

Fluoreszenz bringt Licht ins Dunkel

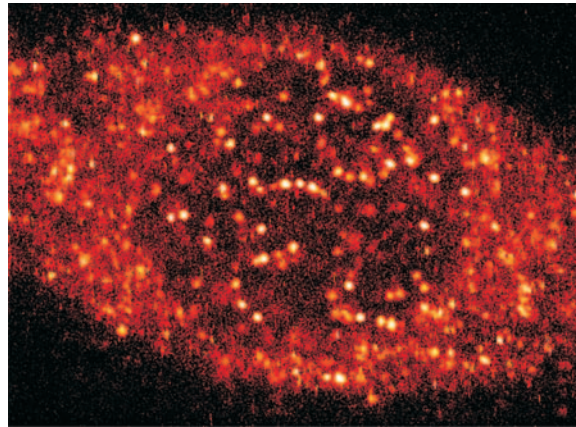
Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht das Studium einzelner Moleküle auch in lebenden Zellen.

Sören Doose und Markus Sauer

Dynamische Prozesse in der Zelle spielen sich auf winzigem Raum und auf so schneller Zeitskala ab, dass sie sich mit herkömmlichen Methoden nicht untersuchen lassen. Inzwischen erlauben es moderne Fluoreszenztechniken mithilfe geschickter Farbstoffmarkierung jedoch, einzelne Moleküle nachzuweisen und dynamische Prozesse im Nanosekundenbereich aufzulösen. Damit bringen sie „Licht ins Dunkel“ biologischer Vorgänge.

In den letzten Jahrzehnten wurden große Anstrengungen unternommen und komplexe wissenschaftliche Methoden entwickelt, um individuelle Atome und Moleküle sichtbar zu machen. Daher erstaunt es umso mehr, dass sich die Fluoreszenz einzelner Farbstoffmoleküle selbst mit bloßem Auge detektieren lässt. Möglich ist dies, unter günstigen Bedingungen, mithilfe eines gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskops. Technische Entwicklungen haben uns inzwischen in die Lage versetzt, Materie auf molekularer Ebene mit hochempfindlichen optischen Verfahren zu studieren. Diese Errungenschaft, die Richard P. Feynman Ende der 50er-Jahre noch als Zukunftsvision postulierte [1], ermöglicht es heute, die Wechselwirkung zwischen Photonen und organischem Material oder lebenden Organismen zu analysieren.

Dynamische Prozesse in isolierten molekularen Systemen (in vitro) oder in lebenden Zellen (in vivo) entziehen sich meist den hochauflösenden Methoden wie der Röntgenkristallographie, der Elektronenmikroskopie oder der Kernresonanzspektroskopie, da die dafür erforderliche Probenpräparation die Zellen in der Regel zerstört. Mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie lassen sich jedoch frei diffundierende oder immobilisierte Moleküle nachweisen und identifizieren sowie dynamische Prozesse auf Zeitskalen zwischen wenigen Nanosekunden und vielen Stunden beobachten – und das alles minimal-invasiv. Ein solcher dynamischer Vorgang ist z. B. die Ausbildung sekundärer und tertiärer Strukturen von Biopolymeren (wie Proteine oder Ribonukleinsäuren), die direkt mit ihrer katalytischen Funktion zusammenhängen können. Inzwischen scheint klar, dass sogar ungeordnete und hochflexible Biomoleküle spezifische Funktionen haben können. Somit wird es immer wichtiger, die zeitliche Änderung der Konformation – also der räumlichen Anordnung der drehbaren Bindungen an den Kohlenstoffatomen – genau zu un-



Konfokale Mikroskopieaufnahme der Fluoreszenz einzelner Moleküle in einer lebenden Zelle.

tersuchen. Die Faltung von Proteinen und Nukleinsäuren, ihre dynamischen Eigenschaften in strukturierten oder unstrukturierten Zuständen sowie der Zusammenhang mit ihrer spezifischen Funktion werfen nach wie vor grundlegende Fragen für die Biophysik auf.

Die Faszination der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie rührt auch daher, dass sie experimentelle Beobachtungen an individuellen Systemen ermöglicht, die sich direkt mit molekularen Modellen vergleichen lassen. Seit der Entschlüsselung des Aufbaus von Molekülen werden Reaktionen anhand der Vorstellung einzelner Atome und Moleküle analysiert, molekulare Vorgänge jedoch aus dem am Ensemble beobachteten Verhalten abgeleitet. Dieses geschieht stets unter der Annahme der sog. Ergodenhypothese, welche besagt, dass Eigenschaften des betrachteten Molekül-Ensembles, das aus einer nahezu unzählbaren Anzahl von Molekülen besteht, den zeitlich gemittelten Eigenschaften eines einzelnen Moleküls gleichen. Individuelle Wechselwirkungen und Reaktionspfade, die

KOMPAKT

- Die Größe von Biomolekülen liegt unterhalb der beugungsbegrenzten optischen Auflösung. Eine geeignete Fluoreszenzmarkierung erlaubt es aber, auch solche kleinen Objekte aufzufinden, die optischen Methoden bislang verborgen geblieben sind.
- Den Durchbruch im Einzelmolekülnachweis brachte die konfokale Fluoreszenzmikroskopie, bei der das Beobachtungsvolumen nur rund einen Femtoliter beträgt.
- Mithilfe moderner Fluoreszenzmethoden lassen sich u. a. der Energietransfer in photonischen Leitern oder auch die Konformationsdynamik innerhalb der Zelle (z. B. bei der Proteinfaltung) genau verfolgen.

Dr. Sören Doose und Prof. Dr. Markus Sauer, Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld, Universitätsstr. 25, 33615 Bielefeld

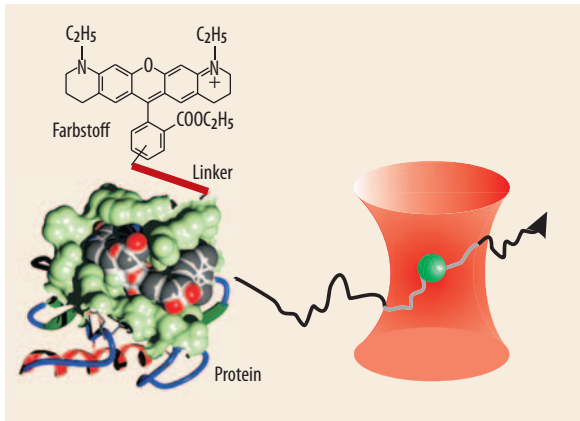


Abb. 1 Wenn ein farbstoffmarkiertes Protein aufgrund Brownscher Molekularbewegung durch den Laserfokus eines konfokalen Mikroskops diffundiert, regt der Laser es vom elektronischen Grundzustand S_0 in den ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 an. Von dort kann es durch spontane Emission eines Fluoreszenzphotons zurück in den Grundzustand gehen.

von der lokalen Umgebung der Moleküle abhängen können, werden dabei nur innerhalb der Verteilung der statistischen Gesamtheit erfasst und gehen häufig im Mittelungsprozess der Ensemblemessung unter. Im Gegensatz dazu liefern Einzelmolekülexperimente auch Informationen über Individuen, über ihre Verteilung und darüber, wie sich ihre Eigenschaften zeitlich verändern. Die Frage, ob die Merkmale einzelner Individuen leicht voneinander abweichen (statische Heterogenität) oder ob sie sich mit der Zeit verändern (dynamische Heterogenität), lässt sich durch eine gemittelte Größe nicht richtig beantworten. Ferner ermöglicht die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie es erstmals, Verteilungen und Heterogenitäten molekularer Charakteristika aufzulösen und die Biomoleküldynamik unter Gleichgewichtsbedingungen ohne Synchronisationsschritte direkt zu verfolgen [2–4].

Mit Fluoreszenz zum Einzelmolekül-Nachweis

Die Größe typischer Biomoleküle liegt weit unterhalb der beugungsbegrenzten optischen Auflösung (bestenfalls rund 200 nm), sodass sich einzelne Moleküle im Fernfeld nur identifizieren und visualisieren lassen, wenn diese mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie z. B. Rhodamin, Oxazin oder Cyanin, markiert sind (**Abb. 1** und **Infokasten**). Der Farbstoff emittiert nach der Laseranregung ein charakteristisches Fluoreszenzsignal, das empfindliche Detektoren nachweisen können. Da-

Abb. 3 Bewegt sich ein gelöstes Farbstoffmolekül durch den Laserfokus, wird es dort angeregt. Durch wiederholte Anregung und Emission (links, gelb markiert) unter Sättigungsbedingungen emittiert das Molekül rund 60 000 Fluoreszenzphotonen, von denen aber aufgrund von Verlusten nur wenige 100 detektiert werden können. Schaut man ins Detail, erkennt man, dass die Signale jedoch nicht konstant sind, sondern durch „Lücken“ (grau) unterbrochen sind (rechts).

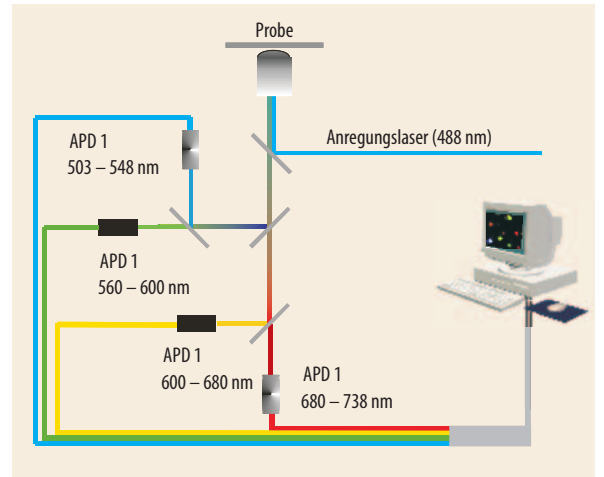
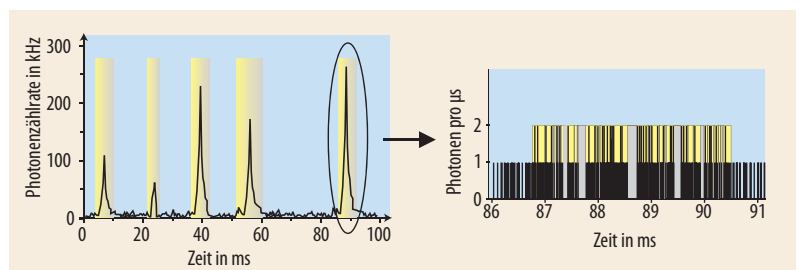


Abb. 2 Bei der spektral aufgelösten Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie regt ein gepulster Laser die Probe an. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wird spektral zerlegt und von vier Photodioden (APDs) registriert, deren digitales Ausgangssignal im PC gespeichert und weiterverarbeitet wird.

durch verbessert sich zwar nicht die Auflösung, allerdings ist es möglich, den Ort eines Objekts, das ohne Farbstoff unsichtbar wäre, auf einen Bereich von rund 200 nm einzugrenzen.

Schon 1961 bestimmte B. Rotman die Aktivität eines einzelnen β -Galaktosidase-Enzyms mittels Fluoreszenzmikroskopie, indem er den durch die enzymatische Aktivität resultierenden Fluoreszenzanstieg mittels eines nicht-fluoreszierenden Substrats in kleinen Tropfen maß [5]. Angetrieben durch den Bedarf hochempfindlicher Verfahren gelang es T. Hirschfeld 1976 erstmals, einzelne Antikörper zu detektieren, die mit 80 bis 100 identischen Fluoresceinfarbstoffen markiert waren [6]. Im Laufe der 80er-Jahre entwickelte die Arbeitsgruppe um R. A. Keller in Los Alamos die fundamentalen Grundlagen, um einzelne fluoreszierende Moleküle in Lösung zu detektieren. Dies gelang schließlich 1990 mit einem einzelnen Rhodaminfarbstoff in wässriger Lösung [7]. Gleichzeitig, aber unabhängig davon, entwickelten W. E. Moerner und M. Orrit eine Tieftemperaturtechnik zur fluoreszenzspektroskopischen Detektion einzelner Pentacen-Moleküle in Gastkristallen [8, 9].

Den entscheidenden Fortschritt im Einzelmolekülnachweis brachte die konfokale Fluoreszenzmikroskopie, bei der der Laser auf einen kleinen beugungsbegrenzten Punkt fokussiert wird und das Beobachtungsvolumen somit auf einen Bereich von etwa einem Femtoliter (10^{-15} Liter) beschränkt ist (**Abb. 2**). Das Licht aus dem Fokus wird anschließend mit hohem

Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (> 100) auf einen Punktdetektor abgebildet und ermöglicht es, einzelne farbstoffmarkierte Moleküle in Lösung zu messen [10]. Dieser Durchbruch ebnete den Weg für die breite Anwendung einzelnmolekülempfindlicher Fluoreszenz-techniken in der Physik, Chemie und Biologie.

Verschiedene Beiträge können allerdings das Fluoreszenzsignal überdecken und die Messung erschweren, doch lassen sich diese störenden Einflüsse reduzieren: Da die Emission der Fluoreszenzphotonen ins Rote verschoben ist, helfen geeignete Filter, die elastische Rayleigh-Streuung des Anregungslichts effizient zu unterdrücken. Eine Anregung im roten Spektralbereich oberhalb von 600 nm verringert Autofluoreszenz, die durch Verunreinigungen oder intrinsische Fluoreszenz der Proben hervorgerufen wird. Durch kleine Beobachtungsvolumina lässt sich inelastische Raman-Streuung minimieren, da diese vom Streuquerschnitt sowie der Anzahl der bestrahlten Moleküle abhängt.

Ein einzelnes Farbstoffmolekül sendet nach seiner Anregung im Laserfokus nur eine begrenzte Anzahl Photonen aus (Abb. 3). Daher muss jedes Photon bestmöglich detektiert und ausgewertet werden. Dies gelingt durch die gleichzeitige Aufzeichnung verschiedener spektroskopischer Parameter, der sog. Multi-parameteranalyse [4]. Dabei regt ein gepulster Laser die Probe an, und mehrere spektral getrennte Detektoren,

meist Lawinenphotodioden (Avalanche Photodioden), nehmen das Fluoreszenzsignal auf. Spezielle PC-Einsteckkarten für zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen, die hohe Zeitauflösung sowie kleine Totzeiten ermöglichen, verarbeiten die digitalen Ausgangssignale der Photodioden. Somit lässt sich für jedes detektierte Photon die spektrale Information sowie die exakte Ankunftszeit in Bezug zum Laserpuls mit einer Auflösung von wenigen Pikosekunden gewinnen und damit die Fluoreszenzlebensdauer bestimmen. Aufgrund der Dipoleigenschaften eines Farbstoffs gibt die polarisationsabhängige Messung Aufschluss über die Orientierung, Anisotropie oder Anzahl der absorbierenden Spezies [4]. Aus den Ankunftszeiten der Photonen lassen sich Koinzidenzhistogramme konstruieren. Die instrumentellen Grundlagen der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie wurden in den letzten zwei Jahrzehnten so weit verbessert, dass heute die Farbstoffe selbst und die spezifische Markierung der Biomoleküle die große Herausforderung darstellen.

Vom Markieren und Löschen

Für die spezifische Markierung des zu untersuchenden Biomoleküls muss der Farbstoff über eine koppelbare Gruppe zur kovalenten Anknüpfung verfügen. Mehr-

PHOTOPHYSIK DER FARBSTOFFE

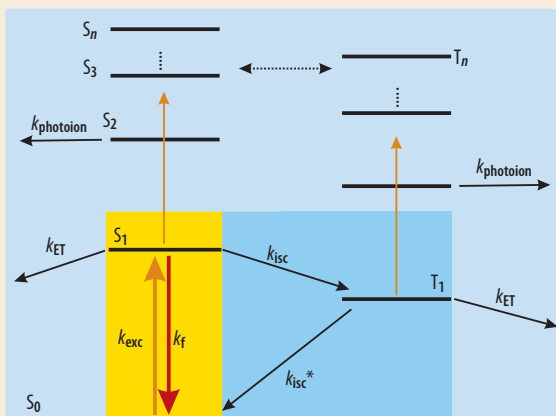
Bei der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie wird ein Farbstoff durch Absorption eines Photons aus dem Singulett-Grundzustand S_0 in einen elektronisch angeregten Zustand, meistens S_1 , überführt (Abb.). Die Anregung in höhere Schwingungs- und Rotationsniveaus sowie die darauffolgende Relaxation in die Boltzmann-Verteilung des jeweiligen Zustandes sei hier vernachlässigt. Abhängig von der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f finden in einer für den Farbstoff charakteristischen Zeit, nämlich der Fluoreszenzlebensdauer τ_f , die spontane Emission eines Photons k_f und die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand statt.

Da verschiedene Prozesse die Fluoreszenz verhindern (**Löschen**), ist die

Intensität des Fluoreszenzsignals nicht konstant (sog. **Blinken**). In organischen Farbstoffen konkurrieren z. B. das Inter-system-Crossing k_{isc} in den langlebigen Triplettzustand, strahlungslose Übergänge k_{isc}^* , die direkte Photoionisation $k_{photoion}$ aus höher angeregten Zuständen sowie andere Lösprozesse wie der photoinduzierte Elektronentransfer k_{ET} mit der eigentlichen Fluoreszenzemission k_f . Dies führt zu einer schwankenden Signalintensität, die speziell bei der Aufnahme von Molekül-Trajektorien (Fluoreszenzimaging) erheblich stört. Andererseits deutet dieses Blinken auf die Beobachtung eines einzelnen Quantensystems hin, das vereinfacht oft als Drei-Zustandsmodell (S_0 , S_1 und T_1) beschrieben wird.

Ebenso problematisch ist die irreversible **Photozerstörung** der Farbstoffe durch das Laserlicht. Diese lässt sich vermeiden, indem langlebige Zustände gelöscht werden, bevor sie ein zweites Photon absorbieren und in noch reaktivere, höher angeregte Zustände gelangen. Gerade energiereichere Photonen, wie sie in Energietransferexperimenten zur Anregung des Farbstoffs eingesetzt werden, fördern die Photozerstörung. Auch molekularer Sauerstoff kann mit den Farbstoffen reagieren und diese zerstören. Da Sauerstoff aber gleichzeitig als effizienter Triplettlöcher fungiert, lässt er sich nicht einfach aus der Probe entfernen.

Für die erfolgreiche Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie ist ein Verständnis der **Photophysik** von Farbstoffen von so großer Bedeutung, dass es weltweit große Anstrengungen gibt, Fluoreszenzfarbstoffe hinsichtlich ihrer Photostabilität und Wasserlöslichkeit zu verbessern. Alternativ finden kolloidale Halbleiterkristalle (Nanokristalle oder Quantenpunkte) vermehrt Einsatz [11]. Nanokristalle zeichnen sich durch eine sehr hohe Photostabilität und veränderliche spektrale Eigenschaften aus. Allerdings zeigen sie starkes Blinken auf allen Zeitskalen und eignen sich aufgrund ihrer Größe (5 bis 25 nm) nicht für alle biologischen Anwendungen.



Im einfachsten Fall befindet sich der Farbstoff im gelb markierten Bereich. Zur Beschreibung der Photophysik wird häufig das Drei-Zustandsmodell benötigt (blau). Für die genaue Betrachtung sind weitere konkurrierende Prozesse zu berücksichtigen.

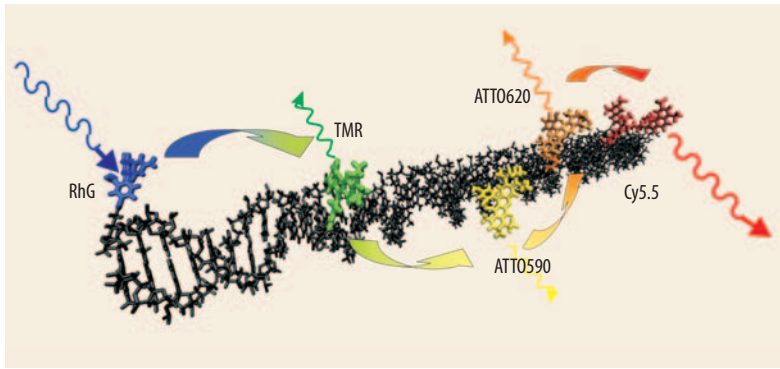


Abb. 4 Bei diesem photonischen Leiter sind fünf Farbstoffe an die doppelsträngige DNA gekoppelt, die als fester Abstandshalter fungiert, um eine Energiekaskade zu realisieren. Im Idealfall wird die Anregungsenergie mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfer vom Donor Rhodamin Grün (RhG) strahlungslos über die Farbstoffe Tetramethylrhodamin (TMR), ATTO 590 und ATTO 620 auf den letzten Akzeptor Cy5.5 übertragen, der die Anregungsenergie als Fluoreszenzlicht emittiert.

fachmarkierungen erfordern unabhängig durchführbare Reaktionen, wobei meistens aktivierte Carbonsäuren als NHS-Ester oder Maleimide zur selektiven Kopplung an aliphatische Amine oder Thiolgruppen dienen. Auch die Eigenschaften des verwendeten Abstandshalters (Linker) spielen eine entscheidende Rolle: Lange, flexible Linker können dazu führen, dass der Farbstoff durch das Abtasten seines Konformationsraumes aufgrund Brownscher Molekularbewegung mit verschiedenen Oberflächenbereichen des Biomoleküls (z. B. Aminosäuren eines Proteins) interagiert. Dies verändert häufig seine spektralen Eigenschaften in unvorhersehbarer Art und Weise.

Die Markierung von Biomolekülen mit mehreren Farbstoffen erlaubt es dank der inter- und intramolekularen Wechselwirkungen, Abstände, ihre Änderungen und damit die Konformationsdynamik der Moleküle auf Längenskalen weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze zu untersuchen. Prinzipiell lässt sich jede Wechselwirkung, wie z. B. der Energie-, Protonen- oder Elektronentransfer, verwenden, um die Konformationsdynamik zu verfolgen. Sobald sich der Wechselwirkungsabstand oder die Orientierung von Farbstoffen verändert, muss sich dies in den Beobachtungsgrößen Fluoreszenzintensität, Spektrum, Lebensdauer oder Polarisation niederschlagen. Hierfür ist das zu untersuchende Molekül gewöhnlich mit einem Fluor-

reszenzfarbstoff (Donor) sowie einem Löschmolekül (Akzeptor) zu versehen, sodass abhängig von der Konformationsdynamik des Biopolymers verschiedene Energietransferprozesse eine Fluoreszenzlöschung bewirken können.

Energieübertragung beim photonischen Leiter

Beim Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) wird die Anregungsenergie des Donorfarbstoffs abhängig vom Abstand und anderen Parametern über eine Strecke von 2 bis 10 nm strahlungslos durch Dipol-Dipol-Kopplung auf den Akzeptorfarbstoff übertragen [12]. Einzelmolekül-FRET-Messungen zwischen zwei Farbstoffen wurden bereits vielfach durchgeführt. Neuere Untersuchungen an einer FRET-Kaskade über mehrere Farbstoffe liefern Informationen über molekulare photonische Leiter, einem Modellsystem für die Energie-transfer-Kaskade der Photosynthese, und tragen daher zum Verständnis von Lichtsammelkomplexen bei. Im Gegensatz zu elektronischen Leitern transportiert ein photonischer Leiter elektronische Anregungsenergie statt Elektronen. Um einen solchen zu realisieren, wird die Anregungsenergie am Donor in den Leiter eingekoppelt. Über FRET wird diese Energie durch konventionelle Farbstoffe von der Eingangseinheit (dem Donorfarbstoff) über mehrere Transmitterfarbstoffe zur Ausgangseinheit (dem letzten Akzeptorfarbstoff der Kaskade) transportiert und schließlich mit anderer Wellenlänge emittiert (Abb. 4). Der Einsatz von doppelsträngiger DNA als relativ rigides Gerüst ermöglicht es, mehrere Farbstoffe an verschiedenen Positionen in definierten Abständen kontrolliert anzubringen. Vor kurzem ist es damit gelungen, den ersten molekularen Lichtleiter zu realisieren, der auf vier hocheffizienten Energietransferschritten zwischen fünf spektral unterschiedlichen Farbstoffen beruht (Abb. 5) [13]. Die FRET-Messungen unterstreichen das Potenzial synthetischer Systeme, die möglicherweise zukünftig dazu dienen könnten, Informationen zwischen zwei Speicherbausteinen auf molekularer Ebene zu speichern und zu übertragen.

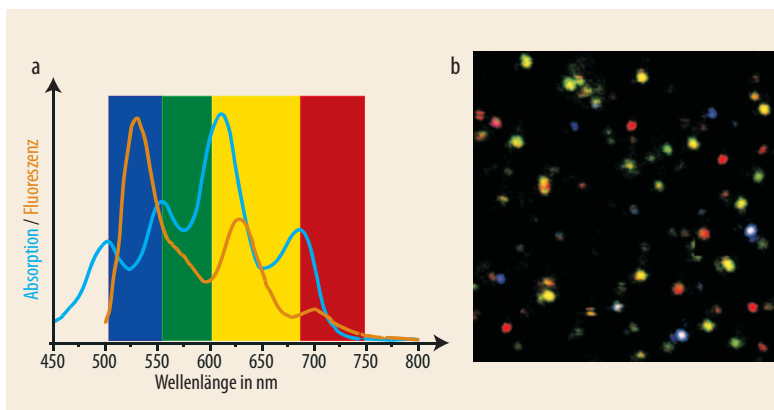


Abb. 5 Absorptions- und Emissionsspektren des photonischen Leiters in wässrigem Puffer zeigen im sichtbaren Bereich signifikante Peaks (a). Aufgrund verschiedener ineffizienter Energietransferschritte liegt die Effizienz nur bei etwa 15 bis 30 Prozent. Im Fluoreszenzbild ein-

zelner molekularer photonischer Leiter auf einer trockenen Glasoberfläche zeigt die Farbe der Punkte (b), welcher der fünf Farbstoffe die stärkste Emission aufweist und stellt damit gleichzeitig die Gesamttransfereffizienz pro Molekül dar, die über 90 Prozent betragen kann.

Der Proteinfaltung auf der Spur

Der zum FRET komplementäre Prozess ist der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) zwischen einem Elektronendonator und -akzeptor. In unserem Fall handelt es sich dabei um einen Farbstoff und ein wenig oder gar nicht fluoreszierendes Löschmolekül. Je nach

Redoxpotential fungiert der Farbstoff als Donor bzw. Akzeptor. Auch PET lässt sich einsetzen, um Struktur und Dynamik auf der Einzelmolekülebene zu untersuchen. Bei Abständen in der Größenordnung weniger Angström zwischen Farbstoff und Donor bzw. Akzeptor, d. h. bei van der Waals-Kontakt, führt PET zu einer effizienten Fluoreszenzlöschung. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sich natürliche Löschmoleküle wie bestimmte Aminosäuren (z. B. Tryptophan) oder Nukleotide (z. B. Guanodin) einsetzen lassen, um eine aufwändige selektive Zweifachmarkierung des Biomoleküls zu umgehen. Eine sorgfältige Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe mit geeigneten Redox-eigenschaften ermöglicht es, PET-Paare zu bestimmen, bei denen die Kontaktformation – also der Vorgang, bei dem die Enden eines Polymers sich berühren und einen (nicht-fluoreszierenden) Kontakt bilden – mit Tryptophan- oder Guanodinresten zu einer selektiven Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs führt. Dieses spezifische Löschrinzip lässt sich vorteilhaft ausnutzen für Fluoreszenzsonden auf der DNA- und Proteinebene [4].

Farbstoffmarkierte DNA-Haarnadelstrukturen (einsträngige DNA) eignen sich zur sensitiven Detektion spezifischer DNA-Sequenzen. Voraussetzung dafür ist, dass die Fluoreszenz der einsträngigen DNA im geschlossenen Zustand durch den Kontakt zwischen Farbstoff und Guanodin gelöscht und bei Hybridisierung reaktiviert wird [14]. Damit lassen sich z. B. Mykobakterien untersuchen, die im Organismus des Menschen eine starke Immunreaktion hervorrufen und von denen einige Arten sogar pathogen wirken. Ein ähnliches Prinzip erlaubt den Nachweis von p53-Antikörpern, die Zellen von Tumorkranken häufig produzieren und die ein starkes Indiz für eine Krebserkrankung sind. Hierbei werden immunogen wirkende, kurze Peptide (sog. Epitope) aus der Sequenz des p53-Proteins verwendet, bei denen die Fluoreszenz des

angebrachten Farbstoffs durch direkte Kontaktformation mit einem Tryptophanrest gelöscht wird. Bei Bindung der Peptid-Epitope an p53-Antikörper reduziert sich die konformationelle Flexibilität des Peptids, wodurch die Fluoreszenzlöschung aufgehoben wird. Die p53-Antikörper führen daher zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzsignale der Peptid-Epitope.

Da die sich bildenden Kontaktformations-Komplexe nicht fluoreszieren, lassen sich die charakteristischen Assoziations- (k_{ass}) und Dissoziationsraten (k_{diss}) zwischen Farbstoff und Tryptophan- bzw. Guanodinrest aus der Fluoreszenzänderung bestimmen. Wird ein Biopolymer an einem Ende mit dem Farbstoff und am anderen Ende mit einem Löschmolekül versehen, kann dieses PET-Paar Auskunft geben über die Kontaktraten der Biopolymer-Enden.

In der Kombination unschlagbar

Zeitliche Fluktuationen der Fluoreszenz lassen sich mit der sog. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) auf Zeitskalen von wenigen Nanosekunden bis Minuten untersuchen. Intensitätsfluktuationen, wie sie z. B. durch den Transport einzelner Moleküle in und aus dem Probenvolumen aufgrund Brownscher Molekularbewegung entstehen, werden über die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ analysiert. Diese berechnet sich aus der detektierten Fluoreszenz.

Im Laufe der letzten Jahre wurde die FCS insbesondere im Bereich der Diagnostik und Biotechnologie, häufig eingesetzt [15]. Die Kombination aus PET und FCS erlaubt es, die Kinetik der Intensitätsfluktuationen des Fluoreszenzsignals mit einer Zeitauflösung von wenigen Nanosekunden aufzunehmen und eröffnet damit die Möglichkeit, Konformationsdynamik von Biopolymeren (Peptide, Proteine, Nukleinsäuren) unter

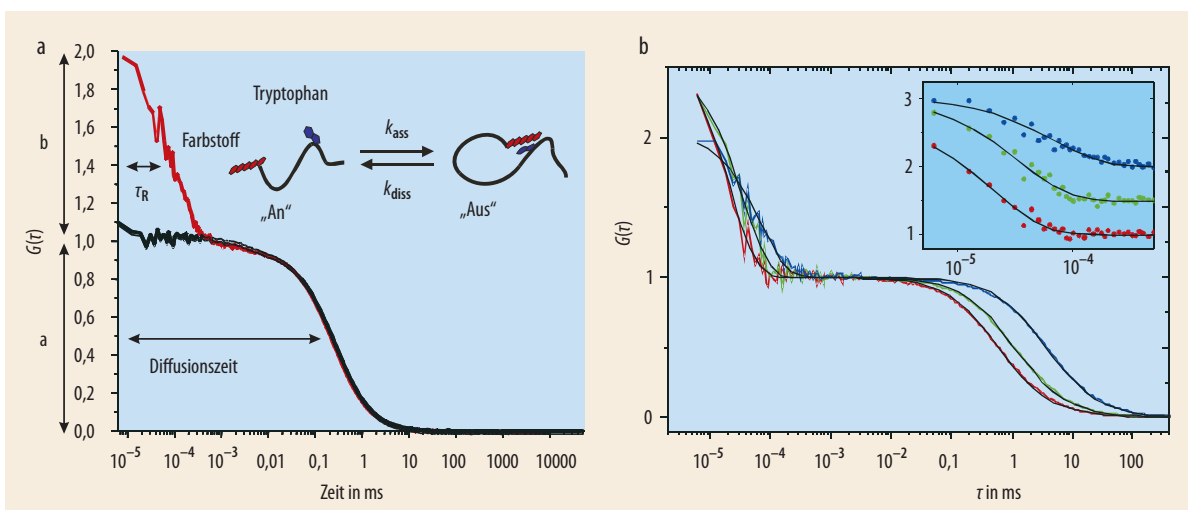
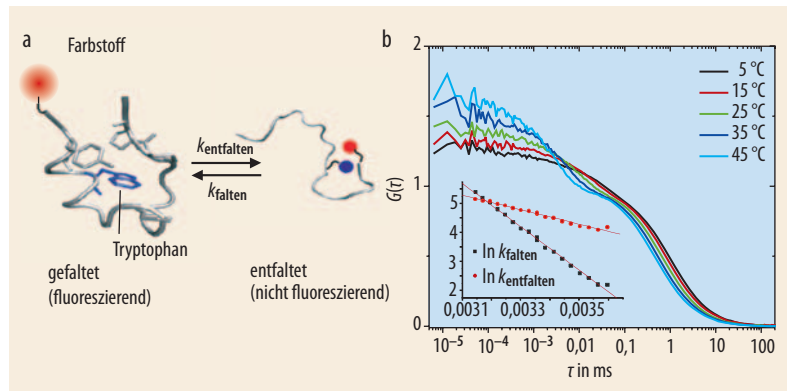


Abb. 6 Die PET-FCS-Kurven von farbstoffmarkierten, flexiblen Peptiden (Glyzin-Serin, GS) mit (rot) bzw. ohne (schwarz) Tryptophanrest weichen in ihrer Dynamik auf kurzen Zeitskalen stark voneinander ab (a). Neben der Diffusionszeit des gesamten Moleküls ($\sim 300 \mu\text{s}$)

ist eine schnelle Konformationsdynamik (10 – 100 ns) über die charakteristischen Assoziations- und Dissoziationsraten von Farbstoff und Tryptophan sichtbar. Das Inset in a zeigt die Struktur des markierten Peptids, wobei der Farbstoff nur leuchtet, wenn er nicht am Tryptophan

haftet („An“). Die PET-FCS-Kurven (b) zeigen, dass die Diffusion der Peptide stark, die Konformationsdynamik nur geringfügig durch eine erhöhte Ficoll-70-Konzentration verlangsamt wird [18]. Die Daten im Inset sind vertikal gegeneinander verschoben.

Abb. 7 Wenn sich bei steigender Temperatur der Tryptophan-Käfig entfaltet, kommen Farbstoff und Tryptophanrest in Kontakt (a). Dies führt zur Fluoreszenzlöschung und zum Auftreten einer Faltungskinetik (1–50 μ s) sowie einer schnellen Konformationskinetik (10–100 ns). Die Faltungs- und Entfaltungsraten auf einer Zeitskala von wenigen Mikrosekunden folgen einem Arrhenius-Gesetz, d. h. der Logarithmus der Messgröße (in diesem Fall die Faltungsrate k des Proteins) ist linear gegen den Kehrwert der Temperatur (b, Inset).



Gleichgewichtsbedingungen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung auf der Einzelmolekülebene zu untersuchen [16–19]. Die Konformationsdynamik von Biopolymeren findet allgemein auf einer Zeitskala von Nanosekunden bis Sekunden statt und erfordert daher schnelle spektroskopische Methoden, um Einblicke in die Funktions- und Faltungsdynamik biologischer Strukturen zu gewinnen. Dies ermöglicht auch den direkten Vergleich mit Molekulardynamik-Simulationen.

Mithilfe der PET-FCS gelang es, die ersten Schritte der DNA-Haarnadelstrukturbildung aufzuklären [16] und die für die Proteinfaltung elementaren Kontaktformationsraten in kleinen unstrukturierten Peptiden zu untersuchen (Abb. 6). Die Konformationsdynamik besteht hierbei darin, dass Farbstoff und Tryptophan periodisch aneinander haften und sich wieder voneinander lösen. Solange beide aneinander haften, leuchtet der Farbstoff nicht und befindet sich im „Aus“-Zustand.

Weiterhin erlaubte die PET-FCS es, Zwischenstufen bei der Faltung eines Miniproteins (Tryptophan-Käfig) aufzudecken, die wichtig für die effiziente, schnelle Faltung sind (Abb. 7) [17]. Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Faltungsdynamik weisen auf die Existenz eines Zwischenzustands mit residueller Struktur hin, der für die schnelle Faltung des Miniproteins verantwortlich ist [17]. Ebenso tritt eine schnelle Konformationskinetik des Tryptophankäfigs im Bereich von Nanosekunden auf, die aufgrund der Bewegung der unstrukturierten Peptidkette zustande kommt. Diese Konformationsdynamik ließ sich mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung unter Molecular Crowding-Bedingungen untersuchen [18].⁹⁾ PET-FCS ist somit eine vielversprechende, zu FRET komplementäre Methode zum Studium der Konformationsdynamik von Biopolymeren und der Proteinfaltung kleiner Proteine.

Die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie hat sich über die vergangenen zwei Jahrzehnte zu einem leistungsfähigen Instrument entwickelt, welches Informationen über biomolekulare Systeme liefert, die direkt zu Lehrbuchmodellen einzelner Moleküle führen können. Die kontaktlose hochsensitive Beobachtung insbesondere dynamischer Prozesse wird noch viele neue Eindrücke lebender Materie liefern, fundamentale Mechanismen der molekularen Biochemie neu beleuchten und auch zu neuen medizinischen und diagnostischen Anwendungen führen.

9) Das bedeutet hohe Dichte und Konzentration von Proteinen und anderen zellulären Bausteinen in Zellen. Molecular Crowding-Bedingungen schafft man, indem man eine hohe Konzentration anderer Proteine in Lösung zugebt und prüft, ob sich die Biopolymerdynamik dadurch verändert.

Literatur

- [1] R. P. Feynman, *Sci. Eng.* **23**, 22 (1960)
- [2] X. S. Xie und J. K. Trautman, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49**, 441 (1998)
- [3] S. Weiss, *Science* **283**, 1670 (1999)
- [4] P. Timmefeld und M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 2642 (2005)
- [5] B. Rotman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1981 (1961)
- [6] T. Hirschfeld, *Appl. Opt.* **15**, 2965 (1976)
- [7] E. B. Shera et al., *Chem. Phys. Lett.* **174**, 553 (1990)
- [8] W. E. Moerner und L. Kador, *Anal. Chem.* **61**, 1217A (1989)
- [9] M. Orrit und J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **65**, 2716 (1990)
- [10] R. Rigler et al., *Eur. Biophys. J.* **22**, 169 (1993)
- [11] X. Michalet et al., *Science* **307**, 538 (2005)
- [12] T. Förster, *Annalen der Physik* **437**, 55 (1948)
- [13] M. Heilemann et al., *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6514 (2004)
- [14] K. Stöhr et al., *Anal. Chem.* **77**, 7195 (2005)
- [15] S. T. Hess et al., *Biochemistry* **41**, 697 (2002)
- [16] J. Kim, S. Doose et al., *Nucleic Acids Res.* **34**, 2516 (2006)
- [17] H. Neuweiler, S. Doose und M. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16650 (2005)
- [18] H. Neuweiler et al., *J. Mol. Biol.* **365**, 856 (2007)
- [19] S. Doose, H. Neuweiler, H. Barsch und M. Sauer, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **104**, 17400 (2007)

DIE AUTOREN

Markus Sauer studierte Chemie in Karlsruhe, Saarbrücken und Heidelberg und promovierte 1995 in Physikalischer Chemie an der Uni Heidelberg. In den Folgejahren beschäftigte er sich mit Farbstoffen und entwickelte eine Technik, um einzelne DNA-Stränge zu sequenzieren. 1998 wurde er für seine Arbeiten zum Handling, zur Detektion sowie Identifizierung einzelner Moleküle mit dem BioFuture-Preis ausgezeichnet. Er habilitierte sich 2002 in Heidelberg und ist seit 2003 Professor für Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie an der Universität Bielefeld.



Sören Doose studierte Physik in Freiburg, Tromsø (Norwegen) und Heidelberg. Anschließend untersuchte er in Berkeley und Los Angeles kolloidale Nanokristalle als Fluoreszenz-Marker und promovierte 2003 in Heidelberg über diese Arbeiten. In Los Angeles und in Oxford entwickelte er eine Einzelmolekülfluoreszenztechnik zur Untersuchung struktureller Eigenschaften von Transkriptionskomplexen weiter. Seit 2004 erforscht er an der Uni Bielefeld die Dynamik von Biopolymeren mithilfe der hochempfindlichen Fluoreszenzspektroskopie.

