

Multiparameter-fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur molekularen Dynamik an einzelnen Biomolekülen

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marcelle König

aus Flensburg

Düsseldorf 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. C. A. M. Seidel
Koreferent:	Prof. Dr. H. Bettermann
Tag der mündlichen Prüfung:	13. Juli 2005

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Prof. Dr. C. A. M. Seidel am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie und am Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Viele Kollegen und Freunde haben zu dem Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen. Ein herzliches Dankeschön geht an

Herrn **Prof. Dr. C. A. M. Seidel** für seine wissenschaftliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft im Rahmen zahlreicher gemeinsamer Projekte. Seine Anregungen haben zum Gelingen einiger wissenschaftlicher Vorhaben wesentlich beigetragen.

Herrn **Prof. Dr. H. Bettermann** für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn **Dr. Ralf Kühnemuth** für sein Interesse an meiner Arbeit und die immerwährende Hilfsbereitschaft sowohl in apparativen wie auch in wissenschaftlichen Fragen. Seine Unterstützung bei auftretenden wissenschaftlichen Problemen wird mir als ganz besonderer Beitrag in Erinnerung bleiben.

Herrn **Dr. Suren Felekyan** für die freundliche Unterstützung im Labor und bei der Analyse, seine Hilfsbereitschaft bei auftretenden apparativen Problemen war unschlagbar. Auch auf sein Mitwirken in einigen methodischen Entwicklungen der Analyseverfahren sei an dieser Stelle wohlwollend verwiesen.

Herrn **Volodymyr Kudryavtsev** für die Verfassung zahlreicher Software. Ohne seine Programmierkenntnisse wären viele Projekt-Vorhaben nicht durchzusetzen gewesen. Seine Hilfsbereitschaft fand weder nachts noch wochenends eine Grenze. Vova, was kann ich sagen; Danke!

Herrn **Carl Sandhagen** für die tatkräftige Unterstützung in der apparativen Realisierung des Imagings.

die Herren **Alexander Gaiduk** und **Dr. Matthew Antonik** für die Diskussionen rund um die Präparation von Oberflächen und speziell an Alexander für die Unterstützung beim Imaging der DNA.

Frau **Anna Wozniak** für ihre Hilfsbereitschaft rund um die Arbeit. Dem moralischen Beistand folgte immer die tatkräftige Unterstützung. Danke für Deinen Einsatz!

Herrn **Martin Schramm** für die messtechnische Unterstützung im Labor und für die vielen geselligen Diskussionen rund um die Wissenschaft und vor allem drum herum.

Herrn **Marcel Merkwitz** für die Hilfsbereitschaft und stets kompetente Hilfe bei Computerangelegenheiten.

die übrigen derzeitigen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe auf deren Hilfsbereitschaft immer Verlass war. Sie alle haben zu dem freundschaftlichen Arbeitsklima beigetragen! Besonders hervorgehoben seien **Dr. Enno Schweinberger, Alessandro Valeri, Opas Tojira, Heike Hornen, Richard Janissen, Jun. Prof. Filipp Oesterhelt** sowie die Damen **Bärbel Hofmann** und **Veronika Mendorf**.

Frau **Dr. Christina Schütte** für ihren außerordentlichen Einsatz im Rahmen der SNARE-Protein-unterstützten Membranfusion. Ihr Elan war mir eine Inspiration. Viel Glück mit ProScencia!

die Freiburger **Dr. Manuel Diez, Boris Zimmermann, Stefan Steigmiller** und **Dr. Michael Börsch**, mit denen nicht nur eine fröhliche, sondern auch sehr erfolgreiche Kooperation im Rahmen der H⁺-ATP-Synthase gepflegt wurde.

die Lektoren, die mit ihren wertvollen Anmerkungen und Vorschlägen diese Arbeit bereichert haben: **Dr. Michael Börsch, Dr. Manuel Diez, Dr. Manuel Gnida, Richard Janissen, Dr. Ralf Kühnemuth, Dr. Christina Schütte, Dr. Enno Schweinberger** und **Anna Wozniak**.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie. Alle **Brandts** haben über die Jahre immer an mich und meine Fähigkeiten geglaubt. Meiner Großmutter **Anna-Maria Brandt** danke ich ganz besonders für ihre Zuneigung und die vielen klugen Worte! Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter **Marion König** für ihre stete Zuneigung und Unterstützung. Sie ist bei Freuden und Sorgen immer für mich da.

Ein lieber Dank geht auch an mein Schwesterlein **Natascha Gnida**, die immer ein offenes Ohr für mich hat.

Mein größter Dank gilt meinem Freund **Manuel Gnida** für seine Unterstützung in allen Lebenslagen. Seine Freundschaft und die mir entgegengebrachte Liebe sind aus meinem Leben nicht mehr wegzudenken. *California, here we come...*

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits folgendermaßen präsentiert und publiziert:

Publikationen

Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1

M. Margittai, J. Widengren, E. Schweinberger, G. F. Schröder, S. Felekyan, E. Haustein, M. König, D. Fasshauer, H. Grubmüller, R. Jahn and C. A. M. Seidel
PNAS 100 (26), 15516-15521, 2003

Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F_0F_1 -ATP synthase

M. Diez, B. Zimmermann, M. Börsch, M. König, E. Schweinberger, S. Steigmiller, R. Reuter, S. Felekyan, V. Kurdyavtsev, C. A. M. Seidel and P. Gräber
Nature Structural & Molecular Biology 11 (2), 135-141, 2004

Determinants of liposome fusion mediated by synaptic SNARE proteins

C. G. Schuette, K. Hatsuzawa, M. Margittai, A. Stein, D. Riedel, P. Küster, M. König, C. A. M. Seidel and R. Jahn
PNAS 101 (9), 2825-2863, 2004

Vorträge

Mechanisms of membrane fusion studied by single molecule FRET and single-molecule fluorescence images

9th International Workshop on „Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences“, 24 – 26 September 2003, Berlin

Poster

Single-molecule FRET dynamics reveal an equilibrium between a closed and an open conformation of syntaxin

M. König, E. Schweinberger, M. Margittai, J. Widengren, D. Fasshauer, R. Jahn, G. Schröder, H. Grubmüller, E. Haustein, S. Felekyan and C.A.M. Seidel
Spring School on Single Molecules in Physics, Chemistry and Biology, 8 – 12 April 2002, Hofgeismar

Conformational dynamics of special nucleic acid structures studied by single-molecule FRET
M. König, E. Schweinberger, P.-A. Müller, V. Kudryavtsev, S. Felekyan, R. Müller, R. Dede and C. A. M. Seidel

8th International Workshop on „Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences“, 25 – 27 September 2002, Berlin

Fluorescence correlation measurements by time-correlated single photon counting

R. Kühnemuth, S. Felekyan, V. Kudryavtsev, C. Sandhagen, M. König, W. Becker and C.A.M. Seidel

8th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes, 24 – 27 August 2003, Prag, Tschechische Republik

Mechanisms of membrane fusion studied by single-molecule FRET and single-molecule fluorescence images

M. König, E. Schweinberger, J. Widengren, C. Schütte, S. Felekyan, V. Kudryavtsev, R. Jahn, C. A. M. Seidel

Optical Spectroscopy of Biomolecular Dynamics, 21 – 25 März 2004, Kloster Banz

*Ich bieg den Regenbogen
Für Dich und immer für Dich
Für immer und Dich*

Rio Reiser

Für Manuel

Inhaltsverzeichnis

KAPITEL 1	1
EINLEITUNG	1
KAPITEL 2	5
THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
<hr/>	
2.1 Photophysikalische Eigenschaften von Fluoreszenzfarbstoffen	5
2.1.1 Fluoreszenz und Fluoreszenzquantenausbeute	6
2.1.2 Fluoreszenzlebensdauer	9
2.1.3 Fluoreszenzanisotropie	10
2.2 Fluoreszenz-Energietransfer-Prozesse	11
2.2.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	12
2.2.2 Eine Quantifizierung des FRET	13
2.2.3 Der Orientierungsfaktor κ^2	15
2.2.4 Weitere Energietransfer-Mechanismen	16
2.3 Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD)	17
2.3.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	18
2.3.2 Burst-Integrierte-Fluoreszenz-Lebensdauer (BIFL)	27
2.3.3 Selektive Spektroskopie	30
KAPITEL 3	33
MATERIAL UND METHODEN	33
<hr/>	
3.1 Proben, Probenpräparation	33
3.1.1 Fluoreszenzfarbstoffe	33
3.1.2 Probenpräparation	36
3.2 Der apparative Aufbau	38
3.2.1 Lichtquellen	38
3.2.2 Konfokales Mikroskop	40

3.3 Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD)	45
3.3.1 Experimentelle Erfassung der Daten	45
3.3.2 Analyse und Darstellung der Daten	48
3.3.3 Experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzparameter	49
3.3.4 Untersuchungen von dynamischen Gleichgewichtsreaktionen	52
3.4 Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion als bildgebende Technik (MFD-Imaging)	53
3.4.1 Experimentelle Erfassung der Daten	53
3.4.2 Analyse und Darstellung der Daten	57
3.4.3 Experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzparameter	59
3.4.4 Quantitative Bestimmung der Anzahl von Fluorophoren	60
3.5 Verwendete Software	65
KAPITEL 4	67
UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTIFIZIERUNG DER EMITTER EINES FLUORESZENTEN SYSTEMS	67
<hr/>	
4.1 Fluoreszente Referenzsysteme	67
4.1.1 DNA-Konstrukte	68
4.1.2 Protein Lectin B	70
4.2 Ein Versuch der Quantifizierung über die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	71
4.2.1 Untersuchungen an DNA	71
4.2.2 Untersuchungen an Lectin B	77
4.3 Ein Versuch der Quantifizierung über die sukzessive Photozerstörung	78
4.3.1 Untersuchungen an DNA	79
4.3.2 Untersuchungen an Lectin B	80
4.4 Diskussion der Voruntersuchungen	81

KAPITEL 5	83
UNTERSUCHUNGEN ZUR SNARE-PROTEIN-UNTERSTÜTZTEN MEMBRANFUSION	83
<hr/>	
5.1 SNARE-Proteine als Initiatoren der Membranfusion	84
5.1.1 Die exozytotische Membranfusion eukaryontischer Zellen	84
5.1.2 SNARE-Proteine	84
5.1.3 Untersuchte Modellsysteme	85
5.2 MFD-Untersuchungen zur Membranfusion	88
5.2.1 Experimentelle Durchführung	88
5.2.2 Charakterisierung der untersuchten Liposomen	90
5.2.3 Der Prozess des Andockens	95
5.2.4 Membranfusion: Welche Anzahl an SNARE-Proteinen wird benötigt?	97
5.2.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	101
5.3 MFD-Imaging-Untersuchungen zur Membranfusion	109
5.3.1 Experimentelle Durchführung	110
5.3.2 Charakterisierung der untersuchten immobilisierten Liposomen	112
5.3.3 Die sukzessive Photozerstörung	114
5.3.4 Quantifizierung der Proteine in den Liposomen	115
5.3.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	119
KAPITEL 6	123
REAKTIONSMECHANISMEN DER H⁺-ATP-SYNTASE AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	123
<hr/>	
6.1 Die H⁺-ATP-Synthase aus <i>Escherichia coli</i>	123
6.1.1 Struktur der H ⁺ -ATP-Synthase	124
6.1.2 Funktion der H ⁺ -ATP-Synthase	125
6.2 MFD-Untersuchungen zu Rotationsmechanismen der H⁺-ATP-Synthase	127
6.2.1 Experimentelle Durchführung	127
6.2.2 Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten ATP-Synthase	129
6.2.3 Inhibition der Rotationsmechanismen	132
6.2.4 Untersuchungen zur ATP-Hydrolyse	133

IV

6.2.5 Untersuchungen zur ATP-Synthese	136
6.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	138
KAPITEL 7	143
ZUSAMMENFASSUNG	143

Kapitel 1

Einleitung

Das Verständnis der Lebensvorgänge auf molekularer Ebene gewinnt in den klassischen Naturwissenschaften als Forschungsschwerpunkt zunehmend an Bedeutung. Fachübergreifende Interaktionen zwischen den Disziplinen ermöglichen die umfassende Erforschung komplexer Biomoleküle, welche das Zusammenspiel der Bausteine lebender Organismen gewährleisten.

Neue biophysikalische und -chemische Methoden ermöglichen die eingehende Erforschung der strukturellen und dynamischen Eigenschaften komplexer biologischer bedeutsamer Makromoleküle. Während die Untersuchungen im Allgemeinen in einem Ensemble von Molekülen durchgeführt werden, erfolgt die Interpretation der Ergebnisse vielfach auf molekularer Ebene. Dieses Verfahren ist für homogene Systeme gerechtfertigt. Bei auftretenden Subpopulationen (statische Inhomogenität) oder zeitlichen Fluktuationen (dynamische Inhomogenität) im Ensemble erfolgt jedoch eine Mittelung über die individuellen Eigenschaften der unterschiedlichen Systeme. Hier liefern Experimente mit einzelnen Molekülen wertvolle Informationen über die spezifischen Zustände der auftretenden Spezies. Subpopulationen werden aufgelöst und individuelle Dynamiken der einzelnen Moleküle erfasst. So können beispielsweise biochemische Vorgänge, denen ein stochastischer Prozess zugrunde liegt, nur über die Charakterisierung der Einzelkomponenten aufgeklärt werden, da sie sich für ein Ensemble von Molekülen nicht synchronisieren lassen.

Nach den Pionierarbeiten zur optischen Detektion einzelner Moleküle bei tiefen Temperaturen (Moerner and Kador 1989) haben sich durch die Entwicklungen in der optischen Spektroskopie und das Aufkommen sensitiver Detektionssysteme eine Reihe von

Einzelmolekültechniken etabliert. Eine Vielzahl dieser Methoden basiert auf einer konfokalen, laserinduzierten Fluoreszenzdetektion. Der Einsatz extrem kleiner Meßvolumina (≈ 1 Femtoliter) erlaubt den Nachweis einzelner Moleküle mit einer hohen Empfindlichkeit und Spezifität. Die beugungsbegrenzte Fokussierung des Anregungslasers gestattet ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, während leistungsfähige Mikroskopobjektive mit hoher numerischer Apertur das Fluoreszenzlicht sammeln und dieses von hochempfindlichen Punktdetektoren („Avalanche Photodioden“, APDs) registriert wird.

Um Einzelmoleküluntersuchungen an biologischen Systemen durchführen zu können, bedarf es einer hohen Fluoreszenzaktivität der Moleküle. Da die wenigsten Moleküle intrinsisch fluoreszent sind bzw. ihre Fluoreszenzeigenschaften den Anforderungen nicht entsprechen, werden biologisch funktionale Moleküle in der Regel über die kovalente Bindung von eigens zu diesem Zweck entwickelten Farbstoffen markiert (Sauer, Han et al. 1993; Mishra 2000; Invitrogen 2005). Im Rahmen der Einzelmolekülspektroskopie können einzelne Biomoleküle schließlich unter nahezu physiologischen Bedingungen untersucht werden.

Die vielfältigen Eigenschaften von fluoreszenzmarkierten Biomoleküle sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter dem Einsatz der Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD) untersucht worden. Über die simultane Erfassung der unabhängigen Fluoreszenzparameter Intensität, Lebensdauer, Anisotropie in jeweils zwei spektralen Bereichen wird eine hochempfindliche Analyse der Fluoreszenz erzielt. Veränderungen in der unmittelbaren Umgebung der Fluorophore, welche beispielsweise durch Dynamiken des Biomoleküls bewirkt werden, beeinflussen in hohem Maße die Fluoreszenzeigenschaften, sodass deren Analyse einen Beitrag zum Verständnis der markierten Biomoleküle liefert. Die Farbstoffe agieren somit als „Reporter“ für ihre molekulare Umgebung. Bei dem Einsatz von zwei Fluoreszenzreportern können durch Analyse des fluoreszenzresonanten Energietransfers (FRET) zusätzliche Informationen über die Struktur der untersuchten Biomoleküle gewonnen werden. Dieser bereits 1948 von Theodor Förster theoretisch beschriebene Mechanismus (Förster 1948) bewirkt einen strahlungslosen Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren, von denen einer als Donor und der andere als Akzeptor der übertragenen Energie agiert. Die Abstände, die diesem Mechanismus zugänglich sind, entsprechen den inter- und intramolekularen Abmessungen vieler biologischer Makromoleküle, weshalb sich FRET im Rahmen biologischer Untersuchungen in der Einzelmolekülspektroskopie etabliert hat.

Die MFD ermöglicht durch zeitaufgelöste Detektion verschiedener, unabhängiger Fluoreszenzparameter den Einsatz einer Vielfalt von Methoden für die Analyse der

registrierten Fluoreszenz. Der Einsatz der Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime (BIFL)-Technik beispielsweise ermöglicht die detaillierte Analyse aller unabhängigen Fluoreszenzparameter einzelner Moleküle. Die selektive Spektroskopie gestattet darüber hinaus in einem heterogenen System eine Auswahl auftretender Subpopulationen mit definierten Fluoreszenzparametern. Die zu Beginn der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts entwickelte Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) (Magde 1972) hingegen gestattet die Beschreibung der zeitlichen Entwicklung einer Vielzahl von Prozessen, welchen die einzelnen Moleküle unterworfen sind. Es werden auf diese Weise kinetische Informationen der untersuchten Systeme auf Einzelmolekül-Niveau zugänglich.

Im Rahmen dieser Arbeit ist eine Weiterentwicklung der MFD durchgeführt worden, sodass diese nicht nur auf frei in Lösung diffundierende Moleküle anwendbar ist, sondern auch auf Moleküle, die auf Oberflächen immobilisiert sind. Hierfür ist die Methode des konfokalen Scannings entwickelt worden. Diese Anwendung eröffnet eine Vielfalt neuer Möglichkeiten für die umfassende Charakterisierung einzelner Moleküle. Neben dem Vorzug einer theoretisch unbegrenzten Beobachtungsdauer einzelner Moleküle auf Oberflächen stellt diese Methode die Erforschung molekularer Vorgänge in lebenden Zellen in Aussicht.

In der vorliegenden Arbeit werden die breiten Anwendungsmöglichkeiten der MFD und des MFD-Imagings auf komplexe biologische Systeme demonstriert. Diese Methoden liefern im Rahmen der Einzelmolekülspektroskopie einen wertvollen Beitrag zum Verständnis der molekularen Mechanismen belebter Natur.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Grundlagen der Fluoreszenz werden in **Kapitel 2** erläutert. Neben einer Beschreibung der Fluoreszenzeigenschaften der eingesetzten Fluorophore werden die auftretenden Energietransferprozesse zwischen verschiedenen Fluorophoren beschrieben. Die theoretischen Grundlagen der MFD werden ebenfalls in diesem Kapitel ausgeführt.

Kapitel 3 ist den apparativen und experimentellen Grundlagen der durchgeführten Untersuchungen gewidmet. Neben den Beschreibungen des konfokalen Mikroskops und den durchgeführten experimentellen Erweiterungen für das MFD-Imaging wird die experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzparameter für die MFD und für das MFD-Imaging beschrieben. Die vorgenommenen Erweiterungen sind unerlässlich für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählter biologischer Systeme.

Die erste experimentelle Fragestellung, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit erörtert wird, ist die Quantifizierung der Emitter eines fluoreszenten Systems. Sie zielt ebenfalls auf die nachfolgend bearbeiteten Systeme ab. Zunächst jedoch sind verschiedene Referenzsysteme mit definierter Anzahl an Fluorophoren in Lösung und auf Oberflächen untersucht worden. Es werden die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und die sukzessive Photozerstörung der Fluorophore auf ihr Potenzial zur Quantifizierung von Fluorophoren hin überprüft. In diesem Zusammenhang ist ein Algorithmus entwickelt worden, der für die Untersuchungen stöchiometrischer Anordnungen nachfolgend eingesetzt werden kann. Die erarbeiteten Ergebnisse werden in **Kapitel 4** vorgestellt.

Es schließt sich ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in **Kapitel 5** an. Hier werden die molekularen Mechanismen der exozytotischen Membranfusion untersucht, welche durch die Anwesenheit neuronaler Proteine in den Membranen eingeleitet wird. Durch den Einsatz von Modellsystemen wird das Auftreten eines in der Literatur vielfach diskutierten Zwischenschritts für die Fusion von Membranen überprüft. Darüber hinaus werden die Stöchiometrien der auftretenden Fusionschritte untersucht. Im Rahmen dieser Fragestellung finden die entwickelte Methode des MFD-Imagings und die sukzessive Photozerstörung ihre erfolgreiche Anwendung.

Ein weiterer experimenteller Schwerpunkt der durchgeführten MFD-Studien an komplexen biologischen Systemen und deren molekularen Mechanismen wird durch die in **Kapitel 6** vorgestellten Untersuchungen zur H^+ -ATP-Synthase dargestellt. Über die MFD wird für das biologisch funktionale Enzym die Kopplung der katalytischen Aktivität mit einer internen Rotation der Untereinheiten des Enzyms untersucht. Sowohl die Synthese als auch die Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) sind im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen als katalytische Prozesse der H^+ -ATP-Synthase untersucht worden, und es kann ein einmaliger Beitrag zur Auflösung der Rotationsmechanismen dieses komplexen Enzyms geliefert werden (Diez 2004).

Kapitel 7 beschließt diese Arbeit und fasst die vorgestellten Resultate zusammen.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

Die Fluoreszenz bildet das Fundament der gegenwärtigen Untersuchungen. Das vorliegende Kapitel widmet sich ihren Grundlagen, wobei maßgeblich jene Aspekte betrachtet werden, die zum Verständnis der nachfolgenden Kapitel benötigt werden. Nach einer Erläuterung der photophysikalischen Eigenschaften von Fluoreszenzfarbstoffen (Kap. 2.1) werden die möglichen Energietransfer-Prozesse zwischen Farbstoffen diskutiert (Kap. 2.2). Schließlich wird die Methode der Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion als wichtigstes Werkzeug der vorliegenden Untersuchungen eingeführt (Kap. 2.3).

2.1 Photophysikalische Eigenschaften von Fluoreszenzfarbstoffen

Allgemein wird bei der Fluoreszenz von Biomolekülen zwischen intrinsischen und extrinsischen Fluorophoren unterschieden. Biomoleküle mit intrinsischen Fluorophoren weisen eine natürliche Fluoreszenz auf, wie sie durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin oder beispielsweise Bakteriorhodopsin hervorgerufen wird. Da die meisten Biomoleküle jedoch nicht-fluoreszent sind, muss für eine fluoreszenzspektroskopische Untersuchung eine Markierung des Moleküls mit einem extrinsischen Fluorophor vorgenommen werden. Dabei handelt es sich zumeist um künstlich hergestellte organische Fluoreszenzverbindungen wie Rhodamin- oder Cyanin-Farbstoffe, die kovalent an das Biomolekül gebunden werden. Da für die vorliegenden Untersuchungen ausschließlich solch extrinsische Fluorophore eingesetzt worden sind, beziehen sich die folgenden Ausführungen auf die spektralen Eigenschaften dieser grundlegenden Hilfsmittel einer biophysikalischen Untersuchung.

2.1.1 Fluoreszenz und Fluoreszenzquantenausbeute

Fluoreszenzfarbstoffe weisen sich durch ihre Fähigkeit aus, elektromagnetische Strahlung aufnehmen und in Form von Fluoreszenz wieder abgeben zu können. Die Wellenlängenbereiche, in denen der Farbstoff Strahlung absorbiert und emittiert, werden durch dessen Energiespektrum bestimmt. Dieses ist definiert durch die elektronischen Zustände des Farbstoffs, welche durch Schwingungs- und Rotationsbewegungen des Moleküls jeweils zusätzlich in Vibrations- und Rotationsniveaus aufgespalten sind. Da in Lösung eine inhomogene Verbreiterung der Spektrallinien auftritt, können Vibrations- und Rotationszustände nicht aufgelöst werden. Abbildung 2-1 zeigt das typische Absorptions- und Fluoreszenzspektrum eines Farbstoffs am Beispiel des Rhodamins 110, aufgenommen in Lösung. Aufgrund der strahlungslosen Relaxation innerhalb von Schwingungszuständen des angeregten elektronischen Energieniveaus ist die Emissionsbande gegenüber der Absorptionsbande in den Bereich höherer Wellenlängen verschoben (Stokes-Verschiebung). Das Fluoreszenzspektrum eines Farbstoffs ist weitgehend unabhängig von der Anregungswellenlänge.

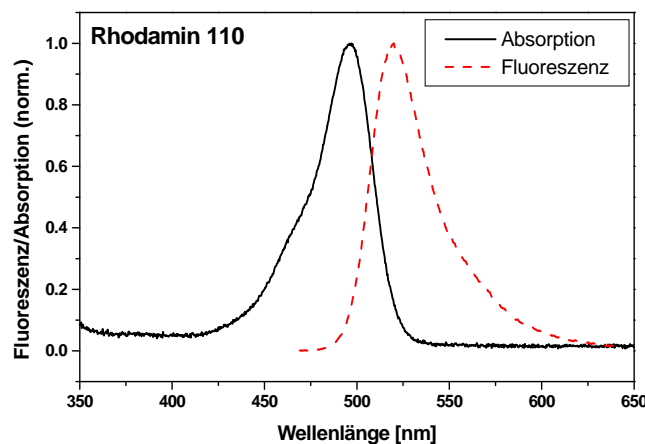


Abbildung 2-1: : Absorptions- und Emissionsspektrum des Farbstoffs Rhodamin 110, aufgenommen in Lösung.

Nach erfolgter Absorption eines Photons und dem damit einhergegangenen Übergang des Moleküls in einen elektronisch angeregten Zustand gibt es eine Vielzahl von Prozessen, die zur Depopulation des angeregten Zustandes führen können. Anhand des Jablonski-Diagramms eines Farbstoffs lassen sich die möglichen Übergänge zwischen den einzelnen Energiezuständen beschreiben. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 2-2. Abhängig von der Spinmultiplizität $M = 2S + 1$ der Elektronen werden Singulett-($M=1$)- und Triplett-($M=3$)-Zustände unterschieden. Bei einem Singulett-Zustand gilt für die Summe aller

Eigendrehimpulse der Elektronen (des Spins) $S = 0$, während bei einem Triplett-Zustand $S = 1$ gilt. Der Übersichtlichkeit halber sind höher angeregte Zustände nicht berücksichtigt.

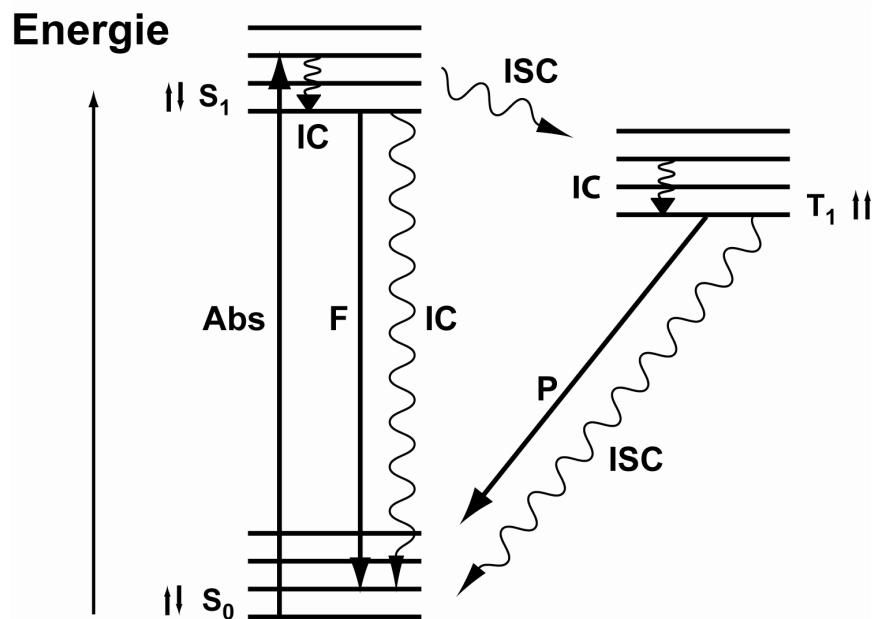


Abbildung 2-2: Jablonski-Diagramm: Schematische Darstellung der elektronischen Energiezustände und der zugehörigen Schwingungszustände eines Farbstoffs. Höhere angeregte Zustände sind nicht dargestellt. S_0 : Singulettgrundzustand, S_1 : erster angeregter Singulettzustand, T_1 : erster angeregter Triplettzustand. Ferner eingezeichnet sind die möglichen Übergänge zwischen den einzelnen Energieniveaus: **Abs** (Absorption): Aufnahme von Strahlung und Übergang in einen energiereicheren Zustand, **F** (Fluoreszenz): strahlungsaktiver Übergang von S_1 nach S_0 , **IC** (engl.: „Internal-conversion“): strahlungsloser Übergang zwischen zwei Zuständen gleicher Spinnultiplizität, **ISC** (engl.: „Intersystem-crossing“): strahlungsloser Übergang zwischen zwei Zuständen unterschiedlicher Spinnultiplizität, **P** (Phosphoreszenz): strahlungsaktiver Übergang von T_1 nach S_0 .

Die kinetische Beschreibung der einzelnen Übergänge erfolgt über die jeweiligen Ratenkonstanten, k_i . Bei Vernachlässigung irreversibler photochemischer Reaktionen sowie spezifischer bimolekularer Lösprozesse ergeben sich folgende Möglichkeiten der Übergänge i (Turro 1991):

Übergang i		Ratenkonstante k_i
Absorption (Abs)	$h\nu + S_0 \rightarrow S_1$	k_{Abs}
Fluoreszenz (F)	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$	$k_F [S_1]$
„Internal conversion“ (IC)	$S_1 \rightarrow S_0 + \text{Wärme}$	$k_{IC} [S_1]$
„Intersystem crossing“ (ISC)	$S_1 \rightarrow T_1 + \text{Wärme}$	$k_{ISC} [S_1]$
„Intersystem crossing“ (ISC)	$T_1 \rightarrow S_0 + \text{Wärme}$	$k_{ISC} [T_1]$
Phosphoreszenz (P)	$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$	$k_P [T_1]$

Bei Anregung des Farbstoffs mit Strahlung der passenden Wellenlänge erfolgt über die Absorption eines Photons (Abs) der Übergang vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen

Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustandes S_1 nach dem Franck-Condon-Prinzip. Es folgt eine instantane Relaxation in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustandes S_1 . Der Übergang von S_1 in einen niedrigen Schwingungszustand des elektronischen Grundzustandes S_0 unter Abgabe eines Photons entspricht der erwünschten Fluoreszenz (F). Erfolgt der Übergang von S_1 in einen hoch angeregten Schwingungszustand des S_0 ist dieser im Allgemeinen strahlungslos und die Energie geht als Wärme verloren („internal conversion“, IC). Ein Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität („inter system crossing“, ISC) ist zwar nach den Auswahlregeln für elektrische Dipolübergänge symmetrieverboten, kann jedoch bei auftretenden Spin-Bahn-Kopplungen stattfinden. Die Depopulation des Triplettzustandes T_1 erfolgt durch einen Übergang in den Grundzustand S_0 entweder über Wärmeabgabe (ISC) oder unter Abgabe eines Photons. Letzteres entspricht, bedingt durch das Symmetrieverbot, einer Phosphoreszenz (P).

Bei hohen Anregungsleistungsdichten kann ein Molekül, welches sich bereits im angeregten Zustand befindet, durch Absorption weiterer Photonen in elektronisch höher angeregte Singulett- oder Triplett-Zustände übergehen. Diese sind energetisch ungünstig und es erfolgt im Allgemeinen eine schnelle Relaxation in den S_1 -, bzw. T_1 -Zustand. Da strahlungsaktive Prozesse nach Kasha nur vom energetisch tiefsten angeregten Zustand der jeweiligen Spinmultiplizität aus erfolgen, in dem vorliegenden Fall also von S_1 aus, sind diese Übergänge strahlungslos (Kasha 1950). Weil angeregte Zustände eines Moleküls im Allgemeinen instabile Konfigurationen darstellen, besteht neben der bereits beschriebenen Relaxation die Möglichkeit der chemischen Reaktion aus dem angeregten Zustand heraus. Die Photozerstörung der Fluoreszenzfarbstoffe stellt eine solche unerwünschte photochemische Reaktion dar. Sie ist abhängig von den verwendeten Anregungsleistungsdichten und ist irreversibel. Der Farbstoff kann den Anregungszyklus nicht mehr durchlaufen und geht dem Experiment verloren.

Ein wichtiger Parameter für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen ist der Anteil der Fluoreszenz an den beschriebenen Zerfallsprozessen. Das Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen zur Anzahl der absorbierten Photonen beschreibt die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F :

$$\Phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbiertes Photonen}} \leq 1 \quad (\text{Gl. 2 - 1})$$

Sie kann durch Wechselwirkungen mit Fremdmolekülen stark herabgesetzt werden. Man spricht in diesem Fall von einer Fluoreszenzlöschung (engl.: „fluorescence quenching“, Q).

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F lässt sich über die Ratenkonstanten der Fluoreszenz, k_F , sowie der übrigen beteiligten Deaktivierungsprozesse (internal conversion IC, intersystem crossing ISC, Fluoreszenzlöschung Q), k_i , definieren:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i} \quad (\text{Gl. 2 - 2})$$

2.1.2 Fluoreszenzlebensdauer

Die Ratenkonstanten k_F , k_{IC} und k_{ISC} der Übergänge, die zur Entvölkerung des elektronisch angeregten Zustandes S_1 führen, bestimmen dessen Fluoreszenzlebensdauer τ_0 :

$$\tau_0 = 1/k_0 = 1/(k_F + k_{IC} + k_{ISC}) \quad (\text{Gl. 2 - 3})$$

Da Wechselwirkungen des Fluorophors mit seiner unmittelbaren Umgebung einen erheblichen Einfluss auf die Ratenkonstanten haben, kann die Lebensdauer des Fluorophors, welcher an ein Molekül gebunden ist, als sensitiver Parameter einer Molekülcharakterisierung eingesetzt werden. Auch Löschprozesse bewirken in der Regel neben einer verminderten Fluoreszenzquantenausbeute eine reduzierte Fluoreszenzlebensdauer.

Die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustandes charakterisiert das zeitliche Abklingverhalten der Fluoreszenz:

$$F(t) = F(0) e^{-t/\tau_0} \quad (\text{Gl. 2 - 4})$$

Die Amplitude $F(0)$ bezeichnet die anfängliche Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 0$ der Anregung durch einen Lichtpuls.

Der monoexponentielle Zerfall gilt nur für Ensembles identischer Moleküle. Befinden sich verschiedene fluoreszierende Spezies in einem zu untersuchenden Volumen, oder besitzt ein Fluorophor, induziert durch wechselnde äußere Umgebungen, Zustände mit unterschiedlichen Lebensdauern, wird das Abklingverhalten der Fluoreszenz durch einen multiexponentiellen Zerfall beschrieben:

$$F(t) = \sum_i F_i(0) \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (\text{Gl. 2 - 5})$$

τ_i bezeichnet hier die einzelnen Lebensdauern, $F_i(0)$ die zum Fluoreszenzzerfall zugehörigen Amplituden.

2.1.3 Fluoreszenzanisotropie

Jeder Fluorophor besitzt ein Absorptions- und ein Emissions-Übergangsdipolmoment definierter Ausrichtung, abhängig von seiner Struktur. Wird der Fluorophor polarisiertem Licht ausgesetzt, kann eine Anregung prinzipiell nur erfolgen, wenn eine Komponente des Absorptions-Übergangsdipolmoments parallel zum elektrischen Feldvektor der Anregungsstrahlung ausgerichtet ist. Die Emission der Fluoreszenzphotonen erfolgt entlang des Emissions-Übergangsdipolmoments. Somit ist das Fluoreszenzlicht im Prinzip polarisiert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe besitzen ausschließlich lineare Übergangsdipolmomente, so dass für Untersuchungen von Depolarisationseffekten eine lineare Polarisation des Anregungslichts erforderlich ist. Die Anisotropie r liefert ein quantitatives Maß für die Polarisation der Fluoreszenz. Sie ist definiert über die Intensitäten der zwei Fluoreszenzkomponenten, F_p und F_s , welche parallel und senkrecht relativ zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts ausgerichtet sind (Jabonski 1960):

$$r = \frac{F_p - F_s}{F_p + 2F_s} \quad (\text{Gl. 2 - 6})$$

Die Anisotropie erweist sich als sensitives Maß für die Beweglichkeit der Fluorophore. Über die Zeit verringert sich die Anisotropie der Fluorophore durch die Brownschen Rotationsbewegungen (Ehrenberg and Rigler 1974; Horng, Gardecki et al. 1996). Energietransfer-Prozesse zeigen den gleichen Effekt, hier liefert die auftretende Depolarisation Informationen über die Effizienz des Energietransfers (Karolin 1997; Karolin 1998).

In einer isotropen Lösung treten alle Orientierungen der Absorptions- und Emissionsdipolmomente mit der gleichen Wahrscheinlichkeit auf. Bei einer Betrachtung der Orientierungen direkt nach der Anregung ergibt sich eine statische Mittelung, wobei die beteiligten Übergangsdipolmomente der Absorption und der Fluoreszenz einen Winkel β einschließen. Ändert sich die Orientierung der Übergangsdipolmomente nicht im angeregten Zustand, bleibt der Winkel β unverändert. In diesem Fall lässt sich die fundamentale Anisotropie r_f einführen:

$$r_f = \frac{3\cos^2\beta - 1}{5} \quad (\text{Gl. 2 - 7})$$

Der Winkel β kann folgende Werte annehmen: $0 \leq \beta \leq \pi/4$. Damit ergeben sich Werte für die fundamentale Anisotropie von $-0,2 \leq r_0 \leq 0,4$. Die fundamentale Anisotropie ist eine

Eigenschaft des Farbstoffs, sie ist beobachtbar bei Abwesenheit aller anderen Depolarisations-Prozesse wie Rotationsdiffusion und Energietransfer.

Für kugelsymmetrische Moleküle kann das zeitliche Abklingverhalten der Anisotropie als monoexponentiell angenommen werden und es gilt

$$r(t) = r_0 \cdot e^{-t/\rho} \quad (\text{Gl. 2 - 8})$$

Hier bezeichnet ρ die Rotationskorrelationszeit und r_0 die Anisotropie zum Zeitpunkt $t = 0$. Sie stimmt mit der bereits eingeführten fundamentalen Anisotropie überein. Nach der Perrin-Gleichung ist die Anisotropie abhängig von der Anisotropie zum Zeitpunkt $t = 0$, r_0 , der Rotationskorrelationszeit, ρ , und der Lebensdauer, τ :

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\rho}} \quad (\text{Gl. 2 - 9})$$

Ist der Fluorophor an ein Makromolekül gebunden, muss die globale Bewegung des Moleküls zusätzlich zur lokalen Bewegung des Fluorophors berücksichtigt werden. Da sich die Gesamtbewegung aus mehreren Komponenten zusammensetzt, muss das zeitliche Abklingverhalten der Anisotropie als multiexponentiell angenommen werden und es gilt

$$r(t) = \sum_j r_{0j} \cdot e^{-t/\rho_j} \quad (\text{Gl. 2 - 10})$$

Für die Amplituden r_{0j} gilt $\sum_j r_{0j} = r_0$. ρ_j bezeichnet hier die einzelnen Rotationskorrelationszeiten.

2.2 Fluoreszenz-Energietransfer-Prozesse

Zwischenmolekulare Energietransfer-Prozesse, bei denen ein strahlungsloser Übergang von Elektronenanregungsenergien ohne jegliche Bindung an das andere Molekül stattfindet, wurden erstmals 1948 von Th. Förster theoretisch abgeleitet (Förster 1948). Ein diesbezüglich vielfach genutzter Prozess in der Strukturbestimmung biologischer Moleküle ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), welcher im Folgenden näher betrachtet werden soll. Weitere Energietransfer-Prozesse, die im Einklang mit dem Förster-Mechanismus stehen und in den vorliegenden Untersuchungen eine Rolle spielen, werden im Anschluss beschrieben.

2.2.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) ist ein bimolekularer Prozess, bei dem ein elektronisch angeregtes Molekül D^* seine Anregungsenergie auf ein sich im Grundzustand befindendes Molekül A (Akzeptor) überträgt und bei diesem einen angeregten Zustand erzeugt:



Charakteristisch für diesen Prozess ist die strahlungslose Dipol-Dipol-Wechselwirkung (langreichweitiger Coulomb-Energietransfer (Gilbert 1991)) zwischen Donor- und Akzeptor-Molekül, die in der Regel einen Energietransfer zwischen Singulett-Zuständen erzeugt. Eine experimentelle Quantifizierung dieses Phänomens lieferten erstmals Stryer und Haugland 1967 (Stryer 1967).

Abbildung 2-3 zeigt schematisch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor. Der Donor-Farbstoff wird über die Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung angeregt und kann seine elektronische Anregungsenergie auf den Akzeptor-Farbstoff übertragen. Dieser gibt die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz ab. Der Energietransfer verursacht eine verringerte Fluoreszenzintensität des Donor-Farbstoffs sowie eine verkürzte Lebensdauer.

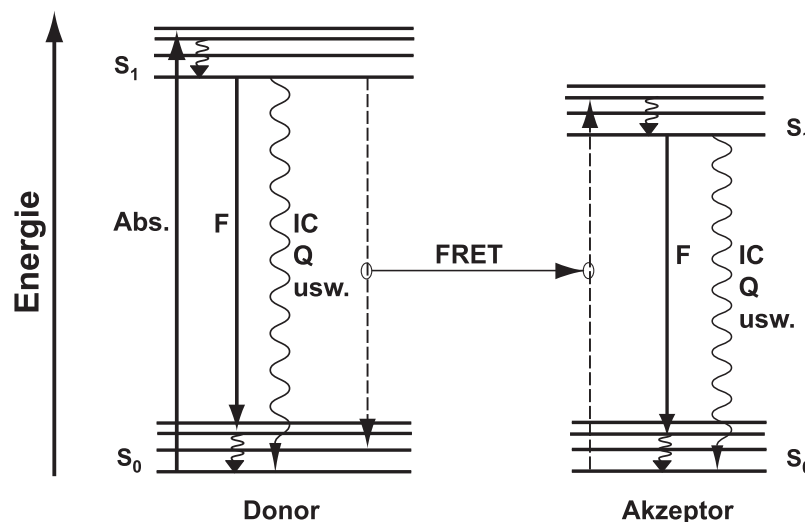


Abbildung 2-3: Jablonski-Diagramm für den Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). In der Regel wird der Energietransfer zwischen den Singulett-Zuständen der beteiligten Fluorophore erzeugt, daher sind nur jene dargestellt.

Folgende Voraussetzungen müssen für einen effizienten Energietransfer erfüllt sein:

1. Eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute des Donor-Fluorophors, Φ_D , in Abwesenheit des Akzeptor-Fluorophors.

2. Eine ausreichende spektrale Überlappung von dem Fluoreszenzspektrum des Donor-Fluorophors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Fluorophors.
3. Eine begünstigte wechselseitige Orientierung der Dipolmomente von Donor- und Akzeptor-Fluorophor sowie ihrem Abstandsvektor.
4. Der räumliche Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor beträgt 1-10 nm.

Die Abstandsabhängigkeit des FRET bewirkt eine breite Anwendung dieses Prozesses in der Strukturbiologie, da die erfassbaren räumlichen Abstände häufig den Abmessungen biologisch interessanter Moleküle entsprechen.

2.2.2 Eine Quantifizierung des FRET

Klassische wie quantenmechanische Betrachtungen liefern ähnliche Ergebnisse in der Quantifizierung des FRET (Cantor 1980). Die Grundlage der Theorie bildet immer die Betrachtung der Fluorophore als oszillierende Dipole, die ihre Energie mit anderen Dipolen ähnlicher Resonanzenergie austauschen können. Eine ausführliche Einführung in die FRET-Theorie liefern R. M. Clegg (Clegg 1992), B. W. van der Meer (van der Meer, Cooker et al. 1994) und P. R. Selvin (Selvin 1995). Im Folgenden werden nur die wichtigsten Zusammenhänge diskutiert.

Bei einem Abstand R_{DA} zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor beträgt die Rate des Energietransfers

$$k_{ET}(R_{DA}) = \frac{\Phi_{FD} \kappa^2}{\tau_D R_{DA}^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) J(\lambda). \quad (\text{Gl. 2 - 12})$$

Hier bezeichnet Φ_{FD} die Fluoreszenzquantenausbeute des Donor-Farbstoffs in Abwesenheit des Akzeptors, κ^2 den Orientierungsfaktor der Übergangsdipolmomente, τ_D die Lebensdauer des Donors, N die Avogadro-Zahl und n den Brechungsindex der Umgebung. $J(\lambda)$ beschreibt das Überlappungsintegral von Donor-Fluoreszenzspektrum und Akzeptor-Absorptionsspektrum. Die bezeichnete Gesamtfläche ist normiert:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (\text{Gl. 2 - 13})$$

$\epsilon_A(\lambda)$ ist der Extinktionskoeffizient des Akzeptors, $F_D(\lambda)$ die flächennormierte Fluoreszenz des Donors bei der Wellenlänge λ .

Wie bereits angedeutet hängt der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer von der Distanz zwischen den zwei beteiligten Fluorophoren ab. Eine in diesem Zusammenhang wichtige Größe ist der Förster-Radius, R_0 , der jenen Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Molekül bezeichnet, bei dem die Ratenkonstante des Energietransfers, k_{ET} , gleich der Zerfallsrate des angeregten Zustandes vom Donor-Fluorophor in Abwesenheit des Akzeptors ist ($k_{ET} = k_0 = \tau_D^{-1}$). Mit Gleichung 2-12 folgt:

$$R_0^6 = \Phi_{FD} \kappa^2 \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) J(\lambda) \quad (\text{Gl. 2 - 14})$$

Beim Zusammenfassen aller Konstanten bedeutet dieses:

$$R_0 = 9,78 \cdot 10^3 (J \kappa^2 \Phi_{FD} n^{-4})^{1/6} \quad \text{mit } [R_0] = 10^{-10} \text{ m} \quad (\text{Gl. 2 - 15})$$

Der Förster-Radius lässt sich im Wesentlichen aus den spektralen Eigenschaften von Donor- und Akzeptor-Molekül bestimmen. Für die Berechnung von R_0 wird für den Orientierungsfaktor meist $\kappa^2 = 2/3$ eingesetzt; auf diese Problematik wird in Abschnitt 2.2.3 ausführlicher eingegangen. Über den Förster-Radius R_0 (Gl. 2-14) ergibt sich ein vereinfachter Ausdruck für die Rate des Energietransfers. Aus den Gleichungen 2-12 und 2-14 ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6 \quad (\text{Gl. 2 - 16})$$

Die quantitative Beschreibung des FRET erfolgt meist über die Transfereffizienz E_T . Sie wird über den Anteil der vom Donor absorbierten Photonen, die an den Akzeptor übergeben werden, beschrieben:

$$E_T = \frac{k_{ET}}{k_F + k_{ET} + \sum_i k_i} \quad (\text{Gl. 2 - 17})$$

k_i beschreibt die Ratenkonstanten der übrigen beteiligten Deaktivierungsprozesse für den Donor-Fluorophor (internal conversion IC, intersystem crossing ISC, Fluoreszenzlöschung Q). Mit Gleichung 2-16 lässt sich die Effizienz wiederum in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor darstellen:

$$E_T = \frac{1}{1 + \left(\frac{R_{DA}}{R_0} \right)^6} \quad (\text{Gl. 2 - 18})$$

Die Effizienz des fluoreszenzresonanten Energietransfers, E_T , ist ein besonders sensibler Parameter in Bezug auf Änderungen des Abstandes R_{DA} zwischen Donor und Akzeptor, wenn

dieser Abstand in etwa dem Förster-Radius R_0 entspricht. Abbildung 2-4 zeigt eine schematische Darstellung der Transfereffizienz als Funktion des Abstandes R_{DA} . Der Förster-Radius R_0 entspricht dem Abstand R_{DA} , bei dem die Effizienz des Energietransfers, E_T , 50% beträgt.

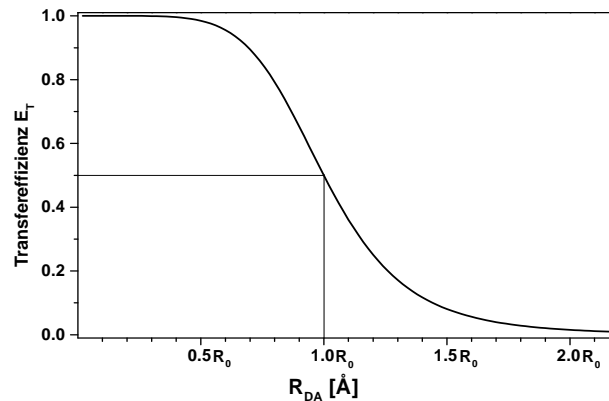


Abbildung 2-4: Abhängigkeit der Transfereffizienz E_T vom Abstand R_{DA} zwischen Donor und Akzeptor, dargestellt in Einheiten von R_0 .

2.2.3 Der Orientierungsfaktor κ^2

Für die Bestimmung des Förster-Abstandes R_0 bzw. der Energietransferrate E_T muss der Orientierungsfaktor κ^2 bekannt sein. Dieser ist bestimmt durch die relativen Orientierungen der Übergangsdipolmomente von Donorfluoreszenz, μ_D , und Akzeptorabsorption, μ_A , und lässt sich geometrisch wie folgt ausdrücken:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 = (\sin\theta_D\sin\theta_A\cos\phi - 2\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \quad (\text{Gl. 2 - 19})$$

Abbildung 2-5 veranschaulicht grafisch die Bedeutung der Winkel θ_T , θ_A und θ_D sowie ϕ . θ_T bezeichnet den Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten von Donor und Akzeptor, μ_D und μ_A . θ_D ist der Winkel zwischen Übergangsdipolmoment des Donors, μ_D , und der Verbindungsgerade von Donor und Akzeptor (Separationsvektor \vec{R}_{DA}). θ_A ist der Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment des Akzeptors und dieser Geraden, und ϕ ist ihr Azimut, d. h. der Winkel zwischen den Projektionen der Übergangsdipolmomente auf eine Fläche senkrecht zur Verbindungsgeraden.

Der Orientierungsfaktor κ^2 kann folgende Werte annehmen: $0 \leq \kappa^2 \leq 4$. Der maximale Wert $\kappa^2 = 4$ wird erreicht, wenn die Übergangsdipolmomente von Donor- und Akzeptor-Fluorophor kollinear angeordnet sind. Der minimale Wert 0 hingegen kann auf vielfache Weise entstehen z. B. für senkrecht zueinander positionierte Übergangsdipolmomente. Häufig wird von einer freien Beweglichkeit der Fluorophore ausgegangen, so dass die Übergangsdipolmomente von Donor- und Akzeptor-Fluorophor innerhalb der Lebensdauern

der angeregten Zustände alle möglichen Orientierungen zueinander einnehmen. Unter dieser Voraussetzung ergibt die Berechnung des Orientierungsfaktors den Mittelwert $\kappa^2 = 2/3$. Die Gültigkeit der Annahme freier Beweglichkeiten der Fluorophore kann über die Bestimmung der Anisotropien von Donor- und Akzeptor-Fluorophor überprüft werden. Für Fluorophore, die als statisch angesehen werden müssen, weil sie sich binnen ihrer Fluoreszenzlebensdauer nicht bewegen, und deren Orientierungen der Übergangsdipolmomente statistisch verteilt sind, besitzt der Orientierungsfaktor den Wert $\kappa^2 = 0.47$ (Steinberg 1971). Bei einer nicht gegebenen freien Beweglichkeit der Fluorophore existieren unterschiedliche Lösungsansätze für die Berechnung von κ^2 ; eine weitergehende Diskussion findet sich in der Literatur (Dale and Eisinger 1974; Dale 1979).

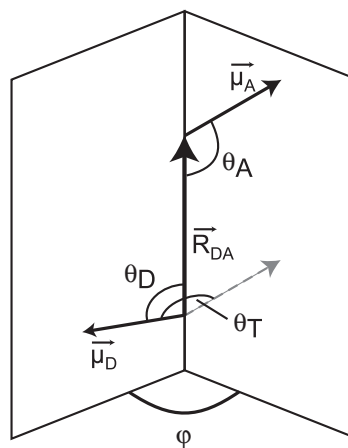


Abbildung 2-5: Veranschaulichung der Winkel θ_T , θ_A , θ_D und ϕ zwischen den Übergangsdipolmomenten μ_D , μ_A und dem Abstandsvektor, \vec{R}_{DA} , zur Berechnung des Orientierungsfaktors κ^2 .

2.2.4 Weitere Energietransfer-Mechanismen

Bislang wurde bei den Betrachtungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers von nicht-identischen Donor- und Akzeptor-Molekülen ausgegangen, dieser muss streng genommen als hetero-FRET bezeichnet werden. Energietransfer zwischen identischen Molekülen findet unter den gleichen Voraussetzungen statt, man spricht hierbei von homo-FRET. Dieser Prozess spielt in einigen Lichtsammelkomplexen der Pflanzen- und Bakterien-Photosynthese eine Schlüsselrolle (Andrews 1999). Homo-FRET findet bevorzugt zwischen identischen Fluorophoren statt, die eine vergleichsweise geringe Stokes-Verschiebung aufweisen. Experimentell lässt sich dieser Energietransfer nur über eine verringerte Anisotropie der Fluorophore quantifizieren (Kawski 1983). Eine verringerte Fluoreszenzintensität oder verkürzte Lebensdauer des Donor-Farbstoffs wie bei hetero-FRET tritt nicht auf.

Weitere mit dem Förster-Formalismus verträgliche Energietransfer-Prozesse sind die Singulett-Singulett- und Singulett-Triplett-Annihilation. Ein Donor-Fluorophor, der sich im ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustand befindet, kann seine Energie strahlungslos aufgrund der Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf einen Akzeptor-Fluorophor übertragen, der sich entweder in einem angeregten Singulett-Zustand oder in einem Triplett-Zustand befindet. Die übertragene Energie wird nun jedoch nicht als Fluoreszenz wieder abgegeben sondern intern umgewandelt und geht als Wärme verloren („internal conversion“, IC) (Hofkens, Cotlet et al. 2003). Da es sich bei diesen Prozessen um Förster-Mechanismen handelt, ist dieselbe Abstandsabhängigkeit wie für FRET gültig. Auch lassen sich Förster-Abstände nach Gleichung 2-14 bestimmen, die abhängig sind von der spektralen Überlappung zwischen Donor-Fluoreszenz und S_1 - bzw. T_1 -Absorptionsspektrum des Akzeptor-Moleküls sowie der relativen Orientierung der beteiligten Übergangsdipolmomente. Da bei Annihilationsprozessen die beteiligten Fluorophore sich beide im angeregten Zustand befinden müssen, fordern diese Mechanismen hohe Anregungsleistungen. Es handelt sich um meist unerwünschte Löschprozesse, welche die Fluoreszenzquantenausbeute herabsetzen.

Es gibt eine Vielzahl weiterer zwischenmolekularer Energietransfer-Prozesse, die jedoch nicht mit dem Förster-Formalismus verträglich sind. So findet bei der Reabsorption ein strahlungsaktiver Energietransfer statt, beim Dexter-Energietransfer hingegen tritt ein strahlungsloser kurzreichweitiger Austausch von Elektronen auf. Für eine ausführliche Darstellung der verschiedenen Energietransfer-Mechanismen sei auf die weiterführende Literatur verwiesen (Gilbert and Baggott 1991). In einer Gemeinschaft identischer Fluorophore eines Systems können diese ferner über schnelle Energietransfer-Mechanismen koppeln und als Ein-Quantensystem agieren (Wu, Goodwin et al. 1996). Ein einzelner Fluorophor tritt hier als alleiniger Emitter des Systems auf. Diese Prozesse sind nicht vollends geklärt.

2.3 Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD)

Die Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD) beinhaltet die simultane Erfassung unabhängig detektierbarer Fluoreszenzparameter. Dazu gehören die Fluoreszenzintensität F , die Fluoreszenzlebensdauer τ und die Anisotropie r . Bei Verwendung von zwei geeigneten Fluorophoren, die über FRET eine gekoppelte Fluoreszenz aufweisen, erweist sich die Effizienz E des Energietransfers als ein weiterer unabhängiger Fluoreszenzparameter. Zusätzlich werden in diesem Fall obige Parameter für beide spektrale Bereiche bestimmt. Jeder der aufgeführten Parameter ermöglicht spezifische Informationen über die räumliche

Orientierung und Beweglichkeit der Fluorophore sowie ihre chemische Umgebung (Eggeling, Berger et al. 2001; Rothwell, Berger et al. 2003).

Die MFD ermöglicht den Einsatz verschiedenster Methoden für die Analyse der experimentellen Daten. So gestattet die Akquisition der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität die Anwendung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Diese vielseitige Methode wird im nächsten Abschnitt (Kap. 2.3.1) näher beschrieben. Der Einsatz der Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime (BIFL)-Technik hingegen ermöglicht die detaillierte Analyse aller unabhängigen Fluoreszenzparameter einzelner Moleküle. Kapitel 2.3.2 ist dieser Anwendung gewidmet. Andere Methoden wie die ein- oder zwei-dimensionale Fluoreszenzintensitäts-Verteilungsanalyse (1D-/2D-FIDA) sowie ihre Kombination mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FIMDA) oder der Fluoreszenzlebensdauer (FILDA) fanden keine Anwendung für die vorliegenden Untersuchungen und werden daher nicht weiter erläutert.

2.3.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurde bereits 1972 von Magde, Elson und Webb vorgestellt (Magde 1972), der Durchbruch kam jedoch erst in den 90er Jahren mit der apparativen Entwicklung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Rigler 1990; Eigen and Rigler 1994; Rigler 1995; Schwille, Meyer-Almes et al. 1997), welche kleine Beobachtungsvolumina und damit ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ermöglicht.

Im Gegensatz zur klassischen Fluoreszenzspektroskopie, bei der stets die Mittelwerte einer Gesamtheit von fluoreszierenden Molekülen betrachtet werden, widmet sich die FCS den Abweichungen vom Mittelwert. Dabei sind die relativen Fluktuationen um einen Gleichgewichtswert umso größer, je geringer die Anzahl an beobachteten Molekülen ist. Jede Reaktion mit einer charakteristischen Zeitdauer bewirkt in der aus der Fluoreszenzmessung berechneten Korrelationsfunktion einen Abfall mit der für den Prozess charakteristischen Zeit. Die FCS liefert kinetische Informationen über eine Vielfalt von Prozessen:

- Translationsdiffusion (bestimmt durch die Größe des Beobachtungsvolumens)
- Rotationsdiffusion
- Photophysikalische Prozesse (Fluoreszenz, Triplett-Besetzung)
- Photochemische Prozesse (Photozerstörung, Löschprozesse)
- Chemische Prozesse (spezielle Gleichgewichtsreaktionen)

Voraussetzung für die Untersuchungen dynamischer Prozesse mit Hilfe der FCS ist, dass die Prozesse die Anzahl an Fluoreszenzereignissen beeinflussen und dass sie zu Schwankungen um einen Gleichgewichtsmittelwert führen, wobei die Zeitskalen durch die translative Diffusion der Moleküle begrenzt werden.

2.3.1.1 Mathematische Grundlagen der FCS

Für die Berechnung der Korrelationsfunktion wird die zeitabhängige Anzahl an detektierten Photonen, $N_F(t)$, die durch Fluoreszenzfluktuationen, $\delta N_F(t)$, um einen Mittelwert, $\langle N_F \rangle$, beschrieben werden kann, betrachtet ($\langle \dots \rangle$ steht für eine zeitliche Mittelung):

$$N_F(t) = \langle N_F \rangle + \delta N_F(t) \quad (\text{Gl. 2 - 20})$$

Ihre Analyse liefert die normierte Autokorrelationsfunktion $G(t_c)$, wobei t_c die Korrelationszeit ist. Mit $\langle \delta N_F(t) \rangle = 0$ folgt:

$$G(t_c) = \frac{\langle N_F(t) N_F(t + t_c) \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta N_F(t) \delta N_F(t + t_c) \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2} \quad (\text{Gl. 2 - 21})$$

Mit zunehmender Korrelationszeit nimmt die Amplitude der normierten Autokorrelationsfunktion ab, da die detektierten Fluoreszenzfluktuationen bei zunehmender zeitlicher Separation unkorrelierter werden. Jeder Abfall in der Korrelationskurve - man spricht hier von einem Bunching-Term - steht in direktem Zusammenhang zur Zerfallsrate eines kinetischen Prozesses. Ferner sind lediglich die Photonen eines einzelnen fluoreszenten Partikels miteinander korreliert, weswegen die Korrelationsamplitude umgekehrt proportional zur mittleren Anzahl der Teilchen im Beobachtungsvolumen ist. Diese Amplitude wird im Folgenden mit $1/N^*$ benannt. Die mittlere Anzahl an Teilchen hingegen, die sich außerdem in einem der Singulett-Zustände, S_0 oder S_1 , befinden, wird mit N bezeichnet. Statt des fluoreszierenden Teilchens wird im Folgenden der Begriff des Moleküls angeführt. Abbildung 2-6 zeigt den schematischen Verlauf einer Fluoreszenzkorrelationsfunktion mit logarithmischer Korrelationszeitachse.

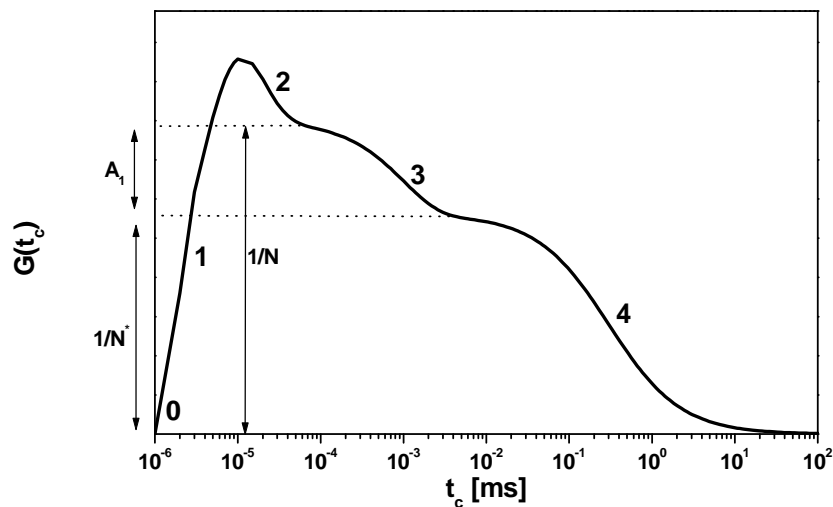


Abbildung 2-6: Schematischer Verlauf einer Fluoreszenzkorrelationskurve: (0): Emission eines Photons, (1): Antibunching, (2): Rotationsdiffusion, (3): Triplettkinetik oder Isomerisierungsreaktion, (4): translative Diffusion. N^* entspricht der Gesamtzahl an Fluorophoren im Beobachtungsvolumen, N der Anzahl an Fluorophoren, die sich in einem der Singulett-Zustände, S_0 oder S_1 , befinden. A_1 bezeichnet die Amplitude des Triplet- bzw. Isomerisierungsterms.

Folgende charakteristische Terme sind erkennbar:

- (0) Emission eines Photons zum Zeitpunkt $t_c = 0$.
- (1) Phänomen des Antibunchings: Die Korrelation zwischen zwei emittierten Photonen desselben Moleküls nimmt für sehr kurze Zeiten mit der Korrelationszeit zunächst zu. Nach der Emission eines Photons befindet sich der Fluorophor im Grundzustand und kann nur nach erneuter Anregung ein Photon aussenden. Das Antibunching ist somit ein quantenmechanischer Effekt.
- (2) Rotationsdiffusion: Absorption und Emission von Licht kann nur erfolgen, wenn sich eine Komponente des elektrischen Feldvektors parallel zu den molekularen Übergangsdipolmomenten eines Fluorophors befindet. Die Anregung mit polarisiertem Licht, und/oder die Detektion nur einer Polarisationsrichtung, führt bei einer Rotation des Moleküls um seine eigene Achse zu einer anisotropen Verteilung der emittierten Fluoreszenz. Die Rotationsdiffusion eines Moleküls führt zu Fluktuationen im Fluoreszenzsignal und damit zu einem Abfall in der Korrelationsfunktion bei der charakteristischen Rotationskorrelationszeit, die üblicherweise im ns-Bereich der Korrelationszeitachse liegt.

- (3) Triplettkinetik/Isomerisierungsreaktion: Beim Übergang des Moleküls in den Tripletzustand ist dieses nicht mehr am Absorptions-Emissions-Zyklus beteiligt und die Korrelationsfunktion klingt bei der charakteristischen Tripletzeit t_{A1} ab. Die Amplitude A_1 spiegelt den mittleren Anteil der Moleküle wider, die sich im Tripletzustand befinden. Für einige Farbstoffe wie beispielsweise den Cyanin-Farbstoff Cyanin 5 kann eine Isomerisierungsreaktion im angeregten Zustand vom fluoreszenten trans-Isomer in das nicht-fluoreszente cis-Isomer stattfinden. Auch diese Reaktion führt zu einem Abklingen der Korrelationsfunktion. Beide Terme besitzen charakteristische Korrelationszeiten im μs -Bereich.
- (4) Translative Diffusion: Bei der Diffusion des Moleküls aus dem Beobachtungsvolumen raus wird die Wahrscheinlichkeit, weitere Photonen von diesem Molekül zu detektieren, Null. Die translative Diffusion begrenzt somit den Zeitbereich, in dem Kinetiken anhand der FCS untersucht werden können. Je nach Größe des Beobachtungsvolumens und des Moleküls können Diffusionszeiten bis in den Sekundenbereich möglich sein.

Sowohl das Antibunching als auch die Rotationsdiffusion liegen in Zeitbereichen, die innerhalb der Totzeiten handelsüblicher Detektoren liegen und damit der Autokorrelation nicht zugänglich sind. Um dieses Problem zu umgehen, wird üblicherweise statt einer Autokorrelation eine Kreuzkorrelation von zwei Signalen A und B vorgenommen (Schwille, Meyer-Almes et al. 1997):

$$G_{AB}(t_c) = \frac{\langle N_F^A(t) N_F^B(t + t_c) \rangle}{\langle N_F^A(t) \rangle \langle N_F^B(t) \rangle} = 1 + \frac{\langle \delta N_F^A(t) \delta N_F^B(t + t_c) \rangle}{\langle N_F^A(t) \rangle \langle N_F^B(t) \rangle} \quad (\text{Gl. 2 - 22})$$

Dieses Verfahren ermöglicht zusätzliche Untersuchungen von Kinetiken, so können z. B. Informationen zur FRET-Effizienz über die Korrelation spektral getrennter Signale erhalten werden (Margittai 2003).

An die experimentell ermittelte Korrelationskurve wird nun eine Modellfunktion angepasst. Für die Herleitung solcher Modelle sei auf Arbeiten von C. Eggeling und J. Widengren (Eggeling 1996; Widengren 1996; Eggeling 1999) verwiesen. Im Allgemeinen wird für das Beobachtungsvolumen ein dreidimensional approximiertes Gauß'sches Detektionsvolumen angenommen. Es werden die unterschiedlichen Ausdehnungen, z_0 in axialer (z-Achse) und ω_0 in radialer (x-y-Ebene) Richtung, berücksichtigt, bei denen die Anregungsintensität der Lichtquelle auf $1/e^2$ abgefallen ist. Die räumliche Verteilung des Detektionsvolumens lässt sich damit über $w(x, y, z) = \exp(-2(x^2 + y^2)/\omega_0^2) \exp(-2z^2/z_0^2)$

beschreiben. Den einfachsten Fall der reinen translativen Diffusion in Lösung mit der Diffusionszeit t_D liefert folgendes Modell (Thompson and Lakowicz 1991; Rigler, Mets et al. 1993):

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + t_c/t_D} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_D} \right)^{1/2} \quad (\text{Gl. 2 - 23})$$

Die Korrelationsfunktion nimmt für $t_c \gg t_D$ aus Normierungsgründen den Wert 1 an. N entspricht der Anzahl fluoreszierender Partikel im Beobachtungsvolumen (es gilt hier der spezielle Fall $N = N^*$). Hierüber lassen sich die Photonenzählraten pro Molekül und, bei bekannter Größe des Beobachtungsvolumens, die Konzentrationen berechnen. Über die Diffusionszeit t_D lässt sich die Diffusionskonstante D bestimmen, $t_D = \omega_0^2/(4D)$.

Für den häufig verwendeten Fall der translativen Diffusion mit Triplettkinetik unter Berücksichtigung des Antibunchings, liefert folgende Modellfunktion eine Anpassung der experimentellen Daten (abgewandelt nach (Mets 2001)):

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N^*} \left(\frac{1}{1 + t_c/t_D} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_D} \right)^{1/2} \left[1 + \frac{T}{m(1-T)} \exp(-t_c/t_T) - \frac{1}{m(1-T)} \exp(-t_c/t_A) \right] \quad (\text{Gl. 2 - 24})$$

T entspricht dem mittleren Anteil der Moleküle, die sich im Tripletzustand befinden, und t_T der Triplettkorrelationszeit, über sie können die Ratenkonstanten für den Tripletzerfall, k_T , und das „Inter System Crossing“, k_{ISC} , bestimmt werden. t_A bezeichnet die charakteristische Anstiegszeit des Antibunching-Terms, sie lässt sich über die reziproke Summe der Ratenkonstanten der Anregung, k_{01} , und des Fluoreszenzzerfalls, k_0 , ableiten: $t_A = 1/(k_{01} + k_0)$. m gibt die Anzahl der Fluorophore pro Molekül an und N^* bezeichnet die Gesamtzahl fluoreszierender Moleküle im Beobachtungsvolumen. Das Auftreten eines unkorrelierten Hintergrundsignals, verursacht durch Streulicht und Dunkelzählraten der Detektoren, ist hier unberücksichtigt, muss jedoch für quantitative Aussagen über N^* mit angepasst werden.

Bei Anwendung der FCS auf immobilisierte Moleküle tritt keine Diffusion auf. Die zu Gleichung 2-24 äquivalente Anpassung der Triplettkinetik unter Berücksichtigung des Antibunchings erfolgt über eine gesonderte Modellfunktion (modifiziert nach (Mets 2001)):

$$G(t_c) = 1 + \frac{T}{m(1-T)} \exp(-t_c/t_T) - \frac{1}{m(1-T)} \exp(-t_c/t_A) \quad (\text{Gl. 2 - 25})$$

Die charakteristischen Parameter entsprechen den obigen Ausführungen.

Es wird bislang nicht zwischen kontinuierlicher und gepulster Anregung unterschieden. Dieses ist streng genommen nur korrekt für die Anpassung der Terme, welche

bei gepulster Anregung im Vergleich zu den Zeiten zwei aufeinander folgender Anregungspulse viel längere charakteristische Zeiten aufweisen. Für die Anpassung des Antibunching-Terms hingegen ergeben sich je nach experimenteller Ausführung der Anregung Unterschiede in der Anpassung.

2.3.1.2 Die Phänomene des Bunchings und des Antibunchings

Die Intensität einer idealen ebenen elektromagnetischen Welle, wie sie in guter Näherung das kohärente Strahlungsfeld eines Lasers darbietet, ist konstant. Die Korrelationsfunktion ist damit ebenfalls konstant und besitzt aus Normierungsgründen den Wert $G(t_c) = 1$. Die Ankunftszeiten von Photonen bei sehr geringem Fluss werden im Falle der idealen elektromagnetischen Welle über die Poisson-Statistik beschrieben¹ (Marti 2003). Es handelt sich hierbei um eine diskrete, unsymmetrische Verteilung. Die Poisson-Verteilung gibt die Wahrscheinlichkeiten $p(n)$ für n Ereignisse an, wenn der Mittelwert μ gegeben ist:

$$p(n) = \frac{\mu^n}{n!} e^{-\mu} \quad (\text{Gl. 2 - 26})$$

Die Poisson-Verteilung ist immer gültig für relativ seltene, zufällige Ereignisse, die voneinander unabhängig sind und die gleiche Wahrscheinlichkeit besitzen (Sachs 2003). Sowie Ereignisse abhängig werden oder die Wahrscheinlichkeit nicht konstant bleibt, tritt eine Abweichung von der Poisson-Verteilung auf.

Stellt man die Photonenstatistik experimentell erzeugten Lichts durch die Korrelationsfunktion (Gl. 2-21) dar, zeigt sich eine Tendenz der Photonen in Bündeln (engl.: „bunches“) aufzutreten. Dieses Phänomen ist zum einen auf klassische statistische Schwankungen zum anderen quantenmechanisch auf die Bosonen-Natur der Photonen zurückzuführen, für die auf sehr kurzen Zeitskalen die Bose-Einstein-Verteilung gültig ist. Die Zeitintervalle zwischen den Photonen sind kürzer als die Poisson-Verteilung erwarten lässt. Es ergibt sich eine Korrelation der Photonen und die Korrelationsfunktion liefert Werte $G(t_c) \geq 1$. Der Effekt der Photonenbündelung kann über eine Super-Poisson-Verteilung beschrieben werden, die breiter als die Poisson-Verteilung ist.

Das Gegenstück zum Bunching ist das Antibunching. Dieses Phänomen wurde erstmals 1977 von H. J. Kimble, M. Dagenais und L. Mandel experimentell nachgewiesen (Kimble 1977). In der Korrelationsfunktion tritt dieser Effekt für Photonen mit sehr kleinen

¹ Streng genommen können aufgrund der quantenmechanischen Unschärfe keine Aussagen über die Ankunftszeiten der Photonen sondern lediglich Aussagen über den mittleren zeitlichen Abstand zweier Photonen vorgenommen werden.

Zeitabständen auf, er lässt sich nur quantenmechanisch erklären. Anschaulich befindet sich der Fluorophor nach der Emission eines Photons zunächst im Grundzustand und kann erst durch eine erneute elektronische Anregung ein Photon aussenden. Dadurch entstehen längere Zeitintervalle als nach der Poisson-Verteilung zu erwarten sind, und es ergibt sich eine Antikorrelation. Experimentell lässt sich das Antibunching nur über ein Ein-Quanten-System nachweisen, da bei Mehr-Quanten-Systemen die Photonen von verschiedenen Emittoren erzeugt werden und damit unabhängig voneinander sind. Sie sind dem antikorrelierten Signal des einzelnen Teilchens überlagert. Die Korrelationsfunktion liefert für das Phänomen des Antibunchings Werte $G(t_c) \leq 1$. Statistisch wird es über eine Sub-Poisson-Verteilung erfasst, die schmäler ist als die Poisson-Verteilung.

Das Antibunching kann über eine Anpassung der experimentellen Daten genutzt werden, um die Anzahl von unabhängigen Emittoren in einem fluoreszenten System zu bestimmen. Die Modellfunktionen nach Gleichung 2-24 bzw. 2-25 liefern eine Anpassung unter Berücksichtigung des Antibunchings. Für eine Bestimmung der Anzahl unabhängiger Emittoren müssen zunächst Ausdrücke für die normierte Amplitude zum Zeitpunkt $t = 0$, $G(0)$, und die normierte maximale Amplitude, G_{\max} , bestimmt werden (modifiziert nach (Mets 2001)):

Mobile Moleküle:

$$G(0) = 1 + \frac{1}{N} + \frac{T}{mN(1-T)} - \frac{1}{mN(1-T)} = 1 + \frac{1}{N} - \frac{1}{mN} = 1 + \frac{m-1}{mN} \quad (\text{Gl. 2 - 27})$$

$$G_{\max} = 1 + \frac{1}{N} + \frac{T}{mN(1-T)} = 1 + \frac{m(1-T) + T}{mN(1-T)} \left(\Rightarrow \frac{1}{G_{\max} - 1} = N \frac{m(1-T)}{m(1-T) + T} \right) \quad (\text{Gl. 2 - 28})$$

Immobilisierte Moleküle:

$$G(0) = 1 + \frac{T}{mN(1-T)} - \frac{1}{mN(1-T)} = 1 - \frac{1}{mN} \quad (\text{Gl. 2 - 29})$$

$$G_{\max} = 1 + \frac{T}{mN(1-T)} \left(\Rightarrow \frac{1}{G_{\max} - 1} = mN \frac{1-T}{T} \right) \quad (\text{Gl. 2 - 30})$$

Mit ihrer Hilfe lässt sich nun die Anzahl der unabhängigen Emittoren für frei diffundierende (mobile) Moleküle in Lösung und für immobilisierte Moleküle auf einer Oberfläche bestimmen:

$$\text{Mobile Moleküle:} \quad m = \frac{1}{1 + N(1 - G(0))} = \left(\frac{G_{\max} - 1}{G_{\max} - G(0)} - T \right) (1 - T)^{-1} \quad (\text{Gl. 2 - 31})$$

$$\text{Immobilisierte Moleküle:} \quad mN = \frac{1}{1 - G(0)} = \left(\frac{G_{\max}}{G_{\max} - G(0)} - T \right) (1 - T)^{-1} \quad (\text{Gl. 2 - 32})$$

Bei einer gepulsten Anregung kann eine Anpassung der experimentellen Daten unter Berücksichtigung der Fluoreszenzlebensdauer vorgenommen werden. Die Korrelationsfunktion wird in diesem Fall von der regelmäßigen Abfolge von Anregungspulsen, welche durch die Fluoreszenzlebensdauer verbreitert sind, überlagert. Bei vernachlässigbarer Abklingzeit des Streulichts wird die Anpassung der Lebensdauer über einen monoexponentiellen Zerfall angenommen. Es wird im Allgemeinen eine Anpassung der Modellfunktion über den Zeitbereich einer Serie aufeinander folgender Pulse bis hin zum Plateau eines ersten Bunchingterms in der Korrelationsfunktion vorgenommen. Die Anpassung erfolgt mit der nachstehenden Modellfunktion (Felekyan, Kühnemuth et al. 2005):

$$G(t_c) = A_1 \exp\left(-\frac{|t_c - t_0|}{\tau}\right) + A_2 \sum_{k=1}^n \left(\exp\left(-\frac{|t_c - t_0 + kt_{\text{Laser}}|}{\tau}\right) + \exp\left(-\frac{|t_c - t_0 - kt_{\text{Laser}}|}{\tau}\right) \right) \quad (\text{Gl. 2 - 33})$$

A_1 ist die Amplitude des zentralen Peaks zum Korrelationszeitpunkt $t_c = 0$, A_2 die mittlere Amplitude der lateralen Peaks. t_0 entspricht dem Zeitversatz der beiden korrelierten Signale, τ der Fluoreszenzlebensdauer und t_{Laser} dem zeitlichen Abstand zwischen zwei Anregungspulsen. Statt der Anpassung einer mittleren Amplitude A_2 für die lateralen Peaks kann eine Anpassung der einzelnen Amplituden A_k ($k = 1, 2, \dots, n$) in die Modellfunktion aufgenommen werden.

Abbildung 2-7 zeigt die korrelierten Daten des Farbstoffs Rhodamin 110 in Lösung für eine gepulste Anregung (Pulsfrequenz 76 MHz, Anregungswellenlänge $\lambda = 496,5$ nm, Leistungsdichte 35 kW/cm^2) und ihre Anpassung über Gleichung 2-33 (Kühnemuth 2005). Die Zeitachse ist im Gegensatz zu der sonst üblichen Darstellung von korrelierten Daten linear. Die Originaldaten sind orange, eine Mittelung über 50 Datenpunkte ist rot und die Anpassung ist in schwarz gezeigt. Die Abstände der Peaks entsprechen der Pulsfrequenz der verwendeten Anregungslichtquelle. Die Amplitude des zentralen Peaks ist im Vergleich zu den anderen Amplituden durch das Phänomen des Antibunchings verringert.

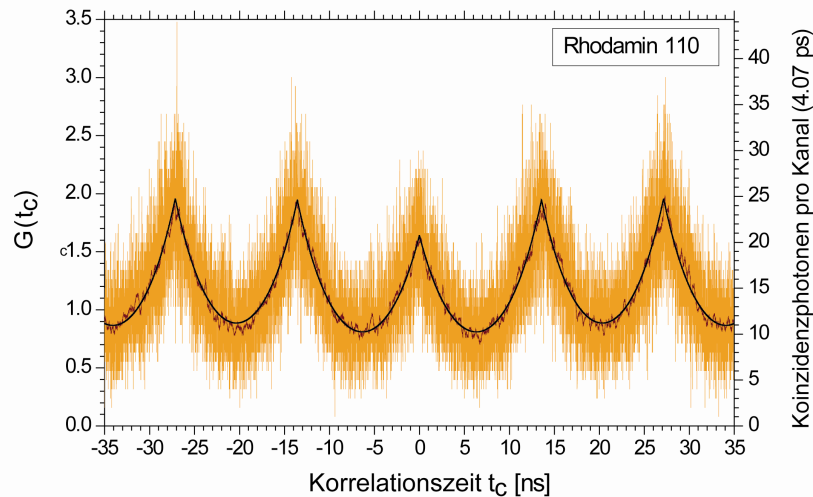


Abbildung 2-7: Anpassung korrelierter Daten des Farbstoffs Rhodamin 110 in Lösung für eine gepulste Anregung (Pulsfrequenz 76 MHz, Anregungswellenlänge $\lambda = 496,5$ nm, Leistungsdichte 35 kW/cm²). Die Abstände der Peaks entsprechen der Pulsfrequenz der verwendeten Anregungslichtquelle. Die Originaldaten sind orange, eine Mittelung über 50 Datenpunkte ist rot und die Anpassung ist in schwarz dargestellt. Die Anpassung der experimentellen Daten wurde über die Levenberg-Marquardt-Routine mit gleicher Gewichtung aller Datenpunkte vorgenommen (Kühnemuth 2005).

Für genauere Betrachtungen kann zusätzlich eine Anpassung des Hintergrundsignals erfolgen. Die Korrelationsfunktion wird in diesem Fall von der regelmäßigen Abfolge von Anregungspulsen überlagert, welche nicht nur durch die Fluoreszenzlebensdauer sondern zusätzlich durch das Streulicht bestimmt wird. Die Modellfunktion beinhaltet in Überlagerung zur monoexponentiellen Anpassung der Fluoreszenzzerfallszeiten die zusätzlichen mittleren Amplituden des Streulichts, A_3 , samt ihrer Abklingzeiten, τ_B (Kühnemuth 2005):

$$G(t_c) = A_1 \exp\left(-\frac{|t_c - t_0|}{\tau_F}\right) + A_2 \sum_{k=1}^n \left(\exp\left(-\frac{|t_c - t_0 + kt_{Laser}|}{\tau_F}\right) + \exp\left(-\frac{|t_c - t_0 - kt_{Laser}|}{\tau_F}\right) \right) + A_3 \sum_{k=1}^n \left(\exp\left(-\frac{|t_c - t_0|}{\tau_B}\right) + \exp\left(-\frac{|t_c - t_0 + kt_{Laser}|}{\tau_B}\right) + \exp\left(-\frac{|t_c - t_0 - kt_{Laser}|}{\tau_B}\right) \right) \quad (\text{Gl. 2 - 34})$$

Da das Hintergrundsignal häufig nur einen geringen Anteil des Gesamtsignals ausmacht, wird es vielfach vernachlässigt.

Um die Anzahl unabhängiger Emitter in einem System unter Einsatz einer gepulsten Anregungsstrahlung zu bestimmen, werden nun die nach Gleichung 2-33 angepassten Daten weiter analysiert. Die Amplituden A_2 werden mit den normierten Korrelationsamplituden $G(i \cdot t_{Laser})$ verknüpft, die bei kontinuierlicher Anregung zu dem Zeitpunkt $t = i \cdot t_{Laser}$

gemessen würden (Felekyan 2005). Über eine Integration der Peaks werden die normierten Korrelationsamplituden $G(0)$ und G_{\max} bestimmt:

$$G(0) = \frac{A_1 2\tau}{t_{\text{Laser}}} \quad \text{und} \quad G_{\max} = \frac{A_2 2\tau}{t_{\text{Laser}}} \quad (\text{Gl. 2 - 35})$$

Über die experimentell extrahierten Amplituden $G(0)$ und G_{\max} sowie den Anteil der Partikel, die sich im Triplettzustand befinden (Anpassung nach Gleichung 2-24 bzw. 2-25), wird mit den Gleichungen 2-31 bzw. 2-32 die Anzahl der unabhängigen Emitter bestimmt.

Sind die Emitter nicht unabhängig, weil z. B. ein Energietransfer zwischen den Fluorophoren vorliegt, ist die Fluoreszenz der Emitter teilweise gelöscht und die Anpassung der experimentellen Daten liefert einen zu geringen Wert für die Anzahl der Emitter. Es lassen sich in diesem Fall keine eindeutigen Aussagen über das untersuchte System treffen.

Eine verwandte Methode zur Bestimmung der Anzahl von unabhängigen Emittlern in einem Detektionsvolumen wurde von K. D. Weston *et al.* vorgestellt (Weston, Dyck *et al.* 2002). Über einen Aufbau nach Hanbury-Brown und Twiss (Hanbury-Brown and Twiss 1956) wird das Fluoreszenzsignal aufgeteilt und auf zwei Detektoren gelenkt, die eine zeitliche Verzögerung in der Datenaufnahme aufweisen. Ein Detektor liefert bei Ankunft eines Photons ein Start- der andere Detektor ein Stop-Signal. Ein Start- und ein Stop-Signal bilden ein Photonenpaar. Die Verzögerungszeiten der Photonenpaare werden in Histogrammen abgebildet und es ergibt sich eine der Abbildung 2-7 äquivalente Darstellung der Daten, jedoch nicht normiert. Im Vergleich zur FCS wird die Triplett-Besetzung vernachlässigt. Über das Verhältnis der Signalintensitäten lässt sich die Anzahl der unabhängigen Emitter bestimmen.

2.3.2 Burst-Integrierte-Fluoreszenz-Lebensdauer (BIFL)

Die Burst-Integrierte-Fluoreszenz-Lebensdauer (BIFL)-Technik ist auf den Signalen einzeln auftretender Moleküle begründet. Wie bei der FCS ist der Einsatz eines konfokalen Mikroskops zur Erhöhung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses von grundlegender Bedeutung. Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern erfordert eine gepulste Anregung der Fluorophore.

Der Durchtritt eines einzelnen Moleküls durch das Beobachtungsvolumen bewirkt eine Häufung von sequentiell detektierten Photonen. Die Identifizierung des Einzelmoleküldurchtritts geschieht über eine Signalspitzen-orientierte Auswertung; alle Photonen eines Durchtritts werden gemeinsam analysiert.

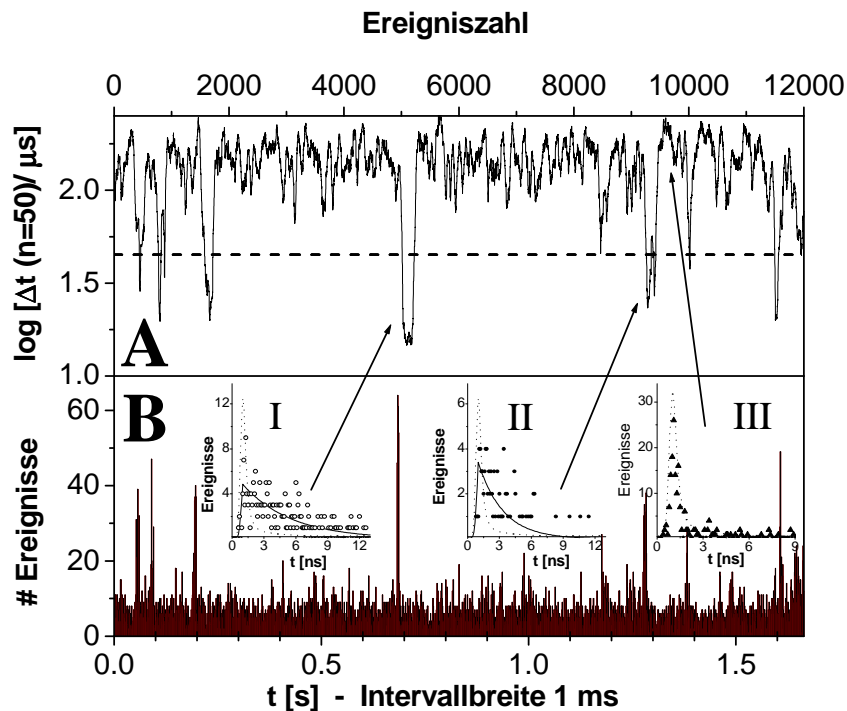


Abbildung 2-8: Zwei äquivalente grafische Darstellungen einzelner Moleküldurchtritte durch das Beobachtungsvolumen von einer Mischung der Farbstoffe Rhodamin 6G (Rh6G) und Rhodamin B (RhB). Abbildung A: Auftragung der logarithmierten Abstandszeiten aufeinander folgender Photonen, Δt , über ihre Ereignisnummer (Mittelung über 50 Photonen). Abbildung B: Vielkanalzählerspur der detektierten Photonen. Die Anzahl der Photonen ist hier in Zeitintervallen von 1 ms dargestellt. Abbildung I und II zeigen zwei typische Fluoreszenzabfälle der Photonen eines identifizierten Moleküldurchtritts, erhalten über die Ankunftszeiten nach erfolgtem Anregungspuls. Abbildung III zeigt das entsprechende Histogramm für das Hintergrundsignal, welches sehr viel kurzlebiger ist (Fries 1998).

Abbildung 2-8 zeigt zwei äquivalente grafische Darstellungen von Durchtritten einzelner Moleküle durch das Beobachtungsvolumen (Fries, Brand et al. 1998). Als Probe diente eine Mischung der Farbstoffe Rhodamin 6G (Rh6G) und Rhodamin B (RhB). Grafik B zeigt eine Vielkanalzählerspur (engl.: „Multichannel-scaler-trace“ MCS-trace) der detektierten Photonen. Die Anzahl der Photonen ist hier in Zeitintervallen von 1 ms dargestellt. Die Durchtritte einzelner Fluorophore durch das Beobachtungsvolumen sind deutlich als Signalspitzen mit einer hohen Anzahl an Photonen gegenüber dem Hintergrund zu erkennen. In Grafik A sind nun die logarithmierten Abstandszeiten aufeinander folgender Photonen, Δt , über ihre Ereignisnummer aufgetragen (Mittelung über 50 Photonen). In dieser Darstellung wird über die Festlegung einer Schwelle Δt_s eine Auswahl der Ereignisse getroffen. Abbildung I und II zeigen zwei charakteristische Fluoreszenzzerfälle der Photonen eines identifizierten Moleküldurchtritts, erhalten über die Erstellung eines Histogramms der

Ankunftszeiten nach erfolgtem Anregungspuls. Über die Anpassung der Fluoreszenzlebensdauern können die Moleküldurchtritte einem der Farbstoffe zugeordnet werden. Abbildung III zeigt das entsprechende Histogramm für das Hintergrundsignal, welches sehr viel kürzerlebig ist. Es spiegelt direkt die Gerätefunktion, d. h. die endliche Breite des Anregungspulses sowie die begrenzte Zeitauflösung der verwendeten Instrumente, wider. Eine detaillierte Beschreibung der Datenanalyse folgt in Kapitel 3.

Nach der Identifizierung der Einzelmoleküldurchtritte können die charakteristischen Fluoreszenzparameter bestimmt werden:

- *Intensität*

Die Intensität des Fluoreszenzsignals für einen spektralen Bereich λ ergibt sich aus der Gesamtzahl der Photonen n_λ des Einzelmolekülereignisses sowie dessen Dauer, welche durch das Zeitintervall zwischen erstem und letztem Photon, $\Delta t(n_\lambda)$, gegeben ist:

$$S_\lambda = \frac{n_\lambda - 1}{\Delta t(n_\lambda)} \quad (\text{Gl. 2 - 36})$$

In der Praxis wird zwischen dem Fluoreszenzsignal, S , welches auch Hintergrundsignal (Streulicht) beinhaltet, und dem Fluoreszenzsignal, F , welches um selbiges korrigiert ist, unterschieden. Die maximale Zählrate eines Einzelmoleküldurchtritts ist durch eine optische Sättigung des Fluorophors und photochemische Prozesse wie die Triplettbesetzung begrenzt.

- *Fluoreszenzlebensdauer*

Der zeitliche Abfall des Fluoreszenzsignals $S_\lambda(t)$ nach erfolgter Pulsanregung wird über die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (engl.: „time-correlated single photon counting“ TCSPC) experimentell festgehalten (Wild 1977; O'Connor 1984). Die registrierten Photonen eines Zeitfensters, welches von der Pulsrepetitionsrate der Anregungsquelle diktiert wird, werden in einem Häufigkeits-Histogramm dargestellt, und die Anpassung der Fluoreszenzlebensdauer erfolgt über eine mathematische Faltung mit einer Exponentialfunktion (vgl. Kap. 2.1.2) unter Berücksichtigung der Gerätefunktion $g(t)$:

$$S_\lambda(t) = g(t) \otimes \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right) \quad (\text{Gl. 2 - 37})$$

Die Anpassung der Lebensdauer berücksichtigt in der vorliegenden Arbeit einen variablen Anteil des Streulichts, γ , sowie die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer hohen Pulsrepetitionsrate der Anregungsquelle ein Fluorophor bereits von vorhergehenden Anregungspulsen angeregt worden ist (Kullback 1959; Zander, Sauer et al. 1996; Brand, Eggeling et al. 1997; Brand 1998).

- *Fluoreszenzanisotropie*

Für die Bestimmung der Anisotropie muss eine linear polarisierte Anregung der Fluorophore sowie eine Detektion der Fluoreszenz in zwei Polarisationsrichtungen (S_p - parallel zur linearen Polarisation, S_s - senkrecht zur linearen Polarisation) erfolgen. Die Anpassung der experimentellen Daten berücksichtigt eine Mischung der Polarisationskomponenten für Objektive mit großer Apertur sowie eine Depolarisation des linear polarisierten Anregungsstrahls durch eine starke Brechung (Korrekturfaktoren I_1 für S_p und I_2 für S_s) (Koshioka, Sasaki et al. 1995; Schaffer 2000). Ferner werden die polarisationsabhängige Transmission der Filter und die unterschiedlich sensitiven Detektoren berücksichtigt. Eine detaillierte Ausführung zur Anpassung der Anisotropie findet sich in (Schaffer 2000).

Sowohl die Lebensdauer als auch die Anisotropie sind im Allgemeinen unabhängig von den experimentellen Einstellungen (z. B. Anregungswellenlänge, Intensität, etc.) und daher geeignete Parameter für die Untersuchung von inter- und intramolekularen Reaktionen fluoreszenzmarkierter Moleküle.

2.3.3 Selektive Spektroskopie

Die Einzelmolekülspektroskopie, realisiert über die MFD, ermöglicht über die Untersuchung der detektierten Fluoreszenzparameter eine Selektion von Ereignissen identischer Eigenschaften und damit eine Auswahl einer Subpopulation. Dieses führt zu einer erheblichen Vergrößerung des Datensatzes und damit zu einer verbesserten Statistik, so dass eine detailliertere Anpassung der Daten möglich wird. Auf diese Weise können Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie sowie Rotationskorrelationszeiten über mehrere Exponenten angepasst (Schaffer 2000) und Heterogenitäten innerhalb einer Spezies aufgedeckt werden.

Untersuchungen dynamischer Gleichgewichtsreaktionen:

Anhand der selektiven Spektroskopie können Dynamiken ausgewählter Subpopulationen untersucht werden. Die speziesselbektive Korrelationsanalyse (Eggeling 1999), bei der die Photonen einer Subpopulation wahlweise einer Auto- oder Kreuz-Korrelation unterzogen werden, ist insbesondere für FRET-Experimente interessant. Eine klassische FCS-Analyse würde das gesamte Ensemble an Molekülen mit einbeziehen, somit auch FRET-inaktive Spezies wie die einfach-markierten Moleküle. Über die speziesselbektive Spektroskopie werden diese unerwünschten Ereignisse herausgefiltert und die doppelt

markierte FRET-Spezies kann über die FCS untersucht werden. So lassen sich Dynamiken bis in den ns-Bereich feststellen. Es bleibt zu beachten, dass der Diffusionsterm durch die Selektion der Daten über die Signalspitzen-orientierte Analyse verfälscht ist.

Eine weitere Methode zur Untersuchung dynamischer Gleichgewichtsreaktionen ist die Zeitfensteranalyse. Bei zeitlichen Fluktuationen der Fluoreszenzparameter innerhalb eines Moleküldurchtritts, welche durch eine Dynamik der Moleküle hervorgerufen werden, kann an Stelle der Signalspitzen-orientierten Analyse eine Zeitfensteranalyse der experimentellen Daten vorgenommen werden. Ein identifizierter Durchtritt eines einzelnen Moleküls wird zu diesem Zweck in kleinere Intervalle aufgeteilt und die Photonen der einzelnen Intervalle nun getrennt analysiert. Auf diese Weise können verschiedene Zustände eines fluoreszenzmarkierten Moleküls innerhalb eines Durchtritts direkt erkannt werden (vgl. Kap. 3.3.4). Limitiert wird diese Methode durch die Statistik der Photonen. Sie beschränkt die erreichbare Zeitauflösung der untersuchten Dynamiken auf den Submillisekunden-Bereich.

Kapitel 3

Material und Methoden

Das vorliegende Kapitel widmet sich dem Material und den Methoden der durchgeführten experimentellen Untersuchungen. Nach einer Beschreibung der fluoreszenzaktiven Proben samt ihrer Präparation (Kap. 3.1) wird der apparative Aufbau der präsentierten fluoreszenzspektroskopischen Experimente erläutert (Kap. 3.2). Fernerhin wird die Datenakquisition und -analyse über die Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD) dargelegt (Kap. 3.3). Schließlich wird die Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion als bildgebende Technik (MFD-Imaging) eingeführt, die im Rahmen dieser Arbeit für einen Teil der vorliegenden Untersuchungen aufgebaut worden ist.

3.1 Proben, Probenpräparation

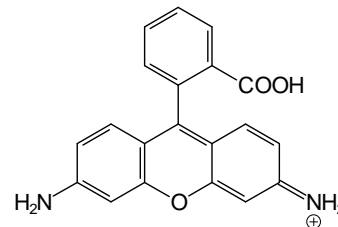
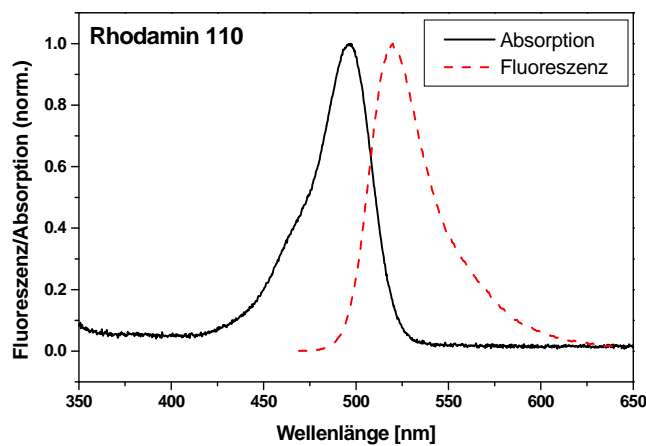
Die biologischen Systeme, welche Gegenstand der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen in den Kapiteln 4, 5 und 6 sind, werden in den entsprechenden Einführungen im Einzelnen vorgestellt. An dieser Stelle werden lediglich die in den Experimenten eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe erläutert. Ferner werden die Präparationen der Proben für die durchgeführten Experimente mit einzelnen Molekülen beschrieben.

3.1.1 Fluoreszenzfarbstoffe

In der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie wird ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis des fluoreszenten Analyten bei langen Beobachtungszeiten angestrebt. Dieses stellt besondere photophysikalische und -chemische Anforderungen an die verwendeten Fluorophore, wie z. B. eine hohe Photostabilität und Fluoreszenz-

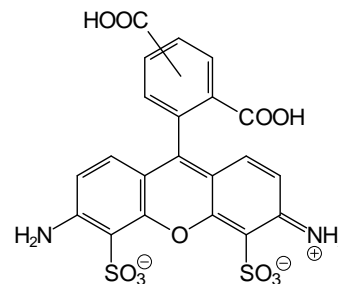
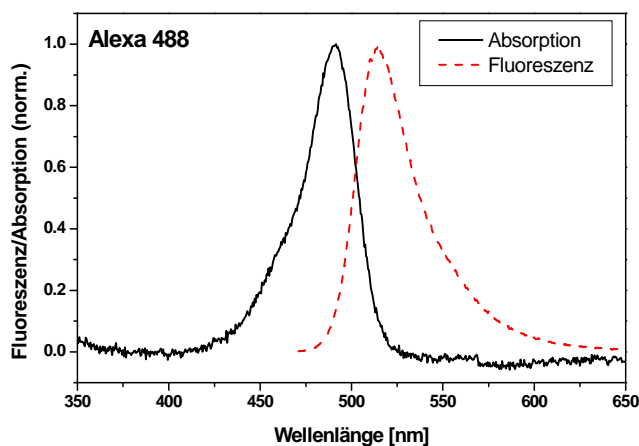
quantenausbeute. Die Auswahl der Farbstoffe wird durch ihre spektralen Eigenschaften eingeschränkt, da diese dem Experiment über eine Anregung mit einer verfügbaren Lichtquelle zugänglich sein sollten. Die verwendeten extrinsischen Farbstoffe werden meist kovalent als N-Hydroxy-Succinimid(NHS)-Ester oder Maleinimid an das Biomolekül gebunden, wobei die Nettoladungen von Fluorophor und Biomolekül gleich sein sollten, um über die Coulomb-Abstoßung direkte Interaktionen zu vermeiden. Die für die vorliegenden Untersuchungen wichtigsten Farbstoffe sowie einige ihrer Eigenschaften sind im Folgenden aufgeführt:

Rhodamin 110 (Evotec, Hamburg)



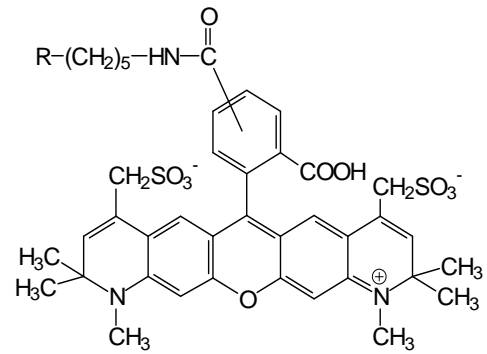
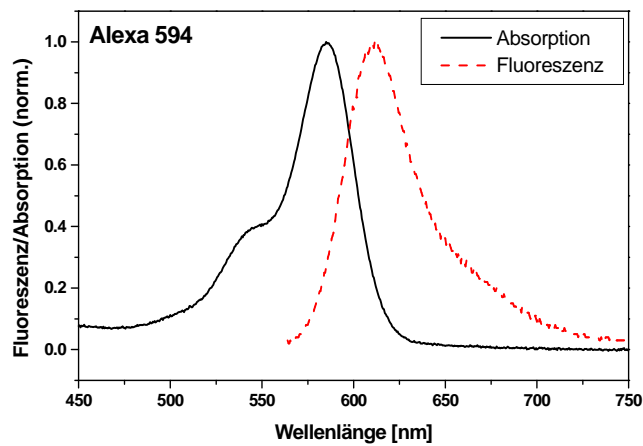
Absorptionsmaximum: 496 nm
 $\epsilon_{496 \text{ nm}}$: 68 000 M⁻¹cm⁻¹
 Fluoreszenzmaximum: 527 nm
 Φ_F : 0.95
 Lösungsmittel: Natriumphosphat-Puffer

Alexa 488 (Molecular Probes Inc., Eugene (OR) USA)



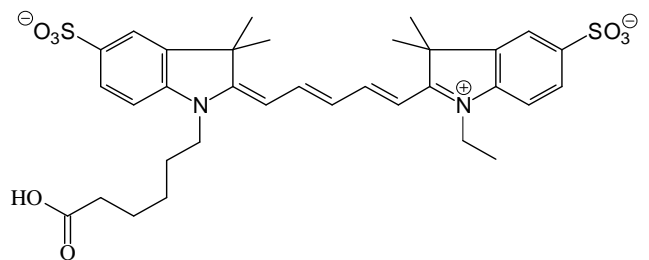
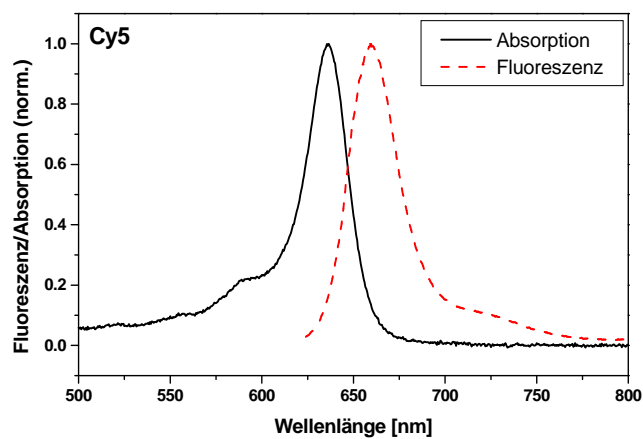
Absorptionsmaximum: 495 nm
 $\epsilon_{495 \text{ nm}}$: 71 000 M⁻¹cm⁻¹
 Fluoreszenzmaximum: 519 nm
 Φ_F : 0.90
 Lösungsmittel: Natriumphosphat-Puffer

Alexa 594 (Molecular Probes)



Absorptionsmaximum: 585 nm
 $\epsilon_{585 \text{ nm}}: 73\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
 Fluoreszenzmaximum: 610 nm
 $\Phi_F: 0.86$
 Lösungsmittel: Natriumphosphat-Puffer

Cyanin 5 (Amersham Biosciences, Freiburg)



Absorptionsmaximum: 649 nm
 $\epsilon_{649 \text{ nm}}: 250\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
 Fluoreszenzmaximum: 670 nm
 $\Phi_F: 0.40$
 Lösungsmittel: Natriumphosphat-Puffer

Für die vorliegenden homo- und hetero-FRET-Experimente sind die in Tabelle 3-1 aufgeführten Donor/Akzeptor-Farbstoffpaare verwendet worden. Das Überlappungsintegral J und der Förster-Abstand R_0 berechnen sich nach den Gleichungen 2-12 bzw. 2-13.

Donor	Akzeptor	J [$10^{-13} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^3$] (454 nm-700 nm)	R_0 [Å]
Alexa 488	Alexa 488	0,62	46,8
Alexa 488	Alexa 594	1,61	54,8
Alexa 488	Cyanin 5	1,66	55,0
Rhodamin 110	Cyanin 5	1,56	49,3
TMR	Cyanin 5	10,5	63,7

Tabelle 3-1: Eingesetzte Donor/Akzeptor-Farbstoffpaare mit angegebenem Überlappungsintegral J und Förster-Abstand R_0 .

3.1.2 Probenpräparation

3.1.2.1 Verwendete Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden in den jeweils höchsten Qualitäts- und Reinheitsstufen erworben:

Aceton (Merck, Darmstadt); Aktivkohle (Merck); Antifade Reagenz (Molecular Probes); L(+)-Ascorbinsäure (Roth, Karlsruhe); Bernsteinsäure (Merck); Dinatriumhydrogenphosphat (Merck); Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Seelze); EDTA (Serva, Heidelberg); Hellmanex (Hellma, Mühlheim); HEPES (Serva); Kaliumchlorid (Merck), Kaliumdihydrogenphosphat (Merck); Kaliumhydroxid (Merck); Magnesiumchlorid Hexahydrat (Sigma-Aldrich); Natriumchlorid (Calbiochem, Bad Soden); Natriumcitrat (Merck); Natriumdihydrogenphosphat (Merck); Natriumhydroxid (Merck); Tricin (AppliChem, Darmstadt); Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (TRIS) (Sigma-Aldrich); Zitronensäure (Merck).

3.1.2.2 Puffer

ATPase-Puffer I:	Bernsteinsäure 20 mM, NaH_2PO_4 5 mM, KOH 0,6 mM, NaOH 1 M, pH 4,7
ATPase-Puffer II:	Tricin 200 mM, NaH_2PO_4 5 mM, KOH 160 mM, NaOH 5 M, pH 8,8
ATPase-Puffer III:	Bernsteinsäure 20 mM, Tricin 20 mM, KCl 0,6 mM, NaOH 5 M, pH 8,0
HEPES-Puffer:	HEPES 25 mM, KCl 100 mM, DTT 1mM, pH 7,4

Hybridisierungs-Puffer:	Natriumcitrat 24 mM, NaCl 360 mM, MgCl ₂ 50 µM, pH 7,0
PBS-Puffer:	Na ₂ HPO ₄ 10,4 mM, KH ₂ PO ₄ 3,2 mM, NaCl 123 mM, pH 7,5
TRIS-Puffer:	TRIS 20 mM, pH 8,0

Die Puffer wurden mit Reinstwasser (Wasseraufbereitungssystem arium 611VF, Sartorius, Göttingen) angesetzt. Um fluoreszierende Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Puffer vor Gebrauch zunächst mit Aktivkohle versetzt und anschließend über Einmal-Filterhalter (0,2 µm Porengröße, Schleicher&Schuell, Dassel) steril filtriert. Der HEPES-Puffer wurde über ein Membran-Filtrationssystem (Porengröße 0,22 µm, GP Express PLUS Membrane, Millipore, Bedford (MA), USA) gereinigt.

3.1.2.3 Einzelne Moleküle in Lösung

Für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen einzelner Moleküle in Lösung wird die konzentrierte Probe erst unmittelbar vor dem Experiment mit einem geeigneten Puffer verdünnt, um eine vorherige eventuelle Dissoziation zu vermeiden. Bei Adsorption der Moleküle auf der Oberfläche wird diese zunächst mit einer höher konzentrierten Lösung bedeckt, um mit den adsorbierten Molekülen eine Absättigung der Oberfläche zu erreichen.

3.1.2.4 Einzelne Moleküle auf Oberflächen

Für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen einzelner Moleküle auf einer Oberfläche muss diese zunächst für eine Reduktion des störenden Hintergrundsignals gereinigt werden. In den vorliegenden Untersuchungen von immobilisierten Molekülen auf Oberflächen sind ausschließlich Deckgläser (Menzel-Gläser #1,5 entsprechend einer Dicke von 170 µm, Menzel, Braunschweig) und Objektträger (Menzel, Braunschweig) verwendet worden, die mit folgender Prozedur im Ultraschallbad gereinigt worden sind (modifiziert nach (Ha 2001)):

1. 30 Minuten bei 35°C in 5%-Lösung Hellmanex
2. 5 Minuten in Reinstwasser
3. 15 Minuten in Aceton
4. 5 Minuten in Reinstwasser

Zwischen den einzelnen Reinigungsschritten wird mit Reinstwasser gespült. Die Aufbewahrung erfolgt ebenfalls in selbigem. Unmittelbar vor ihrer Nutzung werden die Oberflächen in einem Stickstoffstrahl getrocknet. Bei Überprüfung der aufbewahrten gereinigten Oberflächen konnte innerhalb von wenigen Tagen kein signifikanter Anstieg des Hintergrundsignals festgestellt werden.

Für eine Immobilisierung der Proben wird eine stark verdünnte Lösung ($c \approx 10^{-12}$ mol/l) auf die gereinigte Oberfläche gegeben und etwa 20 Minuten stehen gelassen. Über eine nichtspezifische Bindung geht ein Teil der Moleküle an die Oberfläche. Zum Spülen wird Puffer hinzu gegeben und die präparierte Oberfläche vorsichtig aus der Lösung genommen. Das auf diese Weise behandelte Deckglas wird schließlich auf einen gereinigten Objektträger mit Vertiefung gegeben, in der sich Puffer, evtl. mit einer photostabilisierenden Substanz für die Fluorophore, befindet, und möglichst blasenfrei mit Nagellack (Klarlack, Manhattan Cosmetics, Stuttgart) fixiert.

Für einige Messungen sind aktivierte Oberflächen mit spezifischen Silanverbindungen verwendet worden². Über die Behandlung einer gereinigten Oberfläche mit einer Silanverbindung (in diesem Fall APTES) bildet sich ein molekularer Film mit aktiven Gruppen (hier NH_2) auf der Oberfläche, an welche die Probe bindet (Zammatteo 2000).

3.2 Der apparative Aufbau

Dieser Abschnitt erläutert den apparativen Aufbau, mit dem die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt worden sind. Neben dem konfokalen Mikroskop und der Gesamtheit der optischen Bauteile sind die verwendeten Lichtquellen wesentliche Bestandteile des Aufbaus.

3.2.1 Lichtquellen

Als Anregungslichtquellen standen verschiedene Laser zur Verfügung. Je nach verwendeten Fluorophoren kamen folgende Geräte zum Einsatz:

Argon-Ionen-Laser INNOVA Sabre R (Coherent, Dieburg)

Der Argon-Ionen-Laser liefert kontinuierliche Laserstrahlung bei verschiedenen Wellenlängen im sichtbaren (VIS) oder ultravioletten (UV) Bereich. Das Laserlicht ist linear polarisiert. Für einen gepulsten Betrieb ist der Argon-Ionen-Laser mit einem Modenkoppler (APE, Berlin) versehen, der über das Prinzip der aktiven Modenkopplung (Demtröder 1993) gepulste Strahlung erzeugt. Die Pulsfrequenz beträgt 73 MHz bei einer Pulslänge von ca. 200 ps. Für die beschriebenen Experimente sind Anregungswellenlängen von 476,5 nm, 496,5 nm und 514,5 nm verwendet worden.

² Die Präparation der Oberflächen wurde in diesem Fall von Alexander Gaiduk (Institut für Molekulare Physikalische Chemie, HHU, Düsseldorf) übernommen.

Krypton-Ionen-Laser INNOVA Sabre R (Coherent, Dieburg)

Der Krypton-Ionen-Laser liefert kontinuierliche Laserstrahlung bei Wellenlängen vom infraroten (IR) über den sichtbaren (VIS) bis hin zum ultravioletten (UV) Bereich. Das Laserlicht ist linear polarisiert. Für einen gepulsten Betrieb ist der Krypton-Ionen-Laser ebenfalls mit einem Modenkoppler (APE, Berlin) ausgestattet, der gepulste Strahlung erzeugt. Die Pulsfolgefrequenz beträgt 72 MHz bei einer Pulslänge von ca. 200 ps. Für die beschriebenen Experimente ist lediglich die Anregungswellenlänge 568,2 nm im kontinuierlichen Betrieb verwendet worden.

Helium-Neon-Laser LHYP-0201 (Laser 2000, Weßling)

Der Helium-Neon-Laser LHYP-0201 liefert linear polarisierte, kontinuierliche Strahlung der Wellenlänge 594 nm.

Die Strahlungsleistung der drei beschriebenen Laser kann mit verschiedenen OD-Filtern (New Focus, Santa Clara (CA), USA) abgeschwächt werden.

Diodenlasersystem PDL 808 Sepia (Picoquant, Berlin)

Das Diodenlasersystem PDL 808 Sepia besteht im Wesentlichen aus einer Faserkopplungs-Einheit mit drei Diodenlasern: Ein Laserkopf liefert gepulste Strahlung der Wellenlänge 635 nm, ein zweiter gepulste Strahlung der Wellenlänge 470 nm und ein dritter Laserkopf liefert kontinuierliche Strahlung der Wellenlänge 470 nm. Alle drei Laser erzeugen linear polarisiertes Licht. Je nach Bedarf können bis zu drei Laser über eine polarisationserhaltende Monomodens-Faser mit einem achromatischen Auskoppler (Durchmesser 17 mm, Picoquant, Berlin) überlagert werden. Die Diodenlaser werden über ein internes Triggermodul wahlweise mit der Pulsfolgefrequenz 64 MHz oder 50 MHz, bzw. einer durch einen Binärteiler erzeugten Pulsfolgefrequenz (32 MHz, 16 MHz, 8 MHz, 4 MHz, bzw. 25 MHz, 12,5 MHz, 6,3 MHz, 3,1 MHz) betrieben oder einem externen Trigger angeschlossen. Die Pulsbreiten sind abhängig von den Ausgangsleistungen und liegen in der Größenordnung von 70 ps bis 400 ps (Halbwertsbreiten). Für die vorliegenden Experimente sind die gepulsten Wellenlängen 470 nm sowie 635 nm mit unterschiedlichen Pulsfolgefrequenzen verwendet worden. Die Regulierung der Strahlungsleistung erfolgt vor der Einkopplung in die Monomodens-Faser über eine Blende.

Aufgrund der festgelegten Spezifikationen wird angenommen, dass die Strahlung aller eingesetzten Laser im TEM₀₀-Modus vorliegt. Für den am häufigsten verwendeten Argon-Ionen-Laser ist dieses mittels eines Beamprofilers (WinCamD-UCM, GENTEC-EO, Québec, Kanada, Leihgabe von Dr. J. Enderlein, Forschungszentrum Jülich) überprüft worden.

Abbildung 3-1 zeigt die radiale Intensitätsverteilung eines Strahlquerschnitts sowie ihre Anpassung über eine Gauß-Verteilung. Die Zuordnung eines TEM_{00} -Modus ist eindeutig.

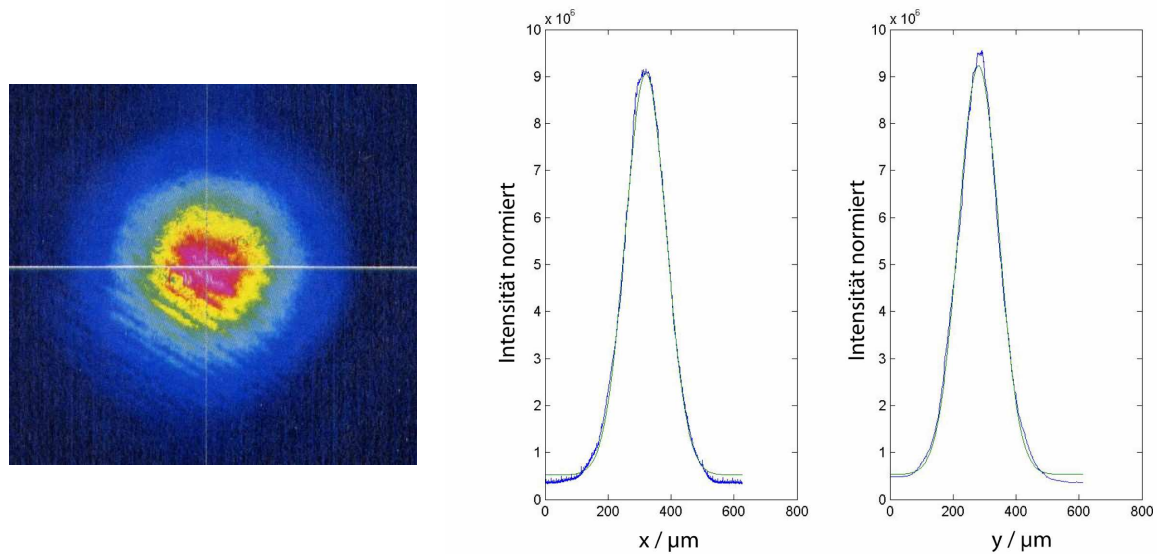


Abbildung 3-1: Links: Überprüfung der radialen Intensitätsverteilung eines Strahlquerschnitts des Argon-Ionen-Lasers INNOVA Sabre R mittels eines Beamprofilers (WinCamD-UCM, GENTEC-EO, Québec, Kanada, Leihgabe von Dr. J. Enderlein, Forschungszentrum Jülich). Die Wellenlänge betrug 496,5 nm, die Pulsfolgefrequenz 73MHz. Rechts: Die Anpassung mit einer Gauß-Verteilung (grün) zeigt die korrekte Zuordnung des TEM_{00} -Modus.

3.2.2 Konfokales Mikroskop

Das Prinzip des konfokalen Mikroskops besteht in einer Epi-Illumination eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur: Anregungs- und Fluoreszenzlicht passieren dasselbe Objektiv. Die hohe numerische Apertur bewirkt eine laterale Begrenzung des Lichtkegels im Fokus von 0,5 - 1 μm . Eine Lochblende in der Bildebene des Mikroskops begrenzt zusätzlich das Anregungsvolumen in axialer Richtung, so dass ein Volumenelement von nur wenigen Femtolitern entsteht. Dieses ist das Detektionsvolumen. Da das Hintergrundsignal, hauptsächlich hervorgerufen durch Raman- und Rayleigh-Streuung (Affleck, Ambrose et al. 1996), proportional zum Detektionsvolumen ist (Mets and Rigler 1994), bietet dieser Aufbau ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, was eine Voraussetzung für die Einzelmolekülspektroskopie ist.

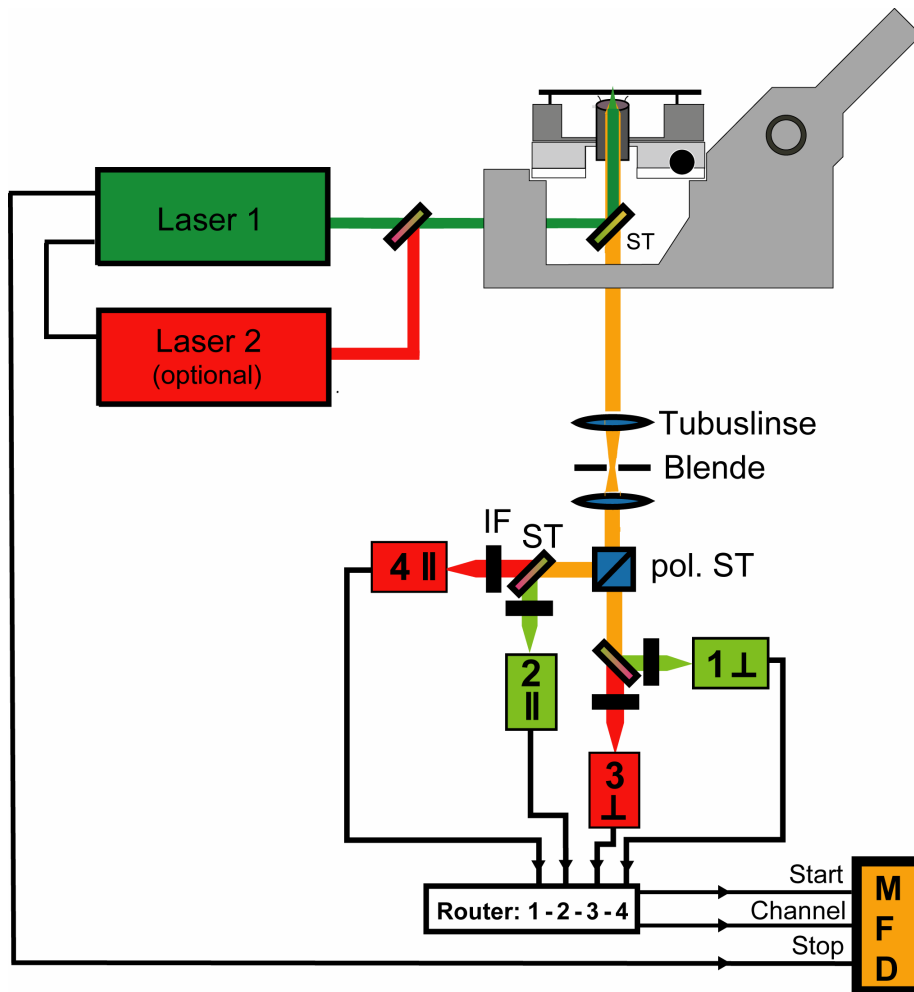


Abbildung 3-2: Schematischer Aufbau des verwendeten epi-illuminierten konfokalen Mikroskops. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Aufbau des epi-illuminierten konfokalen Mikroskops ist schematisch in Abbildung 3-2 dargestellt. Das Anregungslicht wird über einen geeigneten dichroitischen Strahlteiler in das Mikroskopobjektiv eingekoppelt und in die Lösung einer Probe fokussiert. Bei der Diffusion fluoreszenzmarkierter Moleküle durch das offene Anregungsvolumen werden diese zur Fluoreszenz angeregt. Das Fluoreszenzsignal wird wiederum durch das Objektiv gesammelt, passiert den Strahlteiler und wird auf eine Tubuslinse gelenkt, die das Fluoreszenzlicht auf die Bildebene mit der axial begrenzenden Lochblende abbildet. Hinter der Lochblende erfolgt eine Kollimation des Fluoreszenzlichts durch eine weitere Linse. Für die vorliegenden Untersuchungen ist nun das Fluoreszenzlicht nach dem Passieren der Lochblende in folgende Anteile zerlegt worden: Bei erfolgter Anregung mit linear polarisiertem Licht wird das Fluoreszenzlicht zunächst durch einen polarisierenden Strahlteiler (VISHT11, Gsänger, Planegg) in einen parallelen und einen senkrechten Anteil relativ zur Polarisation des Anregungslichts aufgeteilt. Jeder dieser Anteile

kann wiederum über dichroitische Strahlteiler (Q 595 LPXR, AHF, Tübingen) in zwei Wellenlängenbereiche zerlegt werden, so dass vier verschiedene Anteile des Fluoreszenzlichts unterschieden werden können. Die zwei Wellenlängenbereiche werden üblicherweise als grün und rot bezeichnet, da bei FRET-Experimenten häufig der Donor-Farbstoff im grünen Wellenlängenbereich und der Akzeptor-Farbstoff im roten Wellenlängenbereich des optischen Spektrums fluoresziert. Jeder Teilstrahl wird auf die photoaktive Fläche einer der vier Detektoren fokussiert (Single-Photon-Counting Avalanche-Photodioden (APD), EG&G, Vaudreuil, Kanada). Vor den Detektoren befinden sich Sperrfilter, welche das Rayleigh-Streulicht der Anregung und das Raman-Streulicht durch das Lösungsmittel blockieren, während die Fluoreszenz möglichst ungehindert passiert. Detaillierte Beschreibungen zum experimentellen Aufbau finden sich in (Eggeling 1999; Schaffer 2000; Eggeling, Berger et al. 2001; Rothwell, Berger et al. 2003). Die weitere Acquisition der Daten wird in Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

Um auch Untersuchungen an immobilisierten Molekülen auf Oberflächen mit dem oben beschriebenen konfokalen Aufbau durchführen zu können, sind einige apparative Weiterentwicklungen durchgeführt worden. Durch den Einsatz der kleinen Lochblende in der Bildebene des Mikroskops und die damit einhergehende hohe Tiefenschärfe ist der konfokale Aufbau prinzipiell sehr geeignet für Oberflächenbetrachtungen. Das Bild entsteht nun durch die schrittweise Abtastung der Probe in der Ebene senkrecht zur optischen Achse. Man spricht vom konfokalen Scanning. Für die vorliegende Arbeit ist das Scanning über eine piezogesteuerte x-y-Scan-Einheit (Physik Instrumente, Karlsruhe) realisiert worden, welche die Probe relativ zum Objektiv bewegt. Für eine Stabilisierung der z-Ebene wird eine gesonderte Piezo-Einheit (Physik Instrumente) verwendet. Andere Realisierungen der Bildabtastung bewegen den Laserstrahl relativ zur festgehaltenen Probe oder gestalten die Bildabtastung bei festgehaltenem Laserstrahl und festgehaltener Probe durch eine variierende Anordnung von Lichtpunkten, die durch den Lichteinfall auf Lochblenden einer rotierenden Scheibe (Nipkow-Scheibe) entstehen (Frings 2000).

Für eine optimale Auflösung des konfokal aufgenommenen Bildes wird ein beugungsbegrenzter Fokus angestrebt. Infolge der Beugung des Lichts wird eine Lichtpunktquelle nicht als Punkt, sondern an der Begrenzung der Objektivlinse als Lichtscheibchen abgebildet (Bergmann/Schaefer 1993). Sein Durchmesser beträgt näherungsweise $d = 1,22 \lambda / NA$. Die numerische Apertur NA des verwendeten Objektivs bestimmt damit im Wesentlichen die Auflösung des konfokalen Scannings. Voraussetzung ist allerdings eine Überleuchtung des Objektivs mit dem Anregungslicht. Um den

Strahlquerschnitt des Anregungslichts dem jeweils verwendeten Objektiv anzupassen, wird der Laserstrahl vor seiner Einkopplung in das Mikroskop über ein Teleskop, welches aus zwei plankonvexen Linsen besteht, aufgeweitet bzw. gebündelt. Bei Verwendung eines Öl-Immersionsobjektivs, bei dem die Brechungsindizes³ n für das Immersionsmedium Öl ($n = 1,515$) und die Oberflächen, bestehend aus Glas ($n = 1,515$), identisch sind, wird eine so genannte homogene Immersion erzielt, die minimale Beugungsverluste bei der Objektivabbildung bewirkt. In der vorliegenden Arbeit sind die Proben zu ihrer Stabilisation mit wässriger Lösung ($n = 1,333$) auf der Oberfläche bedeckt, was zu geringen Abbildungsfehlern führt. Eine Untersuchung von Molekülen auf einer trockenen Oberfläche führt durch die unterschiedlichen Brechungsindizes der Medien Glas ($n = 1,515$) und Luft ($n = 1,000$; bei 1013 mbar) bereits zu weit größeren Abbildungsfehlern und damit zu einer Verzerrung des Anregungsfokus, so dass hiervon abzuraten ist.

Die für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Objektive mit den angegebenen numerischen Aperturen NA, den zugehörigen Durchmessern d_{Obj} ihrer Eintrittsöffnung, den Auflösungsvermögen A bei einer angenommenen Wellenlänge von $\lambda = 496,5$ nm sowie den verwendeten Lochblenden-durchmessern d_L sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Experiment	Objektiv (Olympus, Hamburg)	$d_{\text{Obj}} / \text{mm}$	A / nm	$d_L / \mu\text{m}$
in Lösung	UPlanApo; 60x; NA 1,2 (Wasserimmersionsobj.)	7,2	505	100
auf Oberflächen	PlanApo; 60x; NA 1,45; TIRF (Ölimmersionsobj.)	8,7	418	50
	PlanApo; 100x; NA 1,4 (Ölimmersionsobj.)	5,0	433	70

Tabelle 3-2: Auflistung der in den vorliegenden Experimenten eingesetzten Objektive mit den angegebenen numerischen Aperturen NA, den Durchmessern ihrer Eintrittsöffnungen d_{Obj} , den maximalen Auflösungsvermögen A bei einer angenommenen Wellenlänge von $\lambda = 496,5$ nm sowie den verwendeten Lochblendendurchmessern d_L (mit freundlicher Unterstützung von Dr. R. Kühnemuth (Institut für Molekulare Physikalische Chemie, HHU, Düsseldorf)).

Um ein Bild der immobilisierten Probe auf der Oberfläche aufnehmen zu können, muss zunächst die optimale Position des Laserfokus auf der Oberfläche gefunden werden. Die

³ Angaben aller Brechungsindizes für 20°C und eine Wellenlänge von $\lambda = 589$ nm.

optimale Auflösung wird experimentell über eine Folge von Bildern einer immobilisierten Probe - aufgenommen in verschiedenen Ebenen - gefunden. Hier empfiehlt sich eine Referenzprobe, die durch ihre intensive Fluoreszenz schnell auf der Oberfläche zu finden ist. So genannte Microspheres (Durchmesser 0,17 μm , Molecular Probes, Eugen (OR), USA) können, lediglich in Wasser verdünnt, auch auf ungereinigten Glasoberflächen bei sehr geringen Anregungsleistungen als Punktquellen angesehen werden. Um nicht für jede neue Probe das Verfahren wiederholen zu müssen, wird ein Rückreflex des Anregungslichtes, der an dem Übergang vom Deckglas zur Probe erscheint, aus dem Mikroskop ausgekoppelt und auf die aktive Fläche einer C-MOS (engl.: „Complementary metal oxide semiconductor“-) Kamera (B-Cam 21 Bw, Conrad, Düsseldorf) gelenkt. Bei gleichen experimentellen Randbedingungen bleibt das Muster des Reflexes unverändert und die optimale Position auf der Oberfläche kann über dieses wieder eingestellt werden. In der Praxis wird über ein zusätzliches Teleskop ein besonders signifikantes Muster eingestellt, das leicht wieder zu erkennen ist. Eine elegantere Lösung wie die Verwendung eines Autofokus, der über die Auskopplung eines Teilstrahls vom Anregungslicht betrieben wird, kann durch die verwendeten geringen Anregungsleistungen beim konfokalen Scanning nicht eingesetzt werden. Hier wäre ein zusätzlicher Justagestrahl die experimentell sinnvollere Lösung. Auch eine automatische Bilderkennungssoftware für die C-MOS-Kamera ist denkbar. Eine automatische Anordnung hätte den Vorteil der stetigen Nachregelung während der Bildabtastung.

Bei Experimenten mit immobilisierten fluoreszenzmarkierten Molekülen ist zu beachten, dass auch die Fluorophore meist nicht mehr frei beweglich sind. Ihre Übergangsdipolmomente sind je nach Probenpräparation mehr oder minder fixiert und auf der Oberfläche statistisch verteilt. Nur Fluorophore mit einer Komponente ihres Absorptionsdipolmoments in Richtung des elektrischen Feldvektors der Anregung besitzen überhaupt eine Wahrscheinlichkeit, über die Absorption eines Photons in den elektronisch angeregten Zustand überzugehen. Die lineare Polarisierung der Laserstrahlung gibt somit eine Vorzugsrichtung der Anregung vor. Daher wird im Allgemeinen eine zirkulare Polarisierung des Laserlichts, erzeugt durch ein $\lambda/4$ -Plättchen (AQWP05M-630, Thorlabs, Karlsfeld), für das konfokale Scanning bevorzugt. Da je nach Anwendung verschiedene Anregungswellenlängen eingesetzt werden, ist hier ein achromatisches Bauteil verwendet worden. Eine zirkulare Polarisierung der Anregung sorgt in der Ebene des konfokalen Scannings für eine gleiche Anregungswahrscheinlichkeit aller Fluorophore.

Um die Fluoreszenz möglichst von dem störenden Raman- und Rayleigh-Streulicht der Anregungsstrahlung zu separieren, müssen geeignete Filter und Strahlteiler ausgewählt werden. Im Vergleich zu den reinen Diffusionsmessungen der Moleküle im Puffer, bei denen lediglich das Raman-Streulicht von Wasser zu berücksichtigen ist, muss beim konfokalen Scanning auf einer Glasoberfläche zusätzlich das Raman-Streulicht des Glases möglichst effektiv geblockt werden. Die verwendeten Filter und Strahlteiler (AHF, Tübingen) sind in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Fluorophor-Paar	$\lambda_{\text{anr}} / \text{nm}$	Strahlteiler	kurzwellige Filter	langwellige Filter
Rhodamin 110 / Cyanin 5	496,5	488/594 PC	HQ 535/50 M	HQ 720/150 M
Alexa 488 / Alexa 594	476,5 (594)	488/594 PC	HQ 533/46 M	HQ 650/75 M
Alexa 488 / Alexa 488	496,5 (470)	488/636 PC 498 DCLP	HQ 533/46 M HQ 533/46 M	-- --

Tabelle 3-3: Verwendete Strahlteiler und Filter (AHF, Tübingen) für die verschiedenen Anwendungen. Für die Auswahl wird das Fluoreszenzspektrum des Fluorophors, die Anregungswellenlänge λ_{anr} und das Raman-Streulicht von Puffer und evtl. von Glas berücksichtigt. Die Anregungswellenlängen in Klammern wurden optional in einem Teil der Experimente verwendet.

3.3 Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD)

Die theoretischen Grundlagen der Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD) sind bereits in Kapitel 2.3 erläutert worden. An dieser Stelle werden die experimentellen Randbedingungen dargelegt.

3.3.1 Experimentelle Erfassung der Daten

Vor den eigentlichen Messungen der fluoreszenzmarkierten Proben muss einmalig die Anregungsleistung festgesetzt werden. Ziel ist ein möglichst hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bei gleichzeitiger Vermeidung einer Photozerstörung der Fluorophore. Es werden daher bei verschiedenen Anregungsleistungen die Zählraten pro Molekül samt ihrer Diffusionszeiten über die FCS bestimmt. Die optimale Anregungsleistung liefert eine maximale Zählrate (maximales Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis) bei noch unverkürzter Diffusionszeit (keine Photozerstörung). Bei der Optimierung der Anregungsleistung für Moleküle, die mit mehreren identischen Fluorophoren markiert sind, muss die

Wahrscheinlichkeit für eine Photozerstörung eines einzelnen Fluorophors miteinbezogen werden. Hier kann trotz einer gleich bleibenden Diffusionszeit bei steigenden Anregungsleistungen ein Teil der Fluorophore bereits zerstört sein.

Nach der sorgfältigen Justage der Apparatur müssen zunächst einige für die weitere Auswertung relevante Parameter experimentell festgelegt werden. Dieses erfolgt über die standardmäßige experimentelle Erfassung folgender Proben (die angegebenen Beispiele gelten für eine Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{anr}} = 496,5 \text{ nm}$) (nach (Schweinberger 2002)):

1. Puffer:

Bestimmung der Gerätefunktion (Halbwertsbreite $\approx 300 \text{ ps}$)

Bestimmung des Hintergrundsignals

Ermittlung des Schwellenkriteriums zur Selektion von Einzelmolekülereignissen

2. grün fluoreszierender Farbstoff (z. B. *Rhodamin 110*)

(Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9} \text{ mol/l}$):

Beurteilung der Güte der Justage

Bestimmung des g-Faktors für den grünen Spektralbereich

3. rot fluoreszierenden Farbstoff (z. B. *Rhodamin 101*)

(Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9} \text{ mol/l}$):

Bestimmung des g-Faktors für den roten Spektralbereich

4. grün fluoreszierender Farbstoff (z. B. *Rhodamin 110*)

(Einzelmolekülmessung, $c \approx 10^{-11} \text{ mol/l}$):

Beurteilung der Güte der Justage

Einmalige Messungen zur Festsetzung zusätzlicher Fluoreszenzparameter:

5. Mit dem jeweiligen Donor-Fluorophor markierte Probe

(Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9} \text{ mol/l}$):

Berechnung des spektralen Crosstalks α (vgl. Kap. 3.3.3)

6. Mit dem jeweiligen Akzeptor-Fluorophor markierte Probe

(Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9} \text{ mol/l}$):

Berechnung der direkten Anregung DE (vgl. Kap. 3.3.3)

Zusätzlich wird optional eine simultane Zweifarben-Anregung der doppelt markierten FRET-Proben durchgeführt.

Die detektierten Photonen werden über eine oder zwei PC-Einsteckkarten (SPC 432 bzw. SPC 132, Becker & Hickl, Berlin) gezählt und abgespeichert. Bei Verwendung von zwei Karten wird die Messung über einen externen Trigger gestartet, damit beide Karten den

gleichen Nullpunkt ihrer Zeitachsen aufweisen. Das Prinzip der Datenaufnahme ist schematisch in Abbildung 3-3 dargestellt. Details finden sich in (Eggeling, Berger et al. 2001). Zu jedem registrierten Photon werden folgende Parameter gespeichert:

1. Die Ereignisnummer $Ev \#$; sie zeigt die Detektionsreihenfolge an.
2. Die Interphotonenzeit Δt ; sie ist definiert als zeitlicher Abstand zum vorhergehend registrierten Photon. Über sie wird die makroskopische Zeitachse definiert. Es ergibt sich aus ihr die Zählrate des Signals.
3. Der zeitliche Abstand $\Delta \tau$ zwischen Anregungspuls und Detektion des Photons; hierüber werden die Abklingzeiten z. B. der Lebensdauer erstellt. Die Messung erfolgt über einen Zeit-zu-Amplitude-Konvertierer (engl.: „Time-to-amplitude converter“, TAC), der im umgekehrten Modus betrieben wird (Brand 1998).
4. Die Kanalnummer $ch \#$; sie gibt den Detektor an, welcher das Photon registriert hat. Über sie werden die Polarisationsrichtung des Photons relativ zum Anregungslicht und der spektrale Bereich festgehalten.

Für nahezu alle folgenden Analysen werden diese unmodifizierten Rohdaten verwendet.

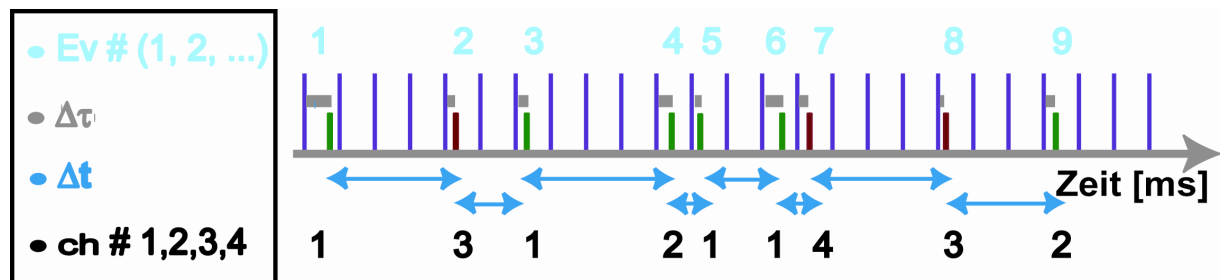


Abbildung 3-3: Prinzip der Datenaufnahme. Zu jedem registrierten Photon (grün/rot) werden vier Parameter gespeichert: Die Ereignisnummer $Ev \#$ (cyan), der zeitliche Abstand Δt zum vorhergehend registrierten Photon (blau), der zeitliche Abstand $\Delta \tau$ zwischen Anregungspuls und Detektion des Photons (grau) sowie die Kanalnummer $ch \#$ (schwarz). Die Laserpulse sind als äquidistante Balken (lila) dargestellt.

Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung, experimentell realisiert durch den Zeit-zu-Amplitude-Konvertierer, ermöglicht eine zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie. Die Akkumulation der Ankunftszeiten $\Delta \tau$ in Zerfallshistogramme erfolgt über eine diskrete Zeitachse, welche im Allgemeinen in 256 Kanäle endlicher Breite aufgeteilt ist. Für Experimente wie die Kurzzeitkorrelation im ns-Bereich steht eine höhere Zeitauflösung von 4096 Kanälen zur Verfügung. Die Kanalbreiten sind abhängig von der Pulsrepetitionsrate des verwendeten Lasers, im Falle des häufig eingesetzten Argon-Ionen-Lasers beträgt diese 73

MHz, d. h. der zeitliche Abstand von zwei aufeinander folgenden Anregungspulsen ist 13,6 ns. Die Breite der 256 Kanäle beträgt hier 49 ps, was zu einem effektivem Messfenster von $T = 12,5$ ns führt. Bei 4096 Kanälen beträgt die Kanalbreite 4,07 ps bei gleichem Messfenster.

3.3.2 Analyse und Darstellung der Daten

Die Identifizierung eines Einzelmolekülereignisses erfolgt über die grafische Auftragung der Interphotonenzeit Δt über die Ereignisse $Ev \#$, wie sie bereits in Abbildung 2-6 A, Kapitel 2.3.2, eingeführt worden ist. Eine zusätzliche Glättung der Kurve wird über eine statistische Mittelung erreicht (Lee-Filter (Enderlein, Robbins et al. 1997)). Als Schwellenkriterium für die Selektion eines Moleküldurchtritts wird eine Interphotonenzeit Δt gewählt, die im Bereich des vierfachen Streuwerts des Hintergrundsignals liegt. Ein weiteres Auswahlkriterium ist die Mindestzahl an Photonen, die einem Einzelmolekülereignis zugeordnet wird (üblicherweise 100 Photonen). Nach der Identifizierung eines Moleküldurchtritts, der diesen Kriterien entspricht, werden alle Photonen zur Bestimmung der Fluoreszenzparameter herangezogen (s. Kap. 2.3.2).

Die aus der Gesamtheit der analysierten Moleküldurchritte hervorgehende Verteilung der Fluoreszenzparameter wird nun in Häufigkeitshistogrammen dargestellt. Um Subpopulationen in einem heterogenen System besser auflösen zu können, werden die Daten einer Messung üblicherweise in zweidimensionalen Histogrammen abgebildet. Dabei werden die eindimensionalen Häufigkeitsverteilungen als Projektionen mit dargelegt. Abbildung 3-4 zeigt eine mögliche Darstellung der analysierten Daten für ein Gemisch der Farbstoffe Rhodamin 110 und Tetramethylrhodamin (TMR) (Schweinberger 2002). Aufgetragen sind die Signale des grünen und des roten Spektralbereichs, S_g und S_r . Die Anregungswellenlänge des Argon-Ionen-Lasers betrug 496,5 nm. Die eindimensionalen Histogramme der beiden Parameter zeigen lediglich undefinierte breite Verteilungen, erst in der zweidimensionalen Darstellung lassen sich deutlich zwei Spezies unterscheiden. Auf die gleiche Weise lassen sich alle bestimmten Fluoreszenzparameter einer Probe zur Identifizierung seiner photophysikalischen und -chemischen Eigenschaften hinzuziehen.

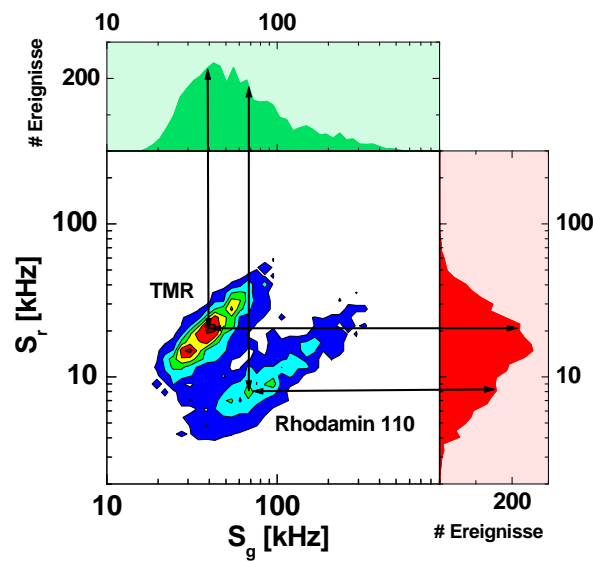


Abbildung 3-4: Zweidimensionale Darstellung der Daten eines Farbstoffgemischs von Rhodamin 110 und TMR. Aufgetragen sind die Signale des grünen und des roten Spektralbereichs, S_g und S_r , zusätzlich sind die Projektionen dargestellt (Schweinberger 2002).

3.3.3 Experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzparameter

Fluoreszenzintensität

Im Allgemeinen werden im Rahmen der fluoreszenzspektroskopischen FRET-Untersuchungen zwei spektrale Bereiche experimentell erfasst; das grüne Signal S_G und das rote Signal S_R . Unter Berücksichtigung der Hintergrundsignale der beiden Spektralbereiche, B_G und B_R , wird die Fluoreszenz des Donor- und des Akzeptor-Fluorophors, $F_G = (S_G - B_G)$ und $F_R = (S_R - B_R)$, bestimmt. Bei Beachtung der unterschiedlichen Detektionseffizienzen für Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz, g_G und g_R , sowie des spektralen Crosstalks, α , können die korrigierten Fluoreszenzintensitäten des Donor- und des Akzeptor-Fluorophors, F_D und F_A , extrahiert werden:

$$F_D = \frac{S_G - B_G}{g_G} = \frac{F_G}{g_G} \quad (\text{Gl. 3 - 1})$$

$$F_A = \frac{(S_R - B_R) - \alpha(S_G - B_G)}{g_R} = \frac{F_R - \alpha F_G}{g_R} \quad (\text{Gl. 3 - 2})$$

Die Zählraten des Hintergrundsignals, B_G und B_R , ergeben sich über die experimentelle Messung des verwendeten Puffers. Sie beinhalten trotz eingesetzter Filter einen verbleibenden Anteil an Raman- und Rayleigh-Streuung sowie die Dunkelzählraten der verwendeten Detektoren (< 100 Hz pro Detektor). Die Detektionseffizienzen, g_G und g_R , setzen sich aus der

Sammeleffizienz des verwendeten Objektivs, den verwendeten optischen Bauteilen im Detektionsstrahlengang und der spezifischen Detektionseffizienz der Detektoren zusammen (Berger 2001). Der spektrale Crosstalk α berücksichtigt einen eventuellen Beitrag der Donor-Fluoreszenz zum Signal S_R in den roten Kanälen:

$$\alpha = \frac{S_{R(Donor)} - B_R}{S_{G(Donor)} - B_G} \quad (\text{Gl. 3 - 3})$$

Da die langwellige Flanke der Fluoreszenzspektren häufig stark verbreitert ist, lässt sich diese spektrale Überlappung der Fluoreszenzbereiche in der Regel nicht vollständig vermeiden.

Für die Bestimmung von intra- und intermolekularen Abständen über FRET wird häufig das Intensitätsverhältnis F_D/F_A herangezogen:

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{g_R F_G}{g_G F_R} = \frac{g_R}{g_G} \frac{S_G - B_G}{(S_R - B_R) - \alpha(S_G - B_G)} \quad (\text{Gl. 3 - 4})$$

Unter Umständen kann ein geringer Anteil der Fluoreszenz im roten Spektralbereich S_R durch eine nicht erwünschte direkte Anregung (engl.: „direct excitation“ = DE) des Akzeptor-Fluorophors hervorgerufen werden. Dieser Anteil lässt sich über eine Messung der Zählrate pro Molekül des Akzeptor-Fluorophors mit der Anregungswellenlänge des Donor-Fluorophors experimentell über eine Korrelation abschätzen und kann dann bei der Bestimmung der korrigierten Akzeptor-Fluoreszenz entsprechend berücksichtigt werden:

$$F_A = \frac{(S_R - (B_R + DE)) - \alpha(S_G - B_G)}{g_R} = \frac{F_R - DE - \alpha F_G}{g_R} \quad (\text{Gl. 3 - 5})$$

Fluoreszenzlebensdauer und Anisotropie

Da ein im konfokalen Mikroskop gemessenes Einzelmolekülereignis je nach Anregungsleistung und Diffusionszeit maximal einige hundert Photonen liefert, kann lediglich eine monoexponentielle Anpassung des entstehenden Fluoreszenz-Zerfallshistogramms nach Gleichung 2-33 vorgenommen werden. Diese erfolgt nach der Methode des Maximum-Likelihood-Schätzers, detaillierte Beschreibungen finden sich in (Köllner 1993; Zander, Sauer et al. 1996; Brand 1998; Schaffer 2000). Eine Ausnahme ist die Fluoreszenz-Lebensdauer des Akzeptor-Fluorophors bei FRET, hier wird lediglich der Mittelwert des Zerfallshistogramms als Lebensdauer definiert.

Die spezie-spezifische Spektroskopie liefert durch die Auswahl multipler Ereignisse (vgl. Kap. 2.3.3) eine signifikante Vergrößerung des Datensatzes, so dass eine Anpassung über mehrere Exponenten möglich wird. Hier erfolgt die Anpassung der Daten an eine

Modellfunktion nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Bevington 1969; Wahl 1979; Schaffer 2000).

Für die Bestimmung von intramolekularen Abständen zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor über FRET ist die Kenntnis des Orientierungsfaktors von entscheidender Bedeutung. Über die Anisotropie, welche mit der Beweglichkeit der Fluorophore verknüpft ist, kann jede gemessene Subpopulation auf Orientierungseffekte hin untersucht werden.

Energietransfereffizienz

Die für Abstandsberechnungen von Donor-Akzeptor-Paaren bedeutsame Energietransfereffizienz E_T wird in der Regel über Intensitätsverhältnisse berechnet (Weiss 2000; Ha 2001). Die MFD mit ihrer simultanen Erfassung unabhängiger Fluoreszenzparameter bietet auf Einzelmolekül-Ebene die Möglichkeit, neben einem Intensitätsverhältnis wie z. B. F_D/F_A auch die Lebensdauer des Donor-Fluorophors in Anwesenheit des Akzeptors, $\tau_{D(A)}$, zur Bestimmung der Energietransfereffizienz heranzuziehen. Es ergeben sich folgende Möglichkeiten der Berechnung des Energietransfers:

$$E_T = 1 - \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_D} \quad \text{und} \quad E_T = \left[1 + \frac{F_D}{F_A} \frac{\Phi_{FA}}{\Phi_{FD}} \right]^{-1} \quad (\text{Gl. 3 - 6})$$

Aus diesen Gleichungen ergibt sich ein Zusammenhang zwischen F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$:

$$\frac{F_D}{F_A} = \frac{\Phi_{FD}}{\Phi_{FA}} \frac{\tau_{D(A)}}{\tau_D - \tau_{D(A)}} \quad (\text{Gl. 3 - 7})$$

Bei einer zweidimensionalen grafischen Darstellung von F_D/F_A über $\tau_{D(A)}$ entspricht dieser mathematische Zusammenhang einer sigmoiden Kurve. Abbildung 3-5 zeigt die Daten von zwei DNA-Duplexen, die mit einem Donor- und einem Akzeptor-Farbstoff im Abstand von 15 bzw. 9 Basenpaaren markiert sind. Durch eine höhere Energietransfereffizienz verringert sich das Intensitätsverhältnis F_D/F_A und die Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Farbstoffs $\tau_{D(A)}$ wird verkürzt. Bei zunehmender FRET-Effizienz, d. h. abnehmendem Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor, verschiebt sich die Population im zweidimensionalen Histogramm auf der sigmoiden Kurve von rechts oben nach links unten. Fluoreszenzlöschungen des Donor- oder des Akzeptor-Fluorophors führen zu Abweichungen von der Kurve. Eine Verbreiterung der Verteilung in horizontaler oder vertikaler Richtung weist auf Schwankungen in den Quantenausbeuten der Fluorophore hin. Fluktuationen im Abstand hingegen haben Auswirkung auf F_D/F_A und auf $\tau_{D(A)}$ und führen zu einer verbreiterten Verteilung entlang der sigmoiden Kurve. Somit lassen sich Abstandsänderungen

klar von Schwankungen, die durch andere photophysikalische und -chemische Prozesse hervorgerufen werden, unterscheiden.

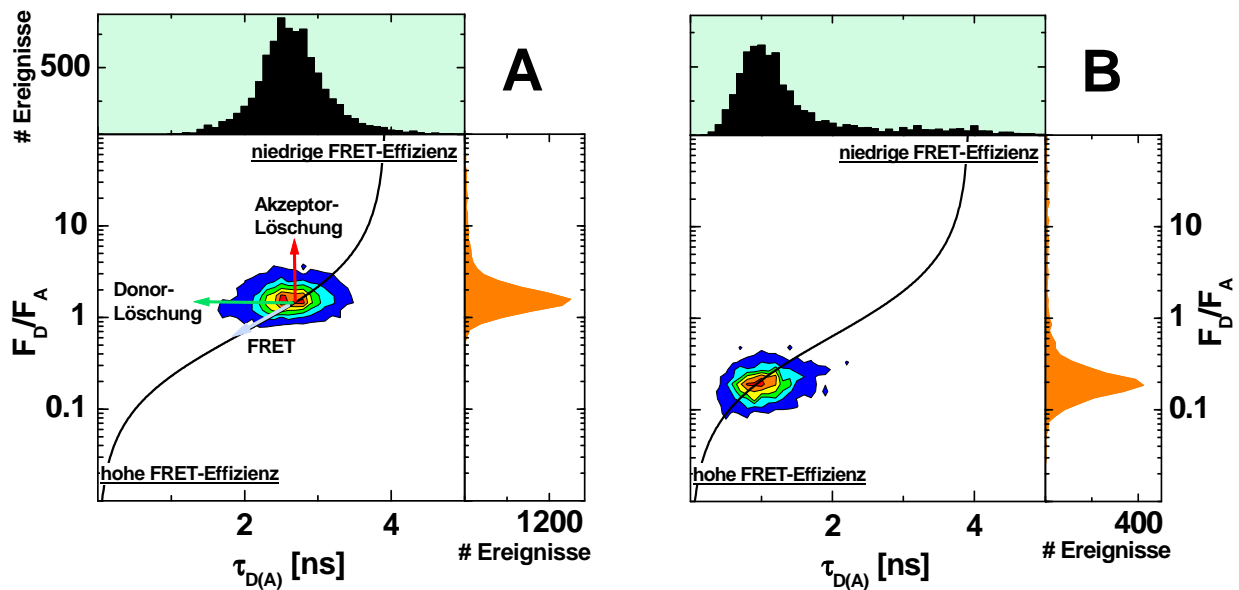


Abbildung 3-5: Daten von zwei DNA-Duplexen, die jeweils mit einem Donor- und einem Akzeptor-Farbstoff im Abstand von 15 (A) bzw. 9 (B) Basenpaaren markiert sind.

3.3.4 Untersuchungen von dynamischen Gleichgewichtsreaktionen

Die MFD ermöglicht Untersuchungen von molekularen Dynamiken über Zeitbereiche, die innerhalb der Durchtrittszeiten der untersuchten Moleküle durch das Detektionssvolumen liegen. Dafür stehen zwei Methoden zur Verfügung, die ganz unterschiedlichen Ansätzen folgen. Die Zeitfensteranalyse zerlegt jedes Einzelmolekülereignis in kleinere Intervalle, um dessen Fluoreszenzparameter zu analysieren. Ihre zeitliche Auflösung ist auf den sub-Millisekunden-Bereich beschränkt. Die speziessensitive FCS hingegen erfasst alle Photonen einer selektierten Subpopulation, um diese gemeinsam zu korrelieren. Die zeitliche Auflösung ist viel höher und erstreckt sich vom Millisekunden- bis in den Nanosekunden-Bereich. Während die Zeitfensteranalyse sich gut zur Visualisierung von Dynamiken eignet, können mit der selektiven FCS die Dynamiken quantifiziert werden.

3.3.4.1 Zeitfensteranalyse

Im Allgemeinen werden innerhalb der MFD die Fluoreszenzparameter über alle Photonen eines selektierten Moleküldurchtritts bestimmt. Damit findet eine Mittelung der Parameter über die Dauer des Moleküldurchtritts durch das Detektionssvolumen statt. Weisen die untersuchten Moleküle innerhalb dieser Durchtrittszeit eine Dynamik auf, werden die Fluoreszenzparameter über mehrere Zustände gemittelt. Über eine Zerlegung des

Moleküldurchtritts in kleinere Zeitfenster definierter Länge und die abermalige Bestimmung der Fluoreszenzparameter für jedes Zeitfenster lassen sich Subzustände identifizieren. Begrenzt wird dieses Verfahren im Wesentlichen durch die Photonenstatistik. Um dieses Problem zu umgehen, kann eine gleitende Zeitfensteranalyse vorgenommen werden, bei der Zeitfenster und Schrittweite unterschiedlich groß sind. Die überlappenden Zeitfenster führen jedoch auch bei diskretem Wechsel zwischen den Zuständen zu scheinbar kontinuierlichen Übergängen (Berger 2001).

3.3.4.2 Speziesselektive Korrelationsanalyse

Die speziesselektive Spektroskopie beinhaltet die Möglichkeit, Daten einer definierten Subpopulation auszuwählen und gemeinsam zu analysieren (vgl. Kap. 2.3.3). So werden z. B. FRET-Ereignisse der klassischen FCS-Analyse zugänglich und es lassen sich FRET-Dynamiken bis in den ns-Bereich feststellen. Da der Energietransfer durch konformationsbedingte dynamische Änderungen des Abstandes zu korrelierten Schwankungen des Donor- und Akzeptor-Signals führt, führt die Dynamik zu einem zusätzlichen Abfall der Autokorrelationsfunktionen des grünen und des roten Signals. Bei einer Kreuzkorrelation beider Signale führen Schwankungen der FRET-Effizienz zu einer Anti-Korrelation. Eine Zunahme der FRET-Effizienz führt zu einer Abnahme des Donor-Signals bei ansteigendem Akzeptor-Signal und umgekehrt. Die Anti-Korrelation führt zu einem Anstieg der Korrelationsfunktion. Diese ist von einer scheinbaren Anti-Korrelation, ausgelöst durch die wellenlängenabhängigen Abbildungseigenschaften des verwendeten Objektivs (chromatischer Effekt), zu unterscheiden (Schweinberger 2002).

3.4 Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion als bildgebende Technik (MFD-Imaging)

Die Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion als bildgebende Technik (MFD-Imaging) unterscheidet sich im Wesentlichen nicht von den bisherigen Ausführungen. Sie verarbeitet Daten von fluoreszenzmarkierten Molekülen, welche nun auf einer Oberfläche immobilisiert sind. Die simultane Erfassung aller Fluoreszenzparameter erfolgt für jedes Pixel des abgetasteten Bildes. Im Folgenden werden die experimentellen Merkmale dargelegt.

3.4.1 Experimentelle Erfassung der Daten

Die experimentelle Erfassung der Daten für das MFD-Imaging folgt im Wesentlichen der in Kapitel 3.3.1 erläuterten Prozedur. Nach der sorgfältigen Justage der Apparatur werden die für die weitere Auswertung relevanten Parameter experimentell festgelegt. Dieses erfolgt

über die standardmäßige experimentelle Erfassung folgender Proben (die angegebenen Beispiele gelten für eine Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 496,5 \text{ nm}$):

1. Puffer oder Reinstwasser, aufgenommen auf der Oberfläche:

Bestimmung der Gerätefunktion

Bestimmung des Hintergrundsignals

2. grün fluoreszierender Farbstoff (z. B. Rhodamin 110) in Lösung

(Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9} \text{ mol/l}$):

Bestimmung des g-Faktors für den grünen Spektralbereich

3. rot fluoreszierender Farbstoff (z. B. Rhodamin 101) in Lösung

(Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9} \text{ mol/l}$):

Bestimmung der g-Faktors für den roten Spektralbereich

4. grün fluoreszierende Probe (z. B. Microspheres) immobilisiert auf einer Oberfläche

(einzelne Teilchen auf der Oberfläche, etwa 1 Teilchen auf $20 \mu\text{m}^2$):

Beurteilung der Güte der Justage

Einmalige Messungen zur Festsetzung zusätzlicher Fluoreszenzparameter:

5. Mit dem jeweiligen Donorfluorophor markierte Probe in Lösung

(Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9} \text{ mol/l}$):

Berechnung des spektralen Crosstalks α (vgl. Kap. 3.3.3)

6. Mit dem jeweiligen Akzeptor-Fluorophor markierte Probe in Lösung

(Ensemblemessung, $c \approx 10^{-9} \text{ mol/l}$):

Berechnung der direkten Anregung DE (vgl. Kap. 3.3.3)

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sind die Moleküle üblicherweise auf Deckplättchen aus Glas immobilisiert und mit Puffer abgedeckt (s. Kap. 3.1.2) worden, daher muss das Rayleigh- und Raman-Streulicht für Wasser und für Glas bei der Wahl der Sperrfilter berücksichtigt werden. Wie auch beim Lösungsmittel sollten Verunreinigungen der Oberfläche vernachlässigbar sein, so dass das Streulicht im Wesentlichen vom verwendeten Material abhängt. Abbildung 3-6 zeigt einen Vergleich der Hintergrundsignale, aufgenommen in Reinstwasser bzw. auf der Glasoberfläche. Die Anregungswellenlänge betrug $476,5 \text{ nm}$, die Anregung war zirkular polarisiert. Die Signale der beiden grünen Kanäle wurden zusammengefasst. Die Halbwertsbreite des Hintergrundsignals, aufgenommen mit dem Fokus auf der Oberfläche, beträgt 1274 ps (26 Kanäle) gegenüber 417 ps (8,5 Kanäle) in der Lösung. Die Oberfläche liefert demnach nicht nur ein durch zusätzliches Raman-Streulicht erhöhtes,

sondern auch ein deutlich verbreitertes Hintergrundsignal. Hierfür ist eine Lumineszenz des Glases verantwortlich, verursacht z. B. durch erzeugte Farbzentren bei Lasereinstrahlung.

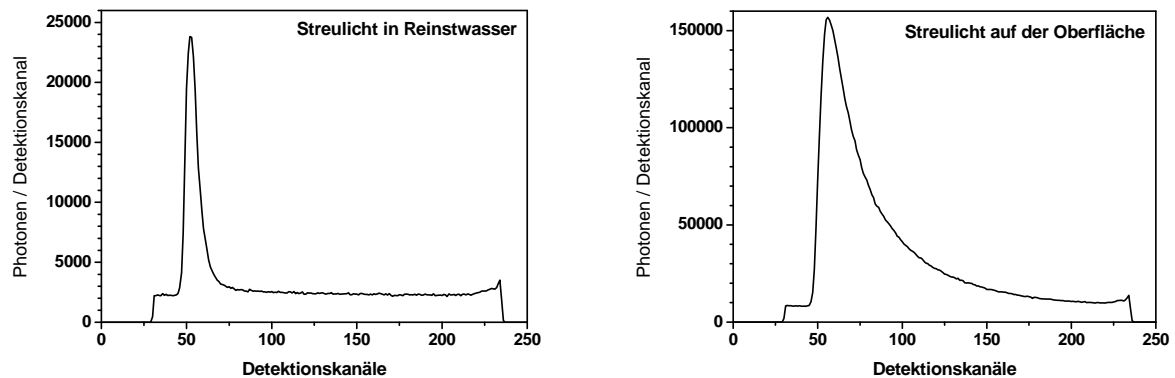


Abbildung 3-6: Vergleich des Streulichts, aufgenommen in Reinstwasser und direkt auf der Glasoberfläche. Die Halbwertsbreite des aufgenommenen Streulichts in Lösung beträgt 417 ps (8,5 Kanäle) gegenüber 1274 ps (26 Kanäle) auf der Oberfläche. Die Anregungswellenlänge betrug 476,5 nm, die Anregung war zirkular polarisiert. Die Signale der beiden grünen Kanäle wurden zusammengefasst.

Eine Reduktion des Hintergrundsignals auf der Oberfläche kann durch den Einsatz von Quarz (Dicke #2 entsprechend einer Dicke von 200 μm , SPI, West Chester (PA), USA) statt Glas erzielt werden. Ein Vergleich der Hintergrundsignale von Reinstwasser auf gereinigten Oberflächen aus Glas und Quarz ist in Abbildung 3-7 dargestellt. Die Anregungswellenlänge betrug 496,5 nm, das Licht war zirkular polarisiert. Die Signale der beiden grünen bzw. roten Kanäle wurden zusammengefasst. Das Hintergrundsignal wurde über das konfokale Scanning aufgenommen und über eine Fläche von 36 μm^2 gemittelt. Im Vergleich zu Glas ist das Hintergrundsignal von Quarz nahezu um eine Größenordnung vermindert. Bei Betrachtung der Halbwertsbreiten des Streulichts ist jene auf Quarz viel geringer als die auf Glas. Vielmehr entspricht das Streulicht von Quarz demjenigen aufgenommen in Wasser (ohne Abbildung). Der verminderte Hintergrund des Quarzes im Vergleich zur Glasoberfläche kann auf die fehlende Lumineszenz des Quarzes zurückgeführt werden.

Das Streulicht des Hintergrundes liefert bei Verwendung sehr geringer Anregungsleistungen auch beim Einsatz von Glasoberflächen einen sehr geringen, absoluten Beitrag zum Fluoreszenzsignal. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sind diese daher trotz der aufgewiesenen Vorteile des Quarzes auf Glasoberflächen vorgenommen worden.

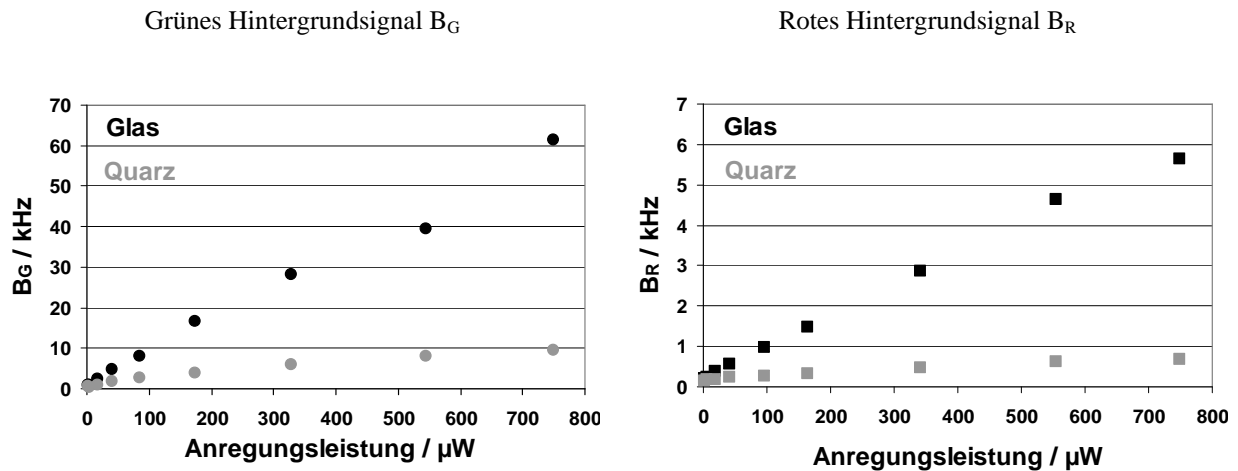


Abbildung 3-7: Hintergrundsignal von Reinstwasser gemessen auf gereinigten Oberflächen aus Glas und Quarz. Links das grüne Hintergrundsignal B_G , rechts das rote Hintergrundsignal B_R . Die Anregungswellenlänge betrug 496,5 nm, die Anregung war zirkular polarisiert. Die Hintergrundsignalraten wurden über das konfokale Scanning aufgenommen und über eine Fläche von $36 \mu\text{m}^2$ gemittelt.

Die Winkelverteilung der Fluoreszenz von einzelnen immobilisierten Emittern auf einer Oberfläche unterscheidet sich wesentlich von derjenigen in wässrigen Lösungen (Macklin 1996; Lerner 1998). Für letztere sind Objektive mit einer numerischen Apertur (NA) bis zu einem Wert von 1,33 (entsprechend dem Brechungsindex von Wasser) sinnvoll. Um einen möglichst großen Anteil der emittierten Fluoreszenz der untersuchten Systeme auf einer Glasoberfläche zu sammeln, werden im Allgemeinen Objektive mit einer höheren numerischen Apertur für die Untersuchungen an Grenzflächen eingesetzt ($NA > 1,33$). In dem Fall einer isotropen Orientierung der Dipolmomente wird bei der Detektion der Fluoreszenz von Fluorophoren auf einer Glasoberfläche folgende ungleiche Winkelverteilung der Fluoreszenz beobachtet: Der Grossteil der Fluoreszenz (72%) wird in Richtung des Glases emittiert, während ein vergleichsweise geringer Anteil (28%) in die wässrige Lösung emittiert wird (Ruckstuhl 2000). Ein signifikanter Anteil der Fluoreszenz, detektiert durch das Glas, wird außerhalb des Winkels der totalen internen Reflexion detektiert. Diese Fluoreszenz wird als „verbotenes Licht“ bezeichnet (Novotny 1997). Ihr Anteil nimmt mit dem Abstand der Moleküle zur Oberfläche um $\lambda/6$ ab. Dieses bedeutet, dass bei einer Anregung im sichtbaren Bereich des Energiespektrums das verbotene Licht hauptsächlich von Molekülen verursacht wird, die einen geringeren Abstand als etwa 100 nm zur Oberfläche besitzen. Objektive mit numerischen Aperturen größer 1,33 sammeln einen Teil des verbotenen Lichts. Die maximal erreichbare Effizienz der Fluoreszenz-Detektion beträgt für ein Objektiv mit $NA = 1,4$ etwa 44%; es wird in diesem Fall etwa 43% des verbotenen Lichts gesammelt (Ruckstuhl 2000).

3.4.2 Analyse und Darstellung der Daten

Das konfokale Scanning wird über das Visual C⁺⁺-basierte Programm gi-scan2 (Sandhagen 2005) gesteuert. Während der Abtastung steuert das Programm zu Beginn jedes neuen Pixels und zu Anfang jeder neuen Zeile Pulsgeneratoren an. Diese erzeugen Puls-Pakete mit einer Dauer von 0,2 ms, welche den Signalen der verwendeten Detektoren ähnlich sind. Sie werden als virtuelle Photonen gehandhabt und über die PC-Einsteckkarten zusätzlich zu den echten Photonen gespeichert. Über die virtuellen Photonen wird die Zuordnung der experimentellen Photonen zu den entsprechenden Pixeln der Abtastung vorgenommen.

Für die Aufnahme eines Bildes wird ein festzulegender Abtast-Bereich in definierten Schritten mit variabler Aufenthaltsdauer, im Folgenden auch Integrationszeit genannt, abgetastet. Abtast-Bereich, Schrittweite und Integrationszeit werden vor der Erzeugung des Bildes über folgende Parameter festgelegt: Anzahl der Pixel in horizontaler und vertikaler Richtung (maximal 200 Pixel x 200 Pixel, entsprechend maximal 97,19 μm x 97,19 μm), Schrittweite $n*s$ als diskrete vielfache Werte $n = \{1, 2, \dots, 20\}$ von $s = 24$ nm, Integrationszeit $i = \{2$ ms, 3 ms, ..., 1000 ms}. Das Anregungslicht des Lasers wird ausschließlich für die Dauer der Abtastung auf die Probe durchgelassen, um eine unnötige Photozerstörung der Fluorophore zu vermeiden. Beim Start der Abtastung wird das Anregungslicht automatisch freigegeben und bei Beendigung über einen externen Laserverschluss wiederum blockiert. Bereits während der laufenden Abtastung werden die erfassten Daten als Intensitäten in einem Bild dargestellt. Parallel geschieht optional eine Erfassung der Daten über zwei PC-Karten. Damit gelingt die simultane Erfassung aller Fluoreszenzparameter für jedes Pixel. Die Analyse und Darstellung der erfassten Daten des MFD-Imagings geschieht nun über das Labview-basierte Programm Marcelle (Kudryavtsev 2003). Für jedes Pixel werden die Intensitäten der vier Detektionseinheiten dargestellt, ferner können Fluoreszenzparameter wie Lebensdauern und, bei linear polarisierter Anregung, Anisotropien angepasst werden. Selbst eine Korrelation der Daten eines Pixels kann vorgenommen werden. Abbildung 3-8 zeigt zwei Darstellungen des gleichen Bildausschnitts von immobilisierten Systemen (Liposomen mit fluoreszenzmarkierten SNARE-Proteinen, die zu einem Teil FRET zeigen, Farbstoffpaar Alexa 488/Alexa 594; Näheres folgt in Kapitel 5) auf einer Glasoberfläche, aufgenommen über das konfokale Scanning. Links sind die Gesamtintensitäten ($S_g + S_r$), rechts die angepassten Lebensdauern τ dargestellt. Die Anregungswellenlänge betrug 476,5 nm, die Leistungsdichte 2,3 kW/cm². Die Lebensdauern einiger immobilisierter Systeme sind gelöscht. Die Visualisierung der Fluoreszenzlebensdauern stimmt mit der bekannten Methode

FLIM (engl.: „Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy“) überein (Lakowicz 1994; Szmecinski 1994).

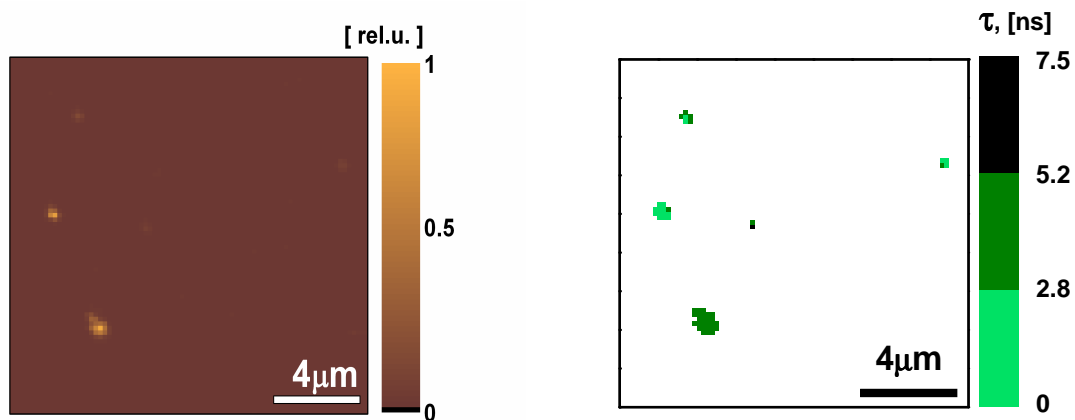


Abbildung 3-8: Immobilisierte Liposomen (mit fluoreszenzmarkierten SNARE-Proteinen, die zu einem Teil FRET zeigen, Farbstoffpaar Alexa 488/Alexa 594) auf einer Glasoberfläche, aufgenommen über das konfokale Scanning (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Leistungsdichte 2,3 kW/cm²). Links sind die Gesamt-Intensitäten ($S_g + S_r$), rechts die angepassten Lebensdauern τ des grünen Spektralbereichs dargestellt (Minimum 1000 Photonen pro Pixel).

Neben der pixelweisen Erfassung und Analyse der experimentellen Daten im bildgebenden Verfahren ist für die vorliegende Arbeit die Erfassung von Daten ausgewählter Moleküle auf der Oberfläche mit definierten Fluoreszenzeigenschaften von besonderem Interesse. Nach der Erzeugung des Bildes von Molekülen auf einer Oberfläche wird ein Molekül nach seinen Fluoreszenzeigenschaften ausgewählt. Über das Steuerprogramm giscan2 lässt sich jedes Pixel auswählen und so positionieren, dass der Fokus der Anregung mit diesem übereinstimmt. Mit der manuellen Freigabe des Anregungslichts über den externen Laserverschluss wird das ausgewählte Molekül zur Fluoreszenz angeregt, und die Daten werden wiederum anhand der MFD über die Zeit erfasst. Man erhält so genannte Intensitätsspuren, die sich in dem Labview-basierten Programm ViewMCS (Kudryavtsev 2003) darstellen lassen. Auch hier können wiederum alle Fluoreszenzparameter wie Lebensdauer und Anisotropie, für die gesamte Spur oder für ausgewählte Teile, bestimmt werden. Abbildung 3-9 zeigt die Intensitätsspur eines einzelnen DNA-Doppelstrangs, der mit dem Farbstoff Alexa 488 fluoreszenzmarkiert und auf einer Glasoberfläche immobilisiert worden ist. Die Anregungswellenlänge betrug 476,5 nm bei einer Leistungsdichte von 1,0 kW/cm². Nach der Positionierung des Moleküls im Fokus wird das Anregungslicht zum

Zeitpunkt $t = 3,7$ s freigegeben. Nach etwa 1,5 Sekunden findet eine Photozerstörung des Fluorophors statt und das Signal wird nur noch durch den Hintergrund bestimmt. Es lassen sich über dieses Vorgehen detaillierte Informationen über ein definiertes Molekül erzielen. Bei einer genaueren Betrachtung ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal nach 0,9 s auf das Niveau des Hintergrundsignals abfällt, um nach einigen 100 ms wieder auf das ursprüngliche Niveau zurückzukehren. Dieses häufig beobachtete Phänomen wird als "Blinken" bezeichnet. Der Fluorophor geht in einen Dunkelzustand über, in dem er dem Anregungszyklus nicht mehr zugänglich ist. Dieser nicht-fluoreszente Zustand kann bis zu einige Sekunden andauern, bevor der Fluorophor wieder aktiv ist. Dieses Phänomen ist für Fluorophore auf Oberflächen bekannt, aber noch nicht hinreichend aufgeklärt.

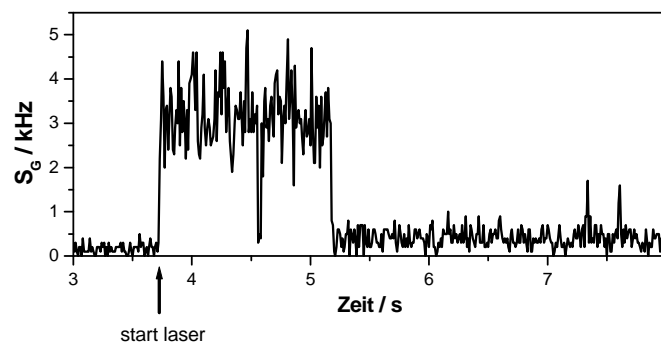


Abbildung 3-9: Intensitätsspur eines einzelnen Fluorophors auf einer Glasoberfläche (DNA-Duplex, markiert mit Alexa 488). Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

3.4.3 Experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzparameter

Die MFD als bildgebendes Verfahren unterscheidet sich nicht wesentlich von der MFD in diffusionsbestimmten Experimenten. Es existieren lediglich geringe Unterschiede bei der experimentellen Anpassung der Fluoreszenzparameter, die im Folgenden dargelegt werden.

Intensität:

Es werden im Allgemeinen wiederum zwei spektrale Bereiche erfasst. Wie bereits angedeutet ergibt sich durch das zusätzliche Rayleigh- und Raman-Streulicht an der Oberfläche ein erhöhtes Hintergrundsignal. Zuweilen lässt sich auch bei einer kurzwelligeren Anregung ein erhöhtes Signal in den längerwelligen Kanälen detektieren, welches durch die Lumineszenz der Glasoberfläche hervorgerufen wird. Da ein solcher Beitrag für die Bestimmung von FRET-Effizienzen hinderlich ist, empfiehlt sich für diese Experimente eine Immobilisierung der FRET-Moleküle auf Quarz-Oberflächen, die insgesamt ein viel geringeres Hintergrundsignal aufweisen.

- *Lebensdauer*

Der erhöhte Hintergrund auf Glasoberflächen wird in der Auswertung der zeitkorrelierten Fluoreszenzdaten berücksichtigt. Zunächst wird das Hintergrundsignal von der Gesamtintensität abgezogen, bevor die Anpassung unter Einbeziehung der Gerätefunktion stattfindet.

- *Anisotropie*

Die Fluorophore sind bei einer Immobilisierung der Moleküle auf einer Oberfläche nur eingeschränkt beweglich und ihre Übergangsdipolmomente statistisch auf der Oberfläche verteilt. Bei mehr oder minder fixierten Absorptionsübergangsdipolmomenten besitzen die Fluorophore jedoch bei linear polarisierter Anregung eine ungleich verteilte Anregungswahrscheinlichkeit. Ebenso ist die Detektionswahrscheinlichkeit durch die Position des Emissionsdipolmoments festgelegt. Da die Orientierungen der Fluorophore im Allgemeinen nicht bekannt sind, lassen sich auf Oberflächen keine eindeutigen Aussagen über die Anisotropie treffen. Daher wird in der Praxis häufig auf diese Information verzichtet und statt einer linear polarisierten eine zirkular polarisierte Anregungsstrahlung eingesetzt. Sie birgt den Vorteil, dass alle Fluorophore in der Ebene senkrecht zur optischen Achse mit gleicher Wahrscheinlichkeit erfasst werden.

- *Energietransfereffizienz*

Die statistische Verteilung der Übergangsdipolmomente auf einer Oberfläche, welche durch die Positionen der als eingeschränkt beweglich angenommen Fluorophore vorgegeben werden, sorgt für eine erschwerte Analyse der FRET-Parameter. Die ungleichen Anregungs- und Detektions-Wahrscheinlichkeiten der Dipolmomente beeinflussen quantitativ die Energietransfer-Effizienz. Für die Bestimmung von FRET-Abständen muss zusätzlich der Orientierungsfaktor bekannt sein; die in Lösung übliche Mittelung aller Orientierungen der Übergangsdipolmomente über den gesamten Raum ist für Oberflächen hinfällig.

3.4.4 Quantitative Bestimmung der Anzahl von Fluorophoren

Bei Untersuchungen immobilisierter Moleküle auf einer Oberfläche ist zunächst eine der grundlegenden Fragen, ob es sich hierbei um einzelne Moleküle handelt. Da die Größe der untersuchten Biomoleküle im Allgemeinen unterhalb des Auflösungsvermögens liegt, kann auch bei einer beugungslimitierten Aufnahme der Daten von einem einzelnen Pixel in einem Bild nicht direkt auf ein einzelnes Molekül auf der Oberfläche geschlossen werden. Auch gibt es häufig keine Erkenntnisse über das Verhalten der Biomoleküle in den geringen Konzentrationen, die für die Einzelmolekülspektroskopie verwendet werden und weit

unterhalb der nativen Bedingungen liegen. Ferner ist die Wechselwirkung von Biomolekül und Oberfläche meist unbekannt. Eine Aggregatbildung auf der Oberfläche kann daher im Allgemeinen nicht ausgeschlossen werden. Um der Frage nach der Anzahl der immobilisierten Moleküle nachzugehen, können verschiedene Ansätze verfolgt werden.

Bei einer Weitfeldbeleuchtung und dem Einsatz einer CCD-Kamera ist eine sehr einfache Methode zur Visualisierung der einzelnen Moleküle auf einer Oberfläche das defokussierte Imaging, bei der durch eine beabsichtigte Unschärfe des aufgenommenen Bildes die dreidimensionale Orientierung einzelner Emissionsdipolmomente direkt sichtbar gemacht wird (Patra, Gregor et al. 2004; Schroeyers 2004). Die Unschärfe kann über den Zusatz einer Aberration, die Aufnahme der Fluoreszenz durch eine Bertrand-Linse oder eine definierte Defokussierung erzielt werden.

Für das konfokale Scanning, welches experimentell über die MFD mit einer zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung realisiert wird, kann die Überprüfung, ob einzelne Fluorophore auf der Oberfläche immobilisiert sind, über die Auszählung koinzidenter Photonen bestimmt werden (vgl. Abschnitt 2.3.1.2). Bei Experimenten auf Oberflächen sollte jedoch die eingeschränkte Beweglichkeit der Fluorophore mit in Betracht gezogen werden, durch die eine gleichwertige Betrachtung aller Fluorophore nicht immer gerechtfertigt ist. Statt einer Korrelation im Kurzzeitbereich und der Anpassung des Antibunching-Terms, welches durch die geringe Photonenzahl eines einzelnen Fluorophors ein anspruchsvolles Anliegen ist, kann in ähnlicher Form über die Betrachtung der Interphoton-Zeiten eine Aussage über die Anzahl der unabhängigen Emitter getroffen werden (vgl. Abschnitt 2.3.1.2). Da auch hier die Zahlen koinzidenter Photonen in den vorliegenden Untersuchungen nicht ausreichend waren, konnten mit beiden Methoden keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt werden.

Eine in den vorliegenden Untersuchungen erfolgreich angewandte Methode zur Bestimmung der Anzahl unabhängiger Emitter eines immobilisierten Systems, ist die sukzessive Photozerstörung der Fluorophore. Bei Betrachtung der Fluoreszenz über die Zeit liefert ein Fluorophor eines immobilisierten, sich im Fokus befindenden Systems ein weitgehend konstantes Signal, bis der Fluorophor schließlich ausbleicht (Ambrose, Goodwin et al. 1994). Zum Zeitpunkt der Photozerstörung fällt das Fluoreszenzsignal abrupt ab, und es bleibt lediglich das Hintergrundsignal. Es entsteht eine Stufe in der Intensitätsspur, wie sie in Abbildung 3-9 zu beobachten ist. Bei einem System mit mehreren Emittoren entstehen mehrere Stufen in der Intensitätsspur. Das manuelle Zählen von Stufen ist bei bis zu etwa vier ausbleichenden Fluorophoren möglich. In Abbildung 3-10 ist eine Intensitätsspur mit vier

Stufen, d. h. mit vier sukzessiv ausbleichenden Fluorophoren, dargestellt. Es handelt sich hierbei um das modifizierte Protein Lektin B, welches mit dem gelb fluoreszierenden Protein eYFP (engl.: „enhanced Yellow Fluorescent Protein“; Näheres folgt in Kapitel 4) fluoreszenzmarkiert wurde (Denis Tielker, Forschungszentrum Jülich, Jülich). Das Protein liegt als Homotetramer vor, d. h. es besteht aus vier identischen Untereinheiten, wobei jedes ein eYFP trägt (Tielker 2005; Tielker 2005). Die Intensitätsspur zeigt die Photozerstörung der vier Fluorophore. Die Anregungswellenlänge betrug 476,5 nm, die Leistungsdichte 2,3 kW/cm².

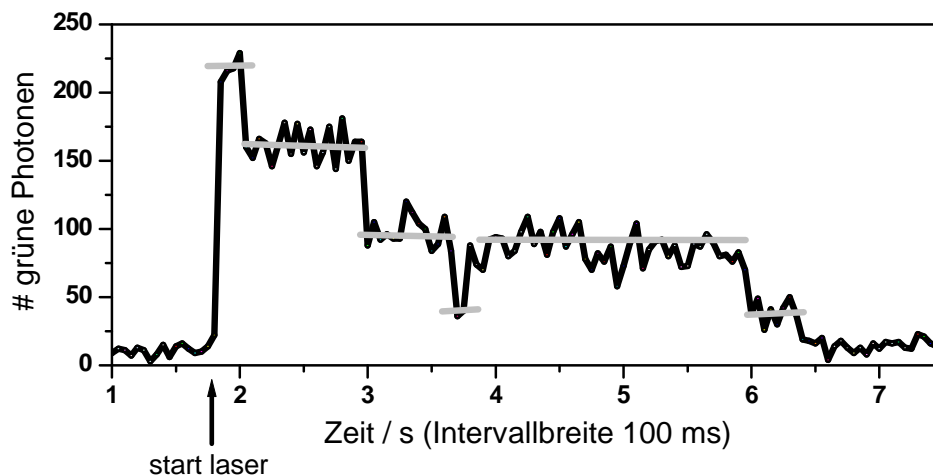


Abbildung 3-10: Intensitätsspur des modifizierten Proteins Lektin B, das mit dem gelb fluoreszierenden Protein eYFP exprimiert wurde und über die Bindung des Zuckers Fucose ein Tetramer mit vier Fluoreszenzmarkierungen bildet. Die Photozerstörung der vier Einheiten ist zu beobachten (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Leistungsdichte 2,3 kW/cm²).

Untersuchungen von immobilisierten Systemen, die eine höhere Anzahl an ausbleichenden Emittlern aufweisen, zeigen Intensitätsspur, bei denen eine sehr schnelle Abnahme der Intensität zu beobachten ist, wobei einzelne Niveaus nicht mehr zu unterscheiden sind. Lediglich die letzten ausbleichenden Fluorophore lassen sich in der Intensitätsspur über unterscheidbare Niveaus identifizieren. Bei den verwendeten geringen Anregungsleistungen kann eine Zwei-Photonen-Anregung ausgeschlossen werden, daher ist die Wahrscheinlichkeit der Photozerstörung für einen Fluorophor proportional zur Anregungsleistung. Für möglichst lange Beobachtungsdauern werden in der Praxis so geringe Leistungen eingestellt, dass die einzelnen Intensitätsstufen eben noch klar unterschieden werden können.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine Methode entwickelt, welche die Anzahl der Fluorophore in einem System bestimmt. Auf der Grundlage der sukzessiven

Photozerstörung und der Annahme, dass die Fluorophore innerhalb eines Systems die gleiche Intensität aufweisen, ist ein Algorithmus zur Bestimmung der Anzahl der photozerstörten Fluorophore in einer Intensitätsspur, wie sie in Abbildung 3-10 dargestellt ist, entwickelt worden. Für die Bestimmung müssen das Hintergrundsignal und das Signal des als letzter übrig gebliebenen Fluorophors als Poisson-Verteilung bekannt sein. Diese werden über die Erstellung von Histogrammen über die Fluoreszenzsignale der identifizierten Spurenabschnitte und eine entsprechende Anpassung mit einer Poisson-Verteilung gewonnen. Sie gibt nun die Wahrscheinlichkeitsverteilung für das Signal des Hintergrundes (B) bzw. eines einzelnen Fluorophors an. Über eine mathematische Entfaltung der beiden Verteilungen wird zunächst die Wahrscheinlichkeitsverteilung für das Fluoreszenzsignal des Fluorophors ohne Hintergrund ($n = 1$) extrahiert. Eine Faltung dieses Fluoreszenzsignals mit sich selbst liefert für das untersuchte System die Wahrscheinlichkeitsverteilung für das zu erwartende Fluoreszenzsignal von zwei Fluorophoren (Abb. 3-11, $n = 2$). Durch weitere Faltungen werden die Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die Fluoreszenzsignale von n Fluorophoren erzielt (Abb. 3-11, $n = \{3, 4, 5, \dots, m\}$) (Schmidt, Schütz et al. 1996; Prummer, Hübner et al. 2000). In Abbildung 3-11 sind die Poisson-Verteilungen der Intensitäten für die Fluoreszenz eines immobilisierten Systems aufgezeigt (Liposomen mit drei fluoreszenzmarkierten Synaptobrevin (Alexa 488), Näheres folgt in Kapitel 5).

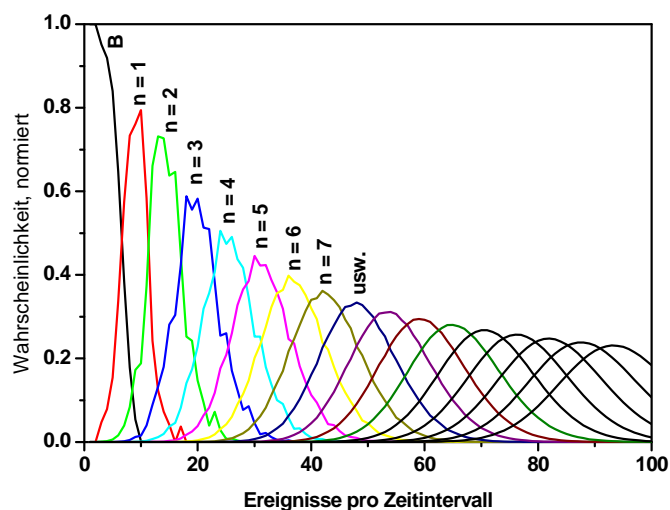


Abbildung 3-11: Berechnete Poisson-Verteilungen für die Intensitäten von n Fluorophoren ($n = \{1, 2, 3, \dots\}$). Es müssen das Hintergrundsignal und das Signal des als letzter übrig gebliebenen Fluorophors als Poisson-Verteilung bekannt sein. Über eine mathematische Entfaltung wird das Fluoreszenzsignal des Fluorophors ohne Hintergrund extrahiert. Eine Faltung dieses Fluoreszenzsignals mit sich selbst liefert für das untersuchte System die Wahrscheinlichkeitsverteilung für das zu erwartende Fluoreszenzsignal von zwei Fluorophoren. Durch weitere Faltungen werden die Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die Fluoreszenzsignale von n Fluorophoren erzielt (Schmidt, Schütz et al. 1996; Prummer, Hübner et al. 2000). (Verwendete Probe: Liposomen mit drei fluoreszenzmarkierten Synaptobrevin (Alexa 488)).

Ein Algorithmus überprüft nun die experimentell detektierte Intensitätsspur. Sie wird zunächst in kleine Zeitintervalle (typischerweise $250 \mu\text{s}$) aufgeteilt. Den Intensitäten der einzelnen Zeiteinheiten werden die Wahrscheinlichkeiten zugewiesen, dass diese durch die Anzahl von 1, 2, 3, ..., m Fluorophoren hervorgerufen worden sind. Das Fluoreszenzmaximum in der untersuchten Intensitätsspur entspricht dem Signal, welches durch die ursprünglich vorhandene Anzahl von Fluorophoren in dem fluoreszenten System hervorgerufen worden ist. Es können nun die Wahrscheinlichkeit angegeben werden, dass dieses Signal durch n Fluorophore hervorgerufen worden ist.

Die ermittelten Wahrscheinlichkeiten sind in Abbildung 3-12 grafisch dargestellt. Über eine Mittelung der Wahrscheinlichkeiten mehrerer aufeinander folgender Zeiteinheiten treten diese deutlicher hervor.

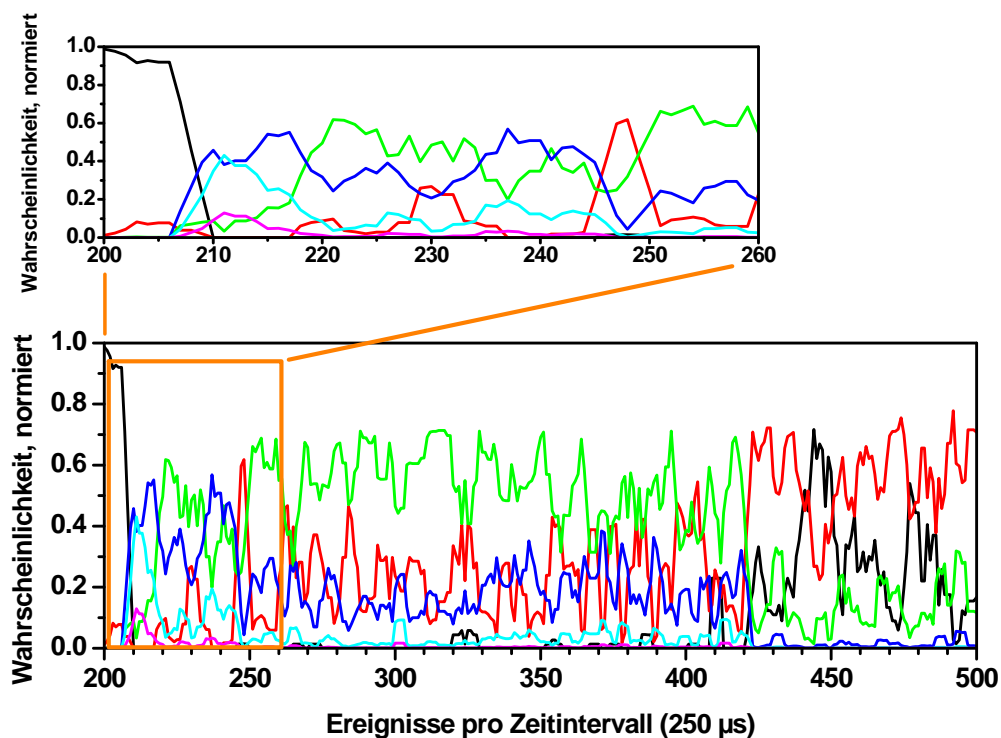


Abbildung 3-12: Beispiel für die ermittelten Wahrscheinlichkeiten, dass die experimentell festgehaltenen Intensitäten der einzelnen Zeitfenster von n Fluorophoren hervorgerufen werden. Es ist keine Mittelung der Daten vorgenommen worden. Die verschiedenen Kurven entsprechen den ermittelten Wahrscheinlichkeiten, dass die Intensität eines Zeitintervalls von n Fluorophoren verursacht worden ist. Schwarz: Hintergrund; rot: 1 Fluorophor; grün: 2 Fluorophore; blau: 3 Fluorophore; cyan: 4 Fluorophore; magenta: 5 Fluorophore; höhere Wahrscheinlichkeiten sind der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Es werden maximal 4 Fluorophore ausgegeben.

Die Zuverlässigkeit bzw. Richtigkeit des entwickelten Algorithmus ist für verschiedene Systeme überprüft und bestätigt worden. Insbesondere die Annahme der gleichen Intensitäten für Fluorophore eines Systems hat sich bei zirkular polarisierter

Anregungsstrahlung für die untersuchten Anordnungen als richtig erwiesen, was eine Gleichverteilung der Übergangsdipolmomente voraussetzt und auf ähnliche Lagen der Fluorophore in der Detektionsebene hinweist. Unterschiedliche Intensitätsspuren weisen allerdings ungleiche Intensitätsstufen für die ausbleichenden Fluorophore auf, dieses ist auf die unterschiedlichen Lagen der fluoreszenten Systeme in der Detektionsebene zurückzuführen. Aus diesem Grund ist eine Vereinheitlichung der Stufen unter gleichen experimentellen Bedingungen für die gleiche fluoreszente Probe nicht möglich.

3.5 Verwendete Software

Die Datenaufnahme für die MFD erfolgte wahlweise mit einer oder mit zwei SPC-Karten (engl.: „Single Photon Counting“) (SPC-432 bzw. SPC-132, Becker&Hickl, Berlin). Für Korrelationen stand eine Korrelatorkarte zur Verfügung (ALV-5000 Software, Version 5,0, ALV, Langen). Die gesamte Weiterverarbeitung der aufgenommenen Daten wurde mit Eigenproduktionen der Arbeitsgruppe Prof. C. Seidel⁴ in den Computersprachen LabView (Versionen 5.1 - 7.0, National Instruments) und Visual C⁺⁺ (Microsoft Corporation) vorgenommen. Für weitere mathematische Anwendungen wurden Excel (Excel für Windows, Microsoft, Version 10) und Origin (MicrocalTM OriginTM, Version 6.0; Microcal Software, Northampton (MA), USA) verwendet.

⁴ Mit großem Dank sei auf Dr. Matthew Antonik, Dr. Suren Felekyan, Alexander Gaiduk, Volodymyr Kudryavtsev, Dr. Ralf Kühnemuth (Institut für Molekulare Physikalische Chemie, HHU Düsseldorf) und Carl Sandhagen (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) verwiesen.

Kapitel 4

Untersuchungen zur Quantifizierung der Emitter eines fluoreszenten Systems

In dem vorliegenden Kapitel werden Untersuchungen zur Bestimmung der Stöchiometrie fluoreszenter Systeme vorgestellt. Diese sind mit Hinblick auf eine der wesentlichen Fragestellungen des Kapitels 5 durchgeführt worden, welche auf eine Quantifizierung von fluoreszenzmarkierten Proteinen in Liposomen abzielt. Um dieser komplexen Problematik nachgehen zu können, sind zunächst vergleichsweise gut erforschte Moleküle mit einer bekannten Zahl an identischen Emittlern untersucht worden. Die Ergebnisse werden im Rahmen dieses Kapitels vorgestellt. Es sind zwei Methoden eingesetzt worden, welche recht unterschiedliche Ansätze verfolgen: Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie unter Einbeziehung des Antibunchings, welche in Kapitel 2 ausführlich erläutert worden ist, sowie die sukzessive Photozerstörung, welche als neu eingeführte Methode in Kapitel 3 vorgestellt worden ist. Im Folgenden werden in aller Kürze vorab die verwendeten Referenzsysteme vorgestellt (Abschnitt 4.1), um daraufhin die durchgeführten Untersuchungen mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (Abschnitt 4.2) und der sukzessiven Photozerstörung zu skizzieren (Abschnitt 4.3). Schließlich wird die Anwendbarkeit der beiden Methoden diskutiert (Abschnitt 4.4).

4.1 Fluoreszente Referenzsysteme

Als Referenzsysteme für die vorliegenden Voruntersuchungen sind einfach zu handhabende Proben bekannter räumlicher Ausmaße ausgewählt worden, die eine möglichst definierte Zahl an identischen Fluorophoren aufweisen. Unter diesem Gesichtspunkt sind

fluoreszenzmarkierte Konstrukte der doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (DNA) sowie eine fluoreszenzmarkierte Mutante des Lectinproteins B eingesetzt worden.

4.1.1 DNA-Konstrukte

Die Desoxyribonukleinsäuren (engl.: „Desoxyribonucleinacid“, DNA) gehören zu den Grundbausteinen des Lebens, ihre grundlegende Struktur wurde bereits 1953 aufgeklärt (Watson and Crick 1953). Die DNA dient vorwiegend als Träger genetischer Informationen im Nukleus eukaryontischer Zellen. Sie besteht aus einem Zucker-Phosphat-Rückgrat (Pentose-Zucker), an denen genetische Informationen in Form von definierten Abfolgen von Nukleobasen (Cytosin, Thymin, Guanin, Adenin) gespeichert sind. Durch physikalisch-chemische Wechselwirkungen zweier komplementärer DNA-Einzelstränge bildet dieses Biomolekül unter Optimierung ihrer thermodynamischen Stabilität eine Doppelhelix-Konformation aus.

Diese äußerst stabile Konformation erreicht die DNA-Doppelhelix durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Nukleobasen, durch Stacking-Wechselwirkung zwischen den benachbarten aromatischen Purin- und Pyrimidin-Ringsystemen (Nukleobasen) und nicht zuletzt durch Van-der-Waals-Kräfte und Coulomb'sche Ladungswechselwirkungen. Aufgrund dieser Eigenschaften in Bezug auf Stabilität und definierter Struktur ist die DNA als Biomolekül für Referenzuntersuchungen geeignet.

Die Sequenzabfolge einzelner Nukleobasen induzieren durch ihre sterische Größe und unterschiedliche molekulare Struktur geringfügige Abweichungen der Helixstruktur in Bezug auf ihre Längsachse. Da für die Untersuchungen definierte und stabile Strukturen nötig waren, wurden durch Struktursimulationen *in silico* (DIAMOD v3.5 (Dlatic 1998), RNAstructure (Mathews 1996-2001)) durchgängig komplementäre DNA-Sequenzen ermittelt, die auf eine möglichst parallele Helixkonformation in Bezug auf ihre Längsachse abzielten.

Die bei der Untersuchung verwendeten DNA-Doppelstränge wurden mit fluoreszierenden Molekülen und Biotin an spezifischen Stellen der Struktur modifiziert (Firma IBA GmbH, Göttingen). Die Fluoreszenzmarkierung wurde durch den Farbstoff Alexa 488 an definierten Positionen über aminomodifizierte Thyminidine vorgenommen. Die spezifische Chemisorption von Biotin erfolgte ebenfalls spezifisch an Thyminidinen. Tabelle 4-1 zeigt die verwendeten DNA-Sequenzen, Tabelle 4-2 die nach einer Vorschrift von Dr. Enno Schweinberger (Schweinberger 2002) hybridisierten DNA-Duplexe. Die Messungen sind in PBS-Puffer vorgenommen worden (vgl. Abschnitt 3.1.2.2).

Name	Sequenz
MK-0*	5'-d(TTC ATT ATT* TAT TAC GAC GA)
MK-1	5'-d((Biotin) TCG TCG TAA TAA ATA ATG AA)
MK-2	5'-d((Biotin) TCG TCG TAA TAA ATA ATG AA TCG TCG TAA TAA ATA ATG AA)
MK-4	5'-d((Biotin) TCG TCG TAA TAA ATA ATG AA TCG TCG TAA TAA ATA ATG AA TCG TCG TAA TAA ATA ATG AA)
D-15	5'-d(GGA CTA GTC TAG GCG AAC GTT TAA GGC GAT CTC TGT TTA CAA CTC CGA)
D-15*	5'-d(GGA CTA GTC TAG GCG AAC GTT TAA GGC GAT CTC T*GT TTA CAA CTC CGA)
D-11*	5'-d(GGA CTA GTC TAG GCG AAC GTT TAA GGC GAT CTC TGT TT*A CAA CTC CGA)
A-20*	5'-d(TCG GAG TTG TAA ACA GAG AT*C GCC TTA AAC GTT CGC CTA GAC TAG TCC)
A-32*	5'-d(TCG GAG TTG TAA ACA GAG ATC GCC TTA AAC GT*T CGC CTA GAC TAG TCC)
A-38*	5'-d(TCG GAG TTG TAA ACA GAG ATC GCC TTA AAC GTT CGC CT*A GAC TAG TCC)

Tabelle 4-1: DNA-Sequenzen. * bezeichnet die mit einem Farbstoff markierten Sequenzen. T* bezeichnet ein aminomodifiziertes Thymin, an welches der Farbstoff Alexa 488 gekoppelt ist.

Die Sequenzen MK-1, MK-2 und MK-4 bestehen aus ein, zwei bzw. vier gleichen Wiederholungssequenzen. Sie werden mit jeweils ein, zwei und vier Gegensequenzen MK-0* gepaart, so dass ein baugleicher Satz aus Duplexen mit variierender Zahl an Fluorophoren entsteht. Die Sequenzen D-11*, D-15* und D-15 weisen gleiche Nukleotidstränge mit unterschiedlichen Markierungspositionen (*) aus; A-20*, A-32* und A-38* bilden die entsprechenden komplementären Gegenstränge. Es entstehen baugleiche DNA-Duplexe mit einem Fluorophor bzw. mit zwei Fluorophoren in unterschiedlichen, definierten Abständen.

Name	Duplex
DNA-(1A1488)-a	MK-0* • MK-1
DNA-(2A1488)-(20bp)	2 MK-0* • MK-2
DNA-(4A1488)-(20bp)	4 MK-0* • MK-4
DNA-(1A1488)-b	D-15 • A-20*
DNA-(2A1488)-(27bp)	D-11* • A-38*
DNA-(4A1488)-(17bp)	D-15* • A-32*
DNA-(4A1488)-(5bp)	D-15* • A-20*

Tabelle 4-2: Hybridisierte DNA-Duplexe.

4.1.2 Protein Lectin B

Proteine sind Vertreter einer weiteren wichtigen Klasse der Biomoleküle. Sie verfügen über eine sehr hohe Struktur- und Komplexität, die ihre höchstspezifische Funktion in den unterschiedlichsten biologischen Systemen ermöglicht und beschreibt.

Lectin B gehört einer 1988 (Barondes 1988) neu gebildeten Klasse von kohlenhydratbindenden Glycoproteinen an, die von Antikörpern und Enzymen deutlich zu unterscheiden und in Flora und Fauna gleichermaßen anzutreffen sind. Seine Funktion besteht in der Bindung von oberflächenexponierten Zuckern bzw. Glycokonjugaten an Erythrozyten, wodurch letztere agglutiniert werden. Diese immunologische Funktion führt es in Pflanzen, Vertebraten und Mikroorganismen aus. Das Protein Lectin B liegt nativ als Homotetramer mit 11,7 kDa pro Untereinheit vor und besteht aus insgesamt 336 Aminosäuren. Über Wasserstoffbrückenbindung und Calcium-induzierte Wechselwirkungen ist jede Untereinheit in der Lage, den Liganden L-Fucose spezifisch zu binden.

Für die Untersuchung an diesem System ist eine Mutante des Lectins B verwendet worden, welche durch die Fusion mit dem gelb-fluoreszierenden Protein (engl.: „enhanced Yellow Fluorescent Protein“ (eYFP, Clontech, Palo Alto, USA)), einer gelb-fluoreszierenden Variante des GFP (green fluorescent protein) aus *Aequorea victoria*, modifiziert worden ist. Die Herstellung dieser Mutante erfolgte durch etablierte mikrobiologische Methoden der Genexpression (Tielker 2005). Das resultierende Fusionsprotein LecB(eYFP) besitzt somit ein eYFP-Molekül an jeder einzelnen Untereinheit und damit eine definierte Anzahl von vier messbaren fluoreszierenden Einheiten. Die einzelnen Messungen sind in TRIS-Puffer durchgeführt worden.

4.2 Ein Versuch der Quantifizierung über die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und ihre Anwendbarkeit auf die Quantifizierung von unabhängigen Emittoren in fluoreszenten Systemen ist ausführlich in Abschnitt 2.3.1 beschrieben worden. Die folgenden Ausführungen sind an diesen angelehnt. Es werden zunächst die frei in Lösung diffundierenden Moleküle untersucht.

4.2.1 Untersuchungen an DNA

Die Quantifizierung der unabhängigen Emittoren eines fluoreszenten Systems wird im Rahmen der FCS über das Phänomen des Antibunchings vorgenommen. Dazu wird bei einer gepulsten Anregung die Anpassung der korrelierten experimentellen Daten nach der Modellfunktion (Gl. 2-33) unter Berücksichtigung der Fluoreszenzlebensdauer vorgenommen. Abbildung 4-1 zeigt stellvertretend für alle folgenden Korrelationen die korrelierten Daten der DNA-Duplexe DNA-(1A1488)-a, welche mit einem einzelnen Farbstoff Alexa 488 markiert sind. Die Originaldaten sind grau, eine Mittelung über 50 Datenpunkte ist schwarz dargestellt. Nach der Anpassung können anhand der Gleichung 2-35 die normierten Korrelationsamplituden $G(0)$ und G_{\max} bestimmt und damit die Zahl der unabhängigen Emittoren, m , über die Gleichung 2-31 festgelegt werden. Unter diesem Aspekt sind die experimentellen Daten verschiedener DNA-Konstrukte betrachtet worden.

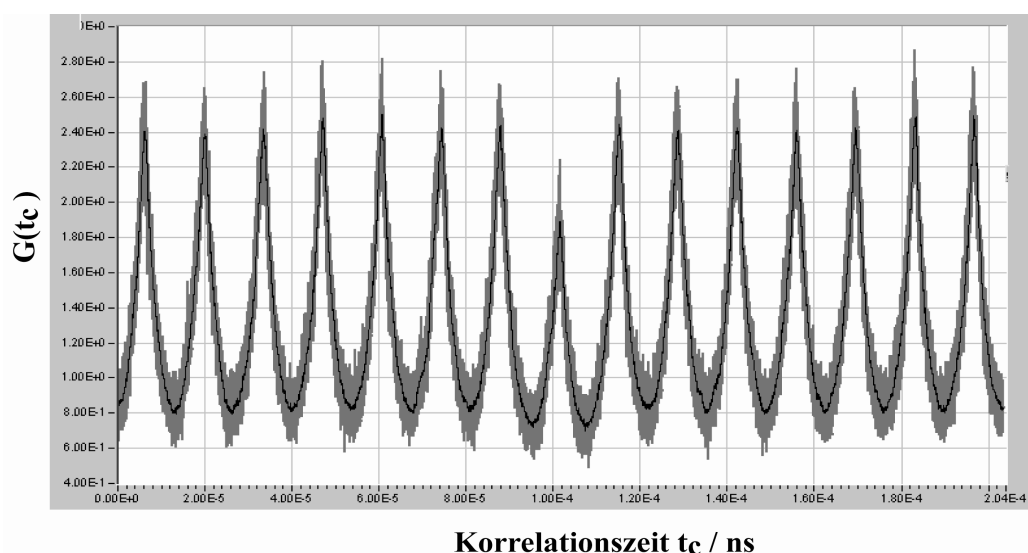


Abbildung 4-1: Korrelierte Daten der DNA-Duplexe DNA-(1A1488)-a, welche mit einem Alexa 488-Farbstoff markiert sind, bei gepulster Anregung (grau: Originaldaten, schwarz: Mittelung über 50 Datenpunkte). Die Zahl der unabhängigen Emittoren wird zu $m = 1,03$ bestimmt. Die Anpassung aller experimentellen Daten wurde über die Levenberg-Marquardt-Routine mit gleicher Gewichtung aller Datenpunkte vorgenommen (Pulsfrequenz 76 MHz, Anregungswellenlänge $\lambda = 496,5$ nm, Anregungsleistungsdichte $P = 123$ kW/cm²).

Zunächst werden DNA-Duplexe der gleichen Sequenzen betrachtet, in denen die Anzahl der Fluoreszenzmarkierungen variiert. An die verschiedenen DNA-Duplexe sind ein, zwei bzw. vier Alexa 488-Farbstoffe angekoppelt, wobei die Abstände zwischen den Fluorophoren jeweils 20 Basenpaare, d. h. 68 \AA , betragen. Die experimentell bestimmten Zahlen der unabhängigen Emitter, m , sind in Tabelle 4-3 gezeigt. Zum Vergleich ist zusätzlich der experimentell bestimmte Wert des reinen Farbstoffs Rhodamin 110 angegeben. Der Sollwert beträgt hier $m = 1$. Über eine zusätzliche Anpassung des Streulichts vom Hintergrund nach Gleichung 2-34 werden im Rahmen der angegebenen Genauigkeit keine Veränderungen in den vorliegenden Daten festgestellt.

Probe	Anzahl unabhängige Fluorophore, m
DNA-(1A1488)-a	1,03
DNA-(2A1488)-(20bp)	1,69
DNA-(4A1488)-(20bp)	1,54
Rhodamin 110	0,96

Tabelle 4-3: DNA-Duplexe mit variierender Anzahl Farbstoffe Alexa 488 und die experimentell ermittelten Zahlen der unabhängigen Emitter m . Zum Vergleich sind die erzielten Ergebnisse für Rhodamin 110 angegeben. (Anregungswellenlänge $\lambda = 496,5 \text{ nm}$, Anregungsleistungsdichte $P = 123 \text{ kW/cm}^2$).

Für die DNA-Duplexe, welche mit einem einzelnen Alexa 488-Farbstoff markiert sind, ergibt sich ebenso wie für das Rhodamin 110 mit geringen Abweichungen der erwartete Wert von Eins. Die DNA-Duplexe mit zwei Farbstoffen weisen einen erhöhten Wert für die Zahl der Emitter auf, dieser bleibt jedoch unter dem erwarteten Wert von zwei. Die DNA-Duplexe mit vier Farbstoffen weisen einen im Vergleich noch niedrigeren Wert m auf. Eine Ursache für dieses Ergebnis ist die auftretende Heterogenität der untersuchten Proben. Ein Teil der Duplexe wird als einfach markierte bzw. zwei- und dreifach markierte Doppelstränge vorliegen. Da alle Moleküle einer Probe über die FCS gemeinsam analysiert werden, werden die auftretenden Heterogenitäten innerhalb der Probe die Ergebnisse verfälschen. Die Problematik der auftretenden Heterogenität einer Probe kann ausschließlich über die MFD eingegrenzt werden. Für fluoreszente Systeme mit identischen Fluorophoren allerdings werden häufig sehr ähnliche Fluoreszenzeigenschaften detektiert, so dass die selektive Spektroskopie in dem vorliegenden Fall variierender Fluorophore häufig nicht eingesetzt

werden kann. Ferner ist eine auftretende Photozerstörung der Farbstoffe zu berücksichtigen, welche für die größeren Moleküle durch die längeren Diffusionszeiten einen größeren Einfluss hat. Schließlich kann eine auftretende Kopplung der Farbstoffe untereinander, welche in der Analyse nicht berücksichtigt wird, die niedrigen, ermittelten Emitterzahlen verursachen. Die möglichen Einflüsse sollen im Folgenden weiter eingegrenzt werden.

Um die Bedeutung einer auftretenden Photozerstörung zu erfassen, sind die Zahlen der unabhängigen Emitter der DNA-Duplexe DNA-(2A1488)-(20bp), welche zwei Alexa 488 aufweisen, für verschiedene Anregungsleistungsdichten bestimmt worden. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 4-4 dargestellt. Offensichtlich liegt eine Photozerstörung zumindest eines Fluorophors vor, welche die ermittelte Zahl der Emitter bei steigender Anregungsleistungsdichte senkt. Für eine Anregungsleistungsdichte von 14 kW/cm^2 kann eine Photozerstörung ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 4-2, links). Die Anzahl der ermittelten Emitter beträgt hierbei 1,68. Da auch hier der Sollwert von Zwei nicht erzielt wird, muss der Einfluss der Heterogenitäten der Proben und die Kopplung der Fluorophore als weitere Ursache angesehen werden.

Anregungsleistungsdichte P / kW/cm^2	Anzahl unabhängige Fluorophore, m
14	1,68
50	1,52
109	1,32
319	1,29

Tabelle 4-4: Experimentell ermittelte Zahlen der unabhängigen Emitter, m, für DNA-(2A1488)-(20bp), gemessen bei verschiedenen Anregungsleistungsdichten P. (Anregungswellenlänge $\lambda = 496,5 \text{ nm}$).

Um eine Photozerstörung der Fluorophore bei hohen Anregungsleistungsdichten zu vermeiden, können photostabilisierende Substanzen zu den fluoreszenten Systemen gegeben werden. L(+)-Ascorbinsäure (Vitamin C) hat sich als effektiver Stabilisator erwiesen. Es wird in einer Konzentration von $400 \mu\text{mol}$ der Probe beigesetzt. In Abbildung 4-2 sind die nach Gleichung 2-24 angepassten Diffusionszeiten der DNA-Duplexe DNA-(1A1488)-b über ansteigende Anregungsleistungsdichten aufgetragen, wobei die Daten links ohne und die rechts mit Vitamin C ermittelt worden sind. Der Vergleich demonstriert eine Eigentümlichkeit

des Vitamins C: Über die Beigabe der photostabilisierenden Substanz werden verlängerte Diffusionszeiten beobachtet. Zusätzlich steigen in der gezeigten Grafik die Diffusionszeiten zunächst mit der Anregungsleistungsdichte an. Diese Beobachtungen sind mit einer optischen Sättigung des S_0 - S_1 -Überganges zu erklären. In der Anpassung der Diffusionszeiten über die FCS wird eine dreidimensionale Gauß'sche Intensitätsverteilung angenommen, aus einer Sättigung des fluoreszenten Überganges resultiert nun eine verbreiterte Gauß-Verteilung, aus der eine verlängerte Diffusionszeit folgt. Ab einer Anregungsleistungsdichte von etwa 150 kW/cm^2 tritt eine Photozerstörung der Fluorophore auf und es werden verkürzte Diffusionszeiten beobachtet. Ohne Vitamin C tritt eine Photozerstörung bereits bei Anregungsleistungsdichten von 20 kW/cm^2 auf. Somit können mit Vitamin C nahezu zehnfach höhere Anregungsleistungen eingestellt werden, was die Photonenausbeute entsprechend erhöht.

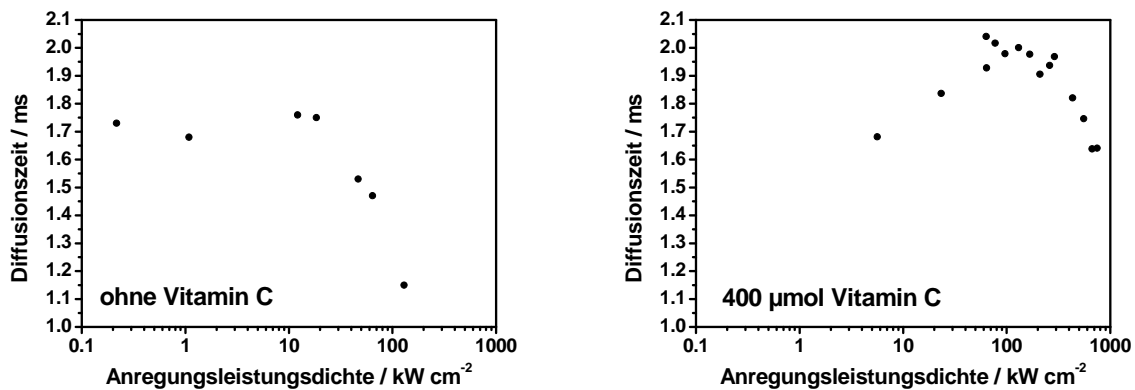


Abbildung 4-2: Nach Gl. 2-24 angepasste Diffusionszeiten der DNA-Duplexe DNA-(1A1488)-a für steigende Anregungsleistungsdichten P , welche über Messungen ohne (links) und mit Vitamin C (rechts) ermittelt worden sind. Für weitere Erläuterungen siehe Text. (Anregungswellenlänge $\lambda = 496,5 \text{ nm}$).

Neben dem Phänomen der optischen Sättigung weisen die Fluorophore unter der Zugabe von Vitamin C eine erhöhte Triplet-Besetzung auf. Die nach Gleichung 2-24 angepassten Anteile der Triplet-Besetzung und die zugehörigen Relaxationsraten der DNA-Duplexe DNA-(1A1488)-b sind in Abbildung 4-3 grafisch dargestellt. Die mit der Anregungsleistungsdichte ansteigenden Triplet-Anteile sind mit abnehmenden Triplet-Relaxationszeiten verknüpft. Bei einem Anteil von etwa 0,4 tritt eine Sättigung der Triplet-Besetzung auf.

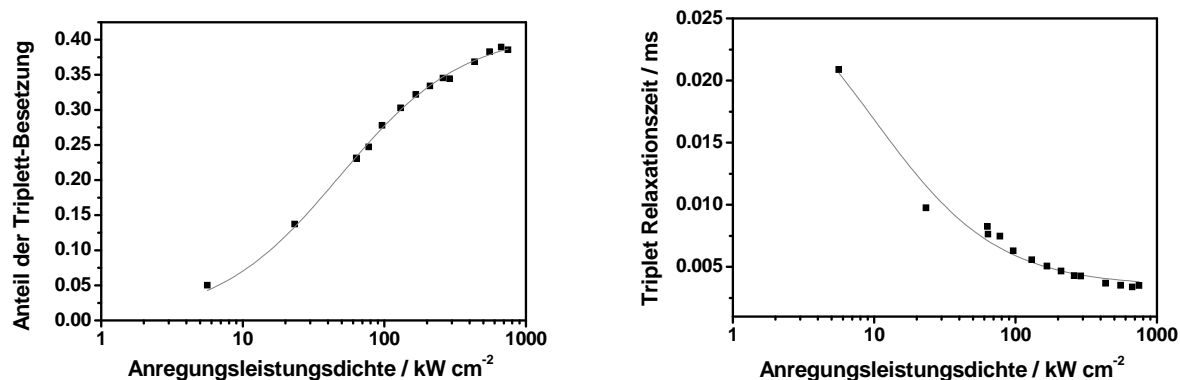


Abbildung 4-3: Nach Gl. 2-24 angepasste Anteile der Triplet-Besetzung und die zugehörigen Relaxationsraten der DNA-Duplexe DNA-(1A1488)-a. (Anregungswellenlänge $\lambda = 496,5$ nm).

Es wird nun der Einfluss des Vitamins C auf die ermittelte Zahl der unabhängigen Emitter untersucht. Für den freien Farbstoff Alexa 488 (5'-Isomer) wird keine signifikante Veränderung festgestellt. Die Diffusionszeit allerdings ist auch für den freien Fluorophor durch die optische Sättigung verlängert. Eine Photozerstörung ist bei dieser Anregungsleistung für den freien Fluorophor ausgeschlossen (ohne Abbildung). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-5 dargestellt.

Anregungsleistungsdichte P / kW cm ⁻²	ohne Vitamin C		mit Vitamin C	
	t _D / ms	m	t _D / ms	m
73	0,398	0,97	0,471	0,98

Tabelle 4-5: Vergleich der ermittelten Diffusionszeiten t_D und beinhalteten Emitter m nach Gl. 2-24 bzw. Gl. 2-33 für den freien Farbstoff Alexa 488 (5'-Isomer). (Anregungswellenlänge $\lambda = 496,5$ nm).

Da Vitamin C eine Photozerstörung der Fluorophore bei moderaten Anregungsleistungsdichten verhindert, sollten die ermittelten Zahlen m für Proben mit einer höheren Zahl von Fluorophoren den erwarteten Werten näher kommen. Für die DNA-Duplexe DNA-(2A1488)-(20bp), welche mit zwei Alexa 488 fluoreszenzmarkiert sind, ergeben sich die ermittelten Werte nach Tabelle 4-6. Ohne Vitamin C werden 1,5 unabhängige Emitter ermittelt, welcher für die höhere Anregungsleistungsdichte weiter auf 1,32 abnimmt. Die verkürzte Diffusionszeit bestätigt hier eine auftretende Photozerstörung der Fluorophore. Mit Vitamin C wird zwar ein erhöhter Wert m von 1,79 festgestellt, der

jedoch ebenfalls für die höhere Anregungsleistungsdichte verringert ist (1,46). Hier allerdings wird eine durch die auftretende optische Sättigung verlängerte Diffusionszeit beobachtet, eine Photozerstörung kann ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint die optische Sättigung auch Einfluss auf die ermittelte Zahl der unabhängigen Emitter Einfluss zu nehmen.

Anregungsleistungsdichte P / kW cm ⁻²	ohne Vitamin C		mit Vitamin C	
	t _D / ms	m	t _D / ms	m
21	1,76	1,50	2,05	1,79
73	1,49	1,32	2,29	1,46

Tabelle 4-6: Vergleich der ermittelten Diffusionszeiten t_D und beinhalteten Emitter m nach Gl. 2-24 bzw. Gl. 2-33 für die DNA-Duplexe DNA-(2A1488)-(20bp) bei zwei verschiedenen Anregungsleistungsdichten. (Anregungswellenlänge λ = 496,5 nm).

Um schließlich den Einfluss von Kopplungen der Fluorophore zu überprüfen, sind verschiedene DNA-Duplexe mit zwei Alexa 488-Farbstoffen, welche in verschiedenen relativen Abständen voneinander an die DNA gebunden sind, untersucht worden. Die Abstände betragen 5, 17 und 27 Basenpaare, bzw. 17,0 Å, 57,8 Å und 91,8 Å. Für abnehmende Abstände zwischen den Fluorophore nimmt der ermittelte Wert m von 1,35 über 1,34 nach 1,16 ab (siehe Tabelle 4-7). Offensichtlich tritt eine zunehmende Kopplung der Fluorophore auf. Neben homo-FRET sind durch die relativ hohen Anregungsleistungsdichten Singulett-Singulett- und Singulett-Triplett-Annihilations-Prozesse als abstandsabhängige Energietransfer-Mechanismen in Betracht zu ziehen (vgl. Abschnitt 2.2.4). Bei einem Abstand von 97,2 Å zwischen den Farbstoffen wird homo-FRET kaum ins Gewicht fallen, hier kommen im Wesentlichen nur die Annihilationsprozesse in Frage. Auch andere Kopplungsmechanismen, welche in Kapitel 2 diskutiert worden sind, wären denkbar.

Probe	Anzahl unabhängige Fluorophore, m
DNA-(2A1488)-(27bp)	1,35
DNA-(4A1488)-(17bp)	1,34
DNA-(4A1488)-(5bp)	1,16
DNA-(1A1488)-b	1,04
Rhodamin 110	0,99

Tabelle 4-7: DNA-Proben markiert mit zwei Farbstoffen Alexa 488 in verschiedenen Abständen und die experimentell ermittelten Zahlen der unabhängigen Emitter m. Zum Vergleich sind die Ergebnisse für DNA mit einem Farbstoff Alexa 488 und für Rhodamin 110 angegeben. (Zugabe von 400 μmol Vitamin C, Anregungswellenlänge $\lambda = 496,5 \text{ nm}$, Anregungsleistungsdichte $P = 112 \text{ kW/cm}^2$).

Im Vergleich zu Ergebnissen der DNA-Duplexe DNA-(2A1488)-(20bp), welche in Tabelle 4-3 vorgestellt worden sind, fällt der vergleichsweise geringe Wert m für die hier untersuchten DNA-Duplexe DNA-(4A1488)-(17bp) und DNA-(2A1488)-(27bp) auf, obwohl hier die Abstände zwischen den Fluorophoren ähnlich bzw. sogar größer sind. Hier kann entweder eine auftretende optische Sättigung der Fluorophore die ermittelten Werte verfälschen (vgl. Tabelle 4-4) oder es tritt eine nukleobasenspezifische Kopplung der Fluorophore an der DNA auf. Um diese Effekte weiter zu quantifizieren, sind zusätzliche Experimente in Planung.

4.2.2 Untersuchungen an Lectin B

Als weiteres Referenzsystem ist das Lectin B über die FCS auf die Anzahl der unabhängigen Emitter untersucht worden. Da jede der vier unabhängigen Untereinheiten des Homotetramers mit einem eYFP fluoreszenzmarkiert ist, beträgt der Sollwert der Emitter vier. Das Lectin B weist eine hohe Affinität zu L-Fucose auf; um eine eventuell auftretende Stabilisierung des Proteins unter der Zugabe des Zuckers auszunutzen, sind experimentelle Daten mit und ohne die Zugabe von 1 mmol L-Fucose zum Puffer erfasst worden. Über eine Anpassung nach Gleichung 2-33 und die anschließende Bestimmung der Zahl unabhängiger Emitter, m, werden die in Tabelle 4-8 gezeigten Werte ermittelt.

Probe	Anzahl unabhängige Fluorophore, m
LecB(eYFP), ohne L-Fucose	1,75
LecB(eYFP), mit L-Fucose	1,89
Rh110	1,02

Tabelle 4-8: Ermittelte Zahlen der unabhängigen Emitter für das Lectin B-(eYFP). Zum Vergleich ist das Ergebnis für Rhodamin 110 angegeben. (Zugabe von 400 μmol Vitamin C, Anregungswellenlänge $\lambda = 476,5 \text{ nm}$, Anregungsleistungsdichte $P = 67 \text{ kW/cm}^2$).

Es werden ähnliche Werte für das Lectin B mit und ohne L-Fucose ermittelt (1,89 bzw. 1,75), beide entsprechen nicht dem erwarteten Wert von vier. Analog zu den Ergebnissen der DNA ist eine Kopplung der Fluorophore zu erwarten, woraus eine verringerte Zahl an ermittelten unabhängigen Emittlern resultiert. Auch eine eventuelle Heterogenität der Probe durch auftretende Homodimere oder Monomere kann nicht ausgeschlossen werden.

Es wird deutlich, dass eine heterogene Probe mit verschiedenen Fluorophorzahlen in ihrer Gesamtheit nicht über die FCS untersucht werden kann. Die MFD ermöglicht hier unter Einzelmolekül-Bedingungen eine Selektion der Daten, falls sich die einzelnen Spezies innerhalb der Probe in ihren Fluoreszenzeigenschaften deutlich unterscheiden. Um das Problem der Heterogenität der Proben zu umgehen, sind nun die Moleküle auf einer Oberfläche immobilisiert und einzeln auf ihre Fluorophore hin untersucht worden. Eine Quantifizierung der Fluorophore über die FCS ist durch die auftretende, geringe Photonenzahlstatistik der einzeln untersuchten Moleküle nicht möglich. An diesem Punkt mussten neue Ideen für die Quantifizierung der Fluorophore von immobilisierten Systemen auf Oberflächen entwickelt werden.

4.3 Ein Versuch der Quantifizierung über die sukzessive Photozerstörung

Das schrittweise Ausbleichen von Fluorophoren in einem fluoreszenten System, welches auf einer Oberfläche immobilisiert ist, kann ebenfalls für die Quantifizierung der anwesenden Emitter verwendet werden. Um dieses Phänomen auch auf fluoreszente Systeme mit höheren Zahlen von Emittlern anwenden zu können, wird die sukzessive Photozerstörung in diesem Fall analytisch erfasst. Die hierfür entwickelte Methode ist in Abschnitt 3.4.4 eingeführt worden.

4.3.1 Untersuchungen an DNA

Zunächst wird das schrittweise Ausbleichen anhand eines einfachen Systems überprüft. Dafür sind Untersuchungen an immobilisierten DNA-Duplexen DNA-(2Al488)-(27bp) auf einer Glasoberfläche vorgenommen worden, die mit zwei Alexa 488-Farbstoffen im Abstand von 91,8 Å markiert sind. Nach dem in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Verfahren werden die Intensitätsspuren der einzelnen DNA-Duplexe detektiert und die Stufen betrachtet (vgl. Abbildung 3-9). Über 23 untersuchte Moleküle ergibt sich die in Abbildung 4-4 dargestellte Stufenverteilung.

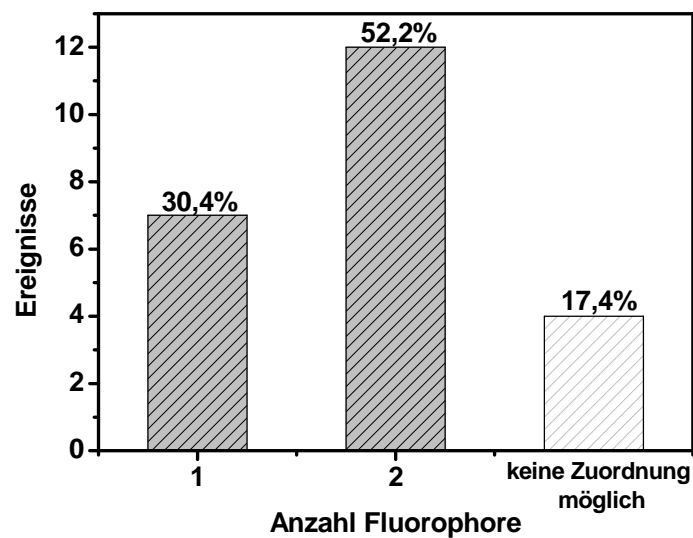


Abbildung 4-4: Verteilung der ermittelten Stufenzahlen in experimentell detektierten Intensitätsspuren von 23 untersuchten DNA-Duplexen (DNA-(2Al488)-(27bp)). (Anregungswellenlänge $\lambda = 476,5$ nm, Anregungsleistungsdichte $P = 1,4$ kW/cm²).

Mehr als die Hälfte der untersuchten Duplexe weist zwei Stufen innerhalb ihrer Intensitätspur auf, diese werden der Photozerstörung von zwei Alexa 488-Farbstoffen zugeordnet. Ein knappes Drittel der untersuchten Moleküle weist nur eine Stufe auf. Eine vorzeitige Photozerstörung eines Fluorophors bei dem vorangestellten konfokalen Scanning zur Lokalisierung der Moleküle wird durch die verwendeten geringen Anregungsleistungsdichten ausgeschlossen. Vielmehr ist diese Fraktion den einfach markierten Molekülen zuzuordnen. Ihr Anteil entspricht in etwa jenem über Einzelmolekülmessungen gewonnenen Anteil von 27%. Hier sind die gleichen DNA-Duplexe untersucht worden, welche statt des zweiten Alexa 488 den Akzeptor-Farbstoff Cyanin 5 aufweisen. 17,4% der untersuchten Moleküle lassen sich nicht eindeutig zuordnen, hier sind keine klaren Stufen in den Intensitätsspuren unterscheidbar.

4.3.2 Untersuchungen an Lectin B

Nach dem gleichen Verfahren wie in dem vorangegangenen Abschnitt wird das Lectin B auf die Zahl der ausbleichenden Fluorophore hin untersucht (vgl. Abbildung 3-10). Die Untersuchungen sind unter Zugabe von 1 mM L-Fucose vorgenommen worden. Über 37 untersuchte Moleküle ergibt sich die in Abbildung 4-5 dargestellte Stufenverteilung.

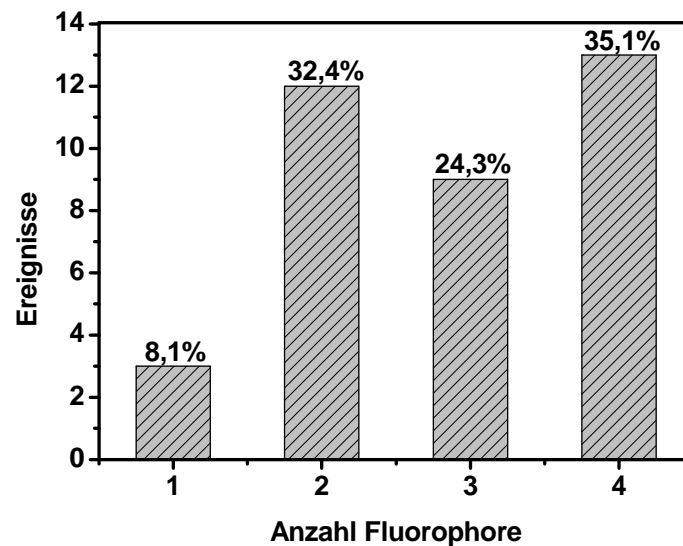


Abbildung 4-5: Verteilung der ermittelten Stufenzahlen in den experimentell detektierten Intensitätsspuren von 37 untersuchten Lectin B-Proteinen. (1 mM L-Fucose, Anregungswellenlänge $\lambda = 476,5$ nm, Anregungsleistungsdichte $P = 0,8$ kW/cm²).

In dem vorliegenden Fall sind allen Intensitätsspuren Stufenzahlen zugeordnet worden; falls eine manuelle Auszählung nicht möglich gewesen ist, ist die sukzessive Photozerstörung analytisch erfasst worden, um eine Fluorophorzahl zu quantifizieren. Die größte Fraktion der Lectin B-Proteine weist die vier erwarteten Fluorophore für das Homotetramer auf. Für etwa ein Viertel der untersuchten Proteine werden drei Fluorophore ermittelt, diese Fraktion wird den Homotetrameren zugeordnet. Knapp ein Drittel der untersuchten Proteine weist nur zwei Fluorophore und etwa jedes zehnte Lectin B nur einen Fluorophor auf. Sie können im Wesentlichen dem Homodimer bzw. dem Monomer zugewiesen werden. Eine Photozerstörung kann durch die auftretende Fraktion der Proteine mit drei Stufen nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da das Auftreten eines Proteins mit drei Untereinheiten mit dem derzeitigen Strukturmodell nicht zu vereinbaren ist.

Die Stufenhöhen, welche den Zählraten der einzelnen Fluorophore entsprechen, sind durch die Lage und Orientierung der Proteine im Fokus bedingt. Letzterer weist im Vergleich zu den untersuchten Systemen größere Ausmaße auf. Die Intensitätsverteilung des jeweils

letzten ausbleichenden Fluorophors ist in Abbildung 4-6 dargestellt. Die Stufenhöhen sind im Wesentlichen auf Zählraten von weniger als 700 Hz beschränkt, nur wenige Proteine weisen höhere Intensitäten bis zu 2 kHz auf.

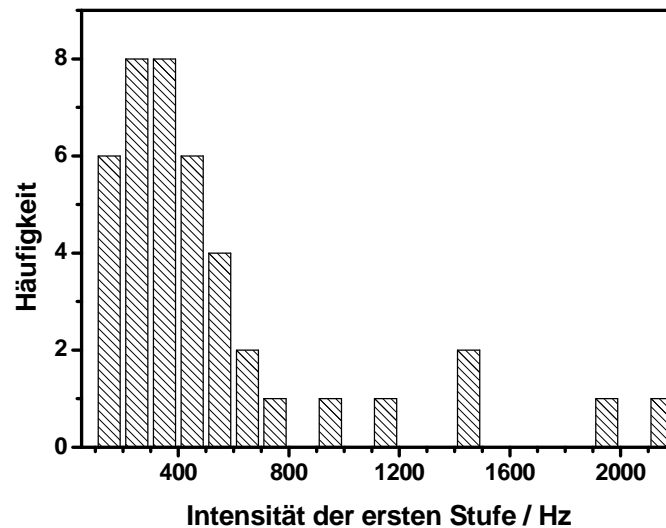


Abbildung 4-6: Verteilung der Stufenhöhen der letzten detektierten Stufen in den Intensitätsspektren der Lectin B-Proteine. Sie entsprechen im Wesentlichen den Zählraten der einzelnen Fluorophore. (Anregungswellenlänge $\lambda = 476,5$ nm, Anregungsleistungsdichte $P = 0,8$ kW/cm²).

Ein Vergleich der manuell zugeordneten Stufen mit den Ergebnissen der angewandten Methode der sukzessiven Photozerstörung liefert für die Lectin-Proteine mit drei und vier ausgewiesenen Stufen eine Übereinstimmung der ermittelten Ergebnisse zu 95%.

4.4 Diskussion der Voruntersuchungen

Die Quantifizierung der Emitter eines fluoreszenten Systems entspricht einer sehr komplexen Zielsetzung, welche Gegenstand der aktuellen Forschung ist. Es sind bislang nur wenige Methoden entwickelt worden, welche eindeutige Ergebnisse liefern (vgl. Abschnitt 2.3.1). Um im Rahmen der Einzelmolekülspektroskopie zu überprüfen, ob ein fluoreszentes System als Ein-Quantensystem vorliegt, erweist sich die FCS als Methode der Wahl. Über das Phänomen des Antibunchings lassen sich eindeutige Aussagen treffen, ob die Fluoreszenz eines Systems durch einen einzelnen Emitter hervorgerufen wird. Die in Kapitel 4.2 untersuchten Systeme, welche nur einen Fluorophor aufweisen, werden eindeutig über die FCS als Ein-Quantensysteme bestätigt. Für die Quantifizierung von höheren Zahlen an Emittlern wirkt sich die auftretende Kopplung der Fluorophore ungünstig auf die ermittelten Zahlenwerte aus und es werden im Allgemeinen zu geringe Werte erzielt. Um die Kopplung der Fluorophore als zusätzliche Informationsquelle nutzen zu können, sind gegenwärtig

Untersuchungen geplant, welche die Anisotropie als sensitiven Fluoreszenzparameter eines fluoreszenzresonanten homo-Energietransfers zusätzlich in die Betrachtungen des Antibunchings mit einfließen lassen.

Die FCS untersucht die Gesamtheit einer fluoreszenten Probe; Heterogenitäten, welche durch Moleküle mit unterschiedlichen Zahlen an Emittlern hervorgerufen werden, wirken sich ungünstig auf die Analyse aus. Die MFD ermöglicht hier unter Einzelmolekül-Bedingungen eine Selektion der Daten, falls die einzelnen Spezies innerhalb der Probe sich über ihre Fluoreszenzeigenschaften unterscheiden lassen. Für Systeme mit identischen Fluorophoren ist dieses häufig nicht der Fall, so dass hier die Einzelmolekülspektroskopie an ihre Grenzen stößt. Um das Problem der Heterogenität der Proben zu umgehen, werden die Moleküle auf einer Oberfläche immobilisiert und einzeln untersucht. Eine Quantifizierung der Fluorophore über die FCS ist durch die auftretende geringe Photonenzahlstatistik der einzelnen Moleküle allerdings nicht möglich.

An dieser Stelle wird nun ein anderer Ansatz verfolgt. In Kapitel 4.3 ist aufgezeigt worden, dass sich die Fluorophore eines immobilisierten Systems über ihre Photozerstörung zuverlässig quantifizieren lassen. Sowohl für die Referenzsysteme mit zwei als auch mit vier Fluorophoren werden die entsprechenden durch die ausbleichenden Fluorophore entstehenden Stufen in der detektierten Intensitätsspur beobachtet. Um dieses Phänomen auch auf Systeme anwenden zu können, welche höhere Zahlen an Emittlern aufweisen, ist die Methode der sukzessiven Photozerstörung entwickelt worden. Sie ist ausführlich in Kapitel 3 eingeführt worden. Ihre Anwendbarkeit ist an dem Protein Lectin B überprüft worden, in dem eine manuelle Auszählung der Fluorophore noch möglich ist. Die Ergebnisse der entwickelten Methode bestätigen die manuelle ausgezählten Stufenzahlen. Es werden zu 95% die gleichen Zahlen an Fluorophoren bestimmt. Die variablen Fluorophorzahlen in einer heterogenen Probe, welche eine Untersuchung über die FCS unmöglich machen, werden über die sukzessive Photozerstörung direkt sichtbar.

Nach der erfolgreichen Einführung einer Methode zur Quantifizierung identischer Fluorophore eines fluoreszenten Systems können nun komplexere Fragestellungen untersucht werden. Im folgenden Kapitel 5 wird die Methode der sukzessiven Photozerstörung auf fluoreszenzmarkierte Proteine in definierten Systemen angewandt, um ihre Zahl zu quantifizieren. Die aufzuweisende Stöchiometrie ist hier von grundlegendem Interesse.

Kapitel 5

Untersuchungen zur SNARE-Protein-unterstützten Membranfusion

Die molekularen Mechanismen der exozytotischen Membranfusion sind über geregelte Protein-Protein-Wechselwirkungen determiniert. Interagierende Proteine gegenüberliegender Membranen unterstützen durch die Ausbildung definierter Proteinkomplexe den Prozess der Membranfusion. Viele Aspekte dieser Mechanismen sind dabei bislang ungeklärt. Die Fluoreszenz-Einzelmolekülspektroskopie kann hier für einige Fragestellungen ihren Beitrag zur Aufklärung der ablaufenden Prozesse leisten. Sie ermöglicht die Untersuchung der fluoreszenzmarkierten Systeme in einer quasi-nativen Umgebung ohne äußere, störende Einflüsse. Heterogenitäten der beteiligten Systeme werden in den Untersuchungen einzelner Systeme aufgeklärt und die separaten Fraktionen getrennt analysiert. Auch stöchiometrische Untersuchungen zu der erforderlichen Anzahl von Proteinen, welche aktiv an der Membranfusion beteiligt sind, können nur über die Auszählung einzelner Proteine realisiert werden.

Im Folgenden werden zunächst die Initiatoren der Membranfusion vorgestellt (Abschnitt 5.1), ferner werden die für die Untersuchungen entwickelten Modellsysteme eingeführt. Daraufhin werden die erzielten Ergebnisse präsentiert; dabei ist sowohl die MFD (Abschnitt 5.2) als auch das MFD-Imaging (Abschnitt 5.3) eingesetzt worden.

Die im Rahmen dieses Kapitels vorgestellten Ergebnisse sind aus einer Kooperation mit Dr. Christina Schütte (jetzt: ProSciencia, Lübeck) der Arbeitsgruppe von Prof. Reinhard Jahn (Abteilung Neurobiologie, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) entstanden.

5.1 SNARE-Proteine als Initiatoren der Membranfusion

SNARE-Proteine (engl.: „Soluble NSF Attachment Protein Receptor“, NSF: „N-ethylmaleimide-sensitive factor“) übernehmen eine Schlüsselfunktion in den Membranfusionsvorgängen eukaryontischer Zellen. Sie bilden eine Klasse von Proteinen, denen eine homologe „Heptad-Repeat“-Sequenz von 60 Aminosäuren gemeinsam ist, die als SNARE-Motiv bezeichnet wird (Jahn 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sind die speziellen exozytotischen, neuronalen SNARE-Proteine untersucht worden, welche die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der Plasmamembran der Präsynapse bei der Neurotransmitter-Ausschüttung vermitteln.

5.1.1 Die exozytotische Membranfusion eukaryontischer Zellen

Die Signalübertragung im zentralen Nervensystem erfolgt über die Neuronen, die spezialisierte Zellen darstellen, welche für die Reizaufnahme sowie die Weitergabe und Verarbeitung von Nervenimpulsen zuständig sind. In Abbildung 5-1 sind zwei Nervenenden mit dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt schematisch dargestellt. In der Präsynapse befinden sich die synaptischen Vesikel, welche mit Neurotransmittern gefüllt sind. Die Ankunft eines Aktionspotentials im präsynaptischen Nervenende initiiert die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran und es erfolgt die Ausschüttung der Neurotransmitter. Diese diffundieren durch den synaptischen Spalt und binden an der postsynaptischen Membran an spezifische Ionenkanäle (Jahn 2005). Der gesamte Prozess benötigt weniger als eine Millisekunde.

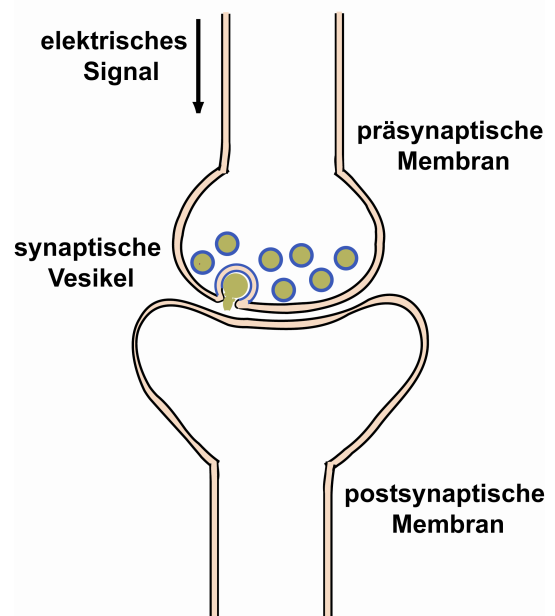


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Signalübertragung im zentralen Nervensystem. Gezeigt sind zwei Nervenzellen mit dem dazwischen liegenden synaptischen Spalt (modifiziert nach (Berg 2003)).

5.1.2 SNARE-Proteine

In dem beschriebenen Fusionsprozess der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran spielen die neuronalen SNARE-Proteine eine zentrale Rolle; dieses sind Synaptobrevin (Sb), Syntaxin 1 (Sx) und SNAP-25 (engl.: „Synaptosomal-Associated

Protein“). Für das Syntaxin 1 allein sind ebenfalls umfassende fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen durchgeführt worden, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht diskutiert werden. Die Ergebnisse sind an anderer Stelle beschrieben (Margittai, Widengren et al. 2003). Das SNARE-Protein SNAP-25 besitzt keine eigene Transmembranregion, es tritt grundsätzlich im binären Komplex mit Syntaxin 1 auf, welches in die präsynaptische Membran eingelagert ist. Synaptobrevin wird auch als VAMP (engl.: „Vesicle Associated Membrane Protein“) bezeichnet, es ist in der Vesikelmembran lokalisiert. Abbildung 5-2 zeigt ein detailliertes Modell der Membranfusion. Nähert sich ein synaptisches Vesikel der Plasmamembran, treten die drei SNARE-Proteine in Wechselwirkung und bringen die beiden gegenüberliegenden Membranen in engen Kontakt. In einem Ca^{2+} -abhängigen Schritt wird über die weitere Ausbildung eines stabilen ternären Komplexes die Fusion der beiden Membranen initiiert, und die Neurotransmitter werden ausgeschüttet.

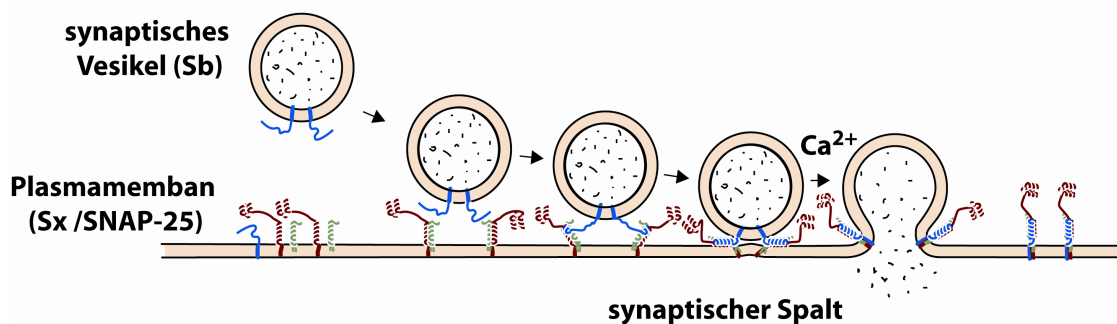


Abbildung 5-2: Schematisches Modell der Membranfusion in den Synapsen (Jahn 2005). Für weitere Erläuterungen, siehe Text.

Details des Fusionsprozesses sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Es ist unklar, ob ein angedockter Zustand der synaptischen Vesikel an die Plasmamembran der Membranfusion vorangestellt ist. Ferner wird diskutiert, ob die sich ausbildenden SNARE-Komplexe eine ringförmige Pore bilden, über welche die Membranfusion eingeleitet wird (Almers 1990; Lindau 1995; Cho 2002), oder ob die SNARE-Komplexe lediglich die Aktivierungsenergie des Fusionsprozesses absenken (Monck 1995; Jahn 1999). Für einen detaillierten Überblick über die SNARE-Proteine und ihre Rolle in der Membranfusion sei auf (Chen and Scheller 2001; Jahn, Lang et al. 2003; Tamm 2003) verwiesen.

5.1.3 Untersuchte Modellsysteme

Für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zur SNARE-Protein-unterstützten Membranfusion sind definierte Modellsysteme entwickelt worden. Die

exprimierten, aufgereinigten und fluoreszenzmarkierten SNARE-Proteine werden in artifizielle Liposomen eingelagert. Die Herstellung der untersuchten Proben ist durch Dr. Christina Schütte (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) erfolgt, eine ausführliche Darstellung der Präparation findet sich in (Schuette, Hatsuzawa et al. 2004).

Die untersuchten Modellsysteme sind in Abbildung 5-3 schematisch dargestellt. Synaptobrevin und der binäre Komplex aus Syntaxin und SNAP-25 sind jeweils in Liposomen eingebettet. Es wird ein Syntaxin verwendet, das um seine N-terminale Domäne verkürzt ist und nur das SNARE-Motiv und die Transmembranregion enthält (Syntaxin 183-289, (Schuette 2004)). Die Markierungspositionen für die Fluorophore liegen innen an der Transmembranregion der Proteine. Synaptobrevin ist mit dem Donor-Farbstoff Alexa 488 und Syntaxin mit dem Akzeptor-Farbstoff Alexa 594 fluoreszenzmarkiert. Die Fusion der Liposomen erfolgt über die Ausbildung des ternären Komplexes und es entsteht ein sehr geringer Abstand zwischen den Fluorophoren, so dass ein fluoreszenzresonanter Energietransfer stattfinden kann.

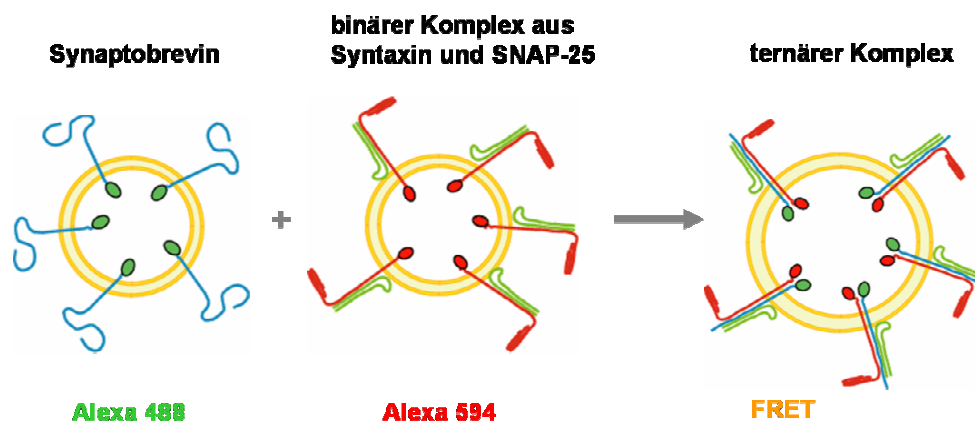


Abbildung 5-3: Schematische Darstellung der eingesetzten Modellsysteme: Die fluoreszenzmarkierten Proteine sind in Liposomen eingebettet; bei einer Fusion der Liposomen bildet sich der ternäre Komplex aus, und es findet FRET statt. (Die Abbildung ist freundlicherweise von Dr. C. Schütte (ProSciencia, Lübeck) zur Verfügung gestellt worden).

Zusätzlich ist ein Modellsystem von angedockten Liposomen entwickelt worden. Dieses ist in Abbildung 5-4 schematisch dargestellt. Für diese Andockkontrolle wird bei der Liposomenherstellung biotinyliertes Lipid zur Lipidmischung zugegeben. Nach Ausbildung der Liposomen wird Streptavidin hinzugegeben, und über die Bindung des Streptavidins an das Biotin bilden sich angedockte Liposomen aus. Um eine Membranfusion zu unterbinden, sind in beide Liposomenfraktionen Synaptobrevin-Proteine eingelagert, die gemeinsam keine Fusion initiieren. Eine Fraktion der Liposomen ist mit Synaptobrevin-Proteinen versehen, die

mit Alexa 488 fluoreszenzmarkiert sind, die andere Fraktion beinhaltet Synaptobrevin, welches mit Alexa 595 markiert ist.

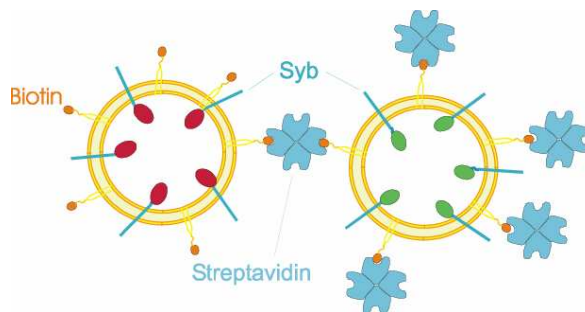


Abbildung 5-4: Schematische Darstellung eines Modellsystems für andockende Liposomen. Über biotinylierte Lipide und die anschließende Zugabe von Streptavidin bilden sich andockende Liposomen aus. (Die Abbildung ist freundlichst von Dr. C. Schütte (ProSciencia, Lübeck) zur Verfügung gestellt worden).

Für die Untersuchungen zur Membranfusion sind die Synaptobrevin-haltigen Liposomen (Donor-Liposomen) und die Syntaxin/SNAP-25-haltigen Liposomen (Akzeptor-Liposomen) im Verhältnis 1:3 gemischt und bei 37°C inkubiert worden. Der Überschuss an Akzeptor-Liposomen soll eine umfassende Fusion der Donor-Liposomen gewährleisten. Die beschriebene Probe stellt die Fusionsprobe dar. Tabelle 5-1 zeigt die verschiedenen Liposomen, welche in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzt worden sind. n gibt die mittlere Anzahl der Proteine in den Liposomen an, welche als statistisch verteilt angesehen werden muss. Sie ist in den Experimenten variiert worden ($n = \{1; 3; 5; 7,5; 10; 20; 30; 100\}$).

Die Frage der Fusions-Kinetik ist nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen gewesen, zum Zeitpunkt der Messung sollten alle Andock- und Fusionsprozesse abgeschlossen sein.

DA-Fusionsprobe	$(Sb(A1488) + Sx(A1594)/SNAP25)-n$
D-Liposomen	$(Sb(A1488))-n$
A-Liposomen	$(Sx(A1594)/SNAP25)-n$
Andock-Kontrolle	$(Sb(A1488) + Sb(A1594))-n$

Tabelle 5-1: Liposomen, welche in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzt worden sind. Alle Liposomen einer ausgewählten Probe besitzen die gleiche Anzahl an Proteinen, da in den vorliegenden Untersuchungen grundsätzlich nur D- und A-Liposomen mit gleicher Protein-Zahl als DA-Fusionsprobe angesetzt worden sind (D-Donor, A-Akzeptor).

Etwa 80% des Syntaxins und 65% des Synaptobrevins sind mit korrekter Orientierung in die Membran eingebaut. Der Markierungsgrad beträgt für das Alexa 488 zirka 95% und für das Alexa 594 85-90%.

Die Durchmesser der Liposomen wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestimmt und betragen etwa 30 nm. Die Lipidmischung ist nach Möglichkeit den nativen Bedingungen angeglichen; die Ladung der verwendeten Lipide ist negativ bzw. neutral.

5.2 MFD-Untersuchungen zur Membranfusion

Bei solch komplexen Systemen wie sie die Liposomen für die Untersuchungen zur SNARE-Protein-unterstützten Membranfusion darstellen, wird ein nicht unerheblicher Anteil der experimentellen Bemühungen sich vorab auf die Entwicklung einer geeigneten fluoreszenzmarkierten Probe und ihrer Anwendbarkeit im Experiment konzentrieren. Daher erfolgt in diesem Abschnitt nach der Beschreibung der experimentellen Durchführung zunächst eine Charakterisierung der entwickelten Probe, um mit diesen Erkenntnissen die Ergebnisse der weiterführenden Experimente ausführlich diskutieren zu können.

5.2.1 Experimentelle Durchführung

Untersuchungen zur Membranfusion über die MFD stellen besondere Anforderungen an die experimentelle Durchführung der Messungen und die sich anschließende Analyse der Daten. Durch die Einbettung der fluoreszenzmarkierten SNARE-Proteine in Liposomen ist die Diffusionszeit gegenüber den isolierten Proteinen verlängert, was prinzipiell den Vorteil langer Beobachtungszeiten mit sich bringt, jedoch experimentell mit zusätzlichem Aufwand verbunden ist. So können Untersuchungen von derart großen Objekten nicht wie üblich in einem offenen Tropfen der verdünnten Lösung durchgeführt werden, da durch externe Schwingungen der Umgebung, die sich auf den Tropfen übertragen, ein detektierter Liposomendurchtritt durch das Anregungsvolumen ebenfalls durch die Schwingung überlagert wird. Systeme dieser Dimension werden daher in einem zylindrisch begrenzten Probenvolumen (25 μ l) untersucht (Micro Carrier AC 24/25, Evotec Biosystems, Hamburg). Ferner muss für eine effektive Nutzung der verlängerten Beobachtungszeit eine Photozerstörung der Fluorophore während des Liposomendurchtritts durch das Anregungsvolumen unterbunden werden. Dieses wird durch entsprechend gering eingestellte Anregungsleistungen erreicht (vgl. Kapitel 3.3.1); die eingesetzten mittleren Anregungsleistungsdichten sind in Tabelle 5-2 aufgeführt. Die Anregung der Fluorophore erfolgt wahlweise über einen oder zwei eingekoppelte Laser: Die Anregung der Donor-

Fluorophore geschieht über den Argon-Ionen-Laser (gepulste Strahlung, 476,5 nm), optional besteht die Möglichkeit einer zusätzlichen Anregung der Akzeptor-Fluorophore mit dem Helium-Neon-Laser (kontinuierliche Strahlung, 594 nm).

Lasertyp	Anregungswellenlänge λ / nm	Leistungsdichte P / kWcm ⁻²
Argon-Ionen	476,5	9,2
Helium-Neon	594,0	0,8

Tabelle 5-2: Verwendete Laser, Anregungswellenlängen λ und Anregungsleistungsdichten P für Liposommessungen in Lösung. Die Anregungsleistungsdichten sind als mittlere Leistungen für die gepulste Strahlung (73 MHz) des Argon-Ionen-Lasers und die kontinuierliche Strahlung des Helium-Neon-Lasers angegeben.

Die vorliegenden Untersuchungen sind grundsätzlich mit Liposomen durchgeführt worden, die eine definierte mittlere Anzahl an SNARE-Proteinen in ihrer Membran aufweisen. Für eine ausgewählte Fusionsprobe, welche die mittlere Proteinzahl n besitzt, sind die in Tabelle 5-1 aufgelisteten Liposomen experimentell erfasst worden. Jede Probe ist zunächst über eine Anregung mit dem Argon-Ionen-Laser (476,5 nm) und dann über die simultane Anregung mit Argon-Ionen- und Helium-Neon-Laser (476,5 nm und 594 nm) untersucht worden. Die Untersuchungen über eine Simultananregung gewährleisten eine genaue Zuordnung der Fluoreszenzereignisse und Artefakte können ausgeschlossen werden. Für die DA-Fusionsprobe und die Andockkontrolle wird über die simultane Anregung von Donor- und Akzeptor-Fluorophor die gleichzeitige Anwesenheit von beiden Farbstoffen in der Probe überprüft. Durch die Auswahl der Farbstoffe (Alexa 488/Alexa 594) und deren spektrale Eigenschaften ergibt sich ein nicht zu vernachlässigender Anteil der direkten Anregung der Akzeptor-Fluorophore durch den Argon-Ionen-Laser. Daher werden auch bei einer Anregung nur mit 476,5 nm ein Teil Durchtritte detektiert, die von Liposomen herrühren, die ausschließlich Akzeptor-markierte Proteine aufweisen. Durch ihre geringen Zählraten im grünen Wellenlängenbereich können die Ereignisse leicht identifiziert und über die selektive Spektroskopie von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Durch den eingesetzten Überschuss an A-Liposomen beträgt der Prozentsatz dieser Ereignisse etwa 10% der Gesamt ereignisse.

Eventuell auftretende Aggregate werden über die Beschränkung der maximalen Anzahl von Photonen pro Liposomendurchtritt über die selektive Spektroskopie von den Analysen ausgeschlossen.

5.2.2 Charakterisierung der untersuchten Liposomen

5.2.2.1 Auswahl der Fluoreszenzmarkierung

Bei FRET-Untersuchungen an einzelnen Molekülen, die mit Hilfe der MFD vorgenommen werden und bei denen das Ziel die Bestimmung der FRET-Effizienz ist, wird ein hoher Markierungsgrad zwar angestrebt, ist jedoch durch die Möglichkeiten der selektiven Spektroskopie keine Voraussetzung für qualitative und quantitative Aussagen. Im Gegensatz hierzu werden die Untersuchungen zur Membranfusion durch niedrige Markierungsgrade der SNARE-Proteine erschwert, da es bei diesen Experimenten um die Ermittlung eines Verhältnisses bzw. um die Auszählung von FRET-aktiven und -inaktiven Molekülen geht. Bei geringen Akzeptor-Markierungsgraden ist unter Umständen ein Teil der Liposomen fusioniert, ohne dass diese als FRET-Ereignis detektiert werden können, da die Donor-Farbstoffe ihre Anregungsenergie nicht an einen Akzeptor abführen können. Der bestimmte Anteil an fusionierten Liposomen würde in diesem Fall geringer ausfallen als er tatsächlich ist.

Der Farbstoff Alexa 488 hat sich in der Vergangenheit als Donor-Fluorophor am SNARE-Protein Syntaxin bewährt (Margittai, Widengren et al. 2003). Für diese Experimente war das Syntaxin jedoch nicht in Liposomen eingebaut. Für die hier beschriebenen Untersuchungen erweist sich diese Markierung als ungünstig, da die Fluoreszenz von Alexa 488 bei Insertion des Syntaxins in die Liposomen teilweise gelöscht wird. Die Fluoreszenzlöschung hat eine verringerte Fluoreszenzausbeute sowie eine verminderte Fluoreszenzlebensdauer gegenüber dem freien Fluorophor ($\tau_D = 2,3$ ns statt $\tau_D = 4,0$ ns für (Sx(A1488)/SNAP25)-0,3) zur Folge. Während der Herstellung des Syntaxins wird häufig eine Dimer-Bildung beobachtet, daher ist eine Selbstlöschung der Fluorophore als Folge des vorliegenden Dimers im Liposom wahrscheinlich. Die Markierung von Syntaxin mit dem Donor-Fluorophor scheidet somit aus. Bei Markierung des Gegenstücks Synaptobrevin hingegen sind nur geringfügige Löscheffekte für das Alexa 488 beobachtet worden. Hier tritt eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer durch Selbstlöschung lediglich bei einer hohen Anzahl an markierten Proteinen im Liposom auf. Für die Untersuchungen der Membranfusion über die MFD werden daher nur 10% der Synaptobrevin-Proteine mit dem Farbstoff Alexa 488 markiert, um eine Selbstlöschung der Fluorophore nach Möglichkeit zu vermeiden. Bei

zirka 30 Proteinen pro Liposom und einem Markierungsgrad von 10% tritt so eine um lediglich 400 ps verminderte Fluoreszenzlebensdauer im Vergleich zum freien Farbstoff auf ($\tau_D = 3,6$ ns statt $\tau_D = 4,0$ ns für (Sb(A1488))-30).

Bei einer entsprechenden Auswahl der Farbstoffe nach ihrer spektralen Separation würde auf Grund der geringeren Anteile der direkten Anregung des Akzeptors und des Crosstalks ein höherer Kontrast der experimentellen Daten erzielt werden. Der Farbstoff Alexa 633 als Akzeptor erfüllt prinzipiell diese Voraussetzungen und liefert für die Membranfusion vergleichbare Ergebnisse wie der Akzeptor-Farbstoff Alexa 594. Allerdings weist Alexa 633 einen hohen Anteil der Triplettbesetzung auf, wodurch dem Messprozess Akzeptor-Photonen verloren gehen, was sich wiederum ungünstig auf den Kontrast zwischen Donor und Akzeptor auswirkt. Alexa 633 ist daher trotz der guten spektralen Separation nicht als Farbstoff eingesetzt worden. Für andere Akzeptor-Fluorophore wie den Farbstoff Cyanin 5 haben sich die Markierungsgrade als zu gering erwiesen. Die hier präsentierten Messungen sind mit (Alexa 488)-markiertem Synaptobrevin und (Alexa 594)-markiertem Syntaxin als FRET-Paar durchgeführt worden.

5.2.2.2 Charakterisierung der Donor-Liposomen

Ziel der Messungen ist die Quantifizierung der Anteile an fusionierten Liposomen in den untersuchten Fusionsproben. Für die korrekte Zuordnung der Ereignisse, welche durch fusionierte Liposomen entstehen, müssen diese von den Durchritten der Donor-Liposomen unterschieden werden. Daher ist die Charakterisierung der reinen Donor-Liposomen unerlässlich. In Tabelle 5-3 sind die Fluoreszenzlebensdauern, τ_D , und die Anisotropien, r , der eingesetzten Donor-Liposomen aufgelistet. Beide Messgrößen sind über eine monoexponentielle Anpassung bestimmt worden. Die Fluoreszenzlebensdauer von Alexa 488 nimmt durch die nicht ganz zu vermeidende Fluoreszenzlöschung mit steigender Zahl der Proteine in den Liposomen ab. Die Anisotropie weist für alle Proben relativ hohe Werte auf, was auf eine eingeschränkte Beweglichkeit der Fluorophore hindeutet.

D-Liposomen	τ_D / ns	r
(Sb(Al488))-1	$4,0 \pm 0,1$	$0,09 \pm 0,01$
(Sb(Al488))-3	$4,0 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,01$
(Sb(Al488))-5	$3,9 \pm 0,1$	$0,09 \pm 0,01$
(Sb(Al488))-7,5	$3,8 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,01$
(Sb(Al488))-10	$3,8 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,01$
(Sb(Al488))-20	$3,8 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,01$
(Sb(Al488))-30	$3,6 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,01$

Tabelle 5-3: Vergleich der ermittelten Fluoreszenzlebensdauern, τ_D , und Anisotropien, r, der eingesetzten D-Liposomen (Sb(Al488))-n, mit $n = \{1; 3; 5; 7,5; 10; 20; 30\}$. Der Markierungsgrad betrug 10%. Die Fluoreszenzparameter sind monoexponentiell angepasst worden. (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Anregungsleistungsdichte 9,2 kW/cm²).

Im Folgenden soll eine Abschätzung der Zählrate pro Donor-Fluorophor vorgenommen werden. Hierfür sind zunächst die Zählraten aller untersuchten D-Liposomen (Sb(Al488))-n, mit $n = \{1; 3; 5; 7,5; 10; 20; 30\}$, über die FCS bestimmt worden. Sie sind in Abbildung 5-5 dargestellt. Alle Zählraten sind auf eine Anregungsleistung von 9,2 kW/cm² bezogen und eventuell schwankende Güten der Justage für verschiedene Messungen sind über eine Kalibration mit dem Farbstoff Rhodamin 110 berücksichtigt. Unter Beachtung der Markierungsgrade von 10% wird deutlich, dass für eine geringe Anzahl Proteine pro Liposom ($n < 10$) die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von nur einem fluoreszenzmarkierten Protein in den Liposomen am höchsten ist. Experimentell spiegelt sich dies in den gleich bleibenden Zählraten für $n = \{1, 3, 5\}$ deutlich wider. Umgekehrt steigt für größere Proteinzahlen pro Liposom die Wahrscheinlichkeit, dass mehr als ein Protein pro Liposom fluoreszenzmarkiert ist. Bereits ab $n \geq 7,5$ lassen sich erhöhte Zählraten feststellen. In diesem Kontext ist zu beachten, dass die Gewichtung der FCS nicht linear sondern quadratisch mit der Zählrate ansteigt. Aufgrund der erhöhten Detektionswahrscheinlichkeit und der Normierung auf die quadrierte Gesamtintensität werden Ereignisse mit einer größeren Helligkeit, hervorgerufen durch mehrere Fluorophore, stärker gewichtet. Daher kann von den Zählraten pro Liposom nicht direkt auf die Anzahl der Fluorophore geschlossen werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss neben der beschriebenen Gewichtung der FCS prinzipiell auch die

Fluoreszenzlöschung für höhere Fluorophorzahlen beachtet werden. Unter der Annahme, dass die ersten drei dargestellten Zählraten ($n = \{1, 3, 5\}$) in der Abbildung 5-5 durch ein einzelnes fluoreszenzmarkiertes Synaptobrevin-Protein hervorgerufen werden, ergibt sich eine mittlere Zählrate von 9,3 kHz pro Fluorophor bei einer Anregungsleistung von $9,2 \text{ kW/cm}^2$.

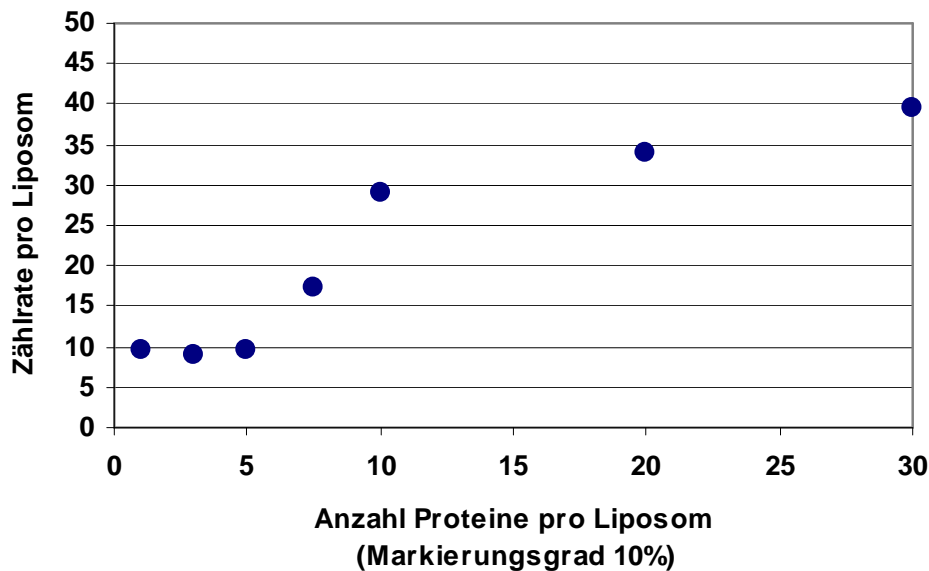


Abbildung 5-5: Zählraten pro D-Liposom für eine ansteigende Anzahl von SNARE-Proteinen ((Sb(A1488))-n, mit $n = \{1; 3; 5; 7,5; 10; 20; 30\}$). Alle Zählraten sind über die FCS bestimmt worden und auf eine Anregungsleistungsdichte von $9,2 \text{ kW/cm}^2$ bezogen. Eventuell schwankende Güten der Justage sind berücksichtigt. Die Markierungsgrade betragen 10%. Für weitere Erläuterungen, siehe Text.

5.2.2.3 Bestimmung der Diffusionskonstanten

Mit Hilfe der FCS sind die Diffusionskonstanten folgender Liposomen bestimmt worden:

- Liposomen mit etwa 100 Synaptobrevin-Molekülen, markiert mit Alexa 488 ((Sb(A1488))-100).
- Liposomen mit etwa 30 binären Komplexen (Sx/SNAP25), wobei das Syntaxin mit Alexa 488 markiert ist ((Sx(A1488)/SNAP25)-30).

Über den Farbstoff Rhodamin 110 mit bekannter Diffusionskonstante ($D = 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Widengren and Rigler 1996; Hansen, Zhu et al. 1998)) wird eine Kalibrierung des konfokalen Volumens vorgenommen. Die Anpassung der Diffusionszeiten der Liposomen erfolgt nach Gleichung 2-29 mit Hilfe des Modells der translativen Diffusion mit Triplettkinetik ohne Einbeziehung des Antibunchings. Die Diffusionskonstante wird über $D = \omega_0^2 / (4t_D)$ bestimmt und liefert folgende Ergebnisse:

(Sb(Al488))-100	$D_{Sb} = 54,7 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$
(Sx(Al488)/SNAP25)-30	$D_{Sx/SNAP25} = 31,3 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$

Tabelle 5-4: Mit Hilfe der FCS bestimmte Diffusionskonstanten einiger Liposomen. Als Referenzprobe ist Rhodamin 110 mit der Diffusionskonstante $D = 2,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ eingesetzt worden. (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Anregungsleistungsdichte $9,2 \text{ kW}/\text{cm}^2$).

Die Größenordnungen der ermittelten Diffusionskonstanten stimmen für beide Liposomen überein. Anhand der Diffusionskonstanten konnte die Fusionswahrscheinlichkeit bei einem Aufeinandertreffen von Liposomen berechnet werden (Schuette, Hatsuzawa et al. 2004). Die Wahrscheinlichkeit ist zu 10^{-7} bestimmt worden; von 10 Millionen Kollisionen führt nur eine zur Membranfusion.

5.2.2.4 Fusion der Liposomen

Fusionierte Liposomen werden über die ausgebildeten ternären SNARE-Komplexe mittels FRET identifiziert, anschließend wird ihr Anteil, bezogen auf die Summe aller detektierten Ereignisse der Fusionsprobe, quantifiziert. Die Lagerung der einzelnen Liposomen-Fractionen erweist sich als unkritisch. Proben, welche über zwei Tage bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert werden, lassen keine Alterungsprozesse erkennen. Ältere Proben sind nicht eingesetzt worden. Auch die langfristige Lagerung bei -80°C von unmittelbar nach ihrer Herstellung schockgefrorenen Proben hat sich als unproblematisch erwiesen und lässt in den experimentellen Untersuchungen keine Unterschiede zu frisch hergestellten Proben erkennen. Der Prozess der Fusion ist ebenfalls unkritisch. Ein Anstieg der Fusion oder des Andockens unter Einzelmolekülbedingungen wird nicht beobachtet. Die Überprüfung der erzielten Ergebnisse unter Einzelmolekülbedingungen durch den Vergleich mit Ergebnissen, die durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie erzielt wurden (Schuette, Hatsuzawa et al. 2004), ergibt vergleichbare Resultate für beide Methoden.

5.2.2.5 Überprüfungen der spezifischen SNARE-Protein-unterstützten Membranfusion

Um zu überprüfen, ob die experimentell nachgewiesene Membranfusion durch SNARE-Proteine spezifisch unterstützt wird, sind folgende Proben untersucht worden:

- Eine Probe, bestehend aus Liposomen mit Syntaxin allein (nicht eingelagert im binären Komplex mit SNAP-25) und Liposomen mit Synaptobrevin (jeweils 30 Proteine pro Liposom).

- Eine Probe, bestehend aus Liposomen, die ausschließlich Synaptobrevin aufweisen. Ein Teil der Liposomen weist Alexa 488-markiertes Synaptobrevin auf, ein anderer Teil Alexa 594-markiertes Synaptobrevin (im Mittel 100 Proteine pro Liposom).

Beide Proben zeigen keine FRET-Population. Somit wird nachgewiesen, dass die Bildung des ternären SNARE-Komplexes essentiell für die Fusion der Liposomen in Lösung ist. Diese tritt ausschließlich bei Anwesenheit aller drei SNARE-Proteine Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP-25 auf. Eine spontane Fusion, welche ohne Beteiligung der SNARE-Proteinen auftreten würde, ist vernachlässigbar (Schuette 2004).

5.2.3 Der Prozess des Andockens

Um zu überprüfen, ob neben der Membranfusion zusätzlich der Prozess des Andockens auftritt, werden zunächst artifiziell hergestellte Andockproben fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Mit Hilfe dieser Experimente werden die Fluoreszenz-Eigenschaften von angedockten Liposomen bestimmt, um diese Population später in den Fusionsproben von den fusionierten Liposomen unterscheiden zu können.

Die Beschreibung der Herstellung ist in Abschnitt 5.1.3 erfolgt: Die Andockkontrollen bestehen aus Liposomen mit Synaptobrevin, bei der eine Fraktion mit Alexa 488 und eine andere mit Alexa 594 markiert ist. Das Andocken der Liposomen wird durch eine Biotin-Streptavidin-Bindung realisiert. Bei der Messung der Andockkontrollen treten im Allgemeinen zwei Spezies auf. Neben der Population der angedockten Liposomen tritt immer eine zweite Population auf, welche den Donor-Liposomen zugeordnet wird. Die Population der angedockten Liposomen weist gegenüber den Donor-Liposomen einen erniedrigten Wert des Quotienten der grünen und roten Fluoreszenzsignale, S_g/S_r , und eine leicht verkürzte Fluoreszenzlebensdauer, $\tau_{D(A)}$, auf, was einer Spezies mit auftretendem fluoreszenzresonanten Energietransfer niedriger Effizienz entspricht. Durch die Lokalisierung der Fluorophore innerhalb der Liposomen ist ein resonanter Energietransfer von Donor- zu Akzeptor-Fluorophor, welcher über die Distanz von zwei Membranschichten ($\approx 100\text{\AA}$) stattfinden müsste, allerdings so gut wie ausgeschlossen. Vielmehr ist das Auftreten der Population auf den Anteil der mit falscher Orientierung eingebauten SNARE-Proteine zurückzuführen, welche ihre Farbstoffmarkierung außerhalb der Liposomen tragen (35%). Eine Population hoher FRET-Effizienz, wie sie beim Andocken von Liposomen mit eingebauten SNARE-Proteinen falscher Orientierung zu erwarten wäre, wird nicht beobachtet. Dieses ist auf die niedrige Wahrscheinlichkeit zurückzuführen, dass zwei Liposomen mit falsch eingebauten

und fluoreszenzmarkierten Proteinen aufeinander treffen (<1%, bei einem Protein pro Liposom).

In Abbildung 5-6 A und B sind exemplarisch die experimentellen Daten der Andock-Kontrolle (Sb(A1488) + Sb(A1594))-7,5 den Daten der reinen Donor-Liposomen (Sb(A1488))-7,5 gegenübergestellt. Es sind hier die Verhältnisse der Fluoreszenz-Signale, S_g/S_r , über die Lebensdauern der Donor-Fluorophore, $\tau_{D(A)}$, aufgetragen. Ereignisse, die aus der direkten Anregung des Akzeptor-Fluorophors folgen, sind über die selektive Spektroskopie von dem Datensatz ausgeschlossen worden. Eine unmittelbare Separation der andockten Liposomen von den Donor-Liposomen ist aufgrund der ähnlichen Fluoreszenz-Eigenschaften kaum möglich. Dennoch zeigt der Vergleich der Andockkontrolle mit den Donor-Liposomen augenfällig das Auftreten einer zweiten Spezies, die sich in einer deutlichen Verbreiterung der Verteilung von S_g/S_r und einer geringfügigen Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauern zu kleineren Werten äußert.

Die experimentellen Daten einer Fusionsprobe sind in Abbildung 5-6 C dargestellt. Anhand der Vergleichsmessungen können jetzt die Anteile der Fraktionen der reinen Donor-Liposomen, der andockten Liposomen und der fusionierten Liposomen, die sich durch eine hohe FRET-Effizienz auszeichnen, abgeschätzt werden. Bei Überprüfung verschiedener Fusionsproben mit variierender Anzahl SNARE-Proteine ist für alle Proben eine Andock-Population erkennbar.

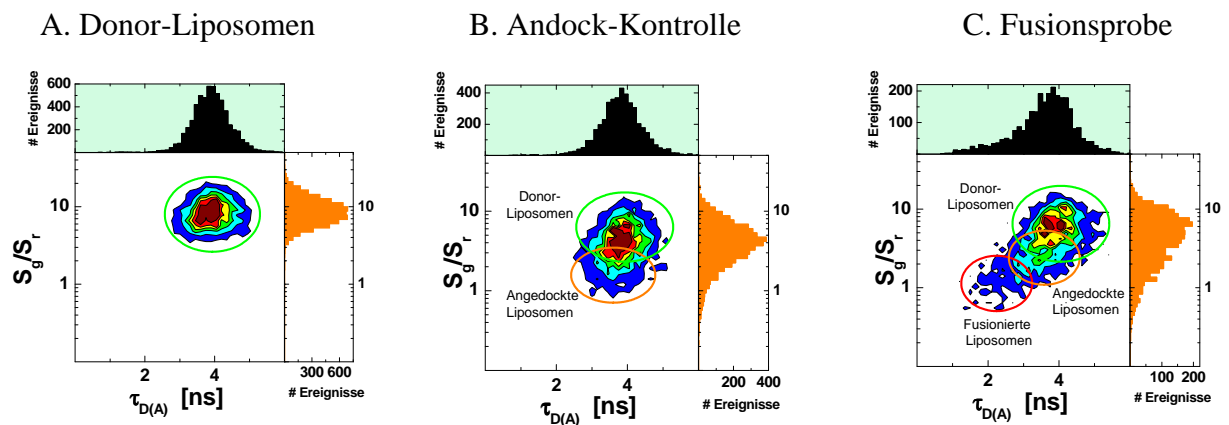


Abbildung 5-6: Vergleich der experimentellen Daten einer Probe: A: Donor-Liposomen (Sb(A1488))-7,5; B: Andock-Kontrolle (Sb(A1488) + Sb(A1594))-7,5; C: Fusionsprobe (Sb(A1488) + Sx(A1594)/SNAP25)-7,5. Es sind die Verhältnisse der Fluoreszenz-Signale, S_g/S_r , über die Lebensdauern der Donor-Fluorophore, $\tau_{D(A)}$, aufgetragen. Ereignisse, die aus der direkten Anregung des Akzeptor-Fluorophors folgen, sind nicht dargestellt. (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Anregungsleistungsdichte 9,2 kW/cm²).

Um der Frage nachzugehen, ob der Prozess des Andockens ebenso wie die Membranfusion ein von den eingesetzten SNARE-Proteinen initiiertes spezifischer Prozess ist, sind die Fusionsproben - bestehend aus Liposomen mit Synaptobrevin und Liposomen mit Syntaxin, welches nicht mit SNAP-25 im binären Komplex eingebettet ist - auf ihre Andockpopulationen hin untersucht worden (im Mittel 30 Proteine pro Liposom). Diese liefern weder fusionierte noch angedockte Anteile. Eine Fusionsprobe, bestehend aus Liposomen mit Synaptobrevin, bei der eine Fraktion mit Alexa 488 und eine andere mit Alexa 594 markiert ist (im Mittel 100 Proteine pro Liposom), weist neben der Population der Donor-Liposomen eine geringe Fraktion einer zweiten Population auf, welche über angedockte Liposomen zu erklären sein könnte. Da ihr Anteil weniger als 5% der Gesamt Ereignisse beträgt, wird ihr Auftreten als nicht signifikant gedeutet. Auf dieser Grundlage wird eine Spezifität des Andock-Prozesses analog zur Membranfusion angenommen.

Aus der obigen Betrachtung der experimentellen Daten wird deutlich, dass das Andocken von Liposomen ein parallel zur SNARE-Protein-spezifischen Membranfusion auftretender Prozess ist. Ob das Andocken der Membranfusion notwendig vorangestellt ist, kann auf Grundlage der bisherigen Daten nicht eindeutig entschieden werden. Die Spezifität des Andockens allerdings deutet auf eine aktive Beteiligung dieses Prozesses in der Membranfusion hin. Eine Quantifizierung der Andock-Populationen und eventuelle Abhängigkeiten von der Anzahl der vorhandenen SNARE-Proteine in den Liposomen werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.2.4 Membranfusion: Welche Anzahl an SNARE-Proteinen wird benötigt?

Neben dem Prozess des Andockens ist in den vorliegenden Untersuchungen die SNARE-Protein-spezifische Fusion der Liposomen von grundlegendem Interesse. Die zentrale Fragestellung konzentriert sich auf die Anzahl der SNARE-Proteine, welche für eine Fusion von Liposomen notwendig ist.

Es sind diesbezüglich Fusionsproben, bestehend aus Liposomen mit einer variierenden Anzahl an SNARE-Proteinen, experimentell untersucht worden. Die experimentellen Ergebnisse für eine Reihe von Fusionsproben (Sb(A1488) + Sx(A1594)/SNAP25)-n, mit $n = \{1; 3; 5; 7,5; 10; 30\}$, sind in Abbildung 5-7 dargestellt.

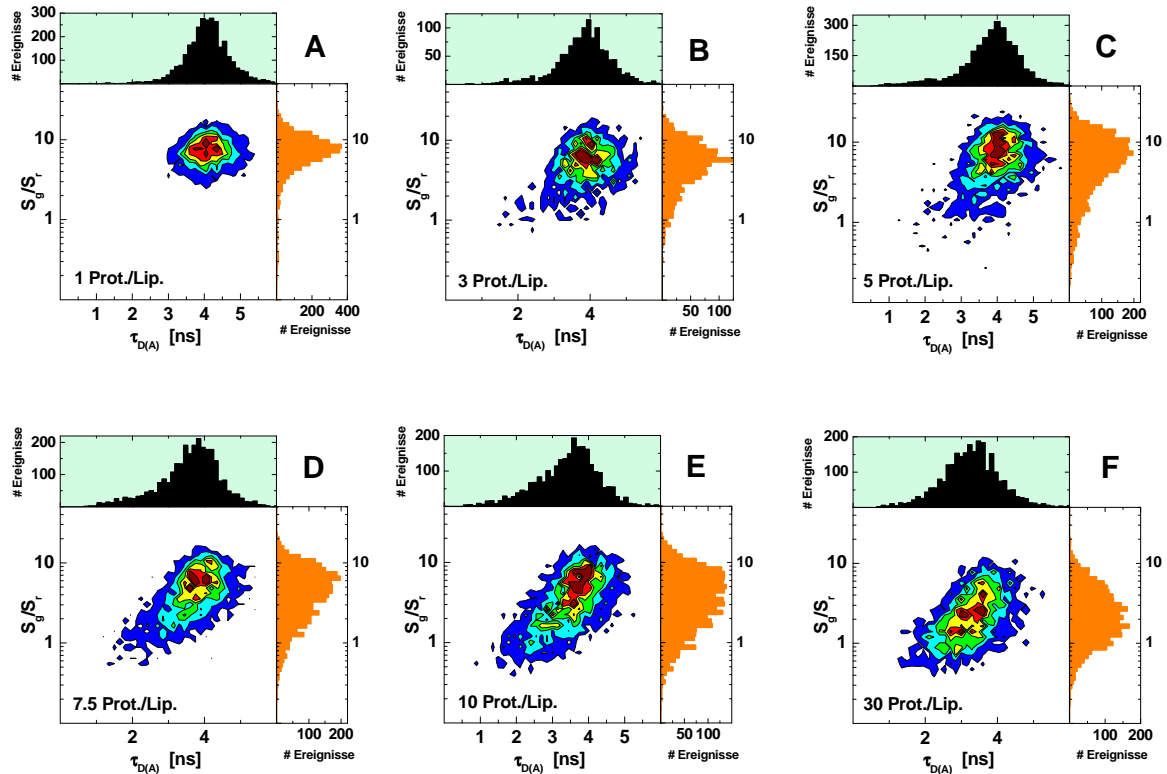


Abbildung 5-7: Experimentelle Ergebnisse für eine Reihe von Fusionsproben (Sb(A1488) + Sx(A1594)/SNAP25)-n, mit $n = \{1; 3; 5; 7,5; 10; 30\}$. A: 1 Protein pro Liposom; B: 3 Proteine pro Liposom; C: 5 Proteine pro Liposom; D: 7,5 Proteine pro Liposom; E: 10 Proteine pro Liposom; F: 30 Proteine pro Liposom. Es sind die Verhältnisse der Fluoreszenz-Signale, S_g/S_r , über die Lebensdauern der Donor-Fluorophore, $\tau_{D(A)}$, aufgetragen. Ereignisse, die aus der direkten Anregung des Akzeptor-Fluorophors folgen, sind nicht enthalten. (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Anregungsleistungsdichte $9,2 \text{ kW/cm}^2$).

Es sind die Verhältnisse der Fluoreszenz-Signale, S_g/S_r , über die Lebensdauern der Donor-Fluorophore, $\tau_{D(A)}$, aufgetragen. Ereignisse, die aus der direkten Anregung des Akzeptor-Fluorophors folgen, wurden über die selektive Spektroskopie herausgefiltert. Es ist deutlich ein Anwachsen der FRET-Populationen zu beobachten. Sowohl das Andocken als auch die Fusion der Liposomen nimmt mit der Zahl der SNARE-Proteine in den Liposomen zu.

Um die Fraktionen der angedockten und der fusionierten Liposomen zu quantifizieren, erfolgt eine Anpassung der experimentellen Daten. Die Unterscheidung der drei Populationen, die für jede Fusionsprobe präsent sind, wird über die Verhältnisse der Fluoreszenz-Signale, S_g/S_r , vorgenommen. Da lediglich eine Quantifizierung der jeweiligen Anteile angestrebt wird, erfolgt die Anpassung über eine flächennormierte Gauß-Funktion:

$$y = y_0 + \frac{A}{\sigma\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-\frac{2(x-\mu)^2}{\sigma^2}\right) \quad \text{mit } y_0 = 0 \quad (\text{Gl. 5 - 1})$$

μ entspricht dem Erwartungswert der Verteilung, σ der Standardabweichung. A liefert das Integral der angepassten Kurve. Die Gauß-Funktion liefert eine hinreichende Anpassung der Verteilungen. Für eine exakte Anpassung der FRET-Verteilungen müsste eine Summe von Poisson-Verteilungen für die Fluoreszenzsignale S_g und S_r untersucht werden (Gopich 2005).

Zunächst erfolgt eine Anpassung der experimentell ermittelten S_g/S_r -Verteilung der Donor-Liposomen (Daten nicht dargestellt). Es werden so Erwartungswert und Standardabweichung für diese Population ermittelt. Daraufhin erfolgt die Anpassung der gemessenen S_g/S_r -Verteilung der Andock-Kontrolle (Daten ebenfalls nicht dargestellt). Dieses geschieht über die bereits festgelegte Verteilung der Donor-Liposomen (Erwartungswert und Standardabweichung sind festgelegt, das Integral der Funktion wird mit angepasst) und eine zusätzliche Anpassung der Population der angedockten Liposomen. Die beiden ermittelten Gauß-Funktionen gehen wiederum in die Anpassung der gemessenen S_g/S_r -Verteilung der Fusionsprobe mit ein (Erwartungswerte und Standardabweichungen sind wiederum festgelegt, das Integral wird mit angepasst). Als zusätzliche Randbedingung wird die Summe der Anteile von Donor-, angedockten und fusionierten Liposomen auf Eins festgelegt. Abbildung 5-8 zeigt exemplarisch eine grafische Darstellung der durchgeführten Anpassung der Anteile für die Liposomen der Fusionsprobe (Sb(AI488) + Sx(AI594)/SNAP25)-7,5. Die Anpassung gibt in guter Näherung die experimentellen Daten wieder.

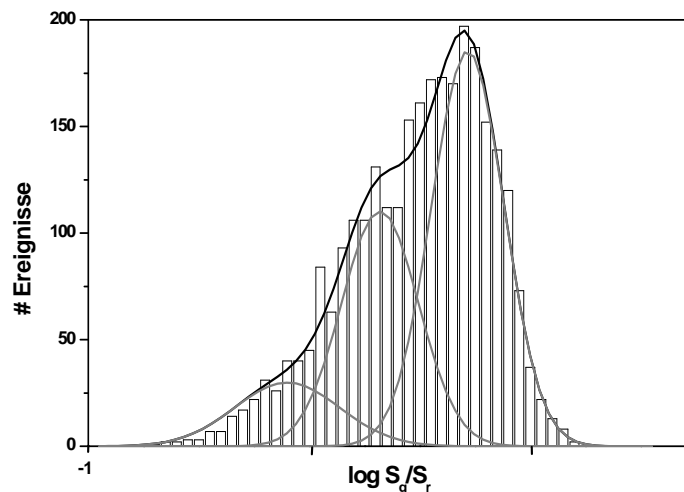


Abbildung 5-8: Grafische Darstellung der Anpassung von experimentell ermittelten S_g/S_r -Verteilungen der Fusionsprobe (Sb(AI488) + Sx(AI594)/SNAP25)-7,5 (vgl. Abb. 5-7 D) über Gauß-Funktionen (Gl. 5-1). Die Anpassung ermöglicht die Quantifizierung der Anteile der angedockten und fusionierten Liposomen. (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Anregungsleistungsdichte 9,2 kW/cm²). Nähere Erläuterungen hierzu finden sich im Text.

Die Bestimmung der Anteile an angedockten und fusionierten Liposomen ist für alle vorliegenden Fusionsproben (Sb(A1488) + Sx(A1594)/SNAP25)-n, mit $n = \{1; 3; 5; 7,5; 10; 30\}$ vorgenommen worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-9 zusammengefasst. Der Übersichtlichkeit halber sind die Datenpunkte mit Trendlinien versehen.

Es ergibt sich folgender Zusammenhang: Der Anteil an Donor-Liposomen nimmt mit ansteigender Proteinzahl ab, während die Fraktionen der angedockten und fusionierten Liposomen zunehmen. Bei zirka 30 Proteinen pro Liposom sind insgesamt 90% der Liposomen entweder im angedockten oder fusionierten Zustand. Dieser Prozentsatz stellt eine obere Grenze dar; auch für eine viel höhere Anzahl an Proteinen in den beteiligten Liposomen in der Fusionsprobe wird dieser Prozentsatz nicht überschritten (Schuette, Hatsuzawa et al. 2004).

Der Anteil der angedockten Liposomen wächst für kleine Zahlen an SNARE-Proteinen zunächst stärker an als der Anteil der fusionierten Liposomen. Ab einer Grenze zwischen 5 und 7,5 Proteinen nimmt die Fraktion der angedockten Liposomen einen Anteil von etwa 32% an, welcher für weiter ansteigende Proteinzahlen konstant bleibt. Bei etwa zehn Proteinen entspricht der Anteil der Fusion in etwa dem Anteil des Andockens und übersteigt diesen für höhere Proteinzahlen. Der vorläufig steilere Anstieg der Fraktion der angedockten Liposomen zeigt, dass der Prozess des Andockens bereits für im Mittel 1-3 Proteine pro Liposom stattfindet, während Fusion erst bei höheren Zahlen sichtbar wird. Dieses Ergebnis verweist klar auf einen Schwellwert von erforderlichen SNARE-Proteinen für den Prozess der Fusion, das Andocken der Liposomen findet bereits für geringere Proteinzahlen statt.

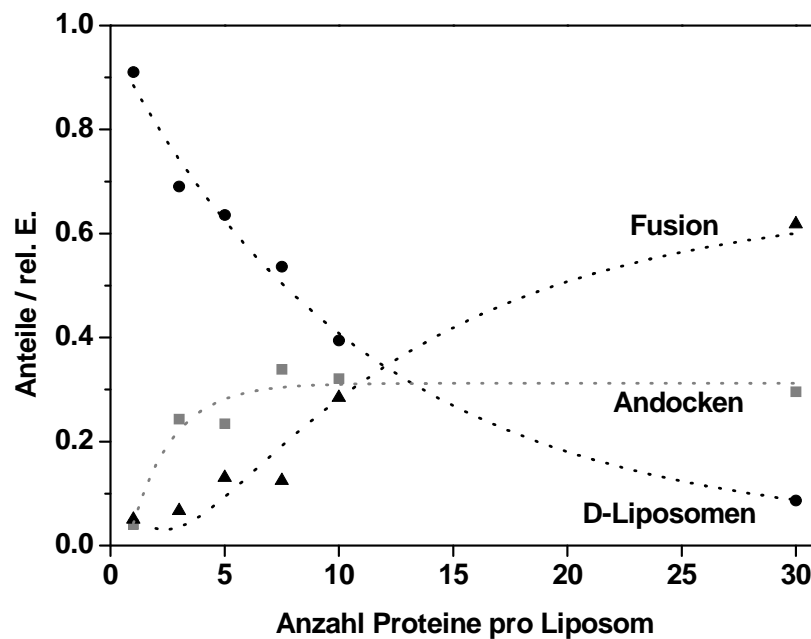


Abbildung 5-9: Grafische Darstellung der durch Gauß-Funktionen angepassten Anteile von Donor-, andockten und fusionierten Liposomen in den Fusionsproben über die Anzahl der enthaltenen SNARE-Proteine in den Liposomen. Der Übersichtlichkeit halber sind die Datenpunkte mit Trendlinien versehen. (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Anregungsleistungsdichte 9,2 kW/cm²).

5.2.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die Untersuchungen zur SNARE-Protein-unterstützten Membranfusion fordern ein komplexes, biologisches System aus unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten SNARE-Proteinen, welche in die Membranen von Liposomen eingebettet sind. Experimentell ergibt sich hieraus der Anspruch einer umfassenden Charakterisierung der Proben, um ein Verständnis der Vorgänge, die in den untersuchten Proben registriert werden, zu entwickeln. Zusätzlich zu den maßgeblichen Untersuchungen zur Membranfusion wird daher stets eine Überprüfung der Gegenwart und Funktionalität aller Fluorophore und damit aller Einzelkomponenten vorgenommen, um eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse zu gewährleisten.

Über die MFD werden die Heterogenitäten der untersuchten Proben aufgedeckt und umfassend untersucht. Die selektive Spektroskopie ermöglicht den Ausschluss unerwünschter Ereignisse, z. B. hervorgerufen durch ausgebildete Aggregate. Ebenso wird der Anteil der reinen Akzeptor-Liposomen, welche über die Donor-Anregungswellenlänge direkt angeregt werden, von der weiteren Analyse der Daten ausgeschlossen. Die Charakterisierung der Donor-Liposomen offenbart, dass die Donor-Fluorophore nicht gänzlich unabhängig

voneinander sind. Es treten Löschprozesse auf, die z. B. eine verkürzte Fluoreszenzlebensdauer verursachen. Da die Löschung der Fluoreszenz mit der Anzahl der fluoreszenzmarkierten Proteine in einem Liposom zunimmt, ist eine Selbstlöschung der Fluorophore wahrscheinlich. Aus diesem Grund ist nur jedes zehnte Synaptobrevin-Protein mit Alexa 488 fluoreszenzmarkiert. Da die Selbstlöschung der Fluorophore bereits eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer verursacht, wird der bei der Membranfusion auftretende fluoreszenzresonante Energietransfer über das Verhältnis der Signalintensitäten, S_g/S_r , und nicht über die Lebensdauer des Donors, $\tau_{D(A)}$, identifiziert. Die untersuchten Fusionsproben weisen neben der Population der reinen Donor-Liposomen zwei FRET-Populationen mit unterschiedlichen Effizienzen auf, die abhängig von den Proben in variablen Anteilen auftreten. Neben einer Population mit hoher FRET-Effizienz, die den fusionierten Liposomen zugeordnet wird, tritt eine Population mit niedriger FRET-Effizienz auf. Diese kann über einen Vergleich mit den Fluoreszenzeigenschaften einer künstlich hergestellten Andock-Kontrolle als Population angedockter Liposomen identifiziert werden. Das Auftreten dieser Spezies in den Untersuchungen zur Membranfusion liefert ein wichtiges Zwischenergebnis, denn es steht in Einklang mit der Vermutung, dass das Andocken der Membranen als wichtiger Erkennungsprozess dem Fusionsvorgang notwendig vorangestellt ist.

Die untersuchten Fusionsprozesse zeigen ferner, dass die Membranfusion spezifisch von den SNARE-Proteinen ausgelöst wird. Nur die gleichzeitige Anwesenheit des Synaptobrevins in der einen Liposomenfraktion und die Gegenwart des binären Komplexes, gebildet aus den Proteinen Syntaxin und SNAP-25, in der anderen Liposomenfraktion führt zu einer Membranfusion der Liposomen komplementärer Fraktionen. Weiterführende Experimente könnten nun zusätzliche katalytische Komponenten für die exozytotische Membranfusion, wie z. B. den Ca^{2+} -Sensor Synaptotagmin (Honda 2002; Jahn, Lang et al. 2003), in die Untersuchungen zum Fusionierungsprozess mit einbeziehen, um die Rolle solcher Additive zu klären.

Auch das Andocken der Liposomen kann im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen als spezifisch identifiziert werden. Die SNARE-Proteine Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP-25 erkennen einander und treten nur bei Anwesenheit aller drei Komponenten in gegenseitige Wechselwirkung. Darüber wird ein Andocken der gegenüberliegenden Membranen veranlasst. In Übereinstimmung mit gängigen Modellen kann dieser Prozess als Zwischenstufe für die Membranfusion angesehen werden, die schließlich über die Ausbildung des ternären SNARE-Komplexes vorgenommen wird.

Verschiedene Fusionsproben mit variabler Anzahl an SNARE-Proteinen sind im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden. Die quantifizierten Anteile der andockten und der fusionierten Liposomen weisen klare Trends auf. Während für Liposomen mit weniger als fünf SNARE-Proteinen das Andocken überwiegt, ist für größere Proteinzahlen die Fusion der dominierende Prozess. Offensichtlich wird für das Andocken der Liposomen eine geringere Zahl an SNARE-Proteinen benötigt. Für die Fusion hingegen muss die Anzahl der SNARE-Proteine einen etwas höheren Schwellwert überschreiten. Die Daten sind verträglich mit dem postulierten Mechanismus des Andockens als Vorstufe der Membranfusion. Für eine genauere quantitative Aussage tritt in den vorliegenden Ergebnissen das Problem der statistischen Verteilung der SNARE-Proteine in den Liposomen auf. Bei der Annahme eines minimalen Schwellwerts werden innerhalb der anzunehmenden Verteilung der Proteine in den Liposomen ausschließlich jene Liposomen fusionieren, die eine Anzahl an SNARE-Proteinen aufweisen, welche oberhalb des Schwellwerts liegen. Unter der Annahme, dass der Einbau der Proteine in die Liposomen ein statistischer Prozess voneinander unabhängiger Ereignisse ist, ist die Zahl der SNARE-Proteine nach der Poisson-Verteilung festgelegt. Sie gibt die Wahrscheinlichkeiten $p(n)$ für n Ereignisse an, wenn der Mittelwert μ gegeben ist:

$$p(n) = \frac{\mu^n}{n!} e^{-\mu} \quad (\text{Gl. 5 - 2})$$

In diesem Fall wären die Verteilungen für kleine Zahlen schmalere als für große. Abbildung 5-10 zeigt eine grafische Darstellung der Poisson-Verteilung für verschiedene Mittelwerte μ .

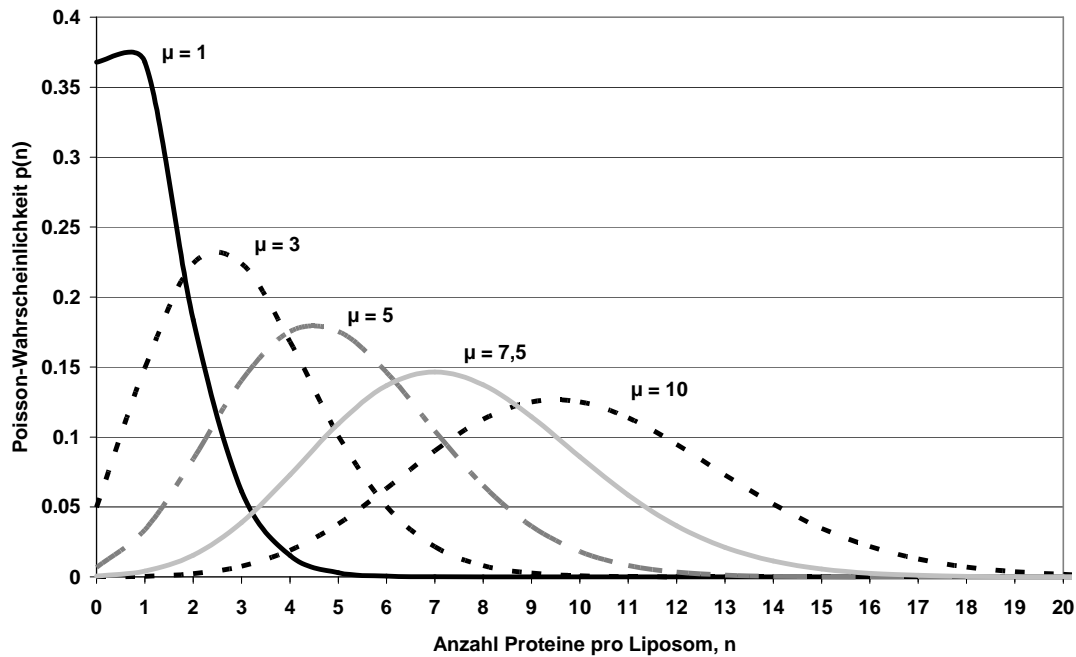


Abbildung 5-10: Grafische Darstellung der Poisson-Verteilung für verschiedene Mittelwerte μ (vgl. auch Kapitel 2.3.1.2). Die Poisson-Verteilung gibt die Wahrscheinlichkeiten $p(n)$ für n Ereignisse an, wenn der Mittelwert μ gegeben ist. Es sind lediglich die Poisson-Verteilungen für die untersuchten Fusionsproben dargestellt.

Durch die partielle Fluoreszenzmarkierung der Proteine besteht eine verminderte Detektionswahrscheinlichkeit der Liposomen, welche eine geringe Anzahl an Proteinen aufweisen. Für Liposomen mit einem Protein wird lediglich im Mittel jedes zehnte Liposom detektiert; für Liposomen mit zehn Proteinen hingegen sollte im Mittel jedes Liposom auch als solches erkannt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein SNARE-Protein ohne Fluorophor in einem Liposom befindet, beträgt $p = 0,90$ bei einem Fluoreszenzmarkierungsgrad von 10%. Für n Proteine in einem Liposom beträgt die Wahrscheinlichkeit p_n , dass kein Protein fluoreszenzmarkiert ist, $p_n = p^n = 0,90^n$. Im Umkehrschluss lässt sich die Wahrscheinlichkeit bestimmen, dass bei n Proteinen in einem Liposom mindestens ein Protein fluoreszenzmarkiert ist und dass das Liposom detektiert wird:

$$P_f(n) = (1 - p^n) \quad (\text{Gl. 5-3})$$

Unter Berücksichtigung dieser Gewichtung der Detektionswahrscheinlichkeiten lassen sich modifizierte Poisson-Verteilungen für die Wahrscheinlichkeiten, dass sich n SNARE-Proteine in einem Liposom befinden und dass dieses detektiert wird, bestimmen:

$$p_f(n) = P_f(n)p(n) \quad (\text{Gl. 5-4})$$

Diese gewichteten Poisson-Verteilungen sind in Abbildung 5-11 grafisch dargestellt. Die Änderungen im Vergleich zu den ungewichteten Poisson-Verteilungen sind für kleine

Proteinzahlen n größer, daher ist der Einfluss der Gewichtung für Liposomen mit geringen Zahlen an SNARE-Proteinen am deutlichsten erkennbar.

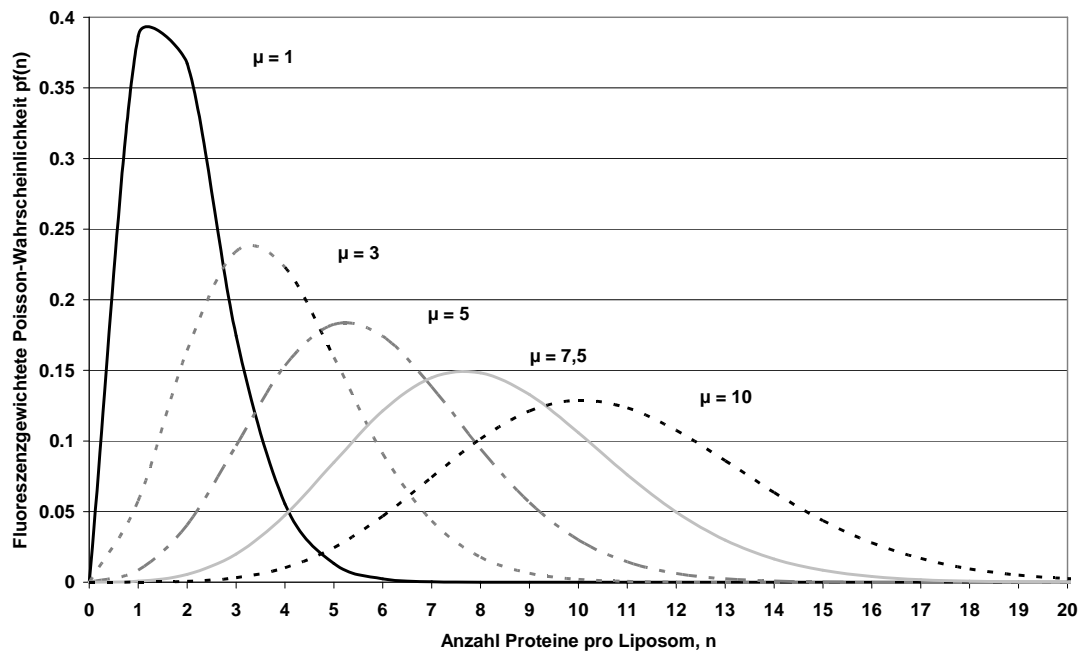


Abbildung 5-11: Grafische Darstellung der gewichteten Poisson-Verteilung für verschiedene Mittelwerte, unter Berücksichtigung, dass lediglich 10% der SNARE-Proteine fluoreszenzmarkiert sind.

Bei einer angenommenen Poisson-Verteilung der SNARE-Proteine in den Liposomen kann für die Fusionsproben über die nach Abbildung 5-9 bestimmten Anteile der angedockten und fusionierten Ereignisse eine Abschätzung der minimal erforderlichen Proteinzahl für den jeweiligen Prozess vorgenommen werden. Innerhalb der Verteilung der Proteine werden nur jene Liposomen andocken bzw. fusionieren können, die eine Proteinzahl oberhalb des angenommenen Schwellwerts aufweisen. Der Vergleich des Anteils von fusionierten/angedockten Liposomen mit dem Poisson-Integral liefert die untere Integrationsgrenze als Schwellwert. Das Verfahren ist in Abbildung 5-12 grafisch dargelegt. Hier sind die Anteile der angedockten (grau) sowie fusionierten Liposomen (schraffiert) am Beispiel der Fusionsprobe (Sb(A1488) + Sx(A1594)/SNAP25))-5 grafisch dargelegt. Als Verteilung wird die gewichtete Poisson-Verteilung mit dem Mittelwert $\mu = 5$ angenommen.

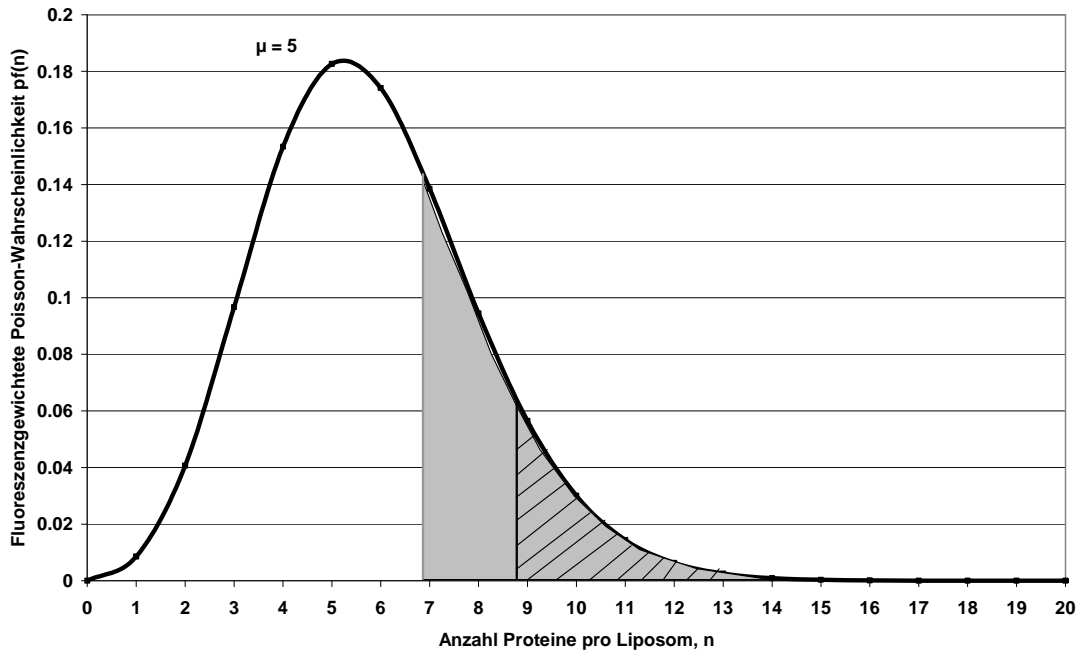


Abbildung 5-12: Grafische Darstellung des Verfahrens zur Ermittlung der erforderlichen Proteinzahlen für das Andocken und die Fusion von Liposomen am Beispiel der Fusionsprobe (Sb(A1488) + Sx(A1594)/SNAP25)-5. Es ist die gewichtete Poisson-Verteilung für den Mittelwert $\mu = 5$ und der Anteil der andockten (grau) sowie fusionierten Liposomen (schraffiert) dargestellt. Die minimal erforderliche Proteinzahl für das Andocken ist über die addierten Fraktionen der Fusion und des Andockens vorgenommen worden; hier wird vorausgesetzt, dass die Fusion durch eine höhere Zahl an Proteinen verursacht wird.

Die Bestimmung der für das Andocken erforderlichen Proteinzahlen ist über die addierten Fraktionen der Fusion und des Andockens extrahiert worden. Hier wird vorausgesetzt, dass für den Fusionsprozess eine höhere Anzahl SNARE-Proteine erforderlich ist. Dieses wird mit den Ergebnissen der Abbildung 5-9 begründet; für eine ansteigende Anzahl an Proteinen tritt zunächst ein Andocken und erst für höhere Proteinzahlen eine Fusion der Liposomen auf.

Bei Einhaltung der exakten Fraktionen von andockten und fusionierten Liposomen werden zunächst kontinuierliche Werte für die Proteinzahlen grafisch bestimmt. Zusätzlich wird nun der Anteil der falsch eingebauten Proteine berücksichtigt, da diese keinen ternären Komplex mit dem Syntaxin und dem SNAP-25 ausbilden können und damit nicht zur Membranfusion beitragen. Der Prozentsatz der korrekt eingebauten Synaptobrevin-Proteine beträgt 65%. Die Korrektur beträgt daher $n^* = 0,65 n$. Da nur diskrete Werte n^* den Proteinzahlen entsprechen können und diese mindestens die ermittelten Anteile an andockten bzw. fusionierten Liposomen herbeiführen müssen, wird die diskrete Proteinzahl über eine Rundung der ermittelten Proteinzahl nach unten bestimmt. Dieses Verfahren liefert

eine Mindestzahl von erforderlichen SNARE-Proteinen für die Prozesse des Andockens und der Fusion unter Berücksichtigung der Fluoreszenzmarkierung und den falsch eingebauten Synaptobrevin-Proteinen. Prinzipiell muss sowohl für die Donor- als auch die Akzeptor-Liposomen eine Poisson-Verteilung der SNARE-Proteine angenommen werden. Da die Akzeptor-Liposomen jedoch im Überschuss zu der Fusionsprobe gegeben werden, wird der Fusionsprozess im Wesentlichen durch die Verteilung der Donor-markierten SNARE-Proteine begrenzt und die Verteilungen der Akzeptor-Liposomen sind in erster Näherung vernachlässigbar. Die vorliegenden Quantifizierungen der Schwellwerte sind daher nur unter Berücksichtigung der gewichteten Poisson-Verteilung der Donor-markierten SNARE-Proteine in den Liposomen vorgenommen worden. Tabelle 5-5 gibt die bestimmten erforderlichen Proteinzahlen unter zusätzlicher Berücksichtigung der falsch eingebauten Synaptobrevin-Proteine für die untersuchten Fusionsproben wieder.

Proteine pro Liposom, n	Erforderliche Proteinzahl für das Andocken	Erforderliche Proteinzahl für Fusion
1	2	2
3	3	4
5	4	5
7,5	5	7
10	6	8

Tabelle 5-5: Für die untersuchten Fusionsproben bestimmte Mindestanzahl der erforderlichen Proteine für das Andocken und für die Membranfusion der Liposomen. Sowohl die Fluoreszenzmarkierung von 10% als auch der Anteil der falsch eingebauten Synaptobrevin-Proteine von 35% sind berücksichtigt. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Die bestimmte Mindestzahl der erforderlichen Proteine für das Andocken und für die Membranfusion steigt mit der mittleren Zahl der SNARE-Proteine in den Liposomen an. Prinzipiell wäre der gleiche Schwellwert für alle Fusionsproben zu erwarten. Drei Folgerungen bieten sich unmittelbar an: 1. Die Annahme der Poisson-verteilten Proteine in den Liposomen ist falsch. 2. Die bestimmten Fraktionen des Andockens und der Fusion sind nicht korrekt. 3. Die Fluoreszenzmarkierung der Proteine beträgt keine 10%. Letzteres hat bei

einem maximalen absoluten Fehler von $\pm 5\%$ keine Auswirkung auf die ermittelten Proteinzahlen und wird daher im Folgenden vernachlässigt.

Die erste Annahme würde bedeuten, dass die Ereignisse für den Einbau der Proteine in die Liposomen nicht unabhängig sind. Eventuell sind bei der Herstellung der Liposomen Wechselwirkungen zu berücksichtigen, welche zu einer Verbreiterung der Poisson-Verteilungen führen würden. Bei einer Wechselwirkung der Synaptobrevin-Proteine untereinander, ähnlich zu der auftretenden Oligomerisierung des Syntaxins, wären die relativen Abweichungen für kleine Proteinzahlen recht hoch und diese Verteilungen würden zu größeren Proteinzahlen hin verbreitert. Hier würden größere Schwellwerte ermittelt. Die Berücksichtigung einer auftretenden Oligomerisierung der Synaptobrevin-Proteine könnte bei angenommenen Poisson-Verteilungen der einzelnen Oligomere in erster Näherung über eine Linearkombination der einzelnen Verteilungen vorgenommen werden. Je nach den auftretenden Wechselwirkungen sind statt der verbreiterten Poisson-Verteilungen jedoch auch gänzlich andere statistische Verteilungen denkbar.

Die Folgerung der inkorrekten Anteile der angedockten und fusionierten Anteile hingegen verweist auf grundsätzlichere Probleme. Da neben den D- auch die A-Liposomen eine Verteilung der SNARE-Proteine aufweisen, können nach Abschluss der Fusion ungleiche Zahlen an Donor- und Akzeptor-Fluorophor vorliegen. Hieraus ergeben sich breit gestreute Werte des Fluoreszenzparameters S_g/S_r , woraus sich in der Anpassung zunächst eine Verschiebung der angedockten und fusionierten Fraktionen ergeben kann. Bei einem Überschuss einzelner Proteine nach Abschluss der Fusion stehen diese wiederum weiteren Andock- oder Fusionsereignissen zur Verfügung, wobei mehrfache Andock- und Fusionsprozesse nur einfach gezählt werden. Dieser Effekt hätte auf Fusionsproben mit einer höheren mittleren Proteinzahl einen größeren Einfluss, hier würden geringere Anteile des Andockens/der Fusion und damit größere Schwellwerte ermittelt.

Einen schwer einzuschätzenden Einfluss birgt die Problematik der biologischen Probe. Der Anteil der Proteine, welche mit falscher Orientierung in die Membran eingebaut sind, begünstigt zwar die Quantifizierung des Andockens, führt jedoch innerhalb der Proteinverteilungen in den Liposomen zu effektiv weniger zur Verfügung stehenden Proteinen, welche das Andocken oder die Fusion initiieren können. Es werden tendenziell höhere erforderliche Proteinzahlen für diese Prozesse ermittelt. Eine Berücksichtigung geschieht über die Proteinzahlen n , der Faktor 0,65 liefert um etwa ein Drittel verringerte Proteinzahlen und ist in Tabelle 5-6 berücksichtigt. Der Effekt wirkt sich auf alle Liposomen gleich aus, unabhängig von der Proteinzahl n , und liefert daher keine Erklärung für den

Anstieg der Schwellwerte mit steigenden Proteinzahlen. Vielmehr ist als Problematik zu beachten, dass die verkehrt eingebauten Proteine sich als Behinderung für die Liposomen erweisen könnten. Ebenso könnte die bereits diskutierte Oligomerisierung sich als hinderlich für die Prozesse des Andockens und der Fusion erweisen und diese blockieren.

Zusammenfassend wird trotz der auftretenden Schwierigkeiten bei der Quantifizierung der SNARE-Proteine durch die durchgeführten Untersuchungen deutlich, dass eine Mindestzahl an Proteinen sowohl für das Andocken als auch für die Fusion der Liposomen erforderlich ist. Dieses ist mit der Vorstellung des Fusionsprozesses über eine vorherige Porenbildung durch die interagierenden SNARE-Proteine vereinbar. Diese kann nur durch ein Minimum an SNARE-Proteinen gebildet werden. Vergangene Studien postulieren eine Mindestzahl von einem SNARE-Komplex bzw. drei und vier SNARE-Komplexen, die für Fusion benötigt werden (Hua 2001; Yersin 2003; Bowen 2004). Der Schwellwert von nur einem erforderlichen Komplex für den Fusionsprozess kann durch die vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden, da für eine geringe Anzahl an Proteinen in den Liposomen zunächst das Andocken und erst für höhere Proteinzahlen auch die Fusion beobachtet wird. Die Zahlen von drei oder vier Komplexen hingegen stimmen mit einem Teil der erzielten Ergebnisse überein. Zusätzlich wird in der Literatur diskutiert, ob die Energie, die für die Membranfusion aufgebracht werden muss, über die Bildung des ternären Komplexes von den SNARE-Proteinen zur Verfügung gestellt wird (Monck 1995; Jahn 1999). Auch in diesem Fall würde eine Fusion nicht unterhalb eines kritischen Schwellwerts für die Anzahl der gebildeten SNARE-Komplexe stattfinden, was mit den vorliegenden Ergebnissen harmoniert.

5.3 MFD-Imaging-Untersuchungen zur Membranfusion

Die bisherigen anhand der MFD durchgeführten Untersuchungen unterstützen die These einer für die Membranfusion erforderlichen Mindestanzahl an SNARE-Proteinen, ermöglichen jedoch keine exakte Quantifizierung. Für diese zentrale Fragestellung ist eine weitergehende Methode entwickelt worden.

Aufgrund der statistischen Verteilungen der SNARE-Proteine in den Liposomen ist ein Vorgehen erforderlich, in dem einzelne fusionierte Liposomen direkt auf die Anzahl der gebildeten ternären Komplexe hin untersucht werden können. Für diese Zwecke ist das MFD-Imaging über das konfokale Scanning entwickelt und aufgebaut worden. Anhand dieser Methode lassen sich einzelne, immobilisierte Liposomen auf einer Oberfläche lokalisieren und über die MFD untersuchen. Die Identifizierung der fusionierten Liposomen wird über

verschiedene Fluoreszenzparameter vorgenommen, woraufhin die Quantifizierung der SNARE-Proteine erfolgt. In Kapitel 4 sind die entsprechenden Methoden eingeführt worden.

5.3.1 Experimentelle Durchführung

Die apparativen Weiterentwicklungen, die für den Aufbau des konfokalen Scannings durchgeführt worden sind, und die sich hieraus ergebenden analytischen Anwendungen des MFD-Imagings sind in den Kapiteln 3 und 4 beschrieben. Es ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zur Untersuchung und Charakterisierung der immobilisierten Systeme.

Die Liposomen werden für das MFD-Imaging nach der Anleitung des Abschnitts 3.1.2 auf einer Glasoberfläche immobilisiert. Um nach Möglichkeit einzelne Liposomen auf der Oberfläche zu erhalten, werden Konzentrationen von etwa 1-2 Liposomen auf einer Fläche von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ verwendet. Im Vergleich zur MFD in Lösung ergeben sich nun prinzipiell unbegrenzte Beobachtungszeiten der Proben, die in der Praxis durch die Photozerstörung der Fluorophore begrenzt sind.

Die Beweglichkeit der Fluorophore sollte durch die Immobilisierung der Proben nicht zusätzlich eingeschränkt sein, da diese sich innerhalb der Liposomen befinden. Auch eine Wechselwirkung der Fluorophore mit der Oberfläche sollte in erster Näherung durch eine hinreichende Abschirmung durch die Liposomenmembran vernachlässigbar sein.

Die Polarisierung der Anregungsstrahlung ist je nach der Art der durchzuführenden Untersuchungen zu wählen. Für eine Quantifizierung der Fluorophore ist eine zirkulare Polarisierung von Vorteil, während Anisotropie-Betrachtungen eine lineare Polarisierung erfordern.

Die Anregungsleistungen für das MFD-Imaging werden in Abhängigkeit von den beabsichtigten Untersuchungen festgelegt. Für eine Untersuchung der Fluoreszenzparameter von immobilisierten Liposomen, wie beispielsweise der Fluoreszenzlebensdauer, werden vergleichsweise hohe Anregungsleistungen benötigt, da die Anpassung ein Mindestmaß an Photonen (ca. 500 Photonen) benötigt. Für die Quantifizierung der Fluorophore wird das konfokale Scanning lediglich zum Lokalisieren der Liposomen auf der Oberfläche verwendet; dieses wird bei minimalen Anregungsleistungen und Integrationszeiten pro Pixel (z. B. 2 ms) durchgeführt, um eine vorzeitige Photozerstörung eines Teils der Fluorophore zu vermeiden. Die Quantifizierung der Fluorophore über die sukzessive Photozerstörung ist über eine experimentell optimierte Anregungsleistung durchzuführen. Es wird hier in der detektierten Fluoreszenzspur ein Kompromiss zwischen der verzögerten Photozerstörung und einem noch eindeutigen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis gesucht, was sich in der detektierten Intensitätsspur als Stufenlänge und Stufenhöhe der ausbleichenden Fluorophore präsentiert.

Die Quantifizierung der Donor-Fluorophore ist für die fusionierten Liposomen nach folgendem Prozedere durchgeführt worden: Die Lokalisierung der fusionierten Liposomen auf der Oberfläche erfolgt über das konfokale Scanning bei der Anregung der Donor-Fluorophore, wobei ausschließlich die roten Kanäle detektiert werden. Auf diese Weise werden lediglich jene Liposomen dargestellt, welche FRET aufweisen. Bei geringen Anregungsleistungen erweist sich die direkte Anregung der Akzeptor-Fluorophore als vernachlässigbar. Ein Pixel eines als fusioniert identifizierten Liposoms wird über das Steuerprogramm der Scan-Einheit ausgewählt und im Anregungsfokus positioniert. Mit der manuellen Freigabe des Anregungslichts über den externen Laserverschluss wird nun ein zweiter Laserstrahl eingekoppelt. Über diesen werden die Akzeptor-Fluorophore vorsätzlich photozerstört, da für die Quantifizierung der Donor-Fluorophore diese nach Möglichkeit unabhängig sein müssen, was bei Anwesenheit der Akzeptor-Fluorophore nicht gegeben wäre. Um eine vollständige Zerstörung zu gewährleisten, ist als zweiter Laser der Krypton-Ionen-Laser mit der Anregungswellenlänge 568,2 nm im kontinuierlichen Modus eingesetzt worden; dieser liefert wunschgemäß hohe Anregungsleistungen. Nach erfolgter Photozerstörung der Akzeptor-Fluorophore kann eine Quantifizierung der Donor-Fluorophore in dem Liposom durch den Argon-Ionen-Laser erfolgen. Diese Vorgehensweise der kontrollierten Photozerstörung einer Spezies von Fluorophoren innerhalb eines definierten Systems und die nachfolgende Untersuchung einer zweiten Spezies ist nur über das konfokale MFD-Imaging zu realisieren. In Tabelle 5-6 sind die eingesetzten Anregungsleistungen für das Scanning und für die Aufnahme einer Intensitätsspur dargestellt. Die Lokalisierung der Liposomen für die Quantifizierung der Fluorophore wird typischerweise bei einem Fünftel der später eingestellten Anregungsleistung durchgeführt, um eine vorzeitige Photozerstörung der Fluorophore zu vermeiden.

Laser	λ / nm	Scanning:	Photozerstörung:
		P / kWcm ⁻²	P / kWcm ⁻²
Argon-Ionen	476,5	0,2	ca. 1,2
Krypton-Ionen	568,2	--	ca. 200

Tabelle 5-6: Die für das MFD-Imaging von immobilisierten Liposomen eingesetzten Laser mit ihren Anregungswellenlängen λ und Anregungsleistungsdichten P.

Die Unterscheidung von D-Liposomen und fusionierten Liposomen über die spektralen Eigenschaften ist in Abbildung 5-13 demonstriert. Hier sind unterschiedlich detektierte experimentelle Daten desselben Bildausschnitts einer immobilisierten Fusionsprobe (Sb(AI488) + Sx(AI594)/SNAP25)-10 dargestellt. In Abbildung a sind nur die grünen Kanäle, in Abbildung b nur die roten und in Abbildung c die grünen und die roten Kanäle detektiert worden. Liposom A wird nur über die grünen Kanäle, Liposom B nur über die roten Kanäle dargestellt. Liposom A wird folglich den Donor-Liposomen zugeordnet. Das Liposom B weist einen hoch-effizienten fluoreszenten Energietransfer auf, welcher vielfach durch den Einfluss der Oberfläche begünstigt wird. Liposom B wird als fusioniert eingeordnet.

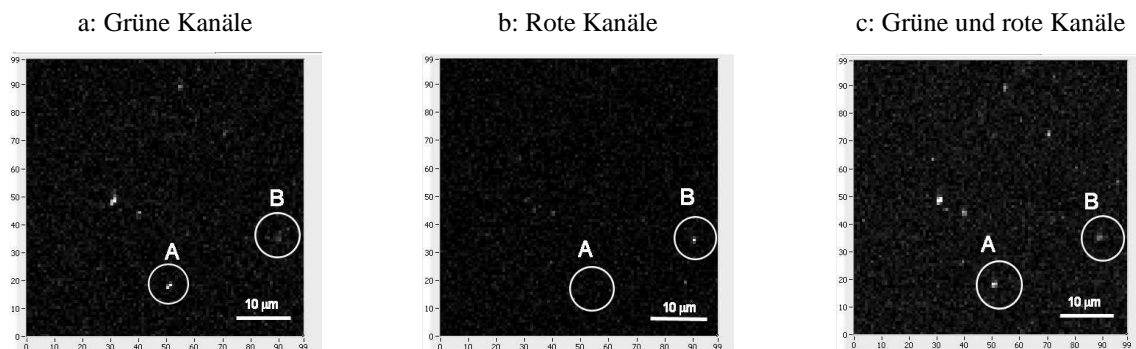


Abbildung 5-13: Verschiedene Darstellungen der experimentellen Daten einer immobilisierten Fusionsprobe (Sb(AI488) + Sx(AI594)/SNAP25)-10. a: Detektion in den grünen Kanäle, b: Detektion in den roten Kanäle, c: Detektion in den grünen und roten Kanäle. Liposom A wird nur über die grünen Kanäle, Liposom B über die roten Kanäle abgebildet. Somit kann das Signal A als Donor-Liposom und das Signal B als fusioniertes Liposom identifiziert werden (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Anregungsleistungsdichte P 670 nW/cm², Bildausschnitt 48µm x 48 µm, Intensitätsskala von 0 bis 1,5 kHz).

5.3.2 Charakterisierung der untersuchten immobilisierten Liposomen

Da die Quantifizierung der SNARE-Proteine in den Liposomen über die Farbstoffe vorgenommen wird, ist ein möglichst hoher Markierungsgrad essentiell. Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen werden daher für diesen Teil der Fragestellung alle Synaptobrevin-Proteine fluoreszenzmarkiert. Eventuelle Einschränkungen durch eine auftretende Selbstlöschung der Fluorophore können gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden und müssen bei der Analyse der experimentellen Daten in Betracht gezogen werden. Für die Donor-Fluorophore sind durchgehend Markierungsgrade von etwa 95% erzielt worden, während die Markierungsgrade der Akzeptor-Fluorophore mit 85-90% geringer ausfallen. Um eine Quantifizierung der Farbstoffe für definierte Liposomen durchführen zu können, muss zunächst eine korrekte Zuordnung der detektierten Ereignisse gewährleistet sein.

Die Unterscheidung zwischen fusionierten und reinen Donor-Liposomen erfolgt über die beiden spektralen Fluoreszenzsignale, S_g , S_r , ihren Quotienten, S_g/S_r , oder über die Fluoreszenzlebensdauer, $\tau_{D(A)}$. Abbildung 5-14 zeigt die Daten der Fusionsprobe (Sb(Al488) + Sx(Al594)/SNAP25)-5. Abbildung A zeigt die Gesamtintensität ($S_g + S_r$). In Abbildung B ist das Signalverhältnis S_g/S_r dargestellt, welches für fusionierte Liposomen durch den auftretenden resonanten Energietransfer gegenüber den Donor-Liposomen erniedrigt ist. Abbildung C zeigt die verkürzte Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$ der fusionierten Liposomen. Die Anisotropien der Fluorophore in den fusionierten Liposomen sind gegenüber denen in reinen Donor-Liposomen unverändert (Daten nicht gezeigt).

A: Gesamtintensität ($S_g + S_r$) B: Signalverhältnis S_g/S_r C: Lebensdauer $\tau_{D(A)}$

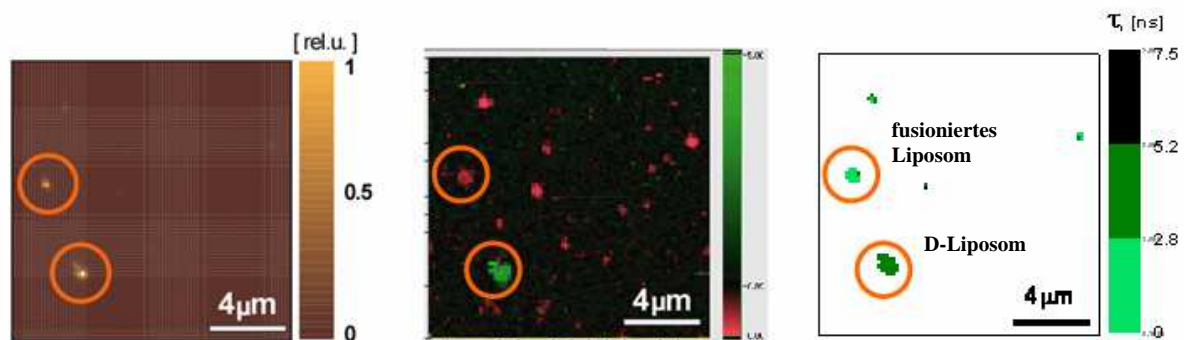


Abbildung 5-14: Daten der Fusionsprobe (Sb(Al488) + Sx(Al594)/SNAP25)-5. A: Darstellung der Gesamtintensität ($S_g + S_r$); B: Darstellung des Signalverhältnisses S_g/S_r ; C: Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$. Für fusionierte Liposomen wird ein verringertes Signalverhältnis S_g/S_r aufgrund der registrierten roten Fluoreszenz registriert. Gleichzeitig wird eine verkürzte Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Farbstoffs detektiert. (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Anregungsleistungsdichte 3,5 kW/cm², Bildausschnitt 15 µm x 15 µm).

Die angedockten Liposomen weisen im Vergleich zu den reinen Donor-Liposomen zu ähnliche Fluoreszenzeigenschaften mit diesen auf, als dass eine Unterscheidung vorgenommen werden könnten. Sowohl Fluoreszenzzählraten als auch Lebensdauern sind durch die zusätzlichen statistischen Schwankungen, welche auf Oberflächen beobachtet werden, keine geeigneten Parameter für eine zuverlässige Separation von den Donor-Liposomen. Eine fälschliche Zuordnung der angedockten Liposomen als fusionierte Ereignisse ist durch die sehr niedrige Effizienz des FRET und die vergleichsweise lange Fluoreszenzlebensdauer nicht zu befürchten. Für die Untersuchungen der immobilisierten Liposomen auf Oberflächen werden die angedockten Systeme zunächst außer Acht gelassen.

5.3.3 Die sukzessive Photozerstörung

Die Zielsetzung besteht in der Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten SNARE-Proteine in den Liposomen. Nach erfolgter Lokalisierung der Liposomen auf der Oberfläche wird eines ausgewählt und die Intensitätsspur der sukzessiv ausbleichenden Fluorophore detektiert. Dieses Verfahren wird in Abbildung 5-15 verdeutlicht. Links ist ein Bildausschnitt einer Oberfläche mit immobilisierten Liposomen, rechts die zugehörige, detektierte Intensitätsspur des ausgewählten Liposoms dargestellt. Deutlich sind zwei Stufen zu unterscheiden, welche der Photozerstörung von zwei Fluorophoren entsprechen.

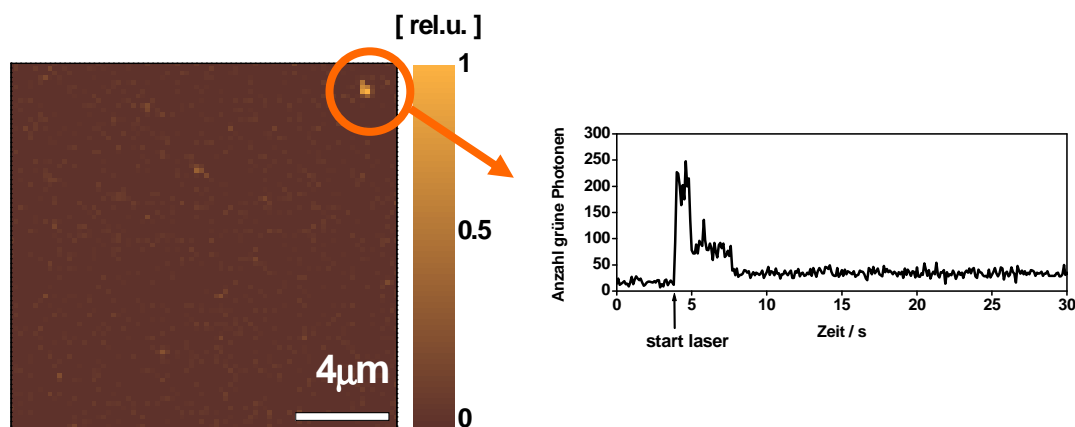


Abbildung 5-15: Lokalisierung eines immobilisierten Liposoms und Detektion seiner Intensitätsspur. Neben dem Bildausschnitt einer Oberfläche mit immobilisierten Liposomen ist die zugehörige, detektierte Intensitätsspur des ausgewählten Liposoms dargestellt. (Fusionsprobe (Sb(A1488) + Sx(A1594)/SNAP25)-1, Anregungswellenlänge 476,5 nm, Leistungsdichte 1,2 kW/cm², Bildausschnitt 15 µm x 15 µm).

Für verschiedene Liposomen auf der Oberfläche ergeben sich bei gleichen Anregungsbedingungen durchaus ungleiche Stufenhöhen, die Stufen der einzelnen Fluorophore in einem ausgewählten Liposom allerdings besitzen im Wesentlichen vergleichbare Intensitäten. Dieses ist durch die ungleiche Positionierung der Liposomen im Fokus zu begründen, welcher relativ zu den Liposomen viel größere Ausmaße besitzt und eine radiale Intensitätsverteilung aufweist. Die Fluorophore eines ausgewählten Liposoms sind der gleichen Intensitätsverteilung im Fokus ausgesetzt. Variationen in den Stufenhöhen können nun noch durch unterschiedliche Lagen der Übergangsdipolmomente der Farbstoffe im Liposom auftreten. Auch eine Kopplung der Fluorophore in einem Liposom ist prinzipiell nicht auszuschließen. Durch die Vielfalt der Prozesse, die in immobilisierten Systemen auftreten können, ist die separate Auswertung der einzelnen Liposomen unerlässlich, denn nur so können Artefakte, welche die Ergebnisse verfälschen, ausgeschlossen werden.

Für die verwendeten Anregungsleistungen kann nun eine Abschätzung der Stufenhöhen vorgenommen werden: Die mittlere Zählrate pro Fluorophor, welche in Kapitel 5.2.2 ermittelt worden ist, gibt die Ausbeute an Photonen bei einer Mittelung über den gesamten Fokus an: $\bar{F} = 9,3$ kHz für eine mittlere Anregungsleistung von $I = 9,2$ kW/cm². Bei Vernachlässigung einer Sättigung kann über die Näherung $I = I_0/2$ (Eggeling 1999), wobei I_0 die Leistungsdichte im Fokuspunkt ($\underline{r} = (0,0)$, $z = 0$) bezeichnet, die Zählrate pro Fluorophor im Mittelpunkt bestimmt werden. Sie beträgt $F = 18,6$ kHz für eine mittlere Anregungsleistung von $I = 9,2$ kW/cm². Die maximal zu erwartende Zählrate eines einzelnen Fluorophors beträgt demnach für das MFD-Imaging $F = 1,4$ kHz für eine mittlere Anregungsleistung von $I = 0,7$ kW/cm². In dieser einfachen Betrachtung ist die Sammeleffizienzfunktion der Einheit Objektiv, Tubuslinse und Lochblende einer Punktquelle im konfokalen Mikroskops vernachlässigt (Koppel, Axelrod et al. 1976). Zum Vergleich ist die maximal auftretende Zählrate bei einer Untersuchung von Einzelmolekülereignissen des reinen Farbstoffs Alexa 488 (5'-Isomer) bestimmt worden; sie beträgt bei Extrapolation auf die Anregungsleistung $I = 0,7$ kW/cm² ebenfalls $F = 1,4$ kHz. Dieser maximale Wert wird experimentell bestätigt.

Das nach der vollständigen Photozerstörung der Fluorophore detektierte Streulicht des Hintergrundes kann für Untersuchungen von Liposomen erhöht sein, da die Lipide im Vergleich zur Oberfläche ein erhöhtes Streulicht verursachen.

5.3.4 Quantifizierung der Proteine in den Liposomen

In Kapitel 4 sind die in Hinblick auf die vorliegende Fragestellung unternommenen Voruntersuchungen für die Bestimmung der unabhängigen Emitter eines fluoreszenten Systems beschrieben worden. Es sind zwei Methoden für die Quantifizierung der Fluorophore eingeführt worden, wobei für immobilisierte Teilchen auf Oberflächen die sukzessive Photozerstörung als wirksameres Nachweisverfahren erprobt worden ist. Bei der Anwendung des entwickelten Algorithmus zur Quantifizierung der Zahl von Fluorophoren werden gleiche Stufenhöhen für die Intensitäten der einzelnen Fluorophore vorausgesetzt. Diese Annahme ist im vergangenen Abschnitt überprüft worden.

Zwei Sachlagen werden nun anhand der sukzessiven Photozerstörung überprüft. Zum einen wird untersucht, ob die Verteilung der SNARE-Proteine in den Liposomen wie erwartet einer Poisson-Verteilung folgt. Zum anderen wird konkret in den fusionierten Liposomen die Anzahl der SNARE-Komplexe bestimmt. Beides zielt auf die Bestimmung einer

Mindestanzahl der Proteine ab, welche für die SNARE-Protein-unterstützte Membranfusion erforderlich ist.

Zunächst wird die auftretende Verteilung der Proteine in den Liposomen überprüft. Dafür wird die Anzahl der beinhalteten fluoreszenzmarkierten Proteine in den immobilisierten Donor-Liposomen Sb(A1488)-3 über die sukzessive Photozerstörung der Fluorophore festgestellt. Für 145 experimentell ermittelte Intensitätsspuren ergibt sich die statistische Verteilung nach Abbildung 5-16. Die auftretenden Aggregate mit mehr als 30 bestimmten Proteinen sind unter der Zahl $n = 30$ zusammengefasst, sie werden im Folgenden nicht weiter betrachtet. Die erwartete Poisson-Verteilung für im Mittel drei Proteine ist dem Histogramm überlagert. Da in diesem Fall alle Synaptobrevin-Proteine fluoreszenzmarkiert sind, wird die normale Poisson-Verteilung, nicht die gewichtete, verwendet. Die experimentell ermittelte Verteilung erweist sich als breiter als jene nach Poisson zu erwartende. Die Poisson-Verteilung ist zwar erkennbar, jedoch scheint zumindest eine zweite Verteilung den experimentellen Daten überlagert zu sein.

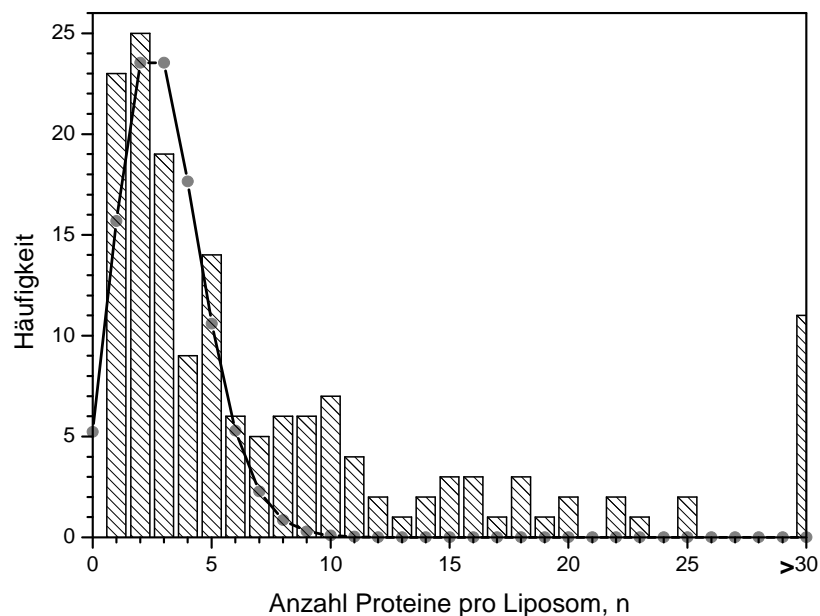


Abbildung 5-16: Experimentell ermittelte Verteilung der Proteinzahlen von Donor-Liposomen Sb(A1488)-3, immobilisiert auf einer Oberfläche. Sie ist über die sukzessive Photozerstörung der Fluorophore von 145 Liposomen ermittelt worden. Die auftretenden Aggregate sind unter der Zahl $n = 30$ zusammengefasst. Die erwartete Poisson-Verteilung für den Mittelwert drei ist dem Histogramm überlagert. (Anregungswellenlänge 476,5 nm, Anregungsleistungsdichte $1,2 \text{ kW/cm}^2$).

Bei einem analog zu Kapitel 5.2.5 festgestellten Schwellwert für die Anzahl der für die Fusion erforderlichen SNARE-Proteine ergibt sich aus der experimentell ermittelten

Proteinverteilung eine Zahl von 14 Proteinen. Dieses ist im Vergleich zu den Betrachtungen des Kapitels 5.2.5 eine höhere Anzahl von Proteinen (5 Proteine). Für das Andocken wird eine mindestens erforderliche Zahl von 6 Proteinen ermittelt. Die Abweichung hier ist geringer (4 Proteine). Die relativen Abweichungen müssen für die experimentell ermittelte statistische Verteilung als vergleichsweise hoch angesehen werden.

Ein zweiter Ansatz für die Bestimmung der minimal erforderlichen Anzahl ternärer SNARE-Komplexe untersucht die Verteilung der Proteine in den fusionierten Liposomen. Der Anteil der fusionierten Liposomen auf den Oberflächen ist sehr gering (vgl. den Prozentsatz fusionierter Liposomen, welcher in Kapitel 5.2.2 ermittelt worden ist) und die Experimente sind, wie bereits angedeutet, ungleich aufwendiger. Mit dem nach Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Verfahren sind für die Fusionsprobe (Sb(A1488)+Sx(A1594)/SNAP25)-3 44 fusionierte Liposomen untersucht worden. Über die Analyse ihrer Intensitätsspuren ist die Verteilung der Synaptobrevin-Proteine ermittelt worden, sie ist in Abbildung 5-17 dargestellt. Die Grauskalierung wird im nächsten Abschnitt erläutert. Über die normierten Häufigkeiten p_i kann die Verteilungsfunktion $F(n) = \sum_{n_i < n} p_i$ bestimmt werden. Sie ist in der oberen Hälfte der

Abbildung 5-17 dargestellt und wird ebenfalls im nachfolgenden Abschnitt diskutiert.

Der Vergleich mit der extrahierten Verteilung der Synaptobrevin-Proteine in den reinen Donor-Liposomen weist kaum Unterschiede auf. Prinzipiell ist eine Verschiebung hin zu größeren Werten zu erwarten, tatsächlich wird lediglich ein relativer Anstieg der zu größeren Proteinzahlen abnehmenden Flanke beobachtet. Als besonders interessant müssen die Liposomen mit der geringsten Anzahl an bestimmten SNARE-Proteinen angesehen werden. Unter Berücksichtigung des Markierungsgrades sowie einer vorangegangenen Photozerstörung einzelner Fluorophore repräsentieren diese Liposomen den Anteil mit der minimalen Zahl an Proteinen, welche für die Initiierung der Membranfusion erforderlich ist. Die Zahl der erforderlichen Proteine beträgt Eins und stimmt nicht mit den bisherigen Ergebnissen überein. Es muss hier von einem beachtlichen Einfluss ausgegangen werden, der eine solche Abweichung verursacht.

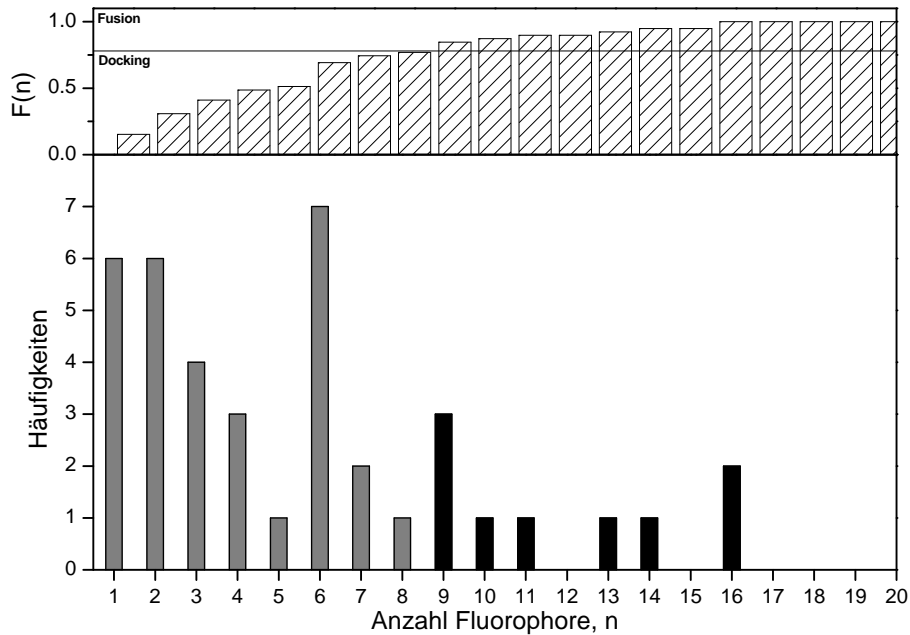


Abbildung 5-17: Experimentell ermittelte Verteilung der Synaptobrevin-Proteine in den fusionierten Liposomen (Sb(AI488) + Sx(AI594)/SNAP25)-3. In der oberen Hälfte ist zusätzlich die Verteilungsfunktion $F(n)$ der normierten Häufigkeiten angegeben. Sie wird ebenso wie die Grauskalierung der Häufigkeiten in Abschnitt 5.3.5 diskutiert. Nach der Photozerstörung der Akzeptor-Fluorophore ist über die sukzessive Photozerstörung die Anzahl der Donor-Fluorophore in den fusionierten Liposomen ermittelt worden. Für die vorliegende Verteilung sind 44 fusionierte Liposomen untersucht worden. (Anregungswellenlängen $\lambda_D = 476,5$ nm, $\lambda_A = 568,2$ nm; Anregungsleistungsdichten $P_D = 1,2$ kW/cm², $P_A = 200$ kW/cm²).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass äußere Einflüsse sich für immobilisierte Liposomen auf Oberflächen eher etablieren können als für Systeme, welche sich frei in einer wässrigen Lösung bewegen. Bei einer Betrachtung der angedockten Liposomen, welche über die Bindung der SNARE-Proteine zusammenhängen, ohne dass jedoch die Ausbildung des ternären SNARE-Komplexes abgeschlossen wäre, kann nicht von einem stabilen System ausgegangen werden. Äußere Kräfte, die während der Immobilisierung auf der Oberfläche auf diese Systeme wirken, könnten unter Umständen eine Fusionierung der angedockten Liposomen initiieren, sodass die Oberfläche quasi als Katalysator für die Fusion wirkt. In diesem Fall würden geringere Schwellwerte für die Fusion ermittelt, nämlich jene für das Andocken von Liposomen.

5.3.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Das MFD-Imaging gestattet die Bearbeitung einzigartiger Fragestellungen zum Verhalten einzelner Liposomen. Die Kombination des konfokalen Scannings von Liposomen auf einer Oberfläche mit der darauf folgenden Identifizierung ihres Fusionszustands über ihre Fluoreszenzparameter ermöglicht die Quantifizierung von SNARE-Proteinen in definierten Systemen. Je nach Fragestellung orientiert sich die Abtastung der Oberfläche bereits an den zu identifizierenden Systemen, wie im Fall der fusionierten Liposomen, welche über die roten Kanäle erkannt werden. Als zusätzlicher experimenteller Zwischenschritt folgt auf die Identifizierung der Liposomen eine kontrollierte Photozerstörung der Akzeptor-Fluorophore, woraufhin sich die Quantifizierung der Donor-Fluorophore anschließt.

Die reinen Donor-Liposomen zeigen analog zu Experimenten, welche in Lösung durchgeführt worden sind, eine Fluoreszenzlebensdauer, die vergleichbar ist zu derjenigen des freien Fluorophors. Die Identifizierung der fusionierten Liposomen auf Oberflächen verläuft analog zu Experimenten in Lösung über eine verkürzte Fluoreszenzlebensdauer und über eine zusätzlich zur grünen Fluoreszenz ebenfalls detektierte rote Fluoreszenz. Orientierungseffekte der beteiligten Übergangsdipolmomente können auf Oberflächen allerdings eine veränderte Effizienz des fluoreszenzresonanten Energietransfers vortäuschen. Da in den vorliegenden Experimenten die fusionierten Liposomen lediglich über die Detektion des roten Signals identifiziert werden, ohne dass eine Quantifizierung des FRETs vorgenommen wird, können eventuell auftretende Orientierungseffekte, welche den Energietransfer verändern, in dem vorliegenden Fall vernachlässigt werden.

Durch die geringe Photonenstatistik, welche bei den geringen Anregungsleistungen für die Untersuchungen auf Oberflächen eingesetzt werden und den relativ höheren Anteil des Streulichts, werden größere relative Abweichungen verursacht. Aus diesem Grund können angedockte Liposomen und Donor-Liposomen auf Oberflächen nicht eindeutig unterschieden werden. Daher werden die angedockten Liposomen aufgrund der ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften den Donor-Liposomen zugeordnet.

Ferner kann, wie bereits erwähnt, eine Wechselwirkung zwischen Liposomen und Oberfläche, die zu einer Fusion der angedockten Liposomen führt, nicht ausgeschlossen werden. Durch diese "oberflächen-katalysierte" Fusion würden die angedockten Liposomen fälschlich den ursprünglich bereits fusionierten Liposomen zugeordnet werden. Die bisherigen Betrachtungen liefern jedoch nur geringe Unterschiede zwischen der erforderlichen Mindestanzahl an Proteinen für die Fusion und das Andocken.

Auf die Identifizierung der gewünschten Liposomen folgt die Detektion der Fluoreszenz mit der Zeit. Die maximale Zählrate pro Fluorophor ist für die verwendete Anregungsleistung auf 1,4 kHz abgeschätzt worden. Dieses entspricht der maximal zu erwartenden Stufenhöhe von einzelnen Fluorophoren in den Intensitätsspuren.

Die Bestimmung der auftretenden Verteilungen von Fluorophoren in einzelnen, analysierten Liposomen sollten eine genauere Abschätzung der minimalen Anzahl an SNARE-Komplexen, welche für die exozytotische Membranfusion benötigt wird, ermöglichen. Die Verteilung der Donor-Liposomen weist relativ zu der erwarteten gewichteten Poisson-Verteilung Veränderungen auf. Die experimentell ermittelte Verteilung an Synaptobrevin-Proteinen scheint aus mehreren Verteilungen zusammengesetzt. Neben einer Verteilung, welche prinzipiell mit der nach Poisson zu erklären ist, tritt eine zweite Population für höhere Proteinzahlen ($n = 8, 9, 10$) auf. Eine Erklärung würde die bereits diskutierte Oligomerisierung des Proteins liefern. Die Verteilungen der Oligomere, bestehend aus m Proteinen, entsprächen wiederum einer Poisson-Verteilung, jedoch mit den Proteinzahlen $n = m$. Die experimentelle statistische Verteilung würde sich aus einer Linearkombination der einzelnen Verteilungen zusammensetzen. Bei einer Bildung verschiedener Oligomere würde die experimentelle Verteilung verständlich, sie wäre aus allen statistischen Verteilungen der einzelnen Oligomere zusammengesetzt. Andere mögliche Ursachen sind bereits in Kapitel 5.2.5 diskutiert worden. Analog zu den dortigen Betrachtungen kann eine Bestimmung der für die Membranfusion erforderlichen Anzahl von SNARE-Proteinen vorgenommen werden. Bei Verwendung der experimentell ermittelten Proteinverteilung und den in Abschnitt 5.2.4 ermittelten Fraktionen für das Andocken und die Fusion der Liposomen ergeben sich unter Vernachlässigung der auftretenden Aggregate für die Fusionsprobe $n = 3$ erhöhte Schwellwerte von 6 Proteinen für das Andocken und 14 Proteinen für die Fusion. Hier ist der Anteil der falsch eingebauten Synaptobrevin-Proteine berücksichtigt. Im Vergleich mit den in Abschnitt 5.2.5 ermittelten Werten (4 und 5 Proteine für das Andocken bzw. die Fusion) müssten die hier bestimmten Proteinzahlen prinzipiell als die plausibleren angenommen werden. Die Proteinzahlen sind ohne einschränkende Annahmen für die statistische Verteilung der Proteine in den Liposomen, sondern basierend auf einer experimentellen Verteilung, bestimmt worden. Einschränkend ist allerdings anzumerken, dass die hier verwendeten Fraktionen für die Liposomen in Lösung bestimmt worden sind, während die statistische Verteilung aus einer Analyse der immobilisierten Liposomen auf Oberflächen resultiert. Ein unerwünschter Einfluss auf die frei in Lösung diffundierenden Liposomen kann quasi ausgeschlossen werden, eine Wechselwirkung der

immobilisierten Liposomen mit der Oberfläche hingegen ist vorstellbar. Hier sind Phänomene, wie beispielsweise eine Zerstörung der Liposomenmembran mit unbekanntem Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften der Fluorophore, nicht auszuschließen. Daher werden die hier bestimmten Proteinzahlen als weiterer Hinweis gesehen, dass die Membranfusion durch eine definierte Anzahl von SNARE-Proteinen initiiert wird, eine genaue Quantifizierung hingegen müsste durch weitere experimentell bestimmte Verteilungen einer variierenden Zahl an Proteinen bestätigt werden.

Über eine direkte Betrachtung der fusionierten Liposomen und die Bestimmung der statistischen Verteilung der Donor-Fluorophore wird eine erheblich kleinere Proteinzahl abgeleitet, nämlich nur ein SNARE-Komplex, der für die Fusion erforderlich ist. Die Diskrepanz zu den vorhergegangenen determinierten Schwellwerten ist beträchtlich und kann über eine "oberflächen-katalysierte" Fusion von angedockten Liposomen erklärt werden.

Die Annahme einer Fusion der angedockten Liposomen auf Oberflächen wird in den folgenden Betrachtungen berücksichtigt. In Abbildung 5-17 ist unter Voraussetzung dieses Phänomens zusätzlich zu der festgestellten Verteilung der Synaptobrevin-Proteine eine Verteilungsfunktion dargestellt, welche angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Proteinzahl n mit angedockten bzw. fusionierten Liposomen korreliert ist. Es sind hier die in Abschnitt 5.2.4 ermittelten Fraktionen für das Andocken/die Fusion berücksichtigt und auf die Gesamtheit Eins normiert worden. Hieraus ergeben sich für die untersuchten Liposomen relative Anteile von 78,9% angedockten und 21,6% fusionierten Liposomen. Die geringeren Proteinzahlen werden den angedockten Liposomen zugeordnet und unter Einbezug der relativen Anteile wird eine Grenze von neun SNARE-Proteinen ermittelt. Da nicht alle angedockten Liposomen notwendig auf der Oberfläche fusionieren, und in diesem Fall nicht in die Untersuchungen aufgenommen werden, kann der ermittelte Grenzwert von neun für die Zahl der erforderlichen Proteine der Membranfusion als obere Grenze angesehen werden. Diese Abschätzung fügt sich in die bisherigen bestimmten Schwellwerte der letzten Abschnitte ein. Auf diese Weise würde eine Anzahl zwischen vier und neun SNARE-Proteinen für die Membranfusion postuliert. Da das Andocken bereits für eine geringere Proteinzahl beobachtet wird, würde hier ein Schwellwert von ein bis drei Proteinen postuliert.

Die obigen Betrachtungen sind unter der Annahme der „katalysierten“ Fusion von angedockten Liposomen auf Oberflächen vorgenommen worden. Da es hierfür keine experimentelle oder theoretische Bestätigung gibt, müssten für die Überprüfung der Plausibilität des erzielten Zahlenwerts zusätzliche Untersuchungen zu den angedockten

Liposomen durchgeführt werden. Um die erzielten Ergebnisse zu erklären, sind auch andere oder zusätzliche Prozesse möglich, die eine verringerte Anzahl an erforderlichen Proteinen verursachen. Durch die eingesetzten hohen Anregungsleistungen bei der Photozerstörung der Akzeptor-Farbstoffe ist eine gleichzeitige photochemische Zerstörung der Donor-Fluorophore nicht auszuschließen. Über Mehr-Photonen-Prozesse können höher angeregte Zustände populiert werden, die instabile Konfigurationen darstellen. Die Annahme dieser Prozesse würde ebenfalls die diskutierte experimentelle Verteilung der Proteine in den fusionierten Liposomen erklären. Das Auftreten solcher Phänomene könnte über die Photozerstörung von Akzeptor-Fluorophoren bei gleichzeitiger Detektion des grünen Signals der Donor-Fluorophore überprüft werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Technik des MFD-Imagings über die sukzessive Photozerstörung einen wertvollen Beitrag zur Bestimmung der Stöchiometrie der SNARE-Protein-unterstützten Fusionsvorgänge liefern kann. Sie ist im Rahmen der bearbeiteten Fragestellung erfolgreich entwickelt und erstmalig eingesetzt worden. Trotz der Komplexität der Systeme ist eine Eingrenzung der erforderlichen molekularen Stöchiometrien gelungen. Für den Prozess des Andockens kann die Anzahl an erforderlichen Proteinen auf 1-3 und für den Prozess der Fusion auf 4-9 beschränkt werden. Die auftretenden Wechselwirkungen zwischen immobilisiertem System und Oberfläche bleiben ungeklärt. Hier sind zusätzliche Experimente für ein tieferes Verständnis erforderlich.

Kapitel 6

Reaktionsmechanismen der H^+ -ATP-Synthase aus *Escherichia coli*

Die katalytische Aktivität der H^+ -ATP-Synthase ist mit einer internen Rotation der Untereinheiten des Enzyms gekoppelt. Da die Rotationsbewegung der H^+ -ATP-Synthase ein stochastischer Prozess ist, welcher nicht synchronisiert werden kann, müssen Untersuchungen diesbezüglich auf der Ebene einzelner Moleküle durchgeführt werden. Die Präparation des biologisch funktionalen Enzyms mit Fluoreszenzmarkierungen, die so klein sind, dass sie die Bewegungen der Untereinheiten während der zu beobachtenden Katalyse nicht beeinflussen, ermöglicht die Untersuchung des Enzyms in einer quasi-nativen Umgebung ohne äußere, störende Einflüsse. Sowohl die Synthese als auch die Hydrolyse von ATP sind im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen als katalytische Prozesse der H^+ -ATP-Synthase auf molekularer Ebene untersucht worden. Die Ergebnisse sind in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Gräber (Abteilung H^+ -ATP-Synthase unter Leitung von Dr. Börsch, Institut für Physikalische Chemie II, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.) entstanden. Sie sind in Auszügen in (Diez 2003) und (Diez 2004) beschrieben.

6.1 Die H^+ -ATP-Synthase aus *Escherichia coli*

ATP (Adenosin-5'-Triphosphat) stellt den wichtigsten Energieträger in den Zellen von Lebewesen dar. Im menschlichen Körper wird jedes ATP-Molekül etwa dreihundertmal pro Tag zu ADP (Adenosin-5'-Diphosphat) und Monophosphat hydrolysiert und wieder zu ATP synthetisiert. Dieses entspricht im Körper eines durchschnittlichen Menschen einem täglichen Umsatz von bis zu 75 kg (Diez 2004). Als wichtigstes Enzym zur ATP-Synthese gilt die H^+ -

ATP-Synthase. Sie synthetisiert ATP unter Ausnutzung einer transmembranen elektrochemischen Potentialdifferenz, hervorgerufen durch einen Protonengradienten.

Die H^+ -ATP-Synthase von *Escherichia coli* gehört zur Klasse der F-Typ-ATP-Synthasen (EF_0F_1) (Jagendorf 1966; Kagawa 1971), welche als Membranprotein einen exergonischen Protonenfluss mit einer endergonischen ATP-Synthese koppelt. Die elektrochemische Energie des Protonengradienten wird über Konformationsänderungen in mechanische Energie umgewandelt und diese schließlich in chemische Energie in Form von ATP umgesetzt. Die H^+ -ATP-Synthase von *E. coli* kann bei entsprechendem Bedarf der Zellen auch umgekehrt eine ATP-Hydrolyse durchführen.

6.1.1 Struktur der H^+ -ATP-Synthase

Die H^+ -ATP-Synthase von *E. coli* besteht aus dem hydrophoben, transmembranen F_0 -Teilkomplex und dem hydrophilen F_1 -Teilkomplex. Im Rotationsmodell der Katalyse ist auch eine Aufteilung von Untereinheiten der H^+ -ATP-Synthase in einen Rotor und einen Stator üblich. Abbildung 6-1 zeigt ein Modell der EF_0F_1 -ATP-Synthase, in welcher der Rotor blau und der Stator orange gekennzeichnet sind. Die Molmasse des Enzyms beträgt insgesamt etwa 550 kDa.

Der lösliche F_1 -Teilkomplex weist eine weitere Unterteilung mit der Stöchiometrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ bei einer Gesamt-Molmasse von etwa 382 kDa auf. Die α - und β -Einheiten sind alternierend angeordnet und bilden zusammen eine hexagonale Struktur (Abrahams 1994). Drei katalytische und drei nichtkatalytische Nukleotidbindungsplätze sind hier lokalisiert. Der $\alpha_3\beta_3$ -Komplex umschließt den oberen Teil der γ -Untereinheit, welche gemeinsam mit ε den zentralen Rotor des F_1 -Teilkomplexes bildet. Dieser funktioniert während der Katalyse als rotierende Achse, welche die Konformationsänderungen der β -Einheiten mit der Rotation des F_0 -Komplexes koppelt (Jianpeng 2002). Die δ -Untereinheit ist relativ zum $\alpha_3\beta_3$ -Komplex fixiert (Lill 1996; Böttcher 2000; Wilkens 2000) und befindet sich an der oberen Spitze des $\alpha_3\beta_3$ -Hexagons.

Der membranintegrierte F_0 -Teilkomplex besitzt die Stöchiometrie $a_2b_2c_{10}$ bei einer Molmasse von etwa 164 kDa. Bei der ATP-Synthese ist dieser für den Protonentransport verantwortlich. Seine Struktur ist bislang nur in Teilbereichen bekannt. Die Untereinheit a ist essentiell für den Protonentransport (Cain 2000), der möglicherweise durch zwei interne Halbkanäle erfolgt (Junge 1997). Die beiden b-Untereinheiten sind mit der δ -Untereinheit des F_1 -Komplexes verbunden und bilden einen Teil eines außen liegenden, nicht-rotierenden Stators der H^+ -ATP-Synthase. Die ringförmig angeordneten c-Untereinheiten gehören zum

Rotor der ATP-Synthase (Meier 2005). Die Anzahl der c-Untereinheiten variiert für verschiedene ATP-Synthasen. Die H^+ -ATP-Synthase von *E. coli* besitzt zehn c-Einheiten (Jiang 2001). Der Symmetriebruch gegenüber der dreizähligen Symmetrie des F_1 -Komplexes verursacht Diskussionen über die Art und Weise der Übersetzung einer 10-stufigen Rotation des c-Rings in die drei-stufige Rotation der $\gamma\varepsilon$ -Untereinheit des Rotors.

Es existiert bislang keine hochauflösende Struktur für die gesamte H^+ -ATP-Synthase, daher werden die Strukturdaten einzelner Teile zu einem Gesamtmodell zusammengefasst. Basierend auf einem Modell der EF_0F_1 -ATP-Synthase nach Engelbrecht (Engelbrecht 1997) ist eine Strukturanpassung vorgenommen worden (Börsch 2002). Abbildung 6-1 zeigt das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Modell der EF_0F_1 -ATP-Synthase samt der eingesetzten Fluoreszenzmarkierungen. Abbildung 6-1a zeigt eine Seitenansicht der ATP-Synthase in der Membran, Abbildung 6-1b eine Ansicht in der Ebene der Fluoreszenzmarkierungen.

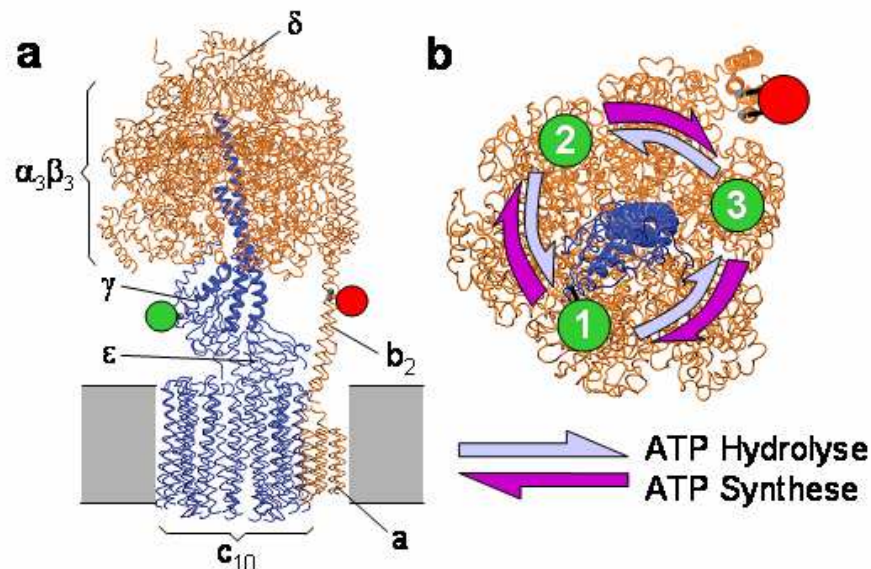


Abbildung 6-1: Modell der EF_0F_1 -ATP-Synthase nach (Engelbrecht 1997, Börsch 2002) mit den Positionen der verwendeten Fluoreszenzmarkierungen. a: Seitenansicht der ATP-Synthase in der Membran; b: Ansicht in der Ebene der Fluoreszenzmarkierungen mit Blick von der Membran. Die Untereinheiten des Stators sind orange, die Untereinheiten des Rotors sind blau gekennzeichnet. Der Donor-Fluorophor ist an die $F_1\gamma$ -Untereinheit gekoppelt (grüner Kreis), der Akzeptor-Fluorophor an die F_0b -Untereinheiten (roter Kreis).

6.1.2 Funktion der H^+ -ATP-Synthase

Die Funktion von biologischen Molekülen steht in Zusammenhang mit ihrer Struktur und deren Dynamik. Auch für die H^+ -ATP-Synthase bestätigen neuere Untersuchungen die starke Kopplung zwischen ihrer katalytischen Funktion und den Konformationsänderungen in Form von Rotationsbewegungen (Kinosita 2004; Rondelez 2005). Für die Katalyse-

Mechanismen der H^+ -ATP-Synthase existieren verschiedene Modelle, die Abläufe sind bislang im Einzelnen nicht vollends geklärt.

Ein anerkanntes Modell für die Katalyse der ATP-Bildung in dem F_1 -Teilkomplex ist der von Paul D. Boyer vorgeschlagene *binding-change*-Mechanismus (Boyer 1975; Boyer 1993; Boyer 1999). Hier wird von drei identischen Bindungsplätzen ausgegangen, die eine Abfolge von verschiedenen Konformationen mit unterschiedlicher Affinität gegenüber den Nukleotiden durchlaufen. Die drei katalytischen Bindungsplätze sind miteinander gekoppelt, so dass jeder der drei Bindungsplätze alternierend eine andere Konformation einnimmt. Die Konformationsänderungen werden durch eine Rotationsbewegung der γ -Untereinheit induziert, wobei für die beiden katalytischen Prozesse Hydrolyse und Synthese unterschiedliche Rotationsrichtungen postuliert wurden.

Die Visualisierung einer schrittweisen Rotation der γ -Untereinheit im F_1 -Teilkomplex ist Noji 1997 in einem videomikroskopischen Experiment gelungen (Noji 1997). Dafür sind einzelne $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Teilkomplexe auf einer Oberfläche immobilisiert und über ein fluoreszierendes Aktinfilament an der γ -Untereinheit sichtbar gemacht worden. Der $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Teilkomplex ist die kleinste Einheit, die noch eine Hydrolyse-Aktivität aufweist (Dunn 1980; Dunn 1981). Unter Zugabe von ATP ist eine Rotation des Aktinfilaments an der γ -Untereinheit in 120° -Schritten beobachtet worden. Jeder Schritt wird mit der Hydrolyse eines ATP-Moleküls erklärt. Ähnliche Ergebnisse sind mit einer lichtstreuenden Goldkugel an Stelle des Aktinfilaments erzielt worden (Yasuda 2001). Hier ist zusätzlich eine Aufspaltung der 120° -Schritte in einen 90° - und einen 30° -Teilschritt beobachtet worden, andere Untersuchungen verweisen auf eine Aufspaltung der 120° -Schritte in einen 80° - und einen 40° -Teilschritt (Shimabukuro 2003). Die ε -Untereinheit spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der H^+ -ATP-Synthase; diese wird über eine Konformationsänderung der Untereinheit gesteuert (Zimmermann 2005). Neuere Katalyse-Modelle beinhalten Intermediate im Katalysemechanismus, die sich mit den aufgefundenen Sub-Schritten decken (Senior 2002).

Im Rahmen der diskutierten Katalyse-Modelle ist auch für den F_0 -Teilkomplex der H^+ -ATP-Synthase eine interne Rotationsbewegung der c-Untereinheiten relativ zu den a- und b-Untereinheiten vielfach postuliert worden (Vik 1994; Duncan 1995; Junge 1997). Als Energiequelle dient ein transmembraner Protonengradient, welcher aus einer hohen Protonenkonzentration auf der periplasmatischen Seite und einer niedrigen auf der cytoplasmatischen Seite resultiert. Der Protonengradient treibt eine Rotation des c-Rings und hierüber die Synthese von ATP an (Junge 1997). Die Zahl der Protonen, welche pro

synthetisiertes ATP-Molekül durch den c-Ring transportiert wird, ist bislang unklar. Aufgrund der unterschiedlichen Stöchiometrien der c-Einheiten in verschiedenen ATP-Synthasen sind ungleiche Zahlen der H^+ -Ionen pro ATP möglich. Thermodynamische Überlegungen führen für die EF_0F_1 -ATP-Synthase zu mindestens drei H^+ -Ionen pro ATP (Kashket 1982).

6.2 MFD-Untersuchungen zu Rotationsmechanismen der H^+ -ATP-Synthase

Untersuchungen einzelner fluoreszenzmarkierter H^+ -ATP-Synthasen über die MFD gestatten die simultane Erfassung der verschiedenen, unabhängigen Fluoreszenzparameter mit einer hohen Zeitauflösung. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen besteht in der Detektion der vermuteten FRET-Stufen und dem Nachweis einer eventuellen Abfolge von verschiedenen FRET-Stufen während der Katalyse innerhalb eines Enzymdurchtritts durch das konfokale Detektionsvolumen. Die experimentellen Randbedingungen der vorgenommenen Untersuchungen werden im nachfolgenden Abschnitt (Kapitel 6.2.1) erläutert. Um ein Verständnis für die Probe zu entwickeln, wird zunächst eine Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten ATP-Synthase vorgenommen (Kapitel 6.2.2). In der Folge wird der Nachweis von verschiedenen, auftretenden FRET-Stufen erbracht (Kap. 6.2.3), um auf dieser Grundlage die Untersuchungen zur ATP-Hydrolyse (Kapitel 6.2.4) und ATP-Synthese (Kapitel 6.2.5) vorzustellen und in den Kontext des untersuchten Systems zu bringen.

6.2.1 Experimentelle Durchführung

Die Detektion einer eventuellen Abfolge verschiedener FRET-Stufen setzt lange Beobachtungszeiten für die betrachtete Probe voraus; die Einbettung der ATP-Synthase in Liposomen als Modell einer quasi-nativen Umgebung liefert günstige Voraussetzungen hierfür. Analog zu Kapitel 5 ergeben sich indes einige experimentelle Besonderheiten für die zu untersuchenden fluoreszenten Systeme. So sind die MFD-Untersuchungen der ATP-Synthase wie auch die Liposomen des Kapitels 5 in den zylindrisch begrenzten Probenvolumina (25 μ l) der Firma Evotec durchgeführt worden. Die Untersuchungen der ATP-Synthase sind in einer speziell angefertigten Durchflussskammer vorgenommen worden, in die parallel folgende Komponenten injiziert werden: (1) Proteoliposomen, vorinkubiert in ATP-Synthase-Puffer I bei pH 4,7; (2) ATP-Synthase-Puffer II mit pH 8,8 (vgl. Kapitel 3.1.2.2) (Diez 2003). Durch die Vermischung der zwei Komponenten wird ein künstlicher Protonen- und K^+ -Gradient über der Membran der Liposomen ausgebildet, der das Enzym zur ATP-Synthese antreibt. Da die eingestellten Gradienten mit der Zeit abnehmen, sind die Messdauern für diese Experimente auf 2-3 Minuten begrenzt. Erst über eine erneute

Vermischung der zwei Komponenten wird die protonengetriebene ATP-Synthese wiederum gestartet. Die anfängliche pH-Differenz über der Membran beträgt $\Delta\text{pH} = 4,1$ und die Differenz des elektrischen Potentials $\Delta\phi = 126 \text{ mV}$ (Fischer 1999; Fischer 2000). Für alle übrigen Messungen ist der ATP-Synthase-Puffer III verwendet worden (vgl. Kapitel 3.1.2.2). Alle MFD-Messungen der H^+ -ATP-Synthase sind bei einer Konzentration von etwa 90 pM durchgeführt worden.

Als weitere Besonderheit der langen Beobachtungszeiten muss mit geringer Anregungsleistung gemessen werden, um eine Photozerstörung der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Die eingesetzten Laser, Anregungswellenlängen und Anregungsleistungsdichten für die vorgestellten Experimente sind in Tabelle 6-1 aufgeführt. Für eine Überprüfung der gleichzeitigen Gegenwart von Donor- und Akzeptor-Fluorophor an den Enzymen werden die Proben in einem Teil der Experimente simultan über zwei Lichtquellen angeregt.

Laser	Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{anr}} / \text{nm}$	Anregungsleistung $P_{\text{anr}} / \text{kWcm}^{-2}$
Argon-Ionen	496,5	18,6
Diode	637,0	9,8

Tabelle 6-1: Verwendete Laser, Anregungswellenlängen λ_{anr} und Anregungsleistungsdichten P_{anr} für die Experimente mit der ATP-Synthase.

Eine Schwierigkeit der Untersuchungen besteht in der Heterogenität der fluoreszenzmarkierten Probe. Neben der erwünschten doppelt markierten FRET-Spezies treten nur mit einem Farbstoff markierte Enzyme auf, die unmarkierten Enzyme hingegen werden im Experiment nicht erfasst. Ferner können die F_1 -Teilkomplexe als Einzelteile in der Lösung vorliegen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass ein Teil der Enzyme biologisch nicht funktional ist. Für weiterführende Untersuchungen muss daher zunächst eine Selektion der Ereignisse vorgenommen werden.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen konzentriert sich auf die Detektion einer eventuell auftretenden Abfolge verschiedener FRET-Stufen innerhalb eines einzelnen Enzymdurchtritts durch das Detektionsvolumen. Daher werden für die Analyse ausschließlich Ereignisse herangezogen, die über lange Verweildauern im Detektionsvolumen verfügen (mindestens 45 ms). Ferner kann über die Anisotropie des Donor-Fluorophors, welche für das vollständig rekonstituierte Enzym, eingebettet in Liposomen, vergleichsweise hoch ist

($r \geq 0,12$), eine effektive Vorauswahl der relevanten Spuren getroffen werden. Hier erweist sich die selektive Spektroskopie als unabdingbar. Die verbleibenden Fluoreszenzspuren werden einzeln auf ihre FRET-Effizienzen hin untersucht.

Um für die H^+ -ATP-Synthase die korrigierten Fluoreszenzintensitäten des Donor- und des Akzeptor-Fluorophors, F_D und F_A , zu erhalten, müssen einige experimentelle Randbedingungen festgelegt werden. So berechnen sich die Detektionseffizienzen der grünen und roten Fluoreszenz zu $g_G = 0,253$ und $g_R = 0,523$. Der spektrale Crosstalk nach Gleichung 3-3 beträgt $\alpha = 0,06$. Die Hintergrundzählraten, B_G und B_R , sind abhängig von den verwendeten Puffern; der Hydrolyse-Puffer ergibt bei einer Anregung über 496,5 nm für die grünen Kanäle $B_G \approx 1000$ Hz und für die roten Kanäle $B_R \approx 400$ Hz; für den Synthese-Puffer ergeben sich $B_G \approx 2000$ Hz und $B_R \approx 500$ Hz.

6.2.2 Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten ATP-Synthase

6.2.2.1 Entwicklung der Fluoreszenzmarkierung

Die Herstellung der fluoreszenzmarkierten H^+ -ATP-Synthase aus *E. coli* ist in Freiburg vorgenommen worden, eine ausführliche Beschreibung findet sich in (Diez 2003). Um die Rotationsmechanismen der ATP-Synthase über FRET experimentell möglichst gut auflösen zu können, sind unterschiedliche Donor/Akzeptor-Farbstoffpaare an verschiedenen Markierungspositionen der ATP-Synthase getestet worden. Diese Voruntersuchungen werden im Folgenden kurz vorgestellt, um die Auswahl der Fluoreszenzmarkierung zu begründen.

Die Anbindung der Fluoreszenzfarbstoffe findet jeweils an das Cystein der entsprechenden *single-cystein*-Mutante statt. Die Markierungspositionen werden durch den Teilkomplex (F_0 bzw. F_1), die Untereinheit und die Aminosäureposition beschrieben. Die Markierung mit dem Donor-Farbstoff ist zunächst an F_0b-40 , F_0b-53 bzw. F_0b-64 vorgenommen worden (nach (Börsch 2002)). Da die b-Untereinheit als Dimer in der ATP-Synthase vorliegt, ergibt sich das prinzipielle Problem der statistischen Markierung der Cysteine in beiden Untereinheiten, was unterschiedliche FRET-Effizienzen verursachen kann. Als Donor-Farbstoffe dienen Rhodamin 110 bzw. Tetramethyl-Rhodamin (TMR), welche jeweils über eine reaktive Maleimid-Gruppe an die Cysteine gebunden werden. Rhodamin 110 weist dabei prinzipiell die bessere spektrale Separation von den verwendeten Akzeptoren auf. Die Markierung mit dem Akzeptor-Farbstoff ist zunächst an $F_1\gamma-106$ vorgenommen worden (nach (Börsch 2002)). Es sind die Akzeptor-Farbstoffe Alexa 633 und Cyanin 5 eingesetzt worden, beide liefern keine zufriedenstellende Ergebnisse, da eine eindeutige Abfolge verschiedener FRET-Stufen, hervorgerufen durch variierende relative Abstände

zwischen den fluoreszenzmarkierten Untereinheiten, nicht möglich ist. Um das Problem der statistischen Markierung der beiden identischen b-Untereinheiten zu umgehen, ist daraufhin als Akzeptor-Farbstoff das bi-funktionale Cyanin 5 (bis-Cy 5) ausgewählt worden, welches über zwei Maleimid-Gruppen an die Positionen F₀b-64 der beiden Untereinheiten gekoppelt wird (Diez 2003). Erst der Einsatz dieses neuen Farbstoffes mit einer genau definierten Position relativ zum FRET-Partner gestattet eine erkennbare Unterscheidung der Abfolgen von unterschiedlichen FRET-Effizienzen in der Hydrolyse und der Synthese von ATP. Die gemessenen Anisotropien der Akzeptor-Moleküle sind für das mono- und das bi-funktionale Cyanin 5 vergleichbar, es entsteht folglich bei der Markierung über zwei Kopplungsgruppen kein Informationsverlust über die Orientierung des Fluorophors. Für die durchzuführenden Experimente wird nun das Rhodamin 110 bzw. TMR an F₁γ-106 gebunden. Die Markierungsgrade für die Farbstoffe betragen 50-60% für das Rhodamin 110 und TMR sowie 64% für das bi-funktionale Cyanin 5, wobei die doppelte Ankopplung zu 90% erfolgreich ist. Nach der Aufreinigungs- und der Markierungs-Prozedur werden die Enzyme in die Membran von Liposomen eingebaut. Auf diese Weise wird das Enzym stabilisiert und es werden quasi-native Bedingungen für die ATP-Synthase erzielt. Über Aktivitäts-Messungen wird schließlich die Funktionalität der Enzyme überprüft.

Nachfolgend werden im Wesentlichen Ergebnisse der mit dem Donor-Farbstoff Rhodamin 110 markierten ATP-Synthase diskutiert, da diese mit dem in Kapitel 3 erläuterten konfokalen Aufbau erzielt worden sind. Die für die Diskussion herangezogenen Ergebnisse mit TMR als Donor-Farbstoff sind in Freiburg an einem konfokalen Zwei-Kanal-Aufbau (Diez 2003) mit kontinuierlicher Anregungsstrahlung experimentell aufgenommen worden.

6.2.2.2 Charakterisierung der Donor-markierten ATP-Synthase

Um FRET-induzierte Änderungen der Fluoreszenzparameter quantifizieren zu können, wird zusätzlich zum doppelt markierten Enzym die lediglich mit dem Donor-Farbstoff markierte Spezies untersucht. Die Analyse der Fluoreszenzparameter liefert Hinweise auf lokale Löscheffekte in Abwesenheit des Akzeptor-Farbstoffs sowie die Beweglichkeit des Fluorophors. Die mit Rhodamin 110 markierten Systeme weisen eine speziesgewichtete Fluoreszenzlebensdauer (vgl. (Lakowicz 1999; Schweinberger 2002)) von $\tau_D = (3,85 \pm 0,13)$ ns auf. Es liegt damit bereits ohne fluoreszenzresonanten Energietransfer eine geringfügige Löschung des Fluorophors vor, welcher im freien Zustand eine Fluoreszenzlebensdauer von 4,0 ns aufweist (Berger 2001). Die Anisotropie des an die ATP-Synthase gebundenen Rhodamins 110 beträgt $r = 0,21 \pm 0,01$; der Fluorophor kann damit

nicht als frei beweglich angesehen werden. Zusätzlich tritt eine zweite Population auf, die eine viel geringere Anisotropie ($r \approx 0,02$) aufweist. Sie wird den Rhodamin 110-markierten F_1 -Teilen zugeordnet, welche nicht an den in die Membran der Liposomen eingebetteten F_0 -Teil gebunden sind, sondern frei in der Lösung diffundieren. Diese Population wird von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

6.2.2.3 Charakterisierung der doppelt markierten ATP-Synthase

Bei Anwesenheit des Akzeptor-Farbstoffs wird die Fluoreszenzlebensdauer des sich an der ATP-Synthase befindenden Donor-Fluorophors zusätzlich über einen fluoreszenzresonanten Energietransfer gelöscht. Verschiedene Abstände zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor resultieren in unterschiedlichen FRET-Effizienzen, für jede weist der Donor-Farbstoff eine andere Lebensdauer auf. Diese werden im Abschnitt 6.2.4 näher betrachtet.

Die Anisotropie der FRET-Spezies ist vergleichbar mit der nur mit dem Donor-Farbstoff markierten Spezies. Die Überprüfung einer eventuellen Zeitabhängigkeit weist keine Veränderungen der Anisotropie über die Dauer der Messungen auf; die Probe ist demnach unter den eingestellten Einzelmolekülbedingungen stabil. Eine Dissoziation der Probe würde eine Verringerung der Anisotropie hervorrufen.

Eine Photozerstörung der Akzeptor-Farbstoffe während der Enzymdurchtritte durch das konfokale Volumen könnte unter Umständen das Auftreten einer FRET-Stufe zu geringer Effizienz vortäuschen. Um dieses auszuschließen, werden die Ereignisdauern der einzelnen Moleküldurchtritte, welche über die grünen und die roten Kanäle detektiert werden, verglichen. Bei einer grafischen Auftragung der detektierten Ereignisdauern in den roten und in den grünen Kanälen, wie es in Abbildung 6-2 dargestellt ist, befinden sich die Daten auf der Diagonalen. Die Ereignisdauern sind demnach für beide spektrale Bereiche gleich und es wird keine signifikante Photozerstörung des Akzeptor-Farbstoffs angezeigt. Bei einer Photozerstörung des Donor-Farbstoffs würde eine verkürzte Ereignisdauer für beide spektrale Bereiche vorgetäuscht.

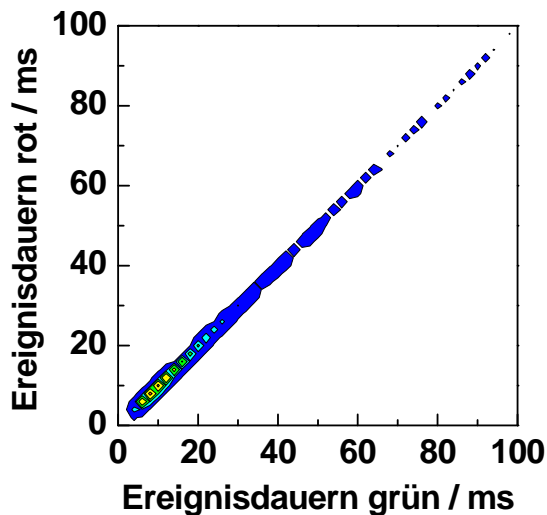


Abbildung 6-2: Grafische Auftragung der Ereignisdauern der doppelt markierten Enzyme, getrennt nach ihrer Detektion in den roten und in den grünen Kanälen. Die Ereignisdauern sind für beide spektrale Bereiche ähnlich. Eine Photozerstörung des Akzeptor-Farbstoffs liegt somit nicht vor.

6.2.3 Inhibition der Rotationsmechanismen

Bei der Untersuchung einzelner fluoreszenzmarkierter F_0F_1 -ATP-Synthasen über die MFD werden die Fluoreszenzparameter während der Enzymdurchtritte durch das konfokale Volumen analysiert. Nur die simultane Betrachtung der unabhängigen Fluoreszenzparameter ermöglicht verlässliche Aussagen über FRET und diesbezügliche eventuell auftretende Dynamiken. Die auftretenden FRET-Stufen werden im vorliegenden Fall zunächst über die Zugabe eines Inhibitors zu der ATP-Synthase abgeleitet. Das nicht hydrolysierbare ATP-Derivat Adenosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat (AMPPNP) blockiert die $F_1\gamma$ -Untereinheit des Enzyms in einer von drei putativen Orientierungen relativ zur b-Untereinheit (Börsch 2002). In einem MFD-Experiment ergeben die Fluoreszenzparameter konstante FRET-Effizienzen für die Dauer der Durchtritte, Übergänge zwischen verschiedenen FRET-Stufen werden nicht beobachtet. Die unterschiedlichen FRET-Effizienzen werden durch die verschiedenen Abstände zwischen den Fluorophoren hervorgerufen, die sich für die Haltepositionen der γ -Untereinheit relativ zur b-Untereinheit ergeben. Bei einer Analyse der Fluoreszenzparameter von 185 einzelnen Ereignissen, welche durch die ATP-Synthase, markiert mit TMR und bifunktionalem Cyanin 5, unter Zugabe von 1 mM AMPPNP erhalten worden sind, ergibt die Darstellung der Fluoreszenzquotienten F_D/F_A in einem Häufigkeitsdiagramm drei unterscheidbare FRET-Stufen. Diese sind in Abbildung 6-4a dargestellt. Die Mittelwerte der drei Verteilungen sind über eine Anpassung mit Gauß-Funktionen bestimmt worden und grafisch durch gepunktete, vertikale Geraden angezeigt.

Bei einem angenommenen Orientierungsfaktor von $\kappa^2 = 2/3$ und einem Brechungsindex von $n = 1,33$ lassen sich die Abstände zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor, R_{DA} , nach Förster abschätzen ($R_{DA} = \{51 \text{ \AA}, 65 \text{ \AA}, 78 \text{ \AA}\}$). Sie sind für die

berechneten Mittelwerte der Verteilungen F_D/F_A angegeben. Prinzipiell können die Fluorophore wegen ihrer hohen Anisotropie nicht als frei beweglich angesehen werden, sodass die Festsetzung des Orientierungsfaktors streng genommen nicht gerechtfertigt ist. Die Abschätzung der Abstände dient lediglich der Anschaulichkeit der FRET-Stufen und kann für die relativen Änderungen der intramolekularen Abstände in den später betrachteten Reaktionsmechanismen herangezogen werden.

6.2.4 Untersuchungen zur ATP-Hydrolyse

Die Zugabe von ATP zu der fluoreszenzmarkierten F_0F_1 -ATPynthase initiiert eine Rotation der Rotor-Untereinheiten im F_1 - und F_0 -Teilkomplex relativ zu den Stator-Untereinheiten, welche mit der Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i einhergeht. Die Rotationsraten sind von der Konzentration des ATP abhängig, bei einer angenommenen stufenweisen Rotation ergeben sich dadurch unterschiedliche Verweildauern der einzelnen FRET-Stufen. Die Rotation bewirkt eine zyklische Änderung der Abstände zwischen den beiden eingesetzten Fluorophoren und es können in den vorgenommenen Untersuchungen verschiedene FRET-Stufen in den analysierten Fluoreszenzspuren detektiert werden.

Nach der Selektion der Fluoreszenzspuren nach langen Verweildauern im Detektionsvolumen und hohen Anisotropien ergeben sich breite Verteilungen der Fluoreszenzparameter. Diese liefern noch keine Hinweise auf das Auftreten diskreter Stufen während der Hydrolyse von ATP. Die Breiten der Verteilungen könnten in der Konformationsdynamik der Enzyme während ihrer Durchtritte durch das konfokale Anregungsvolumen begründet sein. Eine Analyse der Ereignisse über Zeitfenster lässt tatsächlich drei diskrete Verteilungen vermuten, eine eindeutige Zuordnung ist jedoch nicht möglich. Die schlechte Auflösung der Statistik begründet sich vielmehr in der Vielzahl der Spuren, welche durch Enzyme hervorgerufen werden, die zwar vollständig rekonstituiert in den Liposomen eingebettet sind und damit die Auswahlkriterien erfüllen, jedoch während der Beobachtungszeit nicht aktiv sind. Die Selektion ist ausschließlich manuell möglich: Nur für die katalytisch aktive Spezies bewirkt die Anwesenheit von ATP eine Hydrolyse, mit der eine Rotation der Rotor-Untereinheiten im F_1 - und F_0 -Teilkomplex relativ zu den Stator-Untereinheiten einhergehen kann. Es müssen daher bei ausreichend vorhandenem ATP verschiedene FRET-Effizienzen in den Fluoreszenzspuren erkennbar sein. Da die Geschwindigkeit der Hydrolyse abhängig von der eingesetzten ATP-Konzentration ist, sind unterschiedliche Konzentrationen getestet worden; 1 mM erweist sich dabei als günstig. Bei dieser Konzentration werden Übergänge zwischen verschiedenen FRET-Stufen innerhalb der Durchtrittszeiten der Enzyme durch das Detektionsvolumen beobachtet.

Die statistische Analyse der selektierten Fluoreszenzspuren offenbart drei verschiedene FRET-Stufen für die Hydrolyse von ATP. Eine Auswahl von 48 Ereignissen mit mindestens drei detektierten Stufen (entsprechend 207 FRET-Stufen) liefert die Verteilung des Fluoreszenzquotienten F_D/F_A nach Abbildung 6-4b. Es sind deutlich drei Verteilungen zu unterscheiden, die im Vergleich zu den Verteilungen der AMPPNP-inhibierten F_0F_1 -ATPynthasen sogar schmaler sind. Den über eine Anpassung der Gauß'schen Funktion gefundenen Mittelwerten der Verteilungen sind wiederum die abgeschätzten FRET-Abstände R_{DA} zugeordnet ($R_{DA} = \{53 \text{ \AA}, 64 \text{ \AA}, 79 \text{ \AA}\}$).

Die Zuordnung der F_D/F_A -Verteilungen zu verschiedenen FRET-Effizienzen und -Abständen wird über die anderen, simultan erfassten Fluoreszenzparameter bestätigt. So geht jede der über F_D/F_A bestimmten FRET-Stufen mit einer definierten Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors einher. Tabelle 6-2 zeigt die bestimmten Fluoreszenzlebensdauern des Donor-Farbstoffs Rhodamin 110 in Anwesenheit des Akzeptors bis-Cy 5, $\tau_{D(A)}$, für die drei FRET-Stufen. Die Analyse ist analog zur Bestimmung der Lebensdauer der reinen Donor-Spezies, τ_D , wiederum speziesgewichtet. Aus den Fluoreszenzlebensdauern der einzelnen FRET-Stufen lassen sich die verschiedenen FRET-Effizienzen nach Gleichung 3-6 berechnen. Sie sind ebenfalls in Tabelle 6-2 aufgeführt. FRET 1 weist die längste Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{D(A)}$ auf und entspricht einer niedrigen Transfer-Effizienz. FRET 2 besitzt eine im Vergleich verkürzte Lebensdauer und wird als mittlere FRET-Effizienz angesehen und FRET 3 besitzt eine kurze Lebensdauer mit einer vergleichsweise hohen FRET-Effizienz.

	FRET 1	FRET 2	FRET 3	Donor
τ_D / ns	--	--	--	$3,85 \pm 0,13$
$\tau_{D(A)} / \text{ns}$	$3,63 \pm 0,08$	$2,92 \pm 0,28$	$2,11 \pm 0,13$	--
E	$0,057 \pm 0,038$	$0,242 \pm 0,076$	$0,452 \pm 0,037$	--

Tabelle 6-2: Speziesgewichtete Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors Rhodamin 110 in Abwesenheit des Akzeptor-Fluorophors, τ_D , und in Anwesenheit des Akzeptor-Fluorophors, $\tau_{D(A)}$, bei drei detektierten FRET-Zuständen. Die berechneten FRET-Effizienzen E der verschiedenen detektierten FRET-Zustände sind ebenfalls dargestellt.

Abbildung 6-3 zeigt die Fluoreszenzspur einer einzelnen doppelt markierten F_0F_1 -ATP-Synthase (Rh 110/ bis-Cy 5). Neben dem Quotienten F_D/F_A der korrigierten Fluoreszenzen F_D und F_A sind die berechneten Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)}$ dargestellt. Für letztere ist eine gleitende Zeitfensteranalyse in Einheiten von 5 ms und mit einer Überlappung von 2,5 ms durchgeführt worden. Für die einzelnen Stufen sind die berechneten Mittelwerte der entsprechenden Fluoreszenzparameter als horizontale, schwarze Linien überlagert. Auch hier geht jede Stufe mit einer definierten Fluoreszenzlebensdauer einher.

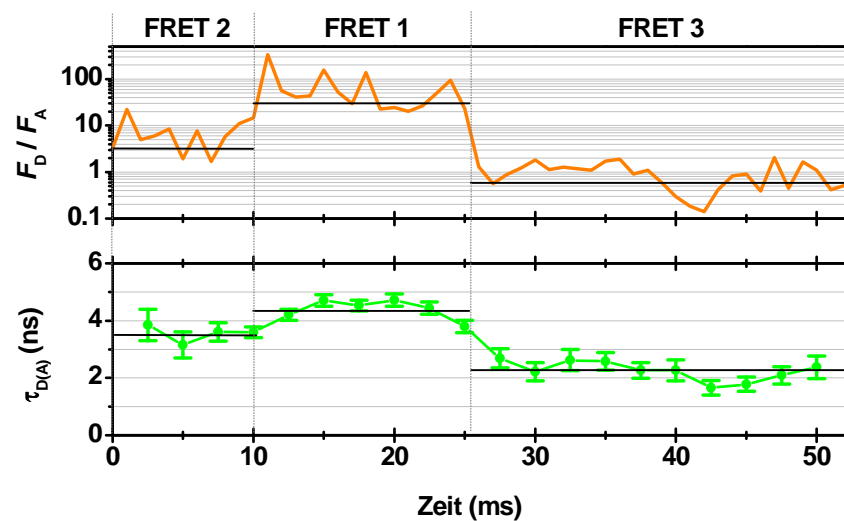


Abbildung 6-3: Fluoreszenzspur einer einzelnen doppelt markierten F_0F_1 -ATPynthase (Rh 110 und bis-Cy 5). Neben dem Quotienten F_D/F_A der korrigierten Fluoreszenzen F_D und F_A (Zeitfenster 1 ms) sind die berechneten Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)}$ des Donor-Fluorophors dargestellt. Für letztere ist eine gleitende Zeitfensteranalyse in Einheiten von 5 ms und mit einer Überlappung von 2,5 ms durchgeführt worden. Es ist die Abfolge folgender FRET-Stufen zu erkennen: FRET 2 \rightarrow FRET 1 \rightarrow FRET 3.

Die koinzidenten Stufensprünge der dargestellten unabhängigen Fluoreszenzparameter F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$ belegen, dass die verschiedenen Stufen nicht durch temporäre photophysikalische Artefakte (Rothwell, Berger et al. 2003) sondern durch Änderungen in der FRET-Effizienz hervorgerufen werden. Jeder Stufe wird ein fester Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor zugeordnet. Die Übergangszeiten zwischen den Stufen betragen weniger als 1 ms, welches die Zeitauflösung der korrigierten Fluoreszenzintensitäten, F_D und F_A , und ihres Quotienten, F_D/F_A , in den dargestellten Spuren ist. Dieses stimmt mit Beobachtungen von (Yasuda 2001) überein. Die Sprünge in den FRET-Effizienzen werden stufenweisen Änderungen in der Konformation zugeordnet. Insgesamt ist deutlich die Abfolge der folgenden drei verschiedenen FRET-Stufen zu erkennen: 2 \rightarrow 1 \rightarrow 3. Die Analyse von 222 Fluoreszenzspuren mit mindestens zwei detektierten FRET-Stufen liefert für

72 % der untersuchten Spuren die Abfolge $3 \rightarrow 2 \rightarrow 1 \rightarrow 3 \dots$ der FRET-Stufen. Dabei wird eine Stufe nur als solche erkannt, wenn ihre Dauer mindestens 5 ms beträgt. Über die ATP-Umsatzzeit und eine angenommene monoexponentielle Verteilung der F_D/F_A -Stufendauern ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 77 %, dass eine Stufe länger als 5 ms andauert.

6.2.5 Untersuchungen zur ATP-Synthese

Mittels der Ausbildung eines Protonen- und K^+ -Gradienten (entsprechend einem elektrochemischen Potentialgradienten) über die Liposomenmembran, in welche die ATP-Synthase eingebettet ist, wird die Synthese von ATP aus ADP und P_i initiiert. Bislang ist die Rotation der zentralen γ -Untereinheit des F_1 -Teilkomplexes über eine protonengetriebene ATP-Synthase lediglich indirekt nachgewiesen worden (Zhou 1997). Mit den vorliegenden Untersuchungen wird eine direkte Observierung der Rotation vorgenommen. Die MFD-Untersuchungen zeigen analog zur Hydrolyse von ATP verschiedene FRET-Stufen in den detektierten Fluoreszenzspuren. Die Übergänge zwischen den Stufen geschehen in weniger als 1 ms, es ist also wiederum eine stufenweise Rotation der γ -Untereinheit relativ zur b-Untereinheit zu beobachten.

Die Auswahl der Spuren, die nach unveränderten Kriterien geschieht, ergibt nur andeutungsweise diskrete FRET-Effizienzen, erst die manuelle Auswahl der Spuren bestätigt die vermutete stufenweise Rotation. Eine Analyse von 32 ausgewählten Spuren mit mindestens drei detektierten FRET-Stufen (entsprechend 129 Stufen) ergibt eine Verteilung des Quotienten der korrigierten Fluoreszenzintensitäten, F_D/F_A , wie sie in Abbildung 6-4c gezeigt ist. Die Verteilungen sind zwar im Vergleich zu jenen mit der AMPPNP-Bindung und ATP-Hydrolyse erzielten Verteilungen verbreitert, trotz allem sind diskrete Stufen zu unterscheiden. Den Mittelwerten der Häufigkeitsverteilungen sind wiederum FRET-Abstände R_{DA} zugeordnet ($R_{DA} = \{52 \text{ \AA}, 66 \text{ \AA}, 84 \text{ \AA}\}$).

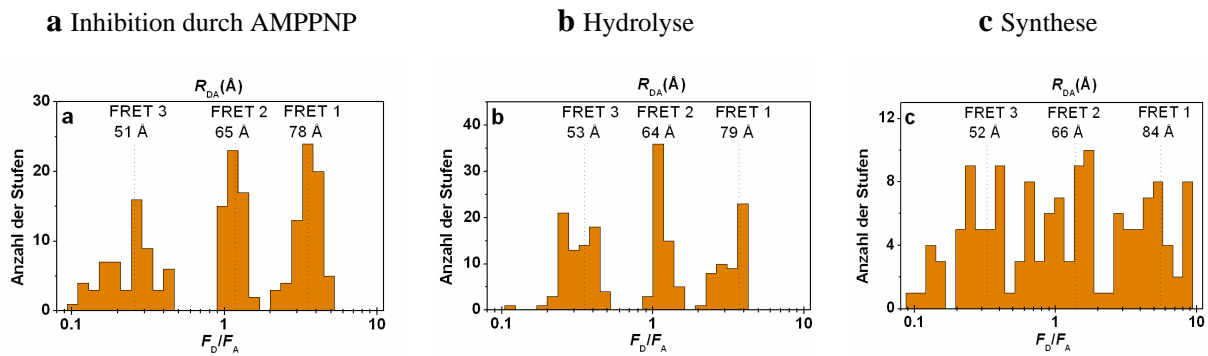


Abbildung 6-4: Häufigkeitshistogramme der Quotienten der korrigierten Fluoreszenzintensitäten, F_D/F_A , bestimmt über die detektierten Spuren einzelner FRET-markierter F_0F_1 -ATP-Synthasen (TMR / bis-Cy 5). Oberhalb der Histogramme sind die FRET-Abstände der Mittelwerte der Verteilungen angezeigt. a: Inhibition durch AMPPNP (1 mM), Analyse von 185 Ereignissen; b: ATP-Hydrolyse (1mM), Analyse von 48 Ereignissen mit mindestens drei detektierten Stufen; c: ATP-Synthese (100 μ M ADP, 5 mM Phosphat, Δ pH = 4,1), Analyse von 32 Ereignissen mit mindestens drei detektierten Stufen.

Abbildung 6-5 zeigt die Fluoreszenzspur einer einzelnen doppelt markierten F_0F_1 -ATPynthase (Rh 110/bis-Cy 5), welche während der initiierten ATP-Synthese detektiert worden ist. Es sind der Quotient F_D/F_A der korrigierten Fluoreszenzen F_D und F_A sowie die berechneten Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)}$ des Donor-Fluorophors dargestellt. Analog zur Hydrolyse-Spur ist für die Fluoreszenzlebensdauer eine gleitende Zeitfensteranalyse in Einheiten von 5 ms und mit einer Überlappung von 2,5 ms durchgeführt worden. Die berechneten Mittelwerte der einzelnen Stufen sind den Fluoreszenzparametern als horizontale schwarze Linien überlagert. Jede Stufe ist wiederum mit einer definierten Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Fluorophors korreliert, was die Zuordnung der unterschiedlichen FRET-Stufen zu verschiedenen Abständen bestätigt. Insgesamt ist in der vorliegenden Spur die Abfolge folgender FRET-Stufen zu erkennen: $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1$. Von 188 analysierten Fluoreszenzspuren mit mindestens zwei detektierten FRET-Stufen weisen 83 % der untersuchten Spuren diese im Vergleich zur Hydrolyse umgekehrte Abfolge auf. Es kann daher wiederum auf eine stufenweise Rotation der zwei relativ zueinander bewegten fluoreszenzmarkierten Untereinheiten geschlossen werden, die Rotationsrichtung ist jedoch für die Synthese von ATP im Vergleich zur Hydrolyse umgedreht.

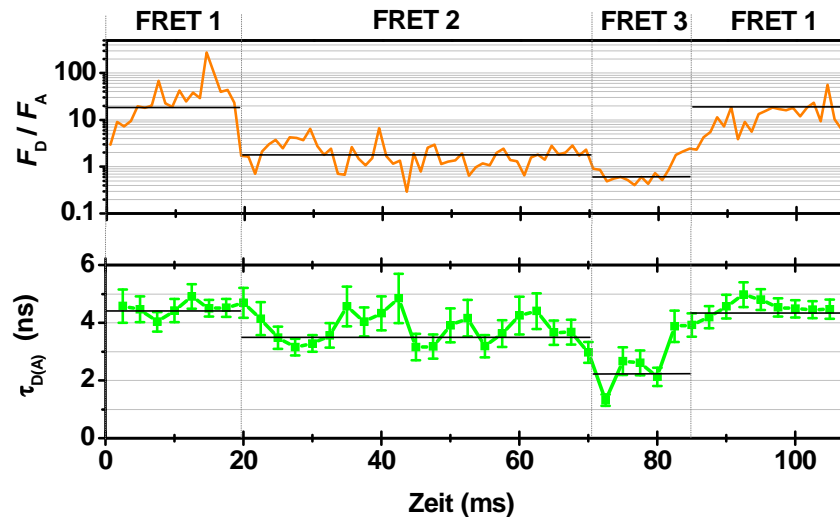


Abbildung 6-5: Fluoreszenzspur einer einzelnen doppelt markierten F_0F_1 -ATPynthase (Rh 110 und bis-Cy 5). Neben dem Quotienten F_D/F_A der korrigierten Fluoreszenzen F_D und F_A (Zeitfenster 1 ms) sind die berechneten Fluoreszenzlebensdauern des Donor-Fluorophors, $\tau_{D(A)}$, dargestellt. Für letztere ist eine gleitende Zeitfensteranalyse in Einheiten von 5 ms und mit einer Überlappung von 2,5 ms durchgeführt worden. Es ist die Abfolge folgender FRET-Stufen zu erkennen: 1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1.

6.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die im Zusammenhang mit der Hydrolyse und der Synthese von ATP postulierten Rotationsmechanismen der ATP-Synthase (Boyer 1975; Boyer 1993; Boyer 1999; Vik 1994; Duncan 1995; Junge 1997) sind bislang nur teilweise experimentell bestätigt. Während eine katalytisch initiierte Rotation der γ -Untereinheit für die Hydrolyse sowohl an immobilisierten F_1 -Teilen (Noji 1997; Yasuda 2001) als auch an dem vollständigen, membranintegrierten Enzym (Börsch 2002) nachgewiesen worden ist, liegen für die Synthese lediglich indirekte Bestätigungen (Zhou 1997) einer katalytisch angeregten Rotation vor. Untersuchungen zur Rotation sind für die Synthese ungleich aufwendiger, da diese an einem vollständigen, in ein Vesikel eingebetteten Enzym durchgeführt werden müssen, über welche ein Protonengradient aufgebaut werden kann. Auch können keine größeren Partikel wie Aktinfilamente für die Visualisierung einer Rotation eingesetzt werden, da diese durch den äußeren Teil des Stators und durch die Membran blockiert würden. Eine ungehinderte Rotation kann nur durch den Einsatz kleiner Reporter-Moleküle gewährleistet werden, welche die Funktion des Enzyms nicht beeinträchtigen. Der Einsatz extrinsischer Farbstoffe und die Anwendung des fluoreszenzresonanten Energietransfers sichern einen weitgehend unbeeinflussten Rotationsprozess des Enzyms.

Die Untersuchungen zu den Rotationsmechanismen der ATP-Synthase sind durch die Anforderungen des komplexen biologischen Systems im Zusammenspiel mit der Technik der

Einzelmolekülspektroskopie eine experimentelle Herausforderung. Bei der Analyse der Daten liegt die besondere Schwierigkeit in der Auswahl der Ereignisse, diese wird über die selektive Spektroskopie vorgenommen. Zunächst sind nur lang andauernde Ereignisse von Interesse; ferner ist die Anisotropie ein wichtiges Auswahlkriterium, da über diese die vollständig rekonstituierten, membranintegrierten ATP-Synthasen von den fluoreszenzmarkierten Einzelteilen unterschieden werden können. Trotzdem bleibt eine Auswahl von Ereignissen bestehen, die zwar alle Kriterien erfüllen, jedoch katalytisch nicht aktive Enzyme aufweisen. Hier kann eine Auswahl der biologisch funktionalen Spezies nur über die manuelle Ansicht der Fluoreszenzspuren geschehen.

Um unter anderem Artefakte durch photophysikalische oder -chemische Prozesse in den Fluorophoren auszuschließen, sind die Experimente mit zwei verschiedenen Donor-Farbstoffen durchgeführt worden; TMR und Rhodamin 110, beide an die $F_1\gamma$ -Untereinheit gebunden. Als Akzeptor-Farbstoff erweist sich das bi-funktionale Cyanin 5 als zweckmäßig, welches über zwei Kopplungsgruppen an die identischen F_0b -Untereinheiten gebunden wird. Bei einer Rotation der zwei fluoreszenzmarkierten Untereinheiten relativ zueinander ändern sich die Abstände zwischen den Fluorophoren, was unterschiedliche Effizienzen des fluoreszenzresonanten Energietransfers hervorruft. Über die auftretenden gleichzeitigen Veränderungen mehrerer detektierter, unabhängiger Fluoreszenzparameter wie Intensität und Lebensdauer können Abweichungen in der FRET-Effizienz eindeutig mit einer Abstandsänderung zwischen den Fluorophoren verknüpft werden. Um eine schrittweise Rotation von einer Oszillation zu unterscheiden, müssen mindestens drei unterschiedliche FRET-Stufen detektiert werden. Eine systematische Abfolge der Stufen kann in diesem Fall mit einer Rotationsbewegung in eine Richtung gleichgesetzt werden. Durch die Symmetrie der ATP-Synthase muss bei der Fluoreszenzmarkierung beachtet werden, dass zwei Haltepositionen nicht die gleichen Abstände zwischen den Fluorophoren und damit nicht-unterscheidbare Fluoreszenzstufen liefern.

Bei Zugabe des nicht hydrolysierbaren ATP-Derivats AMPPNP wird die $F_1\gamma$ -Untereinheit des Enzyms in einer der drei Orientierungen relativ zur F_0b -Untereinheit blockiert. Durch die unveränderten Abstände zwischen den Fluorophoren ergeben sich über die gesamte Länge des Enzymdurchtritts durch das Detektionsvolumen Spuren mit konstanten Intensitätsquotienten F_D/F_A und Fluoreszenzlebensdauern $\tau_{D(A)}$. Diese Fluoreszenzparameter sind unabhängig von den Intensitätsfluktuationen, die durch die Diffusionsbewegung der doppelt-markierten Enzyme durch das konfokale Volumen entstehen. Bei einer größeren Auswahl der Spuren zeigt sich, dass diese unterschiedliche, in den einzelnen Stufen jedoch

konstante FRET-Effizienzen aufweisen. Die festgestellten Verteilungen werden über Gauß-Funktionen angepasst und für die Mittelwerte werden mit Einschränkungen drei FRET-Abstände berechnet, welche sich signifikant unterscheiden. Die Inhibition der ATP-Synthase mit einer einhergehenden Fixierung des Rotors in einer von drei möglichen Haltepositionen wird demnach über die MFD-Untersuchungen bestätigt. Werden die abgeschätzten Abstände zwischen den Fluorophoren in Relation zum F_0F_1 -ATP-Synthase-Modell gesetzt, erweisen sich diese als plausibel. Der größte erreichbare Abstand der Cysteine, an welche die Fluorophore angekoppelt sind, beträgt bei einer Rotation der γ -Untereinheit von F_1 relativ zu den b-Untereinheiten im F_0 -Teilkomplex nach dem Modell 73 Å. Bei einer Drehung um 120° bzw. 240° ergeben sich zwei Abstände der Größenordnung 40-60 Å. Diese stimmen im Rahmen der vorliegenden Unsicherheiten in der Bestimmung der FRET-Abstände und der Unsicherheit in der Definierung der Haltepositionen in dem vorliegenden Modell mit den abgeschätzten Werten grob überein und belegen die Plausibilität der erzielten Ergebnisse.

Bei Zugabe von ATP führt die ATP-Hydrolyse zu einer stufenweisen Rotation der γ -Untereinheit im F_1 -Teilkomplex der ATP-Synthase. Dieses zeigt sich in den detektierten Spuren einzelner Enzyme über erkennbare diskrete Stufen der Fluoreszenzparameter Intensitätsquotient, F_D/F_A , und Lebensdauer, $\tau_{D(A)}$. Die statistische Analyse der ausgesuchten Spuren liefert vergleichbare Verteilungen von F_D/F_A zu jenen, welche unter Zugabe des AMPPNPs beobachtet werden. Da die Verweildauern der Enzyme im Detektionsvolumen für die Gesamtheit der Spuren vergleichbar sein sollten, werden die unter AMPPNP beobachteten konstanten Stufen wesentlich länger sein als jene wechselnden Stufen, beobachtet unter Zugabe des ATPs. Dieses erklärt die etwas größere Streuung der F_D/F_A -Werte für die ATP-Spuren. Die abgeschätzten FRET-Abstände sind jedoch ähnlich. Die Positionen der fluoreszenzmarkierten Untereinheiten relativ zueinander, welche bei der Hydrolyse beobachtet werden, scheinen die gleichen zu sein, wie jene bei der AMPPNP-Inhibition auftretenden. Dieses wird über Untersuchungen bestätigt, in denen bei einer millimolaren Konzentration des ATPs dieses sehr schnell an eine freie Nukleotid-Bindungsstelle bindet und der limitierende Schritt vielmehr in der Freigabe des ADPs besteht. Da das AMPPNP als ATP-Derivat zwar bindet, jedoch das Enzym inhibiert, sollte die Halteposition des Enzyms in diesem Fall mit der Position vor der Freigabe, die in diesem Fall gehemmt ist, übereinstimmen.

Die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten der ATP-Synthase verbleiben während der Hydrolyse von ATP für eine gewisse Aufenthaltsdauer in einer von drei definierten Positionen, bis über eine schrittweise Rotationsbewegung die nächste Position eingenommen

wird. Die Abfolge der Stufen liefert in der Mehrheit der Spuren die FRET-Sequenz $3 \rightarrow 2 \rightarrow 1 \rightarrow 3$. Die videomikroskopischen Experimente von immobilisierten F_1 -ATP-Synthasen mit einem fluoreszierenden Aktin-Filament an der γ -Untereinheit haben ergeben, dass sich bei Anwesenheit von ATP die $F_1\gamma$ -Untereinheit aus Sicht des F_0 -Teilkomplexes entgegen dem Uhrzeigersinn in 120° -Schritten dreht (Noji 1997). Demzufolge wird die detektierte Stufenabfolge der FRET-Sequenz aus Sicht des F_0 -Teilkomplexes einer Rotation der Rotor-Untereinheiten im F_1 - und F_0 -Teilkomplex relativ zu den Stator-Untereinheiten entgegen dem Uhrzeigersinn zugeordnet, wie in Abbildung 6-1b dargestellt.

Die über einen Protonen- und K^+ -Gradienten initiierte Synthese von ATP liefert ähnliche Ergebnisse zur Hydrolyse. Es werden wiederum diskrete Stufen in den bestimmten Fluoreszenzparametern F_D/F_A und $\tau_{D(A)}$ observiert. Die Verteilung des Intensitätsquotienten F_D/F_A ist für die Synthese im Vergleich zu den Verteilungen erreicht unter Zugabe von AMPPNP oder ATP verbreitert. Zum einen wird hier eine schlechtere Statistik erreicht, was eine größere Streuung der Werte mit sich bringt. Zum anderen besteht die Möglichkeit von zusätzlich auftretenden Abständen. In einem geringen Teil der untersuchten Synthespuren ist das Auftreten zusätzlicher Stufen aufgefallen, die allerdings nur kurz sind. Hydrolysespuren weisen dieses Verhalten weitaus seltener auf. Das Auftreten von Sub-Zuständen als Zwischenposition zu den bisher observierten Haltepositionen ist denkbar als funktionelle Zwischenstufe der ablaufenden Hydrolyse- bzw. Synthese-Prozesse. Das Auftreten von Subschritten für den Hydrolyse-Prozess ist bereits in Abschnitt 6.1.2 beschrieben worden. An Stelle einer 120° -Rotation treten 90° - und 30° -Subschritte (Yasuda 2001) auf bzw. 80° - und 40° -Subschritte (Shimabukuro 2003). Die Verweilzeit vor dem 90° -Schritt ist in dem beschriebenen Experiment abhängig von der Konzentration des ATP, weshalb diese Halteposition innerhalb der Hydrolyse der ATP-Bindung zugeordnet wird. Die Konformationsänderung des 30° -Schritts wird der Freisetzung der Produkte ADP und P_i zugeordnet. Eine Bestätigung für das Auftreten von Subschritten in dem vollständigen, membranintegrierten Enzym ist bisher ausgeblieben. Für die Synthese ließe sich eine hypothetische Warteposition des Enzyms für das ADP gegenüber einer mit einer konformationellen Rotation einhergehende katalytische Reaktion oder Freigabe des ATP über eine Variation der Substrat-Konzentrationen überprüfen. Dieses Phänomen ist jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen gewesen. Die gegenüber der Inhibition mit AMPPNP oder der Hydrolyse verbreiterten Verteilungen sind daher wie bislang über Gauß-Funktionen angepasst worden, um den Mittelwerten FRET-Abstände zuzuordnen. Nur die

detektierte Stufe mit der geringsten FRET-Effizienz weist eine signifikante Abweichung zu den berechneten Abständen für die Hydrolyse und die Inhibition auf.

Die Abfolge der detektierten Stufen für die Synthese liefert in der Mehrheit der Spuren die FRET-Sequenz $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1 \dots$, was einer Umkehrung der Rotationsrichtung im Vergleich zur Hydrolyse entspricht. Dieses ist in Simulationen der molekularen Dynamik postuliert, bislang jedoch experimentell nicht nachgewiesen (Böckmann 2002). In dem bereits vorgestellten Modell entspricht dieses aus Sicht des F_0 -Teilkomplexes einer Rotation des F_1 -Komplexes im Uhrzeigersinn, dargestellt in Abbildung 6-1b. Die Haltepositionen entsprechen im Wesentlichen denen, welche bei der Inhibition mit AMPPNP und bei der Hydrolyse von ATP beobachtet werden. Durch den Verbrauch der Protonen bei der Synthese sowie Verluste der Protonen (und in geringem Maß der K^+ -Ionen) über die Membran nehmen die anfänglich eingestellten Gradienten mit der Zeit ab. Nach einem Ausgleich, der sich innerhalb von wenigen Minuten einstellt, werden lediglich konstante Stufen und selten Oszillationen zwischen zwei Stufen observiert.

Die beobachteten Längen der Stufen für die Hydrolyse und die Synthese entsprechen der Verweilzeit einer definierten Konformation. Eine monoexponentielle Anpassung der Verteilungen der Stufenlängen für die Spuren der Abbildung 6-4b und c liefert eine mittlere Verweilzeit von 19 ms für die Hydrolyse und eine mittlere Verweilzeit von 51 ms für die Synthese (zusätzliche Daten aus Freiburg). Die Werte entsprechen im Wesentlichen den Umsatzzeiten der Hydrolyse (15 ms) bzw. Synthese (43 ms) von einem ATP-Molekül, welche über Ensemble-Messungen erhalten werden (Diez 2003). Der Vergleich begründet die Annahme, dass die Dauer einer FRET-Stufe direkt mit dem katalytischen Ereignis verknüpft ist.

Zusammenfassend ist mit den vorliegenden Untersuchungen die Echtzeit-Observation einer kinetisch kontrollierten Hydrolyse und Synthese von ATP für die FRET-markierte, biologisch aktive F_0F_1 -ATP-Synthase aus *E. coli* in frei diffundierenden Liposomen gelungen. Die postulierte stufenweise Rotation ist für das vollständige, membranintegrierte Enzym in einer quasi-nativen Umgebung bestätigt worden. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit dem gegenwärtig angenommenen Modell der ATP-Synthase, welches für die Hydrolyse von ATP eine katalytisch induzierte Rotation der $F_1\gamma$ -Untereinheit aufweist und die Synthese mit einer durch Protonenfluss im F_0 -Komplex verursachten Rotation verbindet. Es entsteht das Bild der ATP-Synthase, welche als Gesamtkomplex zusammengesetzt ist aus zwei gegenläufig rotierenden Maschinen auf den Skalen der Nano-Technologie.

Kapitel 7

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sind fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur molekularen Dynamik an einzelnen biologischen Systemen vorgenommen worden. Im Mittelpunkt der Abhandlung steht die Anwendung der Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD) in einem konfokalen Mikroskop, welche über die sensitive Analyse von simultan erfassten, unabhängigen Fluoreszenzparametern auf die umfassende Charakterisierung der fluoreszenzmarkierten Moleküle abzielt. Die Vielfalt dieser Methode ermöglicht einen Beitrag zur Aufklärung komplexer, molekularer Reaktionsmechanismen der untersuchten Biomoleküle.

MFD-Imaging

Um im Rahmen der vorliegenden Arbeit die konkrete Fragestellung auftretender molekularer Stöchiometrien in definierten, fluoreszenten Systemen bearbeiten zu können, erfolgte durch einen Ausbau der konfokalen Apparatur die experimentelle Realisierung des konfokalen Scannings. Mit der einhergehenden Entwicklung der Datenanalyse konnte die bisherige Anwendung der Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD) von einzelnen Molekülen, die frei in wässriger Lösung diffundieren, auf Moleküle, die auf einer Oberfläche immobilisiert sind, ausgeweitet und die MFD als bildgebendes Verfahren (MFD-Imaging) etabliert werden.

Durch die schrittweise Abtastung der Oberfläche entsteht ein Bild der Verteilung von immobilisierten Molekülen. Für jedes Pixel des abgetasteten Bildes werden die zeitabhängigen Intensitäten von vier Detektionseinheiten erfasst, welche die Fluoreszenzdaten

analog zur MFD in Lösung spektral und nach ihrer Polarisierung, relativ zum Anregungslicht, separiert detektieren. Fluoreszenzparameter wie die Lebensdauer und, bei linear polarisierter Anregung, die Anisotropie lassen sich hierüber für beide Spektralbereiche anpassen. Auf diese Weise gelingt die simultane Erfassung unabhängiger Fluoreszenzparameter für jedes Pixel des abgetasteten Bildes. Die Beobachtungszeiten der Moleküle sind gegenüber einer diffusionsbegrenzten Aufenthaltsdauer im Fokus um Größenordnungen länger und im Wesentlichen nur durch die Photozerstörung der Fluorophore begrenzt.

Neben der Erfassung und Analyse der experimentellen Daten im bildgebenden Verfahren können nun immobilisierte Systeme mit definierten Fluoreszenzeigenschaften gezielt ausgewählt und untersucht werden. Bei Betrachtung ihrer Fluoreszenz über die Zeit liefern die Fluorophore weitgehend konstante Signale, bis sie schließlich ausbleichen. Durch eine gezielte, sukzessive Photozerstörung der Fluorophore lassen sich die molekularen Stöchiometrien fluoreszenter Systeme bestimmen.

Quantifizierung der Emitter eines fluoreszenten Systems

Der Zuwachs an Möglichkeiten, der sich aus der Entwicklung des MFD-Imagings ergibt, offenbart sich auch in der bearbeiteten Fragestellung einer aufzuweisenden Stöchiometrie der fluoreszenten Systeme. Es sind zunächst Untersuchungen an Referenzsystemen durchgeführt worden, in denen anhand verschiedener Methoden die Möglichkeiten der Quantifizierung von Emittern eines fluoreszenten Systems überprüft worden sind.

Zunächst sind MFD-Untersuchungen von DNA, welche mit ein, zwei oder vier identischen Fluorophoren in variablen Abständen markiert sind, in Lösung durchgeführt worden. Die Anwendung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) unter Einbeziehung des Antibunchings ist als eine geeignete Methode für den eindeutigen Nachweis von Ein-Quantensystemen eingeführt worden.

Untersuchungen an einem Lectin-Protein (LecB), welches als Homotetramer mit vier eYFP-Fluorophoren fluoreszenzmarkiert ist, demonstrieren, dass für fluoreszente Systeme mit mehr als einem Emitter die über das MFD-Imaging realisierte Methode der sukzessiven Photozerstörung von Fluorophoren der FCS überlegen ist. Das manuelle Zählen von Stufen ist bei bis zu etwa vier ausbleichenden Fluorophoren möglich. Um auch höhere Fluorophorzahlen quantifizieren zu können, ist zusätzlich, basierend auf der sukzessiven Photozerstörung, ein Algorithmus entwickelt worden, welcher die auftretende Fluoreszenz mit den Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Fluoreszenzsignale einer variierenden

Fluorophorzahl vergleicht. Auf diese Weise kann jeder Fluoreszenzintensität eine Fluorophorzahl zugeordnet werden.

Anhand der untersuchten Referenzsysteme sind somit die Möglichkeiten und die Grenzen in der Bestimmung stöchiometrischer, molekularer Anordnungen aufgewiesen worden. Um die Anwesenheit eines Ein-Quantensystems zu überprüfen, ist die Anwendung der FCS auf die in Lösung diffundierenden Systeme anzuwenden. Größere Fluorophor-Zahlen hingegen lassen sich über die sukzessive Photozerstörung für immobilisierte Systeme auf Oberflächen überprüfen.

SNARE-Protein-unterstützte Membranfusion

Die beschriebenen experimentellen Entwicklungen finden ihre Anwendung in den Untersuchungen zur SNARE-Protein-unterstützten exozytotischen Membranfusion, welche eine zentrale Rolle in der Signalübertragung im zentralen Nervensystem spielt. In der Präsynapse befinden sich die synaptischen Vesikel, welche mit Neurotransmittern gefüllt sind. Die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran der Präsynapse wird über die neuronalen SNARE-Proteine geregelt und resultiert in der Ausschüttung der Neurotransmitter. Für die durchgeführten Untersuchungen sind die beteiligten SNARE-Proteine fluoreszenzmarkiert und in die Membran artifizieller Liposomen eingelagert worden. Das SNARE-Protein Synaptobrevin der synaptischen Vesikel wurde mit dem Farbstoff Alexa 488 markiert und bildet den wesentlichen Bestandteil der Donor-Liposomen. Der in der Plasmamembran des präsynaptischen Nervenendes eingelagerte binäre Komplex besteht aus den SNARE-Proteinen Syntaxin und SNAP-25. Das Syntaxin wurde mit dem Farbstoff Alexa 594 fluoreszenzmarkiert und der binäre Komplex in die Akzeptor-Liposomen eingelagert. Die Markierungspositionen für die Fluorophore liegen innen an der Transmembranregion der Proteine. Die Membranfusion wird über die Ausbildung eines ternären SNARE-Komplexes der beteiligten Proteine gegensätzlicher Liposomen initiiert. Hierüber entsteht ein sehr geringer Abstand zwischen den Fluorophoren, sodass ein fluoreszenzresonanter Energietransfer stattfindet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte über MFD-Untersuchungen zunächst die postulierte Existenz eines Andock-Mechanismus im Prozess der Membranfusion bestätigt werden. Ferner wurden sowohl der Andockmechanismus wie auch die Fusion der eingesetzten Liposomen als spezifisch erkannt. Eine grundlegende Fragestellung befasste sich weiter mit der bislang unbekanntenen molekularen Stöchiometrie der bei der Membranfusion auftretenden Prozesse. Die MFD-Untersuchungen von Liposomen mit variierender Zahl von

SNARE-Proteinen belegen zunächst, dass der Andockmechanismus nur geringe Proteinzahlen benötigt, während die Fusion nur bei Anwesenheit einer definierten Zahl von SNARE-Proteinen stattfinden kann, welche einen gewissen Schwellwert überschreitet. Die statistische Verteilung der Proteinzahlen in den Liposomen und die sich daraus ergebenden Unsicherheiten in den bestimmten Protein-Schwellwerten, welche für die Prozesse des Andockens und der Fusion erforderlich sind, führte zu der Notwendigkeit, definierte Liposomen auf ihre Proteinzahl hin zu untersuchen. Dieses wurde durch den Aufbau des MFD-Imagings realisiert. Die Kombination mit der sukzessiven Photozerstörung der Fluorophore und die Anwendung des entwickelten Algorithmus lieferte die Grundlage für die vorgenommene Eingrenzung der Proteinzahlen. Für das Andocken von Liposomen konnte eine Beteiligung von 1-3 SNARE-Proteinen pro Liposom ermittelt werden. Zur Stöchiometrie der Membranfusion konnte durch die Vereinigung der erzielten Ergebnisse der in Lösung wie auf Oberflächen untersuchten Liposomen eine Eingrenzung der beteiligten Proteine auf 4-9 SNARE-Proteine pro Liposom vorgenommen werden. Die Ergebnisse stehen teilweise im Gegensatz zu bisherigen stöchiometrischen Untersuchungen zur Membranfusion, wobei die präsentierten Untersuchungen als einzige den nachweislich auftretenden Andockmechanismus berücksichtigen.

Reaktionsmechanismen der H^+ -ATP-Synthase

Eine weitere Anwendung der MFD findet sich in den untersuchten Reaktionsmechanismen der H^+ -ATP-Synthase. Die katalytische Aktivität der H^+ -ATP-Synthase ist mit einer internen Rotation der Untereinheiten des Enzyms gekoppelt. Da die Rotationsbewegung ein stochastischer Prozess ist, welcher nicht synchronisiert werden kann, müssen Untersuchungen diesbezüglich auf der Ebene einzelner Moleküle durchgeführt werden.

Die Präparation des biologisch funktionalen Enzyms mit Fluoreszenzmarkierungen, die so klein sind, dass sie die Bewegungen der Untereinheiten während der zu beobachtenden Katalyse nicht beeinflussen, ermöglichte die Untersuchung des Enzyms in einer quasi-nativen Umgebung ohne äußere, störende Einflüsse. Durch gezielte Fluoreszenzmarkierungen mit dem Donor-Farbstoff Rhodamin 110 bzw. Tetramethylrhodamin und dem bifunktionalen Akzeptor-Farbstoff Cyanin 5 an exponierten Positionen der Untereinheiten des Enzyms konnten verschiedene Effizienzen eines fluoreszenzresonanten Energietransfers (FRET) nachgewiesen werden. Über eine Drehung der markierten Untereinheiten relativ zueinander

wurden drei verschiedene FRET-Effizienzen aufgezeigt, welche in Relation zu drei Abständen der Fluorophore gesetzt wurden.

Sowohl die Hydrolyse als auch die Synthese von ATP wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen als katalytische Prozesse der H^+ -ATP-Synthase auf molekularer Ebene untersucht. Über die detektierten und analysierten FRET-Effizienzen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Hydrolyse als auch die Synthese von ATP zu einer schrittweisen Rotation der Untereinheiten relativ zueinander führt. Der Vergleich mit videomikroskopischen Experimenten von immobilisierten Teilkomplexen der H^+ -ATP-Synthase, welche mit einem fluoreszierenden Aktin-Filament versehen waren (Noji 1997), lieferte die Zuordnung einer Rotation in 120° -Schritten. Eine außerordentliche Entdeckung lieferte der Vergleich der Abfolgen der FRET-Effizienzen für die Hydrolyse und die Synthese von ATP. Hier konnte der experimentelle Nachweis der postulierten gegensätzlichen Rotationsrichtungen für die beiden Prozesse geliefert werden.

Literaturverzeichnis

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., Walker, J. E. (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F1 ATPase from bovine heart mitochondria." Nature **370**: 621-628.
- Affleck, R. L., Ambrose, W. P., Demas, J. N., Goodwin, P. M., Schecker, J. A., Wu, M., Keller, R. A. (1996). "Reduction of luminescent background in ultrasensitive fluorescence detection by photobleaching." Analytical Chemistry **68**(13): 2270.
- Almers, W., Tse, F. W. (1990). "Transmitter release from synapses: Does a preassembled fusion pore initiate exocytosis?" Neuron **4**: 813-818.
- Ambrose, W. P., Goodwin, P. M., Martin, J. C., Keller, R. A. (1994). "Single Molecule Detection and Photochemistry on a Surface Using Near-Field Optical Excitation." Physical Review Letters **72**(1): 160.
- Andrews, D. L., Demidov, A. A. (1999). "Resonance Energy Transfer." New York, Wiley.
- Barondes, S. H. (1988). "Bifunctional Properties of Lectins: Lectins Redefined." Trends in Biochemical Sciences **13**: 480-482.
- Berg, J., M., Tymoczko, J., L., Stryer, L. (2003). "Biochemie." Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Berger, S. (2001). "Untersuchung der Einzelmoleküldynamik mit multidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie." Dissertation. Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Bergmann, L., Schaefer, C. (1993). "Lehrbuch der Experimentalphysik, Optik." 9. Auflage, New York, de Gruyter.
- Bevington, P. R. (1969). "Data reduction and error analysis for the physical sciences." New York, MacGraw-Hill College.
- Böckmann, R. A., Grubmüller, H. (2002). "Nanoseconds molecular dynamics simulation of primary mechanical energy transfer steps in F1-ATP synthase." Nature Structural Biology **9**: 198-202.
- Börsch, M., Diez, M., Zimmermann, B., Reuter, R., Gräber, P. (2002). "Stepwise rotation of the γ -subunit of F₀F₁-ATP synthase observed by intramolecular single-molecule fluorescence resonance energy transfer." FEBS Letters **527**: 147-152.
- Böttcher, B., Bertsche, I., Reuter, R., Gräber, P. (2000). "Direct Visualisation of Conformational Changes in EF₀F₁ by Electron Microscopy." Journal of Molecular Biology **296**: 449-457.
- Bowen, M. E., Weninger, K., Brunger, A. T., Chu, S. (2004). "Single Molecule Observation of Liposome-Bilayer Fusion Thermally Induced by Soluble N-Ethyl Maleimide Sensitive-Factor Attachment Protein Receptors (SNAREs)." Biophysical Journal **87**: 3569-3584.
- Boyer, P. D. (1975). "A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport." FEBS Letters **58**: 1-6.
- Boyer, P. D. (1993). "The Binding Change Mechanism for ATP Synthase - Some Probabilities and Possibilities." Biochimica et Biophysica Acta. **1140**: 215-250.
- Boyer, P. D. (1999). "What makes ATP Synthase spin." Nature **402**: 247-249.
- Brand, L. (1998). "Zeitaufgelöster Nachweis einzelner Moleküle in Lösung" Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.

- Brand, L., Eggeling, C., Zander, C., Drexhage, K. H., Seidel, C. A. M. (1997). "Single-molecule identification of coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection - comparison of one- and two-photon excitation in solution." Journal of Physical Chemistry A **101**(24): 4313-4321.
- Cain, B. D. (2000). "Mutagenic Analysis of the F₀ Stator Subunits." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **32**: 365-371.
- Cantor, C. R., Schimmel, P. R. (1980). "Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function." New York, Freeman.
- Chen, Y. A., Scheller, R. H. (2001). "Snare-mediated membrane fusion." Nature Reviews Molecular Cell Biology **2**(2): 98.
- Cho, S. J., Kelly, M., Rognlien, K. T., Cho, J. A., Hörber, J. K. H., Jena, B. P. (2002). "SNAREs in Opposing Bilayers Interact in a Circular Array to Form Conducting Pores." Biophysical Journal **83**: 2522-2527.
- Clegg, R. M. (1992). "Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids." Methods in Enzymology **211**: 353.
- Dale, R. E., Eisinger J. (1974). "Intramolecular distances determined by energy transfer. Dependence on orientational freedom of donor and acceptor." Biopolymers **13**: 1573.
- Dale, R. E., Eisinger, J., Blumberg, W. E. (1979). "The orientational freedom of molecular probes." Biophysical Journal **26**: 161-194.
- Demtröder, W. (1993). "Laserspektroskopie: Grundlagen und Techniken." 3. Auflage, Berlin, Springer-Verlag.
- Diez, M. (2003). "H⁺-ATPsynthase aus E. coli: Beobachtung der Protonen angetriebenen Rotation der γ -Untereinheit mit Einzelmolekül Fluoreszenzspektroskopie." Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität. Freiburg in Breisgau.
- Diez, M., Zimmermann, B., Börsch, M., König, M., Schweinberger, E., Steigmiller, S., Reuter, R., Felekyan, S., Kudryavtsev, V., Seidel, C. A. M., Gräber, P. (2004). "Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F₀F₁-ATP synthase." Nature Structural & Molecular Biology **11**(2): 135.
- Dlagic, M., Harrington, R. E. (1998). "DIAMOD: display and modeling of DNA bending." Bioinformatics **14**: 326-331.
- Donort, E. V., Porter, G. (1970). "Acid-Base Properties of Excited States: Progress in Random Kinetics." Oxford, Pergamon Press: 273.
- Duncan, T. M., Bulygin, V. V., Zhou, Y., Hutcheon, M. L., Cross, R. L. (1995). "Rotation of subunits during catalysis by Escherichia coli F₁-ATPase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**: 10964-10968.
- Dunn, S. D., Futai, M. (1980). "Reconstitution of functional coupling factor from the isolated subunits of Escherichia coli F₁-ATPase." Journal of Biological Chemistry **255**: 113-118.
- Dunn, S. D., Heppel, L. A. (1981). "Properties and functions of the subunits of the Escherichia coli coupling factor ATPase." Archives of Biochemistry and Biophysics **210**: 421-436.
- Eggeling, C. (1996). "Photostabilitätsuntersuchungen an Fluoreszenzfarbstoffen für einen Einzelmolekülnachweis" Diplomarbeit. Georg-August-Universität Göttingen.

- Eggeling, C. (1999). "Analyse von photochemischer Kinetik und Moleküldynamik durch mehrdimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie" Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.
- Eggeling, C., Berger, S., Brand, L., Fries, J. R., Schaffer, J., Volkmer, A., Seidel, C. A. M. (2001). "Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection." Journal of Biotechnology **86**(3): 163.
- Ehrenberg, M., Rigler, R. (1974). "Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations." Chemical Physics **4**: 390.
- Eigen, M., Rigler, R. (1994). "Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**: 5740.
- Enderlein, J., Robbins, D. L., Ambrose W. P., Goodwin P. M., Keller R. A. (1997). "The statistics of single molecule detection: an overview." Bioimaging **5**: 88.
- Engelbrecht, S., Junge, W. (1997). "ATP synthase: a tentative structural model." FEBS Letters **414**: 485-491.
- Felekyan, S., Kühnemuth, R., Kudryavtsev, V., Sandhagen, C., Becker, W., Seidel, C. A. M. (2005). "Full correlation from picoseconds to seconds by time-resolved and time-correlated single photon detection." Review of Scientific Instruments **76**(8): 083104.
- Fischer, S., Gräber, P. (1999). "Comparison of ΔpH - and $\Delta\phi$ -driven ATP synthesis catalyzed by the H^+ -ATPases from Escherichia coli or chloroplasts reconstituted into liposomes." FEBS Letters **457**: 327-332.
- Fischer, S., Gräber, P., Turina, P. (2000). "The activity of the ATP synthase from Escherichia coli is regulated by the transmembrane proton motive force." Journal of Biological Chemistry **275**: 30157-30162.
- Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." Annalen der Physik **6**(2): 55-75.
- Fries, J. R., Brand, L., Eggeling, C., Köllner, M., Seidel, C. A. M. (1998). "Quantitative identification of different single-molecules by selective time-resolved confocal fluorescence spectroscopy." Journal of Physical Chemistry A **102**: 6601.
- Frings, S., Baumann, A. (2000). "Vorlesungsskripte Zoophysiologie", <http://www.zoologie-skript.de/methoden/methodin.htm>, Stand 10. Juni 2005
- Gilbert, A., Baggot, J. (1991). "Essentials of Molecular Photochemistry." Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Gopich, I., Szabo, A. (2005). "Theory of photon statistics in single-molecule Förster resonance energy transfer." Journal of Chemical Physics **122**: 14707-14724.
- Ha, T. (2001). "Single-molecule fluorescence resonance energy transfer." Methods **25**: 78.
- Hanbury-Brown, R., Twiss R. Q. (1956). "Correlation between photons in two coherent beams of light." Nature **177**(4497): 27.
- Hansen, R. L., Zhu, X. R., Harris, J. M. (1998). "Fluorescence Correlation Spectroscopy with Patterned Photoexcitation for Measuring Solution Diffusion Coefficients of Robust Fluorophores." Analytical Chemistry **70**(7): 1281.

- Hofkens, J., M. Cotlet, Vosch, T., Tinnefeld, P., Weston, K. D., Ego, C., Grimsdale, A., Müllen, K., Beljonne, D., Brédas, J. L., Jordens, S., Schweitzer, G., Sauer, M., De Schryver, F. (2003). "Revealing competitive Förster-type resonance energy-transfer pathways in single bichromophoric molecules." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(23): 13146.
- Honda, A., Yamada, M., Saisu, H., Takahashi, H., Mori, K. J., Abe, T. (2002). "Direct, Ca²⁺-dependent interaction between tubulin and synaptotagmin I." Journal of Biological Chemistry **277**(23): 20234-20242.
- Hornig, M. L., Gardecki, J. A., Maroncelli, M. (1996). "Rotational dynamics of coumarin 153: time-dependent friction, dielectric friction, and other nonhydrodynamic effects." Journal of Physical Chemistry A **101**: 1030.
- Hua, Y., Scheller, R. H. (2001). "Three SNARE complexes cooperate to mediate membrane fusion." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(14): 8065-8070.
- Invitrogen (2005). "The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies." Carlsbad, California.
- Jablonski, A. (1960). "On the notion of emission anisotropy." Bulletin de l'Académie Polonaise Des Sciences **6**(4): 259-264.
- Jagendorf, A. T., Uribe, E. (1966). "ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **55**: 170-177.
- Jahn, R. (2005). "Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Research group: Reinhard Jahn." http://www.mpibpc.gwdg.de/groups/jahn/Jahn/Fra_J_home.htm, Stand 10. Juni 2005
- Jahn, R., Südhof, T. C. (1999). "Membrane fusion and exocytosis." Annual Review of Biochemistry **68**: 863.
- Jahn, R., Lang, T., Südhof, T. (2003). "Membrane fusion." Cell **112**(4): 519.
- Jiang, W., Hermolin, J., Fillingame, R. H. (2001). "The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of Escherichia coli ATP synthase is 10." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 4966-4971.
- Jianpeng, M., Flynn, T. C., Cui, Q., Leslie, A.G. W., Walker, J. E., Karplus, M. (2002). "A dynamic analysis of the rotation mechanism for conformational change in F1-ATPase." Structure **10**: 921-931.
- Junge, W., Lill, H., Engelbrecht, S. (1997). "ATP synthase: an electrochemical transducer with rotary mechanics." Trends in Biochemical Sciences **22**: 420-423.
- Kagawa, Y., Racker, E. (1971). "Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. XXV. Reconstitution of vesicles catalyzing 32Pi-adenosine triphosphate exchange." Journal of Biological Chemistry **246**: 5477-5487.
- Karolin, J., Fa, M., Wilczynska, M., Ny, T., Johansson, L. B.-A. (1998). "Donor-Donor Energy Migration for Determining Intramolecular Distances in Proteins: I. Application of a Model to the Latent Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1)." Biophysical Journal **74**: 11-21.
- Karolin, J., Hagglof, P., Ny, T., Johansson, L. B.-A. (1997). "Donor-Donor Energy Migration (DDEM) for Determining Intramolecular Distances in Proteins. II. The Effect of Partial Labeling." Journal of Fluorescence **7**: 331-339.

- Kasha, M. (1950). "Characterization of electronic transitions in complex molecules." Discussion of the Faraday Society **9**: 14.
- Kashket, E. R. (1982). "Stoichiometry of the H⁺-ATPase of growing and resting aerobic Escherichia coli." Biochemistry **21**: 5534-5538.
- Kawski, A. (1983). "Excitation Energy Transfer and Its Manifestation in Isotropic Media." Photochemistry and Photobiology **38**: 487-504.
- Kimble, H. J., Dagenais, M., Mandel, L. (1977). "Photon Antibunching in Resonance Fluorescence." Physical Review Letters **39**(11): 691-695.
- Kinosita, K. J., Adachi, K., Itoh, H. (2004). "Rotation of F₁-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **33**: 245-268.
- Köllner, M. (1993). "How to find the sensitivity limit for DNA sequencing based on laser-induced fluorescence." Applied Optics **32**(6): 806.
- Koppel, D. E., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E. L., Webb, W.W. (1976). "Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility." Biophysical Journal **16**: 1315.
- Koshioka, M., Sasaki, K., Masuhara, H. (1995). "Time-Dependent Fluorescence Depolarization Analysis in Three Dimensional Microscopy." Applied Spectroscopy **49**(2): 224.
- Kudryavtsev, V., Felekyan, S. (2003). Labview-basiertes Computerprogramm "Marcelle."
- Kühnemuth, R. (2005). persönliche Mitteilung.
- Kullback, S. (1959). "Information Theory and Statistics." New York, John Wiley & Sons.
- Lakowicz, J. R. (1999). "Principles of Fluorescence Spectroscopy." New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Lakowicz, J. R., Szymanski, H., Nowaczyk, K., Lederer, W. J., Kirby, M. S., Johnson, M. L. (1994). "Fluorescence lifetime imaging of intracellular calcium in COS cells using Quin-2." Cell Calcium **15**(1): 7-27.
- Lerner, N., Barnes, M. D., Kung, C-Y., Whitten, W. B., Ramsey, J. M., Hill, S. C. (1998). "Spatial photoselection of single molecules on the surface of spherical microcavities." Optics Letters **23**(12): 951-953.
- Lill, H., Hensel, F., Junge, W., Engelbrecht, S., (1996). "Cross-linking of engineered subunit δ to ($\alpha\beta$)₃ in chloroplast F-ATPase." Journal of Biological Chemistry **271**: 32737-32742.
- Lindau, M., Almers, W. (1995). "Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion." Current Opinion in Cell Biology **7**: 509-517.
- Macklin, J. J., Trautman, J. K., Harris, T. D., Brus, L. E. (1996). "Imaging and Time-Resolved Spectroscopy of Single Molecules at an Interface." Science **272**: 255-258.
- Magde, D., Elson, E. L., Webb, W. W. (1972). "Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy." Physical Review Letters **29**: 705.

- Margittai, M., Widengren, J., Schweinberger, E., Schröder, G., Fasshauer, D., Felekyan, S., Hausteiner, E., König, M., Grubmüller, H., Jahn, R., Seidel, C.A.M. (2003). "Single molecule FRET dynamics reveals an equilibrium between a closed and an open conformation of Syntaxin-1." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(26): 15516-15521.
- Marti, O. (2003). "Vorlesungsskript: Einführung in die Fehlerrechnung für Physiker, Wirtschaftsphysiker und Lehramtskandidaten." http://wwwex.physik.uni-ulm.de/lehre/fehlerrechnung/Fehlerrechnung_2003.html, Stand 10. Juni 2005
- Mathews, D. H., Zuker, M., Turner, D. H. (1996-2001). Computerprogramm "RNAstructure.", Version 3.7
- Meier, T., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W., Dimroth, P. (2005). "Structure of the Rotor Ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*." Science **308**: 659-662.
- Mets, Ü., Rigler, R. (1994). "Submillisecond Detection of Single Rhodamine Molecules in Water." Journal of Fluorescence **4**(3): 259.
- Mets, Ü. (2001). "Antibunching and Rotational Diffusion." in "Fluorescence Correlation Spectroscopy", hg. von Rigler, R., Elson, E. S., Springer-Verlag: 346-359.
- Mishra, A., Behera, R. K., Behera, P. K., Mishra, B. K., Behera, G. B. (2000). "Cyanines during the 1990s: A Review." Chemical Review **100**: 1973-2011.
- Moerner, W. E., Kador, L. (1989). "Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid." Physical Review Letters **62**(21): 2535.
- Monck, J., Oberhauser A. F., Fernandez J. M. (1995). "The exocytotic fusion pore interface: a model of the site of neurotransmitter release." Molecular Membrane Biology **12**: 151-156.
- Noji, H., Yasuda, R. Yoshida, M., Kinosita, K. Jr. (1997). "Direct observation of the rotation of F1-ATPase." Nature **386**: 299-302.
- Novotny, L. (1997). "Allowed and forbidden light in near-field optics. I. A single dipolar light source." Journal of the Optical Society of America A **14**: 91-104.
- O'Connor, D. V., Phillips, D. (1984). "Time-correlated Single Photon Counting." New York, Academic Press.
- Patra, D., Gregor, I., Enderlein, J. (2004). "Image analysis of defocused single-molecule images for three-dimensional molecule orientation studies." Journal of Physical Chemistry A **108**(33): 6836-41.
- Prummer, M., Hübner, C. G., Sick, B., Hecht, B., Renn, A., Wild, U. P. (2000). "Single-molecule identification by spectrally and time resolved fluorescence detection." Analytical Chemistry **72**(3): 443.
- Rigler, R. (1995). "Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening - Applications in biotechnology." Journal of Biotechnology **41**: 177.
- Rigler, R., Mets, Ü., Widengren, J., Kask, P. (1993). "Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion." European Biophysics Journal **22**: 169-175.
- Rigler, R., Widengren, J. (1990). "Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy." hg. von Klinge, B., Owman, C., BioScience. Lund University Press: 180-183.

- Rondelez, Y., Tresset, G., Nakashima, T., Kato-Yamada, Y., Fujita, H., Takeuchi, S., Noji, H. (2005). "Highly coupled ATP synthesis by F₁-ATPase single molecules." Nature **433**: 773-777.
- Rothwell, P. J., Berger, S., Kensch, O., Felekyan, S., Antonik, M., Restle, T., Wöhrl, B., Goody, R., Seidel, C. A. M., (2003). "Multi-parameter Single-molecule Fluorescence Spectroscopy reveals Heterogeneity of HIV-1 Reverse Transcriptase:primer/template Complexes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 1655-1660.
- Ruckstuhl, T., Enderlein, J., Jung, S., Seeger, S. (2000). "Forbidden Light Detection from Single Molecules." Analytical Chemistry **72**(9): 2117-2123.
- Sachs, L. (2003). "Angewandte Statistik.", 11. Auflage, Berlin, Springer-Verlag.
- Sandhagen, C. (2005). C⁺⁺-basiertes Computerprogramm "gi-scan2."
- Sauer, M., Han, K. T., Müller, R., Schulz, A., Tadday, R., Seeger, S., Wolfrum, J., Arden-Jacob, J., Deltau, G., Marx, N. J., Drexhage, K. H. (1993). "New fluorescent labels for time-resolved detection of biomolecules." Journal of Fluorescence **3**: 131.
- Schaffer, J. (2000). "Charakterisierung von Einzelmolekülen durch selektive Fluoreszenzspektroskopie." Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.
- Schmidt, T., G. J. Schütz, Baumgartner, W., Gruber, H. J., Schindler, H. (1996). "Imaging of single molecule diffusion." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 2926-2929.
- Schroeyers, W., Vallee, R., Patra, D., Hofkens, J., Habuchi, S., Vosch, T., Cotlet, M., Müllen, M., Enderlein, J., De Schryver F. C. (2004). "Fluorescence Lifetimes and Emission Patterns Probe the 3D Orientation of the Emitting Chromophore in a Multichromophoric System." Journal of the American Chemical Society **126**: 14310-14311.
- Schuette, C. G., Hatsuzawa, K., Margittai, M., Stein, A., Riedel, D., Küster, P., König, M., Seidel, C. A. M., Jahn, R. (2004). "Determinants of liposome fusion mediated by synaptic SNARE proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**: 2858.
- Schweinberger, E. (2002). "Multidimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spektroskopie von fluoreszenzmarkierten Biomolekülen." Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.
- Schwille, P., Meyer-Almes, F. J., Rigler, R. (1997). "Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution." Biophysical Journal **72**(4): 1878.
- Selvin, P. R. (1995). "Fluorescence Resonance Energy Transfer." Methods in Enzymology **246**: 301.
- Senior, A. E., Nadanaciva, S., Weber, J. (2002). "The molecular mechanism of ATP synthesis by F₁F₀-ATP synthase." Biochimica et Biophysica Acta **1553**: 188-211.
- Shimabukuro, K., Yasuda, R., Muneyuki, E., Hara, K. Y., Kinosita, K. Jr., Yoshida, M. (2003). "Catalysis and rotation of F₁ motor: cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40 degree substep rotation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 14731-14736.
- Steinberg, I. Z. (1971). "Long-range Nonradiative Transfer of Electronic Excitation Energy in Proteins and Polypeptides." Annual Review of Biochemistry **40**: 83-114.

- Stryer, L., Haugland, R. P. (1967). "Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **58**: 719-726.
- Szmecinski, H., Lakowicz, J.R., Johnson, M.L. (1994). "Fluorescence lifetime imaging microscopy: homodyne technique using high-speed gated image intensifier." Methods in Enzymology **240**: 723-748.
- Tamm, L. K., Crane, J., Kiessling, V. (2003). "Membrane fusion: a structural perspective on the interplay of lipids and proteins." Current Opinion in Structural Biology **13**: 453-466.
- Thompson, N. L. and J. R. Lakowicz (1991). "Topics in Fluorescence Spectroscopy: Fluorescence Correlation Spectroscopy." New York, Plenum Press: 337.
- Tielker, D. (2005). "Physiologie und Biotechnologie des Lectins B aus *Pseudomonas aeruginosa*." Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation." Microbiology **151**: 1313-1323.
- Turro, N. J. (1991). "Modern Molecular Photochemistry." Mill Valley, CA, University Science Books.
- Van der Meer, B. W., Cooker, G., Chen, S.-Y. (1994). "Resonance Energy Transfer: Theory and Data." New York, VCH Publishers.
- Vik, S. B., Antonio, B. J. (1994). "A mechanism of proton translocation by F₀F₁ ATP synthase suggested by double mutants of the a subunit." Journal of Biological Chemistry **269**: 30364-30369.
- Wahl, P. (1979). "Analysis of fluorescence anisotropy by a least square method." Biophysical Chemistry **10**: 91.
- Watson, J. D., Crick, F. H. C. (1953). "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." Nature **171**: 737.
- Weiss, S. (2000). "Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy." Nature Structural Biology **7**(9): 724.
- Weston, K. D., Dyck, M., Tinnfeld, P., Muller, C., Herten, D. P., Sauer, M. (2002). "Measuring the number of independent emitters in single-molecule fluorescence images and trajectories using coincident photons." Analytical Chemistry **74**(20): 5342-5349.
- Widengren, J. (1996). "Fluorescence Correlation Spectroscopy, Photophysical Aspects and Applications." Dissertation. Karolinska Institutet, Stockholm.
- Widengren, J., Rigler, R. (1996). "Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy." Bioimaging **4**: 149.
- Wild, U. P., Holzwarth, A. R., Good, H. P. (1977). "Measurement and analysis of fluorescence decay curves." Review of Scientific Instruments **48**(12): 1621-1627.
- Wilkins, S., Zhou, J., Nakayama, R., Dunn, S. D., Capaldi, R. A. (2000). "Localization of the δ subunit in the Escherichia coli F1F0-ATP synthase by immuno electron microscopy: The δ subunit binds on top of the F1." J. Mol. Biol. **295**: 387-391.
- Wu, M., Goodwin, P. M., Ambrose, W. P., Keller, R. A. (1996). "Photochemistry and fluorescence emission dynamics of single molecules in solution - B-phycoerythrin." Journal of Physical Chemistry **100**(43): 17406-17409.

- Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K., Itho, H. (2001). "Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase." Nature **410**: 898-904.
- Yersin, A., Hirling, H., Steiner, P., Magnin, S., Regazzi, R., Hüni, B., Huguenot, P., De Los Rios, P., Dietler, G., Catsicas, S., Kasas, S. (2003). "Interactions between synaptic vesicle fusion proteins explored by atomic force microscopy." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(15): 8736-8741.
- Zammatteo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L., Remacle, J. (2000). "Comparison between Different Strategies of Covalent Attachment of DNA to Glass Surfaces to Build DNA Microarrays." Analytical Biochemistry **280**: 143-150.
- Zander, C., Sauer, M., Drexhage, K. H., Ko, D.-S., Schulz, A., Wolfrum, J., Brand, L., Eggeling, C., Seidel, C. A. M. (1996). "Detection and characterization of single molecules in aqueous solution." Applied Physics B **63**(5): 517-523.
- Zhou, Y., Duncan, T. M., Cross, R.L. (1997). "Subunit rotation in Escherichia coli F₀F₁-ATP synthase during oxidative phosphorylation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 10583-10587.
- Zimmermann, B., Diez, M., Zarrabi, N., Gräber, P., Börsch, M. (2005). "Movements of the ε-subunit during catalysis and activation in single membrane-bound H⁺-ATP synthase." EMBO Journal **26**: 1-11.