

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.