

Einzelmolekül 3-Farben Fluoreszenzspektroskopie mit Pulsed Interleaved Excitation

Diplomarbeit am Lehrstuhl für physikalische Chemie
Prof. Dr. C. Bräuchle
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Stefan Paternoster

Betreuer:

Prof. Dr. C. Bräuchle
PhD D. C. Lamb

Tag der Anmeldung: 4. März 2005
Tag der Abgabe: 6. März 2006

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung der Arbeit	2
1.2	Gliederung der Arbeit	3
2	Grundlagen	5
2.1	Fluoreszenzspektroskopie	5
2.1.1	Konfokale Mikroskopie	7
2.2	Aufbau	9
2.2.1	Optische Komponenten	10
2.2.2	Messkarten	16
2.2.3	Farbstoffe	18
2.2.4	Justage	21
2.3	Pulsed Interleaved Excitation (PIE)	23
2.4	Burst Analysis	25
2.4.1	Burst Analysis mit PIE	26
2.5	Fluoreszenz-Korrelations-Analyse	27
2.6	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	32
2.6.1	Burst Analysis FRET	34
2.6.2	Burst Analysis 3-Farben FRET	35
3	Projekt A: 2-Farben FRET mit einem Fluoreszenzprotein	39
4	Projekt B: 3-Farben Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer	45
4.1	DNA-Lineal	45
4.2	Y-DNA	49
5	Projekt C: Wirkungsweise von PEI als künstlicher Virus	53

6 Zusammenfassung und Ausblick	57
Literaturverzeichnis	61

1. Einleitung

Innerhalb der letzten Jahre hat sich die Fluoreszenzspektroskopie zu einem bedeutenden Hilfsmittel in Biologie, Pharmazie und Medizin entwickelt. Eine Vielzahl von Biomolekülen kann mit ihrer Hilfe präzise beobachtet, identifiziert und verfolgt werden. Eine seit langem bekannte Technik ist es, Zellen und zelluläre Bestandteile durch Anfärben mit Farbstoffen sichtbar zu machen. Unter Zuhilfenahme der Fluoreszenz ist es heutzutage sogar möglich, Bewegungen einzelner Moleküle in lebenden Zellen zu beobachten.

Unter den Techniken, die auf der Untersuchung von fluoreszenzmarkierten biologischen bzw. biochemischen Proben basieren, hat sich die konfokale Fluoreszenzspektroskopie auf Grund ihrer Vielseitigkeit als besonders nützlich erwiesen. Wurde sie am Anfang ihrer Entwicklung überwiegend zur statischen Betrachtung von Zellen und ihren Bestandteilen genutzt, können heute gerichtete Bewegungen, Diffusionsvorgänge [31, 15], komplexere Dynamiken wie z.B. Konformationsänderungen und Bindungsreaktionen von Molekülen untersucht werden [29, 47, 38]. Unter Zuhilfenahme des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET)[16], dem strahlungslosen Energieübertrag zwischen Fluoreszenzfarbstoffen, ist es sogar möglich, Abstandsänderungen auf einzelnen Molekülen nachzuweisen. Die Vorteile dieser Technik liegen dabei insbesondere in der Non-Invasivität, der geringen benötigten Probenmenge bzw. -konzentration und der kurzen Messdauer, vor allem aber in der hohen Sensitivität, welche bis hin zur Detektion einzelner Moleküle reicht.

Das grundlegende Prinzip der modernen konfokalen Fluoreszenzspektroskopie besteht darin, Veränderungen im Emissionssignal fluoreszenzmarkierter Biomoleküle statistisch auszuwerten und damit die bereits genannten Informationen zu gewinnen. Die hohe Sensitivität wird dabei durch einen konfokalen Mikroskop-Aufbau erreicht. Das Fokolvolumen wird möglichst klein gehalten, die Fluoreszenz mit einer hochempfindlichen APD (Avalanche Photo Diode) detektiert. Erweitert man den Aufbau auf mehrfarbige Anregung, bietet sich die Möglichkeit, nicht nur die Photonen einer markierten Spezies zu detektieren und auszuwerten, sondern auch die Emission von Fluoreszenzmarkern unterschiedlicher Farben gemeinsam zu analysieren, was die Bestimmung von Abständen auf einzelnen Molekülen mit dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer [20] und die Beobachtung von Prozessen mehrerer Re-

aktionspartner möglich macht. Die Untersuchung von einzelnen Molekülen bringt den immensen Vorteil, dass mehrere konkurrierende Prozesse oder auch Veränderungen an unterschiedlichen Probenkomponenten analysiert werden können, die in Ensemblemessungen durch die Mittelung der Messwerte untergehen.

Für die Einzelmolekülspektroskopie stehen grundsätzlich zwei Methoden zur Verfügung: die Beobachtung von an eine Oberfläche gebundenen Molekülen mit Weitfeld- oder TIRF-Mikroskopie (*Total Internal Reflection Fluorescence*) [1] und die in dieser Arbeit verwendete konfokale Analyse von Signalspitzen im Fluoreszenzsignal von Molekülen in Lösung, die so genannte Burst Analysis [10]. Die Signalspitzen entstehen bei dieser Technik durch den Durchtritt eines einzelnen fluoreszenzmarkierten Moleküls durch das Anregungsvolumen, welches in dieser Zeit Photonen emittiert und damit das Signal am Detektor deutlich anhebt.

Die Entwicklung gepulster Laserquellen hat zu einer weiteren Verbesserung der Fluoreszenzspektroskopie, der Pulsed Interleaved Excitation (PIE)[33], geführt. Hier pulsieren die anregenden Lichtquellen alternierend mit einer Pulsbreite im Picosekunden-Bereich und einer Frequenz von bis zu 40 MHz. Das Fluoreszenzsignal wird zwischen den Anregungspulsen mit einer Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) PC-Karte aufgenommen. Die Karte registriert mit einer Zeitauflösung von unter 40 ps, ob und bei welcher Zeit in Bezug auf den nächsten Laserpuls ein Photon auf den Detektor trifft. Die Frequenz der Anregung ist somit durch die Fluoreszenzlebensdauern der Farbstoffe begrenzt, da alle Fluoreszenzphotonen nach Farbe getrennt detektiert werden sollen. Das Emissionssignal kann mit PIE zeitlich auf den Anregungspuls zurückgeführt werden, wodurch es jetzt möglich ist, die Stöchiometrie der Probenkomponenten zu bestimmen [24, 33] und bei FRET-Messungen ausschließlich die zur Vermessung vorgesehenen, mehrfarbig markierten, Komplexe zu untersuchen. Darüber hinaus stehen die Informationen über die Fluoreszenzlebensdauern der Farbstoffe zur Verfügung, die aber in dieser Arbeit nicht genutzt werden.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den vorhandenen konfokalen Fluoreszenzspektroskopie-Aufbau mit Pulsed Interleaved Excitation von zwei Anregungsquellen auf drei zu erweitern. Dieser 3-Farben Aufbau erlaubt die Analyse von nun drei markierten Probenkomponenten mit allen in der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie verwendeten Methoden, wie z.B. Burst Analysis, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie oder Photon-Counting-Histogram [5]. Da die meisten Abläufe in der Biochemie nicht reine 2-Komponenten-Reaktionen sind, gewinnt man mit dieser Erweiterung einen deutlich tieferen Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen.

Darüberhinaus soll in dieser Arbeit 3-Farben FRET auf Einzelmolekülebene mit den Vorteilen von PIE kombiniert werden und damit die Bestimmung der FRET-Effizienzen zwischen drei Fluorophoren mit einer Messung ermöglicht werden.

Verglichen mit 2-Farben Aufbauten bringt die 3-Farben Fluoreszenzspektroskopie folgende Vorteile mit sich:

- Erstens kann eine zusätzliche Spezies detektiert werden; damit ergeben sich detaillierte Informationen über Reaktionskinetiken, Bindungszustände, Diffusionskoeffizienten, Abstände und Stöchiometrie von nun drei markierten Probenkomponenten.

- Zweitens bietet sich mit dem Two-Step Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers die Möglichkeit, etwa doppelt so große Abstände zu messen.
- Vor allem aber in Kombination mit gepulster Anregung kann man in einer FRET-Messung die geometrische Information über die Anordnung der Fluoreszenzmarker von einer Dimension auf deren zwei erweitern, wodurch die von den Markern aufgespannte Ebene bestimmt werden kann. Damit ersetzt eine Messung drei konventionelle 2-Farben FRET-Messungen mit drei unterschiedlich gelabelten Proben.

1.2 Gliederung der Arbeit

Die Kapitel der Arbeit sind folgendermaßen gegliedert:

Im Kapitel „Theorie“ wird zu Beginn in die Grundlagen der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie eingeführt. Nach der genauen Beschreibung des Aufbaus mitsamt aller für die Messungen notwendigen Komponenten liefert der Abschnitt „Justage“ einen kurzen Einblick in die Vorgehensweise bei der Justage des Aufbaus. Im Anschluss wird das Prinzip der Pulsed Interleaved Excitation erläutert und die Methoden der Datenanalyse, Burst Analysis und Fluoreszenz-Korrelations-Analyse, werden vorgestellt. Zum Schluss des Theorieteils erhält man Einblick in die Grundlagen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers und der Algorithmus zur Auswertung von 3-Farben FRET Messung wird detailliert hergeleitet.

In den anschließenden Kapiteln werden die Daten und Ergebnisse der einzelnen Projekte vorgestellt. Projekt A befasst sich mit dem Resonanz-Energie-Transfer zwischen einem synthetischen Farbstoff und einem fluoreszierenden Protein. Der experimentelle Hauptteil dieser Arbeit, Projekt B, verifiziert anhand von Messergebnissen die vorgestellte Theorie für 3-Farben FRET mit PIE. In Projekt C wird die Wirkungsweise von Polyethylenimin als künstlicher Virus untersucht.

Zum Schluss werden die Ergebnisse der Arbeit kurz zusammengefasst und es wird ein Ausblick auf an diese Arbeit anschließende Projekte gegeben.

2. Grundlagen

2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Als Fluoreszenz bezeichnet man den Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie durch spontane Emission von Licht. Die erforderliche Anregung der Elektronen eines Fluoreszenzmoleküls aus ihrem Grundzustand S_0 in einen Zustand gleicher Spinmultiplizität S_n erfolgt durch Absorption von Strahlung (siehe Abbildung 2.2). Nach einer Lebensdauer im Bereich von einigen Nanosekunden kann das angeregte Elektron wieder in den Grundzustand relaxieren und sendet ein Photon aus [34].

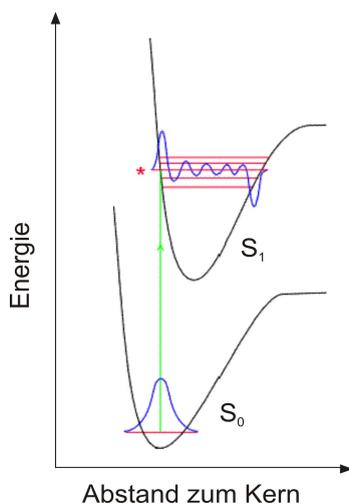


Abbildung 2.1: *Energieanregung eines Elektrons nach dem Franck-Condon Prinzip*

Nach dem Franck-Condon Prinzip (Abbildung 2.1) ändern die Kerne des Fluoreszenzmoleküls während des schnellen Elektronenübergangs ihre Lage und Geschwindigkeit kaum. Daher finden die Übergänge bei konstantem Abstand zum Kern statt. Außerdem ereignen sich die Elektronenübergänge bevorzugt an den klassischen Umkehrpunkten der Schwingungsniveaus, da ihre kinetische Energie dort Null ist und sie sich damit an diesen Punkten am längsten aufhalten. So werden die Elektronen meist nicht nur in ihrem Schwingungsniveau, sondern auch in ihrem Rotationsniveau angehoben. Der sogenannte Stokes-Shift rührt dann daher, dass das Elektron durch Prozesse wie die schnelle Abregung von Schwingungsenergie (Interne Konversion) oder Vibrationsrelaxation strahlungslos Energie bis zum Zustand S_n verliert. Das emittierte Photon besitzt eine geringfügig größere Wellenlänge als das absorbierte.

Bei der mit der Fluoreszenz konkurrierenden Phosphoreszenz hingegen, mit Lebensdauern von mehr als 10^{-4} Sekunden, geht das Elektron quantenmechanisch verboten in den Triplettzustand T_n über (*intersystem crossing*), aus dem es entweder direkt,

oder nach erneutem *intersystem crossing* unter Abgabe eines Photons relaxiert (siehe Abbildung 2.2).

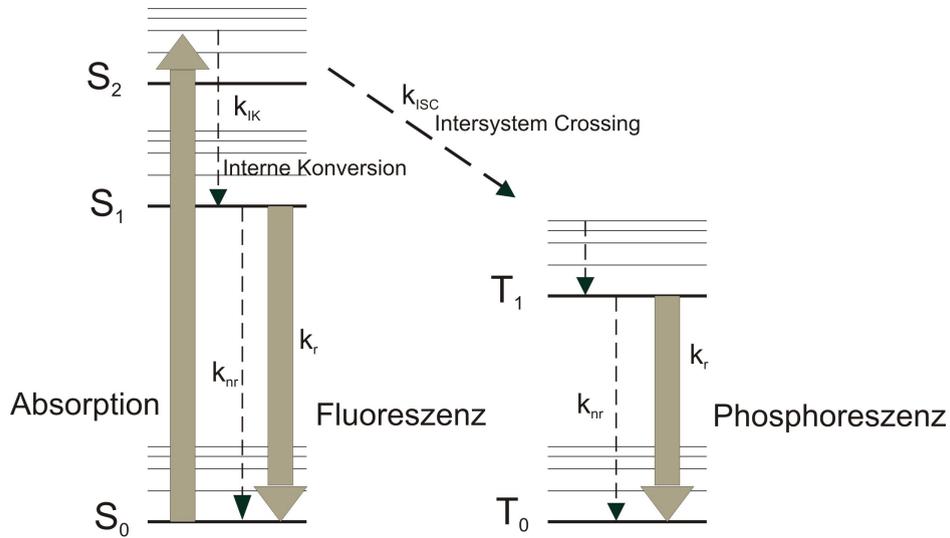


Abbildung 2.2: Jablonski-Termschema [3] - strahlende Übergänge sind mit durchgehenden Pfeilen und strahlungslose mit gestrichelten Pfeilen markiert

Wird nun eine Lösung fluoreszierender Teilchen der Konzentration $C(\vec{r}, t)$ mit Licht bestrahlt, ist die Zahl $N_a(t)$ der absorbierten Photonen proportional zur räumlichen und zeitlichen Verteilung der Anregungsintensität $I_a(\vec{r}, t)$:

$$N_a(t) = \int_V \sigma \cdot C(\vec{r}, t) \cdot I_a(\vec{r}, t) dV \quad (2.1)$$

mit dem Absorptionsquerschnitt σ und dem Anregungsvolumen V .

Es tragen nicht alle absorbierten Teilchen N_a zur Fluoreszenz N_e bei; dies wird durch die Fluoreszenzquantenausbeute Q ausgedrückt [26]:

$$Q = \frac{N_e}{N_a} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2.2)$$

wobei k_r, k_{nr} die Reaktionsraten für Fluoreszenz und nicht-radiative Abregung (k_{nr} fasst Interne Konversion und *intersystem crossing* zusammen) darstellen.

Trägt man auch noch der Sammeleffizienz $S(\vec{r})$ des Aufbaus (in der Literatur oft auch *collection efficiency function*, CEF(r)) [36] und dem Verlust durch Detektor und optische Komponenten κ Rechnung, kann man folgende Gleichung für das Fluoreszenzsignal aufstellen:

$$F(t) = \int_V \kappa \cdot Q \cdot S(\vec{r}) \cdot \sigma \cdot C(\vec{r}, t) \cdot I_a(\vec{r}, t) dV \quad (2.3)$$

Verändern sich Anregung und Konzentration weder räumlich noch zeitlich, so vereinfacht sich die Gleichung folgendermaßen:

$$F = \kappa \cdot Q \cdot S(\vec{r}) \cdot N_a \quad (2.4)$$

2.1.1 Konfokale Mikroskopie

Sowohl bei der Burst Analysis als auch bei der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bedient man sich eines konfokalen Mikroskopaufbaus [37]. Dies führt zu den im folgenden Abschnitt beschriebenen Folgen für das Detektionssignal.

Die Fokussierung der anregenden Laserstrahlen in der Probenlösung mit ihrer gaussförmigen Intensitätsverteilung belässt die Anregungsintensität und die Detektionseffizienz zwar zeitlich konstant, jedoch nicht ortsunabhängig.

$$I_a(\vec{r}, t) = I_0 \cdot I_a(\vec{r}) \quad (2.5)$$

Fasst man die Anregungsintensität $I_a(\vec{r})$ und die Sammeleffizienz des optischen Aufbaus $S(\vec{r})$ zusammen, ergibt sich die molekulare Detektionseffizienz $MDE(\vec{r})$ und die Emissionsintensität $I_e(\vec{r})$, wonach man für Gleichung 2.3

$$F(t) = \kappa \cdot Q \cdot \sigma \cdot I_0 \int_V S(\vec{r}) \cdot I_a(\vec{r}) \cdot C(\vec{r}, t) dV \quad (2.6)$$

$$= \eta \int_V MDE(\vec{r}) \cdot C(\vec{r}, t) dV \quad (2.7)$$

$$= \int_V I_e(\vec{r}) \cdot C(\vec{r}, t) dV \quad (2.8)$$

erhält, wobei

$$\eta = \kappa \cdot Q \cdot \sigma \cdot I_0 \quad (2.9)$$

als molekulare Helligkeit bezeichnet wird.

Zur Bestimmung der räumlichen Verteilung der Anregungs- und Detektionsintensität soll Abbildung 2.3 den Strahlengang im Mikroskop verdeutlichen.

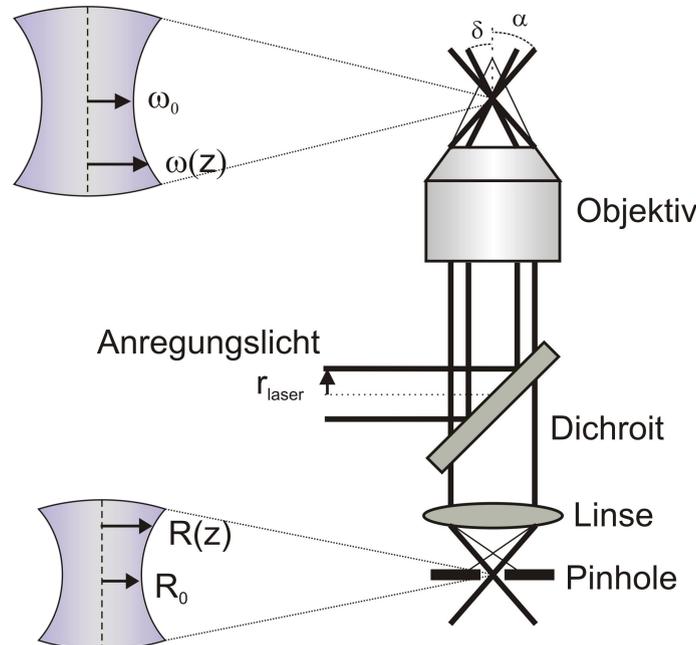


Abbildung 2.3: *Prinzip konfokaler Fluoreszenzmikroskopie*

Das kollimierte Laserlicht wird durch die Rückapertur des Objektivs in die Probe eingestrahlt (Epi-Illumination) und dort beugungsbegrenzt unter dem Winkel δ fokussiert. Die Größe des Fokalfpunktes in lateraler Richtung kann dabei, abhängig

vom Radius des Laserstrahls und der Anregungswellenlänge, auf einige hundert Nanometer begrenzt werden. Hier ist zu beachten, dass auf Grund eines zu starken negativen Einflusses von Beugungserscheinungen (sphärische Aberration) nicht die komplette Rückapertur des Objektivs genutzt werden kann, sondern nur etwas über die Hälfte [37]. Der Winkel δ des Anregungsstrahls ist somit immer kleiner als der Winkel α , unter dem das Fluoreszenzlicht eingesammelt wird. Der Winkel α ergibt sich aus

$$\sin \alpha = \frac{NA}{n} \quad (2.10)$$

mit NA: Numerische Apertur, n: Brechungsindex.

Man erhält für die Strahltaile der Anregung, den Ort des minimalen Strahlradius¹:

$$\omega_0 = \frac{\lambda_a \cdot f}{n \cdot \pi \cdot r_{laser}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\lambda_a \cdot f}{\pi \cdot r_{laser}^2}}} . \quad (2.11)$$

Dabei entspricht r_{laser} dem Radius des Anregungsstrahls, λ_a seiner Wellenlänge, n dem Brechungsindex der Immersionsflüssigkeit (1.33 bei Wasser) und f der Brennweite des eingesetzten Objektivs. Wie bereits oben erwähnt, fällt die Lichtintensität im Fokalbereich lateral gaussförmig ab, in axialer Richtung ist der Abfall lorentzverteilt.

$$I_a(r, z) = I_0(z) \cdot e^{-\frac{r^2}{\omega^2(z)}} \quad (2.12)$$

$$I_0(z) = \frac{\omega_0^2 \cdot I_0}{\omega^2(z)} \quad (2.13)$$

Wie leicht einzusehen ist, hängt der laterale Gaussabfall von der axialen Position z ab. Damit ergibt sich die Geometrie des Anregungsvolumens zu

$$\omega^2(z) = \omega_0^2 + \left(\frac{\lambda_a}{n\pi\omega_0}\right)^2 z^2 . \quad (2.14)$$

Um das Anregungsvolumen auch in z-Richtung zu begrenzen, wird der fluoreszierende Fokalfunkt im Detektionsstrahlengang nach dem Objektiv auf eine Lochblende abgebildet. Da der Radius R des Beugungsbildes eines fluoreszierenden Teilchens an der Lochblende

$$R^2(z) = R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha \quad (2.15)$$

vom axialen Abstand zum Fokalfunkt abhängt, werden zu weit vom Fokus entfernte Teilchen, d.h. wenn zu große Beugungsbilder vorliegen, von der Lochblende ausgeblendet. Das Zusammenspiel aus Lochblende und Beugungsscheibchen wird durch die Sammeleffizienz der Detektionsoptik $S(\vec{r})$ beschrieben:

$$S(\vec{r}, z) = \frac{1}{\Delta} \int T(\vec{r}') \cdot PSF(\vec{r}, \vec{r}', z) d\vec{r}' \quad (2.16)$$

Hier ist die Pinholefunktion $T(\vec{r}')$ der in den Objektraum transformierte Radius der Lochblende, die Punktspreizfunktion $PSF(\vec{r}, \vec{r}', z)$ das, in den Objektraum zurücktransformierte, auf die Lochblende abgebildete Beugungsbild und Δ eine Normierungskonstante. Während die Detektionsoptik das Anregungsvolumen in lateraler

¹Der Radius ist durch den Abstand definiert, an dem die Intensität auf $1/e^2$ ihres Maximums abgefallen ist.

Richtung gleich belässt, wird es durch die Lochblende in z-Richtung beschnitten. Deshalb wird der eigentlich lorentzförmige axiale Abfall der Anregungsintensität durch eine stärker abfallende Gaussverteilung angenähert [37]:

$$I_e(r, z) = \eta \cdot \exp\left(-2\frac{r^2}{\omega_0^2}\right) \cdot \exp\left(-2\frac{z^2}{z_0^2}\right) \quad (2.17)$$

An dieser Stelle bleibt zu erwähnen, dass die obige Näherung nur für einen geeigneten Größenbereich der Lochblenden zutrifft. Ist die Lochblende zu klein, passt das Beugungsbild mit Radius R_0 aus Gleichung 2.15 in xy-Richtung nicht durch die Öffnung und das Gaussprofil wird abgeschnitten. Ist das Pinhole zu groß und damit der Abfall in z-Richtung zu schwach, nähert man sich wieder dem Lorentzprofil. In der Praxis werden in der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie, abhängig von Strahlradius und Vergrößerung des Objektivs (Gleichung 2.11), Lochblenden mit Radien zwischen 25 und 100 μm verwendet.

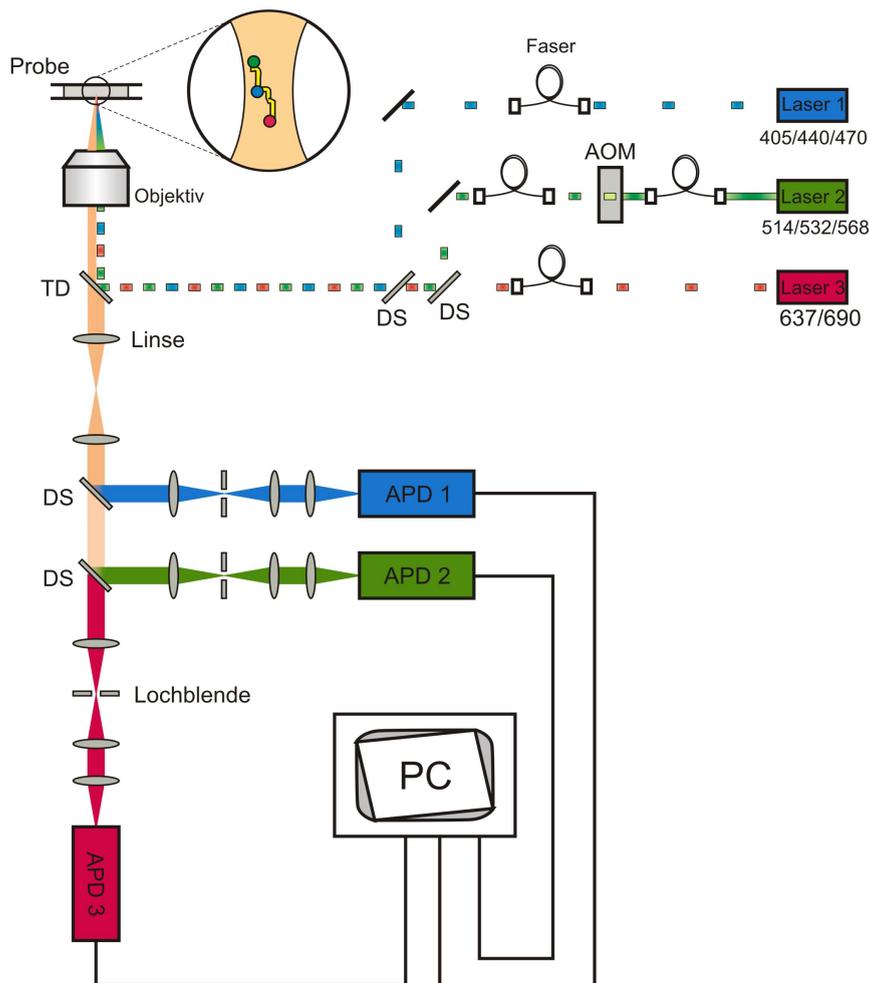


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Aufbaus (DS: Dichroitischer Spiegel, TD: Tripleband-Dichroit, AOM: Akusto-Optischer-Modulator, APD: Avalanche-Photo-Diode)

2.2 Aufbau

Im diesem Abschnitt werden die bei den Messungen eingesetzten optischen Komponenten, Laser, Detektoren, PC-Karten zur Datenaufnahme, sowie Farbstoffe detail-

liert beschrieben. Alle Experimente wurden auf einem invertierten Mikroskop Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

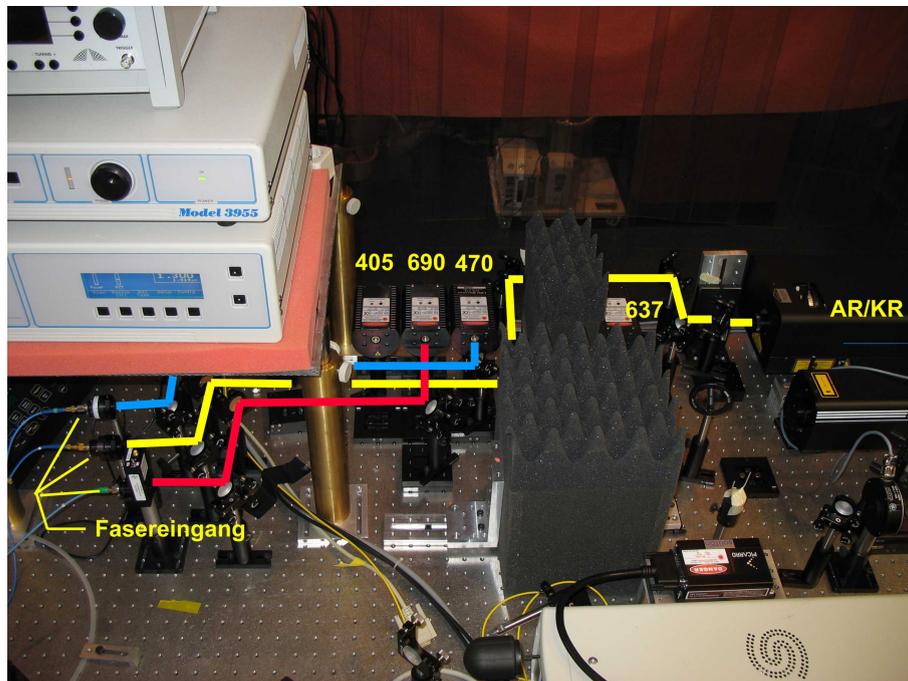


Abbildung 2.5: Anordnung der Laser und Fasereinkopplung

2.2.1 Optische Komponenten

Einen Überblick des Systems geben Abbildungen 2.4, 2.5 und 2.6: das von den Lasern emittierte Anregungslicht verschiedener Wellenlängen wird vor dem Mikroskop durch optische Fasern geleitet, um das Strahlprofil des oft divergierenden und unsymmetrischen Laserlichts zu homogenisieren. Daraufhin wird es mit Hilfe von dichroitischen und vollständig reflektierenden Spiegeln möglichst exakt überlagert und von der Rückseite in das Mikroskop eingespeist. Dort sorgt ein Tripleband-Dichroit für die Reflexion der drei Laserlinien in das Objektiv, das die Strahlen in das Probenvolumen fokussiert. Die Fluoreszenzphotonen der im Fokalvolumen angeregten Teilchen werden wiederum über das gleiche, auf unendlich korrigierte, Objektiv eingesammelt und passieren dann kollimiert den Tripleband-Dichroiten. Von der Tubuslinse fokussiert können sie nun entweder in den Detektionsstrahlengang, auf eine CCD Kamera oder in das Okular ausgekoppelt werden. Im Detektionsstrahlengang wird das Fluoreszenzlicht wieder von einer Linse parallelisiert und von zwei Dichroiten spektral zu den einzelnen Pinholes hin getrennt. Die gebündelte Strahlung trifft dann vor den Lochblenden auf Emissionsfilter, die ungewolltes Streulicht beseitigen, und wird nach dem Passieren der Blenden schlussendlich auf die einzelnen Detektoren fokussiert.

Laser

Um den Aufbau möglichst variabel zu gestalten, d.h. viele Farbstoffkombinationen anregen zu können, wurden zahlreiche Laser in den Aufbau integriert (siehe Abbildung 2.5). Sie alle emittieren im sichtbaren Spektralbereich, was die Justage der

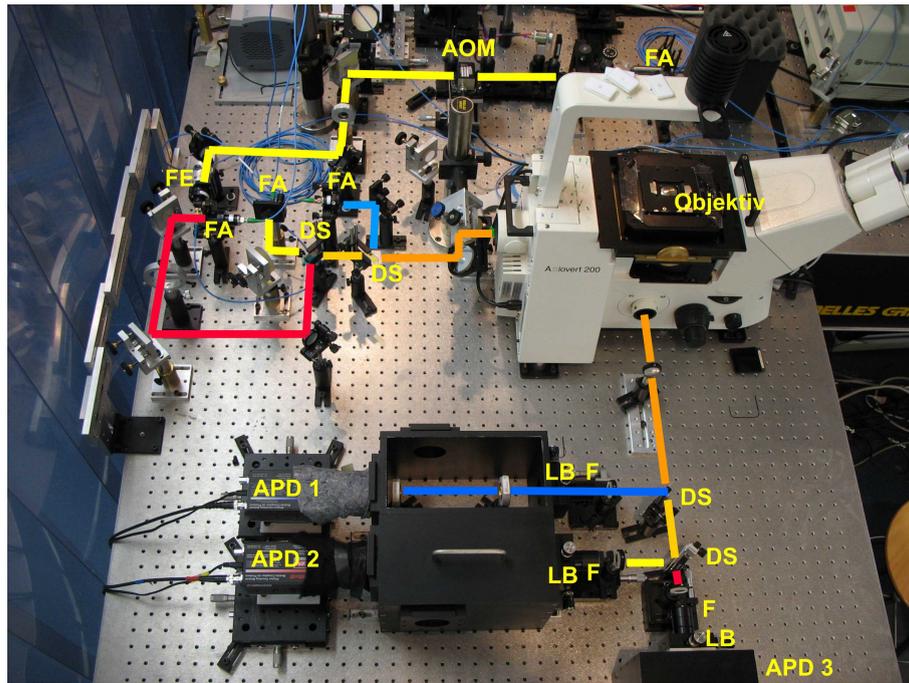


Abbildung 2.6: Strahlengang vor und nach dem Mikroskop. DS: Dichroitischer Spiegel, AOM: Akusto-Optischer-Modulator, APD: Avalanche-Photo-Diode, LB: Lochblende, F: Filter, FE: Fasereingang, FA: Faserausgang

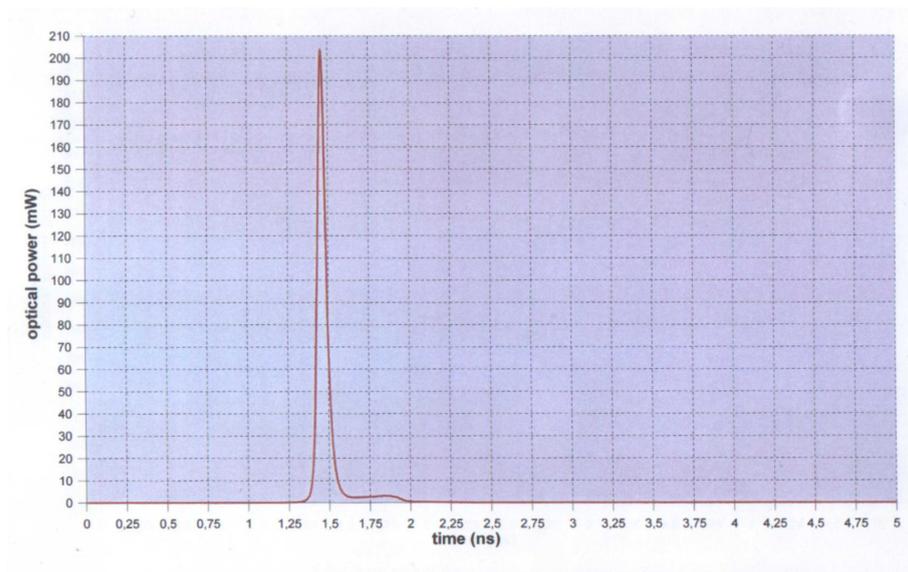


Abbildung 2.7: Pulsbreite des Diodenlasers PicoQuant LDM-690

Strahlengänge wesentlich vereinfacht. Das Gros stellen 5 gepulste Diodenlaser (LDM Serie, PicoQuant, Berlin, Deutschland) mit den Wellenlängen 405 nm, 440 nm, 470 nm, 637 nm und 690 nm. Sie verfügen alle über Pulsbreiten von unter 400 ps (siehe Abbildung 2.7) und einer Wiederholrate von mindestens 40 MHz.

Überwiegend für den grünen Spektralbereich wurde ein Argon/Krypton Ionengas-laser (Stabilite 2018, Spectra Physics, Mountain View, USA) eingesetzt. Der sehr leistungsstarke Dauerstrichlaser (bis 250 mW bei $\lambda = 514\text{nm}$) emittiert zahlreiche Linien, wobei nur die Wellenlängen 514 nm, 531 nm und 568 nm genutzt wurden. Als

Ersatz für die 531 nm Linie des Argon/Krypton Lasers stand ein frequenzverdoppelter $Nd : YVO_4$ Dauerstrichlaser (GCL-100-L-0.5%, Chrystalaser, Reno, USA) mit einer Wellenlänge von 532 nm zur Verfügung. Sämtliche Lichtquellen müssen hohe

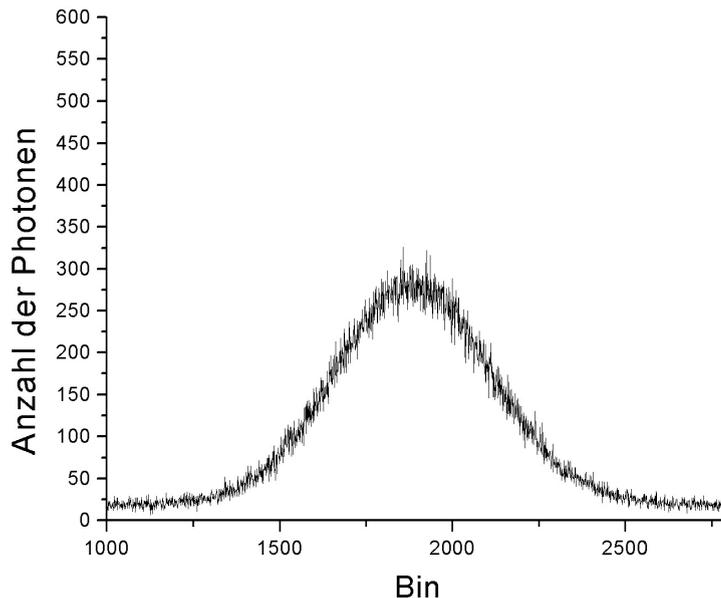


Abbildung 2.8: *Breite des vom AOM modulierten Laserpulses (Bin 1250 bis 2750 entsprechen ca. 50 ns)*

Anforderungen bezüglich ihrer Stabilität erfüllen. Treten Schwankungen periodisch auf, werden sie zum Beispiel in der Autokorrelationsanalyse mitberücksichtigt, wodurch die Auswertung erschwert oder unmöglich gemacht wird.

Da der Argon/Krypton Gaslaser und der $Nd : YVO_4$ Laser nicht gepulst betrieben werden können, muss das Licht einen Akusto-Optischen-Modulator (AOM) (N23080-2-LTD, NEOS Technologies, Melbourne, USA) durchlaufen. In seinen Resonator wird mit einem Piezoelement eine Schallwelle eingestrahlt. Bei der Propagation durch den Kristall bewirkt die Schallwelle eine periodische Dichtemodulation und damit eine periodische Brechungsindexmodulation. Das einfallende Licht sieht die Brechzahlschwankung als parallele halbdurchlässige Banden mit konstantem Abstand, an denen das Licht teilweise reflektiert wird. Die entstehende Beugung kann man als Bragg-Streuung oder -Beugung interpretieren und lässt sich mit abwechselndem An- und Abschalten der Schalleinstrahlung modulieren. Das noch verhältnismäßig intensitätsstarke erste Maximum des Beugungsbildes wird auf diese Weise gepulst und kann über einen Spiegel, auf den das nullte Maximum nicht trifft, ausgekoppelt werden.

Die Synchronisation der Pulse erfolgt über einen Oszillator (Master-Clock 40 MHz) (Sepia SOM808, PicoQuant, Berlin, Deutschland) im Netzteil der Diodenlaser (Sepia PDL808, PicoQuant, Berlin, Deutschland), der über einen Puls-Generator (HM 8035, HAMEG GmbH, Mainhausen, Deutschland) den AOM triggert und für die alternierende Probenanregung mit der gleichen, konstanten Pulsfrequenz sorgt. Auf Grund der großen Breite des vom AOM erzeugten Pulses (ca. 50 ns, siehe Abbil-

dung 2.8) gehen allerdings die Informationen über die Lebenszeit des angeregten Farbstoffs verloren. Eine Auflistung aller eingesetzten Laser gibt Tabelle 2.1.

Bezeichnung	Lasertyp	Betriebsmodus	Laserlinien	Leistung
Sepia LDM Serie	Diodenlaser	single line, gepulst	402 nm	1.07 mW
			440 nm	0.26 mW
			470 nm	0.40 mW
			637 nm	1.00 mW
			690 nm	1.70 mW
GCL-100-L	$Nd : YVO_4$ Festkörperlaser	frequenzverdoppelt, cw	532 nm	100 mW
Stabilite 2018 ²	Argon/Krypton Ionenlaser	multi line, cw	514 nm	250 mW
			531 nm	200 mW
			568 nm	150 mW

² Der Argon/Krypton Ionengas-Laser verfügt über weitere Linien mit Wellenlängen von 458 nm, 477 nm, 488 nm, 521 nm und 647 nm.

Tabelle 2.1: Übersicht der eingesetzten Laser mit ihren Eigenschaften

Spiegel und Filter

Sowohl im Anregungs- als auch im Detektionsstrahlengang werden so genannte dichroitische Spiegel benötigt, welche die drei Spektralbereiche vereinigen oder wieder separieren. Die oft mehrlagig beschichteten Spiegel reflektieren, im 45° Winkel platziert, Licht in bestimmten Wellenlängenbereichen, während sie für das Licht der restlichen Bereiche transparent sind. Für einen dreifarbiges Fluoreszenzspektroskopie-Aufbau ist dabei im Speziellen für den Tripleband-Dichroiten im Mikroskop ein besonders starker Anstieg bzw. Abfall der drei schmalbandigen Reflektionszonen wichtig, da die Emissionswellenlänge selbst bei guten Farbstoffen nur um einen Stokes-Shift von 20-30 nm zur Anregungswellenlänge verschoben ist und man gleichzeitig einen möglichst großen Bereich der Fluoreszenz detektieren möchte. Das Transmissionspektrum des verwendeten Tripleband-Dichroiten zeigt Abbildung 2.9.

Eine ebenso wichtige Rolle im Detektionsstrahlengang spielen die Emissionsfilter. Diese Bandpassfilter gewährleisten, dass ausschließlich Fluoreszenzlicht auf die Detektoren trifft. Für das Rayleigh-Streulicht der Anregungslichtquellen darf der Filter höchstens ein Millionstel der Intensität transmittieren (Optische Dichte von 6), um die Detektion des schwachen Fluoreszenzsignals nicht zu stören. In vielen Fällen ist es nicht zu verhindern, dass die Ramanbande von Wasser (alle Messungen fanden in wässrigen Lösungen statt) im Fluoreszenzbereich eines Farbstoffs liegt und damit die Detektionseffizienz beeinträchtigt. Sämtliche verwendete Filter und Dichroiten wurden von der Firma AHF (Tübingen, Deutschland) bezogen. Das Transmissionspektrum der Filter für die Fluorophorkombination Atto488/Atto565/Atto700 zeigt Abbildung 2.10.

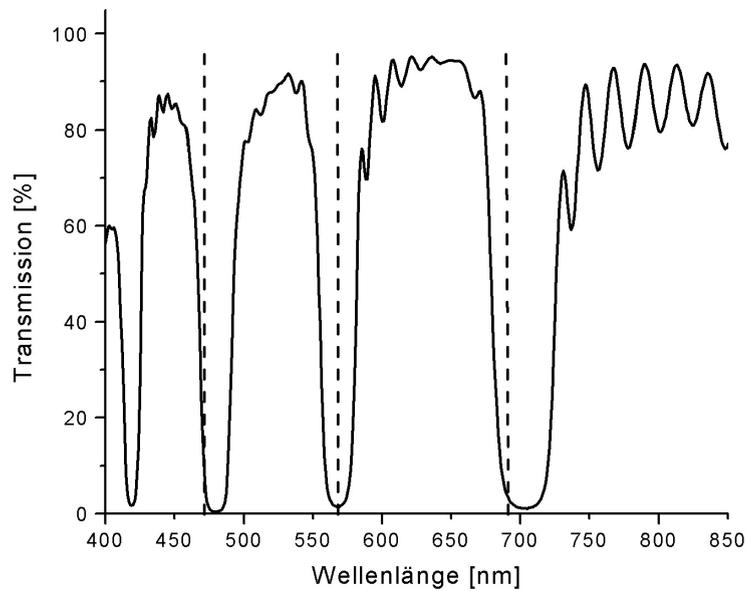


Abbildung 2.9: Transmissionsspektrum des für die Linienkombination 470 nm/568 nm/690 nm gefertigten Tripleband-Dichroiten. Die gestrichelten Linien markieren die Wellenlängen der Anregungslinien.

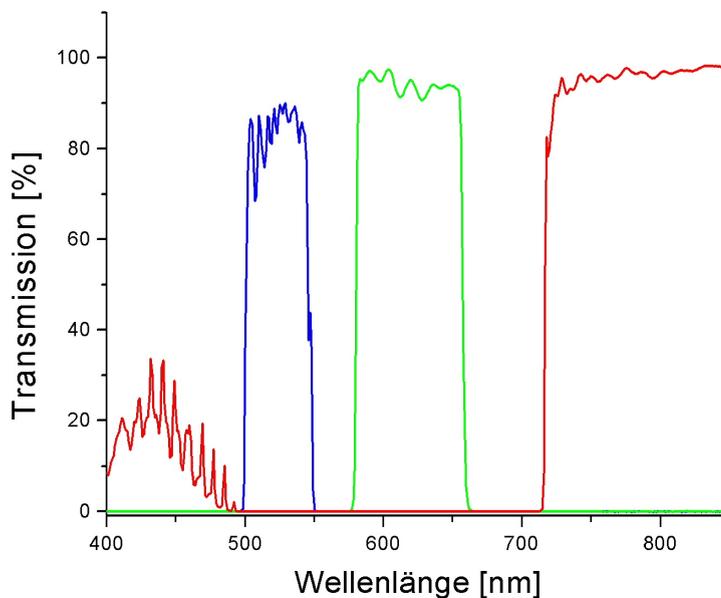


Abbildung 2.10: Transmissionsspektrum der für die Emissionen von Atto488, Atto565 und Atto700 gefertigten Filter

Objektiv

Das Objektiv bildet das Herzstück des Aufbaus. Daher ist ein hervorragendes, chromatisch korrigiertes Objektiv mit einer hohen Numerischen Apertur für die konfokale

Fluoreszenzspektroskopie von größter Bedeutung. Dabei haben sich Wasserimmersionsobjektive, besonders für Messungen in Lösungen (Immersionsflüssigkeit und Puffer haben eine fast identische Brechzahl), als gut geeignet erwiesen. Mit dem hohen Brechungsindex der Immersionsflüssigkeit von 1.33 erfüllt das auf unendlich sowie chromatisch korrigierte C-Apochromat 63x1.2 Objektiv (63-fache Vergrößerung, NA 1.2, Zeiss Mikroskopie, Göttingen, Deutschland) die hohen Anforderungen an NA und einsetzbaren Spektralbereich. Die hohe Numerische Apertur spielt deswegen eine so wichtige Rolle, da man einen möglichst großen Teil des schwachen Fluoreszenzsignals detektieren, also die Photonen unter einem großen Winkel einsammeln will. Ölimmersionsojektive mit einer noch höheren Numerischen Apertur werden auf Grund großer sphärischer Aberrationen beim tieferen Fokussieren in die Probe selten verwendet.

Glasfasern

Die Strahlen aller in Tabelle 2.1 aufgeführten Lichtquellen werden nicht exakt kollimiert ausgesendet, sie divergieren leicht. Auch das Strahlprofil ist nicht wie gewünscht vollkommen radial gaussförmig, im Falle der Laserdioden ist es sogar stark elliptisch. Aus diesem Grund werden die Strahlbündel durch geeignete Lichtwellenleiter geschickt, die das Strahlprofil homogenisieren. Es handelt sich dabei um Glasfaserkabel, deren Wirkungsweise auf der Totalreflexion von Licht an einem Übergang des Brechungsindex zwischen zwei Schichten innerhalb des Kabels beruht. Der Brechungsindex des Kernmaterials ist immer größer als der des Mantels und die Änderung erfolgt entweder, wie bei den hier verwendeten Fasern, abrupt (Stufenindexfaser) oder über einen Gradienten (Gradientenindexfaser). Einerseits sorgen die Fasern an ihrem Ausgang für ein rundes, gaussförmiges, axial kollimiertes Strahlprofil, andererseits erlauben geeignete Linsenkombinationen an Ein- und Ausgang eine Strahlaufweitung, womit man die Größe der Fokalvolumina beeinflussen kann (siehe Gleichungen 2.11 und 2.14). So ist es möglich, die verschiedenen Fokalvolumen durch eine für jede Farbe optimierte Eingangs- und Ausgangslinsen Kombination aufeinander abzustimmen, um den bestmöglichen Überlapp (siehe Abschnitt 2.2.4) zu erreichen. Die für den Aufbau eingesetzten polarisationserhaltenden Monomode-Stufenindexfasern (OZ Optics, Carp, Kanada) sind speziell für die jeweiligen Wellenlängenbereiche gefertigt und verfügen daher über eine hohe Lichttransparenz. Trotzdem gehen je nach Strahlprofil ca. 30%, bei den elliptischen Profilen der Diodenlaser ein weit größerer Teil der Photonen verloren.

Detektoren und Lochblenden

Die Fluoreszenzspektroskopie extrem niedrig konzentrierter Proben erfordert sehr sensible Zählwerke, die einzelne Photonen detektieren können. Gleichzeitig müssen sie für die FCS eine hohe Zeitaufösung besitzen, die Totzeit sollte so kurz wie möglich sein. Bei den verwendeten, diesen Anforderungen entsprechenden, Detektoren (SPCM-AQR-14, EG&G Optoelectronics, Vaudreuil, Kanada) handelt es sich um Silizium-Halbleiter-Dioden. Im pn-Übergang des Halbleiters dieser so genannten Lawinen-Photo-Dioden (Avalanche Photo Diode, APD) werden durch Photoeffekt Elektron-Loch Paare erzeugt. Die freigesetzten Elektronen werden von einem elektrischen Feld beschleunigt und erzeugen daraufhin durch Ionisierung weitere Elektronen, was nach einer Abfolge vieler solcher Sekundärprozesse zu einem Stromfluss führt. Die Detektionseffizienz solcher hochempfindlichen Zählwerke beträgt maximal

70% (bei 630 nm) und ihre Dunkelzählrate liegt bei unter 100 Photonen/Sekunde. Die kurze Totzeit von ca. 50 ns wird durch aktives „Quenchen“, d.h. künstliches Unterdrücken des Lawinenstroms nach der Detektion eines Pulses, ermöglicht. Da aktiv gequenchte APDs extrem empfindlich sind - bereits eine Zählrate von über 10 MHz kann das Zählwerk zerstören (Überhitzung des Halbleiterelements) - wurde im Netzteil ein Überspannungsschutz integriert, der die Versorgungsspannung von 5V bei zu starken Lichtsignalen abschaltet. Für jedes detektierte Photon wird in der APD ein TTL-Puls erzeugt, der zu den PC-Karten zur Auswertung weitergeleitet wird.

In einem Aufbau für die dreifarbig konfokale Fluoreszenzspektroskopie sind die Unterschiede der Fokalgeometrien auf Grund der unterschiedlichen Anregungswellenlängen nicht vernachlässigbar. Um diesen Effekt auch in z-Richtung - in lateraler Richtung versucht man die Einstrahlradien anzupassen - nicht zu groß werden zu lassen, wird in jedem Spektralbereich separat auf ein geeignet großes konfokales Pinhole fokussiert. Es handelt sich dabei ausnahmslos um Lochblenden der Firma Owis (Staufen, Deutschland). Die Durchmesser betragen für den Spektralbereich blau 35 μm , grün 40 μm und rot 50 μm .

2.2.2 Messkarten

Vor dem Input der TTL-Pulse in die PC-Karten werden die Signale über die Netzteile der Detektoren geleitet, wo sie vervielfältigt werden, damit die parallele Datenaufnahme auf mehreren Karten möglich ist. Für die Experimente wurden die ersten beiden, der in folgender Aufzählung genannten Messkarten verwendet. Die dritte Karte wurde nach den in dieser Arbeit beschriebenen Projekten in Betrieb genommen:

- Hardwarekorrelatorkarte ALV 5000 (ALV, Langen, Deutschland)
- Time-correlated Single Photon Counting (TCSPC) Karte TimeHarp 200 (PicoQuant, Berlin, Deutschland)
- Time-correlated Single Photon Counting (TCSPC) Kartensystem SPC-130 (Becker&Hickl, Berlin, Deutschland)

Hardwarekorrelator

Vorwiegend zur Überwachung der Zählraten und um schnell Einschätzungen über die Amplituden der Auto- bzw. Kreuzkorrelationsfunktion treffen zu können, wurde die ALV Korrelatorkarte eingesetzt. Besonders für die Justage der optischen Komponenten ist es sehr wichtig, auf diese Parameter schnell zugreifen zu können. Die Karte bietet die Möglichkeit nach wenigen Millisekunden, nahezu in Echtzeit, aus den TTL-Pulsen der Detektoren Korrelationsfunktionen zu berechnen, wobei sich die Statistik der Korrelationsfunktion während der Datenaufnahme fortlaufend verbessert. Sie verfügt über 288 Kanäle zur Aufsummation der Photonen, die quasilogarithmisch im Bereich von 200 ns bis zu mehreren Stunden angeordnet sind. Die Nachteile der Karte liegen in der fehlenden Möglichkeit die Rohdaten z.B. für Burst Analysis oder Photon Counting Histogram [5] ausgeben zu lassen, fehlender TCSPC Information und, dass es nicht möglich ist, sich Auto- und Kreuzkorrelationsfunktion gleichzeitig berechnen zu lassen. Für 3-Farben Messungen ist die Karte nur

eingeschränkt nutzbar, da sie nur 2 Eingänge für das Signal von Detektoren besitzt. Für die Autokorrelation oder gar Kreuzkorrelation der drei spektral unterschiedlich markierten Teilchen muss lästiges Umstecken in Kauf genommen werden.

TCSPC-Karte Timeharp 200

Zur eigentlichen Rohdatenerfassung wird eine weitere PC-Karte verwendet, TimeHarp 200 von PicoQuant. Die Karte verfügt mit 4096 Kanälen und mit weniger als 40 ps über eine im Vergleich zur Hardwarekorrelatorkarte gute Zeitauflösung. Über den vorgeschalteten Router bietet sie die Möglichkeit, bis zu 4 Farbkanäle gleichzeitig zu messen, wodurch sie sich für die 3-Farben Fluoreszenzspektroskopie eignet. Vom Signal gepulster Lichtquellen getriggert, können Fluoreszenzlebensdauern von unter 1 ns bestimmt werden.

Die Karte wurde in zwei Modi betrieben: im Oszilloskop-Modus, der die Photonen mit gleichen Ankunftszeiten für die sich immer wiederholenden Detektionsbins aufsummiert, wurde die zeitliche Abfolge der Fluoreszenzsignale der einzelnen Detektoren so gestaffelt, dass ihr Überlapp möglichst klein ist (siehe Abbildung 2.16). Dies kann sehr einfach über die Änderung der Kabellänge zwischen Detektor und PC-Karte erreicht werden und erleichtert die Auswertung der Daten. Die Datenaufnahme für die Experimente erfolgte im Time-Tagged Time-Resolved Modus, in dem TTL-Pulse nach Farbkanälen getrennt mit ihrem zeitlichen Abstand zum nächsten Master Clock Puls ohne jegliche Datenanalyse aufgenommen werden. So wird eine äußerst hohe Flexibilität bei der späteren Auswertung gewährleistet und die Daten stehen sowohl für Korrelationen, die Burst Analysis oder das Photon Counting Histogram zur Verfügung. Die Karte an sich kann dabei nur einen Puls verarbeiten, die Signale der verschiedenen Detektoren werden zuvor vom Router vereinigt, der den Eingangskanal des Pulses an die Karte weitergibt. Dadurch können auch Pulse aus anderen Detektoren während der Totzeit der Karte nicht verarbeitet werden, was besonders bei hohen Zählraten zu einem Antikorrelationseffekt bei der Korrelation mehrerer Farben führt.

Die abschließende Analyse wurde mit in PVWave (Visual Numerics, Houston, USA) programmierten Algorithmen durchgeführt, die Visualisierung erfolgte mit MicroCal Origin 6.0 (Northampton, USA).

TCSPC-Kartensystem SPC-130

Am Ende der Experimente wurde ein weiteres PC-Kartensystem in den Aufbau integriert. Das Modul der Firma Becker&Hickl besteht im Gegensatz zur Timeharp 200 Karte aus drei unabhängigen, aber synchronisierten TCSPC-Karten, die ebenfalls Daten im Oszilloskop- und im Time-Tagged Time Resolved Modus aufzeichnen können. Das Kartensystem bringt zwei entscheidende Vorteile mit sich: Erstens haben die Karten eine Totzeit von jeweils 125 ns; das liegt signifikant unter den für die Timeharp Karte gemessenen 485 ns. Zweitens wird das Signal der drei Detektoren nicht mehr von einem Router vereinigt, sondern getrennt von den drei Karten ausgewertet. Befindet sich die Timeharp Karte nach einem Signal in Totzeit, kann sie auch kein Signal von anderen Detektoren registrieren. Das 3-Kartensystem hingegen kann während dieser Zeit das Signal anderer Detektoren verarbeiten, da sich nur die Karte in Totzeit befindet, die gerade den Puls registriert hat. Bei Kreuzkorrelationsmessungen tritt der oben beschriebene Effekt der Antikorrelation nicht mehr auf,

da auch Photonen, die mit einem zeitlichen Abstand kürzer der Totzeit eintreffen, korreliert werden können. Bei der Autokorrelation zeigt sich der Effekt auf Grund der geringeren Totzeit schwächer. Bei der Bestimmung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers mit der Burst Analysis zeigt sich ebenfalls eine Verbesserung. Gerade in 3-Farben Messungen werden viel mehr Photonen detektiert, da sich die Ruhephase der Karte nicht mehr auf alle drei Detektionskanäle auswirkt. Somit steht zur Berechnung der FRET-Effizienzen eine bessere Photonenstatistik zur Verfügung. Einen Vergleich der Antikorrelation von Kreuzkorrelations-Messungen der gleichen

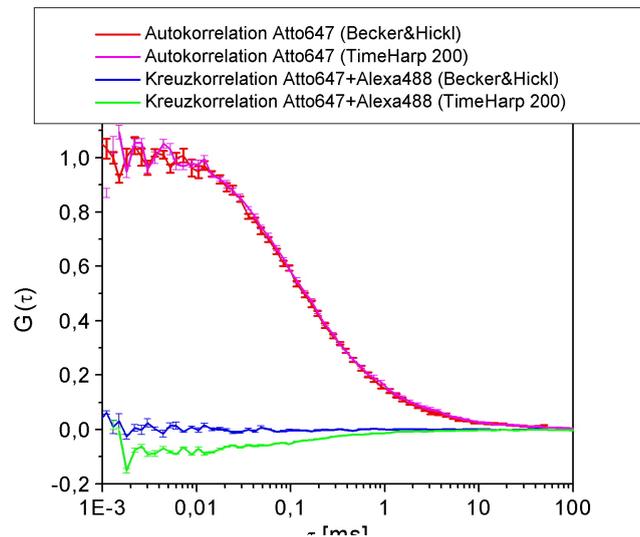


Abbildung 2.11: Vergleich der jeweils mit den Karten Timeharp 200 und Becker&Hickl SPC-130 aufgenommenen Autokorrelationen vom Farbstoff Atto647 und der Kreuzkorrelationen des Farbstoffmix Atto647/Alexa488. Da die Farbstoffe frei und voneinander getrennt in der Lösung fluoreszieren, sollten ihre Signale nicht miteinander korrelieren. Dennoch zeigt sich für die Timeharp Karte der Antikorrelationseffekt, da das Nicht-Detektieren eines Photons während der Totzeit der Karte korreliert wird. Die Messungen wurden allesamt bei gepulster Anregung (Pulsed Interleaved Excitation, siehe Abschnitt 2.4) durchgeführt.

Probe, die mit den beiden TCSPC-Karten aufgenommen wurden, zeigt Abbildung 2.11. Deutlich ist die Beseitigung des Antikorrelationseffekts beim 3-Karten-System für sehr kurze Korrelationszeiten zu sehen.

2.2.3 Farbstoffe

Trotz der hochwertigen Optik und der extrem sensitiven Detektoren kann auf Grund des auch bei hoher NA geringen Detektionsraumwinkels nur ein Bruchteil des Fluoreszenzlichts registriert werden. Aus diesem Grund müssen die in der Fluoreszenzspektroskopie verwendeten Farbstoffe folgende hohe Anforderungen erfüllen:

- hoher Extinktionskoeffizient ϵ (im Idealfall über $10^5 \text{ cm}^2/\text{mmol}$).
- Wellenlängen der maximalen Absorption möglichst nah an den Laserlinien
- hohe Fluoreszenzquantenausbeute Q , Quotient aus der Anzahl der emittierten und absorbierten Photonen (siehe Gleichung 2.2)(bis zu 90% bei den in den Experimenten verwendeten Fluorophoren)

- geeignet großer Stokes-Shift, so dass Anregung und Fluoreszenz von den dichroitischen Spiegeln leicht trennbar ist, die Fluoreszenz bei mehrfarbigen Systemen aber nicht in den nächsten Detektionskanal verschoben wird
- ausreichende Photostabilität, kein Bleichen des Farbstoffs während seines Transits durch das Fokalvolumen

Als Maß für die Güte eines Farbstoffs hat sich in der FCS die Photonenausbeute pro Molekül η (molekulare Helligkeit) etabliert, weil sie sich schnell und einfach aus der Amplitude der Autokorrelation und der mittleren Zählrate bestimmen lässt.

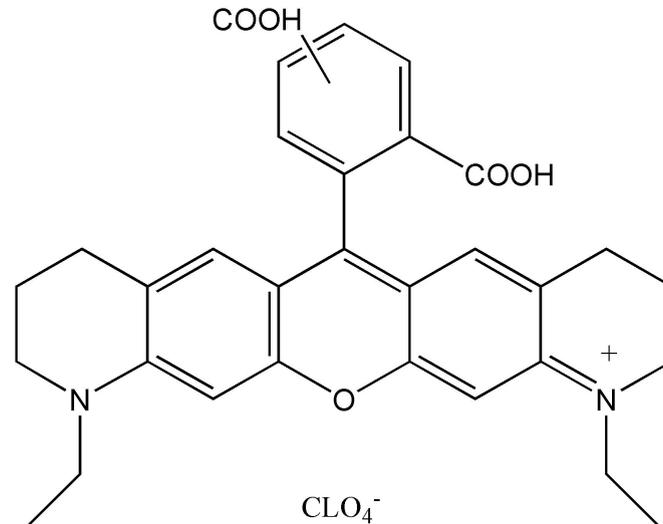


Abbildung 2.12: Struktur von Atto 565

Bis auf eine Ausnahme wurden für die Messungen kommerziell erhältliche Atto (Atto-Tec, Siegen, Deutschland) und Alexa Farbstoffe (Molecular Probes (Invitrogen), Eugene, USA) benutzt. Sie werden allesamt synthetisch hergestellt und sind für die entsprechenden Laserlinien optimiert. Die Farbstoffe werden über eine Succinimidylester-Gruppe (NHS-Ester) kovalent an die zu untersuchenden Moleküle gebunden. Abbildung 2.12 zeigt am Beispiel von Atto 565 die Struktur eines solchen Farbstoffs.

Die Ausnahme bildet das im Projekt A verwendete Yellow Fluorescent Protein (YFP). Durch Veränderung der Primärstruktur wurde es aus dem in der Leuchtquelle vorkommenden Green Fluorescent Protein (GFP) [4] entwickelt. Dieses Protein bildet auf Grund seiner speziellen Faltung eine fluoreszierende Gruppe aus und kann von Zellen dank des Wissens seiner DNA-Sequenz gleich mit Proteinen von Interesse exprimiert werden. Eine Auflistung der eingesetzten Fluorophore samt ihrer photophysikalischen Parameter bietet Tabelle 2.2.

Da sich die Messungen auf den sichtbaren Spektralbereich beschränken, ist für die dreifarbige Fluoreszenzspektroskopie die Wahl der Farbstoffkombination nicht trivial. Es steht nur ein Bereich von circa 400 nm zur Verfügung, um drei unterschiedliche Anregungslinien mit den jeweiligen Fluoreszenzbereichen zu kombinieren. Dabei sollte der spektrale Überlapp der Emissionen der Fluorophore (spektrales Übersprechen) und die direkte Anregung nicht zusammengehörender Laser-Farbstoff-Paare

Farbstoff	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ	Q	λ_{ex}	Filter
Atto 390	390 nm	479 nm	$2.4 \cdot 10^4$	0.90	405 nm	HQ 458/85
Atto 488	501 nm	523 nm	$9.0 \cdot 10^4$	0.80	470 nm	HQ 525/50
Atto 532	532 nm	553 nm	$1.15 \cdot 10^5$	0.90	531 nm	HQ 580/75
Atto 565	563 nm	592 nm	$1.2 \cdot 10^5$	0.90	568 nm	HQ 620/80
Atto 647	645 nm	669 nm	$1.2 \cdot 10^5$	0.20	637 nm	HQ 700/75
Atto 700	700 nm	719 nm	$1.2 \cdot 10^5$	0.25	690 nm	HQ 715 LP
Alexa 532	532 nm	554 nm	$8.1 \cdot 10^4$	n.b.	531 nm	HQ 580/75
Alexa 647	650 nm	665 nm	$2.39 \cdot 10^5$	n.b.	637 nm	HQ 700/75
eYFP	513 nm	527 nm	n.b.	0.61^3	514 nm	HQ 560/80

³ eYFP zeigt von allen Fluoreszenzproteinen die höchste Fluoreszenzquantenausbeute. Der Wert wurde von Patterson et al. [35] übernommen.

Tabelle 2.2: *Photophysikalische Parameter der benutzten Farbstoffe, sowie für die Farbstoffe verwendete Emissionsfilter (λ : maximale Absorptions-, Emissions und Anregungswellenlänge, ϵ : Extinktionskoeffizient in $M^{-1}cm^{-1}$, Q : Fluoreszenzquantenausbeute)*

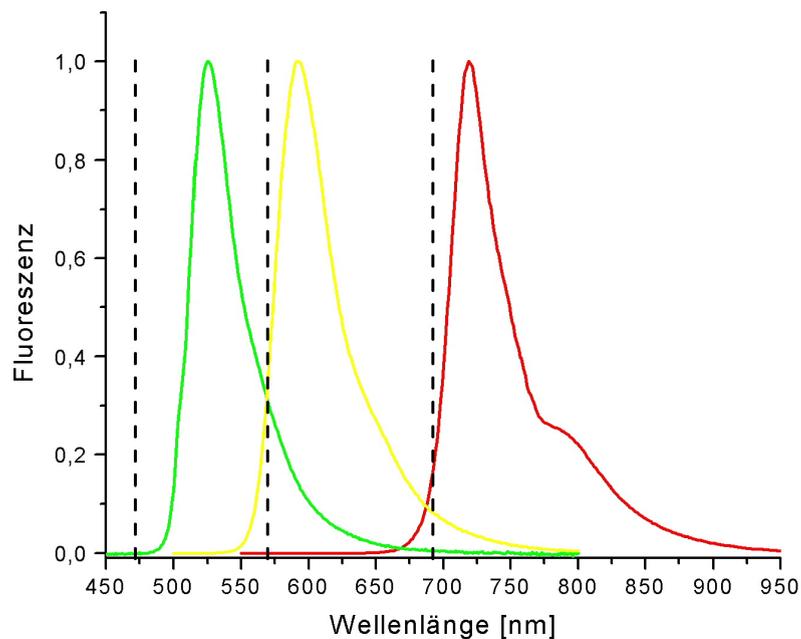


Abbildung 2.13: *Emissionspektren mit Laserlinien der für die 3-Farben FRET Experimente benutzten Farbstoffkombination Atto 488/Atto 565/Atto 700. Die gestrichelten Linien markieren die Wellenlängen der Anregungslichtquellen.*

so klein wie möglich sein, der Stokes-Shift aber wenigstens so groß, dass sich Anregung und Emission gut trennen lassen. Will man nun für eine ausreichende Si-

gnalqualität den überwiegenden Teil der Fluoreszenzbandbreite detektieren, müssen die drei Farbstoffspektren extrem eng im sichtbaren Spektralbereich aneinandergereiht werden. Die zwei Laser-Farbstoff Kombinationen, die für die Arbeit ausgewählt wurden, sind 405 nm (Atto390)/ 531 nm (Atto532)/ 637 nm (Atto647) und 470 nm (Atto488)/ 568 nm (Atto565)/ 690 nm (Atto700). Dabei hat sich die Kombination 405/531/637 als nicht brauchbar erwiesen, weil sich gezeigt hat, dass der Fluorophor Atto390 (auch Alexa405 und Pacific Blue) auf Grund seiner niedrigen Absorption für hochsensible Einzelmolekülmessungen nicht geeignet ist und die 405 nm Laserlinie Schmutzmoleküle in Probenlösung, Deckglas und Immersionswasser zu stark anregt. Das Verhältnis der Signale von Fluorophoren zu Schmutzmolekülen reicht für die durchzuführenden Experimente nicht aus.

2.2.4 Justage

Gerade für den konfokalen 3-Farben Fluoreszenzspektroskopie-Aufbau nimmt die Justage eine ganz entscheidende Stellung ein. Die genaue Abstimmung der durch Lochblenden und Einstrahlradian geometrisch angepassten Fokalvolumina stellt den Experimentator nicht selten bereits bei zwei Anregungsquellen vor Probleme. Der Aufbau mit drei Farben erschwert dies noch ungemein.

Ohne einen Überlapp der Volumina können mehrfarbig markierte Moleküle nicht erkannt und analysiert werden, die Bursts mehrfarbig markierter Komponenten treten in den zugehörigen Detektionskanälen zu verschiedenen Zeiten auf. Die Bursts des Durchtritts eines einzelnen Moleküls können nicht mehr von jenen der Durchtritte verschiedener Moleküle unterschieden werden, woraufhin die FRET-Signale zunehmend ungenauer werden. Die Fokalfpunkte der drei Anregungslichtquellen müssen dabei nicht nur genau aufeinander liegen, die Achsen der Fokalvolumina müssen auch exakt parallel verlaufen. Erschwerend für die Justage kommt hinzu, dass die Hardwarekorrelatorkarte nur zwei Detektionssignale gleichzeitig verarbeiten kann. Es müssen also drei Volumenpaare zum Überlapp gebracht werden, wobei die Veränderung einer Volumenposition gleich den Überlapp zweier Paare beeinflusst.

Zur Einstellung des Volumenüberlapps wird vorwiegend die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) eingesetzt. Der Vergleich der durch die FCS gewonnenen Amplituden von Kreuz- und Autokorrelation erlaubt es, den Volumenüberlapp der Anregungsquellen zu koordinieren. Da die Photonen der zwei Detektionskanäle nur bei überlappenden Fokalvolumina korrelieren, bringt die Maximierung der Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion auch eine Maximierung des Überlapps. In der Praxis kann die Amplitude der Kreuzkorrelation etwa 70% der niedrigeren Amplitude der Autokorrelationen erreichen. In der Theorie entspräche ein vollständiger Überlapp exakt gleich großer Volumina 100% der Amplitude des Mittelwerts der beiden Autokorrelationsfunktionen. Auf Grund der Unsicherheit bezüglich der Labeleffizienz der Probe wird der vorhergehende Wert auch bei vollkommenen Überlapp nicht erreicht, was die Einschätzung der Justage mit einer zusätzlichen Unsicherheit belegt. Nach der groben Überlagerung der Foki über das Okular hat sich folgende Methode zur Feinjustage etabliert. Will man die Volumen von Strahlengang 1 und Strahlengang 2 überlagern, regt man zuerst mit Laser 1 einen Farbstoff an, der unter anderem in Detektionskanal 2 emittiert. Die Lochblende, und damit auch der Detektionsstrahlengang 2, wird dann auf maximales Signal bei Anregung 1 justiert. Regt man nun den eigentlichen Farbstoff 2 mit Laser 2 an - für diese Anregung ist die Lochblende

dejustiert - verschiebt man den Anregungsstrahl so, dass das Signal durch die Lochblende wieder maximal wird, woraufhin die Anregungsvolumina exakt übereinander liegen sollten.

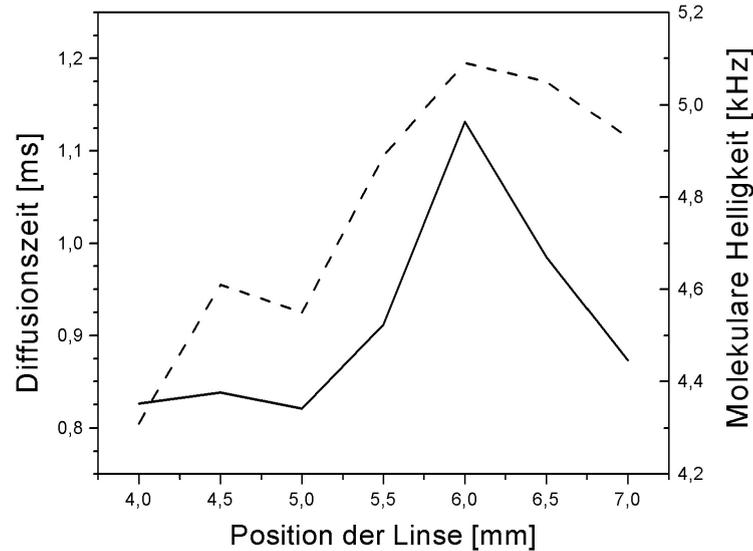


Abbildung 2.14: *Diffusionszeit (durchgezogene Linie) und molekulare Helligkeit (gestrichelte Linie) des Farbstoffs Atto647 bei veränderter Position der Linse vor der Lochblende*

Eine weitere Schwierigkeit für die Justage des Aufbaus stellt die Kombination Linse-Lochblende-Detektor dar. Nach der Trennung der spektralen Emissionsbereiche durch die dichroitischen Spiegel fokussiert jeweils eine Linse das Fluoreszenzlicht auf die in xy-Richtung leicht justierbaren konfokalen Lochblenden. Die Linse steht dabei auf einem Positioniertisch, der in Richtung der Linsenachse verschoben werden kann. Der Fokus des Emissionslichts sollte nach Justage der z-Position genau in der Lochblendenebene liegen, damit ein möglichst großer Teil der Photonen die Blende passieren kann. Die Detektionsvolumina weisen dann die zuvor berechnete ähnliche Geometrie auf, wodurch ein maximaler Überlapp gewährleistet wird. Des Weiteren verschlechtert die Verringerung des eigentlichen Fluoreszenzsignals das Signal zu Rausch-Verhältnis, weshalb etwaige Signalspitzen nur schwer vom Hintergrund zu unterscheiden sind. Die Verschiebung des Fokuspunkts der Linse vor der Lochblende bringt auch die Verschiebung der Fokussierung des Emissionslichts auf den Detektor mit sich. Auch hier verlangt diese doppelte Abhängigkeit Erfahrung des Experimentators. Die z-Positionen von Detektor und Linse müssen abwechselnd nachjustiert werden bis die optimale Einstellung gefunden ist. Das Kriterium für die Güte der Justage ist dabei der Fit der Autokorrelationskurven. Es wird jene Einstellung gesucht, welche die Diffusionszeit τ_d der Moleküle durch das Volumen und die molekulare Helligkeit maximal, die Residuen des Vergleichs von Fit und Messkurve minimal werden lässt und bei der der Strukturparameter

$$p = \frac{z_0^2}{\omega_0^2} \quad (2.18)$$

gefittet werden kann. Der Strukturparameter beschreibt die Geometrie des Fokallvolumens und liegt im Idealfall bei den verwendeten Lochblendengrößen zwischen 6 und 10.

Abbildung 2.14 zeigt die Entwicklung der Diffusionszeiten und der molekularen Helligkeiten für verschiedene z -Positionen der Linse vor der fokalen Lochblende für die Justage von Detektionskanal 1 (Farbstoff Atto488). Deutlich erkennt man das Maximum der Diffusionszeit bei $z=6.0$ mm.

2.3 Pulsed Interleaved Excitation (PIE)

Vor geraumer Zeit wurde die mehrfarbige Fluoreszenzspektroskopie erstmals um alternierende Anregungsquellen erweitert [33]. Bei der so genannten Pulsed Interleaved Excitation (PIE) werden verschiedene Lichtquellen nacheinander gepulst mit einer Frequenz von bis zu 40 MHz in das Probenvolumen eingestrahlt. Mit einer Pulsbreite von unter 1 ns bieten moderne Diodenlaser für viele Spektrallinien ideale Voraussetzungen, um die Einsatzbereiche der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie durch PIE immens zu erweitern. Es besteht nun die Möglichkeit Fluoreszenzlebensdauern zu bestimmen, FRET-Effizienzen mittels der Amplituden aus der FCS zu berechnen [33] und das störende spektrale Übersprechen zu eliminieren. Vor allem aber lässt sich in Burst Analysis Messungen die genaue Stöchiometrie der Probenkomponenten bestimmen [24] und somit die Bestimmung der FRET-Effizienzen von einzelnen Molekülen verbessern.

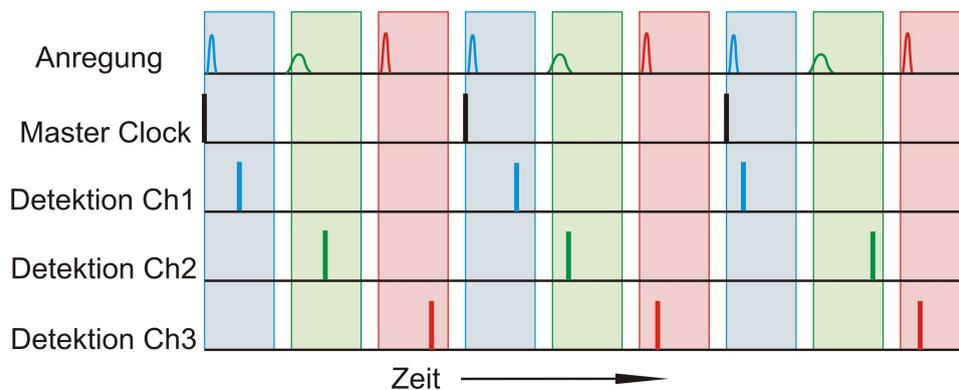


Abbildung 2.15: *Schema von alternierender Anregung und Detektion bei PIE*

Das Funktionsprinzip von PIE wird in Abbildung 2.15 verdeutlicht. Nacheinander werden die Anregungspulse mit konstanter Frequenz synchronisiert in das Mikroskop eingespeist. Die Detektoren messen in der Zeit zwischen den Pulsen, ob ein Photon im jeweiligen Detektionsstrahlengang eintrifft. Indem man bei der Datenanalyse die Ankunftszeit des Photons mit der mit den Anregungspulsen synchronisierten Master Clock der PC-Karte vergleicht, lässt sich jedes einzelne Fluoreszenzphoton auf den Anregungspuls zurückführen. Mit dem Wissen des Anregungsmediums kann auf sehr einfache Weise das spektrale Übersprechen von Fluoreszenzphotonen im Nachhinein beseitigt werden. Im Falle von Photonen, die auf Grund des Überlapps des breiten Emissionsspektrums eines Fluorophors mit dem Detektionsbereich eines anderen rotverschobenen Farbstoffs, in den falschen Detektionskanal gelangen, ermöglicht PIE bei Proben, die keinen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer aufweisen, ihre Identifizierung durch Vergleich von Anregungspuls und Detektionskanal. Insbesondere

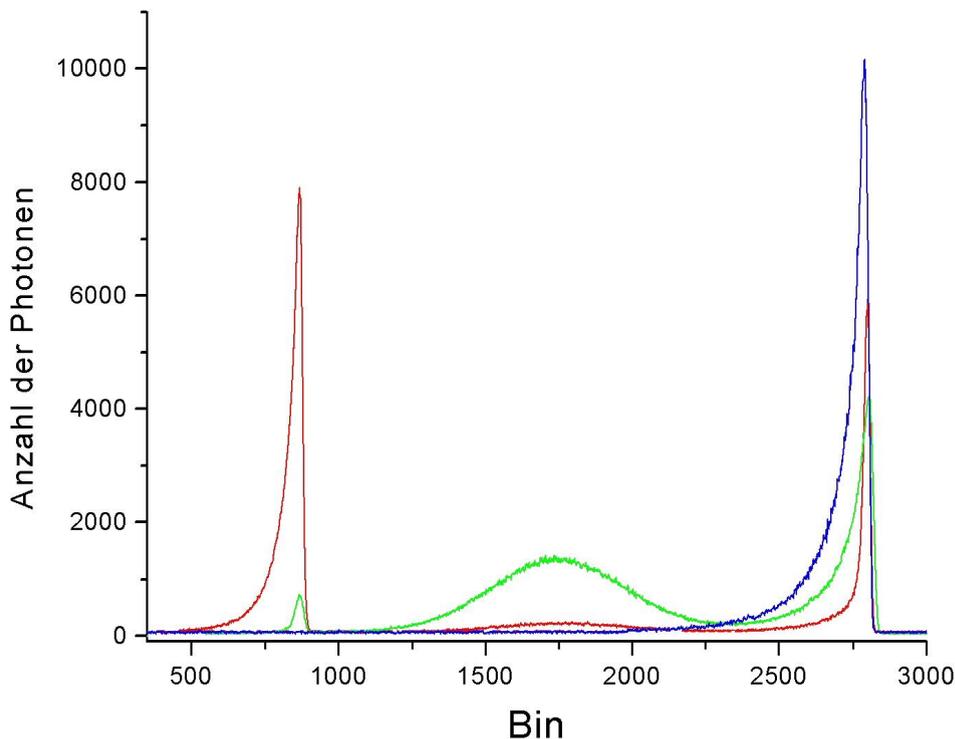


Abbildung 2.16: Zeitlicher Verlauf der Anzahl detektierter Photonen für die drei Detektionskanäle (Bin 300 bis 3000 entspricht ca. 100 ns). Es lassen sich leicht die durch spektrales Übersprechen oder FRET entstandenen Peaks im grünen bzw. roten Kanal nach blauer Anregung und der unerwünschte Peak im grünen Kanal nach roter Anregung erkennen, welcher durch vom Filter nicht geblocktes Streulicht des roten Lasers entsteht.

bei einem dreifarbigem Aufbau im sichtbaren Spektralbereich lässt sich dieser Effekt nie vollkommen vermeiden, da die Emissionsbereiche von drei verschiedenen Farbstoffen, die separat mit ausreichender Effizienz detektiert werden sollen, in einer Spanne von ungefähr 400 nm untergebracht werden müssen. Bei FCCS-Messungen (Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie) [41] bewirkt die Reduktion des Übersprechens große Vorteile, da Photonen, die durch diesen Effekt falsch detektiert werden, direkt mit den Photonen des eigentlichen Detektionskanals korrelieren.

In der Praxis hat sich für PIE mit drei Farben eine Master Clock Frequenz von maximal 10 MHz als sinnvoll erwiesen. Wie in Abbildung 2.16 veranschaulicht, müssen in einem Zeitraum von 100 ns die drei Laserpulse nacheinander abfolgen, wobei die Fluoreszenzabregung der Farbstoffe komplett in der Zeit zwischen den Pulsen erfolgt sein sollte. Für die Anregung des Dauerstrichlasers, die durch den Akusto-Optischen-Modulator gepulst wird, beträgt die Pulsbreite etwa 50 ns, also bereits die Hälfte des Detektionszeitraums. Würde man in diesem Anregungsbereich gepulste Laser verwenden, ließe sich die Taktfrequenz noch einmal erhöhen, was die molekulare Helligkeit der Farbstoffe für den Aufbau leicht verbessert [33]. Während der Zeit zwischen zwei Master Clock Pulsen kann die TCSPC-Karte auf Grund ihrer Totzeit

nur einen Photonenpuls verarbeiten. Registriert ein Detektor in einem Detektionsbin zwei Photonen (mehr sind wegen der Totzeit des Detektors nicht möglich), geht das zweite in der Auswertung verloren.

2.4 Burst Analysis

Die Methode, die zur Auswertung der Daten verwendet wurde, ist die so genannte Burst Analysis [10]. Im Hinblick auf die Suche nach Molekülen mit speziellen Eigenschaften brachte die Entwicklung der Burst Analysis einen höchstempfindlichen, schnellen und eindeutigen Nachweis von biologisch relevanten Molekülen. Die Technik kann durch ihre Einzelmolekülsensivität Informationen über molekulare und physikalische Eigenschaften und Prozesse liefern, die in Ensemblemessungen untergehen. Befindet sich zum Beispiel bei FRET-Messungen eine heterogene Molekülpopulation in verschiedenen Konformationszuständen mit unterschiedlichen D/A-Abständen, erhält man zwei separate Maxima in der Verteilung der FRET-Effizienzen. Die Effizienzen werden also im Gegensatz zum Ensemble nicht gemittelt, jeder Zustand wird einzeln spektroskopisch untersucht.

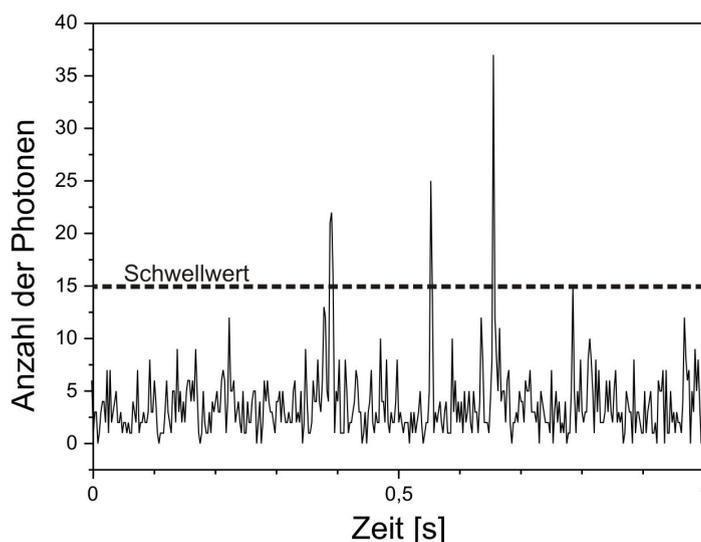


Abbildung 2.17: *Beispiel eines Fluoreszenzsignals mit deutlich sichtbaren Signalspitzen. Die gestrichelte Linie entspricht dem Schwellwert für die Datenanalyse.*

Dabei ist das Funktionsprinzip der Burst Analysis sehr einfach. Signalspitzen (Bursts) in der zeitlichen Spur der Fluoreszenzintensität einer oder mehrerer Detektionskanäle werden detektiert und miteinander verglichen. Diese Fluoreszenzbursts entstehen durch markierte Moleküle, die das Anregungsvolumen auf Grund ihrer natürlichen Diffusion durchqueren und dabei Fluoreszenzphotonen emittieren. Die Konzentration der Probenlösung wird so niedrig gehalten, dass sich im Mittel weniger als ein markiertes Molekül im Anregungsvolumen aufhält und die Gesamtzeit des Aufenthalts der Moleküle im Fokalvolumen ungefähr 1% der Messzeit entspricht. Es lassen sich somit hoch sensitiv einzelne Moleküle separat untersuchen. Der Nachweis der

Durchtritte einzelner Moleküle erfolgt durch die Aufsummation der vom entsprechenden Molekül ausgesandten Photonen innerhalb einer vorgegebenen Integrationszeit (Bin). Die Länge eines Bins sollte ungefähr der durchschnittlichen Diffusionszeit eines Moleküls durch das Fokalvolumen entsprechen, um die Photonenhäufungen gut vom Hintergrundsignal trennen zu können.

Zur Datenanalyse wird für die Amplitude des Fluoreszenzsignals, also der zeitlichen Abfolge der Photonenzahlen pro Bin, ein Schwellwert gesetzt (siehe Abbildung 2.17). Dieser Wert sollte so hoch sein, dass Fluktuationen des Hintergrundsignals deutlich darunter bleiben, aber möglichst viele, auch kleinere durch Farbstoffemission erzeugte, Bursts den Schwellwert übersteigen. So stehen für die Statistik der Auswertung genügend Ereignisse zur Verfügung, ohne den störenden Einfluss des Hintergrundsignals zu groß werden zu lassen. Da höhere Schwellenwerte zu exakteren Messergebnissen führen, erhöht man die Statistik der Auswertung vorzugsweise durch Wiederholen und Aufsummieren der Messzyklen, anstatt die Unsicherheiten eines niedrigen Schwellwerts in Kauf zu nehmen.

2.4.1 Burst Analysis mit PIE

Kombiniert man einen mehrfarbigen Aufbau mit PIE, hat man mit der Burst Analysis die Möglichkeit die Stöchiometrie S der einzelnen Probenkomponenten nach Kapanidis et al. [24] zu ermitteln:

$$S = \frac{F_{Aem}^{Dex} + \alpha F_{Dem}^{Dex}}{F_{Aem}^{Dex} + \alpha F_{Dem}^{Dex} + F_{Aem}^{Aex}} \quad (2.19)$$

mit

$$\alpha = \frac{Q_A \cdot \eta_{Aem}^{Aex}}{Q_D \cdot \eta_{Dem}^{Dex}} \quad (2.20)$$

Der Faktor α korrigiert die unterschiedlichen Detektionseffizienzen (siehe Projekt A), F_j^i entspricht den verschiedenen Photonenzahlen (F_{Aem}^{Dex} ist die Zahl der detektierten Photonen im Akzeptorkanal bei Anregung des Donors usw.). In der Praxis erweist sich das als sehr hilfreich, da diese Information sowohl Schlüsse auf die Labeleffizienz und die Wirksamkeit der damit verbundenen Markierungsprozedur, als auch auf die Konzentrationsverhältnisse der Probenspezies erlauben. Vor allem aber lassen sich Bindungsprozesse und -dynamiken über die Änderung der Stöchiometrie der Komponenten des untersuchten Essays auf Einzelmolekülebene sichtbar machen.

Das Prinzip der Separation der unterschiedlich gelabelten Komponenten wird in Abbildung 2.18 gezeigt. Weist das Signal eines Integrationsbins in Kanal 1 nach der gepulsten Anregung mit Laserlinie 1 einen Burst auf, ist dieser auch mit dem korrespondierenden Farbstoff 1 gelabelt. Zeigt sich sowohl ein Burst in Detektionskanal 1 nach Anregung 1 als auch ein Burst in Kanal 2 und 3 nach Anregung 2 und 3 innerhalb eines Moleküldurchtritts ist es mit allen drei Farbstoffen markiert. Nach diesem Prinzip lassen sich bei einem dreifarbigem Experiment die sieben möglichen Labelvariationen trennen und gruppiert aufsummieren, was zur Stöchiometrie der Komponenten führt.

Änderungen der Stöchiometrie weisen auf Bindungsreaktionen der Probenkomponenten hin. Untersucht man anfänglich verschiedenfarbig einfach markierte Molekülspezies in der Probenlösung, lassen sich gleichzeitige Bursts in mehreren Detektionskanälen auf eine Bindung der mit den in den jeweiligen Kanal emittierenden

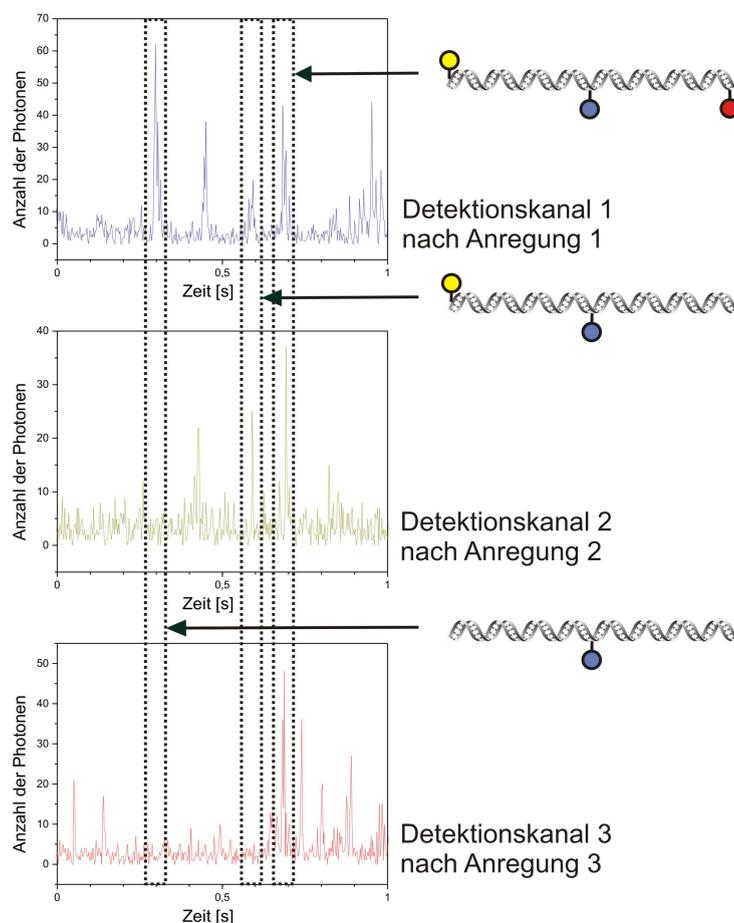


Abbildung 2.18: *Prinzip der Separation unterschiedlich gelabelter Moleküle mit Fluoreszenzsignal aus der 3-Farben Burst Analysis*

Farbstoffen markierten Spezies schließen. Laufen die Bindungsreaktionen langsam genug ab, ergeben die zeitlichen Abläufe der Stöchiometrieänderungen Einblicke in die Kinetiken der Reaktionen. Hier wird ersichtlich, wie sich das spektrale Überschneiden negativ auf die Messergebnisse der Burst Analysis auswirkt. Überlappen die Emissionsbereiche der Farbstoffe zu stark, so werden im nächst langwelligeren Detektionsbereich Bursts auch ohne geeignetes Label registriert und die Moleküle werden fälschlicher Weise als doppelt markiert eingruppiert.

2.5 Fluoreszenz-Korrelations-Analyse

Wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben wurde für die Justage des Aufbaus fast ausschließlich die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie verwendet. Da das Justieren des Aufbaus einen wichtigen Bestandteil der Verwirklichung von 3-Farben FRET darstellt, wird in diesem Abschnitt genauer auf die Theorie der von Elson, Magde und Webb [31, 15] sowie Ehrenberg [11] entwickelten FCS eingegangen.

Im thermodynamischen Gleichgewicht ändert sich die Molekülkonzentration eines makroskopischen, also hinreichend großen, Systems nicht. Zwar finden dynamische Schwankungen statt, sie mitteln sich aber auf Grund der großen Molekülzahl heraus. Reduziert man die Anzahl der Moleküle des zu untersuchenden Systems, ist

der Einfluss der Fluktuationen nicht mehr vernachlässigbar. Dies macht man sich in der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zu Nutze, in dem man die Ähnlichkeit der Fluktuationssignale miteinander vergleicht und über die mathematische Vorschrift der Autokorrelationsfunktion thermodynamische und kinetische Parameter der Komponenten des Systems bestimmen kann. Die Ursachen für das Auftreten solcher Signalschwankungen können statistische Fluktuationen der Molekülkonzentration oder auch durch einen angelegten Fluss induzierte Fluktuationen sein. Des Weiteren können die Schwankungen durch die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffmoleküle, verursacht durch Fluoreszenzlöschung (*Quenching*), Blinken oder Ausbleichen, entstehen, was aber in dieser Arbeit nicht behandelt wird. Bei den durchgeführten Justagemessungen stört die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften und tritt mit den eingesetzten synthetischen Fluorophoren nur marginal auf.

Geht man von statistischen Schwankungen der Konzentration der Probenlösung aus, die durch ungeordnete Diffusionsbewegungen der Moleküle (Brown'sche Molekularbewegung [42, 13, 14]) entstehen, so kann man auf die molekulare Beweglichkeit der Komponenten und damit ihre Diffusionskonstante sowie ihr Molekulargewicht schließen. Daher ist es möglich, Bindungsreaktionen und Änderungen der Molekülstruktur (z.B. Proteinfaltung) auf Grund der Änderung der Diffusionskonstante zu registrieren.

Wie bereits oben erwähnt gibt die Autokorrelationsfunktion die Ähnlichkeit eines Wertes zu einem Zeitpunkt mit sich selbst zu einem anderen Zeitpunkt τ wieder und ist wie folgt definiert:

$$\Phi(\tau) = \langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle \quad (2.21)$$

Autokorreliert man die Schwankungen des Fluoreszenzsignals $F(t)$ (Gleichungen 2.6 - 2.8) der sich durch das Fokalvolumen bewegenden Moleküle, entspricht $F(t)$ aus obiger Gleichung den Fluoreszenzfluktuationen $\delta F(t)$ um den zeitlichen Mittelwert des Signals $\langle F \rangle$ und es ergibt sich mit $\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle$ für die normierte Autokorrelation $G(\tau)$:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2.22)$$

Da es sich bei der ungeordneten Diffusion um einen nicht-periodischen Prozess handelt, ist die Autokorrelation ebenfalls nicht-periodisch. Einen schematischen Verlauf der Kurve zeigt Abbildung 2.19.

Dabei zeigen nur die Bereiche (b) und (c) Korrelationseffekte. (c) zeigt die Korrelation entstehend durch translative Diffusion der Fluoreszenzmoleküle. Der Rücken in Abschnitt (b) tritt bei Farbstoffen besonders ausgeprägt auf, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zeitweise in den Triplettzustand übergehen. Der Abfall des Rückens beschreibt die charakteristische Zeit, in der der Farbstoff fluoreszent korreliert und sich damit nicht im Triplettzustand befindet [45]. Der Abfall zu kleinen Zeiten τ in der Kurve (a) entsteht durch zwei Antikorrelationseffekte. Zum Einen können Photonen, die während der Totzeit auf das Zählwerk treffen, nicht registriert werden und stehen damit auch nicht für die Korrelation zur Verfügung. Zum Anderen emittieren Farbstoffe Fluoreszenzphotonen im Mittel erst nach einem charakteristischen Zeitraum, ihrer Fluoreszenzlebensdauer. Daher ergibt sich im Zeitraum zwischen Anregung und der Fluoreszenzabregung ebenfalls keine Korrelation (Antibunching). Bei

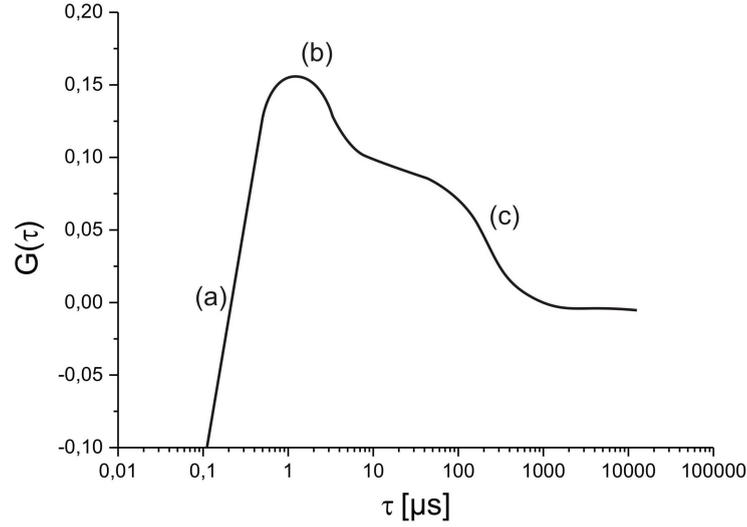


Abbildung 2.19: Schematischer Verlauf einer gemessenen Autokorrelationskurve translativer Diffusion (c) mit Antikorrelation (a) und Triplet (b)

beiden Effekten wird das Nichteintreffen von Photonen korreliert (Antikorrelation) und die Amplitude $G(\tau)$ sinkt auf -1.

Um den Schluss von der Autokorrelationsfunktion auf die gesuchten Parameter zu ermöglichen, muss auf die Verteilung der Detektionsintensität $I_e(\vec{r})$ aus Abschnitt 2.1.1 zurückgegriffen werden. Man erhält dann für das Fluktuationssignal der Konzentrationsschwankungen:

$$\delta F(t) = \int_V I_e(\vec{r}) \cdot \delta C(\vec{r}, t) dV \quad . \quad (2.23)$$

Setzt man in Gl. 2.22 für die Autokorrelationsfunktion ein, ergibt sich

$$G(\tau) = \frac{\int_V \int_{V'} I_e(\vec{r}) \cdot I_e(\vec{r}') \cdot \Phi(\vec{r}, \vec{r}', t) dV' dV}{[\langle C \rangle \int_V I_e(\vec{r}) dV]^2} \quad (2.24)$$

mit der Korrelation der Konzentrationsschwankungen

$$\Phi(\vec{r}, \vec{r}', t) = \left\langle \delta C(\vec{r}, t) \cdot \delta C(\vec{r}', t + \tau) \right\rangle \quad . \quad (2.25)$$

Für den hier betrachteten Fall eines reinen Diffusionssystems ohne angelegten Fluss kann die zeitliche Änderung der Molekülkonzentration durch das 2. Fick'sche Gesetz beschrieben werden:

$$\frac{\partial(\delta C(\vec{r}, t))}{\partial t} = D \Delta \delta C(\vec{r}, t) \quad (2.26)$$

mit dem Diffusionskoeffizienten D . Obiges Gesetz liefert nach Fouriertransformation und Bildung des Ensemble-Mittelwerts für die Autokorrelation der Konzentrationsschwankungen:

$$\Phi(\vec{r}, \vec{r}', t) = \langle C \rangle (4\pi \cdot D \cdot \tau)^{-\frac{3}{2}} \cdot e^{(-|\vec{r}-\vec{r}'|/4D \cdot \tau)} \quad (2.27)$$

Eingesetzt in Gl. 2.21 bekommt man damit für die Autokorrelationsfunktion

$$G(\tau) = \frac{\gamma}{\langle C \rangle (\pi/2)^{3/2} \cdot \omega_0^2 \cdot z_0} \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right) \sqrt{1 + \frac{\omega_0^2 \cdot \tau}{z_0^2 \cdot \tau_d}} \right]^{-1} \quad (2.28)$$

mit der mittleren Aufenthaltsdauer der Teilchen im Detektionsvolumen τ_D . Durch $G(0) = (\gamma \langle C \rangle (\pi/2)^{3/2} \cdot \omega_0^2 \cdot z_0) = \gamma \cdot V_{eff} \langle C \rangle = \gamma \cdot N^{-1}$, der Abhängigkeit der Konzentration und damit auch der Teilchenzahl N von der Amplitude $G(0)$ (effektives Probenvolumen V_{eff} ⁴) ergänzt, ergibt sich:

$$G(\tau) = \frac{\gamma}{N} \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right) \sqrt{1 + \frac{\omega_0^2 \cdot \tau}{z_0^2 \cdot \tau_d}} \right]^{-1} \quad (2.29)$$

Ausgehend von einem zylinderförmigen, in z-Richtung nicht begrenzten Volumen ist dies die Zeit, bei der die Amplitude der Autokorrelation auf die Hälfte gesunken ist (keine Abhängigkeit von z_0). Bei dem *in realitas* ortsabhängigen Detektionsvolumen entspricht sie einer gewichteten Aufenthaltsdauer:

$$\tau_d = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (2.30)$$

Mit diesem Zusammenhang von Diffusionszeit und Diffusionskonstante erhält man über die Stokes-Einstein Relation

$$D = \frac{kT}{6\pi\mu R_h} \quad (2.31)$$

(k : Boltzmann-Konstante, T : Temperatur, μ : Viskosität des Lösungsmittels, R_h : hydrodynamischer Radius des diffundierenden Teilchens)

den hydrodynamischen Radius und kann damit auch auf die Größe bzw. das Gewicht des untersuchten Moleküls schließen.

Mehrkomponentiges System

Besteht ein System aus mehreren gleichfarbig markierten Komponenten, gehen diese jeweils anteilig in die Korrelationsfunktion ein. Sind dabei die molekularen Helligkeiten η_i der Komponenten gleich, werden die einzelnen Funktionen einfach aufaddiert

$$G_{ges}(\tau) = \sum_i G_{diff,i}(\tau) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^Z Y_i Diff_i(\tau) \quad (2.32)$$

wobei $Diff_i(\tau) = \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right) \sqrt{1 + \frac{\omega_0^2 \tau}{z_0^2 \tau_d}} \right]^{-1}$ und $Y_i = \frac{N_i}{N}$ der Anteil der Komponente i an der Gesamtmolekülzahl ist.

Unterscheiden sich die molekularen Helligkeiten zum Beispiel auf Grund von teilweise gequenchten Farbstoffen auf einer Spezies, werden die Korrelationen der einzelnen

⁴Da man in der Theorie zur FCS ein abgegrenztes Volumen annimmt, entspricht das effektive Volumen nicht dem Volumen, dass sich aus der 3-dimensionalen Gaussverteilung ergibt. Es ist um den Faktor $\sqrt{8}$ kleiner. Diesem Unterschied wird in der Literatur oft mit dem Faktor γ Rechnung getragen. Die Größe des Volumens liegt klassischerweise im Bereich von 1 fl.

Komponenten in der Summe mit dem Quadrat des Produkts aus Helligkeiten und Molekülanzahl gewichtet [27]. Durch die quadratische Abhängigkeit schlagen sich hellere Moleküle deutlich stärker in der Gesamtkorrelationsfunktion nieder. Es ist daher darauf zu achten, dass die molekularen Helligkeiten einzelner Komponenten nicht zu stark differieren.

Kreuzkorrelation

Für die Untersuchung von mehrkomponentigen Systemen stellt die einfarbige Analyse in vielen Fällen keine hinreichend genaue Methode dar. Einerseits unterscheiden sich die Diffusionskonstanten einzelner Spezies nicht stark genug, um sie unterscheiden zu können, andererseits möchte man gleichzeitig ablaufende dynamische Prozesse und Wechselwirkungen erfassen, was nur mit den Informationen aus der Autokorrelation nicht möglich ist. Ein Aufbau mit mehrfarbiger Anregung ist daher unumgänglich.

Neben der Autokorrelations-Analyse bietet sich dann die Möglichkeit, die Fluoreszenzsignale aus unterschiedlichen Detektionskanälen miteinander zu korrelieren. Es wird also nicht ein Signal, sondern es werden mehrere Signale zu verschiedenen Zeiten miteinander verglichen. Werden Photonen simultan in beiden Kanälen registriert, korrelieren sie und ergeben damit ein Einzelereignis für die Kreuzkorrelation. Da nur doppelt gelabelte Moleküle in die Auswertung eingehen, lassen sich Informationen über die die einzelnen Spezies verbindenden Mechanismen gewinnen. In der Praxis werden meist zwei Signale miteinander korreliert. Werden die Informationen der einzelnen Kreuzkorrelationen dann kombiniert, erhält man die Informationen über das mehrkomponentige System.

Bei der Durchführung der Experimente ist dabei zu beachten, dass die spektrale Anordnung der Fluorophore, wie in Abschnitt 2.2.1 erläutert, eine hohe Detektionseffizienz erlaubt, die Größen der verschiedenen Anregungsvolumina nicht zu stark voneinander abweichen, vor allem aber die Volumina exakt übereinander liegen. Geht man von einer schnellen (gegenüber den Konzentrationsfluktuationen) und irreversiblen Bindung der verschiedenen markierten Molekülspezies i und j aus, ergibt sich für die normierte Kreuzkorrelationsfunktion der Spezies ij :

$$G_{ij}(\tau) = \frac{\langle \delta F_i(t) \cdot \delta F_j(t + \tau) \rangle}{\langle F_i(t) \cdot F_j(t) \rangle} \quad (2.33)$$

Üblicherweise treten in der Realität Mischungen aus den Komponenten i , j und ij auf. Für diesen Fall ergeben sich die Korrelationen zu:

$$G_{i,j}(\tau) = \frac{\langle C_{i,j} \rangle Diff_{i,j} + \langle C_{ij} \rangle Diff_{ij}}{V_{eff} (\langle C_{i,j} \rangle + \langle C_{ij} \rangle)^2} \quad (2.34)$$

$$G_{ij}(\tau) = \frac{\langle C_{ij} \rangle Diff_{ij}}{V_{eff} (\langle C_i \rangle + \langle C_{ij} \rangle) (\langle C_j \rangle + \langle C_{ij} \rangle)} \quad (2.35)$$

mit $V_{eff} = \pi \cdot \sqrt{\pi} \cdot \omega_0^2 \cdot z_0$. Man sieht, dass man für $i=j$ wieder die bekannte Autokorrelationsfunktion bekommt. Im Gegensatz zur Autokorrelationsanalyse ist bei der Kreuzkorrelation die Amplitude $G_{ij}(0)$ direkt proportional zur Teilchenzahl der Spezies ij , da im Nenner alle Spezies berücksichtigt werden.

Beim oben benutzten effektiven Volumen V_{eff} wird von exakt gleich großen Detektionsvolumina ausgegangen. Diese Annahme lässt sich angesichts verschiedener Detektionswellenlängen (unterschiedliche Punktspreizfunktionen $PSF_{i,j}(\vec{r}, \vec{r}', z)$) und weitgehend separierter Anregungsstrahlengängen im Aufbau nicht hundertprozentig verwirklichen. Somit differieren die Verteilungen der Detektionsintensitäten $I_e(\vec{r})$. Die korrekt definierte Größe des effektiven Volumens

$$V_{eff}^x = \frac{(\int I_{e,i}(\vec{r})dV) \cdot (\int I_{e,j}(\vec{r})dV)}{\int I_{e,i} \cdot I_{e,j}(\vec{r})dV} \quad (2.36)$$

liegt zwischen denen der einzelnen Volumina - es gilt jetzt $V_{eff}^x \propto (\omega_{0,i}^2 + \omega_{0,j}^2)/2 \cdot \sqrt{(z_{0,i} + z_{0,j})^2/2}$ - und die Kreuzkorrelationsfunktion muss korrigiert werden zu:

$$G_{ij}(\tau) = \frac{\langle C_{ij} \rangle Diff_{ij}}{V_{eff}^x (\langle C_{i,j} \rangle + \langle C_{ij} \rangle) (\langle C_{j,i} \rangle + \langle C_{ij} \rangle)} \quad (2.37)$$

Stimmen also die effektiven Volumina von Auto- und Kreuzkorrelation auf Grund verschiedener Detektionswellenlängen, unterschiedlicher Anregungsoptik und ihrem nicht vollkommen kongruenten Überlapp nicht überein, zeigt die Auswertung der Kreuzkorrelation eine scheinbare Dezimierung der doppelt markierten Teilchen, wie bereits Schwille im Rahmen ihrer Dissertation [40] verifizieren konnte.

Die Kreuzkorrelationsanalyse bietet bei einem nicht wechselwirkenden System einen weiteren entscheidenden Vorteil. Im Prinzip entspricht die Kreuzkorrelation der zwei Farbkanäle einer Autokorrelation der doppelt markierten Komponenten. Es wird somit nur dieser doppelt markierte Anteil am Gesamtsystem detektiert und das Signal kann vom störenden Hintergrund befreit werden. Mitunter dieser Vorteil veranlasste Eigen [12] und Schwille [40, 41], die Kreuzkorrelation in hochsensitive FCS-Aufbauten zu integrieren.

Die Entwicklung von PIE hat für die Kreuzkorrelationsanalyse eine herausragende Verbesserung gebracht. Mit dem Bezug auf den Anregungspuls bietet PIE die Möglichkeit, das spektrale Übersprechen zu eliminieren. Je nach Farbstoffkombination werden nicht selten zwischen 10 und 25% der Fluoreszenzphotonen im falschen Detektionskanal registriert. Für die Kreuzkorrelation hat dies immense Auswirkungen, da die Photonen, die in den falschen Kanal gelangen, direkt mit den Photonen des eigentlich vorhergesehenen Detektionskanals korrelieren. Daraus ergibt sich auch bei nicht Vorhandensein von doppelt markierten Komponenten für die Kreuzkorrelation eine Amplitude größer null, die die Analyse der Messergebnisse deutlich erschwert.

2.6 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Der Fluoreszenz(Förster)-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) [16] zwischen zwei Fluorophoren, Donor (D) und Akzeptor (A), hat sich als sehr nützliche spektroskopische Technik zur Messung von Abständen im Bereich von 10-80 Å bewährt [7]. Die Anregungsenergie wird vom Donor strahlungslos über die Wechselwirkung induzierter Dipol/induzierter Dipol auf den Akzeptorfarbstoff übertragen. Folgende Voraussetzungen müssen für den Energietransfer erfüllt sein:

- das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen

- die Fluorophore müssen über eine gemeinsame Schwingungsebene verfügen
- der Abstand von Donor und Akzeptor darf nicht zu groß sein

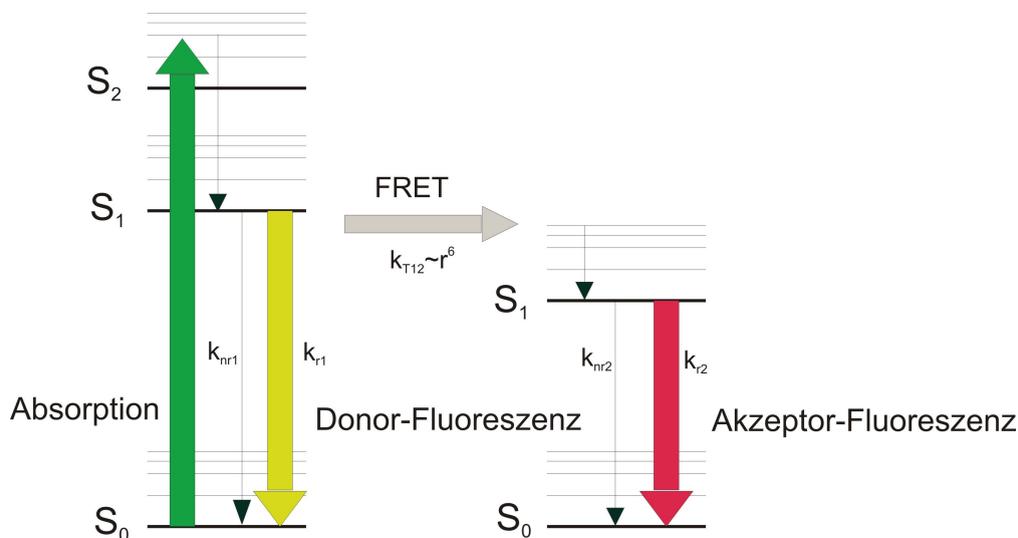


Abbildung 2.20: Jablonski-Termschema - strahlende Übergänge sind mit farbigen Pfeilen und strahlungslose mit gestrichelten Pfeilen markiert. Der strahlungslose FRET ist mit grauem Pfeil markiert.

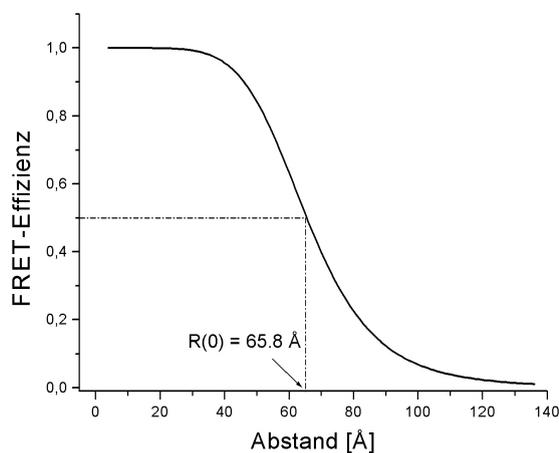


Abbildung 2.21: Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz und Förster-Radius des Farbstoffpaares Atto 488/Atto 565.

Der Försterradius R_0 gibt den Abstand an, bei dem 50% der Strahlungsenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen wird:

$$R_0^6 = \frac{\kappa^2 \cdot J \cdot Q_D}{n^4} \quad (2.38)$$

Q_D ist die Quantenausbeute des Donors ohne Akzeptor, J ist das Überlappintegral von den Spektren für Donoremission und Akzeptorabsorption (siehe Abbildung

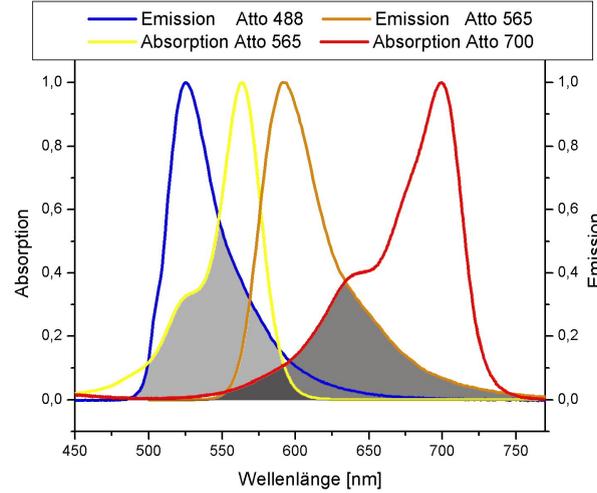


Abbildung 2.22: Überlappsspektrum der für die 3-Farben FRET Experimente benutzten Farbstoffkombination Atto 488/Atto 565/Atto 700

2.22), n der Brechungsindex des Lösungsmittels und κ^2 ist ein Faktor, der die jeweilige Orientierung der Übergangsdipolmomente berücksichtigt [46]. Bei freier Verteilung und Beweglichkeit der beteiligten Farbstoffe kann für κ^2 der Wert $2/3$ eingesetzt werden.

Für die Reaktionsrate des Energietransfers k_T ergibt sich folgende Gleichung:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (2.39)$$

mit τ_D als Lebensdauer des Donors ohne Akzeptor, R Abstand Donor-Akzeptor. Damit bestimmen nur noch der Förster-Abstand R_0 und der Abstand R der beteiligten Fluorophore die Effizienz E des Energietransfers.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0} \right)^6} \quad (2.40)$$

In Abb. 2.21 wird deutlich, dass auf Grund der Abhängigkeit des Abstands R von der sechsten Potenz des Försterradius R_0 nur Messungen von Distanzen zwischen dem 0,5 und 1,5-fachen von R_0 sinnvoll sind. Im Bereich darüber und darunter sind die Änderungen beim Energietransfer zu gering, die Transformation in Längenänderungen daher nicht brauchbar.

In der Praxis zeigt sich die Form der Kurve aus Abbildung 2.21 etwas anders. Wie Schuler et al. [39] zeigen konnte, ist die Kurve für kurze Abstände niedriger und erreicht nicht die FRET-Effizienz von 1, da in diesem Bereich andere Energie-Transfer-Prozesse dominieren. Für lange D/A-Abstände dagegen führen Molekülfuktuationen zu etwas höheren FRET-Effizienzen.

2.6.1 Burst Analysis FRET

Ha et al. [20] ermittelten die ersten FRET-Effizienzen von D/A-Paaren auf einzelnen an eine Oberfläche gebundenen Molekülen. Die ersten Messungen an einzelnen

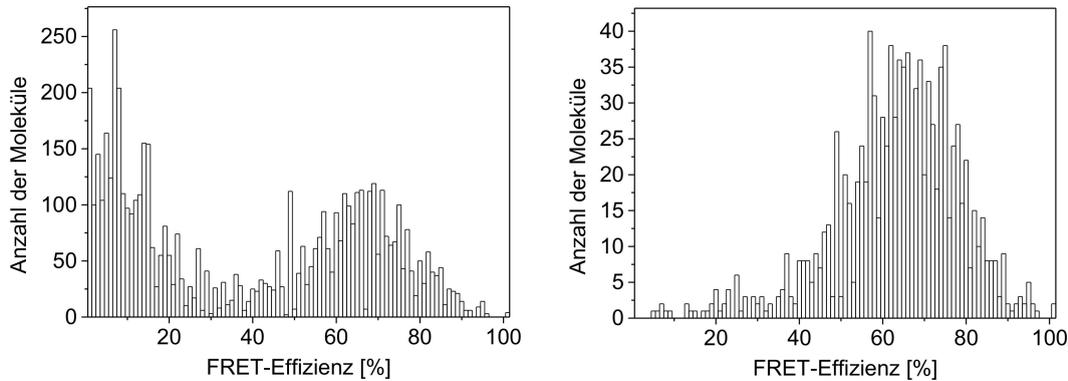


Abbildung 2.23: Vergleich der Bestimmung der FRET-Effizienzen mit und ohne Pulsed Interleaved Excitation. Die Auswertung der FRET-Effizienz ohne PIE (links) zeigt im Gegensatz zur Auswertung mit PIE einen Peak bei 0. Niedrige FRET Effizienzen können in diesem Fall nicht mehr bestimmt werden.

Molekülen in Lösung zur Bestimmung der FRET-Effizienz führten Weiss et al. durch [44, 9, 32]. Sie ließen bei Anregung des Donorfarbstoffs 2-fach markierte doppelsträngige DNA in Lösung durch das Fokalvolumen diffundieren und verglichen die Bursts in Donor- und Akzeptordetektionskanal. Erweiterungen der Messmethode lieferten Lipman, Schuler und Seidel [29, 38, 25, 19].

Das Verhältnis

$$E = \frac{F_{Aem}^{Dex}}{F_{Aem}^{Dex} + \alpha F_{Dem}^{Dex}} \quad (2.41)$$

der Photonenzahlen F_j^i ergibt die Effizienz des Resonanz-Energie-Transfers von Donor auf Akzeptor.

Die Kombination mit Pulsed Interleaved Excitation brachte die Burst Analysis der FRET-Effizienzen weiter voran. Da die Fluoreszenzsignale seitdem auf den Anregungsimpuls zurückgeführt werden können, ist es möglich bereinigte FRET-Effizienzen von ausschließlich doppelt markierten Molekülen zu bestimmen, da nur Photonen von diesen Molekülen (siehe Stöchiometrie Kapitel 2.4) in der Auswertung berücksichtigt werden. Der ohne PIE entstehende Peak bei 0% FRET-Effizienz, der nur von Molekülen abgegeben wird, welche mit Donorfarbstoff markiert sind, tritt nicht auf (siehe Abbildung 2.23).

2.6.2 Burst Analysis 3-Farben FRET

Der Resonanz-Energie-Transfer zwischen drei Chromophoren zeigt sich weit komplizierter. Ohne gepulste Anregung wurden 3-Farben FRET Messungen schon von einigen Gruppen durchgeführt [30, 21, 22]. Der bedeutende Vorteil von 3-Farben FRET mit PIE, eben jene Bestimmung von 3 FRET-Effizienzen in einer einzigen Messung, erfordert jedoch eine neuartige Auswertungsmethode. Für die an Watrob et al. [43] angelehnte Herleitung der Berechnung der Transfereffizienzen benutzt man die Definition des Transfers zwischen zwei Farbstoffen mittels Transferraten. Der Quotient E_{ij} aus der Transferrate vom Energieübertrag durch FRET k_{Tij} und der Summe

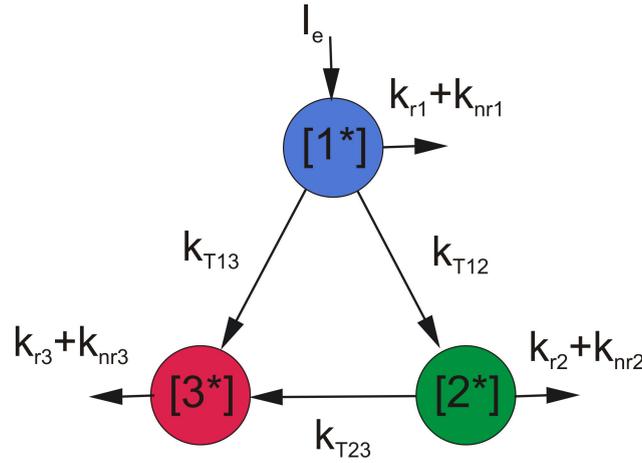


Abbildung 2.24: Veranschaulichung der Transferraten zwischen den angeregten Zuständen $[1^*]$, $[2^*]$ und $[3^*]$ bei 3-Farben FRET.

aller Transferraten (non-radiativ (kein FRET) k_{nr_i} , radiativ k_{r_i}) entspricht dieser FRET-Effizienz:

$$E_{ij} = \frac{k_{Tij}}{k_{nr_i} + k_{r_i} + k_{Tij}} \quad (2.42)$$

Für ein dreifarbiges System, das Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen allen Chromophoren erlaubt, ergeben sich die in Abbildung 2.24 gezeigten Transfermöglichkeiten.

Es ist zu beachten, dass FRET von Fluorophor 1 auf 2 und von Fluorophor 1 auf 3 kompetitive Prozesse darstellen. Die Energieabgabe der angeregten Farbstoffe $[i^*]$ werden deshalb mit folgenden gekoppelten Differentialgleichungen beschrieben:

$$\frac{d[1^*]}{dt} = -(k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13})[1^*] \quad (2.43)$$

$$\frac{d[2^*]}{dt} = -(k_{r2} + k_{nr2} + k_{T23})[2^*] + k_{T12}[1^*] \quad (2.44)$$

$$\frac{d[3^*]}{dt} = -(k_{r3} + k_{nr3})[3^*] + k_{T23}[2^*] + k_{T13}[1^*] \quad (2.45)$$

Löst man dieses Differentialgleichungssystem mit der Annahme einer δ -förmigen Anregung ausschließlich ausgehend von der Laserlinie mit der kürzesten Wellenlänge $[1^*]_0 = N_0$, bekommt man für den Fluoreszenzabfall der Farbstoffe:

$$[1^*](t) = N_0 e^{-(k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13})t} \quad (2.46)$$

$$[2^*](t) = N_0 \frac{k_{T12}(e^{-(k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13})t} + e^{-(k_{r2} + k_{nr2} + k_{T23})t})}{(k_{r2} + k_{nr2} + k_{T23}) - (k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13})} \quad (2.47)$$

$$[3^*](t) = N_0 \frac{\left(\begin{array}{l} (k_{r2} + k_{nr2} + k_{T23}) - (k_{r3} + k_{nr3}) \times \\ k_{T13} + 2k_{T13}(k_{r1} + k_{nr1} - k_{T23}) + k_{T12}k_{T23} \times \\ e^{-(k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13})t} - k_{T12}k_{T23} e^{-(k_{r2} + k_{nr2} + k_{T23})t} \times \\ (k_{r3} + k_{nr3}) - (k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13}) + \\ [(k_{r2} + k_{nr2} + k_{T23}) - (k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13})] \times \\ [(k_{r2} + k_{nr2})k_{T13} + k_{T12}k_{T23} + k_{T13}k_{T23}] + \\ k_{T13}(k_{r3} + k_{nr3})[(k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13}) + \\ (k_{r2} + k_{nr2} - k_{T23})] e^{-(k_{r3} + k_{nr3})t} \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{l} [(k_{r3} + k_{nr3}) - (k_{r2} + k_{nr2} + k_{T23})] \times \\ [(k_{r3} + k_{nr3}) - (k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13})] \times \\ [(k_{r2} + k_{nr2} + k_{T23}) - (k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13})] \end{array} \right)} \quad (2.48)$$

Integriert man $[i^*](t)$ über die Zeit und multipliziert mit $(k_{ri} + k_{nri})/N_0$ und der molekularen Helligkeit η_i

$$I_i = \eta_i \cdot \frac{k_{ri} + k_{nri}}{N_0} \int_0^\infty [i^*](t) dt \quad (2.49)$$

ergeben sich mit den in Abbildung 2.24 gezeigten Transfermöglichkeiten die Fluoreszenzintensitäten I_i :

$$I_1 = \frac{(k_{r1} + k_{nr1})}{k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13}} \cdot \eta_1 \quad (2.50)$$

$$I_2 = \frac{k_{T12}}{k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13}} \cdot \frac{(k_{r2} + k_{nr2})}{k_{r2} + k_{nr2} - k_{T23}} \cdot \eta_2 \quad (2.51)$$

$$I_3 = \left[\left(\frac{k_{T12}}{k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13}} \right) \left(\frac{k_{T23}}{k_{r2} + k_{nr2} - k_{T23}} \right) + \frac{k_{T13}}{k_{r1} + k_{nr1} + k_{T12} + k_{T13}} \right] \cdot \eta_3 \quad (2.52)$$

Setzt man Gleichung 2.39 für die FRET-Effizienzen und die α -Faktoren bezogen auf Detektion 2 aus Gleichung 2.19 in die Fluoreszenzintensitäten ein und löst nach E_{13} und E_{12} auf, erhält man:

$$E_{12} = \frac{I_2 \left(\frac{1}{1-E_{23}} \right)}{\alpha_1 \cdot I_1 + I_2 \left(\frac{1}{1-E_{23}} \right)} \quad (2.53)$$

$$E_{13} = \frac{\alpha_3 \cdot I_3 - I_2 \left(\frac{E_{23}}{1-E_{23}} \right)}{\alpha_1 \cdot I_1 + \alpha_3 \cdot I_3 - I_2 \left(\frac{E_{23}}{1-E_{23}} \right)} \quad (2.54)$$

Die Ermittlung der für die Berechnung der FRET-Effizienzen noch fehlenden Variablen E_{23} stellt einen entscheidenden Vorteil von PIE dar. Da nach Anregung 1

separat mit Laser 2 angeregt wird und kein Transfer von Farbstoff 2 auf 1 möglich ist, findet ein reiner 2-Farben Transfer von Fluorophor 2 auf 3 statt. Man errechnet E_{23} klassisch aus der Summe der detektierten Photonen im grünen (F_{2em}^{2ex}) und roten Kanal (F_{3em}^{2ex}) pro Integrations-Bin:

$$E_{23} = \frac{F_{3em}^{2ex}}{F_{3em}^{2ex} + \alpha F_{2em}^{2ex}} \quad (2.55)$$

3-Farben FRET-Messungen ohne PIE benötigen für diesen Schritt eine eigene Messung mit einer zusätzlichen zweifarbig markierten Probe.

3. Projekt A: 2-Farben FRET mit einem Fluoreszenzprotein

Das erste Projekt des experimentellen Teils der Arbeit wurde vor der Erweiterung des Aufbaus auf drei Farben abgeschlossen. Die Messergebnisse beruhen daher auf konventionellen 2-Farben FRET Messungen. Vor etwas mehr als zehn Jahren ist es

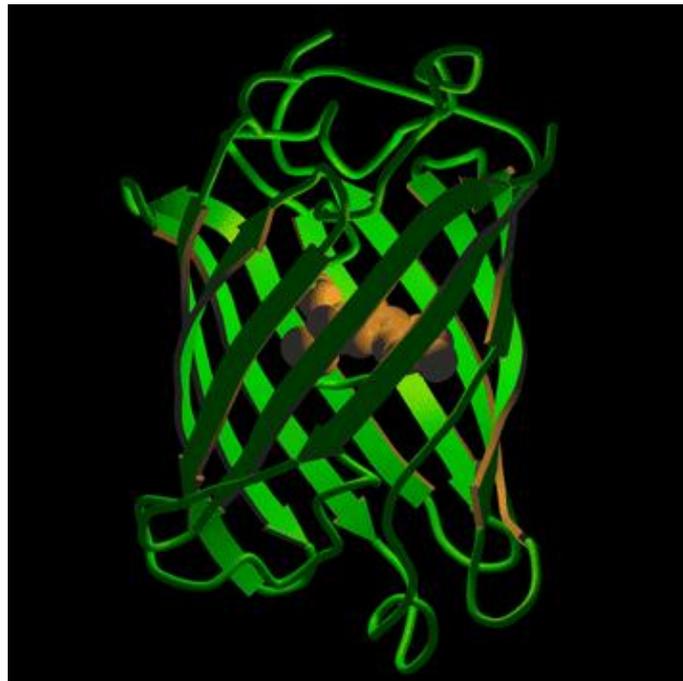


Abbildung 3.1: 3D-Struktur vom Green Fluorescent Protein (entnommen aus www.tsienlab.ucsd.edu/Images.htm)

Chalfie und Prasher [4] das erste Mal gelungen, das *Green Fluorescent Protein* (Abbildung 3.1) der Leuchtqualle *Aequorea Victoria* zu klonieren und zu exprimieren. Seitdem wurden zahlreiche fluoreszierende Proteine durch Mutagenese auf Basis des GFPs entwickelt, die ein breites Spektrum an photophysikalischen Parametern abdecken und die hohen Anforderungen der Fluoreszenzspektroskopie erfüllen. In der

Zellbiologie haben sich die Proteine als hervorragende Fluoreszenzmarker erwiesen, die Einblicke in intrazelluläre Abläufe, wie Transportvorgänge oder Konformationsänderungen, liefern. Auch die Bestimmung von intrazellulären Abständen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer konnte bereits verwirklicht werden.

In diesem Projekt wird nun untersucht, ob sich semisynthetische Fluoreszenzprotein-DNA-Konjugate gezielt für den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer verwenden lassen. Um sie für diese Experimente gezielt anordnen zu können, sucht man nach einer Methode, die Proteine in festgelegten Abständen einfach und effizient aneinanderzureihen. Hier stellt die Hybridisierung von mehreren DNA Einzelsträngen zu einem DNA Doppelstrang die Lösung dar, da die für die Bindung der DNA Fragmente notwendige komplementäre Basensequenz die hohe Spezifität gewährleistet und die Geometrie der DNA-Strukturen äußerst genau untersucht worden sind [8]. Anhand von zwei hybridisierten DNA Komplexen, die jeweils mit einem synthetischen Farbstoff und einem fluoreszierenden Protein markiert sind, soll das Potential solcher DNA-Fluoreszenzprotein-Komplexe für zukünftige Anwendungen untersucht werden.

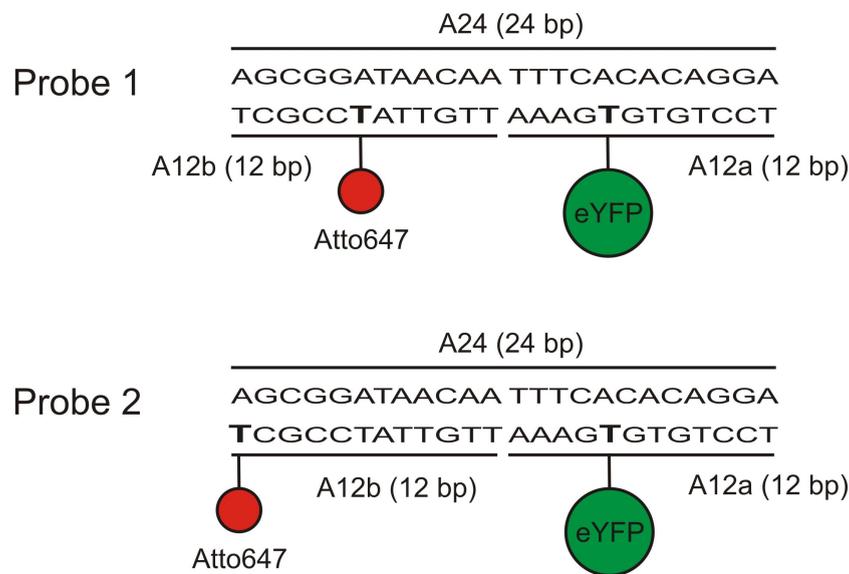


Abbildung 3.2: Aufbau und Sequenz der untersuchten DNA-Doppelstränge

Die Basis bilden dabei, wie in Abbildung 3.2 gezeigt, ein 24 Basen langer DNA-Einzelstrang (A24) und zwei zu den Hälften des 24-mers komplementäre 12 Basen lange Einzelstränge (A12a, A12b). Das 12-mer A12a wurde mit dem Fluoreszenzprotein eYFP (*enhanced Yellow Fluorescent Protein*) intern am Thymin an Position 8 der Sequenz kovalent verbunden, der Strang A12b mit dem synthetischen Farbstoff Atto 647 am Thymin an Position 7 (Probe 1) bzw. am Thymin an Position 12 (Probe 2). Die Synthesisierung und das Labelling der DNA-Stränge wurde von der Niemeyer Group der Universität Dortmund durchgeführt.

Die Vereinigung der DNA Einzelstränge erfolgte folgendermaßen: Noch vor der Hybridisierung wird das 5'-Ende des Strangs A12a bei 5 μ molarer Konzentration durch Zugabe von 1 unit Kinase, 1 μ l Kinasepuffer und 1 μ l 1 mmolarer ATP-Lösung 30 Minuten bei einer Temperatur von 37° Celsius phosphoryliert, um die Ligati-on der Oligonukleotide A12a und A12b nach der Hybridisierung vorzubereiten. Die

Hybridisierung erfolgt daraufhin nach Zugabe der Stränge A12b und A24. Nach 60-minütigem Erhitzen auf 60° Celsius wird die Probe in 2 Minuten Schritten um jeweils 2° Celsius bis auf 4° Celsius abgekühlt. Das Aufheizen des Fluoreszenzproteins bringt keine Probleme mit sich, da wie Messungen der Niemeyer Group gezeigt haben, das Fluoreszenzprotein nach Erhitzen auf 60° Celsius seine Fluoreszenz behält. Zum Schluss gibt man 1 unit DNA-Ligase zu, welche die Stränge A12a und A12b miteinander verbindet.

Die Ligation stabilisiert den DNA-Komplex in seiner Doppelhelix-Struktur, was die korrekte Bestimmung des Donor/Akzeptor-Abstands in Einzelmolekülmessungen gewährleistet. Ohne Ligation zersetzten sich die Komplexe in ersten Messungen nach kurzer Zeit, da die Schmelztemperatur von dsDNA bei den benutzten DNA Stücken von nur 12 Basenpaaren Länge bei nur 34° Celsius liegt und sich die Stabilität des Komplexes bereits bei Zimmertemperatur stark geschwächt zeigt [2]. Die Ligation der Stränge A12a und A12b war somit unumgänglich.

Die Fluoreszenzmarker auf dem hybridisierten DNA-Komplex 1 sind 11 Basenpaare voneinander entfernt, 10 Basenpaare entsprechen, wie in Ensemble-FRET Messungen von Clegg bestätigt [6, 8], einer Distanz von 34 Å. Diese 11 Basenpaare bilden etwas mehr als eine Helixwindung, die Marker sollten sich zwar versetzt, aber trotzdem auf der gleichen Seite des DNA-Komplexes befinden. Der Abstand der Marker wird unter diesen Voraussetzungen nach Clegg [8] auf 38 Å berechnet. Zwischen den Fluoreszenzmarkern auf DNA-Komplex 2 liegen 15 Basenpaare, die Marker befinden sich fast auf den entgegengesetzten Seiten der Helix, ihre Distanz berechnet sich deshalb auf 63 Å. Ein weiterer Faktor, welcher zur Ungewissheit beiträgt, besteht darin, dass die Länge des Linkers zwischen Fluorophor und DNA jeweils um die 10 Å beträgt und seine Orientierung variieren kann. Ebenfalls ist die Ausdehnung des Fluoreszenzproteins selbst, im Gegensatz zum synthetischen Atto647, nicht zu vernachlässigen. Aus diesen Gründen ist eine recht breite Verteilung der FRET-Effizienzen zu erwarten.

Alle Burst Analysis Messungen zur Bestimmung des Abstands von eYFP und Atto 647 wurden bei folgenden Bedingungen durchgeführt: Die Anregung von eYFP erfolgte durch die 514 nm Linie des Ar/Kr Gasionenlasers bei einer Leistung von 50 μW , die Anregung von Atto647 mit dem 637 nm Diodenlaser bei einer Leistung von ebenfalls 50 μW . Die Konzentrationen der Probenlösungen betragen um die 10 pmol/l, die Messdauer eines einzelnen Messabschnitts betrug 200 Sekunden. Um die FRET-Effizienzen quantitativ richtig zu ermitteln, wurde der α -Faktor bestimmt, der die unterschiedlichen Detektionseffizienzen der zwei Detektionswege ins Verhältnis setzt. Die Unterschiede in den Detektionseffizienzen entstehen vorwiegend durch die voneinander abweichende Quantenausbeute der Farbstoffe, die unterschiedliche Reflektion/Transmission der eingesetzten dichroitischen Spiegel und die unterschiedliche Empfindlichkeit der Detektoren für die beiden spektralen Emissionsbereiche. Der α -Faktor lässt sich nach Lee et al. [28] aus Stöchiometrie und FRET-Effizienz der einzelnen Moleküle zweier Proben mit unterschiedlichem D/A-Abstand ermitteln. Setzt man die Photonenzahlen F der einzelnen Kanäle bei Vernachlässigung von spektralem Übersprechen und direkter Anregung

$$F_{Dem}^{Dex} = I_D \cdot \sigma_D \cdot Q_D \cdot \eta_D \cdot (1 - E) \quad (3.1)$$

$$F_{Aem}^{Dex} = I_D \cdot \sigma_D \cdot Q_A \cdot \eta_A \cdot E \quad (3.2)$$

$$F_{Aem}^{Aex} = I_A \cdot \sigma_A \cdot Q_A \cdot \eta_A \quad (3.3)$$

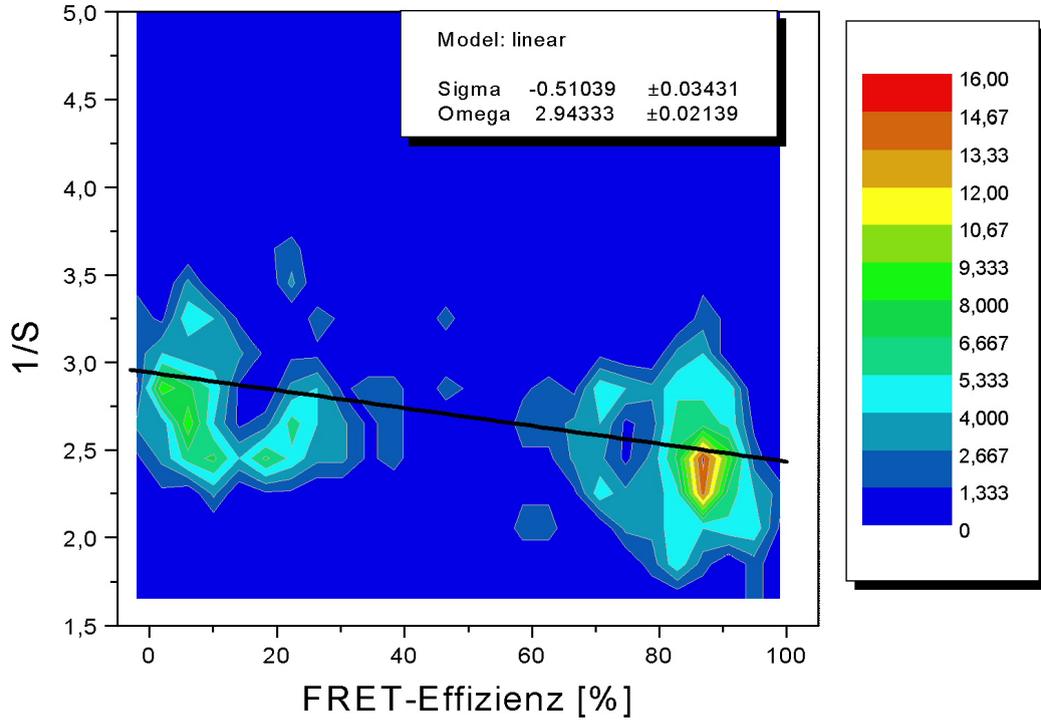


Abbildung 3.3: Kontur-Plot der Datenpunkte und Linearer Fit der Mittelwerte der Datenpunkte ($E, 1/S$) für die zwei untersuchten Proben

(mit der Anregungsintensität I_i , dem Extinktionskoeffizienten σ_1 , der Fluoreszenzquantenausbeute Q_i und der molekularen Helligkeit η_i für Donor D und Akzeptor A) und Gleichung 2.20 in Gleichung 2.19 ein, bekommt man für die Stöchiometrie

$$S = [1 + (\alpha - 1)E]/[1 + \alpha\beta + (\alpha - 1)E] \quad (3.4)$$

mit $\beta = I_A \cdot \sigma_A / I_D \cdot \sigma_D$. Setzt man die α -korrigierte FRET-Effizienz E mit der unkorrigierten Effizienz E_{PR} ins Verhältnis

$$E = E_{PR}/[\alpha - (\alpha - 1)E_{PR}] \quad (3.5)$$

und substituiert in Gleichung 3.4, ergibt sich für $1/S$ und E ein linearer Zusammenhang.

$$1/S = 1 + \alpha\beta + \beta(1 - \alpha)E_{PR} = \Omega + \Sigma E_{PR} \quad (3.6)$$

Ω entspricht dabei dem Schnittpunkt der Geraden bei $E=0$ und Σ ihrer Steigung.

Trägt man nun für mindestens zwei Proben $1/S$ gegen E_{PR} an, kann man β eliminieren und nach α auflösen:

$$\alpha = (\Omega - 1)/(\Omega + \Sigma - 1) \quad (3.7)$$

Abbildung 3.3 zeigt die angetragenen Messwerte für den Donor eYFP und Akzeptor Atto647. Für den Aufbau und die Farbstoffkombination Atto 647/eYFP ergibt sich

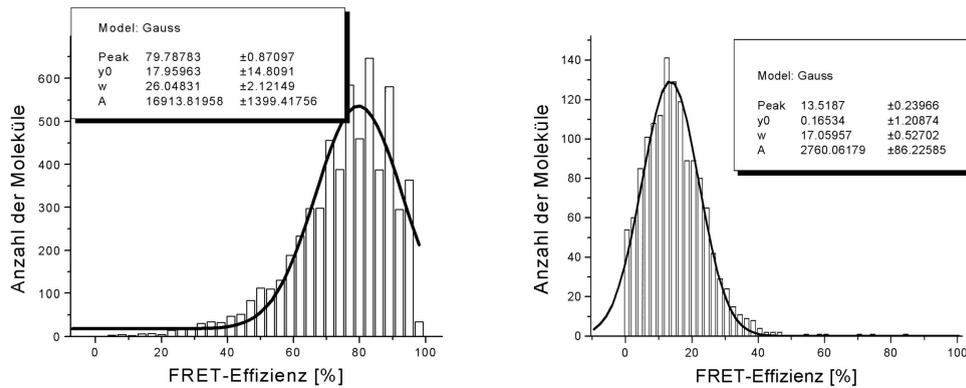


Abbildung 3.4: FRET-Effizienzen von Probe 1 (links) und Probe 2 (rechts)

ein α -Faktor von 1.33, was in diesem Fall bedeutet, dass die Anzahl der von eYFP emittierten Photonen mit 1.33 multipliziert werden muss, um das vom Einfluss der unterschiedlichen Detektionseffizienz bereinigte Verhältnis der Photonenzahlen zu erhalten. Das Ergebnis scheint realistisch, da der Bandpassfilter für eYFP einen schmalen Transmissionsbereich besitzt und deshalb nur ein geringerer Teil der eYFP Emission detektiert werden kann.

Bei Auswertung der Daten des DNA-Komplexes 1 mit einem D/A-Abstand von 11 Basenpaaren ergibt der Gauss-Fit ein Maximum bei einer FRET-Effizienz von 80% (siehe Abbildung 3.4 links). Für DNA-Komplex 2 erhält man 14 % (siehe Abbildung 3.4 rechts).

Für die Bestimmung des Förster Radius der Farbstoffkombination eYFP/Atto647 wurde das Emissionsspektrum von eYFP und das Absorptionsspektrum von Atto647 aufgezeichnet. Die nötigen Werte für den Extinktionskoeffizienten und das Absorptionsmaximum wurden aus den Datentabellen der Firma Attotec übernommen. Der Wert für die Fluoreszenzquantenausbeute von eYFP entstammt aus [35]. Die Berechnung des Radius erfolgte mit dem Programm PhotochemCad und ergibt 51.4 Å.

Daraus resultieren folgende Abstandsverteilungen mit den Maxima bei 42 Å (Probe 1, Abbildung 3.5 links) und 73 Å (Probe 2, Abbildung 3.5 rechts). Das Ergeb-

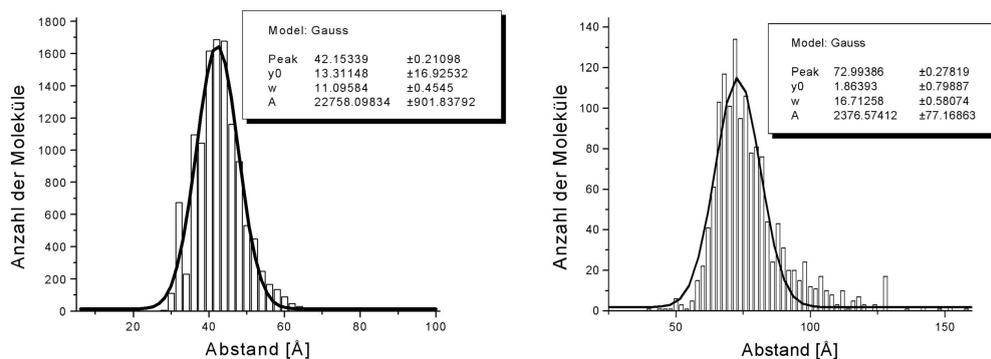


Abbildung 3.5: D/A-Abstände auf Probe 1 (links) und Probe 2 (rechts)

nis zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit den 38 \AA und mehr als 63 \AA , welche über den Basenabstand vorausgesagt wurden. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer Messungen haben sich in der Vergangenheit vornehmlich zur Bestimmung von Abstandsänderungen bewährt, da konkrete Abstandsmessungen vielen Einflussfaktoren unterliegen. Trotz dieser Tatsache und den oben genannten Unsicherheiten des D/A-Abstands ist erfreulich wenig Differenz zwischen Theorie und Messwerten auszumachen.

Die Kombination von DNA und fluoreszierendem Protein scheint also die in sie gesetzten Hoffnungen zu erfüllen. Eventuell stellt sie sogar einen geeigneten Bausatz für Anwendungen in der Photobioelektronik dar. Um die Eignung für diesen Einsatzbereich weiter zu verifizieren, besteht der nächste Schritt nun darin, analoge FRET Experimente mit einem photoschaltbaren Fluoreszenzprotein durchzuführen. Bei ersten Testmessungen mit e^2GFP stellte sich das Protein aber für Einzelmolekülmessungen als ungeeignet heraus, da es weder in genügendem Maße schaltbar ist, noch über eine ausreichende molekulare Helligkeit verfügt. Dennoch ist durch die stetige Weiterentwicklung der fluoreszierenden Proteine in Kürze ein geeigneteres photoschaltbares Protein zu erwarten, das steuerbaren FRET auf DNA-Drähten ermöglicht und den Weg für bioelektronische Bauteile ebnet.

4. Projekt B: 3-Farben Fluoreszenz-Resonanz-Energie- Transfer

Das Hauptprojekt dieser Arbeit befasst sich mit der Etablierung einer Methode, die 3-Farben FRET Messungen von einzelnen Molekülen zulässt. Mit der Kombination von Burst Analysis und Pulsed Interleaved Excitation soll an einem linearen und einem Y-förmigen DNA-Komplex gezeigt werden, dass in einer Messung die Distanzen zwischen drei Fluoreszenzmarkern auf einem Molekül bestimmt werden können und die FRET-Effizienzen mit denen aus separaten 2-Farben Experimenten übereinstimmen.

4.1 DNA-Lineal

Bei 2-Farben FRET Experimenten haben sich lineare DNA-Doppelstrang Komplexe als gute Träger für Fluoreszenzmarker bewährt. Zum Einen zeigen sie sich unter vielen verschiedenen Bedingungen stabil und haben eine ausreichende Persistenzlänge, zum Anderen lassen sich mit der Hybridisierung von Einzelsträngen und der Variation der Labelpositionen an den Strängen gezielt eine große Anzahl von Farbstoffabständen erreichen. Aus diesen Gründen wurden auch für die dreifarbigem Experimente solche DNA Lineale verwendet und die FRET-Effizienzen zweier 3-fach markierter DNA-Doppelstränge ermittelt. Beide hatten insgesamt eine Länge von 82 Basenpaaren. Abbildung 4.1 verdeutlicht den Aufbau von DNA 1 und DNA 2.

Die Synthetisierung der DNA-Einzelstränge und die Vorbereitung für das Labelling wurde im Institut für Polymerphysik der Universität Ulm durchgeführt. Das Labeln erfolgte im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried nach folgender Vorgehensweise: Um fehlerhaft synthetisierte DNA-Fragmente zu entfernen, werden die einzelnen Stränge vor dem Labelprozess mit der Hochleistung-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) aufgereinigt. Da dieser Prozess die Probe stark verdünnt, muss die DNA nach der Aufreinigung durch Zentrifugation ausgefällt werden. Daraufhin werden die Farbstoffe Atto488, Atto565 und Atto700 an die in Abbildung 4.1 gezeigten Positionen über eine NHS-Esterbindung kovalent gebunden. Dies geschieht

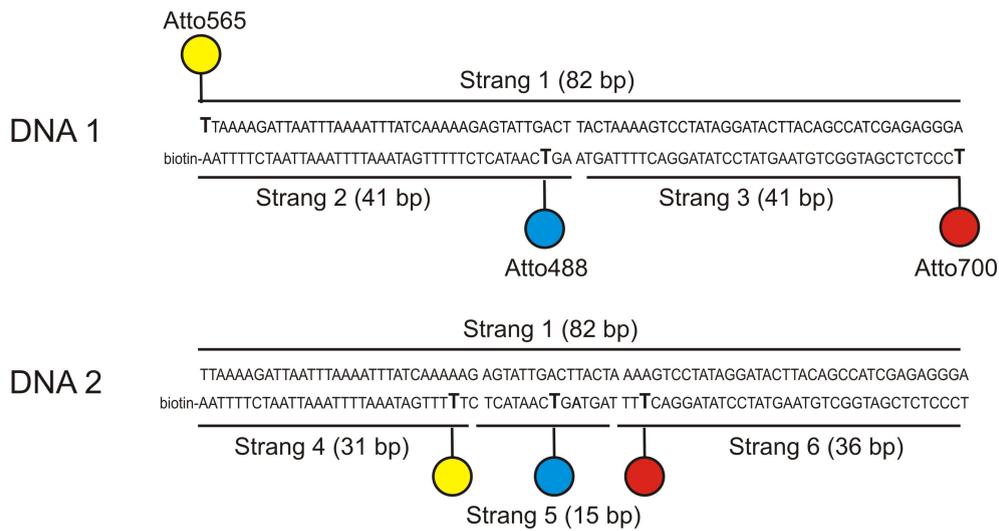


Abbildung 4.1: *Struktur und Sequenz der Proben DNA 1 und DNA 2*

durch einfache Zugabe eines Überschusses des jeweiligen Farbstoffs. Die Reaktion hat dabei genau unter den in der Labelvorschrift der Firma Attotec genannten Bedingungen zu erfolgen. Nach der Markierung muss der überschüssige freie Farbstoff und ungelabelte DNA aus der Probe entfernt werden. Aus diesem Grund reinigt man die Probe erneut mit der HPLC auf und zentrifugiert die nun gelabelten DNA-Einzelstränge ab. Die Hybridisierung und Ligation der einzelnen Stränge zu den in Abbildung 4.1 gezeigten Doppelsträngen wurde analog zu Projekt A durchgeführt. Die Ligation ist auch hier nicht zu umgehen, da vor allem Strang 5 mit 15 Basen sehr kurz ist.

Die nachfolgenden Messungen wurden allesamt bei den Laserleistungen Laser 1 ($\lambda=470$ nm) $70 \mu W$, Laser 2 ($\lambda=568$ nm) $70 \mu W$ und Laser 3 ($\lambda=690$ nm) $100 \mu W$ durchgeführt. Die Konzentrationen wurden individuell den Zählraten und der Trennbarkeit der Bursts im Histogramm des Intensitätssignals angepasst und befanden sich alle im Bereich zwischen 5 und 20 pmol/l.

Für die Farbstoffkombination Atto488/Atto565/Atto700 war es wie im Projekt A notwendig die α -Faktoren zu bestimmen. Dazu wurden zwei mit Atto488 und Atto700 markierte DNA-Lineale mit verschiedenen D/A-Abständen (41 und 10 Basenpaare) untersucht. Die zwei Proben basieren auf den beiden 3-Farben FRET Komplexen DNA 1 und DNA 2. DNA 1 wurde für die Bestimmung des α -Faktors mit einem ungelabelten Strang 1, DNA 2 mit einem ungelabelten Strang 4 (siehe Abbildung 4.1) hybridisiert. Der Faktor für Atto565/Atto700 konnte direkt aus dem Messabschnitt der 3-fach FRET Proben mit der Anregungslinie 568 nm ermittelt werden, da hier ein reiner 2-Farben Transfer stattfindet. Die α -Faktoren wurden relativ zur Detektionseffizienz vom Strahlengang 2 (Atto565) berechnet. Sie betragen 1.38 für Detektionsstrahlengang 1 (Atto488) und 2.02 für Strahlengang 3. Des Weiteren wurden die Förster-Radien der Farbstoffkombination ermittelt. Die dazu benötigten Absorptions- und Emissionspektren entstammen eigenen Messungen. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm PhotochemCad. Es ergeben sich Förster-Radien von 65.8 \AA (Atto488/Atto565), 65.2 \AA (Atto565/Atto700) und 41.4 \AA (Atto488/Atto700).

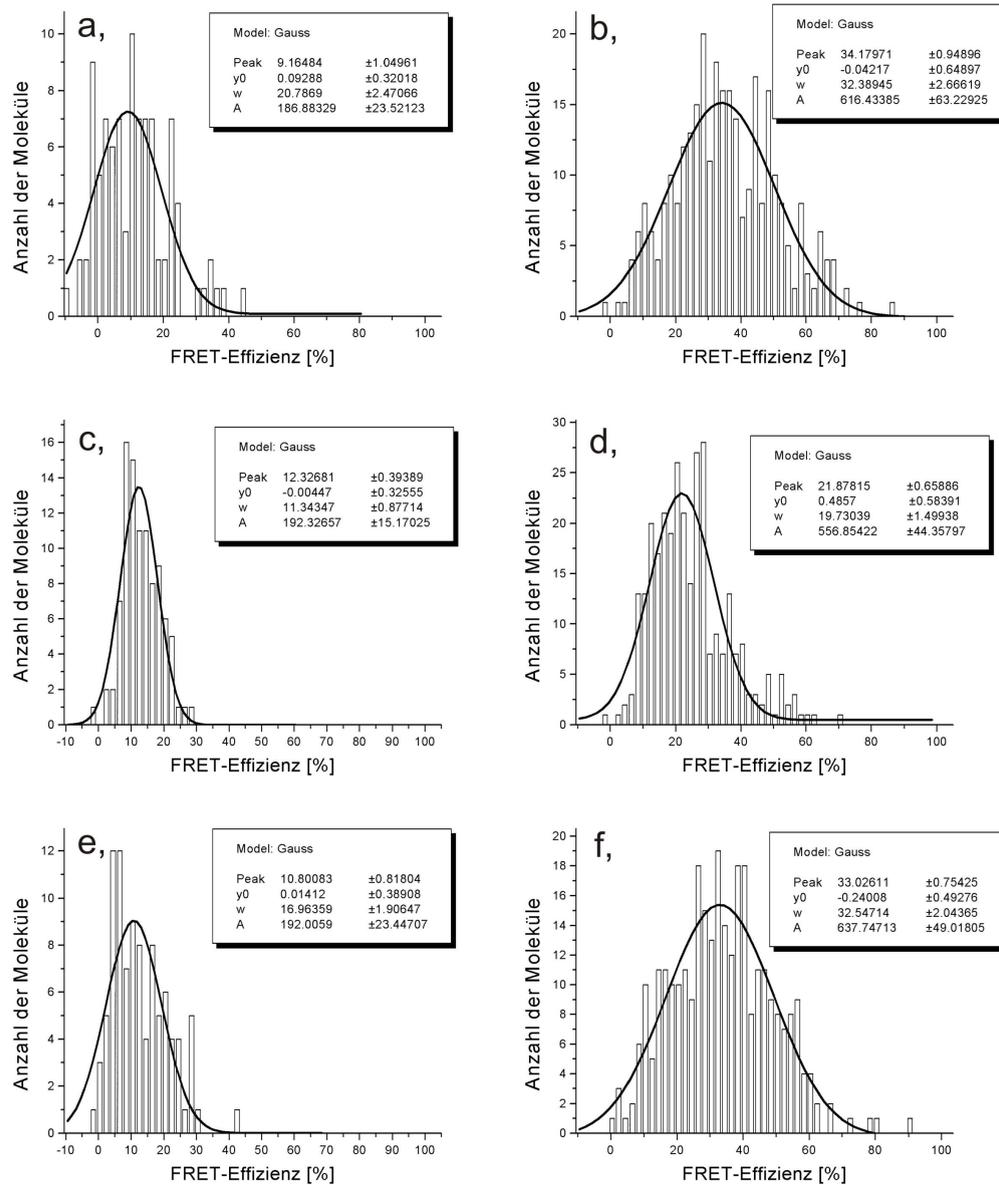


Abbildung 4.2: Vergleich der FRET-Effizienzen von DNA 1 (a, c, e) und DNA 2 (b, d, f). a und b zeigen die Effizienzen des Transfers Atto488-Atto565, c und d Atto565-Atto700, e und f Atto488-Atto700

Die bestimmten Korrekturfaktoren und die Förster-Radien erlauben nun die Auswertung der 3-Farben FRET Messungen. Wie in Abbildung 4.1 ersichtlich, trennen die Fluorophore Atto488 und Atto700, sowie Atto488 und Atto565 in DNA 1 jeweils 41 Basenpaare. Der Abstand zwischen Atto565 und Atto700 beträgt 82 Basenpaare. Die Umwandlung der Basenabstände in Distanzen ergibt ohne die Berücksichtigung der Orientierung der Fluoreszenzmarker auf der Doppelhelix 140 Å und 280 Å. DNA 2 weist bei gleicher Markerreihenfolge Abstände von zwei mal 10 und ein mal 20 Basenpaaren auf. Die Umrechnung ergibt für diesen Komplex Distanzen von 34 Å und 68 Å. Da 10 Basenpaare einer Helixwindung entsprechen, sollten sich hier die Orientierungen der Farbstoffe auf der Doppelhelix nicht unterscheiden. Bei den errechneten Förster-Radien ist bei DNA 1 zwischen allen Farbstoffen kein Resonanz-

Energie-Transfer zu erwarten. Ganz anders stellt sich die Situation von DNA 2 dar. Hier sind die Abstände so kurz, dass ausnahmslos relativ hohe FRET-Effizienzen zu erwarten sind, ca. 98 % bei Atto488/Atto565, 44 % bei Atto565/Atto700 und 76 % bei Atto488/Atto700. Aus den Messdaten ergeben sich die in Abbildung 4.2 gezeigten Verteilungen.

Der Vergleich von DNA 1 und DNA 2 zeigt die zu erwartende klare Tendenz steigender FRET-Effizienzen (Abbildung 4.2). Die Donor/Akzeptor-Abstände aus der Umrechnung der FRET-Effizienzen stimmen allerdings nicht mit den aus dem Wissen über die DNA-Struktur [2] gewonnenen theoretischen Werten überein. Der Fehler scheint aber nicht im Auswertungsprinzip für 3-fach FRET zu liegen, welches in dieser Arbeit vorgestellt wird. Die FRET-Effizienzen von Atto565 und Atto700 liegen sowohl bei DNA 2 als auch DNA 2 ohne Atto565 Label weit unter dem erwarteten Wert. Im zweiten Fall handelt sich hier um einen reinen 2-Farben Resonanz-Energie-Transfer, welcher mit dem im Theorieteil beschriebenen, etablierten Algorithmus [25] ausgewertet wird, der sich bereits im Projekt A bewährt hat.

Der Vergleich mit FRET-Effizienzen aus 2-Farben Messungen soll nun das Funktionsprinzip vom 3-Farben Resonanz-Energie-Transfer untermauern. Die Daten des 2-Farben FRET entstammen der erneuten, jetzt α -korrigierten, Auswertung der nur mit Atto488 und Atto 700 markierten Proben.

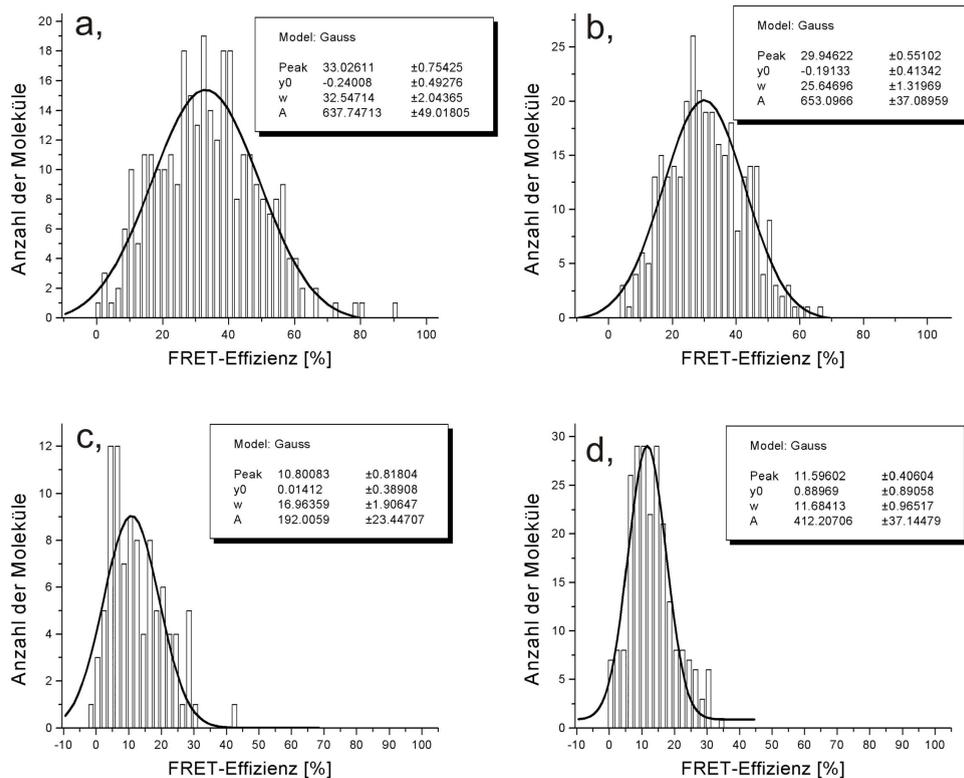


Abbildung 4.3: Vergleich der FRET-Effizienzen des Transfers Atto488-Atto700 für die 3-Farben Proben (links, (a) DNA 1, (c) DNA 2) und die 2-Farben FRET Proben (rechts, (b) modifizierte DNA 1, (d) modifizierte DNA 2)

Die Daten des konventionellen 2-Farben FRETs stimmen bei beiden Proben sehr gut mit den 3-Farben Experimenten überein (Abbildung 4.3). Dies bestätigt das

Prinzip des 3-Farben Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers mit gepulster Anregung und macht es zu einer zukunftssträchtigen Methode in der Fluoreszenzspektroskopie. Dass die FRET-Effizienzen bei der 2-Farben Messung ebenfalls deutlich unter den theoretisch erwarteten Werten liegen, zeigt die Tendenz für den Aufbau zu zu niedrigen FRET-Effizienzen. Eine mögliche Ursache liegt in Unsicherheiten bei der Bestimmung der α -Faktoren, deren Werte durch Referenzmessungen bestätigt werden müssen. In diesem Zusammenhang gilt es, gezielt die Detektionseffizienz der einzelnen Strahlengänge zu verbessern und Proben mit deutlicher voneinander abweichender FRET-Effizienz zu untersuchen, um klarere Statistiken bei der Bestimmung der Korrekturfaktoren zu erhalten. Eine weitere Unsicherheit stellt die Größe der Fokalvolumina dar. Die Volumina wurden zwar diesbezüglich aufeinander abgestimmt, dennoch zeigen FCS-Messungen, dass das Anregungsvolumen des 470 nm Lasers im Vergleich zu den Anderen deutlich kleiner ist. Damit wird es schwer möglich, den Bin für die Burst Analysis auf die Diffusionszeiten der Moleküle durch die Fokalvolumen abzustimmen, da die Diffusionszeiten der einzelnen Moleküle zu stark differieren.

4.2 Y-DNA

In diesem Teilprojekt wurden mit der 3-Farben FRET Methode zwei nichtlineare DNA-Komplexe untersucht. Im Gegensatz zu den Experimenten in Abschnitt 4.1 soll die hier gewählte 2-dimensionale Anordnung der Farbstoffe die neue Methode weiter untermauern.

Die Fluorophore befinden sich, wie in Abbildung 4.4 gezeigt, auf Y-förmigen Komplexen, die jeweils aus drei DNA-Einzelsträngen aufgebaut sind. Sie wurden allesamt aus den Strängen h, r und x nach dem Schema aus Projekt A hybridisiert. Der Unterschied der zwei Proben liegt in der veränderten Position des Atto700 Labels.

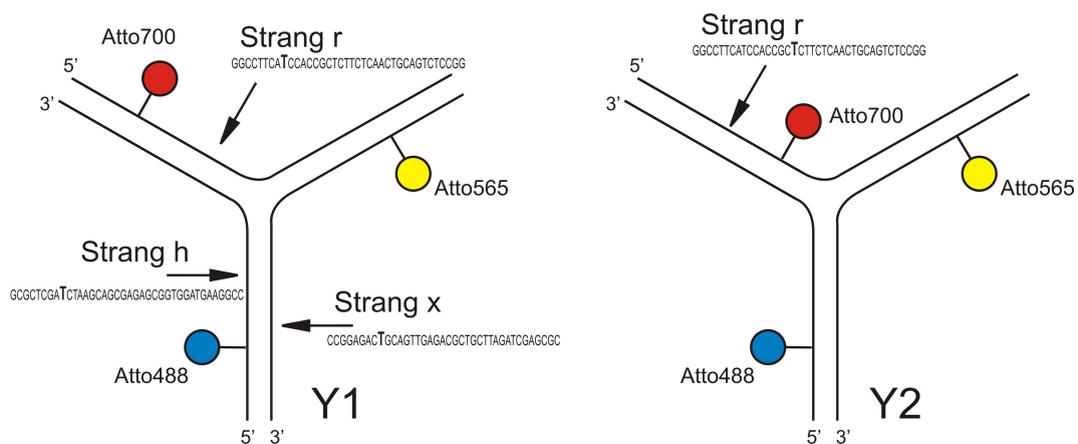


Abbildung 4.4: Aufbau und Sequenz der Y-DNA Proben

Bei Y1 trennen alle Farbstoffpaare genau 21 Basen. Dies entspricht einem linearen Abstand von 72 Å. Bei Y2 wird das Atto700 Label so verschoben, dass die Paare Atto565/Atto700 und Atto488/Atto700 einen Abstand von 13 Basen, umgerechnet 48 Å, aufweisen. Die Distanz zwischen Atto488 und Atto565 bleibt gleich. Es bleibt zu beachten, dass sich alle Abstände leicht verkürzen sollten, da die Struktur zwischen den Armen des Y geknickt ist. Die unterschiedliche Ausrichtung der Labels

auf der DNA-Helix und die abweichende Anordnung der Basen im Kreuzungspunkt der Arme sollten die Abstände zwischen den Labels wiederum größer werden lassen. Zieht man diese Unsicherheiten in Betracht, wird deutlich, dass die oben genannten Längenangaben höchstens Richtwerte darstellen.

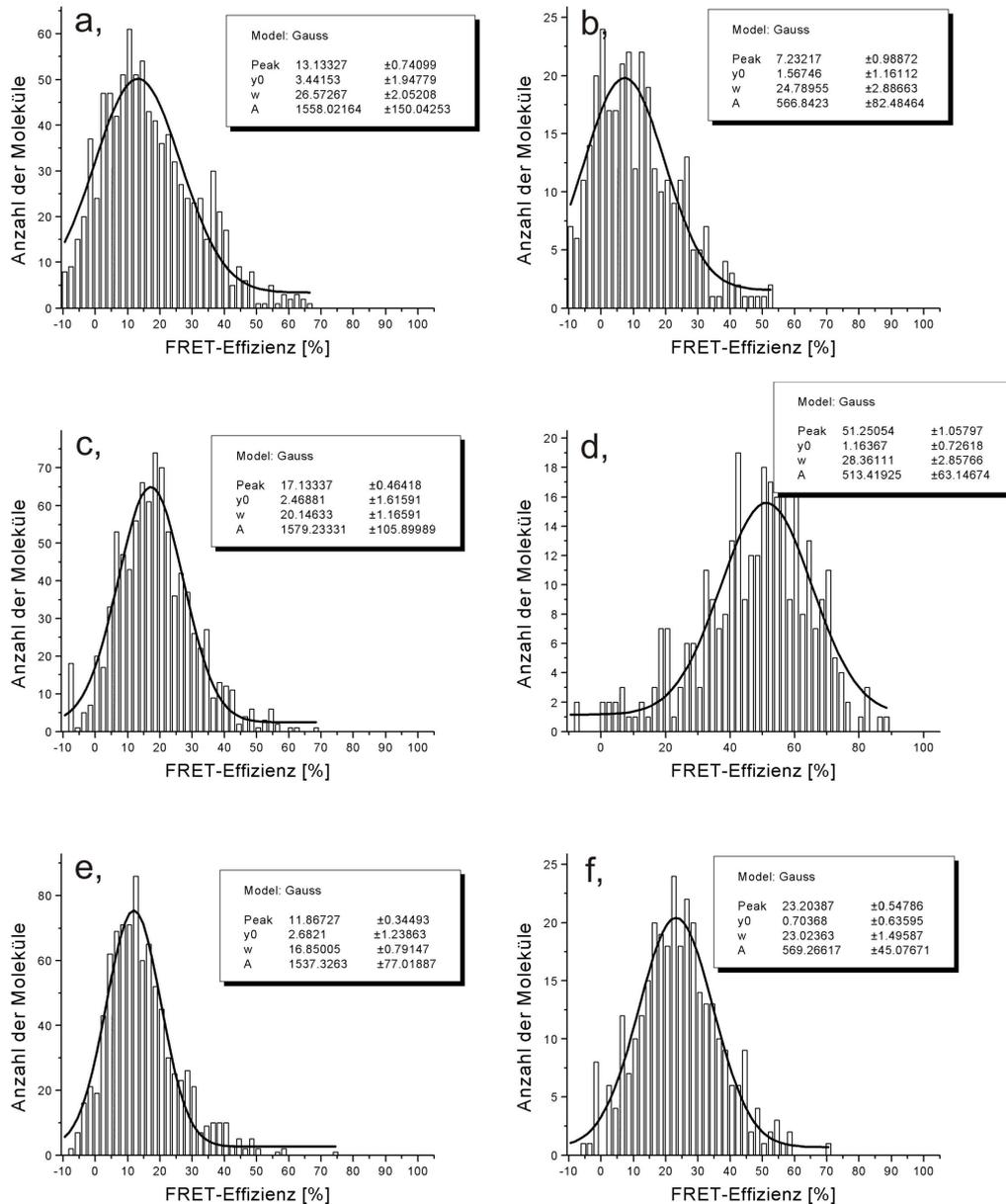


Abbildung 4.5: Vergleich der FRET-Effizienzen von Y1 (a, c, e) und Y2 (b, d, f). a und b zeigen die Effizienzen des Transfers Atto488-Atto565, c und d Atto565-Atto700, e und f Atto488-Atto700.

Die Ergebnisse der 3-Farben FRET Messungen für Y1 und Y2 sind in Abbildung 4.5 aufgeführt. Wie zu erwarten, zeigt Y2 im Vergleich zu Y1 deutlich erhöhte FRET-Effizienzen der Paare Atto488/Atto700 und Atto565/Atto700. Der Wert für die Kombination Atto488/Atto565 bleibt annähernd gleich. Die Methode weist die Veränderung der Position des Atto700 Markers sehr schön nach. Der Vergleich der

theoretischen Werte der FRET-Effizienzen mit der Praxis ist ähnlich wie in Projekt B zu bewerten. 72 Å ergibt theoretisch folgende Effizienzen: für Atto488/Atto565 37 %, Atto565/Atto700 36 %, Atto488/Atto700 4 %. 48 Å errechnet sich zu FRET-Effizienzen von 91 % Atto565/Atto700 und 41 % Atto488/Atto700. Die gemessenen Werte sind, wie in Projekt B, tendenziell zu niedrig, wobei zu beachten ist, dass der Vergleich mit den theoretischen Richtwerten aus den oben genannten Gründen nur bedingt aussagekräftig ist.

Die Fortsetzung dieses Projekts verfolgt das Ziel, die strukturelle Veränderung eines DNA-Doppelstrangs beim Andocken eines Proteins zu untersuchen. Gerade bei der Proteinexpression sind zahlreiche Prozesse bekannt, bei denen Proteine an DNA binden. Ein Beispiel zeigt Abbildung 4.6 mit der Bindung des Lac-Repressors an DNA.

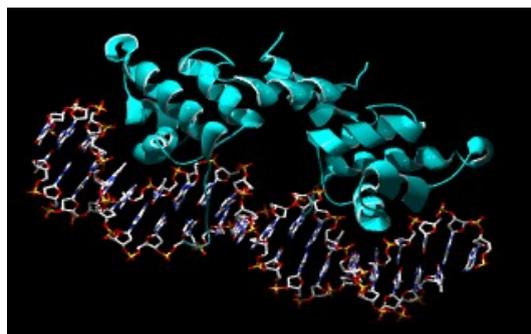


Abbildung 4.6: *Struktur des Lac-Repressors (blau) bei der Bindung an DNA (entnommen aus www.wiley.com)*

Da sowohl ein Verbiegen als auch die Torsion des DNA-Strangs denkbar ist, sollen die 3-Farben FRET Experimente mit zwei Proben erfolgen. Die DNA-Konstrukte mit der Bindungssequenz für die Proteine bauen auf den untersuchten Y-DNA-Komplexen auf; zwei solcher Y-DNAs werden verbunden und bilden die in Abbildung 4.7 gezeigte Struktur.

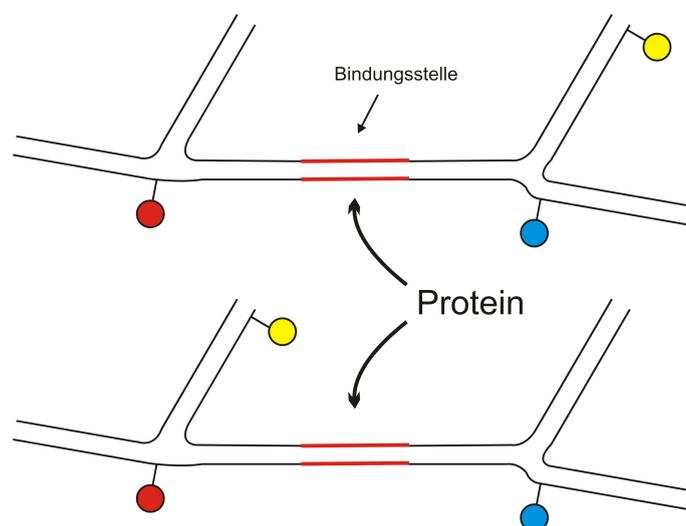


Abbildung 4.7: *Aufbau der Proben zur Untersuchung der Strukturänderung von DNA beim Binden eines Proteins*

5. Projekt C: Wirkungsweise von PEI als künstlicher Virus

In diesem Kapitel wird ein Projekt mit ersten Messergebnissen vorgestellt, in dem die Funktion von Polyethylenimin (PEI) als künstlicher Virus untersucht wird.

Neben den Experimenten mit adenoviralen und retroviralen Vektoren zur Übertragung des Erbguts in den Zellkern haben sich in der Gentherapieforschung auch künstliche Viren als brauchbare Trägermedien etabliert. Die Vorteile solcher künstlichen Vektoren liegen in der einfachen Manipulierbarkeit, ihrer Stabilität, den geringen Kosten, ihrer Sicherheit und dem breiten Einsatzbereich. Polyethylenimin ist für den *in vitro* Gentransport bereits ein effizienter und vielseitig einsetzbarer Vektor. Auch *in vivo* wurden schon Erfolge bei der Expression von Fremd-DNA in Lungenzellen erzielt [23], PEI zählt daher zu den aussichtsreichsten Kandidaten im Bereich der künstlichen Viren.

Das Prinzip des DNA-Transports hat man sich folgendermaßen vorzustellen: Das PEI-Konstrukt muss von der Zelle aufgenommen werden können und die einzuschleusende DNA vor Beschädigung oder Abbau schützen. Dies wird erreicht, indem PEI und DNA, wie in Abbildung 5.1 gezeigt, auf Grund ihrer elektrostatischen Anziehung einen gemeinsamen Komplex bilden, die DNA am PEI kondensiert. In der Zelle trennen sich PEI und DNA entweder im Zytosol und die kondensierte DNA dringt allein in den Zellkern ein [18] oder der ganze Komplex dringt in den Kern ein und löst sich dort auf [17]. Beide Möglichkeiten lassen für die Separation der DNA vom PEI die Theorie einer elektrostatisch generierten Verdrängungsreaktion der DNA durch die in der Zelle vorhandene RNA zu. Diese zu untersuchende Verdrängungsreaktion kann folgenden Mechanismen unterliegen:

- Der Polyplex wird nach und nach durch die RNA/PEI Bindung abgeschält
- Vorerst bildet sich ein Polyplex aus allen drei Komponenten. Die RNA wirkt dann als Lösungsmittel
- Spontane Trennung von DNA und PEI, um die bevorzugte Bindungsreaktion zwischen RNA und PEI zu ermöglichen

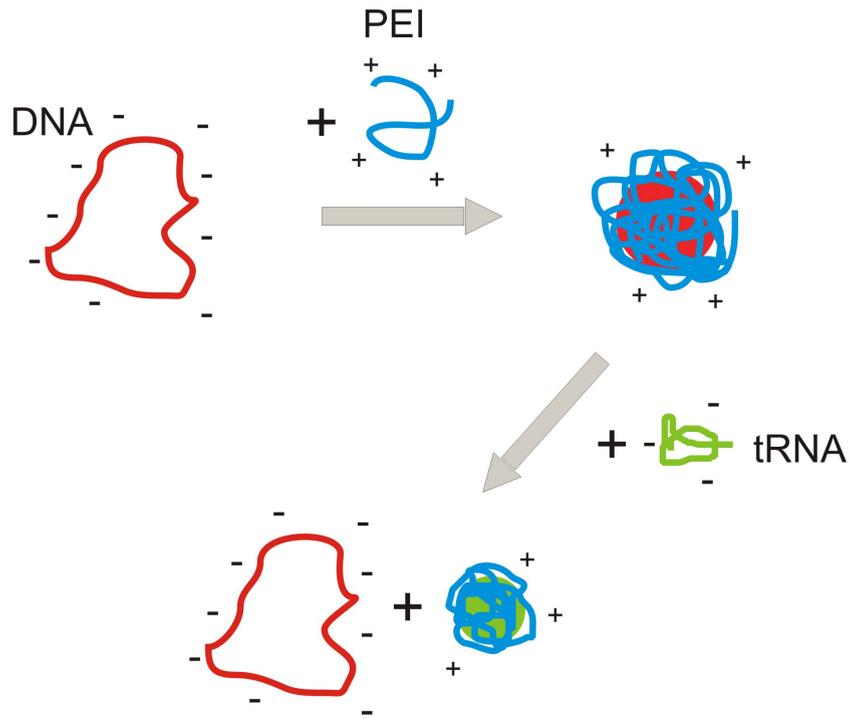


Abbildung 5.1: Schema der Verbindung von DNA und PEI zu einem Polyplex und der elektrostatischen Verdrängungsreaktion der DNA durch RNA

Die Ergebnisse der ersten einfarbigen FCS Testmessungen mit dem DNA Plasmid pcLUC (7.6 kbp, markiert mit Alexa532) und tRNA (37-47 bp, markiert mit Alexa647) veranschaulicht Abbildung 5.2. Es wurden die Autokorrelation von DNA (links) bzw. tRNA (rechts) vor und nach Zugabe von PEI verglichen. Das Verhältnis der Anzahl positiver zu negativer Ladungen, das so genannte N/P-Verhältnis, betrug nach Zugabe von PEI jeweils 5. Die Messdauer musste nach der Zugabe von PEI von 100 Sekunden auf 10 Minuten verlängert werden, da die Korrelation einzelner DNA bzw. RNA Stränge von der Korrelation extrem selten auftretender Bursts der zu beobachtenden Polyplexe überlagert werden soll. Es zeigt sich in beiden Messungen eine deutliche Zunahme der Amplitude und der Diffusionszeit durch

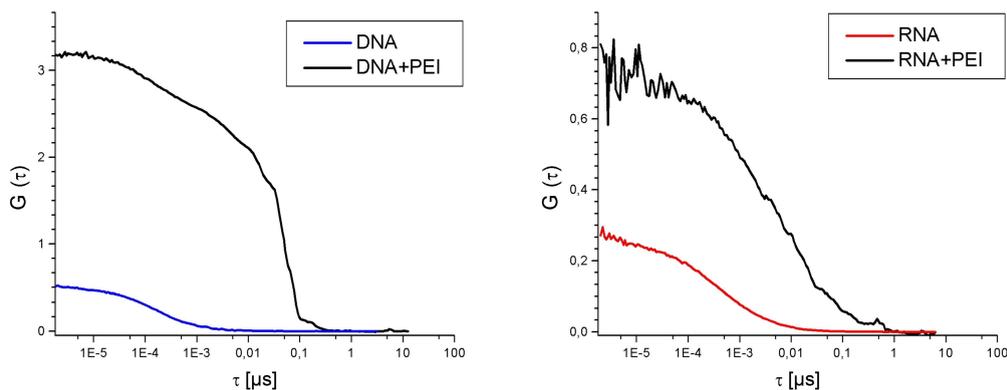


Abbildung 5.2: Autokorrelationskurven von DNA (links) und RNA (rechts) vor und nach Zugabe von PEI

das Messvolumen. Das bedeutet, dass eine geringere Anzahl von erheblich größeren fluoreszenzmarkierten Teilchen detektiert wird, was auf die Bildung von Polyplexen aus DNA/PEI bzw. RNA/PEI schließen lässt. Des Weiteren weist die im Vergleich zur DNA sehr lange Diffusionszeit von reiner tRNA auf die Aggregation mehrerer tRNA Stränge schon vor der Zugabe von PEI hin. Eine detailliertere Untersuchung der Interaktion war an dieser Stelle nicht möglich, da sich das Label auf dem PEI, Atto390, als zu fluoreszenzschwach herausstellte und die vielen Spezies in der Probenlösung quantitative Aussagen aus den FCS-Kurven nicht zuließen.

Die genaue Untersuchung des Zusammenhangs DNA/RNA/PEI soll nun der konfokale 3-Farben Fluoreszenzspektroskopie-Aufbau mit der Farbkombination Atto488/Atto565/Atto700 bewerkstelligen. Die Markierung jeder Reaktionskomponente ist dann von enormen Vorteil. So ist es möglich die Stöchiometrien des 3-Farben DNA/PEI/RNA Systems zu ermitteln.

$$S_1 = \frac{\alpha_1 \cdot F_{1em}^{1ex} + F_{2em}^{1ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{1ex}}{\alpha_1 \cdot F_{1em}^{1ex} + F_{2em}^{1ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{1ex} + F_{2em}^{2ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{2ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{3ex}} \quad (5.1)$$

$$S_2 = \frac{F_{2em}^{2ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{2ex}}{\alpha_1 \cdot F_{1em}^{1ex} + F_{2em}^{1ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{1ex} + F_{2em}^{2ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{2ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{3ex}} \quad (5.2)$$

$$S_3 = \frac{\alpha_3 \cdot F_{3em}^{3ex}}{\alpha_1 \cdot F_{1em}^{1ex} + F_{2em}^{1ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{1ex} + F_{2em}^{2ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{2ex} + \alpha_3 \cdot F_{3em}^{3ex}} \quad (5.3)$$

Der Verlauf der Änderung der Stöchiometrie gibt, wie in Abbildung 5.3 schematisch gezeigt, Auskunft, welcher der Mechanismen der elektrostatischen Verdrängungsreaktion von DNA durch RNA aus obiger Aufzählung vorliegt. Im Fokus steht dabei das mit Farbstoff 1 markierte PEI. Tritt nach und nach eine Abschälung der DNA (Farbstoff 2) durch einzelne RNA Stränge (Farbstoff 3) auf, verschiebt sich die Verteilung der Stöchiometrien der Komplexe mit PEI-Anteil Schritt für Schritt aus der S_1/S_2 -Ebene in die S_1/S_3 -Ebene (Abbildung 5.3 links). Bildet sich relativ schnell ein Polyplex aus allen 3 Komponenten, aus dem dann die DNA gelöst wird, nimmt die Stöchiometrieverteilung abrupt eine Stellung in der Mitte des Raumes ein, woraufhin sie sich nach einer gewissen Zeit in Richtung S_1/S_3 -Ebene bewegt (Abbildung 5.3 mitte). Löst sich der PEI/DNA-Komplex vollkommen auf bevor die RNA sich mit

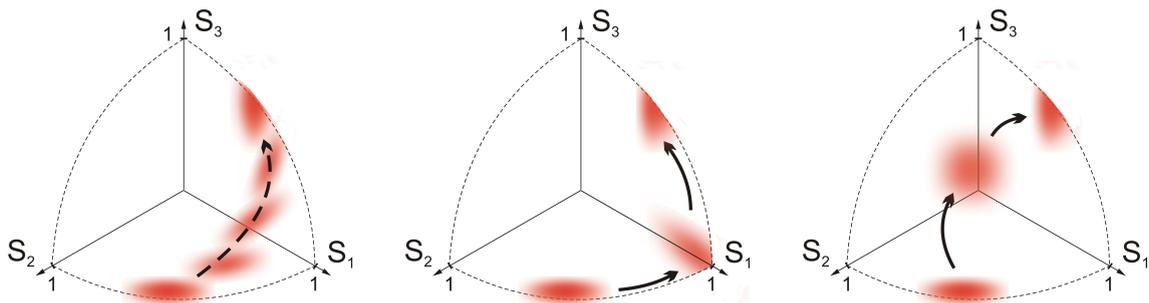


Abbildung 5.3: *Schema der Änderung der Stöchiometrieverteilung für die Möglichkeiten der Verdrängungsreaktion von DNA durch RNA: Abschälen des Polyplex (links), 3-komponentiger Polyplex (mitte) und spontane Trennung von DNA und PEI (rechts)*

dem PEI verbindet, zeigt sich die Verteilung zwischen Anfangs- und Endstadium auf der S_1 -Achse, da PEI isoliert vorliegt (Abbildung 5.3 rechts).

Aus dem Schema wird ersichtlich, dass sich mit der Bestimmung der Stöchiometrien zu verschiedenen Zeiten nicht nur der Mechanismus der Verdrängungsreaktion untersucht werden kann, sondern auch deren zeitliche Abfolge.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine vorhandene 2-Farben Fluoreszenzspektroskopie-Apparatur auf drei Farben ausgebaut. Die Untersuchung biologischer Vorgänge mit der Möglichkeit, drei Komponenten fluoreszent zu markieren, soll tiefere Einblicke in die ablaufenden Mechanismen gewinnen lassen, da sich die Interpretation der Messwerte vielkomponentiger Reaktionen mit jeder zusätzlich detektierbaren Komponente erheblich erleichtert.

Die Apparatur sollte möglichst flexibel gehalten werden und ein breites Spektrum an Techniken der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie abdecken. Die Integration extrem kurz gepulster Anregungslaser in den 3-Farben Aufbau ermöglicht diese Variabilität. Mit dem Prinzip der Pulsed Interleaved Excitation, der alternierenden Anregung der Fluoreszenzmoleküle mit einer Frequenz von bis zu 10 MHz und einer Pulsbreite von unter eine Nanosekunde, gelingt es, sowohl den Informationsgehalt aus Burst Analysis als auch jenen aus der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zu vergrößern. In Kombination mit Pulsed Interleaved Excitation ermöglicht die Burst Analysis, FRET-Effizienzen von ausschließlich mehrfach markierten Molekülen und die Stöchiometrie der Probenzusammensetzung zu bestimmen. Besonders die Stöchiometrie erweitert den Einsatzbereich der Burst Analysis, da somit auch Reaktionsabläufe und -kinetiken quantitativ untersucht werden können. Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wird durch PIE um eine Methode zur Bestimmung von FRET-Effizienzen und der Reduktion des spektralen Übersprechens ergänzt. Mit der Entwicklung gepulster Laser im grünen Spektralbereich sollte sich der Informationsgehalt der beiden Methoden nochmals erhöhen, da dann die Lebensdauern aller Fluorophore bestimmt werden können. Aus den Lebensdauern können dann beispielsweise FRET-Effizienzen bestimmt und mit den Effizienzen aus Burst Analysis verglichen werden.

Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers zwischen drei Fluorophoren. Die Ermittlung von drei FRET-Effizienzen und damit die 2-dimensionale geometrische Anordnung der Marker in einer Messung bringt einige Vorteile mit sich. Erstens spart der Experimentator viel Zeit, da sich zahlreiche Labelprozeduren und Messzyklen erübrigen. Zweitens gewinnt man die Sicherheit, dass die Bedingungen, unter denen die

Messung stattfindet, nicht voneinander abweichen, was ansonsten bei der Untersuchung biologischer Essays oft zu Problemen führt. Und drittens vergrößert sich der Längenbereich für Abstandsmessungen auf das Doppelte.

Die vorgestellte Methode basiert auf der Burst Analysis mit Pulsed Interleaved Excitation. Das durch PIE ermöglichte Zurückführen der Fluoreszenzphotonen auf den Anregungspuls und die alternierende separate Anregung aller Farbstoffe lässt es zu, in der Auswertung die 3-fach markierten Moleküle zu separieren und dann mit dem erstellten Algorithmus zu analysieren. Darüberhinaus erlaubt PIE, auf die in den bisherigen 3-Farben FRET Experimenten nötige zusätzliche Bestimmung einer FRET-Effizienz mit 2-Farben Transfer zu verzichten.

In der Vorarbeit zur Umstrukturierung des Aufbaus wurde ein 2-Farben Projekt abgeschlossen, das das Potenzial der Burst Analysis mit PIE zeigt. Es wurden zwei lineare DNA-Doppelstränge untersucht, die mit einem synthetischen Fluorophor und einem Fluoreszenzprotein markiert waren. Ähnliche Konstrukte, sogenannte molekulare Drähte, sollen die Zukunft der Bioelektronik darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass sich Fluoreszenzproteine sehr gut zur Anordnung auf DNA-Strukturen eignen und sie vor allem als schaltbare Proteine eine große Perspektive für zukünftige Anwendungen haben. Der Vergleich der theoretisch aus der DNA-Struktur berechneten FRET-Effizienzen mit den gemessenen Werten zeigte eine äußerst hohe Übereinstimmung.

In den anschließenden ersten 3-Farben Messungen konnte mit zwei 3-fach markierten DNA-Linealen das vorgestellte Messprinzip getestet werden. Die beiden DNA-Lineale unterschieden sich durch deutlich veränderte Farbstoffabstände. Dabei zeigte sich eine klare Unterscheidbarkeit der beiden DNA-Komplexe mit der Tendenz zu zu kleinen FRET-Effizienzen. Der Vergleich mit zusätzlich durchgeführten 2-Farben Experimenten brachte sehr gut übereinstimmende Werte, was mit Blick auf die zu niedrigen FRET-Effizienzen entweder auf Fehler in den Korrekturfaktoren für die unterschiedlichen Detektionseffizienzen, oder auf eine abweichende Anordnung der Marker hindeutet. Vor allem der Vergleich 2-Farben FRET mit 3-Farben FRET lässt den Schluss zu, dass die Methode in der Zukunft die konfokale Fluoreszenzspektroskopie entscheidend bereichern wird.

Ein weiteres Teilprojekt sollte die vorgestellte Methode an einem nichtlinearen DNA-Komplex verifizieren. Dazu wurden zwei Y-förmige DNA-Strukturen hybridisiert, die mit je einem Fluoreszenzmarker an jedem Arm der Struktur gelabelt waren. Die zwei Proben unterschieden sich durch einen in Komplex 2 verkürzten Abstand des roten Farbstoffs Atto700 zu den restlichen Markern. Die Experimente ergaben die erwartete Zunahme der FRET-Effizienzen der Farbstoffpaare mit Beteiligung von Atto700. Die FRET-Effizienzen des nicht veränderten Farbstoffpaares blieben wie erwartet gleich. Die Experimente bestätigen die Ergebnisse aus den Experimenten mit der linearen DNA und zeigen, dass die Auswertung des 3-Farben FRETs systematisch richtige Ergebnisse liefert.

Im letzten Projekt wurden erste Untersuchungen der Interaktion von DNA und RNA mit PEI und damit der Funktionsweise als künstlicher Virus durchgeführt. Dabei konnte die Bildung von DNA/PEI und RNA/PEI Polyplexen bewiesen werden. Darüber hinaus wurde eine Methode vorgestellt, die mit der 3-Farben Auswertung der Stöchiometrieinformation der Polyplexe den elektrostatischen Verdrängungsmechanismus von DNA durch RNA aufklären soll.

Mittel- und langfristig erschließen sich für den hier vorgestellten Aufbau zahlreiche Folgeprojekte. Die äußerst interessante Wechselwirkung zwischen dem künstlichen Virus PEI und DNA bzw. RNA soll weiter untersucht werden. Gerade dieses Projekt wird die Variabilität des Aufbaus zeigen. Die Kombination von 3-Farben Stöchiometrie aus der Burst Analysis und Auto- und Kreuzkorrelation aus der FCS stellt ein neuartiges und zukunftssträchtiges Konzept der Analyse von Reaktionskinetiken dar. Des Weiteren birgt die Untersuchung der Vorgänge bei der Proteinfaltung [22], die mit drei Farben wesentlich schneller und effizienter erfolgen kann, großes Potential für nachfolgende Experimente. Mit 3-Farben FRET kann bei der Änderung der Proteinstruktur zusätzlich die zeitliche Abfolge von Faltungsreaktionen verfolgt werden, was mit dem 2-Farben Transfer nicht möglich ist.

Grundsätzlich stellt die Interaktion mehrerer Populationen ein fast unbegrenzt großes Forschungsgebiet in der Biochemie dar, wodurch der 3-Farben Aufbau mit Pulsed Interleaved Excitation zunehmend an Bedeutung gewinnen wird.

Literaturverzeichnis

- [1] D. AXELROD. Total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.*, 30: 245–270 (1989).
- [2] K. J. BRESLAUER, R. FRANK, H. BLÖCKER and L. A. MARKY. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *PNAS*, 83: 3746–3750 (1986).
- [3] C. CANTOR and P. SCHIMMEL. Techniques for the Study of Biological Structure and Function, Band 2 of *Biophysical Chemistry*. *W.H. Freeman and Company, New York* (1980).
- [4] M. CHALFIE, J. TU, G. EUSKIRCHEN, W. W. WARD and D. C. PRASHER. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802–805 (1994).
- [5] Y. CHEN, J. D. MÜLLER, P. T. C. SO and E. GRATTON. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 77: 553–567 (1999).
- [6] R. M. CLEGG. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.*, 211: 353–358 (1992).
- [7] R. M. CLEGG. FRET tells us about proximities, distances, orientations and dynamic properties. *Rev. in Mol. Biotech.*, 82: 177 (2002).
- [8] R. M. CLEGG, A. I. H. MURCHIE, A. ZECHEL and D. M. J. LILLEY. Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy-transfer. *PNAS*, 90: 2994–2998 (1993).
- [9] A. A. DENIZ, M. DAHAN, J. R. GRUNWELL, T. J. HA, A. E. FAULHABER, D. S. CHEMLA, S. WEISS and P. G. SCHULTZ. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of forster distance dependence and subpopulations. *PNAS*, 96: 3670–3675 (1999).
- [10] C. EGGELING, J. R. FRIES, L. BRAND, R. GUNTHER and C. A. M. SEIDEL. Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy. *PNAS*, 95: 1556–1561 (1998).
- [11] M. EHRENBERG and R. RIGLER. Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. *Chemical Physics*, 4: 390–401 (1974).
- [12] M. EIGEN and R. RIGLER. Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *PNAS*, 91: 5740–5747. (1994).

- [13] A. EINSTEIN. Über die von der molekular-kinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 17: 549 (1905).
- [14] A. EINSTEIN. Zur Theorie der Brown'schen Bewegung. *Annalen der Physik*, 19: 371 (1906).
- [15] E. L. ELSON and D. MAGDE. Fluorescence correlation spectroscopy. i. conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13: 1–27 (1974).
- [16] T. FÖRSTER. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 2: 55–75 (1948).
- [17] W. T. GODBEY, K. K. WUDAGGER and A. G. MIKOS. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *PNAS*, 96: 5177–5181 (1999).
- [18] S. GROSSE, Y. ARON, G. THÉVENOT, D. FRANÇOIS, M. MONSIGNY and I. FAJAC. Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. *Journal of Gene Medicine*, 7: 1275 – 1286 (2005).
- [19] T. HA. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods*, 25: 78 (2001).
- [20] T. HA, T. ENDERLE, D. F. OGLETREE, D. S. CHEMLA, P. R. SELVIN and S. WEISS. Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *PNAS*, 93: 6264–6268 (1996).
- [21] E. HAUSTEIN, M. JAHNZ and P. SCHWILLE. Triple FRET: A tool for studying longrange molecular interactions. *Chemphyschem*, 4: 745–748 (2003).
- [22] S. HOHNG, C. JOO and T. HA. Single-molecule three-color FRET. *Biophys. J.*, 87: 1328–1337 (2004).
- [23] S. JIA, L. L. WORTH, C. L. DENSMORE, B. XU, X. DUAN and E. S. KLEINERMAN. Aerosol gene therapy with PEI:IL-12 eradicates osteosarcoma lung metastases. *Clinical Cancer Research*, 9: 3462–3468 (2003).
- [24] A. N. KAPANIDIS, N. K. LEE, T. A. LAURENCE, S. DOOSE, E. MARGEAT and S. WEISS. Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *PNAS*, 101: 8936–8941 (2004).
- [25] R. KUHNEMUTH and C. A. M. SEIDEL. Principles of single molecule multi-parameter fluorescence spectroscopy. *Single Molecules*, 2: 251–254 (2001).
- [26] J. LAKOWICZ. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Plenum Press, New York* (1999).
- [27] D. C. LAMB, A. SCHENK, C. RÖCKER, C. SCALFI-HAPP and G. U. NIENHAUS. Sensitivity enhancement in fluorescence correlation spectroscopy of multiple species using time-gated detection. *Biophys J.*, 79: 1129–1138 (2000).

- [28] N. K. LEE, A. N. KAPANIDIS, Y. WANG, X. MICHALET, J. MUKHOPADHYAY, R. H. EBRIGHT and S. WEISS. Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. *Biophysical Journal*, 88: 2939–2953 (2005).
- [29] E. A. LIPMAN, B. SCHULER, O. BAKAJIN and W. A. EATON. Single-molecule measurement of protein folding kinetics. *Science*, 301: 1233–1235 (2003).
- [30] J. LIU and Y. LU. FRET study of a trifluorophore-labeled DNAzyme. *J. AM. CHEM. SOC.*, 124: 15208–15216 (2002).
- [31] D. MAGDE, E. L. ELSON and W. W. WEBB. Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29: 705–708 (1972).
- [32] X. MICHALET and S. WEISS. Single-molecule spectroscopy and microscopy. *Comptes Rendus Physique*, 3: 619–644 (2002).
- [33] B. K. MÜLLER, E. ZAYCHIKOV, C. BRÄUCHLE and D. C. LAMB. Pulsed interleaved excitation. *Biophysical Journal*, 89: 3508–3522 (2005).
- [34] S. NIE and R. ZARE. Optical detection of single molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26: 567 (1997).
- [35] G. PATTERSON, R. DAY and D. PISTON. Fluorescent protein spectra. *Journal of Cell Science*, 114: 837–838 (2001).
- [36] H. QIAN and E. ELSON. Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-d fluorescence correlation spectroscopy. *Applied Optics*, 30(10): 1185 (1991).
- [37] R. RIGLER, P. KASK, U. METS and J. WIDENGREN. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: Analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal*, 22: 169–175 (1993).
- [38] B. SCHULER, E. A. LIPMAN and W. A. EATON. Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature*, 419: 743–747 (2002).
- [39] B. SCHULER, E. A. LIPMAN, P. J. STEINBACH, M. KUMKE and W. A. EATON. Polyproline and the spectroscopic ruler revisited with single-molecule fluorescence. *PNAS*, 102: 2754–2759 (2005).
- [40] P. SCHWILLE. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse Biologischer Systeme Auf Einzelmolekülebene. Ph.D. thesis, TU Braunschweig (1996).
- [41] P. SCHWILLE, F. J. MEYERALMES and R. RIGLER. Dual-color fluorescence crosscorrelation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophysical Journal*, 72: 1878–1886 (1997).
- [42] M. V. SMOLUCHOWSKI. Molekular-kinetische Theorie der Opaleszenz von Gasen im kritischen Zustande, sowie einiger verwandter Erscheinungen. *Annalen der Physik*, 25: 205 (1908).

-
- [43] H. M. WATROB, C. PAN and M. D. BARKLEY. Two-step FRET as a structural tool. *J. AM. CHEM. SOC.*, 125: 7336–7343 (2003).
- [44] S. WEISS. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, 283: 1676–1683 (1999).
- [45] J. WIDENGREN, R. RIGLER and U. METS. Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, 4: 255–258 (1994).
- [46] P. WU and L. BRAND. Orientation factor in steady-state and timeresolved resonance energy transfer measurements. *Biochemistry*, 31: 7939–7947 (1992).
- [47] A. YILDIZ, J. N. FORKEY, S. A. MCKINNEY, T. HA, Y. E. GOLDMAN and P. R. SELVIN. Myosin v walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 300: 2061–2065 (2003).

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für physikalische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Mein Dank gilt daher Prof. Dr. Christoph Bräuchle, der mir die Möglichkeit geboten hat, in seinem Lehrstuhl ein Jahr intensiv zu forschen.

Bei Dr. Don C. Lamb bedanke ich mich recht herzlich für die direkte Betreuung der Diplomarbeit, er stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Vor allem aber möchte ich mich bei Barbara Müller bedanken. Mit großem Zeitaufwand brachte sie mir nahezu alles bei, was ich über die Fluoreszenzspektroskopie weiß und beantwortete mir mit bewundernswerter Geduld meine Fragen.

Zuletzt möchte ich Evgeny Zaychikov danken, weil er viele Stunden seiner Zeit geopfert hat, um mir das Labeln der Oligos beizubringen und die meisten Schritte selbst durchzuführen.

