

Inaugural Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplomchemiker Alexander Kiel
aus Höchst i. Odw.

Tag der mündlichen Prüfung:
27.06.2008

**Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie zur
Untersuchung von Metallkomplex-Reaktionen im
thermodynamischen Gleichgewicht**

Gutachter:

Prof. Dr. Jürgen Wolfrum

Prof. Dr. Roland Krämer

Meinen Freunden, meiner Familie

und besonders meinen Eltern

Gudrun Kiel – sie wäre sicher froh, könnte sie das noch miterleben

und

Helmut Kiel

Publikationen:

Mokhir, A., Kiel, A., Herten, D. P., et al., "Fluorescent sensor for Cu(II) with a tunable emission wavelength", *Inorganic Chemistry*. **2005**, 44, 5661-5666.

Kiel, A., Kovacs, J., Mokhir, A., et al., "Direct monitoring of formation and dissociation of individual metal complexes by single-molecule fluorescence spectroscopy", *Angewandte Chemie-International Edition*. **2007**, 46, 3363-3366.

Kiel, A., Jaerve, A., Kovacs, J., et al., "Single-molecule studies on individual metal complexes", *Proc. SPIE* **2007a**, 6444.

D'Souza, D. M., Kiel, A., Herten, D. P., et al., "Synthesis, structure and emission properties of spirocyclic benzofuranones and dihydroindolones: A domino insertion-coupling-isomerization-Diels-Alder approach to rigid fluorophores", *Chemistry-a European Journal*. **2008**, 14, 529-547.

Kumbhakar, M., Kiel, A., Bhasikuttan, A. C., et al., "Coupling single pair fluorescence resonance energy transfer with single pair electron transfer in a DNA: Towards designing improved spectroscopic ruler", *in preparation*.

Jäger, M. C., Kiel, A., Herten, D. P., et al., "Analysis of Single Molecule Fluorescence Spectroscopic Data with a Markov Modulated Poisson Process", *in preparation*.

Posterpräsentationen:

„Direct observation of formation and dissociation of single copper(II)-complexes by single-molecule fluorescence spectroscopy“, *IX. Annual Linz Winter Workshop*, Linz **2007**

„Direct observation of formation and dissociation of single bipyridine copper(II)-complexes by single-molecule fluorescence spectroscopy“, *Heidelberg Forum of Molecular Catalysis (HFMC)*, Heidelberg **2007**

„Investigation of Reaction Dynamics of Copper(II) Complexes with Single Molecule Spectroscopy“, *11th International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences*, Berlin(PicoQuant) **2005**

Vorträge:

„Ultrasensitive and Single-Molecule Detection Technologies II“, Single molecule studies on individual metal complexes, *Spie Photonics West Bios*, San Jose **2007**

Single-molecule studies on copper(II)bipyridin complexes

13th *International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences*, Berlin(PicoQuant) **2007**

Verwendete Abkürzungen:

[x]	Konzentration oder Einheit
Φ	Quantenausbeute
bipy / bpy	2,2'Bipyridin
BSA	Bovine Serum Albumin (Fetales Rinderalbumin)
dcbpy	4,4'Dicarboxy-2,2'bipyridin
EOM	Elektro-Optischer Modulator
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy (Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie)
(F)RET	(Fluoreszenz-)Resonanz-Energie-Transfer
HMM	Hidden-Markov Model (verstecktes Markov Modell)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MMPP	Markov Modulated Poisson Process (Markov- modulierter Poisson-Prozess)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PEG	Polyethylenglycol
(P)ET	photoinduzierter Elektronen-Transfer
Phen	Phenanthrolin
SFLIM	Spectral Resolved Fluorescence Lifetime Imaging (Spektralaufgelöste Fluoreszenzlebensdauer Bildgebung)
SMFS	Singe Molecule Fluorecence Spectroscopy (Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie)
TCSPC	Time Correlated Single Photon Counting (Zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung)

Zusammenfassung

Die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie wurde in den letzten Jahren erfolgreich zur Untersuchung biologischer Fragestellungen eingesetzt. Dynamische Wechselwirkungen kleiner Biomoleküle, wie z.B. DNS, RNS, Proteine oder enzymkatalytischer Reaktionen, konnten beobachtet werden. Aufbauend auf diesen Verfahren konnte in dieser Arbeit die Grundlage zur Untersuchung heterogener oder homogener katalytischer Reaktionen einfacherer organischer oder anorganischer Systeme geschaffen werden. Dazu wurde eine Fluoreszenzsonde entwickelt, deren Fluoreszenz durch Cu(II)-Ionen gelöscht wird. Die Sonde besteht aus einem DNS-Doppelstrang, welcher als starres Gerüst dient, und endständig mit einem Cu(II)-spezifischen Liganden 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin (dcbpy) sowie einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Um einen geeigneten Fluoreszenzmarker zu finden, wurde eine Reihe Farbstoffe bezüglich ihrer Fluoreszenzlöschung durch Cu(II) charakterisiert. Als besonders geeignet wurden die Farbstoffe Tetramethylrhodamin (TMR), Atto620, MR121 und Atto635 ausgewählt und die Sonde damit markiert, eine bis zu 92-prozentige Fluoreszenzlöschung nach Bindung von Cu(II) am Liganden konnte beobachtet werden. Zur Untersuchung, ob die Ligand-Modifikation ursächlich für die verstärkte Löschung durch Cu(II) ist, wurden Kontrollmessungen mit einer Sonde ohne dcbpy-Modifikation durchgeführt. Mit Ausnahme der Atto635-markierten Sonde konnte bei allen Sonden eine verstärkte Löschung durch den dcbpy-Liganden beobachtet werden. Die beste Unterscheidbarkeit zwischen Ligand-markierter- und Kontrollsonde ergaben die Farbstoffe Atto620 und TMR. Zur quantitativen Bestimmung der Komplexe-gleichgewichtskonstante aus der Fluoreszenzlöschung wurde die Stern-Volmer Theorie auf die hier entwickelten Sonden angepasst, so dass eine Restfluoreszenz im gelöschten Zustand berücksichtigt werden konnte, und der experimentelle Kurvenverlauf erklärt werden konnte. Die Anpassung der Modellparameter erlaubt die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung K , sowie der relativen Quantenausbeute des gelöschten Zustands Φ_{Aus} . Für die mit Atto620 markierte Sonde wurde K zu $5,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und Φ_{Aus} zu 35 % bestimmt, für die mit TMR markierte Sonde ergab sich K zu $8,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ mit $\Phi_{\text{Aus}} = 8 \%$.

Die Spezifität der Sonden wurde mit Löschemperimente in Gegenwart von Mn(II), Fe(II), Ni(II), und Co(II) an der TMR-markierten Sonde untersucht und mit dem modifizierten Stern-Volmer Modell ausgewertet. Mit Ausnahme von Ni(II), das eine relative

Quantenausbeute im gelöschten Zustand Φ_{Aus} von 22 % zeigte, stören diese Ionen mit Φ_{Aus} von > 55 % die Messung von Cu(II) kaum.

Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie wurde die Fluoreszenzlöschung durch Komplexbildung der TMR- und der Atto620-markierten Sonde mit Cu(II) untersucht. Dazu wurde die Sonde auf einer Glasoberfläche immobilisiert und die Fluoreszenz einzelner Sonden nacheinander mit einem konfokalen Mikroskop aufgezeichnet. Dies ermöglichte erstmals die direkte Beobachtung aufeinander folgender Assoziations- und Dissoziationsereignisse. Die Ereignisse sind als Sprünge zwischen zwei Fluoreszenzintensitätsstufen erkennbar, d.h. die Sonde wechselte durch Bindung von Kupfer(II) von einem stark fluoreszierenden An-Zustand in einen schwach fluoreszierenden Aus-Zustand. Dieses Verhalten wurde sowohl bei der TMR-Sonde als auch der Atto620-Sonde beobachtet, wobei sich die Fluoreszenzrate bei der TMR-Sonde um ~90 % verringerte und bei der Atto620-Sonde um ~66 %, in sehr guter Übereinstimmung mit den Ensemble-Messungen. Zur quantitativen Bestimmung der Assoziations- bzw. Dissoziationsraten wurde die Dauer dieser einzelnen Zustände mit Hilfe der Schwellwertanalyse ermittelt und schließlich aus der Häufigkeitsverteilung die Reaktionsraten bestimmt. Zur Verbesserung der Zeitauflösung wurden weitere Analysemethoden angewendet: die Autokorrelation des Fluoreszenzsignals sowie ein computergestützter Algorithmus auf Basis eines „Hidden Markov“ Modells (HMM). Beide Methoden zeigten eine weitere schnellere Kinetik mit An- und Aus-Zeiten von wenigen Millisekunden die in unregelmäßigen Abständen auftrat. Mit der auf HMM-basierten Methode konnten unter Vorgabe eines Drei-Zustandsmodells die kinetischen Parameter der Komplexbildung sowie die der schnellen Fluktuationen bestimmt werden. Die Aufklärung der Ursache dieser schnellen Fluktuationen sind Bestandteil weiterer Experimente.

In dieser Arbeit wurden zwei Hauptgebiete realisiert: die Entwicklung einer Fluoreszenzsonde zur Untersuchung einfacher chemischer Reaktionen an einzelnen Molekülen, was der Ausgangspunkt für die Untersuchung komplexerer Systeme, wie z.B. Metallkomplex-katalysierte Reaktionen, darstellt. Mit der Entwicklung und Automatisierung von Methoden zur Auswertung zeitlich fluktuierender Fluoreszenzintensitäten wurde die Grundlage zur Bestimmung von Kinetiken mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie gelegt. Dies ermöglichte die Bestimmung der Reaktionskinetik der Komplexbildung von Cu(II) mit einem Bipyridinderivat im thermodynamischen Gleichgewicht.

Summary

In recent years single molecule fluorescence spectroscopy (SMFS) has been successfully applied in biology, to study dynamic interactions of small biomolecules like e.g. DNA, RNA, proteins or even enzymatic reactions. This work represents an extension of single molecule methods to study simple chemical reactions, and finally heterogeneous or homogeneous catalytic reactions used for organic or inorganic synthesis. In a first step, a fluorescent probe whose fluorescence was quenched upon binding of copper(II) to a ligand molecule, was developed. The probe consists of a double stranded DNA as a rigid scaffold and was labeled terminally with a copper(II) specific ligand, 4,4'-dicarboxy-2,2'-bipyridine (dcbpy), and a fluorescent dye. In order to find an appropriate dye, several were characterized with respect to their fluorescence quenching upon addition of copper(II). Tetramethylrhodamine (TMR), Atto620, Atto635 and MR121 were selected as their fluorescence quantum yield was decreased in the presence of copper, compared to the corresponding pure dyes. Control measurements were performed with a probe lacking the dcbpy-ligand. It turned out, that quenching was increased for all dyes next to the Cu(II)-binding dcbpy ligand, except of Atto635. The best differentiation with respect to the control measurements was found for Atto620 and TMR. To quantitatively determine the complex equilibrium constant K from fluorescence quenching data, the Stern-Volmer model was modified in order to account for the fact that the quenched state still exhibits residual fluorescence and thus a lower quantum yield. Fitting of the data using the modified Stern-Volmer model revealed the relative quantum yield of the quenched state Φ_{AUS} and the complex equilibrium constant K . For the probe containing Atto620, K was determined to $5,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ and Φ_{AUS} to 35 %, and for the TMR-labeled probe, $K = 8,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ and $\Phi_{\text{AUS}} = 8 \%$.

To study the specificity of the probes, quenching experiments in the presence of other divalent metal ions were performed, i.e. Mn(II), Fe(II), Ni(II), and Co(II), and analyzed with the modified Stern-Volmer model. With Ni (II) representing an exception with $\Phi_{\text{AUS}} = 22 \%$ and $\log K = 6,5$, the other metal ions showed only low fluorescence quenching and low affinity to form a complex, such that the determination of Cu(II) is not affected.

In further experiments, fluorescence quenching of the probe by Cu(II) was studied with SMFS, which allows to determine reaction rates for single complexes. The probes were immobilized on a glass surface, and their fluorescence was recorded with a confocal

Summary

microscope individually one after another. For the first time, individual consecutive association and dissociation events of the coordination of copper(II) to dcbpy were observed in real-time. The events were distinguished by repeated fluctuations of fluorescence intensity between two levels, indicating the formation of the complex with lower quantum yield and subsequent dissociation to the unquenched probe with higher quantum yield. Both the probes labeled with TMR and with Atto620 showed fluorescence quenching upon binding of Cu(II), with fluorescence diminished by $\sim 90\%$ and $\sim 66\%$, respectively. These results agree very well with ensemble spectroscopy.

The kinetic rates of association and dissociation were determined by applying a fluorescence count rate threshold and sorting the durations in the low or accordingly high fluorescent state into a histogram and fitting the data to an exponential model. As the time resolution of this analysis method is limited to the integration time necessary to discriminate between the observed intensity levels, further methods were applied: fluorescence intensity autocorrelation and an automated algorithm based on a Hidden Markov Model (HMM). Both methods revealed an additional kinetic with on- and off-states of few milliseconds that occurred irregularly. With the assumption of a three-state model, the HMM-based method was able to determine the kinetic parameters for the fluctuations corresponding to the association and dissociation events as well as the fluctuations on the faster time scale. Yet, the origin of the fast fluctuation remains left for future studies.

In this work two main projects have been realized: First, the development of a fluorescent probe to study simple chemical reactions as a basis for future research of more complex systems, e.g. metal-complex catalyzed reactions. Second, the development and automatization of analytical methods for fluorescence fluctuations, allowing the determination of kinetic rates with SMFS. In the present work, the developed methods were applied in studies of the kinetics of complex formation and dissociation between Cu(II) and a bipyridine derivative in thermodynamic equilibrium.

1. EINLEITUNG	1
1.1. Fluoreszenzsonden	3
1.1.1. Sondenentwicklung zur Detektion von Metall(II)-Ionen aus vorangegangenen Arbeiten	6
1.2. Entwicklung einer Sonde zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen Cu(II) und Bipyridin	7
1.2.1. Lösungsansatz zum Sondenkonstrukt	8
1.2.2. Sondendesign zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen Bipyridin und Kupfer(II)	10
2. THEORIE	12
2.1. Lichtabsorption und -emission der Farbstoffe	12
2.1.1. Absorptionsprozesse	12
2.1.2. Emissionsprozesse	14
2.2. Fluoreszenzlebensdauer, Quantenausbeute, Photostabilität	16
2.3. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer zwischen Molekülen (FRET)	19
2.4. Fluoreszenzlöschung	23
2.4.1. Dynamische Löschung	24
2.4.2. Statische Löschung	28
2.4.3. Löschung durch photoinduzierten Elektronentransfer	31
2.5. Oligonukleotide – Aufbau und Eigenschaften	34
2.5.1. Nukleinsäuren	34
2.5.2. Denaturierung, Renaturierung und Hybridisierung	38
3. MATERIAL UND METHODEN	41
3.1. Material und Chemikalien	41
3.2. Sonde zur Kupfer(II)-detektion	42
3.3. Immobilisierung Biotin- markierter Sonden auf Glasoberflächen	43
3.4. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	44
3.5. Fluoreszenz- und Absorptionsspektrometer	45
3.5.1. Löschexperimente mit Kupfer(II) via Fluoreszenzintensität	45
3.5.2. Löschexperimente via Quantenausbeute	46
3.6. Aufbau der Einzelmolekülspektroskopieanlage	47
3.6.1. Methoden zur Analyse zeitlicher Fluktuationen der Fluoreszenz von Einzelmolekülfarbstoffen	50
4. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	56
4.1. Ermitteln der Gleichgewichtskonstante aus Stern-Volmer Graphen	56
4.1.1. Anpassen der Stern Volmer Theorie unter Berücksichtigung eines schwach fluoreszierenden gelöschten Zustands	58
4.2. Struktur der Fluoreszenzsonde	62
4.3. Untersuchung einer Auswahl von Fluoreszenzfarbstoffen für die Kupfer(II)-detektion	63
4.4. Charakterisierung der Farbstoff- markierten Sonden	67
4.4.1. Löschung der Fluoreszenz der Sonde durch Kupfer(II)	67

4.4.2. Untersuchung der Absorption der Sonde	70
4.4.3. Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer der Sonde	71
4.4.4. Untersuchung der Spezifität der Sonde auf Kupfer(II) im Vergleich zu Mn(II) bis Ni(II)	74
4.4.5. Zusammenfassung der Ensemble- Ergebnisse	76
4.5. Einzelmolekülspektroskopie mit der TMR-markierten Sonde	77
4.5.1. Immobilisierung der Probe und Untersuchung der Mobilität	78
4.5.1.1. Untersuchung der Beweglichkeit immobilisierter Sonden	79
4.5.2. Einzelmoleküluntersuchungen der TMR-dcbpy-Sonden	82
4.5.3. Untersuchung der Löschung einzelner Sonden durch Kupfer(II)	83
4.5.4. Auswertung der Einzelmolekülergebnisse mittels Schwellwertmethode	85
4.5.5. Auswertung der Daten mittels Intensitätsautokorrelation	91
4.5.6. Auswertung der Daten mit Hilfe des Hidden-Markov Modells	95
4.5.7. Unterschiede in der Kinetik einzelner Moleküle	100
4.6. Einzelmolekülspektroskopie der Atto620-markierten Sonden	103
4.6.1. Ergebnisse der Einzelmolekülmessung	103
4.6.2. Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer mittels SFLIM	106
4.7. Zusammenfassung der Ergebnisse mit der Einzelmolekülmikroskopie	107
5. DISKUSSION UND AUSBLICK	109
5.1. Entwicklung einer Fluoreszenzsonde zum Nachweis von Kupfer(II)ionen basierend auf der Fluoreszenzlöschung	109
5.1.1. Untersuchung der Fluoreszenzlöschung der Sonde	110
5.1.2. Untersuchung der Spezifität gegenüber anderen Metall(II)ionen	112
5.2. Modell zur Beschreibung der Fluoreszenzlöschung der Sonde durch Kupfer(II)	113
5.3. Mechanismus der Fluoreszenzlöschung	116
5.4. Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung im Einzelmolekülexperiment	120
5.4.1. Ansätze zur Untersuchung der schnelleren Kinetik	122
5.5. Ausblick auf katalytische Reaktionen an Metalldotierten Oberflächen	124
5.6. Weiterentwicklung des Sondendesigns	125
5.7. Weiterentwicklung der Sonde zur Untersuchung chemischer Systeme	126
6. ANHANG	129
6.1. Auswertung der Lebensdauermessungen	129
6.2. Aufnahmen von Oberflächen mit Atto620 markierter Sonde	130
6.3. Aufnahmen von Oberflächen mit TMR-markierter Sonde	132
6.4. Aufnahmen der zeitabhängigen Fluoreszenz einzelner Sonden bei unterschiedlichen Konzentrationen an Cu²⁺	135
6.5. Messung des Redoxpotentials von Atto620	140
7. LITERATUR	141

1. Einleitung

In Natur und Technik sind katalytische Reaktionen zur Synthese wichtiger chemischer Rohstoffe, aber auch komplexerer Substanzen, sehr weit verbreitet. Bei Reaktionen in homogener Umgebung werden häufig Metallkomplexe als Katalysatoren verwendet, um höhere Selektivität und Stoffumsatz zu erreichen. Wenn man den Mechanismus des katalytischen Prozesses kennt, bzw. die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge versteht, ermöglicht dies eine gezielte Weiterentwicklung der molekularen Struktur des Katalysators. Um die molekulare Wirkungsweise eines Katalysators zu verstehen, sind Informationen zu Zwischenstufen, sowie die grundlegende Kinetik der Reaktion hilfreich. Anhand der Kinetik der ablaufenden Reaktionen also der Geschwindigkeit mit der Substrat bzw. Produkt verarbeitet oder aufgebaut werden, können Rückschlüsse auf den molekularen Ablauf gezogen, molekulare Modelle bestätigt oder auch widerlegt werden. Um eine Reaktion verfolgen zu können, wird die Akkumulation des Produkts anhand stoffspezifischer, physikalischer Eigenschaften verfolgt. Am besten eignen sich Messmethoden, die ohne Probenentnahme auskommen und damit eine einfache und schnelle Verfolgung der Kinetik ermöglichen. Dies gilt für die meisten optischen Methoden wie die Fluoreszenz-, UV/VIS- und NMR-Spektroskopie. Aus den erhaltenen Daten können Rückschlüsse auf molekulare Abläufe und deren Kinetik gezogen werden. Aufgrund des geringen messtechnischen Aufwands sowie hoher Sensitivität ist hier die UV/VIS-Absorptionsspektroskopie eine sehr beliebte Methode.

Reaktionen im Gleichgewicht kann man nicht direkt untersuchen. Entweder muss die Reaktion nach Mischen der Komponenten bis zur Gleichgewichteinstellung beobachtet werden oder ein System wird durch schnelle Energiezufuhr (z.B. Druck oder Temperatur) aus dem Gleichgewicht gebracht, so dass man dann wiederum die Einstellung des Gleichgewichts beobachten kann. Für sehr schnell verlaufende Reaktionen wurden spezielle Methoden wie die „*Stopped Flow*“-Methode, die Temperatursprungmethode oder die Drucksprungmethode entwickelt. Bei der „*Stopped Flow*“-Methode werden die Reaktanden bei gleichzeitiger Zugabe in die Reaktionskammer sehr schnell vermischt, so dass die Reaktion aus einem homogenen Gemisch abläuft und dann der Reaktionsverlauf durch geeignete spektroskopische Methoden verfolgt werden kann. Langsamere Reaktionen benötigen keine spezielle Versuchsanordnung, da die inhomogene Verteilung der Edukte nach Vermischen durch Diffusion schnell genug ausgeglichen wird. Für Gleichgewichtsreaktionen sind Relaxationsmethoden wie die Temperatur- oder

Drucksprungmethode geeignet. Eine äquilibrierte Reaktion wird durch elektrische Entladung oder hochenergetische Laserstrahlung sprunghaft erhitzt und dadurch aus dem Gleichgewicht gebracht. Daraufhin kann man die Relaxation verfolgen. Ein Problem der beschriebenen spektroskopischen Methoden besteht darin, dass die molekularen Veränderungen am Ensemble vieler Moleküle untersucht werden und damit ein gemittelter Wert gemessen wird. Deshalb ist eine Synchronisation des Reaktionsbeginns wichtig, damit diese Heterogenität vermieden wird. Wenn jedoch unterschiedliche Reaktionswege möglich sind, wird eine Ensemblemessung meist einen gemittelten Messwert ergeben und diese Unterschiede nicht auflösen können. Im Gegensatz zu den Ensemblemethoden können mit der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie auch Reaktionen direkt im Gleichgewicht beobachtet werden. Eine Auslenkung aus dem Gleichgewichtszustand ist nicht mehr nötig, da die aufeinander folgenden Hin- und Rückreaktion am Einzelmolekül erkennbar werden. Bei der konfokalen Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie wird ein Laserstrahl durch ein Mikroskopobjektiv auf ein kleines, beugungsbegrenztes Volumen fokussiert und die dort befindlichen Moleküle zur Fluoreszenz angeregt. Durch dasselbe Objektiv wird dieses Signal gesammelt, vom Anregungsstrahl getrennt und aufgezeichnet. Das Detektionsvolumen ist dabei so klein (10^{-15} L), dass bei entsprechender Verdünnung der Probe einzelne Moleküle im Fokus vorliegen. Aufgrund des geringen Hintergrundsignals wurde eine so hohe Sensitivität erreicht, dass einzelne Moleküle detektiert werden können, was der Methode den Namen Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie (SMFS) gab [Weiss 1999], [Sauer 1997], [Moerner 2003], [Jung 2002], [Nie 1994], [Yanagida 2003].

Durch Verbindung der Fluoreszenzmikroskopie mit bildgebenden Verfahren wurde diese Technik zur Untersuchung von Oberflächen weiterentwickelt. Eine Fläche wird beispielsweise mit einem Piezo- gesteuerten Verschiebetisch mittels Zeilenrasterverfahren abgebildet. Durch eine Weitfeldanregung ist es möglich, eine größere Fläche mit dem Laser zu bestrahlen und die Emission über eine hoche sensitive Kamera aufzunehmen.

Da diese Technik auf Fluoreszenz basiert, müssen besondere Reaktanden ausgewählt werden, die den Ablauf der Reaktion durch Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften anzeigen. Die meisten Moleküle zeigen jedoch keine oder nicht ausreichende Fluoreszenz, so dass spezielle Sonden entwickelt werden müssen, die diese Voraussetzungen erfüllen.

Die Kinetik enzymatischer Reaktionen wurde bereits früh mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie untersucht [Velonia 2005]; [Sunney 2001]. Auch bei Studien über die Dynamik von Polymeren wurde diese Technik bereits angewendet [VandenBout 1997]. Erst kürzlich kam diese Methode zur Untersuchung katalytischer Prozesse an rein chemischen Systemen mit der mit der Untersuchung der heterogenkatalytischen Hydrolyse eines Fluoresceinesters an den Oberflächen eines LDH Kristalls (Li^+ , Al^{3+} , Hydroxid) zum Einsatz [Roeffaers 2006].

Mit dem Ziel, auch homogene katalytische Reaktionen der SMFS zugänglich zu machen, sollten erste Grundlagen zur Untersuchung von Metallkomplex- katalysierten Reaktionen mit der Einzelmolekülspektroskopie erarbeitet werden. Ein erster Schritt bestand darin, Sonden zu entwickeln, die die Untersuchung der Komplexbildung zwischen einem Metallion und einem geeigneten Liganden mit Hilfe der SMS ermöglichen.

1.1. Fluoreszenzsonden

Aufgrund der geringen Auflösung optischer Mikroskope kann die Verfolgung von Interaktionen zwischen Molekülen nicht visuell erfolgen, sondern muss mit sich ändernden physikalischen Eigenschaften der Moleküle gekoppelt werden. Distanzen zwischen Molekülen oder Unterstrukturen sowie direkte Wechselwirkungen zwischen Molekülen können anhand der Änderung der Fluoreszenzeigenschaften gemessen werden. Diese Änderungen können die Wellenlänge der Fluoreszenz, die molekulare Helligkeit oder die Fluoreszenzlebensdauer betreffen. Da nicht alle Moleküle die Fluoreszenzeigenschaft des Farbstoffs beeinflussen, ist es nötig geeignete Farbstoffe zu finden, dessen Fluoreszenzeigenschaften durch das Zielmolekül beeinflusst werden, oder das Zielmolekül ebenfalls mit einem Marker zu versehen. Häufig wird der Resonanz-Energietransfer (RET) zwischen dem Farbstoff und einem geeigneten Akzeptormolekül genutzt, der über weite Distanzen von bis zu 10 nm wirken kann. Dabei wird der Fluorophor angeregt, der die so aufgenommene Energie an den Akzeptor überträgt. Wird als Akzeptor ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, kann dieser über Energietransfer angeregt werden und man spricht von Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET). Eine weitere Möglichkeit bietet die Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer (PET). Dabei wird die Fluoreszenz des Fluorophors durch Übertragung

eines Elektrons auf ein geeignetes Molekül gelöscht. Dieses Molekül spielt dabei je nach Lage des Redoxpotentials die Rolle eines Elektronenakzeptors oder Elektronendonors.

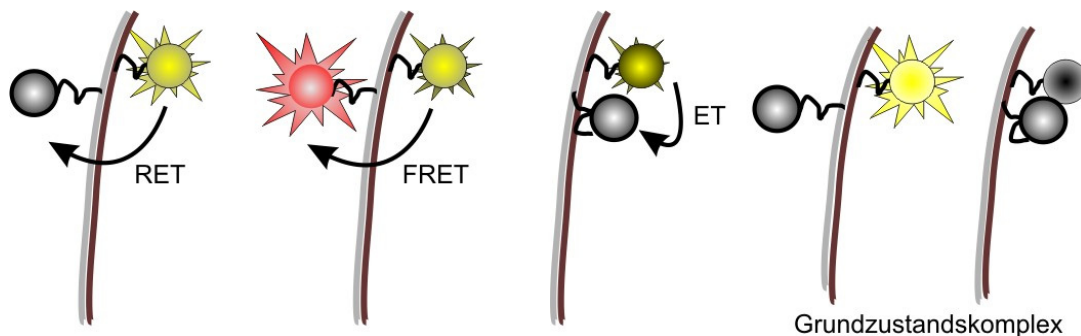


Abbildung 1.1-1. Löschung der Fluoreszenz durch RET, FRET oder ET. Bei RET und FRET wird die Fluoreszenz des Donors gelöscht und die Energie auf den Akzeptor übertragen. Ist der Akzeptor ein Fluoreszenzfarbstoff, so kann er über FRET zur Fluoreszenz angeregt werden. Im Fall von ET wird der Fluoreszenzfarbstoff stark gelöscht.

Elektronentransfer erfolgt nur über sehr kleine Distanzen von maximal 1-2 nm. Die Fluoreszenzlöschung via RET/FRET oder PET kann, im Design spezieller Sonden integriert, zur Beobachtung molekularer Prozesse ausgenutzt werden (Abbildung 1.1-1). Viele Sonden bestehen aus einem Farbstoff gekoppelt an einen Rezeptor, so dass bei Bindung eines Gastmoleküls die Fluoreszenzeigenschaften beeinflusst werden.

Viele Substrukturen wie Guanosin in Oligonukleotiden oder Tryptophan in Proteinen aber auch einfache Metallionen sind potentielle PET- Partner. Solche Metallion-spezifische Sonden bestehen zumeist aus einem Fluorophor, der kovalent mit einem für ein bestimmtes Metallion spezifischen Ligand verbunden wird. Bindet ein Metallion an den Farbstoff markierten Liganden, so wird bei den meisten Sonden die Fluoreszenz stark gelöscht [Bissell 1992]; [de Silva 2000]. Ein solcher Vertreter ist das Calcein. Es gibt aber auch viele Beispiele, die bei Zugabe bestimmter Metallsalze einen Fluoreszenzanstieg verzeichnen (z.B. CalciumGreen, FuraZin oder NewportGreen). Diese Farbstoffe werden nicht durch ET gelöscht, sondern zeigen eine starke Veränderung in der Absorption, wie die Anregungsspektren von FuraZin in Abbildung 1.1-2 zeigen. Viele solcher Sonden sind kommerziell erhältlich.

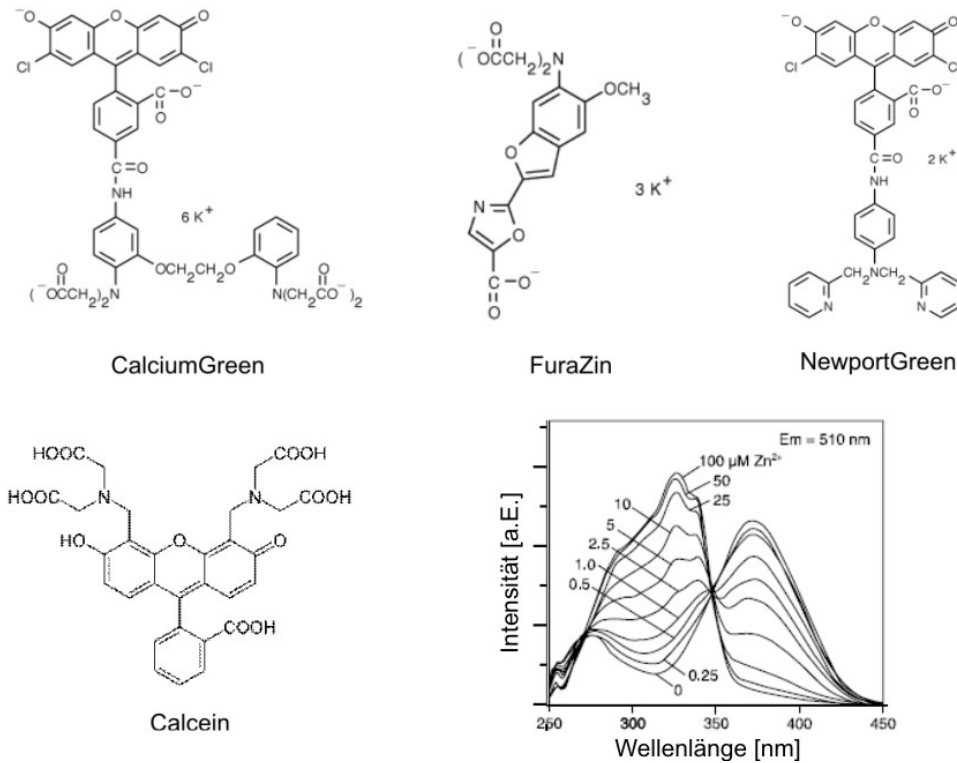


Abbildung 1.1-2. Strukturen einiger Fluoreszenzmetallsonden. Calcein und CalciumGreen erlauben die Detektion von Kalzium. FuraZin ist eine Zinn- spezifische Sonde. NewportGreen ist ebenfalls eine Zinn- Sonde, jedoch wird die Fluoreszenz durch Magnesium oder Calcium weitaus weniger beeinflusst als bei FuraZin. [Invitrogen 2005]

Die meisten der hier vorgestellten Metallsonden sind jedoch für die Einzelmolekülspektroskopie nicht geeignet, da sie entweder zu niedrige Extinktionskoeffizienten oder eine zu niedrige Photostabilität aufweisen. Ebenso wird bei Anregungswellenlängen im UV-Bereich eine hohe Hintergrundstrahlung aufgrund von Raman-Streuung beobachtet. Geeigneter sind Sonden, die besonders photostabile Farbstoffe des langwelligen Spektralbereichs des sichtbaren Lichts (500-700 nm) integrieren. Beispielsweise wurden Sonden entwickelt, die mit hoher Sensitivität und hochspezifisch ganz definierte DNS-Sequenzen nachweisen können. Diese kürzlich entwickelten Sonden (SmartProbes) bestehen aus einem Oligonukleotid bestimmter Sequenz, die am 3'Ende durch mehrere Guanin-Einheiten sowie 5'Ende durch Cytosin-Einheiten sowie einem Fluoreszenzmarker terminiert sind [Heinlein 2003].

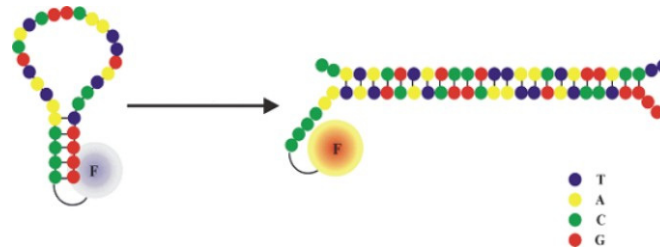


Abbildung 1.1-3. SmartProbe zur spezifischen Erkennung von DNS-Sequenzen. Im Normalzustand ist die Sonde durch ET gelöscht, bei Erkennung der Gegensequenz öffnet sie sich und fluoresziert.

Da die endständigen Basen zueinander komplementär sind, werden Haarnadelstrukturen ausgebildet und der Farbstoff in unmittelbare Nähe des potentiellen PET-Partners Guanosin gebracht und gelöscht. Bei Erkennung der entsprechenden Gegensequenz wird, wie Abbildung 1.1-3 zeigt, die Haarnadelstruktur aufgebrochen und die Fluoreszenz steigt an. Damit lässt sich beispielsweise Tuberkulose DNS sowie deren Mutationen sehr spezifisch nachweisen [Stöhr 2005].

1.1.1. Sondenentwicklung zur Detektion von Metall(II)-Ionen aus vorangegangenen Arbeiten

In vorangegangenen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe AG Krämer bereits verschiedene Sonden entwickelt, die Metall(II)ionen spezifisch nachweisen konnten. Dabei wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mit Chelatfunktionen ausgestattet, wie das Calceinderivat in Abbildung 1.1-2 zeigt [Mokhir 2005]. Durch Komplexbildung wurde die Fluoreszenz des Calceinderivats gelöscht und der Nachweis von Kupfer(II)ionen war bis zu Konzentrationen von wenigen $\mu\text{M/L}$ möglich.

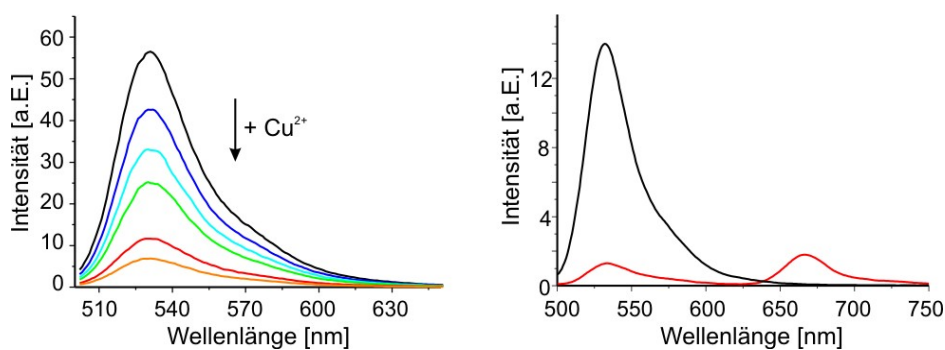


Abbildung 1.1-4. Lösungsreaktion von Calcein nach Zugabe von Cu^{2+} . Die Emissionsspektren links wurden bei $0\mu\text{M}$ (Schwarz) - $1.5\mu\text{M}$ (Orange) aufgenommen. Durch Energietransfer auf den Fluoreszenzfarbstoff CY5 konnte die Emissionswellenlänge zum langwelligeren Spektralbereich verschoben werden.

Andere Ansätze nutzen die katalytische Wirkung von Kupfer(II)-Ionen auf die Hydrolyse von Esterverbindungen. Ein geeignetes Substrat war das nicht fluoreszierende Bis(picolinyl)fluorescein, das durch Spaltung der Esterfunktionen Fluorescein generiert und somit bei Anwesenheit von Kupfer ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet wurde [Kierat 2005]. Ein anderes Sondenkonzept basierte auf der Idee eine Sonde möglichst biokompatibel und leicht modifizierbar zu gestalten. In Analogie zu den bereits gezeigten SmartProbes (Abbildung 1.1-3) wurden Oligonukleotide verwendet, die entweder eine Haarnadelstruktur ausbildeten, oder zu einem Doppelstrang konjugierten. Die Oligonukleotide wurden so markiert, dass ein metallspezifischer Ligand in Nachbarschaft zu einem geeigneten Farbstoff stand (Abbildung 1.1-5). Aufgrund der leicht zugänglichen Kopplungschemie konnten der Farbstoff und der Ligand sehr leicht variiert werden. In den Haarnadelstrukturen wurde ein Kupfer(II) spezifischer Ligand 5-(2-Pyridinyl)pyrazol verwendet und als Reporterfarbstoff kam Fluorescein zum Einsatz [Brunner 2004].

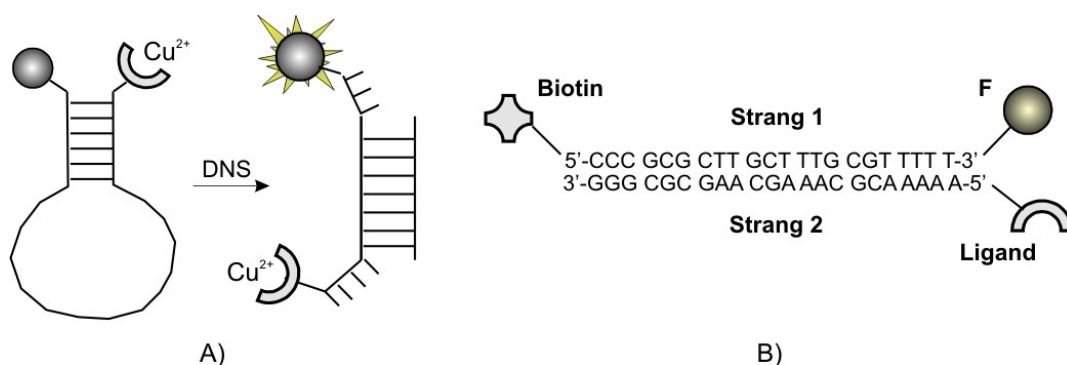


Abbildung 1.1-5. Mögliche Varianten molekularer Sonden auf Basis der Löschung von Fluoreszenzfarbstoffen mit einem DNS-Stamm.

1.2. Entwicklung einer Sonde zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen Cu(II) und Bipyridin

Komplexbildungsreaktionen sind zumeist reversibel und damit Gleichgewichtsreaktionen. Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie könnte dieses Gleichgewicht als einzelne, aufeinander folgende Hin- und Rückreaktionen beobachtet werden. Um diese Schritte spektroskopisch zu verfolgen muss eine Fluoreszenzsonde entwickelt werden, deren Fluoreszenzeigenschaften an den Bindungszustand des Liganden oder des Metallions

gekoppelt ist. Da bei der Einzelmolekülspektroskopie ein Laserstrahl auf ein kleines Volumen fokussiert wird und damit hohe Energiedichten erreicht werden, sind für diese Methode besonders photostabile Fluoreszenzsonden nötig, die zudem geringe Triplett-übergangsraten aufweisen. Um dies zu erreichen werden zumeist bekannte, kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe in das molekulare Gerüst der Sonde integriert.

Um Reaktionen mit diesen Sonden zu beobachten, müssen diese Reaktionen innerhalb der möglichen Beobachtungsdauer ablaufen. Diese Zeit wird hauptsächlich durch zwei Faktoren limitiert: Die Diffusionszeit der Sonde durch das Messvolumen und die Zeit bis zur Photozerstörung des Farbstoffs. Aufgrund des kleinen Detektionsvolumens von <1 fL in der Einzelmolekülmikroskopie diffundieren Moleküle innerhalb von 1-2 ms durch den Fokus. Damit wären die meisten chemische Reaktionen nicht verfolgbar. Um diese Einschränkung zu umgehen, muss ein Reaktionspartner auf dem Objektträger verankert werden. Diese Verankerung sollte derart sein, dass die zu beobachtete Reaktion möglichst wenig gestört wird. Eine zweite Limitierung ergibt sich aus der Photostabilität der Farbstoffe. Wird ein Fluoreszenzfarbstoff angeregt, besteht die Möglichkeit, dass er in einer Photoreaktion gebleicht wird. Das Zeitfenster zur Beobachtung von Reaktionen auf molekularer Ebene wird somit immer noch von der Photozerstörung der Fluoreszenzsonde limitiert. Damit die Kinetik einer Reaktion bestimmt werden kann, muss diese Reaktion mehrfach beobachtet werden und die Reaktionsrate über eine statistische Auswertung ermittelt werden. Möchte man eine Komplexbildung bzw. Dissoziation beobachten, darf die Reaktionszeit nicht länger sein als die Lebenszeit des verwendeten Farbstoffs. Zur Untersuchung von Reaktionen mit SMFS ist es wichtig, dass ein Reaktionspartner auf der Oberfläche verankert werden kann und die zu beobachtende Reaktion schneller abläuft als der Prozess der Photozerstörung.

1.2.1. Lösungsansatz zum Sondenkonstrukt

Zur Entwicklung der Fluoreszenzsonde wurde auf Erfahrungen aus vergangenen Arbeiten zurückgegriffen. Wie das Beispiel in Abbildung 1.1-2b zeigt, ist die Kombination zweier Oligonukleotide mit zueinander komplementären Sequenzen gut als Basisstruktur geeignet und erlaubt die Variation bezüglich des Fluoreszenzfarbstoffs und des zu untersuchenden Liganden. Um die Beobachtungszeit einzelner Sonden mittels SMFS zu verlängern, wurden sie auf einer Oberfläche verankert. Eine bereits bekannte Methode

nutzt die starke Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin. Streptavidin ist ein Protein, das bis zu vier Biotinmoleküle binden kann. Die Sonde wird zusätzlich mit einem Biotin markiert um sie auf einer Streptavidin- dotierten Oberfläche wie von Piestert et al. beschrieben zu verankern [Piestert 2003].

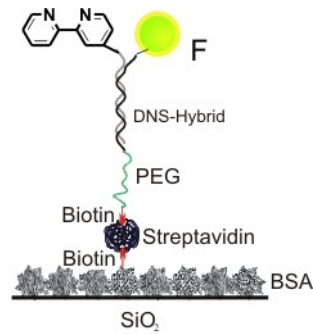


Abbildung 1.2-1. Passivierung einer Glasoberfläche mit BSA und Immobilisierung eines Biotin-modifizierten Oligonukleotiden an ein biotinyliertes BSA über Streptavidin.

In vorangegangenen Arbeiten wurde, wie oben beschrieben, eine DNS-Sonde mit einem Pyridinpyrazolderivat und einem Fluorescein modifiziert und eine starke Löschung der Fluoreszenz durch Kupfer(II) festgestellt. Unter den verschiedenen getesteten zweiwertigen Metallionen zeigten Kupfer(II) und Nickel(II) die stärkste Fluoreszenzlöschung [Görizt 2006], [Mokhir 2005]. Aufgrund der im Vergleich zu Fluorescein besseren Photostabilität sollte in diesen Arbeiten Tetramethylrhodamin (TMR) verwendet werden, das, wie Vorexperimente zeigten (AG Krämer), auch sehr gut von benachbart chelatgebundenen Kupfer(II)ionen gelöscht wird. Als Ligand wurde ein Bipyridinderivat eingesetzt, da aufgrund der Dissoziationskonstanten der entsprechenden Bipyridin-Metallkomplexe erwartet wird, dass der Zerfall des Kupfer(II)-Bipyridin-Komplexes mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden in das oben diskutierte Beobachtungszeitfenster passt und deshalb als Modellreaktion geeignet scheint (Tabelle 1.2-1). Die Reaktionen anderer Metall(II)ionen verlaufen deutlich langsamer. Mit Halbwertszeiten von > 2 min überschreiten solche Reaktionen die mögliche Beobachtungsdauer.

Tabelle 1.2-1. Geschwindigkeitskonstanten und Gleichgewichtskonstanten für die Komplexbildung von 2,2'Bipyridin mit verschiedenen Metall(II)ionen aus [Holyer 1965],[Anderegg 1963],[Irving 1962]

	$k_a [10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	k_d	$\text{Log}(K_{Gl})$
Mn^{2+}	-	-	-
Fe^{2+}	158	~ 8	4,3
Co^{2+}	63	$\sim 0,06$	6
Ni^{2+}	1,5	$5 \cdot 10^{-5}$	7,5
Cu^{2+}	$\sim 10\ 000$	0,18	8
Zn^{2+}	~ 1000	15	5

1.2.2. Sondendesign zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen Bipyridin und Kupfer(II)

Basierend auf den Erfahrungen mit verschiedenen Metallsonden (vgl. oben) wurde auf den Aufbau bestehend aus zwei zueinander komplementären DNS- Einzelsträngen zurückgegriffen. Nach Standardverfahren könnten Farbstoff und Liganden variiert werden. Die zwei zueinander komplementären Oligonukleotide wurden derart mit Farbstoff und Ligand markiert, dass sie, wie Abbildung 1.2-2 zeigt, nach Hybridisierung zueinander benachbart vorliegen.

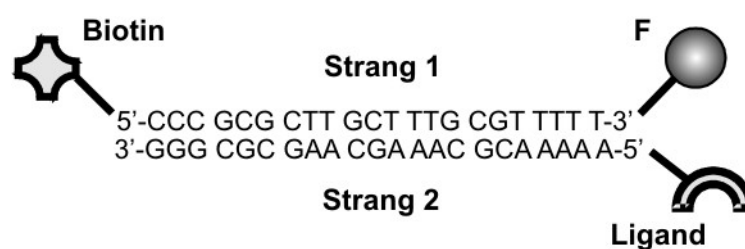


Abbildung 1.2-2. Molekulare Sonde zur Bestimmung der $\text{Me}^{(II)}$ -Konzentration via Fluoreszenzlöschung. Der Fluoreszenzfarbstoff ist benachbart zum Liganden angebracht. Zur Immobilisierung auf Oberflächen wurde die Sonde mit Biotin versehen. Der DNS- Strang dient als Abstandshalter zwischen Oberfläche und SONDENSYSTEM.

Ein Oligonukleotid (Strang 2) wurde am 5'Ende mit dem Liganden ein Bipyridinderivat (4,4'Dicarboxy-2,2'Bipyridin, dcbpy) modifiziert. Der komplementäre Oligonukleotid (Strang 1) wurde am 3'- Ende farbstoffmodifiziert und dadurch der Farbstoff in

unmittelbare Nähe zum Liganden gebracht. Außerdem wird am 5'Ende des Strangs **2** zusätzlich eine Biotin-Einheit verbunden, die eine Verknüpfung an die biotindotierte BSA-Oberfläche ermöglicht.

In ersten Experimenten wurde die Löschung der Fluoreszenz einer Auswahl Farbstoffe durch Kupfer(II)ionen untersucht. Es stellte sich heraus, dass manche schon ohne weitere Modifikation durch Kupfer(II)ionen gelöscht werden. Daraus wurden vier Kandidaten gewählt, mit zunehmender Löschkonstante TMR, Atto620, Atto635 und MR121, und die jeweilige Löschung durch Kupfer(II)ionen untersucht. Zur Überprüfung des Einfluss des Liganden auf die Löschung wurden Kontrollexperimente mit einer Sonde durchgeführt, die bis auf die fehlende Chelatfunktion strukturgleich waren. Die Löschung durch Kupfer(II) der entsprechend farbstoffmarkierten Sonden sowie der Kontrollprobe wurden mittels Ensembleexperimenten untersucht. Zum besseren Verständnis des Löschmechanismus wurde der Einfluss der Komplexbildung auf die Fluoreszenzlebensdauer- und UV/Vis- Absorptionsspektren untersucht. Sonden, die eine gute Differenzierung zwischen Probe und Kontrollexperiment zeigten, TMR und Atto620, wurden daraufhin mittels Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie untersucht. Zur Anregung von TMR wurde ein frequenzverdoppelter Nd:YAG Dauerstrichlaser bei 532 nm verwendet. Atto620 wurde mit einem Diodenlaser bei 635 nm mit 40 MHz gepulst angeregt. Die gepulste Anregung ermöglicht die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer im Einzelmolekülexperiment SFLIM [Weiss 1999].

Zur Durchführung von Einzelmolekülexperimenten muss die Beobachtungsdauer durch Immobilisierung auf Glasoberflächen erhöht werden. Dies soll über die bereits diskutierte Albumin- passivierte, Streptavidin dotierte Oberfläche realisiert werden. Die Löschung aufgrund der Komplexbildung wurde unter Gleichgewichtsbedingungen untersucht und die Fluoreszenz einzelner Sonden über die Zeit aufgenommen. Nachfolgend wurden die Daten zur Bestimmung der Kinetik der Hin- und Rückreaktion mittels Schwellwertmethode, Intensitätsautokorrelation und einem computergestützten, auf dem versteckten Markov-Modell (HMM) basierenden Algorithmus analysiert.

2. Theorie

Im folgenden soll auf grundsätzliche theoretische Themen eingegangen werden, die zum Verständnis dieser Arbeit unumgänglich sind.

2.1. Lichtabsorption und -emission der Farbstoffe

2.1.1. Absorptionsprozesse

Absorptionsprozesse im ultravioletten und sichtbaren Bereich beruhen auf elektronischen Übergängen. Ein Elektron wird durch Absorption eines Photons aus dem HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) in das LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) eines Fluorophors überführt und erreicht so einen elektronisch angeregten Zustand, z.B. den ersten angeregten Singulett Zustand S_1 . Das HOMO entspricht dem Singulett-Grundzustand S_0 , weil aufgrund der hohen Energiedifferenz von 1,5 bis 3 Elektronenvolt der erste angeregte Zustand bei Raumtemperatur nahezu unbesetzt ist (Boltzmann-Verteilung) [Lakowicz 2006].

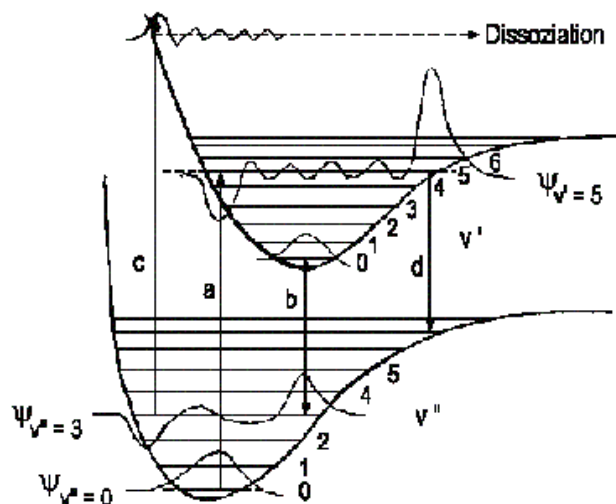


Abbildung 2.1-1. Potentialkurven des Grund- und des ersten elektronisch angeregten Zustandes eines zweiatomigen Moleküls mit Schwingungsniveaus und der Wellenfunktionen Ψ nach Boltzmann

Elektronische Übergänge laufen normalerweise so schnell ab, dass die Kerne aufgrund ihrer höheren trägen Masse gemäß des Frank-Condon-Prinzips nicht darauf reagieren [Kneubühl 2005]. Dies entspricht im Potentialdiagramm einem vertikalen Übergang (S_0 -

S_1), der in den Schwingungszustand mit der größten Wahrscheinlichkeitsdichte ψ^2 erfolgt. S_1 hat in der Regel einen gegenüber S_0 verschobenen Gleichgewichtsabstand r_{gl} , so dass ein schwingungsangeregter Zustand erreicht wird (Abbildung 2.1-1). Da, der Wahrscheinlichkeitsdichte entsprechend, verschiedene Übergänge unterschiedlicher Energie aus dem Grundzustand in den angeregten Zustand möglich sind, gibt es diverse diskrete Beträge, deren Energien von der chemischen Umgebung des Fluorophors abhängen. Im Ensemble vieler Moleküle spiegelt sich dies in der Form des Absorptionsspektrums wieder. Außerdem wird die Bohr'sche Frequenzbedingung $\Delta E = h \cdot \nu$ befolgt, d.h. es sind nur Übergänge mit der Energie eines Vielfachen des Planck'schen Wirkungsquantums h ($h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ Js) zugelassen. Das entsprechende Übergangsdipolmoment vom Grundzustand in den angeregten Zustand $M_{01} = \langle \Psi_0 | \hat{\mu} | \Psi_1 \rangle$ mit Ψ_0 und Ψ_1 als Wellenfunktionen und $\hat{\mu}$ als Dipolmomentoperator des Systems muss von Null verschieden sein: $M_{01} = \langle \Psi_0 | \hat{\mu} | \Psi_1 \rangle \neq 0$. Die Stärke der Absorption von Licht der Wellenlänge λ wird durch den dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ (in $(\text{cm} \cdot \text{mol})^{-1}$) wiedergegeben. Er ist abhängig von Temperatur und Lösungsmittel. Bei nicht zu hoher Intensität des eingestrahlten Lichtes erfolgt durch den Absorptionsvorgang nur eine geringe Besetzung des oberen Niveaus. Demzufolge ist der Extinktionskoeffizient unabhängig von der Intensität des Lichtes. Da die Übergangswahrscheinlichkeit für den elementaren Absorptionsprozess proportional zur Intensität I ist, gilt das *Lambertsche Gesetz*:

$$I(x) = I_0 \cdot \exp\{-\varepsilon(\lambda) \cdot x\} \quad \text{Gleichung 2.1-1}$$

wobei I_0 die Intensität der einfallenden Strahlung unmittelbar nach Durchdringen der Grenzfläche und $I(x)$ die Intensität in der Eindringtiefe x (in Strahlrichtung) bedeuten (*Bouguer-Lambertsches Gesetz*). Standardmäßig wird bei der Messung von Proben in Lösung direkt $\log(I_0 / I)$ bestimmt, sodass über den Zusammenhang

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad \text{Gleichung 2.1-2}$$

c = Konzentration der Probe
 d = Weglänge durch die Küvette

direkt die Konzentration c der Probe bestimmt werden kann, wenn der Extinktionskoeffizient $\varepsilon(\lambda)$ und die Weglänge d des Lichts durch die Probe, sowie die Wellenlänge λ bekannt sind.

2.1.2. Emissionsprozesse

Einem Molekül lässt sich im Energieniveauschema grundsätzlich ein System von Singulett- Zuständen S_0, S_1, S_2, \dots mit dem Gesamtelektronenspin null sowie ein System von Triplett- Zuständen T_1, T_2, \dots mit dem Gesamtspin eins zuordnen. In Abbildung 2.1-2 sind die ersten fünf elektronischen Singulett- (S_n) und Triplett- Zustände T_n dargestellt. Die elektronischen Zustände im Molekül, bei denen die Energiedifferenz ΔE zwischen zwei benachbarten Niveaus $\Delta E \approx 20000 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda \approx 500 \text{ nm}$) beträgt [Kneubühl 2005], spalten sich weiter in einzelne Schwingungs- und Rotationszustände auf. Die Schwingungsniveaus haben dabei zueinander Energiedifferenzen von $\Delta E \approx 1500 \text{ cm}^{-1}$ und die Rotationsniveaus von $\Delta E \approx 15 \text{ cm}^{-1}$.

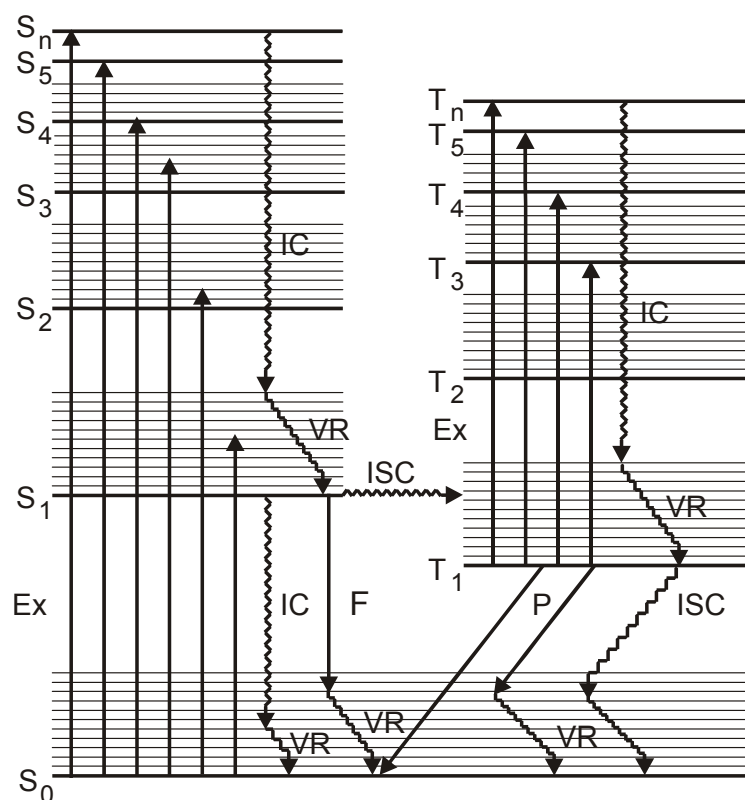


Abbildung 2.1-2. Energieniveauschema für organische Farbstoffmoleküle (Jablonski-Diagramm) Zur Vereinfachung werden keine Rotationsniveaus gezeigt. VR: Schwingungsrelaxation (vibrational relaxation), ISC: intersystem crossing, IC: strahlungslose Deaktivierung (internal conversion)

Die absorbierte Strahlung, die ein Molekül in den ersten oder einen höheren elektronischen Energiezustand überführt hat, wird innerhalb kurzer Zeit wieder an die Umgebung abgegeben. Dabei sind verschiedene Möglichkeiten der Relaxation verfügbar, wie sie im Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.1-2) schematisch dargestellt sind. Der Anregungsprozess erfolgt sehr schnell ($k_{\text{ex}} \sim 10^{15} \text{ s}^{-1}$) und überführt das Molekül in ein höheres Rotations- Schwingungsniveau eines Singulettzustandes (S_n mit $n \geq 1$). Ein Molekül im angeregten Zustand besitzt demnach Vibrations-, Rotations- und elektronische Energie. Da Vibrationsrelaxationsprozesse, die durch Stöße mit der Umgebung (Lösungsmittelmoleküle, Gefäßwand) zustande kommen, im Vergleich zu Fluoreszenz oder photochemischer Reaktionen am schnellsten ablaufen ($k \sim 10^{12} \text{ s}^{-1}$), wird das Molekül zunächst aus dem angeregten Schwingungsniveau strahlungslos in den Schwingungsgrundzustand des entsprechenden elektronischen Niveaus (S_1) übergehen. Aus diesem Zustand bieten sich dem Molekül folgende Möglichkeiten den Grundzustand S_0 zu erreichen.

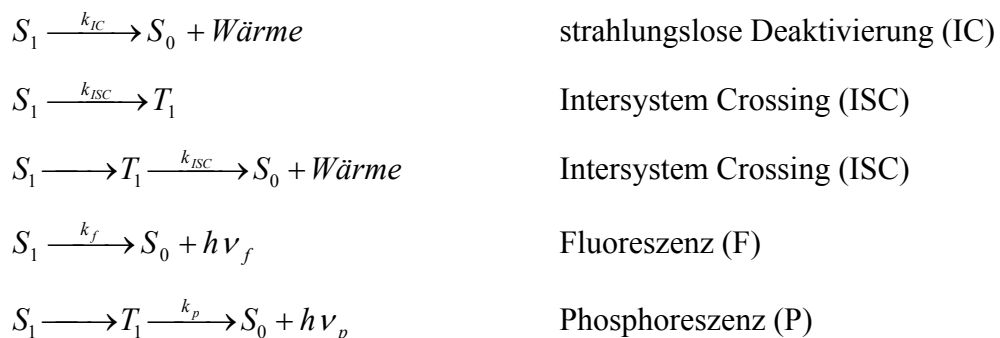


Abbildung 2.1-3. Mögliche Relaxationsprozesse eines Farbstoffmoleküls aus dem ersten angeregten Singulettzustand S_1 .

Der Übergang von einem energetisch höher liegenden S_i [$i \geq 1$]-Zustand in einen energetisch tieferen S_j [$j < i$]-Zustand kann strahlungslos in 10^{-12} s erfolgen [Lakowicz 2006] (entsprechendes gilt auch für die Triplettzustände). Dies wird als internal conversion (IC) bezeichnet. Der Prozess konkurriert direkt mit der Strahlungsemission und ist deutlich schneller als derjenige der Photonenemission, der in der Regel für einen Singulettzustand in 10^{-9} s bis 10^{-7} s und für einen Triplettzustand in 10^{-4} s bis 10^2 s erfolgt [Geworkjan 1986]. Ein weiterer möglicher Übergang eines Moleküls, der allerdings spinverboten ist, da sich der Elektronenspin umkehren muss, ist der vom Singulett- in das

Triplettsystem (intersystem crossing, ISC). Dieser Übergang besitzt eine geringe Übergangswahrscheinlichkeit.

Die beiden in Abbildung 2.1-3 aufgezeigten Übergänge aus dem untersten S_1 -Singulett- und T_1 -Triplet- in den S_0 -Grundzustand können unter Aussendung von Strahlung vollzogen werden. Ein solcher Übergang zwischen den elektronischen S_1 - und S_0 -Singulettzuständen wird als *Fluoreszenz* F bezeichnet. Er ist spinerlaubt und erfolgt in der Regel innerhalb von 10^{-9} s bis 10^{-6} s [Engelke 1985]. Der Übergang vom *metastabilen* T_1 -Triplet- in den S_0 -Singulettzustand ist wegen der nötigen Spinumkehr nach den Auswahlregeln für optische Übergänge verboten, weshalb die Strahlungsemission erst nach etwa 10^{-4} s bis 10^2 s stattfindet. Die dabei emittierte Strahlung wird *Phosphoreszenz* genannt. Da in Lösung intermolekulare Stoßdesaktivierung viel schneller von statten geht, wird dort ein solcher Übergang kaum beobachtet. Strahlungsemission aus höheren Singulettzuständen S_n ($n > 1$) $\rightarrow S_0$ wird nur sehr selten beobachtet, da hier strahlungslose Übergänge überwiegen.

2.2. *Fluoreszenzlebensdauer, Quantenausbeute, Photostabilität*

Die Abklingzeit der Fluoreszenz (Fluoreszenzlebensdauer) eines Farbstoffs nach Anregung mit einem Lichtpuls ist eine charakteristische Größe. Sie kann jedoch durch die molekulare Umgebung des Farbstoffs beeinflusst werden. Durch Stabilisierung des angeregten Zustands kann sie sich verlängern bzw. durch Destabilisierung verkürzen. Zumeist hängt das von der Lösungsmittelpolarität ab, korreliert aber auch mit der molekularen Umgebung, wie z.B. wenn der Farbstoff an ein unpolares Molekül gekoppelt wurde. Im Folgenden soll die der Fluoreszenzlebensdauer zugrunde liegende Theorie erläutert werden. Der Einsteinkoeffizient der spontanen Emission, $A [S_i (v = 0) \rightarrow S_j (v' = 0), j < i]$, beschreibt die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein angeregtes Molekül spontan ein Photon emittiert, das dabei aus dem $S_i (v = 0)$ - in den $S_j (v' = 0, j < i)$ -Zustand übergeht. Die Summe der Übergangswahrscheinlichkeiten A_{S_i} vom $S_i (v = 0)$ -Zustand in alle erlaubten S_j ($j < i, v = 0, 1, 2, \dots$)-Zustände ist:

$$A_{S_i} = \sum_{\substack{j,v' \\ j < i}} A[S_i(v=0) \rightarrow S_j, v'] \quad \text{Gleichung 2.2-1}$$

Hiermit lässt sich die Abnahme dN_{S_i} der Besetzungsdichte N_{S_i} des S_i -Zustands im Zeitintervall dt formulieren:

$$dN_{S_i} = -N_{S_i} \cdot A_{S_i} dt \quad \text{Gleichung 2.2-2}$$

Aus der Integration dieser Gleichung folgt, dass die Besetzungsdichte des angeregten Zustands exponentiell mit der Zeit abnimmt:

$$N_{S_i} = N_{S_{i_0}} \exp\{-tA_{S_i}\} \quad \text{Gleichung 2.2-3}$$

$N_{S_{i_0}}$ = Besetzungsdichte zum Zeitpunkt $t = 0$.

Als mittlere Lebensdauer τ des angeregten Molekülzustands S_i ist der Kehrwert von A_{S_i} , der Summe aller von diesem Zustand ausgehenden Übergangswahrscheinlichkeiten, definiert:

$$\tau = \frac{1}{A_{S_i}} \quad \text{Gleichung 2.2-4}$$

mit $A_{S_i} = k_f + k_{\text{konk}}$

Hier sind k_f und k_{konk} die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz und der konkurrierenden, strahlungslosen Relaxationswege sind.

Die Besetzungsdichte ist nach der Zeit τ_0 auf $1/e$ der ursprünglichen Dichte gesunken. Die Quantenausbeute Q der Fluoreszenz ergibt sich in diesem Modell als Quotient der emittierten Photonen zu den absorbierten Photonen. Sie lässt sich auch als Quotient der Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz und der Summe aller Geschwindigkeitskonstanten der von diesem Zustand ausgehenden Relaxationsprozesse ausdrücken (Gleichung 2.2-5).

$$Q = \frac{k_f}{k_f + k_{konk}} \quad \text{Gleichung 2.2-5}$$

Der Kehrwert von k_f definiert die intrinsische Lebensdauer τ_0 , die den Zusammenhang zwischen Fluoreszenzlebensdauer τ und der Quantenausbeute Q herstellt (Gleichung 2.2-6).

$$\tau_0 = \frac{1}{k_f} \Rightarrow Q = \frac{\tau}{\tau_0} \quad \text{Gleichung 2.2-6}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer kann nicht direkt gemessen werden, sondern muss statistisch im Ensemble bestimmt werden. Es wird der Abfall der Fluoreszenzintensität F , die proportional zur Zahl der angeregten Zustände ist, mit der Zeit t gemessen. Im einfachsten Fall folgt das Fluoreszenzabklingverhalten einem monoexponentiellen Abfall. Bei Wechselwirkung von Farbstoffen mit Biomolekülen (z.B. DNA, Proteine) resultiert meist eine Abklingfunktion, die aus der Summe mehrerer Exponentialfunktionen besteht (Gleichung 2.2-7):

$$F(t) = \sum_i A_i \cdot e^{-t/\tau_i} \cdot F_0 \quad \text{Gleichung 2.2-7}$$

Der präexponentielle Faktor A_i repräsentiert die Amplitude der Komponente i mit der zugehörigen Lebensdauer τ_i .

Die Berechnung dieser Lebensdauer beruht auf einer mathematischen Anpassung an eine gemessene Abklingkurve und muss keine anschauliche physikalische Bedeutung haben. Unter der Annahme, dass alle Lebenszeiten erfasst wurden, ist $\sum A_i \cdot \tau_i$ proportional zur Fluoreszenzintensität.

2.3. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer zwischen Molekülen (FRET)

Der Energietransfer zwischen zwei Molekülen ist die strahlungslose Übertragung der Energie des angeregten Zustands des Donors auf einen geeigneten Akzeptor. Das Emissionsspektrum des Donors überlappt mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptormoleküls (Abbildung 2.3-1). Die Übertragung der Energie geschieht ohne Auftreten von Photonen, sie resultiert vielmehr aus Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor und Akzeptor über relativ große Distanzen (1 – 8 nm). Das Akzeptormolekül kann dabei selbst ein Fluorophor sein und die ihm übertragene Energie in Form von Licht bei längeren Wellenlängen abgeben, oder es fluoresziert nicht und gibt die Energie über andere Kanäle wie z.B. internal conversion, die bereits oben beschrieben wurden, ab. In beiden Fällen verringert sich die Fluoreszenzintensität des Donors und man spricht vom Löschen des Donors. Sendet der Akzeptor nun aufgrund des Energietransfers Photonen aus, so wird der gesamte Vorgang als FRET bezeichnet.

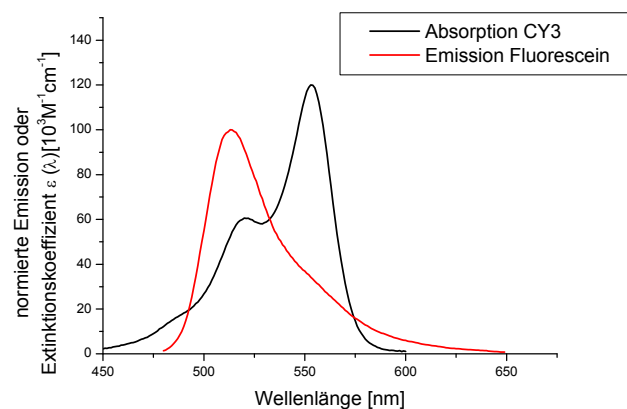


Abbildung 2.3-1. Überlappung des Emissionsspektrums von Fluorescein mit dem Absorptionsspektrum von CY3

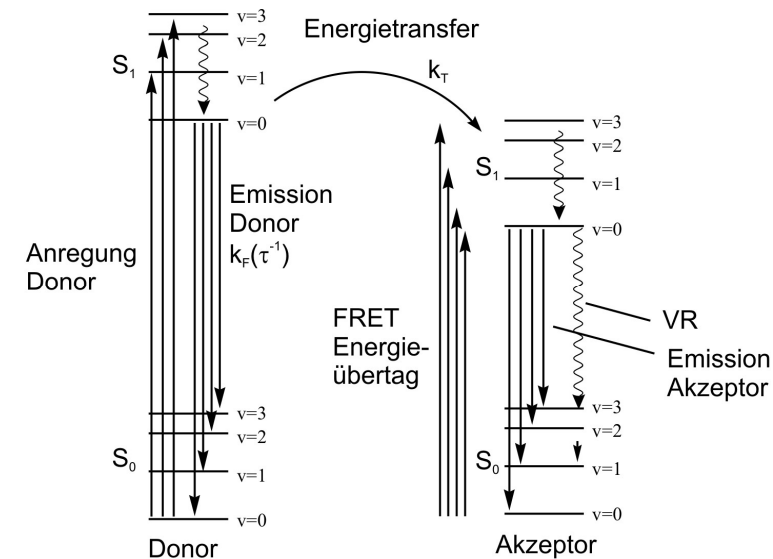


Abbildung 2.3-2. Schematische Darstellung der Prozesse beim Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, VR = Vibrationsrelaxation,

Die Transferrate k_T des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers ist vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor und der Fluoreszenzlebensdauer des Donors abhängig:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad \text{Gleichung 2.3-1}$$

r stellt die Distanz zwischen den Molekülen dar, τ_D die Fluoreszenzlebensdauer und R_0 ist der Försterradius des Donor- Akzeptorpaares, bei dem die Energietransfereffizienz 50 % beträgt.

Der Försterradius ist nach Gleichung 2.3-2 berechenbar, wenn das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und die Quantenausbeute des Donors Q_D bekannt sind.

$$R_0^6 = \left(\frac{9000(\ln 10) Q_D \kappa^2}{128 \pi^5 N n^4} \right) \cdot J(\lambda) \quad \text{Gleichung 2.3-2}$$

κ^2 ist ein Faktor, der die Auswirkung der relativen Orientierung der Moleküle zueinander beschreibt und kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Bei frei rotierenden

Farbstoffmolekülen wird ein Mittelwert von 2/3 angenommen. Theoretisch ist er über Gleichung 2.3-3 berechenbar. N ist die Avogadro-Zahl und n der Brechungsindex des verwendeten Mediums, der für Biomoleküle in Wasser zu 1,4 angenommen wird.

$$\kappa^2 = (\cos\theta - 3\cos\beta\cos\gamma)^2 \quad \text{Gleichung 2.3-3}$$

Das Überlappungsintegral der Donoremission mit der Absorption des Akzeptors (vgl. Abbildung 2.3-1), lässt sich, wie Gleichung 2.3-4 beschreibt, mit Hilfe eines Emissionsspektrums des Donors beliebiger Konzentration und eines Absorptionsspektrums des Akzeptors berechnen.

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad \text{Gleichung 2.3-4}$$

$F_D(\lambda)$ ist das auf die totale Emissionsintensität (Fläche unter der Kurve) normierte Emissionsspektrum des Donors und damit dimensionslos. $\varepsilon_A(\lambda)$ wird in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angegeben und beschreibt den Extinktionskoeffizienten des Akzeptors in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ .

Die Transferrate $k_T(r)$ kann durch Ersetzen von R_0 wie folgt formuliert werden:

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \cdot \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) \cdot J(\lambda) \left(= \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \right) \quad \text{Gleichung 2.3-5}$$

Anhand der errechneten Transferrate k_T kann nun leicht durch Vergleich mit der intrinsischen Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors τ_D erkannt werden, ob diese Prozesse miteinander konkurrieren werden. Die Effizienz des Energietransfers wird durch Gleichung 2.3-6 gegeben.

$$E = \frac{k_T}{k_T + \tau_D^{-1}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{Gleichung 2.3-6}$$

Dies sei am Beispiel des Farbstoffpaars Fluorescein / CY3 mit einem Förster-Radius von $R_0 = 5,6$ nm veranschaulicht. In Abbildung 2.3-3 ist die Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand r graphisch dargestellt.

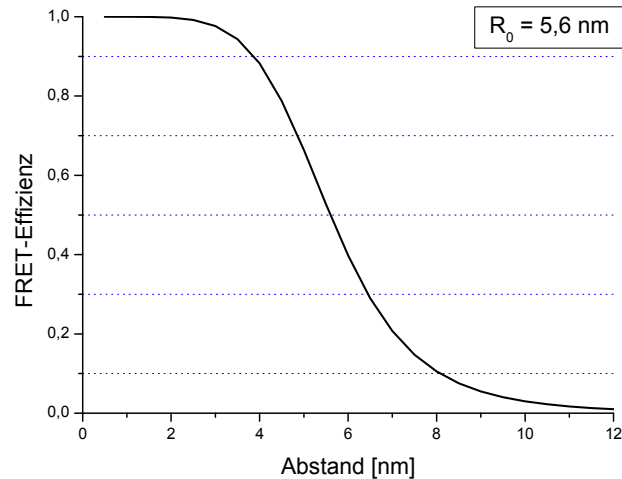


Abbildung 2.3-3. Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz zwischen Fluorescein und CY3

Es ist ersichtlich, dass eine Distanzabhängigkeit besteht. Wie Abbildung 2.3-3 zeigt beträgt die FRET-Effizienz bei einem Abstand von $2 \cdot R_0$ weniger als 10%. Mit der Farbstoffkombination Fluorescein-CY3 ist es demnach möglich, Abstände zwischen 3,8 nm und 8,2 nm zu bestimmen. Die Genauigkeit solcher Messungen liegt bei etwa 10%. Meist stören andere Faktoren die FRET- Ausbeute. Nutzt man farbstoffmarkierte Oligonukleotide, so hängt die experimentell bestimmte FRET-Effizienz stark davon ab, welche Basen sich in der Nähe des Donors oder des Akzeptors befinden und ob man die Fluoreszenz des Doppelstrangs oder des Einzelstrangs bestimmt. So wurde bei vielen Oligonukleotid-gebundenen Fluorophoren eine Fluoreszenzlöschung von 10 - 70 % durch die Nukleobase Guanin berichtet [Marras 2002]. Das bedeutet, dass die absolute Abstandsbestimmung unter Verwendung der FRET-Effizienz nicht ohne Überprüfung auf mögliche Löschprozesse anwendbar ist. Jedoch bleiben relative Distanzänderungen davon unbeeinflusst.

Experimentell bestimmt man die FRET-Effizienz unter Verwendung der Gleichung 2.3-7 oder Gleichung 2.3-8, indem man die Fluoreszenzintensität oder Lebensdauer des Donors in Abwesenheit (F_D bzw. τ_D) und in Gegenwart des Akzeptors (F_{DA} bzw. τ_{DA}) misst und umrechnet.

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

Gleichung 2.3-7

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

Gleichung 2.3-8

Es ist einfacher und genauer, die FRET-Effizienz über die Lebensdauer zu bestimmen, da diese von der Konzentration unabhängig und deshalb besser vergleichbar ist.

2.4. Fluoreszenzlöschung

Angeregte Moleküle können Reaktionen eingehen, die in einer Herabsetzung der Fluoreszenzintensität oder der Fluoreszenzlebensdauer resultieren können. Man spricht von Fluoreszenzlöschung.

Folgende bimolekulare Prozesse können zur Fluoreszenzlöschung beitragen:

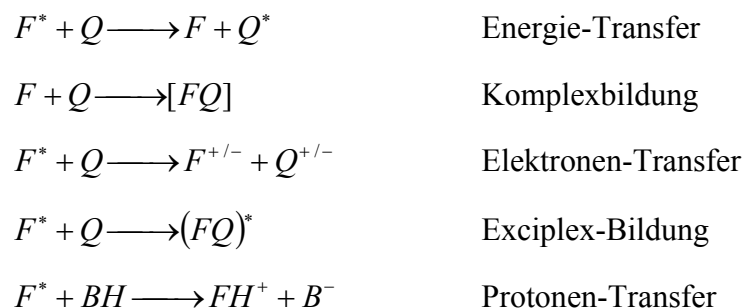


Abbildung 2.4-1. Mögliche Löschreaktionen eines angeregten Farbstoffs mit einem Löschmolekül (* symbolisiert angeregte Zustände, F den Farbstoff, Q das Löschmolekül)

Beim Energietransfer wird, wie bereits oben erklärt, die Anregungsenergie strahlungslos über einen Dipol-Dipol-Mechanismus auf ein Akzeptormolekül übertragen. Es handelt sich nicht um einen Emissions-Reabsorptions-Mechanismus sondern um einen strahlungslosen Prozess [Förster 1948], [Stryer 1978]. Im Falle der Fluoreszenzlöschung relaxiert der Akzeptor ausschließlich über Internal Conversion.

Bilden sich Komplexe mit dem Löschmolekül, die nicht mehr zur Fluoreszenz angeregt werden können, bewirkt das eine Verringerung der Fluoreszenzintensität.

Der photoinduzierte Elektronentransfer beruht auf Redoxreaktionen, die im angeregten Zustand möglich werden. Ein direkter Stoß der Reaktanden ist häufig gar nicht nötig. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Redox-Potentiale, den Abstand und die Lage der Reaktanden zueinander bestimmt.

Bei der Exciplex-Bildung (aus „excited complex“) entsteht ein Komplex, der nur im angeregten Zustand stabil ist und bei der strahlungslosen Deaktivierung wieder zerfällt.

Der Protonentransfer beruht auf einer Änderung der pK_a -Werte der Moleküle im angeregten Zustand.

2.4.1. Dynamische Löschung

Der Fluorophor befindet sich in einem angeregten Zustand und überträgt Energie nach einem der zuvor genannten Mechanismen auf ein Löschmolekül. Anschließend gehen beide Moleküle strahlungslos in den Grundzustand über. Die Fluoreszenzintensität verringert sich durch den zusätzlichen Prozess, der S_1 entvölkert. Damit einhergehend wird auch die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt (Abbildung 2.4-2)

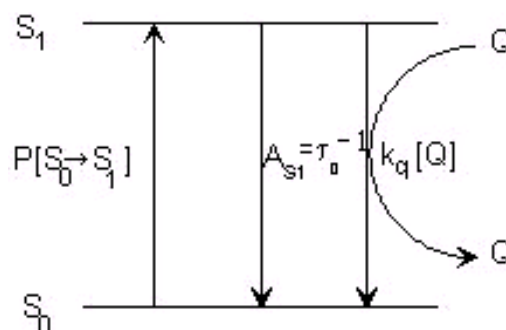


Abbildung 2.4-2. Schematische Darstellung des Dynamischen Löschprozesses

Da die dynamische Löschung auf Stößen zwischen zwei Molekülen beruht, sind zwei Prozesse für die Löschung nötig. Das angeregte Molekül muss seine Energie bei einem Stoß auf das Löschmolekül übertragen, was ein sehr schneller Prozess ist (ca. 10^{-9} - 10^{-6} s). Damit dieser Transfer überhaupt stattfinden kann, müssen diese Moleküle effektiv aufeinander stoßen. Dies erfolgt in Lösung durch Diffusion und kann theoretisch behandelt werden. Die Stoßzahl Z (in s^{-1}) ist proportional der Konzentration der Löschmoleküle $[Q]$ (in mol l^{-1}) und zur bimolekularen Diffusionsgeschwindigkeit k_{diff} (in $\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$).

$$Z = k_{diff} \cdot [Q]$$

Gleichung 2.4-1

Um die Konstante k_{diff} zu berechnen, bedient man sich der Smoluchowski-Gleichung. Befindet sich innerhalb des Stoßabstands r_0 um das Farbstoffmolekül F kein Löschmolekül Q, besteht ein Konzentrationsgradient bezüglich Q. Der Fluss von Q in die durch F und r_0 definierte Kugel wird durch das zweite Ficksche Diffusionsgesetz beschrieben:

$$\frac{\partial[Q]}{\partial t} = D_{F,Q} \nabla^2[Q]$$

Gleichung 2.4-2

Mit der Nebenbedingung, dass auf der Oberfläche der durch r_0 und F definierten Kugel $[Q] = 0$ gilt, liefert die Lösung der obigen Gleichung die Smoluchowski-Gleichung.

$$k_{diff} = k(t) = 4\pi R_0 D_{F,Q} N' \left(1 + \frac{R_0}{\sqrt{\pi D_{F,Q} t}} \right)$$

Gleichung 2.4-3

Der Diffusionskoeffizient $D_{F,Q}$ ist durch die Summe der Diffusionskoeffizienten beider Spezies D_F und D_Q gegeben und berücksichtigt deren gleichzeitige Diffusion. Sie sind entweder Experimentell oder theoretisch durch die Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 2.4-4) zu bestimmen.

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_i}$$

Gleichung 2.4-4

η = Lösungsmittelviskosität

k_B = Boltzmannkonstante

T = Temperatur

Vernachlässigt man den zeitabhängigen (transienten) Term in der Smoluchowski-Gleichung so vereinfacht sich die Gleichung und kann zur Abschätzung der diffusionskontrollierten, bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten herangezogen werden:

$$k_{diff} = k(t) = 4\pi R_0 D_{F,Q} N'$$

Gleichung 2.4-5

Für annähernd gleich große Moleküle F und Q ist mit der Stokes-Einstein-Gleichung k_{diff} von der Molekülgröße unabhängig:

$$k_{diff} = \frac{8000RT}{3\eta}$$

Gleichung 2.4-6

Bei Raumtemperatur und in Wasser ($\eta = 1 \text{ mPa s}$) beträgt die bimolekulare, diffusionskontrollierte Geschwindigkeitskonstante k_{diff} etwa $6,5 \cdot 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Da aber nicht jeder Stoß zu einer effektiven Fluoreszenzlöschung führt, ist die Löschrates k_q geringer als k_{diff} . Deshalb wird ein Korrekturfaktor γ eingeführt, der den Bruchteil der reaktiven Stöße angibt. Somit gilt für die Löschkonstante: $k_q = \gamma k_{diff}$

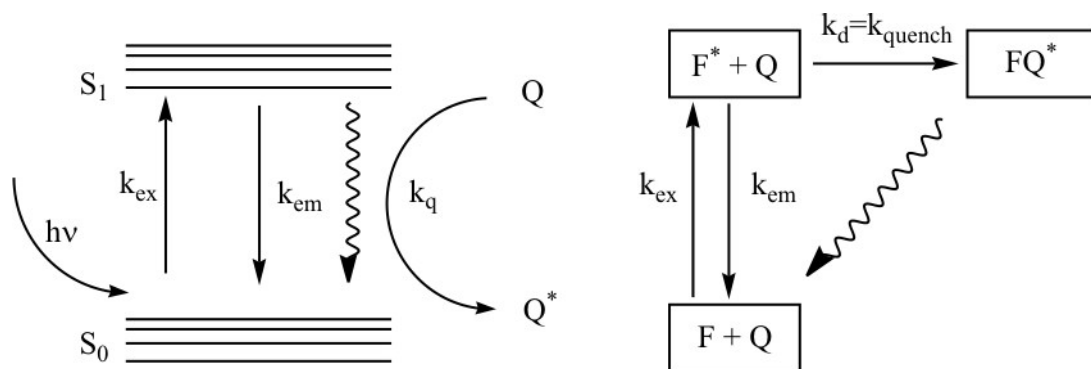


Abbildung 2.4-3. Gegenüberstellung der Prozesse bei dynamischen Löschems und statischen Löschems

An Hand der bisher vorgestellten Theorie kann nun versucht werden, die gewonnenen Erkenntnisse in die Kinetik des Emissionsprozesses zu integrieren. Die Änderung der Fluorophorenzahl im angeregten Zustand entspricht den pro Zeiteinheit angeregten Molekülen ($I_{ex}(t)$) abzüglich derjenigen, die durch Relaxationsprozesse in den Grundzustand zurückfallen ($k[F^*]$).

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -k[F^*] + I_{ex}(t)$$

Gleichung 2.4-7

Nun kann man löschende Moleküle zugeben, dann ändert sich die oben formulierte Gleichung nach

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -(k + k_q[Q])[F^*] + I_{ex}(t) = 0 \quad \text{Gleichung 2.4-8}$$

Die Konstante k stellt die Summe der Geschwindigkeiten aller möglichen Prozesse dar, die das Fluorophor aus dem angeregten in den Grundzustand überführen ($k = k_F + k_{VR}$). Da sich bei konstanter Bestrahlung ein Gleichgewicht zwischen angeregten und im Grundzustand befindlichen Fluorophoren einstellt, ist die Änderung $d[F^*]$ mit der Zeit gleich null. Dividieren von Gleichung 2.4-7 durch Gleichung 2.4-8 führt zur Eliminierung der Anregungsfunktion $I_{ex}(t)$ und ergibt direkt die Stern-Volmer Gleichung:

$$\frac{[F^*]_0}{[F^*]} = \frac{\tau_0}{\tau} = \frac{k + k_q[Q]}{k} = 1 + k_q\tau[Q] \quad \text{Gleichung 2.4-9}$$

mit $\tau = k^{-1}$

Trägt man in einem Graphen das Verhältnis der Ausgangsfluoreszenz F_0 zur von der Löschmolekülkonzentration abhängigen Fluoreszenz F gegen die Löscherkonzentration auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung $K_D = k_q \cdot \tau$ (Abbildung 2.4-4). Setzt man nun für die bimolekulare Löschkonstante den oben mit Gleichung 2.4-6 ermittelten Wert ein, kommt man auf eine Konstante K von etwa 6 l mol^{-1} für $\tau = 1 \text{ ns}$ und 6000 l mol^{-1} für $\tau = 1 \text{ } \mu\text{s}$. Da die meisten verwendeten Farbstoffe eine Lebensdauer im Nanosekundenbereich haben, liegt der maximal mögliche Wert für die Steigung k_D zwischen 6 und $62,5 \text{ M}^{-1}$. Da sich das Verhältnis der entsprechenden Lebensdauern τ_0 / τ gleich dem Verhältnis der Fluoreszenz F_0 / F verhält, gibt ein Graph der τ_0 / τ gegen die Löschmolekülkonzentration Q darstellt, das gleiche Bild.

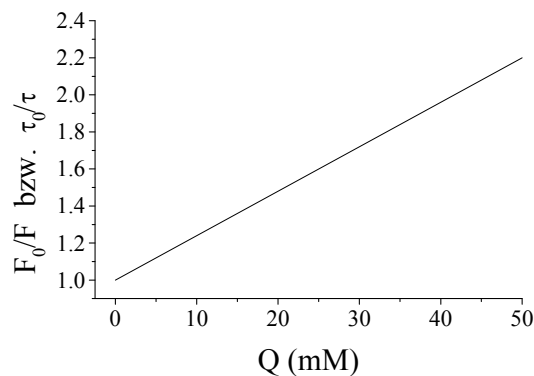


Abbildung 2.4-4. Stern-Volmer Plot bei dynamischer Löschung

2.4.2. Statische Löschung

Der drastische Unterschied zum dynamischen Löschen besteht darin, dass sich ein Komplex zwischen dem Fluorophor und dem Löschmolekül bildet, der nicht mehr fluoresziert. Wenn dieser Komplex einigermaßen stabil ist und die Verweildauer des Löschmoleküls im Komplex viel höher als die Lebensdauer des angeregten Zustands ist, dann unterliegt der Löschvorgang nicht mehr der Diffusionskontrolle, was bedeutet dass die Löschkonstanten sehr große Werte annehmen können.

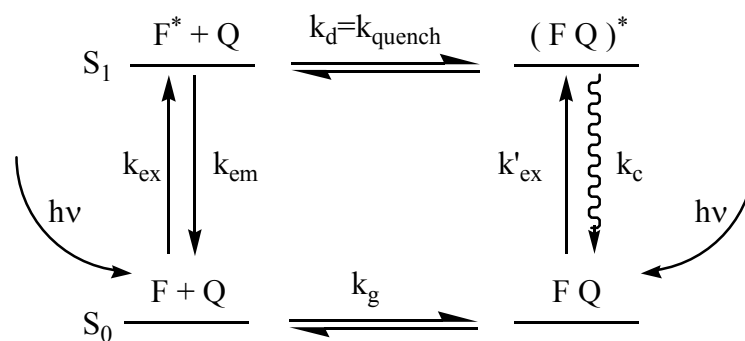


Abbildung 2.4-5. Schematische Gegenüberstellung der statischen und dynamischen Farbstofflöschung

In Abbildung 2.4-5 sind das dynamische und statische Löschen schematisch gegenübergestellt. Beim dynamischen Löschen liegt eine Konkurrenz zwischen dem diffusionskontrolliertem Löschprozess und der Fluoreszenz vor. Beim statischen Löschen wird der Löschvorgang von der Komplexbildungskonstante bestimmt. Der angeregte Komplex relaxiert ausschließlich über strahlungslose Prozesse. Betrachtet man die Komplexbildungsreaktion $F + Q \rightarrow FQ$, so erhält man für die Gleichgewichtsbedingung:

$$K_s = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad \text{Gleichung 2.4-10}$$

mit $[FQ]$ = Konzentration des Komplexes

$[F]$ = Konzentration an freiem Farbstoff

$[Q]$ = Konzentration des Löschmoleküls

Geht man davon aus, dass der Komplex keine Fluoreszenz zeigt, so kann man die verbleibende Fluoreszenz F / F_0 dem Anteil nicht komplexierter Fluorophore gleichsetzen. Die Ausgangskonzentration an Fluorophor durch Gleichung 2.4-11 gegeben.

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \quad \text{Gleichung 2.4-11}$$

umstellen ergibt $[F - Q] = [F]_0 - [F]$

setzt man dies in Gleichung 2.4-10 ein, und formt nach $[F]_0 / [F]$ um, so erhält man Gleichung 2.4-12.

$$\frac{[F]_0}{[F]} = \frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q] \quad \text{Gleichung 2.4-12}$$

Die Konzentrationen $[F]_0$ und $[F]$ können direkt durch die Fluoreszenzintensität ersetzt werden. Man erhält dieselbe Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Konzentration des Löschmoleküls wie im dynamischen Fall. Somit lassen sich diese Prozesse durch Messung der Abnahme der Fluoreszenzintensität nicht voneinander unterscheiden.

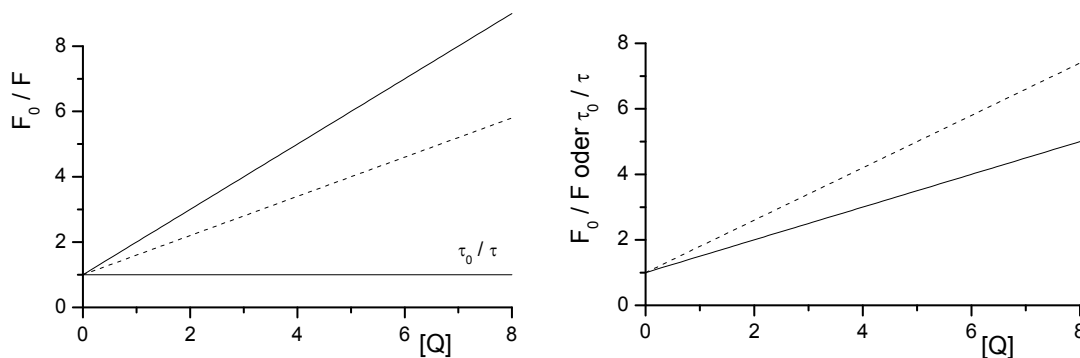


Abbildung 2.4-6. Temperaturabhängigkeit des statischen (Links) und dynamischen Löschprozesses (Rechts). Die gestrichelten Linien zeigen Stern-Volmer Graphen bei hoher Temperatur, durchgezogene Linien bei niedriger Temperatur.

Dies ist aber anhand der Lebensdauer möglich. Da beim statischen Löschen nur noch nicht komplexierte, vom Löschmolekül unbeeinflusste Farbstoffe fluoreszieren, bleibt die Lebensdauer τ_0 unverändert. Beim dynamischen Löschen vermindert sich die Lebensdauer. Somit gilt für statisches Löschen $\tau_0 / \tau = 1$ und für dynamisches Löschen ist $\tau_0 / \tau = F_0 / F$. Eine weitere Möglichkeit zwischen den beiden Prozessen zu differenzieren

besteht in deren unterschiedlichem Verhalten bezüglich einer Temperaturänderung (vgl. Abbildung 2.4-6). Beim dynamischen Löschen wird die Löschkonstante aufgrund schnellerer Diffusion größer, während sich beim statischen Löschprozess die Löschkonstante mit steigender Temperatur verkleinert, da ein Temperaturanstieg die Komplexstabilität in der Regel verringert.

In vielen Fällen kann das Löschen aus einer Kombination beider vorgestellter Mechanismen bestehen. Die Stern-Volmer Kurve weicht dann bei höheren Löschmolekülkonzentrationen von der Linearität ab (Gleichung 2.4-13).

$$\frac{[F]_0}{[F]} = \frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad \text{Gleichung 2.4-13}$$

Durch Umstellen der Gleichung 2.4-13 erhält man eine Form, die bei graphischem Auftragen eine lineare Abhängigkeit zeigt.

$$K_{\text{app}} = \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q] \quad \text{Gleichung 2.4-14}$$

Um die Konstanten bei kombinierten Löschprozessen zu erhalten, kann man K_{app} bei jeder Löschmolekülkonzentration berechnen und gegen $[Q]$ auftragen. Der Achsenabschnitt liefert $K_D + K_S$ und die Steigung ist gleich $K_D \cdot K_S$. Es können aber noch andere Abweichungen von der Stern-Volmer Geraden geben. Sind beispielsweise unterschiedliche Populationen an Farbstoffen vorhanden, die durch das Löschmolekül unterschiedlich stark beeinflusst werden, kann man eine Krümmung zur x-Achse beobachten. Des Weiteren spielt bei polaren oder geladenen Molekülen die Polarität oder Ladung des Löschmoleküls eine große Rolle. Befindet sich der Farbstoff in einer negativ geladenen Umgebung, muss ein negativ geladenes Teilchen eine gewisse Potentialarbeit leisten, bis es zu einem Stoß kommen kann. Ein positiv geladenes Teilchen würde zum Farbstoff hingezogen und würde effektiver Löschen. Es gibt demnach Unterschiede in der Löscheffizienz geladener Löschmoleküle, je nachdem ob man einen freien Farbstoff oder einen an Aminosäuren oder DNA gekoppelten Farbstoff auf dessen Löschverhalten untersucht.

2.4.3. Löschung durch photoinduzierten Elektronentransfer

Die Löschung durch Elektronentransfer erfolgt über sehr kleine Entfernungen und tritt meist nur dann auf, wenn die Reaktionspartner in direktem Kontakt treten und einen Komplex bilden. Die grundlegende Theorie hierzu wurde von Rudolf A. Marcus (Nobelpreis 1992) und Noel Hush begründet und beschreibt den Elektronenübertrag zwischen zwei Molekülen oder Atomen [Marcus 1956, 1993]; [Hush 1968]. Prinzipiell handelt es sich dabei um eine Redoxreaktion, wobei sich die formale Oxidationszahl beider Reaktionspartner ändern. Es werden zwei Mechanismen unterschieden: Der „*Inner-Sphere*“- Elektronentransfer und der „*Outer-Sphere*“ Elektronentransfer. Bei dem „*Inner-Sphere*“ Elektronentransfer wird der Elektronenübertrag intramolekular über eine direkte Bindung vermittelt. Taube *et. al.* beschrieb den Elektronentransfer zwischen Cr(II)aq und dem Komplex $[\text{CoCl}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$, der über ein verbrückendes Chlor-Atom abläuft [Taube 1953]. Beim „*Outer-Sphere*“- Elektronentransfer, liegen die Reaktionspartner während des Transfers nicht molekular verbrückt vor. Das Elektron springt durch den Raum auf den geeigneten Akzeptor.

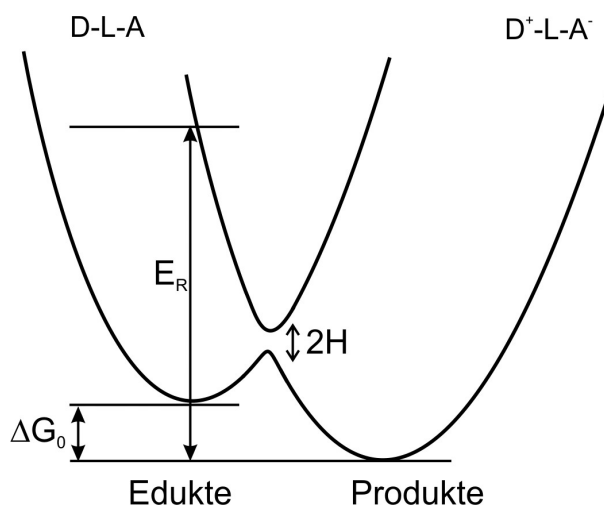


Abbildung 2.4-7. Potentialkurven der Reaktanden vor (Edukte) und nach (Produkte) dem Elektronentransfer (D = Donor; L = Ligand; A = Akzeptor). H ist die elektronische Kopplung zwischen dem Ausgangs- und Endzustand. E_R ist die Reorganisationsenergie und ΔG_0 die freie Enthalpieänderung der Elektronentransferreaktion.

Die Marcus Theorie wird zur Beschreibung vieler Aspekte der Chemie und Biologie, wie z.B. Photosynthese, Korrosion oder Chemolumineszenz, herangezogen. Die Grundgedanken sind folgende:

Die benötigte Energie zur optischen Anregung eines Elektrons von einem Donor auf einen geeigneten Akzeptor (die so genannte Reorganisationsenergie), ist eng an die Aktivierungsenergie beim thermisch- induzierten Elektronentransfer geknüpft. Die Transferrate vom Donor zum Akzeptor steigt mit der thermodynamischen Potentialdifferenz zwischen Donor und Akzeptor. Wird die Potentialdifferenz jedoch zu hoch, so stimmt diese Beziehung nicht mehr, die Rate wird dann abnehmen. Diese wird als invertierte Marcus- Region bezeichnet. Mathematisch wird die Kinetik durch die semiklassische Marcus- Gleichung beschrieben:

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} H_{AB}^2 \frac{1}{\sqrt{4\pi k_b T}} \exp\left[\frac{-(\lambda + \Delta G^0)^2}{4E_R k_b T}\right] \quad \text{Gleichung 2.4-15}$$

H_{AB} ist der Elektronenkopplungsfaktor, der die Abhängigkeit von Distanz und die Orientierung beschreibt. E_R ist die Reorganisationsenergie und ist die Summe der Inner-Sphere und Outer-Sphere Komponenten. k_B ist die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und ΔG_0 die freie Reaktionsenthalpie.

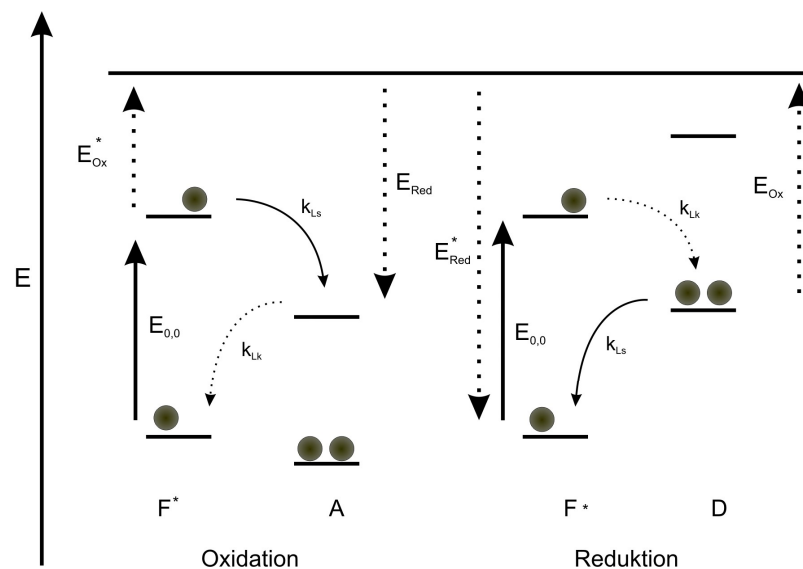


Abbildung 2.4-8. Schematische Darstellung zum möglichen Ablauf des Elektronentransfers. Nach Anregung kann der Farbstoff F^* ein Elektronen auf den Akzeptor übertragen (Oxidation), oder F^* fungiert als Akzeptor, die Elektronenlücke im Grundzustand wird durch ein Elektron eines Donors aufgefüllt. Beides mal werden Ladungen getrennt und anschließend wieder rekombiniert (Rücktransfer).

Da beim photoinduzierten Elektronentransfer durch die elektronische Anregung eines Moleküls Energie zugeführt wird, kann die Elektronenübertragung spontan ohne weitere

Aktivierung erfolgen. Durch Absorption eines Photons geeigneter Energie wird ein Elektron aus dem HOMO (Höchstes besetztes Molekülorbital) in das LUMO (niedrigstes unbesetztes Molekülorbital) angeregt. Durch Aufnahme eines Elektrons eines geeigneten Donors wird das Molekül reduziert ($A^* \rightarrow A^-$; $D \rightarrow D^+$). Ist ein geeigneter Akzeptor zugegen, so kann das angeregte Elektron übertragen werden. ($D^* \rightarrow D^+$; $A \rightarrow A^{*-}$). Durch Rücktransfer des Elektrons wird der Ausgangszustand wiederhergestellt. Die während dieses Prozesses aufgenommene Energie wird im günstigsten Fall als Wärme freigesetzt, da keine Fluoreszenz abgegeben wird. Es ist auch möglich, dass aus dem angeregten Zustand andere, die Struktur des Moleküls verändernde Reaktionen auftreten. Der photoinduzierte Elektronentransfer wird nur ablaufen, wenn die zugrunde liegende Reaktion exergonisch abläuft. Die Reaktionsenthalpie ΔG kann aus den Oxidations- und Reduktionspotentialen ($E(D/D^+)$ und $E(A/A^-)$), der Übergangsenergie $E_{0,0}$ und dem Coulombpotential des Ladungstrennten Zustands (ΔG_{Coul}) abgeschätzt werden. Wenn die Redoxpotentiale und die Löschexperimente im selben Lösungsmittel gemessen wurden, kann die klassische Rehm-Weller Gleichung zur Abschätzung der freien Reaktionsenthalpie angewendet werden [Rehm 1969]; Gleichung 2.4-16.

$$\Delta G = E(D/D^+) - E_{0,0} - E(A/A^-) + \Delta G_{coul} \quad \text{Gleichung 2.4-16}$$

$$\text{Mit } \Delta G_{coul} = \frac{-e^2}{\epsilon_s \cdot R_c}$$

Das Coulomb Potential (ΔG_{Coul}) beschreibt die Distanzabhängigkeit R_c des photoinduzierten Elektronentransfers ($1/R_c$). Der Faktor $1/\epsilon_s$ beschreibt die Abschirmung des ladungsseparierten Zustands beispielsweise durch ein polares Lösungsmittel. Mit Hilfe der Rehm- Weller Gleichung lässt sich die freie Reaktionsenthalpie unter Verwendung leicht zugänglicher Größen sehr gut abschätzen.

Basierend auf dem ET-Mechanismus wurden viele molekularer Sonden sowie molekulare Schalter entwickelt. Dabei können verschiedene strukturell unterschiedliche Konzepte angewendet werden, wobei die Reaktionspartner direkt miteinander verknüpft sind, über einen Anker verbunden werden oder keine molekulare Verbindung besteht (intermolekular). Mit steigendem Abstand verringert sich die Effizienz des Elektronentransfers.

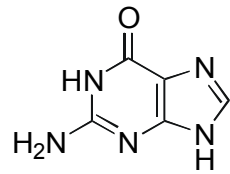
2.5. Oligonukleotide – Aufbau und Eigenschaften

2.5.1. Nukleinsäuren

Es werden zwei Arten von Nukleinsäuren unterschieden: Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA). Diese Moleküle befähigen lebende Organismen dazu, ihre Erbinformation von einer Generation zur nächsten weiterzugeben. DNA ist unter den Molekülen dahingehend einzigartig, dass sie Anweisungen für ihre eigene Replikation enthält. Diese molekulare Reproduktion ist die Basis für die Kontinuität allen Lebens. Die DNA ist im Zellkern einer jeden Körperzelle lokalisiert. Um die in den Genen gespeicherten Informationen umzusetzen, müssen sie aus dem Zellkern heraus ins Zytoplasma geschleust werden. Dazu wird ein Transkript vom entsprechenden DNA-Abschnitt hergestellt, das als RNA vorliegt.

Bei den Nukleinsäuren DNA und RNA handelt es sich um langkettige, unverzweigte Polymere, die aus Monomereinheiten, den Nukleotiden, bestehen. Im Vergleich zu der strukturellen Vielfalt anderer Naturstoffe sind DNA und RNA relativ einfach aufgebaut.

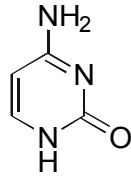
Ein Nukleotid besteht aus drei Einheiten: einer Nukleobase, einem Zucker und einer Phosphatgruppe. Als Nukleobasen finden sich für die DNA die Purin-Basen Adenin (A) und Guanin (G), sowie die Pyrimidin-Basen Cytosin (C) und Thymin (T). In der RNA ist Thymin durch Uracil (U) ersetzt (Abbildung 2.5-1). Der Zucker besteht aus einer Riboseeinheit, der im Fall der DNA am 2'-Kohlenstoffatom ein Wasserstoffatom trägt, während die RNA an dieser Stelle eine Hydroxylgruppe besitzt, die die Wasserlöslichkeit des Moleküls erhöht. Bei der Phosphatgruppe handelt es sich um ein Monophosphat. Im menschlichen Körper wird ein System aus Adenosinmono- und Adenosintriphosphat (AMP/ ATP) zur Energieübertragung in den Zellen benutzt.



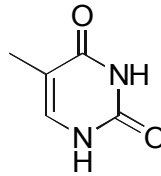
Guanin (G)



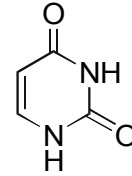
Adenin (A)



Cytosin (C)



Thymin (T)



Uracil (U)

Abbildung 2.5-1. Strukturen der Nucleobasen

Ein Nucleotid kann formal aufgebaut werden, indem die Hydroxygruppe am C1-Atom der Ribose durch eine der Nucleobasen ersetzt wird. Die entstandene Moleküleinheit wird als Nucleosid bezeichnet. Durch Einführung der Phosphatgruppe an der C5-Position der Ribose entsteht das Nucleotid (Abbildung 2.5-2).

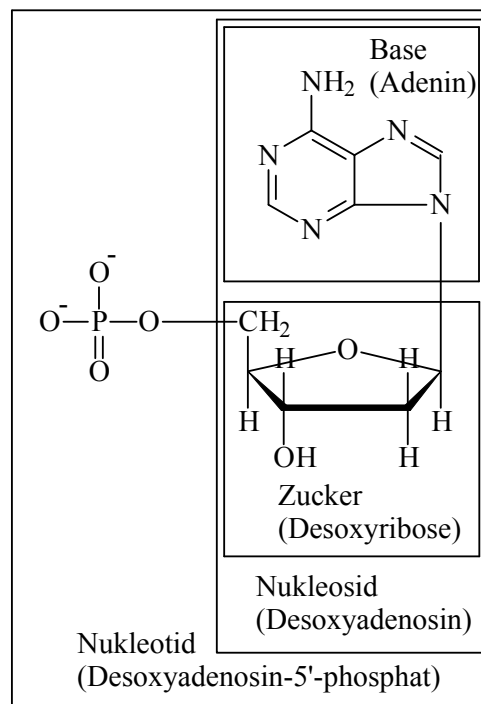


Abbildung 2.5-2. Monomer der Nucleinsäure Desoxyadenosin-monophosphat, bestehend aus Base, Zucker und Phosphatrest.

Die DNA ist im Zellkern lokalisiert und ist der Träger der Erbinformation. Sie besteht aus zwei gegenläufigen Polynukleotidsträngen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind und sich in einer Doppelhelix um eine gemeinsame Achse winden. Dieses Modell wurde 1953 von Francis Watson und James Crick veröffentlicht (Abbildung 2.5-3) [Watson 1953]. Sie erhielten im Jahre 1962 zusammen mit Maurice Wilkins für ihre "Entdeckung über die Molekularstruktur der Nucleinsäuren und ihre Bedeutung für die Informationsübertragung in lebender Substanz" den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

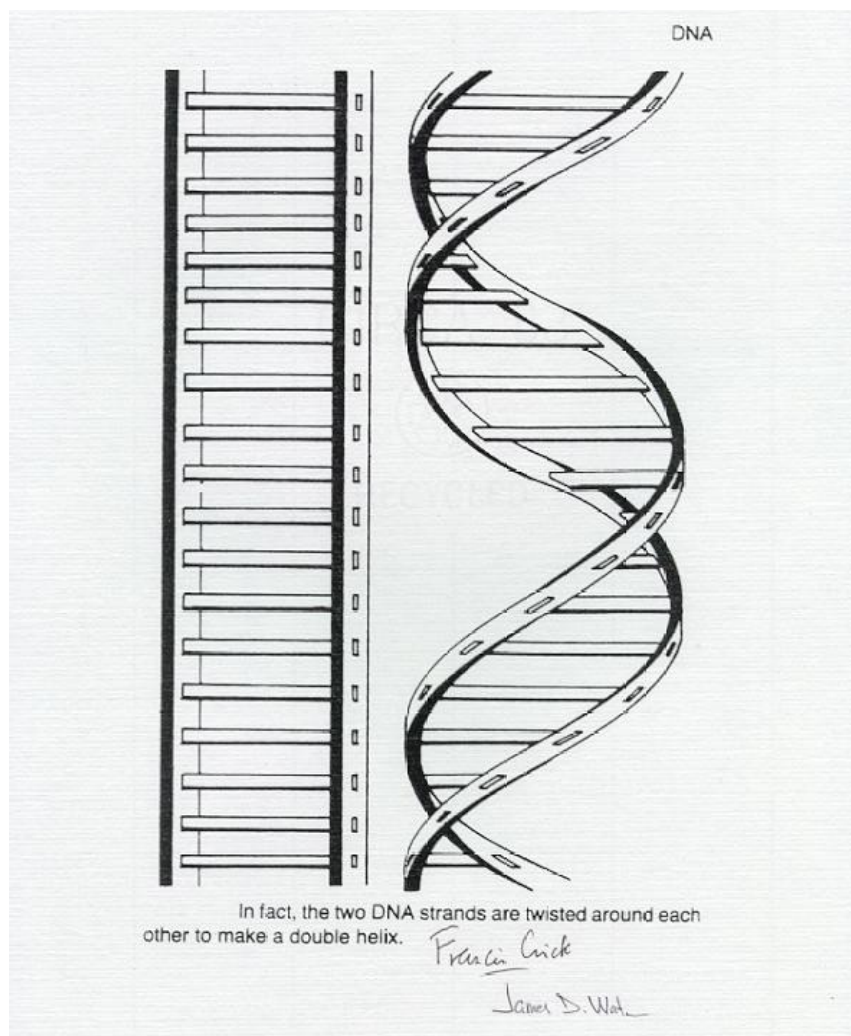


Abbildung 2.5-3. Kopie einer Originalzeichnung von Watson und Crick, die das Modell der DNS-Doppelhelix 1953 der Öffentlichkeit vorstellten.

In der DNS-Doppelhelix koordiniert Adenin über zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausschließlich an Thymin, Cytosin bildet drei Wasserstoffbrückenbindungen zu Guanin aus (Abbildung 2.5-4). Diese Anordnung erklärt die Chargaff-Regel [Chargaff 1951],

nach der immer gleich viel Adenin und Thymin, sowie Cytosin und Guanin in einer doppelsträngigen DNA auftreten.

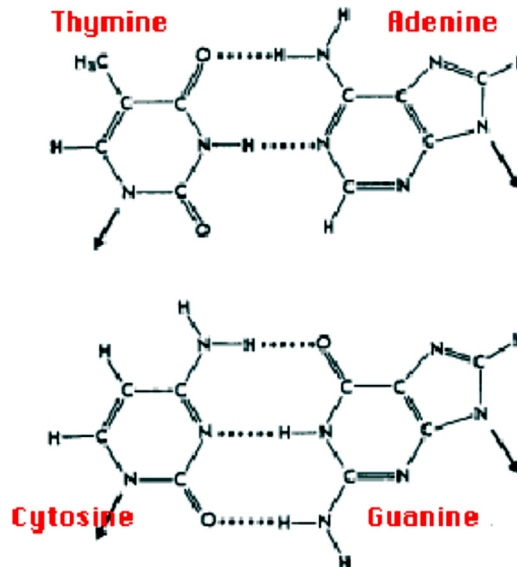


Abbildung 2.5-4. Darstellung der Basenpaarungen in doppelsträngiger DNA.

Die RNA trägt Informationen aus dem Zellkern an den Ort der Protein-Biosynthese (mRNA) oder dient dem Transport von Aminosäuren (tRNA). Bei Viren kann sie auch als Träger der Erbinformation dienen (Retro-Viren). Sie liegt als Einzelstrang vor, kann aber, ebenso wie einzelsträngige DNA, mit sich selbst hybridisieren. Im Gegensatz zu der intermolekularen Basenpaarung in einem DNA-Doppelstrang handelt es sich hierbei um einen intramolekularen Vorgang, der zur Ausbildung von Haarnadelschleifen, sog. Hairpins, führen kann (Abbildung 2.5-5). Der Teil, der hybridisiert, wird als Stamm bezeichnet [Saenger 1984].

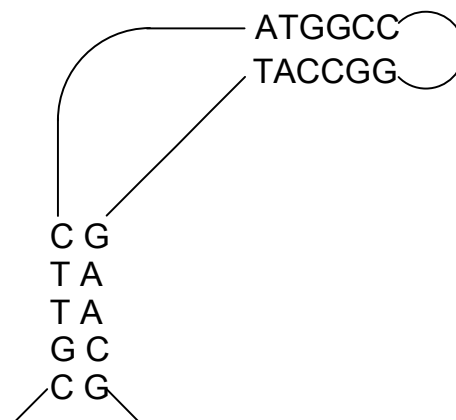


Abbildung 2.5-5. Schematischer Ausschnitt einer einzelsträngigen DNA mit Ausbildung von Haarnadelstrukturen

2.5.2. Denaturierung, Renaturierung und Hybridisierung

Die Wechselwirkung zwischen den komplementären Basen, die die Sekundärstruktur der DNA bzw. RNA bestimmt, wird bei Temperaturerhöhung geschwächt, was zur Auflösung der helikalen Struktur führt. Dieser Prozess wird als Denaturierung bezeichnet. Die Rückbildung von Sekundärstrukturen bei langsamer Abkühlung wird Renaturierung genannt. Wird eine Sekundärstruktur zwischen verschiedenen Einzelsträngen ausgebildet, spricht man von Hybridisierung.

Der Übergang von der renaturierten oder hybridisierten in die denaturierte Form geht mit der Veränderung der physikalischen Eigenschaften einher, z.B. nehmen Viskosität und UV-Absorption (Hypochromizität) zu. Die Denaturierung unterliegt einem kooperativen Effekt. Das bedeutet, dass bei Schwächung oder Auflösung eines Teils der Struktur die noch erhaltene Struktur stark destabilisiert wird. Die Denaturierung findet in einem engen Temperaturintervall von wenigen Grad Celsius statt (Abbildung 2.5-6):

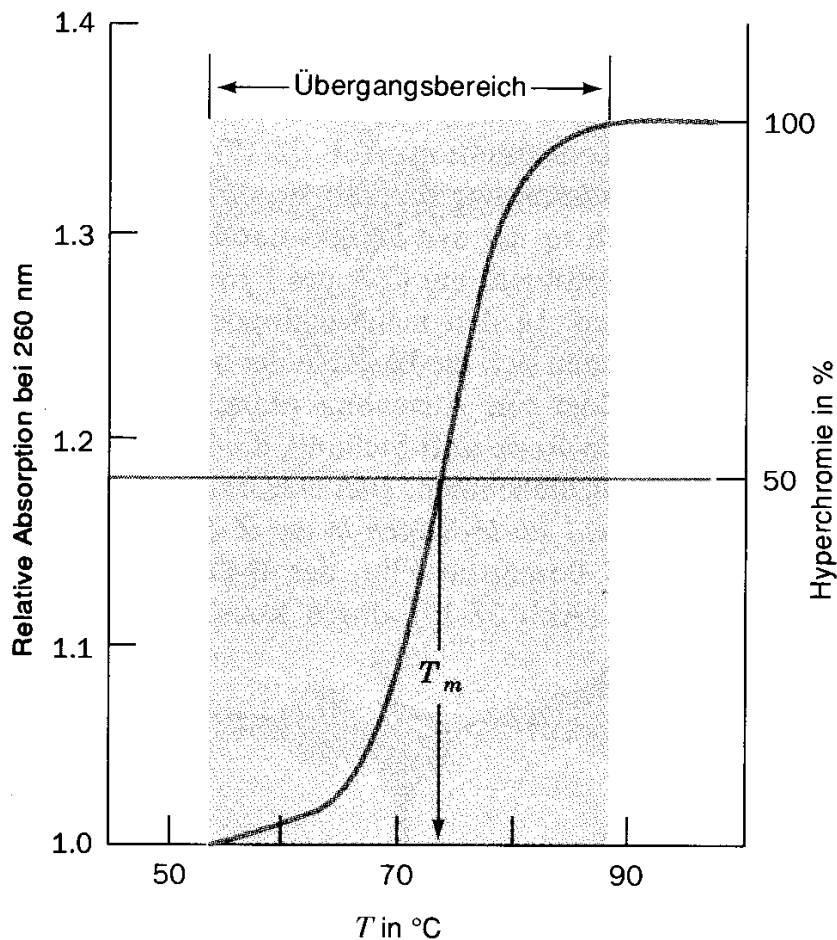


Abbildung 2.5-6. Beispiel einer DNA-Schmelzkurve.

Der Gehalt an doppelsträngiger DNA wird über die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Temperatur, bei der die Hälfte der Nukleinsäuren denaturiert ist, wird Schmelztemperatur genannt. Sie ist nicht nur von der Sequenz abhängig, sondern auch von Faktoren wie der Art und Konzentration anwesender Salze, des Lösungsmittels und der Nukleinsäurekonzentration selbst.

Organische Lösungsmittel, wie z.B. Formamid oder Acetonitril, destabilisieren die Wechselwirkung der Nukleobasen untereinander und senken die Schmelztemperatur. Kationen stabilisieren das nach außen gewandte Zucker-Phosphat-Rückgrat des Nukleinsäure-Polyanions und erhöhen damit die Schmelztemperatur des Hybrids. Im Allgemeinen nimmt die Stabilisierung bis zu einer Konzentration von 50 mM Na⁺/ K⁺ und 15 mM Mg²⁺ zu.

Zur Berechnung des Schmelzpunktes gibt es verschiedene empirische Formeln. Für die Denaturierung langer DNA- oder RNA-Fragmente gilt für einen großen Konzentrationsbereich mono- oder bivalenter Kationen Gleichung 2.5-1:

$$t_s = 81,5 + 16,6 \cdot \log_{10} \left[\frac{(\text{Salz})}{1,0 + 0,7 \cdot (\text{Salz})} \right] + 0,41 \cdot (\%GC) - \frac{500}{L} \quad \text{Gleichung 2.5-1}$$

mit:

t_s = Schmelztemperatur in °C

(Salz) = (K⁺) + (Mg²⁺)^{0,5}

(%GC) = Prozentualer Anteil der Guanin-Cytosin Basenpaare

L = Länge der Nukleinsäure

Um den Schmelzpunkt der Hybridisierung eines kurzen Oligonukleotids zu berechnen, wird eine Formel verwendet, welche die thermodynamischen Daten des Oligonukleotids und seiner Nachbarn, sowie die Abhängigkeit der Schmelztemperatur von der Nukleotidkonzentration berücksichtigt (Tabelle 2.5-1, Gleichung 2.5-2) [Breslauer 1986] [Quartin 1989]:

$$t_s = \frac{T^\circ \Delta H^\circ}{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ + RT \ln(C)} + 16,6 \cdot \log_{10} \left[\frac{(\text{Salz})}{1,0 + 0,7 \cdot (\text{Salz})} \right] - 269,3 \quad \text{Gleichung 2.5-2}$$

mit:

$$\Delta H^\circ = \sum_{nm} (N_{nm} \cdot \Delta H_{nm}) + \Delta H_e$$

$$\Delta G^\circ = \sum_{nm} (N_{nm} \cdot \Delta G_{nm}) + \Delta G_e + \Delta G_i$$

$$T^\circ = 298,2 \text{ K}$$

$$R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$$

Die Indizes i und e beziehen sich auf die Beiträge, die durch die nichtbindenden Enden hervorgerufen werden. Es handelt sich um Durchschnittswerte ($\Delta G^\circ = +2 \text{ kcal/mol}$; $\Delta H_e = -5 \text{ kcal/mol}$; $\Delta G_e = -1 \text{ kcal/mol}$).

Der Index nm bezieht sich auf zwei benachbarte Basen, deren thermodynamische Daten der Tabelle 2.5.1 entnommen werden können:

Tabelle 2.5-1: Thermodynamische Daten der Wechselwirkung benachbarter Basen.

Benachbarte Basen	AA	AT	TA	CA	GT	CT	GA	CG	GC	GG
	TT			TG	AC	AG	TC			CC
$-\Delta H^\circ_{nm}$ (kcal/mol)	9,1	8,6	6,0	5,8	6,5	7,8	5,6	11,9	11,1	11,0
$-\Delta G^\circ_{nm}$ (kcal/mol)	1,55	1,25	0,85	1,15	1,40	1,45	1,15	3,05	2,70	2,30

3. Material und Methoden

3.1. Material und Chemikalien

Es wurden nur Chemikalien mit p.a. Qualität verwendet. Die Lösungsmittel für die HPLC-Anlage, Acetonitril und Methanol, wurden von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen. Die wässrigen Puffer und Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Der Mops-Puffer (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure; Kupfersalzanteil < 0,0005 %) wurde bei Sigma Aldrich gekauft. Davon wurde eine 10 mM Lösung hergestellt und mit Natronlauge (0,1M; 0,0001 % Cu) von Sigma Aldrich auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Der PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline von Sigma Aldrich; pH 7,4) wurde zu 10 mM in Wasser hergestellt (enthält 130 mM Natriumchlorid und 2,7 mM Kaliumchlorid). Die Metallsalze für die Lösungsversuche (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) wurden als Sulfate ebenfalls bei Sigma Aldrich erworben sowie die 0,1 M Fluorwasserstoffsäure.

Für die Oberflächenpräparation wurden folgende Chemikalien verwendet:

- Biotin-modifiziertes fetales Rinder Albumin Serum (Biotin-BSA) (Sigma-Aldrich)
- fetales Rinder Albumin Serum (BSA) (Fluka, Neu-Ulm)
- rekombinantes Streptavidin (Roche Diagnostics, Mannheim)

Als Glasoberfläche dienten spezielle Kammerdeckgläser der Firma Labtek, die aus einem Deckglas mit einem Kunststoffaufbau aus acht Kammern zu je ~500 μ L bestehen. Sie wurden bei der Firma Nunc in Wiesbaden bestellt.

Die verwendeten Farbstoffe wurden von folgenden Quellen bezogen:

- Cy5 (als mono NHS-Ester; Amersham Biosciences)
 - Atto620, 635, 647, 655, 680, und 700 (als MonoNHS-Ester von Atto-Tec; Siegen)
 - TMR (Molecular Probes)
-

3.2. Sonde zur Kupfer(II)-detektion

In dieser Arbeit wurde Sonde bestehend aus einem DNS-Doppelstrang verwendet. Ein Strang wurde mit dem Bipyridinderivat 4,4'-Dicarboxy-2,2'-Bipyridin an das 5' Ende eines Oligonukleotidstrangs modifiziert (Strang 2). Der Strang 2 wurde an Festphase (CPG-Support) gekoppelt bestellt und von der AG Krämer mit dem Ligand dcbpy verknüpft, vgl. auch [Kiel 2007b]. Strang 1 wurde gebrauchsbereit am 5'-Ende über eine Hexaethylenglycoleinheit (HEGL, Abbildung 3.2-1) biotinmarkiert und am 3'-Ende TMR- markiert bestellt, beziehungsweise die Aminfunktion zum Koppeln von Farbstoffen verwendet. Die Kopplung erfolgte nach dem Standardverfahren mit den NHS-Estern der Farbstoffe, wie von der Firma Atto-Tec angegeben. Die Proben wurden zwar bereits HPLC (Hochdruck Flüssigchromatographie) gereinigt erhalten, mussten aber von Zusätzen zur Stabilisierung der Oligonukleotide wie z.B. EDTA befreit werden und wurden deshalb nochmals durch HPLC aufgereinigt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma IBA (Göttingen) bzw. der AG Krämer bezogen und haben folgende Sequenzen:

Strang 1 (Komplementärstrang von der Firma IBA bezogen):

Biotin(HEGL) - 5' C CCG CGC TTG CTT TGC GTT TTT 3'-TMR

Biotin(HEGL) - 5' C CCG CGC TTG CTT TGC GTT TTT 3'-NH₂

Strang 2, Oligonukleotid mit dcbpy modifiziert (AK Krämer):

dcbpy - 5' AAA AAC GCA AAG CAA GCG CGG G 3'

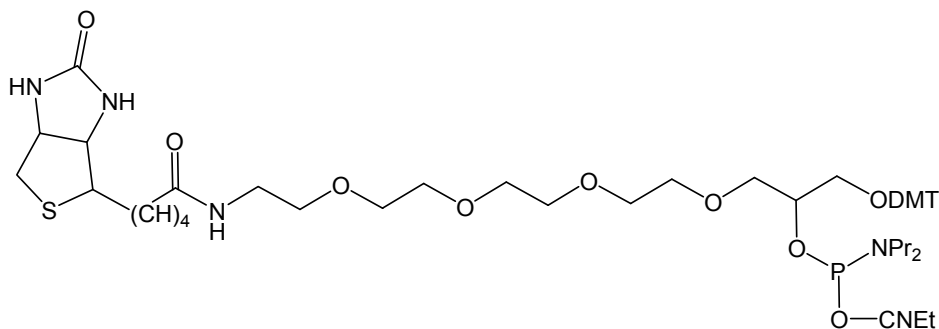


Abbildung 3.2-1. Struktur des Biotinankers der an Oligonukleotide gekoppelt werden kann.

3.3. Immobilisierung Biotin- markierter Sonden auf Glasoberflächen

Als Glasoberfläche dienen Kammerdeckgläser der Firma Labtek, die aus acht Kammern zu je 500 μL Inhalt bestehen. Um die Oberfläche von Verunreinigungen zu befreien, werden 200 μL einer 0,1 M Flusssäurelösung in jede Kammer gegeben und drei Minuten inkubiert. Anschließend wäscht man die Oberfläche dreimal mit je 400 μL 10 mM PBS-Puffer (pH 7,4) von Säure frei. Danach werden 300 μL einer in einem Vorexperiment optimierten Mischung aus BSA und Biotin-BSA in PBS-Puffer zugegeben (siehe unten). Nach zwei Stunden wird die Oberfläche dreimal mit PBS-Puffer gewaschen.

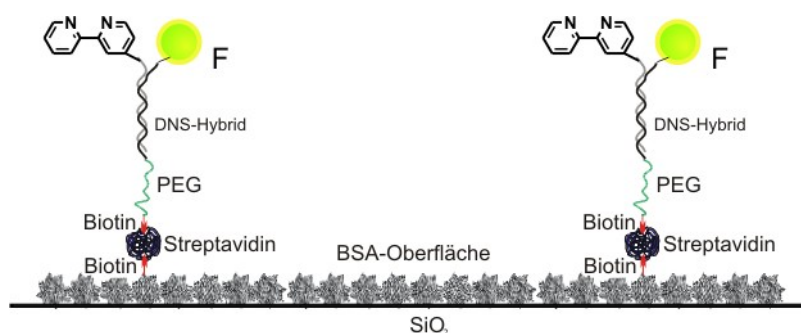


Abbildung 3.3-1. Schematische Darstellung der spezifischen Bindung von DNA-Proben an Glasoberflächen

Auf die nun BSA-geschützte und biotindotierte Oberfläche gibt man pro Kammer 200 μl einer verdünnten Lösung rekombinanten Streptavidin (1 mg in 2 ml PBS, 10 mM). Nach 20 Minuten wird die Streptavidin-Lösung entfernt und die Oberfläche fünfmal mit PBS-Puffer gewaschen. Nun können Biotin-markierte DNS-Proben, wie in Abbildung 3.3-1 schematisch dargestellt, in definierter Weise angebunden werden. Dazu wird die zu immobilisierende Probe auf 10^{-10} Mol/L verdünnt, 200 μL auf die Oberfläche gegeben und mit einer Pipette vermischt. Anschließend wird mit dem Fluoreszenzmikroskop die Oberfläche mittels Rasterverfahren abgebildet und die Belegungsichte ermittelt. Die Konzentration der Probe in der Kammer wird durch schrittweise Zugabe von 50 μl eines $5 \cdot 10^{-10}$ M biotinylierten DNS-Farbstoff-Konjugats so angepasst, dass die gewünschte Belegungsichte erreicht wird. Aus der zugegebenen Menge wird die gerade ausreichende Konzentration der Probe bestimmt.

Optimierung des Mischungsverhältnisses zwischen BSA und Biotin-BSA

Es werden zwei Lösungen vorbereitet, eine enthält 40 mg BSA in 10 mL PBS-Puffer und die andere 1 mg Biotin-BSA in 2,5 ml PBS-Puffer. Die beiden Lösungen werden in verschiedenen Verhältnissen gemischt, indem man 200 µL der BSA- Lösung mit 10, 20, 50 und 100 µL der Biotin-BSA Lösung versetzt. Anschließend wurden Oberflächen nach dem oben vorgestellten Protokoll mit den entsprechenden Mischungen BSA/Biotin-BSA erstellt. Nach Zugabe von 30 µL einer Biotin und Farbstoff markierten Probe (10^{-9} M) wird die Belegungsdichte der verschiedenen Oberflächen bestimmt, woraus sich das optimale Mischungsverhältnis zwischen der BSA und Biotin-BSA Lösung ableitet. Von den Stammlösungen werden Aliquote zu 300 µL mit dem so bestimmten, optimalen Mischungsverhältnis abgefüllt.

3.4. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Zur Aufreinigung von Oligonukleotiden wurde eine HPLC-Anlage der Firma Agilent (Waldbronn) Serie 1100 verwendet, die für analytische Stoffmengen bis etwa 5 nmol geeignet ist. Sie besteht aus dem Entgaser G1322A, der binären Pumpe G1312A, dem Diodenarraydetektor G1315A sowie dem Fluoreszenzdetektor G1321A. Die Trennung erfolgte auf einer Reversed-phase-Säule der Länge 250 mm mit Innendurchmesser 4 mm der Firma Knauer (Berlin). Als Säulenmaterial diente ODS-Hypersil der Korngröße 5 µm. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus 0,1 M Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA) in Wasser und Acetonitril verwendet. Laufmittel A besteht aus 0,1 M Triethylammoniumacetat in Wasser mit einem pH-Wert von 7, Laufmittel B besteht aus 0,1 M Triethylammoniumacetatlösung mit 75 Volumenprozent Acetonitril mit einem pH-Wert von ebenfalls 7. Das Verhältnis Acetonitril/Wasser wird durch die Anlage durch Mischung entsprechender Mengen der Laufmittel A und B eingestellt und durch einen linearen Gradienten mit der Zeit variiert. Die UV-Detektion der Oligonukleotide erfolgte bei 260 nm sowie der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Farbstoffes. Die Fluoreszenz wurde etwas unterhalb des Absorptionsmaximums des Farbstoffs angeregt, um eine Überlappung der Wellenlängen von eingestrahlttem und emittiertem Licht zu vermeiden.

3.5. Fluoreszenz- und Absorptionsspektrometer

Alle UV/Vis-Absorptionsspektren wurden auf einem „Carey 500 Scan“ Spektrometer der Firma Varian (Darmstadt) aufgenommen und die Proben in Quarzglas-Halbmikroküvetten (Suprasil) von Hellma (Müllheim) gemessen. Die Emissionsspektren wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse 500 der Firma Varian (Darmstadt) in Quarzglas-Halbmikroküvetten (Suprasil, Hellma, Müllheim) aufgenommen. Als Anregungslichtquelle diente eine Xenon-Blitzlampe. Zur Aufnahme eines Messpunktes blitzt die Xenon-Lampe nur kurz auf. Lichtempfindliche Proben werden dadurch vor kontinuierlicher Strahlung geschützt. Die Spektren werden bis in einen Wellenlängenbereich von 850 nm automatisch korrigiert.

Die Thermostatisierung wurde mit einem Umlaufthermostaten realisiert. Die Temperatur wurde mit einem Thermometer in einer Vergleichsküvette neben der eigentlichen Messküvette gemessen.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer wurde das FluoTime 100 (PicoQuant, Berlin) verwendet. Als Anregungslichtquelle können wahlweise gepulste „Sub-nanoLEDS“ (PicoQuant, Berlin) der Wellenlängen 370, 450, 500 nm bzw. 600 nm mit einer Pulsdauer von 300 ps und einer Repititionsrate von maximal 80 MHz verwendet werden. Die Detektion erfolgt durch eine integrierte Photoelektronen-Vervielfacher-Röhre (PMT) zusammen mit einer zeitkorrelierten Einzelphotonenzählkarte (TCSPC, TimeHarp 200, PicoQuant, Berlin). Die Auswertung erfolgt mit dem Programm FluoFit (PicoQuant, Berlin).

3.5.1. Löschexperimente mit Kupfer(II) via Fluoreszenzintensität

Die Sonden wurden zu 0,5 μM in 10 mM Mops gelöst und von dieser Lösung 60 μL in eine Fluoreszenzküvette gegeben. Eine 100 μM Kupfersulfatlösung (10 mM Mops pH 7) wurde in 2-5 μL Schritten zugegeben und jeweils durch wiederholtes Aufsaugen und Zugeben mit einer 100 μL -Pipette die vollständige Durchmischung sichergestellt. Nach jeder Zugabe von CuSO_4 wurde ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen und die Intensitäten in die Stern-Volmer Darstellung übertragen.

3.5.2. Löschexperimente via Quantenausbeute

Die Quantenausbeute der Sonde bei einer bestimmten Metall(II)-konzentration wurde anhand einer Konzentrationsreihe bestimmt. Dazu bestimmt man Absorption und Emission bei verschiedenen Konzentrationen der Sonde und gleicher Metall(II)-konzentration. Um eine Konzentrationsreihe zu erstellen, setzt man zunächst 500 μL einer Pufferlösung entsprechender Metall(II)konzentration an. Daraus werden zwei Proben zu je 100 μL entnommen: Zur ersten Lösung gibt man noch 30 μL Metallionen-freie Pufferlösung, zu zweiten werden 30 μL einer Lösung gegeben, die die Sonde zu 10^{-5} M enthält. Beide Lösungen wurden gut vermischt und für zwei Stunden die Gleichgewichtseinstellung abgewartet. Durch schrittweise Zugabe der die Sonde enthaltenden Lösung zu der Metallsalzlösung wird die Konzentration an Sonde langsam erhöht, während die Metallionenkonzentration konstant bleibt.

Von der ersten Lösung, die keine Sonde enthält, wurden 60 μL in eine Küvette gegeben und die Instrumentenfunktion des UV/Vis-Spektrometers aufgenommen. Danach wurden 20 μL der zweiten Lösung (Sonde) zugegeben, die Lösungen mit einer 100 μL -Pipette vermischt und ein Absorptions- sowie ein Emissionsspektrum aufgenommen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und somit eine Konzentrationsreihe aufgenommen. Durch Auftragen der Absorption am Absorptionsmaximum des Farbstoffs gegen die Emission wird eine Gerade erhalten, die durch den Ursprung geht und deren Steigung ein Maß für die Quantenausbeute darstellt. Diese Prozedur wurde zum Erstellen eines Stern-Volmer Graphen für jede gewünschte Metallsalzkonzentration, beispielsweise bei 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 μM , durchgeführt. Durch Messung eines Referenzfarbstoffs kann die Quantenausbeute der Probe bei der entsprechenden Metall(II)konzentration mit Hilfe von Gleichung 3.5-1 bestimmt werden.

$$\Phi_X = \Phi_{St} \cdot \left(\frac{Grad_X}{Grad_{St}} \right) \left(\frac{\eta_X^2}{\eta_{St}^2} \right) \quad \text{Gleichung 3.5-1}$$

Wenn, wie in dieser Arbeit, die Absorption der Probe von der Konzentration der Löschmoleküle unabhängig ist, dann ist die Quantenausbeute der Fluoreszenzintensität proportional. In der Stern-Volmer Darstellung kann dann Φ_0/Φ gegen die Metallionenkonzentration aufgetragen.

3.6. Aufbau der Einzelmolekülspektroskopieanlage

Die Anlage zur Messung von spektral aufgelöster Fluoreszenz – Fluoreszenzlebensdauer – Images einzelner Moleküle mit rotierender Polarisation auf Oberflächen wird in Abbildung 3.6-1 gezeigt.

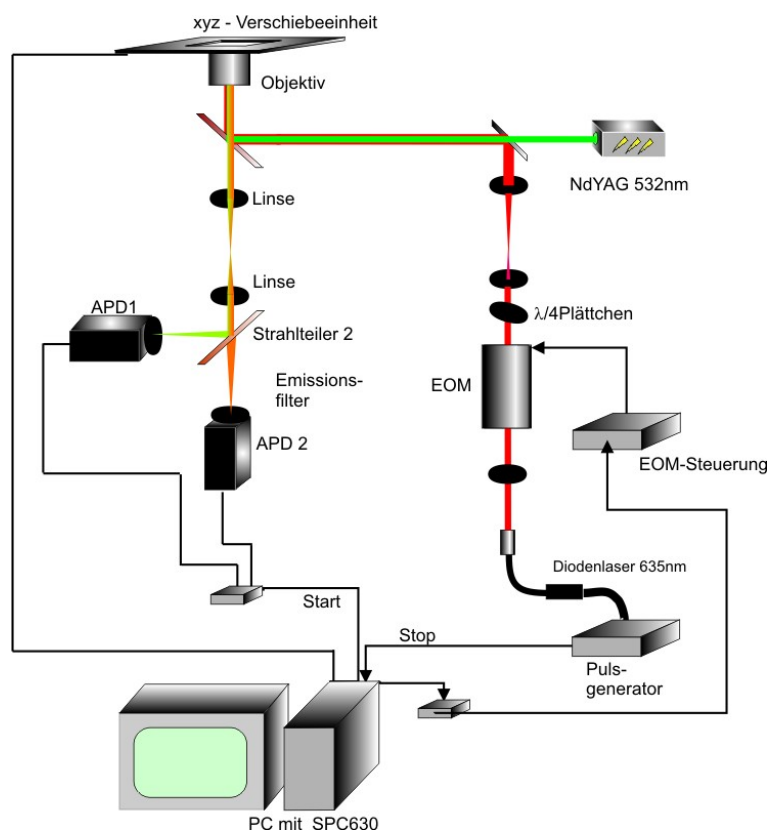


Abbildung 3.6-1. Schematischer Aufbau eines Einzelmolekülmikroskops ausgestattet mit zwei Lasern zur Anregung bei 635 nm und 532 nm und zwei Detektionskanäle, die mit dichroitischen, halbdurchlässigen oder polarisierenden Strahlteiler getrennt werden können. Die xyz-Verschiebeeinheit ermöglicht die Rasteraufnahme von Oberflächen.

Sie besteht aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 100TV, Zeiss), das mit einem Piezo-Tisch der Firma PhysikInstrumente (Karlsruhe, Deutschland) zur Änderung der x-y-z Position ausgestattet wurde. Die Bewegung des Tisches kann durch eine Kontrolleinheit E300 (PhysikInstrumente, Karlsruhe, Deutschland) kontrolliert werden. Die Abbildung von Oberflächen wird mittels Zeilenrasterverfahrens durchgeführt und erlaubt die Darstellung eines Bereiches von 100 x 100 μm . Als Anregungsquellen dient ein gepulster Diodenlaser der Wellenlänge 635 nm und einer Repetitionsrate von 40 MHz (PDL 800-B, PicoQuant, Berlin). Das Licht des Diodenlasers wird in eine Glasfaser eingekoppelt, um

ein gaussähnliches Strahlprofil zu bekommen. Die Polarisation des Laserstrahls wird durch einen Polarisationsfilter senkrecht zur Arbeitsfläche eingestellt und kann durch einen elektrooptischen Modulator (EOM, LM0202, Linos Photophysics GmbH, Göttingen) moduliert werden und elliptisch polarisiertes Licht erzeugt wird. Nach Durchgang durch ein $\lambda/4$ – Plättchen (Alphas GmbH, Göttingen) wird wieder ein linear polarisierter Strahl erhalten. Die Polarisationssebene des Lichts kann somit durch den EOM kontrolliert werden. Danach wird das Licht durch eine Linse aufgeweitet, bevor es in das Mikroskop eingekoppelt wird. Alternativ kann auch ein frequenzverdoppelter Nd:YAG (Laser2000), ein diodengepumpter Kristalllaser der Wellenlänge 532 nm, genutzt werden. Die Laserstrahlen werden über einen Strahlteiler (532/635 nm) (Abbildung 3.6-1) in das Mikroskopobjektiv (100x, NA = 1.4, Olympus, Tokyo) gelenkt und auf die Probe fokussiert.

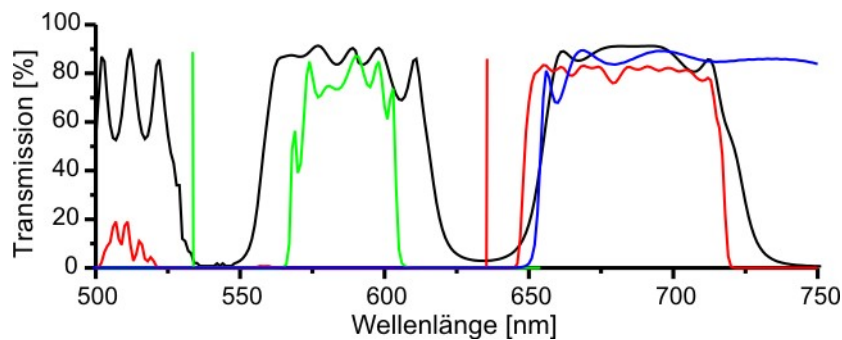


Abbildung 3.6-2. Transmission der verwendeten dichroitischen Strahlteiler (schwarz) Filter (rot und grün) und Strahlteiler der Detektion (blau).

Das Fluoreszenzlicht wird mit demselben Objektiv gesammelt und durch den Strahlteiler vom Anregungslicht getrennt. Durch einen zweiten dichroitischen Strahlteiler (650DCXR, AHF Analystechnik) kann es spektral aufgetrennt und auf zwei Lawinenphotodetektoren (AQR-14; EG&G Optoelectronics) fokussiert werden, die mit entsprechenden Detektionsfiltern ausgestattet sind: 680HQ65 und 650CLFP (Omega Optics, Brattleboro, VT) für den langwelligen Detektor und 575-600 nm (Omega Optics, Brattleboro, VT) für den kurzwelligen Detektor (Abbildung 3.6-2). Alternativ kann die Fluoreszenz durch einen polarisierenden Strahlteiler in die entsprechenden Polarisationsanteile zerlegt und mit den beiden Detektoren aufgezeichnet werden. Kann das emittierende Molekül frei rotieren, so wird, da die Rotation viel schneller erfolgt als die Fluoreszenz, die Polarisationssebene der Emission stochastisch verteilt sein und beide Detektoren gleiche Intensität registrieren. Bei verhinderter Rotation wird eine bestimmte

Polarisationsrichtung ausgestrahlt und ein von 1:1 abweichendes Verhältnis zwischen horizontalen und vertikalen Polarisationsanteilen detektiert.

Das Detektorsignal wird von einer zeitauflösenden Einzelphotonenzählkarte (TCSPC) (SPC-630; Becker & Hickl, Berlin) zusammen mit dem Pulssignal des Lasers weiterverarbeitet. Um die Verzögerung zwischen der Detektorpulsverarbeitung und dem Laserpuls zu kompensieren ist eine Verzögerungseinheit (DG535, Stanford research systems, Bell electronics, Renton, Washington) zwischen den Detektoren und der TCSPC-Karte zwischengeschaltet. Die Daten werden im FIFO- Modus der SPC630-Karte aufgenommen, d.h. jedes Photon wird mit seiner absoluten Ankunftszeit, also der Zeitdifferenz zwischen dem Start der Messung und der Ankunft des Photons, und der mikroskopischen Zeit, der Zeit zwischen dem Laserpuls und der Fluoreszenz, gespeichert. Die Karte arbeitet im reversen Modus, d.h. das Detektorsignal startet den Zeitnehmer für die mikroskopische Zeit und der Triggerpuls vom darauf folgenden Laserpuls stoppt ihn wieder. Durch Polarisationsmodulation mittels EOM kann die Polarisation des Anregungsstrahls beim Scannen in X – Richtung von Pixel zu Pixel um einen frei wählbaren Betrag geändert werden. Um den Start jeder Zeile mit der Datenaufnahme und der Modulation zu koordinieren, wird ein I/O connector block (SCB-68, National Instruments, Austin, Texas) verwendet.

Die Analysesoftware erlaubt die Bestimmung der Fluoreszenzintensität aus Kanal 1 und Kanal 2 sowie der Gesamtintensität, der spektralen Verteilung (F_2 – Wert), der aus dem Verhältnis der Intensität aus Kanal 1 zur Gesamtintensität berechnet wird, sowie der Fluoreszenzlebensdauer aus Kanal 1 und 2 sowie aus beiden Kanälen zusammen. Die Fluoreszenzlebensdauer wird über einen monoexponentiellen Fitt der maximalen Wahrscheinlichkeit bestimmt. Der MLE (maximum likelihood estimator) wird über Gleichung 3.6-1 bestimmt [Soper 1994], [Tellinghuisen 1993].

$$1 + \left(e^{T/\tau} - 1 \right)^{-1} - m \left(e^{mT/\tau} - 1 \right)^{-1} = N^{-1} \sum_{i=1}^m i N_i \quad \text{Gleichung 3.6-1}$$

T	Zeitauflösung der Mikrozeit
m	Zahl der Zeitintervalle (hier 64)
N	Zahl der Photonen
N_i	Zahl der Photonen im Zeitintervall i

Für diese Analyse werden die Photonen aus allen Bildpunkten genommen, die einem einzelnen Molekül zugeordnet werden können. Bei Anregung mit dem Nd:YAG-Laser(cw) ist die Analyse der Fluoreszenzlebensdauer deshalb nicht möglich, da kein Puls generiert wird, sondern mit konstanter Laseremission gearbeitet wird.

3.6.1. Methoden zur Analyse zeitlicher Fluktuationen der Fluoreszenz von Einzelmolekülfarbstoffen

Autokorrelation:

Zeitlich fluktuierende Signalintensitäten $F(t)$ können mittels einer mathematischen Methode auf deren Gesetzmäßigkeiten untersucht werden. Dazu werden die Intensitäten zum Zeitpunkt t mit den Intensitäten im Zeitabstand τ multipliziert und durch das Quadrat der Intensität zum Zeitpunkt t normiert:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad \text{Gleichung 3.6-2}$$

Dies wird für jeden Datenpunkt durchgeführt und das Ergebnis $G(\tau)$ gegen τ aufgetragen. Erfolgen die Intensitätsfluktuationen total zufällig, so wird $G(\tau)$ um den Wert Eins herum schwanken, es gibt also keine Korrelation [Jung 2002]. Folgen die Intensitätsschwankungen einer bestimmten kinetischen Gesetzmäßigkeit, so werden für bestimmte τ eine Korrelation $G(\tau)$ von > 1 erhalten. Eine Anwendung findet die Autokorrelation in der Fluoreszenz- Korrelations- Spektroskopie (FCS), mit deren Hilfe die Diffusion von Farbstoffmolekülen in Lösung sowie deren Triplettlebensdauer untersucht werden kann [Elson 1974], [Widengren 1995]. Es können aber auch andere Reaktionen der Farbstoffe, wie Protonierung [Haupts 1998] und Isomerisierung [Widengren 2000] erkannt werden. Sehr schnelle Dynamiken wie z.B. die Rotation von Farbstoffen können, aufgrund der Fluktuationen, die aus der relativen Orientierung des Dipolmoments bezüglich des anregenden Laserstrahls resultieren, untersucht werden [Mets 2001]. Die solchen Prozessen zugrunde liegende Kinetik kann durch Anpassen einer geeigneten Modellfunktion an die Korrelationskurven erhalten werden. Das Model zur Bestimmung der Diffusion resultiert aus der Annahme eines Zylinderförmigen Anregungsvolumens mit gaussförmigen Anregungsprofil und der Diffusionsparameter aus

Lösungsmittelviskosität. Die Modellfunktion für eine Farbstoffspezies und freier dreidimensionaler Diffusion wird in Gleichung 3.6-3 wiedergegeben.

$$G(t) = G(0) \frac{1}{(1 + (t/\tau_D))(1 + k^2(t/\tau_D))^{1/2}} + G(\infty) \quad \text{Gleichung 3.6-3}$$

mit $k = w_{xy}/w_z$

und $\tau_D =$ Diffusionszeit

$$\text{Diffusionskoeffizient: } D = \frac{w_{xy}^2}{4\tau_D}$$

Prozesse, die einem einfachen An-/Aus-Mechanismus folgen hängen nicht vom Profil des Anregungs- oder Detektionsvolumens (w_{xy} , w_z) ab. Es ergibt sich eine einfache exponentielle Abhängigkeit für die Korrelationsfunktion.

$$G(t) = A \exp\left(-\frac{t}{\tau_c}\right) \quad \text{Gleichung 3.6-4}$$

In logarithmischer Darstellung erkennt man die Korrelationszeit τ_c am Umkehrpunkt des Graphen. In Abbildung 3.6-3 sind zwei simulierte Korrelationskurven nach Gleichung 3.6-4 gezeigt. Die durchgezogene Linie zeigt ein System mit zwei verschiedenen exponentiellen Komponenten und die gestrichelte Linie zeigt ein monoexponentielles Modell.

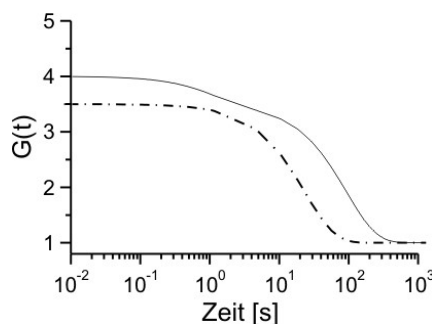


Abbildung 3.6-3. Modellierte Korrelationsfunktionen einer exponentiellen Beziehung (keine Diffusion). Mit $A = 3,5$ und $t = 40$ bei der monoexponentiellen Funktion (gestrichelte Linie) und $A_1 = 0,5$; $A_2 = 3,5$ und $t_1 = 10$ und $t_2 = 80s$ bei der durchgezogenen Linie

Das Reziprok der Korrelationszeit (Gleichung 3.6-5) entspricht der Summe der Reziproken An- und Aus-Zustandslebensdauern. Die Amplitude entspricht dem Verhältnis

der Lebensdauer der An- und Aus-Zustände (Gleichung 3.6-6), d.h. die Amplitude wird größer, wenn die Verweilzeit im Aus-Zustand länger ist [Jung 2002], [Tinnefeld 2001]].

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_{Aus}} + \frac{1}{\tau_{An}} \quad \text{Gleichung 3.6-5}$$

$$A \cong \frac{\tau_{Aus}}{\tau_{An}} \quad \text{Gleichung 3.6-6}$$

An-/Aus-Prozesse können von der Anregungsleistung abhängen, wie beispielsweise Triplet-Übergänge, die durch ein Drei-Zustandsmodell beschrieben werden können. Die Amplitude A erhöht sich mit steigender Anregungsleistung bis zu einem Sättigungspunkt. Typische Korrelationszeiten für Triplet-Übergänge liegen im Bereich von Mikrosekunden.

Grenzwertmethode:

Betrachtet man die Änderung der Fluoreszenzintensität mit der Zeit, so können Zustandsänderungen anhand von Fluktuationen der Intensität direkt erkannt werden. Sind die Intensitätsdifferenzen zwischen An- und Aus-Zustand groß genug, können die Zustandskinetiken durch Anlegen eines Grenzwerts ermittelt werden. Die Verweilzeiten im An- bzw. Aus-Zustand werden jeweils in ein Histogramm eingetragen. Die dem Prozess unterliegende Kinetik kann durch Anpassen eines geeigneten mathematischen Modells an das erhaltene Histogramm bestimmt werden. Diese Methode wurde in die Analysesoftware integriert und erstellt nach Einstellung der Parameter zur Zählrate des An- und Aus-Zustands werden automatisch anhand eines Grenzwerts die Verweilzeiten ermittelt und in ein Histogramm übertragen. Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Origin* wurde ein entsprechendes Modell an die Daten angepasst [Yip 1998].

Analyse von Fluktuierenden Signalintensitäten mittels Modellierung modulierter, Poisson-verteilter Markov- Prozesse (MMPP):

Die Aufnahme der Fluoreszenz einzelner Moleküle gleicht einem Strom von Photonen, wobei jedes mit seiner genauen Ankunftszeit registriert wird. Der Zustand in dem sich ein Molekül zu einem bestimmten Zeitpunkt befindet bleibt unsichtbar, kann aber indirekt anhand der Fluoreszenzeigenschaften erkannt werden. Die Aufgabe eines automatisierten

Algorithmus besteht darin, die wahrscheinlichste Abfolge der Zustände, die den beobachteten Ereignisstrom entspricht, zu bestimmen. Eine Möglichkeit besteht in der Auswertung der Daten mit dem Hidden-Markov Modell (HMM).

Ein Markov Prozess (nach dem russischen Mathematiker Andrei Andrejewitsch Markow) besteht aus einer Reihe von Zustandsänderungen (Markov Kette), die aus den entsprechenden Übergangswahrscheinlichkeiten resultieren. Aus einem Zustand kann ein Übergang in einen anderen Zustand erfolgen, oder aber es bleibt in seinem derzeitigen Zustand. Damit können vier Wahrscheinlichkeiten definiert werden: Der Wahrscheinlichkeit in einen anderen Zustand zu wechseln (a_{12} und a_{21}) oder im Zustand zu verbleiben (a_{11} und a_{22}). Diese Zustände sind nicht direkt sichtbar, können aber anhand eines zweiten Zufallsprozesses wie z.B. der Fluoreszenzeigenschaften identifiziert werden. Dieser zweite Prozess erzeugt zu jedem Zeitpunkt beobachtbare Ereignisse, deren Wahrscheinlichkeitsverteilung vom Zustand des Systems abhängt (z.B. die Wahrscheinlichkeit der Emission eines Photons). Mit dem Hidden-Markov Modell können Systeme beschrieben werden, deren Zustand nur vom unmittelbar vorangehenden Zustand abhängt (nicht aber von weiter zurückliegenden Ereignissen), und die beobachtete Fluoreszenz nur vom derzeitigen Zustand abhängt, d.h. diese Systeme erfüllen die Markov Eigenschaft [Scott 2004],[Yu 2006], [Beausang 2007].

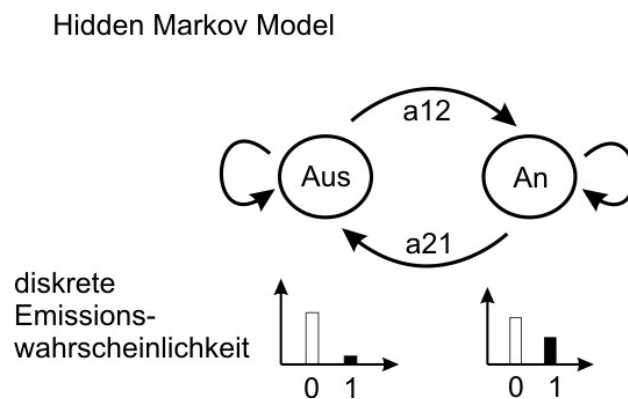


Abbildung 3.6-4. Hidden-Markov Modell am Beispiel eines einfachen Zwei-Zustandsmodell mit diskreten Wahrscheinlichkeiten zur Emission eines Photons aus einem bestimmten Zustand.

Zur Bestimmung der Reihe aufeinander folgender Zustände wird zunächst ein Modell zur Beschreibung der Daten angenommen, in diesem Fall ein einfaches Zwei-Zustandsmodell, bestehend aus einem An- sowie einem Aus-Zustand, wie in Abbildung 3.6-4 schematisch dargestellt. Im An-Zustand wird eine höhere Intensität registriert als im

Aus-Zustand. Die Aufgabe des Algorithmus besteht darin, aus der Sequenz der beobachteten Ereignisse, die wahrscheinlichste Sequenz der verborgenen Zustände zu bestimmen. Um dies zu bewerkstelligen, muss sowohl die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen den Zuständen als auch die Emissionswahrscheinlichkeit $b_j(y)$ bestimmt werden. Bei jeder Zeit t_s kann das System einen Zustandswechsel vollziehen. Gleichzeitig kann ein Photon detektiert werden oder aber auch nicht. Da die Zeitauflösung Δt_s kleiner ist, als die mittlere Zeit zwischen der Ankunft der Photonen, kann für die Detektion eines Photons eine Poisson-Verteilung mit dem Parameter λ_j für den Zustand j angenommen werden. Die Wahrscheinlichkeit $P_p = \lambda_j \Delta t_s$ ein Photon innerhalb eines bestimmten Zeitintervall Δt_s zu detektieren ist niedrig, aber höher für den An-Zustand. Dies bedeutet, dass in den meisten Zeitintervallen kein Photon registriert wird und Rechenzeit eingespart werden kann, wenn Zeitintervalle ohne Ereignis ausspart werden.

Deshalb wurde das Hidden-Markov Modell zur Verwendung mit der Fluoreszenzmikroskopie modifiziert. Statt der Fluoreszenzrate eines bestimmten Zeitintervalls ergibt nun die Zeitdifferenz zwischen zwei nacheinander detektierten Photonen die Sequenz der Beobachtungen. Eine hohe Fluoreszenzrate entspricht kurzen Zeitabständen zwischen detektierten Photonen.

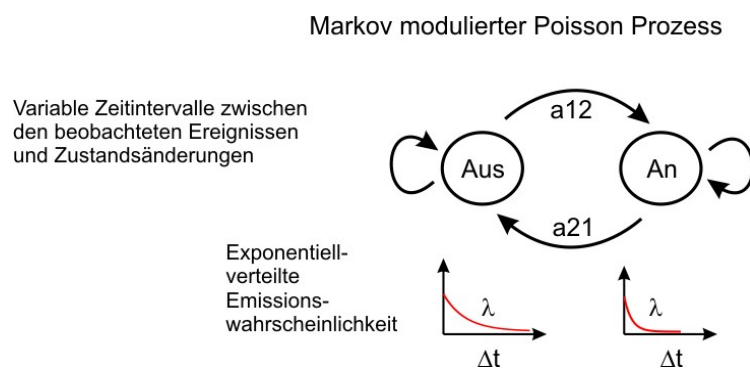


Abbildung 3.6-5. Modifiziertes Hidden-Markov Modell das eine exponentiell verteilte Emissionswahrscheinlichkeit zugrunde legt.

In dieser Arbeit wurde diese Methode auf ein Zwei-Zustandssystem angewendet und der jeweilige Zustand kann anhand der Zeitdifferenz zweier nacheinander detektierter Photonen erkannt werden [Burzykowski 2003]. Für den Markov-modulierten Poisson-Prozess (MMPP) folgt die Interphotonenzeit der exponentiellen Verteilung der Emissionswahrscheinlichkeit. Die Fluoreszenz ist ein stochastischer Prozess und die Emission eines Photons erfolgt demnach zufällig. Deshalb wird der Emissionswahrscheinlichkeit kein diskreter Wert zugeordnet, sondern eine Poisson-

Verteilung angenommen [Ryden 1996]. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Interphotonzeit b_j berechnet sich wie folgt:

$$b_j(\Delta t_s) = \begin{cases} \lambda \exp(-\lambda \Delta t_s) & \text{wenn } \Delta t_s \geq 0 \\ 0 & \Delta t_s < 0 \end{cases} \quad \text{Gleichung 3.6-7}$$

Diese Emissionswahrscheinlichkeitsverteilung ist für beide Zustände verschieden und wird durch den Parameter λ beschrieben, vgl. Abbildung 3.6-5. Für jedes aufgenommene Photon ergibt sich somit eine Wahrscheinlichkeit, dass es aus dem An- oder dem Aus-Zustand emittiert wurde. Anhand der Interphotonenzeit wird Photon für Photon eine Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der das Molekül zu dieser Zeit im selben Zustand geblieben ist oder einen Zustandswechsel vollzogen hat. Daraus wird die wahrscheinlichste Abfolge der versteckten Zustände, die Markov-Kette anhand des angenommenen Modells bestimmt. Der Algorithmus ermittelt im ersten Schritt die Emissionswahrscheinlichkeitsverteilungen der im Modell angenommenen Zustände. Danach wird die wahrscheinlichste Abfolge der Zustände sowie die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Zuständen bestimmt. Aus diesen Wahrscheinlichkeiten ergeben sich direkt die Geschwindigkeitskonstanten mit der das System zwischen Zuständen wechselt. Ein entsprechender Algorithmus wurde von Dr. Mark Jäger in MatLab implementiert und Näheres ist in seiner Dissertation beschrieben [Jäger 2007].

4. Experimente und Ergebnisse

Die homogene Katalyse mit Metallkomplexen enthält im ersten Reaktionsschritt zumeist die Koordination des Substrats an das Zentralion. Zur Untersuchung solcher Koordinationsreaktionen wurde zunächst eine Sonde entwickelt, deren Fluoreszenz bei Koordination von Cu^{2+} gelöscht wurde. In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits verschiedene Sonden zum Nachweis von Metallionen entwickelt.

Beispielsweise wurde Fluorescein auf verschiedene Weise mit Chelat-Liganden verknüpft und dadurch die Sensitivität der Fluoreszenzlöschung durch Metallionen stark erhöht. Darauf basierend wurde eine Fluoreszenzsonde entwickelt, deren modularer Aufbau die Variation des Ligands oder des Farbstoffs und damit zugleich die Modifikation der Sensitivität und Spezifität ermöglicht.

4.1. *Ermitteln der Gleichgewichtskonstante aus Stern-Volmer Graphen*

In den folgenden Kapiteln werden Metallsonden vorgestellt, die bei Bindung von Kupfer(II)ionen eine Löschung der Fluoreszenz zeigen. Aufgrund dieser Kopplung der Fluoreszenzintensität an den Bindungszustand der Sonde (des Fluoreszenzfarbstoffs) kann durch Titration der Sonde mit dem entsprechenden Metallion die Gleichgewichtskonstante unter Verwendung des Stern-Volmer Modells bestimmt werden (Kapitel 2.4). Dazu wird das Verhältnis der Fluoreszenz ohne Zugabe von Löschmolekül F_0 durch die Fluoreszenz bei einer bestimmten Löschmolekülkonzentration F gegen die entsprechende Konzentration der Löschmoleküle aufgetragen. Nach Stern-Volmer ergibt sich eine lineare Abhängigkeit von F_0/F von der Kupfer(II)konzentration, so dass die Gleichgewichtskonstante der Steigung K_{SV} des Stern-Volmer Graphen entspricht. (Gleichung 4.1-1).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \cdot c(\text{Cu}^{2+}) \quad \text{Gleichung 4.1-1}$$

Wie die Experimente dieser Arbeit zeigten, wurden jedoch starke Abweichungen von diesem linearen Zusammenhang bei höheren Löschmolekülkonzentrationen beobachtet

(vgl. z.B. Abbildung 4.4-3 in Kapitel 4.4.1). Solche Abweichungen wurden in der Literatur auf Subpopulationen der fluoreszierenden Spezies zurückgeführt, die nicht durch das Löschmolekül beeinflusst werden und deshalb für eine konstante Hintergrundfluoreszenz sorgen [Lakowicz 2006]. Zur Korrektur der Graphen wurde diese Hintergrundfluoreszenz bei sehr hohen Konzentrationen an Löschmolekül experimentell bestimmt und zur Erstellung des Stern-Volmer Graphen von jedem Messwert abgezogen. Als Resultat erhält man wieder eine lineare Abhängigkeit der Ratio F_0/F von der Kupfer(II)konzentration. Die Anwendung dieser Korrektur führte jedoch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zu keinem befriedigenden Resultat. Da die Sonde in sehr hoher Reinheit eingesetzt wurde, wurde angenommen, dass die Komplex-gebundene Sonde einen zusätzlichen Beitrag zur Fluoreszenz der Probe liefert. Dies steht im Gegensatz zum Stern-Volmer Modell, das annimmt, dass der gelöschte Zustand keine Fluoreszenz zeigt. Basierend auf dieser Annahme wurde ein modifiziertes Stern-Volmer Modell entwickelt, das die Fluoreszenz des gelöschten Zustands berücksichtigt.

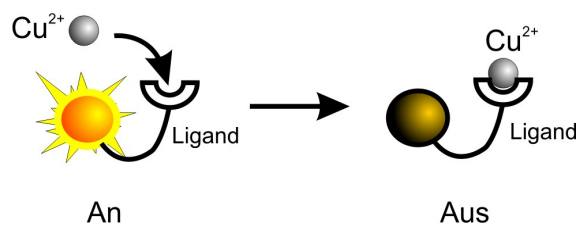


Abbildung 4.1-1. Das Stern-Volmer Modell geht davon aus, dass die Fluoreszenz der Sonde durch Komplexbildung komplett gelöscht wird.

Bislang wurde das Stern-Volmer Modell auf den linearen Bereich bei geringer Löschmolekülkonzentrationen angewendet und die Abweichungen zu höheren Löschmolekülkonzentrationen vernachlässigt. Durch das modifizierte Stern-Volmer Modell konnte der gesamte Messbereich angepasst werden.

4.1.1. Anpassen der Stern Volmer Theorie unter Berücksichtigung eines schwach fluoreszierenden gelöschten Zustands

Am Beispiel der Löschung einer Sonde durch Komplexbildung mit einem Metallion wird im Folgenden die Modifizierung der Stern-Volmer Gleichung beschrieben. Wie Abbildung 4.1-2 skizziert, kann die Sonde durch Koordination eines Kupfer(II)ions vom stark fluoreszierenden, hellen Zustand in den gering fluoreszierenden, dunklen Zustand wechseln.

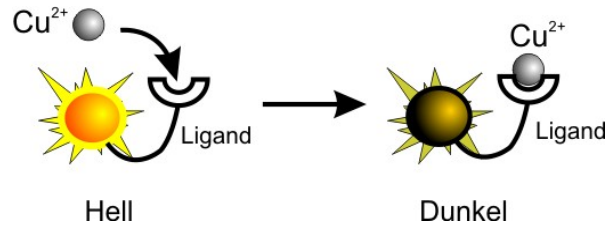


Abbildung 4.1-2. Erweitertes Modell das zur Beschreibung der Abhängigkeit der Löschung von der Löschmolekülkonzentration (hier Cu(II)) herangezogen wurde. Die Sonde kann frei vorliegen und zeigt eine hohe Quantenausbeute (Hell) oder durch Bindung eines Löschmoleküls in den dunklen Zustand mit niedriger Quantenausbeute überführt werden.

Die von einer Probe bei einer bestimmten Kupfer(II)konzentration emittierte Fluoreszenz setzt sich aus dem Signal des Komplexes Cu(L) und der freien Sonde L zusammen. Die Fluoreszenzintensität ist dem Extinktionskoeffizienten, der Konzentration und der Quantenausbeute proportional. Da sich der Extinktionskoeffizient, wie die Absorptionsspektren mit zunehmender Kupfer(II)konzentration in Abbildung 4.4-4 zeigten, kaum änderten, gilt vereinfacht: Die Fluoreszenz ist der Quantenausbeute Φ und der Konzentration der Kupfer(II)ionen proportional. Damit ist die Fluoreszenz der einzelnen Spezies direkt von der entsprechenden Konzentration und Quantenausbeute abhängig und kann als Summe der Einzelintensitäten beschrieben werden:

$$F = F_L + F_{Cu(L)}$$

$$F = [L] \cdot \phi_L + [Cu(L)] \cdot \phi_{Cu(L)}$$

Gleichung 4.1-2

Die Reaktion der Sonde (L) mit Kupfer(II) zum Kupfer-Sonden-Komplex Cu(L) wird durch Gleichung 4.1-3 beschrieben.



Um die Fluoreszenz der Probe zu berechnen, müssen gemäß Gleichung 4.1-2 die unbekannte Konzentration der freien Sonde und des Komplexes durch bekannte Größen ersetzt werden. Die Konzentration an freier Sonde $[\text{L}]$ entspricht deren Ausgangskonzentration $[\text{L}]_0$ abzüglich der Konzentration an gebildetem Komplex $[\text{Cu(L)}]$.

$$[\text{L}] = [\text{L}]_0 - [\text{Cu(L)}] \quad \text{Gleichung 4.1-4}$$

Im thermodynamischen Gleichgewicht gibt die Gleichgewichtskonstante K das Verhältnis zwischen dem Produkt der Konzentration der Endprodukte $[\text{Cu(L)}]$ und dem Produkt der Konzentration der Ausgangsstoffe $[\text{Cu}^{2+}] \cdot [\text{L}]$ an.

$$K = \frac{[\text{Cu(L)}]}{([\text{L}]_0 - [\text{Cu(L)}]) \cdot [\text{Cu}^{2+}]} \quad \text{Gleichung 4.1-5}$$

$$\Rightarrow K \cdot L_0 \cdot [\text{Cu}^{2+}] = [\text{Cu(L)}](1 + K \cdot [\text{Cu}^{2+}])$$

Für die Konzentration des Kupfer(II)-Sonden-Komplexes ergibt sich Gleichung 4.1-6.

$$\Rightarrow [\text{Cu(L)}] = \frac{K \cdot [\text{L}]_0 \cdot [\text{Cu}^{2+}]}{1 + K \cdot [\text{Cu}^{2+}]} \quad \text{Gleichung 4.1-6}$$

Durch Ersetzen von $[\text{Cu(L)}]$ in Gleichung 4.1-4 erhält man für die Konzentration der freien Sonde:

$$[\text{L}] = [\text{L}]_0 - \frac{K \cdot [\text{L}]_0 \cdot [\text{Cu}^{2+}]}{1 + K \cdot [\text{Cu}^{2+}]} = \frac{[\text{L}]_0}{1 + K \cdot [\text{Cu}^{2+}]} \quad \text{Gleichung 4.1-7}$$

Durch Ersetzen von $[\text{L}]$ und $[\text{Cu(L)}]$ in Gleichung 4.1-2 erhält man Gleichung 4.1-8 mit der die Fluoreszenz der Probe berechnet werden kann. Die Quantenausbeute der freien Sonde ist eine experimentell bestimmbare Konstante. Bis auf die Kupfer(II)konzentration wurden damit alle Variablen ersetzt.

$$F = \frac{[L]_0}{1 + K \cdot [Cu^{2+}]} \phi_L + \frac{K \cdot [L]_0 \cdot [Cu^{2+}]}{1 + K \cdot [Cu^{2+}]} \cdot \phi_{Cu(L)} \quad \text{Gleichung 4.1-8}$$

Ausklammern von $[L]_0 \cdot \Phi_L$ ergibt:

$$F = [L]_0 \phi_L \left[\frac{1 + K \cdot [Cu^{2+}]^{\phi_{Cu(L)}/\phi_L}}{1 + K \cdot [Cu^{2+}]} \right] \quad \text{Gleichung 4.1-9}$$

Um die Stern-Volmer Darstellung zu erhalten wird das Verhältnis zwischen F_0 und F gebildet. Mit $F_0 = [L]_0 \phi_L$ ergibt sich Gleichung 4.1-10.

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1 + K \cdot c(Cu^{2+})}{1 + K \cdot c(Cu^{2+})^{\phi_{Cu(L)}/\phi_L}} \quad \text{Gleichung 4.1-10}$$

Zur Allgemeineren Formulierung wurde $\Phi_{Cu(L)}$ und Φ_L durch Φ_{An} und Φ_{Aus} ersetzt.

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1 + K \cdot c(Cu^{2+})}{1 + K \cdot c(Cu^{2+})^{\phi_{Aus}/\phi_{An}}} \quad \text{Gleichung 4.1-11}$$

Die Gleichgewichtskonstante K und die Quantenausbeute des gelöschten Zustands Φ_{Aus} werden durch Anpassen des Modells aus Gleichung 4.1-11 an die Messwerte erhalten und die Kupfer(II)konzentration aus der zugegebenen Menge an Kupfer(II)lösung errechnet. Die Quantenausbeute des An-Zustands Φ_{An} kann separat experimentell bestimmt werden, oder als 100 % eingegeben werden, sodass dann die zum An-Zustand relative Quantenausbeute des gelöschten Zustands Φ_{Aus} erhalten wird.

Abweichungen, Fehlerquellen:

Die Verringerung der Konzentration von freiem Kupfer(II) durch Komplexbildung bleibt bei beiden Modellen ohne Berücksichtigung, was zu Abweichungen bei geringen Kupferkonzentrationen führt, wenn die eingesetzte Sondenkonzentration hoch ist. Wird die Sonde auch durch Stöße mit dem Löschmolekül deaktiviert, so ergibt sich eine weitere

Abweichung bei hohen Löschmolekülkonzentrationen durch eine zusätzliche Löschkomponente aus dynamischer Stoßlöschung.

Abbildung 4.1-3 zeigt ein Experiment zur Untersuchung der Fluoreszenzlöschung. Die Kupfer(II)konzentration wurde schrittweise erhöht und jeweils ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen (Abbildung 4.1-3a). Aus den Intensitätsmaxima wurde der Stern-Volmer Graph in Abbildung 4.1-3b ermittelt und sowohl das Standard-Stern-Volmer Modell, als auch das modifizierte Modell an den Graphen angepasst. Mit dem modifizierten Modell konnten die Datenpunkte des gesamten Messbereichs an das oben beschriebene Modell angepasst werden. Dabei wird zusätzlich zur Löschkonstanten K_{SV} das Verhältnis der Quantenausbeuten zwischen gelöschtem und hellem Zustand Φ_{Aus}/Φ_{An} der Probe bestimmt.

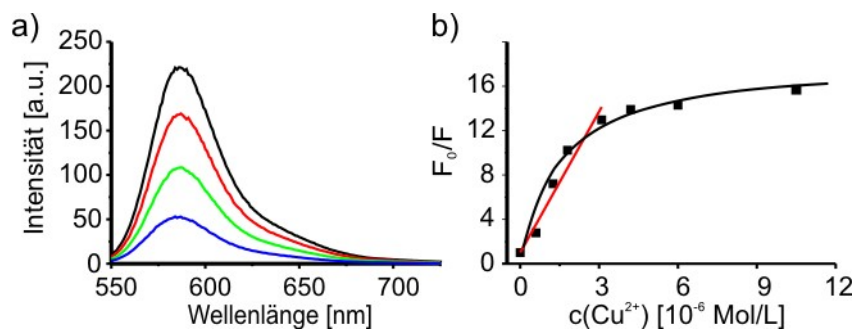


Abbildung 4.1-3. Experiment der Fluoreszenzlöschung einer Sonde durch Metall(II)ionen. Links: Fluoreszenzspektren der Sonde mit zunehmender Kupfer(II)konzentration (von 0 μM , schwarz bis 10 μM , blau). Rechts: Stern-Volmer Graph und die Anpassung des Stern-Volmer Modells (rot) an den Bereich geringer Konzentration sowie die Anpassung des modifizierten Stern-Volmer Modells (schwarz).

Wendet man dieses Modell auf die erhaltenen Graphen an, so ergeben sich Gleichgewichtskonstanten von $8,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und eine relative Abnahme der Quantenausbeute um 95 % gegenüber der freien Sonde. Mit dem Standardmodell wurde die Gleichgewichtskonstante unter Berücksichtigung der Messwerte bei Konzentrationen $< 3 \mu\text{M}$ zu $4,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Die modifizierte Gleichung liefert also mehr Informationen, nämlich die Gleichgewichts- bzw. Löschkonstante und die Quantenausbeute des gelöschten Zustands.

4.2. Struktur der Fluoreszenzsonde

Um die Sonde möglichst leicht mit unterschiedlichen Farbstoffen und Chelatliganden modifizieren zu können, wurde auf der Struktur bereits entwickelter Sonden aufgebaut. Darin wird die Konjugatbildung von zueinander komplementären Oligonukleotidsträngen ausgenutzt. Die komplementären Oligonukleotide werden derart modifiziert, dass der Fluoreszenzfarbstoff und der Chelatligand nach Hybridisierung unmittelbar benachbart vorliegen und damit die Koordination eines Metallions an den Liganden zu einer Löschung der Fluoreszenz des Farbstoffs führt (vgl. Abbildung 4.2-1). Die Modifizierung der Einzelstränge erfolgt nach literaturbekanntem Standardverfahren und ermöglicht die Kopplung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe. Als Kupfer(II)-spezifischer Ligand wurde 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin (dcbpy) über die Karbonsäuregruppe an den Oligonukleotiden gekoppelt. Bei Koordination eines Übergangsmetallions an den Liganden wird die Fluoreszenz des Farbstoffs gelöscht und koppelt somit den Bindungszustand des Liganden mit den Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs. Diese Änderungen wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie sowohl im Ensemble als auch im Einzelmolekül-experiment untersucht. Um die Änderung der Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls über eine längere Zeit beobachten zu können, wurde die Sonde spezifisch auf einer Glassoberfläche unter Erhaltung der Rotationsfreiheit immobilisiert. Hierbei konnte auf ein zuvor entwickeltes System zurückgegriffen werden [Weston 2001], [Piestert 2003]. Auf der Oberfläche wird ein Protein (BSA) adsorbiert und damit eine Passivierung gegenüber unspezifischer DNS-Adsorption erreicht. Einige dieser BSA-Moleküle sind mit Biotin markiert, an das Streptavidin, ein Protein mit vier Bindungsstellen für Biotin, mit hoher Affinität bindet. Dadurch hat man eine Streptavidin- dotierte Oberfläche erstellt, an die selektiv ein Biotin-markiertes Molekül gebunden werden kann. Um dieses Prinzip für unsere Zwecke zu nutzen, wurde die Sonde zusätzlich mit einem Biotin-Anker versehen.

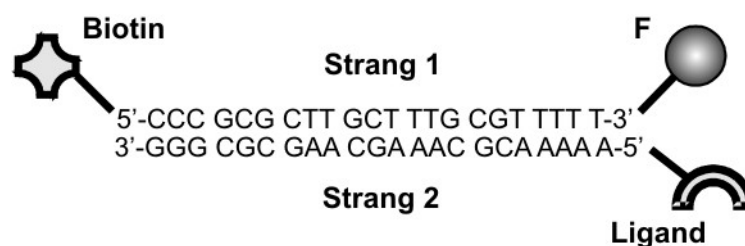


Abbildung 4.2-1. Schematische Struktur der Sonde nach Konjugatbildung. Der Farbstoff wird in unmittelbare Nähe zum Chelatliganden gebracht.

Für den zur Farbstoffmarkierung bestimmten Strang **1** wurde eine Basensequenz gewählt, die endständig fünf aufeinander folgende Thymin-Einheiten enthält, die im Vergleich zu den anderen Basen die geringste Fluoreszenzlöschung bei Farbstoffen zeigt [Marras 2002]. Die restliche Sequenz wurde so gewählt, dass das Hybrid eine ausreichende Stabilität aufweist und möglichst wenig Strukturalternativen ermöglicht werden. Der Strang **2** ist dem Strang **1** komplementär.

4.3. Untersuchung einer Auswahl von Fluoreszenzfarbstoffen für die Kupfer(II)-detektion

Im ersten Schritt wurde untersucht, welche Farbstoffe sich als Bestandteil der Sonde eignen. Der Farbstoff sollte selbst nicht durch Kupfer(II) beeinflusst werden, während die Koordination von Kupfer an die Sonde einen starken Effekt auf die Fluoreszenzeigenschaften des gekoppelten Farbstoffs wie Fluoreszenzlebensdauer, Quantenausbeute, Absorption und Emission, haben muss. Aus Vorexperimenten der AG Krämer war bekannt, dass die Koordination von Kupfer(II) an einen Liganden in Nähe des Farbstoffs TMR dessen Fluoreszenz löscht. Die Untersuchung der Änderung bestimmter Fluoreszenzcharakteristika, wie Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer, im Ensemble erfolgte mit den beschriebenen UV/VIS-Absorptions- und Fluoreszenzspektrometern. Dadurch wurden Erkenntnisse über die Fluoreszenzlöschung durch Kupfer(II) gesammelt, die zukünftig die Auswahl von Farbstoffen als potentielle Sondenbestandteile erleichtern. Anschließend wurde die Spezifität und Sensitivität der Sonde mit derjenigen der reinen Farbstoffe verglichen.

Damit die Farbstoffe auch mit Hilfe der Einzelmolekülmikroskopie untersucht werden können, mussten solche ausgewählt werden, die mit den zur Verfügung stehenden Lasern angeregt werden konnten. Mit einem frequenzverdoppelten Nd:YAG Dauerstrichlaser konnte bei 532 nm angeregt werden und mit dem gepulsten Diodenlaser (5- 40 MHz) bei 473 und 635 nm. Die Verwendung von gepulsten Lasern ermöglicht die Bestimmung der Lebensdauer der Farbstoffe über eine statistische Analyse der Ankunftszeiten der Fluoreszenzphotonen bezüglich des Laserpulses (TCSPC; vgl. Kapitel 3.6). Da dies auch bedeutet, dass im selben Experiment gleichzeitig die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden können und weil langwellig absorbierende Farbstoffe, erfahrungsgemäß eine höhere Photostabilität aufweisen, wurden solche Farbstoffe bevorzugt, die mit 635 nm angeregt werden können. Deshalb wurden anhand

eigener Erfahrungen und Herstellerangaben folgende Farbstoffe ausgewählt: Atto620, Atto635, Atto647N, Atto655, Atto680, MR121, Cy5 und Cy5.5. Aufgrund positiver Vorexperimente wurde des Weiteren TMR gewählt, der mit dem Nd:YAG-Laser angeregt werden kann. Die Farbstoffe zählen zu unterschiedlichen Farbstoffklassen: Rhodaminfarbstoffe (TMR), Carbopyroninderivate (Atto620, Atto635), Carborhodamine (Atto647N), Oxazinfarbstoffe (Atto655, Atto680, MR121) und Cyaninfarbstoffe (Cy5, Cy5.5). Da bei den meisten Farbstoffen die genauen Strukturen nicht veröffentlicht sind, können strukturelle Zusammenhänge mit der Fluoreszenzlöschung nur im Zusammenhang mit der Farbstoffklasse abgeleitet werden.

Die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften dieser Farbstoffe bei Zugabe von Kupfer(II) wurde zunächst mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die Farbstoffe wurden, wie vom Hersteller erhalten, ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Sowohl TMR als auch Atto647N wurden als 5/6 Isomerengemisch eingesetzt. Alle Farbstoffe außer TMR lagen als NHS-Ester vor, bei TMR wurde das Carbonsäurederivat verwendet.

Zur Untersuchung der Löschung der reinen Farbstoffe durch Kupfer(II) wurden sie in gepufferten wässrigen Medium (MOPS, 10 mM, pH 7) gelöst, zu Konzentrationen von ca. 0,5 μM in eine Küvette gegeben und mit Kupfersulfatlösung titriert vgl. Kapitel 3.5.1. Nach jeder Zugabe wurde ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. In Abbildung 4.3-1a sind die Emissionsspektren von TMR bei ansteigenden Kupfer(II)-konzentrationen gezeigt. Man erkennt, dass die Fluoreszenzintensität nach jeder Cu^{2+} -Zugabe verringert wird. Zur quantitativen Auswertung wurden die erhaltenen Intensitäten ermittelt und das Verhältnis der Ausgangsfluoreszenzintensität F_0 (bei 0 μM Cu^{2+}) zur Intensität bei der entsprechenden Kupfer(II)-konzentration F gegen die Kupfer(II)konzentration aufgetragen (Abbildung 4.3-1b). Die Steigung im Anfangsbereich des Graphen gibt in erster Näherung die Affinität des Farbstoffs zu Kupfer(II) wieder. Gegen hohe Kupfer(II)konzentrationen wird keine weitere Abnahme der Fluoreszenz beobachtet. Durch Anpassung des modifizierten Stern-Volmer Modell (s.o.) an die Daten wurde die Löschkonstante K_{SV} und die Quantenausbeute Φ_{Aus} des gelöschten Komplexes bestimmt. Eine Auswertung nach einem Modell, das statische wie auch dynamische Löschung vereint, wurde nicht verwendet, da ein dynamischer Anteil durch Stoßlöschung erst bei höheren Löschmolekülkonzentrationen auftritt (vgl. Kapitel 2.4) und in diesem Fall auch eine Abweichung zur Y-Achse erwartet würde.

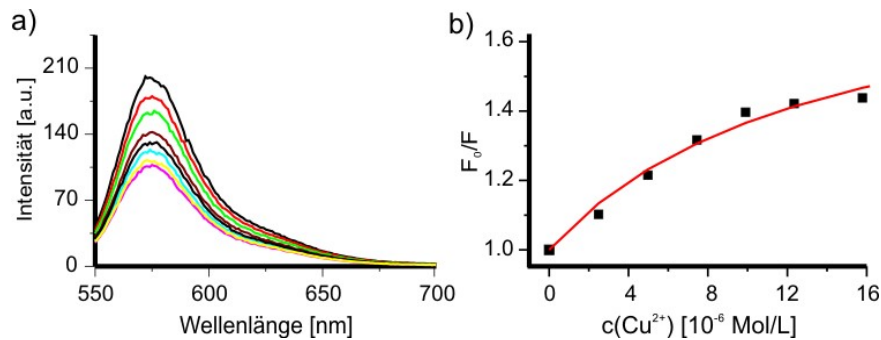


Abbildung 4.3-1. Emissionsspektren der Titration von TMR mit Kupfersulfatlösung und deren Auftragung in einem Stern-Volmer Graphen. Bei hohen Kupfer(II)konzentrationen wird keine weitere Löschung beobachtet.

In Abbildung 4.3-2 sind die Stern Volmer Graphen und der entsprechenden Modellanpassung aller getesteten Farbstoffe gegenübergestellt. Abbildung 4.3-2a zeigt die Stern-Volmer Graphen von Atto647N (schwarz), Atto635 (rot). Man erkennt, dass Atto647N eine sehr starke Löschung zeigt und die Fluoreszenz im Vergleich zur Ausgangsfluoreszenz um 95 % abfällt. Atto635 zeigt ebenfalls eine starke Löschung mit einem Fluoreszenzabfall um etwa 75 %. Abbildung 4.3-2b zeigt die Stern-Volmer Graphen zur Fluoreszenzlöschung durch Kupfer(II) von TMR (blau), Atto680 (grün) und Atto620 (schwarz) und MR121 (rot). Diese Farbstoffe wurden im Vergleich zu den zuvor genannten von Kupfer(II) weniger beeinflusst, die Fluoreszenz von Atto620 und TMR verringert sich um 40 bzw. 47 %. Die Farbstoffe Atto680 und MR121 zeigen eine geringere Fluoreszenzlöschung von 25 bzw. 30 %. Atto655 (grün), Cy5 (rot) und Cy5.5 (schwarz) (Abbildung 4.3-2c) zeigen die geringste Löschung, die Fluoreszenz verringert sich um 10 - 15 %.

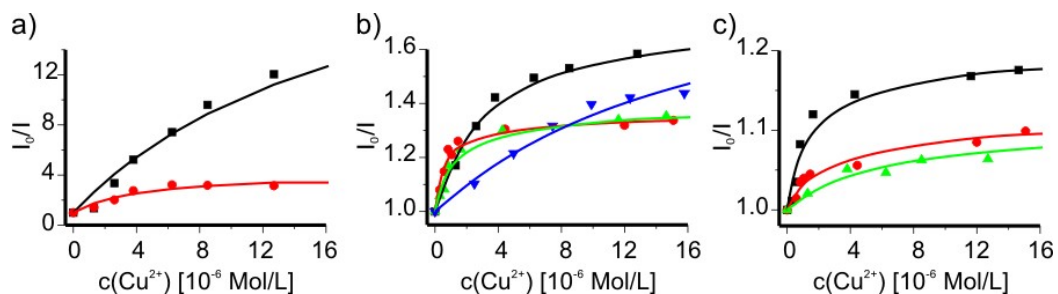


Abbildung 4.3-2. Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Kupfer(II)konzentration in Stern-Volmer Darstellung. Die Daten wurden mit dem modifizierten Modell aus Kapitel 4.1.1 angepasst. a) starke Löschung: Atto674N (schwarz), Atto635 (rot); b) Atto620 (schwarz) Atto680 (grün), TMR (blau), MR121 (rot) c) Cy5 (rot), Cy5.5 (schwarz) Atto655 (grün).

Die Steigung der Graphen im Anfangsbereich gibt die Löschkonstante K_{SV} des Farbstoffs durch Cu^{2+} wieder. Die Fluoreszenz einiger Farbstoffe zeigt bereits ohne besondere Modifikation durch Liganden eine hohe Löschkonstante und ebenso eine sehr starke Abnahme in der Intensität insbesondere Atto647N und Atto635 (vgl. Tabelle 4.3-1). Alle anderen zeigten geringe Änderung der Fluoreszenz. Für alle Farbstoffe gilt, dass bei höheren Konzentrationen an Kupfer(II) eine Sättigung erreicht wird, ab der die Fluoreszenz nicht mehr weiter abnimmt.

Tabelle 4.3-1. Gegenüberstellung der Löscheffizienz und der Löschkonstanten der aufgeführten Farbstoffe durch Kupfer(II). Die Fehlerbestimmung nach der Modellierung ergab 10 % für die Löschkonstante und 5 % für die relative Löschung.

	TMR	Atto620	Atto635	Atto655	Atto680	MR121	Atto647N	Cy5	Cy5.5
Relative Löschung	47 %	40 %	76 %	10 %	30 %	27 %	95 %	10 %	15 %
Löschkonstante [10^3 M^{-1}]	135	500	960	207	1100	1590	1 400	430	820

Aus Tabelle 4.3-1 ist außerdem ersichtlich, dass Cyaninfarbstoffe im Vergleich zu den anderen Farbstoffklassen sehr gering durch Kupfer(II) gelöscht werden. Die restlichen Farbstoffe zeigen keinen deutlichen Zusammenhang zwischen Klasse und der relativen Fluoreszenzlöschung oder der Löschkonstante. Es ist möglich, dass diese Eigenschaften von den Substituenten des Farbstoffgrundgerüsts abhängen, die als mögliche Bindungsstelle für Metallionen fungieren wie zum Beispiel die Dimethylaminofunktion von TMR. Da die Strukturen der meisten Farbstoffe vom Hersteller Atto-Tec nicht bekannt gegeben wurden, können diese Abhängigkeiten nicht diskutiert werden.

Verknüpft man nun einen metallspezifischen Liganden mit dem Farbstoff, so lässt sich die Sensitivität und Selektivität verändern. Aus den untersuchten Farbstoffen wurde eine Auswahl getroffen, die in das Sondendesign integriert werden sollten. TMR wurde ausgewählt, da es bereits mit positivem Ergebnis in vorangegangenen Arbeiten in einem ähnlichen Sondenkonstrukt eingesetzt wurde. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Farbstoffen zeigte TMR die geringste Löschkonstante, was möglicherweise auf die fehlende NHS-Ester Modifizierung zurückzuführen ist. Atto620 wurde ausgewählt, da eine gleichstarke relative Löschung durch Cu^{2+} gefunden wurde. Mit Atto635 wurde ein

Farbstoff ausgewählt, der sich durch eine höhere relative Löschung auszeichnete. Ein Kandidat, der zwar eine hohe Löschkonstante, aber eine geringere relative Löschung als TMR aufwies, ist MR121. Die Farbstoffe Cy5, Cy5.5 und Atto655, die sowohl niedrige Löschkonstanten als auch eine niedrige relative Löschung aufweisen, scheinen nicht durch Kupfer(II) beeinflusst zu werden und sind wenig geeignet. Atto647N zeigte eine so starke Löschung, dass eine Sensibilisierung durch Modifikation mit einem Chelatliganden unwahrscheinlich erscheint. Atto680 zeigt eine geringe Extinktion bei 635 nm und gibt deshalb im Einzelmolekülexperiment bei Anregung mit dem Diodenlaser bei 635 nm ein schlechtes S/R Verhältnis. Die NHS-modifizierten Farbstoffe wurden frisch angesetzt, so dass die Hydrolyse zur freien Carbonsäure bei pH 7 eine untergeordnete Rolle spielte. Aus den charakterisierten Farbstoffen wurden daher TMR, Atto620, Atto635 und MR121 ausgewählt. TMR, Atto620, und MR121 zeigen eine moderate Fluoreszenzlöschung, die durch Kopplung mit einer Chelatmodifizierten Struktur verstärkt werden könnte. Atto635 zeigt bereits eine starke Löschung und durch Integration in das Sondenkonstrukt wurde untersucht, ob hier auch eine weitere Sensibilisierung erreicht werden kann.

4.4. Charakterisierung der Farbstoff- markierten Sonden

Die Farbstoffe TMR, Atto620, Atto635 und MR121 wurden nach literaturbekanntem Standardprotokoll an den DNS-Strang **1** gekoppelt und mittels HPLC aufgereinigt. Zur Fertigstellung der Sonde wurden sie mit dem dcbpy- markierten DNS-Komplementärstrang **2** hybridisiert. Die Kontrollexperimente wurden mit einer Kontrollsonde, bestehend aus einem DNS-Hybrid aus Strang **1** und einem unmodifizierten DNS-Komplementärstrang, durchgeführt.

4.4.1. Löschung der Fluoreszenz der Sonde durch Kupfer(II)

Die Löschwirkung von Cu^{2+} wurde zunächst an den TMR-markierten Sonden untersucht. Dazu wurden 60 μL einer Sondenlösung (0,5 μM in 10 mM MOPS) in eine Fluoreszenzküvette gegeben und schrittweise eine Kupfer(II)sulfatlösung (100 μM , in 10 mM MOPS) zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen und zur Quantifizierung der Löschung in einen Stern-Volmer- Graphen aufgetragen.

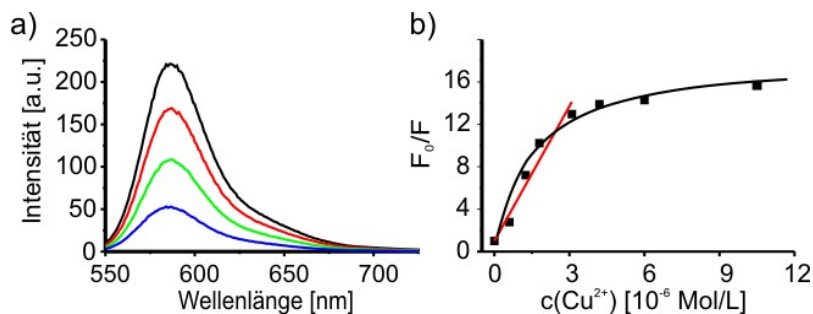


Abbildung 4.4-1. Quantifizierung der Löschung der TMR-dcbpy- markierten Sonde durch Kupfer(II). Links: Emissionsspektren bei steigenden Kupferkonzentrationen (Die Cu^{2+} -Konzentration nimmt in der Reihenfolge Schwarz, Rot, Grün, Blau von $0 \mu\text{M}$ auf $10 \mu\text{M}$ zu). Rechts: Stern-Volmer Graphen zur Bestimmung der Löschkonstanten mit Hilfe des modifizierten Stern-Volmer Modells.

Der erhaltene Graph (Abbildung 4.4-1) zeigt bei niedriger Konzentration an Löschmolekül (bis $4 \mu\text{M}$) eine starke Steigung und neigt sich dann Richtung X-Achse zur Sättigung. Durch Anpassen des modifizierten Stern-Volmer Modells an die Datenpunkte wurde eine Löschkonstante K_{SV} von $8,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($\pm 10 \%$) und eine relative Löschung von 92% ($\pm 4 \%$) bestimmt.

Um zu bestätigen, dass die starke Fluoreszenzlöschung dem Einfluss des Chelatliganden zuzuschreiben ist, wurden Vergleichsmessungen mit der Kontrollsonde ohne dcbpy-Chelatfunktion durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die Löschwirkung allein durch Kupfer(II) oder aber auf den Kupfer(II)bipyridinkomplex zurückzuführen ist, wurde zusätzlich die Löschung der Kontrollsonde durch Bipyridin und den $[\text{Cu}(\text{dcbpy})]$ -Komplex untersucht.

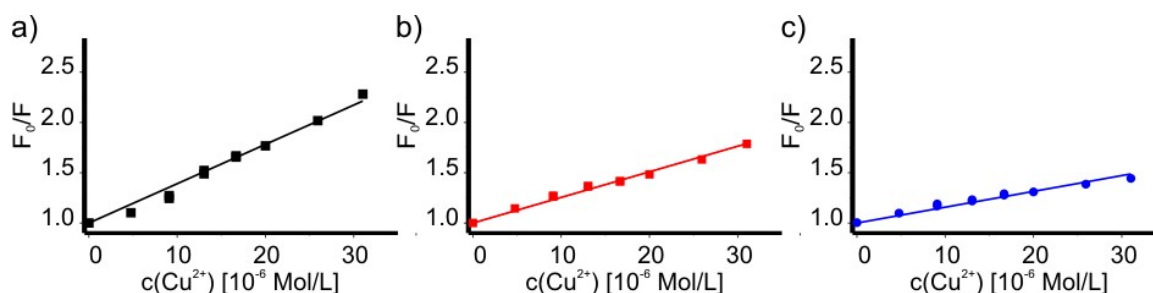


Abbildung 4.4-2. Stern-Volmer Graphen, die zur Untersuchung der Löschung der Kontrollsonde durch $[\text{Cu}(\text{bipy})]^{2+}$ (schwarz), durch Cu^{2+} (rot) und Bipyridin (blau) erstellt wurden.

Die Löschesubstanz wurde in Puffer (MOPS 10 mM) gelöst und schrittweise zu $100 \mu\text{L}$ der Sonde ($0,5 \mu\text{M}$ in 10 mM MOPS) zugegeben. Die entsprechenden Stern-Volmer Graphen

in Abbildung 4.4-2 zeigen im Messbereich keine Abweichung vom Stern Volmer Modell, so dass die unmodifizierte Modellierung zur Auswertung der Daten verwendet wurde. Durch Bipyridin wurde die Sonde nur schwach gelöscht ($K_{SV} = 15000 \text{ M}^{-1}$). Von Kupfer(II) wurde die Sonde etwas stärker gelöscht ($K_{SV} = 25000 \text{ M}^{-1}$) und die stärkste Löschung mit $K_{SV} = 39000 \text{ M}^{-1}$ erfolgte durch den Kupfer(II)-bipy-Komplex. Die Verstärkung der Löschung kommt demnach nicht ausschließlich durch die Lokalisierung von Kupfer(II) in Farbstoffnähe zustande, sondern wird zusätzlich durch den gebildeten Komplex aus Kupfer(II) und der dcbpy- Funktion der Sonde verstärkt. Die Löschung ist aber so schwach, dass sie nicht die Löschung der Sonden erklären kann.

Die Fluoreszenzlöschung der Atto620, Atto635 und MR121 markierten Sonden wurden nach der gleichen Methode untersucht. In Abbildung 4.4-3 sind die Ergebnisse in Form der Stern-Volmer Graphen vorgestellt. In schwarz sind die Ergebnisse der Löschung der dcbpy- Sonden aufgetragen, die Kontrollexperimente sind rot dargestellt. Alle drei Sonden zeigen einen starken Anstieg im Anfangsbereich des Graphen und neigen sich dann in Richtung x-Achse zur Sättigung. Die durchgezogenen Linien stellen die Anpassung nach dem modifizierten Stern-Volmer- Modell an die Daten dar. Die beste Differenzierung gegenüber dem Kontrollexperiment wurde mit der Atto620-markierten Sonde beobachtet [Kiel 2007a].

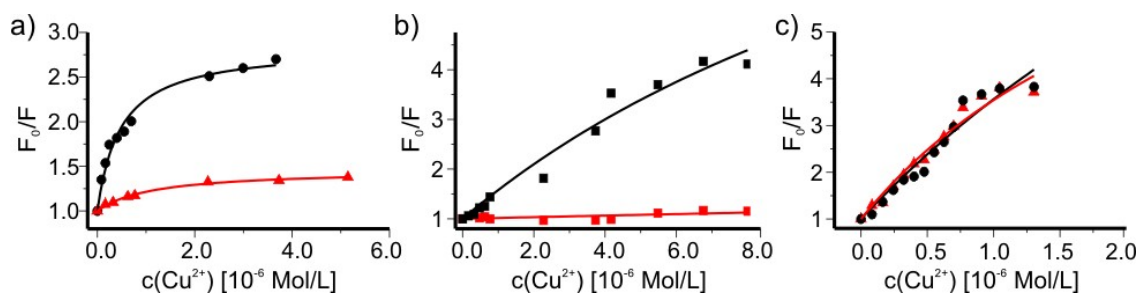


Abbildung 4.4-3. Stern-Volmer Graphen der Sonde und der Kontrollexperimente. Atto620 (links) und MR121 (mitte) zeigen einen großen Unterschied in der Löschung durch Kupfer(II). Atto635 (rechts) zeigt jedoch keinen Unterschied zwischen der dcbpy markierten und der Kontrollsonde.

Die MR121- markierte Sonde zeigte ebenfalls eine gute Unterscheidbarkeit, jedoch einen schwächeren Anstieg des Stern-Volmer- Graphen der Sonde im Bereich niedriger Konzentrationen. Die Atto635-markierte Sonde zeigte keine Differenzierung zwischen der Chelat-modifizierten und der Kontrollsonde. Verglichen mit der TMR-markierten Sonde ist die Differenzierbarkeit aufgrund der geringeren Löscheffizienz der Atto620- und auch der MR121-markierten Sonde geringer.

Tabelle 4.4-1. Gegenüberstellung der Löschkonstanten und relativen Löschung der Fluoreszenzsonde und der Kontrollsonde.

	Sonde		Kontrollsonde	
	$K_{SV} [10^3 M^{-1}]$	Relative Löschung ^{a)}	$K_{SV} [10^3 M^{-1}]$	Relative Löschung ^{b)}
TMR	8 500	92 %	40	55 % ± 20 % ^{b)}
Atto620	5 900	65 %	1200	30 % ± 10 %
Atto635	3 900	90 %	3 200	90 % ± 10 %
MR121	660	90 %	23	30 % ± 20 % ^{b)}

- a) Aufgrund der hohen Varianz verschiedener Proben ist ein Fehler von $\pm 5\%$ bei der relativen Löschung zu berücksichtigen.
- b) Aufgrund geringer Änderung der Intensität im gemessenen Konzentrationsbereich ergibt sich ein höherer Fehler für die relative Löschung.

Der Vergleich mit der Löschung der reinen Farbstoffe durch Kupfer(II) zeigt, dass die Sensitivität auf das Löschmolekül durch einen geeigneten Rezeptor verstärkt werden kann. Bei Atto635 konnte die bereits beim reinen Farbstoff beobachtete Löschung zwar verstärkt, jedoch nicht auf den Liganden zurückgeführt werden, da die Kontrollsonde eine gleichermaßen hohe Löschung zeigt. Weitere Experimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, welcher molekulare Mechanismus für die Löschung verantwortlich sein könnte. Dazu wurde die Abhängigkeit der Absorptionsspektren und der Fluoreszenzlebensdauer von der Kupferkonzentration untersucht.

4.4.2. Untersuchung der Absorption der Sonde

Mit Hilfe der Absorptionsspektren im UV-VIS Bereich wurde untersucht, ob ein Grundzustandskomplex gebildet wurde. Bindet ein Metallion an einen Fluorophor, so wird dessen Struktur beeinflusst, so dass eine Verschiebung des Absorptionsmaximums oder eine veränderte optische Dichte auftritt. Wird zur Aufnahme des Emissionsspektrums im beeinflussten Bereich des Absorptionsspektrums angeregt, so könnte dies für die beobachtete Abnahme der Fluoreszenz bei zunehmender Kupfer(II)konzentration verantwortlich sein. Da in dem vorliegenden Fall keine direkte Bindung des Metallions an den Fluorophor vorliegt, sind aber nur schwache Wechselwirkungen zu erwarten. Abbildung 4.4-4 zeigt die Absorptionsspektren der TMR-dcbpy-markierten Sonde, die bei

Kupfer(II)-konzentrationen von 0 μM bis 30 μM aufgenommen wurden. Die Absorption der Sonde zeigt bei 565 nm eine Abnahme um etwa 10 % und es ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um 2 nm von 565 nm nach 567 nm zu erkennen. Daraus lässt sich eine Interaktion des Kupfers mit dem Farbstoff ableiten. Die Änderungen sind aber klein gegenüber der beobachteten Fluoreszenzlöschung, so dass sie nicht zu deren Erklärung beitragen.

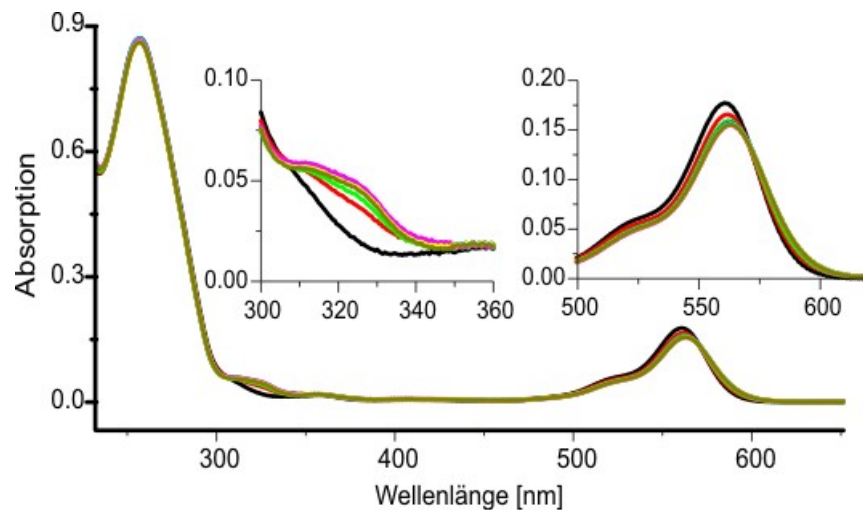


Abbildung 4.4-4. Absorptionsspektren der Sonde mit zunehmender Kupfer(II)konzentration. Während die Optische Dichte bei 565 nm leicht abnimmt, wurde eine Zunahme der Absorption bei 320 nm beobachtet.

Nachdem die Bildung eines Grundzustandskomplexes als Ursache der Fluoreszenzlöschung ausgeschlossen werden konnte, mussten andere Mechanismen wie Elektronentransfer oder Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer in Betracht gezogen werden.

4.4.3. Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer der Sonde

Erfolgt die Fluoreszenzlöschung durch resonanten Energietransfer, so ist zu erwarten, dass die Fluoreszenzlebensdauer der komplexgebundenen Sonde aufgrund zusätzlicher Relaxationskanäle erheblich verringert würde und damit die Stern-Volmer Graphen der Lebensdauer einen ähnlichen Verlauf wie diejenigen der Intensität aufzeigen. Bei einem Löschmechanismus, der auf Elektronentransfer basiert, könnten zwei Fälle auftreten: Erfolgt die Löschung so schnell, dass die Komplex-gebundene, gelöschte Sonde keine

Photonen emittiert, somit lediglich Photonen der Sonde im ungebundenen Zustand detektiert werden, würde keine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer beobachtet. Werden von der komplexgebundenen Sonde aber Photonen aufgesammelt, so ist auch eine Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer erkennbar, die allerdings nicht konform mit der Löschung gehen muss. Die Proben wurden in 60 μL Mops Puffer gegeben und schrittweise die Kupferkonzentration von 0 μM auf 20 μM erhöht. Zu jedem Schritt wurde die Lebensdauer der Probe bestimmt.

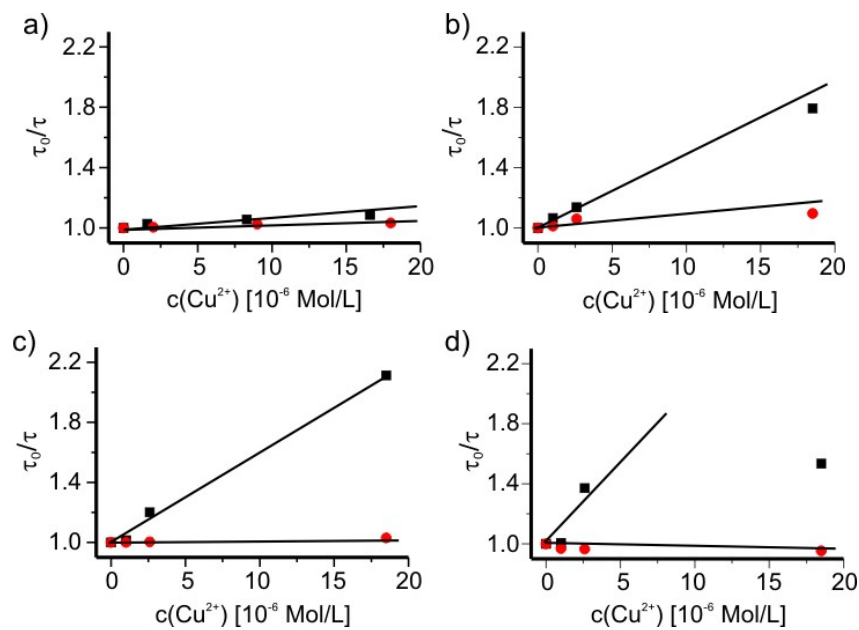


Abbildung 4.4-5. Stern-Volmer Graphen der Lebensdauer der Sonde (schwarz) und der Kontrollsonde (rot). Es ist jeweils τ_0/τ gegen die Kupfer(II)konzentration aufgetragen. Die TMR-markierten Konjugate (a) zeigen die geringste Änderung der Lebensdauer, die Atto620(b), MR121(c) oder Atto635 (d) markierten Konstrukte zeigen eine deutlichere Veränderung.

Vergleicht man die Resultate mit den Experimenten zur Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Kupferkonzentration, ist nur eine geringfügige Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von der Kupferkonzentration beobachtet worden. Zwar ist eine Differenzierung zwischen der Chelat-modifizierten Probe zur Kontrollprobe ohne Chelatligand immer noch möglich, doch nicht so deutlich verglichen mit den Ergebnissen aus den Messungen zur Abhängigkeit zur Fluoreszenzintensität aus Kapitel 4.4.1. Besonders bei geringen Kupferkonzentrationen von 1-3 μM , wo die Fluoreszenzintensität die größten Intensitätsänderungen zeigen, wird kaum eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer beobachtet (vgl. Tabelle 4.4-2). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass der Energieübertrag zwischen Sonde und Löschmolekül so schnell ist, dass kaum

Photonen aus dem gelöschten Zustand emittiert werden und die gemessene Fluoreszenzlebensdauer dadurch der nicht komplexierten Probe entspricht. Ein weiteres Problem stellt die Zeitauflösung dar. Die Pulsdauer der Anregung beträgt 500-600 ps, und limitiert die zeitliche Auflösung auf etwa 300 ps. Da die Ausbeute an Photonen des gelöschten Zustands erheblich geringer ist, werden die Lebensdauerhistogramme von den Photonen der freien Probe dominiert. Bei niedriger Kupfer(II)konzentration sind deshalb kaum Änderungen der Fluoreszenzlebensdauer messbar. Im Einzelmolekülexperiment könnte die Messung der Fluoreszenzlebensdauer gelingen, da man hier isolierte Moleküle betrachtet und die Bindungszustände der Sonde voneinander getrennt beobachtet werden könnten. Der Verlauf der Fluoreszenzlebensdauer eines einzelnen Moleküls kann mit hoher Zeitauflösung aufgenommen werden. Dieses Experiment soll nur mit der Atto620-markierten Sonde durchgeführt werden, da diese unter den drei ausgewählten die beste Differenzierung zwischen Sonde und Kontrollsonde zeigt. Atto635 zeigt die geringste Differenzierung und es wurde vermutet, dass der Farbstoff bei den basischen Bedingungen (pH = 10) der Kopplung teilweise zersetzt wurde, was vom Hersteller, der Firma Atto-Tec, bestätigt wurde.

Tabelle 4.4-2. Gegenüberstellung der Löschkonstanten aus den Stern-Volmer Graphen zur Fluoreszenzlebensdauer und der Fluoreszenzintensität.

K [10^3 M^{-1}]	Sonde		Kontrollsonde	
	$K_{\text{Gl}} (F_0/F)$	$k_q (\tau_0/\tau)$	$K_{\text{Gl}} (F_0/F)$	$k_q (\tau_0/\tau)$
TMR	8 500	5	40	2
Atto620	5 900	43	1200	20
Atto635	3 900	183	3 200	< 0 ^{a)}
MR121	660	60	23	1,5

4.4.4. Untersuchung der Spezifität der Sonde auf Kupfer(II) im Vergleich zu Mn(II) bis Ni(II)

Es war bekannt, dass andere Metallsalze auch die Fluoreszenz diverser Farbstoffe löschen [Mokhir 2005]. Im Folgenden wird exemplarisch die Löschung der TMR-dcbpy-Sonde durch Mangan, Kobalt, Nickel und Eisen beschrieben. Da die Komplexbildung mit diesen Metallen bis zu 2 Stunden dauern kann, musste bei einer einfachen Titration nach jeder Zugabe bis zu 3 Stunden auf die Gleichgewichtseinstellung gewartet werden. Deshalb wurde eine der Titration ähnliche Methode gewählt. Es wurden Proben der Sonde in verschiedenen Metall(II)konzentrationen von 0 bis 100 μM angesetzt und die Gleichgewichtseinstellung über 3 Stunden abgewartet. Da die Fluoreszenzintensität stark von der Konzentration der Sonde abhängt, ist diese Größe stark mit Fehlern belastet. Eine von der Konzentration unabhängige Größe stellt die Quantenausbeute dar. Da die Quantenausbeute der Fluoreszenzintensität bei gleich bleibender Farbstoffkonzentration proportional ist, gilt gleichermaßen das Stern-Volmer Modell.

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1 + k \cdot c(\text{Me}^{2+})}{1 + k \cdot c(\text{Me}^{2+}) \frac{\phi_{\text{off}}}{\phi_{\text{on}}}} \quad \text{mit } F \propto \Phi$$

$$\Rightarrow \frac{\phi_0}{\phi} = \frac{1 + k \cdot c(\text{Me}^{2+})}{1 + k \cdot c(\text{Me}^{2+}) \frac{\phi_{\text{off}}}{\phi_{\text{on}}}} \quad \text{Gleichung 4.4-1}$$

Für verschiedene Ansätze bestimmter Metallsalzkonzentration wurde die jeweilige Quantenausbeute der Sonde bestimmt. Zunächst wurden die Lösungen zu je 100 μL mit Metallsalzkonzentrationen zwischen 0 und 20 μM in MOPS (pH 7 für Ni^{2+} , Cu^{2+} und pH 6 für Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) hergestellt. Zu diesen Lösungen wurden jeweils 10 μL der Sonde (4 μM) zugegeben und dann für zwei Stunden unter Schütteln die Gleichgewichtseinstellung abgewartet. Nach der in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Methode wurde die Quantenausbeute der erstellten Proben bestimmt. Da die Quantenausbeute direkt proportional zur Fluoreszenz ist, kann Gleichung 4.1-11 entsprechend umgeformt werden (Gleichung 4.4-1). Φ_0 ist die Quantenausbeute der Sonde in reinem Puffer und Φ ist die bei den jeweiligen Metallsalzkonzentrationen gemessenen Quantenausbeute.

Trägt man nun Φ_0/Φ gegen die Metallsalzkonzentration auf, so ergibt sich bei kleinen Konzentrationen eine Gerade, die sich zu höheren Konzentrationen gegen die x-Achse

neigt. Durch Anpassen des Modells (Gleichung 4.4-1) an die Werte erhält man die Gleichgewichtskonstante K und die relative Quantenausbeute des gelöschten Zustands.

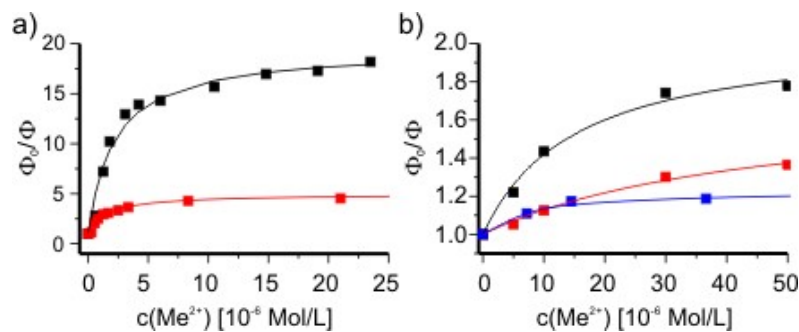


Abbildung 4.4-6. Stern-Volmer Graphen der Quantenausbeuten der TMR-dcbpy-markierten Sonde bei verschiedenen Metall(II)konzentrationen: a) Schwarz: Cu(II); Rot: Ni(II); b) Schwarz: Co(II) Rot: Fe(II); Blau: Mn(II).

Tabelle 4.4-3. Gegenüberstellung der literaturbeschriebenen Komplexeleichgewichtskonstanten verschiedener Metall(II)bipy-komplexe mit den mit der TMR-dcbpy-markierten Sonde gemessenen Werten [Holyer 1965].

Metall(II)	Mn(II)	Fe(II)	Co(II)	Ni(II)	Cu(II)
Rel. Löschung (TMR-dcbpy-Sonde)	22 %	37 %	45 %	78 %	95 %
Log K (TMR-dcbpy-Sonde)	4,5 ^{a)}	5,1 ^{a)}	5,3 ^{a)}	6,5	6,9
Log K (Lit., Bipy)	< 5 ^{b)}	4,3	6,0	7,1	8

a) Die Messung wurde zur Vermeidung von Salzausfällung bei pH 6 durchgeführt.

b) Gleichgewichtskonstante mit Bipy ist nicht angegeben, ist aber kleiner als die von Phen ($\log K = 5$)

Die Bindungskonstanten K der Metallionen mit der Sonde sind in Tabelle 4.4-3 mit den Literaturwerten von Bipyridin gegenübergestellt. Für Nickel(II) und Kupfer(II) sind die bestimmten Bindungskonstanten der Sonde kleiner als die entsprechenden Literaturwerte während für Mangan(II), Eisen(II) und Kobalt(II) höhere Werte erhalten wurden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Sonde auch andere zweiwertige Metallionen nachweisen kann, was als Ausgangspunkt für zukünftige Arbeiten dienen könnte.

4.4.5. Zusammenfassung der Ensemble- Ergebnisse

Nach der Untersuchung der Fluoreszenzlöschung verschiedener Farbstoffe durch Cu^{2+} wurden TMR, Atto620, MR121 und Atto635 zum Aufbau einer Fluoreszenzsonde zum spezifischen Cu(II) -Nachweis ausgewählt. TMR und Atto620 zeigten eine moderate relative Löschung sowie eine niedrige Löschkonstante durch Kupfer(II). Mit Atto635 wurde ein Kandidat mit hoher relativen Löschung sowie hoher Löschkonstante ausgewählt und mit MR121 ein Vertreter, der eine niedrige relative Löschung aber eine hohe Löschkonstante zeigte. Die anderen Farbstoffe zeigten entweder bereits eine sehr hohe relative Löschung, so dass eine Sensibilisierung durch Kopplung mit einem spezifischen Liganden als nicht aussichtsreich angesehen wurde, oder die Löschkonstante als auch die relative Löschung waren sehr niedrig, so dass keine Sensibilisierung erwartet werden konnte.

Bei drei der vier ausgewählten Farbstoffe (TMR, Atto620 und MR121) wurde bei den markierten Sonden eine Verstärkung der Löschung durch Kupfer(II) beobachtet. Die Atto635-markierte Sonde hingegen zeigte keine Differenzierbarkeit zum Kontroll-experiment. Die beste Unterscheidbarkeit wurde bei den Atto620- bzw. TMR-markierten Sonden beobachtet, diese konnten Cu^{2+} - Ionen spezifisch nachweisen. Durch Anwendung des in Kapitel 4.1.1 entwickelten modifizierten Stern-Volmer Modells wurde die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung von Cu^{2+} mit der dcbpy- Struktur der Atto620-markierten Sonde zu $5,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und mit der TMR-markierten Sonde zu $8,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Aufgrund möglicher unvollständiger Kopplung mit Farbstoff oder Chelatligand oder unvollständiger Ausbildung der DNS-Konjugate, können solch starke Abweichungen der Messwerte zueinander erklärt werden.

Die Fluoreszenzlebensdauer der TMR-Sonde blieb bei Kupfer(II)-zugabe konstant, während die Atto620-Sonde eine geringe Änderung der Fluoreszenzlebensdauer zeigte. Die Verminderung der Fluoreszenzintensität war bei beiden Sonden deutlich ausgeprägter. Nach den zur Entwicklung der modifizierten Stern-Volmer Modells angenommenen Zuständen, wäre neben einer reduzierten Quantenausbeute auch eine verminderte Lebensdauer des gelöschten Zustands denkbar, was durch diese Ergebnisse jedoch nicht unterstützt wird. Zur Untersuchung der Spezifität der Sonde wurden auch Löschexperimente mit Mn(II) , Fe(II) , Ni(II) , und Co(II) durchgeführt und mit dem modifizierten Stern-Volmer Modell ausgewertet. Die bestimmten Bindungskonstanten wurden durch literaturbeschriebene Ergebnisse bestätigt [Holyer 1965]. Aufgrund der

hohen relativen Löschung durch Ni(II) sind Cu(II)-Ionen nur neben Mn(II), Fe(II) und Co(II) spezifisch nachweisbar.

4.5. Einzelmolekülspektroskopie mit der TMR-markierten Sonde

Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie wurde die Löschung an einzelnen Sonden untersucht. Da die Beobachtungsdauer einzelner Moleküle in Lösung aufgrund der Diffusionszeit durch das Detektionsvolumen auf wenige ms beschränkt wäre, Reaktionen aber meist langsamer als die Diffusion ablaufen, wurde ein Weg gesucht, die Beobachtungszeit einzelner Sonden zu verlängern. Dies wurde durch Immobilisierung der Probe auf einer optisch transparenten Oberfläche gelöst. Da es dadurch zu Wechselwirkungen der Sonde mit der Oberfläche und im Zuge dessen zu einer Hemmung der Reaktion kommen könnte, wurde die Oberfläche gegenüber Adsorption passiviert und ein besonderes Design der Sonde zur Separation des Reaktionszentrums von der Oberfläche ausgenutzt (Abbildung 4.5-1).

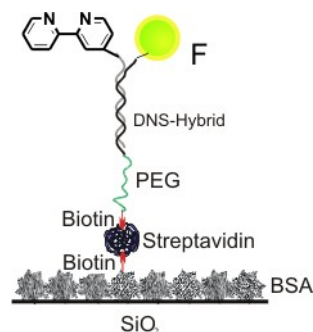


Abbildung 4.5-1. Passivierung der Oberfläche gegenüber Adsorption und Design der Sonde zur Separation des Reaktionszentrums von der Oberfläche.

Durch den langen DNS-Stamm und den Hexaethylenglycol-Anker (HEGL) sollte die Chelatgruppe in die Lösung hineinragen und der Chelatligand möglichst lösungsähnliche Bedingungen erfahren. Damit das reaktive Zentrum, hier der Ligand, leicht durch die Reaktionspartner erreichbar bleibt und keine Wechselwirkung mit der Oberfläche auftritt, wurde eine literaturbekannte Immobilisierungsmethode gewählt, die eine unspezifische Adsorption der Sonde auf der Oberfläche verhindert und sie unter Erhalt der Rotationsfreiheit mit der Oberfläche verknüpft. [Piester 2003], [Weston 2000]. Im Folgenden wird

die Wechselwirkung der nach dieser Methode präparierten Oberflächen mit dem Sondenkonstrukt untersucht. Anschließend werden Experimente zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen Sonde und Kupfer(II) mit der Einzelmolekülmikroskopie vorgestellt und die Kinetik nach verschiedenen Methoden bestimmt.

4.5.1. Immobilisierung der Probe und Untersuchung der Mobilität

Zunächst wurden die BSA / BSA-Biotin-Oberflächen, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, hergestellt. Die Belegungsichte der Oberflächen wurde durch Anpassung der zugegebenen Sondenmenge optimiert. Die Methode wurde zunächst mit einem fertig von der Firma IBA gekauften Cy5- und Biotin-modifizierten Oligonukleotid getestet.

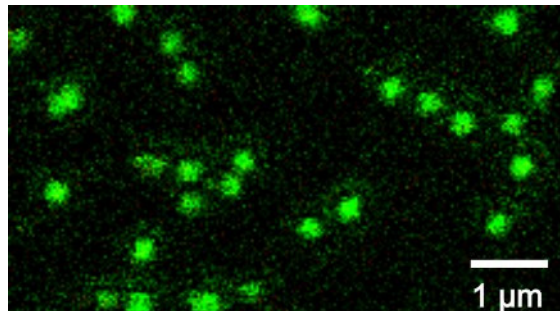


Abbildung 4.5-2. Ausschnitt aus einer Aufnahme einer mit Cy5-Oligonukleotid belegten Oberfläche. Auf $100 \mu\text{m}^2$ wurden zwischen 60 und 120 einzelne Cy5-markierte Oligonukleotide immobilisiert. Die Aufnahme wurde bei $5 \mu\text{W}$ und einer Integrationszeit von 2 ms/ Bildpunkt erstellt.

Die Biotin-markierte Sonde bindet innerhalb kurzer Zeit an eine Bindungsstelle des Streptavidins. Die Aufnahme in Abbildung 4.5-2, am konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen, zeigt die Belegungsichte der so erstellten Oberfläche. Auf $5 \times 10 \mu\text{m}$ waren 27 Punkte zu erkennen. Die Einstellung der richtigen Probenkonzentration ist nötig, da an ein Streptavidin bis zu vier Biotinmoleküle binden können und mit steigender Konzentration auch die Wahrscheinlichkeit zunimmt, mehrere Sonden am selben Streptavidin zu binden. Aufgrund der beugungsbegrenzten Auflösung könnten somit keine einzelnen Moleküle mehr untersucht werden. Um dies sicherzustellen, sollten außerdem die einzelnen Sonden gut voneinander separiert vorliegen, auf einer Fläche von $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ nicht mehr als 120 Sonden, damit das Fluoreszenzsignal der beobachteten Sonde nicht mit dem Signal einer benachbarten Sonde verfälscht wird.

4.5.1.1. Untersuchung der Beweglichkeit immobilisierter Sonden

Zur Unterscheidung von an der Oberfläche adsorbierten Sonden von immobilisierten, aber in Rotation frei beweglichen Molekülen, wurden die Aufnahmen von Oberflächen mit polarisationsmodulierter Anregung durchgeführt (vgl. Kapitel 3.6). Mit Hilfe eines elektro-optischen Modulators kann die Polarisationsebene eines polarisierten Strahls beliebig gedreht werden. Moduliert man die Polarisationsebene des Lasers mit der Zeit und regt damit einen frei beweglichen Farbstoff an, so erhält man aufgrund der schnellen Rotation des Farbstoffdipolmoments ein unmoduliertes Signal (Abbildung 4.5-3a). Ist der Farbstoff fixiert, ändert sich dessen Fluoreszenzintensität mit der Änderung des Winkels zwischen Laserpolarisation und Dipolmoment des Farbstoffs. Bei der Bildaufnahme einer Oberfläche wird die Polarisationsebene des Lasers pro Bildpunkt um 36° gedreht, damit ist nach 5 Bildpunkten die Ausgangspolarisationsebene wieder erreicht (180°). Die Punktabbildung eines fixierten Fluorophors erscheint moduliert (Streifen), während frei rotierende Farbstoffe unverändert ein annähernd gaussförmiges Intensitätsprofil zeigen.

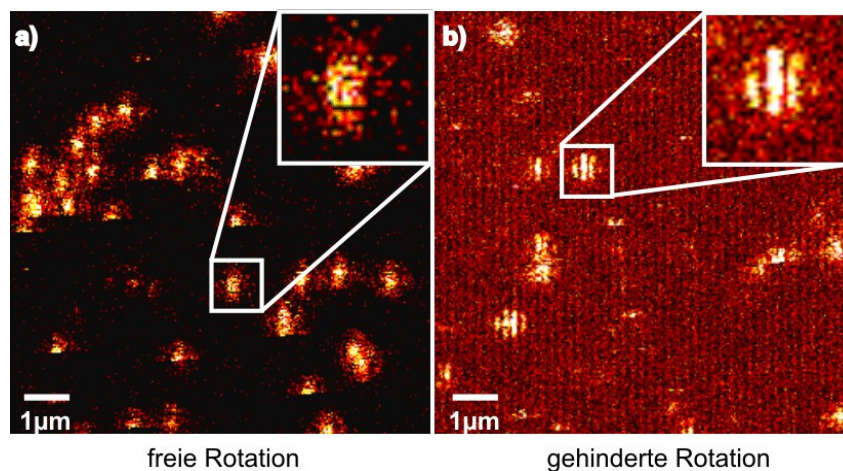


Abbildung 4.5-3. Aufnahmen der mit Cy5-DNS-markierten Oberfläche mit polarisationsmodulierter Anregung. a) Die Oberfläche ist von Lösungsmittel bedeckt und die Emission der Farbstoffe zeigt keine Modulation. b) Nachdem das Lösungsmittel abgezogen wurde, zeigt sich die Modulation der Anregung auch in der Emission.

In Abbildung 4.5-3 wird eine Oberfläche gezeigt, die mit Cy5-modifiziertem Oligonukleotid nach obiger Methode erstellt und mit polarisationsmodulierter Anregung abgebildet wurde. Die Pufferlösung wurde entfernt und die Oberfläche nach dem Trocknen erneut vermessen. Man erkennt sofort, dass auf der trockenen Oberfläche jeder Punkt moduliert erscheint, die Probe nicht mehr frei beweglich ist. Die Probe adsorbierte

auf der BSA-Oberfläche sobald die Oberfläche nicht mit ausreichend Pufferlösung benetzt war. War die Probe einmal fixiert, lies sie sich nicht wieder ablösen. Wenn die Oberfläche unter ausreichend Lösungsmittel aufbewahrt wird, so adsorbiert die DNA-Probe nicht an der Oberfläche. Aus der freien Rotation des Farbstoffs schließt man, dass auch der DNA-Einzelstrang ungehinderte Rotation zeigt und damit für Reaktionen gut zugänglich vorliegt (weitere Bilder im Anhang , Abbildung 6.2-1 und 2).

Eine weitere Möglichkeit, die Rotationsfreiheit der Probe zu untersuchen, besteht darin, die Emission der Sonde durch einen polarisierenden Strahlteiler in deren vertikale und horizontale Polarisationsanteile aufzuspalten und separat aufzunehmen. Werden frei rotierende Moleküle mit zirkular polarisiertem Laserstrahl angeregt, so werden im zeitlichen Mittel gleiche Anteile horizontal- und vertikal polarisierten Lichts emittiert und beide Detektoren zeigen dieselbe Intensität. Sind die Farbstoffe in ihrer Rotation gehindert, so erfolgt die Emission mit einer bestimmten Polarisation, die Detektoren zeigen unterschiedliche Intensität. Wenn Moleküle an eine Oberfläche adsorbieren, wird eine zufällige Orientierung eingenommen. Je nach Orientierung des Moleküls erhält man ein bestimmtes Intensitätsverhältnis zwischen Kanal 1 und Kanal 2. Im Ausnahmefall, d. h. wenn der Farbstoffdipol genau im Winkel von 45° zu der Polarisationssebene der beiden Detektionskanäle adsorbiert wurde, ist ebenso ein gleiches Intensitätsverhältnis der Detektoren zu sehen, was als frei rotierendes Molekül fehlinterpretiert würde. Deshalb ist mit dieser Methode keine direkte Unterscheidung zwischen mobilen und adsorbierten Farbstoffen möglich. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie von der Anregung unabhängig, und damit mit jedem Laser ohne größeren apparativen Aufbau möglich ist. Nur die Detektion der Fluoreszenz muss über einen polarisierenden Strahlteiler und mit zwei Detektoren erfolgen.

Im Falschfarbenbild in Abbildung 4.5-4 wird Kanal 1 in Grün und Kanal 2 in Rot dargestellt. Überlagern sich die Kanäle, werden die Farben gemischt und gleiche Anteile beider Kanäle ergibt Gelb. In dieser Aufnahme zeigen alle Punkte gleiche Anteile der beiden Kanäle (vertikal und horizontal). Die Bilder wurden unmittelbar vor der Zugabe von Kupfer(II) zur Aufnahme der Zeit aufgelösten Fluoreszenz erstellt und zeigen, dass die Rotationsfreiheitsgrade des Konstrukts bei der Immobilisierung erhalten bleiben (weitere Bilder im Anhang, Abbildung 6.3-1 und 2).

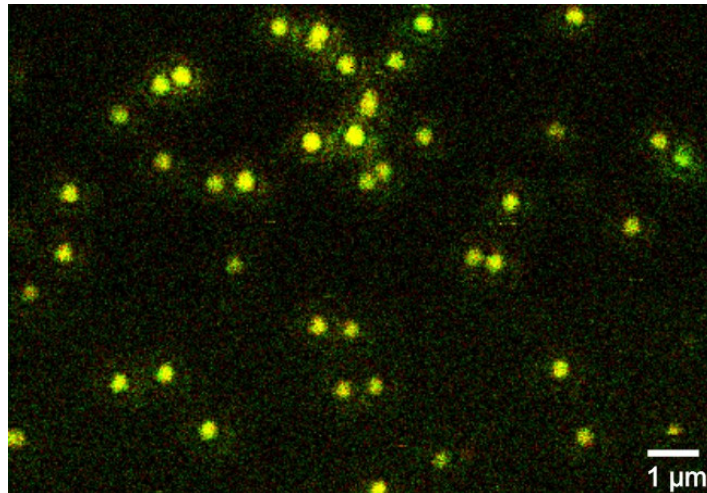


Abbildung 4.5-4. Falschfarbenbild einer Aufnahme einer Oberfläche mit TMR- markierten Sonden. Die Anregung erfolgte mit zirkularer Polarisierung und die Emission wurde in parallel (Kanal 1) und orthogonal (Kanal 2) geteilt und auf zwei Detektoren aufgenommen. Kanal 1 wird Grün dargestellt und Kanal 2 rot. Gemischte Kanäle werden Gelb gezeigt.

Die gezeigten Daten demonstrieren, dass die durch die Behandlung der Oberfläche mit BSA die unspezifische Adsorption der Probe an der Oberfläche verhindert wird. Durch Dotierung mit Biotin-modifizierten BSA konnten Ankerpunkte auf der Oberfläche erzeugt werden, die eine selektive Bindung der Sonde über Streptavidin ermöglichen. Durch Aufnahme von Proben mit polarisationsmodulierter Anregung konnte gezeigt werden, dass die Rotation der Sonde erhalten bleibt. Dieses Ergebnis wurde mit Aufnahmen solcher Oberflächen mit zwei zueinander senkrecht polarisierten Detektoren bestätigt. Aus der freien Rotation des Dipols des Farbstoffs wurde abgeleitet, dass auch die Sonde, insbesondere der dcbpy-Ligand, frei rotieren kann und damit der Einfluss der Oberfläche auf die Komplexbildung minimiert wurde. Die Aufnahme der Fluoreszenzintensität einzelner Moleküle über ein längeres Zeitintervall mit dieser Methode wurde später in Kapitel 4.5.7 zum Nachweis der Änderungen der Moleküllorientierung mit hoher Zeitauflösung genutzt. Wenn die Moleküle wie erwünscht unter Erhalt ihrer Rotationsfreiheit immobilisiert wurden, so wird dies aufgrund der stetigen Rotation des Farbstoffdipols durch ein konstantes Intensitätsverhältnis zwischen den beiden Detektoren erkennbar. Adsorbiert ein Molekül kurzzeitig an der Oberfläche, so kann dies, wie bereits beschrieben, eine Änderung des Signalverhältnisses zwischen Kanal 1 und 2 zur Folge haben. Damit würde eine kurzzeitige Adsorption an der Oberfläche indiziert.

4.5.2. Einzelmoleküluntersuchungen der TMR-dcbpy-Sonden

Nachdem gezeigt wurde, dass die einzelnen Sonden nach der Immobilisierung auf der Oberfläche noch freie Rotation zeigten und damit eine unbeeinflusste Reaktion der Sonde möglich sein sollte, wurde die zeitabhängige Fluoreszenz der Sonde bei Löschung durch Kupfer an einzelnen Sonden untersucht. Eine, wie oben beschrieben, präparierte Oberfläche wurde mit der Sonde dotiert und anschließend 5 mal mit Mops-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Sondenmoleküle zu entfernen und den PBS-Puffer zu ersetzen. Dadurch wurden gleiche Bedingungen wie in den Ensemble-Messungen geschaffen. Abbildung 4.5-5a zeigt die Rasterabbildung einer Oberfläche ohne Zugabe von Kupfer(II). Jeder helle Punkt auf dem Bild steht für einzelne Sonden, die an der Oberfläche gebunden haben. Die Punkte zeigen eine gaussförmige Intensitätsverteilung. Nach Einstellung der Kupfersulfatkonzentration auf 2 μM wurde die Oberfläche erneut abgerastert (Abbildung 4.5-5b, vgl. auch Abbildung 6.4-3 und 4). Die hellen, ehemals runden Punkte zeigen nun Streifen. Da die Abbildung von rechts nach links in einem Zeilenrasterverfahren aufgenommen wurde, werden kurzzeitige Unterbrechungen der Fluoreszenz der Sonde als Längsstreifen sichtbar. Je höher die Kupfer(II)-konzentration, desto häufiger treten diese Streifen auf, bis bei 50 μM kaum Fluoreszenz mehr detektiert werden konnte.

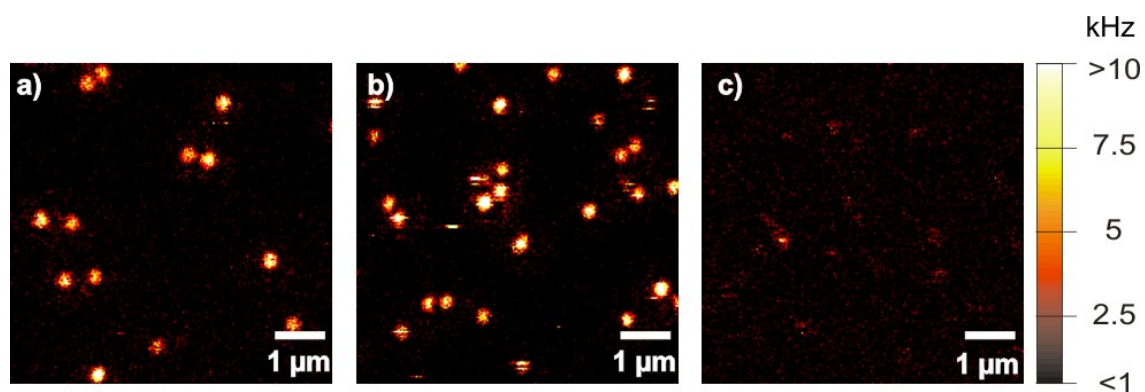


Abbildung 4.5-5. Rasterabbildung von immobilisierten TMR-dcbpy-Sonden in 10 mM Mops in Abwesenheit von Kupfer(II) (a), mit 2 μM (b) und 50 μM (c) Kupfer(II). Die Anregung erfolgte zirkular polarisiert mit 5 μW bei 532 nm. (Auflösung 50 nm/ Bildpunkt, Integrationszeit: 2 ms/ Pixel)

Zur quantitativen Untersuchung der Löschung der Sonde durch Kupfer(II)ionen wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität einzelner Sonden mit der Zeit bei verschiedenen Cu^{2+} -Konzentrationen aufgenommen.

4.5.3. Untersuchung der Löschung einzelner Sonden durch Kupfer(II)

Zur Untersuchung der Fluoreszenzlöschung einzelner Sonden über ein längeres Zeitintervall wurden die immobilisierten Sonden durch Rasterabbildung eines $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ großen Bereichs lokalisiert und nacheinander zur Aufnahme ihrer zeitabhängigen Fluoreszenz in den Fokus gebracht. Zur graphischen Darstellung wurden die in einem Zeitintervall von 20 ms detektierten Photonen gegen die fortlaufende Messzeit aufgetragen. In einem ersten Experiment wurde die Fluoreszenz einzelner Sonden in von Kupfer(II)-freier Lösung aufgenommen. Die Sonden zeigten typischerweise eine konstante Fluoreszenz bis zur Photozerstörung (Abbildung 4.5-6a). Nach Zugabe von $10 \mu\text{L}$ einer CuSO_4 -Lösung ($10 \mu\text{M}$) wurden nach einiger Zeit Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität einzelner Sonden beobachtet (Abbildung 4.5-6b). Das wurde so interpretiert, dass zunächst die nähere Umgebung der Sonden noch frei von Kupfer(II)ionen war und deshalb keine Fluktuationen beobachtet wurden. Nach einiger Zeit hatten sich die Kupfer(II)ionen verteilt, konnten an den Liganden binden und die Fluoreszenz der Sonde löschen. Aufgrund der Instabilität des Komplexes entsteht nach einiger Zeit wieder die freie Sonde und die Fluoreszenz wird wiederhergestellt. Diese aufeinander folgenden Assoziations- und Dissoziationsprozesse wurden als Fluktuationen der Fluoreszenzintensität erkennbar.

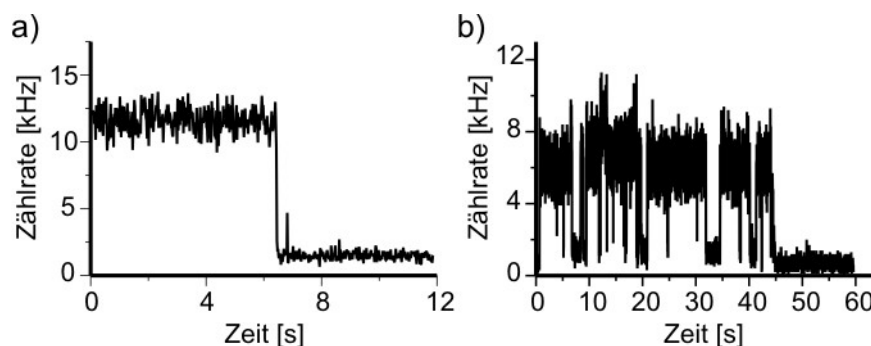


Abbildung 4.5-6. Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität einzelner Sonden (Integrationszeit 20ms). a) typischer Verlauf, wenn kein Kupfer(II) zugegeben wurde; b) nach Zugabe von $10 \mu\text{L}$ einer Kupfersulfatlösung ($10 \mu\text{M}$).

Um die Fluoreszenzlöschung bei definierten Kupfer(II)konzentrationen zu untersuchen, wurde in weiteren Experimenten nach der Lokalisierung der Sonden eine definierte Kupfer(II)konzentration eingestellt. Dazu wurde die überstehende Pufferlösung mit einer Pipette bis auf einen Rest von etwa $80 \mu\text{L}$ abgezogen und anschließend $400 \mu\text{L}$ der

Kupfersulfatlösung (in MOPS pH 7) zugegeben. Dieser Vorgang wurde 4-mal wiederholt und damit die gewünschte Konzentration angenähert. In Abbildung 4.5-7 ist exemplarisch die zeitabhängige Fluoreszenz einzelner Sonden bei Kupfer(II)-konzentrationen von 0, 2 und 6 μM gezeigt. Es ist deutlich eine Abhängigkeit zwischen den Fluktuationen und den Kupferionen erkennbar. Sind keine Kupfer(II)ionen in der Lösung vorhanden, wurden mit Ausnahme weniger Aus-Zeiten aufgrund von Triplett-Übergängen, konstante Fluoreszenzraten bis zur Photozerstörung beobachtet. Wenn Kupfer(II)ionen vorhanden sind, fluktuiert die Fluoreszenz zwischen zwei Intensitätsstufen. Diese Fluktuationen wurden als Übergänge zwischen diskreten Zuständen hoher Quantenausbeute (An-Zustand) und niedriger Quantenausbeute (Aus-Zustand) interpretiert, wie sie in Kapitel 4.1.1 angenommen wurden.

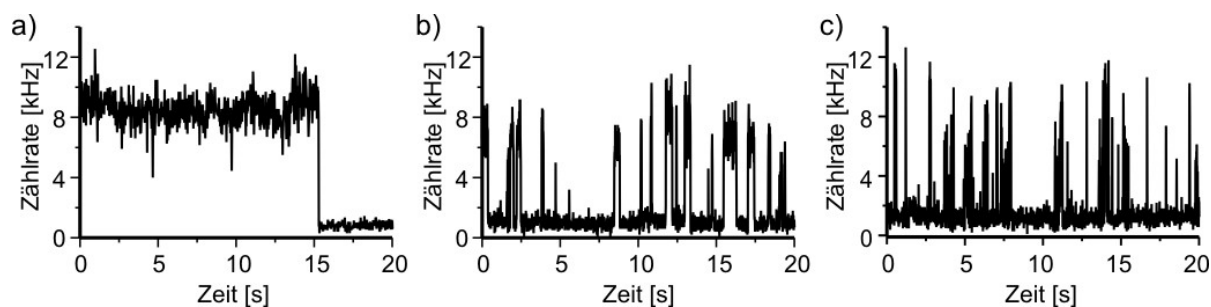


Abbildung 4.5-7. Aufnahmen der Fluoreszenz der TMR-dcbpy-Sonden in Abwesenheit von Kupfer (a); bei 2 μM (b) und bei 4 μM (c) Kupfer(II) (Integrationszeit 10 ms).

Der Aus-Zustand entspräche auf molekularer Ebene der durch Bindung von Kupfer(II) gelöschten Sonde, während im An-Zustand kein Kupfer gebunden wurde und eine hohe Fluoreszenzrate beobachtet wird. Um die Interpretation der Fluoreszenzspuren zu überprüfen, wurden Kontrollexperimente mit Sonden durchgeführt, an die kein dcbpy-Ligand gekoppelt wurde. In Abbildung 4.5-8a und b sind zwei typische Spuren gezeigt, die mit 2 μM bzw. 6 μM Cu^{2+} aufgenommen wurden. Bei Cu^{2+} -Konzentrationen von 2 μM wurden keine Fluktuationen beobachtet und bei 6 μM Cu^{2+} sind nur wenige kurze Aus-Zustände erkennbar. Der Vergleich mit den beobachteten Fluktuationen der dcbpy-modifizierten Sonde bei entsprechenden Konzentrationen bestätigt die Interpretation der Fluktuationen als Assoziation und Dissoziationsprozesse des Kupfer-Sonden Komplexes.

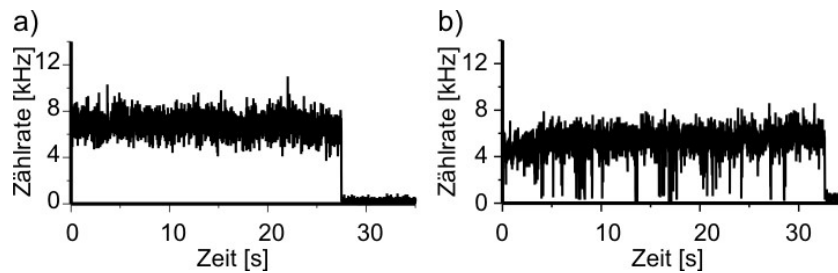


Abbildung 4.5-8. Fluoreszenzaufnahmen der Tür-Sonde ohne Ligandmodifikation. (A) In Abwesenheit von Cu^{2+} wird eine konstante Fluoreszenzintensität bis zur Photozerstörung beobachtet. (B) Nach Einstellen einer Kupfer(II)konzentration von $6 \mu\text{M}$ sind kurze Aus-Zeiten erkennbar, die auf Interaktionen der Kupferionen mit dem DNS-Rückgrats oder auf Stoßlöschung zurückgeführt werden können.

Wenn die Fluktuationen aus einzelnen Assoziations- / Dissoziationsereignissen des Liganden mit Cu^{2+} resultieren, sollte die Verweildauer in einem Zustand mit der Kinetik der Komplexbildungen zusammenhängen. Diese Abhängigkeit wurde mittels statistischer Auswertung der Zustandsverweilzeiten untersucht und die kinetischen Konstanten zur Dissoziation und Assoziation des Sonden-Kupfer(II)-Komplexes bestimmt.

4.5.4. Auswertung der Einzelmolekülergebnisse mittels Schwellwertmethode

Zu jeder Konzentration wurden mehr als 220 Einzelmessungen durchgeführt. Die Aufnahmedauer bis zur Photozerstörung variierte zwischen 0.1 und 400s. Mindestens 10 % dieser Fluoreszenzaufnahmen konnten zur Auswertung herangezogen werden. Die restlichen waren entweder zu kurz oder wiesen kein ausreichendes Signal zu Rausch-Verhältnis auf (Tabelle 4.5-1). Die Auswertung der Fluoreszenzintensitätsspuren erfolgte durch Anlegen eines Schwellwerts, der den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz in aufeinander folgende An- und Aus- Zustände einteilte. Abbildung 4.5-9 zeigt die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität einer einzelnen Sonde bei einer Kupfer(II)konzentration von $2 \mu\text{M}$. Durch Anlegen eines Schwellwerts wurden die An- und Aus- Zustände bestimmt.

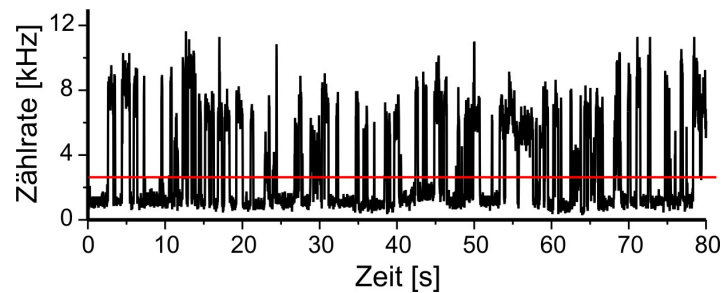


Abbildung 4.5-9. Anlegen eines Schwellwerts (rote Linie) zur Analyse der Dauer der An- und Aus-Zustände.

Die Verweilzeiten in den An- bzw. Aus-Zuständen wurden durch ein selbstentwickeltes Programm in Labview ausgelesen und in ein Histogramm eingetragen (Abbildung 4.5-10). Zur Bestimmung der Kinetik wurde ein Model entwickelt, das die Abhängigkeit der Häufigkeit von der Verweilzeit in einem Zustand beschreibt. Dies wurde aus den Geschwindigkeitsgesetzen für die Komplexbildung aus einem Metall M und dem Liganden L zum Komplex ML bzw. dessen Zerfall abgeleitet (Gleichung 4.5-1).



Die übliche Beschreibung der Kinetik der Assoziations- und Dissoziationsreaktionen (Gleichung 4.5-1) wird durch die folgenden Differentialgleichungen gegeben:

$$\frac{d[L]}{dt} = -k_a \cdot [M] \cdot [L] + k_d \cdot [ML] \quad \text{Gleichung 4.5-2}$$

$$\frac{d[ML]}{dt} = k_a \cdot [M] \cdot [L] - k_d \cdot [ML] \quad \text{Gleichung 4.5-3}$$

Wenn einzelne Moleküle betrachtet werden, verlieren diese Gleichungen ihre Gültigkeit, die Konzentrationen des Ligands [L] und des Komplexes [ML] müssen durch die entsprechenden Zustandswahrscheinlichkeiten $P(t)$ ersetzt werden. Im vorliegenden Fall ist der freie Ligand an den Zustand hoher Intensität und der Komplex an den Zustand niedriger Intensität gekoppelt. Damit kann die Kinetik der Assoziation bzw. Dissoziation durch Verwendung der Wahrscheinlichkeit beschrieben werden, die Sonde ist im Zustand hoher Intensität P_{An} bzw. niedriger Intensität P_{Aus} anzutreffen. Dieser Zusammenhang wird durch Gleichung 4.5-4 und 5 beschrieben.

$$\frac{dP_{An}(t)}{dt} = -k_a \cdot [M] \cdot P_{An}(t) + k_d \cdot P_{Aus}(t) \quad \text{Gleichung 4.5-4}$$

$$\frac{dP_{Aus}(t)}{dt} = k_a \cdot [M] \cdot P_{An}(t) - k_d \cdot P_{Aus}(t) \quad \text{Gleichung 4.5-5}$$

Die Wahrscheinlichkeit, die Sonde im An-Zustand (Aus-Zustand) anzutreffen P_{An} bleibt bei Reaktionen im Gleichgewicht konstant und ändert sich demnach nicht mit der Zeit. Um Kinetiken im Gleichgewicht auf Einzelmolekülebene zu untersuchen müssen einzelne Ereignisse betrachtet werden. Betrachtet man die Dauer der An- bzw. Aus-Zustände separat, werden Randbedingungen gültig, die die Gleichungen vereinfachen. Betrachtet man einen An-Zustand, gilt als Randbedingung zu Beginn des Zustands $P_{An} = 1$ und $P_{Aus} = 0$. Ebenso ist nicht mehr die absolute Zeit relevant, sondern die Verweilzeit in dem entsprechenden Zustand. Die absolute Zeit t wurde deshalb durch die Zeitdifferenz zwischen Beginn und Ende eines Zustands, der Verweilzeit Δt , ersetzt. Damit erhält man folgende Differentialgleichungen für die jeweiligen Zustandswahrscheinlichkeiten:

$$\frac{dP_{An}(\Delta t)}{d\Delta t} = -k_a \cdot [M] \cdot P_{An}(\Delta t) \quad \text{Gleichung 4.5-6}$$

$$\frac{dP_{Aus}(\Delta t)}{d\Delta t} = -k_d \cdot P_{Aus}(\Delta t) \quad \text{Gleichung 4.5-7}$$

Die Integration dieser Gleichungen liefert ein exponentielles Modell erster Ordnung, sowohl für die Assoziation als auch für die Dissoziation:

$$P_a(\Delta t) = \exp(-k_a \cdot [Cu^{2+}] \cdot \Delta t) \quad \text{Gleichung 4.5-8}$$

$$P_d(\Delta t) = \exp(-k_d \cdot \Delta t)$$

$$v_a = k_a \cdot [Cu^{2+}] \quad \text{Gleichung 4.5-9}$$

$$v_d = k_d$$

Damit ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Komplexbildung v_a und der Kupfer(II)konzentration. Die Dissoziationsgeschwindigkeit v_d hingegen ist von der Kupferkonzentration unabhängig (Gleichung 4.5-9). Abbildung 4.5-10 zeigt die Häufigkeitsverteilung der An- und Aus-Zustandsdauer die aus den Fluoreszenzfluktuationen aus Abbildung 4.5-9 erhalten wurden. Je Histogramm sind etwa

90 An- bzw. Aus- Zustände eingetragen. Die Rote Linie stellt die nach der Modellfunktion aus Gleichung 4.5-8 angepasste Häufigkeitsverteilung dar.

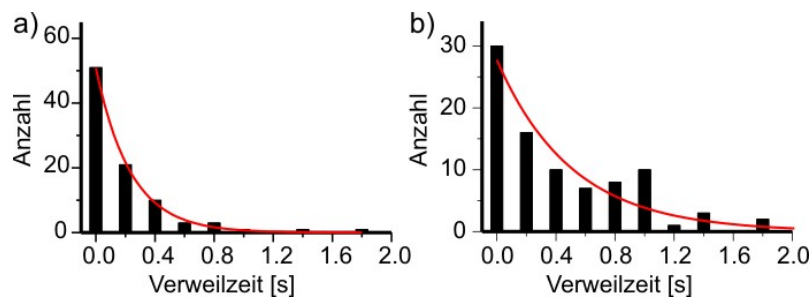


Abbildung 4.5-10. Histogramme der Schwellwertanalyse der Fluktuationen der in Abbildung 4.5-9 gezeigten Aufnahme. Durch Anpassen eines exponentiellen Modells erster Ordnung an die Daten werden die Dissoziations- und Assoziationsgeschwindigkeiten erhalten.

Man erkennt, dass die Dauer der An- Zustände gut durch diese Funktion beschrieben werden können. Die Häufigkeitsverteilung der Dauer der Aus- Zustände weicht stärker von der Modellfunktion ab, was an der Verteilung der Ereignisse im Histogramm liegt. Durch Aufsummieren der Ereignisse aller Aufnahmen, die bei gleicher Kupfer(II)-konzentration durchgeführt wurden, soll die Gesamtzahl Ereignisse erhöht und damit die statistischen Abweichungen verringert werden (Mehrere Beispiele von Einzelmolekül-fluoreszenzaufnahmen zu jeder Kupfer(II)konzentration sind im Anhang in den Abbildung 6.4-1 - 5 aufgeführt). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Histogramme in eine Wahrscheinlichkeitsdichte umgerechnet und normiert. Dazu wird die Häufigkeit bei einer Zeitdifferenz mit allen benachbarten Zeitdifferenzen ohne Ereignis gemittelt (Gleichung 4.5-10).

$$P(\Delta t_i) = \frac{H(\Delta t_i)}{0.5(\Delta t_{i+1} - \Delta t_i)} \quad \text{Gleichung 4.5-10}$$

In Abbildung 4.5-11a und b sind die Wahrscheinlichkeitsdichten der An- und Aus-Zustände P_{An} und P_{Aus} der Messungen bei verschiedenen Kupfer(II)konzentrationen von 0,5, 2, 4, 6 und 10 μM gezeigt. Eine Auswahl der dazu ausgewerteten Fluoreszenzspuren sind im Anhang zu finden (Abbildung 6.4-1 - 5). Die durchgezogenen Linien stellen die Modellanpassung an die verschiedenen Verteilungen dar. In Übereinstimmung mit Gleichung 4.5-8 wird deutlich, dass die Lebensdauer des An-Zustands bei steigender Kupferkonzentration abnimmt und die Steigung der Graphen steiler wird. Die

Lebensdauer Aus-Zustands hingegen zeigt keine Abhängigkeit von der Kupferkonzentration. Zu längeren Verweilzeiten weichen die Histogramme jedoch von der monoexponentiellen Verteilung ab, was auf unterschiedliches Verhalten einzelner Sonden zurückgeführt werden kann und in Kapitel 4.5.7 untersucht und beschrieben ist.

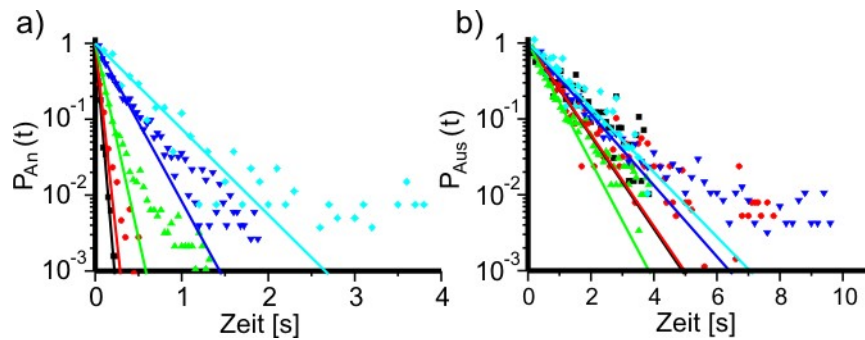


Abbildung 4.5-11. Häufigkeitsverteilung über die Dauer der An- Zustände (a) und Aus- Zustände (b) bei steigender Kupferkonzentration. Hellblau stellt die Verteilung bei $0,5\mu\text{M}$ blau bei $2\mu\text{M}$ grün bei $4\mu\text{M}$ rot bei $6\mu\text{M}$ und schwarz bei $10\mu\text{M}$ dar. Die Aus-Zeiten zeigen keine Änderung während die Dauer der An- Zeiten mit steigender Kupferkonzentration deutlich abnimmt.

Zu jeder Konzentration wurden vier Messreihen durchgeführt und jeweils die Geschwindigkeit ermittelt. Zu jeder Konzentration wurden mindestens 240 Fluoreszenzspuren aufgenommen. Davon konnten jeweils mindestens 10 % zur Auswertung der Kinetik herangezogen werden (Tabelle 4.5-1). Die Länge der Aufnahmen variierte zwischen 10 und 300s und beinhaltete bis zu 300 Assoziations-Dissoziationsereignisse.

Tabelle 4.5-1. Anzahl und Verwendbarkeit von Fluoreszenzspuren, die zur Analyse der Komplexbildungsdynamik bei verschiedenen Konzentrationen an Cu(II) aufgenommen wurden.

$c(\text{CuSO}_4) / \mu\text{M}$	0	0.5	2	4	6	10
# aufgenommene Fluoreszenzspuren	335	847	349	496	243	224
Zur Analyse verwendet	-	70	75	46	35	27

In Abbildung 4.5-12 sind die Mittelwerte der Messreihen gegen die Kupfer(II)-konzentration aufgetragen. Durch Anpassen der in Gleichung 4.5-8 beschriebenen exponentiellen Modellfunktionen an die entsprechenden Histogramme wurden die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Der Fehler ergab sich aus der größten Standardabweichung der zu jeder Konzentration durchgeführten Messreihen. Wie erwartet

zeigt die Dissoziation keine Abhängigkeit von der Kupfer(II)-konzentration während die Assoziation linear mit der Kupfer(II)-konzentration zunimmt (Abbildung 4.5-12).

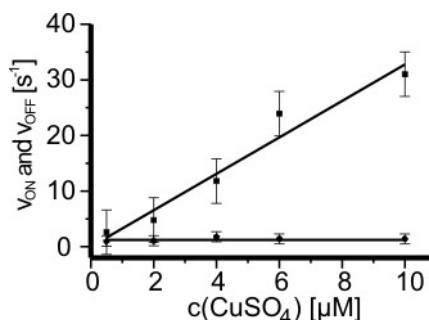


Abbildung 4.5-12. Geschwindigkeiten der Komplexbildung und Dissoziation in Abhängigkeit der Kupfer(II)-konzentration.

Durch Anpassen der Parameter der Gleichung 4.5-9 wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation zu $3,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und der Dissoziation zu $1,2 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung $K = k_a / k_d$ wurde zu $2,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \pm 0,8 \cdot 10^6$ bestimmt, was in derselben Größenordnung des mittels Stern-Volmer Analyse bestimmten Wertes von $8,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \pm 2,2 \cdot 10^6$ liegt.

Eine vergleichbare Reaktion wurde in der Literatur beschrieben. Darin wurde die Kinetik der Komplexbildung zwischen Kupfer(II) und Bipyridin mit Hilfe der „Stopped Flow“-Methode analysiert. Die Assoziation wurde mit $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angegeben und war somit um den Faktor 10 schneller, die Dissoziation wurde mit $0,09 \text{ s}^{-1}$ angegeben und ist langsamer als der hier ermittelte Wert (Tabelle 4.5-2). Die Abweichung dieser Werte von den in dieser Arbeit bestimmten Werten wurde mit dem Einfluss der Carboxylsubstituenden des hier untersuchten Bipyridinderivats erklärt. Die elektronischen und sterischen Effekte könnten eine langsamere Assoziation und eine schnellere Dissoziation und damit eine kleinere Gleichgewichtskonstante erklären.

Tabelle 4.5-2. Geschwindigkeitskonstanten und Gleichgewichtskonstanten der Komplexbildung.

Methode	$k_a (10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_d (\text{s}^{-1})$	$K (10^6 \text{ M}^{-1})$
Stern-Volmer Analyse	-	-	$8,2 \pm 2,2$
Einzelmolekülspektroskopie	$3,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,9$
Literatur (stopped-flow)	50	0,09	500

Aufgrund der Darstellung der Daten mit einer Integrationszeit von 20 ms wurden mit der Schwellmethode keine schnelleren Prozesse, wie beispielsweise Triplett-Übergänge, erkannt. Eine kürzere Integrationszeit würde zwar die Zeitauflösung verbessern, jedoch zu

einer unzuverlässigeren Unterscheidung zwischen An- und Aus-Zustand führen. Zur Untersuchung, ob Fluktuationen im Milli- Mikrosekundenbereich ablaufen, wurden deshalb zwei weitere Methoden zur Datenauswertung angewendet. Zunächst wurde die Methode der Intensitätsautokorrelation zur weiteren Analyse der Daten verwendet. Anschließend wurden die Daten mit einem von Mark Jäger entwickelten, auf einem Hidden-Markov Modell basierenden Algorithmus analysiert.

4.5.5. Auswertung der Daten mittels Intensitätsautokorrelation

Eine Methode zur Analyse von zeitlich fluktuierenden Signalen besteht darin, sie mit sich selbst zu korrelieren. Abbildung 4.5-13 zeigt einen Ausschnitt aus einer Fluoreszenzspur, die bei einer Kupfer(II)konzentration von $2 \mu\text{M}$ aufgenommen wurde und die zugehörige Autokorrelationsfunktion. Durch Anpassen eines geeigneten Modells wurden die der Kinetik zugrunde liegenden Parameter bestimmt.

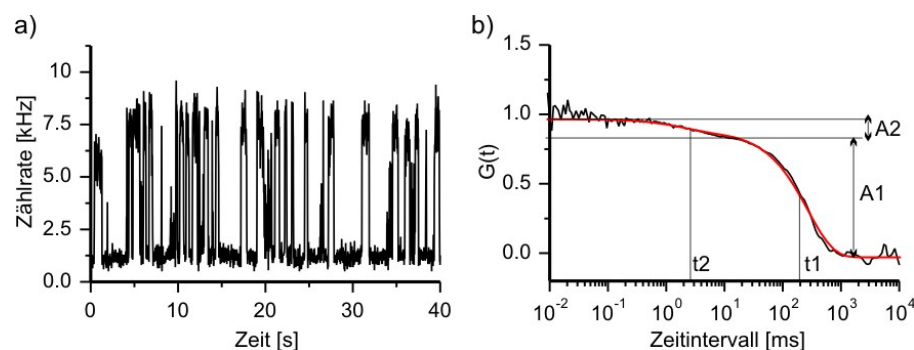


Abbildung 4.5-13. Ausschnitt der Aufnahme der Fluoreszenz über die Zeit einer TMR-dcbpy-markierten Sonde bei $2 \mu\text{M}$ Cu^{2+} und deren Autokorrelation (Schwarze Linie im Graph rechts). Die rote Linie stellt die Anpassung einer biexponentiellen Modellfunktion an die Daten dar.

Die Autokorrelationsfunktion in Abbildung 4.5-13 zeigt zwei Stufen mit Umkehrpunkten bei $t_2 = 2$ und $t_1 = 300$ ms, was bedeutet, dass Fluktuationen zweier unterschiedlicher kinetischer Komponenten sichtbar sind. Die langsame Komponente mit dem Umkehrpunkt bei 300 ms könnte den durch die Komplexbildung ausgelösten Fluktuationen entsprechen, während für die schnelle Komponente noch keine molekulare Interpretation gefunden wurde. Um kinetische Parameter zu erhalten, musste eine Modellfunktion entwickelt werden, mit der die Korrelationskurve beschrieben werden

kann. Wenn die langsamen Fluktuationen aus der Komplexbildung resultieren, kann die Kinetik, wie in Kapitel 4.5.4. gezeigt, mit Exponentialfunktionen beschrieben werden. Da die schnellen Fluktuationen noch keinem molekularen Mechanismus zugeordnet werden konnten, wurde angenommen, dass sie ebenfalls durch ein exponentielles Modell beschrieben werden können. Die Autokorrelation kann demnach durch eine Exponentialfunktion, entsprechend Gleichung 3.6-4 in Kapitel 3.6.1, modelliert werden. Zur Korrektur unterschiedlicher Intensitäten der entsprechenden Zustände wurde diese Gleichung wie in der Literatur beschrieben erweitert [Weston 1998]; [Fleury 1993]; [Zumbusch 1993]. Das so entwickelte Modell enthält zwei exponentielle Komponenten: Eine zur Beschreibung der langsamen und eine zur Beschreibung der schnellen Fluktuationen (Gleichung 4.5-11). Dabei bedeutet k_{Aus} die Rate, mit der das System vom An- in der Aus-Zustand übertritt und I_{An} bezeichnet die Zählrate des An-Zustands. An der Fluoreszenzspur wird die Intensität I_{An} und I_{Aus} abgelesen und dem Model vorgegeben.

$$G(\tau) = 1 + A_1 \cdot e^{-\tau(k_{\text{An}1} + k_{\text{Aus}1})} + A_2 \cdot e^{-\tau(k_{\text{An}2} + k_{\text{Aus}2})} \quad \text{Gleichung 4.5-11}$$

$$A_1 = \frac{k_{\text{An}1} k_{\text{Aus}1} (I_{\text{An}1} - I_{\text{Aus}1})^2}{(k_{\text{An}1} I_{\text{An}1} - k_{\text{Aus}1} I_{\text{Aus}1})^2}$$

$$A_2 = \frac{k_{\text{An}2} k_{\text{Aus}2} (I_{\text{An}2} - I_{\text{Aus}2})^2}{(k_{\text{An}2} I_{\text{An}2} - k_{\text{Aus}2} I_{\text{Aus}2})^2}$$

Die rote Linie in Abbildung 4.5-13 stellt eine Anpassung der Kurve nach der Modellfunktion entsprechend Gleichung 4.5-11 dar. Für die schnellen Fluktuationen wurde eine Amplitude von 0.05 bei einer Korrelationszeit von 1,12 ms erkannt und für die langsamen Fluktuationen eine Amplitude von 0,85 und einer Korrelationszeit von 311 ms. Daraus berechneten sich für Kinetik der langsamen Fluktuationen $k_{\text{An}} = 1,25 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{Aus}} = 2,67 \text{ s}^{-1}$, und für die schnellen Fluktuationen $k_{\text{An}2} = 523 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{Aus}2} = 76,1 \text{ s}^{-1}$. Im Vergleich mit den aus der Grenzwertmethode ermittelten Werten wurde die Dissoziationskonstante k_d recht gut reproduziert, die Assoziation weicht jedoch um 40 % ab. Die Autokorrelationsfunktionen wurden nun von weiteren Messungen bei Cu^{2+} -Konzentrationen von $4 \mu\text{M}$ und $6 \mu\text{M}$ gebildet und ausgewertet. Eine Auswahl der erhaltenen Korrelationsfunktionen ist in Abbildung 4.5-14 dargestellt.

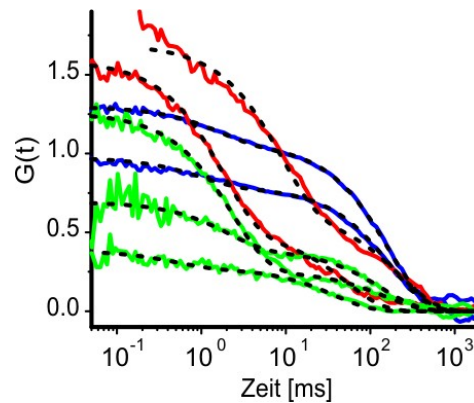


Abbildung 4.5-14. Intensitätsautokorrelationsfunktionen bei verschiedenen Konzentrationen: Blau 2 μM ; Rot 4 μM ; Grün 6 μM

Zur Anpassung des Modells wurden die den Zuständen entsprechenden Intensitäten aus der Fluoreszenzspur entnommen und der Modellfunktion als unveränderliche Werte vorgegeben. Die kinetischen Parameter wurden frei angepasst. Mehrere, bei unterschiedlichen Kupfer(II)konzentrationen aufgenommene, Fluoreszenzspuren wurden so ausgewertet. Die erhaltenen Werte zur Reaktionsgeschwindigkeit zeigen jedoch eine sehr starke Streuung, sodass die genaue Interpretation der so erhaltenen Ergebnisse nicht möglich ist. Die Funktionen zeigen sehr unterschiedliche Amplituden sowohl der schnellen Kinetik als auch der langsamen Kinetik. Bei 2 μM sind die Amplituden der langsamen Komponente deutlich höher als die der schnellen Komponente. Bei höheren Konzentrationen an Cu^{2+} kehrt sich das Verhältnis um. Die Korrelationsfunktionen werden von der schnellen Kinetik dominiert. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass die schnellen Fluktuationen nicht dauerhaft in den Intensitätsspuren zu finden sind. Sie treten kurzzeitig auf und sind dann wieder eine Weile nicht zu sehen (dynamische Heterogenität).

Um diese Variationen besser zu verstehen, wurden Autokorrelationen von Teilen der Fluoreszenzspur erstellt, die hauptsächlich die schnellen Fluktuationen zeigen, sowie von einem Teil, der hauptsächlich die langsamen Fluktuationen zeigt. Abbildung 4.5-15 zeigt eine Fluoreszenzspur zusammen mit Autokorrelationskurven, die über den gesamten Bereich, aus Bereich A und aus Bereich B errechnet wurden. Im Bereich A werden deutlich schnellere Fluktuationen beobachtet als im Bereich B. Dies deutet auf einen weiteren Zustand hin, der im Bereich B nicht mehr auftritt. Das ist auch in den Korrelationskurven erkennbar. Die Korrelationsfunktion A zeigt deutlich zwei separate Zustände mit unterschiedlichen Korrelationszeiten, während die Funktion B von der langsameren Kinetik dominiert wird.

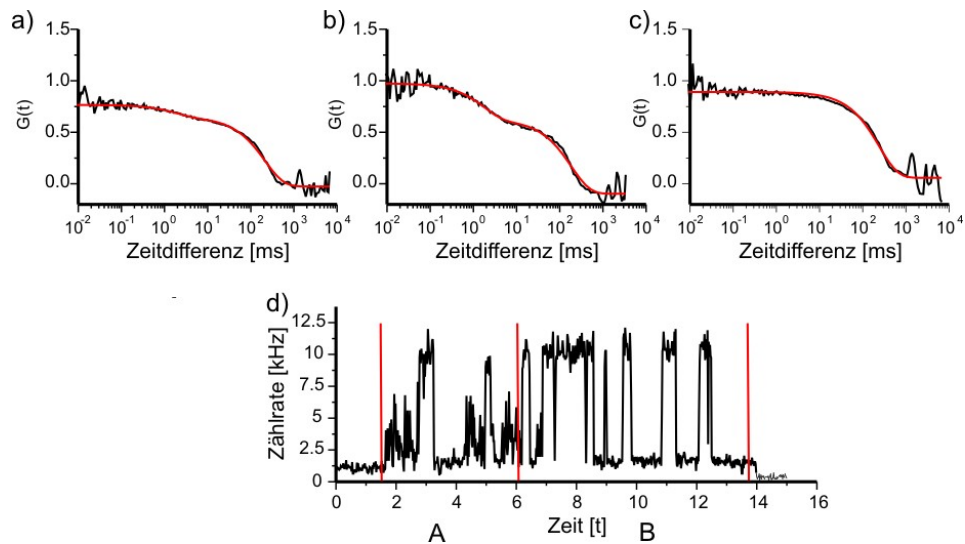


Abbildung 4.5-15. Autokorrelationsfunktionen verschiedener Bereiche der Fluoreszenzspur in d). Die Korrelationsfunktion über den gesamten Bereich wird in a) gezeigt, b) zeigt die Korrelationsfunktion des Bereichs A und c) die Korrelationsfunktion des Bereichs B.

Die mit der Modellfunktion erhaltenen Übergangsraten sind in Tabelle 4.5-3 zusammengefasst. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten variieren stark. Bereich A dient zur besseren Analyse der kinetischen Parameter der schnelleren Fluktuationen, die bei der Auswertung der Gesamspur reproduziert werden müssten. Im Bereich A wurden die schnellen Fluktuationen mit Geschwindigkeitskonstanten von $k_{An} = 312 \text{ s}^{-1}$ und $k_{Aus} = 284 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die Analyse der Gesamspur ergab für $k_{An} = 467 \text{ s}^{-1}$ und für $k_{Aus} = 106 \text{ s}^{-1}$. Das bedeutet, dass die Kinetik der schnellen Fluktuationen aus der Gesamspur mit Hilfe des angewendeten Modells nicht mehr richtig erkannt wurde.

Tabelle 4.5-3. Kinetische Parameter aus den Modellfunktionen

[s ⁻¹]	Schnelle Fluktuationen		Langsame Fluktuationen	
	k_{An1}	k_{Aus1}	k_{An2}	k_{Aus2}
Gesamtbereich	467	106	2,2	2,8
Bereich A	312	284	3,2	3,9
Bereich B	101	10	1,1	2,1

Gleichermaßen verhält es sich mit den langsamen Fluktuationen. Hierzu wurde der Bereich B korreliert, der nur einen geringen Anteil der schnellen Fluktuationen enthält. Die kinetischen Parameter der langsamen Fluktuationen wurden k_{An} zu $1,1 \text{ s}^{-1}$ und k_{Aus} zu $2,1 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Wurde der Gesamtbereich korreliert, so wurde k_{An} zu $2,2 \text{ s}^{-1}$ und k_{Aus} zu

$2,8 \text{ s}^{-1}$ bestimmt, also schnellere Raten angepasst. Damit wurde gezeigt, dass die benutzte Modellfunktion keine quantitative Analyse der Daten zulässt. Dies ist möglicherweise auf den zeitlich variierenden Anteil schneller Fluktuationen in einzelnen Fluoreszenzspuren zurückzuführen, was bei einem einfachen biexponentiellen Modell nicht berücksichtigt wird. Mit Hilfe der Autokorrelation konnte diese dynamische Heterogenität nicht quantitativ erfasst werden. Dennoch konnte mit dieser Methode die Zeitauflösung erhöht und eine schnelle Kinetik im Millisekundenbereich identifiziert werden, die mit der Grenzwertmethode nicht aufgelöst werden konnte.

4.5.6. Auswertung der Daten mit Hilfe des Hidden-Markov Modells

Da mit Hilfe der Autokorrelation keine quantitative Bestimmung der Kinetik möglich war, wurden die Daten mit einer weiteren Methode ausgewertet. Hiefür wurden die aufgenommenen Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Algorithmus analysiert, der zeitlich unregelmäßig auftretende Ereignisse auf Basis eines Markov-modulierten Poisson-Prozesses (MMPP) interpretiert. Diese Methode wurde zur Analyse von in unregelmäßigen Zeitabständen auftretenden Ereignissen entwickelt und auf die Ankunftszeiten ankommender Photonen in Fluoreszenzspuren übertragen. Eine Fluoreszenzspur kann, wie Abbildung 4.5-16 zeigt, durch Auftragen der Interphotonenzeit zwischen zwei aufeinander folgenden Photonen gegen die Zeit dargestellt werden.

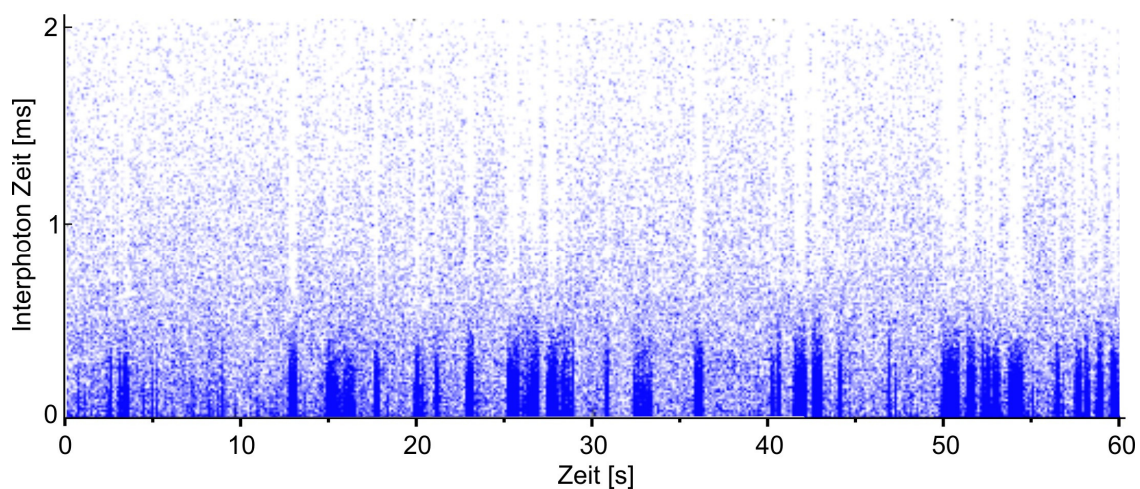


Abbildung 4.5-16. Graphische Darstellung einer Aufnahme des Fluoreszenzsignals einer Sonde bei $2 \mu\text{M}$ CuSO_4 der Zeitdifferenz zum vorangegangenen Photon gegen die absolute Ankunftszeit des Photons.

Als Grundlage für die Interpretation der Ereignisse wird vorab ein Modell angenommen, das den Ereignisstrom beschreiben könnte. Beispielsweise kann das ein einfaches Modell sein, wie es für die Komplexbildung aus Kupfer(II) und der Sonde angenommen wurde.

Diese Reaktion kann vereinfacht als Zwei-Zustands-System, bestehend aus einem An- und Aus-Zustand wie in Abbildung 4.5-17 schematisch dargestellt, betrachtet werden. Die Pfeile bedeuten Wahrscheinlichkeiten, mit denen das System in demselben Zustand verbleiben, oder aber in den anderen Zustand wechseln kann.

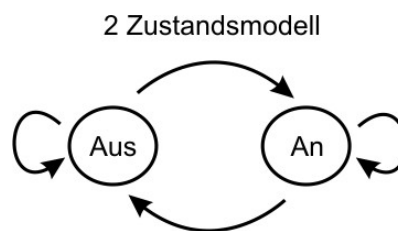


Abbildung 4.5-17. Modell eines Systems mit zwei möglichen Zuständen: Aus und An. Die Pfeile repräsentieren verschiedene Übergangswahrscheinlichkeiten aus einem Zustand in den anderen oder in denselben Zustand.

Entgegen der Grenzwertmethode oder der Autokorrelation, die eine Analyse der Daten erlaubt, ohne zuvor ein Modell festzulegen, muss bei der MMPP-Methode ein bestimmtes Modell zur Datenanalyse angenommen werden, das dann mit den Daten verglichen wird. Der Algorithmus wurde von Dr. Mark Jäger aus der Gruppe um Prof. F. Hamprecht (IWR) entwickelt und für die Analyse der zeitlich stark fluktuierenden Fluoreszenzaufnahmen angepasst, um die beobachteten Fluoreszenzfluktuationen, die bei der Komplexbildung zwischen der Sonde und Kupfer(II) beobachtet wurden, auszuwerten [Jäger 2007]. Für jedes Photon entscheidet der Algorithmus nun anhand der Zeitdifferenz der Ankunftszeiten der Photonen, mit welcher Wahrscheinlichkeit es aus demselben oder aus einem anderen Zustand emittiert wurde.

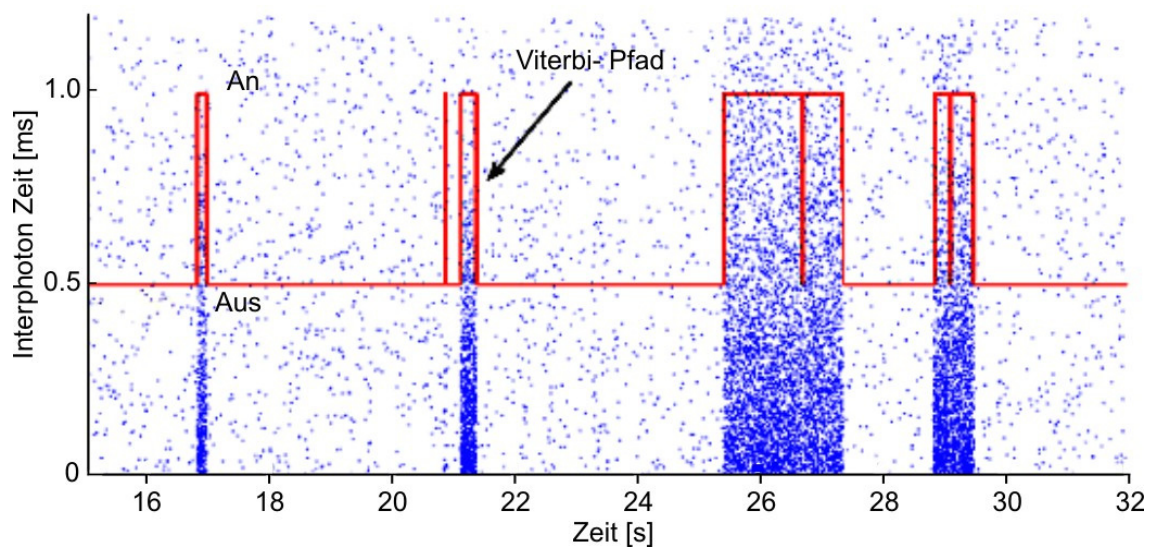


Abbildung 4.5-18. Zustandsanalyse mittels MMPP- Algorithmus. Die rote Linie stellt die nach dem Zweizustandsmodell wahrscheinlichste Abfolge von An- und Aus-Zuständen, den Viterbi-Pfad, dar.

Danach wurde die wahrscheinlichste Abfolge der An- und Aus-Zustände, der so genannte Viterbi-Pfad berechnet (Abbildung 4.5-18). Die so an die Daten angepassten Übergangswahrscheinlichkeiten entsprechen den Übergangsraten der untersuchten Kinetik.

Zur Analyse der Einzelmolekülmessungen wurde zunächst ein einfaches Zwei-Zustandsmodell mit einem An- und einem Aus-Zustand, wie oben bereits beschrieben, angenommen. Auf molekularer Ebene entspricht der An-Zustand der freien Sonde und der Aus-Zustand dem Komplex aus Sonde und Kupfer(II). Im An-Zustand wird eine hohe Zählrate registriert und die Zeitintervalle Δt zwischen den ankommenden Photonen sind kurz. Entsprechend werden im Aus-Zustand weniger Photonen pro Zeiteinheit registriert und es gibt längere Zeitabstände zwischen den einzelnen Photonen.

Wie die Ergebnisse der Autokorrelation bereits zeigten, reicht ein Modell mit zwei Zuständen nicht zur Beschreibung der beobachteten Fluktuationen. Deshalb wurde die Analyse mit drei weiteren Modellen durchgeführt. In Abbildung 4.5-19 sind diese Modelle aufgeführt. Modell 2 stellt das bereits diskutierte Zwei-Zustandsmodell dar, Modell 3A wurde um einen weiteren Zustand (An') erweitert, der sich von der Zählrate des An-Zustands unterscheiden darf und nur aus dem Aus-Zustand zugänglich ist. Der Übergang vom An-Zustand in An' ist nicht möglich. Analog wurde im Modell 3B ein weiterer Aus-Zustand (Aus') eingeführt, der nur aus dem An-Zustand bevölkert werden kann. Modell 4 vereint die Modelle 3A und B.

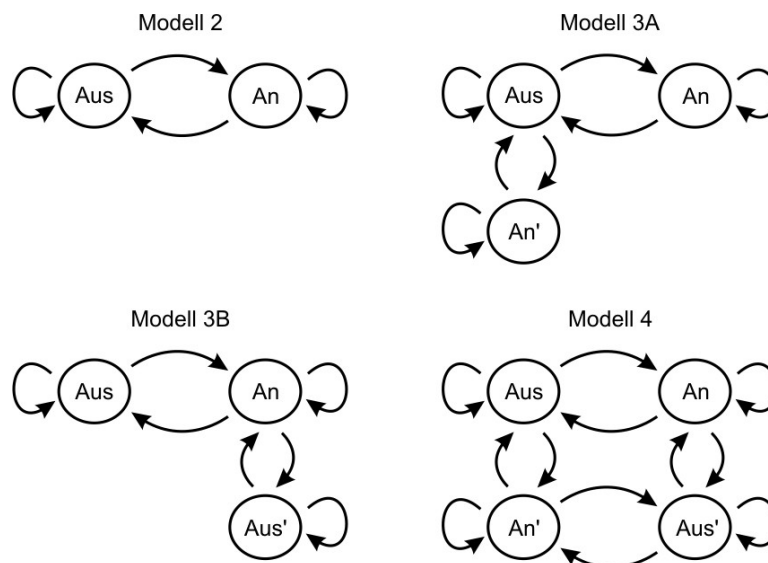


Abbildung 4.5-19. Gegenüberstellung der vier in Betracht gezogenen Modelle, mit denen der MMPP-Algorithmus die Aufnahmen analysierte.

Die Ergebnisse zeigten, dass Modell 2 die Daten zwar gut beschreibt, die schnellen Kinetiken aber nicht berücksichtigt werden können und deshalb starke Abweichungen zu den Ergebnissen der Schwellwertanalyse auftreten. Die anderen drei vorgestellten Modelle konnten besser an die Daten angepasst werden, wobei auch schnellere Fluktuationen erkannt wurden. Welches Modell die Daten am besten beschreibt, wurde anhand des BIC-Kriteriums (Gleichung 4.5-12) und der Tatsache entschieden, wie gut sie die mit der Schwellwertanalyse erhaltenen Kinetiken wiedergeben. Das BIC-Kriterium berücksichtigt neben der standardmäßigen Ähnlichkeitsabschätzung, dass komplexere Modelle besser an Datensätze angepasst werden, wobei aber Zustände bevölkert werden, die für die Anpassung des Modells an die Daten nicht unbedingt nötig wären. Deshalb wird bei dem BIC-Kriterium jeder neue Zustand mit einem Strafparameter belegt, so dass die Ähnlichkeit mit den Daten deutlich besser sein muss, um diesen Strafparameter auszugleichen.

$$BIC(\psi) = \log P(y|\hat{\psi}) - \frac{K}{2} \log N_p \quad \text{Gleichung 4.5-12}$$

N_p stellt die Anzahl der freien Parameter dar und K ist die Anzahl der beobachteten Ereignisse. Der erste Term beschreibt die Ähnlichkeit mit dem Datensatz und der zweite Term gibt den Strafparameter für die Modellkomplexität an. Abbildung 4.5-20 zeigt die

relative Änderung des BIC-Parameters der drei komplexeren Modelle im Vergleich zu Modell 2. Modell 3B und Modell 4 zeigen keinen signifikant besseren BIC-Parameter. Nur Modell 3B lieferte eine verbesserte Beschreibung der Daten.

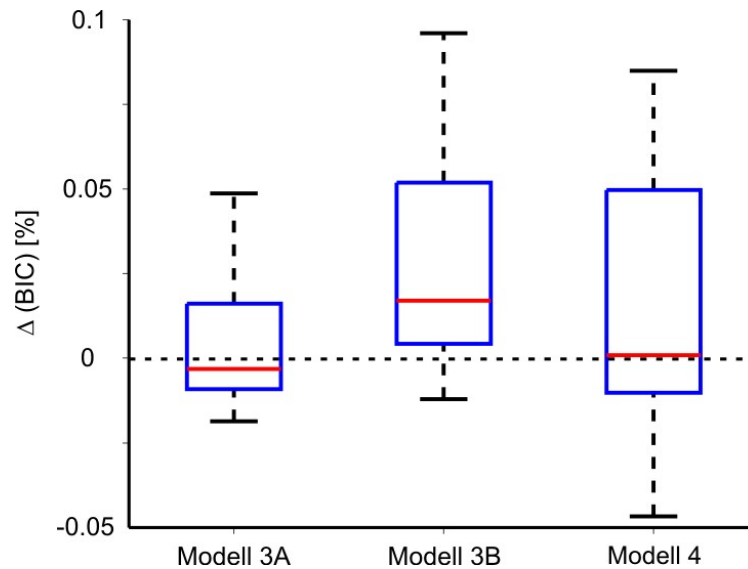


Abbildung 4.5-20. Relative Änderungen des BIC-Parameters in Prozent verschiedener Aufnahmen bei verschiedenen Kupfersulfatkonzentrationen (2 μM , 6 μM , 10 μM). Insgesamt wurde der BIC-Index für 33 Aufnahmen berechnet und dieser Bereich als blauer Kasten in den Graphen eingetragen. Die Rote Linie zeigt den Mittelwert aus den 33 Aufnahmen.

In Tabelle 4.5-4 sind die mit dem MMPP-Algorithmus unter Verwendung der Modelle 2 und 3B ermittelten Raten den Raten der Schwellwertanalyse gegenübergestellt. Die mit Modell 3B bestimmten Werte stimmen am Besten mit den mit der Schwellwertmethode bestimmten Werten überein. Auf molekularer Ebene könnte Modell 3b bedeuten, dass die Sonde eine Konformation einnimmt, bei der die Löschung kurzzeitig unterbrochen und die Sonde in einem fluoreszierenden komplexgebundenen Zustand existiert. Um einen solchen molekularen Zusammenhang zu belegen, müssen weitere Experimente durchgeführt werden, die die Abhängigkeit der schnellen Kinetik von Einflüssen wie pH-Wert, Temperatur und der Laserleistung untersucht.

Tabelle 4.5-4. Gegenüberstellung der mit Modell 2 und 3B erhaltenen Ergebnisse mit den Geschwindigkeitskonstanten, die über die Schwellwertmethode bestimmt wurden.

Analyse Methode	k_a ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$K \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
Schwellwertmethode	$3,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,9$
MMPP Modell 2	$21,0 \pm 2,1$	$3,6 \pm 1,6$	$5,8 \pm 2,6$
MMPP Modell 3b	$6,9 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,7$
MMPP Modell 3b (schnelle Fluktuationen)	$17 \pm 1,4$	$44,8 \pm 15,4$	-

4.5.7. Unterschiede in der Kinetik einzelner Moleküle

Wie bereits in Kapitel 4.5.4 erwähnt, sind, wie Abbildung 4.5-11 zeigt, bei der Schwellwertanalyse Abweichungen vom monoexponentiellen Verhalten aufgetreten. Um Unterschiede zwischen einzelnen Molekülen herauszuarbeiten, wurden nochmals alle Fluoreszenzspuren, die bei CuSO_4 -Konzentration von $2 \mu\text{M}$ aufgenommen wurden visuell auf mögliche signifikant unterschiedliche Übergangsraten überprüft. Die Aufnahme in Abbildung 4.5-21a zeigt deutlich unterschiedliche Fluktuationsraten in verschiedenen Bereichen. Zwischen 50 und 130s ist die Dauer der Aus-Zustände deutlich länger als im restlichen Teil der Aufnahme. Die Autokorrelationsfunktionen in Abbildung 4.5-21b und c wurden von bestimmten Zeitintervallen einer Fluoreszenzspur eines einzelnen Moleküls gebildet. In rot wird die Autokorrelation zwischen 30 und 80s gezeigt, schwarz die Autokorrelation zwischen 150 und 200 sek. Der Unterschied der Amplituden indiziert deutlich eine Veränderung der Aus-Zustandsdauer.

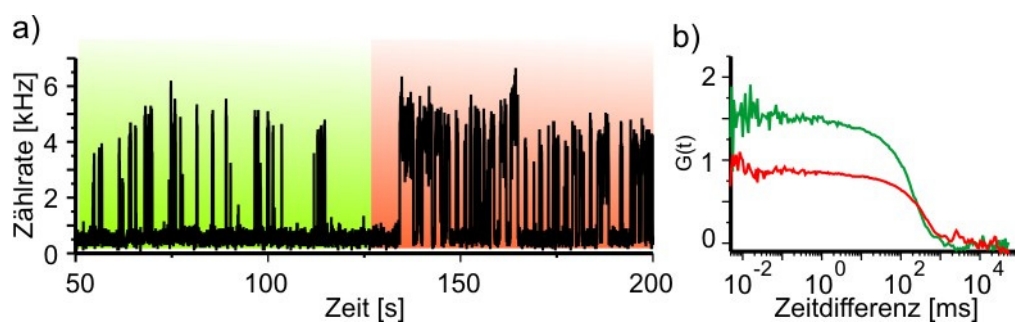


Abbildung 4.5-21: Fluoreszenzspur, die den Wechsel zwischen verschiedenen Kinetiken eines Moleküls zeigt (Integrationszeit 10 ms). Die Lebensdauer der Aus-Zustände kann offensichtlich verschiedene Werte annehmen. Die Autokorrelationen links beweisen die unterschiedliche Kinetik. Die rote Kurve entspricht der Autokorrelation des Bereichs A, die schwarze Kurve des Bereichs B.

Es wurden zwei mögliche Ursachen für dieses Verhalten in Betracht gezogen. Zum einen könnten kurzzeitige Wechselwirkungen mit der Oberfläche die Stabilität des Komplexes beeinflussen, zum anderen sind unterschiedliche Konformationen der Sondenstruktur denkbar, die eine Veränderung der Kinetik hervorrufen. Die Kinetik soll am Beispiel einer Fluoreszenzspur mit Hilfe der Grenzwertanalyse ermittelt werden. Durch Analyse der polarisiert aufgezeichneten Fluoreszenzfluktuationen soll untersucht werden, ob eine Wechselwirkung mit der Oberfläche die Ursache unterschiedlicher Kinetik ist. Das heißt, ob die Polarisationssebene der detektierten Emission mit einer Änderung der Fluktuationen einhergeht.

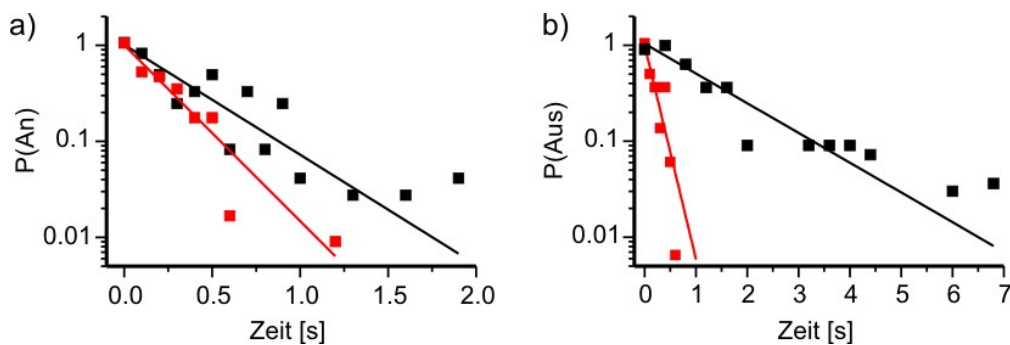


Abbildung 4.5-22. Histogramme der An- (a) bzw. Aus- Zustände (b) einer einzelnen Sonde. Schwarz zeigt das Histogramm über das Zeitintervall von 30-130 s und in Rot sind die Histogramme zwischen 130 und 200s gezeigt. Es wird deutlich, dass sich die Lebensdauer des An-Zustands verändert hat. Rot: $k_d = 1,98 \text{ s}^{-1}$; $k_a = 2,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Schwarz: $k_d = 0,7 \text{ s}^{-1}$ $k_{a1} = 1,72 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Da die Unterschiede der Kinetiken deutlich erkennbar waren, konnten bestimmte Bereiche ausgewählt und die verschiedenen Kinetiken mittels Grenzwertanalyse bestimmt werden. Daraus konnten beide verschiedenen Kinetiken isoliert und an eine exponentielle Verteilung angepasst werden. In Abbildung 4.5-22 sind die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen der beiden Bereiche mit der monoexponentiellen Modellanpassung gezeigt. Man erkennt, dass die Histogramme nun keine Abweichungen mehr vom monoexponentiellen Modell zeigen. Um durch eine höhere Anzahl Ereignisse deutlichere Histogramme zu erhalten, wurden weitere, bei $2 \mu\text{M}$ aufgenommene, Fluoreszenzspuren analysiert. Die Separation ließ sich für sehr viele Fluoreszenzspuren leicht durchführen und führte zu folgenden kinetischen Konstanten:

Assoziation: $k_{a1} = 1,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{a2} = 2,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Dissoziation: $k_{d1} = 1,98 \text{ s}^{-1}$ $k_{d2} = 0,66 \text{ s}^{-1}$

Die sich unterscheidenden Geschwindigkeitskonstanten erlauben es, zwischen zwei Formen zu differenzieren. Wie Abbildung 4.5-21a zeigt, kann eine Sonde zwischen diesen beiden Formen wechseln. Dies könnte so interpretiert werden, dass die Sonde dynamisch zwischen zwei unterschiedlichen Konformationen wechseln kann, die eine unterschiedliche Komplexstabilität aufweisen. Oder die Sonde tritt kurzzeitig in Wechselwirkung mit der BSA-Oberfläche, was zu einer Destabilisierung des Kupfer(II)-Sondenkomplexes führt.

Um Interaktionen der Sonde mit der Oberfläche zu untersuchen, wurden Aufnahmen mit zueinander senkrecht polarisierten Detektionskanälen gemacht. Ist ein Farbstoff nicht in der Rotation eingeschränkt, werden beide Kanäle die gleiche Photonenzählrate detektieren. Dies sollte für alle Sonden gelten, die keine Interaktion mit der Oberfläche zeigen. Bei Interaktion mit der Oberfläche wird der Farbstoff in seiner Rotation eingeschränkt, was zur Folge hätte, dass der Dipol des Farbstoffs in der Orientierung fixiert vorliegt und, je nach Winkel zur Polarisationssebene der Detektoren, unterschiedliche Zählraten bei den beiden Detektoren angezeigt würden. Im Folgenden wird zunächst die unterschiedliche Kinetik analysiert und im Anschluss daran überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Änderung in der Polarisationssebene und den Änderungen der Kinetik besteht.

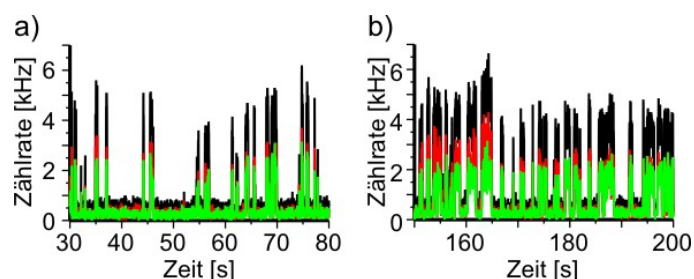


Abbildung 4.5-23. Ausschnitte aus einer Fluoreszenzaufnahme (Integrationszeit 10 ms) zu verschiedenen Zeiten mit jeweils 50s Dauer mit langen Aus-Zeiten a) und kurzen Aus-Zeiten b).

Dies wird durch manche Fluoreszenzspuren indiziert, die temporär deutlich unterscheidbare Kinetiken aufweisen. In Abbildung 4.5-23 sind Ausschnitte von 50s der genannten Bereiche der Fluoreszenzspur mit langen und kurzen Aus-Zeiten gezeigt. Die schwarze Linie repräsentiert die Gesamtzählrate, die grüne und rote Linie sind die Zählraten der einzelnen Detektoren. Die Aufnahme erfolgte mit einem polarisierenden Strahlteiler, sodass Änderungen der Dipolorientierung bzw. Fixierung erkennbar werden. Wie oben bereits diskutiert, sollten solche Änderungen bei freier Rotation nicht auftreten. Im Bereich zwischen 150 und 165 s kann man deutlich erkennen, dass hier ein verändertes

Intensitätsverhältnis der beiden Kanäle vorliegt. Zu Beginn des Bereichs scheint dies auch mit einer Änderung der Kinetik einher zu gehen, die allerdings am Ende des Bereichs bei 165s nicht wieder in das ursprüngliche Muster zurückfällt. Eine solche Korrelation zwischen Wechselwirkungen mit der Oberfläche und einer Änderung der Kinetik wurde jedoch nur sehr selten beobachtet. Der direkte Nachweis, dass die Heterogenität in der Kinetik aus Wechselwirkungen mit der Oberfläche resultiert, konnte nicht erbracht werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass solche Wechselwirkungen zumindest temporär auftreten.

4.6. Einzelmolekülspektroskopie der Atto620-markierten Sonden

Wie die Ensemblestudien gezeigt haben, wurde die Atto620-markierte Sonde auch durch Kupfer(II) gelöscht. Die Löschung ist jedoch in diesem Fall nicht so effizient, die Quantenausbeute wird um 65 % vermindert. Das ist deutlich weniger als die TMR-markierte Sonde, die zu 88 % gelöscht wurde. Die Fluoreszenzlebensdauer zeigte im Vergleich zur Fluoreszenzintensität, sowohl bei den TMR-markierten Sonden als auch den Atto620-markierten Sonden, kaum eine messbare Änderung mit zunehmender Kupferkonzentration. Im Folgenden wird die Löschung der Atto620-markierten Sonde mittels Einzelmolekülspektroskopie näher untersucht. Die Anregung von Atto620 im Einzelmolekülexperiment erfolgte mit einem gepulsten Diodenlaser bei 635 nm mit einer Pulsdauer von 50-60 ps und einer Repetitionsrate von 20 MHz. Aufgrund der gepulsten Anregung und der Detektion der Photonen mit einer zeitauflösenden Einzelphotonenzählkarte (TCSPC) konnte zusätzlich die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden (Kapitel 3.6). Atto620 ist aufgrund guter Photostabilität und niedriger Übergangswahrscheinlichkeit in den Triplettzustand ein gut geeigneter Farbstoff für die Anwendung in der Einzelmolekülspektroskopie.

4.6.1. Ergebnisse der Einzelmolekülmessung

Die Proben wurden analog zu den Studien mit den TMR-markierten Sonden vorbereitet. Auf einer Glasoberfläche wurden entsprechend der Vorschrift aus Kapitel 3.3 die Sonden immobilisiert, so dass auf $10 \times 10 \mu\text{m}$ zwischen 40 und 80 Sonden gebunden wurden.

Durch Abbilden der Oberfläche mittels SMFS wurden die einzelnen Sonden auf der Oberfläche lokalisiert und dann zur Aufnahme der Fluoreszenz in den Fokus gefahren.

Abbildung 4.6-1a zeigt eine Fluoreszenzspur, die bei $4 \mu\text{M}$ Cu(II) aufgenommen wurde. Es sind dieselben Fluktuationen zwischen einem stark und einem schwach fluoreszierenden (gelöschten) Zustand erkennbar, wie sie bei der TMR-markierten Sonde auftraten. Die Zählrate des gelöschten Zustands liegt mit 5 kHz deutlich über der Hintergrundzählrate von etwa 1 kHz , die Zählrate des An-Zustands bei etwa 15 kHz .

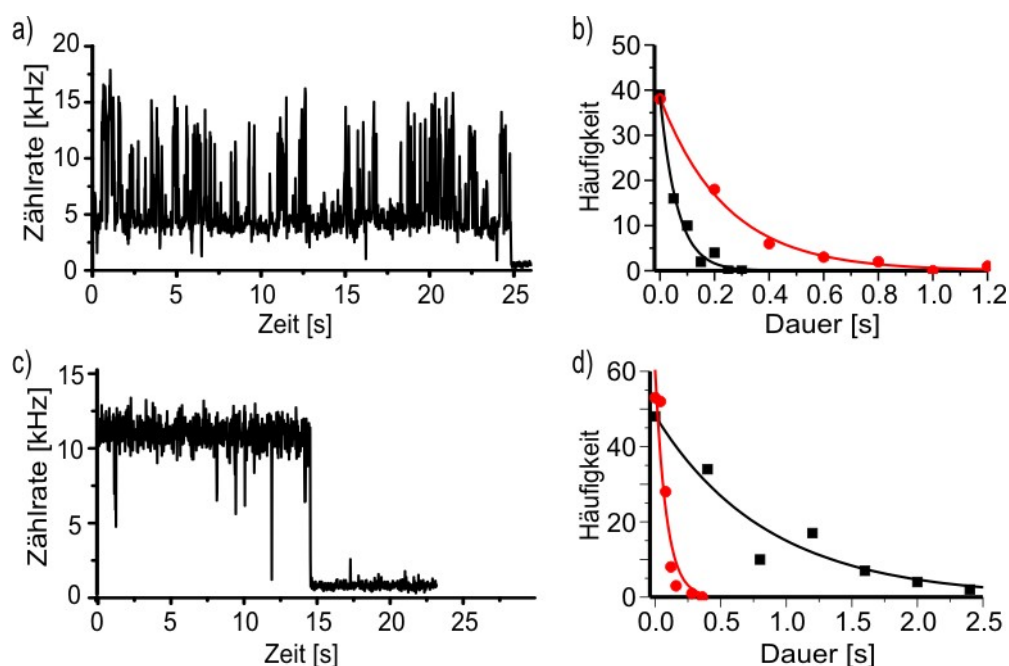


Abbildung 4.6-1. Auswertung der Spuren mit $4 \mu\text{M}$ Cu²⁺ (a) und eine Spur ohne Kupferzugabe(c). In den entsprechenden Histogrammen sind die Dauer der An-Zustände (Quadrate) und der Aus-Zustände (Kreise) aufgetragen. Es ist deutlich erkennbar, dass durch Kupferzugabe die Aus-Zustände länger und die An-Zustände kürzer werden.

Zur Auswertung der Kinetik wurde mittels Schwellwertmethode ein Histogramm über die Dauer eines Zustands gegen dessen Häufigkeit erstellt (Abbildung 4.6-1b). Durch Anpassung an das in Kapitel 4.5.4 beschriebene exponentielle Modell wurden die Geschwindigkeiten zu $v(\text{Aus}) = 12.23 \text{ s}^{-1}$ und $v(\text{An}) = 2.5 \text{ s}^{-1}$ bestimmt, was gut mit den zuvor präsentierten Werten der TMR-markierten Sonden übereinstimmt. Die Kontrollexperimente mit einer Sonde ohne Ligandmodifikation zeigte bei einer Konzentration von $4 \mu\text{M}$ Cu²⁺ eine konstante Fluoreszenz mit wenigen Aus-Zuständen bis zur Photozerstörung (Abbildung 4.6-1c). Die Auswertung der Kinetik mit der Grenzwertmethode wurde bei mehreren Fluoreszenzspuren durchgeführt, die jeweiligen

Häufigkeiten aufaddiert und im Histogramm in Abbildung 4.6-1d dargestellt. Im Vergleich zur Ligand-modifizierten Sonde wurden nur sehr kurze Aus-Zustände beobachtet, die auf Triplettübergänge oder Stoßlöschung mit Cu(II) zurückzuführen sein könnten.

Bei den zuvor gezeigten Auswertungen der TMR-markierten Sonde wurden neben den Fluktuationen, die der Komplexbildung von Cu²⁺ mit der Bipyridineinheit zugeordnet wurden, weitere Fluktuationen entdeckt, die auf einer schnelleren Zeitskala abliefen. Um dies zu untersuchen, wurde die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzspuren berechnet. Abbildung 4.6-2 zeigt die Autokorrelation der Fluoreszenzintensitätsspur aus Abbildung 4.6-1a. Man erkennt deutlich, dass hier ein monoexponentielles Modell zur Beschreibung der Kurve nicht ausreicht, da weitere Komponenten zu kürzeren Korrelationszeiten auftreten.

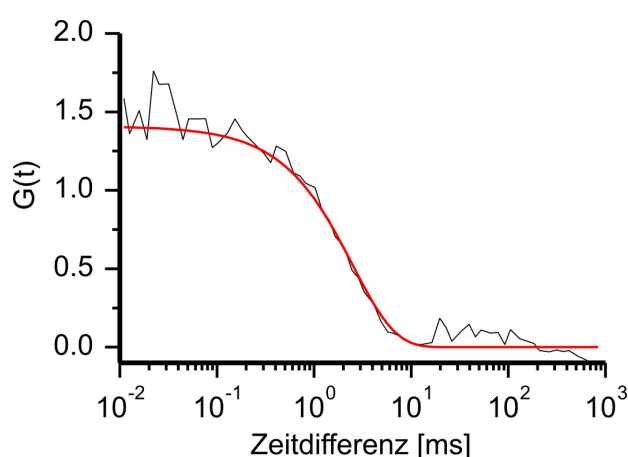


Abbildung 4.6-2. Autokorrelation der zeitlichen Fluoreszenzintensität der Spur in Abbildung 4.6-1 (a). Die schnelle Komponente, die in den Auswertungen der TMR-dcbpy-Sonde bereits diskutiert wurde ist auch mit Atto620 erkennbar.

Die langsame Komponente mit einem Umkehrpunkt bei etwa 50 ms entspricht der Kupfer(II)bindungskinetik. Ein weiterer Umkehrpunkt bei 2 ms zeigt das Vorkommen von Fluktuationen auf schnellerer Zeitskala. Da die Korrelationszeit etwa im selben Bereich liegt wie die der schnellen Fluktuationen, die bei der TMR-Sonde beobachtet wurden, ist anzunehmen, dass beide gleichen Ursprungs sind. Damit sind diese schnellen Fluktuationen keine Eigenschaft des Farbstoffs TMR, sondern müssen eine andere molekulare Ursache haben.

4.6.2. Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauer mittels SFLIM

Die Anregung mit gepulstem Laser ermöglichte die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer mittels SFLIM. In Abbildung 4.6-3 sind die Fluoreszenzintensität respektive Fluoreszenzlebensdauer der Sonde bei Kupfer(II)konzentrationen von $4 \mu\text{M}$ mit einer Integrationszeit von 20 ms gezeigt. Die Fluoreszenzlebensdauer der Probe fluktuiert zwischen 2 ns und 3.8 ns synchron zu den Intensitätsfluktuationen. Den An- und Aus-Zuständen können somit diskrete Werte der Fluoreszenzlebensdauer sowie der Quantenausbeute zugeordnet werden.

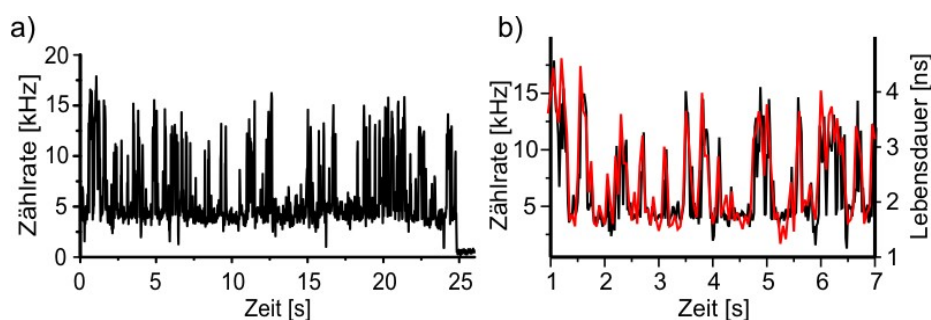


Abbildung 4.6-3. a) Die Fluoreszenzspur wurde bei $4 \mu\text{M}$ Kupfer(II) bei gepulster Anregung von 20 MHz mit SFLIM aufgenommen und zeigt Intensitätssprünge zwischen zwei Zuständen, dem An- und Aus-Zustand. b) Die Fluoreszenzlebensdauer springt ebenfalls zwischen zwei diskreten Werten, 2 und 3.8 ns. Die Sprünge treten gleichzeitig mit den Intensitätssprüngen auf.

Wurde die Messung unter Kupfer(II)freien Bedingungen durchgeführt, zeigten sich keine Sprünge in der Fluoreszenzlebensdauer.

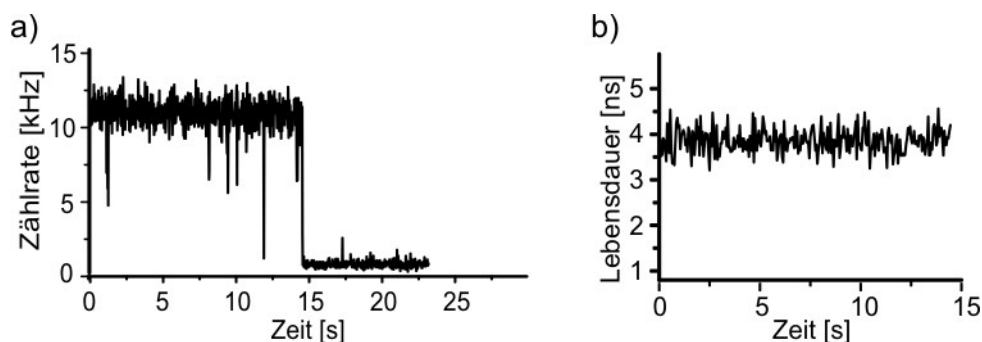


Abbildung 4.6-4. Zeitaufgelöste Aufnahme (Integrationszeit 10 ms) der Fluoreszenz einer Einzelsonde ohne Zugabe von Cu^{2+} . a) Die Intensität zeigt wenige Aus-Zeiten, die auf Triplett-Zustände zurückzuführen sind. B) die Lebensdauer zeigt nur geringe Schwankungen um 3.9 ns.

Die Beobachtung, dass den An- und Aus-Zuständen diskrete Quantenausbeuten aber auch Fluoreszenzlebensdauern zugeordnet werden können, konnte mit den Ensemblemessungen nur für die Fluoreszenzquantenausbeute bestätigt werden. Die Lebensdauer zeigte bei niedrigen Kupfer(II)konzentrationen keine Veränderung, erst bei Konzentrationen von mehr als 4 μM wurde eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer erkennbar. Dies könnte auf unvollständige Hybridisierung der DNS-Konjugate hindeuten, so dass dann der Anteil Sonden, die gelöscht werden können niedriger ist. Im Einzelmolekülexperiment werden solche Ausnahmen aussortiert. Außerdem tragen die Sonden im An-Zustand verhältnismäßig mehr Photonen zu dem Lebensdauerhistogramm bei als der gelöschte Zustand. Damit würde das Histogramm von den Photonen des An-Zustands dominiert und zeigte nur eine sehr geringe Änderung der Lebensdauer an.

4.7. Zusammenfassung der Ergebnisse mit der Einzelmolekül-mikroskopie

Zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen der Sonde und Cu^{2+} wurden die Sonden auf einer Glassoberfläche immobilisiert. Nach Lokalisierung der einzelnen Sonden wurden sie nacheinander in den Fokus gefahren, um deren Fluoreszenz aufzunehmen. Aufeinander folgende Assoziations- und Dissoziationsereignisse zwischen Sonde und Kupfer(II) wurden durch sprunghafte Änderungen der Fluoreszenzrate angezeigt. Die Sonde wechselte nach Bindung von Kupfer(II) von dem stark fluoreszierenden An-Zustand in den schwach fluoreszierenden Aus-Zustand. Dieses Verhalten wurde sowohl bei der TMR-Sonde als auch der Atto620-Sonde beobachtet, wobei sich die Fluoreszenzrate bei der TMR-Sonde um etwa 90 % verringerte und bei der Atto620-Sonde um 65 %. Zur quantitativen Bestimmung der Assoziations- bzw. Dissoziationsraten wurde die Dauer dieser einzelnen Zustände mit Hilfe der Schwellwertanalyse ermittelt und schließlich über die Häufigkeitsverteilung die Reaktionsraten bestimmt. Die so bestimmten Raten als auch die Verminderung der Fluoreszenzintensität zwischen An- und Aus-Zustand standen in guter Übereinstimmung mit entsprechenden Ensemble-Experimenten. Die Auswertung der Ensemble- Löschemperimente der TMR-Sonde mit dem modifizierten Stern-Volmer Modell ergab eine Verminderung der Quantenausbeute um 95%. Für die Atto620-markierte Sonde wurde eine Verminderung um 60 % berechnet.

Zur Verbesserung der Zeitauflösung wurden weitere Methoden zur Analyse der Einzelmoleküldaten angewendet, die Autokorrelation und die Anwendung einer Computer gestützten Auswertung mit Hilfe des Hidden-Markov Modells. Beide Methoden zeigten eine weitere Kinetik auf schnellerer Zeitskala, die in unregelmäßigen Abständen gehäuft auftrat. Damit musste das zur Auswertung verwendete Zwei-Zustandsmodell mit zwei kinetischen Parametern um einen Zustand und entsprechend auch um zwei zusätzliche kinetische Konstanten erweitert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass aufgrund dieser heterogenen Dynamik die Raten mit der Autokorrelation nicht zuverlässig bestimmt werden konnten. Dies gelang hingegen mit der MMPP-Methode unter Verwendung eines Drei-Zustandsmodells. Die kinetischen Parameter der Komplexbildung entsprachen denjenigen, die mit der Grenzwertmethode bestimmt wurden. Zusätzlich wurde die Kinetik der schnellen Fluktuationen bestimmt. Ein molekulares Modell zur Erklärung der schnellen Kinetik konnte noch nicht erstellt werden. Dazu sind weitere Experimente geplant, die die Abhängigkeit dieser Fluktuationen von der Laserleistung, dem pH-Wert und der Sondenstruktur untersuchen.

5. Diskussion und Ausblick

5.1. *Entwicklung einer Fluoreszenzsonde zum Nachweis von Kupfer(II)ionen basierend auf der Fluoreszenzlöschung*

Mit Ausblick auf die Untersuchung homogener katalytischer Reaktionen wurde eine Sonde entwickelt, deren Fluoreszenz bei Koordination mit Kupfer(II)ionen gelöscht wird. Aus vorangegangenen Arbeiten waren bereits verschiedene Sonden zum Nachweis von Metallionen bekannt. Auf Basis dieser Erfahrung wurde eine Sonde entwickelt, die aufgrund ihres modularen Aufbaus leicht in ihren Schlüsselfunktionen, dem Farbstoff oder der Chelatfunktion, variiert werden kann. Die Variation dieser Funktionen ermöglicht die Modifizierung der Sensitivität und Spezifität. Die Sonde, in Abbildung 5.1-1 gezeigt, besteht aus zwei zueinander komplementären Oligonukleotidsträngen, die jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff bzw. einer Chelatfunktion modifiziert wurden. Der Fluoreszenzfarbstoff und Chelatligand liegen nach Hybridisierung der beiden Stränge benachbart zueinander vor, so dass die Koordination eines Metallions an den Liganden zur Löschung der Farbstofffluoreszenz führt. Im ersten Schritt wurde nach geeigneten Farbstoffen zur Funktionalisierung der Sonde gesucht und deren Löscheigenschaften untersucht. Anschließend wurde der Einfluss anderer Metallionen auf die Fluoreszenz der Sonde untersucht.

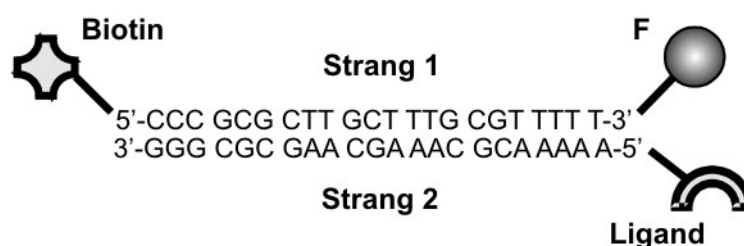


Abbildung 5.1-1. Schematische Struktur der Sonde nach Konjugatbildung. Der Farbstoff wird in unmittelbare Nähe zum Chelatliganden gebracht.

5.1.1. Untersuchung der Fluoreszenzlöschung der Sonde

In einem ersten Experiment wurden die Löschung der Farbstoffe TMR, Atto620, Atto635, Atto647N, Atto655, Atto680, MR121, Cy5 und Cy5.5 untersucht, um potentielle Kandidaten zum Einbau in die Fluoreszenzsonde zu finden. Da die Fluoreszenz der Farbstoffe ab einer bestimmten Konzentration an Cu(II)ionen nicht mehr abnimmt, erfolgte die Auswertung der Löschemperimente nach dem in Kapitel 4.1.1 entwickelten modifizierten Stern-Volmer Modell:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1 + K \cdot c(\text{Cu}^{2+})}{1 + K \cdot c(\text{Cu}^{2+})^{\phi_{\text{Aus}}/\phi_{\text{An}}}} \quad \text{Gleichung 5.1-1}$$

Die durch Anpassung der Modellfunktion bestimmte relative Quantenausbeute des gelöschten Aus-Zustands wurde als relative Löschung bezeichnet, die Löschkonstante beschreibt die Bindungskonstante K des Löschmoleküls an die Sonde (Tabelle 5.1-1). Nach Messung der Fluoreszenzlöschung der Farbstoffe durch Kupfer(II)ionen stellte sich heraus, dass die Cyaninfarbstoffe am schwächsten gelöscht werden.

Tabelle 5.1-1. Gegenüberstellung der Löscheffizienz und der Löschkonstanten der aufgeführten Farbstoffe durch Kupfer(II).

	TMR	Atto620	Atto635	Atto655	Atto680	MR121	Atto647N	Cy5	Cy5.5
Relative Löschung	47 %	40 %	76 %	10 %	30 %	27 %	95 %	10 %	15 %
Löschkonstante [10 ³ M ⁻¹]	135	500	960	207	1100	1590	1 400	430	820

Bei den anderen Farbstoffen war kein deutlicher Zusammenhang zwischen Klasse und der relativen Löschung oder auch der Löschkonstante erkennbar. Diese Eigenschaften hängen stark von den Substituenten am Farbstoffgrundgerüst ab, die als Bindungsstelle für Metallionen fungieren, wie das bei der Dimethylaminofunktion von TMR denkbar wäre. Da viele Strukturen der verwendeten Farbstoffe vom Hersteller (Atto-Tec) nicht veröffentlicht sind, kann dieser Zusammenhang hier nicht weiter diskutiert werden.

Aus diesen ersten Experimenten wurden vier Farbstoffe ausgewählt: TMR, Atto620, Atto635 und MR121. Durch Integration dieser Farbstoffe in das Sondendesign sollte die Löschung verstärkt und somit eine Kupfer(II)-spezifische Fluoreszenzsonde gebildet werden. Als Kontrollsonde diente ein baugleiches Konstrukt, dem die Ligandfunktion fehlte. Die Löschemperimente der Farbstoffe, der Sonden und der Kontrollsonden wurden nach dem modifizierten Stern-Volmer Modell analysiert und die Ergebnisse in Tabelle 5.1-2 zusammengefasst. Als reine Farbstoffe zeigten TMR und Atto620 eine moderate relative Löschung, Atto635 eine starke und MR121 eine niedrige relative Löschung. Die Löschung wurde bei allen Farbstoffen durch Einbau des Farbstoffs in das Sondenkonstrukt verstärkt. Dies betraf sowohl die Löscheffizienz als auch die Löschkonstante K_{SV} mit Ausnahme von MR121, der zwar eine höhere Löscheffizienz, jedoch eine geringere Löschkonstante zeigte. Der Vergleich zwischen Sonde und Kontrollsonde liefert ein deutlicheres Bild: Mit Ausnahme von Atto635 wurde eine sehr gute Differenzierung zwischen Sonde und Kontrolle beobachtet. Die besten Resultate ergaben die TMR- und die Atto620 markierten Sonden, weshalb sie für die weiteren Untersuchungen durch die Einzelmolekülspektroskopie ausgewählt wurden. Bei allen Messungen spielte die dynamische Löschung eine untergeordnete Rolle, wie die Löschkonstante der Lebensdauerermessung k_q zeigt.

Tabelle 5.1-2. Löschkonstanten und Löscheffizienz der Farbstoffe, der dcbpy-Sonde und Kontrollsonde ohne dcbpy-Modifikation.

k 10^3 M^{-1}	Farbstoff			Sonde			Kontrolle		
	Lösch- effizienz	K_{SV}	k_q	Lösch- effizienz	K_{SV}	k_q	Lösch- effizienz	K_{SV}	k_q
TMR	50 %	130	0,5	92 %	8 500	5	55 %	40	2
Atto620	40 %	500	5	65 %	5 900	43	30 %	1200	20
Atto635	76 %	960	< 0 ^{a)}	90 %	3 900	183	90 %	3 200	< 0 ^{a)}
MR121	27 %	1590	0,5	90 %	660	60	30 %	23	1,5

a) Die Lebensdauer zeigt einen Anstieg bei Kupfer(II)- Zugabe.

5.1.2. Untersuchung der Spezifität gegenüber anderen Metall(II)ionen

Die Löschung durch andere Übergangsmetall(II)ionen wurde ebenfalls mit dem Stern-Volmer Modell untersucht. Da die Komplexbildung hier um Größenordnungen langsamer verläuft, konnte die Untersuchung nicht über Titration bestimmt werden. Die Proben wurden drei Stunden vor der Messung angesetzt, damit sich das Gleichgewicht einstellen konnte. Da nicht sichergestellt werden konnte, dass alle Proben exakt die gleiche Sondenkonzentration beinhalten, wurde die jeweilige Quantenausbeute der Proben bestimmt, die eine von der Konzentration unabhängige Größe darstellt. Da die Quantenausbeute der Fluoreszenz proportional ist, kann in der Stern-Volmer Gleichung die Fluoreszenzintensität durch die Quantenausbeute ersetzt werden.

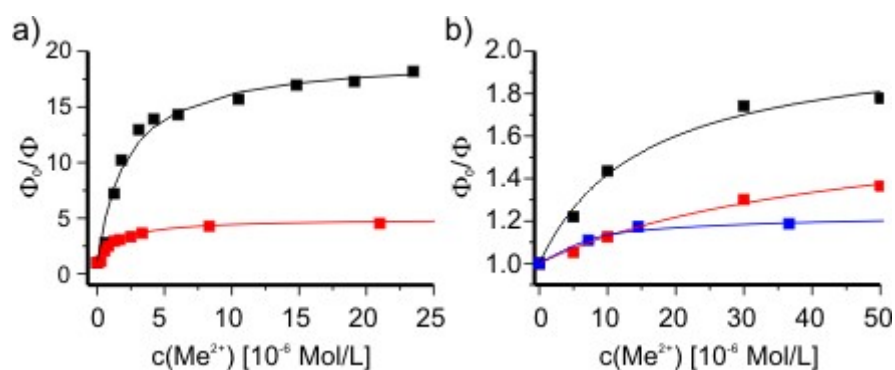


Abbildung 5.1-2. Stern-Volmer Graphen der Löschemperimente der TMR-dcbpy-Sonde mit verschiedenen Metallionen. A) Löschemung durch Kupfer(II) (schwarz) und Nickel(II) (rot). B) Löschemung durch Kobalt(II) (schwarz), Eisen(II) (rot) und Mangan(II) (blau).

Die Ergebnisse, in Abbildung 5.2-2 dargestellt, zeigen, dass die verschiedenen Metall(II)ionen anhand der Löschemkonstanten bzw. Bindungsgleichgewichtskonstanten voneinander unterscheidbar sind. Durch Kupfer(II) wurde die Sonde am stärksten gelöscht. Mit Ausnahme von Nickel(II) zeigen alle anderen untersuchten Metallionen geringe relative Löschemung (vgl. Tabelle 5.1-3). Die Gleichgewichtskonstanten der Komplexbildung von Kobalt(II), Eisen(II) und Mangan(II) mit dcbpy sind zudem noch 1-2 Größenordnungen kleiner als die von Nickel(II) und Kupfer(II). Damit eignet sich die Sonde zum spezifischen Nachweis von Kupfer(II) auch in Gegenwart anderer Metallionen außer Nickel(II)salzen. Die Komplexbildungskonstanten für das Sondenkonstrukt mit dem entsprechenden Metall liegen, außer bei Eisen(II), rund eine Größenordnung niedriger als die Literaturwerte für unmodifiziertes Bipyridin.

Tabelle 5.1-3. Gegenüberstellung der literaturbeschriebenen Komplexgleichgewichtskonstanten verschiedener Metall(II)bipy komplexe mit den gemessenen Werten der TMR- dcbpy- markierten Sonde. [Holyer 1965]

Metall(II)	Mn	Fe	Co	Ni	Cu
Log K (Lit., Bipy)	<5 ^{b)}	4,3	6,0	7,1	8
Log K rel. Löschung	4,5 ^{a)} 22 %	5,1 ^{a)} 37 %	5,3 ^{a)} 45 %	6,5 78 %	6,9 95 %

a) Die Messung wurde zur Vermeidung von Salzausfällung bei pH 5 durchgeführt.

b) Geschätzter Wert aus der Bindungskonstante Phen abgeleitet

5.2. Modell zur Beschreibung der Fluoreszenzlöschung der Sonde durch Kupfer(II)

In Kapitel 4.1.1 wurde ein modifiziertes Stern-Volmer Modell zur Beschreibung der Löschung der Fluoreszenzsonde vorgestellt. Wie Abbildung 5.2-1a schematisch darstellt, geht das Stern-Volmer Modell davon aus, dass der Komplex aus Sonde und Metallion keine Fluoreszenz mehr zeigt. Im Gegensatz dazu wurde bei dem modifizierten Modell angenommen, dass der Komplex eine bestimmte Restfluoreszenz zeigt (Abbildung 5.2-1b) und durch eine geringere Quantenausbeute beschrieben werden kann.

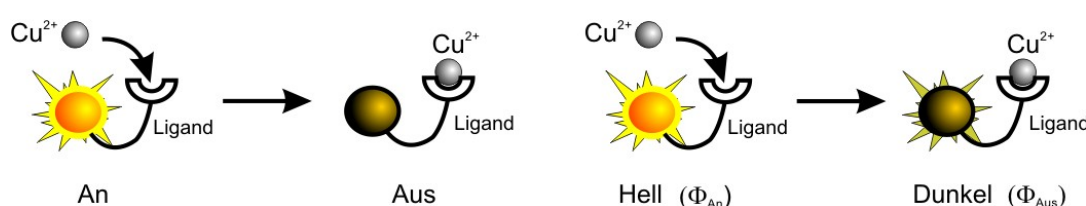


Abbildung 5.2-1. Bei der Entwicklung des Stern-Volmer Modells wurde davon ausgegangen, dass der gelöschte Zustand keine Fluoreszenz zeigt (links). Das modifizierte Stern-Volmer Modell nimmt an, dass der gelöschte Zustand noch zur Fluoreszenz der Probe beiträgt (rechts) und eine definierte niedrigere Quantenausbeute und Lebensdauer zeigt.

In Abbildung 5.2-2 sind die Stern-Volmer Graphen zur Fluoreszenzlöschung der TMR (a) und der Atto620 (b) markierten Sonde Kupfer(II) gegenübergestellt. Die angepassten Modellfunktionen, als durchgezogene Linien dargestellt, ergeben eine relative Löschung der Sonden um 88 % (TMR) bzw. 65 % (Atto620). Das modifizierte Stern-Volmer Modell

beschreibt diese relative Löschung als einen diskreten Zustand mit geringerer Quantenausbeute. Im Einzelmolekülexperiment konnten diese Zustände als Sprünge zwischen diskreten Intensitätsstufen direkt beobachtet werden.

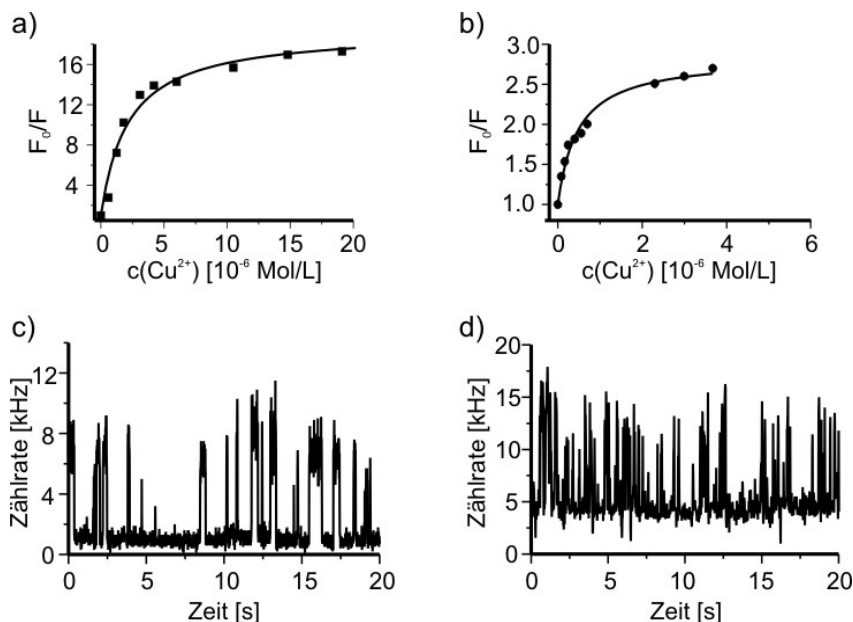


Abbildung 5.2-2. Auswertung der Experimente zur Untersuchung der Fluoreszenzlöschung der TMR-dcbpy-Sonde (a) und der Atto620-dcbpy-Sonde (b).

In Abbildung 5.2-2c und d sind zwei Aufnahmen aus Kapitel 4.5.4 und 4.6.1 gezeigt. Die TMR- Sonde zeigt Intensitätssprünge zwischen 9 und etwa 1 kHz, was einer relativen Löschung von 89 % entspricht. Die bei $4 \mu\text{M}$ Kupfer(II) aufgenommene Fluoreszenzspur der Atto620-markierten Sonde zeigt Intensitätssprünge zwischen 15 und 5 kHz was einer relativen Löschung von 66 % entspricht. Beide Werte stimmen sehr gut mit den Werten aus den Ensembleexperimenten überein (Tabelle 5.1-2).

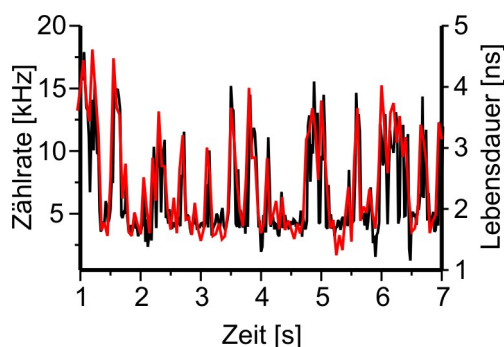


Abbildung 5.2-3 Ausschnitt aus der Fluoreszenzspur von Abbildung 5.2-2d: Die Fluktuationen der Lebensdauer (rot) und der Intensität verlaufen synchron.

Die Aufnahmen der Atto620-modifizierte Sonde wurden mit zeitkorrelierter Einzelphotonen Detektion (TCSPC) durchgeführt. Damit konnte der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzlebensdauer einer einzelnen Sonde mit den Fluktuationen der Zählrate verglichen werden. Wie in Abbildung 5.2-3 erkennbar, zeigt der gelöschte Zustand der Atto620-markierten Sonde neben einer verringerten Helligkeit auch eine verminderte Fluoreszenzlebensdauer. Die Fluoreszenzlebensdauer der An- und Aus-Zustände der Atto620- Sonde wurden zu 3.8 und 1.8 ns bestimmt.

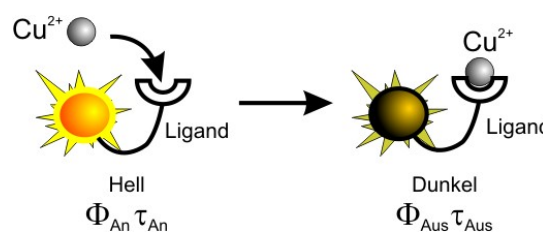


Abbildung 5.2-4. Schematische Darstellung der zwei möglichen Zustände der Sonde.

Entsprechend Abbildung 5.2-4 wurde der freien Sonde ein Zustand hoher Quantenausbeute und langer Fluoreszenzlebensdauer und der komplexgebundenen Sonde ein Zustand mit niedriger Quantenausbeute und kurzer Fluoreszenzlebensdauer zugeordnet. Die Fluoreszenzlebensdauer der TMR-Sonde konnte im Einzelmolekül-experiment nicht bestimmt werden, da kein gepulster Laser zur Anregung bereitstand. Vor kurzem wurde jedoch ein gepulster Weißlichtlaser in Betrieb genommen, der jede beliebige Wellenlänge des sichtbaren Lichts zur Verfügung stellt und somit die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer des gelöschten Zustands der TMR-markierten Sonde ermöglicht.

Entsprechend dem Modell aus Abbildung 5.2-4 müsste auch im Ensemble- Experiment eine signifikante Verminderung der Fluoreszenzlebensdauer auftreten.

Aufgrund der Proportionalität zwischen Fluoreszenzlebensdauer τ und Quantenausbeute ϕ sollte der gelöschte Zustand der TMR-markierten Sonde eine Fluoreszenzlebensdauer von rund 300 ps zeigen. Da dies Nahe der Auflösungsgrenze des Lebensdauerspektrometers liegt, wird keine signifikante Änderung erkennbar. Jedoch konnte weder bei der TMR- noch Atto620-markierten Sonde eine so deutliche Verminderung der Fluoreszenzlebensdauer beobachtet werden.

Obwohl die Fluoreszenzlebensdauer der Atto620-markierten Sonde im gut aufgelösten Bereich des Lebensdauerspektrometers liegt, wurde aber auch hier keine deutliche

Veränderung der Lebensdauer beobachtet. Eine weitere mögliche Ursache, die für beide Sonden gelten würde, besteht darin, dass die Proben unvollständig hybridisierten oder Konformationen ausbilden, die wenig bzw. keine Fluoreszenzlöschung zeigten. Diese Subpopulation trägt zu einem zusätzlichen Hintergrundsignal in den Ensemble-Experimenten bei und erschwert die Auswertung.

5.3. Mechanismus der Fluoreszenzlöschung

Sowohl anhand der Ergebnisse der Ensembleexperimente als auch der Einzelmolekülexperimente, lässt sich der Mechanismus der Fluoreszenzlöschung nicht ganz eindeutig klären, man kann aber einige Mechanismen ausschließen. Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie lässt sich die Bildung eines nicht-fluoreszierenden Grundzustandskomplexes ausschließen. Wie Abbildung 4.4-4 zeigt, verändert sich die Absorption kaum, das Maximum verschiebt sich um etwa 2 nm zum langwelligen Spektralbereich und der Extinktionskoeffizient bleibt nahezu konstant. Die Verringerung der Fluoreszenz ist demnach nicht an die Veränderung des Absorptionsspektrums geknüpft. Daraus lässt sich schließen, dass die Löschung der Fluoreszenz aus dem angeregten Zustand des Farbstoffs erfolgt. Die Aufnahmen der zeitabhängigen Fluoreszenz auf Einzelmolekülebene zeigen ebenfalls Fluktuationen zwischen zwei Intensitätsniveaus und deuten auf zwei diskrete Zustände hin. Wie oben gezeigt, springt die Lebensdauer synchron mit der Zählrate zwischen zwei diskreten Stufen. Der stark fluoreszierende Zustand kann der freien Sonde mit hoher Quantenausbeute und langer Fluoreszenzlebensdauer zugeordnet werden. Der gering fluoreszierende Zustand liegt vor, wenn Kupfer(II) gebunden ist. Die Quantenausbeute verringert sich bei der Atto620-Sonde um 60-70 % und bei der TMR-Sonde um 80-90 %, was sowohl im Einzelmolekül-, als auch im Ensembleexperiment gefunden wurde.

Der Mechanismus der Löschung lässt sich anhand der vorgestellten Ergebnisse weiter eingekreisen. Eine Möglichkeit wäre ein resonanter Energietransfer (RET) zwischen Donor und Akzeptor. Der Donor geht vom angeregten Zustand in den Grundzustand unter gleichzeitiger Anregung des Akzeptors über. Dieser Energietransfer ist umso effizienter, je mehr das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Die Emission von TMR erfolgt bei 585 nm und das Absorptionsmaximum des $\text{Cu}(\text{dcbpy})^{2+}$ -komplexes liegt bei 325 nm. Da für den Prozess eines resonanten Energietransfers die Überlappung der Emissions- und Absorptionsspektren nötig ist, kann ein solcher Mechanismus für die hier vorgestellte Sonde ausgeschlossen werden.

Viele in der Literatur beschriebene Fluoreszenzsonden zum Nachweis von Metallionen nutzen die Fluoreszenzlöschung durch die entsprechenden Metallionen [de Silva 2000]. Bei vielen Sonden wird die Löschung durch einen PET- Mechanismus verursacht, weshalb bei der vorgestellten Sonde ebenfalls ein photoinduzierter Elektronentransfer (PET) in Betracht gezogen wurde. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs wird ein Elektron in das LUMO angeregt, so dass sich jeweils ein Elektron in HOMO und LUMO befinden. Der ET kann nun auf zwei Wegen erfolgen: Der Farbstoff überträgt das Elektron im LUMO auf ein LUMO eines anderen Moleküls (Oxidation) oder er nimmt ein Elektron aus dem HOMO eines geeigneten Donors auf (Reduktion).

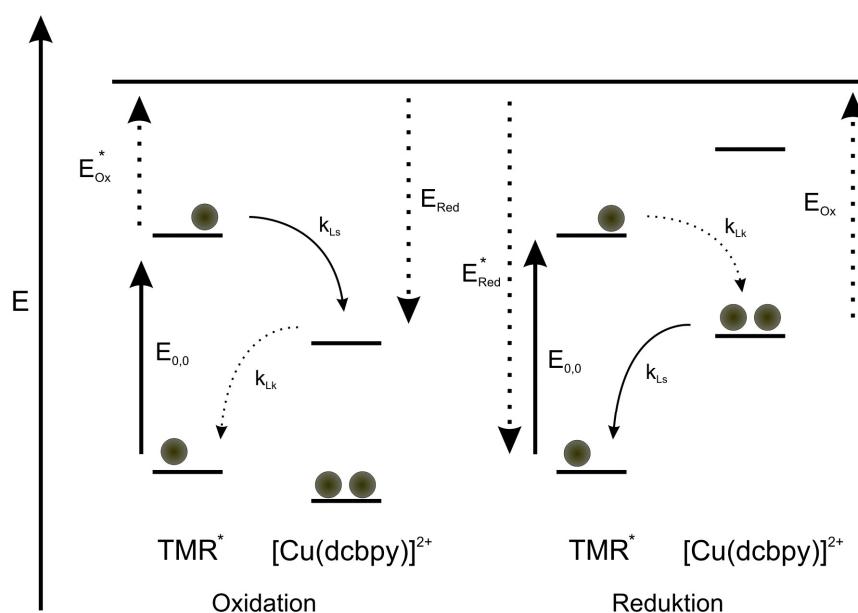


Abbildung 5.3-1. Schematischer Ablauf der Löschung von TMR über photoinduzierten Elektronentransfer. Die Konstanten k_{Ls} und k_{Lk} bezeichnen die Ladungsseparation bzw. die Ladungskombination.

In beiden Fällen tritt keine Relaxation in Form von Fluoreszenz auf. PET entspricht im Grunde einer Redoxreaktion, die nur ablaufen kann, wenn deren freie Enthalpie ΔG negativ ist. Dies kann mit Hilfe der Rehm- Weller Gleichung abgeschätzt werden:

$$\Delta G = E(D/D^+) - E_{0,0} - E(A/A^-) + C \quad \text{Gleichung 5.3-1}$$

Die entsprechenden Redoxpotentiale der beteiligten Moleküle wurden aus strukturähnlichen Substanzen abgeschätzt, bzw. mittels zyklischer Voltammetrie bestimmt und sind in Tabelle 5.3-1 aufgeführt, vgl. Anhang Abbildung 6.5-1 sowie [Heinlein 2003], [Sauer 1995]. Da die Potentiale der beteiligten Spezies nicht in wässriger Umgebung

sondern in Acetonitril bestimmt wurden, kann der erhaltene Wert für ΔG nur als Abschätzung dienen.

Tabelle 5.3-1. Redoxpotentiale der Farbstoffe R6G und Atto620 sowie der Substanzen Bipyridin und der Komplex $[\text{Cu}(\text{bpy})]^{2+}$. Potentiale gegen Standardkalomelektrode (SCE).

V bzw. eV	OX \rightarrow X^{n+1} [V / vs. SCE]	Red \rightarrow X^{n-1} [V / vs. SCE]	E00 [eV]	ΔG_{It} vs. Cu(bpy)	ΔG_{It} vs. Cu^{2+}
$\text{Cu}(\text{bpy})^{2+}$	-	+0,1	-		-
R6G ^{b)} (TMR)	1,39	-0,95	2,27 (2,16)	-0,98 (-0,87)	-0,71 (-0,6)
Atto620	1,1	-0,69	1,9	-0,95	-0,73

Das Redoxpotential des $\text{Cu}(\text{dcbpy})^{2+}$ -komplexes beträgt 100 mV (vs. SCE). Zur Abschätzung der freien Enthalpie für den photoinduzierten Elektronentransfer von TMR mit dem $\text{Cu}(\text{bpy})$ -Komplex wurde das bekannte Potential von Rhodamin6G der Oxidation (1,39 V) und der Reduktion (-0,95 V) angenommen. Damit ergibt sich näherungsweise ein Energiegewinn von -0,98 eV. Das Potential von Atto620 wurde mittels zyklischer Voltammetrie zu 1,1 V (Oxidation) und -0,69 V (Reduktion) gegen SCE bestimmt. Auch hier ergibt sich ein Energiegewinn für den photoinduzierten Elektronentransfer von ca. -0,95 eV.

Der Elektronentransfer läuft im Bereich von 10^{-12} s ab und ist damit ein um drei Größenordnungen schnellerer Prozess als die Fluoreszenz (10^{-9} s). Im Widerspruch dazu steht die Beobachtung, dass der Kupfer(II)-Sonden Komplex eine Restfluoreszenz mit verminderter Fluoreszenzlebensdauer zeigt. Dennoch ist PET als Löschmechanismus denkbar. Eine mögliche Erklärung liefert die Distanzabhängigkeit der Rate des PET. In der Literatur wurde ein ähnliches Phänomen beschrieben und detailliert untersucht [Yang 2003]. Sie berichteten über photoinduzierten Elektronentransfer über einen Distanz von 0,45 nm zwischen FAD und Tyrosin in Proteinen. Sie beobachteten Fluktuationen der Fluoreszenzlebensdauer zwischen 30 ps und 3 ns, die mit der Zählrate korrelierte. Die Schwankungen der Lebensdauer wurden mit Fluktuationen des Abstands zwischen FAD (Flavin Adenin Dinukleotid) und Tyrosin und der damit einhergehenden schwankenden ET-Rate erklärt.

Andererseits könnte dem PET ein anderer dynamischer, die Geschwindigkeit bestimmender Schritt überlagert sein. Dabei könnte es sich um Fluktuationen der DNS-

Struktur handeln. Kim *et. al.* beschrieb MR121 markierte DNS-Sonden, deren Fluoreszenz bei Ausbildung einer Haarnadelstruktur gelöscht wurde. Der Stamm bestand lediglich aus einer GC- Basenpaarung, was eine recht labile Struktur zur Folge hatte. In den Fluoreszenzautokorrelationsfunktionen wurde eine schnelle Komponente im μ s-Bereich entdeckt, die auf eine schnelle Dynamik der DNS-Struktur zurückgeführt werden konnte [Kim 2006]. Bei der hier diskutierten Sonde sind die fraglichen Redoxzentren nur durch je eine C₆- Kette voneinander separiert, weshalb die Fluktuationen auf einer noch schnelleren Zeitskala ablaufen könnten.

Auch wenn die genaue Distanz des Kupferkomplexes zum TMR bzw. Atto620 nicht mittels Kristallstruktur bestimmt werden konnte, kann anhand eines einfachen Modells ein Abstand abgeschätzt werden. TMR sowie der Ligand dcbpy sind endständig an das Phosphatrückgrat der DNA über einen Anker mit ca. zehn C-C Bindungen (Länge \sim 1,5 nm) gebunden. Da diese Anker flexibel sind, können sie sich, ausgehend von der Anknüpfstelle, in einem Radius von 1,5 nm bewegen. Die maximale Distanz beträgt somit etwa 5-6 nm, während die minimale Distanz der direkte Kontakt wäre. Die grün und rot markierten Bereiche in Abbildung 5.3-2 kennzeichnen die Aufenthaltssphäre der fraglichen Moleküle. Zusätzlich wurde ein schmaler Bereich von etwa 0,5 nm addiert, der die Reichweite des ET- Transfers berücksichtigt. Die Bewegungen eines Moleküls innerhalb dieser Sphäre erfolgt vermutlich sehr schnell. Bei Kontakt der Beiden ET- Partner würde der photoinduzierte ET sehr effizient ablaufen und zu einer vollständigen Löschung der Fluoreszenz führen. Aufgrund der Bewegung der beiden Moleküle zueinander ist es vorstellbar, dass eine solche Dynamik im ns- Bereich abläuft, die Fluoreszenz nicht komplett gelöscht und eine verminderte Fluoreszenzlebensdauer beobachtet wird.

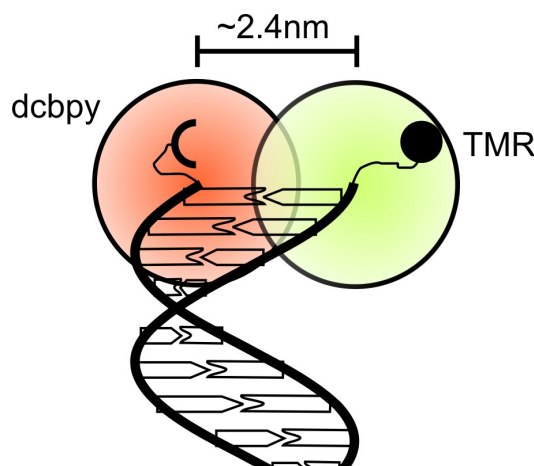


Abbildung 5.3-2. Schematische Darstellung der Aufenthaltssphären der TMR bzw. dcbpy-Strukturen durch Linkerfluktuationen.

Die abgeschätzten freien Enthalpien für den photoinduzierten Elektronentransfer liegen für TMR als auch für Atto620 bei rund $-0,9$ eV. Die Unterschiede in der Löscheffizienz zwischen der TMR- und der Atto620-markierten Sonde konnte damit nicht erklärt werden. Es ist denkbar, dass Atto620 stärker vom ET-Partner abgeschirmt ist als TMR, und deshalb der Elektronentransfer weniger effizient abläuft. Weiterhin ist möglich, dass der Farbstoff aufgrund ionischer Wechselwirkungen zwischen dem Phosphatrückrat der DNA und der positiv geladenen Farbstoffstruktur an eine bestimmte Position der DNA bindet. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur der Farbstoffe könnten sie verschiedene Orientierungen und Positionen bevorzugen und dadurch zu unterschiedlichen ET-Raten führen. Ähnliche Wechselwirkungen zwischen DNS und dem Farbstoff TMR wurden kürzlich von Neubauer et. al. beschrieben [Neubauer 2007].

5.4. Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung im Einzelmolekülexperiment

Für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten mussten die Dauer der An- und Aus-Zustände histogrammiert werden. Dazu wurde die Photonenzahl pro 20 ms Zeitintervall gegen die Zeit aufgetragen. Dies war nötig, um anhand der Zählraten zwischen An- und Aus-Zustand unterscheiden zu können, was aber die Zeitauflösung auf 20 ms begrenzt. Bereiche, in denen schnellere Fluktuationen auftraten, zeigten eine Zählrate, die weder dem An- noch Aus-Zustand zugeordnet werden konnte. Solche Bereiche traten temporär auf und beinhalten eine zweite schnellere Kinetik und werden in Kapitel 5.4.1 diskutiert. Die Häufigkeitsverteilung der An- bzw. Aus-Zustandsdauer kann durch ein monoexponentielles Gesetz beschrieben werden (vgl. Kapitel 4.5.4). Die Histogramme in Abbildung 4.5-11 zeigen aber zu längeren Zustandsverweilzeiten Abweichungen von diesem Gesetz. In manchen Fluoreszenzaufnahmen (bei konstanter Kupfer(II)konzentration) waren Zeitdomänen erkennbar, die eine relativ kurze Verweilzeit im Aus-Zustand zeigten, auf die Abschnitte mit längeren Verweilzeiten folgen. Dies wird exemplarisch in Abbildung 5.4-1a gezeigt. Im schwarzen Bereich bleibt die Sonde im Schnitt länger im Aus-Zustand, während im roten Bereich kürzere Aus-Zustände vorkommen. Dies wird durch die Histogramme der An-Zustände (Abbildung 5.4-1b) und der Aus-Zustände (Abbildung 5.4-1c) verdeutlicht. Während sich die Verteilung der

Dauer der An-Zustände sich in den beiden Bereichen kaum unterscheidet, ist bei der Verteilung der Dauer der Aus-Zustände eine deutliche Veränderung erkennbar.

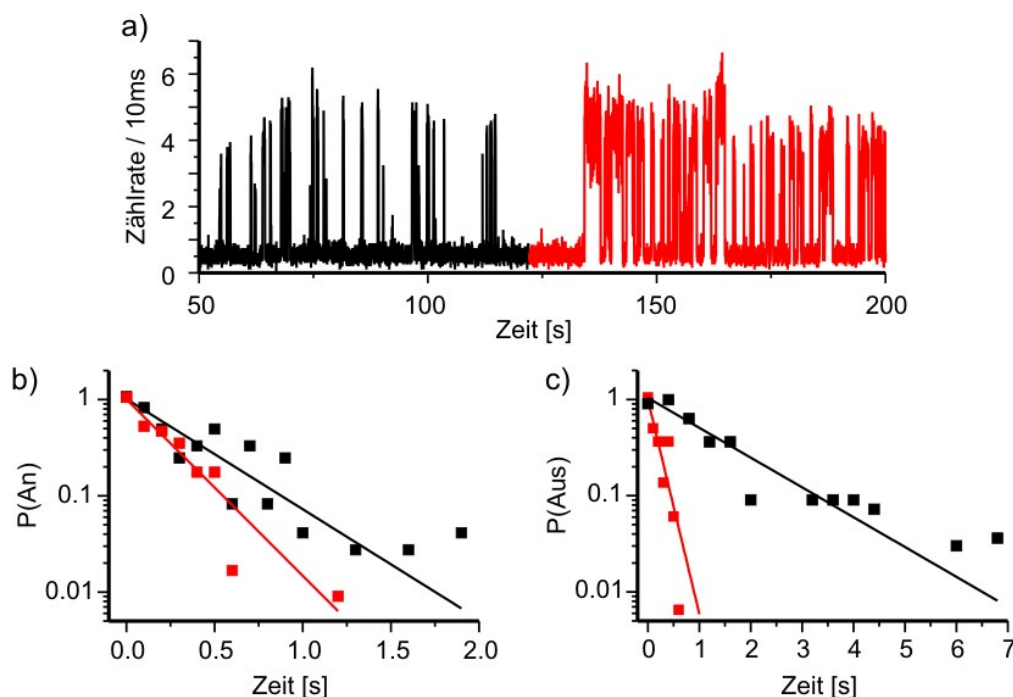


Abbildung 5.4-1. a) Fluoreszenzaufnahme einer TMR-dcbpy-Sonde bei einer Cu^{2+} -Konzentration von $2 \mu\text{M}$. Im schwarz markierten Bereich sind lange Aus-Verweilzeiten erkennbar, während im roten Bereich eine schnellere Kinetik vorliegt. Die Unterschiede der Kinetik sind leicht an den Histogrammen der Verweilzeiten im An-Zustand (a) und Aus-Zustand (b) zu erkennen. Die schwarzen und roten Datenpunkte wurden aus den entsprechend gekennzeichneten Bereichen mit Hilfe der Grenzwertmethode erhalten.

Diese Sprünge zwischen zwei kinetischen Konstanten wurden nicht bei allen Experimenten beobachtet. Deshalb konnte die Ursache hierfür noch nicht eindeutig geklärt werden. Es ist denkbar, dass dies auf Inhomogenitäten der Oberfläche bzw. der lokalen Umgebung des Reaktionszentrums zurückzuführen ist und damit Wechselwirkungen mit dem oberflächengebundenem Protein BSA auftreten. Die Untersuchungen mit Hilfe der polarisationsmodulierten Anregung zeigen jedoch, dass keine lang andauernden Wechselwirkungen mit der Oberfläche auftreten. Da die polarisationsmodulierte Anregung nur mit dem Diodenlaser bei 635 nm möglich ist, kann die Wechselwirkung der TMR-markierten Sonde mit der Oberfläche mit dieser Technik nicht untersucht werden. Deshalb wurde die Detektion auf zwei Detektoren umgerüstet und die Emission mittels polarisierendem Strahlteiler in einen parallelen und orthogonalen Komponenten gespalten und getrennt voneinander registriert (vgl. Kapitel 4.5.1 und

4.5.7). Die Rasteraufnahmen zeigen, dass die meiste Zeit gleiche Zählraten auf beiden Detektoren auftraten, woraus geschlossen wurde, dass keine Wechselwirkung zwischen Sonde und Oberfläche stattfindet. In den Aufnahmen der zeitabhängigen Fluoreszenz einzelner Sonden bis zur Photozerstörung konnten aber Veränderungen im Intensitätsverhältnis zwischen den beiden Detektoren beobachtet werden, was als zeitweilige Adsorption an die Oberfläche interpretiert wurde. Jedoch konnte bislang kein Zusammenhang zwischen der Wechselwirkung mit der Oberfläche und einem Wechsel der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt werden.

Andererseits könnten aber auch strukturelle Veränderungen der Sonde für die veränderten Geschwindigkeiten verantwortlich sein. Denkbar sind Abhängigkeiten vom pH-Wert, da die Carboxylsubstituenden oder ein Stickstoff des Pyridins des Liganden protoniert vorliegen können, sodass sich die elektronische Struktur verändert und damit auch die Stabilität beeinflusst wird. Des Weiteren sind aber auch Wechselwirkungen mit anderen Ionen oder Liganden denkbar, die die Stabilität des Kupfer(II)sondenkomplexes beeinflussen. Die Untersuchung der hier beschriebenen Einflüsse kann mit Hilfe der vorhandenen Methoden und Materialien in weiteren Experimenten erfolgen.

5.4.1. Ansätze zur Untersuchung der schnelleren Kinetik

Die oben diskutierte Variation der Kinetik spielte sich im zeitlich gut aufgelösten Bereich ab und konnte mit Hilfe der einfachen Schwellwertanalyse erkannt werden. Mit Hilfe von Methoden mit höherer Zeitauflösung wurden Fluktuationen auf einer Zeitskala < 1 ms entdeckt, die mittels Schwellwertanalyse nicht mehr aufgelöst werden konnten. Die Bestimmung der An- und Aus-Kinetik mit Hilfe der Autokorrelation (vgl. Kapitel 4.5.5) ergab jedoch bei der langsameren Kinetik, die der Komplexbildung zugeschrieben wurden, sehr starke Abweichungen zu den mit der Grenzwertmethode bestimmten Werten. Daraus wurde die Schlussfolgerung getroffen, dass die zur Auswertung der Autokorrelationsfunktion benutzte Modellfunktion keine quantitative Analyse der Daten zulässt. Dies wurde auf einen zeitlich variierenden Anteil schneller Fluktuationen in einzelnen Fluoreszenzspuren, also eine dynamische Heterogenität, zurückgeführt, die nicht durch das benutzte einfache biexponentielle Modell beschrieben werden kann. Dennoch wurde mit dieser Methode eine schnellere Kinetik im Millisekundenbereich identifiziert, die mit der Grenzwertmethode nicht aufgelöst werden kann.

Zur quantitativen Auswertung der Daten mit hoher Zeitauflösung wurde eine weitere Methode entwickelt. Hiefür wurden die aufgenommenen Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Algorithmus analysiert, der die zeitlich unregelmäßig auftretenden Ereignisse auf Basis eines Markov Modulierten Poisson Prozesses (MMPP) interpretiert. Damit war es möglich, anhand eines Drei-Zustandmodells die Übergangswahrscheinlichkeiten der langsamen sowie der schnellen Kinetik zu bestimmen. Diese schnellen Fluktuationen scheinen auch auf einer Wechselwirkung des Kupfer(II)komplexes mit dem Farbstoff zu basieren, da sie nur beobachtet wurden, wenn der Lösung Kupfer(II) zugegeben wurde. Die Einflussnahme verschiedener Parameter wie pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur und der Laserleistung auf die schnelle Kinetik sind aber auch nicht auszuschließen. Mit der Möglichkeit der quantitativen Auswertung dieser Kinetik durch MMPP können nun weitere Experimente durchgeführt und diese Parameter systematisch untersucht werden. Auf molekularer Ebene könnte die schnelle Kinetik so gedeutet werden, dass die Sonde zwischen Konformationen fluktuiert, bei der die Löschung kurzzeitig unterbrochen und die Sonde in einem fluoreszierenden komplexgebundenen Zustand existierte. Die Sonde wird durch 5 aufeinander folgende Thymin-Adenin Basenpaarungen terminiert, die sich zueinander verschieben könnten und dadurch zu einer Variation des Abstands zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Löschmolekül führen (Abbildung 5.4-2). Um einen solchen Effekt zu untersuchen, soll die Basensequenz der Sonde verändert werden und zwei der T-A Basenpaare durch G-C Basenpaare ersetzt werden.

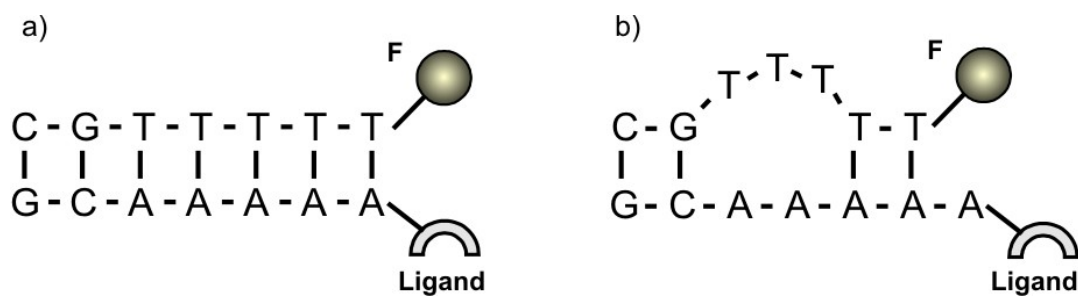


Abbildung 5.4-2. Mögliche strukturelle Fluktuationen durch die endständigen T-A Basenpaarungen

- Weiterentwicklung des MMPP- Algorithmus unter Berücksichtigung der Fluoreszenzlebensdauer:

Die Zuordnung der Einzelphotonen zu einem bestimmten Zustand erfolgt bei MMPP anhand der beobachteten Interphotonenzeit. Durch Berücksichtigen der Fluoreszenzlebensdauer als weiteres Kriterium könnte bei der Identifizierung des verborgenen Zustands helfen. Je größer der Unterschied der Fluoreszenzlebensdauer der beteiligten

Zustände, desto deutlicher kann das Photon einem bestimmten Zustand zugeordnet werden.

5.5. **Ausblick auf katalytische Reaktionen an Metalldotierten Oberflächen**

Voraussetzung für die Beobachtung katalytischer Reaktionen mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie ist unter anderem, dass diese Reaktion im fokalen Beobachtungsvolumen abläuft. Dazu muss einer der Reaktionspartner mit der Oberfläche verknüpft werden, so dass die Reaktion an einer definierten Position der Oberfläche abläuft. Der erste Schritt dazu wurde in dieser Arbeit durch die Immobilisierung des Sondenkonstrukts auf einer Glasoberfläche realisiert. Aufgrund der schnellen Dissoziation des Komplexes aus Cu^{2+} und der Sonde bleibt das Ion nur kurze Zeit im Fokus. Die Beobachtung einer katalytischen Reaktion dieses Ions mit einem geeigneten Substratmolekül im Fokus ist nur dann möglich, wenn nur komplexgebundenes Cu^{2+} katalytische Aktivität zeigt. Ist dies nicht gegeben, so können andere Ansätze gewählt werden. Wie oben bereits gezeigt, bilden auch Mn^{II} , Fe^{II} , Co^{II} , Ni^{II} und Zn^{II} - Ionen Komplexe mit der Sonde. Zwar liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion mit Ausnahme von Nickel(II) nicht so stark auf Seiten des Komplexes (vgl. Tabelle 5.1-3), jedoch sind die Geschwindigkeiten der Dissoziation das entscheidende Kriterium. Wie Tabelle 5.5-1 zeigt, ist im Vergleich zum $\text{Cu}(\text{bpy})^{2+}$ - Komplex die Dissoziationsgeschwindigkeit des $\text{Ni}(\text{bpy})^{2+}$ - Komplexes etwa vier Größenordnungen und die des $\text{Co}(\text{bpy})^{2+}$ Komplexes um den Faktor 3 langsamer. Damit könnte eine stabilere Metallion- dotierte Oberfläche erstellt und die Beobachtung katalytischer Prozesse ermöglicht werden.

Tabelle 5.5-1. Geschwindigkeitskonstanten und Gleichgewichtskonstanten für die Komplexbildung von 2,2'Bipyridin mit verschiedenen Metall(II)ionen [Holyer 1965]

	$k_a [10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	$k_d [\text{s}^{-1}]$	Log K_{Gl}
Mn^{2+}	-	-	-
Fe^{2+}	158	~8	4,3
Co^{2+}	63	~0,06	6
Ni^{2+}	1,5	$5 \cdot 10^{-5}$	7,5
Cu^{2+}	~10 000	0,18	8
Zn^{2+}	~1000	15	5

Durch Verwendung eines Substrats, das bei der Reaktion in eine fluoreszierende Form überführt wird, kann die Reaktion mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Methoden beobachtet werden. Ein mögliches Beispiel stellt der Fluoresceinester dar, dessen Hydrolyse zur fluoreszierenden Form durch zweiwertige Übergangsmetalle katalysiert wird [Kierat 2005].

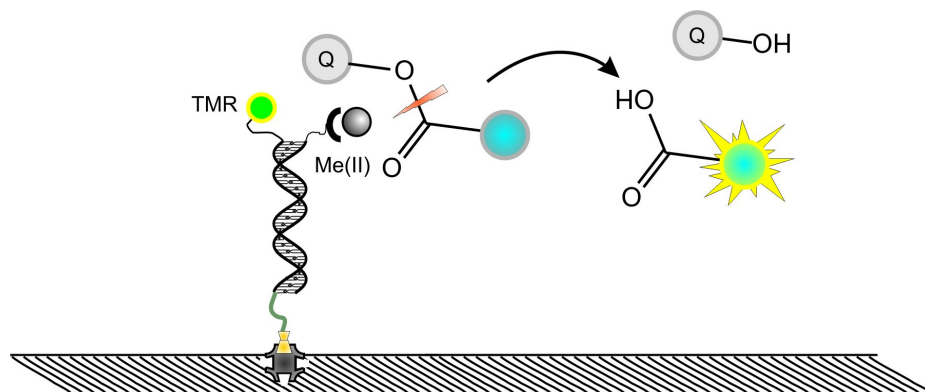


Abbildung 5.5-1. Ablauf einer katalytischen Bindungsspaltung, wobei ein fluoreszierendes Molekül generiert wird.

Da der Komplex von Kupfer(II) mit der Sonde aber sehr schnell zerfällt, eignet sich dieser Komplex nicht für Einzelmoleküluntersuchungen, da dann eine starke Hintergrundhydrolyse auftritt. Anders stellt es sich für Nickel(II) oder Kobalt(II) dar. Nach Dotieren der Oberfläche mit dem entsprechenden Metallion könnte es mehrere Stunden dauern, bis diese Komplexe dissoziieren. Innerhalb dieser Zeit könnte der Umsatz des Substrats an den Sonden beobachtet werden.

5.6. Weiterentwicklung des Sondendesigns

Das Sondenkonstrukt kann leicht zur Untersuchung von Komplexbildungsreaktionen anderer Liganden mit Kupfer modifiziert werden. Einzige Bedingung dafür ist, dass der interessierende Ligand eine Karbonsäuregruppe zum Anknüpfen an den DNS-Stamm der Sonde trägt. Außerdem kann die Sonde zur Untersuchung von Reaktionen in der Koordinationssphäre des Zentralions herangezogen werden, wie beispielsweise bei einem Ligandenaustausch. Um diese Möglichkeit in definierter Art und Weise zu ermöglichen, könnte die Sonde, wie in Abbildung 5.6-1 gezeigt, modifiziert werden. Die zwei interessierenden Liganden werden so in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert.

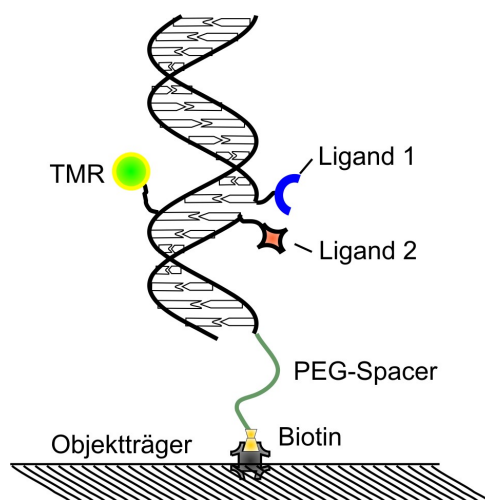


Abbildung 5.6-1. Mögliche DNS- basierte Sonde mit zwei verschiedenen Liganden zur Untersuchung von definierten Reaktionen in der Koordinationssphäre des Zentralions. Der Farbstoff TMR könnte variiert werden. Änderungen des Bindungszustands könnte Auswirkungen auf die Löschung des Farbstoffs TMR haben und könnte somit verfolgt werden.

Aufgrund der schnellen Kinetik ist vor allem Kupfer(II) dafür sehr gut geeignet. Wenn man andere Metalle untersuchen möchte, steht man vor dem Problem, dass die Reaktion langsamer als die Photozerstörung abläuft und deshalb nicht mehr im Beobachtungszeitfenster liegt. Um solche langsamen Reaktionen zu beobachten, muss die Photozerstörung der Sonde verhindert werden. Aitken *et. al.* berichtete kürzlich, dass die Photozerstörung verschiedener Farbstoffe durch Zugabe geeigneter Reduktions- oder Oxidationsmittel verhindert wird [Aitken 2008]. In einer Publikation von Vogelsang *et. al.* wird eine Kombination aus reduzierenden und oxidierenden Reagenzien eingesetzt und die Photozerstörung bei manchen Farbstoffen gänzlich unterdrückt [Vogelsang 2008]. Somit könnten auch langsamere Reaktionen untersucht werden, wie im vorliegenden Fall beispielsweise die Komplexbildung von Ni(II) oder Co(II) mit der Bipyridineinheit des Sondenkonstruktes.

5.7. Weiterentwicklung der Sonde zur Untersuchung chemischer Systeme

Zwar erlaubt die Verwendung einer DNS-Grundstruktur die einfache Modifikation der Spezifität durch Verwendung anderer Liganden oder Farbstoffe, das bedeutet aber gleichzeitig eine Limitierung auf milde, wässrige Reaktionsbedingungen wie ein pH-Wert

von 6-9 und einen Temperaturbereich zwischen 10 und 30 °C. Um Reaktionen auch bei extremeren Bedingungen untersuchen zu können, könnte die DNS- Grundstruktur beispielsweise durch eine Polyethylenglycolstruktur (PEG) ersetzt werden, die zwei Verzweigungen enthält, an die der Farbstoff und der Ligand verknüpft werden könnten (Abbildung 5.7-1a). Die Verknüpfung der Sonde an der Oberfläche könnte über Silane erfolgen. Eine PEG basierte Sonde wäre zur Untersuchung von Reaktionen in polarem Medium geeignet. Für Reaktionen, die in unpolarem Medium ablaufen sollen, könnte eine unpolare Kohlenwasserstoffkette für eine Distanz zwischen Reaktionsort und Oberfläche sorgen (Abbildung 5.7-1b).

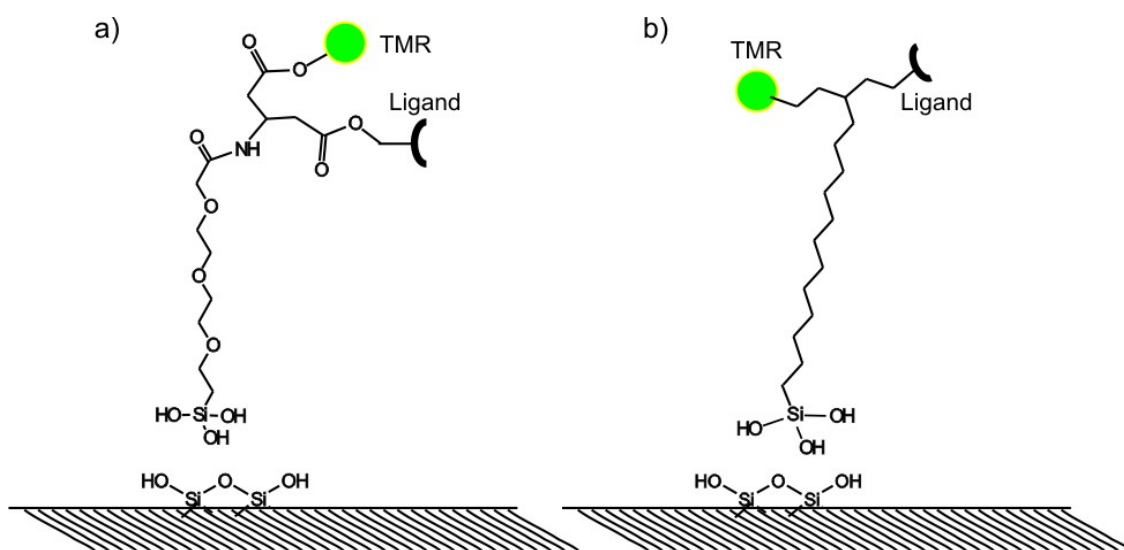


Abbildung 5.7-1. Alternative Sondenstrukturen zur Untersuchung der Metallkomplexbildung oder Metallkomplex- katalysierte Reaktionen

Nach diesem Ansatz könnten beispielsweise Metallkomplexbeschleunigte Reaktionen zur organischen Synthese untersucht werden. Ein erster Schritt bestünde in der Entwicklung einer Sonde, die beispielsweise den Bindungsstatus eines Palladiumkomplexes durch Veränderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften anzeigt. Danach müsste eine Modellreaktion gefunden werden, die unter milden Bedingungen abläuft und deren Fortgang am besten durch Generierung fluoreszierender Moleküle angezeigt würde.

6. Anhang

6.1. Auswertung der Lebensdauerermessungen

	[Cu] μM	A ₁	A ₂	τ_1	τ_2	ampl.w .lifet	χ^2	τ_0/τ_1	int weight lifetime
MR121	0	10630.6		1.855		1.855	1.023	1	
	1	10633.2		1.844		1.844	1.048	1.006	
	2.6	10258.5		1.842		1.842	1.099	1.007	
	18.5	10416		1.837		1.837	1.004	1.009	
	174	10212.8		1.837		1.837	1.002	1.010	
MR121 bipy	0	6030.6	1534.7	2.954	0.88	2.533	0.998	1	2.81
	1	5974.9	1598.7	2.916	0.813	2.472	0.99	1.013	2.77
	2.6	4693.4	4374.2	2.734	0.726	1.765	0.99	1.080	2.34
	18.5	3260.2	7995.2	1.896	0.561	0.948	1.271	1.558	1.33
	174	1397.4	44489.1	1.866	0.088	0.142	1.051	1.583	0.80
MR121 Kontrolle	0	7312.9	1688.7	2.915	1.603	2.669	1.079	1	2.77
	1	7579.6	1608	2.904	1.629	2.681	1.029	1.0037	2.77
	2.6	7345.3	1987.8	2.929	1.686	2.664	1.086	0.9952	2.76
	18.5	7263.6	2102	2.862	1.624	2.584	0.955	1.0185	2.69
	174	7084.6	2971.7	2.394	1.005	1.984	1.176	1.2176	2.19
	326	1397.4	44489.1	1.866	0.088	0.142	1.051	1.5621	0.80

ATTO635	0	4429.5	5060.4	2.985	1.579	2.235	1.039	1	2.46
	1	4268.6	5147.3	3.115	1.639	2.308	1.026	0.9582	2.54
	2.6	5065.3	4226.9	2.978	1.489	2.301	1.126	1.0023	2.54
	18.5	5301.6	3617.7	2.939	1.485	2.349	1.076	1.0156	2.57
	174	5690.9	3011.6	2.945	1.33	2.386	1.021	1.0136	2.63
ATTO635 bipy	0	8371.3	1421.1	4.148	2.445	3.901	1.075	1	3.99
	1	7448.9	2296.3	4.225	2.654	3.855	1.016	0.9818	3.97
	2.6	4692	4187.2	3.04	1.605	2.363	1.0141	1.3645	2.58
ATTO635 Kontrolle	0	4118.3	5355.3	3.045	1.622	2.241	1.005	1	2.46
	1	4365.1	5056.6	3.096	1.624	2.306	0.988	0.9835	2.54
	2.6	4518.9	4736.6	3.077	1.584	2.313	1.064	0.9896	2.55
	18.5	4656.7	4220.2	3.046	1.612	2.364	1.039	0.9997	2.58
	174	5442.5	3235	2.989	1.397	2.395	0.988	1.0187	2.64

ATTO620	0	9679.2	778.4	2.931	1.217	2.803	1.05	1	2.88
	1	9274.8	1370.5	2.954	1.823	2.808	1.068	0.9922	2.86

	2.6	9973.4	782.8	2.892	1.073	2.760	1.001	1.0135	2.84
	18.5	10060.1	923.7	2.9	1.209	2.758	1.016	1.0107	2.84
	174	9401.4	1244.2	2.928	1.307	2.739	1.079	1.0010	2.84
ATTO620 bipy	0	6793.8	2601.9	3.866	1.672	3.258	1.003	1	3.55
	1	7966.4	3960.4	3.692	1.328	2.907	1.094	1.0471	3.33
	2.6	6716.6	4184.5	3.513	1.106	2.589	1.047	1.1005	3.12
	18.5	5243.1	8281.8	2.519	0.652	1.376	1.209	1.5347	1.98
	174	1.599	619.2	2.316	0.001	0.007	1.035	1.6693	1.98
ATTO620 Kontrolle	0	4344.5	531.9	3.989	1.602	3.729	0.957	1	3.88
	1	4174.8	760.9	3.986	1.516	3.605	1.038	1.00075	3.83
	2.6	3970.3	1332.1	3.906	1.098	3.201	1.062	1.02125	3.66
	18.5	3657.8	1560.3	3.845	1.155	3.041	1.028	1.03745	3.54
	174	4118.3	5355.3	3.045	1.622	2.241	1.005	1.31002	2.46

6.2. Aufnahmen von Oberflächen mit Atto620 markierter Sonde

- Aufnahme mit polarisationsmodulierter Anregung bei 635 nm:

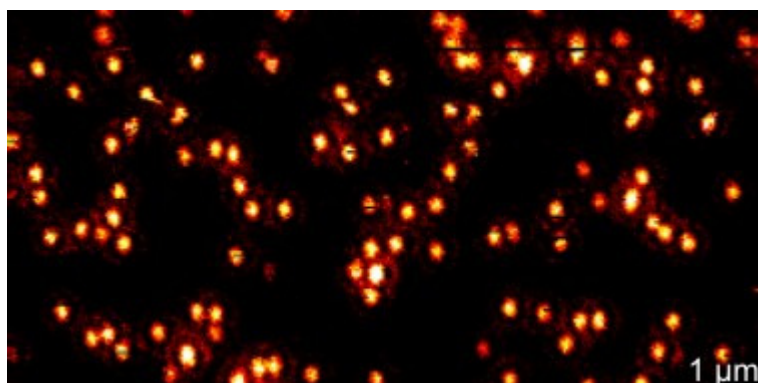


Abbildung 6.2-1 Mit Atto620- Sonde dotierte Oberfläche.

- Aufnahme der gleichen Oberfläche nach vier Tagen:

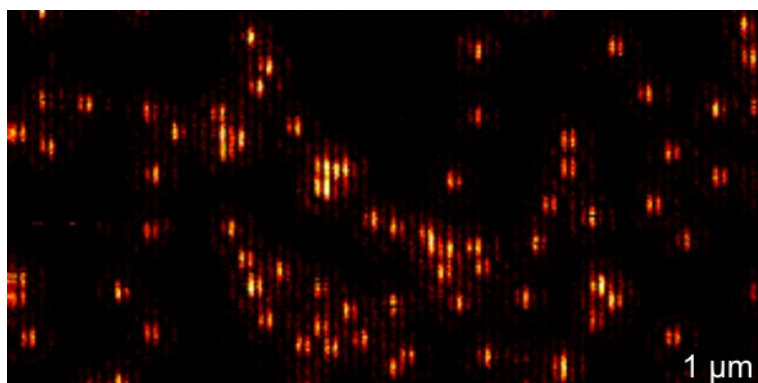


Abbildung 6.2-2. Atto620 markierte Sonde auf einer Oberfläche nach 4 Tagen.

- Belegungsdichte der Atto620-Sonde für Einzelmoleküluntersuchungen

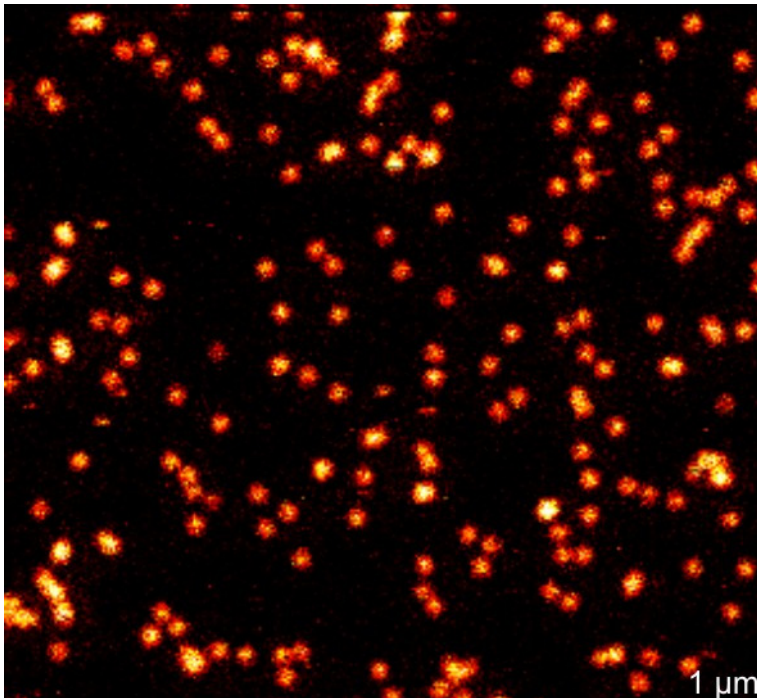


Abbildung 6.2-3. Bestimmung der Belegungsdichte der mit Atto620- Sonde dotierten Oberfläche

- Aufnahme der Oberfläche nach Einstellung von 10 μM Cu²⁺

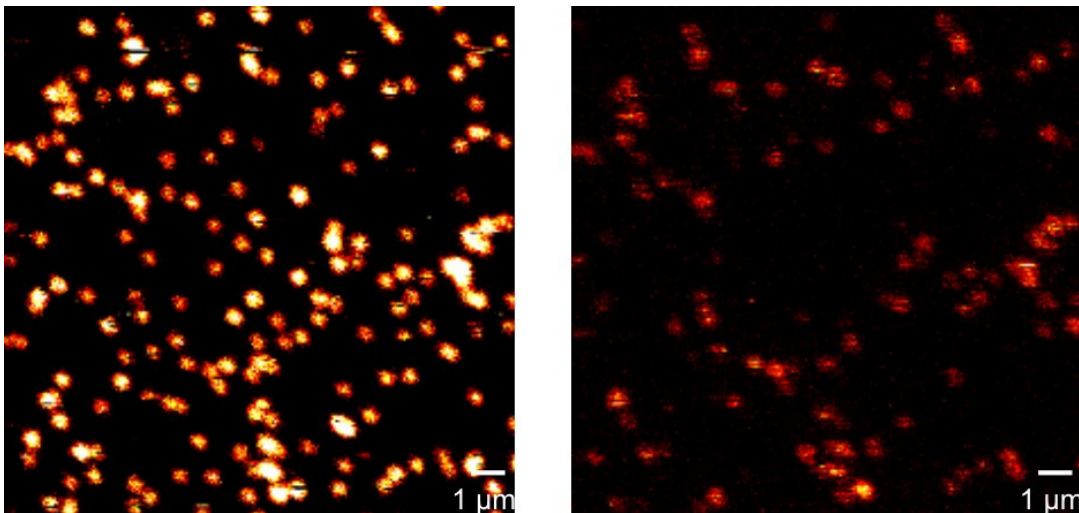


Abbildung 6.2-4. Oberflächen vor und nach Einstellung von 10 μM CuSO₄

6.3. *Aufnahmen von Oberflächen mit TMR-markierter Sonde*

- Aufnahme der Oberflächen mit polarisierter Detektion und zirkular polarisierter Anregung

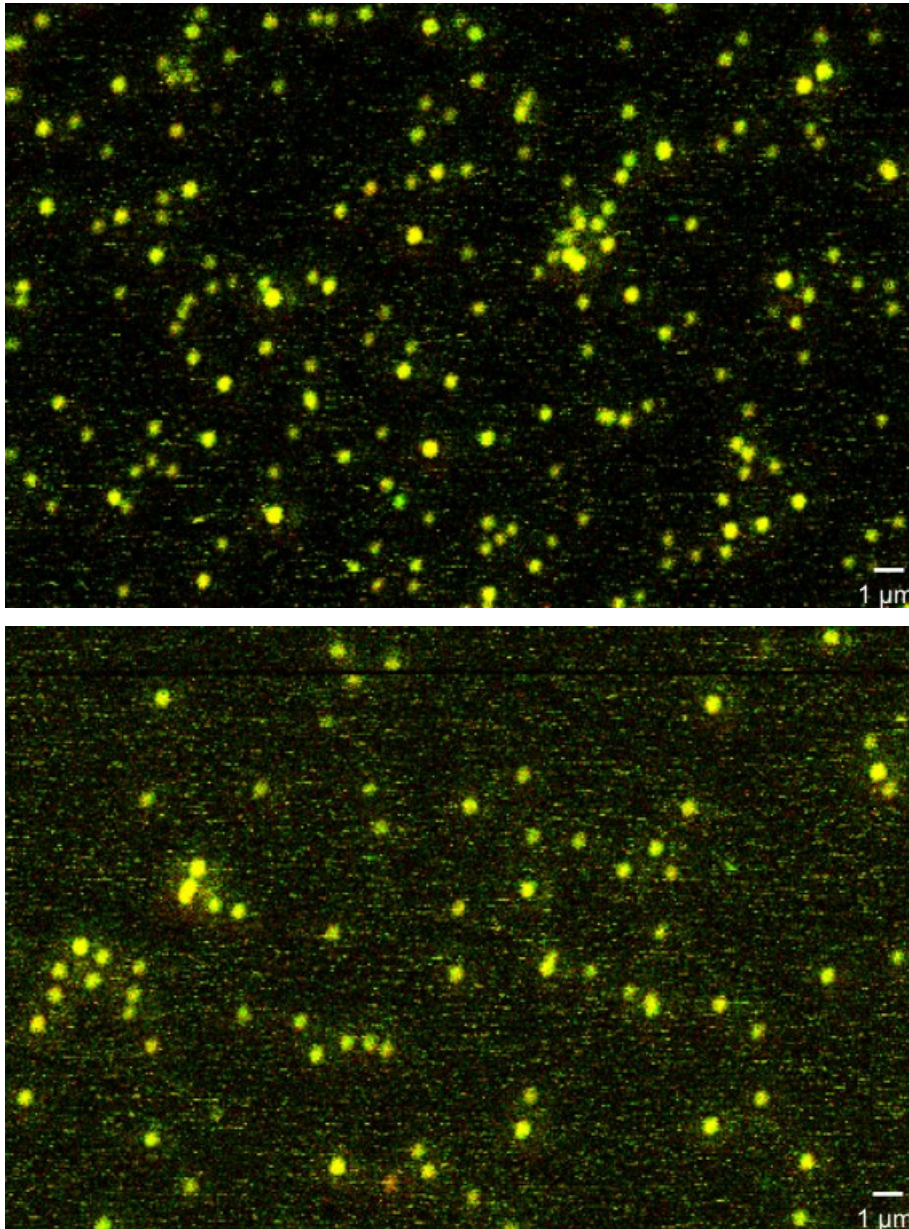


Abbildung 6.3-1 Aufnahmen von TMR- Sonden direkt nach der Immobilisierung. Streifen im Bild sind die Ursache von noch nicht gebunden, frei diffundierenden Sonden, die später durch Waschen der Oberfläche und Einstellen auf die gewünschte Kupferkonzentration entfernt wurden. (Falschfarbenbild Kanal 1: Grün; Kanal 2: Rot; Bei gleicher Intensität wird der Punkt gelb dargestellt)

- Aufnahmen nach Waschen der Oberfläche mit Puffer (MOPS 10 mM) mit polarisierter Detektion und zirkular polarisierter Anregung. Vereinzelt zeigen Sonden keine freie Rotation und sind als grüne oder rote Punkte erkennbar.

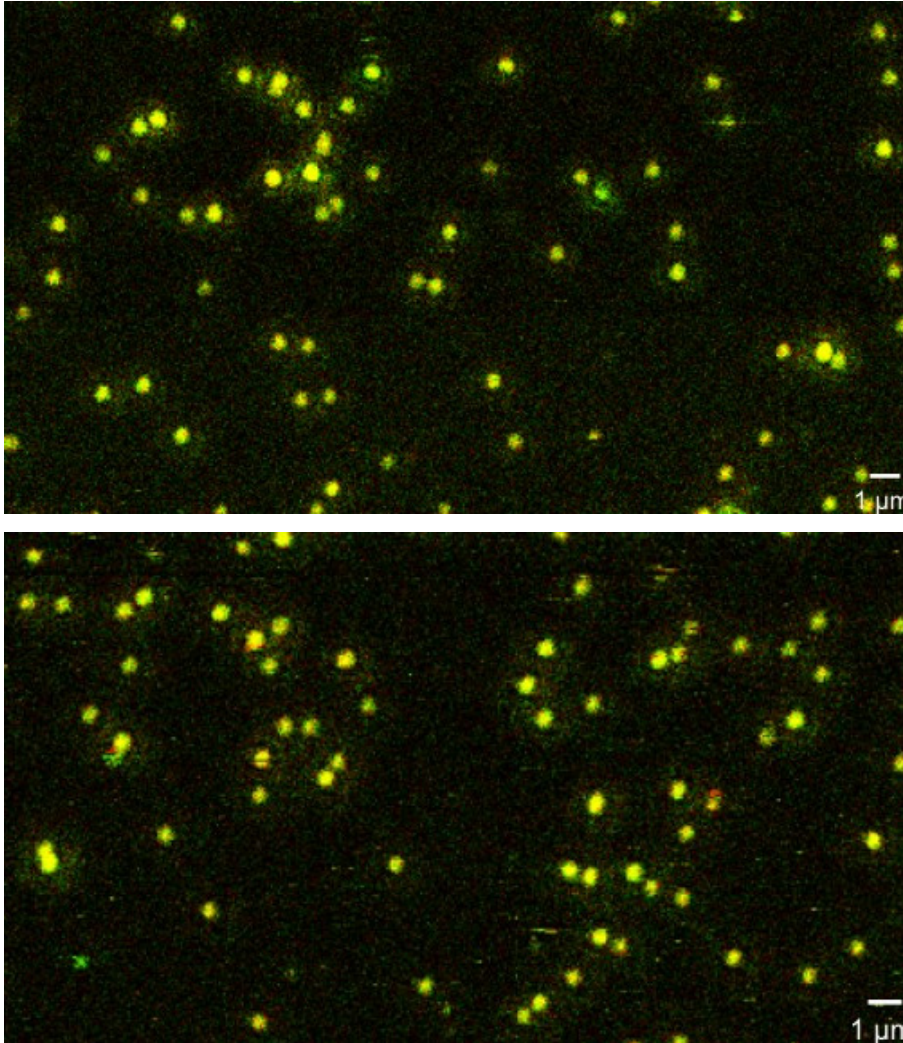


Abbildung 6.3-2. Aufnahme der Oberflächen mit polarisierter Detektion nach Waschen mit Pufferlösung (MOPS). (Falschfarbenbild Kanal 1: Grün; Kanal 2: Rot; Bei gleicher Intensität wird der Punkt gelb dargestellt)

-Aufnahme der Oberfläche nach Zugabe von Kupfer(II) mit polarisierter Detektion und zirkular polarisierter Anregung:

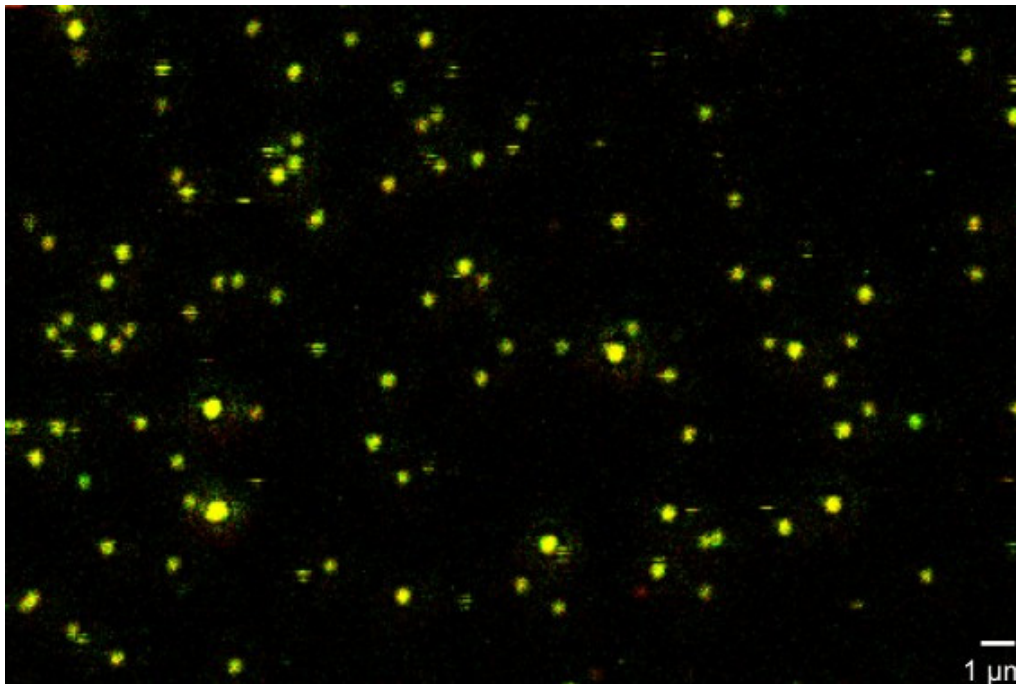


Abbildung 6.3-3. Aufnahme einer mit TMR- Sonde dotierten Oberfläche nach Einstellung der Kupfer(II)-konzentration auf 2 µM.

- Aufnahme der Oberfläche nach Zugabe von Kupfer(II) mit nur einem Detektor:

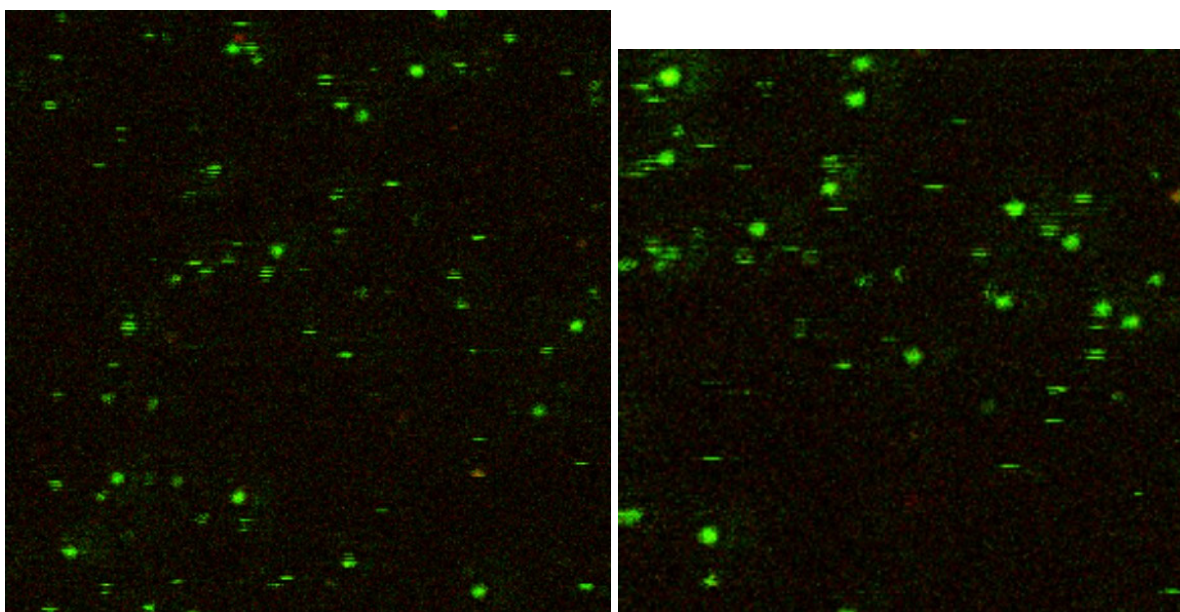


Abbildung 6.3-4 Aufnahme einer mit TMR- Sonde dotierten Oberfläche nach Einstellung der Kupfer(II)-konzentration auf 4 µM.

6.4. Aufnahmen der zeitabhängigen Fluoreszenz einzelner Sonden bei unterschiedlichen Konzentrationen an Cu^{2+}

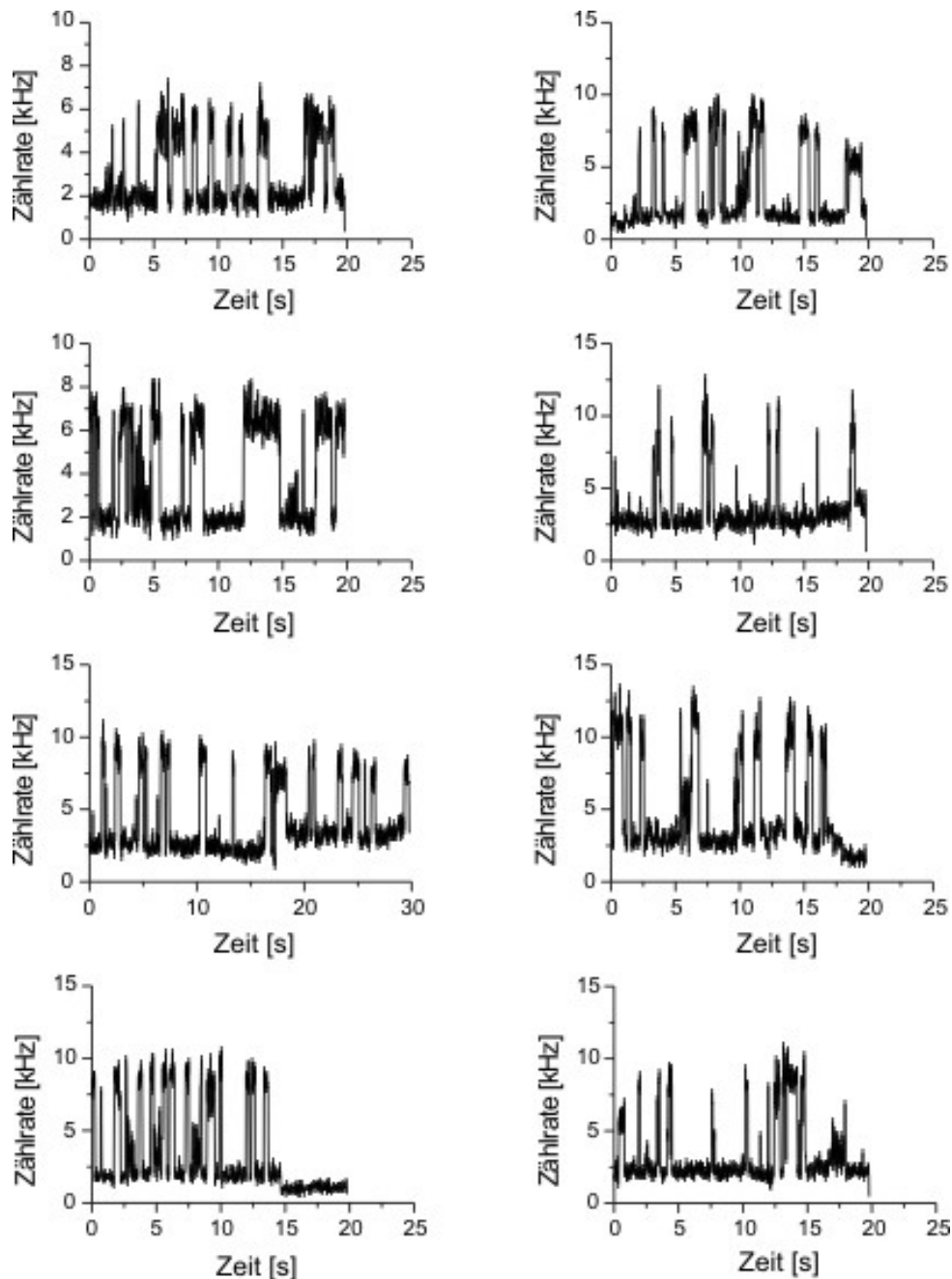


Abbildung 6.4-1. Fluoreszenzspuren ausgewählter TMR- Sonden bei $0.5\mu\text{M}$ Kupfer(II)

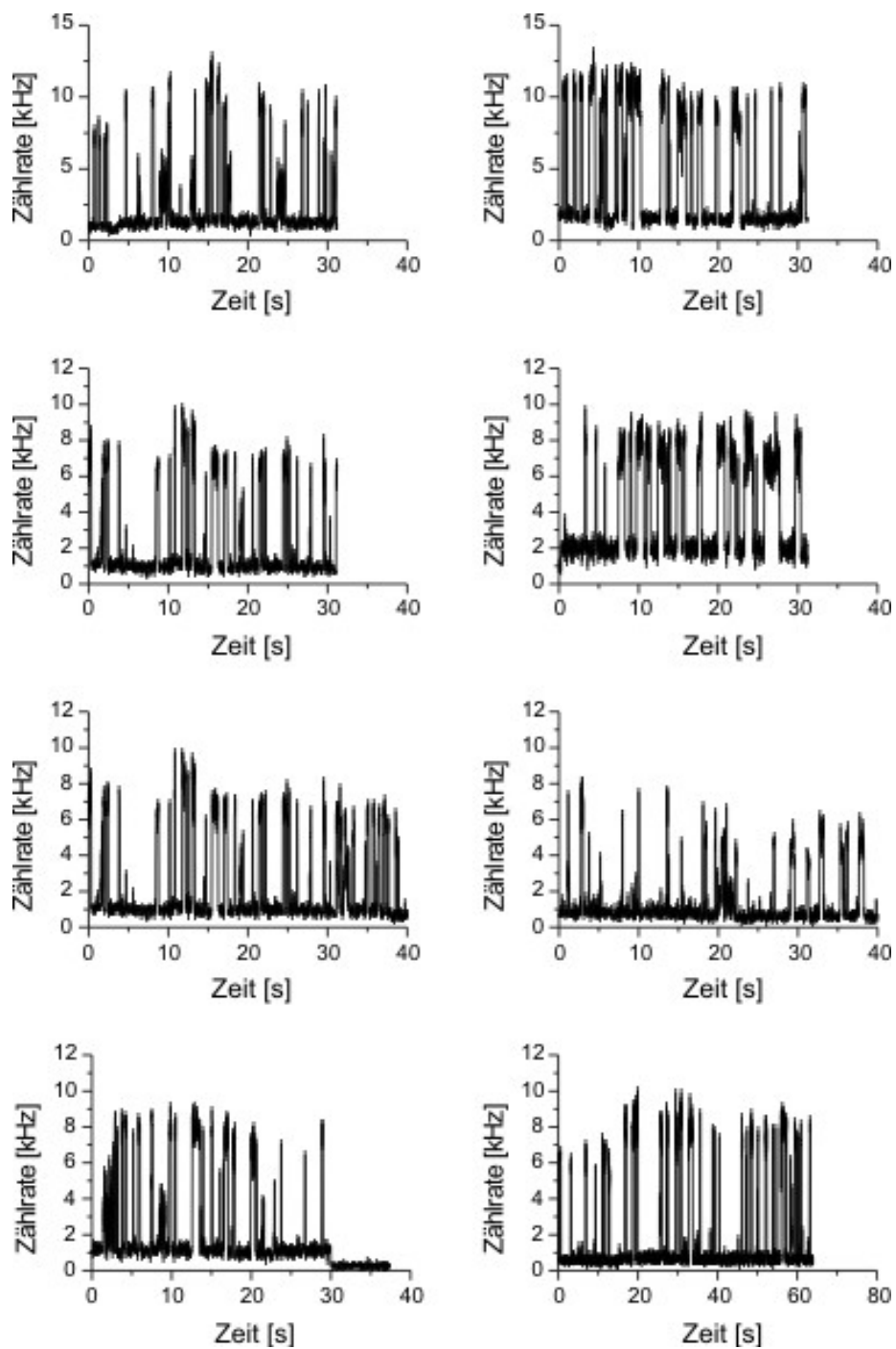


Abbildung 6.4-2. Fluoreszenzspuren bei einer Cu^{2+} -konzentration von $2\mu\text{M}$.

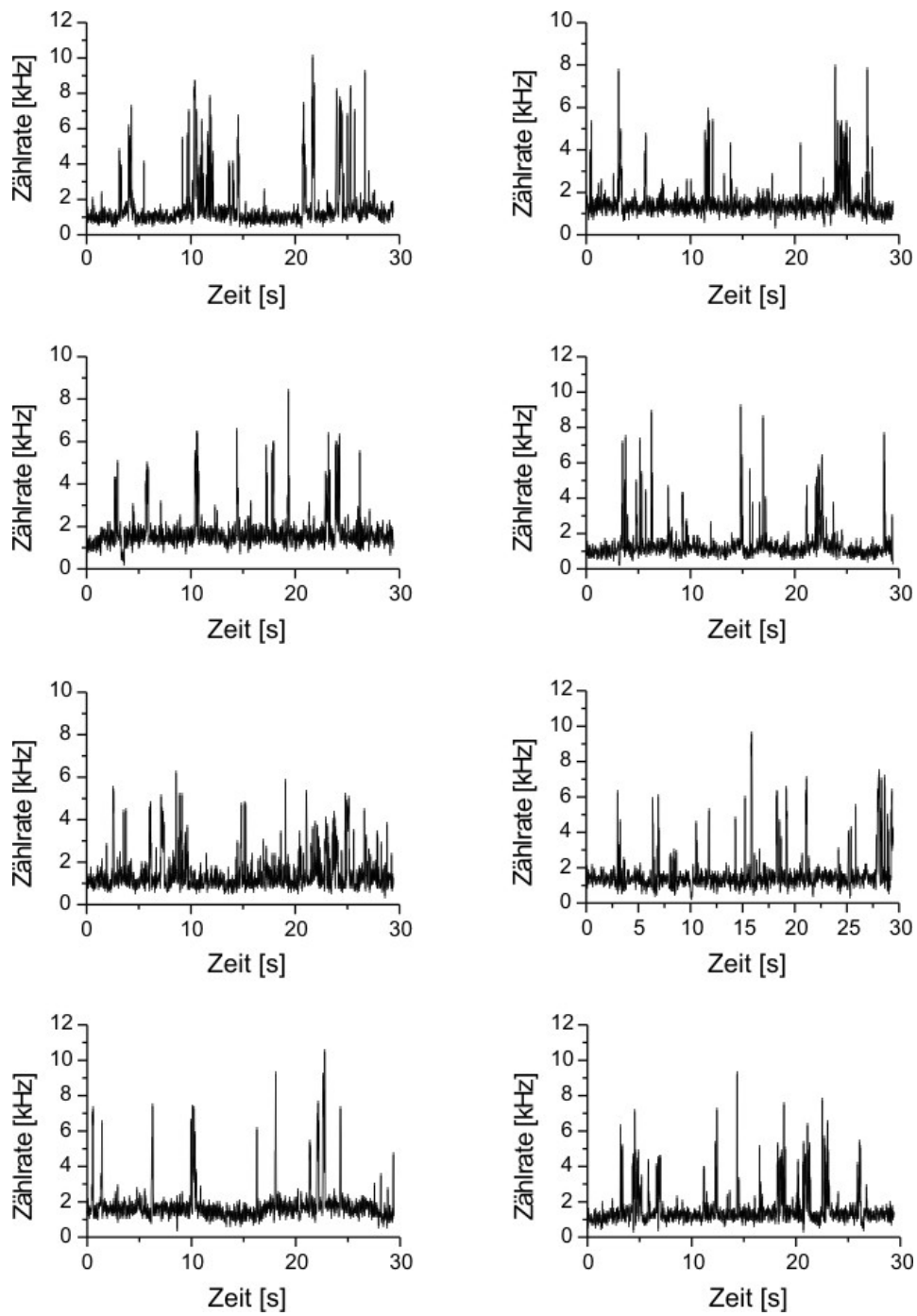


Abbildung 6.4-3. Fluoreszenzspuren bei einer Cu²⁺ - konzentration von 4 μM.

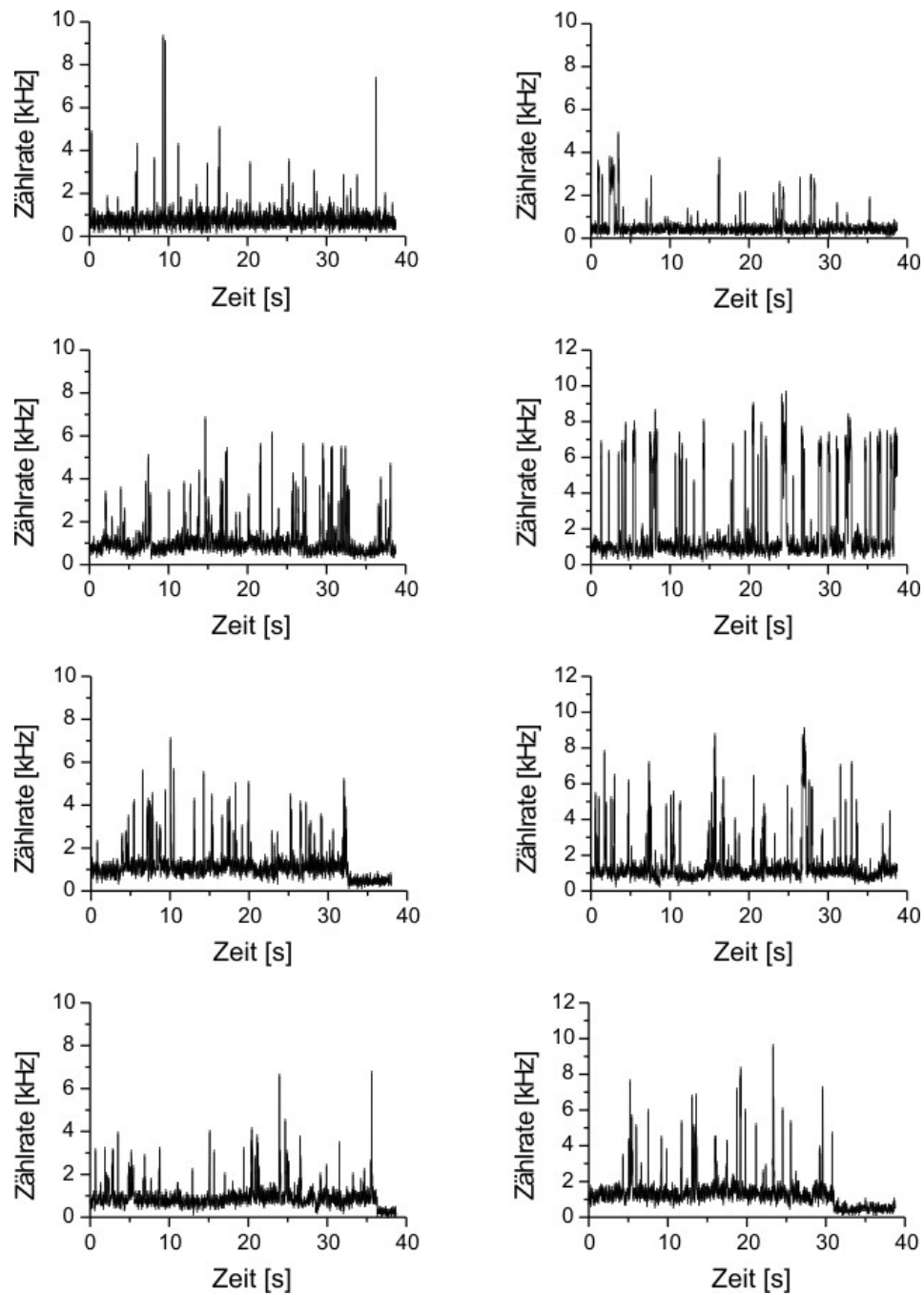


Abbildung 6.4-4 Fluoreszenzspuren bei einer Cu^{2+} -konzentration von $6 \mu\text{M}$.

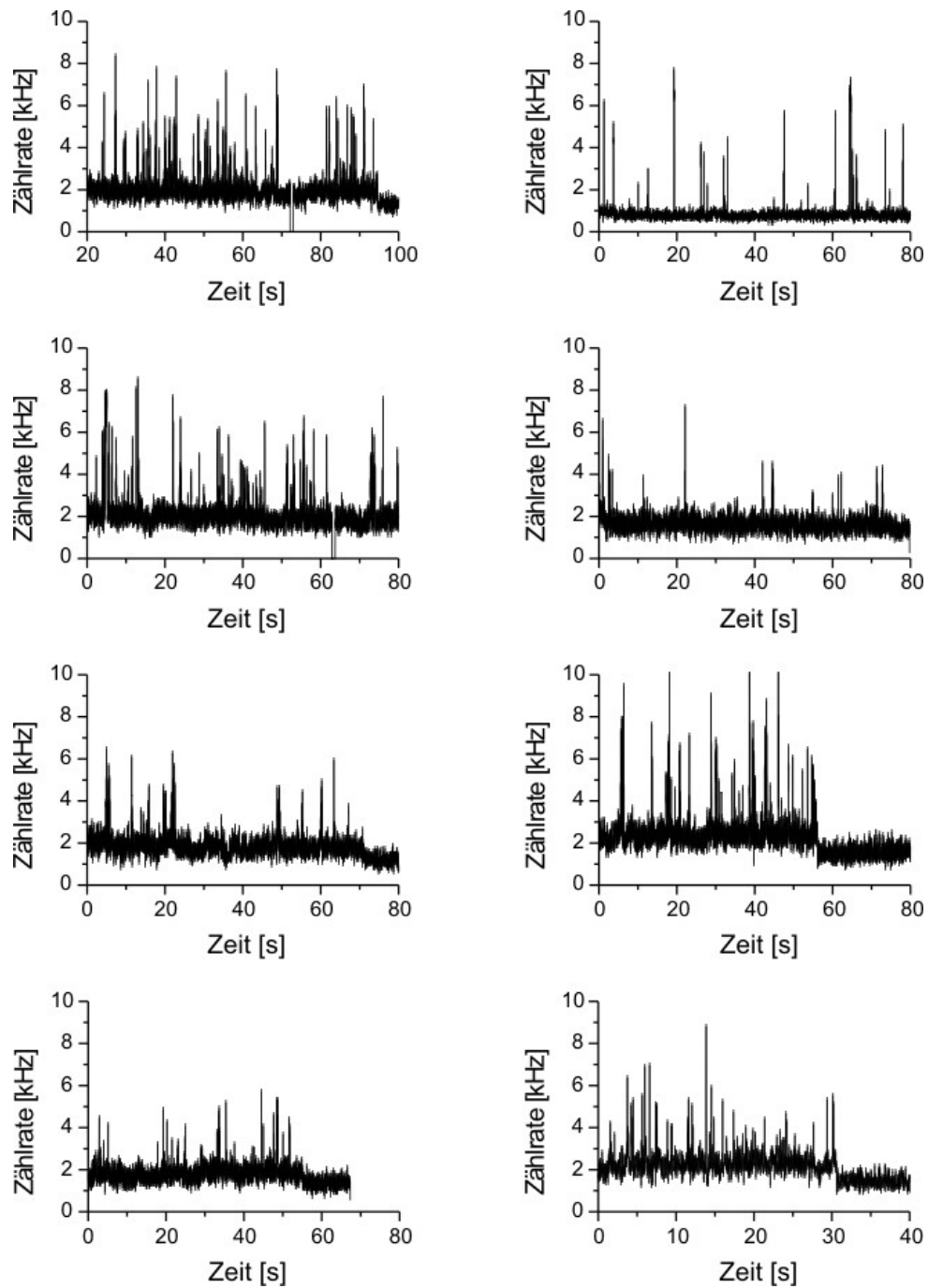


Abbildung 6.4-5. Fluoreszenzspuren bei einer Cu^{2+} -konzentration von $6 \mu\text{M}$.

6.5. Messung des Redoxpotentials von Atto620

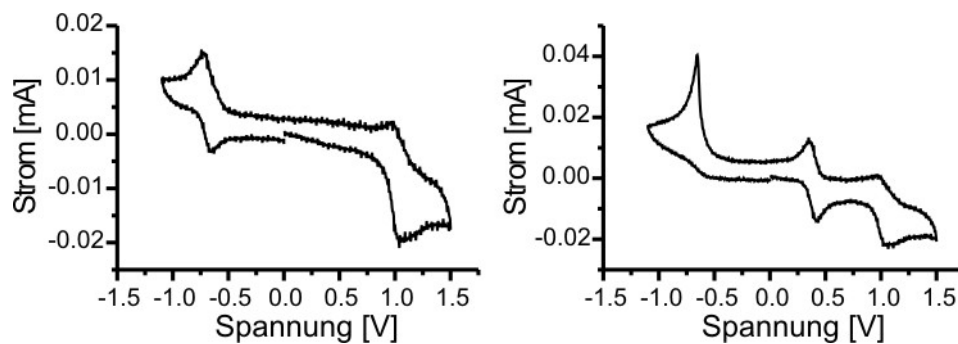


Abbildung 6.5-1. Zyklische Voltammetrie von Atto620 (links) und einer Atto620-Ferrocen Mischung.

7. Literatur

- Aitken, C. E., Marshall, R. A. and Puglisi, J. D., "An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments", *Biophysical Journal*. **2008**, 94, 1826-1835.
- Anderegg, G., "Pyridinderivate als Komplexbildner V. Die Metallkomplexe von 1,10-Phenanthrolin und , -Dipyridyl", *Helvetica Chimica Acta*. **1963**, 46, 2397-2410.
- Beausang, J. F., Zurla, C., Manzo, C., et al., "DNA looping kinetics analyzed using diffusive hidden Markov model", *Biophysical Journal*. **2007**, 92, L64-L66.
- Bissell, R. A., Desilva, A. P., Gunaratne, H. Q. N., et al., "Molecular Fluorescent Signaling with Fluor Spacer Receptor Systems - Approaches to Sensing and Switching Devices Via Supramolecular Photophysics", *Chemical Society Reviews*. **1992**, 21, 187-195.
- Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H., et al., "Predicting DNA duplex stability from the base sequence", *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1986**, 83, 3746-3750.
- Brunner, J. and Kraemer, R., "Copper(II)-quenched oligonucleotide probes for fluorescent DNA sensing", *Journal of the American Chemical Society*. **2004**, 126, 13626-13627.
- Burzykowski, T., Szubiakowski, J. and Ryden, T., "Analysis of photon count data from single-molecule fluorescence experiments", *Chemical Physics*. **2003**, 288, 291-307.
- Chargaff, E., "Structure and function of nucleic acids as cell constituents", *Federation Proceedings*. **1951**, 10, 654-659.
- de Silva, A. P., Fox, D. B., Huxley, A. J. M., et al., "Combining luminescence, coordination and electron transfer for signalling purposes", *Coordination Chemistry Reviews*. **2000**, 205, 41-57.
- Elson, E. L. and Record, M. T., Jr., "The strand-separation transition of T2 bacteriophage DNA", *Biopolymers*. **1974**, 13, 797-824.
- Engelke, F., *Aufbau der Moleküle*, Teubner, Stuttgart, **1985**.
- Fleury, L., Zumbusch, A., Orrit, M., et al., "Spectral Diffusion and Individual 2-Level Systems Probed by Fluorescence of Single Terrylene Molecules in a Polyethylene Matrix", *Journal of Luminescence*. **1993**, 56, 15-28.
- Förster, T., "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz", *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55-75.
- Geworkjan, R. G. and Klose, G., "Physik", *Akademie-Verlag Berlin*. **1986**.
- Göritz, M., "Funktionalisierte Nucleinsäuren für die DNA-Sequenzerkennung", *Dissertation Universität Heidelberg*. **2006**.
-

- Ha, T. J., Ting, A. Y., Liang, J., et al., "Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1999**, 96, 893-898.
- Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P., et al., "Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy", *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998**, 95, 13573-13578.
- Heinlein, T., Knemeyer, J. P., Piestert, O., et al., "Photoinduced electron transfer between fluorescent dyes and guanosine residues in DNA-hairpins", *Journal of Physical Chemistry B*. **2003**, 107, 7957-7964.
- Holyer, R. H., Hubbard, C. D., Kettle, S. F. A., et al., "The Kinetics of Replacement Reactions of Complexes of the Transition Metals with 1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridine", *Inorganic Chemistry*. **1965**, 4, 929-935.
- Hush, N. S., "Homogeneous and heterogeneous optical and thermal electron transfer", *Electrochimica Acta*. **1968**, 13, 1005-1023.
- Invitrogen, "A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies", *The Handbook 10th Edition* **2005**, 879-925.
- Irving, H. and Mellor, D. H., "The stability of metal complexes of 1,10-phenanthroline and its analogues. Part I. 1,10-Phenanthroline and 2,2-bipyridyl", *J. Chem. Soc.* **1962**, 5222 - 5237.
- Jäger, M. C., "Time Series Analysis and Classification with State-Space Models for Industrial Processes and the Life Sciences", *Dissertation Universität Heidelberg*. **2007**.
- Jung, Y. J., Barkai, E. and Silbey, R. J., "Current status of single-molecule spectroscopy: Theoretical aspects", *Journal of Chemical Physics*. **2002**, 117, 10980-10995.
- Kiel, A., Jaerve, A., Kovacs, J., et al., "Single-molecule studies on individual metal complexes", *Proc. SPIE* **2007a**, 6444.
- Kiel, A., Kovacs, J., Mokhir, A., et al., "Direct monitoring of formation and dissociation of individual metal complexes by single-molecule fluorescence spectroscopy", *Angewandte Chemie-International Edition*. **2007b**, 46, 3363-3366.
- Kierat, R. M. and Kramer, R., "A fluorogenic and chromogenic probe that detects the esterase activity of trace copper(II)", *Bioorg Med Chem Lett*. **2005**, 15, 4824-4827.
- Kim, J., Doose, S., Neuweiler, H., et al., "The initial step of DNA hairpin folding: a kinetic analysis using fluorescence correlation spectroscopy", *Nucleic Acids Research*. **2006**, 34, 2516-2527.
- Kneubühl, F. K. and Sigrist, M. W., *Laser*, Teubner, Wiesbaden, **2005**.
- Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, **2006**.
-

-
- Marcus, R. A., "On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. I", *The Journal of Chemical Physics*. **1956**, 24, 966-978.
- Marcus, R. A., "Electron-Transfer Reactions in Chemistry - Theory and Experiment (Nobel Lecture)", *Angewandte Chemie-International Edition in English*. **1993**, 32, 1111-1121.
- Marras, S. A., Kramer, F. R. and Tyagi, S., "Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes", *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 122.
- Mets, U., "Antibunching and rotational diffusion in FCS", *In: Rigler R, Elson ES, editors. Fluorescence correlation spectroscopy, theory and applications. New York: Springer-Verlag.* **2001**, 346-359.
- Moerner, W. E. and Fromm, D. P., "Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy", *Review of Scientific Instruments*. **2003**, 74, 3597-3619.
- Mokhir, A., Kiel, A., Herten, D. P., et al., "Fluorescent sensor for Cu(II) with a tunable emission wavelength", *Inorganic Chemistry*. **2005**, 44, 5661-5666.
- Neubauer, H., Gaiko, N., Berger, S., et al., "Orientational and dynamical heterogeneity of rhodamine 6G terminally attached to a DNA helix revealed by NMR and single-molecule fluorescence spectroscopy", *Journal of the American Chemical Society*. **2007**, 129, 12746-12755.
- Nie, S., Chiu, D. T. and Zare, R. N., "Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy", *Science*. **1994**, 266, 1018-1021.
- Piestert, O., Barsch, H., Buschmann, V., et al., "A single-molecule sensitive DNA hairpin system based on intramolecular electron transfer", *Nano Letters*. **2003**, 3, 979-982.
- Quartin, R. S. and Wetmur, J. G., "Effect of ionic strength on the hybridization of oligodeoxynucleotides with reduced charge due to methylphosphonate linkages to unmodified oligodeoxynucleotides containing the complementary sequence", *Biochemistry*. **1989**, 28, 1040-1047.
- Rehm, D. and Weller, A., "Kinetics and mechanism of electron transfer in fluorescence quenching in acetonitrile", *Berichte der Bunsen-Gesellschaft*. **1969**, 73, 843.
- Roelfaers, M. B. J., Sels, B. F., Uji-i, H., et al., "Spatially resolved observation of crystal-face-dependent catalysis by single turnover counting", *Nature*. **2006**, 439, 572-575.
- Ryden, T., "An EM algorithm for estimation in Markov-modulated Poisson processes", *Computational Statistics & Data Analysis*. **1996**, 21, 431-447.
- Saenger, W., Principles of nucleic acid structure, Springer, Berlin [u.a.], **1984**.
- Sauer, M., Han, K.-T., Müller, R., et al., "New Fluorescent Dyes in the Red Region for Biodiagnostics", *Journal of Fluorescence*. **1995**, 5.
-

- Sauer, M., Zander, C., Muller, R., et al., "Detection and identification of individual antigen molecules in human serum with pulsed semiconductor lasers", *Applied Physics B-Lasers and Optics*. **1997**, 65, 427-431.
- Scott, S. L., "A Bayesian paradigm for designing intrusion detection systems", *Computational Statistics & Data Analysis*. **2004**, 45, 69-83.
- Soper, S. A. and Legendre, B. L., "Error Analysis of Simple Algorithms for Determining Fluorescence Lifetimes in Ultradilute Dye Solutions", *Applied Spectroscopy*. **1994**, 48, 400-405.
- Stöhr, K., Hafner, B., Nolte, O., et al., "Species-specific identification of mycobacterial 16S rRNA PCR amplicons using smart probes", *Analytical Chemistry*. **2005**, 77, 7195-7203.
- Stryer, L., "Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler", *Annu Rev Biochem*. **1978**, 47, 819-846.
- Sunney, X., "Single-Molecule Approach to Enzymology", *Single Molecules*. **2001**, 2, 229-236.
- Taube, H., Myers, H. and Rich, R. L., "The Mechanism of Electron Transfer in Solution", *Journal of the American Chemical Society*. **1953**, 75, 4118.
- Tellinghuisen, J., "Effect of Background on the Least-Squares Estimation of Exponential Decay Parameters", *Analytical Chemistry*. **1993**, 65, 1277-1280.
- Tinnefeld, P., Herten, D. P. and Sauer, M., "Photophysical dynamics of single molecules studied by spectrally-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy (SFLIM)", *Journal of Physical Chemistry A*. **2001**, 105, 7989-8003.
- VandenBout, D. A., Yip, W. T., Hu, D. H., et al., "Discrete intensity jumps and intramolecular electronic energy transfer in the spectroscopy of single conjugated polymer molecules", *Science*. **1997**, 277, 1074-1077.
- Velonia, K., Flomenbom, O., Loos, D., et al., "Single-enzyme kinetics of CALB-catalyzed hydrolysis", *Angew Chem Int Ed Engl*. **2005**, 44, 560-564.
- Vogelsang, J., Kasper, R., Steinhauer, C., et al., "A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes", *Angew Chem Int Ed Engl*. **2008**, accepted.
- Watson, J. D. and Crick, F. H., "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid", *Nature*. **1953**, 171, 737.
- Weiss, S., "Fluorescence spectroscopy of single biomolecules", *Science*. **1999**, 283, 1676-1683.
- Weston, K. D., Carson, P. J., Metiu, H., et al., "Room-temperature fluorescence characteristics of single dye molecules adsorbed on a glass surface", *Journal of Chemical Physics*. **1998**, 109, 7474-7485.
-

-
- Weston, K. D. and Goldner, L. S., "Measuring the orientation and re-orientation dynamics of single molecules", *Biophysical Journal*. **2000**, 78, 384a-384a.
- Weston, K. D. and Goldner, L. S., "Orientation imaging and reorientation dynamics of single dye molecules", *Journal of Physical Chemistry B*. **2001**, 105, 3453-3462.
- Widengren, J., Mets, U. and Rigler, R., "Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet-States in Solution - a Theoretical and Experimental-Study", *Journal of Physical Chemistry*. **1995**, 99, 13368-13379.
- Widengren, J. and Schwille, P., "Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy", *Journal of Physical Chemistry A*. **2000**, 104, 6416-6428.
- Yanagida, T. and Ishii, Y., "Stochastic processes in nano-biomachines revealed by single molecule detection", *Biosystems*. **2003**, 71, 233-244.
- Yang, H., Luo, G. B., Karnchanaphanurach, P., et al., "Protein conformational dynamics probed by single-molecule electron transfer", *Science*. **2003**, 302, 262-266.
- Yip, W. T., Hu, D. H., Yu, J., et al., "Classifying the photophysical dynamics of single- and multiple-chromophoric molecules by single molecule spectroscopy", *Journal of Physical Chemistry A*. **1998**, 102, 7564-7575.
- Yu, M. and Zhou, M. C., "A model reduction method for traffic described by MMPP with unknown rate limit", *Ieee Communications Letters*. **2006**, 10, 302-304.
- Zumbusch, A., Fleury, L., Brown, R., et al., "Probing Individual 2-Level Systems in a Polymer by Correlation of Single Molecular Fluorescence", *Physical Review Letters*. **1993**, 70, 3584-3587.
-

„Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.“

Heidelberg, im

Danksagung:

Ich möchte Herrn Prof. Dr. J. Wolfrum und Herrn Dr. D.-P. Herten für die Themenstellung und Förderung meiner Dissertation danken. Herr Dr. D.-P. Herten stand mir jederzeit mit zahlreichen praktischen Hilfestellungen und weiterführenden Vorschlägen sowie Diskussionen zur Seite. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Andriy Mokhir und Prof. Dr. R. Krämer für die Bereitstellung von Proben und der Kooperation in diesem Projekt bedanken. Direkte Unterstützung durch Messung der zyklischen Voltammetrie erhielt ich von Dipl. Chem. Klaus Hempel (AG Kunze). Außerdem danke ich Anne Järve (Master Molekulare Biotechnologie), die während ihres Forschungspraktikum die Löschung verschiedener Farbstoffe, sowie die Löschung der Atto620 markierten Sonde auf Einzelmolekülebene untersucht hat. Außerordentlicher Dank gilt Christian Patze (Wissenschaftliche Hilfskraft, Cand. Chem.) für zahlreiche Messungen am Fluoreszenzspektrometer. Des Weiteren möchte ich meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe „Single-Molecule-Spectroscopy“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die immerzu gute Stimmung, Diskussionen und für Unterstützung bei meinen Arbeiten und der Durchsicht des Manuskripts danke. Christian Roth und Haisen Ta sowie Dirk-Peter Herten möchte ich außerdem für Problembehebung und Unterstützung bei den LabView Softwareapplikationen danken. Für Praktische Tips zum Aufbau und Einrichten einer Einzelmolekülspektroskopieanlage bedanke ich mich bei Mike Heilemann. Bei Manoj Kumbakah bedanke ich mich für Diskussionen, die zum besseren Verständnis meiner Ergebnisse führte. Außerdem möchte ich mich nochmals bei Dirk-Peter für stets gute Laune und grundsätzlich optimistischer Einstellung sowie etlichen Korrekturvorschlägen bedanken. Abschließend möchte ich mich bei Nina Gaiser für zahlreiche Korrekturen bedanken sowie bei meiner Familie, die jederzeit unterstützt haben.