

1 Einleitung

Die meisten Modellvorstellungen in den Naturwissenschaften beschreiben die Wechselwirkungen zwischen Molekülen auf atomarer Ebene. Das Wissen über die chemische Struktur und Dynamik von Molekülen stammt hingegen primär aus Untersuchungen von Molekülensembles. Bei einer Ensemblemessung eines heterogenen Systems geht jedoch die Information über Zustände einzelner Moleküle durch die Mittelung verloren. Daher ist es sinnvoll Techniken zu entwickeln, mit denen die Beobachtung einzelner Moleküle möglich ist, um auf diese Weise direkte Informationen über Heterogenitäten und Verteilungen zu erhalten. Solche Verfahren sind besonders bei der Untersuchung sehr komplexer Vorgänge, wie sie häufig in biologischen Systemen auftreten, von großem Vorteil.

Nach den Pionierarbeiten zur Detektion von einzelnen Molekülen mit Hilfe optischer Methoden (Hirschfeld, 1976; Moerner, 1989; Orrit, 1990) haben sich die Einzelmolekül-techniken in den letzten Jahren, durch die Verbesserung der optischen Spektroskopie und Mikroskopie sowie die Entwicklung empfindlicherer Detektionssysteme, rasant weiterentwickelt. Die Mehrzahl dieser Techniken beruht dabei auf der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion, die eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität gewährleistet (Goodwin, 1996; Moerner, 1999; Weiss, 1999) auch unter physiologischen Bedingungen eingesetzt werden kann. Dabei können mit den verbesserten Methoden, je nach experimentellem Aufbau, verschiedenste Eigenschaften der Fluoreszenz, wie z.B. Intensität, Fluoreszenzlebensdauer (Enderlein, 2001) und Fluoreszenzanisotropie (Ha, 1999a; Schaffer, 1999), bestimmt werden, so daß die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie mittlerweile weit über den bloßen Nachweis einzelner Moleküle hinausgeht. Daneben wurde eine der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie verwandte Technik, die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), entwickelt, die Intensitätsschwankungen von wenigen Moleküle herrührend analysiert, und so Aussagen über dynamische Prozesse zuläßt.

Voraussetzung für die Detektion von Fluoreszenz ist zunächst die Gegenwart eines geeigneten Fluorophors. Da die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie besonders hohe Ansprüche bezüglich der Fluoreszenzquantenausbeute und Photostabilität hat, werden in der Regel Rhodamin- oder Cyaninfarbstoffe als Fluoreszenzsonden (extrinsische Fluorophore) kovalent an den entsprechenden Analyten, z.B. ein Biomolekül, gebunden.

In einigen Einzelmolekül-Fluoreszenzuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Fluoreszenzeigenschaften einzelner Moleküle sehr stark von deren unmittelbaren Umgebung abhängen (Gaiko, 2002; Moerner, 1994; Xie, 1998). Ist ein Fluorophor an ein Biomolekül gebunden, können Veränderungen der Mikroumgebung durch Dynamiken des Biomoleküls ausgelöst werden. In einem solchen Fall können sowohl die einzelnen Zustände als auch die Dynamik in einem Einzelmolekülexperiment direkt anhand der gemessenen Fluoreszenzparameter verfolgt werden (Ha, 1996b), während die Information bei einer herkömmlichen Ensemblemessung infolge der Mittelung verborgen bleibt.

Eine besonders interessante Variante der Fluoreszenzspektroskopie ist die Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) mit Hilfe von zwei Fluoreszenzsonden: Einem Donor- und einem Akzeptorfluorophor. Bei FRET handelt es sich um einen photophysikalischen Effekt, dessen theoretische Beschreibung auf T. Förster (Förster, 1948) zurückgeht. Dabei wird die Energie des angeregten Donorfluorophors strahlungslos über eine Dipol- Dipol-Wechselwirkung auf den Akzeptor übertragen. Phänomenologisch äußert sich FRET durch die Löschung der Donorfluoreszenz und einer Sensibilisierung (Zunahme) der Akzeptorfluoreszenz. Da die Effizienz des Energietransfers (FRET-Effizienz) in einem Bereich von 10 bis 100 Å stark vom Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor abhängt, kann dieser Effekt als „Lineal“ auf molekularem Niveau eingesetzt werden (Clegg, 1992; Förster, 1948; Lakowicz, 1999; van der Meer, 1994). Dabei eignet sich der Abstandsbereich, für den FRET sensitiv ist, ideal zur Untersuchung biologischer Systeme, während er anderen Techniken wie NMR oder EPR meist verschlossen bleibt.

Auf Ensemblesniveau ist die Messung von Abständen mit FRET bereits eine etablierte Technik und wurde zur Charakterisierung einer Vielzahl von biologischen Strukturen eingesetzt (Förster, 1948; Selvin, 1995; Stryer, 1967). Die Kombination der Stärken von Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie und FRET-Messungen eröffnet völlig neue Perspektiven: Im Gegensatz zu FRET-Ensemblemessungen können intra- sowie intermolekulare Wechselwirkungen von Systemen mit heterogener Abstandsverteilung untersucht werden und dabei der Anteil einzelner Konformationen bestimmt werden. Daneben können dynamische Konformationsänderungen von Biomolekülen direkt beobachtet werden, so daß die entsprechenden kinetischen Parameter aus diesen Messungen bestimmt werden können. Daher eignen sich Einzelmolekül-FRET-Messungen beispielsweise ideal zur Untersuchung von

Entfaltung/Faltung von Makromolekülen sowie zur Analyse von Konformationsänderungen von Enzymen während der Katalyse.

Im Rahmen einer Studie an einem DNA-FRET-Konstrukt, das auf einer trockenen Glasoberfläche fixiert war, konnten Ha et al. (Ha, 1996a; Ha, 1996b) erstmals FRET-Effizienzen auf dem Niveau einzelner Moleküle erfolgreich bestimmen. Inzwischen wurde die Technik der Einzelmolekül-FRET-Messung soweit verfeinert, daß Biomoleküle unter physiologischen Bedingungen untersucht werden können (Ha, 1999b; Rothwell, 2001).

Trotz dieser ersten Erfolge ist die Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie noch eine sehr junge Technik mit großem Entwicklungspotential, bei der längst noch nicht alle Probleme gelöst sind. So sind die bisherigen Einzelmolekül-FRET-Messungen auf die Detektion der Fluoreszenzintensität der Donor- und Akzeptorfluoreszenz beschränkt. Diese Parameter reichen jedoch für eine zuverlässige Bestimmung der FRET-Effizienz, bzw. des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor, nicht aus. Photophysikalische Effekte wie Fluktuationen in den Quantenausbeuten der eingesetzten Fluorophore sowie Orientierungseffekte, die den Energietransfer beeinflussen und leicht zu Fehlinterpretationen führen, können allein anhand von Intensitätsmessungen nicht erkannt werden. Darüber hinaus ist das Auflösungsvermögen der bisher für Einzelmolekül-FRET-Studien eingesetzten Methoden nicht sehr hoch, so daß nur Untersuchungen, bei denen große Differenzen in den FRET-Effizienzen auftreten, analysiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit soll gezeigt werden, daß die simultane Erfassung mehrerer charakteristischer Fluoreszenzparameter für die Donor- und Akzeptorfluoreszenz in einem Einzelmolekül-FRET-Experiment eine sicherere Interpretation der Meßdaten bei einer verbesserten Auflösung zuläßt. Für die Datenerfassung wurde dabei die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) eingesetzt, die eine Weiterentwicklung der BIFL-Technik (Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime) darstellt. Mit Hilfe dieser Technik können für einzelne, frei in Lösung diffundierende, fluoreszenzmarkierte Moleküle in zwei unterschiedlichen spektralen Bereichen simultan Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie, Intensität sowie die individuelle Dauer des Ereignisses registriert werden.

Um das Potential dieser Technik für die Bestimmung von FRET-Effizienzen auf Einzelmolekülebene aufzuzeigen, werden drei Studien vorgestellt. Die Erste, eine DNA-Strukturstudie, dient zur Evaluation der Technik. Die zweite Studie beschäftigt sich mit dem

Konformerengleichgewicht einer Holliday-Junction, dabei wird die Anwendung neu entwickelter Verfahren vorgestellt, die die Aufdeckung und Analyse von Kinetiken ermöglichen. Im Rahmen der dritten Studie wird ein Protein untersucht, das eine Schlüsselrolle bei der Fusion von Membranen spielt. Dabei kann gezeigt werden, daß die Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie mit MFD in der Lage ist, völlig neue Erkenntnisse über molekulare Vorgänge zu liefern, und gleichzeitig so präzise Abstandsmessungen erlaubt, daß, aufbauend auf den Ergebnissen der Studie, ein Strukturmodell berechnet werden kann.