

DISSERTATION IN PHYSIK

**Aufdeckung der räumlichen  
Wechselwirkungen einzelner  
Biomoleküle mittels  
Fluoreszenz–Resonanz–Energietransfer  
(FRET) und alternierender  
Laseranregung**

vorgelegt von

**Joachim Roß**

geboren am 18. Juni 1975

in Hamm

Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie

Universität Bielefeld

6. Februar 2006



# Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Bielefeld, 6. Februar 2006

---

Joachim Roß

GUTACHTER:  
Prof. Dr. Markus Sauer  
Priv. Doz. Robert Ros



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>15</b>
2.1	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	15
2.1.1	Prinzip der Fluoreszenz . . . . .	16
2.1.2	FRET . . . . .	22
2.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	28
2.2.1	Auflösungsvermögen eines Mikroskops . . . . .	28
2.2.2	Konfokale Mikroskopie . . . . .	30
2.3	Einzelmolekülspektroskopie . . . . .	34
2.3.1	Prinzip der Einzelmolekülspektroskopie . . . . .	34
2.3.2	<i>sm</i> -FRET . . . . .	36
2.4	Prinzip der alternierenden Laseranregung . . . . .	39
2.4.1	Multidimensionale alternierende Laseranregung . . . . .	46
2.4.2	Berechnung der FRET-Effizienz aus TrALEx-Daten . . . . .	51
2.4.3	Übersprechen und Direktanregung der Fluoreszenz in andere Detektionskanäle bei TrALEx . . . . .	54
2.4.4	Darstellung der TrALEx-Daten . . . . .	56
2.5	Vakuoläre H <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	59
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>65</b>
3.1	Konfokaler Aufbau . . . . .	65
3.1.1	Anregungsquelle . . . . .	67
3.1.2	Selektion der Wellenlängen . . . . .	69
3.1.3	Mikroskop . . . . .	70
3.1.4	Objektiv . . . . .	70
3.1.5	Filter und Dichroite . . . . .	71
3.1.6	Detektoren . . . . .	74
3.1.7	Zählkarte . . . . .	77
3.1.8	xyz-Scanner . . . . .	78
3.2	Steuerung des TrALEx-Aufbaus und Auswertung . . . . .	78

3.2.1	Steuerung . . . . .	78
3.2.2	Auswertung . . . . .	81
3.3	Aufbau eines Modellsystems für Multistep-FRET . . . . .	83
3.4	Bursterkennung . . . . .	90
3.5	Empfindliche Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	91
3.5.1	Titan-Saphir Laser . . . . .	91
3.5.2	Spektrometer . . . . .	92
3.5.3	Bildverstärker und CCD . . . . .	93
3.6	Ensemblespektroskopie . . . . .	93
3.6.1	Absorption . . . . .	93
3.6.2	Fluoreszenz . . . . .	93
3.7	FCS . . . . .	94
3.8	Verwendete Farbstoffe und deren Eigenschaften . . . . .	95
3.9	Koppeln von Farbstoffen an DNA und Protein . . . . .	97
3.9.1	Kopplungsvorschrift . . . . .	98
3.9.2	Aufreinigung . . . . .	99
3.10	Hybridisierung . . . . .	99
3.11	Präparation von Oberflächen . . . . .	100
3.11.1	Passivierung . . . . .	100
3.11.2	Immobilisierung durch unspezifische Wechselwirkung . . . . .	100
3.11.3	Immobilisierung in wässriger Umgebung . . . . .	101
3.12	Präparation der Proteinkomplexe und der Untereinheiten . . . . .	102
3.12.1	Gewinnung des Proteinkomplex aus <i>mesembryanthenum crystallinum</i> . . . . .	102
3.12.2	Expression und Aufreinigung von VHA Untereinheiten aus <i>E.coli</i> . . . . .	104
3.12.3	Vorbereiten des Gesamtkomplex für einen Reassemblierungsnachweis . . . . .	104
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> . . . . .	<b>107</b>
4.1	TrALEx . . . . .	107
4.1.1	Bestimmung der $\gamma$ -Faktoren mit Oligoprolinen . . . . .	107
4.1.2	Prinzip TrALEx am photonischen Draht . . . . .	113
4.1.3	Das Modellsystem DNA-Stern . . . . .	128
4.2	Die vakuoläre H <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	138
4.2.1	VHA-A-CFP und VHA-B-YFP Experimente . . . . .	138
4.2.2	Messungen am Gesamtkomplex . . . . .	143
4.2.3	VHA-E: Einfügen in den Gesamtkomplex . . . . .	152
4.2.4	VHA-E: Dimer oder Monomer . . . . .	157

<b>5 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>161</b>
5.1 Triple Alternating Laser Excitation . . . . .	162
5.2 Pflanzliche vakuoläre $H^+$ -ATPase . . . . .	169



# Kapitel 1

## Einleitung

Das Zusammenwachsen der Naturwissenschaften führte in den letzten Jahren zu komplexen interdisziplinären Fragestellungen in vielen Forschungsbereichen. Dabei kommt dem Verständnis von molekularen Prozessen in lebenden Zellen eine tragende Rolle zu. Vieler dieser Prozesse sind ohne ein grundlegendes Verständnis der dahinter stehenden Mechanismen nicht nachzuvollziehen. Der transmembrane Transport kleinerer Moleküle zum Be- und Entladen der Vakuole, einem vom Cytoplasma durch eine Membran getrennten Bereich, stellt einen solchen Prozess dar. Von besonderem Interesse ist dabei die Versorgung dieser aktiven Transportprozesse mit Energie. Über die Zellmembran werden unterschiedliche chemische oder elektrische Gradienten in den Kompartimenten einer Zelle getrennt. Diese können aktiv über den Austausch von Ionen gesteuert werden. ATP stellt den Energielieferanten für viele dieser Vorgänge in allen eukaryontischen und vielen prokaryontischen Zellen dar. Die durch Hydrolyse von ATP zu ADP freiwerdende Energie versorgt die eigentlichen Motoren, die transmembranen Proteinkomplexe. Die Hydrolyse wird durch eine Vielzahl von membranständigen Prozessen übernommen. Die umgesetzte Energie kann in Form von Ionen durch die Membran durchgeschleust werden. Die  $F_1F_0$ -,  $V_1V_0$ - und  $A_1A_0$ -Enzyme bilden dabei eine Klasse zum Austausch von Protonen zwischen den Zellbereichen. Spätestens seit der Auflösung diskreter Rotationsschritte der F-ATPase ist der Begriff der molekularen Maschine gerechtfertigt [1, 2].

Anhand der gezielten spektroskopischen Untersuchungen einer Vielzahl einzelner Moleküle kann ein Verständnis der grundlegenden Prozesse erlangt und damit ein Bild der Formation dieser Molekülaggregate gewonnen werden. So konnte beispielsweise die Struktur vieler Proteinkomplexe durch Röntgenstrukturanalyse aufgelöst werden (z.B. [3]). Viele dieser Techniken sind aber leider statisch, so dass die Moleküle für das Studium in einen homogenen Zu-

stand präpariert werden müssen, z.B. durch das Bilden einer Kristallstruktur. Daher können dynamische Prozesse nicht bzw. nur mit einer relativ großen Ungenauigkeit aufgelöst werden. Um größtmögliches Vertrauen in die beobachteten Daten zu bekommen, werden die Ergebnisse mit einer Fülle von Experimenten und Bedingungen wiederholt. Einen anderen Zugang bilden fluoreszenzspektroskopische Verfahren. Einige wurden weiter entwickelt, so dass die Veränderungen eines Chromophores Rückschlüsse auf biomolekulare Strukturen und Funktionen zulassen. Obwohl kristallographische und spinresonatorische Techniken mehr strukturelle Details wiedergeben, bieten optische, auf Fluoreszenz basierende, Methoden wesentliche Vorteile in der Spezifität, Flexibilität und zeitlichen Auflösung. Gerade die zeitliche Auflösung ist für biomechanische Studien von großer Bedeutung, denn Biomoleküle bilden dynamische Strukturen [4].

Die Verfolgung dynamischer Prozesse gelingt durch den Einsatz der Einzelmoelkülfluoreszenzspektroskopie (SMFS<sup>1</sup>). Sie stellt eine Technik dar, mit der eine Vielzahl detaillierter Informationen zur Analyse der statischen und dynamischen Heterogenität gewonnen werden können [5, 6]. Neben der statischen Heterogenität durch eine Vielzahl unterschiedlicher, aber während einer Messung konstanter, Zustände sind in biomolekularen Motoren die dynamischen Prozesse die interessantesten. Eine Synchronisation aller Moleküle ist im Gegensatz zu aussagekräftigen Ensemblemessungen nicht notwendig, vielmehr kann die zeitliche Auflösung einzelner Moleküle angestrebt werden. Die ersten einzelnen Moleküle wurden optisch bereits 1976 nachgewiesen [7]. Erst eine Dekade später konnten einzelne Fluorophore bei Tieftemperaturmessungen im Kristall nachgewiesen werden [8, 9]. Ebenfalls 1990 gelang die Detektion einzelner Moleküle bei Raumtemperatur [10]. Die Kombination mit der konfokalen Mikroskopie brachte 1992 einen entscheidenden Vorteil [11], so dass sich in den folgenden Jahren diese Technik enorm weiterentwickelt hat. Durch das sehr kleine betrachtete Volumen in einem konfokalen Mikroskop können einzelne Moleküle bis zu einer Konzentration von  $10^{-12}$  M sehr empfindlich detektiert werden. Der Einsatz moderner Detektoren ermöglicht dabei die Detektion einzelner Photonen. Über spektrale Filter können die Wellenlängen auf die Fluoreszenz eingegrenzt werden, so dass ein gutes Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund erzielt wird. In der heutigen Zeit ist die konfokale SMFS eine weit verbreitete und gebräuchliche Technik [12, 13, 5, 6].

Z.B. konnte die Gültigkeit des ergodischen Prinzips bei vielen Einzelmolekülmessungen direkt nachgewiesen werden: Der Mittelwert aus einer Summe von

---

<sup>1</sup>SMFS: Single Molecule Fluorescence Spectroscopy

Einzelmolekülereignissen über einen längeren Zeitraum reflektiert die Ergebnisse der Ensemblemessungen. Damit können sowohl die spektralen Daten, die Energieüberträge als auch die zeitauflösenden Informationen im Mittel mit den Ensemblemessungen verglichen werden. Ebenso kann mit Hilfe der SMFS wesentlich detaillierter die Zusammensetzung einer Probe wiedergegeben werden, da viele Eigenschaften im Ensemble verwaschen werden.

Der Einsatz fluoreszierender Marker<sup>2</sup> ermöglicht die Visualisierung von nicht selbständig leuchtenden Molekülen. Dabei werden hohe Anforderungen an die Farbstoffe gestellt. Mit Proteinfarbstoffen wie GFP<sup>3</sup> kann eine hohe Selektivität bei Proteinen erreicht werden, jedoch ist die maximale Anzahl emittierter Photonen für Einzelmolekülmessungen gering. Halbleiter-Nanokristalle (Quantendots) sind sehr photostabil und besitzen eine große Quantenausbeute. Sie werden auch in Einzelmolekülmessungen eingesetzt [14]. Die Größe der Kristalle liegt im Bereich von 10 nm und ist daher für eine Auflösung dieser Größenordnung ungeeignet. Eine weitere Klasse wird durch organische Farbstoffe gebildet. Aufgrund ihrer geringen Größe, den hohen Quantenausbeuten und einer ausreichend hohen Photostabilität eignen sich diese für die Fluoreszenzspektroskopie. Das spezifische Markieren von Proteinen mit solchen Farbstoffen ist jedoch erschwert, da Proteine generell mehrere aktive oder funktionelle Gruppen tragen.

Die Effizienz des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) weist im Bereich von zwei bis zehn Nanometern eine Abhängigkeit mit der sechsten Potenz vom Abstand auf. In dieser Größenordnung laufen die Prozesse der molekularen Motoren ab, wodurch sich FRET als molekulares Lineal anbietet. FRET wurde 1948 von Förster theoretisch beschrieben [15]. Durch die schwache elektronische Wechselwirkung zwischen den Dipolen zweier Farbstoffe kann die Anregungsenergie strahlungslos von einem Farbstoff (Donor) auf einen anderen Farbstoff übertragen werden. Voraussetzung hierfür ist die spektrale Überdeckung des Donoremmissionsspektrums mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Dadurch ist der Energieübertrag nicht auf zwei unterschiedliche Farbstoffe beschränkt, sondern kann in Form des *energy hoppings* auch über gleiche Farbstoffe erfolgen. Unterschiedliche Marker erleichtern die Abstandsbestimmung zwischen den fluoreszierenden Farbstoffen. Nicht nur über die Lebensdauer oder einem schwer zu detektierenden Rückgang der Donorfluoreszenz, sondern auch durch den Anstieg der Akzeptorfluoreszenz kann mit FRET der Abstand zwischen Molekülen bestimmt

---

<sup>2</sup>Farbstoffmoleküle, die kovalent mit dem zu untersuchenden Molekül verknüpft werden

<sup>3</sup>GFP: Green Fluorescent Protein

werden.

Vorausgesetzt, dass die Moleküle trotz der angebrachten Markierungen ebenso ihre Funktion behalten, werden Veränderungen in der Umgebung durch die Sonden widergespiegelt. Spektrale Veränderungen können ebenso wie eine Veränderung der Fluoreszenzabklingzeit über FRET Rückschlüsse auf Veränderungen in der Struktur oder der Nanoumgebung des Fluorophors geben.

Der Einsatz FRET-gestützter Experimente hat in den Bereich der SMFS starken Einzug erhalten [16]. Hierbei wird das Fluoreszenzsignal entsprechend der Emissionsmaxima der Fluorophore spektral separiert. Die Abstände zwischen den Farbstoffen können über die anteilige Intensität auf den Kanälen berechnet werden. Die Anregung erfolgt für Abstandsbestimmungen generell nur mit einer Anregungswellenlänge. Alternativ kann auch das Zählen zeitkorrelierter Einzelphotonen (TCSPC<sup>4</sup>) genutzt werden. Damit kann die Fluoreszenzabklingzeit eines Moleküls aus den Ankunftszeiten aller Photonen bestimmt werden, woraus schließlich die Abstände berechnet werden können [13]. Beide Methoden weisen einen Nachteil auf: Bei Anregung des Donors bleibt unbekannt, wie groß der Anteil der direkten Anregung des Akzeptor bei einzelnen Ereignissen ist. Die Transferrate und damit der scheinbare Abstand wird durch die Stöchiometrie beeinflusst.

Eine Erweiterung zu den bisherigen Einzelmolekül-FRET-Verfahren zur Abstandsbestimmung ist 2004 vorgestellt worden und beruht auf der alternierenden Laseranregung mit zwei Anregungswellenlängen (ALEX<sup>5</sup>) [17, 18]. Zusätzlich zu der Transferrate wird für jedes Ereignis ein stöchiometrischer Index bestimmt, indem neben der Anregung des fluoreszierenden Donors auch der ebenfalls fluoreszierende Akzeptor angeregt wird. Damit ist es möglich, selektiv die Population von beiden Farbstoffen auszuwerten. Die Trennung der Signale von freiem Donor von Ereignissen mit beiden Farbstoffen und ermöglicht selbst die Abstandsbestimmung von Paaren mit geringem FRET. Mit ALEX können also, unabhängig vom Försterregime, Aussagen über Bindungen getroffen werden. Dies birgt wesentliche Vorteile gegenüber der Anregung mit nur einer Wellenlänge.

Die räumliche Anordnung und deren Veränderung von Molekülen in Proteinkomplexen oder von Nanostrukturen im Allgemeinen ist von besonderem Interesse. Durch eine vielschichtige Anordnung kann der Energietransfer mit mehr als zwei Farbstoffen auf konkurrierenden Pfaden verlaufen. Diese

---

<sup>4</sup>TCSPC: Time Correlated Single Photon Counting

<sup>5</sup>ALEX: Alternating Laser Excitation

sind selbst mit ALEX nicht und mit TCSPC nur durch Lebensdauermessungen auf allen Detektionskanälen zu entwirren. Die häufig interdisziplinären Fragestellungen verlangen weit mehr Informationen, als durch die Anregung und dem Energietransfer von zwei Farbstoffen abgefragt werden kann. Der Komplex der vakuolären  $H^+$ -ATPase (VHA) zum Beispiel besteht aus zwölf Untereinheiten, die miteinander wechselwirken. Durch verminderte Produktion einzelner Teile der transmembranen Protonenpumpe, reagiert der Organismus regulativ auf Salzstress [19]. Der dadurch herbeigeführte Mangel an bestimmten Untereinheiten führt wahrscheinlich zu einer partiellen Dissoziation des Gesamtkomplexes. Daher ist es von großem Interesse, eine Methode zu entwickeln, mit der mehrere dieser Untereinheiten voneinander unterschieden werden können, um so die Reassemblierung zu beobachten.

In dieser Dissertation wird eine Methode vorgestellt, mit der es möglich ist, die Energietransferraten mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe in einer Messung zu bestimmen. Die Methode beruht auf dem Prinzip der alternierenden Laseranregung in einem bildgebenden, konfokalen Einzelmolekülmikroskop. Anstelle mit einer festen Wellenlänge wird zwischen drei Anregungswellenlängen eines Lasers so schnell alterniert, dass jedes Molekül im Fokus in wenigen Mikrosekunden mit allen Farben angeregt wird (TrALEX<sup>6</sup>). Die Detektion erfolgt mit drei Avalanche Photodioden (APD), auf die das Fluoreszenzlicht spektral durch dichroitische Strahlteiler aufgeteilt wird.

Die Herausforderungen bei der Umsetzung gliedern sich in drei Bereiche. Die erste Herausforderung liegt in der theoretischen Betrachtung des mehrfachen FRET. Bestehende Theorien gilt es zu kombinieren [20, 21, 17] und entsprechend zu erweitern. Die technische Umsetzung mit der Ansteuerung alternierender Anregung, einer sinnvollen Datenstruktur und der zu entwickelnden Auswertung bilden den zweiten Bereich. Die praktische Umsetzung stellt schließlich den dritten Bereich der Herausforderungen. Es gilt, sowohl die Farbstoffe, als auch die Anregungswellenlängen sorgfältig auszuwählen. Die Farbstoffe sollen photostabil sein, eine hohe Quantenausbeute besitzen und wenig Einfluss auf die Proben nehmen. Diese Kriterien beschränken die Auswahl zur Zeit auf organische Farbstoffe im sichtbaren Bereich [22]. Die SMFS erfordert zudem sehr geringe Untergrundsignale. Die Detektion des spektral verschobenen Ramansignals ist zu verhindern. Eine Überlagerung der Ramanlinien mit weiteren Anregungswellenlängen wurde daher angestrebt.

---

<sup>6</sup>TrALEX: Triple Alternating Laser Excitation

Anhand zweier Modellsysteme wird die Auflösung der Transferpfade des multidimensionalen FRET demonstriert. Beide Modelle basieren auf Oligonukleotiden, an denen Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb des Förster-Regimes wechselwirken können. In dem einen System sind die Farbstoffe linear angeordnet und zeigen gerichteten FRET. Dieses Modell ist bereits als photonischer Draht vorgestellt worden [22]. Es besteht aus einem 60 Basen langen Strang, der mit drei je 20 Basen langen Gegensträngen vervollständigt wird. An jedem Einzelstrang ist ein Farbstoff kovalent gebunden, so dass diese relativ definierte Positionen annehmen können. Das andere Modell wurde im Rahmen dieser Dissertation entwickelt. Es besteht aus drei 40 Basen langen DNA-Sequenzen, die zur Hälfte jeweils den Gegenstrang zu den beiden anderen Sequenzen bilden. Diese bilden vollständig hybridisiert eine sternförmige Struktur. Wiederum liegt die Position der Farbstoffe innerhalb der Reichweite des resonanten Energietransfers, diesmal kann die Energie auf unterschiedlichen Wegen weitergegeben werden.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der partiellen Auflösung der Feinstruktur der vakuolären  $H^+$ -ATPase. Einige Untereinheiten und der Gesamtkomplex wurden mit herkömmlichen spektroskopischen Verfahren als auch den Methoden der Einzelmolekülspektroskopie untersucht. Die selbständige Assemblierung heterolog exprimierter Untereinheiten sowie die Dissoziation und Reassemblierung des solubilisierten Gesamtkomplexes bilden einen weiteren Schwerpunkt der Untersuchungen. Als Strategie wurde eine statistische Markierung der Proteine verfolgt, um auf einfachem Weg Informationen zur Bindung und zu den Abständen innerhalb des Komplexes zu erhalten.

Die mit den, in dieser Arbeit beschriebenen, Techniken mögliche Auflösung der intrazellulären Strukturen im Bereich weniger Nanometer erlaubt es, Eingriffe in empfindliche Systeme besser zu verstehen. Ein größeres Verständnis dieser Prozesse könnte z.B. bei der Entwicklung von weniger schädigenden Düngemitteln weiterhelfen. Ebenso kann der Nachweis von Bindungen einer Reihe verschiedener Bindungspartner bei sehr geringen Konzentrationen bei der Erforschung neuer Impfstoffe oder der Wirkung neuer Medikamente von Nutzen sein.

# Kapitel 2

## Theoretische Grundlagen

In den letzten Jahren ist in den Naturwissenschaften der Trend zur interdisziplinären Forschung gewachsen. Die Ergebnisse aus der Biologie, Chemie und Physik haben sich durch das erlangte Verständnis in ihren Disziplinen angenähert und profitieren auf vielfältige Weise voneinander. Der erlangte Grad an Komplexität der untersuchten Objekte ist gleichzeitig überproportional gestiegen. Das Verständnis konnte vor allem durch den Übergang auf kleinere Abstände vertieft werden. Gerade in diesem Rahmen spielt der Übergang von vielen auf einzelne Moleküle eine wesentliche Rolle. Die Methoden und Techniken müssen an die neuen Fragestellungen angepasst werden. Der Einsatz von fluoreszierenden Markern ermöglicht Abstandsmessungen biologischer Systeme in wässriger Umgebung. Diese Arbeit beruht auf den Prinzipien der fluoreszenzgestützten Einzelmolekülspektroskopie. In den folgenden Abschnitten (2.1–2.3) werden die Grundlagen dieser Technik dargestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode TrALEx<sup>1</sup> wird im Abschnitt 2.4 eingeführt. Abschließend folgt eine Übersicht über die vakuoläre  $H^+$ -ATPase in Abschnitt 2.5.

### 2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Das Phänomen der Fluoreszenz ist seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt. Entdeckt und beschrieben wurde dieses Phänomen von Henschel an dem Mineralgestein Flussspat. Fluoreszenz ist die molekulare Eigenschaft, aus einem angeregten atomaren Zustand durch Emission eines Photons zu relaxieren. Dabei konnte Stokes einen Versatz zwischen der Exitationswellenlänge und der Emission beobachten. Die Emission ist energieärmer als die Exitation. Dieser Versatz wird daher auch Stokes-Shift genannt. In den letzten Jah-

---

<sup>1</sup>TrALEx: Triple Alternating Laser Excitation

ren hat das Prinzip der Fluoreszenz Einzug in das Gebiet der Mikroskopie erhalten. Viele organische und anorganische Materialien zeigen Fluoreszenz. Zunächst wurde in der Mikroskopie vor allem diese primäre Fluoreszenz oder Autofluoreszenz beobachtet. In den letzten Jahrzehnten sind immer mehr und besonders helle Fluoreszenzfarbstoffe entwickelt worden, die an spezielle Gruppen in Molekülen selektiv angekoppelt werden können. Diese indirekte oder sekundäre Fluoreszenz steht heutzutage im Mittelpunkt der Fluoreszenzmikroskopie.

Durch die Vielfältigkeit der fluoreszierenden Systeme und den daraus resultierenden breit gestreuten Anwendungsbereichen, stellt sie gerade in der interdisziplinären Wissenschaft ein wesentliches Verfahren zur Erforschung dieser Fragestellungen dar. Gerade der Einsatz von fluoreszierenden Markern hat in den vergangenen Jahren tiefe Einblicke in die Nanowissenschaft gebracht und dem Prinzip der Fluoreszenzspektroskopie zu einer Renaissance verholfen: Zum Beispiel bei der Beobachtung von molekularen Prozessen in intrazellulären Systemen [23, 24], in bildgebenden Verfahren an lebenden Zellen durch konfokale oder 2-Photonen Mikroskopie [25, 26, 27, 28], oder in der Einzelmolekülspektroskopie. Daher wird im Folgenden das Prinzip der Fluoreszenz etwas genauer dargestellt.

### 2.1.1 Prinzip der Fluoreszenz

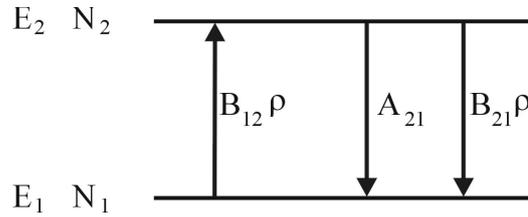
Als Fluoreszenz bezeichnet man die Eigenschaft eines Materials aus einem angeregten Singulett Zustand  $S_n$  durch die Emission eines Photons in den elektronischen Grundzustand  $S_0$  zu gelangen. Der Energiezustand eines Atoms wird bestimmt durch die Konfiguration seiner Elektronen [29]. Der Zustand mit der niedrigsten Energie wird Grundzustand  $S_0$  des Moleküls genannt, höhere Energiestufen bezeichnet man als angeregte Zustände.

#### Absorption

Die Anregung eines Moleküls kann aufgrund von Stößen mit freien Elektronen, anderen angeregten Molekülen und durch Absorption von Licht geschehen.

Die Absorption von Licht ist eine resonante Kopplung von elektromagnetischen Zuständen eines Moleküls mit der einfallenden elektromagnetischen Welle. Da die Zustände von Molekülen quantisierte Energien besitzen, muss die Energie der eingestrahlten Welle, z.B. eines oder mehrerer Photonen, der Energiedifferenz zweier Zustände eines Moleküls gleichen:

$$h\nu = \Delta E \tag{2.1}$$



**Abbildung 2.1:** Spontane und induzierte Übergänge: Zwei Energieniveaus  $E_1$  und  $E_2$  mit den Besetzungszahlen  $N_1$  und  $N_2$  sind durch die Übergänge mit den Wahrscheinlichkeiten  $B_{12}\rho$ ,  $B_{21}\rho$  und  $A_{21}$  verbunden.

wobei  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum und  $\nu$  die Frequenz des einfallenden Photons ist. In der Regel regt man Moleküle aus ihrem stabilen elektronischen Grundzustand  $S_0$  in einen energiereichen Zustand  $S_1$  an. Die Beziehung in Gleichung 2.2 stellt die Wahrscheinlichkeit dar, aus dem Grundzustand der Wellenfunktion  $\psi_0$  über das elektrische Dipolmoment  $\hat{\mu}$  in den angeregten Zustand  $\psi_1$  zu gelangen:

$$\vec{\mu}_{0,1} = \int \psi_1^* \hat{\mu} \psi_0 \quad (2.2)$$

Dies wird als das Übergangsmoment  $\vec{\mu}_{0,1}$  zwischen den beiden Zuständen bezeichnet. Für die Anregung eines Moleküls muss  $\vec{\mu}_{0,1}$  von null verschieden sein. Das elektrische Dipolmoment  $\hat{\mu}$  in dem Ausdruck führt dazu, dass ein Übergang wahrscheinlicher wird, wenn die Ladungen in dem Molekül Dipolcharakter besitzen. Der Übergang kann demnach als die Wechselwirkung zwischen zwei oszillierenden Feldern angesehen werden[30].

Dieser Prozess wird als induzierte Absorption bezeichnet und hängt von der Dichte des eingestrahlten elektromagnetischen Feldes und somit von der Intensität ab. Einstein formulierte für die Übergangswahrscheinlichkeit  $w$ , ein Molekül in einem angeregten Zustand zu finden, den Ausdruck

$$w = \frac{\delta P}{\delta t} = \rho B_{12}, \quad (2.3)$$

wobei

$$B_{12} = \frac{|\vec{\mu}_{12}|^2}{6\epsilon_0 \hbar^2} \quad (2.4)$$

der Einsteinkoeffizient für induzierte Absorption und  $\rho$  der Streuquerschnitt ist. Diese Übergänge sind in Abbildung 2.1 dargestellt. Die Relaxion eines angeregten Zustands erfolgt auf dem Weg der spontanen oder induzierten Emission ( $A_{21}$  bzw.  $B_{21}$ ), wobei die induzierte Emission der induzierten Absorption ( $A_{12}$ ) gleicht. Der Einsteinkoeffizient für spontane Emission stellt

ein Maß für die sogenannte natürliche Linienbreite eines atomaren Übergangs dar. Durch diesen zufälligen Prozess haben die Moleküle in einem angeregten Zustand eine mittlere Lebensdauer

$$\tau = \frac{1}{A_{21}}, \quad (2.5)$$

die in der Unschärferelation begründet liegt [31].  $\tau$  entspricht einer Verminderung auf  $1/e$  der ursprünglich vorhandenen angeregten Moleküle und liegt in der Größenordnung von  $\tau = 10^{-9}$  bis  $10^{-8}$  s [32]. Hieraus ergibt sich eine natürliche Verbreiterung des Emissionsspektrums

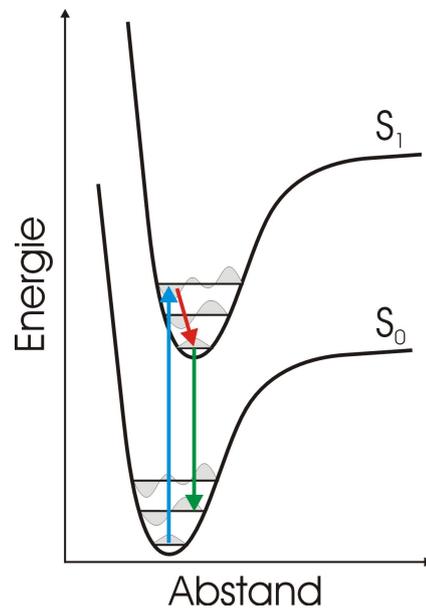
$$\Delta\nu_{nat} = \frac{A_{21}}{2\pi}. \quad (2.6)$$

Zwischen der spontanen Emission und der induzierten Absorption besteht im thermischen Gleichgewicht der Zusammenhang

$$A_{21} = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} A_{12} \quad (2.7)$$

Die Anregung erfolgt schnell im Vergleich zu einer Konformationsänderung der Kerne im Molekül. Es kann daher angenommen werden, dass die Atomkerne sich während dieser Zeit nicht bewegen (Franck-Condon Prinzip). Betrachtet man dieses im Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.2, so sind nur senkrechte elektronische Übergänge erlaubt. Zusammen mit der Verteilung der Wellenfunktion innerhalb des elektronischen Grundzustand im Schwingungsgrundzustand, können somit nur energiereichere Vibrationszustände im elektronisch angeregten Zustand erreicht werden. Diese sind energetisch jedoch instabil, daher relaxiert das Molekül schnell in den metastabilen elektronisch angeregten Schwingungsgrundzustand  $S_1$ . Die Form der Absorptionsspektren ist abhängig von der Lage der beiden Potentialkurven zueinander. Ausgedehnte Schwingungsbanden hängen mit weit gegeneinander verschobenen Potentialkurven zusammen. Angeregte Zustände haben mehr antibindenden Charakter und sind daher im Diagramm nach rechts verschoben. Moleküle können auch direkt in einen energiereicheren Singulett Zustand  $S_n$  angeregt werden, jedoch relaxieren sie in etwa  $10^{-12}$  s in den ersten angeregten Zustand  $S_1$  über internal conversion ( $k_{IC}$ ).

Die Absorption wird als Stoffeigenschaft mit dem Buchstaben  $\epsilon$  angegeben. Die verwendete Einheit ist  $(\text{Mcm})^{-1}$  und man kann somit über die Absorption eines Stoffes dessen Konzentration mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmen [33].

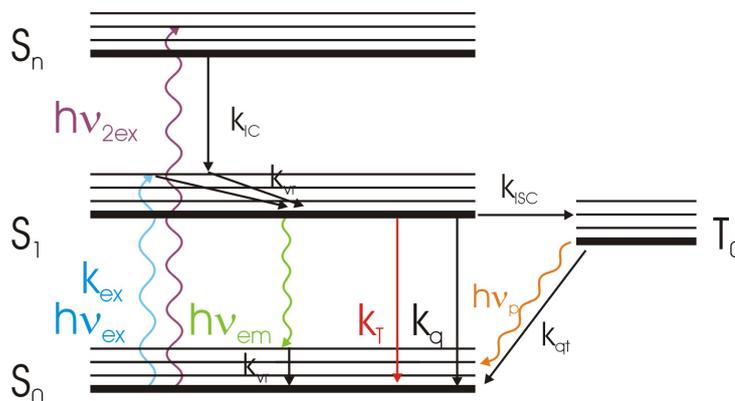


**Abbildung 2.2:** Franck–Condon Prinzip im Jablonski–Diagramm: Die Anregung erfolgt schnell und somit ohne räumliche Änderungen im Molekül. Die Übergänge sind daher senkrecht dargestellt.

### Fluoreszenz

Elektronisch angeregte Zustände können auf unterschiedlichen Wegen ihre Energie wieder abgeben. In der Regel geschieht dies vor allem durch Übertragung der Energie in Schwingung, Rotation oder Translation auf Moleküle in der Umgebung, letztendlich in Umsetzung der Energie in Wärme. Jedoch kann die Energie auch in chemische Reaktionen (Photochemie) oder in die Aussendung von Photonen umgesetzt werden. Wirkt das Molekül als ein längerer Energiespeicher, so spricht man von Phosphoreszenz ( $10^{-6}$  bis  $10^{-3}$  s), im Fall einer quasi instantanen Umsetzung von Fluoreszenz ( $10^{-9}$  bis  $10^{-8}$  s), welche für die Untersuchung von einzelnen Molekülen von besonderer Bedeutung ist.

Ein, im Zustand  $S_n$  angeregtes Molekül, relaxiert zunächst über einen schnellen strahlungslosen Prozess (vibrational relaxation) in etwa  $k_{vr} \approx 10^{-12}$  s in den angeregten Schwingungsgrundzustand  $S_1$ . In dem Fall, dass die überschüssige Energie nicht durch die Moleküle in der Umgebung in thermische Energie umgesetzt werden kann ( $k_q$  in Abbildung 2.3), erfolgt wie bei der Absorption ein vertikaler elektronischer Übergang nach dem Franck–Condon–Prinzip. Damit erhält man entsprechend der erreichbaren Schwingungszustände ein für das Molekül typisches Fluoreszenzspektrum der Energie  $h\nu_{em}$ .



**Abbildung 2.3:** Energieniveauschema und Reaktionsraten bei Fluoreszenz. Die Anregung erfolgt mit einem Photon der Energie  $h\nu_{ex}$  bzw.  $h\nu_{2ex}$  in den Zustand  $S_1$  bzw.  $S_n$ . Aus letzterem gelangt es schnell via innerer Konvertierung (IC) in den Zustand  $S_1$ . Da die Anregung in Vibrationszustände erfolgt (siehe Text) wird durch Vibrationsrelaxation  $k_{vr}$  der Grundzustand des  $S_1$  erreicht. Aus diesem kann die Energie durch Energietransfer ( $k_T$ ), Stoß ( $k_q$ ), innerer Konversion ( $k_{IC}$ ) oder Abgabe eines Photons der Energie  $h\nu_{em}$  in den Grundzustand gelangen. Der Übergang vom Singulett in den Triplett ist auf Grund der Spinzustände verboten, jedoch überlappen die Energieniveaus der Triplett-Zustände häufig mit denen des  $S_1$ . Daher können diese über intersystem crossing ( $k_{ISC}$ ) dennoch erreicht werden.

Die Betrachtungen der Emission in den o.g. Gleichungen 2.5 und 2.6 gelten nur für isolierte Atome im Vakuum. Fluorophore Systeme im Wechselspiel mit anderen Liganden zeigen eine deutliche Verbreiterung der Übergänge. Die elektronischen Singulett- oder Triplettzustände sind durch zahlreiche Vibrations- und Rotationszustände erweitert. Die emittierten Lichtquanten verschmelzen statistisch zu einem kontinuierlichen Spektrum.

Dass die Fluoreszenz eines Moleküls immer einer bestimmten Energie und somit einem Wellenlängenbereich zugeordnet ist, stellt eine grundlegende Eigenschaft dar und ist bekannt unter der Kasha Regel [34]. Es kommt zwar zu einer Verbreiterung des Spektrums und eventuell zu einer leichten Verschiebung der Intensitätsmaxima, jedoch bleiben die typischen Merkmale des Fluoreszenzspektrums erhalten. Ebenso ist die Emission eines fluoreszierenden Moleküls unabhängig von der Wellenlänge, mit der es angeregt wurde. Vergleicht man das Anregungsspektrum mit dem Fluoreszenzspektrum, fällt bei den meisten Molekülen auf, dass die beiden Spektren eine spiegelbildliche Struktur besitzen. Die räumliche Konfiguration der Elektronen innerhalb eines Moleküls ist bei den meisten Farbstoffen im angeregten als auch im thermischen Gleichgewichtszustand ähnlich. Somit sind vergleich-

bare Vibrationszustände in beiden Fällen vorzufinden. Betrachtet man nun im Jablonski–Diagramm die Energieabstände, so kann die Spiegelung durch die Verteilung der Energieniveaus abgelesen werden. Abweichungen von den gespiegelten Energieniveaus können z.B. bei Eximeren oder Exciplexen beobachtet werden.

### Fluoreszenzlebensdauer und Quanteneffizienz

Die Fluoreszenzlebensdauer und die Quantenausbeute sind wahrscheinlich die wichtigsten Eigenschaften eines Fluorophors. Als Quantenausbeute oder Quanteneffizienz wird der Quotient aus absorbierten und emittierten Photonen bezeichnet. Eine hohe Quantenausbeute nahe eins steht somit für einen besonders hellen Farbstoff. Die Fluoreszenzlebensdauer stellt hingegen ein Maß für die Zeit dar, in denen die elektronische Anregung für Reaktionen zu Verfügung steht. Betrachtet man das Jablonski–Diagramm in Abbildung 2.2, so kann die Quanteneffizienz auch über die strahlungslose Rate  $k_{nr}$  und die sogenannte intrinsische Rate  $k_r$  für den photoemittierenden Prozess definiert werden<sup>2</sup>:

$$\Phi := \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2.8)$$

Vereinfachend sind an dieser Stelle alle strahlungslosen Prozesse zu einer Rate

$$k_{nr} = k_{IC} + k_{ISC} + k_q + k_T \quad (2.9)$$

zusammengefasst, wobei  $k_{IC}$  der Rate des internen Übergang (internal conversion),  $k_{ISC}$  der Rate des Übergangs in den Triplettzustand (intersystem crossing) und  $k_q$  schließlich der Quenchingrate durch Kollision entspricht. Gibt es eine weitere externe Möglichkeit z.B. über elektronischen Energietransfer nach Dexter (EET) oder resonante Dipol–Dipol–Wechselwirkung (FRET), so ist  $k_T$  größer null. Die Fluoreszenzlebensdauer ist nun über

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2.10)$$

bestimmt und hängt mit der in Gleichung 2.5 gegeben natürlichen oder intrinsischen Lebensdauer über

$$\tau_n = \frac{1}{k_r} = \frac{1}{A_{21}} \quad (2.11)$$

zusammen. Die radiative Zerfallsrate kann über das Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum nach Strickler und Berg berechnet werden [35]. Es gilt

---

<sup>2</sup>nr: nonradiative, r radiative

der Zusammenhang

$$k_r = 1/\tau_n = 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \frac{\int F(\nu) d\nu}{\int F(\nu)/\nu^3 d\nu} \int \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu. \quad (2.12)$$

Jedoch zeigen viele Fluorophore im Ensemble eine andere Lebensdauer als über die Fluoreszenz- und Absorptionsspektren ermittelten: Durch Interaktion mit dem Lösungsmittel oder durch Änderungen des (lokalen) Brechungsindex wird die Lebensdauer beeinflusst und die Raten für Quenching oder intersystem crossing verändern sich.

### Fluoreszenzquenching

Viele Prozesse führen zu einer Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer und somit zu einer Verminderung der Fluoreszenzintensität. Diese Prozesse fasst man unter dem Begriff Quenching zusammen. Die einfachste Möglichkeit, elektronisch angeregte Zustände zu depopulieren, erfolgt über Stöße mit anderen Molekülen. Die Rate hängt von der Konzentration der jeweiligen Stoßpartner ab. Die Abnahme der Fluoreszenz kann über die bekannte Stern-Volmer-Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q[Q] \cdot \tau_0, \quad (2.13)$$

wobei  $k_q$  die bimolekulare Quenchingkonstante,  $[Q]$  die Konzentration des Quenchers und  $\tau_0$  die Lebensdauer des Farbstoffs in Abwesenheit des Quenchers ist. Bekannte Quencher in Lösungen sind Sauerstoff, Halogenide und Amine.

Aus dem Triplettzustand heraus, erfahren viele Farbstoffe eine irreversible Zerstörung, so dass es hilfreich sein kann, diesen Zustand wiederum zu entvölkern. Dazu können Triplettquencher wie z.B. Mercaptoethylamin (MEA) eingesetzt werden.

### 2.1.2 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) stellt die Wechselwirkung eines fluoreszierenden Moleküls (Donor) mit einem räumlich nah liegenden Empfänger (Akzeptor) dar. Das angeregte Fluorophor gibt dabei seine Anregungsenergie strahlungslos an das Akzeptormolekül ab. Dieser Effekt wurde bereits 1948 von Th. Förster quantenmechanisch dargelegt [15] und ist eine Weiterführung der Arbeiten von J. und F. Perrin [36]. Es handelt sich bei diesem Übergang um eine Dipol-Dipol Wechselwirkung im Nahfeld, dass heißt die Dipole des Sendermoleküls und des Empfängermoleküls überlagern

sich in ihrer Ausdehnung<sup>3</sup>.

Neben der räumlichen Nähe der beteiligten Moleküle, ist die grundlegende Voraussetzung für eine solche Wechselwirkung, dass sich das Fluoreszenzspektrum vom Donor mit dem Absorptionsspektrum vom Akzeptor überlagert. Dies ist gleichbedeutend damit, dass, ähnlich der Anregung durch Licht, eine von null verschiedene Wahrscheinlichkeit für eine resonante Überlagerung der elektromagnetischen Schwingungszustände besteht. Dadurch ergibt sich für den Donor eine durch den Energietransfer veränderte Lebensdauer

$$\tau_{DA} = \frac{1}{k_{nr} + k_r + k_T}. \quad (2.14)$$

Der Akzeptor muss nicht zwingend fluoreszieren [37]. Die Übertragungsrate  $k_T$  dieses Prozesses hängt maßgeblich von dem Abstand zwischen den Dipolen von Donor und Akzeptor, sowie von der ursprünglichen Lebensdauer  $\tau_D$  des Donor ab:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.15)$$

wobei  $R_0$  der Försterradius ist. Beim Abstand  $r = R_0$  beträgt die Effizienz des Energieübertrages 50%, womit die inverse Fluoreszenzlebensdauer des Donors ohne Akzeptor der Übertragungsrate  $k_T$  entspricht. Der Försterradius ist bestimmt über elektrodynamische Betrachtungen der Dipolfelder mit

$$R_0 := \sqrt[6]{\frac{9 \ln 10 \kappa^2 \Phi_d J}{128 \pi^5 n^4 N_A}}, \quad (2.16)$$

wobei  $\kappa^2$  der Orientierungsfaktor der beiden Dipole und  $\Phi_d$  die Quantenausbeute des Donors nach Gleichung 2.8 ohne Einfluss durch den Akzeptor ist. Weiterhin gehen der lokale Brechungsindex  $n$  zusammen mit der Avogadrozahl  $N_A$  ein. In dieser Gleichung ist die spektrale Überlappung

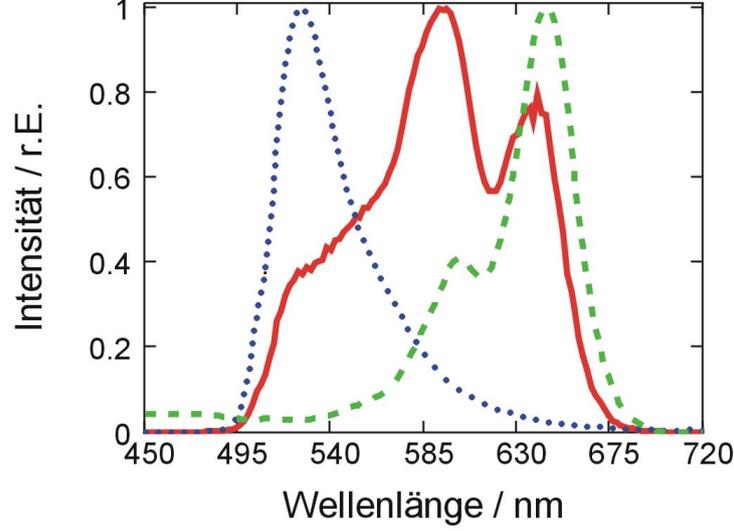
$$J = \frac{\int F_d(\lambda) \epsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_d(\lambda) d\lambda} \quad (2.17)$$

des Emissions- und Absorptionsspektrums enthalten.

Dieses Integral kann aus den Messgrößen der Absorption des Akzeptors und der Fluoreszenz des Donors für ein Farbstoffpaar berechnet werden. In Abbildung 2.4 ist die spektrale Überlappung von ATTO488 und ATTO647N dargestellt. Die Berechnung von  $R_0$  erfolgt mit Gleichung 2.17 an gemessenen

---

<sup>3</sup>Im Gegensatz dazu steht eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung mit einem, im Verhältnis zu ihrer Ausdehnung, großen Abstand, dem Fernfeld.



**Abbildung 2.4:** Überlapp (rot) von ATTO488 und ATTO647N berechnet mit Gleichung 2.17 aus dem Fluoreszenzspektrum von ATTO488 (blau gepunktet) und dem Absorptionsspektrum von ATTO647N (grün gestrichelt). Alle Graphen sind normiert.

Spektren. Fluoreszenz- als auch Absorptionsspektren sind von ihrer Umgebung abhängig. Somit ergibt sich ein von der Umgebung abhängiges Integral  $J(\lambda)$ , was schließlich zu unterschiedlichen  $R_0$ -Werten führen kann, wenn sich die lokale Umgebung des Systems ändert (vgl. S. 22). Für absolute und nicht nur relative Abstandsbestimmung ist es daher notwendig, die spektrale Überdeckung der Farbstoffe in der jeweiligen Umgebung zu ermitteln.

### Der Orientierungsfaktor $\kappa^2$

Eine weitere wesentliche Abhängigkeit des Försterradius stellt der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  dar. Der Wert ergibt sich aus denen in Abbildung 2.5 gegebenen Winkeln:

$$\kappa^2 := (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (2.18)$$

mit

$$\theta_T = \sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi + \cos \theta_D \cos \theta_A \quad (2.19)$$

$\kappa^2$  kann daher alle Werte zwischen null und vier annehmen [38]. Experimentell ist dieser Wert nicht direkt zu ermitteln, daher nimmt man meist eine Verteilung an. Unter der Annahme, vollständig frei rotierender Dipole nimmt dieser im Mittel einen Wert von  $2/3$  ein. Gleichzeitig muss die Rotation der

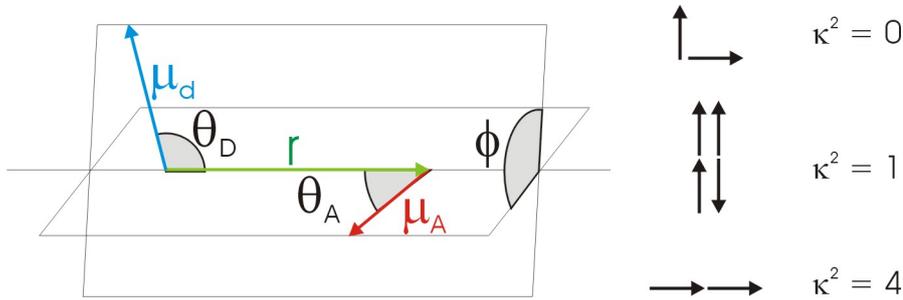


Abbildung 2.5: Abhängigkeit von  $\kappa^2$  von der Lage der Dipole bei FRET

Dipole auf einer Zeitskala erfolgen, die wesentlich kleiner ist, als die Messzeit. Dies kommt vor allem in der Einzelmolekülspektroskopie zum Tragen, da die Teilchen eine Diffusionszeit von einer Millisekunde oder weniger haben. Bei mittleren FRET-Werten konnte gezeigt werden, dass diese Annahme für viele untersuchte Systeme gerechtfertigt ist [39]. Bei sehr kurzen Abständen wird die Orientierung der Dipole beeinträchtigt, wodurch die scheinbare Transferrate sinkt. Können innerhalb der Messzeit nicht alle Zustände eingenommen werden, ist eine Umrechnung der Transferrate in Abstände fast nicht möglich. Die Wahrscheinlichkeitsdichte  $p(\kappa^2)$ , dargestellt in Abbildung 2.6 ist sehr breit und steigt mit Abnehmenden  $\kappa^2$ . Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass  $\kappa^2 < 0.1$  ist, liegt immerhin noch bei 0.25.

### Effizienz des Energietransfer

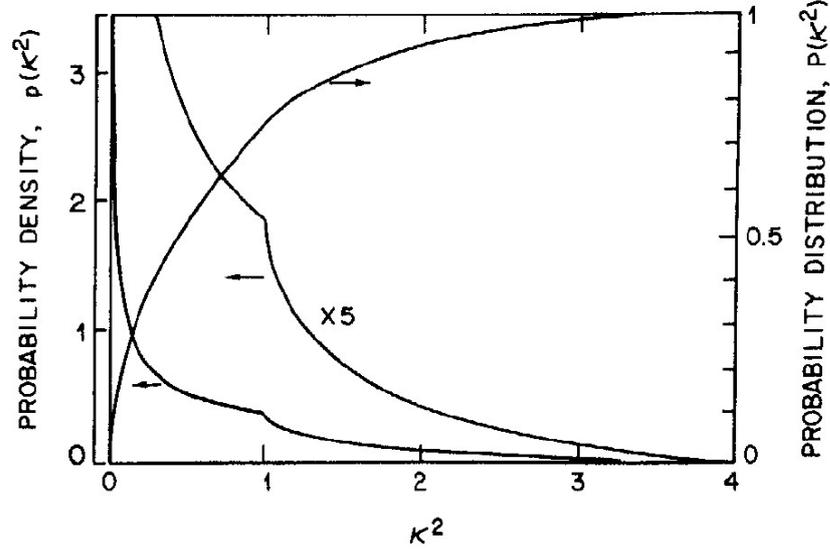
Die Quanteneffizienz eines Prozesses bestimmt man nach 2.8 über den Quotienten aus der Reaktionsrate und der Summe alle Quenschraten. Aus den Gleichungen 2.14 und 2.15 ergibt sich die Effizienz des Energieübertrag zu

$$E = \frac{k_T}{k_{nr} + k_r + k_T} \quad . \quad (2.20)$$

Auf der Ebene der Fluoreszenz führt das Abwandern der Energie vom Donor auf den Akzeptor zu einer Abnahme der Fluoreszenz des Donors. Ist der Akzeptor ebenfalls fluoreszent, kann durch das Lösen der Ratengleichungen im Gleichgewicht

$$\frac{d[F_D(t)*]}{dt} = -(k_{rD} + k_{nrD} + k_T)[F_D(t)*] \quad (2.21)$$

$$\frac{d[F_A(t)*]}{dt} = -(k_{rA} + k_{nrA})[F_A(t)*] + k_T[F_D(t)*] \quad (2.22)$$



**Abbildung 2.6:** Wahrscheinlichkeitsdichte  $p(\kappa^2)$ , bzw. die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $P(\kappa^2)$  für ein gegebenes  $\kappa^2$  aufgetragen gegen  $\kappa^2$ . Darstellung entnommen aus [38].

die Gesamtfluoreszenz des Donors (Akzeptors) in Anwesenheit des Akzeptors (Donors)  $I_{DA}$  ( $I_{AD}$ ) durch Integration über die Zeit  $t$  ermittelt werden:

$$I_{DA} = \frac{1}{k_{nrD} + k_{rD} + k_T} \quad (2.23)$$

$$I_{AD} = \frac{k_T}{k_{nrD} + k_{rD} + k_T} \cdot \frac{1}{k_{nrA} + k_{rA}} \quad (2.24)$$

Analog gilt dies für die Intensität des Akzeptors. Vergleicht man Gleichung 2.24 mit Gleichung 2.20, so kann man schreiben

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2.25)$$

bzw.

$$E = 1 - \frac{\Phi_f^{DA}}{\Phi_f^D}, \quad (2.26)$$

wobei  $\tau_{DA}$  die mittlere Lebensdauer des angeregten Donors und  $\Phi_f^{DA}$  die Quantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors darstellt. Gleichung 2.25 kann geschrieben werden als

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (2.27)$$

mit den leichter messbaren Fluoreszenzintensitäten  $I_{DA}$  und  $I_D$ . Für den Fall, dass der Akzeptor ebenfalls leuchtet, kann die Zunahme an Akzeptorfluoreszenz als Maß für die FRET-Effizienz herangezogen werden [37]. Dabei wird Bezug auf die nicht messbare Fluoreszenz bei 100% Transmission genommen, einer schwer zugänglichen Größe. Da sich aber die Wellenlänge der Donor- und Akzeptorfluoreszenz aufgrund der Rotverschiebung von Fluoreszenz häufig spektral separieren lassen, kann aus Gleichung 2.20 eine sehr hilfreiche Beziehung hergeleitet werden:

$$E = \frac{1}{1 + \frac{k_{nrD} + k_{rD}}{k_T}}$$

Mit Detektionswahrscheinlichkeit  $\eta_D^{Dem} \neq \eta_A^{Aem}$  und den Fluoreszenzquanteneffizienzen aus Gleichung 2.8 folgt:

$$\begin{aligned} E &= \frac{1}{1 + \frac{\Phi_{fA} \eta_A^{Aem} k_{nrA} + k_{rA}}{\Phi_{fD} \eta_D^{Dem} k_T}} \\ &= \frac{1}{1 + \gamma \frac{k_{nrA} + k_{rA}}{k_T}}, \end{aligned}$$

wodurch mit den Gleichungen 2.23 und 2.24 folgt:

$$\begin{aligned} E &= \frac{1}{1 + \gamma \frac{I_{DA}}{I_{AD}}} \\ \Rightarrow E &= \frac{I_{AD}}{I_{AD} + \gamma I_{DA}} \end{aligned} \quad (2.28)$$

wobei

$$\gamma := \frac{\Phi_{fA} \eta_A^{Aem}}{\Phi_{fD} \eta_D^{Dem}}. \quad (2.29)$$

Das heißt, dass die Effizienz des Energieübertrags durch die spektral aufgelösten Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor ausgedrückt werden kann. Der  $\gamma$ -Faktor ist dabei nur von den Quantenausbeuten der beiden freien Farbstoffe und ihrer Detektionswahrscheinlichkeit abhängig und somit apparateabhängiger Parameter.

### FRET mit gleichen Partnern

Die Wahrscheinlichkeit für einen Energieübertrag zwischen freien Molekülen in einer Lösung (homo-FRET) ist sehr gering. Schon Förster hat die kritische Konzentration dafür mit

$$c_0 = \frac{3}{4\pi} \frac{1}{N_A R_0^3} \quad (2.30)$$

abgeschätzt [15]. Für diese Konzentration werden etwa 65% der Energie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung durch die in der Nähe befindlichen Moleküle abgenommen. Für Fluorescein ergibt sich eine kritische Konzentration von  $c_0 = 3,2 \cdot 10^{-3}$  mol/l. Diese Art der Energiewanderung spielt jedoch in einigen biologischen Systemen eine Rolle. Die Konzentration von Chlorophyll im Blatt beträgt im Mittel 0.1 mol/l. Somit wird die Energie des eintreffenden Sonnenlichts über dieses Prinzip weitergegeben. Da die Bestrahlung von einer Seite des Blattes erfolgt, kann sogar ein gerichteter Energietransfer über etwa  $10^4$  Moleküle stattfinden.

Die Konzentrationen der Einzelmolekülspektroskopie liegen zwischen  $10^{-8}$  mol/l bei der FCS bis hin zu  $10^{-11}$  mol/l. Die Wahrscheinlichkeit für einen homo-FRET ist daher quasi null.

## 2.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

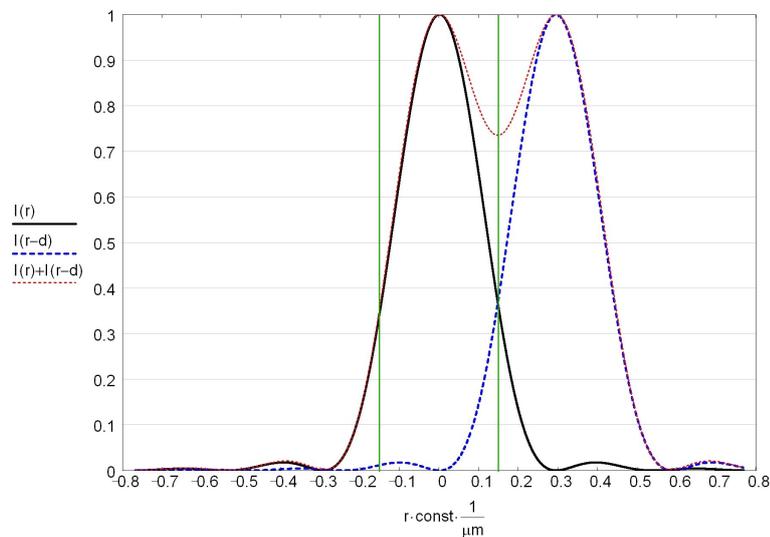
Bereits im 19. Jahrhundert wurde erkannt, dass die normale Mikroskopie mit sichtbarem Licht in ihrer Auflösung von der Theorie her begrenzt ist. Der minimale Abstand zwischen zwei Punkten, die aufgelöst werden können, ist gegeben durch

$$D = \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{NA} \quad , \quad (2.31)$$

wobei  $n$  der Brechungsindex des Medium,  $\alpha$  der Öffnungswinkel des Objektivs und  $\lambda$  die Wellenlänge des gebrochenen Lichts ist. Beobachtet wurde dies von Abbe anhand von kontinuierlichen Gitterstrukturen mit unterschiedlichen Abständen. Der Faktor  $n \sin \alpha$  wird auch als numerische Apertur  $NA$  bezeichnet und ist der Öffnungswinkel eines optischen Elements. Die Beziehung 2.31 gilt unter der Annahme einer kohärenten Lichtquelle und ist bei vollständiger Ausleuchtung des Objektivs erreichbar.

### 2.2.1 Auflösungsvermögen eines Mikroskops

Mit Hilfe der Theorie kann die scheinbare Größe eines beliebig kleinen, punktförmigen Objekts unter dem Mikroskop abgeschätzt werden. Ähnlich wie bei



**Abbildung 2.7:** Berechnete Intensitätsverteilung einer beugungslimitierten Abbildung einer punktförmigen Lichtquelle mit der Besselfunktion erster Ordnung (schwarz). Weitere Intensitätsverteilung, um den Radius der ersten verschoben sowie der Summe der beiden (blau bzw. rot gestrichelt). Das Minimum der Summe fällt auf etwa 73.5% der maximalen Intensität ab. Wählt man eine Lochblende mit diesem Radius (grün dargestellt) in einer konfokalen Abbildung, so bleiben etwa 85% der Intensität eines Punktes erhalten.

einer Lochkamera interferiert das Licht mit sich selbst, und es bildet sich eine kreisförmige Beugungsfigur. Die nullte Ordnung der Verteilungsfunktion des punktförmigen Objekts bei Betrachtung in einem Mikroskop bildet die sogenannte *Airy-Disk*. Das Intensitätsprofil

$$I(r) \propto (J_1(r)/r)^2 \quad (2.32)$$

wird beschrieben durch eine Besselfunktion erster Ordnung:

$$J_1(x) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{-1^m x / 2^{2m+1}}{(m+1)!m!} \quad (2.33)$$

Somit ergibt sich der Durchmesser der Airy-Disk

$$d_{Airy} = \frac{3.8317}{2\pi} \frac{\lambda}{NA} = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.34)$$

in Abhängigkeit von der numerischen Apertur und der Wellenlänge. Diese Größe stellt die Ausbreitungsfunktion (PSF<sup>4</sup>) z.B. eines fluoreszierenden Teilchens in einer Abbildung dar und entspricht dem Abstand zwischen den beiden benachbarten Intensitätsminima aus Abbildung 2.7. Der kleinste auflösbare Abstand zweier benachbarter Punkte kann nun mit dem Rayleigh'schen Kriterium als  $0.5 d_{Airy}$  abgeschätzt werden. In diesem Fall fällt die Intensität zwischen zwei gleich hellen Punkten auf etwa 73.5%.

Neben der gerade betrachteten lateralen Auflösung, ist die axiale Auflösung, entlang der optischen Achse, zu betrachten. Diese ist definiert über die dreidimensionale Ausbreitung einer punktförmigen Lichtquelle nahe der Fokalebene. Der Abstand zwischen den ersten Beugungsminima ist gegeben durch

$$d_z = 1.4 \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (2.35)$$

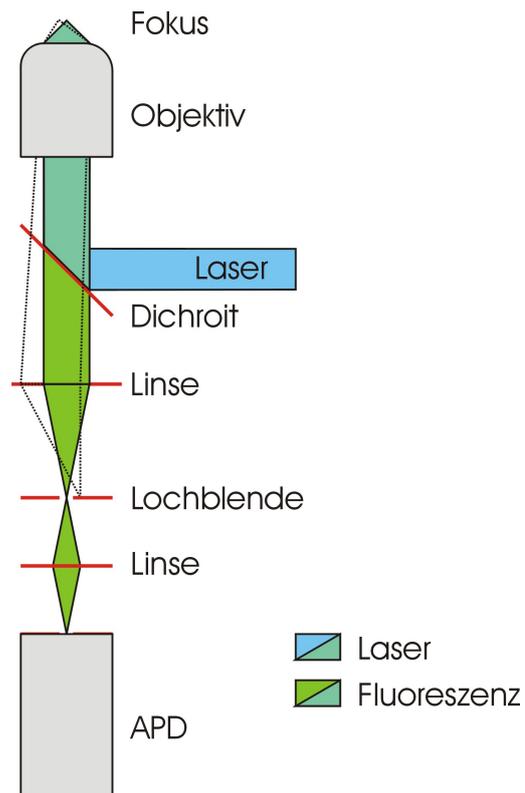
Die Betrachtungen der Auflösung gelten in dieser Form für ein optimal eingestelltes Mikroskop bei normaler Weitfeldmikroskopie. Durch den Übergang zur konfokalen Mikroskopie kann die Auflösung weiter verbessert werden.

### 2.2.2 Konfokale Mikroskopie

In der konfokalen Mikroskopie ist, anders als in der klassischen Mikroskopie, das Beobachtungsvolumen auf den Fokus beschränkt. Licht außerhalb des Fokus wird über eine Blende mit kleiner Öffnung gefiltert. Durch diese Art der Mikroskopie kann das theoretisch ermittelte Auflösungsvermögen erreicht werden. Der Aufbau ist in dem Schema in Abbildung 2.8 dargestellt. Dadurch,

---

<sup>4</sup>Point-Spread-Function



**Abbildung 2.8:** Prinzip der konfokalen Abbildung. Das Anregungslicht (blau) trifft auf einen dichroitischen Strahlteiler und wird in die Probe fokussiert. Das von der Probe ausgehende Licht (grün) wird über dasselbe Objektiv auf eine Lochblende fokussiert. Licht außerhalb des beleuchteten Fokus kann die Lochblende nicht passieren (gestrichelt), da der untere Fokus nicht mit der Lochblende übereinstimmt.

dass nur Signale aus dem Fokus auf den Detektor gelangen, ist die konfokale Mikroskopie zunächst kein bildgebendes Verfahren. Stattdessen muss zur Bilderzeugung die Probe punktwise abgetastet werden (CLSM<sup>5</sup>). Im Wesentlichen gibt es zwei Arten daraus ein zweidimensionales Bild zu erzeugen. Zum einen kann die Probe z.B. über Schrittmotoren oder Piezoelementen in der  $xy$ -Ebene gerastert werden. Dabei entsteht ein Abbild der Scanfläche in Abhängigkeit von der Zeit. Zum anderen kann über einen beweglichen Spiegel der Anregungsstrahl die Probe selbst rastern. Jedoch muss dabei die Detektion über das Pinhole ebenfalls der Rasterung angepasst werden. Dies kann z.B. dadurch geschehen, dass Detektion und Anregung erst hinter dem beweglichen Spiegel getrennt werden.

In Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie wird das Anregungsvolumen an das Beobachtungsvolumen angepasst. Dies wird erreicht, indem in der Anregung eine homogene und meist monochromatische Lichtquelle über einen Strahlteiler durch das Objektiv in die Probe fokussiert wird. Die im Fokus befindlichen Farbstoffe geben Photonen ab, welche über das selbe Objektiv gesammelt werden. Diese gelangen durch den Strahlteiler über fokussierende Linsen auf den Detektor. Damit Licht aus anderen Ebenen nicht mit auf den Detektor gelangt, wird eine der Vergrößerung angepasste Lochblende, das *Pinhole*, vor dem Detektor eingesetzt.

Als fluoreszierende Farbstoffe kommen viele Varianten in Frage. Eine Möglichkeit ist es, z.B. bei Proteinen die natürliche Fluoreszenz zu nutzen. Jedoch nehmen die Schädigungen in Zellen mit der energiereicheren UV-Strahlung zu und die Selektivität ist zunächst nicht zu erreichen. Für Messungen an einem einzelnen Molekül ist die Zahl der Photonen vor der Zerstörung des Proteins im Moment noch zu gering. Daher werden stattdessen fluoreszierende Farbstoffe eingesetzt, die im sichtbaren Bereich leuchten. Diese Epifluoreszenzmikroskopie wird in der Biologie inzwischen als Standard eingesetzt.

### Numerische Apertur der Lochblende

Die Lochblende in der konfokalen Mikroskopie dient als Filter für Photonen außerhalb der fokalen Ebene. Da die Größe des Detektionsvolumen, aus dem verwendbare Signale kommen, auf die Ausdehnung des Laserfokus beschränkt werden soll, ist es sinnvoll die Abbildung auf das Volumen des Laserfokus einzugrenzen. Der Durchmesser des Fokus hinter der Abbildungslinse an der Stelle des Pinhole steht im Zusammenhang mit der Airy-Disk aus Gleichung

---

<sup>5</sup>Confocal laser scanning microscopy

## 2.34

$$d = d_{Airy} \cdot M , \quad (2.36)$$

wobei  $M$  die Vergrößerung des Objektivs ist. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn das Pinhole etwa dem 0.5- bis 0.6-fachen der Fokusgröße entspricht. Nach Abbildung 2.7 auf Seite 29 ist dabei die Intensität auf etwa 37% gesunken und 85% der Gesamtintensität der Beugungsfigur liegen innerhalb dieses Bereichs.

Durch die konfokale Mikroskopie kann damit das Auflösungsvermögen gegenüber den in Gleichungen 2.34 und 2.35 angegebenen Werten um Faktor  $\sqrt{2}$  verbessert werden, indem nur das durch das Pinhole in lateraler und axialer Richtung beschränkte Volumenelement auf den Detektor abgebildet wird. Somit können mit dem Rayleigh'schem Kriterium Objekte bei einem Abstand von

$$\begin{aligned} r_{lat} &= 0.43 \frac{\lambda}{NA} \\ r_{ax} &= 1.41 \frac{n\lambda}{NA^2} \end{aligned} \quad (2.37)$$

als getrennt angenommen werden. Sind die Signale jedoch schwach gegenüber dem Hintergrundrauschen, so ist es sinnvoll die Lochblende größer zu wählen.

In dieser Arbeit wurden Objektive mit einer numerischen Apertur von 1.45 und einer 100-fachen Vergrößerung verwendet. Nach 2.36 ergibt sich somit ein idealer Durchmesser von  $35 \mu\text{m}$  bei einer maximalen Detektionswellenlänge von  $700 \text{ nm}$ . Jedoch gelten diese Annahmen nur unter der Voraussetzung einer homogenen Ausleuchtung des Objektivs. Im Falle eines eher gaußförmigen Strahlprofil des Lasers, wird das beleuchtete Volumen vergrößert [40]. Mit dieser Betrachtung kann eine laterale Auflösung von etwa  $420 \text{ nm}$  und eine axiale Auflösung von etwa  $630 \text{ nm}$  erreicht werden.

Jedoch haben Fluoreszenzfarbstoffe nur eine begrenzte Zyklendauer und somit können gerade in der weiter unten beschriebenen Einzelmolekülspektroskopie nur eine limitierte Anzahl von Photonen von einem Molekül aufgefangen werden. Um diese von dem Rauschen des Detektors signifikant zu unterscheiden ist ein gewisses Signal zu Rausch Verhältnis  $S/N$  notwendig. Zur Verbesserung des  $S/N$ -Verhältnis kann der Durchmesser der Lochblende vergrößert werden. In dieser Arbeit kam ein Pinhole mit einem Durchmesser von  $100 \mu\text{m}$  zum Einsatz. Die laterale Auflösung wird dadurch nur unwesentlich beeinflusst [40] und das Signal zu Rausch-Verhältnis kann bei geeigneter Filterwahl auf etwa  $100 : 1$  in Lösungen gehalten werden.

## 2.3 Einzelmolekülspektroskopie

Der Übergang von Ensemblespektroskopie zur Einzelmolekülspektroskopie (SMS<sup>6</sup>) wurde erstmals von Rigler *et al.* 1992 in einem konfokalen Mikroskop beobachtet [11], jedoch schon 1990 in der Gruppe um Keller vorhergesagt, welche die ersten Einzelmoleküldaten in Lösung aufnehmen konnten [10]. In den Jahren danach entwickelte sich diese Technik rasant weiter, da durch die Beobachtung von einzelnen Molekülen eine Vielzahl von Aussagen und Vermutungen belegt oder auch widerlegt werden konnten [41, 42, 43, 44, 45, 16, 46, 47]. Bezüglich abstandsabhängiger Reaktionen oder zur Analyse von komplexen Reaktionen besteht ein hohes Interesse an dem Verhalten einzelner Moleküle [48, 49, 50]. Das konfokale Prinzip zusammen mit den heutzutage vorhandenen hochempfindlichen Detektoren, ermöglichen eine Analyse von einzelnen Molekülen.

### 2.3.1 Prinzip der Einzelmolekülspektroskopie

Prinzipiell kann durch eine hinreichende Verdünnung einer Substanz immer erreicht werden, dass sich in einem definierten Volumen statistisch gesehen nur ein einzelnes Molekül aufhält. Jedoch sind dabei der Beobachtung von Reaktionskinetiken starke Grenzen gesetzt. Die Bindungskonstante muss ausreichend hoch sein, damit auch bei geringen Konzentrationen die Bindung stabil bleibt. Durch die hohe Auflösung in einem konfokalen Mikroskop erreicht man ein Beobachtungsvolumen von  $(1\ \mu\text{m})^3 = 1\ \text{fl}$ , so dass eine Konzentration von  $10^{-11}$  molar ausreicht, um bei einer Diffusionszeit von 1 ms immer nur ein Molekül im Fokus zu haben. Jedoch bieten auch andere Methoden wie totale interne Reflexion (TIRF), Optische-Raster-Nahfeld-Mikroskopie (NSOM) oder bildgebende Weitfeldmikroskopie (wide-field imaging microscopy) die Möglichkeit, einzelne Moleküle zu beobachten. Allen Methoden gemeinsam ist eine Reduzierung des Anregungs- bzw. des Beobachtungsvolumen.

Der Aufbau eines *sm*-empfindlichen konfokalen Mikroskops entspricht im Prinzip einem konfokalem Mikroskop. Als Lichtquelle dienen ein oder mehrere Laser, die über den Dichroiten in das Objektiv gelangen. Als Objektiv kommen vor allem Achromate bzw. Apochromate mit einer hohen numerischen Apertur oberhalb von 1.2 in Frage, damit die wenigen Photonen nicht verloren gehen. Beobachtet wird nur das Fluoreszenzlicht von einzelnen Fluorophoren, die sich im Fokus befinden. Deren Signal gelangt über die Lochblende mit einem Durchmesser von 50–100  $\mu\text{m}$  auf die etwa 150  $\mu\text{m}$  große Fläche einer hochempfindlichen Avalanche-Photodiode (APD).

---

<sup>6</sup>Single Molecule Spectroscopy

Ein Einzelmolekülereignis zeichnet sich gegenüber mehreren Molekülen eindeutig aus. Gerade wenn Fluorophore auf Oberflächen betrachtet werden, kommen eine Reihe typischer Merkmale zum Vorschein, wie zum Beispiel nicht reversibles, aber spontanes Bleichen der Fluoreszenz (*Bleaching*), Unterbrechungen in der Fluoreszenz (*Blinking*) aufgrund von nicht radiativen Zuständen sowie einer definierten Polarisationsrichtung der Fluoreszenz von dem Dipol des Emitters. In Lösungen können diese Eigenschaften bis auf die Polarisation nicht direkt beobachtet werden. Jedoch ermöglicht z.B. eine schnelle Korrelationspektroskopie [51] das Aufdecken der nicht fluoreszierenden Triplett-Zustände mit der Möglichkeit eine Reaktion durch Änderungen der Übergangsraten in den Triplett-Zustand zu beobachten [52, 53].

### Vergleich einer 2f-Abbildung mit einem parallelen Strahlengang

Mikroskopobjektive sind meist mit einer auf unendlich korrigierten Optik versehen, so dass die Abberationen minimal werden, wenn sich das Objekt in der Fokusebene des Objektivs befindet. Somit wird das Licht von einem Objekt parallel aus dem Objektiv austreten. Viele Hersteller (Zeiss, Olympus) haben aber in ihrem Mikroskop eine Tubuslinse eingebaut, die diesen Strahlengang außerhalb des Mikroskops fokussiert. Die Fokalebene bietet sich bei einem Aufbau mit einer 2f-Abbildung als Position der Lochblende an.

Bei einer 2f-Abbildung ist das Objekt ebenso wie das Bild im Abstand der doppelten Fokalebene der Linse angeordnet [54]. Der Vorteil dieser Abbildung liegt in der Erhaltung der Abbildungseigenschaften, wodurch Gegenstand und Bild gleich groß sind. Dadurch bleiben auch die in Gleichung 2.36 gegebenen Verhältnisse der Fokusgröße erhalten [40] und es ist gewährleistet, dass dasselbe Volumen auch bei unterschiedlichen Wellenlängen beobachtet wird. Weiterhin kann durch das Nutzen der Tubuslinse auf eine weitere Linse verzichtet werden.

Der Vorteil eines parallelen Strahlengangs liegt darin, dass die Lochblende auf den jeweiligen Wellenlängenbereich angepasst werden kann. So kann ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden. Außerdem kann auf die im Mikroskop eingebaute Tubuslinse verzichtet werden, so dass mit vollständig korrigierten Objektiven das Signal parallel von dem Objektiv ohne zusätzliche Linsen geführt werden kann. Während bei einer 2f-Abbildung die  $150 \mu\text{m}^2$  große aktive Fläche der APD überstrahlt wird, kann bei parallelen Strahlengang dieser Fokus verkleinert werden, indem mit einer Linse mit kurzer Brennweite das Fluoreszenzsignal auf die Fläche fokussiert wird. Dies führt zu einer geringeren Streuung bei der Auflösung von Fluoreszenz-abklingdauern durch unterschiedliches Verhalten der beleuchteten Bereiche

der Photodiode. Durch den parallelen Strahlengang ist auch die Position der Dioden nicht festgelegt, da der Strahldurchmesser sich nicht ändert. Dies ermöglicht eine freiere Gestaltung des Aufbaus.

In dieser Arbeit kamen sowohl der parallele Aufbau als auch ein Aufbau mit einer 2f-Abbildung zum Einsatz. Da keine wesentlichen Unterschiede sowohl in der Detektionseffizienz als auch im Signal-zu-Rausch-Verhältnis beobachtet werden konnten, überwog letztendlich die erhöhte Variabilität des parallelen Aufbaus, sowie die geringere Anfälligkeit gegen Störungen.

### Spektrale Auflösung der Fluoreszenz

Da der Einzelmolekülspektroskopie gerade bei der Untersuchung von Reaktionen eine besondere Rolle zukommt, ist der Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der Reaktionspartner nahe liegend. Dabei können die Fluorophore sowohl anhand ihres Spektrums als auch ihrer Fluoreszenzlebensdauer unterschieden werden [55]. Eine einfachere Trennung auch ohne Nanosekundenauflösung ist über die Spektren möglich. Dazu wird das vom Mikroskop kommende Signal über dichroitische Strahlteiler nach den Wellenlängen getrennt. Dichroite besitzen die Eigenschaft, Wellenlängen unterhalb einer Grenzwellenlänge zu mehr als 90% zu reflektieren, während für längere Wellenlängen der Strahlteiler eine hohe Transmission besitzt. Zum Schutz der Photodioden werden zusätzlich spektrale Transmissionsfilter eingesetzt, die z.B. Laserstreulicht oder Photonen der Ramanstreuung filtern, das Fluoreszenzsignal jedoch passieren lassen. Die jeweiligen Filter sind abhängig von den verwendeten Farbstoffen, die Auswahl ist im Kapitel 3 zu finden.

#### 2.3.2 *sm*-FRET

Nachdem einzelne Moleküle in einem konfokalen Setup mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht wurden, erfuhr der FRET-Effekt kurze Zeit später eine Renaissance in dieser Disziplin [48, 56, 57, 49, 58] als Einzelpaar-FRET (*sm*-FRET)<sup>7</sup>. Gegenüber der Ensemblespektroskopie hat *sm*-FRET die von der Einzelmolekülspektroskopie bekannten Vorteile. In Bezug auf FRET bedeutet dies konkret:

---

<sup>7</sup>sm: single-molecule

## Verteilungen

Mit Hilfe des *sm*-FRET können Verteilungen von unterschiedlichen FRET-Werten innerhalb einer Probe unterschieden werden. Während im Ensemble nur ein einziger Wert für die Effizienz berechnet wird, kann mit *sm*-FRET eine mittlere gewichtete Verteilung über die unterschiedlichen FRET-Werte von einzelnen Molekülen angegeben werden. Dieser Vorteil ist zwar nicht einzigartig, jedoch besonders hilfreich: Mit zeitaufgelöster Spektroskopie ist man ebenfalls in der Lage, durch die Analyse der Fluoreszenzabklingzeit des Donors unterschiedliche FRET-Werte entsprechend ihren Anteilen zu trennen. Jedoch können verschiedene Fluoreszenzabklingdauern durch statische und dynamische Heterogenität aus unterschiedlichen Quellen stammen.

## Dynamik

Das Beobachten von biochemischen Reaktionen stellt einen weiteren Vorteil des *sm*-FRET gegenüber der Ensemblespektroskopie dar. Nicht nur über FCS können schnelle Reaktionskinetiken aufgelöst werden, sondern auch im FRET-Experiment. Der Vorteil liegt darin, dass nicht alle Moleküle in einem Zustand präpariert werden müssen. Die Kinetik kann aufgrund unterschiedlicher FRET-Werte in einer Probe ermittelt werden. Dabei ergeben sich zeitlich abhängige Veränderungen der Übertragungseffizienz einzelner Bursts.

## Übersprechen und direkte Anregung

Im Unterschied zum Ensemble ist die Detektion der Fluoreszenz bisher beschränkt auf größere Wellenlängenbereiche, da die Detektion über ein Spektrometer zu ineffektiv ist. Daher besteht die Wahrscheinlichkeit, dass Photonen eines Farbstoffs auf dem „falschen“ Detektor registriert werden. Die detektierte Fluoreszenz setzt sich in Anlehnung an [59] folgendermaßen zusammen:

$$F_{D_{ex}}^{Dem} = I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D \Phi^D \eta_{Dem}^D (1 - E) \quad (2.38)$$

$$F_{D_{ex}}^{Aem} = I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D \Phi^D \eta_{Aem}^D (1 - E) + I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^A \Phi^A \eta_{Aem}^A + I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D \Phi^A \eta_{Aem}^A E \quad , \quad (2.39)$$

wobei  $I_{D_{ex}}$  die Anregungsintensität ist. Der Index soll verdeutlichen, dass vor allem der Donor angeregt wird und bezeichnet somit die entsprechende Wellenlänge.  $\sigma_{D_{ex}}^D$  bzw.  $\sigma_{D_{ex}}^A$  sind der Absorptionsquerschnitt des Donors bzw. des Akzeptors bei der Wellenlänge  $D_{ex}$  und  $\Phi^D$  und  $\Phi^A$  Quantenausbeuten der Farbstoffe in Abwesenheit eines FRET Paares. Schließlich sind mit  $\eta_{Dem}^D$ ,  $\eta_{Aem}^D$  und  $\eta_{Aem}^A$  die Detektionswahrscheinlichkeiten der Donorfluoreszenz im

Donorkanal und im Akzeptorkanal bzw. der Akzeptorfluoreszenz im Akzeptorkanal gegeben.

Entsprechend des Anteils an Donorintensität auf dem Akzeptorkanal kann das Übersprechen korrigiert werden:

$$\begin{aligned} ct &:= I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D \Phi^D \eta_{A_{em}}^D (1 - E) & (2.40) \\ &= \eta_{A_{em}}^D / \eta_{D_{em}}^D F_{D_{ex}}^{D_{em}} \\ &= \alpha F_{D_{ex}}^{D_{em}} \end{aligned}$$

mit

$$\alpha = \eta_{A_{em}}^D / \eta_{D_{em}}^D . \quad (2.41)$$

Dieses Übersprechen (*crosstalk*) ist eine konstante Größe für ein Setup mit einer gewählten Farbstoff-Filter Kombination. Der Verlust an den Akzeptorkanal kann daher durch einen bestimmbaren Faktor  $\alpha$  im Mittel korrigiert werden. Das Übersprechen betrifft vor allem den Donor, da die Filterkombination im Allgemeinen so gewählt werden kann, dass nur ein Übersprechen des Donors in den Akzeptorkanal beobachtet wird. Obwohl in einem konfokalen Einzelmolekülaufbau einzelne Photonen detektiert werden, ist schon bei einer Zählrate von 100 *kHz* die Statistik ausreichend groß, dass in jedem Burst jeder Detektionskanal mit einem konstanten Faktor von dem Übersprechen eines Kanals in den anderen korrigiert werden kann. Das Übersprechen kann theoretisch aus einer Faltung der Fluoreszenzspektren und der wellenlängenabhängigen Filtertransmission errechnet werden. Sinnvoller ist es jedoch, die Faktoren an dem Setup zu bestimmen, indem nacheinander Lösungen der einzelnen farbstoffmarkierten Proben detektiert werden.

Des Weiteren besteht aufgrund der Absorptionsspektren eine Wahrscheinlichkeit für eine direkte Anregung des Akzeptor mit der Anregungswellenlänge des Donors (*direct excitation*). Dies entspricht dem zweiten Summanden aus 2.39. Auch die direkte Anregung stellt eine Konstante für eine gewählte Kombination aus Farbstoff, Filtern und Anregungswellenlängen dar. In erster Näherung ergibt sich direkte Anregung aus dem Absorptionsspektrum des Farbstoffs. Einer bessere Annäherung kann über die folgenden Beziehungen bestimmt werden:

$$\begin{aligned} direx &:= I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^A \Phi^A \eta_{A_{em}}^A & (2.42) \\ &= \frac{I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^A}{I_{A_{ex}} \sigma_{A_{ex}}^A} F_{A_{ex}}^{A_{em}} \\ &= \beta F_{A_{ex}}^{A_{em}} , & (2.43) \end{aligned}$$

da für eine direkte Anregung des Akzeptor mit seiner Anregungswellenlänge gilt:

$$F_{A_{ex}}^{A_{em}} = I_{A_{ex}} \sigma_{A_{ex}}^A \Phi^A \eta_{A_{em}}^A . \quad (2.44)$$

Der Faktor

$$\beta = \frac{I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^A}{I_{A_{ex}} \sigma_{A_{ex}}^A} \quad (2.45)$$

kann in einem Setup mit alternierender Laseranregung bestimmt werden und somit die gemessene Intensität auf dem Akzeptorkanal korrigiert werden. Bei einer Anregung mit nur einer Wellenlänge ist es aber nicht möglich, die direkte Anregung des Akzeptors bei Donoranregung zu bestimmen. Eine vollständige Korrektur ist nicht möglich, da unbekannt bleibt, wie stark der Akzeptor in einem Burst fluoresziert [17].

Aus den gegebenen Beziehungen kann die vom Energietransfer stammende Fluoreszenz

$$F_{\text{FRET}} = F_{D_{ex}}^{A_{em}} - ct - \text{direx} \quad (2.46)$$

bestimmt werden. Aus Gleichung 2.15 wird im Rahmen der Einzelmolekülspektroskopie

$$E = \frac{F_{\text{FRET}}}{F_{\text{FRET}} + \gamma F_{D_{ex}}^{D_{em}}} . \quad (2.47)$$

## 2.4 Prinzip der alternierenden Laseranregung

Eine wesentliche Einschränkung bei FRET Experimenten mit einfacher Laseranregung liegt in dem nicht möglichen direkten Nachweis unterschiedlicher Fluorophore in einem Komplex. Vor allem wenn der Abstand zwischen den Farbstoffen für den resonanten Energietransfer zu groß wird oder aus anderen Gründen kein Energietransfer zum Akzeptor stattfindet. Dies kann dann der Fall sein, wenn die Fluorophore nicht frei beweglich sind und die beteiligten Dipole aufgrund ihrer räumlichen Anordnung für einen wesentlich schwächeren Energietransfer sorgen (vgl. dazu Abschnitt 2.1.2), oder konkurrierende Prozesse, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, eine Depopulation des angeregten Donors zur Folge haben.

Während bei immobilisierten multichromophoren FRET-Systemen noch die Möglichkeit besteht über Akzeptorbleaching nach und nach alle Farbstoffe aufzudecken [60, 22], ist es in Lösungen von solchen Systemen selbst auf Einzelmolekülebene nicht möglich, die beteiligten Farbstoffe allein anhand ihres spektralen Fingerabdrucks und den Fluoreszenzlebensdauern mit einer Anregungswellenlänge zu identifizieren. Gleichzeitige Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen ist zum Nachweis aller Farbstoffe ob mit oder ohne FRET

notwendig und wird z.B. in der FCS eingesetzt [61]. Somit können kolokalisierte Farbstoffmoleküle nachgewiesen werden, jedoch erlaubt dies keine Bestimmung der FRET-Effizienz. Die Fluoreszenz durch direkte Anregung der Akzeptormoleküle überlagert das durch FRET hervorgerufene Fluoreszenzsignal. Somit ist der fluoreszierende Anteil durch resonanten Energietransfer nicht mehr nachzuvollziehen.

Die Idee besteht nun darin, unterschiedliche Anregungswellenlängen sequentiell in einem konfokalen Aufbau einzusetzen. Damit ist es möglich, die Existenz unterschiedlicher Farbstoffe an einen Molekül oder Molekülkomplex abzufragen. Diese Methode wurde bereits 2004 von Kapanidis vorgestellt [17, 18]. Jedoch sind die vielschichtigen Fragestellungen mit einem Donor-Akzeptor Paar häufig nicht mehr zu lösen. Vielmehr ist man durch die Fragen z.B. aus der Biologie an den Strukturen und Interaktionen von heterogenen und heteromeren komplexen Systemen interessiert. Ein solches System ist auch die im zweiten Teil dieser Arbeit untersuchte vakuoläre  $H^+$ -ATPase (Kapitel 2.5). Gerade ihre Komplexität war ein ausschlaggebender Grund, neue Untersuchungsmethoden zu entwickeln und an diesem Komplex auszuprobieren. Im Folgenden wird zunächst das Prinzip der alternierenden Laseranregung eingeführt und im Anschluss daran auf drei Farben erweitert. Dazu folgen unterschiedliche Testsysteme, um Einblicke in die Funktion des TrALEx zu geben und die Möglichkeiten und auch Grenzen dieses kombinierten System aus mehreren Anregungswellenlängen zu erkunden.

Die Repetitionsrate der unterschiedlichen Wellenlängen muss bei alternierender Anregung mindestens der Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle durch den Laserfokus entsprechen. Jedoch ist bei dieser Zyklendauer nicht gewährleistet, dass auch Moleküle, die den Fokus schneller passieren, einen vollständigen Zyklus aller Anregungswellenlängen erfahren. Freie Farbstoffe haben eine typische Diffusionszeit von etwa  $300\mu s$ , DNA hingegen hat eine Diffusionszeit von etwa einer Millisekunde, je nach Länge des Stranges (vgl. Kapitel 2.2). Wählt man die Zyklendauer mindestens zehnmal so schnell, kann von einer ausreichenden Homogenität aller Anregungswellenlängen für ein einzelnes Molekül mit unterschiedlichen Farbstoffen ausgegangen werden [17].

Durch das Abfragen der einzelnen Farbstoffe kann nun ähnlich der Energietransfereffizienz für jeden Burst ein stöchiometrischer Index  $S$  definiert werden:

$$S := \frac{F_{D_{exc}}}{F_{D_{exc}} + F_{A_{exc}}} \quad (2.48)$$

wobei

$$F_{D_{exc}} = F_{fret} + F_{D_{exc}}^{Dem} \quad (2.49)$$

und

$$\begin{aligned} F_{A_{exc}} &= F_{A_{exc}}^{Aem} + F_{A_{exc}}^{Dem} \\ &= F_{A_{exc}}^{Aem} \end{aligned} \quad (2.50)$$

da  $F_{A_{exc}}^{Dem} = 0$ .  $F_{x_{exc}}^{yem}$  ist die vom Übersprechen und der direkten Anregung korrigierte Fluoreszenzintensität bei der Anregungswellenlänge  $x$  und dem Emissionskanal  $y$ .  $F_{D_{exc}}$  bzw.  $F_{A_{exc}}$  stellen die Gesamtfluoreszenzen bei der jeweiligen Anregungswellenlänge dar. Der so definierte Wert  $S$  stellt nun ein Maß für die Stöchiometrie des Bursts dar. Sind Donor und Akzeptor in gleichen Teilen vorhanden, so wird  $S$  den Wert 0.5 annehmen. Nur Donor (Akzeptor) führt zu  $S$  gleich 1 (0). In den Fällen, dass ein Farbstoff überwiegt, wird das Verhältnis in Richtung des Überschusses verschoben. Zwei Donor Moleküle und ein Akzeptor ergeben eine stöchiometrischen Index von 0.66.

Anhand dieser zusätzlichen Information können nun eindeutig Ereignisse mit nur einem Farbstoff von denen mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen getrennt werden.  $F_{A_{exc}}$  geht für den Fall, dass nur der Donor vorhanden ist, gegen Null und somit gilt

$$S_{F_{A_{exc}} \rightarrow 0} = \frac{F_{D_{exc}}}{F_{D_{exc}}} = 1 \quad .$$

Für den Fall, dass der Akzeptor alleine vorliegt, geht  $F_{D_{exc}} \rightarrow 0$  und somit nimmt  $S$  Werte nahe Null an:

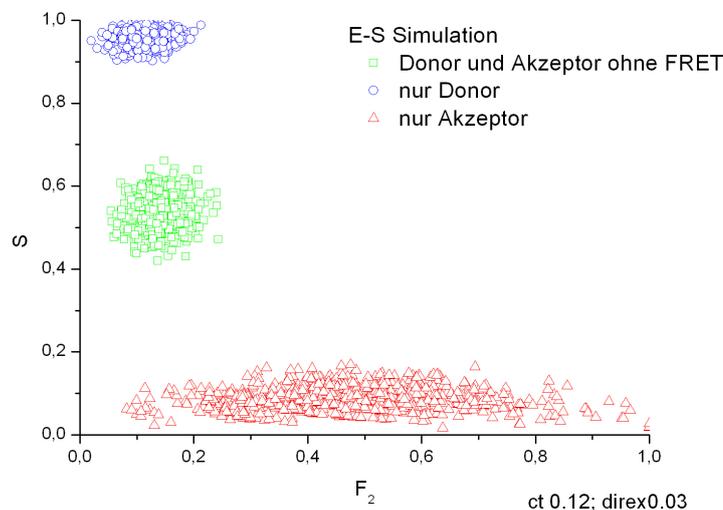
$$S_{F_{D_{exc}} \rightarrow 0} = \frac{0}{0 + F_{A_{exc}}} = 0 \quad .$$

Nur für den Fall, dass beide Farbstoffe vorliegen, ist  $0 < S < 1$  und bei ausgeglichener Stöchiometrie gilt:

$$F_{D_{exc}} = F_{A_{exc}}$$

und somit

$$\begin{aligned} S &= \frac{F_{D_{exc}}}{F_{D_{exc}} + F_{A_{exc}}} = \frac{F_{D_{exc}}}{F_{D_{exc}} + F_{D_{exc}}} \\ &= 0.5 \end{aligned}$$



**Abbildung 2.9:** Simulation von Bursts mit Donor alleine, Akzeptor alleine und einem Molekül mit je einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff. Näheres im Text

In Abbildung 2.9 sind die Verteilungen von Bursts für nur Donor (blaue Kreise), nur Akzeptor (rote Dreiecke) und Donor und Akzeptor zusammen (grüne Quadrate) dargestellt. Die Simulation erfolgte mit der Annahme von einem Übersprechen der Donorfluoreszenz in den Akzeptorkanal von 12% und einer Direktanregung des Akzeptors von 3% durch die Donoranregungswellenlänge. Die Addition eines weißen Rauschens mit etwa 0.5 kHz und einer Poissonverteilung von je 1000 Werten um die Quantenausbeute führt zu den angegebenen Verteilungen. Die Detektions- und Anregungswahrscheinlichkeit sind als identisch angenommen. Innerhalb dieses Plots existieren drei Bereiche: Oben links befindet sich relativ klar abgegrenzt eine Population mit einem  $E_{\text{prox}}$ -Wert nahe null und einem stöchiometrischen Index von eins. Dies stellt die Fraktion dar, in der nur der Donor alleine registriert wurde. Die breit verteilte Population mit einem Stöchiometrieindex von null gehört zu der reinen Akzeptor Population. Dies resultiert analog zu der Bursterkennung über die Summe aller Fluoreszenzsignale. Durch die Direktanregung des Akzeptor wird ein Burst erkannt, jedoch werden die  $E_{\text{prox}}$ -Werte nach 2.15 nur über die Donoranregung bestimmt. Diese nehmen bei fehlendem Donor beliebig kleine Werte an. Somit streut der  $E_{\text{prox}}$ -Wert breit. Die dritte Population streut um einen Stöchiometriewert von etwa 0.5 und einem kleinen  $E_{\text{prox}}$ -Wert. Diese Population enthält beide Farbstoffe und hat in der Simulation keine Übertragungseffizienz. Die Abweichung von null ist mit einem Übersprechen von 0.12 und einem simuliertem Rauschen auf beiden Kanälen zu

erklären. Durch die Korrektur des Übersprechens und der direkten Anregung verlagern sich die beiden Populationen mit Donorfarbstoff zu  $E_{\text{prox}}$ -Werten um null. Die Streuung bleibt erhalten.

Der freie Donor kann eindeutig von dem Donor– Akzeptorpaar ohne Energietransfer aufgrund der Stöchiometrie unterschieden werden. Die Transferrate von freiem Akzeptor ist, da quasi keine Anregung stattfindet, breit gestreut. Somit bietet die Analyse von Einzelmoleküldaten mit alternierender Laseranregung eine einfache Möglichkeit, sich das Verhalten von Subpopulationen innerhalb einer Messreihe anzuschauen: Durch das Setzen von Schwellwerten für  $E_{\text{prox}}$  oder  $S$ , bzw. für die Bursthöhe der Fluoreszenzkanäle kann z.B. gezielt die Verteilung von Ereignissen mit sowohl Donor– als auch Akzeptorfarbstoff analysiert werden. Gerade bei einer geringen Bindungsaffinität zwischen zwei unterschiedlich gefärbten Molekülen, überlagert bei einfacher Einzelmolekülspektroskopie das Signal des freien Donors die Verteilung der Transferraten mit beiden Farbstoffen.

Einen weiteren Vorteil bietet die Methode der alternierenden Laseranregung beim statistischen Markieren mit unterschiedlichen Fluorophoren oder bei Reaktionen mit einer unbekanntem Stöchiometrie: Liegen die Farbstoffe in einem anderen Verhältnis als 1:1 vor, verschiebt sich der stöchiometrische Index zugunsten des Überschusspartners, z.B. wird bei einem Verhältnis von 2:1 von Donor zu Akzeptor  $S$  im Mittel bei  $2/3$  erwartet.

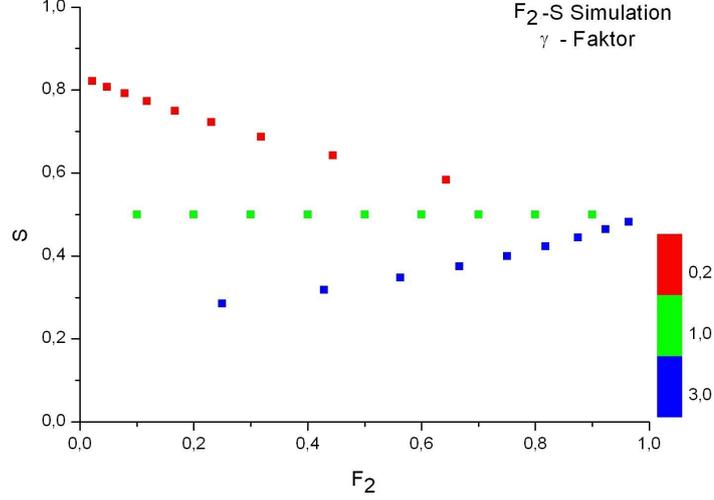
Der stöchiometrische Index ist durch die Definition 2.48 nicht unabhängig vom Energietransfer. Mit den Gleichungen 2.38, 2.39, 2.49 und 2.50 ergibt sich

$$\begin{aligned} S &= \frac{I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D \Phi^D \eta_{D_{em}}^D (1 - E) + I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D \Phi^D \eta_{A_{em}}^D (1 - E)}{I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D \Phi^D \eta_{D_{em}}^D (1 - E) + I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D \Phi^D \eta_{A_{em}}^D (1 - E) + I_{A_{ex}} \sigma_{A_{ex}}^A \Phi^A \eta_{A_{em}}^A} \\ &= \frac{1 + (\gamma - 1)E}{1 + \gamma\delta + (\gamma - 1)E} \end{aligned} \quad (2.51)$$

wobei  $\gamma = \Phi^A \eta_{A_{em}}^A / \Phi^D \eta_{D_{em}}^D$  den Korrekturfaktor zur Berechnung des Energietransfers aus Gleichung 2.29 und

$$\delta := \frac{I_{A_{ex}} \sigma_{A_{ex}}^A}{I_{D_{ex}} \sigma_{D_{ex}}^D} \quad (2.52)$$

das Verhältnis der Anregungsintensitäten und der Stöchiometrie darstellt. Letztere steckt in dem Verhältnis  $\sigma_{A_{ex}}^A / \sigma_{D_{ex}}^D$ . Aus dieser Überlegung ist es



**Abbildung 2.10:** Simulation von Bursts bei unterschiedlichen  $\gamma$ . Dargestellt ist der stöchiometrische Index  $S$  in Abhängigkeit von der Übertragungseffizienz von 0.1, 0.2, ..., 0.9 mit  $\gamma$ -Faktoren 0.2 (rot), 1 (grün) und 3 (blau).

sinnvoll, den stöchiometrischen Index unabhängig von  $E$  neu zu definieren:

$$S_\gamma = \frac{F_{fret} + \gamma F_{D_{exc}}^{Dem}}{F_{fret} + \gamma F_{D_{exc}}^{Dem} + F_{A_{exc}}^{Aem}} \quad (2.53)$$

Die Korrektur  $\gamma$  der Anregungs- und Detektionswahrscheinlichkeit ermöglicht, aus den  $E_{\text{prox}}$ -Werten näherungsweise die Abstände zwischen den beteiligten Fluorophoren zu bestimmen. Dies ist in Kapitel 2.1.2 bereits dargestellt. Durch diese Korrektur erfährt der Stöchiometrische Index ebenfalls eine Veränderung, nach Lee [18] ist

$$S_\gamma = (1 + \delta)^{-1} \quad (2.54)$$

und somit nur von dem Verhältnis der Anregungsintensitäten und der Stöchiometrie abhängig. Gleichzeitig ist  $S_\gamma$  unabhängig von der FRET-Effizienz.

### Bestimmung von $\gamma$

An einem System mit genau einem Donor und einem Akzeptor, kann aus Messdaten mit unterschiedlichen FRET-Werten  $\gamma$  ermittelt werden. Dazu kann die von Dahan [47] definierte Näherung an  $E$

$$E_{\text{prox}} = \frac{F_{D_{exc}}^{Aem}}{F_{D_{exc}}^{Aem} + F_{D_{exc}}^{Dem}} = \frac{\gamma E}{1 + (\gamma - 1)E} \quad (2.55)$$

betrachtet werden. In Abbildung 2.10 sind für unterschiedliche Detektionswahrscheinlichkeiten die resultierenden  $E_{\text{prox}}$ -Werte dargestellt. Bei gleichbleibender Quanten- und Detektionseffizienz ist der stöchiometrische Index  $S$  für alle  $E_{\text{prox}}$ -Werte konstant. Verschiebt sich die Detektionswahrscheinlichkeit zugunsten des Donorkanals, erscheint die Übertragungseffizienz stets zu geringeren  $E_{\text{prox}}$ -Werten verschoben (rote Punkte). Gleichzeitig fällt  $S$  mit steigender Effizienz ab. Korrigiert werden muss in diesem Beispiel mit  $\gamma = 0.3$ . Der Wert kann über die Steigung zwischen zwei Punkten ermittelt werden. Wird der blaue Kanal schlechter detektiert als der rote, so sind die  $E_{\text{prox}}$ -Werte gegenüber der Übertragungsrate zu groß und gleichzeitig ist der stöchiometrische Index unterhalb von 0,5. In dem Beispiel ist eine Korrektur von  $\gamma = 2$  zu wählen.

Auflösen der Gleichung 2.55 nach  $E$  ergibt

$$E = \frac{E_{\text{prox}}}{\gamma - (\gamma - 1)E_{\text{prox}}} \quad (2.56)$$

wodurch ein linearen Zusammenhang von  $E_{\text{prox}}$  und  $1/S$  deutlich wird:

$$\begin{aligned} S^{-1} &= 1 + \gamma\delta + \delta(1 - \gamma)E_{\text{prox}} \\ &= \Omega + \Sigma E_{\text{prox}} \quad . \end{aligned} \quad (2.57)$$

Wird  $S^{-1}$  gegen  $E_{\text{prox}}$  aufgetragen, so kann aus dem Achsenabschnitt  $\Omega$  und der Steigung  $\Sigma$  durch einen linearen Fit durch zwei Proben mit unterschiedlicher FRET-Effizienz sowohl  $\gamma$  als auch  $\delta$  gewonnen werden [18]:

$$\delta = \Omega + \Sigma - 1 \quad (2.58)$$

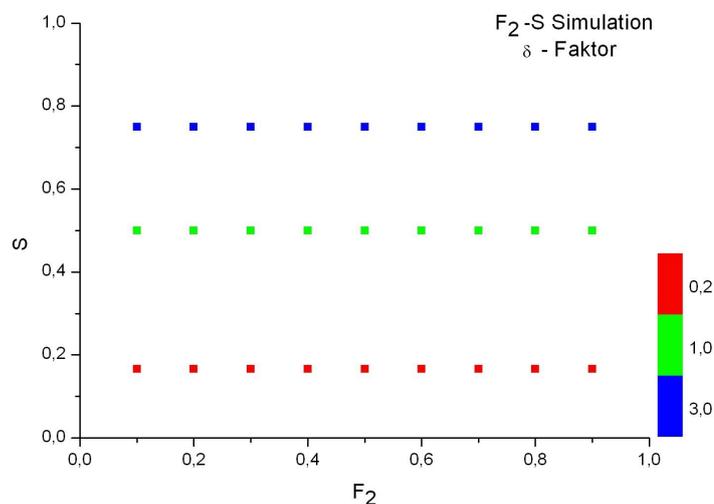
$$\gamma = (\Omega - 1)/(\Omega + \Sigma - 1) \quad (2.59)$$

In der Simulation in Abbildung 2.11 fällt auf, dass  $\delta$  nur eine konstante Verschiebung aller stöchiometrischen Indize zu Werten kleiner bzw. größer 0,5 bewirkt. Die  $E_{\text{prox}}$ -Werte bleiben bei allen FRET-Raten erhalten. Da bei alternierender Anregung mehrere Wellenlängen in ein System eingekoppelt werden, kann die Detektionswahrscheinlichkeit eines Kanals mit der Anregung variieren. Dies liegt darin begründet, dass die Anregungsvolumina nicht zu 100% übereinstimmen. Li *et al.* gehen in ihrer Betrachtung von einer Übereinstimmung von nur 30% aus [62]. Dies wird durch den  $\delta$ -Faktor ebenfalls einbezogen.

Durch alternierende Laseranregung (ALEX<sup>8</sup>), kann für jedes Molekül im Fokus festgestellt werden, welche Fluoreszenzfarbstoffe es trägt und welche

---

<sup>8</sup>Alternating Laser Excitation

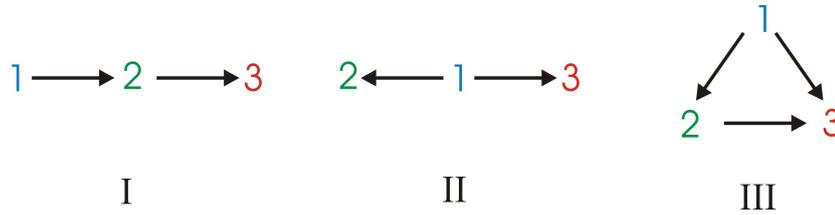


**Abbildung 2.11:** Einfluss der Detektionseffizienz auf den stöchiometrischen Index in Abhängigkeit vom  $E_{\text{prox}}$ -Wert.

Wege die Energie zwischen den Farbstoffen nimmt. Kapanidis *et al.* haben dies für ein zweifarbiges System bereits 2004 vorgestellt [17, 18]. Jedoch ist gerade bei Prozessen mit biologischen Molekülen die Einführung eines dritten Fluoreszenzfarbstoff wünschenswert. Diese Erweiterung birgt mehr als nur die Information eines zwei- oder dreifach durchgeführten Experiments mit unterschiedlichen Markierungen. Es bietet eine Vielzahl von zusätzlichen Informationen, die durch geschickte Fragestellungen und ein intelligentes Design der Proben nutzbar zu machen sind. Im folgenden Abschnitt wird diese Erweiterung mit ihren aufwendigen, aber notwendigen Korrekturen dargestellt.

### 2.4.1 Multidimensionale alternierende Laseranregung

Der multidimensionale Energietransfer stellt mehr als nur eine Erweiterung des einfachen FRET-Experiments auf drei oder mehr Farben dar. Schon alleine bei drei Farbstoffen bilden sich unterschiedliche Situationen mit teilweise konkurrierenden Transferpfaden aus. Als Veranschaulichung soll Abbildung 2.12 dienen, in denen drei mögliche Situationen dargestellt sind. Zunächst gibt es den Fall I, bei dem die Farbstoffe in der Reihenfolge ihrer Fluoreszenzwellenlänge einen linearen, gerichteten Energietransfer ausüben. Die Energie kann dabei in erster Näherung nur vom ersten auf den zweiten und von dort auf den dritten Farbstoff übertragen werden. Dies kann als eine



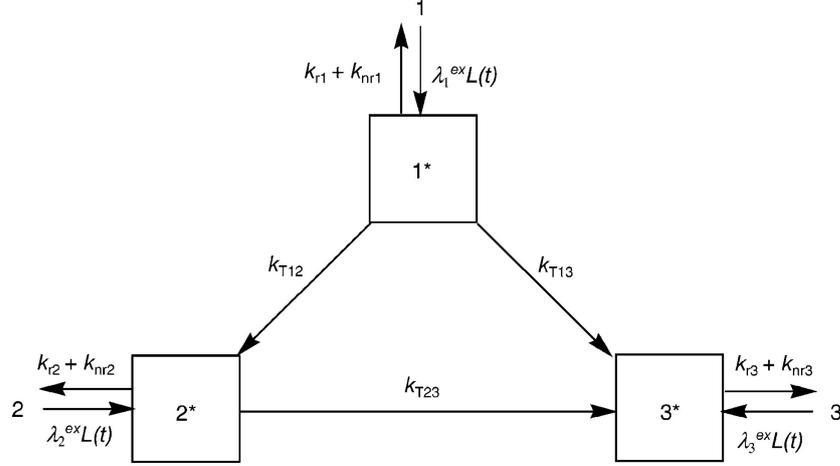
**Abbildung 2.12:** Transferpfade von Systemen mit drei Fluorophoren

Kaskade von zwei Transferstufen betrachtet werden. Die Energielandschaft einer solchen Anordnung wurde von Heilemann *et al.* anhand eines sogenannten Photonischen Drahtes untersucht, der die Anregungsenergie anstatt nur zum nächsten Nachbarn auch über einen Farbstoff hinweg transportieren kann [60, 22, 63]. Weiterführende Ergebnisse zu dieser Energiekaskade werden in dem Kapitel 4.1 dargestellt.

In den beiden anderen Fällen konkurrieren die Pfade des Energietransfers miteinander. Dadurch beeinflussen die beobachtbaren, scheinbaren Transferaten sich gegenseitig: Im Fall II erfolgt der Energietransfer parallel vom ersten zum zweiten sowie vom ersten zum dritten Farbstoff, während im Fall III zusätzlich die Transferrate zwischen dem zweiten und dritten Farbstoff eine Rolle spielt. Um die konkurrierenden Transferpfade analysierbar zu machen und Abstände zwischen drei Farbstoffen bestimmen zu können, werden mehr Informationen benötigt, als durch die einfache Intensität auf drei Kanälen erhalten wird. Eine Möglichkeit bestünde z.B. aus der simultanen Messung der Fluoreszenzlebensdauer auf den drei Kanälen. Ein globaler Fit der Lebensdauern auf drei Kanälen könnte die Energietransferpfade aufklären. Allerdings ist dies bei niedriger Photonenstatistik, wie sie im Fall durch einen Laserfokus diffundierender Moleküle zu erwarten ist, schwierig durchzuführen. Ferner ergibt sich das Problem, dass bei niedrigem FRET oder Abständen außerhalb der FRET-Reichweite eine Kollokalisierung der Moleküle nicht detektierbar wäre. Eine Alternative bietet die alternierende, quasi simultane Laseranregung aller Farbstoffe. Durch Anregung des spektral mittleren Farbstoffs wird der Energieübertrag vom zweiten auf den dritten analysiert. Das vereinfacht den generellen Fall III zum einfacheren Spezialfall II.

Aus der Theorie von Förster setzt sich die Transfereffizienz eines FRET-Paares  $i, j$  aus allen radiativen  $k_r$  und nicht radiativen Transferraten  $k_{nr}$  zusammen (vgl. dazu Kapitel 2.1.2):

$$E_{ij} = \frac{k_{T_{ij}}}{k_{r_i} + k_{nr_i} + k_{T_{ij}}} . \quad (2.60)$$



**Abbildung 2.13:** Abklingpfade angeregter Zustände ( $1^*$ ,  $2^*$  und  $3^*$ ) eines Systems mit dreifachem FRET und beliebiger Anordnung, entnommen aus [21].

Verändert sich nun die Ratengleichung, indem ein konkurrierender Prozess z.B. durch einen weiteren Akzeptor  $k$  hinzukommt, so taucht dessen Transferrate  $k_{T_{ik}}$  als Summand im Nenner der nun scheinbaren Transfereffizienz

$$E'_{ij} = \frac{k_{T_{ij}}}{k_{ri} + k_{nr i} + k_{T_{ij}} + k_{T_{ik}}}$$

auf. Somit verringert sich scheinbar die Effizienz des Energietransfers. Da der Abstand zwischen den beteiligten Farbstoffen von Interesse ist, bedarf es einer genaueren Betrachtung der angeregten Zustände. In Abbildung 2.13 werden die möglichen Pfade anhand eines Schaubildes in sogenannten *general irreversible excited-state* Reaktionen dargestellt. Vereinfachend werden die nicht radiative Rate  $k_{nr i}$  und die radiative Rate  $k_{ri}$  eines Farbstoffs  $i$  in einer Rate

$$k_i := k_{nr i} + k_{ri} = \frac{1}{\tau_{fi}} \quad (2.61)$$

zusammengefasst. Um aus diesem System die Energietransferraten zu erhalten, die den Abständen entsprechen, ist es notwendig, die zeitlich abhängigen Differentialgleichungen

$$\begin{aligned} d[1^*]/dt &= -(k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}) \cdot [1^*] \\ d[2^*]/dt &= -(k_2 + k_{T_{23}}) \cdot [2^*] + k_{T_{12}}[1^*] \\ d[3^*]/dt &= -(k_3)[3^*] + k_{T_{23}}[2^*] + k_{T_{13}}[1^*] \end{aligned}$$

der angeregten Zustände der drei Chromophoren zu lösen. Unter der Annahme, dass Farbstoff **1** nur von einer Wellenlänge mit einem  $\delta$ -Puls angeregt

wird, folgt  $[1_0^*]_{t=0} = N_0$ . Daraus ergeben sich nach [21] die Anteile der angeregten Farbstoffe nach der Anregung von  $N_0$  Teilchen des ersten Farbstoffs zu jedem Zeitpunkt  $t$ .

$$\begin{aligned}
[1^*](t) &= N_0 \cdot \exp^{-(K_1) \cdot t} \\
[2^*](t) &= N_0 \cdot k_{T_{12}} \cdot \{ \exp^{-K_1 \cdot t} - \exp^{-K_2 \cdot t} \} \{ K_2 - K_1 \}^{-1} \\
[3^*](t) &= N_0 \cdot \left\{ (K_2 - K_3) \cdot (k_{T_{13}}^2 + 2k_{T_{13}}(k_1 - k_{T_{23}}) + k_{T_{12}}k_{T_{23}}) \cdot \exp^{-K_1 \cdot t} \right. \\
&\quad - (k_{T_{12}}k_{T_{23}}(K_3 - K_1)) \cdot \exp^{-(K_2) \cdot t} \\
&\quad + \{ (K_2 - K_1) \cdot [k_2k_{T_{13}} + k_{T_{12}}k_{T_{23}} + k_{T_{13}}k_{T_{23}}] \\
&\quad \left. + k_{T_{13}} \cdot K_3 \cdot [K_1 + (k_2 - k_{T_{23}})] \} \cdot \exp^{K_3 \cdot t} \right\} \\
&\quad \cdot \left\{ (K_3 - K_2) \cdot (K_3 - K_1) \cdot (K_2 - K_1) \right\}^{-1}
\end{aligned} \tag{2.62}$$

mit

$$\begin{aligned}
K_1 &:= (k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}) \\
K_2 &:= (k_2 + k_{T_{23}}) \\
K_3 &:= (k_3)
\end{aligned} \tag{2.63}$$

Durch Integration von  $[i^*](t)$  über die Zeit erhält man schließlich die Intensität  $I_i$  in Relation zur Anregung  $N_0$ .

**Fall I** Die drei Farbstoffe bilden einen photonischen Draht mit einem gerichteten Energietransfer und der Übertragungsrate  $k_{T_{23}} = 0$ . Die gemessene Intensität im 1. Kanal

$$I_1 = \frac{1}{k_1 + k_{T_{12}}} \tag{2.64}$$

ergibt sich aus Integration von 2.62 und ist unabhängig von dem weiteren Verbleib der Anregungsenergie. Somit kann im Fall einer Lebensdauermessung z.B. über gepulste Anregung der Energietransfer

$$E_{12} = 1 - I_1/\tau_1 = \frac{k_{T_{12}}}{k_1 + k_{T_{12}}} \tag{2.65}$$

über Donorquenching ermittelt werden, wobei  $\tau_1 = 1/k_1$  der Abklingdauer der Donorfluoreszenz in Abwesenheit des Akzeptors entspricht. Die Intensität in Kanal **2**

$$I_2 = \frac{k_{T_{12}}}{k_1 + k_{T_{12}}} \frac{1}{k_2 + k_{T_{23}}} \quad (2.66)$$

ist sowohl in der Anregung abhängig von  $k_{T_{12}}$ , als auch von der Rate, mit der der angeregte Zustand  $2^*$  via FRET depopuliert wird. In 2.66 steckt demnach die Transfereffizienz

$$E_{12} = I_2/\tau_2' \quad , \quad (2.67)$$

die über die Abklingdauer  $\tau_2' = 1/k_2 + k_{T_{23}}$  der Fluoreszenz in Anwesenheit des Farbstoff **3** in Kanal zwei bestimmt ist. Kanal drei enthält die Information der weitergeleiteten Energie von **1** über **2** auf den letzten der drei Farbstoffe. Die Intensität

$$I_3 = \left( \frac{k_{T_{12}}}{k_1 + k_{T_{12}}} \right) \left( \frac{k_{T_{23}}}{k_2 + k_{T_{23}}} \right) \left( \frac{1}{k_3} \right) \quad (2.68)$$

ergibt sich wiederum über die Integration von 2.62 in dem Sonderfall, dass  $E_{13} = 0$  und man erhält

$$E_{123} = I_3/\tau_3 = E_{12} \cdot E_{23} \quad (2.69)$$

**Fall II** Liegt **1** in der Mitte zwischen **2** und **3**, kann der Energietransfer nur von **1** aus erfolgen.  $k_{T_{23}}$  ist null, jedoch beeinflussen sich die beiden anderen Raten  $k_{T_{12}}$  und  $k_{T_{13}}$ , so dass die gemessenen Transferraten nicht direkt den Abständen entsprechen. Die Intensität

$$I_1 = \frac{1}{k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} \quad (2.70)$$

ergibt sich wiederum aus Integration von 2.62 woraus sich der Anteil an übertragener Energie

$$\begin{aligned} E_{12,13} &= 1 - I_1/\tau_1 \\ &= \frac{k_{T_{12}}}{k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} + \frac{k_{T_{13}}}{k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} \\ &= E_{12}^* + E_{13}^* \end{aligned} \quad (2.71)$$

ergibt. Über die Fluoreszenzlebensdauer und die Intensitäten von **2** und **3** können die Transfereffizienzen

$$E_{1j}^* = I_j/\tau_j = \frac{k_{T_{1j}}}{k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} \quad (2.72)$$

gewonnen werden. Aus diesen kann jedoch nicht der Abstand direkt berechnet werden, da die Transferpfade in Konkurrenz zueinander stehen. Nach [20] gilt:

$$r_{1j} = R_{01j} \left( \frac{1 - E_{1j}^* - E_{1k}^*}{E_{1j}^*} \right)^{1/6} \quad (2.73)$$

**Fall III** In dem Fall, dass die Energie der angeregten Zustände über alle drei Pfade weitergegeben werden kann, kommen Watrob *et al.* durch Integration von 2.62 auf die Intensität

$$I_3 = \left[ \left( \frac{k_{T12}}{k_1 + k_{T12} + k_{T13}} \right) \left( \frac{k_{T23}}{k_2 + k_{T23}} \right) + \frac{k_{T13}}{k_1 + k_{T12} + k_{T13}} \right] \left( \frac{1}{k_3} \right) \quad (2.74)$$

von **3** [21]. Der zweistufige Energietransfer führt zusammen mit dem direkten Energietransfer von **1** nach **3** zu der messbaren Intensität des Farbstoffs **3**. Die Abklingzeit von **1** enthält wie in Fall II die Information über die Übertragsraten nach **2** als auch nach **3**. Die Fluoreszenzlebensdauer von Fluorophor **2** berichtet wie in Fall I von den Transferraten von **1** nach **2** und dem Energietransfer von **2** nach **3**. Jedoch ist anders als in Fall I der konkurrierende Prozess von **1** nach **3** mit in Betracht zu ziehen. Die Intensität

$$I_2 = \frac{k_{T12}}{k_1 + k_{T12} + k_{T13}} \frac{1}{k_2 + k_{T23}} \quad (2.75)$$

ist daher durch den direkten Energietransfer von **1** nach **3** geringer. Somit ergibt sich nur noch ein Energietransfer

$$E_{12}^* = I_2 / \tau_2' \quad (2.76)$$

über die Abklingrate von **2**. Ebenso ist

$$I_1 = \frac{1}{k_1 + k_{T12} + k_{T13}} \quad (2.77)$$

durch beide Transferraten wie im Fall II beeinflusst. Teilt man 2.74 durch die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_3$ , erhält man die totale Transferrate von **1** nach **3**:

$$E_{tot} = I_3 / \tau_3 = E_{12}^* E_{23} + E_{13}^* \quad (2.78)$$

## 2.4.2 Berechnung der FRET-Effizienz aus TrALEX-Daten

Mit TrALEX ist man nun in der Lage, ohne Messung der Fluoreszenzlebensdauer die Energieeffizienz des resonanten Energietransfers zu ermitteln.

Durch die direkte Anregung der einzelnen Chromophore können sukzessive die Transferraten bestimmt werden.

Zunächst muss der Einfluss vom Übersprechen und der direkten Anregung aus den Messdaten extrahiert werden (vgl. den folgenden Abschnitt 2.4.3). Weiterhin sind für zwei der Farbstoffkombinationen aus **1**, **2** und **3** die  $\gamma$ -Faktoren ( $\gamma_{12}, \gamma_{23}$ ) gemäß Abschnitt 2.4 zu bestimmen. Dazu werden je Paar zwei Proben mit unterschiedlichen FRET-Werten benötigt. Je eine davon kann auch ohne FRET als Koinzidenzprobe vorliegen. Der dritte Faktor folgt aus der Beziehung

$$\begin{aligned} \gamma_{12}\gamma_{23} &= \frac{\Phi_{f_2}\eta_2^{2em}}{\Phi_{f_1}\eta_1^{1em}} \frac{\Phi_{f_3}\eta_3^{3em}}{\Phi_{f_2}\eta_2^{2em}} \\ &= \gamma_{13} \text{ ,} \end{aligned} \quad (2.79)$$

Daraus ergibt sich ein Satz von sechs Intensitäten, die jeweils nur unter dem Einfluss von Energietransferraten stehen, dargestellt in Tabelle 2.1. Die ersten drei sind die Intensitäten der drei Farbstoffe bei Anregung mit der Wellenlänge für **1**,  $I_2^2$  und  $I_2^3$  geben die Intensität der Farbstoffe **2** und **3** bei der Anregung von **2** wieder, während der letzte Kanal nur die Fluoreszenz von Farbstoff **3** direkt durch einen Laser angeregt widerspiegelt.

Über die direkte Anregung von **2** wird die Bestimmung der FRET-Rate auf

$I_1^1$	Intensität von <b>1</b> bei Anregung von <b>1</b>
$I_1^2$	Intensität von <b>2</b> bei Anregung von <b>1</b>
$I_1^3$	Intensität von <b>3</b> bei Anregung von <b>1</b>
$I_2^2$	Intensität von <b>2</b> bei Anregung von <b>2</b>
$I_2^3$	Intensität von <b>3</b> bei Anregung von <b>2</b>
$I_3^3$	Intensität von <b>3</b> bei Anregung von <b>3</b>

**Tabelle 2.1:** Nomenklatur der sechs Kanäle aus der Kombination der Anregungswellenlänge und dem Detektor

den Fall mit zwei Farbstoffen reduziert. Die Übertragungsrate

$$E_{23} = \frac{I_2^3}{I_2^3 + \gamma_{23}I_2^2} \quad (2.80)$$

ergibt sich direkt aus 2.47 mit dem FRET-Paar **2** und **3**. Mit diesem Wert kann der Fall III bereits auf den Fall II zurückgeführt werden. Es gilt:

$$\begin{aligned} I_1^{2*} &:= \frac{I_1^2}{1 - E_{23}} \\ &= \frac{k_{T_{12}}}{k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} \frac{1}{k_2} \\ &= E_{12}^* \tau_2 \quad , \end{aligned} \quad (2.81)$$

wodurch sich die Intensität durch den Energietransfer  $E_{12}^* = \frac{k_{T_{12}}}{k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}}$  ergibt. Dadurch lässt sich nun direkt die abstandsabhängige Transferrate bestimmen:

$$E_{12} = \frac{I_1^{2*}}{I_1^{2*} + \gamma_{12} I_1^1} . \quad (2.82)$$

Mit 2.77 und 2.28 folgt:

$$\begin{aligned} &\frac{I_1^{2*}}{I_1^{2*} + \gamma_{12} I_1^1} \\ &= \frac{1}{1 + \gamma_{12} \frac{I_1^1}{I_1^{2*}}} \\ &= \frac{1}{1 + \frac{k_1}{k_2} \frac{1}{k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} \frac{k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}}{k_{T_{12}}} k_2} \\ &= \frac{k_{T_{12}}}{k_1 + k_{T_{12}}} . \end{aligned}$$

$I_{13}$  enthält nach 2.74 Informationen sowohl über den Energietransfer von **1** nach **3**, als auch von **2** nach **3**. Da  $E_{23}$  nun bekannt ist, kann der Anteil in  $I_1^3$  aufgrund von Energieübertrag von **1** nach **3** berechnet werden durch

$$\begin{aligned} I_1^{3*} &:= I_1^3 - \gamma_{23} I_1^{2*} E_{23} \\ &= (E_{12}^* E_{23} + E_{13}^*) \frac{1}{k_3} - \frac{k_2}{k_3} E_{12}^* \frac{1}{k_2} E_{23} \\ &= E_{13}^* \tau_3 \end{aligned} \quad (2.83)$$

mit der Transferrate

$$E_{13}^* := \frac{k_{T_{13}}}{k_1 + k_{T_{12}} + k_{T_{13}}} . \quad (2.84)$$

Die Transferrate von **1** nach **3** ohne den Einfluss der anderen beiden Wege kann analog zu 2.82 berechnet werden:

$$E_{13} = \frac{I_1^{3*}}{I_1^{3*} + \gamma_{13} I_1^1} . \quad (2.85)$$

Die korrigierten Energietransferraten 2.80, 2.82 und 2.85 können mit 2.15 in Abstände übertragen werden.

Die Gesamteffizienz eines Systems von **1** nach **3** kann analog zu 2.78 mit der Beziehung

$$E_{1j}^* = E_{1j} \frac{1 - E_{1k}}{1 - E_{1j}E_{1k}} \quad (2.86)$$

berechnet werden [20]. Es folgt:

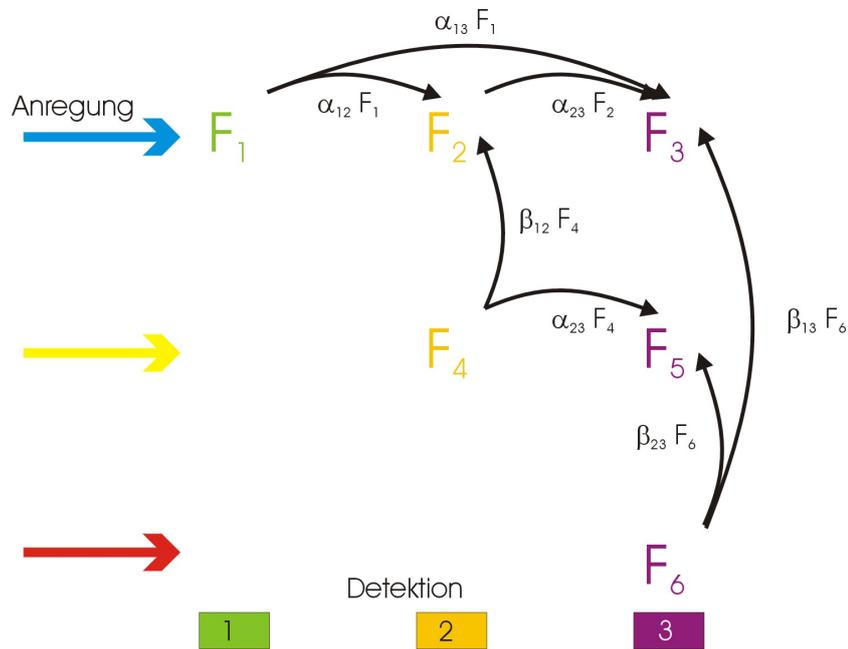
$$\begin{aligned} E_{tot} &= E_{12} \frac{1 - E_{13}}{1 - E_{12}E_{13}} E_{23} + E_{13} \frac{1 - E_{12}}{1 - E_{12}E_{13}} \\ &= \frac{E_{12}(1 - E_{13})E_{23} + E_{13}(1 - E_{12})}{1 - E_{12}E_{13}}. \end{aligned} \quad (2.87)$$

### 2.4.3 Übersprechen und Direktanregung der Fluoreszenz in andere Detektionskanäle bei TrALEx

Betrachtet man die Fluoreszenzspektren und vergleicht diese mit den jeweiligen Detektionskanälen, so fällt auf, dass die meisten Fluoreszenzfarbstoffe nicht nur in einem Kanal detektiert werden, sondern es immer eine Wahrscheinlichkeit gibt, dass ein Photon in einem anderen Detektionskanal detektiert wird. Diese Wahrscheinlichkeit wurde in Kapitel 2.3.2 dargestellt und *Übersprechen* in andere Kanäle genannt. Die Auswirkungen auf Messungen mit TrALEx lassen sich aus dem normalen Einzelmolekülmikroskop ableiten. Für drei Detektionskanäle und drei Laseranregungen ergibt sich ein lineares Gleichungssystem, welches es zu lösen gilt. Analog zu Abbildung 2.14 geben  $F_1$  bis  $F_6$  die gemessenen Zählraten aller Detektor-Laser-Kombinationen wieder. In dieser Grafik ist der Einfluss des Übersprechens und der direkten Anregung durch Pfeile dargestellt. Da bei den verwendeten Farbstoffkombinationen kein Übersprechen von längeren Wellenlängen zu kürzeren Wellenlängen entsteht, reichen drei Korrekturfaktoren aus:

- $\alpha_{12}$  Übersprechen von Farbstoff 1 auf Detektor 2
- $\alpha_{13}$  Übersprechen von Farbstoff 1 auf Detektor 3
- $\alpha_{23}$  Übersprechen von Farbstoff 2 auf Detektor 3

Zusätzlich muss für jeden Farbstoff die ebenfalls schon eingeführte direkte Anregung durch kurzwelliges Laserlicht korrigiert werden. Von den sechs Kanälen kann eine Direktanregung nur in den Kanälen  $F_2 = I_1^2$ ,  $F_3 = I_1^3$  und  $F_5 = I_2^3$  erfolgen. Die Korrektur erfolgt analog zu Kapitel 2.3.2.



**Abbildung 2.14:** Direktanregung und Übersprechen bei TrALEx

- $\beta_{12}$  direkte Anregung von Farbstoff 2 durch Laser 1
- $\beta_{13}$  direkte Anregung von Farbstoff 3 durch Laser 1
- $\beta_{23}$  direkte Anregung von Farbstoff 3 durch Laser 2

Daher werden aus den gemessenen Intensitäten  $F_1..F_6$  durch Korrektur der direkten Anregung

$$\begin{aligned}
 I_1^{1'} &= F_1 \\
 I_1^{2'} &= F_2 - \beta_{12} F_4 \\
 I_1^{3'} &= F_3 - \beta_{13} F_6 \\
 I_2^{2'} &= F_4 \\
 I_2^{3'} &= F_5 - \beta_{23} F_6 \\
 I_3^{3'} &= F_6 \quad .
 \end{aligned}$$

Das Übersprechen ergibt sich analog durch Lösen des Gleichungssystems zunächst zu

$$\begin{aligned}
 I_1^1 &= I_1^{1'} \\
 I_1^2 &= I_1^{2'} - \alpha_{12} I_1^{1'} \\
 I_1^3 &= I_1^{3'} - \alpha_{13} I_1^{1'} - \alpha_{23} (I_1^{2'} - \alpha_{12} I_1^{1'}) \quad .
 \end{aligned}$$

Da neben den drei Kanälen sowohl bei blauer Anregung als auch bei gelber Anregung ein Übersprechen stattfindet, muss dies ebenfalls korrigiert werden:

$$\begin{aligned} I_2^2 &= I_2^{2'} \\ I_2^3 &= I_2^{3'} - \alpha_{23} I_2^{2'} \end{aligned}$$

Somit ergeben sich die korrigierten Intensitäten zu:

$$I_1^1 = F_1 \quad (2.88)$$

$$I_1^2 = F_2 - \beta_{12} F_4 - \alpha_{12} F_1 \quad (2.89)$$

$$I_1^3 = F_3 - \beta_{13} F_6 - \alpha_{13} F_1 - \alpha_{23} (F_2 - \beta_{12} F_4 - \alpha_{12} F_1) \quad (2.90)$$

$$I_2^2 = F_4 \quad (2.91)$$

$$I_2^3 = F_5 - \beta_{23} F_6 - \alpha_{23} F_4 \quad (2.92)$$

$$I_3^3 = F_6 . \quad (2.93)$$

Die neu bestimmten Fluoreszenzintensitäten  $I_1^1 - I_3^3$  gehen schließlich in die Berechnung der  $\gamma$ -Faktoren und der FRET-Effizienz ein. Die Bestimmung der Koeffizienten zur Korrektur des Übersprechens können weiterhin wie gewohnt durch die Fluoreszenz des Donors alleine (ohne FRET) bestimmt werden

$$\alpha_{ij} = \frac{\eta_{jem}^i}{\eta_{iem}^i} = \frac{F_{jem}^i}{F_{iem}^i} , \quad (2.94)$$

wobei  $\eta_{jem}^i$  (bzw.  $\eta_{iem}^i$ ) die Detektionswahrscheinlichkeit von Donor  $i$  in Detektor  $j$  (bzw.  $i$ ) ist.

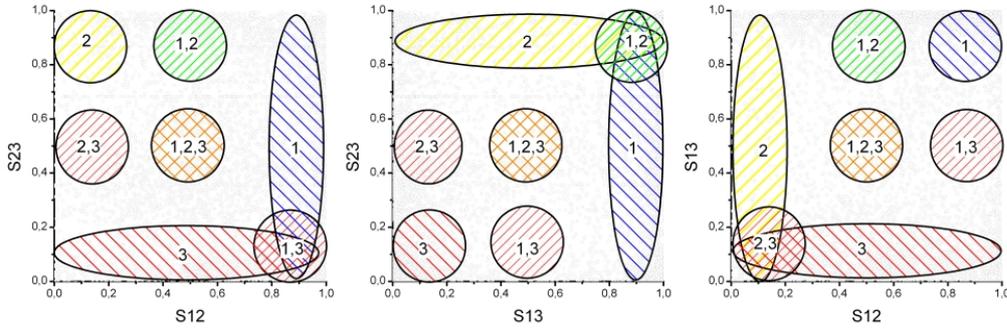
Die direkte Anregung kann mit Hilfe von TrALEx ebenfalls direkt bestimmt werden, da gilt:

$$\beta_{ij} = \frac{I_{iex} \epsilon_{iex}^j}{I_{jex} \epsilon_{jex}^j} , \quad (2.95)$$

wobei durch den Akzeptor alleine bei einem festen Verhältnis der Anregungsintensität auch  $\beta_{ij}$  bestimmt ist.

#### 2.4.4 Darstellung der TrALEx-Daten

Die Auswertung der TrALEx-Daten ist gegenüber alternierender Anregung mit zwei Farben komplexer. Man erhält für die drei Anregungslaser und bei drei Detektionskanälen drei Stöchiometrien und drei FRET-Verteilungen. Als vierte Verteilung ergibt sich noch die Verteilung der totalen Energieeffizienz. In dieser Arbeit wurden die FRET-Verteilungen zwischen zwei Partnern jeweils gegen ihre Stöchiometrie aufgetragen. Dies entspricht der gewohnten



**Abbildung 2.15:** 2D-Verteilungen der stöchiometrischen Indizes in allen Kombinationen. Farblich markiert ist jeweils das Vorkommen von Subpopulationen. In jeder Darstellung sind zwei Populationen in den Diagrammen breit verteilt, während die anderen fünf eindeutig lokalisiert sind.

Darstellung aus der ALEX. Zusätzlich wurden alle Kombinationen der stöchiometrischen Indizes gegeneinander aufgetragen. In [Abbildung 2.15](#) sind diese dargestellt. Es ist nicht ausreichend, nur eines der drei Diagramme darzustellen, da jeweils zwei der sieben möglichen Kombinationen aus drei Farbstoffen breit in dem Diagramm verteilt sind und mit einer weiteren überlagern. Anhand dieser Diagramme lässt sich feststellen, welche Farbstoffe an dem Experiment beteiligt waren und es lassen sich sinnvolle Subpopulationen auswählen.

Befinden sich alle drei Farbstoffe in einem Burst, so wird die Stöchiometrie von allen Kombinationen gleich um 0.5 streuen. Diese Population liegt also in allen drei Diagrammen in der Mitte. Als Annahme geht dabei eine gleichmäßige Anregungsintensität ein, d.h.  $\delta = 1$ . Fehlt nur einer der Farbstoffe, z.B. **1**, so wandert der Schwerpunkt in jedem Diagramm in die entsprechende Richtung:  $S_{12}$  und  $S_{13}$  streben gegen null, während  $S_{23}$  weiterhin bei 0.5 liegt. Somit liegt die Verteilung in den Diagrammen  $(S_{12} - S_{23})$  und  $(S_{13} - S_{23})$  bei  $(0; 0.5)$ , während dies Population im Diagramm  $(S_{12} - S_{13})$  bei  $(0; 0)$  zu finden ist. Interessant sind die breiteren Verteilungen der einzelnen Farbstoffe  $i$ . Der stöchiometrische Index  $S_{jk}$  ist nur durch das Rauschen beeinflusst und somit breit gestreut.

Es gibt zwei Möglichkeiten, sich nur eine bestimmte Population zu betrachten: Zum einen können über die Stöchiometrie bestimmte Populationen aus einem Datensatz extrahiert werden. Zum Beispiel wählt die Voraussetzung  $0.3 \leq S_{ij} \leq 0.7$  für alle  $i$  und  $j$ , nur die Subpopulation mit allen drei Farbstoffen. Zum anderen können auch an die Burst selbst die Vorausset-

zung gestellt werden, oberhalb eines Schwellwerts für eine bestimmte Farbe zu liegen. Dies ermöglicht eine einfachere Auswahl unabhängig von der Anregungsintensität.

## 2.5 Vakuoläre $H^+$ -ATPase

Vakuoläre  $H^+$ -ATPasen sind große Proteinkomplexe mit einem Gesamtgewicht von 700 – 800 kDa. Sie sorgen für eine über die ATP Konzentration gesteuerte Ansäuerung der endomembranen Kompartimente und sind ein Teil des sekretorischen Systems. Der Komplex besteht aus 14 verschiedenen Untereinheiten, deren Gencode bei *arabidopsis thaliana* vollständig vorliegt [64, 65, 66]. Durch die Hydrolyse von ATP in ADP nach der Reaktionsgleichung



wird über die freigesetzte Energie  $\Delta E$  der Stiel der ATPase in eine Drehbewegung versetzt. Dabei werden Protonen durch die Membran entgegen den Konzentrationsgradienten transportiert. Somit wird gegen den elektrochemischen Protonengradienten Arbeit geleistet und die Energie umgesetzt.

Adenosin 5'-Triphosphat (ATP) ist der wesentliche Energiespeicher in allen eukaryontischen und auch vielen prokaryontischen Zellen. Die Synthese durch oxidierende oder photoinduzierte Phosphorylierung wird bei diesen Zellen durch eine Vielzahl von membranständigen Prozessen bewerkstelligt, die durch Enzyme wie der  $F_1F_0$ -,  $V_1V_0$ - und  $A_1A_0$ -Enzymen übernommen werden. Die umgesetzte Energie wird dabei in Form von Ionen oder Protonen durch Membranen hindurch ausgetauscht. Die Erforschung der Zusammensetzung und die Funktion der Untereinheiten stellt zur Zeit hohe Anforderungen an die interdisziplinäre Wissenschaft.

Die ATPase-Formen haben einen gemeinsamen Punkt in der genetischen Entwicklung [67]. Alle drei Formen besitzen einen ähnlichen Aufbau, der im wesentlichen aus drei Gruppen besteht: einem membranständigen Teil ( $A_0, F_0, V_0$ ), der einen Ionenkanal enthält, einem zentralen Stiel sowie dem annähernd kugelförmigen Kopf ( $A_1, F_1, V_1$ ) [68, 69, 70]. Die V-ATPase besitzt zusätzlich eine zweite Stütze in der Membran, wie Boekema *et al.* durch elektronenmikroskopische Aufnahmen beobachten konnten [71], wodurch sich die V-ATPase gegenüber der F- oder A-ATPase auszeichnet. Einen weiteren fundamentalen Unterschied bildet die reversible Dissoziation des Kopfes  $V_1$  der V-ATPase gegenüber den anderen ATPasen [72, 73, 74], wodurch eine zusätzliche Regulierung der ATPase-Aktivität *in vivo* gegeben wird. Im Gegensatz dazu bilden  $A_1/A_0$  und  $F_1/F_0$  einen stabilen Komplex in der Zelle. Diese beiden Formen sind in der Lage, ATP auch zu synthetisieren, die V-ATPase aber nicht. Betrachtet man jedoch die Gemeinsamkeiten in der Struktur und der Gensequenz (Tabelle 2.2), so fällt eine höhere Übereinstimmung zwischen der V-ATPase und der A-ATPase auf [75, 76, 77]. Während in den letzten

<i>M. mazei</i> Gö1 $A_1A_O$	<i>M. sexta</i> $V_1V_O$	<i>Bovine</i> $F_1F_O$	<i>E. coli</i> $F_1F_O$
A	A	b	b
B	B	a	a
C	C	-	-
-	D	-	-
D	E	g	g
E	-	OSCP	dec
F	F	dm	eec
-	G	-	-
-	H	-	-
-	-	em	-
I	a	a+b	a+b
K	c	c	c
-	d	-	-
-	e	-	-
H	-	-	-
G	-	-	-
-	-	d	-
-	-	e	-
-	-	f	-
-	-	g	-
-	-	F6	-
-	-	IF1	-

**Tabelle 2.2:** Auflistung ähnlicher Gensequenzen in A-, V- und F-ATPasen [67].

Jahren die aus acht Untereinheiten bestehende  $F_1F_0$ -ATPase mit der Darstellung der ATP-Hydrolyse als molekularer Motor aufgelöst [1, 58] und bereits 1995 in atomarer Auflösung erfolgreich klassifiziert werden konnte [3], lagen von der pflanzlichen V-ATPase lange Zeit nicht einmal alle Untereinheiten in ihrer Struktur aufgelöst vor. Erst in 2003 gelang es Imamura *et al.*, die Rotation des Stiels in der Membran nachzuweisen[2, 78]. Dazu wurde der Kopf der ATPase mit drei His-tags an einer mit Ni-NTA beschichteten Oberfläche fixiert, und über ein Polystyrolkugelchen an der Untereinheit D bzw. F konnte die Bewegung sichtbar gemacht werden. Dabei wurde ausgenutzt, dass die Kopfgruppe ohne die Membran selbständig stabil und funktionstüchtig ist. Ende 2005 konnte schließlich der Nachweis erbracht werden, dass der Bewegungsablauf der V-ATPase sich von der F-ATPase unterscheidet[79]. Die bei dem Experiment verwendeten V-ATPase stammt aus *thermus thermophilus*, und gehört somit zu der Familie der Prokaryonten. Diese weisen im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Eukaryonten eine weitaus

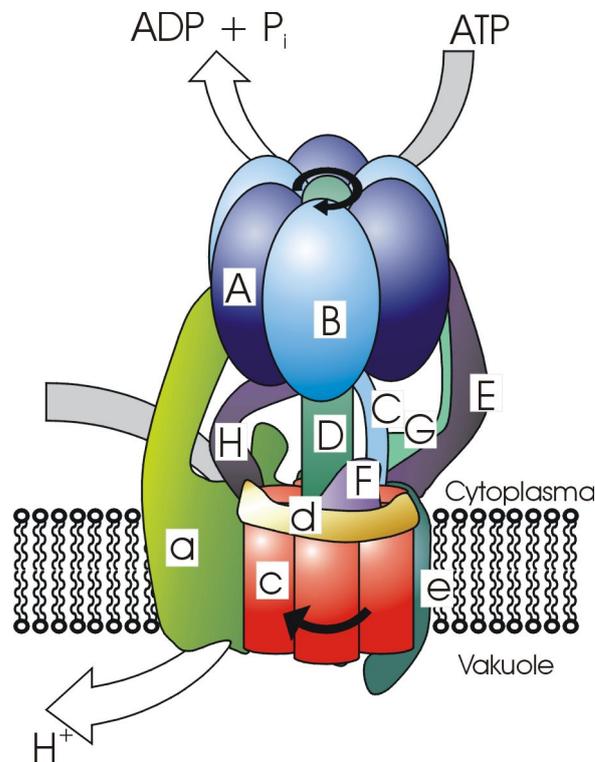


Abbildung 2.16: Arbeitsmodell der VHA, angelehnt an [82]

höhere Stabilität auf. Die Assemblierung des Kopfes konnte 1999 auch bei Eukaryonten (Weizen) gezeigt werden [80]. In dieser Arbeit wurde die VHA aus *arabidopsis thaliana* verwendet, deren Gencode im Rahmen der Arabidopsis Initiative vollständig aufgelöst wurde [64]. Es konnte gezeigt werden, dass *mesembryanthemum crystallinum* und *arabidopsis thaliana* einen gleichen Satz Untereinheiten produzieren [66]. Somit wurden viele Untereinheiten aus *mesembryanthemum crystallinum* gewonnen, deren cDNA Sequenzen zu Beginn des Projektes bereits vorlagen [19, 81].

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den ATPasen und bestehenden Daten zu den Untereinheiten wurde als Hypothese das Arbeitsmodell aus Abbildung 2.16 von der VHA erstellt. Große Buchstaben bezeichnen dabei Untereinheiten außerhalb der Membran, kleine Buchstaben membranständige Teile. Eine Übersicht über die Massen ist in Tabelle 2.3 wiedergegeben. Die Benennung erfolgt analog zu der von Sze vorgeschlagenen Nomenklatur [83].

Der Kopf  $V_1$  wird aus jeweils drei Untereinheiten VHA-A und VHA-B im Wechsel und einer Untereinheit VHA-D gebildet. Gestützt wird der Kopf aus einer Kombination aus VHA-G und VHA-E, wobei Seidel *et al.* zeigen kann-

ten, dass die Untereinheit VHA–E *in vivo* als Dimer vorliegt [84, 26], während Arai *et al.* folgerten, dass nur die Untereinheiten A,B, und c mehrfach in dem Komplex vorliegen [85]. In wie weit VHA–E und VHA–G ständig gleichzeitig in dem Komplex vorliegen oder ob sich gegenseitig ergänzen, ist nicht geklärt. Die beiden Untereinheiten sind in der Membran zwischen Zytoplasma und der Vakuole verankert und bilden zusammen mit dem kugelförmigen Kopf aus VHA–A und VHA–B einen Stator.

In der Mitte der hexagonalen Struktur aus A und B liegt die Untereinheit VHA–D, von der angenommen wird, dass sie bei Aktivität innerhalb des Kopfes rotiert. Außerhalb der Membran befinden sich noch die Untereinheiten C, F, G und H, wobei unklar ist, ob sie sich ständig im Komplex befinden, oder sich einzeln ablösen können. Von der 54 kDa großen Untereinheit H wird angenommen, dass sie eine regulierende Wirkung bei der Hydrolyse von ATP hat [86]. Diese Untereinheit ist auch die einzige, von der bisher Kristallstrukturen veröffentlicht worden sind [87]. Die Position und Rolle der membranständigen Untereinheiten ist bei weitem nicht so gesichert. Die Untereinheit c bildet einen Ring aus sechs bzw. in einigen Fällen auch fünf Isoformen. c' kommt jedoch maximal in mal vor [26]. Auffällig ist die Größe der membranständigen Untereinheit a mit 95 kDa. Diese reagiert empfindlich auf Proteasen und ist nicht immer an dem Komplex zu sehen. Dennoch spielt sie bei der Zusammensetzung von  $V_1$  und  $V_0$  eine Rolle. Die Größe der gesamten VHA liegt bei etwa 15 nm im Durchmesser und einer Länge von etwa 25 nm.

2003 konnten Zhang *et al.* elektronenmikroskopische Aufnahmen des  $V_1$  von

Bezeichnung		Molmasse / kDa
$V_1$	A	68
	B	57
	C	42
	D	28
	E	27
	F	14
	G	13
	H	54
$V_0$	a	95
	d	40
	c	16
	c'	17
	c''	19

**Tabelle 2.3:** Molekulares Gewicht der VHA–Untereinheiten [83].

*saccharomyces cerevisiae* erzeugen, die in guter Übereinstimmung mit dem verwendeten Modell stehen [88]. Die Auflösung lag bei 25Å. Auf Grundlage der vorhandenen Daten wurde das Modell aus Abbildung 2.16 weiter entwickelt.



# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Konfokaler Aufbau

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit bestand in dem Aufbau und der Entwicklung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops mit dreifach alternierender Laseranregung. Als Grundlage wurde dafür ein bestehender Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM<sup>1</sup>) auf alternierende Anregung erweitert. Dabei wurde sowohl der Aufbau selbst, als auch die Software zur Ansteuerung und Auswertung entwickelt. In Abbildung 3.1 ist der prinzipielle Aufbau dargestellt. Zunächst soll hier eine kurze Übersicht gegeben werden, bevor auf die einzelnen Komponenten genauer eingegangen wird.

Das Herzstück dieses Aufbaus ist das invertierte Mikroskop (Olympus IX 70) mit einem xyz-piezoelektrischen Verschiebetisch (PI-509, Physik Instrumente), sowie den drei Avalanche Photodioden (APDs). Die Besonderheit gegenüber herkömmlicher SMFS liegt im Bereich der Anregung. Für diese steht ein Multiline-Argon-Krypton Laser (Innova 70C, Coherent, USA) zu Verfügung, dessen Wellenlängen über einen AOTF (AA.AOTF.nC, AA.Optics, Frankreich) selektiert werden können. Die Ansteuerung aller Komponenten wird an eine Analog-Output Karte (PXI 6713, National Instruments) in einem Echtzeitrechner (PXI 8186, National Instruments) übergeben.

Die unterschiedlichen Wellenlänge des Lasers werden über den AOTF selektiert und in einen Lichtwellenleiter (460-HP, Nufern, USA) gekoppelt. Nach dem Auskoppeln wird der Strahldurchmesser über ein Teleskop dem Objektiv angepasst. Ein Strahlteiler reflektiert das Laserlicht nun in das Ölimmersionsobjektiv. An dieser Stelle wurde je nach Anwendung ein Triple- oder Dualband Strahlteiler verwendet. Diese haben einen schmalen reflektiven Bereich

---

<sup>1</sup>CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy

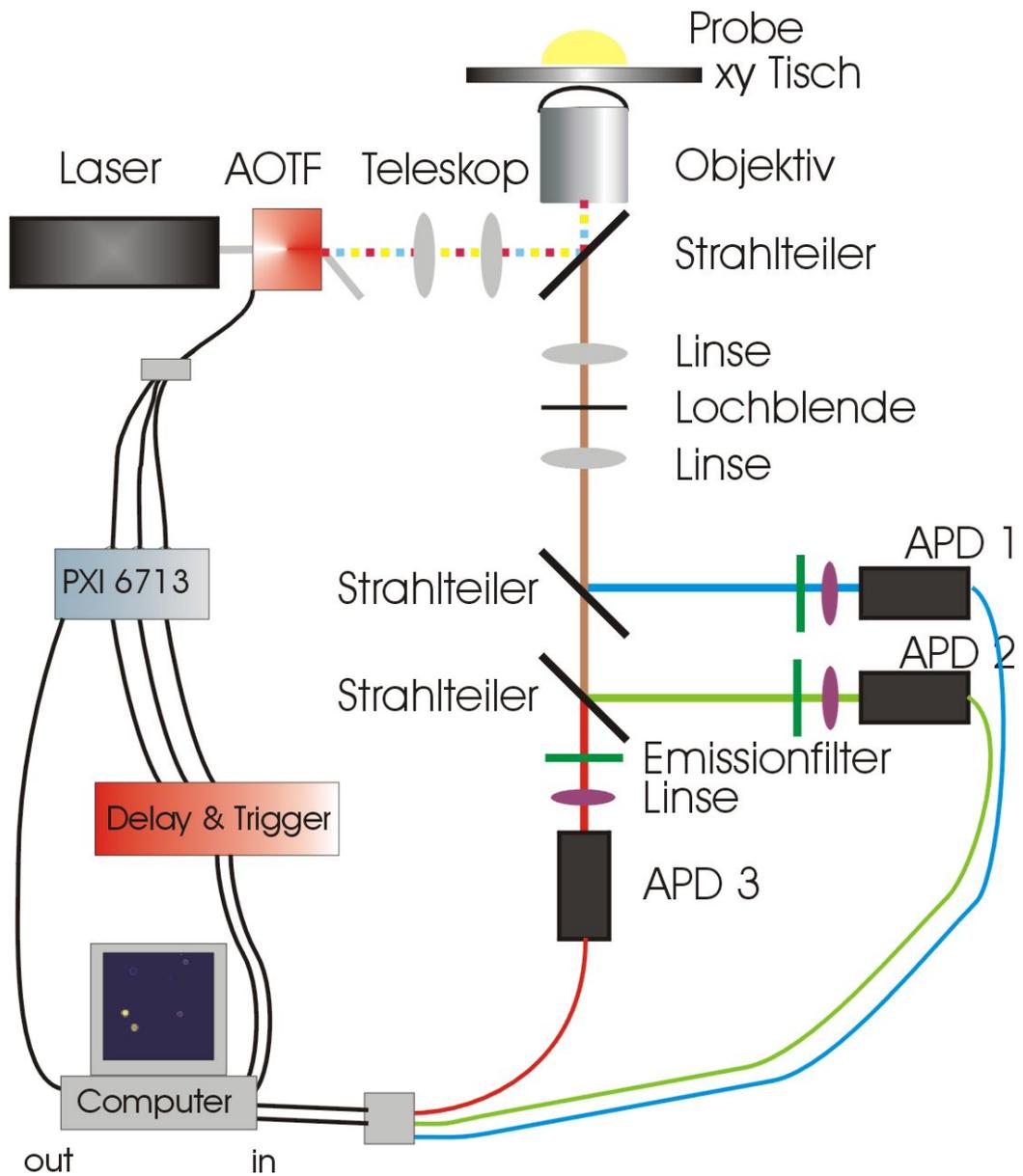


Abbildung 3.1: Übersicht über den TrALEx-Aufbau



Abbildung 3.2: Innova 70C

mit einer hohen Durchlässigkeit jenseits dieser Wellenlängen. Fluoreszenzlicht aus dem Fokus wird wiederum über das Objektiv gesammelt und tritt durch den Strahlteiler hindurch. Entsprechend eines konfokalen Aufbaus gelangt das parallele Licht über eine Kombination aus zwei Linsen und einer Lochblende auf die Emissionsstrahlteiler. Diese sind dichroitische Langpasskantenfilter, so dass Licht unterhalb einer Wellenlänge reflektiert wird und oberhalb passieren kann. Durch zusätzliche Emissionsfilter vor jedem Detektor wird das restliche Streulicht gefiltert. Schließlich wird über eine Linse ( $f=40$  mm) das Signal auf die APD fokussiert.

Bei einem Ereignis auf einem der Detektoren wird dieses aus einer Kombination aus den Detektoren und der Anregungswellenlänge, sowie einer makroskopischen und einer mikroskopischen Zeit in dem Rechner gespeichert.

### 3.1.1 Anregungsquelle

Als Anregungsquelle wurde ein Argon–Krypton Ionenlaser (Innova 70C, Coherent) verwendet. Dieser konnte so konfiguriert werden, dass alle potentiellen Wellenlängen des Mediums zeitgleich in dem Resonator in Resonanz gelangen. Die Wellenlänge mit ihrer Leistung sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Der Laser arbeitet im sogenannten „Multiline Modus“ [89]. Dadurch werden gleichzeitig die Wellenlängen 476 nm, 488 nm, 514 nm, 531 nm, 568 nm und 647 nm emittiert. Das Verhältnis der Intensitäten kann dabei sowohl über eine innere Blende als auch über die Pumpleistung angepasst werden. Ein Nachteil dieser Anordnung ist, dass der Laser nicht auf allen Wellenlängen in einer  $TEM_{00}$ -Mode emittiert. Durch die Wahl einer kleinen Blende können relativ homogene Moden bei allen verwendeten Wellenlängen erreicht werden. Die Messungen wurden daher bei einem Pumpstrom von 30 Ampere

Wellenlänge / nm	Leistung / mW
476	335
488	980
514	950
531	270
568	415
647	360

**Tabelle 3.1:** Spektrum des Innova 70C im cw-Betrieb mit maximalen Pumpstrom (40 A) und offener Austrittsblende (A0)

mit der Austrittsblende A2 vorgenommen. Jedoch waren zusätzliche Schritte notwendig, das Strahlprofil zu verbessern.

Der weiter hinten dargestellte AOTF lässt eine schnelle Selektion einzelner Wellenlängen zu. Durch ein OD-Filterrad wurde die mittlere Intensität den Messungen angepasst. In dem Schema auf Seite 66 fehlt die zusätzliche Säuberung der ausgewählten Moden über eine „Single-Mode“ Glasfaser (460-HP, Nufern, USA), bevor der Strahldurchmesser vergrößert wurde. Durch diese Faser konnte schließlich eine sehr homogene Ausleuchtung der hinteren Öffnung des Objektivs gewährleistet werden. Die Faser transmittiert im Bereich von 450 nm bis 600 nm und verhindert die Transmission höherer Moden.

Die Auswahl der Anregungswellenlängen wurde so getroffen, dass die Ramanlinien von Wasser wieder in Übereinstimmung mit der nächsten Anregungswellenlänge bzw. außerhalb der zu detektierenden Fluoreszenz liegt. Die symmetrische O-H Streckschwingung hat eine Bande bei  $3585\text{ cm}^{-1}$ . Daher wurden Rh110 und ATTO488 anstelle der üblichen 488 nm mit 476 nm angeregt (vgl. Tabelle 3.2). Als weitere Wellenlängen wurden 568 nm und 647 nm gewählt.

Die eingesetzten Leistungen sind zunächst größer als bei SMFS mit einer

Anregung	Ramanstreuung von Wasser
476 nm	576 nm
568 nm	716 nm
647 nm	847 nm

**Tabelle 3.2:** Ramanbanden der symmetrischen O-H Streckschwingung.

Wellenlänge. Dies liegt daran, dass jede Anregungswellenlänge bei TrALEX nur ein Drittel der Zeit an ist. Da die Zerstörung der Fluoreszenzfarbstoffe nicht nur von der durchschnittlichen Leistung abhängt, ist es dennoch nicht

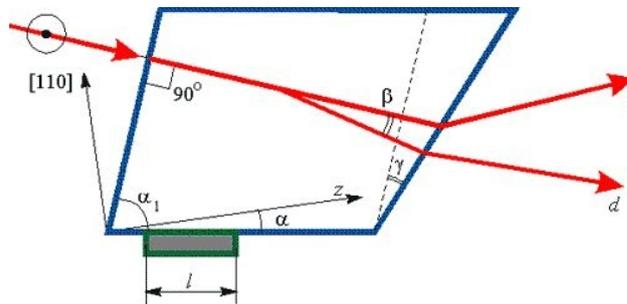


Abbildung 3.3: Beugung in einem AOTF nach Bragg

sinnvoll, die dreifache Anregungsleistung im Vergleich zu kontinuierlicher Bestrahlung einzusetzen. Daher wurden die Leistungen so angepasst, dass eine optimale Zählrate für die Farbstoffe erzielt wurde. Typische Anregungsleistungen bei einfarbiger SMFS liegen zwischen 100 und 300  $\mu\text{W}$ . Für TrALEX wurde für 476 nm eine Leistung zwischen 400 und 1000  $\mu\text{W}$  gewählt. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass der Extinktionskoeffizient von Rh110 oder ATTO488 nur noch etwa 40% vom Maximum beträgt. Die beiden anderen Wellenlängen wurden zwischen 200 und 500  $\mu\text{W}$  eingesetzt. Zusätzlich konnten mit dem AOTF die Beleuchtungsdauer für eine gleichmäßige Detektion optimiert werden.

### 3.1.2 Selektion der Wellenlängen

Die Auswahl der Wellenlängen erfolgt über einen einstellbaren akusto-optischen Filter (AOTF<sup>2</sup>, AA Opto-Electronic, Frankreich). Dieser erlaubt die Auswahl und Modulation einzelner oder mehrerer Wellenlängen über ein breites Spektrum. Das Prinzip des Akusto-Optischen-Effekts wurde bereits 1921 von Brillouin vorhergesagt und 1932 durch Lucas, Biquard und Debye bestätigt. Durch eine mechanische Kraft  $a$  wird eine lokale Änderung der Permittivität  $\epsilon$  in einem Kristallgitter hervorgerufen. Eine planare akustische Welle entlang der Achse  $z$  bewirkt eine periodische Änderung des Brechungsindex. Daher stellt das Medium für Licht ein sich bewegendes Phasengitter dar. Prinzipiell wird zwischen dem Raman-Nath und dem Bragg Gebiet unterschieden. Bei einem AOTF wird die Bragg'sche Reflexion ausgenutzt (Abbildung 3.3). Durch eine Frequenz von etwa 100 MHz wird eine Wellenlänge von der 0. Ordnung auf die 1. Beugungsordnung abgelenkt. Dabei trifft die einfallende Lichtwelle senkrecht auf den geschliffenen Kristall, in dem über einen Schwingquarz eine sich bewegende Welle induziert wird. Durch das

<sup>2</sup>AOTF: Acousto Optical Tunable Filter

Laserleistung	< 5W
Polarisation (in)	$\perp$
Polarisation (out)	$\parallel$
Material	TeO <sub>2</sub>
Anstiegsflanke	1.5 $\mu$ s ( $\varnothing$ 1.5 mm)
Temp. Stab.	$\pm$ 0.05°C
Spektraler Bereich	450–700 nm
Seperation (0. und 1. Ordnung)	> 4.6°
Chromatische Abweichung	< 0.2mrad

**Tabelle 3.3:** Eigenschaften des AA.AOTF.nC [90]

sich verändernde Beugungsgitter, wird eine Frequenz von dem ordentliche Strahl weg gebeugt, und verlässt den Kristall mit einem leichtem Versatz gegenüber dem einfallenden Lichtstrahl. Unterschiedliche Frequenzen bewirken nur, dass sich die gebeugte Wellenlänge ändert, nicht jedoch die Position des gebeugten Strahles. Über die Amplitude des akustischen Signales wird der Anteil der Reflexion verändert. Die relative Änderung ist dabei proportional zu  $\sin^2 \sqrt{P_{rf}}^{-1}$ , wobei  $P_{rf}$  die Leistung der Radiofrequenz ist. Durch die nichtlineare Beugung dreht sich die Polarisationssebene des ausgehenden Strahles. Alle relevanten Eigenschaften des verwendeten AOTF sind in Tabelle 3.3 wiedergegeben.

### 3.1.3 Mikroskop

Als Mikroskop wurde ein Olympus IX 70 eingesetzt. Dieses Mikroskop hat durch seine frei zugängliche Strahlteilerkassette den Vorteil einer hohen Variabilität. Während bei den ersten Messungen noch die Detektion über die Tubuslinse mit einer 2f-Abbildung erfolgte, wurde später der Strahlteiler ebenfalls außerhalb des Mikroskops gesetzt, um einen parallelen Strahlengang zu verwirklichen. Dies hat den Vorteil, dass auf der Detektionsseite weitere Komponenten eingebaut werden können, da der Abstand zwischen Mikroskop und den Detektoren nicht so begrenzt ist. Weiterhin kann eine genauere Positionierung des Signales auf die Detektoren erfolgen.

### 3.1.4 Objektiv

Während der Arbeit kamen zwei unterschiedliche Objektive zum Einsatz. Zum einen ein Nikon 60fach Objektiv mit einer NA von 1.4 und einer hinteren Öffnung von 0.5 cm. Dieses Objektiv wurde bei Messungen in Lösungen eingesetzt. Durch seine relativ kleine Öffnung ist es nicht so anfällig gegen

Störungen im Strahlprofil, die bis zum Einbau der Glasfaser vorhanden waren. Messungen in der Nähe der Oberfläche waren jedoch mit diesem Objektiv nicht durchführbar. Daher wurde das Objektiv nach der Korrektur des Strahlprofils bei Oberflächenmessungen durch ein lichtstärkeres 60-fach Objektiv mit einer NA von 1.45 (PlanApoChromat, Olympus) ausgetauscht. Die hintere Öffnung ist mit fast einem Zentimeter sehr groß und kann zur totalen internen Reflexion benutzt werden.

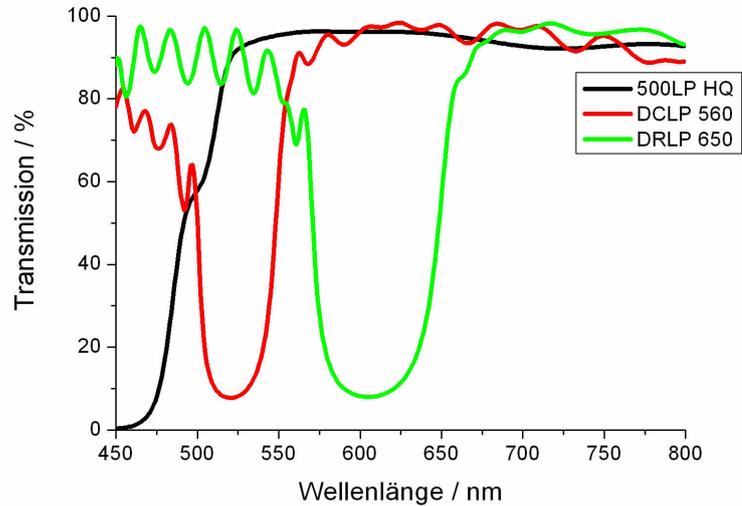
### 3.1.5 Filter und Dichroite

Bei dem Einsatz von Filtern wird zwischen Anregungsfiltern und Emissionsfiltern unterschieden. Während Anregungsfilter vor allem dafür sorgen, dass nur die gewünschte Wellenlänge in die Probe gelangt, sind die Anforderungen an die Emissionsfilter weitaus größer.

Auf der Anregungsseite waren durch den Einsatz des AOTFs keine Filter vorgesehen. Jedoch hat sich herausgestellt, dass beim schnellen Wechsel der am AOTF angelegten Frequenzen 514 nm und 531 nm den AOTF ebenfalls passieren konnten, obwohl nur die Frequenzen für 476 nm, 568 nm und 647 nm auf den Kristall einwirken. Dies machte den Einsatz eines Filters notwendig. Als Lösung wurde ein 546LP vor dem Glasfaserkabel leicht verkippt eingesetzt. Dieser zeigte einen Durchlass bei 476 nm und oberhalb von 535 nm, während 514 nm und 531 nm zu etwa 95% geblockt wurden.

Bei der SMFS wird die Anregungswellenlänge häufig durch einen dichroitischen Strahlteiler von den Fluoreszenzsignalen getrennt. Der Einsatz von mehreren Wellenlängen während einer Messung stellt daher an den Strahlteiler den besonderen Anspruch, alle Anregungswellenlängen zu reflektieren und das Fluoreszenzlicht dennoch möglichst breit durchgehen zu lassen. Erreicht wurde dies bei TrALEX durch einen speziellen Tripleband-Passfilter, dessen Spektrum in Abbildung 3.5 dargestellt ist.

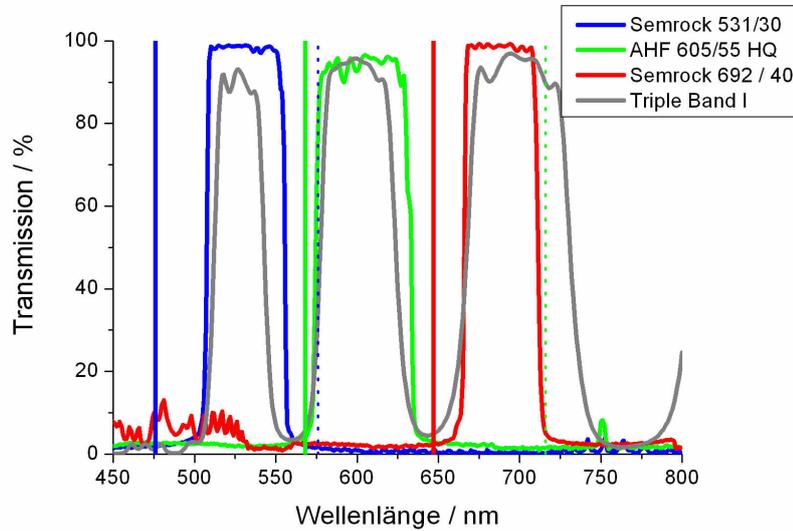
Die Detektion von Photonen soll in Abhängigkeit ihrer Wellenlänge erfolgen. Dadurch kann wesentlich mehr Information gewonnen werden. In dieser Arbeit wurde die spektrale Auflösung durch mehrere Detektoren mit dichroitischen Strahlteilern umgesetzt. Die Entwicklung der Strahlteiler hat gerade in der letzten Zeit enorme Fortschritte gemacht, so dass heute breitbandige Langpasskantenfilter zur Verfügung stehen, die oberhalb einer gewünschten Wellenlänge eine hohe Transmission ( $>95\%$ ), und für einen großen Bereich unterhalb dieser Wellenlänge eine Refletivität von über 95% zeigen. Für die Messungen mit TrALEX wurden die beiden Strahlteiler DC560LP und DRLP650 (Omega, USA) unter  $45^\circ$  verwendet. Die Absorptionsspektren sind in Abbildung 3.4 wiedergegeben. Da die beiden Filter unterhalb 500 nm bzw. unterhalb 575 nm wieder transmittieren, wurde zusätzlich ein



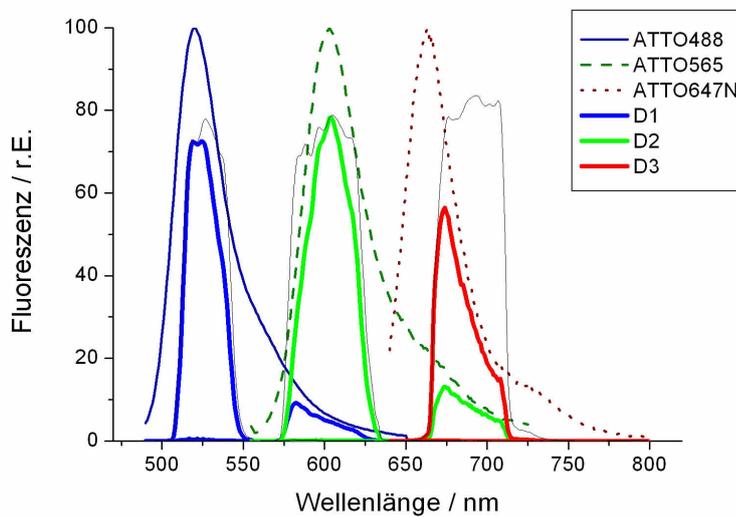
**Abbildung 3.4:** Transmission der Langpassfilter und Strahlteiler bei Verwendung von TrALEx.

500 nm Langpasskantenfilter senkrecht in den Emissionsstrahlengang eingesetzt.

Die Strahlteiler allein sind jedoch zur ausreichenden Unterdrückung der Anregungswellenlängen nicht geeignet. Um jedoch möglichst wenig Photonen zu verlieren, sollte die Transmission der zusätzlichen Filter im Bereich der Fluoreszenz eines Farbstoffes nahe 100% sein, und gleichzeitig andere Wellenlängen vollständig unterdrücken. Vor allem Streulicht der Anregung, aber auch Ramanstreuung, das Übersprechen anderer Fluoreszenzfarbstoffe oder unerwünschte Fluoreszenz der Probe, z.B. von Chlorophyll, gilt es zu unterdrücken. Als geeignet haben sich ein 531/30 (Semrock) vor Diode 1, ein 605/55 HQ (AHF) vor Diode 2 und ein 692/40 (Semrock) vor Diode 3 erwiesen (Abbildung 3.5). Dadurch lagen alle Detektionsbereiche außerhalb der Anregungswellenlängen und der jeweiligen Ramankomponenten von Wasser. Die Transmission der Kombination aller Filter ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Zusätzlich sind die Fluoreszenzspekten der drei verwendeten Farbstoffe Rh110, AlexaFluor 568 und ATTO647N wiedergegeben. Während die ersten beiden Farbstoffe ihr Maximum in Übereinstimmung mit dem Detektionsbereich haben, fällt das Emissionsmaximum von ATTO647N außerhalb des Filterbereichs. Wie in Tabelle 3.4 wiedergegeben, ergibt sich auch für ATTO647N eine passable Wahrscheinlichkeit von 34% auf Detektor 3 detektiert zu werden. Die beiden anderen Farbstoffe werden nicht wesentlich besser



**Abbildung 3.5:** Transmission der Bandpassfilter bei Verwendung von TrALEx. Zusätzlich sind die Anregungswellenlängen (476, 568, 647 nm) und deren Ramanlinien von Wasser (576, 716, 847 nm) eingetragen.



**Abbildung 3.6:** Transmission der Filterkombinationen für alle APDs (schwarz), sowie die Fluoreszenzspektren (gestrichelt) und die Detektionswahrscheinlichkeit (durchgezogen) der Fluoreszenzfarbstoffe.

Farbstoff	Diode 1	Diode 2	Diode 3
ATTO488	38.5 (100)	5.4 (14.0)	0.2 (0.5)
ATTO565	–	45.8 (100)	6.9 (15.0)
ATTO647N	–	–	33.5 (100)

**Tabelle 3.4:** Detektionswahrscheinlichkeit der Farbstoffe auf die Detektoren bei TrALEX in Prozent. In Klammern sind die erwarteten Werte für das Übersprechen dargestellt.

	ct	direx	$\gamma$	$\delta$
ATTO488	0.1403	0.1064	1.3681	1.4652
ATTO565				
ATTO488	0.0052	0.0098	0.7070	2.8011
ATTO647N				
ATTO565	0.1507	0.0780	0.5168	1.2500
ATTO647N				

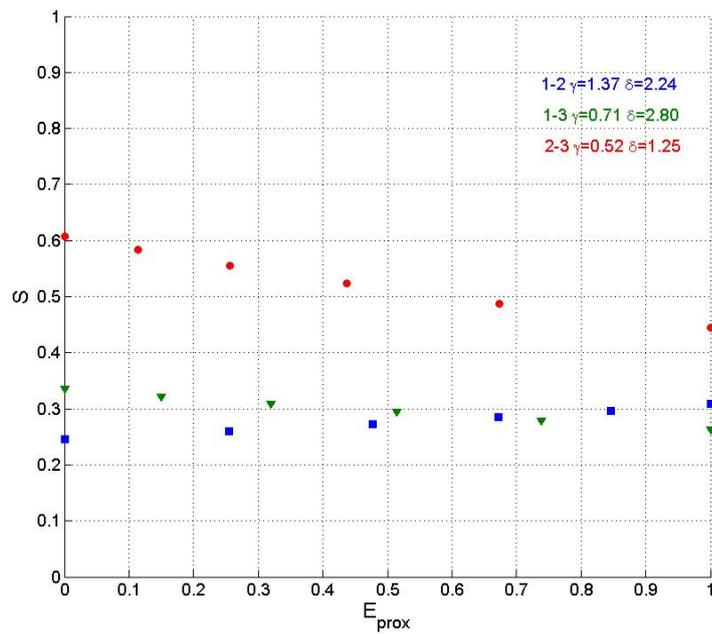
**Tabelle 3.5:** Berechnung von  $\gamma$  und  $\delta$

detektiert. Aus diesen Werten kann das Übersprechen eines Farbstoffs auf andere Kanäle bestimmt werden. Die Werte in Prozent sind ebenfalls in der Tabelle dargestellt.

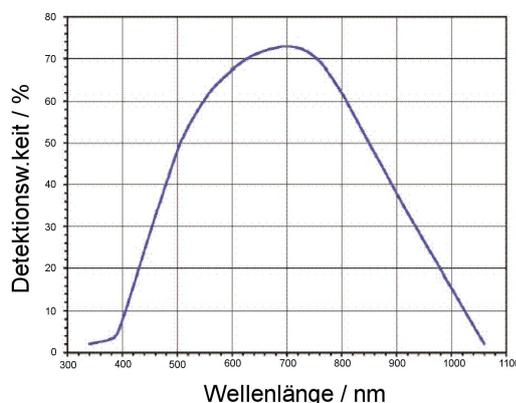
Der Einfluss dieser Faktoren auf die Messungen von Energietransfer und der Stöchiometrie mit alternierender Anregung ist in Kapitel 2.4 ausführlich behandelt worden. In Abbildung 3.7 sind, mit den aus Ensemblemessungen der Farbstoffe und der Filtertransmission bestimmten Werten, die potentiellen Fluoreszenzsignale der Detektoren in  $E_{\text{prox}}$  und  $S$  für unterschiedliche Transferraten dargestellt. Die ebenfalls daraus errechneten  $\gamma$ - und  $\delta$ -Faktoren sind in Tabelle 3.5 für die Anregungsleistungen  $350 \mu\text{W}$  (476 nm),  $250 \mu\text{W}$  (568 nm) und  $250 \mu\text{W}$  (647 nm), zusammengefasst.

### 3.1.6 Detektoren

Für die Detektion von Fluoreszenz einzelner Moleküle ist zunächst eine gute Quantenausbeute gefordert. Durch die schnellen Veränderungen in der Fluoreszenz gerade bei Experimenten mit FRET, ist die Ansprechzeit und die Totzeit zwischen zwei aufeinander folgenden Ereignissen ebenfalls interessant. Als drittes Kriterium sollte das Hintergrundrauschen mindestens zwei Größenordnungen geringer als das Signal sein.



**Abbildung 3.7:** Detektion von Bursts mit den FRET–Werten (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0) in Abhängigkeit von  $\gamma$  und  $\delta$ . Die Verteilungen sind simuliert auf Grundlage der errechneten Detektionswahrscheinlichkeit der Farbstoffe und Filter bei TrALEX.



**Abbildung 3.8:** Detektionswahrscheinlichkeit der Dioden aus der AQR-1x Serie.

Avalanche Photodioden (APD) sind festkörperbasierte Halbleiterdioden, die aus Photonen Elektronen erzeugen. Anders als in normalen Photodioden werden die Elektronen über den Avalanche-Effekt innerhalb der Diode in Abhängigkeit zur angelegten Spannung verstärkt. Das Signal ist proportional zur Intensität auf der aktiven Detektorfläche. Die in dieser Arbeit verwendeten Detektoren (AQR 14 / 15 (PerkinElmer)) haben eine aktive Fläche von etwa  $180 \mu\text{m}$  und sind über Peltierelemente gekühlt. Dadurch wird eine Untergrundzählrate von weniger als 100 Ereignissen pro Sekunde erreicht. Die Auszeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden, detektierbaren Ereignissen liegt für diese Dioden bei etwa 300 ns. Die APDs können mit einer Genauigkeit von 300 ps die Ankunftszeit der Photonen zu einem entsprechenden Triggersignal detektieren. Die Genauigkeit kann durch eine kleinere, effektiv genutzte Fläche erhöht werden.

In der Detektionseffizienz liegen diese APDs mit einem Maximum von 70% bei 700 nm inzwischen hinter modernen CCD-Kameras, die aufgrund ihrer Wiederholrate im Bereich von kHz vermehrt Einzug in dem Gebiet der Einzelmolekülmessungen erhalten. Die Vorteile von APDs liegen immer noch in der zeitlichen Genauigkeit, was bei Lebensdauermessungen, aber auch bei dynamischen Veränderungen in der Fluoreszenz von besonderem Interesse ist. In dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten spektralen Fenster von 500 nm bis 800 nm liegt die Detektionswahrscheinlichkeit durchgehend oberhalb von 50%. Zusammen mit der zeitlichen Auflösung und dem geringen Rauschen stellen APDs einen guten Kompromiss an die gestellten Anforderungen.

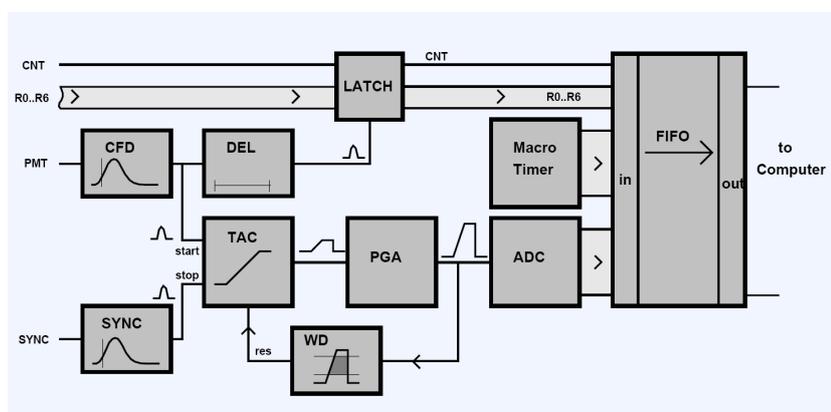


Abbildung 3.9: Prinzip des TCSPC der SPC830 (entnommen aus [91])

### 3.1.7 Zählkarte

Die verwendete Zählkarte (SPC 830, Becker & Hickl, Berlin) ist speziell auf die Detektion von einzelnen Molekülen ausgelegt. Durch die extrem schnelle Signalverarbeitung und einem ausreichenden Speicher können bis zu  $410^6$  Photonen pro Sekunde detektiert werden. Die Auflösung liegt bei 7 ps mit einer Totzeit von 125 ns für aufeinander folgende Ereignisse. Das Prinzip dieser Karte beruht auf einer Umwandlung der zeitlichen Information in eine Amplitude (TAC<sup>3</sup>), vergleiche dazu die Abbildung 3.9. Ein Ereignis vom Detektor wird vom CFD<sup>4</sup> an den TAC weitergegeben. Dies löst eine Spannungsrampe aus und der Wert wird beim Eintreffen des nächsten Synchronisationspulses (SYNC) vom 12 Bit ADC<sup>5</sup> digitalisiert auf der Karte gespeichert. Die Daten werde dabei im FIFO<sup>6</sup>-Modus aufgenommen, wodurch für jedes Photon die Ankunftszeit gespeichert wird. Dadurch können nachträglich die Photonen durch Software korreliert werden. Neben der sogenannten Mikrozeit, wird zusätzlich eine 50 ns genaue makroskopische Zeit gespeichert. Bei der Verwendung mehrerer Detektoren wird zu jedem Ereignis eine Zuordnung in 4 Bit gespeichert. Liefern zwei Detektoren innerhalb eines SYNC ein Signal, so wird dieses Ereignis als ungültig markiert und nicht gespeichert. Alle Daten sind dem Handbuch zu dieser Karte entnommen [91].

<sup>3</sup>TAC: Time-to-amplitude Converter

<sup>4</sup>CFD: Constant Fraction Discriminator

<sup>5</sup>ADC: Analog-digital Converter

<sup>6</sup>FIFO: First In First Out

### 3.1.8 xyz–Scanner

Verwendet wurde ein dreidimensionaler closed-loop–Piezoscanner (P-517.3CL, Physik Instrumente, Göttingen), dessen Position über einen 3–Kanal Verstärker (E503.00, Physik Instrumente, Göttingen) geregelt wird. Über die AO–Karte erhält der Verstärker (PI-509, Physik Instrumente, Göttingen) ein Spannungssignal mit einer Übersetzung von einem Volt pro  $\mu\text{m}$ . Die Scanweite beträgt in x,y 100  $\mu\text{m}$  und in z 20  $\mu\text{m}$ . Die Ansteuerung ist mit dem AOTF und der Datenaufnahme synchronisiert.

## 3.2 Steuerung des TrALEx–Aufbaus und Auswertung

### 3.2.1 Steuerung

Die zentrale Steuerung und Synchronisation aller Komponenten wurde durch ein Programm in LABVIEW (Version 7.1) vorgenommen. Das Programm ist im Rahmen dieser Arbeit entwickelt worden und beruht auf einem Programm zur Ansteuerung eines konfokalen Laser–Scanning Mikroskops. Als externer Zeitgeber wird eine präzise Uhr (Modelocker PulseDrive, APE GmbH, Berlin) mit 76.529700 MHz verwendet.

In Abbildung 3.10 ist die Ansteuerung in einem Flussdiagramm wiedergegeben. Über das Programm erhält die Analog–Output Karte (AOut, PXI 6713, National Instruments) zunächst die auszugebenden Funktionswerte, sowie die Wiederholrate und deren Geschwindigkeit. Insgesamt werden zur Steuerung drei Kanäle für den piezotriebenen xyz–Verschiebetisch, drei Kanäle zur Steuerung des AOTFs und ein Kanal für die Synchronisation benötigt. Innerhalb der Karte werden die digitalen Funktionen in analoge Spannungen umgewandelt, mit einer maximalen Auflösung von einem Megasample. Dies entspricht in etwa einer Auflösung von einer Mikrosekunde. Der Startimpuls bewirkt, dass die Photonenzählkarte (SPC830) gestartet wird. Werden von den APDs nun Ereignisse detektiert, wird der Kanal über den Router in 2 Bit verschlüsselt und über den Eingang „cfd“ ein Ereignis an die Zählkarte weitergegeben. Die drei Kanäle sind in den Routing–Bits  $R0$  und  $R1$  kodiert. Gleichzeitig mit dem Startimpuls erhalten sowohl der AOTF als auch der Piezotisch die in Spannung kodierten Anweisungen vom analogen Output an ihre jeweiligen Steuereinheiten (AA.AOTF.nC bzw. Amp E503.00). Mit der Spannung von 0 . . . 10 V wird im AOTF für jeden Kanal einzeln die Amplitude einer Radiofrequenz im Kristall geregelt, wodurch der Anteil an gebeugter Intensität einer Wellenlänge verändert wird. Somit regelt die Amplitude die

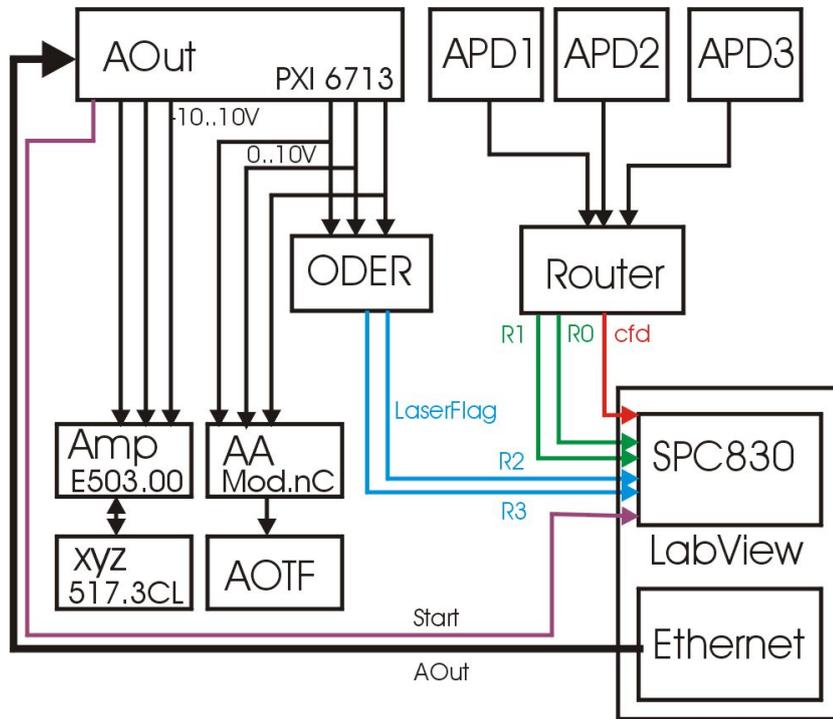


Abbildung 3.10: Flussdiagramm der TrALEx-Ansteuerung.

Intensität einer Wellenlänge. Diese Spannungen werden über ein externes ODER-Gatter (ODER) wiederum in zwei Bit kodiert, die auf die SPC830 als Routing-Bit  $R2$  und  $R3$  gegeben werden (blau). Da die interne Elektronik der AOTF-Ansteuerung (AA.AOTF.4C), wie im folgenden Abschnitt erläutert, eine Verzögerung hervorruft, ist es notwendig, diese Bits ebenfalls zu verzögern. Die Verzögerung betrug konstant  $8 \mu\text{s}$ , diese kann über ein Miniatürknoten im Gerät eingestellt werden.

Der Piezotisch (xyz) bekommt von dem Verstärker (Amp) die Anweisung, welche Position er einnehmen soll. Diese wird selbständig über eine Schleife zwischen dem Positioniertisch und dem Verstärker kontrolliert.

Da die Diffusionszeit von Molekülen durch einen Fokus etwa  $300 \mu\text{s}$  beträgt, ist ein schnelles Schalten der Wellenlängen notwendig. Ziel sind daher mehrere Zyklen aller Anregungswellenlängen während der Diffusionszeit. Durch die AO-Karte konnten bei einer Belegung von sechs Kanälen gleichzeitig noch sechs Werte pro Mikrosekunde ausgegeben werden. Die Anzahl der Datenpunkte begrenzte wiederum die Wiederholrate, so dass bei drei zu steuernden Laserwellen eine maximale Wiederholrate von  $60 \mu\text{s}$  und einer Auflösung von 360 Werten erreicht werden konnte. Da die Anstiegsflanke des

AOTFs größer ist als eine Mikrosekunde (Tabelle 3.3), ist dies ausreichend genau. Über ein Oszilloskop wurde die Flankensteilheit und der Jitter des analogen Ausgangs überprüft. Der Jitter lag unterhalb von  $0.05 \mu\text{s}$ , die Flanken wiesen einen Anstieg von 0V auf 10V und umgekehrt kleiner  $1 \mu\text{s}$  auf, ein Überschwingen konnte nicht beobachtet werden. Die vorgegebene Dauer von  $60 \mu\text{s}$  konnte im Rahmen der Auflösung bestätigt werden.

Bei der Auswertung der ersten mit TrALEX erzeugten Daten, wurde ein nicht konstant bleibender Unterschied zwischen den von der AO-Karte erzeugten Signalen und den Makrozeiten der FIFO-Daten erkannt. Diese unterschieden sich um den Faktor  $0.9999887 \pm 0.0000003$ . Bei einem Zyklus von  $60 \mu\text{s}$  macht dies zunächst nur einen Unterschied von  $0.00067 \mu\text{s}$  aus, jedoch bereits nach 100 000 Zyklen ist zwischen den beiden Uhren eine Differenz von mehr als einem Zyklus. Gerade die nicht konstante Abhängigkeit führt zu Schwierigkeiten. Die Differenz in der Korrektur führt zu einer Abweichung von  $10^{-5} \mu\text{s}$ , wodurch nach etwa 360 Sekunden (6000000 Zyklen) ein vollständiger Zyklus als Differenz auftaucht. Weiterhin entstand ein konstanter Offset von  $8 \mu\text{s}$  zwischen der eingestellten und ausgegebenen Wellenlänge. Zunächst wurden daher die aufgenommenen Daten über deren Verteilung bei der Auswertung optimiert. Dies ist ein langwieriger Prozess und liefert vermeidbare Fehlerquellen. Da die SPC830 über insgesamt vier Routing Kanäle verfügt und nur zwei dieser Kanäle durch die drei Detektoren belegt waren, wurde stattdessen den Photonen eine zusätzliche Markierung für die jeweilige Laseranregung mitgegeben. Dafür wurden drei Varianten in Betracht gezogen:

Variante I Routing Flag wird bei Auswertung durch Software erzeugt, Anpassung erfolgt über Flankensteilheit

- Langwierige Auswertung
- Hohe Fehlerrate bei kurzen Messzeiten
- Veränderungen der Korrektur während einer Messung können nicht korrigiert werden

Variante II Routing Flag durch zwei Stanford Uhren, Synchronisation mit einem Kanal

- Synchronisation ist ausreichend (1x pro Zyklus)
- Umständliche Programmierung vor allem beim Wechsel vom 2D-Scan zur zeitlichen Aufnahme eines Spots
- Einfügen von Pausen zur Vermeidung von Schwebungen beim Schalten des AOTF nur bedingt möglich

Variante III Routing Flag durch Hardware. Über ein ODER-Gatter werden je zwei der AO-Kanäle verknüpft. Zusätzlich kann eine Verzögerung über Jumper eingestellt werden. Benötigte Auflösung etwa 1 Megasample pro Kanal

- Verzögerung wird korrigiert
- TrALEX-Markierung ist permanent synchronisiert mit der Ansteuerung
- Große Variabilität in der Steuerung
- Keine zusätzlichen Fehlerquellen
- Erweiterung um maximal einen Detektor und eine Wellenlänge

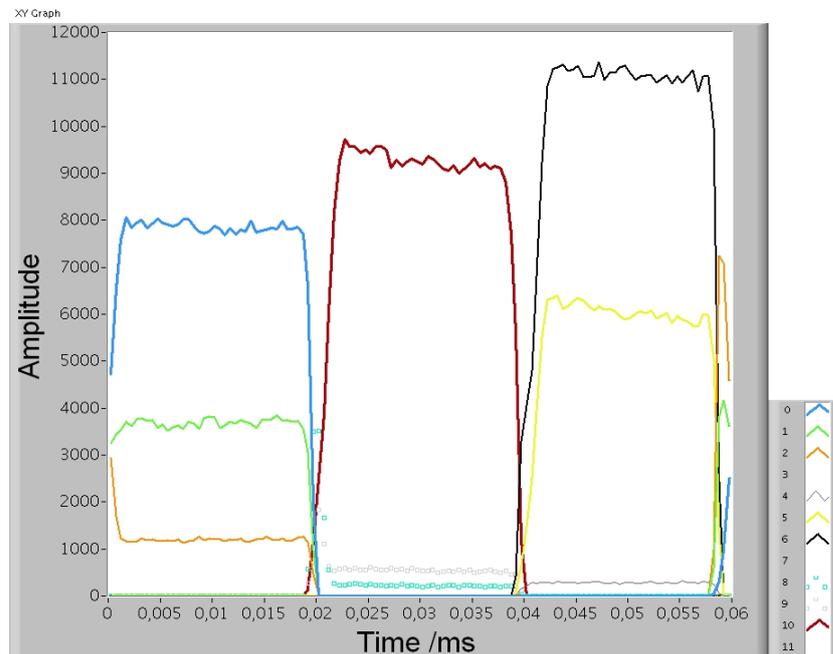
Variante III ist vor allem durch die Variabilität von Vorteil. Veränderungen an der Ansteuerung ergaben die korrekt veränderten Werte für die entsprechende Wellenlänge. Dadurch waren Aufnahmen mit nur einer Wellenlänge oder mit ALEX möglich. Das Setzen von Pausen vor jedem Wechsel der Wellenlänge von einer Millisekunde wurde vereinfacht. Weiterhin konnte das Verhältnis der Anregungsdauer innerhalb des Zyklus beliebig verändert werden, so dass über diesen Faktor die effektive Anregungsleistung reguliert werden konnte, ohne die Intensität weiter zu erhöhen.

Das Ansprechen des AOTFs wurde anhand von Histogrammen der Ankunftszeiten innerhalb eines Zyklus sichergestellt. In Abbildung 3.11 ist das Antwortverhalten zu erkennen. Die Reihenfolge der Anregung war 476–647–568 nm, ohne Pausen vor einem Wechsel.

Als Probe wurde „wire0409“ in einer Konzentration von  $10^{-8}$  molar eingesetzt. Durch FRET erhalten bei blauer Anregung auch die Detektoren 2 und 3, bei gelber auch Detektor 3 ein Signal. Die Flanken sind bei allen Wechseln etwa  $2.5 \mu\text{s}$  steil. Auffallend ist das Überschwingen beim Wechsel von 568 nm auf 476 nm. Offenbar sind beide Frequenzen für einen kurzen Moment gleichzeitig im AOTF vorhanden. Dadurch wird die eindeutige Zuordnung gestört. Durch Messungen mit einem Spektrometer konnte gezeigt werden, dass nicht nur die beiden Wellenlängen vorhanden sind, sondern zusätzlich 514 nm und 527 nm den AOTF passieren konnten. Das Einfügen einer Pause von etwa  $1 \mu\text{s}$  konnte sowohl das Überschwingen, als auch die Transmission der zusätzlichen Wellenlängen unterbinden.

### 3.2.2 Auswertung

Da die Auswertung der FIFO-Daten recht speicherintensiv ist, wurde diese auf einem externen Rechner durchgeführt, um die Messungen nicht zu stören.



**Abbildung 3.11:** Antwortverhalten des AOTF

Das Programm `tralex.11b` zur Auswertung von TrALEx-Daten in Lösungen ist zu weiten Teilen im Rahmen dieser Arbeit entstanden, nur für die Umwandlung der Rohdaten in FIFO-Daten und die Burstanalyse wurde auf bereits bestehende Komponenten zurückgegriffen.

Die Auswertung der Daten erfolgt in mehreren Schritten: Nach der Umwandlung der Rohdaten in FIFO-Daten werden diese auf die sechs relevanten Kanäle reduziert, und entsprechend der Anregungswellenlänge und den Detektionskanälen sortiert. Dabei wird jedem Photon ein neuer Routerkanal zugewiesen und der Datensatz in einer globalen Variablen gespeichert, um eine unnötige Speicherbelastung durch ungenutzte Kanäle zu vermeiden (Tabelle 3.6).

Im Anschluss daran erfolgte das Zusammenfassen der Daten pro Kanal in gleich große Zeitabschnitte (Binning) und die Umrechnung aller Intensitäten auf kHz. Diese Spuren können sehr groß werden und werden daher nur temporär als „MCS“-Spur im Speicher abgelegt.

Die eigentliche Auswertung beginnt mit der Korrektur des Hintergrundes für alle Kanäle aus den Messdaten des Puffers unter den eingestellten Messbedingungen. Danach werden die Koeffizienten für das Übersprechen und der direkten Anregung aus den entsprechenden Proben bestimmt (vgl. Abschnitt 2.4.3). Diese sind relative Faktoren und bleiben für eine Einstellung während

Bezeichnung	Routerkanal
Summe	0
L1D1	1
L1D2	2
L1D3	3
L2D2	4
L2D3	5
L3D3	6

**Tabelle 3.6:** Kanalzuordnung bei TrALEx,  $L_n$  liefert die Bezeichnung für die Anregungswellenlänge,  $D_n$  für den Detektor.

einer Messreihe konstant. Beim Einlesen neuer Messdaten wird die Intensität auf jedem Kanal entsprechend des Übersprechens und der direkten Anregung korrigiert, so dass in den Daten eines Kanals nur noch das Fluoreszenzsignal eines Farbstoffs enthalten ist.

Die Auflösung der durch FRET bedingten Veränderungen wird durch den nächsten Teil der Software übernommen. Dafür werden aus den MCS-Spuren über eine Burstanalyse die Intensitäten eines jeden Kanals in Bursts zusammengefasst. Die genauere Beschreibung der Bursterkennung ist in Abschnitt 3.4 erläutert. An dieser Stelle beginnt die Übersetzung der Intensität in den Stöchiometrischen Index und in  $E_{\text{prox}}$ -Werte, bzw. nach der Korrektur durch die  $\gamma$ -Faktoren in korrigierte  $E$  und  $S_\gamma$ -Werte.

Für die Bestimmung der  $\gamma$ -Faktoren wurden die Daten der Kalibrierungsproben exportiert und über ein Script in MATLAB die Schwerpunkte von  $E_{\text{prox}}$  gegen  $1/S$  durch eine lineare Regression angepasst. Aus den beiden Koeffizienten ergeben sich die Faktoren  $\gamma$  und  $\delta$  nach Gleichung 2.79.

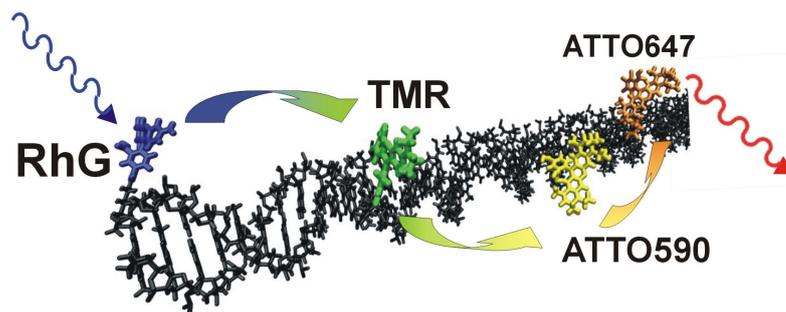
### 3.3 Aufbau eines Modellsystems für Multistep-FRET

Um verlässliche Ergebnisse aus unbekanntem Daten zu gewinnen, ist es notwendig ein neuartiges Messverfahren unter bekannten Voraussetzungen zu testen. Die so gewonnenen Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf mögliche Fehlerquellen, Stärken und Schwächen des Messverfahrens zu. Als Modellsysteme kommen nur solche in Frage, in denen bekannte Abstände zwischen den Fluorophoren bestehen. Idealerweise sollte es mit dieser Probe oder den Proben möglich sein, unterschiedliche räumliche Anordnungen zu erzielen, die sich dann mit TrALEx beobachten lassen. DNA hat sich als Träger für solche

Messverfahren als gut geeignet herausgestellt. Ob es um Studien zu den Bindungskräften geht [92, 93, 94], Einfluss von DNA-Hairpins [95, 96, 48] und den Einsatz von fluoreszierenden DNA-Sonden in der Virologie, oder die bekanntere *Holiday Junction* [97, 98]. Vor allem das einfache Handling und das relativ einfache Design von neuen Proben bieten hier eine Vielzahl von Möglichkeiten.

Für eine sinnvolle Probe im TrALEX-Setup müssen mindestens drei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe an diese Probe fest verbunden werden. Der Abstand der Farbstoffe sollte im Bereich des Försterradius liegen. Die Probe sollte zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen können, die durch äußere Einflüsse veränderbar sind. Weiterhin sollte es möglich sein, das Modellsystem auf zwei Farben zu begrenzen, ohne dass dies die Konformation beeinflusst.

### Der photonische Draht



**Abbildung 3.12:** 3D-Modell des hybridisierten Wire 0409 [60]. Die Farbstoffe haben einen Abstand von 10 Basenpaaren und können in dieser Anordnung ihre Energie gerichtet weiterreichen. Nicht gezeigt sind die 20 freien Basen mit dem Biotinanker am 3'-Ende

Die von Heilemann *et al.* in dem Bereich des Photonic-Wire gewonnenen Erfahrungen mit mehreren Einzelsträngen waren sehr positiv [60, 99, 63]. Daher wurde der photonische Draht auch in den ersten Messungen mit TrALEX eingesetzt. Im Gegensatz zu einem herkömmlichen Leiter aus Metall wird nicht elektrische Energie über Elektron-Loch-Paare weitergegeben, sondern die Anregungsenergie eines Fluorophors über mehrere Farbstoffe. Die eingesetzten Farbstoffe sind in der Lage, Energie gerichtet weiter zu leiten. Ein Farbstoff wird direkt angeregt und die Energie wandert über FRET zum nächsten. Dieser wiederum kann seine Anregungsenergie via FRET an den dritten Farbstoff weitergeben. Die Richtung wird dadurch erreicht, dass die



den Gegenstrang zu den beiden anderen Strängen bilden. Durch die Bindungen bilden sich drei Arme doppelsträngiger DNA aus, die einen gemeinsamen Punkt in der Mitte der Stränge besitzen. Eine Skizze ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Die Form entspricht einem dreiarmligen Stern. Zunächst sind die Arme gegeneinander frei beweglich, so dass die Farbstoffe sich zumindest teilweise recht nahe kommen können. Die Mitte der drei DNA-Stränge stellt eine Bindungsstelle für Steroide dar [100]. Bindet ein solches Steroid daran, so versteift sich die Struktur und die Arme des Sterns formen einen Tetraeder mit dem Steroid als Spitze. Einer der Stränge wird zusätzlich mit einem Biotin gekoppelt, wodurch eine Immobilisierung des Stranges und damit des gesamten Stern an Streptavidin möglich wird. Genaueres zu diesem Verfahren befindet sich in Kapitel 3.11.3. An Position 10 (x, y, z) wurde in allen Strängen ein aminomodifiziertes Thymidin eingebaut. An diese kann über einen NHS-Ester ein geeigneter fluoreszierender Marker gekoppelt werden. Um mögliche Schleifen oder gegenseitige Behinderungen zu vermindern, wurde folgendes Design gewählt:

**Strang A:**

5'- AGA GAG AGA xAG AGA GAG AGG GTG TGT GTG AGT GTG TGT G -3'

**Strang B:**

Biotin - 5'- CAC ACA CAC yCA CAC ACA CCA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A -3'

**Strang C:**

5'- TTT TTT TTT zTT TTT TTT TTC TCT CTC TCT ATC TCT CTC T -3'

**Schleifen**

Zunächst einmal ist für jeden Einzelstrang sicherzustellen, dass sich keine Ösen oder Schleifen bilden, die bei Raumtemperatur stabil sind. Mit Hilfe von `mfold` kann die Bindungsenergie von möglichen Schleifen im voraus berechnet werden [101]. Alle Berechnungen erfolgten mit einer Na<sup>+</sup> Konzentration von 100 mM. Nach `mfold` ist nur Strang A in der Lage, überhaupt eine nennenswert stabile Schleife zu bilden. Da die Bindung nur über ein Basenpaar erfolgt (vgl. Abbildung 3.3), wird diese Struktur jedoch nicht stabil sein. Die Bindungsenergie lässt ebenfalls darauf schließen, dass dieser bei Raumtemperatur nicht stabil ist:

### 3.3. AUFBAU EINES MODELLSYSTEMS FÜR MULTISTEP-FRET 87

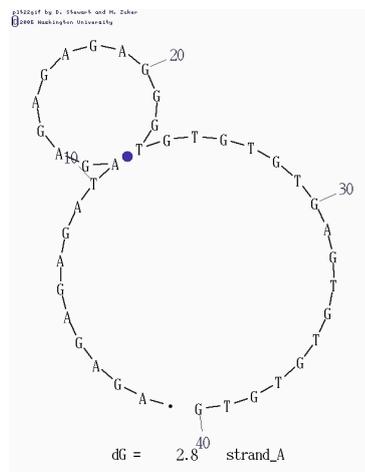


Abbildung 3.14: Mögliche Stamm-Schleifen Struktur vom Strang A.

$\Delta G$	2.76	kcal mol <sup>-1</sup>
TM	-55.3	°C
$\Delta H$	-7.6	kcal mol <sup>-1</sup>
$\Delta S$	-34.9	cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>

Die Bindungsstelle wird zusätzlich durch die Aminomodifikation verändert und durch Ankoppeln eines Farbstoffs weiter beeinflusst. Es zeigte sich, dass diese Sequenz schwer mit einem Farbstoff eine kovalente Bindung eingeht. Daher wurde diese Sequenz als einzige gefärbt eingekauft (IBA Göttingen).

#### Dimerisierung

Der andere Aspekt beim Design von Oligonukleotiden ist die Bindungsenergie zwischen den Strängen. Diese sollte ausreichend groß sein, damit bei Raumtemperatur die Dimere bzw. in diesem Fall Trimere nicht auseinander fallen. Dazu wurde wiederum mit `mfold` die Dimerisierung zwischen je zwei unterschiedlichen Strängen berechnet. Durch das Design konnte ausgeschlossen werden, dass sich homogene Dimere ausbilden können.

Maximum $\Delta G$	-71.51	kcal × mol <sup>-1</sup>
$\Delta G$	-32.61	kcal × mol <sup>-1</sup>
Base Pairs	20	

5'	AGA	GAG	AGA	TAG	AGA	GAG	AGG	GTG	TGT	GTG	AGT	GTG	TGT	G
			:											
3'	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAC	CAC	ACA	CAC	TCA	CAC	ACA	C

Maximum $\Delta G$	-71.51	kcal/mol
Delta G	-36.94	kcal/mol
Base Pairs	20	

5'	CAC	ACA	CAC	TCA	CAC	ACA	CCA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	A
			:											
3'	TCT	CTC	TCT	ATC	TCT	CTC	TCT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	T

**Tabelle 3.7:** Stabilität eines Heterodimer von Strang B und Strang C mit `mfold` berechnet.

Maximum $\Delta G$	-71.51	kcal $\times$ mol <sup>-1</sup>
$\Delta G$	-29.42	kcal $\times$ mol <sup>-1</sup>
Base Pairs	20	

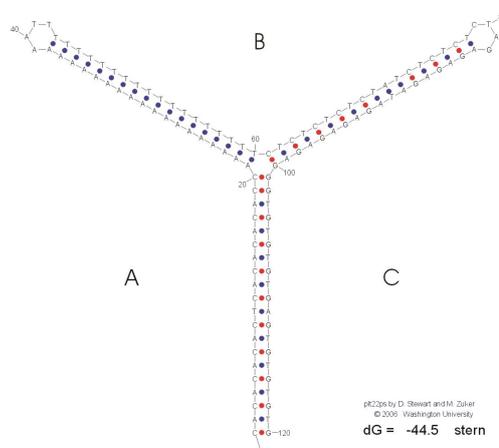
5'	AGA	GAG	AGA	TAG	AGA	GAG	AGG	GTG	TGT	GTG	AGT	GTG	TGT	G
											:			
3'	TCT	CTC	TCT	ATC	TCT	CTC	TCT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT	T

**Tabelle 3.8:** Stabilität eines Heterodimer von Strang A und Strang C mit `mfold` berechnet.

Die Bindungsenergie zwischen je zwei Einzelsträngen ist ausreichend hoch. Die Schmelztemperatur wird bei etwa 50°C erwartet. Somit bilden diese Dimer wechselseitig bei Raumtemperatur eine stabile Einheit. Homogene Oligonukleotide aus nur einer Base sind im Allgemeinen nicht gegen einen Versatz geschützt. Daher kann es bei der Kombination aus Strang B und Strang C auch zu einem solchen kommen. Die Stabilität nimmt aber im Vergleich zu dem in Tabelle 3.7 dargestellten Werten mit jeder Verschiebung ab. Bei einer Verschiebung um einen ist die Bindungsenergie nur noch  $\Delta G = -35$  kcal/mol. Bei mehr als drei Basenpaaren Versatz ist das Dimer nicht mehr ausreichend stabil im Vergleich zu den anderen Konfigurationen. Ebenso können wiederholende Muster aus Basen sich gegenseitig verschieben. Jedoch ist die Bindungskonstante in dieser Konformation nur in etwa ein Drittel von der besten Überdeckung.

### Stabilität und Eindeutigkeit des Sterns

Zur Berechnung der Stabilität des hetero-Trimeres ist das Programm `mfold` nicht in der Lage. Als eine Näherung wurde daher die Schmelztemperatur eines 120 Basen langen Stranges aus allen drei Einzelsträngen berechnet.



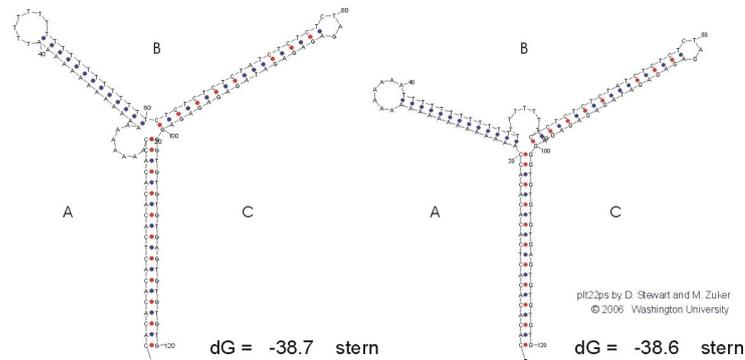
**Abbildung 3.15:** Faltung des Sternes aus allen drei Einzelsträngen berechnet mit mfold.

Dieser nimmt als stabilste Form die des dreiarmigen Sternes an (Abbildung 3.15), mit den folgenden Charakteristika:

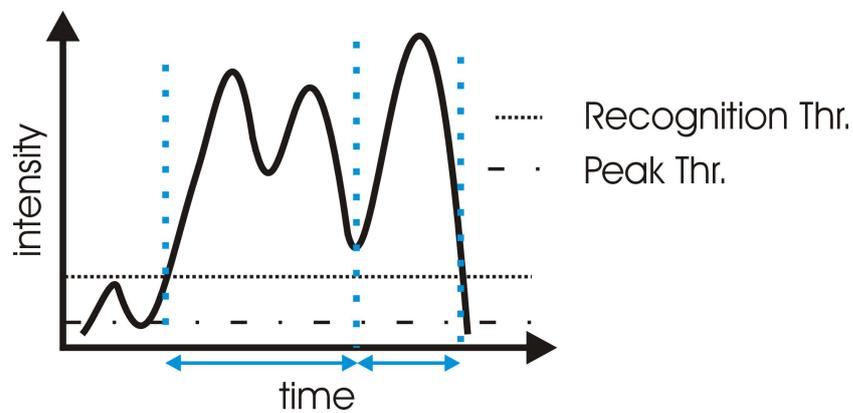
$$\begin{array}{lll}
 \Delta G & -44.5 & \text{kcal mol}^{-1} \\
 TM & 72.2 & \text{°C} \\
 \Delta H & -436.5 & \text{kcal mol}^{-1} \\
 \Delta S & -1263.9 & \text{cal K}^{-1}\text{mol}^{-1}
 \end{array}$$

Damit ist die Bindungsenergie des gesamten Sternes größer als die der einzelnen Dimere. Dies ist zu erwarten, da ja auch die im Dimer vorhandenen freien Basen mit zu einer Stabilisierung beitragen. Die Anordnung ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Durch den Winkel von  $120^\circ$  in der zweidimensionalen Struktur scheint diese vollständig zu binden. Dies ist die stabilste Struktur, die der Stern einnehmen kann. Wie jedoch in dem Abschnitt zuvor festgestellt, können die Stränge durch Verschiebung um einige Basenpaare ebenfalls stabile Strukturen ausbilden. Dies macht sich bei der Zusammensetzung von allen drei Oligonukleotiden wiederum bemerkbar: Speziell in den homogenen Teilen der Stränge A und BC bilden die versetzten Stränge zusammen mit dem dritten Strang vergleichbar stabile Strukturen mit kleinen Schleifen aus (Abbildung 3.16):

	a		b	
$\Delta G$	-38.72	kcal mol <sup>-1</sup>	-38.56	kcal mol <sup>-1</sup>
$TM$	70.2	°C	70.2	°C
$\Delta H$	-400.3	kcal mol <sup>-1</sup>	-399.2	kcal mol <sup>-1</sup>
$\Delta S$	-1165.9	cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	-1162.7	cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>



**Abbildung 3.16:** Suboptimale Faltung des Sternes berechnet mit `mfold`. Durch den Versatz bildet sich in der Mitte eine kleine Schleife in Strang A bzw. Strang B.



**Abbildung 3.17:** Bursterkennung anhand von Schwellwerten.

Daher ist bei der Hybridisierung der Sterne zwischen  $75^{\circ}\text{C}$  und  $55^{\circ}\text{C}$  eine geringe Temperaturänderungsrate zu wählen.

### 3.4 Bursterkennung

Anders als bei der FCS werden bei der Burstanalyse die Ereignisse eines Moleküls im Fokus zusammengefasst und diese analysiert. Dazu muss die Konzentration so gering angesetzt werden, dass sich zu jedem Zeitpunkt maximal ein fluoreszierendes Molekül im Fokus befindet. Nach den Betrachtungen in Kapitel 2.2 liegt das Fokusvolumen bei etwa einem Femtoliter, woraus eine Konzentration von  $10^{-11}$  bis  $10^{-12}$  mol/l für einzelne Moleküle im Fokus folgt.

Die Bursterkennung erfolgt mit Hilfe einer kleinen C++ Routine, in der die zeitlich aufgelösten Intensitäten einer Einzelmolekülspur anhand der drei Kri-

terien *Recognition Threshold*, *Peak Threshold* und *Separation Limit* verglichen werden [102]. Dies ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Betrachtet wird für die Burstanalyse die Summe aus allen Kanälen, um möglichst alle Ereignisse aufzunehmen. Die Auswahl von bestimmten Ereignissen erfolgt im Anschluss an die Bursterkennung durch unterschiedliche Schwellwerte: Steigt das Signal über den Schwellwert „Recognition Threshold“, wird es als Signal gewertet und vom Untergrund getrennt. Ein Peak beginnt dann, wenn die Intensität oberhalb des „Peak Threshold“ steigt. Sinkt die Intensität wieder unterhalb des Peak Threshold, endet der Peak. Bleibt die Intensität oberhalb des Erkennungsschwellwerts und sinkt nur auf ein lokales Minimum, so gelten die Peaks als getrennt, wenn der Mittelwert der Maxima multipliziert mit dem „Separation Limit“ kleiner ist als das Minimum. Zum Vergleich der Intensität der Bursts werden alle Spuren unabhängig von der zeitlichen Zusammenfassung in kHz wiedergegeben.

Der Vorteil einer Burstanalyse gegenüber anderen Verfahren liegt vor allem darin, dass hier wirklich einzelne Ereignisse betrachtet werden können [13, 48, 47]. Daher können vor allem im Zusammenhang mit FRET auch unterschiedliche Populationen betrachtet werden. Weiterhin ist es möglich selbst bei diffundierenden Molekülen, das Blinken der Farbstoffe aufzunehmen. Ebenso können Bleichprozesse des Akzeptors mit dem typischen Farbwechsel direkt beobachtet werden. Im Zusammenhang mit TrALEX können auch die FRET Verteilungen von multichromophoren Systemen aufgelöst werden und somit an einzelnen Molekülen Abstände berechnet werden.

## 3.5 Empfindliche Fluoreszenzspektroskopie

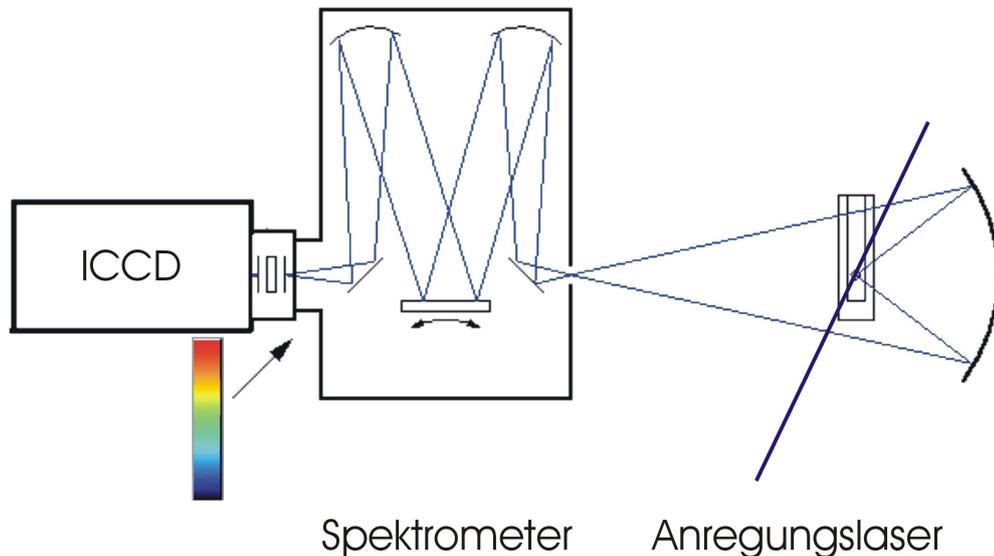
Die ersten Messungen an den chimären Proteinuntereinheiten der VHA erfolgten an einem eigenen spektroskopischen Aufbau. Die Anregung der fluoreszierenden Proteine wurde durch einen Frequenzverdoppelten Titan–Saphir Laser (TiSa) erreicht, der zunächst in eine Quarzglasküvette und später in eine Kapillare fokussiert wurde. Über einen Bildverstärker wurden das Spektrum auf einer CCD<sup>7</sup> abgebildet. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

### 3.5.1 Titan-Saphir Laser

Als Lichtquelle wurde ein Femtosekunden Titan–Saphir Laser mit Frequenzverdopplung (Tsunami, Spectra Physics) eingesetzt. Der Laser kann im Bereich von 780 nm bis 980 nm justiert werden, so dass nach der Frequenzver-

---

<sup>7</sup>CCD: Charge Coupled Device



**Abbildung 3.18:** Detektion von Fluoreszenzlicht aus einer Küvette mit Spektrometer und CCD mit Bildverstärker (ICCD)

dopplung ein Wellenlängenbereich von 390 nm bis 490 nm erreicht werden kann [103]. Die Pulsdauer des Laser liegt bei ca. 130 fs, bei einer Wiederholrate von 82 MHz, wodurch Lebensdauermessungen ermöglicht werden. Die spektrale Breite ist größer als 26 nm, dem Fourierlimit von Femtosekunden Pulsen. Die direkte Anregung von E-YFP beträgt bei 420 nm noch etwa 4% der maximalen Anregung, E-CFP wird zu 88% angeregt. Damit wird für die meisten Messungen eine Frequenz von 840 nm am TiSa eingestellt.

Zur Filterung der fundamentalen Wellenlänge wurde der Strahl über ein Pellin-Broca Prisma [31] spektral zerlegt und zusätzlich über zwei Langpass-Kantenfilter (400 nm bis 650 nm, 45°) gereinigt. Die Leistung der frequenzverdoppelten Anregung beträgt maximal 98 mW. Das Prinzip der Frequenzvervielfachung kann ist z.B. in [54] beschrieben.

### 3.5.2 Spektrometer

Das Spektrometer (Spectra Pro 275, Acton Research) ist in der „Czerny-Turner“ Anordnung aufgebaut. Die abbildenden Hohlspiegel im Spektrometer haben eine NA von 3.8 und eine Brennweite von 275 mm. Der Eintrittsspalt kann im Bereich von 10  $\mu\text{m}$  bis 3 mm eingestellt werden. Der Blazewellenlänge des Gitters liegt bei 300 nm, wodurch sich eine Transmission von von etwa 60% im Emissionsbereich von E-CFP und E-YFP ergibt. Die Auflösung ist durch das Gitter mit 600 Linien pro mm auf etwa 0.1 nm gegeben [104].

### 3.5.3 Bildverstärker und CCD

Das spektral aufgelöste Fluoreszenzlicht wird vom Spektrometer auf den Bildverstärker (PP0340N, B.V. Delft Elektronische Produkte) abgebildet. Die Funktionsweise von Bildverstärkern ist in [105] hinreichend dargestellt. Die Quanteneffizienz des Bildverstärkers ist bei 480 nm mit 12.8% angegeben und fällt mit steigender Wellenlänge ab. Bei 600 nm beträgt sie nur noch 7%. Der verwendete Bildverstärker arbeitet mit einem P43 Phosphor und hat somit eine Nachleuchtdauer von etwa 1 ms.

Die Datenaufnahme erfolgt mit einer CCD-Kamera (Pixelfly, PCO) mit 640x480 Pixeln und einer Dynamik von 12 Bit. Als Untergrundzählrate wurden  $30 \pm 2$  Ereignisse gemessen. Betrieben wurde die Kamere im schnelleren Videomodus, wodurch ein kontinuierliches Auslesen für Belichtungszeiten größer als 24.8 ms erreicht werden konnte. Die Totzeiten liegen damit bei etwa 50 ms.

## 3.6 Ensemblespektroskopie

### 3.6.1 Absorption

Absorptionsmessungen wurden an einem UV/VIS-Spektrometer (Lambda 25, PerkinElmer, USA) durchgeführt. Es wurden Quarzglasküvetten aus Suprasil (Hellma, Mühlheim) mit einem Probenvolumen von  $45 \mu\text{l}$  verwendet. Diese Küvetten haben eine Pfadlänge von nur 3 mm und können gleichzeitig in das Fluoreszenzspektrometer eingesetzt werden, da sie drei Fenster besitzen.

Zur Konzentrationsbestimmung muss daher die Pfadlänge ( $pl$ ) in dem Lambert-Beer'schen Gesetz beachtet werden:

$$Konz = \frac{A(\lambda) df}{\epsilon(\lambda) pl} . \quad (3.1)$$

$df$  ist der Verdünnungsfaktor,<sup>8</sup> um den die Probe zur Messung verdünnt wurde. Die verwendeten Konzentrationen lagen unterhalb von  $10^{-6}$  molar, so dass Reabsorption ausgeschlossen werden kann. Das Spektrometer weist eine Empfindlichkeit von bis zu  $10^{-8}$  molar auf.

### 3.6.2 Fluoreszenz

Die weiteren Fluoreszenzmessungen im Ensemble wurden an einem kommerziellen Fluoreszenzspektrometer (Cary Eclipse, Varian, Darmstadt) durch-

---

<sup>8</sup>df: dilution factor

geführt. Bei diesem Spektrometer besteht neben den Intensitätsmessungen die Möglichkeit, die Temperatur durch ein Thermoelement einzustellen, so dass temperaturabhängige Messungen zwischen 4°C und 90°C durchgeführt werden können. Somit konnte die Hybridisierung kontrolliert werden. Die Empfindlichkeit des Spektrometers wird mit  $10^{-9}$  molar angegeben, da die Detektion über einen Photonenvervielfacher erfolgt.

### 3.7 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS<sup>9</sup>) bietet für viele Prozesse die Möglichkeit einer zeitlichen Auflösung. Neben der Diffusionszeit durch ein definiertes Volumen, sind in ihr die Informationen über Reaktionskinetiken, An- und Auszustände von Farbstoffen oder der Fluoreszenzlöschung enthalten. Gerade wenn nur schwächere Signale erzielt werden können stellt die FCS eine Alternative zur Detektion einzelner Moleküle dar. Bei der FCS werden die Ankunftszeiten der Fluoreszenzsignale aus einem festen Probenvolumen mit sich selbst korreliert. Dies kann über die normalisierte Autokorrelationsfunktion

$$G(\tau) := \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.2)$$

beschrieben werden. Die Intensität  $F(t)$  zu einem Zeitpunkt  $t$  wird mit sich selbst zu allen anderen Zeitpunkten  $t + \tau$  in Beziehung gesetzt. Physikalisch wird dabei die Wahrscheinlichkeit für die Detektion eines Photons zu einem Zeitpunkt  $t + \tau$  nach erfolgreicher Detektion zum Zeitpunkt  $t$  bestimmt. Unkorrelierte Photonen erzeugen so eine konstante Verschiebung, während abhängige Ereignisse zu einer zeitlichen Abhängigkeit führen. Über die Art der Abhängigkeit können verschiedenen Ursprünge der dahinterstehenden Prozesse aufgeklärt werden.

Das in dieser Arbeit verwendete Modell zur Anpassung der experimentellen Daten beruht auf der Annahme, dass nur ein exponentieller Term durch Übergänge in Tripletzustände  $\tau_{exp}$  und eine Diffusionszeit  $\tau_{Diff}$  in den korrelierten Daten enthalten ist:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_{Diff}} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{p}{1-p} \exp^{-\tau/\tau_{exp}} \right) \quad (3.3)$$

$p$  ist der Anteil der Farbstoffmoleküle im Tripletzustand. Bei diesem Modell wird der Einfluss der Fokusgröße außer Acht gelassen, so dass nur relative Diffusionszeiten ermittelt werden können. Der Anpassung der Messdaten

---

<sup>9</sup>FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy

durch ein mathematisches Modell sind Grenzen gesteckt. So können selbst mit einem erweiterten Modell sehr ähnliche Diffusionszeiten nicht voneinander getrennt werden. Eine detaillierte Übersicht über die FCS ist z.B. in [106, 107] gegeben, weitreichende Informationen im Hinblick auf unterschiedliche Modelle und der Herleitung dieser sind in [108] zusammengefasst.

## 3.8 Verwendete Farbstoffe und deren Eigenschaften

### GFP und Varianten

Die Entdeckung fluoreszierender Proteine [109] und die vollständige Klonierung von Prasher *et al.* 1992 [110] ergaben vielseitige Anwendungsmöglichkeiten und erlaubten den Zugang zu ganz neuen Fragestellungen in lebenden biologischen Systemen. Durch die gezielte Weiterentwicklung der fluoreszierenden Eigenschaften konnten die Farbstoffe schließlich so stabilisiert werden, dass sie nicht nur für das Lokalisieren von Proteinen in den Zellen geeignet sind, sondern auch Abstandsbestimmungen mit FRET innerhalb von Zellen zu ließen [23, 111, 25, 26]. Eine Übersicht über die Entwicklung und Eigenschaften des Green Fluorescent Protein (GFP) sowie deren cyanfarbenen, blauen und gelben Variationen ist in [112] gegeben. Die beiden Farbstoffe CFP und YFP<sup>10</sup> bilden zusammen ein FRET-Paar, welches in vielen Experimenten Verwendung findet. Die Struktur von CFP ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Das verwendete eYFP<sup>11</sup> gehört nach [112] zu der Klasse der Chromophore mit einem Phenolat-Anion im gestapeltem  $\pi$ -Elektronen System, während eCFP ein Indol im Chromophor besitzt. Die relevanten physikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst. Der Försterradius dieser beiden Proteine liegt bei 48.4 Å unter nativen Bedingungen.

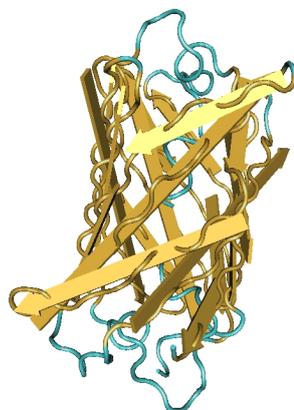
### Chemische Farbstoffe

Neben den beiden GFP-Varianten wurden mehrere Farbstoffe im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Die verwendeten Farbstoffe lassen sich chemisch in zwei Klassen einteilen: Carbocyanine und Rhodamine. Prinzipiell ist man bei dem Einsatz von Photodioden oder Photonenvervielfachern nicht unbedingt auf den sichtbaren spektralen Bereich begrenzt. Jedoch weisen gerade hier

---

<sup>10</sup>CFP: Cyan Fluorescent Protein  
YFP: Yellow Fluorescent Protein

<sup>11</sup>eYFP: enhanced YFP



**Abbildung 3.19:** 3D Visualisierung von CFP. Elf  $\beta$ -Faltblätter erzeugen einen Hohlzylinder, durch den eine Helix führt, an der das eigentliche Chromophor sitzt. Die Abbildung wurde aus den Daten von [113] mit Hilfe von `cn3d` erzeugt [114].

die Farbstoffe eine höhere Photostabilität im Vergleich mit energiereicheren Farbstoffen kürzerer Emissionswellenlängen. Gerade in der Einzelmolekülspektroskopie ist diese Stabilität von besonderem Interesse, da die einzelnen Chromophore möglichst viele Anregungszyklen durchlaufen sollen. Dadurch kann eine besser Statistik erreicht werden.

Mit der Tendenz zu längeren Wellenlänge geht ein Anstieg der nicht radiativen Übergänge einher. Dies ist dadurch zu erklären, dass der energetische Abstand zwischen dem höchsten besetzten molekularen Orbital und dem untersten nicht besetzten Orbital mit wachsender Wellenlänge geringer wird. Dadurch kann durch Vibrationsrelaxierung die Energie in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben werden (vgl. 2.1, IC). Als eine Konsequenz sind die Farbstoffe im sichtbaren Bereich zu bevorzugen. Diese sind bis 650 nm Emission auch mit funktionellen Gruppen kommerziell zu erwerben. Heilemann *et al.* konnten zeigen, dass sich für Farbstoffe aus unterschiedlichen Klassen nur schlecht ideale Bedingungen finden lassen. Daher wurde vornehmlich auf Rhodamine und Carborhodamine zurückgegriffen. Eine Ausnahme bildet Cy5, welches zu der Klasse der Cyanine gehört. Eine Auflistung der wichtigsten Eigenschaften ist in Tabelle 3.9 wiedergegeben.

Rhodamine lassen sich durch die Zugabe von Triplet-Quenchern stabilisieren. Daher wurde zu fast allen Proben für die Messung Mercaptoethylamin (MEA) zugegeben. Wie im Kapitel 2.1.2 beschrieben, ist eine Berechnung der Försterradien von Farbstoffen aus dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors möglich. Für die verwendeten Farbstoffkombinationen sind in Tabelle 3.10 die Radien zusammengefasst. Häufig

Name	$\lambda_{ex}$ /nm	$\epsilon$ /(cm M) <sup>-1</sup>	$\lambda_{em}$ /nm	$\Phi$	$\tau$ /ns	Quelle
eYFP	514	83400	527	0.61	Clontech	
eCFP	434	32500	476	0.4		
	452		505			
AlexaFluor 488	494	100000	517	0.6	4.1	Molecular Probes
AlexaFluor 546	556	112000	573	0.9	4.1	
Rh110	497	81000	520	0.91	0.3	Amersham Biosciences
Cy5	646	250000	664	0.28		
ATTO488	501	90000	523	0.8	3.2	Atto-Tec
ATTO565	563	120000	592	0.92	3.4	
ATTO590	594	120000	624	0.8	3.7	
ATTO647N	644	150000	669	0.65	3.4	
ATTO655	663	125000	700	0.3	1.9	

**Tabelle 3.9:** Farbstoffe und deren Eigenschaften

	Rh110	Atto565	Alexa568	Atto590	Atto647N	Atto655
Rh110	51	63.3	60.1	60.4	50.5	50.3
Atto488		62.9	60.5	61.0	52.9	52.1
Atto565				70.6	71.8	72.9
Atto590				61	74.0	74
Alexa568					70	
Atto655						60

**Tabelle 3.10:** Berechnete Försterradien für Farbstoffkombinationen in Å

wurde der Försterradius für Homo-FRET mit angegeben, um zu verdeutlichen, dass auch zwischen gleichen Farbstoffen ein guter FRET zu erwarten ist.

### 3.9 Koppeln von Farbstoffen an DNA und Protein

Viele Farbstoffe werden als reaktive Farbstoffe direkt vom Hersteller angeboten. An das fluorophore Gerüst eines Farbstoffkomplexes wird eine frei zugängliche funktionelle Gruppen gebunden. Diese Farbstoffe besitzen eine

reaktive Gruppe, um mit jeweils einer bestimmten Gruppe in Proteinen kovalente Bindungen eingehen zu können. Weit verbreitet sind zwei unterschiedliche Varianten, zum einen Farbstoffe mit NHS-Esther, zum anderen Farbstoffe mit Maleimiden als funktionelle Gruppe. Der Esther bindet bei einem pH-Wert um 8.5 gut an primäre Amine wie z.B. bei der Aminosäure Lysin. Farbstoffe mit einer Maleimid-Gruppe binden an Thiolgruppen wie z.B. bei der Aminosäure Cystein. In Proteinen gibt es häufig viel mehr Lysin als Cystein, so dass unterschiedliche Fragestellungen angegangen werden können. Weiterhin können zwei Cysteine zusammen eine Disulfidbrücke bilden. Diese sind in Proteinen häufig maßgeblich an der Strukturbildung beteiligt. Daher kam für das Anfärben von Proteinen vor allem die Kopplung mit Lysin in Frage, um störende Effekte in der Strukturbildung und somit in der Interaktion zwischen den Proteinen zu minimieren.

Beim Koppeln von DNA wurde anstelle einer normalen Base eine aminomodiifizierte Base eingebaut. Die Aminogruppe kann wiederum mit NHS-Esther gekoppelt werden.

### 3.9.1 Kopplungsvorschrift

Um die Kopplung zu ermöglichen, muss der natürliche Umgebungspuffer der Proben auf einen Säuregehalt zwischen pH 7.5 und pH 9 gebracht werden. Für DNA hat sich pH 8 – 8.5 als günstig erwiesen und wurde normalerweise zum Koppeln gewählt. DNA wurde entsprechend der folgenden Liste nach Heilemann [60] gekoppelt:

- 10 nmol Oligonukleotid  $10^{-4}$  molar
- 40  $\mu$ l PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma)
- 10  $\mu$ l Carbonat / Bicarbonat Puffer pH 9
- 10 .. 30 nmol reaktiver Farbstoff in DMF (Fluka)

Beim Koppeln von Proteinen erfolgte meist ein Ansatz von einem Mol Farbstoff zu einem Mol Protein. Der Phosphatpuffer wurde durch Dialysepuffer ersetzt. Teilweise wurde der pH-Wert etwas erniedrigt und gleichzeitig die Inkubationszeit verlängert. Unter ständigem Schwenken bei Raumtemperatur kann der reaktive Farbstoff mit den Amino-Gruppen reagieren.

### 3.9.2 Aufreinigung

Restlicher, freier Farbstoff wurde nach ein bis drei Stunden bei DNA-Proben durch ein- bis zweimalige HPLC-Aufreinigung von der markierten DNA getrennt. Verwendet wurde eine reversed-phase HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn) mit ODS-Säulen und einem linearen Gradienten von 0%–75% Acetonitril in 0.1M wässrigem Triethylammoniumacetat (TEAA).

Bei hydrophoben Farbstoffen erfolgte vorher zusätzlich eine Größenausschlusschromatografie über eine NAP-10 Säule von Amersham Biosciences. Die Säulen sind gefüllt mit Sephadex G-25 [115]. Proteine können durch die HPLC nicht aufgereinigt werden, so dass die Trennung von freien Farbstoffen nur durch Gelfiltration in Sephadex G-25 erfolgte.

Kontrolliert wurde das Anfärben mit einem Absorptionsspektrometer (Perkin-Elmer, Lambda 25), indem das Verhältnis von Farbstoff zu Protein bzw. DNA (DOL<sup>12</sup>) bestimmt wurde. Über die Absorption kann mit Hilfe der Absorptionskoeffizienten des Proteins (bzw. der DNA)  $\epsilon_{base}$  und dem Farbstoff  $\epsilon_{dye}$  der DOL

$$DOL = \frac{A_{dye}\epsilon_{base}}{A_{base} - cfA_{dye}\epsilon_{dye}} \quad (3.4)$$

bestimmt werden. Wenn nicht bekannt, kann die Absorption der Proteine (bzw. der DNA) durch eine Referenzmessung bestimmt werden. Dazu wurden Vergleichsmessungen vor und nach dem Färben angesetzt, und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung vor dem Färben erfolgte zusätzlich über einen Farbumschlag mit dem BioRad Test. Dieser Wert wurde als Referenz zur Stoffmengenbestimmung beim Färben eingesetzt.

## 3.10 Hybridisierung

Die Hybridisierung von Oligonukleotiden erfolgt mit Hilfe eines programmierbaren Thermocontrollers (PTC 100, MJ Research, USA). Bei der Hybridisierung werden Oligonukleotide auf eine Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur erhitzt und langsam abgekühlt. Dabei haben die Stränge Zeit, sich in ihrer energetisch günstigsten Form zu falten. Gerade der Bereich ihrer Schmelztemperatur sollte daher langsam überstrichen werden. Stärkere Temperaturänderungen ermöglichen das Entstehen instabiler Strukturen bzw. verhindern sogar die Hybridisierung vollständig.

Aus diesem Grund wurden die farbstoffmarkierten DNA-Stränge in gleicher

---

<sup>12</sup>degree of labelling

Konzentration zusammengegeben, kurzzeitig auf 95°C erhitzt und in einer Minute auf 65°C gekühlt. Innerhalb einer Stunde wurden die Proben schrittweise weiter auf Raumtemperatur gekühlt.

## 3.11 Präparation von Oberflächen

### 3.11.1 Passivierung

Unspezifische Bindung von Proteinen oder DNA an Oberflächen stellt in der Einzelmolekülspektroskopie eine Schwierigkeit dar. Bei Messungen in Lösungen kommt es aufgrund der sehr geringen Konzentrationen häufig zu Konzentrationverminderungen während einer Messung. Daher wird versucht, die Wechselwirkung weitgehend zu unterdrücken. Durch die Zugabe von BSA im Überschuss mit typischer Konzentration 0.3g/l wird durch Verdrängung die Oberfläche mit BSA belegt. Stören die BSA Moleküle in der Lösung kann alternativ die Oberfläche mit BSA belegt und mit Wasser abgespült werden. Dadurch findet nur wenig Wechselwirkung der Probe mit der Oberfläche statt, jedoch gelangt auch nur wenig BSA in die Lösung.

### 3.11.2 Immobilisierung durch unspezifische Wechselwirkung

Der Effekt der Glaswandadsorption kann zur Immobilisierung von Oberflächen genutzt werden. Dazu ist es notwendig, die Oberfläche zunächst von vorhandenen Verschmutzungen zu befreien. Dazu wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 1 Minute 0.5% HF
- 3x spülen mit Aqua Dest.
- Trocknen unter Druckluft
- 10 Minuten 1-2% Amino-Propyl-Silan (APS) in Methanol
- 3x spülen mit Aqua Dest.

Auftragen der Proben:

- 1 Tropfen  $10^{-9}$  bzw.  $10^{-11}$  molar für Einzelmolekülbelegung großflächig auftragen

- Einwirkzeit 10 Sekunden bis 10 Minuten, je nach Belegung
- 1x spülen mit Aqua Dest.

Bei dennoch zu dichter Belegung kann die Oberfläche auch mit BSA teilweise passiviert werden, indem zu der Probe BSA gegeben wird.

### 3.11.3 Immobilisierung in wässriger Umgebung

Um den Einfluss der Glaswand auf die Farbstoffe zu verringern, ist es notwendig, eine Immobilisierung der Moleküle mit einem gewissen Abstand zur Oberfläche zu bewerkstelligen. Dadurch wird die Umgebung des Fluorophores homogener und die Farbstoffe zeigen sehr ähnliche Fluoreszenzeigenschaften. In dieser Arbeit kam eine Immobilisierung auf Proteinbasis zum Einsatz, indem Proteine über die vergleichsweise starke Bindung zwischen Streptavidin und Biotin miteinander verankert wurden.

Dazu wurden Deckgläser mit acht Kammern (LabTek, Nunc, Karlsruhe) nach folgendem Schema vorbehandelt:

- 20 Sekunden 0.5% HF
- 3x spülen mit Aqua Dest.
- mehrere Stunden Inkubation mit einer Lösung aus 1 mg/ml biotiniliertem BSA und 5 mg/ml BSA (Sigam Aldrich, Paris) in PBS
- 3x spülen mit PBS
- 2 Minuten Inkubation mit 0.1 mg/ml rekombinanten Streptavidin (Roche, USA)
- 3x spülen mit PBS

Die Proben bestanden aus fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden, deren eines Ende mit einem Biotin modifiziert war. Zur Messung wurden die Oberflächen mit wenigen Mikrolitern einer  $10^{-9}$  molaren Lösung der Probe unter Beobachtung inkubiert. Nach wenigen Minuten, wenn die gewünschte Dichte auf der Oberfläche erreicht wurde, wurde wiederum dreimal mit PBS gewaschen, bis der Überstand frei von farbstoffmarkierten Oligonukleotiden ist. Durch diese Art der Immobilisierung sind die Fluorophore frei rotierend in der Lösung und die Oligonukleotide können ebenfalls ohne Behinderung genutzt werden. Dies konnte durch eine Hybridisierung auf der Oberfläche mit einem weiteren Farbstoff nachgewiesen werden. Dazu wurde eine etwa  $10^{-8}$  bis  $10^{-9}$  molare Lösung der Gegensequenz in die Kammer gegeben. Da die

Oberfläche komplett mit BSA belegt ist, kommt es zu keiner unspezifischen Wechselwirkung. Nur an dem vorgelegten Strang hybridisierte DNA bleibt nach mehrmaligem Spülen auf der Oberfläche.

## 3.12 Präparation der Proteinkomplexe und der Untereinheiten

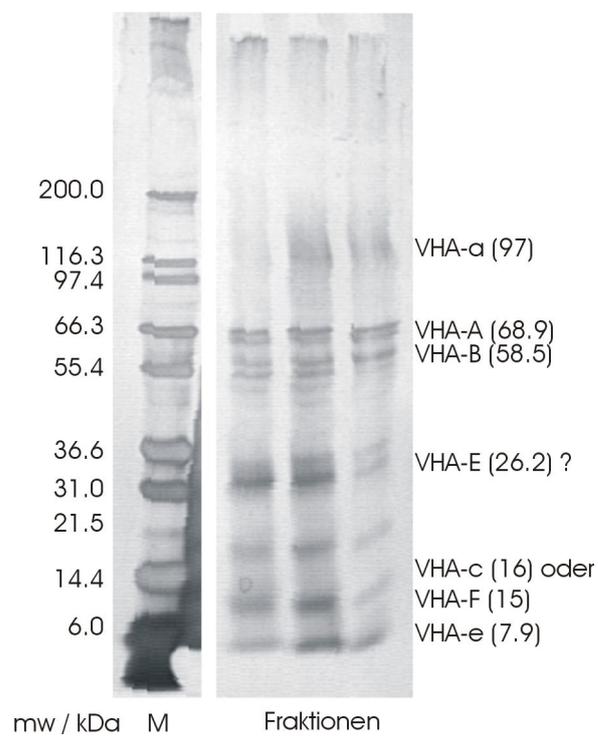
### 3.12.1 Gewinnung des Proteinkomplex aus *mesembryanthenum crystallinum*

Der Gesamtkomplex der Vakuolären  $H^+$ -ATPase (VHA) wird aus der Pflanze *mesembryanthenum crystallinum* gewonnen. Dazu werden die Pflanzen zunächst in einer Klimakammer aufgezogen und im Alter von etwa drei Monaten geerntet. Die Blätter der Pflanze werden nun mit dem Mörser zerkleinert und über einem Saccharosegradienten zentrifugiert[116]. Übrig bleiben Zellmembranen, in denen sich unter anderem der Gesamtkomplex befindet. Die Proteine werden aus der Membran durch das Detergenz Brij58 solubilisiert. Brij58 kann Mizellen mit einem hydrophoben Inneren ausbilden. In diesen Mizellen liegen nun die membranständigen Proteinuntereinheiten weiterhin als Komplex vor.

Mit Hilfe der Gelfiltration über Sephacrylsäulen (S-300 HR, Amersham Biosciences) werden die gelösten Proteine der Größe nach aufgetrennt und durch ihre Eigenfluoreszenz detektiert. Der Peak bei einem Molekulargewicht von etwa 600–800 *kDa* wird aufgefangen. Zur Kontrolle wurde mit Hilfe von denaturierender Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) die Größe der Untereinheiten im so gereinigten Komplex beobachtet. Die Gele wurden im Anschluss mit CoomassieBlue oder Silber gefärbt [82], um die Proteinbanden sichtbar zu machen (Abbildung 3.20)

Als Nachweis, dass es sich bei dem Proteinkomplex um die VHA handelt, erfolgte im Western-Blott ein Antikörpernachweis gegen Teilstücke bekannter Untereinheiten. Der Vorteil in dieser Methode gegenüber einfacher Gelauf-trennung liegt in der spezifischen Markierung bestimmter Proteine. Somit ist im Zusammenhang mit der vorherigen Massenbestimmung sichergestellt, dass der vollständige Proteinkomplex aufgefangen werden konnte. Die Herstellung und Reinigung der Proteinkomplexe erfolgte ausschließlich in der biologischen Fakultät in Anlehnung an das Protokoll von C.Kluge [82]

### 3.12. PRÄPARATION DER PROTEINKOMPLEXE UND DER UNTEREINHEITEN 103



**Abbildung 3.20:** SDS-PAGE der gereinigten VHA. Wesentliche Untereinheiten sind in der Lösung enthalten, einige konnten nicht aufgelöst werden.

### 3.12.2 Expression und Aufreinigung von VHA Untereinheiten aus *E.coli*

Alle einzeln hergestellten Proteinuntereinheiten wurden N-Terminal mit einem sechsfachen Histidinrest (*His-Tag*) versehen. Somit können diese über eine Affinitätschromatographie aus dem restlichen Lysat später entfernt werden. Um sicherzustellen, dass die erzeugten Proteine auch die gesamte Sequenz darstellen und zur besseren Reinigung, wurde bei einigen Untereinheiten zusätzlich ein Streptavidinrest (*Strep-Tag*) C-Terminal mit eingefügt. Die Expression und Reinigung erfolgten ausschließlich in der Biologischen Fakultät und beruhen auf den Arbeiten von C.Kluge [82].

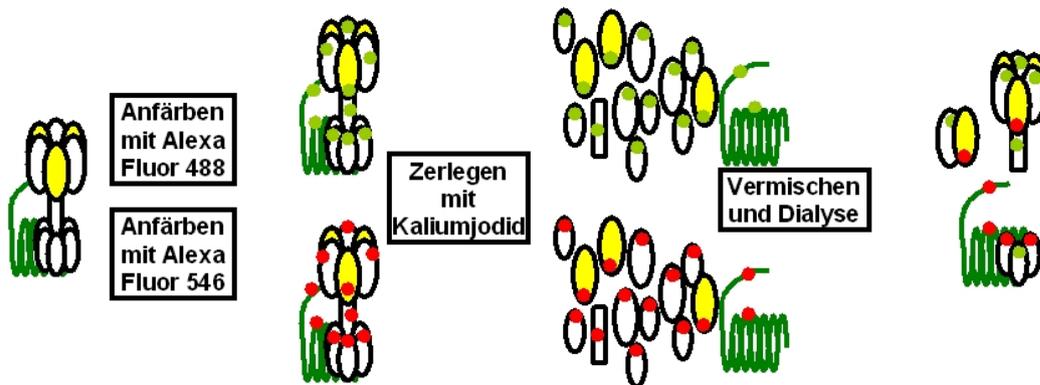
Zur Expression werden die cDNA-Sequenzen nach einer Amplifikation mittels PCR mit einem Vektor in *E.coli* kloniert. Die Analyse erfolgte durch Kolonien-PCR und Restriktionsverdau.

Für die Anzucht wurden 20 ml der erzeugten Kultur über Nacht bei 37°C in einem passenden Medium unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine weitere Inkubation in einem Liter Nährmedium, bis eine optische Dichte von 0.6 bei 590 nm erreicht wurde. Zugabe von 500 µM IPTG induzierte die Expression des rekombinanten Proteins, welches nach weiteren vier Stunden durch Zentrifugieren sedimentiert wurde. Bis zu Verwendung wurde dies bei -20°C gelagert.

Die tiefgefrorenen *E.coli*-Sedimente wurden nach schonendem Auftauen in nativem Lyse-Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) aufgenommen und mit 1 mg/ml Lysozym (Sigma, Deisenhofen) für 30 Minuten auf Eis inkubiert, wobei sie alle fünf Minuten für zehn Sekunden im Ultraschall homogenisiert wurden. Das Abtrennen der unlöslichen Zellbestandteile erfolgte in einer Zentrifuge mit 10 000 *g* bei 4°C. Der Überstand wird mit 10% Nickel-Nitrilotriacetat (Ni-NTA) versetzt und eine Stunde bei 4°C geschwenkt. Dabei bilden die in die Proteine eingebundenen Histidinreste eine Matrix mit Ni-NTA und können über einer Chromatographiesäule von Proteinen getrennt werden. Unspezifische Bindungen wurden durch zweimaliges Spülen mit dem Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) gelöst und von der Säule gespült. Mit dem Lysepuffer konnten nun die gebundenen Proteine von der Säule eluiert werden.

### 3.12.3 Vorbereiten des Gesamtkomplex für einen Reassemblierungsnachweis

Im Rahmen der Aufklärung der Topologie der V-ATPase bildet die eigenständige Assemblierung einzelner Untereinheiten bis hin zum Gesamtkomplex



**Abbildung 3.21:** Der Gesamtkomplex der ATPase wurde statistisch mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend chaotrop zerlegt. Nach dem Mischen erfolgte über Nacht ein Dialyseschritt, um die chaotropen Salze zu entfernen. Die neu gebildeten partiellen ATPasen sollen über FRET nachgewiesen werden.

*in vitro* einen wesentlichen Baustein. Neben dem Versuch, chimäre Proteinuntereinheiten mit CFP und YFP in den Komplex einzubinden, liegt ein Schwerpunkt auf Experimenten mit statistisch gefärbten Gesamtkomplexen. Im Rahmen dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass sich die VHA in Lösung dissoziieren und reassemblieren lässt. Als Grundlage dienen die Untersuchungen von Ward, der ein entsprechendes Verhalten der ATPase aus *avena sativa* in der Zellmembran beobachten konnte [117]. Gleichzeitig soll gezeigt werden, dass die Spektroskopie von einzelnen Molekülen ein geeignetes Mittel ist, auch große Komplexe aus vielen Bausteinen zu untersuchen. Weiterhin können diese Experimente als Vorexperimente betrachtet werden, mit deren Hilfe es gelingen soll, durch statistisches Markieren heterolog exprimierter Untereinheiten den Zusammenbau der ATPase *in vitro* zu charakterisieren. Die Idee des Experiments ist in Abbildung 3.21 skizziert. Zunächst sollen die intakten Gesamtkomplexe in zwei unterschiedlichen Proben mit jeweils einem chemischen Farbstoff markiert werden (vgl. Kapitel 3.9). Die Anzahl der gebundenen Farbstoffe pro ATPase ist dabei nicht so sehr entscheidend, jedoch sollte jede ATPase mindestens einen Farbstoff tragen. Da beim Anfärben von Proteinkomplexen zunächst nur die außen liegenden Bereiche zugänglich sind, wurde erwartet, dass die Funktion der ATPase weniger eingeschränkt wird, als wenn einzelne Untereinheiten markiert werden. Im Anschluss an das Anfärben erfolgte die chaotrope Zerlegung mit Kaliumiodid und das Mischen der beiden Proben. Über Nacht wurden die Proben wieder durch Dialyse in eine für die ATPase natürlichere Umgebung gebracht. Die Schritte sind in der folgenden Aufzählung zusammen gefasst:

1. VHA-gesamt mit Donor- und VHA-gesamt Akzeptorfarbstoff färben

2. NAP-10 Säule zum Auffangen von freiem Farbstoff
3. Absorptionsspektrum beider Proben und Bestimmung des DOL
4. Zusatz von 500 mM Kaliumjodid, 5 mM ATP, 5 mM MgSO<sub>4</sub>
5. Mischen der beiden Ansätze im Verhältnis der Farbstoffkonzentration und bei 4°C (20°C) unter Schwenken Desassemblieren lassen
6. Dialyse über Nacht in ATPase-Puffer. Aufgrund der geringen Mengen wurde der Dialyseschlauch (Visking, Roth, cutoff 14000 g/mol) über 1.5ml Reaktionsgefäße gespannt
7. Standardspektroskopie (eventuell FRET im Ensemble)

Als ATPase-Puffer kamen zwei unterschiedliche Puffer zum Einsatz. Die ersten Experimente erfolgten mit

20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH8  
50 mM NaCl  
0.002% Brij58 ,

während spätere Experimente mit dem Puffer

20 mM KHCO<sub>3</sub>, pH8  
50 mM KCl  
0.002% Brij58

durchgeführt wurden. Kaliumsalze stellen für die VHA eine natürlichere Umgebung als Natriumsalze. Bei den Experimenten mit exprimierten Untereinheiten wurden diese ebenfalls mit einem Farbstoff markiert und erst nach der Einwirkung von Kaliumjodid zur Dialyse zugegeben.

Das Verfahren beruht auf dem Prinzip des resonanten Energietransfers [2.1.2](#) mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen.

# Kapitel 4

## Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 TrALEx

#### 4.1.1 Bestimmung der $\gamma$ -Faktoren mit Oligoprolinen

Die Bestimmung der  $\gamma$ -Faktoren für das verwendete Setup ist ein notwendiger Schritt, um aus den berechneten  $E_{\text{prox}}$ -Werten zu den FRET-Effizienzen zu gelangen. Im Rahmen dieser Arbeit stand ein System aus doppelt markierten Oligoprolinen mit unterschiedlichen Längen zur Verfügung. Oligoproline gelten als starre Abstandshalter und sind deshalb schon früh als spektroskopisches Lineal bezeichnet worden [35, 118]. Neuere Ergebnisse stellen jedoch dies für längere Oligoprolinketten in Frage, da diese eher dem Wormlike-Chain-Modell entsprechen, als dem Rod-Like-Spacer [39]. Die Persistenzlänge wurde dabei mit Einzelmolekülspektroskopie als wesentlich kürzer bestimmt, als bisher im Ensemble angenommen. Die Oligoproline wurden mit den beiden Farbstoffen ATTO488 und ATTO647N endständig markiert.

Der Aufbau entspricht dem TrALEx-Aufbau, jedoch mit einem alternativen Strahlteiler. Der Anteil der Fluoreszenz auf dem blauen und dem roten Kanal wird dadurch nicht wesentlich beeinflusst, jedoch ist dieser Strahlteiler besser für die Anregung bei 488 nm geeignet. Die  $\gamma$ -Faktoren wurden für zwei unterschiedliche Filtersätze bestimmt. In Setup I kommen die Filter zum Tragen, die auch bei TrALEx zum Einsatz kommen, während im zweiten Setup die Detektion im grünen Kanal für dieses Zweifarben-Experiment optimiert wurde.

Excitation	488 nm	350 $\mu\text{W}$	30 $\mu\text{s}$	
	647 nm	250 $\mu\text{W}$	30 $\mu\text{s}$	Ex.: 542LP, 50 mm
	Dualband 488 / 630			

Mikroskop Olympus IX 70  
Backport

Objektiv Nikon PlanApo, 60, NA 1.4

Setup I 500LP  
560 LP Strahlteiler  
D1 („blau“): 531/30 Semrock  
D2 („rot“): 542LP + 700/75

Setup II 500LP  
560 LP Strahlteiler  
D1 („blau“): 545 / 75  
D2 („rot“): 542LP + 700/75

DAQ Becker&Hickl SPCM-830 Routing Flag bei Auswertung  
(8  $\mu$ s delay,  $60 * 0.9999887 \pm 3 \cdot 10^{-8} \mu$ s Zyklendauer)

Die Oligoprolin lagen in drei unterschiedlichen Längen vor, mit sechs, zehn und vierzehn Einheiten. Die Länge eines Prolins wurde zu 0.25 nm berechnet, so dass die Farbstoffe ATTO488 und ATTO647N einen Abstand von 1.5, 2.5 und 3.5 nm haben [39]. Dadurch, dass die beide Farbstoffe an einem Oligoprolin hängen, liegt der Stöchiometriefaktor  $S$  bei 0.5 bei gleicher Anregungsleistung, oder im Fall einfach markierter Oligoprolin bei null bzw. eins. Letzteres kann aber auch bedeuten, dass der Akzeptor frühzeitig zerstört wurde und daher nicht mehr fluoreszieren kann.

### Setup I

Auf der linken Seite der Abbildung 4.1 sind die  $S$ - $E_{\text{prox}}$  Histogramme aus den ALEX Spuren mit der Häufigkeitsverteilung der  $E_{\text{prox}}$  und  $S$  Werte dargestellt. Der stöchiometrische Index streut bei allen Diagrammen um 0.37, was auf einen  $\gamma$ -Faktor nahe eins hindeutet. Dies bestätigt sich durch eine lineare Regression der drei Schwerpunkte im  $S$ - $E_{\text{prox}}$  Diagramm in Abbildung 4.2. Über die Steigung  $\Sigma = 0.0250$  und den Achsenabschnitt  $\Omega = 2.5094$  errechnen sich die beiden Faktoren  $\gamma = 0.98$  und  $\delta = 1.53$ .

Daraus resultieren die in Abbildung 4.1 auf der rechten Seite gezeigten korrigierten Verteilungen der Effizienz, die kaum eine Abweichung gegenüber den unkorrigierten  $E_{\text{prox}}$ -Werten aufzeigen. Das Maximum der Verteilung liegt bei 0.96 (0.88, 0.7) für Oligoprolin 6 (10, 14). Die Genauigkeit der Ausgleichsgeraden ist beschränkt durch die nahe beieinander liegenden FRET-Werte.

Der aus den Fluoreszenzdaten bestimmte  $R_0$  für das Farbstoffpaar an Oligoprolin ist 4.94 nm, woraus sich mit den verwendeten Oligoprolinen theoretisch erwartete FRET-effizienzen von 99.9%, 98.3% bzw. 88.8% ergeben. Ebenso wie Schuler [39] konnte eine Verteilung der FRET-Effizienz mit einer einhergehenden Verschiebung zu kleineren FRET-Werten beobachtet werden. Erklärt wird dies durch eine Veränderung des Orientierungsfaktor  $\kappa^2$ , da die Dipole bei diesen Abständen nicht mehr als frei rotierend angenommen werden können.

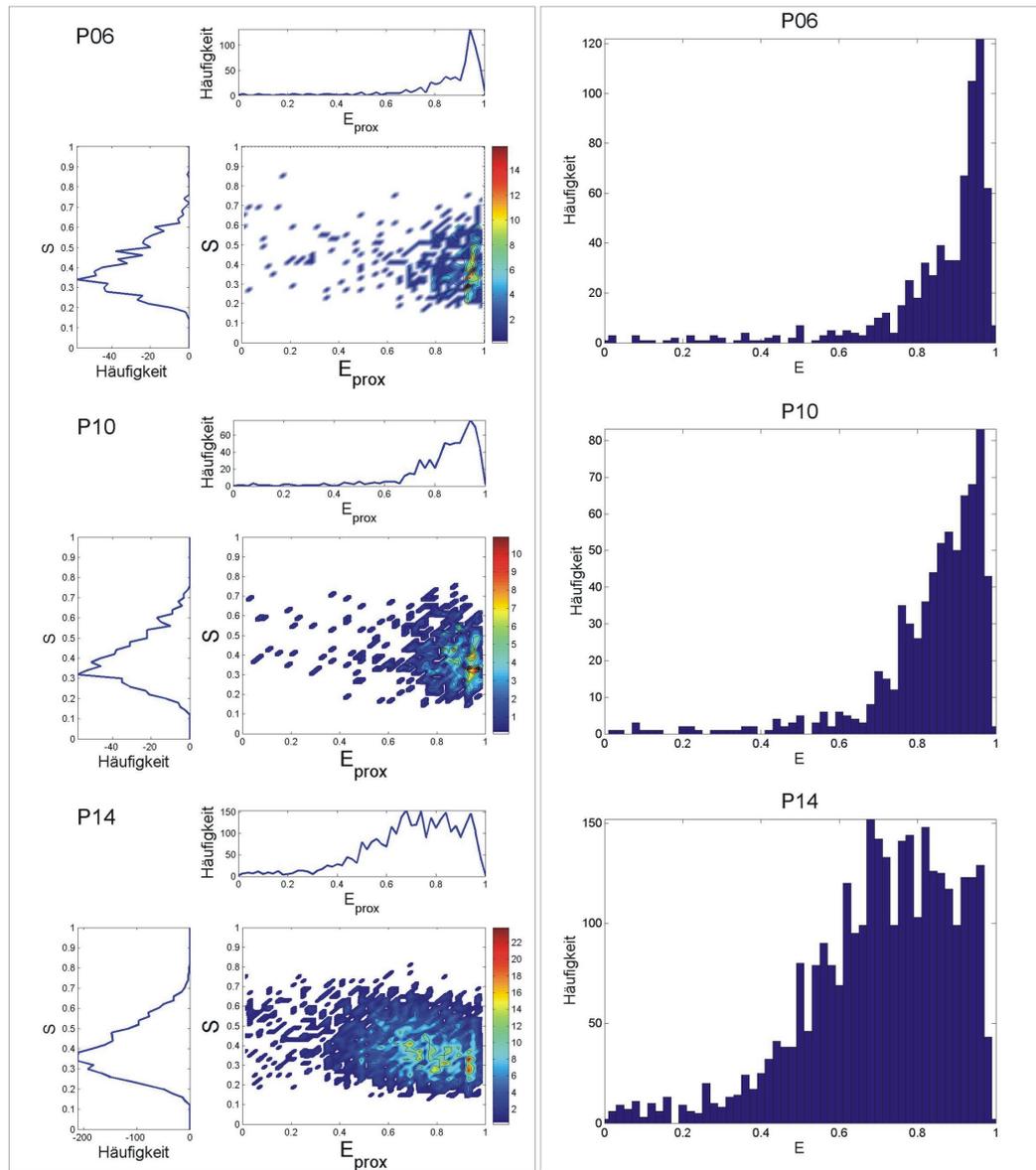
## Setup II

Im Vergleich der Daten mit dem auf zwei Farben optimierten System, fällt in den  $S-E_{\text{prox}}$  Histogrammen in Abbildung 4.4 auf, dass die Verteilung der  $E_{\text{prox}}$ -Werte auf der linken Seite zu kleineren Werten verschoben ist. Dies hängt mit der besseren Detektion der Fluoreszenz von ATTO488 zusammen. Der Filter vor der ersten APD sammelt mehr Fluoreszenzlicht dieses Farbstoffs. In Abbildung 4.3 sind die drei Schwerpunkte der Verteilungen mit einer linearen Regression angepasst. Der resultierende  $\gamma$ -Faktor nimmt mit 0.44 wesentlich mehr Einfluss auf die Verteilungen als der  $\gamma$ -Faktor aus dem vorherigen Setup.  $\delta$  hingegen liegt mit 1.70 in vergleichbarer Größe wie zuvor. Dies ist sinnvoll, da das Verhältnis der Anregungsleistung zwischen den Messungen konstant gehalten wurde. Durch die Korrektur mit dem  $\gamma$ - und  $\delta$ -Faktor können die beiden Verteilungen in eine gute Übereinstimmung mit den am Setup I erzielten Daten gebracht werden (rechte Seite der Abbildungen 4.1 und 4.4). Ein Vergleich der Maxima der FRET-Verteilungen liefert eine gute Übereinstimmung mit denen aus Setup I gemachten Werten:

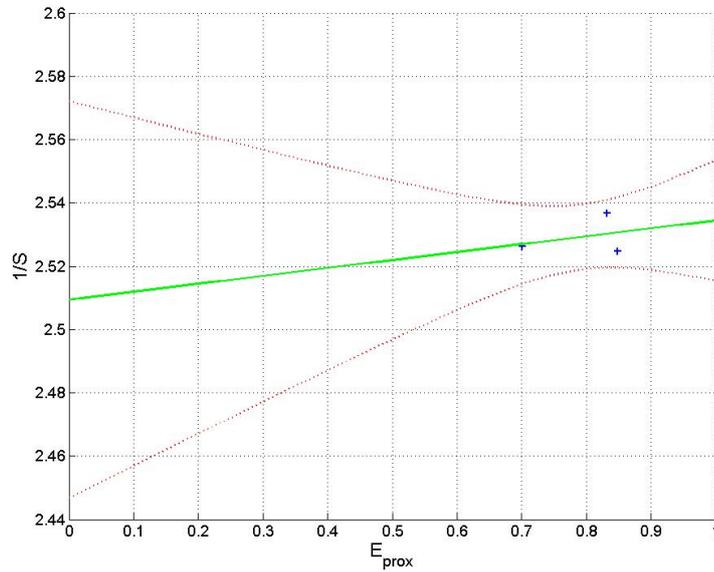
Oligoprolin	FRET-Effizienz	
	Setup I	SetupII
P06	0.96	0.96
P10	0.88	0.87
P14	0.7	0.8

Allein die Werte für Oligoprolin 14 weichen maßgeblich voneinander ab. Bei der Betrachtung der Verteilungen wird festgestellt, dass im ersten Setup die Verteilung breiter ist als beim zweiten. Diese Verbreiterung ist aufgrund einer höheren Konzentration in den Messungen zurückzuführen. Dadurch gelangt mehr Störsignal auf die APD, was wiederum zu einer Verbreiterung der  $E_{\text{prox}}$ -Verteilung führt.

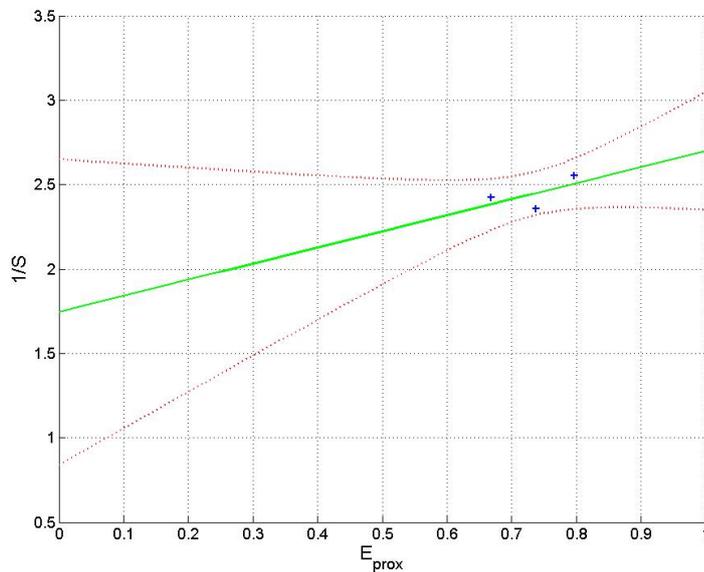
Hier muss darauf hingewiesen werden, dass für eine exakte Bestimmung der beiden Faktoren zwei Proben mit stark unterschiedlichen FRET-Effizienzen



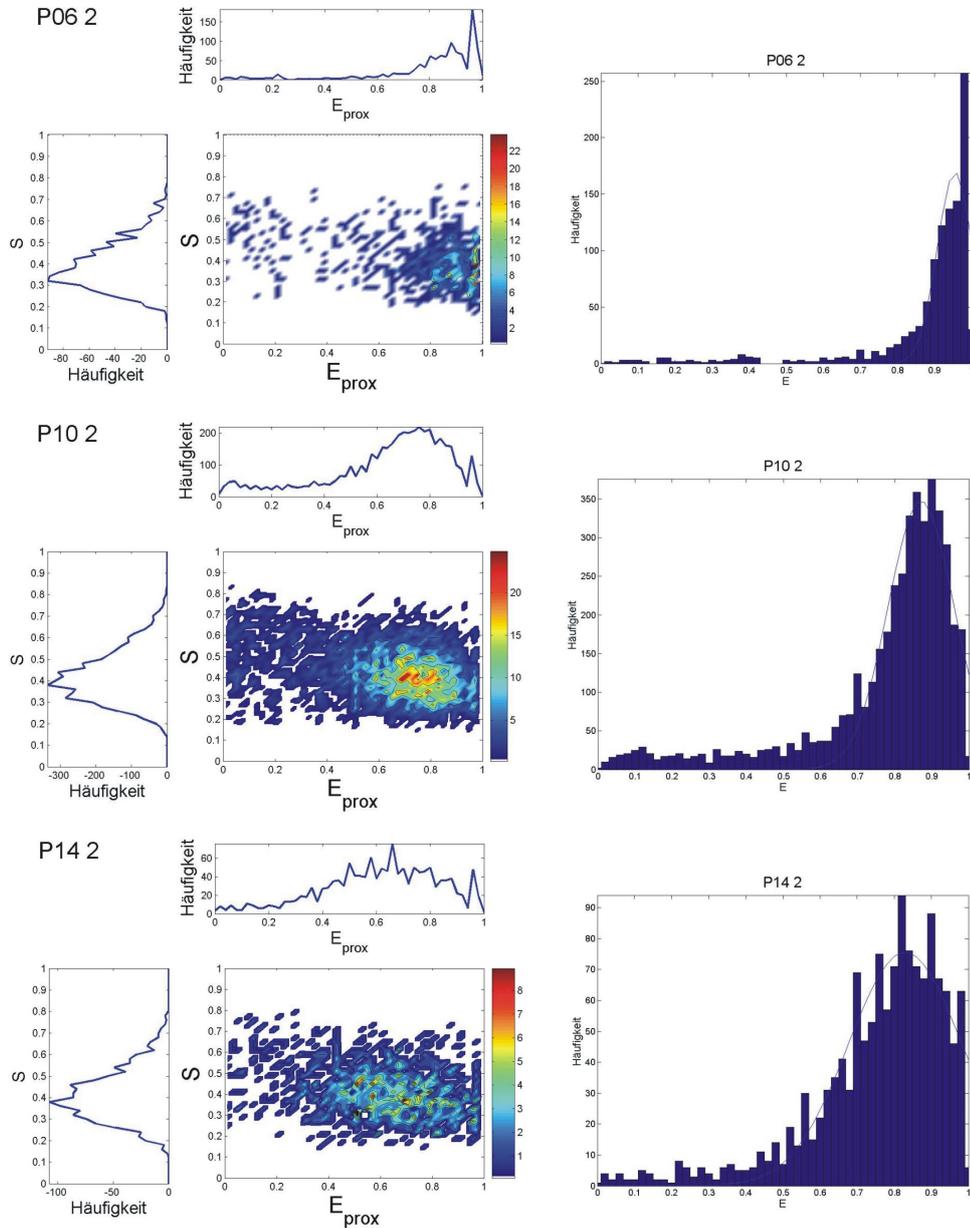
**Abbildung 4.1:** Setup I: S gegen  $E_{\text{prox}}$  in zweidimensionalen Histogrammen (links) und korrigierten E Histogrammen (rechts) von Oligoprotilinen aus 6, 10 und 14 Protilinen.



**Abbildung 4.2:**  $1/S$  gegen  $E_{\text{prox}}$  mit Daten aus Setup I. Der Fit liefert  $\Omega = 2.5094$  und  $\Sigma = 0.0250$  ( $\gamma = 0.98$  und  $\delta = 1.53$ ). In grün dargestellt ist das Valenzband mit einfacher Abweichung. Die nah beieinander liegenden  $E_{\text{prox}}$ -Werte führen zu großen Toleranzbereichen.



**Abbildung 4.3:**  $1/S$  gegen  $E_{\text{prox}}$  mit Daten aus Setup II. Die linearere Näherung der Schwerpunkte aus den E-S Verteilungen ergibt  $\gamma = 0.44$  und  $\delta = 1.70$ . Die Abweichungen sind ausgeprägter als bei Setup I.



**Abbildung 4.4:** Setup II: S gegen  $E_{\text{prox}}$  2D-Histogrammen (links) und korrigierte E Histogramme (rechts) von Oligoprolineinen aus 6, 10 und 14 Prolinen mit ATTO488 und ATTO647N markiert. Gegenüber Setup I sind die  $E_{\text{prox}}$ -Werte sind aufgrund der besseren Detektion des Donorkanal zu kleineren Werten verschoben. Nach der Umrechnung in korrigierte Effizienz stimmen die Verteilungen wieder überein.

geeignet sind. Durch die geringe Differenz der Abstände der hier verwendeten Oligoproline ist der Fit in den Darstellungen 4.2 und 4.3 nur sehr ungenau. Vor allem beim zweiten Setup sind die Abweichungen vom Fit sehr groß. Die Valenzbänder im linearen Fit ergeben folgende Fehler für die Faktoren:

	Setup I	Setup II
$\gamma$	$0.98 \pm 0.057$	$0.44 \pm 0.73$
$\delta$	$1.53 \pm 0.09$	$1.70 \pm 2.60$

Für weitere akkurate FRET Messungen mit ALEX bzw. TrALEX ist es daher notwendig, verlässliche Kalibrierungsproben bereit zu stellen. Gut geeignet ist eine Probe ohne FRET, die ein natürliches Maß für  $\Sigma$  darstellt, und einer Probe mit erwarteten 80% Energietransfer. Viele Proben mit einem größeren Abstand zwischen den Enden sind recht beweglich und führen daher zu breiten Verteilungen. Eine Alternative zu Oligoprolin sind doppelsträngige Oligonukleotide. Die Einzelstränge können mit je einem Farbstoff versehen werden, so dass nach dem Hybridisieren beide Farbstoffe ebenfalls im Verhältnis 1:1 vorliegen.

#### 4.1.2 Prinzip TrALEX am photonischen Draht

Der photonische Draht (vgl. Abschnitt 3.3) ist ein gutes Beispiel für einen unidirektionalen Energietransfer über mehrere Farbstoffe. Ihm entspricht der Fall I aus Abbildung 2.12. Heilemann hat im Rahmen seiner Dissertation zeigen können, dass die Energie hingegen nicht nur zwischen den nächsten Nachbarn transferiert wird, sondern auch über einen Farbstoff hinweg. Mit TrALEX kann dieser Anteil direkt beobachtet werden.

Als Probe ist „wire0409“ eingesetzt worden, bei der im Ensemble eine Transfereffizienz über alle Schritte von 0.37 beobachtet wurde (vgl. [60]). Der Draht besteht aus einem 60 Basen langen Einzelstrang mit RhG am 5' Ende und einem Biotinanker am 3' Ende (*ss60*). Dazu wurden zwei Gegenstränge mit je 20 Basen hybridisiert (vgl. Abschnitt 3.12). Am ersten Gegenstrang hängen die beiden Farbstoffe TMR und ATTO590 an den Positionen 10 bzw. 20 (*anti1*), der zweite Gegenstrang besitzt an Position 10 den Farbstoff ATTO647N (*anti2*). Rechnerisch ergibt sich bei einem vollständigen Draht eine Transfereffizienz von mehr als 95% unter der Annahme frei rotierender Dipole. Das Setup wurde so optimiert, dass die Anregungsdauer im TrALEX-Modus der einzelnen Laser eingestellt werden konnte, um vergleichbare Signale auf allen Kanälen zu erhalten.

Anregung	476 nm	870 $\mu$ W	50 $\mu$ s
	568 nm	360 $\mu$ W	25 $\mu$ s

647 nm 360  $\mu$ W 25  $\mu$ s  
 542LP, 50 mm  
 Tripleband FITC

Mikroskop Sideport vom Olympus IX 70

Objektiv Nikon PlanApo, 60, NA 1.4

Emission D1 („blau“): Dichroit 560LP + 531/30 Semrock  
 D2 („grün“): Dichroit 650LP + 605/55  
 D3 („rot“): 692/40 Semrock  
 Paralleler Strahlengang

DAQ Becker&Hickl SPCM-830 Routing Flag durch zwei SI-clock  
 (8  $\mu$ s delay; t+40  $\mu$ s..t+60  $\mu$ s, t+20  $\mu$ s..t+60  $\mu$ s)

Die hohe Leistung von 870  $\mu$ W bei 476 nm hängt damit zusammen, dass der Absorptionsquerschnitt von RhG bei 476 nm nur noch 42% des Maximums entspricht. Weiterhin ist durch TrALEX der Laser in diesem Fall nur 50% der Zeit an. Somit entspricht dies einer vertretbaren Anregung mit einer Leistung von 165  $\mu$ W. Alle Filter und Bauteile sind in Kapitel 3.1.5 beschrieben. Das Übersprechen der Fluorophore auf die Detektionskanäle wurde mit höheren Konzentrationen (in der Regel zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  M) der Einzelstränge bestimmt, ebenso das Ausmaß der Direktanregung.

Kanäle	ct.	direx
	$\alpha$	$\beta$
1 $\rightarrow$ 2	8.1	14.46
1 $\rightarrow$ 3	1.04	0.9
2 $\rightarrow$ 3	30.6	8.0

Das hohe Übersprechen von **2** in Detektor 3 hängt genauso wie die starke direkte Anregung von **2** durch 476 nm mit der Kombination von TMR und ATTO590 zusammen. Da die beiden Farbstoffe TMR und ATTO590 an einem Strang hängen und nur einen Abstand von 10 Basenpaaren haben, ist der Energietransfer extrem hoch. Weiterhin ist gewährleistet, dass immer beide Farbstoffe vorhanden sind. Somit können sie quasi als ein Farbstoff (**2**) angesehen werden. Der Energietransfer beträgt bei dem Abstand etwa 98%. In der Regel ist daher die Fluoreszenz vom TMR vollständig gelöscht. Die Fluoreszenz von ATTO590 gelangt auf den zweiten, zum Teil aber auch auf den dritten Detektor. Daraus bedingen sich zwei Besonderheiten: Zum einen lässt sich TMR im Vergleich zu RhG noch relativ gut mit 476 nm

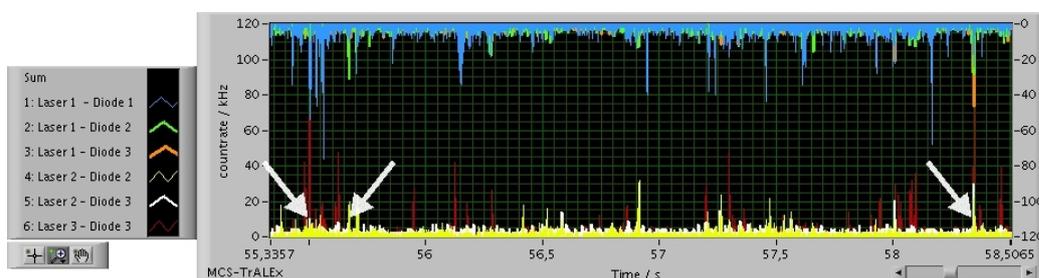


Abbildung 4.5: Einzelmolekülspur photonischer Drähte in Lösung mit TrALEX

anregen, und ein relativ hoher Anteil der Fluoreszenz von ATTO590 überstrahlt in den Detektionsbereich oberhalb von 650 nm. Zum anderen kann es vorkommen, dass einer der beiden Farbstoffe z.B. durch photoinduzierte Zerstörung keine Energie mehr aufnehmen kann. Durch die hohe Depopulation von TMR via FRET wird dies am Strang *anti1* häufiger mit ATTO590 passieren. Die Fluoreszenz von TMR wird nur im zweiten Detektionskanal nachgewiesen, während ATTO590 auch im dritten Kanal detektiert wird. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei der Auswertung der Daten, da das Übersprechen von 30% zu vielen negativen Intensitäten führt, d.h. beim Fehlen des *anti1* oder der Zerstörung einer der beiden Farbstoffe wirkt sich der Korrekturfaktor des Übersprechens dennoch auf die Verteilungen aus.

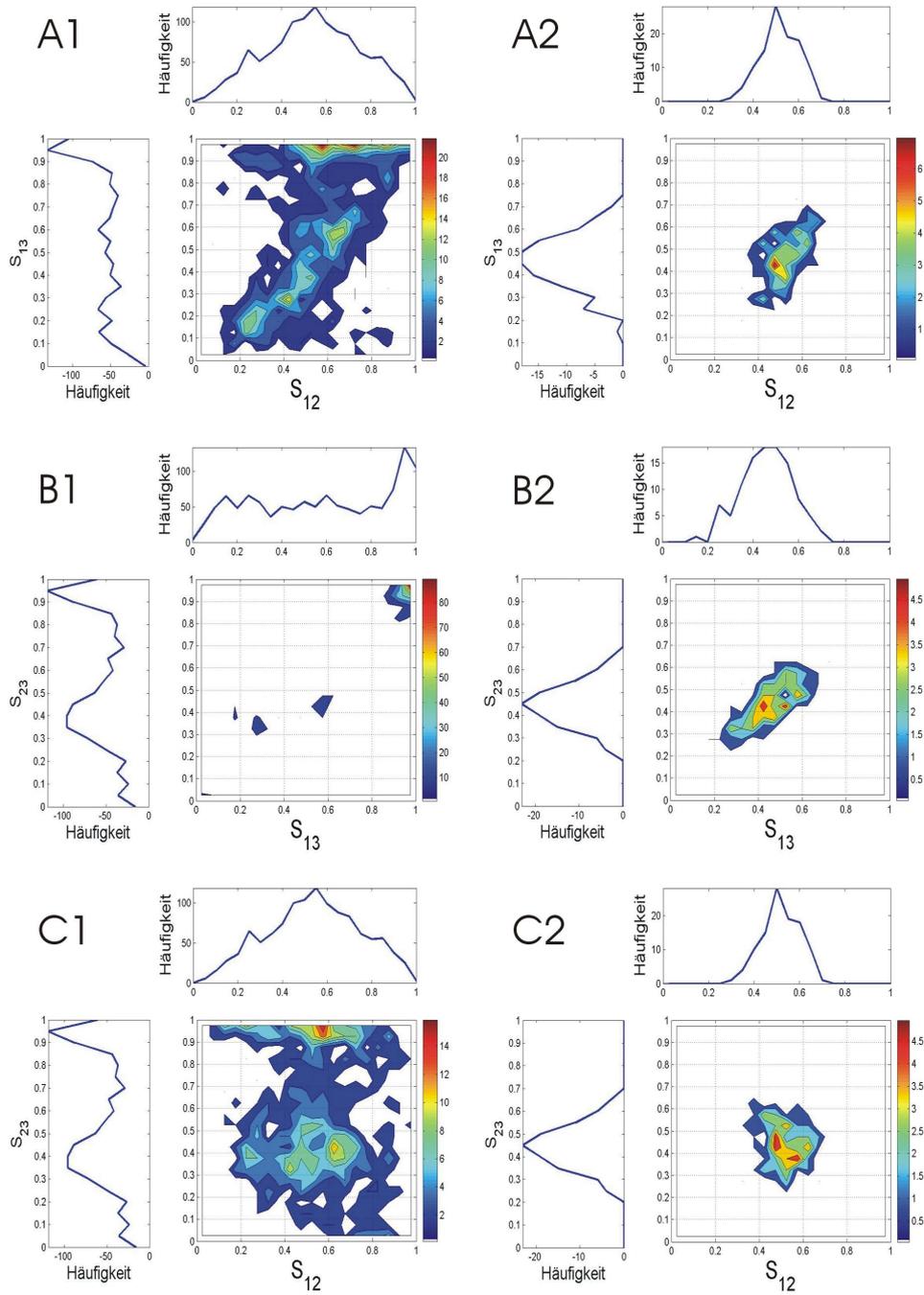
### Photonische Drähte in Lösung mit TrALEX

Eine Stärke von TrALEX liegt in der Möglichkeit, sich aus heterogenen Verteilungen von unterschiedlichen FRET-Werten und Proben mit unterschiedlicher Zusammensetzung gezielt Subpopulationen heraus zu suchen. In Abbildung 4.5 ist eine Einzelmolekülspur photonischer Drähte mit TrALEX aufgenommen dargestellt. Die mit einer Anregungswellenlänge erreichbaren Informationen sind in den ersten drei Kanälen von oben nach unten dargestellt. Blau ist die Intensität des ersten Detektors bei 476 nm Anregung, grün des zweiten und orange die des dritten. Die zusätzlichen Informationen durch die alternierende Anregung ist in den drei Farben von unten nach oben kodiert. Gelb (bzw. weiß) stellt die Detektion im zweiten (bzw. dritten) Detektor bei der Anregung mit 568 nm dar. In rot wird schließlich die detektierte Fluoreszenz bei 647 nm Anregung im roten Detektor wiedergegeben. Viele Ereignisse stammen von ungebundenen DNA Strängen. Nur wenige Ereignisse weisen auf hybridisierte DNA mit mehreren Farbstoffen hin. Bei etwa 55.5s haben sich *ss60* und *anti2* gefunden, zeigen jedoch keinen FRET. Bei 55.53s scheinen die beiden Stränge *ss60* und *anti1* gebunden zu haben und zeigen FRET.

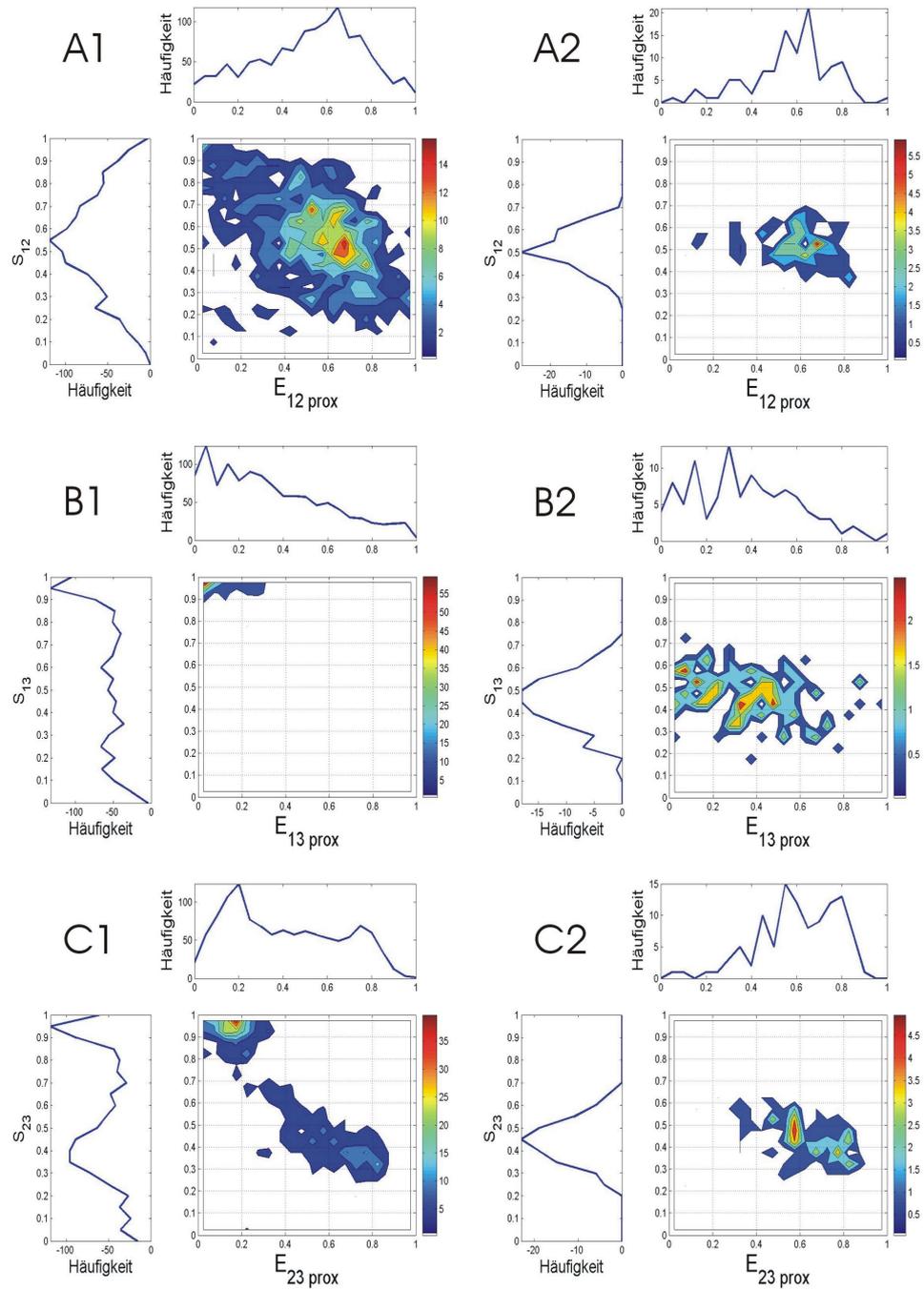
Schließlich ist bei 58.4 s ein Ereignis mit allen drei Farbstoffen und einem relativ hohem FRET zu erkennen.

In den Abbildungen 4.6 und 4.7 auf den Seiten 118 und 117 sind die TrALEx Daten des photonischen Drahts in zweidimensionalen Histogrammen aller Kombinationen der stöchiometrischen Indizes  $S$  bzw. der Kombinationen  $E_{\text{prox}}$  gegen  $S$  aufgetragen. Jeweils auf der linken Seite sind diese ohne Schwellwerte für die einzelnen Kanäle ( $b=0, g=0, r=0$ ) und zum Vergleich auf der rechten mit allen drei Schwellwerten ( $b=30, g=30, r=30$ ) dargestellt. Die Schwellwerte sind jeweils in kHz angegeben. Anhand der stöchiometrischen Verteilungen in Abbildung 4.6 erkennt man gut, dass sehr häufig *ss60* zusammen mit *anti1* vorliegt. In (C1) befindet sich ein Schwerpunkt bei  $S_{13} = S_{23} = 1$ , in (A1) und (B1) kann dieser Schwerpunkt jeweils bei (0.5, 1) wiedergefunden werden. D.h. es gibt viele Ereignisse, in denen der ATTO647N und somit ein Strang fehlt. Es gibt weiterhin wenig Ereignisse, in denen nur ein Farbstoff vorhanden ist, häufig sind zumindest in zwei Kanälen die Bursts vertreten. Im Vergleich zu den selben, durch Schwellwerte gefilterten Daten fällt auf, dass etwa 45% aller betrachteten Ereignisse die Kriterien der Schwellwerte erfüllen. Auffallend ist auch, dass nur  $S_{12}$  zu  $S_{23}$  gleichmäßig um (0.5, 0.5) verteilt ist (B2). Die Werte  $S_{12}$  und  $S_{13}$  bzw.  $S_{13}$  und  $S_{23}$  sind scheinbar voneinander abhängig. Die Position deutet beide Male auf ein Fehlen des Donors und des Transmitterpaares aus TMR und ATTO590 hin, so dass diese Kanäle mit einem höheren Schwellwert zu belegen wären. Das Verhältnis von Signal zum Hintergrund bei allen Kanälen ist maximal 60:1 bei einer Signalstärke von 60 kHz, so dass keine höheren Schwellwerte gerechtfertigt sind. Dennoch kann festgehalten werden, dass zumindest ein Teil der Ereignisse aufgrund der stöchiometrischen Daten alleine bereits alle Farbstoffe und somit alle drei Stränge enthalten. Interessant ist daher die Verteilung der FRET-Werte in Bezug auf den stöchiometrischen Index in allen Kanälen. Diese sind in Abbildung 4.7 zunächst durch die Annäherung der FRET-Werte durch  $E_{\text{prox}}$  dargestellt. In der linken Spalte sind wiederum die Schwellwerte auf null gesetzt, während in der rechten Spalte alle drei Schwellwerte auf 30 kHz gesetzt wurden. Auffallend ist, dass alle drei Verteilungen durch das Setzen der Schwellwerte schmaler werden. Dies ist gleichbedeutend damit, dass die Schwellwerte Ereignisse einer gemeinsamen Populationen selektiert. Die  $E_{\text{prox}}$ -Werte fallen jeweils für die beiden benachbarten Farbstoffe viel zu klein aus. Nach den Ergebnissen von Heilemann [60] wird erwartet, dass sich eine Subpopulation mit einer Energietransfereffizienz nahe 90% über alle Farbstoffe ausbildet. Da jedoch sowohl in  $E_{\text{prox } 12}$  als auch in  $E_{\text{prox } 23}$  das Maximum der Population zwischen 0.6 und 0.8 liegt, sind keine hohen Transferraten über alle drei Stränge in dieser Messung zu beobachten.

Die  $E_{\text{prox}}$ -Verteilung über alle Farbstoffe ist in Abbildung 4.8 wiedergege-



**Abbildung 4.6:** Stöchiometrischer Index in 2D-Histogrammen ohne (links) und mit kanalabhängigen Schwellwerten (rechts) berechnet aus TRALEX-Daten des photonischen Drahts.



**Abbildung 4.7:**  $E_{\text{prox}}$  gegen  $S$  in 2D-Histogrammen ohne (links) und mit kanal-abhängigen Schwellwerten (rechts) berechnet aus TrALEx-Daten des photonischen Drahts.

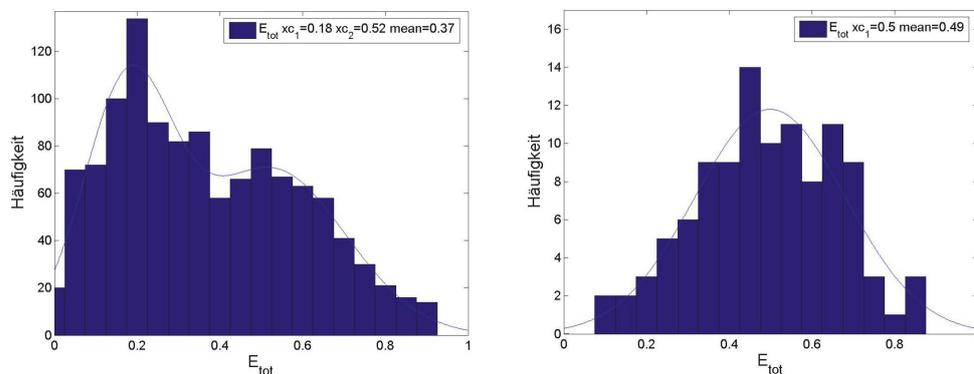
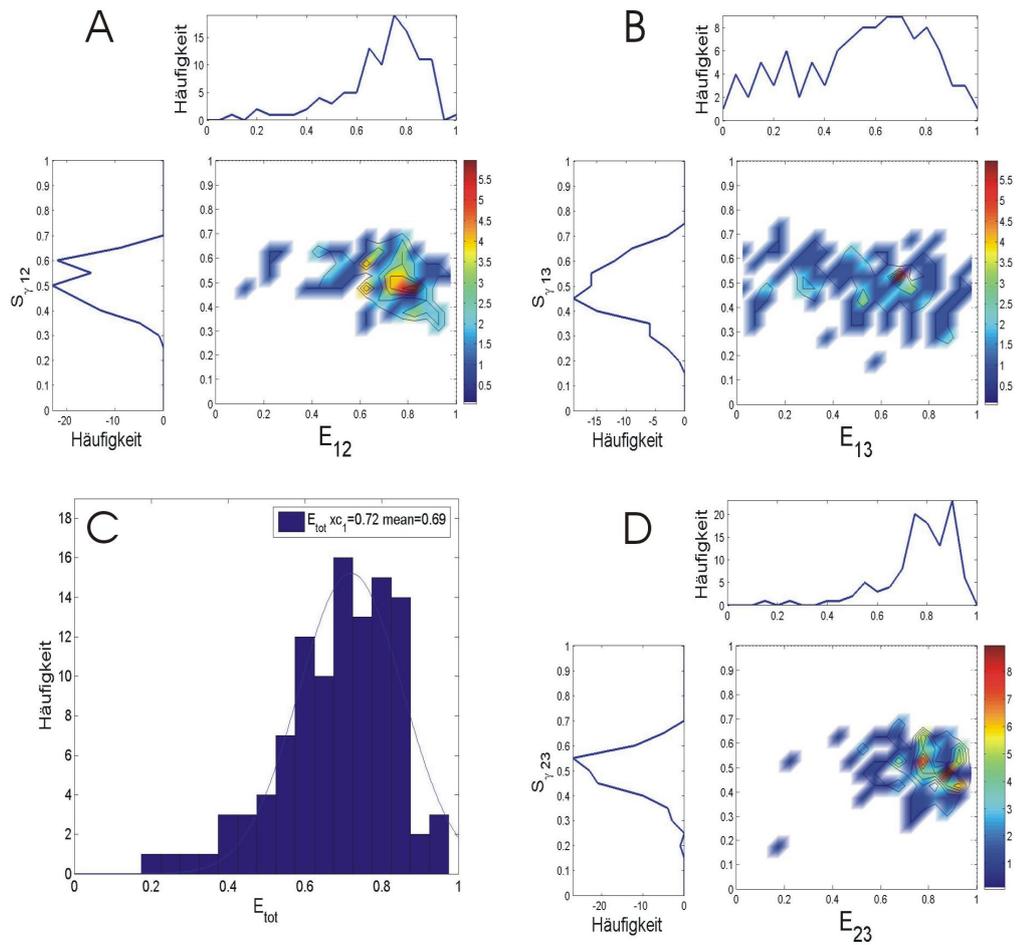


Abbildung 4.8: Totaler Energieübertrag  $E_{tot}$  von **1** auf **3** des photonischen Drahts

ben. Gut zu erkennen ist, wie sich durch die Schwellwerte für die einzelnen Kanäle die Verteilung auf einen  $E_{prox}$ -Wert konzentriert: Während ohne die zusätzlichen Schwellwerte zwei Maxima mit unterschiedlicher Energietransfereffizienz resultieren (links), schält sich in dem rechten Histogramm eine Verteilung mit dem Schwerpunkt bei  $E_{prox} = 0.5$  heraus. Der Mittelwert der Verteilung (Abbildung 4.8, linke Seite) mit allen Ereignissen entspricht dem im Ensemble bestimmten Energietransfer von 37% über alle vier Stationen.

Anhand der Neigung der Verteilungen ist zu erkennen, dass die Populationen nicht voneinander unabhängig sind. Daher müssen die Verteilungen mit entsprechenden  $\gamma$ -Faktoren korrigiert werden. Da die Farbstoffe nicht an einem festen System hängen, sind jeweils zwei neue Proben mit den entsprechenden Farbstoffkombinationen notwendig. Der  $\gamma$ -Faktor zwischen *ss60* und *anti1* kann am bestehenden System nur bedingt bestimmt werden, da sich am Strang *anti1* zwei Farbstoffe befinden, die teilweise im gleichen Kanal detektiert werden. Als Näherung wurde die Steigung der Messdaten selbst im  $E-1/S$  Diagramm durch  $\gamma$ -Faktoren auf null gesetzt. Daraus ergab sich  $\gamma_{23} = 0.4$ . Da für  $1/S_{12}$  keine Abhängigkeit von  $E_{12}$  zu erkennen war, ist  $\gamma_{12} = 1$  angenommen worden. Durch die Beziehung 2.79 ergibt sich der dritte Faktor  $\gamma_{13} = 0.4$ . Dieser Wert steht im Widerspruch zu der Messung von  $\gamma_{13} = 0.98$  anhand der Oligoproline. Die in Abbildung 4.9 dargestellten Verteilungen, zeigen die neu berechneten E-S Populationen mit diesen  $\gamma$ -Faktoren. Besonders deutlich wird die Korrektur in der Grafik 4.9 (D), der die E-S Verteilung zwischen den Detektoren zwei und drei darstellt: Die Population ist homogener geworden und im Mittel auf 83% FRET gestiegen. Da sich die Kanäle gegenseitig beeinflussen, ändert sich auch die FRET-Effizienz zwischen **1** und **2** (Abbildung 4.9 (A)). Sie steigt auf fast 80% im



**Abbildung 4.9:** E-S 2D-Dichte Histogramm der selben TrALEx-Daten des photonischen Drahts mit  $\gamma$ -Korrektur ( $\gamma_{12} = 1$ ,  $\gamma_{13} = 0.4$  und  $\gamma_{23} = 0.4$ )

	$E_{12}$	$E_{13}$	$E_{23}$	
TrALEx $\gamma = 1$	0.59	0.41	0.62	0.49
TrALEx $\gamma = 0.4$	0.79	0.62	0.83	0.72
Ensemble	0.35		0.37	
SMFS	0.83			

**Tabelle 4.1:** Vergleich der FRET–Werte des photonischen Drahtes

Mittel an. Breit gestreut bleibt die Verteilung des FRET–Effizienz zwischen **1** und **3**. Da der Abstand zwischen den Farbstoffen 30 Basenpaare beträgt, ist kein bzw. ein sehr geringer Energietransfer zu erwarten. Eine Betrachtung der Berechnung des Energietransfers von **1** nach **3** nach Gleichung 2.85 führt darauf, dass bei hohem FRET von **1** nach **2** und gleichzeitig großem Abstand von **1** und **3** der relative Fehler bei der Berechnung der Transfereffizienz groß wird. Die Übertragungseffizienz über den gesamten Draht wird erwartungsgemäß nach rechts zu höheren FRET–Werten verschoben und weist nun einen Schwerpunkt bei 0.72 auf.

Für eine abschließende Betrachtung sind in Abbildung 4.10 die E-S Diagramme und die Verteilung des totalen Energieübertrages einer Mischung aus den vier Farbstoffen frei in Lösung dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass sich dort keine Ereignisse mit Energieübertrag wiederfinden. Ebenso liegt der Stöchiometriewert immer bei eins oder null. Die Energieeffizienz über alle drei Kanäle ist ebenfalls gleich null. Sämtliche Bursts bestehen eindeutig aus einzelnen Farbstoffen: das Setzen von detektorabhängigen Schwellwerten führt dazu, dass kein einziger Burst übrig bleibt. Damit ist das Setzen der Schwellwerte für einzelne Kanäle eine geeignete Methode Bursts selektiv zu filtern.

Mit TrALEx ist es daher möglich, die Energietransfereffizienz zwischen unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen zu bestimmen. Neben den Mittelwerten aus den FRET–Effizienzverteilungen ist die breite der Verteilungen im Blick zu behalten. Speziell bei einem niedrigen FRET zwischen dem ersten und dritten Farbstoff wird die Verteilung von  $E_{13}$  breit streuen und der Mittelwert kann daher nicht in Abstände umgerechnet werden. Im Vergleich zu den von Heilemann erzielten Daten fällt auf, dass die bestimmte totale Transfereffizienz kleiner als die von ihm maximal beobachtete Transfereffizienz ist. Es ist zudem keine eindeutige Subpopulation mit wesentlich größerem FRET zu erkennen. Zusammen mit der deutlichen Korrektur durch einen  $\gamma_{23} = 0.4$  gibt Anlass zum nachdenken. Mit Hilfe der Oligoproline wurde am gleichen Setup  $\gamma_{13}$  zu 0.98 bestimmt. Zusammen mit  $\gamma_{12} = 1$  nimmt auch  $\gamma_{23}$  einen



Wert nahe eins an. Der resultierende geringe Energieübertrag stimmt jedoch nicht mit den Ergebnissen von Heilemann mit einer Anregung bei 488 nm überein [60]. Eine höhere Zeitaufösung einzelner Burst liefert dafür eine Erklärung:

Bei mehreren Ereignissen wurde der Akzeptor ATTO647N vorzeitig gebleicht, während im direkten Anschluss daran die Fluoreszenz der anderen Farbstoffe wieder aufkommt. Durch die Bursterkennung wird über die Dauer eines Bursts der Mittelwert der Fluoreszenz betrachtet. Dadurch verändert sich die scheinbare Quantenausbeute des gebleichten Farbstoffs, wodurch eine scheinbare Verschiebung der FRET Signale zum schwächeren Energieübertrag resultiert. Woher stammt aber diese schnelle Zerstörung des ATTO647N? Einen Hinweis darauf ergaben Messungen der Oligoproline mit den beiden Farbstoffen Rh110 und ATTO647N. Bei einer Anregung mit 476 nm zeigten sie ebenfalls einen geringeren FRET und eine schnelle Zerstörung des Akzeptors. Zusammen mit dem Absorptionsspektrum von ATTO647N muss angenommen werden, dass der angeregte Farbstoff zusätzlich bei 476 nm absorbiert und diesen zumindest für längere Zeit in einen nicht fluoreszierenden Zustand versetzt [119]. Welche Prozesse zu der Zerstörung des Farbstoffs führen, oder ob dieser nur in einen längeren, nicht fluoreszierenden Zustand gelangt, sind im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden.

### **Immobilisierte photonische Drähte in wässriger Umgebung**

Um mehr Informationen über die verschiedenen photoinduzierten Prozesse im photonischen Draht zu erhalten, ist es sinnvoll, immobilisierte photonische Drähte in wässriger Umgebung anzuschauen. Durch die Immobilisierung können die Prozesse bis zum Bleichen eines Farbstoffs betrachtet werden. Die Reihenfolge der Zerstörung lässt Rückschlüsse auf mögliche Lecks und vorübergehende Übergänge in Triplettzustände zu.

Ein geeignetes Verfahren für die Synthese eines photonischen Drahts auf Oberflächen ist es, die Hybridisierung auf der Oberfläche erfolgen zu lassen. Der Strang *ss60* besitzt an einem Ende ein Biotin, mit dessen Hilfe eine Immobilisierung an der Oberfläche über Streptavidin möglich ist. Das Verfahren ist in Kapitel 3.11.2 beschrieben. Auf die, mit dem Einzelstrang präparierte, Oberfläche wurden schrittweise die beiden Gegenstränge *anti1* und *anti2* zugegeben. Dadurch konnte eine homogenere Oberfläche erzielt werden, als wenn das vorher hybridisierte Oligonukleotid auf die Oberfläche gebracht worden wäre [60].

Für die Messungen wurde das lichtstärkere Olympusobjektiv verwendet und die Anregungsleistung wurde auf allen Kanälen für Oberflächenmessungen angepasst.

Excitation 476 nm 77  $\mu$ W 20  $\mu$ s  
 568 nm 30  $\mu$ W 20  $\mu$ s  
 647 nm 30  $\mu$ W 20  $\mu$ s  
 542LP, 50 mm  
 Tripleband I

Mikroskop Sideport vom Olympus IX 70

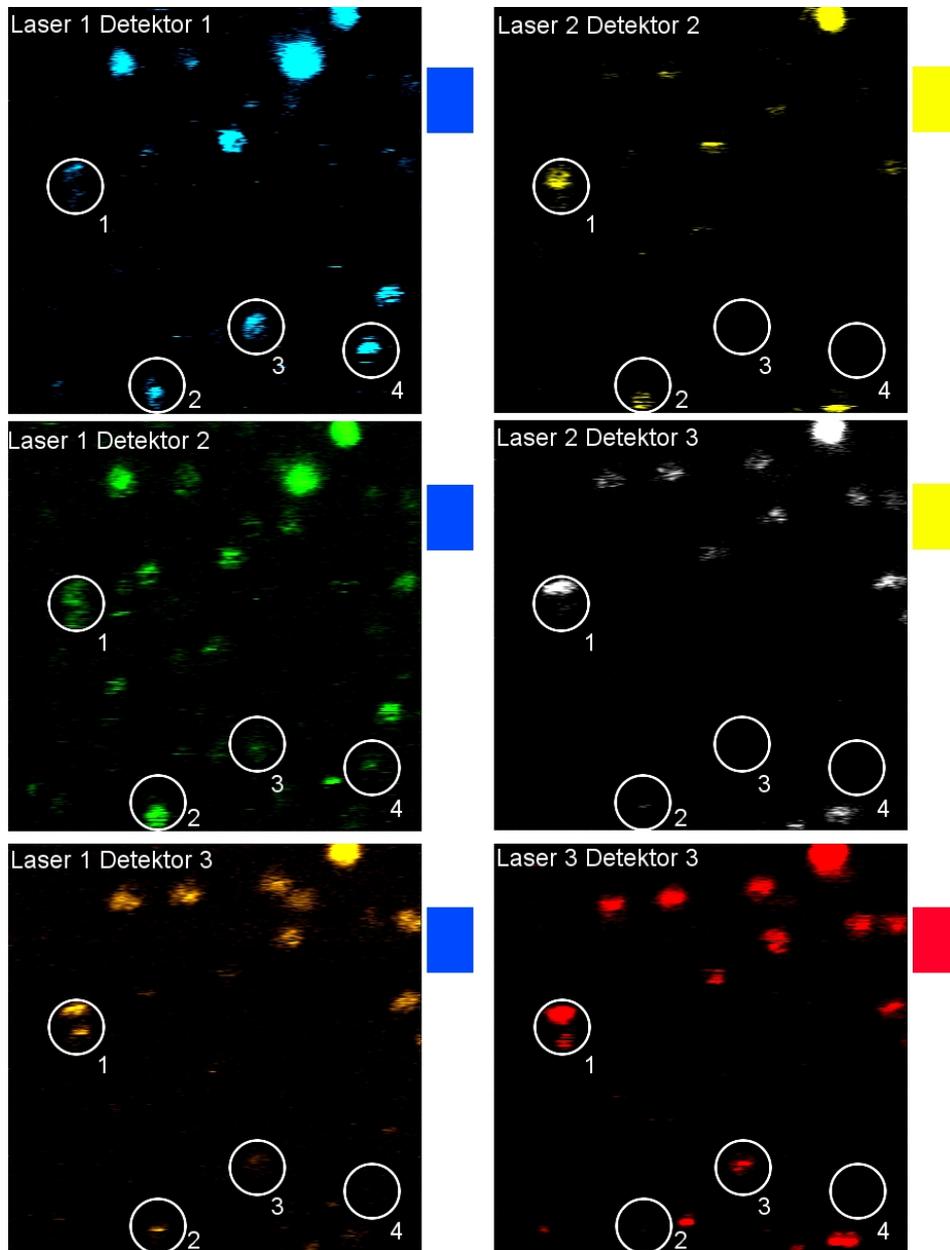
Objektiv Olympus 60x 1.45 Öl-Immersion Apochromat

Emission D1 („blau“): Dichroit 560LP + 531/30 Semrock  
 D2 („grün“): Dichroit 650LP + 605/55  
 D3 („rot“): 692/40 Semrock  
 Paralleler Strahlengang

DAQ Becker&Hickl SPCM-830

Routing Flag durch ODER-Gatter mit 100 MHz, 8  $\mu$ s delay

Die Oberflächen wurden mit einer Auflösung von 50 nm pro Pixel bei einer Belichtungszeit von 1 ms gerastert. In [Abbildung 4.11](#) sind alle sechs Detektor-Laser Kombinationen dargestellt. Auf der linken Seite sind die drei Kanäle mit 476 nm Anregung abgebildet. Dies entspricht der Information mit einer Anregungswellenlänge. Auf der rechten Seite sind die durch TrALEx zusätzlich gewonnenen Informationen dargestellt, in gelb und weiß die Signale bei Anregung mit 568 nm, in rot schließlich die Signale des Detektors für ATTO647N, angeregt bei 647 nm. Der gescannte Bereich hat eine Fläche von  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ . Die PSF der Spots beträgt etwa  $0.9 \mu\text{m}$ . Analog zu einfarbiger Anregung zeigen auch hier die Signale typisches Verhalten von einzelnen Molekülen mit photoinduzierter Zerstörung oder Blinken einzelner Farbstoffe. Auffällig ist, dass bei allen beobachteten Spots der rote Farbstoff ATTO647N vorzeitig zerstört wurde. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von freien photonischen Drähten im vorherigen Abschnitt. In den Kreisen dargestellt sind vier unterschiedliche Varianten. In (1) sind alle drei Farbstoffe an *ss60* gebunden. Bei blauer Anregung ist fast kein Signal im ersten Kanal (Laser 1 Detektor 1). Sehr wohl kann ein schwaches Signal auf dem zweiten Detektor (Laser 1 Detektor 2) beobachtet werden. In der Mitte scheint der Farbstoff kurz heller zu werden. Auf dem roten Detektor bei blauer Anregung fällt auf, dass ATTO647N während des Scans kurz ausgeht, um anschließend etwas schwächer wieder Fluoreszenz zu zeigen. Die zusätzlichen Kanäle durch TrALEx liefern die zur vollständigen Erklärung notwendigen Informationen: Bei Anregung mit 568 nm (Laser 2 Detektor 2, Laser 2 Detektor 3) fällt auf,



**Abbildung 4.11:** Falschfarbendarstellung der Detektor-Laserkombinationen einer  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  Fläche, belegt mit *ss60* und den Gegensträngen *anti1* und *anti2*. In Spot 1 sind alle drei Stränge gleichzeitig vorhanden. Rh110 wird, ebenso wie ATTO590 und TMR stark gelöscht, während der ATTO647 auf dem roten Kanal leuchtet.

dass der gelbe Farbstoff nur bis etwa zur Hälfte des Spots fluoreszierte. Zunächst verschwindet die Fluoreszenz vom ATTO647N und die Fluoreszenz von ATTO590 wurde bis zu dessen Photozerstörung detektiert. Jedoch ist kein Anstieg des Signales im blauen Kanal zu erkennen. Stattdessen beginnt wiederum der rote Farbstoff zu leuchten. Im verbleibenden Kanal (Laser 3 Detektor 3) wurde eindeutig ATTO647N erneut nachgewiesen. Das heißt, der Farbstoff war zu diesem Zeitpunkt nicht zerstört. Vielmehr ist in seinem kurzen Auszustand ATTO590 zerstört worden. Im Anschluss daran wird die Energie nur noch vom Rh110 auf das TMR und weiter auf den ATTO647N übertragen.

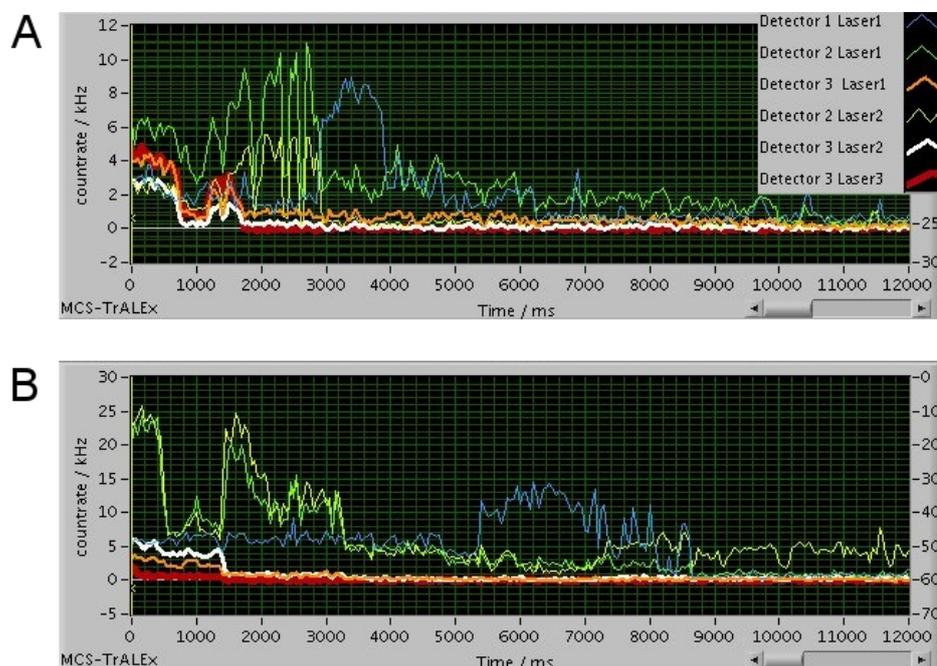
Spot (2) zeigt eine unvollständige Hybridisierung. Es fehlt der zweite Gegenstrang *anti 2*. Die Fluoreszenz von der Kombination TMR–ATTO590 weist ein starkes Blinken bei direkter Anregung auf.

In (3) ist das Fehlen des ersten Gegenstranges zu sehen, da keine direkte Anregung durch 568 nm zu verzeichnen ist. Auch hier ist ein sehr geringer Energieübertrag vom Rh110 direkt auf ATTO647N zu erkennen. Immerhin beträgt der Abstand zwischen den beiden Chromophoren 30 Basenpaare.

Schließlich ist in (4) ein Spot nur mit Rh110 zu erkennen. Die beiden Gegenstränge fehlen oder deren Farbstoffe sind bereits zerstört.

Die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenz eines an der Oberfläche fixierten Moleküls mit TrALEX bestätigt die oben gemachte Beobachtung, dass die Farbstoffe nicht immer in der Reihenfolge von rot nach blau zerstört werden. In Abbildung 4.12 (A) ist zunächst ein Spot mit der erwarteten Reihenfolge der Photozerstörung abgebildet. In dem Bereich bis 800 ms ist eine Transfereffizienz über alle Farbstoffe von etwa 50% gegeben. Bei blauer Anregung ist die Signalstärke auf dem roten Kanal (orange) genauso groß wie bei direkter Anregung des roten Farbstoffs. Ebenso liegt die Fluoreszenz des TMR–ATTO590 Stranges bei gelber Anregung (gelb) auf gleichem Niveau wie die Fluoreszenz in Detektor 3 (weiß). Bei etwa 1800 ms stirbt der rote Farbstoff und die Fluoreszenz von TMR–ATTO590 wird alleine nachgewiesen. Interessanter Weise ist der  $E_{\text{prox}}$ -Wert zwischen grün und blau größer als bei der Fluoreszenz von ATTO647N. TMR zeigt in der Zeit Blinken, das im gelben Detektor zu beobachten ist. Rh110 fluoresziert zu dieser Zeit nicht. Zum Zeitpunkt  $t=3000$  ms wird wahrscheinlich TMR photozerstört, so dass das Rh110 nicht weiter gelöscht wird und selbst fluoresziert. Dies erfährt bei etwa 6200 ms einen für Rh110 typischen Shift in der Emission zu längeren Wellenlängen [22] und wird teilweise im zweiten Detektor nachgewiesen.

In Abbildung 4.12 (B) hingegen beginnt bei etwa 7300 ms ATTO590 wieder zu fluoreszieren. Dieser Farbstoff muss bei Anregung mit einem Laser als zerstört angenommen werden. Solche Ereignisse sind mit herkömmlicher Ein-



**Abbildung 4.12:** Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz einzelner immobilisierter photonischer Drähte (*wire0409*) mit Rh110, TMR, ATTO590 und ATTO647N unter TrALEX.

zelmolekülspektroskopie mit einer Anregungswellenlänge nicht nachzuweisen. Zu erklären ist dies damit, dass der ATTO590 in einen langlebigeren Tripletzustand angeregt und in dieser Zeit Rh110 zerstört wurde.

Abschließend konnte hier gezeigt werden, dass TrALEX es erlaubt, komplexe Photophysik wie in Abbildung 4.12 (B) aufzudecken. Zusätzlich verhindert TrALEX die Fehlinterpretation von MultiFRET Daten. Z.B. hätten viele FRET Fluktuationen auch als Abstandsänderungen von Biomolekülen interpretiert werden können, wenn nicht quasi simultan die Fluoreszenz aller Farbstoffe nachgewiesen worden wäre. Dies erlaubte, lange Auszeiten einzelner Farbstoffe im photonischen Draht nachzuweisen.

TrALEX ist eine geeignete Methode, multichromophore Systeme mit und ohne FRET zu untersuchen. Neben den durch FRET aufzulösenden Abständen können Informationen über die Stöchiometrie selbst ohne FRET gewonnen werden. Das Verfahren kann sowohl in Lösungen als auch auf Oberflächen mit immobilisierten Molekülen in wässriger Umgebung angewandt werden.

### 4.1.3 Das Modellsystem DNA–Stern

Um die Unterschiede zwischen einem gerichteten Energietransfer und einer räumlichen Anordnung der Farbstoffe mit annähernd gleichem Abstand zueinander aufzulösen, wurde das Modellsystem des DNA–Sterns im Rahmen dieser Dissertation entwickelt (Abschnitt 3.3). Die berechnete Affinität zwischen allen Kombinationen der drei Stränge wurde zunächst im Ensemble überprüft. In dem ersten Schritt wurde die Konzentration der markierten Einzelstränge eingestellt und über die spektral aufgelöste Absorption kontrolliert (Abbildung 4.13 (A)). Über die Absorption ergaben sich die relativen Anteile entsprechend der nachfolgenden Tabelle aus der Konzentration der Farbstoffe (vgl. Abbildung 4.14).

Der Markierungsgrad ist aufgrund nur einer vorhandenen Bindungsstel-

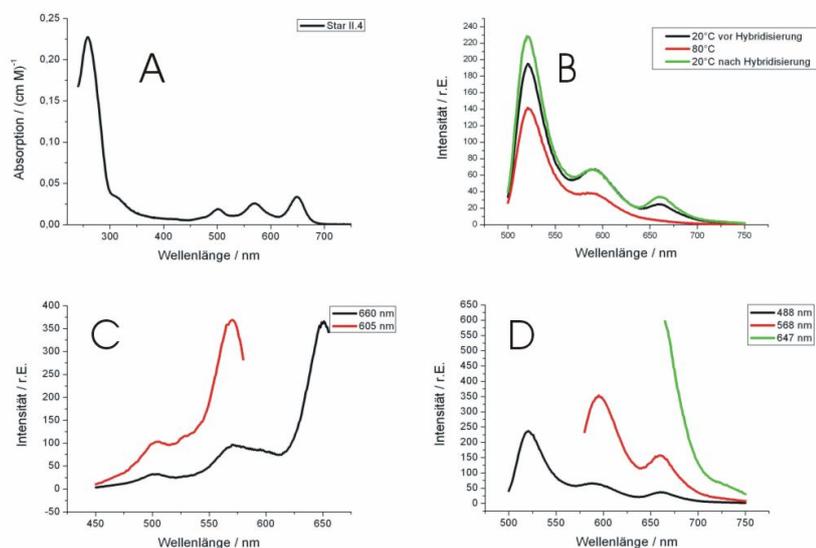
Strang	A–ATTO488	B–ATTO565	C–ATTO647
$\alpha_i$	0.4443	0.6765	1.0455
$\epsilon_i$	90 000	120 000	150 000
$\alpha_{abs}$	0.2814	0.3213	0.3973
Konz. / (mol/l)	$6.96 \cdot 10^{-7}$	$7.19 \cdot 10^{-7}$	$7.50 \cdot 10^{-7}$

**Tabelle 4.2:** Linearkombination aus Absorptionsspektren einzelner Fluorophore zur Annäherung an das Absorptionsspektrum vom DNA–Stern

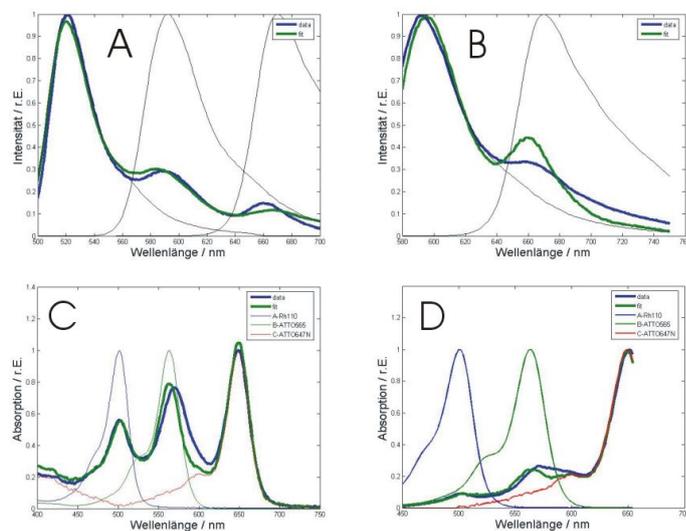
le gleich eins, was in guter Übereinstimmung mit dem Spektrum ist. Die drei Stänge liegen somit in vergleichbarer Konzentration vor. Von diesem Gemisch wurde vor und nach der Hybridisierung ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. In Abbildung 4.13 (B) ist ein Anstieg der Fluoreszenz beider Akzeptoren nach diesem Schritt zu erkennen.

Die Bestimmung der Transfereffizienz bei einem System aus drei Farbstoffen an drei einzelnen DNA–Strängen ist nicht trivial. Nach [59] gibt es drei unterschiedliche Methoden, die Transfereffizienz zwischen zwei Farbstoffen zu bestimmen:

1. Linearkombination aus den, auf die Quanteneffizienz normierten, Emissionsspektren
2. Vergleich der Intensität der durch FRET erzeugten Fluoreszenz mit der Intensität einer Probe mit 100% FRET
3. Annäherung des Anregungsspektrums der FRET–Probe durch eine Linearkombination der Absorptionsspektren



**Abbildung 4.13:** DNA-Stern: (A) Absorptionsspektrum, (B) Emissionsspektren in Abhängigkeit von der Temperatur bei 488 nm angeregt zeigen den Einfluss der Hybridisierung. (C) Anregungsspektren, Beobachtung bei 605 und 680 nm. (D) Emissionsspektren bei 488, 568 und 647 nm Anregung



**Abbildung 4.14:** DNA-Stern, Linearkombination aus Emissionsspektren bei (A) 488 nm und (B) 568 nm aus drei (zwei) Fluorophoren zur Anpassung des Emissionsspektrums, (C) Linearkombination aus den Absorptionsspektren der Einzelstränge zur Anpassung des Absorptionsspektrums, (D) Linearkombination aus drei Absorptionsspektren zur Anpassung des Anregungsspektrums.

Alle drei Verfahren wurden zur Kontrolle angewandt, um einen möglichst gesicherten Überblick über die Verteilung der FRET–Werte des Sternes im Ensemble zu bekommen.

### FRET–Werte durch Fluoreszenzspektren

Diese Methode greift das Fluoreszenzspektrum bei der Anregung des ersten Donors auf. Das Spektrum wird durch eine Linearkombination aus den Emissionsspektren (4.13 (D)) gebildet:

$$F(\lambda) = \sum_i \alpha_i f_i(\lambda) \quad (4.1)$$

Die FRET–Effizienz ergibt sich durch die Korrektur mit der Quantenausbeute und anschließender Normierung.

	ATTO488	ATTO565	ATTO647N
$\alpha_i$	0.912	0.149	0.089
$\Phi$	0.80	0.92	0.65
$\alpha_a bs$	0.79	0.11	0.10

Unter der Annahme eines gerichteten Energietransfers liegt die FRET–Effizienz über alle drei Schritte bei etwa 10%. Auch der Energietransfer auf ATTO565 liegt mit 11% unter den Erwartungen. Damit ist die FRET–Effizienz insgesamt recht gering. An dieser Stelle wird deutlich, dass ein großer Teil der Energie vom Donor an keinen der anderen Farbstoffe weitergegeben wird.

Um den Energietransfer zwischen ATTO565 und ATTO647N zu bestimmen, ist bei dieser Methode eine zweite Messung erforderlich. Der nicht durch die Anordnung beeinflusste FRET–Wert von ATTO565 auf ATTO647N kann aus dem Emissionsspektrum des Sterns bei Anregung mit 568 nm berechnet werden (Abbildung 4.14 (B)).

	ATTO565	ATTO647N
$\alpha_i$	0.988	0.190
$\Phi$	0.92	0.65
$\alpha_a bs$	0.786	0.214

Der Energieübertrag zwischen ATTO565 und ATTO647N beträgt 21.4%. Erwartet wurde eine Transfereffizienz von etwa 50%. Auch hier bleibt ein größerer Teil der Anregungsenergie bei dem angeregten Farbstoff, oder es liegt Strang B ungebunden in der Lösung vor. Ein Vergleich der absoluten Anteile der Linearkombinationen zwischen diesen beiden Farbstoffen mit der Anregung bei 488 nm ergibt, dass die detektierte Fluoreszenz des ATTO647N

nicht vollständig vom ATTO565, sondern auch vom ATTO488 hervorgerufen wird. Analog zur Bestimmung der Transfereffizienz bei TrALEX, kann nun die Effizienz zwischen dem ersten und dem mittleren Farbstoff bestimmt werden. Es gelten die Gleichungen 2.82 und 2.85, wobei sich Unterschiede in der Detektionswahrscheinlichkeit durch die Methode aufheben. Daher sind alle  $\gamma$ -Faktoren eins, woraus eine Energietransfereffizienz von 15% von ATTO488 auf ATTO565 und 8% von ATTO488 auf ATTO647N folgt.

### FRET-Werte durch direkte Anregung des Akzeptors

Durch die direkte Anregung des Akzeptors ist es ebenfalls möglich, die Transfereffizienz zwischen Donor und Akzeptor zu bestimmen [59]. Dazu wird die Fluoreszenz des Akzeptors durch FRET und der Direktanregung in Beziehung gesetzt. Da die Fluoreszenzintensität durch den Absorptionsquerschnitt der Farbstoffe beeinflusst ist, muss diese korrigiert werden. Es ergeben sich folgende Werte:

Anregung bei	488 nm	568 nm	647 nm
Fluoreszenz bei 665 nm	35	147	597
Anteil des ATTO647N	29.1	123.5	597
$\epsilon(\lambda_{ex}) / (\text{M cm})^{-1}$	60300	120000	150000
Normalisierte Fluoreszenz	0.12	0.25	1.00

Dabei wurde das Übersprechen der anderen Fluorophore bei 665 nm substrahiert und die Fluoreszenz anteilig zur direkten Anregung des Akzeptors wiedergegeben. Schließlich ergab sich eine FRET-Effizienz über alle drei Schritte von etwa 12% und zwischen den Farbstoffen an den Strängen B und C von 25%.

### FRET-Werte durch Anregungsspektren

Die letzte Variante zur Bestimmung der FRET-Werte verwendet das Anregungsspektrum (C) aus Abbildung 4.13 mit der Detektion der Fluoreszenz bei 665 nm. Dabei wird aus den Absorptionsspektren der Einzelstränge eine optimale Linearkombination gebildet. Diese Methode wird vor allem dann unzuverlässig, wenn der Akzeptor im Überschuss vorliegt. Die relativen Anteile müssen mit den Absorptionsquerschnitt normiert werden. Dadurch ergeben sich folgende Werte:

	Rh110	ATTO568	ATTO647N
$\alpha_{rel}$	0.0626	0.1460	0.9852
$\epsilon(\lambda_{max}) / (\text{M cm})^{-1}$	90000	120000	150000
$\alpha_{abs}$	0.11	0.19	1.00

Durch die Normierung auf den Anteil der direkten Anregungen können die FRET-Werte ermittelt werden. Wiederum zeigt sich eine geringe Transfereffizienz vom ATTO488 auf C-ATTO647N (11%) und eine etwas größere zwischen den Strängen B-ATTO565 und C-ATTO647N (19%).

Aus den drei unterschiedlichen Modellen für die Bestimmung der FRET-Werte ergeben sich vergleichbare Werte für die Effizienz des Energietransfers. Allen Messungen gemeinsam fällt die Transferrate wesentlich geringer aus als erwartet. Dies kann sowohl in einem geringeren Energietransfer zwischen den Farbstoffen als auch an einer unvollständigen Hybridisierung der Stränge liegen. Eine Unterscheidung zwischen unvollständigen Sternen oder einem geringen Energietransfer ist aus diesen Daten nicht möglich. Eine genauere Methode zur Untersuchung der Abstände ist daher notwendig.

### Der Stern in Lösung mit TrALEx

Obwohl die Ensembeldaten nicht die erwarteten FRET-Werte ergeben haben, wurde versucht vollständig hybridisierte Sterne aufzuspüren. Die Stärke von TrALEx liegt in der gezielten Auffindung von Subpopulationen. Erwartet werden Populationen, die einen moderaten FRET, größer als 50%, zwischen allen drei fluoreszierenden Partnern zeigen. Die bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  molar hybridisierten Sterne wurden für die Messungen auf etwa  $10^{-11}$  molar verdünnt. Um zufällige Koinzidenzen der Farbstoffe im Laserfokus zu vermeiden, wurden die Messungen mit so verdünnten Lösungen durchgeführt, dass nur maximal fünf Einzelmolekülereignisse pro Sekunde erkannt wurden (vgl. Abschnitt 3.4). Dem Puffer (PBS) wurden 0.3 mg/ml BSA zugegeben. Der Aufbau (Kapitel 3.1) wurde für die Detektion der Farbstoffe ATTO488, ATTO565 und ATTO647N optimiert:

Excitation	476 nm	350 $\mu$ W	18 $\mu$ s
	568 nm	250 $\mu$ W	18 $\mu$ s
	647 nm	250 $\mu$ W	18 $\mu$ s
	542LP, 50mm		
	Tripleband I		

Mikroskop Sideport vom Olympus IX 70

Objektiv Nikon PlanApo 60x 1.4 Ölimmersion

Emission D1 („blau“): Dichroit 560LP + 531/30  
 D2 („grün“): LP585 + Dichroit 650LP + 605/55(AHF)  
 D3 („rot“): LP5858 + 692/40  
 Paralleler Strahlengang

DAQ Becker&Hickl SPCM-830

Routing Flag durch ODER-Gatter mit 100 MHz, 8  $\mu$ s delay

Zunächst wurde der Hintergrund des Puffers bestimmt, anschließend die Korrekturfaktoren für das Übersprechen und die direkte Anregung aus den einzelnen Einzelstranglösungen:

Kanäle	crosstalk	direx
	$\alpha$	$\beta$
1 $\rightarrow$ 2	11.0	7.6
1 $\rightarrow$ 3	1.1	0.7
2 $\rightarrow$ 3	9.0	7.8

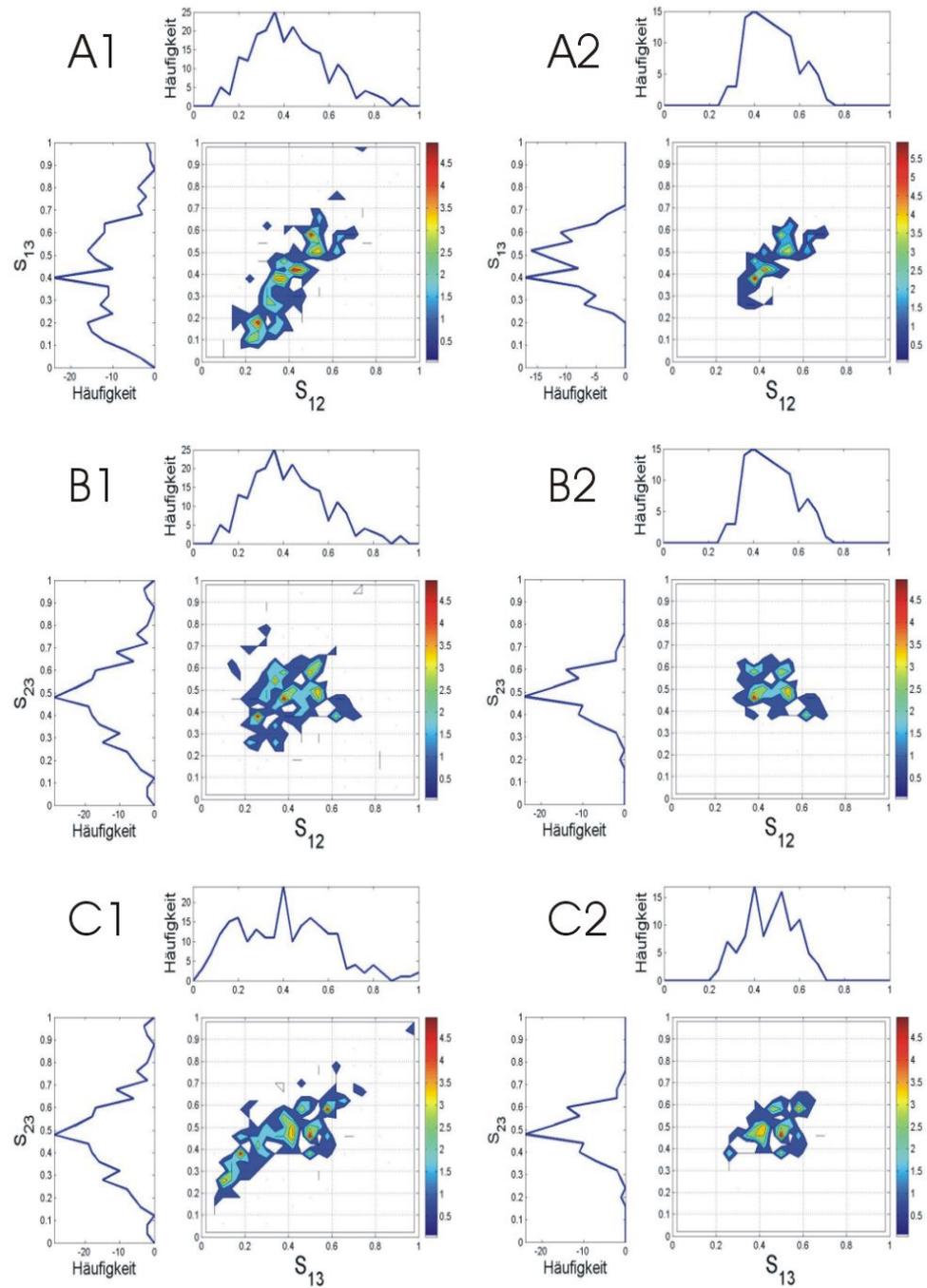
Die Werte liegen in Übereinstimmung mit den aus der Kombination für Filter und Farbstoffe berechneten Werten. In den Abbildungen 4.15 und 4.16 sind die Verteilungen der Bursts des DNA-Sterns in S-S bzw. E<sub>prox</sub>-S Diagrammen wiedergegeben. Zunächst fällt auf, dass sich die Verteilungen in Abbildung 4.15 mit oder ohne Schwellwerte ähnlich sind. Der wesentliche Unterschied liegt in einer Subpopulation, die auf dem grünen und roten Kanal gleichzeitig detektiert wird. Diese kann gut in (A1) und (C1) erkannt werden, da sie sich jeweils um das Wertepaar (0.2; 0.2) abzeichnet. Weiterhin ist in (C1) eine kleine Population des ATTO647N alleine erkennbar. Aufgrund des leichten Überschusses des Stranges C-ATTO647N war dies zu erwarten. Durch die Auswahlkriterien der Bursts wurden schon bei diesem Schritt Ereignisse mit mehreren Fluorophoren bevorzugt. Ein relativ großer Anteil erfüllt die Kriterien für alle drei Farbstoffe. Durch das Setzen von Schwellwerten, auf der rechten Seite, ist eine Konzentrierung der Verteilung auf eine 1:1:1 Stöchiometrie zu beobachten. Die Anzahl der Bursts wird durch die Schwellwerte um etwa 70% reduziert. In Tabelle 4.3 sind die Mittelwerte der stöchiometrischen Verteilungen dargestellt.

Alle Schwerpunkte sind durch die Schwellwerte zur Mitte hin verschoben.

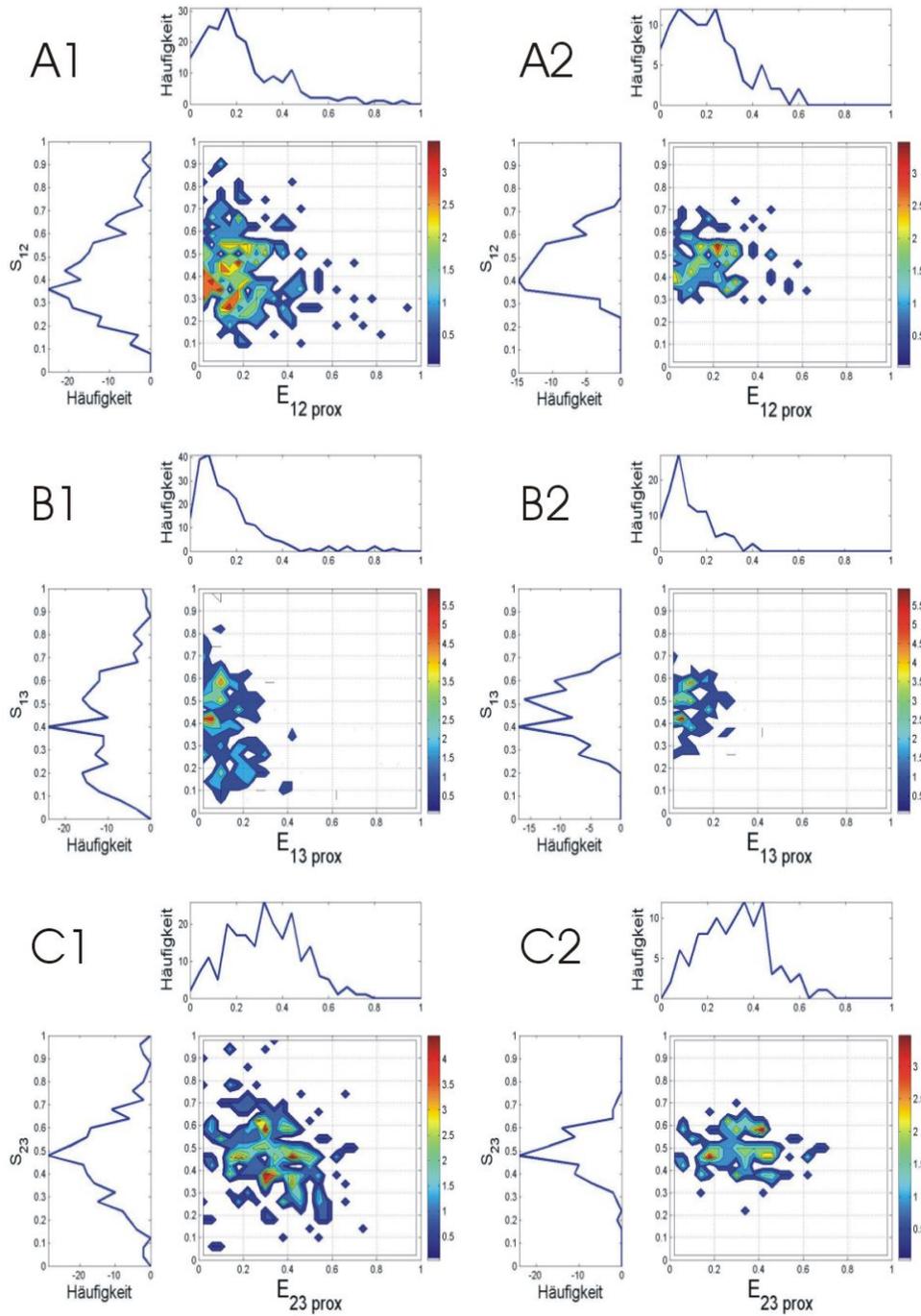
Schwellwert	1 $\rightarrow$ 2	1 $\rightarrow$ 3	2 $\rightarrow$ 3
ohne	0.43	0.40	0.47
mit	0.48	0.47	0.49

**Tabelle 4.3:** Mittelwerte der S-Verteilungen.

Die Verteilung zwischen dem grünen (2) und roten (3) Kanal ändert sich kaum. Die stöchiometrischen Daten lassen den Rückschluss zu, dass alle drei Farbstoffe an der betrachteten Subpopulation in jedem Burst enthalten sind.



**Abbildung 4.15:** Darstellung der TrALEx-Daten des DNA-Sternes mit ATTO488, ATTO565 und ATTO647N ohne Schwellwerte (linke Seite) und mit Schwellwerten (rechte Seite) in S-S Dichteplots.



**Abbildung 4.16:** Darstellung der TrALEX-Daten des DNA-Sternes mit ATTO488, ATTO565 und ATTO647N ohne Schwellwerte (linke Seite) und mit Schwellwerten (rechte Seite) in  $E_{\text{prox}}$ -S Dichteplots.

Beginnend mit der S gegen  $E_{\text{prox}}$  Verteilung zwischen den letzten beiden Strängen (Abbildung 4.16 (C1)) ist zu erkennen, dass sich auch ohne Schwellwerte auf den Kanälen keine reinen Donor- oder Akzeptorpopulationen auszeichnen. Vielmehr sind an allen erkannten Bursts sowohl ATTO565 als auch ATTO647N vorhanden. Sie zeigen in gleichem Maße Energietransfer. Der Schwerpunkt der Verteilung der  $E_{\text{prox}}$ -Werte ändert sich nicht, wenn zusätzliche Schwellwerte gesetzt werden (vgl. Tabelle 4.4).

Anders verhalten sich die Verteilungen zwischen dem blauen und grünen,

Schwellwert	1→2	1→3	2→3
ohne	0.22	0.16	0.32
mit	0.20	0.12	0.32

**Tabelle 4.4:** Mittelwerte der  $E_{\text{prox}}$ -Verteilungen.

bzw. dem blauen und roten Kanal. Beide weisen eine Subpopulation mit einem niedrigen stöchiometrischen Index und einem gegenüber den Schwerpunkt höheren  $E_{\text{prox}}$ -Wert auf. Dies wird durch die Verschiebung der Mittelwerte von  $E_{\text{prox}}$  zu kleineren Werten bestätigt.

Nach Abschnitt 4.1.1 ist zwischen den Kanälen **1** und **3** kaum eine Korrektur durch einen  $\gamma$ -Faktor notwendig. Die Verschiebung der Anregungswellenlänge zu 476 nm bewirkt keine Änderung des  $\gamma$ -Faktors. Daher beträgt die FRET-Effizienz zwischen den Farbstoffen ATTO488 und ATTO647N im Mittel 12%. Die aus den Filterkombinationen abgeschätzten  $\gamma$ -Faktoren ( $1 \rightarrow 2 = 1.37, 2 \rightarrow 3 = 0.52, 1 \rightarrow 3 = 0.71$ ) liefern keine brauchbaren Ergebnisse. Für eine Abschätzung der beiden anderen  $\gamma$ -Faktoren wurden TrALEx-Spuren von je zwei hybridisierten Strängen im 1/S gegen E Diagramm verglichen. Dies führte zu  $\gamma_{12} = \gamma_{23} \approx 1$ . Daher können die  $E_{\text{prox}}$ -Werte in Annäherung als FRET-Werte angenommen werden.

Ein Vergleich der FRET-Werte mit denen im Ensemble ist in Tabelle 4.5 dargestellt. Es fällt auf, dass die Werte bei den TrALEx-Messungen insgesamt größer ausfallen als im Ensemble. Dies ist dadurch zu erklären, dass nur Bursts mit einer Rate größer 70 kHz betrachtet wurden. Dadurch sind Bursts bevorzugt, zu denen mehrere Farbstoffe beitragen.

Die Farbstoffe befinden sich im Abstand von 20 Basen. Bei einer vollständigen Hybridisierung haben die Farbstoffe einen maximalen Abstand von 6.8 nm. Dabei wurde die Verbindung zwischen Farbstoff und DNA vernachlässigt. Da in diesem Fall jedoch die Stränge bei einer flachen Anordnung einen Winkel von  $120^\circ$  zueinander einnehmen, verringert sich der Abstand auf 4.8 nm. In Tabelle 4.5 sind die erwarteten FRET-Werte unter der Annahme von  $\kappa^2 = 2/3$  dargestellt. Die mit dem DNA-Stern erzielten Werte

	$1 \rightarrow 2$	$2 \rightarrow 3$	$1 \rightarrow 3$	$E_{tot}$
Ensemble	15%	21%	8%	10%
TrALEx (ohne)	22%	32%	16%	19%
TrALEx (mit)	20%	32%	12%	16%
$180^\circ$	38%	58%	24%	–
$120^\circ$	83%	92%	64%	–

**Tabelle 4.5:** Vergleich der FRET–Werte im Ensemble, auf Einzelmolekülebene (ohne und mit Schwellwerten) und mit den erwarteten Werten aus den Försterradien (Annahme  $\kappa^2 = 2/3$ ) für den DNA–Stern mit den Farbstoffen ATTO488 (1), ATTO565 (2) und ATTO647N (3).

liegen alle weit unterhalb der theoretischen Berechnung, selbst unter der Annahme von gestreckten DNA–Strängen. Bei dem erwarteten Abstand wurde davon ausgegangen, dass eine gegenseitige Behinderung der Farbstoffe nahezu ausgeschlossen werden kann (Vergleiche [39]). Messungen mit anderen Farbstoffen (Rh110, Alexa568) wiesen vergleichbare Ergebnisse auf. Die Umrechnung der FRET–Werte in Abstände ergibt folgenden mittlere Abstände: 7.9 nm (ATTO488–ATTO565), 7.4 nm (ATTO488–ATTO647N) und 8.1 nm (ATTO565–ATTO647N). Diese Werte sind wieder unter der Annahme frei rotierender Fluorophore berechnet. Die bei der Untersuchung des photonischen Drahtes gemachten Beobachtungen können hier nur zum Teil greifen: Durch ein vorzeitiges Bleichen des ATTO647N wäre ein geringerer Energieübertrag von **1** nach **3** und von **2** nach **3** logisch. Jedoch bleibt eine Erklärung offen, da ATTO565 bzw. der ebenfalls untersuchte Alexa568 das schnelle Bleichen nicht zeigen. Daher kann angenommen werden, dass sich in dem Modell andere stabile Strukturen ausbilden, die einen größeren Abstand zwischen den Fluorophoren bewirken, als die mit `mfold` berechneten Werte vorgegeben haben. Es bleibt jedoch auch die Möglichkeit offen, dass weitere, ungeklärte photophysikalische Ursachen die FRET–Werte beeinflussen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Unterschiede zwischen einem gerichteten Energietransfer und einer anderen Anordnung der Fluorophore durch TrALEx beobachtet werden konnten.

## 4.2 Die vakuoläre H<sup>+</sup>–ATPase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der heteromere Komplex der V-ATPase mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden untersucht. Die ersten Experimente fanden mit chimären Untereinheiten A und B statt, die mit den im sichtbaren fluoreszierenden Proteinen eCFP bzw. eYFP markiert wurden. Die weiteren Untersuchungen wurden mit heterolog exprimierten, nachträglichem gefärbten Untereinheiten bzw. dem solubilisierten Gesamtkomplex aus *mesembryanthemum crystallinum* durchgeführt.

### 4.2.1 VHA-A-CFP und VHA-B-YFP Experimente

Von VHA-A und VHA-B wird angenommen, dass sie eine hexagonale Struktur aus je drei Kopien bilden. Diese sind im Wechsel regelmäßig angeordnet (Abbildung 2.16 auf Seite 61). Ziel dieser Experimente war es, eine Komplexbildung aus diesen beiden Proteinen zu beobachten. Da die beiden Untereinheiten ein Molekulargewicht von 68 bzw. 57 kDa haben, wachsen die chimären Proteine auf eine Größe von 85 bzw. 74 kDa. Die N-Terminalen GFP-Varianten ragen aus den beiden Proteinen ab, wodurch die Funktion nicht beeinträchtigt werden soll [82].

Die Messungen erfolgten zum Teil am kommerziellen Spektrometer LS45 von PerkinElmer, zum Teil wurden sie mit einem gepulsten TiSa Laser bei 420 nm an einem Oriol Spektrometer durchgeführt (vgl. Abbildung 3.18 in Abschnitt 3.5). Aufgrund der geringen Konzentrationen konnten die FRET-Messungen nicht an dem kommerziellen Gerät durchgeführt werden (Abbildung 4.17). Die chimären Proteine lagen bei den Messungen nur in einer begrenzten Sauberkeit vor. Reste vom Zellsat waren noch in den Proben zu finden, was sich auch in den Spektren widerspiegelt.

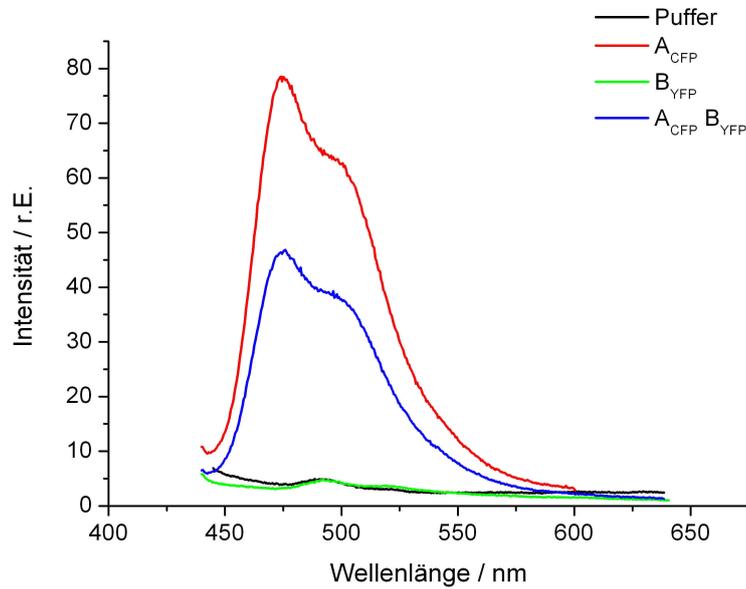
Aufgrund der Fluoreszenzspektren in den Abbildungen 4.17 und 4.18 der beiden Proben kann mit Hilfe der Quanteneffizienz und dem Extinktionskoeffizienten das Konzentrationsverhältnis abgeschätzt werden:

$$\frac{[A]}{[B]} \propto \frac{I_A(\lambda_A) \epsilon_B(\lambda_B) \Phi_B}{I_B(\lambda_B) \epsilon_A(\lambda_A) \Phi_A} . \quad (4.2)$$

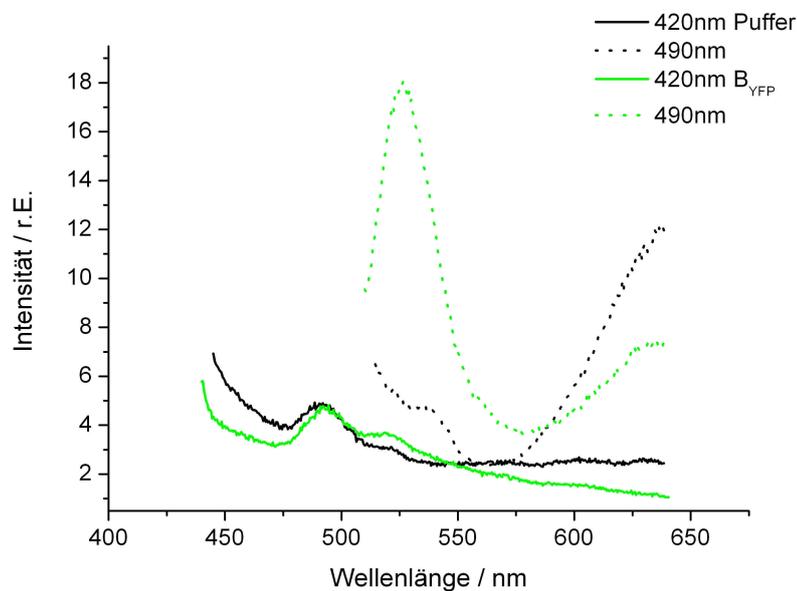
Daraus resultiert ein Konzentrationsverhältnis von

$$A_{CFP} : B_{YFP} = 5.9 : 1$$

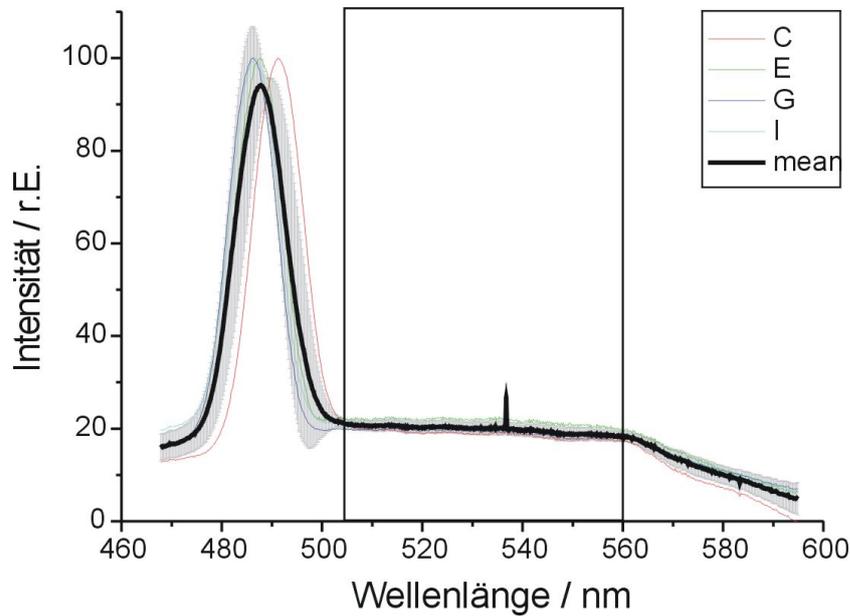
Für eine empfindlichere Detektion wäre die Betrachtung unterschiedlicher Konzentrationen wünschenswert gewesen. Aufgrund der geringen Probenkonzentration wurde davon aber abgesehen.



**Abbildung 4.17:** Fluoreszenzspektrien der chimären Proteine VHA-A<sub>CFP</sub> und VHA-B<sub>YFP</sub> bei 420nm angeregt.



**Abbildung 4.18:** Fluoreszenzspektrum von B<sub>YFP</sub> bei 420 nm bzw. 490 nm angeregt. Als Bezug ist das Spektrum des reinen Puffers abgebildet.

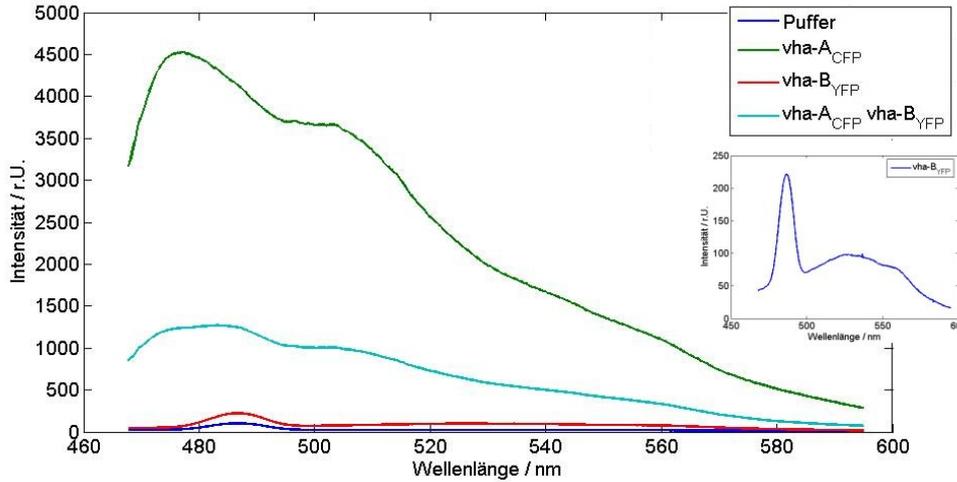


**Abbildung 4.19:** Spektrum des Puffer im eigenen Aufbau. Das Maximum der Ramanstreuung korreliert mit der Anregungswellenlänge. Messwerte von aufeinanderfolgenden Tagen.

Das ungewöhnlich hohe Signal im Vergleich zu den Literaturspektren von ECFP und EYFP bei etwa 490 nm stammt von der Ramanstreuung der Wassermoleküle, dessen Energieabstand  $3652\text{ cm}^{-1}$  beträgt. Eine Anregung mit 420 nm ergibt ein Ramanmaximum bei 496 nm. Die FRET-Analyse wurde aus den oben genannten Gründen an dem eigenen Aufbau mit einem TiSa-Laser als Lichtquelle durchgeführt. Die Detektion durch eine CCD-Kamera mit Bildverstärker ist signifikant empfindlicher als das kommerzielle Spektrometer. Der Laser konnte nicht durchgehend bei der Wellenlänge von 420 nm gehalten werden, so dass eine Drift um bis zu 5 nm zu beobachten war. Auf das Verhältnis der Anregung beider Farbstoffe hat dies keinen Einfluss, jedoch verschiebt sich die Position des Ramanmaximums mit der Anregungswellenlänge (Abbildung 4.19). Da das Ramanspektrum bei der Betrachtung von VHA- $B_{YFP}$  überwiegt (Abbildung 4.20), ist es nicht sinnvoll das gesamte Spektrum für eine lineare Regression zu nutzen. Die Ramanstreuung beeinflusst nur einen Bereich von 480 bis 505 nm, deshalb kann der Bereich oberhalb von 505 nm genutzt werden. Für das Spektrum der Mischprobe gilt:

$$F_{ACFP+B_{YFP}}(\lambda) = \alpha F_{ACFP}(\lambda) + \beta F_{B_{YFP}}(\lambda) \quad , \quad (4.3)$$

woraus die FRET-Effizienz über die Quantenausbeute mit Hilfe der Fitparameter zu ermitteln ist [59]. Im Wesentlichen ist dies die Situation wie in



**Abbildung 4.20:** Fluoreszenzspektren am eigenen Aufbau, angeregt mit einem TiSa-Laser bei 420nm. Vergrößert dargestellt ist das Spektrum von  $B_{YFP}$ .

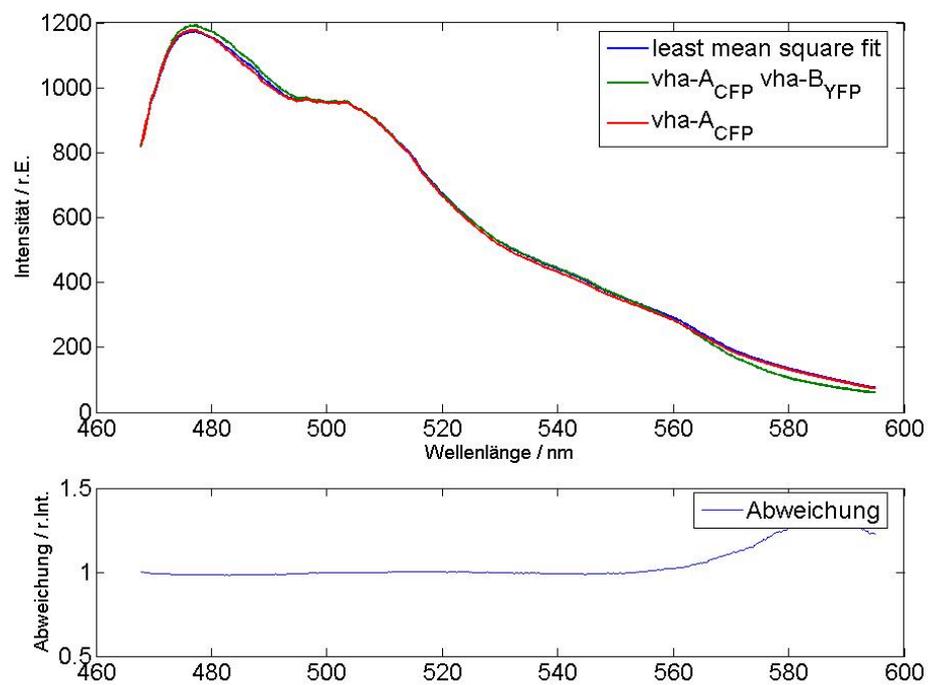
Gleichung 2.47 beschrieben. Die Detektionswahrscheinlichkeit kann als homogen angenommen werden, d.h.  $\eta_D = \eta_A$ , und der  $\gamma$ -Faktor entspricht dem Verhältnis der Quanteneffizienzen. Die Effizienz wird durch die Fitparameter  $\alpha$  und  $\beta$  ausgedrückt. Es gilt:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{\beta}{\frac{\Phi_{EYFP}}{\Phi_{ECFP}}\alpha + \beta} \quad (4.4)$$

In dem nicht vom Ramanspektrum beeinflussten Bereich ergeben sich mit der Methode der kleinsten quadratischen Abweichung (least mean square)

$$\alpha = 0.2593 \quad \beta = 0.0084,$$

wodurch sich eine Effizienz von 2.1% errechnet. Der Vergleich der errechneten Koeffizienten mit der Messung ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Problematisch bei dieser Messung ist das unbekannte Spektrum von YFP. Da die Anregungswellenlänge nicht auf das Absorptionsmaximum eingestellt werden konnte, wurde als Referenz die direkte Anregung von YFP mit 420 nm betrachtet. Der Extinktionskoeffizient von eYFP beträgt bei 420 nm in etwa 4.5% der maximalen Extinktion, weshalb der Fit einer großen Unsicherheit unterliegt. Auf Ensembleebene gibt es zwei Erklärungen dafür, warum dieses Ergebnis so gering ausfällt. Geht man davon aus, dass die beiden chimären Proteine vollständig gebunden haben, d.h. jedes  $VHA-B_{YFP}$  ist an ein  $VHA-A_{CFP}$  gebunden, dann wäre der Abstand zwischen den beiden chromophoren Gruppen außerhalb des Arbeitsbereichs von FRET. In der Tat sind



**Abbildung 4.21:** Fit des Fluoreszenzspektrum von  $A_{CFP}B_{YFP}$  durch  $\alpha A_{CFP}$  und  $\beta B_{YFP}$  ergibt die Parameter 0.2593 und 0.0084. Als Vergleich ist das Spektrum von  $A_{CFP}$  abgebildet.

die beiden GFP-Varianten mit einem Durchmesser von 2.4 nm und eine Höhe von 4.2 nm recht groß. Der minimale Abstand der beiden fluoreszierenden Gruppen liegt somit bei 2.4 nm. Dies entspricht bei einem Försterradius von 5.2 nm (vgl. 3.8) und einem frei rotierenden System einem Energieübertrag von über 99%, so dass hier nicht die Limitierung gegeben ist. Der gesamte Kopf hat einen Durchmesser von etwa 15 nm, so dass die Untereinheiten A und B mit einem Durchmesser von kleiner als 7.5 nm abgeschätzt werden können. Dennoch kann dadurch der Abstand der Chromophore fast das Doppelte des Försterradius betragen. Der Energieübertrag läge bei etwa 2%, also in der Größenordnung der gemessenen Transferraten. Dies legt wiederum die Vermutung nahe, dass die Fusionsproteine sich in der Interaktion behindern. Zumindest können keine Komplexe mit mehreren Proteinuntereinheiten gebildet werden, da dann der Abstand der Fluorophore kleiner als 7.5 nm wird. Die andere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass die beiden chimären Untereinheiten keinen stabilen Komplex bilden können. Die Gründe dafür können sowohl in den angehängten GFP-Varianten liegen, als auch am Fehlen weiterer Untereinheiten. Messungen in Gegenwart der exprimierten Untereinheit VHA-E ergaben ebenfalls keinen Anstieg der Akzeptorfluoreszenz. Weitere heterolog exprimierte Untereinheiten lagen für diese Messungen nicht vor, so dass die Versuchsreihe an diesen Punkt beendet wurde.

Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass weitere Verfahren zur eindeutigen Charakterisierung der Wechselwirkung notwendig sind. Eine Möglichkeit besteht darin, auf einzelne Moleküle überzugehen. Die fluoreszierenden Proteine CFP und YFP sind aber leider aufgrund ihrer geringen Photostabilität nur bedingt für Einzelmolekülexperimente geeignet. Stabilere, chemische Farbstoffe sind nur über funktionelle Gruppen an Lysine oder Cysteine in den Proteinen zu koppeln. Da die Lysate in den bisherigen Proben nicht vollständig entfernt werden konnten, müssen die Proteinuntereinheiten weiteren Reinigungsstufen unterzogen werden.

Als Alternative kann der gesamte Proteinkomplex aus der Pflanze solubilisiert und mit einer ausreichenden Reinheit erzeugt werden.

### 4.2.2 Messungen am Gesamtkomplex

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Dissoziation und partielle Reassemblierung der VHA in Lösung zu demonstrieren. Diese Experimente können als Vorstufen betrachtet werden, mit deren Hilfe es gelingen soll, durch statistisches Markieren heterolog exprimierter Untereinheiten den Zusammenbau der ATPase *in vitro* zu charakterisieren. Die Methode der Einzelmolekülspektroskopie ist ein probates Mittel detailliertere Einsichten zu gewinnen

und potentielle Verteilungen zu erkennen.

Der aus *mesembryanthenum crystallinum* gewonnene Komplex VHA wurde nach der in Kapitel 3.12.3 beschriebenen Methode in zwei Proben mit je einem der FRET-fähigen Farbstoffe Rh110 bzw. ATTO590 als Succinimidylester an die Lysinreste des Komplexes statistisch gekoppelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Markierungsgrad (DOL<sup>1</sup>) zwischen eins und zehn liegt. D.h. pro Gesamtkomplex stehen statistisch ein bis zehn Farbstoffmoleküle zur Verfügung. Da die ATPase zu dem Zeitpunkt des Anfärben frisch vorlag, kann davon ausgegangen werden, dass die Komplexe noch intakt sind. Somit können die Farbstoffe vor allem die frei zugänglichen Aminogruppen belegen, und die funktionellen Bausteine werden nicht behindert. Weiterhin wurde auch während der Reaktion Brij58 in der Lösung belassen, so dass die hydrophoben Untereinheiten innerhalb der Mizellen verweilten. Ansonsten bestünde die Gefahr von hydrophoben Wechselwirkungen der Farbstoffe mit diesen Untereinheiten.

Analog zu der beobachteten Dissoziation und Reassemblierung in Zellmembranen wurden die beiden Proben im Anschluss daran mit Kaliumjodid, Magnesiumsalz und ATP versetzt, mit den Endkonzentrationen von

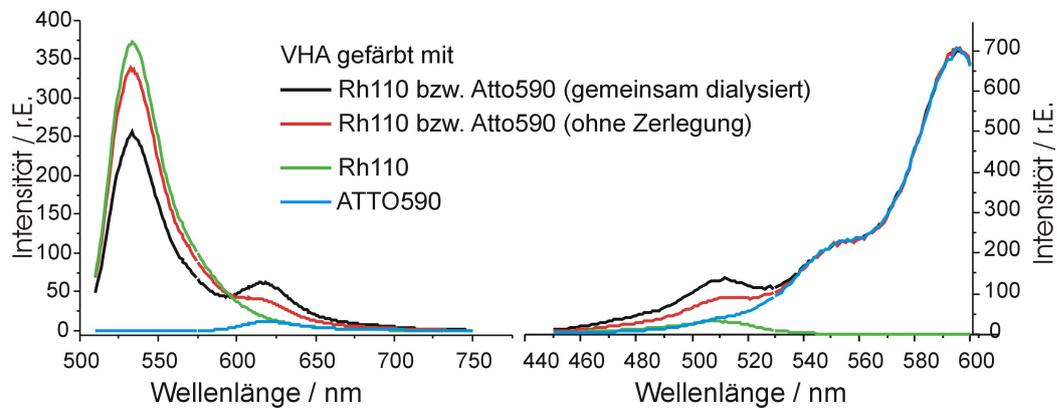
- 5 mM ATP
- 5 mM MgSO<sub>4</sub>
- 500 mM Kaliumjodid.

Dabei erfolgt eine Destabilisierung der hydrophoben Interaktionen zwischen den Proteinen. Die Proben wurden gemischt und für eine Stunde bei 18°C unter leichtem Schwenken gelagert. Nach dieser Zeit erfolgte die gemeinsame Dialyse der Proben über Nacht in einem mindestens 1000-fachen Überschuss an Dialyse-Puffer II (50 mM KCL, 20 mM KHCO<sub>3</sub>, pH 8) bei 4°C. Anhand der fluoreszenzspektroskopischen Daten konnte über das o.g. Verfahren eine Energietransfereffizienz von etwa 28% nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4.22, schwarze Kurve).

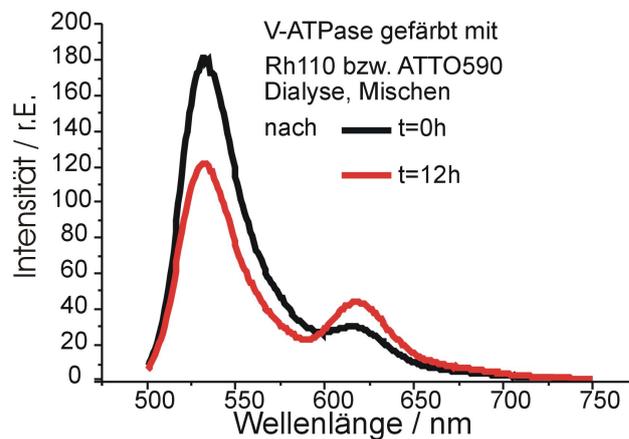
Damit ist gewährleistet, dass zumindest ein Teil der Proteine nach der Dialyse wieder rekombinieren und die Farbstoffe dies nicht verhindern. Selbst ohne chaotrope Zerlegung war nach mehreren Stunden bei 4°C ein geringer Anstieg der Energietransfereffizienz zu beobachten. In Abbildung 4.23 sind die Fluoreszenzspektren von nach der Dialyse gemischten Proben direkt (schwarz) und nach 12 Stunden (rot) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist hier ein Anstieg der Akzeptorfluoreszenz bei gleichzeitigem Rückgang

---

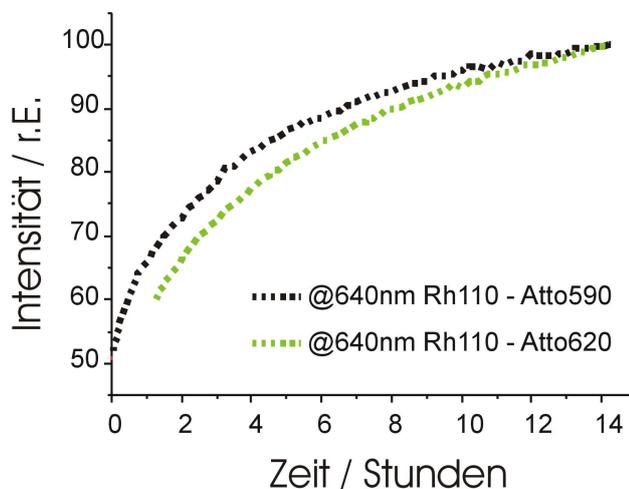
<sup>1</sup>Degree of Labelling



**Abbildung 4.22:** Ensemblespektroskopie von VHA gefärbt mit Rh110 bzw. ATTO590. Nach chaotroper Dissoziation und gemeinsamer Dialyse (schwarz) kann ein deutlicher Anstieg der Akzeptorfluoreszenz bei gleichzeitigem Rückgang der Donorfluoreszenz nachgewiesen werden. Rechts sind die Anregungsspektren der gleichen Proben dargestellt.



**Abbildung 4.23:** Reassemblierung der chaotrop destabilisierten VHA nach getrennter Dialyse. 12 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  nach dem Mischen kann ein Anstieg der FRET-Effizienz verzeichnet werden.



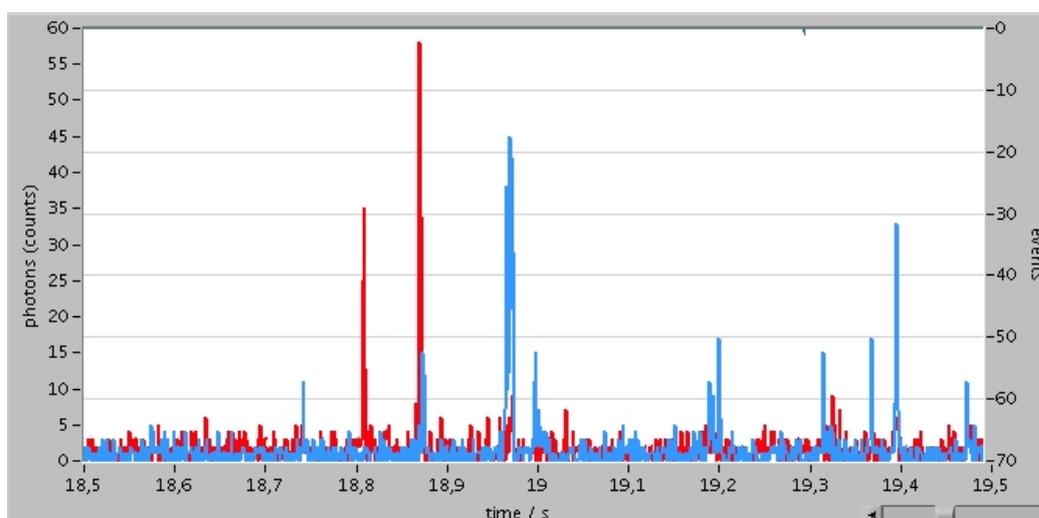
**Abbildung 4.24:** Reaktionskinetik der V-ATPase. Die Mischung der Proben erfolgte nach chaotroper Desassemblierung und Dialyse in der Messküvette. Mit beiden Farbstoffkombinationen wird eine vergleichbare Kinetik erzielt.

der Donorfluoreszenz. Dies spricht für einen langsamen Austausch der VHA-Untereinheiten im Gleichgewicht. Die Reaktionskinetiken in [Abbildung 4.24](#) zeigen eine Sättigung des Austausches der Untereinheiten im Gleichgewicht. Der Versuch wurde mit zwei unterschiedlichen Farbstoffpaaren durchgeführt, um hydrophobe Wechselwirkungen von ATTO590 auszuschließen.

### Einzelmolekül-FRET der ATPase

Es stellt sich die Frage, ob der FRET-Anteil aus einer homogenen Verteilung um einem Abstand stammt, oder vielmehr unterschiedliche Abstände innerhalb der Komplexbildung angenommen werden müssen. Aufgrund der Ringbildung aus sechs Untereinheiten ist eine Verteilung von mehreren Abständen wahrscheinlich. Da es sich um ein statistisches Markierungsverfahren handelt, ist es interessant, ob sich im Gemisch nach der Dialyse Subpopulationen befinden, oder wie viel Prozent der gefärbten Untereinheiten wieder reassemblieren. Daher wurden weitere Messungen auf der Einzelmolekülebene durchgeführt. Der Aufbau entspricht der in [\(3\)](#) gegebenen Darstellung. Angeregt wird Rh110 bei 488 nm, die Detektion erfolgt auf zwei APDs mit einem Dichroiten (DCLP550) als Strahlteiler und einem Langpasskantenfilter LP500 bzw. dem Bandpassfilter 645/75HQ vor je einer APD. In [Abbildung 4.25](#) ist ein Auszug einer Einzelmolekülspur abgebildet. Die Analyse der Bursts erfolgt mit dem in [3.4](#) beschriebenen Verfahren.

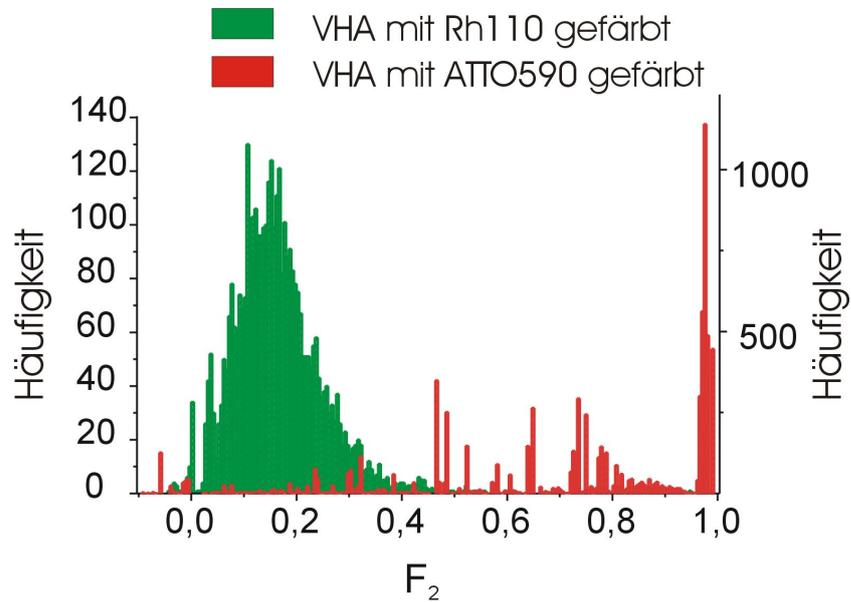
Die Auswertung der Einzelmolekülmessungen liefert die Verteilung der



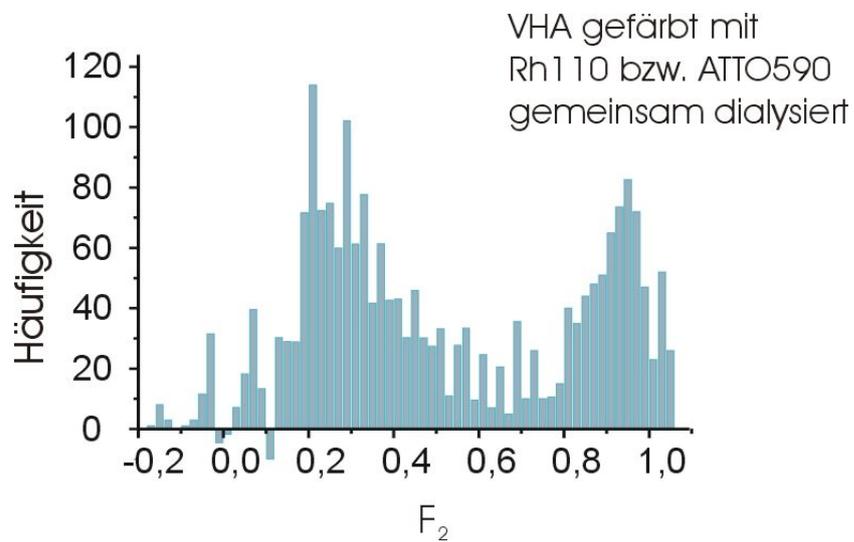
**Abbildung 4.25:** Einzelmolekülpuren von VHA gefärbt mit Rh110 bzw. ATTO590. Nach chaotroper Dissoziation und gemeinsamer Dialyse zeigen einige Moleküle FRET.

Energietransferraten an einzelnen Proteinkomplexen. Aus den Einzelproben (Abbildung 4.26) ergibt sich, dass Rh110 zu etwa 12% in den Akzeptorkanal überspricht. Es fällt auf, dass die Werte um 0.12 recht breit gestreut sind. ATTO590 an der VHA liefert erwartungsgemäß eine schmale Verteilung von  $E_{\text{prox}}$  Werten nahe eins. Die Histogramme aus der gemeinsamen Dialyse enthalten einen hohen Anteil von reinem Donorsignal. Die FRET-Verteilung kann durch subtrahieren der gewichteten Donorverteilung extrahiert werden. Die resultierende Verteilung in Abbildung 4.27 weist deutlich zwei Subpopulationen auf. Eine mit einer FRET-Effizienz von 0.89 und eine mit einer Effizienz von 0.26. Dies deutet auf bevorzugte Kopplungspositionen und unterschiedliche Positionen der Fluorophore in den gebildeten Komplexen hin. Unter der Annahme frei rotierender Farbstoffe ( $\kappa^2 = 2/3$ ) ergeben sich mittlere Abstände von 4.4 bzw. 6.5 nm.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass der solubilisierte Komplex der VHA durch 500 mM Kaliumjodid in Anwesenheit von Magnesiumsalz und ATP dissoziiert werden kann. Durch die Dialyse in einem für die ATPase natürlichen Puffer können mindestens Teile wieder reassemblieren. Der Anteil der wieder gebildeten Komplexe ist gering, wie im Vergleich mit den Ensemblemessungen zu sehen. FRET auf Einzelmolekülebene mit gefärbten Gesamtkomplexen ist ein geeignetes Mittel. Diese Reassemblierung zu charakterisieren. Es gibt zwei Subpopulationen mit etwa 4.4 nm bzw. 6.5 nm Abstand zwischen den Chromophoren. Ein geringerer Anteil der Pro-



**Abbildung 4.26:** VHA Komplexe gefärbt mit Rh110 (grün) bzw. ATTO590 (rot). Rh110 verursacht ein Übersprechen in den Akzeptorkanal und ergibt eine FRET Verteilung größer 0. ATTO590 lässt sich direkt durch 488 nm anregen, jedoch liegen die  $E_{\text{prox}}$ -Werte Nahe eins.



**Abbildung 4.27:**  $E_{\text{prox}}$ -Verteilung der gemeinsam dialysierten Mischung aus VHA-Rh110 und VHA-ATTO590. Die Verteilung wurde mit der Distribution des Donor allein korrigiert.

teine kann auch ohne chaotrope Behandlung *in vitro* ausgetauscht werden. Der Austausch konnte sowohl im Ensemble, als auch an einzelnen Molekülen beobachtet werden.

Versuche, bei denen Cysteinreste innerhalb der VHA gefärbt wurden, ergaben mit allen dargestellten Methoden keinen Energietransfer. Der Vorteil bei dieser Markierungsmethode liegt in der voraussichtlich geringen Anzahl an frei zugänglichen Cysteine im Gesamtkomplex. Dazu wurden die Maleimide von Cy5, sowie von ATTO488 und ATTO590 verwendet. Trotz einer guten Markierungsrate von durchschnittlich einem Farbstoff pro Komplex konnte kein Energietransfer zwischen den desassemblierten und gemischt wieder dialysierten Proben beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die frei zugänglichen Cysteine für die Reassemblierung von Bedeutung sind.

### Beobachtung einzelner VHA auf Oberflächen

Zwei Ziele wurden mit diesen Experimenten angestrebt. Zum einen sollte nachgewiesen werden, dass die reassemblierten ATPase-Komplexe auch auf Glasoberflächen gebunden bleiben, zum anderen sollte die Anzahl der reassemblierten Untereinheiten abgeschätzt werden.

Durch den Markierungsgrad pro ATPase größer als eins können mehrere gefärbte ATPase-Untereinheiten an einem Einzelmolekülereignis beteiligt sein. Versuchsweise wurden daher Oberflächen mit einer dünnen Lösung aus gemeinsam dialysierten ATPase Molekülen analog zu Abschnitt 3.11.2 präpariert. Anders als bei den Messungen in Lösung sind die Farbstoffe ATTO590 und ATTO655 verwendet worden. Die Messungen wurden mit folgendem Aufbau durchgeführt:

Excitation 590 nm 30  $\mu$ W

Mikroskop Zeiss Axiovert 200M

Objektiv Zeiss 100x 1.45 Öl Immersion

Emission D1 („blau“): Dichroit DCR 650 + AHF 700/76 HQ

D2 („grün“): AHF 645/65 HQ

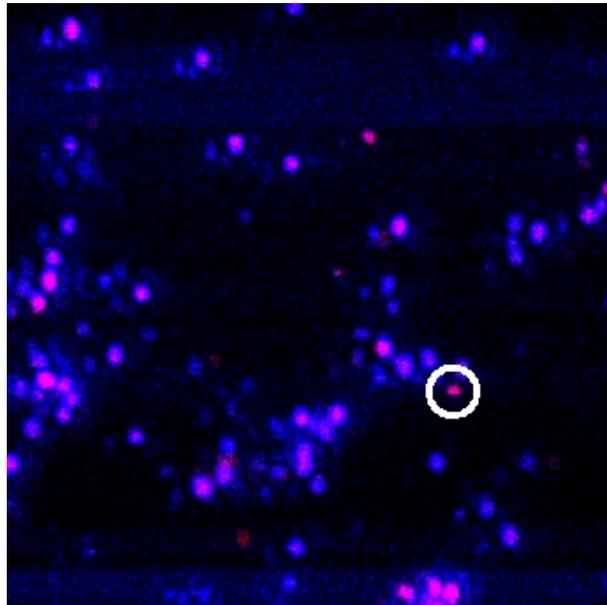
2f-Strahlengang

APD PerkinElmer,

D1: SPCM AQR-14

D2: SPCM AQR-14

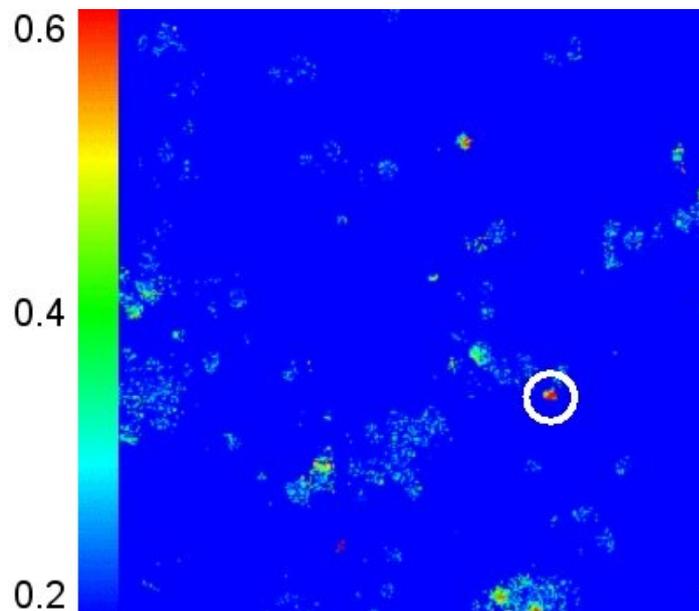
DAQ Becker&Hickl SPCM-630



**Abbildung 4.28:** Scan einer dünn mit gefärbter ATPase belegten Glasoberfläche. Blau dargestellt ist die detektierte Emission von ATTO590, rot die von ATTO655. Viele Ereignisse sind mehrfach markiert, einige davon tragen zwei verschiedene Farbstoffe und zeigen FRET. Im Kreis hervorgehoben ist das Bleichen eines einzelnen Akzeptors zu sehen.

Abbildung 4.28 ist ein Scanbild einer mit ATPasen belegter Oberfläche. Das Fluoreszenzsignal von ATTO590 ist in blau dargestellt, rot ist die Fluoreszenz von ATTO655. Wie zu erwarten, sind viele der beobachteten Ereignisse mit mehreren Fluorophoren bestückt. Durch die Analyse der Bleichschritte kann die Anzahl der Farbstoffmoleküle pro Spot auf maximal fünf abgeschätzt werden. Es konnten auch eindeutige Spuren reassemblierter Komplexe mit genau einem Donor und einem Akzeptor aufgenommen werden (weißer Kreis).

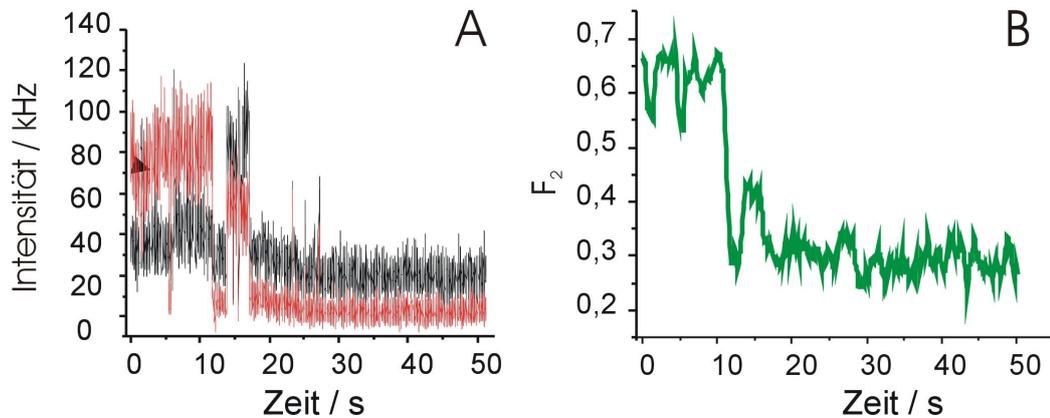
Eine Betrachtung der  $E_{\text{prox}}$ -Werte beider Kanäle in Abbildung 4.29, stellen sich viele Ereignisse als Donor alleine mit einem  $E_{\text{prox}}$  unterhalb von 0.3 dar. Es gibt wenige Ereignisse mit einem höheren FRET-Wert, maximale  $E_{\text{prox}}$ -Werte lagen bei 0.6. Dies ist niedriger, als die in Lösungen beobachteten  $E_{\text{prox}}$ -Effizienzen von bis zu 0.89. Farbstoffe allgemein zeigen jedoch unter dem Einfluss von Glasoberflächen Veränderungen in Bezug auf ihre Absorptions- und Emissionsspektren als auch auf ihre Quantenausbeute [60]. Somit kann die Verschiebung der Effizienz nicht als eindeutiger Hinweis auf eine veränderte Bindung dienen.



**Abbildung 4.29:** Falschfarbendarstellung der  $E_{\text{prox}}$ -Werte von 0.2 bis 0.6 der mit VHA belegten Fläche aus Abb. 4.28. Einige Ereignisse sind eindeutig durch FRET mit genau zwei Farbstoffen zu erklären (weißer Kreis).

Weiterhin ist erkennbar, dass sich die Proteingruppen nicht homogen über die Fläche verteilen. Die ATPase scheint die Eigenschaft zu haben, sich in größeren Mengen beim Spülen auf der Glasoberfläche zu sammeln. Die Bilanz zwischen ATPasen mit beiden FRET-Partnern und denen nur mit dem Donor markierten, liegt bei etwa 1:15. Die Bereiche außerhalb der Moleküle weisen ein  $E_{\text{prox}}$  von konstant 0.25 auf. Abbildung 4.30 (A) zeigt den zeitlichen Intensitätsverlauf eines Spots aus einem Scan. Eindeutig ist das Sterben des Akzeptormoleküls nach 11 Sekunden zu beobachten. Kurze Zeit später kam die Fluoreszenz des Donors zurück. Aufgrund des verbleibenden Signals im Donorkanal ist anzunehmen, dass mindestens ein weiterer Donor in der Nähe des Spots liegt. Die  $E_{\text{prox}}$ -Werte (B) ändern sich entsprechend mit der Zeit.

Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass die Assemblierung der Untereinheiten auch unter dem Einfluss von unspezifischen Wechselwirkungen mit Glasoberflächen erhalten bleibt. Häufig sind mehrere Farbstoffe in den Spots anzutreffen. Sie legen die Vermutung nahe, dass sich Komplexe aus mehr als zwei Partnern bilden. Das Verhältnis zwischen zweifarbigen Spots zu allen detektierten liegt bei 1:15. Einige davon weisen sowohl mehrere Donoren als auch mehrere Akzeptoren auf.



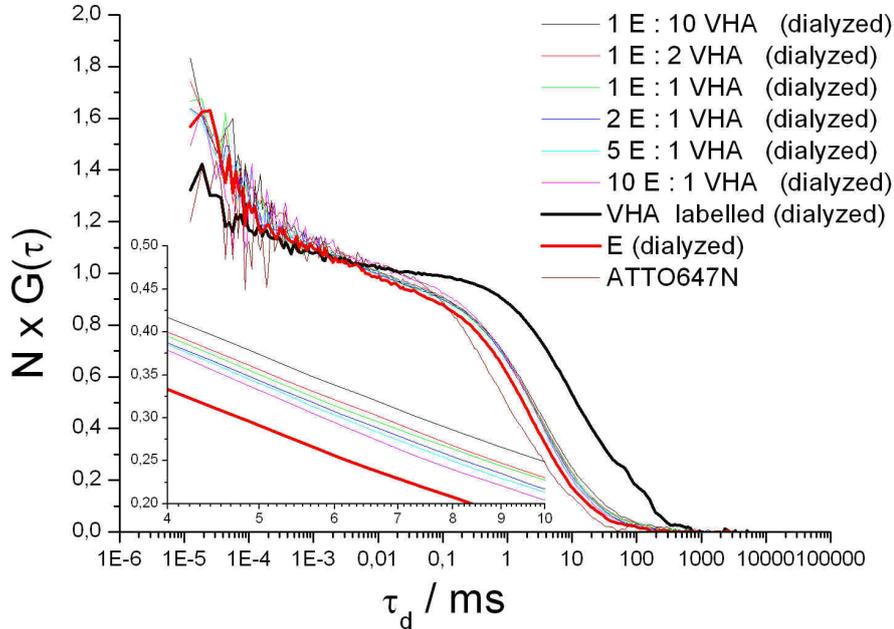
**Abbildung 4.30:** Intensitätsverlauf (A) und  $E_{\text{prox}}$ -Wert (B) einer immobilisierter ATPase mit beiden Fluorophore bis zum Bleichen: Zunächst leuchtet fast nur der Akzeptorfarbstoff (0..11 s,  $E_{\text{prox}} = 0.6$ ), während nach einer kurzen Auszeit der Donor verstärkt aufleuchtet (14..16 s,  $E_{\text{prox}} = 0.4$ ). Anschließend wird auch dieser gebleicht. Der Untergrund stammt vermutlich von weiteren Farbstoffen in direkter Nachbarschaft.

### 4.2.3 VHA-E: Einfügen in den Gesamtkomplex

Die Untereinheit E der VHA ist die einzige Untereinheit, die bisher erfolgreich außerhalb der Pflanze in *E. coli* heterolog exprimiert werden konnte. Analog zu den chimären Untereinheiten erhielt diese ebenfalls einen sechsfachen Histidintag zur Trennung vom Zelllysate (vgl. Kapitel 3.12.2). Durch SDS-PAGE wurde sichergestellt, dass das Protein in der Volllänge erzeugt wurde. VHA-E befindet sich außerhalb der Zellmembran im Zytoplasma. Es galt zu klären, ob diese Untereinheit sich in den Komplex einfügen lässt. Die exprimierte Untereinheit hat eine Masse von etwa 30 kDa, während allein der



**Abbildung 4.31:** Modell der Untereinheit E. Sie befindet sich außerhalb der Zellmembran im Zytoplasma



**Abbildung 4.32:** FCS von VHA-E mit ATTO647N bei verschiedenen Konzentrationen von VHA. Im Inset ist eine Ausschnittvergrößerung des Bereichs von 4 bis 10 ms gezeigt. Die Diffusionszeiten steigen mit wachsender ATPase Konzentration.

Ring aus je drei VHA-A und VHA-B eine Masse von 375 kDa hat. Aufgrund des Massenunterschiedes wurde FCS als Methode gewählt. Erwartet wird eine Diffusionszeiterhöhung von

$$\sqrt[3]{375/30} = 2.3$$

durch Bindung an den Gesamtkomplex. Die Untereinheit wurde mit ATTO647N markiert und analog zu den Experimenten mit dem Gesamtkomplex in die chaotrop behandelte ATPase gegeben und gemeinsam dialysiert. Als Kontrolle wurde der Gesamtkomplex mit ATTO647N markiert und sowohl direkt als auch mit chaotroper Behandlung unter FCS beobachtet.

Angeregt wurde mit einem HeNe-Laser bei 632 nm mit einer Intensität von  $300\mu\text{W}$ . Die Detektion erfolgte mit zwei APDs, die über eine Korrelatorkarte kreuzkorreliert wurden. In Abbildung 4.32 sind die FCS-Kurven dieser Proben dargestellt. Alle Kurven sind auf die Anzahl der Teilchen im Fokus normiert. Die Konzentration von VHA-E-ATTO647N wurde bei den Proben konstant gehalten und für die Messungen auf etwa  $10^{-9}\text{M}$  eingestellt.

Deutlich zu erkennen ist die Zunahme der Diffusionszeit der Untereinheit nach dem Mischen mit dem Gesamtkomplex. Die erwartete Zunahme der Diffusionszeit ist mit 1.5 fach nicht so hoch wie erwartet. Die Erwartung stützt sich auf die Annahme, dass eine Zunahme der Masse auch einem entsprechenden Zuwachs an Volumen nachkommt. Das Experiment konnte mit mehreren Ansätzen mit gleichem Ergebnis wiederholt werden. Dies belegt, dass die Untereinheit mit der ATPase im Austausch steht.

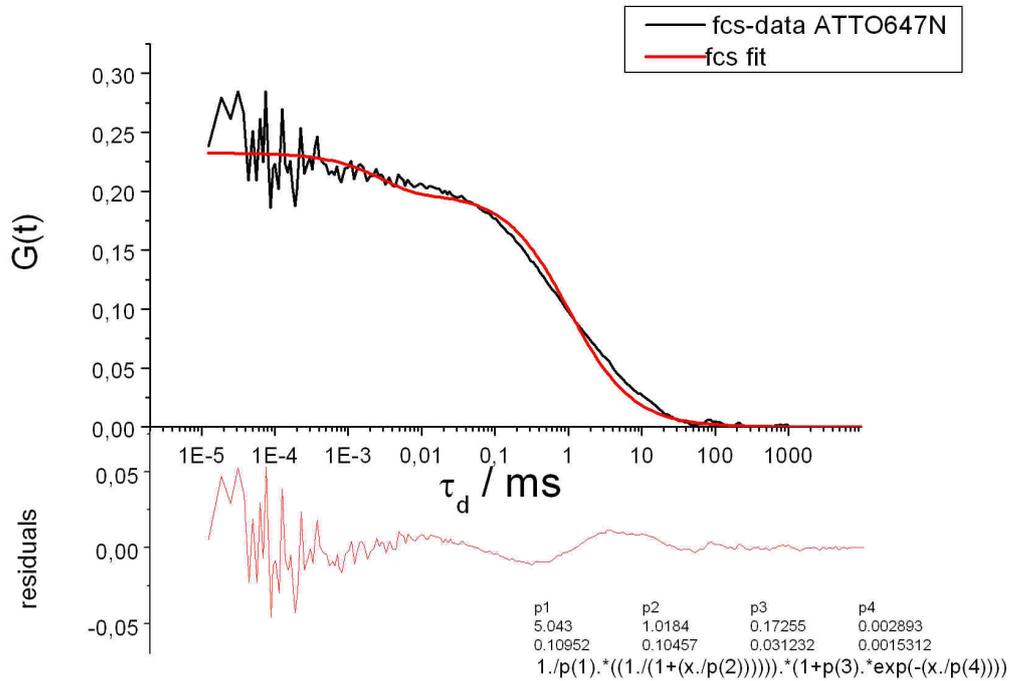
Die Diffusionszeit des Gesamtkomplexes ist wesentlich höher als erwartet. Da sich das in dem Puffer enthaltene Detergenz vor allem an den hydrophoben Gruppen anlagert, ist anzunehmen, dass z.B. durch Bildung von Mizellen der Komplex langsamer diffundiert als der Rest. Die chaotrope Behandlung mit Kaliumjodid greift die hydrophoben Wechselwirkungen an, so dass auch die membranständigen Untereinheiten in Lösung gehen. Dennoch wird auch nach der Dialyse eine vergleichbare Diffusionszeit erreicht. Dies konnte ebenfalls mehrmals bestätigt werden.

Auffällig ist ebenfalls, dass die Diffusionszeiten aller gemischten Proben nahezu gleich sind. Im Inset der Abbildung auf Seite 153 ist der entscheidende Ausschnitt vergrößert dargestellt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Diffusionszeiten angegeben. Gefittet wurde mit dem Modell einer Diffusionszeit und einem exponentiellen Term, der die Triplettkinetik wiedergibt.

Verhältnis	[VHA ]	$\tau_D$	$\Delta\tau_D$
VHA-ATTO647N		12,371	$\pm 0.728$
1:10	1E-8	2,472	$\pm 0.214$
1:5	2E-9	2,307	$\pm 0.179$
1:1	1E-9	2,213	$\pm 0.172$
2:1	5E-10	2,157	$\pm 0.156$
5:1	2E-10	2,153	$\pm 0.156$
10:1	1E-10	2,169	$\pm 0.183$
E	1E-9	1,621	$\pm 0.126$

An dem Verlauf der FCS-Kurven kann bereits erkannt werden, dass dieses Modell nur bedingt geeignet ist. Durch zusätzliche Diffusionsterme konnte jedoch keine nennenswerten Verbesserung in der Anpassung erreicht werden. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass viele, unterschiedlich große Moleküle den Fokus passieren. Die Diffusionszeiten sind daher breiter gestreut als in dem einfachen Modell angenommen. Die Ursachen konnte ebenfalls lokalisiert werden:

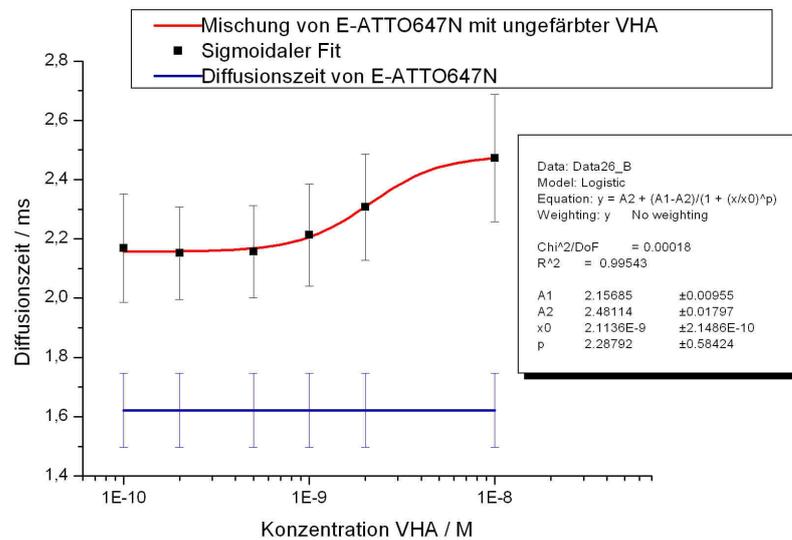
Als Vergleich ist die FCS des freien Farbstoff in Abbildung 4.33 wiedergegeben. Auch hier ist eine deutliche Abweichung der Fitfunktion von der Mes-



**Abbildung 4.33:** FCS von ATTO647N in ATPasepuffer. Die FCS entspricht nicht dem Modell mit einer Diffusionszeit und einem exponentiellen Term.

sung erkennbar. Dies ist durch die Verwendung des ATPasepuffer zu erklären. Dieser enthält 0.002% Brij58, wodurch die hydrophoben Gruppen der membranständigen Untereinheiten gestützt werden sollen. Offenbar lagert sich das Detergenz auch an den Farbstoff an und führt zu einer Streuung in der Diffusionszeit. Ohne Brij hat der freie Farbstoff eine Diffusionszeit von etwa  $300 \mu\text{s}$ . Unter Einwirkung des Detergenz, wird der Verlauf der Korrelationsfunktion im Bereich der Diffusionszeit flacher. Außerdem verschiebt sich die Diffusionszeit zu längeren Zeiten.

Daher sind die Messergebnisse nicht geeignet, eine absolute Bestimmung der Diffusionszeit vorzunehmen. Ohne das Detergenz ist die ATPase nicht stabilisiert. Dennoch zeigt die Diffusionszeit in Abhängigkeit von der Konzentration der VHA in [Abbildung 4.34](#) einen Wendepunkt. Die Diffusionszeit von E ohne ATPase bildet mit 1.6 ms nicht die Asymptote der konzentrationsabhängigen Diffusionszeiten. Die Untereinheit E liegt bei der niedrigsten ATPasekonzentration im zehnfachen Überschuss vor. Im Vergleich zur freien Untereinheit E zeigt die Autokorrelationsfunktion keinen flacheren Verlauf im Bereich der Diffusionszeit. Dies deutet darauf hin, dass die gebildeten



**Abbildung 4.34:** Abhängigkeit der Diffusionszeit von dem Anteil an VHA bei der Dialyse.

Komplexe nicht aus der gesamten ATPase bestehen, sondern aus einem kleineren Teil. Wahrscheinlich handelt es sich um Teile des Kopfes  $V_1$ .

Bei der Betrachtung des gefärbten Gesamtkomplexes vor und nach chaotroper Behandlung mit anschließender Dialyse, ändert sich die Diffusionszeit wenig. Ohne die Behandlung mit Kaliumjodid beträgt die Diffusionszeit 13.0 ms, mit 12.4 ms. Unter Berücksichtigung der Experimente im Gesamtkomplex lässt dies zwei Vermutungen zu: Entweder wird ein Teil der gefärbten VHA nicht aus dem Komplex gelöst, oder der Anteil an wieder zusammengesetzter ATPase ist sehr hoch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untereinheit E ist in der Lage ist, *in vitro* in den destabilisierten Komplex der ATPase mit aufgenommen zu werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verbindung mit einem kleinen Teil der gesamten ATPase erfolgt, da die Diffusionszeit wesentlich kleiner ist, als die der gefärbten ATPase. Die Diffusionszeit hängt von dem relativen Anteil an ATPase gegenüber der Untereinheit zusammen. Das Verhältnis der Diffusionszeiten zwischen gebundener und ungebundener Untereinheit liegt bei etwa 1.5. Unter Vernachlässigung der tertiären Struktur und der Annahme einer kugelförmigen Oberfläche entspricht dies einem Massenzuwachs um den Faktor 3.5, was einer Molmasse von circa 100 kDa entspricht. Dies käme einer Wechselwirkung mit nur einer oder zwei Untereinheiten aus dem Gesamtkomplex gleich.

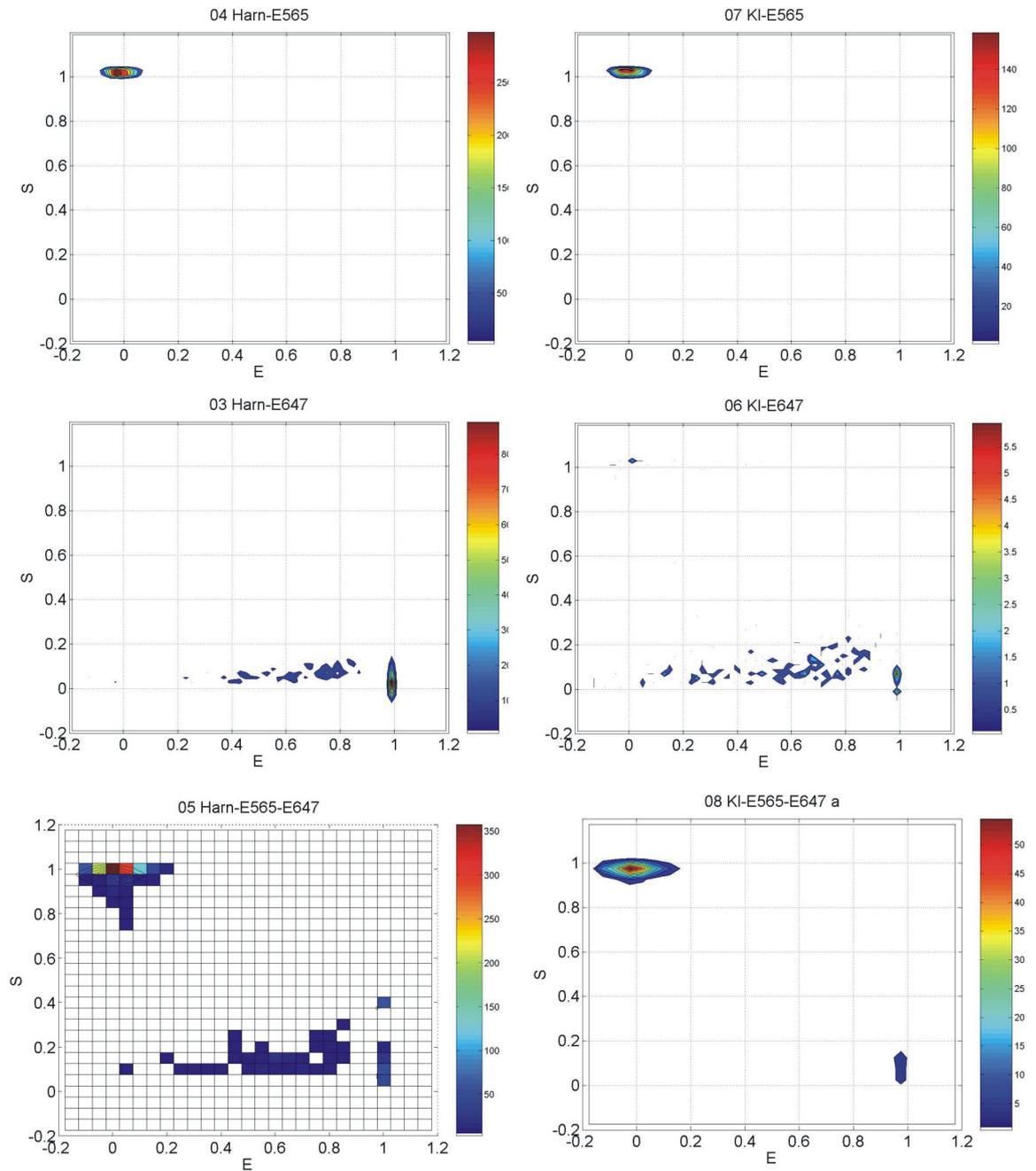
Das Prinzip der FCS ist im Zusammenhang mit dem stabilisierenden Detergenz Brij58 nur eingeschränkt einzusetzen, da die Anlagerung an hydrophobe Gruppen die Diffusionszeit beeinflusst. Bilden sich gar Mizellen, so ist mit einem Anstieg und einer Streuung der Diffusionszeit zu rechnen. Dies konnte mit ATTO647 in Anwesenheit des Detergenzes bestätigt werden.

#### 4.2.4 VHA-E: Dimer oder Monomer

Nachdem fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Protoplasten starke Indizien zeigen, dass in der VHA die Untereinheit E als Dimer vorliegen kann, stellte sich die Frage, ob dies auch *in vitro* zu beobachten sei. Mittels FRET kann eine mögliche Interaktion der 30 kDa schweren Untereinheit mit sich selbst aufgedeckt werden. Da im Ensemble keine Wechselwirkung zu beobachten war, wurde die Einzelmolekültechnik ALEX eingesetzt, um die Interaktion über die Stöchiometrie nachzuweisen. Die Wahl der Farbstoffe fiel auf ATTO565 und ATTO647N, die sich bereits bei den Messungen mit TrALEX etabliert hatten. Probleme mit ATTO647N sind nicht zu erwarten, da keine Anregung bei 476 nm erfolgt (vgl. Kapitel 4.1.2). Als Ansatz wurde beim Anfärben ein DOL von fünf angestrebt. Die Signalhöhe der Bursts weisen auf einen DOL zwischen eins und zwei bei beiden Ansätzen hin und decken sich mit den Daten aus den Absorptionsspektren. Im Falle einer Dimerisierung werden stöchiometrische Werte zwischen 0.3 und 0.7 erwartet.

Um eventuell vorliegende Dimere zu lösen, wurden die Proben wieder mit 500 mM Kaliumjodid bzw. mit 6 M Harnstoff behandelt und über Nacht dialysiert. In Abbildung 4.35 sind die E-S Histogramme der Einzelmolekülspuren dargestellt. Es sind nur eindeutige Donor bzw. Akzeptor Verteilungen in den Diagrammen zu erkennen. Die als Akzeptor markierte Probe lag in diesen Messungen im Unterschuss vor, jedoch ergab das Setzen des blauen und roten Schwellwerts keine Bursts.

Eine Dimerisierung der Untereinheit E konnte *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Weder die Ensemblespektroskopie noch die empfindlichere Technik ALEX konnte eine Interaktion oder sogar FRET sichtbar machen. Veränderungen des pH-Werts hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Messergebnisse. Eine mögliche Erklärung kann eine geringe Bindungskonstante sein. Liegt diese im Bereich von Mikromol pro Liter, so wird aufgrund der Konzentration von etwa  $10^{-9}$  M der Edukte die Konzentration des Dimers nur noch  $10^{-12}$  M sein (vgl. [120]). Dabei kann diese Population verdeckt werden. Durch ALEX kann zwar eine Subpopulation durch den stöchiometrischen Index in einer Majorität wahrgenommen werden, jedoch liegt die Grenze bei etwa 1:100.



**Abbildung 4.35:** E-S Histogramme von VHA-E mit ATTO565 bzw. ATTO647 markiert. Ein Ansatz wurde mit 6M Harnstoff behandelt (links), der andere Teil mit Kaliumjodid. In beiden Fällen zeigen sich die typischen Verteilungen von Donor und Akzeptor ohne feste Beziehung.

Wenn die Untereinheit E dimerisieren kann, liegt die Bindungskonstante *in vitro* unterhalb von  $10^{-5}$  M. Über die Dimerisierung der Untereinheit E in der natürlichen Umgebung der Zellen kann mit diesen Daten allerdings keine Aussage getroffen werden.



# Kapitel 5

## Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der dreifach alternierenden Laseranregung (TrALEx) stellt eine Erweiterung der Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie dar. Der Einsatz mehrerer Anregungswellenlängen erlaubt es, unterschiedlich fluoreszierende Sonden simultan zur Erforschung der Zusammensetzung oder räumlichen Wechselwirkungsmöglichkeiten im Rahmen von FRET z.B. an Biomolekülen einzusetzen. Mit der entwickelten Methode lassen sich:

- Räumliche Anordnungen innerhalb einzelner Moleküle / Molekülkomplexe abfragen.
- Bindungen an komplexen Molekülen / Molekülaggregaten studieren.
- Zeitliche Strukturveränderungen molekularer Aggregate nachweisen.
- Subpopulationen in einer heterogenen Probe selektiv auswerten.
- Konkurrierende Energietransferpfade auflösen.
- Lecks z.B. in einem gerichteten FRET über mehrere Stationen aufdecken.
- Abstände jenseits des zweifarbigen FRET bestimmen.

Die alternierende Laseranregung wurde mit einem akusto-optischen Filter (AOTF) bewerkstelligt, der aus den Linien eines Multiline-Lasers die jeweilige Wellenlänge selektiert. Die für die Charakterisierung notwendigen Proben für gerichteten Energietransfer und Energietransfer mit drei beliebigen Transferpfaden wurden sowohl mit klassischer Ensemblespektroskopie als auch mit der auf TrALEx erweiterten Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie

untersucht. Ein Vergleich der Daten mit herkömmlicher Einzelmolekülmikroskopie, mit nur einer anregenden Wellenlänge, deckte wesentliche Informationen über die Transferpfade des FRET bei beiden Proben auf. Es konnten Abstände zwischen mehreren Farbstoffen bestimmt werden, selbst wenn die Energietransferpfade konkurrieren. Aufgrund der zusätzlichen Anregungswellenlängen wurden für einige Farbstoffe Indizien für weiter zu untersuchende photophysikalische Effekte gefunden.

Den zweiten Schwerpunkt dieser Dissertation bildet die partielle Strukturauflösung des heterogenen Proteinkomplexes der vakuolären  $H^+$ -ATPase. Dieser Komplex aus zwölf unterschiedlichen Proteinen wurde mit Methoden aus der Ensemblespektroskopie und der Einzelmolekülspektroskopie untersucht. Bindungsstudien auf Einzelmolekülebene des chaotropen Salzen ausgesetzten Proteinkomplexes, konnten eindrucksvoll belegen, dass sich dieser nach Dialyse teilweise reassembliert. Es wurde der Nachweis erbracht, dass statistisches Markieren von Molekülkomplexen einen Zugang zur Struktur und Zusammensetzung von Biomolekülen bilden kann. Mit dieser Methode konnte die Integration der heterolog exprimierten Untereinheit E in den solubilisierten Gesamtkomplex nachgewiesen werden. Ebenso wurde die Annahme einer Dimerisierung der Untereinheit E und ihr zweifaches Vorkommen im Gesamtkomplex *in vitro* in Frage gestellt.

Im Folgenden werden die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit noch einmal zusammengefasst. Mögliche Punkte für weitere Studien werden dargelegt, mit denen die Technik des dreifachen FRET mit dreifach alternierender Laseranregung einen gegenüber Ensemblemessungen detaillierteren Einblick in die Zusammensetzung und Wechselwirkungsmöglichkeiten biologischer Aggregate und Komplexe liefert. Schließlich werden weitere mögliche Anwendungen und Verbesserungen diskutiert.

## 5.1 Triple Alternating Laser Excitation

Das Prinzip der alternierenden Laseranregung ist 2004 das erste Mal vorgestellt worden [17]. Dabei wurde zwischen zwei Anregungswellenlängen in einem konfokalen Einzelmolekülmikroskop gewechselt. In dieser Arbeit wurde das Konzept auf drei Anregungswellenlängen und drei Detektoren erweitert.

Der simultane Einsatz von mehreren Farben bei FRET, bietet im Vergleich zum sequenziellen Messen der gleichen Abstände in mehreren Schritten wesentliche Vorteile. Zunächst wird durch das Beobachten eines einzel-

nen Systems die Anzahl der Proben reduziert. Nicht alle Kombinationen an Abständen müssen einzeln präpariert und gemessen werden. Dies führt zu konsistenten Proben, in denen unterschiedliche Ergebnisse durch abweichende Präparation nicht auftauchen. Weiterhin kann durch den Einsatz mehrerer Chromophore die Reichweite der FRET-Experimente signifikant erweitert werden [121, 22]. Schließlich ermöglicht die Beobachtung von FRET an verschiedenen Zweigen eines Biomoleküls Rückschlüsse sowohl auf die Struktur als auch auf die Dynamik aller Zweige. Wenn daher FRET auf Einzelmolekülebene an Biomolekülen nachgewiesen wird, sind abstandsabhängige Prozesse auf intramolekularer Ebene zugänglich. Mit einer solchen Technik können an immobilisierte Biomolekülen Faltungen und Reaktionen in zeitlicher und räumlicher Abhängigkeit studiert werden.

Im Zusammenspiel mit TrALEx wird das Spektrum an Vorteilen erweitert. Durch die direkte Anregung aller Fluorophore können diese unabhängig vom FRET nachgewiesen werden. Dies erlaubt Aussagen über Bindungen zwischen einzelnen Molekülen, oder kann als Indikator für Formationsänderungen von größeren Molekülkomplexen gesehen werden. Stehen die Energietransferpfade in Konkurrenz zueinander, können diese mit TrALEx aufgelöst werden. Somit sind mit mehreren Farbstoffsonden die Abstände zwischen den Sonden zugänglich.

Für alternierende Laseranregung müssen mehrere Anregungswellenlängen dasselbe Volumen in einem konfokalen Mikroskop beleuchten. Die Überlagerung unterschiedlicher Laserfoki und das Alternieren zwischen den Anregungswellenlängen wurde durch die Kombination aus einem Multiline-Laser und einem akusto-optischen Filter gelöst. Mit dem Filter lassen sich die benötigten Wellenlängen innerhalb weniger Mikrosekunden selektieren. Dadurch konnten selbst in diffundierenden Molekülen alle Farbstoffe sequentiell angeregt werden. Die Synchronisation zwischen detektierten Photonen und der Anregungswellenlänge konnte durch eine, zur Verschlüsselung des Detektorkanals analogen, Markierung der detektierten Photonen umgesetzt werden.

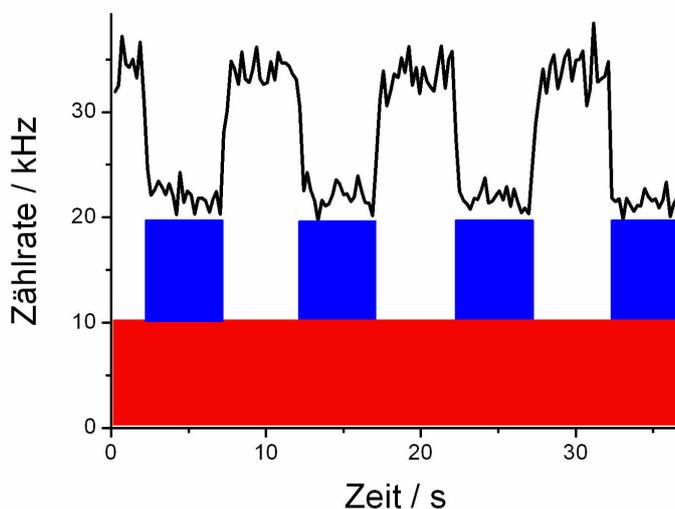
Das für die Einzelmolekülspektroskopie notwendige Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurde durch den Einsatz von hochempfindlichen Lawinenphotodioden und der Verwendung von organischen Farbstoffen im spektral sichtbaren Bereich in Kombination mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Ebenso bedeutend ist ein gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Der Hintergrund setzt sich vor allem aus inelastischer und elastischer Streuung zusammen. Inelastisches Streulicht der Rayleighstreuung wurde über die Kombination aus einem Triplebandfilter und einem für jeden Kanal angepas-

ten Bandpassfilter minimiert. Die Unterdrückung elastischer Ramanstreuung wurde minimiert durch die Übereinstimmung der zweiten Anregungswellenlänge mit der durch die O-H Streckschwingung hervorgerufenen Ramanbande. Daher fiel die Wahl der Anregungswellenlängen auf 476, 568 und 647 nm.

Durch die verkürzte Anregungsdauer bei alternierender Anregung sind Farbstoffe mit einer hohen Quantenausbeute von besonderem Interesse, die gleichzeitig viele Anregungszyklen überstehen. Die Wahl der Farbstoffe fiel daher auf Rhodaminderivate. Diese emittieren in einer reduzierenden Umgebung, also in Gegenwart starker organischer elektrischer Donoren, eine große Anzahl von Photonen und haben eine hohe Quantenausbeute. Hierbei konnte die Photostabilität durch den Einsatz von Mercaptoethylamin (MEA) erheblich verbessert werden.

### Korrigiertes $E_{\text{PROX}}$ liefert $E_{\text{FRET}}$

Über die angepasste Detektionswahrscheinlichkeit sind bei TrALEX korrigierte FRET-Werte zu erreichen, so dass sich aus diesen leichter intermolekulare Abstände berechnen lassen. Die Korrekturen können aus dem Aufbau selbst über Kalibrierungsproben hergeleitet werden. Anhand von Oligoprolinen wurde die Detektionswahrscheinlichkeit zwischen zwei Kanälen über den  $\gamma$ -Faktor angepasst. Dieser ist für eine Kombination aus Farbstoffen und Filtern konstant. Die Intensität, Anregungsdauer und sogar die Anregungswellenlänge haben keinen Einfluss auf diesen Wert. Die Bestimmung erfolgte über drei unterschiedlich lange Prolinketten, an deren Enden die Farbstoffe ATTO488 und ATTO647N kovalent gebunden waren. Für das TrALEX-Setup konnte  $\gamma = 0.98$  ermittelt werden. Dieser Wert unterscheidet sich von dem aus den Absorptionsspektren ermittelten Korrekturfaktor (0.71). Diese Differenz kann verschiedene Ursachen haben: Zum einen ist es denkbar, dass durch die Breite des Spektrums die Position der Lochblende aufgrund chromatischer Abberationen nicht für alle Kanäle optimiert werden kann. Durch sequenzielles Optimieren der Kanäle konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Zählrate beobachtet werden. Zum anderen kann dies ebenfalls auf die Farbstoffphysik der verwendeten roten Farbstoffe unter den Einfluss von blauer und roter Anregung gleichzeitig zurückzuführen sein. Zwei Filterkombinationen mit unterschiedlichen  $\gamma$ -Werten, erzielten gleiche FRET-Werte für unterschiedlich lange Oligoproline (P06=0.96, P10=0.88, P14=0.75). Diese Werte liegen in guter Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten [39]. Somit konnte die Funktion des Aufbaus sichergestellt werden.



**Abbildung 5.1:** Einfluss von 476 nm Anregung auf die Zählrate des ATTO647N

### **Geringere Photostabilität organischer Farbstoffe bei blauer Anregung**

Neben den möglichen Verbesserungen mit TrALEx traten aber auch erhebliche Probleme durch die alternierende Laseranregung gerade hinsichtlich der Photostabilität organischer Farbstoffe unter Anregung im blauen Spektralbereich auf. In Abbildung 5.1 ist der Einfluss der gleichzeitigen Anregung des Farbstoffs ATTO647N mit 647 und 476 nm im Vergleich zu einer rein roten Anregung gezeigt. Während das rote Laserlicht kontinuierlich das Probenvolumen ausleuchtete, wurde das blaue Laserlicht wahlweise dazugeschaltet. Deutlich ist ein Einbruch der Zählrate bei gleichzeitiger blauer und roter Anregung zu verzeichnen. Inzwischen konnte über FCS gezeigt werden, dass nicht nur ATTO647N, sondern auch Cy5 dieses Verhalten zeigt. Bei Letzterem konnte der Rückgang der Zählraten bei 476 nm durch MEA weitgehend verhindert werden.

### **TrALEx entwirrt konkurrierende FRET-Pfade**

Bei der Betrachtung des photonischen Drahts, einer Kaskade FRET-fähiger Farbstoffe an doppelsträngiger DNA, konnte der gerichtete Energietransfer erfolgreich mit TrALEx nachgewiesen werden. Die Selektion vollständig hybridisierter photonischer Drähte wurde durch TrALEx ermöglicht und durch die homogene Verteilung der Abstände und sowie der Stöchiometrie bestä-

tigt. Im Vergleich zu Ensemblemessungen als auch zu den Einzelmoleküldaten von Heilemann [60] wurden geringere Transfereffizienzen beobachtet. Die Verringerung konnte auf eine scheinbare Änderung der Quanteneffizienz von ATTO647N zurückgeführt werden. Diese ist durch ein frühzeitiges Bleichen des Farbstoffs unter dem Einfluss der Laseranregung bei 476 nm zu erklären.

Mit dem zweiten Modellsystem, einem Stern aus drei DNA-Strängen, ergaben sich bereits in der Ensemblespektroskopie unerwartet niedrige Energieüberträge zwischen den Farbstoffen. Aufgrund von Simulationen mit `mfold` wurde eine vollständige Hybridisierung aller drei DNA-Stränge erwartet. Das Design wurde auf Messungen mit TrALEX optimiert, so dass die Farbstoffe ATTO488 bzw. Rh110 als Donor fungierten, ATTO565 bzw. AlexaFluor 568 als mittlerer Farbstoff und schließlich ATTO647N als Akzeptor. Die sternförmige Anordnung der hybridisierten DNA resultiert in einem theoretischen Abstand zwischen benachbarten Farbstoffen von 4.8 nm. Dieser ist geringer als die Försterradien aller Farbstoffkombinationen und bedeutet einen Energietransfer von 83% vom ATTO488 auf ATTO565, 92% von ATTO565 auf ATTO647N und 64% von ATTO488 auf ATTO647N, jeweils unter der Annahme frei rotierender Farbstoffe. Dies entspricht einem totalen Energietransfer von fast 82%.

Im Ensemble ist ein totaler Energietransfer über alle Stationen von 10% zu beobachten. Die größte Energietransfereffizienz findet zwischen den Strängen B und C von ATTO565 auf ATTO647N statt (21%). Dies kann an einer inhomogenen Probe mit unvollständiger Hybridisierung liegen. Der Übergang zur SMFS mit TrALEX konnte eine Population mit allen drei Farbstoffen selektieren. Diese zeigte insgesamt höhere Transferraten als im Ensemble. Ein geringer Energietransfer von ATTO488 auf ATTO647N von 12% (7.4 nm), 20% Transfer auf ATTO565 (7.9 nm) und einem Transfer von 32% von ATTO565 auf ATTO647N (8.1 nm). Aufgrund der berechneten Abstände ist von der vorhergesagten sternförmigen Anordnung der Farbstoffe auszugehen.

Die vergleichsweise geringen Energietransferraten können nicht durch das Bleichen von ATTO647N alleine erklärt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die Farbstoffe sich an dem DNA-Stern sehr wohl wechselseitig beeinflussen können. Hinweise auf Photochemie durch unterschiedliche Strukturen bei einer Drei-Wege-Kreuzung sind z.B. in [122] gegeben. Eventuell können aber auch Spannungen im Stern zu normalerweise energetisch ungünstigeren Konstrukten führen, die unter diesen Bedingungen stabiler sind. Durch die Betrachtung weiterer Subpopulationen der gleichen Daten wird diese Annahme gestärkt. Dort wurden etwas größere Transferraten zwischen

den DNA-Strängen A und B (22%) bzw. A und C (16%) beobachtet, wenn nicht vorausgesetzt wurde, dass alle Farbstoffe vorhanden sind. Dies weist auf stabilere Paare aus zwei DNA-Strängen, die sich nicht als Stern formieren.

Immobilisierte Proben sind mit TrALEx ebenfalls zugänglich. Dies bewies das Studium des immobilisierten photonischen Drahts. Diese Moleküle zeigten auch mit TrALEx die typischen Eigenschaften von Farbstoffen: Blinking, Übergang in den Triplettzustand und Photozerstörung. Trotz eines hohen FRET wurde der stärkste Emitter nicht immer als Erster gebleicht. Dies ist bei dem Design neuer Proben von großem Interesse.

### Weiterführende Forschung mit TrALEx

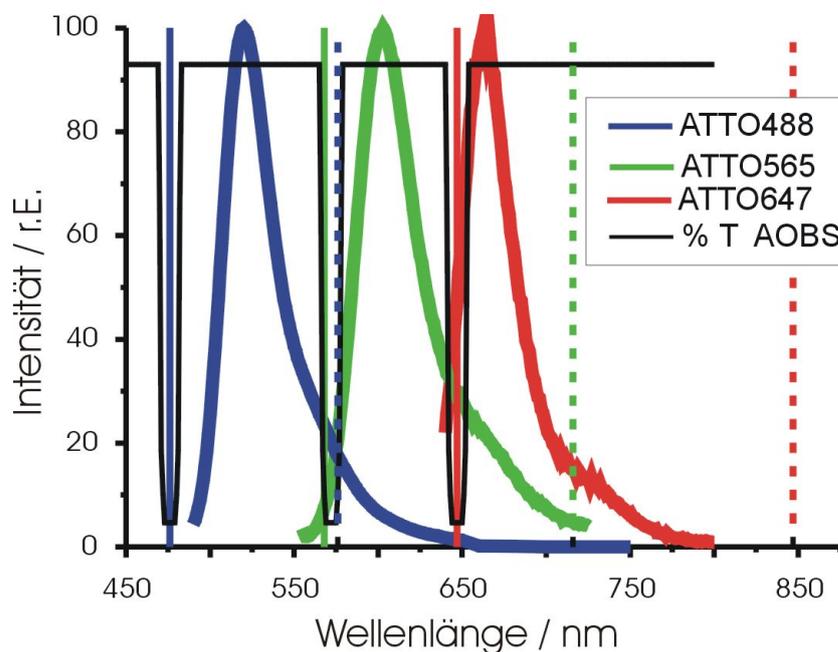
Die Möglichkeiten von TrALEx selbst sind noch lange nicht ausgeschöpft. Die neue Erweiterung der Einzelmolekülspektroskopie ermöglicht die Beantwortung vielfältiger Fragestellungen gerade im Rahmen der Biophysik. Mit TrALEx können Abstände in einem Bereich von zwei bis zehn Nanometern gemessen werden. Durch Triangulation kann die zweidimensionale Auflösung verbessert werden. Weiterhin ist TrALEx nicht beschränkt auf FRET. Der vorgestellte stöchiometrische Index liefert für Abstände außerhalb des Försterregimes Informationen über die Zusammensetzung einzelner Molekülkomplexe.

Eine tiefer gehende Einsicht in die Abläufe innerhalb des Energietransfers ist durch den Einsatz gepulster Laser möglich. Da diese jedoch nicht im Multiline-Modus arbeiten können, sind wiederum mehrere Lichtquellen einzusetzen. Eine sehr gute Alternative sind Laserdioden. Ihr Einsatz erspart zugleich einen AOTF, da sich Laserdioden häufig über einen externen Zeitgeber ansteuern lassen. Dies bedeutet auch eine wesentlich höhere Alternierungsrate. Teilweise kommen Systeme mit zwei Laserdioden bereits zum Einsatz (PIE<sup>1</sup> [123], ns-ALEX [124]), jedoch sind grüne Laserdioden noch nicht verfügbar.

Eine weitere Verbesserung bildet die Auswahl geeigneter Strahlteiler. Ihre Aufgabe ist es, die Fluoreszenz von den Anregungswellenlängen und dem auftretenden Ramanstreulicht zu trennen. Gleichzeitig muss eine hohe Transmission des Fluoreszenzsignals gewährleistet sein, um keine Photonen zu verlieren. Die Auswahl der Anregungswellenlängen ist durch den Einsatz dichroitischer Strahlteiler begrenzt. Eine Variante besteht darin, anstelle eines

---

<sup>1</sup>Pulsed Interleaved Excitation



**Abbildung 5.2:** Transmission eines AOBS im Zusammenhang mit den Fluoreszenzspektren einer möglichen Farbstoffkombination.

Strahlteilers ein dünnes Quarzglas zu verwenden. Die Reflexe des Lasers an deren Oberfläche reichen zur Anregung aus. Eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses kann hingegen durch den Einsatz eines Strahlteilers auf Grundlage des akusto-optischen Effekts (AOBS<sup>2</sup>) beruhen. Dieser könnte mit dem AOTF synchronisiert betrieben nur jeweils die Anregungswellenlänge und deren rotverschobene Ramanlinie selektiv filtern. Diese Filter besitzen sehr schmale Filterbanden, so dass eine Verbesserung der Signalstärke über das gesamte Spektrum zu erwarten ist. Gleichzeitig ist keine Bindung der Wellenlängen an die Ramanlinie notwendig, so dass ein größerer spektraler Bereich abgedeckt wird. Durch die freie Auswahl der Wellenlänge ist auch der Einsatz von mehr als drei Farbstoffen und Anregungswellenlängen denkbar. Zusammen mit TCSPC könnten komplexe Vorgänge aufgelöst werden, so dass eine Rekonstruktion der dreidimensionalen dynamischen Organisation von Molekülkomplexen möglich wird.

<sup>2</sup>Acousto Optical Beam Splitter (Leica)

## 5.2 Pflanzliche vakuoläre $H^+$ -ATPase

Die vakuoläre  $H^+$ -ATPase (VHA) stellt als biomolekularer Komplex mit ihren zwölf verschiedenen Untereinheiten für den derzeitigen Stand der Forschung eine Herausforderung dar. Trotz ihrer Bedeutung z.B. für die Ansäuerung der Vakuole gegenüber dem Cytoplasma und ihrer weiten Verbreitung, hat sich dieser Komplex als vergleichsweise instabil für Experimente *in vitro* erwiesen. Die funktionelle Rekonstruktion von aus Wurzelzellen isolierten ATPasen konnte bereits gezeigt werden [117, 125], daher stellt die Untersuchung der Dissoziation und Reassemblierung der aus *mesembryanthenum crystallinum* gewonnenen ATPasen mit der Einzelmolekülspektroskopie einen ersten Schritt zur Auflösung der räumlichen Organisation dar. Die stufenweise Integration aller Untereinheiten in den Gesamtkomplex kann schließlich in eine detaillierte Strukturauflösung unter Erhaltung der Funktion führen.

Weiterhin stellen die Wechselwirkungen zwischen einzelnen Untereinheiten sowie die Formierung von stabilen Teilkomplexen einen weiteren Schritt in der Aufklärung der regulativen Wirkung dieser selbständigen Assemblierung dar. Die Interaktionen zwischen den Untereinheiten oder zwischen Teilkomplexen ist ebenso wie die Funktionsweise oder das Vorkommen des Gesamtkomplexes innerhalb der Zellen weitgehend unbekannt. Das Aufklären von Interaktionen einiger Proteinuntereinheiten und die Assemblierung des Gesamtkomplexes bilden Gegenstand der hiesigen Untersuchung.

### Chimäre Proteinuntereinheiten zeigen keine Wechselwirkung

Mit Hilfe der GFP Varianten eCFP und eYFP wurde untersucht, ob eine Komplexbildung der chimären Proteine VHA-A-CFP und VHA-B-YFP zu beobachten ist. Unter den gegebenen Bedingungen konnte im Ensemble maximal ein 2%-iger Energietransfer beobachtet werden. Dies kann entweder an einem großen, nicht gebundenen Anteil liegen, oder daran, dass die beiden Einheiten *in vitro* keine Wechselwirkung aufweisen. Die Zugabe einer weiteren, den Kopf eventuell stabilisierenden Untereinheit (VHA-E), zeigte keinen Einfluss auf die gemessenen Transfereffizienzen. Die verwendeten Proteinfarbstoffe sind jedoch nicht ausreichend photostabil, so dass ein Wechsel auf die Einzelmolekülebene nicht möglich war. Ein nachträgliches Anfärben durch organische Farbstoffe wurde aufgrund der in Lösung verbliebenden Lysozyme verhindert.

### VHA kann *in vitro* reassemblieren

Das Destabilisieren und Reassemblieren des solubilisierten Gesamtkomplexes der VHA konnte erfolgreich mit FRET im Ensemble und durch Einzelmolekülmessungen nachgewiesen werden. Die isolierte ATPase wurde dazu in zwei Proben aufgeteilt und jeweils mit einem der Farbstoffe Rh110 bzw. ATTO590 statistisch markiert. Zur Destabilisierung wurden 500 mM Kaliumjodid bei gleichzeitiger Anwesenheit von Magnesiumionen und ATP verwendet. Die Reassemblierung wurde durch Dialyse in nativen Lysepuffer bei pH 8 erreicht. Der Nachweis von FRET im Ensemble belegte, dass eine Reassemblierung stattgefunden hat. Während Energietransfer im Ensemble mit 28% relativ gering war, konnte auf Einzelmolekülebene belegt werden, dass sich zwei unterschiedliche Populationen ausbilden. Die FRET-Effizienz lag bei 89% bzw. 26%, woraus sich theoretische Abstände von 4.4 nm bzw. 6.5 nm ergeben. Dies deutet zum einen auf bevorzugte Bindungsstellen für aminbindende Farbstoffe hin, zum anderen können diese großen Transfereffizienzen nur durch die Markierung benachbarter Proteinuntereinheiten hervorgerufen werden. Der Einsatz von Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS) konnte belegen, dass keine vollständige Reassemblierung der VHA auftritt. Die Diffusionszeit blieb unterhalb der des markierten Gesamtkomplexes. Im Vergleich mit dem bestehenden Modell der ATPase spricht dies für eine bevorzugte Markierung zweier benachbarter Untereinheiten des hydrophilen Kopfes.

Durch die Immobilisierung der chaotrop behandelten und wieder dialysierten ATPasen auf trockenen Glasoberflächen konnte der Markierungsgrad pro ATPase mit fünf abgeschätzt werden. Das Verhältnis von zweifarbigem zu einfach markierter ATPase lag bei etwa 7%. Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass die Fluorophore an dem immobilisierten Proteinkomplex über FRET interagierten. Der Energieübertrag blieb mit maximal 60% unterhalb des in Lösung beobachteten. Dabei kann die Wechselwirkung der Glasoberfläche mit den Farbstoffen Einfluss haben.

### Untereinheit E bindet am Gesamtkomplex

Der Einbau der Untereinheit E in destabilisierte Gesamtkomplexe konnte nach Dialyse mittels FCS nachgewiesen werden. Die Diffusionszeit wurde gegenüber der Untereinheit E um den Faktor 1.5 erhöht. Dies entspricht einer Massenzunahme von 60 kDa auf etwa 100 kDa, unter der Annahme von kugelförmigen Oberflächen mit homogener Dichte. Verglichen mit den bekannten

Molmassen der VHA entspräche dies einer Bindung mit VHA-A.

Im Zusammenhang mit der Beobachtung von Dimeren der Untereinheit E in Protoplasten [26], wurde versucht, diese *in vitro* ebenfalls nachzuweisen. Dies konnte weder im Ensemble noch mit Hilfe von ALEX auf Einzelmolekülniveau nachgewiesen werden. Sämtliche Ergebnisse deuten hier darauf, dass die Dimerisierung der Untereinheit in nativem Lysepuffer nicht möglich ist. Ebenso konnte die Annahme, dass mehrere Untereinheiten E in dem Gesamtkomplex anzutreffen sind, nicht mit TrALEX bestätigt werden.

### Zukünftige Einzelmolekülexperimente mit der VHA

Der fluoescenzmikroskopische Zugang der VHA hat sich als unerwartet schwierig erwiesen. Gerade das Studium solch komplexer und zugleich empfindlicher Systeme wie die VHA stellt eine enorme Herausforderung an die heutige Wissenschaft dar. Immerhin gehört die Familie der ATPasen zu einer der wichtigsten Energielieferanten für die Zellen von Pflanzen und Tieren. Die Regulierung des Energiehaushalts wird zumindest bei Pflanzen ebenfalls von der VHA vorgenommen. Dies ist besonders unter schwierigen Bedingungen, wie etwa bei Wassermangel oder unter Salzstress von überlebenswichtiger Bedeutung. Daher wird auch in Zukunft versucht werden, das Prinzip der ATPasen zu verstehen und eventuell sogar sinnvoll beeinflussen zu können. Die SMFS bietet weitreichende Möglichkeiten zum besseren Verständnis biologischer Komplexe. Mittels SMFS werden Untersuchungen in natürlicher Umgebung, eventuell selbst in lebenden Zellen ermöglicht.

Für die nahe Zukunft können Experimente mit immobilisierten Komplexen tiefere Einblicke in die Welt der ATPase geben. Nicht nur der schrittweise Transport von  $H^+$  in die Zelle ist dabei von Bedeutung, sondern gerade im Hinblick auf die regulative Wirkung der ATPase, das Zusammensetzen des Komplexes unter dem Einfluss der Umgebung. Aufgrund der Empfindlichkeit der VHA empfiehlt es sich, diese am besten in ihrer natürlichen Umgebung zu lassen. Ein geeigneter Zugang kann daher das Ablegen der Zellmembran auf Oberflächen sein. An dieser können sowohl der Austausch von Untereinheiten als auch die Aktivität beobachtet werden. Eine Kombination mit anderen Verfahren kann dabei sehr sinnvoll sein. Zum Beispiel könnte durch das Aufspüren von Änderungen der lokalen Leitfähigkeit z.B. durch Scanning-Ion-Conductance-Microscopy (SICM), die Position einzelner ATPasen festgestellt werden. Durch SICM können an diesen Stellen selektiv fluoreszierende Marker eingebracht oder lokale Manipulationen vorgenommen werden.

Für diese Experimente sind Farbstoffe notwendig, die an eine wohldefinierte Stelle innerhalb des Komplexes gekoppelt werden können, jedoch die Funktion des Komplexes nicht beeinträchtigen. Die Entwicklung der Proteinfarbstoffe auf GFP-Basis weist in Richtung auf gesteigerte Photostabilität und eine verbesserte Fluoreszenzquantenausbeute. Über die heterologe Expression als chimäre Proteine sind diese als natürliche Lichtquellen gut geeignet. Anstelle der Proteinfarbstoffe, die aufgrund ihrer Größe eventuell zu Behinderungen führen können, ist der Einsatz von fluoreszierenden Markern an definierten Stellen möglich. Dazu werden bisher sämtliche Cysteine bis auf eines ersetzt. Dies kann jedoch auch die Struktur von Proteinkomplexen beeinflussen. Durch das statistische Markieren, wie es in dieser Arbeit eingesetzt wurde, sind einige Fragestellungen ebenfalls zugänglich. Verbleiben z.B. die Proteine zum Färben in der Membran, kann auch darüber eine Selektion erfolgen. Eine andere Entwicklung wäre der Einsatz von Quantendots in biologischen Proben. Diese zeigen praktisch keine Photozerstörung und sind somit für die Messung von langsameren Prozessen von Interesse.

Weiterhin ist es sinnvoll die Strategie einzelne Untereinheiten in den isolierten Gesamtkomplex zu integrieren weiter zu verfolgen. Durch den Austausch verschiedener, markierter Untereinheiten gleichzeitig können die gewonnenen Abstandsinformationen in eine dreidimensionale Karte umgesetzt werden. Mit Aggregatbildung aus zwei oder mehreren heterolog exprimierten Untereinheiten kann die Frage nach stabilen Subkomplexen und der Funktion im Gesamtkomplex angegangen werden. Zusätzlich kann durch den Einsatz von TrALEX auf der Einzelmolekülebene die Anzahl der zu generierenden Proben drastisch reduziert und sofort Aussagen über zweidimensionale Abstandsbeziehungen getroffen werden.

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Spontane und induzierte Übergänge . . . . .	17
2.2	Franck–Condon Prinzip im Jablonski–Diagramm . . . . .	19
2.3	Energieniveauschema . . . . .	20
2.4	Überlapp von ATTO488 und ATTO647N . . . . .	24
2.5	Abhängigkeit von $\kappa^2$ von der Lage der Dipole bei FRET . . . . .	25
2.6	$\kappa^2$ –Verteilung . . . . .	26
2.7	Berechnung der PSF . . . . .	29
2.8	Prinzip der konfokalen Abbildung . . . . .	31
2.9	Simulation von Bursts ohne FRET . . . . .	42
2.10	Simulation von Bursts bei unterschiedlichen $\gamma$ . . . . .	44
2.11	Einfluss der Detektionseffizienz auf den stöchiometrischen Index . . . . .	46
2.12	Transferpfade von Systemen mit drei Fluorophoren . . . . .	47
2.13	Abklingpfade angeregter Zustände . . . . .	48
2.14	Direktanregung und Übersprechen bei TrALEx . . . . .	55
2.15	2D-Verteilungen der stöchiometrischen Indizes . . . . .	57
2.16	Arbeitsmodell der VHA, angelehnt an [82] . . . . .	61
3.1	Übersicht über den TrALEx–Aufbau . . . . .	66
3.2	Innova 70C . . . . .	67
3.3	Beugung in einem AOTF nach Bragg . . . . .	69
3.4	Transmission der Langpassfilter und Strahlteiler bei Verwendung von TrALEx. . . . .	72
3.5	Transmission der Bandpassfilter bei Verwendung von TrALEx . . . . .	73
3.6	Transmission der Filterkombinationen für alle APDs . . . . .	73
3.7	Detektion von Bursts mit unterschiedlichen FRET–Werten . . . . .	75
3.8	Detektionswahrscheinlichkeit der AQR-1x Serie . . . . .	76
3.9	Prinzip des TCSPC der SPC830 (entnommen aus [91]) . . . . .	77
3.10	Flussdiagramm der TrALEx–Ansteuerung. . . . .	79
3.11	Antwortverhalten des AOTF . . . . .	82
3.12	3D-Model des hybridisierten Wire 0409 . . . . .	84

3.13	Sternförmige Anordnung von drei DNA-Strängen, die jeweils zu 50% zu einem anderen Komplementär sind. An den Stellen $x$ , $y$ , $z$ befindet sich aminomodifiziertes Thymidin zum anbinden der Farbstoffe. Ein Strang ist am 5'-Ende mit Biotin modifiziert. . . . .	85
3.14	Mögliche Stamm-Schleifen Struktur vom Strang A. . . . .	87
3.15	Faltung des Sternes aus allen drei Einzelsträngen berechnet mit <code>mfold</code> . . . . .	89
3.16	Suboptimale Faltung des Sternes . . . . .	90
3.17	Bursterkennung anhand von Schwellwerten . . . . .	90
3.18	Detektion von Fluoreszenzlicht aus einer Küvette mit Spektrometer und CCD mit Bildverstärker (ICCD) . . . . .	92
3.19	3D Visualisierung von CFP . . . . .	96
3.20	SDS-PAGE der gereinigten VHA. . . . .	103
3.21	Statistisches markieren des VHA-Gesamtkomplex . . . . .	105
4.1	Setup I: $E_{\text{prox}}$ -S Histogramme sowie korrigierte E Histogramme	110
4.2	$1/S$ gegen $E_{\text{prox}}$ mit Daten aus Setup I . . . . .	111
4.3	$1/S$ gegen $E_{\text{prox}}$ mit Daten aus Setup II . . . . .	111
4.4	Setup II: $E_{\text{prox}}$ -S Histogramme sowie korrigierte E Histogramme	112
4.5	Einzelmolekülspur photonischer Drähte in Lösung mit TrALEx	115
4.6	Photonischer Draht: Stöchiometrischer Index in 2D-Histogrammen	117
4.7	Photonischer Draht: $E_{\text{prox}}$ gegen S in 2D-Histogrammen . . . .	118
4.8	Totaler Energieübertrag $E_{\text{tot}}$ von <b>1</b> auf <b>3</b> des photonischen Drahts . . . . .	119
4.9	Photonischer Draht: E-S 2D-Dichte Histogramm mit $\gamma$ -Korrektur	120
4.10	$E_{\text{prox}}$ -S Diagramm als Kontrolle mit freien Farbstoffen . . . . .	122
4.11	Oberflächenscan des Drahtes mit TrALEx . . . . .	125
4.12	Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz immobilisierter photonischer Drähte . . . . .	127
4.13	DNA-Stern: Ensemblespektroskopie . . . . .	129
4.14	DNA-Stern: Linearkombinationen der Spektren . . . . .	129
4.15	DNA-Stern: Darstellung der TrALEx-Daten in S-S Diagrammen	134
4.16	DNA-Stern: Darstellung der TrALEx-Daten in E-S Diagrammen	135
4.17	Fluoreszenzspektren der chimären Proteine VHA- $A_{CFP}$ und VHA- $B_{YFP}$ bei 420nm angeregt. . . . .	139
4.18	Fluoreszenzspektrum von B-YFP . . . . .	139
4.19	Ramanstreuung am Puffer . . . . .	140
4.20	Fluoreszenzspektren von CFP und YFP am TiSa-Aufbau . . .	141
4.21	Fit von $A_{CFP}B_{YFP}$ . . . . .	142

4.22	Ensemblespektroskopie von VHA mit Rh110 bzw. ATTO590 gefärbt . . . . .	145
4.23	Reassemblierung der chaotrop destabilisierten VHA . . . . .	145
4.24	Reaktionskinetik der V-ATPase . . . . .	146
4.25	sm-Spur von VHA mit Rh110 und ATTO590 . . . . .	147
4.26	VHA Komplexe gefärbt mit Rh110 bzw. ATTO590 . . . . .	148
4.27	$E_{\text{prox}}$ -Verteilung der gemeinsam dialysierten Mischung aus VHA- Rh110 und VHA-ATTO590 . . . . .	148
4.28	Oberflächenscan der VHA am konfokalen Mikroskop . . . . .	150
4.29	$E_{\text{prox}}$ -Werte des Oberflächenscans der VHA . . . . .	151
4.30	Intensität und $E_{\text{prox}}$ -Wert immobilisierter ATPase mit AT- TO590 und ATTO655 gefärbt . . . . .	152
4.31	Modell der Untereinheit E . . . . .	152
4.32	FCS von VHA-E . . . . .	153
4.33	FCS von ATTO647N in ATPasepuffer . . . . .	155
4.34	Abhängigkeit der Diffusionszeit von dem Anteil an VHA bei der Dialyse. . . . .	156
4.35	E-S Histogramme von VHA-E . . . . .	158
5.1	Einfluss von 476 nm Anregung auf die Zählrate des ATTO647N . . . . .	165
5.2	Transmission eines AOBs . . . . .	168



# Tabellenverzeichnis

2.1	Nomenklatur der sechs Kanäle aus der Kombination der Anregungswellenlänge und dem Detektor . . . . .	52
2.2	Auflistung ähnlicher Gensequenzen der ATPasen . . . . .	60
2.3	Molekulares Gewicht der VHA-Untereinheiten [83]. . . . .	62
3.1	Spektrum des Innova 70C im cw-Betrieb mit maximalen Pumpstrom (40 A) und offener Austrittsblende (A0) . . . . .	68
3.2	Ramanbanden der symmetrischen O-H Streckschwingung. . . . .	68
3.3	Eigenschaften des AA.AOTF.nC [90] . . . . .	70
3.4	Detektionswahrscheinlichkeit der Farbstoffe . . . . .	74
3.5	Berechnung von $\gamma$ und $\delta$ . . . . .	74
3.6	Kanalzuordnung bei TrALEX . . . . .	83
3.7	Stabilität eines Heterodimer von Stang B und Strang C mit mfold berechnet. . . . .	88
3.8	Stabilität eines Heterodimer von Stang A und Strang C mit mfold berechnet. . . . .	88
3.9	Farbstoffe und deren Eigenschaften . . . . .	97
3.10	Berechnete Försterradien für Farbstoffkombinationen in Å . . . . .	97
4.1	Vergleich der FRET-Werte des photonischen Drahtes . . . . .	121
4.2	Linearkombination aus Absorptionsspektren . . . . .	128
4.3	Mittelwerte der S-Verteilungen. . . . .	133
4.4	Mittelwerte der $E_{\text{prox}}$ -Verteilungen. . . . .	136
4.5	DNA-Stern: Vergleich der FRET-Werte . . . . .	137



# Literaturverzeichnis

- [1] M. Börsch, M. Diez, B. Zimmermann, R. Reuter und P. Graßbe: *Stepwise rotation of the Q-subunit of EF0F1-ATP synthase observed by intramolecular single-molecule fluorescence resonance energy transfer*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 527:147–152, 2002.
- [2] H. Imamura, M. Nakano, H. Noji, E. Muneyuki, S. Ohkuma, M. Yoshida und K. Yokoyama: *Evidence for rotation of V1-ATPase*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 100(5):2312–2315, 2003.
- [3] J. P. Abrahams, A. G. Leslie, R. Lutter und J. E. Walker: *Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria*. Nature, 370(6491):621–628, Aug 1994.
- [4] E. Chen, R. A. Goldbeck und D. S. Kliger: *Nanosecond time-resolved spectroscopy of biomolecular processes*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 26:327–355, 1997.
- [5] P. Tinnefeld und M. Sauer: *Branching out of single-molecule fluorescence spectroscopy: challenges for chemistry and influence on biology*. Angewandte Chemie, 44(18):2642–2671, Apr 2005.
- [6] H. Neuweiler und M. Sauer: *Exploring life by single-molecule fluorescence spectroscopy: molecular characteristics hidden by ensemble experiments can be revealed by fluorescence*. Analytical Chemistry, 77(9):179A–185A, May 2005.
- [7] T. Hirschfeld: *Optical microscopic observation of single small molecules*. Applied Optics, 15:2965, 1976.
- [8] Moerner und Kador: *Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid*. Physical Review Letters, 62(21):2535–2538, May 1989.

- [9] Orrit und Bernard: *Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal*. Physical Review Letters, 65(21):2716–2719, Nov 1990.
- [10] E. Shera, N. Seitzinger, L. Davis, R. Keller und S. Soper: *Detection of single fluorescent molecules*. Chemical Physics Letters, 174:553, 1990.
- [11] R. Rigler und . Mets: *Diffusion of single molecules through a gaussian laser beam*. Proceedings- SPIE The International Society for Optical Engineering, 1921:239–248, 1992.
- [12] W. E. Moerner und M. Orrit: *Illuminating single molecules in condensed matter*. Science, 283(5408):1670–1676, Mar 1999.
- [13] M. Böhmer und J. Enderlein: *Fluorescence Spectroscopy of Single Molecules under Ambient Conditions: Methodology and Technology*. ChemPhysChem, 4:792–808, 2003.
- [14] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir und S. Weiss: *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. Science, 307(5709):538–544, Jan 2005.
- [15] T. Förster: *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 6(2):55–75, 1948.
- [16] T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin und S. Weiss: *Single Molecule Dynamics Studied by Polarization Modulation*. Physical Review Letters, 77(19):3979–3982, 1996.
- [17] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. A. Laurence, S. Doose, E. Margeat und S. Weiss: *Fluorescence-aided molecule sorting: analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 101(24):8936–8941, Jun 2004.
- [18] N. K. Lee, A. N. Kapanidis, Y. Wang, X. Michalet, J. Mukhopadhyay, R. H. Ebright und S. Weiss: *Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation*. Biophysical Journal, 88(4):2939–2953, Apr 2005.
- [19] C. Kluge, P. Lamkemeyer, N. Tavakoli, D. Golldack, A. Kandlbinder und K.-J. Dietz: *cDNA cloning of 12 subunits of the V-type ATPase from Mesembryanthemum crystallinum and their expression under stress*. Mol Membr Biol, 20(2):171–183, 2003.

- [20] J. Liu und Y. Lu: *FRET Study of a Trifluorophore-Labeled DNzyme*. Journal of the American Chemical Society, 124:15208–15216, 2002.
- [21] H. M. Watrob, C.-P. Pan und M. D. Barkley: *Two-step FRET as a structural tool*. Journal of the American Chemical Society, 125(24):7336–7343, Jun 2003.
- [22] M. Heilemann, P. Tinnefeld, G. S. Mosteiro, M. G. Parajo, N. F. V. Hulst und M. Sauer: *Multistep energy transfer in single molecular photonic wires*. Journal of the American Chemical Society, 126(21):6514–6515, Jun 2004.
- [23] T. Gadella: *GFP-based FRET microscopy in living plant cells*. Trends in Plant Science, 4(7):287–291, 1999.
- [24] G. A. Green: *Intracellular oligonucleotide hybridization detected by*. Nucleic Acids Research, 22(4):662ff, 1994.
- [25] T. Seidel, C. Kluge, M. Hanitzsch, J. Ross, M. Sauer, K.-J. Dietz und D. Golldack: *Colocalization and FRET-analysis of subunits c and a of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in living plant cells*. Journal of Biotechnology, 112(1-2):165–175, Aug 2004.
- [26] T. Seidel, D. Golldack und K.-J. Dietz: *Mapping of C-termini of V-ATPase subunits by in vivo-FRET measurements*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 579(20):4374–4382, Aug 2005.
- [27] T. Nielsen, M. Fricke, D. Hellweg und P. Andresen: *High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy*. J Microsc, 201(Pt 3):368–376, Mar 2001.
- [28] J. Kalb, T. Nielsen, M. Fricke, M. Egelhaaf und R. Kurtz: *In vivo two-photon laser-scanning microscopy of Ca<sup>2+</sup> dynamics in visual motion-sensitive neurons*. Biochem Biophys Res Commun, 316(2):341–347, Apr 2004.
- [29] A. Corney: *Atomic and Laser Spectroscopy*. Clarendon Press, Oxford, 1977.
- [30] P. W. Atkins: *Physikalische Chemie*. VCH, Weinheim, 1 Aufl., 1988.
- [31] L. Bergmann und C. Schaefer: *Lehrbuch der Experimentalphysik, Optik*, Bd. III. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 8. Aufl., 1987.

- [32] H. Haken und H. C. Wolf: *Atom- und Quantenphysik: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 6 Aufl., 1996.
- [33] L. Stryer: *Biochemie*. Vieweg, Braunschweig, 4 Aufl., 1987.
- [34] J. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York [u.a.], 2. ed. Aufl., 1999. Includes bibliographical references and index. - Previous ed.: 1983.
- [35] S. J. Strickler und R. A. Berg: *Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules*. The Journal of Chemical Physics, 37(4):814–822, August 1962.
- [36] J. Perrin: *2me conseil de Chimie Solvay Bruxelles*. Gauthier-Villars, Paris, 2:322, 1925.
- [37] J. R. Lakowicz: *Topics in fluorescence spectroscopy*, Bd. 2. Principles. Plenum Press, XV Aufl., 1991.
- [38] R. E. Dale, J. Eisinger und W. E. Blumberg: *The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer..* Biophysical Journal, 26:161–194, 1979.
- [39] B. Schuler, E. A. Lipman, P. J. Steinbach, M. Kumke und W. A. Eaton: *Polyproline and the spectroscopic ruler revisited with single-molecule fluorescence..* Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 102(8):2754–2759, Feb 2005.
- [40] C. Müller: *Entwicklung einer Methode zur zeit- und spektralaufgelösten Präzisionsdistanzmikroskopie auf Einzelmolekülebene*. Doktorarbeit, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, 2003.
- [41] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren und P. Kask: *Fluorescence Correlation Spectroscopy With High Count Rate and Low-Background - Analysis of Translational Diffusion..* European Biophysical Journal, 22:169, 1993.
- [42] S. Nie, D. T. Chiu und R. N. Zare: *Probing Individual Molecules with Confocal Fluorescence Microscopy*. Science, 266(5187):1018–1021, November 1994.
- [43] M. J. Absalon, W. Wu, J. W. Kozarich und J. Stubbe: *Sequence-specific double-strand cleavage of DNA by Fe-bleomycin. 2. Mechanism and dynamics..* Biochemistry, 34(6):2076–2086, Feb 1995.

- [44] M. J. Absalon, J. W. Kozarich und J. Stubbe: *Sequence-specific double-strand cleavage of DNA by Fe-bleomycin. 1. The detection of sequence-specific double-strand breaks using hairpin oligonucleotides..* Biochemistry, 34(6):2065–2075, Feb 1995.
- [45] S. Nie, D. T. Chiu und R. N. Zare: *Real-Time Detection of Single Molecules in Solution by Confocal Fluorescence Microscopy.* Analytical Chemistry, 67(17):2848–2857, 1995.
- [46] J. W. Trauger, E. E. Baird und P. B. Dervan: *Extended hairpin polyamide motif for sequence-specific recognition in the minor groove of DNA..* Chemical Biology, 3(5):369–377, May 1996.
- [47] M. Dahan, A. Deniz, T. J. Ha, D. Chemla, P. Schulz und S. Weiss: *Ratiometric Measurements and identification of single diffusing molecules.* Chemical Physics, 247:85–106, 1999.
- [48] A. A. Deniz, M. Dahan, J. R. Grunwell, T. Ha, A. E. Faulhaber, D. S. Chemla, S. Weiss und P. G. Schultz: *Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: observation of Förster distance dependence and subpopulations..* Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 96(7):3670–3675, Mar 1999.
- [49] T. Ha: *Single-molecule fluorescence resonance energy transfer..* Methods, 25(1):78–86, Sep 2001.
- [50] K. Kinoshita: *Real time imaging of rotating molecular machines..* FA-SEB J, 13 Suppl 2:S201–S208, Dec 1999.
- [51] P. Schuille, S. Kummer, A. A. Heikal, W. E. Moerner und W. W. Webb: *Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins..* Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 97(1):151–156, Jan 2000.
- [52] S. Doose, H. Neuweiler und M. Sauer: *A Close Look at Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan..* ChemPhysChem, 6(11):2277 – 2285, Oct 2005.
- [53] H. Neuweiler, A. Schulz, M. Böhmer, J. Enderlein und M. Sauer: *Measurement of submicrosecond intramolecular contact formation in peptides at the single-molecule level..* Journal of the American Chemical Society, 125(18):5324–5330, May 2003.

- [54] F. L. Pedrotti, L. S. Pedrotti und W. Bausch: *Optik: Eine Einführung*. 1996.
- [55] P. Tinnefeld, D.-P. Herten und M. Sauer: *Photophysical Dynamics of Single Molecules Studied by Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (SFLIM)*. *Journal of Physical Chemistry A*, 105:7989–8003, 2001.
- [56] A. A. Deniz, T. A. Laurence, G. S. Beligere, M. Dahan, A. B. Martin, D. S. Chemla, P. E. Dawson, P. G. Schultz und S. Weiss: *Single-molecule protein folding: diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2.*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 97(10):5179–5184, May 2000.
- [57] A. A. Deniz, T. A. Laurence, M. Dahan, D. S. Chemla, P. G. Schultz und S. Weiss: *Ratiometric single-molecule studies of freely diffusing biomolecules.*. *Annual Reviews Physical Chemistry*, 52:233–253, 2001.
- [58] M. Diez, B. Zimmermann, M. Börsch, M. König, E. Schweinberger, S. Steigmiller, R. Reuter, S. Felekyan, V. Kudryavtsev, C. A. M. Seidel und P. Gräber: *Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound  $F_0 F_1$ -ATP synthase*. *Nature structural and molecular biology*, 2:135–141, 2004.
- [59] R. Clegg: *Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids*. *Methods in Enzymology*, 211(18):353–388, 1992.
- [60] M. Heilemann: *Design of Single-Molecule Optical Devices: Unidirectional Photonic Wires and Digital Photoswitches*. *Doktorarbeit, Universität Bielefeld*, 2005.
- [61] M. A. Medina und P. Schwille: *Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology.*. *Bioessays*, 24(8):758–764, Aug 2002.
- [62] H. Li, L. Ying, J. J. Green, S. Balasubramanian und D. Klenerman: *Ultrasensitive coincidence fluorescence detection of single DNA molecules.*. *Analytical Chemistry*, 75(7):1664–1670, Apr 2003.
- [63] P. Tinnefeld, M. Heilemann und M. Sauer: *Design of molecular photonic wires based on multistep electronic excitation transfer.*. *ChemPhysChem*, 6(2):217–222, Feb 2005.

- [64] The Arabidopsis Initiative: *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*.. Nature, 408:796–815, 2000.
- [65] K. Dietz, N. Tavakoli, C. Kluge, T. Mimura, S. Sharma, G. Harris, A. Chardonnens und D. Golldack: *Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level*.. Journal of Experimental Botanica, 363:1969–1980, 2001.
- [66] C. Kluge, J. Lahr, M. Hanitzsch, S. Bolte, D. Golldack und K.-J. Dietz: *New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase*.. Journal of Bioenergeering and Biomembranes, 35(4):377–388, Aug 2003.
- [67] G. Grüber, H. Wiczorek, W. R. Harvey und V. Müller: *Structure–Function Relationship of A-, F- and V-ATPases*. Journal of Experimental Biology, 204:2597–2605, 2001.
- [68] G. Schäfer, M. Engelhard und V. Müller: *Bioenergetics of the Archaea*.. Microbiol Mol Biol Rev, 63(3):570–620, Sep 1999.
- [69] A. G. Leslie und J. E. Walker: *Structural model of F1-ATPase and the implications for rotary catalysis*.. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 355(1396):465–471, Apr 2000.
- [70] M. Forgac: *Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H(+)-ATPases*. Journal of Experimental Biology, 203:71–80, 2000.
- [71] E. J. Boekema, T. Ubbink-Kok, J. S. Lolkema, A. Brisson und W. N. Konings: *Visualization of a peripheral stalk in V-type ATPase: evidence for the stator structure essential to rotational catalysis*.. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 94(26):14291–14293, Dec 1997.
- [72] J. P. Sumner, J. A. Dow, F. G. Earley, U. Klein, D. Jäger und H. Wiczorek: *Regulation of plasma membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits*.. Journal of Biological Chemistry, 270(10):5649–5653, Mar 1995.
- [73] P. M. Kane: *Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase in vivo*.. Journal of Biological Chemistry, 270(28):17025–17032, Jul 1995.

- [74] H. Wieczorek, G. Grber, W. R. Harvey, M. Huss, H. Merzendorfer und W. Zeiske: *Structure and regulation of insect plasma membrane H(+)-V-ATPase*. Journal of Experimental Biology, 203(Pt 1):127–135, Jan 2000.
- [75] N. Iwabe, K. Kuma, M. Hasegawa, S. Osawa und T. Miyata: *Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 86(23):9355–9359, Dec 1989.
- [76] Ihara, Abe, Sugimura und Mukohata: *Halobacterial A-ATP Synthase in Relation to V-ATPase*. Journal of Experimental Biology, 172(Pt 1):475–485, Nov 1992.
- [77] V. Müller, C. Ruppert und T. Lemker: *Structure and Function of the A1A0-ATPases from Methanogenic Archaea*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 31(1):15–27, 1999.
- [78] K. Yokoyama, K. Nagata, H. Imamura, S. Ohkuma, M. Yoshida und M. Tamakoshi: *Subunit Arrangement in V-ATPase from Thermus thermophilus*. Journal of Biological Chemistry, 278(43):42686–42691, 2003.
- [79] H. Imamura, M. Takeda, S. Funamoto, K. Shimabukuro, M. Yoshida und K. Yokoyama: *Rotation scheme of V1-motor is different from that of F1-motor*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 102(50):17929–17933, 12 2005.
- [80] L. A. Graham und T. H. Stevens: *Assembly of the Yeast Vacuolar Proton-Translocating ATPase*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 31:39–47, 1999.
- [81] K. J. Dietz und B. Arbinger: *cDNA sequence and expression of subunit E of the vacuolar H(+)-ATPase in the inducible Crassulacean acid metabolism plant Mesembryanthemum crystallinum*. Biochim Biophys Acta, 1281(2):134–138, Jun 1996.
- [82] C. Kluge: *Der Multiproteinkomplex der vakuolären H+ATPase höherer Pflanzen: Klonierung, Expression und subzelluläre Lokalisation der Untereinheiten*. Doktorarbeit, Universität Bielefeld, 2002.
- [83] H. Sze, S. K., M. Muller, S. Padmanaban und L. Taiz: *A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H(+)-ATPase*. Trends Plant Science, 7:157–161, 2002.

- [84] C. Kluge, T. Seidel, S. Bolte, S. S. Sharma, M. Hanitzsch, B. Satiat-Jeunemaitre, J. Ross, M. Sauer, D. Golldack und K.-J. Dietz: *Subcellular distribution of the V-ATPase complex in plant cells, and in vivo localisation of the 100 kDa subunit VHA-a within the complex..* BMC Cell Biol, 5:29, Aug 2004.
- [85] H. Arai, G. Terres, S. Pink und M. Forgac: *Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump..* Journal of Biological Chemistry, 263(18):8796–8802, Jun 1988.
- [86] K. J. Parra, K. L. Keenan und P. M. Kane: *The H Subunit (Vma13p) of the Yeast V-ATPase Inhibits the ATPase Activity of Cytosolic V1 Complexes.* Journal of Biological Chemistry, 275(28):21761–21767, 2000.
- [87] M. Sagermann und B. Matthews: *Cloning, expression and crystallization of VMA13p, an essential subunit of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase of Saccharomyces cerevisiae..* Acta Crystallographica, 56:475–477, 2000.
- [88] Z. Zhang, C. Charsky, P. M. Kane und S. Wilkens: *Yeast V1-ATPase: affinity purification and structural features by electron microscopy..* Journal of Biological Chemistry, 278(47):47299–47306, Nov 2003.
- [89] COHERENT, 5100 Patrick Henry Drive, Santa Clara, CA 95054: *Innova 70C Series Ion Laser Operator's manual*, A Aufl., nov 2002.
- [90] A-A OPTO-ELECTRONIC, Saint-Rémy lès Chevreuse, France: *Operating Manual, Acousto Optic Tunable Filters AA.AOTF.nC & driver AA.MOD.nC Polychromatic Modulation System*, 2 2004.
- [91] BECKER & HICKL GMBH: *Time-Correlated Single Photon Counting Modules Multi SPC Software SPC-134 SPC-144 SPC-600 SPC-630 SPC-700 SPC-730 SPC-830*, May 2004.
- [92] R. Eckel, S. D. Wilking, A. Becker, N. Sewald, R. Ros und D. Anselmetti: *Single-molecule experiments in synthetic biology: an approach to the affinity ranking of DNA-binding peptides..* Angewandte Chemie, 44(25):3921–3924, Jun 2005.
- [93] A. Ros, W. Hellmich, T. Duong und D. Anselmetti: *Towards single molecule analysis in PDMS microdevices: from the detection of ultra low dye concentrations to single DNA molecule studies..* Journal of Biotechnology, 112(1-2):65–72, Aug 2004.

- [94] A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Ros und D. Anselmetti: *Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands..* Biophysical Journal, 88(1):404–411, Jan 2005.
- [95] G. Cosa, E. J. Harbron, Y. Zeng, H.-W. Liu, D. B. O'Connor, C. Eta-Hosokawa, K. Musier-Forsyth und P. F. Barbara: *Secondary structure and secondary structure dynamics of DNA hairpins complexed with HIV-1 NC protein..* Biophysical Journal, 87(4):2759–2767, Oct 2004.
- [96] H. Li, X. Ren, L. Ying, S. Balasubramanian und D. Klenerman: *Measuring single-molecule nucleic acid dynamics in solution by two-color filtered ratiometric fluorescence correlation spectroscopy..* Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 101(40):14425–14430, Oct 2004.
- [97] S. A. McKinney, E. Tan, T. J. Wilson, M. K. Nahas, A.-C. Déclais, R. M. Clegg, D. M. J. Lilley und T. Ha: *Single-molecule studies of DNA and RNA four-way junctions..* Biochemical Society Transaction, 32(Pt 1):41–45, Feb 2004.
- [98] T. J. Fu, Y. C. Tse-Dinh und N. C. Seeman: *Holliday junction crossover topology..* Journal of Molecular Biology, 236(1):91–105, Feb 1994.
- [99] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer und P. Tinnefeld: *Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch..* Journal of the American Chemical Society, 127(11):3801–3806, Mar 2005.
- [100] T. Kato, K. Yano, K. Ikebukuro und I. Karube: *Interaction of three-way DNA junctions with steroids..* Nucleic Acids Research, 28(9):1963–1968, May 2000.
- [101] R. A. Dimitrov und M. Zuker: *Prediction of hybridization and melting for double-stranded nucleic acids.* Biophysical Journal, 87:215–226, 2004.
- [102] J. Enderlein, D. L. Robbins, W. P. Ambrose und R. A. Keller: *Molecular Shot Noise, Burst Size Distribution, and Single-Molecule Detection in Fluid Flow: Effects of Multiple Occupancy.* Journal of Physical Chemistry A, 102(30):6089–6094, 1998.

- [103] SPECTRA-PYSICS, 1335 Terra Bella Avenue, Mountain View CA 94043: *Tsunami, Modelocked Ti:Sapphire Laser, User's manual*, B Aufl., dec 1999.
- [104] ACTON RESEARCH: *Handbuch zum Spektrometer Spectra Pro 275*, 1993.
- [105] PCO: *Grundprinzipien der Bildverstärker*, 1998.
- [106] S. T. Hess, S. Huang, A. A. Heikal und W. W. Webb: *Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review..* Biochemistry, 41(3):697–705, Jan 2002.
- [107] E. Haustein und P. Schwille: *Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy..* Methods, 29(2):153–166, Feb 2003.
- [108] O. Krichevsky und G. Bonnet: *Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications.* Reports on Progress in Physics, 65(2):251–297, 2002.
- [109] O. Shimomura, F. H. Johnson und Y. Saiga: *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea..* J Cell Comp Physiol, 59:223–239, Jun 1962.
- [110] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast und M. J. Cormier: *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein..* Gene, 111(2):229–233, Feb 1992.
- [111] R. Siegel, F. Chan, D. Zacharias, R. Swofford, K. Holmes, R. Tsien und M. Lenardo: *Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein..* Science stke, 38:1–6, 2000.
- [112] R. Y. Tsien: *The green fluorescent protein..* Annual Review of Biochemistry, 67:509–544, 1998.
- [113] J. Henderson und S. Remington: *Crystal structures and mutational analysis of amFP486, a cyan fluorescent protein from Anemonia majano..* Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 6;102(36):12712–7. Epub 2005 Aug 24., 102:12712–12717, 2005.

- [114] J. Chen, J. B. Anderson, C. DeWeese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geyer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Madej, A. Marchler-Bauer, G. H. Marchler, R. Mazumder, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, A. R. Panchenko, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. J. Yin und S. H. Bryant: *MMDB: Entrez's 3D-structure database..* Nucleic Acids Research, 31(1):474–477, Jan 2003.
- [115] A. Bioscience (Hrsg.): *Gel Filtration, Principles and Methods*. Amersham Bioscience, 2002.
- [116] R. Gräf, W. R. Harvey und H. Wiczorek: *Purification and Properties of a Cytosolic V1-ATPase*. Journal of Biological Chemistry, 271(34):20908–20913, 1996.
- [117] J. M. Ward, A. Reinders, H.-T. Hsu und H. Sze: *Dissociation and Reassembly of the Vacuolar H<sup>+</sup>ATPase Complex from oat roots*. Plant Physiology, 99:161–169, 1992.
- [118] L. Stryer: *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler*. Annual Review of Biochemistry, 47(1):819–846, Juli 1978.
- [119] P. Tinnefeld, J. Hofkens, D.-P. Herten, S. Masuo, T. Vosch, M. Cotlet, S. Habuchi, K. Müllen, F. C. D. Schryver und M. Sauer: *Higher-excited-state photophysical pathways in multichromophoric systems revealed by single-molecule fluorescence spectroscopy..* Chemphyschem, 5(11):1786–1790, Nov 2004.
- [120] T. A. Laurence und S. Weiss: *Analytical chemistry. How to detect weak pairs..* Science, 299(5607):667–668, Jan 2003.
- [121] E. Haustein, M. Jahnz und P. Schwille: *Triple FRET: a tool for studying long-range molecular interactions..* Chemphyschem, 4(7):745–748, Jul 2003.
- [122] U. Santhosh und G. B. Schuster: *Long-distance radical cation reactions in DNA three-way junctions: inter-arm interaction and migration through the junction..* Nucleic Acids Research, 31(19):5692–5699, Oct 2003.
- [123] B. K. Müller, E. Zaychikov, C. Bräuchle und D. C. Lamb: *Pulsed interleaved excitation..* Biophysical Journal, 89(5):3508–3522, Nov 2005.

- [124] T. A. Laurence, X. Kong, M. Jager und S. Weiss: *Probing structural heterogeneities and fluctuations of nucleic acids and denatured proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 102(48):17348–17353, 2005.
- [125] J. M. Ward und H. Sze: *Isolation and functional reconstruction of the vacuolar H(+)-ATPase..* Methods Cell Biol, 50:149–160, 1995.



# Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Angewandten Laserphysik und Laserspektroskopie, mit deren Unterstützung diese Arbeit realisiert werden konnte. Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Markus Sauer und Dr. Philip Tinnefeld, die mich während der gesamten Dissertation unterstützten und dieser Arbeit durch die Konzentration auf die Einzelmolekülspektroskopie einen wesentlichen Vortrieb gebracht haben. Viele der in Diskussionen entstandenen Ideen und praktischen Tipps sind in diese Arbeit eingeflossen. Erinnern möchte ich auch an Prof. Dr. Andresen, der die Grundsteine dieser Arbeit gelegt hat.

Miriam Hanitzsch und Thorsten Seidel aus der Fakultät für Biologie danke ich für die aufwendige Präparation der ATPase und deren Untereinheiten, sowie für deren Geduld bei der Darstellung molekularbiologischer Zusammenhänge.

Mein Dank geht auch an Dr. Mike Heilemann für seine Einführung in die Welt der einzelnen Photonen, an Dr. Christian Müller und Andreas Biebricher für ihre oft unkonventionellen aber dennoch hilfreichen Ratschläge, sowie an Hannes Barsch für die Mithilfe bei der Modellierung der DNA-Proben. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Dirk-Peter Hertel und Christian Roth für ihre Unterstützung in der Programmierung von Steuerung und Auswertung bedanken, sowie bei Dr. Sören Dörmann für die Einblicke in die FCS.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und Freunden für ihre andauernde Unterstützung bedanken und ganz besonders bei meiner Frau Carla Roß für ihr Verständnis und ihre Liebe in den letzten Jahren.