

**Sylvia Berger**

---

**Untersuchung der Einzelmoleküldynamik mit  
multidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie**

---



**Cuvillier Verlag Göttingen**

# **Untersuchung der Einzelmoleküldynamik mit multidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Sylvia Berger  
aus Essen

Göttingen 2001

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

**Berger, Sylvia:**

Untersuchung der Einzelmoleküldynamik mit multidimensionaler  
Fluoreszenzspektroskopie / vorgelegt von Sylvia Berger. -

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2001

Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-89873-434-X

D 7

Referent: Prof. Dr. J. Troe

Korreferent: Prof. Dr. A. de Meijere

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2001

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung  
des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile  
daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie)  
zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2001

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-434-X

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1998 bis September 2001 in der Abteilung Spektroskopie und photochemische Kinetik am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen angefertigt.

Ich danke dem Direktor der Abteilung, Herrn Prof. Dr. J. Troe, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen und für die Betreuung seitens der Georg-August-Universität Göttingen. Ebenso danke ich Prof. Dr. A. de Meijere für seine Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. C. Seidel für die Anleitung zu dieser Arbeit, seine freundschaftliche und engagierte Unterstützung und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Den derzeitigen Mitgliedern des Arbeitskreises M. Antonik, S. Felekyan, B. Frederichs, M. König, V. Kydryatsev, R. Kühnemuth, C. Sandhagen und E. Schweinberger danke ich für ihre Zusammenarbeit und wertvolle Unterstützung bei dieser Arbeit ebenso wie den ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises C. Eggeling, J. Fries, E. Haustein, M. Khazarchyán, J. Schaffer, A. Volkmer, und J. Widengren.

Prof. Dr. C. Griesinger und N. Gaiko danke ich für die Zusammenarbeit bei den farbstoffmarkierten Nukleotiden und bei der Untersuchung von Rh6G am Oligonukleotid. Dr. J. Arden-Jacob, Dr. L. Haalck, Dr. M. Sauer und Prof. Dr. O. Wolfbeis danke ich für die Bereitstellung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe.

Prof. Dr. R.S. Goody am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund und den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, O. Kensch, T. Restle, P. Rothwell und B. Wöhr, danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei den Untersuchungen der Reversen Transkriptase. Mein Dank gilt auch A. Scheidig für seine Hilfe bei der Erstellung des Strukturmodells.

Herrn M. Fechner, der Reprostelle am MPI, der ZEWEg und den Mitarbeitern der Gesellschaft für Wissenschaftliche Datenverarbeitung Göttingen (GWDG) danke ich für wertvolle Ratschläge und ihre rasche, zuverlässige Hilfe in allen Computerfragen. Mein Dank gilt auch Dr. E. Tauer und W. Bosch für die Unterstützung bei der Synthese des wasserlöslichen Triplettlöschers. Der Sekretärin der Abteilung, I. Dreger, danke ich für ihre wertvolle Unterstützung in organisatorischen Dingen. Ich danke auch den Mitarbeitern der Werkstätten und der Otto-Hahn-Bibliothek für ihre kompetente Hilfe.

Meinen Freunden und meiner Familie gilt mein ganz besonderer, herzlicher Dank.



# Zusammenfassung

Einer der aufregenden Fortschritte in den Naturwissenschaften ist die Möglichkeit zur direkten Untersuchung von chemischen und biologischen Systemen auf atomarer und molekularer Ebene. Im Allgemeinen werden Wechselwirkungen und chemische Reaktionen auf molekularer Ebene beschrieben, obwohl die Modelle von chemischer Struktur und Dynamik primär aus der Untersuchung von Molekülensembles erhalten werden. Ein wichtiges Problem ist dabei die häufig nicht vorhandene Homogenität des Ensembles. In dieser Hinsicht liefern Experimente mit einzelnen Molekülen neue Informationen, weil die Mittelung über ein Ensemble umgangen wird, und somit die individuellen Eigenschaften der vertretenen Subpopulationen dem Experiment zugänglich sind.

Die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion in einem Mikroskop ist aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Spezifität die bei weitem wichtigste Technik der optischen Einzelmolekülspektroskopie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Untersuchung einzelner Moleküle mit Hilfe der Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) durchgeführt.

Die Verwendung eines konfokalen Mikroskops mit vier Detektoren gewährleistet ein geringes Detektionsvolumen und erlaubt die Untersuchung von frei diffundierenden fluoreszenzmarkierten biologischen Makromolekülen in wässriger Lösung. Während des Durchtritts (in der Größenordnung von ca. 1 ms) eines einzelnen Moleküls durch das Detektionsvolumen wird ein Photonenschauer registriert.

Die Analyse der detektierten Fluoreszenzphotonen bietet die Möglichkeit, simultan die Parameter Fluoreszenzintensität, Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie in zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen zu bestimmen. Dies wird mit dem Begriff der Multidimensionalität der Fluoreszenz beschrieben. Diese Fluoreszenzparameter liefern spezifische Informationen über die chemische Umgebung, die räumliche Orientierung und Beweglichkeit eines einzelnen Fluorophors. Verschiedene Kombinationsmöglichkeiten der erhaltenen Parameter bieten eine umfassende Einsicht in das zu untersuchende Molekülsystem.

Durch den Einsatz von MFD bei Untersuchungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) von einem Donor- auf einen Akzeptorfarbstoff zur Strukturbestimmung biologischer Makromoleküle können die Fluoreszenzeigenschaften beider Farbstoffe simultan beobachtet werden. Einen großen Fortschritt gegenüber bisherigen Studien stellt die quantitative Bestimmung des Energietransfers dar. Mit MFD wird eine gezielte Abstandsbestimmung

## II

einzelner Subpopulationen in einem heterogenen System sowohl über die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffs als auch über die Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe erreicht. Bei Untersuchungen mit Oligonukleotiden folgten die Verteilungen der beiden experimentell ermittelten Parameter den berechneten Standardabweichungen.

Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, Verunreinigungen durch nicht vollständig markierte Moleküle herauszufiltern, so dass ausschließlich die Abstandsbestimmung der FRET-aktiven Spezies möglich ist. Darüber hinaus gestattet MFD die Berücksichtigung einer eventuell auftretenden Photozerstörung beider Farbstoffe in den Untersuchungen von Energietransfer.

Für die Energietransfer-Studien ist es zunächst aber von großer Bedeutung, das Fluoreszenzverhalten und die Bindungsgeometrie der einzelnen Farbstoffe am Molekülsystem zu kennen. Daher wurden die intramolekularen Wechselwirkungen potentieller Donor- und Akzeptorfarbstoffe mit Nucleobasen und Oligonukleotiden untersucht. Ein dabei häufig auftretender Prozess ist die Fluoreszenzlöschung, bei der die dynamische Löschung aufgrund von Stossprozessen und die statische Löschung aufgrund der Komplexbildung mit Löschmolekülen unterschieden werden.

Die Fluoreszenzlöschung der Rhodaminfarbstoffe durch die vier Nucleobasen wurde unter zwei Gesichtspunkten durchgeführt: Zum einen wurde der Farbstoff JF4 - jeweils kovalent an eine Nucleobase gebunden - im Hinblick auf eine Charakterisierung und Unterscheidung der Konjugate anhand der Fluoreszenzlebensdauer auf Einzelmolekülebene untersucht. Dabei wird die Fluoreszenz des Farbstoffs durch statische Löschung so stark gelöscht, dass eine Unterscheidung der verschiedenen Moleküle auf Einzelmolekülebene nicht möglich ist. Zum anderen konnten in der vorliegenden Arbeit mindestens zwei Bindungsgeometrien des Farbstoffs Rhodamin 6G gekoppelt an Oligonukleotiden anhand seiner spezifischen Fluoreszenzlöschung durch die Nucleobase Guanin identifiziert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im Folgenden die Basensequenzen der Oligonukleotide derart modifiziert, dass die Löschung gebundener Rhodaminfarbstoffe weitgehendst ausgeschlossen werden konnte.

In weiteren Untersuchungen mit einfach-markierten Oligonukleotiden hat sich Alexa488 als gut geeignet zur Verwendung als Donorfarbstoff erwiesen, da es wasserlöslich ist, eine lange Fluoreszenzlebensdauer aufweist, eine kurzweilige Fluoreszenz und aufgrund seiner negativen Ladung kaum Wechselwirkung mit dem negativen Phosphatrückgrad der Oligonukleotide in den Einzelmolekülmessungen aufwies.

Die Farbstoffe Cy5 und Bodipy650/665X gebunden an Nucleinsäuren besitzen vergleichbar gute Eigenschaften als Akzeptorfarbstoffe. Nachteilig bei Cy5 ist das Vorhandensein von zwei isomeren Formen, die nicht die gleichen Fluoreszenzeigenschaften besitzen.

In den FRET-Studien an Oligonukleotiden wurden die experimentell ermittelten Abstandswerte mit berechneten Werten aus einem theoretischen Modell des Farbstoffabstands an Oligonukleotiden verglichen. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Farbstoffpaare an Oligonukleotiden für den Einsatz bei der Einzelmolekülspektroskopie untersucht. Danach sind Alexa488 oder Rhodamin 6G als Donorfarbstoff gut geeignet und als Akzeptorfarbstoff Cy5 oder Bodipy650/665X. Mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie konnte Energietransfer von Alexa488 zu den beiden Cy5-Isomeren am Oligonukleotid unterschieden werden.

Die Erfahrungen aus den Untersuchungen mit einfach- und doppelt-markierten Oligonukleotiden wurden auf die Strukturbestimmung der Komplexe des Enzyms Reverse Transkriptase mit verschiedenen Nukleinsäuresubstraten angewendet.

Durch den Einsatz von MFD - erweitert für die Auswertung von Moleküldynamik - konnten drei strukturell verschiedene Komplexe der Reversen Transkriptase mit Nukleinsäuren identifiziert werden. Abstandsänderungen zwischen Donor und Akzeptor aufgrund des Einbaus von Nukleotiden bewiesen das Vorhandensein von zwei enzymatisch „produktiven“ Zuständen. Ferner wurde ein dritter, unproduktiver Komplex beobachtet, der sich strukturell von den anderen beiden Komplexen unterscheidet. Kinetische Studien am Molekülensemble ließen bereits das Vorhandensein solcher Komplexe vermuten; in dieser Arbeit liegt der erste direkte Nachweis ihrer Existenz vor und gibt damit Komplexstrukturen an, die bisher nicht mit Röntgenkristallstrukturanalysen gelöst werden konnten. Die Bestimmung der Abstände zwischen dem Donorfarbstoff an verschiedenen Proteinmutanten und dem Akzeptor gebunden am diversen Substratmolekülen ermöglicht die Berechnung von Strukturmodellen für den unproduktiven und die produktiven Komplexe.

Die hier vorgestellten Ergebnisse demonstrieren die Bedeutung von MFD, verschiedene Fluoreszenzparameter simultan zu registrieren, um eine möglichst vollständige Information über das untersuchte Molekülsystem zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode zur Untersuchung einzelner biologischer Makromoleküle unter physiologischen Bedingungen sehr gut geeignet ist.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>5</b>
<i>2.1 Absorption.....</i>	<i>5</i>
<i>2.2 Zerfallsprozesse eines angeregten Farbstoffmoleküls .....</i>	<i>6</i>
<i>2.3 Fluoreszenz.....</i>	<i>8</i>
2.3.1 Eigenschaften der Fluoreszenz .....	8
2.3.1.1 Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer .....	8
2.3.1.2 Polarisierung.....	10
Das <i>wobbling-in-a-cone</i> -Modell .....	12
2.3.2 Fluoreszenzlöschung.....	13
2.3.2.1 Dynamische Fluoreszenzlöschung .....	13
2.3.2.2 Statische Fluoreszenzlöschung .....	14
2.3.2.3 Quantenausbeuten der Löschung .....	14
2.3.2.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nach Förster .....	15
Bedingungen für Energietransfer.....	16
<i>2.4 Fluoreszenzspektroskopie.....</i>	<i>19</i>
2.4.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	19
2.4.2 Einzelmolekülspektroskopie.....	25
2.4.2.1 Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) .....	25
Zwei verschiedene Auswerteprozessoren .....	25
Bestimmung der verschiedenen Fluoreszenzparameter .....	26
2.4.2.2 Selektive Spektroskopie.....	29
2.4.2.3 Untersuchungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers.....	30
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
<i>3.1 Spektroskopische Methoden.....</i>	<i>33</i>
3.1.1 Absorptionsspektroskopie.....	33
3.1.2 Fluoreszenzspektroskopie .....	33
3.1.2.1 Stationäre Fluoreszenzspektroskopie .....	33
3.1.2.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie .....	34
3.1.2.3 Einzelmolekülspektroskopie mit Multiparameter-Fluoreszenzdetektion .....	34
Lichtquellen.....	34
Detektion der Photonen.....	35
Datenaufnahme.....	36
Auswahl eines Einzelmolekülereignisses.....	37
Bestimmung der Fluoreszenzparameter .....	38
2D-Darstellung.....	40
Vergleich der Signalspitzen-orientierten und der gleitenden Auswertung am Beispiel der Fluoreszenzlebensdauer.....	42

3.1.3 Software für Messungen und Auswertung.....	43
<b>3.2 Untersuchungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers.....</b>	<b>44</b>
3.2.1 Allgemeine Grundlagen.....	44
3.2.2 Eigenschaften der Donor- und Akzeptorfarbstoffe.....	44
3.2.3 Bestimmung der Energietransfer-Parameter.....	45
3.2.3.1 Bestimmung des Überlappungsintegrals.....	46
3.2.3.2 Bestimmung des Försterabstands.....	46
3.2.3.3 Bestimmung der Transfereffizienz und des Fluorophorabstands im Molekül-ensemble.....	47
mit Hilfe der Donorfluoreszenz.....	48
- Fluoreszenzquantenausbeute.....	48
- Fluoreszenzlebensdauer.....	48
- über (ratio) <sub>D</sub> .....	48
mit Hilfe der Akzeptorfluoreszenz.....	49
- über (ratio) <sub>A</sub> .....	50
- über Ratiofunktion R <sub>A</sub> .....	51
Weitere Methoden.....	52
3.2.3.4 Bestimmung der Transfereffizienz und des Fluorophorabstands mittels Multiparameter-Fluoreszenzdetektion.....	53
<b>3.3 Chemikalien.....</b>	<b>54</b>
<b>3.4 Lösungsmittel und Puffer.....</b>	<b>55</b>
<b>3.5 Proben und Probenvorbereitung.....</b>	<b>55</b>
3.5.1 Farbstoffe.....	55
3.5.2 Oligonukleotide.....	55
3.5.3 Mutanten der Reversen Transkriptase.....	56
<b>4 EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Wechselwirkung von Fluoreszenzfarbstoffen mit Nukleinsäuren.....</b>	<b>59</b>
4.1.1 Farbstoffe und Nukleobasen frei in Lösung.....	59
4.1.2 Farbstoff gekoppelt mit Nukleobase.....	61
4.1.2.1 Untersuchungen von Rh6G-markierten Nukleotiden.....	63
4.1.2.2 Untersuchungen von JF4-markierten Nukleotiden.....	64
Spektren, FCS und MFD von konzentrierten Lösungen.....	64
Einzelmolekülmessungen.....	69
Zugabe von Triplettlöschern.....	71
4.1.3 Farbstoff am Oligonukleotid.....	80
4.1.3.1 „Grüne“ Fluoreszenzfarbstoffe.....	80
Rh6G am Oligonukleotid KFO.....	81
- Einzelmolekülmessungen.....	84
- Einschub: Selektive Spektroskopie.....	84
TMR am Oligonukleotid KFO.....	90

- Einzelmolekülmessungen .....	90
Rh6G, RhGr und Alexa488 am Oligonukleotid TKFO .....	91
- Einzelmolekülmessungen .....	92
4.1.3.2 „Rote“ Fluoreszenzfarbstoffe.....	95
Farbstoffe verschiedener Farbstoffklassen am Oligonukleotid.....	95
- Einzelmolekülmessungen .....	100
Zweifach-reaktives Cy5 am Oligonukleotid.....	103
- Einzelmolekülmessungen .....	108
RotS: Eine Alternative zu Cy5? .....	110
- Einzelmolekülmessungen .....	111
4.1.4 Zusammenfassung.....	112
<b>4.2 Untersuchungen von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer an fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden .....</b>	<b>114</b>
4.2.1 Variation des Abstandes von Donor- und Akzeptorfarbstoff .....	116
4.2.1.1 Einzelmolekülmessungen.....	118
4.2.2 Die Cis-Trans-Isomerisierung von Cy5 .....	123
4.2.3 Verwendung verschiedener Akzeptorfarbstoffe .....	124
4.2.3.1 Einzelmolekülmessungen.....	126
4.2.4 Vergleich von verschiedenen Donor-Akzeptorpaaren.....	128
4.2.4.1 Einzelmolekülmessungen.....	129
4.2.5 Zusammenfassung.....	135
<b>4.3 Strukturuntersuchungen und kinetische Studien von HIV-1 Reverser Transkriptase im Komplex mit verschiedenen Nukleinsäuresubstraten.....</b>	<b>136</b>
4.3.1 Einführung .....	136
4.3.1.1 Das Protein und seine Wirkungsweise.....	136
4.3.1.2 Die reverse Transkription.....	137
4.3.1.3 Enzymkinetik .....	139
4.3.1.4 Die Struktur der Reversen Transkriptase .....	140
4.3.2 Experimenteller Teil .....	142
4.3.2.1 Enzymsubstrate .....	142
4.3.2.2 Proteinmutanten .....	143
4.3.2.3 Voruntersuchungen .....	144
4.3.2.4 Untersuchungen der statischen Komplexe mit MFD .....	147
4.3.2.5 Untersuchungen der Polymerisation mit MFD .....	149
4.3.2.6 Modell der Substratbindung.....	151
4.3.2.7 Selektive Spektroskopie.....	154
4.3.3 Zusammenfassung.....	156
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>157</b>

<b>ANHANG .....</b>	<b>169</b>
<b><i>A Der Orientierungsfaktor <math>\kappa^2</math></i> .....</b>	<b>169</b>
<b><i>B Filter für die Spektroskopie</i> .....</b>	<b>171</b>
<b><i>C Farbstoffe</i> .....</b>	<b>173</b>
C1 Strukturen .....	173
C2 Absorptions- und Fluoreszenzspektren .....	175
C3 Weitere spektroskopische Parameter .....	177
C4 Markierung mit Farbstoff .....	178
<b><i>D Sequenzen der Oligonukleotide</i> .....</b>	<b>180</b>
D1 Bei Farbstoff- und FRET-Untersuchungen .....	180
D2 Bei FRET-Untersuchungen .....	181
D3 Bei Untersuchungen der Reversen Transkriptase .....	182
<b><i>E Exciton Splitting</i> .....</b>	<b>183</b>
<b><i>F Ergebnisse der FRET-Studien an Oligonukleotiden mit zwei Donorpopulationen</i> .....</b>	<b>184</b>
<b><i>G Ergebnisse der FRET-Studien an Oligonukleotiden mit verschiedenen Akzeptorfarbstoffen</i> .. ...</b>	<b>185</b>
G1 Einfach-markiert mit Alexa488 .....	185
G2 Farbstoffpaar Alexa488-Alexa633 .....	186
G3 Farbstoffpaar Alexa488-Bodipy650 .....	187
G4 Farbstoffpaar Alexa488-Cy5 .....	188
G5 Farbstoffpaar Alexa488-LCR640 .....	189
G6 Farbstoffpaar Alexa488-MR200 .....	190
G7 Farbstoffpaar Alexa488-RotS .....	191
G8 Farbstoffpaar Alexa488-Sq635 .....	192
<b><i>H Ergebnisse der FRET-Studien an Oligonukleotiden mit verschiedenen Donor-Akzeptorpaaren</i> .....</b>	<b>193</b>
H1 Farbstoffpaar Rh6G-Cy5 .....	193
H2 Farbstoffpaar Rh6G-Bodipy650 .....	194
H3 Farbstoffpaar Cy3-Cy5 .....	195
H4 Farbstoffpaar Cy3-Bodipy650 .....	196
<b><i>I Ergebnisse der Strukturuntersuchungen der Donor-markierten Mutanten von Reverser Transkriptase mit verschiedenen Akzeptor-markierten Substraten</i> .....</b>	<b>197</b>
I1 Mutante Q6C(p66) .....	198
I2 Mutante T27C(p66) .....	199
I3 Mutante K287C(p66) .....	201
I4 Mutante Q6C(p51) .....	203
I5 Mutante K173C(p51) .....	205
I6 Mutante K281C(p51) .....	206
<b><i>J Abkürzungsverzeichnis</i> .....</b>	<b>208</b>

## 1 Einleitung

Untersuchungen molekularer Prozesse chemischer und biologischer Systeme werden im Allgemeinen mit einer großen Anzahl von Molekülen, einem Molekülensemble, durchgeführt. Dabei werden die Eigenschaften der Moleküle gemittelt. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt jedoch in der Regel auf molekularer Ebene. Handelt es sich dabei um ein homogenes System, ist dieser Erklärungsansatz gerechtfertigt.

Die individuellen Eigenschaften der Moleküle in einem heterogenen System können mit Hilfe der *Einzelmolekülspektroskopie* detektiert werden. Dabei werden die Informationen über statistische Verteilungen von Subpopulationen - hervorgerufen durch lokale Umgebungseffekte (statische Inhomogenität) oder über zeitliche Fluktuationen (dynamische Inhomogenität) - auf direktem Weg erhalten. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Extremen ist nur bei ausreichender Zeitauflösung des Experiments möglich.

Pionierarbeiten zur *optischen Detektion einzelner Moleküle* in der Festphase wurden von Moerner und Kador im Jahr 1989 bei tiefen Temperaturen (Moerner, 1989) durchgeführt. Ein Jahr später führte der Einsatz empfindlichster Detektoren zur Detektion einzelner Moleküle in Lösung (Shera, 1990), indem die Farbstoffmoleküle anhand ihres Fluoreszenzsignals beim Durchtritt durch das Laserlicht in einer Kapillarflußzelle registriert wurden. Es konnten einzelne Farbstoffmoleküle eingebettet im Kristall gezeigt werden mit Hilfe von Fluoreszenzanregungsspektren, die das Signal-zu-Hintergrundverhältnis stark erhöhen und somit zu einer erhöhten Empfindlichkeit führten (Orrit, 1990). Die ersten Bilder von immobilisierten Molekülen in wässrigem Medium bei Raumtemperatur wurden von Betzig und Chichester mit einem Raster-Nahfeld-Mikroskop (SNOM) an Oberflächen (Betzig, 1993) erhalten. Die rasche Weiterentwicklung der Einzelmolekülspektroskopie in den letzten Jahren wird auf unterschiedlichsten Gebieten deutlich, wie beispielsweise bei der Untersuchung von Konformationen und Dynamik von Polymeren (Barbara, 1999; English, 2000), des Surface-enhanced-Raman-scattering (Eggeling, 2001b; Kneipp, 1998) sowie der Visualisierung von einzelnen Atomen und Molekülen mit Rastersondentechniken (Tunnel-, Kraft- und Elektronenmikroskopie).

Die aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und Spezifität bei weitem wichtigste Technik zur Detektion und Analyse einzelner Moleküle ist die *laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie* (Goodwin, 1996; Moerner, 1999; Weiss, 1999). Dabei wird zur Erhöhung der Empfindlichkeit in einem kleinen Probenvolumen gearbeitet, in dem sich meist nur ein Molekül befindet, welches von Laserlicht angeregt wird.

Um eine Einzelmoleküldetektion in Lösung mittels laser-induzierter Fluoreszenz zu realisieren, werden unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt: beispielsweise in

Flußsystemen (Dörre, 1997; Goodwin, 1996; Keller, 1996; Lyon, 1997; Zander, 1996a), im Nahfeld (Ruiter, 1997) oder durch die Anregung mit einem evaneszenten Feld (Dickson, 1996; Xu, 1997) sowie mit konfokaler Fluoreszenzspektroskopie (Mets, 1994; Nie, 1994; Nie, 1995; Rigler, 1990). Dabei hängt die molekulare Detektionseffizienz der Techniken von der räumlich abhängigen Faltung aus der Leistungsdichte des Anregungslasers mit der Sammeleffizienz der Optik ab.

In der vorliegenden Arbeit wird ein *konfokales Fluoreszenzmikroskop* verwendet, da es die höchste Detektionseffizienz bietet und ermöglicht, fluoreszenzmarkierte biologische Makromoleküle unter physiologischen Bedingungen in Lösung zu beobachten.

Voraussetzung für die Detektion von Fluoreszenz ist das Vorhandensein eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffs, eines Fluorophors. Dabei wird zwischen intrinsischen und extrinsischen Fluorophoren unterschieden.

Bei *intrinsischen Fluorophoren* handelt es sich beispielsweise um die aromatischen Aminosäuren in einem Protein, die Lichtsammelkomplexe der Photosysteme (Jelezko, 2000) oder Enzyme mit Flavin-Kofaktoren (Lu, 1998). Durch chemische Modifizierung von DNS oder RNS-Basen (Ye, 2000) können ebenfalls intrinsische Fluorophore erhalten werden. In neuerer Zeit wird das Green Fluorescent Protein (GFP) eingesetzt (Dickson, 1997), u.a. weil es in Zellen exprimiert werden kann.

In vielen Fällen werden effiziente Fluoreszenzfarbstoffe wie Rhodamine und Cyanine kovalent an das zu untersuchende System gebunden oder spezifisch in eine Matrix eingebunden (*extrinsische Fluorophore*).

Die Fluoreszenz eines Farbstoffs kann durch verschiedene Parameter charakterisiert werden: durch die Fluoreszenzintensität, die Fluoreszenzlebensdauer, die Anisotropie und den spektralen Bereich.

Die *Fluoreszenzintensität* ist die Anzahl der emittierten Photonen in einem vorgegebenen Zeitintervall. Die *Fluoreszenzlebensdauer* entspricht der Zeit, in der die Population des ersten elektronisch angeregten Zustands auf den Wert  $1/e$  gesunken ist. Dieser Parameter kann durch zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenz nach Anregung des Fluorophors durch kurze Laserpulse erhalten werden. Durch experimentelle Bestimmung der Depolarisation des Fluoreszenzlichts kann der Parameter *Anisotropie* bestimmt werden. Die Anisotropie gibt Aufschluß über die Beweglichkeit des Fluorophors. Darüber hinaus tragen die spektralen Eigenschaften der Absorption und Fluoreszenz zum Molekülverständnis bei (Tamarat, 2000).

Diese Parameter lassen Aussagen über die chemische Umgebung, räumliche Orientierung und Beweglichkeit des Fluorophors zu. So werden beispielsweise durch Stoßprozesse oder Komplexbildung mit sogenannten Löschmolekülen die Fluoreszenzintensität und -lebensdauer erniedrigt.

Eine *Unterscheidung von einzelnen Farbstoffmolekülen* gelang zunächst Shera *et al.* anhand ihrer spektralen Fluoreszenzeigenschaften (Shera, 1990). Später konnte eine Unterscheidung einzelner Moleküle auch über die Fluoreszenzlebensdauer (Müller, 1996; Zander, 1996a) und Fluoreszenzanisotropie (Schaffer, 1999) erzielt werden.

Neben der Identifizierung der charakteristischen photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften eines Moleküls geht die Einzelmolekülspektroskopie in neuerer Zeit dazu über, *biologische Fragestellungen* zu untersuchen (Weiss, 1999). Eine Vielzahl biologischer Systeme wurden bereits erforscht: Membranen (Schmidt, 1996), Proteine und Enzyme (Lu, 1998), DNS (Eggeling, 1998a) und RNS (Zhuang, 2000). Aufbauend auf der Visualisierung einzelner Moleküle (Funatsu, 1995; Sase, 1995) wurden beeindruckende Dynamik-Studien von einzelnen Motorproteinen (Adachi, 2000; Funatsu, 1995) von Kinosita und Yanagida mit ihren Mitarbeitern präsentiert.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Untersuchung einzelner fluoreszierender Moleküle ist die *Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD)* (Eggeling, 2001a) unter Einsatz der BIFL-Technik (Burst Integrated Fluorescence Lifetime) (Brand, 1998; Fries, 1998b; Keller, 1996). Damit ist die simultane Aufnahme der Fluoreszenzparameter Intensität, Lebensdauer sowie Anisotropie in zwei spektralen Bereichen möglich. Zusätzlich besteht mit dieser Technik die Möglichkeit, Moleküle in Bezug auf bestimmte Fluoreszenzparameter selektiv zu erfassen (*Selektive Spektroskopie*) (Eggeling, 1999a; Schaffer, 2000), über die Einzelmolekülereignisse eines Subzustands in einem heterogenen System zu mitteln und mit - gegenüber Einzelmolekülereignissen - verbesserter Statistik weiter zu analysieren.

Eine mögliche Anwendung der Einzelmolekülspektroskopie bietet die Sequenzierung von Nukleinsäuren (Ambrose, 1993; Dörre, 1997; Knemeyer, 2000; Sauer, 2001). Eine Variante dazu beinhaltet die Verwendung eines sogenannten „*intelligenten*“ Farbstoffs. Ein „*intelligenter*“ Farbstoff besitzt in der Umgebung der vier verschiedenen Nukleobasen aufgrund unterschiedlicher Löscheffizienzen vier charakteristische Fluoreszenzlebensdauern. Die Fluoreszenzlöschung von Rhodaminfarbstoffen durch Nukleobasen (Eggeling, 1998a; Nord, 1998; Seidel, 1996) kann hierfür genutzt werden. Der Rhodamin-Farbstoff JF4 zeigte in Löschemperimenten mit Nukleotiden in Lösung ein derartiges Verhalten (Fries, 1998a).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, den *Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer* (FRET) von einem Donorfluorophor auf einen Akzeptorfluorophor mit Einzelmolekülspektroskopie zu untersuchen. Die Untersuchung des Energietransfers kann zur Bestimmung des Abstands zwischen diesen beiden Farbstoffen eingesetzt werden (Clegg, 1992; Förster, 1948; Lakowicz, 1999; van der Meer, 1994). Häufig wurden dazu die bereits erwähnten Rhodamin- und Cyaninfarbstoffe (Norman, 2000) herangezogen, aber auch Oxazine sind untersucht worden

(Sauer, 1998). Dabei ist es von Bedeutung, die Bindungsgeometrie der einzelnen Farbstoffe im zu untersuchenden System zu kennen (Hillisch, 2001). Die Abstandsbestimmung ist bei Distanzen zwischen 10 Å und 100 Å besonders empfindlich, ein Bereich, vergleichbar mit dem Durchmesser vieler Proteine oder der Dicke von Lipidmembranen.

In Ensemblemessungen wurde FRET bereits zur Charakterisierung verschiedener Nukleinsäurestrukturen eingesetzt. Es wurden einerseits B- und Z-DNS-Strukturen untersucht (Clegg, 1993; Hochstrasser, 1992; Jares-Erijman, 1996), andererseits aber auch komplexere Strukturen wie gekrümmte DNS (Gohlke, 1994; Lorenz, 1999), Three-Way-Junctions (Stühmeier, 1997), Hairpins (Vámosi, 1998; Wallace, 2000) und Holliday-Junctions (Miick, 1997).

Im Rahmen der Einzelmolekülspektroskopie wurden mittels FRET bisher u.a. Donor-Akzeptor-Abstände an B-DNS-Molekülen frei in Lösung (Deniz, 1999) und immobilisiert an Oberflächen untersucht (Ha, 1999d). Durch Immobilisierung kann die Beobachtungszeit im Prinzip beliebig ausgedehnt werden; sie ist dann nur durch die endliche (Photo)Stabilität der Fluorophore begrenzt. Intensiv studiert wurden auch Konformationsänderungen der RNA-Stränge in Ribozymen (Zhuang, 2000). In den Arbeiten zur Konformationsdynamik von Nukleinsäuren und Proteinen wurden bislang nur relative Abstandsänderungen und keine absoluten Abstandswerte angegeben (Deniz, 2000; Weiss, 1999; Weiss, 2000).

Die Leistungsfähigkeit von MFD wurde anhand von Studien an doppelt-markierten Oligonukleotiden und Untersuchungen des Enzyms *Reverse Transkriptase* (RT) des human immunodeficiency virus (HIV) demonstriert (Rothwell, 2001). Dieses Enzym spielt eine Schlüsselrolle im Lebenszyklus des Virus, indem es für die Umwandlung viraler RNS in doppelsträngige DNS verantwortlich ist, welche anschließend in das Wirtsgenom integriert wird. Es stellte damit ein Hauptangriffsziel der ersten Therapien gegen HIV-1 dar. Die Ausbildung resistenter Viren erfordert weitere Untersuchungen der Struktur und Funktion von RT. Kinetische Untersuchungen am Molekülensemble ließen auf die Existenz von drei verschiedenen Protein-Substrat-Komplexen schließen (Wöhrl, 1999). Mit MFD konnte das Modell aus den Kinetik-Studien von verschiedenen Komplexen der Reversen Transkriptase bestätigt werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

Im Folgenden werden die physikalischen Grundlagen von Absorption und Fluoreszenz eines Moleküls vorgestellt. Dabei werden die Eigenschaften der Fluoreszenz wie Intensität, Fluoreszenzlebensdauer und Polarisation erläutert sowie die Fluoreszenzlöschung aufgrund von verschiedenen Energieübertragungsmechanismen. In diesem Rahmen wird die Fluoreszenzlöschung durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) ausführlicher behandelt, da die Untersuchung dieses Prozesses einen großen Teil dieser Arbeit einnimmt. Die Fluoreszenz wird im experimentellen Teil mit Hilfe von Korrelationsspektroskopie und der Einzelmolekülspektroskopie durch *Multiparameter-Fluoreszenzdetektion* untersucht, so dass die theoretischen Grundlagen dieser Untersuchungsmethoden ebenfalls im vorliegenden Kapitel erläutert werden.

### 2.1 Absorption

Durch die Wechselwirkung eines Moleküls mit elektromagnetischer Strahlung kann es Energie aufnehmen und ein Elektron aus dem elektronischen Grundzustand in einen energetisch höheren Zustand  $S_1$  übergehen. Diese Anregung eines Moleküls erfolgt gemäß dem Franck-Condon-Prinzip (Atkins, 1988). Nach der Bohr'schen Frequenzbedingung (Gl. 2.1-1) findet Absorption statt, wenn die Energiedifferenz  $\Delta E$  zwischen zwei Energieniveaus einer Wellenlänge  $\lambda$  des elektromagnetischen Spektrums entspricht.

Mit  $h$ , dem Planckschen Wirkungsquantum ( $h = 6,63 \cdot 10^{-34}$  J s),  $c$  der Lichtgeschwindigkeit (im Vakuum:  $c = 2,998 \cdot 10^8$  m s<sup>-1</sup>) und  $\nu$  der Frequenz des Lichts gilt

$$\Delta E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad \text{Gl. 2.1-1}$$

Die Teile eines Moleküls, die für die Absorption im UV-VIS-Bereich (ultravioletter (UV) und sichtbarer (VIS) Bereich (180 bis 800 nm)) verantwortlich sind, werden als chromophor (gr. *chromos* = farbtragend) bezeichnet.

Das Gesetz von Lambert und Beer beschreibt diesen Vorgang durch das Verhältnis von eingestrahelter Lichtintensität  $I_0$  zur transmittierten Lichtintensität  $I$  mit der Extinktion  $E$ , der Konzentration des Chromophors  $c$  [M], der Schichtdicke  $d$  der Probe [cm] und dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  [M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>]. In den eckigen Klammern befinden sich Angaben zur Einheit der jeweiligen Größe. Die Extinktion  $E$  ist definiert als dekadischer Logarithmus von  $I_0/I$  und wird bei einer Schichtdicke der Probe von 1 cm auch als optische Dichte, OD, bezeichnet.

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c d \quad \text{Gl. 2.1-2}$$

Mit Transmission  $T$  [%] wird der Bruchteil des Lichts bezeichnet, der durch die Probe durchgelassen wird.

$$T = 100 \cdot \frac{I}{I_0} \quad \text{Gl. 2.1-3}$$

Ein Absorptionsspektrum (Abb. 2.1-1) läßt sich durch den maximalen Wert des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{\max}$  und der korrespondierenden Wellenlänge  $\lambda_{\max}$  charakterisieren.

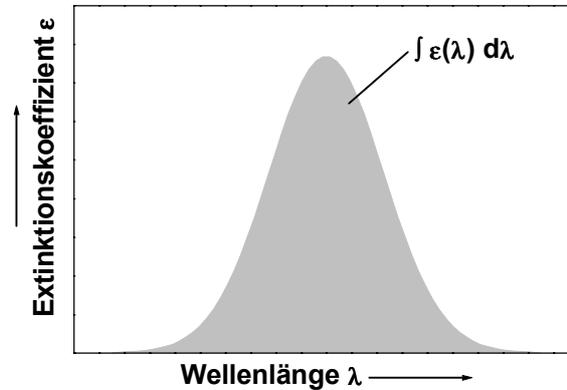


Abb. 2.1-1: Schematisch dargestelltes Absorptionsspektrum  $\epsilon(\nu)$ .

## 2.2 Zerfallsprozesse eines angeregten Farbstoffmoleküls

Für elektronische Übergänge gelten folgende quantenmechanische Auswahlregeln:

- Nach der Laporte'schen Regel sind elektronische Übergänge erlaubt bei denen sich die Parität ändert. Eine Änderung der Parität bedeutet die Änderung des Vorzeichens einer Wellenfunktion durch die Inversion am Molekülzentrum (Atkins, 1988).
- Übergänge zwischen Zuständen gleicher Spinnmultiplizität sind erlaubt. Die Spinnmultiplizität beträgt 1, wenn die Elektronen eines Elektronenpaares antiparallel zueinander ausgerichtet sind (Singulettzustand) und 3, wenn sie parallel zueinander sind (Tripletzustand). Daher sind Übergänge zwischen Singulett- und Tripletzuständen quantenmechanisch verboten.

In Abb. 2.2-1 sind die Reaktionsmöglichkeiten eines angeregten Farbstoffmoleküls anhand eines Jablonski-Diagramms aufgezeigt, wobei die Aufspaltung einzelner elektronischer Zustände in Schwingungszustände angedeutet wird.

Nach der erfolgten Anregung gelangen durch innere Umwandlung ihrer Energie (*internal conversion*, IC) die angeregten Moleküle in den untersten Schwingungszustand des ersten angeregten Zustands. In Lösung geben sie die überschüssige Energie durch Stöße mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen ab. Die entsprechende Geschwindigkeitskonstante heißt  $k_{IC}$  und liegt in der Größenordnung  $10^{-11} \text{ s}^{-1}$  bis  $10^{-12} \text{ s}^{-1}$ . Analog hierzu kann eine strahlungslose Relaxation auch vom untersten Schwingungszustand von  $S_1$  in den elektronischen Grundzustand erfolgen, besitzt jedoch eine geringere Geschwindigkeitskonstante aufgrund der größeren Energiedifferenz.

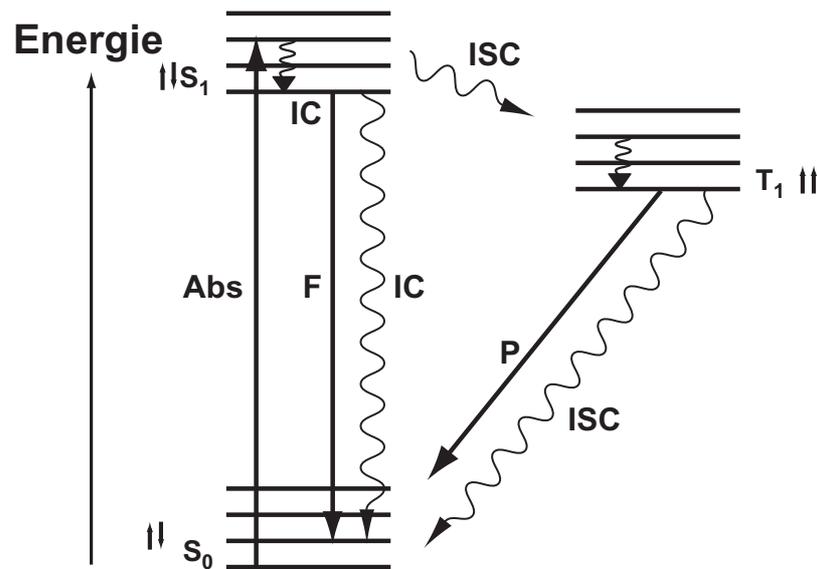


Abb. 2.2-1: Jablonski-Diagramm: Nach Absorption (Abs) von Licht des Grundzustandes  $S_0$  gelangt das Molekül in den ersten angeregten Singulettzustand ( $S_1$ ). Die Depopulation dieses Zustands kann über mehrere Prozesse verlaufen.: IC - innere Umwandlung, F - Fluoreszenz, ISC - Übergänge zwischen Singulettzustand und Triplettzustand ( $T_1$ ), P - Phosphoreszenz. Strahlungsaktive Prozesse sind mit durchgezogenen Linien, strahlungslose Prozesse mit geschwungenen Pfeilen dargestellt. Die Orientierung der zueinander parallel bzw. antiparallel orientierten Spins in den Triplett- bzw. Singulettzuständen stellen kleine Pfeilpaare dar.

Fluoreszenz F findet normalerweise vom niedrigsten Schwingungszustand eines elektronisch angeregten Zustandes in den elektronischen Grundzustand unter der Emission von Photonen statt (Kasha, 1950). Die Geschwindigkeitskonstante dieses Prozesses ist  $k_F$  ( $10^7 \text{ s}^{-1}$  bis  $10^8 \text{ s}^{-1}$ ). Dabei wird Energie in Form von Lichtquanten abgegeben. Fluoreszenzfähige Chromophore werden auch als Fluorophore bezeichnet.

Der elektronische Übergang von einem Singulettzustand in einen Triplettzustand (*intersystem crossing*, ISC) und umgekehrt ist gemäß der Auswahlregeln zwar verboten, kann jedoch aufgrund von Spin-Bahn-Kopplungen stattfinden. Die Depopulation des  $T_1$ -Zustandes kann durch Emission eines Photons (Phosphoreszenz) oder durch strahlungslose Relaxation nach  $S_0$  (ISC) erfolgen. Beide Prozesse sind ebenfalls spinverboten. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_P$  kann dabei Werte zwischen  $10^4 \text{ s}^{-1}$  und  $1 \text{ s}^{-1}$  annehmen. Durch die Erniedrigung der Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplettzustands mit molekularem Sauerstoff in Lösung wird die Geschwindigkeitskonstante  $k_T$  ( $\sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ ), die den Übergang von  $T_1$  nach  $S_0$  beschreibt, beeinflusst.

Das angeregte Farbstoffmolekül kann neben diesen intramolekularen Reaktionen auch intermolekulare Reaktionen eingehen, die im Weiteren beschrieben werden.

## 2.3 Fluoreszenz

### 2.3.1 Eigenschaften der Fluoreszenz

Das Fluoreszenzspektrum bei Anregung mit Licht einer konstanten Wellenlänge besitzt folgende Eigenschaften:

- Die Emissionsbande ist gegenüber der Absorptionsbande in den Bereich höherer Wellenlängen aufgrund der strahlungslosen Relaxation in Schwingungszustände des gleichen Niveaus verschoben. Dieses Phänomen wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet.
- Ein Fluoreszenzspektrum ist i.a. unabhängig von der Anregungswellenlänge.
- Das Absorptionsspektrum ist durch die Schwingungszustände des angeregten Zustands  $S_1$  charakterisiert, während das Fluoreszenzspektrum durch die Schwingungszustände des Grundzustandes  $S_0$  gegeben ist. Liegen die Franck-Condon-Faktoren der Schwingungszustände  $S_1$  und  $S_0$  in der gleichen Größenordnung, sind beide Spektren spiegelbildlich zueinander.
- Durch die Differenz der Dipolmomente des angeregten Zustands und des Grundzustands tritt eine Verschiebung der Absorptions- und Emissionsbanden eines Fluorophors auf. Diese ist abhängig vom Übergangsdipolmoment  $\bar{\mu}$  (s. Polarisation, Kap. 2.3.1.2) und der Lösungsmittelpolarität (Orientierungspolarisation und induzierte Polarisation). Dieses Phänomen wird als Solvatochromie bezeichnet. Bei Zunahme der Lösungsmittelpolarität werden Absorptions- und Fluoreszenzmaxima zu höheren Wellenlängen (bathochrom) verschoben, wobei die Verschiebung für die Fluoreszenz größer ist. Eine Solvatochromie zu niedrigeren Wellenlängen wird Hypsochromie genannt.

#### 2.3.1.1 Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer

Der Anteil der Fluoreszenz an den beschriebenen Zerfallsprozessen aus  $S_1$  wird durch die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  angegeben. Sie beschreibt das Verhältnis der Anzahl der emittierten zur Anzahl der absorbierten Photonen.

$$\Phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbiertes Photonen}} \leq 1 \quad \text{Gl. 2.3-1}$$

Mit den Geschwindigkeitskonstanten der genannten Deaktivierungsprozesse  $k_i$  (F, Fluoreszenz; i = IC, strahlungsloser Relaxation, und ISC, *Intersystem Crossing*) und eines weiteren Prozesses, der Fluoreszenzlöschung Q (engl. *quenching* = Löschung) durch ein Löschmolekül Q ist die Fluoreszenzquantenausbeute folgendermaßen definiert:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i} = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_Q \cdot [Q]} \quad \text{Gl. 2.3-2}$$

$\Phi_F$  ist unabhängig von der Anregungswellenlänge, da die Fluoreszenz immer vom niedrigsten Schwingungsniveau des  $S_1$ -Zustands ausgeht.

Wird ein Fluorophor mit einem kurzen Lichtpuls angeregt, so gilt mit  $N_0$  als Anzahl der fluoreszierenden Moleküle am Zeitpunkt  $t = 0$  und  $N$  als Anzahl der fluoreszierenden Moleküle

$$-\frac{dN}{dt} = k_F \cdot N_0 \quad \text{Gl. 2.3-3}$$

und damit

$$N(t) = N_0 \cdot \exp^{-k_F \cdot t} \quad \text{Gl. 2.3-4}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$  ist als die Zeit  $t$  definiert, in der die Anzahl angeregter Moleküle auf den Anteil  $N_0/e$  abgefallen ist. Sie ist die Zeit, in der sich das Molekül im angeregten Zustand befindet, bevor es fluoresziert und in den Grundzustand zurückkehrt. Aus Gl. 2.3-4 folgt somit

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad \text{Gl. 2.3-5}$$

Diese Fluoreszenzlebensdauer ist die sogenannte „Strahlungslebensdauer“. Bei der experimentell gemessenen Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  müssen zusätzlich die strahlungslosen Prozesse mit berücksichtigt werden. Mit  $k_0$ , der Summe der Geschwindigkeitskonstanten von Fluoreszenz, F, strahlungsloser Relaxation, IC, und *Intersystem Crossing*, ISC, gilt

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_Q [Q]} = \frac{1}{k_0 + k_Q [Q]} \quad \text{Gl. 2.3-6}$$

Die korrespondierende Lebensdauer zu  $k_0$  ist  $\tau_0$ .

Damit kann die Fluoreszenzquantenausbeute auch beschrieben werden als

$$\Phi_F = \frac{\tau}{\tau_F} \quad \text{Gl. 2.3-7}$$

Bei unimolekularen Deaktivierungsprozessen beobachtet man eine monoexponentielle Abnahme der Fluoreszenzintensität  $F$ :

$$F(t) = F(0) \cdot \exp^{-t/\tau} \quad \text{Gl. 2.3-8}$$

wobei  $F(t)$  die Fluoreszenzintensität zur Zeit  $t$  und  $F(0)$  die Fluoreszenzintensität zur Zeit  $t = 0$  nach Anregung des Fluorophors beschreibt.

In vielen Fällen kann es zu einem Abklingverhalten der Fluoreszenz kommen, das nicht mehr nach Gl. 2.3-8 mit einem monoexponentiellem Abklingverhalten zu beschreiben ist - beispielsweise bei Fluoreszenzlöschung (Kapitel 2.3.2). Zur Anpassung der Abklingkurve verschiedener fluoreszierender Spezies muß eine Summe von Exponentialfunktionen herangezogen werden:

$$F(t) = \sum_i x_i \cdot \exp^{-t/\tau_i} \quad \text{Gl. 2.3-9}$$

Die Exponentialfunktion jeder Lebensdauerkomponente startet zum Zeitpunkt  $t = 0$  bei 1, so dass die Amplituden  $x_i$  direkt den Teilchenanteil der jeweiligen Spezies an den insgesamt

vorhanden Molekülen angeben. Die Amplituden  $x_i$  werden als molekulgewichtete Amplituden bezeichnet.

Durch die Normierung der Exponentialfunktionen mit der Lebensdauer der einzelnen Spezies kann folgende Umformung durchgeführt werden:

$$F(t) = \sum_i x_i \cdot \exp^{-t/\tau_i} = \sum_i \frac{1}{\tau_i} \cdot a_i \cdot \exp^{-t/\tau_i} \quad \text{Gl. 2.3-10}$$

Nach Gl. 2.3-10 gilt somit:  $x_i = a_i/\tau_i$ .

Die Amplituden  $a_i$  geben den Anteil der Photonen der einzelnen Zerfallskomponenten an, da es sich um normierte Exponentialfunktionen handelt. Sie werden fluoreszenzgewichtete Amplituden genannt.

### 2.3.1.2 Polarisation

Wird ein Fluorophor mit polarisiertem Licht angeregt, so kann die Fluoreszenzstrahlung zum Teil depolarisiert werden. Als Ursache hierfür kommen folgende Faktoren in Frage:

- Eine ungehinderte Rotation des Fluorophors innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer.
- Durch polarisiertes Licht werden bevorzugt die Fluorophore angeregt, deren Übergangsdipolmomente  $\vec{\mu}$  - die Differenz zwischen dem permanenten Dipolmoment des Grundzustandes und dem Dipolmoment des angeregten Zustandes - parallel zum elektrischen Feldvektor  $\vec{E}$  des Anregungslichtes ausgerichtet sind (Photoselektion). Bei einer Position des Übergangsdipolmoments senkrecht zu  $\vec{E}$  erfolgt keine Anregung.
- Das Ausmaß der Polarisation hängt von der Orientierung des Fluoreszenz-Übergangsdipolmoments ab (Kawski, 1993; Lakowicz, 1999).

Von einem isotropen Verhalten des Fluorophors spricht man, wenn bei der Fluoreszenz keine Raumrichtung bevorzugt wird. Anisotropes Verhalten liegt vor, wenn die Fluoreszenz nicht in allen Raumrichtungen gleich ist.

Zur Beschreibung der Polarisation werden zwei Größen verwendet, die Polarisation  $P$  und die Anisotropie  $r$ . Zur experimentellen Bestimmung beider Größen wird eine Probe mit linear polarisiertem Licht bestrahlt, wobei in Abb. 2.3-1 der Feldvektor  $\vec{E}$  des elektromagnetischen Feldes in der x-z-Ebene liegt.

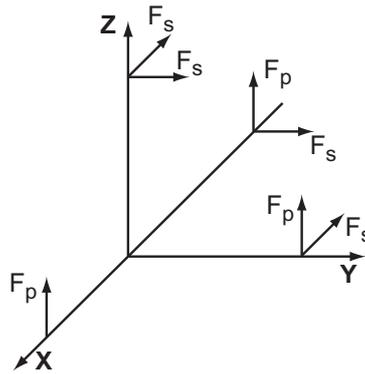


Abb. 2.3-1: Schema zur Bestimmung der Fluoreszenz-Polarisation. Der Feldvektor  $\vec{E}$  des elektromagnetischen Feldes liegt in der x-z-Ebene.

Die Polarisation  $P$  und die Anisotropie  $r$  sind folgendermaßen definiert:

$$P = \frac{F_p - F_s}{F_p + F_s} \quad \text{Gl. 2.3-11a}$$

$$r = \frac{F_p - F_s}{F_p + 2F_s} \quad \text{Gl. 2.3-11b}$$

$F_p$  und  $F_s$  sind die Fluoreszenzintensitäten in paralleler und senkrechter Position zu  $\vec{E}$ . Im Folgenden wird die Anisotropie verwendet, da diese Größe die abgestrahlte Fluoreszenz in allen Raumrichtungen berücksichtigt.

Die Bestimmung der Gesamtfluoreszenzintensität  $F_{\text{ges}} = F_p + 2 \cdot F_s$  kann erfolgen, indem man nicht die einzelnen Fluoreszenzintensitäten  $F_p$  und  $F_s$  detektiert, sondern das emittierte Licht in einem Winkel von  $54,7^\circ$  (*magic angle*) zur Polarisation des Anregungslichtes misst (Lakowicz, 1999). Da die Fluoreszenzintensität proportional zum Quadrat des transmittierten elektrischen Feldes ( $F_{54,7^\circ} \propto \vec{E}_{54,7^\circ}^2$ ) ist, wird wegen  $\sin^2_{54,7^\circ} = 2 \cos^2_{54,7^\circ}$  im Vergleich zur parallel registrierten Intensität die doppelte Intensität senkrecht zur Polarisationsebene des Anregungslichtes registriert.

Für den Fall, dass sich die Orientierung der Übergangsdipolmomente der Absorption und dem der Fluoreszenz im angeregten Zustand nicht ändert und somit der Winkel  $\beta$  zwischen dem Übergangsdipolmomenten unverändert bleibt, gilt

$$r = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{5} \quad \text{Gl. 2.3-12}$$

Für den Winkel  $\beta$  zwischen den beteiligten Übergangsdipolmomenten der Absorption und der Fluoreszenz von  $0 \leq \beta \leq \pi/4$  ergeben sich Werte für die Anisotropie von  $-0,2 \leq r \leq 0,4$ .

Wird berücksichtigt, dass sich die Orientierung der Übergangsdipolmoments innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes ändern kann, gilt die Perrin-Gleichung (Gl. 2.3-13). Hierbei ist die Anisotropie  $r$  mit der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  und der Rotationskorrelationszeit  $\rho$  [ns] verknüpft, wobei  $r_0$  die Anisotropie ohne Veränderung der Orientierung darstellt.

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\rho}} \quad \text{Gl. 2.3-13}$$

Ist die Rotationsbewegung sehr schnell gegenüber der Lebensdauer des angeregten Zustands ( $\tau \gg \rho$ ), ist die Fluoreszenz der Probe vollständig depolarisiert ( $r \approx 0$ ).

Die Rotationskorrelationszeit  $\rho$  wird durch die Viskosität des Lösungsmittels  $\eta$ , die absolute Temperatur  $T$  und das Rotationsvolumen  $V$  des Fluorophors beeinflusst ( $R$  ist die allgemeine Gaskonstante).

$$\rho = \frac{\eta V}{RT} \quad \text{Gl. 2.3-14}$$

Den zeitlichen Verlauf der Anisotropie beschreibt Gl. 2.3-15. Ein monoexponentielles Abklingverhalten ist nur für kugelförmige Moleküle zu erwarten. Ist der Fluorophor kovalent an ein Makromolekül gebunden, ergibt sich ein mehr exponentielles Abklingverhalten der Anisotropie aufgrund der lokalen Beweglichkeit des Farbstoffes sowie der globalen Bewegung des Gesamtmoleküls (Lakowicz, 1999).

$$r(t) = \sum_j r_{0j} \cdot \exp^{-t/\rho_j} \quad \text{Gl. 2.3-15}$$

Für die Amplitude  $r_{0j}$  gilt  $\sum r_{0j} = r_0$ , wobei  $r_0$  die Anisotropie zum Zeitpunkt  $t = 0$  nach der Anregung darstellt.

### ***Das wobbling-in-a-cone-Modell***

Das *wobbling-in-a-cone*-Modell (Kinosita, 1977) beschreibt die Bewegung des Farbstoffs vereinfacht als Diffusion in einem Kegel, wenn dieser an ein biologisches Makromolekül gebunden ist. Es wurde ursprünglich entwickelt, um die Anisotropie von Fluorophoren auf einer Membranoberfläche zu charakterisieren.

Das Modell nimmt ein biexponentielles Abklingverhalten der Anisotropie an mit einer lokalen Beweglichkeit des Fluorophors und einer globalen Beweglichkeit des Gesamtmoleküls. Zur mathematischen Beschreibung dieses Modells muß dabei die Lage des Absorptionsdipolmoments relativ zur Achse des chromophoren Systems bekannt sein. Bei Fluorophoren der Rhodamin-Familie befindet sich dieses entlang der Längsachse des Xanthenringssystems.

Für einen stabförmigen Farbstoff, der an der Oberfläche des Makromoleküls befestigt ist und dessen Absorptionsdipolmoment parallel zu seiner Drehachse, also senkrecht zur Oberfläche, steht, gilt für den maximalen Öffnungswinkel  $\theta_{\max}$  des Kegels

$$\theta_{\max} = \arccos \left[ \frac{I}{2} \sqrt{I + 8 \frac{r_{\infty}}{r_0} - I} \right] \quad \text{Gl. 2.3-16}$$

$r_{\infty}$  ist die Nullpunktsanisotropie der globalen Bewegung.

Befindet sich das Absorptionsdipolmoment allerdings senkrecht zur Längsachse des Farbstoffs und somit parallel zur Oberfläche, kann sich das Absorptionsdipolmoment nur außerhalb eines Kegel bewegen. Der Winkel  $\theta_{\max}$  berechnet sich in diesem Fall zu

$$\theta_{\min} = \arccos \sqrt{1 - 2 \left( \frac{r_{\infty}}{r_0} \right)^2} \quad \text{Gl. 2.3-17}$$

Dieser zweite Fall gilt bei einem Rhodamin-Farbstoff, wenn der Linker, mit dem der Farbstoff an das Makromolekül gebunden ist, bei der Beschreibung der Bewegung berücksichtigt wird.

### 2.3.2 Fluoreszenzlöschung

Als Fluoreszenzlöschung werden Prozesse bezeichnet, die zu einer Verminderung der Fluoreszenz eines Moleküls führen können. Dabei kann die Energie des angeregten Zustandes strahlungslos vom Fluorophor auf ein Löschmolekül übertragen werden. Es werden mehrere Mechanismen für die Energieübertragung von dem Fluorophor auf ein Löschmolekül unterschieden.

Beim Energietransfer über geringe räumliche Abstände zwischen Fluorophor und Löschmolekül können je nach Lebensdauer eines Komplexes dynamische und statische Löschung unterschieden werden. Bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung findet ein Stoß von Fluorophor und Löschmolekül statt. Bei der statischen Löschung werden nicht-fluoreszierende Komplexe von Fluorophor und Löschmolekül gebildet, bei denen sich der Fluorophor im angeregten Zustand befindet.

Fluoreszenzlöschung durch Energietransfer über größere Abstände bis zu 100 Å ist ebenfalls möglich, wobei die Anregungsenergie ohne Kollision oder Komplexbildung durch Dipol-Dipol-Kopplung strahlungslos von einem angeregten Farbstoff, dem Donor, auf ein Akzeptormolekül übertragen wird. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer bezeichnet.

#### 2.3.2.1 Dynamische Fluoreszenzlöschung

Die dynamische Fluoreszenzlöschung wird auch als Kollisionslöschung bezeichnet, da aufgrund von Stoßprozessen mit einem Löschmolekül das angeregte Molekül deaktiviert wird. Für die Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer gilt mit der Löschmolekül-Konzentration [Q] folgende Gleichung:

$$\tau = \frac{1}{k_0 + k_Q [Q]} \quad \text{Gl. 2.3-18}$$

Gl. 2.3-18 gilt unter der Annahme, dass das Löschmolekül in wesentlich höherer Konzentration als der Farbstoff vorliegt und die Löschmolekül-Konzentration [Q] somit zeitlich als konstant angesehen werden kann. Die Reaktion zweiter Ordnung geht so in eine Reaktion pseudo-erster Ordnung über.

Die Quantenausbeute und damit auch die Lebensdauer sind proportional zur Intensität  $F$  einer Fluoreszenzbande. Für das Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauer bzw. der Fluoreszenzsignale mit ( $\tau$  bzw.  $F$ ) und ohne ( $\tau_0$  bzw.  $F_0$ ) Löschmolekülen gilt dann

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = \frac{k_0 + k_Q [Q]}{k_0} = 1 + \tau_0 k_Q [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{Gl. 2.3-19}$$

Die Betrachtung von  $(F_0/F)-1$  bzw.  $(\tau_0/\tau)-1$  in Abhängigkeit von der Löschmolekülkonzentration (Stern-Volmer-Diagramm) liefert den Wert der Löschkonstanten  $K_{SV}$ .

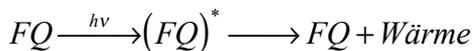
### 2.3.2.2 Statische Fluoreszenzlöschung

Bei der statischen Fluoreszenzlöschung besteht bereits im Grundzustand des Fluorophors ein chemisches Gleichgewicht zwischen Fluorophor und Löschmolekül



mit der Gleichgewichtskonstanten der Assoziation  $K_A = \frac{[FQ]}{[F][Q]}$ .

Wird der Komplex  $FQ$  angeregt, kann er im Vergleich zum freien Fluorophor Licht eines anderen Wellenlängenbereichs emittieren oder strahlungslos in seinen Grundzustand relaxieren. Falls der angeregte Komplex nicht oder schwächer als der freie Farbstoff fluoresziert, spricht man von statischer Fluoreszenzlöschung.



Bei der statischen Löschung gilt für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten

$$\frac{F_0}{F} = \frac{[F^*] + [FQ]^*}{[F^*]} = 1 + \frac{[FQ]^*}{[F^*]} \quad \text{Gl. 2.3-21}$$

Bei gleicher Anregungswahrscheinlichkeit für Fluorophor und Komplex gilt

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{[FQ]^*}{[F^*]} = 1 + \frac{[FQ]}{[F]} = 1 + K_A [Q] \quad \text{Gl. 2.3-22}$$

Das Verhältnis von komplexierten zu nicht komplexierten Farbstoffmolekülen,  $F/F_0$ , wird auch mit  $1/f$  beschrieben.

Bei der dynamischen und statischen Fluoreszenzlöschung handelt es sich um Grenzfälle, da die Löschung nur abhängig von der Lebensdauer des gebildeten Stoßkomplexes ist.

### 2.3.2.3 Quantenausbeuten der Löschung

Der Vergleich von zeitaufgelösten und stationären Messungen der Fluoreszenz erlaubt die Berechnung verschiedener Quantenausbeuten der Löschung (Seidel, 1992).

Für die Bildung eines 1:1-Komplexes aus Fluorophor und Löschmolekül gilt für den Fall der dynamischen Löschung  $f = 1$  und das Intensitätsverhältnis  $F_0/F$  ist gleich dem Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_0/\tau$ .

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = f(1 + K_{SV}[Q]) \quad \text{Gl. 2.3-23}$$

Die Quantenausbeute der Gesamtlöschung,  $\Phi_{QG}$ , ist folgendermaßen definiert:

$$\Phi_{QG} = 1 - \frac{F}{F_0}, \quad \text{Gl. 2.3-24}$$

Für die Quantenausbeute der statischen Löschung,  $\Phi_{QS}$ , gilt:

$$\Phi_{QS} = 1 - f = 1 - \left( \frac{F}{F_0} - \frac{\tau_0}{\tau} \right) \text{ und} \quad \text{Gl. 2.3-25}$$

Für die Quantenausbeute der dynamischen Löschung,  $\Phi_{QD}$ , gilt:

$$\Phi_{QD} = f \cdot \left( 1 - \frac{\tau}{\tau_0} \right) = \frac{F}{F_0} \cdot \frac{\tau_0}{\tau} \left( 1 - \frac{\tau}{\tau_0} \right) \quad \text{Gl. 2.3-26}$$

Eine weitere Quantenausbeute, die des *Intersystem Crossing*,  $\Phi_{ISC}$ , kann anhand dieser Ergebnisse ermittelt werden (Gl. 2.4-13).

#### 2.3.2.4 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nach Förster

Beim Energietransfer nach Förster (als *fluorescence* oder *Förster resonance energy transfer*, FRET, bezeichnet) findet ein strahlungsloser Dipol-Dipol-Energietransfer zwischen einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff statt (Förster, 1948). Da der Energietransfer zwischen den Singulett-Zuständen der beteiligten Farbstoffe auftritt, spricht man auch von Singulett-Singulett-Energietransfer. Die Absorption des Akzeptorfarbstoffs ist bathochrom verschoben gegenüber dem Donorfarbstoff. Die Reabsorption des Donorfarbstoffs durch weitere Donormoleküle in der Probe kann durch Verringerung der Probenkonzentration eingeschränkt werden.

Durch den Energietransfer wird die Fluoreszenzlebensdauer des Donors,  $\tau_D$ , verkürzt und die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors,  $\Phi_{FD}$ , verringert. Dabei nimmt die Intensität der Akzeptorfluoreszenz mit abnehmendem Abstand  $R_{DA}$  zwischen beiden Fluorophoren zu.

Da die Effizienz des Energietransfers von der Entfernung zwischen den beiden Farbstoffen abhängt, wird dieser Prozeß genutzt, um Abstände der Farbstoffe und Strukturen von Molekülen aufzuklären, an die die beiden Farbstoffe gebunden sind. Die Theorie dazu wurde bereits 1948 von T. Förster entwickelt (Förster, 1948). Einführungen bieten van der Meer *et al.* (van der Meer, 1994), Clegg (Clegg, 1992) und Selvin (Selvin, 1995).

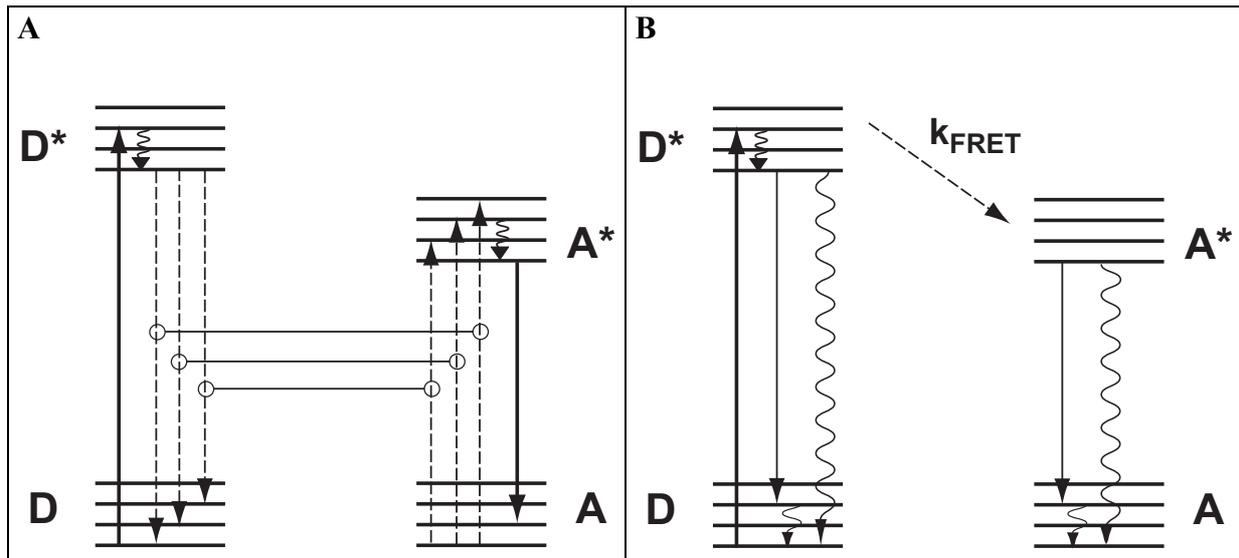


Abb. 2.3-2: Modelle für den Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer dargestellt im Jablonski-Diagramm (nach (van der Meer, 1994)). Strahlende Prozesse sind mit einer durchgezogenen Linie, nicht-strahlende Prozesse mit einer geschwängelten Linie, nicht-strahlende und gekoppelte Prozesse mit einer gestrichelten Linie dargestellt. **(A)** Die Übergänge von Donor(D)- bzw. Akzeptor(A)-Grundzustand in die angeregten Zustände,  $D^*$  und  $A^*$ , sind miteinander gekoppelt. **(B)** Der Energietransfer findet vom energiereichen, angeregten Zustand des Donors,  $D^*$ , zum energieärmeren, angeregten Zustand des Akzeptors,  $A^*$ , statt.

Nach Förster findet der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor nach dem Modell in Abb. 2.3-2A statt. Darin wird die Kopplung der Donor-Fluoreszenz mit der Akzeptor-Absorption dargestellt. Das Modell in Abb. 2.3-2B zeigt dagegen, dass der Energietransfer vom Donor zum Akzeptor mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{FRET}}$  stattfindet. Übergänge von und zu den Tripletzuständen von zwei Fluorophoren werden hier nicht berücksichtigt. Beide Modelle werden als gleichwertig betrachtet.

### **Bedingungen für Energietransfer**

Damit der Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor stattfinden kann, müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein:

- Das Donor-Fluoreszenzspektrum muss mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum überlappen. Die Größe dieser Überlappung wird durch das Überlappungsintegral  $J$  wiedergegeben.
- Die Donor- und Akzeptordipolmomente und ihr Abstandsvektor  $\vec{R}_{DA}$  liegen in geeigneter wechselseitiger Orientierung, welche durch den Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  beschrieben wird.
- Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor  $R_{DA}$  liegt im Bereich von 10 Å bis 100 Å. Die Farbstoffe müssen dabei nicht unbedingt Teil des gleichen Moleküls sein.
- Aufgrund der vorher genannten Bedingungen ist es ausreichend, wenn der Akzeptor die übertragene Energie absorbieren kann. Neben der Untersuchung des Energietransfers mit Hilfe der Donorfluoreszenz, untersuchen einige Methoden diesen Prozess unter zusätzlicher Verwendung der Akzeptorfluoreszenz, so dass es sich dann bei dem Akzeptor um einen Fluorophor handeln muss.

Mit der Geschwindigkeitskonstante für den Energietransfer  $k_{FRET}$  wird die Transfereffizienz  $E_T$  folgendermaßen definiert

$$E_T = \frac{k_{FRET}}{k_F^D + k_{IC}^D + k_{ISC}^D + k_Q^D [Q] + k_{FRET}} = \frac{k_{FRET}}{k_D + k_{FRET}} = \frac{k_{FRET}}{\tau_D^{-1} + k_{FRET}} \quad \text{Gl. 2.3-27}$$

Der Index D gibt an, dass es sich beim jeweiligen Parameter, Geschwindigkeitskonstante  $k$  bzw. Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$ , um eine Größe der Donorfluoreszenz handelt.

Für die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors bei Energietransfer gilt dann

$$\Phi_{F,D(A)} = \frac{k_F^D}{k_D + k_{FRET}} \quad \text{Gl. 2.3-28}$$

Der Index D(A) gibt an, dass es sich dabei um einen Parameter des Donorfluorophors in Anwesenheit des Akzeptors handelt, wenn also Energieübertragung stattfinden kann. Damit ist das Verhältnis der Quantenausbeuten, mit  $\Phi_{F,D(A)}$  und ohne,  $\Phi_{FD}$ , Energietransfer, folgendermaßen mit der Transfereffizienz verknüpft

$$\frac{\Phi_{F,D(A)}}{\Phi_{FD}} = \frac{k_F^D}{k_D + k_{FRET}} \bigg/ \frac{k_F^D}{k_D} = 1 - E_T \quad \text{Gl. 2.3-29}$$

Mit  $\tau_{D(A)} = 1/(k_D + k_{FRET})$  gilt analog:

$$\frac{\tau_{D(A)}}{\tau_D} = 1 - E_T \quad \text{Gl. 2.3-30}$$

Die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers  $k_{FRET}$  kann daher über die Fluoreszenzlebensdauern des Donorfluorophors ohne und mit Energietransfer ermittelt werden:

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_{D(A)}} - \frac{1}{\tau_D} = \frac{E_T}{\tau_D(1 - E_T)} \quad \text{Gl. 2.3-31}$$

Die theoretische Herleitung des Energietransfers mit Hilfe der Quantenmechanik wird von Cantor beschrieben (Cantor, 1980b), wobei im Folgenden nur die Ergebnisse vorgestellt werden.

Das Überlappungsintegral  $J$ , das den Grad der spektralen Überlappung von Donor-Fluoreszenz und Akzeptor-Absorption angibt, ist folgendermaßen definiert, wenn man es als Wellenlängen-abhängige Größe beschreibt mit  $f_D(\lambda)$  als Formfaktor der Donorfluoreszenz:

$$J = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad \text{Gl. 2.3-32}$$

Die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers ist mit dem Überlappungsintegral,  $J$ , dem Orientierungsfaktor,  $\kappa^2$ , der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors ohne Energietransfer,  $\Phi_{FD}$ , dem Brechungsindex der Lösung,  $n_D$ , und der Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffs in Abwesenheit von Akzeptor,  $\tau_D$ , proportional zum Abstand  $R_{DA}$  zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor gemäß

$$k_{FRET} = 8,79 \cdot 10^{23} \frac{J\kappa^2\Phi_{FD}}{n_D^4\tau_D R_{DA}^6} s^{-1} \quad \text{Gl. 2.3-33}$$

Das Verhältnis  $\Phi_{FD}/\tau_D$  ist dabei gleich der Geschwindigkeitskonstanten der Donorfluoreszenz  $k_F^D$  (vgl. Gl. 2.3-5 und -27).

Werden  $J$ ,  $\kappa^2$ ,  $\Phi_{FD}$ ,  $n_D$  und der Faktor  $8,79 \cdot 10^{23} s^{-1}$  zu einer Größe, dem Försterabstand  $R_0$ , zusammengefaßt, gilt

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 \quad \text{Gl. 2.3-34}$$

Der Försterabstand  $R_0$  ist der Abstand, bei dem die Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers,  $k_{FRET}$ , gleich der Zerfallsrate des Donors in Abwesenheit von Energietransfer,  $k_D$ , ist, gemäß Gl. 2.3-27. Bei diesem Abstand wird der angeregte Zustand  $S_1$  der einen Hälfte der Donormoleküle aufgrund von Energietransfer deaktiviert und  $S_1$  der anderen Hälfte der Moleküle durch gewöhnliche strahlende und nichtstrahlende Prozesse.

Mit der Einheit des Überlappungsintegrals  $[J] = M^{-1}cm^3$  erhält man folgende Beschreibungen für  $R_0$

$$R_0^6 = 8,79 \cdot 10^{23} (J\kappa^2\Phi_{FD}n_D^{-4}) [\text{\AA}^6] \quad \text{Gl. 2.3-35a}$$

$$R_0 = 9,78 \cdot 10^3 (J\kappa^2\Phi_{FD}n_D^{-4})^{1/6} [\text{\AA}] \quad \text{Gl. 2.3-35b}$$

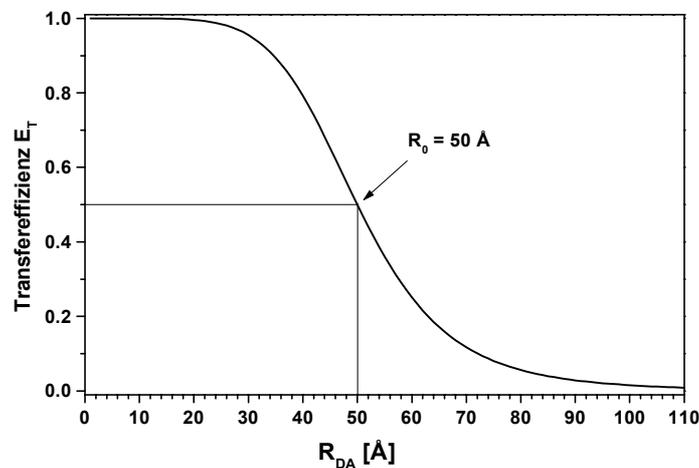


Abb. 2.3-3: Die Transfereffizienz  $E_T$  ist gegen den Donor-Akzeptor-Abstand  $R_{DA}$  dargestellt. Die Kurve besitzt bei  $E_T = 0,5$  den Wert des Försterabstands  $R_0$  (hier  $R_0 = 50 \text{\AA}$ ).

Die Transfereffizienz kann mit Gl. 2.3-27 und Gl. 2.3-34 direkt mit dem Abstand  $R_{DA}$  verbunden werden

$$E_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R_{DA}^6} = \frac{1}{1 + \left( \frac{R_{DA}}{R_0} \right)^6} \quad \text{Gl. 2.3-36}$$

## 2.4 Fluoreszenzspektroskopie

### 2.4.1 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Anhand von Fluoreszenzfluktuationen mit einer charakteristischen Zeitdauer um einen Gleichgewichtsmittelwert, die durch eine wechselnde Anzahl an frei diffundierenden fluoreszierenden Molekülen und durch weitere Prozesse im Detektionsvolumen verursacht werden, können mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (engl. *fluorescence correlation spectroscopy*; FCS) kinetische Informationen auf molekularem Niveau erhalten werden (Ehrenberg, 1974; Eigen, 1994; Elson, 1974; Magde, 1972; Rigler, 1990; Rigler, 1995; Schwille, 1997; Thompson, 1991; Widengren, 1998).

Dabei handelt es sich um Prozesse, die die Fluoreszenzintensität beeinflussen, d.h. Translationsdiffusion (durch die Größe des Detektionsvolumens bestimmt) und Rotationsdiffusion, photophysikalische (Fluoreszenz- und Tripletteigenschaften), photochemische (Photozerstörung, Löschung) und chemische Parameter (Gleichgewichtsreaktionen).

Während der Aufenthaltsdauer der zu untersuchenden fluoreszierenden Moleküle im Detektionsvolumen werden diese fortlaufend angeregt und Photonen emittiert. Die Diffusion eines Moleküls durch das Beobachtungsvolumen lässt sich somit durch die Detektion der dabei erzeugten Photonen beobachten. Die experimentelle Datengrundlage stellen die Vielkanalzählerspuren einer Fluoreszenzmessung dar (Kap. 3). Diese Methode der Fluoreszenzspektroskopie wird mit sehr verdünnten Probelösungen ( $10^{-8}$  -  $10^{-12}$  M) und bei sehr kleinen Probevolumina (ca. 1-10 fl) durchgeführt.

Mit Hilfe der Korrelationsfunktion einer beliebigen Zeitfunktion  $z(t)$  können die zeitlichen Vorgänge analysiert werden

$$\langle z(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^{+T} z(t) dt \quad \text{Gl. 2.4-1}$$

<...> bezeichnet dabei die Mittelung über die Messzeit T.

Die Autokorrelation  $A(t_c)$  einer Zeitfunktion  $z(t)$  ist definiert als

$$A(t_c) = \langle z(t)z(t+t_c) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^{+T} z(t)z(t+t_c) dt \quad \text{Gl. 2.4-2}$$

Dabei wird  $t_c$  als Korrelationszeit bezeichnet. Die Autokorrelation drückt dabei den Grad der Übereinstimmung einer Funktion mit sich selbst zu einem anderen Zeitpunkt aus. Die in der Vielkanalzählerspur verwendete Intervallbreite  $T_{IV}$  bestimmt die Zeitauflösung der daraus berechneten Autokorrelationsfunktion (Koppel, 1974).

Die zeitabhängige Anzahl an detektierten Fluoreszenzphotonen  $N(t) = \langle N \rangle + \delta N(t)$  in einem Zeitintervall  $T_{IV}$  wird durch die Fluoreszenzfluktuationen  $\delta N(t)$  um einen Mittelwert  $\langle N \rangle$  beschrieben. Die Berechnung erfolgt durch die normierte Autokorrelationsfunktion  $G(t_c)$ , wobei  $t_c$  die Korrelationszeit ist.

$$G(t_c) = \frac{\langle N(t)N(t+t_c) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta N(t)\delta N(t+t_c) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2} \quad \text{Gl. 2.4-3}$$

Abb. 2.4-1 zeigt den simulierten Verlauf einer Fluoreszenzkorrelationsfunktion mit einer logarithmischen Korrelationszeitachse. Terme, die in der Korrelationsfunktion zu einem Abfall führen, werden als *Bunchingterme*, und solche, die zu einem Anstieg führen, als *Antibunchingterme* bezeichnet.

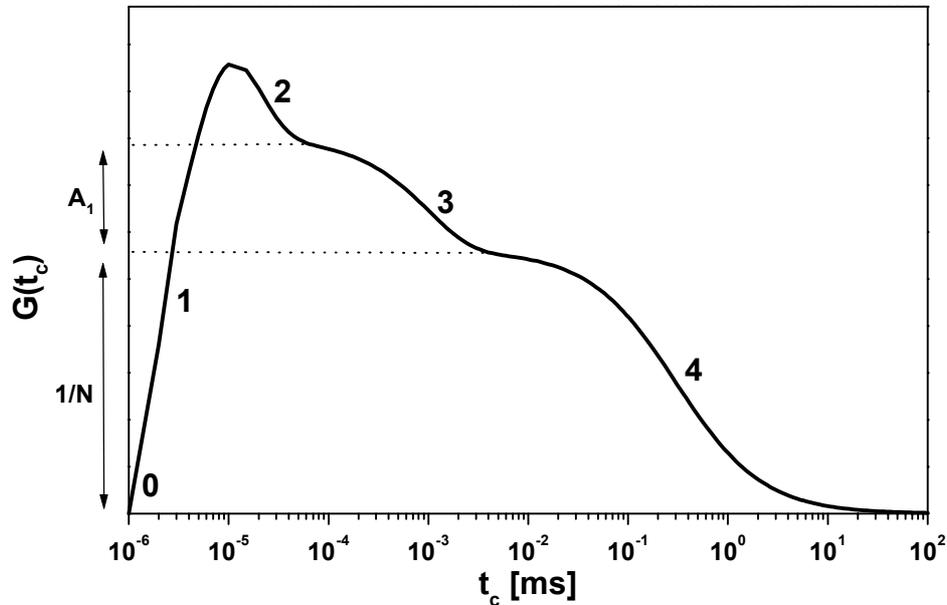


Abb. 2.4-1: Simulierter Verlauf einer Fluoreszenzkorrelationskurve: (0): Emission eines Photons, (1): *Antibunching*, (2): Rotationsdiffusion, (3): Triplettkinetik oder Isomerisierungsreaktion, (4): translative Diffusion.

- (0) Zur Zeit  $t_c = 0$  ms wird ein Photon emittiert.
- (1) Hier zeigt sich das Phänomen des *Antibunching*. Das Photonen-Antibunching ist ein rein quantenmechanischer Effekt und beschreibt das Phänomen, dass die Korrelation zwischen zwei emittierten Photonen von einem einzelnen Molekül für sehr kurze Zeiten  $t_c$  mit der Korrelationszeit zunimmt. Dies liegt daran, dass sich ein Molekül nach Aussendung eines Photons zum Zeitpunkt  $t_c = 0$  im Grundzustand befindet und die Wahrscheinlichkeit, dann ein zweites Photon auszusenden, gleich Null ist. Erst mit der erneuten Anregung des Moleküls steigt die Wahrscheinlichkeit, ein zweites Photon zu emittieren. Der *Antibunching*-Term kann aufgrund der Totzeit eines Detektors in der Regel nicht aufgelöst werden, außer durch die sogenannte Kreuzkorrelation der Signale von zwei Detektoren.
- (2) Der Abfall an Punkt 2 taucht bei Anregung mit polarisiertem Licht auf oder wenn nur Photonen einer Polarisationsrichtung detektiert werden. Aufgrund der Rotation eines Moleküls um seine eigene Achse verändert sich dessen Wirkungsquerschnitt für die Absorption und die Effizienz für die Detektion der Fluoreszenzemission. Diese Erscheinungen führen zu Fluoreszenzintensitätsänderungen, die sich in der Korrelations-

funktion in einem Abfall bei der charakteristischen Rotationszeit  $\phi$  (im ns-Zeitbereich der Korrelationszeitachse) eines Moleküls bemerkbar machen.

- (3) Dieser Term im  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich repräsentiert meist die charakteristische Tripletzeit  $t_T$  eines Moleküls. Dieser Term ist charakterisiert durch die Geschwindigkeitskonstanten des *Intersystem Crossing*  $k_{ISC}$  und des Übergangs vom Triplet- in den Grundzustand  $k_T$ . Nach dem Übergang in den Tripletzustand ist das Molekül im Mittel für die Zeit  $t_T$  nicht am Absorptions-Emissionszyklus beteiligt. Die Korrelationsfunktion fällt ab. Die Amplitude ist ein Maß für den mittleren Anteil der Moleküle, die sich unter den gegebenen Anregungsbedingungen im Tripletzustand befinden. Eine andere Ursache ist die Isomerisierungsreaktion des Cyanin-Farbstoffs Cy5 in diesem Zeitbereich zwischen dem nicht-fluoreszenzenden cis-Isomer und dem fluoreszenzenden trans-Isomer.
- (4) Am Punkt 4, der typischen Diffusionszeit  $t_D$  eines Moleküls durch das Beobachtungsvolumen, nimmt die Wahrscheinlichkeit ab, ein zweites Photon zu detektieren, da das Molekül aus dem Messfokus verschwindet. Bei den hier verwendeten Molekülen ist  $t_D \approx 1$  ms. Die Korrelationsfunktion sinkt auf den Wert Null ab.

An die Korrelationskurven können verschiedene Modelle angepasst werden. Die Herleitung dieser Modelle liefern beispielsweise Eggeling (Eggeling, 1996; Eggeling, 1999a) und Widengren (Widengren, 1996a) und soll an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt werden.

Der einfachste Fall ist die Beeinflussung des Fluoreszenzsignals durch die translative Diffusion der Moleküle in einem dreidimensional approximierten Gauß'schen Detektionsvolumen mit der charakteristischen Diffusionszeit  $t_D$ .

$$G(t_c) - 1 = G_D(t_c) = \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + t_c/t_D} \right) \left( \frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_D} \right)^{1/2} \quad \text{Gl. 2.4-4}$$

Hierbei ist  $N$  ist die Anzahl der fluoreszierenden Moleküle im Singulettzustand ( $S_0$  und  $S_1$ ). Anhand dieser Gleichung erkennt man, dass die Amplitude der Korrelationsfunktion  $G(t_c)$  invers zur Anzahl von Molekülen im Fokus ist (Abb. 2.4-1). Bei bekanntem Detektionsvolumen können daher Konzentrationen ermittelt werden sowie die (Photonen)Zählrate pro Molekül, die bei geringer Anregungsleistungsdichte der Fluoreszenzquantenausbeute proportional ist.

$\omega_0$  ist die radiale Ausdehnung (x-y-Ebene) und  $z_0$  die axiale Ausdehnung (z-Achse) des Beobachtungsvolumens, bei der die Anregungsintensität des Laserlichts jeweils auf  $1/e$  abgefallen ist. Diese Parameter können über die Bestimmung der Diffusionszeit  $t_D$  ermittelt werden. Bei Rhodaminfarbstoffen ist die Diffusionskonstante bekannt mit  $D = 3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (Hansen, 1998; Widengren, 1996b). So gilt für  $\omega_0$  mit Gl. 2.4-5:

$$\omega_0 = \sqrt{4Dt_D} \quad \text{bzw.} \quad t_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad \text{Gl. 2.4-5}$$

Die Anregungsleistungsdichte  $I_0$  [ $\text{kW cm}^{-2}$ ] ergibt sich aus der Leistung am Objektiv P und dem Parameter  $\omega_0$ .

$$I_0 = \frac{P}{0,5\pi\omega_0^2} \quad \text{Gl. 2.4-6}$$

Das Anregungsprofil wird durch ein rechteckiges homogenes Anregungsstrahlprofil angenähert (Eggeling, 1998b; Eggeling, 1999b; Widengren, 1994). Dies führt zu einer homogenen mittleren Anregungsleistungsdichte von  $I = I_0/(2b^2)$  mit  $b = 1$ , so dass  $I = I_0/2$  ist. Darüber hinaus muss die Transmission für das verwendete Objektiv bei der Bestimmung der Anregungsleistung P berücksichtigt werden.

Mit einem Verhältnis von  $z_0/\omega_0$ , welches aus der Anpassung der Kurve erhalten wird, berechnet sich nun das Detektionsvolumen  $V_D$  [fl] nach

$$V_D = \pi^{3/2} \cdot z_0 \cdot \omega_0^2 \quad \text{Gl. 2.4-7}$$

Bei der FCS müssen aufgrund der hohen Leistungsdichten auch photochemische Reaktionen wie Photozerstörung berücksichtigt werden, die zu zusätzlichen Signalschwankungen führen. Durch Dunkelphasen wie der Tripletzustand eines Moleküls oder Isomerisierungsreaktionen zwischen fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Molekülen kann ein zusätzlicher Bunchingterm im  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich sichtbar werden. Widengren *et al.* (Widengren, 1994; Widengren, 1995; Widengren, 1996b) haben einen entsprechenden Ausdruck für die normierte Autokorrelationsfunktion  $G(t_c)$  abgeleitet, der neben der translativen Diffusion den mittleren Anteil  $T_{1eq}$  der Fluorophore im Tripletzustand und die charakteristische Tripletzeit  $t_T$  beinhaltet.  $T_{1eq}$  und  $S_{1eq}$  werden auch als die stationären Besetzungswahrscheinlichkeiten vom Tripletzustand  $T_1$  bzw. vom Singulettzustand  $S_1$  bezeichnet.

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0)^2 \cdot t_D}\right)}} \cdot \left(1 - T_{1eq} + T_{1eq} \cdot \exp(-t_c/t_T)\right) \quad \text{Gl. 2.4-8a}$$

$$\text{mit } \frac{1}{t_T} = \left( k_T + \frac{k_{01} k_{ISC}}{k_{01} + k_0} \right) \quad \text{Gl. 2.4-8b}$$

$$\text{und } T_{1eq} = \frac{k_{ISC} \cdot S_{1eq}}{k_T} = \frac{k_{ISC} \cdot k_{01}}{k_{01} \cdot (k_{ISC} + k_T) + k_0 \cdot k_T} \quad \text{Gl. 2.4-8c}$$

Damit können aus FCS-Messungen die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{ISC}$  und  $k_T$  bestimmt werden.

Die Anpassung der Korrelationskurve erfolgt hierbei in allgemeiner Form mit einem Bunchingterm mit der Korrelationszeit  $t_1$  und der Amplitude  $A_1$  nach

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0)^2 \cdot t_D}\right)}} \cdot \left(1 - A_1 + A_1 \cdot \exp(-t_c/t_1)\right) \quad \text{Gl. 2.4-8d}$$

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_T$  des Übergangs  $T_1 \rightarrow S_0$  wird anhand folgender Gleichung ermittelt:

$$k_T = \frac{(1 - T_{1eq})}{t_T} \quad \text{Gl. 2.4-9}$$

Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ISC}$  des Übergangs von  $S_1 \rightarrow T_1$  lässt sich dann ermitteln nach

$$k_{ISC} = \frac{(k_0 + k_{01})(1 - k_T t_T)}{k_{01} t_T} = \frac{(k_0 + \sigma_{01} \gamma_P I)(1 - k_T t_T)}{\sigma_{01} \gamma_P I t_T} \quad \text{Gl. 2.4-10}$$

$k_0$  ist invers zur messbaren Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors  $\tau_0$ ,  $\sigma$  der Absorptionsquerschnitt und  $\gamma_P$  die inverse Photonenenergie.

Für alle Prozesse mit einer Geschwindigkeitskonstante  $k_{ij}$  für einen Übergang aus einem elektronischen Zustand  $i$  in einen elektronisch höher angeregten Zustand  $j$  gilt, dass sie proportional zur Leistungsdichte  $I$  und zum Absorptionsquerschnitt  $\sigma_{ij}(\lambda_{Ex})$  bei der Anregungswellenlänge  $\lambda_{Ex}$  ist. Die inverse Photonenenergie,  $\gamma_P [J^{-1}]$ , wird durch das Plancksche Wirkungsquantum  $h$  und die Lichtgeschwindigkeit  $c$  beschrieben.

$$k_{ij} = I \sigma_{ij}(\lambda_{Ex}) \gamma_P \quad \text{mit} \quad \gamma_P = \frac{\lambda}{hc} \quad \text{Gl. 2.4-11}$$

Der Absorptionsquerschnitt für einen Übergang von  $S_0 \rightarrow S_1$  berechnet sich mit dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon(\lambda_{Ex}) [M^{-1} \text{cm}^{-1}]$  zu

$$\sigma_{01} = 0,385 \cdot 10^{-20} \epsilon(\lambda_{Ex}) \quad \text{Gl. 2.4-12}$$

Mit den Werten für  $k_{ISC}$  und die Lebensdauer des Farbstoffs  $\tau_0$  bzw.  $k_0$  (Gl. 2.3-6) kann die Triplettquantenausbeute  $\Phi_{ISC}$  berechnet werden.

$$\Phi_{ISC} = \frac{k_{ISC}}{k_0} = k_{ISC} \cdot \tau_0 \quad \text{Gl. 2.4-13}$$

Bei Molekülen mit vielen Konformationszuständen, wie z.B. Proteinen, liegen viele Zustände energetisch dicht beieinander, so dass die Anpassung unter Verwendung einer sogenannten gestreckten Exponentialfunktion durchgeführt werden muss. Dies ist gleichzusetzen mit Schwankungen um einen Gleichgewichtsmittelwert. Gl. 2.4-8d geht dann über in:

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0)^2 \cdot t_D}\right)}} \cdot \left(1 - A_1 + A_1 \cdot \exp(-t_c/t_1)\right)^\beta \quad \text{Gl. 2.4-14}$$

$\beta$  ist der Parameter der gestreckten Anpassung. Die Breite der Verteilung korreliert mit der Abweichung von  $\beta = 1$ .

Treten  $n$  Bunchingterme auf, wird Gl. 4.2-8d verallgemeinert zu

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0)^2 \cdot t_D}\right)}} \cdot \left(1 - \sum_{i=1}^n A_i + \sum_{i=1}^n A_i \cdot \exp(-t_c/t_i)\right) \quad \text{Gl. 2.4-15}$$

Es treten auch Fälle bei Korrelationskurven mit zwei Bunchingtermen auf, bei denen die Anpassung des ersten Bunchingterms eine gestreckten Exponentialfunktion erfordert (Gl. 2.4-16).

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t_c}{(z_0/\omega_0)^2 \cdot t_D}}} \cdot (1 - A_1 + A \cdot \exp(-t_c/t_1)^\beta - A_2 + A_2 \cdot \exp(-t_c/t_2)) \quad \text{Gl. 2.4-16}$$

Die folgende Gleichung beinhaltet neben der Translationsdiffusion und dem Übergang in den Triplettzustand auch die Rotationsdiffusion und das Phänomen des *Antibunching* (Rigler, 1993).

$$G(t_c) - 1 = \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} + \frac{4}{5} \exp\left(-\frac{t_c}{\rho}\right) - \frac{9}{5} \exp\left(-\frac{t_c}{\tau}\right) \right) \cdot \left( 1 - T_{1eq} + T_{1eq} \exp\left(-\frac{t_c}{t_T}\right) \right) \quad \text{Gl. 2.4-17}$$

$\rho$  ist die Rotationskorrelationszeit und  $\tau$  die Fluoreszenzlebensdauer der Moleküle. Dieses Modell ist zur Simulation der Kurve in Abb. 2.4.-1, jedoch nicht weiter im Rahmen dieser Arbeit, verwendet worden.

Bei hohen Anregungsleistungsdichten führt die Vernachlässigung der Fluoreszenzsättigung in den obigen Gleichungen zu einem nicht mehr proportionalem Verhalten der Photonenzählrate, so dass die Annahme eines 3-dimensionalen Gaußprofils nicht uneingeschränkt gültig ist. In diesem Fall wird das Detektionsvolumen unter Berücksichtigung der Sättigung durch ein Detektionsvolumen ersetzt, welches durch eine Überlagerung von zwei dreidimensionalen Gaußprofilen beschrieben wird (Widengren, 1995). Dies führt zu folgender empirischer Modellfunktion (Eggeling, 1996):

$$G_D(t_c) = R \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_{D1}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega_0/z_0)^2 \frac{t_c}{t_{D1}}}} + (1 - R) \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_{D2}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega_0/z_0)^2 \frac{t_c}{t_{D2}}}} \quad \text{Gl. 2.4-18}$$

$R$  ist der Anteil eines Diffusionsterms mit der Diffusionszeit  $t_{D1}$ , während für den anderen Diffusionsterm  $(1-R)$  und die Diffusionszeit  $t_{D2}$  gilt.

## 2.4.2 Einzelmolekülspektroskopie

### 2.4.2.1 Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD)

Mit Hilfe der Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) können mehrere Fluoreszenzparameter simultan gemessen und analysiert werden: Fluoreszenzintensität, Fluoreszenzlebensdauer und die Anisotropie. Da die von der Probe emittierten Photonen nach ihrem Wellenlängenbereich aufgeteilt werden, ist es möglich, diese Parameter für zwei Wellenlängenbereiche G („grün“) und R („rot“) zu ermitteln.

#### Zwei verschiedene Auswerteprinzipien

Die meist verwendete Art der Auswertung ist die *Signalspitzen-orientierte* Auswertung (engl. *burstwise analysis*). Dabei werden alle Photonen eines Einzelmoleküldurchtritts durch das Beobachtungsvolumen gemeinsam analysiert. Diese Analyse dient z.B. zur Identifizierung von einzelnen Molekülen durch ihre charakteristischen Fluoreszenzparameter.

Ein anderes Prinzip der Auswertung stellt die *gleitende Analyse* (engl. *sliding analysis*) dar, die einer gleitenden Mittelwertbildung der einzelnen Fluoreszenzparameter entspricht. Dabei wird eine feste Anzahl an Photonen analysiert ausgehend vom ersten Photon eines Molekülereignisses. Die feste Photonenzahl wird als Photonenfenster bezeichnet. Das zweite Photonenfenster ist um ein Photon „weitergerutscht“, indem es das vormals zweite Photon als erstes Photon enthält und ein neues letztes Photon hinzugewonnen hat (Abb. 2.4-2). Dieses Gleiten findet über alle Photonen eines Einzelmolekülereignisses statt. Durch die gleitende Analyse kann der zeitliche Verlauf der einzelnen Parameter innerhalb eines Einzelmoleküldurchtritts beobachtet werden und so auf Prozesse geschlossen werden, die zu einer Veränderung dieser Fluoreszenzparameter führen.

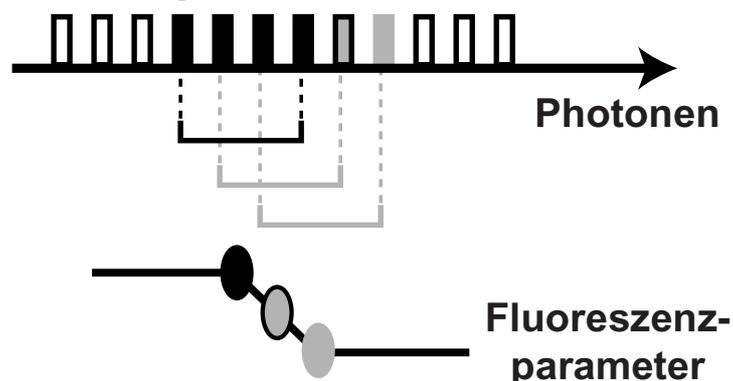


Abb. 2.4-2: Schema der gleitenden Analyse. Die ausgefüllten Rechtecke auf der oberen Skala stellen die Photonen eines Einzelmolekülereignisses dar. Die schwarzen Rechtecke bilden dabei die Photonen des ersten Photonenfensters (dargestellt durch die waagerechte Klammer). Für jedes der drei Photonenfenster wird je ein Wert für den jeweiligen Fluoreszenzparameter (Ellipsen) erhalten.

Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Photonen in den Photonenfenstern am Anfang und am Ende jeden Ereignisses weniger oft gezählt werden, da sie weniger häufig in

einem Photonenfenster angepasst werden. Deshalb werden nach Schaffer (Schaffer, 2000) die Photonen bei der gleitenden Analyse so gewichtet, dass wieder jedes Molekülereignis in der Summe seiner Photonenfenster als ein Ereignis gezählt wird.

Sind die zeitlichen Fluktuationen der Fluoreszenzparameter langsamer als die Diffusionszeit des Moleküls durch das Detektionsvolumen, geben Signalspitzen-orientierte und gleitende Analyse das gleiche Ergebnis. Die gleitende Analyse hat in diesem Fall aufgrund der überlappenden Photonenfenster eine glättende Funktion auf die Histogramme der Fitparameter über alle Ereignisse.

### ***Bestimmung der verschiedenen Fluoreszenzparameter***

Die Fluoreszenzparameter Intensität, Lebensdauer und Anisotropie werden in den beiden vorgestellten Auswerteverfahren, Signalspitzen-orientierte und gleitende Analyse, gleich ausgewertet.

#### *Intensität*

Das Fluoreszenzsignal (auch als Zählrate bezeichnet) des „grünen“ Wellenlängenbereichs,  $S_G$ , wird anhand von Gl. 2.4-19 ermittelt.  $S_G$  entspricht dabei der Anzahl der Photonen  $n_G$  in einem Einzelmolekülereignis pro Dauer des Molekülereignisses, welches durch das Zeitintervall zwischen erstem und letztem Photon,  $\Delta t(n_G)$ , gegeben ist.

$$S_G = \frac{n_G - 1}{\Delta t(n_G)} \quad \text{Gl. 2.4-19a}$$

So gilt für das im „roten“ Wellenlängenbereich,  $S_R$ , analog

$$S_R = \frac{n_R - 1}{\Delta t(n_R)} \quad \text{Gl. 2.4-19b}$$

Bei der Bestimmung der Fluoreszenzintensität mittels MFD wird zwischen dem Fluoreszenzsignal  $S$  und der Fluoreszenzintensität  $F$  unterschieden. Bei  $F$  handelt es sich um das Fluoreszenzsignal, welches mit dem Streulichtanteil  $\gamma$  bzw. Hintergrundsignal  $B$  korrigiert wurde.

#### *Fluoreszenzlebensdauer*

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern werden im Rahmen von MFD mit Hilfe von zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung durchgeführt (O'Connor, 1984; Wild, 1977).

Aus den registrierten Fluoreszenzphotonen wird der Fluoreszenzzerfall in einem Häufigkeits-Histogramm dargestellt aus  $k$  Messkanälen ( $k = 256$ ) mit einem Messfenster  $T = 12,5$  ns (Abb. 2.4-3). Die Größe des Messfensters ist durch die Frequenz der Laserpulse vorgegeben, da jede 13,66 ns eine Anregung mit dem Laser erfolgt (Die Frequenz entspricht einer Repetitionsrate von 73 MHz).

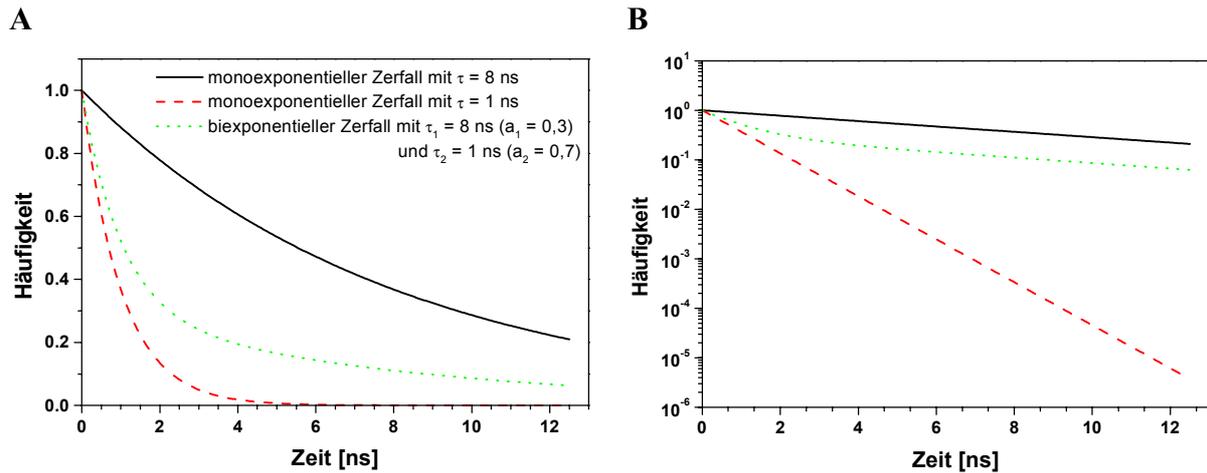


Abb. 2.4-3: Fluoreszenzabklingkurven (A) in linearer und in (B) exponentieller Darstellung der Häufigkeit der Photonen gegen die Zeit  $t$ .

Der zeitliche Abfall des gemessenen Fluoreszenzsignals  $S$  nach gepulster Anregung ist durch die Geschwindigkeitskonstante  $k_0$  (s. Kap. 2.3.1.2) für die Entvölkerung des angeregten Zustandes gegeben. Bei der Anpassung muss zusätzlich die Gerätefunktion  $g(t)$  berücksichtigt werden.

$$S(t) = g(t) \otimes \exp(-t \cdot k_0) \quad \text{Gl. 2.4-20}$$

$\otimes$  steht hier für die Faltungsvorschrift einer Faltung von  $g(t)$  mit einer Exponentialfunktion (Bronstein, 1991).

Dabei kann aufgrund der geringen Anzahl der Photonen in einem Einzelmolekülereignis nur ein monoexponentielles Verhalten angepasst werden. Als Kriterium zur Auswahl eines Einzelmolekülereignisses wird eine minimale Anzahl von 160 Photonen oder (s. Kap. 4.3) 100 Photonen vorausgesetzt. Die Anpassung der Lebensdauer findet durch einen Maximum-Likelihood-Schätzer statt. Dabei wird neben dem variablen Anteil an Streulicht  $\gamma$  auch die Wahrscheinlichkeit berücksichtigt, dass bei der hohen Frequenz an Anregungspulsen ein Fluorophor von vorhergehenden Laserpulsen angeregt werden kann (Brand, 1997b; Brand, 1998; Kullback, 1959; Zander, 1996b).

Nach Schaffer (Schaffer, 2000) gilt für die Standardabweichung  $\sigma$  der Lebensdauer  $\tau$

$$\sigma(\tau) = \left[ \frac{\tau^4 k^2}{NT^2} (1 - \exp^{-T/\tau}) \right]^{1/2} \left[ \frac{\exp^{T/\tau K} (1 - \exp^{-T/\tau})}{(\exp^{T/\tau K} - 1)^2} - \frac{K^2}{\exp^{T/\tau} - 1} \right]^{-1/2} \quad \text{Gl. 2.4-21}$$

mit  $N$  als der Anzahl der Photonen der Abklingkurve.

*Anisotropie*

Für die Fluoreszenzanisotropie  $r_E$  eines Einzelmolekülereignisses gilt folgender Ausdruck

$$r_E = \frac{G \cdot \sum_{t=0}^T S_p - \sum_{t=0}^T S_s}{(1 - 3 \cdot l_2) \cdot G \cdot \sum_{t=0}^T S_p + (2 - 3l_1) \cdot \sum_{t=0}^T S_s} \quad \text{Gl. 2.4-22}$$

Bei großen Apertur des Objektivs und damit Sammlung der Photonen aus einem großen Raumwinkel werden die Polarisationskomponenten der Fluoreszenz gemischt. Ebenso wird der linear polarisierte Laserstrahl durch die starke Brechung in gewissem Maße depolarisiert. Bei  $l_1$  und  $l_2$  handelt es sich um Korrekturfaktoren, die diese Eigenschaften des Objektiv für die jeweilige Polarisationsrichtung ( $l_1$  für  $S_p$  und  $l_2$  für  $S_s$ ) beschreiben (Koshioka, 1995; Schaffer, 2000).  $G$  stellt hier den sogenannten Detektionssystem-abhängigen G-Faktor dar, der die polarisationsabhängige Transmission der Detektoren und Filter im optischen Aufbau beschreibt. Bei einer vollkommen isotropen Probe gilt für den G-Faktor

$$G = \frac{\sum_{t=0}^T S_s}{\sum_{t=0}^T S_p} \quad \text{Gl. 2.4-23}$$

Der G-Faktor wird aus der Messung eines Fluorophors mit  $\rho \sim 0,2$  ns erhalten, indem die letzten Detektionskanäle in einem Zerfallshistogramm analysiert werden (Schaffer, 2000).

Da Laser- und Ramanstreulicht hoch polarisiert ist, kann unter der Berücksichtigung des Untergrund-Polarisations-Verhältnisses  $\chi$  die Streulicht-korrigierte Anisotropie  $r_s$  berechnet werden.

$$r_s = \frac{G \cdot \sum_{t=0}^T S_p - \sum_{t=0}^T S_s - \gamma \left( 1 - \frac{3}{2} \chi \right) \cdot S_{ges}}{(1 - 3 \cdot l_2) \cdot G \cdot \sum_{t=0}^T S_p + (2 - 3l_1) \cdot \sum_{t=0}^T S_s - \gamma \left( 1 - 3 \cdot l_2 - \frac{3}{2} \chi (l_1 - 2 \cdot l_2) \right) \cdot S_{ges}} \quad \text{Gl. 2.4-24}$$

$$\text{mit } \chi = \frac{2 \cdot B_s}{G \cdot B_p + 2 \cdot B_s} \quad \text{Gl. 2.4-25}$$

$$\text{mit } S_{ges} = G \cdot \sum_{t=0}^T S_p + 2 \cdot \sum_{t=0}^T S_s \quad \text{Gl. 2.4-26}$$

$B_s$  bzw.  $B_p$  sind Zählraten des parallel bzw. senkrecht polarisierten Hintergrundsignals.

Bei den Einzelmolekülmessungen im Rahmen dieser Arbeit wird die Anisotropie  $r_s$  nach Gl. 2.4-24 angegeben.

### 2.4.2.2 Selektive Spektroskopie

Die Einzelmolekülspektroskopie mit MFD eröffnet die Möglichkeit, Ereignisse einer Subpopulation in einem heterogenen System aufgrund ihrer vergleichbaren Fluoreszenzeigenschaften auszuwählen und weiter zu analysieren. Da im Rahmen dieser Methode von jedem Photon die Photonnummer und die Ankunftszeit registriert werden, können die selektierten Photonen anhand dieser Zeit erkannt werden.

Indem das Fluoreszenzzerfallshistogramm aller selektierter Photonen aufgebaut wird, kann durch Vergrößerung des Datensatzes und damit erheblicher Verbesserung der Statistik die Anpassung mit mehreren Exponenten und damit Lebensdauerkomponenten erfolgen (Schaffer, 2000). Zusätzlich kann aus allen selektierten Photonen eine Vielkanalzählerspur aufgebaut oder die Korrelationsanalyse dieser Ereignisse durchgeführt werden (Eggeling, 1999a).

Neben der Anpassung einer Fluoreszenzabklingkurve mit einer oder mehreren Lebensdauerkomponenten  $i$  mit den Amplituden  $x_i$ , kann die Rotationskorrelationszeit  $\rho$  für mehrere Zustände  $j$  mit den Amplituden  $r_{0j}$  erhalten werden. Die Anpassung der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  folgt dabei Gl. 2.3-10 und die Anpassung der Rotationskorrelationszeit  $\rho$  folgt Gl. 2.3-15.

Anhand der Ergebnisse von  $\tau$  und  $\rho$  ist es möglich, die Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  für den parallelen und den senkrechten Detektionskanal,  $F_p(t)$  und  $F_s(t)$ , und somit die stationäre Anisotropie  $r$  zu berechnen (Gln. 2.4-27 und -28). Dabei werden die normierten Amplituden  $b_j$  für die Rotationskorrelationszeiten  $\rho_j$  verwendet. Mit Hilfe dieses Verfahrens kann überprüft werden, ob der Schwerpunkt der Anisotropieverteilung im 2D-Histogramm mit dem Maximum der Verteilung übereinstimmt. Da hier der Streulichtanteil bereits bei der Anpassung der Fluoreszenzabklingkurven berücksichtigt wurde, handelt es sich bei der Berechnung in Gl. 2.4-27 um die Fluoreszenzintensität  $F$ .

$$F_p(t) = \frac{F_0}{3} \left[ \sum_{i=1}^n x_i \cdot \exp^{-t/\tau_i} + 2 \cdot r_0 \cdot \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m x_i \cdot b_j \cdot \exp^{-t(\tau_i^{-1} + \rho_j^{-1})} \right] \quad \text{Gl. 2.4-27a}$$

$$F_s(t) = \frac{F_0}{3} \left[ \sum_{i=1}^n x_i \cdot \exp^{-t/\tau_i} - r_0 \cdot \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m x_i \cdot b_j \cdot \exp^{-t(\tau_i^{-1} + \rho_j^{-1})} \right] \quad \text{Gl. 2.4-27b}$$

mit  $\sum_j^m b_j = \sum_j^m r_{0j}/r_0 = 1$  und der Integration über  $t$  von  $t = 0$  bis  $t = T$  gilt

$$F_p = \frac{F_0}{3} \left[ \sum_{i=1}^n (-x_i \tau_i) (\exp^{-T/\tau_i} - 1) + 2 \cdot r_0 \cdot \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left( -\frac{x_i b_j}{\tau_i^{-1} + \rho_j^{-1}} \right) (\exp^{-T(\tau_i^{-1} + \rho_j^{-1})} - 1) \right] \quad \text{Gl. 2.4-27c}$$

$$F_s = \frac{F_0}{3} \left[ \sum_{i=1}^n (-x_i \tau_i) (\exp^{-T/\tau_i} - 1) - r_0 \cdot \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \left( -\frac{x_i b_j}{\tau_i^{-1} + \rho_j^{-1}} \right) (\exp^{-T(\tau_i^{-1} + \rho_j^{-1})} - 1) \right] \quad \text{Gl. 2.4-27d}$$

Die stationäre Anisotropie wird nun gemäß Gl. 2.4-28 erhalten (Koshioka, 1995; Schaffer, 1999).

$$r = \frac{G \cdot F_p - F_s}{(1 - 3 \cdot l_2) \cdot G \cdot F_p + (2 - 3l_1) \cdot F_s} \quad \text{Gl. 2.4-28}$$

Bei  $l_1$  und  $l_2$  handelt es sich um Korrekturfaktoren für die Mischung der Polarisationsanteile bei Transmission durch das Objektiv. Da im Rahmen dieser Arbeit  $T = 12,5$  ns ist, aber die Größe des Messfensters mit  $T = 13,66$  ns ist ein systematischer Fehler bei der Berechnung der stationären Anisotropie vorhanden.

Die Anpassung der Rotationskorrelationszeiten mit Hilfe der selektiven Spektroskopie ermöglicht die Abschätzung des Fehlers bei der Abstandsbestimmung mit Hilfe von FRET (Anhang A) und die Berechnung des Öffnungswinkel eines Kegel, indem sich der Farbstoff bewegt, wenn er an ein Makromolekül gebunden ist (*wobbling-in-a-cone*-Modell, Kap. 2.3.1.2).

### 2.4.2.3 Untersuchungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers

Bei dem in den Akzeptorkanälen gemessenen Fluoreszenzsignal müssen die folgenden Fluoreszenzbeiträge mit den Amplituden  $c_i$  beachtet werden:

- (1) geringer Anteil an Donorfluoreszenz  $S_D$  aufgrund der spektralen Überlappung, den sogenannten *Crosstalk*  $\alpha = c_1$ ;
- (2) bei der Laseranregung am Absorptionsmaximum des Donors wird ebenfalls ein geringer Anteil ( $c_2$ ) des Akzeptors  $S_A$  direkt angeregt;
- (3) zu untersuchende Akzeptorfluoreszenz  $S_{A,FRET}$  durch Energietransfer vom Donor.

Somit gilt für das in den roten Detektionskanälen registrierte Signal  $S_R$

$$S_R = c_1 S_D + c_2 S_A + c_3 S_{A,FRET} \quad \text{Gl. 2.4-29}$$

Der *Crosstalk*  $\alpha$  wird aus der Messung der Probe erhalten, die nur mit Donorfluorophor markiert ist. Dann gilt

$$\alpha = \frac{S_R - B_R}{(S_G - B_G)} \quad \text{Gl. 2.4-30}$$

Als weitere Korrekturfaktoren werden die Aufbau- und Filter-abhängigen Detektionseffizienzen  $g_G$  und  $g_R$  benötigt, die abhängig vom verwendeten Farbstoff und vom optischen Aufbau sind (s. Anhang B).

Für die korrigierten Intensitäten  $F$  von Donor und Akzeptor gilt dann

$$F_D = \frac{F_G}{g_G} = \frac{1}{g_G} (S_G - B_G) \quad \text{Gl. 2.4-31}$$

$$F_A = \frac{F_R}{g_R} = \frac{1}{g_R} ((S_R - B_R) - \alpha(S_G - B_G)) \quad \text{Gl. 2.4-32}$$

Das Verhältnis  $F_D/F_A$  ist bei Proben, die nur mit einem Donorfarbstoff markiert sind, ein Maß für die spektrale Verschiebung des Fluorophors relativ zum Akzeptorfarbstoff.

Die Bestimmung von  $F_D/F_A$  und seines Fehler sehen folgendermaßen aus:

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{g_R F_G}{g_G F_R} = \frac{g_R}{g_G} \frac{S_G - B_G}{(S_R - B_R) - \alpha(S_G - B_G)} \quad \text{Gl. 2.4-33a}$$

Der Standardfehler  $\sigma$  bei der Bestimmung von  $F_D/F_A$  berechnet sich nach Gl. 2.4-33b, wenn man annimmt, dass die Verteilung des Hintergrundsignals B einer Poisson-Statistik folgt.

$$\sigma\left(\frac{F_D}{F_A}\right) = \frac{g_R F_G}{g_G F_R} \left[ \left( \frac{1}{F_G} + \frac{\alpha}{F_R} \right)^2 (S_G - B_G) + \left( \frac{1}{F_R} \right)^2 (S_R - B_R) \right]^{1/2} \quad \text{Gl. 2.4-33b}$$

Im Fall von FRET, kann anhand des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  die Transfereffizienz  $E_T$  folgendermaßen berechnet werden

$$E_T = \left[ 1 + \frac{F_D}{F_A} \frac{a_{\text{trans}} \Phi_{FA}}{\Phi_{FD}} \right]^{-1} \quad \text{Gl. 2.4-34}$$

Neben den Proben, die nur Donor und beide Farbstoffe enthalten, wird hier auch der Wert der Akzeptorquantenausbeute verwendet. Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass die Gl. 2.4-34 nur gilt, wenn der Akzeptor ein Fluorophor ist. Handelt es sich dabei um den Farbstoff Cy5 wird zur Berechnung von  $E_T$  noch ein weiterer Faktor,  $a_{\text{trans}}$ , benötigt, der das Verhältnis der Häufigkeiten von cis- zur trans-Form des Farbstoffs wiedergibt (Widengren, 2000). Ist der Farbstoff an das 5'-Ende von DNS gebunden, beträgt  $a_{\text{trans}}$  0,8. Gl. 2.4-34 stellt somit eine Alternative der  $E_T$ -Berechnung zu Gl. 2.3-30 dar.

Die Berechnung des Donor-Akzeptor-Abstands  $R_{DA}$  erfolgt nun gemäß Gl. 2.4-35a, wenn Gl. 2.3-36 und Gl. 2.4-34 miteinander kombiniert werden.

$$R_{DA} = R_{0r} \left[ \frac{F_D}{F_A} a_{\text{trans}} \Phi_{FA} \right]^{1/6} \quad \text{Gl. 2.4-35a}$$

mit dem Standardfehler (berechnet durch Fehlerfortpflanzung)

$$\sigma(R_{DA}) = \frac{1}{6} \frac{g_R F_G}{g_G F_R} \left[ \left( \frac{1}{F_G} + \frac{\alpha}{F_R} \right)^2 (S_G - B_G) + \left( \frac{1}{F_R} \right)^2 (S_R - B_R) \right]^{1/2} \quad \text{Gl. 2.4-35b}$$

Bei  $R_{0r}$  [ $\text{\AA}$ ] handelt es sich um einen „reduzierten“ Försterabstand, der es ermöglicht,  $R_{DA}$  unabhängig von der Donorquantenausbeute  $\Phi_{FD}$  einer einfach-markierten Probe zu berechnen.

$$R_{0r} = \frac{R_0}{\sqrt[6]{\Phi_{FD}}} = 9780 (J(\lambda) \kappa^2 n_D^{-4})^{1/6} \quad \text{Gl. 2.4-36}$$

Der Wertebereich des Orientierungsfaktors  $\kappa^2$  ist durch die Mobilität der Farbstoffe bestimmt (s. Anhang A). Mit Hilfe der Messung der zeitaufgelösten Anisotropie  $r(t)$  und dem *wobbling-in-a-cone*-Modell können Aussagen zur Mobilität und räumlichen Orientierung gemacht werden. Auf diese Weise liefert die Anisotropie weitere Informationen für die FRET-Untersuchungen.

Zur Berechnung der Transfereffizienz über die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffs gilt Gl. 2.3-30. Eine unvollständige Markierung mit Farbstoff wird dabei nicht korrigiert. Nach Epe *et al.* (Epe, 1983) erhält man unter Einbeziehung des Markierungsgrads mit Akzeptorfluorophor  $a^+$

$$E_T = \left(1 - \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_D}\right) / a^+ \quad \text{Gl. 2.4-37}$$

Die Markierungsverhältnis  $a^+ = 1$  besagt, dass 100 % aller Moleküle mit dem jeweiligen Fluorophor markiert sind.

Analog zur Gl. 2.4-20 kann der Gesamtfluoreszenzzerfall  $F_{D(A)}$  des Donors bei FRET beschrieben werden mit

$$F_{D(A)}(t) = g(t) \otimes \exp(-t(k_{D(0)} + k_{FRET})) \quad \text{Gl. 2.4-38}$$

mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_D = k_F^D + k_{IC}^D + k_{ISC}^D + k_Q^D [Q]$  und der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)} = (k_D + k_{FRET})^{-1}$ .

Die Gleichung für die Donorfluoreszenz ohne Energietransfer lautet wie folgt

$$F_D(t) = g(t) \otimes \exp(t \cdot k_D) \quad \text{Gl. 2.4-39}$$

Bei direkter Anregung des Akzeptors mit einem gepulsten Laser geeigneter Wellenlänge kann die Faltung mit der Gerätefunktion analog zu Gl. 2.4-20 durchgeführt werden, so dass für das Abklingen der Akzeptorfunktion  $S_{A,FRET}$  mit der Fluoreszenzlebensdauer des Akzeptors  $\tau_A = k_A^{-1}$  gilt

$$F_A(t) = g(t) \otimes \exp(t \cdot k_A) \quad \text{Gl. 2.4-40}$$

Im Fall von Energietransfer wird das Abklingverhalten der Akzeptorfluoreszenz durch den Fluoreszenzfarbstoff des Donors bestimmt, welches damit bei der Faltung berücksichtigt werden muss.

$$F_{A,FRET}(t) = \frac{k_{FRET}}{k_D + k_{FRET} - k_A} g(t) \otimes [\exp(-t/\tau_{D(A)}) + \exp(-t/\tau_D)] \quad \text{Gl. 2.4-41}$$

## 3 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird zunächst die experimentelle Durchführung der Absorptions- und der Fluoreszenzspektroskopie im Rahmen dieser Arbeit beschrieben, wobei die Fluoreszenzspektroskopie zwischen den Messungen am Molekülensemble (Stationäre Fluoreszenzspektroskopie und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie) und den Einzelmolekülexperimenten unterschieden wird. Zur Untersuchung einzelner Moleküle wurde die Methode der Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) verwendet. Ausführlich erläutert sind die Untersuchungsmethoden des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers zwischen einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff mit den genannten Fluoreszenztechniken. Zum Schluss sind die eingesetzten Chemikalien, Lösungsmittel, Puffer und die Proben mit der Probenvorbereitung beschrieben.

### 3.1 Spektroskopische Methoden

#### 3.1.1 Absorptionsspektroskopie

Als Absorptionsspektrometer wurde ein Cary-5E (Varian, Mulgrave/Australien) verwendet. Alle Messungen wurden in Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) durchgeführt. Spektren wurden mit vorheriger Basislinienkorrektur in 0,5-nm-Schritten (Integrationszeit: 0,5 s) gegen eine Referenzküvette mit dem Lösungsmittel aufgenommen.

#### 3.1.2 Fluoreszenzspektroskopie

##### 3.1.2.1 Stationäre Fluoreszenzspektroskopie

Für die Messung der stationären Fluoreszenzspektren wurde ein Spex FluoroLog III (Instruments SA, Edison/USA) verwendet. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Lampe mit einer Leistung von 450 W (Osram, Frankfurt). Zur Ausstattung gehörten Doppelmonochromatoren auf Anregungs- und Fluoreszenzseite und ein peltiergekühlter Einzelphotonenzähler (PMT R928P) diente als Detektor. Die Detektion erfolgte im 90°-Winkel zur Anregung. Die Polarisatoren befanden sich zum Feldvektor  $\vec{E}$  des anregenden elektromagnetischen Feldes im Winkel von 0°, 55° oder 90°. Falls nicht die Anisotropie der Probe bestimmt werden sollte, wurde mit einer Einstellung des Polarisators auf der Detektionsseite von 55° (*magic angle*) gemessen (Kap. 2.3.1.2).

Der Küvettenhalter (Eigenbau, Werkstätten MPI für biophysikalische Chemie) ist für Messungen in Abhängigkeit der Temperatur gebaut worden und besitzt Positionen für die Meßküvette und eine Referenzküvette, die zur Bestimmung der Temperatur diente. Das Wasserbad wurde auf eine Temperatur von 25°C eingestellt.

### **3.1.2.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie**

Bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) betragen die Konzentrationen der Probelösungen ca.  $10^{-9}$  M; dies entsprach in der Regel fünf bis neun Molekülen im Beobachtungsvolumen. Dazu wurde der gleiche Aufbau benutzt wie für die Einzelmolekülexperimente (Kap. 3.1.2.3). Um sogenannte „Totzeiten“ der Detektoren zu erniedrigen, wurden die Signale von zwei Detektoren miteinander korreliert. Dieses Verfahren wird als Kreuzkorrelation bezeichnet und ermöglicht es, Korrelationszeiten im ns-Bereich zu erfassen. Aufgrund der vorhandenen vier Detektoren war es somit möglich, die Signale des Detektors 1 mit denen von Detektor 2, 3 oder 4 zu korrelieren. In der Regel wurden die Signale eines Wellenlängenbereichs miteinander korreliert: die „grünen“ Signale (Detektoren 2 und 4) oder die „roten“ Signale (Detektoren 1 und 3) (Abb. 3.1-2). Die Aufnahmezeit einer Korrelationskurve betrug in der Regel 30 s.

### **3.1.2.3 Einzelmolekülspektroskopie mit Multiparameter-Fluoreszenzdetektion**

Zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Einzelmolekülen wurde die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) eingesetzt. Sie basiert auf der BIFL-Technik (*Burst Integrated Fluorescence Lifetime*), deren Methodik von R. Keller (Keller, 1996) vorgestellt und im Arbeitskreis von C. Seidel weiter entwickelt wurde (Eggeling, 1998a). Diese wurde auf vier Detektionskanäle erweitert, so dass jeweils der parallele und senkrechte Anteil der emittierten Fluoreszenzphotonen im Wellenlängenbereich unterhalb („grün“) und oberhalb („rot“) einer definierten Wellenlänge (Strahlteiler (AHF, Tübingen), s. Anhang B) detektiert wird. Im Weiteren werden der experimentelle Aufbau, Messung und Auswertung dieses Verfahrens beschrieben.

### **Lichtquellen**

Es stand ein Argon-Ionen-Laser (Sabre, Coherent) zur Verfügung, der in der Regel gepulst betrieben wurde. Dazu wurde ein aktiver Modenkoppler (APE, Berlin) verwendet. Die Pulslänge betrug ca. 180 ps und die Pulzfolgefrequenz 73 MHz. Die Anregungswellenlängen waren 496 nm und 528 nm.

Des Weiteren wurde ein Krypton-Ionen-Laser (Innova 400, Coherent) verwendet, der kontinuierliches Laserlicht bei 647 nm lieferte. Für gepulste Anregung bei einer Wellenlänge von 637 nm wurde ein Diodenlaser (Picoquant, Berlin) mit einer Pulsfolgefrequenz von 80 MHz betrieben. Die Pulsbreite ist variabel und betrug in den hier vorgestellten Experimenten ca. 250 ps.

Zur Abschwächung und Regulierung des Laserlichts wurden OD-Filter (New Focus, Santa Clara(CA), USA) verwendet. Die Anregungsleistung des Laserstrahls wurde mit einem Leistungsmesskopf bestimmt (Fieldmaster, Coherent, Ashburn(VI), USA).

Um nach dem Durchtritt durch Strahlteiler und OD-Filter linear polarisiertes Anregungslicht zu erhalten, wurde ein Dünnschicht-Polarisator (VISHT 11), Gsänger, Planegg) in den Strahlengang eingebaut.

### ***Detektion der Photonen***

Es wurde ein epi-illuminiertes konfokales Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus) verwendet. Störendes Hintergrundsignal, welches von Raleigh- und Ramanstreuung des Lösungsmittels sowie von darin enthaltenen fluoreszierenden Verunreinigungen verursacht wird (Affleck, 1996) und proportional zum Detektionsvolumen ist (Mets, 1994), ist beim konfokalen Aufbau sehr gering, da das Detektionsvolumen zwischen 1 und 6 fl groß ist. Daher ist dieser Aufbau für den Einsatz bei der Einzelmolekülspektroskopie gut geeignet.

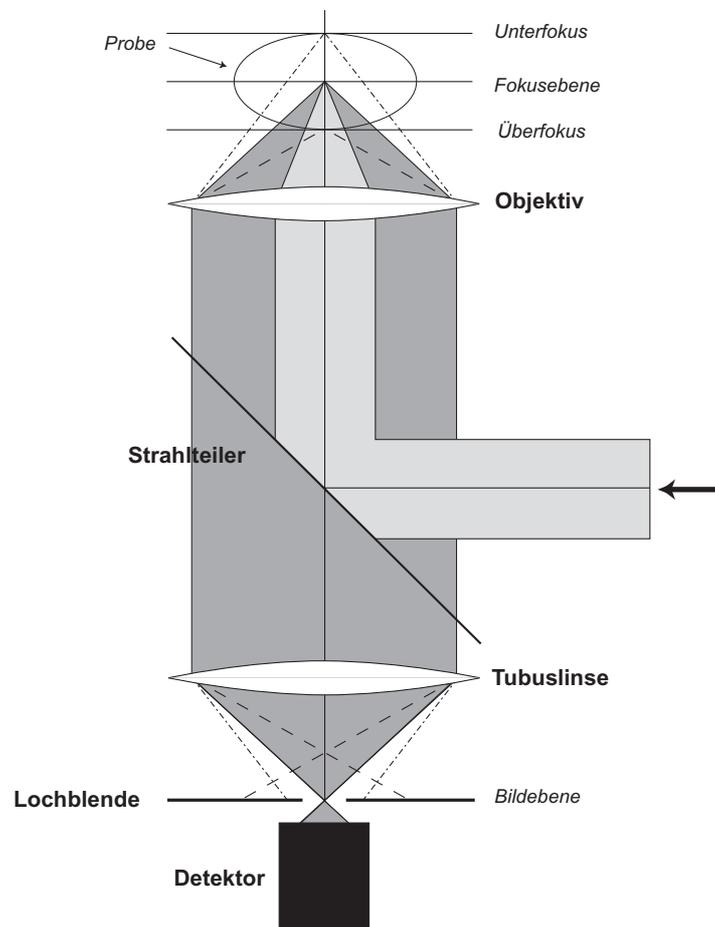


Abb. 3.1-1: Schema eines konfokalen, inversen Mikroskops mit einer „Unendlich-Optik“, wie es auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.

Der Lichtstrahl des Lasers wird über einen Strahlteiler durch das Objektiv (Uplanapo, 60x, NA 1,2 Wasserimmersionsobjektiv, Olympus) in die Probe fokussiert (Abb. 3.1-1). Das dadurch entstandene Anregungsvolumen wird auch als offenes Volumenelement bezeichnet. Diffundiert ein Molekül durch das Anregungsvolumen, kann es durch das Laserlicht angeregt werden. Handelt es sich dabei um einen Fluorophor oder um ein mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes Molekül, werden nach erfolgter Anregung Fluoreszenzphotonen emittiert, die nun

mit dem selben Objektiv gesammelt werden (epi-illuminiertes Mikroskop). Über den gleichen Strahlteiler werden die Photonen durch eine Tubuslinse auf eine Lochblende in der Bildebene (konfokales Mikroskop) abgebildet. Der Durchmesser der Lochblende (in dieser Arbeit wurde ein Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  verwendet) gibt die Größe des Detektionsvolumens vor.

Das Fluoreszenzlicht fällt, nachdem es die Lochblende passiert hat, auf einen polarisierenden Strahlteiler, der es in einen parallelen und senkrechten Anteil zur Ebene des linear polarisierten Anregungslichts aufteilt. Jeder dieser Anteile wird dann von einem weiteren Strahlteiler in Komponenten in zwei Wellenlängenbereichen (s. Anhang B) eingeteilt. Diese vier verschiedenen Anteile werden von vier *Single-Photon-Counting* Avalanche-Photodioden (APD) (EG&G, Vaudreuil, Kanada) detektiert.

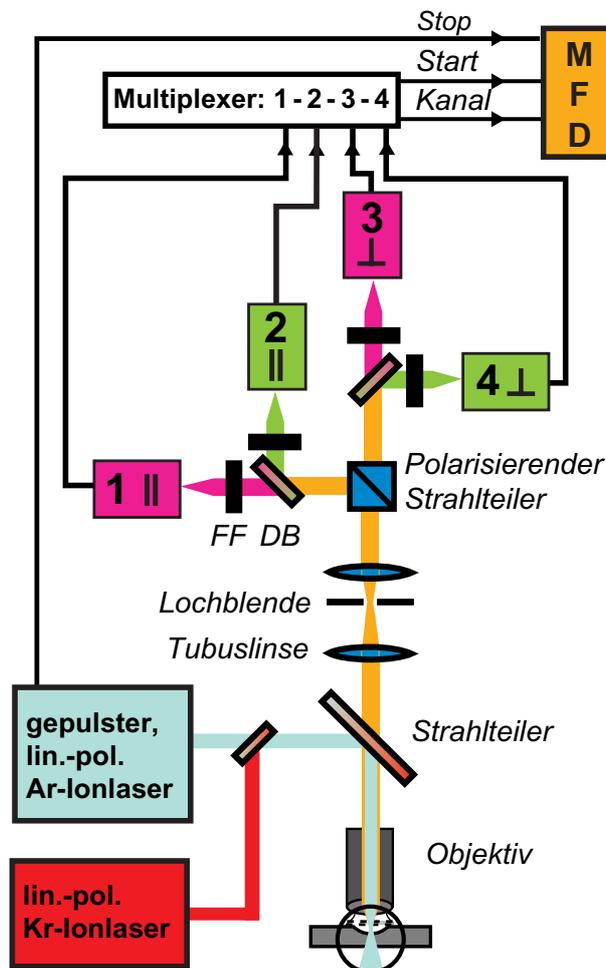


Abb. 3.1-2: Optische Anordnung zur simultanen Datenaufnahme verschiedener Fluoreszenzparameter Intensität, Lebensdauer und Anisotropie in zwei spektralen Bereichen für die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) im Rahmen der Einzelmolekülspektroskopie. DB: Strahlteiler zur Aufteilung des Lichts in Wellenlängenbereiche unter- und oberhalb eines bestimmten Wertes, FF: Fluoreszenzfilter.

### Datenaufnahme

Die emittierten Photonen werden mit einer PC-Karte (Becker&Hickl GmbH, Berlin) erfasst. Jedem detektierten Photon wird eine Ereignisnummer zugeteilt.

Ein *Multiplexer* sorgt dafür, dass das registrierte Photon einem bestimmten Detektor (1, 2, 3 und 4) zugeordnet werden kann (Abb. 3.1-3).

Als weitere Informationen zu jedem Photon werden die Ankunftszeit nach dem Anregungspuls des Lasers und die Zeit  $\Delta t$  zu dem vorhergehenden Photon registriert.

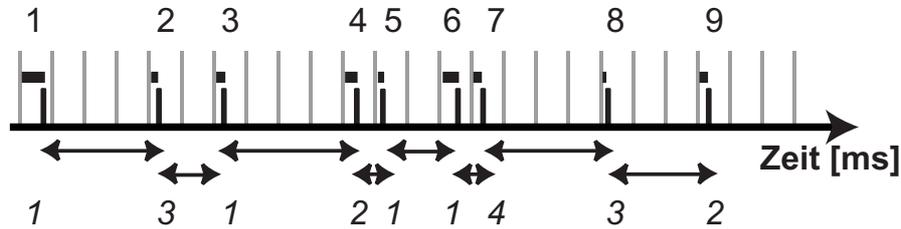


Abb. 3.1-3: Zu jedem Photon (schwarze vertikale Linien) werden vier Informationen abgespeichert: (1) die Ereignisnummer des Photons angezeigt in der oberen Zahlenreihe, (2) die Ankunftszeit nach jedem Laserpuls, (3) die Zeit  $\Delta t$  zu dem vorhergehenden Photon, dargestellt als Doppelpfeil, und (4) die Nummer des Detektors, bei dem das Photon registriert wurde, s. untere Zahlenreihe. Die Laserpulse sind dargestellt als graue, äquidistante Rechtecke.

### **Auswahl eines Einzelmolekülereignisses**

Aus den registrierten Fluoreszenzphotonen kann nun eine Vielkanalzählerspur (*Multichannel-Scaler-Trace*, (MCS)-Spur) erhalten werden. Dabei wird die Anzahl der Photonen in Zeitintervallen  $T_{IV}$  von 1 ms dargestellt. Beim Durchtritt eines Moleküls durch das Anregungsvolumen kann es angeregt werden und Fluoreszenzphotonen emittieren, die in Abb. 3.1-4 als Signalspitzen mit einer hohen Anzahl an Photonen gegenüber dem meist vorhandenen Hintergrundsignal zu erkennen sind. Eine Signalspitze wird dabei einem Einzelmolekülereignis zugeordnet.

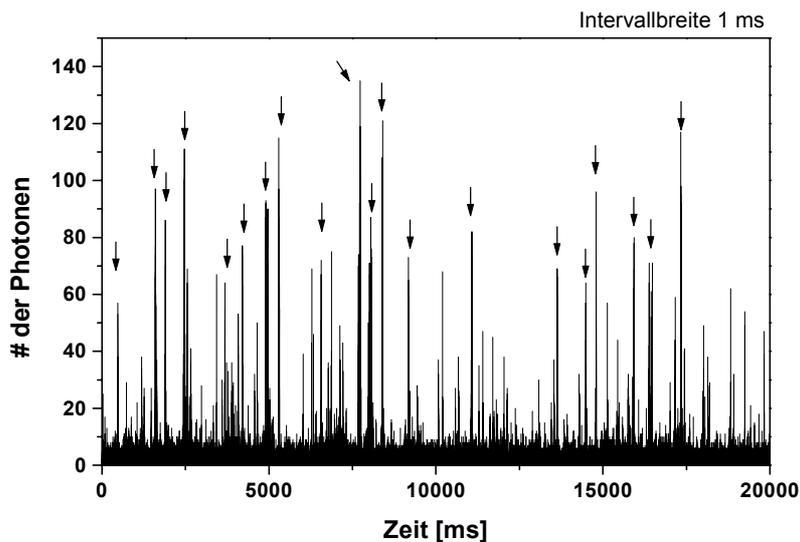


Abb. 3.1-4: Vielkanalzählerspur. Die meiste Zeit liegt nur Hintergrundsignal vor. Diffundiert ein Molekül durch das Beobachtungsvolumen, wird es durch das Laserlicht angeregt und emittiert Photonen beim anschließenden Fluoreszenzzerfall. Diese werden als Signalspitze aufgrund der stark erhöhten Photonenzahl pro Zeitintervall registriert. Die mit einem Pfeil markierten Signalspitzen werden als Einzelmolekülereignisse selektiert, da sie in diesem Fall eine Mindestanzahl von 100 Photonen (in allen vier Detektionskanälen) besitzen und der Abstand  $\Delta t$  ihrer Fluoreszenzphotonen kleiner als 0,0421 ms ist.

Die Vielkanalzählerspur dient zur Visualisierung der Einzelmolekülereignisse während der Messung und zur Kontrolle der Probenkonzentration.

Als Kriterium zur Auswahl eines Moleküls bzw. einer Signalspitze dient der registrierte Zeitabstand  $\Delta t$  gegen die Photonereignisnummer (Abb. 3.1-5). Durch einen Lee-Filter wird statistisches Rauschen dieser sogenannten  $\Delta t$ -Spur geglättet (Enderlein, 1997), so dass die Molekülereignisse besser vom Hintergrundsignal separiert werden können. Als Auswahlkriterium hierfür gilt nun ein möglichst kleiner Zeitabstand  $\Delta t$  zwischen zwei aufeinanderfolgenden Photonen, da ein Einzelmolekülereignis durch eine schnelle Abfolge von Fluoreszenzphotonen charakterisiert ist. Als weiteres Auswahlkriterium muss eine Mindestanzahl von Photonen in jedem Einzelmolekülereignis vorhanden sein, so dass nur die Signalspitze eines Einzelmolekülereignisses analysiert wird (in der Regel handelt es sich um eine Anzahl von 160 oder 100 (Kap. 4.3) Photonen).

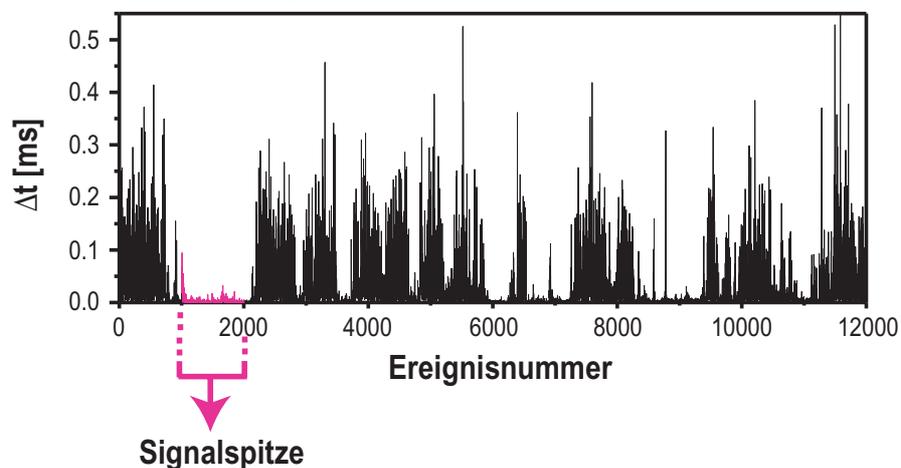


Abb. 3.1-5:  $\Delta t$ -Spur. Die Photonen aus einem Einzelmolekülereignis sind im Vergleich zum Hintergrundsignal durch einen möglichst kleinen Wert von  $\Delta t$  gekennzeichnet.

### ***Bestimmung der Fluoreszenzparameter***

Aus den Photonen pro Detektor jeder Signalspitze bzw. jeden Einzelmolekülereignisses werden nun vier Zerfallshistogramme erstellt und angepasst (Abb. 3.1-6): zwei für jede Polarisationsrichtung und zwei für jeden Wellenlängenbereich.

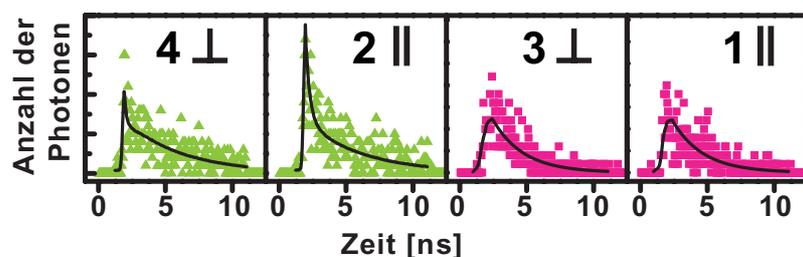


Abb. 3.1-6: Zerfallshistogramme von den registrierten Photonen der vier verschiedenen Detektorsignale. Die Detektoren 2 und 4 registrieren das „grüne“ Signal, 1 und 3 das „rote“ Signal.

Daraus können die Fluoreszenzintensität, die Lebensdauer und die Anisotropie - und für jeden Wellenlängenbereich getrennt - eines Moleküls beim Durchtritt durch das Beobachtungsvolumen bestimmt werden. Die Bestimmung der Parameter ist in Kap. 2.4 beschrieben und wird gemäß Gl. 2.4-19, Gl. 2.4-20 und Gl. 2.4-24 durchgeführt. Die Werte aller ausgewählten Ereignisse einer Probe werden anschließend in einem 1D-Histogramm dargestellt (Abb. 3.1-7).

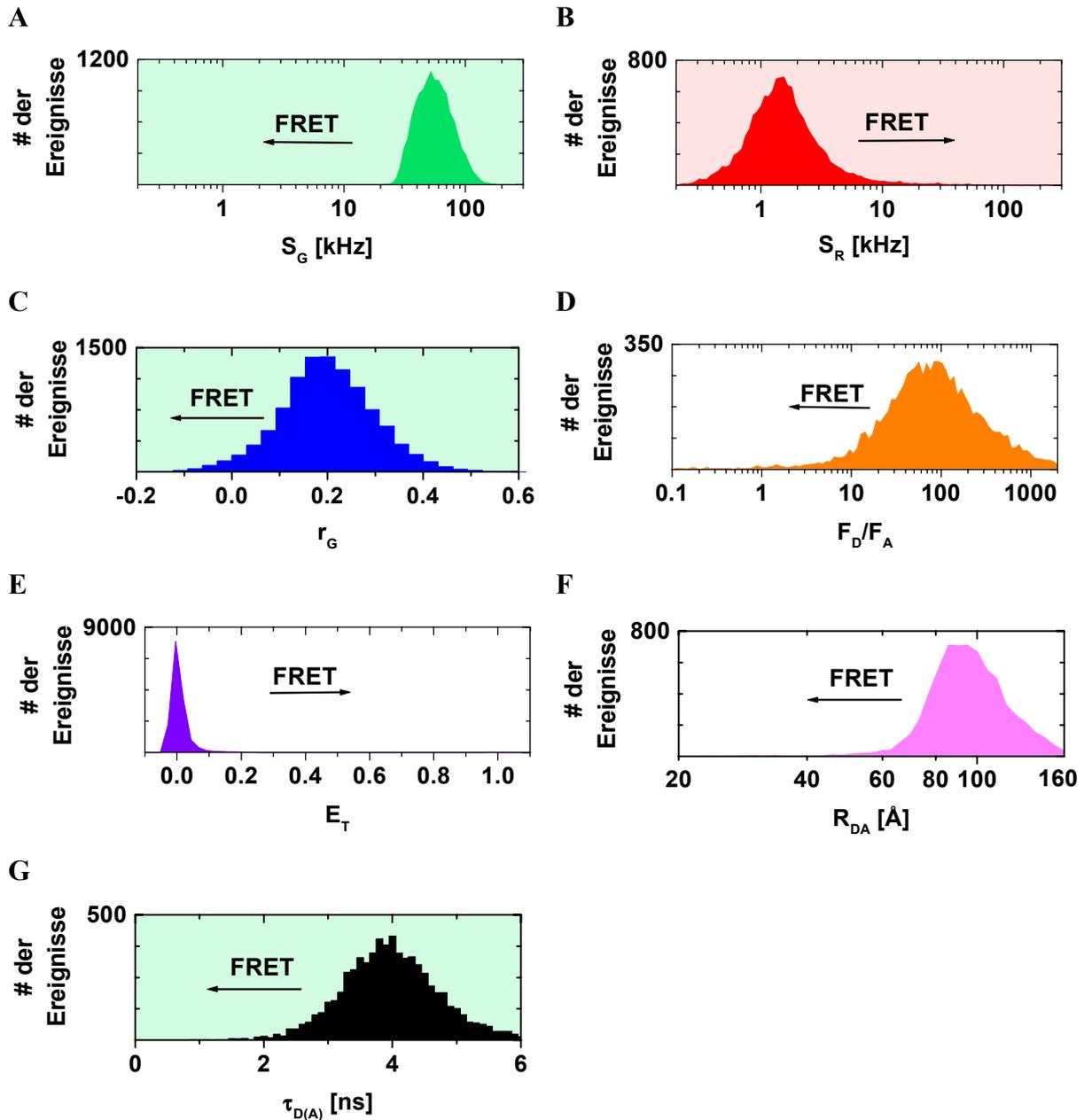


Abb. 3.1-7: Eindimensionale (1D-)Histogramme einer Donor-Probe. # der Ereignisse entspricht im Folgenden der Anzahl der Einzelmolekülereignisse. Dargestellt sind die Histogramme (A) der Intensität in den „grünen“ Detektionskanälen  $S_G$ , (B) der Intensität in den „roten“ Detektionskanälen  $S_R$ , (C) der Anisotropie  $r$  (hier der „grünen“ Detektionskanäle), (D) dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $F_D/F_A$ , (E) der Transfereffizienz  $E_T$ , (F) des Donor-Akzeptor-Abstandes  $R_{DA}$  und (G) der Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors  $\tau_{D(A)}$ . Die Pfeilrichtung gibt an, ob der Mittelwert der Verteilung bei Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zu- oder abnimmt.

Bei den Untersuchungen von einem Farbstoff werden die Indizes G („grün“) und R („rot“) verwendet für die einzelnen Parameter. Bei doppelt-markierten Proben werden zusätzlich die Indizes der Proben D, A und D(A) verwendet.

Im Folgenden sind die Histogramme zur Untersuchung des Donor-Akzeptor-Abstandes mit Hilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) vorgestellt. Dabei werden neben den Parametern Intensität  $S$ , Lebensdauer  $\tau$  und Anisotropie  $r$ , das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $F_D/F_A$  gemäß Gl. 2.4-33, der Energietransfer  $E_T$  gemäß Gl. 2.4-34 und der Donor-Akzeptor-Abstand  $R_{DA}$  nach Gl. 2.4-35 für jedes Einzelmolekülereignis ermittelt.

In Abb. 3.1-7 sind die 1D-Histogramme einer Probe dargestellt, die nur Donorfarbstoff enthält. Der Mittelwert der Verteilung im 1D-Histogramm von der „grünen“ Fluoreszenzintensität,  $S_G$ , (Abb. 3.1-7A) ist hoch im Vergleich zum Wert der „roten“ Intensität,  $S_R$ , (Abb. 3.1-7B), so dass das Intensitätsverhältnis  $F_D/F_A$  (Abb. 3.1-7D) ebenfalls einen hohen Wert aufweist.

Erhalten werden auch die Histogramme der Anisotropie,  $r_G$ , (Abb. 3.1-7C) und der Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors,  $\tau_{D(A)}$ , (Abb. 3.1-7G). Bei dem Farbstoff handelt es sich um den Fluorophor Alexa488, gebunden an ein Makromolekül, der in der Donorprobe eine Lebensdauer von ca. 4 ns und eine Anisotropie von 0,18 aufweist. Gemäß Gl. 2.4-35 kann für ein Einzelmolekülereignis eines Donormoleküls ein Wert für  $R_{DA}$  bestimmt werden, da er über die Intensitäten in den „grünen“ und „roten“ Detektionskanälen bestimmt wird. Das Gleiche gilt für die Berechnung von  $E_T$  mit Gl. 2.4-34. Die Berechnung ist hier möglich, da die Intensitäten des Streulichtsignals in den „grünen“ und „roten“ Kanälen einer Poisson-Verteilung folgen. Die Ereignisse, die bei der Berechnung der Akzeptorfluoreszenz  $F_A$  nach Gl. 2.4-36 eine Intensität  $S_R > B_R$  aufweisen, können in den Histogrammen von  $E_T$  und  $R_{DA}$  (Abb. 3.1-7E und F) dargestellt werden. Ist  $S_R \leq B_R$ , kann  $F_A$  nicht berechnet werden, so dass die zugehörigen Ereignisse nicht gezählt und dargestellt werden können.

Im Fall von  $R_{DA}$  ist der Mittelwert der Verteilung als maximal bestimmbarer Abstand  $R_{DA(max)}$  für die Messungen mit dieser Donor-Probe zu verstehen. Dieser Wert ist abhängig von den verwendeten Farbstoffen und den Versuchsbedingungen. Der Mittelwert der Verteilung von  $E_T$  muss als untere Grenze der Bestimmung der Transfereffizienz betrachtet werden.

Im Beispiel von Abb. 3.1-7 bedeutet dies, dass bei einer doppelt-markierten Probe mit dieser korrespondierenden Donor-Probe kein Abstand  $R_{DA}$  ermittelt werden kann, der größer als 90 Å ist. Der Mittelwert der Verteilung von  $E_T$  gibt die theoretisch zu erwartende untere Grenze von 0 wieder.

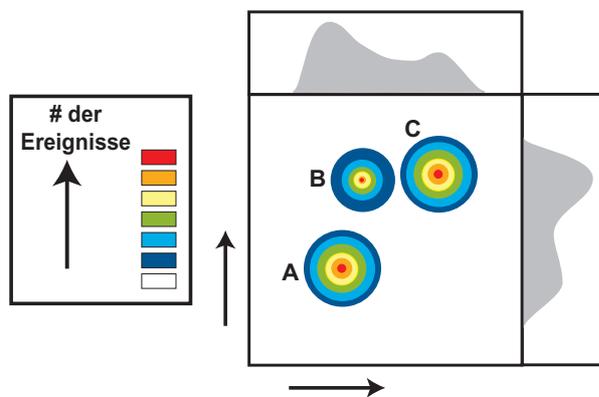
### **2D-Darstellung**

Zur besseren Auflösung von Subpopulationen in einem heterogenen System werden die 1D-Histogramme von zwei der erhaltenen Parameter gegenübergestellt, wie in Abb. 3.1-8A

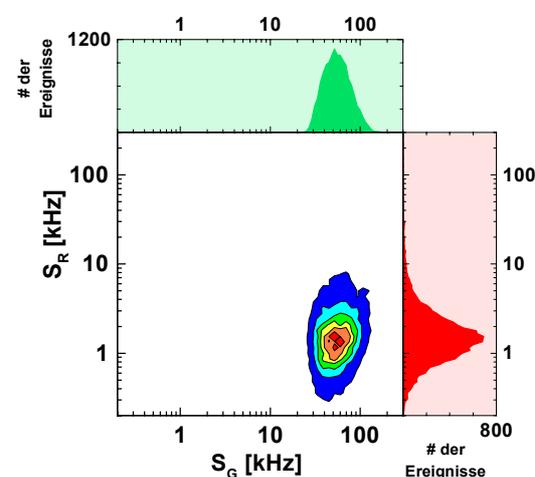
schematisch dargestellt ist. Dabei finden sich drei Regionen mit gleichen Verteilungen in x- und y-Richtungen im 2D-Plot um deutlich voneinander abweichende Mittelwerte. Diese Populationen werden auch als Zustände oder Spezies bezeichnet. Der Zustand B in Abb. 3.1-8A kann nur im 2D-Histogramm, aber nicht in den einzelnen 1D-Histogrammen aufgelöst werden.

Abb. 3.1-8B zeigt die in dieser Art verwendete Darstellung von zwei Parametern am Beispiel der Darstellung der „grünen“ Signalintensität,  $S_R$ , und der „roten“ Signalintensität,  $S_G$ . Dabei handelt es sich um die gleiche Donor-Probe wie in Abb. 3.1-7. In Abb. 3.1-8C ist das 2D-Histogramm in einem 3D-Graphen dargestellt, um den räumlichen Effekt der Population zu deutlich zu machen.

A



B



C

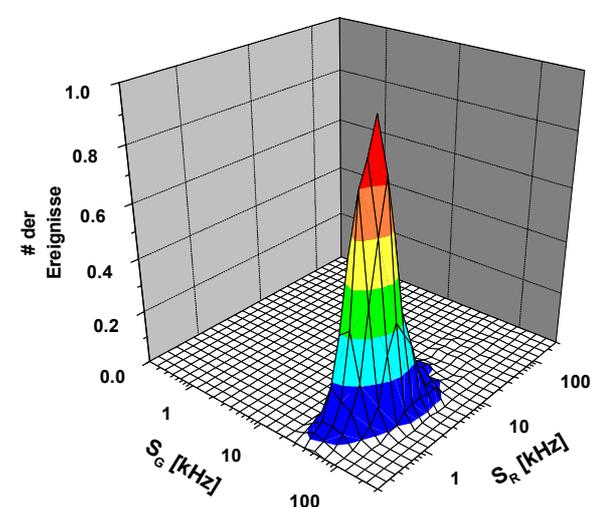


Abb. 3.1-8: Bildung eines 2D-Histogramms aus den 1D-Histogrammen von zwei Fluoreszenzparametern. (A) Schematische Darstellung einer Probe mit drei Populationen. In den 1D-Histogrammen sind nur die Verteilungen um zwei Mittelwerte erkennbar. (B) 2D- und 1D-Histogramme, wie sie im Folgenden verwendet werden, am Beispiel der Intensitäten  $S_G$  und  $S_R$  einer Donor-Probe bei FRET-Untersuchungen. Jedem Einzelmolekülereignis kann somit ein Wertepaar  $S_G/S_R$  zugeordnet werden. (C) Dreidimensionale Darstellung des 2D-Histogramms aus (B) mit der auf Eins normierten Anzahl (#) der Ereignisse als z-Achse.

### Vergleich der Signalspitzen-orientierten und der gleitenden Auswertung am Beispiel der Fluoreszenzlebensdauer

Bei der Auswertung der Fluoreszenzlebensdauer besteht neben der Signalspitzen-orientierten Auswertung auch die Möglichkeit der gleitenden Auswertung (Kap. 2.4). In Abb. 3.1-9 werden diese Auswertemöglichkeiten anhand der Darstellung der Anisotropie  $r_G$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$  verglichen.

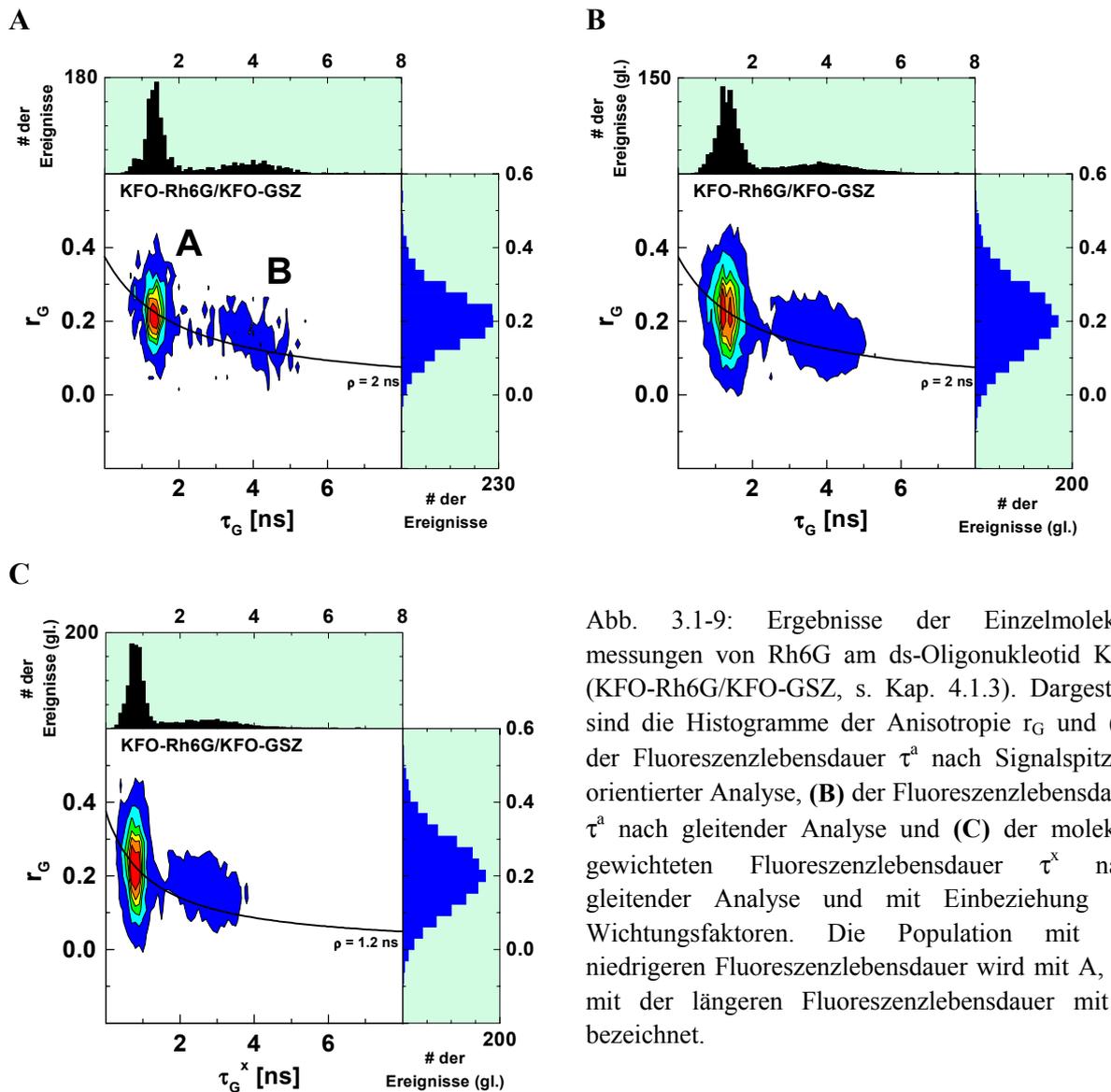


Abb. 3.1-9: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von Rh6G am ds-Oligonukleotid KFO (KFO-Rh6G/KFO-GSZ, s. Kap. 4.1.3). Dargestellt sind die Histogramme der Anisotropie  $r_G$  und (A) der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau^a$  nach Signalspitzen-orientierter Analyse, (B) der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau^a$  nach gleitender Analyse und (C) der molekulgewichteten Fluoreszenzlebensdauer  $\tau^x$  nach gleitender Analyse und mit Einbeziehung der Wichtungsfaktoren. Die Population mit der niedrigeren Fluoreszenzlebensdauer wird mit A, die mit der längeren Fluoreszenzlebensdauer mit B bezeichnet.

Der Farbstoff Rh6G zeigt bei der Messung der Probe zwei verschiedene Umgebungen, erkennbar an den zwei Populationen (A und B) in der Darstellung von Anisotropie gegen die Fluoreszenzlebensdauer. Abb. 3.1-9B zeigt das Ergebnis nach der gleitenden Analyse. Der Kommentar (gl.) zeigt an, dass es sich um die Anzahl der Einzelmolekülereignisse nach der gleitenden Analyse handelt und nicht nach der Signalspitzen-gerichteten Auswertung (Abb. 3.1-A). Die ähnlichen Ergebnisse der beiden Auswertemethoden zeigen, dass keine Dynamik im Beobachtungszeitraum (ca. 1 ms; entspricht der Diffusionszeit des Rh6G-markierten Moleküls durch das Detektionsvolumen) zwischen den beiden Zuständen auftritt. In den Abb.

3.1-9A und -9B sind gleich viele Ereignisse dargestellt; dabei wird der glättende Effekt der gleitenden Analyse im Vergleich zur Signalspitzen-orientierten Auswertung deutlich.

In den beschriebenen Histogrammen von Abb. 3.1-9A und -9B ist die Fluoreszenzlebensdauer nach monoexponentieller Anpassung der Abklingkurven der einzelnen Einzelmolekülereignisse dargestellt. Die tatsächliche Häufigkeit der Einzelmolekülereignisse in Abhängigkeit vom  $\tau$ -Wert liefert eine Umrechnung in die molekulgewichtete Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G^x$  (Abb. 3.1-9) mit Hilfe der selektiven Spektroskopie (Eggeling, 1999a; Schaffer, 2000). In diesem Fall wurden die Molekülereignisse mit  $\tau < 2,45$  ns (Population A) und  $\tau > 2,45$  ns (Population B) ausgewählt. Aus den selektierten Photonen werden die Fluoreszenzabklingkurven - getrennt für jeden Detektionskanal (hier 2 und 4) - erstellt. Damit wird eine ausreichend hohe Photonenzahl für die Anpassung der Fluoreszenzabklingkurve erhalten. Zeigt die Fluoreszenzabklingkurve aus den Photonen eines Zustands ein mehr-exponentielles Verhalten, kann eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  anhand Gl. 3.1-1 berechnet werden.

$$\text{Fluoreszenzgewichtet: } \tau_{av}^a = \sum_i a_i \cdot \tau_i \quad \text{mit} \quad \sum_i a_i = 1 \quad \text{Gl. 3.1-1a}$$

$$\text{Molekulgewichtet: } \tau_{av}^x = \sum_i x_i \cdot \tau_i \quad \text{Gl. 3.1-1b}$$

Im Beispiel ergeben sich für Population A die folgenden Lebensdauerwerte:  $\tau_{av}^x = 0,9$  ns und  $\tau_{av}^a = 1,4$  ns. Die Ergebnisse für Population B lauten:  $\tau_{av}^x = 3,1$  ns und  $\tau_{av}^a = 4,2$  ns.

Es besteht folgender Zusammenhang zwischen  $\tau_{av}^a$  gegen  $\tau_{av}^x$ , wenn die Ausgleichskurve durch den Koordinatenursprung verläuft:  $\tau_{av}^x = 0,0485 \cdot (\tau_{av}^a)^2 + 0,5365 \cdot \tau_{av}^a$ . Damit ist es möglich, die Histogramme in Abb. 3.1-9 mit  $\tau^x$ -Werte als Werten der x-Achse zu berechnen. Durch die Darstellung der molekulgewichteten Lebensdauer in den 1D- und 2D-Histogrammen erhält man somit ein korrigiertes Bild von der Verteilung der Populationen zueinander (Abb. 3.1-9C). Die Verteilung der Populationen in Abb. 3.1-9C ändert sich gegenüber den Darstellungen in Abb. 3.1-9A und -9B nur geringfügig und liefert damit keine neue Information über die Anteile der einzelnen Spezies, so dass die aufwändige Umrechnung der Lebensdauer im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter durchgeführt wurde.

In Kap. 4.1-3 wurde die gleitende Analyse durchgeführt, um eventuell vorhandene Fluktuationen aufzuklären. In allen Messungen der vorliegenden Arbeit sind die Lebensdauer-histogramme nach der Signalspitzen-orientierten Auswertung angegeben.

### 3.1.3 Software für Messungen und Auswertung

Die Vielkanalzählerkarte (count.exe, Eigenproduktion der Abteilung Jovin/MPI, Göttingen), die Korrelatorkarte ALV-5000 Software (Version 5,0, ALV Langen GmbH, Langen) für die FCS und die BIFL-Karte (SPC 432, Becker&Hickl GmbH, Berlin) wurden käuflich erworben.

Weitere Meß- und Auswerteprogramme wurden von Arbeitskreismitgliedern (M. Antonik, C. Eggeling, E. Haustein, J. Schaffer) der Gruppe Arbeitsgruppe von C. Seidel (MPI, Göttingen) in LabView (Version 5.1, National Instruments) und Visual C++ (Microsoft Corporation) geschrieben.

Für mathematische Auswertungen wurde die Windows-basierende Software Origin (Microcal™ Origin™, Version 5.0 und 6.1; Microcal Software, Northampton (MA), USA) verwendet. Mit Excel (Excel für Windows, Microsoft, Version 7,0) wurden Vorlagen zur Auswertung der stationären FRET-Untersuchungen geschrieben.

### **3.2 Untersuchungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers**

Die Fluoreszenzlöschung eines Donorfarbstoffs durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer auf einen Akzeptorfarbstoff wird zur Bestimmung des Farbstoffabstandes verwendet. Bei bekannten Positionen der Fluorophore in einem Makromolekül kann somit Aufschluss über die Struktur oder die Dynamik des Makromoleküls erlangt werden. Im Folgenden sind die verschiedenen Schritte zur Bestimmung des Abstands dargestellt mit Hilfe verschiedener Methoden, wobei zwischen Methoden der Ensemblemessungen und der Einzelmolekülspektroskopie unterschieden wird.

#### **3.2.1 Allgemeine Grundlagen**

Um alle hier vorgestellten Methoden zur Bestimmung der Transfereffizienz  $E_T$  und des Donor-Akzeptor-Abstands  $R_{DA}$  durchführen zu können, benötigt man folgende drei Systeme: Die Probe (dabei handelt es sich um eine DNA-Sequenz oder Proteinuntereinheit) markiert mit

- Donorfarbstoff, bezeichnet als D,
- Donor- und Akzeptorfarbstoff, bezeichnet als D(A)
- Akzeptorfarbstoff, bezeichnet als A.

Diese Abkürzungen werden im Folgenden auch als Indizes verschiedener Fluoreszenzparameter dieser Proben verwendet.

#### **3.2.2 Eigenschaften der Donor- und Akzeptorfarbstoffe**

Die Farbstoffe zur Untersuchung des Energietransfers sollten folgende Eigenschaften besitzen:

- Um die Fluoreszenzlöschung des Donorfarbstoffs durch den Energietransfer gut beobachten zu können, sollte dieser eine möglichst hohe Quantenausbeute der Fluoreszenz,  $\Phi_F$ , und eine geringe Quantenausbeute des *Intersystem Crossing*,  $\Phi_{ISC}$ , besitzen.
- Beide Farbstoffe sollten eine hohe Photostabilität besitzen, damit eine Photozerstörung während des Experiments weitgehend ausgeschlossen werden kann.

- Damit der Abstand als Mittelpunkt-Mittelpunktsabstand betrachtet werden kann, sollten sie nicht zu groß sein und als sphärische Moleküle betrachtet werden können. Dazu gehört auch, dass Strukturänderungen des Farbstoffs ausgeschlossen werden können, die zu einem inhomogenen Fluoreszenzverhalten führen (Hochstrasser, 1992; Parkhurst, 1995).
- Nicht bei allen biologischen Makromolekülen können bereits vorhandene, sogenannte intrinsische, Fluorophore, wie z.B. Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, zur spektroskopischen Untersuchung verwendet werden. Bei FRET müssen zudem zwei Farbstoffe vorliegen, so dass die Makromoleküle meist mit extrinsischen Farbstoffen an bestimmten Positionen markiert werden.
- Die Fluorophore bei der Untersuchung von biologischen Makromolekülen sollten wasserlöslich sein und außerdem eine geeignete funktionelle Gruppe besitzen, welche die kovalente Bindung an das Makromolekül erlaubt. Im Allgemeinen werden dazu Maleinimid- bzw. N-hydroxysuccinimidylester(NHS)-Derivate der Farbstoffe verwendet (s. Anhang C). Diese Bindung zwischen Fluorophor und zu untersuchendem Molekül, der Linker, sollte nicht zu lang sein, da sonst der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren durch die räumliche Bewegung zu stark fluktuiert. Als Folge gilt dann die Abhängigkeit der Transfereffizienz von der sechsten Potenz des Donor-Akzeptor-Abstands (Gl. 2.3-44) nicht mehr.
- Die Fluoreszenzlebensdauer des Donors sollte nicht durch die Bindung des Akzeptors beeinflusst werden, außer durch die strahlungslose Transferrate  $k_{\text{FRET}}$ . Bei fluoreszenzmarkierten Makromolekülen können allosterische Wechselwirkungen zwischen Donor- und Akzeptor-Positionen die Donorlebensdauer durch Begünstigung anderer Zerfallsprozesse verändern (z.B. zusätzlicher Beitrag von  $k_{\text{Q}}[Q]$ ).
- Die Fluoreszenz- bzw. Absorptionsspektren sollten weitgehendst unabhängig vom pH-Wert und von der Polarität des Lösungsmittels sein. Besonders in biologischen Makromolekülen können lokale Umgebungseffekte den pH-Wert und die Polarität beeinflussen. Zu diesem Aspekt gehört auch, dass Pseudobasenbildung ausgeschlossen werden kann, wie sie bei unveresterten Rhodamin-Farbstoffen auftritt (Kap. 4.1.2).

### 3.2.3 Bestimmung der Energietransfer-Parameter

Die Bestimmung des Abstandes  $R_{\text{DA}}$  zwischen Donorfärbstoff D und Akzeptorfärbstoff A erfolgt in mehreren Schritten:

Zunächst wird das sogenannte Überlappungsintegral  $J$  ermittelt. Anschließend wird der Försterabstand  $R_0$  erhalten. Die Transfereffizienz  $E_{\text{T}}$  kann anhand mehrerer Methoden über Absorptions- und Fluoreszenzmessungen der verschiedenen Proben (D, D(A), A) bestimmt werden. Durch Einsetzen in Gl. 2.3-36 erhält man dann den Abstand  $R_{\text{DA}}$ . Bei den Einzelmolekülmessungen mit MFD kann der Abstand  $R_{\text{DA}}$  direkt, ohne vorherige Bestimmung von  $E_{\text{T}}$ , ermittelt werden.

### 3.2.3.1 Bestimmung des Überlappungsintegrals

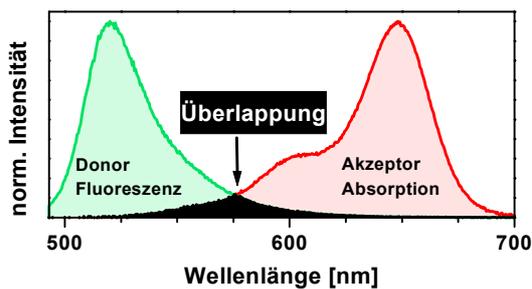
Der spektrale Überlappungsbereich von Donor- und Akzeptorfarbstoff ist von großer Bedeutung für den Energietransfer. Er hängt von der Form des Donor-Fluoreszenzspektrums ab und vom Absorptionsspektrum des Akzeptors.

Aus den Spektren der Farbstoffe werden die Parameter  $f_D(\lambda)$  und  $\epsilon_A(\lambda)$  erhalten. Bei  $f_D(\lambda)$  handelt es sich um die normierte Fluoreszenzintensität des Donors im Wellenlängenbereich von  $\lambda$  bis  $(\lambda+d\lambda)$ .  $\epsilon_A(\lambda)$  ist der Extinktionskoeffizient des Akzeptors in Abhängigkeit von der Wellenlänge  $\lambda$  (und besitzt die Einheit  $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$$f_D(\lambda) = \frac{F_D(\lambda)}{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) d\lambda} \quad \text{Gl. 3.2-1}$$

Das Überlappungsintegral  $J$  [ $M^{-1} \text{ cm}^3$ ] kann nun nach Gl. 2.3-32 berechnet werden. Der Wert von  $J$  der hier verwendeten Farbstoffpaare liegt in der Größenordnung von  $10^{-13} M^{-1} \text{ cm}^3$ .

**A**



**B**

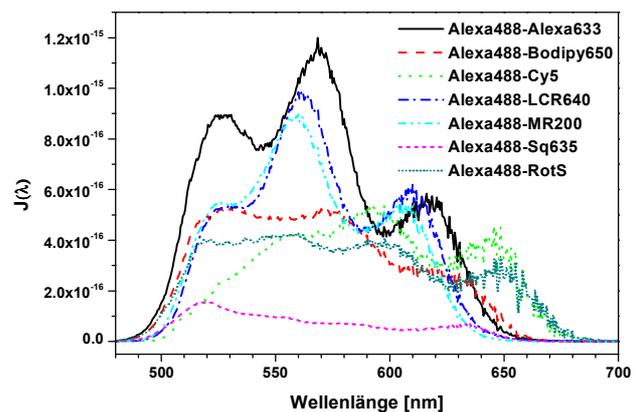


Abb. 3.2-1: **(A)** Das Überlappungsintegral  $J$  zwischen einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff ist schematisch dargestellt (schwarzer Bereich). **(B)** Überlappungsintegrale in Abhängigkeit von der Wellenlänge der verschiedenen Kombinationen mit Alexa488 als Donorfarbstoff ( $\Phi_{FD} = 0,58$ ) und den Farbstoffen Alexa633, Bodipy650, Cy5, LCR640, MR200, Sq635 und RotS als Akzeptorfarbstoff. Die Spektren der Farbstoffe sind in Anhang C wiedergegeben.

In Abb. 3.2-1A ist das Überlappungsintegral zwischen einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff schematisch dargestellt. Abb. 3.2-1B zeigt die Überlappungsintegrale mehrerer Farbstoffkombinationen in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Dabei wird die Feinstruktur deutlich.

### 3.2.3.2 Bestimmung des Försterabstands

Zur Berechnung des Försterabstands gemäß Gl. 2.3-36 werden neben dem Überlappungsintegral  $J$  weitere Parameter benötigt.

Der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  (s. Anhang A) gibt ein Maß für die Orientierung der Übergangsdipolmomente beider Farbstoffe zueinander an. Er kann durch Anisotropiemessungen abgeschätzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde  $\kappa^2$  als  $2/3$  angenommen. Der

Försterabstand ist darüber hinaus abhängig von der Quantenausbeute des Donors,  $\Phi_{FD}$ , in Abwesenheit des Akzeptors, und dem Brechungsindex,  $n_D$ , der Lösung in der lokalen Umgebung der Fluorophore. Da es sich bei den FRET-Untersuchungen der Makromoleküle um Messungen im wässrigen Medium handelt, wird im Weiteren  $n_D = 1,33$  verwendet.

Bei dem Försterabstand  $R_0$  handelt es sich um eine molekulspezifische Konstante. Es darf daher nicht außer Acht gelassen werden, dass z.B. durch Konformationsänderungen in einem Protein bei verschiedenen Mutanten eine Änderung von  $\Phi_{FD}$  oder  $\kappa^2$  durch lokale Umgebungseffekte der verwendeten Fluorophore eintreten kann und Veränderungen von  $R_0$  hervorrufen können.

In Tab. 3.2-1 sind Donor-Akzeptorpaare mit ihren Parametern ( $\Phi_{FD}$ ,  $\epsilon_A(\lambda)$ ) zur Berechnung des Försterabstands vorgestellt. Dabei wird die Anregungswellenlänge des Donorfarbstoff mit  $\lambda'$  bezeichnet, analog dazu die Anregungswellenlänge des Akzeptors mit  $\lambda''$ . Die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums des Donors ist  $\lambda_1$  und die des Akzeptormaximums  $\lambda_2$ . Durch Variation der Parameterwerte kann der Einfluss auf  $R_0$  abgeschätzt werden.

**Tab. 3.2-1: Parameter zur Abstandsberechnung verschiedener Donor-Akzeptorpaare.**

Donor	Akzeptor	$\Phi_{FD}$	$\epsilon_A(\lambda'')$ [ $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]	$\lambda''$ [nm]	J [ $10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$ ] (454 nm - 700 nm)	$R_0$ [Å]
Alexa488	Cy5	0,90	230	647	1,66	55
RhGreen	Cy5	0,95	230	647	2,21	58
Alexa488	Rh6G	0,90	71,5	524	3,02	61
Alexa488	TMR	0,90	101	553	3,45	62
Alexa488	Cy3	0,90	150	557	5,65	66

Wenn beispielsweise bei dem Paar Alexa488-Cy5 die Quantenausbeute des Donors auf die Hälfte reduziert ist, beträgt  $R_0$  49 Å. Hat der Akzeptor einen halb/doppelt so großen Extinktionskoeffizienten, ist  $R_0$  bei 49/62 Å. Wenn das Absorptionsmaximum des Akzeptors um 10 nm bathochrom/hypsochrom verschoben ist, dann liegt  $R_0$  bei 54/57 Å.

Man erkennt, dass relativ starke Änderungen von  $\Phi_{FD}$ ,  $\epsilon_A$  oder ausgeprägte spektrale Verschiebungen auftreten müssen, um Abweichungen des Försterabstands  $R_0$  von ca. 10 % hervorzurufen.

Abschließend ist zu bemerken, dass die Abstandsbestimmung am präzisesten durchgeführt werden kann, wenn sich der zu bestimmende Abstand von Donor- und Akzeptorfarbstoff in der Größenordnung des Försterabstands befindet.

### ***3.2.3.3 Bestimmung der Transfereffizienz und des Fluorophorabstands im Molekülensemble***

Bei den Methoden zur Bestimmung der Transfereffizienz können zwei Gruppen unterschieden werden: eine Gruppe untersucht die Donorfluoreszenz, während die zweite Gruppe die

Akzeptorfluoreszenz ebenfalls in die Bestimmung mit einbezieht. Alle Methoden können mit stationärer Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden bis auf die Methode über die Fluoreszenzlebensdauer, die nur mit zeitaufgelöster Spektroskopie eingesetzt werden kann.

### **mit Hilfe der Donorfluoreszenz**

#### *Fluoreszenzquantenausbeute*

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  des Donorfluorophors unterscheidet sich bei An- bzw. Abwesenheit des Akzeptorfarbstoffes nur durch den Beitrag des Energietransfers  $k_{FRET}$ , so dass für den Energietransfer  $E_T$  gilt

$$E_T = 1 - \frac{\Phi_{F,D(A)}}{\Phi_{FD}} \quad \text{Gl. 2.3-29}$$

Es müssen lediglich die Quantenausbeute des Donors im doppelt-markierten Molekül und die des Moleküls, welches nur mit Donorfarbstoff markiert ist, bestimmt werden.

#### *Fluoreszenzlebensdauer*

Für die Bestimmung des Energietransfers  $E_T$  mit Hilfe der Fluoreszenzlebensdauer gilt

$$E_T = \left(1 - \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_D}\right) / a^+ \quad \text{Gl. 2.4-41}$$

Das Markierungsverhältnis des Akzeptorfarbstoffs,  $a^+$ , wird aus dem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten von Farbstoff und Makromolekül ermittelt (s. Kap. 3.6). Für die Bestimmung von  $E_T$  wird die Fluoreszenzlebensdauer der doppelt-markierten Probe D(A) und der Donorprobe D benötigt.

#### *über (ratio)<sub>D</sub>*

Nach dieser Methode (Clegg, 1992) setzt sich der Anteil der Donorfluoreszenz am Fluoreszenzmaximum  $F(\lambda_1, \lambda')$  im doppelt-markierten Molekül  $F_{D(A)}$  - analog zu Gl. 2.4-29 - nach Gl. 3.2-2 zusammen aus dem Anteil, der verringert ist durch den Energietransfer, aber auch aus dem Anteil der Donorfluoreszenz, der nicht verringert ist, da nicht alle Moleküle doppelt-markiert sind. Dann handelt es sich um ein Markierungsverhältnis von Donorfarbstoff  $d^+$  (s. Kap. 3.6) kleiner als 1 und/oder für den Akzeptorfarbstoff gilt  $a^+ < 1$ .

$$F(\lambda_1, \lambda') = F_{D(A)}(\lambda_1, \lambda') \propto F_{em}^{D(A)}(\lambda_1, \lambda') = [M] \epsilon_D(\lambda') \Phi_{FD}(\lambda_1) d^+ [(1 - E_T) a^+ + a^-] \quad \text{Gl. 3.2-2}$$

Der Index *em* steht für die Fluoreszenz (engl. *emission*).  $[M]$  ist die Gesamtkonzentration der Moleküle. Bei  $\epsilon_D(\lambda')$  handelt sich hierbei um den Extinktionskoeffizienten des Donors bei der Wellenlänge  $\lambda'$ .  $\Phi_{FD}(\lambda)$  ist der Formfaktor für die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors, der sich aus dem normierten Spektrum und der Quantenausbeute des Donors zusammensetzt. Bei

$a^-$  handelt es sich um den fehlenden Anteil an Akzeptorfarbstoff im doppelt-markierten Molekül.

Für das Anregungsspektrum des Akzeptors (Index *ex*, engl. *excitation*) gilt Gl. 3.2-3 mit

$$F_A(\lambda_2, \lambda'') = F_{ex}^A(\lambda_2, \lambda'') \propto [M] \left\{ \varepsilon_A(\lambda'') \Phi_{FA}(\lambda_2) a^+ \right\} \quad \text{Gl. 3.2-3}$$

Der Index *ex* steht für die Fluoreszenz aus einem Anregungsspektrum (engl. *excitation*).

Als  $(ratio)_D$  bezeichnet man den Quotienten aus Gl. 3.2-2 und Gl. 3.2-3:

$$(ratio)_D = \frac{F_{D(A)}(\lambda_1, \lambda')}{F_A(\lambda_2, \lambda'')} = \frac{\varepsilon_D(\lambda') \Phi_{FD}(\lambda_1) \left( \frac{d^+}{a^+} \right)}{\varepsilon_A(\lambda'') \Phi_{FA}(\lambda_2) \left( \frac{d^+}{a^+} \right)} \left[ (1 - E_T) a^+ + a^- \right] \quad \text{Gl. 3.2-4}$$

Damit berechnet sich die Transfereffizienz  $E_T$  zu:

$$E_T = 1 - \frac{F_{D(A)}(\lambda_1, \lambda') \cdot \varepsilon_A(\lambda'') \cdot \Phi_{FA}(\lambda_2) \cdot a^+}{F_A(\lambda_2, \lambda'') \cdot \varepsilon_D(\lambda') \cdot \Phi_{FD}(\lambda_1) \cdot d^+} - a^- \quad \text{Gl. 3.2-5}$$

Zur experimentellen Bestimmung von  $E_T$  wird ein Fluoreszenzspektrum der doppelt-markierten Probe bei der Anregungswellenlänge  $\lambda'$  aufgenommen, um  $F_{D(A)}(\lambda, \lambda')$  und damit  $F_{D(A)}(\lambda_1, \lambda')$  zu bestimmen. Wird bei  $\lambda''$  angeregt, - wo der Donor nicht absorbiert, erhält man  $F_A(\lambda_1, \lambda'')$  bzw.  $F_A(\lambda_2, \lambda'')$ . Aus den Absorptionsspektren der einfach-markierten Proben A und D bzw. der Fluorophore sind  $\varepsilon_A(\lambda'')$  und  $\varepsilon_D(\lambda')$  sowie die Markierungsverhältnisse  $d^+$  und  $a^+$  bekannt. Ein Nachteil dieser Bestimmungsmethode für  $E_T$  ist, dass sie neben den Markierungsverhältnissen  $d^+$  und  $a^+$  die Quantenausbeuten sowohl des Donor- als auch des Akzeptorfluorophors verwendet. Diese Werte sind alle fehlerbehaftete Größen und tragen somit zu einem vergrößerten Fehler bei der Bestimmung von  $E_T$  bei.

### mit Hilfe der Akzeptorfluoreszenz

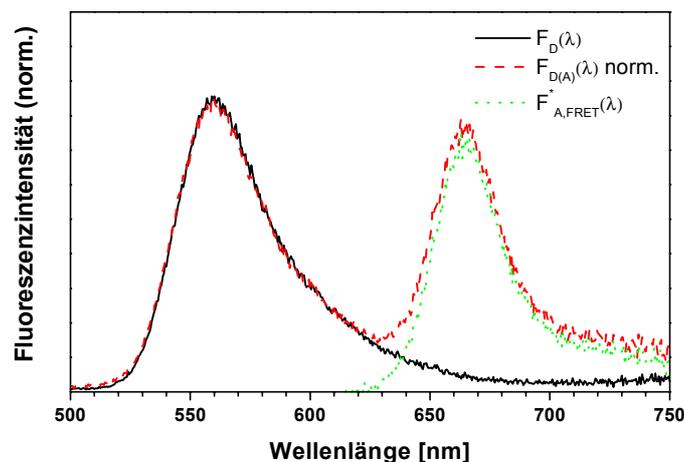


Abb. 3.2-2: Die Fluoreszenzspektren der D-Probe, der D(A)-Probe (normiert) und die Differenz dieser Spektren, welche der Akzeptorfluoreszenz durch Energietransfer entspricht,  $F_{A,FRET}^*$ , und als „extrahierte“ Akzeptorfluoreszenz bezeichnet wird.

Die Akzeptorfluoreszenz setzt sich aus drei Anteilen zusammen:

- der Akzeptorfluoreszenz durch Energietransfer,

- der Akzeptorfluoreszenz durch direkte Anregung und
- und der Donorfluoreszenz, die noch in den Wellenlängenbereich der Akzeptorfluoreszenz hineinreicht.

Diese Summation aus drei verschiedenen Anteilen ist in Abbildung 3.2-2 dargestellt und wird in den folgenden Methoden als Grundlage verwendet.

über  $(ratio)_A$

Die Vorstellung einer zusammengesetzten Akzeptorfluoreszenz findet ihre Anwendung in der Energietransferbestimmung nach  $(ratio)_A$  (Clegg, 1992).

Für die Gesamtfluoreszenz  $F_{DA}(\lambda, \lambda')$  einer doppelt-markierten Probe angeregt bei einer Wellenlänge  $\lambda'$  und gemessen bei  $\lambda$ , gilt Gl. 3.2-6:

$$F_{D(A)}(\lambda, \lambda') \propto \underbrace{[M_{D(A)}] E_T \varepsilon_D(\lambda') \Phi_{FA}(\lambda)}_{\text{Beitrag von FRET an Akzeptorfluoreszenz}} + \underbrace{([M_A] + [M_{D(A)}]) \varepsilon_A(\lambda') \Phi_{FA}(\lambda)}_{\text{direkt angeregte Akzeptorfluoreszenz}} + \underbrace{((1 - E_T) [M_{D(A)}] + [M_D]) \varepsilon_D(\lambda') \Phi_{FD}(\lambda)}_{\text{Donorfluoreszenz}}$$

$\varepsilon_D(\lambda')$  ist der molare Extinktionskoeffizient des Donors bei  $\lambda'$ .  $\Phi_{FD}(\lambda)$  ist der Formfaktor für die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors. Mit  $[M_{D(A)}]$ ,  $[M_D]$  und  $[M_A]$  werden die Konzentrationen der doppelt- bzw. einfach-markierten Moleküle bezeichnet

Wenn die Gesamtkonzentration der Moleküle  $[M]$  ist, dann gilt mit  $[M_{D(A)}] = [M] d^+ a^+$  usw. die Gl. 3.2-7:

$$F_{DA}(\lambda, \lambda') \propto [M] \left\{ \underbrace{\varepsilon_D(\lambda') \Phi_{FA}(\lambda) E_T d^+ a^+}_{\text{Beitrag von FRET an Akzeptorfluoreszenz}} + \underbrace{\varepsilon_A(\lambda') \Phi_{FA}(\lambda) a^+}_{\text{direkt angeregte Akzeptorfluoreszenz}} + \underbrace{\varepsilon_D(\lambda') \Phi_{FD}(\lambda) d^+ [(1 - E_T) a^+ + a^-]}_{\text{Donorfluoreszenz}} \right\}$$

$$= F_{A,FRET}^*(\lambda, \lambda') + F_D(\lambda, \lambda')$$

Die Summe aus Akzeptorfluoreszenz aufgrund von Energietransfer und aus direkter Anregung des Akzeptors wird als  $F_{A,FRET}^*(\lambda, \lambda')$  bezeichnet und die Donorfluoreszenz anteilig an der Gesamtfluoreszenz als  $F_D(\lambda, \lambda')$ .

Für die weitere Berechnung muss ein Akzeptorspektrum „extrahiert“ werden, welches nur die Akzeptorfluoreszenz ohne Donoranteil besitzt ( $F_{A,FRET}^*$ ). Dazu werden die Fluoreszenzspektren des doppelt-markierten Moleküls und Donor-Moleküls aufgenommen, beide auf das Maximum der Donorfluoreszenz normiert und das normierte Donorspektrum von dem des doppelt-markierten Moleküls subtrahiert (Abb. 3.2-2):

Somit gilt

$$F_{A/FRET}^*(\lambda_3, \lambda') = F_{em}^A(\lambda_3, \lambda') \propto [M] \left\{ \underbrace{\varepsilon_D(\lambda') \Phi_{FA}(\lambda_3) E_T d^+ a^+}_{\text{Beitrag von FRET an Akzeptorfluoreszenz}} + \underbrace{\varepsilon_A(\lambda') \Phi_{FA}(\lambda_3) a^+}_{\text{direkt angeregte Akzeptorfluoreszenz}} \right\} \quad \text{Gl. 3.2-8}$$

mit  $\lambda_3$  als Wellenlänge, bei der der Akzeptor fluoresziert. Für das Anregungsspektrum des Akzeptors gilt wiederum Gl. 3.2-3.

Berechnet man nun den Quotienten aus der „extrahierten“ Akzeptorfluoreszenz  $F_{A,FRET}^*(\lambda, \lambda')$ , die bei der Wellenlänge  $\lambda'$  angeregt und bei  $\lambda_3$  gemessen wird, und der Akzeptoranregung der doppelt-markierten Probe, gemessen bei  $\lambda_2$  und angeregt bei  $\lambda''$ , dann erhält man:

$$(ratio)_A = \frac{F_{A,FRET}^*(\lambda_3, \lambda')}{F_A(\lambda_2, \lambda'')} = \left\{ E_T d^+ \left[ \frac{\varepsilon_D(\lambda')}{\varepsilon_A(\lambda'')} \right] + \frac{\varepsilon_A(\lambda')}{\varepsilon_A(\lambda'')} \right\} \frac{\Phi_{FA}(\lambda_3)}{\Phi_{FA}(\lambda_2)} \quad \text{Gl. 3.2-9}$$

$$E_T = \left[ \frac{F_{A,FRET}^*(\lambda_3, \lambda')}{F_A(\lambda_2, \lambda'')} \cdot \frac{\Phi_{FA}(\lambda_2)}{\Phi_{FA}(\lambda_3)} - \frac{\varepsilon_A(\lambda')}{\varepsilon_A(\lambda'')} \right] \cdot \frac{1}{d^+} \cdot \frac{\varepsilon_A(\lambda'')}{\varepsilon_D(\lambda')} \quad \text{Gl. 3.2-10}$$

Ein großer Vorteil dieser Bestimmungsmethode besteht darin, dass alle Fluoreszenzmessungen mit derselben Lösung durchgeführt werden, so dass die Konzentration der Probe nicht bekannt sein muss. Es müssen neben den Fluoreszenzspektren keine Absorptionsspektren aufgenommen werden außer zur Bestimmung von  $d^+$  (Kap. 3.2). Das Markierungsverhältnis des Akzeptors  $a^+$  geht nicht mit in die Gleichung ein. Die Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors muss ebenfalls nicht bekannt sein, wenn  $\lambda_2 = \lambda_3$  ist, so dass  $\Phi_{FA}(\lambda_2) = \Phi_{FA}(\lambda_3)$  gilt. Damit sind drei Größen zur Bestimmung von  $E_T$  umgangen worden, die bei  $(ratio)_D$  bekannt sein müssen und dort zu einem größeren Fehler von  $E_T$  führen.

#### über Ratiofunktion $R_A$

Das „extrahierte“ Akzeptorfluoreszenzspektrum  $F_{A,FRET}^*(\lambda_2, \lambda')$  berechnet sich aus dem Fluoreszenzspektrum des doppelt-markierten Moleküls reduziert um den Anteil der Donorfluoreszenz bei  $\lambda_2$  und den Anteil aus der direkt angeregten Akzeptorfluoreszenz; Gl. 3.2-11:

$$F_{A,FRET}^*(\lambda_2, \lambda') = \underbrace{F_{D(A)}(\lambda_2, \lambda')}_{\text{gemessenes Gesamtspektrum}} - \underbrace{\frac{F_{D(A)}(\lambda_1, \lambda')}{F_D(\lambda_1, \lambda')} \cdot F_D(\lambda_2, \lambda')}_{\text{Donorfluoreszenz}} - \underbrace{\frac{\varepsilon_A(\lambda')}{\varepsilon_A(\lambda'')} \cdot F_A(\lambda_2, \lambda'')}_{\text{direkt angeregte Akzeptorfluoreszenz}} \propto \varepsilon_D(\lambda') \cdot E_T \cdot \Phi_{FA}(\lambda)$$

Für das Fluoreszenzspektrum des doppelt-markierten Moleküls angeregt bei  $\lambda''$  und gemessen bei  $\lambda_2$  gilt, wenn bei  $\lambda''$  der Donor nicht absorbiert, gemäß Gl. 3.2-3 die Proportionalität  $F_A(\lambda_2, \lambda'') \propto \varepsilon_A(\lambda'') \cdot \Phi_{FA}(\lambda_2)$ . Die Ratiofunktion  $R_A$  als Verhältnis von  $F_{A,FRET}^*$  zu  $F_A$  ist demnach folgendermaßen definiert:

$$R_A = \frac{F_{A,FRET}^*(\lambda_2, \lambda')}{F_A(\lambda_2, \lambda'')} = \frac{\varepsilon_D(\lambda') \cdot E_T \cdot \Phi_{FA}(\lambda_2)}{\varepsilon_A(\lambda'') \cdot \Phi_{FA}(\lambda_2)} = \frac{\varepsilon_D(\lambda')}{\varepsilon_A(\lambda'')} \cdot E_T \quad \text{Gl. 3.2-12}$$

$$E_T = R_A \cdot \frac{\varepsilon_A(\lambda'')}{\varepsilon_D(\lambda')} \quad \text{Gl. 3.2-13}$$

Im Vergleich zum Ansatz von Clegg ((ratio)<sub>A</sub>) gilt

$$(\text{ratio})_A = R_A + \frac{\varepsilon_A(\lambda')}{\varepsilon_A(\lambda'')} \quad \text{Gl. 3.2-14}$$

### Weitere Methoden

Diese im Folgenden beschriebenen Methoden wurden bei der Bestimmung des Energietransfers nicht angewandt und werden daher nur sehr kurz dargestellt.

Die Ratiofunktion  $R_{(DA)}$  leitet sich von der Ratiofunktion  $R_A$  ab (Jares-Erijman, 1996) und ist mit den bereits vorgestellten Parametern folgendermaßen definiert:

$$R_{(DA)} \equiv \frac{F_{D(A)}(\lambda_1, \lambda')}{f_D(\lambda)} \cdot \frac{f_A(\lambda)}{F_{A,FRET}(\lambda_2, \lambda')} \quad \text{Gl. 3.2-15}$$

$f(\lambda)$  sind die Formfaktoren der Fluoreszenzspektren.

Die Bestimmung der Transfereffizienz erfolgt nach

$$E_T = \frac{1}{\left( \frac{\Phi_{FA}}{\Phi_{FD}} \right) R_{(DA)} + 1} \quad \text{Gl. 3.2-16}$$

Die bisher vorgestellten Methoden  $R_A$  und (ratio)<sub>D</sub> hängen folgendermaßen mit  $R_{(DA)}$  zusammen:

$$(\text{ratio})_D = \frac{f_D(\lambda)}{f_A(\lambda)} \cdot R_A \cdot R_{(DA)} \quad \text{Gl. 3.2-17}$$

Eine weitere Methode wurde von Dale und Eisinger entwickelt (Dale, 1975) und basiert auf der Messung der Akzeptorfluoreszenz. Ein Nachteil im Vergleich zu anderen Methoden besteht darin, dass alle drei Proben D(A), D und A benötigt werden und die Spektren bei gleicher Molekülkonzentration aufgenommen werden müssen.

Epe *et al.* (Epe, 1983) geben ein Verfahren zur Bestimmung der Transfereffizienz bei enzymatisch abbaubaren Molekülsystemen an. Die Bestimmung erfolgt über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten, mit denen die Fluoreszenzspektren einer doppeltmarkierten Probe (hier RNS) mit Energietransfer  $F_{D(A)}(\lambda)$  und nach enzymatischer Verdauung  $F'_{DA}(\lambda)$  jeweils in die Spektren von einzeln markierten Proben zerlegt und miteinander verglichen werden. Bei der Bestimmung von  $F'_{DA}(\lambda)$  liegt ein so großer Abstand der Fluorophore vor, dass kein Energietransfer mehr stattfinden kann. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Konzentration und das Markierungsverhältnis des Donors  $d^+$  nicht bekannt sein müssen. Außerdem spielen jegliche Umgebungseffekte, die sich auf Extinktionskoeffizienten, Quantenausbeuten etc. auswirken können, keine Rolle.

Analog zu den Methoden von (ratio)<sub>A</sub> und Ratiofunktion  $R_A$ , die die Fluoreszenzintensität des Akzeptors verwendet haben, kann die Transfereffizienz über die Akzeptoranisotropie bestimmt werden. So wird angenommen, dass sich die mittlere Anisotropie aus den Beiträgen

einzelner Anisotropien der Donorfluoreszenz, der Akzeptorfluoreszenz und des Energietransfers zusammensetzt. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet, doch aufgrund der großen Fehler bei der Bestimmung der einzelnen Anisotropiebeiträge als zu ungenau eingestuft.

### 3.2.3.4 Bestimmung der Transfereffizienz und des Fluorophorabstands mittels Multiparameter-Fluoreszenzdetektion

Die Berechnung der Transfereffizienz  $E_T$  und des Donor-Akzeptorabstands  $R_{DA}$  für ein Einzelmolekülereignis erfolgt nach Gl. 2.4-34 und 2.4-35. Durch die Kombination dieser Parameter mit der Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffs in der doppelt-markierten Probe D(A) kann Aufschluß auf zusätzliche Vorgänge neben dem Energietransfer erhalten werden.

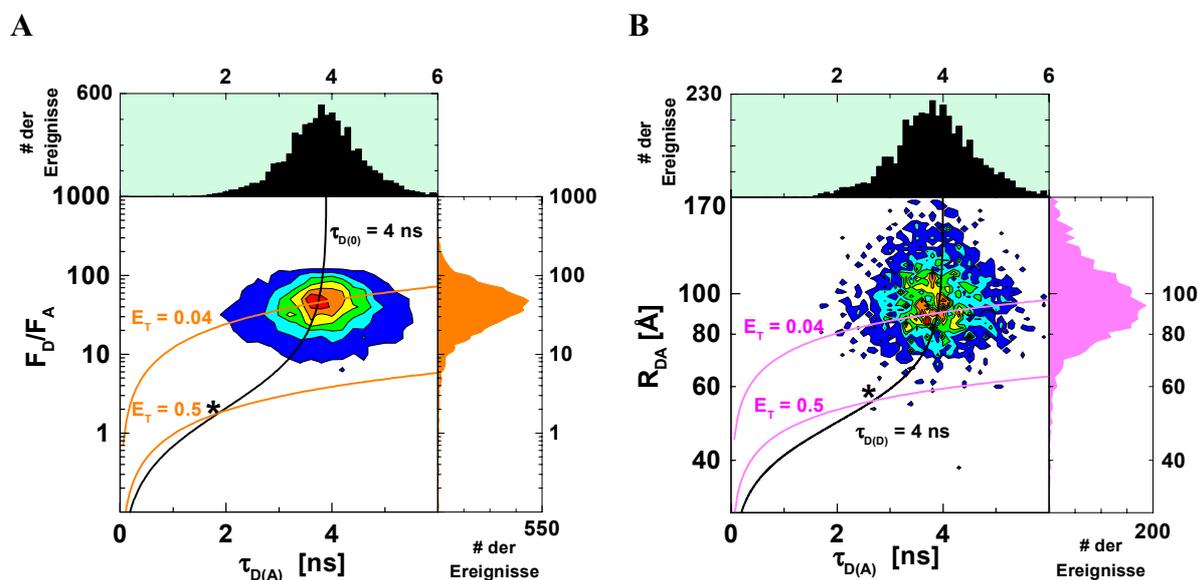


Abb. 3.2-3: Darstellung der Einzelmolekülergebnisse von (A)  $F_D/F_A$  gegen  $\tau_{D(A)}$  und (B)  $R_{DA}$  gegen  $\tau_{D(A)}$ . Die Kurven in den 2D-Histogrammen geben Iso-Linien mit Werten von gleichem  $\tau_{D(0)}$  und gleichem  $E_T$  wieder. Demnach befindet sich der Schwerpunkt einer Population von Einzelmolekülen mit  $E_T = 0,5$  und  $\tau_{D(0)} = 4$  ns am Schnittpunkt der Kurven, der hier mit \* gekennzeichnet ist. Die Werte der weiteren Parameter für diese Donorprobe sind:  $R_{0r} = 53,3$  Å,  $\Phi_{FD} = 0,63$ ,  $\Phi_{FD(0)} = 0,95$ ,  $\Phi_{FA} = 0,40$  und  $a_{trans} = 0,80$ . Diese Werte gelten für das Farbstoffpaar Alexa488-Cy5.

In Abb. 3.2-3 werden die Histogramme  $F_D/F_A$  gegen  $\tau_{D(A)}$  und  $R_{DA}$  gegen  $\tau_{D(A)}$  vorgestellt. Man kann Iso-Linien für die gleiche Werte von  $E_T$  und  $\tau_{D(0)}$  für die Histogramme  $F_D/F_A$  gegen  $\tau_{D(A)}$  und  $R_{DA}$  gegen  $\tau_{D(A)}$  berechnen. Bei  $\tau_{D(0)}$  handelt es sich um die Lebensdauer des ungebundenen, freien Farbstoffs. Befinden sich die Mittelwerte der detektierten Populationen auf den Schnittpunkten dieser Iso-Linien, so tritt nur Energietransfer in der Probe auf. Damit besitzen die Iso-Linien eine Kontrollfunktion, wie gut die Werte für  $E_T$  bzw.  $R_{DA}$  übereinstimmen, die über das Lebensdauerverhältnis  $\tau_{D(A)}/\tau_D$  und das Intensitätsverhältnis  $F_D/F_A$  bestimmt werden. Abweichungen lassen auf zusätzliche Löschvorgänge schliessen.

Werden die Histogramme der Parameter  $R_{DA}$  und  $\tau_{D(A)}$  miteinander kombiniert (Abb. 3.2-3B), so lauten die Gleichungen für die Iso-Linien:

$$R_{DA}(\tau_{D(0)}) = R_{0r} \left[ \left( \frac{\tau_{D(0)}}{\tau_{D(0)} - \tau_{D(A)}} - 1 \right) \Phi_{FD} \right]^{1/6} = R_{0r} \left[ k_{D(0)} \left( \frac{1}{\tau_{D(A)}} - \frac{1}{\tau_{D(0)}} \right)^{-1} \right]^{1/6} \quad \text{Gl. 3.2-18}$$

$$R_{DA}(E_T) = R_{0r} \left( \frac{\tau_{D(A)} \cdot \Phi_{FD}}{\tau_{D(0)} \cdot E_T} \right)^{1/6} = R_{0r} \left( \frac{\tau_{D(A)} \cdot k_{D(0)}}{E_T} \right)^{1/6} \quad \text{Gl. 3.2-19}$$

Bei der Kombination der Histogramme des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  und der Lebensdauer  $\tau_{D(A)}$  lauten die Gleichungen für die Iso- $\tau_{D(0)}$ - und Iso- $E_T$ -Linie wie folgt:

$$\frac{F_D}{F_A}(\tau_{D(0)}) = \left( \left( 1 - \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_{D(0)}} \right)^{-1} - 1 \right) \frac{\Phi_{FD}}{\Phi_{FA}} = \left( \frac{\tau_{D(0)}}{\tau_{D(0)} - \tau_{D(A)}} - 1 \right) \frac{\Phi_{FD}}{\Phi_{FA}} \quad \text{Gl. 3.2-20}$$

$$\frac{F_D}{F_A}(E_T) = \frac{\tau_{D(A)}}{E_T \cdot \tau_{D(0)}} \frac{\Phi_{FD(0)}}{a_{trans} \Phi_{FA}} \quad \text{Gl. 3.2-21}$$

$\Phi_{FD(0)}$  ist analog zu  $\tau_{D(0)}$  die Quantenausbeute des ungebundenen Farbstoffs. Der Faktor  $a_{trans}$  gibt bei den Cyanin-Farbstoffen das Verhältnis der Häufigkeit von cis- zur trans-Form des Farbstoff wieder (Widengren, 2001). Bei allen anderen Farbstoffen ist  $a_{trans}$  gleich 1.

Die Iso- $E_T$ -Linien werden im Weiteren nicht verwendet, da der Abstand  $R_{DA}$  eine leichter verständliche Information über das untersuchte Makromolekül als  $E_T$  liefert. Darüber hinaus besitzt  $R_{DA}$  im Vergleich zu  $E_T$  einen niedrigeren relativen Fehler, weil zur Bestimmung der reduzierte Försterabstand verwendet und somit eine fehlerhafte Bestimmung der Donor-quantenausbeute umgangen wird.

### 3.3 Chemikalien

Hersteller	Substanz
Calbiochem (Bad Soden)	Natriumchlorid
Fluka (Seelze)	Kaliumchlorid, Natriumacetat, Trifluoressigsäure
Merck (Darmstadt)	Aktivkohle, Dinatriumhydrogensulfat, Natriumdihydrogensulfat, Natriumcitrat, Citronensäure
Sigma-Aldrich (Seelze)	L-Ascorbinsäure (Vitamin C), Casein ( $\kappa$ , from bovine milk), dATP, dCTP, Diethylpyrocarbonat (DEPC), dGTP, dTTP, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris), Tris-HCl-Lösung (1M, pH 7,6)

Alle Reagenzien waren von höchster Qualität und Reinheitsstufe. Für die Untersuchungen mit dem Protein *Reverse Transkriptase* wurden Chemikalien verwendet, die frei von RNasen und DNasen waren.

### 3.4 Lösungsmittel und Puffer

Lösungsmittel (Ethanol, Acetonitril, Wasser) waren von J. T. Baker (Deventer, Holland). Für die Aufnahme von Spektren wurde Ethanol für die Spektroskopie (Merck) verwendet. Bidestilliertes Wasser wurde mit Hilfe einer Quarz-Bidestille (Heraeus, Hanau) gewonnen. Wässrige Lösungen für die Einzelmolekülexperimente wurden max. ein Tag über Aktivkohle (Merck) stehen gelassen, um fluoreszierende Verunreinigungen zu entfernen.

DEPC-Wasser: 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) in 2 l Wasser, schütteln, nach 30 min 2 h bei 120°C autoklavieren.

FRET-Puffer:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, NaCl 180 mM, L-Ascorbinsäure 400  $\mu\text{M}$ , pH 7,5.

Hybridisierungspuffer I: NaCl 360 mM, Natriumcitrat 24 mM,  $\text{MgCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ , pH 7.

Hybridisierungspuffer II: NaCl 360 mM, Natriumcitrat 24 mM,  $\text{MgCl}_2$  2  $\mu\text{M}$ , pH 7.

NaAc-Puffer: Natriumacetat 200 mM, pH 5.

NaPi-Puffer:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, NaCl 180 mM, pH 7,5.

RT I-Puffer: Tris-HCl 50 mM, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  6 mM, pH 7,6.

RT II-(Mess)-Puffer: Tris-HCl 50 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  6 mM, L-Ascorbinsäure 400  $\mu\text{M}$ , pH 7,6.

SV-Puffer: Natriumacetat 50 mM, pH 5,5.

Neben den RNasen und DNasen-freien Chemikalien wurde für Messungen mit der *Reversen Transkriptase* DEPC-Wasser anstelle des bidestillierten Wassers verwendet.

### 3.5 Proben und Probenvorbereitung

#### 3.5.1 Farbstoffe

Farbstoffe zur Markierung von Nukleinsäuren oder Mutanten der *Reversen Transkriptase* wurden von Molecular Probes (Eugene (OR), USA) bezogen. Die Bezugsquellen, Strukturen und spektroskopischen Eigenschaften aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe sind in Anhang C angegeben. Wurden im Experiment Derivate der Farbstoffe verwendet, ist dies vermerkt.

#### 3.5.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von IBA GmbH (Göttingen) hergestellt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Anhang D angegeben. Bei IBA GmbH wurde ebenfalls die

Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffe durchgeführt. Ausnahmen davon sind die Sequenzen HD1-MR200 (erhalten von M. Sauer, Universität Heidelberg) und HD1-Sq635 (erhalten von O.S. Wolfbeis, Universität Regensburg).

Bei fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden wurde vor der Hybridisierung das Markierungsverhältnis ([Farbstoff]:[Oligonukleotid]) am Absorptionsspektrometer überprüft, da dieser Wert bei Ensemblemessungen zur Untersuchung des Energietransfers eine wichtige Rolle spielt. Die Konzentrationen der Farbstoffe bzw. Oligonukleotide können nach Gl. 2.1-2 anhand eines Absorptionsspektrums bestimmt werden. Dazu wird der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Farbstoffs am Maximum der Absorption und der des Oligonukleotids bei 260 nm benötigt. Der Wert des Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Oligonukleotids wurde nach der *Nearest-Neighbour*-Methode (Cantor, 1980b) abgeschätzt.

Für Farbstoffuntersuchungen an Oligonukleotiden wurden je 8  $\mu\text{M}$  Sequenz der beiden Stränge in 216  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer zusammengegeben, im Wasserbad auf 90 °C aufgeheizt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Bei der Hybridisierung der Primer-Template-Sequenzen für Untersuchungen mit der *Reversen Transkriptase* wurden 40  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Sequenz in 50 mM NaCl und 20 mM Tris-HCl (pH 7,0) ebenfalls für kurze Zeit auf 90 °C aufgeheizt und dann langsam abgekühlt.

### 3.5.3 Mutanten der Reversen Transkriptase

Die Mutanten der *Reversen Transkriptase* wurden in der Gruppe von R.S. Goody am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (Dortmund) exprimiert, aufgereinigt und mit dem Farbstoff Alexa488 markiert. Die Positionen der eingeführten Mutationen werden in Kap. 4.3 erläutert.

Die Aufreinigung der Mutanten wurden gemäß dem Protokoll von Wöhrl durchgeführt (Wöhrl, 1997). Die Rekonstruktion zum Heterodimer wurde durch *Escherichia coli*-Zellen ermöglicht, die wahlweise die Untereinheiten p66 und p51 exprimieren. Nach Dialyse in einem 100 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 7,0 mit 25 mM NaCl und 10 (Gewichts-%) Glycerin wurden die Proteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Über die massenspektrometrische Analyse wurde das Vorhandensein der Mutationen bestätigt.

Die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde bereits von Kensch *et al.* beschrieben (Kensch, 2000a; Kensch, 2000b). Das Protokoll zur Markierung der Proteinmutanten mit Alexa488 sieht nach der Markierungsreaktion (2 h bei 4 °C unter Schütteln) einen Aufreinigungsschritt per Nap10-Säule mit folgendem Puffer vor: 75 mM Natriumhydrogenphosphat und 500 mM NaCl. Danach wird eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Säule mit dem gleichen Puffer durchlaufen, wobei die Lösung aufgefangen und mit Puffer und 1 M Imidazol gewaschen wird. Zum Schluß wird die Proteinlösung mit Millipore Spinfiltern aufkonzentriert.

Die Proteinkonzentrationen und auch das Markierungsverhältnis ([Farbstoff]:[Protein]) wurden per Absorptionsspektrometer bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des Proteins

wurde mit  $260\ 450\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  bei 280 nm angenommen. Die aufgereinigten Mutanten waren frei von Nukleasen.

Die Proteinaktivität nach Einbringen des Fluoreszenzfarbstoffs wurde überprüft und ist nahezu unverändert gegenüber dem sogenannten Wildtyp (dem nicht modifizierten Protein). Dies ist besonders wichtig bei den Strukturuntersuchungen, so dass auch auf eine unveränderte Struktur der fluoreszenzmarkierten Proteine im Vergleich zum Wildtyp geschlossen werden kann.

Um Untersuchungen zur Enzymkinetik durchführen zu können, ist eine stabile Konzentration der Moleküle über einen langen Beobachtungszeitraum notwendig. Dazu wurde die Oberfläche des Deckglases mit  $\kappa$ -Casein (1 mg/ml in Wasser) inkubiert, danach mit Messpuffer gewaschen und sofort zur Messung eingesetzt.

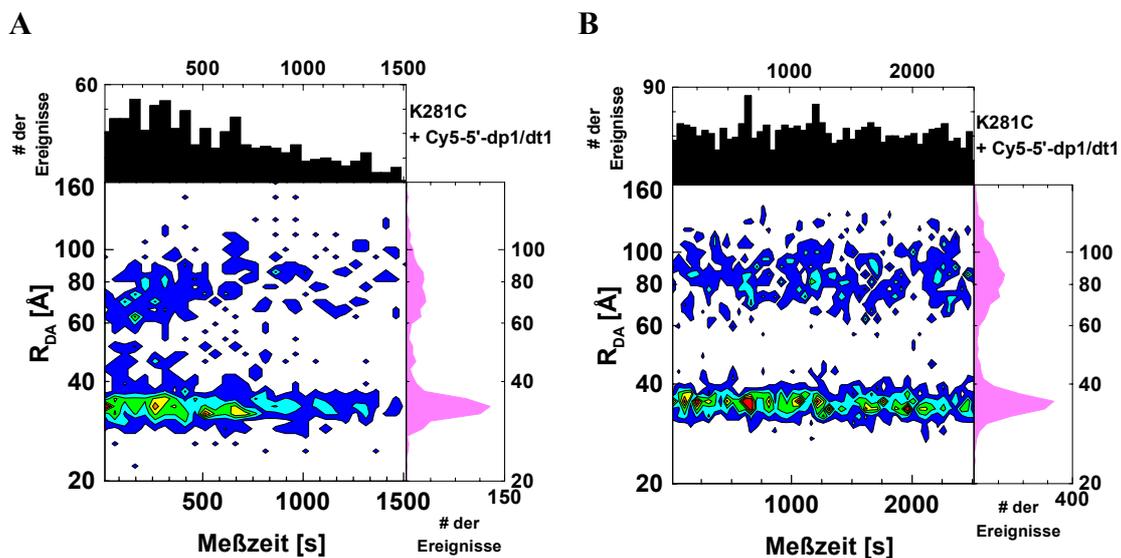


Abb. 3.5-1: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen der RT-Mutante K281C gebunden mit Cy5-5'-dp1/dt1, wobei die Deckglasoberfläche (A) unbehandelt und (B) mit  $\kappa$ -Casein inkubiert wurde. Dargestellt sind die Histogramme der Messzeit und von  $F_D/F_A$  (Signalspitzen-orientierte Analyse).

In Abb. 3.5-1 erkennt man, dass durch die Verwendung einer mit  $\kappa$ -Casein behandelten Oberfläche die Anzahl der Einzelmolekülereignisse über einen Zeitraum von 40 min nahezu unverändert bleibt, während die Konzentration der Probe auf einem unbehandelten Deckglas abnimmt und nach ca. 20 min keine Einzelmolekülereignisse mehr registriert werden. Die Anwesenheit von  $\kappa$ -Casein stabilisiert somit die Konzentration an *Reverse Transkriptase*, so dass bei allen Experimenten in Kap. 4.3 diese Oberflächenbehandlung des Deckglases durchgeführt wurde.



## 4 Experimenteller Teil

Der experimentelle Teil kann auf zwei Arten gelesen werden. Zum einen kann der detaillierte Beschreibung der Versuche und Ergebnisse gefolgt werden, zum anderen finden sich kurze Resümees *in kursiver Schrift*, um dem Leser einen besseren Überblick zu verschaffen.

### 4.1 Wechselwirkung von Fluoreszenzfarbstoffen mit Nukleinsäuren

#### 4.1.1 Farbstoffe und Nukleobasen frei in Lösung

Die Fluoreszenz von Xanthenfarbstoffen wird durch Nukleobasen gelöscht. So wird beispielsweise die Fluoreszenz der Farbstoffe Rhodamin 6G (Rh6G) und Tetramethylrhodamin (TMR) von Guanin gelöscht (Nord, 1997; Seidel, 1996).

Je nach Lage des Oxidations- bzw. Reduktionspotentials des Farbstoffes im angeregten Zustand kommt es in Lösung zu einem Elektronentransfer von der Nukleobase zum Farbstoff bzw. vom Farbstoff zur Nukleobase. Dadurch wird die Fluoreszenz gelöscht. In zeitaufgelösten Messungen bewirkt dieser Vorgang eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer und in stationären Messungen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum freien Farbstoff. Die Stärke der Löschung wird durch die Freie Standardreaktionsenthalpie des Elektronentransfers bestimmt. Der Mechanismus der Löschung beruht dabei entweder auf Komplexbildung (statische Löschung) oder Stoßereignissen (dynamische Löschung), die aber Grenzfälle der Löschung beschreiben.

Es wurden in stationären Stern-Volmer-Experimenten (s. Kap. 2.3.2) die stationäre Löschkonstante  $K_D$  und die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen angeregtem Farbstoff und Löschmolekül,  $k_Q$ , ermittelt. Bei den untersuchten Fluorophoren handelt es sich dabei um die Xanthenfarbstoffe Alexa488 und Rhodamine Green (RhGr) sowie den Cyaninfarbstoff Cy5, da sie im Weiteren für die FRET-Untersuchungen an Oligonukleotiden verwendet werden sollen. Strukturen und spektroskopische Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe sind im Anhang angegeben. Als Löschmoleküle wurden die Nukleosidmonophosphate der Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) verwendet. Ein hoher Wert der stationären Löschkonstante  $K_{SV}$  wird bei einer starken Fluoreszenzlöschung erhalten. Das Gleiche gilt für  $k_Q$ , da mit zunehmender Stärke der Löschung der Wert für  $k_q$  zunimmt.

Alexa488 und RhGr zeigen eine starke Löschung (Tab. 4.1-1) durch 2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat (dGMP), was anhand des hohen Wertes von  $K_{SV}$  - verglichen mit den Messungen der anderen Nukleosidmonophosphate - deutlich erkennbar ist. Der Wert von  $k_Q$  ist ebenfalls sehr groß. RhGr zeigt darüberhinaus eine Löschung durch 2'-Desoxyadenosin-5'-monophosphat (dAMP). Dies stimmt mit den Beobachtung von Rhodaminfarbstoffen (Fries,

1998a) überein, dass die Löschung durch die Purinbasen, Adenin und Guanin, stärker ist im Vergleich zu den Pyrimidinbasen, was in der leichteren Oxidierbarkeit der Purinbasen begründet ist.

Beim Vergleich der Löschkonstanten  $K_{SV}$  des Farbstoffs Cy5 mit denen der Xanthenfarbstoffe wird ersichtlich, dass die Cy5-Fluoreszenz kaum von den Nukleosidmonophosphaten gelöscht wird. Allein die Löschung mit dGMP zeigt einen etwas erhöhten Wert von  $K_{SV}$ , der jedoch in der gleichen Größenordnung wie die  $K_{SV}$ -Werte der anderen Nukleosidmonophosphate liegt.

**Tab. 4.1-1: Stationäre Löschkonstante  $K_{SV}$  und die Geschwindigkeitskonstante der dynamischen Löschung  $k_Q$  der Farbstoffe Alexa488, Cy5 und RhGr mit Nukleotiden.**

Farbstoff	Löschmolekül	$K_{SV} [M^{-1}]$	$k_Q [10^{10} M^{-1}s^{-1}]$
Alexa488	dAMP	2,2	0,09
	dCMP	1,0	0,04
	dGMP	12,7	0,57
	TMP	2,2	0,09
Cy5	dAMP	*	*
	dCMP	6,3	0,55
	dGMP	3,3	0,27
	TMP	0,7	0,09
RhGr	dAMP	30,7	0,79
	dCMP	0,2	0,01
	dGMP	55,6	1,44
	TMP	1,7	0,05

\* Die Zugabe an Nukleosidmonophosphat bewirkt eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, keine Löschung.

Die Fluoreszenzlebensdauerwerte der freien Farbstoffe betragen:  $\tau_0(\text{Alexa488}) = 2,3 \text{ ns}$ ,  $\tau_0(\text{Cy5}) = 1,1 \text{ ns}$  und  $\tau_0(\text{RhGr}) = 3,9 \text{ ns}$ . Die Abweichungen vom Mittelwert betragen jeweils  $\pm 25 \%$  für  $K_{SV}$  und  $k_Q$ . Als Puffer wurde SV-Puffer (pH 5,5) verwendet.

*Für die Xanthenfarbstoffe, die ausschließlich als Donorfarbstoffe für FRET-Untersuchungen eingesetzt werden sollen, ist daher die Basensequenz des Oligonukleotids, an das sie gebunden sind, wichtig für die Fluoreszenzeigenschaften wie Fluoreszenzquantenausbeute, Fluoreszenzlebensdauer und spektrale Lage. Cy5, welches als Akzeptorfarbstoff verwendet wird, ist anhand dieser Ergebnisse jedoch relativ unabhängig von der Basensequenz, da seine Fluoreszenz kaum von den Nukleobasen gelöscht wird.*

#### 4.1.2 Farbstoff gekoppelt mit Nukleobase

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff JF4 konnte ebenfalls eine Fluoreszenzlöschung in Lösung durch die vier Nukleinsäurebausteine gezeigt werden (Fries, 1998a). Die Stärke der Löschung durch die Nukleotide ist in folgender Reihenfolge beobachtet worden: dGMP > dAMP > dCMP  $\approx$  TMP.

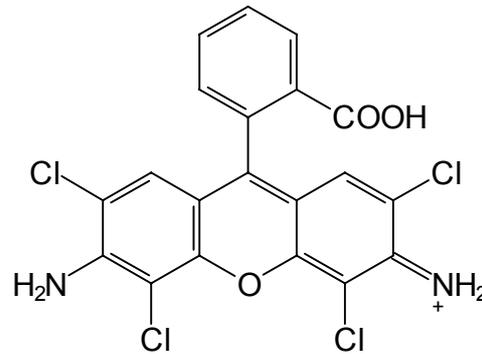


Abb. 4.1-1: Der Farbstoff JF4 (6'-Amino-2'-4',5',7'-tetrachloro-9'-(2-carboxy-phenyl)-xanthen-3-yliden-ammoniumperchlorat).

Durch die unterschiedlich starke Löschung durch die Nukleotide ergibt sich damit eine Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffes, die eine Identifizierung der jeweiligen Nukleobase möglich macht. Ein solcher Farbstoff wird als „intelligenter“ Farbstoff bezeichnet, da er sich bei jeder Nukleobase bzw. jedem Nucleosid anders verhält.

Mit Cumarin 120 konnten erstmals die Nukleobasen auf diese Weise unterschieden werden (Seidel, 1996). Zur Einzelmoleküldetektion sind Cumarine allerdings aufgrund ihrer geringen Photostabilität nur begrenzt einsetzbar (Eggeling, 1997; Eggeling, 1998b; Eggeling, 1999b). Der Farbstoff JF4 als „intelligenter“ Farbstoff soll bei der DNS-Einzelmolekülsequenzierung verwendet werden. Diese Idee ist ein Teil des Projektes „Neue Methoden der Genomanalyse“ des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, bei dem untersucht wird, ob anstelle der herkömmlichen Didesoxy-Methode (Sanger, 1977) in Zukunft ein DNS-Strang direkt durch Einzelmoleküldetektion analysiert werden kann (Dörre, 1997).

Der DNS-Strang wird sequentiell durch das Enzym *terminale Desoxynukleotidyltransferase* (TdT) mit Hilfe der Pyrophosphorylase-Aktivität abgebaut (Abb. 4.1-2). Das vom 3'-Ende des DNS-Stranges abgespaltene Nukleotid wird mit einem farbstoffmarkierten Pyrophosphat zum markierten Nucleosidtriphosphat umgesetzt. Die Detektion des auf diese Weise mit einem „intelligenten“ Farbstoff markierten Mononucleosidtriphosphates soll dann über zeitaufgelöste Einzelmoleküldetektion erfolgen.

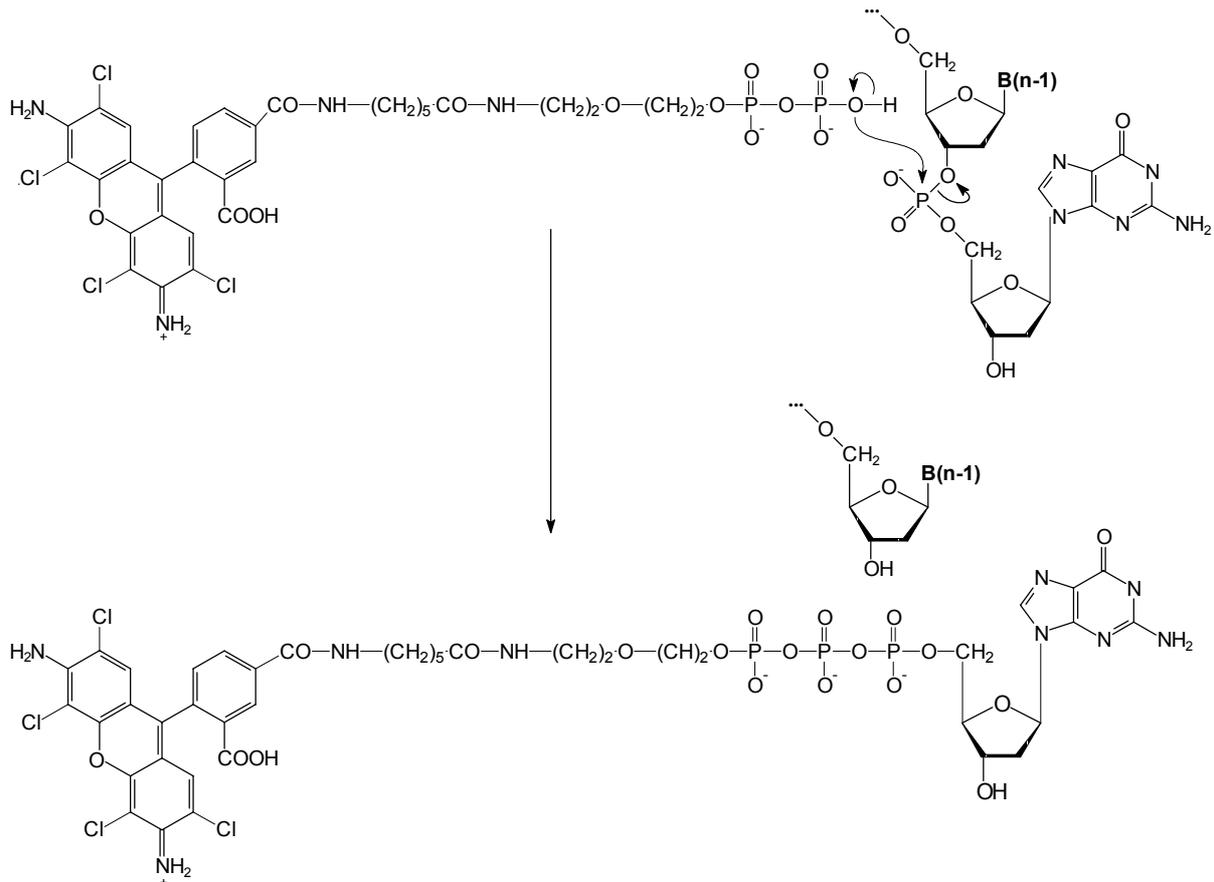


Abb. 4.1-2: Prinzip der DNS-Sequenzierung durch die *terminale Desoxynukleotidyltransferase* und farbstoffmarkiertes Pyrophosphat am Beispiel eines Oligonukleotides mit der Nucleobase Guanin am 3'-Ende (B = A, C, G oder T). Bei dem Fluorophor handelt es sich um den Farbstoff JF4.

Die von Dörre *et al.* vorgeschlagene Verwendung von vier Fluoreszenzfarbstoffen ist bei der Umsetzung der Sequenzierung mit einem „intelligenten“ Farbstoff (Seidel, 1992; Seidel, 1996) nicht erforderlich, da hier alle vier Nucleobasen mit Hilfe eines Fluorophors eindeutig identifiziert werden können.

Im Folgenden werden die Farbstoffe Rh6G und JF4 gebunden an ein Nucleosidtriphosphat fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die Charakterisierung von JF4 als „intelligenten“ Farbstoff gelang bisher nur durch die Untersuchung mit Nucleosidmonophosphat (Fries, 1998a), so dass die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte kovalente Bindung an ein Nucleosidtriphosphat einen weiteren Schritt auf dem Weg zur Einzelmolekülsequenzierung nach dem erwähnten Prinzip darstellt.

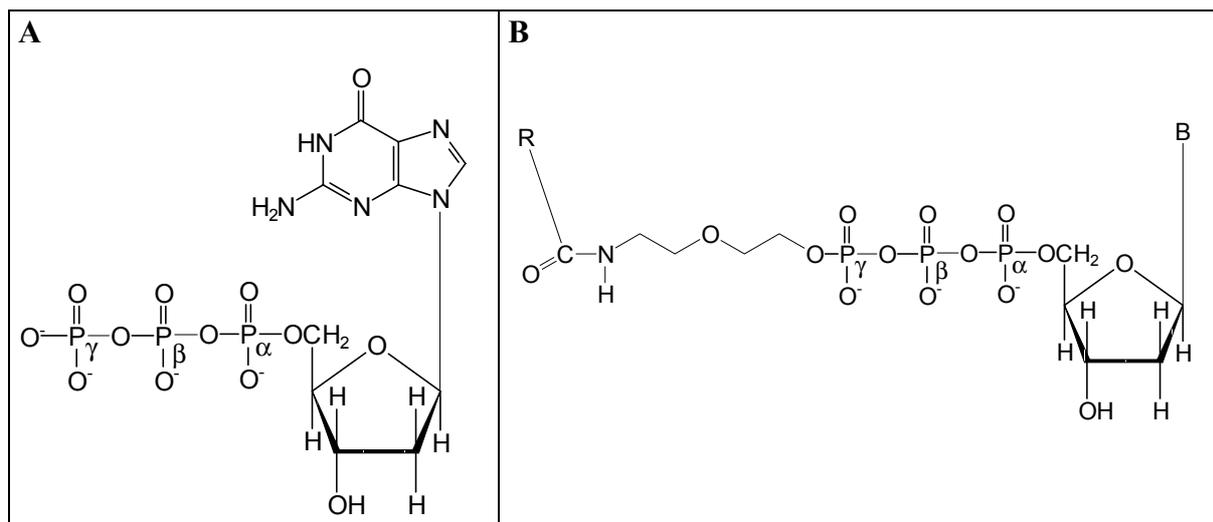


Abb. 4.1-3: Das Nucleosidtriphosphat dGTP besteht aus der Nucleobase Guanin, einem Molekül  $\beta$ -D-Desoxyribose und drei Phosphatgruppen, die als  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet werden (A). Die Strukturen der fluoreszenzmarkierten Nucleotide sind schematisch in (B) dargestellt: B steht für die jeweilige Nucleobase, R für den Fluorophor, Rh6G bzw. JF4. Das C-Atom der Carbonylgruppe entspricht dem C-Atom der Carboxylgruppe des freien Farbstoffes an Position 6 des Phenylrestes (s. Anhang C).

Die verwendeten Farbstoff-markierten Nucleosidtriphosphate (dNTPs) wurden von N. Gaiko (Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. Griesinger, Universität Frankfurt) synthetisiert. Die Synthese von JF4 wurde ebenfalls von N. Gaiko nach der Synthesevorschrift von J. Fries (Fries, 1998a) durchgeführt. Die Produkte gemäß Abb. 4.1-3 wurden mit Hilfe von NMR und MS auf ihre Reinheit untersucht.

#### 4.1.2.1 Untersuchungen von Rh6G-markierten Nucleotiden

Zunächst wurden die Nucleosidtriphosphate gebunden an Rh6G untersucht, um zu überprüfen, wie sich die relativ kurze Bindung an die Base auf die Fluoreszenz des Farbstoffes auswirkt. Eine zu starke Löschung hätte den Nachteil, dass durch eine stark reduzierte Fluoreszenzintensität bzw. -lebensdauer nicht mehr genügend Photonen bei der Einzelmoleküldetektion registriert werden können. Für das Prinzip der Einzelmolekülsequenzierung mit einem „intelligenten Farbstoff“ ist damit die Unterscheidung der Nucleobasen erschwert. Rh6G als Fluorophor bietet sich als Kontrolle aufgrund seiner hohen Fluoreszenzquantenausbeute an. In Tab. 4.1-2 sind die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen dargestellt. Die Konzentration der Lösungen betrug ca.  $10^{-9}$  M in NaPi-Puffer. Die Kurvenanpassung der Fluoreszenzabklingkurven wurde - außer bei Rh6G-dGTP - unter der Annahme eines monoexponentiellen Zerfalls durchgeführt. Bei den Nucleotiden außer dGTP wurde keine verringerte Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$  gegenüber dem freien Farbstoff beobachtet. Das lässt den Schluss zu, dass hier die Bindung an das Nucleotid keine verstärkte Löschung hervorruft.

**Tab. 4.1-2: Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$ , Rotationskorrelationszeit  $\rho$  und Anisotropie  $r_G$  der Rh6G-markierten Nukleotide.**

Probe	$\tau_G$ [ns]	$\rho$ [ns]	$r_G$	$\Phi_F$ aus $\tau_G$
Rh110	4,0	0,1	0,01	0,95
Rh6G-dATP	3,9	0,9	0,07	0,98
Rh6G-dCTP	3,9	0,8	0,07	0,98
Rh6G-dGTP *	2,9	0,8	0,08	0,73
Rh6G-dTTP	4,0	0,9	0,07	0,95

\* zweite Fluoreszenzlebensdauer:  $\tau_G = 0,1 \pm 0,1$  ns.

Die Abweichungen vom Mittelwert betragen:  $\sigma(\tau_G) = 0,1$  ns,  $\sigma(\rho) = 0,1$  ns,  $\sigma(r_G) = 0,01$ .

Die Fluoreszenzlebensdauer von Rh6G gebunden an dGTP (Rh6G-dGTP) ist in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Stern-Volmer-Messung in Lösung (Fries, 1998a; Seidel, 1996). Die zweite Fluoreszenzlebensdauer bei Rh6G-dGTP von 0,1 ns auf die Bildung eines Komplexes der Base mit dem Fluorophor hin (statische Löschung).

Die Anisotropie  $r_G$  der Farbstoffe mit Nukleosidtriphosphat im Vergleich zum freien Farbstoff ist erhöht, da die Beweglichkeit - ausgedrückt in der Rotationskorrelationszeit  $\rho$  - aufgrund der Molekülgröße eingeschränkt ist (Gl. 2.3-13).

*Aus den Ergebnissen der zeitaufgelösten Messungen erkennt man, dass außer bei Rh6G-dGTP die Fluoreszenz von Rh6G gebunden an die verschiedenen Nukleotide kaum gelöscht wird. Bei Rh6G-dGTP wurde dabei ein zweiter, stark gelöschter Zustand ermittelt.*

#### **4.1.2.2 Untersuchungen von JF4-markierten Nukleotiden**

##### **Spektren, FCS und MFD von konzentrierten Lösungen**

Als Referenzfarbstoff wurden im folgenden Abschnitt entweder Rh110, Rh123 (die veresterte Form von Rh110) oder RhGr, ein Rh110-Derivat mit einer zusätzlichen Carboxylgruppe am Phenylring, aber mit den gleichen Eigenschaften ( $\Phi_F = 0,95$  und  $\tau_G = 4$  ns) verwendet.

Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren des Farbstoffes JF4 sind im Anhang angeben. Die Spektren der JF4-markierten Nukleotide in NaPi-Puffer (pH 7,5) zeigen im Vergleich dazu Verschiebungen der Banden, aber keine auffallende Änderung der spektralen Form. Die Werte der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima sowie der Quantenausbeuten  $\Phi_F$  gibt Tab. 4.1-3 wieder.

**Tab. 4.1-3: Absorptions- und Fluoreszenzmaxima und Fluoreszenzquantenausbeuten des freien JF4-Farbstoffes und der JF4-markierten Nukleotide.**

	$\lambda_{\text{Abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{Fluo}}$ [nm]	$\Phi_{\text{F}}$
JF4	519,5	542	0,45
JF4-dATP	519,5	543	0,26
JF4-dCTP	517,5	538	0,41
JF4-dGTP	520,5	542	0,05
JF4-dTTP	519,5	538,5	0,30

Die Fluoreszenzquantenausbeuten sind mit RhGr als Referenz berechnet worden. Der Fehler von  $\Phi_{\text{F}}$  beträgt 5 %.

Die Nucleosidtriphosphate sind an die unveresterte Form des Farbstoffes JF4 gebunden und können damit bei höherem pH-Werten eine Pseudobase bilden (Fries, 1998a). Dabei wird die Anlagerung eines OH<sup>-</sup>-Ions an dem zentralen C-Atom des Farbstoffgerüsts angelagert. Bei JF4 wird die Tendenz zur Pseudobasenbildung durch den I-Effekt der Chloratome am Xanthengerüst noch verstärkt. Es besteht nun ein zusätzliches Gleichgewicht - neben dem Gleichgewicht zwischen zwitterionischer und kationischer Form - mit der Pseudobase, die jedoch kein chromophores System besitzt. Dies führt zu einer Verringerung des Extinktionskoeffizienten, aber nicht zu einer Änderung der Quantenausbeute und nicht zu einer Verschiebung des Spektrums. Um diesen Prozess weitgehend ausschließen zu können, wird im Weiteren der NaAc-Puffer (pH 5) verwendet.

Der Farbstoff JF4 zeigt eine Fluoreszenzquantenausbeute von 0,45 mit einem Maximum der Absorption bei 519,5 nm und einem Maximum der Fluoreszenz von 542 nm.

Alle JF4-markierten Nukleotide weisen verringerte Fluoreszenzquantenausbeuten im Vergleich zum freien Farbstoff auf. Dabei besitzt JF4-dGTP den geringsten Wert von  $\Phi_{\text{F}}$  und eine geringe Verschiebung des Absorptionsspektrums. Komplexbildung des Farbstoffs und der Nucleobase und die daraus folgende starke statische Fluoreszenzlöschung sind hierfür als Gründe zu nennen. Die Verschiebungen der Spektren von JF4-dCTP und JF4-dTTP deuten ebenfalls auf eine Komplexbildung von Fluorophor und Löschermolekül hin.

*Die Ergebnisse der Fluoreszenzlöschung aus den stationären Messungen von JF4 gebunden an die Nucleotide sind den Ergebnissen der zeitaufgelösten Stern-Volmer-Experimenten ähnlich. Die Erniedrigung von  $\Phi_{\text{F}}$  ist im Fall von JF4-dGTP am stärksten ausgeprägt. Die Reihenfolge der Löschung lautet mit abnehmender Stärke: dGTP > dATP  $\approx$  TMP > dCTP.*

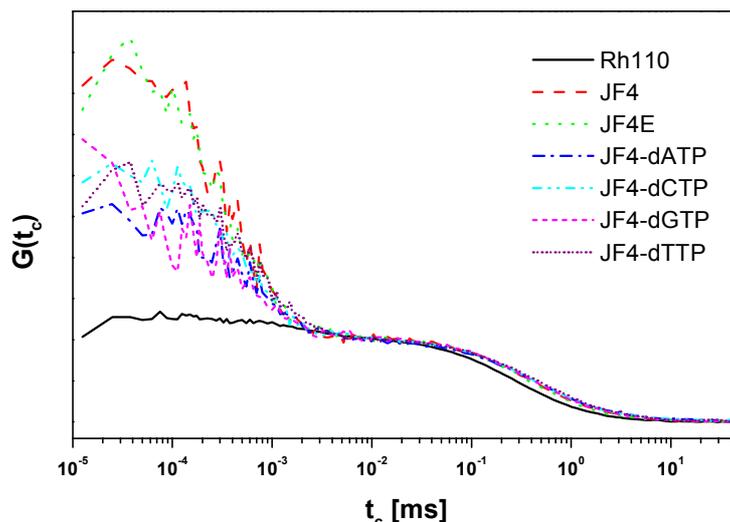


Abb. 4.1-4: Normierte Korrelationskurven der JF4-markierten Nucleotide. Messbedingungen: Gepulste Anregung bei  $\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$ ,  $I = 42,9 \text{ kW cm}^{-2}$ ,  $\omega_0 = 0,58 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 1,25 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = 2,35 \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ535/50, dichroitische Strahlteiler 488/636PC und 595DCXR. Die Abkürzungen der Parameter sind in Anhang J, die Spektren der Filter in Anhang B zu finden.

Die Farbstoff-markierten Nucleosidtriphosphate wurden zunächst mit Hilfe der FCS untersucht. Abb. 4.1-4 zeigt die Korrelationskurven, die auf die Anzahl der fluoreszierenden Moleküle,  $N$ , normiert wurden. Die Parameter der Anpassung sind in Tab. 4.1-4 aufgeführt.

Alle Nucleotid-Derivate besitzen eine längere Diffusionszeit  $t_D$  als der freie Farbstoff. Dies ist auf zwei Effekte zurückzuführen: Zum einen auf einen vergrößerten hydrodynamischen Radius und zum anderen auf Triplet-Sättigungsphänomene (Eggeling, 1998a; Widengren, 1995), da alle JF4-Derivate eine relativ hohe Tripletamplitude aufweisen. Aufgrund der Sättigungsphänomene variiert die Diffusionszeit bei der Anpassung der einzelnen Korrelationskurven.

Der freie Farbstoff JF4 weist einen Bunchingterm mit hohen Amplitude im  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich auf. Aufgrund der Abhängigkeit von der Anregungsleistungsdichte, kann dieser Bunchingterm dem Übergang in den Tripletzustand zugeschrieben werden. Die hohe Tripletamplitude  $A_1 = T_{1\text{eq}}$  zeigt eine hohe Tripletquantenausbeute  $\Phi_{\text{ISC}}$  ( $\Phi_{\text{ISC}} = 0,055$ ) an. Anschaulich bedeutet dies, dass die Besetzungswahrscheinlichkeit des Tripletzustandes hoch ist und sich viele Moleküle im Tripletzustand befinden. Dies führt zu einer Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute im Vergleich zu Rh110.

Die JF4-NTPs zeigen geringere Tripletamplituden  $A_1 = T_{1\text{eq}}$  als die freien Farbstoffe JF4 und JF4E. Durch Komplexbildung mit dem jeweils gebundenen NTP ist der Übergang in den Tripletzustand mit der Korrelationszeit  $t_A = t_T$  sichtbar eingeschränkt (Abb. 4.1-4). Bei JF4-dGTP zeigt sich im ns-Bereich der Korrelationskurve ( $t_2 = 0,022 \text{ }\mu\text{s}$ ) ein weiterer Bunchinterm, der auf die Löschreaktion zurückzuführen ist. Die Tripletamplitude und Tripletquantenausbeute von JF4-dGTP sind darüberhinaus nur halb so groß wie die der anderen JF4-NTPs.

**Tab. 4.1-4: Parameter nach Anpassung der Korrelationskurven der JF4-markierten Nukleotide.**

	$t_D$ [ms]	$t_A$ [ $\mu$ s]	$A_1$	$t_2$ [ $\mu$ s]	$A_2$	$k_T$ [ $10^5$ s $^{-1}$ ]	$k_{ISC}$ [ $10^6$ s $^{-1}$ ]	$\Phi_{ISC}$
Rh110	0,295	2,33	0,198			3,44	0,81	0,003
JF4	0,447	0,51	0,762			4,64	21,84	0,055
JF4E	0,422	0,50	0,755			4,93	22,33	0,056
JF4-dATP	0,479	0,84	0,604			4,71	10,53	0,026
JF4-dCTP	0,456	0,67	0,669			4,96	14,70	0,037
JF4-dGTP	0,464	0,79	0,305	0,022	0,46	8,84	5,70	0,014
JF4-dTTP	0,518	0,87	0,655			3,97	11,07	0,028

Die Standardabweichungen der Werte liegen bei 25 % für  $k_{ISC}$  und bei 10 % für  $k_T$ . Die Triplettparameter der JF4-Nukleotide sind mit einer mittleren Fluoreszenzlebensdauer von 2,5 ns berechnet worden (s. Tab. 4.1-5). Die Werte von  $k_T$ ,  $k_{ISC}$  und  $\Phi_{ISC}$  sind gemäß Gl. 2.4-9, Gl. 2.4-10 und Gl. 2.4-13 berechnet worden. Messbedingungen: s. Abb. 4.1-4.

In Tab. 4.1-5 sind die Ergebnisse der zeitaufgelösten Messungen der JF4-dNTPs zusammengefasst. Alle Proben zeigen einen biexponentiellen Verlauf der Fluoreszenzabklingkurve. Durch die Berechnung der mittleren, molekulgewichteten Fluoreszenzlebensdauer,  $\tau_{av}^x$ , (Gl. 3.1-1) erhält man die tatsächliche mittlere Fluoreszenzlebensdauer, die in Tab. 4.1-5 der mittleren, fluorenszengewichteten Fluoreszenzlebensdauer,  $\tau_{av}^a$ , gegenübergestellt ist (Gl. 3.1-1).

**Tab. 4.1-5: Molekül- und fluorenszengewichtete Fluoreszenzlebensdauern,  $\tau_{av}^x$  und  $\tau_{av}^a$ , aus den Abklingkurven der JF4-markierten Nukleotide.**

	$\tau_{av}^a$	$\tau_{av}^x$	$\tau_1$ [ns]	$\tau_2$ [ns]	$a_1$	$a_2$	$x_1$	$x_2$	$\Phi_F^a$	$\Phi_F^x$
JF4	3,41	2,55	2,37	15,70	0,92	0,08	0,99	0,01	0,81	0,60
JF4E	3,28	2,54	2,36	12,54	0,91	0,09	0,98	0,02	0,78	0,60
JF4-dATP	2,70	2,27	1,92	5,08	0,75	0,25	0,89	0,11	0,64	0,54
JF4-dCTP	3,05	2,51	2,24	7,64	0,85	0,15	0,95	0,05	0,72	0,59
JF4-dGTP	2,55	2,09	1,83	5,81	0,82	0,18	0,93	0,07	0,61	0,50
JF4-dTTP	2,91	2,35	1,90	5,27	0,70	0,30	0,87	0,13	0,69	0,56

Die Quantenausbeuten  $\Phi_F^a$  bzw.  $\Phi_F^x$  sind bezogen auf Rh110 als Referenz und berechnen sich nach  $\Phi_F = \tau_{Probe} / \tau_{Referenz}$  mit den jeweiligen fluorensz- bzw. molekulgewichteten Lebensdauern (Index a bzw. x).

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-4.

Aus den Daten in Tab. 4.1-5 ergibt sich eine höhere Quantenausbeute für den Farbstoff JF4 als die aus stationären Messungen ermittelte. Dieser Wert für  $\Phi_F$  stimmt mit vorherigen Beobachtungen überein (Fries, 1998a). Durch die Berechnung der Lebensdauer mit den molekulgewichteten Amplituden  $x_i$  werden die Moleküle mit einer kürzeren Lebensdauer stärker gewichtet, was in einer Korrektur der gemessenen Werte mit den Amplituden  $a_i$  zu

niedrigeren Werten der Fluoreszenzlebensdauer und der Fluoreszenzquantenausbeute resultiert.

Die Reihenfolge der Löschung lautet hier mit abnehmender Stärke der Löschung: dGTP > dATP  $\approx$  TMP > dCTP. Dieses Ergebnis stimmt mit den stationären Messungen überein.

In Tab. 4.1-6 sind - basierend auf den vorhergehenden Messungen - die verschiedenen Quantenausbeuten der Löschung (Gl. 2.3-24 bis -26) ermittelt worden: der Gesamtlöschung,  $\Phi_{QG}$ , der statischen Löschung,  $\Phi_{QS}$ , und der dynamischen Löschung,  $\Phi_{QD}$ .

**Tab. 4.1-6: Die Löschkonstanten der Gesamtlöschung,  $\Phi_{QG}$ , der statischen Löschung,  $\Phi_{QS}$ , und der dynamischen Löschung,  $\Phi_{QD}$ , der JF4-markierten Nukleotide.  $\tau_0$  ist die Fluoreszenzlebensdauer des freien Farbstoffs,  $\tau_{av}$  die mittlere Fluoreszenzlebensdauer des JF4-Nukleotids.  $F_0$  ist die Fluoreszenzintensität des freien Farbstoffs bei den stationären Messungen,  $F$  die Fluoreszenzintensität der Probe.**

	$\tau_{av}$ [ns]	$\Phi_F$ aus stationären Messungen	$\tau_0/\tau$	F/F <sub>0</sub>	f	$\Phi_{QG}$	$\Phi_{QS}$	$\Phi_{QD}$	$\Phi_{ISC}^*$
JF4	2,55	0,45	1,00	1,00	1,0	0,00	0,00	0,00	0,06
JF4-dATP	2,27	0,26	1,12	0,58	0,6	0,42	0,35	0,07	0,03
JF4-dCTP	2,51	0,41	1,02	0,91	0,9	0,09	0,07	0,01	0,05
JF4-dGTP	2,09	0,05	1,22	0,11	0,1	0,89	0,86	0,02	0,01
JF4-dTTP	2,35	0,30	1,09	0,67	0,7	0,33	0,28	0,06	0,04

\* Der Wert  $\Phi_{ISC}$  für JF4 wurde aus der FCS erhalten (s. Tab. 4.1-4) und als Referenz verwendet. Die Werte  $\Phi_{ISC}$  der JF4-markierten Nukleotide wurden gemäß  $\Phi_{ISC} = \Phi_{ISC}(JF4) \cdot (1 - \Phi_{QG})$  erhalten.

Messbedingungen der zeitaufgelösten Messungen: s. Abb. 4.1-4.

Die Ergebnisse für die einzelnen Quantenausbeuten (Tab. 4.1-6) basieren auf dem Vergleich der Lebensdauerwerte aus zeitaufgelösten Messungen mit den Fluoreszenzquantenausbeuten der stationären Messungen. Beim Vergleich der verschiedenen Quantenausbeuten wird deutlich, dass mit einer starken Gesamtlöschung QG (niedriger Wert für  $\Phi_{QG}$ ) eine starke statische Löschung QS (niedriger Wert für  $\Phi_{QS}$ ) verbunden ist. Dies lässt sich damit erklären, dass wegen der Molekülstruktur die 1:1 Komplexbildung aus Farbstoff und Base durch die direkte Bindung begünstigt ist. Aufgrund der niedrigen Werte von  $\Phi_{QD}$  kann die dynamische Löschung QD vernachlässigt werden.

Vergleicht man die Werte der Tripletquantenausbeute  $\Phi_{ISC}$  von Tab. 4.1-4 mit 4.1-6, so wird deutlich, dass JF4-dGTP den niedrigsten Tripletanteil besitzt und JF4-dCTP die höchste Tripletquantenausbeute.

*Die Ergebnisse der FCS-Messungen zeigen für alle JF4-markierten Nukleotide eine hohe Besetzungswahrscheinlichkeit des Tripletzustandes, die jedoch geringer ist als beim freien Farbstoff. Zudem wurde bei JF4-dGTP eine Reaktionskinetik im ns-Bereich gefunden, die auf die Löschung des Farbstoffs durch Guanin hinweist. Die Reihenfolge der Löschung aufgrund der Fluoreszenzlebensdauer lautet hier mit abnehmender Stärke der Löschung: dGTP >*

$dATP \approx TMP > dCTP$ . Durch den Vergleich zeitaufgelöster und stationärer Messungen erkennt man, dass die Löschung bei allen Proben fast ausschließlich statische Löschung aufgrund der Komplexbildung von Fluorophor und gebundener Base stattfindet.

### **Einzelmolekülmessungen**

In Abb. 4.1-5 sind die drei Fluoreszenzparameter Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$ , Intensität  $S_G$  und Fluoreszenzanisotropie  $r_G$  aus Einzelmolekülexperimenten der JF4-markierten dNTPs dargestellt. Die Ergebnisse der Anpassung der 1D-Histogramme durch eine Gaußverteilung zeigt Tab. 4.1-7.

**Tab. 4.1-7: Mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  aus den Abklingkurven der JF4-markierten Nukleotide nach der Signalspitzen-orientierten Auswertung der Einzelmolekülmessungen. Der Wert für  $\sigma_i$  gibt die Breite der Gaußverteilung und  $a_i$  die relative Amplitude der Verteilung um  $\tau_i$  an (mit  $i = 1$  und  $2$ ).**

	$\tau_{av}$ [ns]	$\tau_1$ [ns]	$\tau_2$ [ns]	$\sigma_1$ [ns]	$\sigma_2$ [ns]	$a_1$	$a_2$
Rh110	4,01	4,08	2,47	0,60	0,18	0,96	0,04
JF4	2,67	2,67	-	0,45	-	1,00	-
JF4E	3,07	3,23	1,48	0,84	0,22	0,91	0,09
JF4-dATP	2,82	2,50	3,10	0,35	0,93	0,46	0,54
JF4-dCTP	2,88	2,54	3,18	0,33	0,91	0,46	0,54
JF4-dGTP	2,92	2,46	3,17	0,29	0,85	0,36	0,64
JF4-dTTP	3,28	3,28	-	0,89	-	1,00	-

Die Berechnung von  $\tau_{av}$  folgt:  $\tau_{av} = \sum_i \tau_i \cdot a_i$ . Messbedingungen: s. Abb. 4.1-4.

JF4 zeigt im Vergleich zu Rh110 eine niedrigere mittlere Lebensdauer  $\tau_{av}^a$ , eine stark verringerte Intensität in den „grünen“ Detektionskanälen und eine leicht erhöhte Anisotropie. Die Unterscheidung der verschiedenen JF4-NTPs über die Anisotropie  $r_G$  und die „grüne“ Intensität  $S_G$  ist nicht möglich. Allein die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$  zeigt Unterschiede in den 1D-Histogrammen und bewirkt damit auch leichte Unterschiede in den 2D-Histogrammen. Da die Lebensdauerwerte jedoch breit verteilt sind, kann bei Untersuchung einer der vier Proben mit Hilfe der Lebensdauer keine exakte Aussage darüber getroffen werden, an welcher der vier Basen der Farbstoff gebunden ist.

*Die Idee, durch simultane Detektion mehrerer Fluoreszenzparameter die Basenzuordnung zu erreichen, scheitert daran, dass nur ein Parameter Unterschiede bei den Nukleotiden zeigt. Die Unterscheidung auf Einzelmolekülbasis unter diesen Messbedingungen ist daher nicht zuverlässig. Im Weiteren soll versucht werden, ob durch Änderung der Messbedingungen Unterschiede in der Fluoreszenzintensität,  $S_G$ , für die JF4-Nukleotide erzielt werden können.*

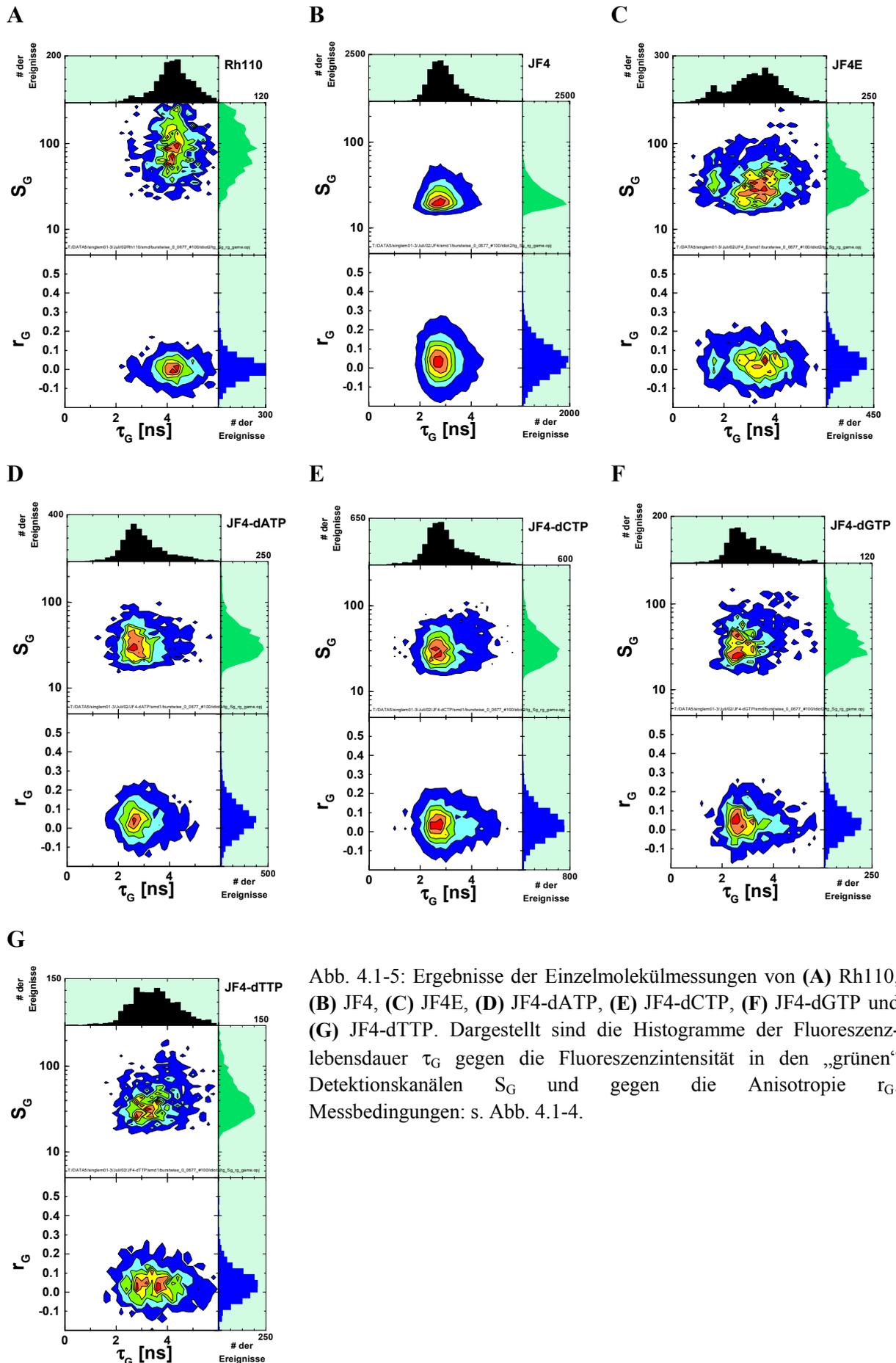


Abb. 4.1-5: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von (A) Rh110, (B) JF4, (C) JF4E, (D) JF4-dATP, (E) JF4-dCTP, (F) JF4-dGTP und (G) JF4-dTTP. Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$  gegen die Fluoreszenzintensität in den „grünen“ Detektionskanälen  $S_G$  und gegen die Anisotropie  $r_G$ . Messbedingungen: s. Abb. 4.1-4.

### Zugabe von Triplettlöschern

Aufgrund des hohen Triplettanteils wurde der Einsatz von sogenannten Triplettlöschern QT untersucht. Diese Substanzen erniedrigen die Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplettzustandes, wodurch sich Amplitude  $T_{1eq}$  des charakteristischen Triplettterms verringert. Die Geschwindigkeitskonstante des Übergangs vom Triplettzustand T in den Grundzustand  $S_0$ ,  $k_T^*$ , wird dabei erhöht, indem zusätzlich eine Geschwindigkeitskonstante  $k_{QT}$  der Löschung auftritt.

$$k_T = k_T^* + k_{QT}[QT] \quad \text{Gl. 4.1-1}$$

Zum einen wurde dabei eine sauerstoffgesättigte Lösung von JF4 untersucht, da bereits gezeigt wurde, dass Sauerstoff bei Rhodaminfarbstoffen als Triplettlöcher wirkt (Eggeling, 1999b; Fries, 1998a; Widengren, 1995). Ebenfalls löschende Wirkung auf den Triplettzustand besitzen beispielsweise Cyclooctatetraen (Hillisch, 1998; Pappalardo, 1998; Weber, 1973) und Cysteamin (Eggeling, 1999b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde als weiterer Triplettlöcher ein wasserlösliches Derivat eines bekannten Triplettlöschers von Rhodaminen eingesetzt, dessen Synthese im Arbeitskreis entwickelt wurde. Aufgrund des laufenden Patentverfahrens können Namen und Struktur nicht angegeben werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird dieses Molekül daher als TL bezeichnet.

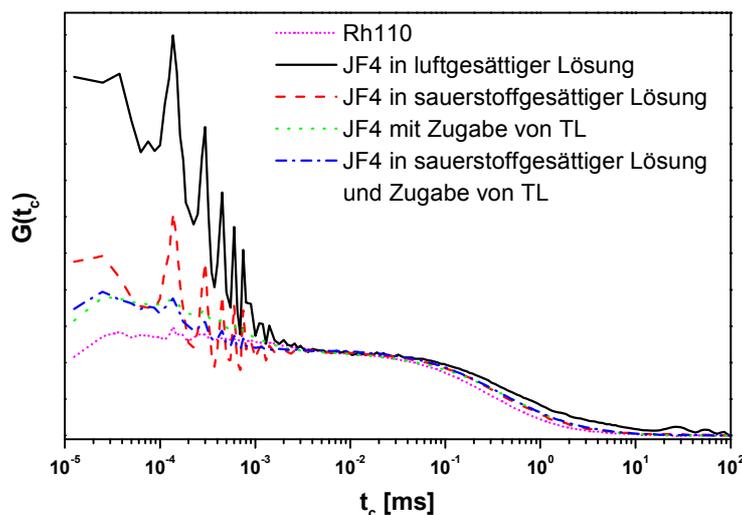


Abb. 4.1-6: Korrelationskurven von JF4 in Anwesenheit von verschiedenen Triplettlöschern. Messbedingungen: Anregung bei  $\lambda_{Ex} = 496 \text{ nm}$ ,  $I = 44 \text{ kW cm}^{-2}$ ,  $\omega_0 = 0,6 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 2,0 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = 1 \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ535/50, Strahlteiler 488/594PC und 595DCXR.

In Abb. 4.1-6 sind die Korrelationskurven von JF4 dargestellt in luftgesättigter und sauerstoffgesättigter Lösung mit und ohne Zusatz von TL. Dabei wurde der Puffer mit Sauerstoff gesättigt und die Probenkammer mit Sauerstoff gespült. Wie man anhand der Kurven und der Werte in Tab. 4.1-8 erkennt, erniedrigen sowohl TL als auch Sauerstoff den Triplettanteil, wobei die Triplettamplitude  $A_1 = T_{1eq}$  von 0,77 bei Zusatz von TL auf 0,39 und bei Sauerstoff auf 0,51 erniedrigt wird. Die Kombination von Sauerstoff und TL bewirkt dieselbe Erniedrigung der Triplettamplitude wie TL alleine. Als Grund hierfür sind

verschiedene Mechanismen der beiden Triplettlöschern zu nennen, die die „Löschung“ des Triplettzustands verursachen. TL scheint damit den Einfluss von Sauerstoff zu blockieren, so dass nur die Löschung von TL ausschlaggebend für die Erniedrigung der Amplitude ist. Die Erniedrigung der Triplettamplitude geht einher mit der Erhöhung von  $k_T$ , der Geschwindigkeitskonstante für den Übergang aus dem Triplettzustand T in den Grundzustand  $S_0$ .

**Tab. 4.1-8: Parameter der Korrelationskurven von JF4 in Anwesenheit von verschiedenen Triplettlöschern.**

		$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu$ s]	$A_1$	$k_T$ [ $10^5 \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{ISC}$ [ $10^6 \text{ s}^{-1}$ ]	$\Phi_{ISC}$
Rh110		0,330	2,285	0,15	3,71	0,65	0,003
JF4	luftgesättigt	0,572	0,449	0,77	5,05	25,70	0,064
JF4	sauerstoffgesättigt	0,357	0,265	0,51	18,44	28,70	0,072
JF4	Zusatz von TL	0,411	0,834	0,39	7,33	6,95	0,017
JF4	sauerstoffgesättigt und Zusatz von TL	0,388	0,293	0,39	20,69	20,05	0,050

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-6. Die Standardabweichungen der Werte liegen bei 25 % für  $k_{ISC}$  und bei 10 % für  $k_T$ . Die Triplettparameter sind mit einer mittleren Fluoreszenzlebensdauer von 2,5 ns berechnet worden. Die Werte von  $k_T$ ,  $k_{ISC}$  und  $\Phi_{ISC}$  sind gemäß Gl. 2.4-9, Gl. 2.4-10 und Gl. 2.4-13 berechnet worden.

Im Weiteren wird die Konzentrationsabhängigkeit der Triplettlöschung von TL untersucht. Dabei sollte die Konzentration des Triplettlöschers nicht zu groß sein, da sonst eine Komplexbildung mit dem Fluorophor nicht ausgeschlossen werden kann, die zur Fluoreszenzlöschung führt. Dieser Effekt wurde bei Rh6G mit Cyclooctatetraen beobachtet (Eggeling, 1999b). Als Fluorophor wurde hier Rh110 eingesetzt. Da die Bevölkerung des Triplettzustands mit erhöhter Anregungsintensität zunimmt, wurde bei einer möglichst hohen Anregungsleistungsdichte gemessen.

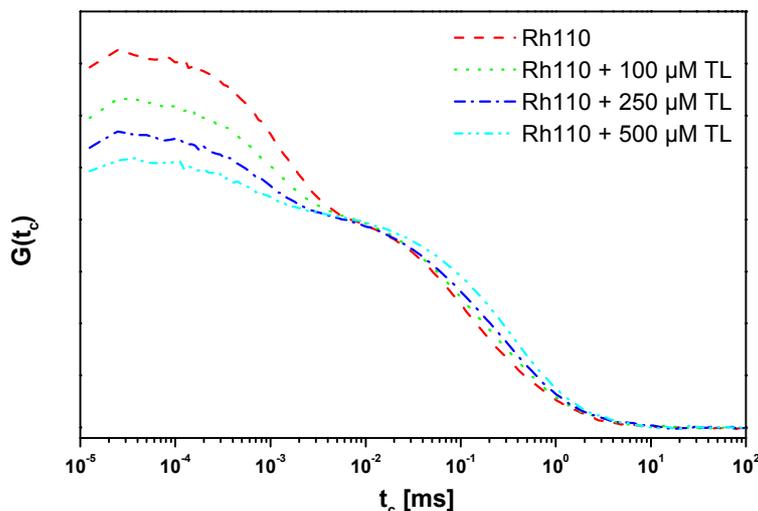


Abb. 4.1-7: Korrelationskurven von Rh110 in Abhängigkeit von der TL-Konzentration. Messbedingungen: Anregung bei  $\lambda_{Ex} = 496 \text{ nm}$ ,  $I = 431 \text{ kW cm}^{-2}$ ,  $\omega_0 = 0,6 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 0,6 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = 1 \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ535/50, Strahlteiler 488/594PC und 595DCXR.

Anhand von Abb. 4.1-7 und Tab. 4.1-9 erkennt man die Erniedrigung der Tripletamplitude mit gesteigerter TL-Konzentration. Bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  TL ist  $A_1 = T_{1\text{eq}}$  auf die Hälfte reduziert worden. Die weitere Erhöhung der Konzentration bewirkt keine proportionale Änderung der Amplitude, so dass im Weiteren eine Konzentration nicht höher als 250  $\mu\text{M}$  TL bei den Messungen mit den JF4-Nukleotiden eingesetzt wurde.

**Tab. 4.1-9: Parameter aus der Anpassung der FCS-Kurven von Rh110 in Abhängigkeit der TL-Konzentration.**

[TL] [ $\mu\text{M}$ ]	$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_1$	$t_2$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_2$	$k_T$ [ $10^5 \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{\text{ISC}}$ [ $10^6 \text{ s}^{-1}$ ]	$\Phi_{\text{ISC}}$
0	0,139	1,471	0,43	-	-	3,90	0,52	0,0021
100	0,296	1,086	0,33	48,990	0,15	6,19	0,55	0,0022
250	0,322	0,937	0,26	37,173	0,12	7,88	0,51	0,0020
500	0,474	0,755	0,19	25,476	0,08	10,76	0,45	0,0018

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-7. Die Standardabweichungen der Werte liegen bei 25 % für  $k_{\text{ISC}}$  und bei 10 % für  $k_T$ . Die Werte von  $k_T$ ,  $k_{\text{ISC}}$  und  $\Phi_{\text{ISC}}$  sind gemäß Gl. 2.4-9, Gl. 2.4-10 und Gl. 2.4-13 berechnet worden.

Der zusätzliche Bunchingterm bei der Anpassung der Korrelationskurven deutet auf eine weitere Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Tripletlöcher hin. Dieser Term tritt dann auf, wenn beide Substanzen gemeinsam über längere Zeit in der Lösung vorliegen.

Den zusätzlichen Einsatz von Vitamin C (VitC) als Sauerstofffänger zu TL in der Messlösung zeigt Abb. 4.1-8. Bei höheren Anregungsleistungsdichten  $I$  wird nach Eggeling (Eggeling, 1999b) ein Anstieg der Tripletpopulation erwartet. Die Reduktion von gelöstem Sauerstoff im vorliegenden Versuch hat ebenfalls die Erhöhung der Besetzungsdichte des Tripletzustandes zur Folge. Dies kann man deutlich in der Zunahme der Tripletamplitude  $A_1 = T_{1\text{eq}}$  und der Abnahme der Geschwindigkeitskonstante  $k_T$  im Vergleich zu den Messungen ohne Vitamin C erkennen (Tab. 4.1-10).

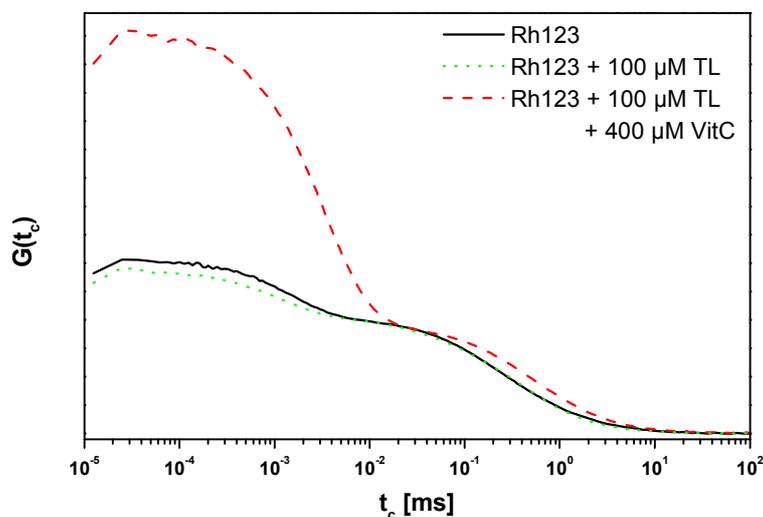


Abb. 4.1-8: Einfluss von Vitamin C (VitC) zusätzlich zur Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  TL. Messbedingungen: Anregung bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 496 \text{ nm}$ ,  $I = 281 \text{ kW cm}^{-2}$ ,  $\omega_0 = 0,6 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 1,7 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = 3 \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ535/50, Strahlteiler 488/594PC und 595DCXR.

Ascorbinsäure verdrängt vermutlich TL aus der Umgebung des Farbstoffs, welches dann keine reduzierende Wirkung auf den Triplettzustand ausüben kann. Eine andere Möglichkeit ist, dass der Effekt von Ascorbinsäure so stark ist, dass der Einfluss von TL nicht mehr registriert werden kann. Bei der Anpassung der Korrelationskurve der Messung mit Ascorbinsäure wird kein zweiter Bunchingterm benötigt. Das deutet darauf hin, dass es sich bei der Messung ausschließlich mit TL um eine Gleichgewichtsreaktion der Komplexbildung von Farbstoff und Triplettlöcher handelt, die bei Zusatz von Ascorbinsäure aufgehoben ist.

**Tab. 4.1-10: Einfluss von Ascorbinsäure zusätzlich zur Zugabe von Triplettlöcher TL.**

		$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu$ s]	$A_1$	$t_2$ [ $\mu$ s]	$A_2$	$k_T$ [ $10^5 \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{ISC}$ [ $10^6 \text{ s}^{-1}$ ]
Rh123		0,275	1,711	0,34	-	-	3,88	0,46
Rh123	+ 100 $\mu$ M TL	0,399	1,242	0,28	38,434	0,08	5,83	0,52
Rh123	+ 100 $\mu$ M TL + 400 $\mu$ M Vit C	0,492	3,617	0,72	-	-	0,77	0,47

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-8. Die Standardabweichungen der Werte liegen bei 25 % für  $k_{ISC}$  und bei 10 % für  $k_T$ . Die Werte von  $k_T$ ,  $k_{ISC}$  und  $\Phi_{ISC}$  sind gemäß Gl. 2.4-9, Gl. 2.4-10 und Gl. 2.4-13 berechnet worden.

Im nächsten Schritt wurden die JF4-markierten Nukleotide unter Zusatz von 100  $\mu$ M TL und 250  $\mu$ M TL bei verschiedenen Anregungsleistungsdichten  $I$  untersucht. Durch Variation von  $I$  sollte die Messbedingung ermittelt werden, bei der die JF4-Nukleotide bei Zugabe von TL möglichst unterschiedliche Photonenzählraten pro Molekül und damit Intensitäten aufweisen. In Tab. 4.1-11 und -12 sind die Zählraten und Anregungsleistungsdichten  $I$  aufgelistet. Abb. 4.1-9 zeigt sogenannte Sättigungskurven, die bei niedrigen  $I$  einen proportionalen Anstieg der Photonenzählrate zeigen und bei hohen  $I$  einem Sättigungswert entgegenstreben.

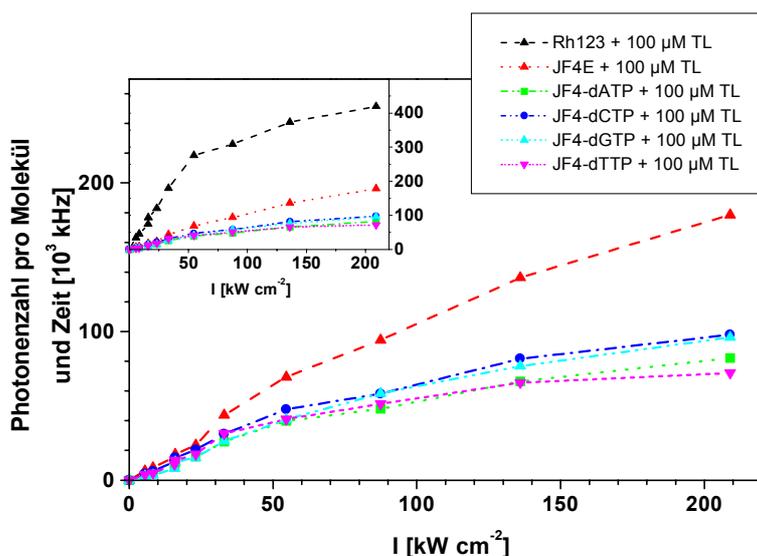


Abb. 4.1-9: Sättigungskurven der JF4-NTPs mit Zusatz von 100  $\mu$ M TL. Dargestellt ist die Photonenzählrate in Abhängigkeit von der Anregungsleistungsdichte  $I$ . Messbedingungen: Gepulste Anregung bei  $\lambda_{Ex} = 496 \text{ nm}$ ,  $\omega_0 = 0,6 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 2,4 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = 4 \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ535/50, Strahlteiler 488/594PC und 595DCXR.

Aus Abb. 4.1-9 ist ersichtlich, dass der Anstieg der Photonenzählrate bei Rh123 stärker ist als bei JF4 und den JF4-markierten Nukleotiden und einem höheren Wert der Sättigung entgegenstrebt. Als Grund hierfür ist die geringere Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplettzustandes bei Rh123 zu nennen. Vergleicht man JF4 mit den JF4-NTPs, erkennt man, dass die Photonenzählrate der JF4-dNTPs bei allen Anregungsleistungsdichten  $I$  niedriger ist. Da die Photonenzählrate (bei niedrigen Leistungsdichten) proportional zur Fluoreszenzquantenausbeute ist, spiegelt sich hier die Löschung des JF4 gebunden am Nukleotid wider. Beim Vergleich der Kurven der JF4-NTPs untereinander, kann man zwei Gruppen unterscheiden: JF4-dCTP und JF4-dGTP haben bei höheren Anregungsleistungsdichten niedrigere Photonenzählraten als JF4-dATP und JF4-dTTP. Bei niedrigen  $I$ -Werten sind die Photonenzählraten der JF4-dNTPs nicht voneinander zu unterscheiden. Dies bedeutet, dass der Zusatz des Triplettlöschers TL den linearen Bereich der Sättigungskurven zu höheren  $I$  verschiebt, aber diese Verschiebung bei allen JF4-NTP ähnlich stark ist, so dass keine verbesserte Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den Nukleobasen besteht.

Aus den Korrelationskurven der Messungen in Abb. 4.1-9 wurden die Geschwindigkeitskonstanten des Übergangs in den Triplettzustand  $k_{ISC}$  und aus dem Triplettzustand  $T$  in den Grundzustand  $S_0$ ,  $k_T$ , berechnet und gegen die Anregungsleistungsdichte  $I$  aufgetragen. Wie Eggeling bereits für Rhodamine ohne Zugabe von Triplettlöschler gezeigt hat (Eggeling, 1999a), bleiben die Werte von  $k_T$  konstant bei einem mittleren Wert von  $4,0 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ , welcher mit dem Wert von  $4,3 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  (Eggeling, 1999a) innerhalb der Messgenauigkeit übereinstimmt. In Anwesenheit von  $100 \mu\text{M}$  TL erhöht sich  $k_T$  auf einen mittleren Wert von  $5,0 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ .

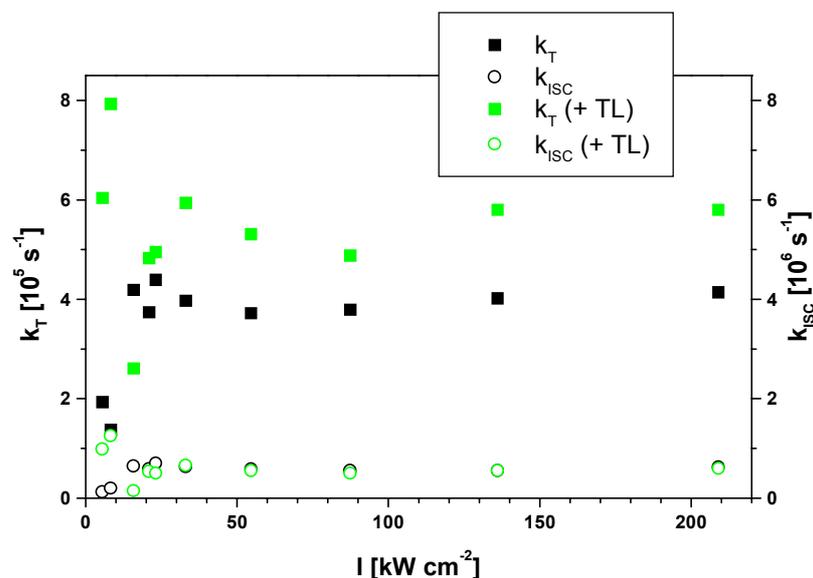


Abb. 4.1-10: Die Triplettparameter  $k_T$  (schwarze Quadrate) und  $k_{ISC}$  (offene Kreise) von Rh123 ohne und mit Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  TL in Abhängigkeit von der Anregungsleistungsdichte  $I$ . Messbedingungen: s. Abb. 4.1-9.

Wegen der zunehmenden Sättigung sollte  $k_{ISC}$  bei verändertem  $I$  nicht konstant sein (Eggeling, 1999a). Die erwartete Abnahme von  $k_{ISC}$  mit steigendem  $I$  ist hier nicht erkennbar (Abb. 4.1-10). Die Werte von  $k_{ISC}$  für die Messung von Rh123 mit dem Triplettlöschler TL

sind immer größer als die von Rh123 ohne TL, was einem rascheren Übergang in den Triplettzustand entspricht.

In den Tabellen 4.1-11 und -12 sind die Ergebnisse der FCS-Messungen von Rh123, JF4 und den JF4-NTPs bei zwei verschiedenen Konzentrationen von TL und bei je drei verschiedenen Anregungsleistungsdichten angegeben. Als Referenz für jede Messung wurde Rh123 ohne Zusatz von TL verwendet.

*Die Triplettamplitude der Rh123-Messungen in Anwesenheit von TL ist erniedrigt im Vergleich zur Messung ohne TL, was sich in der Erhöhung eines mittleren Wertes von  $k_T$  von  $4,0 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  (ohne TL) auf  $4,5 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  (mit  $62,5 \text{ } \mu\text{M TL}$ ) bzw.  $6,0 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  (mit  $250 \text{ } \mu\text{M TL}$ ) zeigt. Bei einer Zugabe von  $62,5 \text{ } \mu\text{M TL}$  sind  $k_T$ -Werte der JF4-Nukleotide untereinander sehr ähnlich. Anscheinend ist die Zugabe von  $62,5 \text{ } \mu\text{M TL}$  nicht ausreichend für eine systematische Änderung der Geschwindigkeitskonstante des Triplettzustandes.*

*Bei  $250 \text{ } \mu\text{M TL}$  lautet die Reihenfolge der Werte für die Geschwindigkeitskonstante  $k_T$ :  $k_T(\text{JF4-dATP}) < k_T(\text{JF4-dGTP}) < k_T(\text{JF4-dTTP}) < k_T(\text{JF4-dCTP})$ .*

*Die Triplettquantenausbeuten in Anwesenheit von TL sind erniedrigt, was besonders deutlich im Fall von JF4E wird. In vorhergehenden Messungen wurde gezeigt, dass JF4 bei  $I = 42,9 \text{ kW cm}^{-2}$  und  $\lambda_{\text{Ex}} = 496 \text{ nm}$  einen Wert von  $\Phi_{\text{ISC}} = 0,055$  besitzt. Bei Zusatz von TL von  $62,5 \text{ } \mu\text{M}$  wird  $\Phi_{\text{ISC}}$  auf  $0,023$  und mit  $250 \text{ } \mu\text{M TL}$  auf  $0,018$  erniedrigt. Man erkennt auch deutlich den Trend, dass mit höherer Leistungsdichte  $I$  der Wert von  $k_{\text{ISC}}$  abnimmt. Die relative Erniedrigung von  $\Phi_{\text{ISC}}$  bei den mittleren Anregungsleistungsdichten von  $34$  bzw.  $43 \text{ kW cm}^{-2}$  zu den Werten in Tab. 4.1-4 ist stärker ausgeprägt bei einer Zugabe von  $250 \text{ } \mu\text{M TL}$  als bei  $62,5 \text{ } \mu\text{M}$ .*

*Auffallend ist das Auftreten eines zweiten Bunchingterms bei erhöhter TL-Konzentration und höherer Anregungsleistungsdichte. Dies lässt wiederum auf Sättigungsphänomene schließen.*

Tab. 4.1-11: Zusatz von 62,5  $\mu\text{M}$  TL.

	I [kW cm <sup>-2</sup> ]	t <sub>D</sub> [ms]	t <sub>1</sub> [ $\mu\text{s}$ ]	A <sub>1</sub>	k <sub>T</sub> [10 <sup>5</sup> s <sup>-1</sup> ]	k <sub>ISC</sub> [10 <sup>6</sup> s <sup>-1</sup> ]	$\Phi_{\text{ISC}}$
Rh123 (ohne TL)	22,6	0,269	2,64	0,09	3,46	0,59	0,0024
Rh123	22,6	0,265	1,99	0,06	4,70	0,57	0,0023
JF4E	22,6	0,358	1,03	0,45	5,30	12,29	0,0307
JF4-dATP	22,6	0,508	1,21	0,44	4,60	10,26	0,0256
JF4-dCTP	22,6	0,457	1,18	0,47	4,51	11,03	0,0276
JF4-dGTP	22,6	0,517	1,24	0,46	4,34	10,42	0,0261
JF4-dTTP	22,6	0,528	1,58	0,47	3,33	8,38	0,0210
Rh123 (ohne TL)	34,3	0,288	2,34	0,12	3,76	0,62	0,0025
Rh123	34,3	0,296	2,09	0,09	4,37	0,51	0,0020
JF4E	34,3	0,375	0,94	0,46	5,82	9,16	0,0229
JF4-dATP	34,3	0,502	1,04	0,48	4,98	8,67	0,0217
JF4-dCTP	34,3	0,515	1,03	0,44	5,42	8,01	0,0200
JF4-dGTP	34,3	0,514	1,24	0,44	4,47	6,74	0,0168
JF4-dTTP	34,3	0,528	1,38	0,48	3,77	6,58	0,0165
Rh123 (ohne TL)	57,2	0,286	2,35	0,16	3,57	0,53	0,0021
Rh123	57,2	0,305	1,98	0,13	4,40	0,51	0,0020
JF4E	57,2	0,371	0,90	0,46	6,06	5,94	0,0148
JF4-dATP	57,2	0,492	1,15	0,43	4,94	4,44	0,0111
JF4-dCTP	57,2	0,500	1,01	0,47	5,31	5,41	0,0135
JF4-dGTP	57,2	0,493	0,92	0,45	5,93	5,76	0,0144
JF4-dTTP	57,2	0,515	1,23	0,48	4,19	4,61	0,0115

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-9. Die Standardabweichungen der Werte liegen bei 25 % für  $k_{\text{ISC}}$  und bei 10 % für  $k_{\text{T}}$ . Die Werte von  $k_{\text{T}}$ ,  $k_{\text{ISC}}$  und  $\Phi_{\text{ISC}}$  sind gemäß Gl. 2.4-9, Gl. 2.4-10 und Gl. 2.4-13 berechnet worden.

**Tab. 4.1-12: Zusatz von 250  $\mu\text{M}$  TL.**

	I [kW cm <sup>-2</sup> ]	t <sub>D</sub> [ms]	t <sub>A</sub>	A	t <sub>B</sub>	B	k <sub>T</sub> [10 <sup>5</sup> s <sup>-1</sup> ]	k <sub>ISC</sub> [10 <sup>6</sup> s <sup>-1</sup> ]	$\Phi_{\text{ISC}}$
Rh123 (ohne TL)	26,0	0,241	2,07	0,11			4,31	0,80	0,0032
Rh123	26,0	0,285	1,59	0,04			6,06	0,37	0,0015
JF4E	26,0	0,356	0,96	0,33			6,97	8,41	0,0210
JF4-dATP	26,0	0,486	1,50	0,30			4,67	4,84	0,0121
JF4-dCTP	26,0	0,515	1,07	0,32			6,38	7,26	0,0182
JF4-dGTP	26,0	0,557	1,64	0,25			4,55	3,81	0,0095
JF4-dTTP	26,0	0,520	1,27	0,35			5,09	6,80	0,0170
Rh123 (ohne TL)	43,4	0,234	2,33	0,14			3,68	0,61	0,0024
Rh123	43,4	0,273	1,58	0,06			5,93	0,40	0,0016
JF4E	43,4	0,350	0,67	0,31	8,12	0,05	10,40	7,00	0,0175
JF4-dATP	43,4	0,455	1,67	0,22	0,06	0,19	4,68	2,00	0,0050
JF4-dCTP	43,4	0,495	0,83	0,34	19,68	0,04	7,91	6,14	0,0153
JF4-dGTP	43,4	0,496	1,34	0,24	0,05	0,18	5,66	2,72	0,0068
JF4-dTTP	43,4	0,571	0,98	0,34	18,23	0,05	6,77	5,26	0,0131
Rh123 (ohne TL)	72,3	0,237	2,12	0,21			3,75	0,61	0,0024
Rh123	72,3	0,305	1,55	0,09			5,86	0,36	0,0015
JF4E	72,3	0,432	0,63	0,33	13,22	0,05	10,56	4,94	0,0123
JF4-dATP	72,3	0,497	1,75	0,22	0,16	0,15	4,45	1,20	0,0030
JF4-dCTP	72,3	0,456	0,74	0,31	11,10	0,04	9,32	3,98	0,0099
JF4-dGTP	72,3	0,489	1,18	0,24	0,06	0,18	6,43	1,96	0,0049
JF4-dTTP	72,3	0,536	0,92	0,34	17,62	0,04	7,19	3,53	0,0088

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-9. Die Standardabweichungen der Werte liegen bei 25 % für  $k_{\text{ISC}}$  und bei 10 % für  $k_{\text{T}}$ . Die Werte von  $k_{\text{T}}$ ,  $k_{\text{ISC}}$  und  $\Phi_{\text{ISC}}$  sind gemäß Gl. 2.4-9, Gl. 2.4-10 und Gl. 2.4-13 berechnet worden.

In Abb. 4.1-11 sind die Ergebnisse der Einzelmolekülexperimente der JF4-markierten Nukleotide bei Zugabe von TL wiedergegeben. Dargestellt sind die Parameter Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{\text{G}}$ , Fluoreszenzintensität in den grünen Kanälen  $S_{\text{G}}$  und die Anisotropie  $r_{\text{G}}$ .

*Wie aufgrund der Ergebnisse aus den FCS-Messungen erwartet, zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede in den Histogrammen. Vermutlich aufgrund von Komplexbildung (s. auch Tab. 4.1-9) des Triplettlöschers mit dem Farbstoff bzw. dem jeweiligen JF4-NTP erscheint eine zweite Population, die auf Komplexbildung zurückgeführt werden kann. Die Fluoreszenzintensitäten liegen alle in einer ähnlichen Größenordnung und können daher nicht als zweites Unterscheidungskriterium neben der Fluoreszenzlebensdauer bei einer Einzelmolekülsequenzierung verwendet werden.*

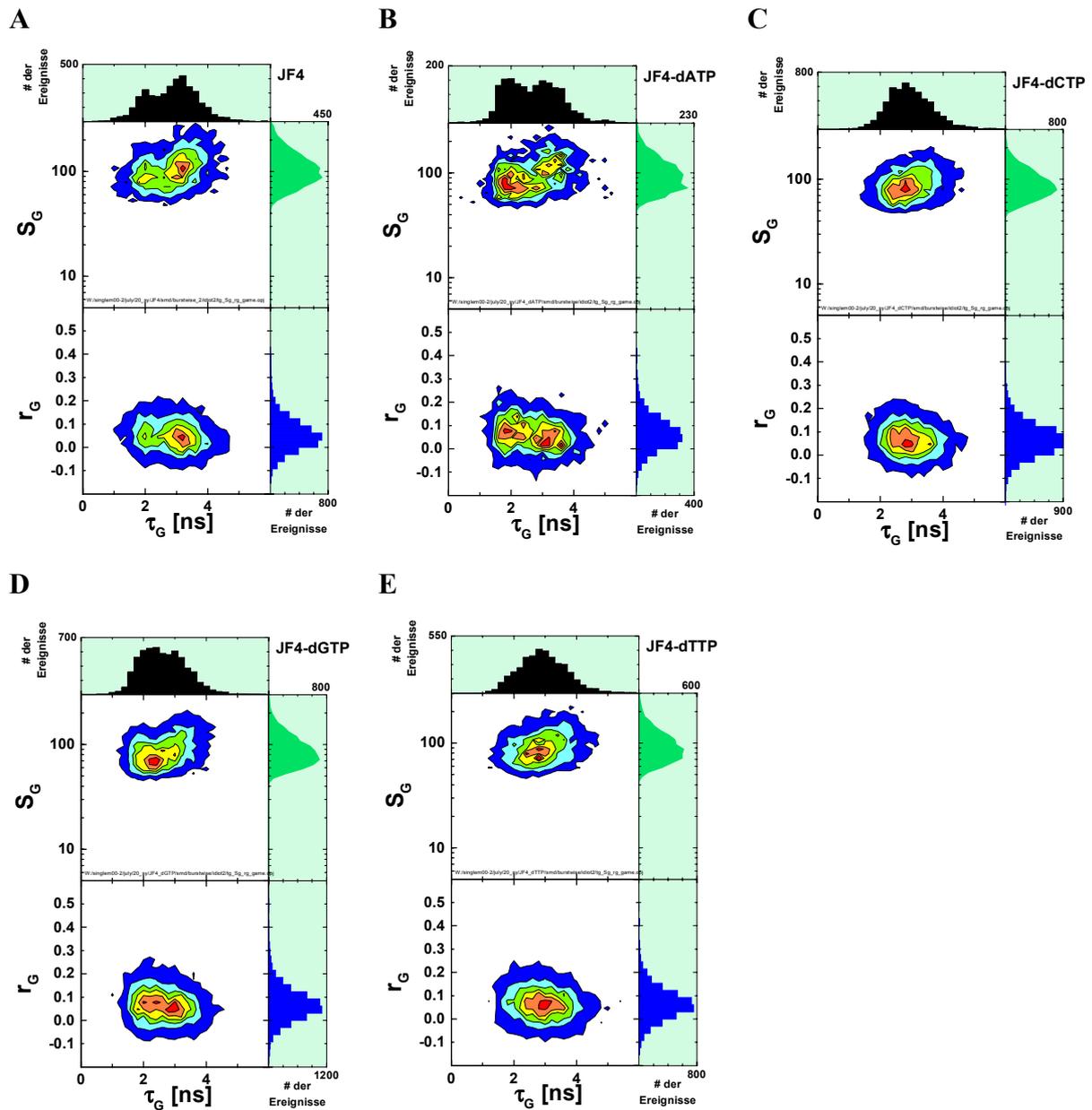


Abb. 4.1-11: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von (A) JF4, (B) JF4-dATP, (C) JF4-dCTP, (D) JF4-dGTP und (E) JF4-dTTP mit Zusatz von TL. Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$  gegen die Fluoreszenzintensität in den „grünen“ Kanälen  $S_G$  und die Anisotropie  $r_G$ . Messbedingungen: Gepulste Anregung bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 496 \text{ nm}$ ,  $I = 20 \text{ kW cm}^{-2}$ ,  $\omega_0 = 0,6 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 2,8 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = 6 \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ535/50, Strahlteiler 488/636PC und 595DCXR.

### 4.1.3 Farbstoff am Oligonukleotid

#### 4.1.3.1 „Grüne“ Fluoreszenzfarbstoffe

In diesem Kapitel wird der Einfluss der Basensequenz von Oligonukleotiden auf die Rhodaminfarbstoffe Rh6G, TMR, RhGr und Alexa488 untersucht, die an die Sequenz gebunden sind. Aufgrund der Löschung durch die Nucleobasen kann das Verhalten der verschiedenen Farbstoffe an Nucleinsäuren untersucht werden.

Bei der Sequenz KFO handelt es sich um ein kurzes Oligonukleotid (20mer) zur Untersuchung der Fluoreszenzfarbstoffe an doppelsträngiger (ds) DNS, wobei Guanin als erste Nucleobase im komplementären DNS-Strang vorliegt (Abb. 4.1-12). Alle Experimente mit Oligonukleotiden wurden in NaPi-Puffer durchgeführt. Ein Verzeichnis der Sequenzen, die in dieser Arbeit verwendet werden, findet sich in Anhang D.

Die KFO-Sequenz wurde variiert, um die Abstandsabhängigkeit der Löschung von Rh6G durch Guanin zu untersuchen. Dazu wurde das Guanin an 1.-3. Stelle von 5'-Ende des Stranges positioniert, an dem sich auch der Farbstoff befindet. Diese Reihe wird mit G1-G3 bezeichnet. Die C-Sequenzen (C1-C3) enthalten analog dazu das Guanin an der 1.-3. Position vom 3'-Ende der Gegensequenz.

Die Sequenz TKFO wurde mit den Farbstoffen Rh6G, RhGr und Alexa488 untersucht. Dabei handelt es sich um die Sequenz von KFO mit einem zusätzlichen Thymin am 5'-Ende der Sequenz, an dem die Farbstoffe ebenfalls gebunden sind.

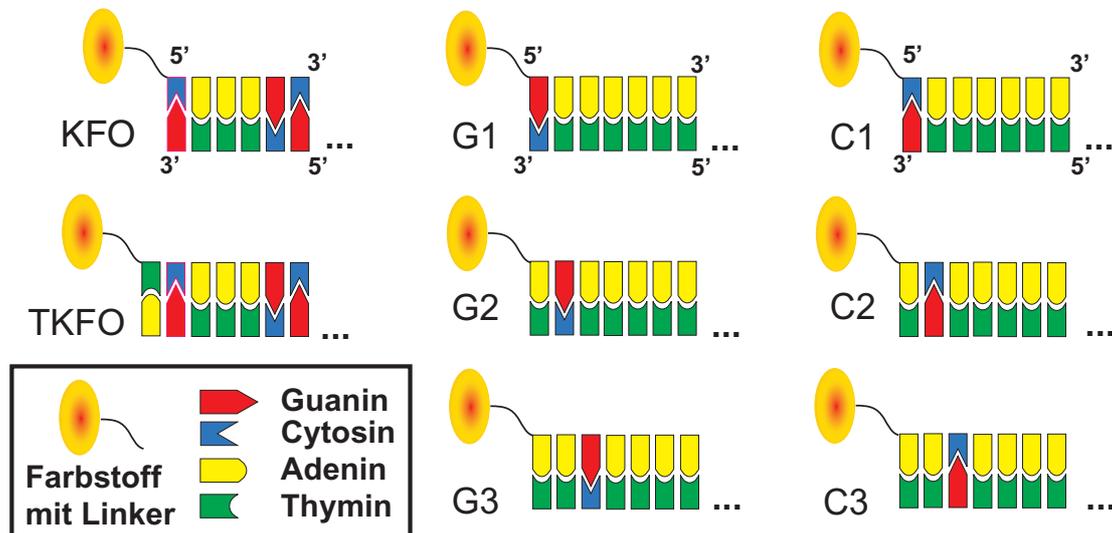
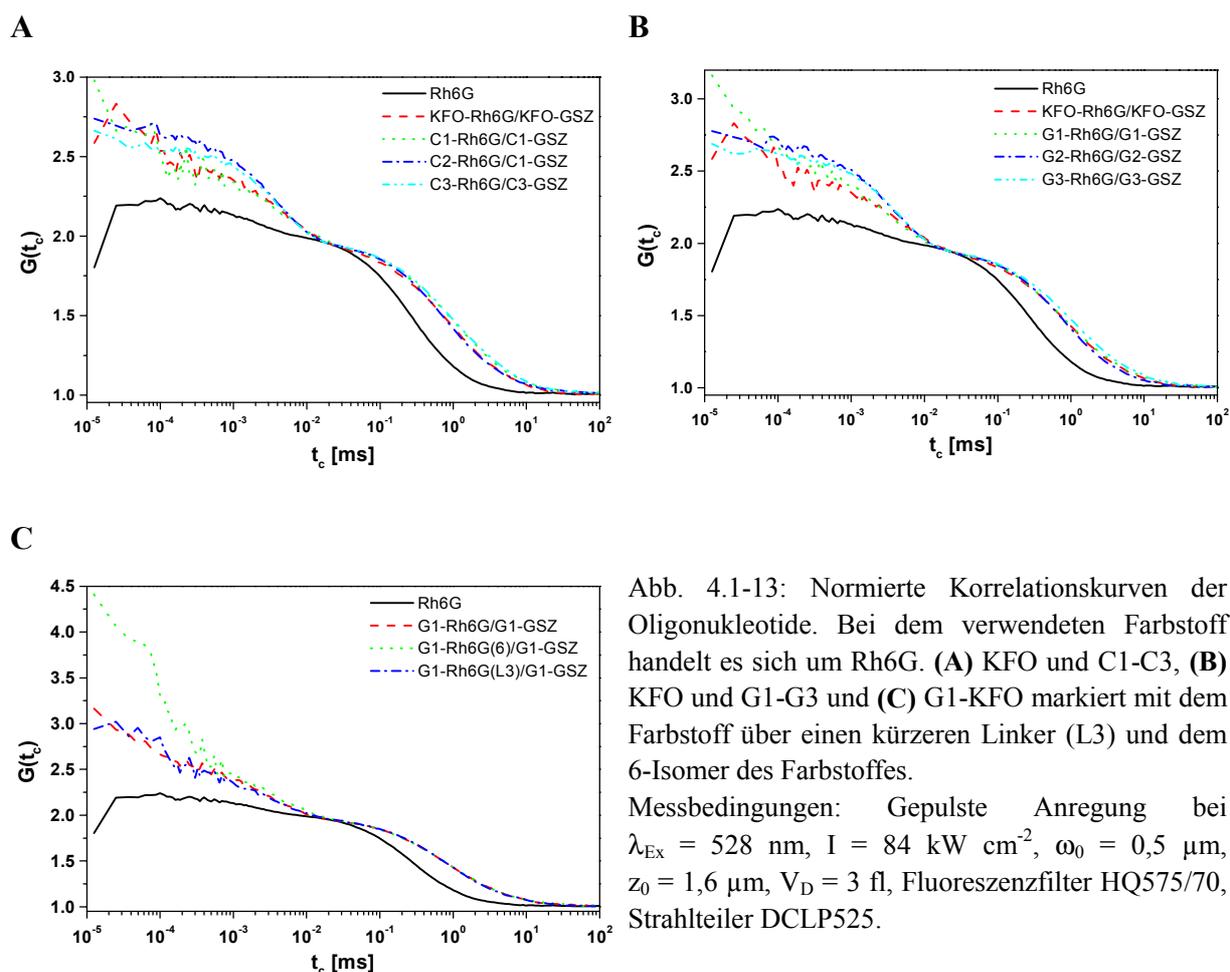


Abb. 4.1-12: Schematische Darstellung der ersten Basen der Oligonukleotide basierend auf der KFO-Sequenz (vollständige Sequenzen, s. Anhang D).

### Rh6G am Oligonukleotid KFO

Im Folgenden werden die Untersuchungen des Farbstoffs am Oligonukleotid KFO und dessen Varianten G1-G3 und C1-C3 vorgestellt. Dabei handelt es sich um das 5-Isomer (s. Anhang C) des Farbstoffs mit einem C<sub>6</sub>-Linker gebunden am 5'-Ende der Sequenz.

Die Sequenz G1 wurde darüberhinaus mit dem 6-Isomer von Rh6G (Rh6G(6)) fluoreszenzspektroskopisch untersucht, um Aufschluss über den Einfluss des Bindungswinkels im Vergleich zum 5-Isomer zu erhalten. Der Linker des 5-Isomers des Farbstoffs zum Oligonukleotid wurde zu einem C<sub>3</sub>-Linker modifiziert (Rh6G(L3)), um das Verhalten des Farbstoffes mit einem kürzeren Bindungsabstand zu untersuchen.



In Abb. 4.1-13 sind die normierten Korrelationskurven von Rh6G an den Doppelstrang-Oligonukleotiden basierend auf der Sequenz KFO wiedergegeben und in Tab. 4.1-13 - neben den stationären Fluoreszenzquantenausbeuten - die Ergebnisse der FCS-Messungen.

Rh6G als freier Farbstoff in Lösung hat eine Diffusionszeit von 0,25 ms und eine geringe Triplettamplitude  $A_1 = T_{\text{leq}}$  und besitzt eine hohe Geschwindigkeitskonstante  $k_T$ , die den Übergang vom Triplettzustand in den Grundzustand beschreibt. Daher ist die Triplettlebensdauer (der Kehrwert von  $k_T$ ) klein.

Die Oligonukleotide haben unter diesen Messbedingungen eine Diffusionszeit von ca. 1 ms.

KFO-Rh6G/KFO-GSZ und C1-Rh6G/C1-GSZ, bei denen Guanin jeweils im ersten Basenpaar vorhanden ist, zeigen eine stark erniedrigte Fluoreszenzquantenausbeute im Vergleich zu freien Farbstoff und die höchste Tripletamplitude aller hier untersuchten Moleküle. Beide FCS-Kurven weisen einen zweiten Bunchingterm bei 80 bzw. 100 ns mit einer hohen Amplitude von 0,25 auf. Dieser Term beschreibt den Löschvorgang, der hier durch das Guanin an Position 1 des komplementären Stranges stattfindet.

Wie erwartet, nimmt die Löschung bei den Molekülen G1-G3 und C1-C3 mit wachsendem Abstand von Farbstoff zu Guanin ab.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten von C2-Rh6G/C2-GSZ und C3-Rh6G/C3-GSZ sind nur geringfügig gegenüber dem freien Farbstoff erniedrigt, wobei die von C3-Rh6G/C3-GSZ mit dem größten Abstand von Guanin und Farbstoff am größten in der Reihe C1-C3 ist. C3-Rh6G/C3-GSZ zeigt eine größere Tripletamplitude als C2-Rh6G/C2-GSZ, besitzt dafür aber keinen zweiten Bunchingterm. Dieser geht, da die Löschung bei dieser Sequenz nur schwach ausgeprägt ist, mit in den ersten Bunchingterm ein und erhöht somit dessen Amplitude. Ab dem zweiten Basenpaar spielt es keine Rolle mehr, ob das Guanin in der Sequenz oder in der Gegensequenz lokalisiert ist. Dies geht aus dem Vergleich von C2 mit G2 und C3 mit G3 hervor.

**Tab. 4.1-13: Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_F$  und die Parameter aus der Anpassung der FCS-Messungen.**

	$\Phi_F$	$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu$ s]	$A_1$	$t_2$ [ $\mu$ s]	$A_2$	$k_T$ [ $10^5 \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{ISC}$ [ $10^6 \text{ s}^{-1}$ ]
Rh6G	0,95	0,250	1,77	0,17			4,73	0,41
KFO-Rh6G/KFO-GSZ	0,15	0,900	6,49	0,25	0,082	0,26	1,15	0,17
C1-Rh6G/C1-GSZ	0,12	1,070	7,13	0,25	0,103	0,24	1,06	0,15
C2-Rh6G/C2-GSZ	0,75	0,831	4,74	0,36	0,515	0,08	1,36	0,33
C3-Rh6G/C3-GSZ	0,85	1,080	4,82	0,39			1,26	0,36
G1-Rh6G/G1-GSZ	0,21	0,856	4,33	0,28	0,115	0,24	1,66	0,28
G2-Rh6G/G2-GSZ	0,75	0,807	4,89	0,35	0,898	0,09	1,32	0,31
G3-Rh6G/G3-GSZ	0,84	1,075	4,80	0,42			1,22	0,38
G1-Rh6G(L3)/G1-GSZ	0,10	0,860	4,85	0,23	0,134	0,32	1,59	0,21
G1-Rh6G(6)/G1-GSZ	0,11	0,844	5,32	0,17	0,140	0,55	1,55	0,14

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-13. Bei der Anpassung wurde das Verhältnis von  $z_0/\omega_0 = 3$  festgehalten. Zur Berechnung von  $k_T$  (Gl. 2.4-9) und  $k_{ISC}$  (Gl. 2.4-10) wurde  $t_1 = t_T$  und  $A_1 = T_{1eq}$  angenommen. Die Standardabweichungen der Werte liegen bei 5 % für  $\Phi_F$ , 25 % für  $k_{ISC}$  und bei 10 % für  $k_T$ .

Beim Vergleich von G1-Rh6G/G1-GSZ mit C1-Rh6G/C1-GSZ sieht man jedoch einen deutlichen Unterschied. Befindet sich Guanin an der 5'-Position der Sequenz (G1), ist die Löschung nicht so stark ausgeprägt wie bei C1. Dies wird an der höheren Quantenausbeute  $\Phi_F$  von 0,21 im Vergleich zu 0,12 sichtbar. Außerdem ist die Tripletamplitude ( $A_1 = T_{1eq}$ )

geringer; das bedeutet, dass sich weniger Moleküle im Triplettzustand befinden. Die Amplituden der zweiten Bunchingterme,  $A_2$ , beider Proben sind jedoch nahezu identisch.

Wird bei G1 die Länge des Linkers verkürzt, so verstärkt sich die Löschung, die sich in einer geringeren Quantenausbeute ( $\Phi_F = 0,10$ ) und einer höheren Amplitude des zweiten Bunchingterms, der Term der Löschreaktion, bemerkbar macht.

Die beiden Rhodamin-Isomere, 5- und 6-Isomer, zeigen ebenfalls unterschiedliches Löschverhalten. Beim 6-Isomer tritt eine höhere Löschung auf, ähnlich wie sie bei der Verkürzung des Linkers ( $C_3$ - statt  $C_6$ -Linker) beobachtet wird.

*Als Zwischenergebnis aus den Messungen der konzentrierten Lösungen ist festzuhalten, dass sich der Farbstoff Rh6G an der 5'-Position des Oligonukleotids aufgrund seiner zwitterionischen Struktur nicht frei am Oligonukleotid bewegt, sondern in Kontakt mit der DNS steht. Obwohl sich durch die Linkerlänge (ca. 0,8 nm) und der zusätzlichen Phosphatgruppe (ca. 0,5 nm) der Farbstoff aufgrund theoretischer Berechnungen bis zum sechsten Basenpaar bewegen kann (Hillisch, 1998), ist die Löschung durch Guanin nur bis zum zweiten Basenpaar nachweisbar. KFO besitzt an der vierten Position ein Guanin, was aber keine löschende Wirkung auf den Farbstoff hat. Bei den Messungen zeigt es sich, dass sich Rh6G mehr in der Nähe der letzten Base des komplementären Stranges aufhält als in der Nähe der Base, an die es gebunden ist.*

*Stellt man sich die DNS vereinfacht als Zylinder vor, kann sich der Farbstoff, gebunden am 5'-Ende, über der kreisförmigen Oberfläche bewegen. Wird diese Bewegung durch einen kurzen Linker eingeschränkt, befindet sich der Farbstoff über der Base der Sequenz, an die er gebunden ist. Bei einem längeren Linker kann sich Rh6G über der letzten Base der komplementären Sequenz aufhalten. Wird ein längerer Linker verwendet, aber statt dem 5-Isomer das 6-Isomer von Rh6G, bewirkt diese Veränderung des Bindungswinkels, dass sich der Farbstoff vornehmlich in der Nähe der Base aufhält, an die er gebunden ist.*

*Eine andere Vorstellung der Konformation des Farbstoffs am Oligonukleotid besteht darin, dass sich Rh6G mit seiner positiven Partiaalladung entlang des negativ geladenen Phosphatgerüsts der DNS bewegt. Das Ausmaß dieser Rutschbewegung wird von der Linkerlänge bestimmt. Rh6G verhält sich an der KFO- und an der C1-Sequenz nahezu identisch. Dies läßt den Schluss zu, dass sich der Farbstoff vornehmlich beim ersten und zweitem Basenpaar (vom 5'-Ende betrachtet) aufhält. Abhängig davon, ob sich der Farbstoff in der großen oder kleinen Grube der DNS bewegt, sollten dann Unterschiede zwischen C2 und G2 bzw. C3 und G3 erkennbar sein (falls die Bewegung so weit in die Furche hinein stattfinden kann). Dieser Unterschied ist aber in den hier gezeigten Ensemblemessungen nicht erkennbar. Der verkürzte Linker schränkt diese Rutschbewegung ein, so dass sich - wie bei dem ersten Szenario - der Farbstoff kaum frei bewegen kann und nur in der Nähe der Base aufhält, an die er gebunden ist. Obwohl der Linker beim 6-Isomer relativ lang ist ( $C_6$ ), scheint der Winkel von der Bindung des Farbstoffs zur Zylinderachse des Oligonukleotids so*

*ungünstig zu sein, dass keine Rutschbewegung stattfinden kann oder der Farbstoff nur auf der kreisförmigen Zylinderoberfläche zu liegen kommt.*

### *Einzelmolekülmessungen*

Anhand der bisherigen Messungen können keine Aussagen über eventuell vorhandene Subzustände getroffen werden. Diese lassen sich ausschließlich mit Hilfe der Einzelmolekülmessungen auflösen, die im Folgenden vorgestellt werden (Abb. 4.1-14).

Dabei sind die Histogramme der Parameter Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$  und der Anisotropie  $r_G$  für die gleitende Analyse (s. Kap. 2.4 und 3.1) dargestellt. Es wurden nur Einzelmoleküldurchtritte mit mehr als 160 Photonen zur weiteren Analyse ausgewählt. Zur gleitenden Analyse wurde ein Photonenfenster von 150 Photonen gewählt bei einer Schrittweite von einem Photon.

Die schwarzen Kurven im 2D-Histogramm geben die Perrin-Gleichung (Gl. 2.3-13) mit einem Wert für  $r_0$  ( $r_0 = 0,375$ ) wieder. Mit Hilfe dieser Kurven lassen sich die mittleren Rotationskorrelationszeiten  $\rho$  der Populationen abschätzen.

Man erkennt bei Rh6G am KFO-Oligonukleotid in Abb. 4.1-14B zwei Populationen mit jeweils unterschiedlichen Verteilungen der Lebensdauer und der Anisotropie. Beide Populationen zeigen eine höhere Anisotropie als freies Rh6G (Abb. 4.1-14A, mit  $\rho = 0,01$ ). Dies lässt sich auf die Bindung des Farbstoffs am Oligonukleotid zurückzuführen. Dadurch wird dessen Beweglichkeit eingeschränkt, so dass die Rh6G-Fluoreszenz nicht mehr isotrop in alle Raumrichtungen ist. Im Folgenden wird die Population mit einer niedrigen Fluoreszenzlebensdauer als A, die Population mit einer höheren Fluoreszenzlebensdauer als B bezeichnet. Population A von KFO-Rh6G/KFO-GSZ besitzt im 2D-Histogramm einen Wert von  $\rho = 2,0$  ns, während Population B eine höhere Rotationskorrelationszeit von  $\rho = 2,0$  ns gemäß der Iso- $\rho$ -Linie besitzt und damit trotz einer niedrigeren Anisotropie weniger beweglich ist. Vergleicht man das Ergebnis der gleitenden Analyse mit dem Ergebnis nach der Signalspitzen-orientierten Analyse (Schaffer, 2000) (Kap. 3.1), sind die Histogramme nahezu identisch, was besagt, dass im Beobachtungszeitraum (wiedergegeben in der Diffusionszeit von 1 ms) die Zustände stabil sind.

### *Einschub: Selektive Spektroskopie*

Zur genaueren Analyse wurde eine (Spezies-)selektive Auswertung (Kap. 2.4) durchgeführt. Hiermit soll die Frage geklärt werden, ob die Populationen gemäß der Iso- $\rho$ -Linie im 2D-Histogramm tatsächlich unterschiedliche Rotationskorrelationszeiten und somit unterschiedliche Beweglichkeiten aufweisen. Es wurden bereits innerhalb beider Populationen weitere Subzustände beobachtet (Eggeling, 1999a; Schaffer, 2000). Die stationäre Anisotropie beider Populationen wird nach Gl. 2.4-28 berechnet und mit den Ergebnissen von Abb. 4.1-14B verglichen.

Dazu wurden die Molekülereignisse unterhalb von 2,45 ns (Population A) und oberhalb von 2,45 ns (Population B) ausgewählt (s. auch Abb. 3.1-9). Die Fluoreszenzabklingkurven enthalten die Photonen der selektierten Ereignisse und werden zu Fluoreszenzzerfallshistogrammen addiert. Dadurch wird eine ausreichend hohe Photonenzahl für eine mehrexponentielle Anpassung der Fluoreszenzabklingkurve erhalten. Dies geschieht getrennt für die „grünen“ Detektionskanäle 2 und 4.

Die Analyse der beiden Populationen liefert jeweils ein biexponentielles Fluoreszenzabklingverhalten und gibt damit an, dass beide Populationen jeweils zwei Subzustände haben. Gemäß Gl. 3.1-1a zeigt Population B eine mittlere Lebensdauer  $\tau_{av}^a$  von 4,2 ns, Population A von 1,4 ns. Der höhere Wert der Fluoreszenzlebensdauer von Rh6G in Population B im Vergleich zum freien Farbstoff deutet auf das Vorhandensein von Grundzustandskomplexen mit Adenin hin (Fries, 1998a).

Die Anpassung der Fluoreszenzabklingkurven liefert auch Werte für die Rotationskorrelationszeit  $\rho$ . Dabei erhält man für beide Populationen zwei Zustände mit verschiedenen Rotationskorrelationszeiten  $\rho_i$ . Unter der Annahme, dass es sich bei beiden Spezies um den Farbstoff an der ds-DNS handelt, wurde ein Wert für  $\rho$  auf 7,5 ns festgehalten, der die Rotation der DNS beschreibt. Der Wert für  $\rho$  wurde durch die Anpassung erhalten. Es ist anzumerken, dass es sich bei den Ergebnissen der Anpassung nicht um Wertepaare  $\tau_1$  und  $\rho_1$  bzw.  $\tau_2$  und  $\rho_2$  handelt.

Löst man die Gln. 2.4-27c und -27d für  $m = 2$  und  $n = 2$  und setzt die Werte der Anpassung für  $\tau_i$  und  $\rho_i$  ein, so erhält man für die stationäre Anisotropie (Gl. 2.4-28) von Population A  $r(A) = 0,224$ . Für Population B wird  $r(B) = 0,160$  berechnet.

Die Ergebnisse der selektiven Auswertung sind vergleichbar mit der mittleren Anisotropie im 2D-Histogramm (hier  $r(A) = 0,23$  und  $r(B) = 0,15$ ). Da jedoch im Rahmen der selektiven Spektroskopie der Schwerpunkt der Fluoreszenzlebensdauer- und Anisotropiewerte ermittelt wird, im 2D-Histogramm aber die Maximalwerte abgelesen werden, ergibt sich eine geringe Abweichung.

*Die Übereinstimmung der Anisotropiewerte - erhalten nach Auswertung aller Ereignisse und nach selektiver Analyse - deutet darauf hin, dass Rh6G in der Population A eine niedrigere Beweglichkeit besitzt als in der Population B. Dies lässt auf zwei unterschiedliche Bindungsgeometrien des Farbstoffs am Oligonukleotid schliessen.*

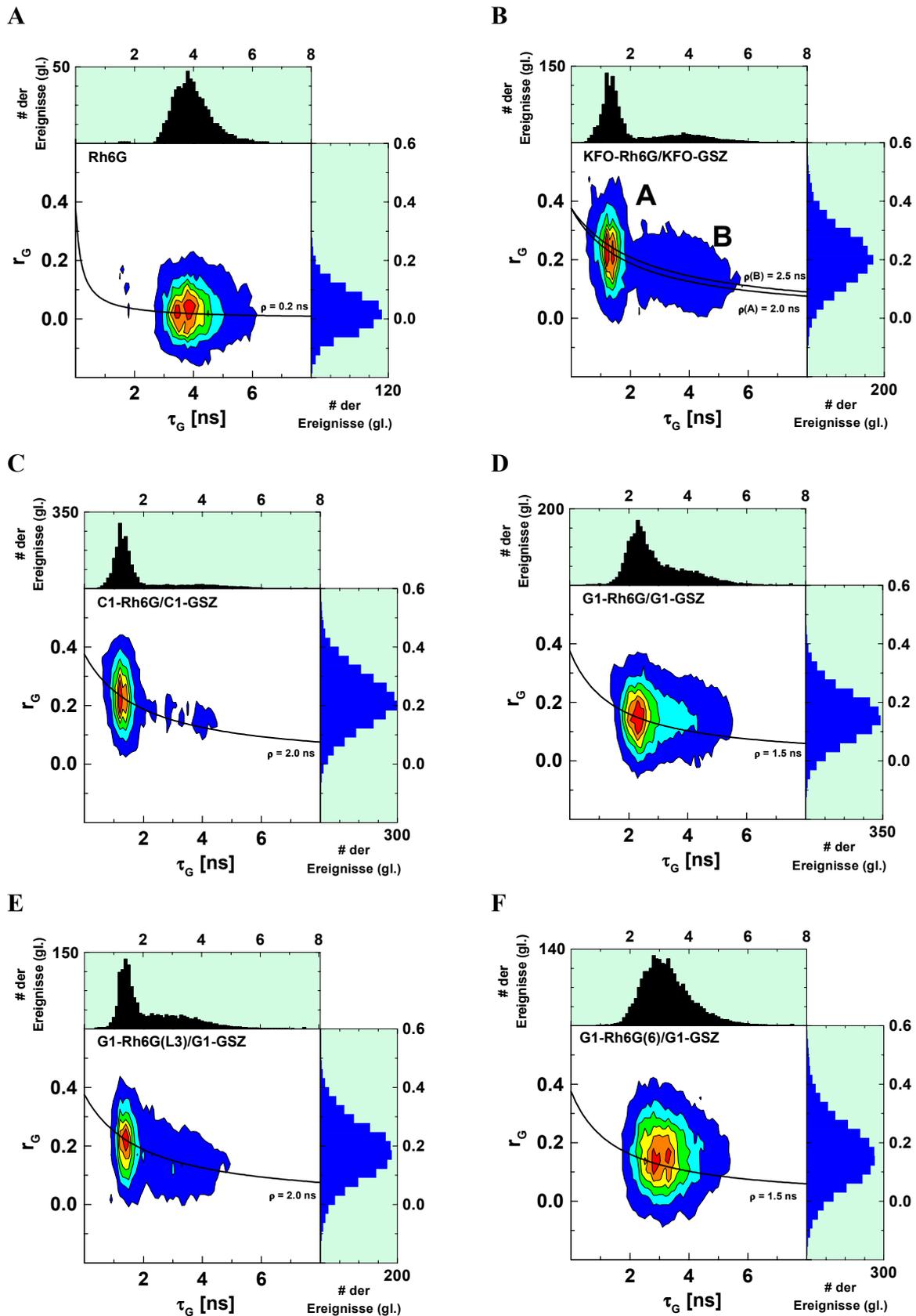


Abb. 4.1-14: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von (A) Rh6G, (B) KFO-Rh6G/KFO-GSZ, (C) C1-Rh6G/C1-GSZ, (D) G1-Rh6G/G1-GSZ, (E) G1-Rh6G(L3)/G1-GSZ und (F) G1-Rh6G(6-Isomer)/G1-GSZ. Dargestellt sind die Histogramme der fluoreszenzgewichteten Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$  und der Anisotropie  $r_G$  nach gleitender Analyse und Einbeziehung der Wichtungsfaktoren. Messbedingungen: s. Abb. 4.1-13.

**Tabelle 4.1-14: Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  und Anisotropie  $r$  der Oligonukleotide markiert mit Rh6G erhalten aus der Kurvenanpassung der 1D-Histogramme (aus Abb. 4.1-14) mit einer Gaußverteilung.**

	$\tau$ [ns]	$a(\tau)$	$r$	$a(r)$
Rh6G	$\tau_1 = 3,85 \pm 1,13$ $\tau_2 = 1,64 \pm 0,27$	0,99 0,01	$r = 0,023 \pm 0,137$	1,00
KFO-Rh6G/KFO-GSZ	$\tau_1 = 3,66 \pm 2,52$ $\tau_2 = 1,32 \pm 0,53$	0,36 0,64	$r_1 = 0,158 \pm 0,167$ $r_2 = 0,227 \pm 0,180$	0,32 0,68
C1-Rh6G/C1-GSZ	$\tau_1 = 3,20 \pm 3,26$ $\tau_2 = 1,27 \pm 0,48$	0,32 0,68	$r_1 = 0,169 \pm 0,177$ $r_2 = 0,233 \pm 0,179$	0,23 0,77
G1-Rh6G/G1-GSZ	$\tau_1 = 3,46 \pm 2,13$ $\tau_2 = 2,30 \pm 0,68$	0,52 0,48	$r = 0,151 \pm 0,167$	1,00
G1-Rh6G(L3)/G1-GSZ	$\tau_1 = 2,79 \pm 2,28$ $\tau_2 = 1,39 \pm 0,42$	0,55 0,45	$r_1 = 0,147 \pm 0,169$ $r_2 = 0,209 \pm 0,176$	0,45 0,55
G1-Rh6G(6)/G1-GSZ	$\tau_1 = 3,81 \pm 1,73$ $\tau_2 = 2,89 \pm 1,12$	0,39 0,61	$r = 0,156 \pm 0,210$	1,00

Sind zwei Populationen im 2D-Histogramm von Abb. 4.1-14 vorhanden, entspricht der Index 1 der Population A, 2 der Population B. Werte ohne Index geben das Ergebnis der Anpassung im 1D-Histogramm aller Daten wieder. Die Werte  $a(\tau)$  bzw.  $a(r)$  geben die normierten Häufigkeiten der Werte für  $\tau$  bzw.  $r$  an.

Bei C1-Rh6G/C1-GSZ (Abb. 4.1-14C) werden ebenfalls zwei Populationen beobachtet. Nach der Anpassung mit einer Gaußfunktion wird für die Population A eine Lebensdauer von 1,3 ns und für B  $\tau = 3,2$  ns erhalten (Tab. 4.1-14). Aufgrund der vergleichbaren Basensequenz liefert C1-Rh6G/C1-GSZ ein ähnliches Ergebnis der Einzelmolekülmessung wie KFO-Rh6G/KFO-GSZ.

Bei G1-Rh6G/G1-GSZ (Abb. 4.1-14D) können mindestens zwei Populationen beobachtet werden. Die Population A besitzt eine nicht so geringe Fluoreszenzlebensdauer wie bei KFO und C1 und besitzt einen großen Überschneidungsbereich mit der breit verteilten Population B. Die längere Lebensdauer von Population A stimmt mit der bisher beobachteten geringeren Löschung von Rh6G im Vergleich zu KFO und C1 überein. Gemäß Gl. 2.3-13 besitzt diese Population damit eine geringere mittlere Rotationskorrelationszeit als Population A von KFO bzw. C1 und deutet auf eine höhere Beweglichkeit des Fluorophors hin. Die B-Populationen der drei Proben KFO, C1 und G1 zeigen ein ähnliches Lebensdauerhistogramm und lassen somit auf eine ähnliche Umgebung des Farbstoffs schliessen.

Die Histogramme von G1-Rh6G(L3)/G1-GSZ (Abb. 4.1-14E) zeigen eine Population (A) mit einer Lebensdauer von 1,4 ns an und eine zweite (B) mit einer längeren Lebensdauer von 2,8 ns. Beide Populationen, die bei G1-Rh6G/G1-GSZ (Abb. 4.1-14D) beobachtet werden, sind bei der Probe mit einem kürzeren Linker zu niedrigeren Lebensdauerwerten verschoben, was auf einen kürzeren Abstand schliessen lässt.

Im 1D-Lebensdauerhistogramm von G1-Rh6G(6)/G1-GSZ (Abb. 4.1-14F) sind keine deutlich voneinander separierten Populationen erkennbar, aber die Breite der Verteilung im Vergleich zu freiem Rh6G und die asymmetrische Verteilung der Populationen im 2D-Histogramm lassen den Schluss zu, dass in diesem Fall mindestens zwei Populationen vorliegen. Wird das Lebensdauerhistogramm von  $\tau_G$  mit zwei Gaußfunktionen angepasst, ergibt sich ein Maximum der Lebensdauer bei 2,9 ns und eine zweite Population, die keine Änderung der Lebensdauer gegenüber Rh6G aufweist ( $\tau = 3,8$  ns).

Aufgrund der hohen mittleren Rotationskorrelationszeit kann bei allen Proben davon ausgegangen werden, dass sich der Farbstoff in der Nähe der DNS aufhält und nicht so frei beweglich wie ungebundener Farbstoff ist.

*Als Ergebnis dieser Messungen ist nun Folgendes festzuhalten: Bei fast allen Proben treten in den Einzelmolekülmessungen mindestens zwei Populationen mit unterschiedlichen Werten der Lebensdauer und Anisotropie auf. Es können nun weitere Überlegungen zu den Konformationen des Farbstoffs an der DNS angestellt werden. Wird wiederum das Zylindermodell zu Grunde gelegt, handelt es sich bei den A-Populationen (niedrige Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffs) um die Konformation, bei der der Farbstoff auf der kreisförmigen Oberfläche liegt und einen Komplex mit den Basen des endständigen Basenpaars eingehen kann. Dabei hält er sich bevorzugt an der Base des komplementären Stranges auf. Die Verkürzung des Linkers schiebt den bevorzugten Aufenthaltsort auf dem endständigen Basenpaar zur Base der Sequenz - weg von der Gegensequenz -, so dass die Löschung durch Guanin hier verstärkt auftreten kann.*

*Die zweite Konformation (Spezies B) reflektiert den Farbstoff in der Grube der helikalen Doppelstrang-DNS. Die breite Verteilung der Lebensdauerwerte deutet auf eine Rutschbewegung des Farbstoffs in der Grube entlang des DNS-Phosphatrückgrats hin. Geht man davon aus, dass keine der beiden Gruben (große und kleine) bevorzugt wird, kann diese Rutschbewegung sowohl bei C1 und G1 zur Löschung führen und damit zu ähnlichen Verteilungen in den Histogrammen der Einzelmolekülmessungen. Die kürzere Linkerlänge schränkt ferner die Bewegung in der Grube auf den Endbereich der DNS ein, so dass sich der Farbstoff ebenfalls in der Nähe des löschenden Guanins von G1 befindet. Im Allgemeinen scheint die Rutschbewegung in der Grube weniger häufig aufzutreten als die Bewegung auf dem letzten Basenpaar des Oligonukleotids. Der Bindungswinkel des 6-Isomers von Rh6G ist verschieden zu dem des 5-Isomers, so dass nur ein Zustand beobachtet werden kann, was auf eine homogenere Farbstoffumgebung schliessen lässt. Genauere Angaben hierzu sind anhand der Einzelmolekülmessung nicht möglich.*

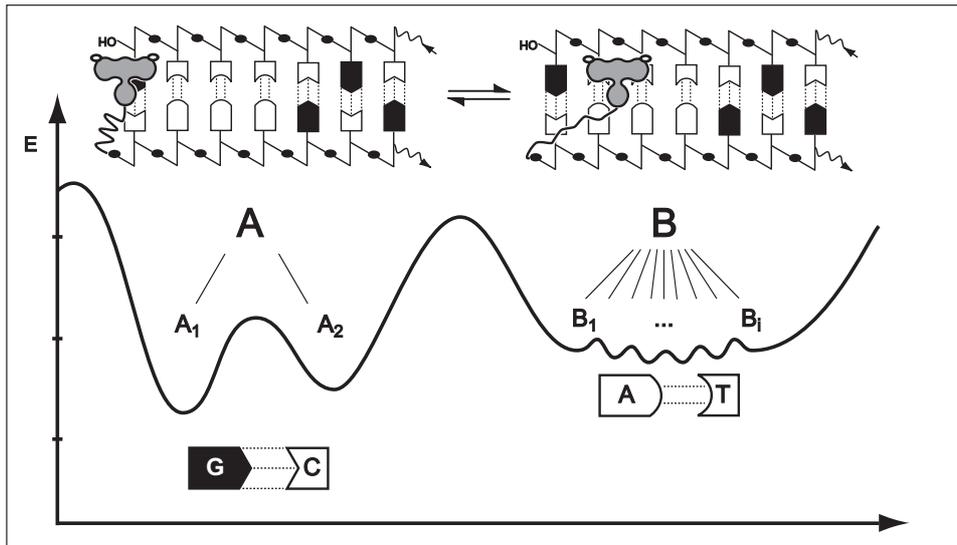


Abb. 4.1-15: Mögliche Konformationszustände von Rh6G am KFO-Oligonukleotid. Bei der Population A befindet sich der Farbstoff auf dem ersten Basenpaar und zeigt zwei Energieminima. Population B hat eine weniger definierte Struktur und besitzt eine Vielzahl an Energieminima. Aufgrund der größeren Häufigkeit von Population A gegenüber Population B, liegen die Energieminima von A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> auf der vertikalen Energieskala (Energie E) bei niedrigeren Werten.

*In NMR-Messungen von KFO-Rh6G/KFO-GSZ konnte der Konformationsvorschlag von Population A bestätigt werden. Dabei wurden Wechselwirkungen sowohl mit Guanin als auch mit Cytosin, den Basen des endständigen Basenpaars gefunden (persönliche Mitteilung, C. Griesinger/N. Gaiko).*

*Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie auf Einzelmolekülebene verschiedene Populationen des Farbstoffs am Oligonukleotid identifizierbar sind und mit Hilfe mehrerer Methoden (FCS und MFD) Aussagen über die Umgebung des Fluorophors bzw. sein Verhalten am Oligonukleotid gemacht werden können. Abb. 4.1-15 stellt die Strukturvorschläge der beobachteten Populationen dar und die Übertragung der Ergebnisse in eine Energielandschaft. Zustand A zeigt zwei Subzustände (A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>, biexponentielles Abklingverhalten der Fluoreszenz). Population B besitzt mehrere Subzustände (B<sub>1</sub> bis B<sub>i</sub>). Dies zeigen Ergebnisse der selektiven Korrelationsauswertung (Eggeling, 1999a), da die Anpassung der Korrelationskurve nur mit einem gestreckten Zerfall (Kap. 2.4) der Triplettkorrelationszeit möglich ist.*

Diese Ergebnisse sind für FRET-Untersuchungen am Oligonukleotid von großer Bedeutung. Die Löschung des Donorfarbstoffs durch einen weiteren Prozess neben dem Energietransfer sollte zur Verringerung von Fehlern bei der Bestimmung von Donor-Akzeptor-Abständen vermieden werden. Bei Verwendung von Rh6G am 5'-Ende eines Oligonukleotids ist folglich darauf zu achten, dass sich die Nukleobase Guanin weder in der Sequenz noch in der Gegensequenz an erster Position befindet. Um die Löschung durch Guanin nahezu vollständig auszuschließen, sollte es sich möglichst erst beim zweiten oder dritten Basenpaar um ein GC-Paar handeln. Die Modifizierung der Linkerlänge auf eine C<sub>3</sub>-Kette ist von Vorteil, da somit

eine geringere Abstandverteilung erwartet wird. Das 6-Isomer zeigt ein homogeneres Verhalten des Farbstoffes als das 5-Isomer. Da aber der Aufenthaltsort des Farbstoffes bei dem 6-Isomer nicht eindeutig ist, stehen hierzu weitere Untersuchungen aus.

### **TMR am Oligonukleotid KFO**

Im Folgenden wird das Verhalten des Farbstoffs TMR gebunden an dem KFO-Oligonukleotid untersucht.

Wie beim Rh6G zeigt sich ebenfalls eine starke Löschung durch Guanin, sichtbar durch die Erniedrigung der Quantenausbeute und das Auftreten eines zweiten Bunchingterms (Abb. 4.1-16 und Tab. 4.1-15) gegenüber dem Farbstoff frei in Lösung. Die Geschwindigkeitskonstante vom Übergang aus dem Triplettzustand in den Grundzustand beträgt  $k_T = 0,85 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  und ist damit - wie schon bei KFO-Rh6G/KFO-GSZ beobachtet - im Vergleich zum freien Farbstoff niedriger. Die Triplettamplitude  $A_1 = T_{1eq}$  ist ebenfalls verringert.

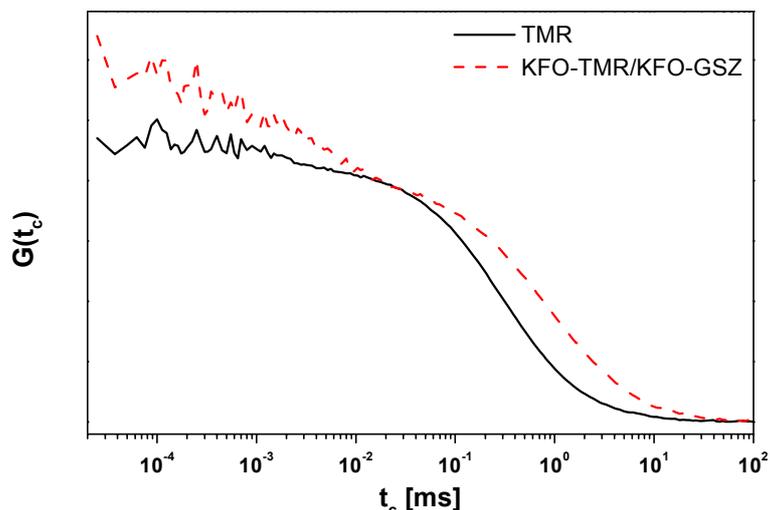


Abb. 4.1-16: Normierte Korrelationskurven von TMR frei und gebunden an das Oligonukleotid KFO. Messbedingungen:  $\lambda_{EX} = 528 \text{ nm}$ , Anregungsleistungsdichte  $I = 91 \text{ kW/cm}^2$ ,  $\omega_0 = 0,6 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 2,5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = 5 \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ575/70, Strahlteiler 525DCLP.

**Tab. 4.1-15: Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_F$  und Parameter der FCS-Kurvenanpassung.**

	$\Phi_F$	$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_1$	$t_2$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_2$	$k_T$ [ $10^5 \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{ISC}$ [ $10^6 \text{ s}^{-1}$ ]
TMR	0,50	0,296	2,04	0,10	-	-	4,42	0,17
KFO-TMR/KFO-GSZ	0,17	0,877	9,42	0,20	0,55	0,14	0,85	0,08

Die Quantenausbeuten wurden mit Rh6G als Referenz bestimmt. Messbedingungen: s. Abb. 4.1-16. Die Standardabweichungen der Werte liegen bei 5 % für  $\Phi_F$ , 25 % für  $k_{ISC}$  (Gl. 2.4-10) und bei 10 % für  $k_T$  (Gl.2.4-9).

### *Einzelmolekülmessungen*

Die Einzelmolekülmessungen ergeben für freies TMR zwei Populationen mit Lebensdauerwerten von 2,1 bzw. 3,8 ns. Beide besitzen eine äußerst geringe Rotations-

korrelationszeit von 0,1 ns. Das deutet auf die hohe Beweglichkeit des Farbstoffs in beiden Populationen hin.

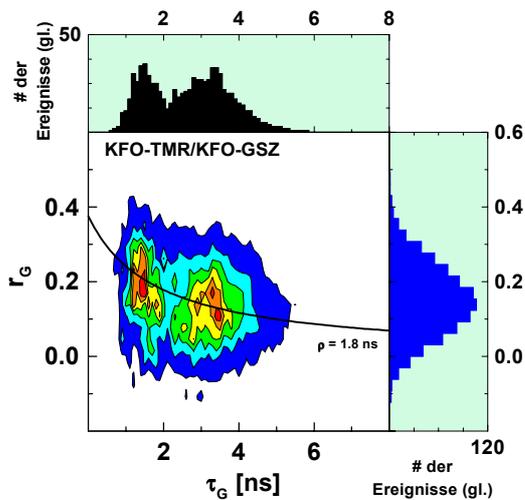


Abb. 4.1-17: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von (A) TMR und (B) KFO-TMR/KFO-GSZ. Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$  und der Anisotropie  $r_G$  unter Einbeziehung der Wichtungsfaktoren. Messbedingungen: s. Abb. 4.1-16.

Wie bereits bei der Messung von Rh6G am Oligonukleotid KFO beobachtet wurde, treten bei KFO-TMR/KFO-GSZ (Abb. 4.1-17) zwei Populationen auf. Diese besitzen eine Rotationskorrelationszeit des Farbstoffs von  $\rho = 1,8$  ns. TMR, das wie Rh6G zur Klasse der Rhodaminfarbstoffe gehört, wird - wie bereits erwähnt - ebenfalls von der Nukleobase Guanin gelöscht. Diese Beobachtung lässt auf eine ähnliche Bindungsgeometrie schließen. Da beim freien TMR jedoch zwei Populationen beobachtet werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein konformeller Unterschied zum Rh6G am Oligonukleotid besteht.

**Rh6G, RhGr und Alexa488 am Oligonukleotid TKFO**

Die Untersuchung verschiedener Farbstoffe an der gleichen DNS-Sequenz (TKFO) soll eine Aussage zugunsten eines der Farbstoffe als Donor-Fluorophor für FRET-Untersuchungen ermöglichen. Bei den Farbstoffen handelt es sich um Rh6G, RhGr und Alexa488. Wie bereits gezeigt (Tab. 4.1-1), löscht Guanin ebenfalls die Fluoreszenz von RhGr und Alexa488.

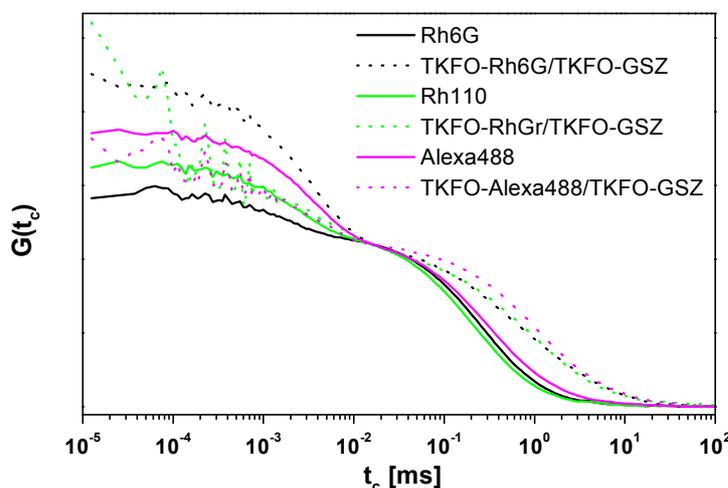


Abb. 4.1-18: Normierte Korrelationskurven der Farbstoffe Rh6G, RhGr und Alexa488 frei und gebunden an das Oligonukleotid TKFO. Messbedingungen der Messungen mit Rh6G: Gepulste Anregung bei  $\lambda_{Ex} = 528$  nm,  $I = 70$  kW cm<sup>-2</sup>,  $\omega_0 = 0,7$   $\mu$ m,  $z_0 = 0,7$   $\mu$ m,  $V_D = 2$  fl, Fluoreszenzfilter HQ575/70, Strahlteiler 525DCLP. Messbedingungen der Messungen mit Alexa488 und RhGr: Gepulste Anregung bei  $\lambda_{Ex} = 496$  nm,  $I = 64$  kW cm<sup>-2</sup>,  $\omega_0 = 0,6$   $\mu$ m,  $z_0 = 1,8$   $\mu$ m,  $V_D = 3$  fl, Fluoreszenzfilter HQ535/50, Strahlteiler DCLP498.

Die in Abb. 4.1-18 dargestellten FCS-Messungen zeigen Korrelationskurven des Farbstoffe Rh6G, Rh110 und Alexa488 ungebunden oder gebunden an ein Oligonukleotid. Die Absorptionsspektren von Alexa488 und RhGr bzw. Rh110 sind im Vergleich zu Rh6G hypsochrom verschoben. Daher wird für diese beiden Farbstoffe  $\lambda_{\text{EX}} = 496 \text{ nm}$  als Anregungswellenlänge gewählt.

Rh6G zeigt durch die Bindung an das Oligonukleotid TKFO einen gestreckten exponentiellen Zerfall. Dieses Phänomen tritt auch bei Population B von Rh6G an KFO auf und deutet auf die Möglichkeit mehrerer, energetisch ähnlicher Zustände hin.

**Tab. 4.1-16: Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_F$  und Parameter der FCS-Kurvenanpassung.**

	$\Phi_F$	$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_1$	$t_2$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_2$	$\beta$	$k_T$ [ $10^5 \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{\text{ISC}}$ [ $10^6 \text{ s}^{-1}$ ]
Rh6G	0,95	0,241	1,58	0,19	-	-	-	5,13	0,71
TKFO-Rh6G	-	0,840	3,83	0,53	-	-	0,73	1,23	0,77
RhGr	0,95	0,196	2,15	0,27	-	-	-	3,39	0,88
TKFO-RhGr	-	0,878	8,03	0,18	0,091	0,43	-	1,02	0,16
Alexa488	0,71	0,307	3,58	0,38	-	-	-	1,73	0,78
TKFO-Alexa488	-	1,078	4,40	0,25	0,129	0,15	-	1,70	0,42

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-18. Die Kurven sind mit einem festgehaltenen Wert für  $z_0/\omega_0 = 3$  angepasst worden. Zur Berechnung von  $k_T$  (Gl. 2.4-9) und  $k_{\text{ISC}}$  (Gl. 2.4-10) wurde  $t_1 = t_T$  und  $A_1 = T_{\text{1eq}}$  angenommen. Die Standardabweichungen der Werte liegen bei 5 % für  $\Phi_F$ , 25 % für  $k_{\text{ISC}}$  und bei 10 % für  $k_T$ .

Dies ist bei Rh110 nicht der Fall. Dort tritt wieder - aufgrund der Löschung durch Guanin im zweiten Basenpaar - ein Bunchingterm mit einer Korrelationszeit von 100 ns (Tab. 4.1-16) auf. Der Wert von  $t_T$  ist hier gegenüber  $t_T(\text{TKFO-Rh6G/TKFO-GSZ})$  am Oligonukleotid doppelt so hoch. Alexa488 zeigt im Vergleich mit RhGr eine erniedrigte Triplettamplitude und ebenfalls einen Bunchingterm aufgrund von Fluoreszenzlöschung. Dieser weist jedoch eine geringere Amplitude auf.

*Alexa488 am Oligonukleotid TKFO wird weniger stark gelöscht im Vergleich zu Rh6G und RhGr. Die geringere Löschung ist auf eine größere Entfernung vom Guanin zurückzuführen, die durch elektrostatische Abstoßung vom negativ geladenen Alexa488 und dem Phosphatrückgrat zu Stande kommen kann.*

### Einzelmolekülmessungen

Die drei Farbstoffe Rh6G, RhGr und Alexa488 wurden ebenfalls auf Einzelmolekülebene untersucht.

In der Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer gegen die Anisotropie (Abb. 4.1-19) ist zu erkennen, dass TKFO-Rh6G/TKFO-GSZ eine Population mit erhöhter Fluoreszenzlebensdauer im Vergleich zum freien Farbstoff besitzt. Diese Population kommt aufgrund eines Grundzustandskomplexes mit der Nukleobase Adenin im ersten Basenpaar zu Stande

(Fries, 1998a). Die Rotationskorrelationszeit des Farbstoffs an diesem Oligonukleotid ist  $\rho = 2,5$  ns.

RhGr hat als freier Farbstoff die gleiche Fluoreszenzlebensdauer wie Rh6G. Diese ist im Fall von RhGr am Oligonukleotid TKFO jedoch erniedrigt ( $\tau_G = 2,1$  ns). Ein Komplex mit Adenin im ersten Basenpaar wie bei TKFO-Rh6G/TKFO-GSZ kann ausgeschlossen werden. Die mittlere Rotationskorrelationszeit beträgt  $\rho = 1,4$  ns und deutet auf eine größere Beweglichkeit als Rh6G am gleichen Oligonukleotid hin.

Alexa488 als freier Farbstoff zeigt zwei Populationen mit Fluoreszenzlebensdauerwerten von 1,7 ns und 3,65 ns. Am Oligonukleotid zeigt Alexa eine sehr breite Verteilung der Lebensdauer, aber eine schmalere Verteilung im Anisotropie-Histogramm als die anderen beiden Farbstoffe an der DNS. Die Rotationskorrelationszeit ist mit  $\rho = 1,3$  ns ähnlich wie bei TKFO-RhGr/TKFO-GSZ.

*Von den drei untersuchten Farbstoffen wird RhGr am stärksten gelöscht am Oligonukleotid TKFO. Rh6G bildet bei diesem Oligonukleotid mit Adenin, der ersten Base in der Gegensequenz, einen Komplex. Alexa488 tritt dagegen kaum mit der DNS in Wechselwirkung. Dies kann aus der geringen Amplitude des Bunchingterms mit der Löschung, einer erniedrigten, aber schmalen verteilten Lebensdauer im 2D-Histogramm der Einzelmolekülmessung im Vergleich zu den anderen Proben und einer höheren Beweglichkeit geschlossen werden.*

*Für FRET-Untersuchungen an Nukleinsäuren ist Alexa488 ein sehr gut geeigneter Farbstoff, da er negativ geladen ist und eine geringere Wechselwirkung als die anderen untersuchten Farbstoffe mit der DNS zeigt. Wie der Vergleich am TKFO-Oligonukleotid zeigt, wird die Fluoreszenz weniger gelöscht, so dass bei FRET-Untersuchungen mit Alexa488 am Oligonukleotid mit einer ähnlichen Basensequenz Löschung vorwiegend auf Energietransfer zum Akzeptorfarbstoff zurückgeführt werden kann. Darüberhinaus führt die hypsochrome Verschiebung der Spektren von Alexa488 und RhGr gegenüber Rh6G zu weniger Crosstalk (Gl. 2.4-30) mit der Fluoreszenz der häufig verwendeten Akzeptorfarbstoffe (z.B. Bodipy650 und Cy5).*

Ein Nachteil von Alexa488 ist die „Verunreinigung“ mit einer Population von geringer Fluoreszenzlebensdauer. Dies ist jedoch ein spezifisches Problem des NHS-Esters dieses Farbstoffs, da bei dem Maleinimidderivat keine zweite Population auftritt. Das Alexa488-Maleinimid wird zur Bindung des Farbstoffs an Proteine verwendet. Neben den Messungen von Alexa488 an der Reversen Transkriptase (s. Kap. 4.3) ist auch bei Untersuchungen an SNARE-Proteinen nur eine Population beobachtet worden (persönliche Mitteilung, E. Schweinberger).

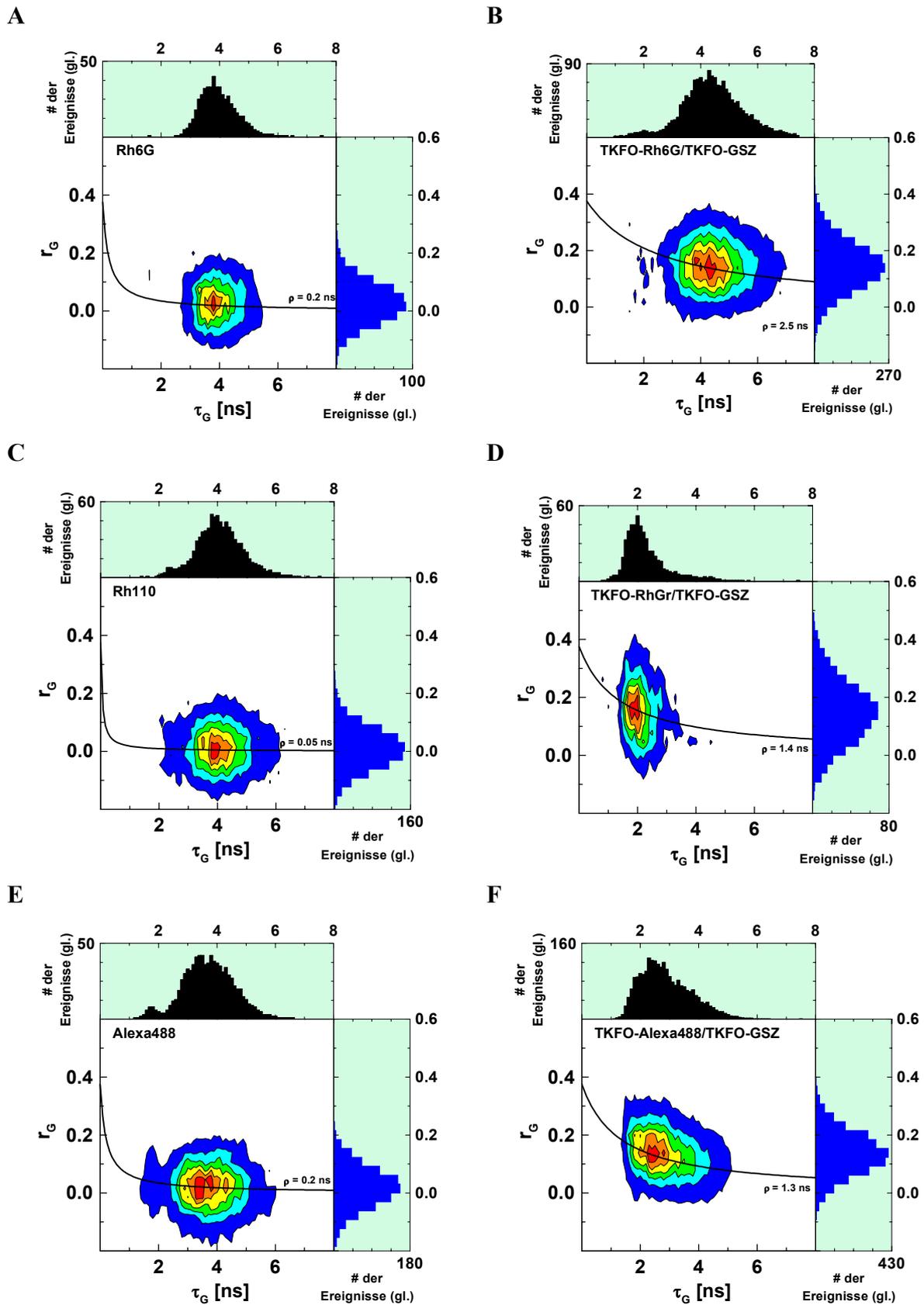


Abb. 4.1-19: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von (A) Rh6G, (B) TKFO-Rh6G/TKFO-GSZ, (C) Rh110, (D) TKFO-RhGr/TKFO-GSZ, (E) Alexa488 und (F) TKFO-Alexa488/TKFO-GSZ. Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$  und der Anisotropie  $r_G$  nach der gleitenden Analyse unter Einbeziehung der Wichtungsfaktoren. Messbedingungen: s. Abb. 4.1-18.

#### 4.1.3.2 „Rote“ Fluoreszenzfarbstoffe

##### *Farbstoffe verschiedener Farbstoffklassen am Oligonukleotid*

Im vorliegenden Abschnitt werden verschiedene Farbstoffe untersucht, deren Absorptions- und Emissionsspektren im langwelligen Bereich des Spektrums zu finden sind. Ihr Verhalten am Oligonukleotid wird untersucht, um aus dieser begrenzten Auswahl mögliche Akzeptorfarbstoffe für FRET-Untersuchungen am Oligonukleotid zu finden.

Es wurden die Farbstoffe Alexa633, Bodipy650, Cy5, LCR640, MR200 und Sq635 untersucht. Strukturen und vollständige Namen sind im Anhang zu finden. Von den Farbstoffen Bodipy650, Cy5, MR200 und Sq635 sind die Strukturen bekannt. Aufgrund fehlender Herstellerangaben kann bei Alexa633 lediglich vermutet werden, dass es sich um ein großes Molekül handelt. Das Molekulargewicht von Alexa633 wird mit ca.  $1200 \text{ g mol}^{-1}$  angegeben, annähernd doppelt so groß wie das Molekulargewicht der übrigen Farbstoffe. Von LCR640 sind weder die Struktur noch das Molekulargewicht bekannt.

Wie man im vorhergehenden Kapitel gesehen hat, ist es von Bedeutung, die Struktur und insbesondere die Ladung der Farbstoffe zu kennen, um eventuelle Wechselwirkungen der Fluoreszenzsonde mit dem interessierenden Biomolekül (neben Nukleinsäuren auch Proteine) in Betracht zu ziehen zu können.

Der Squarain-Farbstoff Sq635 (Oswald, 1999) lag nicht als freier Farbstoff, sondern nur gebunden am Oligonukleotid vor. Die Messungen mit diesem Farbstoff wurden, da es sich um ein Cy5-Derivat handelt, mit den Ergebnissen von Cy5 verglichen.

Der wasserlösliche Cyanin-Farbstoff Cy5 wurde schon häufig in FRET-Experimenten und auch auf Einzelmolekülebene verwendet (Dahan, 1999; Ha, 1999b; Ha, 1999a). Von Vorteil ist der hohe Extinktionskoeffizient von ca.  $250\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Aufgrund seiner cis-trans-Isomerie (Widengren, 2000) kann Cy5 aber zwischen fluoreszierendem (trans) und nicht-fluoreszierendem (cis) Zustand wechseln und besitzt damit ein heterogenes Fluoreszenzverhalten. Darüberhinaus sind mit Cy5 markierte Proben nicht stabil über einen längeren Zeitraum. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich eine langsame Zersetzung des Farbstoffs. Dies erniedrigt den Markierungsgrad an Akzeptor von doppelmarkierten Molekülen zur FRET-Untersuchung. Dieses Verhalten wurde auch bei Cy3 beobachtet, ist aber wie im Fall von Cy5 noch nicht näher untersucht worden.

In Tab. 4.1-17 sind die stationären Quantenausbeuten der Farbstoffe am Oligonukleotid - gemessen in NaPi-Puffer - dargestellt. Cy5 wurde als Referenz mit  $\Phi_F = 0,40$  verwendet (dieser Wert wurde zuvor im Vergleich zu Rh700 in angesäuerter, ethanolischer Lösung ermittelt).

Man erkennt, dass Cy5 am Oligonukleotid mit der Sequenz HD1 (s. Anhang D) eine nahezu unveränderte Quantenausbeute im Vergleich zum Farbstoff im wässrigen Puffer besitzt.

Sq635, das Cy5-Derivat, bei dem die cis-trans-Isomerisierung nicht vorhanden ist, besitzt eine etwas niedrigere Quantenausbeute. Der Extinktionskoeffizient konnte hier mit  $180\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  bestimmt werden (der Extinktionskoeffizient des es-Oligonukleotids beträgt ca.  $165580\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). Alexa633 und Bodipy650 sowie LCR640 zeigen am Oligonukleotid sehr hohe Quantenausbeuten. Problematisch bei LCR640 war die schnelle Konzentrationsabnahme aufgrund von Absorption. Auch bei LCR640-markierten Oligonukleotiden tritt Absorption auf. Eine Vorbehandlung der Glasoberflächen mit einer konzentrierten Lösung des Farbstoffs führte nicht zu einer ausreichenden „Passivierung“ der Oberfläche. Das Adsorptionsverhalten führt zu Fehlern bei der Bestimmung der Quantenausbeute und Aufnahme von Korrelationskurven.

**Tab. 4.1-17: Fluoreszenzquantenausbeuten der Farbstoffe gebunden an ein Oligonukleotid.**

	$\Phi_F$
HD1-Alexa633/HD1-GSZ	0,75
HD1-Bodipy650/HD1-GSZ	0,59
HD1-Cy5/HD1-GSZ	0,40
HD1-LCR640/HD1-GSZ	0,75
HD1-MR200/HD1-GSZ	0,62
HD1-Sq635/HD1-GSZ	0,33

\* Die Quantenausbeuten sind bezogen auf Cy5 ( $\Phi_F = 0,40$ ).

In Abb. 4.1-20 sind Korrelationskurven der Farbstoffe frei und gebunden am Oligonukleotid HD1 (Sequenz s. Anhang) gezeigt. Alle Farbstoffe außer Cy5 sind an das 5'-Ende der Sequenz gebunden. Alle FCS-Messungen wurden in NaPi-Puffer mit  $400\text{ }\mu\text{M}$  Vitamin C durchgeführt. Der Zusatz von Vitamin C soll die Photozerstörung von Cy5 bei den FRET-Proben herabsetzen.

Bei der Anpassung der Korrelationskurven (Abb. 4.1-20) wurden Bunchingterme mit Korrelationszeiten im ms-Bereich, größer als die Diffusionszeit, gefunden. Da die Korrelationsmessungen - wie bereits beschrieben (Kap. 3.1) - mit einer Lochblende mit einem Durchmesser von  $100\text{ }\mu\text{m}$  durchgeführt wurden, würden Messungen mit einer vergrößerten Lochblende Aufschluss über die Ursache dieser Bunchingterme geben. Aufgrund eines niedrigeren Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses ist jedoch für die Einzelmolekülspektroskopie die kleinere Öffnung der Lochblende von Vorteil, so dass weiterhin eine Lochblende von  $100\text{ }\mu\text{m}$ -Durchmesser verwendet wird.

Alexa633 besitzt als Farbstoff in Lösung eine sehr hohe Besetzungswahrscheinlichkeit des Triplettzustandes, erkennbar in Abb. 4.1-20A und Tab. 4.1-18 deutlich an der hohen Amplitude im  $\mu\text{s}$ -Bereich. Am Oligonukleotid ist diese jedoch reduziert. Dagegen zeigt Bodipy650, abgesehen von der Erhöhung der Diffusionszeit bei der Bindung am Oligonukleotid, ein nahezu unverändertes Verhalten: sowohl beim freien Farbstoff als auch

am Oligonukleotid ist die Tripletamplitude sehr klein, so dass nur der Diffusionsterm vorliegt.

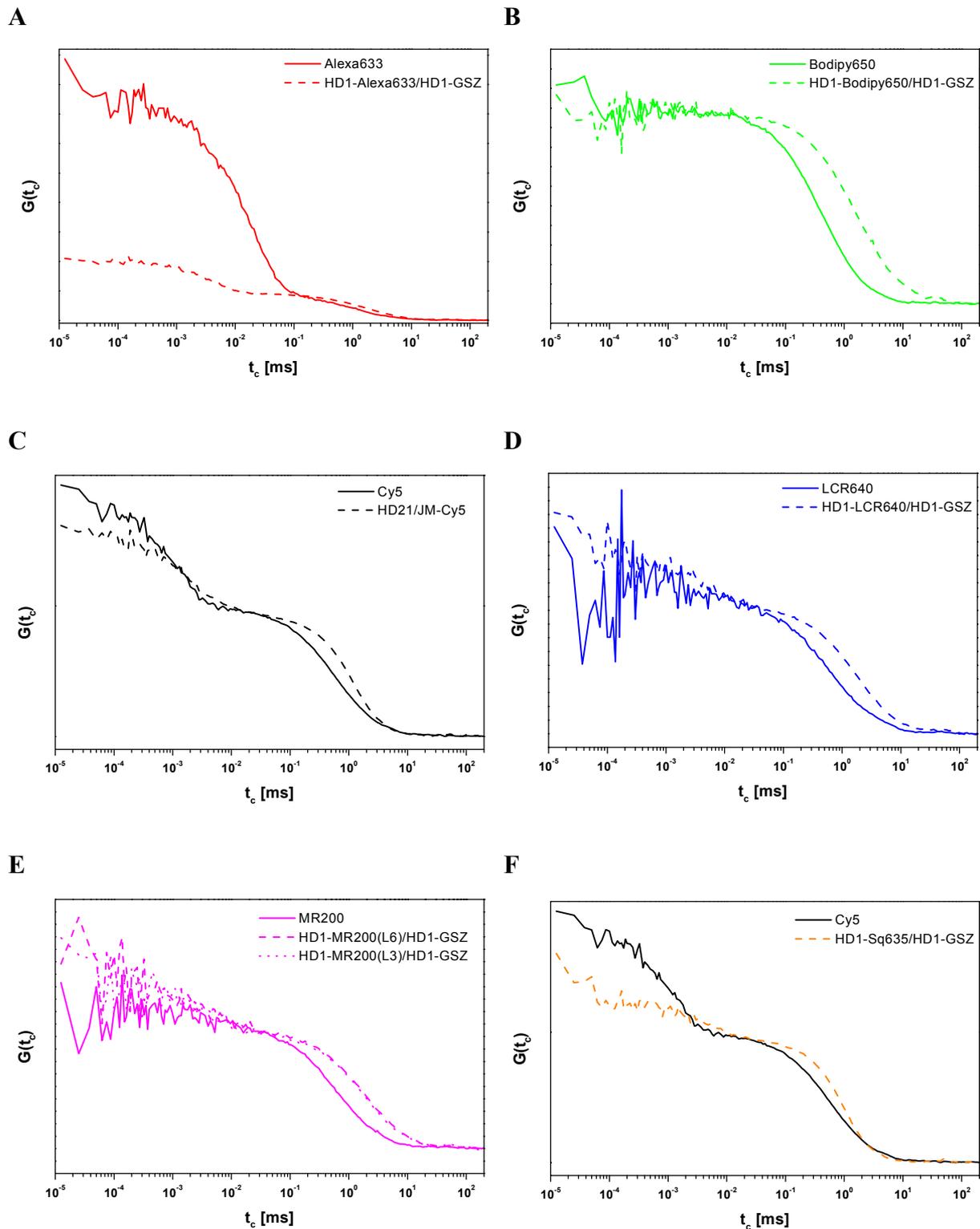


Abb. 4.1-20: Normierte Korrelationskurven der Farbstoffe allein und gebunden an ein Oligonukleotid. Messbedingungen:  $\lambda_{\text{EX}} = 637 \text{ nm}$ ,  $I = 19 \text{ kW cm}^{-2}$ ,  $\omega_0 = 0,8 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 1,7 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = 6 \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ730/140, Strahlteiler 488/636PC und 595DCXR.

Der Bunchingterm bei Cy5 im  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich der Korrelationskurve reflektiert die Isomerisierungsreaktion von angeregten Zustand der trans-Konformation. Triplettbildung findet bei Cyanin-Farbstoffen kaum statt (Widengren, 2000). Je größer die Amplitude, desto mehr liegt das Isomerisierungsgleichgewicht auf der Seite des nicht-fluoreszenten cis-Isomers. Durch die Bindung an das 5'-Ende des Oligonukleotids ist diese Reaktion eingeschränkt. Dies ist an der geringen Amplitude  $A_1$  im Vergleich zu freiem Farbstoff sichtbar.

**Tab. 4.1-18: Parameter der Korrelationsmessungen für die Farbstoffe alleine und jeweils gebunden an ein Oligonukleotid.**

	Relative Intensität* <sup>1</sup>	$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_1$	$t_2$ [ns]	$A_2$	$t_3$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_3$	$k_T$ [ $10^5 \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{ISC}$ [ $10^6 \text{ s}^{-1}$ ]
Alexa633	0,36	0,776	1,94	0,15	-	-	22,292	0,72	4,37	1,30
HD1-Alexa633/ HD1-GSZ	0,64	2,218	4,25	0,55	-	-	-	-	1,06	2,41
Bodipy650	0,19	0,487	0,09	0,07	-	-	-	-	-	-
HD1-Bodipy650/ HD1-GSZ	0,19	1,613	8,33	0,03	-	-	-	-	-	-
Cy5	0,40	0,578	1,35	0,44	-	-	-	-	-	-
HD21/ JM-Cy5* <sup>2</sup>	0,45	2,098	1,66	0,27	13,47	0,12	11,72	0,45	-	-
LCR640	0,66	0,688	4,14	0,04	0,36	0,64	-	-	2,32	0,14
HD1-LCR640/ HD1-GSZ	0,45	4,009	5,90	0,26	-	-	2,13	0,64	1,25	0,67
MR200	0,25	0,653	6,97	0,12	-	-	-	-	1,27	0,31
HD1-MR200(L3)/ HD1-GSZ	0,28	1,649	7,19	0,15	104,00	0,30	-	-	1,18	0,39
HD1-MR200(L6)/ HD1-GSZ	0,27	1,980	8,21	0,18	220,87	0,23	-	-	1,00	0,40
HD1-Sq635/ HD1-GSZ	0,40	1,371	6,20	0,14	63,21	0,20	6,23	0,37	1,39	0,52

\*<sup>1</sup> Die relativen Intensitäten sind um die Werte der Detektionseffizienzen korrigiert und bezogen auf Cy5 ( $\Phi_F = 0,40$ ). Die Werte der Detektionseffizienzen sind:  $g_R(\text{Alexa633}) = 0,196$ ,  $g_R(\text{Bodipy650}) = 0,461$ ,  $g_R(\text{Cy5}) = 0,393$ ,  $g_R(\text{LCR640}) = 0,174$ ,  $g_R(\text{MR200}) = 0,166$  und  $g_R(\text{Sq635}) = 0,221$ .

\*<sup>2</sup> Zusätzlicher Bunchingterm mit  $t_4 = 15,53 \mu\text{s}$  und einer Amplitude von 0,07.

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

LCR640 und MR200 zeigen im Vergleich des FCS-Kurvenverlaufs von frei in der Lösung vorliegenden Farbstoff zum Farbstoff am Oligonukleotid erhöhte Amplituden der Bunchingterme im  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich. Aufgrund der bereits erwähnten Lochblende und der starken Adsorption von LCR640-haltigen Proben liefert die Anpassung der Kurve zwei Bunchingterme im  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich. Zur Berechnung von  $k_T$  und  $k_{ISC}$  in diesem Fall wurde  $t_3 = t_T$  und  $A_3 = T_{1eq}$  angenommen. Der Bunchingterm mit der Zeit von 0,361 ns bei LCR640 kann unter diesen Messbedingungen nicht genauer untersucht werden, da aufgrund der

Adsorption nur kurze Messzeiten zur Aufnahme der FCS-Kurven geeignet sind. Eine längere Messzeit erhöht die Anzahl der Photonen und liefert damit eine bessere Grundlage zur Anpassung der Korrelationskurven. Daher können Proben mit LCR640 nur in Anwesenheit von Reagenzien gemessen werden, die die Glasoberfläche blockieren und die Absorption verringern bzw. verhindern. Geeignete Reagenzien sind DMF, BSA oder PEG-Derivate. Der Nachteil einer solchen Zugabe besteht darin, dass Wechselwirkungen mit dem Farbstoff oder dem Makromolekül, an das der Farbstoff gebunden ist, auftreten können.

Die unterschiedliche Linkerlänge von MR200 zum Oligonukleotid (L3 = C<sub>3</sub>-Linker, L6 = C<sub>6</sub>-Linker) wirkt sich nicht auf die Triplettkinetik aus. Im ns-Bereich nimmt jedoch beim MR200 mit dem C<sub>6</sub>-Linker die Amplitude ab. Da es sich bei MR200 um einen Rhodamin-Farbstoff handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Guanin an zweiter Position in der Sequenz die Fluoreszenz von MR200 löscht wie bei Rh6G (Kap. 4.1.3.1) und dieser Bunchingterm (mit der Korrelationszeit  $t_2$ ) der Löschung zugeschrieben werden kann. Dieses Verhalten ähnelt der Löschung von Rh6G mit Guanin an erster Position in der Sequenz (Tab. 4.1-13).

Sq635 zeigt am Oligonukleotid eine geringere Amplitude des Bunchingterms als Cy5. Da dieser die Isomerisierungsreaktion von Cyaninen widerspiegelt, kann daraus geschlossen werden, dass bei Sq635 das Gleichgewicht der Isomerisierungsreaktion auf die Seite der trans-Konformation verschoben ist.

**Tab. 4.1-19: Ergebnisse der mittleren Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{av}$  aus der Anpassung der Fluoreszenzabklingkurven für die Farbstoffe frei in Lösung und jeweils gebunden an ein Oligonukleotid.**

	Anpassung	$\tau_{av}^a$ [ns]	$\tau_{av}^x$ [ns]
Alexa633	monoexponentiell	3,40	3,40
HD1-Alexa633/HD1-GSZ	biexponentiell	4,20	3,71
Bodipy650	biexponentiell	2,81	2,03
HD-Bodipy650/HD1-GSZ	biexponentiell	4,61	4,61
Cy5	biexponentiell	0,97	0,87
HD21/JM-Cy5	biexponentiell	1,38	1,08
LCR640	biexponentiell	3,81	3,17
HD1-LCR640/HD1-GSZ	biexponentiell	4,79	4,63
MR200	biexponentiell	3,87	3,87
HD1-MR200(L3)/HD1-GSZ	biexponentiell	4,02	3,20
HD1-MR200(L6)/HD1-GSZ	biexponentiell	4,25	3,72
HD1-Sq635/HD1-GSZ	biexponentiell	1,55	1,22

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

Bei Analyse der Fluoreszenzabklingkurven der vorgestellten Proben zeigt nur Alexa633 ein monoexponentielles Abklingverhalten. Für alle anderen Farbstoffe werden zwei Exponential-Funktionen zur Beschreibung der Kurven benötigt. Bei der Berechnung der

molekulgewichteten mittleren Fluoreszenzlebensdauer nach Gl. 3.1-1b, erhält man die Werte in Tab. 4.1-19. Die Werte der fluorezenzgewichteten Lebensdauer sind zum Vergleich ebenfalls angegeben.

Alle Farbstoffe zeigen eine verlängerte Fluoreszenzlebensdauer, wenn sie ans Oligonukleotid gebunden sind. Diese Zunahme ist bei Bodipy650 am stärksten ausgeprägt, bei dem die Lebensdauer um einen Faktor  $> 2$  vergrößert ist. Im Vergleich zum freien Farbstoff ( $\tau = 0,51\text{ns}$ ) (Oswald, 1999) zeigt Sq635 ebenfalls eine Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer, wenn es am Oligonukleotid gebunden ist.

### *Einzelmolekülmessungen*

Bei allen Histogrammen (Abb. 4.1-21 und -22) der Anisotropie  $\tau_R$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_R$  wurde für die Berechnung der schwarzen Kurve im 2D-Histogramm, die den Verlauf einer Iso- $\rho$ -Linie gemäß der Perrin-Gleichung (Gl. 2.1-13) darstellt, ein Wert für  $r_0$  von 0,375 angenommen.

Die niedrige Werte der Rotationskorrelationszeiten von Alexa633 und Bodipy650 deuten darauf hin, dass sich die Farbstoffe in allen drei Raumrichtungen nahezu isotrop verhalten. Bodipy650 frei in Lösung besitzt jedoch mit  $\tau_R = 2\text{ ns}$  eine niedrigere Lebensdauer als Alexa633. Gebunden ans Oligonukleotid zeigen beide ein ähnliches 2D-Histogramm und einen gleich großen Wert der Rotationskorrelationszeit ( $\rho = 2,5\text{ ns}$ ).

Im Vergleich zu diesen beiden Farbstoffen besitzt Cy5 eine erhöhte Anisotropie und damit auch eine erhöhte Rotationskorrelationszeit  $\rho$ . Der höhere Wert für die Anisotropie bzw. die Rotationskorrelationszeit des Farbstoffs wird hier durch die Bindung innerhalb der Sequenz verursacht. Am 5'-Ende der Sequenz HD1/HD1-GSZ besitzt Cy5 jedoch eine Rotationskorrelationszeit von 2,3 ns (Widengren, 2001). Dieser Wert ist ähnlich zu  $\rho(\text{HD1-Alexa633/HD1-GSZ})$  und  $\rho(\text{HD1-Bodipy650/HD1-GSZ})$ . Sq635 zeigt eine ähnliche Fluoreszenzlebensdauer in der Einzelmolekülmessung wie Cy5, jedoch eine niedrigere Rotationskorrelationszeit. Sq635 ist am Oligonukleotid beweglicher als Cy5, was in der Isomerisierung von Cy5 begründet sein kann.

LCR640 und MR200 verhalten sich sowohl frei als auch gebunden an die DNS ähnlich wie Alexa488: breite Lebensdauererweiterung um 4 ns als freier Farbstoff und Verlängerung der Lebensdauer im Fall der Bindung ans Oligonukleotid. Die Beweglichkeit des Farbstoffs ist in der Lösung im Vergleich zu Alexa633 und Bodipy650 eingeschränkt, erkennbar an der erhöhten Rotationskorrelationszeit. Die Histogramme von HD1-MR200(L3)/HD1-GSZ und HD1-MR200(L3)/HD1-GSZ sind ähnlich. Demnach hat die unterschiedliche Linkerlänge bei MR200 keinen großen Einfluss.

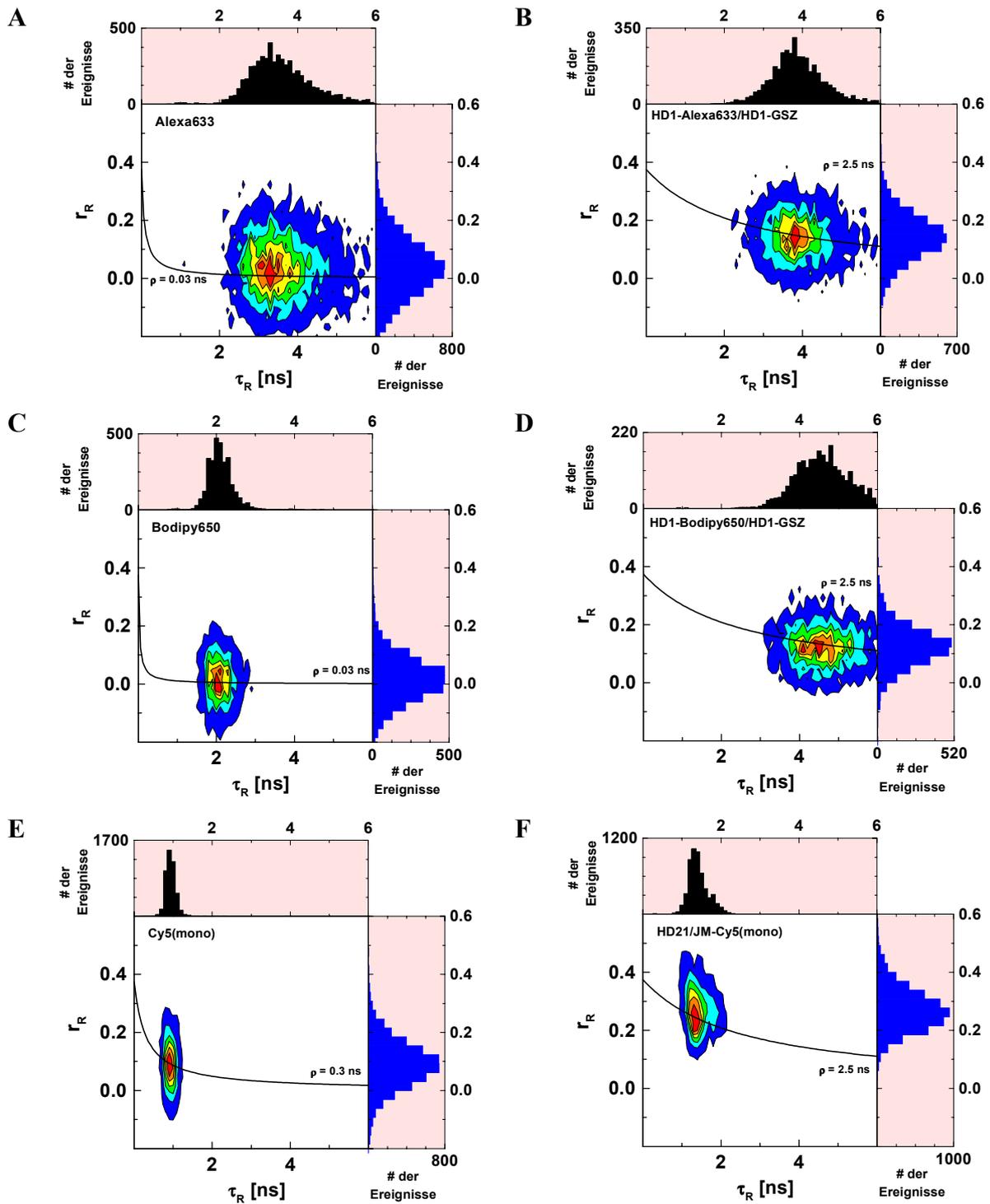


Abb. 4.1-21: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von (A) Alexa633, (B) HD1-Alexa633/HD1-GSZ, (C) Bodipy650, (D) HD1-Bodipy650/HD1-GSZ, (E) Cy5 und (F) HD21/JM-Cy5. Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_R$  und der Anisotropie  $r_R$  (Signalspitzen-orientierte Auswertung). Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

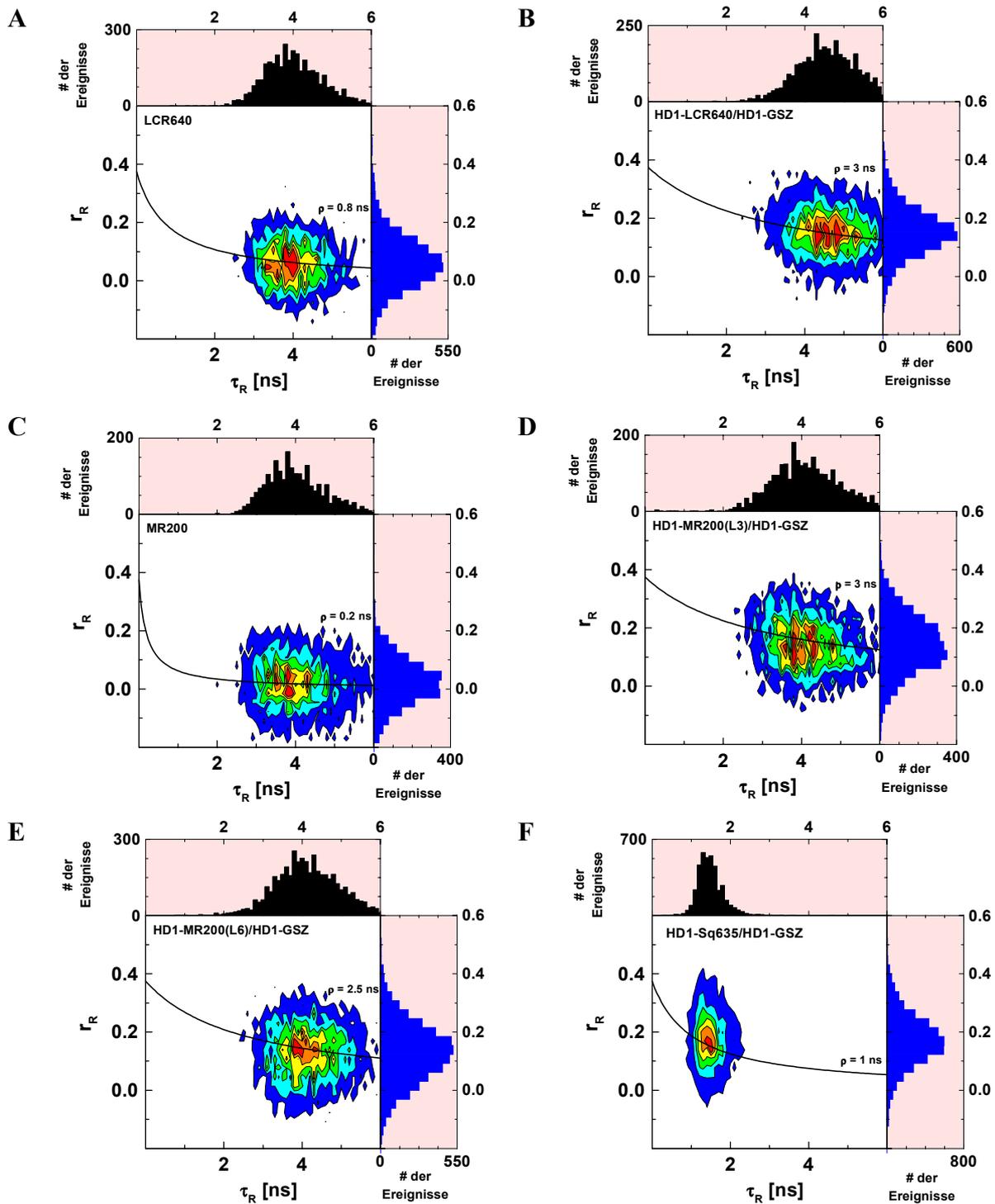


Abb. 4.1-22: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von (A) LCR640, (B) HD1-LCR640/HD1-GSZ, (C) MR200, (D) HD1-MR200/HD1-GSZ (mit  $C_3$ -Linker), (E) HD1-MR200/HD1-GSZ (mit  $C_6$ -Linker) und (F) HD1-Sq635/HD1-GSZ. Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_R$  und der Anisotropie  $r_R$  (Signalspitzen-orientierte Auswertung). Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass alle Farbstoffe am Oligonukleotid eine erhöhte Fluoreszenzlebensdauer und eine eingeschränkte Beweglichkeit aufweisen. Die Zunahme der Fluoreszenzlebensdauer kann anhand der Perrin-Gleichung (Gl. 2.3-13) auf die Zunahme der Rotationskorrelationszeit zurückgeführt werden.

*Alexa633 und Bodipy650 haben stark veränderte Fluoreszenzeigenschaften bei der Bindung an das Oligonukleotid (Erniedrigung der Triplettamplitude bei Alexa633, Erhöhung der Lebensdauer bei Bodipy650). Eine Sequenzabhängigkeit dieser Farbstoffe kann nicht ausgeschlossen werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.*

*Die negative Ladung der Sulfonsäuregruppen am Cy5 führt zu einer elektrostatischen Abstoßung des Farbstoffs von den Phosphatgruppen der DNS. Cy5 besitzt von allen verwendeten Farbstoffen den höchsten Extinktionskoeffizienten, jedoch eine niedrige Fluoreszenzquantenausbeute. Nachteilig ist die Bildung der Isomeren, die dazu führt, dass sich der Farbstoff bei der Bindung an unterschiedlichen DNS-Molekülen unterschiedlich verhält. Bei Abstandsuntersuchungen mit FRET ist jedoch ein homogenes Farbstoffverhalten erwünscht, nicht aber Wechselwirkungen von Molekül und Fluoreszenzsonde erwünscht, die die Bestimmung des Abstandes verfälschen können. Sq635 besitzt ebenfalls Sulfonsäuregruppen, einen ähnlichen Extinktionskoeffizienten und eine ebenfalls niedrige Fluoreszenzquantenausbeute. In der FCS zeigte dieser Farbstoff eine stark verringerte Amplitude des Bunchingterms im  $\mu\text{s}$ -Bereich, was darauf die erniedrigte Wahrscheinlichkeit einer cis-trans-Isomerisierung schliessen lässt. Daher kann Sq635 als sehr gute Alternative zu Cy5 als Akzeptorfarbstoff bei FRET-Untersuchungen eingesetzt werden.*

*LCR640 und MR200 zeigen in allen Proben breite Verteilungen im 2D-Histogramm. Die hohen Quantenausbeuten und Fluoreszenzlebensdauern sind von Vorteil für die Einzelmoleküluntersuchung von FRET. Nachteilig sind die Adsorption an Glasoberflächen und die fehlende Strukturinformation bei LCR640.*

### **Zweifach-reaktives Cy5 am Oligonukleotid**

Die cis-trans-Isomerie führt bei dem Cyanin-Farbstoff Cy5 zu einer verringerten Fluoreszenzquantenausbeute, da nur die trans-Form fluoreszent ist. Daher liegt es nahe, den Farbstoff in dieser Form zu fixieren, um die Quantenausbeute zu erhöhen. Dies ist bei Sq635 umgesetzt worden.

Im Folgenden wird eine andere Strategie zur Fixierung von Cy5 in der trans-Form vorgestellt. Die kovalente Anbindung des Farbstoffs am Oligonukleotid geht normalerweise von einem Linker am Stickstoffatom einer der beiden Indolgruppen aus (*monoreactive dye*, im Weiteren als Cy5(mono) bezeichnet). Es ist jedoch auch der sogenannte *bisreactive dye* (Cy5(bis)) kommerziell erhältlich.

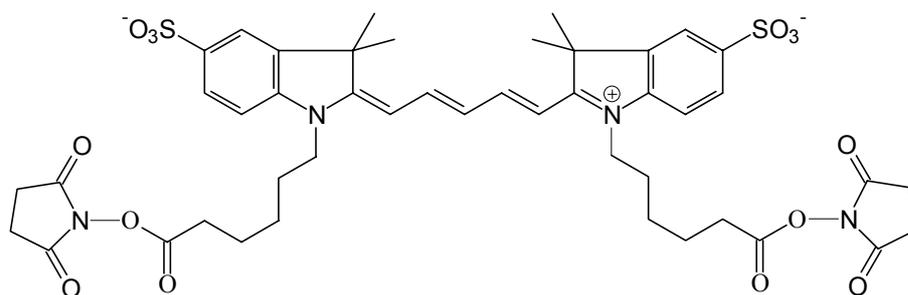


Abb. 4.1-23:  
Der Farbstoff Cy5 mit  
zwei NHS-Gruppen  
(Cy5(bis)).

Durch zwei N-hydroxysuccinimidyl-Reste (NHS-Reste) soll der Farbstoff an zwei Positionen im Oligonukleotid-Einzelstrang gebunden werden. Dadurch soll die Isomerisation vom trans- zum cis-Isomer des Farbstoffs an der Nukleinsäure eingeschränkt werden, so dass sich der Farbstoff fast nur in der fluoreszenten trans-Form befindet. Ein anderer Effekt ist die erhöhte Fluoreszenzanisotropie im Vergleich zum einfach-reaktiven Farbstoff, die es möglich machen sollte, Oligonukleotide mit dem einfach- und dem zweifach-reaktiven Farbstoff auf Einzelmolekülebene voneinander zu unterscheiden.

Bei der Synthese des Oligonukleotids müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Zum einen wurde mit dem Programm *Hyperchem* der Abstand der zwei Stickstoffatome in Cy5 abgeschätzt (ca. 8 Å). Anhand dessen wurde eine Oligonukleotid-Sequenz (JM, s. Anhang D) mit einem Abstand der zwei Markierungspositionen von zwei Basen gewählt.

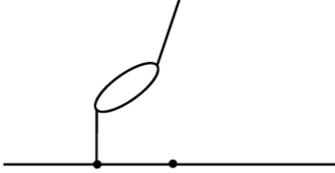
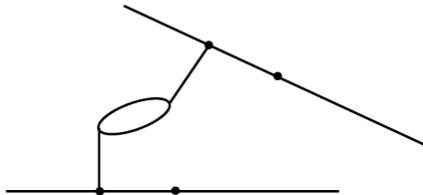
	Schema	Eigenschaften
<b>A</b>		- 2-fach negativ 1 DNA-Strang $a^+ = 1$
<b>B</b>		- 2-fach negativ 1 DNA-Strang $a^+ = 1$
<b>C</b>		- 4-fach negativ 1 DNA-Strang $a^+ = 2$
<b>D</b>		- 2-fach negativ 2 DNA-Stränge $a^+ = 0,5$

Abb. 4.1-24: Mögliche Produkte der Markierung einer Oligosequenz mit Cy5(bis) (die Ellipse stellt den Farbstoff, die kurzen Striche die Linker, der lange Strich die DNS und die schwarzen Punkte die gewünschten Positionen in der Oligosequenz dar). Bei  $a^+$  handelt es sich um den Markierungsgrad (s. Kap. 3) des Farbstoffs.

Die Markierungsreaktion liefert drei Banden in einem nativen Polyacrylamid-Gel und somit drei strukturell verschiedene Produkte. Diese unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung von Farbstoff und Oligonukleotid. In Abb. 4.1-24 sind vier zu erwartende Produkte skizziert; weitere, hochmolekulare Strukturen wurden nicht berücksichtigt, da sie aufgrund der Beteiligung mehrerer Moleküle DNS oder Farbstoff weniger wahrscheinlich sind.

Die isolierten Moleküle der drei Gel-Banden haben eine ähnlich erhöhte Anisotropie im Vergleich zum freien Farbstoff (Tab. 4.1-20), die auf eine Bindung und damit sterische Hinderung des Farbstoffs am Oligonukleotid hinweist.

Die Ausbeute der Moleküle von Bande 2 ist die höchste im Vergleich zu den anderen Banden, die somit auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit dieser Struktur hindeutet. Das Verhältnis es-DNS:Farbstoff beträgt ca. 1:2 (ermittelt aus den Absorptionsspektren; der Extinktionskoeffizient der Sequenz beträgt ca.  $241\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; im Weiteren wird bei allen drei Produkten mit einem Extinktionskoeffizienten von Cy5 von  $250\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  gerechnet). Den Molekülen der Bande 2 ist wahrscheinlich die Struktur von Variante D zuzuordnen, da zwei Moleküle Oligonukleotid pro Farbstoffmolekül die Mobilität im Gel herabsetzen. Der Markierungsgrad von 0,51 spricht ebenfalls für diese Struktur.

Die Moleküle der Bande 3 haben eine Ausbeute von 36,8 % und ein Verhältnis DNS:Farbstoff von ca. 2,7:1. Hierbei handelt es sich vermutlich um Variante C. Aufgrund der zusätzlichen negativen Ladung durch den Farbstoff und eines Oligonukleotid-Strangs laufen diese Moleküle schneller im Gel als die Varianten A, B oder D. Dies wird aber kompensiert durch den größeren hydrodynamischen Radius des Moleküls. Der hohe Markierungsgrad kann auch aus einer komplexen Struktur resultieren, die aus mehreren Molekülen Farbstoff und Oligonukleotidsträngen aufgebaut ist.

**Tab. 4.1-20: Ergebnisse aus Absorptions- und Fluoreszenzspektren von mono- und bisreaktivem Cy5 frei in Lösung oder gebunden an ein Oligonukleotid mit der Sequenz JM.**

Cy5		Lauf im Gel	rel. Ausbeute [%]	$\Phi_F^{*1}$	r	Labelinggrad $a^{+*2}$
bis	-	-	-	0,41	0,13	-
bis	Bande 1	langsam	15,2	0,47	0,22	0,66
bis	Bande 2 <sup>*3</sup>	mittel	48,0	0,36	0,22	0,51
bis	Bande 3	schnell	36,8	0,43	0,20	0,37

\*<sup>1</sup> Die Quantenausbeuten wurden mit Rh700 in angesäuerter wässriger Lösung ermittelt.

\*<sup>2</sup> Der Extinktionskoeffizient des Oligonukleotidstrangs beträgt ca.  $241\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  und  $\epsilon(\text{Cy5})$  in allen Proben wird mit  $250\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  angenommen. Da aber Änderungen der Absorptionsspektren beobachtet werden, ist die Annahme desselben Extinktionskoeffizienten bei allen drei Produkten nur eingeschränkt anwendbar.

\*<sup>3</sup> Die Schulter im Absorptionsspektrum von Cyaninen ist hier eine zweite Bande mit:  $\epsilon_1(650\text{ nm})/\epsilon_2(612\text{ nm}) = 0,59$ .

Bei den Spektren der drei Reaktionsprodukte liegt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 647 nm auf 656 nm vor (Abb. 4.1-25).

Die Form des Absorptionsspektrums des Produkts in Bande 1 deutet auf das sogenannte *exciton splitting* hin (s. Anhang E). Bei geringen Konzentrationen (im  $\mu\text{M}$ -Bereich) zeigt das Cy5-Spektrum ein Maximum bei 650 nm und eine Schulter bei kürzeren Wellenlängen. Bei der Bande 1 ist diese Schulter jedoch zu einer zweiten, deutlich sichtbaren Absorptionsbande bei 612 nm angestiegen. Das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_1(650\text{ nm})/\epsilon_2(612\text{ nm})$  liegt bei 0,59 und gibt ein Maß für dieses Phänomen an.

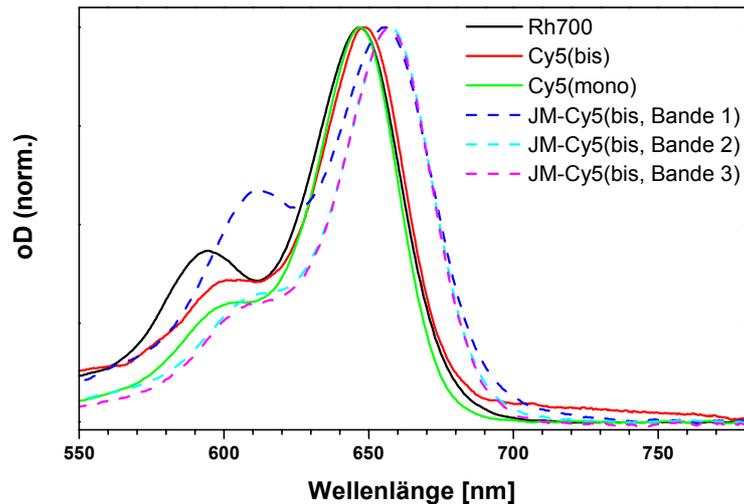


Abb. 4.1-25: Absorptionsspektren von Rh700, mono- und bisreaktivem Cy5 und der drei Produkte nach der Markierung des Oligonukleotids JM mit Cy5(bis).

Da die optische Dichte der Probe jedoch nicht erhöht ist im Vergleich zur Messung von Cy5 in Lösung, bei dem nur eine Bande auftritt, scheint es sich um einen Effekt zu handeln, der durch die Bindung des zweifach-reaktiven Cy5 an das Oligonukleotid hervorgerufen wird (Varianten A und B). Denn eine zweite Absorptionsbande anstelle der Schulter tritt nicht auf, wenn der einfach-reaktive Farbstoff an ein Oligonukleotid gebunden wird. Dabei kann jedoch nicht gesagt werden, um welche der beiden Varianten es sich bei den Molekülen in Bande 1 handelt oder ob ein Gemisch aus beiden Strukturen vorliegt.

Durch die Bindung an das Oligonukleotid scheint die Anordnung der Übergangsdipolmomente für die Bildung von H-Aggregaten gegeben zu sein (Anhang E). Eine Erklärungsmöglichkeit liefert McKay, der die Bildung von H-Aggregaten mit einer Wechselwirkung von Farbstoff-Ion und Gegenionen erklärt (McKay, 1965), wobei hier das Oligonukleotid die Funktion des Gegenions übernimmt. Da, wie erwähnt, die Konzentration der Probe nicht erhöht war, ist diese Möglichkeit sehr wahrscheinlich.

Da sich das Absorptionsspektrum gegenüber dem freien Farbstoff verändert hat, ist die Annahme eines Extinktionskoeffizienten von  $250\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  möglicherweise nicht mehr korrekt. Die Annahme eines geringeren Extinktionskoeffizienten erhöht den Wert des Labelinggrades (Danach entspricht dem erwarteten Labelinggrad von 1 für dieses Molekül ein Extinktionskoeffizient bei 650 nm von ca.  $170\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ).

Diese Sequenzen werden zum Doppelstrang-Oligonukleotid hybridisiert, um weiter mit Hilfe von FCS und MFD untersucht zu werden. In Abb. 4.1-26 sind die Korrelationskurven von Cy5 als einfach- und als zweifachreaktivem Farbstoff dargestellt.

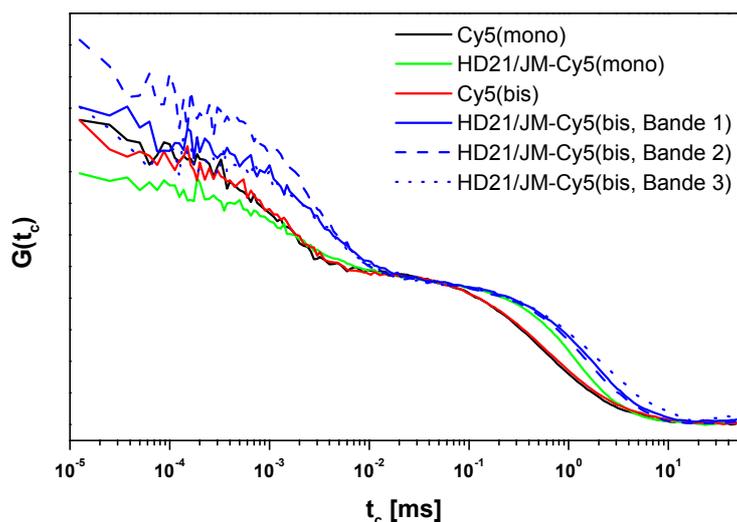


Abb. 4.1-26: Normierte Korrelationskurven von einfach- und zweifachreaktivem Cy5 frei in Lösung und gebunden an eine Oligonukleotidsequenz. Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

**Tab. 4.1-21: Parameter nach Anpassung der Korrelationskurven von einfach- und zweifachreaktivem Cy5.**

	rel. Intensität*	$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu$ s]	$A_1$	$t_2$ [ $\mu$ s]	$A_2$	$t_3$ [ $\mu$ s]	$A_3$	$t_4$ [ms]	$A_4$
Cy5(mono)	0,40	0,578	1,35	0,437						
Cy5(bis)	0,42	0,762	1,87	0,399	0,156	0,05				
HD21/JM-Cy5(mono)	0,39	2,098	1,66	0,266	0,013	0,12	15,533	0,07	11,723	0,45
HD21/JM-Cy5(bis, Bande 1)	0,37	3,277	2,42	0,235	0,038	0,18	8,633	0,16	3,761	0,38
HD21/JM-Cy5(bis, Bande 2)	0,32	4,057	2,96	0,419	0,111	0,09	11,020	0,08	3,312	0,36
HD21/JM-Cy5(bis, Bande 3)	0,38	3,050	2,85	0,306			9,524	0,17	4,151	0,44

\* Die relativen Intensitäten wurden auf 0,4 von Cy5(mono) bezogen und, da es sich bei allen Fluorophoren um Cyanine handelt, stellen sie den Wert der Quantenausbeute der Probe dar. Dies gilt nur unter der Annahme eines identischen Werts für  $\epsilon$  für den Farbstoff in den drei Reaktionsprodukten.

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

Aufgrund der Korrelationsmessungen zeigen die freien Farbstoffe Cy5(mono) und Cy5 (bis) nahezu gleiches Fluoreszenzverhalten. Die Anpassung der Korrelationskurve von Cy5(bis) zeigt einen zusätzlichen Bunchingterm bei  $t_3 = 156$  ns.

Bei allen Oligonukleotid-Proben ist die Quantenausbeute verringert - ausgedrückt in der relativen Zählrate pro Molekül - im Vergleich zu den freien Farbstoffen, Cy5(mono) und Cy5(bis), die im Rahmen des Fehler den gleichen Wert für  $\Phi_F$  haben. Am niedrigsten ist dieser Wert bei HD21/JM-Cy5(bis, Bande 2).

Die drei Produkte aus der Markierungsreaktion des Oligonukleotids mit Cy5(bis) besitzen wie Cy5(bis) eine höhere Amplitude der Isomerisierungsreaktion als bei Cy5(mono). In allen Proben mit Cy5(bis) ist daher die cis-Konformation begünstigt. Dies deutet darauf hin, dass die gewünschte Markierungsreaktion nicht vollständig bis zum Produkt B, sondern nur bis zum Produkt A, abgelaufen ist. Die Abstoßung durch die Sulfonsäuregruppen vom Phosphatrückgrad kann vermutlich eine Bindung des zweiten NHS-Esters verhindern.

### *Einzelmolekülmessungen*

In den Einzelmolekülmessungen (Abb. 4.1-27) erkennt man eine erhöhte Rotationskorrelationszeit des Cy5(bis) gegenüber Cy5(mono), da vermutlich die zwei NHS-Linker die freie Rotation des Farbstoffs einschränken. Alle Proben mit Farbstoff gebunden an Nukleinsäure zeigen eine sehr stark eingeschränkte Beweglichkeit ( $r_0 = 0,375$ ) des jeweiligen Farbstoffs. Auffallend dabei ist der hohe Wert von  $\rho = 4$  ns bei HD21/JM1-Cy5(bis, Bande 3). Aufgrund der vorherigen Messungen war bei diesem Molekül eine komplexere Struktur vermutet worden, so dass es sich hierbei nicht um die erwartete Erhöhung der Anisotropie aufgrund des gewünschten Produkts handelt.

*Anhand der FCS-Messung kann die Aussage getroffen werden, dass das Ziel - Verschiebung des Isomerisierungsgleichgewichts von Cy5 auf die Seite des fluoreszenten trans-Isomers - nicht erreicht wird. Die Markierungsreaktion von zweifach reaktivem Cy5 läuft nicht vollständig ab, da die Bindung des zweiten NHS-Esters an das Oligonukleotid nicht stattfindet. Als Ursache hierfür ist die elektrostatische Abstoßung des Farbstoff durch die DNS zu nennen, die bei einfach-reaktivem Cy5 ein Vorteil ist, da die Basenzusammensetzung keinen Einfluss auf die Fluoreszenz des Fluorophors haben kann.*

*Im Vergleich zu Cy5(mono) kann sogar davon ausgegangen werden, dass der zweite NHS-Ester bei Cy5 (bis) zu einer Verschiebung des Isomerisierungsgleichgewichts auf die Seite des cis-Isomers verschiebt, da in der FCS erhöhte Amplituden des Bunchingterms im  $\mu$ s-Zeitbereich gefunden wurden.*

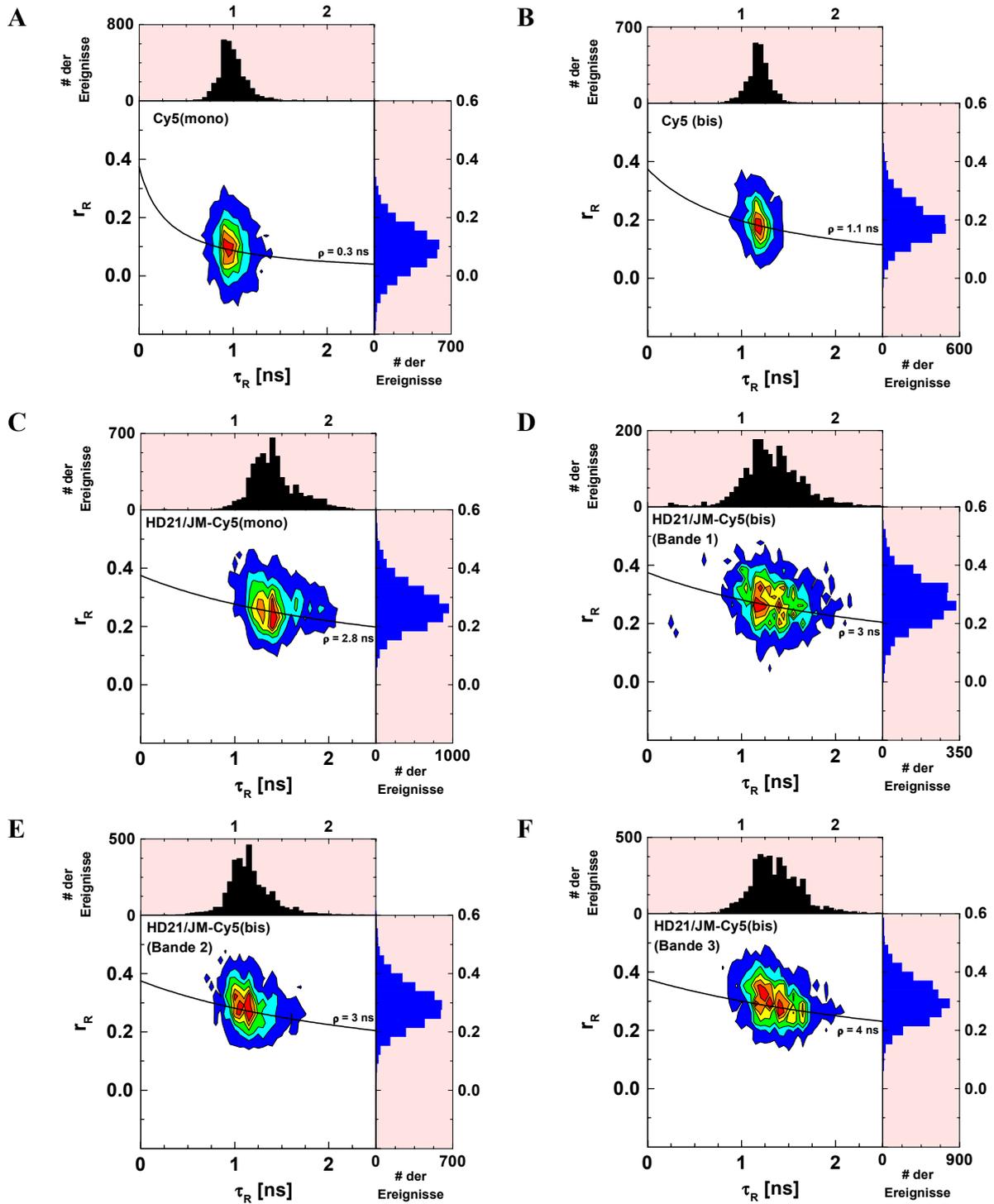


Abb. 4.1-27: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von (A) Cy5(mono), (B) Cy5 (bis), (C) JM1-Cy5(bis, Bande 1), (D) JM1-Cy5(bis, Bande 2) und (E) JM1-Cy5(bis, Bande 3). Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_R$  und der Anisotropie  $r_R$  (Signalspitzen-orientierte Auswertung). Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

### RotS: Eine Alternative zu Cy5?

Aufgrund der Isomerisierung der Cyanin-Farbstoffe wurde nach einem weiteren Farbstoff neben Sq635 gesucht, der ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften wie Cy5 (Absorptions- und Fluoreszenzmaximum, Extinktionskoeffizient, Wasserlöslichkeit) besitzt, aber bei dem Isomerenbildung ausgeschlossen werden kann. Solch ein Farbstoff stand mit RotS im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung.

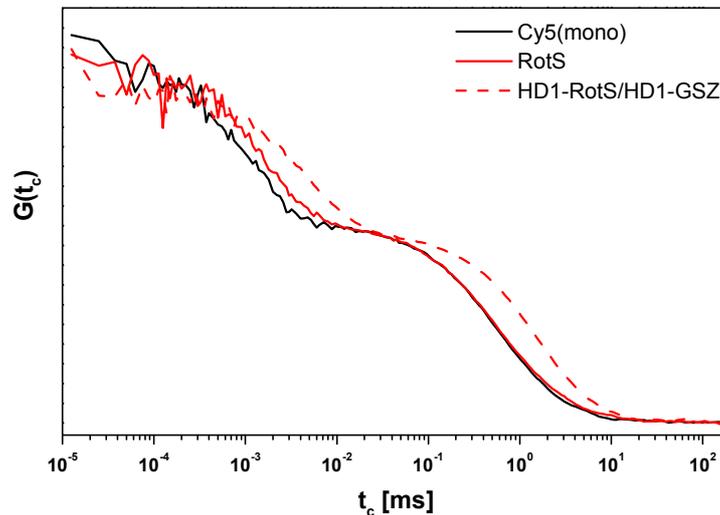


Abb. 4.1-28: Normierte Korrelationskurven von einfach reaktivem Cy5 und dem Farbstoff RotS. Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

RotS besitzt wie Cy5 einen hohen Extinktionskoeffizienten ( $200\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) am Absorptionsmaximum und erfüllt damit eine wichtige Bedingung. Wie aus Abb. 4.1-28 ersichtlich ist, zeigt RotS ebenfalls wie Cy5 einen Bunchingterm im  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich (Tab. 4.1-22). Das Verhältnis von cis-Isomeren zu trans-Isomeren ist bei beiden Farbstoffen demnach gleich. Darüber hinaus ist die relative Intensität von RotS, frei und am Oligonukleotid, geringer als bei Cy5.

**Tab. 4.1-22: Parameter nach Anpassung der Korrelationskurven von RotS.**

	relative Intensität* <sup>1</sup>	$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_1$	$t_2$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_2$	$t_3$ [ $\mu\text{s}$ ]	$A_3$	$t_4$ [ms]	$A_4$
RotS	0,26	0,591	1,61	0,333	0,012	0,10	5,560	0,07	-	-
HD1-RotS/ HD1-GSZ* <sup>2</sup>	0,27	2,099	4,93	0,437	-	-	-	-	4,27	0,40

\*<sup>1</sup> Die relative Intensität wurde auf 0,4 von Cy5(mono) bezogen und um die Detektionseffizienz  $g_R$  korrigiert:  $g_R(\text{RotS}) = 0,508$ .

\*<sup>2</sup> gestreckter Zerfall,  $\beta = 0,78$  (beim ersten Bunchingterm)

Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

### Einzelmolekülmessungen

Während RotS mit  $\tau = 0,91$  ns eine kurze Fluoreszenzlebensdauer des freien Farbstoffs besitzt, zeigt sich am Oligonukleotid wie bei den anderen „roten“ Farbstoffen (Kap. 4.3.1.2.1) ein verlängerte Fluoreszenzlebensdauer (Abb. 4.1-29).

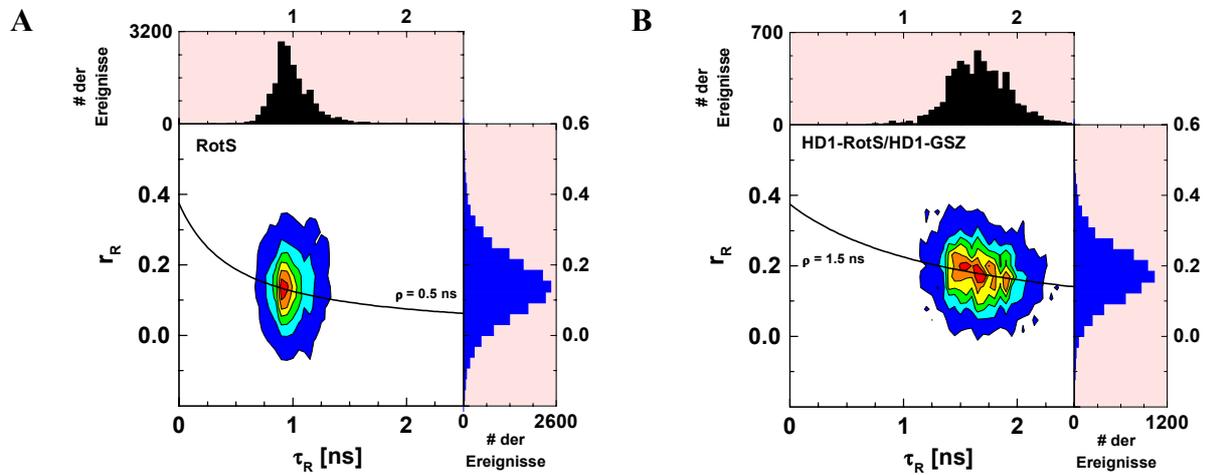


Abb. 4.1-29: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von (A) RotS und (B) HD1-RotS/HD1-GSZ. Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_R$  und der Anisotropie  $r_R$  (Signalspitzenorientierte Auswertung). Messbedingungen: s. Abb. 4.1-20.

*RotS besitzt vergleichbare Fluoreszenzeigenschaften zu Cy5 und verhält sich am Oligonukleotid ähnlich. Es tritt die cis-trans-Isomerisierung auf und zwar mit der gleichen Amplitude des Bunchingterms im  $\mu$ s-Bereich der Korrelationskurve. Darüberhinaus kann bei den zeitaufgelösten Messungen eine verlängerte Lebensdauer am Oligonukleotid im Vergleich zum freien Farbstoff RotS beobachtet werden. Die symmetrischere Verteilung im 2D-Histogramm von Lebensdauer und Anisotropie als bei Cy5 deutet auf das gewünschte, homogenere Verhalten am Oligonukleotid hin.*

#### 4.1.4 Zusammenfassung

Die Fluoreszenzlöschung von Rhodaminfarbstoffen durch die vier Nucleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin kann genutzt werden, um Nucleinsäuresequenzen aufzuklären. Dazu wird der Rhodaminfarbstoff JF4 eingesetzt, der als „intelligenter Farbstoff“ unterschiedlich stark durch die Nucleobasen gelöscht wird und dabei unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften wie Fluoreszenzlebensdauer und -intensität aufweist. Wird der Farbstoff an die Nucleotide gebunden, so lautet die Reihenfolge der Löschung mit abnehmender Stärke: dGTP > dATP  $\approx$  TMP > dCTP. Dies konnte mit Hilfe von stationären Messungen, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und Einzelmolekülspektroskopie mit Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) geklärt werden.

Die Messungen auf Einzelmolekülebene ergaben ausschliesslich geringe Fluoreszenzintensitäten und auch bei der Fluoreszenzlebensdauer nur geringfügige Unterschiede zwischen den Spezies, die keine Unterscheidung der Nucleobasen mit dem Sensor JF4 ermöglichen. Durch Zugabe von einem wasserlöslichen Triplettlöcher werden die Fluoreszenzintensitäten erhöht; der Löschprozess an sich blieb allerdings im Detail unklar. Anhand der Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen kann die Bildung von Komplexen mit dem Triplettlöcher nicht ausgeschlossen werden.

JF4 ist damit als „intelligenter Farbstoff“ prinzipiell zur Sequenzierung geeignet, jedoch nicht im Rahmen der Einzelmolekülspektroskopie.

Wird ein Rhodaminfarbstoff an ein Oligonucleotid gebunden, sollte die Basensequenz so beschaffen sein, dass das stark löschende Guanin mindestens zwei Basenpaare von der Bindungsstelle entfernt ist. Zudem besitzen die Linkerlänge und der Bindungswinkel - vorgegeben durch das Isomer - Einfluss auf die Orientierung des Farbstoffs am Oligonucleotid. Mit Hilfe von FCS und Einzelmolekülmessungen mittels MFD können zwei verschiedene Positionen von Rh6G am 5'-Ende eines Oligonucleotids beobachtet werden, in denen sich der Farbstoff am häufigsten aufhält: zum einen liegt er oben auf dem endständigen Basenpaar und zum anderen kann er bei ausreichender Linkerlänge aufgrund seiner Ladung das Phosphatrückgrat der DNS „entlangrutschen“. Der Einsatz der selektiven Spektroskopie ermöglicht die Beobachtung der zwei Positionen, indem verschiedene Werte der Anisotropie und somit Beweglichkeiten der zwei Populationen aus den Einzelmolekülexperimenten ermittelt wurden.

Beim Vergleich der Rhodaminfarbstoffe Rh6G, TMR, RhGr und Alexa488 wird nur bei Alexa488 eine geringe Wechselwirkung mit dem Oligonucleotid gefunden. Dieser wird daher und wegen seiner sehr kurzwelligen Fluoreszenz bei den Untersuchungen des Energietransfers meist als Donorfarbstoff verwendet.

Beim Vergleich von Farbstoffen, die als Akzeptor für FRET-Untersuchungen eingesetzt werden können, haben sich die Farbstoffe Bodipy650, Cy5, RotS und Sq635 als gut geeignet erwiesen.

Cy5 besitzt einen hohen Extinktionskoeffizienten und eine negative Ladung, die eine Wechselwirkung mit Oligonukleotiden bei Untersuchung an Nukleinsäuren verringert. Von Nachteil ist, dass es nicht isomerenrein erhältlich ist. Die beiden Isomere besitzen nicht die gleichen Fluoreszenzeigenschaften.

Bodipy650 hat am Oligonukleotid eine lange Fluoreszenzlebensdauer und ähnliche Absorptions- und Fluoreszenzmaxima wie Cy5, jedoch einen geringeren Extinktionskoeffizienten. Als einziger untersuchter Farbstoff zeigt Bodipy650 unter den Versuchsbedingungen nur geringe Triplettbildung, so dass Dunkelzustände vernachlässigt werden können.

RotS und Sq635 als (vermutlich) isomerenreine Alternativen zu Cy5 weisen ebenfalls hohe Extinktionskoeffizienten, Absorption und Fluoreszenz im gleichen Wellenlängenbereich, negative Ladung und eine ähnliche Fluoreszenzlebensdauer am Oligonukleotid auf. Bei Sq635 ist die Isomerisierungsreaktion - erkennbar an der Amplitude des Bunchingterms im  $\mu$ s-Bereich der FCS - am weitesten von den drei Farbstoffen eingeschränkt. Damit liegen weitere gut geeignete Akzeptorfarbstoffe neben den recht häufig eingesetzten Farbstoffen Cy5 und Bodipy 650 vor.

## 4.2 Untersuchungen von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer an fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden

Wie bereits in Kap. 2 beschrieben, kann mit Hilfe des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor der Abstand zwischen den Fluorophoren ermittelt werden. Im Folgenden wird die Bestimmung des Donor-Akzeptor-Abstands  $R_{DA}$  an Oligonukleotiden mit verschiedenen Methoden durchgeführt.

Die experimentell ermittelten Werte wurden mit den Ergebnissen eines theoretischen Modells (Clegg, 1992; Clegg, 1993) zur Berechnung des Abstands  $R_{DA}$  der Fluorophore an Oligonukleotiden verglichen. Die Basis des Modells bildet die Vereinfachung der Nukleinsäure-Struktur als Zylinder (Abb. 4.2-1), an dessen entgegengesetzten Enden die Farbstoffe lokalisiert sind. Die Farbstoffe werden dabei als kugelförmige Moleküle dargestellt.

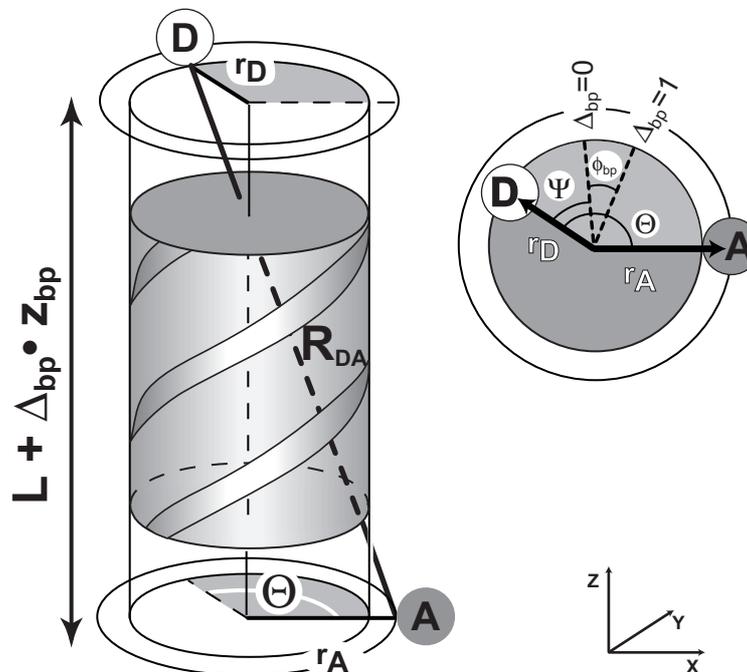


Abb. 4.2-1: Darstellung des Zylindermodells. (A) Ermittlung der Zylinderhöhe in der Schrägansicht. (B) Darstellung der Winkel zwischen den Farbstoffpositionen in der Aufsicht.

Für die Berechnung des Donor-Akzeptor-Abstands  $R_{DA}$  kann dieser als Hypotenuse eines rechtwinkligen Dreiecks betrachtet werden. Die Ankathete  $a$  des aufgespannten Dreiecks ist die Höhe der effektiven Helixachse  $\Delta z$ , die sich zusammensetzt aus der Ganghöhe (Abstand zwischen zwei Basenpaaren) und der Summe  $L$  aus dem Abstand des Donorfärbstoffs in  $z$ -Achsenrichtung zum Basenpaar,  $z_D$ , an das er gebunden ist, und des Akzeptorfärbstoffs zu seiner Bindungsposition,  $z_A$ , so dass gilt

$$a^2 = \left( L + \Delta_{bp} \cdot z_{bp} \right)^2 \quad \text{Gl. 4.2-1}$$

$\Delta_{bp}$  ist der Basenabstand der Bindungspositionen der beiden Farbstoffe. Man beachte, daß  $\Delta_{bp}$  gleich 0 ist, wenn beide Farbstoffe am gleichen Basenpaar gebunden sind.

Für die Gegenkathete  $b$  gilt mit  $r_D$  und  $r_A$ , den Abständen des jeweiligen Farbstoffes zur Helixachse,

$$b^2 = r_A^2 + r_D^2 - 2r_A r_D \cos(\Theta) \quad \text{Gl. 4.2-2}$$

$\Theta$  ist der Gesamtwinkel zwischen Donor- und Akzeptorposition bezogen auf die Helixachse. Dieser setzt sich zusammen aus dem Winkel  $\Psi$  zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff, wenn sich beide an demselben Basenpaar, aber an komplementären Basen befinden. Der Parameter  $\phi_{bp}$  gibt den Winkel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Basenpaaren an. Dabei ist der Drehsinn entlang der Oligonukleotidsequenz vom 5'- zum 3'-Ende.

$$\Theta = \Psi + \Delta_{bp} \cdot \phi_{bp} \quad \text{Gl. 4.2-3}$$

Bei Clegg handelt es sich bei  $\Delta_{bp}$  in Gl. 4.2-1 und Gl. 4.2-3 nicht um die gleiche Größe, so dass das hier verwendete Modell auf den identischen Parameter modifiziert wurde.

Nach dem Cosinussatz für ein rechtwinkliges Dreieck berechnet sich  $R_{DA}$  wie folgt

$$(R_{DA})^2 = \left( L + \Delta_{bp} \cdot z_{bp} \right)^2 + \left( r_A^2 + r_D^2 - 2r_A r_D \cdot \cos(\Psi + \Delta_{bp} \cdot \phi_{bp}) \right) \quad \text{Gl. 4.2-4}$$

Demnach gilt für die Transfereffizienz  $E_T$  des modifizierten Modells mit dem Försterabstand  $R_0$

$$E_T = \left[ \frac{\left[ \left( L + \Delta_{bp} \cdot z_{bp} \right)^2 + \left( r_A^2 + r_D^2 - 2r_A r_D \cdot \cos(\Psi + \Delta_{bp} \cdot \phi_{bp}) \right) \right]^3}{R_0^6} + 1 \right]^{-1} \quad \text{Gl. 4.2-5}$$

Im Rahmen dieser Arbeit sind die Farbstoffe immer an komplementären DNS-Strängen gebunden. Ein Farbstoff befindet sich dabei am 5'-Ende der Sequenz, während der andere innerhalb der Gegensequenz gebunden ist (Anhang D). Dies ist schematisch in Abb. 4.2-2 dargestellt.

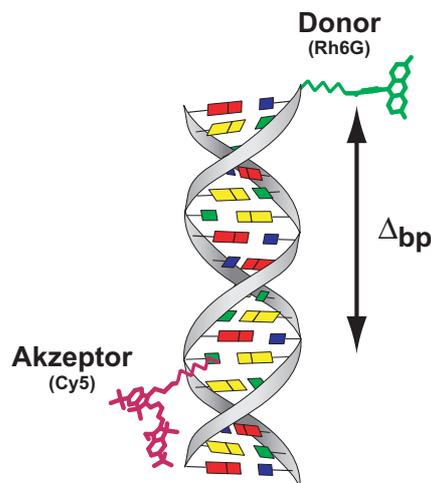


Abb. 4.2-2: Schema eines Oligonukleotids markiert mit dem Donorfarbstoff Rh6G und dem Akzeptorfarbstoff Cy5.

Die Parameter  $L$ ,  $z_{bp}$ ,  $r_A$ ,  $r_D$ ,  $\Psi$ ,  $\phi_{bp}$  und  $R_0$  können auf der Basis dieses Modells ermittelt werden, indem die Transfereffizienz  $E_T$  für verschiedene Oligonukleotide derselben Sequenz,

aber einer unterschiedlichen verschiedenen Anzahl an Basenpaaren zwischen den Bindungspositionen der Farbstoffe,  $\Delta_{bp}$ , bestimmt wird. Die Ergebnisse für  $E_T$  in Abhängigkeit von  $\Delta_{bp}$  können dann mit Gl. 4.2-5 angepasst werden. Ein auf diesem Prinzip beruhendes Verfahren wurde bereits von Clegg und Jares-Erijman beschrieben (Clegg, 1992; Clegg, 1993; Jares-Erijman, 1996).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Oligonukleotide nehmen in Lösung die B-DNS-Struktur an, d.h. der Abstand zwischen zwei Basen beträgt  $z_{bp} = 3,4 \text{ \AA}$  und der Winkel zwischen zwei Basen  $\phi_{bp} = 36^\circ$  (Cantor, 1980a). Um die Zahl der Parameter der Anpassung weiter zu verringern, wurden neben  $z_{bp}$  und  $\phi_{bp}$  auch in der Regel  $R_0$  bei der Anpassung festgehalten.  $R_0$  wurde zuvor als molekülspezifischer Wert des Donor-Akzeptorpaars bestimmt. Mit dem Programm *Hyperchem* wurde die Orientierung der Bindungen beider Farbstoffe ausgehend von der Helixachse und damit die Größenordnung von  $\Psi$  abgeschätzt.

#### 4.2.1 Variation des Abstandes von Donor- und Akzeptorfarbstoff

Es soll untersucht werden, ob die beiden beobachteten Zustände A und B von Rh6G an C1 (s. Kap. 4.1.3), die unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie zeigen, Fluoreszenzlöschung durch Energietransfer aufweisen.

Dazu wurde die Sequenz C1 leicht variiert, um bei  $\Delta_{bp} = 4, 8, 11$  und  $16$  einen Akzeptorfarbstoff in der Gegensequenz anbinden zu können. Diese Sequenz wird als C1M (s. Anhang D) bezeichnet. Als Donorfarbstoff wurde das 5-Isomer von Rh6G eingesetzt und über einen  $C_6$ -Linker an das 5'-Ende der C1M-Sequenz gebunden. Die letzten fünf Basen von C1M sind identisch zu C1, so dass die Mikroumgebung für Rh6G an beiden Oligonukleotiden identisch ist.

Mit Hilfe von Absorptions- und stationären Fluoreszenzspektren der Donor-haltigen Probe, D, der Akzeptor-haltigen Probe, A, und des Oligonukleotids mit beiden Farbstoffen, D(A), kann mit den in Kap. 3.2 vorgestellten Methoden die Transfereffizienz  $E_T$  bzw. der Abstand  $R_{DA}$  der D(A)-Probe ermittelt werden. Die Ergebnisse aus den stationären Verfahren nach Clegg und Jares-Erijman (Kap. 3.2.3.3) sind in Abb. 4.2-3 dargestellt. Die Anpassung der Werte erfolgte nach Gl. 4.2-5.

Mit der geringen Quantenausbeute von D,  $\Phi_{FD} = 0,13$ , wird für den Försterabstand  $R_0 = 46 \text{ \AA}$  erhalten und bei der Anpassung auf diesen Wert festgehalten. Da für die Anpassung der vier Parameter  $L$ ,  $r_A$ ,  $r_D$  und  $\Psi$  nur wenige Datenpunkte zur Verfügung stehen, soll das Ergebnis der Anpassung nur qualitativ diskutiert werden (Um eine bessere Anpassung zu erzielen, wurden zusätzlich die Werte  $E_T(\Delta_{bp}=0) = 1$  und  $E_T(\Delta_{bp}=40) = 0$  verwendet).

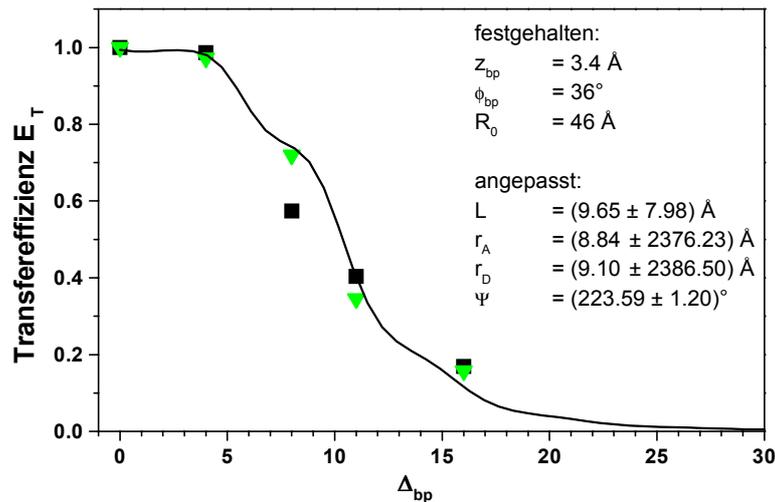


Abb. 4.2-3: Effizienzen des Energietransfers der Oligonukleotide C1M in Abhängigkeit von  $\Delta_{bp}$ , erhalten aus stationären Messungen nach Clegg (Kap. 3.2, Quadrate) und nach Jares-Erijman (Kap. 3.2, Dreiecke). Als Donorfarbstoff wurde Rh6G und als Akzeptorfarbstoff Cy5 eingesetzt.

Aufgrund des geringen Datenumfangs sind die relativen Fehler der angepassten Parameter sehr groß. Die Abstände  $z_D$  und  $z_A$  sind in der verwendeten Berechnung von  $E_T$  im Parameter  $L$  ( $L = z_D + z_A$ ) zusammengefaßt, so dass man keinen Eindruck davon erhält, welchen Abstand jeder Farbstoff entlang der  $z$ -Achse des DNS-Zylinders zu der Base hat, an die er gebunden ist. Aus Gl. 4.2-2 geht hervor, dass die Werte von  $r_A$  und  $r_D$  stark voneinander abhängig sind (hohe Werte der Kovarianz), so dass keine Strukturaussage über die Farbstoffe an der DNS anhand dieser Werte getroffen werden kann. Der Wert für  $\Psi$  von  $227^\circ$  deutet auf eine Abweichung vom erwarteten Wert  $180^\circ$  hin, der für den Fall gilt, dass beide Farbstoffe an den Phosphatgruppen der komplementären Basen desselben Basenpaars gebunden sind und in völlig entgegengesetzte Richtung von der Nukleinsäure weisen. Der Grund dafür kann die Orientierung der Phosphatgruppe am 5'-Ende sein, so dass ein Farbstoff weiter in Gangrichtung geschoben wird.

In Abb. 4.2-4 sind die Korrelationskurven der Messungen dieser Oligonukleotide dargestellt und in Tab. 4.2-1 die Ergebnisse der Kurvenanpassung aus der Korrelation der „grünen“ Detektionssignale zusammengefaßt.

Die Messungen von C1-Rh6G/C1-GSZ (Kap. 4.1.3.1) und von C1M-Rh6G/C1M-GSZ sind nur bedingt vergleichbar, da für die FRET-Studien eine andere Anregungswellenlänge gewählt wurde (s. Abb. 4.2-4). Bei vergleichbaren Anregungsleistungsdichten zeigt Rh6G in C1M-Rh6G/C1M-GSZ eine geringere anregungsabhängige Tripletamplitude am C1-Oligonukleotid. Dabei, wie auch bei den Proben mit  $\Delta_{bp} = 8, 11$  und  $16$  wurde dieser Bunchingterm mit einer Verteilung um den Wert  $\beta$  angepasst, der einem gestreckten exponentiellen Zerfall des Tripletzustands entspricht. Die verwendete Oligonukleotidsequenz wurde im Vergleich zu C1 leicht variiert. Diese Abweichung kann dabei für diesen Effekt verantwortlich sein, da ein gestreckter Zerfall bei den FCS-Ensemblemessungen von C1-Rh6G/C1-GSZ nicht beobachtet wurde.

Sowohl bei der Donor-Probe als auch bei der Probe D(A), bei dem der Basenpaarunterschied  $\Delta_{bp} = 4$  beträgt, tritt ein zweiter Bunchingterm auf, der auf Löschung durch Komplexbildung zurückgeführt werden kann. Bei der D-Probe entspricht das dem bereits diskutierten Verhalten (s. Kap. 4.1.3.1), indem der Farbstoff zwei Zustände mit verschiedener Fluoreszenzlöschung besitzt. Bei der D(A)-Probe kann die Ursache darin bestehen, dass die Farbstoffe aufgrund des geringen Abstands miteinander kollidieren; dies kann zur Löschung der Rh6G-Fluoreszenz aufgrund von statischer Löschung führen.

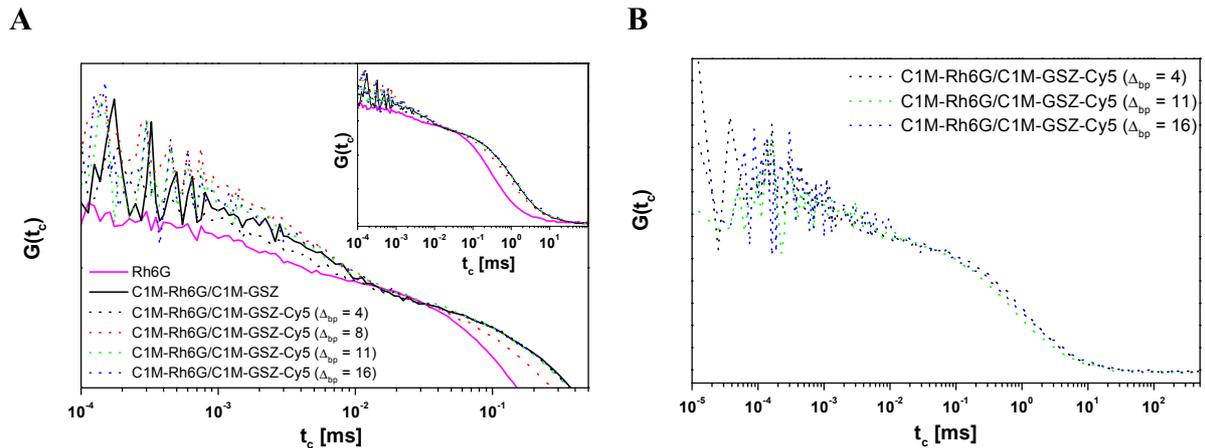


Abb. 4.2-4: Normierte Korrelationskurven der C1M-Oligonukleotide mit Rh6G als Donorfarbstoff und Cy5 als Akzeptorfarbstoff. Dabei beträgt  $\Delta_{bp}$  4, 8, 11 und 16. Die gepunkteten Linien geben die Kurven der D(A)-Proben wieder. **(A)** FCS-Kurven aus Korrelation der „grünen“ Photonen (Kanäle 2 und 4). Das *Inset* zeigt dieselben Korrelationkurven mit vergrößerter Zeitskala. **(B)** FCS-Kurven aus Korrelation der „roten“ Detektionssignale (Kanäle 1 und 3). Messbedingungen: Gepulste Anregung bei  $\lambda_{EX} = 515$  nm,  $I = 93$  kW cm<sup>-2</sup>,  $\omega_0 = 0,6$   $\mu$ m,  $z_0 = 1,3$   $\mu$ m,  $V_D = 3$  fl, Fluoreszenzfilter HQ575/70 und HQ730/140, Strahlteiler 510DCLP und 620DCXR.

**Tab. 4.2-1: Ergebnisse aus den Anpassungen der Korrelationskurven der C1M-Oligonukleotide mit verschiedenen Abständen zwischen Rh6G, dem Donor, und Cy5, dem Akzeptor.**

	$t_D$ [ms]	$t_1$ [ $\mu$ s]	$A_1$	$\beta$	$t_2$ [ $\mu$ s]	$A_2$	$k_T$ [10 <sup>5</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_{ISC}$ [10 <sup>6</sup> s <sup>-1</sup> ]
Rh6G	0,319	2,08	0,135	-	-	-	4,16	0,26
C1M-Rh6G/C1M-GSZ	1,345	5,97	0,057	0,133	0,385	0,55	1,58	0,04
C1M-Rh6G/C1M-GSZ ( $\Delta_{bp} = 4$ )	1,061	7,78	0,198	-	0,319	0,11	1,03	0,09
C1M-Rh6G/C1M-GSZ ( $\Delta_{bp} = 8$ )	0,783	3,64	0,373	0,534	-	-	1,72	0,36
C1M-Rh6G/C1M-GSZ ( $\Delta_{bp} = 11$ )	1,046	4,17	0,330	0,529	-	-	1,61	0,31
C1M-Rh6G/C1M-GSZ ( $\Delta_{bp} = 16$ )	1,115	4,86	0,318	0,584	-	-	1,40	0,26

Messbedingungen: s. Abb. 4.2-4.

#### 4.2.1.1 Einzelmolekülmessungen

Da in den Einzelmolekülmessungen von Rh6G am Oligonukleotid C1 zwei Zustände mit unterschiedlicher Fluoreszenzlöschung beobachtet werden, kann ebenfalls nur mit MFD die Frage geklärt werden, wieviele Zustände mit Fluoreszenzenergie transfer identifiziert werden

können, wenn Energie via FRET von Rh6G auf Cy5 am Oligonukleotid übertragen werden kann.

In den Einzelmolekülmessungen (Abb. 4.2-5) zeigt sich für C1M-Rh6G/C1M-GSZ ein ähnliches Bild wie bei C1-Rh6G/C1-GSZ: Es treten zwei Populationen im 2D-Histogramm von  $\tau_G$  gegen  $r_G$  auf (Abb. 4.2-5A), eine mit einer relativ schmalen Verteilung um  $\tau_G \sim 1,5$  ns (Population A) und eine breite Verteilung bei  $\tau_G > 4$  ns (Population B). Die Rotationskorrelationszeit liegt bei 2 ns. In Abb. 4.2-5B ist die Transfereffizienz  $E_T$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer dargestellt. Da kein Energietransfer auftritt, weisen die Populationen einen Wert der Transfereffizienz nahe bei 0 auf. Diese zwei Populationen werden im Folgenden als Donor-Zustände bezeichnet.

In den Histogrammen der Darstellung von  $E_T$  gegen  $\tau_{D(A)}$  der doppelt-markierten Proben ist erkennbar, dass in den Populationen, die Energietransfer aufweisen, die Transfereffizienz - wie erwartet - mit der Zunahme von  $\Delta_{bp}$  abnimmt.

In allen doppelt-markierten Proben (D(A)-Proben) ist neben den Molekülen mit Energietransfer ein nicht zu vernachlässigender Anteil von Molekülen vorhanden, die dieselben Fluoreszenzeigenschaften aufweisen wie die Proben, die nur Donorfarbstoff enthalten (D-Proben). Das Vorhandensein dieser Moleküle ist auf einen Markierungsgrad von Donor- bzw. Akzeptorfarbstoff kleiner als 1 zurückzuführen.

Im Folgenden wird die Darstellung der Histogramme des Abstands  $R_{DA}$  gegenüber den Histogrammen der Transfereffizienz  $E_T$  (Abb. 4.2-6) aus zwei Gründen bevorzugt. Zum einen gibt die Verteilung um einen Abstandsmittelwert die gewünschte Strukturinformation direkt wieder und zum anderen können Fehler aufgrund der fehlerbehafteten Größe der Donorquantenausbeute ausgeschlossen werden, da die Bestimmung von  $R_{DA}$  mit Hilfe des reduzierten Försterradius  $R_{0r}$  durchgeführt wird.

Gemäß Gl. 2.4-35 kann für ein Einzelmolekülereignis eines Donormoleküls ein Wert für  $R_{DA}$  bestimmt werden, da er über die Intensitäten in den „grünen“ und „roten“ Detektionskanälen bestimmt wird. Die Intensitäten des Streulichtsignals in den „grünen“ und „roten“ Kanälen folgen einer Poisson-Verteilung, so dass im Diagramm die Einzelmolekülereignisse dargestellt werden, die bei der Berechnung der Akzeptorfluoreszenz  $F_A$  nach Gl. 2.4-32 eine Intensität  $S_R > B_R$  aufweisen. Diese Ereignisse geben einen maximal bestimmbaren Abstand  $R_{DA(max)}$  für die Messung an. Dieser Wert ist abhängig von den verwendeten Farbstoffen und den Versuchsbedingungen.

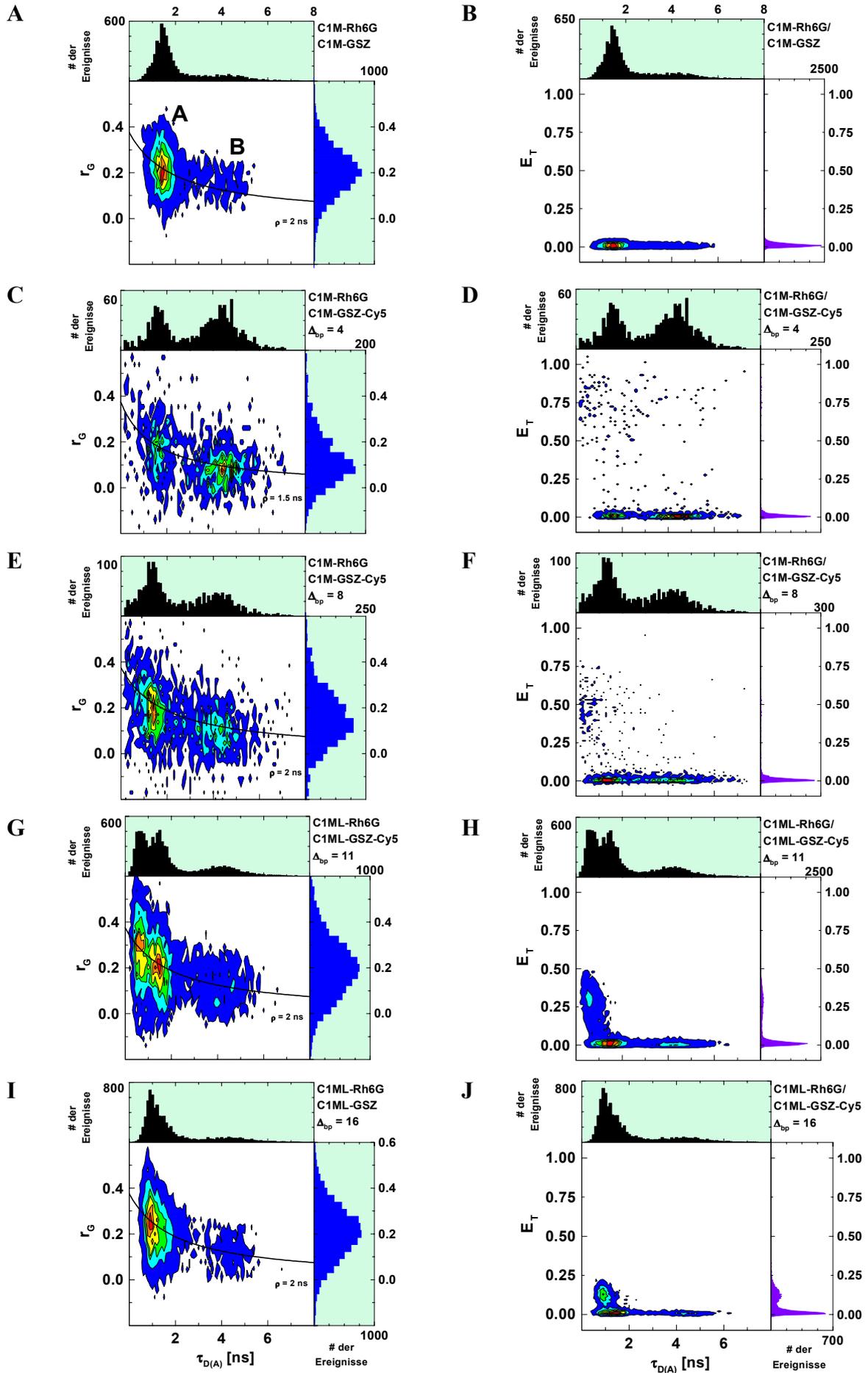


Abb. 4.2-5: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen der Farbstoffe Rh6G und Cy5 am Oligonukleotid C1M /C1M-GSZ bzw. C1ML/C1ML-GSZ mit Basenpaarabständen von  $\Delta_{bp} = 4, 8, 11$  und  $16$ . Dargestellt sind die Histogramme nach Signalspitzen-orientierter Analyse der Anisotropie  $r_G$  (A, C, E, G, I) bzw. der Transfereffizienz  $E_T$  (B, D, F, H, J) gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)}$ . Messbedingungen: s. Abb. 4.2-4.

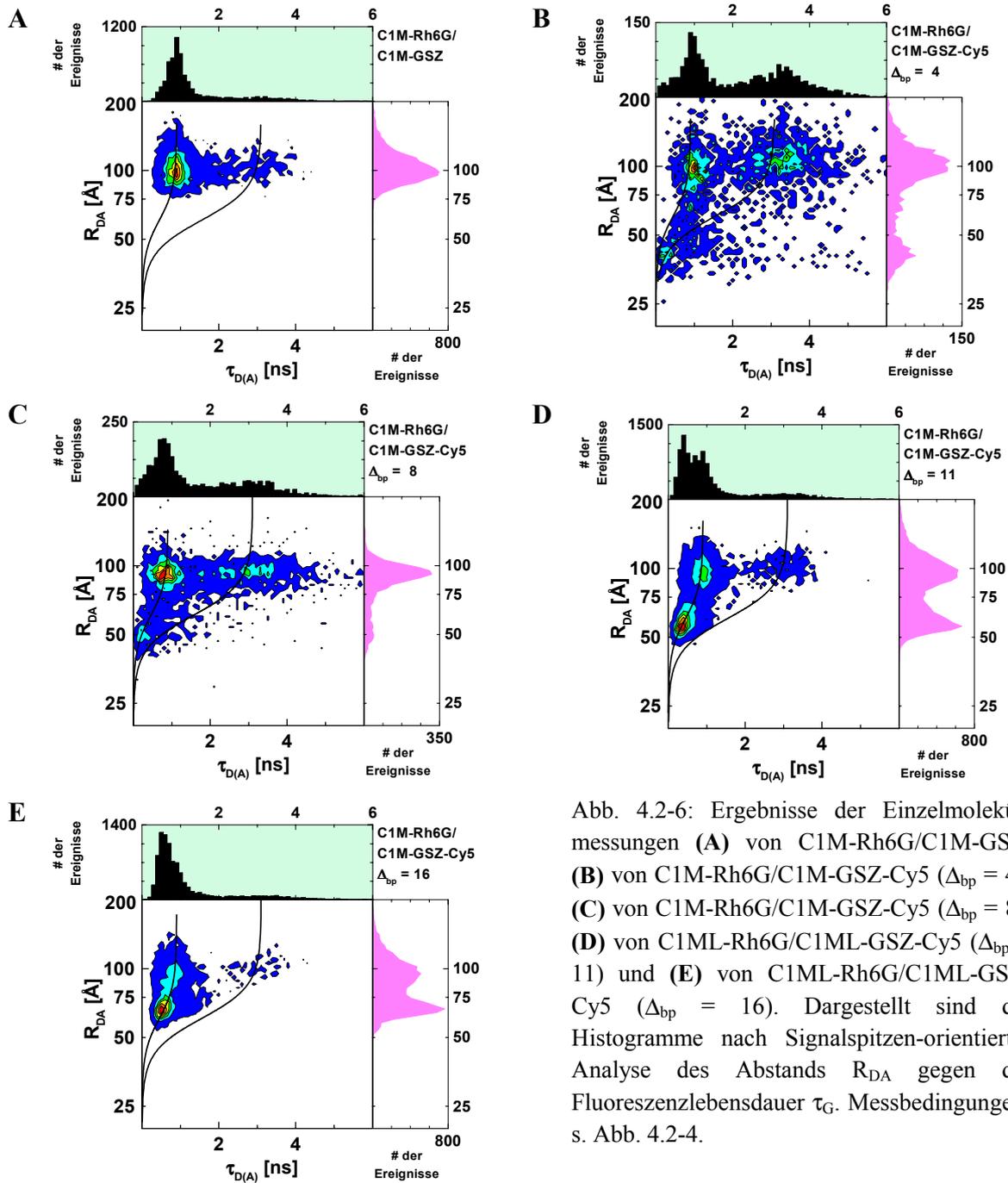


Abb. 4.2-6: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen (A) von C1M-Rh6G/C1M-GSZ, (B) von C1M-Rh6G/C1M-GSZ-Cy5 ( $\Delta_{bp} = 4$ ), (C) von C1M-Rh6G/C1M-GSZ-Cy5 ( $\Delta_{bp} = 8$ ), (D) von C1ML-Rh6G/C1ML-GSZ-Cy5 ( $\Delta_{bp} = 11$ ) und (E) von C1ML-Rh6G/C1ML-GSZ-Cy5 ( $\Delta_{bp} = 16$ ). Dargestellt sind die Histogramme nach Signalspitzen-orientierter Analyse des Abstands  $R_{DA}$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_G$ . Messbedingungen: s. Abb. 4.2-4.

Die schwarzen Kurven in Abb. 4.2-6 stellen gemäß Gl. 3.2-18 die Linien dar, entlang derer die FRET-aktiven Moleküle im 2D-Histogramm bei Änderung der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)}$  beobachtet werden mit bei einem konstantem Wert von  $k_{D(0)}$ . Da zwei Donorpopulationen vorliegen, gibt es auch zwei Kurven. Die Werte von  $k_{D(0)}$  sind für die beiden Populationen A und B in Abb. 3.1-9 und 4.1-14B und -14C ermittelt worden. Für die Population A betragen sie:  $k_{D(0)} = 5,8 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$  und  $\tau_{av}^x = \tau_{D(0)} = 0,9 \text{ ns}$ ; und für die

Population B  $k_{D(0)} = 1,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  und  $\tau_{av}^x = \tau_{D(0)} = 3,1 \text{ ns}$ . Der Wert für den reduzierten Försterradius  $R_{0r}$  zur Berechnung der schwarzen Kurven beträgt  $67,6 \text{ \AA}$ .

In den Histogrammen von Abb. 4.2-6 zeigen die Zustände A und B der Donor-Probe als maximalen Abstandswert für die Abstandsbestimmung in einer D(A)-Probe einen Wert von  $R_{DA(max)} = 101 \text{ \AA}$  an. Dieser Wert gilt für die gewählten Messbedingungen wie Wahl der optischen Filter, Anregungsleistungsdichte und das verwendete Farbstoffpaar Rh6G und Cy5. Aus den Histogrammen des Abstands  $R_{DA}$  gegen  $\tau_{D(A)}$  der doppelt-markierten Proben ist ersichtlich, dass in den Populationen, die Energietransfer aufweisen, der Abstand -wie erwartet - mit der Zunahme von  $\Delta_{bp}$  abnimmt.

*Bei den Ergebnissen aller D(A)-Proben kann auch unter Zuhilfenahme von  $F_D/F_A$  (Anhang F) nicht ausgeschlossen werden, dass zwei FRET-aktive Zustände beobachtet werden.  $F_D/F_A$  ist hierfür besser geeignet als  $R_{DA}$ , da hier die fehlerbehafteten Größen der Quantenausbeuten nicht berücksichtigt werden wie im Fall von  $R_{DA}$ .*

*Es sind daher drei Möglichkeiten denkbar.*

*Zum einen tritt nur ein FRET-aktiver Zustand auf. Dies deutet auf eine ungünstige Orientierung der Übergangsdipolmomente und damit erniedrigte Wahrscheinlichkeit des Energietransfers der einen Population hin.*

*Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass zwei FRET-aktive Zustände auftreten, jedoch die Populationen in den dargestellten Histogrammen zusammenfallen. Dabei nehmen die Übergangsdipolmomente in einem Zustand eine Orientierung ein, die ebenfalls zu einer veränderten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{FRET}$  führen.*

*In beiden Fällen gilt die Annahme des Orientierungsfaktors  $\kappa^2$  mit  $\kappa^2 = 2/3$  nicht mehr.*

*Die letzte Möglichkeit beinhaltet, dass es sich bei der Verbreiterung der deutlich erkennbaren FRET-aktiven Population um eine Verunreinigung der Probe handelt.*

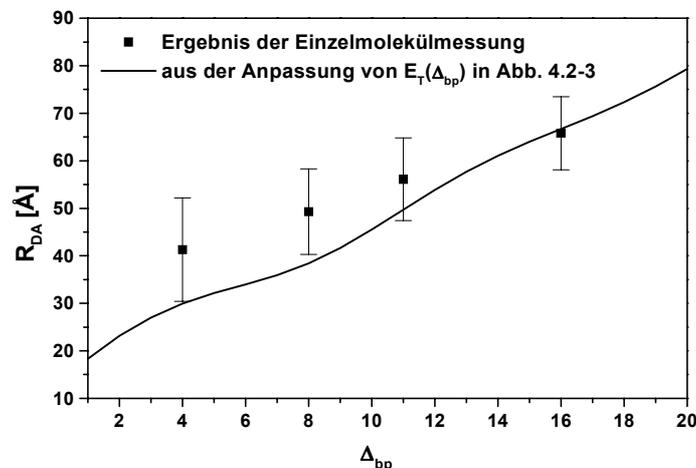


Abb. 4.2-7: Die  $R_{DA}$ -Werte der Einzelmolekülmessungen (schwarze Quadrate) im Vergleich mit der Kurve aus der Anpassung der Ergebnisse der Ensemblemessungen. Die Parameter zur Berechnung von  $R_{DA}(\Delta_{bp})$  sind in Abb. 4.2-3 angegeben und folgen Gl. 4.2-5 und Gl. 2.3-36.

In Abb. 4.2-7 sind die Abstandswerte der Populationen, die den Energietransfer von Rh6G nach Cy5 widerspiegeln, als Funktion des Basenpaarunterschiedes dargestellt. Die angegebenen Fehler entsprechen der Varianz aus einer Gaußanpassung im 1D-Abstandshistogramm.

*Beim Vergleich der Ergebnisse (Abb. 4.2-7) aus den Einzelmolekülmessungen mit den Werten der Ensemblemessungen wird deutlich, dass die Abstandswerte, die aus den Experimenten im Molekülensemble erhalten werden, geringer sind als die der Einzelmolekülexperimente.*

*Dabei nimmt die Abweichung der Werte aus beiden Methoden mit Zunahme von  $\Delta_{bp}$  ab. Ursache hierfür ist die Existenz der zwei Donor-Populationen mit einem mittleren Wert des Energietransfers von  $E_T = 0$ .*

*An dieser Stelle wird ein weiterer Vorteil der MFD-Technik deutlich: Verunreinigungen durch eine ungenügende Markierung der Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoff können bei der Abstandsberechnung herausgefiltert werden, so dass eine zusätzliche chemische Aufreinigung der Probe entfallen kann. Durch die Einzelmolekülmessung wird somit eine fehlerhafte Bestimmung des Donor-Akzeptor-Abstands aufgrund von Verunreinigungen vermieden.*

*Durch den Einsatz von MFD ist es somit gelungen, neben der Information über zwei verschiedene Zustände des Donorfarbstoffs am Oligonukleotid, den Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff nur von den FRET-aktiven Populationen zu bestimmen.*

#### **4.2.2 Die cis-trans-Isomerisierung von Cy5**

Mit Hilfe von FCS kann die FRET-Effizienz bei Cy5 auf zwei verschiedene Arten bestimmt werden (Widengren, 2001): Zum einen durch die Verwendung der Akzeptor-Zählrate (Zählrate pro Molekül in den „roten“ Detektionskanälen) und zum anderen durch Verwendung der cis-trans-Isomerisierung von Cy5, die im Bunchingterm im  $\mu\text{s}$ -Bereich auftritt. Die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung ist proportional zur Anregung des Akzeptors und damit proportional zum Energietransfer.

In diesem Fall wurde Alexa488 als Donorfluorophor eingesetzt zur Untersuchung des Energietransfers an Oligonukleotiden. Cy5 ist als Akzeptor beibehalten worden und an das 5'-Ende des Oligonukleotids gebunden. Die Position des Alexa488 in der Gegensequenz wird variiert (Änderung von  $\Delta_{bp}$ ). Diese Studie wurde mit der HD1-Sequenz durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse kurz vorgestellt.

Für die beiden Isomeren des Cyaninfarbstoffs wurden unterschiedliche Werte für  $r_A$  und  $L$  gefunden. Aufgrund der beiden FCS-Methoden zur Bestimmung des Energietransfers kann ein Modell (Abb. 4.2-8) vorgeschlagen werden, wie sich der Farbstoff Cy5 am 5'-Ende des Oligonukleotids (mit Alexa488 als Donor) verhält.

Die trans-Form ist dadurch charakterisiert, dass sich das Stickstoffatom, welches nicht den Linker trägt, näher an der DNS aufhält, als seine benachbarte Sulfonsäuregruppe. Die Partiallandungen am Stickstoff und der Phosphatgruppe ziehen sich gegenseitig an und

bewirken eine Positionierung des trans-Isomers dicht am DNS-Molekül. Das cis-Isomer ist dadurch gekennzeichnet, dass sich das Stickstoffatom im Vergleich zu der Sulfonsäuregruppe weiter entfernt von der DNS aufhält, da sich die Ladungen der Sulfonsäuregruppe und einer Phosphatgruppe abstoßen.

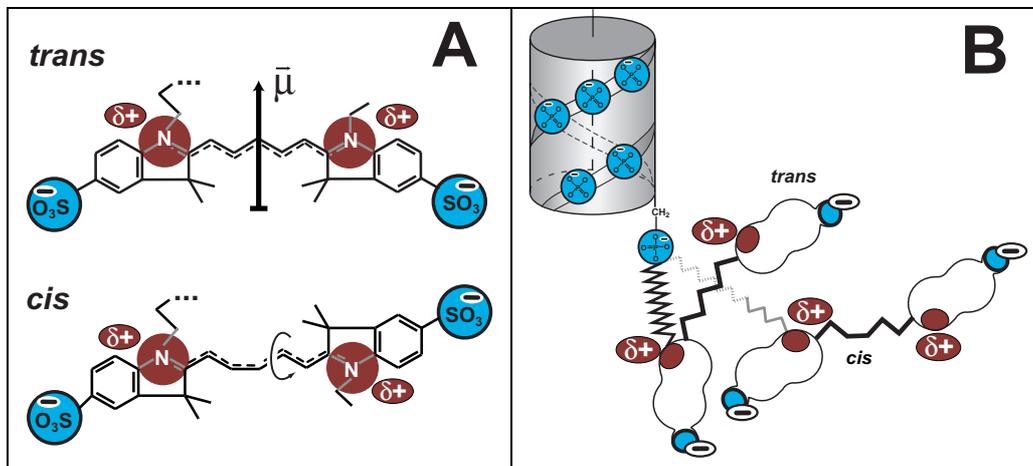


Abb. 4.2-8: (A) Die cis- und trans-Form von Cy5. (B) Schema der beiden Cy5-Konformationen gebunden an die 5'-Position eines Oligonukleotids (Sequenz HD1).

Die Ergebnisse zeigen, dass neben der Einzelmolekülspektroskopie mit MFD die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie wertvolle Informationen bei Untersuchungen von Energietransfer an Oligonukleotiden liefert. Im Fall des Akzeptorfarbstoffs Cy5 kann mit zwei Bestimmungsmethoden Energietransfer zwischen dem cis- und dem trans-Isomer unterschieden werden, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur verschieden am Oligonukleotid verhalten.

#### 4.2.3 Verwendung verschiedener Akzeptorfarbstoffe

Im folgenden Abschnitt werden FRET-Untersuchungen mit den verschiedenen „roten“ Farbstoffen (Kap. 4.1.3.2) bei gleichem Donorfarbstoff (Alexa488) und jeweils gleichem Basenpaarunterschied ( $\Delta_{bp} = 9$ ) gezeigt.

In Tab. 4.2-3 sind die Wellenlängen der Anregung und der Detektion der Proben angegeben, die bei den stationären Methoden zur Untersuchung des Energietransfers verwendet werden.

**Tab. 4.2-2: Anregungswellenlängen ( $\lambda'$ ,  $\lambda''$ ) und Wellenlängen der Fluoreszenzmaxima ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ) zur Berechnung der Transfereffizienz basierend auf Absorptions- und stationären Fluoreszenzspektren.**

Donor	Akzeptor	$\lambda'$ [nm]	$\lambda''$ [nm]	$\lambda_1$ [nm]	$\lambda_2$ [nm]	$\gamma_A$
Alexa488	Bodipy650	496	647	520	670	0,0112
Alexa488	Cy5	496	647	520	670	0,0047
Alexa488	LCR640	496	594	520	635	0,0361
Alexa488	MR200	496	594	520	635	0,0529

Der Parameter  $\gamma_A$  gibt das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten des Akzeptorfarbstoffes bei  $\lambda'$  zu  $\lambda''$ ,  $\epsilon_A(\lambda'')/\epsilon_A(\lambda')$ , an.

In Tab. 4.2-3 sind die Ergebnisse der Effizienz- und Abstandsbestimmungen von Alexa488 mit den roten Farbstoffen Bodipy650, Cy5, LCR640 und MR200 aufgelistet. Darüber hinaus wurden die Werte für den Försterabstand  $R_0$ , das Überlappungsintegral  $J$ , und die Quantenausbeute von Donor und Akzeptor im Molekül  $D(A)$  jeweils bei direkter Anregung bestimmt.

Die Bestimmung von  $E_T$  und  $R_{DA}$  wurde mit den Methoden  $(ratio)_A$ ,  $R_A$ ,  $(ratio)_D$  und über die Donorquantenausbeute durchgeführt, die in Kap. 3.2.3 vorgestellt sind. Die Fehler  $\sigma$  von  $E_T$  und  $R_{DA}$  beziehen sich auf den Mittelwert aus den Messergebnissen der Methoden.

Der ermittelte Abstand von Donor und Akzeptor bei den vier Farbstoffkombinationen variiert geringfügig. Die einzige Ausnahme bildet die Probe mit der Kombination Alexa488 und Bodipy650. Der Abstand der Farbstoffe ist geringer als bei den anderen Varianten. Eine mögliche Ursache ist, dass weniger Donor-Moleküle in dieser Probe vorliegen (s. Kap. 4.2.1).

**Tab. 4.2-3: Ergebnisse der stationären Messungen der Oligonukleotide mit Alexa488 als Donorfarbstoff und verschiedenen Akzeptorfarbstoffen.**

Akzeptor	$J$ [ $10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$ ]	$\Phi_{F,D(A)}$	$\Phi_{FA, FRET}$	$R_0$ [Å]	$E_T$	$\sigma(E_T)$	$R_{DA}$ [Å]	$\sigma(R_{DA})$ [Å]
Bodipy650	0,69	0,14	0,61	44,20	0,86	0,03	32,3	1,5
Cy5	1,14	0,21	0,47	48,06	0,76	0,04	39,3	1,5
LCR640	1,22	0,14	0,81	48,62	0,80	0,01	38,5	0,5
MR200(C <sub>3</sub> )	1,36	0,20	0,87	49,49	0,74	0,05	41,5	1,7

Der Försterabstand  $R_0$  wurde mit einem Wert für die Quantenausbeute  $\Phi_{FD}$  von Alexa488 gleich 0,58 berechnet.

In Abb. 4.2-9A und -9C sind die Korrelationskurven der FCS-Ensemblemessungen der Donorfluoreszenz dargestellt. Aus den Kurven ist ersichtlich, dass sich der Donorfarbstoff Alexa488 in den Proben nahezu gleich verhält.

Die FCS-Messungen der Akzeptorfarbstoffe (aus der Korrelation der Fluoreszenzsignale der „roten“ Detektoren) zeigen das schon zuvor beobachtete Verhalten (s. Kap. 4.1.3.2): Alexa633 zeigt eine große Amplitude im  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich, während Bodipy650 nur den Bunchingterm der Diffusion aufweist. Der Term im  $\mu\text{s}$ -Bereich bei Cy5 und RotS reflektiert die cis-trans-Isomerisierung. Die Korrelationskurven der Proben mit LCR640 und MR200 besitzen ebenfalls einen Bunchingterm im  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich. Die Kurve von Sq635 ist im ns- bis  $\mu\text{s}$ -Zeitbereich stark verrauscht.

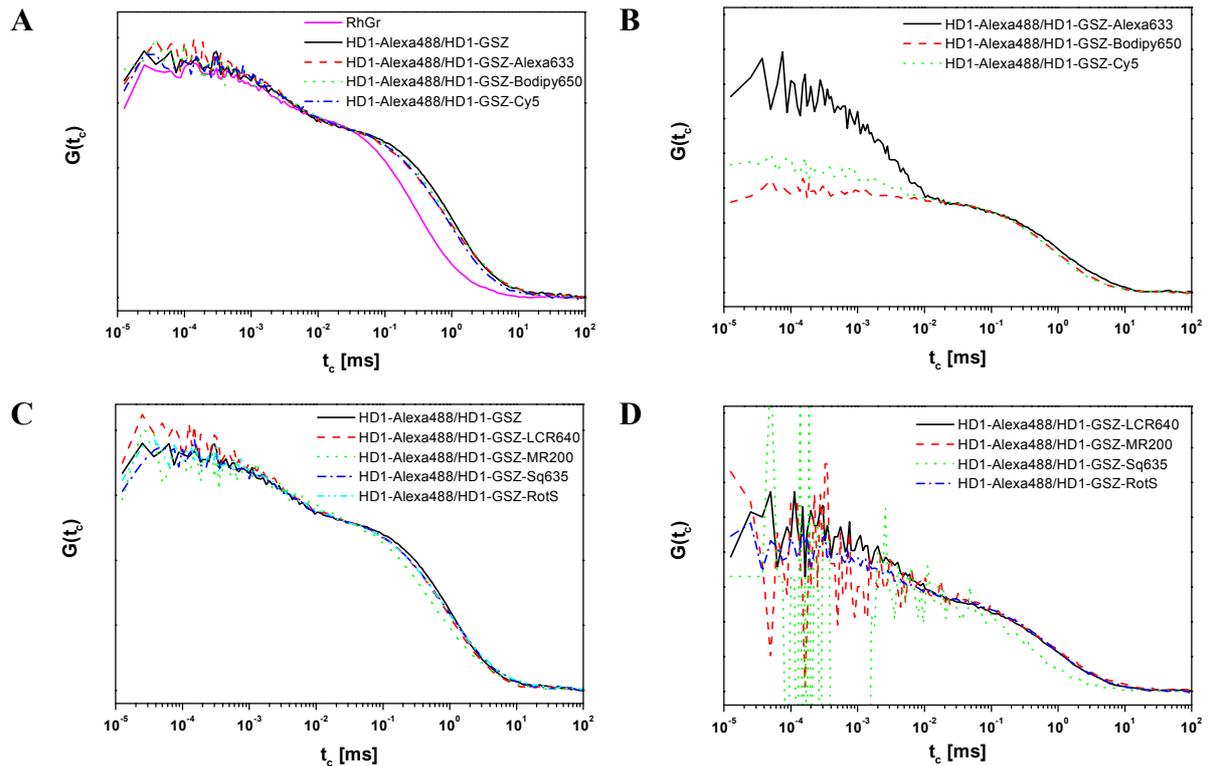


Abb. 4.2-9: Normierte Korrelationskurven der doppelt-markierten Oligonukleotide. In allen Fällen handelt es sich beim Donorfarbstoff um Alexa488 und um  $\Delta_{bp} = 9$ . (A) und (C) zeigen die FCS-Kurven des Donors und (B) und (D) der verschiedenen Akzeptorfarbstoffe. Messbedingungen: Gepulste Anregung bei  $\lambda_{Ex} = 496 \text{ nm}$ ,  $I = 26 \text{ kW cm}^{-2}$ ,  $\omega_0 = 0,6 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 1,1 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = 2 \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ535/50 und HQ730/140, Strahlteiler 488/636PC und 595DCXR.

#### 4.2.3.1 Einzelmolekülmessungen

In Abb. 4.2-10 sind die Histogramme des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)}$  nach Signalspitzen-orientierter Auswertung der Einzelmolekülmessungen dargestellt. In Anhang G sind die Histogramme der übrigen Parameter dargestellt. Die zur Berechnung der Parameter verwendeten Werte sind in Tab. 4.2-4 wiedergegeben.

**Tab. 4.2-4: Korrekturwerte und relative Signalintensität  $F_A$  für die FRET-Untersuchungen mit verschiedenen Akzeptorfarbstoffen (Donor ist Alexa488). Für die Auswertung aller Messungen wurden die Werte  $\Phi_{FD} = 0,58$  und Crosstalk  $\alpha = 0,014$  verwendet.**

	$g_G$	$g_R$	$J$ [ $10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$ ]	$R_{0r}$ [ $\text{\AA}$ ]	$R_0$ [ $\text{\AA}$ ]	$\Phi_{FA}$	rel. „rote“ Signalintensität [%]
Alexa633	0,315	0,196	1,92	57,4	52,4	0,79	90
Bodipy650	0,315	0,461	1,15	52,7	48,1	0,19	46
Cy5	0,315	0,393	1,11	52,4	47,9	0,32	71
LCR640	0,315	0,174	1,42	54,6	49,9	0,60	100
MR200	0,315	0,166	1,34	54,0	49,4	0,74	60
Sq635	0,315	0,221	0,24	40,7	37,2	0,17	33
RotS	0,315	0,508	1,11	52,4	47,8	0,28	43

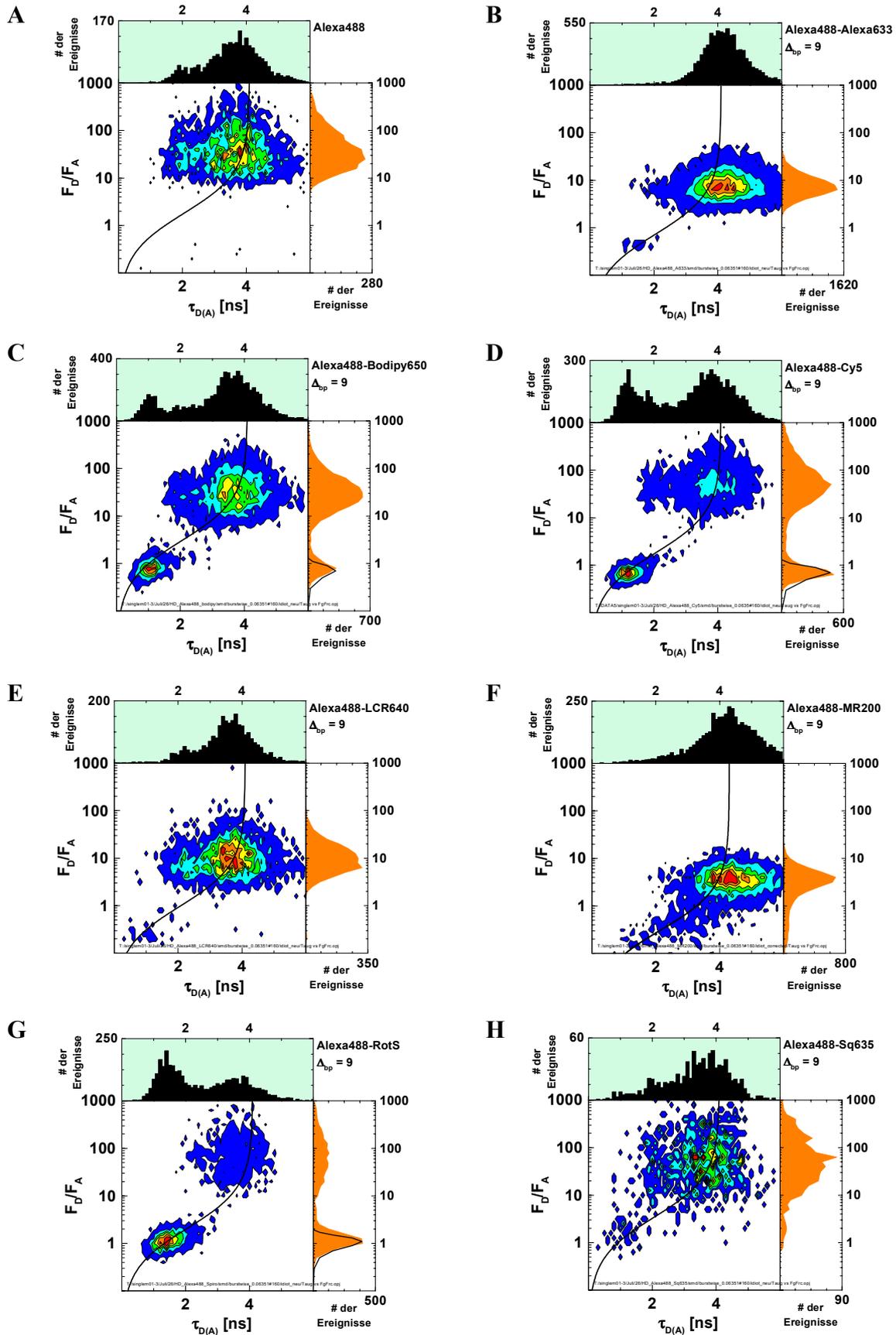


Abb. 4.2-10: Einzelmolekülmessungen der Oligonukleotide mit den Akzeptorfarbstoffen Alexa633 (B), Bodipy650 (C), Cy5 (D), LCR640 (E), MR200 (F), RotS (G) und Sq635 (H) am Oligonukleotid HD1-Alexa488/HD1-GSZ. Der Basenpaarunterschied  $\Delta_{bp}$  beträgt in allen Proben  $\Delta_{bp} = 9$ . Die Probe, die nur den Donorfarbstoff Alexa488 enthält, ist in (A) gezeigt. Dargestellt sind die Histogramme von  $F_D/F_A$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)}$ . Messbedingungen: s. Abb. 4.2-9.

Wie bereits in Kap. 4.1.3.1 beschrieben, zeigt Alexa488 am Oligonukleotid zwei Spezies im mit zwei Lebensdauern, die dann auftreten, wenn der NHS-Ester von Alexa488 eingesetzt wird. Diese zwei Donor-Populationen treten bei den D(A)-Proben ebenfalls auf.

*Beim Vergleich des Intensitätsverhältnisses erkennt man, dass bei den vorliegenden Messbedingungen Bodipy650, Cy5, RotS und Sq635 die höchsten Werte der FRET-aktiven Spezies aufweisen, was auf eine gute Detektion dieser Farbstoffe bei Energietransfer im Vergleich zu den übrigen hinweist. Sq635 zeigt dabei den höchsten Wert, aber auch eine diffuse Verteilung aller auftretenden Spezies. Die anderen drei Farbstoffe besitzen eine Verteilung von  $F_D/F_A$ , die der berechneten Standardabweichung entspricht.*

*Die stark verschobenen Verteilungen der übrigen Proben (Alexa633, LCR640, MR200) deuten auf fehlerhafte Bestimmung der Detektionseffizienzen hin. Daher muss die Methode der Berechnung von  $g_G$  und  $g_R$  zukünftig modifiziert werden.*

*Beim Vergleich der roten Fluoreszenzintensität  $F_A$  der Proben mit gleichem Basenpaarunterschied zeigt LCR640 bei den vorliegenden Messbedingungen die höchste Intensität gefolgt von Alexa633 und Cy5.*

#### **4.2.4 Vergleich von verschiedenen Donor-Akzeptorpaaren**

Im folgenden Kapitel werden im Rahmen der FRET-Untersuchungen vier verschiedene Donor-Akzeptorpaare verwendet mit je drei verschiedenen Bindungsabständen am Oligonukleotid ( $\Delta_{bp} = 9, 13$  und  $17$ ). Dabei sollte geprüft werden, ob bei Mischung verschiedener Proben ein Einzelmolekülereignis eindeutig einer Oligonukleotid-Probe zugeordnet werden kann. Dazu wurden Versuchsbedingungen und die Farbstoffe so gewählt, dass alle Messungen bei gleicher Anregungswellenlänge und mit dem gleichen Filtersatz durchgeführt werden. Darüberhinaus wurden die Ergebnisse der Einzelmolekülmessung der Farbstoffpaare miteinander verglichen, um mögliche strukturelle Unterschiede der Farbstoffe am Oligonukleotid aufzuklären.

Die Hybridisierung und Messung der Oligonukleotide mit der Sequenz MI (s. Anhang D) wurden bei einer  $MgCl_2$ -Konzentration von  $2 \text{ mM}$  durchgeführt. Mit einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von  $50 \text{ }\mu\text{M}$  - wie bisher verwendet - lagen bei den Messkonzentrationen von  $\sim 10^{-12} \text{ M}$  die Stränge anscheinend nur ungenügend hybridisiert vor. Dies wird sichtbar an der Verteilung der Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer (Ergebnisse nicht dargestellt): bei niedriger  $Mg^{2+}$ -Konzentration zeigt eine doppeltmarkierte Probe eine sehr breite Verteilung der Fluoreszenzlebensdauer, die sich bei Zugabe von  $Mg^{2+}$  in Verteilungen um zwei Maxima ändert; eine lange Fluoreszenzdauer des Probenanteils, der nur mit Donorfarbstoff markiert ist, und eine kurze Fluoreszenzdauer aufgrund der Löschung durch Energietransfer.

#### 4.2.4.1 Einzelmolekülmessungen

In Abb. 4.2-11 sind die Ergebnisse aus den Einzelmolekülmessungen von allen 12 Proben addiert worden. Da diese nur qualitativ betrachtet werden, wurde nicht berücksichtigt, dass gleich viele Ereignisse von jeder Probe gezählt wurden.

Man erkennt in der Darstellung von  $S_R$  gegen  $S_G$  (Abb. 4.2-11A) ein Maximum in den Histogrammen bei  $S_G = 48,4$  kHz und  $S_R = 4,2$  kHz. Hierbei handelt es sich wie zuvor beobachtet um einen relativ großen Anteil an der Donor-Population, sowohl von Cy3 als auch von Rh6G an MI/MI-GSZ. Im 1D-Histogramm der „roten“ Intensität ist noch eine Schulter erkennbar, die auf FRET hindeutet. Anhand dieser Darstellung kann nicht vermutet werden, dass es sich um 12 verschiedene Proben handelt.

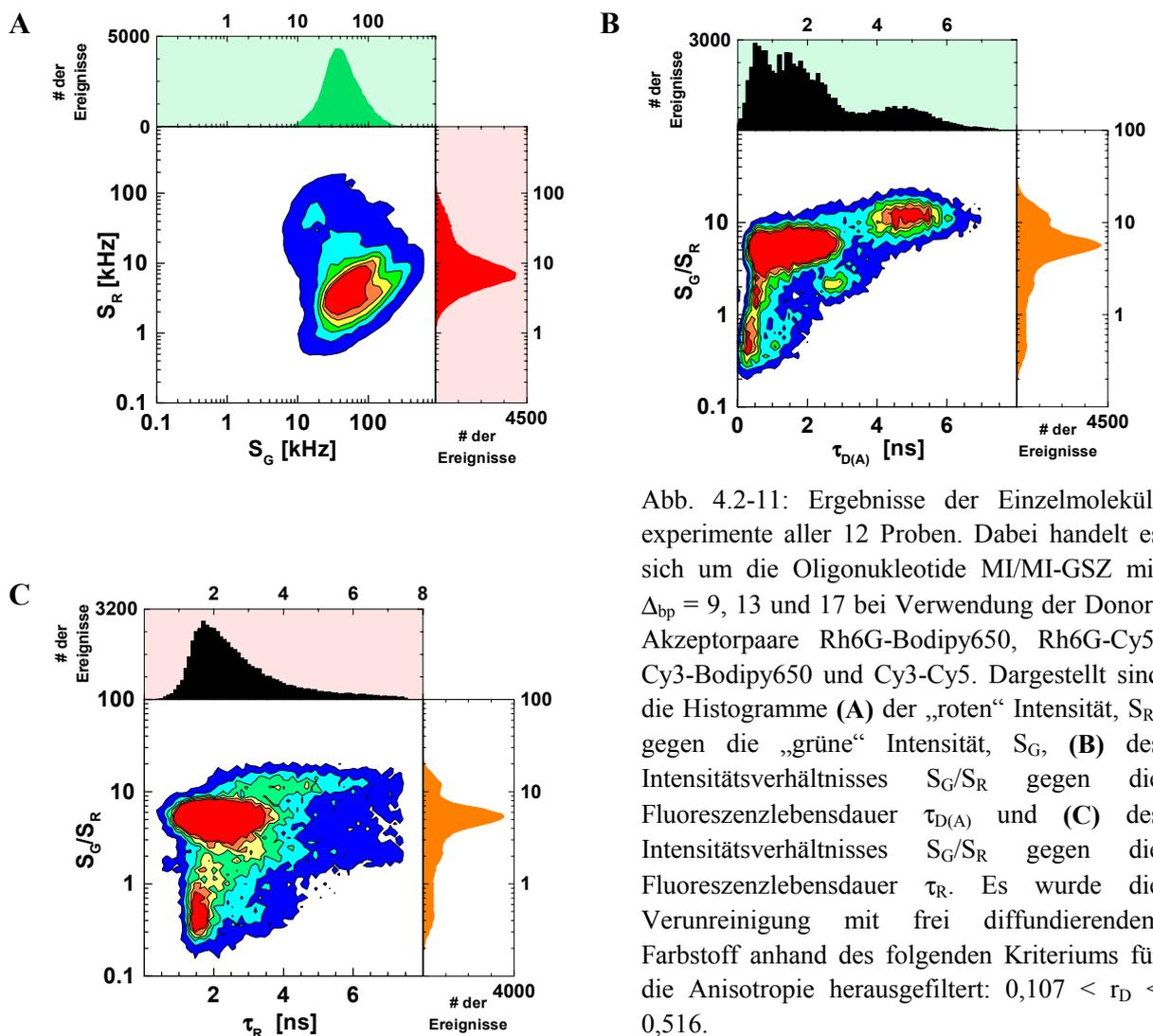


Abb. 4.2-11: Ergebnisse der Einzelmolekülexperimente aller 12 Proben. Dabei handelt es sich um die Oligonukleotide MI/MI-GSZ mit  $\Delta_{bp} = 9, 13$  und  $17$  bei Verwendung der Donor-Akzeptorpaare Rh6G-Bodipy650, Rh6G-Cy5, Cy3-Bodipy650 und Cy3-Cy5. Dargestellt sind die Histogramme (A) der „roten“ Intensität,  $S_R$ , gegen die „grüne“ Intensität,  $S_G$ , (B) des Intensitätsverhältnisses  $S_G/S_R$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)}$  und (C) des Intensitätsverhältnisses  $S_G/S_R$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_R$ . Es wurde die Verunreinigung mit frei diffundierendem Farbstoff anhand des folgenden Kriteriums für die Anisotropie herausgefiltert:  $0,107 < r_D < 0,516$ .

In der Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)}$  bzw.  $\tau_R$  gegen das Intensitätsverhältnis  $S_G/S_R$  (Abb. 4.2-11B und -11C) können bereits mehrere Populationen im 2D-Histogramm unterschieden werden, jedoch nicht 12 verschiedene. Die Darstellung des Intensitätsverhältnisses  $S_G/S_R$  anstelle von  $F_D/F_A$  ist gewählt worden, da hier die verschiedenen Detektionseffizienzen und der *Crosstalk* nicht berücksichtigt werden müssen.

In Abb. 4.2-11B treten am häufigsten zwei Zustände auf mit einem Wert  $\tau_{D(A)} \sim 1,5$  ns bzw.  $\sim 4,8$  ns auf. Diese können den Donor-Populationen von Cy3 bzw. Rh6G zugeordnet werden und treten im Histogramm von  $S_G/S_R$  gegen die „rote“ Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_R$  auf, da die Fluoreszenz des Donorfarbstoffs aufgrund des *Crosstalks* auch in den „roten“ Kanälen detektiert werden kann (Abb. 4.2-11C). Aufgrund des Energietransfers zwischen dem gepulst angeregten Donor und dem Akzeptor ist die „rote“ Fluoreszenzlebensdauer abhängig von der Lebensdauer des Donorfluorophors (Gl. 2.4-40). Diese wird im Rahmen der Auswertung derzeit nicht berücksichtigt und führt zu einer breiten Verteilung von  $\tau_R$  der FRET-aktiven Spezies.

Im 1D-Histogramm von Abb. 4.2-12 erkennt man mehrere Maxima der Verteilung von  $S_G/S_R$ . Diese sind mit mehreren verschiedenen Abständen des Donor-Farbstoffs Rh6G und der Akzeptorfarbstoffe Bodipy650 und Cy5 gleichzusetzen. Neben der in allen Proben auftretenden Donor-Population, angedeutet durch die Ellipse A, können deutlich die Populationen der Proben mit Cy5 erkannt werden (Ellipsen B, C und D). Diese besitzen niedrigere Werte der Fluoreszenzlebensdauer als die Proben mit Bodipy650 (erkennbar die weniger häufig vertretenen Populationen E, F und G), wenn man die Ergebnisse der Messungen in Kap. 4.1.3.2 auf diese FRET-Untersuchungen überträgt.

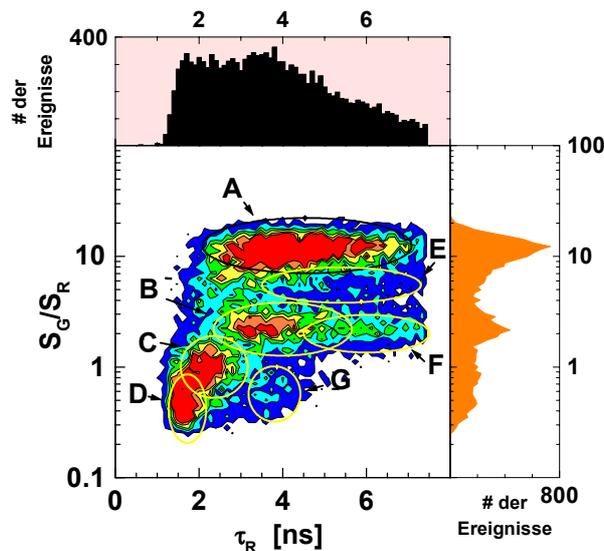


Abb. 4.2-12: Ergebnisse der Einzelmolekülexperimente aller Proben mit Rh6G. Zusätzlich zu den in Abb. 4.2-11 beschriebenen Auswahlkriterien wurden die Ereignisse ausgewählt nach:  $-0,05 \text{ ns} < \tau_{D(A)} < 7,35 \text{ ns}$  und  $5,53 < S_G/S_R < 22,31$ . Die Ellipsen deuten die  $(\tau_{D(A)})$ - $(S_G/S_R)$ -Bereiche der folgenden Proben an: A - *Crosstalk* des Rhodaminsignals, B - Rh6G/Cy5-18b, C - Rh6G/Cy5-14b, D - Rh6G/Cy5-10b, E - Rh6G/Bodipy650-18b, F - Rh6G/Bodipy650-14b und G - Rh6G/Bodipy650-10b.

Ähnliche Beobachtungen werden bei den Proben gemacht, die Cy3 als Donorfarbstoff enthalten (Abb. 4.2-13). Das 1D-Histogramm von  $S_G/S_R$  zeigt jedoch nur ein Maxima bei 5,5 mit zwei Schultern bei einem niedrigeren Verhältnis an, so dass hier nicht auf das Vorhandensein von Populationen verschiedener Abstände geschlossen werden kann. Darüberhinaus besitzt Cy3 eine geringere Fluoreszenzlebensdauer als Rh6G am

Oligonukleotid, so dass die Populationen im 2D-Histogramm von Abb. 4.2-13 grundsätzlich niedrigere Werte der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_R$  aufweisen. Dies hat zur Folge, dass die Populationen enger beieinander liegen als das mit Rh6G als Donor der Fall ist. Da der Fehler von  $\tau$  mit niedrigeren Werten abnimmt, kann trotzdem die Unterscheidung verschiedener Zustände stattfinden.

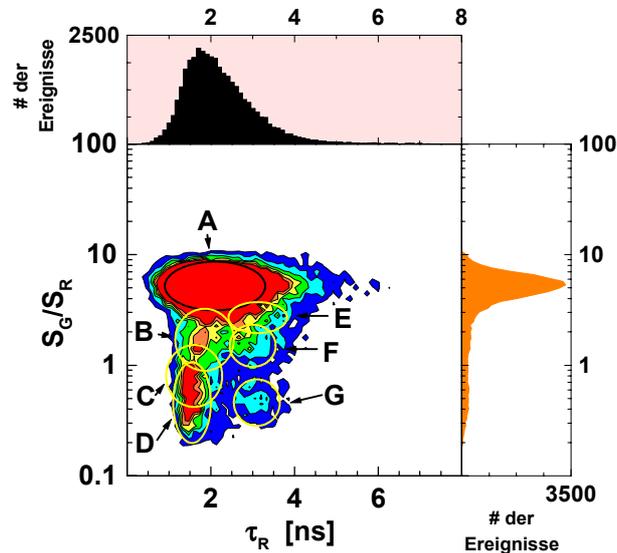


Abb. 4.2-13: Ergebnisse der Einzelmolekülexperimente aller Proben mit Cy3. Die Ereignisse sind ausgewählt nach:  $0,107 < r_D < 0,516$  und  $-0,05 \text{ ns} < \tau_{D(A)} < 7,35 \text{ ns}$  und  $5,53 < S_G/S_R < 22,31$ ). Die Ellipsen deuten die  $(\tau_{D(A)})-(S_G/S_R)$ -Bereiche der folgenden Proben an: A - Crosstalk des Cy3-Signals, B - Cy3/Cy5-18b, C - Cy3/Cy5-14b, D - Cy3/Cy5-10b, E - Cy3/Bodipy650-18b, F - Cy3/Bodipy650-14b und G - Cy3/Bodipy650-10b.

*Das Verhältnis der Intensitäten, aufgenommen von den „grünen“ bzw. „roten“ Detektoren, ist ein wichtiges Hilfsmittel in Kombination mit der Fluoreszenzlebensdauer, um verschiedene Abstände zwischen den Fluorophoren zu unterscheiden.*

*Die Kombination der Parameter Fluoreszenzlebensdauer und Intensitätsverhältnis liefert die Möglichkeit, sechs FRET-aktive Moleküle mit demselben Donorfarbstoff voneinander zu unterscheiden. Diese Unterscheidung wurde aufgrund der Addition von sechs Messergebnissen getroffen; dieses Verfahren muss aber noch mit einem einzigen Versuch durch Mischung der einzelnen Proben in Lösung getestet werden. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass keine Korrektur (Detektionseffizienzen und Crosstalk) durchgeführt werden kann.*

*Die Unterscheidung des Akzeptorfarbstoffs ist in diesem Fall möglich, da Cy5 und Bodipy650 am Oligonukleotid Werte der Fluoreszenzlebensdauer besitzen, die um einen Faktor 2 voneinander abweichen. Auch die Abstände der Fluorophore wurden so gewählt, dass die Ereignisse mit hoher Wahrscheinlichkeit eindeutig einem Molekül zugeordnet werden können. In Tab. 4.2-5 sind die Parameter zur Berechnung des Donor-Akzeptorabstandes aufgelistet. Mit Hilfe dieser Werte wurden die Histogramme der 12 Proben für  $S_G$ ,  $S_R$ ,  $E_T$ ,  $F_D/F_A$ ,  $R_{DA}$ ,  $\tau_{D(A)}$ ,  $\tau_R$ ,  $r_G$  und  $r_R$  erstellt (s. Anhang G).*

Die Anpassung FRET-Population in den 1D-Histogrammen von  $F_D/F_A$ ,  $E_T$  und  $R_{DA}$  mit einer Gaußfunktion liefert die Werte in Tab. 4.2-6. In den Proben der Oligonukleotide mit Rh6G-Bodipy650 und Cy3-Bodipy650 bei einem Basenpaarunterschied von  $\Delta_{bp} = 17$  ist der Anteil der FRET-aktiven Populationen sehr gering, so dass kein Standardfehler ermittelt werden kann.

**Tab. 4.2-5: Korrekturwerte für die FRET-Untersuchungen mit verschiedenen Donor-Akzeptorpaaren.**

Donor	Akzeptor	$g_G$	$g_R$	J [ $10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$ ]	$R_{0r}$ [Å]	$\Phi_{FD}$	$\Phi_{FA}$	$\alpha$
Rh6G	Cy5	0,237	0,414	5,52	68	0,58	0,32	0,065
Cy3	Cy5	0,311	0,414	6,12	71	0,12	0,32	0,15
Rh6G	Bodipy650	0,237	0,517	1,76	57	0,58	0,3	0,065
Cy3	Bodipy650	0,311	0,517	2,31	59	0,12	0,3	0,15

**Tab. 4.2-6: Ergebnisse der Anpassung der 1D-Histogramme von  $F_D/F_A$ ,  $R_{DA}$  und  $E_T$  der 12 Proben, wenn nur die Ereignisse mit FRET berücksichtigt wurden. Die Standardabweichung  $\sigma$  wurde aus der Anpassung mit einer Gauß-Funktion erhalten. Die vollständigen Histogramme sind im Anhang G dargestellt.**

Donor	Akzeptor	$\Delta_{bp}$	$F_D/F_A \text{ cor}'$	$\sigma(F_D/F_A)$	$E_T$ [A]	$\sigma(E_T)$ [A]	$R_{DA}$ [A]	$\sigma(R_{DA})$ [A]
Rh6G	Cy5	9	0,63	0,20	0,84	0,27	52,01	2,82
Rh6G	Cy5	13	1,59	0,42	0,67	0,17	60,78	2,64
Rh6G	Cy5	17	4,24	1,21	0,43	0,20	71,56	3,41
Cy3	Cy5	9	0,35	0,14	0,59	0,50	49,19	3,42
Cy3	Cy5	13	0,71	0,28	0,41	0,50	55,48	3,65
Cy3	Cy5	17	2,25	0,99	0,18	0,50	67,20	4,93
Rh6G	Bodipy650	9	1,14	0,33	0,79	0,20	47,66	2,31
Rh6G	Bodipy650	13	5,33	1,94	0,44	0,16	61,64	3,74
Rh6G	Bodipy650	17	17,60	*	*	*	76,35	*
Cy3	Bodipy650	9	0,57	0,21	0,54	0,50	43,90	2,69
Cy3	Bodipy650	13	2,83	1,15	0,19	0,50	57,42	3,88
Cy3	Bodipy650	17	10,57	*	*	*	72,20	*

\* Die Bestimmung des Standardfehlers ist aufgrund einer geringen Anzahl an FRET-aktiven Molekülen nicht möglich.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse von Tab. 4.2-6 als Funktion des Basenpaarabstandes  $\Delta_{bp}$  zeigt weit verstreute Werte für  $F_D/F_A$ , wenn man die Proben mit gleichem  $\Delta_{bp}$  vergleicht. Durch die weitere Berechnung des Energietransfers  $E_T$  wird diese starke Streuung der Werte erniedrigt, da hier die Quantenausbeute von Donor- und Akzeptorfarbstoff berücksichtigt werden. Dabei ist jeder relative Fehler von  $E_T$  mit einem Minimalwert von 20 % sehr groß. Aufgrund der  $R_{DA}^6$ -Abhängigkeit (Gl. 2.3-36) der Transfereffizienz  $E_T$  ist der relative Fehler bei der Bestimmung des Donor-Akzeptor-Abstands  $R_{DA}$  deutlich kleiner als bei  $E_T$ .

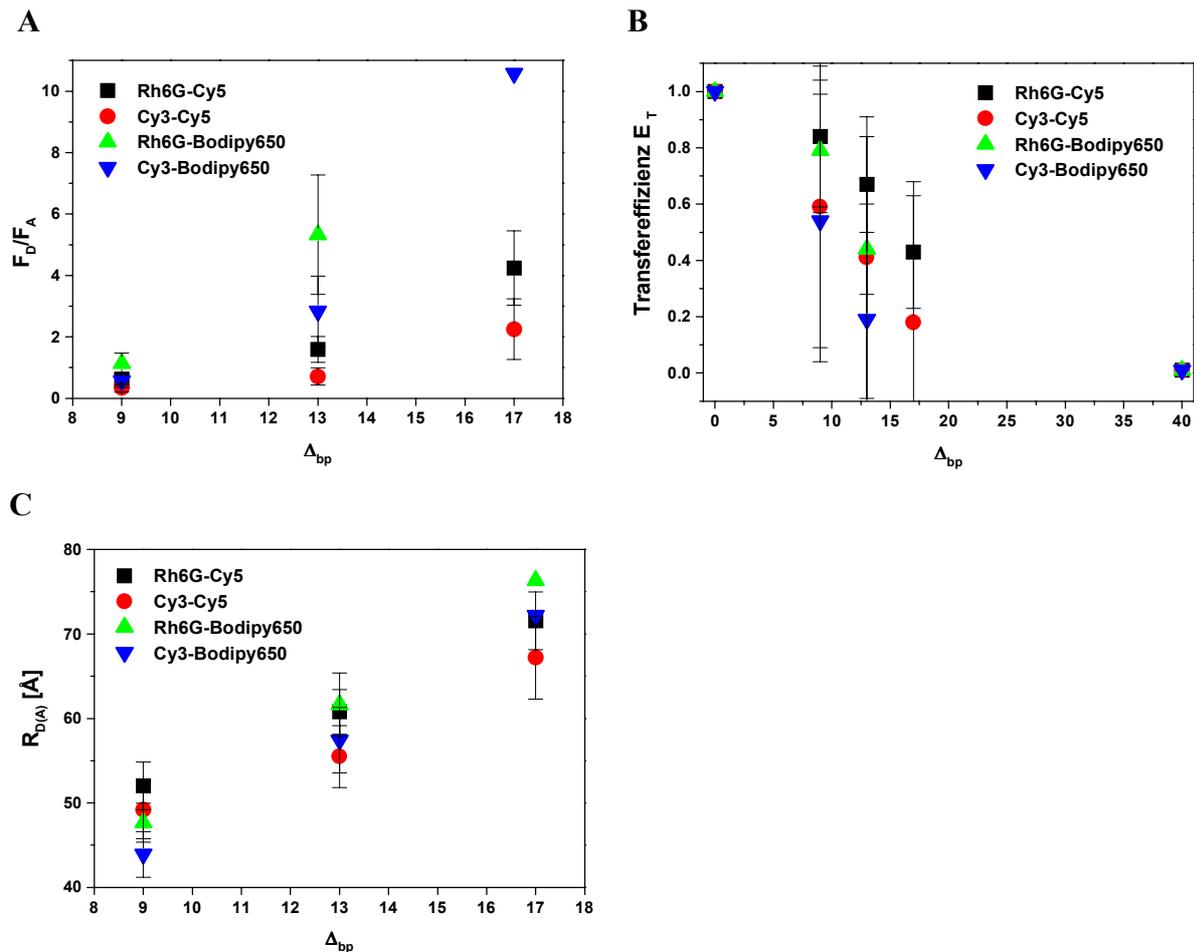


Abb. 4.2-14: Darstellung der Ergebnisse von Tab. 4.2-6 aus den Einzelmolekülmessungen der 12 Proben. (A)  $F_D/F_A$ , (B)  $E_T$  und (C)  $R_{D(A)}$  als Funktion des Basenpaarunterschiedes zwischen den Bindungsstellen von Donor und Akzeptor.

Anhand von Abb. 4.2-14C erkennt man, dass die Abstände aller Proben mit  $\Delta_{bp} = 9, 13$  und  $17$  niedrigere Werte aufweisen, wenn Cy3 und nicht Rh6G der Donorfarbstoff ist. Dies widerspricht auf den ersten Blick den Beobachtungen der vorherigen Messungen: Rh6G am 5'-Ende der DNS gebunden befindet sich in der Nähe des endständigen Basenpaares, während Cy3 -vorausgesetzt, es verhält sich aufgrund seiner ähnlichen Struktur wie Cy5 - von der DNS abgestoßen wird. Danach wird ein größerer Abstand zum Akzeptor bei Cy3 erwartet als bei Rh6G. Im eingangs vorgestellten Modell spielen neben dieser Entfernung der Farbstoffe in z-Richtung jedoch auch die Entfernung der Farbstoffe senkrecht zur Helixachse und die Winkel der Farbstoffe zueinander eine Rolle, die hier für diesen Effekt verantwortlich sind.

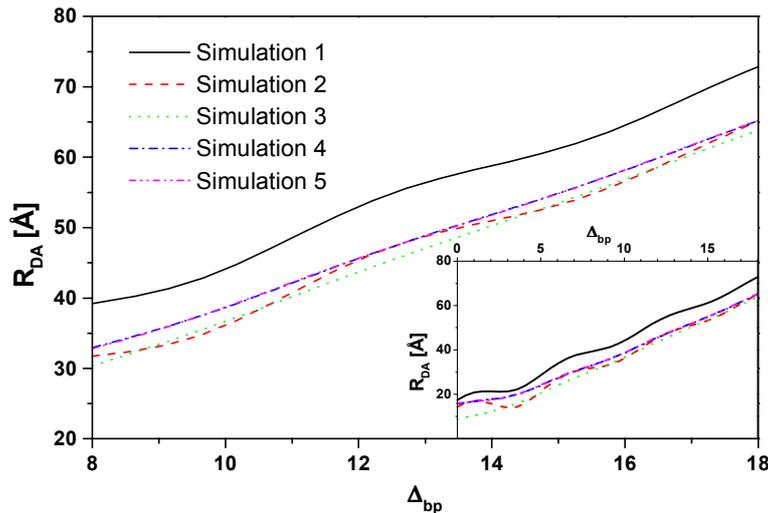


Abb. 4.2-15: Simulation von  $R_{DA}(\Delta_{bp})$  mit **(1)**  $L = 10 \text{ \AA}$ ,  $r_A = 8 \text{ \AA}$ ,  $r_D = 8 \text{ \AA}$ ,  $\Psi = 180^\circ$ ; **(2)**  $L = 2 \text{ \AA}$ ,  $r_A = 8 \text{ \AA}$ ,  $r_D = 8 \text{ \AA}$ ,  $\Psi = 180^\circ$ ; **(3)**  $L = 2 \text{ \AA}$ ,  $r_A = 1 \text{ \AA}$ ,  $r_D = 8 \text{ \AA}$ ,  $\Psi = 180^\circ$ ; **(4)**  $L = 2 \text{ \AA}$ ,  $r_A = 1 \text{ \AA}$ ,  $r_D = 15 \text{ \AA}$ ,  $\Psi = 180^\circ$  und **(5)**  $L = 2 \text{ \AA}$ ,  $r_A = 1 \text{ \AA}$ ,  $r_D = 15 \text{ \AA}$ ,  $\Psi = 230^\circ$ . Die kleine Grafik zeigt die Simulationskurven im Bereich von  $\Delta_{bp} = 0 - 18$ . Der Wert von  $R_0$  beträgt in allen Kurven  $46 \text{ \AA}$ .

In Abb. 4.2-15 sind Kurven von  $R_{DA}$  als Funktion von  $\Delta_{bp}$  berechnet worden, wenn jeweils einer der Parameter  $L$ ,  $r_A$ ,  $r_D$  oder  $\Psi$  geändert wird. Ist der Abstand  $L$  erniedrigt, ist die Kurve deutlich zu niedrigeren  $R_{DA}$ -Werten verschoben. Die Änderung von  $r_A$  bzw.  $r_D$  zu sehr geringen Werten glättet die Kurve, da dann die helikale Abhängigkeit weniger stark ausgeprägt ist. Ist der Abstand  $r_A$  bzw.  $r_D$  vergrößert, dann sind die Abstandswerte ebenfalls größer. Sie steigen mit zunehmendem Wert für  $\Delta_{bp}$  jedoch weniger stark an als bei niedrigeren Werten. Eine Änderung des Winkels  $\Psi$  verändert das Ergebnis von Simulation 4 nur geringfügig.

*Im Hinblick auf das Ergebnis der MI-Oligonukleotide mit Cy3 und Rh6G kann dies bedeuten, dass ein Unterschied im Abstand der Donorfarbstoffe entlang der z-Achse zum endständigen Basenpaar bestehen kann, wenn einer der beiden Farbstoffe jedoch deutlich weiter entfernt ist von der Helixachse.*

*Der Vergleich von Simulation 3 und 4 (Erhöhung der Differenz von  $r_A$  und  $r_D$  mit gleichem Wert für  $L$ ) deutet - bezogen auf die Ergebnisse von Abb. 4.2-14 - darauf hin, dass bei gleichem Akzeptor der Farbstoff Rh6G weiter von der Helix-Achse des Oligonukleotids entfernt ist als Cy3. Ursache ist die kürzere Linkerlänge von Cy3 zum Oligonukleotid als bei Rh6G.*

*Eine Untersuchung von zusätzlichen Proben mit verändertem  $\Delta_{bp}$  liefert mehr Datenpunkte für die Anpassung von  $R_{DA}(\Delta_{bp})$  und im Vergleich mit dem DNS-Modell präzisere Angaben zum Verhalten der Farbstoffe am Oligonukleotid, so dass der Widerspruch in den Ergebnissen aufgeklärt werden kann.*

#### 4.2.5 Zusammenfassung

Die Untersuchungen des Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren am Oligonukleotid sind unter verschiedenen Gesichtspunkten durchgeführt worden.

Die Informationen aus den Untersuchungen von Rh6G am einfach-markierten Oligonukleotid unter Verwendung der Fluoreszenzlöschung durch die Nukleobasen wurden auf die Donormoleküle für die FRET-Untersuchungen übertragen. So konnte mit Hilfe der Einzelmolekülmessungen beobachtet werden, dass in einem DNS-Hybrid - mit den Farbstoffen an unterschiedlichen DNS-Strängen gebunden - viele Moleküle die Eigenschaften der Donor-Probe aufweisen. Dieses Phänomen trat bei allen Untersuchungen mit zwei Farbstoffen am Oligonukleotid mehr oder weniger stark ausgeprägt auf. Mittels MFD wurden diese Einzelmolekülereignisse herausgefiltert. Als Ursache ist eine ungenügende Hybridisierung (abhängig von Sequenz und Farbstoffen) zu nennen.

Der Einfluss der Photozerstörung wurde den Einzelmolekülmessungen der FRET-Studien weitgehend eingeschränkt, indem nur die Einzelmolekülereignisse mit einem ähnlichen zeitlichen Schwerpunkt von „grünen“ und „roten“ Photonen ausgewählt wurden.

Die Ergebnisse für den Energietransfer bzw. den Donor-Akzeptorabstand wurden mit einem mathematischen Modell verglichen und lieferten damit Vorstellungen von den Positionen der Farbstoffe am Oligonukleotid. Die nach Selektion der FRET-aktiven Moleküle erhaltenen Abstandswerte geben eine genauere Strukturinformation wieder als die Werte der Ensemblemessungen, die aufgrund der einfach-markierten Moleküle in der Probe ein verfälschtes Ergebnis liefern. Die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie ermöglichte im Vergleich mit dem theoretischen Modell eine Unterscheidung des Energietransfers zu den beiden isomeren Formen des Akzeptorfarbstoffs Cy5.

Beim Vergleich verschiedener Akzeptorfarbstoffe stellt man fest, dass bei den Proben mit Bodipy650, Cy5, RotS und Sq635 die FRET-Population mit relativ hoher Intensität des roten Farbstoffs auftritt. Daneben wiesen die Proben eine äußerst geringe Adsorption auf. Berücksichtigt man unterschiedliches Verhalten der Farbstoffe an der DNS, so weisen die Donor-Akzeptor-Abstände dieser Farbstoffe (mit Alexa488 als Donorfarbstoff) am gleichen Oligonukleotid Werte im ähnlichen Abstandsbereich auf.

### 4.3 Strukturuntersuchungen und kinetische Studien von HIV-1 Reverser Transkriptase im Komplex mit verschiedenen Nukleinsäuresubstraten

#### 4.3.1 Einführung

##### 4.3.1.1 Das Protein und seine Wirkungsweise

Die Reverse Transkriptase (RT) ist ein Schlüsselenzym besonderer RNS-Viren, den Retroviren. Diese Viren werden so genannt, da sie sich mit Hilfe der RT über DNS-Zwischenstufen replizieren und damit das sogenannte zentrale Dogma der Molekularbiologie aufheben, das besagte, dass der Fluss der genetischen Information ausschließlich von der DNS zur RNS erfolgt.

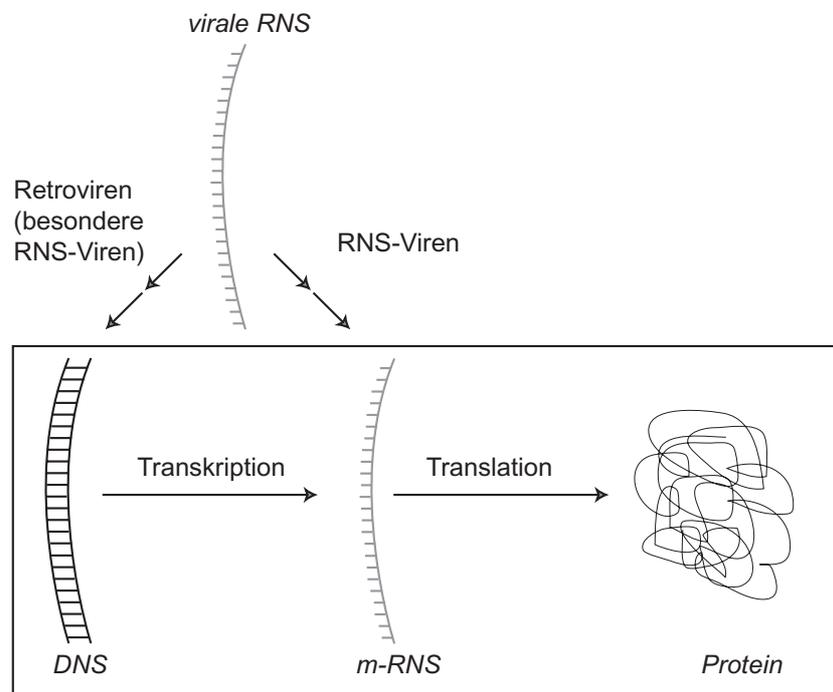


Abb. 4.3-1: Retroviren heben das zentrale Dogma der Molekularbiologie auf, welches innerhalb des Kastens schematisiert dargestellt ist.

Bei dem Retrovirus HIV handelt es sich um den menschlichen Immunschwäche-Virus (*human immunodeficiency virus*), dem Auslöser von AIDS (*Aquired Immunodeficiency Disease Syndrome*). Es werden zwei verschiedene Typen unterschieden; im Rahmen dieser Arbeit wird die Reverse Transkriptase von Typ I untersucht.

Bisher haben sich seit den frühen achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts mehr als 40 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert und fast 12 Millionen Menschen sind an den Folgen der Pandemie gestorben (Mann, 1998). Anti-HIV-Therapien greifen in den Replikationszyklus (Abb. 4.3-2) ein, indem sie die Tätigkeit von Schlüsselenzymen zu unterbinden versuchen. Zwei Klassen von Wirkstoffen hemmen die Reverse Transkriptase: Nukleosid-Analoga und nicht-nukleosidische Inhibitoren. Zur ersten Klasse gehört das erste Medikament gegen HIV, das AZT (Zidovudin). Im Gegensatz zu den nukleosidischen Inhibitoren blockieren die nicht-

nukleosidischen Inhibitoren wie z.B. Nevirapin die Katalyse, indem sie an das Enzym binden, aber nicht die Substratbindung verhindern. Protease-Inhibitoren bilden die dritte Klasse von Wirkstoffen und verhindern die Prozessierung der viralen Proteine.

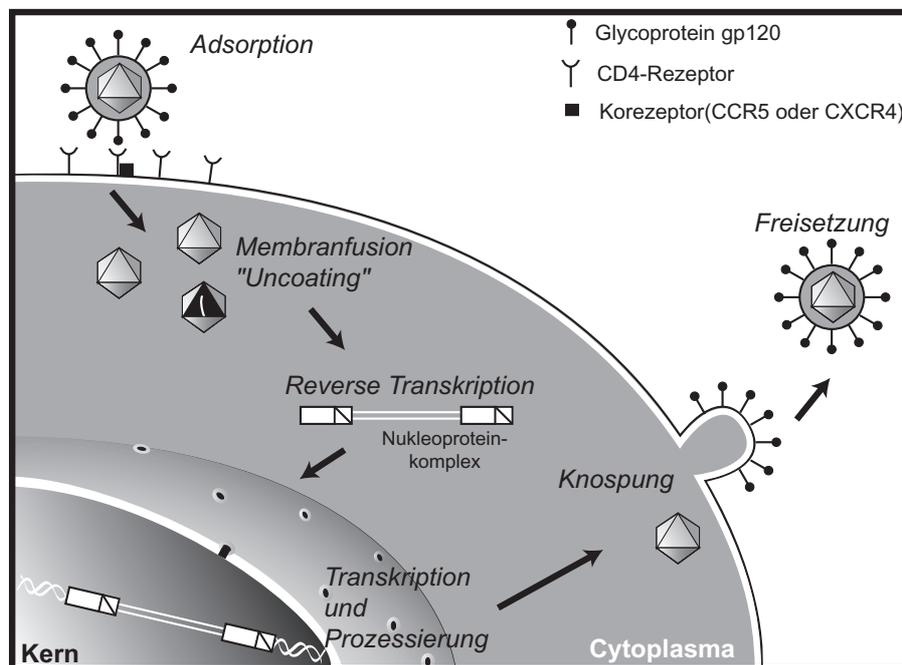


Abb. 4.3-2: Replikationszyklus von HIV. Das Virion bindet mit dem Glycoprotein gp120 in seiner Membranhülle an ein CD4-Rezeptormolekül und ein Korezeptormolekül einer T4-Helferzelle oder eines Makrophagen. Nach der Membranfusion wird die Nukleokapsidhülle entfernt und aus der viralen RNS, der Reversen Transkriptase und der viralen Integrase wird der sogenannte Nukleoproteinkomplex gebildet, der doppelsträngige, provirale DNS ausbildet. Gebunden an die virale Integrase und den Komplex, gelangt diese in den Zellkern, wo die DNS in das Genom integriert wird und virale RNS entsteht. Nachdem diese durch die Kernhülle wieder in das Cytoplasma transportiert wurde, gelangen zwei Moleküle RNS und neu gebildete Virusproteine an die Plasmamembran, wo ein neues Virion gebildet wird.

Obwohl auf zellulärer Ebene der Verlauf der Infektion heute recht gut bekannt ist, soll ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse durch die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erhalten werden.

#### 4.3.1.2 Die reverse Transkription

Die reverse Transkription von viraler, genomischer, einzelsträngiger RNS in lineare, doppelsträngige DNS wird durch die *Reverse Transkriptase* katalysiert. Hierzu ist die RT mit einer RNS- und einer DNS-abhängigen DNS-Polymerase-Aktivität ausgestattet. Polymerasen sind Enzyme, die Nukleinsäureketten unter den Einbau neuer Nukleotide von 5'- zum 3'-Ende verlängern können. Zusätzlich besitzt die RT eine RNase H-Aktivität, die RNS in einem RNS/DNS-Hybrid endonukleolytisch schneidet.

Abb. 4.3-3 zeigt schematisch nach Darnell (Darnell, 1990) die Umwandlung von genomischer (+)-RNS eines Retrovirus in eine doppelsträngige provirale DNS. Die virale RNS besteht aus zwei identischen Sequenzbereichen, R, der sogenannten „terminalen Redundanz“ am 3'- und

am 5'-Ende. U5 ist eine Sequenz neben dem R-Bereich am 5'-Ende und U3 analog dazu am 3'-Ende. Bei PBS handelt es sich um die Primer-Bindungsstelle, zu der eine tRNS (transfer-RNS) aus der vorherigen Wirtszelle eine komplementäre Sequenz besitzt.

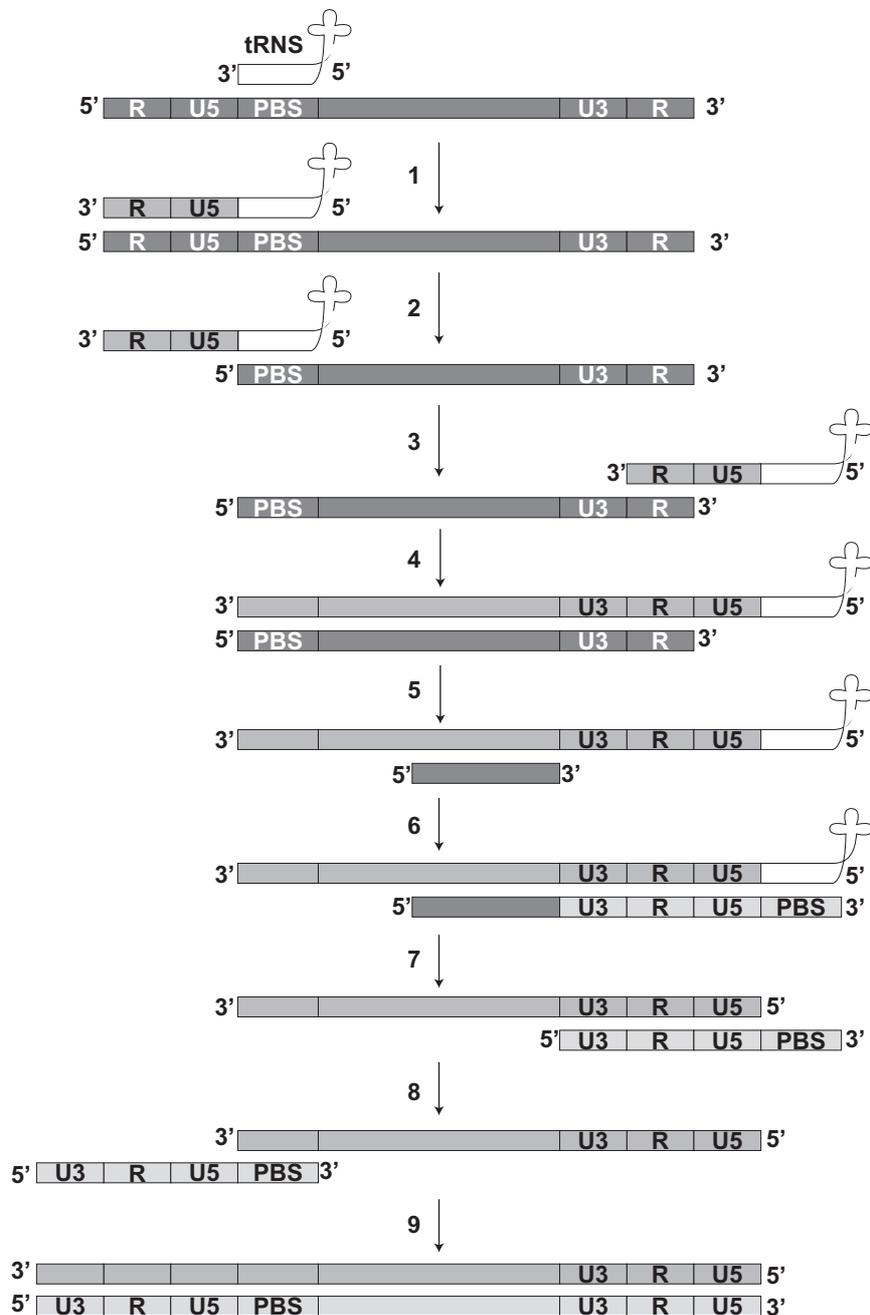


Abb. 4.3-3: Mechanismus der reversen Transkription. PBS bedeutet Primer-Bindungsstelle, U3 und U5 sind verschiedene Sequenzen und R ist eine wiederholte Sequenz. (+)RNS ist dunkelgrau, (-)DNS mittelgrau und (+)DNS hellgrau dargestellt. Bei tRNS (weiss) handelt es sich um den Primer einer tRNS, der zur Initiation benötigt wird.

Zur Initiation der viralen DNS-Synthese benötigt die RT neben der viralen (+)-DNS diese nichtkovalent gebundene tRNS, die als Primer (Startermolekül) für die DNS-Synthese dient. Das Enzym kann die Polymerisation nicht *de novo* starten und verwendet so das 3'-OH-Ende der tRNS zum Start der Polymerisation. Im Rahmen der Wechselwirkung der RT mit dem natürlichen Primermolekül tRNS<sup>Lys3</sup> konnte gezeigt werden (Thrall, 1996), dass es keine

spezifische Wechselwirkung zwischen der Reversen Transkriptase und tRNS<sup>Lys3</sup>, sondern nur eine schwache Bindung aller tRNS-Spezies gibt.

Nach der Anbindung der tRNS an die virale DNS erfolgt die Umwandlung von (+)-RNS in doppelsträngige DNS in neun weiteren Teilschritten:

- Die erste Eigenschaft - die RNS-abhängigen DNS-Polymerase-Aktivität - wird genutzt, indem der komplementäre (-)DNS-Strang gebildet wird.
- Im nächsten, dem zweiten Schritt wird mit der RNS-Hydrolysefunktion die hybridisierte RNS bestehend aus R und U5 entfernt.
- Nach einem „Sprung“ an das 3'-Ende der viralen (+)RNS und Hybridisierung an die noch vorhandene R-Sequenz,
- wird der DNS-Strang verlängert.
- Im fünften Schritt wird der größte Teil der hybridisierten RNS wiederum hydrolytisch entfernt.
- Die restliche RNS dient nun als Template (Matrizenmolekül) für den Aufbau (6. Schritt) des 3'-Endes des zweiten DNS-Stranges.
- Im darauffolgenden Schritt werden RNS und tRNS entfernt.
- Nun erfolgt ein zweiter „Sprung“, indem die (+)DNS an das 3'-Ende der (-)DNS hybridisiert wird.
- Im letzten Schritt werden beide DNS-Stränge vervollständigt.

Durch ein ebenfalls im Virus vorhandenes Integrationsenzym, die Integrase, wird dann die Rekombination der retroviralen DNS mit der DNS der Wirtszelle katalysiert. Dieses erkennt die langen endständigen Wiederholungssequenzen LTR (*long terminal repeats*), die in der retroviralen DNS entstanden sind, und kann die neue DNS unspezifisch an jeder Stelle im Wirtsgenom einbauen.

#### **4.3.1.3 Enzymkinetik**

Der kinetische Mechanismus der durch die Reverse Transkriptase katalysierten DNS-Polymerisation wurde näher untersucht und beschrieben (Divita, 1993; Rittinger, 1995), ebenso der Mechanismus der Hemmung der Reversen Transkriptase durch nicht-nukleosidische Inhibitoren (Rittinger, 1995).

Bei den Untersuchungen der RT-Substrat-Assoziation des Enzyms in Ensemblemessungen sind drei kinetisch verschiedene Spezies identifiziert worden (Wöhrl, 1999). Beim Einbau von Nukleotiden wurden dabei zwei schnelle Phasen und eine langsame Phase beobachtet. Diese wurden auf verschiedene Formen der Komplexbildung zwischen RT und Substrat zurückgeführt:

- auf einen „produktiven“ Komplex, der den Einbau von Nukleotiden ermöglicht,

- einen „nicht-produktiven“ Komplex, der durch konformelle Änderung in den „produktiven“ Komplex übergehen kann, und
- einen „dead-end“-Komplex, der strukturell von den beiden anderen Komplexen stark abweicht, so dass der Komplex vollständig dissoziiert sein muss und erst eine erneute Assoziation von RT und Substrat einen „produktiven“ Komplex und damit Polymerisation ermöglicht.

Der langsame Schritt der Bindung eines Primer/Template-Moleküls an die RT kann mit einer relativen Bewegung der sogenannten Daumen- und Fingerdomänen der p66 Untereinheit (s. Kap. 4.3.5.4) einhergehen. Diese und weitere Strukturänderungen, die während des Polymerisationsvorgangs zwangsläufig stattfinden müssen (z.B. die Bewegung des Nukleinsäuresubstrates relativ zum Protein bei prozessiver Polymerisation), konnten aber bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Kettenterminierende Nukleotide verursachen die Inhibierung der Transkription und konnten quantitativ beschrieben werden (Goody, 1991; Muller, 1991b). Der Effekt von Mutationen, die dem HIV eine Resistenz gegen Kettenterminatoren verleihen, ist dabei auf die Reverse Transkriptase zurückzuführen (Krebs, 1997).

#### **4.3.1.4 Die Struktur der Reversen Transkriptase**

Die Reverse Transkriptase von HIV-1 ist ein dimeres Protein mit einer 51 kD und einer 66 kD Untereinheit. Die kleinere der beiden Untereinheiten entsteht aus dem 66 kD Protein durch proteolytische Abspaltung des C-Terminus (Di Marzo Veronese, 1986; Lightfoote, 1986). Die dreidimensionale Struktur des Proteins ist in Abwesenheit eines Substrates (Esnouf, 1995; Rodgers, 1995), in Verbindung mit nukleosidischen Inhibitoren (Ding, 1995; Kohlstaedt, 1992; Ren, 1995) und als ternärer Komplex mit einer doppelsträngigen DNS (Jacobo-Molina, 1993) durch Röntgenkristallographie aufgeklärt worden.

Die Polymerase-Domäne besteht aus vier Unterdomänen, den „Fingern“, der „Handfläche“, dem „Daumen“ und dem „Verbindungsbereich“ (Abb. 4.3-4). Diese formen in der p66-Untereinheit eine Struktur wie eine offene rechte Hand und bilden eine große Spalte mit den drei katalytisch aktiven Aminosäuren D110, D185 und D186 (D steht für Asparaginsäure, die Zahl steht für die Position innerhalb der Aminosäuresequenz). In der p51-Untereinheit existieren ebenfalls diese vier Unterdomänen, nehmen jedoch eine geschlossene Konformation ein, die die katalytischen Aminosäuren einschließt. p51 ist katalytisch inaktiv, besitzt aber eine wichtige Aufgabe zur Bildung der gesamten Enzymstruktur. Von der Daumenregion wird angenommen, dass sie aufgrund ihrer großen Flexibilität für eine richtige Positionierung des 3'-Endes des Primerstrangs im aktiven Zentrum der Polymerase-Region verantwortlich ist.

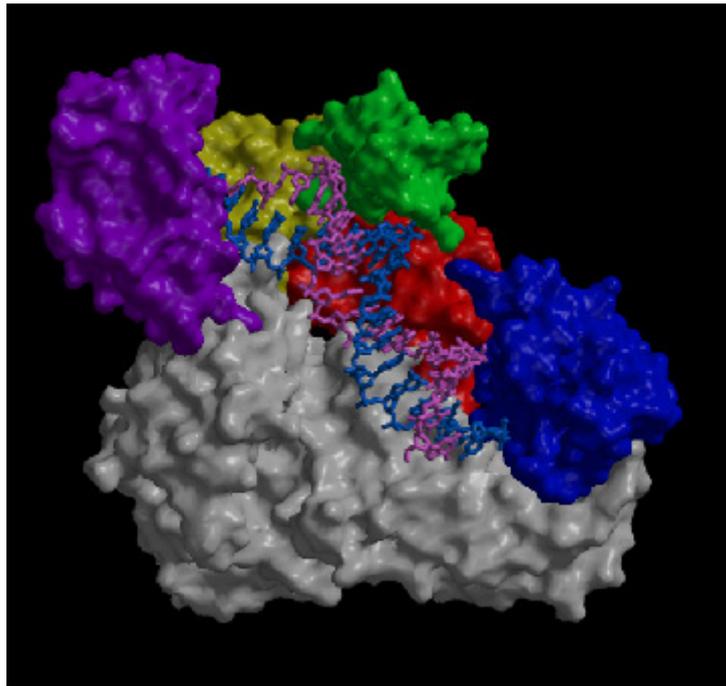


Abb. 4.3-4: Kristallstruktur der Reversen Transkriptase im Komplex mit dem Primer/Template-Substrat nach Huang *et al.* (Huang, 1998). Das Protein ist als Moleküloberfläche, das Substrat im Stäbchenmodell dargestellt mit dem Primer in brombeerfarben und dem Template in blau. Die p51-Untereinheit ist grau koloriert; bei der p66-Untereinheit sind die Domänen farbig gekennzeichnet: „Finger“ (brombeerfarben), „Handfläche“ (gelb), „Daumen“ (grün), „Verbindungsbereich“ (rot) und RNase H (blau).

Die Bindung von DNS ändert die Struktur des Proteins nicht signifikant (Jacobo-Molina, 1993). Die DNS wird jedoch derart verformt, dass eine Struktur zwischen A- und B-Form eingenommen wird. Die Bindung von nicht-nukleosidischen Inhibitoren bewirkt eine Strukturänderung der p66-Untereinheit, in der wie in einer ähnlichen Struktur zur p51-Untereinheit die drei aktiven Aminosäuren verborgen sind.

Abhängig von den Positionen der „Finger“- , „Daumen“- und „Handflächen“-Domänen wird eine offene und eine geschlossene Konformation unterschieden. Bei der Wechselwirkung mit einem Substratmolekül geht die RT von einer geschlossenen in eine offene Konformation über. Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie konnte diese Änderung beobachtet werden (Kensch, 2000a).

In frühen Studien wurden die Dimerisierungseigenschaften der Untereinheiten untersucht, und es wurde gezeigt, dass nur dimere Formen des Enzyms aktiv sind (d.h. Homodimere aus p51, Homodimere aus p66 oder p66/p51 Heterodimere) (Restle, 1990).

### 4.3.2 Experimenteller Teil

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von R.S. Goody am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund wurden Strukturuntersuchungen mittels Fluoreszenz-Energietransfer durchgeführt, um das Verständnis von der Bindung von Nukleinsäuren mit der RT in Lösung und somit von der Wirkungsweise des Proteins zu vertiefen. Dazu wurden in allen Messungen die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa488 und Cy5 als Donor-Akzeptor-Paar eingesetzt.

#### 4.3.2.1 Enzylsubstrate

Entsprechend seiner Rolle im Infektionszyklus akzeptiert HIV-RT ein ungewöhnlich großes Spektrum an Nukleinsäuresubstraten. So kann der Primer (Startermolekül) tRNS, RNS oder DNS sein, und das Template (Matrizenmolekül) kann sowohl RNS oder DNS sein. Die verschiedenen Kombinationen dieser Moleküle reflektieren die hohe Zahl der verschiedenen Situationen *in vivo*. Da die verschiedenen Substrate erheblich unterschiedliche Konformationen haben, liegen vermutlich verschiedene Bindungsmöglichkeiten vor, die wiederum unterschiedliche Proteinkonformationen implizieren.

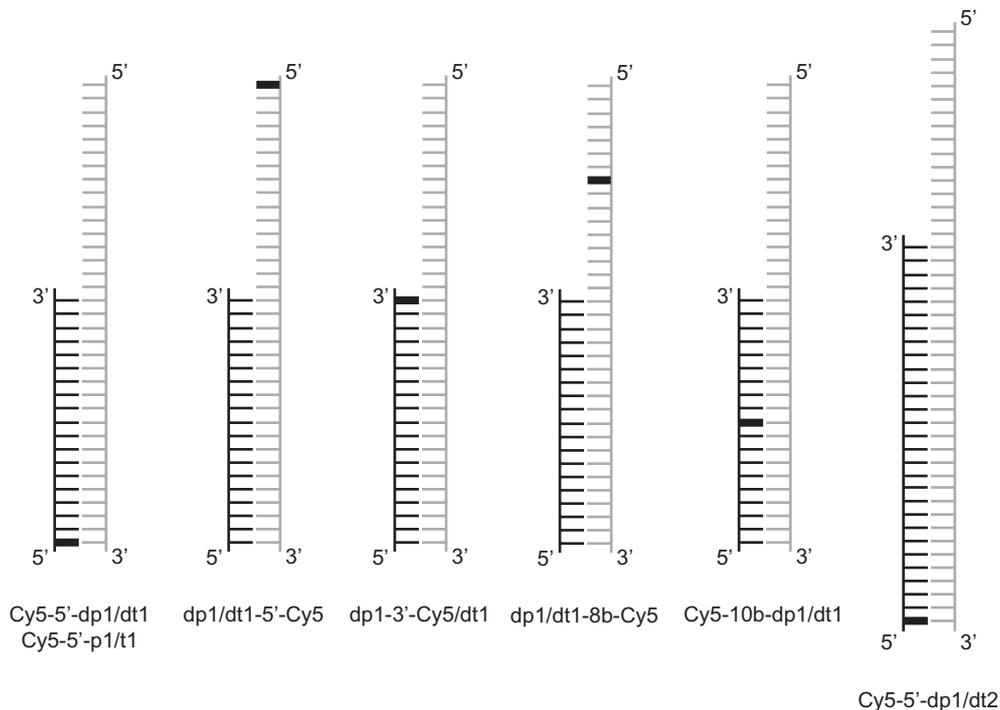


Abb. 4.3-5: Schema der Markierung des Substrates mit dem Akzeptorfarbstoff Cy5. Die schwarzen Striche zeigen die Primer-Sequenz, die grauen die Template-Sequenz an. Die schwarzen, dicken Striche geben die jeweilige Position des Farbstoffs an (detaillierte Angaben s. Anhang D).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Primer-Template-Komplexe (p/t) wie DNS/DNS- und DNS/RNS-Hybride untersucht. Die Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Nukleinsäuren basieren auf der PBS-Sequenz (Abb. 4.3-3) und sind in Anhang D wiedergegeben.

Der Akzeptorfarbstoff Cy5 wurde kovalent an einen Nukleinsäure-Strang eines Substratmoleküls gebunden (s. Anhang D). Die eingesetzten Akzeptor-markierten Substrate sind in Abb. 4.3-5 schematisch dargestellt.

#### 4.3.2.2 Proteinmutanten

In der Arbeitsgruppe Goody stehen Expressionssysteme für die Expression der beiden Untereinheiten in *Escherichia coli* für die Herstellung von größeren Mengen (ca. 100 mg) der rekombinanten Reversen Transkriptasen von HIV-1 und HIV-2 zur Verfügung (Muller, 1991b; Muller, 1991a). Die entwickelten Systeme haben den Vorteil, dass die Untereinheiten des Enzyms einerseits getrennt exprimiert und gereinigt, andererseits die Untereinheiten von einem Plasmid gleichzeitig hergestellt werden können (Koexpression).

Es ist gezeigt worden, dass die natürlich vorkommenden Cysteinreste (C38 und C280) für Markierungsreaktionen nicht geeignet sind, da eine große Gruppe an Position 38 die enzymatische Aktivität hemmt und C280 in p66 nicht zugänglich ist. So wurden diese Reste C38 und C280 durch andere Aminosäuren ersetzt und neue Cysteinreste an ausgewählten Positionen eingeführt (Abb. 4.3-6). Diese Reste sind zumeist in den sogenannten Finger- und Daumendomanänen lokalisiert.

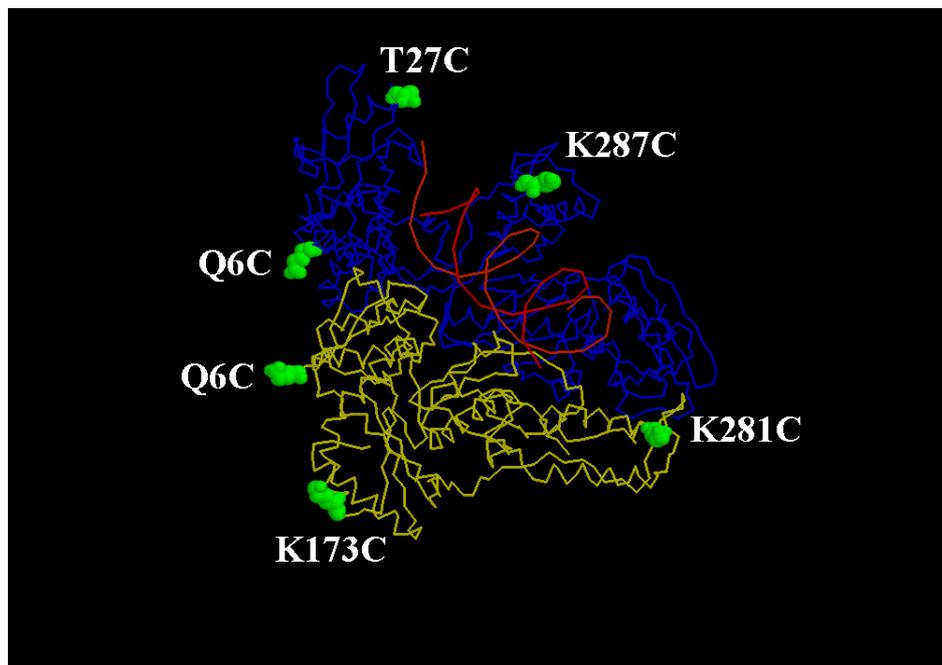


Abb. 4.3-6: Positionen der Cystein-Mutanten von HIV-1 Reverser Transkriptase. Die p66-Untereinheit ist blau dargestellt, die p51-Untereinheit besitzt eine gelbe Färbung. Die Positionen der Mutationen sind grün gefärbt und mit dem Namen ihrer Position versehen.

Durch Reaktion eines Cysteinrests mit einem Maleinimid kann nun ein Farbstoffmolekül kovalent an das Protein gebunden werden (s. Anhang D). Die Synthese der Mutanten und anschließende Markierung wurden am MPI in Dortmund durchgeführt. In Tab. 4.3-1 sind die Positionen der Mutanten angegeben.

**Tab. 4.3-1: Verwendete Mutanten von HIV-1 Reverser Transkriptase.**

Name	Name	Position
p66 <sup>C38S/C280/Q6C[Alexa488]</sup> p51 <sup>C280S</sup>	Q6C(p66)	Finger
p66 <sup>C38S/C280/T27C[Alexa488]</sup> p51 <sup>C280S</sup>	T27C(p66)	Finger
p66 <sup>C38S/C280/K287C[Alexa488]</sup> p51 <sup>C280S</sup>	K287C(p66)	Daumen
p66 <sup>C38S/C280</sup> p51 <sup>C280S/Q6C[Alexa488]</sup>	Q6C(p51)	Finger
p66 <sup>C38S/C280</sup> p51 <sup>C280S/K173C[Alexa488]</sup>	K173C(p51)	Handfläche
p66 <sup>C38S/C280</sup> p51 <sup>C280S/K281C[Alexa488]</sup>	K281C(p51)	Daumen

Die Namen der Mutanten tragen an erster Stelle die Abkürzung der ersetzten Aminosäure, dann die nummerierte Position in der Sequenz der jeweiligen Untereinheit (p66 oder p51) und als letztes die Abkürzung der ersetzenden Aminosäure. Die Abkürzungen der Aminosäuren sind: C für Cystein, K für Lysin, Q für Glutamin, S für Serin T für Threonin und W für Tryptophan.

#### 4.3.2.3 Voruntersuchungen

Durch die Titration von RT mit p/t wurden Dissoziationsgleichgewichtskonstanten von 3,5 nM für das Wildtyp-Enzym und 6 nM für eine Mutante erhalten (Kensch, 2000a). Dieser Wert deutet auf einen sehr stabilen Enzym-Substrat-Komplex hin.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Stopped-Flow wurde einer Lösung mit Enzym-Substrat-Komplexen aus RT und fluoreszenzmarkierten p/t-Molekülen ein 100-facher Überschuss an unmarkierten p/t zugesetzt (Kensch, 2000a). Die Abnahme der Akzeptorfluoreszenz aufgrund von Dissoziation des markierten p/t und Assoziation mit unmarkiertem p/t kann über die Zeit verfolgt werden. Dabei wurde eine sehr niedrige Dissoziationskonstante bei Erniedrigung des KCl-Gehalts in der Lösung gefunden. Da dieser Wert jedoch stark fehlerbehaftet ist, wurde ein vierfacher Überschuss an Substrat eingesetzt, der das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite des Enzym-Substrat-Komplexes verschiebt. Die Bestimmungen der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten und der Dissoziationskonstanten wurden am MPI in Dortmund durchgeführt.

In den Einzelmolekülexperimenten bei Proteinkonzentrationen von 50 pM spielt die Reassoziaton des Proteins mit markiertem p/t keine bedeutende Rolle im Vergleich zur Dissoziation. Es sollen jedoch über einen längeren Zeitraum der Messung stabile Komplexe untersucht werden können. Durch die Wahl des Puffers mit einen niedrigen KCl-Gehalt (10 mM) wurde daher die Dissoziationsreaktion verlangsamt.

Die optimale Anregungswellenlänge für den Farbstoff Alexa488 ist 496 nm mit dem Argon-Ionen-Laser. Beim Farbstoff am Protein können lokale Umgebungseffekte auftreten, die schon

bei niedrigen Anregungsleistungsdichten zu Photozerstörung führen können. Daher wurden FCS-Kurven mit der Proteinmutante K281C bei verschiedenen Laserleistungen aufgenommen (Abb. 4.3-7A). Wie man anhand der verkürzten Diffusionszeiten bei zunehmender Anregungsleistungsdichte sieht, tritt schon bei niedriger Laserleistung Photozerstörung auf. Daher wurde in weiteren Experimenten mit allen Mutanten eine Anregungsleistungsdichte von  $9,5 \text{ kW cm}^{-2}$  eingestellt.

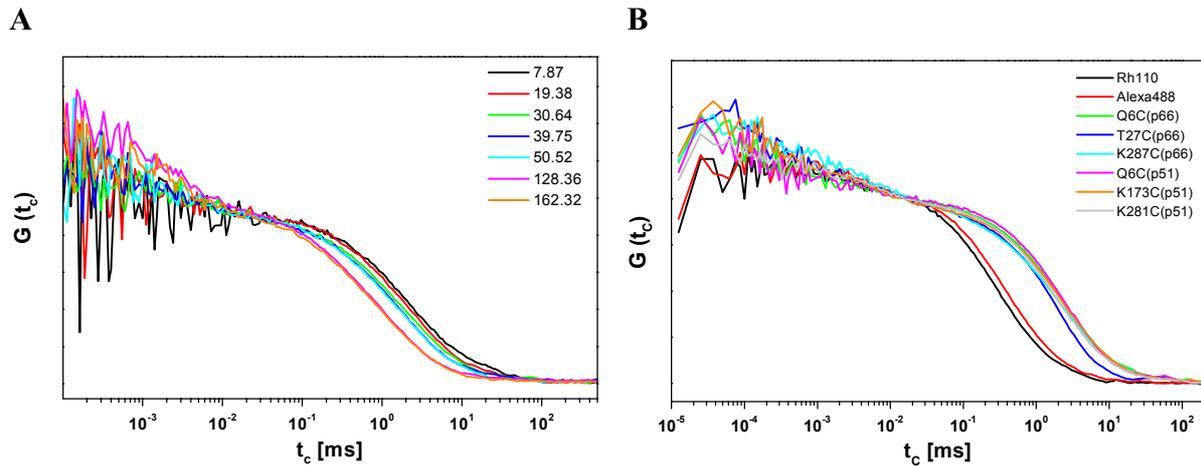


Abb. 4.3-7: **(A)** Normierte Korrelationskurven von K281C bei verschiedenen Anregungsleistungsdichten  $I$ . Die in der Legende angegebenen Werte geben die Anregungsleistungsdichte (in  $\text{kW cm}^{-2}$ ) der jeweiligen Messung wieder. Messbedingungen: Gepulste Anregung bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 496 \text{ nm}$ ,  $\omega_0 = 0,5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $z_0 = 2,5 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V_D = (2-4) \text{ fl}$ , Fluoreszenzfilter HQ535/50 und HQ730/140, Strahlteiler 488/636PC und 595DCXR. **(B)** Normierte Korrelationskurven der sechs Proteinmutanten markiert mit Alexa488 im Vergleich mit den freien Farbstoffen Rh110 und Alexa488. Messbedingungen: s. Abb. 4.3-7A, mit  $I = 9,5 \text{ kW cm}^{-2}$ .

Der Vergleich der FCS-Kurven der Proteinmutanten im Komplex mit unmarkiertem Substrat  $dp1/dt1$  zeigt ein ähnliches Tripletverhalten aller Mutanten auf, außer bei der Mutante T27C. Aufgrund einer Verunreinigung tritt ein weiterer Bunchingterm mit einer Korrelationszeit von  $3 \text{ ms}$  auf, was auch in Abb. 4.3-7B deutlich erkennbar an einer gegenüber den übrigen Mutanten veränderten Diffusionszeit ist.

**Tab. 4.3-2: Parameter der Anpassung der Fluoreszenzkorrelationskurven der Proteinmutanten.**

	$t_D [\mu\text{s}]$	$t_1 [\mu\text{s}]$	$A_1$	$t_2 [\mu\text{s}]$	$A_2$	$k_T [10^5 \text{ s}^{-1}]$	$k_{\text{ISC}} [10^6 \text{ s}^{-1}]$
Rh110	0,269	2,721	0,10	-	-	3,31	1,44
Alexa488	0,377	4,960	0,12	-	-	1,78	0,92
Q6C(p66)	2,014	14,939	0,09	0,343	0,19	0,61	0,23
T27C*	2,760	0,386	0,20	11,582	0,14	20,80	19,79
K287C	1,953	2,589	0,20	52,568	0,11	3,09	2,98
Q6C(p51)	2,304	8,997	0,09	0,200	0,17	1,01	0,40
K173C	2,088	11,085	0,14	0,413	0,19	0,78	0,48
K281C	1,794	9,099	0,14	0,399	0,08	0,94	0,62

\* Weiterer Bunchingterm mit einer Korrelationszeit von  $3 \text{ ms}$ .

Die Standardabweichungen der Werte liegen bei  $25 \%$  für  $k_{\text{ISC}}$  und bei  $10 \%$  für  $k_T$ . Messbedingungen: s. Abb. 4.3-7B.

Für die Bestimmung der Transfereffizienz  $E_T$  und des Donor-Akzeptor-Abstands  $R_{DA}$  im Rahmen der Einzelmolekülmessungen wird die Fluoreszenzquantenausbeute des Donorfärbstoffs in der Donorprobe benötigt. Diese wurde aus den mittleren Fluoreszenzlebensdauern einer Messung bei  $10^{-9}$  M der Proteinmutante im Komplex mit unmarkiertem Substrat  $dp1/dt1$  erhalten.

**Tab. 4.3-3: Mittlere molekül- und fluoreszenzgewichtete Lebensdauern,  $\tau_{av}^x$  und  $\tau_{av}^a$ , (gemäß Gl. 3.1-1) der Proteinmutanten mit Fluoreszenzquantenausbeute. Die Zerfallskurven der Mutanten wurden biexponentiell angepasst.**

	$\tau_{av}^a$ [ns]	$\tau_{av}^x$ [ns]	$\Phi_{FD}$ aus $\tau_{av}$
Q6C(p66)	3,58	2,85	0,68
T27C	3,67	3,11	0,74
K287C	3,51	2,71	0,64
Q6C(p51)	3,67	3,08	0,74
K173C	3,70	3,11	0,75
K281C	3,78	3,21	0,76

Als Referenz wurde Rh110 mit einer Fluoreszenzlebensdauer  $\tau = 4$  ns und einer Fluoreszenzquantenausbeute von  $\Phi_F = 0,95$  verwendet. Messbedingungen: s. Abb. 4.3-7B.

In Einzelmolekülexperimenten der Proteinmutanten ohne Substrat fiel auf, dass neben Fluoreszenzereignissen mit relativ hoher Anisotropie  $r_D$  um 0,23 auch viele Ereignisse mit einer Anisotropie von 0 auftraten, die eine Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_D$  von ca. 4 ns aufwiesen. Die Selektion dieser Ereignisse und anschließende Kontrolle der Photonenzahl in den grünen Detektionskanälen zeigte, dass für diese Ereignisse weniger Photonen als für die übrigen detektiert werden. Dies deutet auf eine kürzere Diffusionszeit hin und alle Beobachtungen damit auf freien, ungebundenen Farbstoff.

Der zweite Schritt der Aufreinigung mit der  $Ni^{2+}$ -Säule (Kap. 3.6) wurde nun modifiziert, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen, indem vor der Pufferelution ein Waschschriff mit anderen Lösungsmitteln eingefügt wurde. Dazu wurden 10 %-ige Lösungen von Acetonitril, von Triton X-100 und von Tween 20 verwendet.

Anhand Abb. 4.3-8 wird deutlich, dass bei allen Aufreinigungen mit einem zusätzlichen Zwischenschritt der Anteil an Bursts mit einer Anisotropie  $r_D$  kleiner als 0,095 auf unter 10% sank. Bei der Aufreinigung mit Triton X-100 wurde der niedrigste Anteil mit 6,2 % erzielt, was auch deutlich sichtbar im Vergleich zu den anderen Proben in Abb. 4.3-7B ist. Daher wurde das Protokoll der Aufreinigung um diesen zusätzlichen Schritt modifiziert.

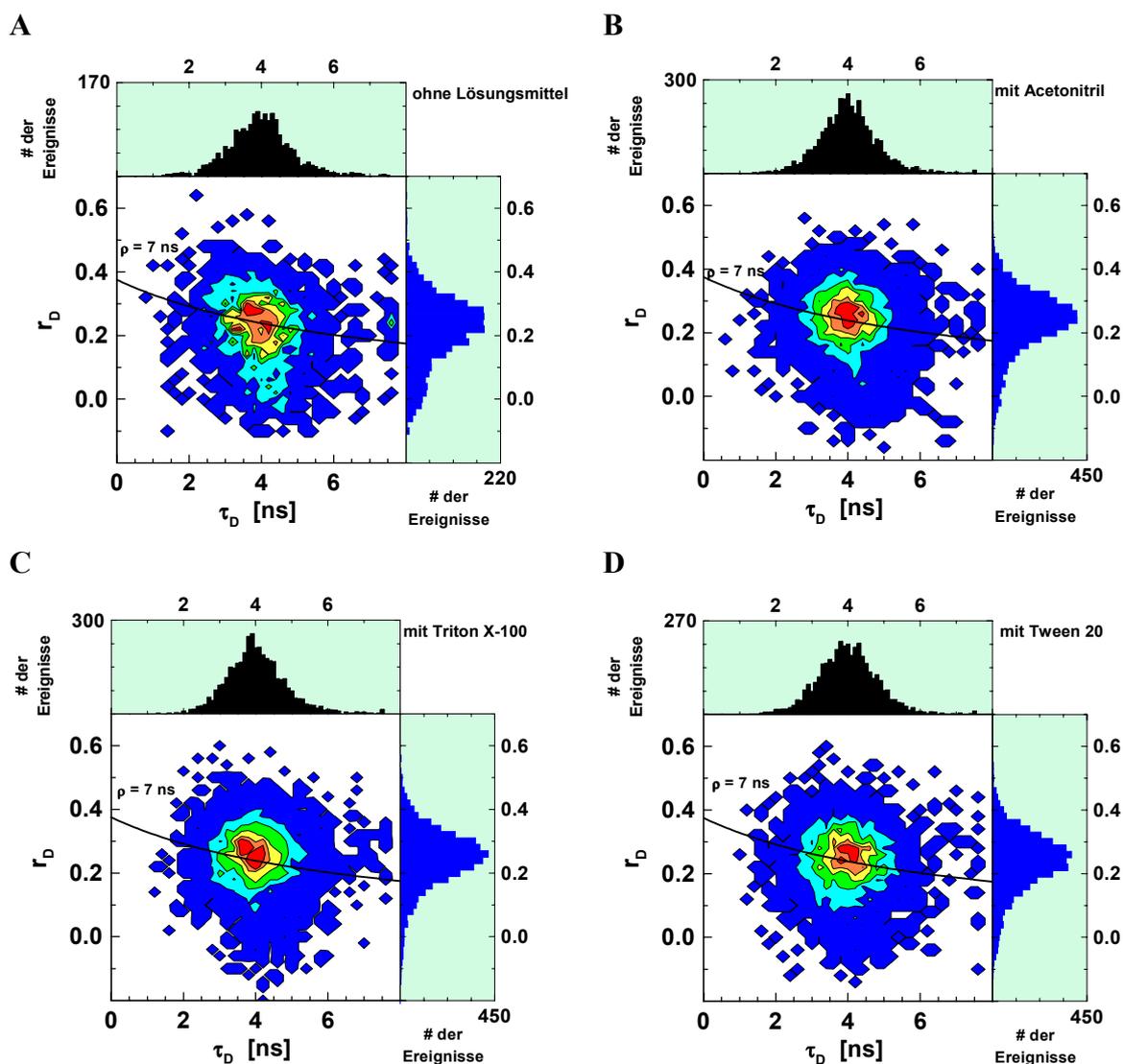


Abb. 4.3-8: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von K287C eluiert von der Nap 10-Säule (A) ohne zusätzlichem Lösungsmittel (d.h. nur mit Puffer), (B) mit Acetonitril, (C) mit Triton X-100 und (D) mit Tween 20. Dargestellt sind die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_D$  und der Anisotropie  $r_D$  (Signalspitzen-orientierte Auswertung). Messbedingungen: s. Abb. 4.3-7B.

#### 4.3.2.4 Untersuchungen der statischen Komplexe mit MFD

Mit den Komplexen der sechs Proteinmutanten mit allen Substraten wurden Einzelmolekülexperimente durchgeführt. Die Histogramme der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)}$ , des Donor-Akzeptor-Abstands  $R_{DA}$  und der Anisotropie  $r_D$  sind in Abb. 4.3-9 und im Anhang I dargestellt. In Anhang II sind die Fluorophor-Abstände der beobachteten Spezies mit den Standardabweichungen gemäß Gl. 2.4-35 aufgelistet.

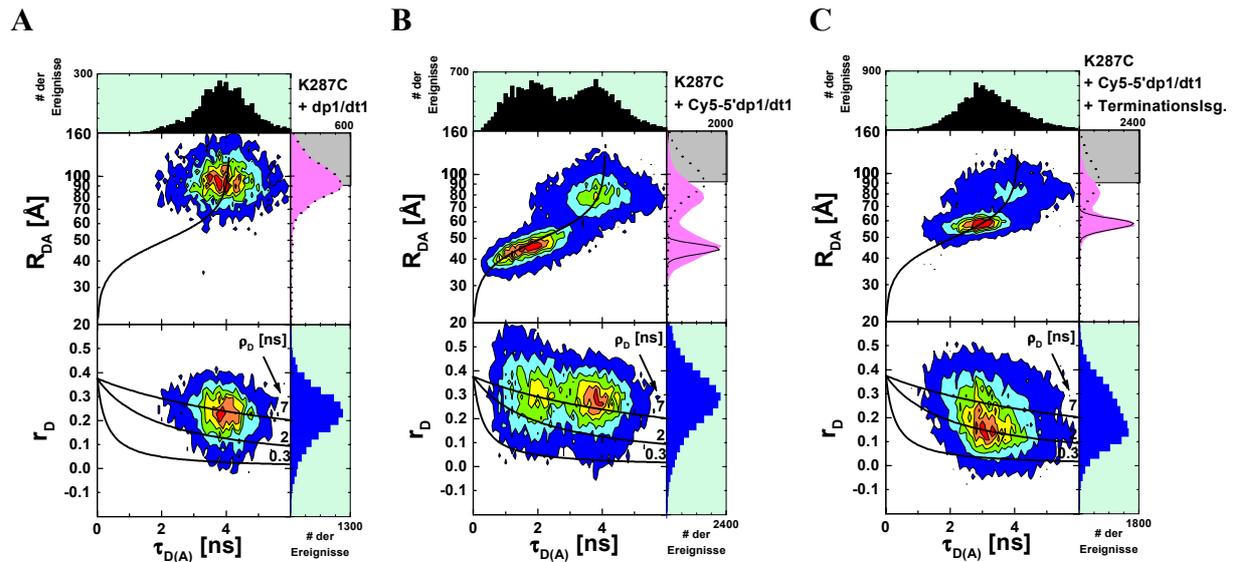


Abb. 4.3-9: Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen von K287C mit (A) dp1/dt1, (B) Cy5-5'-dp1/dt1 und (C) Cy5-5'-dp1/dt1 nach Zugabe einer äquimolaren Lösung von dATP, dGTP, TTP und ddCTP (Terminationslösung). Dargestellt sind die Histogramme des Donor-Akzeptorabstands  $R_{DA}$  und der Anisotropie des Donorfarbstoffs Alexa488,  $r_D$ , gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)}$ . Die schwarze Linie im oberen 2D-Histogramm ( $R_{DA}$  gegen  $\tau_{D(A)}$ ) gibt die Trajektorie von einem konstanten Wert von  $\tau_{D(0)} = 4$  ns wieder. Die schwarzen Linien im unteren 2D-Histogramm ( $r_D$  gegen  $\tau_{D(A)}$ ) geben Linien gleicher Rotationskorrelationszeit,  $\rho_D$ , wieder mit  $\rho_D = 0,3$  ns, 2 ns und 7 ns ( $r_0 = 0,375$ ). Die Werte der weiteren Parameter sind:  $g_G = 0,26$ ,  $g_R = 0,37$ ,  $B_G = 1,7$  kHz,  $B_R = 0,5$  kHz,  $R_{0r} = 53,3$  Å,  $\Phi_{FD} = 0,64$ ,  $\Phi_{FD(0)} = 0,95$ ,  $\Phi_{FA} = 0,40$  und  $a_{trans} = 0,80$ . Messbedingungen: s. Abb. 4.3-7B.

Am Beispiel der Messung von Abb. 4.3-9 werden die Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen gedeutet.

In der Donorprobe der Mutante K287C zeigt Alexa488 (Abb. 4.3-9A) einen maximal bestimmbaren Abstand von  $\sim 95$  Å, eine Fluoreszenzlebensdauer am Maximum der Verteilung von 3,8 ns und eine Anisotropie von 0,26.

Bei der Komplexbildung mit dem Substratmolekül Cy5-5'-dp1/dt1 (Abb. 4.3-9B) treten zwei Populationen auf, die aufgrund von Abstandsunterschieden als verschiedene RT:p/t-Komplexe gedeutet werden. Eine Population besitzt einen mittleren Abstand von  $46$  Å (Spezies I) und die zweite von  $\sim 83$  Å (Spezies II), beide deutlich von der Donorpopulation (Abb. 4.3-9A) abweichend.

Durch die Zugabe einer äquimolaren Lösung von dATP, dGTP, TTP und ddCTP (im Weiteren als Terminationslösung bezeichnet) verschwindet Spezies I, und eine Population mit einem Abstand  $R_{DA}$ ,  $\sim 13$  Å verschoben zu höheren Abständen im Vergleich zu Spezies I, wird beobachtet. Dieser Abstandsunterschied korrespondiert mit dem Abstand von vier Basen einer B-DNS und wird als Polymerisationsprodukt gedeutet. Die Verwendung von ddCTP verhindert den Einbau einer fünften Base durch das Enzym, so dass die Polymerisation an

dieser Stelle gestoppt wird. Das Vorhandensein des Didesoxynukleotids an der Bindungsstelle verhindert den Einbau weiterer Nukleotide und gleichzeitig die Dissoziation des Polymerisationsprodukts.

*Da Spezies I Nukleotide an die Primersequenz anbauen kann, wird diese Population als „produktiver“ Komplex bezeichnet. Die Position von Spezies II im 2D-Histogramm ist nach der Polymerisation unverändert; diese Population wird als „dead-end“ Komplex bezeichnet.*

Die Verteilung von  $R_{DA}$  der Spezies nach Polymerisation entspricht i.a. der berechneten Standardabweichung für Poisson-verteilte Intensitäten. Bei Spezies I in Abb. 4.3-9B ist die Verteilung von  $R_{DA}$  jedoch größer als die erwartete Standardabweichung. Diese Beobachtung wird im Hinblick auf das Ergebnis von Abb. 4.3-9C nicht auf Messfehler zurückgeführt werden, sondern auf Inhomogenitäten von Spezies I. Im Histogramm von Abb. 4.3-9B ist eine Schulter bei einem um 6 Å niedrigeren  $R_{DA}$ -Wert zu beobachten, so dass das Vorhandensein von mindestens zwei Subpopulationen (Spezies Ia und Ib) angenommen wird.

Durch Zugabe von dNTP (Anhang I3) verschwindet Spezies II im Vergleich zur limitierten Polymerisation (Zugabe der Terminationslösung) vollständig. Es wird vermutet, dass bei der limitierten Polymerisation das Didesoxynukleotid die Bindungsposition für Nukleotide dauerhaft besetzt, so dass keine neue Anbindung von dNTP stattfinden kann. Dadurch ist das elongierte Substrat auch in der Bindungsfurche fest gebunden (Abb. 4.3-9C). Im Fall der Zugabe von dNTP kann nach jedem Einbau eines Nukleotids wieder ein neues dNTP gebunden und eingebaut werden usw.. Die Polymerisation kann daher solange stattfinden bis der Komplex aus RT und Polymerisationsprodukt zerfällt. Die Polymerisation und die Dissoziation fanden so schnell nach Zugabe von dNTP statt, dass nur noch ein Komplex in Lösung beobachtet werden konnte.

#### **4.3.2.5 Untersuchungen der Polymerisation mit MFD**

Zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_d$  wurde analog zum bereits erwähnten Stopped-flow-Experiment ein 1000-facher Überschuss an  $dp1/dt1$  zur Lösung von K287C mit Cy5-5'- $dp1/dt1$  gegeben. Dabei wurden die Intensitäten  $S_G$ ,  $S_R$  und das Fluoreszenzintensitätsverhältnis  $F_D/F_A$  über die Zeit verfolgt.

In Abb. 4.3-10A und -C erkennt man die Spezies I und II in der Darstellung der Intensitäten  $S_R$  gegen  $S_G$ . Nach 1720 sec ist nur noch Spezies II in Lösung vorhanden.

In der Darstellung von Abb. 4.3-11 des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  gegen die Messzeit erkennt man die rasche Abnahme der Population mit höherem Energietransfer (Spezies I) mit der Zeit, während die Anzahl der Donor-Ereignisse zunimmt und nach ca. 9 min konstant bleibt. Die Position des Pfeils zeigt an, dass zusätzlich zu den Komplexen von RT: Cy5-5'- $dp1/dt1$  mit der Zeit Ereignisse mit sehr hohen  $F_D/F_A$ -Werten auftreten. Diese sind

den neugebildeten Komplexen von RT:dp1/dt1 zuzuordnen, da durch den hohen Überschuss an unmarkiertem Substrat auch Assoziation von Enzym und Substrat stattfinden kann.

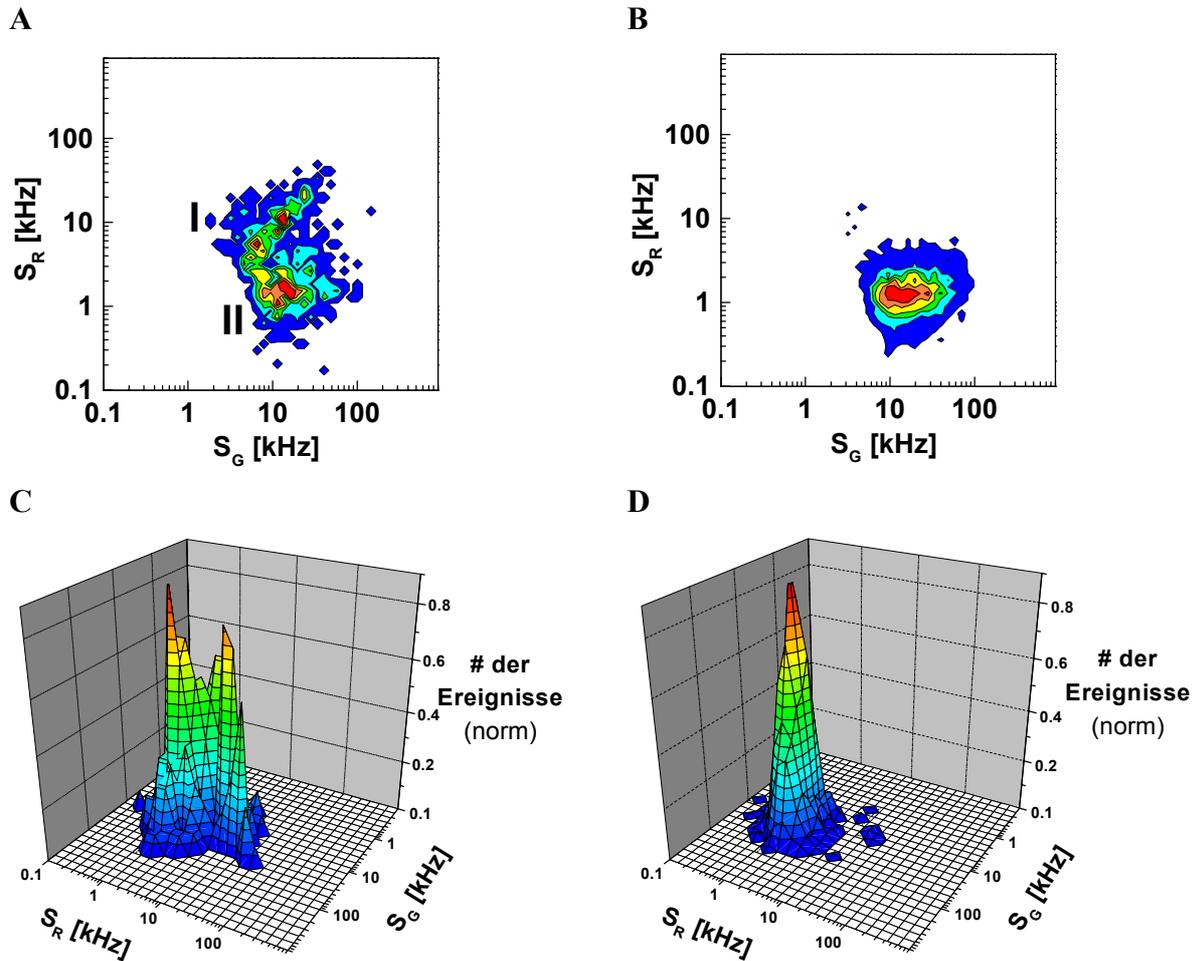


Abb. 4.3-10: Darstellung der Histogramme  $S_R$  gegen  $S_G$  des Experiments zur Messung der Dissoziation (Abb. 4.3-11). In (A) und (C) sind die Ereignisse im Zeitraum bis 80 sec nach Start der Messung gezeigt, während in (B) und (D) die Ereignisse von 1720 sec bis 2020 sec nach Start der Messung dargestellt sind. Messbedingungen: s. Abb. 4.3-7B.

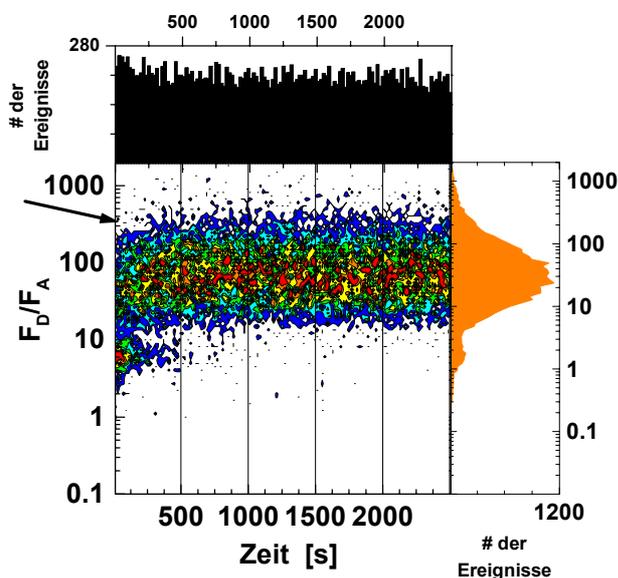


Abb. 4.3-11: Dissoziation von RT:p/t. Ergebnis der Einzelmolekülmessung von K287C mit Cy5-5'-dp1/dt1 nach Zugabe eines 1000-fachen Überschusses von dp1/dt1. Dargestellt sind die Histogramme des Intensitätsverhältnisses  $F_D/F_A$  gegen die Messzeit. Messbedingungen: s. Abb. 4.3-7B.

Werden Ereignisse einer bestimmten  $F_D/F_A$ -Region selektiert und wird ihre Häufigkeit gegen die Messzeit aufgetragen, erhält man Zerfallshistogramme dieser Population. In Abb. 4.3-12 wurden die drei Ereignisse der folgenden Bereiche selektiert und ihre Histogramme erstellt:

- Bereich der Spezies I:  $0,7 < F_D/F_A < 3,8$
- Bereich der Spezies II:  $5,7 < F_D/F_A < 14,1$ , und
- Bereich der neugebildeten Spezies:  $19,5 < F_D/F_A < 291,7$ .

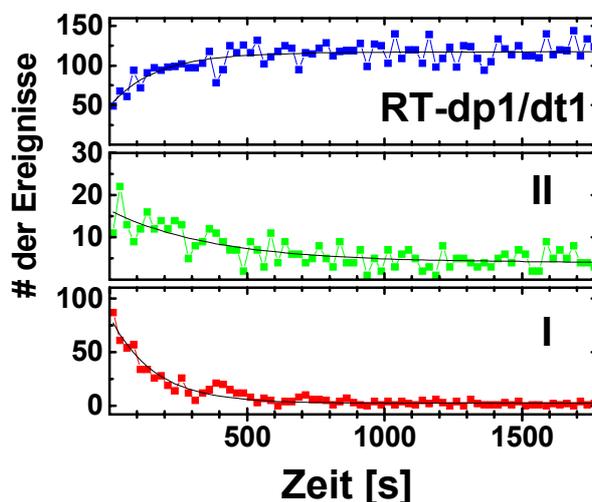


Abb. 4.3-12: Anzahl der Einzelmolekülereignisse gegen die Messzeit des Experiments zur Dissoziation des Komplexes RT:p/t (Abb. 4.3-10), nachdem die Ereignisse nach folgenden Kriterien ausgewählt wurden: (A)  $19,5 < F_D/F_A < 291,7$ , (B)  $5,7 < F_D/F_A < 14,1$  und (C)  $0,7 < F_D/F_A < 3,8$ . Die schwarzen Linien geben die Ergebnisse einer exponentiellen Anpassung wieder. Messbedingungen: s. Abb. 4.3-7B.

Die exponentielle Anpassung der Kurven liefert die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von Spezies I mit  $k_d(I) = (6,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-3} s^{-1}$  und von Spezies II mit  $k_d(II) = (2,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} s^{-1}$ .

#### 4.3.2.6 Modell der Substratbindung

Der Donor-Akzeptor-Abstand von Spezies Ia stimmt mit dem berechneten Abstand der  $C_\beta$ -Atome der Markierungspositionen in der Kristallstruktur von Huang et al. (Huang, 1998). Die Struktur des „produktiven“ Komplexes in Lösung wird daher in einer ähnlichen Konformation wie im Kristall vorgeschlagen.

Die Änderung des Fluorophor-Abstands von Ib lässt den Schluss zu, das es sich hierbei um eine leicht verschobene Konformation des Substrats zur Spezies Ia handelt. Im Vergleich mit dem eingangs beschriebenen Beobachtungen der Enzymkinetik (Kap. 4.3.5.3), handelt es sich bei Spezies Ib um den im Modell (Wöhrl, 1999) vorgeschlagenen Komplex, der durch geringe konformelle Änderung in den „produktiven“ Komplex übergehen kann und im Weiteren als „prä-produktiv“ bezeichnet wird. Auf der Basis der erwähnten Röntgenkristallstruktur können die Populationen der Einzelmolekülmessungen aus den Messungen der verschiedenen Mutanten mit den verschiedenen Substraten den „produktiven“ und „prä-produktiven“ Komplexen zugeordnet werden.

Die übrigen Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen werden dem „dead-end“ Komplex zugeordnet, der eine vollkommen andere Struktur einnimmt. Die Zuordnung der Abstandswerte ist in Anhang II angegeben.

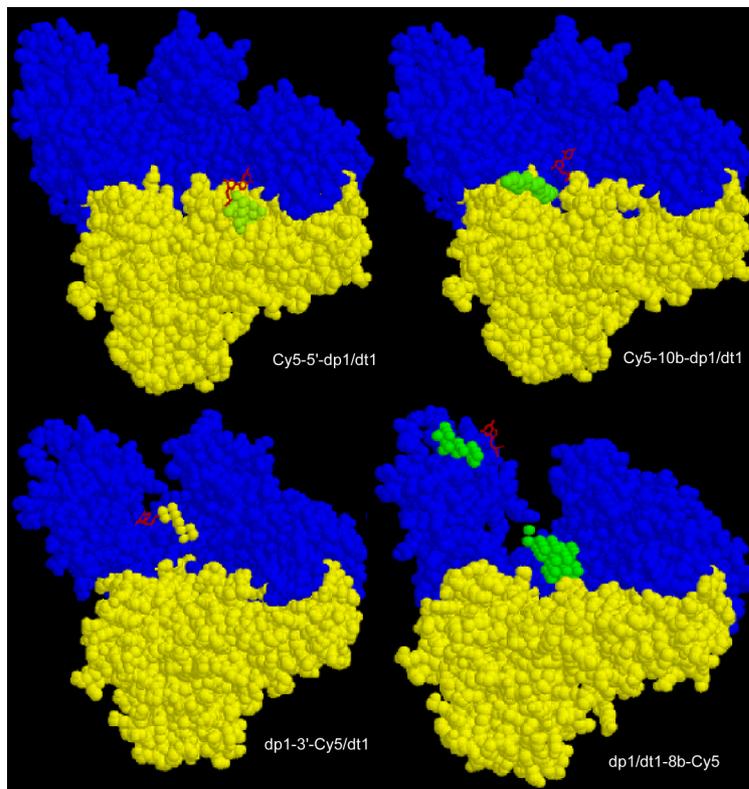


Abb. 4.3-13: Bindungsmodi beobachtet für den „produktiven“ Komplex. Die p66-Untereinheit ist in blau dargestellt, die p51-Untereinheit in gelb. Rot dargestellt sind die Basen, an die der Akzeptorfarbstoff gekoppelt ist, sowie die korrespondierende Überlappungsregion in grün.

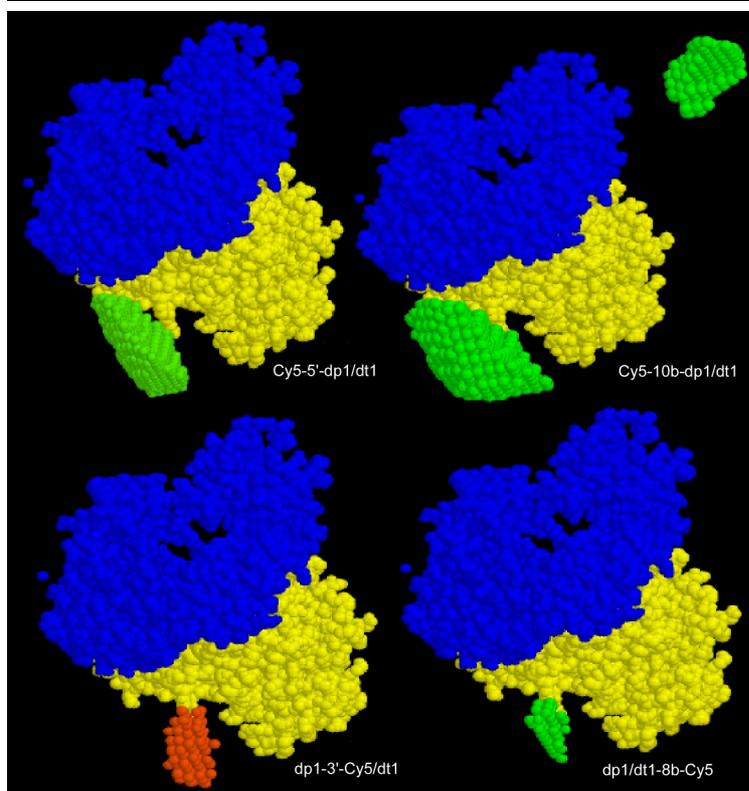


Abb. 4.3-14: Bindungsmodi beobachtet für den „dead-end“ Komplex. Die p66-Untereinheit ist in blau dargestellt, die p51-Untereinheit in gelb. Die Überlappungsregion sind in grün bzw. orange dargestellt.

In Zusammenarbeit mit A.J. Scheidig (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) wurde eine neue Software entwickelt, die es ermöglicht, Strukturmodelle der beobachteten Komplexe zu erstellen (Abb. 4.3-13 und -14).

Dabei wurden die Abstandswerte als Punkte auf einer Kugeloberfläche mit der Position der jeweiligen Mutante als Zentrum der Kugel berechnet. Die Dicken der Kugelschalen reflektieren dabei die Verteilung durch die berechnete Standardabweichung von  $R_{DA}$ . Aus den Schnittregionen der Kugeloberflächen können dann die wahrscheinlichen Aufenthaltsorte des Akzeptorfarbstoffs relativ zur Position des Enzyms ermittelt werden (grüne und orange Bereiche in Abb. 4.3-13 und -14).

Die Entwicklung der Modelle wurde in mehreren Schritten durchgeführt.

Zunächst wurden alle Ergebnisse der Einzelmolekülmessungen in Tab. II (s. Anhang I) berücksichtigt außer den Messungen mit dem Substrat dp1/dt1-5'-Cy5. Dort befindet sich der Akzeptorfarbstoff am Überhang der Template-Sequenz, welche als Einzelstrang vorliegt. Da die Struktur des Einzelstrang-DNA nicht bekannt ist, kann der Abstand für den „produktiven“ Komplex nur abgeschätzt und keine eindeutige Zuordnung der Einzelmolekülergebnisse getroffen werden. Die Untersuchungen von Negroni und Buc (Negroni, 2001) deuten eine Beteiligung des Template-Überhangs bei der Rekombination in Retroviren an und geben eine schematische Vorstellung der Orientierung relativ zum Enzym an. Mit den vorhandenen Daten wurde dann ein vorläufiges, grobes Modell entwickelt.

Erst im zweiten Schritt der Berechnung der Überlappungsregionen wurden diese Daten ebenfalls verwendet.

Die Ergebnisse mit dem DNS/RNS-Hybrid (Cy5-5'-dp1/t1) wurden bei den Berechnungen nicht berücksichtigt. Da bei allen Proteinmutanten die RNaseH-Domäne vorhanden ist, kann im Komplex ein Abbau des Template-Stranges nicht ausgeschlossen werden. Die Mutante K281C wurde ohne RNaseH-Domäne exprimiert, zeigte jedoch im Gel mehrere Proteinbanden (persönliche Mitteilung, P. Rothwell), so dass hier noch weitere Schritte zur Aufreinigung benötigt werden.

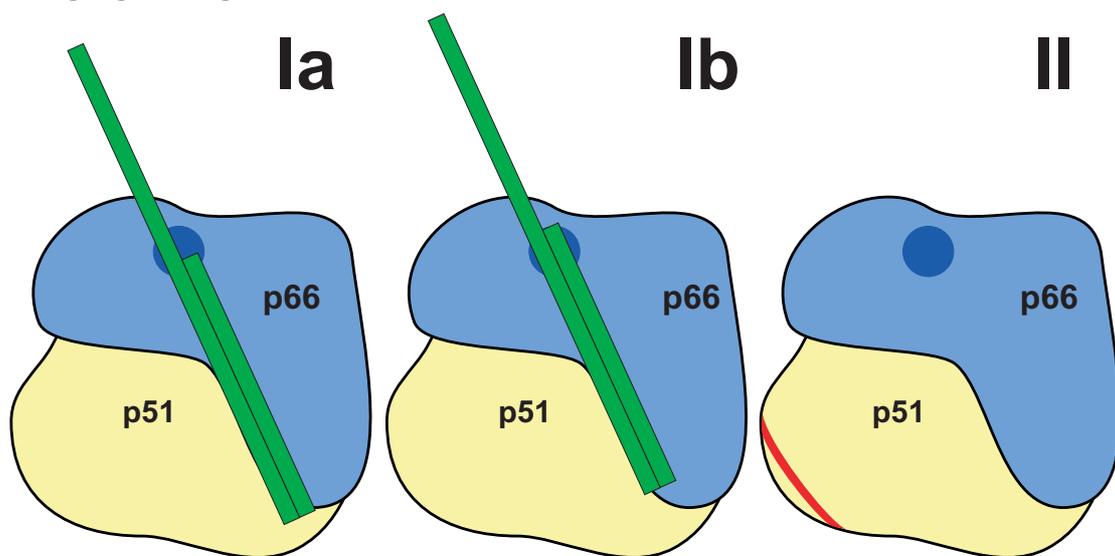


Abb. 4.3-15: Schema zur Darstellung der RT:p/t-Wechselwirkungen. Die p66-Untereinheit ist in blauer Farbe, die p51-Untereinheit in gelber Farbe dargestellt. Das aktive Zentrum der Polymerisation ist dunkelblau gefärbt.

Bei einer weiteren Berechnung der Modelle sollen die Daten mit dem Substrat dp1/dt2 eingesetzt werden. Die Verwendung des Substrats dp1/dt2 ermöglicht bei Zugabe der Terminationslösung einen Einbau von 10 Nukleotiden und damit die Beobachtung größerer Abstandsverschiebungen durch die Polymerisation.

In Abb. 4.3-15 ist das vorläufige Schema der RT:p/t-Komplexe dargestellt. Der „produktive“ Komplex (Ia) wechselwirkt mit dem p/t (grün) in einer Konformation, die bereits bekannten RT:p/t-Strukturen ähnelt (Huang, 1998). Im „prä-produktiven“ Komplex (Ib) ist das Ende des Primers verschoben, so dass das Substrat die Position zu Anbindung von dNTP besetzt. Für den dritten Komplex (II) gibt die rote Linie eine Berührungszone mit dem 5'-Ende des Primers an.

#### 4.3.2.7 Selektive Spektroskopie

Bei der Diskussion der Ergebnisse wurden bisher die Anisotropiedaten des Donorfarbstoffs nicht näher erläutert.

Die Anisotropie  $r_D$  ist im Vergleich zum freien Farbstoff sehr groß, was auf eine stark eingeschränkte Beweglichkeit des Fluorophors am Protein hinweist. Mit Hilfe der selektiven Spektroskopie können die Ereignisse der einzelnen Spezies D-Probe und Spezies I und II aus Abb. 4.3-9A und -9B ausgewählt und ihre Fluoreszenzabklingkurven analysiert werden. Dabei werden die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  sowie die Rotationskorrelationszeit  $\rho$  angepasst. Indem die Rotationskorrelationszeit des Proteins abgeschätzt und bei der Anpassung festgehalten wird, kann die lokale Bewegung des Fluorophors erhalten werden (Tab. 4.3-4).

**Tab. 4.3-4: Parameter der biexponentiellen Anpassung der Fluoreszenzabklingkurven der einzelnen Spezies sowohl für die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  als auch für die Rotationskorrelationszeit  $\rho$ . Gemäß dem *wobbling-in-a-cone*-Modell sind die Winkel  $\theta_{\max}$  und  $\theta_{\min}$  berechnet worden.**

K287C +	$\tau_{av}^x$ [ns]	$\tau_1$ [ns]	$\tau_2$ [ns]	$x_1$	$x_2$	$\rho_1$ [ns]	$\rho_2$ [ns]	$r_{01}$	$r_{02}$	$\theta_{\max}$ [°]	$\theta_{\min}$ [°]
-	3,34	4,40	0,90	0,70	0,30	1,23	60,00	0,04	0,27	65,6	-
dp1/dt1	3,34	4,39	1,02	0,69	0,31	0,84	60,00	0,10	0,16	78,0	58,7
Cy5-5'-dp1/dt1 (Spezies I)	1,54	3,10	0,94	0,28	0,72	0,42	60,00	0,14	0,17	81,0	50,2
Cy5-5'-dp1/dt1 (Spezies II)	3,26	4,35	1,08	0,67	0,33	0,95	60,00	0,12	0,17	78,2	58,2

Unter der Annahme eines kugelförmigen Moleküls mit einem Radius von 40 Å, wurde die Rotationskorrelationszeit  $\rho_2$ , welche die Bewegung des Gesamtmoleküls repräsentiert, gemäß Gl. 2.3-14 mit 60 ns abgeschätzt und bei der Anpassung festgehalten.

Zur Berechnung von  $\theta_{\max}$  bzw.  $\theta_{\min}$  wird  $r_{02} = r_{\infty}$  verwendet (Gl. 2.3-16 und -17).

Nach dem *wobbling-in-a-cone*-Modell können zwei verschiedene Winkel berechnet werden.

Der Winkel  $\theta_{\max}$  eines Kegel, indem der Farbstoff sich aufhält, wenn er an das Makromolekül gebunden ist, wird berechnet unter der Annahme, dass das Absorptionsdipolmoment von Alexa488 senkrecht zur Proteinoberfläche steht. Anhand der Werte in Tab. 4.3-4 kann man erkennen, dass, wenn Substrat am Protein gebunden ist, der Kegel die annähernd gleiche Größe besitzt. Der Kegel besitzt jedoch einen geringeren Öffnungswinkel, wenn das Protein keinen Komplex mit Substrat bildet. Dies kann eine konformelle Umwandlung des Proteins bei Bindung von p/t nicht ausschliessen. Diese Änderung kann bedeuten, dass der Farbstoff in der Daumenregion eine unterschiedliche Beweglichkeit in der geschlossenen und in der offenen Konformation besitzt (Kensch, 2000c).

Im zweiten Fall des *wobbling-in-a-cone*-Modells, mit dem Absorptionsdipolmoment parallel zur Molekülachse, kann der Winkel  $\theta_{\min}$  im Fall des Proteins ohne Substrat nicht berechnet werden, da das Verhältnis  $r_{\infty}/r_0$  außerhalb des Gültigkeitsbereiches der Gl. 2.3-17 liegt. Bei gebundenem Substrat sind die Öffnungswinkel bei den verschiedenen Spezies wiederum in der gleichen Größenordnung. Diese Berechnung bezieht den Linker zwischen Farbstoff und Protein mit ein in die Beschreibung der lokalen Bewegung des Farbstoffs.

Die zwei Winkel geben zwei Grenzfälle des Verhaltens von Alexa488 gebunden an RT wieder. Das wirkliche Verhalten kann mit diesem Modell nicht ausreichend beschrieben werden. Es kann lediglich aufgrund der beobachteten Abweichung von  $\theta_{\max}$  ein Konformationsunterschied von RT mit und ohne Substrat nicht ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe der selektiven Spektroskopie ist möglich, den Fehler der Abstandsbestimmung abzuschätzen (Anhang A). Durch Berechnung eines minimalen und eines maximalen Werts für  $\kappa^2$ ,  $\kappa_{\min}^2$  und  $\kappa_{\max}^2$ , kann der minimale und maximale Abstand abgeschätzt werden, wenn  $\kappa^2$  nicht gleich 2/3 ist.

Zur Berechnung werden zunächst die Verhältnisse der Amplituden der längeren Rotationskorrelationszeiten,  $r_{\infty}$ , zur Anisotropie am Zeitpunkt  $t = 0$ ,  $r_0$ ,  $d_A$  und  $d_D$  bestimmt.

Die Anisotropie des Akzeptorfarbstoffs ist bei  $r_R = 0,05$  (Daten nicht gezeigt) und zeigt damit an, dass Polarisierungseffekte außer Acht gelassen werden können. Nach Gl. A-3 gilt somit  $d_A \approx 1$ . Mit den Messergebnissen für  $r_{02} = r_{\infty}$  (Tab. 4.3-4) können die korrespondierenden Werte für  $d_D$  der Spezies I und II berechnet werden.

Für Spezies I werden danach Werte für  $R_{DA,\min}$  von 84 Å und für  $R_{DA,\max}$  von 111 Å bestimmt. Für Spezies II werden  $R_{DA,\min} = 47$  Å und  $R_{DA,\max} = 62$  Å erhalten. Die minimalen Werte stimmen recht gut mit den Werten aus den 2D-Histogrammen überein, so dass die Annahme von  $\kappa^2 = 2/3$  einen Fehler von 2 % verursacht. Die Werte von  $\kappa_{\max}^2$  betragen bei beiden Spezies  $\approx 3,5$  und liegen damit sehr dicht am maximal möglichen Wert von 4. Dies bedeutet einen Fehler von 25 %. Da aber die Moleküle frei in Lösung diffundieren und nicht immobilisiert sind, sind die Werte für  $R_{DA,\max}$  bei beiden Spezies nicht sehr wahrscheinlich.

### 4.3.3 Zusammenfassung

In den Einzelmoleküluntersuchungen von *Reverser Transkriptase* (RT) mit Nukleinsubstraten (p/t), wurden mehrere Spezies beobachtet. Diese weisen auf verschiedene Komplexe RT:p/t hin, da sie verschiedene Fluorophor-Abstände  $R_{DA}$  besitzen.

Die Zugabe von Nukleotiden führt zur Verlängerung der Templatesequenz und damit zur Veränderung des Abstands einer Spezies, während die andere einen konstanten Donor-Akzeptor-Abstand besitzt. Die erste Spezies, I, wird als „produktiver“ Komplex bezeichnet, da sie zur Polymerisation befähigt ist. Die sehr breite Verteilung mit Andeutung einer Schulter im 1D- $R_{DA}$ -Histogramm von Spezies I deutet auf die Existenz von mindestens zwei Subpopulationen (Ia und Ib) hin, die um 6 Å differieren. Die weitere Spezies (II) wird als „dead-end“ Komplex bezeichnet, da sie keine Änderung der Fluoreszenz bei Zugabe von Nukleotiden zeigt, d.h. nicht zur Polymerisation befähigt ist. Diese Spezies zeigen in Verdrängungsexperimenten eine unterschiedliche Geschwindigkeit der Dissoziation, wobei die von Spezies I um einen Faktor zwei schneller als von II ist.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einem Modell, welches anhand von Ensemblemessungen entwickelt wurde (Wöhrl, 1999). Nach Experimenten mit Kombinationen verschiedener Alexa488-markierter Proteinmutanten mit Substratmolekülen, die den Akzeptorfarbstoff an unterschiedlichen Positionen tragen, kann ein Bindungsmodell für die drei beobachteten Komplexe (Ia, Ib und II) entwickelt werden.

Der Komplex von Spezies Ia korrepondiert vermutlich mit der von Huang *et al.* aufgelösten Struktur (Huang, 1998). Der zweite Komplex, als „prä-produktiver“ Komplex bezeichnet, muss einen Isomerisierungsschritt vollziehen bevor der Einbau von Nukleotiden stattfinden kann. Er repräsentiert eine „verrutschte“ Struktur, indem das Substrat in der richtigen Orientierung gebunden ist, jedoch nicht optimal in der Bindungsspalte positioniert ist, um die Bindung von Nukleotiden zu ermöglichen. Eine Möglichkeit besteht darin, dass das 3'-Ende des Primers das aktive Zentrum der Polymerisation blockiert, so dass das letzte Nukleotid die Bindungsstelle der Nukleotide zum weiteren Einbau besetzt. Die breite Verteilung deutet auf eine weniger definierte Struktur als bei Spezies Ia hin.

Der dritte Komplex („dead-end“, Spezies II) besitzt im Vergleich zu den beiden anderen Komplexen eine völlig verschiedene Struktur und repräsentiert die langsame kinetische Phase, die beim Einbau von einem Nukleotid beobachtet wurde. Dies deutet auf eine Bindung des p/t's in einer Orientierung hin, die nur durch Dissoziation und erneute Bindung des Substrats an das Enzym zum „produktiven“ Komplex den Einbau von Nukleotiden ermöglicht.

## 5 Literaturverzeichnis

- Adachi,K., Yasuda,R., Noji,H., Itoh,H., Harada,Y., Yoshida,M., und Kinoshita Jr.,K., "Stepping rotation of F1-ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging." 2000, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97(13), 7243-7247.
- Affleck,R.L., Ambrose,W.P., Demas,J.N., Goodwin,P.M., Schecker,J.A., Wu,J.M., und Keller,R.A., "Reduction of luminescent background in ultrasensitive fluorescence detection by photobleaching." 1996, *Anal.Chem.*, 68(13), 2270-2276.
- Ambrose,W.P., Goodwin,P.M., Jett,J.H., Johnson,M.E., Martin,J.C., Marrone,B.L., Schecker,J.A., Wilkerson,C.W., Keller,R.A., Haces,A., Shih,P.J., und Harding,J.D., "Application of Single Molecule Detection to DNA Sequencing and Sizing." 1993, *Ber.Bunsenges.Phys.Chem.*, 97, 1535-1542.
- Atkins,P.W., 1988, "Bestimmung der Molekülstruktur: Elektronenspektroskopie." in *Physikalische Chemie*, 475-496, VCH, Weinheim, Basel, Cambridge, New York (NY).
- Barbara,P.F., Adams,D.M., und O'Connor,D.B., "Characterization of organic thin film materials with near-field scanning optical microscopy (NSOM)." 1999, *Annu.Rev.Mat.Sci.*, 29, 433-469.
- Betzig,E. und Chichester,R.J., "Single Molecules Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy." 1993, *Science*, 262, 1422-1425.
- Brand,L., "Zeitaufgelöster Nachweis einzelner Moleküle in Lösung" 1998, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Brand,L., Eggeling,C., und Seidel,C.A.M., "Single-molecule detection of coumarin-120." 1997a, *Nucleosides & Nucleotides*, 16(5-6), 551-556.
- Brand,L., Eggeling,C., Zander,C., Drexhage,K.H., und Seidel,C.A.M., "Single-molecule identification of coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection - comparison of one- and two-photon excitation in solution." 1997b, *J.Phys.Chem.A*, 101(24), 4313-4321.
- Bronstein,I.N. und Semendjajew,K.A., 1991, in *Taschenbuch der Mathematik*, B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Brooker,L.G.S., 1966, "Sensitizing and Desensitizing Dyes." in *The Theory of the Photographic Process*, (Mees,C.E.K. und James,T.H., Eds.) 198-232, The Macmillan Company/Collier-Macmillan Limited, New York/London.
- Cantor,C.R. und Schimmel,P.R., 1980a, in *Biophysical Chemistry Part I: The conformation of biological macromolecules*, (Bartlett, A.C., Vapnek, P.C., und McCombs, L.W., Eds.), W.H.Freeman and Company, San Francisco.
- Cantor,C.R. und Schimmel,P.R., 1980b, in *Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the study of biological structure and function*, (Bartlett, A.C., Vapnek, P.C., und McCombs, L.W., Eds.), W.H.Freeman and Company, San Francisco.

- Clegg,R.M., Murchie,A.I.H., Zechel,A., und Lilley,D.M., "Observing the helical geometry of double-strand DNA in solution by fluorescence energy transfer." 1993, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90, 2294-2298.
- Clegg,R.M., "Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids." 1992, *Methods Enzymol.*, 211, 353-388.
- Dahan,M., Deniz,A.A., Ha,T.J., Chemla,D.S., Schultz,P.G., und Weiss,S., "Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules." 1999, *Chem.Phys.*, 247(1), 85-106.
- Dale,R.E. und Eisinger,J., 1975, "Polarized Excitation Energy Transfer." in *Biochemical Fluorescence: Concepts Vol. 1*, (Chen,R.F. und Edelhoch,H., Eds.) 115-284, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Darnell,J., Lodish,H., und Baltimore,D., 1990, in *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York.
- Deniz,A.A., Laurence,T.A., Beligere,G.S., Dahan,M., Martin,A.B., Chemla,D.S., Dawson,P.E., Schultz,P.G., und Weiss,S., "Single-molecule protein folding: Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2." 2000, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97(10), 5179-5184.
- Deniz,A.A., Dahan,M., Grunwell,J.R., Ha,T.J., Faulhaber,A.E., Chemla,D.S., Weiss,S., und Schultz,P.G., "Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Förster distance dependence and subpopulations." 1999, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96(7), 3670-3675.
- Dickson,R.M., Cubitt,A.B., Tsien,R.Y., und Moerner,W.E., "On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein." 1997, *Nature*, 388(6640), 355-358.
- Dickson,R.M., Norris,D.J., Tzeng,Y.L., Sakowicz,R., Goldstein,L.S.B., und Moerner,W.E., "Single molecules solvated in pores of polyacrylamide gels." 1996, *Mol.Cryst.Liq.Cryst.Sci.Technol., Sect.A*, 291, 31-39.
- Ding,J., Das,K., Tantillo,C., Zhang,W., Clark,A.D., Jr., Jessen,S., Lu,X., Hsiou,Y., Jacobo-Molina,A., und Andries,K., "Structure of HIV-1 reverse transcriptase in a complex with the non-nucleoside inhibitor alpha-APA R 95845 at 2.8 Å resolution." 1995, *Structure*, 3(4), 365-379.
- Di Marzo Veronese,F., Copeland,R.D., De Vico,A.L., Rahman,R., Oroszlan,S., Gallo,R.C., und Sarngadharan,M.G., "Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV." 1986, *Science*, 231, 1289-1291.
- Divita,G., Muller,B., Immendorfer,U., Gautel,M., Rittinger,K., Restle,T., und Goody,R.S., "Kinetics of interaction of HIV reverse transcriptase with primer/template." 1993, *Biochemistry*, 32(31), 7966-7971.
- Dörre,K., Brakmann,S., Brinkmeier,M., Han,K.T., Riebeseel,K., Schwille,P., Stephan,J., Wetzels,T., Lapczynska,M., Stuke,M., Bader,R., Hinz,M., Seliger,H., Holm,J., Eigen,M., und Rigler,R., "Techniques for single molecule sequencing." 1997, *Bioimaging*, 5, 139-152.
- Eggeling,C., Berger,S., Brand,L., Fries,J.R., Schaffer,J., Volkmer,A., und Seidel,C.A.M., "Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection." 2001a, *J.Biotechnol.*, 86(3), 163-180.

- Eggeling,C., Schaffer,J., Seidel,C.A.M., Korte,J., Brehm,G., Schneider,S., und Schrof,W., "Homogeneity, transport, and signal properties of single Ag particles studied by single-molecule surface-enhanced resonance Raman scattering." 2001b, *J.Phys.Chem.*, 105(15), 3673-3679.
- Eggeling,C., "Analyse von photochemischer Kinetik und Moleküldynamik durch mehrdimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie" 1999a, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Eggeling,C., Widengren,J., Rigler,R., und Seidel,C.A.M., 1999b, "Photostabilities of fluorescent dyes for single-molecule spectroscopy: Mechanisms and experimental methods for estimating photobleaching in aqueous solution." in *Applied fluorescence in chemistry, biology and medicine*, (Rettig,W., Strehmel,B., Schrader,M., Seifert,H., Eds.) 193-240, Springer, Berlin.
- Eggeling,C., Fries,J.R., Brand,L., Günther,R., und Seidel,C.A.M., "Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy." 1998a, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 1556-1561.
- Eggeling,C., Widengren,J., Rigler,R., und Seidel,C.A.M., "Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions used for Single-Molecule-Detection: Evidence of Two-Step Photolysis." 1998b, *Anal.Chem.*, 70(13), 2651-2659.
- Eggeling,C., "Photostabilitätsuntersuchungen an Fluoreszenzfarbstoffen für einen Einzelmolekülnachweis" 1996, Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen.
- Ehrenberg,M. und Rigler,R., "Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations." 1974, *Chem.Phys.*, 4, 390-401.
- Eigen,M. und Rigler,R., "Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology." 1994, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91, 5740-5747.
- Elson,E.L. und Magde,D., "Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory." 1974, *Biopolymers*, 13, 1-27.
- Emerson,E.S., Conlin,M.A., Rosenoff,A.E., Norland,K.S., Rodriguez,H., Chin,D., und Bird,G.R., "The Geometrical Structure and Absorption Spectrum of a Cyanine Dye Aggregate." 1967, *J.Phys.Chem.*, 71(8), 2396-2403.
- Enderlein,J., Robbins,D.L., Ambrose,W.P., Goodwin,P.M., und Keller,R.A., "The statistics of single molecule detection: an overview." 1997, *Bioimaging*, 5, 88-98.
- English,D.S., Furube,A., und Barbara,P.F., "Single-molecule spectroscopy in oxygen-depleted polymer films." 2000, *Chem.Phys.Lett.*, 324(1-3), 15-19.
- Epe,B., Steinhauser,K.G., und Woolley,P., "Theory of measurement of Forster-type energy transfer in macromolecules." 1983, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80(9), 2579-2583.
- Esnouf,R., Ren,J., Ross,R., Jones,Y., Stammers,D., und Stuart,D., "Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non nucleoside inhibitors." 1995, *Nat.Struct.Biol.*, 2, 303-308.
- Förster,T. und König,E., "Absorptionsspektren und Fluoreszenzeigenschaften konzentrierter Lösungen organischer Farbstoffe." 1956, *Z.Elektrochem.*, 61(3), 344-348.
- Förster,T., "Zwischenmolekular Energiewanderung und Fluoreszenz." 1948, *Ann.Phys.*, 2, 55-75.

- Fries, J.R., "Charakterisierung einzelner Moleküle in Lösung mit Rhodamin-Farbstoffen" 1998a, Dissertation, Universität-Gesamthochschule Siegen.
- Fries, J.R., Brand, L., Eggeling, C., Köllner, M., und Seidel, C.A.M., "Quantitative identification of different single-molecules by selective time-resolved confocal fluorescence spectroscopy." 1998b, *J.Phys.Chem.A*, 102, 6601-6613.
- Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., und Yanagida, T., "Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution." 1995, *Nature*, 374, 555-559.
- Gilbert, A. und Baggott, J., 1991, in *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Gohlke, C., Murchie, A.I.H., Lilley, D.M., und Clegg, R.M., "Kinking of DNA and RNA helices by bulged nucleotides observed by fluorescence resonance energy transfer." 1994, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 91, 11660-11664.
- Goodwin, P.M., Ambrose, W.P., und Keller, R.A., "Single-molecule detection in liquids by laser-induced fluorescence." 1996, *Acc.Chem.Res.*, 29(12), 607-613.
- Goody, R.S., Muller, B., und Restle, T., "Factors contributing to the inhibition of HIV reverse transcriptase by chain-terminating nucleotides in vitro and in vivo." 1991, *FEBS Lett.*, 291(1), 1-5.
- Ha, T., Laurence, T.A., Chemla, D.S., und Weiss, S., "Polarization Spectroscopy of Single Fluorescent Molecules." 1999a, *J.Phys.Chem.B*, 103(33), 6839-6850.
- Ha, T., Ting, A.Y., Liang, J., Caldwell, W.B., Deniz, A.A., Chemla, D.S., Schultz, P.G., und Weiss, S., "Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism." 1999b, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96(3), 893-898.
- Ha, T., Ting, A.Y., Liang, J., Deniz, A.A., Chemla, D.S., Schultz, P.G., und Weiss, S., "Temporal fluctuations of fluorescence resonance energy transfer between two dyes conjugated to a single protein." 1999c, *Chem.Phys.*, 247(1), 107-118.
- Ha, T., Zhuang, X.W., Kim, H.D., Orr, J.W., Williamson, J.R., und Chu, S., "Ligand-induced conformational changes observed in single RNA molecules." 1999d, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96(16), 9077-9082.
- Ha, T., Enderle, T., Chemla, D.S., und Weiss, S., "Dual-molecule spectroscopy - molecular rulers for the study of biological macromolecules." 1996, *IEEE J.Selected Topics Quantum Electron.*, 2(4), 1115-1128.
- Hansen, R.L., Zhu, X.R., und Harris, J.M., "Fluorescence Correlation Spectroscopy with Patterned Photoexcitation for Measuring Solution Diffusion Coefficients of Robust Fluorophores." 1998, *Anal.Chem.*, 70, 1281-1287.
- Hillisch, A., Lorenz, M., und Diekmann, S., "Recent advances in FRET: distance determination in protein-DNA complexes." 2001, *Current Opinion in Structural Biology*. 11(2):201-207.
- Hillisch, A., "Computer Aided Design and Structure Verification of Single- and Multiple-Bulge DNA Molecules." 1998, Dissertation, Formal- und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien.

- Hochstrasser,R.M., Chen,S.M., und Millar,D.P., "Distance distribution in a dye-linked oligonucleotide determined by time-resolved fluorescence energy transfer." 1992, *Biophys.Chem.*, 45, 133-141.
- Huang,H., Chopra,R., Verdine,G.L., und Harrison,S.C., "Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance." 1998, *Science*, 282(5394), 1669-1675.
- Jacobo-Molina,A., Ding,J., Nanni,R.G., Clark,A.D., Lu,X., Tantillo,C., Williams,R.L., Kramer,G., Ferris,A.L., Clark,P., Hizi,A., Hughes,S.H., und Arnold,E., "Crystal Structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA." 1993, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90, 6320-6324.
- Jares-Erijman,E.A. und Jovin,T.M., "Determination of DNA Helical Handedness by Fluorescence Resonance Energy Transfer." 1996, *J.Mol.Biol.*, 257, 597-617.
- Jelezko,F., Tietz,C., Gerken,U., Wrachtrup,J., und Bittl,R., "Single-molecule spectroscopy on photosystem I pigment-protein complexes." 2000, *J.Phys.Chem.B*, 104(34), 8093-8096.
- Jelley,E.E., "Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State." 1936, *Nature*, 138, 1009-1010.
- Kasha,M., "Characterization of electronic transitions in complex molecules." 1950, *Discussion Faraday Soc.*, 9, 14.
- Kawski,A., "Fluorescence Anisotropy: Theory and Applications of Rotational Depolarization." 1993, *Critic.Rev.Analytic.Chem.*, 23(6), 459-529.
- Keller,R.A., Ambrose,W.P., Goodwin,P.M., Jett,J.H., Martin,J.C., und Wu,M., "Single-molecule fluorescence analysis in solution." 1996, *Appl.Spectrosc.*, 50(7), 12A-32A.
- Kensch,O., "Untersuchung zur Konformation und Dynamik der Reversen Transkriptase von HIV-1 durch ESR- und Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie" 2000a, Dissertation, Universität Dortmund.
- Kensch,O., Connolly,B.A., Steinhoff,H.-J., McGregor,A., Goody,R.S., und Restle,T., "HIV-1 Reverse Transcriptase-Pseudoknot RNA Aptamer Interaction Has a Binding Affinity in the Low Picomolar Range Coupled with High Specificity." 2000b, *J.Biol.Chem.*, 275(24), 18271-18278.
- Kensch,O., Restle,T., Wohrl,B.M., Goody,R.S., und Steinhoff,H.-J., "Temperature-dependent Equilibrium between the Open and Closed Conformation of the p66-Subunit of HIV-1 Reverse Transcriptase Revealed by Site-directed Spin Labelling." 2000c, *J.Mol.Biol.*, 301, 1029-1039.
- Kinosita,K., Kawato,S., und Ikegami,A., "A theory of fluorescence polarization decay in membranes." 1977, *Biophys.J.*, 20, 289-305.
- Kneipp,K., Kneipp,H., Manoharan,R., Itzkan,I., Dasari,R.R., und Feld,M.S., "Surface-enhanced raman scattering (Sers) - A new tool for single molecule detection and identification." 1998, *Bioimaging*, 6(2), 104-110.
- Knemeyer,J.-P., Marmé,N., und Sauer,M., "Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level." 2000, *Anal.Chem.*, 72(16), 3717-3724.

- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., und Steitz, T.A., "Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor." 1992, *Science*, 256(5065), 1783-1790.
- Koppel, D.E., "Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy." 1974, *Phys.Rev.A*, 10(6), 1938-1945.
- Koshioka, M., Sasaki, K., und Masuhara, H., "Time-Dependent Fluorescence Depolarization Analysis in Three Dimensional Microscopy." 1995, *Appl.Spectrosc.*, 49(2), 224-228.
- Krebs, R., Immendorfer, U., Thrall, S.H., Wohrl, B.M., und Goody, R.S., "Single-step kinetics of HIV-1 reverse transcriptase mutants responsible for virus resistance to nucleoside inhibitors zidovudine and 3-tc." 1997, *Biochemistry*, 36(33), 10292-10300.
- Kullback, S., 1959, in *Information Theory and Statistics*, John Wiley & Sons, New York.
- Lakowicz, J.R., Gryczynski, I., Cheung, H.C., Wang, C.K., Johnson, M.L., und Joshi, N., "Distance distributions in proteins recovered by using frequency-domain fluorometry." 1988, *Biochemistry*, 27, 9149-9160.
- Lakowicz, J.R., 1999, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.
- Lightfoote, M.M., Coligan, J.E., Folks, T.M., Fauci, A.S., Martin, M.A., und Venkatesan, S., "Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus." 1986, *Journal of Virology*, 60(2), 771-775.
- Lorenz, M., Hillisch, A., Payet, D., Buttinelli, M., Travers, A., und Diekmann, S., "DNA Bending Induced by High Mobility Group Proteins Studied by Fluorescence Resonance Energy Transfer." 1999, *Biochemistry*, 38(37), 12150-12158.
- Lu, H.P., Xun, L., und Xie, X.S., "Single-Molecule Enzymatic Dynamics." 1998, *Science*, 282, 1877-1882.
- Lyon, W.A. und Nie, S., "Confinement and detection of single molecules in submicrometer channels." 1997, *Anal.Chem.*, 69, 3400-3405.
- Magde, D., Elson, E.L., und Webb, W.W., "Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy." 1972, *Phys.Rev.Lett.*, 29, 705-708.
- Mann, J.M. und Tarantola, D.J.M., "Hiv 1998 - the global picture." 1998, *Scientific American*, 279(1), 82-83.
- McKay, R.B. und Hillson, P.J., "Metachromatic behaviour of dyes in solution - Interpretation on basis of interaction between dye ions and counter-ions." 1965, *Trans.Faraday Soc.*, 61(512P), 1800.
- Mets, Ü. und Rigler, R., "Submillisecond Detection of Single Rhodamine Molecules in Water." 1994, *J.Fluoresc.*, 4(3), 259-264.
- Miick, S.M., Fee, R.S., Millar, D.P., und Chazin, W.J., "Crossover isomer bias is the primary sequence-dependent property of immobilized Holliday junctions." 1997, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94(17), 9080-9084.

- Moerner, W.E. und Orrit, M., "Illuminating Single Molecules in Condensed Matter [Review]." 1999, *Science*, 283(5408), 1670-1676.
- Moerner, W.E. und Kador, L., "Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid." 1989, *Phys.Rev.Lett.*, 62(21), 2535-2538.
- Muller, B., Restle, T., Kuhnel, H., und Goody, R.S., "Expression of the heterodimeric form of human immunodeficiency virus type 2 reverse transcriptase in *Escherichia coli* and characterization of the enzyme." 1991a, *J.Biol.Chem.*, 266(22), 14709-14713.
- Muller, B., Restle, T., Reinstein, J., und Goody, R.S., "Interaction of fluorescently labeled dideoxynucleotides with HIV-1 reverse transcriptase." 1991b, *Biochemistry*, 30(15), 3709-3715.
- Müller, R., Zander, C., Sauer, M., Deimel, M., Ko, D.S., Siebert, S., Arden-Jacob, J., Deltau, G., Marx, N.J., Drexhage, K.H., und Wolfrum, J., "Time-resolved identification of single molecules in solution with a pulsed semiconductor diode laser." 1996, *Chem.Phys.Lett.*, 262, 716-722.
- Negroni, M. und Buc, H., "Retroviral recombination: what drives the switch?" 2001, *Nat.Cell Biol.*, 2(2), 151-155.
- Nie, S., Chiu, D.T., und Zare, R.N., "Real-Time Detection of Single Molecules in Solution by Confocal Fluorescence Microscopy." 1995, *Anal.Chem.*, 67, 2849-2857.
- Nie, S., Chiu, D.T., und Zare, R.N., "Probing Individual Molecules with Confocal Fluorescence Microscopy." 1994, *Science*, 266, 1018-1021.
- Nord, S., "Spektroskopische Untersuchung der inter- und intramolekularen Fluoreszenzlöschung von Rhodaminfarbstoffen durch Nukleotide und Nukleinsäuren" 1998, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Nord, S., Sauer, M., Arden-Jacob, J., Drexhage, K.H., Lieberwirth, U., Seeger, S., und Wolfrum, J., "Ground and Excited State Reactions of New Red Fluorescent Dyes and the DNA base guanosine." 1997, *J.Fluoresc.*, 7(1), 79S-81S.
- Norman, D.G., Grainger, R.J., Uhrin, D., und Lilley, D.M.J., "Location of cyanine-3 on double-stranded DNA: Importance for fluorescence resonance energy transfer studies." 2000, *Biochemistry*, 39(21), 6317-6324.
- O'Connor, D.V. und Phillips, D., 1984, in *Time-correlated Single Photon Counting*, Academic Press, New York.
- Orrit, M. und Bernard, J., "Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a p-Terphenyl Crystal." 1990, *Phys.Rev.Lett.*, 65(21), 2716-2719.
- Oswald, B., Patsenker, L., Duschl, J., Szmecinski, H., Wolfbeis, O.S., und Terpetschnig, E., "Synthesis, Spectral Properties, and Detection Limits of Reactive Squaraine Dyes, a New Class of Diode Laser Compatible Fluorescent Protein Labels." 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10, 925-931.
- Pappalardo, P., Samelson, H., und Lempicki, A., "Long Pulse Laser Emission From Rhodamine 6 G Using Cyclooctatetraene." 1998, *Appl.Phys.Lett.*, 16(7), 267-269.

- Parkhurst,K.M. und Parkhurst,L.J., "Donor-acceptor distance distributions in a double-labeled fluorescent oligonucleotide both as a single strand and in duplexes." 1995, *Biochemistry*, 34(1), 293-300.
- Ren,J., Esnouf,R., Garman,R., Somers,D., Ross,C., Kirby,C.R.I., Keeling,J., Darby,G., Jones,Y., Stuart,D.I., und Stammers,D., "High resolution structures of HIV-1 RT from four RT-inhibitor complexes." 1995, *Nat.Struct.Biol.*, 2, 293-302.
- Restle,T., Muller,B., und Goody,R.S., "Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention." 1990, *J.Biol.Chem.*, 265(16), 8986-8988.
- Rigler,R., "Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening - Applications in biotechnology." 1995, *J.Biotechnol.*, 41, 177-186.
- Rigler,R., Widengren,J., und Mets,Ü., 1993, "Interactions and Kinetics of Single Molecules as Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy." in *Fluorescence Spectroscopy. New Methods and Applications.*, (Wolfbeis,O.S., Ed.) 13-24, Springer-Verlag, Berlin.
- Rigler,R. und Widengren,J., 1990, "Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy." in *BioScience*, (Klinge,B. und Owman,C., Eds.) 180-183, Lund University Press, Lund.
- Rittinger,K., Divita,G., und Goody,R.S., "Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors." 1995, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 92(17), 8046-8049.
- Rodgers,D.W., Gamblin,S.J., Harris,B.A., Ray,C., Culp,J.S., Hellmig,B., Woolf,D.J., Debouck,C., und Harrison,S.C., "The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1." 1995, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 92, 1222-1226.
- Rothwell,P.J., Berger,S., Kensch,O., Felekyan,S., Antonik,M., Wohrl,B.M., Restle,T., Goody,R.S., und Seidel,C.A.M., "Multi-Parameter Single-molecule Fluorescence Spectroscopy reveals Heterogeneity of HIV-1 Reverse Transcriptase:primer/template Complexes." 2001, *Manuskript in Vorbereitung*.
- Ruiter,A.G., Veerman,J.A., Garcia-Parajo,M.F., und van Hulst,N.F., "Single-molecule rotational and translational diffusion observed by near-field scanning optical microscopy." 1997, *J.Phys.Chem.A*, 101, 7318-7323.
- Sanger,F., Nicklen,S., und Coulson,A.R., "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." 1977, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 5463-5467.
- Sauer,M., Angerer,B., Ankenbauer,W., Foldes-Papp,Z., Gobel,F., Han,K.T., Rigler,R., Schulz,A., Wolfrum,J., und Zander,C., "Single molecule DNA sequencing in submicrometer channels: state of the art and future prospects." 2001, *Journal of Biotechnology.86(3 Special Issue SI):181-201*.
- Sauer,M., Drexhage,K.H., Lieberwirth,U., Müller,R., Nord,S., und Zander,C., "Dynamics of the electron transfer reaction between an oxazine dye and DNA oligonucleotides monitored on the single-molecule level." 1998, *Chem.Phys.Lett.*, 284, 153-163.
- Sase,I., Miyata,H., Corrie,J.E.T., Craik,J.S., und Kinosita Jr.,K., "Real time imaging of single fluorophores on moving actin with an epifluorescence microscope." 1995, *Biophys.J.*, 69, 323-328.

- Schaffer, J., "Charakterisierung von Einzelmolekülen durch selektive Fluoreszenzspektroskopie" 2000, Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Schaffer, J., Volkmer, A., Eggeling, C., Subramaniam, V., Striker, G., und Seidel, C.A.M., "Identification of single molecules in aqueous solution by time-resolved fluorescence spectroscopy." 1999, *J.Phys.Chem.A*, 103(3), 331-336.
- Schmidt, Th., Schütz, G.J., Baumgartner, W., Gruber, H.J., und Schindler, H., "Imaging of single molecule diffusion." 1996, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93, 2926-2929.
- Schwille, P., Meyer-Almes, F.J., und Rigler, R., "Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution." 1997, *Biophys.J.*, 72(4), 1878-1886.
- Seidel, C.A.M., Schulz, A., und Sauer, M.H.M., "Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. [Review]." 1996, *J.Phys.Chem.*, 100(13), 5541-5553.
- Seidel, C.A.M., "Laserspektroskopische Untersuchungen molekularer Aspekte der nukleobasenspezifischen Löschung von Fluoreszenzfarbstoffen" 1992, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Selvin, P.R., "Fluorescence Resonance Energy Transfer." 1995, *Methods Enzymol.*, 246, 301-335.
- Shera, E.B., Seitzinger, N.K., Davis, L.M., Keller, R.A., und Soper, S.A., "Detection of single fluorescent molecules." 1990, *Chem.Phys.Lett.*, 174(6), 553-557.
- Stühmeier, F., Welch, J.B., Murchie, A.I.H., Lilley, D.M.J., und Clegg, R.M., "Global structure of three-way DNA junctions with and without additional unpaired bases: a fluorescence resonance energy transfer analysis." 1997, *Biochemistry*, 36, 13530-13538.
- Tamarat, P., Maali, A., Lounis, B., und Orrit, M., "Ten Years of Single-Molecule Spectroscopy." 2000, *J.Phys.Chem.*, 104(1), 1-16.
- Thompson, N.L., 1991, "Fluorescence Correlation Spectroscopy." in *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 1: Techniques*, (Lakowicz, J.R., Ed.) 337-378, Plenum Press, New York.
- Thrall, S.H., Reinstein, J., Wohrl, B.M., und Goody, R.S., "Evaluation human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase primer tRNA binding by fluorescence spectroscopy - specificity and comparison to primer/template binding." 1996, *Biochemistry*, 35(14), 4609-4618.
- van der Meer, B.W., Cooker, G., und Chen, S.Y., 1994, in *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*, VCH Publishers, New York.
- Vámosi, G. und Clegg, R.M., "The helix-coil transition of dna duplexes and hairpins observed by multiple fluorescence parameters." 1998, *Biochemistry*, 37(40), 14300-14316.
- Wallace, M.I., Ying, L., und Klenerman, D., "FRET Fluctuation Spectroscopy: Exploring the Conformational Dynamics of a DNA Hairpin Loop." 2000, *J.Phys.Chem.B*, 104(48), 11551-11555.
- Weber, J., "Study of the influence of triplet quencher on the photobleaching of rhodamine-6G." 1973, *Opt.Commun.*, 7(4), 420-422.

- Weiss,S., "Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy." 2000, *Nat.Struct.Biol.*, 7(9), 724-729.
- Weiss,S., "Fluorescence spectroscopy of single biomolecules." 1999, *Science*, 283(5408), 1676-1683.
- Weller,A., "Photoinduced Electron Transfer in Solution: Exciplex and Radical Ion Pair Formation Free Enthalpies and their Solvent Dependence." 1982, *Z.Phys.Chem.*, 133, 93-98.
- West,W. und Carroll,B.H., 1966, "Spectral Sensitivity and the Mechanism of Spectral Sensitation." in *The Theory of the Photographic Process*, (Mees,C.E.K. und James,T.H., Eds.) 233-277, The Macmillan Company, Collier-Macmillan Limited, New York, London.
- West,W. und Pearce,S., "The Dimeric State of Cyanine Dyes." 1965, *J.Phys.Chem.*, 69(6), 1894-1903.
- Widengren,J., Schweinberger,E., Berger,S., und Seidel,C.A.M., "Two new concepts to measure fluorescence resonance energy transfer via fluorescence correlation spectroscopy: Theory and experimental realizations." 2001, *J.Phys.Chem.*, 105(28), 6851-6866.
- Widengren,J. und Schwille,P., "Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy." 2000, *J.Phys.Chem.A*, 104(27), 6416-6428.
- Widengren,J. und Rigler,R., "Review - fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces." 1998, *Cell.Mol.Biol.*, 44(5), 857-879.
- Widengren,J., "Fluorescence Correlation Spectroscopy, Photophysical Aspects And Applications" 1996a, Dissertation, Karolinska Institutet.
- Widengren,J. und Rigler,R., "Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy." 1996b, *Bioimaging*, 4, 149-157.
- Widengren,J., Mets,Ü., und Rigler,R., "Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study." 1995, *J.Phys.Chem.*, 99, 13368-13379.
- Widengren,J., Rigler,R., und Mets,Ü., "Triplet-State Monitoring by Fluorescence Correlation Spectroscopy." 1994, *J.Fluoresc.*, 4(3), 255-258.
- Wild,U.P., Holzwarth,A.R., und Good,H.P., "Measurement and analysis of fluorescence decay curves." 1977, *Rev.Sci.Instrum.*, 48(12), 1621-1627.
- Wöhrl,B.M., Krebs,R., Goody,R.S., und Restle,T., "Refined model for primer/template binding by HIV-1 reverse transcriptase: Pre-steady-state kinetic analyses of primer/template binding and nucleotide incorporation events distinguish between different binding modes depending on the nature of the nucleic acid substrate." 1999, *J.Mol.Biol.*(2), 333-344.
- Wöhrl,B.M., Krebs,R., Thrall,S.H., Le Grice,S.F.J., Scheidig,A.J., und Goody,R.S., "Kinetic analysis of four hiv-1 reverse transcriptase enzymes mutated in the primer grip region of p66 - implications for dna synthesis and dimerization." 1997, *J.Biol.Chem.*, 272(28), 17581-17587.
- Xu,X.H. und Yeung,E.S., "Direct measurement of single-molecule diffusion and photodecomposition in free solution." 1997, *Science*, 275, 1106-1109.

- Ye, J.Y., Yamane, Y., Yamauchi, M., Nakatsuka, H., und Ishikawa, M., "Direct observation of the interaction of single fluorescent nucleotide analogue molecules with DNA polymerase I." 2000, *Chem. Phys. Lett.*, 320(5-6), 607-612.
- Zander, C. und Drexhage, K.H., "Sequential Counting of Single Molecules in a Capillary." 1996a, *J. Fluoresc.*, 7, 37S-39S.
- Zander, C., Sauer, M., Drexhage, K.H., Ko, D.S., Schulz, A., Wolfrum, J., Brand, L., Eggeling, C., und Seidel, C.A.M., "Detection and characterization of single molecules in aqueous solution." 1996b, *Appl. Phys. B*, 63(5), 517-523.
- Zhuang, X., Bartley, L.E., Babcock, H.P., Russell, R., Ha, T., Herschlag, D., und Chu, S., "A single-molecule study of RNA catalysis and folding." 2000, *Science*, 288(5473), 2048-2051.



## Anhang

### A Der Orientierungsfaktor $\kappa^2$

Der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  ist abhängig von der relativen Orientierung von Donor-Übergangsdipolmoment, Akzeptor-Übergangsdipolmoment und der Verbindungslinie der Zentren von Donor und Akzeptor.  $\theta_D$  bzw.  $\theta_A$  sind die Winkel zwischen den Dipolmomenten und dem Abstandsvektor von Donor und Akzeptor,  $\vec{R}_{DA}$ . Projiziert man das Fluoreszenzdipolmoment des Donors  $\vec{\mu}_D$  und das Absorptionsdipolmoment des Akzeptors  $\vec{\mu}_A$  auf denselben Ursprung, wird der Winkel zwischen den Dipolmomenten mit  $\theta_T$  bezeichnet. Die Winkel sind in Abb. A1 schematisch dargestellt.

Die folgende Gleichung gibt einen Ausdruck für  $\kappa^2$  wieder

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cdot \cos\theta_A)^2 \quad \text{Gl. A-1a}$$

Unter Berücksichtigung des Winkels zwischen den Übergangsdipolmomenten in einer Ebene senkrecht zum Abstandsvektor,  $\varphi$ , kann  $\kappa^2$  auch beschrieben werden als

$$\kappa^2 = (\sin\theta_D \sin\theta_A \cos\varphi - 2\cos\theta_D \cdot \cos\theta_A)^2 \quad \text{Gl. A-1b}$$

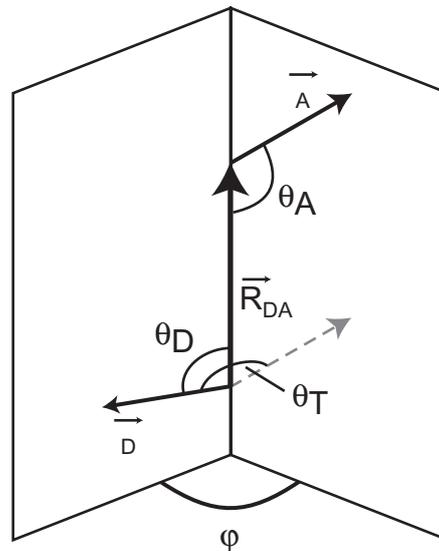


Abb. A1: Darstellung der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten  $\vec{\mu}_A$  und  $\vec{\mu}_D$  und des Abstandsvektors  $\vec{R}_{DA}$ .

Es können mehrere Fälle unterschieden werden:

- $\kappa^2 = 0,476$ : Donor- und Akzeptor-Orientierungen ändern sich nicht während der Lebensdauer des angeregten Zustands. Bei isotroper Verteilung von relativen D-A-Orientierungen sollte die Lösung „eingefroren“ werden (niedrige Temperatur oder hohe Viskosität). Sind die Verteilungen von Orientierung und auch Abstand zufällig, kann das statistische Mittel  $\kappa^2 = 0,476$  verwendet werden. Für diesen Fall wird ein

multiexponentielles Fluoreszenzabklingverhalten des Donorfluorophors erwartet (falls dieses monoexponentiell im Fall des freien Farbstoffs ist).

- $\kappa^2 = 2/3$ : Donor- und Akzeptormomente ändern sich während der Lebensdauer der angeregten Zustände durch Rotationsdiffusion.

In den meisten Fällen wird  $\kappa^2 = 2/3$  angenommen.

Der Wert von  $\kappa^2$  kann für ein reales System nicht berechnet, jedoch ein minimaler und ein maximaler Wert,  $\kappa_{\min}^2$  und  $\kappa_{\max}^2$ , bestimmt werden (Lakowicz, 1988; Lakowicz, 1999). In Anlehnung an das *wobbling-in-a-cone*-Modell (Kinosita, 1977) wird angenommen, dass sich sowohl der Donor- als auch der Akzeptorfarbstoff innerhalb eines Kegels bewegen. Außerdem wird angenommen, dass der Energietransfer über alle möglichen Orientierungen der Übergangsdipolmomente zueinander gemittelt wird.

Für die Berechnung der Grenzwerte von  $\kappa^2$  gilt:

$$\kappa_{\min}^2 = \frac{2}{3} \left( 1 - \frac{d_D + d_A}{2} \right) \quad \text{Gl. A-2a}$$

$$\kappa_{\max}^2 = \frac{2}{3} (1 + d_D + d_A \cdot 3d_D d_A) \quad \text{Gl. A-2b}$$

Die Werte  $d_i$  ( $i = D$  oder  $A$ ) stellen die Depolarisationsfaktoren aufgrund der Bewegung von Donor und Akzeptor dar, jedoch nicht aufgrund der Gesamtbewegung des Makromoleküls (DNS oder Protein). Sie werden aus der biexponentiellen Anpassung von Fluoreszenzabklingkurven erhalten, indem das Verhältnis der Amplitude der längeren Rotationskorrelationszeit,  $r_\infty$ , zur Anisotropie am Zeitpunkt  $t = 0$ ,  $r_0$ , ermittelt wird:

$$d_i = \left( \frac{r_\infty}{r_0} \right)^2 \quad \text{Gl. A-3}$$

Es gilt  $d_D = d_A = 1$ , wenn Donor und Akzeptor während der Lebensdauer des angeregten Zustands nicht relativ zueinander rotieren. Dann gilt  $\kappa_{\min}^2 = 0$  und  $\kappa_{\max}^2 = 4$ .

Der Fehler bei der Abstandsbestimmung kann somit abgeschätzt werden. Ist der Abstand  $R_{DA}$  mit einem Försterabstand  $R_0(\kappa^2=2/3)$  bestimmt worden, dann gilt für den minimalen und den maximalen Wert  $R_{DA,\min}$  und  $R_{DA,\max}$ :

$$R_{DA,\min} = \left( \frac{\kappa_{\min}^2}{2/3} \right)^{1/6} \cdot R_{DA}(\kappa^2 = 2/3) \quad \text{Gl. A-4a}$$

$$R_{DA,\max} = \left( \frac{\kappa_{\max}^2}{2/3} \right)^{1/6} \cdot R_{DA}(\kappa^2 = 2/3) \quad \text{Gl. A-4b}$$

## B Filter für die Spektroskopie

Es werden für den optischen Aufbau verschiedene Arten von Filtern genutzt.

Die OD-Filter dienen zur Abschwächung des Laserlichts, d.h. zur Regulierung der Anregungsleistungsdichte.

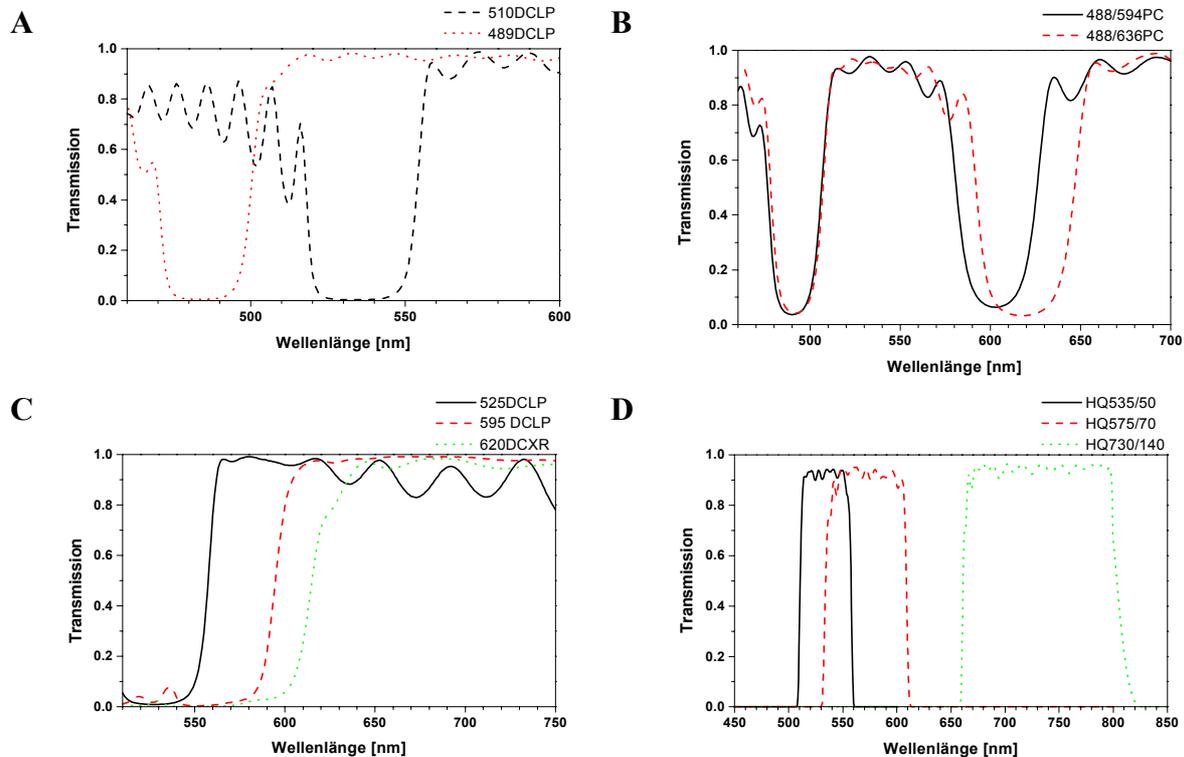


Abb. B1: Transmission in Abhängigkeit von der Wellenlänge von (A) und (B) den Strahlteilern im Mikroskop, (C) den Strahlteiler vor den Detektoren und (D) den Fluoreszenzfiltern. Alle verwendeten Strahlteiler und Filter waren Anti-Reflex-beschichtet.

Zur Einkopplung des Laserstrahls in das Mikroskop (optischer Aufbau, Abb. 3.1-2) wird ein Spiegel bzw. Strahlteiler verwendet, der  $45^\circ$  zum eintreffenden Lichtstrahl steht und das Licht im Wellenlängenbereich des Laserlichts reflektiert. Die Photonen, die von der Probe emittiert werden, werden durch den Spiegel durchgelassen und weiter zu den Detektoren geleitet. Dagegen werden die Photonen im Wellenlängenbereich der Anregungswellenlänge nicht transmittiert. In Abb. B1A und B1B ist die Transmission der verwendeten Strahlteiler in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei einem Winkel von  $45^\circ$  dargestellt.

Nachdem die Photonen die Lochblende passiert haben, treffen sie auf einen weiteren Strahlteiler, der sie in Anteile oberhalb und unterhalb einer definierten Wellenlänge teilt, indem das langwelligere Licht transmittiert und das kürzerwelligere Licht im  $45^\circ$  Winkel reflektiert wird (Abb. B1C).

Nachdem sie einen Polarisator passiert haben, werden diese Photonen nochmals gefiltert, der das Licht in Anteile von parallel und senkrecht polarisiertem Licht teilt. Die Fluoreszenzfilter transmittieren nun eng gefasste Wellenlängenbereiche (Abb. B1D).

In Abb. B2 sind diese Wellenlängenbereiche für die Filter HQ535/50 und HQ730/140 schematisch angegeben. Im Vergleich dazu sieht man die normierten Fluoreszenzspektren der Farbstoffe Alexa488 und Cy5, die das am häufigsten verwendete Donor-Akzeptor-Paar bei den FRET-Untersuchungen darstellen.

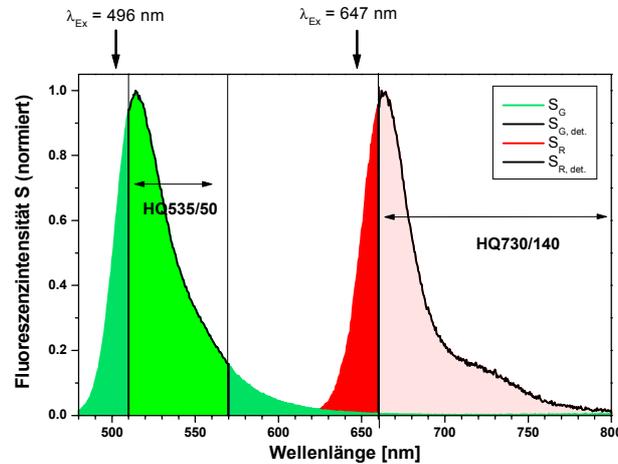
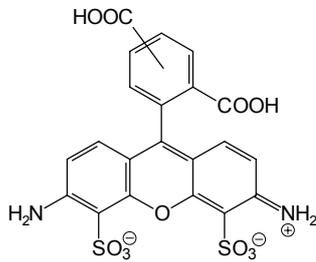


Abb. B2: Farbstoffspektren der Farbstoffe Alexa488 und Cy5. Der dunkelfarbige Bereich zeigt die Fluoreszenzspektren, der hell-markierte den Ausschnitt aus dem Spektrum, der vom jeweiligen Fluoreszenzfilter transmittiert wird. Als Filter sind hier HQ535/50 und HQ730/140 dargestellt.

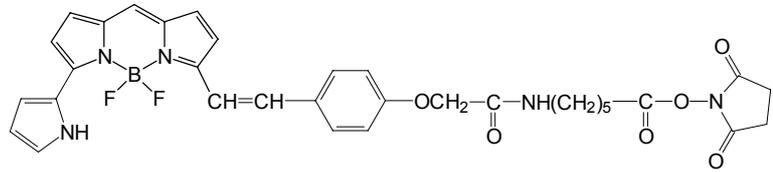
Die Detektionseffizienzen für jeden Farbstoff berechnen sich nun aus der Transmission der Strahlteiler, der Fluoreszenzfilter, des Detektors (*Single-Photon Counting Avalanche Photodiode*) und dem Fluoreszenzspektrum des Farbstoffs. Die Detektionseffizienz im „grünen“ Wellenlängenbereich wird mit  $g_G$  und im „roten“ Wellenlängenbereich mit  $g_R$  bezeichnet.

## C Farbstoffe

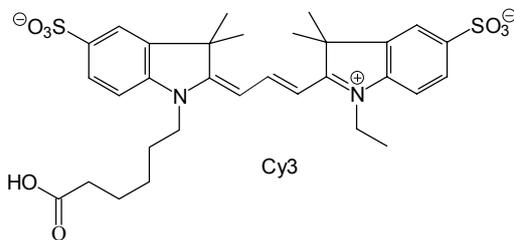
## CI Strukturen



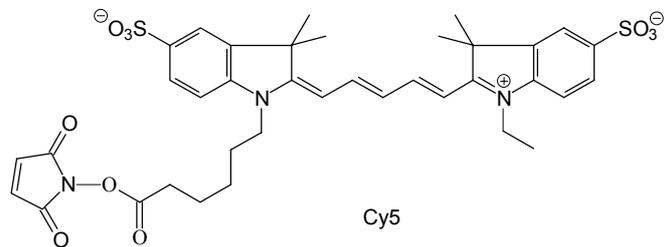
Alexa 488



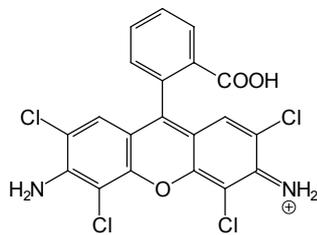
Bodipy 650/665-X



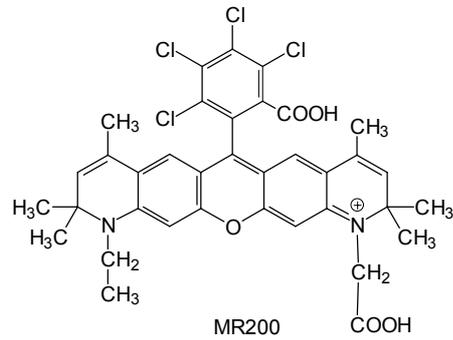
Cy3



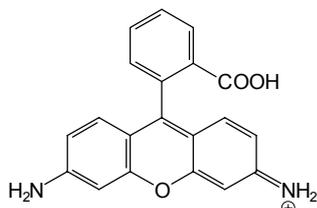
Cy5



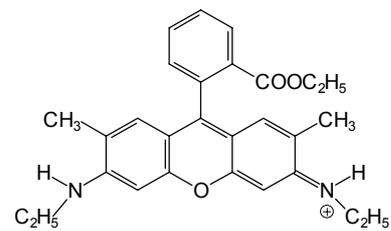
JF4 E



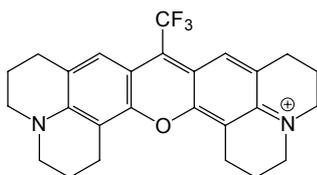
MR200



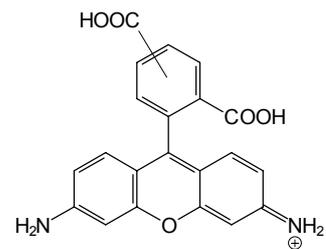
Rhodamin 110



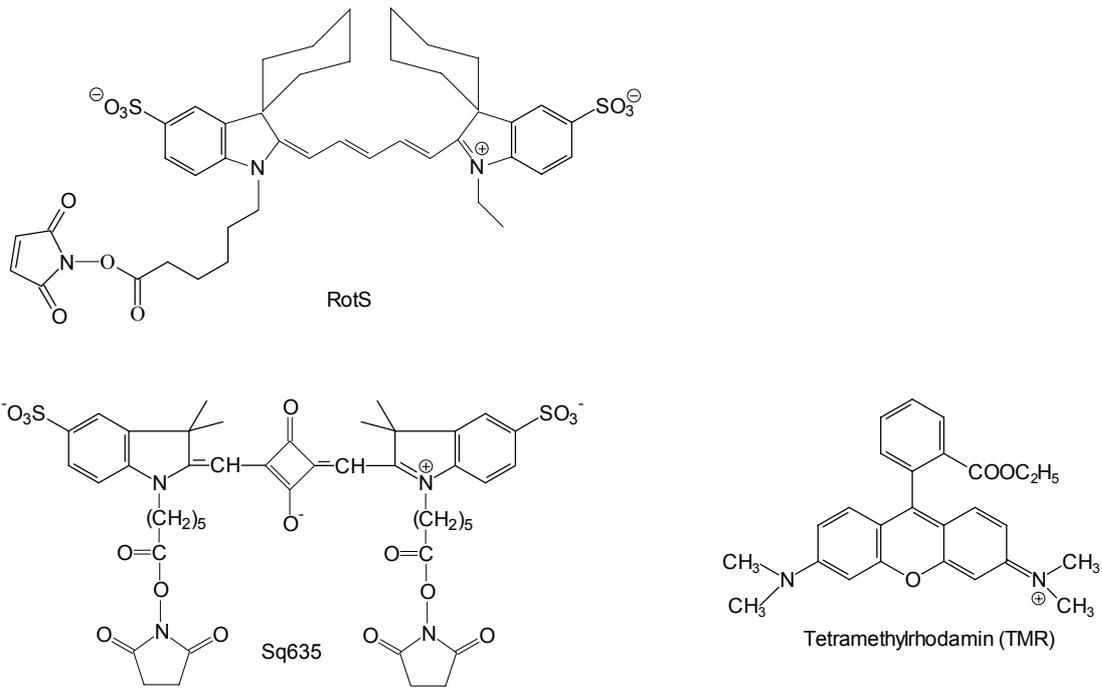
Rhodamin 6G



Rhodamin 700 (Rh700)



Rhodamine Green



In Abb. C1 wird die Nomenklatur der Farbstoffisomeren von Rhodaminen dargestellt.

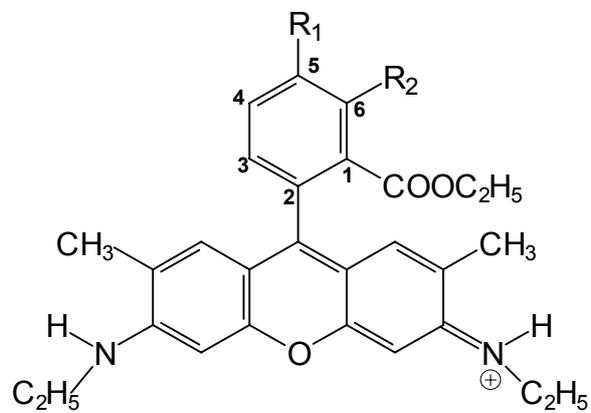
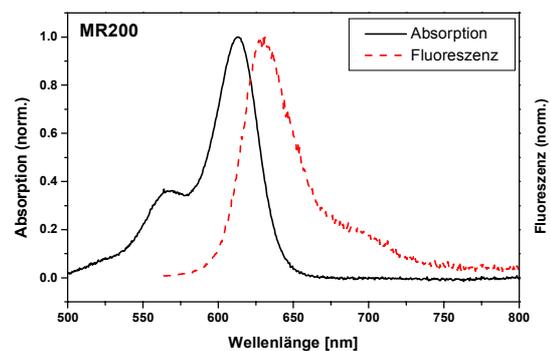
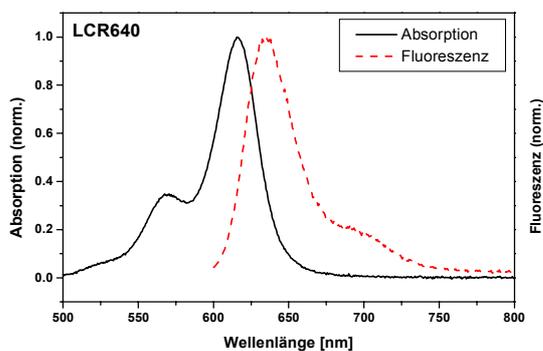
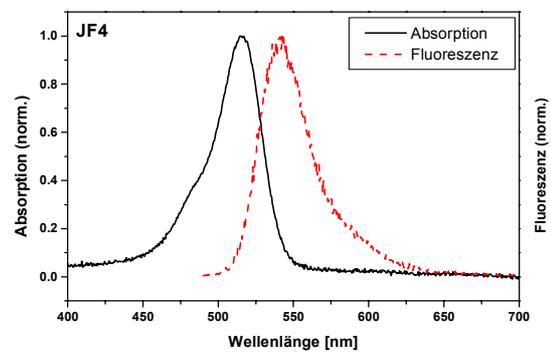
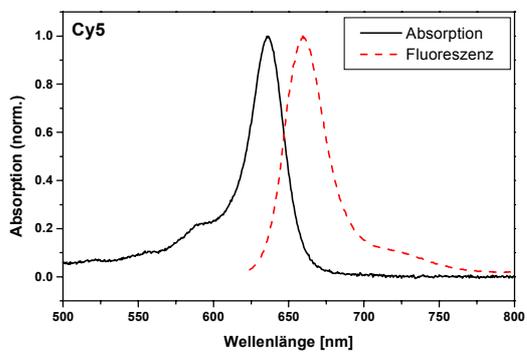
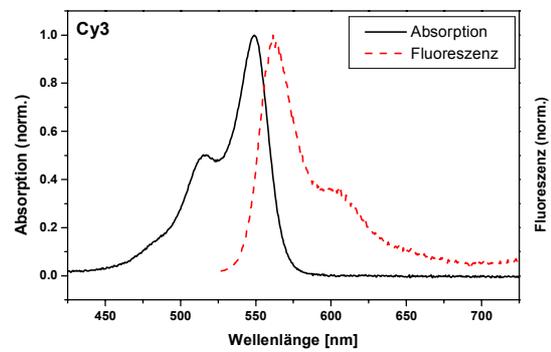
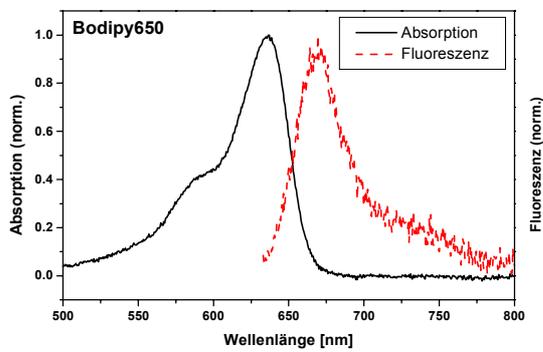
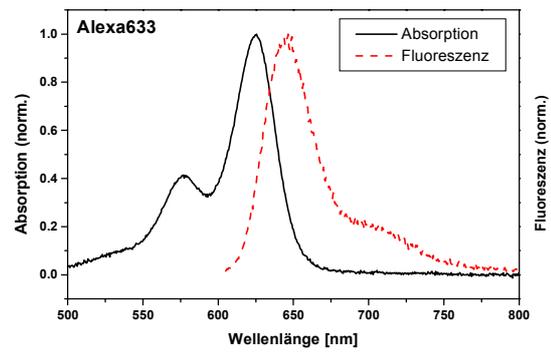
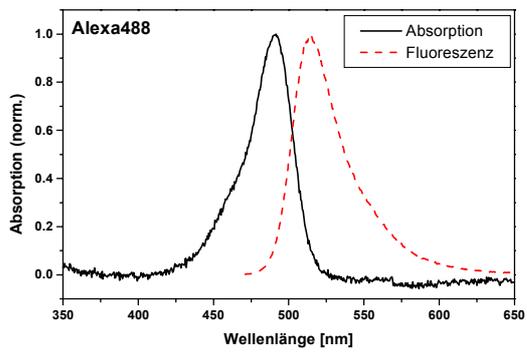
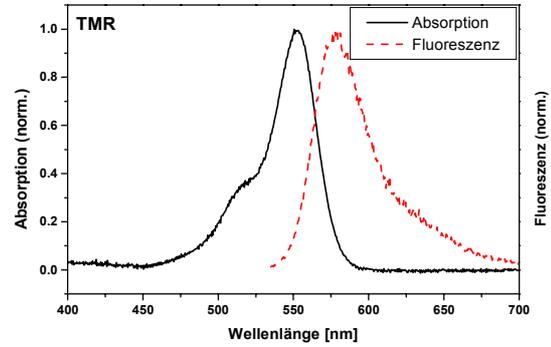
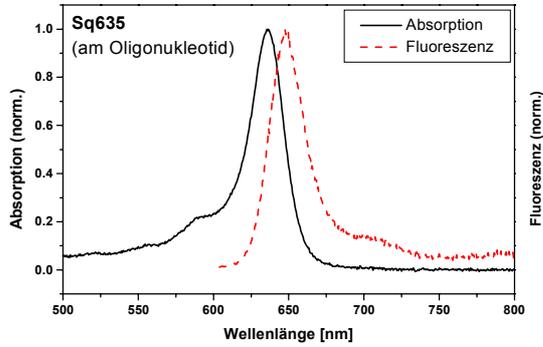
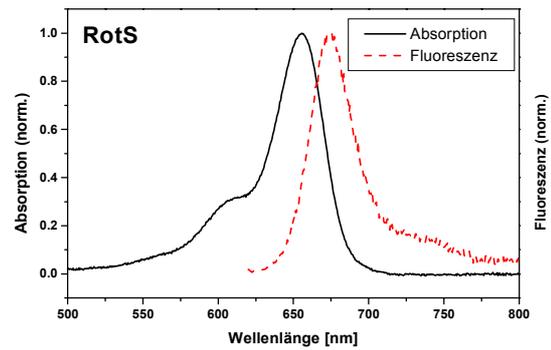
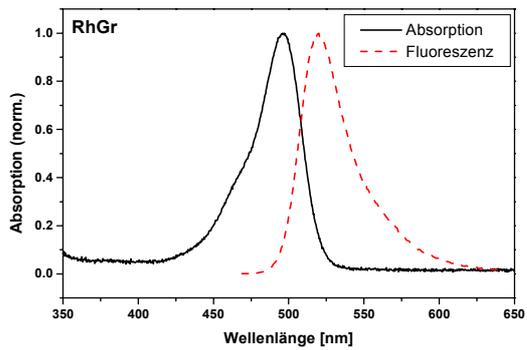
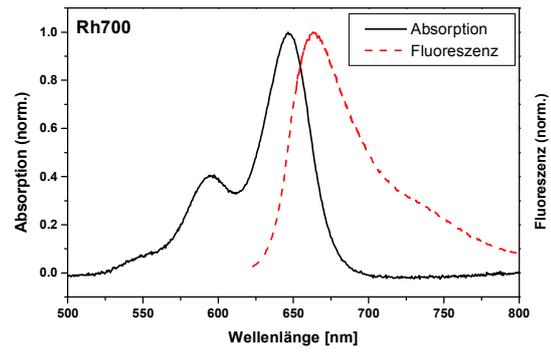
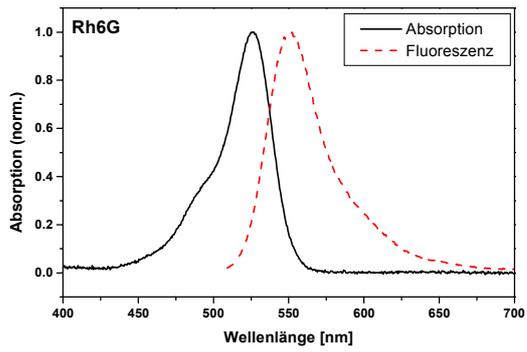


Abb. C1: Im Fall des 5-Isomers gilt  $\text{R}_1 = \text{COOH}$ ,  $\text{R}_2 = \text{H}$  und im Fall des 6-Isomers gilt  $\text{R}_1 = \text{H}$ ,  $\text{R}_2 = \text{COOH}$ .

**C2 Absorptions- und Fluoreszenzspektren**



**C3 Weitere spektroskopische Parameter**

Name:	Alexa488	Alexa633	Bodipy650/665X
Abkürzung:	-	-	Bodipy650
Farbstoffklasse:	Rhodamine	-	Bodipy
erhalten von:	Molecular Probes, Eugene (OR)	Molecular Probes, Eugene (OR)	Molecular Probes, Eugene (OR)
Molekulargewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	643 (NHS)	~1200 (NHS)	643 (NHS)
Absorptionsmaximum [nm]:	495	632	651
Extinktionskoeffizient am Maximum [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	71 000	169 000*	102 000*
Fluoreszenzmaximum [nm]:	519	647	660

Name:	Cy3	Cy5	JF4
Abkürzung:	-	-	-
Farbstoffklasse:	Cyanine	Cyanine	Rhodamine
erhalten von:	Amersham Pharmacia Biotech	Amersham Pharmacia Biotech	J. Fries/ MPI Göttingen
Molekulargewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	766	792	495
Absorptionsmaximum [nm]:	550	649	526
Extinktionskoeffizient am Maximum [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	150000	250000	-
Fluoreszenzmaximum [nm]:	570	670	550

Name:	Lightcycler640	MR200	Rhodamin 6G
Abkürzung:	LCR640	-	Rh6G
Farbstoffklasse:	-	Rhodamine	Rhodamine
erhalten von:	Roche Diagnostics, Mannheim	M. Sauer, Uni Heidelberg	Molecular Probes, Eugene (OR)
Molekulargewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	-	722	555 (NHS)
Absorptionsmaximum [nm]:	625	613*	524
Extinktionskoeffizient am Maximum [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	125 000*	100 000*	105 000*
Fluoreszenzmaximum [nm]:	640	630*	552

Name:	Rhodamin 700	O-656	Sq635
Abkürzung:	Rh700	RotS	-
Farbstoffklasse:	Rhodamine	Spironine	Squarain
erhalten von:	J. Arden-Jacob/ Siegen	Denovo Biolabels GmbH, Münster	O.S. Wolfbeis/ Uni Regensburg
Molekulargewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	539	872	992
Absorptionsmaximum [nm]:	646*	656	635
Extinktionskoeffizient am Maximum [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	92 500**	mind. 200 000	180 000*
Fluoreszenzmaximum [nm]:	664*	676	642

Name:	Tetramethyl- rhodamin
Abkürzung:	TMR
Farbstoffklasse:	Rhodamine
erhalten von:	Molecular Probes, Eugene (OR)
Molekulargewicht [g mol <sup>-1</sup> ]	528
Absorptionsmaximum [nm]:	553
Extinktionskoeffizient am Maximum [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	65 000*
Fluoreszenzmaximum [nm]:	580

Das Molekulargewicht bezieht sich auf den NHS-Ester des Farbstoffs, sofern dieser auch als NHS-Ester eingesetzt wurde. Die Wellenlängenmaxima wurden in wässriger Lösung bestimmt, außer bei JF4 und Rh700, deren Spektren in angesäuertem Ethanol gemessen wurden.

\*Im Rahmen dieser Arbeit bestimmt.

\*\* Aus: U. Brakman, *Lambdachrome Laser Dyes*, Lambda Physik GmbH, 1997.

#### C4 Markierung mit Farbstoff

Der einfachste Weg der Farbstoffmarkierung von Oligonukleotiden ist die Bindung an das 5'- oder 3'-Ende des Oligonukleotids (Abb. C2).

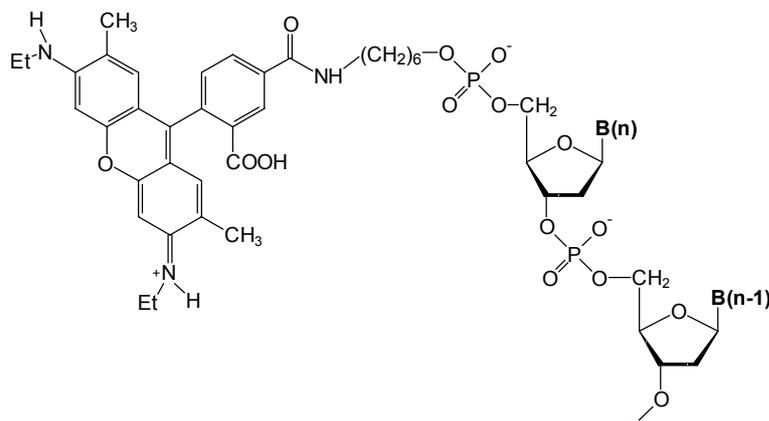


Abb. C2: Rh6G gebunden an das 5'-Ende der Sequenz (in diesem Fall aufgebaut aus 2'-Desoxyribonukleotiden).

Manchmal ist es notwendig, den Farbstoff in die Oligonukleotidsequenz einzubringen. Dazu wird während der Oligonukleotidsynthese ein Thymidin-Phosphoramidit eingebaut, an das der gewünschte Farbstoff bereits über einen Linker gebunden ist. Bei einem weiteren Verfahren wird ein modifiziertes Thymidin in die Sequenz eingebaut, welches eine reaktive Aminogruppe trägt. Noch abgeschlossener Synthese des Oligonukleotids kann der NHS-Ester des gewünschten Farbstoffs selektiv mit der Aminogruppe reagieren. Dieses Verfahren wird als *Postlabeling* bezeichnet (Abb. C3).

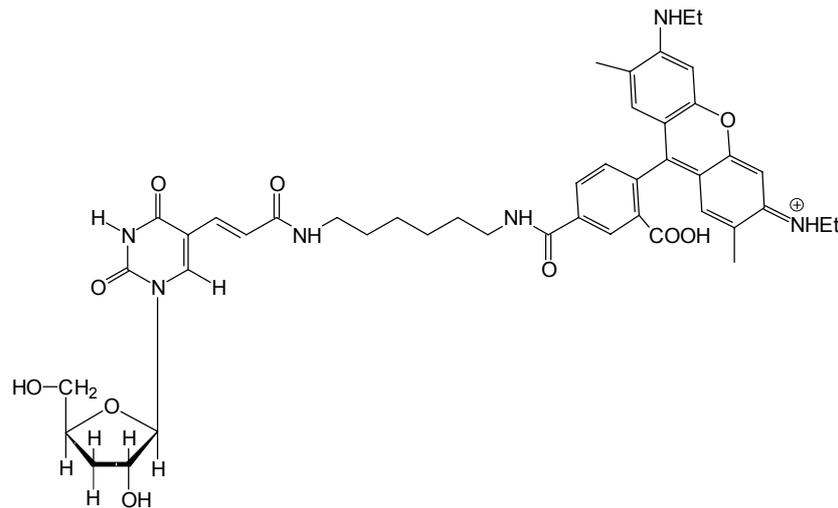


Abb. C3: Rh6G gebunden an Thymidin über einen Aminolinker mit einem sogenannten C<sub>6</sub>-Linker (6 C-Atome befinden sich zwischen den Aminogruppen).

Bei Proteinen wird in der Regel nicht der NHS-Ester eines Farbstoffs zur Markierung verwendet, sondern das Maleinimid-Derivat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Farbstoff Alexa488 mit dem Protein Reverse Transkriptase kovalent verbunden, indem das Maleinimid mit der Thiolgruppe eines Cysteins im Protein reagiert (Abb. C4).

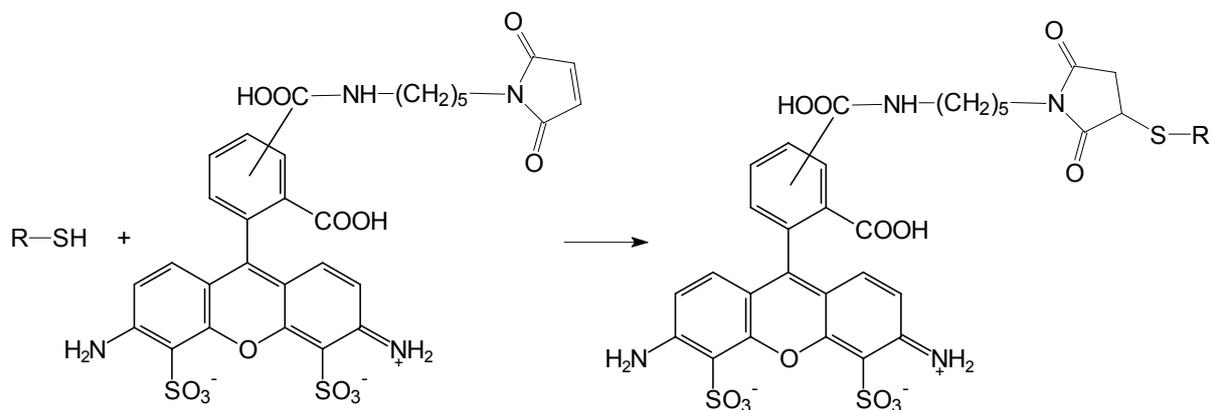


Abb. C4: Das Alexa488-Maleinimid reagiert mit einem Thiol zu einem Thioether. Bei R handelt es um ein Protein mit einem Cystein in der Aminosäuresequenz.

## D Sequenzen der Oligonukleotide

Bei der Namensangabe der Hybride aus Sequenz und Gegensequenz werden die Sequenzen durch ein Trennzeichen (/) getrennt und der Farbstoff durch ein Minuszeichen (-) getrennt von der Sequenz, an die er gebunden ist.

### D1 Bei Farbstoff- und FRET-Untersuchungen

#### KFO, GC und TKFO

Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben:

Name	-1	1	21
KFO		CAA AGC GCC ATT CGC CAT TC	
TKFO	T	CAA AGC GCC ATT CGC CAT TC	
C1		CAA AAA AGC CAT TCG CCA TTC	
C2		ACA AAA AGC CAT TCG CCA TTC	
C3		AAC AAA AGC CAT TCG CCA TTC	
G1		GAA AAA AGC CAT TCG CCA TTC	
G2		AGA AAA AGC CAT TCG CCA TTC	
G3		AAG AAA AGC CAT TCG CCA TTC	

Bei allen Sequenzen befindet sich der Farbstoff am 5'-Ende. Bei Rh6G handelt es sich - wenn nicht anders angegeben - um das 5-Isomer. Der Linker ist - wenn nicht anders angegeben - ein C<sub>6</sub>-Linker.

Die Gegensequenzen (GSZ) sind in 3'-5'-Richtung angegeben:

Name	-1	1	21
KFO-GSZ		GTT TCG CGG TAA GCG GTA AG	
TKFO-GSZ	A	GTT TCG CGG TAA GCG GTA AG	
C1-GSZ		GTT TTT TCG GTA AGC GGT AAC	
C2-GSZ		TGT TTT TCG GTA AGC GGT AAC	
C3-GSZ		TTG TTT TCG GTA AGC GGT AAC	
G1-GSZ		CTT TTT TCG GTA AGC GGT AAC	
G2-GSZ		TCT TTT TCG GTA AGC GGT AAC	
G3-GSZ		TTC TTT TCG GTA AGC GGT AAC	

#### HD und JM

Sequenz ist in 5'-3'-Richtung angegeben:

Name	1	18	27
HD1	TGT AAA ACG ACG GCC AGT		
HD21	TGT AAA ACG AGA GAG CCT AAA ACG ATC		

Gegensequenz ist in 3'-5'-Richtung angegeben:

Name	1	18	27
HD1-GSZ	ACA TTT TGC TGC CGG TCA		
JM	ACA TTT TGC TCT CTC GGA TTT TGC TAG		

- HD1 Die Farbstoffe Alexa633, Bodipy650, Cy5(mono), LCR640, MR200, RotS und Sq635 befinden sich jeweils am 5'-Ende der Sequenz.
- JM Zweifach-reaktives Cy5 (Cy5(bis)) befindet sich an Positionen 12 und 14, gebunden via dT-Aminolink, oder einfach-reaktives Cy5 (Cy5(mono)) ist via dT-Aminolink an Position 12 gebunden.

## ***D2 Bei FRET-Untersuchungen***

### ***C1M***

Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben:

Name	1	24
C1M	CAA AAC GAA CAT CAG CCA TTC	
C1ML	CAA AAC GAA CAA ACG AAA CAA AGC	

Diese Sequenzen sind Modifikationen der C1-Sequenz aus dem vorhergehenden Abschnitt. Entweder ist kein Farbstoff gebunden oder der Farbstoff Rh6G befindet sich am 5'-Ende. Dabei handelt es sich um das 5-Isomer mit einem C<sub>6</sub>-Linker.

Die Gegensequenzen sind in 3'-5'-Richtung angegeben:

Name	1	24
C1M-GSZ	GTT TTG CTT GTA GTC GGT AAG	
C1ML-GSZ	GTT TTG CTT GTT TGC TTT GTT TCG	

Cy5 ist via dT-Aminolink an Position 5 oder 9 an die Sequenz C1M-GSZ bzw. an Position 12 oder 17 der Sequenz C1ML-GSZ gebunden.

### ***MIG***

Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben:

Name	1	27
MIG	TTG AAA ACG AGA GAG ACA TAA ACG ATC	

Bei den markierten Sequenzen befindet sich der Donorfarbstoff am 5'-Ende.

An diese Sequenz werden die Farbstoffe Rh6G (5-Isomer mit C<sub>6</sub>-Linker) und Cy3 (C<sub>3</sub>-Linker) gebunden.

Die Gegensequenzen sind in 3'-5'-Richtung angegeben:

Name	1	27
MI	AAC TTT TGC TCT CTC TGT ATT TGC TAG	

Diese Sequenz ist mit Bodipy650 oder Cy5 markiert worden. Die Positionen der Farbstoffe sind Position 10, 14 oder 18 vom 3'-Ende gezählt.

**D3 Bei Untersuchungen der Reversen Transkriptase****PBS**

Primer (Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben):

	19	1
p1	TTG TCC CTG TTC GGG CGC C	

Template (Sequenzen sind in 3'-5'-Richtung angegeben):

	19	1	-1	-16
t1	AAC AGG GAC AAG CCC GCG G		TAC GTC TCT AAT TGG G	
t2	AAC AGG GAC AAG CCC GCG G		ATA CCA ATC GTT TGG G	

Kurzname * <sup>1</sup>	Markierungsposition in der Primersequenz * <sup>2</sup>	Markierungsposition in der Templatessequenz * <sup>2</sup>
dp1/dt1	-	-
Cy5-5'-dp1/dt1	Position 19 (am 5'-Ende)	-
Cy5-5'-dp1/dt2	Position 19 (am 5'-Ende)	-
Cy5-5'-dp1/t1	Position 19 (am 5'-Ende)	-
Cy5-10b-dp1/dt1	Position 10 (10 Basen vom 5'-Ende entfernt)	-
dp1-3'-Cy5/dt1	Position 1 (am 3'-Ende)	-
dp1/dt1-8b-Cy5	-	Position 9 (8 Basen vom 5'-Ende entfernt)
dp1/dt1-5'-Cy5	-	Position 16 (am 5'-Ende)

\*<sup>1</sup> Die Abkürzung p steht für die Primersequenz, t für die Templatessequenz. Befindet sich ein d vor der Abkürzung der Sequenz, handelt es sich um DNS; wenn kein d erscheint, handelt es sich um Ribonukleinsäure.

\*<sup>2</sup> Der Farbstoff wurde als NHS-Ester mit einem C<sub>6</sub>-Linker an ein Amino-dT gebunden; nur bei dp1-3'-Cy5/dt1 wurde das Cy5-Phosphoramidit-dCTP zur Synthese verwendet.

## E Exciton Splitting

Schon seit langem ist das Aggregationsverhalten von Cyaninen (Brooker, 1966; Emerson, 1967; West, 1965; West, 1966) sowie von Farbstoffen der Xanthen-Familie (z.B. Rhodamin B) (Förster, 1956) in wässriger Lösung bekannt.

Bei der Anregung aggregierter Moleküle ist es möglich, dass das angeregte Elektron nur in einer Komponente lokalisiert ist. Ein solcher angeregter Zustand wird als Exciton bezeichnet (Gilbert, 1991).

Im Fall der Excitonbildung gilt bei Zunahme der Farbstoffkonzentration das Lambert-Beer'sche-Gesetz nicht mehr und die Absorptionsbande des monomeren Farbstoffs spaltet sich im Fall von einem Dimer, bestehend aus zwei elektronisch miteinander wechselwirkenden Chromophoren, in zwei Banden auf (Cantor, 1980). Dieses Phänomen wird als *exciton splitting* bezeichnet.

Die auftretende Frequenz-Differenz in der aufgespaltenen Dimerenbande ist abhängig vom Abstand der Monomeren im Exciton und von der relativen Orientierung ihrer Übergangsdipolmomente. Treten weitere Banden im Absorptionsspektrum auf, handelt es sich in der Regel um eine Absorption durch Polymere, welche jedoch weniger signifikant ist.

Im Allgemeinen wird zwischen sogenannten J- und H-Aggregaten unterschieden (Emerson, 1967). Die Absorptionsbanden der J-Aggregate, benannt nach E. Jelley (Jelley, 1936), sind zu höheren Wellenlängen verschoben, während es sich bei den H-Aggregaten, „H“ steht für hypsochrom, um „blau“-verschobene Absorptionsbanden handelt. Eine ausführlichere Beschreibung findet sich bei Cantor (Cantor, 1980).

Die Orientierung der Übergangsdipolmomente von stabförmigen H- und J-Aggregaten ist in Abb. E1 dargestellt.

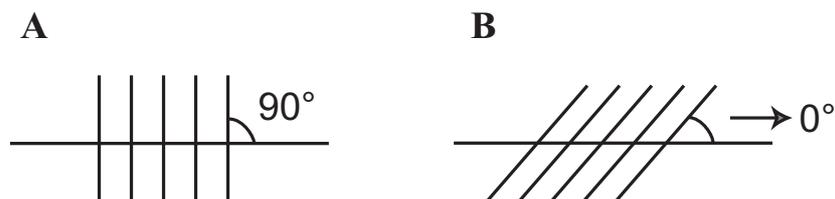
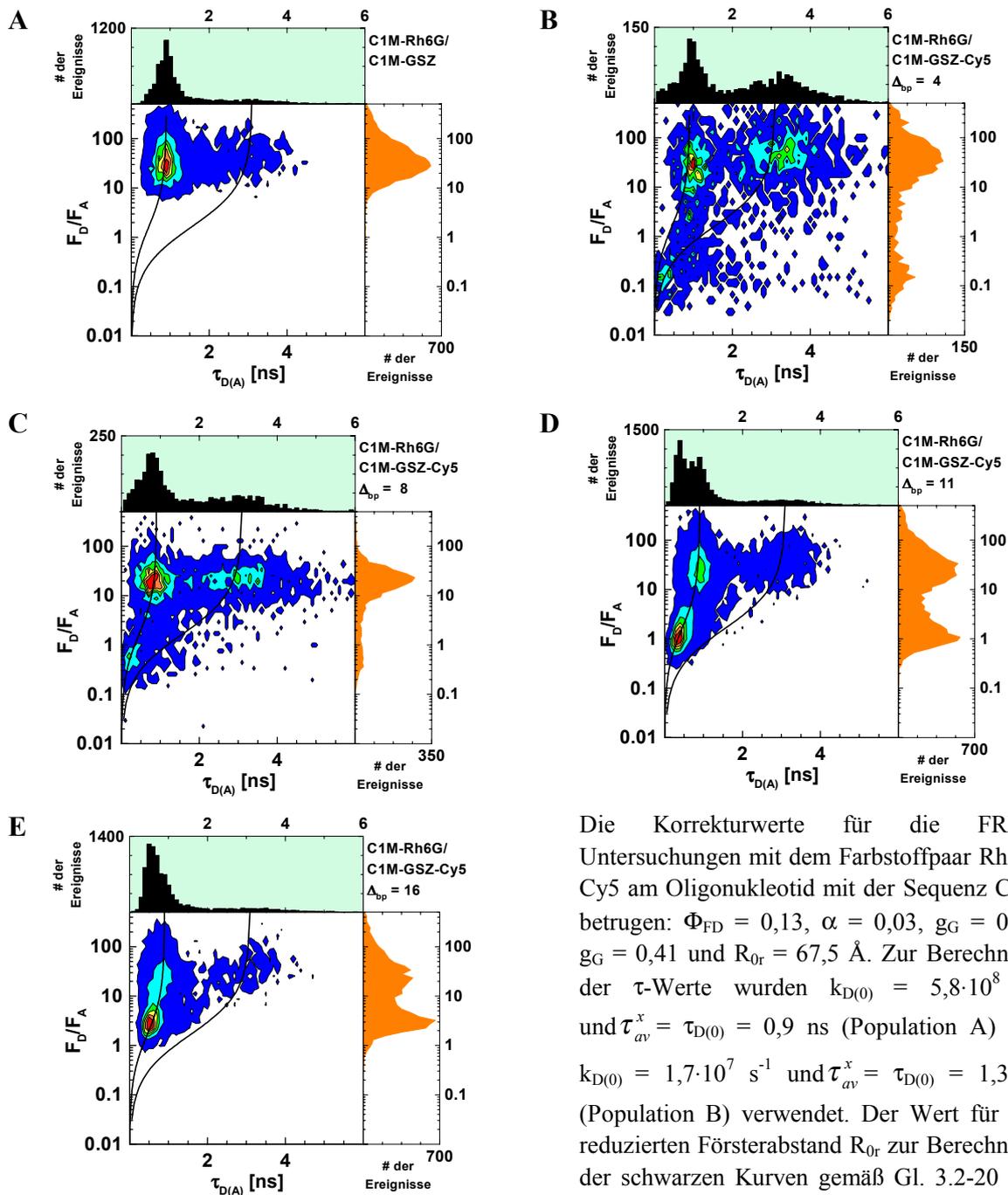


Abb. E1: Die Orientierung der Übergangsdipolmomente für lineare H- (A) und J-Aggregate (B) (Emerson, 1967).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Cyaninen hängt das Verhalten des *exciton splittings* zusammen mit der hohen Polarisierbarkeit der Chromophor-Kette und der hohen Dielektrizitätskonstante von Wasser, welche die Abstoßung von gleich geladenen Farbstoffkationen und -anionen im Aggregat erniedrigt (West, 1965). Darüberhinaus spielt auch die Solvation bei der Aggregation eine Rolle.

Das Phänomen des *exciton splittings* kann grundsätzlich auch bei Nukleobasen in Polynukleotiden oder bei Peptidchromophoren in Polypeptiden auftreten. Es ist nicht zu verwechseln mit der Excimeren-Bildung. Hierbei handelt es sich um angeregte Dimere (*excimer = excited dimer*), die sich im Fluoreszenzspektrum durch eine weitere Bande von den Monomeren unterscheiden, während das Absorptionsspektrum unverändert ist.

## F Ergebnisse der FRET-Studien der Oligonukleotide mit zwei Donorpopulationen

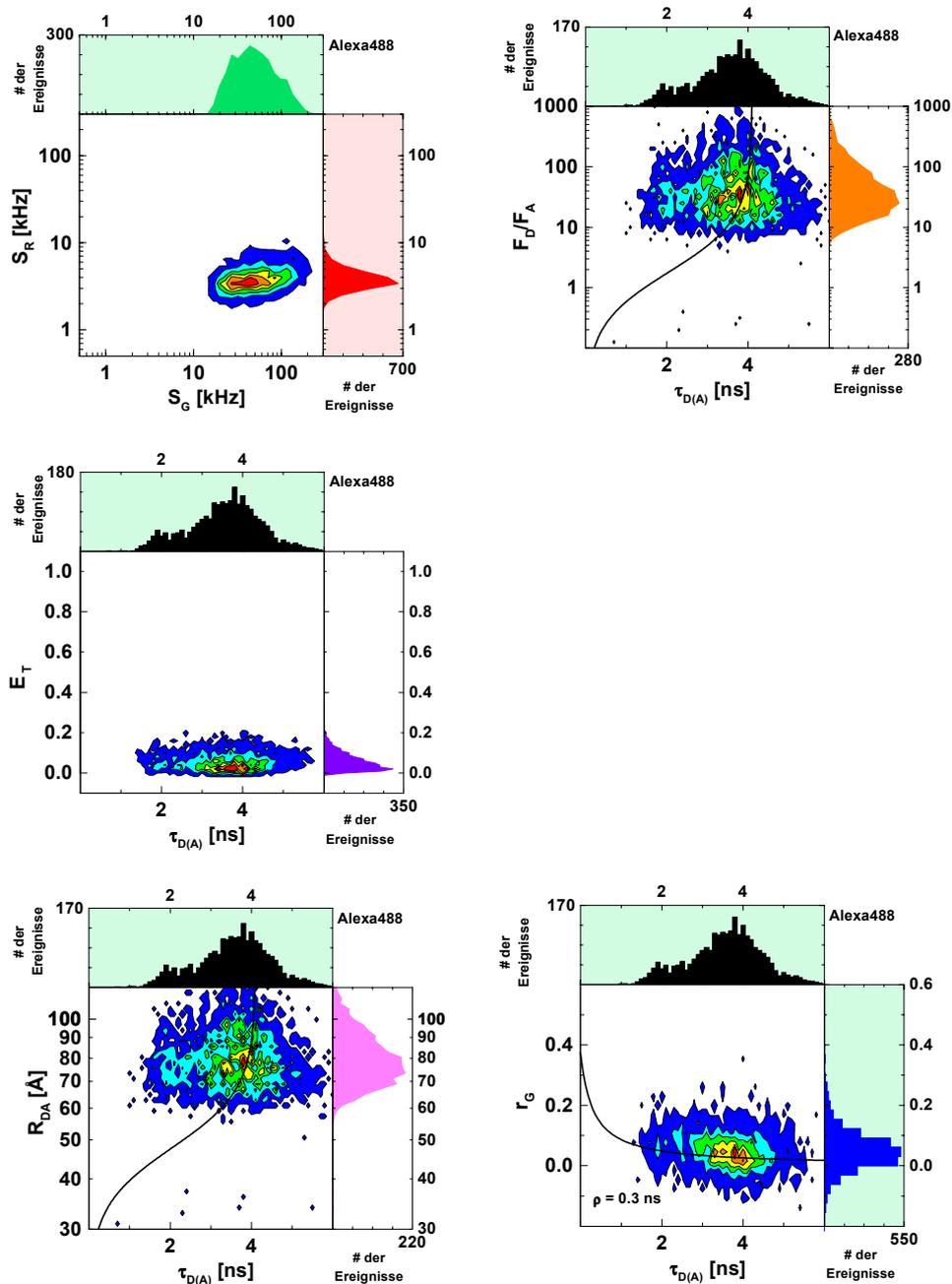


Die Korrekturwerte für die FRET-Untersuchungen mit dem Farbstoffpaar Rh6G-Cy5 am Oligonukleotid mit der Sequenz C1M betragen:  $\Phi_{FD} = 0,13$ ,  $\alpha = 0,03$ ,  $g_G = 0,27$ ,  $g_G = 0,41$  und  $R_{0r} = 67,5 \text{ \AA}$ . Zur Berechnung der  $\tau$ -Werte wurden  $k_{D(0)} = 5,8 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$  und  $\tau_{av}^x = \tau_{D(0)} = 0,9 \text{ ns}$  (Population A) und  $k_{D(0)} = 1,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  und  $\tau_{av}^x = \tau_{D(0)} = 1,3 \text{ ns}$  (Population B) verwendet. Der Wert für den reduzierten Försterabstand  $R_{0r}$  zur Berechnung der schwarzen Kurven gemäß Gl. 3.2-20 und -21 beträgt  $67,6 \text{ \AA}$  und das Verhältnis  $\Phi_{FD}/\Phi_{FA} = 1,63$ .

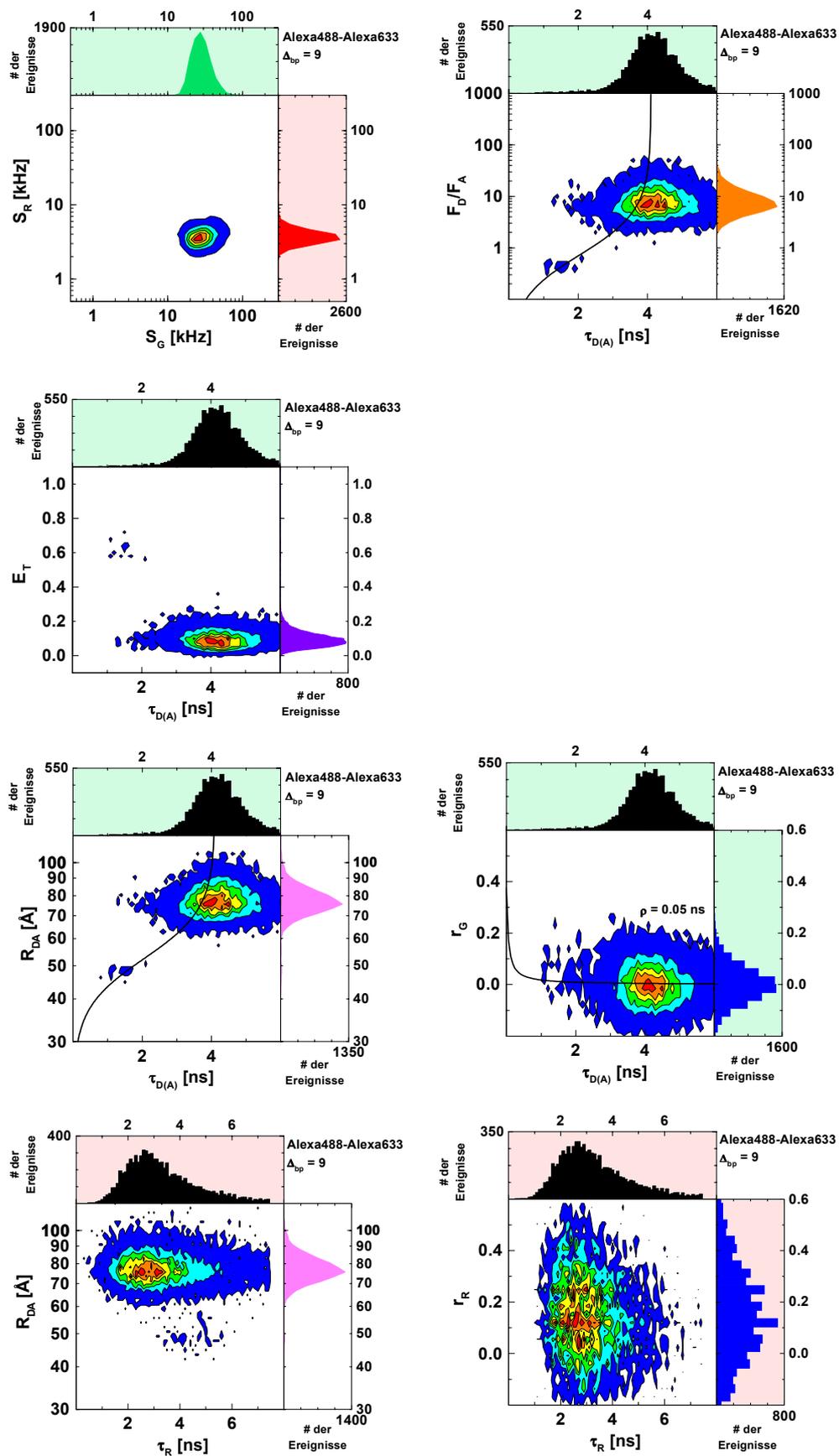
## G Ergebnisse der FRET-Studien der Oligonukleotide mit verschiedenen Akzeptorfarbstoffen

Die Graphen mit von  $F_D/F_A$ ,  $E_T$  und  $R_{DA}$  gegen die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{D(A)}$  sind mit den Werten von  $g_G$ ,  $g_R$ ,  $R_{0r}$ ,  $\Phi$ ,  $\Phi_{FA}$ ,  $\alpha$ ,  $B_D$  und  $B_R$  aus Tab. 4.2-4 berechnet worden. Zur Berechnung der Histogramme der Donorprobe wurden die Werte des Farbstoffpaares Alexa488-Cy5 verwendet.

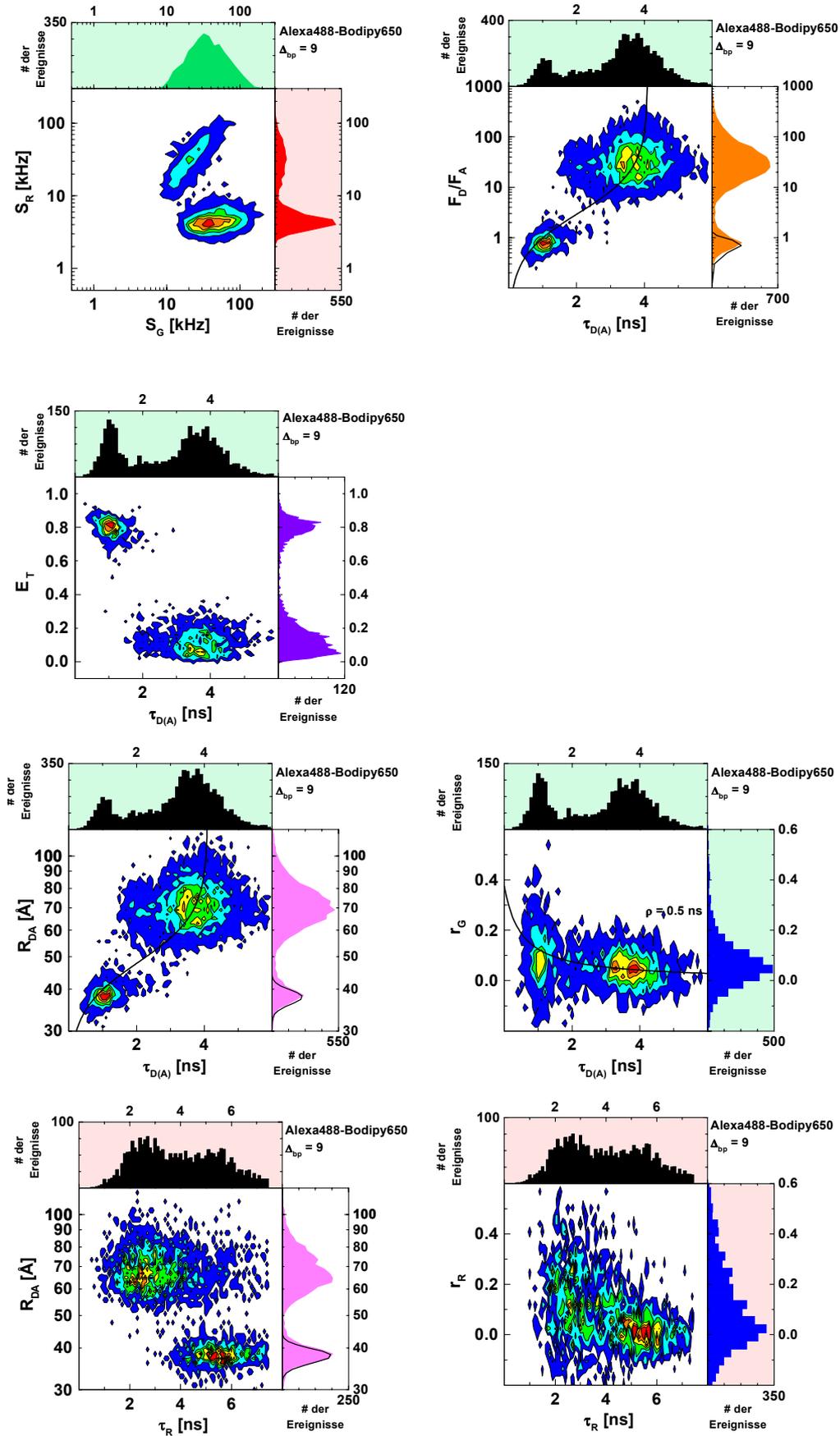
### G1 Einfach-markiert mit Alexa488



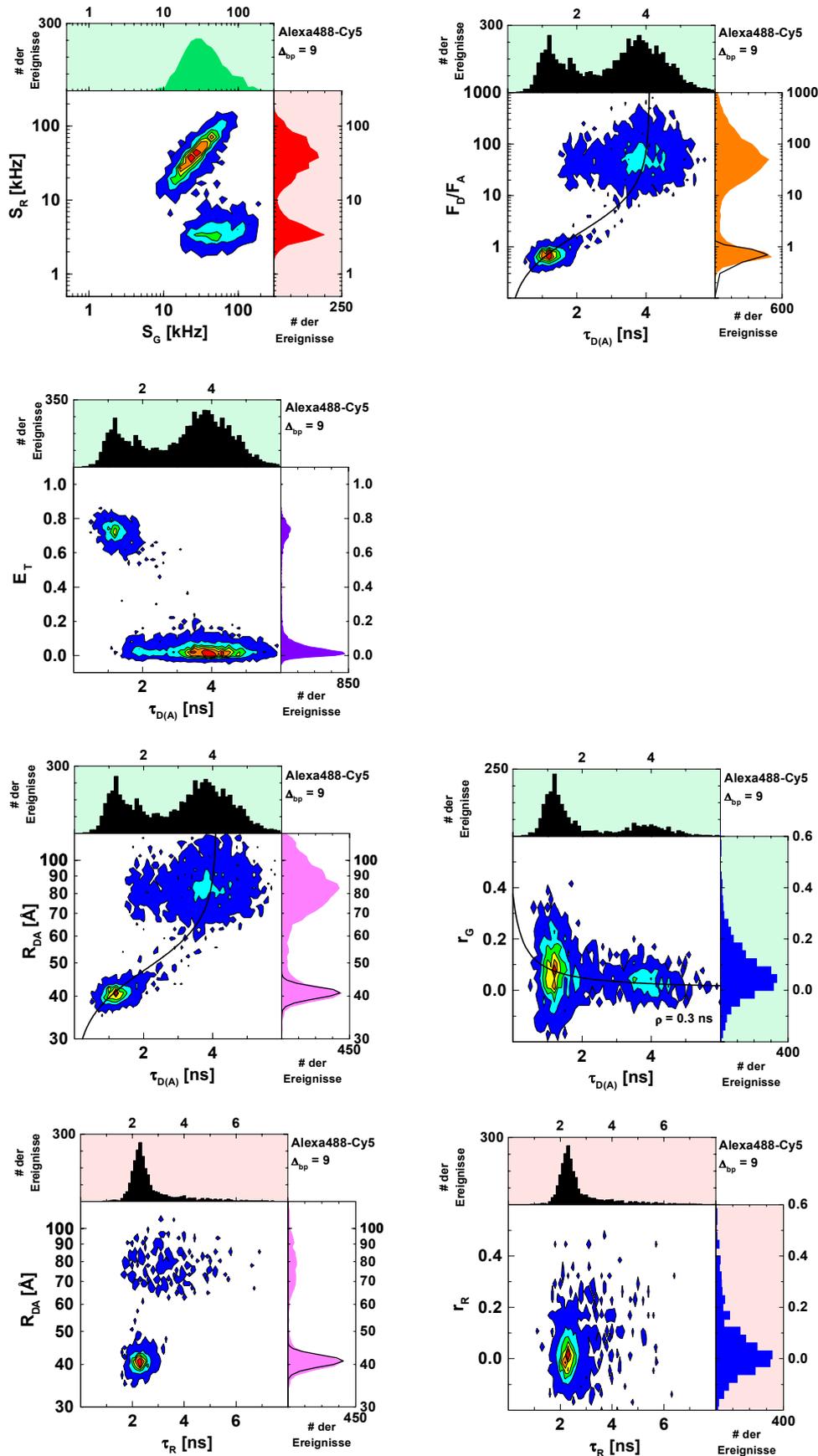
G2 Farbstoffpaar Alexa488-Alexa633



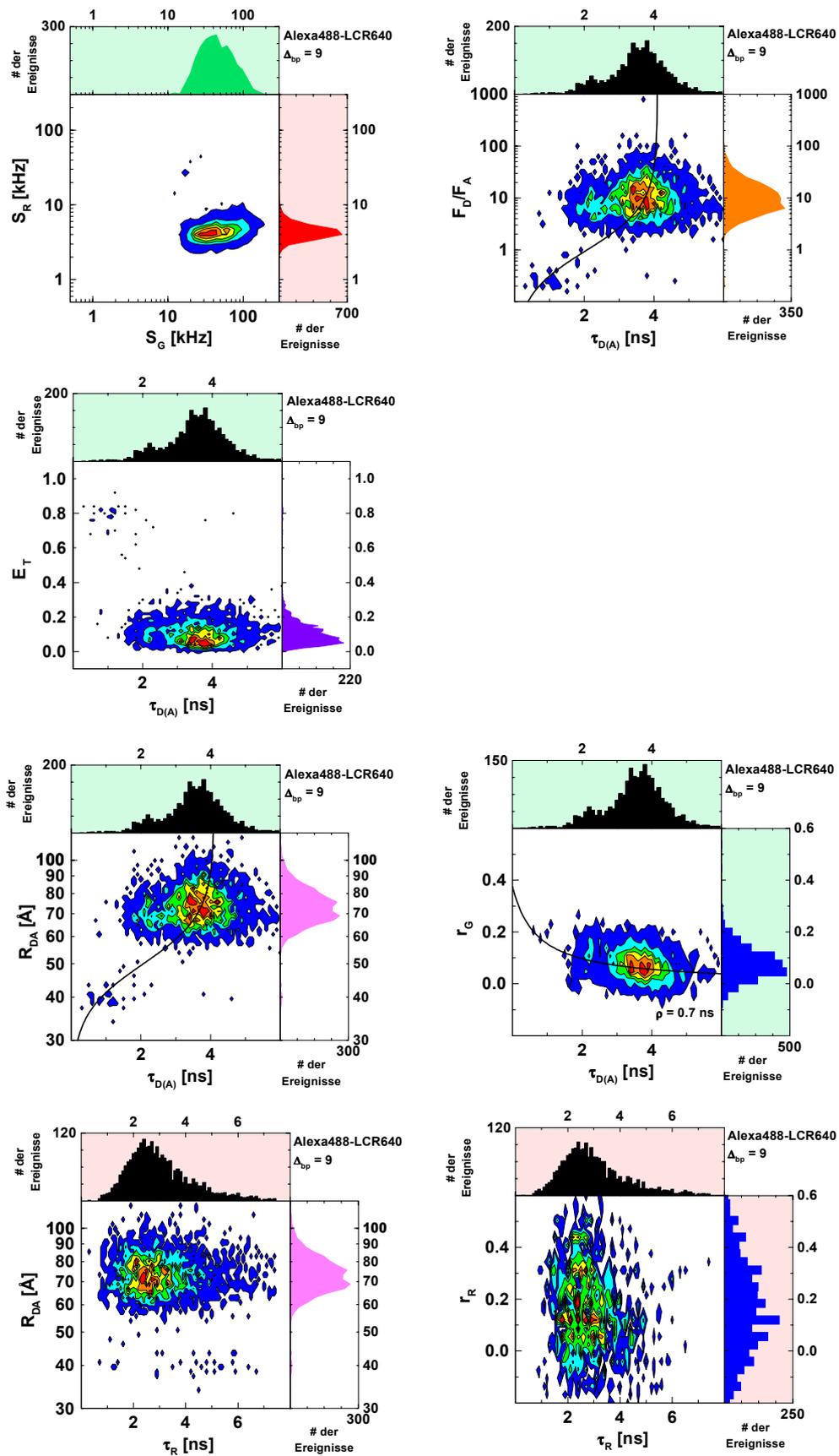
G3 Farbstoffpaar Alexa488-Bodipy650



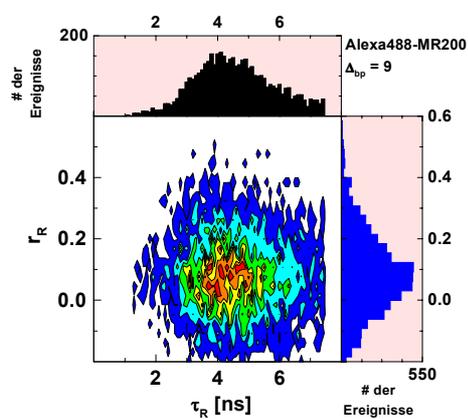
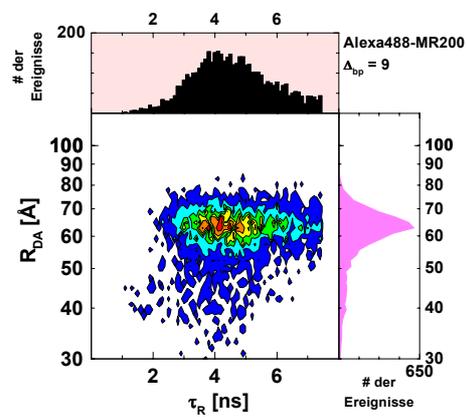
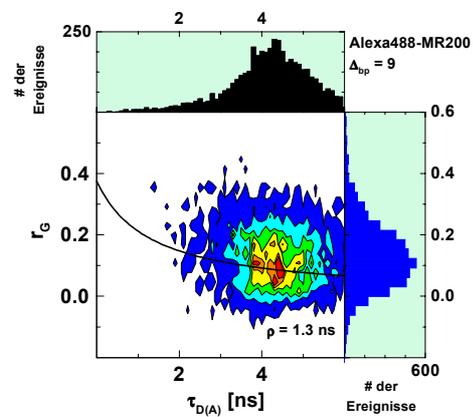
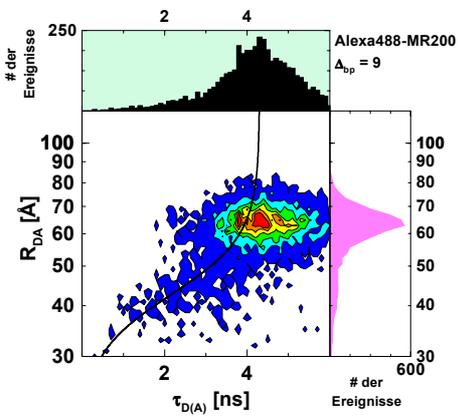
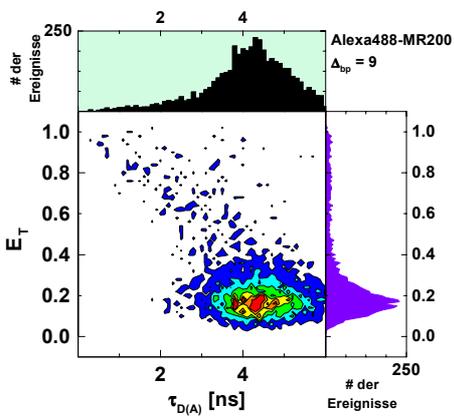
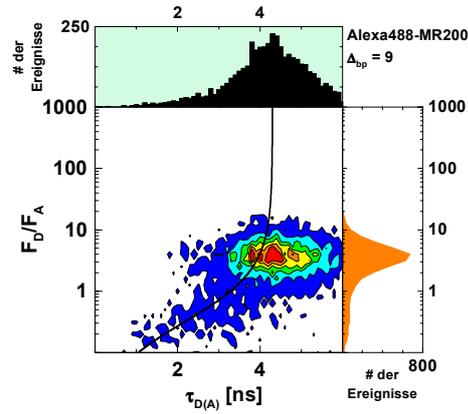
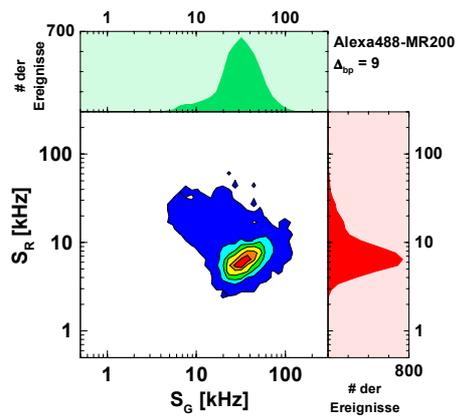
G4 Farbstoffpaar Alexa488-Cy5



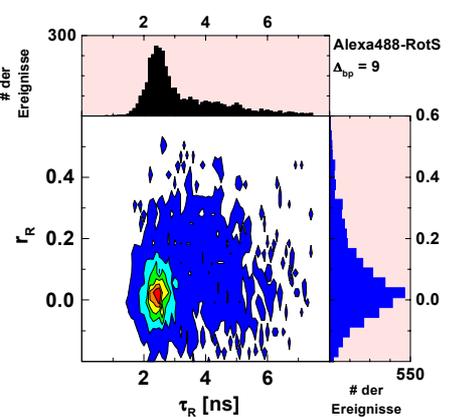
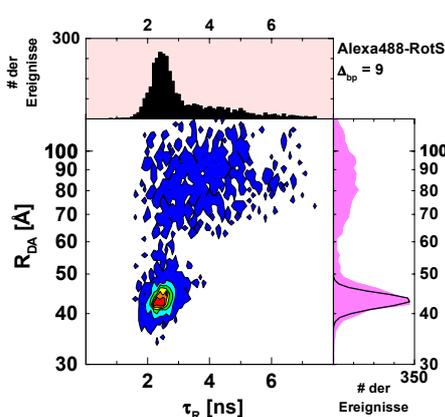
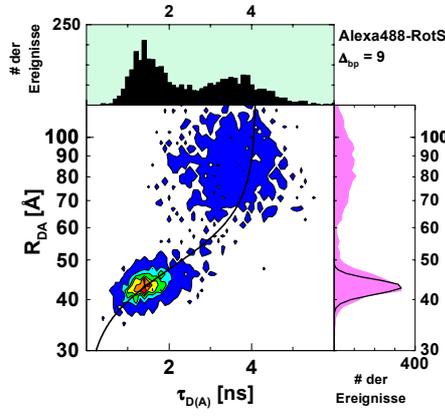
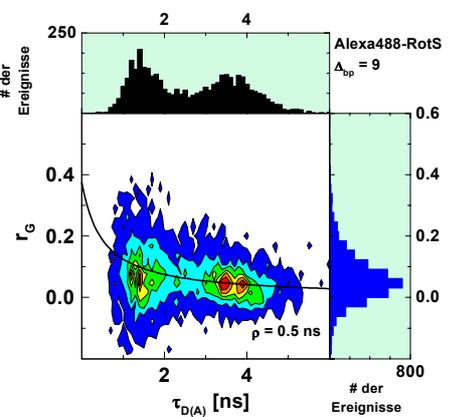
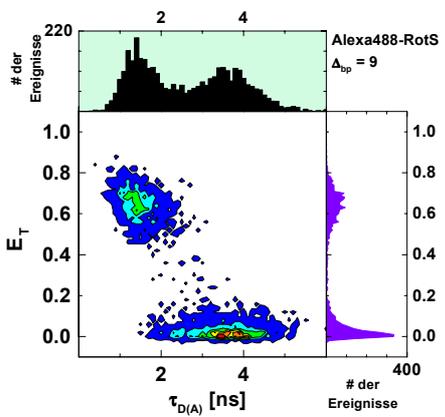
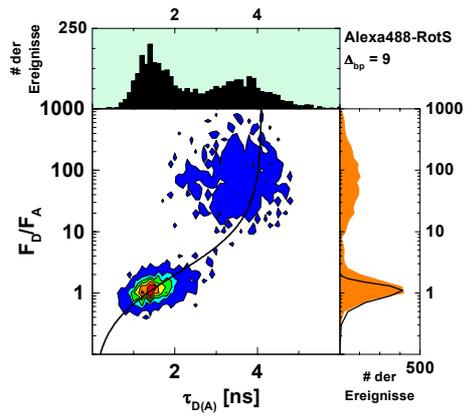
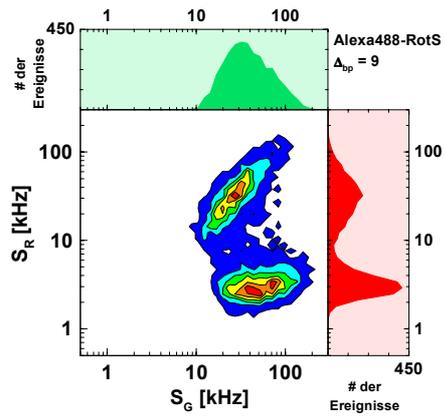
## G5 Farbstoffpaar Alexa488-LCR640



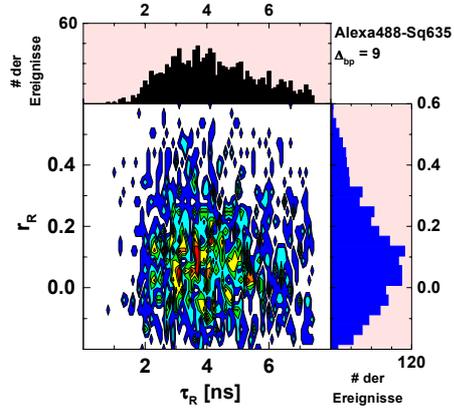
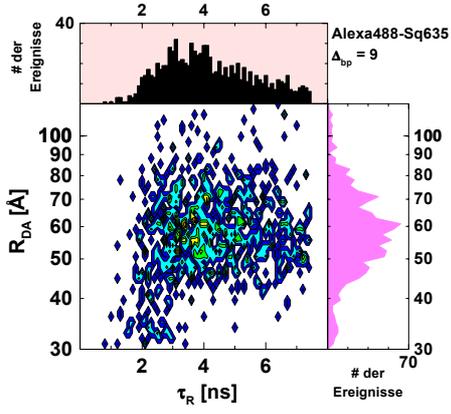
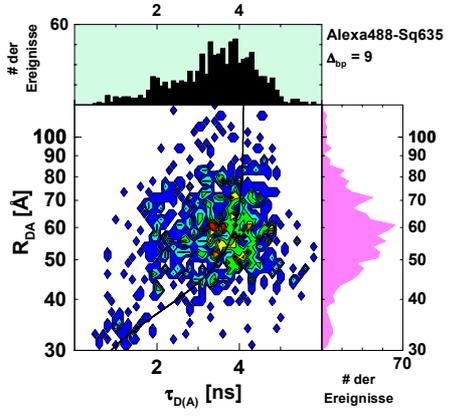
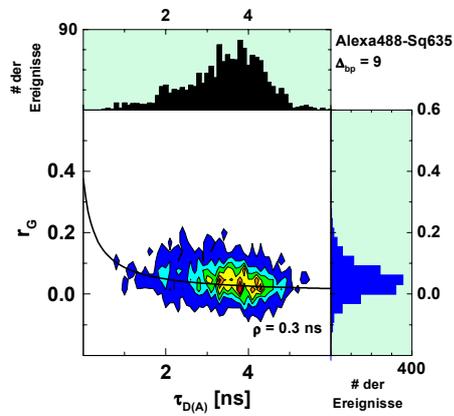
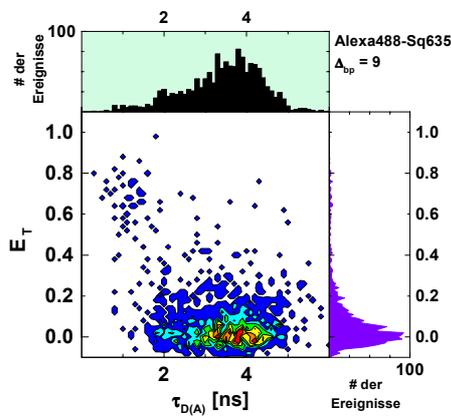
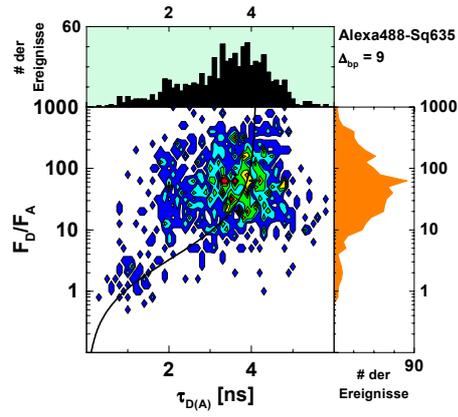
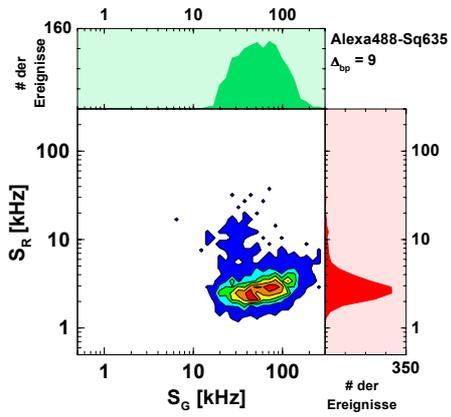
G6 Farbstoffpaar Alexa488-MR200



G7 Farbstoffpaar Alexa488-RotS

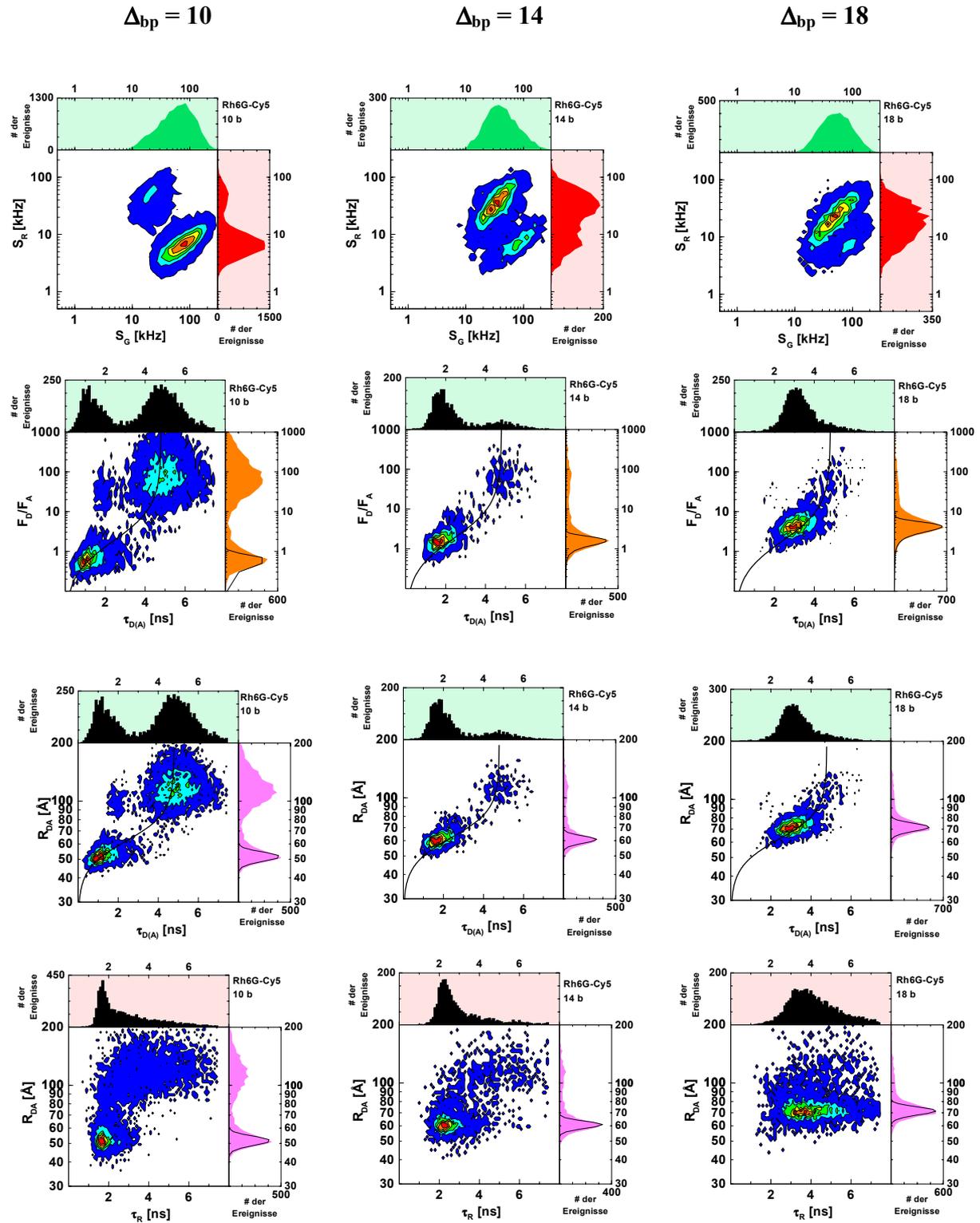


G8 Farbstoffpaar Alexa488-Sq635

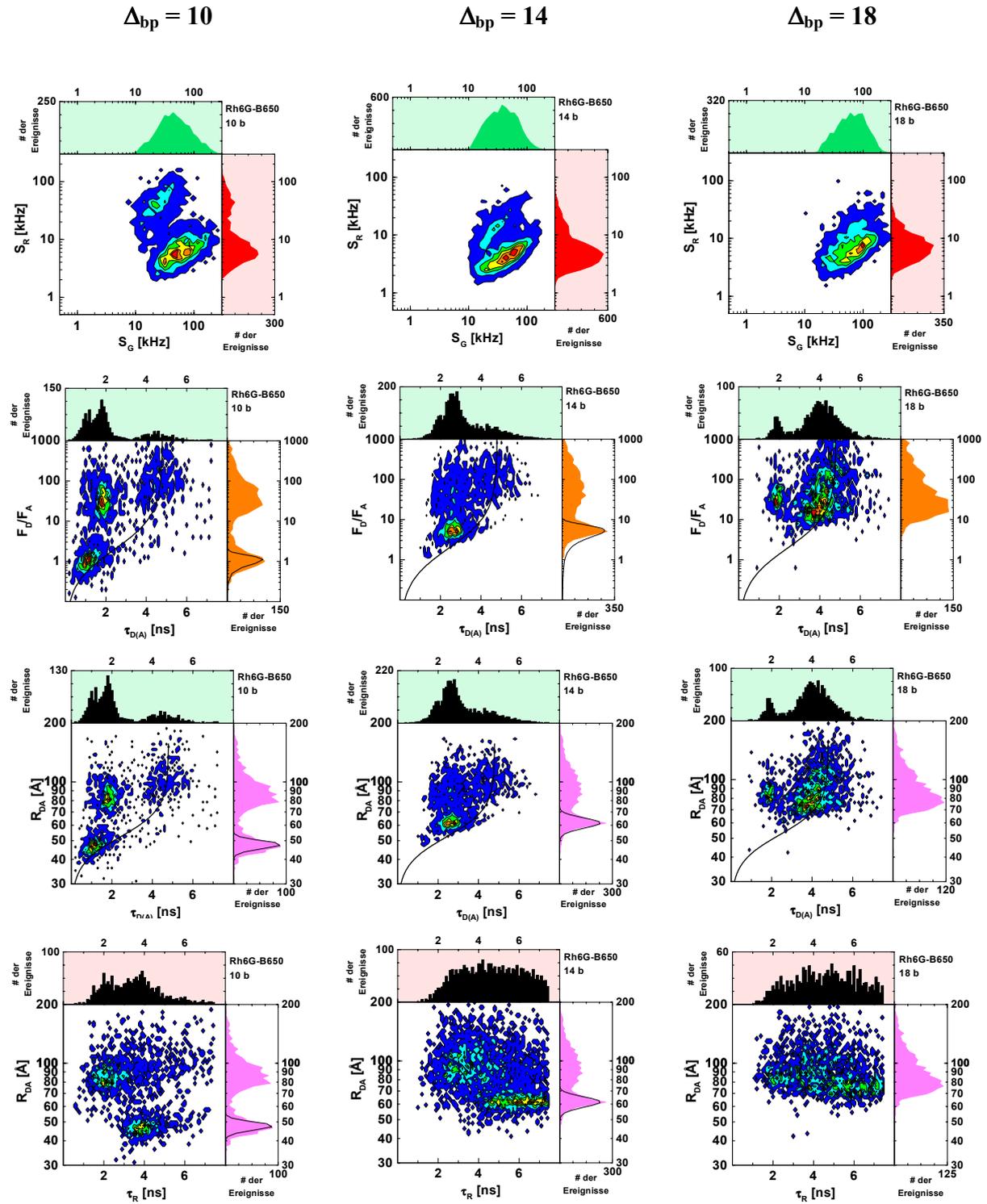


## H Ergebnisse der FRET-Studien an Oligonukleotiden mit verschiedenen Donor-Akzeptorpaaren

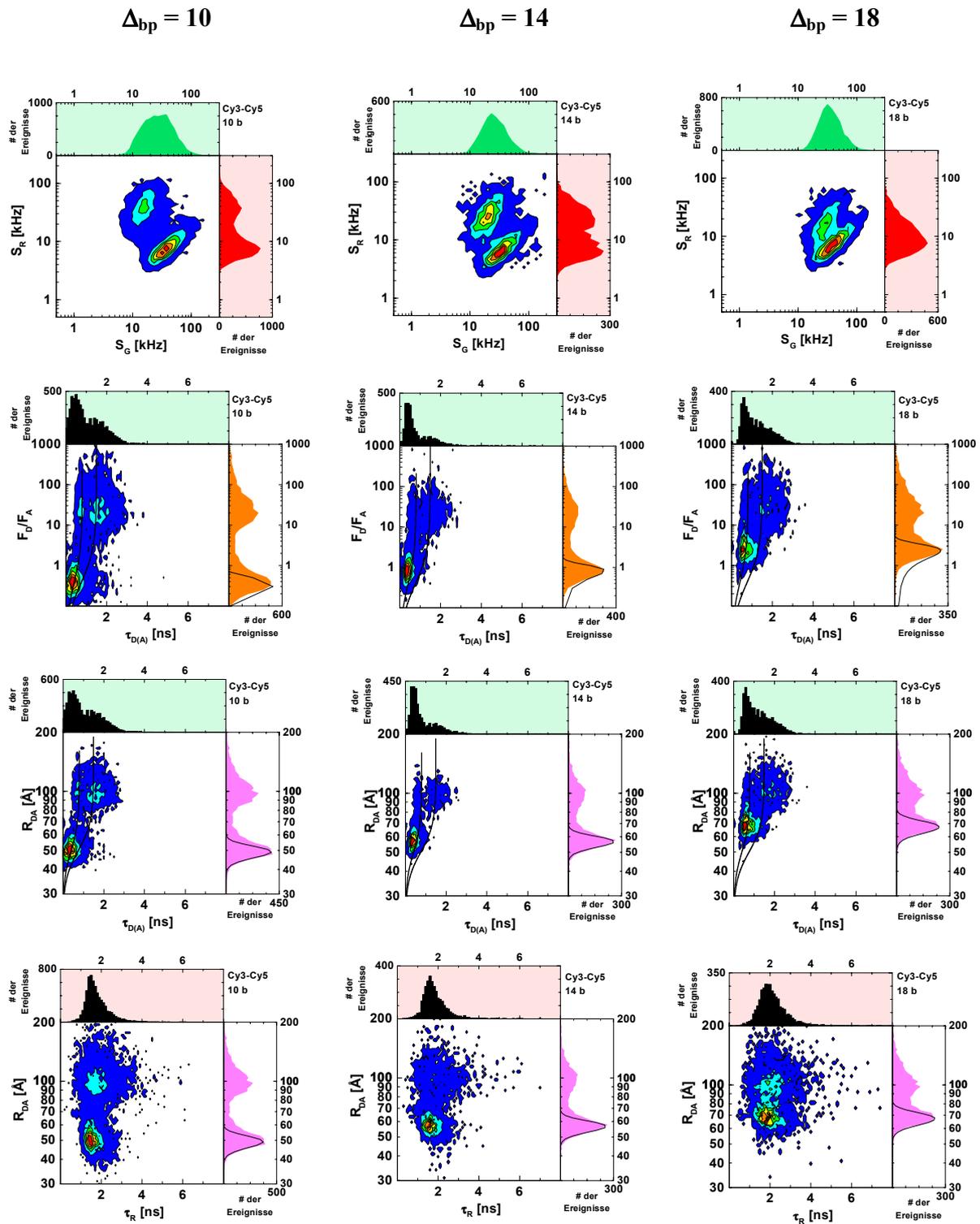
### H1 Farbstoffpaar Rh6G-Cy5



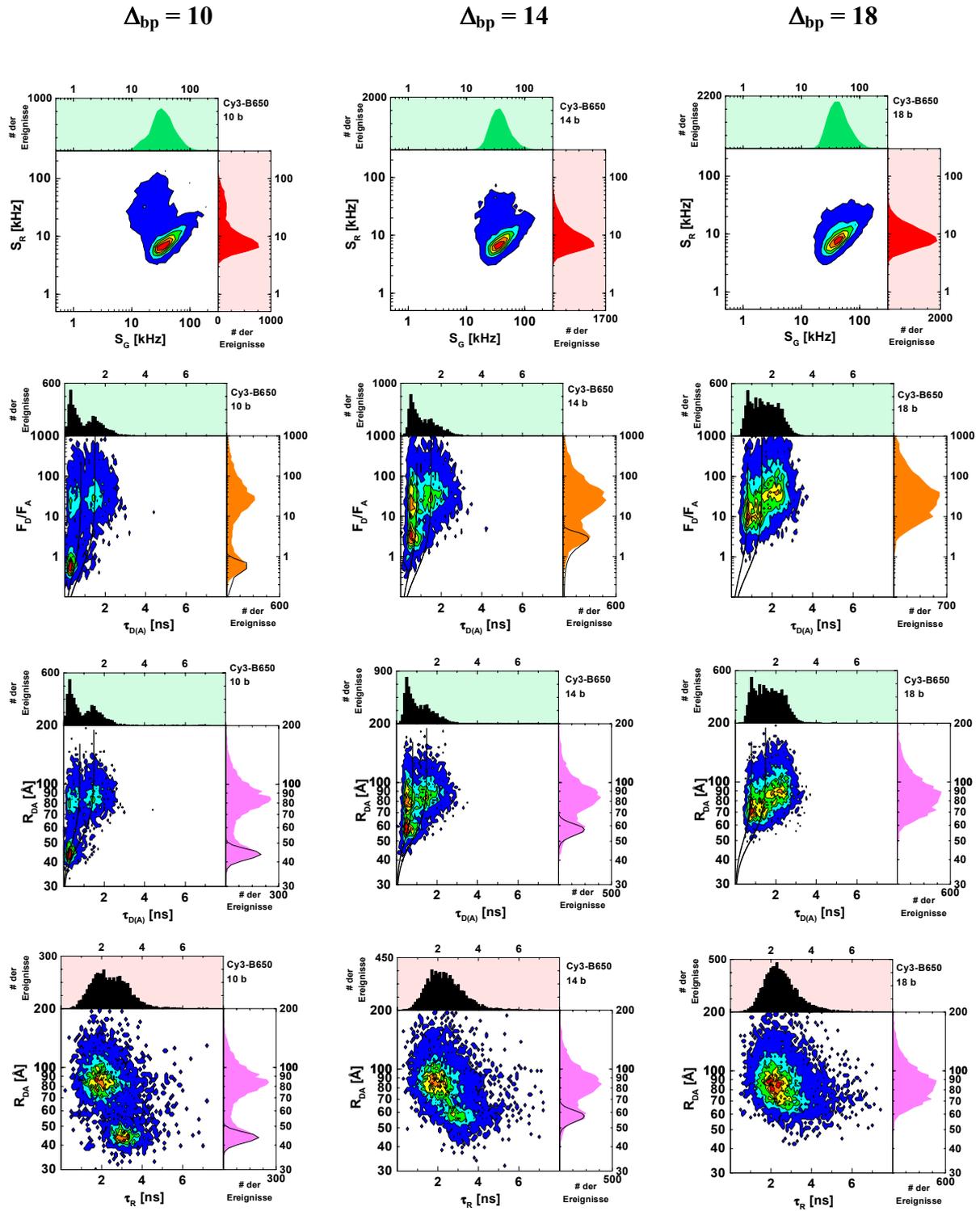
H2 Farbstoffpaar Rh6G-Bodipy650



## H3 Farbstoffpaar Cy3-Cy5



H4 Farbstoffpaar Cy3-Bodipy650



## I Ergebnisse der Strukturuntersuchungen der Donor-markierten Mutanten von Reverser Transkriptase mit verschiedenen Akzeptor-markierten Substraten

**Tab. II: Abstandswerte  $R_{DA}$  mit Standardabweichungen  $\sigma$  und den relativen Häufigkeiten  $H$ , die zur Berechnung der Strukturen der einzelnen Komplexe verwendet wurden.**

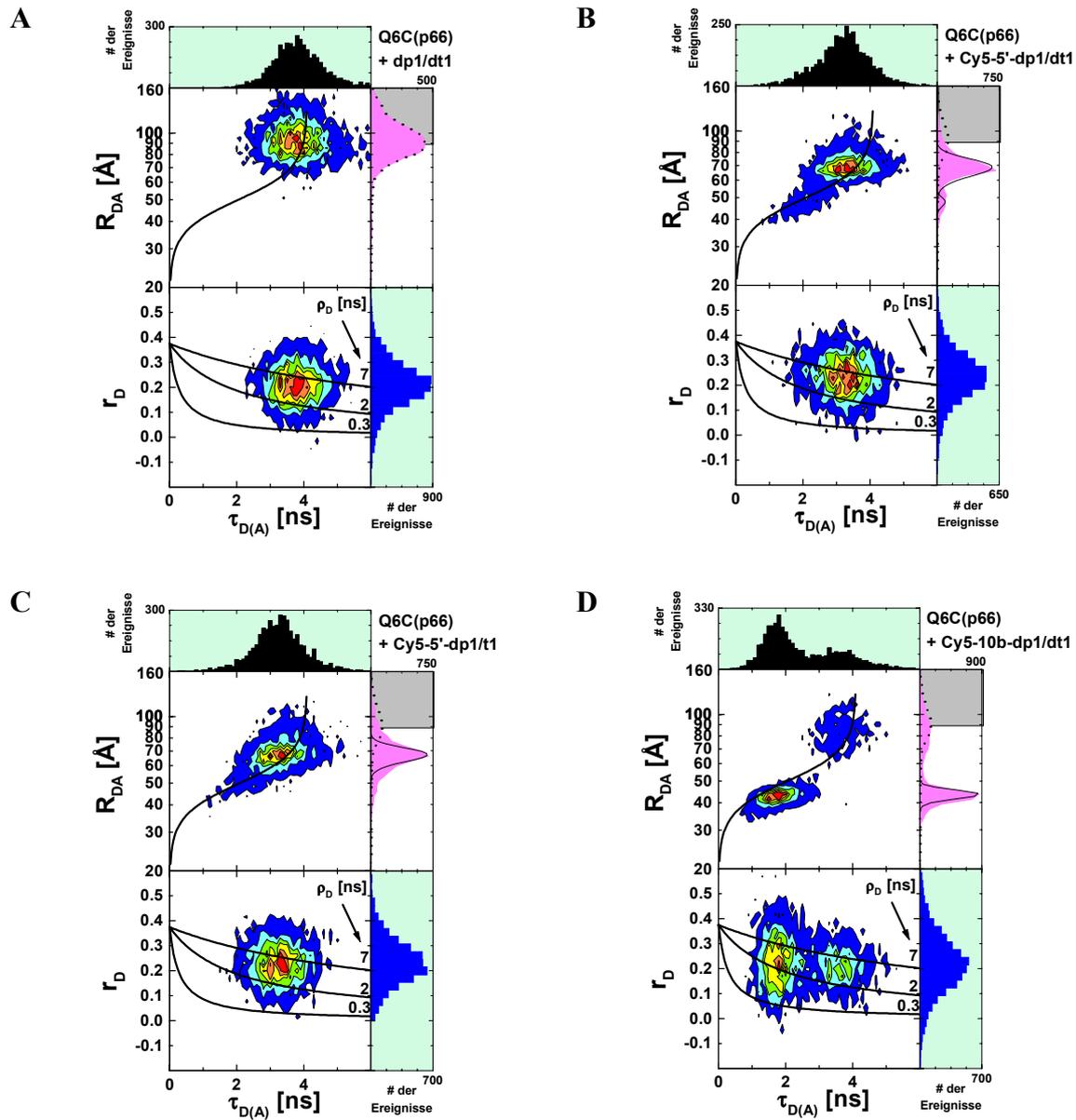
<b>Substrate + Protein</b>	$R_{DA}^{*1}$ [Å]	$R_{DA1}$ [Å]	$R_{DA2}$ [Å]	$R_{DA3}$ [Å]	$\sigma_1$ ( $R_{DA}$ ) [Å]	$\sigma_2$ ( $R_{DA}$ ) [Å]	$\sigma_3$ ( $R_{DA}$ ) [Å]	$H_1$ [%]	$H_2$ [%]	$H_3$ [%]	(1) <sup>*2</sup>	(2) <sup>*2</sup>	(3) <sup>*2</sup>
<b><i>Cy5-5'-dp1/dt1</i></b>													
Q6C(p66)	63	68,9	47,8	-	11,7	9,6	-	84	16	-	P+DE	?	-
T27C	65	80,4	68,7	35,5	27	9,4	12,1	51	44	5	DE	P	?
K287C	42	83,0	45,7	-	26,8	10,9	-	52	48	-	DE	P	-
Q6C(p51)	56	71,2	60,7	45,8	17,1	9	4,8	34	64	3	DE	P	?
K173C	59	72,1	62,1	-	36	10,1	-	44	56	-	DE	P	-
K281C	34	83,5	38,4	35,2	35,1	9,5	3,7	54	14	33	DE	?	P
<b><i>Cy5-10b-dp1/dt1</i></b>													
Q6C(p66)	39	79,9	42,9	-	42,3	4,97	-	44	56	-	DE	P	-
T27C	43	82,1	45,4	35,5	28,5	10,5	8,1	68	11	21	DE	?	P
K287C	25	84,2	41,4	35,2	28,1	12,7	4,1	65	21	14	DE	P	?
Q6C(p51) <sup>*3</sup>	43	70,4	68,2	-	27,9	9,1	-	61	39	-	DE	P	-
K173C	54	70,4	58	-	40	7	-	61	34	-	DE	P	-
K281C	49	85,1	72,1	-	32,7	11,6	-	62	38	-	DE	P	-
<b><i>dp1-3'-Cy5/dt1</i></b>													
Q6C(p66)	24	72	42,6	-	32,9	6,98	-	30	70	-	DE	P	-
T27C	26	83,8	36,9	-	33,4	13,2	-	77	23	-	DE	P	-
K287C	33	87,2	40,4	-	28,6	11,6	-	86	14	-	DE	P	-
Q6C(p51)	48	70	64,9	-	32,9	10,7	-	47	53	-	DE	P	-
K173C	65	69,8	56	-	52,8	8,5	-	45	55	-	P	DE	-
K281C	76	74,7	-	-	14	-	-	100	-	-	P+DE	-	-
<b><i>dp1/dt1-8b-Cy5</i></b>													
Q6C(p66)	39	75,9	48,4	-	42,1	9,9	-	41	59	-	DE	P	-
T27C	12	90,9	80,1	37,4	36,2	19	10,2	59	32	10	DE	P	?
K287C	27	87	38,1	-	31,8	9,3	-	66	34	-	DE	P	-
Q6C(p51)	61	68,1	67,9	-	8,5	27,3	-	35	65	-	DE	P	-
K173C	80	71,8	58,2	-	40,5	7,8	-	55	45	-	P	DE	-
K281C	80	80,3	73,3	-	34,2	12,5	-	45	55	-	P	DE	-
<b><i>dp1/dt1-5'-Cy5</i></b>													
Q6C(p66)	39	76,5	48,8	35,7	32,6	10,5	4,2	28	63	-	DE	P	?
T27C	12	74,1	42,1	30,5	36,2	10	6,1	69	25	31	DE	?	P
K287C	27	86,4	50,8	42	30,3	5,8	6,7	62	4	33	DE	?	P
Q6C(p51)	61	66,6	-	-	14,8	-	-	100	-	-	P+DE	-	-
K173C	80	67,4	56,8	-	40,9	9,3	-	46	54	-	P	DE	-
K281C	80	74,1	-	-	21,1	-	-	100	-	-	P+DE	-	-

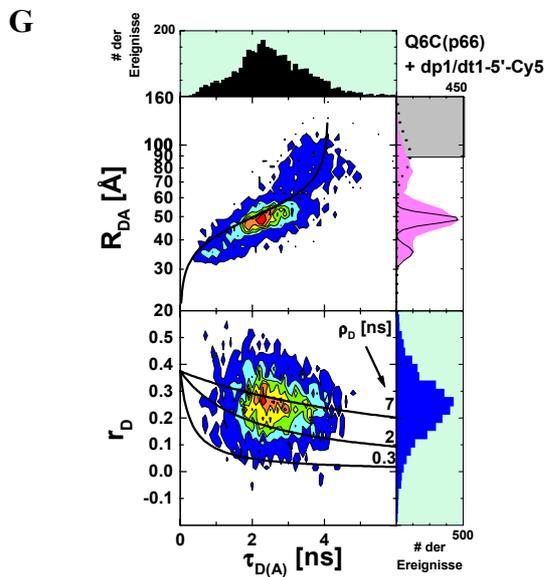
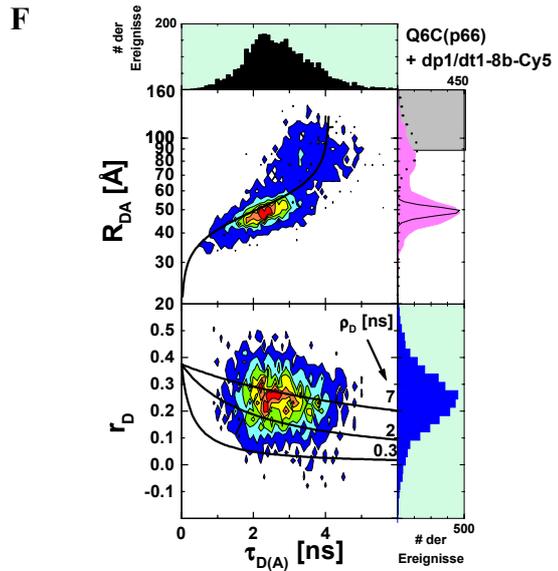
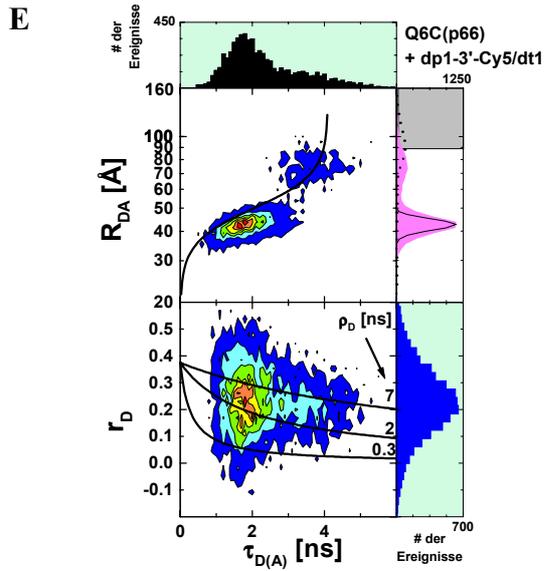
\*<sup>1</sup> berechneter Abstand RDA für den „produktiven“ Komplex gemäß Huang *et al.* (Huang, 1998)

\*<sup>2</sup> Diese Spalten geben die Zuordnung des jeweiligen Abstandswertes zu einem Komplex an. Die Zeichen stehen für: P = „produktiver“ Komplex, DE = „dead-end“ Komplex und ? für keine eindeutige Zuordnung.

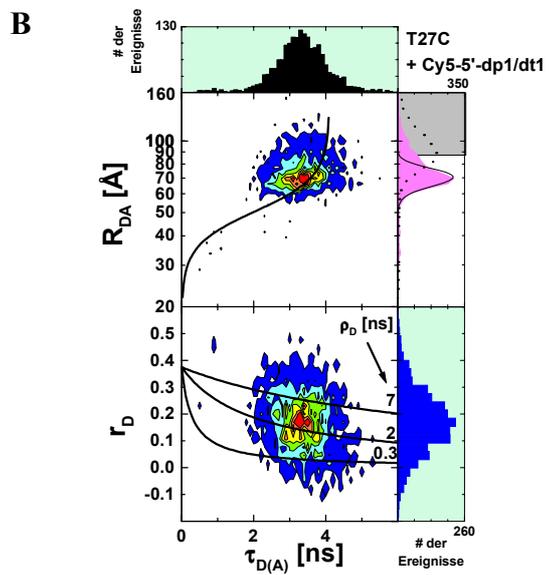
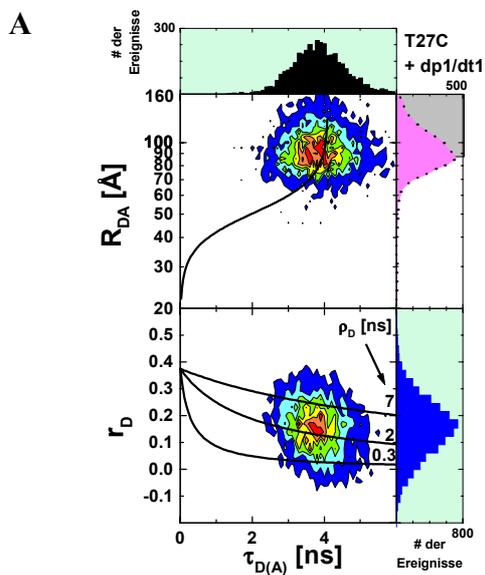
\*<sup>3</sup> nicht bei der Berechnung berücksichtigt, da die Abstandswerte nicht in das Modell passen

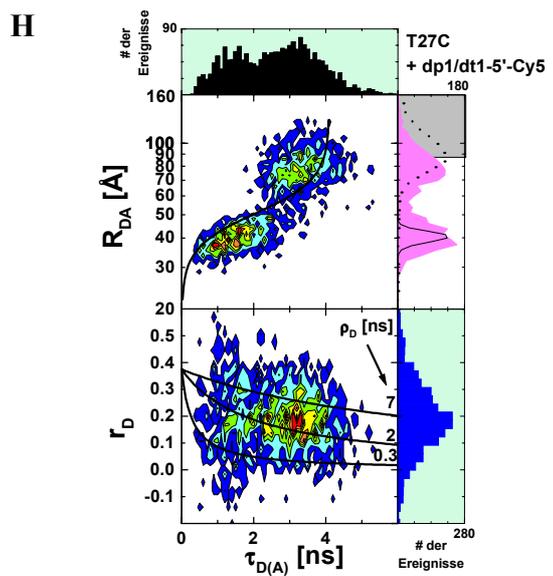
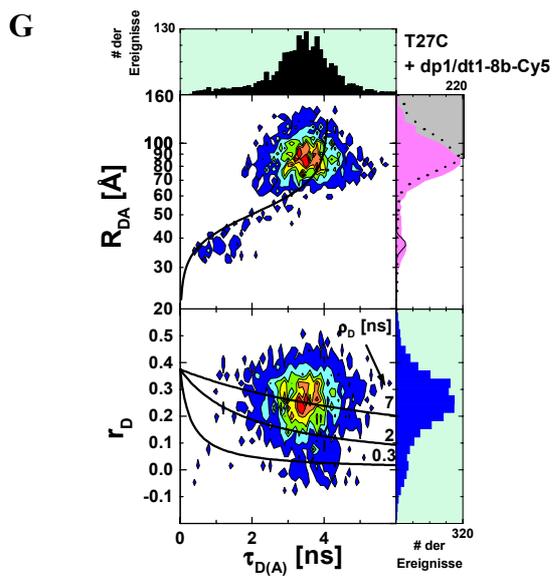
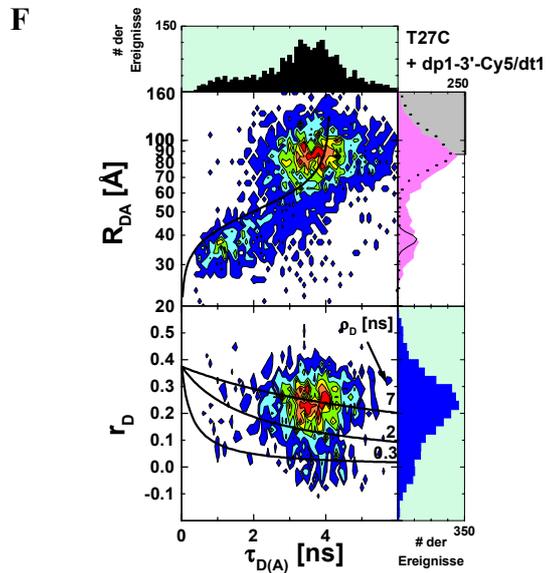
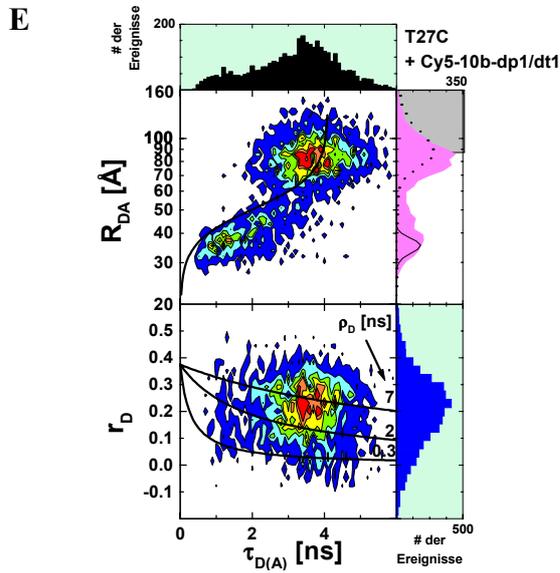
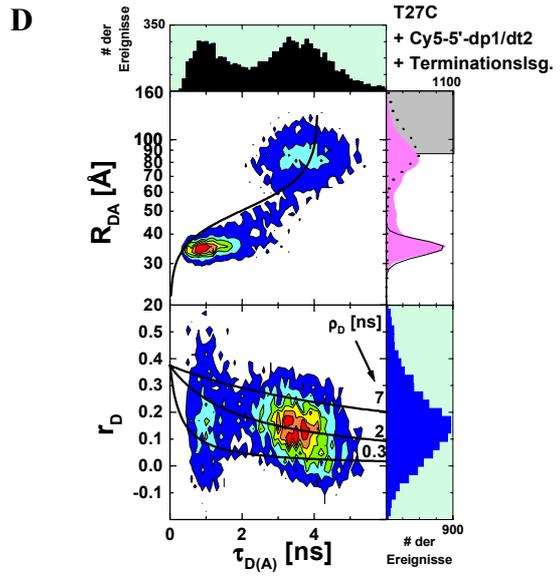
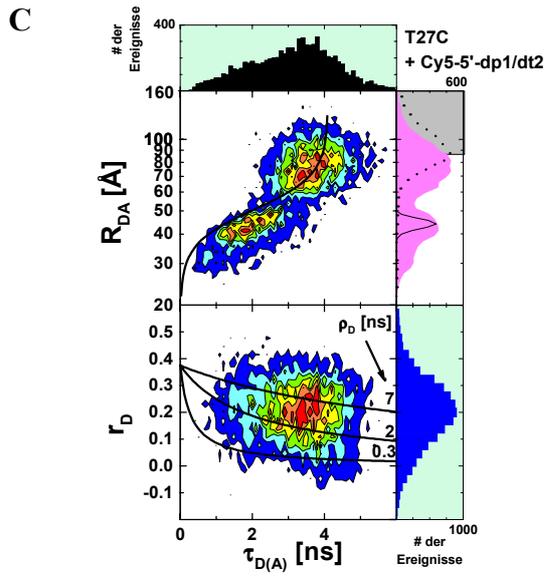
## 11 Mutante Q6C(p66)



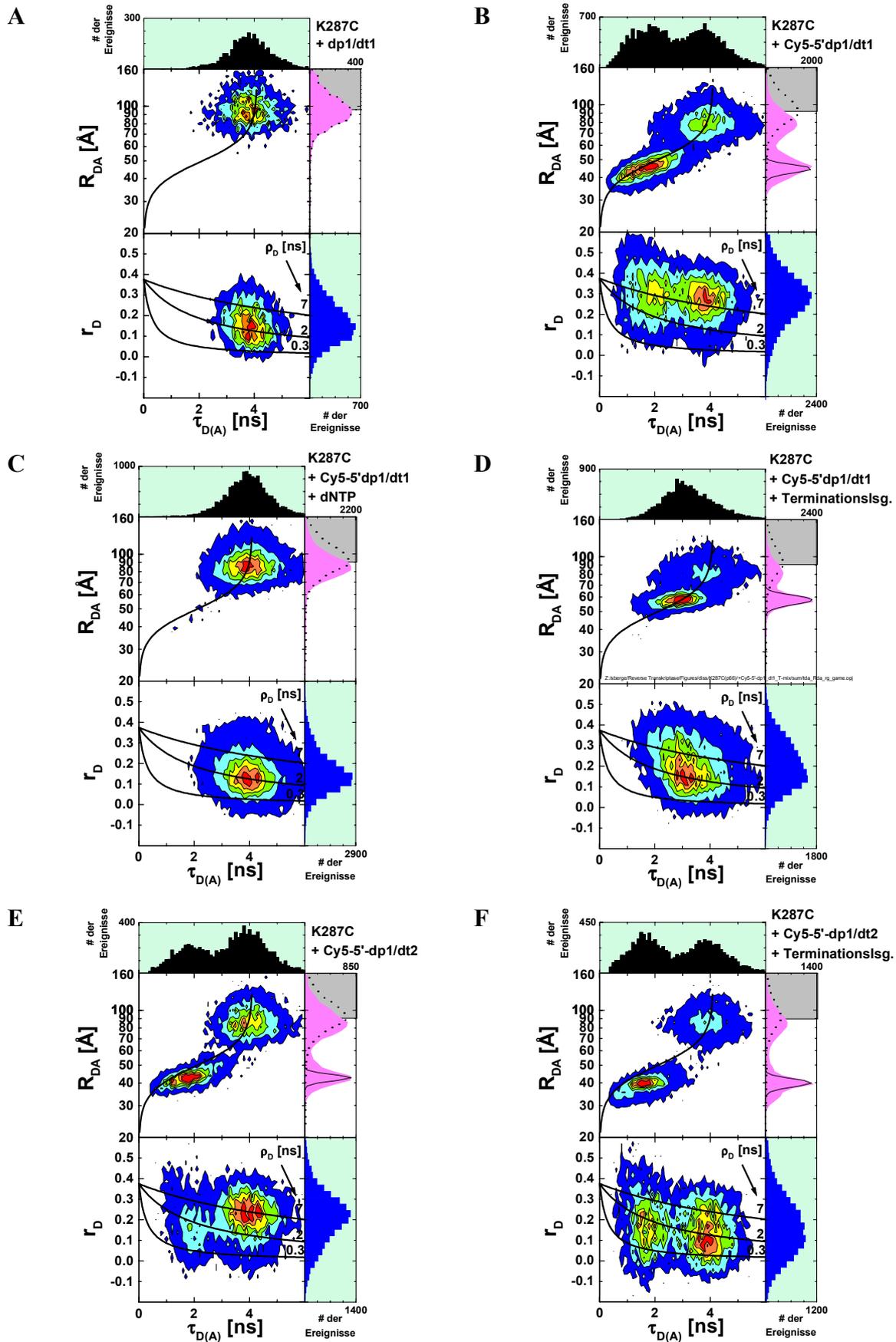


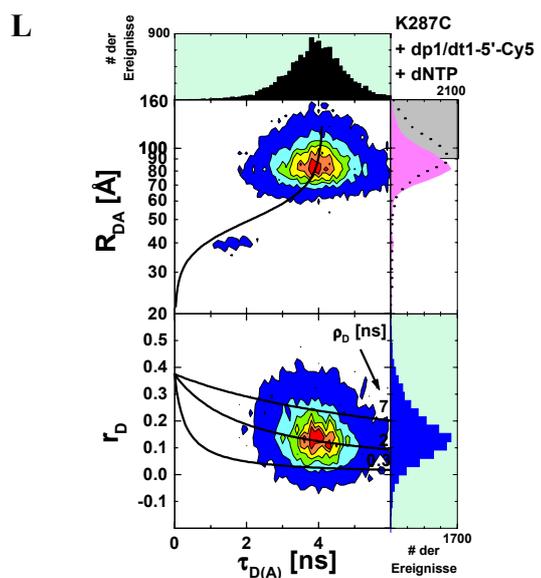
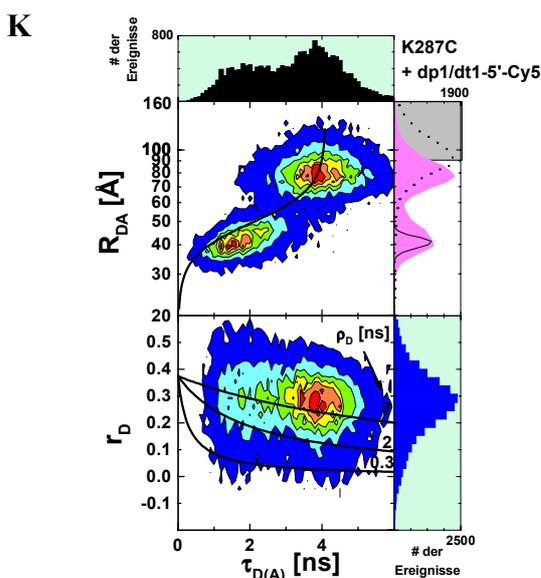
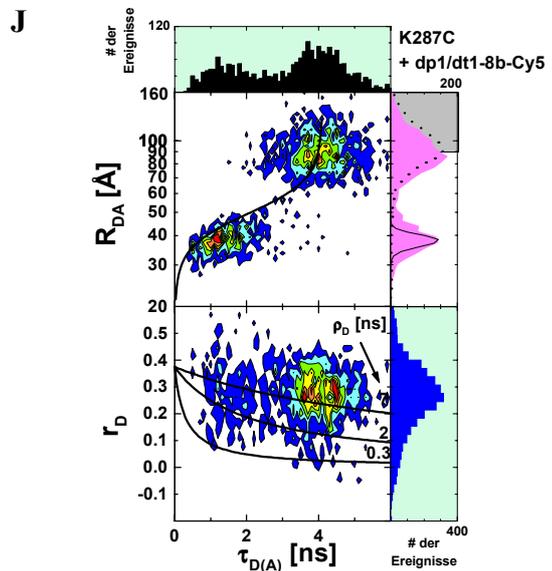
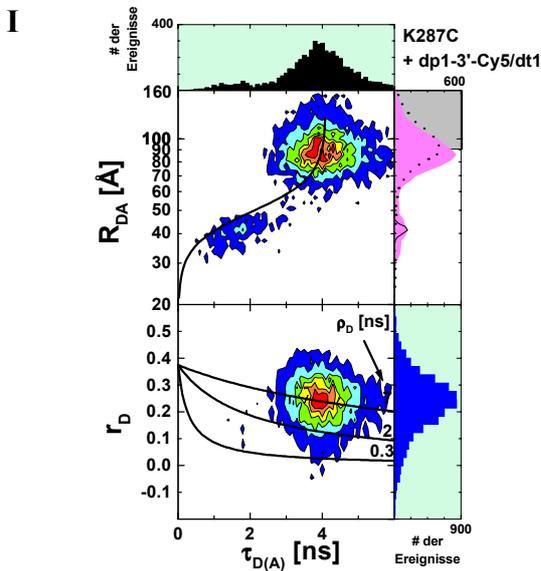
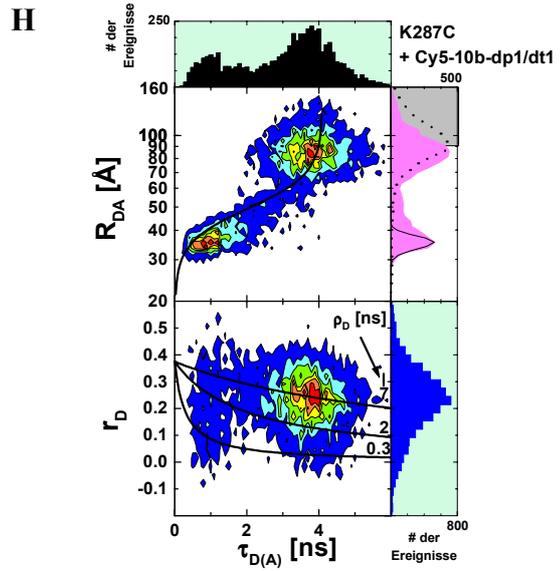
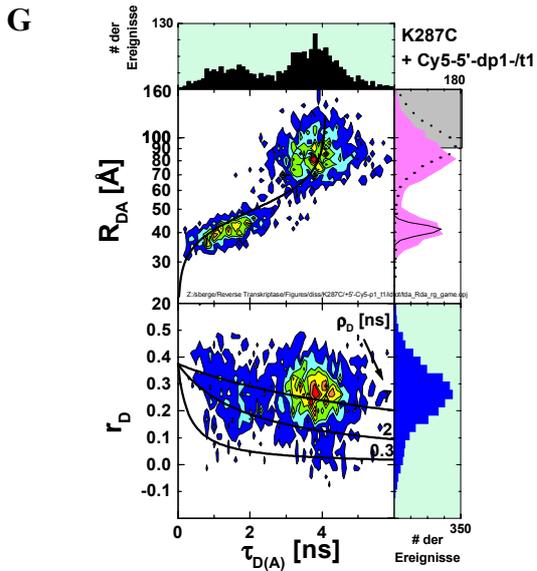
**I2 Mutante T27C(p66)**



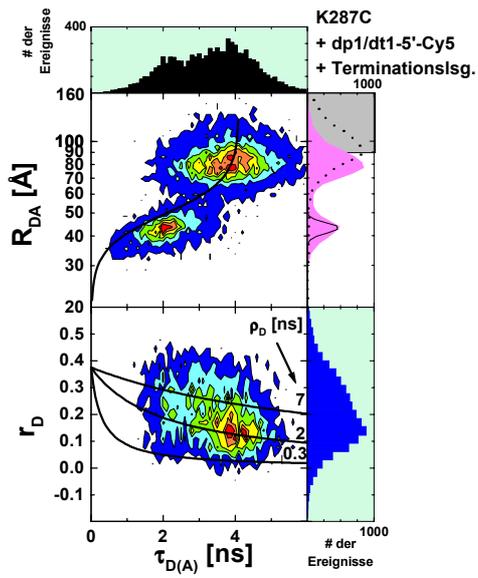


I3 Mutante K287C(p66)



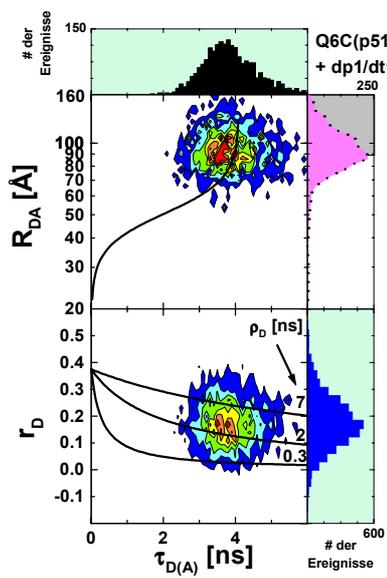


M

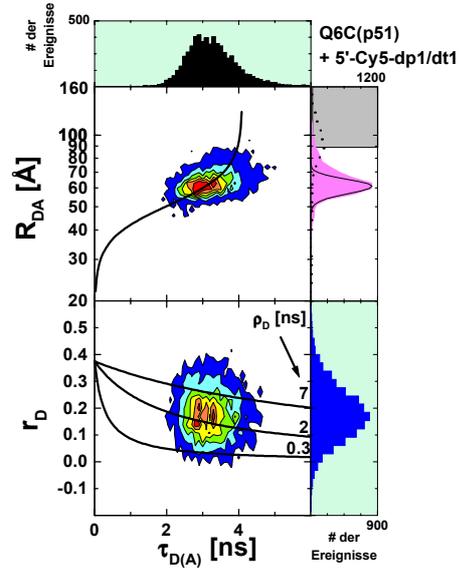


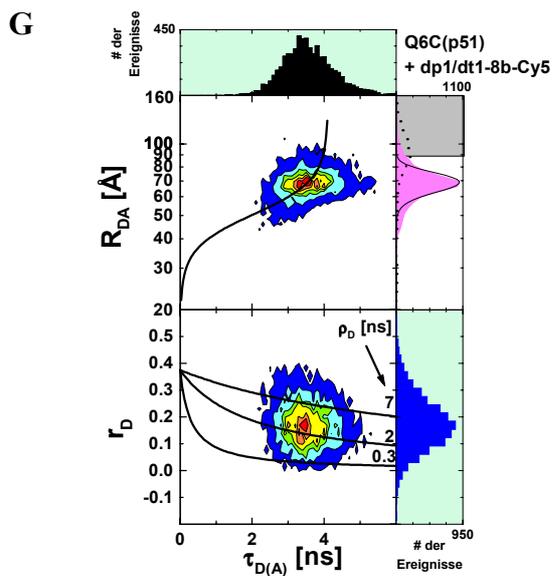
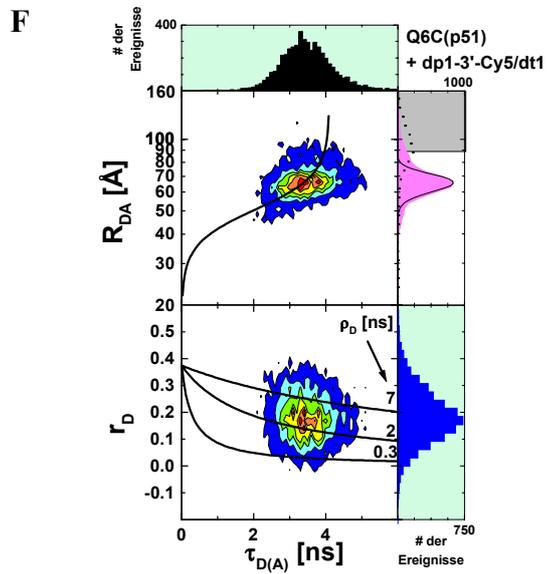
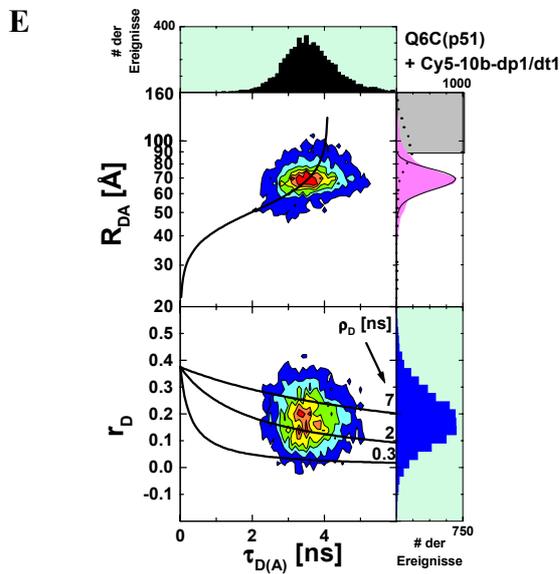
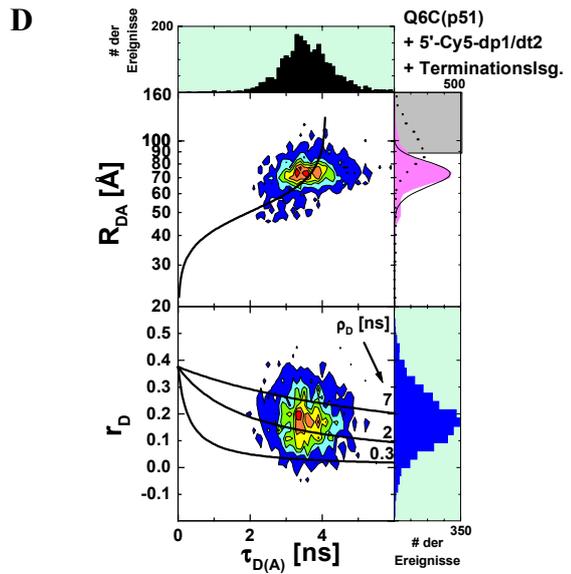
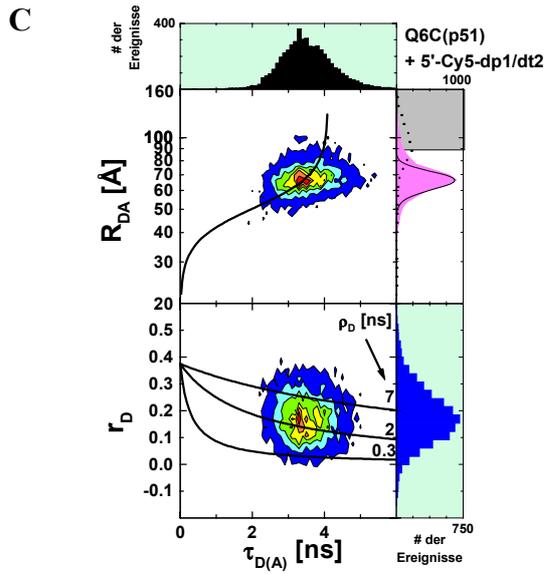
I4 Mutante Q6C(p51)

A

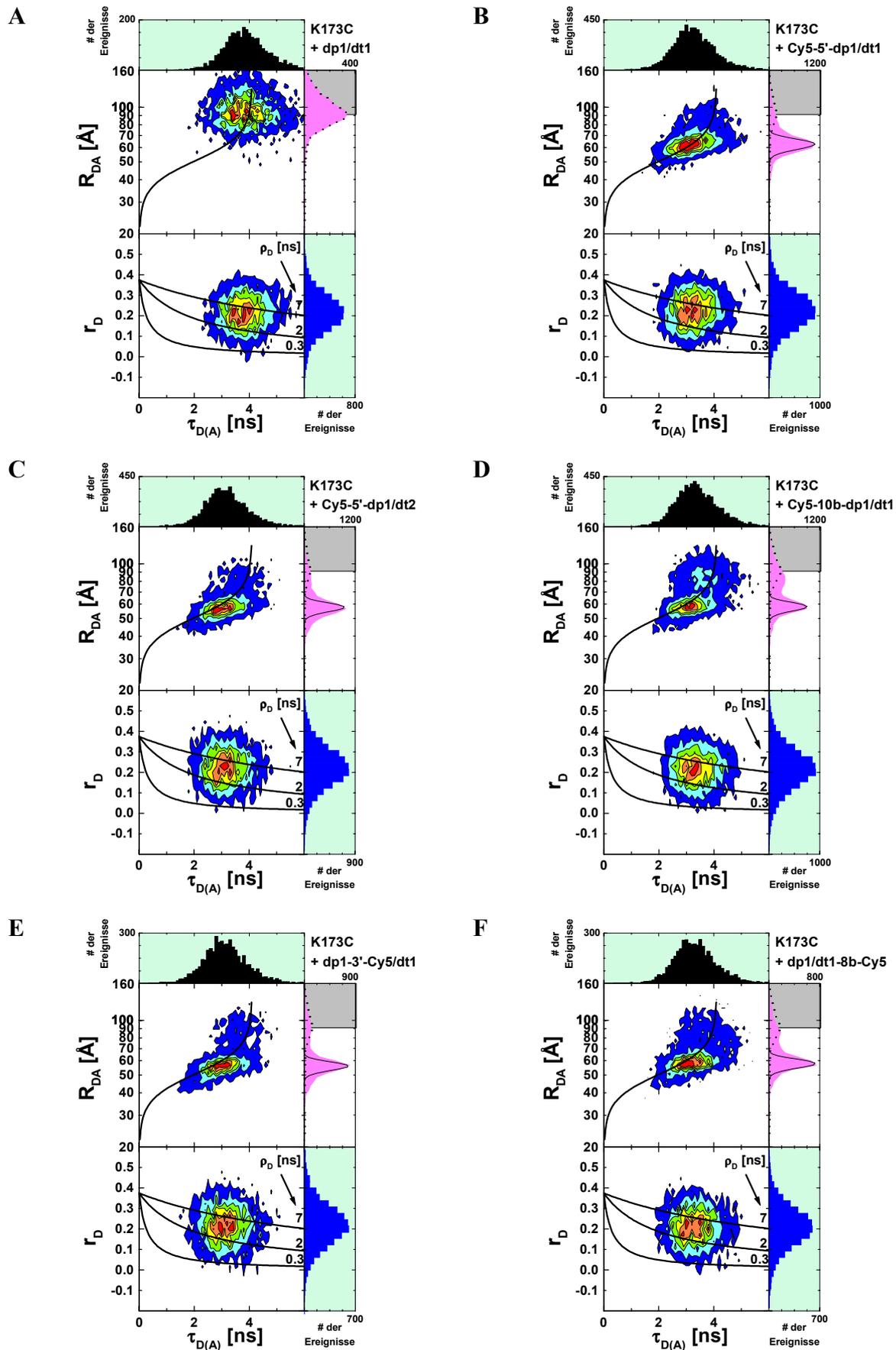


B

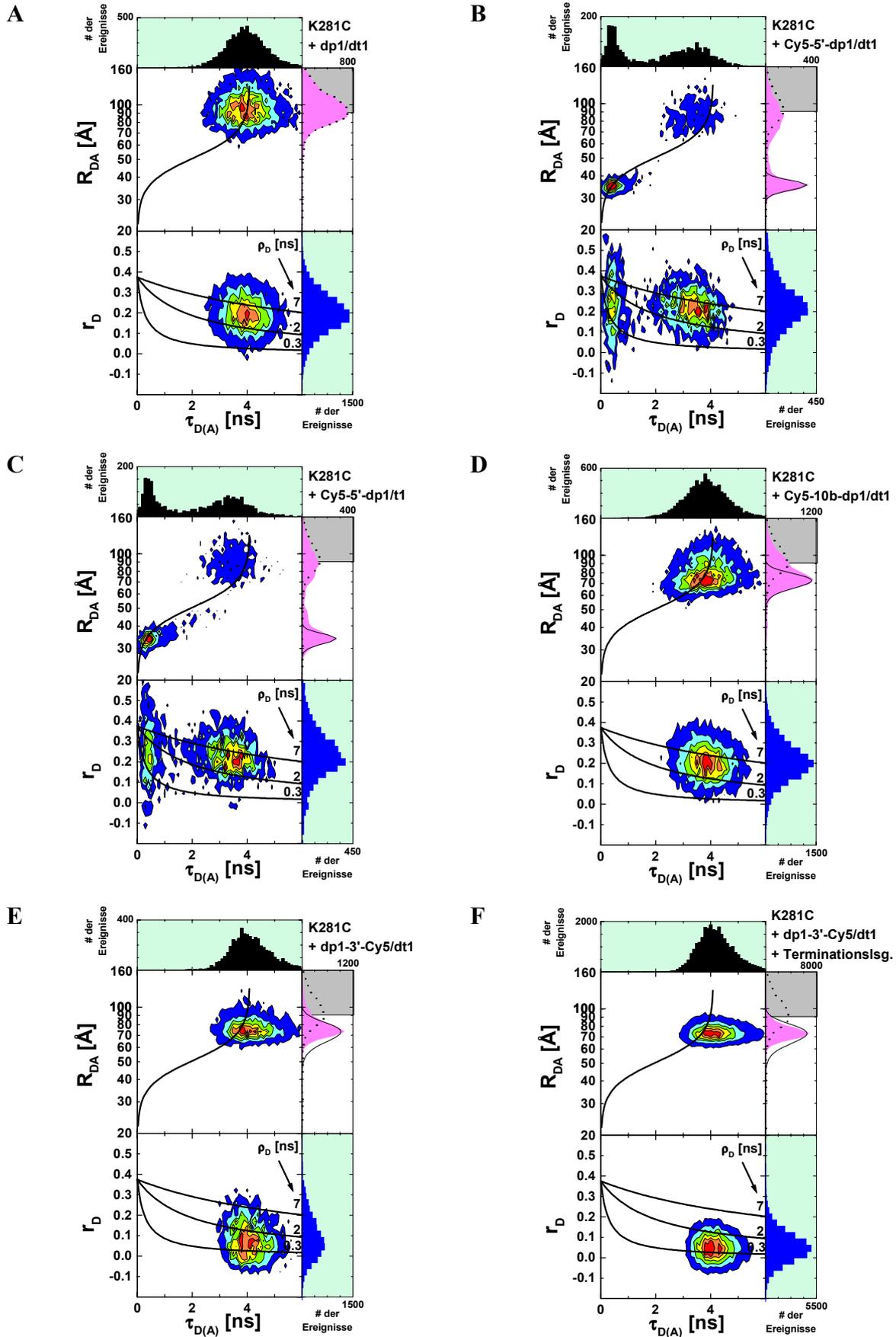




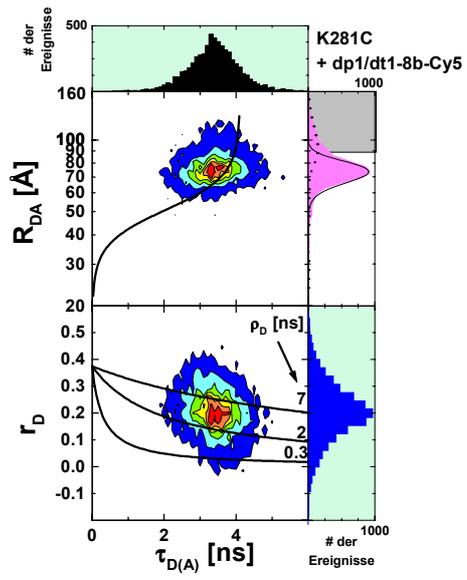
## I5 Mutante K173C(p51)



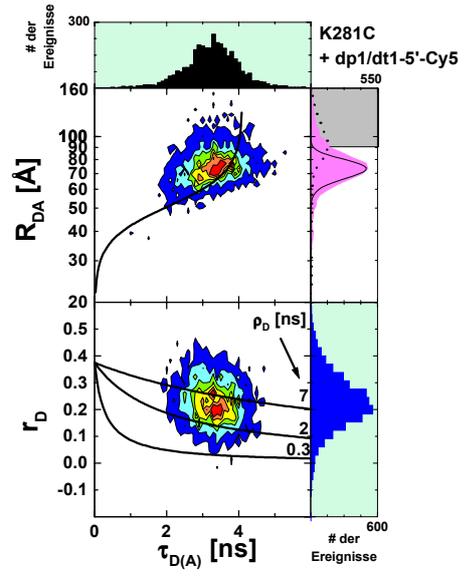
I6 Mutante K281C(p51)



G



H



## J Abkürzungsverzeichnis

Zahlenwerte von Konstanten sind in runden Klammern () angegeben; in eckigen Klammern [] befinden sich Angaben zur Einheit der jeweils beschriebenen Größe.

$a^+$	Markierungsverhältnis des Akzeptorfarbstoffs
$a_i$	fluoreszenzgewichtete Amplitude der Abklingzeit $\tau_i$ bei mehr exponentieller Abklingkurvenanpassung
$a_{\text{trans}}$	Verhältnis der Häufigkeiten von cis- zu trans-Form beim Farbstoff Cy5
Abs	Absorption
A	Akzeptor bzw. mit Akzeptor markiertes Molekül, Amplitude des ersten Bunchingterms in der FCS, Adenin
$A(t_c)$	Autokorrelationsfunktion
$A_i$	Amplitude des Bunchingterms $i$ in der FCS
APD	Avalanche Photodiode
$b_i$	Amplitude der Rotationskorrelationszeit des Zustands $i$
BIFL	<i>Burst-Integrated Fluorescence Lifetime</i>
$B_p$	Streulichtsignal in den Detektoren 1 und 2
$B_s$	Streulichtsignal in den Detektoren 3 und 4
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (ein Protein)
$c$	Konzentration; Lichtgeschwindigkeit
$c_i$	Anzahl der Photonenergebnisse im Kanal $i$
C	Cytosin
$d$	Schichtdicke der Probe bei der Absorption
$d^+$	Konzentration des mit Donor markierten Moleküls oder Markierungsverhältnis
dAMP	2'-Desoxyadenosin-5'-monophosphat
dCMP	2'-Desoxycytosin-5'-monophosphat
dGMP	2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat
dNTP	Desoxynukleotid-monophosphat
ds	doppelsträngig (= <i>double-stranded</i> )
D	Diffusionskonstante; Donorfluorophor; mit Donorfluorophor markiertes Molekül
D(A)	mit Donor- und Akzeptorfarbstoff markierter Molekülkomplex
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>em</i>	Fluoreszenz ( <i>emission</i> )
engl.	englisch
es	einzelsträngig
<i>ex</i>	Anregung ( <i>excitation</i> )
E	Extinktion
$E_T$	Energietransfereffizienz
f	Anteil der fluoreszierenden Moleküle an der Gesamtzahl der Moleküle

$f(\lambda)$	normierte Fluoreszenzintensität im Wellenlängenbereich von $\lambda$ bis $\lambda+d\lambda$
F	Fluoreszenz; Fluoreszenzintensität
F*	angeregter Fluoreszenzfarbstoff
$F_0$	Fluoreszenzintensität (um Streulichtanteil-korrigiertes Fluoreszenzsignal) am Zeitpunkt $t = 0$ nach Anregung
$F_a$	Faraday-Konstante ( $= 9,65 \cdot 10^4 \text{ C mol}^{-1}$ )
$F_A$	Fluoreszenzintensität des Akzeptorfarbstoffs
$F_{A,\text{FRET}}$	Fluoreszenzintensität des Akzeptorfarbstoffs durch direkte Anregung und durch Energietransfer
FCS	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i> (= Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie)
$F_D$	Fluoreszenzintensität des Donorfarbstoffs
$F_{\text{ges}}$	Gesamt-Fluoreszenzintensität
FRET	Förster/Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
$g(t)$	Gerätefunktion
$g_G$	Detektionseffizienz im „grünen“ Wellenlängenbereich
$g_R$	Detektionseffizienz im „roten“ Wellenlängenbereich
gr.	griechisch
G	Guanin, „grüner“ Wellenlängenbereich; G-Faktor
$G(t_c)$	normierte Autokorrelationsfunktion
$G_D(t_c)$	normierte Autokorrelationsfunktion der Diffusion
GSZ	Gegensequenz
h	Plancksches Wirkungsquantum ( $= 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$ )
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
I	mittlere Anregungsleistungsdichte [ $\text{kW cm}^{-2}$ ]; Intensität des transmittierten Lichts bei der Absorption
$I_0$	Anregungsleistungsdichte in der Fokusebene [ $\text{kW cm}^{-2}$ ]; Intensität des eingestrahnten Lichts bei der Absorption
IC	<i>Internal Conversion</i> (= Innere Umwandlung)
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
J	Überlappungsintegral [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^3$ ]
k	Anzahl der Kanäle; Boltzmann-Konstante ( $= 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ); Geschwindigkeitskonstante
$k_0$	Summe der Geschwindigkeitskonstanten von Fluoreszenz, innerer Umwandlung und <i>intersystem crossing</i> eines Fluorophors
$k_d$	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
kD	kiloDalton (Gewichtseinheit)
$k_D$	Summe der Geschwindigkeitskonstanten von Fluoreszenz, innerer Umwandlung und <i>intersystem crossing</i> des Donorfarbstoffs [ $\text{s}^{-1}$ ]
$k_{D(0)}$	Summe der Geschwindigkeitskonstanten von Fluoreszenz, innerer Umwandlung und <i>intersystem crossing</i> des Donorfarbstoffs [ $\text{s}^{-1}$ ]
$k_F$	Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz [ $\text{s}^{-1}$ ]
$k_{\text{FRET}}$	Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers [ $\text{s}^{-1}$ ]

$k_{IC}$	Geschwindigkeitskonstante der inneren Umwandlung (engl. <i>internal conversion</i> ) [ $s^{-1}$ ]
$k_{ISC}$	Geschwindigkeitskonstante für den Übergang vom angeregten in den Triplettzustand [ $s^{-1}$ ]
$k_P$	Geschwindigkeitskonstante der Phosphoreszenz [ $s^{-1}$ ]
$k_Q$	Geschwindigkeitskonstante der Löschung [ $M^{-1} s^{-1}$ ]
$k_T$	Geschwindigkeitskonstante für den Übergang vom Triplettzustand in den Grundzustand [ $s^{-1}$ ]
$K_A$	Gleichgewichtskonstante der Assoziation
$K_D$	dynamische Löschkonstante; Dissoziationsgleichgewichtskonstante
$K_{SV}$	stationäre Stern-Volmer-Löschkonstante [ $M^{-1}$ ]
$I_1, I_2$	Korrekturfaktoren für die Mischung der Polarisationsanteile bei Transmission durch das Objektiv
MCS	<i>Multichannel-Scaler Trace</i> (= Vielkanalzähler-Spur)
MFD	Multiparameter-Fluoreszenzdetektion
MLE	<i>Maximum Likelihood Estimator</i> (= Maximum-Likelihood-Schätzer)
$n$	Anzahl an Photonen in einem Einzelmolekülereignis
$n_D$	Brechungsindex des Lösungsmittels
$N$	Anzahl an fluoreszierenden Molekülen; Nukleobase
$N_0$	Anzahl an fluoreszierenden Molekülen zur Zeit $t = 0$ der Anregung
$N_i$	Besetzungsdichte eines Energieniveaus
$N_A$	Avogadro-Konstante ( $= 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
NHS	N-hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (= Kernmagnetische Resonanz)
p/t	Primer/Template
P	Polarisation; Laserlichtleistung am Objektiv
PEG	Polyethylenglycol
Q	Löschmolekül; Löschung (engl. <i>quenching</i> )
$r$	Anisotropie
$r_0$	Anisotropie zur Zeit $t = 0$ der Anregung des Moleküls (molekülabhängig)
$R_0$	Försterabstand [ $\text{\AA}$ ]
$R_{0r}$	reduzierter Försterabstand [ $\text{\AA}$ ]
R	ideale Gaskonstante ( $= 8,31 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ); Anteil des Diffusionsterms mit der Diffusionszeit $t_{D1}$ bei der FCS; „roter“ Wellenlängenbereich
$R_A$	Ratiofunktion $R_A$
$R_{DA}$	Abstand von Donor und Akzeptor eines FRET-Paares [ $\text{\AA} = 10^{-10} \text{ m}$ ]
$R_{DA(\text{max})}$	maximal bestimmbarer Abstand von Donor und Akzeptor im Rahmen einer Einzelmolekülmessung
$R_{(DA)}$	Ratiofunktion $R_{(DA)}$
RNS	Ribonukleinsäure
RT	<i>Reverse Transkriptase</i>
S	Fluoreszenzintensität, die nicht mit dem Streulicht-Anteil korrigiert ist
$S_0$	Singulettzustand des Grundzustands; Fluoreszenzsignal ohne Fluoreszenzlöschung
$S_1$	Singulettzustand des ersten angeregten Zustands

SNOM	Scanning near-field optical microscopy (Raster-Nahfeld-Mikroskop)
$S_p$	Fluoreszenzsignal in den Detektoren 1 und 2
$S_s$	Fluoreszenzsignal in den Detektoren 3 und 4
$t$	Zeit
$t_i$	Korrelationszeit des Bunchingterms $i$ in der FCS
$t_c$	Korrelationszeit [ms]
$t_D$	Diffusionszeit [ms]
$t_T$	Triplettkorrelationszeit [ $\mu$ s]
$T$	absolute Temperatur [K], Tripletzustand; Messfenster bei der zeitaufgelösten Spektroskopie; zeitlicher Schwerpunkt eines Einzelmolekülereignisses, Thymidin
$T_{1eq}$	Amplitude des Tripletanteils der Korrelationskurve
TCSPC	Time-correlated Single Photon Counting (Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung)
$T_{IV}$	Intervallbreite der Vielkanalzählerspur [ms]
TL	wasserlöslicher Triplettlöcher
TMP	Thymidin-5'-monophosphat
$V$	Rotationsvolumen des Fluorophors
$V_D$	Detektionsvolumen [fl]
VitC	Vitamin C
$x_i$	molekulgewichtete Amplitude der Abklingzeit $\tau_i$ bei mehrexponentieller Abklingkurvenanpassung
$z_0$	$1/e^2$ -Radius in axialer ( $z$ ) Richtung [ $\mu$ m]

### *griechische Zeichen*

$\alpha$	effektives molares Lösolvolumen, <i>Crosstalk</i>
$\beta$	Winkel zwischen Absorptions- und Fluoreszenzdipolmoment; Parameter der gestreckten Anpassung von $t_T$ in der FCS
$\chi$	Hintergrund-Polarisationsverhältnis
$\Delta E$	Energiedifferenz
$\Delta t$	Zeitdifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Photonen
$\Delta t(n)$	Zeitdifferenz zwischen erstem und letztem Photon in einem Einzelmolekülereignis
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
$\varepsilon_0$	Dielektrizitätskonstante im Vakuum
$\Phi_F$	Fluoreszenzquantenausbeute
$\Phi_{FA}$	Fluoreszenzquantenausbeute der Akzeptor-Probe
$\Phi_{FD}$	Fluoreszenzquantenausbeute der Donor-Probe
$\Phi_{F,D(A)}$	Fluoreszenzquantenausbeute der Donor- und Akzeptor-haltigen Probe
$\Phi_{ISC}$	Tripletquantenausbeute
$\Phi_{QD}$	Quantenausbeute der dynamischen Löschung
$\Phi_{QG}$	Quantenausbeute der Gesamtlöschung
$\Phi_{QS}$	Quantenausbeute der statischen Löschung

$\gamma$	Streulichtanteil
$\gamma_P$	inverse Photonenenergie
$\eta$	Viskosität des Lösungsmittels
$\kappa^2$	Orientierungsfaktor, der die relative Orientierung im Raum der Übergangsdipole von Donor und Akzeptor beschreibt
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
$\lambda'$	Wellenlänge, des Donorabsorptionsmaximums
$\lambda''$	Wellenlänge, des Akzeptorabsorptionsmaximums
$\lambda_1$	Wellenlänge, des Donorfluoreszenzmaximums
$\lambda_2$	Wellenlänge, des Akzeptorfluoreszenzmaximums
$\lambda_{Ex}$	Anregungswellenlänge
$\mu$	Übergangsdipolmoment
$\mu_A$	Übergangsdipolmoment des Akzeptorfarbstoffs
$\mu_D$	Übergangsdipolmoment des Donorfarbstoffs
$\nu$	Frequenz
$\rho$	Rotationskorrelationszeit [ns]
$\sigma$	Absorptionsquerschnitt; Standardabweichung
$\tau$	Fluoreszenzlebensdauer
$\tau_0$	Fluoreszenzlebensdauer [ns] des Farbstoffs mit Einbeziehung der strahlungslosen Prozesse außer der Fluoreszenzlöschung
$\tau_{av}^a$	mittlere Fluoreszenzlebensdauer mit Einbeziehung der fluoreszenzgewichteten Amplituden
$\tau_{av}^x$	mittlere Fluoreszenzlebensdauer mit Einbeziehung der molekulgewichteten Amplituden
$\tau_A$	Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffs in der Akzeptor-Probe
$\tau_D$	Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffs in der Donor-Probe
$\tau_{D(A)}$	Fluoreszenzlebensdauer der Donorfarbstoffs in der Probe mit Donor- und Akzeptorfarbstoff
$\tau_i$	Fluoreszenzlebensdauer der Abklingzeit $\tau_i$ bei mehrexponentieller Abklingkurvenanpassung
$\omega_0$	$1/e^2$ -Radius in radialer (x,y) Richtung [ $\mu\text{m}$ ]





## Lebenslauf

Name: Sylvia Berger  
Geburtsdatum: 02.05.1973  
Geburtsort: Essen-Borbeck  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulbildung

1979-1984 Eichendorff-Grundschule, Essen-Borbeck  
1984-1992 B.M.V.-Gymnasium, Essen-Holsterhausen

### Hochschulstudium

ab WS 1992/93 **Studium Chemie** (Diplom) an der Westfälischen Wilhelms-  
bis WS 1997/98 Universität (WWU) Münster  
Mai-Dezember 1997 **Diplomarbeit** an der Universität Salamanca/Spanien  
(Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Arbeitskreis Prof. Dr.  
E. Villar)  
fernbetreut von Prof. Dr. H.-J. Galla am Institut für Biochemie der  
WWU Münster, betreut von Prof. Dr. V. Shnyrov  
*Microcalorimetric and Spectroscopic Study of Newcastle Disease  
Virus (NDV) M Protein*

seit März 1998 **Doktorarbeit** am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
in Göttingen  
(Abteilung Spektroskopie und photochemische Kinetik, Arbeitskreis  
Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie)  
betreut von Prof. Dr. J. Troe seitens der Universität Göttingen, betreut  
von Priv.-Doz. Dr. C.A.M. Seidel)  
*Untersuchung der Einzelmoleküldynamik mit multidimensionaler  
Fluoreszenzspektroskopie*





