FRET. Insbesondere ist hierbei die Möglichkeit der Bestimmung von FRET-Effizienzen mittels FCCS hervorzuheben. Die Einführung einer dritten Farbe erhöht den Informationsgehalt einer einzelnen Messung zusätzlich.

Die Mechanismen der Chaperonin-gesteuerten Proteinfaltung konnten bis heute nur unzulänglich gelöst werden, wobei von besonderem Interesse ist, warum die Faltungseffizienz der Proteine mit Hilfe von Chaperoninen erhöht und die Faltungsrate beschleunigt werden kann. In dieser Arbeit konnten anhand von spFRET-Messungen mit PIE die einzelnen Stufen des Reaktionszyklusses des Chaperonins GroEL auf ihre Heterogenität untersucht und somit ein detaillierterer Einblick in die Funktionsweise gewonnen werden.

In nanotechnologischen Anwendungen spielen Nanokonstrukte aus DNA eine wichtige Rolle, wobei deren Charakterisierung derzeit mit den verwendeten Ensemble-Studien nur unzureichend möglich ist. Daher ist die Untersuchung auf der Einzelmolekülebene erforderlich. Mittels spFRET in Kombination mit PIE konnte dies eindrucksvoll für ein semisynthetisches Antennenmolekül aus DNA und einem fluoreszierenden Protein sowie für einen der Prototypen der DNA-Nanomaschinen, der DNA-Pinzette, gezeigt werden.

Abstract

Confocal fluorescence spectroscopy enables the investigation of the structure and dynamics of biomolecules. In recent years, the development of photostable fluorescent dyes and highly sensitive detectors has allowed the establishment of confocal fluorescence spectroscopy for single molecules. The increasing number of *in vivo* applications in particular, but also *in vitro* studies, on the single molecule level require the extraction of the maximum possible information from each photon. In the presented work, a method (Pulsed Interleaved Excitation, PIE) was established, which provides additional information: namely the excitation source that generated a photon. The extensive advantages could be shown in principle for different fields in confocal fluorescence spectroscopy and microscopy, and was applied to concrete biological and nanotechnological problems.

Applications range from determination of the stoichiometry in single-pair Fluorescence Resonance Energy Transfer (spFRET), the elimination of spectral cross-talk in Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy (FCCS) and Laser Scanning Microscopy images or quantitative FCCS measurements in presence of FRET. Of special interest is the possibility of determining FRET efficiencies by FCCS. The introduction of a third colour enhances the information content further.

The mechanisms of Chaperonin-mediated protein folding has previously not been completely understood. It is of special interest as to why the efficiency and rate of protein folding is increased with the help of Chaperonins. In this study, the reaction cycle of the Chaperonin GroEL could be pictured by snapshots with spFRET measurements in combination with PIE. Thus, a detailed insight could be gained into the functionality of GroEL.

Nanodevices made of DNA play an important role in nanotechnological applications, but the currently used ensemble techniques do not give sufficient information for the characterisation of such devices. This necessitates investigations at the single molecule level. Using spFRET with PIE, the advantages of single molecule studies could be demonstrated on a semisynthetic antenna molecule made of DNA and a fluorescent protein, and on one of the prototype DNA nanomachines, the DNA tweezers.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	5
2.1	Fluoreszenzspektroskopie	5
2.1.1	Jablonski-Diagramm	5
2.1.2	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	9
2.2	Konfokale Fluoreszenzspektroskopie	12
2.2.1	Beschreibung des konfokalen Volumens	12
2.2.2	Messung von FRET-Effizienzen: <i>Burst Analysis</i>	15
2.2.3	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	18
2.2.4	Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS)	23
3	Gepulste Anregung in der Fluoreszenzspektroskopie	27
3.1	Funktionsweise von PIE	27
3.2	Experimenteller Aufbau	30
3.3	<i>Burst Analysis</i> mit PIE	32
3.3.1	Drei-Farben-FRET	33
3.4	PIE-FCCS ohne spektrales Übersprechen	35
3.5	PIE-FCCS bei gleichzeitigem FRET	37
3.5.1	PIE-FCCS mit FRET	38
3.5.2	Berechnung der FRET-Effizienzen mittels PIE-FCCS	41
4	Anwendungsbereiche von PIE	45
4.1	<i>Burst Analysis</i> mit PIE	45
4.1.1	Stöchiometrie	48
4.1.2	Bestimmung des α -Faktors	49
4.2	FCCS mit PIE	50
4.2.1	PIE-FCCS ohne Übersprechen	50
4.2.2	PIE-FCCS mit einem Detektor	53
4.2.3	PIE-FCCS in Gegenwart von FRET	55
4.2.4	Bestimmung der FRET-Effizienzen mit PIE-FCCS	56

4.3	<i>Laser Scanning Microscopy</i> (LSM) mit PIE	58
4.4	<i>Time-Gated-FCS</i>	60
4.5	Drei-Farben-FRET	62
4.5.1	Farbstoffwahl	63
4.5.2	<i>Two-Step</i> FRET	63
4.6	Signal/Rausch-Verhältnis mit PIE	68
4.7	Zusammenfassung	70
5	Untersuchung der Chaperonin-gesteuerten Proteinfaltung	73
5.1	Proteine	73
5.1.1	Proteinstruktur	75
5.1.2	Proteinfaltung	75
5.2	Molekulare Chaperone	76
5.2.1	Das Chaperonin-System GroEL-GroES	77
5.3	Ergebnisse	80
5.3.1	Das Substrat: Maltose-Binding-Protein	81
5.3.2	GroEL-Mutanten	84
5.3.3	Heterogenität des GroEL gebundenen Substrats	85
5.3.4	Allosterische Regulation des GroEL-Zyklus	89
5.3.5	Abhängigkeit der Verteilung von der Anzahl durchlaufener Zyklen und dem Faltungszustand	90
5.3.6	Entfaltung des Substrat-Proteins nach der GroES-Bindung	92
5.3.7	Experimentelle Bedingungen	93
5.4	Zusammenfassung	94
6	DNA-Nanokonstrukte	97
6.1	Eigenschaften von Nucleinsäuren	97
6.2	Entwicklung eines DNA-Protein-Konjugats	99
6.2.1	Aufbau des DNA-Protein-Komplexes	100
6.2.2	Ensemble-FRET-Messungen	101
6.2.3	spFRET-Messungen	102
6.3	DNA-Nanomaschinen	104
6.3.1	Aufbau der DNA-Pinzette	105
6.3.2	Ergebnisse	107
6.4	Zusammenfassung	112
7	Zusammenfassung und Ausblick	115
A	Theorie des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers	119
B	Autokorrelationsanalyse	121

C	Details des experimentellen Aufbaus	125
C.1	Laser	126
C.2	Akusto-Optischer Modulator (AOM)	127
C.3	Optische Glasfasern	128
C.4	Objektiv	129
C.5	Dichroitische Spiegel und Filter	129
C.6	Detektoren	129
C.7	Datenaufnahme	132
	C.7.1 Korrelatorkarte	132
	C.7.2 <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i> (TCSPC)	133
C.8	Synchronisation von Laserpulsen und TCSPC-Karte	134
C.9	Datenauswertung	135
D	Fluoreszenzfarbstoffe und Markierung	137
D.1	Synthetische Farbstoffe	137
D.2	Entwicklung neuer Farbstoffe	138
D.3	Autofluoreszierende Proteine	138
D.4	Bestimmung der Förster-Radien und α -Faktoren	140
D.5	DNA-Doppelstränge	141
	D.5.1 Markierung von DNA/Protein mit Fluoreszenzfarbstoffen	141
	D.5.2 Sequenzen der DNA	142
D.6	Probenvorbereitung	142
D.7	HeLa-Zellen und Polyplexe	143
E	SpFRET-Verteilungen der DM-MBP-Mutanten	145

Kapitel 1

Einleitung

Die komplizierten, dynamischen Prozesse in lebenden Organismen können nur durch das reibungslose Zusammenspiel einer riesigen Anzahl komplexer Biomoleküle ablaufen. Mit Hilfe von Energie, die lebende Systeme aus Nahrung oder Sonnenlicht gewinnen, bilden und erhalten sie ihre Strukturen und passen sich neuen Bedingungen an, wobei sie weit entfernt vom thermischen Gleichgewicht arbeiten.

Biomoleküle sind größtenteils aus Kohlenstoff, der mit Sauerstoff, Wasserstoff und Stickstoff kovalent verknüpft ist, aufgebaut. Daraus bilden sich kleine Untereinheiten wie Aminosäuren, Nucleotide, Monosaccharide oder Fettsäuren, die wiederum Makromoleküle wie Proteine, Nucleinsäuren, Polysaccharide oder Lipide formen. Die dreidimensionale Struktur dieser Makromoleküle spielt dabei eine wichtige Rolle, denn nur in der korrekten Form funktionieren z.B. Proteine fehlerfrei. Isoliert gehorchen diese Moleküle den physikalischen und chemischen Gesetzen, zusammen besitzen sie jedoch außergewöhnliche Eigenschaften, die eine zufällige Anordnung von Biomolekülen nicht aufweist. In einer Zelle existieren Tausende verschiedener Moleküle, die über eine enorme Diversität verfügen. Diese lassen sich nur schwierig allgemein beschreiben, sondern müssen zunächst einzeln auf ihre Funktion untersucht werden, um anschließend das Zusammenspiel genau verstehen zu können.

Da sich die Funktionen solcher Biomoleküle oftmals nicht synchronisieren lassen, ist es in diesem Fall nicht ausreichend, Untersuchungen an einzelnen Sorten von Biomolekülen durchzuführen, sondern diese müssen zusätzlich auf dem Einzelmolekülniveau stattfinden. Hierfür sind einzelmolekülsensitive Methoden vonnöten, mit denen als erster Schritt *in vitro*, weiterführend aber auch *in vivo*-Studien möglich sind. Gerade für *in vivo*-Untersuchungen sind vor allem weitestgehend nicht invasive Methoden, bei denen die Biomoleküle möglichst nahe ihrer natürlichen Umgebung analysiert werden können, notwendig.

Neben dem Verständnis der molekularen Grundlagen des Lebens ist heute in der Nanotechnologie ein Bestreben vorhanden, nach dem Vorbild der Natur Nanomaschinen zu gestalten. Für die Entwicklung solcher Maschinen auf der Nanometerskala sind Bio-

moleküle wie DNA aufgrund ihrer selbstorganisierenden Eigenschaften aber auch Proteine wichtige Bausteine. Um solche Nanokonstrukte zu realisieren, ist ein grundlegendes Verständnis über die Eigenschaften der einzelnen Bauteile essentiell, was wiederum nur durch die Charakterisierung auf der Einzelmolekülebene in ausreichendem Maß möglich ist.

Als einzelmolekülsensitive Methoden kommen vor allem die Fluoreszenzspektroskopie, überwiegend zur Untersuchung inter- und intramolekularer Wechselwirkungen und deren Dynamik, und die Kraftspektroskopie, wie die Optische Pinzette [1] oder Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*, AFM) [2], zur Messung von Kräften im Bereich von einigen Piconewton, zum Einsatz. Insbesondere die Fluoreszenzspektroskopie, wozu die konfokale Fluoreszenzspektroskopie, die Weitfeld-Mikroskopie [3, 4] und die interne Totalreflexions-Mikroskopie (*Total Internal Reflection Microscopy*, TIRF) [5] gehören, hat bei der Untersuchung biologischer Fragestellungen eine wichtige Stellung einnehmen können, da sie weitgehend nicht invasiv und daher zunehmend auch für *in vivo*-Studien eingesetzt werden kann [6, 7]. Die hohe Sensitivität und Selektivität kann dadurch erreicht werden, dass gezielt nur die zu untersuchenden Moleküle, die entweder autofluoreszent oder systematisch mit Fluoreszenz-Markern versehen sind, angeregt werden. Die in dieser Arbeit verwendete konfokale Fluoreszenzspektroskopie ist hinsichtlich ihrer Sensitivität weiterhin optimiert, da lediglich Licht aus einem Volumen, das kleiner als 1 Femtoliter ist, im Fokus des Objektivs detektiert wird. Dies ermöglicht z.B. bei der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) die Beobachtung der Diffusion einzelner Moleküle durch das Volumenelement, woraus Informationen über die Anzahl der Moleküle und deren Diffusionskoeffizienten gewonnen werden können [8]. Darüber hinaus können Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Molekülen mit Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) untersucht werden [9]. Dazu werden die Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher spektraler Eigenschaften markiert und in verschiedenen Kanälen detektiert. Das Signal der beiden Detektionskanäle ist korreliert, wenn die Moleküle als Einheit durch das Volumen diffundieren. Ein anderer wichtiger Anwendungsbereich der konfokalen Mikroskopie stellt die Aufnahme dreidimensionaler Bilder dar. Bei der *Laser Scanning Microscopy* (LSM) wird die Probe mit dem Laser abgerastert.

Eine dazu komplementäre Methode ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) der mit verschiedenen Methoden der Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden kann [10]. Hierbei wird Energie von einem Donorfarbstoff auf einen Akzeptorfarbstoff übertragen, wenn deren Abstand weniger als 100 Å beträgt. Da die Höhe des Energietransfers, der anhand der Änderung der gemessenen Fluoreszenz ermittelt werden kann, vom Abstand dieser Farbstoffe abhängt, wird diese Methode auch als molekulares Lineal bezeichnet [11]. Dieser eignet sich insbesondere für Abstandsmessungen von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen von Biomolekülen wie Proteinen. Bei diesen kommt

es oft auf die räumliche Anordnung an, damit eine vollständige Funktionalität gegeben ist. Dafür ist zum einen die Struktur wichtig, die mittels Kernmagnetresonanz (NMR) oder Röntgenbeugung aufgelöst werden kann, zum anderen aber auch deren Dynamik, welche mit diesen Methoden nur äußerst aufwändig zu untersuchen ist. FRET bietet hier eine schnelle und präzise Methode, Heterogenitäten und Dynamiken von Molekülen in Lösung nahe ihrer natürlichen Umgebung beobachten zu können. Auflösung und Aufwand limitieren diese Technik allerdings dahingehend, dass keine kompletten Strukturen bestimmt werden können.

Trotz stetiger Weiterentwicklung besteht bei allen Einzelmolekülmethoden noch Potential, die Sensitivität und die Information, die aus einem einzelnen Datensatz herausgefiltert werden kann, zu erhöhen, was für genauere und aufschlussreichere Messungen essentiell ist.

Ziele dieser Arbeit

Zur Erhöhung der Sensitivität der eben beschriebenen Fluoreszenzmethoden werden in dieser Arbeit gepulste Laser verschiedener Wellenlängen verwendet, um spektral unterschiedliche Farbstoffe alternierend anzuregen (PIE). Dazu werden in Kapitel 2 zunächst die Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie und die verwendeten Methoden eingeführt. In Kapitel 3 schließen sich die Beschreibung des entwickelten Aufbaus und die Herleitungen der theoretischen Erweiterungen durch PIE an. Anhand einfacher Testsysteme werden folgend die Erweiterungen von PIE für die verschiedenen Anwendungsbereiche in den einzelnen Techniken experimentell bestätigt (Kapitel 4). In einem darauf aufbauenden Projekt werden die Vorteile von PIE dafür ausgenutzt, hochsensitive Messungen zur Aufklärung der Chaperonin gesteuerten Proteinfaltung auf dem Einzelmolekülniveau durchzuführen (Kapitel 5). Abschließend werden in einem weiteren Projekt zwei verschiedene DNA-Nanokonstrukte, ein semisynthetisches Antennenmolekül und eine DNA-Nanomaschine, auf der Einzelmolekülebene charakterisiert (Kapitel 6).

Kapitel 2

Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

In diesem Kapitel werden zunächst die elementaren Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie eingeführt, bevor die einzelnen in dieser Arbeit verwendeten Methoden erläutert werden.

2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Lumineszenz, die Emission von Licht durch Abgabe von Energie eines elektronisch angeregten Zustands, wird in zwei Kategorien aufgeteilt, die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz. Bei der Fluoreszenz findet die spontane Emission von Strahlung beim Übergang vom angeregten Singulett-Zustand in den Grundzustand innerhalb von einigen Nanosekunden nach der Anregung statt. Bei der Phosphoreszenz ist das Ausgangsniveau des Übergangs der angeregte Triplett-Zustand. Die Energie kann hierbei über Sekunden bis hin zu Stunden gespeichert und nur allmählich durch spontane Emission abgegeben werden. Die Prozesse, die zwischen Emission und Absorption eines Photons ablaufen, werden gewöhnlich in einem Jablonski-Diagramm dargestellt [12].

2.1.1 Jablonski-Diagramm

Durch Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge kann ein Elektron vom elektronischen Grundzustand in einen höheren elektronischen Zustand angeregt werden. Der Grundzustand ist meistens der Singulett-Zustand S_0 , weshalb aufgrund der Auswahlregel ($\Delta S=0$) das Elektron in einen Zustand S_n gleicher Spinnmultiplizität angehoben wird. Da die Absorption des Photons innerhalb einiger Femtosekunden erfolgt, kann näherungsweise angenommen werden, dass sich der Kernabstand nicht ändert (Franck-Condon-Prinzip). Dies hat zur Folge, dass die Anregung nicht im Schwingungsgrundzustand des S_n -Zustands endet, sondern in einem höheren Schwingungsniveau. Durch

Schwingungsrelaxation fällt das Elektron innerhalb von Pikosekunden auf das Niveau des Schwingungsgrundzustands des S_n -Zustands zurück. Die verschiedenen Pfade, auf denen das Elektron wieder in den Grundzustand zurückkehren kann, sind in einem Jablonski-Diagramm in Abb. 2.1 dargestellt. Das angeregte Molekül kann durch spontane Emission eines Fluoreszenzphotons seine Energie abgeben. Dieser Übergang ist spinerlaubt und hat deswegen eine Lebensdauer von nur einigen Nanosekunden. Aufgrund des Franck-Condon-Prinzips fällt das Elektron auch hier nicht in den Schwingungsgrundzustand, sondern in ein energetisch höheres Schwingungsniveau und kehrt durch Schwingungsrelaxation in den Grundzustand zurück. Zwei strahlungsfreie, zur Fluoreszenz kompetitive Prozesse sind die interne Konversion (Verlust der Energie durch interne Schwingungsmoden) und die Fluoreszenzlöschung (s. unten). Weiterhin kann das Elektron durch *Intersystem Crossing* vom angeregten Singulett-Zustand in den Triplett-Zustand übergehen und - abgesehen von den oben erwähnten strahlungsfreien Übergängen - durch Emission eines Phosphoreszenzphotons in den Grundzustand gelangen. Der notwendige Übergang vom angeregten Triplett-Zustand in den Singulett-Grundzustand ist allerdings aufgrund oben erwähnter Auswahlregel spinverboten, bei starker Spin-Bahn-Wechselwirkung wird diese aber aufgehoben. Der Übergang ist dennoch unwahrscheinlich, weshalb die Phosphoreszenzlebensdauer deutlich größer als die Fluoreszenzlebensdauer ist ($\geq 10^{-4}$ s).

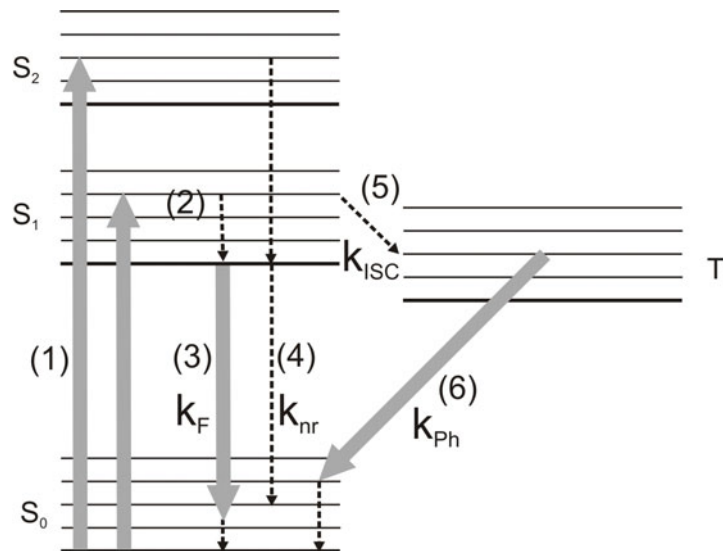


Abbildung 2.1: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm: (1) Absorption, (2) Schwingungsrelaxation, (3) Fluoreszenz, (4) Interne Konversion, (5) *Intersystem Crossing*, (6) Phosphoreszenz

Absorptions-/Anregungs- und Emissionsspektren Ein Fluoreszenzfarbstoff wird durch sein Absorptions-, Emissions- und Anregungsspektrum charakterisiert. Für ein

Absorptionsspektrum wird die Absorption¹ in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge dargestellt. Bei einem Anregungsspektrum wird die Intensität der Fluoreszenz bei einer bestimmten Wellenlänge in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge gemessen. Ein Emissionsspektrum zeigt die Intensität der Fluoreszenz abhängig von der Wellenlänge bei Anregung mit Licht konstanter Wellenlänge. Wegen der schnellen Schwingungsrelaxation ist der Verlauf eines Emissionsspektrums gewöhnlich unabhängig von der Anregungswellenlänge, da der Übergang vom Schwingungsgrundzustand des S_1 -Niveaus ausgeht. Aufgrund des Franck-Condon-Prinzips erfolgt die Anregung meist in ein höheres Schwingungsniveau des angeregten Zustands und nach der Schwingungsrelaxation die Emission vom S_1 -Niveau in ein höheres Schwingungsniveau des Grundzustands S_0 , weshalb die emittierten Photonen eine niedrigere Energie bzw. eine größere Wellenlänge als die anregenden Photonen besitzen. Diese Verschiebung von Absorption und Emission ist unter dem Namen *Stokes-Shift* bekannt (s. Abb. 2.2).

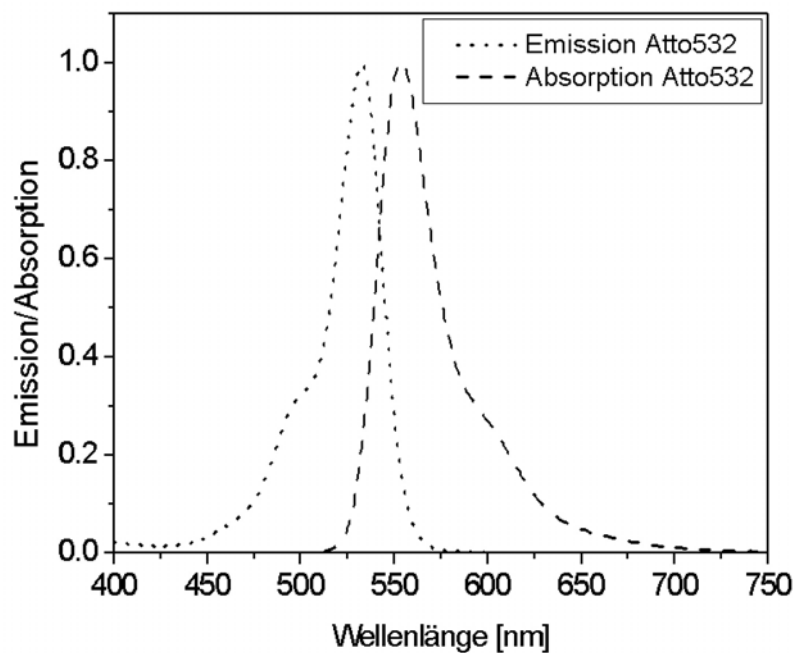


Abbildung 2.2: Emissionsspektrum und Absorptionsspektrum des Farbstoffes Atto532: Die Verschiebung zwischen Emissions- und Absorptionsmaximum wird als *Stokes-Shift* bezeichnet.

¹Die Abnahme der Intensität von Licht beim Passieren eines Mediums ist durch das Lambert-Beer-Gesetz gegeben: $I(l) = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$ (mit dem Extinktionskoeffizienten ϵ , der Konzentration c und der Weglänge l). Der dekadische Logarithmus von $\frac{I}{I_0}$ wird als Absorption oder Optische Dichte bezeichnet: $A \equiv OD = \alpha \cdot c \cdot l$ (mit dem Absorptionskoeffizienten $\alpha = \frac{\epsilon}{\ln 10}$). Abweichung von diesem Gesetz entstehen durch Streulicht, Aggregatbildung bei hohen Molekülkonzentrationen und Fluoreszenzemission der untersuchten Probe.

Fluoreszenzquantenausbeute Die Wahrscheinlichkeit, dass ein angeregtes Molekül durch Emission eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand zurückkehrt, wird als Quantenausbeute ϕ bezeichnet. Demnach ist sie als das Verhältnis der Anzahl emittierter Photonen zur Anzahl absorbierter Photonen gegeben und kann aus den entsprechenden Übergangsraten berechnet werden:

$$\phi = \frac{\# \text{ Photonen emittiert}}{\# \text{ Photonen absorbiert}} = \frac{k_F}{k_F + \sum k_{nr}} \quad (2.1)$$

wobei k_F die Übergangsrate der Fluoreszenz und k_{nr} die der nicht strahlenden Übergänge (z. B. Interne Konversion, *Intersystem Crossing* und Fluoreszenzlöschung) sind.

Fluoreszenzlebensdauer Die mittlere Zeit, die sich ein Molekül im angeregten Zustand befindet bevor es in den Grundzustand zurückkehrt, ist als Lebensdauer τ definiert. Sie ist gegeben durch die möglichen Übergangsraten in den Grundzustand:

$$\tau = \frac{1}{k_F + \sum k_{nr}} \quad (2.2)$$

Die Lebensdauer der strahlenden Übergänge wird als natürliche Lebensdauer bezeichnet und lässt sich aus dem Emissionsspektrum $F(\bar{\nu})$ und dem Absorptionsspektrum $\epsilon(\bar{\nu})$ berechnen²:

$$\tau_n = \frac{1}{k_F} \quad \text{mit} \quad (2.3)$$

$$k_F \approx 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \frac{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu} / \bar{\nu}^3} \int \frac{\epsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu}, \quad (2.4)$$

wobei n der Brechungsindex des Mediums ist. Der zeitliche Abfall der Fluoreszenzintensität kann im einfachsten Fall durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden, dessen Stärke durch die Lebensdauer τ bestimmt ist:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.5)$$

Bei verschiedenen fluoreszierenden Spezies in einer Lösung oder einem Fluorophor mit von der Umgebung abhängigen verschiedenen Lebensdauern muss das Abklingverhalten der Fluoreszenz durch einen multiexponentiellen Zerfall beschrieben werden.

Fluoreszenzlöschung Neben den oben beschriebenen gibt es zahlreiche andere Prozesse, die der Fluoreszenz entgegenwirken und unter dem Begriff Fluoreszenzlöschung (*Quenching*) zusammengefasst werden. Fluoreszenzlöschung kann durch Kollision mit einem anderen Molekül (z.B. Sauerstoff) oder Komplexbildung (statisches *Quenching*) auftreten.

² $\bar{\nu}$ ist die Wellenzahl in cm^{-1} .

2.1.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) ist die strahlungsfreie Übertragung der Energie des angeregten Zustands eines Fluorophors (Donor) auf einen anderen Fluorophor (Akzeptor). Dieser verläuft im Allgemeinen von einem Fluorophor mit kürzerer Absorptionswellenlänge/höherer Energie auf einen mit längerer Absorptionswellenlänge/niedrigerer Energie (s. Abb. 2.3).

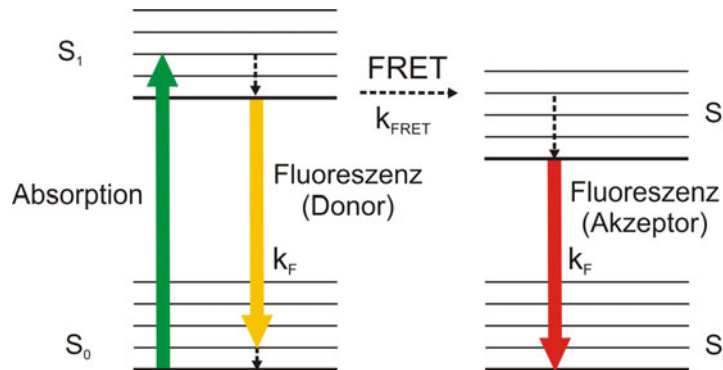


Abbildung 2.3: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung von FRET: Bei Anwesenheit eines zweiten Farbstoffes (Akzeptor) kann es bei Anregung des Farbstoffes mit der geringeren Wellenlänge (Donor) neben den in Abb. 2.1 dargestellten Übergängen auch zum Energietransfer auf den niederenergetischeren Akzeptor kommen. Der Energietransfer wird sichtbar, indem die Fluoreszenz mit der für diesen Farbstoff charakteristischen Wellenlänge detektiert wird.

Der strahlungsfreie Übergang findet aufgrund von intermolekularen langreichweitigen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen statt [10]. Da in diesem Prozess kein Photon involviert ist, ist der Name Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer irreführend. Daher wird oft der Ausdruck Förster-Resonanz-Energietransfer, benannt nach Theodor Förster, der die Theorie des FRET entwickelte, verwendet. Obwohl er die Fluorophore lediglich als Hertz'sche Oszillatoren beschrieben hat, gelang ihm 1946 die richtige Voraussage für die Abstandsabhängigkeit der Transferrate [13]. Bereits 1948 veröffentlichte er eine exakte quantenmechanische Herleitung, bei der er von zwei Zuständen, $\psi_{D^*,A}$ und ψ_{D,A^*} , die durch einen Dipoloperator gekoppelt sind, ausgeht [14].

Die Transferrate hängt vom Abstand R zwischen den Dipolen, von der spektralen Überlappung des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors (s. Abb. 2.4), der Quantenausbeute des Akzeptors und der Orientierung der beiden Dipole zueinander ab. Die Transferrate k_T des Energietransfers kann durch

$$k_T = \tau_D^{-1} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (2.6)$$

berechnet werden, wobei τ_D die Lebensdauer des Donors ohne Akzeptor, R der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen und R_0 der Förster-Radius ist. Der Förster-Radius ist

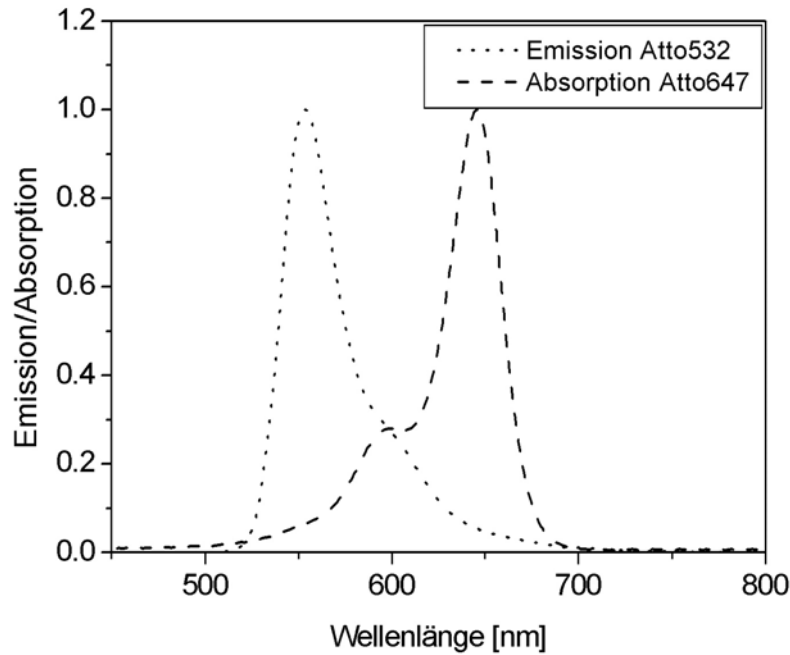


Abbildung 2.4: Emissionsspektrum des Farbstoffes Atto532 und Absorptionsspektrum des Farbstoffes Atto647: der Energietransfer hängt von der spektralen Überlappung des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors ab.

definiert als der Abstand, bei dem 50% der Energie übertragen wird. Details zur theoretischen Berechnung des Förster-Radius befinden sich in Anhang A, zur experimentellen Bestimmung in Anhang D.

Die FRET-Effizienz f_E ist definiert als das Verhältnis der zum Akzeptor transferierten Energie zu der vom Donor absorbierten Energie:

$$f_E = \frac{\text{von D nach A transferierte Energie}}{\text{von D absorbierte Energie}} = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T}. \quad (2.7)$$

Diese Gleichung kann mit 2.6 leicht in

$$f_E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}. \quad (2.8)$$

umgeformt werden. In Abb. 2.5 ist der Verlauf der FRET-Effizienz für die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoff-Paare zu sehen. FRET reagiert in Abstandsbereichen nahe des Förster-Radius sehr sensitiv auf Abstandsänderungen, wird aber bei größerer Distanz vom Förster-Radius zunehmend unempfindlicher. Daher ist bei der Wahl des Farbstoff-Paares und der Markierungspositionen darauf zu achten, dass der Förster-Radius möglichst im Bereich des zu erwartenden Abstands liegt ($\frac{1}{2}R_0 < R < 2R_0$).

Aufgrund der starken Abhängigkeit der Transferrate vom Abstand (vgl. Glg. 2.8) wird

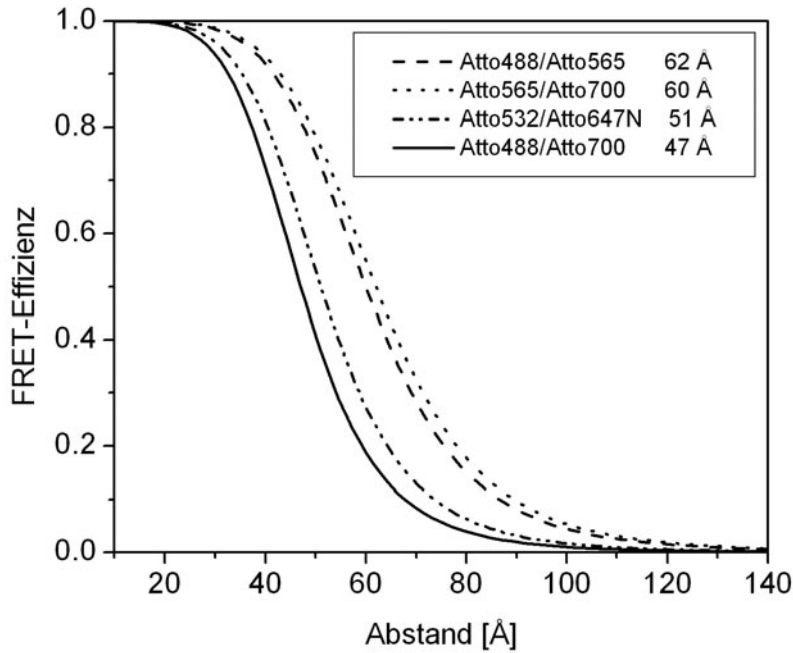


Abbildung 2.5: Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand für die verwendeten Farbstoff-Paare.

FRET auch als spektroskopisches Lineal bezeichnet [11]. Mittels FRET können Abstände im Bereich von ca. 10 bis 100 Å bestimmt werden, so dass FRET bestens geeignet ist, strukturelle und dynamische Informationen innerhalb oder zwischen biologischen Makromolekülen wie Proteinen und DNA zu untersuchen [15].

Zur Bestimmung von FRET-Effizienzen existieren verschiedene Möglichkeiten, am häufigsten werden allerdings Ensemble-Messungen verwendet. Hierbei kann die FRET-Effizienz durch das Verhältnis der Fluoreszenz des Donors mit Akzeptor (F_{DA}) und ohne Akzeptor (F_D) zueinander, also über die Abnahme der Donor-Fluoreszenz durch FRET, berechnet werden:

$$f_E = \left(1 - \frac{F_{DA}}{F_D}\right) \left(\frac{1}{f_A}\right) \quad (2.9)$$

f_A beschreibt dabei den Anteil der Moleküle mit Donor und aktivem Akzeptor. Entsprechend kann die FRET-Effizienz aber auch über die Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz bestimmt werden:

$$f_E = \frac{\varepsilon_A(\lambda_{ex})}{\varepsilon_D(\lambda_{ex})} \left(\frac{F_{AD}}{F_A}\right) \left(\frac{1}{f_D}\right), \quad (2.10)$$

wobei F_{AD} die Fluoreszenzintensität mit aktivem Donor und F_A ohne aktivem Donor, $\varepsilon_D(\lambda_{ex})$ und $\varepsilon_A(\lambda_{ex})$ die Extinktionskoeffizienten vom Donor bzw. Akzeptor und f_D der Anteil an Komplexen mit aktivem Donor ist. Da der Anteil an Molekülen mit aktivem

Donor und Akzeptor (f_D bzw. f_A) nur sehr schwer mit der nötigen Genauigkeit bestimmt werden kann, sind diese Methoden vor allem zur Untersuchung von Abstandsänderungen geeignet. Dieses Problem kann entweder mit Hilfe von zeitaufgelösten Messungen über den Unterschied in den Lebensdauern umgangen werden:

$$f_E = \left(1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}\right) \quad (2.11)$$

oder durch Einzelmolekül-FRET-Methoden, wie in dieser Arbeit beispielsweise die *Burst Analysis* (siehe Abschnitt 2.2.2).

2.2 Konfokale Fluoreszenzspektroskopie

Bei der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie wird der Laserstrahl durch ein Objektiv stark fokussiert, so dass eine Strahltaile von einigen 100 nm entsteht. Die Tiefenschärfe des Objektivs ist allerdings nicht ausreichend, um eine hinreichend scharfe Begrenzung des Probenvolumens auch in axialer Richtung zu erreichen, weshalb in der Bildebene eine Lochblende eingebracht wird. Dadurch werden extrem kleine, definierte Probenvolumina ($< 10^{-15}$ l) erzeugt und damit ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis erreicht, da die Lochblende fokus-fernes Licht herausfiltert. Mit dieser hohen räumlichen Auflösung in Kombination mit hochsensitiven Detektoren und photostabilen Farbstoffen kann Einzelmolekülsensitivität erreicht werden. Dies ermöglicht es neben der FCS und der *Burst Analysis* auch mittels LSM dreidimensionale Bilder zu erstellen.

2.2.1 Beschreibung des konfokalen Volumens

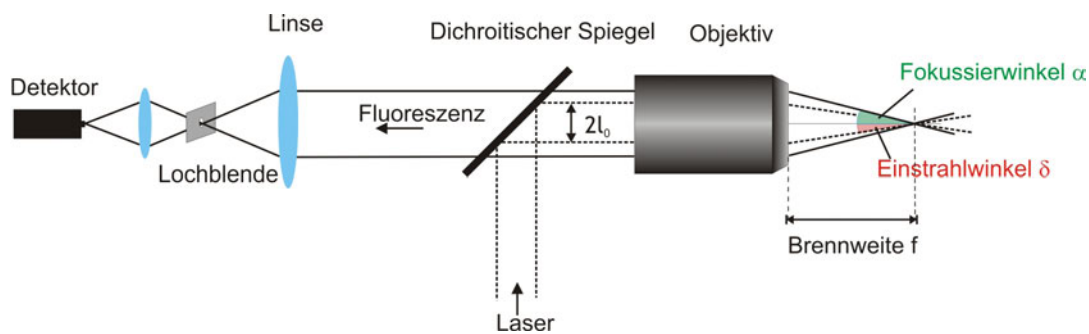


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines Mikroskopaufbaus zur konfokalen Fluoreszenzspektroskopie.

Zur Veranschaulichung ist der Anregungs- und Detektionsstrahlengang eines konfokalen Mikroskopaufbaus in Abb. 2.6 schematisch dargestellt. Der Laser wird über einen dichroitischen Spiegel in die Rückapertur eines Objektivs eingekoppelt und unter dem Winkel δ auf die Probe fokussiert. Die Fluoreszenz wird mit demselben

Objektiv unter dem Winkel α eingesammelt und auf eine Lochblende fokussiert, durch die das Detektionsvolumen in axialer Richtung begrenzt wird. Anschliessend wird die Fluoreszenz über eine weitere Linse auf den Detektor fokussiert.

Anregungsvolumen Die Intensitätsverteilung des anregenden Laserstrahls I_{ex} und dessen Strahlradius ω sind ortsabhängige Funktionen. Bei unterfüllter Rückapertur ist das Anregungsprofil nicht eine beugungslimitierte Airy-Scheibe, sondern kann in der Gauß'schen Optik als ein in lateraler Richtung gaußförmiges und in axialer Richtung lorentzförmiges Profil beschrieben werden [16]:

$$I_{ex}(r, z) = I_0 \frac{\omega_r^2}{\omega^2(z)} \cdot \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega^2(z)}\right) \quad (2.12)$$

mit dem Strahlradius

$$\omega(z) = \omega_r \left[1 + \left(\frac{\lambda z}{n\pi\omega_r^2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}, \quad (2.13)$$

$r = \sqrt{x^2 + y^2}$, dem Brechungsindex n der Immersionslösung und dem Strahlradius ω_r im Fokus (Strahltaile). Wie aus Glg. 2.13 ersichtlich, ist die Anregung in Fokuspnähe in axialer Richtung nicht limitiert, lateral ist der Laserstrahl hingegen scharf abgegrenzt. Der Einstrahlwinkel δ kann bei einem Strahlradius l_0 vor dem Eintritt in das Objektiv und einer Brennweite f des Objektivs näherungsweise durch $\tan \delta = l_0/f = \lambda/n\pi\omega_r$ ausgedrückt werden, womit sich für die Strahltaile

$$\omega_r = \frac{\lambda f}{n\pi l_0} = \frac{\lambda}{n\pi \tan \delta} \quad (2.14)$$

ergibt.

Für einen Laserstrahl der Breite 4 mm und einer Wellenlänge von 532 nm, der mit einem 63-fach Objektiv fokussiert wird, würde sich demnach theoretisch eine Strahltaile von $\omega_r = 0.165 \mu m$ ergeben.

Idealerweise würde der Strahldurchmesser l_0 des anregenden Lasers möglichst groß gewählt werden, um eine möglichst kleine Strahltaile ($\omega_0 \propto \frac{1}{l_0}$) und eine optimale Ausleuchtung des Raumwinkels $\Omega = 2\pi(1 - \cos \delta)$ zu erreichen. Allerdings kann es bei vollständiger Ausleuchtung der Rückapertur zu Abbildungsfehlern (sphärische Aberration) kommen, weshalb der Winkel δ stets kleiner als der Winkel α , unter dem die Fluoreszenz eingesammelt wird, gewählt werden sollte [17]. In der Praxis muss ein Kompromiss zwischen dem optimalen Strahldurchmesser und geringen Abbildungsfehlern gefunden werden.

Detektionsvolumen Die entscheidenden Parameter, die bestimmen, welcher Anteil des emittierten Lichtes vom Detektor registriert wird, sind die numerische Apertur³ NA und der Radius der Lochblende in der Bildebene r_0 .

Durch die numerische Apertur wird der Radius des auf die Lochblende abgebildeten Beugungsbildes festgelegt, der im Objektraum durch $R^2(z) = r_A^2 + z^2 \tan^2 \alpha$ angenähert werden kann, wenn r_A das Auflösungsvermögen des Objektivs⁴ ist [19]. Die Intensitätsverteilung des Beugungsbildes ausgehend von einer Punktlichtquelle am Ort (\vec{r}, z) im Objektraum kann in der Bildebene \vec{r}' durch die sogenannte Punktspreizfunktion $PSF(\vec{r}', \vec{r}, z)$ berechnet werden⁵. Der Effekt der Lochblende auf dieses Beugungsbild wird durch die Sammeleffizienz der Detektionsoptik $S(\vec{r}, z)$ beschrieben:

$$S(\vec{r}, z) = \frac{1}{\Delta} \int T(\vec{r}') \cdot PSF(\vec{r}', \vec{r}, z) d\vec{r}' \quad (2.15)$$

wobei $T(\vec{r}')$ die Transmissionsfunktion der Lochblende und Δ ein Normierungsfaktor ist.

Die Bedeutung dieser Funktion kann leicht veranschaulicht werden: Ist der Radius der Lochblende r_0/M in der Objektebene⁶ deutlich größer als der Radius des Beugungsbildes $R(z)$ ($r_0/M \gg R(z)$), hat die Lochblende keinen Einfluss auf das Detektionsvolumen; ist $r_0/M \ll R(z)$, trifft nur ein kleiner Teil des Lichts auf den Detektor. Sind die beiden Radien etwa gleich groß und trifft das emittierte Licht die Lochblende mittig, wird fokus-nahes Licht vom Detektor registriert, fokus-fernes aber nicht, da mit wachsendem Abstand der Radius $R(z)$ zunimmt und dieses Licht von der Lochblende abgeschirmt wird. Somit wird das Detektionsvolumen in axialer Richtung begrenzt.

Die räumliche Intensitätsverteilung des emittierten Lichtes am Detektor⁷ $W(\vec{r})$ ist als das Produkt des normierten Anregungsprofils und der Sammeleffizienz der Detektionsoptik definiert:

$$W(\vec{r}) = \frac{S(\vec{r}) \cdot I_{ex}(\vec{r})}{I_0} \quad (2.16)$$

³Die numerische Apertur NA beschreibt das Vermögen des Objektivs, Licht einzusammeln, und begrenzt somit das Auflösungsvermögen. Sie kann als Produkt des Winkels α und dem Brechungsindex der Immersionsflüssigkeit n berechnet werden: $NA = n \cdot \sin \alpha$ [18].

⁴ $r_A = \frac{0.61\lambda}{NA}$ ist der Radius des ersten konzentrischen Interferenzrings (Airy-Scheibchen) des Beugungsbildes.

⁵ $\vec{r} = (x, y)$ ist ein zweidimensionaler Vektor, der den Abstand der Lichtquelle von der optischen Achse angibt, und z beschreibt den Abstand entlang der optischen Achse. Diese dreidimensionale Information wird in der Bildebene in eine zweidimensionale transformiert \vec{r}' [16].

⁶ M ist die Vergrößerung des Objektivs, r_0/M gibt somit den Radius der Lochblende in der Objektebene an.

⁷Die räumliche Intensitätsverteilung des emittierten Lichtes am Detektor wird teilweise auch als Probenvolumen bezeichnet.

Diese Funktion ist analytisch nicht lösbar, kann aber durch ein dreidimensionales Gaußprofil angenähert werden, wenn die Lochblende unten aufgeführte Bedingungen erfüllt:

$$W(\vec{r}) = \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{\omega_r^2}\right) \cdot \exp\left(-2\frac{z^2}{\omega_z^2}\right) \quad (2.17)$$

ω_r und ω_z sind definiert als die Radien in lateraler bzw. axialer Richtung, bei der die Intensität auf $1/e^2$ vom Maximalwert abgefallen ist.

Damit diese Näherung eingegangen werden kann, darf die Lochblende weder einen zu kleinen Radius haben, da sonst das schon gaußförmige Profil in lateraler Richtung zu stark beeinflusst wird, noch einen zu großen Radius, da die Lochblende sonst einen zu geringen Effekt auf das ursprünglich lorentzförmige Strahlprofil in axialer Richtung haben würde. Aus diesem Grund sollte der Radius der Lochblende im Bereich von

$$\omega_r \leq \frac{r_0}{M} \leq \frac{\tan \alpha}{2 \tan \delta} \omega_r \quad (2.18)$$

liegen [17].

Das messbare Fluoreszenzsignal $F(t)$ lässt sich nun als Integral über das Produkt der räumlichen Intensitätsverteilung $W(\vec{r})$ und der Konzentration $C(\vec{r})$ berechnen:

$$F(t) = \int_V \kappa \cdot \phi \cdot \sigma \cdot I_0 \cdot W(\vec{r}) \cdot C(\vec{r}, t) d\vec{r} \quad (2.19)$$

Hierbei müssen zusätzlich die Detektionseffizienz κ , die Quantenausbeute ϕ , der Absorptionsquerschnitt σ und die Amplitude der Intensität I_0 berücksichtigt werden. Diese Parameter werden typischerweise zur **Molekularen Helligkeit**

$$\varepsilon = \kappa \cdot \phi \cdot \sigma \cdot I_0. \quad (2.20)$$

zusammengefasst. Diese hat die Einheit Photonen pro Molekül und Sekunde und spielt vor allem bei der Justage eine wichtige Rolle. Aufgrund der Molekularen Helligkeit wird entschieden, ob ein Detektionskanal optimal justiert ist.

2.2.2 Messung von FRET-Effizienzen: *Burst Analysis*

Wie schon in Abschnitt 2.1.2 angedeutet, gibt es zahlreiche Möglichkeiten FRET-Effizienzen zu bestimmen. Meist werden Ensemble-Messungen mittels eines Fluoreszenzspektrometers durchgeführt, wobei allerdings Informationen über die Heterogenität der Probe verloren gehen, da nur ein Mittelwert der FRET-Effizienzen aller Moleküle bestimmt werden kann.

Aufgrund dieser Nachteile wurden 1996 die ersten spFRET-Experimente von Ha et al. durchgeführt [20]. Bei den von ihm vorgestellten Messungen mittels SNOM (*Scanning Near-field Optical Microscopy*), aber auch mit anderen abbildenden Techniken wie LSM oder TIRF, können Dynamiken und Konformationsänderungen auf einer Zeitskala von

einigen Sekunden beobachtet werden. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass die Immobilisierung der Moleküle zu unerwünschten Oberflächeneffekten führen kann.

In dieser Arbeit wurde die sogenannte *Burst Analysis* verwendet [21, 22]. Hierbei diffundieren die Moleküle frei in einer pikomolaren Lösung und passieren aufgrund der Brownschen Molekularbewegung⁸ das konfokale Anregungsvolumen. Während ihres Weges

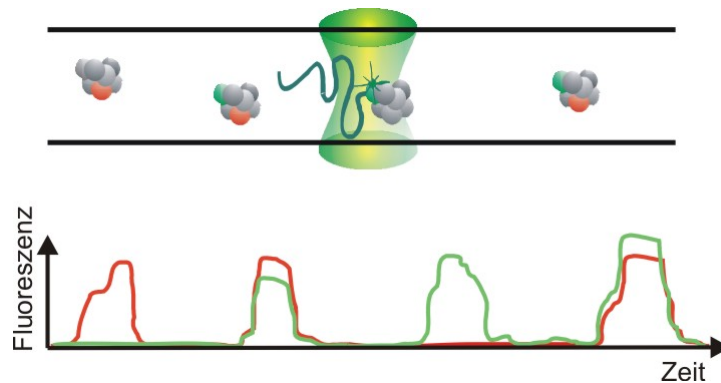


Abbildung 2.7: Bei spFRET-Messungen werden pikomolare Konzentrationen verwendet, so dass die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Moleküle gleichzeitig im Fokus sind, vernachlässigbar klein ist. (Abb. nach [27])

durch den Fokus kann ein *Burst*⁹ an Photonen registriert werden, der - abhängig von der Trajektorie des Moleküls - eine Dauer von einigen Millisekunden hat (s. Abb. 2.7). Durch die Verwendung von Konzentrationen von etwa 10 bis 50 pM ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Moleküle gleichzeitig im Detektionsvolumen befinden, vernachlässigbar klein ($< 0.01\%$) [28].

Bei der Bestimmung von FRET-Effizienzen mittels *Burst Analysis* wird lediglich der Donor angeregt, meist mit einem kontinuierlich emittierenden (cw-)Laser. Die Detektion findet in zwei Kanälen statt, einen für die Donorfluoreszenz und einen für die Akzeptorfluoreszenz (Abb. 2.8). Ein *Burst* wird als Molekül erkannt, wenn die Summe der Photonen in beiden Detektionskanälen einen vorher festgelegten Grenzwert überschreitet¹⁰. Für diese Ereignisse kann aus dem Verhältnis von Fluoreszenzintensität des Akzeptors in Anwesenheit eines aktiven Donors (F_{AD}) und der gesamten Fluoreszenzintensität, die sich als Summe der Fluoreszenzintensitäten des Akzeptors (F_{AD}) und des Donors (F_{DA}) jeweils in Anwesenheit des anderen Farbstoffes ergibt, die FRET-Effizienz f_E berechnet

⁸Die Brownsche Molekularbewegung wird durch Impulse verursacht, die durch Stöße mit Flüssigkeitsmolekülen auf die gelösten Teilchen übertragen werden [23]. Diese Zickzackbewegungen der gelösten Teilchen konnten erstmals durch Einstein und Smoluchowski theoretisch beschrieben werden [24, 25, 26].

⁹Ein *Burst* bezeichnet eine Anhäufung von Photonen in einem bestimmten Zeitintervall.

¹⁰Bei einer Molekularen Helligkeit von 8 000 Photonen/(s·mol) bei 80 μ W Anregungsleistung werden in einem Zeitbin von 2 ms, was etwa der Diffusionszeit der verwendeten DNA entspricht, 16 Photonen pro Molekül erwartet.

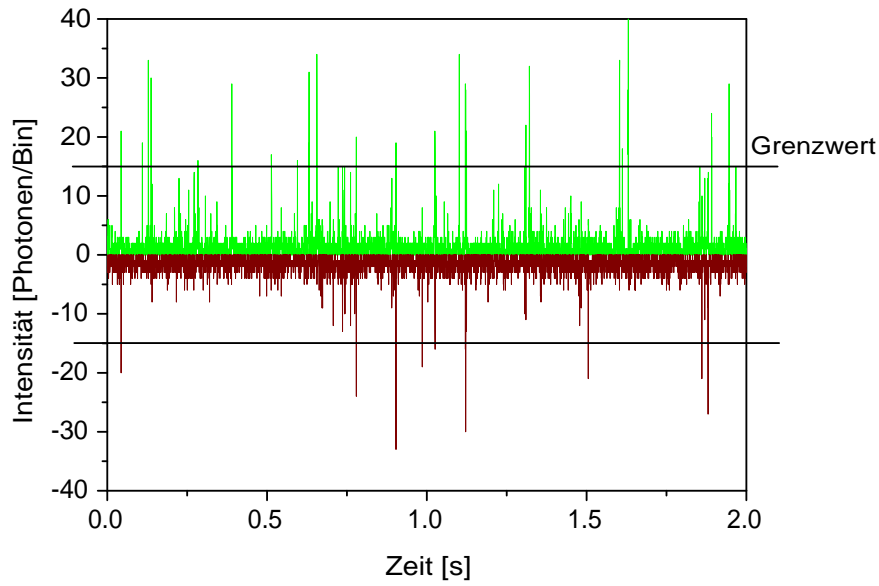


Abbildung 2.8: Fluoreszenzspuren im grünen und roten Detektionskanal. Der Schwellenwert wurde hier bei 15 Photonen/Bin gewählt, dieser muss allerdings nur in der Summe beider Kanäle überschritten werden. (Ein Bin ist ein Zeitabschnitt mit in diesem Fall 2 ms.)

werden:

$$f_E = \frac{F_{AD}}{F_{AD} + \alpha \cdot F_{DA}} \quad (2.21)$$

Mit $F_D = \frac{1}{\alpha} F_{AD} + F_{DA}$ lässt sich Glg. 2.21 unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Detektionseffizienzen¹¹ und Quantenausbeuten der Farbstoffe in Form des α -Faktors in Glg. 2.9 umformen. Der Korrekturfaktor $\alpha = \frac{\eta_A \cdot \phi_A}{\eta_D \cdot \phi_D}$ ist als das Verhältnis der Produkte von Detektionseffizienz η und Quantenausbeute ϕ von Akzeptor bzw. Donor definiert [22]. Die experimentelle Bestimmung des α -Faktors wird in Kapitel 4.1.2 erläutert.

Zur exakten Berechnung der FRET-Effizienz müssen zwei weitere Korrekturterme mit einbezogen werden: Das spektrale Übersprechen vom Donor in den Akzeptorkanal und die direkte Anregung des Akzeptors durch die Donor-Anregung. Diese Terme werden vorher für das jeweilige Farbstoffpaar bestimmt, können allerdings nur als Mittelwert berücksichtigt werden. Dies führt dazu, dass sowohl FRET-Effizienzen unterhalb von 0 % als auch oberhalb von 100 % auftauchen können. Die FRET-Effizienz wird letztendlich mit der korrigierten Version von Glg. 2.21 [29]

$$f_E = \frac{F_{AD} - \beta_{dir} \cdot F_A - \beta_{SU} \cdot F_{DA}}{F_{AD} - \beta_{dir} \cdot F_A - \beta_{SU} \cdot F_{DA} + \alpha \cdot F_{DA}} \quad (2.22)$$

¹¹Die Detektionseffizienz setzt sich aus der Transmission/Reflexion der verwendeten Filter und Spiegel und der Empfindlichkeit des Detektors bei der entsprechenden Wellenlänge zusammen.

berechnet, wobei β_{dir} der relative Anteil der direkten Anregung, β_{SU} der relative Anteil des spektralen Übersprechens ist und F_A die Fluoreszenzintensität aller mit aktivem Akzeptor markierten Moleküle, welche in einer separaten Messung bestimmt werden muss. Die so berechnete FRET-Effizienz kann in Abstände umgerechnet werden:

$$R = R_0 \left(\frac{\alpha \cdot F_D}{F_A} \right)^{\frac{1}{6}}. \quad (2.23)$$

Mit dieser Technik können somit verschiedene Populationen in einer Lösung ohne Oberflächen-Effekte untersucht werden. Es ist aber nicht möglich Informationen über Dynamiken im Bereich von Millisekunden bis Minuten von einem einzelnen Molekül zu erhalten.

2.2.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

FCS ist eine Methode, bei der kleinste zeitliche Schwankungen des Fluoreszenzsignals einer Probe im thermischen Gleichgewicht analysiert werden, um Aufschluss über deren zugrunde liegenden Prozesse zu erlangen. Diese Fluktuationen können verschiedene Ursachen haben, sind aber im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass Moleküle in das Probenvolumen hinein und aus dem Probenvolumen heraus diffundieren. Makroskopisch gesehen ist im thermischen Gleichgewicht die Konzentration einer wässrigen Lösung mit frei diffundierenden, fluoreszierenden Teilchen konstant, wird das Probenvolumen allerdings stark verkleinert, werden mikroskopische thermische Fluktuationen aufgrund der Brownschen Molekularbewegung sichtbar. Um derart winzige Fluktuationen beobachten zu können, werden möglichst kleine Konzentrationen und Messvolumina benötigt. Daher brachte die Einführung des konfokalen Volumens in die FCS [17] nach ihrer ursprünglichen Entwicklung in den siebziger Jahren [30, 31, 32] eine enorme Verbesserung mit sich.

Wenn ein Molekül durch das offene Probenvolumen hindurch diffundiert, wird es angeregt und emittiert Photonen. Die Photonen werden also nicht rein stochastisch detektiert, sondern in *Bursts*, welche in ihrer Länge von der Trajektorie des Moleküls abhängen. Durch Autokorrelationsanalyse können die charakteristischen Prozesse herausgefiltert werden, die den Fluktuationen zugrunde liegen. In Abb. 2.10 ist der typische Verlauf einer solchen Autokorrelationsfunktion (ACF) auf einer logarithmischen Zeitskala skizziert.

2.2.3.1 Autokorrelationsanalyse

Im Folgenden wird nur ein kurzer Abriss über die Theorie der Autokorrelationsanalyse gegeben. Eine ausführliche Herleitung befindet sich im Anhang B.

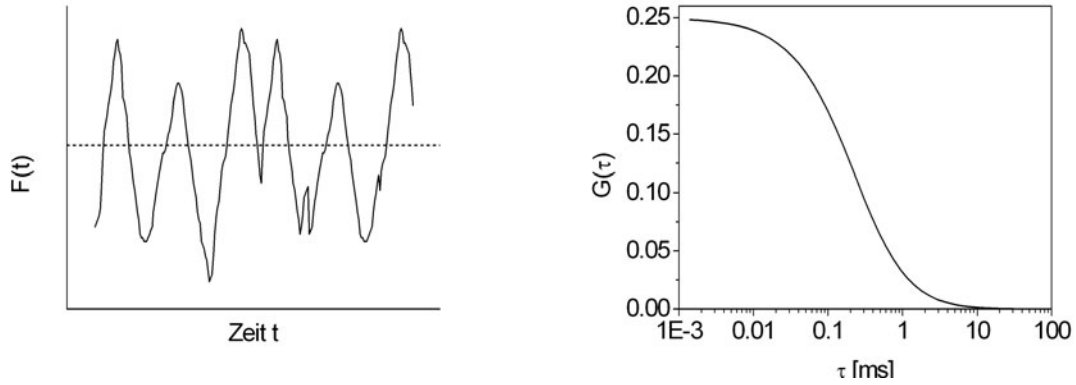


Abbildung 2.9: Die Autokorrelation der Fluoreszenzfluktuationen (links) führt zu einer Autokorrelationsfunktion wie sie rechts simuliert wurde. Die Amplitude ist invers proportional zur mittleren Anzahl der Teilchen im Volumen und der Abfall auf die Hälfte der Amplitude entspricht der Diffusionszeit.

Die Fluktuationen $\delta F(t)$ des Fluoreszenzsignals $F(t)$ sind bei konstanter Anregungsleistung als Abweichung vom zeitlichen Mittelwert definiert:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad \text{mit} \quad \langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \quad (2.24)$$

Die Autokorrelationsfunktion, die die Selbstähnlichkeit eines zeitlich schwankenden Signals beschreibt, kann allgemein als Mittelwert des Produktes des Signals zum Zeitpunkt t mit dem Signal zum Zeitpunkt $t + \tau$ berechnet werden. Daher ist die Autokorrelationsfunktion ein Maß für die Überlappung zweier Signale. Zum Zeitpunkt $\tau = 0$ überlappen die Flächen unter den Signalkurven vollständig, bei zunehmender Verschiebung wird die überlappende Fläche immer kleiner und somit nimmt auch der Wert der ACF ab. Die normierte ACF $G(\tau)$ für die Fluktuationen $\delta F(t)$ lässt sich demnach folgendermaßen berechnen:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2.25)$$

Bei der FCS gibt diese Funktion die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Photon zum Zeitpunkt $t + \tau$ detektiert wird, wenn bereits ein Photon zum Zeitpunkt t detektiert worden ist [33].

Für die Fluktuationen des Fluoreszenzsignals δF gilt entsprechend Glg. 2.19:

$$\delta F(t) = \int W(\vec{r}) \cdot \delta(\varepsilon \cdot C(\vec{r}, t)) d\vec{r} \quad (2.26)$$

Einsetzen der Funktion 2.26 in Glg. 2.25 führt zu:

$$G(\tau) = \frac{\int \int W(\vec{r}) \cdot W(\vec{r}') \cdot \langle \delta(\varepsilon \cdot C(\vec{r}, t)) \cdot \delta(C(\vec{r}', t)) \rangle d\vec{r} d\vec{r}'}{[\int W(\vec{r}) \cdot \langle \delta(\varepsilon \cdot C(\vec{r}, t)) \rangle d\vec{r}]^2} \quad (2.27)$$

Ist die Bewegung der fluoreszierenden Teilchen ausschließlich auf die freie Diffusion in drei Dimensionen zurückzuführen, führt dies schließlich auf folgende ACF (Diffusions-

ACF):

$$G_{diff}(\tau) = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} \left(\frac{1}{1 + 4D\tau/\omega_r^2} \right) \left(\frac{1}{1 + 4D\tau/\omega_z^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.28)$$

mit dem Diffusionskoeffizienten D und der mittleren Teilchenzahl $\langle N \rangle$ im effektiven Probenvolumen. Durch den Korrekturfaktor γ wird dem nicht uniform ausgeleuchteten, offenen Messvolumen Rechnung getragen. Wird anstelle des in drei Dimensionen gaußförmigen Volumens ein Volumen, das uniform mit der maximalen Intensität ausgeleuchtet ist, angenommen, beträgt $\gamma = \left(\frac{1}{2}\right)^{(3/2)}$. Somit ist im Volumen die gleiche Anzahl an Molekülen wie in dem offenen nicht uniform ausgeleuchteten enthalten.

Die ACF gibt Aufschluss über zwei wichtige Parameter: die Konzentration und den Diffusionskoeffizienten. Die Konzentration kann über die Amplitude der Diffusions-ACF bestimmt werden, da diese umgekehrt proportional zur mittleren Anzahl der Teilchen im Volumen ist:

$$G(0) = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{eff} \cdot \langle C \rangle \cdot N_A} \iff \langle C \rangle = \frac{\gamma}{V_{eff} \cdot G(0) \cdot N_A} \quad (2.29)$$

Die Größe des effektiven Messvolumens $V_{eff} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \cdot \omega_r^2 \cdot \omega_z$ kann geeicht werden, indem eine ACF mit einem Farbstoff mit bekanntem Diffusionskoeffizienten¹² durchgeführt wird.

Der zweite Parameter, der mittels FCS bestimmt werden kann, ist der Diffusionskoeffizient, der für sphärische Teilchen nach der Einstein-Stokes-Beziehung durch

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (2.30)$$

definiert ist, wobei k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur, η die Viskosität des Lösungsmittels und R_h der hydrodynamische Radius ist. Dieser hängt mit der Diffusionszeit τ_D folgendermaßen zusammen: $\tau_D = \frac{\omega_D^2}{4D}$. Der Diffusionskoeffizient ist also ein Maß für die mittlere Aufenthaltsdauer der Teilchen im Messvolumen. Zu beachten ist allerdings, dass τ_D nicht der wirklichen Aufenthaltsdauer entspricht, sondern sich durch Faltung der gewichteten mittleren transversalen Diffusionszeit mit der Detektionsoptik ergibt. Bei einem in z -Richtung unendlich ausgedehntem Messvolumen entspräche τ_D genau der Zeit, bei dem die Amplitude der ACF auf die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes abgefallen wäre. Im Idealfall sollte das Verhältnis des sogenannten Volumenparameters ω_z/ω_r aber zwischen 3 und 5 liegen, um eine hinreichende Begrenzung in z -Richtung zu garantieren.

FCS ist im Allgemeinen sensitiv auf Änderungen in der Molekularen Helligkeit. Aufgrund dessen können mittels FCS neben der eben beschriebenen Translationsdiffusion auch andere Prozesse wie Rotationsdiffusion innerhalb des Volumens, gerichteter

¹²Zum Beispiel Rhodamin 6G mit $D=2.8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ [34]

Transport, intramolekulare Dynamiken (z.B. Anregung des Triplett-Zustands) und Konformationsänderungen untersucht werden. Diese Prozesse spielen sich auf verschiedenen Zeitskalen ab, weshalb zwischen ihnen, wie in Abb. 2.10 ersichtlich, unterschieden werden kann. Auf der Nanosekundenzeitskala kann das sogenannte *Antibunching* be-

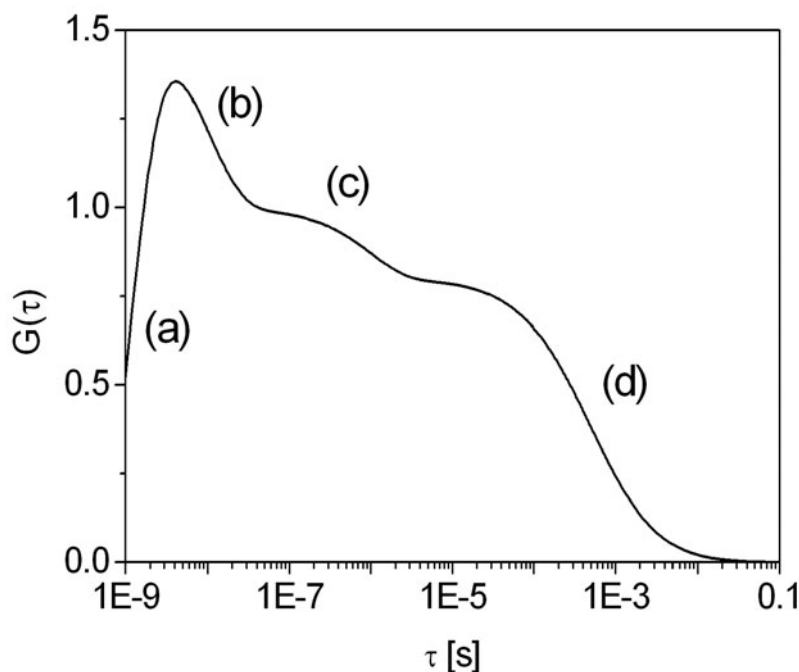


Abbildung 2.10: Die jeweiligen Prozesse sind auf unterschiedlichen Zeitskalen zu beobachten: (a) *Antibunching*, (b) Rotationsdiffusion, (c) schnelle intramolekulare Reaktionen (d) Translationsdiffusion

obachtet werden, was auf den limitierten Anregungs-/Emissionszyklus der Fluorophore zurückzuführen ist und durch die Lebensdauer des angeregten Zustands bestimmt wird. Die Amplitude der ACF nimmt in diesem Bereich mit kürzer werdenden Zeiten ab, da die Wahrscheinlichkeit, ein weiteres Molekül zu detektieren, geringer wird, wenn schon eines detektiert worden ist. Das *Antibunching* kann aber im Normalfall aufgrund der Totzeit des Detektors von etwa 50 ns nicht beobachtet werden¹³. Im Bereich von einigen 10 bis 100 ns sind Dynamiken aufgrund der Rotationsdiffusion der Moleküle zu beobachten, welche bei polarisationssensitiver Detektion zu Fluktuationen im Fluoreszenzsignal durch Änderung der Absorptionsdipolorientierung führen. Auf der Mikrosekundenskala zeigen sich interne Dynamiken wie Anregung in den Triplett-Zustand oder andere schnelle photochemische oder photophysikalische Prozesse. Die Translationsdiffusion der Moleküle ist im Bereich von Millisekunden und Sekunden zu finden.

Ein Beispiel für die intramolekularen Reaktionen, bei denen das Molekül zwischen einem

¹³Antibunching kann daher nur gemessen werden, indem das Fluoreszenzsignal durch einen Strahlteiler auf zwei Detektoren aufgeteilt wird und deren Signale korreliert werden.

hellen und einem dunklen Zustand wechselt, ist der Übergang in den Triplett-Zustand. Die Lebensdauer des Triplett-Zustands ist verglichen mit der Fluoreszenzlebensdauer extrem lang, da der Übergang vom angeregten Triplett-Zustand in den Grundzustand S_0 quantenmechanisch verboten ist. Der Fluoreszenzfarbstoff ist während dieser Zeit nicht erneut anregbar und somit dunkel, erst nach dem Übergang in den Grundzustand durch Abgabe eines Phosphoreszenzphotons oder anderer nicht strahlender Prozesse kann er wieder angeregt werden. Ein weiteres Beispiel ist die Protonierung/Deprotonierung des Chromophores des *Green Fluorescent Protein*, die zu einer Veränderung der Absorptionseigenschaften führt. Allgemein kann dieses Blinken durch einen exponentiellen Abfall beschrieben werden: $X(\tau) = \frac{1-F+F \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_f}}}{1-F}$, wobei F der Anteil der Moleküle im Dunkel-Zustand ist und τ_f die charakteristische Zerfallszeit beschreibt. Wenn diese Fluktuationen auf einer deutlich schnelleren Zeitskala ablaufen als die Diffusionsbewegung und der Diffusionskoeffizient nicht dadurch beeinflusst wird, können diese beiden Prozesse getrennt behandelt werden. Multiplikation der beiden Terme führt zur ACF $G_{total}(\tau)$, die frei diffundierende Moleküle mit Blinken beschreibt [35]:

$$\begin{aligned} G_{total}(\tau) &= X(\tau) \cdot G_{diff}(\tau) \\ &= \frac{\gamma}{N} \cdot \left(\frac{1-F+F \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_f}}}{1-F} \right) \cdot \left(\frac{1}{1+4D\tau/\omega_r^2} \right) \left(\frac{1}{1+4D\tau/\omega_z^2} \right)^{\frac{1}{2}} \end{aligned} \quad (2.31)$$

Irreversible Photoreaktionen, durch die der Farbstoff dauerhaft zerstört wird, werden Photobleichen genannt. Daraus resultiert eine scheinbar kürzere Diffusionszeit, da das Molekül noch während es sich im Fokus befindet, keine weiteren Photonen aussenden kann.

2.2.3.2 Signal-Rausch-Verhältnis

Das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) von FCS im konfokalen Laseraufbau ist im Allgemeinen sehr gut. In Kombination mit speziell für die verwendeten Farbstoffe und Anregungswellenlängen optimierten Emissionsfilter, die effektiv das Anregungslicht und Streulicht wie die Ramanstreuung des Lösungsmittels blocken, das Fluoreszenzlicht aber zu einem hohen Prozentsatz ($> 90\%$) transmittieren, Detektoren mit wenig Hintergrundrauschen und zeitlich stabilen Laser kann das Signal bis zu drei Größenordnungen über dem Hintergrundsignal liegen [36].

Das S/N-Verhältnis ist definiert als das Verhältnis von theoretisch erwarteter und Standardabweichung der gemessenen Korrelationsfunktion [37]. Das S/N-Verhältnis hängt überwiegend von der Photonenstatistik ab, d.h im Wesentlichen von der Molekularen Helligkeit ε und der Messzeit T_m [37, 38, 39]:

$$\frac{S}{N} \propto \varepsilon \cdot \sqrt{T_m} \quad (2.32)$$

Dieses Ergebnis ist aber nur in einem bestimmten Bereich von Konzentrationen gültig [38], da die Fluktuationen nur dort signifikant sind. Die untere Grenze ist gegeben durch die Anzahl der Fluktuationen, die während einer Messung auftreten und liegt etwa bei 1 pM. Bei Konzentrationen unterhalb dieser Grenze ist das S/N-Verhältnis zusätzlich von der Teilchenzahl m abhängig:

$$\frac{S}{N} \propto \varepsilon \cdot \sqrt{m \cdot T_m}. \quad (2.33)$$

Die obere Grenze ist dadurch gegeben, dass sich bei zu vielen Molekülen im Detektionsvolumen die Fluktuationen nicht mehr ausreichend von statistischen Fluktuationen des Hintergrundes unterscheiden. Des Weiteren sind die Zählraten bei solch hohen Konzentrationen so hoch, dass der Detektor gesättigt wird, weswegen die Laserleistung und damit auch die Molekulare Helligkeit gesenkt werden muss. Die obere Grenze liegt etwa bei 500 nM oder 1000 Molekülen im Messvolumen [8].

2.2.4 Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS)

In der Biophysik sollen oftmals nicht nur Diffusionseigenschaften analysiert werden, sondern auch Reaktionen und Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Theoretisch ist dies mit FCS möglich, weil sich bei einer Reaktion zwischen zwei Molekülen meist das Molekulargewicht und somit auch der Diffusionskoeffizient ändert. Die Sensitivität der Autokorrelation ist aber limitiert, da der Diffusionskoeffizient vom hydrodynamischen Radius abhängt und sich deshalb mit der dritten Wurzel des Molekulargewichts ändert [33, 40].

Nach einem Vorschlag von Eigen und Rigler die verschiedenen Komponenten mit spektral unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren [41], konnte die Funktion der FCCS von Schwille et al. [9] anhand einer DNA-Hybridisierungskinetik aufgezeigt werden. Neben zahlreicher *in vitro*-Anwendungen wie Proteinaggregation [42] oder Enzymkinetik [43], konnten inzwischen auch *in vivo*-Studien [7] durchgeführt werden. Im Gegensatz zur ACF, bei der das Signal mit sich selbst verglichen wird, um wiederkehrende Muster herauszufiltern, werden mit der Kreuzkorrelationsanalyse charakteristische Gemeinsamkeiten zweier Signale analysiert.

Der Aufbau muss hierfür dahingehend verändert werden, dass nun zwei Anregungslaser benötigt werden, deren Anregungsvolumina exakt überlappen müssen. Auch die Fluoreszenz muss in zwei spektral getrennten Kanälen detektiert werden. Befinden sich nun an einem Molekül beide Farbstoffe, erscheint ein *Burst* an Photonen in beiden Detektionskanälen gleichzeitig und die Fluoreszenzsignale korrelieren miteinander. Diffundieren die verschieden markierten Spezies allerdings unabhängig voneinander durch das Messvolumen, sind die Photonenbursts nicht miteinander korreliert.

Diese Methode ist also hervorragend geeignet um Reaktionen zwischen verschiedenen

Molekülen zu beobachten, wenn die zwei unterschiedlich markierten Moleküle entweder vor der Reaktion zusammen sind und hinterher getrennt oder umgekehrt [44].

Die folgende Herleitung beschränkt sich auf zwei Komponenten, aber es existieren schon erste Studien bei der eine dritte Farbe verwendet wurde [45].

2.2.4.1 Kreuzkorrelationsanalyse

Die Kreuzkorrelationsfunktion (CCF) zwischen Kanal i und j ist definiert durch

$$G(\tau)_{i \times j} = \frac{\langle \delta F_i(t) \cdot \delta F_j(t + \tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \cdot \langle F_j(t) \rangle} \quad (2.34)$$

Die hier diskutierten CCF sind symmetrisch, somit unterscheiden sich $G_{i \times j}$ und $G_{j \times i}$ nicht.

Die Fluoreszenzintensitäten der beiden Spezies (G) und (R) können unter der Voraussetzung, dass sich die Molekulare Helligkeiten zwischen einfach und doppelt markierten Partikeln nicht ändern (z.B. durch reaktionsbedingtes *Quenchen* bei der Komplexbildung) folgendermaßen beschrieben werden:

$$F_G(t) = \int W_G(\vec{r}) \cdot \varepsilon_G [C_G(\vec{r}, t) + C_{GR}(\vec{r}, t)] d\vec{r} \quad (2.35)$$

$$F_R(t) = \int W_R(\vec{r}) \cdot \varepsilon_R [C_R(\vec{r}, t) + C_{GR}(\vec{r}, t)] d\vec{r} \quad (2.36)$$

$W_i(\vec{r})$ beschreibt das Probenvolumen der einzelnen Spezies, $C_i(\vec{r}, t)$ deren Konzentration und $C_{GR}(\vec{r}, t)$ die Konzentration der zweifach markierten Spezies.

Unter der Annahme, dass die Probenvolumina $W_i(\vec{r})$ identisch sind und vollständig überlappen, ergibt sich daraus für die CCF [9]:

$$G_{G \times R}(\tau) = \frac{\gamma N_{GR}}{\langle N_G + N_{GR} \rangle \langle N_R + N_{GR} \rangle} \cdot \left(\frac{1}{1 + 4D_{GR}\tau/\omega_r^2} \right) \left(\frac{1}{1 + 4D_{GR}\tau/\omega_z^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.37)$$

Bei Proben konstanter Konzentration markierter Teilchen G und R ist die CCF direkt proportional zur Anzahl zweifach markierter Teilchen. Die Konzentration der doppelt markierten Moleküle kann demnach durch

$$\langle C_{GR} \rangle = \frac{G_{G \times R}(0)}{V_{eff} \cdot G_G(0) \cdot G_R(0)} \quad (2.38)$$

berechnet werden. In Abb. 2.11 ist eine CCF und die zugehörigen ACF der DNA₆₀ gezeigt.

Eine Schwierigkeit bei der Durchführung der Zwei-Farben-Kreuzkorrelation ist die Justierung der Probenvolumina: Die Größe der Volumina ist aufgrund des unterschiedlichen Beugungsverhaltens der Wellenlängen oft nicht identisch, dieses Problem wird

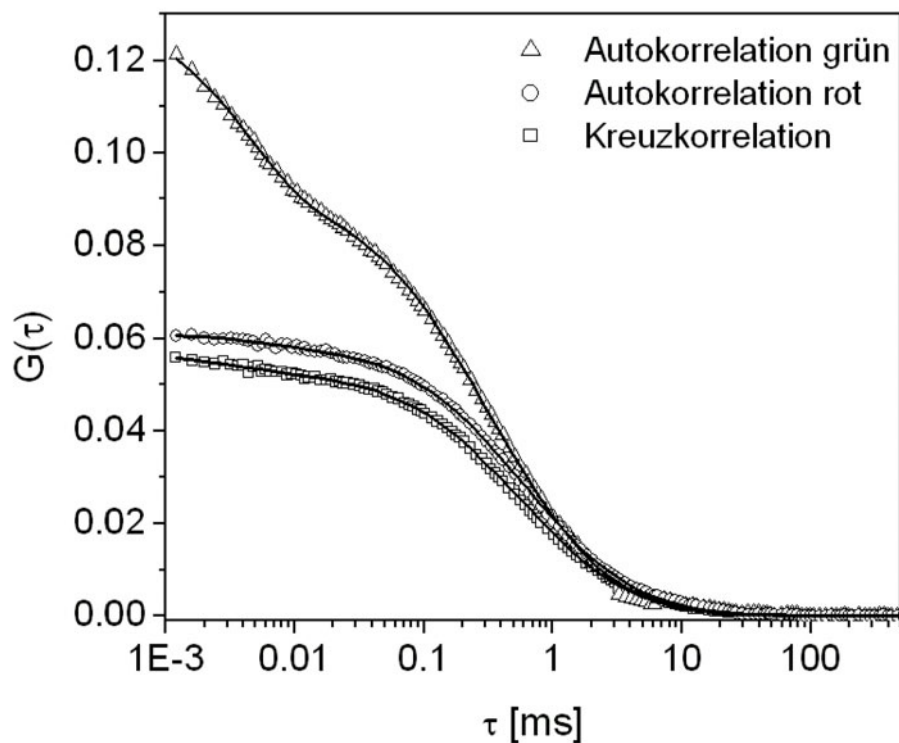


Abbildung 2.11: Kreuzkorrelationsanalyse eines doppeltmarkierten DNA-Stranges (DNA_{60}). Die Amplitude der CCF ist direkt proportional zur Anzahl der doppeltmarkierten Moleküle im Volumen.

in Abschnitt 3.20 diskutiert. Auch das exakte Überlappen der Volumina ist äußerst schwierig zu realisieren. Dadurch wird die Amplitude und damit die Konzentration der doppelt markierten Teilchen verfälscht [9]. Bei der Verwendung von Zwei-Photonen-Anregung können diese Probleme vermieden werden, da Farbstoffe unterschiedlicher Emissionswellenlängen mit der gleichen Lichtquelle angeregt werden können [46].

Kapitel 3

Gepulste Anregung in der Fluoreszenzspektroskopie

Bei Mehrfarben-Experimenten kann es von Bedeutung sein, nicht nur den Detektionskanal zu kennen, sondern auch die Anregungsquelle. Die gepulste alternierende Anregung (*Pulsed Interleaved Excitation*, PIE) macht dies möglich.

3.1 Funktionsweise von PIE

PIE basiert darauf, dass bei einem Experiment mit mehreren spektral unterscheidbaren Farbstoffen die Anregung nicht kontinuierlich, mit allen Farben gleichzeitig, sondern gepulst und alternierend erfolgt, so dass die Photonen, die nach der Anregung mit einem Laserpuls emittiert werden, bereits detektiert sind, wenn der folgende Laserpuls einer anderen Farbe die Probe von neuem anregt.

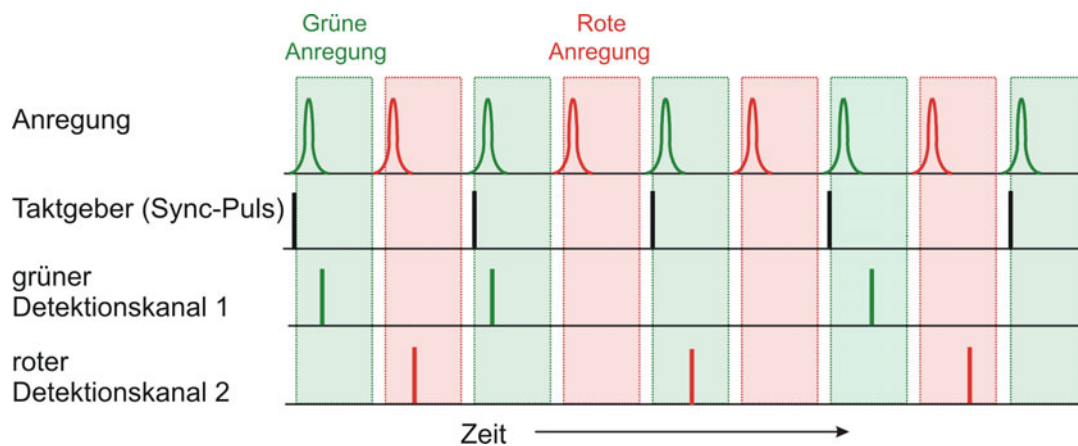


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Anregung und Detektion bei Verwendung von PIE

In Abb. 3.1 ist die Anregung und die Detektion bei der Verwendung von PIE schematisch

dargestellt. Die Taktfrequenz der Anregung wird in Form von Synchronisations-Pulsen (Sync-Puls) der Messkarte vorgegeben. Während eines Taktzyklusses treffen nacheinander die Anregungspulse der verschiedenen Laserwellenlängen, in diesem Fall grün und rot, auf die Probe. Nach der Anregung kann entweder im grünen oder im roten Detektionskanal ein Photon registriert werden. Neben der Information des Detektionskanals wird zusätzlich die Zeit zwischen dem Sync-Puls und der Detektion gespeichert¹.

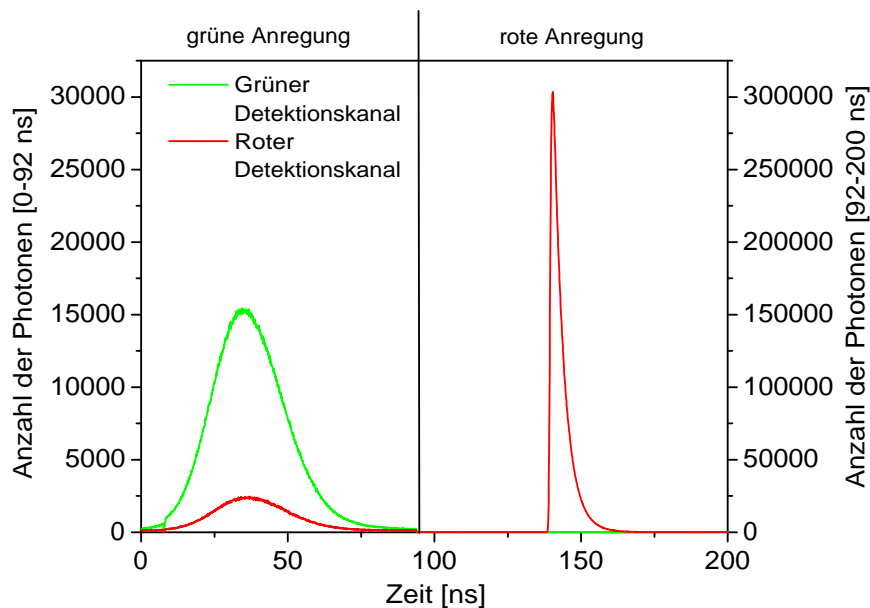


Abbildung 3.2: Das Histogramm über alle Taktzyklen zeigt für beide Detektionskanäle, in welchen Zeitbins Photonen, die nach der grünen bzw. nach der roten Anregung emittiert wurden, zu erwarten sind. Bei dieser Messung mit einer Taktfrequenz von 5 MHz werden die Photonen, die durch die grüne Anregung erzeugt wurden, im Bereich von 0-92.2 ns detektiert und die von der roten Anregung erzeugten von 130-180 ns detektiert.

Ein Histogramm über alle Taktzyklen führt zu Abb. 3.2, wobei beide Detektionskanäle in der entsprechenden Farbe gezeigt sind. Die Taktfrequenz ist in diesem Fall 5 MHz, ein Taktzyklus ist also 200 ns lang. In dieser Darstellung wird deutlich, zu welchen Zeiten relativ zum Sync-Puls Photonen, die nach der grünen bzw. der roten Anregung emittiert worden sind, erwartet werden können. Hier wurden als Zeitbereiche für die grüne Anregung 0-92.2 ns und für die rote Anregung 130-180 ns gewählt. Weiterhin ist in dieser Abbildung zu erkennen, dass die Taktfrequenz nicht beliebig schnell gewählt werden

¹Da die Verarbeitung eines Photons einige Zeit in Anspruch nimmt, wird die Zeit zwischen dem Auftreffen eines Photons und dem darauffolgenden Sync-Puls gespeichert. Somit ist die Karte nur dann mit der Weiterverarbeitung und Speicherung beschäftigt, wenn wirklich ein Photon detektiert worden ist.

kann, sondern der Länge der Pulse und der Lebensdauer angepasst werden muss, damit beide Bereiche eindeutig getrennt werden können.

Die Photonen innerhalb eines Detektionskanals können nun den Anregungspulsen zugeordnet werden, wodurch effektiv vier Detektionskanäle entstehen: grüne Detektion nach grüner Anregung (F_{GG}), grüne Detektion nach roter Anregung (F_{GR}), rote Detektion nach grüner Anregung (F_{RG})² und rote Detektion nach roter Anregung (F_{RR})².

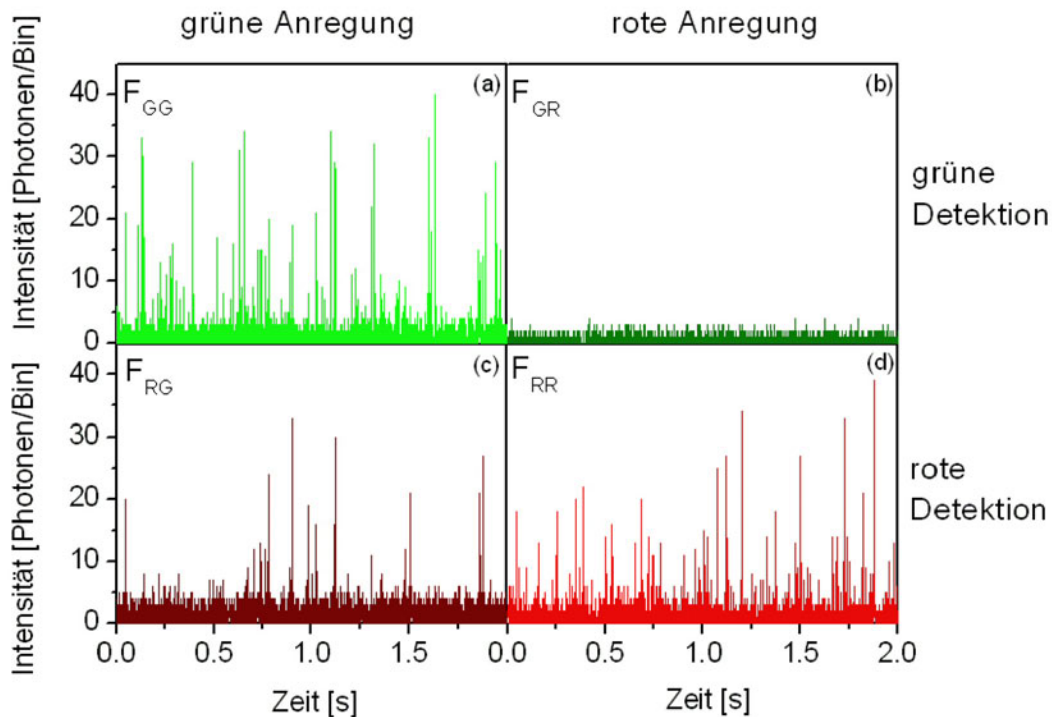


Abbildung 3.3: Die Detektion kann mit Hilfe von PIE in vier Kanäle aufgeteilt werden: grüne Detektion nach grüner Anregung (F_{GG}) (a), grüne Detektion nach roter Anregung (F_{GR}) (b), rote Detektion nach grüner Anregung (F_{RG}) (c) und rote Detektion nach roter Anregung (F_{RR}) (d)

Diese vier Detektionskanäle sind in Abb. 3.3 dargestellt. Bei der grünen Detektion nach grüner Anregung (a) und der roten Detektion nach roter Anregung (d) werden, wie zu erwarten ist, viele Photonen registriert. Bei der roten Detektion nach grüner Anregung (c) ist abhängig von der Höhe des Übersprechens bzw. des FRET, ein unterschiedlich hohes Signal zu erwarten. Bei der grünen Detektion nach roter Anregung (b) ist bei geeigneter Wahl von Filtern und Anregungswellenlängen nur das Hintergrundrauschen zu erkennen, da aus energetischen Gründen weder Übersprechen, FRET noch direkte Anregung möglich ist.

² F_{ij} kennzeichnet die Fluoreszenzintensität im Detektionskanal i mit Anregung j .

3.2 Experimenteller Aufbau

Der konfokale Drei-Farben-Aufbau, basierend auf einem invertierten Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Göttingen, Deutschland), ist in Abb. 3.4 dargestellt.

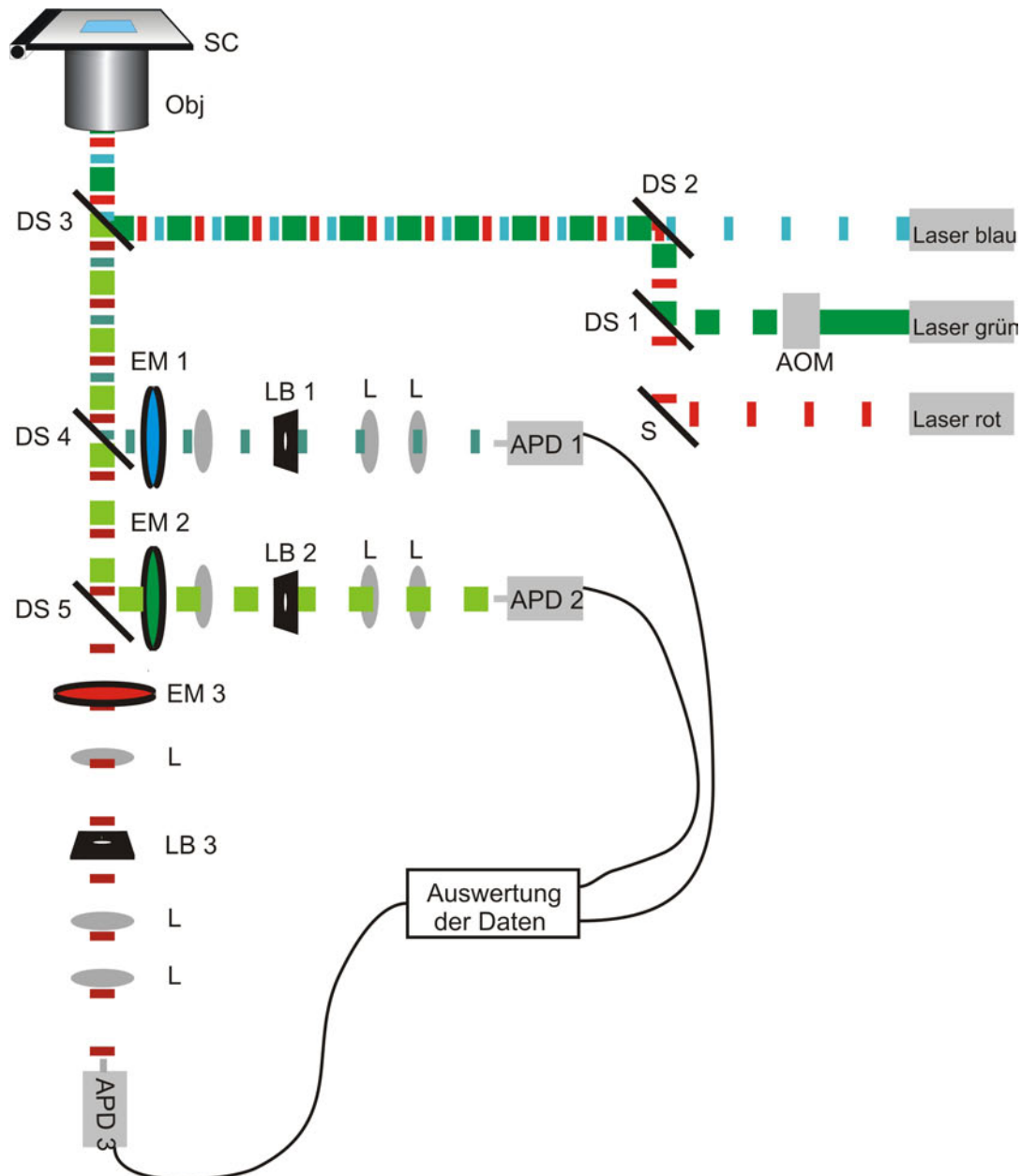


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Drei-Farben-Aufbaus: Die drei Laserlinien werden zunächst über dichroitische Spiegel überlagert (DS1 und DS2) und anschließend über einen weiteren dichroitischen Spiegel (DS3) in das Objektiv eingekoppelt. Die Detektion erfolgt in drei verschiedenen Kanälen, bei denen das Fluoreszenzlicht nach Aufteilung in die Wellenlängenbereiche (DS4 und DS5) jeweils einen Bandpassfilter (EM1-3) passiert und nach der Lochblende (LB1-3) auf den Detektor (APD1-3) fokussiert wird.

Die Anregung besteht aus drei Strahlengängen: blau (405-488 nm), grün (514-568 nm)

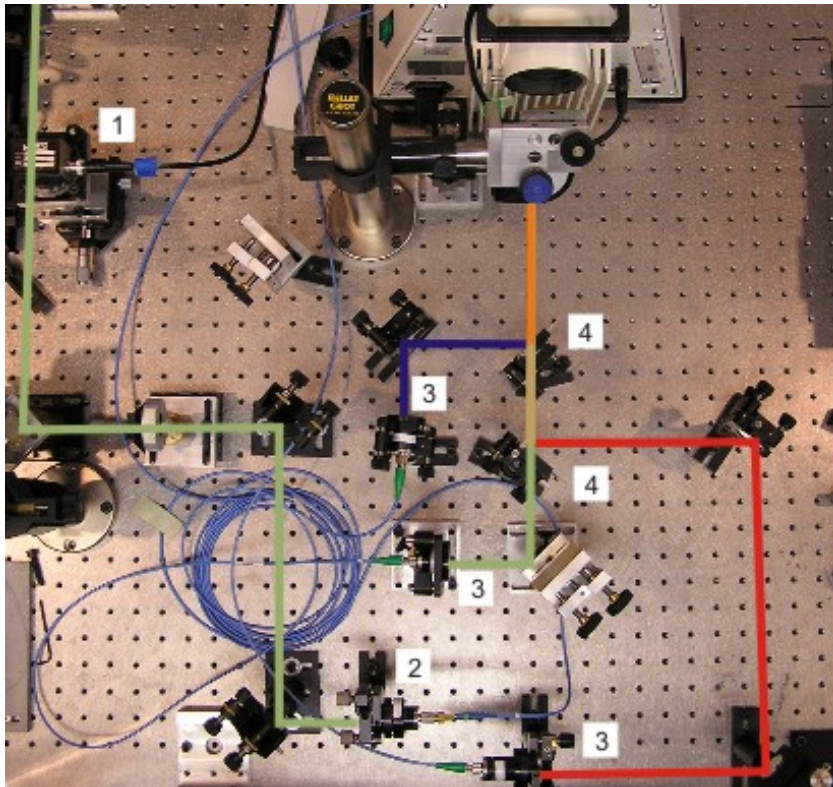


Abbildung 3.5: Photo des Anregungsstrahlengangs: (1) AOM, (2) Fasereingang, (3) Faserausgang, (4) Dichroitischer Spiegel

und rot (633-700 nm), für die verschiedene Laser zur Verfügung stehen. Die Laser werden zunächst jeweils in *single-mode* Glasfasern (OZ Optics, Carp, Ontario, Canada) eingekoppelt, um zum einen das Strahlprofil aufzureinigen und zum anderen die Flexibilität bei der Auswahl der Laser zu erhöhen. Für den grünen Wellenlängenbereich gibt es keine geeigneten gepulsten Laser. Aus diesem Grund wird dieser Strahl nach Durchlaufen der Glasfaser zunächst auf einen Akusto-Optischen Modulator (AOM) (N23080-2-LTD, NEOS Technologies, Melbourne, USA) fokussiert und die erste Beugungsordnung wiederum durch eine *single-mode* Faser geführt. Limitiert durch die Anstiegs- und Abfallszeit des AOM entstehen Pulse mit einer Dauer von ca. 50 ns. Die Laserstrahlen werden nach den Fasern auf verschiedene Durchmesser kollimiert, damit die beugungslimitierten Foki etwa den gleichen Durchmesser aufweisen³. Die unterschiedlichen Anregungsquellen werden anschließend über dichroitische Spiegel überlagert und in das Mikroskop einjustiert. Das Anregungslicht wird durch ein Wasserimmersionsobjektiv (C-Apochromat, 63 x 1.2, Zeiss, Göttingen, Deutschland) auf die Probe fokussiert, die zusätzlich mit einem dreidimensionalen piezoelektrischen Tisch abgerastert werden kann (P-517.3CL, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland).

³Der Durchmesser des beugungslimitierten Fokus hängt vom Strahlradius l , der Wellenlänge λ und der Brennweite des Objektivs f wie folgt ab: $d = \frac{1.22 \cdot f \cdot \lambda}{l}$

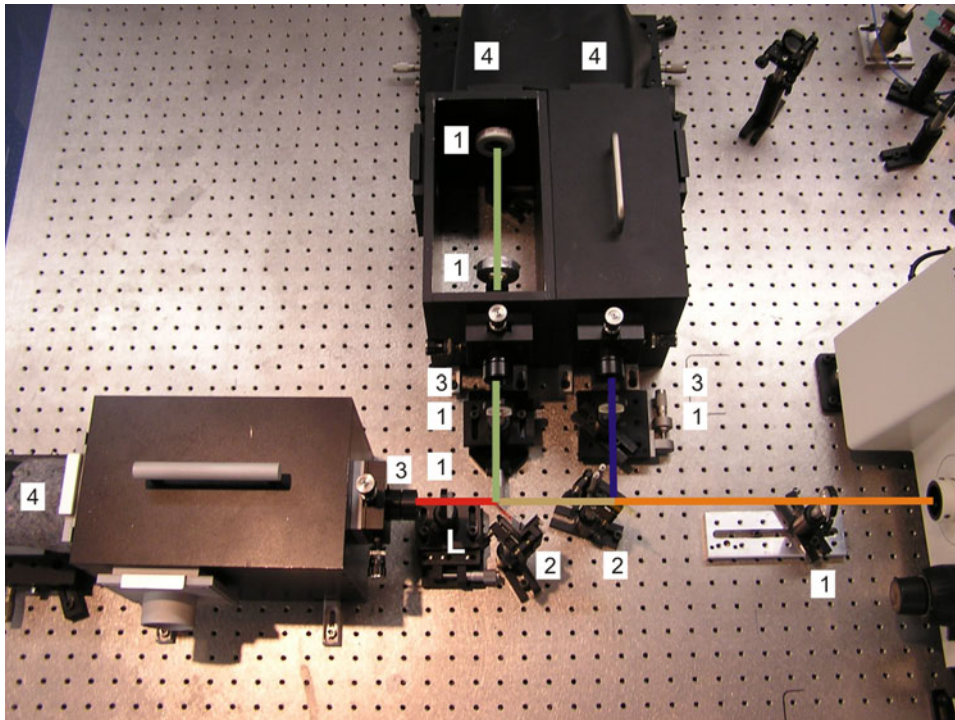


Abbildung 3.6: Photo des Detektionsstrahlengangs: (1) Linse, (2) Dichroitischer Spiegel, (3) Bandpassfilter und Lochblende, (4) APD

Die Fluoreszenz wird mit demselben Objektiv eingesammelt und über dichroitische Spiegel aufgeteilt. Nachdem das Licht die entsprechenden Emissionsfilter passiert hat, wird es auf die jeweilige Lochblende fokussiert, deren Durchmesser wiederum an die verschiedenen Wellenlängen angepasst wurden, um gleiche Detektionsvolumina zu garantieren ($50\ \mu\text{m}$ (rot), $40\ \mu\text{m}$ (grün), $30\ \mu\text{m}$ (blau), Owis, Staufen, Deutschland). Die Fluoreszenz wird anschließend von Avalanche Photodioden (APD) detektiert (SPCM-AQR-14, PerkinElmer Optoelectronics, Wellesley, USA). Die verwendeten Filterkombinationen sind in Tabelle C.2 aufgelistet.

Der Aufbau ist so gestaltet, dass alle Laser über Klappspiegel in die drei Fasern einjustiert werden, was ein schnelles Umschalten zwischen verschiedenen Anregungskombinationen ermöglicht. Details über die Komponenten des Aufbaus werden in Anhang C gegeben.

3.3 *Burst Analysis* mit PIE

Die in Abschnitt 2.2.2 beschriebene Methode zur Bestimmung der FRET-Effizienzen hat einen essentiellen Nachteil: Moleküle, die nur mit einem Donor aber nicht mit einem (aktiven) Akzeptor markiert sind, werden dennoch nach der Anregung durch einen grünen Laser ausreichend Photonen emittieren, dass sie den Grenzwert überschreiten. Sie werden also als Molekül erkannt und damit wird die FRET-Effizienz für dieses Mo-

lekül berechnet. Diese ist allerdings Null, da kein Akzeptor vorhanden ist, zu dem ein Energietransfer stattfinden könnte. Da es praktisch unmöglich ist 100 % der Komplexe mit zwei aktiven Farbstoffen zu markieren, gibt es immer neben der eigentlichen FRET-Population eine zweite Population nur mit einem Donor markierter Moleküle [47]. Ist die eigentliche FRET-Population niedrig, ist diese oft nicht von der Population der nur mit einem Donor markierten zu unterscheiden, was diese Methode auf die Bestimmung höherer ($> 30\%$) FRET-Effizienzen limitiert.

Mit PIE besteht die Möglichkeit, wie eben beschrieben, nicht nur den Donor direkt anzuregen, sondern alternierend auch den Akzeptor. Ist das Molekül sowohl mit einem Donor als auch mit einem aktiven Akzeptor markiert, sollte im gleichen Intervall nach der grünen und nach der roten Anregung eine Anhäufung von Photonen detektiert werden. Es kann also neben dem Donor-Kriterium ein weiteres Kriterium für den Akzeptor eingeführt werden, wonach die Anzahl der Photonen im roten Detektionskanal nach der roten Anregung (F_{RR} , s. Abb. 3.3 (d)) ebenfalls einen vorher festgelegten Grenzwert überschreiten muss. Des Weiteren erhält man mit PIE aus einer Messung auch die Fluoreszenz des Akzeptors nach der roten Anregung, die für die Korrektur der direkten Anregung zur Berechnung der FRET-Effizienz nach Glg. 2.22 vonnöten ist.

Vor allem bei der Verwendung von drei Farbstoffen hat PIE, wie im folgenden Abschnitt beschrieben wird, einen enormen Vorteil, da hier die Markierungseffizienz deutlich schlechter ist und somit die Aussortierung aller nicht dreifarbig markierten Moleküle noch essenzieller ist und weiterhin alle drei Abstände zwischen den Farbstoffen mit einer Messung bestimmt werden können.

3.3.1 Drei-Farben-FRET

Die Einführung eines dritten Fluorophors bei FRET-Messungen erweitert deren Anwendungsspektrum: (i) Bei linearer Anordnung verschiedener Farbstoffe, kann der Energietransfer in mehreren Stufen entlang dieses photonischen Drahtes stattfinden, was die Bestimmung von größeren Distanzen ermöglicht [48, 49], (ii) in Kombination mit PIE können alle drei Abstände zwischen den Fluorophoren mit einer Messung bestimmt werden, wodurch bei geeigneter Anordnung der drei Farbstoffe Aufschluss über zweidimensionale Strukturen erlangt werden kann.

Die Theorie zu Drei-Farben-FRET ist weitaus komplexer als bei Zwei-Farben-FRET, da es zwei kompetitive Prozesse gibt: wird Farbstoff 1 angeregt, kann es einen Energietransfer entweder zu Farbstoff 2 oder direkt zu Farbstoff 3 geben. Des Weiteren kann die Energie in zwei Schritten von Farbstoff 1 zu Farbstoff 2 und von diesem weiter zu Farbstoff 3 übertragen werden⁴. Die möglichen Übergangsraten für diese Prozesse sind

⁴Farbstoff 1 ist derjenige mit der kleinsten Wellenlänge (z.B. blau), Farbstoff 2 der mit der mittleren Wellenlänge (z.B. grün oder gelb) und Farbstoff 3 der mit der größten Wellenlänge (z.B. rot)

schematisch in Abb. 3.7 dargestellt.

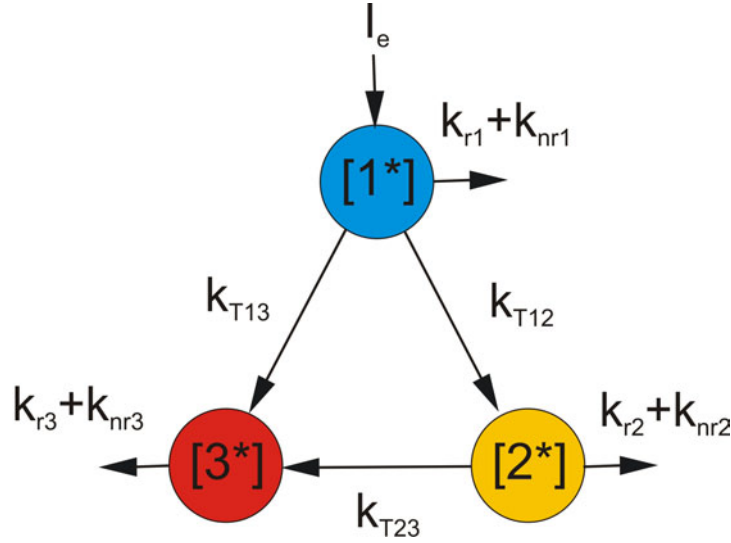


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der möglichen Transferraten zwischen den angeregten Zuständen $[1^*]$, $[2^*]$ und $[3^*]$ bei 3-Farben FRET (Abb. nach [50])

Die FRET-Effizienzen $f_{E_{ij}}$ von Donor i zu Akzeptor j können entsprechend Glg. 2.7 durch

$$f_{E_{ij}} = \frac{k_{T_{ij}}}{\tau_{D_i}^{-1} + k_{T_{ij}}} \quad (3.1)$$

berechnet werden. Die Energieabgabe der angeregten Fluorophore $[i^*]$ kann durch folgendes Differentialgleichungssystem beschrieben werden:

$$\frac{d[1^*]}{dt} = -(k_{r_1} + k_{nr_1} + k_{T_{12}} + k_{T_{13}})[1^*] \quad (3.2)$$

$$\frac{d[2^*]}{dt} = -(k_{r_2} + k_{nr_2} + k_{T_{23}})[2^*] + k_{T_{12}}[1^*] \quad (3.3)$$

$$\frac{d[3^*]}{dt} = -(k_{r_3} + k_{nr_3})[3^*] + k_{T_{23}}[2^*] + k_{T_{13}}[1^*] \quad (3.4)$$

Unter der Annahme, dass der Anregungspuls δ -förmig ist und ausschließlich der Farbstoff 1 direkt angeregt wird, führt dieses Gleichungssystem zu folgenden Fluoreszenzintensitäten F_i :

$$F_1 = \frac{k_{r_1} + k_{nr_1}}{k_{r_1} + k_{nr_1} + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} \cdot \eta_1 \quad (3.5)$$

$$F_2 = \frac{k_{T_{12}}}{k_{r_1} + k_{nr_1} + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} \cdot \frac{k_{r_2} + k_{nr_2}}{k_{r_2} + k_{nr_2} - k_{T_{23}}} \cdot \eta_2 \quad (3.6)$$

$$F_3 = \left(\frac{k_{T_{12}}}{k_{r_1} + k_{nr_1} + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} \right) \cdot \left(\frac{k_{T_{23}}}{k_{r_2} + k_{nr_2} - k_{T_{23}}} \right) + \frac{k_{T_{13}}}{k_{r_1} + k_{nr_1} + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} \cdot \eta_3 \quad (3.7)$$

Einsetzen dieser Fluoreszenzintensitäten in Glg. 3.1 und Auflösen nach $f_{E_{12}}$ bzw. $f_{E_{13}}$ ergibt:

$$f_{E_{12}} = \frac{F_2 \left(\frac{1}{1-f_{E_{23}}} \right)}{\alpha_{12} \cdot F_1 + F_2 \left(\frac{1}{1-f_{E_{23}}} \right)} \quad (3.8)$$

$$f_{E_{13}} = \frac{\alpha_{32} \cdot F_3 - F_2 \left(\frac{f_{E_{23}}}{1-f_{E_{23}}} \right)}{\alpha_{12} \cdot F_1 + \alpha_{32} \cdot F_3 - F_2 \left(\frac{f_{E_{23}}}{1-f_{E_{23}}} \right)} \quad (3.9)$$

mit $\alpha_{ij} = \frac{\eta_j \phi_j}{\eta_i \phi_i}$. Da bei PIE auch Farbstoff 2 direkt angeregt wird, ergibt sich die noch fehlende FRET-Effizienz $f_{E_{23}}$ leicht: Sie kann wie bei Zwei-Farben-FRET aus den Intensitäten nach der direkten Anregung von Farbstoff 2 berechnet werden, da keine weiteren kompetitiven Transferprozesse zu Farbstoff 1 auftreten können:

$$f_{E_{23}} = \frac{F_{32}}{F_{32} + \alpha_{32} \cdot F_{22}} \quad (3.10)$$

Dabei wurde angenommen, dass die bloße Anwesenheit des Farbstoffs 1 auch die Molekulare Helligkeit von Farbstoff 2 und 3 nicht beeinflusst.

3.4 PIE-FCCS ohne spektrales Übersprechen

Eine Limitierung der Sensitivität von FCCS entsteht durch spektrales Übersprechen der Fluorophore: Aufgrund der langauslaufenden Emissionsspektren werden Teile der Fluoreszenz, die vom kürzerwelligeren Farbstoff (z.B. grün) ausgesandt werden, im Detektionskanal des längerwelligeren Farbstoffs (z.B. rot) detektiert (s. Abb. 3.8). Diese Photonen stammen ursprünglich von dem grünen Farbstoff und korrelieren mit solchen aus dem grünen Detektionskanal. Somit ist selbst bei einer Probe mit ausschließlich einfarbig markierten Molekülen eine Kreuzkorrelation zu beobachten, deren Amplitude von der Größe der Überlappung abhängt.

Um dieses spektrale Übersprechen zu berücksichtigen, müssen die Fluoreszenzintensitäten aus Glg. 2.35 und 2.36 folgendermaßen umgeschrieben werden:

$$F_G(t) = \int W(\vec{r}) \cdot [\varepsilon_{G,G} C_G(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR,G} C_{GR}(\vec{r}, t)] d\vec{r} \quad (3.11)$$

$$F_R(t) = \int W(\vec{r}) \cdot [\varepsilon_{G,R} C_G(\vec{r}, t) + \varepsilon_{R,R} C_R(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR,R} C_{GR}(\vec{r}, t)] d\vec{r} \quad (3.12)$$

$\varepsilon_{i,j}$ bezeichnet die Molekulare Helligkeit der Spezies i im Detektionskanal j . Damit ergibt sich für die CCF mit spektralem Übersprechen:

$$G_{GD \times RD}(\tau) = \frac{\gamma \mathfrak{S}_{G,R}}{\langle N_G + \frac{\varepsilon_{GR,G}}{\varepsilon_{G,G}} N_{GR} \rangle} \left(\frac{1}{1 + 4D_G \tau / \omega_r^2} \right) \left(\frac{1}{1 + 4D_G \tau / \omega_z^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.13)$$

$$+ \frac{\gamma \mathfrak{S}_{GR,R}}{\langle \frac{\varepsilon_{G,G}}{\varepsilon_{GR,G}} N_G + N_{GR} \rangle} \left(\frac{1}{1 + 4D_{GR} \tau / \omega_r^2} \right) \left(\frac{1}{1 + 4D_{GR} \tau / \omega_z^2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

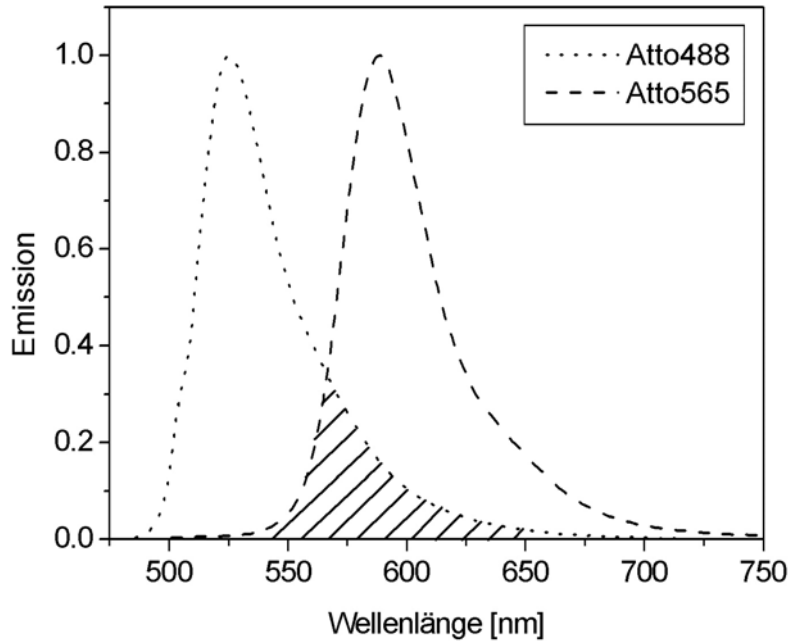


Abbildung 3.8: Emissionspektren von Atto488 und Atto565. Die Spektren der beiden Farbstoffe überlappen in dem schraffierten Bereich, was dazu führt, dass Fluoreszenz des Atto488 im Detektionskanal für Atto565 registriert wird.

Durch $\mathfrak{S}_{i,j}$ wird die anteilige Intensität der Spezies i im Detektionskanal j beschrieben:

$$\mathfrak{S}_{i,j} = \frac{\varepsilon_{i,j} \langle N_i \rangle}{\sum_{k=1}^n \varepsilon_{k,i} \langle N_k \rangle} \quad (3.14)$$

Selbst wenn sich keine zweifach markierten Teilchen in der Lösung befinden, verschwindet die Amplitude der CCF aus Glg. 3.13 nicht vollständig:

$$G_{GD \times RD}(0) = \frac{\gamma \mathfrak{S}_{G,R}}{\langle N_G \rangle} = \frac{\gamma}{\langle N_G \rangle + \left(\frac{\varepsilon_{R,R}}{\varepsilon_{G,R}} \right) \langle N_R \rangle} \quad (3.15)$$

Durch die Verwendung von PIE kann jedem Photon nicht nur der jeweilige Detektionskanal ("Farbe"), sondern auch seine Anregungsquelle zugeordnet werden. Aufgrund dieser zusätzlichen Information muss nun ein weiterer Index für die Molekulare Helligkeit eingeführt werden: $\varepsilon_{i,j,k}$. Diese beschreibt die Molekulare Helligkeit der Spezies i , die im Kanal j detektiert und mit der Lichtquelle k angeregt wurde. Es gibt drei verschiedene Spezies (nur grün, nur rot oder grün-rot) und für Detektion und Anregung jeweils zwei Möglichkeiten (grün oder rot), insgesamt könnten also bis zu 12 verschiedene Molekulare Helligkeiten existieren. Einige der Anregungs-/Detektionskombinationen können allerdings ausgeschlossen werden und deswegen als Null angenommen werden: liegen die Absorptionsspektren des grünen und roten Farbstoffes hinreichend weit auseinander, so kann der grüne Farbstoff nicht durch den roten Laser angeregt werden und

die rote Emission kann bei geeigneter Wahl von Filtern nicht im grünen Detektionskanal detektiert werden, damit werden $\varepsilon_{R,G,G} = \varepsilon_{R,G,R} = \varepsilon_{G,G,R} = \varepsilon_{G,R,R} = \varepsilon_{GR,G,R} = 0$. Die Fluoreszenzintensitäten der vier Detektionskanäle setzen sich damit folgendermaßen zusammen:

$$F_{GG}(t) = \int W(\vec{r}) \cdot [\varepsilon_{G,G,G}C_G(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR,G,G}C_{GR}(\vec{r}, t)] d\vec{r} \quad (3.16)$$

$$F_{GR}(t) \approx 0 \quad (3.17)$$

$$F_{RG}(t) = \int W(\vec{r}) \cdot [\varepsilon_{G,R,G}C_G(\vec{r}, t) + \varepsilon_{R,R,G}C_R(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR,R,G}C_{GR}(\vec{r}, t)] d\vec{r} \quad (3.18)$$

$$F_{RR}(t) = \int W(\vec{r}) \cdot [\varepsilon_{R,R,R}C_R(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR,R,R}C_{GR}(\vec{r}, t)] d\vec{r} \quad (3.19)$$

Unter der Annahme, dass sich die Molekularen Helligkeiten der einfach und doppelt markierten Teilchen nicht unterscheiden ($\varepsilon_{G,G,G} = \varepsilon_{GR,G,G}$ und $\varepsilon_{R,R,R} = \varepsilon_{GR,R,R}$), verschwindet der Term des Übersprechens aus der CCF, wenn F_{GG} mit F_{RR} korreliert wird. $G_{GG \times RR}$ entspricht damit Glg. 2.37. Bei vernachlässigbarer direkter Anregung des roten Fluorophors durch die grüne Anregungsquelle, können auch die Photonen, die nach der grünen Anregung im roten Kanal detektiert wurden (F_{GR}), zum grünen Detektionskanal dazu addiert werden ($F_{GX} = F_{GG} + F_{GR}$), damit alle detektierten Photonen in die Analyse mit einbezogen werden. Eine ähnliche Methode zur Eliminierung des spektralen Übersprechens bei FCCS, bei der nur ein Detektor verwendet wurde und die Photonen aufgrund ihrer Ankunftszeit den Anregungswellenlängen zugeordnet wurden, wurde parallel von Thews et al. entwickelt [51].

3.5 PIE-FCCS bei gleichzeitigem FRET

Eine weitere Einschränkung bei der FCCS ist das gleichzeitige Auftreten von FRET bei zweifarbig markierten Proben [52]. Dies führt dazu, dass sich die Molekulare Helligkeit des Donors des zweifarbig markierten Komplexes verringert, wohingegen sie sich im Detektionskanal des Akzeptors durch FRET erhöht. Da sich in der Lösung niemals ausschließlich Moleküle, die sowohl mit aktivem Donor als auch aktivem Akzeptor markiert sind, befinden, sind nun Moleküle mit unterschiedlichen Molekularen Helligkeiten zu finden. Daher ist es nur schwer möglich, bei gleichzeitigem FRET quantitative Kreuzkorrelationsanalysen durchzuführen. Mit PIE kann dieses Problem allerdings gelöst werden, indem es ähnlich zu dem des spektralen Übersprechens behandelt wird, da auch hier Photonen im roten Detektionskanal nach der grünen Anregung detektiert werden. Des Weiteren wird hier gezeigt, wie mittels PIE-FCCS FRET-Effizienzen bestimmt werden können.

3.5.1 PIE-FCCS mit FRET

Zur Berechnung der Kreuzkorrelation müssen auch hier die Molekularen Helligkeiten genauer betrachtet werden: Im grünen Detektionskanal werden zum einen die (aufgrund

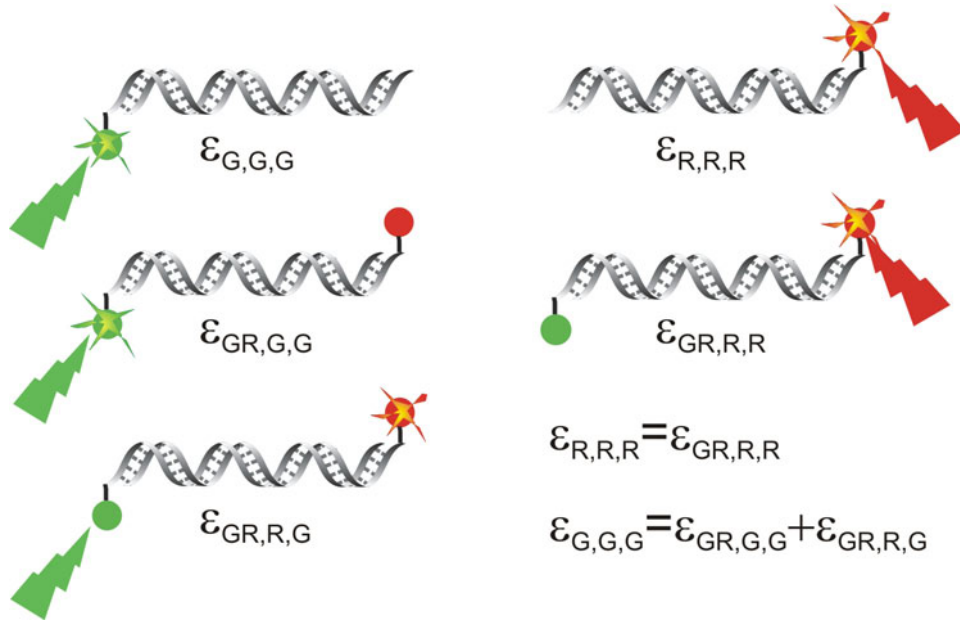


Abbildung 3.9: Es können Spezies mit 4 verschiedene Molekularen Helligkeiten in einer Probe vorhanden sein: nur grün markierte Moleküle mit $\varepsilon_{G,G,G}$, zweifach markierte, bei denen nach der grünen Anregung der Donor emittiert $\varepsilon_{GR,G,G}$ oder der FRET-angeregte Akzeptor $\varepsilon_{GR,R,G}$, einfach oder zweifach markierte Moleküle, bei denen der Akzeptor direkt angeregt wird: $\varepsilon_{R,R,R} = \varepsilon_{GR,R,R}$

von unzureichender Markierungseffizienz) nur grün markierten Partikel mit der Molekularen Helligkeit $\varepsilon_{G,G,G}$, zum anderen die zweifach markierten, deren Molekulare Helligkeit $\varepsilon_{GR,G,G}$ durch FRET reduziert ist, registriert. Im roten Detektionskanal werden sowohl die nur rot markierten als auch die zweifarbig markierten Teilchen nach der roten Anregung detektiert. Es wird angenommen, dass die Präsenz des grünen Farbstoffes die Emission des roten Farbstoffes nicht beeinflusst: $\varepsilon_{R,R,R} = \varepsilon_{GR,R,R}$. Des Weiteren sind im roten Kanal die zweifach markierten Teilchen nach der grünen Anregung durch FRET sichtbar: $\varepsilon_{GR,R,G}$. Die direkte Anregung des roten Farbstoffes durch den grünen Laser wird vernachlässigt: $\varepsilon_{R,R,G} = 0$.

Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Detektionskanäle können daher mit Glg. 3.16-3.19 unter Berücksichtigung der eben diskutierten Bedeutung der Molekularen Helligkeiten beschrieben werden. Die Berechnung der Kreuzkorrelation der Fluoreszenz im grünen Detektionskanal ($F_{GD} = F_{GG} + F_{GR} \approx F_{GG}$) mit der im roten Detektionskanal ($F_{RD} = F_{RG} + F_{RR}$) bei Vernachlässigung des spektralen Übersprechens ($\varepsilon_{G,R,G} = 0$) zeigt leicht, dass die Amplitude der CCF nicht mehr direkt proportional zur Anzahl der

zweifarbige markierten Teilchen ist:

$$G_{GD \times RD}(\tau) = \left(\frac{1 - f_E}{1 - f_E f_{GR,G}} \right) \left(\frac{1 + f'_E}{1 + f'_E f_{GR,R}} \right) \frac{\gamma N_{GR}}{\langle N_G + N_{GR} \rangle \langle N_R + N_{GR} \rangle} \cdot \left(\frac{1}{1 + 4D_{GR}\tau/\omega_r^2} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + 4D_{GR}\tau/\omega_z^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.20)$$

mit

$$f_E = 1 - \frac{\varepsilon_{GR,G,G}}{\varepsilon_{G,G,G}} \quad (3.21)$$

$$f'_E = \frac{\varepsilon_{GR,R,G}}{\varepsilon_{R,R,R}} \quad (3.22)$$

$$f_{GR,G} = \frac{\langle N_{GR} \rangle}{\langle N_G + N_{GR} \rangle} \quad (3.23)$$

$$f_{GR,R} = \frac{\langle N_{GR} \rangle}{\langle N_R + N_{GR} \rangle}. \quad (3.24)$$

f_E gibt die FRET-Effizienz an, die über den Abfall des Donorsignals in Anwesenheit des Akzeptors berechnet wird. Da hier zur Berechnung der FRET-Effizienz die Molekularen Helligkeiten herangezogen werden und nicht das gesamte Fluoreszenzsignal (wie beispielsweise in Glg. 2.9), ist die FRET-Effizienz unabhängig von der Markierungseffizienz. f'_E ist definiert als das Verhältnis der Molekularen Helligkeiten des mit FRET angeregten Akzeptors zu direkt angeregtem Akzeptor. Nach Glg. 2.10 kann die FRET-Effizienz auch über die Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz bestimmt werden, damit ist f'_E direkt proportional zur FRET-Effizienz f_E . Durch Eichung der beiden Anregungsleistungen könnte somit aus f'_E ebenfalls die FRET-Effizienz berechnet werden. $f_{GR,G}$ und $f_{GR,R}$ beschreiben jeweils das Verhältnis der doppelt markierten Teilchen zur Gesamtanzahl derer, die eine grüne bzw. eine rote Markierung tragen. Sie spiegeln also die grüne bzw. die rote Markierungseffizienz wider.

Die beiden im Vergleich zur FCCS ohne FRET (Glg. 2.37) zusätzlichen Faktoren in Glg. 3.20 begründen sich einerseits mit der aufgrund von FRET erniedrigten Molekularen Helligkeit im grünen Detektionskanal,

$$\left(\frac{1 - f_E}{1 - f_E f_{GR,G}} \right) \frac{1}{\langle N_G + N_{GR} \rangle} = \frac{1}{\langle \left(\frac{\varepsilon_{G,G,G}}{\varepsilon_{GR,G,G}} \right) N_G + N_{GR} \rangle} \quad (3.25)$$

andererseits mit der höheren Molekularen Helligkeit im roten Detektionskanal durch die FRET-angeregten Akzeptoren:

$$\left(\frac{1 + f'_E}{1 + f'_E f_{GR,R}} \right) \frac{1}{\langle N_R + N_{GR} \rangle} = \frac{1}{\langle \left(\frac{\varepsilon_{R,R,R}}{\varepsilon_{GR,R,R} + \varepsilon_{GR,R,G}} \right) N_R + N_{GR} \rangle} \quad (3.26)$$

In Abwesenheit von FRET gilt $f_E = f'_E = 0$ und die Gleichung 3.20 reduziert sich zu Glg. 2.37. Gleiches gilt bei Komplexen die zu 100 % zweifach markiert sind, d.h. $f_{GR,G} =$

$f_{GR,R}=1$, da dann ebenfalls nur jeweils eine Spezies in jedem Detektionskanal vorhanden ist. Praktisch ist dieser letzte Fall jedoch nicht zu realisieren, da es unmöglich ist, ein Molekül zu 100 % mit zwei aktiven Farbstoffen zu markieren.

Wie bei der PIE-FCCS ohne Übersprechen besteht auch hier die Möglichkeit die Photonen aus dem grünen Detektionskanal nach grüner Anregung (F_{GG}) mit denen aus dem roten Detektionskanal nach roter Anregung (F_{RR}) zu korrelieren. Dadurch ist im roten Detektionskanal nur noch eine Spezies vorhanden und die Amplitude aus Glg. 4.9 reduziert sich zu:

$$G_{GG \times RR}(0) = \left(\frac{1 - f_E}{1 - f_E f_{GR,G}} \right) \frac{\gamma N_{GR}}{\langle N_G + N_{GR} \rangle \langle N_R + N_{GR} \rangle} \quad (3.27)$$

Die Amplitude dieser CCF ist allerdings noch immer von der FRET-Effizienz abhängig, was darauf zurückzuführen ist, dass im Fluoreszenzsignal F_{GG} Spezies mit verschiedenen Molekularen Helligkeiten vorliegen: $\varepsilon_{G,G,G}$ und $\varepsilon_{GR,G,G}$. Vom roten Detektionskanal wird allerdings nur der Anteil nach der roten Anregung (F_{RR}) mit in die Analyse einbezogen. Das durch FRET hervorgerufene Fluoreszenzsignal (F_{RG}) wird nicht berücksichtigt, wodurch der zweite Term aus Glg. 3.20 wegfällt.

Das Problem, dass im grünen Detektionskanal zwei verschiedene molekulare Helligkeiten vorliegen, lässt sich gleichfalls mittels PIE lösen. Die Photonen, die aufgrund von FRET nicht vom grünen Farbstoff emittiert werden, werden dafür vom roten Farbstoff emittiert und im roten Detektionskanal nach der grünen Anregung detektiert. Unter der Annahme, dass $\alpha = 1$ ist, ergibt sich: $\varepsilon_{G,G,G} = \varepsilon_{GR,G,G} + \varepsilon_{GR,R,G}$. Das Fluoreszenzsignal im roten Detektionskanal nach der grünen Anregung F_{GR} und das Fluoreszenzsignal im grünen Detektionskanal nach der grünen Anregung F_{GG} können also addiert werden, um das gesamte Fluoreszenzsignal nach der grünen Anregung zu erhalten. Die Korrelation der gesamten Fluoreszenz nach der grünen Anregung ($F_{GX} = F_{GG} + F_{RG}$) mit der Fluoreszenz nach der roten Anregung ($F_{RX} \approx F_{RR}$) resultiert in der gleichen Amplitude wie bei der CCF ohne FRET:

$$G_{GX \times RR}(0) = \frac{\gamma N_{GR}}{\langle N_G + N_{GR} \rangle \langle N_R + N_{GR} \rangle} \quad (3.28)$$

Somit kann durch die Verwendung von PIE eine quantitative Kreuzkorrelationsanalyse auch bei gleichzeitigem FRET durchgeführt werden. Da die Fluoreszenz der beiden Detektionskanäle nach der grünen Anregung addiert wird, wird das spektrale Übersprechen automatisch berücksichtigt. Die einzige Näherung, die eingegangen werden muss, ist die Vernachlässigung der direkten Anregung des Akzeptors mit dem grünen Laser.

In dieser Arbeit wurde nur der Fall $\alpha = 1$ bearbeitet, aber theoretisch kann diese Methode auch bei unterschiedlichen α -Faktoren durchgeführt werden. Bei der Addition der Fluoreszenzintensitäten müsste der α -Faktor entsprechend berücksichtigt werden: $F_{GX} = F_{GG} + \frac{1}{\alpha} F_{RG}$.

3.5.2 Berechnung der FRET-Effizienzen mittels PIE-FCCS

Aus Glg. 3.20 ist ersichtlich, dass in der CCF die Information über die FRET-Effizienz enthalten ist. Bis jetzt existiert allerdings nur eine Arbeit, in der mittels FCCS FRET-Effizienzen bestimmt wurden [53]. Die Berechnung der FRET-Effizienz nach Glg. 3.20 ist kompliziert, da hierzu die Anteile der doppelt markierten Teilchen $f_{GR,G}$ und $f_{GR,R}$ bekannt sein müssten. Dies sind üblicherweise die Parameter, die mit FCCS bestimmt werden sollen. Mit PIE können wie oben beschrieben aber noch zwei weitere CCF, $G_{GG \times RR}$ und $G_{GX \times RR}$, berechnet werden. Das Verhältnis dieser beider Funktionen aus Glg. 3.27 und 3.28 führt zu folgendem Ausdruck:

$$\frac{G_{GG \times RR}(0)}{G_{GX \times RR}(0)} = \frac{1 - f_E}{1 - f_E f_{GR,G}} \quad (3.29)$$

In Glg. 3.29 ist neben der FRET-Effizienz f_E der einzige unbekannte Parameter der Anteil der doppelt markierten Teilchen zur Gesamtzahl der grün markierten Teilchen $f_{GR,G}$. Dieser ist als das Verhältnis der Amplitude der CCF zur Amplitude der ACF der im roten Detektionskanal nach der roten Anregung detektierten Photonen definiert:

$$f_{GR,G} = \frac{G_{GX \times RR}(0)}{G_{RR \times RR}(0)}. \quad (3.30)$$

Einsetzen der Glg. 3.30 in 3.29 und Auflösen nach f_E führt zu folgendem Ausdruck für die FRET-Effizienz:

$$f_E = \frac{1 - \frac{G_{GG \times RR}(0)}{G_{GX \times RR}(0)}}{1 - \frac{G_{GG \times RR}(0)}{G_{RR \times RR}(0)}} \quad (3.31)$$

Die FRET-Effizienz kann also durch drei Korrelationsfunktionen, die aus dem gleichen Datensatz berechnet werden können, experimentell mittels PIE-FCCS bestimmt werden. Die Markierungseffizienzen müssen im Gegensatz zur Bestimmung mit Hilfe von Glg. 3.20 nicht vorausgesetzt sein.

Falls die Proportionalitätskonstante zwischen f_E und f'_E bekannt ist, kann die FRET-Effizienz auch über das Verhältnis der Akzeptoremission nach FRET bzw. direkter Anregung bestimmt werden:

$$f'_E = \frac{\frac{G_{GD \times RD}(0)}{G_{GG \times RR}(0)} - 1}{1 - \frac{G_{GX \times RR}(0) \cdot G_{GD \times RD}(0)}{G_{GX \times GX}(0) \cdot G_{GG \times RR}(0)}}. \quad (3.32)$$

3.5.2.1 Unterschiedliche FRET-Populationen

Bisher wurde nicht berücksichtigt, dass in der Probe Spezies unterschiedlicher FRET-Effizienzen vorliegen können. Bei zwei verschiedenen Spezies werden die Fluoreszenzintensitäten aus Glg. 3.16-3.19 unter Vernachlässigung des spektralen Übersprechens und

der direkten Anregung zu:

$$F_{GG}(t) = \int W(\vec{r}) \cdot [\varepsilon_{G,G,G} C_G(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR1,G,G} C_{GR1}(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR2,G,G} C_{GR2}(\vec{r}, t)] d\vec{r} \quad (3.33)$$

$$F_{RG}(t) = \int W(\vec{r}) \cdot [\varepsilon_{GR1,R,G} C_{GR1}(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR2,R,G} C_{GR2}(\vec{r}, t)] d\vec{r} \quad (3.34)$$

$$F_{RR}(t) = \int W(\vec{r}) \cdot [\varepsilon_{R,R,R} C_R(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR1,R,R} C_{GR1}(\vec{r}, t) + \varepsilon_{GR2,R,R} C_{GR2}(\vec{r}, t)] d\vec{r}. \quad (3.35)$$

Mit den FRET-Effizienzen f_{E1} und f_{E2} und den Teilchenzahlen N_{GR1} und N_{GR2} der beiden FRET-Spezies kann folgende FRET-Effizienz \tilde{f}_E definiert werden:

$$\tilde{f}_E = \frac{f_{E1} N_{GR1} + f_{E2} N_{GR2}}{N_{GR1} + N_{GR2}} \quad (3.36)$$

Der Anteil doppelt markierter Teilchen im Verhältnis zur Anzahl aller grün markierter Teilchen lässt sich nun durch

$$\tilde{f}_{GR,G} = \frac{N_{GR1} + N_{GR2}}{N_G + N_{GR1} + N_{GR2}} \quad (3.37)$$

berechnen. Damit folgt für die Amplitude der Kreuzkorrelation $G_{GX \times RR}$

$$G_{GX \times RR}(0) = \frac{\gamma (N_{GR1} + N_{GR2})}{\langle N_G + N_{GR1} + N_{GR2} \rangle \langle N_R + N_{GR1} + N_{GR2} \rangle}. \quad (3.38)$$

und für $G_{GG \times RR}$ entsprechend zu Glg. 3.27:

$$G_{GG \times RR}(0) = \left(\frac{1 - \tilde{f}_E}{1 - \tilde{f}_E \tilde{f}_{GR,G}} \right) \frac{\gamma (N_{GR1} + N_{GR2})}{\langle N_G + N_{GR1} + N_{GR2} \rangle \langle N_R + N_{GR1} + N_{GR2} \rangle}. \quad (3.39)$$

Der gewichtete Mittelwert der einzelnen FRET-Effizienzen \tilde{f}_E kann demnach durch

$$\tilde{f}_E = \frac{1 - \frac{G_{GG \times RR}(0)}{G_{GX \times RR}(0)}}{1 - \frac{G_{GG \times RR}(0)}{G_{RR \times RR}(0)}} \quad (3.40)$$

berechnet werden.

3.5.2.2 Unterschiedliche Detektionsvolumina

Bei der Herleitung der CCF (Abschnitt 2.2.4) wurde angenommen, dass die Detektionsvolumina $W_i(\vec{r})$ identisch sind und vollständig überlappen. Vor allem die unterschiedlichen Beugungseigenschaften von Licht mit verschiedenen Wellenlängen können aber zu ungleichen Detektionsvolumina führen [9]:

$$W_G(\vec{r}) = \exp\left(-2 \frac{x^2 + y^2}{\omega_{r_G}^2}\right) \cdot \exp\left(-2 \frac{z^2}{\omega_{z_G}^2}\right) \quad (3.41)$$

$$W_R(\vec{r}) = \exp\left(-2 \frac{x^2 + y^2}{\omega_{r_R}^2}\right) \cdot \exp\left(-2 \frac{z^2}{\omega_{z_R}^2}\right) \quad (3.42)$$

Hierbei stehen die Indices G und R weiterhin beispielhaft für grüne und rote Anregung. Dies resultiert in einem effektiven Probenvolumen für die Kreuzkorrelation von:

$$V_{eff} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \frac{(\omega_{rG}^2 + \omega_{rR}^2)}{2} \frac{(\omega_{zG}^2 + \omega_{zR}^2)^{\frac{1}{2}}}{\sqrt{2}} \quad (3.43)$$

Bei der Berechnung der Kreuzkorrelationen mit PIE muss das effektive Volumen natürlich auch berücksichtigt werden. Die CCF ohne Übersprechen und die CCF bei gleichzeitigem FRET selbst ändern sich nicht, einzig das Probenvolumen ändert sich gemäß Glg. 3.43. Da allerdings die mittlere Anzahl der Teilchen mit dem Probenvolumen korrespondiert, muss der Unterschied bei der Berechnung der FRET-Effizienzen berücksichtigt werden:

$$f_E = \frac{1 - \frac{G_{GG \times RR}}{G_{GX \times RR}}}{1 - \frac{G_{GG \times RR}}{G_{RR \times RR}} V_C} \quad (3.44)$$

mit

$$V_C = \frac{(\omega_{rG}^2 + \omega_{rR}^2) (\omega_{zG}^2 + \omega_{zR}^2)^{\frac{1}{2}}}{\sqrt{8} \omega_{rR}^2 \omega_{zR}}$$

als Korrekturfaktor.

Diese Korrektur ist allerdings auch nur eine Näherung, da bei FRET grün angeregt wird und rot detektiert, weshalb sich die Frage stellt, ob das Anregungs- oder das Detektionsvolumen den entscheidenderen Einfluss auf die Amplitude hat.

Kapitel 4

Anwendungsbereiche von PIE

Wie im vorherigen Kapitel theoretisch hergeleitet, bietet die gepulste alternierende Anregung für zahlreiche Methoden der Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie Vorteile, welche im Folgenden für die verschiedenen Anwendungen experimentell bestätigt werden sollen. Im Detail sind dies die Eliminierung des spektralen Übersprechens bei FCCS und LSM, FCCS und LSM mit einem Detektor, quantitative FCCS bei gleichzeitigem FRET und Bestimmung von FRET-Effizienzen mittels FCCS sowie die Sortierung von Molekülen bei der *Burst Analysis*.

4.1 *Burst Analysis* mit PIE

Für spFRET-Messungen, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, bietet die Kombination mit PIE den Vorteil, dass nur Moleküle, die einen aktiven Akzeptor haben, in die Analyse mit eingeschlossen werden und daher auch FRET-Populationen mit sehr kleinen FRET-Effizienzen eindeutig bestimmt werden können.

Normalerweise wird bei der *Burst Analysis* nur der Donor direkt angeregt und die Fluoreszenz im Donor- und Akzeptorkanal detektiert. Es existiert nur ein Grenzwert, den die Summe der Photonen in einem bestimmten Zeitintervall überschreiten muss, damit ein *Burst* als Molekül erkannt wird (Donor-Kriterium, s. Abschnitt 2.2.2) Wenn ein Molekül aber nur mit einem Donor markiert ist, also kein (aktiver) Akzeptor zur Verfügung steht, werden dennoch während seines Weges durch den Fokus eine grosse Anzahl an Photonen detektiert, die den Grenzwert überschreiten. Somit wird auch dieses Molekül als solches erkannt und die FRET-Effizienz berechnet. Die FRET-Effizienz ist allerdings Null, da kein (aktiver) Akzeptor vorhanden ist, zu dem ein Energietransfer stattfinden könnte. Mit *Burst Analysis* wird also zusätzlich zu der "echten" Verteilung der FRET-Effizienz noch eine zweite FRET-Population um Null gemessen (s. Abb. 4.2 a) und c)).

Bei der Kombination von *Burst Analysis* mit PIE werden Donor und Akzeptor abwechselnd direkt angeregt resultierend in den drei effektiven Detektionskanälen: F_{GG} , F_{RG}

und F_{RR} (s. Abb. 4.1).

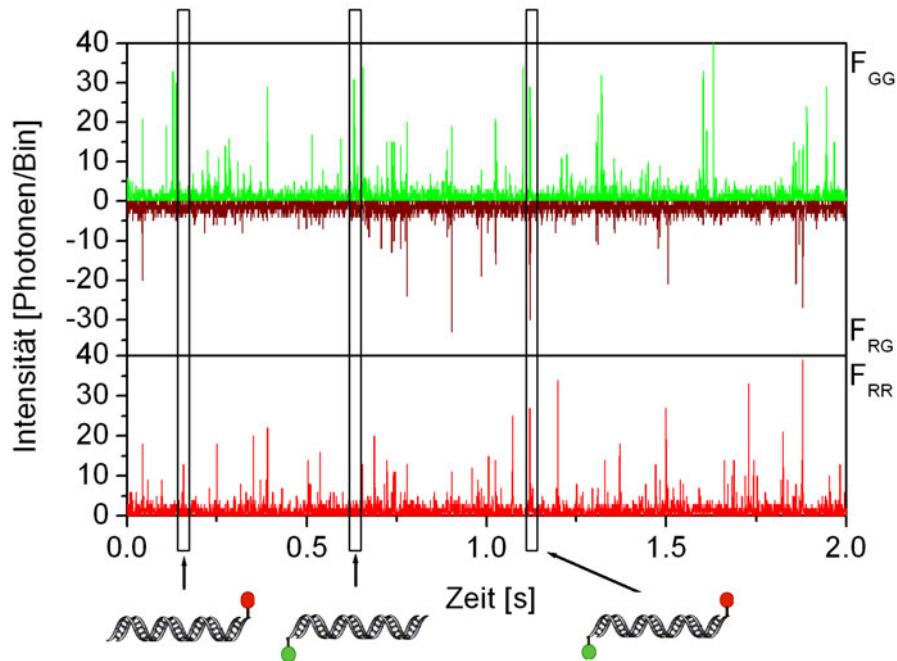


Abbildung 4.1: Mit PIE kann das Fluoreszenzsignal in effektiv drei Detektionskanäle aufgeteilt werden: F_{GG} , F_{RG} und F_{RR} . Passiert ein nur grün markiertes Molekül den Fokus, kann ein Photonenburst in Kanal F_{GG} detektiert werden, ein nur rot markiertes Molekül kann nur in Kanal F_{RR} detektiert werden, bei einem zweifarbigen markierten Molekül wird sowohl in Kanal F_{RR} als auch in F_{GG} ein Photonenburst detektiert, in Abhängigkeit der FRET-Effizienz zeigt sich auch ein Photonenburst in Kanal F_{RG} .

Es gibt nun zusätzlich zum Donor-Kriterium noch ein weiteres Kriterium, das Akzeptor-Kriterium: Die Photonen im roten Detektionskanal nach roter Anregung müssen in einem bestimmten Zeitintervall einen Grenzwert überschreiten, d.h. es ist ein aktiver Akzeptor vorhanden. Nur in diesem Fall wird auch das Donor-Kriterium geprüft, ob in demselben Zeitintervall ein Donor vorhanden ist. Es wird also nur für solche Moleküle die FRET-Effizienz berechnet, die beide Kriterien erfüllen und daher sowohl einen Donor als auch einen aktiven Akzeptor haben. Des Weiteren können durch PIE alle Fluoreszenzintensitäten, die nach Glg. 2.22 zur Berechnung der FRET-Effizienzen benötigt werden, mit einer Messung bestimmt werden.

Abb. 4.2 zeigt die Verteilungen der FRET-Effizienzen für DNA_{15} (oben) und DNA_{10} (unten) mit und ohne PIE (Details zur DNA im Anhang D). Die Histogramme wurden aus denselben Datensätzen gewonnen, jeweils mit und ohne Verwendung des zusätzlichen Kriteriums für den Akzeptorkanal. Bei der DNA_{10} sind die beiden Verteilungen gut unterscheidbar und es lässt sich trotz dieser zusätzlichen Verteilung um 0% FRET-Effizienz dieselbe FRET-Effizienz von 67.3 ± 0.5 % bestimmen. Bei der DNA_{20} und

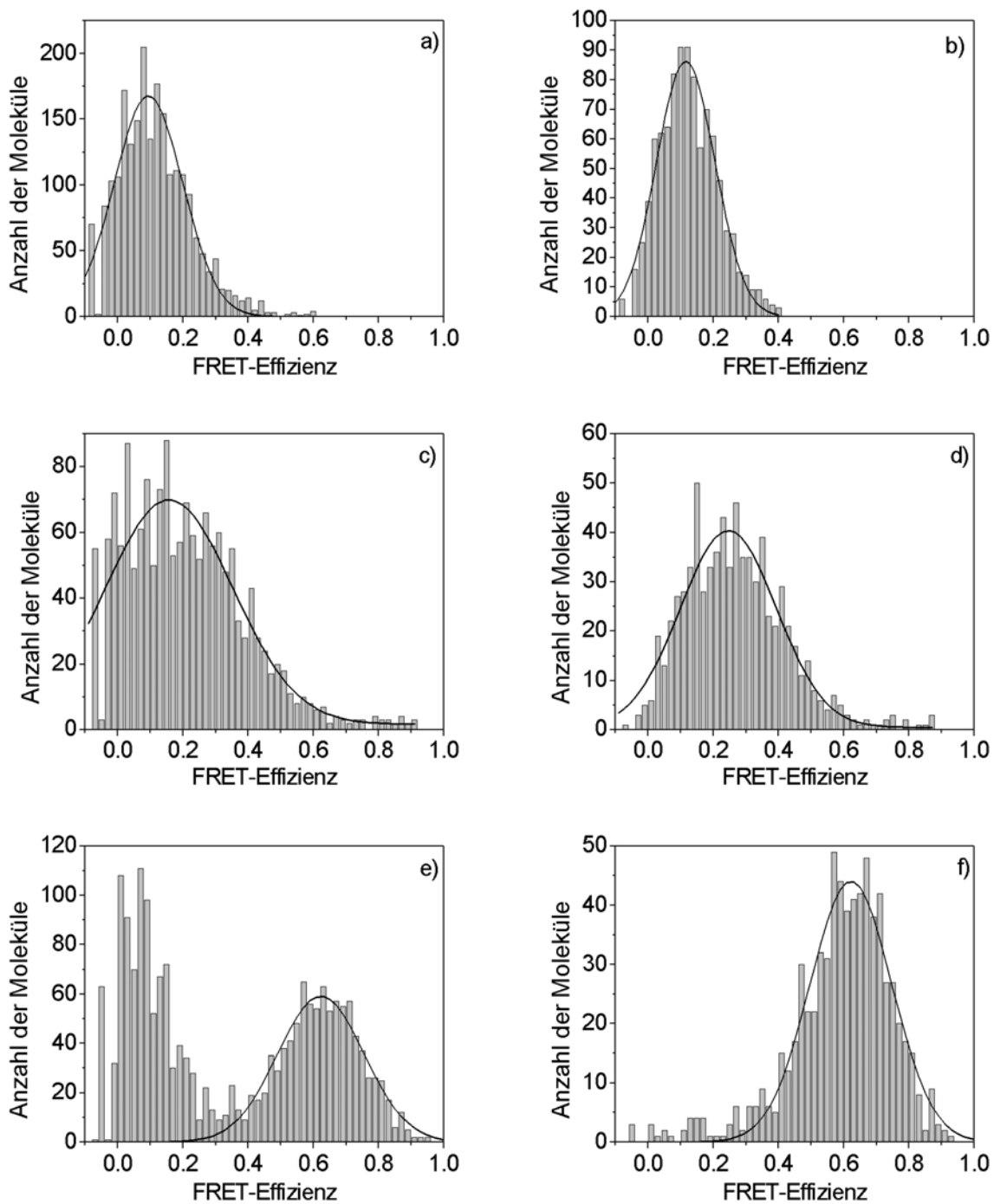


Abbildung 4.2: Histogramme der FRET-Effizienzen mit und ohne PIE: a) DNA₂₀ ohne PIE b) DNA₂₀ mit PIE c) DNA₁₅ ohne PIE d) DNA₁₅ mit PIE e) DNA₁₀ ohne PIE f) DNA₁₀ mit PIE. Die Histogramme mit oder ohne PIE wurden jeweils aus den gleichen Datensätzen berechnet, bei b), d) und f) mussten als zusätzliches Kriterium mind. 15 Photonen im roten Kanal nach roter Anregung detektiert werden.

DNA₁₅ überlappen die beiden Verteilungen allerdings so stark, dass es nicht möglich ist, die Verteilungen auseinander zu halten. Ohne PIE werden daher Werte von $10.4 \pm 0.6 \%$ für DNA₂₀ und $15.7 \pm 0.9 \%$ für DNA₁₅ erhalten. Die exakten Werte der FRET-Effizienz

liegen allerdings für die DNA₂₀ bei $12.6 \pm 0.3 \%$ und für die DNA₁₅ bei $24.6 \pm 0.7 \%$, wie mit Hilfe von PIE bestimmt werden konnte.

4.1.1 Stöchiometrie

Kapanidis et. al konnten weiterhin zeigen, dass die Verwendung gepulster Anregung es erlaubt, die Stöchiometrie von einzelnen Molekülen zu bestimmen [27]. Die Stöchiometrie

$$S = \frac{\alpha F_{GG} + F_{RG}}{\alpha F_{GG} + F_{RG} + F_{RR}} \quad (4.1)$$

ist ein Maß für das Verhältnis von Donor- und Akzeptor-Farbstoffen an einem Molekül und erlaubt eine Unterscheidung von Molekülen mit unterschiedlich vielen Akzeptor- bzw. Donor-Farbstoffen.

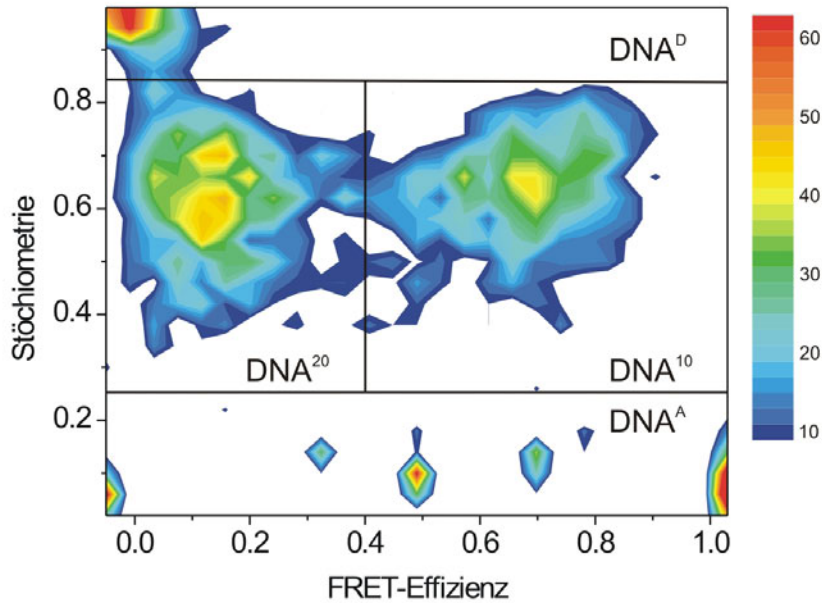


Abbildung 4.3: Durch die Darstellung der Stöchiometrie in Abhängigkeit der FRET-Effizienz können die verschiedenen in der Lösung vorhandenen Moleküle sortiert werden. Hier gibt es vier Populationen: (i) $S > 0.80$ und $f_E \approx 0$: nur Donor-markierte Moleküle (ii) $0.35 < S < 0.80$ und $0 < f_E < 0.40$: doppelt-markierte Moleküle der DNA₂₀ (iii) $0.35 < S < 0.80$ und $f_E > 0.40$: doppelt-markierte Moleküle der DNA₁₀ (iv) $S < 0.35$ und f_E nicht definiert: nur Akzeptor-markierte Moleküle

Die Auftragung der Stöchiometrie in Abhängigkeit der FRET-Effizienz (Abb. 4.3) zeigt die verschiedenen vorhandenen Moleküle in einer Lösung aus DNA₁₀ und DNA₂₀. Stöchiometriewerte im Bereich oberhalb von 0.80 kennzeichnen Moleküle, die nur mit einem

Donor markiert sind, deren FRET-Effizienz nahe 0 ist. Der Bereich unterhalb von 0.35 kann Molekülen, die nur mit einem Akzeptor markiert sind, zugeordnet werden. Für diese ist die FRET-Effizienz nicht definiert und sie sind somit über die gesamte x-Achse verteilt aufzufinden. Die doppelt-markierten Moleküle sind im Bereich der Stöchiometrie zwischen 0.35 und 0.80 zu finden, anhand der FRET-Effizienz können die beiden Populationen mit niedriger (DNA_{20}) bzw. mit hoher (DNA_{10})-FRET-Effizienz unterschieden werden.

4.1.2 Bestimmung des α -Faktors

Zur exakten Berechnung von absoluten FRET-Effizienzen wird, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, der Korrekturfaktor $\alpha = \frac{\eta_A \cdot \phi_A}{\eta_D \cdot \phi_D}$ zur richtigen Gewichtung der unterschiedlichen Detektionseffizienzen und Quantenausbeuten der Farbstoffe benötigt. Bisher wurde dieser Faktor entweder theoretisch berechnet, durch Faltung der Filterspektren mit der Quantenausbeute oder experimentell durch Photobleichen des Akzeptors von immobilisierten Molekülen ermittelt [54]. Diese Werte stellen für Moleküle in Lösung allerdings nur eine Näherung dar. Die Kombination von *Burst Analysis* mit gepulster Anregung bietet alternativ dazu eine relativ einfache Möglichkeit, den α -Faktor für frei diffundierende Moleküle zu messen [55]. Der Stöchiometriewert und die FRET-Effizienz ohne Berücksichtigung des α -Faktors

$$S_\alpha = \frac{F_{GG} + F_{RG}}{F_{GG} + F_{RG} + F_{RR}} \quad (4.2)$$

und

$$f_{E\alpha} = \frac{F_{RG}}{F_{GG} + F_{RG}}, \quad (4.3)$$

stehen in folgendem Zusammenhang:

$$\frac{1}{S_\alpha} = \Omega + \Sigma \cdot f_{E\alpha}, \quad (4.4)$$

wobei $\Omega = 1 + \alpha\beta$ und $\Sigma = \beta(1 - \alpha)$ sind. β ist als das Verhältnis der Anregungsintensitäten und Absorptionsquerschnitte von Akzeptor und Donor definiert: $\frac{I_A \sigma_A}{I_D \sigma_D}$. Damit ergibt sich für den α -Faktor:

$$\alpha = \frac{(\Omega - 1)}{(\Omega + \Sigma - 1)} \quad (4.5)$$

Ω und Σ können leicht durch lineare Regression durch zwei FRET-Populationen bestimmt werden (Abb. 4.4). Die α -Faktoren für die verwendeten Farbstoff-Paare sind im Anhang D in Tabelle D.3 aufgelistet. Bei dieser Methode zur Bestimmung der α -Faktoren ist zu beachten, dass es sich bei den so erhaltenen α -Faktoren nur um einen Mittelwert handelt, im Einzelnen können die α -Faktoren von Molekül zu Molekül extrem hohe

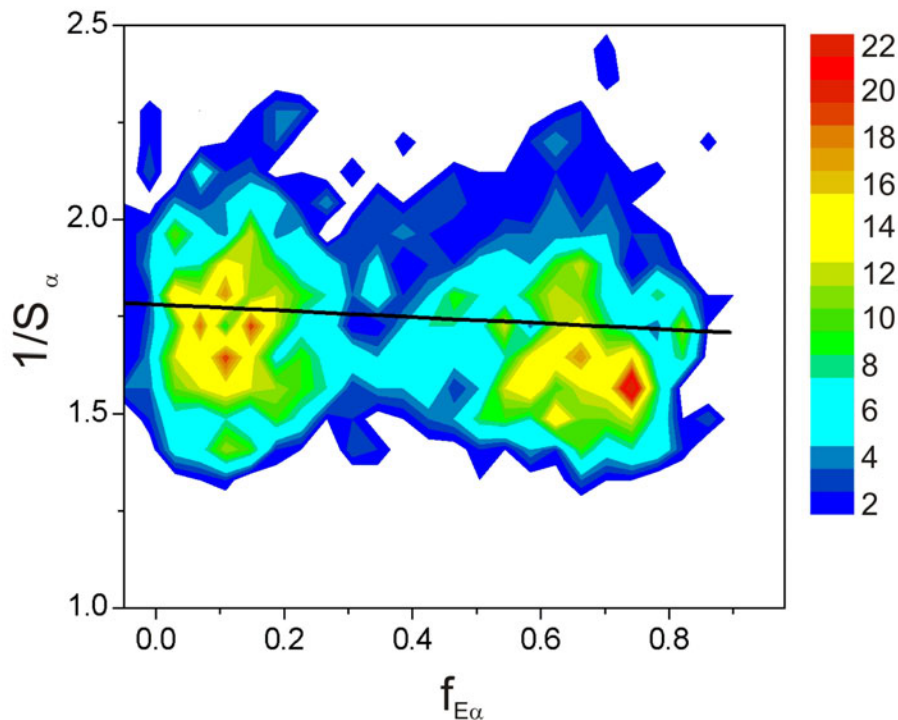


Abbildung 4.4: Auftragung des inversen Stöchiometrieffaktors S_α gegen die unkorrigierte FRET-Effizienz $f_{E\alpha}$ für DNA₁₀ und DNA₂₀ zur Bestimmung des α -Faktors. Aus der Steigung Σ und dem y-Achsenabschnitt Ω einer linearen Regression (schwarze Linie) durch die beiden Populationen lässt sich der α -Faktor berechnen.

Schwankungen aufweisen, welche auf interne Dynamiken der Moleküle zurückzuführen sind. Diese Ungenauigkeit führt zu einer Verbreiterung der Histogramme der FRET-Effizienz.

4.2 FCCS mit PIE

4.2.1 PIE-FCCS ohne Übersprechen

In Abschnitt 3.4 wurde bereits diskutiert, dass es aufgrund der weit auslaufenden Emissionsspektren der Fluorophore trotz bestmöglicher Filter zumeist nicht gelingt, die Spektren der beiden Farbstoffe vollständig zu separieren (s. Abb. 3.8). Folglich wird Fluoreszenz, die von dem Farbstoff mit der kürzeren Wellenlänge emittiert wird, auch in dem Detektionskanal des Fluorophors mit der längeren Wellenlänge detektiert¹. Dieses

¹Quantum Dots würden zwar aufgrund ihres schmalen Emissionsspektrums dieses Problem lösen, da sie aber sehr groß sind und eine komplizierte Photodynamik aufweisen, sind sie für unsere Anwendungen

spektrale Übersprechen führt bei der Kreuzkorrelationsanalyse dazu, dass die Amplitude nach Glg. 3.13 nicht direkt proportional zur Anzahl zweifarbig markierter Teilchen ist, sondern auch von der Höhe des spektralen Übersprechen abhängt. Selbst bei einer Lösung, in der sich keine zweifach markierten Teilchen befinden, ist die Kreuzkorrelationsamplitude nach Glg. 3.15 von Null verschieden. Da PIE ermöglicht, zwischen roter Emission und spektralem Übersprechen zu unterscheiden, kann mittels PIE das spektrale Übersprechen herausgeschnitten werden.

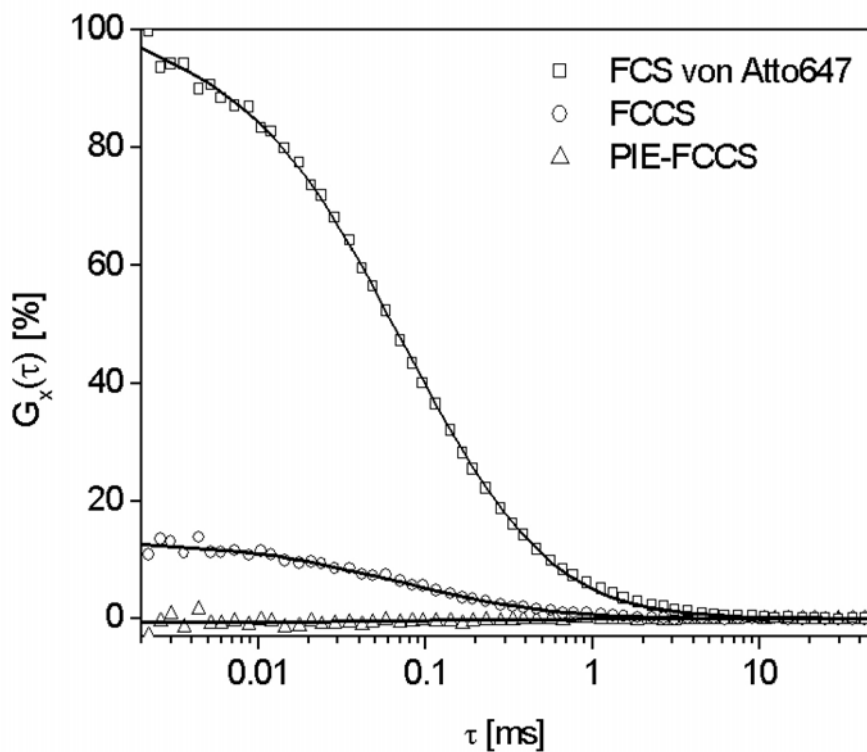


Abbildung 4.5: Korrelationsfunktionen einer Lösung frei diffundierender, nicht wechselwirkender Farbstoffe (Atto532 und Atto647, je 2nM). Die CCF ohne PIE (Kreise) zeigt eine Amplitude von 13.0 % aufgrund des spektralen Übersprechen, die CCF mit PIE eine Amplitude von -0.7 % (Dreiecke); beide CCFs sind auf die ACF von Atto647 (Quadrate) normiert.

Zur Verifizierung wurde eine Kreuzkorrelationsanalyse von einer Probe mit zwei frei diffundierenden, nicht wechselwirkenden Farbstoffen (Atto532 und Atto647) durchgeführt, bei der ohne Übersprechen theoretisch keine Kreuzkorrelation zu erwarten wäre (Abb. 4.5). Mit diesem Datensatz wurde zum Einen eine "gewöhnliche" Kreuzkorrelationsanalyse durchgeführt, bei der alle im grünen Detektionskanal registrierten Photonen (F_{GD}) mit solchen im roten Detektionskanal registrierten (F_{RD}) korreliert wurden (Kreise in Abb. 4.5). Zum Anderen wurden nur die Photonen im grünen Detektionskanal nach der
keine geeignete Alternative.

grünen Anregung (F_{GG}) mit solchen im roten Detektionskanal nach der roten Anregung (F_{RR}) korreliert (Dreiecke in Abb. 4.5). Beide Kreuzkorrelationen wurden auf die ACF des roten Farbstoffes Atto647 (Quadrate in Abb. 4.5) normiert. Die auf die "gewöhnliche" Weise berechnete CCF zeigt eine Amplitude von 13.0 %, die, bei der mit PIE das spektrale Übersprechen herausgeschnitten wurde, eine Amplitude von -0.7 %.

Wie theoretisch erwartet, wurde ohne PIE eine positive, von Null verschiedene Amplitude erhalten. Mit PIE ist mit einem Wert von -0.7 % fast keine Kreuzkorrelation zu beobachten. Jedoch ist eine geringe Antikorrelation zu bemerken, deren Ursache im folgenden Abschnitt genauer diskutiert werden soll.

4.2.1.1 Antikorrelation

Zur genaueren Untersuchung der geringen Abweichung vom theoretisch erwarteten Wert bei PIE-FCCS wurden weitere FCCS-Experimente mit der Farbstofflösung aus Atto532 und Atto647 bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (s. Abb. 4.6). Damit soll der Zusammenhang zwischen Zählrate und Amplitude der Antikorrelation im Detail besser verstanden und die mögliche Ursache herausgefunden werden.

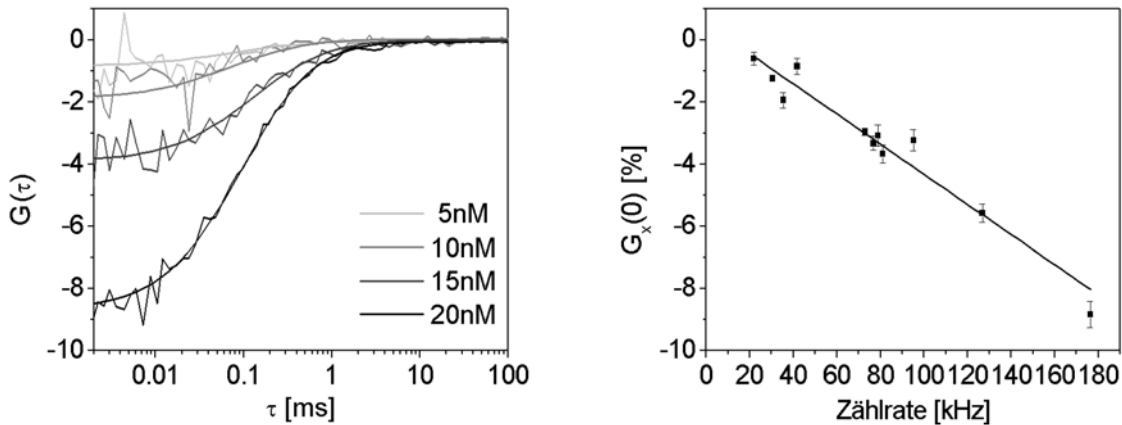


Abbildung 4.6: links: Auf die ACF von Atto647 normierte Antikorrelationen für verschiedene Farbstoffkonzentrationen: 5 nM (hellgrau), 10 nM (grau), 15 nM (dunkelgrau) und 20 nM (schwarz). Die Amplitude hängt von der Konzentration ab. rechts: Prozentuale Amplitude der Antikorrelationen in Abhängigkeit von der gesamten Anzahl an Photonen pro Sekunde (grüner plus roter Detektionskanal). Die Steigung 485 ± 39 ns entspricht der Totzeit der TCSPC-Karte.

Die Antikorrelationen für vier verschiedene Konzentrationen (grün: 5 nm, blau: 10 nm, rot: 15 nm und schwarz: 20 nm) jeweils normiert auf die Amplitude der ACF von Atto647 sind in Abb. 4.6 (links) dargestellt. In Abb. 4.6 (rechts) sind die prozentualen Amplituden der Antikorrelationen in Abhängigkeit von der gesamten Anzahl der pro Sekunde detektierten Photonen aufgetragen. Bei gleichen Versuchsbedingung (z.B. Laserleistung, Justage), ist die Konzentration direkt proportional zur Zählrate und somit auch zur Antikorrelationsamplitude.

Die Abhängigkeit der Antikorrelationsamplitude von der Zählrate legt die Vermutung nahe, dass die Antikorrelation auf die Totzeit der Messkarte zurückzuführen ist. Die TCSPC-Karte von PicoQuant hat laut Hersteller eine Totzeit von 350 ns. Da zur Aufteilung der verschiedenen Detektionskanäle nicht separate Messkarten, sondern ein Router² verwendet wird, ist es möglich, dass während der Totzeit ein Photon z.B. im grünen Detektionskanal registriert wird, während ein weiteres Photon im roten Detektionskanal nicht gezählt werden kann, da die Karte noch das grüne verarbeiten muss. Dadurch nimmt die Wahrscheinlichkeit ab, dass ein Photon z.B. im roten Detektionskanal detektiert wird, wenn gerade eines im grünen Kanal detektiert worden ist und umgekehrt. Bei der CCF äußert sich die Abnahme der Detektionswahrscheinlichkeit als eine Antikorrelation. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Photonen während der Totzeit detektiert werden, ist direkt proportional zur Zählrate: Je mehr Photonen pro Sekunde insgesamt detektiert werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei innerhalb der Totzeit auftreffen. Die Steigung aus Abb. 4.6 entspricht daher der Totzeit der Karte, welche demnach 485 ± 39 ns ist.

Ein endgültiger Nachweis, dass die Totzeit der Messkarte die Ursache für die Antikorrelation ist, kann nur erbracht werden, wenn für jeden Kanal eine separate TCSPC-Karte zur Verfügung stünde. Damit können Photonen in beiden Detektionskanälen gezählt werden, unabhängig davon, ob gerade eines in dem anderen Detektionskanal registriert worden ist. Die TCSPC-Karte von Becker&Hickl, die aus drei separaten, synchronisierten Messkarten (SPC-140), besteht, bietet diese Möglichkeit. Das oben beschriebene Experiment wurde parallel mit der TCSPC-Karte von Becker&Hickl und der von PicoQuant wiederholt, diesmal mit einer Lösung aus Atto488 und Atto647. Wie in Abb. 4.7 eindeutig zu erkennen ist, ist bei einer Zählrate von ca. 300kHz mit der TimeHarp200 eine eindeutige Antikorrelation zu erkennen, die erwartungsgemäß bei der SPC-140 ausbleibt.

4.2.2 PIE-FCCS mit einem Detektor

Die Kombination von PIE mit FCCS ermöglicht weiterhin eine mehrfarbige Detektion mit nur einem Detektor. Die Photonen werden hierbei aufgrund ihrer Ankunftszeit den verschiedenen Anregungen zugeordnet. Sind die beiden Fluorophore so gewählt, dass die Anregungswellenlänge nur einen der Farbstoffe anregt, können die Photonen den verschiedenen Farbstoffen zugeteilt werden. Diese Bedingung ist für den Farbstoff mit der kürzeren Anregungswellenlänge leicht zu erfüllen, bei dem Farbstoff mit der längeren Anregungswellenlänge ist es meist nicht zu vermeiden, dass es zu einer direkten Anregung durch den Laser mit der kürzeren Wellenlänge kommt. Diese direkte Anregung liegt bei geeigneter Wahl der Farbstoffe allerdings unter 5% und kann somit vernachlässigt wer-

²Durch den Router, der der TCSPC-Karte vorgeschaltet ist, ist es möglich, Photonen bis zu vier verschiedenen Detektionskanälen zuzuordnen.

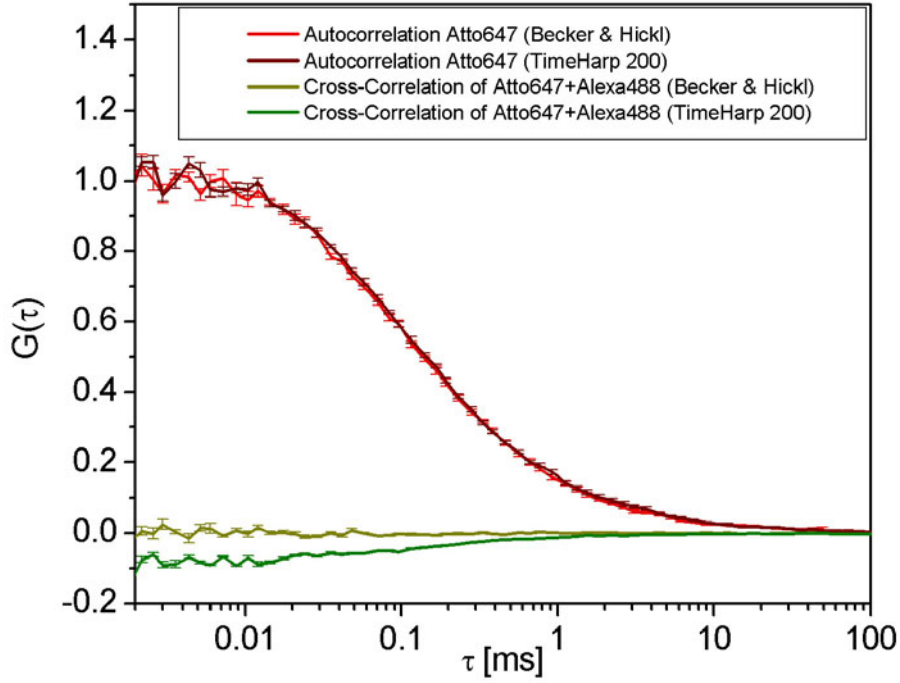


Abbildung 4.7: Vergleich der Kreuzkorrelation mit den TCSPC-Karten von Becker&Hickl (SPC-140) und PicoQuant (TimeHarp200): Von einer Lösung aus Atto488 und Atto647 wurden gleichzeitig mit beiden Messkarten Kreuzkorrelationen aufgenommen. Bei der Messung mit den SPC-140-Karten (Dunkelgelb) ist die Amplitude wie erwartet Null, bei der Messung mit der TimeHarp200-Karte (Dunkelgrün) ist wiederum eine deutliche Antikorrelation zu erkennen. Die Kreuzkorrelationen sind auf die mit der jeweiligen TCSPC-Karte gemessenen Autokorrelationen von Atto647 normiert.

den. Ein Vorteil bei der Verwendung von nur einem Detektor ist, dass es kein spektrales Übersprechen gibt, da die gesamte Fluoreszenz aufgrund der Anregung einem Farbstoff zugeordnet wird und nicht aufgrund seiner Wellenlänge.

In Abb. 4.8 sind links die ACF von Atto532 (schwarz) und Atto647 (grau) und die CCF (hellgrau) von DNA₆₀ zu sehen, die mit zweifarbiger Detektion aufgenommen wurden. Das spektrale Übersprechen wurde mittels PIE eliminiert. Für die rechte Abbildung wurde die gleiche Messung mit einem Detektionskanal wiederholt und die Photonen aufgrund ihrer Ankunftszeit in die zwei Kanäle aufgeteilt. Die geringen Unterschiede zwischen den Abbildungen sind darauf zurückzuführen, dass zwischen den beiden Messungen, die Detektion neu justiert werden musste und somit einige Minuten vergangen sind. Die Messung mit zwei Detektoren wurde zuerst durchgeführt, daher ist die Teilchenzahl hier etwas höher, die Amplitude also niedriger. Im Verhältnis zur ACF des Atto647 beträgt die Kreuzkorrelation aber für beide Messungen 92 %. Weiterhin könnten die verschiede-

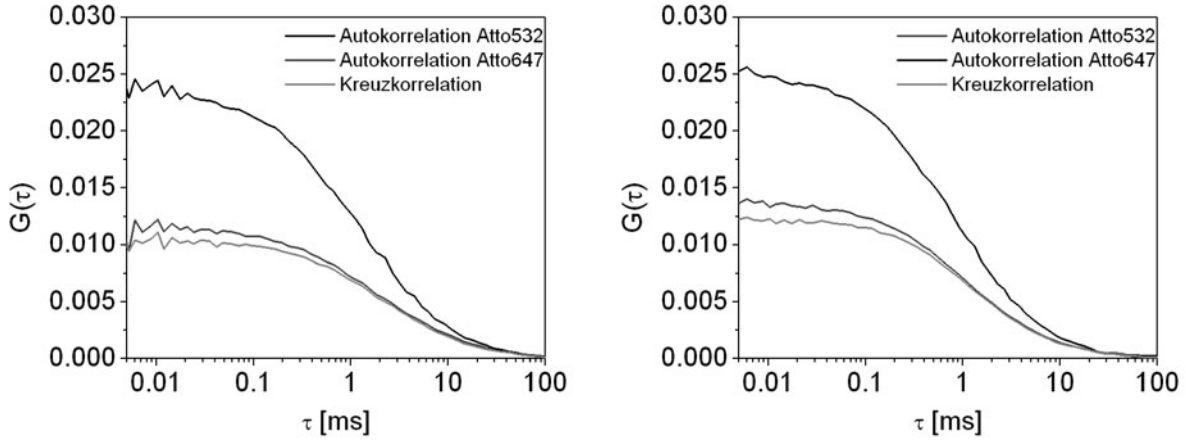


Abbildung 4.8: links: ACFs und CCF von DNA₆₀ mit zweifarbiger Detektion, rechts: ACFs und CCF von DNA₆₀ mit einem Detektor

nen Emissionsfilter³ und der zusätzliche dichroitische Spiegel bei der Detektion mit zwei Kanälen geringe Unterschiede hervorrufen.

4.2.3 PIE-FCCS in Gegenwart von FRET

Wie oben schon besprochen, ist FRET ein ähnliches Problem bei FCCS wie das spektrale Übersprechen: auch hier werden Photonen im roten Kanal nach der grünen Anregung detektiert. Wie in Abschnitt 3.5.1 theoretisch hergeleitet wurde kann dieses Problem umgangen werden, indem nicht der grüne Detektionskanal (F_{GD}) mit dem roten (F_{RD}) korreliert wird, sondern das gesamte Signal nach der grünen Anregung ($F_{GX} = F_{GG} + F_{RD}$) mit dem Signal nach der roten Anregung ($F_{RX} \approx F_{RR}$) korreliert wird. Zur Verifizierung der theoretischen Voraussagen wurden Kreuzkorrelations-Experimente mit drei verschiedenen Mischungen aus DNA₁₀ und DNA_A, womit das Verhältnis $f_{GR,R}$ verändert wurde, durchgeführt. Obwohl sich die grüne Markierungseffizienz $f_{GR,G}$ bei diesem Experiment also nicht verändert, d.h. die Amplitude der Kreuzkorrelation, normiert auf die rote Autokorrelation, sollte theoretisch konstant bleiben, ändert sich die Amplitude bei der Korrelation $G_{GD \times RD}(\tau)$, wie in Abb. 4.9 zu sehen ist, jedoch deutlich. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Amplitude der CCF bei gleichzeitigem FRET auch von $f_{GR,R}$ abhängt:

$$\frac{G_{GD \times RD}}{G_{RR \times RR}} = \left(\frac{1 - f_E}{1 - f_E f_{GR,G}} \right) \left(\frac{1 + f'_E}{1 + f'_E f_{GR,R}} \right) \frac{N_{GR}}{\langle N_G + N_{GR} \rangle \langle N_R + N_{GR} \rangle} \quad (4.6)$$

Die Korrelation der Photonen, die nach der grünen Anregung detektiert wurden (F_{GX}), mit denen, die nach der roten Anregung detektiert werden (F_{RR}), führt aber bei allen

³Bei der Messung mit nur einem Detektor wurde ein Doppelbandpassfilter verwendet, welcher sowohl im grünen als auch im roten Bereich öffnet. Dies führt dazu, dass gleichzeitig Streulicht aus beiden spektralen Bereichen durchgelassen wird.

drei verschiedenen Verhältnissen von $f_{GR,R}$ zu der gleichen Amplitude (Abb. 4.9 rechts):

$$\frac{G_{GX \times RR}}{G_{RR \times RR}} = f_{GR,G} = \frac{\langle N_{GR} \rangle}{\langle N_G + N_{GR} \rangle} \quad (4.7)$$

Hierbei werden die Photonen, die aufgrund von FRET nicht vom Donor emittiert werden wieder zum Donorkanal addiert, so dass die Molekularen Helligkeiten identisch sind.

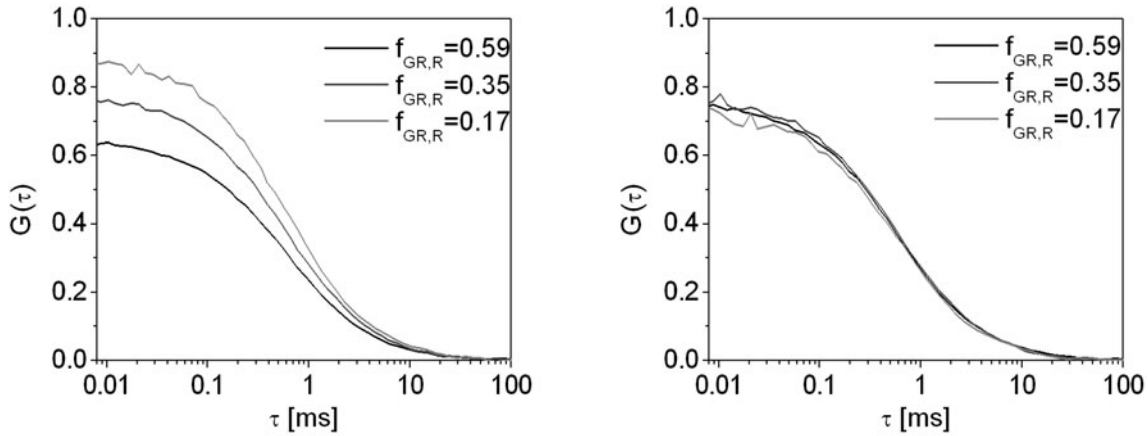


Abbildung 4.9: links: FCCS mit FRET ohne PIE bei Veränderung von $f_{GR,R}$. Die Amplitude der CCF, normiert auf die Amplitude der ACF von Atto647, hängt nicht nur von der Konzentration der grünen Markierungseffizienz ab, sondern auch von der FRET-Effizienz. rechts: FCCS mit FRET mit PIE bei Veränderung von $f_{GR,R}$: Die Amplitude der CCF, normiert auf die Amplitude der ACF von Atto647, hängt nur von der grünen Markierungseffizienz ab und bleibt somit konstant.

4.2.4 Bestimmung der FRET-Effizienzen mit PIE-FCCS

Zur Bestimmung von FRET-Effizienzen mit PIE-FCCS nach Glg. 3.31 wurden Messungen an drei verschiedenen DNA-Strängen (DNA₁₀, DNA₁₅ und DNA₂₀) bei verschiedenen Markierungseffizienzen $f_{GR,G}$ und $f_{GR,R}$ durchgeführt (Abb. 4.10).

Der Vergleich mit den FRET-Effizienzen, die aus spFRET-Experimenten ermittelt wurden (Linien), zeigt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen diesen beiden Methoden. Allerdings werden in Abb. 4.10 auch die Grenzen der FRET-Bestimmung mit PIE-FCCS deutlich. Da die FRET-Effizienzen durch das Verhältnis der Molekularen Helligkeiten mit oder ohne Akzeptor berechnet werden, müssen beide Spezies in der Probe vorhanden sein. Befinden sich keine einfach grün markierten Spezies in der Lösung ($f_{GR,G} = 1$) werden $G_{GG \times RR} = G_{GX \times RR}$ und Glg. 3.31 sinnlos. Auch bei $f_{GR,R} \ll 1$ wird diese Methode sehr ungenau, da in diesem Bereich die direkte Anregung signifikant werden kann. FRET-Effizienzen zwischen 10 und 90 % können aber mit großer Genauigkeit bestimmt werden. In Tabelle 4.1 sind alle erhaltenen FRET-Effizienzen für die verschiedenen DNA und Markierungseffizienzen aufgelistet.

In dem verwendeten Aufbau war der Radius des roten Volumens $\omega_{r_R} = (1.09 - 1.15)\omega_{r_G}$,

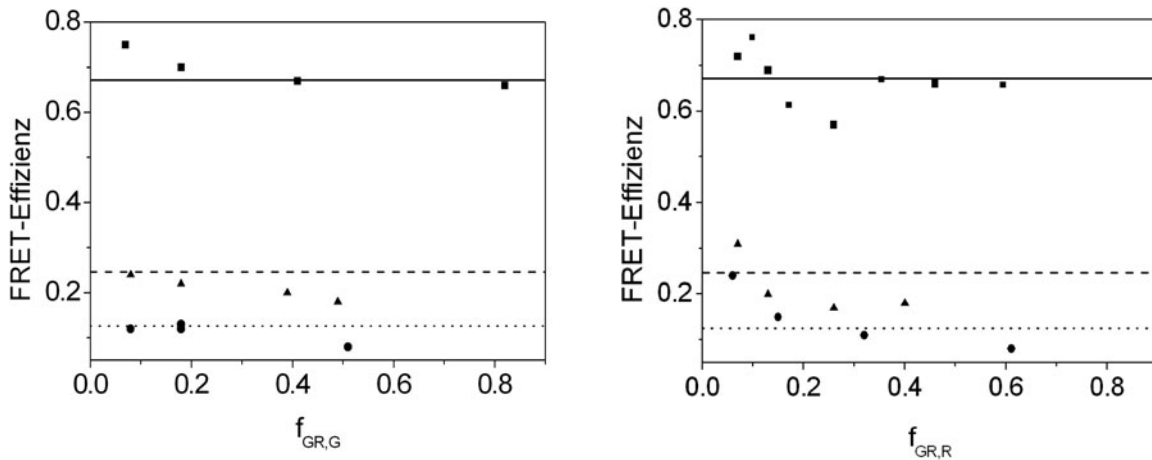


Abbildung 4.10: FRET-Effizienzen mit PIE-FCCS für DNA₁₀ (Quadrate), DNA₁₅ (Dreiecke) und DNA₂₀ (Kreise) bei verschiedenen Markierungseffizienzen $f_{GR,G}$ (rechts) und $f_{GR,R}$ (links). Die Linien signalisieren die für die jeweilige DNA mittels spFRET bestimmte FRET-Effizienz.

was zu einem Unterschied im Volumen von ca. 25 bis 50 % führt. Die Ergebnisse in dieser Arbeit wurden nicht auf die Unterschiede im Probenvolumen korrigiert.

	DNA ₁₀			DNA ₁₅			DNA ₂₀		
	f_E	$f_{G,GR}$	$f_{R,GR}$	f_E	$f_{G,GR}$	$f_{R,GR}$	f_E	$f_{G,GR}$	$f_{R,GR}$
Ursprüngliche Probe	0.66	0.82	0.46	0.18	0.49	0.40	0.08	0.51	0.61
Verdünnung mit DNA ^D	0.67	0.41	0.40	0.20	0.39	0.40	0.13	0.18	0.60
	0.70	0.18	0.39	0.22	0.18	0.35	0.12	0.18	0.61
	0.75	0.07	0.35	0.24	0.08	0.36	0.12	0.08	0.59
Verdünnung mit DNA ^A	0.57	0.74	0.26	0.17	0.49	0.40	0.11	0.49	0.32
	0.69	0.83	0.13	0.20	0.52	0.26	0.15	0.49	0.15
	0.72	0.75	0.07	0.31	0.49	0.13	0.24	0.48	0.06
spFRET	0.67			0.25			0.13		

Tabelle 4.1: FRET-Effizienzen bei verschiedenen Verdünnungen mit DNA_D und DNA_A

PIE-FCCS zur Bestimmung von FRET-Effizienzen hat den Vorteil, dass FCCS im Gegensatz zu den spFRET-Messungen mit bis zu zehntausendfach höheren Konzentrationen durchgeführt werden kann und somit eine attraktive Alternative zu Einzelmolekül-FRET-Messungen bietet. Manche Dynamiken können aufgrund ihrer geringen Affinität beispielsweise nicht auf einzelmolekularer Ebene untersucht werden. Gerade bei *in vivo*-Anwendungen in der Zelle ist es praktisch unmöglich, Markierungseffizienzen zu bestimmen oder die Konzentrationen so genau einzustellen, dass spFRET-Messungen möglich sind. Selbst schnelle Dynamiken könnten mit dieser Methode untersucht werden, da sich eine Änderung der FRET-Effizienz während des Aufenthalts im Volumen in der CCF $G_{GG \times RR}$ ähnlich wie ein Triplet-Zustand zeigen sollte.

4.3 Laser Scanning Microscopy (LSM) mit PIE

Bei abbildenden Methoden wie LSM oder Weitfeld-Mikroskopie findet PIE ebenfalls nützliche Anwendungen: Zum Einen können das spektrale Übersprechen herausgefiltert und Autofluoreszenz von Zellen erkannt werden, zum Anderen können ultrasensitive Koll-lokalisationsmessungen durchgeführt werden.

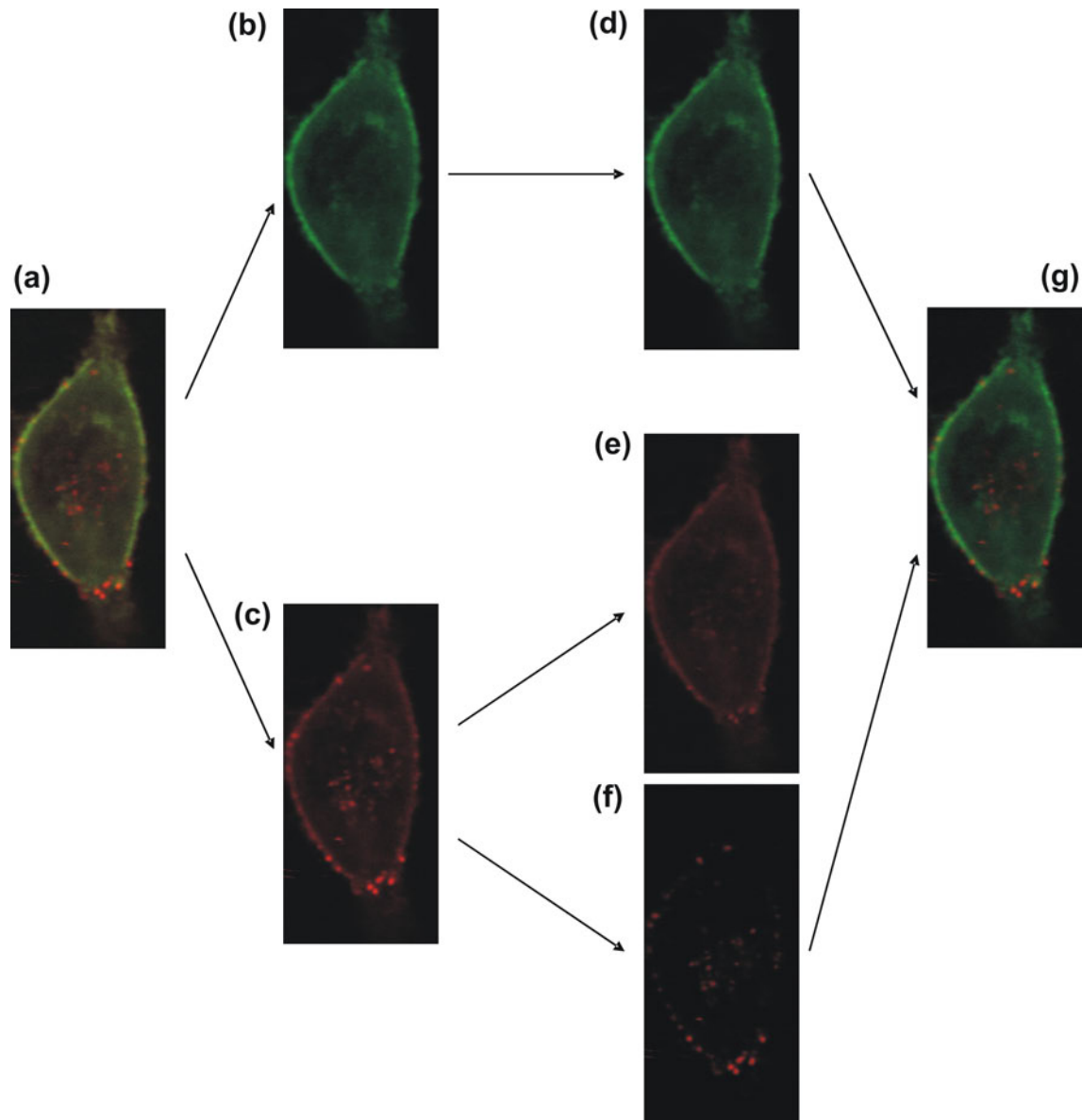


Abbildung 4.11: Bild einer mit DsRed markierten HeLa-Zelle, die mit Cy5-markierten Polyplexen transfiziert wurde: (a) Überlagerung der Abbildung aller Photonen aus dem roten und grünen Detektionskanal. Die Abbildung kann in den grünen Detektionskanal (b) und den roten Detektionskanal (c) aufgespalten werden. Mittels PIE können diese Bilder wiederum in grüne Detektion nach grüner Anregung (d), in rote Detektion nach grüner Anregung (e) und in rote Detektion nach roter Anregung (f) aufgeteilt werden. Die Überlagerung von (d) und (f) führt zur Abbildung (g), die gegenüber (a) im Kontrast aufgrund des fehlenden Übersprechens deutlich verbessert ist.

Die Erhöhung des Kontrastes durch Eliminierung des spektralen Übersprechens konnte anhand von HeLa-Zellen, die mit Polyplexen transfiziert wurden, gezeigt werden. Die Aktinfilamente der HeLa-Zellen waren mit DsRed markiert und konnten somit im grünen Detektionskanal detektiert werden. Die Plasmid-DNA in den Polyplexen war mit dem rot fluoreszierenden Cy5 markiert. Abbildungen der Zellen wurden erhalten, indem die Probe mit Hilfe des Piezoscanners rasternd über das konfokale Messvolumen bewegt wurde. Wie in Abb. 4.11 dargestellt, ist der Kontrast des ursprünglichen Bildes (a) sehr schlecht, da im roten Detektionskanal die Zelle aufgrund von spektralem Übersprechen deutlich zu erkennen ist (c). Dieses Bild kann aber aufgrund von PIE in zwei Bilder zerlegt werden: eines nach der grünen Anregung (e), bei dem nur die Zelle zu erkennen ist, und eines nach der roten Anregung (f), bei dem die Polyplexe deutlich zu erkennen sind. Da es kein spektrales Übersprechen vom roten Farbstoff in den grünen Detektionskanal gibt, ändert sich für den grünen Detektionskanal nichts (d). Überlagerung der Bilder grüne Detektion nach grüner Anregung (d) und roter Detektion nach roter Anregung (f) führt zur Abbildung (g), die im Gegensatz zur ursprünglichen Abbildung (a) deutlich kontrastreicher ist.

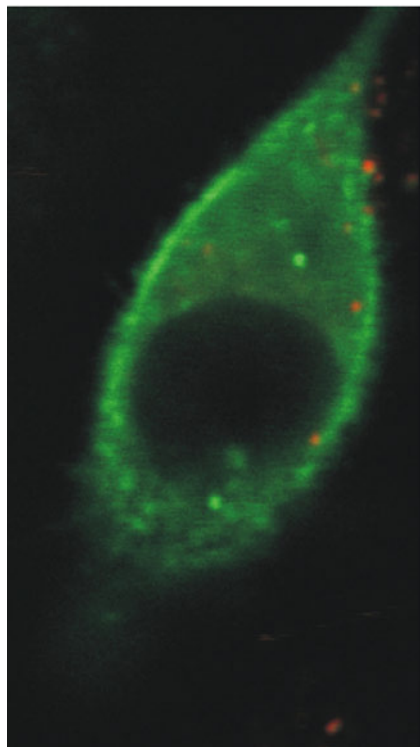


Abbildung 4.12: Abbildung einer HeLa-Zelle, deren Aktinfilamente mit DsRed transfiziert wurden und die mit Cy5-markierten Polyplexen infiziert wurde. Die Abbildung wurde mit einem einzigen Detektor aufgenommen, die Fluoreszenz wurde aufgrund ihrer Anregungsquelle dem grünen (DsRed) bzw. dem roten (Cy5) Farbstoff zugeordnet.

Die zweite oben erwähnte Möglichkeit zur Anwendung von PIE bei abbildenden Metho-

den ist die Datenaufnahme mit nur einem Detektor für hochauflösende Kollokalisationsmessungen, indem - ähnlich wie bei der FCCS mit einem Detektor - die beiden Farben nur aufgrund ihrer Anregungsquelle unterschieden werden. Auch diese Anwendung konnte am Beispiel der Ds-Red markierten HeLa-Zellen, die mit Cy5-markierten Polyplexen transfiziert wurden, gezeigt werden. Für Abb 4.12 wurde die Fluoreszenz nach der grünen Anregung dem grünen Farbstoff (DsRed) zugeordnet, die Fluoreszenz nach der roten Anregung dem roten Farbstoff (Cy5). Die direkte Anregung des roten Farbstoffs nach der grünen Anregung muss auch hier als vernachlässigbar klein angenommen werden. Dadurch dass hierbei beide Farben mit der identischen Optik auf den Detektor abgebildet werden, können sonst notwendige Transformationen beim Überlagern der beiden Bilder vermieden werden.

PIE wurde inzwischen auch für die Weitfeld-Mikroskopie eingeführt [56]. Bei dieser Technik wird mit einem Laser eine Fläche von ca. $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ausgeleuchtet und mit einer CCD-Kamera die Fluoreszenz aufgenommen. Dadurch können Filme mit Bildfrequenzen von 10 Bildern pro s aufgenommen werden, allerdings unter Verlust der Tiefenschärfe. Die Repetitionsraten der Laserpulse müssen hierbei nicht im Bereich von MHz liegen, sondern können im Millisekunden-Bereich sein. Daher reicht es aus, die alternierende Anregung über Blenden zu betreiben. Vor allem Autofluoreszenz der Zelle kann hierdurch von dem eigentlichen Signal unterschieden werden.

4.4 *Time-Gated-FCS*

Die gepulste Anregung kann auch bei nur einfarbigen Messungen Vorteile haben. Hier wird die Lebensdauerinformation dafür verwendet, dass Photonen innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls t_G nach der Anregung unterdrückt werden. Diese Methode kann, wie Lamb et. al zeigen konnten, dafür verwendet werden, Hintergrund- und Streulicht zu unterdrücken, Reaktionskinetiken und Heterogenitäten in der Lebensdauer der markierten Biomoleküle zu untersuchen [57]. In der ursprünglichen Arbeit von Lamb et. al wurden die Photonen durch ein Hardware-Gate unterdrückt. Hier soll nun am Beispiel der Unterdrückung von fluoreszentelem Hintergrund gezeigt werden, dass diese Methode bei der Verwendung einer TCSPC-Karte leicht mit Software durchzuführen ist.

Die Lebensdauer eines Farbstoffes nimmt nach der Anregung gewöhnlich in einem monoexponentiellen Verlauf ab (s. Abschnitt 2.1). Streulicht von Laser oder Ramanstreuung und Hintergrundlicht hat meist eine deutlich kürzere Lebensdauer als die Fluoreszenzfarbstoffe, es erreicht beinahe simultan mit dem Anregungspuls den Detektor. Wenn also die Photonen, die direkt nach dem Anregungspuls detektiert werden, nicht für die Korrelationsanalyse verwendet werden, kann das Streulicht eliminiert werden.

Zur experimentellen Bestätigung wurde hier eine Lösung aus Atto488 und ANS (1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid) und zum Vergleich eine Lösung mit nur Atto488 mit

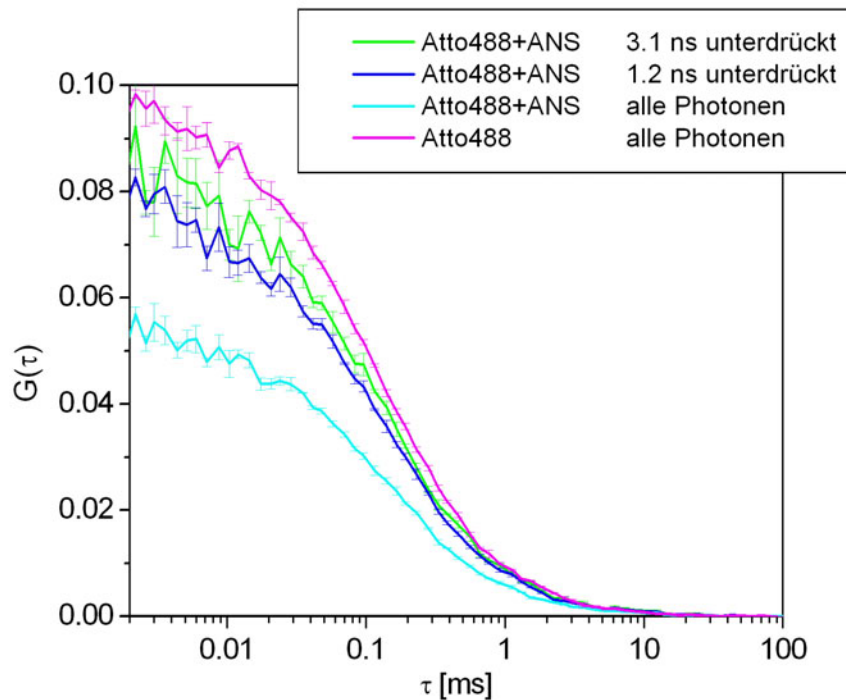


Abbildung 4.13: Autokorrelationsanalyse einer Lösung aus Atto488 und ANS (türkis) und einer Lösung der gleichen Konzentration Atto488 (rechts). Durch Unterdrückung der Photonen, die in den ersten 1.2 ns bzw. 3.1 ns nach der Anregung detektiert werden, steigt die Amplitude der Mischung aus Atto488 und ANS deutlich an (blau und grün).

der gleichen Konzentration verwendet. Atto488 hat eine Lebensdauer von 3.2 ns und ANS in wässriger Lösung eine Lebensdauer von weniger als 100 ps. Bei letzterem ist also die Form und Breite des Laserpulses und nicht die Lebensdauer für die Ankunftszeit entscheidend. ANS ist in wässriger Lösung ein sehr schlechter Farbstoff, so dass er hier als künstlicher autofluoreszentes Hintergrundsignal eingesetzt wird. Mit beiden Lösungen wurde eine Autokorrelationsanalyse durchgeführt und wie in Abb. 4.13 zu sehen ist, ist die Amplitude der Mischung aus Atto488 und ANS (türkis) nur etwa halb so hoch wie die des reinen Farbstoffs (lila), obwohl die Konzentration von Atto488 identisch war. Werden allerdings die Photonen, die in den ersten 1.2 ns (blau) bzw. 3.1 ns (grün) nach der Anregung detektiert wurden, nicht in die Analyse einbezogen, steigt die Amplitude beinahe auf den Wert der Amplitude des reinen Farbstoffs Atto488. Die Amplitude erreicht trotz einer Unterdrückungszeit von 3.1 ns die Amplitude der reinen Atto488-Lösung nicht. Dies begründet sich vermutlich darin, dass der Laserpuls (PDL 808 Sepia mit LDH-P-C-470) vermutlich aufgrund der Faser, durch die er geleitet wird, schon eine relativ große Breite im Gegensatz zu der vom Hersteller angegebenen 63 ps hat. In Abb. 4.14 ist dies an dem Abfall der Fluoreszenzintensität von ANS zu erkennen, da der Abfall überwiegend durch die Breite des Lasers und nicht durch die äußerst kurze Lebensdauer

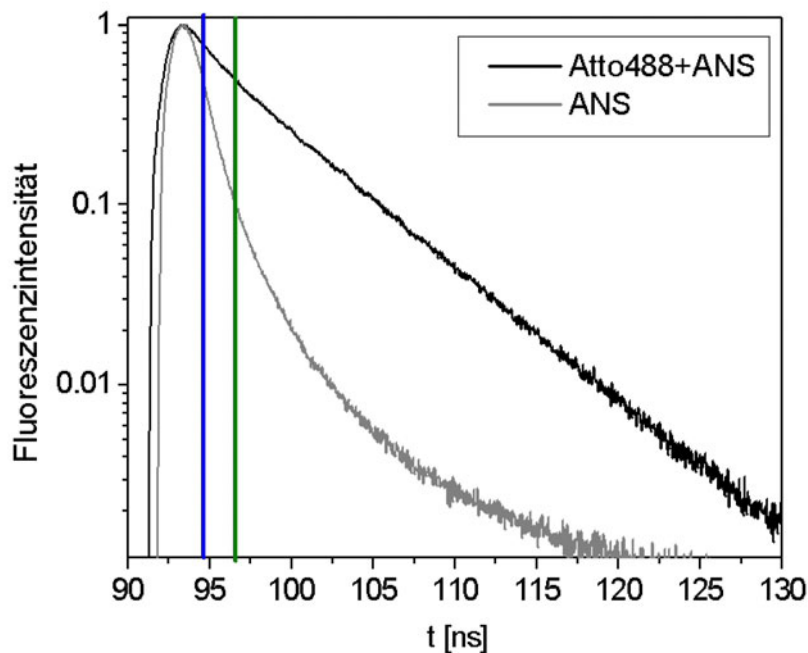


Abbildung 4.14: Die Lebensdauer von reinem ANS und dem Gemisch aus Atto488 und ANS. Die Zeiten, bis zu der die Photonen unterdrückt wurden, sind farblich entsprechend gekennzeichnet (1.2 ns blau, 3.1 ns grün).

von ANS geprägt ist. Daher ist es leider nicht möglich, die als künstliches Streulicht eingesetzte Fluoreszenz des ANS vollständig zu eliminieren. Wie an den ACF zu erkennen ist, nimmt auch das S/N-Verhältnis deutlich ab, da durch die lange Unterdrückungszeit von 3.2 ns eine nicht zu vernachlässigende Anzahl an Photonen nicht in die Analyse mit einbezogen wird. Diese Methode ist also nur mit deutlich kürzeren Laserpulsen sinnvoll einzusetzen.

4.5 Drei-Farben-FRET

FRET wird überwiegend zur Untersuchung von intermolekularen Wechselwirkungen und Konformationsänderungen im Bereich von 10 bis 100 Å verwendet [58]. Durch die Limitierung der zugänglichen Abstände auf höchstens 100 Å ist Zwei-Farben-FRET auf kleinere Moleküle beschränkt und es können des Weiteren nur relativ einfache Dynamiken untersucht werden, da nur ein einziger Abstand bestimmt werden kann. Durch einen dritten Farbstoff können Informationen über drei Abstände gewonnen werden, wodurch deutlich komplexere Moleküldynamiken beobachtet werden können. Die Erweiterung von FRET durch einen zusätzlichen Farbstoff wurde bereits in einigen Ensemble-Messungen [48, 58, 49], aber auch schon in ersten Einzelmolekülmessungen angewandt [50, 59]. Gera-

de bei drei Farben ist PIE besonders wichtig, da eine effiziente Markierung mit drei verschiedenen Farbstoffen äußerst schwierig zu realisieren ist und nur mit PIE die dreifarbig markierten Moleküle aussortiert werden können [59]. Das größte Potential liegt allerdings darin, dass mit PIE gleichzeitig, d.h. in einer einzigen Messung, drei Abstände bestimmt werden können. Bei geeigneter Anordnung der drei Farbstoffe können 2-dimensionale Informationen über die Struktur und Dynamik gewonnen werden.

4.5.1 Farbstoffwahl

Eine besondere Schwierigkeit bei Drei-Farben-FRET liegt bei der Farbstoffwahl. Die Farbstoffe müssen einerseits spektral so weit getrennt voneinander liegen, dass eine eindeutige spektrale Trennung von Anregung und Emission möglich ist. Andererseits sind die verwendeten Detektoren (APD) nur in einem eingeschränkten spektralen Bereich sensitiv, unterhalb von 500 nm nimmt deren Sensitivität schnell ab. Hinzu kommt weiterhin die Ramanstreuung der Laserstrahlung an Wassermolekülen, die rotverschoben zur Fluoreszenz ist, aber damit in den Fluoreszenzbereich des nächsten Farbstoffes fallen könnte. Die Entscheidung fiel hier für die Kombination Atto488, Atto565 und Atto700 mit den Anregungswellenlängen 470 nm, 568 nm und 690 nm. Die Förster-Radien liegen für diese Farbstoff-Paare in Wasser für Atto488/Atto565 bei 64 Å, für Atto488/Atto700 bei 44 Å und für Atto565/Atto700 bei 62 Å. Theoretisch werden so alle Kriterien bestmöglich erfüllt, wie sich allerdings später herausstellte, bereitete vor allem der blaue Farbstoff, Atto488, einige Schwierigkeiten. Aufgrund seines breiten Emissionsspektrums gab es etwa 30 % Übersprechen in den gelben Detektionskanal (s. Abb. 3.8). Ausserdem wurde Atto565 zu etwa 8 % von dem blauen Laser mit der Wellenlänge 470 nm angeregt. Deshalb ist die Bestimmung der FRET-Effizienz von Atto488 nach Atto565 entsprechend ungenau und die Verteilungen sind extrem breit. Des Weiteren lag die Farbstoffkonzentration des Atto488 etwa 5- bis 10-fach niedriger als die der Farbstoffe Atto565 und Atto700. Ob der Farbstoff nicht aktiv oder nicht gebunden war, konnte den FCS-Messungen nicht entnommen werden.

4.5.2 *Two-Step* FRET

Zur Justage und zur Überprüfung des Aufbaus wurden zwei DNA-Stränge (DNA_{3F1} und DNA_{3F2}) verwendet, die jeweils an verschiedenen Positionen mit den drei Farbstoffen markiert waren. Die Sequenzen und die Markierungspositionen sind Abb. 4.15 zu entnehmen.

Bei DNA_{3F1} wird kein FRET zwischen den Farbstoffen erwartet, da der Abstand zwischen Atto488 und Atto565 sowie zwischen Atto488 und Atto700 jeweils 41 bp, also etwa 140 Å, und der Abstand zwischen Atto565 und Atto700 82 bp, also etwa 280 Å, beträgt. In Abb. 4.16 sind die erhaltenen FRET-Histogramme dargestellt.

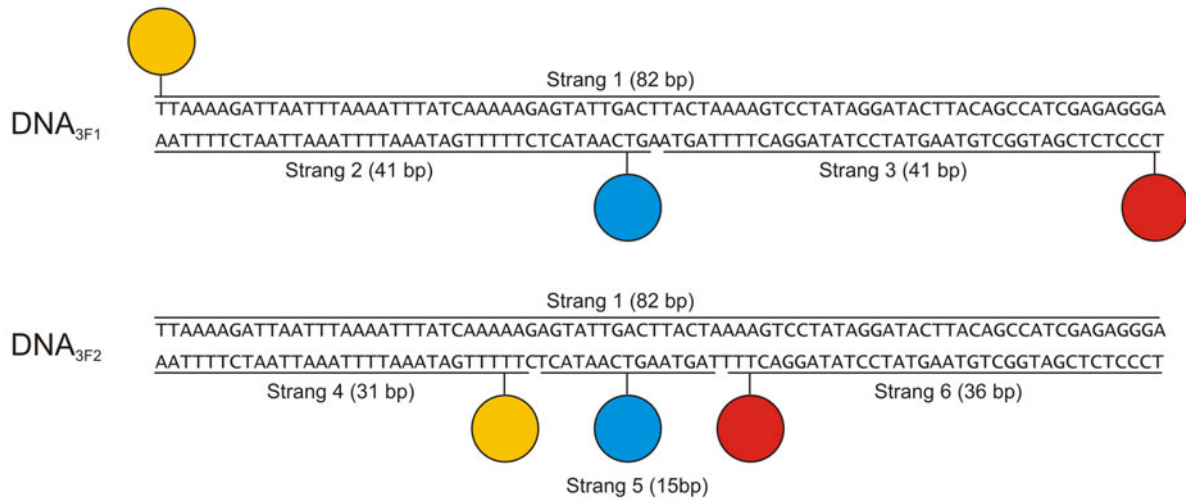


Abbildung 4.15: Aufbau und Sequenz der linearen DNA zur Justage des Drei-Farben-Aufbaus: Bei DNA_{3F1} wird kein FRET erwartet, da der Abstand zwischen den Farbstoffen jeweils 41 bzw. 82 bp beträgt, bei DNA_{3F2} beträgt der Abstand jeweils 10 bzw. 20 bp, weshalb es zu FRET kommen kann.

Durch Anpassung einer Gaußverteilung an die Histogramme, ergeben sich FRET-Effizienzen von $f_{E_{12}} = -6.7\%$ zwischen Atto488 und Atto565, $f_{E_{13}} = 0.5\%$ zwischen Atto488 und Atto700 und $f_{E_{23}} = 2.6\%$ zwischen Atto565 und Atto700. Für die Farbstoff-Paare Atto488/Atto700 und Atto565/Atto700 entsprechen die erhaltenen Werte exzellent den theoretisch erwarteten, nur für das Paar Atto488/Atto565 ergibt sich eine im Vergleich zur Genauigkeit der Zwei-Farben-Messungen relativ große Abweichung. Allerdings ist dies bei einem derartig hohen Übersprechen und großer direkter Anregung nicht verwunderlich. In den Breiten der Verteilungen zeigt sich diese Ungenauigkeit ebenfalls. Während die Breiten der Verteilungen von Atto488/Atto700 und Atto565/Atto700 beide bei 17% liegen, beträgt die von Atto488/Atto565 26%.

Ebenso wurden die FRET-Effizienzen der DNA_{3F2} bestimmt, deren Verteilungen in Abb. 4.17 zu sehen sind. Für den Abstand zwischen Atto488 und Atto565 ergibt die Anpassung einer Gaußverteilung einen Wert von $f_{E_{12}} = 62.4\%$, zwischen Atto488 und Atto700 einen Wert von $f_{E_{13}} = 47.3\%$ und zwischen Atto565 und Atto700 einen Wert von $f_{E_{23}} = 13.4\%$.

Diese Werte können mit den Förster-Radien, die für diese DNA wie in Abschnitt D.4 bestimmt wurden, in Abstände umgerechnet werden. Die zugehörigen Histogramme dieser Abstandsverteilungen sind in Abb. 4.18 dargestellt.

Aus den Histogrammen ergibt sich ein Wert von 55 Å für Atto488/Atto565, 40 Å für Atto488/Atto700 und 75 Å für Atto565/Atto700. Die Abstände zwischen den Farbstoffen betragen 10 bp für Atto488/Atto565 sowie für Atto488/Atto700, was in etwa einer Windung der DNA-Doppelhelix und 34 Å entspricht. Zwischen Atto565 und Atto700 liegen 20 bp also zwei Windungen oder 68 Å. Hier muss kein zylindrischen Modell der DNA

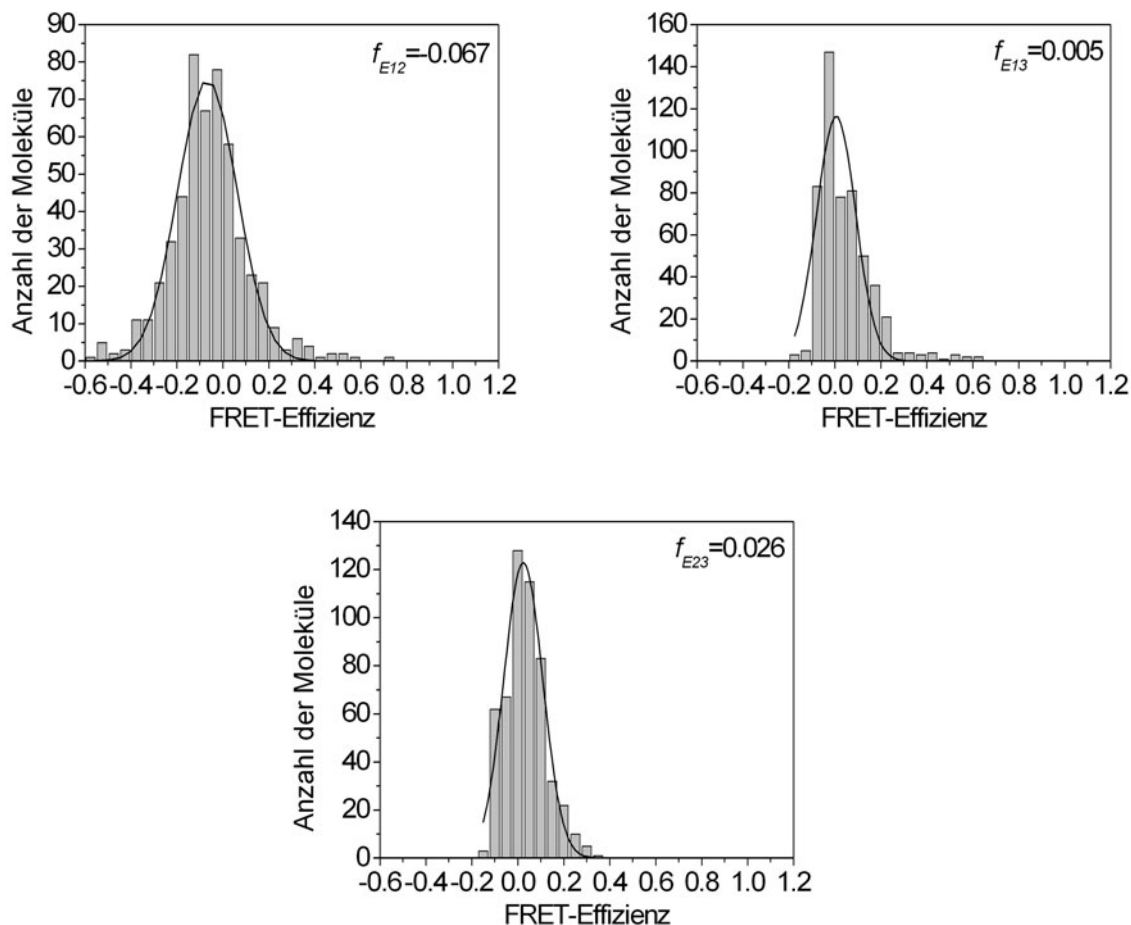


Abbildung 4.16: Histogramme der FRET-Effizienzen der DNA_{3F1}. Alle drei FRET-Effizienzen sind ungefähr Null, was aufgrund der Abstände zwischen den Farbstoffen (41 bzw. 82 bp) zu erwarten ist.

angewandt werden, da die Farbstoffe sich an derselben Seite der DNA-Helix befinden. Für Atto488/700 und Atto565/Atto700 stimmen die erhaltenen Werte sehr gut mit den theoretisch erwarteten überein. Die geringen Abweichungen sind darauf zurückzuführen, dass die Farbstoffe aufgrund des etwa 10 Å langen Verbindungsstücks zur DNA etwas Bewegungsfreiheit haben und des Weiteren bei der Berechnung der Förster-Radien angenommen wurde, dass beide Farbstoffe frei rotieren können ($\kappa^2 = 2/3$). Für das Paar Atto488/Atto565 weicht der Wert mit 55 Å allerdings signifikant von dem zu erwartenden ab, was wiederum auf die Ungenauigkeit aufgrund des Übersprechens und der direkten Anregung zurückzuführen ist.

Zur weiteren Überprüfung der Methode wurde die DNA_{3F2} in zwei weiteren Varianten mit jeweils nur zwei Farbstoffen hergestellt und die erhaltenen Verteilungen aus den Zwei-Farben-Messungen mit den Histogrammen aus den Drei-Farben-Messungen verglichen. Bei der Hybridisierung wurde dazu Strang 4 bzw. Strang 6 weggelassen (vgl. Abb. 4.15). Dadurch besitzt die DNA zwar einen langen einzelsträngigen Überhang, in dem hier

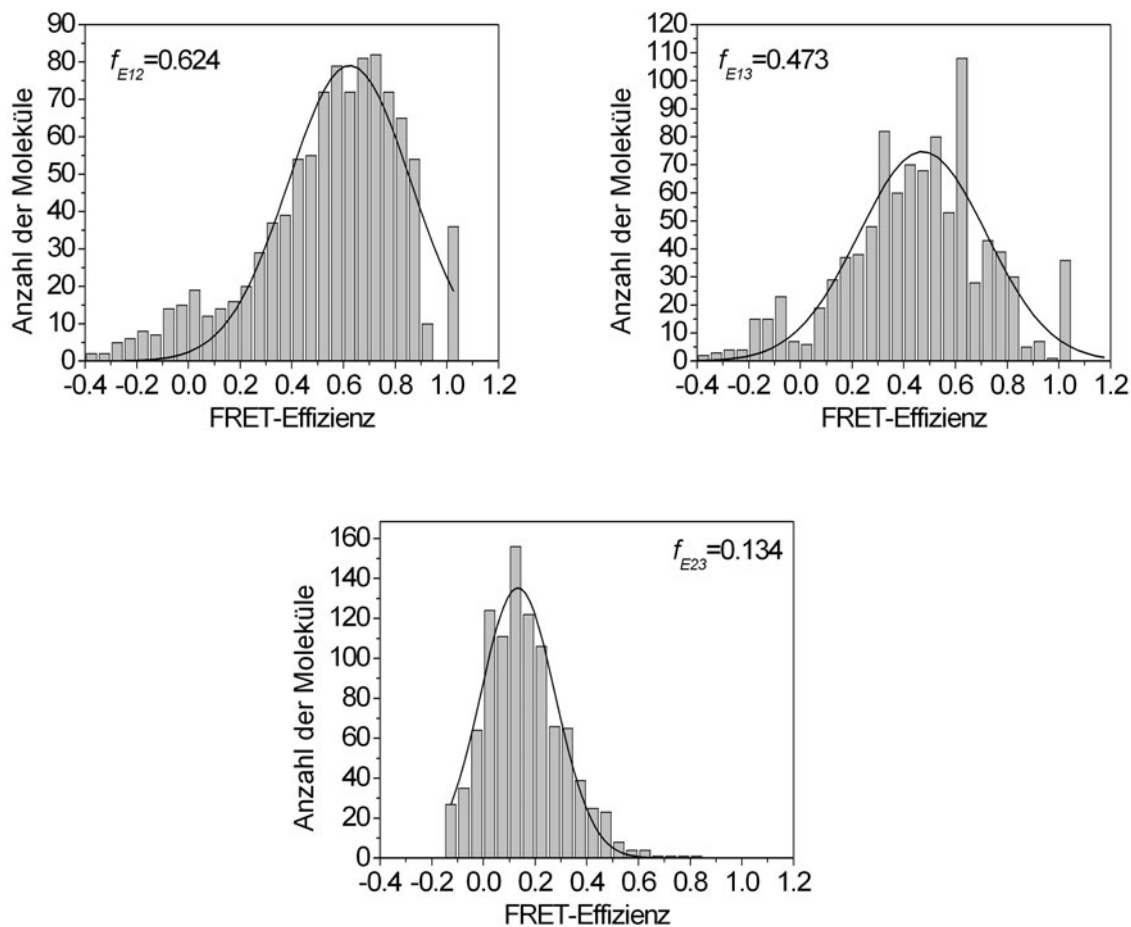


Abbildung 4.17: Histogramme der FRET-Effizienzen der DNA_{3F2} . Durch Anpassung einer Gaußverteilung ergeben sich daraus FRET-Effizienzen von $f_{E_{12}} = 62.4\%$ für Atto488/Atto565 (links oben), $f_{E_{13}} = 47.3\%$ für Atto488/Atto700 (rechts oben) und $f_{E_{23}} = 13.4\%$ für Atto565/Atto700 (unten).

interessanten Bereiche sollte sie allerdings als Doppelstrang vorliegen. Mit dieser DNA wurden jeweils Zwei-Farben-Messungen für Atto488/Atto565 sowie für Atto488/Atto700 durchgeführt, wobei die Ergebnisse in Abb. 4.19 zu sehen sind. Für das Farbstoffpaar Atto565/Atto700 ist der Vergleich zwischen Zwei- und Drei-Farben-Messung nicht nötig, da hier wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, immer nur ein Zwei-Farben-Prozess stattfindet.

Für Atto488/Atto565 ergibt sich daraus eine FRET-Effizienz von 64.8 % bzw. ein Abstand von 54 Å, was in exzellenter Übereinstimmung mit den Werten, die aus den Drei-Farben-Messungen erhalten wurden, ist. Dahingegen wird für Atto488/Atto700 ein Wert von 34.0 %, was einem Abstand von 44 Å entspricht, ermittelt. Dies weicht von den aus den Drei-Farben-Messungen erhaltenen Werten signifikant ab, wobei überraschender Weise die Werte der Drei-Farben-Experimente deutlich besser mit der Theorie übereinstimmen. Der Unterschied aus den Zwei- bzw. Drei-Farben-Experimenten könnte sich zum Einen daraus erklären, dass die DNA nur zum Teil zu einem Doppelstrang hy-

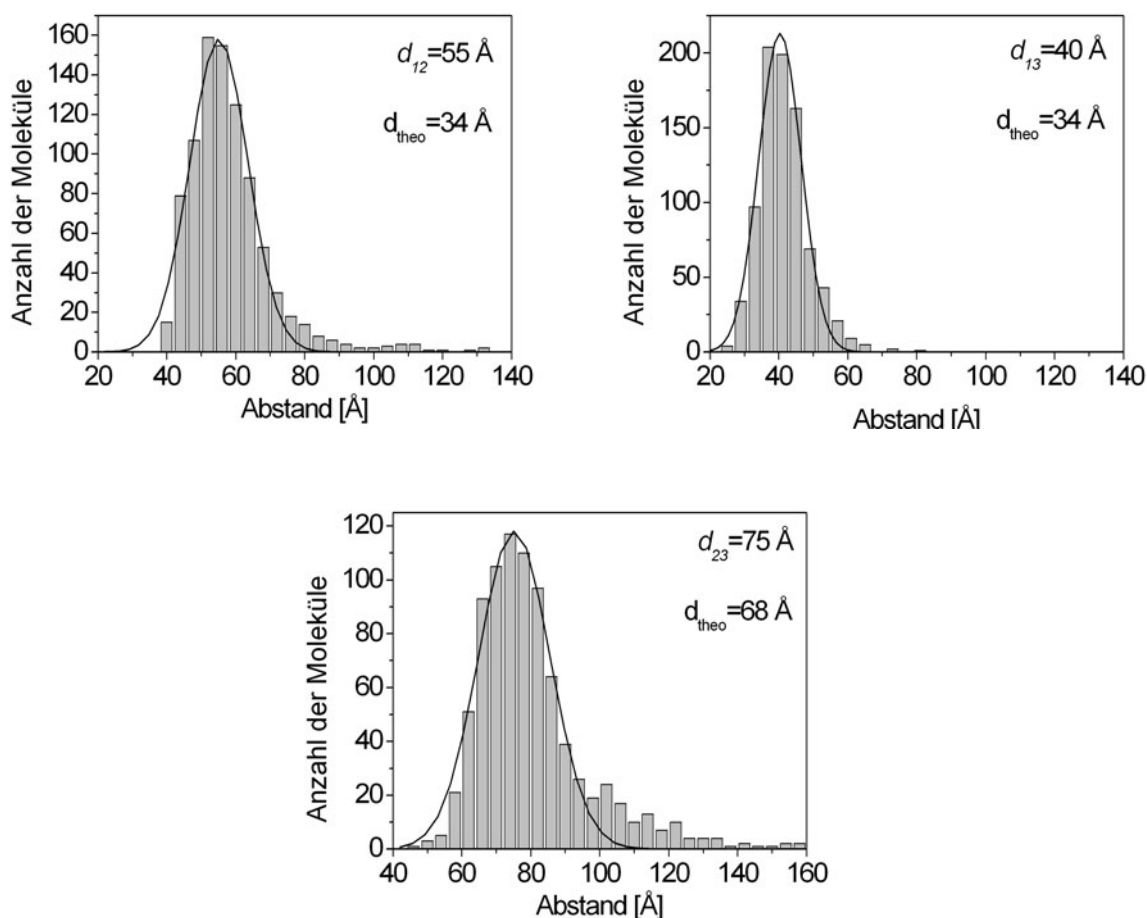


Abbildung 4.18: Histogramme der Abstände für die DNA₃F₂. Für Atto488/Atto700 (rechts oben) und Atto565/Atto700 (unten) werden Abstände von 40 Å und 75 Å gemessen, was mit dem erwarteten Wert sehr gut übereinstimmt, bei Atto488/Atto565 wurde ein Abstand von 55 Å bestimmt (links oben), was bei Berücksichtigung des hohen Übersprechens und der hohen direkten Anregung ebenfalls hinreichend genau bestimmt werden konnte.

bridisiert war, was möglicherweise einen Einfluss auf die Umgebung der Farbstoffe und damit auf den Förster-Radius hatte, zum Anderen daraus, dass der α -Faktor für dieses Farbstoff-Paar nur aus den α -Faktoren von Atto488/Atto565 und Atto565/Atto700 berechnet wurde.

Die Breiten der Gaußverteilungen sind für Atto488/Atto565 15 Å / 41 % bei der Zwei-Farben-Messung bzw. 17 Å / 47 % bei der Drei-Farben-Messung, für Atto488/Atto700 beträgt die Breite des Zwei-Farben-Experiments 9 Å / 30 % und des Drei-Farben-Experiments 12 Å / 49 %. Die Verteilungen sind wie erwartet sowohl für die Abstände als auch für die FRET-Effizienzen bei den Drei-Farben-Messungen breiter. Zur Berechnung der FRET-Effizienzen von Atto488/Atto565 sowie Atto488/Atto700 wird nach Glg. 3.8 die FRET-Effizienz von Atto565/Atto700 benötigt, bei Atto488 und Atto700 sogar zusätzlich nach Glg. 3.9 noch die FRET-Effizienz Atto488/Atto565. Dadurch wird der

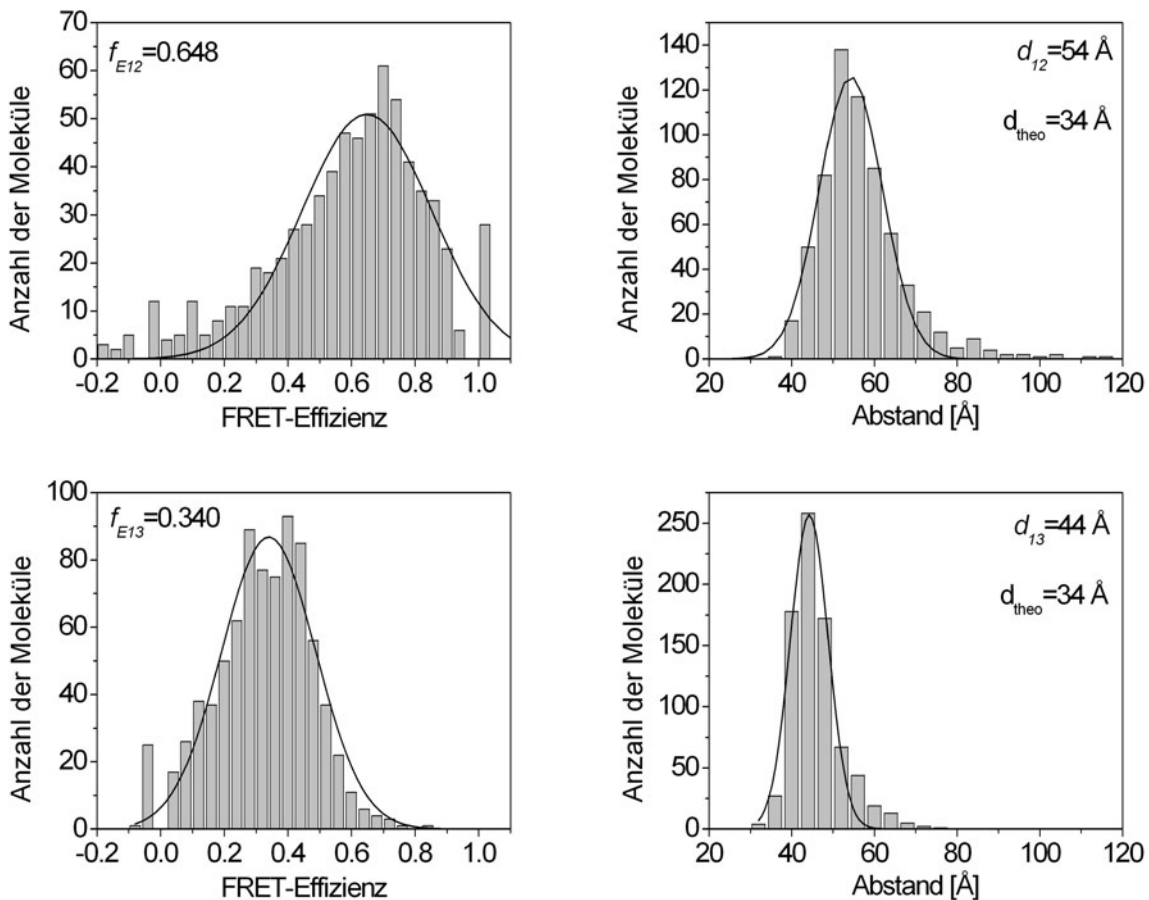


Abbildung 4.19: Zwei-Farben-Messungen für DNA_{3F2} , wobei bei der Hybridisierung Strang 6 (oben) bzw. Strang 4 (unten) weggelassen wurde. Die FRET-Effizienzen betragen 64.8 % für Atto488/Atto565 und 34.0 % für Atto488/Atto700. Umgerechnet in Abstände ergeben sich daraus 54 Å bzw. 44 Å.

Fehler der FRET-Effizienz f_{E23} in den beiden anderen fortgepflanzt, bei f_{E13} zusätzlich der von f_{E12} .

4.6 Signal/Rausch-Verhältnis mit PIE

Eine wichtige Frage ist, welche Auswirkungen die gepulste Anregung auf das S/N-Verhältnis hat. Es gibt zwei Ursachen, die sich negativ auf das S/N-Verhältnis auswirken könnten: das Weglassen einiger Photonen bei der Berechnung der FCCS und der limitierte Anregungszyklus, der u.a. zu Sättigungseffekten führen könnte.

Bei FCCS ohne spektrales Übersprechen werden die Photonen, die im roten Kanal nach der grünen Anregung detektiert werden (F_{RG}), bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Diese aussortierten Photonen sind zum einen auf das spektrale Übersprechen zurückzuführen und zum anderen auf die direkte Anregung des roten Farbstoffes durch den grünen Laser. Ersteres sollte zu keiner Verschlechterung des S/N-Verhältnisses führen, da die Photonen größten Teils durch Lichtstreuung und nicht durch Fluoreszenz entste-

hen. Letztere Photonen enthalten zwar relevante Informationen, da aber im Normalfall die direkte Anregung unter 5 % liegt, ändert sich dadurch das S/N-Verhältnis nicht entscheidend. Bei FCCS mit FRET werden alle detektierten Photonen berücksichtigt, so dass hier keine Verschlechterung des S/N-Verhältnisses durch die Verwendung von PIE zu erwarten ist.

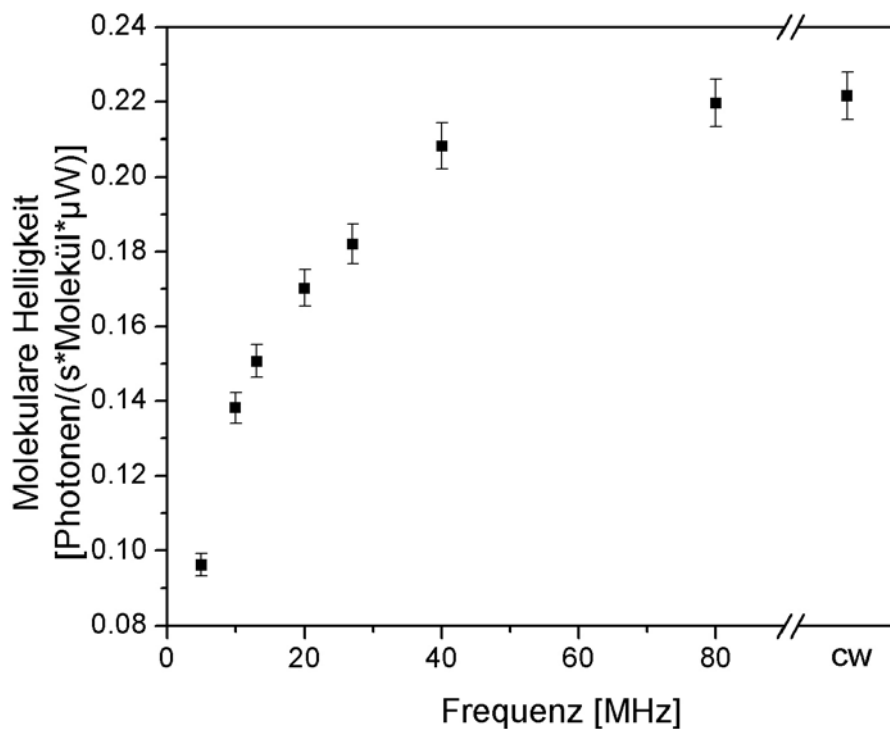


Abbildung 4.20: Molekulare Helligkeit in Abhängigkeit der Pulsfrequenz: aufgrund des limitierten Anregungszyklus nimmt die Molekulare Helligkeit mit sinkender Pulsfrequenz ab.

Einen größeren Einfluss auf das S/N-Verhältnisses hat die Molekulare Helligkeit ε aufgrund ihrer Abhängigkeit von der Pulsfrequenz. Die Molekulare Helligkeit nimmt mit sinkender Pulsfrequenz aufgrund des limitierten Anregungszyklusses ab. Die Abhängigkeit der Molekularen Helligkeit von der Pulsfrequenz von Atto647 ist in Abb. 4.20 zu sehen. Dafür wurde Atto647 bei verschiedenen Pulsfrequenzen mit dem Diodenlaser LDH-P-C-635B angeregt und die Molekulare Helligkeit mittels FCCS bestimmt. Anschließend wurde zum Vergleich ein cw-Laser (HeNe) mit $\lambda = 633$ nm in dieselbe Faser eingekoppelt, so dass sich weder Anregungs- noch Detektionsstrahlengang veränderten, und ebenfalls die Molekulare Helligkeit bestimmt. Die mittlere Anregungsintensität wurde konstant bei $50 \mu\text{W}$ gehalten. Zwischen einer Pulsfrequenz von 80 MHz und kontinuierlicher Anregung ist kein Unterschied messbar, bei einer Pulsfrequenz von 5 MHz müssen allerdings Verluste von bis zu 60 % in Kauf genommen werden.

Aufgrund des langsamen AOMs konnte hier nur bei Pulsfrequenzen von 10 MHz gearbeitet werden. Wenn allerdings ausschließlich ps oder kürzer gepulste Laser verwendet werden, ist einzig die Lebensdauer der Farbstoffe der limitierende Faktor. Bei 2 Farben könnte so eine Repetitionsrate von 27 MHz und bei drei Farben von 20 MHz erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit für die spFRET-Messungen wäre unregelmäßig zu pulsen, also z.B. nur nach jedem dritten grünen Puls einen roten Puls. Da rot nur als Kontrolle verwendet wird, ist hier die Molekulare Helligkeit nicht für das S/N-Verhältnis entscheidend.

Der Einfluss der Sättigung auf FCS-Messungen mit cw- und gepulster Anregung wurde von Enderlein et al. [60] beschrieben. Vor allem der Diffusionskoeffizient ist stark von der Anregungsleistung und der Pulsfrequenz abhängig. Bei den hier vorgestellten Messungen konnte allerdings kein signifikanter Einfluss der Pulsfrequenz auf die Diffusionszeit beobachtet werden.

4.7 Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte anhand einfacher Testsysteme gezeigt werden, wie die durch PIE zugängliche Zusatzinformation, von welcher Anregungsquelle ein Fluoreszenzphoton erzeugt wurde, effektiv in der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden kann.

Für die Bestimmung von FRET-Effizienzen mittels *Burst-Analysis* können die Moleküle sortiert werden, indem parallel Stöchiometrie und FRET-Effizienz bestimmt werden. Damit können in die Auswertung nur solche Moleküle, die mit einem aktiven Donor und Akzeptor markiert sind, einbezogen werden, was eine äußerst genaue Bestimmung der FRET-Effizienzen auch im Bereich kleine FRET-Effizienzen ermöglicht. Vor allem bei der Erweiterung auf drei spektral unterschiedliche Farbstoffe ist die Sortierung der Moleküle essentiell, da die Markierungseffizienz bei dreifach markierten Molekülen deutlich schlechter ist. Insbesondere müsste hier aber ein besserer blauer Farbstoff als Atto488 mit einem deutlich schmälere Emissionsspektrum, gefunden werden, wodurch Drei-Farben-FRET vor allem bei der Untersuchung von Konformationsänderungen bei der Bindung von Proteinen an DNA von großem Nutzen sein könnte.

In der abbildenden Mikroskopie können mit PIE Zwei-Farben-Experimente mit nur einem Detektor durchgeführt werden, was hochsensitive Kollokationsmessungen erlaubt, da alle Farben mit derselben Optik abgebildet werden. Bei der Verwendung eines Zwei-Kanal-Aufbaus kann das spektrale Übersprechen herausgeschnitten werden und somit der Kontrast der Bilder erhöht werden.

Bei FCCS kann durch PIE das spektrale Übersprechen herausgeschnitten werden, wodurch sich der sensitive Bereich erhöht. Diese FCCS-Experimente ohne Übersprechen können mit PIE auch mit nur einem Detektor durchgeführt werden. Des Weiteren kann

mit PIE eine quantitative Kreuzkorrelationsanalyse an Komplexen, bei denen zusätzlich FRET auftritt, durchgeführt werden. Darüberhinaus kann aus diesen Messungen gleichzeitig die FRET-Effizienz bestimmt werden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass im Gegensatz zu sonst üblichen Techniken keine Kalibrierung der Markierungseffizienz vorgenommen werden muss und sie nicht vom spektralen Überlapp beeinflusst wird.

Kapitel 5

Untersuchung der Chaperonin-gesteuerten Proteinfaltung

Viele Proteine können *in vivo* nur von Chaperoninen unterstützt effizient falten. Die genaue Funktionsweise der Chaperonin-unterstützten Proteinfaltung ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Hier wurden spFRET-Messungen an Chaperonin-Substrat-Komplexen durchgeführt, um die Heterogenität der einzelnen Zustände während des Faltungszyklusses besser charakterisieren zu können. Dazu wird zunächst eine Einführung in die Struktur von Proteinen und Proteinfaltung gegeben, bevor die Ziele dieses Teilprojekts präzisiert und die Ergebnisse diskutiert werden.

5.1 Proteine

Proteine gehören zu den häufigsten biologischen Makromolekülen und bilden den Hauptteil der Trockenmasse einer Zelle. Aufgrund ihrer enormen Bandbreite an verschiedenen Funktionen spielen sie in fast allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Proteine katalysieren als Enzyme chemische Reaktionen in biologischen Systemen oder fungieren als Transporter von kleinen Molekülen (z.B. Hämoglobin) und Ionen, sind in die Synthese der zellulären Energiequelle ATP involviert, steuern als Motorproteine (z.B. Myosin, Aktin) die Muskelkontraktion und sind für Infektionen, als Antikörper aber auch für die Immunabwehr verantwortlich [61].

Trotz ihrer funktionellen Vielfalt bestehen Proteine aus max. 20 vergleichbaren Grundbausteinen, den Aminosäuren, die kovalent zu linearen Polymeren verbunden sind. Diese α -Aminosäuren setzen sich aus einem Wasserstoffatom, einer Carboxyl-, einer Aminogruppe und einer an den α -Kohlenstoff gebundenen Seitenkette zusammen (s. Abb. 5.1). Die Seitenketten, die auch als Aminosäure-Reste bezeichnet werden, unterscheiden sich

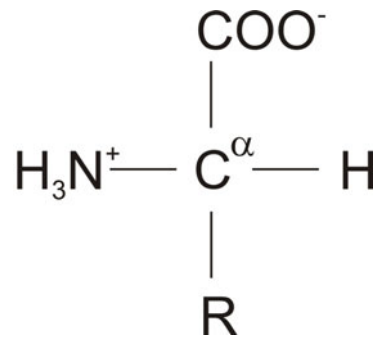


Abbildung 5.1: Aminosäuren bestehen aus einer Carboxyl-, einer Aminogruppe, einem Wasserstoffatom und einer variablen Seitenkette, die an den α -Kohlenstoff gebunden sind

dabei in Struktur, Größe, elektrischer Ladung, Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken und chemischer Reaktivität. Der Rest kann ein einzelnes Wasserstoffatom wie beim Glycin sein, aber auch aus insgesamt 18 Kohlenstoffen, Wasserstoffen und Stickstoffen wie beim Tryptophan bestehen.

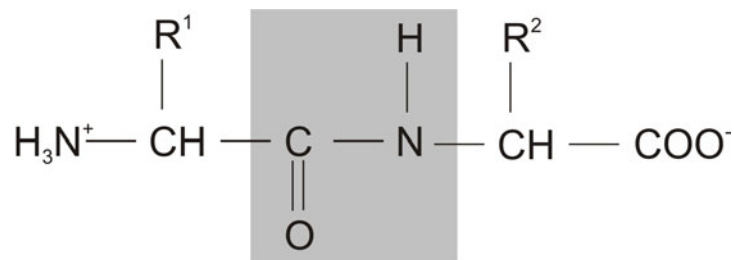


Abbildung 5.2: Unter Abspaltung eines Wassermoleküls können Aminosäuren sich über eine Peptidbindung zu Ketten verbinden. Die Peptidbindung (grau hinterlegt) ist eine starre, planare Einheit.

Zwei Aminosäuren können durch Abspaltung eines Wassermoleküls eine kovalente Bindung, die sogenannte Peptidbindung, ausbilden, die in Abb. 5.2 dargestellt ist. Die Peptidbindungen bilden das Rückgrat derart gebildeter Aminosäureketten, die allgemein Peptide genannt werden. Abhängig von der Anzahl verknüpfter Aminosäuren werden auch die Bezeichnungen Oligopeptide, Polypeptide oder Proteine verwendet. Konventiongemäß beginnt das Peptid mit der freien α -Aminogruppe (amino- oder N-terminaler Rest) und endet mit der freien α -Carboxylgruppe (carboxy- oder C-terminaler Rest). Aminosäuren haben ein Molekulargewicht - abhängig von ihrer Seitenkette - von ungefähr 100 D¹. Ein Protein, welches aus bis zu einigen Tausend Aminosäuren aufgebaut sein kann, kann also ein Molekulargewicht von bis zu 10⁶ Dalton aufweisen.

¹Ein Dalton (D) entspricht einer Atommasseneinheit.

5.1.1 Proteinstruktur

Die Proteinstruktur wird in vier Komplexitätsebenen beschrieben. Als Primärstruktur wird die lineare Sequenz der Aminosäurereste bezeichnet. Die Sekundärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung benachbarter Aminosäurereste, die teilweise in periodischen Strukturen wie α -Helix, β -Faltblatt oder β -Schleifen angeordnet sind. Die Tertiärstruktur bezieht sich auf die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturen und beschreibt damit die dreidimensionale Anordnung aller Aminosäuren des Proteins. Besteht ein Protein aus mehreren Untereinheiten (Domänen), wird die räumliche Anordnung dieser Domänen zueinander durch die Quartärstruktur beschrieben. Die native Struktur des Proteins ist bereits in der Primärstruktur festgelegt [62].

Proteinstrukturen können mit Röntgenstrukturanalyse und Kernmagnetresonanz (NMR) mit einer Auflösung von unter 3 Å bestimmt werden.

5.1.2 Proteinfaltung

Der Ablauf der Proteinsynthese in der Zelle kann im Allgemeinen durch folgendes Schema dargestellt werden:



DNA-Sequenzen, in deren Genen die Aminosäuresequenzen der Proteine kodiert sind, werden in eine Boten-RNA (*messenger*-RNA) umgeschrieben (Transkription). Diese Information wird dann in den Ribosomen zu einer Aminosäuresequenz übersetzt (Translation). Ein solches gerade exprimiertes (naszierendes) Protein muss sich während und nach der Synthese falten, um seine native Struktur zu erlangen [63]. Die treibende Kraft für diese Reaktion ist ein kleiner, jedoch signifikanter Unterschied der freien Enthalpie zwischen nativer und denaturierter Struktur.

Die Peptidbindung wie in Abb. 5.2 dargestellt ist eine starre planare Einheit, die beiden Einfachbindungen zwischen Stickstoff bzw. dem Carbonylkohlenstoff weisen jedoch große Rotationsfreiheit auf. Theoretisch wären also unzählige Konformationen möglich, aber nur einige wenige besitzen die biologische Funktion. Würde die Proteinfaltung durch Probieren verschiedener Konformationen ablaufen, würde z.B. ein Faltungsprozess eines Proteins aus 100 Aminosäuren länger als 10^{77} Jahre dauern, wenn jede Konformation in 100 fs ausprobiert würde (Levinthal Paradoxon).

Der komplexe Faltungsprozess eines Proteins ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt, zwei verschiedene Modelle werden hauptsächlich diskutiert. Ersteres geht davon aus, dass sich zunächst lokale Sekundärstrukturen bilden, die durch Diffusion und Kollision mit anderen Sekundärstrukturen in Tertiärstrukturen kollabieren. Das zweite Modell nimmt einen spontanen Kollaps an, der von den hydrophoben Wechselwirkungen der unpolaren Seitenketten ausgelöst wird. In diesem kollabierten Zustand (*molten globule*) existieren bereits große Anteile an Sekundärstrukturen und somit weit weniger Konfor-

mationsmöglichkeiten.

Thermodynamisch kann der Faltungsprozess durch einen Faltungstrichter der Freien Enthalpie beschrieben werden, in dem das Protein über verschiedene Pfade zum globalen Minimum der Freien Enthalpie, das den nativen Zustand widerspiegelt, gelangen kann. Teile der Proteinpopulation können dabei metastabile Zwischenzustände, sogenannte kinetische Fallen, bilden, die in Abb. 5.3 durch lokale Minima repräsentiert werden [64].

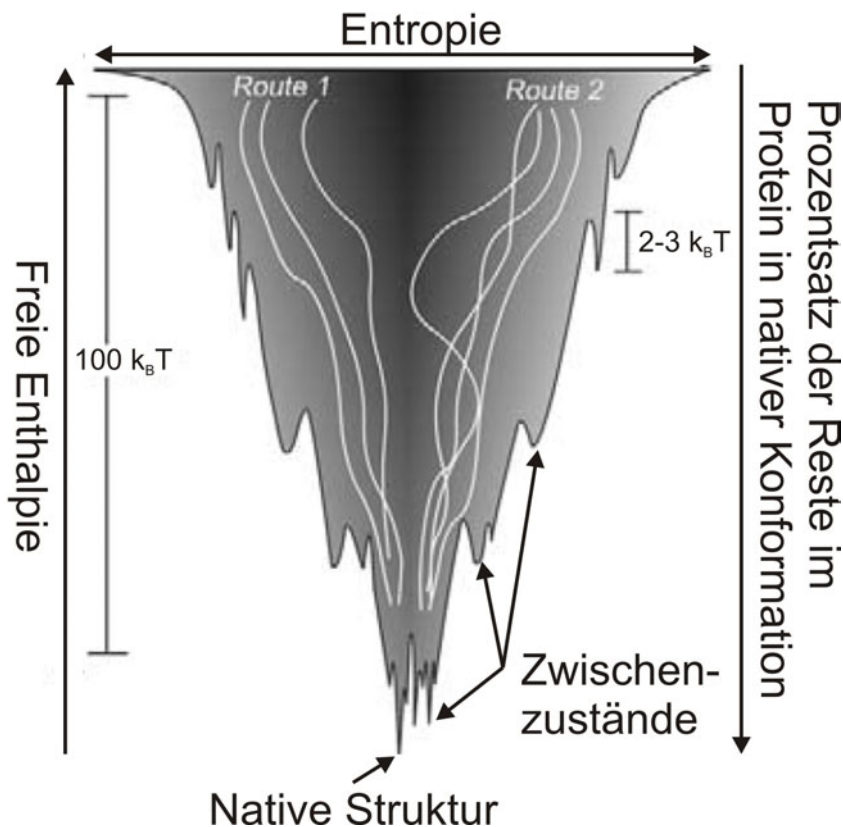


Abbildung 5.3: Die Energielandschaft der Proteinfaltung kann durch einen Faltungstrichter beschrieben werden. Zu Beginn liegen viele Konformationen vor, die Entropie ist also groß, im Laufe der Proteinfaltung nimmt die Entropie ab, da es immer weniger verschiedene Zustände gibt. Die Einbuchtungen spiegeln Faltungsintermediate wieder. (Abb. nach [64])

5.2 Molekulare Chaperone

Lediglich kleine Proteine (weniger als 100 Aminosäuren) mit einer Domäne können sich in der Regel *in vitro* schnell und effizient spontan falten. Größere Proteine mit mehreren Domänen bilden oft Zwischenzustände mit hoher Tendenz zur unspezifischen Aggregatbildung, so dass der Faltungsprozess äußerst ineffizient verläuft [65]. *In vitro* kann durch Optimierung der physikalisch-chemischen Parameter wie Konzentration, Tempe-

ratur oder Ionenstärke die Ausbeute erhöht werden, was unter physiologischen Bedingungen in der Zelle nicht möglich ist [66]. Bei den in der Zelle vorliegenden sehr hohen Makromolekülkonzentrationen (300 g/l) wäre ohne die Intervention spezifischer Faltungshelfer die Aggregation häufige Nebenreaktion. Diese Helferproteine werden molekulare Chaperone genannt, die auf unterschiedliche Art und Weise unproduktive Nebenreaktionen und Aggregation ungefalteter Polypeptidketten in der gefüllten, komplexen intrazellulären Umgebung verhindern. Allerdings falten sie in der Regel ihre Substrat-Proteine nicht aktiv und verändern auch nicht deren Faltungskinetik, sondern erhöhen nur die Effizienz des Faltungsprozesses [67].

Im Allgemeinen binden diese Chaperone an hydrophobe Reste oder unstrukturierte Peptidbindungs-Rückgrate, die im nativen Protein typischerweise eingeschlossen und somit nicht mehr zugänglich für andere reaktive Oberflächen sind.

Stressfaktoren wie erhöhte Temperatur aber auch Ethanol, Sauerstoffmangel oder Schwermetallionen führen oft zur Entfaltung und Aggregation von Proteinen [68]. Deswegen werden die molekularen Chaperone, die auch als Hitzeschockproteine (Hsp) bezeichnet werden, unter Stress in erhöhtem Maße exprimiert. Die Namensgebung und die Einteilung in Klassen erfolgt aufgrund ihres Molekulargewichts, beispielsweise ist Hsp60 ein Hitzeschockprotein mit etwa 60 kD schweren Untereinheiten. Die am besten untersuchten Klassen sind die Hsp60- und Hsp70-Familien.

Die Familie der Hsp70-Chaperone spielt zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der *de-novo*-Proteinfaltung und beim Transport von Proteinen durch Membranen [69]. Sie binden an hydrophobe Reste von gerade synthetisierten Polypeptidketten und denaturierten Proteinen, um sie in einem für die Faltung geeigneten Zustand zu bewahren oder um die Faltung zu blockieren, damit sie durch Membranen geschleust werden können. Die Hsp60, die auch Chaperonine genannt werden, bestehen aus zwei zylindrischen Ringen und bilden bis zu 1 MD schwere Komplexe. In den von diesen Doppelringen gebildeten Taschen können die Proteine, geschützt vor unerwünschten intermolekularen Wechselwirkungen im Cytosol, falten [65].

5.2.1 Das Chaperonin-System GroEL-GroES

Eines der bekanntesten und am besten untersuchten Chaperonine ist das in *Escherichia coli*² vorkommende Chaperonin-System GroEL/GroES, welches etwa 10-15 % der zellulären Proteine bei der Faltung unterstützt [67].

GroEL ist ein 800 kD schwerer Doppelring, wobei jeder dieser Ringe aus jeweils sieben identischen, 57 kD Untereinheiten zusammengesetzt ist (s. Abb 5.4). Die Untereinheiten bestehen aus drei Domänen: die äquatoriale Domäne ist für die ATP/ADP-Bindung und die stabile Verbindung zwischen den beiden heptameren Ringen verantwortlich, die

²*Escherichia coli* ist eine Bakterienzelle, die im menschlichen Verdauungstrakt zu finden ist.

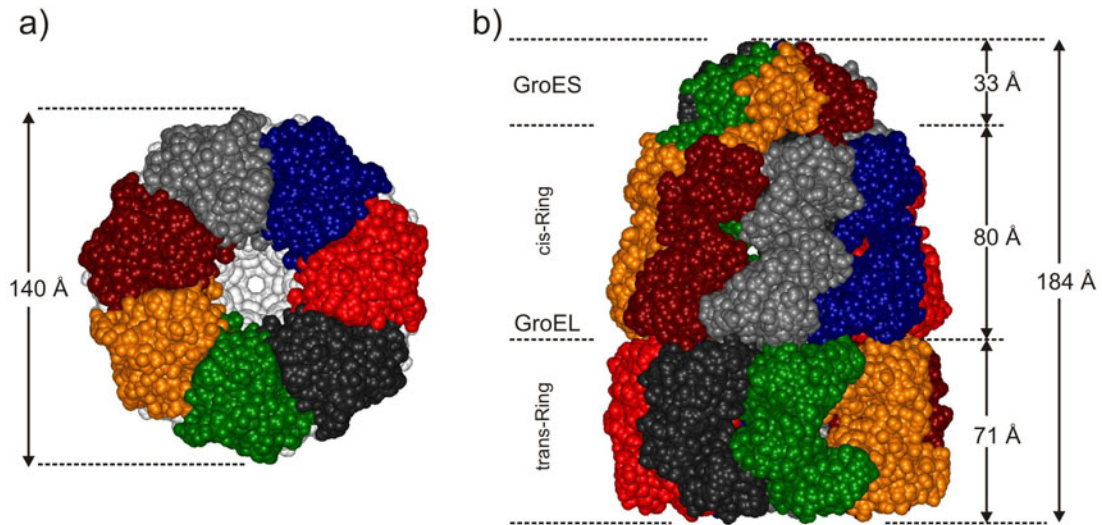


Abbildung 5.4: Die Struktur des GroEL/GroES Systems (PDB 1AON [70]): GroEL besteht aus zwei heptameren Ringen aus 57 kD Untereinheiten und wird bei der Proteinfaltung von einem ebenfalls heptameren Co-Chaperonin GroES unterstützt, welches wie ein Deckel an einen der Ringe, den sogenannten cis-Ring, des GroEL bindet.

apikale Domäne besitzt einige freiliegende hydrophobe Reste an der Öffnung der GroEL-Taschen, um das Substrat und das Co-Chaperonin GroES zu binden, die mittlere ist eine flexible, gelenkartige Domäne, die die äquatoriale und die apikale Domäne verbindet und große Konformationsänderungen ermöglicht. Das Co-Chaperonin GroES ist ebenfalls ein heptamerer Ring aus 10 kD Untereinheiten, der abhängig von der ATP-Hydrolyse an einen der beiden GroEL-Ringe wie ein Deckel bindet [71]. Die Seite, an die GroES gebunden ist, wird als cis-Ring bezeichnet, die andere als trans-Ring. Letztere zeigt eine hohe Affinität für ungefaltetes Substrat.

Der Reaktionspfad der GroEL/GroES gesteuerten Proteinfaltung ist in Abb. 5.5 dargestellt. GroEL ist in seiner Funktion asymmetrisch: An einen der heptameren Ringe (cis-Ring) sind 7 ADP und GroES gebunden, die andere Seite (trans-Ring) ist frei, so dass ein Substrat daran binden kann (Abb. 5.5a). Die Bindung von 7 ATP, je eines pro Untereinheit, an diesen trans-Ring führt zu strukturellen Neuordnungen, was einem anderen GroES ermöglicht, an diesen Ring zu binden. Dabei wird das Substrat von der neu gebildeten Tasche eingeschlossen. Gleichzeitig induziert die Bindung des ATP an den trans-Ring die Dissoziation der 7 ADP und des GroES vom ursprünglichen cis-Ring und die Freilassung eines möglicherweise in dieser Tasche eingeschlossenen Substratproteins. Da die cis-Seite die ist, an der GroES gebunden ist, sind nun cis- und trans-Ring im Vergleich zu Abb. 5.5a vertauscht (Abb. 5.5b). Die strukturelle Neuordnung wird durch die flexible mittlere Domäne ermöglicht, wodurch die Taschen ein etwa doppelt so großes Volumen erlangen und die hydrophoben Oberflächen innerhalb der GroEL-Tasche in hy-

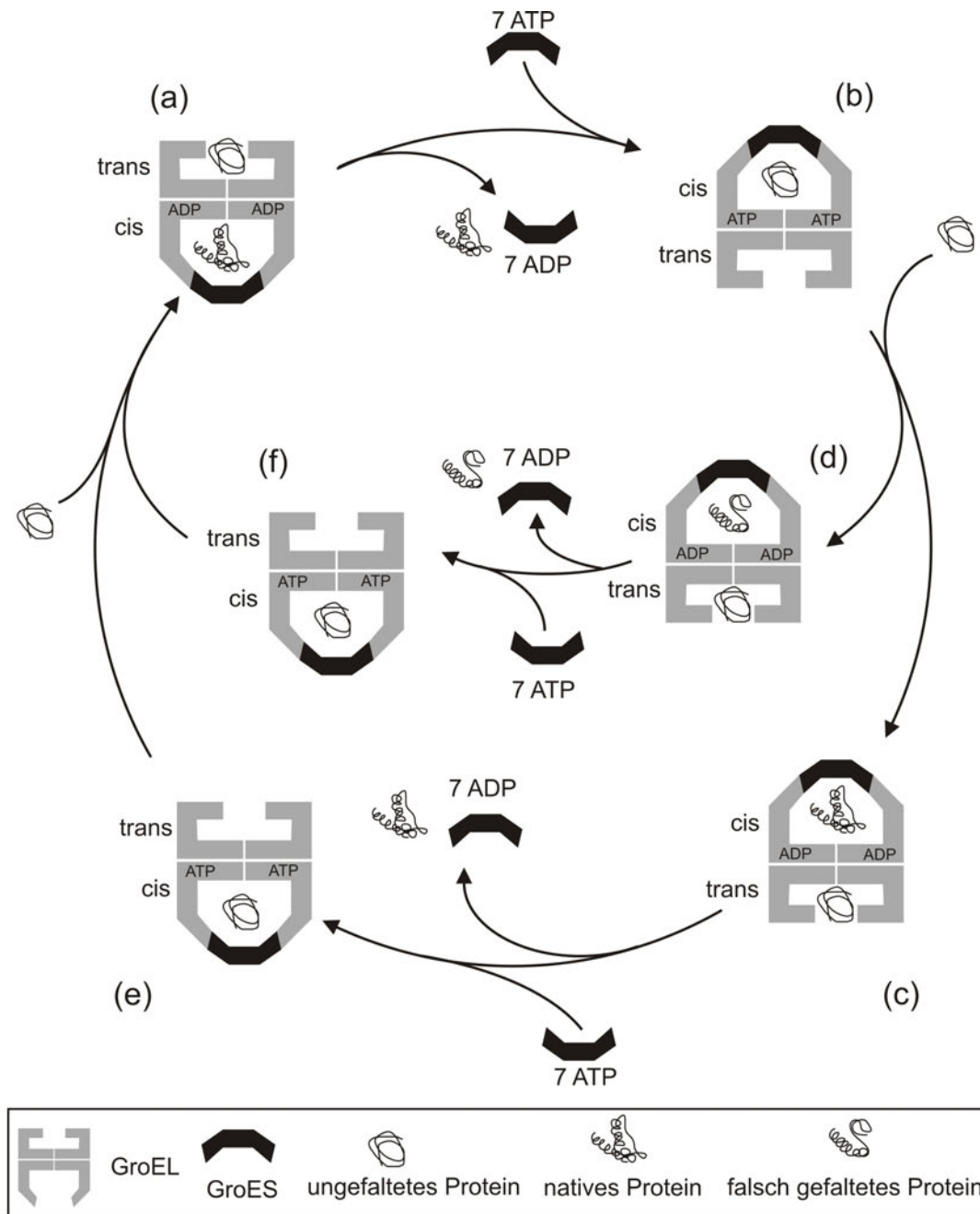


Abbildung 5.5: Vereinfachtes Schema des GroEL/GroES-Reaktionszyklusses (nach [65]): Zu Beginn sind am cis-Ring GroES und 7 ADP gebunden, in diesem Hohlraum kann sich ein vollständig gefaltetes Protein befinden. Der trans-Ring ist frei, um ein ungefaltetes Protein zu binden (a). An den trans-Ring binden anschließend GroES und 7 ATP, was die Dissoziation des GroES und der 7 ADP am vorherigen cis-Ring und die Freilassung des vollständig gefalteten Proteins auslöst (b). Nun kann das eingeschlossene Protein in etwa 10 s entweder vollständig falten (c) oder in einen Zwischenzustand übergehen (d) und wird durch erneute Bindung von 7 ATP und GroES an der trans-Seite freigesetzt (e/f). Das Faltungsintermediat kann erneut an einen trans-Ring des GroEL binden, bis es zu der nativen Form gelangt.

drophile umgewandelt werden. Das ungefaltete Protein kann nun in dem neu gebildeten cis-Hohlraum durch Hydrolyse von ATP falten (Abb. 5.5c/d). Auf der anderen Seite, jetzt ein trans-Ring, kann während des Faltungsprozesses wieder ein noch ungefaltetes oder nur teilweise gefaltetes Protein assoziieren, das darauffolgende Binden von ATP löst wiederum das Öffnen des cis-Rings durch Dissoziation der 7 ADP und des GroES und somit die Freisetzung des Substrats aus (Abb. 5.5e/f).

Für den Faltungsprozess stehen etwa 10s zur Verfügung, was durch die Dauer der ATP-Hydrolyse vorgegeben wird. Dieser Zyklus wird so lange wiederholt bis das Protein vollständig gefaltet ist. Proteine bis zu einem Molekulargewicht von etwa 60kD können so in den GroEL-Taschen falten. Der Faltungszyklus wird sowohl über das GroEL/Substrat-Verhältnis als auch durch die ATP-Bindung und -Hydrolyse allosterisch reguliert. Bei steigender ATP-Konzentration steigt auch die Affinität des GroEL für ATP und die für das Substrat sinkt [72].

In der Regel beschleunigen molekulare Chaperone die Proteinfaltung nicht, sondern erhöhen nur deren Ausbeute. Einige Chaperonine, wie GroEL können den Faltungsprozess allerdings auch beschleunigen, möglicherweise durch Ebenen der Energielandschaft beim Falten [65]. Eine weitere ungeklärte Frage ist, inwieweit GroEL nur als passiver Schutz vor Aggregation dient oder ob es aktiv in die Proteinfaltung eingreift, beispielsweise durch partielle Entfaltung des Substrats bei der Bindung an GroEL, um falsch gefaltete Zwischenzustände auf einen produktiven Faltungsweg zurückzuführen [73].

5.3 Ergebnisse

In diesem Projekt wurden die verschiedenen Zwischenstufen des GroEL-Faltungszyklusses, die in Abb. 5.6 dargestellt sind, anhand von Schnappschüssen mittels spFRET untersucht.

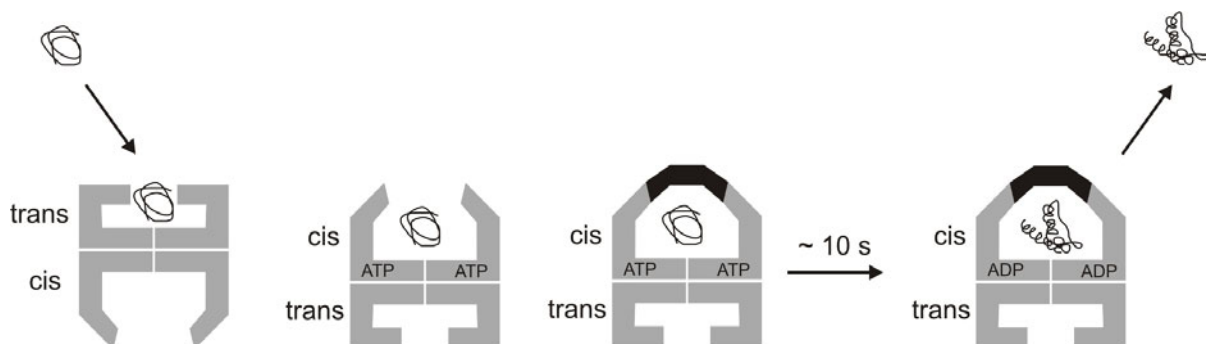


Abbildung 5.6: Schema der verschiedenen Zwischenstufen, die mit spFRET untersucht werden sollen: denaturiertes Protein, GroEL-Substrat-Komplex, GroEL-Substrat-Komplex mit ATP, GroEL-GroES-Substrat-Komplex mit ATP, natives Protein

Obwohl das GroEL/GroES-System zu den best untersuchten Chaperon-Systeme zählt,

ist bis heute nicht vollständig verstanden, wie GroEL im Detail die Proteinfaltung unterstützt. Dabei ist vor allem unverstanden, inwieweit GroEL aktiv in den Faltungszyklus eingreifen kann. Zum Beispiel ist nicht klar, welche Auswirkung die strukturelle Neuordnung der GroEL-Tasche auf die Konformation des Substrat-Proteins hat und wie diese Neuordnung die Beschleunigung des Faltungsprozesses beeinflusst, wie heterogen die Konformation des Chaperon-Substrat-Komplexes ist und welche Auswirkungen Heterogenitäten auf die anschließende Faltung haben. Bisher wurden an solchen Systemen noch keine Fluoreszenzspektroskopie-Messungen auf dem Einzelmolekülniveau durchgeführt, die aber zum besseren Verständnis der Chaperonin-gesteuerten Proteinfaltung beitragen könnten [72]. Die Proteinfaltung ist inhärent ein heterogener Prozess, da viele verschiedene Pfade existieren, die schließlich zum korrekt gefalteten Protein führen [74]. Daher haben sich spFRET-Messungen als ideale Methode zur Untersuchung von Proteinfaltung erwiesen. Durch *Burst Analysis* mit PIE lassen sich die Prozesse der Proteinfaltung mit hoher Genauigkeit analysieren ohne durch Immobilisierung induzierte Oberflächeneffekte in Kauf nehmen zu müssen [75].

5.3.1 Das Substrat: Maltose-Binding-Protein

Als Substratprotein wurde das *Maltose Binding Protein* (MBP) gewählt, welches ein *in vivo*-Substrat des GroEL ist. MBP ist Teil des Maltose/Maltodextrin-Transportsystems der *Escherichia coli*-Bakterien und für die Aufnahme und den effizienten Katabolismus des Maltodextrins verantwortlich [76]. MBP besteht aus 396 Aminosäuren und ist in zwei etwa gleich große Domänen aufgeteilt, die N- und die C-Domäne. Das Molekulargewicht beträgt 43 kD. Die Maltose/das Maltodextrin bindet in der Furche zwischen den beiden Domänen [77].

In der Gruppe von F.U. Hartl am Max-Planck-Institut für Biochemie wurde die Zweifach-Mutante DM-MBP (*double mutant*-MBP) hergestellt, bei der an Position 8 die Aminosäure Valin durch Glycin und an Position 283 Tyrosin durch Asparaginsäure ersetzt ist. Das DM-MBP faltet spontan mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} \approx 1900$ s, also etwa 75-mal langsamer als das Wildtyp-MBP, welches mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} \approx 25$ s faltet. Von GroEL unterstützt ist die Faltungsrate des DM-MBP allerdings im Vergleich zur spontanen Faltung etwa 13-fach beschleunigt ($t_{1/2} \approx 145$ s). Zusätzlich wurden in das DM-MBP an verschiedenen weiteren Positionen Cystein-Reste kloniert, welche mit der Maleimid-Gruppe der synthetischen Farbstoffe Atto532 und Atto647N reagieren³. Diese weiteren Mutationen und Markierungen mit Farbstoffen haben zu keinem signifikanten Unterschied in der Faltungsrate des DM-MBP geführt. Insgesamt standen 10 verschiedene Mutanten zur Verfügung, für die zunächst die spFRET-Verteilung des nativen und

³Im folgenden werden diese Mutanten des DM-MBP jeweils in Klammern mit den Positionen gekennzeichnet, an denen eine Aminosäure durch Cystein ersetzt wurde. DM-MBP(52C-298C) bedeutet also beispielsweise, dass sich die Markierungen an Positionen 52 und 298 der Mutante DM-MBP befinden.

des denaturierten Zustands bestimmt wurde. Im Folgenden wird hauptsächlich auf die beiden Mutanten DM-MBP(52C-298C) und DM-MBP(175C-298C) fokussiert.



Abbildung 5.7: Proteinstruktur des MBP mit Farbstoffmarkierung an Aminosäureresten 52C und 298C (links) und 175C und 298C (rechts) (PDB 1OMP [77] dargestellt mit PyMol [78])

In Abbildung 5.7 sind die zwei verschieden markierten Mutanten DM-MBP(52C-298C) und DM-MBP(175C-298C) abgebildet. Die jeweils markierten Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Die dazugehörigen spFRET-Verteilungen der nativen und denaturierten Proteine sind in Abb. 5.8 dargestellt.

Der Abstand zwischen den Markierungspositionen im Protein beträgt laut Kristallstruktur für DM-MBP(52C-298C) 33 Å, aus der spFRET-Messung ergibt sich ein Abstand von 35 Å. Für DM-MBP(175C-298C) beträgt der Abstand aus der Kristallstruktur 32 Å, der gemessene 34 Å. Diese Genauigkeit ist dabei überraschend, da gerade bei Proteinen Fluoreszenzlöschung oder Veränderungen der photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe auftreten können.

Die spFRET-Verteilungen der anderen 8 Markierungsmutanten sind im Anhang E dargestellt. Die gemessenen Abstände des nativen und des denaturierten Proteins sowie die Abstände im nativen Protein gemäß der Kristallstruktur sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Im Allgemeinen stimmen die mittels spFRET bestimmten Abstände sehr gut mit den Abständen aus der Kristallstruktur überein. Lediglich für DM-MBP(30C-298C) und DM-MBP(30C-312C) ist die Abweichung signifikant. Da beide Mutanten an Position 30 markiert sind, könnte es sein, dass das Protein in Lösung in diesem Bereich eine relativ hohe Mobilität aufweist.

Die an der denaturierten Struktur bestimmten Abstände sollen mit den Vorhersagen des *Freely Jointed Chain*-Modells (FJC) zur Beschreibung von Polymerketten verglichen werden. Bei diesem Modell wird angenommen, dass jeder Bindungsvektor vollständig unabhängig von jedem anderen Bindungsvektor der Kette ist. Die Konformation wird also als Zufallsbewegung beschrieben, bei der jeder Schritt unabhängig von dem vorhergehenden zufällig gesetzt wird [79]. Die Schrittlänge l entspricht dabei der Mono-

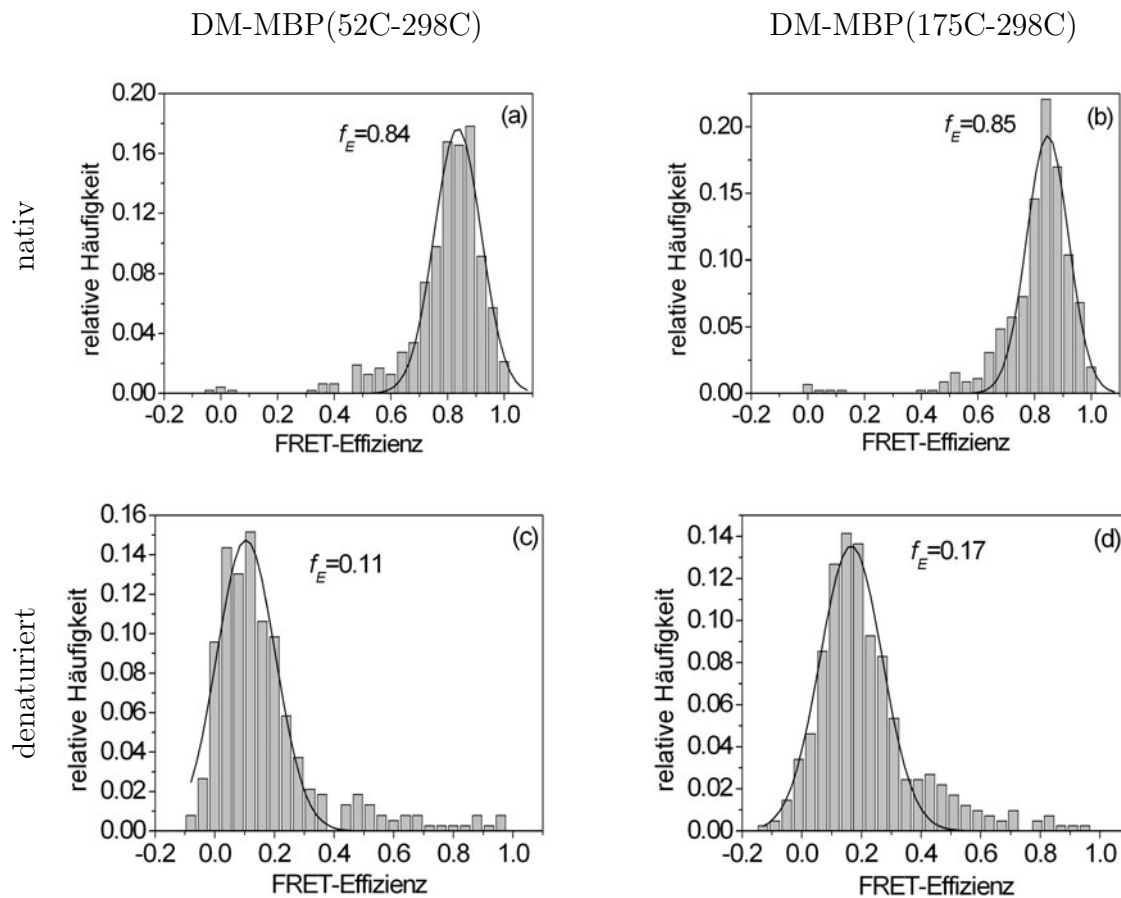


Abbildung 5.8: spFRET-Verteilungen von DM-MBP (52C-298C) und DM-MBP (175C-298C) nativ (a und b) und denaturiert (c und d)

DM-MBP	nativ _{Kristall} [Å]	nativ _{FRET} [Å]	denaturiert[Å]
175C-298C	32	34	60
134C-298C	37	38	57
73C-298C	32	36	65
52C-298C	33	35	65
30C-298C	27	39	60
52C-312C	39	39	73
30C-312C	30	40	70
345C-298C	36	33	47
30C-134C	61	61	58
30C-175C	40	42	52

Tabelle 5.1: Vergleich der mit spFRET gemessenen Abstände des nativen Proteins mit den Abständen aus der Kristallstruktur, zusätzlich sind die mit spFRET gemessenen Abstände im denaturierten Protein aufgelistet.

merlänge. Werden jegliche Wechselwirkungen zwischen den Monomeren vernachlässigt, so kann aufgrund der Selbstähnlichkeit des Polymers jedes Teilstücks zwischen zwei Mar-

kierungen des DM-MBP als eine FJC-Polymerkette angesehen werden. Die mit spFRET bestimmten mittleren End-zu-End-Abstände $\sqrt{\langle \overline{R}^2 \rangle}$ stehen nach dem FJC-Modell mit der Anzahl der dazwischenliegenden Aminosäuren n in folgendem Zusammenhang:

$$\langle \overline{R}^2 \rangle = n \cdot l^2. \quad (5.1)$$

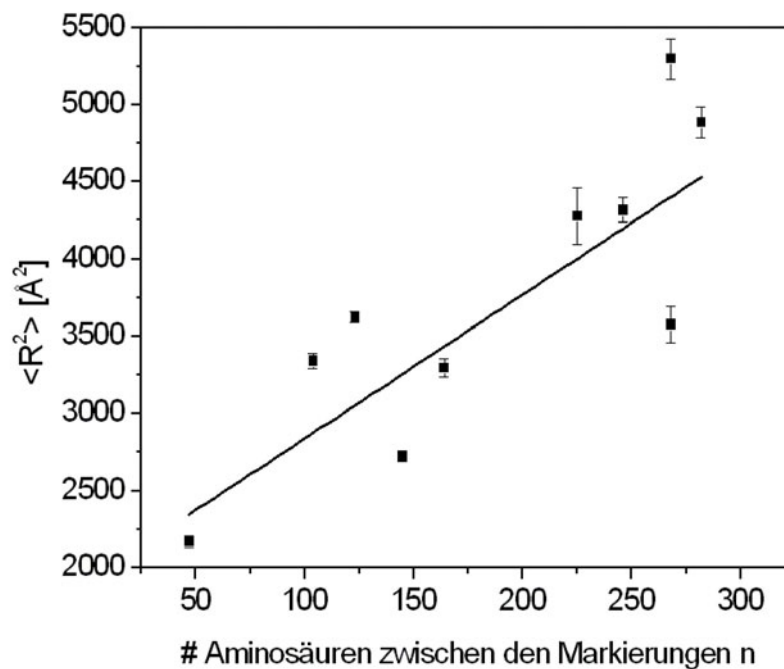


Abbildung 5.9: Die mit spFRET ermittelten End-zu-End-Abstände zwischen den verschiedenen Markierungspositionen der DM-MBP-Mutanten wurden gegen die Anzahl der Aminosäuren, die zwischen den Markierungen liegen, aufgetragen. Die Steigung entspricht nach dem FJC-Modell dem Quadrat der Konturlänge und konnte hier als $l=3.1 \pm 0.4 \text{ \AA}$ ermittelt werden.

In Abb. 5.9 wurden die mittleren End-zu-End-Abstände gegen die Anzahl der Aminosäuren zwischen den Markierungen n aufgetragen. Aus der Steigung kann nach Glg. 5.1 die Konturlänge eines einzelnen Aminosäurerests erhalten werden: $l=3.1 \pm 0.4 \text{ \AA}$. Bei Berücksichtigung der Einfachheit des FJC-Modells, ist dieser Wert in guter Übereinstimmung mit dem in der Literatur zu findenden Wert von $3.65 \pm 0.02 \text{ \AA}$ [80]. Letzterer wurde allerdings mittels AFM-basierter Kraftspektroskopie durch Strecken der Moleküle bestimmt, wodurch sich größere Werte ergeben könnten.

5.3.2 GroEL-Mutanten

Für die Untersuchungen wurden zunächst das Wildtyp-GroEL und eine Mutante, die nur aus einem der heptameren Ringe besteht (SR1), verwendet. SR1 kann nicht den oben

beschriebenen Zyklus durchlaufen, da die Dissoziation des GroES nicht ausgelöst werden kann. Ein Substrat kann zwar in SR1 falten, bleibt aber in der Tasche eingeschlossen [81]. Im Weiteren wurden die GroEL-Mutanten GroEL-D87K, die kein ATP binden kann, und GroEL-D398A verwendet, die keine ATP-Hydrolyse durchführen kann.

5.3.3 Heterogenität des GroEL gebundenen Substrats

Zunächst wurde die Heterogenität des GroEL/SR1 gebundenen Substrats untersucht. Dazu musste zuerst die Stabilität des Protein-Chaperonin-Komplexes überprüft werden, wozu FCS-Messungen an DM-MBP(52C-298C) alleine, an GroEL gebunden und an SR1 gebunden durchgeführt wurden. Ein stabiler Substrat-Chaperonin-Komplex sollte aufgrund des großen Molekulargewichts von GroEL (800kD) bzw. SR1 (400kD) einen deutlich kleineren Diffusionskoeffizienten als das Protein alleine besitzen.

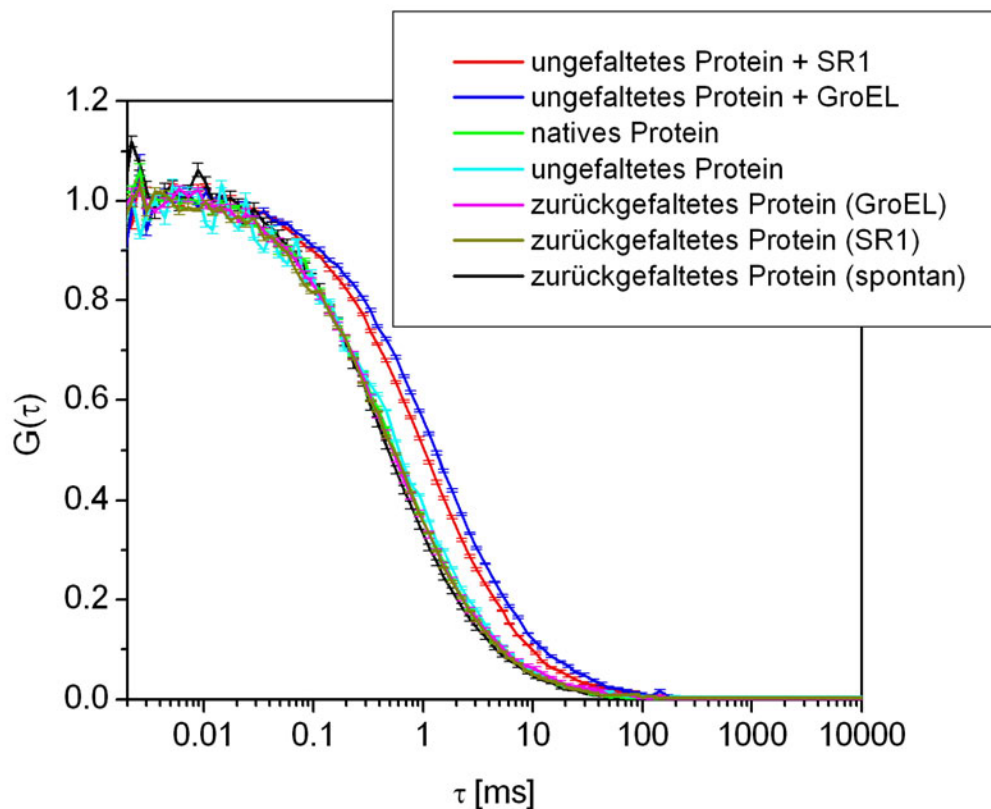


Abbildung 5.10: Autokorrelationsanalyse des Substrats DM-MBP(52C-298C) im nativen (grün) und ungefalteten (türkis) Zustand, an GroEL (blau) und an SR1 gebunden (rot) sowie spontan (schwarz), mit GroEL (magenta) und mit SR1 (olivgrün) zurückgefaltet. Der Diffusionskoeffizient des Proteins allein beträgt $D_{MBP} = 4.8 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, an SR1 gebunden $D_{MBP+SR1} = 2.6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ und an GroEL gebunden $D_{MBP+GroEL} = 2.0 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$

Wie Abb. 5.10 zu entnehmen ist, sind die Diffusionskoeffizienten des nativen Proteins (grün) und die der auf unterschiedliche Weisen zurückgefalteten Proteine gleich

($D_{nat} = 4.8 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), unabhängig davon, ob die Rückfaltung spontan (schwarz), in GroEL (magenta) oder in SR1 (olivgrün) stattgefunden hat. Der Diffusionskoeffizient des ungefalteten Proteins ist etwas niedriger ($D_{unf} = 4.4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), da der hydrodynamische Radius des ungefalteten Proteins größer ist als der der nativen Struktur. Der Diffusionskoeffizient des GroEL-MBP-Komplexes weicht im Gegensatz dazu deutlich ab und beträgt $D_{MBP+GroEL} = 2.0 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, der des SR1-MBP-Komplexes $D_{MBP+SR1} = 2.6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

Der Diffusionskoeffizient ist invers proportional zur dritten Wurzel des Molekulargewichts ($D \propto \sqrt[3]{M}$) [40], weshalb ein Verhältnis der Diffusionskoeffizienten des MBP und des Chaperonin-MBP-Komplexes von einem Faktor 2.6 bzw. 2.2 erwartet würde. Aus der Messung ergibt sich ein Verhältnis von 2.4 für MBP/GroEL und 1.8 für MBP/SR1. In der Lösung liegt also hauptsächlich der Chaperonin-Substrat-Komplex vor.

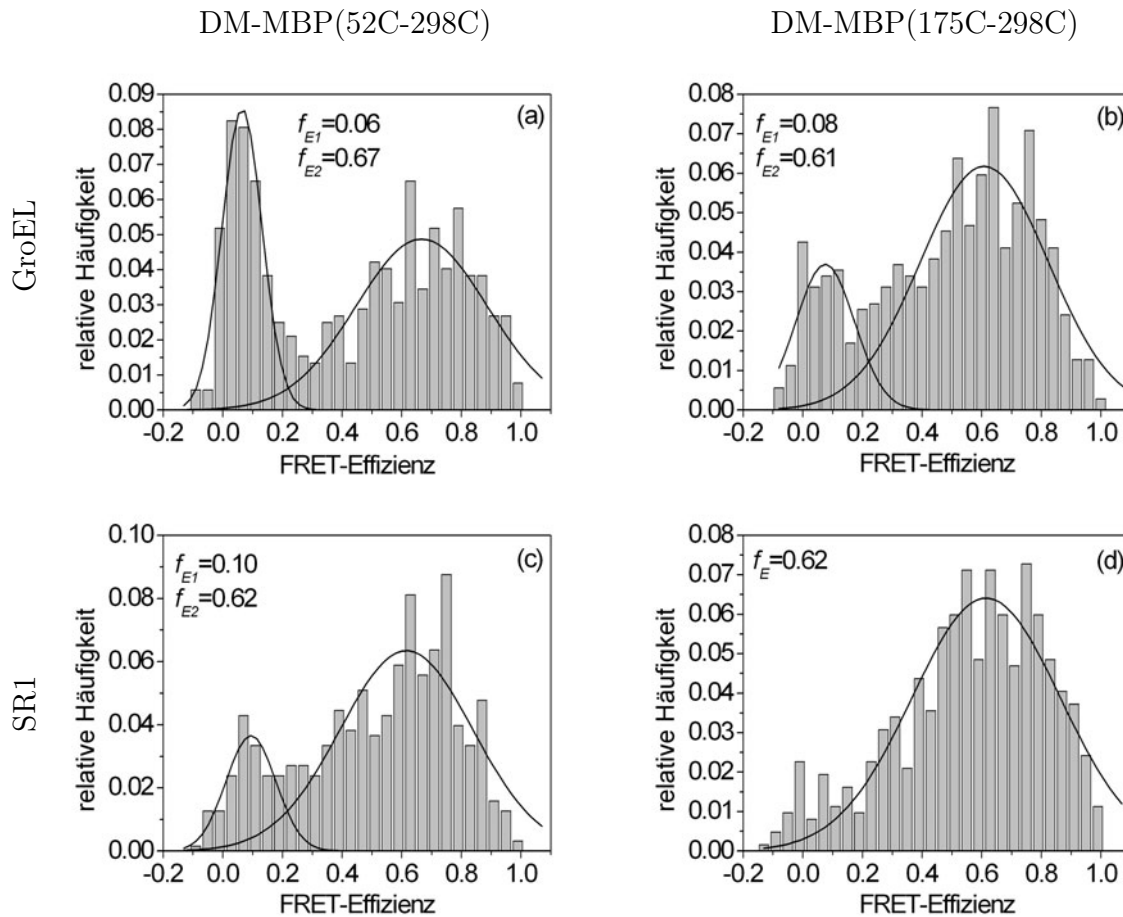


Abbildung 5.11: FRET-Verteilungen von DM-MBP(52C-298C) und DM-MBP(175C-298C) gebunden an GroEL (a und b) und an SR1 (c und d)

An diesen Chaperonin-Substrat-Komplexen wurden nun spFRET-Messungen durchgeführt, wobei auch in den pM-Lösungen ein 50-facher Überschuss von GroEL über MBP verwendet wurde, um auszuschließen, dass sich in der Lösung ungebundenes Substrat befindet. Die zugehörigen spFRET-Verteilungen sind in Abb. 5.11 dargestellt. Der

GroEL-MBP-Komplex zeigt eine bimodale Verteilung mit Maxima bei 70 % FRET-Effizienz und bei 4 % (Abb. 5.11a), wobei sich etwa 35 % der Moleküle in der Verteilung mit niedriger FRET-Effizienz befinden. Der Vergleich mit der Verteilung des ungefalteten Zustands ($f_E=11$ %) zeigt, dass dieser Zustand eine noch niedrigere FRET-Effizienz aufweist und damit noch weiter geöffnet ist. Die niedrige FRET-Verteilung kann also nicht auf ungebundenes Substrat zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu zeigt der SR1-MBP-Komplex nur eine schwach bimodale Verteilung. Der Großteil der Moleküle (~ 80 %) befindet sich in einer breiten Verteilung um 70 % FRET-Effizienz (Abb. 5.11c). Bei Ensemble-Messungen zeigte sich im Mittel ebenfalls eine niedrigere FRET-Effizienz für den GroEL-Komplex als für den SR1-Komplex, weshalb die Verteilung bei niedrigen FRET-Effizienzen auch nicht auf einen Effekt, der nur bei niedrigen Konzentrationen auftritt, zurückzuführen ist.

Um auszuschließen, dass die Verteilung um 4 % FRET-Effizienz auf Komplexe zurückzuführen ist, bei denen an beiden heptameren Ringen des GroEL ein Substrat gebunden ist, wurde eine FCCS-Analyse durchgeführt. Dazu wurde eine äquimolare Mischung aus denaturiertem DM-MBP, welches entweder mit nur einem Akzeptor- oder mit nur einem Donor-Farbstoff markiert war, in Puffer mit GroEL verdünnt. Bindet an beiden Seiten des GroEL ein Protein, so ist mit 50 %-iger Wahrscheinlichkeit eines rot und eines grün markiert, so dass es zu einer Kreuzkorrelation zwischen diesen beiden Farbstoffen kommen sollte.

Die Kreuzkorrelationsanalyse einer solchen Mischung zeigt aber, dass sich im Rahmen der Messgenauigkeit, die durch PIE deutlich erhöht ist, keine zweifarbig-markierten Komplexe in der Lösung befinden (Abb. 5.12). Die Verteilung bei niedrigen FRET-Effizienzen kann also weder mit ungebundenem Protein noch mit Komplexen, bei denen auf beiden Seiten ein Protein gebunden ist, erklärt werden.

Entsprechende spFRET-Messungen an Substrat-Chaperonin-Komplexen wurden auch mit den anderen Mutanten des DM-MBP durchgeführt, um zu sehen, ob die bimodale Verteilung der FRET-Effizienzen, d.h. die Entfaltung einiger Substratproteine, ein lokaler Effekt ist und damit nur bei bestimmten Markierungspositionen zu beobachten ist. Abb. 5.11 b und d zeigen die Verteilungen der Komplexe aus DM-MBP(175C-298C) und GroEL bzw. SR1, die beide eine ähnliche Verteilung an FRET-Effizienzen mit einem Maximum bei 61 % (GroEL) bzw. 62 % (SR1) aufweisen. Die Verteilung bei niedrigen FRET-Effizienzen ist bei dem DM-MBP(175C-298C)-GroEL-Komplex deutlich schwächer ausgeprägt als bei DM-MBP(52C-298C). Alle anderen Mutanten haben ähnliche Verteilungen der FRET-Effizienz, die teilweise eine, teilweise auch zwei Populationen im gebundenen Zustand aufzeigen. Die zugehörigen FRET-Verteilungen sind im Anhang E zu finden, in Tabelle 5.2 sind die zugehörigen FRET-Effizienzen und, falls vorhanden, der Anteil A_n der Moleküle, die sich im niedrigen FRET-Zustand befinden, aufgelistet.

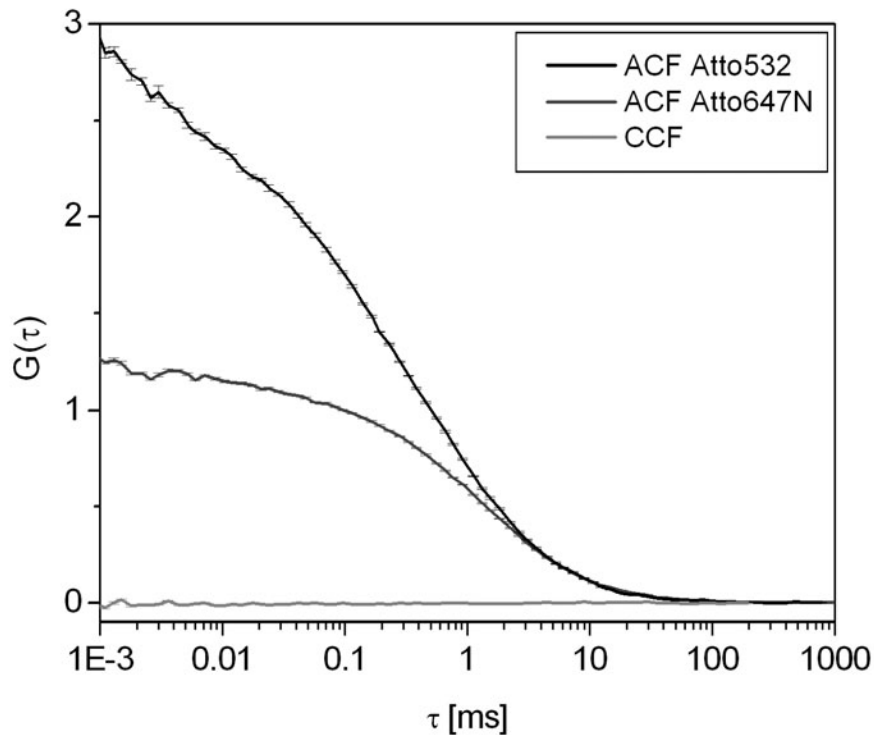


Abbildung 5.12: Kreuzkorrelationsanalyse des GroEL-Substrat-Komplexes, bei dem die Hälfte des MBP nur mit Atto532 und die andere Hälfte nur mit Atto647N markiert ist. Im Rahmen der Messgenauigkeit, ist keine Kreuzkorrelation zu erkennen, woraus geschlossen werden kann, dass nicht an beiden Seiten des GroEL ein Protein gebunden ist.

	GroEL			SR1		
	$f_{Eniedrig}$ [%]	f_{Ehoch} [%]	A_n [%]	$f_{Eniedrig}$ [%]	f_{Ehoch} [%]	A_n [%]
175C-298C	8	61	21	-	62	-
134C-298C	5	67	20	-	64	-
73C-298C	1	71	23	6	65	34
52C-298C	6	67	35	10	62	18
30C-298C	9	50	18	-	62	-
52C-312C	1	59	37	10	54	25
30C-312C	2	52	37	-	-	-
345C-298C	-	72	-	-	74	-
30C-134C	-	63	-	-	63	-
30C-175C	-	76	-	7	60	29

Tabelle 5.2: Auflistung der FRET-Effizienzen der GroEL-Substrat-Komplexe und SR1-Substrat-Komplexe sowie des Anteils der Moleküle, die sich im niedrigen FRET-Zustand befinden.

Zusätzlich wurde als Kontrolle ein Polyprolin an das C-terminale Ende des DM-MBP kloniert. Dieses besteht aus 10 Prolinen und je einem Cystein an den Enden der Polyprolinkette, an die ein Donor- bzw. ein Akzeptorfarbstoff angebracht wurden. Die Polyprolinkette weist eine hohe Steifheit auf, weshalb sich die FRET-Effizienz unter den verschiedenen Bedingungen nicht ändern sollte [75]. Dieses Protein zeigte keinen Unterschied in der FRET-Effizienz im Rückfaltungspuffer an GroEL oder SR1 gebunden oder ungefaltet im Denaturierungspuffer Rb (s. unten). Dies zeigt, dass die Farbstoffe und der Brechungsindex nicht durch die unterschiedlichen Puffer beeinflusst werden.

5.3.4 Allosterische Regulation des GroEL-Zyklus

Chaperonine erleichtern die Proteinfaltung durch Energie (ATP)-abhängige strukturelle Neuordnungen, die zeitlich und räumlich auf komplizierte Weise allosterisch reguliert werden. Die ATP-Bindung und Hydrolyse dienen dabei als Signal für die Substrat- und GroES-Bindung und die anschließende Freilassung des Proteins.

Die allosterische Regulation durch ATP wurde untersucht, indem GroEL-DM-MBP(52C-298C)-Komplexe bei verschiedenen Konzentrationen von ATP gebildet wurden. Da die ATP-Hydrolyse deutlich schneller als die Messung abläuft wurde hierzu eine GroEL-Mutante (GroEL-D398A) verwendet, die keine ATP-Hydrolyse durchführen kann. Mit zunehmender ATP-Konzentration verliert die Verteilung mit niedriger FRET-Effizienz an Bedeutung und ist ab etwa 10 μM nicht mehr beobachtbar (Abb. 5.13a).

Dieser Vorgang ist reversibel: wird die Probe bei nanomolarer Protein-Konzentration mit 2 mM ATP angesetzt und anschließend 500-fach in Puffer ohne ATP verdünnt, kann die Verteilung bei niedriger FRET-Effizienz erneut beobachtet werden (Abb. 5.13b).

Wird hingegen eine GroEL-Mutante (GroEL-D87K) verwendet, die ATP nicht binden kann, wird kein Unterschied zwischen den Verteilungen bei verschiedenen ATP-Konzentrationen beobachtet. Die Konformationsänderungen des GroEL-Substrat-Komplexes sind also auf die Bindung von ATP und nicht auf die bloße Anwesenheit von ATP in der Lösung zurückzuführen.

Die zwei heptameren Ringe des GroEL befinden sich in einem ATP-abhängigen Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen: dem T-Zustand (*tense state*) mit hoher Bindungsaffinität für ungefaltetes Protein, aber niedriger Bindungsaffinität für ATP, und dem R-Zustand (*relaxed state*) mit niedriger Bindungsaffinität für ungefaltetes Protein, aber hoher Bindungsaffinität für ATP. Mit steigender ATP-Konzentration wechselt GroEL vom TT-Zustand über einen TR-Zustand in den RR-Zustand [72]. Die beiden Verteilungen, die für das an GroEL gebundene Substrat zu beobachten sind, lassen sich möglicherweise auf diese beiden Zustände zurückführen. Da die Verteilung bei niedriger FRET-Effizienz mit zunehmender ATP-Konzentration verschwindet, könnte diese den T-Zustand repräsentieren.

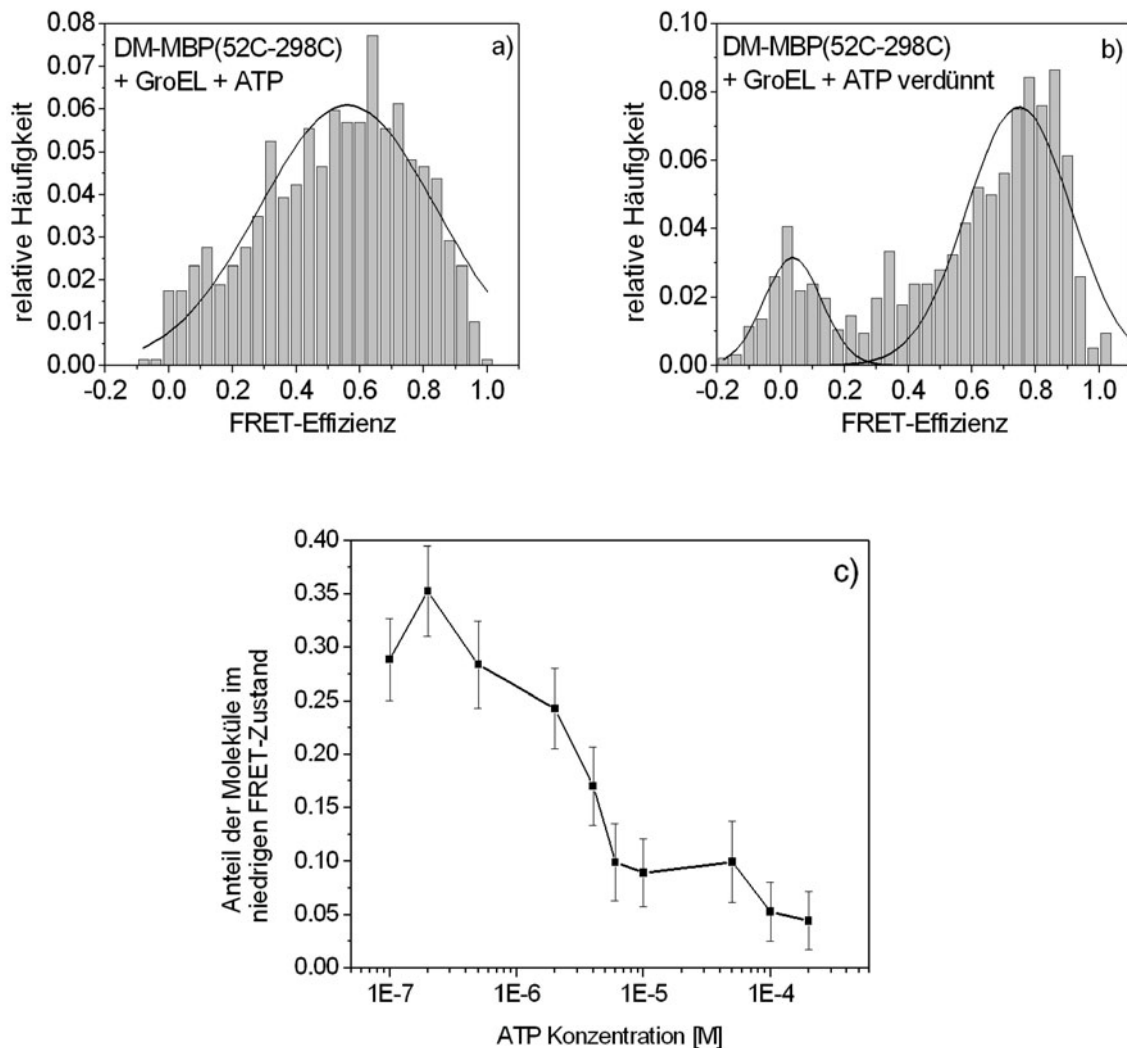


Abbildung 5.13: (a) Bei Zugabe von 2mM ATP ist die Verteilung bei niedriger FRET-Effizienz nicht mehr vorhanden. (b) Dieser Vorgang ist reversibel, durch Verdünnen eines GroEL-Substrat-Komplexes mit ATP in Puffer ohne ATP, erscheint die Verteilung bei niedriger FRET-Effizienz wieder. (c) Die Verteilung mit niedriger FRET-Effizienz verschwindet bei zunehmender ATP-Konzentration.

Nach der Zugabe von ADP ist die Verteilung bei niedrigen FRET-Effizienzen ebenfalls nicht mehr sichtbar. Bei den Verteilungen, bei denen die geöffnete Form nicht beobachtet werden kann, wie SR1/DM-MBP(175C-298C), ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Verteilungen mit und ohne ATP/ADP zu erkennen.

5.3.5 Abhängigkeit der Verteilung von der Anzahl durchlaufener Zyklen und dem Faltungszustand

Mit zunehmender Anzahl an durchlaufenen GroEL-Zyklen könnte sich die Verteilung der FRET-Effizienzen ändern, da immer mehr Proteine zumindest schon teilweise ge-

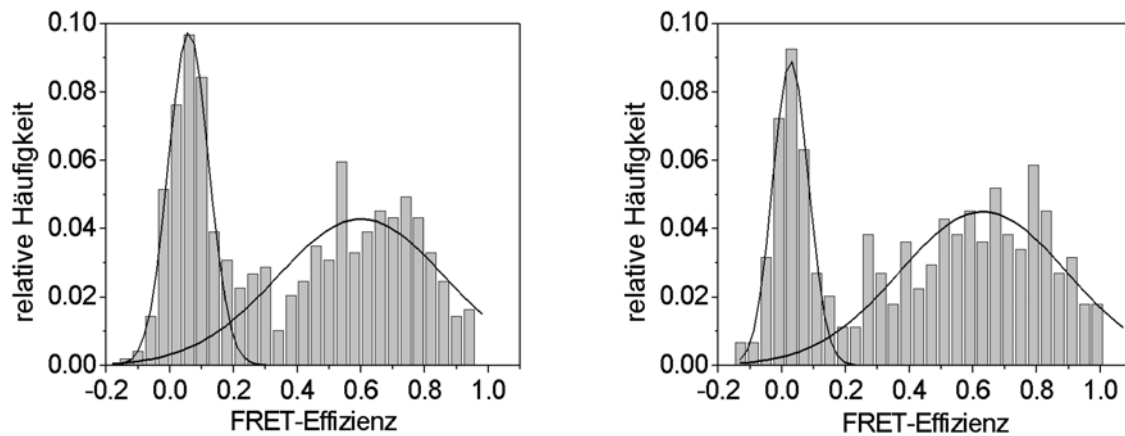


Abbildung 5.14: FRET-Verteilungen von DM-MBP (52C-298C) mit der nicht ATP bindenden GroEL-Mutante D87K. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen den Verteilungen mit (rechts) und ohne (links) ATP.

faltet sind, wenn sie an GroEL binden. Zur Überprüfung wurde die GroEL gesteuerte Rückfaltung des DM-MBP(52C-298C) durch Zugabe von ATP gestartet und zu bestimmten Zeitpunkten mit Apyrase und EDTA⁴ gestoppt. Die GroEL-Substrat-Komplexe wurden anschließend aufgereinigt, so dass sich kein schon gefaltetes Protein mehr in der Lösung befand. Zu den späteren Zeitpunkten wurde nach der Aufreinigung eine deutlich geringere Konzentration an GroEL-Substrat-Komplexen erhalten, da ein höherer Prozentsatz der Proteine bereits vollständig gefaltet war.

Zu den gemessenen Zeitpunkten (30 s, 90 s und 300 s) konnte keine Veränderung in der Verteilung beobachtet werden, wie in Abb. 5.15 zu erkennen ist. Dies zeigt, dass die Bindung nicht von der Anzahl der Zyklen abhängt, die die GroEL gesteuerte Rückfaltung schon durchlaufen hat.

Zusätzlich wurde auch die spontane Rückfaltung an bestimmten Zeitpunkten (10 min, 40 min, 90 min) gestoppt, indem GroEL zugegeben wurde, wonach die noch ungefalteten und falsch gefalteten Proteine an dieses binden können. Auch diese bis zu verschiedenen Zeitpunkten spontan gefalteten Proteine zeigen keinen Unterschied in der Verteilung der FRET-Effizienzen bei der Bindung an GroEL (Abb. 5.16). In Abwesenheit von ATP liegen T- und R-Zustand demnach in einem dynamischen Gleichgewicht vor.

⁴Diese stoppen die Reaktion, da die Apyrase die ATP-Hydrolyse katalysiert und das ATP dadurch ein Phosphat und damit auch seine Energie verliert. Das EDTA bindet die Magnesium-Ionen in der Lösung, wodurch ATP nicht mehr hydrolysiert werden kann.

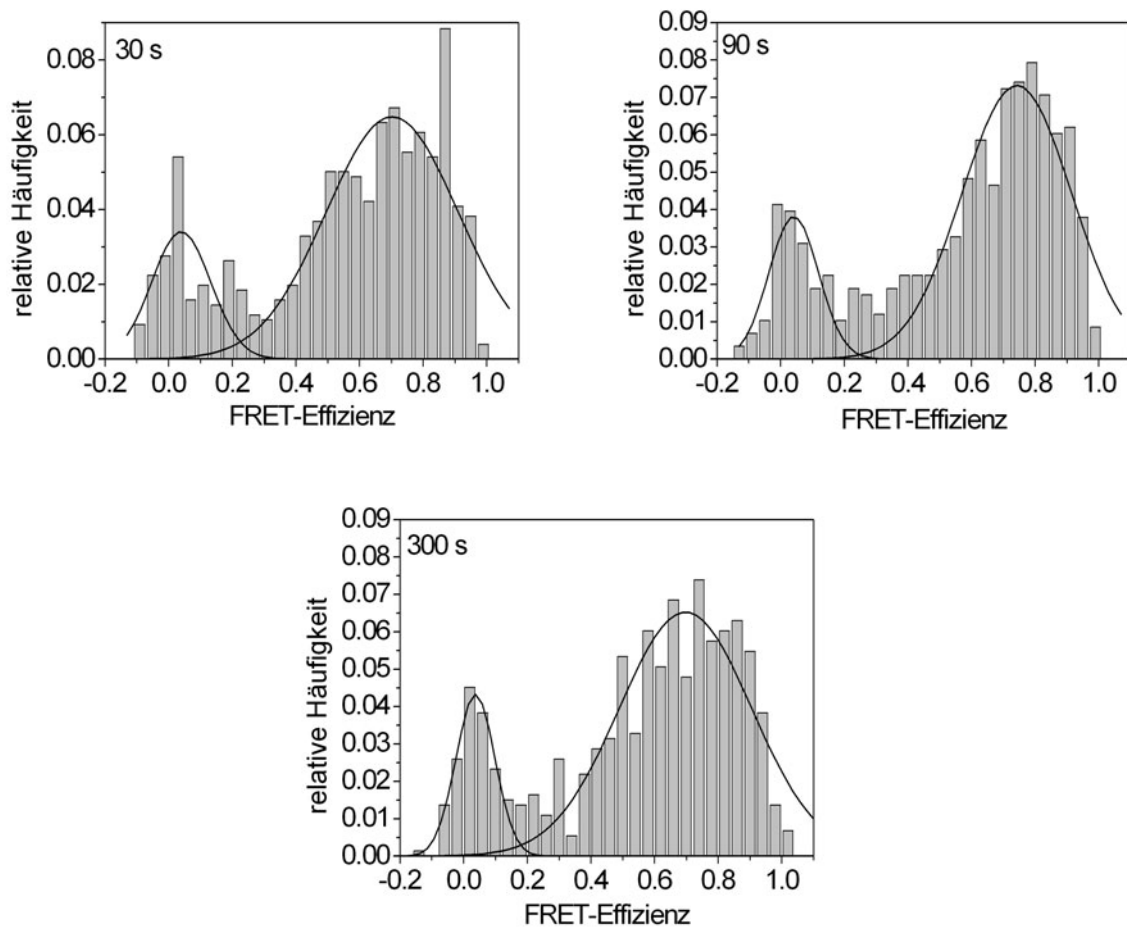


Abbildung 5.15: Die FRET-Verteilungen des GroEL-Substrat-Komplexes verändern sich nicht in Abhängigkeit der schon durchlaufenen Reaktionszyklen (DM-MBP(52C-298C)). Die Reaktion wurde nach 30s, 90s bzw. 300s gestoppt.

5.3.6 Entfaltung des Substrat-Proteins nach der GroES-Bindung

SR1 kann GroES binden, wenn ADP in der Lösung ist, ohne das Substrat in die Tasche zu entlassen. Ein solcher GroEL-GroES-Substrat-Komplex wurde dazu verwendet, um zu testen, ob es durch Bindung des GroES zu einer Entfaltung an der apikalen Domäne kommt.

Wie in Abb. 5.17 zu erkennen ist, ist keine Entfaltung des Proteins, d.h. eine Verteilung niedrigerer FRET-Effizienz, zu beobachten. Im Gegenteil, die Verteilung ist im Vergleich zur FRET-Effizienz des SR1-Substrat-Komplexes ohne ATP (durchgezogene Linie) sogar zu etwas höheren FRET-Effizienzen verschoben. Dies zeigt, dass es nicht zu einer Entfaltung des Substrats durch die Bindung von GroES an GroEL/SR1, sondern zu einem schrittweisen Kollaps des gebundenen Zustands kommt.

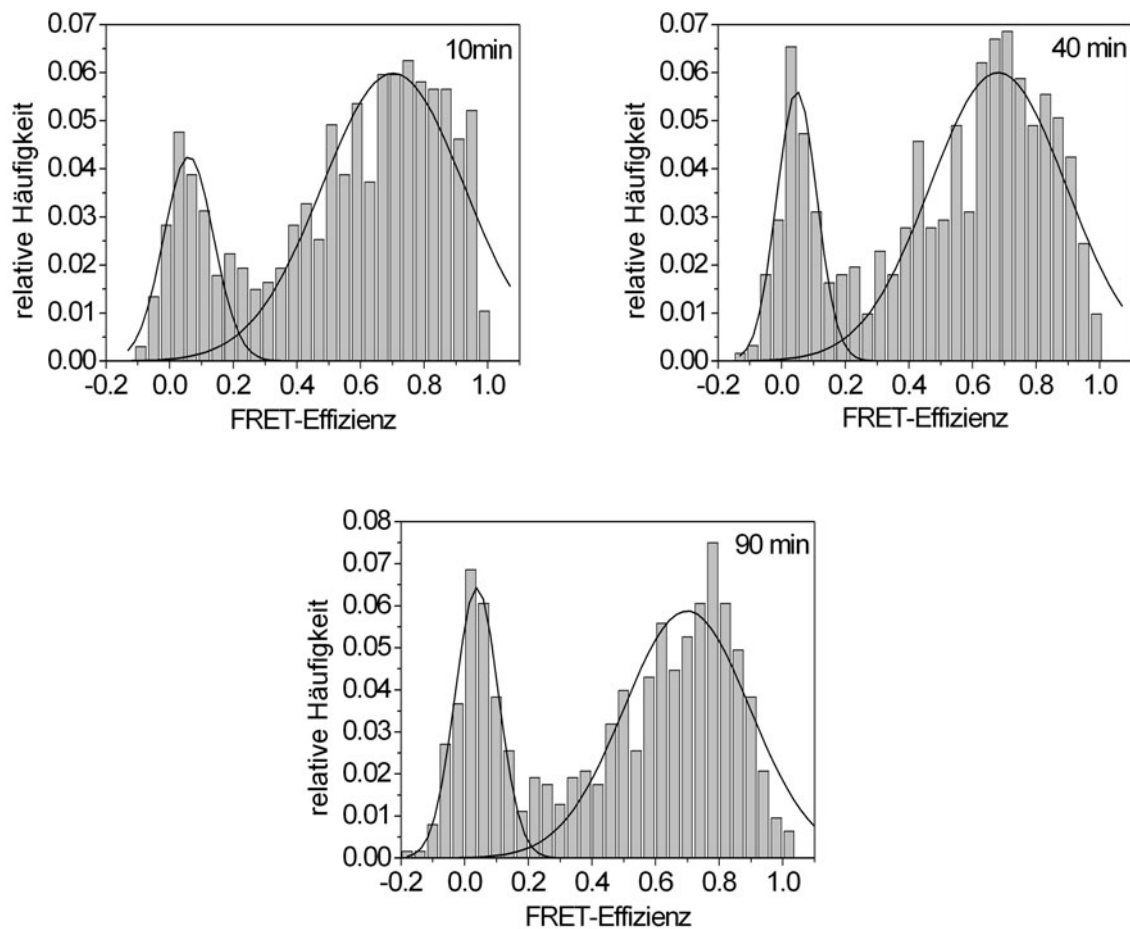


Abbildung 5.16: Die FRET-Verteilungen verändern sich nicht in Abhängigkeit des Faltungszustands bei der Zugabe von GroEL. Die Rückfaltung wurde dabei durch die Zugabe von GroEL bei verschiedenen Zeitpunkten (10 min, 40 min, 90 min) gestoppt.

5.3.7 Experimentelle Bedingungen

Die zweifach markierten Proteine DM-MBP wurden in denaturierter Form im Puffer Rb (5 mM Tris, pH 7.5, 20 mM KCl, 3 M GndHCl) aufbewahrt⁵. Für die FCS-Messungen wurden die Protein-Substrat-Komplexe gebildet, indem das denaturierte Protein (3 μ M) 100-fach im Rückfaltungspuffer Ra (5 mM Tris, pH 7.5, 20 mM KCl, 5 mM Mg(OAc)₂) verdünnt wurde, der 1.2 μ M GroEL bzw. SR1 enthielt. Für die sp-FRET Messungen wurden die Proteine (3 μ M) 1000-fach in Rb-Puffer und anschließend 50-fach in Ra-Puffer, der 3 μ M GroEL bzw. SR1 enthielt, auf 60 pM verdünnt. Je nach Experiment wurde der Lösung zusätzlich GroES im Verhältnis 2:1 zu GroEL/SR1 oder ADP/ATP in verschiedenen Konzentrationen zugegeben.

⁵Guanidinhydrochlorid (GndHCl) denaturiert Proteine, indem nicht kovalente Wechselwirkungen aufgebrochen werden. Kovalente Bindungen werden nicht aufgebrochen, weshalb das Protein im Rückfaltungspuffer wieder renaturieren kann.

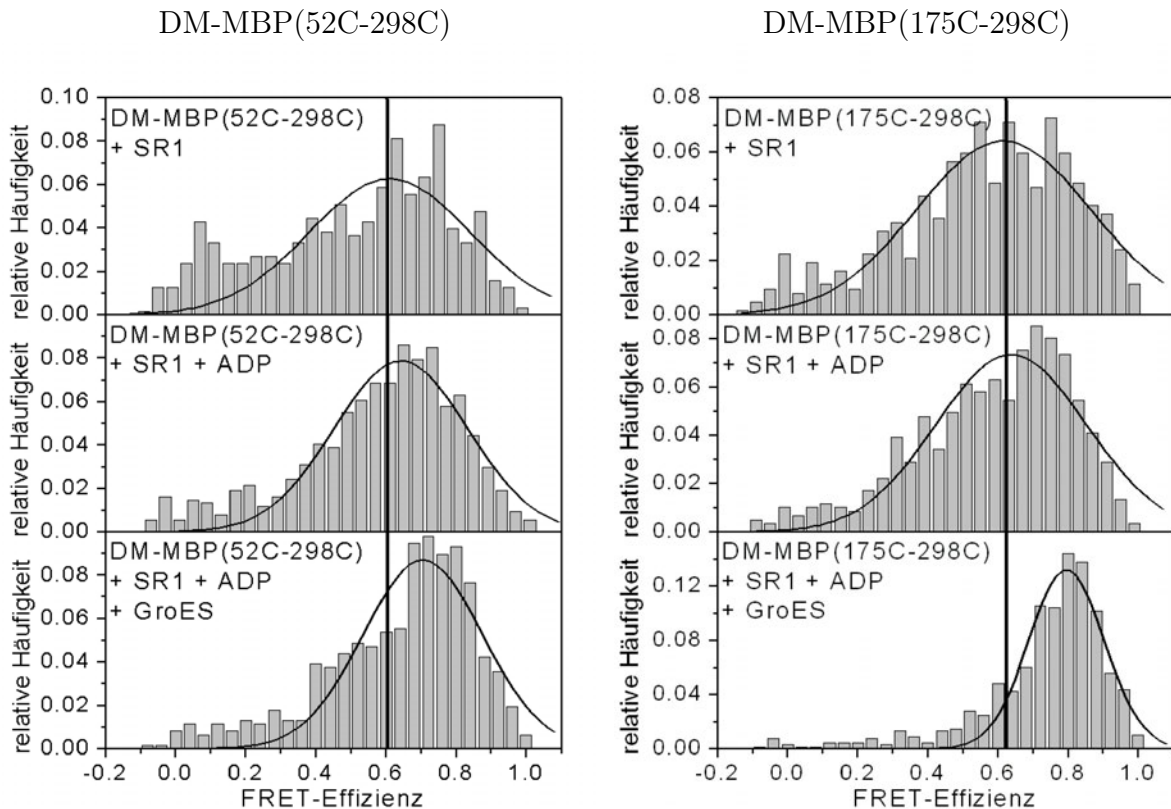


Abbildung 5.17: Vergleich des Substrat-SR1-Komplexes (oben), des SR1-Substrat-Komplexes mit ADP (Mitte) und des SR1-GroES-Substrat-Komplexes mit ADP (unten) für DM-MBP(52C-298C)(links) und (175C-198C)(rechts). Die Linie deutet jeweils die FRET-Effizienz des Protein-SR1-Komplexes an.

5.4 Zusammenfassung

Die offene Struktur, die unter anderem für den GroEL-DM-MBP(52C-298C)-Komplex beobachtet wird, zeigt deutlich, dass das Protein durch Bindung an GroEL weiter geöffnet werden kann als im denaturierten Zustand. Eine mögliche Entfaltung zur Entfernung von kinetischen Fallen wurde in der Literatur schon mehrfach erwähnt [73, 71, 82, 83], konnte aber in Ensemble-Messungen nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Aufweitung des Proteins ist möglicherweise essentiell für falsch gefaltete Proteine, um wieder auf den richtigen Faltungsweg zu gelangen und wurde bisweilen möglicherweise in ihrer Wichtigkeit für die Faltungseffizienz unterschätzt. Für den SR1-DM-MBP-Komplex kann diese aufgeweitete Form in keiner der untersuchten Markierungskombinationen so ausgeprägt beobachtet werden wie für den GroEL-DM-MBP-Komplex, weshalb diese Entfaltung nicht für die höhere Faltungsgeschwindigkeit verantwortlich sein kann, da für SR1 und GroEL die gleiche Beschleunigung gemessen wurde. Zumindest für dieses Protein scheint der Entfaltungs-Prozess nicht die Ursache der schnelleren Faltungsrate zu sein. Es wäre allerdings äußerst interessant zu wissen, ob sie eine Auswirkung auf die Faltungseffizienz hat, d.h. ob Proteine, die sich mit Hilfe von SR1 nicht falten können, von GroEL gesteu-

ert hingegen ihren nativen Zustand erreichen.

Der geöffnete Zustand des Substrats verschwindet allerdings bei der Zugabe von ATP. Die Bindungsaffinität ist abhängig von der ATP-Konzentration, weshalb der geöffnete Zustand wahrscheinlich auf den für ATP niedrig affinen Zustand zurückzuführen ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Konformationsverteilung des GroEL-Substrat-Komplexes nicht mit zunehmender Anzahl an durchlaufenen Reaktionszyklen ändert und auch nicht davon abhängt, zu welchem Zeitpunkt der spontanen Rückfaltung das GroEL zugegeben wurde. Hierzu wären Experimente, bei denen das GroEL auf einer Oberfläche immobilisiert wird und die Reaktionszyklen mit TIRF-Mikroskopie in Echtzeit verfolgt werden könnten, von höchstem Interesse.

Kapitel 6

DNA-Nanokonstrukte

Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist der molekulare Speicher der genetischen Information, die in der Basensequenz kodiert ist. Wegen der außerordentlich spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Basenpaaren können DNA-Replikation und -Transkription nahezu fehlerfrei ablaufen [61].

Daher eignet sich DNA hervorragend zur Zusammensetzung von hoch strukturierten Materialien mit bestimmten Eigenschaften oder zur Programmierung, um komplexe Informationen weiterzugeben. Damit ist DNA eines der vielversprechendsten chemisch-basierten Selbstorganisationssysteme für die Nanotechnologie [84]. Neben statischen Nanokonstrukten ist es auch möglich, bewegliche DNA-Nanomaschinen zu entwerfen, wobei neben den Wechselwirkungen zwischen den Basenpaaren vor allem die polymermechanischen Eigenschaften der DNA und deren elektrostatischen Eigenschaften als Polyelektrolyt ausgenutzt werden können.

6.1 Eigenschaften von Nucleinsäuren

Die DNA ist ein Polymer aus aufeinanderfolgenden Nucleotiden, welche aus einer stickstoffhaltigen Base, einer Pentose und einem Phosphat bestehen. Als DNA-Basen kommen jeweils zwei Purine, Adenin (A) und Guanin (G), und zwei Pyrimidine, Cytosin (C) und Thymin (T), vor. Die über Phosphodiesterbindungen kovalent gekoppelten Nucleotide bestimmen die Sequenz der DNA, d.h. deren Primärstruktur. Die Bindungen werden zwischen den Hydroxylgruppen des 3'-Kohlenstoffs der ersten Pentose und des 5'-Kohlenstoffs der Pentose des darauffolgenden Nucleotids ausgebildet. An einem Ende der DNA gibt es daher eine freie 5'-Endgruppe und am anderen eine freie 3'-Endgruppe. Konventionsgemäß wird ein DNA-Einzelstrang in die 5'→3'-Richtung geschrieben. Zwischen den Nucleinsäure-Molekülen können sich Wasserstoffbrückenbindungen bilden, wodurch zwei Nucleinsäureketten assoziieren und einen DNA-Doppelstrang bilden können (Sekundärstruktur). Dabei paaren sich jeweils Adenin mit Thymin und Guanin mit Cy-

tosin. Damit sich ein Doppelstrang bilden kann, müssen die Stränge also komplementär sein, d.h. Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin müssen sich jeweils gegenüber liegen [63].

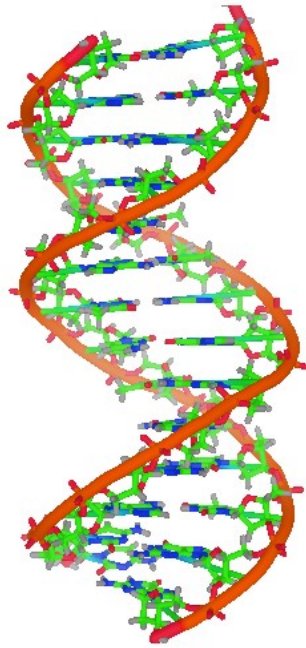


Abbildung 6.1: Zwei DNA-Einzelstränge paaren sich zu einem Doppelstrang, der wiederum eine Helix bildet (PDB 1K8J dargestellt mit PyMol [78]).

Nach dem von Watson und Crick aufgestellten Modell winden sich solche Doppelstränge um eine gemeinsame Achse zu einer helicalen Struktur (Doppelhelix), der Tertiärstruktur (s. Abb. 6.1). In der physiologisch stabilsten Variante, der sogenannten B-Form, sind zwei benachbarte Basen in der Doppelhelix 0.34 nm voneinander entfernt, eine Windung ist 3.6 nm bzw. 10.5 Basenpaare (bp) und der Durchmesser beträgt 2 nm.

Die Steifheit eines DNA-Doppelstrangs (dsDNA) kann durch ihre Persistenzlänge¹ angegeben werden, die - abhängig von der Sequenz - etwa 50 nm bzw. 150 bp ist. Im Gegensatz dazu hat ein DNA-Einzelstrang (ssDNA) eine Persistenzlänge von nur 1 nm [86]. Die DNA-Doppelhelix kann durch extreme pH-Werte oder Temperaturen zu zwei Einzelsträngen aufgeschmolzen werden. Die Schmelztemperatur hängt dabei jedoch stark von der Sequenz ab, da G-C-Basenpaare eine höhere Bindungsenergie als A-T-Basenpaare aufweisen [87].

Aufgrund der ausgeprägten selbstorganisierenden Eigenschaften der DNA können sich aus selbstkomplementären Einzelsträngen zum Beispiel sogenannte Haarnadelschleifen (*hairpin loops*) bilden oder aus vier entsprechenden Einzelsträngen kreuzförmige Strukturen (*Holliday-Junctions*) realisiert werden [88]. Inzwischen werden immer raffiniertere

¹Die Persistenzlänge l_p ist ein Maß für die Steifheit eines Polymers [85].

Strukturen wie beispielsweise ein DNA-Tetraeder, der als molekularer Käfig verwendet werden kann, konstruiert [89].

Neben der Fähigkeit der Selbstorganisation spielen beim Aufbau solcher DNA-Konstrukte auch die elektrostatischen Eigenschaften der DNA als stark geladener Polyelektrolyt eine große Rolle [86, 90]. Polyelektrolyte dissoziieren in polaren Lösungsmitteln wie z.B. Wasser zu geladenen Makroionen und kleinen Gegenionen. Auf der makroskopischen Längenskala wird durch die Gegenladungswolke die Ladungsneutralität gewährleistet, auf der molekularen Größenskala werden die Eigenschaften maßgeblich von der Coulomb-Abstoßung innerhalb der Polymere bestimmt. Die Reichweite der elektrostatischen Wechselwirkungen ist in wässrigen Salzlösungen gegeben durch die sogenannte Debye-Abschirmlänge [91]:

$$l_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{2 \cdot 10^3 e^2 N_A c}}, \quad (6.1)$$

wobei ϵ_r die Dielektrizitätskonstante des Mediums, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante, k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, e die Elementarladung, N_A die Avogadrozahl und c die Konzentration ist. Die Wechselwirkungen zwischen zwei DNA-Doppelhelices und das Verhalten von dsDNA in der Zelle hängt daher stark von der Konzentration der Gegenionen ab [92].

6.2 Entwicklung eines DNA-Protein-Konjugats

Seitdem die Klonierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der *Aequorea victoria*-Qualle das erste Mal gelang [93], haben sich fluoreszierende Proteine zu einem wichtigen Hilfsmittel in der Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie entwickelt. In der Zwischenzeit gibt es sowohl zahlreiche Mutanten als auch andere Proteine mit neuen und verbesserten spektralen Eigenschaften [94, 95]. Die FP können genetisch an andere Proteine kodiert und zusammen exprimiert werden, was vor allem bei *in vivo*-Studien in Zellen Anwendung findet, da eine externe Markierung mit synthetischen Farbstoffen, die möglicherweise toxische Eigenschaften haben, umgangen werden kann. Aber auch in der Entwicklung von künstlichen Lichtsammelkomplexen (*light-harvesting complexes*) zum besseren Verständnis der Photosynthese, von molekularer Photonik oder Bioelektronik können FP eingesetzt werden. Hierbei haben vor allem reversibel photoschaltbare Mutanten als optischer Speicher oder Schalter ein großes Potential [96].

Für die Verwendung einzelner Biomoleküle für nanotechnologische Anwendungen ist die präzise Positionierung der verschiedenen Komponenten innerhalb eines solchen Konjugats essentiell. DNA ist daher ideal für solche selbstorganisierenden Strukturen geeignet, da sie sich wie oben beschrieben durch außergewöhnlich spezifische molekulare Wechselwirkungen von komplementären Einzelsträngen und eine räumlich definierte Struktur

auszeichnet. Dadurch können andere Biomoleküle, wie FP oder synthetische Farbstoffe, auf der DNA mit einer Genauigkeit von Nanometern angeordnet werden.

In diesem Projekt wurde in einer Kooperation mit der Gruppe von C. M. Niemeyer ein DNA-Protein-Komplex als Baustein für ein DNA-basiertes bioorganisches FRET-System entwickelt und auf der Einzelmolekülebene mittels spFRET charakterisiert.

6.2.1 Aufbau des DNA-Protein-Komplexes

Der DNA-Protein-Komplex lag in zwei verschiedenen Varianten vor und wurde aus drei DNA-Einzelsträngen aufgebaut. Als Donor diente eine Mutante des GFP, das *enhanced Yellow Fluorescent Protein* (eYFP), welches im Vergleich zu GFP ein rotverschobenes Absorptions- und Emissionsspektrum hat. Als Akzeptor wurde der synthetische Farbstoff Atto647 verwendet.

An einen der Einzelstränge (A12a: TCCTGTGTGAAA) wurde das eYFP kovalent gebunden, wozu zunächst das Thymin an Position 8 der DNA-Sequenz mit einer Amino-Gruppe modifiziert wurde. An das C-terminale Ende des eYFP wurde ein Cystein-Rest kloniert, so dass eine frei zugängliche Thiol-Gruppe zur Verfügung stand. Die DNA und das eYFP konnten daher über ein Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate (sSMCC) quervernetzt werden. Das sSMCC enthält sowohl eine Maleimid- als auch eine N-Hydroxysuccinimid-Ester-Gruppe. Letztere reagiert mit der Amino-Gruppe der modifizierten DNA und Maleimid mit der Thiol-Gruppe des Cysteins [97].

Ein weiteres Oligonucleotid mit 12 Basenpaaren (A12b: TTGTTATCCGCT) lag in zwei verschiedenen Varianten vor: Atto647 wurde entweder intern an Position 7 oder am 3'-Ende angebracht. Des Weiteren stand der zu diesen beiden ssDNA komplementäre 24 bp lange Strang (cA24: AGCGGATAATTTTCACACAGGA) zur Verfügung.

Diese drei Stränge wurden bei äquimolaren Konzentrationen zu zwei verschiedenen FP-DNA-Konjugaten hybridisiert (s. Abb. 6.2). Die Schmelztemperaturen von A12a und A12b liegen ohne Farbstoffmarkierung bei 35.4° C bzw. 39.5° C, mit Markierung möglicherweise sogar noch niedriger. Daher wurden die Stränge A12a und A12b ligiert, um die Stabilität des FP-DNA-Konjugats auch bei pikomolaren Konzentrationen zu gewährleisten. Dazu wurde noch vor der Hybridisierung das 5'-Ende des Strangs A12a mit 1 u Kinase und 1 mM ATP in 1 x Kinasepuffer 30 min bei 37° C phosphoryliert. Nach der Hybridisierung mit den Strängen A12b und cA24, die durch Aufheizen auf 60°C und anschließendes Abkühlen in 2° C Schritten auf 4° C erreicht wurde, wurden Strang A12a und A12b durch Zugabe von 1 u Ligase miteinander verbunden.

Die beiden so entstandenen FP-DNA-Konjugate sind in Abb. 6.2 dargestellt. Der Abstand zwischen den beiden Chromophoren beträgt 11 bp für Komplex 1 und 16 bp für Komplex 2, was ungefähr einer bzw. eineinhalb Windungen der Doppelhelix entspricht.

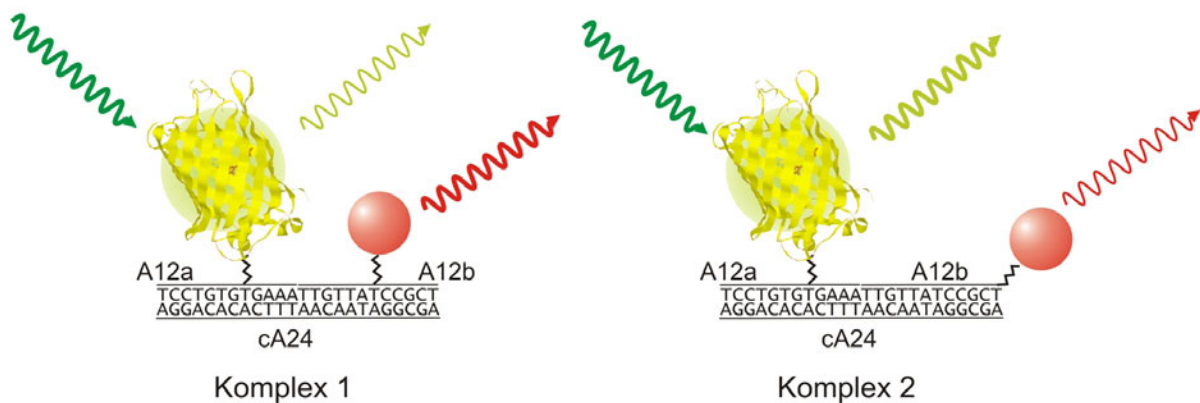


Abbildung 6.2: Aufbau und Sequenz der DNA-Protein-Komplexe: Komplex 1 aus eYFP-A12a, Atto647-A12b(Position 7) (links) und Komplex 2 aus eYFP-A12a, Atto647-A12b(Position 12) (rechts)

Bei Komplex 1 befinden sich die Chromophore also auf der gleichen und bei Komplex 2 auf der gegenüberliegenden Seite.

6.2.2 Ensemble-FRET-Messungen

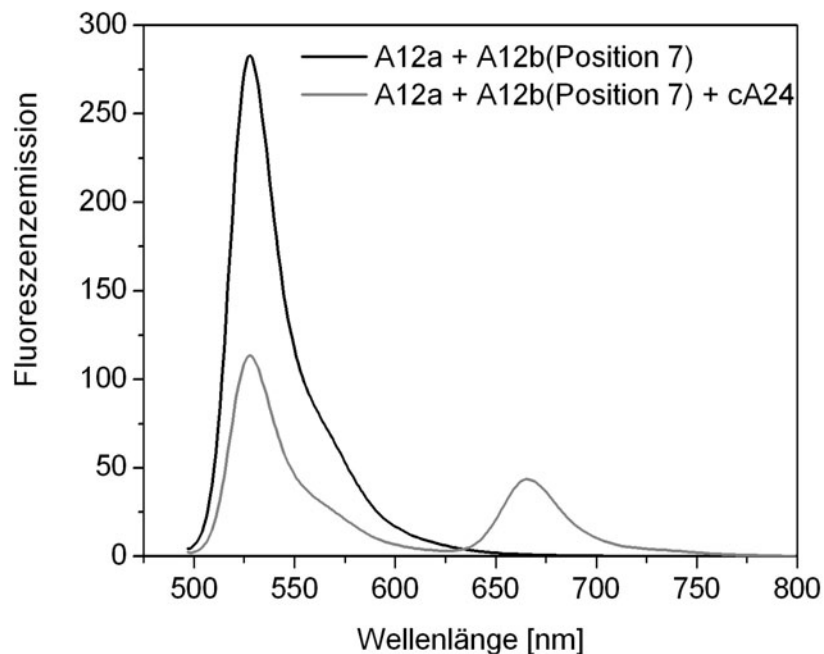


Abbildung 6.3: Ensemble-Fluoreszenzspektren des eYFP- (A12a) und Atto647- (A12b(Position 7)) Konjugats mit (grau) und ohne (schwarz) komplementärem Gegenstrang (cA24) (Abb. aus [98])

Der Komplex 1 wurde zunächst im Fluoreszenzspektrometer als Ensemble auf sei-

ne Funktionstüchtigkeit untersucht. Dabei konnte eindeutig beobachtet werden, dass durch Zugabe des komplementären Gegenstrangs (cA24) zu den beiden Einzelsträngen eYFP-A12a und Atto647-A12b(Position 7) die Donor-Fluoreszenz abnimmt und dafür Fluoreszenz im Wellenlängenbereich des Akzeptors detektiert werden kann (s. Abb. 6.3). Hiermit konnte eine untere Grenze des Energietransfers von 60 % für den Komplex 1 abgeschätzt werden. Aufgrund der unbekanntenen Markierungseffizienz des Donors konnten aber keine exakten Werte berechnet werden. Als weitere Kontrolle der Hybridisierung wurden die Fluoreszenzintensitäten des Donors und Akzeptors in Abhängigkeit der Temperatur untersucht. Bei 55°C konnte keine Fluoreszenz des Akzeptors detektiert werden, beim Abkühlen wurde ein Absinken der Emission des Donors und ein Anstieg der Emission des Akzeptors beobachtet. Ab 35°C blieben die Werte der Fluoreszenzintensität konstant, was darauf zurückzuführen ist, dass unterhalb dieser Temperatur die DNA als vollständig hybridisierter Doppelstrang vorlag [98].

6.2.3 spFRET-Messungen

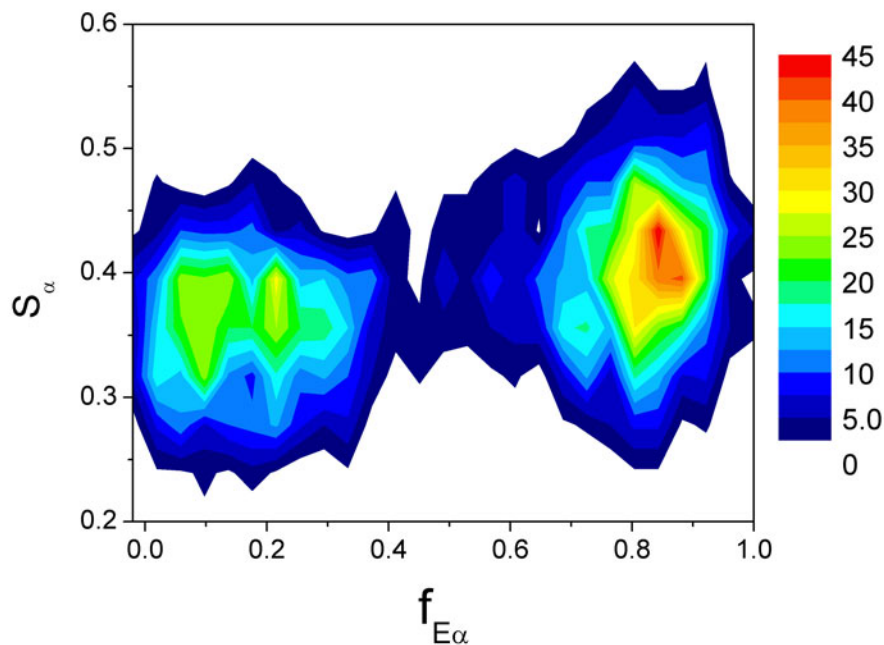


Abbildung 6.4: Konturabbildung des unkorrigierten Stöchiometriewerts S_α und der unkorrigierten FRET-Effizienz f_{E_α} : Der Unterschied im Stöchiometriewert der beiden FRET-Populationen ist deutlich zu erkennen, so dass die Gewichtung der Fluoreszenzintensitäten notwendig ist.

Für die exakte Charakterisierung der beiden Komplexe mit spFRET wurde zunächst

der α -Faktor mit der Methode nach [55] bestimmt. In Abb. 6.4 ist eine Konturabbildung der beiden nicht korrigierten FRET-Populationen zu sehen, wobei ein deutlicher Unterschied im Stöchiometriewert S_α zu erkennen ist, obwohl nur zweifarbig markierte Moleküle in die Analyse mit einbezogen wurden. Daraus ergibt sich ein Wert von 1.33 für den α -Faktor.

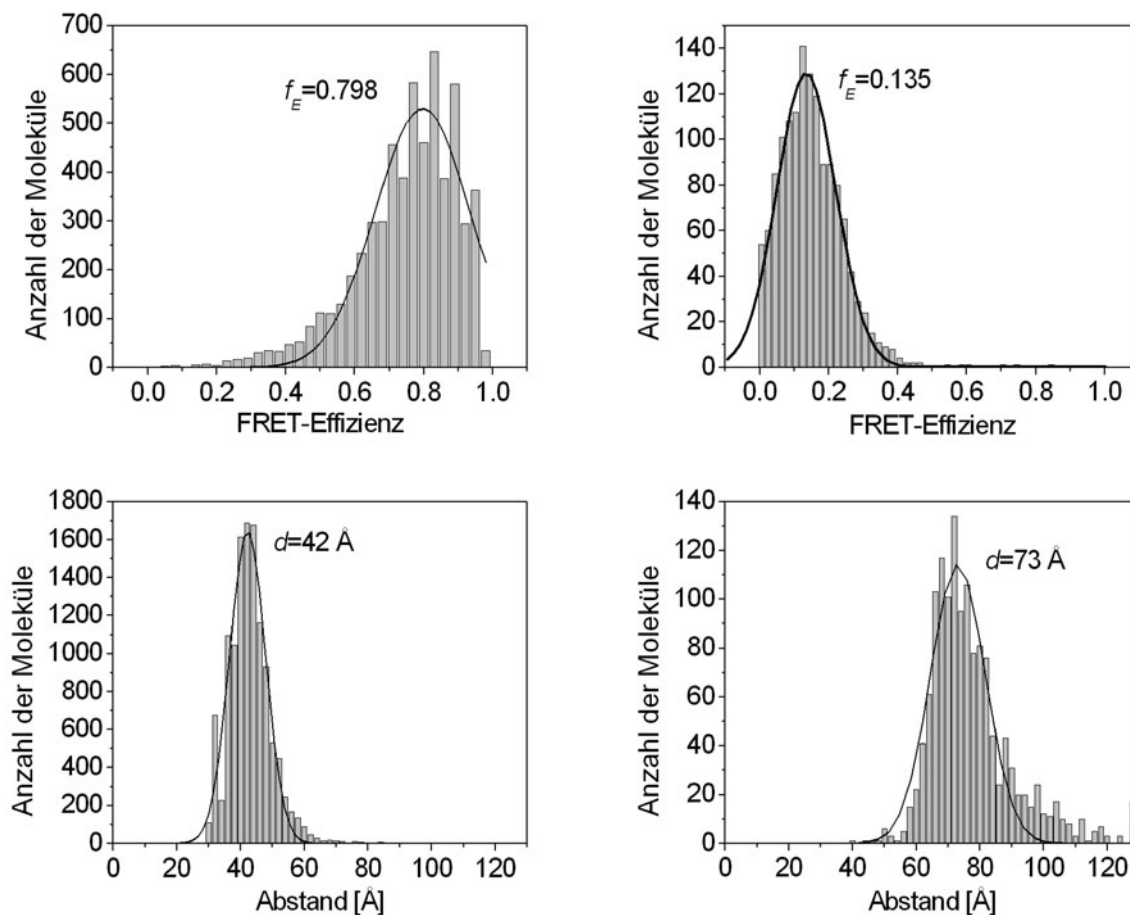


Abbildung 6.5: Histogramme der FRET-Effizienz (oben) und zugehöriger Abstände (unten) der DNA-Konjugate: Komplex 1 mit Atto647 an Position 7 (links) und Komplex 2 mit Atto647 an Position 12 (rechts). Die Abstände wurden aus den FRET-Verteilungen mit $R_0=51$ Å berechnet.

Mit diesem Wissen konnte eine *Burst Analysis* mit PIE durchgeführt und die exakten FRET-Effizienzen der beiden Komplexe bestimmt werden: $f_E = 79.8$ % für Komplex 1 und $f_E = 13.5$ % für Komplex 2 (s. Abb. 6.5). Zur Umrechnung der FRET-Effizienzen in Distanzen wurde der Förster-Radius für dieses Farbstoff-Paar wie in Abschnitt D.4 beschrieben berechnet. Die dazu benötigten Spektren wurden bei möglichst ähnlichen Bedingungen wie bei den spFRET-Experimenten aufgenommen. Mit einem Förster-Radius von 51 Å ergibt sich ein Abstand von 42 Å für Komplex 1 und 73 Å für Komplex 2 (s. Abb. 6.5 unten). Um diese Abstände mit den theoretisch erwarteten vergleichen zu können, wird ein zylindrisches Modell der DNA verwendet [99] (s. Abb. 6.6). Danach ist

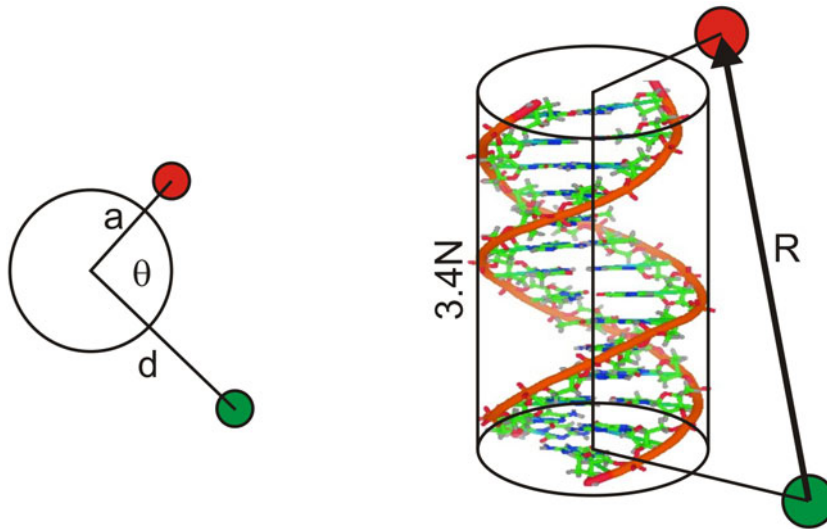


Abbildung 6.6: Zur Berechnung des Abstands zwischen den beiden Farbstoffen (grün: Donor, rot: Akzeptor) wird ein zylindrisches Modell zur Beschreibung der DNA verwendet.

der Abstand von Donor und Akzeptor gegeben durch:

$$R = \left[(3.4N)^2 + (a^2 + d^2 - 2ad \cos \theta) \right]^{\frac{1}{2}}, \quad (6.2)$$

wobei N die Anzahl der Basenpaare zwischen den beiden Markierungen und $\theta = 0.6 \cdot N$ der Winkel zwischen Donor und Akzeptor für $N=1$ ist, sowie d und a die Abstände von Donor bzw. Akzeptor senkrecht zur Helixachse sind. Einsetzen der gemessenen Abstände für die Komplexe 1 und 2 ergibt $d=31.5 \text{ \AA}$ und $a=19.5 \text{ \AA}$. Das eYFP hat eine fassförmige Struktur mit einer Höhe von ca. 40 \AA und einem Durchmesser von ca. 30 \AA [100], in deren Mitte der Chromophor liegt. Unter Einbeziehung des Radius der DNA (10 \AA) wird also ein Abstand des Chromophors von mehr als 30 \AA von der Helixachse erwartet, da zwischen DNA und Protein zusätzlich noch die sSMCC-Bindung liegt. Der Akzeptor Atto647 sollte - abgesehen von dem Verbindungsstück, welches eine Länge von ca. 10 \AA aufweist - sehr nahe an der DNA liegen, es würde also ein Abstand im Bereich von 10 bis 20 \AA erwartet werden. Das Ergebnis stimmt also exzellent mit den theoretisch erwarteten Werten überein, was zum einen die Genauigkeit dieser Methode und zum anderen die Eignung von FP-DNA-Konjugaten als Nanobauteile unterstreicht.

6.3 DNA-Nanomaschinen

DNA eignet sich aufgrund ihrer hochspezifischen Bindungseigenschaften nicht nur als Bauteil für statische Nanokonstrukte, sondern auch DNA-Nanomaschinen, die Rotations- [101, 102], Dehnungs- [103, 104, 105] und Translokationsbewegungen [106, 107] auf der Nanometerskala durchführen können, sind konstruierbar. Die entsprechenden Bewegun-

gen können durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden, beispielsweise durch Konformationsänderungen wie bei dem Übergang der DNA von der B-Form in die Z-Form [101]. Aber auch Änderungen der Ionenkonzentration [108] und des pH-Werts [109] sowie DNA- Moleküle [103, 110] können die Bewegungen auslösen. Solche DNA-Nanomaschinen wurden bisher größtenteils in Ensemble-Messungen mit FRET oder Gelelektrophorese untersucht, Einzelmolekül-Untersuchungen existieren aber nur wenige [111].

In dieser Arbeit wurde in einer Kooperation mit der Gruppe von F.C. Simmel einer der Prototypen der DNA-Maschinen, die DNA-Pinzette [103], verwendet und mit spFRET detailliert charakterisiert.

6.3.1 Aufbau der DNA-Pinzette

Die DNA-Pinzette ist, wie in Abb. 6.7 dargestellt, aus einem 40 bp-langen, zentralen DNA-Strang C und zwei jeweils 42 bp-langen Strängen, $A1$ und $A2$, zusammengesetzt. Letztere bilden mit C zwei 18 bp-lange, doppelsträngige Arme mit jeweils einem 24 bp-langen Überhang, zwischen den Armen verbleibt ein flexibles Gelenk aus 4 bp.

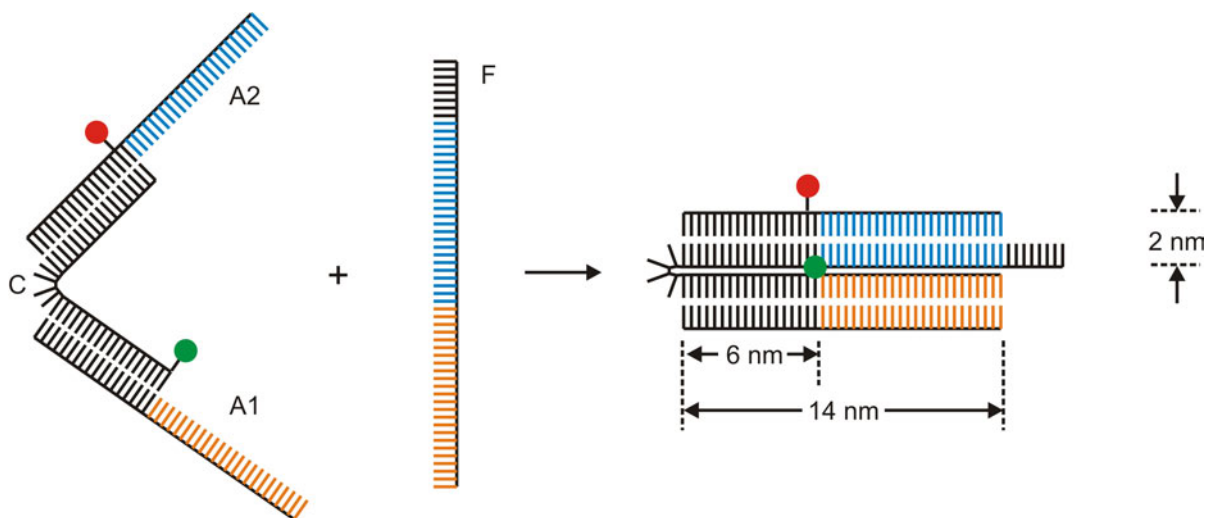


Abbildung 6.7: Die offene DNA-Pinzette wird durch Hybridisierung der überhängenden Enden der beiden Arme (blau und orange) mit dem Schließstrang F geschlossen.

Diese offene Struktur kann geschlossen werden, indem ein geeigneter 56 bp-langer Strang F mit den Überhängen der Arme hybridisiert. Da auch der Strang F einen kurzen Überhang (8 bp) besitzt, an den ein zu F komplementärer DNA-Strang \bar{F} hybridisieren kann, kann Strang F wieder abgelöst werden. Dies geschieht dadurch, dass der Strang \bar{F} zunächst an den 8 bp-langen Überhang hybridisiert und dann durch Wanderung entlang der DNA den Strang F nach und nach durch Zufallsbewegungen (*random walk*) von den Armen der Pinzette ablöst. Die Pinzette ist anschließend wieder im offenen Zustand,

d.h. sie kann mittels der Stränge F und \bar{F} reversibel geschlossen und geöffnet werden. Bei einem solchen Zyklus, wie er in Abb. 6.8 dargestellt ist, wird allerdings jeweils ein DNA-Doppelstrang $F\bar{F}$ als Abfallprodukt gebildet. Ein vollständiger Durchlauf dauert etwa 13 s.

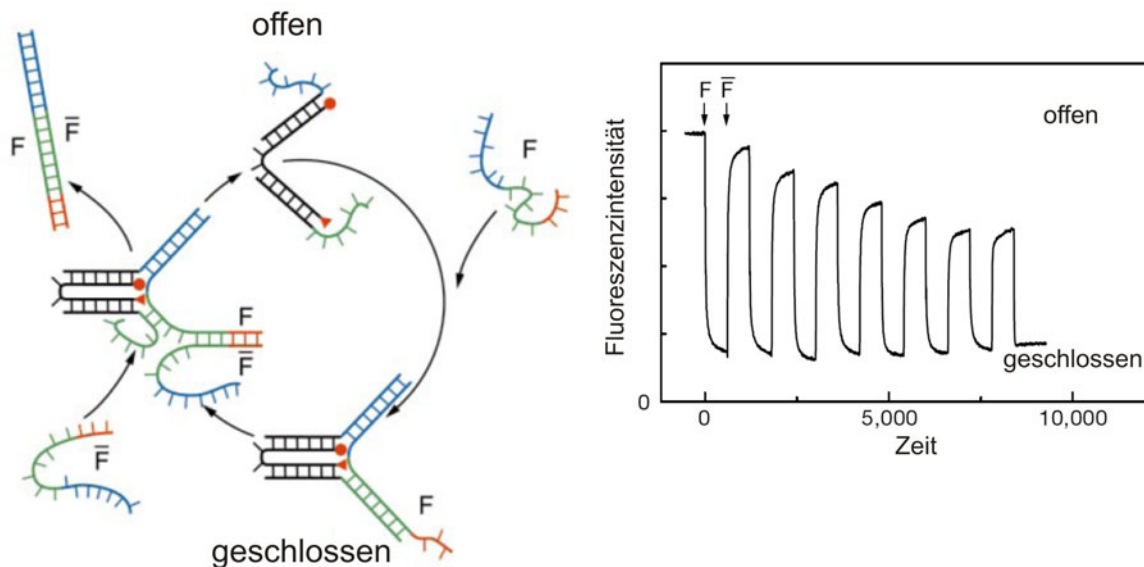


Abbildung 6.8: Die offene DNA-Pinzette wird durch Hybridisierung der überhängenden Enden der beiden Arme (blau und grün) mit dem Schließstrang F geschlossen. Das überhängende Ende des Strangs F (rot) wird bei Zugabe eines zu F komplementären Strangs \bar{F} zu einem Doppelstrang hybridisiert und die Pinzette wird durch Migration somit wieder geöffnet (links). Ist an den Enden der Arme ein FRET-Paar angebracht, nimmt die Donor-Fluoreszenz im geschlossenen Zustand stark ab. Durch Zugabe stöchiometrischer Mengen der Stränge F bzw. \bar{F} kann zwischen offenem und geschlossenem Zustand hin- und hergeschaltet werden, was sich in der Zu- und Abnahme der Fluoreszenzintensität des Donors äußert (rechts). (Abb. aus [103])

In vorhergehenden Studien der DNA-Pinzette wurde der DNA-Strang C an beiden Enden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und sowohl mit Gelelektrophorese als auch mit Ensemble-FRET untersucht [103]. Bei der offenen Pinzette sind die Arme und somit auch die Farbstoffe weit voneinander entfernt, wird die Pinzette geschlossen, befinden sich die Farbstoffe in unmittelbarer Nähe zueinander. Bei FRET-Messungen zeigt sich dies in einem starken Anstieg der FRET-Effizienz. Auf diese Weise konnte der Zyklus von offener zu geschlossener Pinzette veranschaulicht werden (s. Abb. 6.8 rechts). Die DNA-Pinzetten könnten allerdings, neben der bis jetzt diskutierten offenen und geschlossenen Form, auch Multimere bilden. Des Weiteren sind die Arme der DNA-Pinzette aufgrund der Persistenzlänge der DNA steif, das Gelenk, welches aus 4 Basenpaaren besteht, ist allerdings flexibel. Es ist also möglich, dass die Arme aufgrund der elektrostatischen Eigenschaften der DNA eine salzabhängige Dynamik zeigen. Weder die Dynamik noch die Multimere können mit Ensemble-Messungen aufgelöst wer-

den, weshalb es notwendig ist, solche DNA-Nanomaschinen auf der Einzelmolekülebene zu untersuchen. Dazu wurde der Strang *C* am 5'-Ende mit Atto532 als Donor und der Strang *A2* intern an Position 26 mit dem Akzeptor Atto647N markiert. Die Sequenzen der verwendeten DNA-Stränge (IBA Technologies, Göttingen, Deutschland) sind Abb. 6.9 zu entnehmen.

C: 5'-**Atto532**-TGCCTTGTAAGAGCGACCATCAACCTGGAATGCTTCGGAT-3'
A1: 5'-GGTCGCTCTTACAAGGCACTGGTAACAATCACGGTCTATGCG-3'
A2: 5'-GGAGTCCTACTGTCTGAACTAACGAXCCGAAGCATTCCAGGT-3' **X=T-Atto647N**
F: 5'-CGCATAGACCGTGATTGTTACCAGCGTTAGTTCAGACAGTAGGACTCCTGCTACGA-3'

Abbildung 6.9: Die Sequenzen der verwendeten DNA-Stränge zum Bau der DNA-Pinzetten.

6.3.2 Ergebnisse

Zur Überprüfung der Hybridisierung wurde zunächst eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE, 9 % Polyacrylamid/Volumen) durchgeführt (s. Abb. 6.10). In Spur *a* ist die offene Pinzetten-Struktur zu sehen, die durch Hybridisierung äquimolarer Konzentrationen der Stränge *C*, *A1* und *A2* in TE-Puffer erhalten wurde. Dazu wurden die drei Stränge in TE-Puffer zunächst auf 90° C erhitzt und anschließend langsam über 2 1/2 Stunden auf 4° C abgekühlt. Der größte Teil der DNA befindet sich in einer Bande, die der offenen Pinzetten-Struktur zuzuordnen ist, ein kleiner Teil liegt in einer unvollständigen Form vor, bei der Strang *C* lediglich mit einem der beiden Stränge *A1* bzw. *A2* hybridisiert ist. Spur *b* zeigt die Probe aus Spur *a*, welcher der Strang *F* zugegeben wurde. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur (RT) ist die Hybridisierung in TE-Puffer noch nicht vollständig abgelaufen, wie in dem Gel deutlich zu erkennen ist. Neben einer dominanten Bande, die der geschlossenen Pinzette zugeordnet werden kann, sind noch Banden der offenen Pinzette, der nur aus zwei Strängen bestehenden unvollständigen Pinzette und des Schließstrangs *F* zu erkennen. Zusätzlich ist eine Bande oberhalb der geschlossenen Pinzette zu erkennen, die auf Multimere zurückzuführen ist. In Spur *c* ist die gleiche Probe wie in Spur *b* aufgetragen mit dem Unterschied, dass bei der Hybridisierung dem TE-Puffer zusätzlich 1 M NaCl zugesetzt wurde. Hier ist zu erkennen, dass die Hybridisierung deutlich weiter fortgeschritten ist: die DNA liegt überwiegend in der geschlossenen Form oder als Multimer vor. Für die Probe in Spur *d* wurden nacheinander bei Raumtemperatur Strang *C* und Strang *A1* in äquimolaren Konzentrationen für eine Stunde bei RT in TE-Puffer inkubiert und nach Zugabe von Strang *A2* eine weitere Stunde. Dieser Probe wurde wiederum der Schließstrang *F* zugegeben und bei RT eine Stunde in TE-Puffer (Spur *e*) bzw. in TE-Puffer mit 1 M NaCl (Spur *f*) hybridisiert.

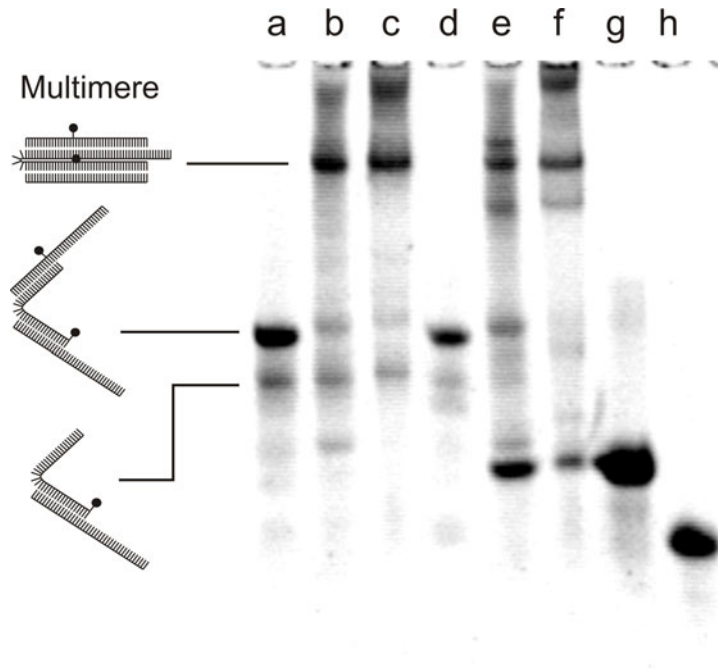


Abbildung 6.10: Polyacrylamid-Gelelektrophorese der offenen und geschlossenen Pinzetten, die unter verschiedenen Bedingungen hybridisiert wurden: Spur *a* offene Pinzette, bei der die Stränge C, A1 und A2 in TE-Puffer durch Erhitzen hybridisiert wurden; Spur *b* Probe aus Spur *a* nach Zugabe des Schließstrangs F mit 1 Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur in TE-Puffer; Spur *c* wie Spur *b* nur in TE + 1 M NaCl; Spur *d* offene Pinzetten, die durch Hybridisierung von Strang C und A1 1 Stunde bei RT und eine weitere Stunde bei RT nach Zugabe von Strang A2 in TE-Puffer hergestellt wurde; Spur *e* Zugabe des Schließstrangs F zur Probe aus Spur *d*, 1 Stunde bei RT in TE-Puffer; Spur *f* wie Spur *e* nur in TE + 1 M NaCl; Spur *g* Schließstrang F; Spur *h* Strang A1

Das Ergebnis unterscheidet sich deutlich von dem aus Spur *b* und *c*. Dies zeigt, dass die DNA-Pinzetten eine Vielzahl verschiedener Strukturen bilden können, die von der Hybridisierungsreaktion, deren Zeit, der Salzkonzentration und der Vorgeschichte der DNA abhängt. Es ist daher leicht einzusehen, dass hier Einzelmolekül-Experimente zur Charakterisierung der einzelnen Populationen notwendig sind.

Um einen möglichen Einfluss der Salzkonzentration auf den Öffnungswinkel oder die Dynamik zu studieren, wurde die Probe aus Spur *a*, d.h. die offene Pinzette, mit spFRET mit PIE untersucht. Dabei wurden verschiedene Salzkonzentrationen (kein Salz, 10 mM, 100mM und 1M NaCl) verwendet. Die erhaltenen Verteilungen der FRET-Effizienzen sind in Abb. 6.11 zu sehen. Die mittlere FRET-Effizienz wurde für jede Salz-Konzentration durch Anpassung einer Gaußverteilung an das Histogramm erhalten. Danach ergeben sich FRET-Effizienzen von 1.7 % (kein Salz), 2.1 % (10 mM NaCl), 2.5 % (100 mM NaCl) und 3.5 % (1 M NaCl). Aus diesen FRET-Effizienzen ergeben sich mit einem Förster-Radius von 51 Å, der, wie in Abschnitt D.4 beschrieben, ermittelt wurde, Abstände zwischen den beiden Fluorophoren von 10.0 nm (kein Salz), 9.7 nm (10 mM

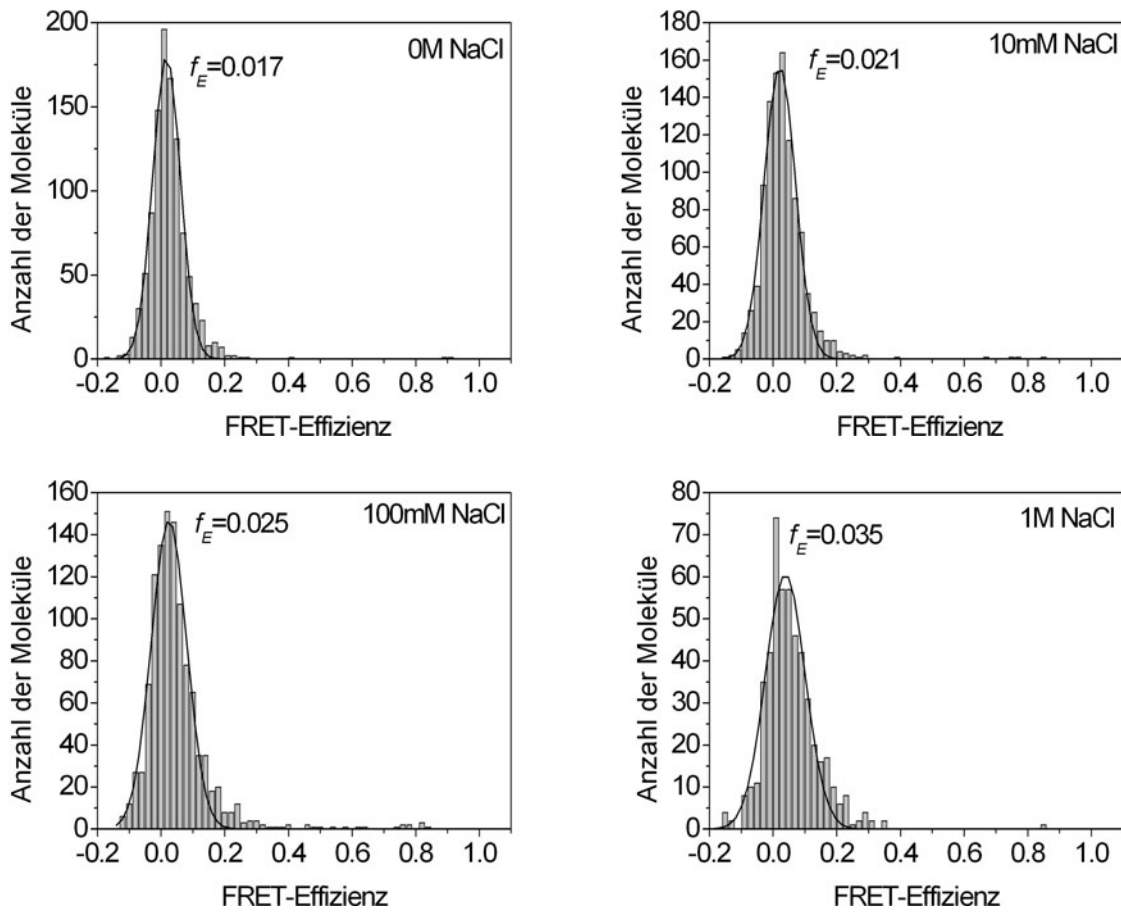


Abbildung 6.11: FRET-Effizienzen der offenen DNA-Pinzetten bei verschiedenen Salzkonzentrationen: 0.017 (kein Salz), 0.021 % (10 mM NaCl), 0.025 % (100 mM NaCl) und 0.035 % (1 M NaCl)

NaCl), 9.4 nm (100 mM NaCl) und 8.7 nm (1 M NaCl). Dies würde in etwa einem Winkel zwischen den beiden Armen der Pinzette zwischen 90° und 110° entsprechen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Abstände bei niedriger Salzkonzentration an das Limit der Sensitivität des spFRET-Aufbaus trotz Verwendung von PIE stoßen. Um die minimal detektierbare FRET-Effizienz des Aufbaus zu bestimmen, wurde die DNA₆₀, bei der die Farbstoffe 60 bp, also ca. 20 nm, entfernt voneinander sind, getestet. Hierbei wurde eine FRET-Effizienz von 2.2 % gemessen, die die Grenze der Auflösung widerspiegelt. Der Anstieg der FRET-Effizienz bei steigender Salzkonzentration konnte allerdings mehrfach reproduziert werden, so dass dieser als signifikant angesehen werden kann. Allerdings muss bei der Angabe von Abständen dieses Auflösungslimit berücksichtigt werden: die Abstände unterhalb von 2.2 % FRET-Effizienz könnten auch größer sein. Der Effekt der Salzkonzentration auf den Winkel zwischen den Armen kann leicht durch die elektrostatische Abstoßung zwischen den Armen erklärt werden. Mit steigender Salzkonzentration wird die repulsive Coulomb-Wechselwirkung gemäß Glg. 6.1 zunehmend durch die Salzionen abgeschirmt. Deren Reichweite beträgt bei 1mM NaCl beispielsweise 10 nm, bei 1M NaCl nur noch 0.3 nm.

Um auszuschließen, dass die Änderung der FRET-Effizienz auf unterschiedliches Verhalten der Farbstoffe oder Veränderung des Brechungsindex' bei verschiedenen Salzkonzentrationen zurückzuführen ist, wurde das Polyprolin aus Kapitel 5 bei den entsprechenden Salzkonzentrationen untersucht. Obwohl die FRET-Effizienz des Polyprolin mit etwa 80 % in einem deutlich dynamischeren Bereich liegt, konnte zwischen 10 mM und 1M NaCl kein signifikanter Unterschied in den Verteilungen beobachtet werden.

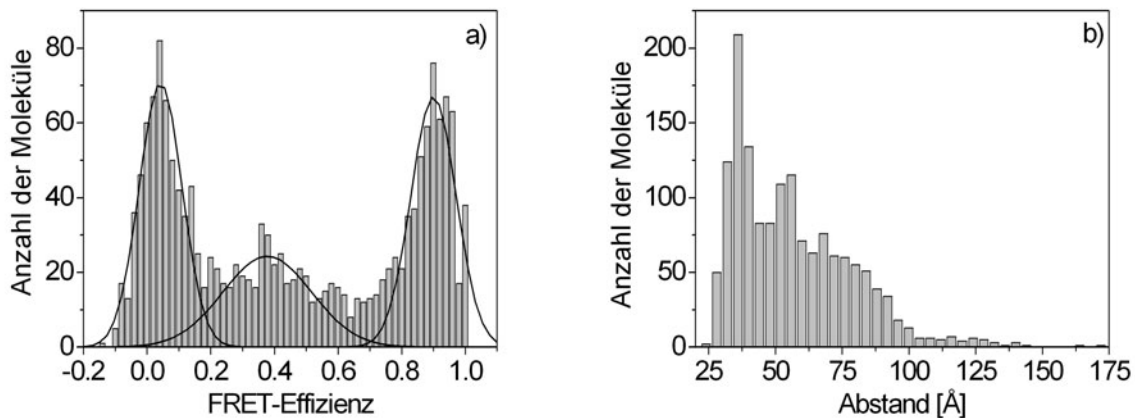


Abbildung 6.12: FRET- und Abstandsverteilung der geschlossenen DNA-Pinzetten bei 1 M NaCl (Probe aus Spur *c*). Es zeigen sich drei verschiedene Populationen, wobei die mit der niedrigen und der mittleren FRET-Effizienz auf Multimere zurückzuführen sind.

Das Histogramm der FRET-Effizienzen für den geschlossenen Zustand (Probe aus Spur *c* der PAGE) weist im Vergleich zum offenen Zustand eine deutlich veränderte Zustandsverteilung auf (s. Abb. 6.12). Es sind drei Populationen zu erkennen: eine bei 90 % FRET-Effizienz, die dem geschlossenen Zustand zuzuordnen ist, eine bei 4.3 %, die entweder von noch offenen Pinzetten oder Multimeren hervorgerufen wird, und eine bei 37.3 %, die durch Multimere zustande kommt.

Für den geschlossenen Zustand wird ein Abstand zwischen den Farbstoffen im Bereich von 0 bis 6 nm erwartet, da die Fluorophore an zwei nebeneinander liegende DNA-Helices gebunden sind. Der Abstand kann also maximal den zweifachen Durchmesser einer DNA-Helix (2 nm) zu- bzw. abzüglich der beiden Säureamidbindungen (bis zu ca. 1 nm) betragen, d.h. zwischen 0 und 6 nm liegen (Abb. 6.7). 90 % FRET-Effizienz entspricht einem Abstand von 3.5 nm, der damit in guter Übereinstimmung mit der Vorhersage ist.

Bei der Verteilung der FRET-Effizienzen ist eine Spitze bei ähnlich niedrigen Werten wie bei den offenen Pinzetten zu erkennen. Diese muss allerdings auf Multimere zurückzuführen sein, da einerseits bei der PAGE in Spur *c* nur eine sehr schwache Bande bei den offenen Pinzetten zu erkennen ist und andererseits auch bei Hinzugabe des Schließstrangs *F* im Überschuss die Verteilung bei niedriger FRET-Effizienz erhalten bleibt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass hier an jeden der Arme ein einzelner

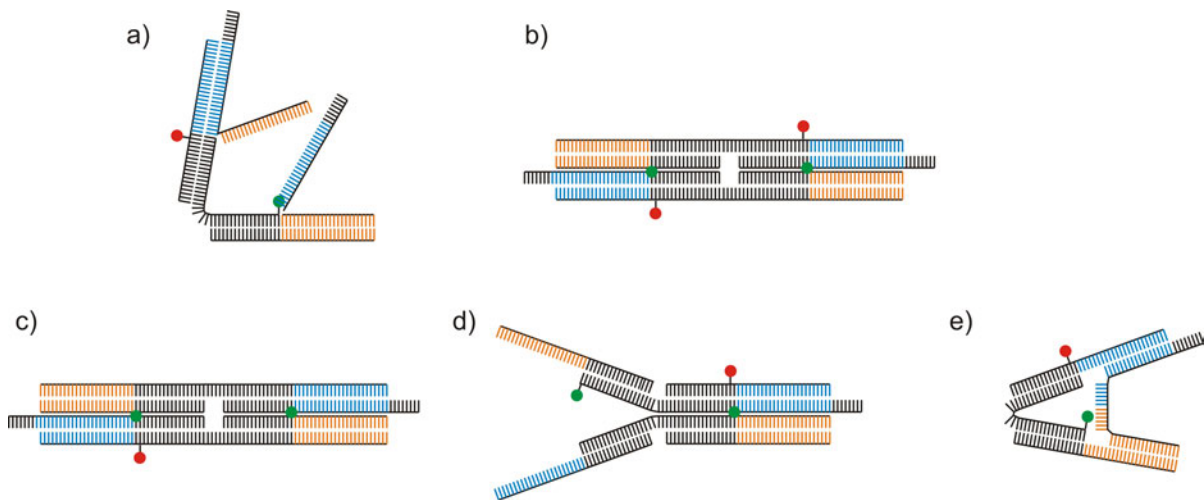


Abbildung 6.13: Mögliche Multimere mit unterschiedlichen Stöchiometrien

Schließstrang F gebunden hat. Die offene Form bleibt so erhalten, das Molekulargewicht liegt aber oberhalb der geschlossenen Pinzette (Abb. 6.13a).

Die dritte Verteilung der FRET-Effizienzen ist zum Teil auf Konstrukte, wie in Abb. 6.13 c) und d) dargestellt, zurückzuführen. Aus FCS-Experimenten konnte die Markierungseffizienz unter Berücksichtigung der unterschiedlich großen Messvolumina auf 41 % für den grünen Farbstoff und 33% für den roten bestimmt werden. Dies bedeutet, dass in einem Konstrukt wie in Abb. 6.13c und d) zwei grüne und nur ein roter Farbstoff vorhanden sein können. Dies führt sowohl dazu, dass die FRET-Effizienz deutlich kleiner ist als bei der geschlossenen Form mit zwei Farbstoffen als auch dazu, dass die Stöchiometrie höher ist als bei einem 1:1 Verhältnis der Farbstoffe. Diese Hypothese wird durch Abb. 6.14 gestützt: Die Stöchiometrie der mittleren Verteilung ist höher als die der beiden anderen Verteilungen. Allerdings ist sie kleiner als 0.66, was bedeutet, dass auch Konstrukte mit gleicher Anzahl an Farbstoffen vorliegen müssen. Dies können unvollständig geschlossene Pinzetten wie in Abb. 6.13e sein, bei denen die Hybridisierung des Schließstrangs an beiden Armen gleichzeitig begonnen hat aber aus sterischen Gründen aufgrund der helicalen Struktur der DNA nicht komplett ausgeführt werden konnte.

Idealerweise wäre ein Schalten zwischen offener und geschlossener Pinzette ohne Multimerbildung wünschenswert. Die Hybridisierung der Stränge und damit auch die Bildung von Multimeren ist, wie gezeigt werden konnte, durch die Salzkonzentration und die Hybridisierungsreaktion beeinflussbar. Denkbar wäre zudem eine Abhängigkeit von der Konzentration der Stränge bei der die Hybridisierung durchgeführt wird. Zur Vermeidung der Bildung von Multimeren könnten die Überhänge an den beiden Armen unterschiedlich lang gewählt werden, so dass ein Arm schneller und stabiler hybridisiert und Konstrukte wie in Abb. 6.13e mit niedrigerer Wahrscheinlichkeit auftreten.

Die Dynamik der Arme der offenen Pinzetten konnte aufgrund des großen Abstands

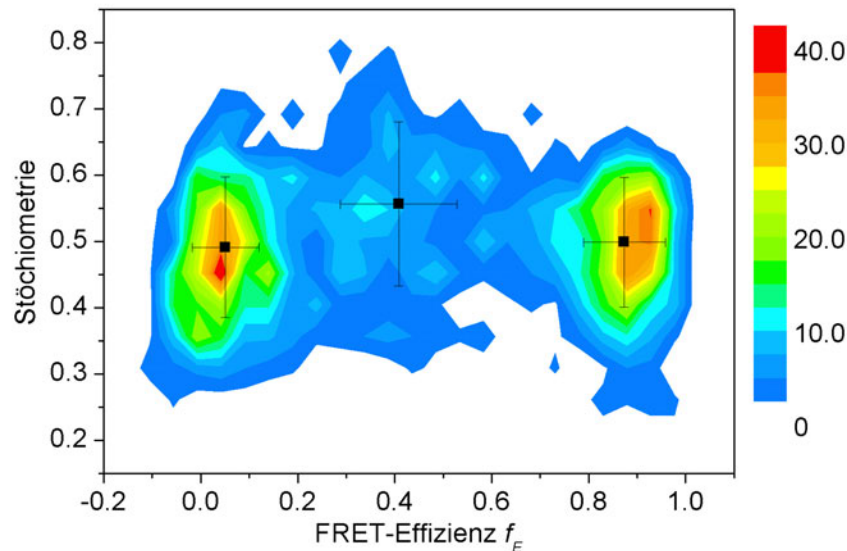


Abbildung 6.14: Konturabbildung der Stöchiometrie in Abhängigkeit der FRET-Effizienz der geschlossenen Pinzetten. Die Stöchiometrie der mittleren FRET-Population ist eindeutig höher, was auf Multimere mit zwei Donoren und einem Akzeptor zurückzuführen ist.

der Arme voneinander nur unzureichend untersucht werden. Die Markierungspositionen sind ursprünglich so gewählt worden, dass ein möglichst großer Unterschied der FRET-Effizienzen zwischen offenem und geschlossenem Zustand entsteht, um die Funktionalität der DNA-Pinzetten zu untersuchen. Zur Charakterisierung der Dynamik im offenen Zustand müssten die Markierungspositionen allerdings so gewählt werden, dass die FRET-Effizienz im empfindlichen Bereich, also bei etwa 50 % liegt. Die Arme müssten dazu nicht am Ende, sondern in der Mitte markiert werden.

6.4 Zusammenfassung

Mit Einzelmolekül-Experimenten an DNA-Nanokonstrukten konnte gezeigt werden, dass DNA aufgrund ihrer bemerkenswerten Eigenschaft der Selbstorganisation ideal für supramolekulare geordnete Strukturen und als nanomechanischer molekularer Baustein geeignet ist. In beiden Projekten ist die Notwendigkeit der Untersuchung auf der Einzelmolekülebene deutlich zu erkennen.

Das DNA-FP-Konjugat konnte mit Ensemble-Messungen nur äußerst unzulänglich charakterisiert werden, da die Bestimmung der FRET-Effizienzen aufgrund der nicht bekannten Markierungseffizienz große Fehler mit sich bringt. Mit der hier verwendeten

Methode zur Bestimmung der FRET-Effizienzen, der *Burst Analysis* mit PIE, konnten die Abstände zwischen den Chromophoren in überzeugender Übereinstimmung mit dem einfachen theoretischen Modell, welches die DNA als einen Zylinder beschreibt, bestimmt werden.

Es ist also gelungen ein semisynthetisches Antennenmolekül zu konstruieren, welches großes Potential in der molekularen Photonik und Bioelektronik zeigt. DNA erweist sich in solchen Konjugaten als idealer Baustein, da hiermit die fluoreszierenden Proteine auf der Nanometerskala exakt platziert werden können. Die Konstrukte können aufgrund der verschiedenen physikochemischen Eigenschaften der fluoreszierenden Proteine in zahlreichen Varianten entworfen werden, so dass sie sich für viele Anwendungen in der Nanobiotechnologie eignen. In einem darauf aufbauenden Projekt soll dieses DNA-Konjugat dahingehend erweitert werden, dass anstelle des eYFP eine photoschaltbare Mutante, Dronpa, verwendet wird. Dieses FP lässt sich durch Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 488 nm bzw. 405 nm reversibel etwa 100 mal an- und ausschalten [96]. Die DNA-Pinzetten wurden bislang nur in Ensemble-Messungen auf ihre Funktionalität untersucht [103]. Hierdurch konnte weder die Struktur der Pinzetten aufgeklärt noch die verschiedenen Populationen der Multimeren aufgelöst werden. Durch die Einzelmolekül-Messungen konnten Informationen über die genauen Abstände und somit den Öffnungswinkel der Pinzetten in Abhängigkeit der Salzkonzentration gewonnen und verschiedene Populationen von Multimeren identifiziert werden. In der geschlossenen Form liegt eine größere Anzahl an Multimeren vor als erwartet, die sich in zwei Populationen, die sich in der Stöchiometrie unterscheiden, aufteilt. Dies zeigt deutlich, dass für ein vollständiges Verständnis und zur Optimierung von DNA-Nanomaschinen Einzelmolekül-Messungen vonnöten sind.

Kapitel 7

Zusammenfassung und Ausblick

Das Verständnis der molekularen Grundlagen des Lebens, aber auch die Entwicklung und Charakterisierung von Maschinen und Bauteilen für die Nanotechnologie erfordern die Genauigkeit einzelmolekülsensitiver Methoden, wie die der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie. Aufgrund der Komplexität der im Interesse stehenden Systeme ist die Weiterentwicklung solcher Einzelmolekültechniken von weitreichendem Interesse.

In dieser Arbeit wurde mit der gepulsten alternierenden Anregung (PIE) eine Technik entwickelt, bei der die Fluoreszenzfarbstoffe alternierend mit gepulsten Lasern angeregt werden. Bei hohen Repetitionsraten von 5-30 MHz, kann jedem emittierten Photon sowohl dessen Farbe als auch dessen Anregungsquelle zugeordnet werden. Diese Unterscheidung erhöht die Sensitivität bei einer Vielzahl von Methoden der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie. Bei spFRET kann beispielsweise unterschieden werden, ob ein Farbstoff direkt durch den Laser oder über FRET angeregt wurde, so dass Informationen über die Stöchiometrie jedes einzelnen Moleküls zugänglich sind. Die Sensitivität steigert sich infolgedessen vor allem im Bereich kleiner FRET-Effizienzen. Die Erweiterung von PIE auf drei Farben bringt insbesondere den Vorteil, dass drei inter- oder intramolekulare Abstände gleichzeitig bestimmt und so zweidimensionale Abstandsinformationen gewonnen werden können.

Weiterhin erhöht sich die Genauigkeit von FCCS sowie der Kontrast von LSM-Bildern, indem das spektrale Übersprechen, welches durch die Überlappung der Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe entsteht, herausgeschnitten werden kann. Mit PIE werden darüber hinaus Verbesserungen bei Kollokalisationsmessungen auf Bildern erzielt, da mehrfarbige Messungen mit nur einem Detektor durchgeführt werden können und damit beide Farben mit der gleichen Optik abgebildet werden. Dabei werden die Photonen aufgrund ihrer Ankunftszeit einer Anregungsquelle zugeordnet. Hervorzuheben ist ebenfalls die Möglichkeit, dass mittels PIE nicht nur quantitative FCCS-Messungen bei gleichzeitigem FRET, sondern auch die Bestimmung von FRET-Effizienzen aus demselben Datensatz möglich sind.

Die Vorteile von PIE-basierten Fluoreszenztechniken kommen insbesondere bei der Untersuchung komplexer biologischer Systeme, wie zum Beispiel der Proteinfaltung oder bei der Entwicklung von DNA-Konstrukten für die Nanotechnologie, zum Tragen.

Die effiziente Faltung neu exprimierter Proteine wird oftmals von Molekularen Chaperonen unterstützt, die vor Falschfaltung und Aggregation schützen. Eines der am besten untersuchten Chaperone ist das Chaperonin GroEL, welches aus zwei heptameren Ringen besteht, in denen ein Protein mit Hilfe von ATP und dem Co-Chaperonin GroES ungestört von äußeren Einflüssen falten kann. Obwohl inzwischen ein detailliertes Bild des Reaktionszyklusses existiert, ist es noch weitgehend unverstanden, wieso manche Proteine nicht spontan falten können, sondern nur mit Hilfe von GroEL. In dieser Arbeit konnte durch spFRET-Messungen in Kombination mit PIE ein detaillierter Einblick in die Konformation der einzelnen Zustände im Verlauf eines Reaktionszyklusses gewonnen werden. Es konnte eine partielle Entfaltung des Substratproteins bei der Bindung an GroEL beobachtet werden, die jedoch nicht für die Beschleunigung der Faltungsrate verantwortlich sein kann. Möglicherweise werden durch diese Entfaltung allerdings kinetische Fallen falsch gefalteter Proteine entfernt und diese Proteine somit wieder auf einen effizienten Faltungsweg zurückgebracht.

In der Nanotechnologie werden Materialien mit programmierbaren Eigenschaften benötigt, auf denen einzelne Komponenten auf der Nanometerskala exakt angeordnet werden können. DNA ist dafür aufgrund ihrer selbstorganisierenden Eigenschaften ideal geeignet. So konnte ein DNA-Protein-Konjugat entwickelt werden, welches aus einem kurzen DNA-Doppelstrang, auf dem ein fluoreszierendes Protein und ein synthetischer Farbstoff kovalent gebunden waren, mit Hilfe von *Burst Analysis* mit PIE äußerst genau charakterisiert werden. Dies ist besonders interessant im Hinblick auf Weiterentwicklungen mit schaltbaren Mutanten der fluoreszierenden Proteine zur Verwendung in der Bioelektronik und molekularen Photonik. Zur Entwicklung und Optimierung von DNA-Nanomaschinen ist die Kenntnis der genauen Eigenschaften von höchstem Nutzen. Daher wurde eine DNA-Nanomaschine, die DNA-Pinzette, auf dem Einzelmolekülniveau mit spFRET in Kombination mit PIE untersucht. Im Gegensatz zu Ensemble-Messungen konnten Informationen über salzabhängige Konformationsänderungen und über die Bildung von Multimeren gewonnen werden. Untersuchungen solcher DNA-Nanomaschinen auf dem Einzelmolekülniveau, um Informationen über Stabilität, Integrität, Fluktuationen und Einzigartigkeit solcher Strukturen zu erlangen, sind also unabdingbar.

Weitere Anwendungsbereiche von PIE entstünden durch die Verwendung von zwei pikosekunden-gepulsten Lasern: Neben der schnelleren Repetitionsrate und somit weniger Verlusten in der Molekularen Helligkeit, wären auch zusätzlich die Lebensdauerinformationen zugänglich. Die Lebensdauer kann nach Glg. 2.11 ebenfalls zur Berechnung der FRET-Effizienzen herangezogen werden. Dadurch kann aus dem gleichen Datensatz die

FRET-Effizienz auf zwei verschiedene Weisen berechnet werden und somit eine noch höhere Genauigkeit erzielt werden, insbesondere auch deswegen, da Änderungen in der Molekularen Helligkeit der einzelnen Fluorophore beobachtet werden können [112]. Wie schon von Seidel und seinen Mitarbeitern gezeigt werden konnte [28], können mit der Lebensdauerinformation bei der *Burst Analysis* auch Konformationsänderungen untersucht werden.

Bei spFRET mit PIE wäre auch eine unregelmäßige Pulsabfolge denkbar, so dass beispielsweise nur nach jedem dritten grünen Puls ein roter Puls folgte. Die Molekulare Helligkeit nach der grünen Anregung würde dementsprechend erhöht werden, wodurch sich die Photonenstatistik zur Berechnung der FRET-Effizienz, die nur aus den Fluoreszenzintensitäten nach der grünen Anregung berechnet wird, verbessern würde. Die direkte rote Anregung wird nur zur Kontrolle der Anwesenheit eines aktiven Akzeptors verwendet, weshalb hier die Photonenstatistik keine so entscheidende Rolle spielt.

Bei *Burst Analysis* mit PIE ist es prinzipiell möglich, die Moleküle, die durch das Probenvolumen diffundieren, zu zählen. Die Zahl ist allerdings stark davon abhängig, wie der Grenzwert, den ein Photonenburst überschreiten muss, um als Molekül erkannt zu werden, gewählt wird. Daher müsste zunächst ein geeignetes Kriterium für die Festlegung des Grenzwertes in Abhängigkeit der Molekularen Helligkeit gefunden werden. Eine Anwendung wäre hier beispielsweise eine genauere Bestimmung der Quantenausbeute des GFP, indem bei einem mit einem roten Farbstoff markierten GFP, gezählt wird, wieviele der Proteine einen aktiven Chromophor ausgebildet haben.

Zur allgemeinen Anwendung der Bestimmung der FRET-Effizienzen mit PIE muss weiterhin der Fall ungleicher Detektionseffizienzen und Quantenausbeuten, d.h. $\alpha \neq 1$, behandelt werden. Vermutlich müssten hierzu die Detektionskanäle nach der grünen Anregung mit der entsprechenden Gewichtung addiert werden.

Anhang A

Theorie des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers

Die Transferrate k_T für zwei Farbstoffe mit Abstand R ist gegeben durch:

$$k_T(R) = \frac{\phi_D \kappa^2}{\tau_D R^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty \epsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (\text{A.1})$$

wobei ϕ_D die Quantenausbeute des Donors ohne Akzeptor, κ^2 der Orientierungsfaktor, τ_D die Lebensdauer des Donors ohne Akzeptor, N die Avogadro-Zahl, n der Brechungsindex, $F_D(\lambda)$ die Fluoreszenzintensität des Donors und $\epsilon_A(\lambda)$ der Extinktionskoeffizient des Akzeptors. Die Fläche unter der Fluoreszenzintensität sollte auf 1 normiert werden. Das Integral in dieser Gleichung wird als das Überlappintegral bezeichnet:

$$J(\lambda) = \int \epsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (\text{A.2})$$

Förster-Radius Der Abstand, bei dem 50% der Energie übertragen wird, wird als Förster-Radius R_0 bezeichnet. Diese Bedingung ist erfüllt, wenn gilt: $k_T(R) = \tau_D^{-1}$. Dies führt mit Glg. A.1 auf folgenden Ausdruck für den Förster-Radius:

$$R_0^6 = \phi_D \kappa^2 \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty \epsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (\text{A.3})$$

Dieser kann vereinfacht werden zu:

$$R_0 = 8.79 \cdot 10^{-5} \left[\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda) \right]^{1/6} \quad (\text{in } \text{Å}) \quad (\text{A.4})$$

Orientierungsfaktor Der Orientierungsfaktor κ^2 beschreibt die Orientierung der Dipole der Fluorophore zueinander und ist gegeben durch:

$$\begin{aligned} \kappa^2 &= (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \\ &= (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi_A - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

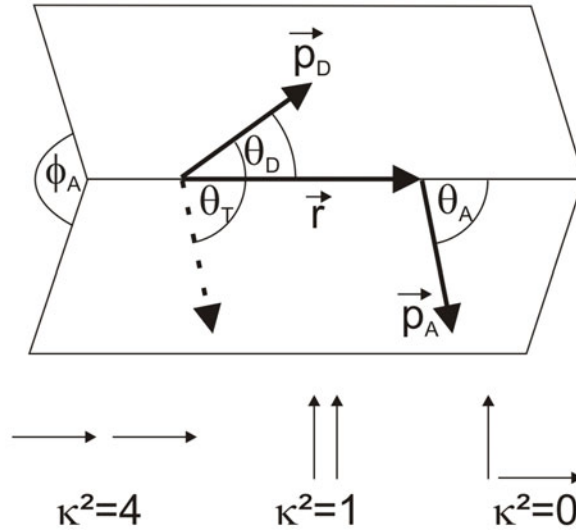


Abbildung A.1: Orientierung der Dipolmomente \vec{p}_D und \vec{p}_A und Definition der Winkel (Abb. nach [12])

mit den Definitionen der Winkel wie in Abb. A.1.

κ^2 kann, abhängig von der Orientierung der Donor und Akzeptor-Dipole, zwischen 0 und 4 liegen. Für kollineare Übergangsdipolmomente ist $\kappa^2 = 4$, für parallele ist $\kappa^2 = 1$. Für Übergangsdipolmomente, die senkrecht zueinander stehen, wird κ^2 jedoch Null. In der Praxis wird bei der Berechnung von Förster-Radien meistens angenommen, dass die Dipole aufgrund von Rotationsdiffusion über alle Winkel gleichmäßig verteilt sind:

$$\begin{aligned}
 \langle \kappa^2 \rangle &= \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \left[\frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi_A - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \sin \theta_A d\theta_A d\phi_A \right] \\
 &\quad \sin \theta_D d\theta_D d\phi_D \\
 &= \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \left[(\cos \theta_D)^2 + \frac{1}{3} \right] \sin \theta_D d\theta_D d\phi_D \\
 &= \frac{2}{3}
 \end{aligned} \tag{A.6}$$

Durch diese Annahme können nur enorme Fehler auftreten, wenn Donor- und Akzeptor vollständig senkrecht zueinander polarisiert wären, d.h. $\kappa = 0$. Dies ist aber experimentell extrem unwahrscheinlich. Liegt κ^2 zwischen 1 und 4 kann die Verwendung von $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ zu einem maximalen Fehler von 35% führen, da κ^2 nur mit der sechsten Wurzel in die Berechnung des Abstandes eingeht [12]. Es ist schwierig, genaue Werte für κ^2 zu bestimmen, mit Hilfe von Anisotropie-Messungen kann aber zumindest eine Abschätzung des Fehlers durchgeführt werden [12].

Anhang B

Autokorrelationsanalyse

Die Korrelationsfunktion beschreibt die Ähnlichkeit zweier zeitlich schwankender Signale, die Autokorrelation entsprechend die Selbstähnlichkeit eines Signals. Durch die Korrelation einer Funktion können charakteristische Zeitkonstanten der zugrundeliegenden Prozesse herausgefiltert werden. Die Autokorrelationsfunktion ist im Allgemeinen durch

$$\Phi(\tau) = \langle f(t)f(t + \tau) \rangle \quad (\text{B.1})$$

definiert, wobei $\langle \rangle$ den zeitlichen Mittelwert bezeichnet. In diesem speziellen Fall entspricht dem Signal $f(t)$ das Fluoreszenzsignal $F(t)$. Bei konstanter Anregungsleistung sind die Schwankungen dieses Fluoreszenzsignals δF als die Abweichung vom Mittelwert definiert:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad \text{mit} \quad \langle \delta F(t) \rangle = 0 \quad (\text{B.2})$$

Für Prozesse, die zum Einen stationär, d.h. die mittleren Parameter verändern sich nicht mit der Zeit, und zum Anderen ergodisch sind, d.h. jedes Mittel über einen Teil der Probe ist repräsentativ für die ganze Probe, ist die ACF somit unabhängig von der absoluten Zeit und der zeitliche Mittelwert entspricht dem Mittelwert über das Ensemble. Somit kann die normierte Autokorrelation für das Fluoreszenzsignal durch

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 \quad (\text{B.3})$$

ausgedrückt werden. Die Konstante +1 wird im Folgenden vernachlässigt, da sie keinerlei relevante Informationen enthält.

Die Fluoreszenzintensität ist nach Glg. 2.19 gegeben durch

$$F(t) = \int_V \kappa \cdot \phi \cdot \sigma \cdot I_0 \cdot W(\vec{r}) \cdot C(\vec{r}, t) d\vec{r} \quad (\text{B.4})$$

mit

σ : Absorptionsquerschnitt

ϕ : Fluoreszenz-Quantenausbeute

κ : Gesamteffizienz des Detektors und der Apparatur (Verluste durch Filter, Spiegel,...)

ε : Molekulare Helligkeit mit $\varepsilon = \kappa \cdot \phi \cdot \sigma \cdot I_0$

$S(\vec{r})$: Detektionswahrscheinlichkeit, limitiert durch die Objektiv-Pinhole-Kombination (*Collection Efficiency Function*)

$X(\vec{r})$: Ausdehnung der Probe¹

$W(\vec{r})$: Intensitätsverteilung des detektierten Lichts mit $W(\vec{r}) = \frac{I_{ex}(\vec{r}) \cdot S(\vec{r}) \cdot X(\vec{r})}{I_0} = \varepsilon \cdot e^{-2\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2}} \cdot e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}}$

Damit kann Glg. 2.19 folgendermaßen vereinfacht werden:

$$F(t) = \int_V W(\vec{r}) \cdot \varepsilon \cdot C(\vec{r}, t) d\vec{r} \quad (\text{B.5})$$

Unter der Annahme, dass die Translationsdiffusion der Moleküle die einzige Ursache für die Fluktuationen sind, können diese durch die Änderung der lokalen Konzentration δC beschrieben werden:

$$\delta F(t) = \varepsilon \int W(\vec{r}) \cdot \delta C(\vec{r}, t) d\vec{r} \quad (\text{B.6})$$

Einsetzen der Funktion B.6 ind B.3 führt zu:

$$G(\tau) = \frac{\int \int W(\vec{r}) \cdot W(\vec{r}') \cdot \langle \delta(\varepsilon \cdot C(\vec{r}, t)) \cdot \delta(C(\vec{r}', t + \tau)) \rangle d\vec{r} d\vec{r}'}{[\int W(\vec{r}) \cdot \langle \delta(\varepsilon \cdot C(\vec{r}, t)) \rangle d\vec{r}]^2} \quad (\text{B.7})$$

Die Korrelation der Konzentrationsfluktuationen wird zur Funktion

$$f(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, t) \cdot \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle \quad (\text{B.8})$$

zusammengefasst.

Zur Beschreibung der Anzahl von Teilchen in einem gegebenem Volumenelement kann die Poissonverteilung verwendet werden². Die Wahrscheinlichkeit N Teilchen in einem Volumenelement mit im Mittel ν Teilchen zu finden, ist demnach gegeben durch:

$$W(N) = \frac{e^{-\langle N \rangle} \langle N \rangle^N}{N!} \quad (\text{B.9})$$

¹Dieser Faktor ist bei Proben vonnöten, bei denen das Volumen der Probe, aus dem Fluoreszenz gemessen werden kann, kleiner als das Probenvolumen ist. Dies ist zum Beispiel bei Membranen der Fall. In den hier behandelten Messungen ist $X(\vec{r}) = 1$ und braucht demnach nicht berücksichtigt werden.

²Wahrscheinlichkeit, wieviele Ereignisse von sehr vielen möglichen, aber einzeln relativ unwahrscheinlichen unabhängigen Ereignissen eintreten [113].

Da bei der Poissonverteilung Erwartungswert und Varianz identisch sind, gilt: $\langle \delta N^2 \rangle = \langle N \rangle$. Damit gilt für die Schwankungen der Konzentration $\langle \delta C^2 \rangle$:

$$\langle \delta C^2 \rangle = \frac{\langle \delta N^2 \rangle}{V^2} = \frac{\langle N \rangle}{V^2} = \frac{\langle C \rangle}{V} \quad (\text{B.10})$$

mit $\langle C \rangle = \langle N \rangle / V$.

Für den Konzentrationskorrelationsterm B.8 hat dies zur Folge, dass

$$f(\vec{r}, \vec{r}', 0) = \langle \delta C(\vec{r}, 0) \cdot \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle = \langle C \rangle \delta(\vec{r} - \vec{r}') \quad (\text{B.11})$$

gilt, wobei die Deltafunktion die Dimension eines reziproken Volumens hat. Dies bedeutet soviel, dass nicht wechselwirkende Teilchen zum Zeitpunkt $\tau = 0$ nur am selben Ort korrelieren.

Der zeitliche Verlauf der Konzentrationsfluktuationen δC lässt sich nach dem zweiten Fickschen Gesetz beschreiben:

$$\frac{\partial(\delta C)}{\partial t} = D \nabla^2(\delta C) \quad (\text{B.12})$$

wobei D der Diffusionskoeffizient ist. Diese Differentialgleichung lässt sich im Fourierraum lösen. Die Fouriertransformation von Glg. B.12 in den \vec{k} -Raum führt auf [8]:

$$\frac{\partial}{\partial t} \delta \tilde{C}(\vec{k}, t) = -D \vec{k}^2 \delta \tilde{C}(\vec{k}, t) \quad (\text{B.13})$$

mit der Lösung:

$$\delta \tilde{C}(\vec{k}, t) = \delta \tilde{C}(\vec{k}, 0) \cdot e^{-D \vec{k}^2 t} \quad (\text{B.14})$$

Fouriertransformation des Konzentrationskorrelationsterms B.8 führt mit B.14 zu:

$$f(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \int \{ \langle \delta C(\vec{r}', 0) \cdot \delta \tilde{C}(\vec{k}, 0) \cdot e^{-D \vec{k}^2 \tau} \rangle \} e^{i \vec{k} \vec{r}} d\vec{k} \quad (\text{B.15})$$

Durch Einsetzen der Anfangsbedingung B.11 gelangt man zu:

$$\langle \delta \tilde{C}(\vec{k}, t) \cdot \delta C(\vec{r}', 0) \rangle = \langle \delta C(\vec{r}', 0) \cdot \delta \tilde{C}(\vec{k}, 0) \cdot e^{-D \vec{k}^2 \tau} \rangle \quad (\text{B.16})$$

Rücktransformation von Glg. B.16 liefert schließlich:

$$f(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \frac{\langle C \rangle}{(4\pi D \tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4D\tau}} \quad (\text{B.17})$$

Dieser Ausdruck gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Teilchen, das sich zum Zeitpunkt $\tau = 0$ am Ort \vec{r} befindet, sich zum Zeitpunkt τ' am Ort \vec{r}' aufhält.

Einsetzen von Glg. B.17 in Glg. 2.10 ergibt:

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{1}{\langle C \rangle} \cdot \frac{1}{(4\pi D \tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot \frac{\int \int W(\vec{r}) W(\vec{r}') e^{-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4D\tau}} d\vec{r} d\vec{r}'}{[\int W(\vec{r}) d\vec{r}]^2} \quad (\text{B.18}) \\ &= \frac{1}{\langle C \rangle} \cdot \frac{1}{(4\pi D \tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot \frac{\int \int e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_r^2}} \cdot e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}} \cdot e^{-\frac{2(x'^2+y'^2)}{\omega_r^2}} \cdot e^{-2\frac{z'^2}{z_0^2}} \cdot e^{-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4D\tau}} d\vec{r} d\vec{r}'}{\left[\int e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_r^2}} \cdot e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}} d\vec{r} \right]^2} \end{aligned}$$

Lösen dieser Gleichung führt zur endgültigen Autokorrelationsfunktion:

$$G_{diff}(\tau) = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} \left(\frac{1}{1 + 4D\tau/\omega_r^2} \right) \left(\frac{1}{1 + 4D\tau/\omega_z^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{B.19})$$

In der Literatur ist oft eine andere Form dieser Gleichung zu finden, bei der $\tau_D = \frac{\omega_r^2}{4D}$ gesetzt wurde:

$$G_{diff}(\tau) = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{\omega_r^2}{\omega_z^2} \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (\text{B.20})$$

τ_D entspricht in etwa der Diffusionszeit durch das effektive Messvolumen. Dieses lässt sich durch $V_{eff} = [\int W(\vec{r}) d\vec{r}]^2 / \int W^2(\vec{r}) d\vec{r}$ berechnen und ist $\left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \omega_r^2 \cdot \omega_z$ berechnet.

Anhang C

Details des experimentellen Aufbaus

In diesem Kapitel werden die einzelnen Komponenten des konfokalen Mikroskopaufbaus aus Abb. 3.4 und die Datenauswertung genauer erläutert. In Abb. C.1 ist nochmals der Aufbau schematisch dargestellt, diesmal in der Zwei-Farben-Variante.

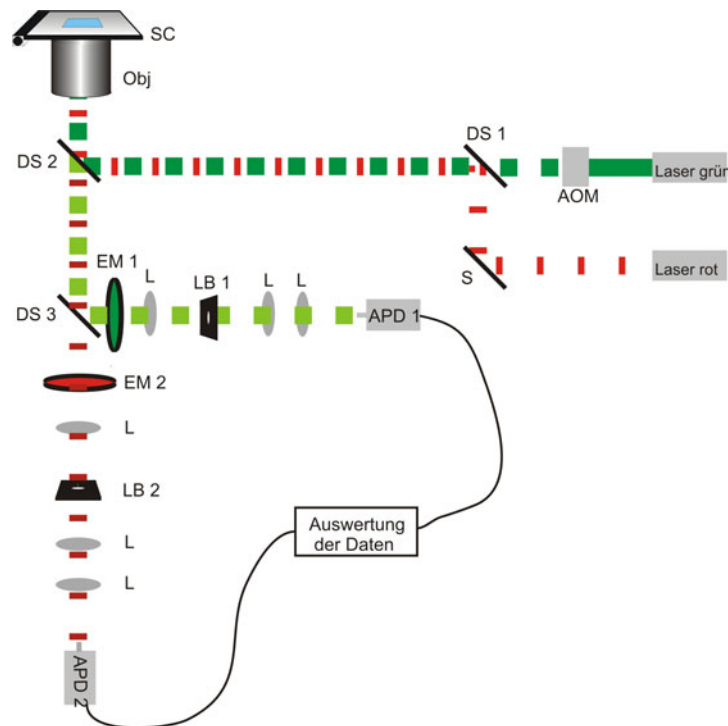


Abbildung C.1: Schematische Darstellung des 2-Farben-Aufbaus: Die beiden Laserlinien werden zunächst über einen dichroitischen Spiegel überlagert (DS1) und anschließend über einen weiteren dichroitischen Spiegel (DS2) in das Objektiv eingekoppelt. Die Detektion erfolgt in drei verschiedenen Kanälen, bei denen das Fluoreszenzlicht nach Aufteilung in die Wellenlängenbereiche (DS3) jeweils einen Bandpassfilter (EM1/EM2) passiert und nach der Lochblende (LB1/LB2) auf den Detektor (APD1/APD2) fokussiert wird.

C.1 Laser

Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe stehen verschiedene Laser zur Verfügung. Für die Anregung im grünen bis gelben Wellenlängenbereich wurde zunächst ein diodengepumpter Festkörperlaser mit einem Neodym (Nd^{3+}) dotierten Yttrium-Vanadat Wirtsgitter bei einer Wellenlänge von 532nm verwendet. Später wurde dieser durch einen wassergekühlten Argon-Krypton-Mischgaslaser ersetzt, bei dem ein Prisma das Einstellen verschiedener Wellenlängen ermöglicht. Beide Laser sind kontinuierlich emittierende (*continuous wave, cw-*) Laser mit Leistungen von bis zu einigen 100 mW pro Laserlinie. Für den blauen und roten Wellenlängenbereich stehen jeweils mehrere Diodenlaser zur Verfügung. Diese sind gepulste Laser mit einer Pulsdauer im Bereich von etwa 50 ps und Repetitionsraten von bis zu 80 MHz. In Abb. C.2 ist die Breite und Form eines solchen Laserpulses zu sehen. Diodenlaser haben allerdings den Nachteil, dass sie eine größere spektrale Breite und ein stark elliptisches Strahlprofil haben. Letzteres kann entweder durch die Verwendung von Raumfiltern oder *single-mode* Fasern aufgereinigt werden.

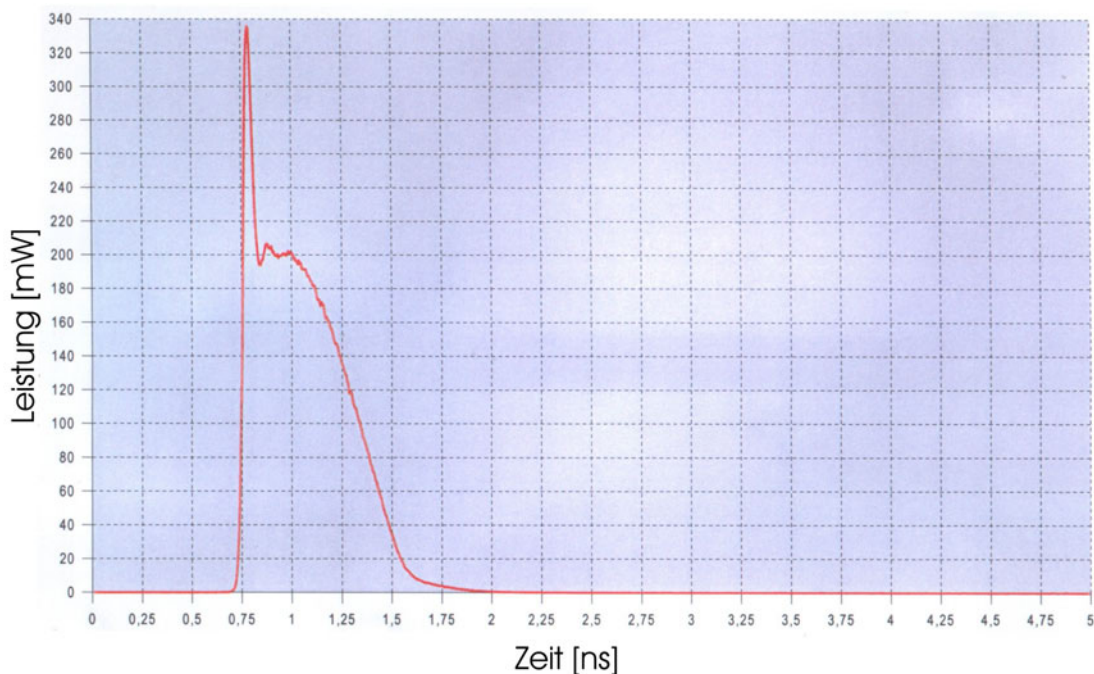


Abbildung C.2: Breite und Form eines Pulses des Diodenlasers LDH-P-C-635B (aus [114])

Die verwendeten Laser und deren Wellenlängen sind in Tabelle C.1 aufgeführt.

Laser	Modell	Laserlinien [nm]	Leistung [mW]	Pulsbreite	Hersteller
Dioden gepumpter Festkörperlaser (Nd:YVO ₄)	GCL-100-L-0.5%	532	100	cw	CrystaLaser, Reno, USA
Dioden gepumpter Festkörperlaser (Nd:YVO ₄)	Millenia	532	10 000	cw	Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland
Argon-Krypton-Ionenlaser	Stabilite 2018	488	600	cw	Spectra Physics, Darmstadt, Deutschland
		514	550		
		531	240		
		568	225		
Multi-channel Pulsed Diode Laser System (PDL 808 Sepia)	LDH-P-C-405B	402	3.07 (40 MHz)	44 ps	PicoQuant, Berlin, Deutschland
	LDH-P-C-440	437	1.14 (40 MHz)	63 ps	
	LDH-P-C-470	468	1.17 (40 MHz)	63 ps	
	LDH-P-C-635B	635	9.00 (80 MHz)	83 ps	
	LDH-P-C-690	690	8.20 (80 MHz)	59 ps	

Tabelle C.1: Auflistung der verwendeten Laser

C.2 Akusto-Optischer Modulator (AOM)

Bei der Verwendung des Nd:YVO₄-Lasers und des Argon-Krypton-Ionen-Lasers werden die Pulse mit einem AOM erzeugt. Ein AOM besteht aus einem Kristall, durch den eine Schallwelle läuft und räumlich periodische Dichteschwankungen verursacht, die zu einer Modulation des Brechungsindex führen. Ein einfallender Lichtstrahl wird an den Stellen mit hohem Brechungsindex gebeugt, ähnlich wie Röntgenstrahlen an einem Kristallgitter (Bragg-Beugung) (s. Abb. C.3). Eine Schallwelle der Frequenz Ω besitzt eine von der

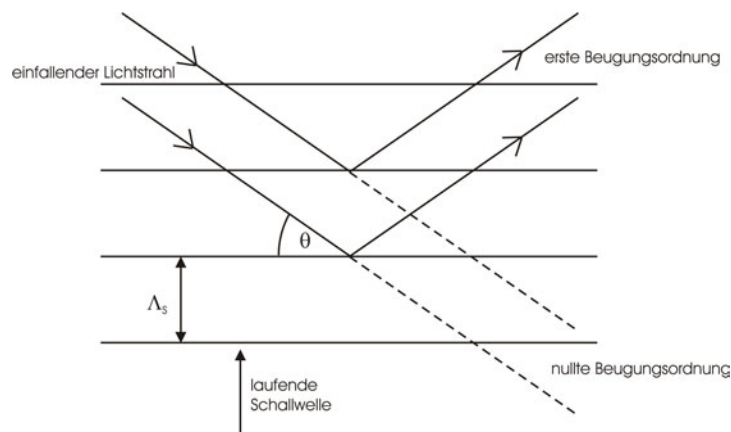


Abbildung C.3: Beugung eines einfallenden Lichtstrahls in einem Akusto-Optischen Modulator

Schallgeschwindigkeit v_S abhängige Wellenlänge $\Lambda_S = \frac{v_S}{\Omega}$. Die Bedingung für die k -te Beugungsordnung lautet somit:

$$2\Lambda_S \sin \theta = k\lambda \quad \text{mit} \quad k=1,2,3\dots \quad (\text{C.1})$$

In dem hier beschriebenen Aufbau wird die erste Beugungsordnung in das Mikroskop eingekoppelt. Der AOM wird mittels eines Pulsgenerators an- und ausgeschaltet, so dass die erste Beugungsordnung nur vorhanden ist, wenn gerade ein Spannungspuls anliegt. Der verwendete AOM hat eine Anstiegszeit von 20 ns, weshalb Laserpulse mit einer Breite von etwa 50-100 ns entstehen und die Repetitionsfrequenz auf maximal 10 MHz limitiert ist (s. Abb. C.9).

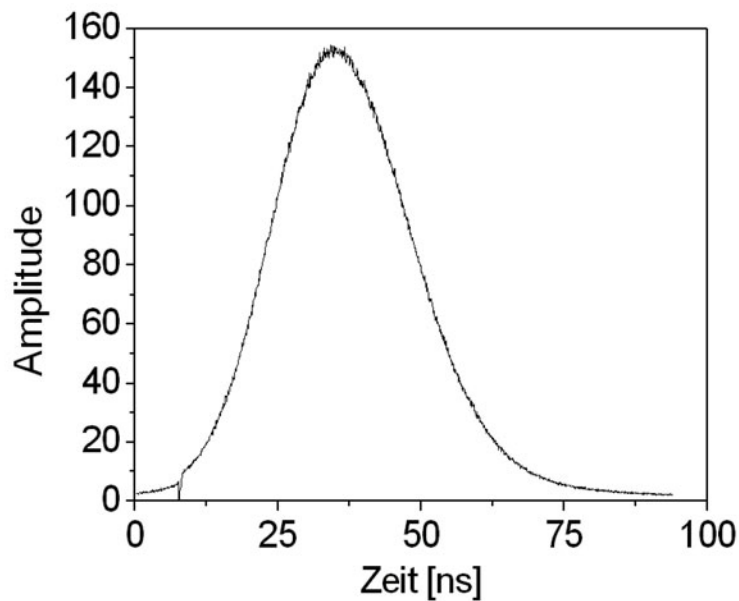


Abbildung C.4: Form des Laserpulses nach dem AOM

C.3 Optische Glasfasern

In Glasfasern oder Lichtleitern kann Licht entlang gerader und gekrümmter Wege geleitet werden. Eine Glasfaser besteht aus einem Kern und einem Mantel aus Glas, die sich im Brechungsindex derart unterscheiden, dass der Brechungsindex des Mantels kleiner als der des Kerns ist. Folglich tritt am Übergang, der stufen- oder gradientenförmig sein kann, interne Totalreflexion auf und Lichtwellen innerhalb des Kerns können über lange Distanzen geleitet werden. Es wird zwischen *multimode* und *single-mode* Fasern unterschieden, letztere haben einen sehr kleinen Kern, wodurch nur eine Lasermode hindurch laufen kann [115, 19].

Für diesen Aufbau wurden ausschließlich *single-mode* Fasern verwendet, damit die Glasfasern gleichzeitig zur Aufreinigung des Laserprofils dienen. Des Weiteren kann durch eine geeignete Wahl des Kollimators am Faserausgang eine Strahlaufweitung erzielt werden.

C.4 Objektiv

Für das Auflösungsvermögen eines Objektivs ist die Numerische Apertur entscheidend. Diese ist definiert als das Produkt aus dem Winkel, unter dem Licht eingesammelt werden kann, und dem Brechungsindex der Immersionsflüssigkeit. Vor allem bei Einzelmolekülmessungen ist es also extrem wichtig, Objektive mit hoher Numerischer Apertur zu verwenden. Für die Messungen wurde ein Wasserimmersionsobjektiv der Firma Zeiss mit einer Numerischen Apertur von 1.2 verwendet (C-Apochromat, 63 x 1.2, Zeiss, Göttingen, Deutschland). Das Objektiv ist chromatisch korrigiert und somit für den gesamten sichtbaren Spektralbereich geeignet.

Obwohl Ölimmersionsojektive eine noch höhere Numerische Apertur als Wasserimmersionsojektive haben, sind letztere für diesen Anwendungsbereich besser geeignet, da biologische Proben üblicherweise in wässrigen Lösungen untersucht werden und somit geringere Aberration auftritt.

C.5 Dichroitische Spiegel und Filter

Zur Überlagerung der anregenden Laserstrahlen und zur Trennung der Fluoreszenz in die Detektionskanäle werden dichroitische Spiegel verwendet. Diese Spiegel sollten mindestens 90% Reflexion bei den entsprechenden Wellenlängen haben. Eine höhere Anforderung wird an den dichroitischen Spiegel im Mikroskop gestellt, der die Laser in das Objektiv reflektiert und die Fluoreszenz durchlässt. Da die Anregung und das Maximum der Fluoreszenz oft nur 20 nm spektral auseinander liegen, müssen die Kanten zwischen Transmission und Reflexion sehr steil sein. Vor allem die Herstellung von dichroitischen Tripleband-Spiegeln stellt eine besondere Herausforderung dar.

Im Detektionsstrahlengang werden nach der Trennung der Fluoreszenz Emissionsfilter eingesetzt. Diese sollen das restliche Streulicht des Lasers und die im Vergleich zur Fluoreszenz rotverschobene Ramanbande des Lösungsmittels (meist Wasser) blockieren. Daher eignen sich als Emissionsfilter vor allem Bandpassfilter mit einer minimalen optischen Dichte¹ von OD 6 bei der Anregungswellenlänge und einer Breite der Transmission von ca. 50-70 nm. Die verwendeten Filterkombinationen für die verschiedenen Farbstoffe sind in Tabelle C.2 aufgelistet, die Transmissionsspektren der beiden am häufigsten Filterkombinationen sind in Abb. C.5 und Abb. C.6 gegeben.

C.6 Detektoren

Das Zählen einzelner Photonen erfordert extrem empfindliche Detektoren, bei gleichzeitiger kurzer Totzeit, damit sie für die zeitaufgelöste Spektroskopie geeignet sind. Diese

¹OD=Optische Dichte, Abschwächung um den Faktor 10^{-OD}

λ_{Ex} [nm]	Farbstoffe	Dichroitische Filter	Bandpassfilter
470	GFP, Atto488	DC470/532/633 z475/568/695rpc	HQ525/50
514	YFP	DC440/514/633 z405/514/633rpc	HQ560/80
532	Atto532, Cy3	z405/532/633 DC470/532/633	HQ580/75
568	Atto565	z475/568/695rpc	HQ620/80
637	Atto647, Cy5	z405/532/633 DC440/514/633 DC470/532/633	HQ700/75
690	Atto690	z475/568/695rpc	HQ715LP

Tabelle C.2: Auflistung der verwendeten Filterkombinationen für die verschiedenen Farbstoffe

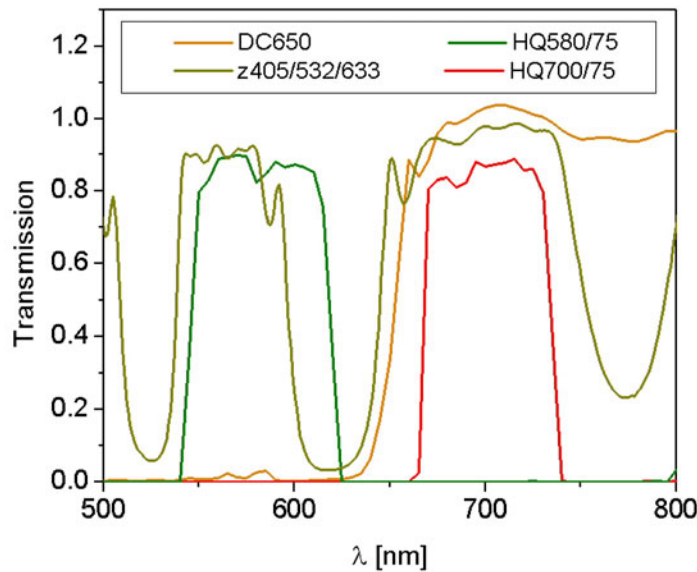


Abbildung C.5: Für den Zwei-Farben-Aufbau (Anregung 532/635 nm) am häufigsten verwendete Filterkombination: z405/532/633 Dichroitischer Spiegel im Mikroskop (dunkelgelb), DC650 Dichroitischer Spiegel zur Aufteilung der Fluoreszenz in die beiden Detektionskanäle (orange), und HQ580/75 sowie HQ700/75 als Bandpassfilter vor den Lochblenden

Bedingungen erfüllen Avalanche Photodioden (APD). Bei diesen Silizium-Halbleiterdioden werden bei Absorption von Licht Elektron-Loch-Paare generiert, die durch Anlegen einer Sperrspannung an den pn-Übergang beschleunigt werden. Bei der Kollision dieser beschleunigten Elektronen-Loch-Paare mit dem Kristallgitter werden durch Ioni-

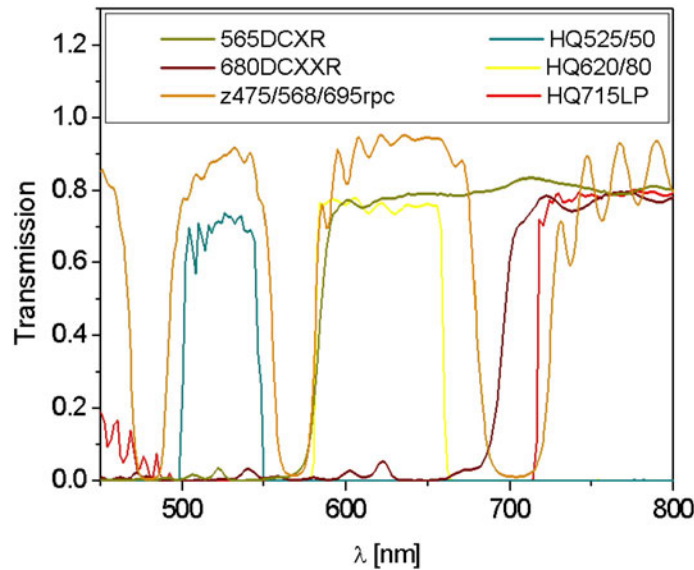


Abbildung C.6: Für den Drei-Farben-Aufbau verwendete Filterkombination: z475/568/695rpc Dichroitischer Spiegel im Mikroskop (orange), 565DCXR sowie 680DCXXR Dichroitische Spiegel zur Aufteilung der Fluoreszenz in die drei Detektionskanäle (dunkelgelb/weinrot), und HQ525/50, HQ620/80 sowie HQ715LP als Emissionsfilter vor den Lochblenden

sation neue Elektron-Loch-Paare erzeugt. Diese lawinenartige Verstärkung (Avalanche-Effekt) ermöglicht die Detektion eines einzelnen Photoelektrons. Um die Totzeit des Detektors möglichst gering zu halten, werden die APDs entweder passiv "gequencht", indem der Stromfluss durch einen Widerstand begrenzt wird, oder aktiv "gequencht", indem die Sperrspannung auf einen Wert unterhalb der Durchbruchspannung reduziert wird.

Die hier verwendeten APDs sind sogenannte *Single Photon Counting Modules* der Firma PerkinElmer Optoelectronics (SPCM-AQR-14, PerkinElmer Optoelectronics, Wellesley, USA). Die aktive Fläche mit einem Durchmesser von $180 \mu\text{m}$ ist in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 1060 nm sensitiv, mit einer maximalen Detektionseffizienz von 65 % bei 650 nm. Durch aktives Quenchen liegt die Totzeit bei 50 ns, die Dunkelzählrate im Bereich von 25-250 Photonen/s. Die Detektoren geben ein Signal in Form eines TTL-Pulses² aus, welches über einen Verteiler (Eigenbau der Elektronikwerkstatt) an die drei Messkarten weitergeleitet wird.

²Ein TTL-Signal schaltet bei einer Spannung $>2.4 \text{ V}$ und $<0.8 \text{ V}$ aus.

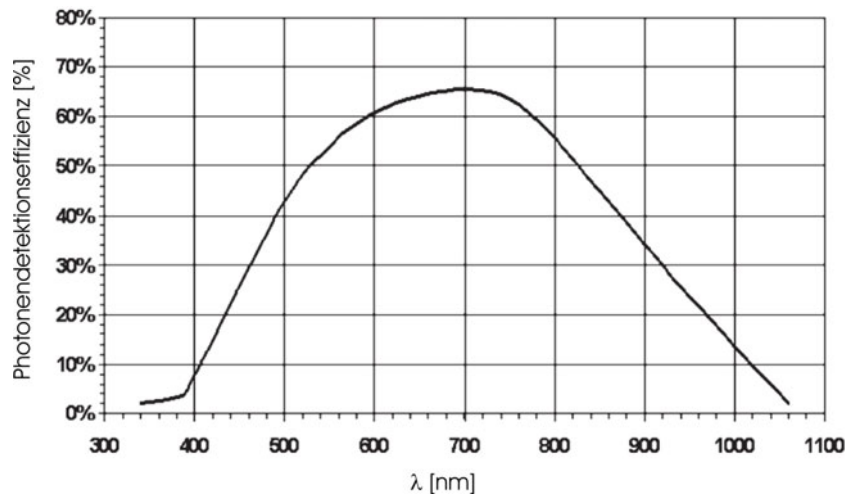


Abbildung C.7: Detektionseffizienz der APD in Abhängigkeit der Wellenlänge (aus [116])

C.7 Datenaufnahme

Zur Datenaufnahme stehen drei verschiedenen Messkarten zur Verfügung. Ein Hardware-Korrelator und zwei *Time-Correlated Single Photon Counting* (TCSPC)-Karten.

C.7.1 Korrelatorkarte

Die digitale Korrelatorkarte (ALV-5000 Multiple Tau, ALV, Langen, Deutschland) berechnet in Quasi-Echtzeit Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen und verfügt über zwei unabhängige Eingangskanäle. Diese bestehen aus 288 Datenkanälen, die logarithmisch auf einer Zeitskala von 200 ns bis mehreren Stunden angeordnet sind. Die Korrelationskurven werden berechnet, indem das Eingangssignal eines bestimmten Zeitintervalls t_S aufgenommen und mit einem Zeitintervall zu einem späteren Zeitpunkt $t_S + Nt_S$ multipliziert wird. Die zeitliche Verzögerung muss dabei einem ganzzahligen Vielfachen des Messintervalls t_S entsprechen. Die Produkte werden für verschiedene Verzögerungszeiten berechnet und für die jeweilige Verzögerungszeit aufsummiert und normiert. Aufgrund der logarithmischen Anordnung der Verzögerungszeiten kann dabei ein sehr grosser Zeitbereich abgedeckt werden [117]. Die Korrelatorkarte kann entweder die Autokorrelation von einem oder zwei Eingangssignalen berechnen oder deren Kreuzkorrelation. Eine gleichzeitige Berechnung von Auto- und Kreuzkorrelationen ist leider nicht möglich. Des Weiteren besteht keine Möglichkeit die Rohdaten zu speichern, wodurch PIE mit dieser Karte nicht durchgeführt werden kann. Es wird allerdings die aktuelle Zählrate auf dem Bildschirm angezeigt, weshalb diese Karte überwiegend zur Justage verwendet wurde.

C.7.2 *Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)*

Die TCSPC-Karten verfügen über einen weitaus breiteren Anwendungsbereich als die Korrelatorkarte. Es können Photonen mit einer Auflösung von einigen zehn Pikosekunden gezählt werden, wodurch zum Beispiel die Messung von Fluoreszenzlebensdauern möglich wird.

Zur Anregung müssen in diesem Fall gepulste Laser verwendet werden, deren Pulsfrequenz als Referenzsignal (Sync-Signal) an die TCSPC-Karte weitergegeben wird. Die Zeit zwischen zwei Laserpulsen ist in Zeitbins³ mit einer Auflösung von einigen Pikosekunden aufgeteilt. Die Messung erfolgt auf folgende Weise: Der Sync-Puls des Lasers gibt der Karte ein Startsignal, das Stoppsignal sendet der Detektor in Form eines Spannungspulses. Die Karte speichert, in welchem Zeitbin nach dem Sync-Puls das Signal des Detektors registriert wurde. So kann die Zeit zwischen der Anregung und der Emission eines Photons gemessen werden. Praktisch wird dies durch den Zeit-zu-Amplitudenkonverter (*Time to Amplitude Converter*, TAC) realisiert. Dieser beginnt eine lineare Spannungsrampe hochzufahren, sobald das Startsignal eintrifft, und wird vom Stoppsignal angehalten. Der resultierende Spannungswert ist proportional zur Zeitdifferenz zwischen Start- und Stoppsignal und wird mittels eines Analog-zu-Digital-Konverters in einen Zählwert umgewandelt. Eine TCSPC-Karte hat somit zwei verschiedene zeitliche Auflösungen: Zum einen in welchem Anregungszyklus das Photon emittiert (ca. 10 - 200 ns) und zum anderen in welchem Zeitbin nach der Anregung das Photon registriert wurde (≥ 38 ps). Ein Histogramm über alle gemessenen Anregungszyklen zeigt den typischen exponentiellen Abfall einer Fluoreszenzlebensdauer.

TimeHarp200 Die TimeHarp 200 (PicoQuant, Berlin, Deutschland) ist eine TCSPC-Karte, die nur über einen Eingangskanal verfügt. Die Zeit zwischen zwei Anregungspulsen wird in bis zu 4096 Zeitbins mit einer minimalen zeitlichen Auflösung von 38 ps aufgeteilt. Die Totzeit liegt bei etwa 450 ns. Wenn eine Messung mit mehreren Detektionskanälen durchgeführt werden soll, kann ein Router vorgeschaltet werden. Durch den Router werden die Photonen von bis zu vier Kanälen mit der Zusatzinformation, von welchem Detektor sie registriert wurden, versehen. Sobald allerdings ein Photon von einem der Detektoren registriert wurde, können während der Totzeit keine Photonen der anderen Detektoren gespeichert werden. Dies kann zu Messartefakten führen, wie in Kapitel 4 diskutiert wird.

Im sogenannten *Time-Tagged Time-Resolved*-Modus wird zusätzlich zur Zeit zwischen Photon und darauf folgendem Sync-Puls die absolute Zeit vom Start der Messung mit einem unabhängigen Taktgeber mit einer zeitlichen Auflösung von 100 ns gespeichert.

³Als Bins werden definierte Zeitabschnitte bezeichnet.

SPC-140 Die TCSPC-Karte von Becker & Hickl (Berlin, Deutschland) besteht aus drei unabhängigen, synchronisierten TCSPC-Karten (SPC-140), so dass die Totzeit für jeden Detektionskanal separat zählt. Es spielt bei dieser Karte also keine Rolle, ob bereits ein Photon in einem anderen Detektionskanal detektiert worden ist. Die Totzeit jeder der drei einzelnen Karten beträgt 100 ns und liegt damit signifikant unter der Totzeit der TimeHarp200-Karte. Die maximale zeitliche Auflösung eines Zeitbins reduziert sich ebenso und beträgt 6 ps.

Diese Karte stand erst zum Ende der vorliegenden Arbeit zur Verfügung, der größte Teil der Messungen wurde daher mit der TimeHarp200 durchgeführt.

C.8 Synchronisation von Laserpulsen und TCSPC-Karte

Für PIE ist die Synchronisation der Laserpulse und der TCSPC-Karte notwendig. Als Taktgeber wurde der Oszillator (SOM808, PicoQuant) des Netzgeräts der gepulsten Diodenlaser (PDL 808 Sepia) verwendet, der einen 80 MHz Nim-Puls⁴ vorgibt. Dieser geht zunächst in den Sequenzierer (SSM808, PicoQuant), der den Puls auf bis zu acht Kanäle aufteilt, die zeitlich gegeneinander verschoben sind. Die aus dem Sequenzierer kommenden Pulse synchronisieren die verschiedenen Laser und die TCSPC-Karte. Der AOM kann allerdings nur mit TTL-Pulsen gespeist werden. Deswegen wird hierfür der Nim-Puls zunächst in einen TTL-Puls umgewandelt (Eigenbau aus der Elektronikwerkstatt). Dieser TTL-Puls wird wiederum als Taktgeber für einen Pulsgenerator (HM 8035, HAMEG GmbH, Mainhausen, Deutschland) verwendet, da die Form des Pulses nicht für eine einwandfreie Funktion des AOMs ausreicht. Der Pulsgenerator stellt nun formschöne TTL-Pulse, die zu den übrigen Lasern synchronisiert sind, zur Verfügung.

Die zeitliche Verschiebung der synchronisierten Laserpulse wird dadurch erreicht, dass der Sequenzierer zeitlich verschobene NIM-Pulse liefert. Die Feineinstellung kann über die Kabellänge vorgenommen werden. Ein vereinfachtes Schema der Synchronisation ist in Abb. C.8 zu sehen.

Zur Überprüfung der Synchronisation und der Verschiebung wurde das Laserlicht auf eine Photodiode abgebildet und mit einem Oszilloskop aufgezeichnet. In Abb. C.9 ist die alternierende Anregung zum einen für zwei ps-gepulste Laser und zum anderen für einen ps-gepulsten roten Laser und einen grünen Laser, der über den AOM gepulst wird, dargestellt.

⁴Ein Nim-Signal schaltet bei einer Spannung <-0.8 V an und die Pulsbreite beträgt mind. 5 ns.

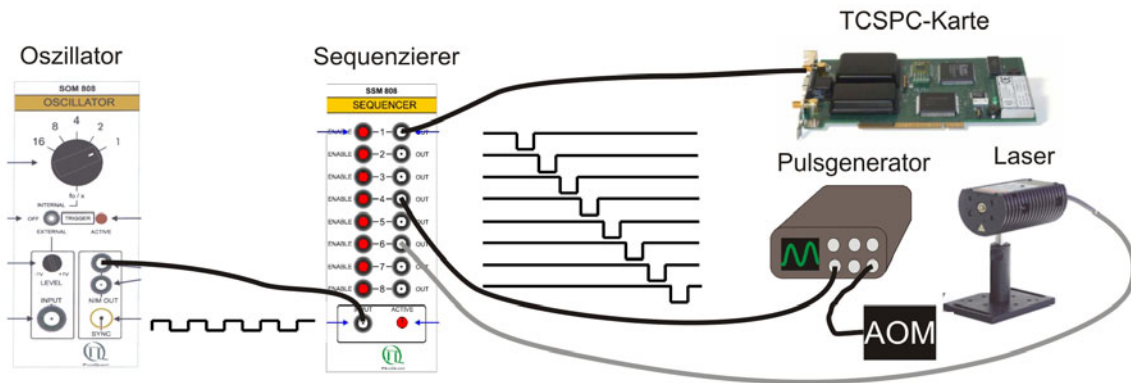


Abbildung C.8: Schema der Synchronisation: Der Oszillator gibt eine Taktfrequenz von 80MHz vor, die vom Sequenzierer in acht zeitlich verschobene Kanäle aufgeteilt wird. Diese Spannungspulse triggern die TCSPC-Karte, die ps-gepulsten Laser und den Pulsgenerator und damit den AOM.

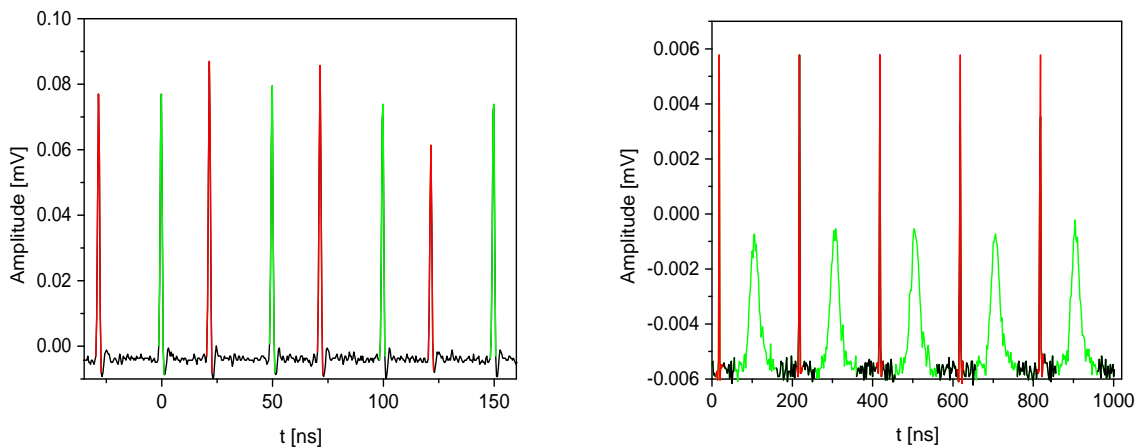


Abbildung C.9: links: alternierende Laserpulse von zwei ps-gepulstem Laserdioden, rechts: Laserpulse eines roten, ps-gepulsten Lasers und eines grünen, über AOM gepulsten Lasers

C.9 Datenauswertung

Die Datenauswertung wurde größtenteils mit selbstgeschriebenen Programmen durchgeführt, die auf der Skriptsprache PV-Wave (Visual Numerics, Inc., Houston, Texas, USA) aufbauen.

Modus der Datenaufnahme Die Daten können im Photonenmodus oder Zeitmodus aufgenommen werden.

Im Zeitmodus wird die Anzahl der Photonen in einem bestimmten Zeitintervall gespeichert, beim Photonenmodus werden die Zeiten zwischen zwei Photonen gemessen. Im Photonenmodus sind also mehr Informationen enthalten als im Zeitmodus, weshalb nur

der Photonenmodus in den Zeitmodus umgewandelt werden kann, aber nicht umgekehrt. Solange die mittlere Anzahl der Moleküle nicht die Datentransferrate übersteigt, sollte also immer der Photonenmodus verwendet werden. Die TCSPC-Karten arbeiten grundsätzlich im Photonenmodus, zur weiteren Verarbeitung werden die Daten allerdings im Nachhinein teilweise in den Zeitmodus transferiert.

Auto- und Kreuzkorrelation Zur Berechnung der ACF wird im Zeitmodus das Produkt der Photonen pro Zeiteinheit τ zum Zeitpunkt τ und $n \cdot \tau$ ($n=0,1,2\dots$) berechnet. Der Mittelwert dieses Produktes wird für verschiedene Verzögerungszeiten τ berechnet, wobei diese auf einer logarithmischen Zeitskala angeordnet sind.

Zur Berechnung der CCF werden zwei verschiedene Algorithmen kombiniert. Die ersten Punkte werden mit einem Algorithmus im Photonmodus ähnlich zu dem des Hardware-Korrektors berechnet [118]. Hierbei werden die Ankunftszeiten des ersten Kanals $\{t_{11}, t_{12}, \dots, t_{1N}\}$ solange gegen die Ankunftszeiten des zweiten Kanals $\{t_{21}, t_{22}, \dots, t_{2N}\}$ verschoben, bis der Zeitunterschied gleich oder größer einer vorgegebenen Verzögerungszeit τ ist und der Wert der Korrelation für diesen Wert von τ um eins erhöht wird. Die Berechnung findet bei linearer Verteilung der Verzögerungszeiten τ statt, anschließend wird der Mittelwert in logarithmischen Abständen gebildet. Der hintere Teil der CCF wird bei niedriger zeitlicher Auflösung im Zeitmodus entsprechend des Algorithmus für die ACF berechnet. Diese Kombination der beiden Algorithmen führt zu einer Optimierung der Rechenzeit bei gleichzeitig hinreichender Genauigkeit.

Burst Analysis Für die *Burst Analysis* wurde ein Algorithmus verwendet, bei dem die Daten zu Zeitbins einer Länge, die etwa der Diffusionszeit entspricht, zusammengefasst werden. Ab einem bestimmten Schwellenwert wird ein *Burst* als Molekül erkannt. Bei benachbarten Bins wird anschließend geprüft, ob sie ebenfalls über einem anderen, niedrigeren Schwellenwert liegen. Falls ja, werden die Photonen aus dem oder den benachbarten Bins hinzuaddiert. Als Bin wird typischerweise 2 ms, als Grenzwert für den roten Detektionskanal nach der roten Anregung 12 Photonen/Bin und als Grenzwert für die Summe an Photonen nach der grünen Anregung im roten und grünen Detektionskanal 17 Photonen/Bin verwendet.

Anhang D

Fluoreszenzfarbstoffe und Markierung

Bei Einzelmolekülmessungen kommt es entscheidend darauf an, ein möglichst hohes Fluoreszenzsignal von jedem Teilchen detektieren zu können. Neben der Numerischen Apertur des Objektivs und qualitativ hochwertigen optischen Komponenten sind deswegen extrem gute Fluorophore notwendig. Im Folgenden wird eine Einführung in die wichtigsten Eigenschaften der Farbstoffe und der Probenvorbereitung gegeben.

D.1 Synthetische Farbstoffe

In den hier beschriebenen Experimenten wurden hauptsächlich kommerziell erhältliche, synthetische Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Bei der Auswahl der Farbstoffe ist in erster Linie zu beachten, dass die zur Verfügung stehende Anregungswellenlänge möglichst gut mit der Wellenlänge des Absorptionsmaximums ($\lambda_{max,Abs}$) übereinstimmen, um einen möglichst hohen Extinktionskoeffizienten zu gewährleisten. Dies ist im Normalfall unproblematisch, da es inzwischen speziell auf häufig verwendete Laserlinien optimierte Farbstoffe gibt (z.B. Atto-Farbstoffe der Firma Atto-Tec oder Alexa-Farbstoffe der Firma Invitrogen). Neben dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ sind wichtige Kriterien die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ , die das Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen angibt, und die Photostabilität. Experimentell zeigt sich die Güte eines Farbstoffes in der Photonen ausbeute pro Molekül und Sekunde, der Molekularen Helligkeiten ε , die sich bei FCS-Messungen besonders leicht als Produkt aus Amplitude und Zählrate berechnen lässt. In Tabelle D.1 sind alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren photophysikalischen Parametern aufgelistet.

Farbstoff	$\lambda_{max,Abs}$ [nm]	$\lambda_{max,Em}$ [nm]	ϵ [cm ⁻¹ /M ⁻¹]	ϕ [%]
Alexa488 ^a	495	519	71000	43
Atto532 ^b	532	553	115000	90
Atto565 ^b	563	592	120000	92
Atto647 ^b	645	669	120000	20
Atto647N ^b	644	669	150000	65
Atto700 ^b	700	719	120000	25
Cy5 ^c	649	670	250000	28

^aInvitrogen, Carlsbad, USA

^bATTO-TEC, Siegen, Deutschland

^cAmersham, Buckinghamshire, England

Tabelle D.1: Photophysikalische Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe [119, 120, 121]

D.2 Entwicklung neuer Farbstoffe

Bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen für die Einzelmolekül-Spektroskopie werden äußerst hohe Ansprüche an diese gestellt, weshalb ein stetiges Interesse an der Entwicklung neuer wasserlöslicher Farbstoffe zur Markierung von biologischen Systemen besteht. Gerade kürzlich konnte ein neuer Terrylen-Diimid-basierter wasserlöslicher Farbstoff (WS-TDI) vorgestellt werden, der in Wasser nicht fluoreszierende H-Aggregate bildet. Die monomere Form, wie sie z.B. in nanoporösen Materialien oder in Lipidmembranen vorliegt, ist allerdings hoch fluoreszent und extrem photostabil. Anhand von FCS-Messungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich dieser Farbstoff auch zur Markierung von Proteinen eignet (s. Abb. D.1). Dadurch dass WS-TDI in Wasser nicht-fluoreszierende Aggregate bildet, ist der Überschuss an nicht gebundenen bzw. nicht eingelagertem WS-TDI nicht sichtbar [122].

D.3 Autofluoreszierende Proteine

Neben den synthetischen Farbstoffen wurden auch autofluoreszierende Proteine verwendet, die vor allem bei *in vivo*-Messungen in Zellen ihre Anwendung finden. Zur Kopplung synthetischer Fluorophore an Proteine, die in lebenden Zellen untersucht werden sollen, müssten diese Proteine zuerst aus der Zelle isoliert, mit einem Fluorophor markiert und anschließend wieder in die Zelle eingebracht werden. Dieser Vorgang ist meist schwierig und garantiert nicht, dass das Protein hinterher noch seine volle Funktion besitzt. Bei autofluoreszenten Proteinen wie dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) ist der Chromophor vollständig genetisch kodiert. Durch Einbau eines GFP-Vektors in die Sequenz des zu untersuchenden Proteins kann dieses Protein als Fusionsprotein in der Zelle exprimiert werden [123].

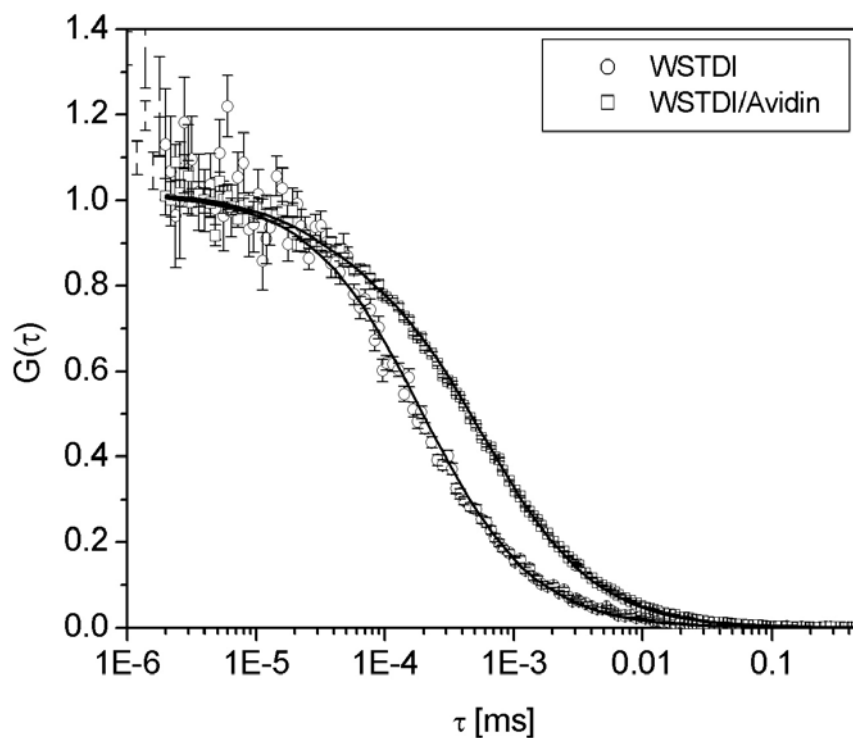


Abbildung D.1: FCS-Messungen des WS-TDI und WS-TDI an das Protein Avidin markiert. Die Diffusionskoeffizienten betragen $140 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für den reinen Farbstoff und $48 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für den Farbstoff markiert an Avidin. Der Unterschied von einem Faktor 3 ist aufgrund der Molekulargewichte von 67 kD bzw. 1.524 kDa zu erwarten.

Die Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden Proteine sind in Tabelle D.2 zusammengestellt.

Farbstoffe	$\lambda_{max,Abs}[\text{nm}]$	$\lambda_{max,Em}[\text{nm}]$	$\epsilon[\text{cm}^{-1}/\text{M}^{-1}]$	$\phi[\%]$
GFP	489	508	55000	60
YFP	514	527	84000	61
DsRed	558	583	72500	68

Tabelle D.2: Photophysikalische Eigenschaften der verwendeten fluoreszenten Proteine [124]

D.4 Bestimmung der Förster-Radien und α -Faktoren

Zur Berechnung der Förster-Radien für die verschiedenen Farbstoff-Paare werden die Quantenausbeute des Donors ϕ_D , der Extinktionskoeffizient des Akzeptors, der Orientierungsfaktor κ^2 , das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors benötigt. Die Absorptions- und Emissionsspektren wurden von den an DNA-/Protein-gebundenen Farbstoffen aufgenommen, von denen auch das Absorptionsmaximum abgelesen werden konnte, der Extinktionskoeffizient wurde der Literatur entnommen. Die Quantenausbeute wurde aus dem Verhältnis von emittierten Photonen (Fläche des Emissionsspektrums) zu an der Anregungswellenlänge absorbierten Photonen des Farbstoffs in Wasser bestimmt. Die Spektren wurden dazu von der gleichen Probe aufgenommen, um aber die unterschiedlichen Anregungs- und Detektionseigenschaften der verwendeten Spektrometer (Cary50, UV-Vis Spectrophotometer, Palo Alto, CA, USA und Fluoreszenzspektrometer FS900, Edinburgh Instruments, Livingston, UK) mit einbeziehen zu können, wurde zusätzlich die Quantenausbeute für den Farbstoff in Wasser auf dieselbe Weise bestimmt und mit dem Literaturwert verglichen. Mit den so erhaltenen Werten für die Quantenausbeute, dem Literaturwert des Extinktionskoeffizienten, der Annahme, dass $\kappa^2 = \frac{2}{3}$, und den Absorptions-/Emissionsspektren konnten die Förster-Radien nach Glg. D.3 berechnet werden. Dafür wurde das Programm PhotochemCad [125] verwendet. Die Förster-Radien für die verschiedenen verwendeten Farbstoff-Paare jeweils für den Farbstoff alleine und den an DNA-gebundenen Farbstoff sind in Tabelle D.3 aufgelistet. Die α -Faktoren für die entsprechenden Farbstoff-Paare sind ebenfalls dieser Tabelle zu entnehmen.

Akzeptor	Donor	R_{0,H_2O} [Å]	$R_{0,DNA}$ [Å]	α_{DNA}	$\alpha_{Protein}$
Atto488	Atto565	64	60	1.7	
Atto488	Atto700	44	40	0.51	
Atto532	Atto647	61		1	
Atto532	Atto647N	60	51	0.9	0.9
Atto565	Atto700	62	60	0.3	
YFP	Atto647N		51	1.3	

Tabelle D.3: Förster-Radien R_0 und α -Faktoren für die verwendeten Farbstoff-Paare

D.5 DNA-Doppelstränge

Bei einem konfokalen Zwei- oder sogar Drei-Farben-Aufbau ist es äußerst schwierig die Laserfoki exakt zu überlagern. Zur Justage werden Proben benötigt, die möglichst vollständig mit zwei bzw. drei Farbstoffen markiert sind. Zu diesem Zweck wurden verschiedene doppelsträngige DNA-Sequenzen entworfen, die mit Fluorophoren markiert wurden.

D.5.1 Markierung von DNA/Protein mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden über eine Säureamidbindung kovalent an die DNA gekoppelt. Die Fluorophore werden dazu mit einem N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) funktionalisiert, bei der DNA wird die zu markierende Base, ein Thymin, mit einer Aminogruppe (NH_2) versehen. Das Reaktionsschema ist in Abb. D.2 dargestellt. Die

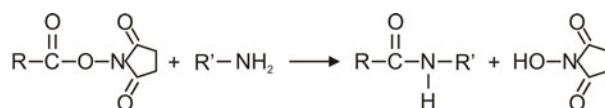


Abbildung D.2: Reaktionsschema der NHS-Ester-Reaktion

DNA ist so aufgebaut, dass jeder Teilstrang mit nur einem Farbstoff markiert wird und die beiden Stränge hinterher zu einem Doppelstrang hybridisiert werden. Sowohl nach der Markierung der Einzelstränge als auch nach der Hybridisierung werden die Proben durch hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC, EcoNova, Novosibirsk, Russland) aufgereinigt. Dadurch konnten Markierungseffizienzen von bis zu ca. 70 % erreicht werden.

Proteine werden meist über eine Thioether-Bindung mit Farbstoffen gekoppelt. Die Aminosäure Cystein hat eine freie Thiol-Gruppe, die wie in Abb. D.3 mit einem Maleimid-modifiziertem Farbstoff reagieren kann.

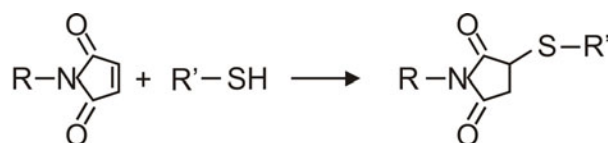


Abbildung D.3: Reaktionsschema der Thiol-Maleimid-Reaktion

D.5.2 Sequenzen der DNA

Zur Justierung der Kreuzkorrelation wurde ein 60 Basenpaare (bp) langer Strang (DNA₆₀) entworfen, der an den 5'-Enden mit Atto532 und Atto647 markiert wurde. Die Sequenz ist in Abb. D.4 dargestellt.

Atto532-AGTATTGACTTACTAAAAGTCCTATAGGATACTTACAGCCATCGAGAGGGACACGGCGAA
TCATAACTGAATGATTTTCAGGATATCCTATGAATGTCGGTAGCTCTCCCTGTGCCGCTT-Atto647

Abbildung D.4: Sequenz des 60 bp langen DNA-Doppelstrangs DNA₆₀ zur Justage des Zwei-Farben-Aufbaus

Für die FRET-Messungen wurde ein 40 bp DNA-Doppelstrang mit internen Markierungen verwendet, dessen Sequenz in Abb. D.5 zu sehen ist. An den mit X gekennzeichneten Stellen wurde jeweils ein Thymin mit einem Aminolink versehen, woran die Farbstoffe Atto532 bzw. Atto647 gebunden wurden. Der untere Strang lag in drei verschiedenen Varianten vor, so dass der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen 10, 15 bzw. 20 Basenpaare beträgt. Diese DNA-Doppelstränge werden mit DNA₁₀, DNA₁₅ und DNA₂₀ bzw. DNA_A und DNA_D für die jeweils nur mit Akzeptor bzw. Donor markierte Variante bezeichnet. Die gleichen DNA-Doppelstränge lagen zur Justierung des Drei-Farben-Aufbaus mit den Farbstoff-Kombinationen Atto488/Atto565, Atto488/Atto700 und Atto565/Atto700 vor.

Biotin-AACCGGATAAGXCCGGGGTCAACCGGATGACACCGGGGTC
TTGGCCTATT CAGGCCCCAGTXGGCCXACTGXGGCCCCAG

Abbildung D.5: Sequenz des 40-mers zur Untersuchung von FRET. An den mit X gekennzeichneten Positionen befindet sich ein T-Aminolink. Der untere, nicht biotinierte Strang lag in drei verschiedenen Varianten vor, in jedem ist jeweils nur eines der Thymine mit einer Aminogruppe funktionalisiert.

zeichenten Stellen wurde jeweils ein Thymin mit einem Aminolink versehen, woran die Farbstoffe Atto532 bzw. Atto647 gebunden wurden. Der untere Strang lag in drei verschiedenen Varianten vor, so dass der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen 10, 15 bzw. 20 Basenpaare beträgt. Diese DNA-Doppelstränge werden mit DNA₁₀, DNA₁₅ und DNA₂₀ bzw. DNA_A und DNA_D für die jeweils nur mit Akzeptor bzw. Donor markierte Variante bezeichnet. Die gleichen DNA-Doppelstränge lagen zur Justierung des Drei-Farben-Aufbaus mit den Farbstoff-Kombinationen Atto488/Atto565, Atto488/Atto700 und Atto565/Atto700 vor.

Die Sequenzen der dreifarbig-markierten DNA sind Abschnitt 4.5 zu entnehmen.

D.6 Probenvorbereitung

Für FCS/FCCS-Experimente wurden die Proben auf eine Konzentration von ca. 20nM verdünnt. Die Proben für die spFRET-Messungen wurden nochmals 500 bis 1000-fach verdünnt, so dass ca. 10-50 pM Lösungen verwendet wurden.

Als Probenhalter wurden für die reinen Farbstoffe Deckglas-„Sandwiches“ verwendet. Hierzu werden mittels eines doppelseitigen Klebebands zwei Deckgläser so zusammengeklebt, dass ein schmaler Kanal entsteht, der mit ca. 5 µl Probe gefüllt und anschließend an beiden Seiten mit Paraffin verschlossen wird. Dies ist zur Justierung des Aufbaus äußerst hilfreich, da die Proben über einen längeren Zeitraum (einige Stunden bis Tage)

nicht verdunsten und somit unveränderte Konzentrationen haben.

DNA und vor allem Proteine adsorbieren leicht auf Glasoberflächen, so dass z.B. bei Verwendung eines Deckglas-”Sandwiches” schnell eine Verringerung der Konzentration beobachtet wird. Daher wurden DNA und Proteine in einem Teflonhalter, auf den von unten mit Paraffin ein Deckglas geklebt wurde, vermessen. Dies hat den Vorteil, dass die Probe nur mit einer Glasfläche von ca. 2 mm Durchmesser in Berührung kommt. Im Teflonhalter wird ein Probenvolumen von 10 μl eingesetzt, welches mit einer Glasfläche von 3.14 mm^2 in Berührung kommt, im Vergleich dazu wird bei den Deckglas-”Sandwiches” lediglich ein Volumen von 5 μl verwendet, welches mit einer Glasfläche von etwa 80 mm^2 in Berührung kommt.

D.7 HeLa-Zellen und Polyplexe

Die Aktinfilamente der verwendeten HeLa-Zellen waren dauerhaft mit dem fluoreszenten Protein DsRed transfiziert [126]. Nach dem Aussäen in LabTek-Kammern (155411, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) wuchsen die Zellen zwei Tage in dem Medium DMEM mit 10% FCS und 1% Antikörpern an. Die Polyplexe wurden aus Polyethylenimin und Cy5-markierter Plasmid-DNA analog zu Boeckle et al. [126] hergestellt und 30 min mit den Zellen inkubiert. Nach dem Wechsel des Mediums und weiteren 30 min im Brutschrank konnten die Zellen direkt in den LabTek-Kammern abgebildet werden.

Anhang E

SpFRET-Verteilungen der DM-MBP-Mutanten

Im Folgenden werden die FRET-Verteilungen für weitere Markierungskombinationen des DM-MBP gezeigt. Es wurden jeweils der Substrat-GroEL-Komplex, der Substrat-SR1-Komplex, die native und die denaturierte Struktur untersucht.

DM-MBP(134C-298C)

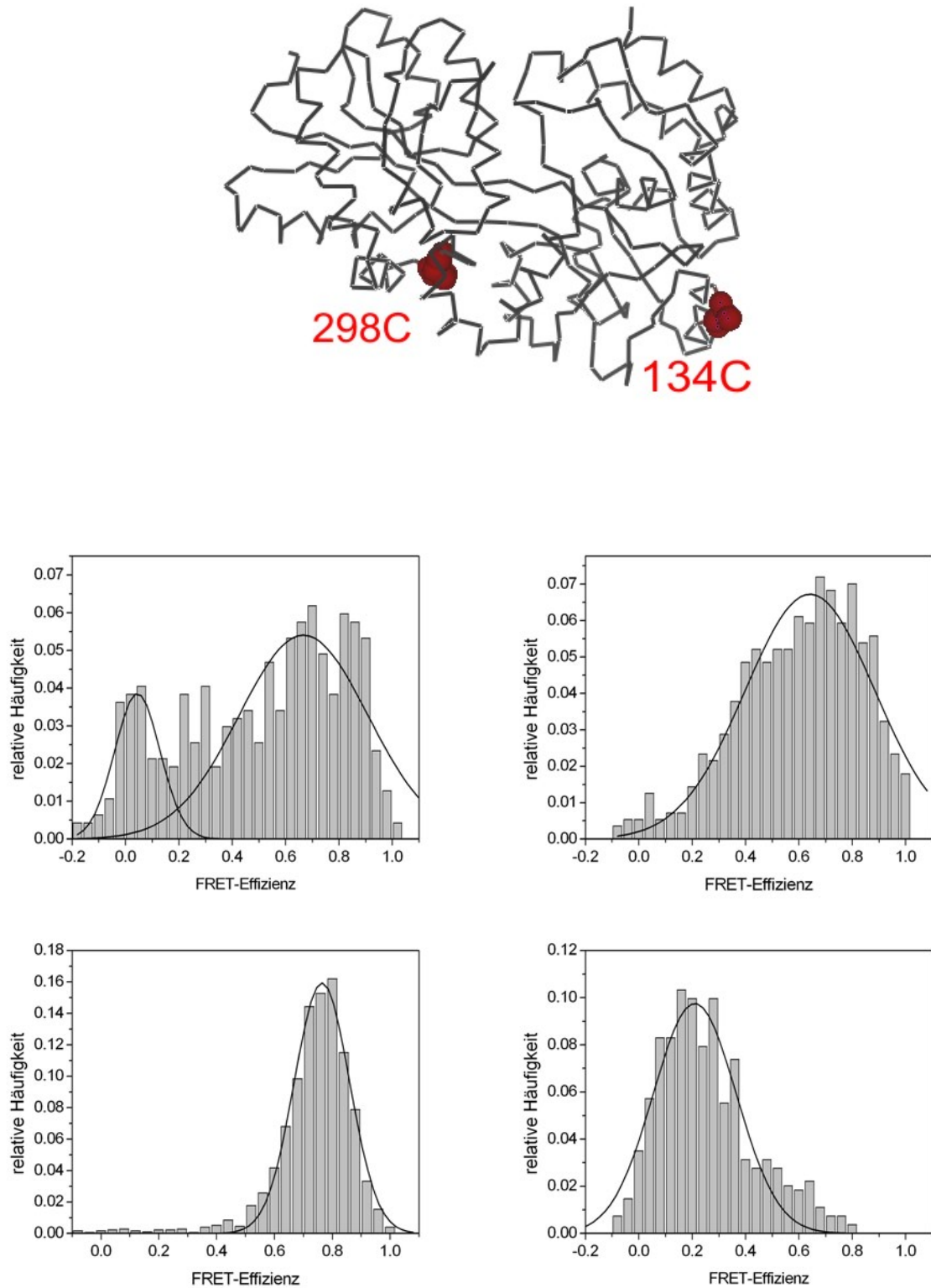


Abbildung E.1: DM-MBP(134C-298C) gebunden an GroEL (links oben), an SR1 (rechts oben), nativ (links unten) und denaturiert (rechts unten)

DM-MBP(73C-298C)

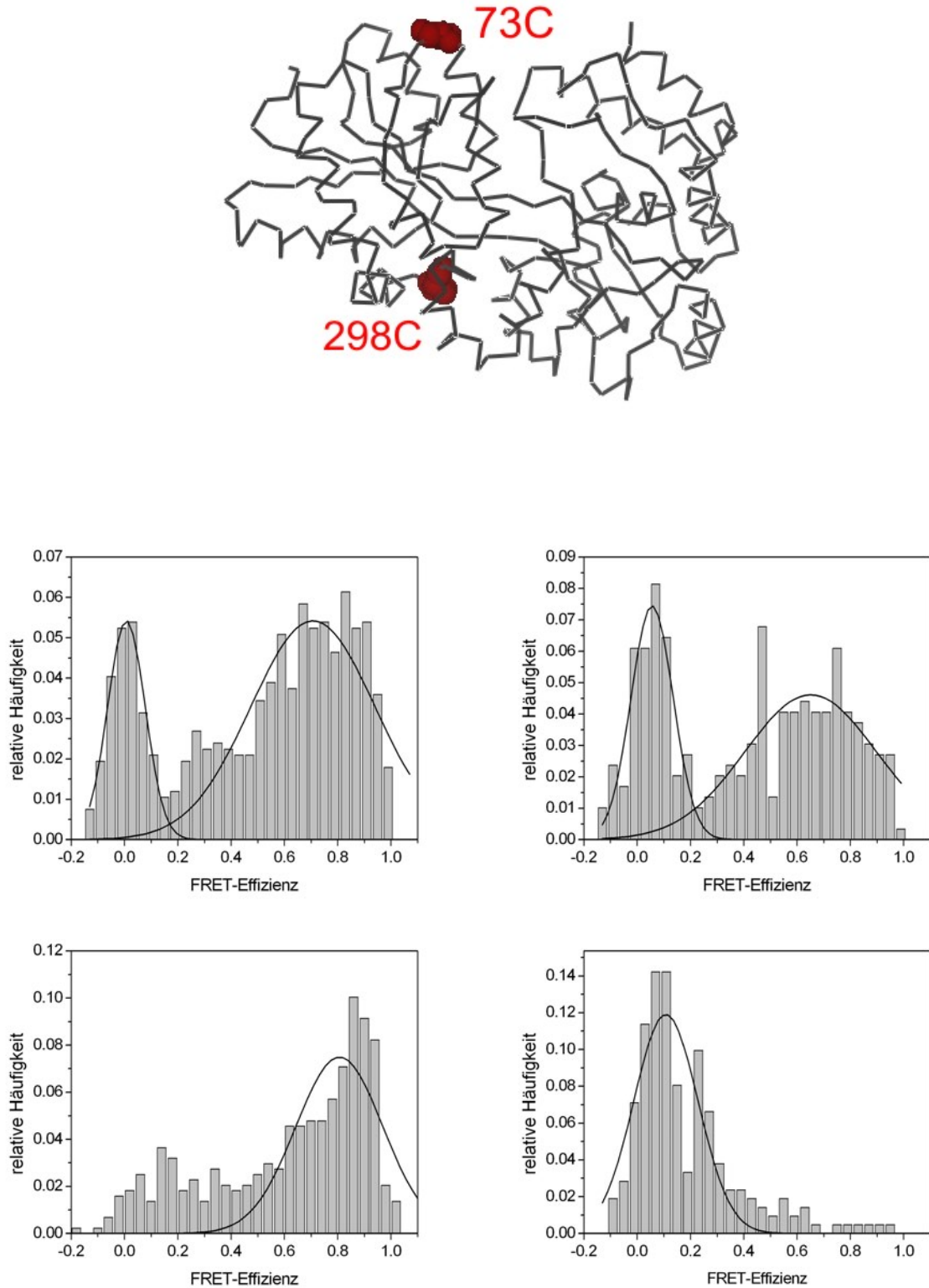


Abbildung E.2: DM-MBP(73C-298C) gebunden an GroEL (links oben), an SR1 (rechts oben), nativ (links unten) und denaturiert (rechts unten)

DM-MBP(30C-298C)

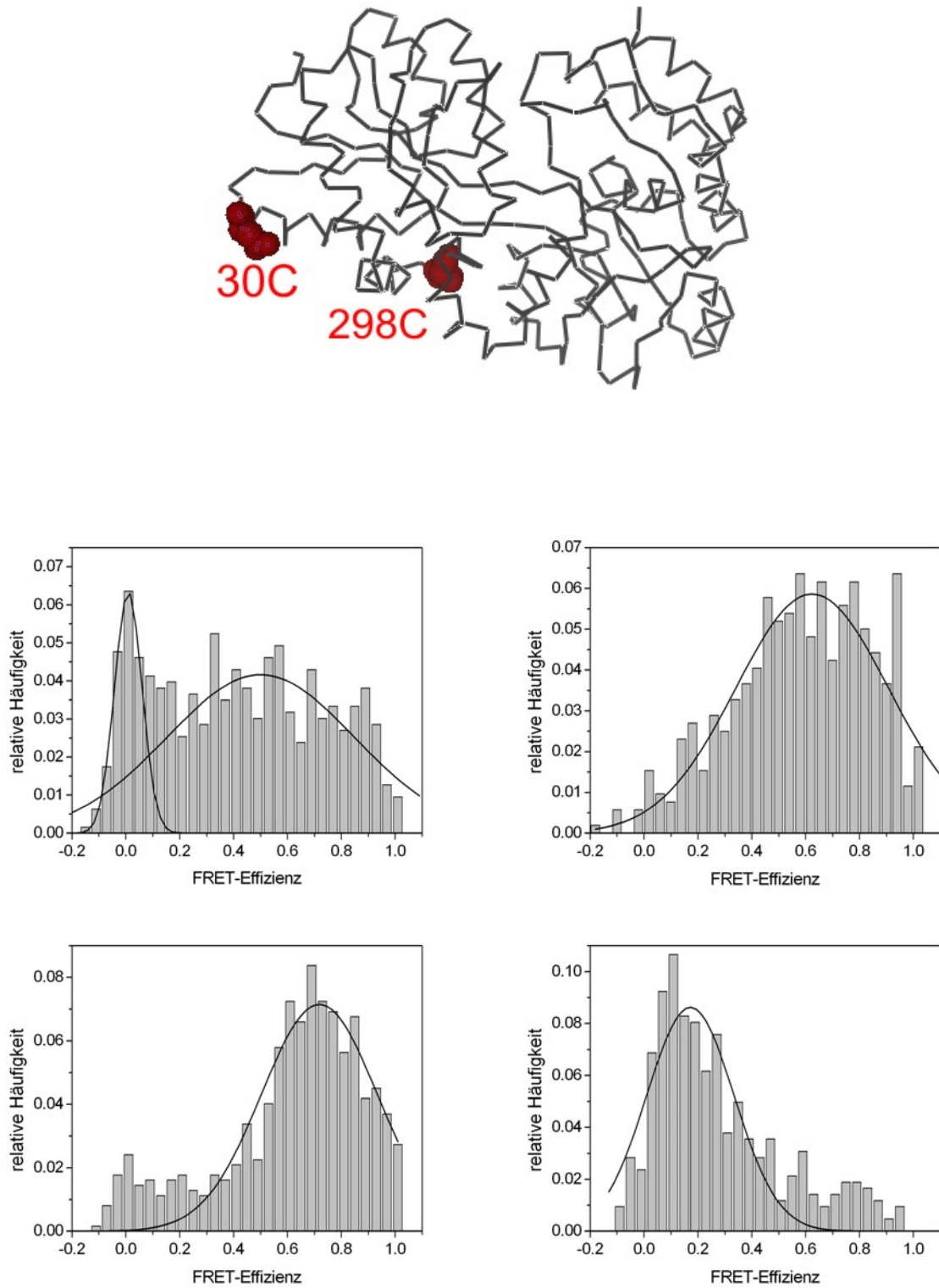


Abbildung E.3: DM-MBP(30C-298C) gebunden an GroEL (links oben), an SR1 (rechts oben), nativ (links unten) und denaturiert (rechts unten)

DM-MBP(52C-312C)

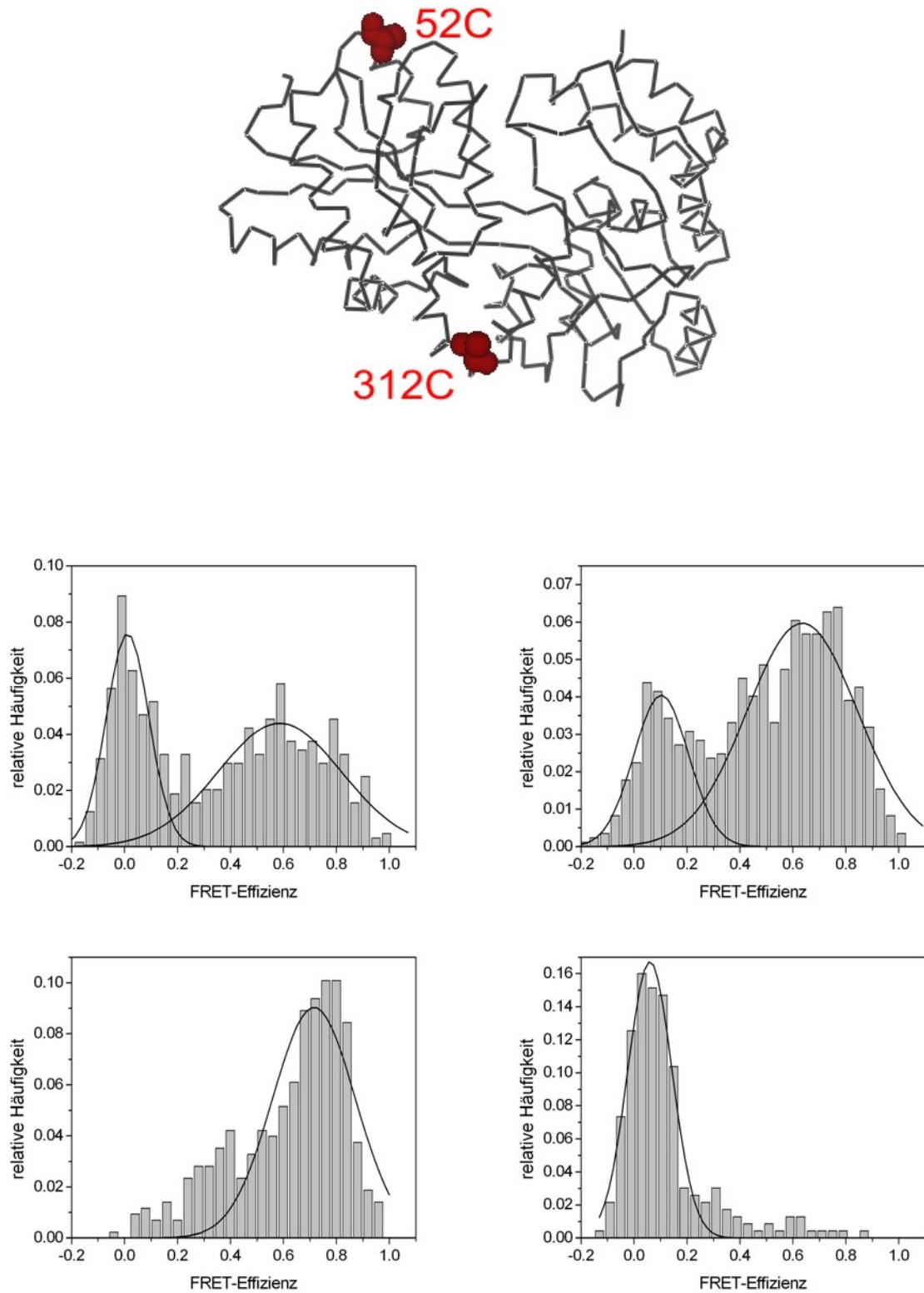


Abbildung E.4: DM-MBP(52C-312C) gebunden an GroEL (links oben), an SR1 (rechts oben), nativ (links unten) und denaturiert (rechts unten)

DM-MBP (30C-312C)

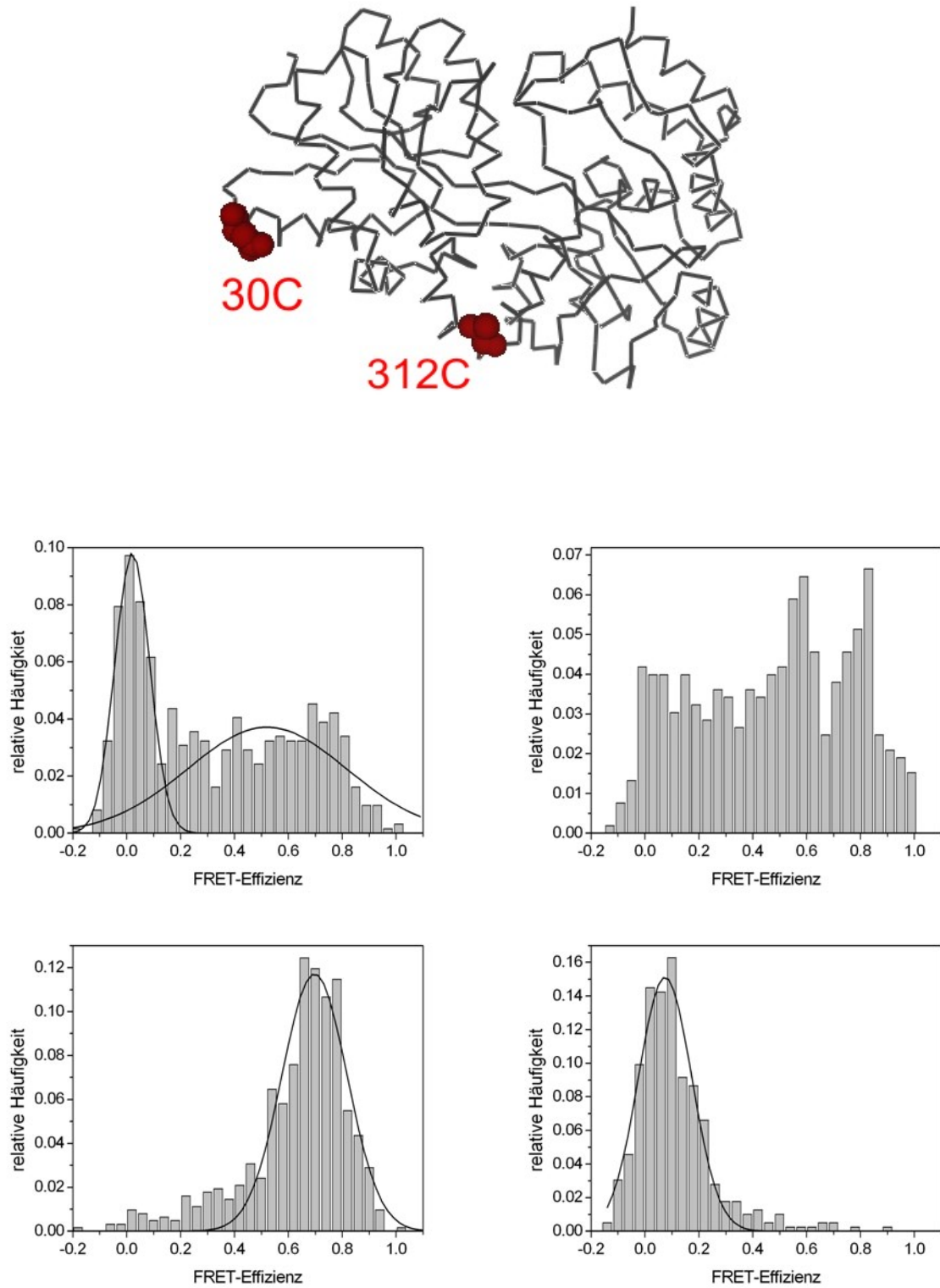


Abbildung E.5: DM-MBP(30C-312C) gebunden an GroEL (links oben), an SR1 (rechts oben), nativ (links unten) und denaturiert (rechts unten)

DM-MBP(345C-298C)

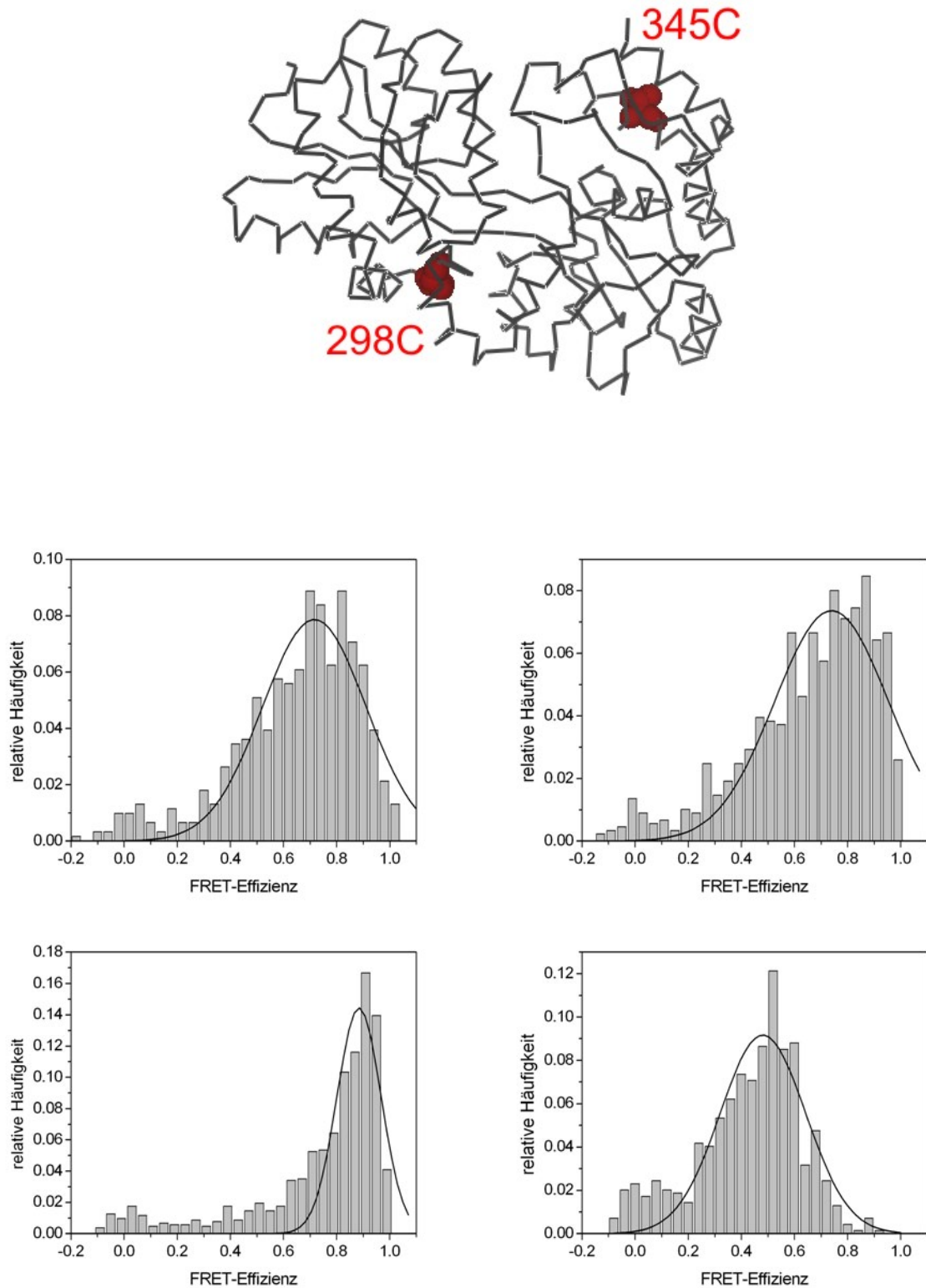


Abbildung E.6: DM-MBP(A8C-298C) gebunden an GroEL (links oben), an SR1 (rechts oben), nativ (links unten) und denaturiert (rechts unten)

DM-MBP(30C-134C)

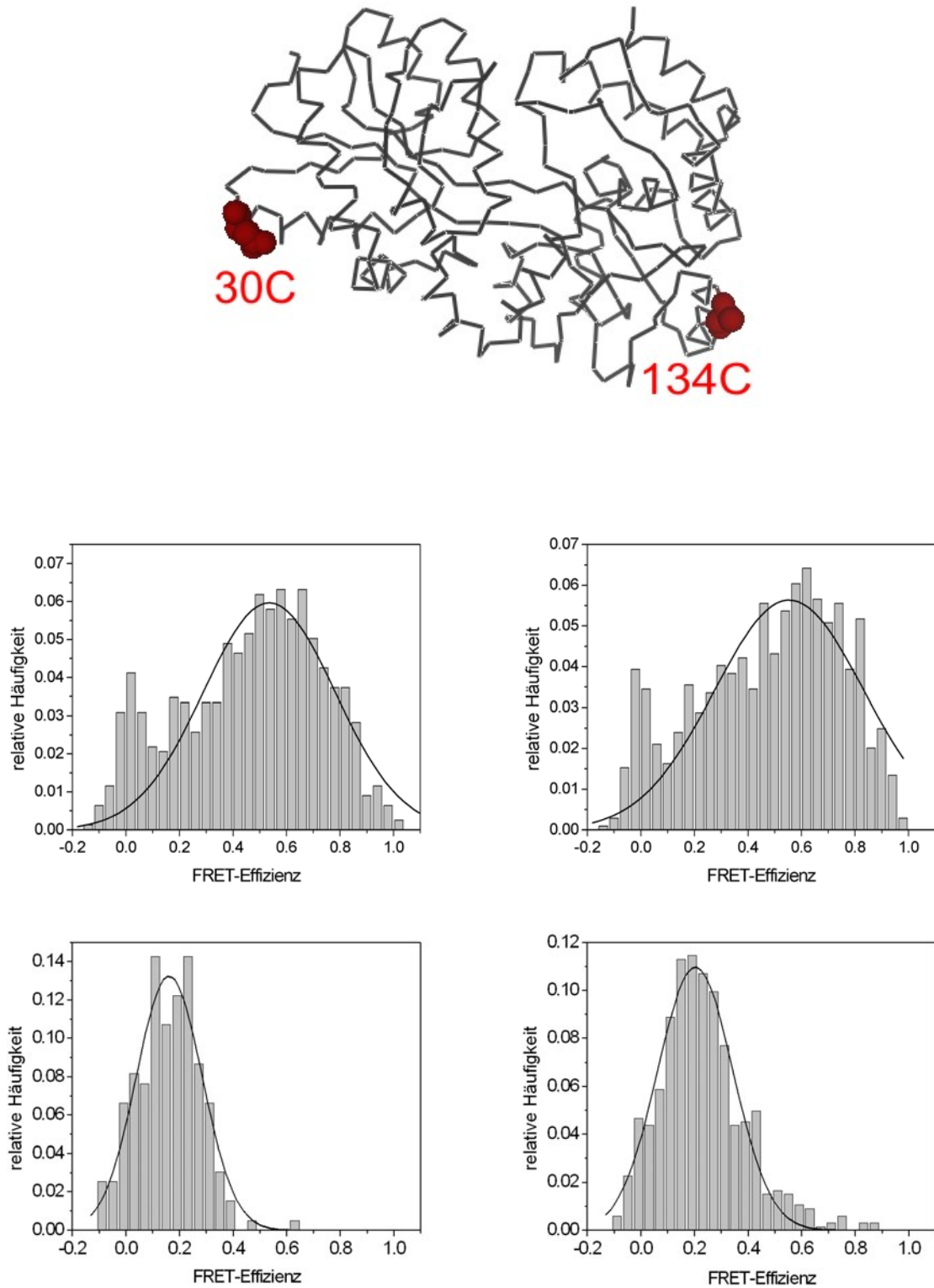


Abbildung E.7: DM-MBP(30C-134C) gebunden an GroEL (links oben), an SR1 (rechts oben), nativ (links unten) und denaturiert (rechts unten)

DM-MBP(30C-175C)

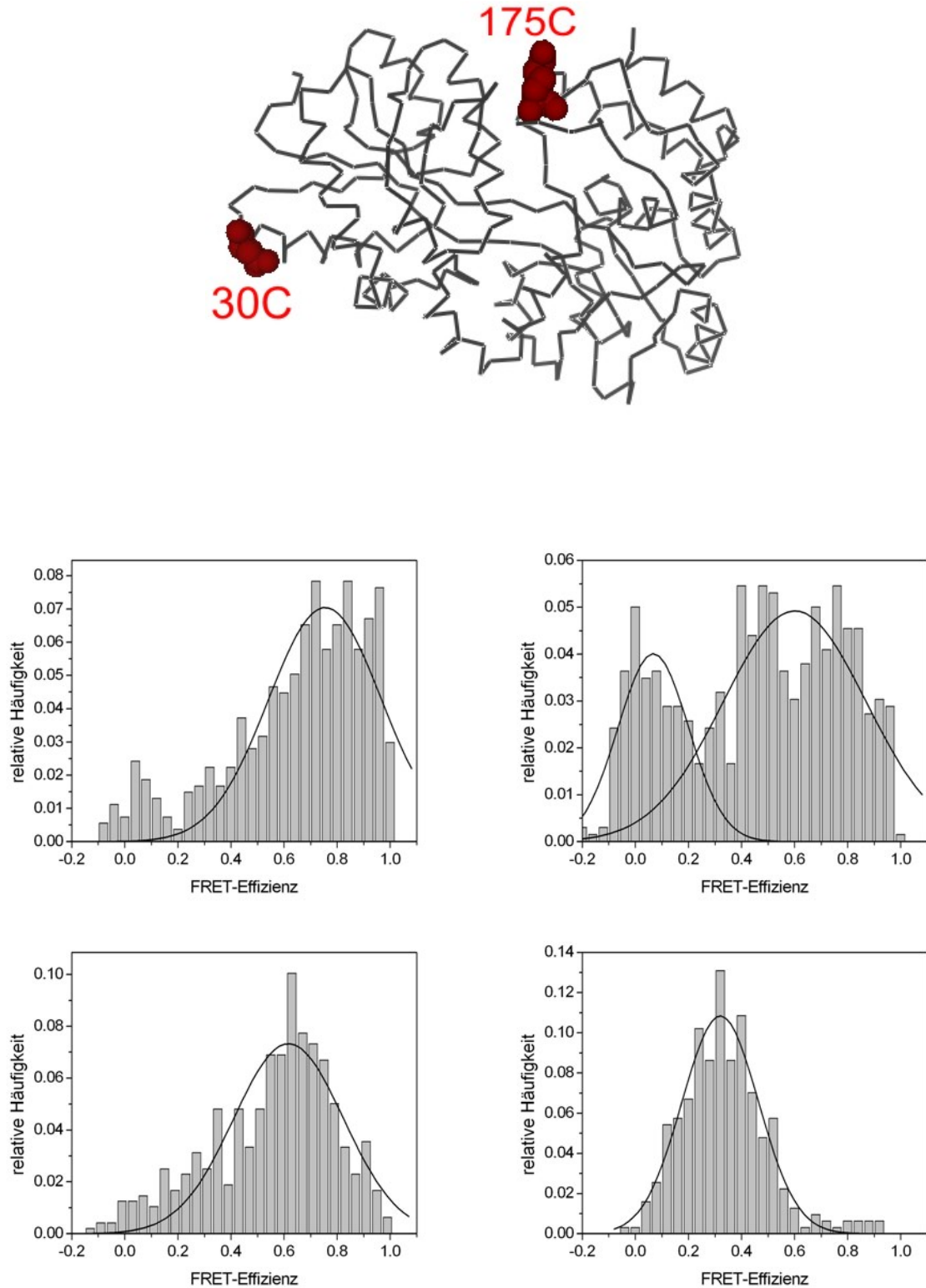


Abbildung E.8: DM-MBP(30C-175C) gebunden an GroEL (links oben), an SR1 (rechts oben), nativ (links unten) und denaturiert (rechts unten)

Literaturverzeichnis

- [1] Ashkin A, Schütze K, Dziedzic JM, Euteneuer U, Schliwa M (1990) *Force Generation of Organelle Transport Measured In vivo by an Infrared-Laser Trap*, Nature, 348 (6299), pp. 346
- [2] Hugel T, Seitz M (2001) *The study of molecular interactions by AFM force spectroscopy*, Macromolecular Rapid Communications, pp. 989–1016
- [3] Sonnleitner A, Schütz GJ, Schmidt T (1999) *Free Brownian motion of individual lipid molecules in biomembranes*, Biophysical Journal, 77 (5), pp. 2638
- [4] Schmidt T, Schütz GJ, Baumgartner W, Gruber HJ, Schindler H (1996) *Imaging of single molecule diffusion*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93 (7), pp. 2926
- [5] Axelrod D, Burghardt TP, Thompson NL (1984) *Total Internal-Reflection Fluorescence*, Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 13, pp. 247
- [6] Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M, Bräuchle C (2001) *Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus*, Science, 294 (5548), pp. 1929
- [7] Bacia K, Kim SA, Schwille P (2006) *Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells*, Nature Methods, 3 (2), pp. 83
- [8] Thompson N (1991) *Fluorescence Correlation Spectroscopy, Topics in Fluorescence Spectroscopy*, vol. 1, Plenum Press, New York
- [9] Schwille P, MeyerAlmes FJ, Rigler R (1997) *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution*, Biophysical Journal, 72 (4), pp. 1878
- [10] Clegg RM (1996) *Fluorescence Resonance Energy Transfer, Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*, vol. 137, John Wiley & Sons, New York

- [11] Stryer L, Haugland RP (1967) *Energy Transfer - a Spectroscopic Ruler*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 58 (2), pp. 719
- [12] Lakowicz JR (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 2. Aufl.
- [13] Förster T (1946) *Energiewanderung und Fluoreszenz*, Naturwissenschaften, 33 (6), pp. 166
- [14] Förster T (1948) *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*, Annalen der Physik, 2 (1-2), pp. 55
- [15] Wu PG, Brand L (1994) *Resonance Energy-Transfer - Methods and Applications*, Analytical Biochemistry, 218 (1), pp. 1
- [16] Qian H, Elson EL (1991) *Analysis of Confocal Laser-Microscope Optics for 3-D Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Applied Optics, 30 (10), pp. 1185
- [17] Rigler R, Mets U, Widengren J, Kask P (1993) *Fluorescence Correlation Spectroscopy with High Count Rate and Low-Background - Analysis of Translational Diffusion*, European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 22 (3), pp. 169
- [18] Hecht E (2001) *Optik*, Oldenbourg Verlag, München, 3. Aufl.
- [19] Paul H (Editor) (2003) *Lexikon der Optik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 2. Aufl.
- [20] Ha T, Enderle T, Ogletree DF, Chemla DS, Selvin PR, Weiss S (1996) *Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93 (13), pp. 6264
- [21] Brand L, Eggeling C, Zander C, Drexhage KH, Seidel CAM (1997) *Single-molecule identification of Coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection: Comparison of one- and two-photon excitation in solution*, Journal of Physical Chemistry A, 101 (24), pp. 4313
- [22] Deniz AA, Dahan M, Grunwell JR, Ha TJ, Faulhaber AE, Chemla DS, Weiss S, Schultz PG (1999) *Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Forster distance dependence and subpopulations*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96 (7), pp. 3670

- [23] Greulich W (Editor) (1998) *Lexikon der Physik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1. Aufl.
- [24] Einstein A (1905) *The motion of elements suspended in static liquids as claimed in the molecular kinetic theory of heat*, Annalen der Physik, 17 (8), pp. 549
- [25] Einstein A (1906) *The theory of the Brownian Motion*, Annalen der Physik, 19 (2), pp. 371
- [26] v Smoluchowski M (1908) *Molekular-kinetische Theorie der Opaleszenz von Gasen im kritischen Zustande, sowie einiger verwandter Erscheinungen*, Annalen der Physik, 25, p. 205
- [27] Kapanidis AN, Lee NK, Laurence TA, Doose S, Margeat E, Weiss S (2004) *Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101 (24), pp. 8936
- [28] Eggeling C, Fries JR, Brand L, Günther R, Seidel CAM (1998) *Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95 (4), pp. 1556
- [29] Sabanayagam CR, Eid JS, Meller A (2005) *Using fluorescence resonance energy transfer to measure distances along individual DNA molecules: Corrections due to nonideal transfer*, Journal of Chemical Physics, 122 (6)
- [30] Magde D, Webb WW, Elson E (1972) *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Physical Review Letters, 29 (11), pp. 705
- [31] Elson EL, Magde D (1974) *Fluorescence Correlation Spectroscopy I: Conceptual Basis and Theory*, Biopolymers, 13 (1), pp. 1
- [32] Magde D, Elson EL, Webb WW (1974) *Fluorescence Correlation Spectroscopy II: Experimental Realization*, Biopolymers, 13 (1), pp. 29
- [33] Haustein E, Schwille P (2004) *Single-molecule spectroscopic methods*, Current Opinion in Structural Biology, 14 (5), pp. 531
- [34] Widengren J, Schwille P (2000) *Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy*, Journal of Physical Chemistry A, 104 (27), pp. 6416

- [35] Widengren J, Mets U, Rigler R (1995) *Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet-States in Solution - a Theoretical and Experimental-Study*, Journal of Physical Chemistry, 99 (36), pp. 13368
- [36] Schwille P (1996), *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene*, Doktorarbeit, TU Braunschweig
- [37] Koppel DE (1974) *Statistical Accuracy in Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Physical Review A, 10 (6), pp. 1938
- [38] Qian H (1990) *On the Statistics of Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Biophysical Chemistry, 38 (1-2), pp. 49
- [39] Kask P, Günther R, Axhausen P (1997) *Statistical accuracy in fluorescence fluctuation experiments*, European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 25 (3), pp. 163
- [40] Kim SA, Heinze KG, Waxham MN, Schwille P (2004) *Intracellular calmodulin availability accessed with two-photon cross-correlation*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101 (1), pp. 105
- [41] Eigen M, Rigler R (1994) *Sorting Single Molecules - Application to Diagnostics and Evolutionary Biotechnology*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91 (13), pp. 5740
- [42] Bieschke J, Schwille P (1998) *Aggregation of Prion Protein investigated by Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*, Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes, 2, p. 81
- [43] Kettling U, Koltermann A, Schwille P, Eigen M (1998) *Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95 (4), pp. 1416
- [44] Hausteil E, Schwille P (2001) *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Biophysical Society, <http://www.biophysics.org/education/schwille.pdf>
- [45] Heinze KG, Jahnz M, Schwille P (2004) *Triple-color coincidence analysis: One step further in following higher order molecular complex formation*, Biophysical Journal, 86 (1), pp. 506
- [46] Heinze KG (2002), *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Zweiphotonenanregung in der biomolekularen Analytik*, Doktorarbeit, Universität Oldenburg

- [47] Ha T (2001) *Single-molecule fluorescence resonance energy transfer*, *Methods*, 25 (1)
- [48] Hausteiner E, Jahnz M, Schwille P (2003) *Triple FRET: A tool for studying long-range molecular interactions*, *Chemphyschem*, 4 (7), pp. 745
- [49] Watrob HM, Pan CP, Barkley MD (2003) *Two-step FRET as a structural tool*, *Journal of the American Chemical Society*, 125 (24), pp. 7336
- [50] Hohng S, Joo C, Ha T (2004) *Single-molecule three-color FRET*, *Biophysical Journal*, 87 (2), pp. 1328
- [51] Thews E, Gerken M, Eckert R, Zapfel J, Tietz C, Wrachtrup J (2005) *Cross talk free fluorescence cross correlation spectroscopy in live cells*, *Biophysical Journal*, 89 (3), pp. 2069
- [52] Kohl T, Heinze KG, Kuhlemann R, Koltermann A, Schwille P (2002) *A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (19), pp. 12161
- [53] Widengren J, Schweinberger E, Berger S, Seidel CAM (2001) *Two new concepts to measure fluorescence resonance energy transfer via fluorescence correlation spectroscopy: Theory and experimental realizations*, *Journal of Physical Chemistry A*, 105 (28), pp. 6851
- [54] Ha TJ, Ting AY, Liang J, Caldwell WB, Deniz AA, Chemla DS, Schultz PG, Weiss S (1999) *Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (3), pp. 893
- [55] Lee NK, Kapanidis AN, Wang Y, Michalet X, Mukhopadhyay J, Ebricht RH, Weiss S (2005) *Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation*, *Biophysical Journal*, 88 (4), pp. 2939
- [56] Margeat E, Kapanidis AN, Tinnefeld P, Wang Y, Mukhopadhyay J, Ebricht RH, Weiss S (2006) *Direct observation of abortive initiation and promoter escape within single immobilized transcription complexes*, *Biophysical Journal*, 90 (4), pp. 1419
- [57] Lamb DC, Schenk A, Rocker C, Scalfi-Happ C, Nienhaus GU (2000) *Sensitivity enhancement in fluorescence correlation spectroscopy of multiple species using time-gated detection*, *Biophysical Journal*, 79 (2), pp. 1129

- [58] Horsey I, Furey WS, Harrison JG, Osborne MA, Balasubramanian S (2000) *Double fluorescence resonance energy transfer to explore multicomponent binding interactions: a case study of DNA mismatches*, Chemical Communications, (12), pp. 1043
- [59] Clamme JP, Deniz AA (2005) *Three-color single-molecule fluorescence resonance energy transfer*, Chemphyschem, 6 (1), pp. 74
- [60] Gregor I, Patra D, Enderlein J (2005) *Optical saturation in fluorescence correlation spectroscopy under continuous-wave and pulsed excitation*, Chemphyschem, 6 (1), pp. 164
- [61] Stryer L (1999) *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 4.Aufl.
- [62] Anfinsen CB (1973) *Principles That Govern Folding of Protein Chains*, Science, 181 (4096), pp. 223
- [63] Nelson D, Cox M (1995) *Lehninger Biochemie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3.Aufl.
- [64] Onuchic JN, Wolynes PG (2004) *Theory of protein folding*, Current Opinion in Structural Biology, 14 (1), pp. 70
- [65] Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) *Protein folding - Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*, Science, 295 (5561), pp. 1852
- [66] Hartl FU (1996) *Molecular chaperones in cellular protein folding*, Nature, 381 (6583), pp. 571
- [67] Thirumalai D, Lorimer GH (2001) *Chaperonin-mediated protein folding*, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 30, pp. 245
- [68] Lindquist S, Craig EA (1988) *The Heat-Shock Proteins*, Annual Review of Genetics, 22, pp. 631
- [69] Martin J, Hartl FU (1997) *Chaperone-assisted protein folding*, Current Opinion in Structural Biology, 7 (1), pp. 41
- [70] Xu ZH, Horwich AL, Sigler PB (1997) *The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)(7) chaperonin complex*, Nature, 388 (6644), pp. 741
- [71] Fenton WA, Horwich AL (2003) *Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide*, Quarterly Reviews of Biophysics, 36, pp. 229

- [72] Horovitz A, Willison KR (2005) *Allosteric regulation of chaperonins*, Current Opinion in Structural Biology, 15 (6), pp. 646
- [73] Lin Z, Rye HS (2004) *Expansion and compression of a protein folding intermediate by GroEL*, Molecular Cell, 16 (1)
- [74] Schuler B, Lipman EA, Eaton WA (2002) *Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy*, Nature, 419 (6908), pp. 743
- [75] Schuler B (2005) *Single-molecule fluorescence spectroscopy of protein folding*, Chemphyschem, 6 (7), pp. 1206
- [76] Boos W, Shuman H (1998) *Maltose/maltodextrin system of Escherichia coli: Transport, metabolism, and regulation*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62 (1), pp. 204
- [77] Sharff AJ, Rodseth LE, Spurlino JC, Quioco FA (1992) *Crystallographic Evidence of a Large Ligand-Induced Hinge-Twist Motion between the 2 Domains of the Maltodextrin Binding-Protein Involved in Active-Transport and Chemotaxis*, Biochemistry, 31 (44), pp. 10657
- [78] <http://pymol.sourceforge.net/>
- [79] Cantor CR, Schimmel PR (1980) *Part III: The behavior of biological macromolecules*, Biophysical Chemistry, W. H. Freeman and Company, New York
- [80] Dietz H, Rief M (2006) *Protein structure by mechanical triangulation*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (5), pp. 1244
- [81] Weissman JS, Hohl CM, Kovalenko O, Kashi Y, Chen SX, Braig K, Saibil HR, Fenton WA, Horwich AL (1995) *Mechanism of Groel Action - Productive Release of Polypeptide from a Sequestered Position under Groes*, Cell, 83 (4), pp. 577
- [82] Shtilerman M, Lorimer GH, Englander SW (1999) *Chaperonin function: Folding by forced unfolding*, Science, 284 (5415), pp. 822
- [83] Ranson NA, Dunster NJ, Burston SG, Clarke AR (1995) *Chaperonins Can Catalyze the Reversal of Early Aggregation Steps When a Protein Misfolds*, Journal of Molecular Biology, 250 (5), pp. 581
- [84] Seeman NC (2003) *DNA in a material world*, Nature, 421 (6921), pp. 427

- [85] Ullner M, Woodward CE (2002) *Orientational correlation function and persistence lengths of flexible polyelectrolytes*, *Macromolecules*, 35 (4), pp. 1437
- [86] Simmel FC, Dittmer WU (2005) *DNA nanodevices*, *Small*, 1 (3), pp. 284
- [87] Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H, Marky LA (1986) *Predicting DNA Duplex Stability from the Base Sequence*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (11), pp. 3746
- [88] McKinney SA, Declais AC, Lilley DMJ, Ha T (2003) *Structural dynamics of individual Holliday junctions*, *Nature Structural Biology*, pp. 93–97
- [89] Goodman RP, Schaap IAT, Tardin CF, Erben CM, Berry RM, Schmidt CF, Turberfield AJ (2005) *Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication*, *Science*, 310 (5754), pp. 1661
- [90] Gelbart WM, Bruinsma RF, Pincus PA, Parsegian VA (2000) *DNA-inspired electrostatics*, *Physics Today*, 53 (9), pp. 38
- [91] Debye P, Hückel E (1923) *The theory of electrolytes I. The lowering of the freezing point and related occurrences*, *Physikalische Zeitschrift*, 24, pp. 185
- [92] Grosberg AY, Nguyen TT, Shklovskii BI (2002) *Colloquium: The physics of charge inversion in chemical and biological systems*, *Reviews of Modern Physics*, 74 (2), pp. 329
- [93] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) *Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene-Expression*, *Science*, 263 (5148), pp. 802
- [94] Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY (2002) *Creating new fluorescent probes for cell biology*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3 (12), pp. 906
- [95] Dittrich PS, Schäfer SP, Schwille P (2005) *Characterization of the photoconversion on reaction of the fluorescent protein kaede on the single-molecule level*, *Biophysical Journal*, 89 (5), pp. 3446
- [96] Habuchi S, Ando R, Dedecker P, Verheijen W, Mizuno H, Miyawaki A, Hofkens J (2005) *Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (27), pp. 9511
- [97] Kukolka F, Niemeyer CM (2004) *Synthesis of fluorescent oligonucleotide-EYFP conjugate: Towards supramolecular construction of semisynthetic biomolecular antennae*, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2 (15), pp. 2203

- [98] Kukolka F, Müller BK, Paternoster S, Arndt A, Niemeyer CM, Bräuchle C, Lamb DC (2006) *A single-molecule Förster resonance energy transfer analysis of fluorescent DNA-protein conjugates for nanobiotechnology*, *Small*, 2 (8-9), pp. 1083
- [99] Clegg RM, Murchie AIH, Zechel A, Lilley DMJ (1993) *Observing the Helical Geometry of Double-Stranded DNA in Solution by Fluorescence Resonance Energy-Transfer*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (7), pp. 2994
- [100] Yang F, Moss LG, Phillips GN (1996) *The molecular structure of green fluorescent protein*, *Nature Biotechnology*, 14 (10), pp. 1246
- [101] Mao CD, Sun WQ, Shen ZY, Seeman NC (1999) *A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA*, *Nature*, 397 (6715), pp. 144
- [102] Yan H, Zhang XP, Shen ZY, Seeman NC (2002) *A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology*, *Nature*, 415 (6867), pp. 62
- [103] Yurke B, Turberfield AJ, Mills AP, Simmel FC, Neumann JL (2000) *A DNA-fuelled molecular machine made of DNA*, *Nature*, 406 (6796), pp. 605
- [104] Simmel FC, Yurke B (2002) *A DNA-based molecular device switchable between three distinct mechanical states*, *Applied Physics Letters*, 80 (5), pp. 883
- [105] Chen Y, Wang MS, Mao CD (2004) *An autonomous DNA nanomotor powered by a DNA enzyme*, *Angewandte Chemie-International Edition*, 43 (27), pp. 3554
- [106] Yin P, Yan H, Daniell XG, Turberfield AJ, Reif JH (2004) *A unidirectional DNA walker that moves autonomously along a track*, *Angewandte Chemie-International Edition*, 43 (37), pp. 4906
- [107] Tian Y, He Y, Chen Y, Yin P, Mao CD (2005) *Molecular devices - A DNAzyme that walks processively and autonomously along a one-dimensional track*, *Angewandte Chemie-International Edition*, 44 (28), pp. 4355
- [108] Niemeyer CM, Adler M, Lenhert S, Gao S, Fuchs H, Chi LF (2001) *Nucleic acid supercoiling as a means for ionic switching of DNA-nanoparticle networks*, *Chem-biochem*, 2 (4), pp. 260
- [109] Liedl T, Simmel FC (2005) *Switching the conformation of a DNA molecule with a chemical oscillator*, *Nano Letters*, 5 (10), pp. 1894
- [110] Dittmer WU, Reuter A, Simmel FC (2004) *A DNA-based machine that can cyclically bind and release thrombin*, *Angewandte Chemie-International Edition*, 43 (27), pp. 3550

- [111] Buranachai C, McKinney SA, Ha T (2006) *Single molecule nanometrology*, Nano Letters, 6 (3), pp. 496
- [112] Rothwell PJ, Berger S, Kensch O, Felekyan S, Antonik M, Wöhrl BM, Restle T, Goody RS, Seidel CAM (2003) *Multiparameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 reverse transcriptase: primer/template complexes*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100 (4), pp. 1655
- [113] Krenzel U *Einführung in die Wahrscheinlichkeitstheorie*, Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 5. Aufl.
- [114] *Light Sources, Operation Manual and Technical Data*, PicoQuant
- [115] Lauterborn W, Kurz T (2003) *Coherent Optics: Fundamentals and Applications*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl.
- [116] *SPCM-AQR - Single Photon Counting Module*, PerkinElmer Optoelectronics, http://optoelectronics.perkinelmer.com/content/Datasheets/DTS_SPCMAQR.pdf
- [117] Schatzel K, Drewel M, Stimac S (1988) *Photon-Correlation Measurements at Large Lag Times - Improving Statistical Accuracy*, Journal of Modern Optics, 35 (4), pp. 711
- [118] Wahl M, Gregor I, Patting M, Enderlein J (2003) *Fast calculation of fluorescence correlation data with asynchronous time-correlated single-photon counting*, Optics Express, 11 (26), pp. 3583
- [119] <http://www.invitrogen.com/>
- [120] <http://www.atto-tec.de/>
- [121] <http://www.amersham.com/>
- [122] Jung C, Müller BK, Lamb DC, Nolde F, Müllen K, Bräuchle C (2006) *A new photostable terrylene diimide dye for applications in single molecule studies and membrane labeling*, Journal of the American Chemical Society, 128 (15), pp. 5283
- [123] Stearns T (1995) *Green Fluorescent Protein - the Green-Revolution*, Current Biology, 5 (3), pp. 262
- [124] Patterson G, Day RN, Piston D (2001) *Fluorescent protein spectra*, Journal of Cell Science, 114 (5), pp. 837

-
- [125] Du H, Fuh RCA, Li JZ, Corkan LA, Lindsey JS (1998) *PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry*, *Photochemistry and Photobiology*, 68 (2), pp. 141
- [126] Boeckle S, Gersdorff Kv, van der Piepen S, Culmsee C, Wagner E, Ogris M (2004) *Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer*, *Journal of Gene Medicine*, 6 (10), pp. 1102

Abkürzungsverzeichnis

ACF	Autokorrelationsfunktion (<i>Autocorrelation Function</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
APD	Avalanche Photodiode
ATP	Adenosintriphosphat
AOM	Akusto-Optischer Modulator
bp	Basenpaare
CCF	Kreuzkorrelationsfunktion (<i>Cross-Correlation Function</i>)
cw	Dauerstrich- (<i>continous wave</i>)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double stranded DNA</i>)
F_{ij}	Fluoreszenzintensität im i ten Detektionskanal nach der j ten Anregung
$\varepsilon_{i,j,k}$	Molekulare Helligkeit der Spezies i im Detektionskanal j und Anregungsquelle k
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>)
FCCS	Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (<i>Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy</i>)
FJC	<i>Freely Jointed Chain</i>
FRET	Fluoreszenz- (Förster-)Resonanz-Energietransfer
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
LSM	<i>Laser Scanning Microscopy</i>
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
OD	Optische Dichte
PIE	<i>Pulsed Interleaved Excitation</i>
RNA	Ribonucleinsäure
R_0	Förster-Radius
S/N	Signal-Rausch (<i>Signal-to-Noise</i>)
spFRET	Einzelmolekül-FRET (<i>single-pair FRET</i>)
SR1	<i>Single Ring</i> (GroEL-Mutante aus nur einem der heptameren Ringe)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
TCSPC	<i>Time Correlated Single Photon Counting</i>

u unit (Einheit, mit der die Aktivität eines Enzyms angegeben wird:
Enzymmenge, die unter Standardbedingungen pro min 1 μmol
Substrat umsetzt)

(e)YFP (enhanced) Yellow Fluorescent Protein

Danksagung

Prof. Christoph Bräuchle möchte ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, für die exzellenten Arbeitsbedingungen in unseren Laboren und im Rahmen des CeNS und die Finanzierung zahlreicher Tagungen danken. Eine solche Ausstattung und so viele Gestaltungsmöglichkeiten sind selten zu finden.

Prof. Joachim Rädler danke ich für die Übernahme des Zweigutachtens.

Mein Dank gilt insbesondere Dr. Don C. Lamb für die direkte Betreuung meiner Arbeit. Vor allem möchte ich ihm auch für die Toleranz und Unterstützung bei allen meinen Vorhaben, seien es die Reisen zu den *Biophysical-Society*-Tagungen nach Baltimore und Salt Lake City oder mein Aufenthalt in Paris, danken.

Merci à Maxime Dahan pour m'avoir accueillie dans son équipe durant mon stage à Paris. J'ai passé de très bons moments à Paris aussi bien du point de vue professionnel que personnel.

Bei der deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die Finanzierung der Reise zum *50th Annual Biophysical Society Meeting* nach Salt Lake City im Februar 2006 bedanken.

I would like to thank Shruti Sharma, Kausik Chakraborty, Manajit Hayer-Hartl and F. Ulrich Hartl for the fruitful collaboration in the GroEL-project, especially Shruti for answering very patiently all my questions about chaperonins and in particular GroEL.

Fritz Simmel und Andreas Reuter danke ich für die produktive Zusammenarbeit beim DNA-Nanomaschinen-Projekt.

Bei Evgeny Zaychikov vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried möchte ich mich für das Markieren der DNA-Proben bedanken.

Mein Dank gilt vor allem auch dem gesamten Ak Bräuchle für das gute Arbeitsklima, das den manchmal tristen Laboralltag erleichtert hat. Insbesondere möchte ich meinen Bürokollegen Johanna Kirstein und Christophe Jung danken, dass ich *honoraie causa* in das Team Nano aufgenommen wurde, Johanna für unsere vielen wissenschaftlichen als auch privaten Gespräche, Christophe dafür, dass er unser ständiges Gequatsche ertragen hat und für die Erkenntnis, dass es einen großen Unterschied zwischen Franzosen und Deutschen gibt, obwohl wir nur 50 km entfernt voneinander aufgewachsen sind. Iko Katayama möchte ich dafür danken, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte, die

Fortführung meiner Projekte während meines Frankreich-Aufenthalts und für das Korrekturlesen der Arbeit. Stefan Paternoster danke ich für die Hilfe beim Umbau auf drei Farben und bei den Drei-Farben-Messungen, Robert Lewis für die Beantwortung vieler biochemischer Fragen und den Aufbau und die Verwaltung des Biochemielabors, Karla de Bruin für die Verstärkung der "Spätesserfraktion", Ondrej Burkacky für die Hilfe bei allen Computerproblemen, Moritz Ehrl für seine Hilfe bei organisatorischen Aufgaben und Markus Krause für die Programmierung der Scanning-Software.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'équipe optique et biologie de Laboratoire Kastler Brossel à l'ENS pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans l'équipe, et particulièrement à Sébastien Courty pour tout ce qu'il m'a appris.

Allen voran möchte ich aber Lars dafür danken, dass er alle Höhen und Tiefen meines Doktorandendaseins mitgemacht hat und mich immer wieder motiviert und aufgemuntert hat, sowie für das fleißige Korrekturlesen dieser Arbeit. Meinen Eltern möchte ich für die Unterstützung während meines gesamten Studiums, Annika und William für die englischen Korrekturen, Moritz für die Hilfe bei LaTeX-Problemen, Dieter und Karin für die grosszügigen Finanzspritzen, Jo Anne für den stetigen Puzzle-Nachschub, Tobias für die Beherbergung während des FCS-Workshops in Dresden und Margit für die Beherbergung während der DPG-Tagung in Berlin danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Barbara Katrin Müller
geb. am 15.06.1979 in Karlsruhe

Schulbildung:

1985-1989	Ernst-Reuter-Schule, Karlsruhe
1989-1996	Otto-Hahn-Gymnasium, Karlsruhe
1996-1998	Bismarck-Gymnasium, Karlsruhe

Abitur: 06/1998

Hochschulstudium:

10/1998-05/2003	Studium der Physik an der Georg-August-Universität Göttingen Vordiplom: 07/2000 Diplom: 05/2003
seit 07/2003	Anfertigung der vorliegenden Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig- Maximilians-Universität München
03-05/2006	Forschungsaufenthalt an der Ecole Normale Supérieure Paris

Preise und Stipendien:

Student Award "Best Talk", 11th International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in Life Science, September 2005, Berlin

Finanzierung der Kongressreise zum *50th Annual Meeting of the Biophysical Society* in Salt Lake City/USA durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, 18. - 22. Feb. 2006

Marie Curie Host Fellowship, März - Mai 2006, Forschungsaufenthalt an der Ecole Normale Supérieure, Laboratoire Kastler Brossel, Paris