

Aus dem Institut für Physik
der Universität zu Lübeck

Direktor:
Prof. Dr. Christian G. Hübner

Einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen
hochmarkierter DNS in Hinblick auf
Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von
Nicky Ehrlich
aus Leipzig

Lübeck, 2008

1. Berichterstatter
2. Berichterstatter
Vorsitzender des Prüfungsausschusses

Prof. Dr. Ch. Hübner
Priv.-Doz. Dr. A. Schromm
Prof. Dr. Th. Peters

Tag der mündlichen Prüfung:

28. Oktober 2008

Zum Druck genehmigt,
Lübeck, den 28. Oktober 2008

gez. Prof. Dr. Jürgen Prestin
Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Physikalische Grundlagen	5
2.1.1	Photophysik von Fluoreszenzfarbstoffen	5
2.1.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	10
2.1.3	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM)	14
2.1.4	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)	18
2.1.5	Fluoreszenzereignisse	22
2.2	Biologische Grundlagen	25
2.2.1	DNS	25
2.2.2	DNS als Polymer	27
2.2.3	Herstellung von DNS	32
2.2.4	Sequenzierung/Sequenzanalyse	33
2.2.5	Exonuklease III - ein DNS abbauendes Enzym	37
3	Material und Methoden	41
3.1	Fluoreszenzfarbstoffe	41
3.2	Konfokales Fluoreszenzrastermikroskopsystem	42
3.3	Evaneszente Anregung	46
3.4	Einzelmoleküldetektion und -identifikation	46
3.5	DNS-Proben	49
3.5.1	Markierung der DNS	50
3.5.2	Immobilisierung hochmarkierter DNS	52
3.5.3	Exonukleolytischer Abbau	53
4	Ergebnisse und Diskussion	55
4.1	Das konfokale Anregungsvolumen	55
4.2	Evaneszente Anregung	61
4.3	Einzelmoleküldetektion und -identifikation	64
4.4	Isomerisierung von Cy5	68
4.5	Wechselwirkungen von R110-dCTP mit Exo III	70
4.6	Charakterisierung der DNS-Proben	72
4.6.1	DNS in Lösung	72
4.6.2	Immobilisierte DNS	78
4.7	Exonukleolytischer Abbau von DNS	88
4.7.1	Abbau in Lösung	88

4.7.2	Abbau immobilisierter DNS	94
4.7.3	Vorexperimente für den DNS-Einzelmolekül-Abbau	98
5	Zusammenfassung und Ausblick	101
	Literatur	105
	Lebenslauf	117
	Publikationen	119
	Danksagung	121

1 Einleitung

Im Verlaufe von 3,5 Milliarden Jahren hat sich auf der Erde eine unvorstellbare Vielfalt von Leben entwickelt, welche selbst zu Beginn des 21. Jahrhunderts noch nicht vollständig erforscht ist. So wurden erst im Jahr 2007 auf einer Forschungsreise am Südpol mit dem deutschen Forschungseisbrecher Polarstern 700 unbekannte Arten entdeckt [1]. Doch allem terrestrischen Leben gemein ist ein Molekül, welches als Informationssystem zur Steuerung von Stoffwechselfvorgängen sowie zur Vermehrung dient, die Desoxyribonukleinsäure (DNS). Zahlreiche kleine Änderungen dieses Moleküls und die Vererbung auf nachfolgende Generationen führten zu dem unglaublichen Artenreichtum auf der Erde. Die Erforschung dieses Erbmaterials ist deshalb in vielen Forschungszweigen von größtem Interesse. Der Vergleich von Erbmaterial erlaubt nicht nur beim Vaterschaftstest Verwandtschaftsbeziehungen aufzuzeigen, sondern auch in der Evolutionsforschung Beziehungen zwischen verschiedenen Arten aufzudecken. Das Wissen über DNS hat die gerichtliche Wissenschaft (Forensik) revolutioniert und spielt in der Medizin bei der Entdeckung und Heilung von Krankheiten, wie zum Beispiel in der Krebsforschung, sowie in der Pharmazie bei der Entwicklung von Medikamenten eine zunehmend wichtige Rolle.

Die DNS ist ein Polymer, bestehend aus zwei zueinander komplementären Einzelsträngen. Diese sind aus vier unterschiedlichen Monomeren, den sogenannten Basen aufgebaut. Deren Sequenzabfolge kodiert die Information (Genotyp), die anschließend im Organismus durch Transkription und Translation in die entsprechenden Genprodukte, die Proteine (Phänotyp) übersetzt wird. Die Standardmethode zur Bestimmung der DNS-Sequenzabfolge basiert auf der in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelten Methode von Sanger [2]. Hierbei werden zahlreiche DNS-Moleküle enzymatisch erzeugt, von denen jede Population um ein Basenpaar länger als die vorangegangene ist, und anschließend entsprechend ihrer Länge elektrophoretisch getrennt. Aufgrund der spezifischen Markierung der vier Monomere kann anhand der entstandenen Banden auf die Sequenz der DNS geschlossen werden. Durch das begrenzte Auflösungsvermögen bei der elektrophoretischen Trennung, sind hierbei nur DNS-Moleküle bis zu 1000 Basenpaaren in einem Durchlauf sequenzierbar.

Durch die Entwicklung der Gentechnik seit dem Ende der 1970er sowie die Suche nach medizinisch relevanten Genen und Genprodukten entstand ein wachsender Bedarf an Sequenzinformationen. Im Zuge des Humangenom-Projekts (HUGO), in dem das menschliche Genom entschlüsselt wurde [3, 4], sind die Geschwindigkeit der DNS-Sequenzierung aufgrund verbesserter Technik, Automatisierung und Parallelisierung deutlich gesteigert sowie die Kosten um das hundertfache von 100 US\$ auf 1 US\$ pro 10 Basenpaare gesenkt worden [5]. Trotz allem bleibt die Sanger-Sequenzierung eine kostspielige, zeit- sowie arbeitsaufwendige Methode und ist nicht geeignet, um zum Beispiel das gesamte Genom einzelner Patienten für die Gesundheitsvorsorge zu sequenzieren [6, 7, 8, 9]. Deshalb wird die Entwicklung alternativer Prinzipien der Sequenzanalyse angestrebt, die schneller und wirtschaftlicher sind.

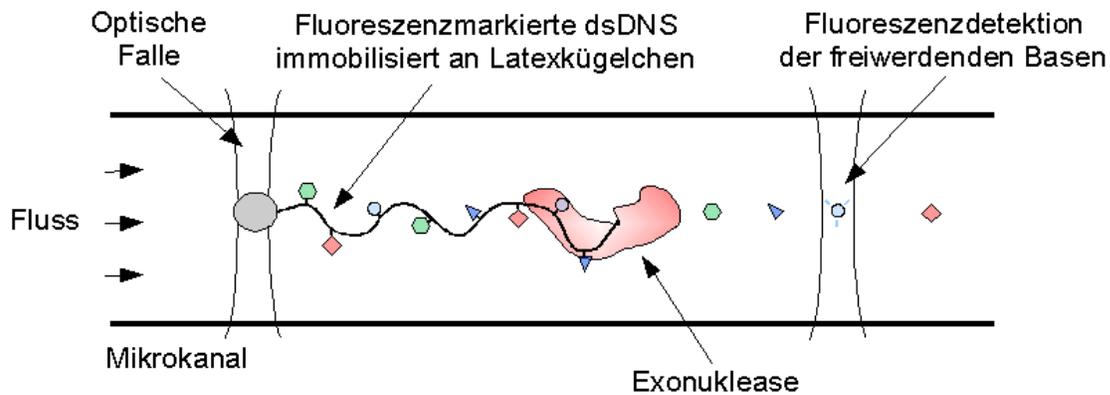


Abbildung 1: Prinzip der Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung mittels exonukleolytischen Abbaus [11, 12]. Ein immobilisiertes DNS-Molekül wird durch eine Exonuklease Base für Base abgebaut. Die fluoreszenzmarkierten Basen werden durch den elektro-osmotischen Fluss in Richtung des Detektionsbereich transportiert. Das zeitliche Eintreffen der Basen entspricht dabei ihrer Position auf dem abgebauten DNS-Strang und damit der DNS-Sequenz.

Eine Idee für eine neue Methode zur DNS-Sequenzierung basiert auf der sequentiellen Spaltung eines einzelnen DNS-Moleküls durch exonukleolytischen Abbau [10] und der Detektion der abgespaltenen Basen. Im Gegensatz zur Sanger-Methode gibt es hierbei theoretisch keine Begrenzung der Leselänge der zu sequenzierenden DNS. Desweiteren ist die Geschwindigkeit der Sequenzierung allein durch die Abbaurrate des Enzyms bestimmt. Die Herausforderung bei der Umsetzung dieser Methode besteht einerseits in der Handhabung beziehungsweise der Separation einzelner DNS-Moleküle und andererseits in der Detektion der freierwerdenden Basen entsprechend ihrer Position im DNS-Strang auf Einzelmolekülniveau. In Abbildung 1 ist eine mögliche praktische Umsetzung dieser Einzelmolekül-DNS-Sequenzierungsmethode nach [11] dargestellt. Hierbei wird ein DNS-Molekül, in dem einzelne Basen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, an einem Latexkugeln immobilisiert. Dieses wird mittels eines fokussierten Laserstrahls, einer sogenannten optischen Falle, in einem elektro-osmotischen Fluss innerhalb eines Mikrokanals positioniert. Das DNS-Molekül wird Base für Base von einer Exonuklease abgebaut. Die freierwerdenden Basen werden durch den elektro-osmotischen Fluss in Richtung des Detektionsbereichs transportiert, wo sie mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie detektiert und identifiziert werden können. Das zeitliche Eintreffen der Basen entspricht dabei ihrer Abfolge in der DNS. Problematisch sind hierbei die Separation und Immobilisierung nur eines DNS-Einzelmoleküls auf einem Latexkugeln sowie Wechselwirkungen der freierwerdenden Basen mit der Mikrokanalwand. So können sich durch Adhäsion an der Mikrokanalwand einzelne Basen überholen, wodurch ihr Abfolge in der Detektion nicht mehr der im DNS-Molekül entspricht.

Idealerweise sollte bei einer Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung alle vier Basentypen mit unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffen markiert sein. Aber auch eine Sequenzierung eines DNS-

Moleküls, in der nur zwei der vier Basen markiert sind, ist möglich. Hierbei werden jedoch mehrere Sequenzierdurchgänge bei veränderter Basenmarkierung benötigt. Für die Synthese sowie für den Abbau solcher hochmarkierten DNS sind Enzyme notwendig, die mit den fluoreszenzmarkierten Basen umgehen können. Eine vollständige Markierung zweier Basentypen in DNS sowie deren exonukleolytischer Abbau konnten bereits erfolgreich durchgeführt werden [13, 14, 15].

Für die Detektion der freiwerdenden fluoreszenzmarkierten Basen eignen sich aufgrund des guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses konfokale Fluoreszenzmikroskopsysteme [16], die auch bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) zur Anwendung kommen [17, 18, 19]. Bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wird das Anregungslicht eines Lasers durch die rückwärtige Apertur eines Objektivs in die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird vom selben Objektiv eingesammelt und auf sehr empfindliche Detektoren gelenkt, die einzelne Photonen registrieren können. Die ersten Einzelmolekülnachweise einzelner Fluoreszenzfarbstoffe wurden durch grundlegende Arbeiten der Arbeitsgruppe um R.A. Keller zur Einzelmoleküldetektion in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts ermöglicht [20, 21, 22, 10].

Um die grundsätzlichen Probleme bei der Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung in Mikrokanälen, wie die Separation einzelner DNS-Moleküle sowie Wechselwirkungen der freigesetzten Basen mit den Kanalwänden, zu vermeiden, sollte in dieser Arbeit die Möglichkeit der Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung von auf einer Deckglasoberfläche immobilisierter DNS durch exonukleolytischen Abbau untersucht werden. Dabei soll ausgenutzt werden, dass durch die hohe Dichte der Fluoreszenzfarbstoffe in der DNS, die Fluoreszenzintensität dieser stark reduziert ist [23]. Erst durch die Freisetzung der fluoreszenzmarkierten Basen von der DNS durch die Exonuklease wird die Unterdrückung der Fluoreszenz beseitigt, und die einzelnen fluoreszenzmarkierten Basen sind detektierbar. Dafür sollte zunächst mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie der exonukleolytische Abbau hochmarkierter DNS in Lösung sowie immobilisiert nachgewiesen und der Einfluss der Fluoreszenzfarbstoffe auf den Abbau bestimmt werden.

In Abschnitt 2.1 dieser Arbeit werden zunächst die physikalischen Grundlagen der Fluoreszenz, der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie sowie das Prinzip der evaneszenten Anregung von Molekülen nahe der Deckglasoberfläche vorgestellt. Desweiteren werden die Methoden der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie sowie der Einzelmoleküldetektion und -identifikation beschrieben. Auf die biologischen und physikalischen Eigenschaften des Biomoleküls DNS wird in Abschnitt 2.2 näher eingegangen. Neben den Standard-Sequenziermethoden werden außerdem weitere neue Sequenzieransätze vorgestellt.

In Abschnitt 3 werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden beschrieben, wie der Aufbau des konfokalen Fluoreszenzrastermikroskops (Abschnitt 3.2), die Methoden für die Einzelmoleküldetektion und -identifikation (Abschnitt 3.4), sowie die Prozeduren der Fluoreszenzmarkierung, der Immobilisierung und des exonukleolytischen Abbaus der DNS (Abschnitt 3.5). Die Experimente und Ergebnisse dieser Arbeit werden in Abschnitt 4 vorgestellt und diskutiert. So findet in Abschnitt 4.1 und 4.2 eine nähere Charakterisierung des Anregungsvolumens bei konfokaler

sowie evaneszenter Anregung statt, und in Abschnitt 4.3 werden die Ergebnisse der Einzelmoleküldetektion und -identifikation vorgestellt. Für die Bestimmung der Abbaugeschwindigkeit der hochmarkierten DNS werden zunächst die Eigenschaften der fluoreszenzmarkierten DNS-Proben frei in Lösung sowie immobilisiert auf der Deckglasoberfläche charakterisiert (Abschnitt 4.6) und anschließend der exonukleolytische Abbau mittels der konfokalen Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie verfolgt (Abschnitt 4.7). Schließlich wurde ein erster Versuch des Abbaus eines immobilisierten DNS-Einzelmoleküls durchgeführt (Abschnitt 4.7.3).

Abschnitt 5 gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse sowie einen möglichen Ansatz für eine Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung anhand der Erkenntnisse dieser Arbeit.

2 Grundlagen

2.1 Physikalische Grundlagen

2.1.1 Photophysik von Fluoreszenzfarbstoffen

Da die Größe typischer Biomoleküle mit wenigen Nanometern unterhalb der optischen Auflösungsgrenze eines Mikroskops liegt, werden für deren Visualisierung Fluoreszenzfarbstoffe als Marker eingesetzt. Fluoreszenzfarbstoffe besitzen meist aromatische Ringe, deren delokalisierte π -Elektronen sich durch geeignete Lichtquellen auf ein energiereicheres elektronisches Niveau anheben lassen (Absorption). Dem nun angeregten Farbstoff stehen mehrere Wege zur Verfügung, seine Energie wieder abzugeben, wobei gute Fluoreszenzfarbstoffe ihre Energie vor allem als Fluoreszenzlicht abgeben (Emission). Nachfolgend werden die Prinzipien der Absorption und Emission vorgestellt.

Absorption

Für die Absorption eines Photons durch einen Fluoreszenzfarbstoff müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. So muss der elektrische Feldstärkevektor der Erregerwelle einen zum elektrischen Übergangsdipol parallel orientierten Anteil besitzen und der Übergang quantenmechanisch erlaubt sein. Vor allem aber muss die Bohrsche Frequenzbedingung erfüllt sein, nach der die Energie des Photons der Energiedifferenz ΔE zwischen zwei Energieniveaus entsprechen muss. Die Energie E_P eines Photons lässt sich dabei wie folgt berechnen:

$$E_P = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

mit dem Planckschen Wirkungsquantum h ($h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{Js}$), der Frequenz ν und der Wellenlänge λ der elektromagnetischen Welle sowie der Lichtgeschwindigkeit c .

Die Rate k_A der Photonenabsorption ist dabei proportional zur Leistungsdichte des eingestrahelten Lichtes I mit der Wellenlänge λ , dem Absorptionsquerschnitt des Moleküls $\sigma(\lambda)$ und dem Kehrwert der Photonenenergie E_P :

$$k_A = I\sigma(\lambda)E_P^{-1} . \quad (2)$$

Der Absorptionsquerschnitt eines Moleküls stellt ein Maß für die Wahrscheinlichkeit zur Absorption eines Photons dar. Er steht im folgenden Zusammenhang mit dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ [m^2/mol] und der Avogadrokonstante N_A [24]:

$$\sigma(\lambda_{Ex}) = \frac{\log_{10} \varepsilon(\lambda)}{N_A} . \quad (3)$$

Der molare Extinktionskoeffizient ist eine molekül- sowie wellenlängenspezifische Größe und gibt an, wie stark das Licht in einer Farbstofflösung absorbiert wird. Unter Berücksichtigung der

Konzentration c sowie der Dicke d der Probe im Lichtstrahl stellt er die Extinktion E einer Probe dar. Die Extinktion entspricht dem dekadischen Logarithmus des Verhältnisses von eingestrahelter Lichtintensität I_{ein} zu transmittierter Lichtintensität I_{aus} . Dieser Zusammenhang ist als das Lambert-Beersche Gesetz bekannt:

$$E = \log \frac{I_{ein}}{I_{aus}} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d . \quad (4)$$

Jabłońskidiagramm

Mit einem einfachen Energiestufen-Diagramm nach Aleksander Jabłoński [25] lassen sich die ablaufenden Prozesse zwischen Absorption und Emission eines Photons veranschaulichen (Abbildung 2). Mit der Absorption eines Photons gelangt das Elektron aus dem Grundzustand S_0 je nach Photonenenergie auf ein vibronisches Schwingungsniveau eines höher gelegenen elektronischen Singulettzustandes. Da die Übergänge zwischen den verschiedenen Energiezuständen aufgrund der geringen Masse der Elektronen auf einer sehr kurzen Zeitskala von 10^{-15} s ablaufen, ändert sich die relative Lage der trägen Atomkerne mit einer Kernschwingungsperiode von etwa 10^{-13} s während der Anregung nicht (Franck-Condon-Prinzip). Aus den höheren Schwingungszuständen findet eine schnelle Relaxation (10^{-12} s [26]) auf das energetisch niedrigste Schwingungsniveau des S_1 -Zustandes statt. Dies geschieht strahlungslos durch Wärmeabgabe an das umgebende Lösungsmittel.

Aufgrund der schnellen Relaxation auf das Grundniveau von S_1 findet die Emission von Fluoreszenzphotonen $h\nu_F$ fast immer von diesem statt (Kashas Regel), dadurch ist das Emissionsspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge. Die emittierten Fluoreszenzphotonen sind aufgrund von Lösungsmittelrelaxation stets energieärmer als die absorbierten Photonen. Dies zeigt sich in den Emissionsspektren, die im Vergleich zu den Absorptionsspektren zu langwelligeren Bereichen verschoben sind. Diese Rotverschiebung wird als Stokes-Shift bezeichnet und ist die Voraussetzung für die konfokale Fluoreszenzspektroskopie, da hier eine Trennung des Emissionslichts vom Anregungslicht erforderlich ist. Aufgrund der Ähnlichkeiten der Schwingungsniveaus im Grund- und angeregten Zustand sowie für die entsprechenden Übergangswahrscheinlichkeiten ist der Verlauf der Absorptions- und Emissionsspektren auf einer Energieskala oft gespiegelt (Spiegelgesetz [27]).

Auch ein strahlungsloser Übergang aus dem angeregten Singulettzustand S_1 in den Grundzustand S_0 kann erfolgen, zum Beispiel durch innere Umwandlung (IC), durch Auslösen einer chemischen Reaktion wie bei der photoinduzierte Isomerisierungsreaktion von Cy5-Farbstoffen [28], oder durch Energieübertragung auf benachbarte Moleküle (Quenching (Q)). Dabei hat beim Quenching der Fluoreszenzfarbstoff entweder direkten Kontakt mit sogenannten Kollisionsquenchern, wie zum Beispiel Sauerstoff, Halogene, Amine oder elektronegative Moleküle, oder die Fluoreszenz wird gequencht aufgrund von kurzreichweitigen Wechselwirkungen, wie zum Beispiel bei einem Fluoreszenzresonanzenergietransfer zwischen zwei Farbstoffmolekülen.

Aus dem S_1 -Grundzustand kann ein Fluoreszenzfarbstoff unter Spinumkehr strahlungslos in

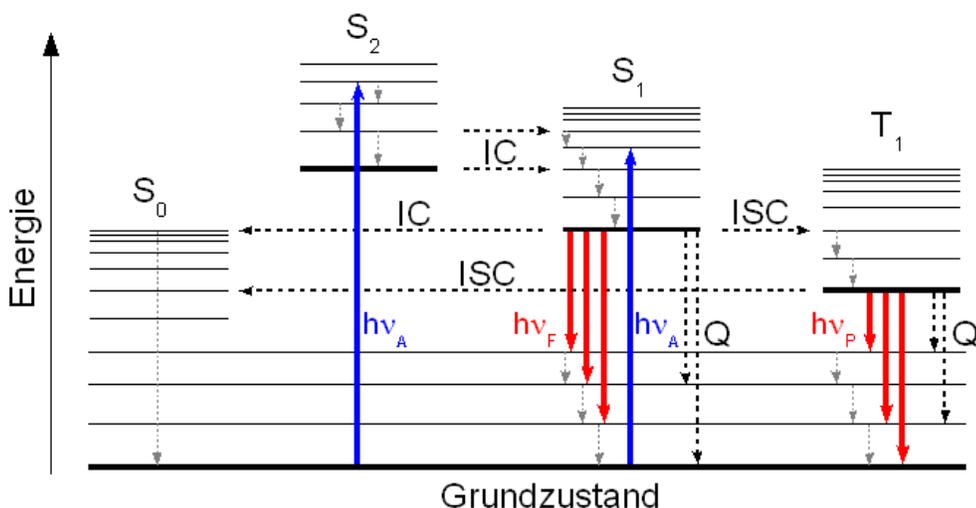


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung eines Jablonski-Diagramms. Erklärung siehe Text. S_0 - Grundzustand; S_1 - erster angeregter Singulettzustand; S_2 - zweiter angeregte Singulettzustände; T_1 - erster angeregter Triplettzustand; $h\nu_A$ - absorbiertes Photon; $h\nu_F$ - Fluoreszenzphoton; $h\nu_P$ - Phosphoreszenzphoton; IC - innere Umwandlung (*internal crossing*); ISC - *intersystem crossing*; Q - Quenching;

den Triplettzustand T_1 übergehen. Dieser Prozess wird als *Intersystem Crossing* (ISC) bezeichnet. Der Triplettzustand ist stets energetisch niedriger als der S_1 -Zustand. Der Farbstoff kann aus dem Triplettzustand wieder unter Spinumkehr strahlungslos oder unter Abgabe eines Photons $h\nu_P$ (Phosphoreszenz) in den Grundzustand S_0 übergehen. Da die Übergänge zwischen Singulett- in den Triplettzuständen quantenmechanisch verboten sind, ist die Rate der Phosphoreszenz um ein Vielfaches kleiner als die der Fluoreszenz, bei der Raten von 10^8 s^{-1} einen typischen Wert darstellen. Die Wahrscheinlichkeit der Besetzung von T_1 steigt aufgrund der Zunahme der S_1 -Population mit der Anregungsintensität [29] und kann auch stark durch das Lösungsmittel beeinflusst werden [30].

Fluoreszenzquantenausbeute, -lebenszeit, -sättigung und Photozerstörung

Ein wichtige, die Qualität eines Fluoreszenzfarbstoffes kennzeichnende Größe, ist die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F , welche das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen darstellt [31]:

$$\Phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} = \frac{k_e}{k_A} = \frac{k_e}{k_e + \sum_i k_i}. \quad (5)$$

Dabei ist k_e die Rate emittierter Photonen, k_A die Rate der absorbierten Photonen, $\sum_i k_i$ die Gesamtrate aller strahlungslosen Übergänge aus S_1 . Eine Quantenausbeute von 1 würde somit bedeuten, dass keine strahlungslosen Übergänge stattfinden. Die Fluoreszenzquantenausbeute stellt eine intrinsische Eigenschaft der Farbstoffe dar, die aber auch durch die Polarität des Lösungsmittels beeinflusst wird. So besitzt Tetramethylrhodamin in Wasser eine Fluoreszenzquantenausbeute von 0,45, in Ethanol jedoch von 0,9 [32].

Die Fluoreszenzlebenszeit τ_F gibt die mittlere Zeit zwischen der Anregung eines Fluoreszenz-

farbstoffes in den angeregten Zustand sowie der Relaxation aus diesem an. Sie entspricht dem Kehrwert der Summe aller Ratenkonstanten strahlungsloser Übergänge $\sum_i k_i$ sowie der Fluoreszenzrate k_e :

$$\tau_F = \frac{1}{k_e + \sum_i k_i} . \quad (6)$$

In Abwesenheit von strahlungslosen Übergängen entspricht die Fluoreszenzlebenszeit der wahren beziehungsweise natürlichen Fluoreszenzlebenszeit τ_n der Farbstoffe:

$$\tau_n = \frac{1}{k_e} . \quad (7)$$

Die Anzahl der emittierten Photonen und damit die Fluoreszenzintensität ist zunächst proportional zur Anregungsleistung, da die Wahrscheinlichkeit des Übergangs von S_0 in einen angeregten Zustand erhöht wird [33, 34]. Mit zunehmenden Populationsgrad von S_1 nehmen ebenfalls die Übergänge in das Triplett-System zu [35], wodurch ein erneuter Fluoreszenzzyklus erst nach längerer Zeit (μs) wieder möglich ist. Dies führt zur Sättigung der Fluoreszenz des Farbstoffes, da die Anregungsrate des Farbstoffes nicht mehr proportional zur Anregungsleistung ist. Neben Triplettübergängen führen auch andere photoinduzierte Übergänge in nichtfluoreszierenden Zuständen wie zum Beispiel bei der *cis-trans* Isomerisierung von Cyaninen [28] zur Sättigung. Aber auch die Fluoreszenzlebenszeit beeinflusst die Emissionsrate von Photonen, da nur Farbstoffe, die sich wieder im Grundzustand befinden, zur Fluoreszenz angeregt werden können.

Ein weiterer Prozess der die Photonenausbeute mindert, ist die Photozerstörung (Bleichen) der Fluoreszenzfarbstoffe [29]. Darunter versteht man den irreversiblen Übergang eines Fluoreszenzfarbstoffes in einen Zustand, in dem er nicht mehr in der Lage ist, Fluoreszenzphotonen zu emittieren. Dies findet in der Regel aus hoch angeregten Triplettzuständen heraus statt [36]. Die Photochemie, die hinter den Bleichprozessen steht, ist oftmals nur unvollständig aufgeklärt. Dabei scheinen auch freie Radikale, wie zum Beispiel Sauerstoff, eine Rolle zu spielen, da durch Antioxidantien wie zum Beispiel das Vitamin C das Bleichen der Farbstoffe abgeschwächt werden kann [37]. Vorsichtige Schätzungen gehen für Farbstoffe wie Cy5 oder Rhodamin von $10^5 - 10^6$ emittierten Photonen vor dem irreversiblen Photobleichen aus [38].

Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)

Beim Fluoreszenzresonanzenergietransfer wird die Energie eines Farbstoffes (Donor) durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung strahlungslos auf einen anderen Farbstoff (Akzeptor) übertragen. Dabei muss der Donor in einem Wellenlängenbereich emittieren, welcher sich mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überschneidet. Die physikalischen Prinzipien wurden erstmals von Förster untersucht [39, 40]. Die Rate der Energieübertragung kann dabei wie folgt berechnet werden:

$$k_T = \left(\frac{1}{\tau_F} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (8)$$

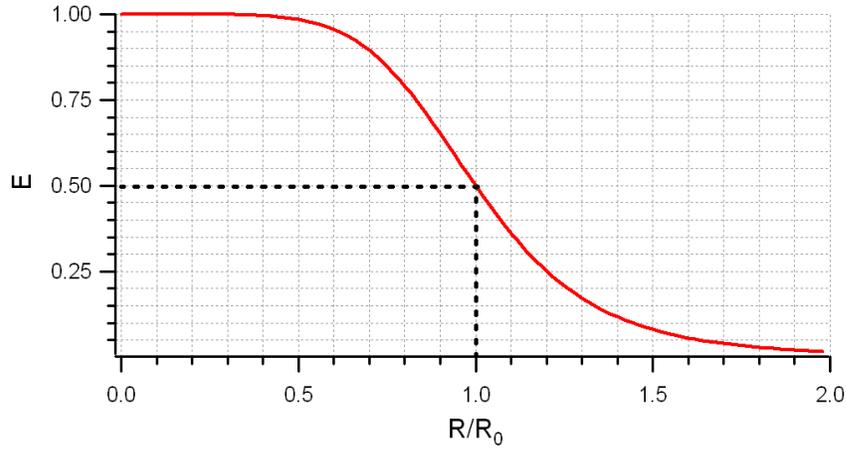


Abbildung 3: Abhängigkeit der Energietransfereffizienz (E) vom Abstand R zwischen Donor und Akzeptor. R_0 ist der Försterradius.

mit der Fluoreszenzlebenszeit τ_F des Donors, dem räumlichen Abstand R der beiden Farbstoffmoleküle und dem Försterradius R_0 . Der Försterradius ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50 % beträgt. Er wird für jedes FRET-Paar individuell bestimmt und liegt gewöhnlich zwischen 2 und 6 nm. Mit Hilfe des Försterradius kann die Effizienz der Energieübertragung zwischen einem FRET-Paaren charakterisiert werden [27]:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} . \quad (9)$$

Anhand dieser Gleichung wird ersichtlich, dass die Transfereffizienz stark vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängt, wenn sich dieser im Bereich des Försterradius befindet (Abbildung 3). Dadurch können FRET-Paare auch als sogenannte spektroskopische Lineale verwendet werden [41].

Der Försterradius ist abhängig von der spektroskopischen Überlappung $J(\lambda)$ des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors, vom Brechungsindex n des Mediums, der Quantenausbeute Q_D des Donors sowie der Orientierung κ der Farbstoffmoleküle zueinander, wobei bei frei rotierenden Farbstoffmolekülen von $\kappa = \frac{2}{3}$ ausgegangen wird [27]:

$$R_0 = 0,211 [\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)]^{\frac{1}{6}} . \quad (10)$$

Der spektroskopische Überlapp lässt sich wie folgt berechnen [27]:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (11)$$

$\varepsilon_A(\lambda)$ ist der Extinktionskoeffizient des Akzeptors bei der Wellenlänge λ und $F_D(\lambda)$ das normierte Fluoreszenzspektrum des Donors.

2.1.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

In der Konfokalmikroskopie wird, wie in Abbildung 4 a) schematisch gezeigt, ein Laserstrahl (Ls) mittels eines dichroitischen Spiegels (DC) in die rückwärtige Apertur eines Mikroskopobjektivs (O) eingekoppelt und von diesem in die Probe fokussiert. Dadurch wird ein sehr kleines Volumen im Bereich von Femtolitern in der Probe angeregt. Das Fluoreszenzlicht (Fl) wird über das selbe Mikroskopobjektiv und den dichroitischen Spiegel, über ein Bandpassfilter (BF) und eine Lochblende (LB) mit Hilfe einer Linse (L) auf das aktive Feld eines Detektors fokussiert.

Objektive

Immersionsobjektive weisen deutlich höhere numerische Aperturen (N.A.) auf als Linsen oder Luftobjektive. Die numerische Apertur bestimmt das Auflösungsvermögen eines Objektivs und ist abhängig vom Brechungsindex n des Mediums und dem halben Öffnungswinkel α des Objektivs:

$$\text{N.A.} = n \cdot \sin \alpha . \quad (12)$$

Der halbe Öffnungswinkel ist der Winkel zwischen optischer Achse des Objektivs und dem größten Winkel des einstrahlenden Lichtstrahls (Abbildung 4 b). Je größer der Öffnungswinkel ist, desto mehr Photonen können vom Objektiv eingesammelt werden.

Mit einem größeren Öffnungswinkel besitzt ein Objektiv auch ein größeres Auflösungsvermögen. Das Auflösungsvermögen A entspricht dem Kehrwert des Abstandes d_{min} , den zwei Punkte voneinander haben müssen, damit sie noch als voneinander getrennt erkannt werden. Nimmt man für d_{min} den Radius des Airy-Scheibchens an, welches das erste kreisförmige Minimum der Beugungsfigur eines runden Loches darstellt, so erhält man für d_{min} :

$$d_{min} = 1.22 \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = 0.66 \frac{\lambda}{\text{N.A.}} . \quad (13)$$

Wie Gleichung 12 zeigt, ist die numerische Apertur und damit auch das Auflösungsvermögen abhängig vom Brechungsindex n des Mediums. Bei einem Luftobjektiv ist der theoretisch maximale Wert für N.A. gleich 1 ($n_{\text{Luft}} = 1$, $\alpha = 90$). Bei Immersionsobjektiven werden höhere numerische Aperturen erreicht, da die zwischen Objekt und Objektiv verwendeten Immersionsmedien höhere Brechzahlen als Luft aufweisen. So kann bei Standard-Ölimmersionsobjektiven eine theoretische numerische Apertur von 1,518 erreicht werden. Mit Spezialöl und speziellen Deckgläsern sind sogar noch höhere numerische Aperturen möglich (Tabelle 1).

Detektionsvolumen

Das Detektionsvolumen stellt den Bereich der Probe dar, der vom Laser angeregt und aus dem die Fluoreszenzphotonen der Farbstoffe detektiert werden. Dabei ist das Anregungsvolumen durch die Abbésche Beugung begrenzt, so dass ein minimaler Fokussdurchmesser von $\sim \frac{\lambda}{2}$ und damit ein

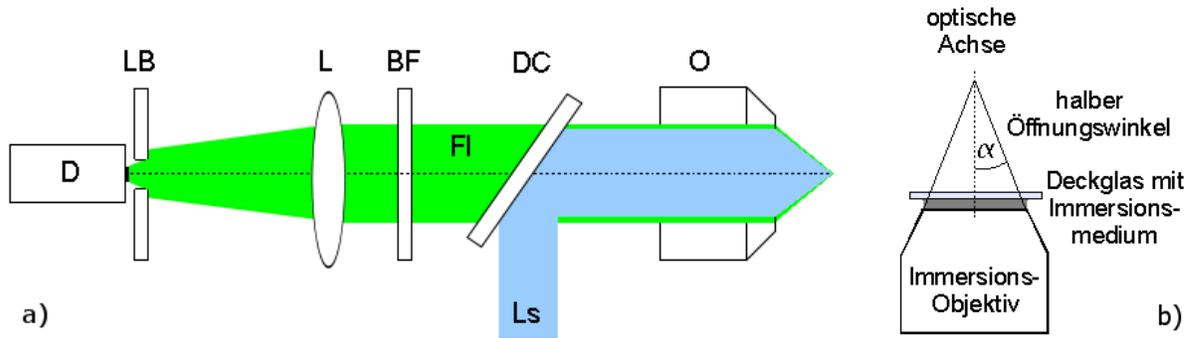


Abbildung 4: a) Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskopsystems. Erklärung siehe Text. (O - Objektiv; DC - Dichroit; BF - Bandpassfilter; L - Linse; LB - Lochblende; D - Detektor; Ls - Laserstrahl; Fl - Fluoreszenzlicht). b) Der halben Öffnungswinkel α eines Objektivs.

Anregungsvolumen unterhalb eines Femtoliters erreicht werden kann.

Die Form des Detektionsvolumens wird durch die Detektionsfunktion (*instrument response function*) $IRF(\vec{r}', z)$ charakterisiert und ergibt sich aus dem Produkt der Anregungsintensität im Fokus $I(\vec{r}', z)$ und der Sammeffizienzfunktion (*collection efficiency function*) $CEF(\vec{r}', z)$ des Mikroskopsystems [42]:

$$IRF(\vec{r}', z) = I(\vec{r}', z) \cdot CEF(\vec{r}', z) \quad (14)$$

mit den Koordinaten \vec{r}' und dem Abstand z zur Fokalebene der Punktlichtquelle. Aus dem Produkt der $IRF(\vec{r}', z)$, der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F und dem Absorptionsquerschnitt $\sigma(\lambda)$ des Farbstoffes lässt sich die Emissionscharakteristik $I_e(\vec{r})$ des Fluoreszenzfarbstoffes bestimmen:

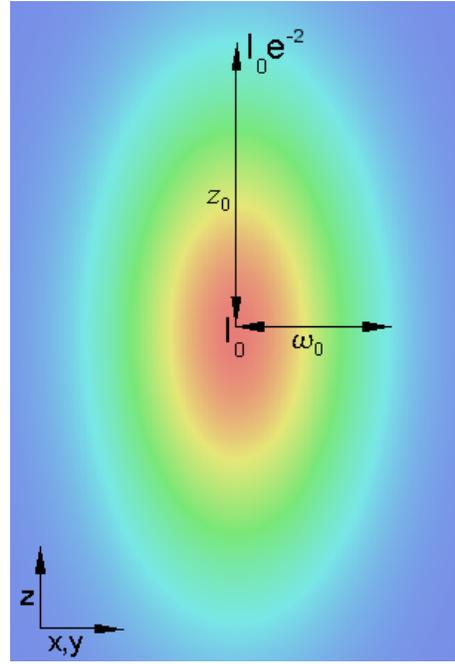
$$I_e(\vec{r}) = \kappa \Phi_F \sigma(\lambda) IRF(\vec{r}', z), \quad (15)$$

wobei der dimensionslose Vorfaktor κ angibt, welcher Anteil der Emissionsphotonen aus dem Anregungsvolumen vom Detektor registriert werden. Da die $IRF(\vec{r}', z)$ die ortsabhängige Intensität der detektierten Moleküle angibt, bestimmt sie das effektive Volumen.

Die Sammeffizienzfunktion $CEF(\vec{r}', z)$ beschreibt die räumliche Detektionswahrscheinlichkeit eines Farbstoffes im Punkt \vec{r}' . Sie gibt an, welcher Anteil des Lichtes einer isotrop strahlenden Punktlichtquelle an einem bestimmten Ort (\vec{r}', z) auf den Detektor fällt und wird somit durch das Mikroskopobjektiv und durch die Lochblende bestimmt. Die Sammeffizienzfunktion gibt die rein geometrische Detektionswahrscheinlichkeit an. Für die tatsächliche Detektionswahrscheinlichkeit eines Photons durch das Gesamtsystem muss die Sammeffizienzfunktion mit der Transmissionswahrscheinlichkeit der optischen Komponenten wie Objektiv, Strahlenteiler, Emissionsfilter und Linsen sowie mit der Quantenausbeute des Detektors für ein Photon der betrachteten Wellenlänge multipliziert werden.

Die Sammeffizienzfunktion wird mathematisch aus einer Faltung der Transmissionsfunktion der Lochblende $T(\vec{r})$ und der durch das Objektiv gegebenen Punktspreizfunktion

Abbildung 5: 2D-Darstellung der gaußförmigen Intensitätsverteilung (farbkodiert) im konfokalen Anregungsvolumen berechnet nach Gleichung 19. (I_0 - Intensitätsmaximum; w_0, z_0 - laterale beziehungsweise axiale Ausdehnung des konfokalen Anregungsvolumens, bei der das Intensitätsmaximum auf $1/e^2$ gefallen ist)



$PSF(\vec{r}, \vec{r}', z)$ erhalten [43]:

$$CEF(\vec{r}', z) = \beta \int_{\text{Bildebene}} T(\vec{r}) PSF(\vec{r}, \vec{r}', z) d\vec{r} \quad (16)$$

mit β als Anteil des Lichtes der Lichtquelle, die durch das Objektiv fällt und die Bildebene erreicht. Die Punktspreadfunktion $PSF(\vec{r}, \vec{r}', z)$ mit \vec{r} als Abstand vom Schnittpunkt der optischen Achse mit der Bildebene, beschreibt die Intensitätsverteilung einer punktförmigen Lichtquelle im Objektraum, in der Bildebene und damit auf dem Detektor. Dabei nimmt der Radius der PSF eines Lichtpunktes mit wachsendem Abstand zur Fokalebene des Objektivs zu. Die Transmissionsfunktion $T(\vec{r})$ gibt an, ob der Bildpunkt des Leuchtpunktes in der Öffnung der Lochblende liegt. Beide Funktionen $T(\vec{r})$ und $PSF(\vec{r}, \vec{r}', z)$ können in Annäherung als Scheibchenfunktion *circ* beschrieben werden, das heißt der Leuchtpunkt ergibt als Bild näherungsweise ein Scheibchen konstanter Helligkeit [42]:

$$T(\vec{r}) = \text{circ} \left(\frac{\vec{r}}{s_0} \right) = \begin{cases} 1 & \text{falls } |\vec{r}| \leq s_0 \\ 0 & \text{falls } |\vec{r}| > s_0 \end{cases} \quad (17)$$

$$PSF(\vec{r}, \vec{r}', z) = \frac{\text{circ} \left(\frac{\vec{r} - \vec{r}'}{R(z)} \right)}{\pi R^2(z)} \quad (18)$$

mit $R^2(z) = d_{min}^2 + z^2 \tan^2 \alpha$. Dabei ist s_0 der durch die Objektivvergrößerung geteilte Lochblendenradius, $R(z)$ der Radius des Beugungsscheibchens in Abhängigkeit vom Abstand z vom Brennpunkt, und d_{min} beschreibt das Auflösungsvermögen mit dem halben Öffnungswinkel α des Objektivs.

Die ortsabhängige Intensität im Fokus wird in der konfokalen Detektion durch eine dreidimen-

sionale Gaußverteilung angenähert [42]:

$$I(x, y, z) = I_0 e^{-2 \frac{x^2 + y^2}{w_0^2}} e^{-2 \frac{z^2}{z_0^2}} \quad (19)$$

mit den Raumkoordinaten x , y und z , und den beiden Halbachsen w_0 und z_0 in lateraler beziehungsweise axialer Richtung desjenigen Ellipsoids, das eine Oberfläche beschreibt, auf der das Intensitätsmaximum auf $1/e^2$ gefallen ist (Abbildung 5). Die mittlere Anregungsleistungsdichte I_0 [kW cm^{-2}] ergibt sich aus der Leistung P am Objektiv und dem Parameter w_0 :

$$I_0 = \frac{2P}{\pi w_0^2}. \quad (20)$$

Der Fokusradius der kleinen Halbachse $w(z)$ ist abhängig von z und nimmt entlang der z -Achse quadratisch zu:

$$w^2(z) = w_0^2 + \left(\frac{\lambda}{n\pi w_0} \right)^2 z^2. \quad (21)$$

Der minimale Fokusradius der kleinen Halbachse w_0 lässt sich in der Gaußschen Optik wie folgt berechnen:

$$w_0 = \frac{\lambda f}{n\pi l_0} \quad (22)$$

mit der Wellenlänge des Laserlichtes λ , der Brennweite des Objektivs f , dem Brechungsindex n des Mediums in das der Laserstrahl fokussiert wird und dem Radius l_0 des Laserstrahls, der auf die rückwärtige Apertur des Objektivs auftrifft. Das Fokusvolumen ergibt sich zu:

$$V_{\text{Fokus}} := \frac{(\int I(x, y, z) dV)^2}{\int I(x, y, z) dV} = \pi^{\frac{3}{2}} w_0^2 z_0. \quad (23)$$

Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Das stets vorhandene Hintergrundsignal wird unter anderem durch inelastische Raman- und elastische Rayleigh-Streuung des Lösungsmittels hervorgerufen und ist proportional zur Anregungsintensität. Der Raman-Absorptionsquerschnitt von Wasser bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm beträgt 10^{-28}cm^2 und ist damit deutlich kleiner als der Absorptionsquerschnitt eines guten Fluoreszenzfarbstoffes mit 10^{-16}cm^2 [44]. Jedoch kann der Absorptionsquerschnitt aller Wassermoleküle im Detektionsvolumen ein mehrfach höheres Signal erzeugen als das Fluoreszenzsignal eines einzigen Farbstoffmoleküls. Durch Verringerung des Detektionsvolumens wird auch die Anzahl der darin enthaltenen Wassermoleküle verkleinert und stellt damit ein effektives Mittel zur Minderung des Hintergrundsignals dar. So befinden sich bei der konfokalen Mikroskopie im Fokus mit einem Volumen von etwa 0,1 fl etwa 10^9 Wassermoleküle, die im Mittel nur 1:1000 bis 1:10000 des Signals eines guten Farbstoffes verursachen. Bei einem solchen Signal-zu-Rausch-Verhältnis

ist die effiziente Detektion einzelner Moleküle möglich [42, 45, 33, 46].

Aber auch die Autofluoreszenz von Verunreinigungen kann zu einer Erhöhung des Hintergrunds und damit zu einem schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen. Dabei spielt die intrinsische Fluoreszenz biologischer Systeme im sichtbaren Licht eine große Rolle. Da die Autofluoreszenz aufgrund der geringen Anzahl natürlich vorkommender Verbindungen, die über 600 nm effizient absorbieren und fluoreszieren, gering ist, werden bei der Untersuchung von biologischen Systemen Anregungswellenlängen in diesem Spektralbereich bevorzugt.

Ein weiterer Faktor, der das Signal-zu-Rausch-Verhältnis beeinflusst, ist die Dunkelzählrate der Detektoren, die aufgrund thermischer Energie verursacht wird. Dies kann durch Kühlen der Detektoren verringert werden.

Für die Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ist neben dem Hintergrundsignal aber auch die Rate, mit der Photonen von den Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden, von Bedeutung. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N , *signal to noise*) lässt sich wie folgt bestimmen [47]:

$$S/N = \frac{\eta_{det}R}{\sqrt{(\eta_{det}R + C_b + N_d)}} \sqrt{t_{int}} \quad (24)$$

mit der Detektionseffizienz η_{det} , der Emissionsrate der Fluoreszenzfarbstoffe R , der Integrationszeit t_{int} , der Zählrate der Streuphotonen C_b und der Dunkelzählrate N_d .

Mit zunehmender Anregungsleistung steigt das Fluoreszenzsignal der Farbstoffe im Vergleich zum Hintergrundsignal stärker an, so dass damit ein höheres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis erreicht werden kann. Bei zu hohen Anregungsleistungen sinkt das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis wieder ab, da aufgrund von Sättigung und des erhöhten Anteils an Triplettzuständen (siehe Abschnitt 2.1.1) die Steigerung des Fluoreszenzsignals eingeschränkt ist, jedoch das Hintergrundsignal weiter proportional mit der Anregungsleistung wächst. Dadurch ergibt sich eine optimale Anregungsleistung, bei der das Signal-zu-Rausch-Verhältnis maximal ist.

2.1.3 Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM)

Beim Übergang eines Lichtstrahls von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium, zum Beispiel von Glas in Luft oder in Wasser, wird ein Teil des Lichtstrahls vom Lot weggebrochen und der andere reflektiert (Abbildung 6). Je höher der Einfallswinkel δ_1 desto größer ist auch der Austrittswinkel δ_2 . Der Winkel des reflektierten Strahls entspricht dabei dem Einfallswinkel (Reflexionsgesetz). Bei einem bestimmten Einfallswinkel, dem sogenannten Grenzwinkel δ_c , beträgt der Austrittswinkel 90° . Bei Einfallswinkeln oberhalb des Grenzwinkels werden die einfallenden Strahlen an der Grenzfläche ausschließlich reflektiert, dies wird als Totalreflektion bezeichnet. Der Grenzwinkel ist von den beiden optischen Medien, genauer gesagt von ihrer Brechzahl n abhängig, und lässt sich bei gegebenen Brechzahlen über das Brechungsgesetz von Snellius bestimmen:

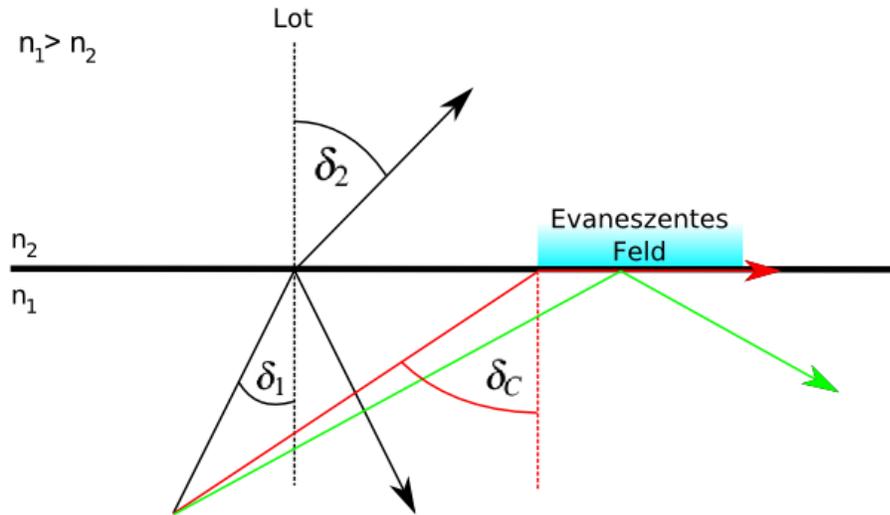


Abbildung 6: Verhalten eines Lichtstrahls an der Grenzschicht zweier unterschiedlich optisch dichten Medien. Beim Übergang eines Lichtstrahls aus einem optisch dichteren n_1 in ein optisch dünneres Medium n_2 , wird ein Teil des Lichtstrahls vom Lot weggebrochen. Der andere Teil des Lichtstrahls wird an der Grenzfläche reflektiert. Mit zunehmenden Einfallswinkel δ_1 nimmt ebenfalls der Ausfallswinkel δ_2 zu sowie der Anteil des reflektierten Lichtes. Ab einem bestimmten Einfallswinkel, dem kritischen Winkel δ_c , wird der gesamte einfallende Lichtstrahl reflektiert. Dies nennt man Totalreflexion. Bei der Totalreflexion bildet sich hinter der reflektierenden Grenzfläche ein evaneszentes Feld aus, welches nur wenige hundert Nanometer in das optisch dünnere Medium reicht.

$$\frac{\sin(\delta_1)}{\sin(\delta_2)} = \frac{c_1}{c_2} = \frac{n_2}{n_1}. \quad (25)$$

Da bei der Totalreflexion der Ausfallswinkel $\delta_2 = 90^\circ$ ist, lässt sich der kritische Winkel δ_c wie folgt berechnen:

$$\delta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right). \quad (26)$$

Somit beträgt der kritische Winkel für den Übergang eines Lichtstrahls von Glas (leichtes Kronglas mit $n = 1,51$) in Luft ($n = 1$) $41,5^\circ$ und in Wasser ($n = 1,33$) $61,7^\circ$.

Bei der Totalreflexion bildet sich hinter der reflektierenden Grenzfläche ein evaneszentes Feld aus, welches bei der TIRFM zur Anregung der Probe genutzt wird. Dieses Feld wird auch verbotenes Feld genannt, da es sich mit der klassischen Strahlenoptik nicht erklären lässt. Die Intensität des evaneszenten Feldes fällt von der Grenzfläche Richtung optisch dünneres Medium exponentiell ab:

$$I_z = I_0 e^{-\frac{z}{d_p}} \quad (27)$$

mit der Anfangsintensität I_0 , dem Abstand z zur Grenzfläche und der Eindringtiefe d_p . Die Eindringtiefe, definiert als der Abfall der maximalen Anfangsintensität auf den e-ten Teil ($\approx 37\%$), ist

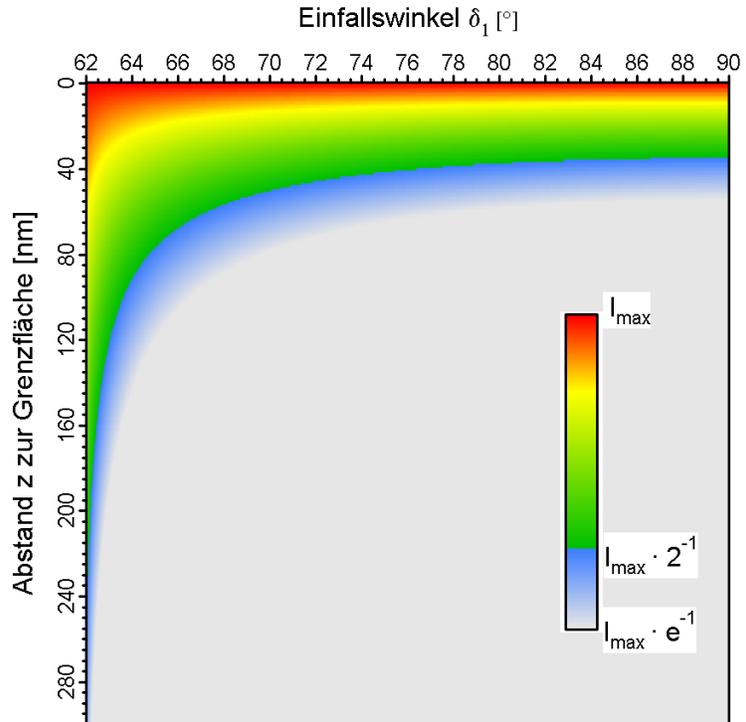


Abbildung 7: Intensitätsverteilung des evaneszenten Feldes in Abhängigkeit vom Einfallswinkel δ_1 des Lichtes ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und den Abstand z zur Grenzschicht zwischen Deckglas ($n = 1,51$) und Wasser ($n = 1,33$) nach Gleichung 27.

neben dem Brechungsindex beider Medien abhängig vom Einfallswinkel sowie von der Wellenlänge des reflektierten Lichtes:

$$d_p = \frac{\lambda}{(4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \delta_1 - n_2^2})}. \quad (28)$$

Näherungsweise befindet sich die Eindringtiefe in der selben Größenordnung wie die Wellenlänge des einfallenden Lichtstrahls. Liegt der Einfallswinkel jedoch nahe dem kritischem Winkel, werden deutlich größere Eindringtiefen erreicht. In Abbildung 7 wird die Abhängigkeit der Intensität des evaneszenten Feldes vom Einfallswinkel δ_1 und dem Abstand zur Grenzschicht z verdeutlicht.

Mit Hilfe des evaneszenten Feldes können oberflächennahe Moleküle sichtbar gemacht werden, die ansonsten durch einen hohen Hintergrund, zum Beispiel das Zytosol von Zellen, überstrahlt werden würden. So wird TIRFM vor allem bei Untersuchungen von Membranvorgängen und in der Zellbiologie verwendet.

Es können zwei verschiedene Typen von TIRFM unterschieden werden, der Objektiv-Typ und der Prismen-Typ. Beide sind in Abbildung 8 im Vergleich mit der Weitfeld- und Konfokalmikroskopie dargestellt. Mit dem Prismen-Typ kann der Einfallswinkel und damit die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes problemlos variiert werden, jedoch ist ein schlechter Zugang zur Probe gegeben. Beim Objektiv-Typ wird das einfallende Licht in den äußersten Randbereichen des Objektivs eingekoppelt, um die benötigten Einfallswinkel für die Totalreflektion zu erhalten. Dadurch kommen nur Objektive mit hohen numerischen Aperturen in Frage, da nur diese ausreichend große Öffnungswinkel aufweisen. Im Gegensatz zum Prismen-Typ lässt sich der Einfallswinkel des Lichtes kaum variieren, jedoch ist dafür eine bessere Zugänglichkeit zur Probe gegeben.

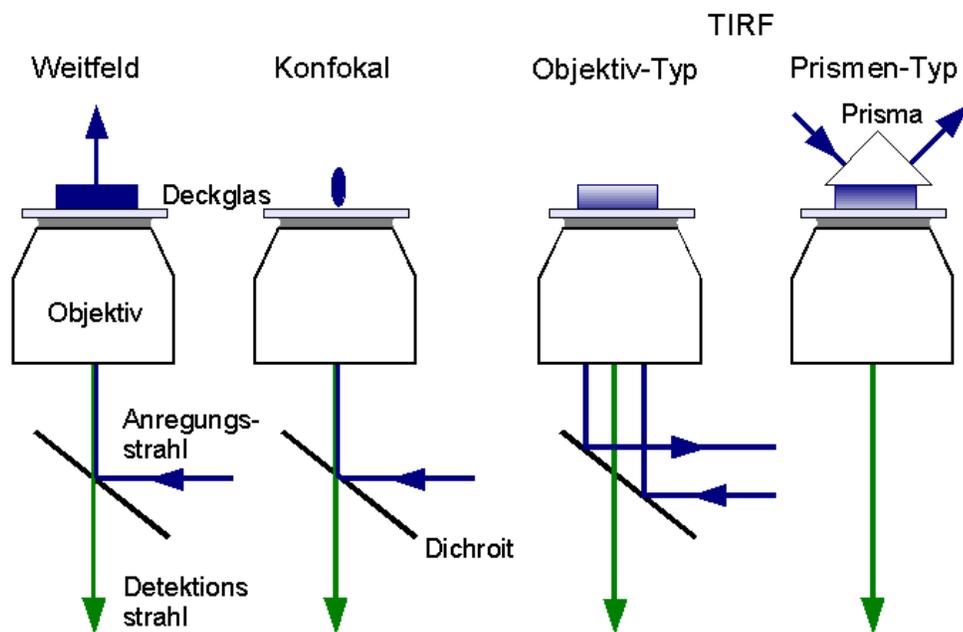


Abbildung 8: Vergleich verschiedener Anregungsmöglichkeiten in der Fluoreszenzmikroskopie. Bei der Weitfeldmikroskopie wird das Anregungslicht in die rückwärtige Apertur des Objektivs fokussiert. Dadurch verlässt das Anregungslicht als paralleler Strahlenbündel das Objektiv, wodurch ein relativ großer Anregungsbereich erhalten wird. Im Gegensatz dazu wird in der konfokalen Mikroskopie das Anregungslicht parallel in das Objektiv eingekoppelt, und von diesen in die Probe fokussiert. Dadurch sind Anregungsvolumen unterhalb eines Femtoliters möglich. In der TIRF-Mikroskopie kann zum Erhalten eines evaneszenten Feldes das Anregungslicht entweder seitlich in ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur eingekoppelt (Objektiv-Typ) oder mittels eines Prismas erzeugt werden (Prismen-Typ). Darstellung in Anlehnung an [48].

In Tabelle 1 sind wichtige Eckdaten von zwei Ölimmersionsobjektiven für eine evaneszente Anregung in der Objektiv-Typ TIRFM aufgelistet. Darunter befindet sich ein spezielles TIRF-Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,65. Diese hohe numerische Apertur und der damit verbundene große Öffnungswinkel wird über ein spezielles Immersionsöl sowie spezielle Deckgläser erreicht, die einen Brechungsindex von 1.78 aufweisen.

Objektivtyp	N.A.	n	$\alpha_{\max} [^\circ]$	δ_c in Wasser $[^\circ]$	δ_c in Luft $[^\circ]$
Ölimmersion	1,4	1,52	67	61	41
TIRF-Ölimmersion	1,65	1,78	68	48	34

Tabelle 1: Vergleich eines handelsüblichen Ölimmersionsobjektiv mit hoher numerischer Apertur mit einem speziell für evaneszente Anregung bestimmtes Ölimmersionsobjektiv [49]. (α_{\max} - maximaler halber Öffnungswinkel; δ_c - kritischer Winkel)

2.1.4 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Die Korrelationsanalyse von Datenströmen wurde von Wiener [50] zur Rauschunterdrückung und statistischen Datenanalyse eingeführt. Bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) wird diese Methode auf den Signalverlauf eines Fluoreszenzdetektors angewandt. Zur Untersuchung kinetischer Eigenschaften molekularer Systeme wie Diffusion, chemische Kinetik [19] sowie Rotationsbewegung einzelner Moleküle [51] wurde die Theorie der FCS Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts von Magde und Elson [18, 19, 17] entwickelt. Hierbei ist nicht die absolute Fluoreszenzintensität von Bedeutung, sondern die momentane Intensitätsfluktuation um einen zeitlichen Mittelwert.

Über die Autokorrelationsfunktion kann auf die Veränderung des Fluoreszenzsignals $F(t)$ nach einer Zeit τ geschlossen werden. Sie beschreibt somit die Selbstähnlichkeit eines Fluoreszenzsignals zu unterschiedlichen Zeitpunkten t und $t + \tau$. Sind die Schwankungen der Fluoreszenzintensität allein auf die Diffusion der Farbstoffe zurückzuführen, so gibt die Autokorrelationsfunktion die Wahrscheinlichkeit an, ein zum Zeitpunkt t detektiertes Molekül auch zum Zeitpunkt $t + \tau$ zu detektieren. Somit lassen sich mit einer Autokorrelationsfunktion die Diffusionseigenschaften von Molekülen durch ein konfokales Volumenelement erfassen [19, 22]. Anhand der Fluoreszenzfluktuationen lässt sich aber auch auf photophysikalische Parameter wie Triplett [52] oder Antibunching [53], sowie auf die mittlere Konzentration oder die Rotation der fluoreszierenden Moleküle schließen. Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie hat sich besonders bei der Auswertung dynamischer Prozesse im Gleichgewicht bewährt [54, 55, 56].

Autokorrelationsfunktion

Das Fluoreszenzsignal $F(t)$ fluktuiert um einen zeitlichen Mittelwert [56]:

$$F(t) = \langle F(t) \rangle + \delta F(t) . \quad (29)$$

Dabei stellen die eckigen Klammern einen zeitlichen Durchschnitt und δ das Symbol für die Fluktuation dar. Die zeitliche Analyse von $F(t)$ erfolgt über eine normierte Autokorrelationsfunktion (AKF) (Abbildung 9), die die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals zu unterschiedlichen Zeitpunkten t und $t + \tau$ beschreibt, mit $t \rightarrow \infty$:

$$G(\tau) := \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} . \quad (30)$$

Die Korrelationsfunktion für die freie, dreidimensionale Diffusion von Farbstoffmolekülen durch ein 3D Gauß-Volumenelement ist [42]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} . \quad (31)$$

S ist der Strukturfaktor, der die Geometrie des Fokus beschreibt:

$$S = \frac{w_0}{z_0} \quad (32)$$

mit den beiden Halbachsen w_0 und z_0 des Anregungsvolumens (Gleichung 23).

τ_D entspricht der charakteristischen Zerfalls- beziehungsweise Relaxationszeit der Autokorrelationskurve. Sie gibt Auskunft über die Dynamik eines Systems. Ist τ_D nur durch die Aufenthaltsdauer der Farbstoffe im Anregungsvolumen bestimmt, dann entspricht sie der Diffusionszeit. Die Diffusionszeit ist abhängig von der Diffusionskonstante D und der Größe des Anregungsvolumens:

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4D} \quad (33)$$

Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich darüber auf den hydrodynamischen Radius der Moleküle schließen:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (34)$$

mit der Boltzmannkonstante k , der Temperatur T , der Viskosität des Lösungsmittels η und dem hydrodynamischen Radius R des als kugelförmig angenommen Moleküls.

N ist die mittlere sich im Anregungsvolumen befindliche Teilchenanzahl:

$$N = V_{Fokus} \langle C \rangle \quad (35)$$

mit der mittleren Konzentration $\langle C \rangle$ der Teilchen.

Kreuzkorrelationsfunktion

Wird nicht das Fluoreszenzsignals eines Farbstoffes betrachtet, sondern das Signal zweier Farbstoffe F_g und F_r , die durch zwei verschiedene Laserwellenlängen λ_g und λ_r angeregt und spektral getrennt von zwei Detektoren registriert werden, so ergibt sich folgende normierte Kreuzkorrelationsfunktion (KKF):

$$G_{gr}(\tau) = G_{rg}(\tau) := \frac{\langle F_g(t) \cdot F_r(t + \tau) \rangle}{\langle F_g(t) \rangle \cdot \langle F_r(t) \rangle} \quad (36)$$

welche die Ähnlichkeit des Fluoreszenzsignals beider Farbstoffe beschreibt. Die entsprechenden Parameter der Kreuzkorrelation sind [57]

$$V_{gr} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \cdot (w_g^2 + w_r^2) \cdot (z_g^2 + z_r^2)^{\frac{1}{2}} \quad (37)$$

und

$$\tau_{D_{gr}} = \frac{(\tau_{D_g} + \tau_{D_r})}{2} = \frac{(w_g^2 + w_r^2)}{8D} = \frac{(w_{gr}^2)}{4D} \quad (38)$$

N beinhaltet in der Kreuzkorrelationsfunktion korreliertes sowie unkorreliertes Signal

$$\frac{1}{N} = \frac{N_{gr}}{(N_g + N_{gr})(N_r + N_{gr})}, \quad (39)$$

N_{gr} ist die Anzahl der Moleküle, die beide Farbstoffe tragen und damit ein Signal in der Kreuzkorrelationskurve erzeugen. N_g und N_r ist die Anzahl der Moleküle, die nur einen der beiden Farbstoffe tragen.

Ein korreliertes Signal in der Kreuzkorrelationsfunktion kann auch durch das Signal nur eines Farbstoffes entstehen, wenn von diesem in beiden Detektoren ein Fluoreszenzsignal registriert wird. Dieser *cross-talk* kann durch den Einsatz gepulster Laser, die alternierend pulsen, in der Kreuzkorrelationsfunktion eliminiert werden (*pulsed-interleaved excitation fluorescence correlation spectroscopy*, PIE-FCS) [58]. Hierbei werden die Farbstoffe abwechselnd durch Pulse der entsprechenden Laser angeregt, so dass die detektierten Photonen nicht nur nach ihrer Wellenlänge, sondern auch nach dem Anregungslaser sortiert werden können.

Photochemische/-physikalische Prozesse

Neben der Diffusion der Fluoreszenzfarbstoffe durch das konfokale Anregungsvolumen führen photochemische und -physikalische Prozesse (Triplettzustände, Isomerisierung) zu weiteren Intensitätsfluktuationen, bei denen die Farbstoffe zwischen einem fluoreszenzaktiven und -inaktiven Zustand wechseln. Dies führt zu einem weiteren Anstieg der Amplitude der Autokorrelationsfunktion [59, 52] (Abbildung 9). Sind diese Prozesse gegenüber der Diffusion der Moleküle sehr schnell, so kann die Gesamtkorrelationsfunktion in einen diffusiven $G_{Diff}(\tau)$ (Gleichung 31) und einen schnellen $G_{fast}(\tau)$ Term aufgeteilt werden, die multiplikativ miteinander verbunden sind [37]:

$$G(\tau) = 1 + G_{Diff}(\tau) \cdot G_{fast}(\tau). \quad (40)$$

Dabei kann $G_{fast}(\tau)$ als einfacher Exponentialterm beschrieben werden [52]:

$$G_{fast}(\tau) = \left(\frac{A}{1-A} e^{-\frac{\tau}{\tau_{fast}}} \right) \quad (41)$$

mit dem relativen Anteil A der Moleküle, die sich im fluoreszenzinaktiven Zustand befinden, und dessen charakteristischer Zeitkonstante τ_{fast} .

Afterpulsing

Kurz nach dem Auftreten eines Fluoreszenzphotons auf die aktive Fläche eines Detektors kann aufgrund von Rückkopplung ein zweiter Zählpuls auftreten [60]. Diese imaginären Photonen führen vor allem bei einem sehr niedrigem Gesamtsignal zu einem weiteren Anstieg der Amplitude in der Autokorrelationskurven in einem Zeitbereich von 10^{-7} - 10^{-6} Sekunden. Dieser Anstieg kann

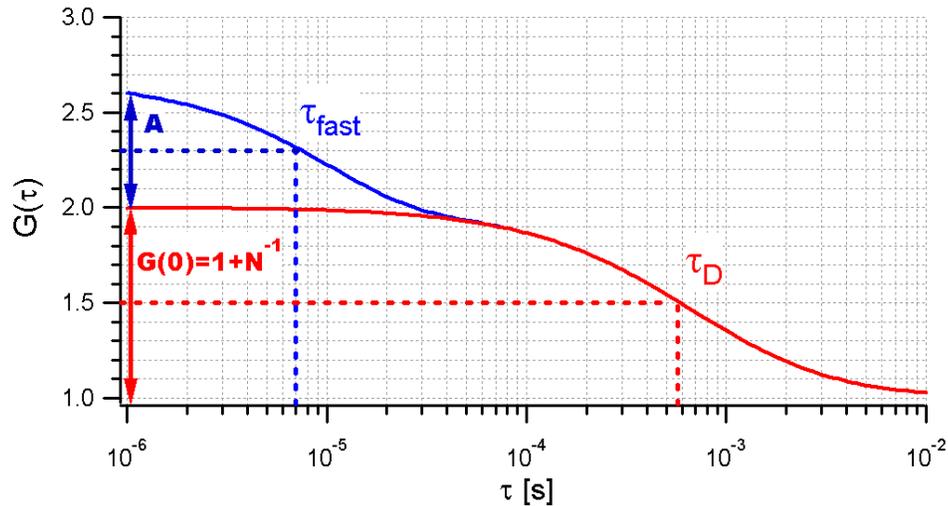


Abbildung 9: Beispiel einer Korrelationskurve, dessen Verlauf durch die Diffusion der Moleküle durch das Anregungsvolumen (rote Kurve) und durch einen photophysikalischen beziehungsweise -chemischen Prozess (blaue Kurve) bestimmt ist. Über die Amplitude $G(0)$ der diffusiven Komponente lässt sich auf die mittlere Teilchenanzahl N im Anregungsvolumen schließen. Die Zeit, in der die Amplitude der diffusiven Komponente auf die Hälfte gefallen ist, entspricht der mittleren Aufenthaltszeit τ_D der Moleküle im Anregungsvolumen. Photochemische beziehungsweise -physikalische Prozesse führen zu einem weiteren Anstieg der Amplitude. Diese zusätzliche Amplitude gibt den Anteil der Moleküle an, die während der Diffusion durch das Anregungsvolumen in einen nichtfluoreszierenden Zustand wechseln. Die Zeit, in der dieser zusätzlichen Komponente auf die Hälfte der Amplitude gefallen ist, entspricht der charakteristischen Zeit τ_{fast} des zugrunde liegenden Prozesses.

durch eine Kreuzkorrelation zweier Detektorsignale vermieden [61] oder mit Hilfe der Fluoreszenzlebensdauerkurve korrigiert [62] werden.

Hintergrund-Korrektur

Wenn dem Fluoreszenzsignal ein unkorreliertes Hintergrundsignal überlagert ist, so sinkt die Amplitude der Korrelationsfunktion [63]. Aufgrund dieser Dämpfung wird eine höhere Teilchenkonzentration bestimmt, als tatsächlich vorhanden ist. Die aus einer Korrelationsfunktion ermittelte Teilchenanzahl N kann unter Berücksichtigung des Hintergrundsignals I_{BG} nach folgender Gleichung [64] korrigiert werden:

$$N_I = \frac{N}{\left(1 + \frac{1}{I_{BG} - 1}\right)^2} \quad (42)$$

mit der realen Teilchenanzahl N_I und der mittleren Intensität I in der Probelösung.

Da das Hintergrundsignal zeitunabhängig ist, hat es keinen Einfluss auf die aus den Korrelationsfunktionen gewonnenen Zeiten beziehungsweise Raten wie Diffusionszeiten oder Triplettübergangsraten.

Korrelationsfunktion von Mischungen

Bei einer Mischung aus verschiedenen fluoreszierenden Molekülen setzt sich die gemessene Signalintensität aus den Teilbeträgen aller Spezies zusammen:

$$I(t) = F_1(t) + F_2(t) + F_3(t) + \dots \quad (43)$$

Die Korrelationsfunktion einer Mischung ergibt sich somit aus einer Linearkombination der Korrelationsfunktionen der einzelnen Komponenten [65]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^M \frac{y_i}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right) \left(\sqrt{1 + S^2 \left(\frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right)}\right)} \right) \quad \text{mit } \sum y_i = 1 \quad (44)$$

mit der durchschnittlichen Anzahl N der fluoreszierenden Moleküle im Detektionsvolumen, Anzahl der Fluoreszenzkomponenten M und der Beitrag y_i der i -ten Komponente zur Korrelationsfunktion. Für eine Zwei-Komponentige Anpassungsfunktion kann demnach folgende Gleichung benutzt werden:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{y}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_1}}\right) \left(\sqrt{1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_{D_1}}}\right)} + \frac{1-y}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_2}}\right) \left(\sqrt{1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_{D_2}}}\right)} \right), \quad (45)$$

mit dem Anteil y der ersten Komponente und dem Anteil $1 - y$ der zweiten Komponente.

2.1.5 Fluoreszenzereignisse

Einzelmolekülexperimente

Bei Einzelmolekülexperimenten wird hauptsächlich Hintergrund gemessen, von dem sich Ereignisse als intensive Photonenschauer abheben. Da das Detektionsvolumen V gegenüber dem Probevolumen sehr klein ist, ist die Zahl der Moleküle N im Detektionsvolumen Poissonverteilt [66]. Die Wahrscheinlichkeit $W(N)$, dass sich N Moleküle gleichzeitig im Detektionsvolumen befinden, lässt sich wie folgt bestimmen:

$$W(N) = e^{-\varepsilon} \frac{\varepsilon^N}{N!} \quad (46)$$

mit dem Erwartungswert ε , der angibt, wie viele Moleküle im Mittel im betrachteten Anregungsvolumen anzutreffen sind:

$$\varepsilon = \langle N \rangle = c N_A V \quad (47)$$

mit der Konzentration c der Moleküle und der Avogadrokonstante N_A . Je kleiner die Molekülkonzentration, desto kleiner ist auch der Erwartungswert. Ist der Erwartungswert deutlich kleiner als

eins, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich mehr als ein Molekül im Detektionsvolumen befindet, sehr gering, so dass ein gemessener Photonenschauer mit hoher Sicherheit vom Durchtritt eines Moleküls durch das Fokusbereich stammt.

Glätten

Beim Durchtritt eines Farbstoffmoleküls durch das Anregungsvolumen sollte die Fluoreszenzintensität während des Eintritts graduell ansteigen sowie während des Austritts graduell abfallen. Doch aufgrund der nichtlinearen Bewegung der Moleküle, die dem *random walk* der freien Diffusion entspricht [16, 67], und aufgrund von photochemischen beziehungsweise photophysikalischen Prozessen fluktuiert das Fluoreszenzsignals mitunter sehr stark während eines Fluoreszenzereignisses. Um Fluoreszenzereignisse trotzdem zuverlässig vom Hintergrund zu unterscheiden, werden die Rohdaten meist mit einem Filter geglättet. Der einfachste Filter ist dabei der gleitende Durchschnitt [68, 69, 70]:

$$f_n^l = \mu_g(n) = \frac{1}{2g+1} \sum_{j=-g}^g f_{n+j}. \quad (48)$$

Andere in der Literatur beschriebene Filter sind der Fast-Fourier-Niedrigpassfilter [71, 72], der Gaußfilter [73] oder der Leefilter [74].

Beim Lee-Filter wird neben dem lokalen Mittelwert \bar{n}_k auch die lokale Standardabweichung σ_k^2 berücksichtigt. Ein Leefilter der Breite $(2m+1)$ definiert sich wie folgt:

$$\bar{n}_k = \frac{1}{(2m+1)} \sum_{j=-m}^m n_{k+j} \quad m < k \leq N_P - m \quad (49)$$

$$\sigma_k^2 = \frac{1}{(2m+1)} \sum_{j=-m}^m (n_{k+j} - \bar{n}_{k+j})^2 \quad 2m < k \leq N_P - 2m \quad (50)$$

mit der Anzahl der Datenpunkte N_P und einem Parameter k , der durch die Integrationszeit bestimmt wird. Für die gefilterten Daten \tilde{n}_k gilt:

$$\tilde{n}_k = \bar{n}_k + (n_k - \bar{n}_k) \frac{\sigma_k^2}{\sigma_k^2 + \sigma_0^2}. \quad (51)$$

Die Glättungsparameter Fensterbreite m und die Varianzbreite σ_0^2 müssen dabei vorgegeben werden. Die Fensterbreite sollte dabei der Breite der Fluoreszenzereignisse entsprechen, was sich über die Autokorrelationskurven bestimmen lässt. Für die Festlegung der Varianzbreite gilt, dass der Lee-Filter für $\sigma_0^2 \rightarrow \infty$ in den gleitenden Durchschnitt übergeht und für $\sigma_0^2 \rightarrow 0$ die Rohdaten unverändert lässt. Durch den Lee-Filter kann das Rauschen deutlich reduziert werden, womit einer höhere Sicherheit beim Identifizieren von Ereignissen erreicht wird.

Mustererkennung

Nachfolgend wird eine Methode der schnellen und hocheffizienten Identifikation von Einzelmolekülen nach Prummer und Mitarbeiter [75] vorgestellt. Die Methode basiert auf Betrachtungen von Wahrscheinlichkeitsverteilungen. Dabei kann zur Identifizierung jede Messgröße wie Fluoreszenzlebenszeit, Polarisation oder das Wellenlängenspektrum des Fluoreszenzsignals verwendet werden.

Werden zum Beispiel verschiedene Farbstofflösungen mit Detektoren gemessen, die in verschiedenen spektralen Bereichen Photonen detektieren, so unterscheidet sich die Intensitätsverteilung zwischen den Detektoren je nach gewählter Farbstofflösung. Mit folgender Gleichung kann die Wahrscheinlichkeit bestimmt werden, dass ein Photon eines bestimmten Fluoreszenzfarbstoffes i auf einen bestimmten Detektor b fällt:

$$P(b|m_i) = \frac{c_i(b)}{\sum_{b=0}^K c_i(b)}, \quad (52)$$

mit der Gesamtphotonenanzahl c und der Gesamtanzahl K der Detektoren. Daraus lässt sich nun mit dem Satz von Bayes [76]:

$$P(m_i|b) = \frac{P(b|m_i)}{\sum_{q=1}^N P(b|m_q)} \quad (53)$$

die Wahrscheinlichkeit bestimmen, dass ein detektiertes Photon von einem bestimmten Farbstoff stammt, mit der Gesamtanzahl N der beteiligten Farbstoffe. Dies ergibt ein Erkennungsmuster, nach dem die Wahrscheinlichkeit für ein Farbstofftyp in Abhängigkeit von den Detektoren für jedes detektierte Photon zugeordnet werden kann.

Um ein Fluoreszenzereignis, welches aus mehreren detektierten Photonen besteht, einem Farbstoff zuzuordnen, werden die einzelnen Wahrscheinlichkeiten der Photonen wie folgt zur Gesamtwahrscheinlichkeit $P_L(m_i)$ für einen Farbstoff multipliziert:

$$P_L(m_i) = \frac{\prod_{j=1}^L P(m_i|b_j)}{\sum_{q=1}^N \prod_{j=1}^L P(m_i|b_j)} \quad (54)$$

mit der Photonenzahl L und der Nummer j des Detektors (in [75] ist diese Gleichung fehlerhaft).

2.2 Biologische Grundlagen

2.2.1 DNS

Primärstruktur

Die Desoxyribonukleinsäure (DNS) besteht aus zwei Polynukleotidketten. Die Untereinheiten der Polynukleotidkette sind die Nukleotide (Abbildung 10), bestehend aus einer stickstoffhaltigen Base, die über eine N-glykosidische Bindung an das C-Atom 1' der Pentose 2-Desoxyribose gebunden ist, und einer Phosphatgruppe. Aufgrund der Phosphatgruppen ist die doppelsträngige DNS (dsDNS) negativ geladen. Aktivierte Nukleotide besitzen eine Triphosphat-Gruppe, von dem ein Pyrophosphat bei der Synthese eines Stranges abgespalten wird, um die Polymerisationsreaktion thermodynamisch zu bevorzugen. Es gibt zwei Typen von stickstoffhaltigen Basen. Die Pyrimidine, zu denen das Cytosin und Thymin gehören, besitzen einen sechsgliedrigen Ring und die Purine, zu denen Adenin und Guanin gehört, haben zwei miteinander verbundene fünf- und sechsgliedrige Ringe. Fehlt dem Nukleotid die Phosphatgruppe, so wird die Verbindung bestehend aus der Pentose und der Base Nukleosid genannt. In der Polynukleotidkette bilden der Phosphat- und Zuckerrest das Rückgrat, wobei die 5'-Position eines Pentoserings über eine Phosphatgruppe mit der 3'-Position des nächsten Pentoserings verbunden ist. An einem Ende bleibt schließlich eine freie 5'-Gruppe und am anderen Ende eine freie 3'-Gruppe über. Nukleinsäuresequenzen werden im Regelfall in 5'->3'-Richtung geschrieben. Die Information ist durch die Reihenfolge (Sequenz) der vier Basen gespeichert.

Sekundärstruktur

Nach dem Modell von Watson-Crick [77] bilden zwei Polynukleotidketten die Doppelhelix der DNS, wobei sie sich antiparallel anordnen, was bedeutet, dass ein Strang in 5'->3'-Richtung und der andere in 3'->5'-Richtung verläuft. Verbunden sind die Polynukleotidketten über Wasserstoffbrücken zwischen den stickstoffhaltigen Basen, wobei sich nur Guanin und Cytosin sowie Adenin und Thymin miteinander paaren. Dabei bilden sich zwischen Guanin und Cytosin drei und zwischen Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrückenbindungen. Aufgrund dieser Paarbildung kann von der Sequenz des einen Stranges auf die Sequenz des andern Stranges geschlossen werden. Damit befindet sich das Zucker-Phosphat-Rückgrat außen und die Basen auf der Innenseite. Die Basen sind planare Moleküle und liegen paarweise, gestapelt senkrecht zur Achse der Helix. Dadurch stabilisieren sie die Doppelhelix nicht nur durch die Wasserstoffbrückenbindungen, sondern auch durch Wechselwirkungen der π -Systeme zwischen aufeinander liegenden Basen. Aber auch hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der Waals-Kräfte tragen zur Stabilität bei, wobei die große Stabilität der DNS hauptsächlich auf der großen Anzahl der Basenpaarungen beruht.

Doppelstrang-DNS hat mehrere mögliche Doppelhelixstrukturen, die durch die Zahl der Nukleotide pro Windung und durch den Abstand zwischen benachbarten, sich wiederholenden Einheiten beschrieben werden. Die B-Konformation entspricht dabei der üblichen Struktur der DNS

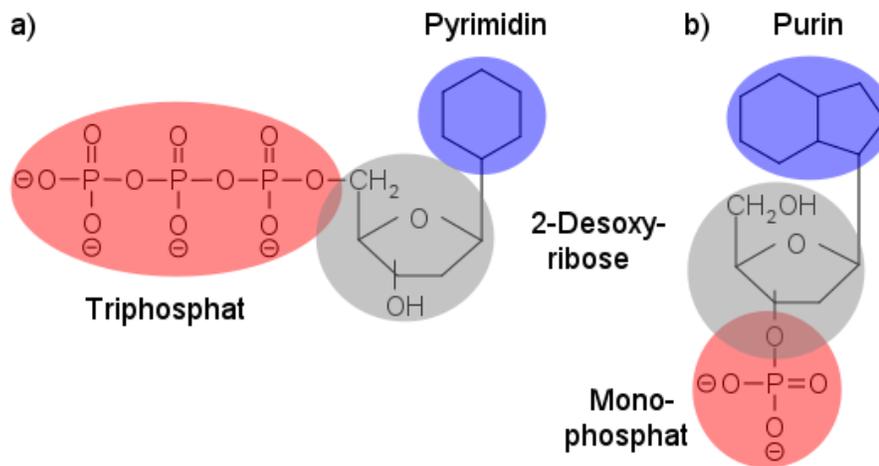


Abbildung 10: Die Grundbausteine der DNS, die Nucleotide, bestehen aus einer stickstoffhaltigen Base (Pyrimidin oder Purin), aus einer 2-Desoxyribose sowie eins bis drei Phosphatgruppen. Die Phosphatreste können sich an Position 5', hier am (Pyrimidin)-5'-Triphosphat (a), oder an Position 3', hier an (Purin)-3'-Monophosphat (b) gezeigt, befinden. Zu den Pyrimidinen gehören Cytosin und Thymin und zu den Purinen Adenin und Guanin.

Tabelle 2: Physikalische Daten von doppelsträngiger sowie einzelsträngiger DNS [78, 79, 80].

	dsDNS	ssDNS
Persistenzlänge	150 bp	1 – 2 bp
	50 nm	0,7 – 1 nm
Vorschub pro Basenpaar/Base	0,34 nm	0,7 nm
Vorschub pro Windung	3,4 nm	–
Durchmesser	2,4 nm	–
Ladung	$2 e^-$ /bp	$1 e^-$ /bp
	$5,88 e^-$ /nm	$1,43 e^-$ /nm

unter den Bedingungen in der lebenden Zelle. In der B-Konformation ist jedes Basenpaar gegen das nächste um etwa 36° weiter um die Helixachse gedreht, so dass 10 Basen eine komplette Windung von 360° bilden. Die beiden umeinander gewundenen Polynucleotidketten bilden eine rechtsgewundene Doppelhelix (α -Helix) mit einer kleinen (Durchmesser 1,2 nm) und einer großen Furche (Durchmesser 2,2 nm). Die A-Konformation ist im Vergleich zur B-Konformation kompakter, die Basen sind nicht flach, sondern gegen die Helixachse geneigt, es gibt auch mehr Basenpaare pro Windung. Die Z-Konformation ist die einzige linksgewundene Helix. Sie weist einen geringen Durchmesser auf und ist die am wenigsten gewundene Struktur, wodurch sie die meisten Basenpaare pro Windung besitzt. Die Z-Konformation tritt auf, wenn sich Purine und Pyrimidine in der Sequenz abwechseln. *In vivo* ist die Bildung der Z-Konformation jedoch unwahrscheinlich.

In Tabelle 2 sind einige physikalische Daten von einzelsträngiger DNS und doppelsträngiger DNS in B-Konformation gegenübergestellt.

Der genetische Code

In der DNS-Sequenz ist die Aminosäuresequenz aller Proteine eines Organismus enthalten. Die Sequenz eines codierenden DNS-Stranges besteht aus Basentriplets, den so genannten Codons, die, in 5' → 3'-Richtung gelesen, der Aminosäuresequenz eines vom N- zum C-Terminus gelesenen Proteins entsprechen. Da jedes der vier möglichen Nukleotide alle drei Codonpositionen besetzen kann, sind $4^3 = 64$ verschiedene Trinukleotidsequenzen möglich. 61 Codons stehen für eine bestimmte Aminosäure und drei, die so genannten Stopcodons, verursachen die Termination der Proteinsynthese. Da es mehr Codons als Aminosäuren gibt, werden fast alle Aminosäuren durch mehr als ein Codon vertreten.

In allen Organismen kodieren die selben Codons dieselben Aminosäuren. Die Universalität des genetischen Codes spricht dafür, dass er sehr frühzeitig in der Evolution entstanden sein muss, denn alle lebenden Organismen stammen offensichtlich von einer einzigen Population primitiver Zellen mit seitdem unverändertem Code ab. Ausnahmen beim universellen genetischen Code sind selten und betreffen eher die Terminationscodons. Eine Ausnahme, bei der es zu einer systematischen Änderung des Codes gekommen ist, ist das Erbgut der Mitochondrien, dem einzigen eukaryotischen Zellorganell mit einem eigenen Genom.

2.2.2 DNS als Polymer

Für zelluläre Funktionen wie Faltung, Packung, Regulation, Rekombination, Replikation und Transkription des Genoms spielen die mechanischen Eigenschaften der DNS eine zentrale Rolle. Dabei kann die Struktur eines DNS-Moleküls als Polymerkette betrachtet werden, dessen Bausteine die Nukleotide darstellen. Die wichtigsten Parameter eines linearen Polymers sind die Gesamtlänge oder auch Konturlänge L sowie die Persistenzlänge l_p , welche die elastischen Eigenschaften beziehungsweise Flexibilität des Polymers beschreibt. Innerhalb der Persistenzlänge ist dabei das Polymer nahezu starr. Die Persistenzlänge einer dsDNS entspricht 50 nm und damit zirka 150 Basenpaaren.

Die ideale Gaußkette

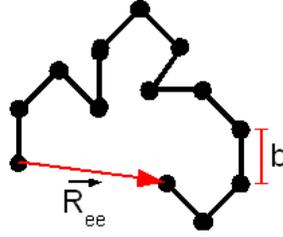
In einem Polymermodell wird die DNS als eine Kette von frei gegeneinander beweglichen Segmenten b angenommen, die so genannten Gaußkette (im englischen: *freely jointed chain* - FJC). Die Gesamtlänge oder Konturlänge des Polymers ergibt sich aus der Anzahl N der einzelnen Segmenten b :

$$L = Nb . \quad (55)$$

Der End-zu-End-Abstand \vec{R}_{ee} ist wie folgt definiert:

$$\vec{R}_{ee} = \sum_{i=1}^N \vec{b}_i . \quad (56)$$

Abbildung 11: Das Polymermodell der idealen Gaußkette (FJC - *freely jointed chain*). (\vec{R}_{ee} - End-zu-End-Abstand; b - Länge eines einzelnen Segments)



Zur Abschätzung der Größe des Polymerknäuels wird der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand $\langle \vec{R}_{ee} \rangle$ verwendet:

$$\langle \vec{R}_{ee} \rangle = Nb^2 . \quad (57)$$

Wird die Kette in Segmente unterteilt, die der doppelten Persistenzlänge l_p , und damit der Kuhnlänge l_K entsprechen ($b = 2l_p = l_K$), so kann der End-zu-End-Abstand auch mittels der Konturlänge und der Persistenzlänge beschrieben werden:

$$\langle \vec{R}_{ee} \rangle = 2Ll_p^2 . \quad (58)$$

Der End-zu-End-Abstand stellt eine experimentell oft nicht zugängliche Größe dar. Dagegen kann der Gyrationradius R_G der Polymere durch die meisten Streuexperimenten bestimmt werden. Der Gyrationradius ist ein Maß für die Rotationsträgheit der Polymere aufgrund ihrer Ausdehnung. Die Definition lautet:

$$R_G^2 := \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \langle |\vec{r}_i - \vec{r}_c|^2 \rangle \quad (59)$$

mit dem Schwerpunkt des Polymers im Punkt \vec{r}_c . Für die ideale Gaußsche Kette ergibt sich daraus:

$$R_G^2 = \frac{R_{ee}^2}{6} = \frac{Ll_p}{3} . \quad (60)$$

Im idealen Gauß-Modell wächst der Gyrationradius des Polymers mit der Wurzel der Länge

$$R_G \propto L^v \quad \text{mit } v = \frac{1}{2} = 0.5 . \quad (61)$$

Schwachpunkt des idealen Gauß-Modells ist die Annahme, dass die Segmente keinen gegenseitigen Einfluss ausüben und sich deren Zufallswege kreuzen können. Wird das Modell noch um Wechselwirkungen der Segmente untereinander erweitert, so dass sie sich auf ihren Weg selbst meiden [81], so wird ein Skalenverhalten erhalten von:

$$v = \frac{3}{5} = 0.6 . \quad (62)$$

Rouse- und Zimm-Modell

Bei der Diffusion von Polymeren kann die Wechselwirkung der einzelnen Segmente, also die innere Dynamik, nicht unberücksichtigt bleiben. Rouse stellte ein Kugel-Feder-Modell (*bead-spring-model*) für das Polymer vor [82], welches eine komplementäre Beschreibung des idealen Gauß-Modells darstellt. Dabei werden die einzelnen Segmente als Kugeln angenommen in gleichmäßigem Abstand a zueinander, zwischen denen entropische Federn gespannt sind mit der Federkonstante $k = \frac{3k_B T}{a^2}$. Dadurch werden in diesem Modell nur Nachbar-Nachbar-Wechselwirkungen betrachtet. Der Schwerpunktdiffusionskoeffizient lässt sich wie folgt berechnen:

$$D_R = \frac{k_B T}{N \xi} \propto N^{-1} \quad (63)$$

dabei stellt der Reibungskoeffizient ξ eine problematische Größe dar, da er nicht experimentell zugänglich ist. Das Rouse-Modell liefert ein stimmiges Modell für Polymerschmelzen.

Das Zimm-Modell erweitert das Rouse-Modell durch hydrodynamische Wechselwirkungen [83]. Die bewegten Segmente lösen im umgebenden Lösungsmittel Strömungen hervor, die die Bewegung der Nachbarsegmente beeinflussen. Die Diffusionskonstante des Schwerpunkts im Zimm-Modell lautet:

$$D_Z = \frac{8k_B T}{3(6\pi^3)^{0.5} \eta a \sqrt{N}} = 0,196 \frac{k_B T}{\eta R_{ee}} \quad (64)$$

Damit entspricht das Diffusionsverhalten der Zimm-Ketten dem von harten Kugeln mit einem hydrodynamischen Radius R_h von:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \text{ mit } R_h = \frac{R_{ee}}{6\pi \cdot 0,196} \approx \frac{2}{3} R_G \quad (65)$$

Das Zimm-Modell konnte sehr gut bei synthetischen Polymeren in Lösung bestätigt werden und stellt bis heute das Standardmodell für Polymerdynamik in Lösung dar.

Semiflexible Ketten - Worm-Like Chain Model (WLC)

Für DNS-Moleküle, deren Konturlänge im Bereich der Persistenzlänge liegt, passt das Modell eines elastischen Stabes, bei dem die Verbiegung der DNS nicht aus den beweglichen Verbindungen zwischen den starren Segmenten herrührt, sondern kontinuierlich stattfindet. Bei Konturlängen unterhalb der Persistenzlänge verhält sich die Polymerketten dann wiederum wie ein steifer Stab und bei deutlich größeren Konturlängen wie eine ideale Gaußsche-Kette. Die Polymere besitzen also eine gewisse Steifigkeit, sodass die Stellung eines Segmentes die Positionierung und Orientierung seines Nachbarsegmentes beeinflusst. 1949 führen Kratky und Porod das *Worm-Like Chain Model* (WLC) ein [84], um auf verschiedenen Längenskalen die Struktur von Polymeren korrekt zu beschreiben.

Der Gyrationradius einer semiflexiblen Kette lässt sich bestimmen durch:

$$R_G^2 = \frac{Ll_p}{3} - l_p^2 + \frac{2l_p^3}{L} - \frac{2l_p^4 \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{l_p}\right) \right]}{L^2}. \quad (66)$$

Im Grenzfall eines flexiblen Polymers ergibt sich:

$$R_G^2 = \frac{Ll_p}{3} \text{ mit } l_p \ll L \quad (67)$$

und für den Grenzfall eines steifen Stabes:

$$R_G^2 = \frac{L^2}{12}. \quad (68)$$

Die Diffusionskonstante eines Stäbchens der Dicke d und der Länge L lässt sich berechnen durch [85]:

$$D_{Stab} = \frac{Ak_B T}{3\pi\eta L} \quad (69)$$

mit

$$A = \ln \frac{L}{d} + 0.312 + 0.565 \frac{d}{L} - 0.1 \frac{d^2}{L^2} \quad (70)$$

wenn gilt:

$$2 < \frac{L}{d} < 30. \quad (71)$$

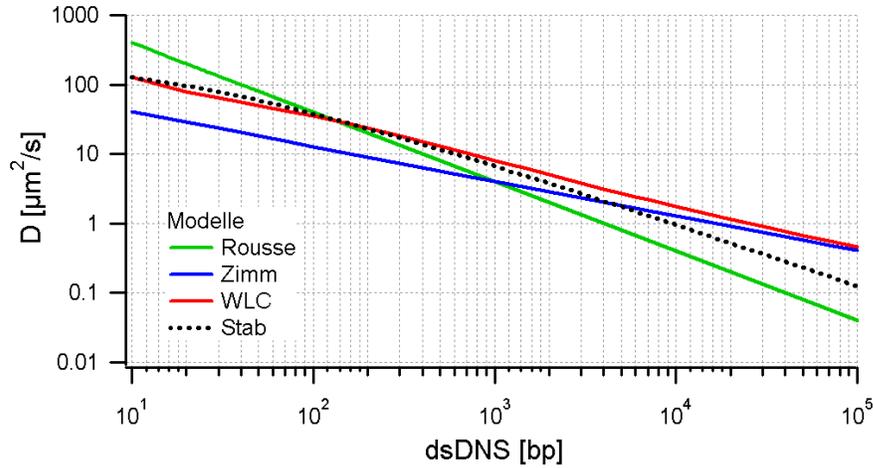
Der Diffusionskoeffizient für den Schwerpunkt semiflexibler Ketten lässt sich wie folgt berechnen [86, 87]:

$$D_{semifl.} = \frac{k_B T}{3\pi\eta L} \left[1 + \frac{\sqrt{6}}{\sqrt{\pi}} \int_0^L \frac{L-s}{\sqrt{a(s)}} \exp\left(-\frac{3d^2}{2a(s)}\right) ds \right]. \quad (72)$$

In Abbildung 12 sind die Diffusionskonstanten der verschiedenen Polymermodelle in Abhängigkeit der Konturlänge gegenübergestellt.

Geladene Makromoleküle

Bei der DNS handelt es sich um ein Polyelektrolyt, welcher eine große Zahl ionisierbarer Gruppen trägt. Aufgrund der zahlreiche Phosphatgruppen im Rückgrat handelt es sich in Lösung also um ein negativ geladenes Polymer. Dessen Konformation wird entscheidend durch die Abstoßungskräfte der fixierten Ladung beeinflusst. Diese elektrostatischen Abstoßungskräfte sind abhängig von der Ionenstärke der einzelnen Ladungen und der Konzentration der Gegenionen in der Lösung. Ein Maß für die Abschirmung elektrostatischer Kräfte ist die Abschirmungskonstante κ , deren

**Abbildung 12:**

Doppellogarithmische Darstellung der Diffusionskoeffizienten des Rouse- (grün), Zimm- (blau), semiflexible (WLC) (rot) und Stab-Modell (schwarz) in Abhängigkeit der Anzahl der Basenpaare von DNS. ($l_p = 50$ nm; $d = 2,4$ nm; $T = 22$ C; $\eta = 1005 \cdot 10^{-6}$ Pa s)

reziproker Wert der Debye-Länge, also der Abschirmlänge entspricht:

$$\kappa = \sqrt{\frac{2N_A e_0^2 I}{\epsilon \epsilon_0 k_B T}} \quad (73)$$

mit der Avogadro-Konstanten N_A , der Elementarladung e_0 , der relativen beziehungsweise absoluten Dielektrizitätskonstanten ϵ und ϵ_0 , der Boltzmann-Konstanten k_B , der absoluten Temperatur T und der Ionenstärke I in der Lösung. Die Ionenstärke lässt sich wie folgt bestimmen:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i \quad (74)$$

mit der Ladungszahl z_i und der Konzentration c_i der der Ionenart i .

Da die Gegenionen in der Lösung die Ladung der DNS abschirmen, haben sie einen großen Einfluss auf die Struktur und Steifigkeit des Polymers. Dabei können die Gegenionen frei um das Polymer diffundieren oder sie lagern sich fest an Polymeren mit hohen Ladungsdichten wie zum Beispiel bei DNS an (Manning-Kondensation) und reduzieren damit die effektive Ladungsdichte. Manning hat die Existenz eines kritischen Ladungsabstandes berechnet [88, 89, 90], welcher bei einwertigen Gegenionen der Bjerrumlänge l_B entspricht:

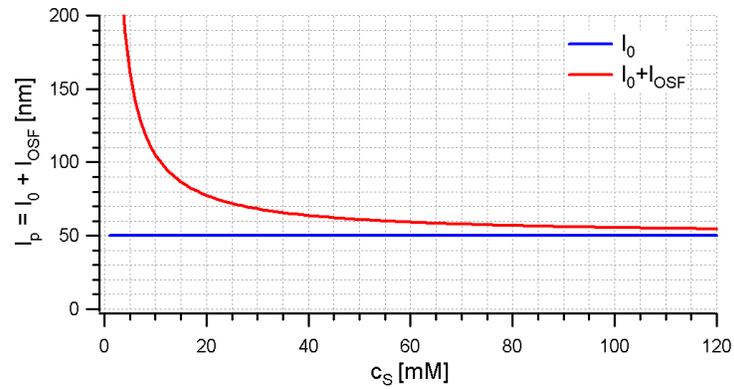
$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 k_B T} \cdot \quad (75)$$

Die Bjerrum-Länge gibt den Abstand zwischen zwei Ladungen an, bei der die elektrostatischen Wechselwirkungen gerade der thermischen Energie $k_B T$ entspricht. In Wasser beträgt sie 0,72 nm bei 25°C.

Die Abschirmlänge κ^{-1} lässt sich nach den Gleichungen 73, 74 und 75 wie folgt berechnen:

$$\kappa^{-1} = (8\pi z^2 l_B c_S)^{-0.5} \quad (76)$$

Abbildung 13: Persistenzlänge l_p (rote Kurve) bestehend aus der mechanischen l_0 (blaue Kurve) und der elektrostatischen Persistenzlänge l_{OSF} in Abhängigkeit von der Salzkonzentration c_S eines dsDNS-Polymers nach Gleichung 77.



mit der Salzkonzentration c_S . Bei Entfernungen oberhalb der Abschirmlänge spielen elektrostatische Wechselwirkungen keine Rolle. Sie beträgt unter physiologischen Bedingungen ($c_S \approx 100\text{nM}$, $z = 1$) etwa 1 nm.

Odijk [91, 92] sowie Skolnick und Fixman [93] führten den Begriff der elektrostatischen Persistenzlänge l_{OSF} ein, um den durch elektrostatische Wechselwirkung einzelner Segmente einer Polymerkette entstehenden Beitrag zur Persistenzlänge zu beschreiben:

$$l_p = l_0 + l_{OSF} \quad (77)$$

dabei entspricht l_0 der mechanischen Persistenzlänge. l_{OSF} lässt sich berechnen durch:

$$l_{OSF} = \frac{l_B \sigma^2}{4\kappa^2} = \frac{\sigma^2}{32\pi z^2 c_S} \quad (78)$$

Die Ladungsdichte σ bei dsDNS beträgt $\sigma = 2e/bp \approx 6e/nm$. Unter physiologischen Bedingungen ($c_S \approx 100\text{nM}$) ist der Beitrag der elektrostatischen Wechselwirkung zur Persistenzlänge mit 5,5 nm im Vergleich zur mechanischen Persistenzlänge von 50 nm fast schon vernachlässigbar, gewinnt jedoch mit abnehmender Salzkonzentration zunehmend an Bedeutung (Abbildung 13).

2.2.3 Herstellung von DNS

Chemische Synthese

Die chemische Methode zur Synthese von Nukleinsäure wurde in den 1960iger beziehungsweise 1970er Jahren von H. Gobind Khorana und seinen Mitarbeitern entwickelt. Bei der Synthese ist der wachsende Strang an einem festen Träger gebunden, wobei ähnliche Prinzipien angewendet werden wie bei der Merrifield-Synthese von Peptiden. Im Gegensatz zur Biosynthese wird hier der Strang in 3'-5'-Richtung aufgebaut. Jeder Additionsschritt ist sehr effizient, wodurch die routinemäßige Synthese von Polymeren mit 70 oder 80 Nukleotiden möglich wird. Über 100 Basen sind jedoch aufgrund von Nebenreaktionen bei jedem Zyklus nicht möglich. Durch die chemische Synthese sind relativ preiswerte DNS-Polymere mit einer vorgegebenen Sequenz verfügbar.

Primerverlängerung (primer extension)

Bei dieser enzymatische Synthese entsteht aus einer ssDNS, dem so genannten Template, eine dsDNS. Dabei knüpft eine Polymerase am 5'-Ende eines Primers, der an der ssDNS gebunden hat, neue Nukleotide an und verlängert den Primer so zum komplementären Strang der Ausgangs-ssDNS.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird die Reaktion der Primerverlängerung mehrfach wiederholt. Die zu vervielfältigende DNS wird zyklisch denaturiert. Beim Abkühlen binden Primer an die durch das Erhitzen entstandene ssDNS und werden durch hitzebeständige Polymerasen, zum Beispiel die Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, mittels in der Lösung vorhandener Nukleosidtriphosphate verlängert. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Menge der DNS, so dass sich die DNS-Masse nach 25 Zyklen um den Faktor 10^6 vervielfacht hat. Eine Grenze ist durch die Fehlerrate der Polymerase gegeben, da auch alle Fehler vervielfältigt werden. Um diese minimal zu halten, wird in der Regel bei einer PCR nur eine begrenzte Anzahl von 25-50 Zyklen durchlaufen.

Klonierung

Hierbei handelt es sich um ein in-vivo-Verfahren. In einem Klonierungsvektor, einem Plasmid oder einer Phagen-DNS, die vorher mittels Restriktionsenzymen spezifisch geschnitten wurde, wird mit Hilfe von Ligasen die zu amplifizierende Fremd-DNS an diesen Schnittstellen eingefügt. Diese Hybrid-DNS oder auch rekombinante DNS wird in eine Bakterienzelle eingeschleust, wo sie sich wie das Original vermehrt. Die Nachkommen dieser Bakterienzellen werden als Klone bezeichnet und die aus ihnen erhaltene rekombinante DNS als DNS-Klon.

2.2.4 Sequenzierung/Sequenzanalyse**Standardmethoden**

Der erste Ansatz zur Sequenzierung von Nukleinsäuren orientierte sich an der Sequenzierung von Proteinen: man teilt das Molekül in kleine Fragmente auf, bestimmt deren Basensequenz und leitet aus einander überlappenden Fragmenten die genaue Sequenz ab. Da Nukleinsäure im Gegensatz zu Proteinen nur aus vier unterschiedlichen Untereinheiten besteht, war es bis Ende der 1970er Jahre sehr schwierig, mit dieser Methode auch nur die Sequenz einer Nukleinsäure mit fünf oder zehn Nukleotiden zu bestimmen. 1977 wurden zwei neue Methoden, die Maxam-Gilbert- [94] und Sanger-Methode [2], entwickelt, die die Sequenzierung immer größerer DNS-Moleküle erlaubten.

Das grundlegende Prinzip beider Sequenzierungsmethoden ist die Entstehung einer Reihe von DNS-Einzelstrangmolekülen, von denen jedes um ein Basenpaar länger ist als das vorangegangene. Diese werden dann mittels Elektrophorese auf Acrylamid getrennt und bilden entsprechend ihrer Länge eine Leiter von Banden.

Maxam-Gilbert-Methode: Bei der Maxam-Gilbert-Methode [94] handelt es sich um eine chemische Reaktion, in der es je nach gewählten Bedingungen zu einer bevorzugten Spaltung der Esterverknüpfungen einer der vier Basen in dem zuvor nur an einem Ende mit radioaktivem ^{32}P oder ^{35}S markierten DNS-Molekül kommt. Die Reaktionsbedingungen werden so gewählt, dass nur wenige der möglichen Basen reagieren, so dass ein Gemische aller Kettenlängen entsteht. Dabei wird eine der vier Basen modifiziert und anschließend vom Zucker getrennt. An dieser Stelle wird das DNS-Rückgrat dann gespalten. Die DNS wird in 4 getrennten, basenspezifischen Reaktionen partiell abgebaut, und die entstandenen Bruchstücke werden in einer Gelmatrix auf den vier entsprechenden Bahnen elektrophoretisch nach der Kettenlänge getrennt. Die Detektion erfolgt durch die Belichtung eines Filmes durch den radioaktiven Marker, und anhand der entstandenen Banden kann auf die Sequenz geschlossen werden.

Sanger-Methode: Die Sanger-Methode [2] ist ein enzymatische Sequenzierungsmethode. Dabei dient die zu sequenzierende DNS als Matrize für eine Polymerisierungsreaktion. In den vier Ansätzen, entsprechend den vier Basen, sind die zu sequenzierende DNS, ein kurzes Oligonukleotid als Primer, die DNS-Polymerase, die vier Nukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und je Ansatz zu gewissem geringem Anteil eine Nukleotidsorte als radioaktiv markiertes 2'-3'-Dideoxynalogon enthalten. Diesen Dideoxynalogons fehlt die 3'-OH-Gruppe, so dass die DNS-Polymerase keine weitere 3'-5'-Phosphordiesterverknüpfung herstellen kann und es somit zu einen Abbruch der Reaktion an dieser Base kommt. Wie in der Maxam-Gilbert-Methode werden in jedem der vier Ansätze DNS-Fragmente mit unterschiedlicher Länge erhalten, die mit der selben Base enden, die dann ebenfalls elektrophoretisch getrennt werden, so dass über die erhaltenen Banden auf die Sequenz geschlossen werden kann. Im Vergleich zur Maxam-Gilbert-Methode ist die Sanger-Methode jedoch schneller und auch einfacher in der Durchführung. Der zeitaufwendigste Schritt ist die elektrophoretische Trennung. Aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens im Gel können weniger als 1000 bp pro Lauf ausgelesen werden, so dass die Leselänge dadurch begrenzt ist.

Die Sanger-Methode erfuhr in den letzten Jahrzehnten eine rasante Weiterentwicklung. So gelang es Mitte der 1980er, die DNS mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, womit einerseits auf die Markierung mit den gefährlichen radioaktiven Markern verzichtet werden kann und andererseits eine Automatisierung der Datenaquisition ermöglicht wird [95]. Durch starke Parallelisierung des Trennvorgangs ist auch die parallele Analyse mehrerer Sequenzieransätze möglich. Durch das Markieren der Terminatoren mit unterschiedlichen Farbstoffen war es außerdem möglich, die Trennung auf einer Gelbahn durchzuführen, was die Zahl der Sequenzieransätze um den Faktor vier reduziert. Da verschiedene Farbstoffe aber auch die Laufeigenschaften der Fragmente im elektrischen Feld ändern, ist nach einer solchen Trennung noch eine aufwendige Datenverarbeitung notwendig. Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese ist eine höhere Auflösung möglich. Dies bedeutet, dass längere DNS-Moleküle sequenziert werden können und eine schnellere Trennung möglich ist [96, 97, 98].

Da in den Kapillaren aufgrund der besseren Wärmeableitung ein höheres elektrisches Feld angelegt werden kann, verkürzt sich dadurch die Trennzeit, wodurch ein höheres Auflösungsvermögen erzielt werden kann, da die Bandenverbreiterung durch Diffusion vermindert wird. Auf dieser Basis wurde ein DNS-Sequenzierapparat mit 96 Glaskapillaren entwickelt [99, 100, 101, 102].

Die Sequenzierung von großen DNS-Fragmenten von über 100.000 Basen Länge wird durch eine massive Parallelisierung von Sequenzierautomaten (100 und mehr) erreicht. Dadurch wird zwar die Geschwindigkeit der Sequenzierung deutlich erhöht, jedoch steigen auch die Kosten.

Schrotflinten-Sequenzanalyse (shotgun sequencing): Die Klonierung eines vollständigen Genoms wird häufig auch als Schrotschuss-Experiment bezeichnet, da das Genom in Fragmente von geeigneter Größe zerlegt wird. Für die Sequenzierung des Erbguts eines Organismus werden vom Genom zwei Bibliotheken mit Zufallsbruchstücken erzeugt. Die erste Bibliothek enthält kurze Fragmente und wird in Plasmiden vervielfältigt, die zweite Bibliothek enthält große Fragmente und wird in Bakteriophagen vervielfältigt. Die erste Bibliothek wird ansequenziert, das heißt die ersten 500 Basen der Fragmente und zusammenhängende Bereiche, die so genannten Contigs, werden mittels eines Computerprogramms rekonstruiert. Auch die zweite Bibliothek wird ansequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit den Contigs verglichen, um die Lücken zwischen den Contigs zu füllen. Dadurch wird die vollständige Kette der Fragmente in der richtigen Reihenfolge erhalten. Nun müssen nur noch die unbekannteren mittleren Abschnitte vollständig sequenziert werden. Die Schrotflinten-Sequenzanalyse ist die wichtigste Methode zur Sequenzierung kleiner Genome. Sie liefert schneller die Sequenzen der DNS-Fragmente und deren Abfolge als die mühsame Sequenzierung einzelner Klone. Jedoch ist ihre Anwendung auf größere Genome umstritten [103, 104].

Humangenomprojekt (HUGO): HUGO begann 1990 im Department of Energy und am National Institute of Health (USA) und ist ein gemeinsames, weltweites Forschungsvorhaben mit dem Ziel, das menschliche Genom in einem Zeitraum von 15 Jahren zu entschlüsseln. Dabei sollten bestehende Sequenzierverfahren verbessert, beschleunigt sowie durch wirtschaftliche Methoden ersetzt werden, aber auch alternative Sequenzanalysen sollten entwickelt werden. Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms wird sich erhofft, dass die Disposition bestimmter Erbkrankheiten besser eingeschätzt werden kann, um durch Prophylaxe deren Ausbruch zu verzögern beziehungsweise deren Verlauf abzumildern sowie die Wirksamkeit und Nebenwirkungen von neuen Medikamenten besser am Patienten abzuschätzen, die Ursache bestimmter Erbkrankheiten zu finden und Krankheiten durch die Reparatur der defekten Gene zu heilen. Neben dem menschlichen Genom sollten auch die Genome von Modellorganismen vollständig sequenziert werden. Alle Erkenntnisse sollten öffentlich zugänglich sein.

Innerhalb des HUGO-Projekt wurde das Genom von 5 Personen sequenziert, dabei zeigt sich, dass das Erbgut unterschiedlicher Menschen sich nur in 0,1% Basen unterscheidet, und der Unterschied oft nur im Austausch auf einer Base beruht. Auch ist die Zahl der Gene mit 20000-25000

viel kleiner als angenommen und macht weniger als 2% der Erbguts aus.

Neue Sequenzieransätze

Mikroelektrophorese: Bei der Sequenzierung durch Mikroelektrophorese wird die Miniaturisierung der Sanger-Methode angestrebt [105, 106], indem die DNS-Amplifikation, -Reinigung und -Sequenzierung auf einem Mikrochip durchgeführt werden sollen [107]. Der Vorteil der Miniaturisierung ist die fast 1000 fache Reduktion des Reaktionsvolumen verglichen mit gängigen Kapillarsystemen und damit auch eine Verringerung der Kosten [108] sowie der Tatsache, dass diese Technik weiterhin auf den Prinzipien der viele Male angewandten und deshalb sehr gut erprobten elektrophoretischen Sequenzierung basiert. Zudem sind auf Mikrochips Trennungen leicht parallelisierbar, schon 500 parallele Kanäle auf einem Chip wurden realisiert [109], und weisen, verglichen mit Kapillaren, deutlich bessere Detektionseigenschaften auf [110].

Sequenzierung durch Hybridisierung (SBH -sequencing by hybridization): Bei der Sequenzierung durch Hybridisierung [111, 112, 113, 114, 115] befindet sich eine vordefinierte Oligonukleotidmatrix, die alle verschiedenen Oktamersequenzen enthält, die sich durch Permutation der vier Basen herstellen lassen $4^8 = 65536$, auf einem Mikrochip mit einer Matrix von 65536 (4^8) Feldern. Auf diesem Mikrochip wird die genomische DNS dazugegeben, und die passenden Sequenzen hybridisieren mit den Oktamersequenzen. Die gebundenen Fragmente werden massenspektroskopisch oder mittels Interkalationsfarbstoffen und einer CCD-Kamera nachgewiesen. Anhand des Bindungsmusters auf dem Chip kann auf die Sequenz geschlossen werden, die kombinatorisch errechnet wird. Diese Methode erlaubt den Nachweis bestimmter Sequenzen im Erbgut, aber nicht deren Reihenfolge, was für den Einsatz für diagnostische Methoden ausreicht, aber die Sequenzanalyse erheblich einschränkt [111]. Erschwerend kommt hinzu, dass die verschiedenen Oktamere unterschiedliche Bindungseigenschaften besitzen, so dass nicht alle DNS-Sequenzen gleich gut binden und damit identifiziert werden können. Zwar können mit dieser Methode keine repetitiven Sequenzen entschlüsselt werden [116], jedoch wurde sie erfolgreich bei Genom-Resequenzierung sowie *de novo* Sequenzierung eingesetzt [117, 118, 119].

Einzelmolekülelektrophorese: Ein DNS-Strang wird elektrophoretisch durch einen α -Hemolysin Kanal gezogen, wodurch die Ionenleitfähigkeit des Kanals in Abhängigkeit von der gerade durchtretenden Base herabgesetzt wird. Diese Änderung in der Leitfähigkeit wird genutzt, um die DNS zu sequenzieren [120, 121].

Einzelmolekülsynthese: Hierbei wird der zu sequenzierende DNS-Strang Base für Base aufgebaut, und jedes aktuell eingebaute Nukleotid ist markiert und wird am Synthesort detektiert.

Vor dem Einbau einer weiteren Base wird der Marker entweder abgespalten [122] oder photozerstört [123].

Einzelmolekülhydrolyse: Bei der Einzelmolekülhydrolyse [124, 10, 125, 126, 127] wird das zu sequenzierende DNS-Molekül nicht aufgebaut, sondern abgebaut. Dabei wird ein an mindestens zwei Basen vollständig unterscheidbar markierter DNS-Strang durch eine Exonuklease abgebaut, und die freigesetzten Mononukleotide werden in der Reihenfolge detektiert, in der sie abgebaut wurden, was der Sequenzinformation des DNS-Moleküls entspricht.

Für die Einzelmolekülsequenzierung auf der Basis der Einzelmolekülhydrolyse ist es also notwendig, einen im Idealfall vollständig markierten DNS-Strang zu synthetisieren, diesen zu isolieren und zu positionieren, um exonukleolytisch abzubauen zu können, sowie alle Nukleotide auf Einzelmolekülniveau in der Reihenfolge ihrer Freisetzung vollständig nachzuweisen.

Eine Möglichkeit der Markierung der einzelnen Basen ist, diese erst nach der DNS-Synthese mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren [10, 128]. Dadurch würden die Farbstoffe die Synthese der DNS nicht stören. Jedoch wurde durch dieses Postlabeling nicht der notwendige 100%e Markierungsgrad erreicht. Dies wird erst durch das sogenannte Prelabeling möglich, in der die Triphosphat-Nukleotide bereits bei der DNS-Synthese einen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Bei künstlichen Sequenzen gelingt die Synthese mit natürlicher Polymerase wie dem Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I (Pol I) aus *Escherichia coli* [13, 14, 23, 129]. Für Wildtyp-Sequenzen werden mutierte Polymerasen eingesetzt [130, 131].

Beim exonukleolytischen Abbau wird das DNS-Molekül beginnend von einem Ende Base für Base abgebaut. Der Vorteil des exonukleolytischen Abbaus auf Einzelmolekülniveau ist, dass mehrere Enzyme nicht, wie es für den Parallelabbau mehrerer DNS-Stränge nötig wäre, in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit synchronisiert werden müssen. Auch ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt allein durch die Wechselzahl der Exonuklease gegeben, und die Länge der abzubauenen DNS ist nicht beschränkt.

Aufgrund des außergewöhnlichen guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bietet die Einzelmoleküldetektion in einer konfokalen Anordnung einen idealen Lösungsansatz für die Einzelmolekülsequenzierung [16]. Um die freiwerdenden Nukleotide vom DNS-Molekül zu trennen, wurde eine Sequenzierung in einem Flusssystem innerhalb von Mikrostrukturen angestrebt [132]. Der Nachteil von Mikrostrukturen ist neben erhöhten Hintergrund aufgrund von Wandreflexionen die Adhäsion der Nukleotide an den Wänden, wodurch ein Nukleotid ein anderes Überholen könnte.

2.2.5 Exonuklease III - ein DNS abbauendes Enzym

Brakmann und Löbermann zeigten, dass die Exonuklease III sich für den Abbau von DNS eignet, in der jedes Basenpaar mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist [15]. Die Exonuklease III wurde erstmals von Richardson und Kornberg [134, 133] untersucht. Sie spielt eine wichtige Rol-

	Exonuklease I	Exonuklease II	Exonuklease III
End-Gruppe: -OH	aktiv	aktiv	aktiv
End-Gruppe: -P	inaktiv	inaktiv	aktiv aufgrund Phosphatase-funktion
DNS-Struktur	ss-DNS	ss- und ds-DNS	ds-DNS
Ausmaß des Abbaus	bis zum terminierenden Dinukleotid	Komplett	etwa 40%-Abbau (beidseitig);
Art des Abbau	schrittweise, vom 3'-hydroxyl-Ende	schrittweise, vom 3'-hydroxyl-Ende	schrittweise, vom 3'-hydroxyl- bzw. 3'-phosphoryl-Ende
Produkt	Mono- und Dinukleotide mit 5'-phosphodiester Gruppe	5'-Mononukleotide	P _i , 5'-Mononukleotide, ssDNS

Tabelle 3: Vergleich der *E. coli* Exonukleasen I, II und III [133].

le in der Replikation, Rekombination und Reparatur der DNS. Exo III wird aus *Escherichia coli* (*E. coli*) gewonnen und ist ein monomeres, globuläres Protein mit einem molekularen Gewicht von 28000 g/mol [135] und einem Stokes-Radius von 2,29 nm [136]. Es hat folgende vier katalytischen Funktionen, 1) als 3'->5' Exodeoxyribonuklease spezifisch für doppelsträngige DNS, 2) als eine DNS 3'-Phosphatase, 3) es besitzt eine AP Endonukleaseaktivität und 4) eine RNase H-Aktivität [137, 138]. All diese Funktionen werden von einer einzelnen aktiven Stelle der Exo III vermittelt [136, 138]. Als Exodeoxyribonuklease baut die Exo III dsDNS von glatten Enden, Enden mit 5'-Überhang sowie innerhalb der dsDNS an Einschnitten (Nicks) ab [139]. Dabei werden vom 3'-Ende angefangen 5'-Mononukleotide freigesetzt, und es entsteht eine einzelsträngige DNS. Doppelsträngige DNS mit 3'-Überhängen mit einer Länge von mehr als 4 Basenpaaren, einzelsträngige DNS oder Nukleotide, die über Phosphorothioat-Bindungen verknüpft sind, werden nicht von der Exonuklease III abgebaut. Die Bindung des Enzyms an unspezifischen Sequenzen scheint nicht die DNS-Konformation zu beeinflussen [140, 141]. Die Exo III baut unterhalb von 20°C die dsDNS hoch prozessiv ab, bei höheren Temperaturen wird sie distributiver, wobei sich die Aktivität der Exo III zwischen 22°C und 46°C in Abständen von 6°C je verdoppelt. Ab einer Temperatur von 46°C, der Denaturierungstemperatur des Enzyms [142], spielt die Hitze-Inaktivierung eine immer größere Rolle bis ab 70°C das Enzym absolut inaktiv ist [142]. Es wurde gezeigt, dass bei niedrigen Temperaturen von 5°C die Exo III DNS binden kann, diese jedoch nicht abbaut, aber auch nicht davon

dissoziiert [143, 144]. Exo III hydrolysiert DNS mit einer sehr gleichförmigen Rate [145, 144], auch wenn die sekundäre Struktur einen Einfluss auf die Abbaurrate hat [133], und die Rate der Freilassung der einzelnen Mononukleotide variiert [146]. Bei höheren Temperaturen (37°C) baut Exo III nicht mehr prozessiv ab, da es vom Doppelstrang während des Abbaus in höherem Maße dissoziiert [147]. Da dsDNS zwei 3'-Enden besitzt, wird sie auch von beiden Seiten von der Exo III abgebaut. Deswegen entstehen neben den freigelassenen Mononukleotiden auch einzelsträngige DNS-Bereiche. Die beiden Einzelstränge der DNS können nach dem Abbau entweder über einen kurzen doppelsträngigen DNS-Bereich miteinander verbunden sein [133], oder sie haben sich voneinander getrennt, und sind etwa halb so lang wie die vorausgegangene doppelsträngige DNS, mit nur wenigen komplementären Basen zwischen ihnen [148]. Dabei baut die Exo III die DNS mit einer Geschwindigkeit von 13-17 Nukleotiden pro Sekunde ab [148]. Die Exo III kann keine kurzen Oligonukleotide hydrolysieren. Zum Abbau von dsDNS braucht Exo III Mg^{++} als Co-Faktor. Die Zugabe von 30% Glycerin in die Probe stabilisiert das Enzym und vermittelt die Denaturierung der DNS [149].

Im Vergleich zur Exo I und Exo II kann die Exo III aufgrund ihrer Phosphataseaktivität auch mit phosphorylierten 3'-Enden umgehen. Dabei wird die terminale Phosphatgruppe hydrolysiert, als Phosphomonoester freigesetzt und anstelle dafür eine 3'-OH-Gruppe eingebaut. Aufgrund ihrer RNase H-Aktivität kann die Exo III den RNS-Strang aus einem DNS-RNS-Hybriddoppelstrang entfernen. Exo III schneidet als AP Endonuklease Phosphodiester-Bindungen an depurinierten oder depyrimidierten Positionen und erzeugt dadurch basenfreie Desoxyribose-5'-Phosphat Termini [137].

3 Material und Methoden

3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Markierung von DNS-Molekülen (Abschnitt 3.5.1) wurden als Fluoreszenzfarbstoffe die Rhodaminderivate Rhodamin 110 (R110) und Tetramethylrhodamin (TMR) und zu der Klasse der Dicarbocyanine gehörendes Cyanin 5 (Cy5) gewählt, da sie spektral gut voneinander zu unterscheiden sind. Dabei ist das 5 fach negativ geladene Cy5 verglichen mit den Rhodaminen zwar sehr viel bleichempfindlicher, hat aber einen doppelt so großen Absorptionsquerschnitt. Daneben weist Cy5 neben Übergängen in den Triplettzustand auch eine photoinduzierte Cis-Trans-Isomerisierung auf [150]. Dabei erfolgt die Isomerisierung aus dem angeregten Singulettzustand [28], wobei das Molekülrückgrat des Farbstoffes einknickt. Das Cis-Isomer ist fluoreszenzaktiv und relaxiert nach kurzer Zeit (μs) strahlungslos, aber lichtinduziert aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand.

R110 und TMR sind für die spezifische Markierung einer bestimmten Nukleotidsorte verwendet worden. Dabei wurde in dieser Arbeit keine Beeinflussung der Fluoreszenzeigenschaft aufgrund dieser Bindung festgestellt. Dies gilt aber nicht für den Einbau in hochmarkierten DNS-Molekülen, da sich einerseits die Farbstoffe gegenseitig stark beeinflussen und andererseits der Kontakt mit dem bekannten Quencher Guanosin Fluoreszenzlebensdauer und -intensität der Farbstoffe stark verkürzt [151].

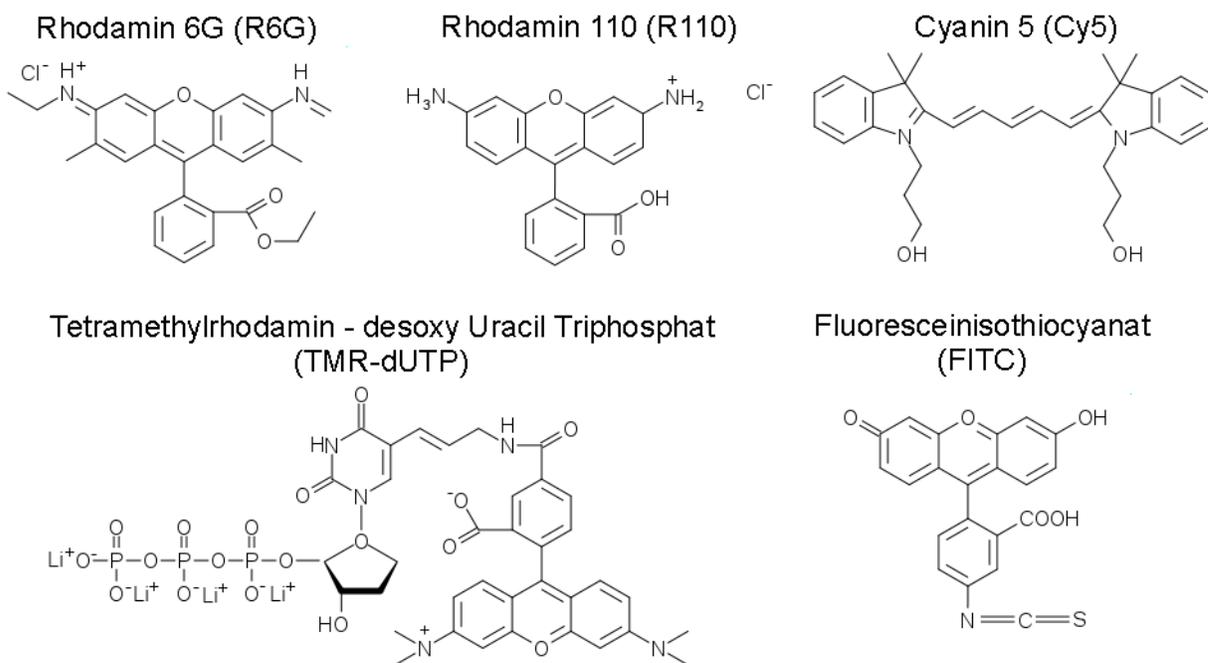


Abbildung 14: Strukturformeln der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen Rhodamin 6G (R6G) und dessen Derivate Rhodamin 110 (R110) und Tetramethylrhodamin an desoxyribose-Uracil-Triphosphat (TMR-dUTP) sowie von den Farbstoffen Cyanin 5 (Cy5) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC).

Farbstoff	D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$]	ϵ [$\times 10^3$ $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$]	Q (Wasser) [%]	MW [g/mol]	Absorption λ_{max} [nm]	Emission λ_{max} [nm]
R110	280 [42]	68 [152]	91 [153]	323 [154]	496 [152]	527 [152]
R110-dCTP	225 [155]		77 [155]	626		
R6G	280 [19]	116 [156]	95 [157]	479 [158]	497 [154]	523 [154]
TMR	280 [153]	95 [159]	45 [32]	467 [159]	542 [154]	566 [154]
TMR-dUTP	260 [11]			800 [11]		
Cy5	250 [28]	250 [160]	27 [160]	792 [160]	649 [152]	670 [152]
FITC	420 [161]	80 [123]	50 [123]	389,4 [162]	495 [162]	525 [162]

Tabelle 4: Charakteristische Daten verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe. (D - Diffusionskoeffizienten, ϵ - Extinktion, Q - Fluoreszenzquantenausbeute im Lösungsmittel Wasser, MW - Molekulargewicht, λ_{max} - maximale Absorptions- beziehungsweise Emissionswellenlänge)

Für FCS-Messungen mit evanescentem Feld wurde der Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet, da dieser negativ geladen ist und so Adsorption auf der ebenfalls negativ geladenen Deckglasoberfläche vermindert wird. FITC besitzt zwar eine hohe Quantenausbeute von fast 1, doch weist es eine geringe Photostabilität auf, wodurch es schnell bleicht. Aufgrund der Hydroxylgruppe ist seine Fluoreszenzintensität sehr pH-sensitiv.

Fluoreszenzfarbstoffe mit bekannten Diffusionskoeffizienten werden in der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie als Vergleichsproben und zur Charakterisierung des konfokalen Fluoreszenzmikroskops verwendet. Dabei wurde in dieser Arbeit je nach Laser eine R110-dCTP-, R6G- oder Cy5-Farbstofflösung als Standardprobe verwendet. Charakteristische Daten der verwendeten Farbstoffe sowie der markierten Nukleotide sind in Tabelle 4 aufgelistet. Neben Fluoreszenzfarbstoffen finden auch fluoreszenzmarkierte Latexkügelchen als Vergleichsprobe Verwendung. Diese tragen eine Vielzahl von Farbstoffmolekülen, weshalb sie sehr photostabil sind und auch bei schwacher Anregung stark fluoreszieren. Latexkügelchen gibt es in unterschiedlichsten Größen, Markierungen sowie Modifizierungen (Tabelle 5).

3.2 Konfokales Fluoreszenzrastermikroskopsystem

Fluoreszenzmessungen wurden an einem in der Arbeitsgruppe gebauten konfokalem Rastermikroskopsystem (Abbildung 15) durchgeführt. Dabei kamen für die Anregung der Fluoreszenzproben sowohl gepulste als auch Dauerstrichdiodenlaser bei verschiedenen Wellenlängen zum Einsatz (Tabelle 6).

Größe [nm]	D^* [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$]	λ_A [nm]	Firma	Produktnummer
32	14,34	470	Sigma	L5155
100	4,30	470	Sigma	L4905
100	4,30	520	Sigma	L5655
100	4,30	405/470/ 532/632	Molecular Probes	69B1-4
200	2,15	470/532	Molecular Probes	

* Bestimmt über Stoke-Einstein-Beziehung (Gleichung 34)

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Latexkügelchen. Alle Latexkügelchen von Sigma sind carboxyliert. Die Tetraspeck-Latexkügelchen von Molecular Probes (69B1-4) tragen vier verschiedenen Farbstofftypen. (D - Diffusionskonstante, λ_A - Anregungswellenlänge)

Wellenlänge	Typ	Firma	Bemerkung
470 nm	gepulst	Picoquant	LDH-P-C470, PDL 808, 40 MHz
488 nm	kontinuierlich	Laser 2000 / Novalux Protera	frequenzverdoppelter Diodenlaser
532 nm	kontinuierlich	CrystaLaser LC	GCL-005-L
633 nm	kontinuierlich	JDS Uniphase	Helium-Neon
635 nm	gepulst	Picoquant	LDH-P-635, PDL 808, 40 Mhz

Tabelle 6: Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Anregungslaser.

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Objektive. (NA - numerische Apertur)

Objektiv	Vergößerung	NA	Firma
Wasserimmersions-	60fach	1,2	Nikon
Ölimmersions-	100fach	1,4	Nikon

Mit Hilfe eines Laserstrahl-Kopplers (60 SMS, Schäfer & Kirchhoff, Deutschland) wird der Anregungsstrahl in ein Singlemode-Glasfaserkabel (Schäfer & Kirchhoff) eingekoppelt. Vor der Einkopplung in die Glasfaser (GF) passiert der Laserstrahl eine $\lambda/4$ - und $\lambda/2$ - Phasenplatte (Melles Griot), mit deren Hilfe die Polarisation des Laserlichtes eingestellt werden kann, sowie einen Magnetschalter (MS), der softwaregesteuert zum Ein- und Ausschalten der Laseranregung verwendet wird. Nach der Glasfaser wird zum Erzeugen von parallelen Strahlen ein Objektiv (O) ($4\times$, UPlan Apochromat, 0,16 NA, Olympus, Japan) verwendet, wobei sich das Glasfaserende im Brennpunkt des Objektivs befindet. Die nachfolgende Lochblende (LB) begrenzt den nun parallelen Laserstrahl senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Das Laserlicht wird über einen dichroitischen Spiegel (D) in die rückwärtige Apertur eines Mikroskopobjektivs (MO) eingekoppelt, welches das Laserlicht in die Probe fokussiert. Als Mikroskopobjektiv wurde je nach Experiment ein Wasserimmersions- oder Ölimmersionsobjektiv verwendet (Tabelle 7). Das Mikroskopobjektiv kann zur Fokuseinstellung mittels eines Piezo-Stellelementes (Pifoc, PI, Deutschland) im Bereich von $100\ \mu\text{m}$ in z-Richtung bewegt werden. Die Pifoc-Einheit besteht aus Piezoaktuatoren, die auch zur Bewegung des Probenhalters in x-y-Richtung verwendet werden. Dadurch ist es möglich, mittels Rastern eine Fluoreszenzaufnahme sowohl der Deckglasoberfläche in x-y-Richtung als auch senkrecht zur Deckglasoberfläche in x-z-Richtung jeweils mit den Ausmaßen von $100 \times 100\ \mu\text{m}$ aufzunehmen.

Das Fluoreszenzsignal wird wieder vom Mikroskopobjektiv eingesammelt und passiert aufgrund des Stokes Shifts den dichroitischen Spiegel. Je nach verwendeter Laserwellenlänge werden passende Sperr- beziehungsweise Kantenfilter verwendet, um diffus gestreutes sowie reflektiertes Laserlicht herauszufiltern, um ein möglichst gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Auch ist es möglich, das Fluoreszenzlicht mit Hilfe von Strahlenteilern (ST) in mehrere optische Pfade aufzutrennen, um so zum Beispiel das Fluoreszenzlicht in Abhängigkeit von der Wellenlänge oder der Polarisation zu detektieren.

Das parallele Strahlenbündel des Fluoreszenzlichts wird von achromatischen Sammellinsen mit einer Brennweite von 50 cm auf die aktive Fläche von Lawinenphotodioden (APD - *Avalanche Photo Diode*) fokussiert. Diese APDs (SPCM-AQR-14, Perkin-Elmer, USA) sind Silizium-Halbleiterdioden, die einzelne Photonen registrieren können. Ihre aktive Fläche besitzt einen Durchmesser von $175\ \mu\text{m}$ und dient gleichzeitig als Lochblende. Die hier verwendeten APDs besitzen eine relativ niedrige Dunkelzählrate von etwa 100 pro Sekunde und eine hohe Detektionseffizienz von bis zu 65%.

Zum Zählen der von den APDs detektierten Photonen wird eine Messkarte (Time-Harp, Picoquant, Deutschland) verwendet, die die Photonenankunftszeit sowohl absolut mit 25 nm Zeitauf-

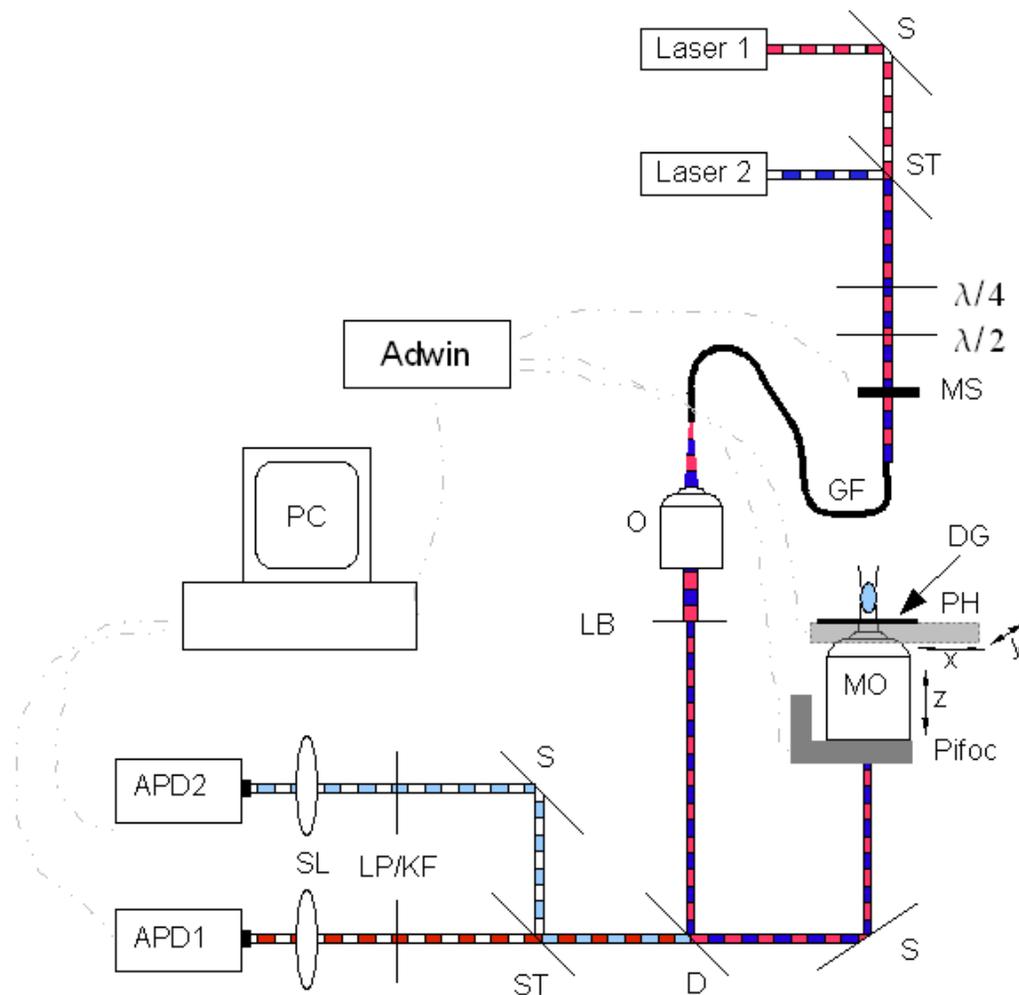


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Grundaufbaus des konfokalen Fluoreszenzrastermikroskopsystems am Beispiel einer gepulsten zwei-Laser-Anregung. S - Spiegel; ST - Strahlenteiler; MS - Magnetschalter; GF - Glasfaser; O - Objektiv; LB - Lochblende; D - Dichroit; MO - Mikroskopobjektiv; PH - Probenhalter; DG - Deckglas; LP/KF - Langpass- beziehungsweise Kantenfilter; SL - achromatische Sammellinse; APD - *avalanche photo diode*; Adwin - AdWin Light16 Gold;

lösung als auch relativ zum Laserpuls mit $12 \mu\text{s}$ Auflösung aufzeichnet. Dadurch ist es bei der Verwendung von gepulsten Lasern möglich, die Fluoreszenzlebenszeit von Fluoreszenzfarbstoffen zu bestimmen. Die Time-Harp-Karte hat eine Zeitauflösung von unter 40 ps sowie eine Totzeit von unter 350 ns [163].

Vorwiegend als Steuereinheit wurde die Karte AdWin Light16 Gold (AdWin) verwendet. Sie besitzt einen eigenen Prozessor und ist so in der Lage, autonom in Echtzeit zu arbeiten. Gesteuert werden damit der Magnetschalter, die APDs, aber auch die Piezoaktuatoren zur Steuerung des Objektivs und des Probenhalters. Programmiert wird die Karte über AdBasic, eine Basic-basierte Sprache. Zur Kontrolle beziehungsweise für die Einstellungen des Setups wurde Labview 6.1 (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench) verwendet.

3.3 Evaneszente Anregung

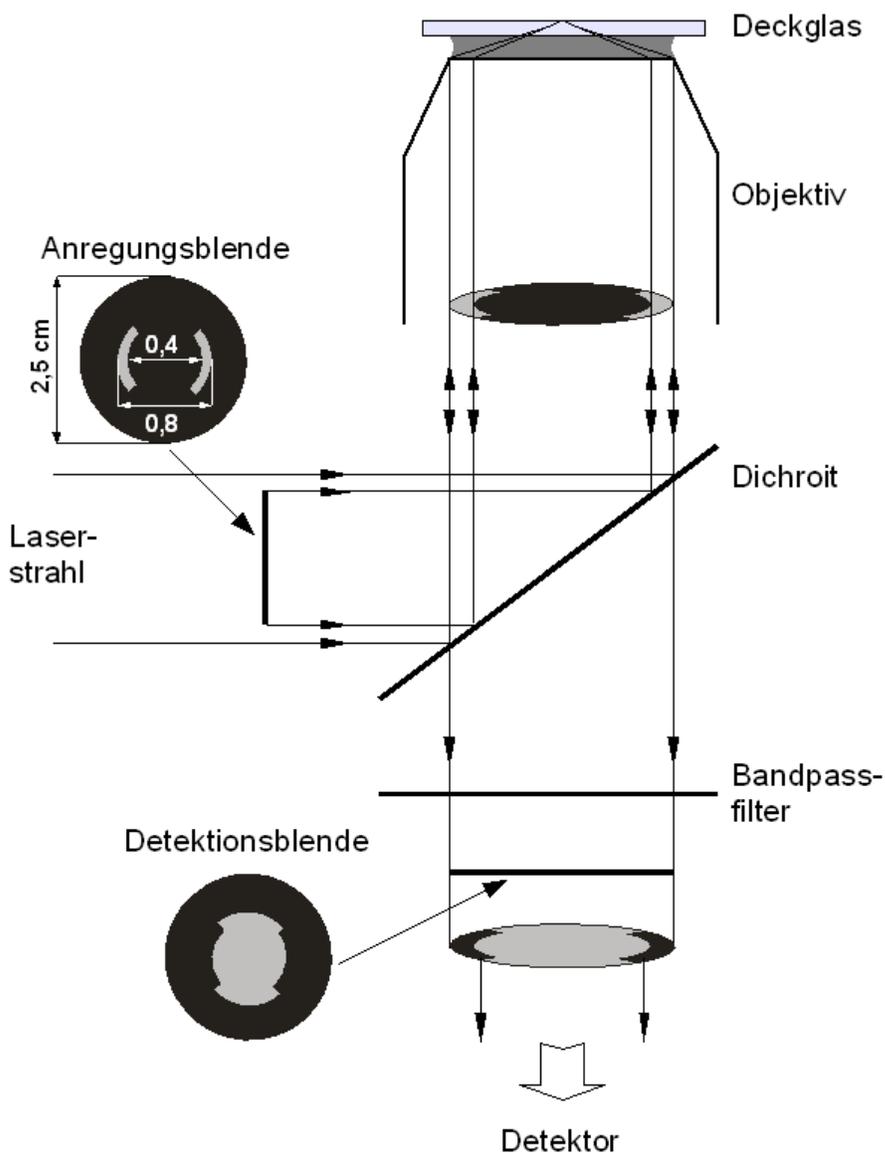
Nachfolgend soll der Grundaufbau für ein in dieser Arbeit entwickeltes Objektiv-Typ TIRF-Mikroskop beschrieben werden, der es ermöglicht, schnell zwischen einer konfokalen und einer evaneszenten Anregung zu wechseln. Das evaneszente Feld wird dabei nicht, wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, durch das seitliche Einkoppeln des Anregungslichts in das Objektiv erzeugt, sondern indem mittels einer speziellen Blende der Teil des Anregungslichts blockiert wird, der nicht an der Deckglasoberfläche total reflektiert wird, so dass nur der äußere Bereich des Anregungslaserstrahls durchgelassen wird. Ein ähnlicher Aufbau für ein TIRF-Mikroskop ist schon in [49] beschrieben. Doch im Gegensatz zu diesem ist hier auch im Detektionsstrahlengang eine strukturierte Blende platziert (Abbildung 16).

Dabei lässt die Blende im Anregungsstrahlengang nur einen Teil des für die Totalreflektion nötigen äußeren Bereich des Laserstrahls passieren. Die Blende in Detektionsstrahlengang blockiert genau diesen von der vorherigen Blende durchgelassenen Bereich und lässt den Rest des Fluoreszenzstrahlengangs passieren. Dieser Aufbau soll zu einem höheren Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, emittieren Fluoreszenzfarbstoffe an Grenzflächen zwischen zwei optischen unterschiedlich dichten Medien je nach Lage ihres Dipols inhomogen. Ein Großteil des emittierten Lichtes wird seitlich in das Objektiv eingespeist, wohin auch das Anregungslicht aufgrund der Totalreflektion zurückreflektiert wird. Durch die Kombination der beiden Blenden im Anregungs- und Detektionsstrahlengang soll das Fluoreszenzsignal mit einem möglichst geringen Anteil des zurückreflektierenden Anregungslichts detektiert werden.

3.4 Einzelmoleküldetektion und -identifikation

Im Hinblick auf die Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung wurden zwei Basentypen mit den Fluoreszenzfarbstoffen R110 und TMR markiert. Die gleichzeitige Detektion und Identifikation dieser beiden Farbstoffmoleküle stellt eine große Herausforderung dar, da durch die geringe Anregung des TMR-Farbstoffes durch den 488 nm Laser der zusätzliche Einsatz des 532 nm Lasers vonnöten ist. Jedoch liegt die Laserlinie des 532 nm Lasers in der Nähe des Emissionsmaximums von R110 (Abbildung 18), was zwangsläufig aufgrund der Verwendung der notwendigen Blockfilter für den 532 nm Laser zu einer verringerten Detektion der Fluoreszenz des R110-Farbstoffes führt.

Die beiden Laserstrahlen des 488 nm und 532 nm cw-Laser werden über einen dichroitischen Spiegel (z488_532bs, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland), der beide Laserwellenlängen reflektiert, in ein Wasserimmersionsobjektiv eingekoppelt. Mit Hilfe des Langpassfilters LP500 und des Notchfilters DNPF532-25 (AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) wird das reflektierte Licht vom 488 nm beziehungsweise vom 532 nm Laser geblockt. Das Fluoreszenzsignal wird in Abhängigkeit der Wellenlänge mit Hilfe von Strahlenteilern auf drei APDs aufgetrennt. Dabei detektiert APD 1 das Fluoreszenzsignal oberhalb von 645 nm, APD 2 zwischen 500 und 550 nm und APD 3 zwischen 550 und 645 nm (Abbildung 18). Zu beachten ist dabei, dass aufgrund des

**Abbildung 16:**

Modifikation des Fluoreszenzmikroskopsystems für evaneszente Anregung. Die Blende im Anregungsstrahlengang lässt nur den äußeren Bereich des Laserstrahls passieren, der durch die Fokussierung durch das Objektiv an der Deckglasoberfläche totalreflektiert wird. Dadurch entsteht ausgehend von der Deckglasoberfläche ein evaneszentes Feld Richtung Messlösung. Die Blende im Detektionsstrahlengang soll neben dem Bandpassfilter das zurückreflektierte Laserlicht für ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnisses blockieren.

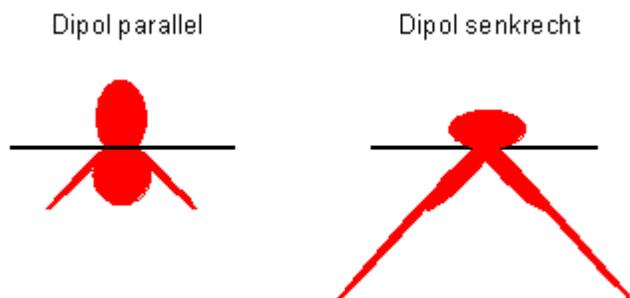


Abbildung 17: Fluoreszenzemission eines Fluoreszenzfarbstoffes an der Kontaktfläche zweier unterschiedlich optisch dichten Medien [164]. Die Fluoreszenzemission ist unter anderem abhängig von der Dipolorientierung des Farbstoffes.

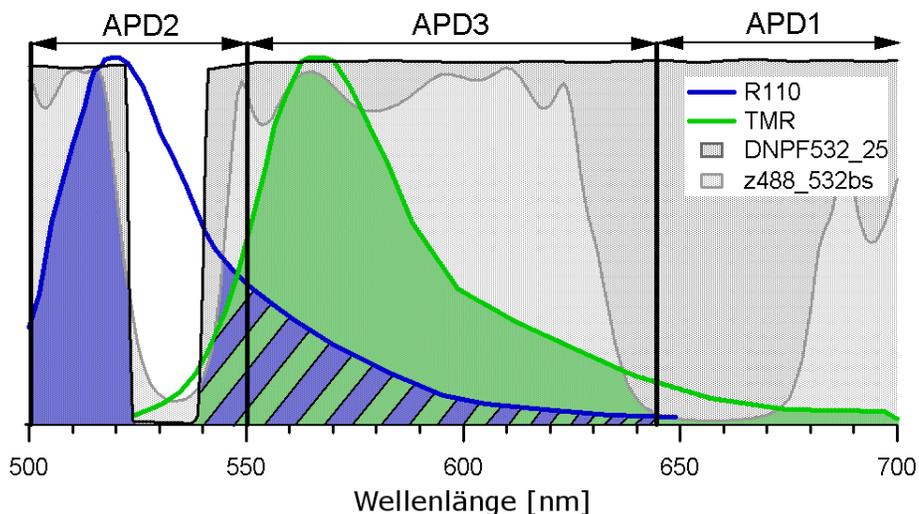


Abbildung 18: Absorptions- und Emissionsspektren von R110 (blaue Kurve) und TMR (grüne Kurve), die Transmissionsspektren des dichroitischen Spiegels z488_532bs und des Notchfilters DNPF532-25, sowie die Detektionsbereiche der drei Detektoren. Die ausgefüllten Flächen unterhalb der Emissionskurven entsprechen den detektierbaren Anteilen der Fluoreszenz der beiden Farbstoffe.

Notchfilters DNPF532-25 ein großer Wellenlängenbereich mit einer spektralen Breite von 25 nm in APD2 nicht detektiert werden kann.

Für die Detektion von Fluoreszenzereignissen wurde eine Prozedur (Nic_SingleMoleculeDetection_v4) in Igor Pro 5.0 entwickelt. Diese Prozedur besteht aus mehreren Unterprozeduren, die nachfolgend mit ihrer jeweiligen Funktion vorgestellt werden. Die Bezeichnung *wave* in Igor Pro 5.0 stellt dabei ein Objekt dar, in der die Messdaten beziehungsweise allgemein große Zahlenreihen gespeichert werden:

Load_t3r(): Mit dieser Prozedur werden die von der TimeHarp-Karte aufgenommenen Photondaten (t3r-Dateien) in Igor Pro 5.0 eingeladen. Dabei werden für jeden Detektor (x) die aufsummierten Ankunftszeiten der einzelnen detektierten Photonen in eine *wave* (*tt-apdx*) geschrieben.

atd_summe(): Hier werden die einzelnen *waves* (*tt_apdx*) mit den Photondaten der jeweiligen Detektoren in eine gemeinsame *wave* (*int_atd_sum*) zusammengefasst. In einer zweiten neuen *wave* (*APDnr*) wird für jedes Photon der Detektor, der dieses Photon registriert hat, notiert. Aus den Ankunftszeiten der einzelnen Photonen werden die Zeiten zwischen aufeinander folgenden Photonen $\Delta t_{\text{Photonen}}$ bestimmt und in die *wave* *atd_summe* geschrieben.

smoothing_lee("atd_sum"): Die *wave* *atd_summe* wird durch einen Lee-Filter nach [74] geglättet (siehe Abschnitt 2.1.5).

start_end(schwelle_zeit, schwelle_photonen): Diese Prozedur sucht in der geglätteten *atd_summe* nach Einzelmolekülereignissen. Dabei werden jeweils in einer *wave* der Startpunkt (*w_start*), Endpunkt (*w_ende*) und Dauer (*w_delta_t*) eines Ereignisses notiert. Für die Detektion eines Ereignisses müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: 1) der Zeitabstand zwischen zwei aufeinander folgenden Photonen muss unterhalb einer vorher festgelegten Schwelle *Schwelle_{Zeit}* liegen, und 2) die Photonenzahl eines Ereignisses muss oberhalb einer bestimmten Mindestphotonenzahl *Schwelle_{Photonen}* liegen.

photonen(schwelle_zeit): Hier werden für jedes Einzelmolekülereignis die Gesamtphotonenzahl (*w_photonen_all*) sowie die Verteilung der Photonen auf die einzelnen Detektoren (*w_photonen_x*) bestimmt.

auswertung(): Diese Prozedur fasst die Ergebnisse eines Einzelmolekülexperiments in der *wave w_SMD* zusammen. So wird die Anzahl der Ereignisse pro Messung beziehungsweise Zeiteinheit, die durchschnittliche Dauer sowie die durchschnittliche Photonenzahl mit maximalen und minimalen Wert bestimmt. Zudem sind in *w-SMD* die beiden verwendeten Schwellen *Schwelle_{Zeit}* und *Schwelle_{Photonen}* protokolliert.

Für die Identifikation von einzelnen Farbstoffmolekülen in einem mehrkomponentigen System wurde wie folgt verfahren (siehe Abschnitt 2.1.5): Die beteiligten Komponenten (R110-dCTP und TMR-dUTP (=Fluorored)) wurden zunächst einzeln gemessen und die Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(b|m_i)$ anhand der unterschiedlichen Verteilung der Fluoreszenzphotonen auf die Detektoren mit der Gleichung 52 bestimmt. Mit Hilfe der Gleichung 53 wurde damit das Erkennungsmuster generiert, in dem die Wahrscheinlichkeiten der beteiligten Farbstoffe für jedes detektierte Photon abgelesen werden kann. Mit dem Erkennungsmuster und der Gleichung 54 ließ sich so die Gesamtwahrscheinlichkeit $P_L(m_i)$ eines Ereignisses für einen Farbstoff Photon für Photon berechnen.

3.5 DNS-Proben

Die Fluoreszenzmarkierung der DNS sowie deren Immobilisierung auf Deckglas wurden von Dr. Katrin Anhalt in der Fachgruppe von PD Dr. Susanne Brakmann an der Universität Leipzig durchgeführt. Der nachfolgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über diese von mir untersuchten Proben geben.

Als Ausgangs-DNS diente das Gen 1 Fragment der Bakteriophage T7, welches mittels PCR vervielfältigt und terminal mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie R6G oder Cy5 markiert und/oder für die Immobilisierung mit einer Aminogruppe unter Verwendung entsprechender Primer (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) funktionalisiert wurde (Abbildung 19).

TAUP 205 CAGGAAACAGCTATGA CQATGATTAC GCCAAGCTTG GTACCGAGCT
 251 CGGATCCACT AGTAACGGCC GCCAGTGTGC TGGAAATCGG CTTGGCGTTA
 301 GTGATGGTGA TGGTGATGCG GCAACGCGAA GTCCGACTCT AAGATGTAC
 351 GGAGGTTCAA GTTACTTTA GCGCGAAGTG CTGGCATTIT GTCCAATTGA
 401 GACTCGTGCA ACTGGTCAGC GAACTGTGCG TAGAAATCAG CCAGTACATC
 451 ACAAGACTCA TATGTGTCAA CCATGTTTT GCGCACTGCT TTGAACAGGT
 501 TCGCAGCGTC AGCCGGAATG GTACC GAAGG AGTCGTGAAT CAGTGCAAAA
 551 GATTGGAITC CGTACTTCTC GTGTGCCACACTACAGTCT TACGAAGGTG
 601 GCTACCGTCT TGGCTGTGA CAAAGTTAGG AGCGATACCA GACTCCTGTT

TAL O2 651 TGTGTGCATC AATCTCGCTA TCTTTGTGG TGTTAATGGT AGGCTGTAAG
 701 CGGAACGTAC CGAGGAACAT CAGGTTCAA GCGCTCTGAA TAGGCTTCTT
 751 GTATTCTGC CACACAGGA AACCATCAGG AGTTACCCAA TGCACAGCGC
 801 AACGCTTGC AAGAATCTCT CCAGTCTTCT TATCTTTGAC CTCAGCAGCC
 851 AGCAGCTTAG CAGCAGACTT AAGCCAAGTT CATTGCTTCAA CCGCAGCTAC
 901 CACCGTCA CG CTCACAGATT CCAAATCAG CTTAGCCATG TATCCAGCAG
 951 CCTGATTCGG CTGAGTGAAC ATCAGACCCCT TGCCGGAATC AATAGCTGGC
 1001 TGAATGTAT CTTCCAGCAC TTGTGACGG AAGCCGAACCT CTTTGGACCC
 1051 GTAAGCCAGC GTCATGACTG AAGCCTTAGT CACACTGCGA GTAACCCGCT
 1101 AAGCCAGCCA TTGACCAAGCC AGTGCCTTAG TGCCAGCCTT GACTTTCTCA
 1151 GAGATTTAC CAGTGTCTC ATCGGTACAG GTAACACTT CTTTCTCGGT
 1201 CCCATTGATT GCGTCTGCTT GTAGAACTCT GTTACTTTT TAGCAACAA
 1251 TCCCCTAGAT GTCCCTGAACG GTTTCACTAG GAAGCAAATT AACCCGCGA
 1301 CCACCTACCT CATCTCGGAG CATCGCGGAG AAGTGCTGGA TGCAGAGCA
 1351 AGACCCGTCA AACGCCAGCG GAAAGGAGCA GTTATAGCTC AGGCCGTGGT
 1401 GCTGTACCC AGCGTACTCA AAGCAGAACG CAAGGAAGCA GAACGGAGAA
 1451 TCTTGCTCAG CCCAACAAGT GTTCTCCAGT GGAGACTTAG CGCAAGCCAT
 1501 GATGTTCTCG TGGTTTTCT CAATGAACCT GATGCGCTCA GGGAACGGAA
 1551 CCTATCGAC ACCCGCACAG TTTGACCCGT GGATTTTCA GCGAGTAA
 1601 CCTTCTTAC CGATTTGTTT ACCTTTCGCCAGCGTAAGCA GTCCCTTGGT
 1651 CATATCGTTA CCTTGCGGGT TGAACATTGA CACAGCGTAA ACACGACCGC

1701 GCCAGTCCAT GTTGTAAGGG AACAGATGG CCTTATGGTT AGCAAACTTA
 1751 TTGGCTTGCT CAAGCATGAA CTCGAAGGCTG ATACGGCCGAG ACTTTCGAGC
 1801 CTTGTCCCTG CGGTACACAG CAGCGGCAGC ACGTTTCCAC GCGGTGAGAG
 1851 CCTCAGGATT CATGTGATG TCTTCCGGTT TCATCGGGAG TTCTTACCGC
 1901 TCAATCGCAG GGATGTCCTC GACCAGCAAA TGCTTCCAAT TGGTATTAC
 1951 GTTGGCGACC GCTAGGACTT TCTTGTGAT TTTCCATGCG GTGTTTTGGG
 2001 CAATGTTAAT CGCTTTGTAC ACCTCAGGCA TGTAAACGTC TTCGTAGCGC
 2051 ATCAGTCTT TCTTACTGTG AGTACGACC AGCCAGCAGG GACGAGGACC
 2101 GTTAGCCCAA TAGCCACCAC CAGTAATGCC AGTCCACGGC TTAGGAGGAA
 2151 CTACGCAAGG TTGGAAATC GGAGAGATG C CAGCCAGCGC ACCTGCACGG
 2201 GTTGCATAG CCTCAGCGTA TTCAGGTGCG AGTTCGATG TCTCAGAGTC
 2251 TTGACCTACT ACGCCAGCAT TTTGCGGGT TAAGTAAACC ATTCCGGTTG
 2301 ACTCAATGAG CATCTCGATG CAGCGTACTC CTACATGAAT AGAGCTTCC
 2351 TTATGCCAG AAGACCAGCG CTCGCCACCG AGTAGACCCCT TAGAGAGCAT
 2401 GTCAGCCTCG ACAACTTGCA TAAATGCTTT CTTGTAGACG TGCCCTACGC
 2451 GCTTGTGAG TTGTCTCTCA ACGTTTTTCT TGAAGTGCTT AGCTTCAAAG
 2501 TCAGGATAC GACCGAAGCG AGCCTCGTCC TCAATGGCCC GACCGATTGC
 2551 GCTTGCTACA GCCTGAACGG TTGATTGTC AGCACTGGT TAGGCAAGCCA
 2601 GAGTGGTCTT AATGTTGATG TACGCTACCG CTTCCGGCTT GATTTCTGTC
 2651 AGGAACTGGA AGGCTGTCGG GCGCTTGGCC CGCTTAGGCTT TCACCTCTCC
 2701 AAACCAGTCC TTGATGCGTG CAATCATCTT AGGGAGTAGG GTAGTGATGA
 2751 GAGGCTTGGC GGCAGCGTTA TCCGCAACCT CACCAGCTTT AAGTTGACCG
 2801 TCAAACATCT TGCGGAAGCG TGCTTCAACC ATCTCGTAAG ACTCATGCTC
 2851 AAGGGCCAAC TGTTCCGGAG CTAACCGCTC ACCGTAATGG TCAGCCAGAG
 2901 TGTTGAACGG GATAGCAGCC AGTTCGATG CAGAGAAAGTC GTTCTTAGCG
 2951 ATGTTAATCG TGTTCAATTA GTGCTCTTC CAGTTAGTAA ATCCGGGATC
 3001 GAATTCGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC CGCTCACAAT TCACACATT
 3051 ATACGA GCCG ATGATTAATT GTCAAAAGCC GAATTCTGCA GATATCCATC
 3101 ACACTGGCGG CCGCTCGAGC ATGCATCTAG AGGCCCCAAT TCGCCCTATA

TAL O 3151 GTGAGTCGTA TTACAATTCA CTGGCCGTGC TTTTAC

Abbildung 19: Sequenz des Gen 1 Fragments der Bakteriophage T7. Aus diesem Fragment wurde über eine Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) die unterschiedlich langen DNS-Moleküle gewonnen. Dabei wurde neben den Startprimer TAUP (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') für die 500 bp DNS der Endprimer TALO2 (5'-CTACCATTAACACCAAC-3') und für die 3000 bp DNS der Endprimer TALO (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') verwendet.

3.5.1 Markierung der DNS

Der Einbau der fluoreszenzmarkierten Nukleotide erfolgte durch Primerverlängerung (*primer extension*). Die exakte Herstellung der hochmarkierten DNS ist in [14, 13] beschrieben. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden zwei Rhodaminderivate verwendet, R110 gebunden an Cytosin (R110-dCTP, Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland) und TMR gebunden an Uracil (TMR-dUTP, FluororedTM, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), welches ein Analogon zu Thymin darstellt. Für die Trennung von nicht eingebauten markierten Nukleotiden wurde eine Gelelektrophorese mit 0,8% Agarosegel verwendet. Das Produkt wurde anschließend nach dem Protokoll von Földes-Papp [23] gereinigt.

Als Ausgangsmaterial für die Primerverlängerung wurde eine am 5'-Ende des einen Stranges mit Cy5 markierte DNS verwendet. Die markierten Nukleotide werden während der Primerverlängerung in den Gegenstrang eingebaut und ersetzen alle entsprechenden natürlichen Nukleotide.

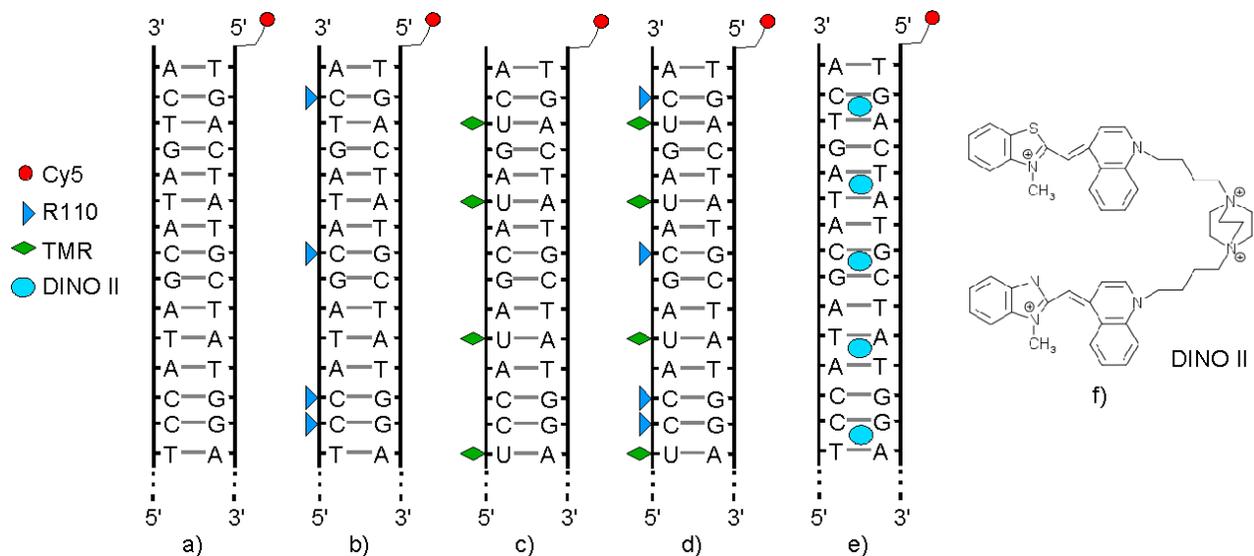


Abbildung 20: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung von doppelsträngiger DNS. Alle DNS-Proben trugen am 5'-Ende des einen Einzelstranges den Farbstoff Cy5. Die kovalent mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Nukleotiden wurden in Zuge der Primerverlängerung in den Komplementärstrang eingebaut, wo sie als Basenanaloge die entsprechenden natürlichen Basen ersetzen. **a)** native DNS, **b)** einfach kovalent mit R110-dCTP markierte DNS, **c)** einfach kovalent mit TMR-dUTP markierte DNS, **d)** zweifach kovalent mit R110-dCTP und TMR-dUTP markierte DNS, **e)** mit dem interkalierenden Farbstoff DINO II markierte DNS und **f)** Strukturformel von DINO II.

Je nach Kombination der eingesetzten natürlichen und fluoreszenzmarkierten Nukleotide werden dabei unterschiedlich markierte DNS-Moleküle erhalten. Folgende vier Kombinationen von mit Cy5 markierten DNS-Proben wurden untersucht (Abbildung 20): **a)** native DNS, die keinen zusätzlichen Farbstoff trägt, **b)** einfach kovalent markierte DNS, in der in einem Strang alle Cytosine mit R110 markiert sind, **c)** einfach kovalent markierte DNS, in der in einem Strang alle Thymine durch TMR-dUTP ersetzt sind, und **d)** zweifach kovalent markierte DNS, in der in einem Strang alle Cytosine und alle Thymine/Uracile mit R110 beziehungsweise TMR markiert sind. Wenn von einer Gleichverteilung der vier Nukleotidarten in der DNS ausgegangen wird, sind bei der einfach kovalent markierten DNS-Probe 25 % und bei der zweifach kovalent markierten DNS-Probe 50% der Nukleotide des einen Stranges mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Desweiteren wurde ein Teil der DNS-Proben mit dem interkalierenden Farbstoff DINO II (Atto-Tec GmbH, Siegen, Deutschland) markiert (Abbildung 20 e). Interkalierende Farbstoffe lagern sich in die doppelsträngigen Bereiche der DNS ein, wodurch deren Fluoreszenzintensität um ein Vielfaches steigt. Dabei ist die genaue Bindung an der DNS bisher noch ungeklärt. DINO II besteht aus zwei symmetrisch miteinander verbundene Farbstoffen (Abbildung 20 f). Es hat ein Molekulargewicht von 1312 g/mol, ist vierfach positiv geladen, und sein Absorptionsmaximum liegt bei 513 nm [165]. Bei der Markierung der DNS mit DINO II wurde ein Verhältnis von Substrat zu Farbstoffmolekül gewählt, bei dem das DNS-Molekül mindestens ein DINO II-Molekül pro Persistenzlänge (150 Basenpaare) trägt.

3.5.2 Immobilisierung hochmarkierter DNS

Die Immobilisierung der DNS auf Deckglas erfolgte nach der von Kusnezow [166] beschriebenen Prozedur. Folgende Schritte waren nötig: Reinigung der Deckgläser (Roth, Karlsruhe, Deutschland), Silanisierung mit MTPS (3-mercaptopropyl)trimethoxy-silane) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen Deutschland), Zugabe des Crosslinkers LC-SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxy-(6-amido-caproate)) (Perbio Science, Bonn, Deutschland), Zugabe der aminofunktionalisierten DNS und anschließendes Waschen der Proben (Abbildung 21 a). Die Proben wurden trocken, luftdicht, sowie dunkel gelagert.

Folgend das genaue Protokoll von Dr. Katrin Anhalt für die Immobilisierung der DNS-Moleküle auf der Deckglasoberfläche:

1. 5min unvergällter Ethanol
2. 1h 10% NaOH
3. 15min 10% NaOH Ultraschall
4. 4 x 5min Aqua destillatum (A. dest.)
5. 2 x 5min unvergällter Ethanol
6. trocknen
7. 1h 1% MTPS in 10mM CH₃COOH in unvergälltem Ethanol
8. 15min 1% MTPS in 10mM CH₃COOH in unvergälltem Ethanol im Ultraschallbad
9. 5min 16mM CH₃COOH in unvergälltem Ethanol
10. mit Pressluft trocknen
11. im Exsikator lagern (wenn nötig)
12. 20µl 200mM LC-SMCC-Stammlösung + 180µl DMF (trocken gemischt)
13. je 25µl auf Deckgläschen geben und mit gewaschenen Deckgläschen (22x22mm) abdecken
14. mit Fixogum versiegeln, 3h bei Raumtemperatur
15. Fixogum abziehen und kleine Deckgläschen entfernen
16. Deckgläschen 2 x 5min in DMF und 2 x 5min in unvergälltem Ethanol waschen
17. mit Pressluft trocknen und im Exsikator lagern bis zur Immobilisierung

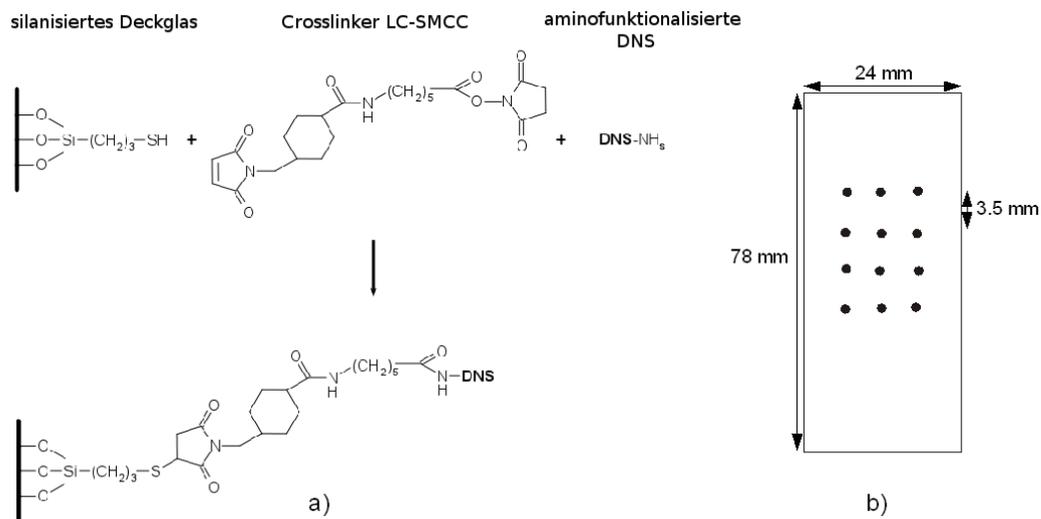


Abbildung 21: a) Schemata der Immobilisierung von DNS auf einer Deckglasoberfläche. Die aminofunktionalisierte DNS wird über dem Crosslinker LC-SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxy-(6-amido-caproate) auf der silanisierten Deckglasoberfläche immobilisiert. b) Skizze eines Deckglases mit der Position der punktweise aufgetragenen DNS.

Die DNS wurde anfänglich punktweise auf das Deckglas gegeben, wie in Abbildung 21 b) gezeigt. Dies erlaubte es, verschiedene DNS-Proben auf einem Deckglas unterzubringen. Bei späteren Proben wurde auch über die ganze Fläche des Deckglases die DNS-Lösung verteilt, wobei während des Immobilisierungsprozesses die Lösung auf den Deckgläsern luftdicht verschlossen wurde, um Verdunstungseffekte zu vermeiden.

3.5.3 Exonukleolytischer Abbau

DNS in Lösung

Der exonukleolytische Abbau der DNS in Lösung wurde auf zwei Arten durchgeführt. Zum einen wurde der Abbau direkt mit dem konfokalen Mikroskopsystem (Abschnitt 3.2) verfolgt, indem 4,5 µl Exo III Reaktionspuffer (Tris-HCl, 66 mM, pH 8,0; MgCl₂, 0,66 mM) mit der markierten DNS als Tropfen auf ein Deckglas gegeben und dieser mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop gemessen wurde. Zur Vermeidung von Verdunstung befand sich dabei das Deckglas mit dem DNS-Tropfen in einer Feuchtkammer. Der exonukleolytische Abbau wurde durch die Zugabe von 0,5 µl Exonuklease III mit einer Konzentration von 5 u/µl (Exo III, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) bei laufender Messung gestartet.

Zum anderen wurde der Abbau nicht direkt verfolgt, sondern Abstoppproben von Dr. Katrin Anhalt an der Universität Leipzig hergestellt, in der die DNS von der Exo III unterschiedlich weit abgebaut wurde (Abbildung 22). Dabei wurde die DNS in Exo III Reaktionspuffer mit einem Gesamtvolumen von 200 µl gemischt. Der exonukleolytische Abbau wurde durch die Zugabe von

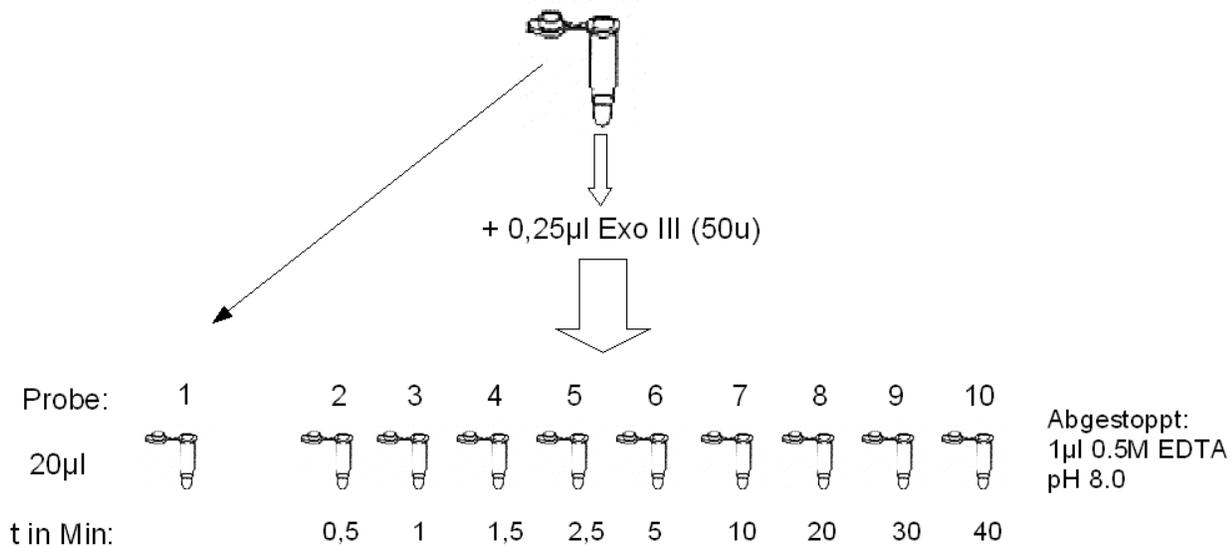


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Herstellung von DNS-Abstoppproben. Von einer 200 µl DNS-Lösung wurden 20 µl entfernt. In die restliche Lösung wurde zum Starten des exonukleolytischen Abbaus 0,25 µl Exo III in einer Konzentration von 50 u (units) dazupipetiert. Nach 0,5, 1, 1,5, 2,5, 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten wurden je 20 µl aus der Reaktionslösung entnommen und der Abbauprozess durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Exo III (50 u) bei Raumtemperatur (24°C) gestartet. Es wurden je 20 µl der DNS Lösung vor der Enzymzugabe und 0,5, 1, 1,5, 2,5, 5, 10, 20, 30 sowie 40 Minuten nach der Enzymzugabe entnommen und die Enzymfunktion durch Zugabe von 1 µl Ethylendiamintetraacetat (EDTA, 0,5 M) gestoppt. Die DNS-Abstoppproben wurden anschließend im Dunkeln bei 4°C gelagert. Auch hier wurden die FCS-Messungen der Abstoppproben in einer Feuchtkammer mit Hilfe des konfokalen Fluoreszenzmikroskops durchgeführt.

Immobilisierte DNS

Durch die Immobilisierung der DNS auf Standard-Deckgläser (Abbildung 21 b), sind diese Proben für Messungen mit dem konfokalen Fluoreszenzrastermikroskop (Abschnitt 3.2) geeignet. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wurden die Bereiche mit immobilisierter DNS lokalisiert und durch Scannen der Oberfläche ein Fluoreszenzbild (max. 100 x 100 µm) aufgenommen.

Für den exonukleolytischen Abbau der immobilisierten DNS wurden 3 µl Exo III Reaktionspuffer (Tris-HCl, 66 mM, pH 8,0; MgCl₂, 0,66 mM) auf das gewünschte Areal des Deckglases gegeben. Die FCS-Messungen erfolgten 40 µm über der Deckglasoberfläche. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 µl Exo III gestartet. Während der gesamten Messzeit befand sich die Probe in einer Feuchtkammer, um eine Verdunstung der Reaktionslösung zu verhindern. Neben der FCS-Messung während der Reaktion wurden sowohl vor als auch nach dem exonukleolytischen Abbau Fluoreszenzbilder der Oberfläche aufgenommen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Das konfokale Anregungsvolumen

Mit dem Wissen über der Größe des konfokalen Anregungsvolumens ist es mittels der Fluoreszenz-korrelationspektroskopie möglich, Konzentration, Diffusionskonstanten sowie weitere Parameter von beobachteten Moleküle zu bestimmen. In diesen Abschnitt soll der Einfluss der in dieser Arbeit verwendeten Öl- beziehungsweise Wasserimmersionsobjektiv sowie der Laserwellenlänge auf das Beobachtungsvolumen untersucht werden.

Vergleich Öl- und Wasserimmersionsobjektiv

Zur Visualisierung des konfokalen Volumenelements wurden Fluoreszenzaufnahmen von in 0,25 %igem Agarosegel eingebetteten 100 nm Latexkügelchen (L4905, Sigma) aufgenommen. Da die Größe der Latexkügelchen unterhalb des Auflösungsvermögens liegt, können sie als Punktlichtquelle angesehen werden [167]. Die Konzentration der Agarose wurde so gewählt, dass einerseits die Latexkügelchen keine Eigenbewegung mehr aufweisen und andererseits der Brechungsindex des Agarosegels mit dem des Lösungsmittels Wasser vergleichbar bleibt. Im Gegensatz zum Antrocknen einer Lösung mit Latexkügelchen auf einem Deckglas werden durch das Einbetten Wechselwirkungen mit der Deckglasoberfläche vermieden, und eine Bestimmung des konfokalen Anregungsvolumens in Abhängigkeit der Probertiefe ist möglich. Die auf einem Deckglas befindlichen Agarosegelproben wurde mit einem 488 nm cw-Laser bei einer Anregungsleistung von 10 nW in xz-Richtung abgerastert, wodurch gleichzeitig anhand der Fluoreszenzaufnahmen der eingebetteten Latexkügelchen die kurze Halbachse w_0 sowie die lange Halbachse z_0 des konfokalen Volumenelements bestimmt werden kann. Es wurden ein Öl- sowie ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet und die ermittelten konfokalen Volumenelemente in Abhängigkeit der Probertiefe miteinander verglichen.

In Abbildung 23 sind die mit einem Wasser- beziehungsweise Ölimmersionsobjektiv in Deckglasnähe aufgenommenen Fluoreszenzrastreraufnahmen eingebetteter 100 nm Latexkügelchen dargestellt. Beim Wasserimmersionsobjektiv weisen alle Latexkügelchen ähnliche Fluoreszenzintensitäten auf (Abbildung 23 a), während beim Ölimmersionsobjektiv die Fluoreszenzintensität der Latexkügelchen mit zunehmenden Abstand zur Deckglasoberfläche abnimmt (Abbildung 23 b). Außerdem sind beim Ölimmersionsobjektiv deutlich optische Abbildungsfehler zu erkennen, die wie leicht nach links hinten versetzte benachbarte Latexkügelchen aussehen, sich jedoch in der selben Form an jedem Latexkügelchen beobachten lassen (roter Kreis in Abbildung 23 b). Diese optischen Abbildungsfehler sind, wenn auch weniger deutlich, auch beim Wasserimmersionsobjektiv als kleiner Schleier zu beobachten (roter Pfeil in Abbildung 23 a), und vermutlich auf eine nicht perfekte Justage zurückzuführen.

In Abbildung 24 sind die Fluoreszenzrastreraufnahmen einzelner Latexkügelchen in Abhän-

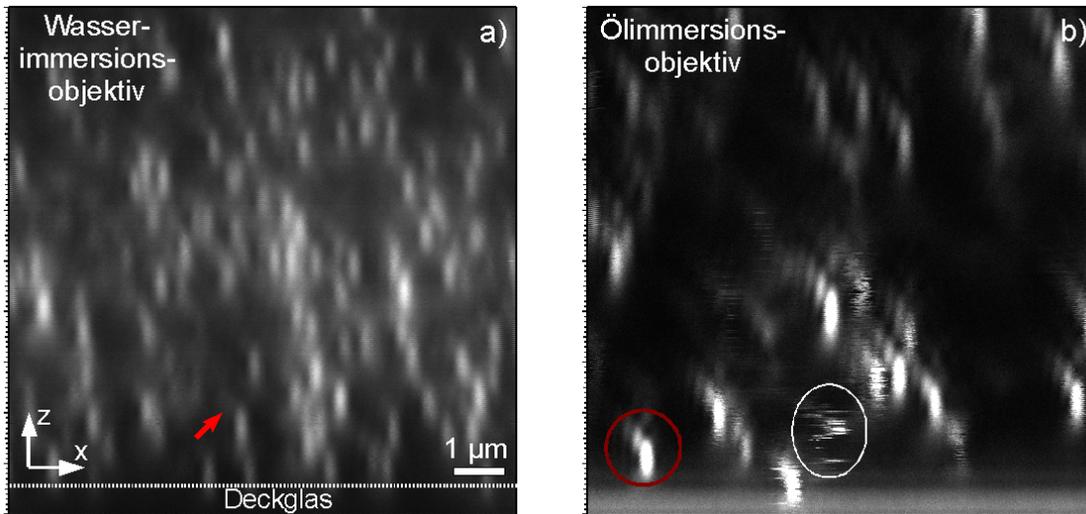


Abbildung 23: Fluoreszenzrastreraufnahmen von 200 nm Latexkügelchen im Agarosegel in xz -Richtung aufgenommen mit einem a) Wasser- und b) Ölimmersionsobjektiv. Aufgrund der geringen Größe der Latexkügelchen wird hier die Ausdehnung des konfokalen Volumenelements abgebildet. Das konfokale Anregungsvolumen entspricht einer Ellipse, dessen größte Ausdehnung auf der z -Achse liegt. Deutlich beim Ölimmersionsobjektiv (roter Kreis) aber auch beim Wasserimmersionsobjektiv (roter Pfeil) sind Abbildungsfehler sichtbar. In b) ist mit einem weißen Kreis ein Latexkügelchen markiert, welches nicht vollständig im Agarosegel fixiert ist, wodurch von diesen aufgrund seiner Bewegungen nur eine schlechte Abbildung möglich ist.

gigkeit vom Abstand zur Deckglasoberfläche unter Verwendung eines Wasser- beziehungsweise Ölimmersionsobjektivs dargestellt. Während sich die Form der Latexkügelchen beim Wasserimmersionsobjektiv kaum ändert, ist beim Ölimmersionsobjektiv eine Vergrößerung der Abbildungen der Latexkügelchen in z -Richtung mit zunehmendem Abstand zur Deckglasoberfläche zu beobachten.

Zur Bestimmung der Fokusausdehnung in x - und z -Richtung wurde, wie in Abbildung 25 dargestellt, der Fluoreszenzintensitätsverlauf eines eingebetteten Latexkügelchen in x - und z -Richtung mit einem Gaußprofil angepasst. Die Ausdehnung des Fokus in beiden Richtungen stellt dabei den Abstand dar, bei dem die Intensität auf $I_{max}e^{-2}$, mit der Intensität des Maximums I_{max} , gefallen ist.

Die so ermittelten Parameter des konfokalen Volumenelements sind in Abhängigkeit vom Abstand zur Deckglasoberfläche für das Wasser- und das Ölimmersionsobjektiv in Abbildung 26 dargestellt. Wie schon aus Abbildung 24 ersichtlich, ändert sich das konfokale Volumenelement bei Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs kaum, während beim Ölimmersionsobjektiv eine Zunahme des Volumenelements in x - und z -Richtung und damit eine Vergrößerung des effektiven Volumens V_{eff} mit zunehmendem Abstand zur Deckglasoberfläche zu beobachten ist. Da die Zunahme in z - größer als in x -Richtung ist, ändert sich somit auch der Strukturfaktor S .

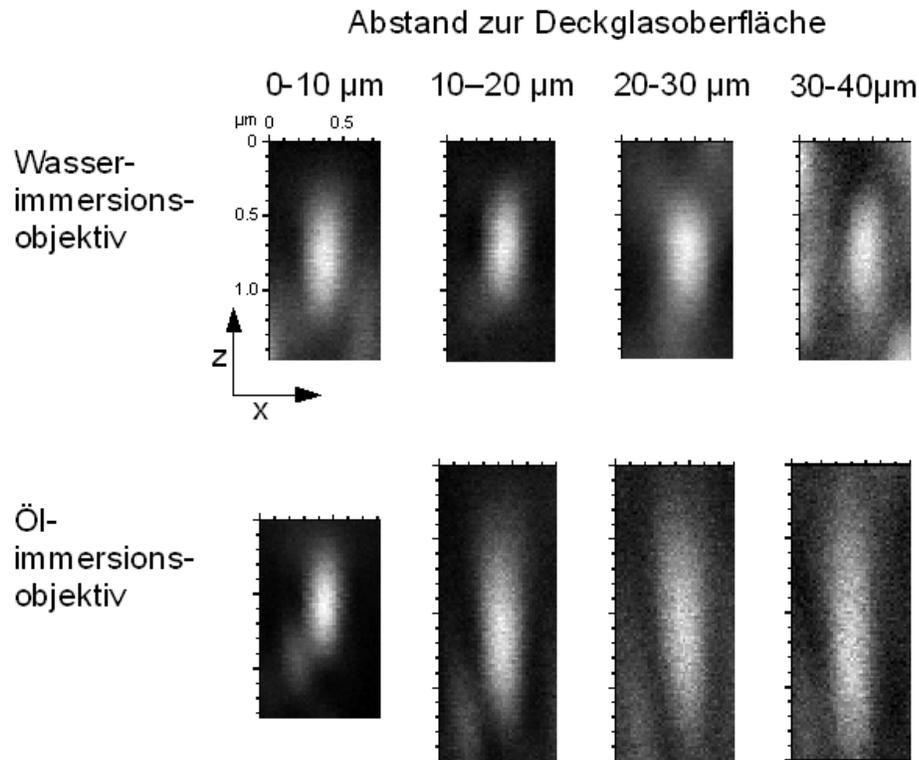


Abbildung 24: Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen einzelner in Agarosegel eingebetteter Latexkügelchen in Abhängigkeit zum Abstand zur Deckglasoberfläche unter Verwendung eines Wasser- (obere Reihe) und eines Ölimmersionsobjektivs (untere Reihe). Während beim Wasserimmersionsobjektiv kaum Veränderungen feststellbar sind, ist beim Ölimmersionsobjektiv eine deutliche Zunahme des konfokalen Volumenelements in z-Richtung mit zunehmenden Abstand zur Deckglasoberfläche zu beobachten.

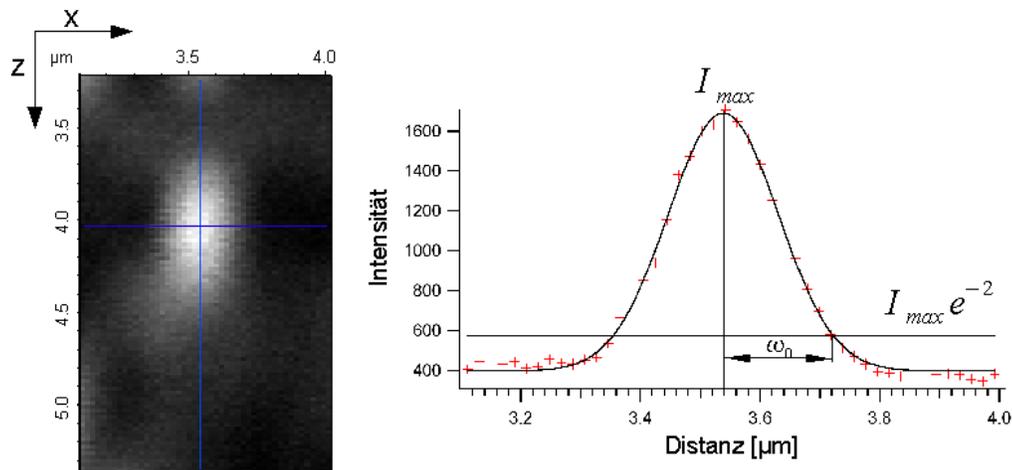


Abbildung 25: Bestimmung der Fokalausdehnung in z- und x-Richtung anhand der Fluoreszenzaufnahme eines in Agarosegel eingebetteten Latexkügelchen. Der Intensitätsverlauf in xz-Richtung kann durch eine Gauß-Anpassungsfunktion beschrieben werden. Der Abstand z_0 in z-Richtung und w_0 in x-Richtung ist der Abstand, auf den die Intensität des Mittelpunkts auf $I_{max}e^{-2}$ gefallen ist.

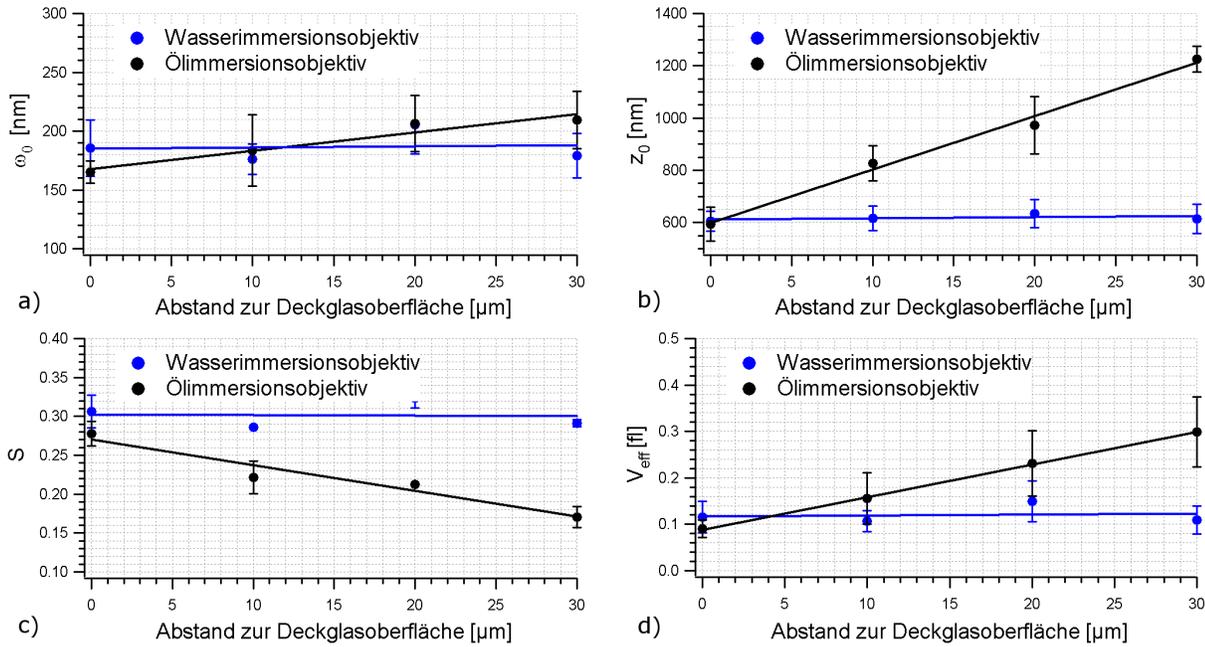


Abbildung 26: Vergleich der Parameter **a)** w_0 , **b)** z_0 , **c)** des Strukturfaktors S und **d)** des effektiven Volumen V_{eff} des Anregungsfokus bestimmt aus den Fluoreszenzbilder von in Agarose eingebetteter Latexkügelchen bei Verwendung eines Wasser- (blaue Kurve) beziehungsweise eines Ölimmersionsobjektivs (schwarze Kurve) in Abhängigkeit des Abstandes zur Deckglasoberfläche.

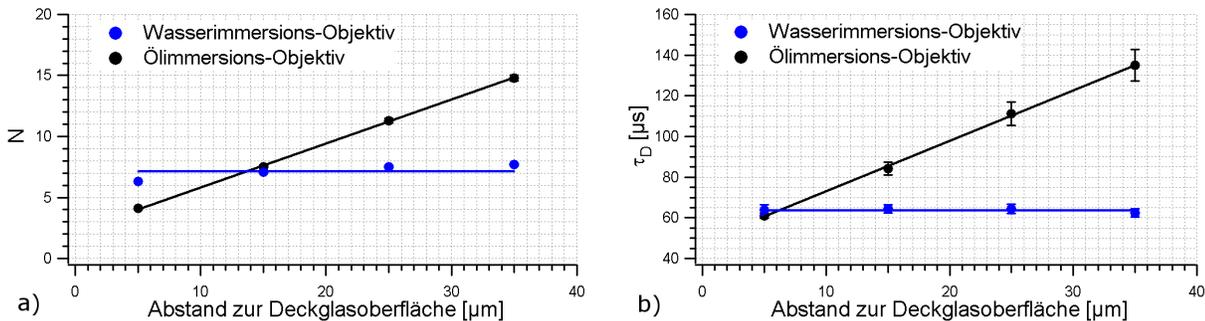


Abbildung 27: Vergleich der FCS-Parameter **a)** Teilchenanzahl N und **b)** Diffusionszeit τ_D in Abhängigkeit vom Abstand zur Deckglasoberfläche einer R110-dCTP-Farbstofflösung bei der Verwendung eines Wasser- (blaue Kurve) beziehungsweise eines Ölimmersionsobjektivs (schwarze Kurve).

Die Änderung des Fokusvolumens beim Ölimmersionsobjektiv beeinflusst aber auch das Ergebnis von FCS-Messungen, da die gemessene Teilchenanzahl N und die Diffusionszeit τ_D von diesem abhängen (Abbildung 27). Durch die Zunahme des Fokusvolumens nimmt die Anzahl der Teilchen sowie deren Aufenthaltsdauer in diesem zu. Der Einfluss des je nach Probentiefe unterschiedlichen Hintergrundsignals auf die Teilchenanzahl wird durch eine Hintergrundkorrektur (siehe Abschnitt 2.1.4) vermieden.

Zweifarbenerregung

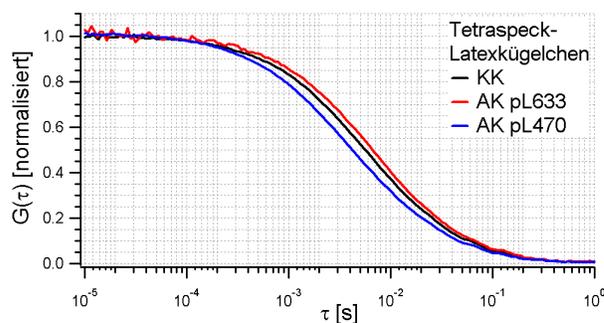
Neben den Eigenschaften des Objektivs bestimmt auch die Wellenlänge des Lasers die Ausdeh-

nung des Anregungsvolumens. Dies ist in Abbildung 28 anhand der normierten Korrelationskurven einer Tetraspeck-Lösung verdeutlicht. Aufgrund der Markierung der Tetraspeck-Latexkügelchen mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ist es möglich, diese Latexkügelchen gleichzeitig mit zwei gepulsten Lasern der Wellenlänge von 470 nm (pL470) und 635 nm (pL635) anzuregen. Das Fluoreszenzsignal wurde entsprechend der Anregungswellenlänge spektral in ein grünes und in ein rotes Fluoreszenzsignal aufgetrennt. Dabei zeigt sich, dass die Autokorrelationskurve des grünen Fluoreszenzsignals (blaue Kurve) im Vergleich zur Autokorrelationskurven des roten Fluoreszenzsignals (rote Kurve) zu kürzeren Zeiten verschoben ist. Dies lässt sich durch die Abhängigkeit des Anregungsvolumens von der Anregungswellenlänge erklären [168]:

$$\frac{\lambda_1}{\lambda_2} = \frac{w_1}{w_2} . \quad (79)$$

Nach den hier verwendeten Anregungswellenlängen ist demnach ein Verhältnis von 1,35 zu erwarten. In der Tabelle in Abbildung 28 sind die aus den beiden Autokorrelationskurven bestimmten Diffusionszeiten sowie w_0 des Anregungsvolumens dargestellt. Das Verhältnis von w_0 bei 635 nm und bei 470 nm Anregung mit 1,23 liegt dabei etwas unterhalb des erwarteten Wertes. Diese Abweichung beträgt weniger als 10 % und ist möglicherweise auf chromatische Abberationen zurückzuführen.

Durch die Korrelation des grünen mit dem roten Fluoreszenzsignal wird eine Kreuzkorrelationskurve erhalten (schwarze Kurve in Abbildung 28). Das gemeinsame Beobachtungsvolumen der beiden Laser kann über die Bestimmung der beiden einzelnen Beobachtungsvolumen und der Gleichung 37 ermittelt werden. Jedoch können bei nicht akkurater Ausrichtung der Laser oder



	τ_D [ms]	w_0 [nm]	V [fl]
AK pL470	$4,33 \pm 0,04$	273 ± 1	$0,79 \pm 0,01$
AK pL635	$6,62 \pm 0,07$	337 ± 2	$1,49 \pm 0,03$
KK	$5,68 \pm 0,08$	313 ± 2	$1,19 \pm 0,02$

Abbildung 28: Korrelationskurven einer Lösung mit Tetraspeck-Latexkügelchen. Die Autokorrelationskurve (AK) des Fluoreszenzsignals beim 470 nm Laser (blaue Kurve) ist zu kürzeren Zeiten verschoben als die beim 635 nm Laser (rote Kurve). Die Kreuzkorrelationskurve (KK, schwarze Kurve) beider Fluoreszenzsignale liegt zwischen den beiden Autokorrelationskurven. In der Tabelle sind die charakteristischen Zeiten der Korrelationskurven und die daraus ermittelten Parameter w_0 (Gleichung 33) und V (Gleichung 23) der entsprechenden Anregungsvolumen dargestellt.

durch chromatische Abberationen die beiden Beobachtungsvolumen verschoben sein [169, 170], was die wahre Ausdehnung des Beobachtungsvolumen der Kreuzkorrelation verkleinert. Mit Hilfe

von Tetraspek-Latexkügelchen und der Kreuzkorrelationskurven lässt sich dieses jedoch über die Diffusionszeit der Latexkügelchen direkt bestimmen.

Die normierte Kreuzkorrelationskurve (Abbildung 28, schwarze Kurve) liegt zwischen den beiden Autokorrelationskurven und damit auch die Ausdehnung des Beobachtungsvolumens der Kreuzkorrelation zwischen den Beobachtungsvolumen der beiden Anregungslaser (Tabelle in Abbildung 28). Wenn die Ausdehnung des Beobachtungsvolumens der Kreuzkorrelation nach Gleichung 38 mit Hilfe der aus den Autokorrelationskurven bestimmten Ausdehnungen der Beobachtungsvolumen der beiden Anregungslaser bestimmt wird, wird für w_0 307 nm erhalten, was nur einer Differenz von 5 nm verglichen mit dem aus der Kreuzkorrelationskurve bestimmten Wert bedeutet. Dies ist ein deutlicher Hinweis für die gute Überlappung der Beobachtungsvolumen von den beiden verwendeten Lasern.

Anregungsleistung

Eine Erhöhung der Anregungsleistung führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Übergangs der Fluoreszenzfarbstoffe in einen angeregten Zustand, wodurch eine Erhöhung der Fluoreszenzrate und damit auch eine Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses erreicht werden kann. Dies wird bei hohen Anregungsleistungen durch die Sättigung des Farbstoffes begrenzt, wodurch die Anregungsrate des Farbstoffes nicht mehr proportional zur Anregungsleistung ist (Abschnitt 2.1.1).

Aufgrund des Sättigungseffekts sind die Autokorrelationskurven abhängig von der Anregungsleistung, da dieser zu einer virtuellen Vergrößerung des Detektionsvolumens führt [171, 172, 173]. Dies ist in Abbildung 29 anhand der FCS-Parameter N und τ_D , bestimmt aus FCS-Messungen einer R110-dCTP-Farbstofflösung, dargestellt. Durch die Vergrößerung des Detektionsvolumens wird die Anzahl sowie die Aufenthaltszeit der Fluoreszenzfarbstoffe erhöht, wobei ein linearer Anstieg der beiden Parameter mit zunehmender Anregungsleistung zu beobachten ist. Bei sehr hohen Anregungsleistungen ist ein weiterer Effekt, das Bleichen der Farbstoffe, zu beobachten, welches sich durch einen Abfall der Diffusionszeit bemerkbar macht.

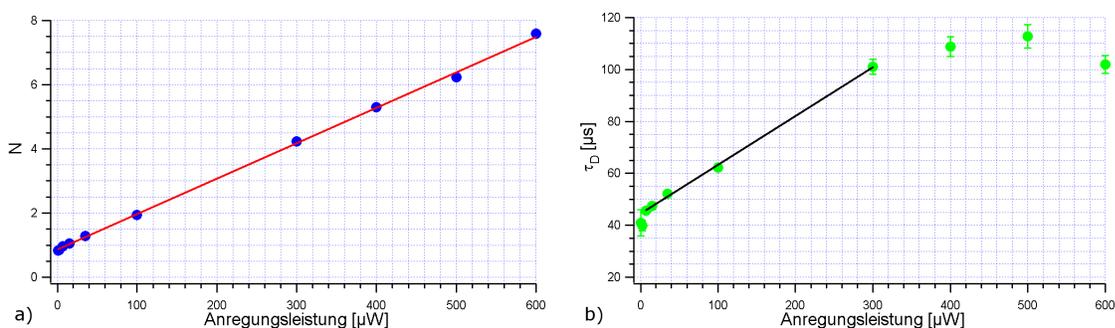


Abbildung 29: a) Teilchenanzahl N und b) Diffusionszeit τ_D in Abhängigkeit der Anregungsleistung einer R110-dCTP-Farbstofflösung. Mit zunehmender Anregungsleistung steigt die Teilchenanzahl und die Diffusionszeit linear an. Sehr hohe Anregungsleistungen führen zum Bleichen der Farbstoffe, welches sich dann im Abfall der Diffusionszeit bemerkbar macht.

4.2 Evaneszente Anregung

Von einer hochkonzentrierten Fluoreszenzfarbstofflösung wurden Fluoreszenzaufnahmen in Deckglasnähe in xz-Richtung mittels konfokaler und evaneszenter Anregung aufgenommen (Abbildung 30). Bei beiden Anregungen ist die höchste Fluoreszenzintensität auf der Deckglasoberfläche feststellbar. Die Fluoreszenzintensität sollte bei konfokaler Anregung unabhängig vom Abstand zur Deckglasoberfläche sein. Hier zeigt sich jedoch ein linearer Abfall mit zunehmender Probtiefe. Dies liegt, wie in Abschnitt 4.1 gezeigt, an der zunehmenden Vergrößerung des Anregungsvolumens beim Ölimmersionsobjektiv mit steigender Probtiefe, wodurch die gemessene Intensität bei gleicher Anregungsleistung abnimmt.

Bei der evaneszenten Anregung fällt die Fluoreszenz von der Deckglasoberfläche her exponentiell ab, da aufgrund der Totalreflektion nur Fluoreszenzfarbstoffe in der Nähe der Deckglasoberfläche angeregt werden. Konstruktionsbedingt sind die Einstrahlwinkel zur Erzeugung des evaneszenten Feldes nahe am kritischen Winkel, wodurch relativ große Eindringtiefen erreicht werden (Abbildung 7). So beträgt zum Beispiel die Eindringtiefe unter Verwendung eines 488 nm Lasers bei einem Einfallswinkel von $61,74^\circ$ rund $5 \mu\text{m}$ (Gleichung 28, $n_{\text{Deckglas}} = 1,55$, $n_{\text{Wasser}} = 1,33$). Zusätzlich erfolgt die Detektion der Fluoreszenz konfokal, und da z_0 des Detektionsvolumens sehr groß ist, wird auch noch in Probtiefen, in der das evaneszente Feld abgeklungen ist, Fluoreszenz von der Deckglasoberfläche detektiert. Demnach entspricht der Verlauf der Fluoreszenzintensität auch dem des konfokalen Detektionsvolumens in z-Richtung.

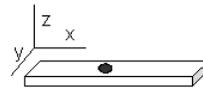
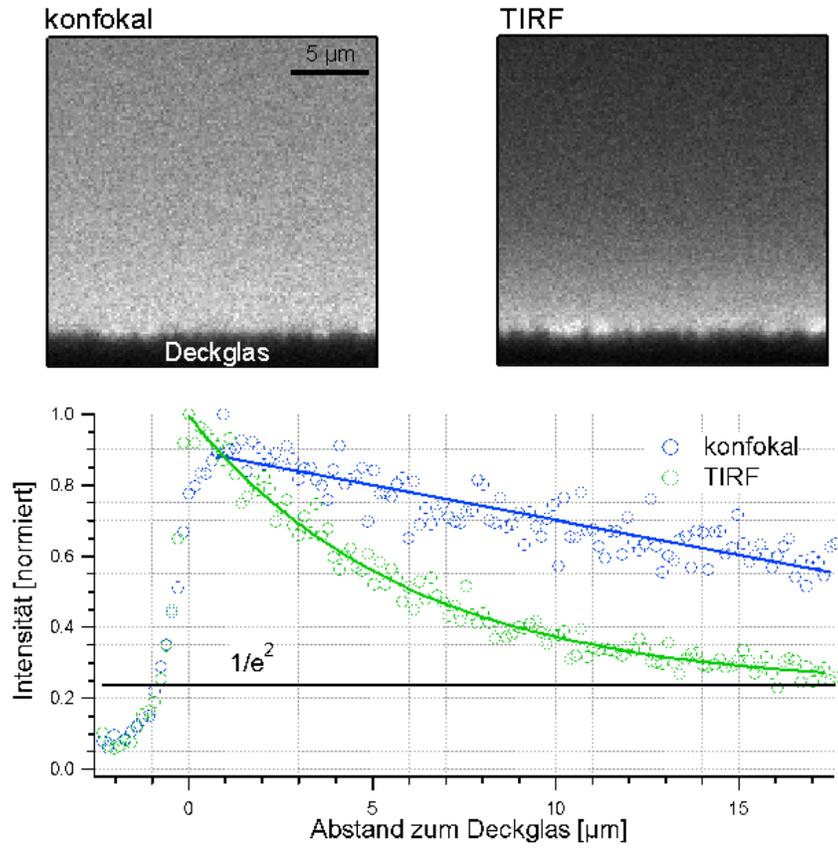
Eine Möglichkeit der Abbildung des Detektionsvolumens stellen, wie in Abschnitt 4.1 gezeigt, Fluoreszenzaufnahmen von farbstoffmarkierten Latexkügelchen dar. In Abbildung 31 ist dies für ein 200 nm großes Latexkügelchen, welches auf der Deckglasoberfläche adsorbiert ist, bei konfokaler sowie bei evaneszenter Anregung gezeigt. Dabei zeigt sich, dass sich das Anregungsvolumen bei evaneszenter Anregung im Vergleich zur konfokalen Anregung, je nach Orientierung der Blende im Anregungsstrahlengang, entweder in x- oder in y-Richtung vergrößert. Solche Ausdehnungen des evaneszenten Feldes werden auch in der Literatur beschrieben [174]. Da die Blende im Anregungsstrahlengang wie ein Doppelspalt wirkt, kommt es zu Interferenzerscheinungen, so dass mehrere Intensitätsmaxima im Detektionsvolumen beobachtbar sind.

Mit Hilfe einer Farbstoffkonzentrationsreihe wurden FCS-Messungen bei einer konfokalen sowie bei einer evaneszenten Anregung durchgeführt. Dabei wurde der negativ geladene Fluoreszenzfarbstoff FITC gewählt, um Adhäsionseffekte an der ebenfalls negativ geladenen Deckglasoberfläche zu vermindern. Zur Vermeidung des Afterpulssignals (siehe Abschnitt 2.1.4) in den Autokorrelationskurven wurde das Fluoreszenzsignal mittels eines 50/50-Strahlenteilers auf zwei Detektoren fokussiert und das Signal dieser beiden Detektoren miteinander korreliert. Bei der konfokalen Anregung wurde zum einen auf der Deckglasoberfläche und zum anderen direkt in der Lösung gemessen.

Die Amplitude der Korrelationskurven bei $G(\tau \rightarrow 0) = \frac{1}{N}$ gibt direkt die durchschnittliche Teil-

Abbildung 30:

Fluoreszenzaufnahmen einer hochkonzentrierten Farbstofflösung in Deckglasnähe bei konfokaler (oben links) und evaneszenter (oben rechts) Anregung jeweils unter Verwendung des Ölimmersionsobjektivs. Im unteren Graph ist der Abfall der Fluoreszenzintensität in der Lösung ausgehend von der Deckglasoberfläche für die beiden Anregungen dargestellt. Bei der konfokalen Anregung (blau) fällt die Fluoreszenzintensität linear und bei der evaneszenten Anregung (grün) exponentiell ab.

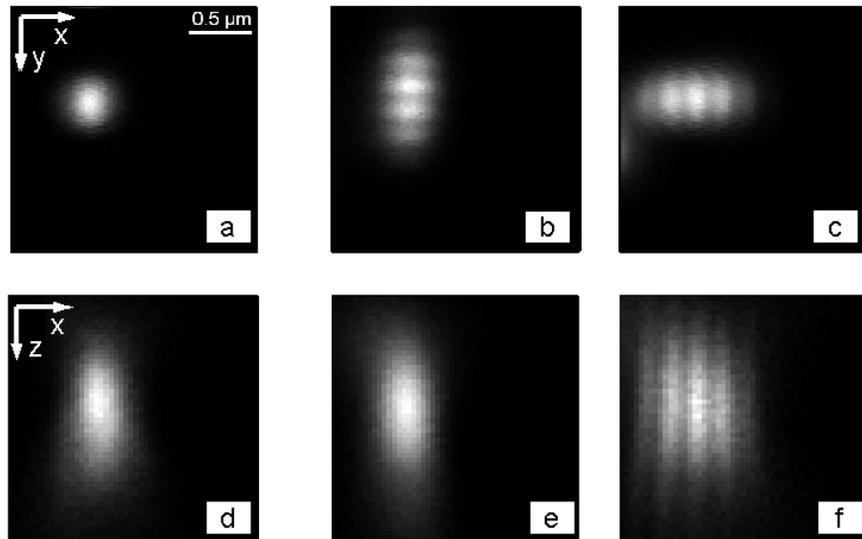


konfokal

evaneszent



Abbildung 31: Fluoreszenzrastreraufnahmen in xy-Richtung (a-c) und xz-Richtung (d-e) eines auf der Deckglasoberfläche immobilisiert 200 nm-Latexkügelchen bei konfokaler (a,d) und evaneszenter Anregung (b,c,e,f) mit einem 488 nm Laser. Bei evaneszenter Anregung wurde die Orientierung der Blenden variiert. Dargestellt ist die Orientierung der Blende im Anregungsstrahlengang.



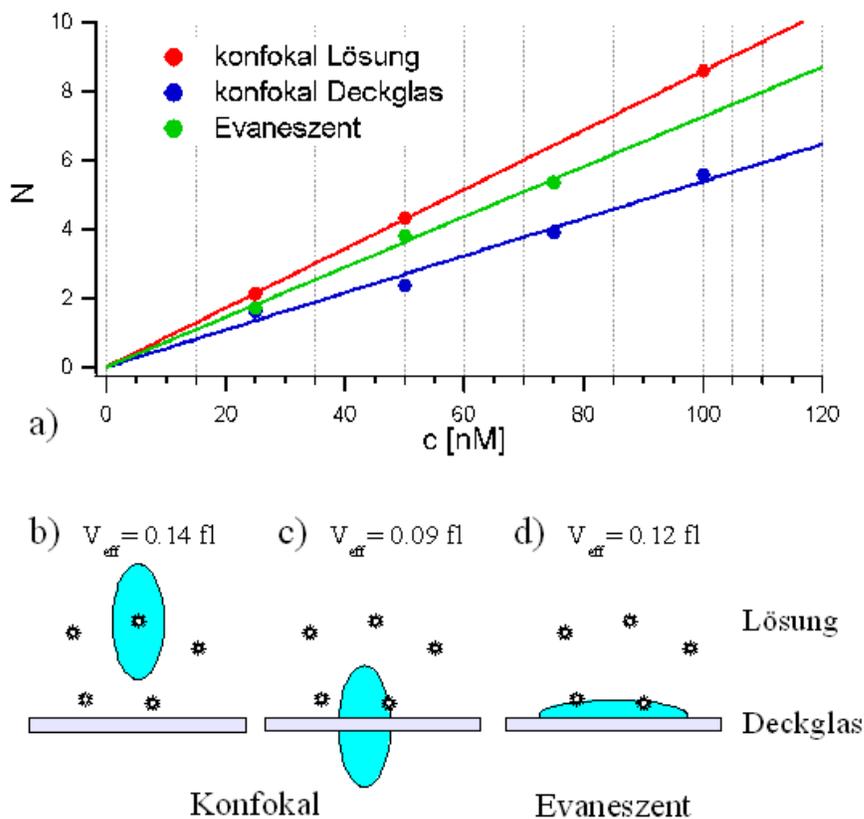


Abbildung 32: a) Aus FCS-Messungen bestimmte Teilchenanzahl N aufgetragen gegen die Farbstoffkonzentration bei einer konfokalen Anregung in Lösung (rot) sowie auf dem Deckglas (blau) und bei einer evaneszenten Anregung (grün). Der Anstieg m der linearen Anpassungsfunktion ist proportional zum effektiven Anregungsvolumen V_{eff} . b-d) Vereinfachte Darstellung sowie Angabe des effektive Anregungsvolumens, bestimmt aus dem Anstieg der Graphen in a, bei b) konfokaler Anregung in Lösung, c) konfokaler Anregung auf der Deckglasoberfläche und d) evaneszenter Anregung.

chenanzahl im Beobachtungsvolumen an. Damit lässt sich über $N = c \cdot V_{eff} \cdot N_A$ bei bekannter Farbstoffkonzentration c unabhängig von der Form des Detektionsvolumens direkt auf dessen effektives Volumen V_{eff} schließen. Da das unkorrelierte Hintergrundsignal Einfluss auf die Amplitude der Korrelationskurve hat, wurde noch eine Hintergrundkorrektur nach Gleichung 42 durchgeführt. Die so ermittelte Teilchenanzahl wurde für die drei Anregungsmodi konfokale Anregung in der Lösung, konfokale Anregung auf der Deckglasoberfläche und evaneszente Anregung gegen die Farbstoffkonzentration aufgetragen (Abbildung 32 a). Vom Anstieg m dieser Kurven lässt sich direkt auf das effektive Volumen schließen $V_{eff} = \frac{m}{N_A}$. Dabei wurde bei einer konfokalen Anregung in Lösung ein effektives Volumen von 0,14 fl, bei einer konfokalen Anregung auf der Deckglasoberfläche von 0,09 fl und bei einer evaneszenten Anregung von 0,12 fl erhalten (Abbildung 32 b).

Demnach wird mit einer konfokalen Anregung auf der Deckglasoberfläche das geringste effektive Anregungsvolumen erreicht, da sich dieses teils in der Farbstofflösung und teils im Deckglas befindet und die Farbstoffe so nur einen Teil des konfokalen Anregungsvolumens durchwandern können. Bei der evaneszenten Anregung wird zwar eine deutliche Verringerung des Anregungsvolumens in z-Richtung erreicht, jedoch auch eine beträchtliche Vergrößerung entlang der x- beziehungsweise y-Achse und damit keine deutliche Verringerung des effektiven Gesamtvolumens im Vergleich zur konfokalen Anregung direkt auf der Deckglasoberfläche.

4.3 Einzelmoleküldetektion und -identifikation

Im Hinblick auf die Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung ist es notwendig, die Nukleotide voneinander zu unterscheiden. Dies wird durch die Markierung mit unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffen und die Detektion des Fluoreszenzsignals erreicht. Je nach Datenaufnahme gibt es zwei Möglichkeiten, die Zeitspur eines Fluoreszenzsignals darzustellen, als Angabe der Intensität (Anzahl der Photonen) pro Zeiteinheit (Bin) oder als Angabe der Zeit $\Delta t_{\text{Photonen}}$ zwischen jeweils zwei aufeinander folgenden Photonen (Abbildung 33). Ein Fluoreszenzereignis zeigt sich als Photonschauer, bei dem deutlich mehr Photonen pro Bin gezählt werden als im Durchschnitt, beziehungsweise bei dem $\Delta t_{\text{Photonen}}$ sehr kleine Zeiten annimmt. In beiden Fällen können durch Setzen geeigneter Schwellen die einzelnen Fluoreszenzereignisse vom Hintergrund getrennt werden.

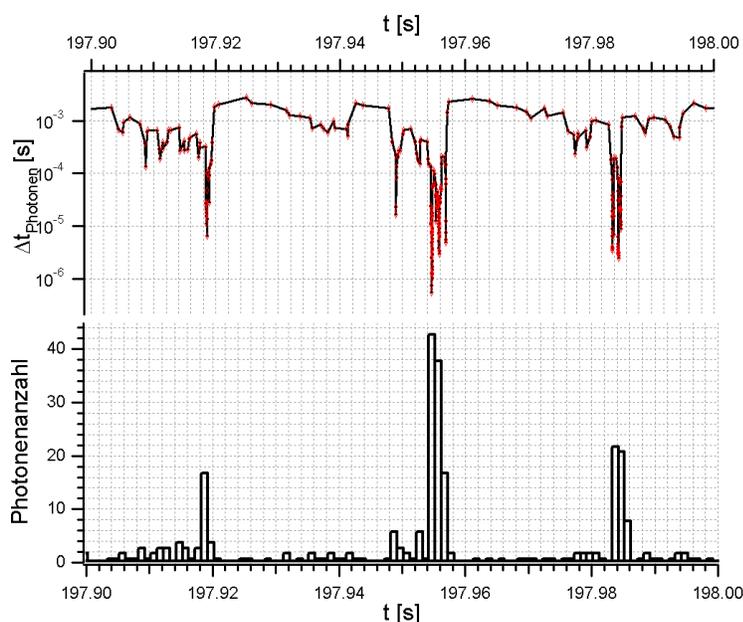


Abbildung 33: Zwei äquivalente graphische Darstellungen einzelner Moleküldurchtritte durch das Beobachtungsvolumen einer Farbstofflösung. In der oberen Abbildung sind die Abstandzeiten $\Delta t_{\text{Photonen}}$ aufeinander folgender Photonen logarithmisch gegen die Messzeit aufgetragen. In der unteren Abbildung ist der entsprechende Ausschnitt als gebintete Intensitäts-Zeitspur dargestellt. Bei einem Fluoreszenzereignis nehmen $\Delta t_{\text{Photonen}}$ sehr kleine Zeiten an beziehungsweise werden mehr Photonen pro Zeiteinheit (Bin) gezählt.

Beim Setzen einer Schwelle sollte mit größter Sorgfalt vorgegangen werden, da dies maßgeblich das Ergebnis eines Experiments beeinflusst. Wird die Schwelle zu niedrig in der Intensitäts-Zeitspur beziehungsweise zu hoch in der $\Delta t_{\text{Photonen}}$ -Zeitspur gesetzt, treten vermehrt falsch-positiv Ereignisse auf. Wird dagegen die Schwelle in der ersten Darstellung zu hoch beziehungsweise in der zweiten zu niedrig gesetzt, werden manche Moleküle nicht mehr als Ereignisse erkannt. In [175] wird bei einer Intensitäts-Zeitspur die dreifache Standardabweichung des nicht-fluoreszierenden Hintergrunds als Schwelle verwendet.

Als Anhaltspunkt für das Setzen einer Schwelle kann der Vergleich der Histogramme für die

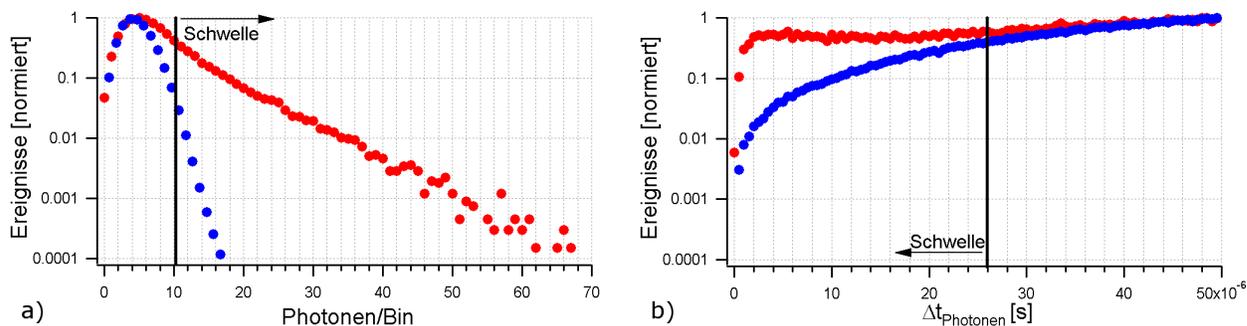


Abbildung 34: Histogrammierte Photonenzahl pro Bin (a) sowie $\Delta t_{\text{Photonen}}$ (b) einer Farbstofflösung (rot) im Vergleich zum Lösungsmittel (blau). In beiden Darstellungen sind die y-Achsen logarithmisch aufgetragen. Aus diesem Vergleich lässt sich jeweils eine geeignete Schwelle für die Trennung von Fluoreszenzergebnissen vom Hintergrund bestimmen.

Photonenzahl pro Bin beziehungsweise $\Delta t_{\text{Photonen}}$ zwischen dem Lösungsmittel und der Farbstofflösung dienen (Abbildung 34). Dabei ist eine deutliche Überlappung in den Histogrammen der Farbstofflösung und des Lösungsmittels zu erkennen. Dieser Überlapp ist von zwei Faktoren abhängig: 1) wie hoch die Mindestanzahl der Photonen, die ein Molekül während seines Durchtritts durch das Detektionsvolumen emittiert, ist und 2) wie hoch dabei das Signal des Hintergrunds ist. Wegen der Schnittmenge beider Verteilungen, des Fluoreszenz- und des Hintergrundsignals, können niemals 100% aller durch das Detektionsvolumen transportierten Moleküle mit absoluter Sicherheit identifiziert werden. Zur Überprüfung der Güte der gesetzten Schwelle können die Ergebnisse mit den Ergebnissen aus FCS-Messungen verglichen werden.

Zum Testen der Peakerkennungsroutine aus Abschnitt 3.4 zur Unterscheidung der Fluoreszenzfarbstoffe R110 und FR (entspricht TMR) wurden Fluoreszenzzeitspuren einer reinen R110-dCTP- und FR-Farbstofflösung sowie einer Mischlösung beider Fluoreszenzfarbstoffe mittels des in Abschnitt 3.4 beschriebenen konfokalen Mikroskopsystems aufgenommen. Dabei entspricht die Konzentration der einzelnen Farbstoffe in der Mischlösung der Konzentration in den jeweiligen einkomponentigen Farbstofflösungen. Die Parameter Peakanzahl, Photonenzahl pro Ereignis und Peakbreite, die durch die Auswerterroutine der Peakerkennung ermittelt wurden, sind in der Tabelle 8 für die drei gemessenen Farbstofflösungen dargestellt. Die hier für die R110-dCTP-Farbstofflösung ermittelte durchschnittliche Peakbreite von $74 \mu\text{s}$ befindet sich im selben Zeitbereich wie die durch die Autokorrelationskurve bestimmten Diffusionszeit von $72 \mu\text{s}$ und spricht für die Qualität der Peakerkennung. Nach der ermittelten Peakanzahl in den Einkomponentenfarbstofflösungen ist die Konzentration von R110-dCTP um den Faktor 7,5 größer als die von FR. Dieses Verhältnis sollte sich auch in der Mischlösung wiederfinden, das heißt, dass etwa 88 % der Ereignisse in der Mischlösung R110-dCTP und der Rest von 12 % FR zuzuordnen sein sollten.

Für die Erstellung des Erkennungsmusters wurden die Photonen aller Fluoreszenzereignisse in den einkomponentigen Farbstofflösungen entsprechend ihrer Verteilung auf die drei APDs aufsummiert (Abbildung 35 a, b). Wie nach den Emissionsspektren (Abbildung 18) der beiden Farbstoffe

	R110-dCTP-Lösung	FR-Lösung	R110-dCTP/FR-Mischlösung
Peakanzahl pro Min	1120	149	1014
Photonenanzahl			
avg	11,6	10,8	11,5
max	65	42	65
min	5	5	5
Peakbreite [μ s]			
avg	74	71	73
max	432	234	356
min	6	11	5

Tabelle 8: Ergebnisse der Auswerterroutine der Peakerkennung aus Abschnitt 3.4 bei einer R110-dCTP-, FR-Farbstofflösung und einer Mischlösung beider Fluoreszenzfarbstoffen. (Schwelle: 18,5 μ s und 5 Photonen pro Ereignis)

zu erwarten, werden in beiden Farbstofflösungen kaum Photonen über 640 nm (APD1) detektiert. Bei der FR-Farbstofflösung wird die Mehrzahl der Photonen in APD3 (550-630 nm) und bei der R110-dCTP-Farbstofflösung in APD2 und APD3 mit einem leichtem Übergewicht in APD2 (< 550 nm) detektiert. Mit dem aus dieser Photonenverteilung erstellten Erkennungsmuster (Abbildung 35 c) ist es möglich, jedes Photon mit einer entsprechenden Wahrscheinlichkeit einem der beiden Farbstoffe zuzuordnen (Abbildung 35 d, e).

In Abbildung 36 a) sind die Fluoreszenzereignisse der Mischlösung aus R110-dCTP- und FR-Farbstoff in Abhängigkeit von der Verteilung der Photonen auf APD2 und APD3 zweidimensional dargestellt. Da in APD1 (> 640 nm) hauptsächlich Hintergrundphotonen detektiert werden, werden die Photonen in diesem Detektor hier nicht weiter in Betracht gezogen. Die Farbkodierung gibt die Zuordnung der Ereignisse zu einem der beiden Farbstoffe an, mit blau für den R110-dCTP- und grün für den FR-Farbstoff. Dabei konnten 63% der Ereignisse als R110-dCTP und 13% als FR identifiziert werden (Abbildung 36 b). 24 % der Ereignisse konnten nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit von weniger als 0,8 einem der beiden Farbstoffe zugeordnet werden. Dies betraf vor allem Ereignisse mit einer geringen Photonenzahl unterhalb von 20 Photonen. Der Anteil von R110 und FR an den zuordnungsbaaren Ereignissen beträgt 83% beziehungsweise 17% und entspricht damit den erwarteten Werten aus den FCS-Messungen (Tabelle 8).

Für die eindeutige Identifikation einzelner Farbstoffmoleküle ist ein hohes Fluoreszenzsignal bei einem möglichst kleinen Hintergrundsignal vonnöten. Bei in Lösung frei diffundierenden Farbstoffmolekülen verringert vor allem der nicht zentrale Durchtritt durch das konfokale Anregungsvolumen die Photonenzahl eines Fluoreszenzereignisses, da zum Randbereich hin die Anregungsintensität und damit auch die Anregungswahrscheinlichkeit der Farbstoffe abnimmt (Abschnitt 2.1.2). Für eine Einzelmolekülidentifikation, wie sie bei der Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung vonnöten ist, ist es somit erstrebenswert, dass die abgebauten Farbstoff-Basen-Komplexe möglichst zentral

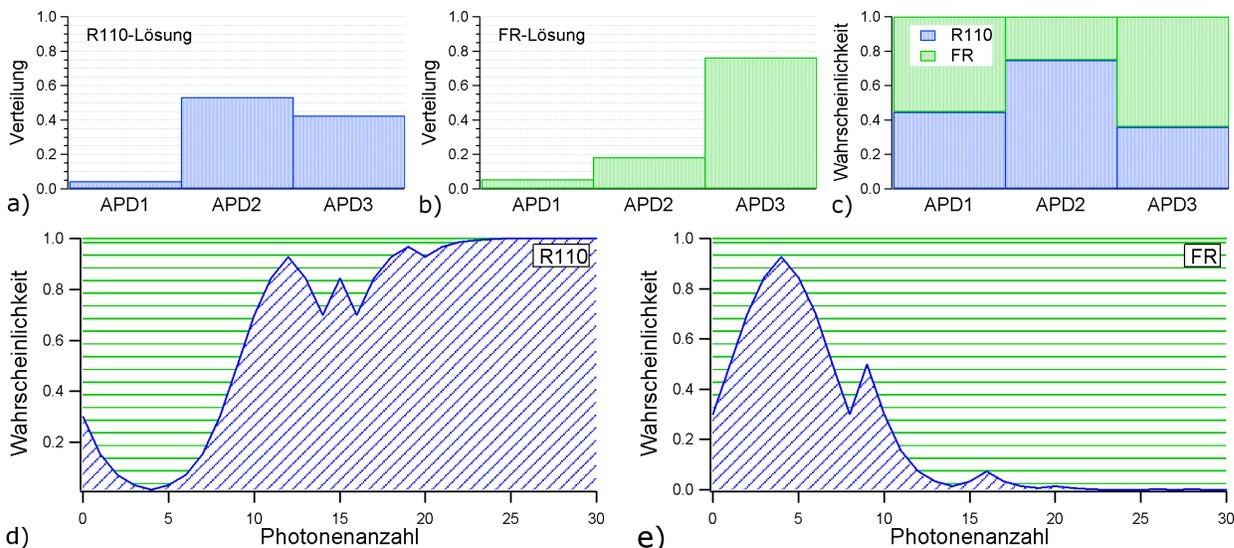


Abbildung 35: Normierte Verteilung der Photonen auf drei, für verschiedene Wellenlängenbereiche empfindliche Detektoren (APDs) bei einer R110-dCTP- (a), einer FR-Farbstofflösung (b). c) Aus diesen beiden Verteilungen bestimmtes Erkennungsmuster für die Einzelmolekülidentifikation. d,e) Zwei Beispiele für die Änderung der Zuordnungswahrscheinlichkeit von Photon zu Photon, bis mit hoher Sicherheit ein Ereignis einem der beiden Farbstoffe R110 (d) oder FR (e) zuzuordnen ist. (APD1 - > 645 nm; APD2 - 500-550 nm; APD3 - 550-630 nm)

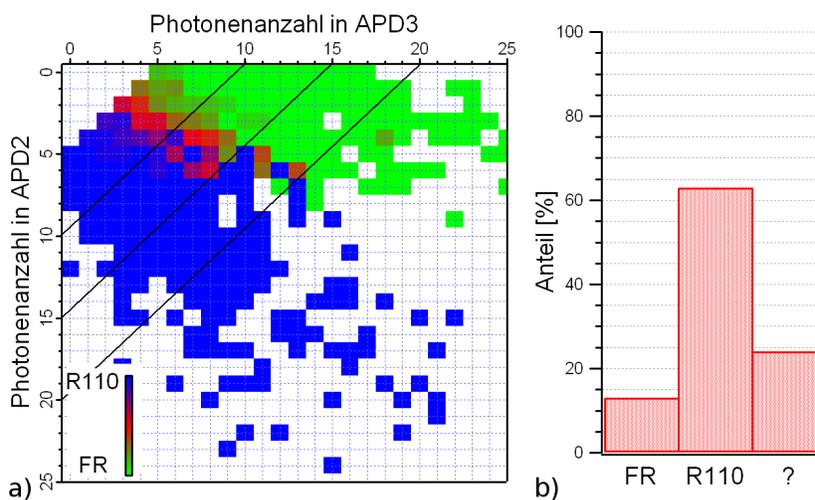


Abbildung 36: a) Zweidimensionale Darstellung der Verteilung der Fluoreszenzereignisse eines Farbstoffgemisches von R110-dCTP und FR. Aufgetragen sind die Ereignisse in Abhängigkeit der Photonenzahl auf die beiden Detektoren APD2 und APD3. Farbkodiert ist die Zuordnung der einzelnen Ereignisse zu einem der beiden Farbstoffe mit blau für den Farbstoff R110-dCTP und grün für FR. Die drei schwarzen Linien zeigen die Schwellen bei einer Gesamtphotonenzahl von 10, 15 und 20 an. Ab einer Gesamtphotonenzahl von über 20 Photonen ist eine eindeutige Zuordnung eines Fluoreszenzereignisses zu einem der beiden Farbstoffe möglich. b) Anteil der identifizierten Fluoreszenzereignisse. 13 % der Ereignisse konnte FR und 63 % R110 zugeordnet werden. 24 % der Ereignisse konnten nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit unterhalb von 0,8 einem der beiden Farbstoffe zugeordnet werden (Fragezeichen). (488 nm Laser mit 65 μ W; 532 nm Laser mit 74 μ W; APD2 - 500-550 nm; APD3 - 550-630 nm)

das Anregungsvolumen traversieren. Eine weitere Begrenzung der Photonenausbeute ist durch die Aufenthaltsdauer der Moleküle im Anregungsvolumen gegeben, die hier bei den Farbstoff-Basen-Komplexen unterhalb von 100 μs liegt. Durch hohe Anregungsintensitäten ist auch bei sehr kurzen Aufenthaltszeiten eine Steigerung des Fluoreszenzsignals möglich. Dies wird jedoch durch Sättigung oder auch Photozerstörung der Farbstoffe begrenzt (Abschnitt 2.1.1).

Somit ist es unter Umständen nötig, Fluoreszenzereignisse auch mit einer geringen Photonenzahl eindeutig zu identifizieren, denn für eine vollständige DNS-Sequenzierung zählt jede Base. Wie in Abbildung 36 a) ersichtlich, kann hier bereits ein Ereignis mit einer Photonenzahl von 20 Photonen mit hoher Wahrscheinlichkeit einem der beiden Farbstoffe zugeordnet werden. Bei den Einzelmolekülexperimenten von Prummer und Mitarbeitern [75] werden im Durchschnitt 191 Photonen für eine Identifikation benötigt. Die hier gezeigte Verbesserung ist vor allem darauf zurückzuführen, dass hier nur zwei anstatt vier Fluoreszenzfarbstoffe unterschieden werden, die sich zudem spektral gut voneinander trennen lassen. Mit jedem zusätzlichen Farbstoff verringert sich die Zuordnungswahrscheinlichkeit eines Photons zu einem der beteiligten Farbstoffen. Durch Berücksichtigung weiterer Fluoreszenzparameter ist es aber möglich, die Mindestphotonenzahl für die Identifikation weiter zu verringern. So können bei der Verwendung von gepulsten Lasern neben einer spektralen Unterscheidung auch die Unterschiede in der Fluoreszenzlebenszeit mit berücksichtigt werden [75].

4.4 Isomerisierung von Cy5

Die hochmarkierten DNS-Proben wurden unter anderem für FCS-Messungen zusätzlich am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Um den Einfluss der photoinduzierten Isomerisierung des Cy5-Farbstoffes auf die Autokorrelationskurven zu charakterisieren, wurden FCS-Messreihen an Cy5 markierten Proben bei unterschiedlichen Anregungsleistungen (1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 μW) mit dem gepulsten 635 nm Laser durchgeführt. Dabei sind die Anregungsleistungen so niedrig gewählt, dass Übergänge in den Triplett sowie Bleicheffekte ausgeschlossen werden können. In der ersten Probe ist das Cy5-Farbstoffmolekül kovalent an einem Nukleotid (dCTP) gebunden und in der zweiten an einem 500 bp langen DNS-Molekül. Dadurch konnten zwei Cy5-Proben mit deutlich unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten untersucht werden.

Für die Auswertung der FCS-Kurven der Cy5-dCTP-Probe wurde eine Anpassungsfunktion verwendet, die neben dem diffusiven Anteil auch den Anteil für die Isomerisierung des Moleküls mit berücksichtigt (Gleichung 40). Für die 500bp DNS-Probe wurde beim diffusiven Teil der Anpassungsfunktion zusätzlich ein zweite Komponente (siehe Gleichung 44) für mögliche freie Cy5-Moleküle berücksichtigt. Dabei wurden die Diffusionszeiten, die bei der Messung der Cy5-dCTP-Probe ermittelt wurden, entsprechend der Anregungsleistung für die zweite, schnell diffundierende Komponente verwendet. Die Ein-Komponenten-Fitfunktion bei der Cy5-dCTP-Probe und die Zwei-Komponenten-Fitfunktion bei der Cy5-500bp-DNS-Probe wurden als globale Anpassungs-

	Isomerisierungs- anteil	Fluoreszenz- lebenszeit τ_{FL} [ns]
Cy5-dCTP	$0,43 \pm 0,01$	$1,212 \pm 0,005$
Cy5-DNS	$0,36 \pm 0,01$	$1,345 \pm 0,001$

Tabelle 9: Vergleich des Isomerisierungsanteil und der Fluoreszenzlebenszeit von Cy5 gebunden an einem Mononukleotid (dCTP) sowie an einem 500 bp langem doppelsträngigem DNS-Molekül.

funktion auf die jeweiligen Autokorrelationskurven, die mit unterschiedlichen Anregungsleistung erhalten worden sind, angewandt, wobei der Isomerisierungsanteil und bei der DNS-Probe der Anteil der beiden diffusiven Komponenten als globale Parameter festgehalten wurden, da diese von der Anregungsleistung unbeeinflusst bleiben. Dabei wurde bei der DNS-Probe ein Anteil von 30% an freien Cy5-Farbstoff bestimmt.

In Abbildung 37 a) sind am Beispiel der 500 bp DNS-Probe die normierten Autokorrelationskurven bei unterschiedlichen Anregungsleistungen dargestellt. In allen Kurven ist der Anteil der Isomerisierung bei kurzen Zeiten deutlich sichtbar. Die gemessenen Diffusionszeiten τ_D der Moleküle nehmen mit zunehmender Anregungsleistung aufgrund des Sättigungseffekts zu (siehe Abschnitt 4.1). Da die Isomerisierung in beiden Richtungen photoinduziert ist, ändert sich zwar nicht der Anteil der Moleküle im Zustand der Fluoreszenzinaktivität, jedoch werden mit steigender Anregungsleistung die Raten in und aus dem Isomerisierungszustand erhöht. Dadurch verringert sich die charakteristische Zeit der Isomerisierung τ_{Iso} bei gleichbleibendem Anteil.

Beim Vergleich der FCS-Parameter der Cy5-dCTP-Probe mit der terminal mit Cy5 markierten 500bp DNS-Probe fallen signifikante Unterschiede auf. So ist der Anteil der Moleküle im fluoreszenzinaktiven Zustand bei der Cy5-dCTP-Probe höher und die Fluoreszenzlebenszeit niedriger als bei der 500 bp DNS-Probe (Tabelle 9). Auch die Verweildauer im nichtfluoreszierenden Isomerisierungszustand τ_{Iso} ist, wie in Abbildung 37 b) ersichtlich, bei der Cy5-dCTP signifikant niedriger.

Diese beobachteten Unterschiede der FCS-Parameter von Cy5, gebunden an einem Nukleotid und an einem DNS-Molekül, stimmen mit den Beobachtungen von Widengren und Schwille [28] überein. Durch die Bindung des Cy5-Moleküls an ein langes DNS-Molekül nimmt die Rate in den fluoreszenzinaktiven Isomerisierungszustand ab, da auf der einen Seite sich weniger Cy5 Moleküle im nichtfluoreszierenden Zustand befinden, andererseits aber dessen charakteristische Zeit erhöht ist. Auch die Erhöhung der Fluoreszenzlebenszeit der an DNS-Moleküle gebundenen Cy5-Farbstoffe weist darauf hin, dass die Rate nichtfluoreszierender Prozesse beim Übergang von S_1 zu S_0 verringert ist.

Da bei der Anpassungsfunktion für die Autokorrelationskurven der 500 bp DNS-Probe nur eine Komponente für die Isomerisierung verwendet worden ist, aber nachgewiesen wurde, dass sich die charakteristische Zeit τ_{Iso} von Cy5 gebunden an einem Nukleotid und gebunden an einem DNS-Molekül unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass diese hier ermittelte charakteristische Zeit τ_{Iso} für die DNS-Probe einen Mittelwert zwischen frei diffundierenden und an DNS-Molekülen gebundenen Cy5-Farbstoffmolekülen darstellt.

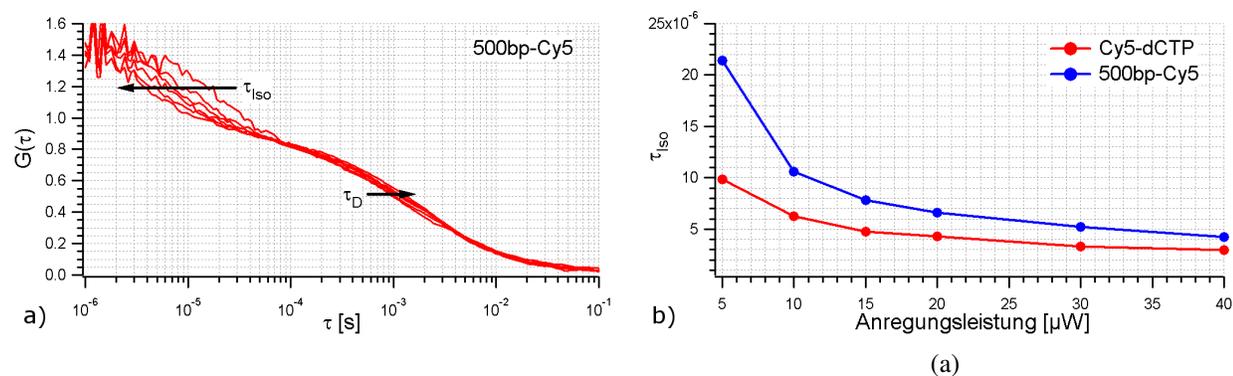


Abbildung 37: a) Normierte Autokorrelationskurven der terminal mit Cy5 markierten 500 bp DNS-Probe bei unterschiedlichen Anregungsleistungen eines 635 nm Lasers. Mit steigender Anregungsleistung nimmt die charakteristische Zeit der Isomerisierung τ_{iso} ab und die Diffusionszeit τ_D zu. b) charakteristische Zeit der Isomerisierung τ_{iso} für eine Cy5-dCTP-Farbstofflösung (rote Kurve) und einer terminal mit Cy5 markierten 500 bp DNS-Probe (blaue Kurve) in Abhängigkeit der Anregungsleistung eines 635 nm Lasers.

Bei höheren Anregungsleistungen kommen neben den Isomerisierungszuständen auch noch Tripletzustände hinzu, die sich auf ähnlichen Zeitskalen in der Autokorrelationskurve zeigen. Diese photophysikalischen beziehungsweise photochemischen Prozesse können FCS-Messungen mit diesem Farbstoff im Vergleich zu anderen Farbstoffen erschweren und sind bei der Untersuchungen von Diffusionsdynamiken zu berücksichtigen.

4.5 Wechselwirkungen von R110-dCTP mit Exo III

Bei einer Versuchsreihe mit einer R110-dCTP Farbstofflösung mit steigender Exo III-Konzentration wurde festgestellt, dass sich die Autokorrelationskurven des R110-Fluoreszenzsignals mit zunehmender Enzymkonzentration zu größeren Zeiten verschieben (Abbildung 38 a). Dies kann einerseits auf die Zunahme des Diffusionskoeffizienten von R110-dCTP hindeuten oder auf einen wachsenden Anteil einer zweiten, langsameren Komponente.

In der Annahme, dass neben freien R110-dCTP eine zweite Komponente in der Lösung vorhanden ist, wurden die Autokorrelationskurven mit einer Zwei-Komponenten-Fitfunktion (Gleichung 45) angepasst. Die Anpassungsfunktion wurde als globaler Fit über alle Autokorrelationskurven angewandt. Die beiden Diffusionszeiten τ_{D_1} und τ_{D_2} der beiden Komponenten und der Strukturfaktor S wurden dabei als globale Parameter verwendet. τ_{D_1} wurde über eine reine R110-dCTP-Farbstofflösung bestimmt ($80 \mu s$) und beim globalen Fit festgehalten. Die Teilchenanzahl N und der Anteil y von R110-dCTP bleiben als freie, nicht globale Parameter übrig.

Als Diffusionszeit der zweiten Komponente wurde $(237 \pm 1) \mu s$ ermittelt, was der dreifachen Diffusionszeit von R110-dCTP mit $80 \mu s$ entspricht. Das Molekulargewicht von R110-dCTP entspricht 771 g/mol und das von Exo III 28000 g/mol [135]. Mit folgende Formel lässt sich der

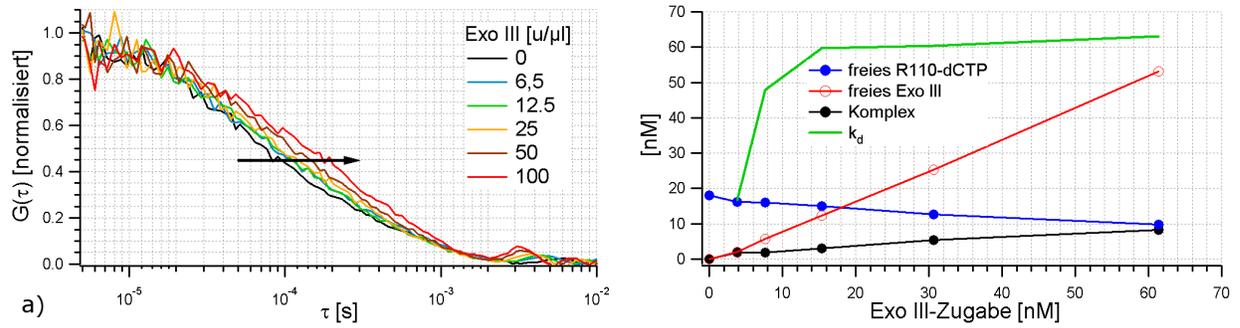


Abbildung 38: a) Autokorrelationskurven einer R110-dCTP-Exo-III-Lösungen bei unterschiedlichen Exo III-Konzentrationen. Aufgrund der Bildung von R110-dCTP–Exo III-Komplexen verschiebt sich die Autokorrelationskurve zu größeren Zeiten. Aus diesen Kurven kann die Konzentration der Komplexe bestimmt werden. b) Angabe der Konzentration von freien R110-dCTP (blaue Kurve), freien Exo III-Molekülen (rote Kurve) und den Komplex (schwarze Kurve) aus beiden in Abhängigkeit der zugegebenen Exo III-Konzentration. Aus diesen Konzentrationensangabe lässt sich jeweils die Dissoziationskonstante k_c (grüne Kurve) bestimmen.

Einfluss des Molekulargewichts MW auf die Diffusionszeit abschätzen:

$$\sqrt[3]{MW} \sim \tau_D. \quad (80)$$

Da Exo III ein 36 mal größeres Molekulargewicht aufweist als R110-dCTP, sollte dessen Diffusionszeit nach dieser Formel auch um etwa 3,3 größer als die von R110-dCTP sein. Dieser Unterschied entspricht dem ermittelten Verhältnis zwischen R110-dCTP und der zweiten Komponente in den Autokorrelationsfunktionen. Da in der reinen Exo III-Stammlösung keine Komponente mit entsprechender Diffusionsgeschwindigkeit gefunden werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass sich freie R110-dCTP-Moleküle an Exo III anhaften und diese somit als zweite langsame Komponente in den Autokorrelationskurven sichtbar werden. Durch die Zunahme der Exo III-Konzentration werden um so mehr R110-dCTP-Moleküle an Exo III gebunden, so dass die Konzentration dieses Komplexes zunimmt.

Die Reaktionsgleichung für die Komplexbildung von R110-dCTP und Exo III kann wie folgt geschrieben werden:



Das Massenwirkungsgesetz dieser Gleichgewichtskonstante lautet:

$$k_d = \frac{[\text{R110-dCTP}] \cdot [\text{Exo III}]}{[\text{R110-dCTP} - \text{Exo III}]}. \quad (82)$$

Die Gleichgewichtskonstante k_d , die in dem Fall als Dissoziationskonstante bezeichnet wird, gibt an, auf welcher Seite das Gleichgewicht liegt. Anhand der bekannten Ausgangskonzentration

$[R110\text{-dCTP}]_0$, kann die Konzentration des Komplexes über die Autokorrelationskurven bestimmt werden. Da die Konzentration des eingesetzten Enzyms $[Exo\ III]_0$ variiert wird und damit ebenso die Konzentration des Komplexes, folgt für die Konzentration an freien R110-dCTP- und freien Exo III-Molekülen:

$$[R110\text{-dCTP}] = [R110\text{-dCTP}]_0 - [R110\text{-dCTP} - Exo\ III] \quad (83)$$

$$[Exo\ III] = [Exo\ III]_0 - [R110\text{-dCTP} - Exo\ III] . \quad (84)$$

In Abbildung 38 b) ist der Verlauf der Konzentration an freien R110-dCTP-, freien Exo III-Molekülen sowie den Komplexen aus beiden in Abhängigkeit von der zugegebenen Exo III-Konzentration dargestellt. Mit zunehmender Exo III-Konzentration nimmt die Konzentration des Komplexes zu und die der freien R110-dCTP-Moleküle ab. Ebenfalls ist die Dissoziationskonstante k_d dargestellt. Diese ist wider erwarten nicht konstant. Dies deutet darauf hin, dass sich das System möglicherweise nicht im Gleichgewicht befindet, oder dass das hier verwendete einfache Modell, dass ein Komplex nur aus einem R110-dCTP- und einem Exo III-Molekül besteht, nicht stimmt. Die Größenordnung der Dissoziationskonstante kann jedoch angegeben werden.

4.6 Charakterisierung der DNS-Proben

4.6.1 DNS in Lösung

Im folgenden werden die Eigenschaften nativer sowie hochmarkierter DNS in Lösung, die mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie bestimmt wurden, vorgestellt.

Native DNS

Zur Untersuchung der Eigenschaften von nativer DNS in Lösung wurden DNS-Proben mit Längen von 500, 1200 und 3000 Basenpaaren untersucht, die terminal mit dem Farbstoff Rhodamin Green (RhG) markiert sind. Da RhG im Gegensatz zu Cy5 keine Isomerisierung und bei niedriger Anregungsleistung kaum Triplett aufweist, sind die erhaltenen Autokorrelationskurven allein von der Dynamik der DNS-Moleküle geprägt.

Die DNS-Proben wurden bei Raumtemperatur (24°C) mit dem in Abschnitt 3.2 beschriebenen Setup gemessen und die erhaltenen Autokorrelationskurven mit einer Zweikomponenten-Anpassungsfunktion (Gleichung 45) angepasst, die neben der Eigendiffusion der mit RhG markierten DNS-Moleküle auch ungebundenen Farbstoff sowie einen Triplettanteil (Gleichung 41) berücksichtigt. Die Diffusionszeit des freien Farbstoffes wurde durch eine Messung einer reinen RhG-Farbstofflösung bestimmt und konnte daher hier als fester Parameter verwendet werden. Mit derselben Farbstofflösung wurde auch die Ausdehnung des Anregungsfokus bestimmt, und mittels Gleichung 33 konnten damit die Diffusionskoeffizienten der DNS-Moleküle ermittelt werden.

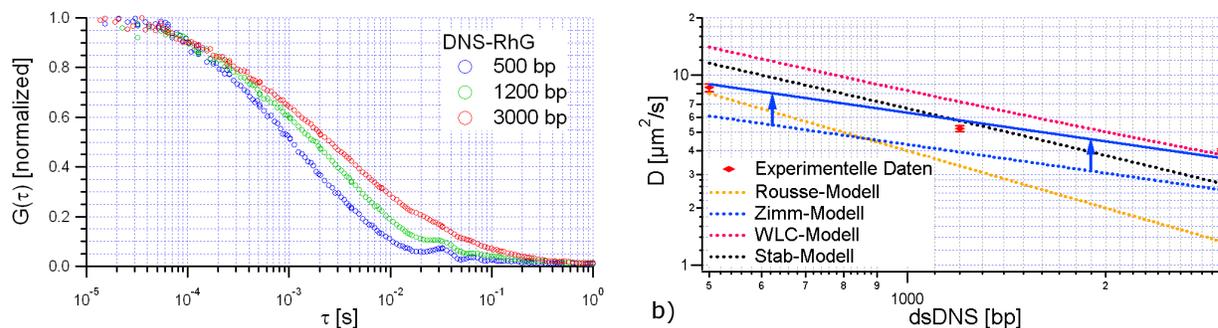


Abbildung 39: a) Autokorrelationskurven von 500 bp (blau), 1200 bp (grün) und 3000 bp (rot) langer DNS, die terminal mit RhG markiert sind. Mit zunehmender Länge der DNS-Moleküle verschiebt sich die Autokorrelationskurve zu größeren Zeiten. b) Die aus den Autokorrelationskurven bestimmten Diffusionskonstanten in Abhängigkeit der Anzahl der Basenpaare verglichen mit dem Stab-, Rouse-, Zimm- und WLC-Modellen für DNS ($l_p = 50$ nm, $d = 2,4$ nm). Graph ist doppellogarithmisch dargestellt. Durch eine parallele Verschiebung des Zimmmodells zu größeren Diffusionskonstanten hin (Pfeile), lassen sich die experimentellen Daten mit diesem Modell am besten beschreiben.

In Abbildung 39 a) sind die Autokorrelationskurven der drei DNS-Proben dargestellt. Mit steigender Länge der DNS-Moleküle verschiebt sich die Autokorrelationskurve zu größeren Zeiten. Die aus diesen Kurven bestimmten Diffusionskoeffizienten sind in Abbildung 39 b) in Abhängigkeit der DNS-Länge dargestellt und mit den vier Modellen für Polymere, dem Stab-, Rouse-, Zimm- und WLC-Modell, verglichen. Dabei scheint keines dieser Modelle die experimentellen Daten richtig beschreiben zu können. Der Abfall der Diffusionskonstante mit zunehmender Basenlänge wird noch am Besten durch das Zimm-Modell beschrieben (durchgezogene blaue Kurve), wobei die ermittelten Diffusionskoeffizienten deutlich größer sind, als nach diesem Modell zu erwarten wäre.

Dies könnte darin begründet sein, dass bei der Auswertung der Autokorrelationskurven keine innere Dynamik der DNS-Polymere berücksichtigt wurde, da in dieser Arbeit relativ kurze DNS-Moleküle verwendet wurden. Diese sollten aufgrund der großen Persistenzlänge kaum eine innere Dynamik aufweisen. Zudem ist die größte hier verwendete DNS mit 3000 bp und einem Gyrationradius von etwa 130 nm noch deutlich kleiner als das konfokale Volumenelement mit $w_0 \approx 200$ nm. Die Dynamik einzelner DNS-Segmente würde somit während der Diffusion der DNS durch das Volumenelement nicht zum Austritt des Farbstoffes aus dem Detektionsvolumen führen und damit auch nicht zu zusätzlichen, in den Autokorrelationskurven sichtbaren Intensitätsfluktuationen. Jedoch könnten die Lage des Farbstoffes am recht flexiblen Ende der DNS oder Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und dem DNS-Molekül, zum Beispiel mit der Base Guanosin, welches als Fluoreszenzquencher bekannt ist [176], zu zusätzlichen Intensitätsfluktuationen führen. Dadurch würde sich die Autokorrelationszeit aus der langsameren Schwerpunktdiffusion und der schnelleren terminalen Dynamik des DNS-Moleküls ergeben. Ohne Berücksichtigung dieser zusätzlichen Dynamik würde eine größere Diffusionskonstante bestimmt werden.

Doch wahrscheinlich ist eine eindeutige Zuordnung für den in dieser Arbeit verwendete Längenbereich der DNS zu einem der Polymermodelle nicht möglich. In [177] wird für DNS unter

1000 bp das Stabmodell und in [178] für DNS zwischen 2100 und 200000 bp das Zimm-Modell angewandt. Die hier verwendeten DNS-Längen befinden sich damit im Übergangsbereich dieser beiden Modelle.

Hochmarkierte DNS

Mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie sollte der Einfluss der kovalent eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe auf die DNS-Moleküle untersucht werden. Die Messungen wurden mit dem in Abschnitt 3.2 beschriebenen konfokalen Fluoreszenzmikroskop bei einer alternierenden Zweifarbenanregung mittels der beiden gepulsten Laser der Wellenlänge 470 und 635 nm durchgeführt. Das Fluoreszenzsignal wurde wellenlängenabhängig von zwei Detektoren detektiert, einer für das grüne Fluoreszenzsignal (< 600 nm) von den Farbstoffen R110 beziehungsweise DINO II, der andere für das rote Fluoreszenzsignal (> 645 nm) vom Cy5-Farbstoff (Abbildung 15).

In Abbildung 40 a) sind die normierten Autokorrelationskurven des grünen Fluoreszenzsignals von 500 bp und 3000 bp DNS-Proben, die einfach beziehungsweise zweifach kovalent markiert sind (siehe Abschnitt 3.5.1, Abbildung 20), und zum Vergleich die einer reinen R110-dCTP-Farbstofflösung dargestellt. Bei den einfach kovalent markierten DNS-Proben ist wie zu erwarten mit Zunahme der DNS-Länge eine Verschiebung der Autokorrelationskurven zu größeren Zeiten feststellbar. Die Kurven der zweifach kovalent markierten DNS-Proben zeigen dagegen keine Längenabhängigkeit und entsprechen der Kurve der reinen R110-dCTP-Farbstofflösung. Dass sich die Diffusionseigenschaften von freien R110-dCTP und doppelt markierte DNS unterscheiden, weisen die aus den Autokorrelationskurven des terminalen Cy5-Signals bestimmten Diffusionskonstanten für die doppelt markierten DNS-Proben hin (Abbildung 43). Damit scheinen die Autokorrelationskurven des grünen Fluoreszenzsignals der zweifach kovalent markierten DNS-Proben nicht die Diffusion der hochmarkierten DNS-Moleküle widerzuspiegeln.

Auch ein Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der DNS-Proben zeigt, dass die Intensitäten der doppelt markierten DNS-Lösungen viel zu niedrig sind und sogar dem Signal des Puffers entsprechen (Abbildung 40 a). Dies lässt darauf schließen, dass kein Fluoreszenzsignal von der doppelt markierten DNS erhalten wird, und dass damit die Autokorrelationskurven des grünen Fluoreszenzsignals von der Diffusion vereinzelter freier R110-dCTP-Farbstoffe stammen.

Aber auch schon in den einfach markierten DNS-Proben ist eine Änderung der Fluoreszenzintensität der eingebauten R110-Farbstoffen im Vergleich zu freien R110-dCTP-Molekülen zu erkennen. Für die einfach markierte 500 bp DNS wird eine Rate von etwa 16.500 Photonen pro Sekunde pro DNS-Molekül erhalten (Abbildung 20 d). Für freien R110-dCTP werden etwa 7.000 Photonen pro Sekunde gezählt. Damit ist die Fluoreszenzintensität eines 500 bp DNS-Moleküls mit etwa 125 eingebauten R110-Farbstoffen gerade etwas mehr als doppelt so hoch beziehungsweise die Fluoreszenzintensität eines eingebauten R110-Farbstoffmolekül um den Faktor fünfzig kleiner als die eines einzelnen freien R110-dCTP-Moleküls. Die Änderung der Fluoreszenzeigenschaft zwischen freiem und eingebauten R110-dCTP-Farbstoff lässt sich auch in der Fluoreszenzlebenszeit

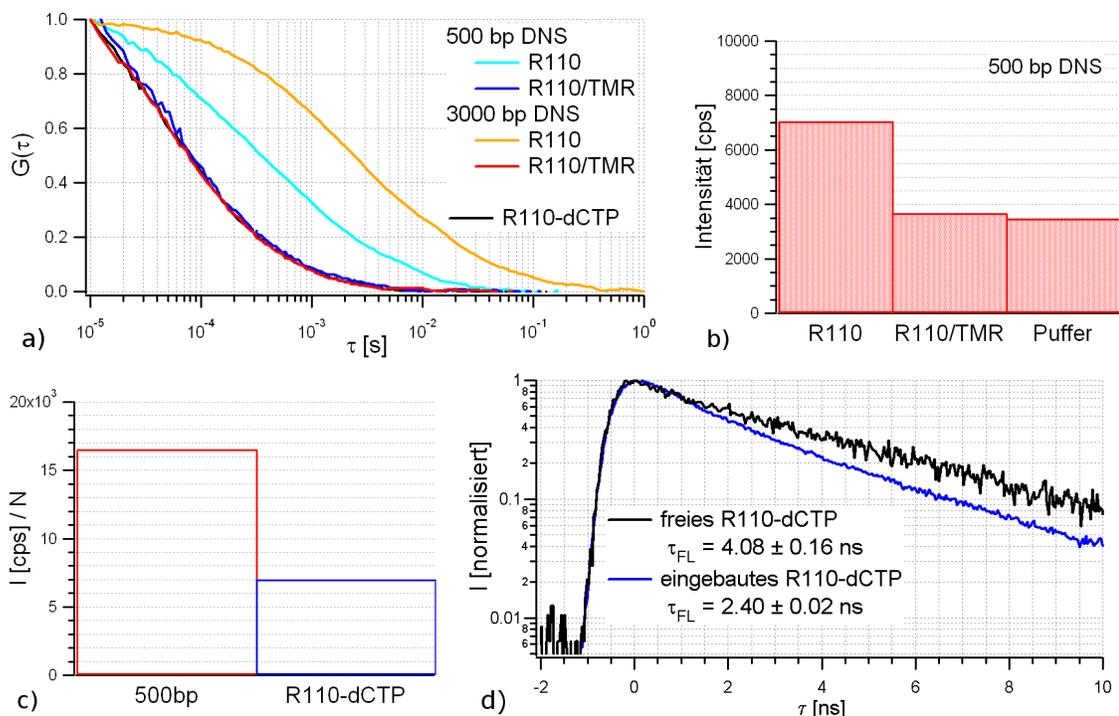


Abbildung 40: **a)** Normierte Autokorrelationskurven des Fluoreszenzsignals des eingebauten R110-Farbstoffes (< 600 nm) unterschiedlich stark markierter 500 bp und 3000 bp DNS im Vergleich zu einer reinen R110-dCTP-Farbstofflösung. **b)** Intensität einer einfach und zweifach kovalent markierten 500 bp DNS-Lösung im Vergleich zur Pufferlösung. **c)** Vergleich der Fluoreszenzintensität pro Molekül einer 500 bp DNS mit freien R110-dCTP-Farbstoffen. **d)** Fluoreszenzlebenszeiten von R110-dCTP eingebaut in eine 500 bp DNS (blaue Kurve) und von einer R110-dCTP-Farbstofflösung (schwarze Kurve). Für nähere Erläuterung siehe Text.

beobachten (Abbildung 20 d), die von 4 ns bei der R110-dCTP-Farbstofflösung auf 2,4 ns bei einer einfach markierten DNS-Probelösung fällt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität sowie der Fluoreszenzlebenszeit weist auf ein Quenchen der Farbstoffe hin. Zu erwarten wäre dabei, dass die Fluoreszenzlebenszeit um den selben Faktor wie die Fluoreszenzintensität der R110-dCTP-Moleküle fällt. Da jedoch in der DNS-Probelösung zu einem gewissen Anteil auch frei diffundierende R110-dCTP-Moleküle vorhanden sind, setzt sich die hier bestimmte Fluoreszenzlebenszeit somit aus freien sowie in die DNS eingebauten R110-Farbstoffmolekülen zusammen. Als Fluoreszenzquencher ist einerseits die Base Guanosin bekannt [176], andererseits sind die Fluoreszenzfarbstoffe so dicht in der DNS gepackt, dass sie sich gegenseitig beeinflussen und sich so selbst quenchen. In der doppelt markierten DNS führt die extrem hohe Dichte an Fluoreszenzfarbstoffe dann dazu, dass diese in Lösung nicht mehr detektierbar sind.

Für eine möglichst genaue Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der unterschiedlich stark markierten DNS wurden die DNS-Moleküle neben dem terminalen Cy5-Farbstoff zusätzlich mit dem interkalierenden Farbstoff DINO II markiert. Das verwendete Setup erlaubt es, sowohl beide Farbstoffe getrennt anzuregen, als auch deren Fluoreszenzlicht getrennt zu detektieren, so dass

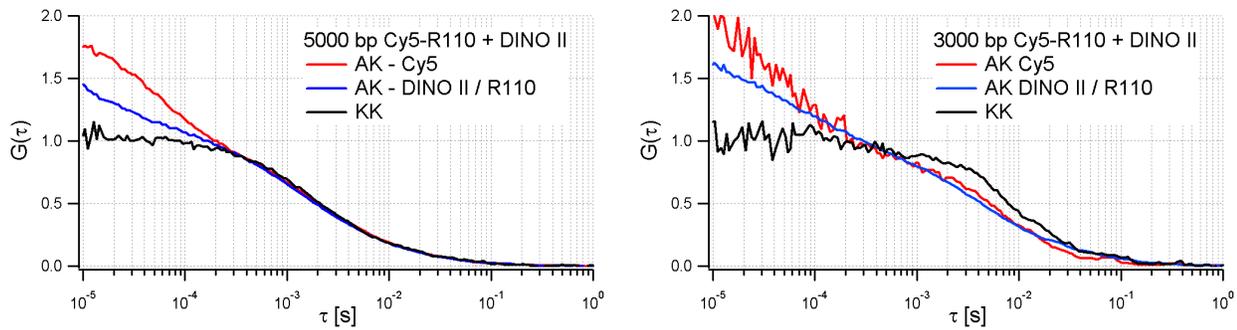


Abbildung 41: Normierte Korrelationskurven von einfach markierter **a)** 500 bp und **b)** 3000 bp langer DNS, die neben dem terminalen Cy5 und eingebauten R110-dCTP zusätzlich mit dem interkalierenden Farbstoff DINO II markiert wurden. Neben den Autokorrelationskurven (AK) der Fluoreszenzsignale von Cy5 (rote Kurve) und R110 beziehungsweise DINO II (blaue Kurve) ist auch die Kreuzkorrelationskurve (KK) beider Signale (schwarze Kurve) dargestellt. Während die Kreuzkorrelationskurven nur die Diffusion der DNS widerspiegelt, sind in den Autokorrelationskurven zusätzliche Dynamiken aufgrund von photophysikalischen beziehungsweise- chemischen Prozessen sichtbar.

sowohl Informationen aus den Autokorrelationskurven des Fluoreszenzsignals der einzelnen Farbstoffe, von Cy5 und DINO II, als auch durch eine Kreuzkorrelation beider Fluoreszenzsignale erhalten wird. In Abbildung 41 sind diese drei normierten Korrelationskurven einer einfach kovalent mit R110-dCTP markierten 500 bp und 3000 bp DNS-Probe dargestellt. Die Verläufe der einzelnen Korrelationskurven unterscheiden sich deutlich voneinander. Neben der Schwerpunktdiffusion der DNS-Moleküle kommen in den Autokorrelationskurven (rote und blaue Kurve) auch photophysikalische beziehungsweise photochemische Prozesse wie die photoinduzierte Isomerisierung von Cy5, die *on-off*-Kinetik der DINO II-Moleküle sowie Triplett-Zustände aller Fluoreszenzfarbstoffe zum Tragen. Aber auch mögliche freie Farbstoffe (R110-dCTP oder Cy5) sind bei der Auswertung dieser Kurven mit zu berücksichtigen. Bei der Kreuzkorrelation (schwarze Kurve) andererseits wird das Fluoreszenzsignal korreliert, welches von beiden Farbstoffen detektiert wird, also wenn ein mit DINO II und Cy5 markiertes DNS-Molekül durch das Messvolumen diffundiert. Dementsprechend wird aus der Kreuzkorrelationskurve die reine Schwerpunktdiffusion der DNS-Moleküle erhalten, und es kann über das experimentell bestimmte Detektionsvolumen (siehe Abschnitt 4.1) auf den Diffusionskoeffizienten geschlossen werden.

Für die DNS-Proben, die terminal mit Cy5 und mit dem interkalierenden Farbstoff DINO II markiert sind, wurden die so bestimmten Diffusionskoeffizienten mit den terminal mit RhG markierten DNS-Proben aus Abbildung 39 verglichen (Abbildung 42). Dabei zeigt sich, dass die Diffusionskoeffizienten der mit DINO II markierten DNS-Moleküle um $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ unter denen der RhG-markierten DNS-Moleküle liegen, erstere also langsamer diffundieren. Die Einlagerung der DINO II Moleküle innerhalb der doppelsträngigen Bereiche der DNS-Moleküle führt zu einem Aufquellen und Versteifung der DNS und damit auch zu einer Vergrößerung der Persistenzlänge [179, 180, 181, 182], wodurch die mit DINO II beladenen DNS-Moleküle langsamer diffundieren als native DNS.

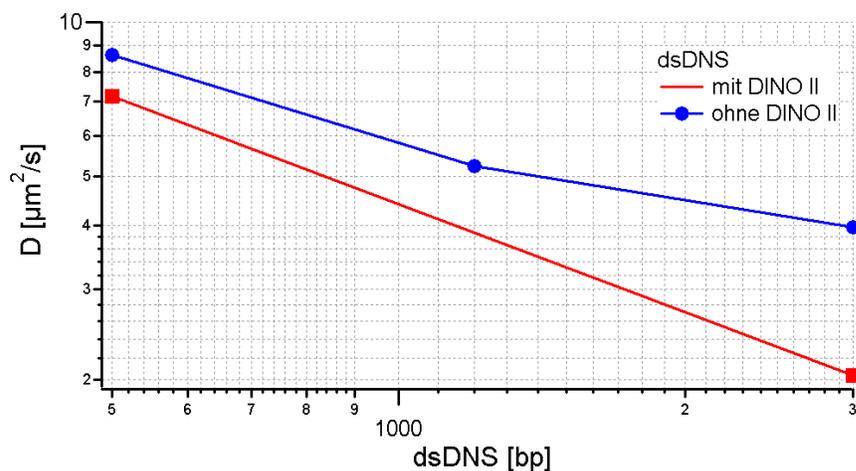


Abbildung 42: Vergleich der Diffusionskonstanten von doppelsträngiger DNS mit (rot) und ohne (blau) Markierung mit dem interkalierenden Farbstoff DINO II. Graph ist doppellogarithmisch dargestellt.

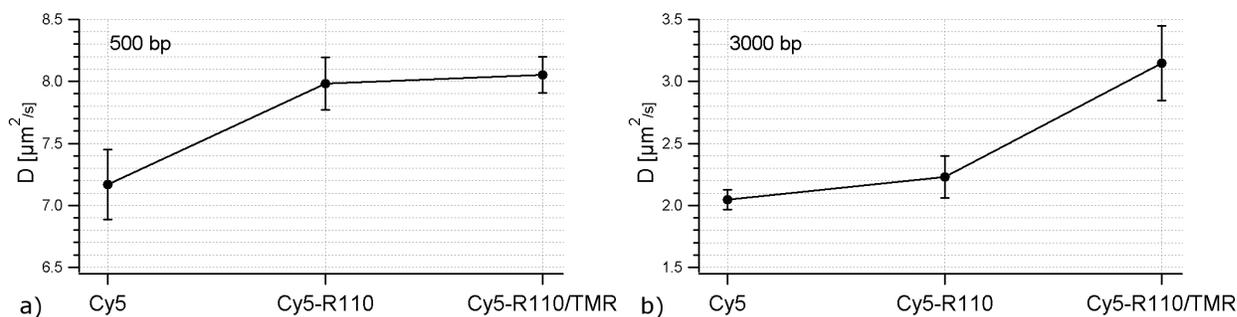


Abbildung 43: Diffusionskonstanten der a) 500 bp und b) 3000 bp langen doppelsträngigen DNS in Abhängigkeit des Markierungsgrads bestimmt aus den Autokorrelationskurven des Fluoreszenzsignals des terminalen Cy5. Mit steigendem Markierungsgrad nimmt die Diffusionskonstante zu. Das bedeutet, dass die hochmarkierten DNS-Moleküle schneller diffundieren als die weniger stark markierten.

In Abbildung 43 sind die Diffusionskonstanten der nativen, einfach-markierten (R110-dCTP) und der doppelt-markierten (R110-dCTP/TMR-dUTP) DNS-Proben für die 500 bp und 3000 bp DNS dargestellt. Dabei weisen die DNS-Moleküle, in denen die fluoreszenzmarkierten Nukleotide eingebaut sind, einen größeren Diffusionskoeffizienten auf als die native DNS. Dass die kovalent markierten DNS-Proben schneller als die native DNS diffundieren, scheint zunächst widersprüchlich, da ja die kovalent markierte DNS aufgrund der zusätzlichen vielen Farbstoffe ein deutlich größeres molekulares Gewicht aufweist und damit größer als die native DNS sein sollte. Doch als Polymer ist die Diffusionszeit der DNS auch von ihrer Form und Flexibilität abhängig. Die kovalent gebundenen Farbstoffe scheinen aufgrund von gegenseitigen Wechselwirkungen die DNS kompakter zu machen, so dass diese einen kleineren hydrodynamischen Radius als native DNS aufweist und damit schneller diffundieren kann. Dabei spielt anscheinend auch die Größe und damit die Flexibilität der DNS-Moleküle selbst eine Rolle, da bei der 3000 bp im Vergleich zur 500 bp DNS eine weitere Erhöhung des Diffusionskoeffizienten bei einer Doppelmarkierung mit R110-dCTP und TMR-dUTP zu beobachten ist.

Eine zu starke Verdichtung der DNS-Moleküle durch die an ihnen kovalent gebundenen Farb-

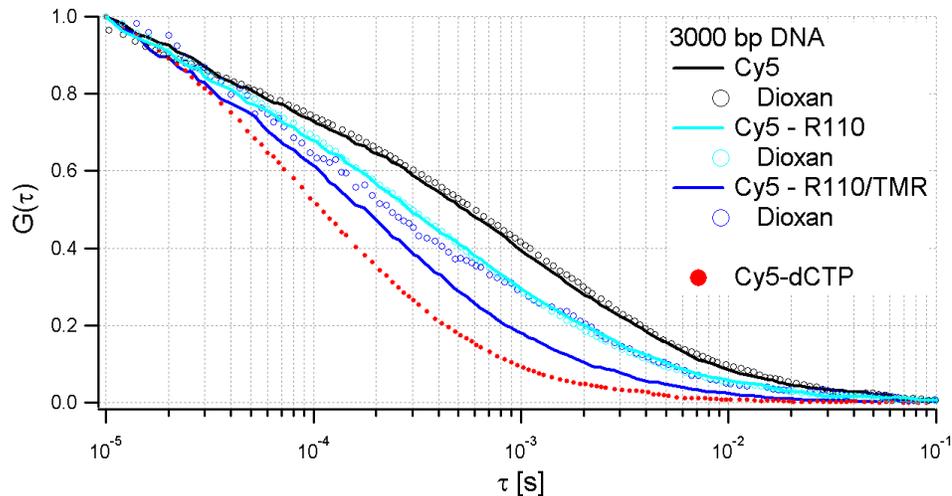


Abbildung 44: Normierte Autokorrelationskurven des Fluoreszenzsignals des terminalen Cy5-Farbstoffes unterschiedlich stark markierter 3000 bp DNS mit (Kreise) und ohne (durchgezogene Kurven) Dioxan im Lösungsmittel. Bei der doppelt markierten DNS ist eine Verschiebung der Autokorrelationskurve zu größeren Zeiten bei einer Zugabe von Dioxan zu beobachten.

stoffe könnte problematisch für einen exonukleolytischen Abbau sein, da möglicherweise das Enzym nicht mehr an das 3'-Ende der DNS gelangen kann. S. Brakmann zeigte, dass durch die Zugabe des Detergenz Dioxan in die Reaktionslösung der exonukleolytische Abbau hochmarkierter DNS möglich ist, beziehungsweise dass das Enzym sogar hoch prozessiv arbeitet [15]. Darum wurde auch der Einfluss von Dioxan auf die hochmarkierten DNS-Proben untersucht. In Abbildung 44 sind die normierten Autokorrelationskurven des Fluoreszenzsignals des terminalen Cy5-Farbstoffes unterschiedlich stark markierter 3000 bp DNS mit und ohne Dioxan im Verhältnis 1:4 im Lösungsmittel dargestellt. Dabei scheint das Dioxan bei der nativen und einfach markierten DNS kaum Einfluss auf den Verlauf der Autokorrelationskurven zu haben. Doch bei der doppelt markierten DNS ist eine deutliche Verschiebung der Autokorrelationskurve zu größeren Zeiten feststellbar, so dass diese dem der einfach markierten DNS entspricht. Möglicherweise verringert Dioxan bei der doppelt markierten DNS signifikant die Verdichtung der DNS, indem es die Wechselwirkung zwischen den Farbstoffen verringert, so dass sich der hydrodynamische Radius wieder vergrößert und die Diffusionszeit abnimmt.

4.6.2 Immobilisierte DNS

Zur Charakterisierung der auf der Deckglasoberfläche immobilisierten, hochmarkierten DNS wurde ein konfokales Fluoreszenzmikroskop, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, mit einem 488 nm beziehungsweise einem 635 nm Anregungslaser verwendet. Zur Lokalisation der DNS-Bereiche wurde eine CCD-Kamera verwendet, und die Aufnahmen der immobilisierten DNS erfolgten beim konfokalen Fluoreszenzmikroskop durch Abrastern der Deckglasoberfläche. Das Fluoreszenzlicht

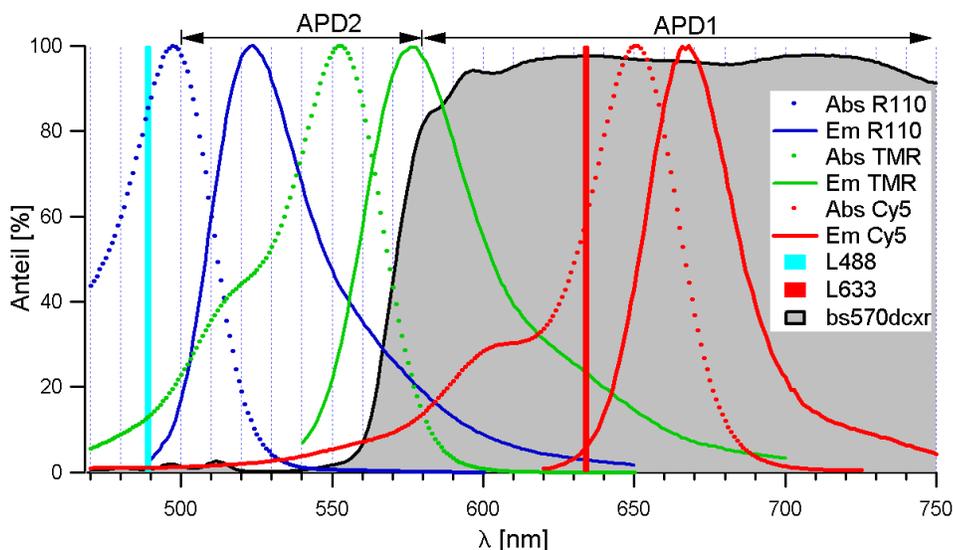


Abbildung 45: Absorptions- (gepunktete Kurven) und Emissionsspektren (durchgezogene Kurven) der Farbstoffe R110 (blau), TMR (grün) und Cy5 (rot) sowie die Laserlinie des 488 nm Lasers und des 635 nm Lasers. Mit Hilfe eines 570 nm Strahlenteilers (Transmissionsspektrum in grau) wurde das Fluoreszenzlicht wellenlängenabhängig auf zwei Detektoren (APD1 und APD2) aufgeteilt.

wurde wellenlängenabhängig mittels eines 570-Strahlenteilers auf die zwei Detektoren APD1 und APD2 aufgeteilt. Die Absorptions- und Emissionsspektren der für die Markierung der DNS verwendeten Farbstoffe, die Wellenlängen der Anregungslaser sowie der Detektionsbereich der beiden Detektoren sind in Abbildung 45 dargestellt. Da die Laserlinie des 488 nm Lasers nahe am Absorptionsmaximum von R110 liegt, lässt sich dieser Farbstoff hervorragend mit diesem Laser anregen, während dies für TMR nicht der Fall ist. Dabei werden die meisten Fluoreszenzphotonen des R110-Farbstoffes in APD2 detektiert, während die von TMR sich auf beide Detektoren nahezu gleich verteilen mit einem kleinen Übergewicht in APD1. Cy5 lässt sich sehr gut mit dem 635 nm Laser anregen, und dessen gesamte Fluoreszenzphotonen werden in APD1 detektiert.

Charakterisierung der Proben

Unterschiedlich fluoreszenzmarkierte DNS-Probelösungen wurden für die Immobilisierung punktweise auf ein Deckglas gegeben (siehe Abschnitt 3.5.2). Dadurch wurde ein kreisförmiger Bereich immobilisierter DNS mit einem Radius von ≈ 3 mm erhalten. In Abbildung 46 sind Fluoreszenzaufnahmen vom Rande dieser DNS-Bereiche von I) nativen, II) einfach mit R110-dCTP, III) einfach mit TMR-dUTP und IV) doppelt markierter DNS zu sehen. Anhand des Farbstoffes Cy5, mit dem alle DNS-Proben terminal markiert sind, lassen sich die einzelnen DNS-Moleküle bei einer Anregung mit dem 635 nm Laser lokalisieren (Abbildung 46 a). Das Fluoreszenzlicht an der selben Position bei einer Anregung mit dem 488 nm Laser von einer Wellenlänge unterhalb von 570 nm ist in der Spalte b) der Abbildung 46 und oberhalb von 570 nm in der Spalte c) der Abbildung 46 dargestellt.

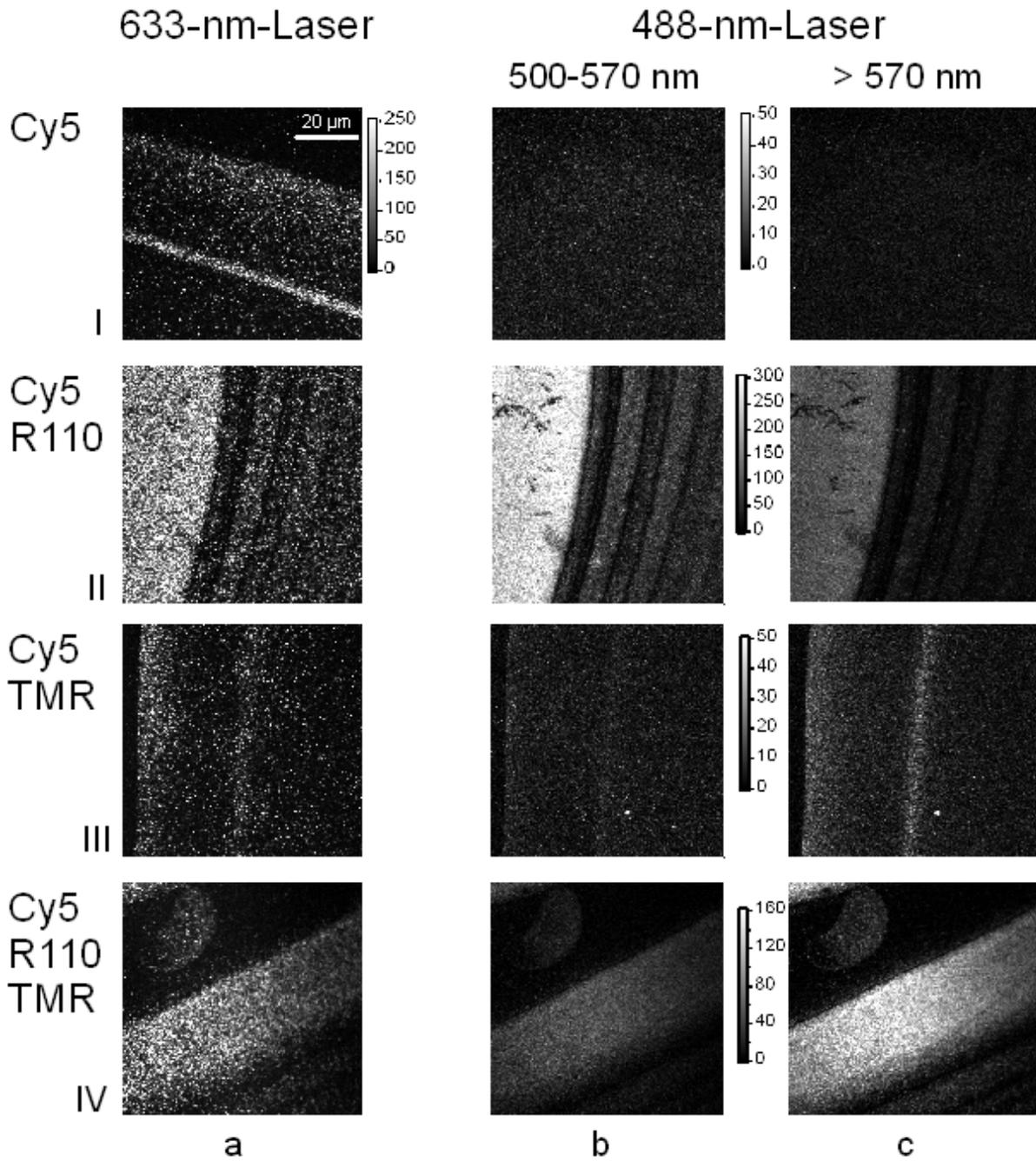


Abbildung 46: Fluoreszenzrasteraufnahmen unterschiedlich markierter, auf der Deckglasoberfläche immobilisierter DNS bei einer Anregung mit einem 635 nm Laser (Spalte a, selbe Skalierung der Fluoreszenzintensität) sowie bei einer Anregung mit einem 488 nm Laser und Detektion der Fluoreszenz im Bereich von 500-570 nm (Spalte b) beziehungsweise über 570 nm (Spalte c). Alle DNS-Proben sind neben den eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleotiden terminal mit Cy5 markiert. - Reihe I: native DNS; Reihe II: einfach markiert mit R110-dCTP; Reihe III: einfach markiert mit TMR-dUTP; Reihe IV: doppelt markiert mit R110-dCTP und TMR-dUTP. (Ölimmersionsobjektiv, Deckglasoberfläche trocken)

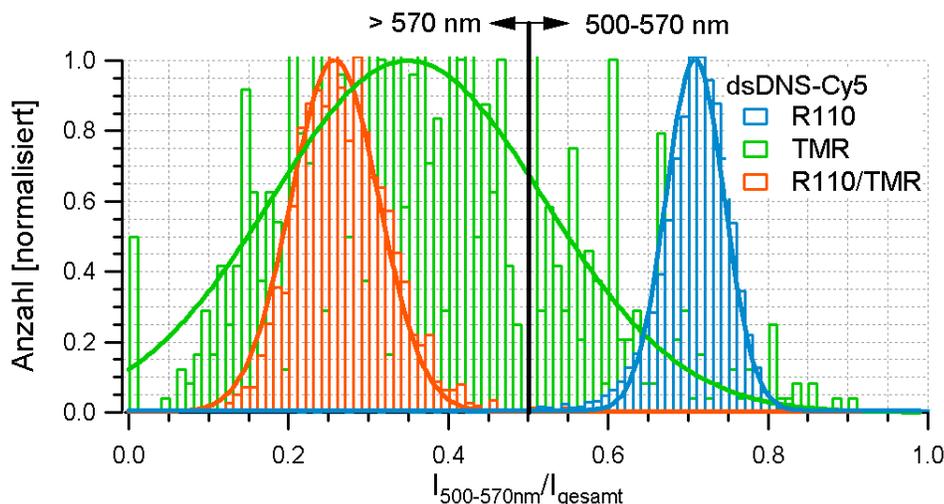


Abbildung 47: Normierte Fluoreszenzverteilung immobilisierter, einfach mit R110-dCTP (blau), einfach mit TMR-dUTP (grün) und zweifach (rot) markierter DNS-Moleküle auf die Wellenlängenbereiche unterhalb beziehungsweise oberhalb von 570 nm bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die durchgezogenen Kurven stellen Gauß-Anpassungen an die jeweiligen Verteilungen dar.

Bei allen DNS-Proben ist eine inhomogene Verteilung der immobilisierten DNS-Moleküle auf der Deckglasoberfläche zu beobachten. Dies ist auf die Probenherstellung zurückzuführen. Bei der Verdunstung, in deren Verlauf sich der Lösungstropfen auf dem Deckglas verkleinert, entstehen um die zentralen DNS-Bereiche ringförmige Regionen mit unterschiedlicher Flächendichte an immobilisierten DNS-Molekülen. Die genauen Mechanismen der Bildung von Ringstrukturen bei der Verdunstung von Lösungstropfen sind in der Literatur beschrieben [183, 184, 185].

Für die Analyse der Fluoreszenzeigenschaften der unterschiedlich markierten DNS-Moleküle bei einer Anregung mit dem 488 nm Laser wurde für jedes immobilisierte DNS-Molekül, dessen Position über das Signal des Cy5 bestimmt wurde, die Fluoreszenzverteilung auf die Wellenlängenbereiche unterhalb und oberhalb von 570 nm bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm bestimmt. Das Histogramm dieser Verteilung ist in Abbildung 47 für die drei hochmarkierten DNS-Proben dargestellt.

Wie bei Messungen in Lösung (Abschnitt 4.6.1) wird von der mit R110-dCTP markierten DNS entsprechend des Emissionsspektrums des Farbstoffes (Abbildung 45) ein gutes Fluoreszenzsignal unterhalb von 570 nm detektiert. Da die Laserlinie des 488 nm Laser weit unterhalb des Absorptionsmaximums von TMR liegt, lässt sich die mit TMR-dUTP markierte DNS-Probe auch nur sehr schlecht zur Fluoreszenz anregen. Dadurch wird eine sehr breite Verteilung im Histogramm erhalten. Diese ist aber im Vergleich zu den mit R110-dCTP markierten DNS-Proben in den Bereich $\frac{I_{500-570}}{I_{\text{gesamt}}} < 0,5$ verschoben, was eine höhere Fluoreszenzintensität oberhalb von 570 nm bedeutet.

Während von doppelt markierter DNS in Lösung kein Fluoreszenzsignal zu detektieren ist (Abschnitt 4.6.1), ist dies immobilisiert möglich. Dies kann einerseits im Abstrahlverhalten der Fluor-

reszenzfarbstoffe an Grenzflächen begründet sein (Abbildung 17), wodurch mehr Fluoreszenzphotonen in Richtung des Objektivs emittiert werden als bei Fluoreszenzfarbstoffen in Lösung. Andererseits könnten die Farbstoffe nicht so stark gequenchet werden, da die DNS auf der Deckglasoberfläche weniger als ein Knäuel vorliegt als in Lösung [14]. Verglichen mit der TMR-dUTP markierten DNS liegt das Fluoreszenzsignal ebenfalls oberhalb von 570 nm, die Intensität ist jedoch deutlich größer. Demnach scheint das Fluoreszenzsignal hauptsächlich vom TMR-Farbstoff zu stammen, welcher in der doppelt markierten DNS sogar besser zur Fluoreszenz angeregt wird als in der einfach mit TMR-dUTP markierten DNS. Dies lässt sich nur durch einen Energietransfer zwischen R110 und TMR erklären. Nach Gleichung 10 beträgt der Försterradius R_0 zwischen R110-dCTP und TMR 6,2 nm. Der Abstand zwischen den Basen in der DNS beträgt 0,34 nm. Damit ist der Abstand der beiden Farbstoffe eingebaut in die DNS deutlich kleiner als der Försterradius, wodurch eine starke Energieübertragung von R110 auf TMR stattfindet. Somit werden mit dem 488 nm Laser zwar hauptsächlich die R110-Farbstoffmoleküle angeregt, diese geben jedoch aufgrund der räumlichen Nähe und des Überlapps des Emissionsspektrums von R110 mit dem Absorptionsspektrum von TMR ihre Energie strahlungslos an die TMR-Moleküle weiter. Die TMR-Moleküle ihrerseits geben diese übertragene Energie anschließend als Fluoreszenzphotonen entsprechend ihres Emissionsspektrums ab.

Desweiteren ist auch eine strahlungslose Energieübertragung auf den terminalen Marker Cy5 vorstellbar. Zwar ist Cy5 über einen 17 bp langen Primer in die DNS eingebaut und damit mindestens 5,8 nm von der nächsten fluoreszenzmarkierten Base entfernt, jedoch befindet sich dieser Abstand nach Gleichung 10 noch im Bereich des Försterradius, der für R110-dCTP und Cy5 5,4 nm beziehungsweise für TMR und Cy5 6,5 nm beträgt. Um zu bestimmen, ob bei einer Anregung von doppelt markierten DNS-Molekülen mit einem 488 nm Laser auch Cy5 aufgrund von Energieübertragung zur Fluoreszenz angeregt wird, wurde das konfokale Fluoreszenzmikroskopsystem dahingehend verändert, dass das Fluoreszenzsignal wellenlängenabhängig anstatt von zwei nun von drei Detektoren registriert wird. Dabei wurden die Wellenlängenbereiche der Detektoren so gewählt, dass im ersten hauptsächlich die Fluoreszenz vom Fluoreszenzfarbstoff R110 (500-550 nm), im zweiten vom TMR (550-635 nm) und im dritten vom Cy5 (> 645 nm) detektiert wird.

In der Abbildung 48 a-c) sind die Fluoreszenzrastraufnahmen der immobilisierten, doppelt markierten DNS-Probe, aufgetrennt in die drei Wellenlängenbereiche, bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm dargestellt. Jeder Punkt in den Aufnahmen entspricht mindestens einem DNS-Molekül. Zahlreiche DNS-Moleküle sind in den Fluoreszenzwellenlängenbereichen von R110 (Abbildung 48 a) und TMR (Abbildung 48 b) zu sehen. Von einigen dieser DNS-Moleküle wird ebenfalls ein Fluoreszenzsignal vom Cy5 detektiert (Abbildung 48 c). Nach einer großflächigen Bestrahlung der DNS-Probe mit dem 488 nm Laser ist eine deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals von TMR und Cy5 zu beobachten (Abbildung 48 e, f), während das Fluoreszenzsignal des R110 erhalten bleibt. Die doppelt markierte DNS scheint wie eine photonische Leiter [186, 187] die eingestrahlte Energie des 488 nm Laser vom R110 über TMR auf Cy5 zu übertragen. Dabei bleichen

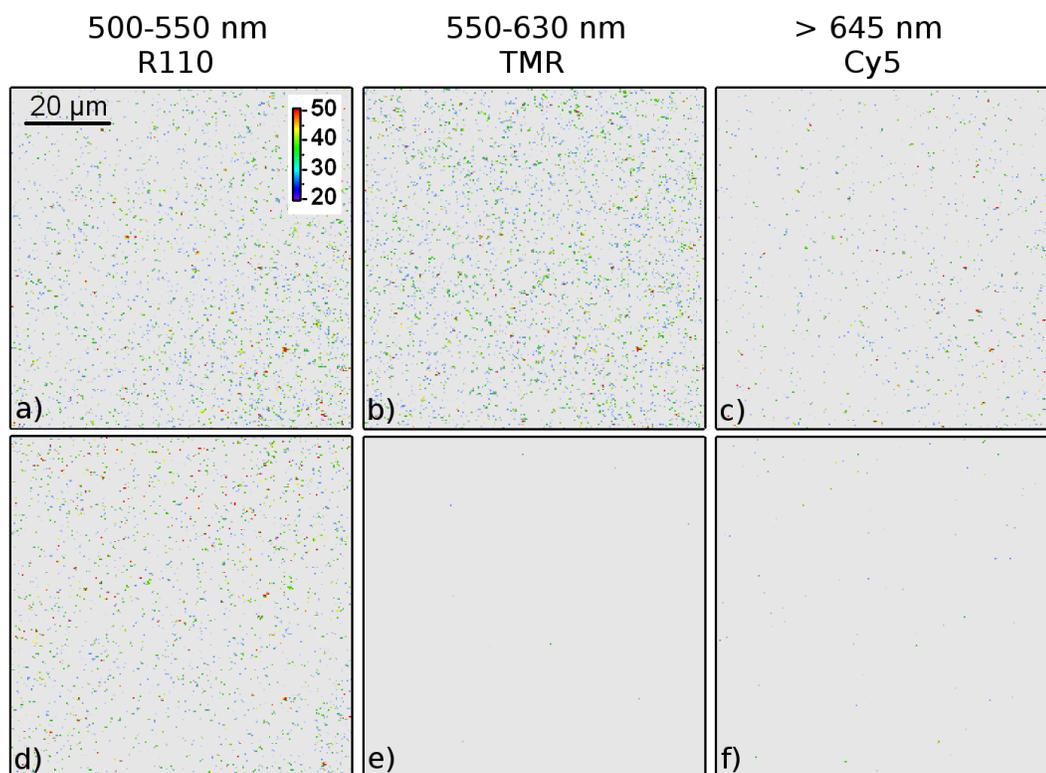


Abbildung 48: Fluoreszenzrasteraufnahmen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm von immobilisierter DNS, die doppelt markiert mit R110-dCTP und TMR-dUTP ist, sowie terminal Cy5 trägt, vor (obere Reihe, **a-c**) und nach (untere Reihe, **d-f**) einer längeren Bestrahlung mit dem 488 nm Laser. Das Fluoreszenzsignal wurde entsprechend der verwendeten Farbstoffe in drei Emissionswellenlängenbereiche aufgetrennt: von 500-550 nm (R110, **a,d**), von 550-630 nm (TMR, **b,e**) und von über 645 nm (Cy5, **c,f**). Der Intensitätsbalken in a) gibt die Photonenzahl pro Pixel an. Trotz einer geringen Anregungsintensität von $3,1 \text{ W/cm}^2$ ist nach einer längeren Bestrahlung ein verringertes Fluoreszenzsignal von TMR (**b,e**) und Cy5 (**c,f**) zu beobachten. Dies deutet auf ein Bleichen dieser Farbstoffe hin. Das Fluoreszenzsignal von R110 (**a,b**) hat sich dagegen kaum verändert.

dann diese beiden Farbstoffe bei längerer Bestrahlung als erstes.

Für eine genauere Untersuchung wurden bei den unterschiedlich markierten DNS-Proben einige immobilisierte DNS-Molekül in den Laserfokus positioniert und dabei der Verlauf des Fluoreszenzsignals in den drei Detektoren (APDs) verfolgt (Abbildung 49). Dabei zeigt sich, dass bereits ein Energietransfer von den R110-dCTP-Molekülen auf das terminale Cy5-Farbstoffmolekül stattfindet (Abbildung 49 a). Das Fluoreszenzsignal über 640 nm bricht nach kurzer Zeit aufgrund des Bleichens des Cy5-Farbstoffes abrupt ab. Das Fluoreszenzsignal der R110-Farbstoffmoleküle verteilt sich zu gleichen Teilen auf APD2 ($< 570 \text{ nm}$) und APD3 ($570\text{-}640 \text{ nm}$). Bei den einfach mit TMR-dUTP markierten DNS-Proben wird dagegen die Fluoreszenz von den TMR-Farbstoffen vorrangig in APD3 detektiert (Abbildung 49 b). Das Cy5-Signal ist bei diesen Proben weniger deutlich sichtbar, da ein gewisser Teil des Fluoreszenzsignals von TMR auch in APD1 detektiert wird und sich das Cy5-Signal von diesem weniger gut abhebt.

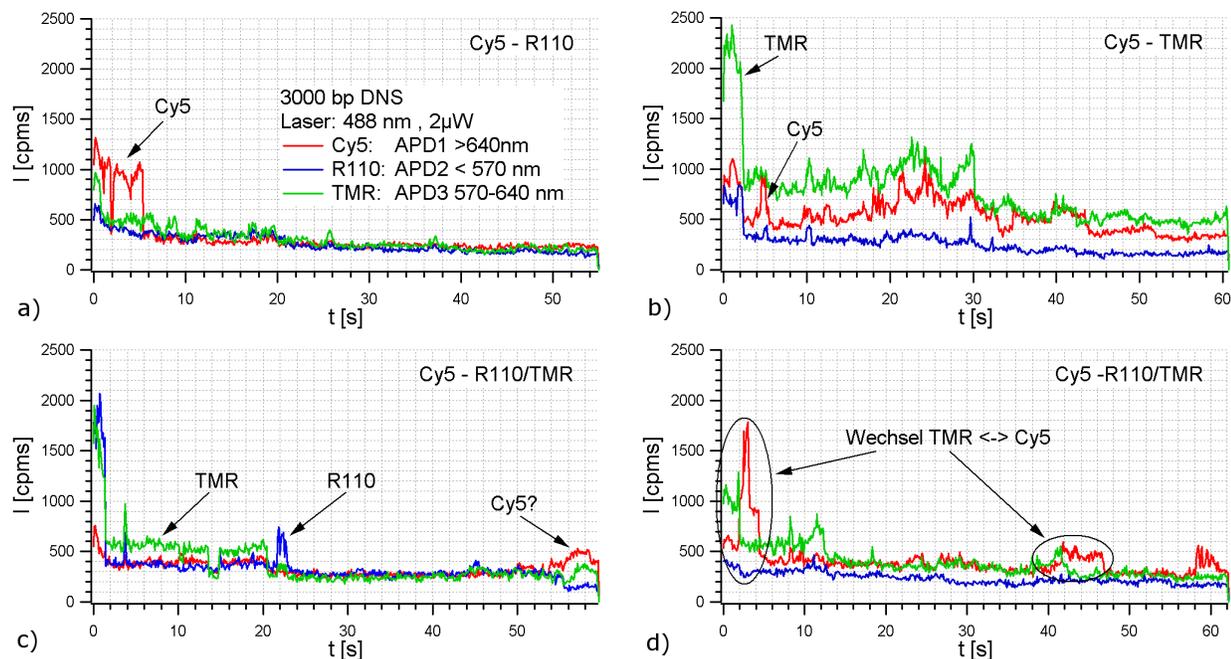


Abbildung 49: Intensitätszeitspur von immobilisierter **a)** einfach mit R110-dCTP, **b)** einfach mit TMR-dUTP sowie **c-d)** zweifach mit R110-dCTP und TMR-dUTP markierter 3000 bp DNS bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm bei einer Anregungsleistung von 2 μ W. Alle DNS-Proben tragen zusätzlich terminal den Farbstoff Cy5. Das Fluoreszenzsignal wurde entsprechend der verwendeten Farbstoffe wellenlängenabhängig von drei Detektoren registriert.

Bei den zweifach markierten DNS-Proben (Abbildung 49 c, d) ist in einer Intensitätszeitspur sogar ein Wechsel zwischen den Fluoreszenzsignalen von TMR und Cy5 zu beobachten. Hier wird die Fluoreszenzemission von TMR aufgrund des Energietransfers auf Cy5 vermindert, welches seinerseits vermehrt Photonen aussendet. Wie bei der einfach mit TMR-dUTP markierten DNS-Probe wird bei der zweifach markierten DNS am Anfang der Laserbestrahlung in APD3 gegenüber APD2 mehr Fluoreszenz detektiert. Die Fluoreszenzintensität in beiden Detektoren gleicht sich jedoch aufgrund des zunehmenden Bleichens der TMR-Farbstoffe mit fortschreitender Bestrahlung aneinander an.

Dass ein Energietransfer zwischen den hier verwendeten, in DNS-Molekülen eingebauten Farbstoffen stattfindet, ist nicht überraschend, da diese bereits als FRET-Paare in DNS-basierten photonischen Leitern verwendet wurden [187]. Verblüffend ist jedoch, dass die Bleichkurven des R110- und auch TMR-Fluoreszenzsignals nur ein bis drei diskrete Stufen aufweisen. Aufgrund der hohen Anzahl eingebauter Fluoreszenzfarbstoffe wären deutlich mehr Bleichstufen beziehungsweise eine kontinuierlich abfallende Bleichkurve zu erwarten gewesen. Möglicherweise ist der überwiegende Teil der eingebauten Farbstoffe vollständig gequenchet und die Fluoreszenz, die von den hochmarkierten DNS-Moleküle detektiert wird, stammt tatsächlich nur von 1 bis 3 Farbstoffmolekülen ab.

Barbara und Mitarbeiter konnten bei konjugierten fluoreszierenden Polymeren wie PPV einen elektronischen Energietransfer entlang der Polymerketten nachweisen [188, 189]. Dadurch verhielt

sich ein solches Polymer wie ein einheitliches fluoreszierendes Einzelmolekül und nicht wie ein Cluster aus voneinander getrennten Farbstoffmolekülen. Eine solche elektronische Kopplung wäre auch in der hochmarkierten DNS aufgrund des extrem geringen Abstandes zwischen den eingebauten Farbstoffen sowie deren direkte Verbindung über das DNS-Molekül vorstellbar. Verkomplizierend kommt im Gegensatz zu den konjugierten fluoreszierenden Polymeren jedoch hinzu, dass hier Farbstoffmoleküle mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften miteinander wechselwirken. Einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen von konjugierten fluoreszierenden Polymeren lassen vermuten, dass aufgrund der elektronischen Kopplung bereits wenige, wenn nicht sogar nur ein photochemischer Defekt in den Polymerketten zu einem Quenchen der Gesamtfluoreszenz des Polymers führt[188]. In der hochmarkierten DNS könnte dies in Hinblick auf eine Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung ausgenutzt werden, um das Bleichen der Fluoreszenzfarbstoffe in der DNS zu verhindern, bevor sie von dieser freigesetzt und detektiert werden. Dazu müsste ein chemisch stabiler, effizienter Quencher am Terminus eingebaut werden.

Flächendichte und Ausbeute der Immobilisierung von hochmarkierter DNS

Für eine Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung sollte die Flächendichte von hochmarkierter DNS möglichst gering sein, damit zum einen die einzelnen DNS-Moleküle weit voneinander entfernt liegen, so dass gewährleistet ist, dass nur von einem DNS-Molekül die freigesetzten Nukleotide detektiert werden. Zum anderen sollten so wenig wie möglich abbaubare DNS-Moleküle in der Reaktionslösung vorhanden sein, da jedes freigesetzte fluoreszenzmarkierte Nukleotid das Hintergrundsignal erhöht. Dies führt zu ein schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis und damit zu einer schlechteren Detektion und Identifikation der Nukleotide.

Die Dichte der immobilisierten DNS-Moleküle auf der Deckglasoberfläche kann durch die Konzentration der eingesetzten aminofunktionalisierten DNS in der Reaktionslösung kontrolliert werden, wie in Abbildung 50 gezeigt. Die Anzahl der immobilisierten DNS wurde anhand der Fluoreszenzaufnahmen der Deckglasoberfläche von immobilisierter DNS für eine Konzentrationsreihe mit vier unterschiedlichen DNS-Konzentration bestimmt. Hierbei wurden die modifizierten Deckgläschen nicht punktwise sondern großflächig mit der DNS-Reaktionslösung bedeckt und die Lösung während des Immobilisierungsprozesses mit einem zweiten Abdeck-Deckgläschen luftdicht verschlossen, um die oben beschriebenen Verdunstungseffekte zu vermeiden. Mit der Verringerung der DNS-Konzentration in der Reaktionslösung verringert sich erwartungsgemäß auch die Anzahl der immobilisierten DNS-Moleküle auf der Deckglasoberfläche. Bei der niedrigsten DNS-Konzentration von 20 pM werden 18 Moleküle auf einer Fläche von 100 x 100 µm gezählt. Da auf einer vergleichbaren DNS-freien Fläche bereits 8 Partikel gezählt werden, scheint eine weitere Verringerung der DNS-Konzentration ohne vorherige Verringerung von Verunreinigungen der Deckglasoberfläche kaum noch sinnvoll zu sein.

Aus der Fläche der Immobilisierungsreaktion auf dem Deckglas und der Flächendichte der immobilisierten DNS sowie dem Volumen der DNS-Lösung und der Konzentration der eingesetzten

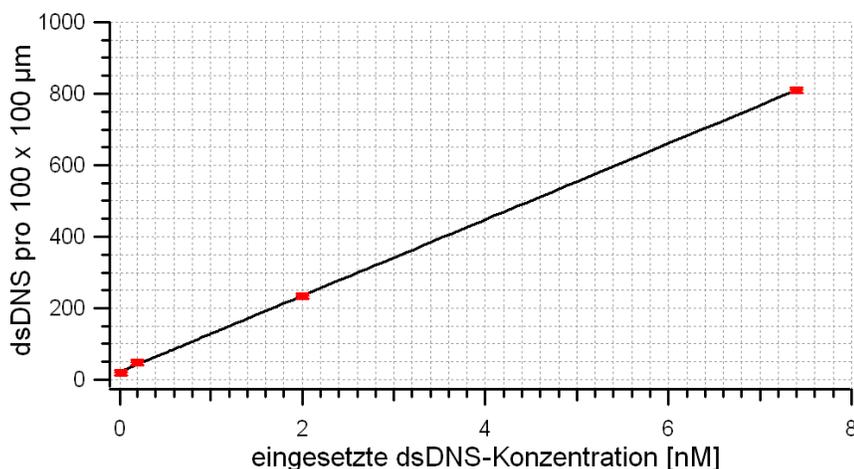


Abbildung 50: Anzahl der immobilisierte DNS-Moleküle in Abhängigkeit der zur Immobilisierung eingesetzten DNS-Konzentration. Für die Immobilisierung wurden doppelt (R110-dCTP, TMR-dUTP) und terminal mit Cy5 markierte 3000 bp DNS-Lösungen in Konzentrationen von 7,4 nM, 2 nM, 0,2 nM und 0,02 nM verwendet. Die Anzahl der immobilisierten DNS steigt linear mit der eingesetzten DNS-Konzentration an.

Tabelle 10: Ausbeute der DNS-Immobilisierung bestimmt aus der Konzentration der eingesetzten und immobilisierten DNS. Nur ein geringer Anteil von weniger als ein Promille der eingesetzten DNS wird auf der Deckglasoberfläche immobilisiert. Die Ausbeute erhöht sich mit Verringerung der eingesetzten DNS-Konzentration. (Immobilisierungsfläche: 20×20 mm, Reaktionsvolumen: 400 µl)

Konzentration DNS [nM]		Ausbeute
eingesetzt	immobilisiert	[%]
0,02	$6 \cdot 10^{-6}$	0,015
0,2	$16 \cdot 10^{-6}$	0,004
2	$78 \cdot 10^{-6}$	0,002
7,4	$269 \cdot 10^{-6}$	0,002

hochmarkierten DNS lässt sich die Ausbeute der Immobilisierung bestimmen (Tabelle 10). Diese liegt deutlich unter ein Promille. Ein Grund für diese schlechte Ausbeute ist die unspezifische Adsorption der DNS-Moleküle an die Abdeck-Deckgläser (Abbildung 52 a), die zum Schutz der Probelösung vor Verdunstung benutzt werden, wodurch diese Moleküle zur spezifischen Immobilisierung nicht mehr zur Verfügung stehen.

Modifizierung der Standardprozedur zur Immobilisierung von DNS

Bei der Immobilisierung der DNS auf der Deckglasoberfläche wird vor der Zugabe des Linkers LC-SMCC und der aminofunktionalisierte DNS zunächst die Oberfläche des Deckglases mit NaOH geätzt. Dies geschieht dabei durch mehrere Einzelschritte und ist deshalb mit einem größeren Aufwand verbunden (siehe Abschnitt 3.5.2). Um diesen Aufwand zu verringern, wurde untersucht, ob das Ausbrennen der Deckgläser im Ofen bei 510 °C die Behandlung mit NaOH ersetzen kann. Das Ausbrennen von Deckgläsern wurde schon in [190] zur Verringerung von fluoreszierenden

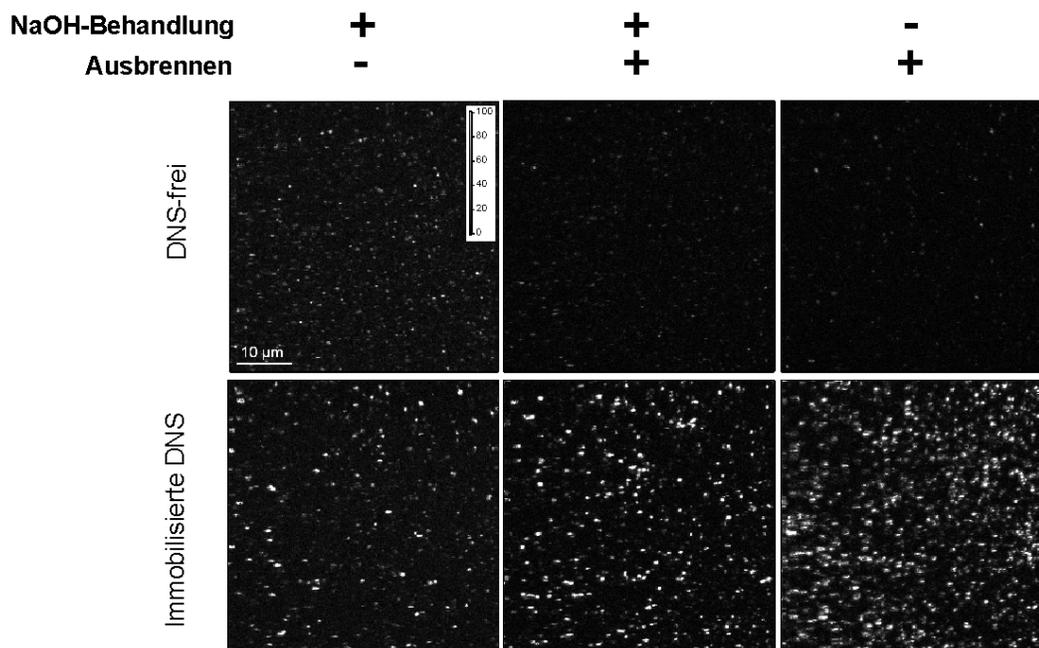


Abbildung 51: Fluoreszenzrastraufnahmen von unterschiedlich behandelten Deckgläsern für die Optimierung der DNS-Immobilisierung. Durch das Ausbrennen der Deckgläser bei 510 °C wird eine deutliche Verringerung von fluoreszierenden Verunreinigungen erreicht. Außerdem kann auf das Ätzen der Deckglasoberfläche mit NaOH verzichtet werden. (Obere Reihe - DNS-freie Bereiche; Untere Reihe - Bereiche mit immobilisierter DNS; Linke Spalte - normale Deckgläser, behandelt nach Standardprozedur; mittlere Spalte - gebrannte Deckgläser, behandelt nach Standardprozedur; rechte Spalte - gebrannte Deckgläser, mit modifizierter Prozedur)

Kontaminationen angewandt.

In Abbildung 51 sind Fluoreszenzaufnahmen der Oberflächen von im Ofen ausgebrannten (mittlere und rechte Spalte) und nicht ausgebrannten (linke Spalte) sowie mit (linke und mittlere Spalte) und ohne (Spalte rechts) NaOH behandelten Deckgläsern in Bereichen ohne (obere Reihe) und mit (untere Reihe) immobilisierter DNS dargestellt. Durch das Ausbrennen der Deckgläser wird eine deutliche Verringerung der Verunreinigung der Deckglasoberfläche erreicht (Vergleich Abbildung 51 oben links mit oben Mitte beziehungsweise oben rechts). Auch scheint das Ausbrennen der Deckgläser und die Kürzung des Standardprotokolls um die NaOH-Behandlung keinen negativen Einfluss auf die Immobilisierung der DNS auf der Deckglasoberfläche zu haben (rechte Spalte). Damit empfehlen sich ausgebrannte Deckgläser als Substrat für die Immobilisierung von DNS, da einerseits Verunreinigungen und damit das Hintergrundsignal verringert wird und andererseits die Herstellung der immobilisierten DNS-Proben verkürzt beziehungsweise vereinfacht werden kann.

Einen weiteren Effekt, der durch die Behandlung von Deckgläsern im Ofen erhalten wird, ist die verringerte unspezifische Adsorption der DNS-Moleküle auf der Deckglasoberfläche. Dies ist in Abbildung 52 gezeigt. Das im Ofen ausgebrannte und nicht ausgebrannte Deckglas sind nicht mit dem Linker MTPS funktionalisiert, so dass sich die aminofunktionalisierte DNS nicht über

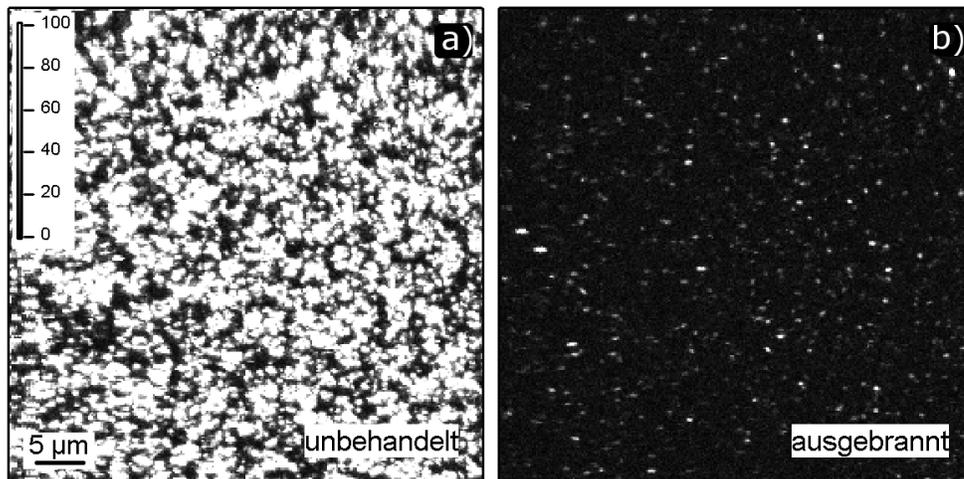


Abbildung 52: Fluoreszenzrasteraufnahmen adsorbierter, zweifach wie terminal mit Cy5 markierter DNS auf ein unbehandeltes (a) und auf ein vorher in einem Ofen bei 510 °C ausgebranntes Deckglas (b) bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm. Ohne Behandlung der Deckgläser im Ofen ist eine deutlich erhöhte unspezifische Adsorption von DNS auf der Deckglasoberfläche zu beobachten.

diesen an die Deckglasoberfläche binden kann. Nach der Zugabe und einer längeren Einwirkzeit einer hochmarkierten DNS-Lösungen wurden die Deckgläser mehrmals mit A. dest. gespült. Auf der Oberfläche des nicht ausgebrannten Deckglases ist im Gegensatz zum ausgebrannten Deckglas eine deutlich erhöhte Fluoreszenz aufgrund der adsorbierten DNS-Moleküle zu detektieren. Durch das Ausbrennen der Deckgläser wird die Oberflächenstruktur des Deckglases derart geändert, dass diese nicht mehr so attraktiv für die negativ geladenen DNS-Moleküle sind. Aber auch eine Änderung der Wechselwirkung zwischen dem Lösungsmittel und der Oberfläche des ausgebrannten Deckglases lässt sich beobachten. Die Lösungstropfen bilden keine Kugelformen mehr sondern fließen breiter auseinander, was darauf hindeutet, dass die Deckglasoberfläche durch das Erhitzen hydrophiler geworden ist.

4.7 Exonukleolytischer Abbau von DNS

4.7.1 Abbau in Lösung

Bestimmung des Endprodukts

Die Exonuklease III baut einen Einzelstrang eines doppelsträngigen DNS-Moleküls vom 3'-Ende her Nukleotid für Nukleotid ab (Abbildung 53). Da sich an den beiden Enden eines dsDNS-Moleküls jeweils ein 3'-Ende eines der beiden Einzelstränge befindet, werden beide Einzelstränge der dsDNS abgebaut. Somit findet von beiden Seiten des dsDNS-Moleküls eine Umwandlung von doppelsträngigen in einzelsträngigen Bereichen statt. Je nachdem, wie weit Exo III die Einzelstränge der dsDNS abbauen kann, können als Endprodukt entweder zwei einzelsträngige DNS-Moleküle, deren Länge etwa der Hälfte der Ausgangs-DNS entspricht, oder ein DNS-Molekül mit

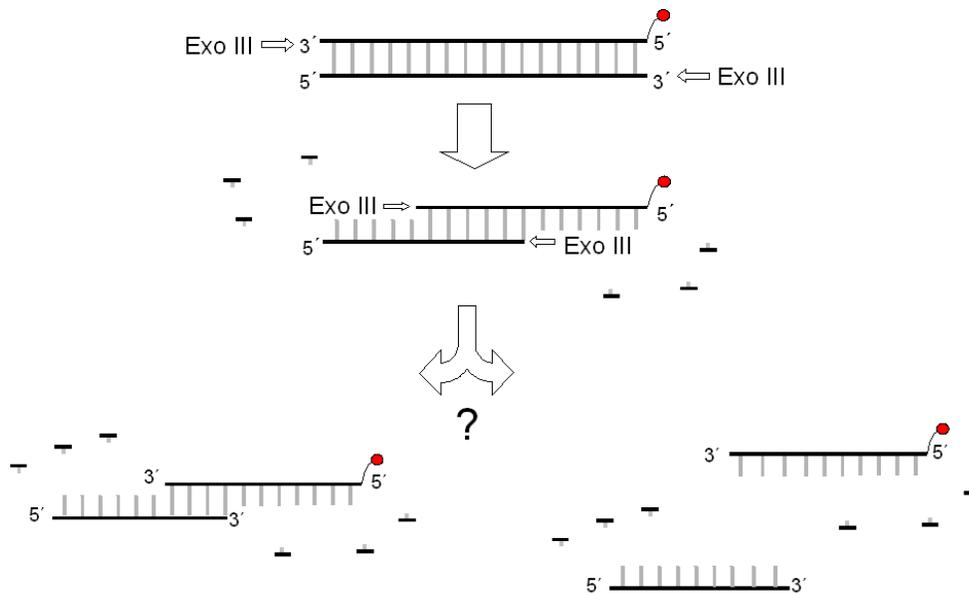


Abbildung 53: Exo III Abbau von doppelsträngiger DNS und mögliche Endprodukte. Exo III baut einen Strang des Doppelstranges vom 3'-Ende her Base für Base ab. Als Endprodukt kann neben den abgebauten Basen entweder ein DNS-Molekül, bestehend aus zwei langen einzelsträngigen Bereiche, die über einen kurzen Doppelstrangbereich miteinander verbunden sind, oder zwei einzelsträngige DNS-Moleküle, die etwa halb so lang wie die ursprüngliche doppelsträngige DNS sind, entstehen.

zwei langen Einzelstrangbereichen, die durch einen kurzen Doppelstrangbereich miteinander verbunden sind, in Frage kommen. Da sich interkalierende Farbstoffe nur in den Doppelstrangbereichen der DNS-Moleküle einbauen und dort eine erhöhte Fluoreszenzaktivität aufweisen, sollte mit Hilfe der DINO II markierten dsDNS-Proben eine Aussage über das Endprodukt des exonukleolytischen Abbaus von dsDNS möglich sein.

In Abbildung 54 sind die Autokorrelationskurven des DINO II-Fluoreszenzsignals einer DNS-Probe vor und nach dem exonukleolytischen Abbau dargestellt. Die Autokorrelationskurve der abgebauten DNS ist zu kürzeren Zeiten verschoben, da sich durch die Freisetzung von Nucleotiden das Molekulargewicht sowie der hydrodynamischen Radius der DNS-Moleküle verringert hat und diese dadurch schneller diffundieren. Dass überhaupt ein Fluoreszenzsignal von DINO II und damit eine Autokorrelationskurve von der abgebauten DNS-Probe erhalten wird, weist auf noch vorhandene doppelsträngige DNS-Bereiche hin. Zusätzlich fällt ein weiterer Anstieg in der Autokorrelationskurve bei kürzeren Zeiten auf, welches vom Blinken einzelner DINO II-Moleküle aufgrund von photophysikalischen Prozesse wie zum Beispiel Triplett-Übergängen herrührt. Die vor der Exo III Zugabe noch vollständig doppelsträngigen DNS-Moleküle sind mit zahlreichen DINO II-Farbstoffen markiert, so dass das Blinken einzelner DINO II-Moleküle sich kaum bemerkbar macht. In der abgebauten DNS hat sich der doppelsträngige Bereich so stark reduziert, dass sich nur noch wenige DINO II-Moleküle auf einem DNS-Molekül befinden und sich nun das Blinken einzelner Farbstoffe deutlich bemerkbar macht. Anhand dieser Erkenntnisse kann in Übereinstim-

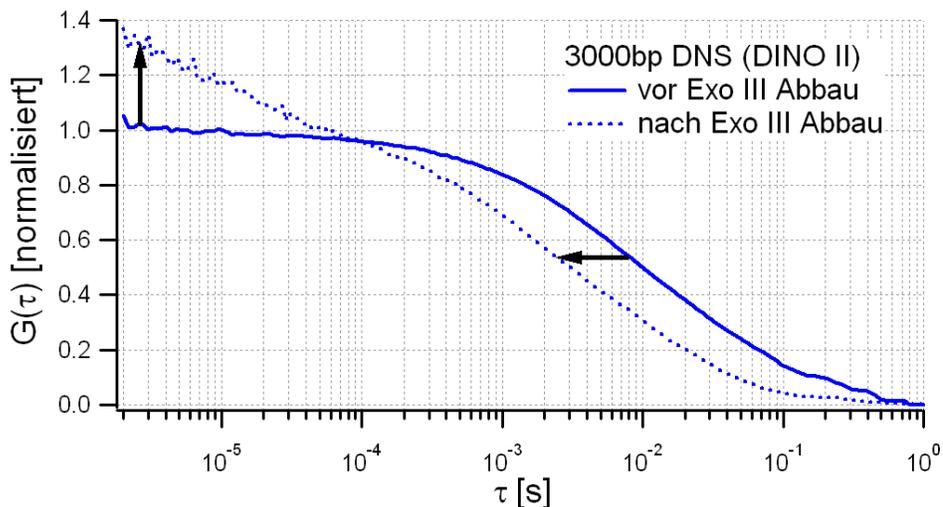


Abbildung 54: Normierte Autokorrelationskurven des DINO-II-Fluoreszenzsignals einer DNS-Probe vor (durchgezogene Kurve) und nach (gepunktete Kurve) dem exonukleolytischen Abbau. Nach dem exonukleolytischen Abbau ist eine Verschiebung der Autokorrelationskurve zu kürzeren Zeiten und eine Zunahme einer zweiten Komponente bei sehr kleinen Zeiten zu beobachten.

mung mit Arbeiten von Richardson und Mitarbeiter [133] geschlossen werden, dass als Endprodukt des exonukleolytischen Abbaus von dsDNS in Lösung durch Exo III ein DNS-Molekül mit zwei langen Einzelstrangbereichen erhalten wird, die über einen kurzen Doppelstrangbereich miteinander verbunden sind.

Kinetik des exonukleolytischen Abbaus

Aufgrund der Fluoreszenzmarkierung der DNS-Proben lässt sich ein exonukleolytischer Abbau durch die Änderung der Fluoreszenzintensität bei einer Anregung mit dem 470 beziehungsweise 488 nm Laser sowie anhand der Änderung der Autokorrelationskurve des Fluoreszenzsignals des terminalen Cy5 verfolgen (Abbildung 55). Die Änderung der Fluoreszenzintensität ist dabei von der Markierung der DNS-Moleküle abhängig. Bei den DNS-Proben, in denen die Fluoreszenzfarbstoffe kovalent an Nukleotide gebunden sind, steigt die Fluoreszenz, da die von der Exo III freigesetzten Nukleotid-Farbstoff-Komplexe nicht mehr gequencht werden. Bei den mit dem interkalierenden Farbstoff DINO II markierten DNS-Proben nimmt die Fluoreszenzintensität stattdessen während des exonukleolytischen Abbaus ab, da Exo III die doppelsträngigen Bereiche der DNS abbaut, so dass die Anzahl der DINO II-Moleküle pro DNS-Molekül und damit auch die Fluoreszenzintensität abnimmt. Da bei der nativen, terminal mit Cy5 markierten DNS keine weiteren Fluoreszenzmarker vorhanden sind, ist auch keine Änderung der Fluoreszenzintensität während des Abbaus zu beobachten.

Mit Hilfe des terminalen Cy5-Farbstoffes lassen sich Änderungen des Diffusionsverhaltens der DNS-Moleküle während des exonukleolytischen Abbaus verfolgen. Durch die Freisetzung von Nu-

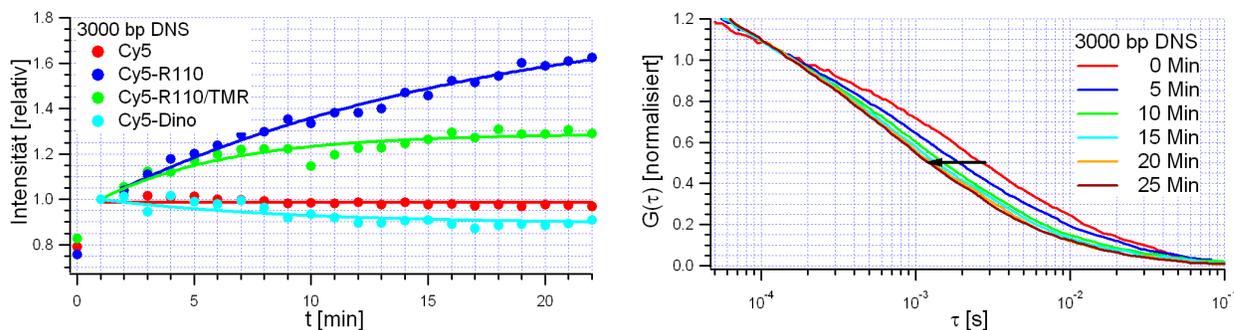


Abbildung 55: a) Verlauf der Fluoreszenzintensität während des exonukleolytischen Abbaus von nativer (rot), einfach mit R110-dCTP (blau), zweifach mit R110-dCTP sowie TMR-dUTP (grün) und mit dem interkalierenden Farbstoff DINO II (türkis) markierten 3000 bp DNS-Proben bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm. Alle DNS-Moleküle sind terminal mit Cy5 markiert. b) Autokorrelationskurven des Cy5-Fluoreszenzsignals am Beispiel der nativen DNS-Probe. Mit fortschreitendem exonukleolytischen Abbau verschiebt sich die Autokorrelationskurve zu kürzeren Zeiten.

kleotiden und die Umwandlung von Doppelstrangbereiche in Einzelstrangbereiche verringert sich der hydrodynamische Radius der DNS-Moleküle, so dass diese mit fortschreitendem Abbau schneller diffundieren. Durch diese Änderung der Schwerpunktsdiffusion lässt sich bei allen terminal mit Cy5 markierten DNS-Proben der Abbau verfolgen und miteinander vergleichen.

Bei den einfach markierten DNS-Proben lässt sich zusätzlich in der Autokorrelationskurven des R110-Signals der Anteil der freigesetzten R110-dCTP-Moleküle beobachten. Während die Verschiebung der Autokorrelationskurven des Cy5-Signals in der Verringerung der Schwerpunktsdiffusion der DNS-Moleküle begründet liegt, führt vor allem der rasant anwachsende Anteil an freien R110-dCTP-Moleküle zu einer deutlich stärkeren Verschiebung der Autokorrelationskurven des R110-Signals (Abbildung 56 a, b). Zur Bestimmung des Anteils der freien R110-dCTP-Moleküle wurden eine Zwei-Komponenten-Anpassungsfunktion (Gleichung 45) verwendet. Dabei wurden die Diffusionskoeffizienten der R110-dCTP-Moleküle, bestimmt aus einer reinen R110-dCTP-Farbstofflösung, und der DNS, bestimmt aus den Autokorrelationskurven des Cy5-Signals, als feste Parameter verwendet, so dass nur der Anteil an freien R110-dCTP-Moleküle als freier Parameter vorhanden ist.

Wird die Anzahl der freien R110-dCTP-Moleküle auf die Anzahl der DNS-Moleküle im Gemisch normiert, so ergibt dies die Anzahl der freigesetzten R110-dCTP-Moleküle pro DNS (Abbildung 56 c). Mit Hilfe der linearen Anpassungsfunktion $f(t) = f(t_0) + k_F \cdot t$ lässt sich aus dem Anstieg dieser Kurve eine Freisetzungsrate k_F von R110-dCTP-Moleküle pro DNS von $0,09 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ bestimmen. Unter der Annahme, dass alle vier Nukleotide in der DNS gleich verteilt sind, beträgt damit die Abbaurate k_A des einfach markierten Stranges $0,38 \pm 0,06$ Nukleotide pro Sekunde.

Zum Vergleich des Abbaus der unterschiedlich markierten DNS wurde aus den Autokorrelationskurven des Cy5-Signals die Diffusionszeit der sich verkürzenden DNS-Moleküle bestimmt. Dabei wurde eine Zwei-Komponenten-Anpassungsfunktion (Gleichung 45) verwendet, in der ne-

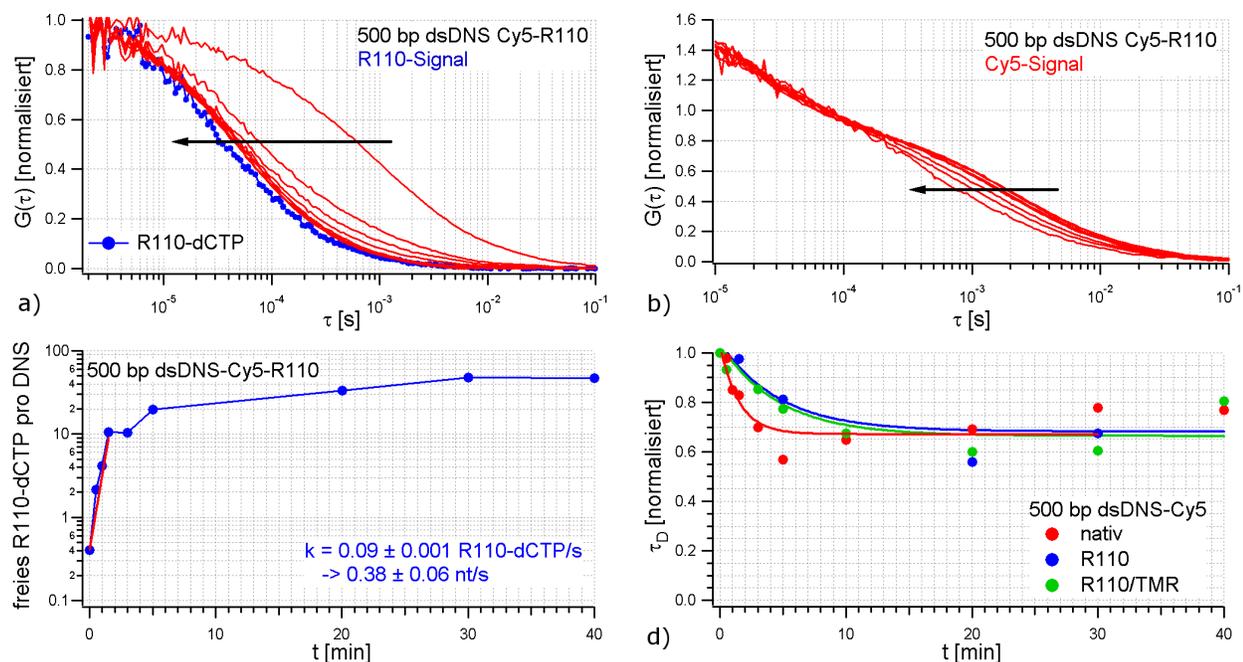


Abbildung 56: Normierte Autokorrelationskurven des Fluoreszenzsignals von **a)** R110 und **b)** Cy5 der einfach markierten 500 bp DNS-Abstoppproben. In beiden Abbildungen ist eine Verschiebung der Autokorrelationskurven zu kürzeren Zeiten während des exonukleolytischen Abbaus feststellbar. **c)** Halblogarithmische Darstellung der Anzahl von freigesetzten R110-dCTP pro DNS-Molekül in Abhängigkeit der Abbaupzeit bestimmt aus den Autokorrelationskurven des R110-Fluoreszenzsignals (a). Über eine lineare Anpassungsfunktion (rote Gerade) lässt sich eine R110-dCTP-Freisetzungsrates von $0,09 \pm 0,01$ und damit eine Abbaurates von $0,38 \pm 0,06$ bestimmen. **d)** Relative Diffusionszeiten der nativen (rot), einfach- (blau) und zweifach- (grün) markierten 500 bp DNS-Abstoppproben während des exonukleolytischen Abbaus. Die Diffusionszeiten wurden aus den Autokorrelationskurven des Cy5-Signals (b) bestimmt und auf die Diffusionszeit vor der Exo III-Zugabe normiert. Die Diffusionszeit fällt während des exonukleolytischen Abbaus auf ein unteres Plateau ab. Mittels einer exponentiellen Anpassungsfunktion lässt sich eine charakteristische Abbaupzeit τ_A bestimmen (siehe Tabelle 11).

ben den DNS-Moleküle als zweite Komponente freie Cy5-Farbstoffmoleküle sowie die photoinduzierten Isomerisierung des Cy5-Farbstoffes (Gleichung 41) mit berücksichtigt wurden. In Abbildung 56 d) sind die so ermittelten Diffusionszeiten normiert auf die Diffusionszeit der Ausgangsprobe am Beispiel der unterschiedlich markierten 500 bp DNS-Abstoppproben dargestellt. Mit zunehmender Reaktionszeit nimmt bei allen Proben die Diffusionszeit bis zum Erreichen eines Plateaus ab. Dabei ist bei der nativen DNS ein schnellerer Abfall der Diffusionszeit zu beobachten als bei den beiden fluoreszenzmarkierten Proben.

Mittels der exponentiellen Anpassungsfunktion:

$$f(t) = f(t_0) + Ae^{(-\frac{t}{\tau_A})} \quad (85)$$

lässt sich eine charakteristische Zeit τ_A des exonukleolytischen Abbaus bestimmen. In Tabelle 11 sind τ_A der 500 bp DNS-Abstoppproben und der 3000 bp DNS Proben aufgelistet. Da bei den 3000

	charakteristisch Abbauzeit τ_A [min]	Abbaurrate k [nt/s]
500 bp (Abstopp)		
nativ	$1,5 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,19$
R110	$4,8 \pm 2,0$	$0,38 \pm 0,06$
R110/TMR	$4,8 \pm 1,6$	$0,38 \pm 0,06$
3000 bp (online)		
nativ	$2,1 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,24$
DINO II	$3,0 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,16$
R110	$8,3 \pm 2,8$	$0,38 \pm 0,06$
R110/TMR	$8,3 \pm 2,1$	$0,38 \pm 0,06$

Tabelle 11: Vergleich der charakteristischen Abbauzeit τ_A , bestimmt aus dem Abfall der Korrelationszeit während des exonukleolytischen Abbaus, der unterschiedlich markierten 500 bp DNS Abstoppproben und der 3000 bp DNS-Proben, deren Abbau direkt verfolgt wurde. Die Abbaurrate k wurde mit Hilfe der in Abbildung 56 c) für die einfach markierte 500 bp DNS-Abstoppprobe ermittelt Abbaurrate und dem Verhältnis dessen charakteristische Abbauzeit mit dem der anderen DNS-Probe bestimmt.

bp DNS-Proben im Gegensatz zu den 500 bp Abstoppproben während des exonukleolytischen Abbaus gemessen wurde und sich damit das System nicht im Gleichgewicht befand, wird hier teilweise eine hohe Standardabweichung erhalten. In den jeweiligen DNS-Proben mit 500 bp und 3000 bp langer DNS kann kein Unterschied zwischen den einfach und den zweifach markierten DNS-Proben festgestellt werden. Die nativen DNS-Proben werden jedoch um fast das drei- bis vierfache schneller abgebaut als die kovalent fluoreszenzmarkierten Proben. Der Unterschied in τ_A zwischen der mit dem interkalierenden Farbstoff DINO II markierten DNS und nativer DNS ist aufgrund des hohen Standardfehlers nicht signifikant.

Bereits Ende der 1990er Jahre wurden FCS-Untersuchungen des exonukleolytischen Abbaus von DNS durchgeführt [191, 192, 193, 23, 129]. Dabei wurden jedoch teilweise deutlich kürzere DNS-Fragmente verwendet, in denen zudem nur wenige fluoreszenzmarkierte Basen eingebaut waren. Außerdem fand anstelle Exo III die T7-Exonuklease für den Abbau Verwendung. Diese kann neben doppelsträngige auch einzelsträngige DNS abbauen, wodurch nach einem vollständigen Abbau nur noch die einzelnen Basen der DNS vorliegen. Dadurch konnte direkt die Verkürzung der DNS beziehungsweise der zunehmende Anteil vollständig abgebauter DNS verfolgt werden. Bei der Verwendung von Exo III findet jedoch eine Umwandlung von relativ steifen, doppelsträngigen in sehr flexible, einzelsträngigen DNS-Bereiche statt. Dadurch ist eine direkte Bestimmung einer Abbaurrate aus der Diffusionszeit nicht möglich, da neben der Abnahme des Molekulargewichts durch die Freisetzung der einzelnen Basen diese Strukturänderung ebenfalls zu einer Änderung des Diffusionsverhalten von DNS führt.

Deshalb wurden hier mit Hilfe der in Abbildung 56 c) über die Freisetzungsrates von R110-dCTP bestimmten Abbaurates von 0,38 nt/s der einfach markierten 500 bp DNS-Abstoppproben und über das Verhältnis von τ_A die Abbaurates der DNS-Proben abgeschätzt (Tabelle 11). Da τ_A

der einfach und doppelt markierten DNS einander entsprechen, kann hier auch von derselben Abbaurate ausgegangen werden. Für die native DNS konnte eine Abbaurate zwischen 1,2 und 1,5 nt/s abgeschätzt werden. Diese bestimmten Abbauraten für native und hochmarkierte DNS liegen etwas unterhalb der Werte, die von Brakmann und Löbermann für entsprechenden DNS-Proben publiziert wurden (4 nt/s bei nativer und 1 nt/s bei hochmarkierter DNS bei 20°C) [15]. Jedoch konnte die Abnahme der Abbaurate von hochmarkierter DNS gegenüber nativer DNS mit einem Faktor von 3-4 bestätigt werden. Die hier verringerten Abbauraten lassen sich vermutlich auf unterschiedliche Reaktionsbedingungen zurückführen.

4.7.2 Abbau immobilisierter DNS

Der Nachweis des exonukleolytischen Abbaus hochmarkierter DNS in Lösung wurde in Abschnitt 4.7.1 erbracht. Doch kann Exo III auch auf einem Deckglas immobilisierte, hochmarkierte DNS abbauen? Hier könnten Wechselwirkungen mit der Deckglasoberfläche den Abbau erschweren, wenn nicht sogar verhindern. Um dies zu untersuchen, sollte ein exonukleolytischer Abbau anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals auf der Deckglasoberfläche sowie in der Reaktionslösung überprüft werden.

Die hochmarkierte DNS kann über eines der beiden 5'-Enden immobilisiert werden. Das heißt, dass die DNS entweder über den fluoreszenzmarkierten oder den unmarkierten Strang mit der Deckglasoberfläche verknüpft ist (Abbildung 57). Ein exonukleolytischer Abbau konnte jedoch nur bei der Immobilisierung über den fluoreszenzmarkierten Strang beobachtet werden. Ist die DNS über den unmarkierten Strang immobilisiert, dann befindet sich das 3'-Ende des fluoreszenzmarkierten Stranges, an dem die Exo III den Strang abbaut, in unmittelbarer Nähe zur Deckglasoberfläche. Dies scheint den Abbau des fluoreszenzmarkierten Stranges, möglicherweise aufgrund von sterischen Effekten, zu verhindern. Auch Lee und Mitarbeiter haben bei einem ähnlichen Versuch diese Beobachtungen gemacht [194]. Dies bedeutet aber auch, dass bei der DNS, die über den fluoreszenzmarkierten Strang immobilisiert ist, dieser nahezu vollständig abgebaut und fast alle fluoreszenzmarkierten Nukleotide in die Lösung freigesetzt werden sollten, da der unmarkierte Gegenstrang nicht von der Exo III angegriffen wird.

In Abbildung 58 ist der exonukleolytische Abbau von über den fluoreszenzmarkierten Strang immobilisierter DNS dargestellt. Da beim Abbau die fluoreszenzmarkierten Nukleotide aus der immobilisierten DNS freigesetzt werden, sollte sich die Fluoreszenzintensität auf der Oberfläche verringern und in der Lösung erhöhen. Um auszuschließen, dass sich die Fluoreszenz nicht aufgrund des Einfluss der Reaktionslösung ändert, wurde zunächst für 60 Minuten auf einem Deckglas mit immobilisierter hochmarkierter DNS ein Lösungstropfen des Exo III-Puffers gegeben, und die Fluoreszenzintensitäten am Anfang und am Ende dieser 60 Minuten miteinander verglichen. Wie in Abbildung 58 zu sehen ist, ändert sich diese nur minimal auf der Deckglasoberfläche sowie in der Lösung. Anschließend wurde das Enzym Exo III dazu gegeben. Nach 60 Minuten konnte eine

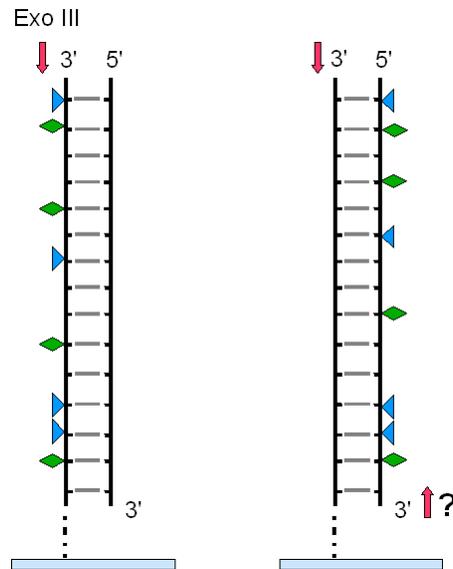


Abbildung 57: Die doppelsträngige DNS kann je nach Modifikation entweder am 5'-Ende des markierten (Abbildung links) oder des unmarkierten (Abbildung rechts) Stranges an der Deckglasoberfläche immobilisiert werden. Jedoch scheint Exo III nur das von der Deckglasoberfläche abgewandte 3'-Ende abbauen zu können. Damit würde bei einer Immobilisierung über den unmarkierten Strang keine fluoreszenzmarkierten Basen freigesetzt werden.

deutliche Verringerung der Fluoreszenzintensität auf der Deckglasoberfläche sowie Erhöhung in der Reaktionslösung beobachtet werden.

Um die Abbauraten der immobilisierten DNS zu bestimmen, wurden auf einem Deckglas mit flächendeckend gleich verteilter, immobilisierter hochmarkierter DNS mehrere Abbauprobe mit unterschiedlicher Exo III Konzentration durchgeführt (Tabelle 12). Dabei wurde ein 2,5 μl Lösungstropfen mit Exo III Puffer auf das Deckglas gegeben und der Abbau durch hinzupipetieren von 0,5 μl Exo III gestartet. Die Kreisfläche, die der Reaktionstropfen auf dem Deckglas bedeckte, hatte einen Durchmesser von 3 mm und betrug damit $7,1 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$.

Die Flächendichte der immobilisierten DNS sollte, da ein und dasselbe Deckglas verwendet wurde, bei jedem Versuch gleich sein. Die Flächendichte der DNS wurde über das terminale Cy5-Signal durch Abrastern der Deckglasoberfläche und eine Partikelsuchprozedur aus Igor 6.0 bestimmt und ist für die einzelnen Abbauprobe in Tabelle 12 aufgelistet. Für 3 der 4 Abbauprobe wurde eine Anzahl von etwa 270 DNS-Moleküle auf einer Fläche von $50 \times 50 \mu\text{m}$ bestimmt. Nur bei einem Abbauprobe (bei Exo III-Konzentration von 33,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde eine deutlich niedrigere Partikelanzahl von 98 bestimmt, wobei hier von einer lokalen Abweichung der durchschnittlichen Partikelanzahl ausgegangen wird. Die Standardabweichung wurde durch eine Messung eines DNS freien Bereiches bestimmt.

Die Anzahl der DNS-Moleküle von 270 bezogen auf die Kreisfläche des Reaktionstropfens beträgt demnach etwa 750000, was einer Konzentration von 0,4 pM entspricht (Reaktionsvolumen = 3 μl). Dies bedeutet, dass selbst bei der hier eingesetzten niedrigsten Exo III-Konzentration von 2,5 nM die Anzahl der Enzymmoleküle die Anzahl der DNS-Moleküle weit übersteigt und damit kann bei jeder Enzymkonzentration davon ausgegangen werden, dass stets ein DNS-Molekül von einem Exo III-Enzym besetzt ist.

Der exonukleolytische Abbau der immobilisierten DNS wurde mittels FCS-Messungen im Lösungsmittel oberhalb der Deckglasoberfläche verfolgt. Aufgrund der Freisetzung von R110-dCTP

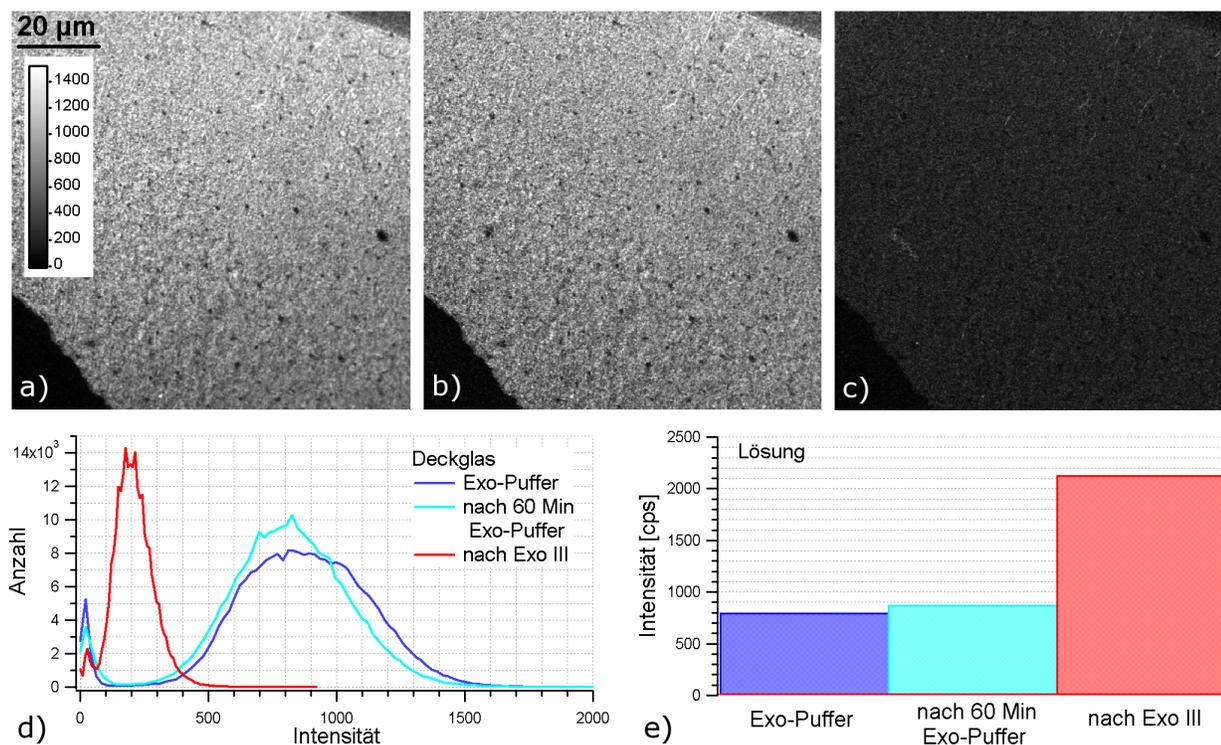


Abbildung 58: a-c) Fluoreszenzrastreraufnahmen von auf der Deckglasoberfläche immobilisierter hochmarkierter DNS, die durch einen Tropfen Exo III Puffer benetzt ist, **a)** vor der Enzymzugabe, **b)** nach 60 minütiger Wartezeit ohne Enzym und **c)** nach dem exonukleolytischen Abbau durch Exo III. In **d)** sind die Intensitätsverteilung der drei Fluoreszenzrastreraufnahmen histogrammiert und in **e)** jeweils die Fluoreszenzintensität in der Lösung oberhalb der Deckglasoberfläche dargestellt. Die Fluoreszenzanregung erfolgt mit einem 488 nm Laser.

Exo III		immobilisierte DNS		Exo III : DNS
[u/μl]	[nM]	[pro 50 × 50 μm]	[nM]	
4,2	2,5	272 ± 13	0,43 · 10 ⁻³	6 · 10 ³ : 1
8,3	5	264 ± 13	0,42 · 10 ⁻³	12 · 10 ³ : 1
16,7	10	283 ± 13	0,44 · 10 ⁻³	23 · 10 ³ : 1
33,3	20	98 ± 13	0,15 · 10 ⁻³	136 · 10 ³ : 1

Tabelle 12: Verhältnis Exo III zur immobilisierten DNS beim exonukleolytischen Abbau bei unterschiedlichen Enzymkonzentration. Die durchschnittliche Anzahl von immobilisierter DNS auf einer Fläche von 50 × 50 μm beträgt 272 ± 13. Dies entspricht einer Konzentration von 0,4 pM im Reaktionsvolumen von 3 μl. Damit ist bei jeder Enzymkonzentration ein deutlicher Überschuss von Exo III gegenüber dem Substrat DNS vorhanden. (Exo III Stammlösung: 200 u/μl beziehungsweise 0,38 g/l[195])

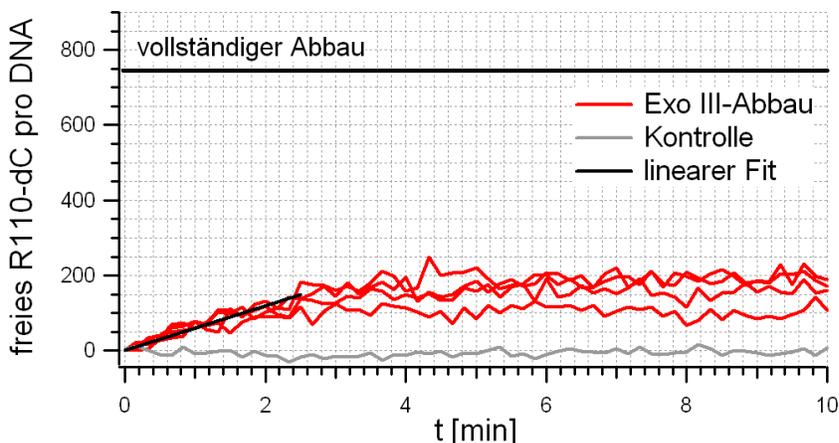


Abbildung 59: Anzahl freigesetzter mit R110 markierter Basen pro DNA-Molekül in Abhängigkeit der Abbaupzeit von vier Abbaupexperimenten jeweils mit einem Überschuß an Exo III. Die Linie bei 750 entspricht der erwarteten Anzahl an freigesetzten R110 markierten Basen, bei einem vollständigen Abbau der 3000 bp DNS. Beim Kontrolllexperiment wurde anstelle Exo III nur Exo-Puffer zugegeben, so daß kein Abbau stattfand. Mittels einer linearen Anpassungsfunktion im Anstieg der Abbaukurven konnte eine Freisetzungsrates von R110 markierten Basen von $(0,94 \pm 0,05)/\text{DNA}/\text{s}$ bestimmt werden.

aus den DNS-Moleküle erhöht sich die Teilchenanzahl in der Reaktionslösung (Abbildung 59). Werden die immobilisierten hochmarkierten 3000 bp DNS-Moleküle vollständig abgebaut und sind alle vier Nukleotiden in der DNS gleich verteilt, so müssten pro DNS-Molekül etwa 750 R110-dCTP Moleküle freigesetzt werden. Demnach würde nach einem vollständigen Abbau die Konzentration von frei in der Lösung diffundierenden R110-dCTP-Molekülen etwa 300 pM entsprechen. Dies entspricht einer Teilchenanzahl in einem konfokalen Fokusbereich mit 0,5 fl von 0,09.

In Abbildung 59 ist die Zunahme der freigesetzten R110 markierten Basen nach der Exo III Zugabe für die vier Abbaupexperimente sowie einer Kontrolle dargestellt. Als Plateau erreichen die Abbaukurven etwa 30 % der erwarteten Anzahl an freigesetzten R110 markierten Basen von 750. Ein vollständiger Abbau aller DNS-Moleküle wird demnach nicht erreicht. Eine Aussage, inwieweit ein DNS-Molekül vollständig abgebaut wird beziehungsweise ob alle immobilisierten DNS-Moleküle abgebaut werden, lässt sich nicht treffen.

Mittels einer linearen Anpassungsfunktion im Anstieg der Abbaukurven in Abbildung 59 lässt sich die Freisetzungsrates k_F von R110-dCTP pro DNA-Molekül bestimmen (Tabelle 13). Da bei jeder Enzymkonzentration Exo III gegenüber der immobilisierten DNS weit im Überschuss vorliegt, kann daraus eine mittlere R110-dCTP-Freisetzungsrates von $(0,9 \pm 0,1) \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Da nur etwa jedes vierte Nukleotid in der DNS mit R110 markiert ist, entspricht dies einer Abbaurates von $(3,6 \pm 0,7) \text{ nt}/\text{s}$. Dies liegt zwar im Bereich der bestimmten Abbaurates von hochmarkierter DNA in Lösung 4.7.1 ist jedoch signifikant höher.

Kritisch zu betrachten ist hierbei die Konzentrationsbestimmung der immobilisierten DNA über

Tabelle 13: Freisetzungsraten k_F von R110-dCTP pro DNA-Molekül bestimmt durch eine lineare Anpassungsfunktion des anfänglichen Anstiegs der Graphen in Abbildung 59.	Exo III [nM]	k_F [s^{-1}]
	4,2	$0,98 \pm 1,5$
	8,3	$0,93 \pm 0,5$
	16,7	$0,77 \pm 0,03$
	33,3	$1,00 \pm 0,10$

den terminalen Cy5-Marker, denn nur die DNA-Moleküle wurden beachtet, deren Cy5-Farbstoff noch intakt ist. Ist der Anteil defekter Cy5-Moleküle sehr hoch, würde dies zu einer signifikanten Unterbestimmung der DNA-Konzentration führen, wodurch die bestimmte Abbaurate deutlich höher bestimmt werden würde als die wahre.

4.7.3 Vorexperimente für den DNS-Einzelmolekül-Abbau

Für die Beobachtung des exonukleolytischen Abbaus von DNS-Einzelmolekülen sowie für die Möglichkeit einer Sequenzanalyse ist es erforderlich, einzelne Moleküle auf der Deckglasoberfläche zu lokalisieren und den Abbau oberflächennah durch die Detektion der freiwerdenden fluoreszenzmarkierten Nukleotide zu verfolgen. Dafür wurde ein Fluoreszenzbild der Deckglasoberfläche mit Hilfe eines Ölimmersionsobjektivs bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm aufgenommen. Das Fluoreszenzsignal der markierten DNS-Molekülen wurde dabei wellenlängenabhängig von drei Detektoren registriert. Dabei wird im Wellenlängenbereich von 500 nm bis 550 nm hauptsächlich die Fluoreszenz des Farbstoffes R110, im Wellenlängenbereich zwischen 550 und 635 nm die von TMR und oberhalb von 645 nm die von Cy5 detektiert (Abbildung 60).

In allen drei Detektionswellenlängenbereichen sind deutliche Fluoreszenzsignale von auf der Deckglasoberfläche befindlichen Molekülen zu erkennen. Es werden um so mehr Moleküle detektiert, je näher der Detektionswellenlängenbereich an der Laserlinie des 488 nm Lasers liegt. Ein Teil davon stammt von fluoreszierenden Verunreinigungen, die stärker in der Nähe der Anregungswellenlänge fluoreszieren. Für den exonukleolytischen Abbau wurden DNS-Moleküle gewählt, bei denen auch bei einer Wellenlänge von über 645 nm Fluoreszenzphotonen detektiert werden konnten (Abbildung 60 a), da diese nur von den terminalen Cy5-Farbstoffmolekülen stammen können (siehe Abschnitt 4.6.2). Zum Verfolgen des exonukleolytischen Abbaus anhand der Freisetzung von R110-dCTP wurde der 488 nm Laser auf das zu beobachtende DNS-Molekül fokussiert. Die Messungen begannen nach der Zugabe der Reaktionslösung mit, beziehungsweise als Kontrolle, ohne Exo III.

In Abbildung 61 a) und b) sind die Intensitätszeitspuren der Kontrollmessungen bei einer Anregungsleistung von 1 μ W und 5 μ W dargestellt. Wie schon im Abschnitt 4.6.2 gezeigt, lässt sich am Anfang der Messung ein Energietransfer auf das terminale Cy5 beobachten (Abbildung 61). Die Fluoreszenz der immobilisierten hochmarkierten DNS nimmt aufgrund von Bleicheffekten schnell ab. Im Detektionsbereich zwischen 500 und 550 nm können danach vor allem bei hohen

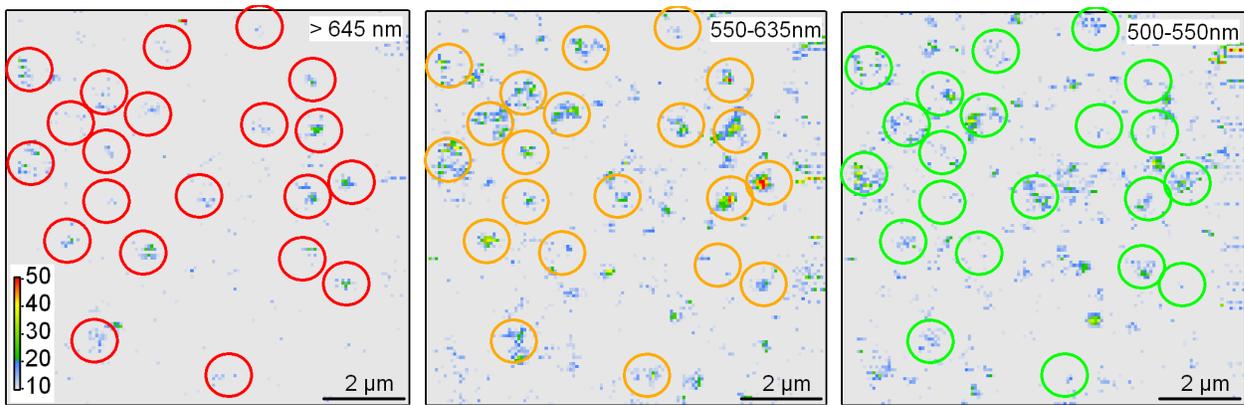


Abbildung 60: Fluoreszenzrastraufnahmen von auf der Deckglasoberfläche immobilisierter, zweifach mit R110-dCTP und TMR-dUTP sowie terminal mit Cy5 markierter DNS bei einer Anregung mit einem 488 nm Laser. Das Fluoreszenzsignal wurde wellenlängenabhängig auf drei Detektoren aufgetrennt: **a)** > 645 nm, **b)** 550-635 nm und **c)** 500-550 nm. Die farbigen Kreise markieren einzelne DNS-Moleküle entsprechend des Fluoreszenzsignals der Farbstoffe: rot - Cy5, orange - TMR und grün - R110. (Pixel: 128; Integrationszeit: 1ms).

Anregungsleistungen weitere Fluoreszenzereignisse beobachtet werden. Diese stammen von fluoreszierenden Verunreinigungen im Reaktionspuffer, die während der Messung durch das konfokale Anregungsvolumen diffundieren.

Für den exonukleolytischen Abbau der immobilisierten DNS wurde versucht, eine Anregungsleistung zu wählen, bei der einerseits die in den DNS-Molekülen eingebauten Farbstoffe nicht zu stark gebleicht werden, aber bei der andererseits die freiwerdenden markierten Nukleotide noch im ausreichenden Maße zur Fluoreszenz angeregt werden. In Abbildung 61 c) ist die Intensitätszeitspur eines solchen Abbaus bei einer Anregungsleistung von 2 μW dargestellt. Aufgrund dieser geringen Anregungsleistung ist die Photonenzahl pro Fluoreszenzereignis deutlich niedriger als bei der Kontrollmessung mit einer Anregungsleistung von 5 μW .

In Abbildung 61 d) wird die Anzahl der Ereignisse mit fortschreitender Messzeit für den exonukleolytischen Abbau und die 5 μW -Kontrollmessung miteinander verglichen. Da eine Zeiteinheit in den Intensitätszeitspuren mit 1 ms deutlich über den Diffusionszeiten freier R110-dCTP-Moleküle von weniger als 100 μs liegt, wurde zur Vereinfachung als Fluoreszenzereignis eine Zeiteinheit angesehen, in dem die Anzahl der Photonen über einer bestimmten Schwelle liegt. Diese Erkennungsschwelle betrug dabei jeweils das zwanzigfache der durchschnittlichen Photonenzahl pro Zeiteinheit der jeweiligen Intensitätszeitspur. Wegen der unterschiedlichen verwendeten Anregungsleistungen betrug diese bei der Kontrollmessung 10 Photonen und beim exonukleolytischen Abbau 5 Photonen. Aufgrund des anfänglichen Bleichens der hochmarkierten immobilisierten DNS wurde mit der Zählung der Fluoreszenzereignisse erst 20 Sekunden nach dem Beginn der Messzeit begonnen.

Die Rate der Fluoreszenzereignisse ist nach der Exo III-Zugabe aufgrund der Freisetzung von R110-dCTP aus dem immobilisierten DNS-Molekül verglichen mit der Kontrollmessung deutlich

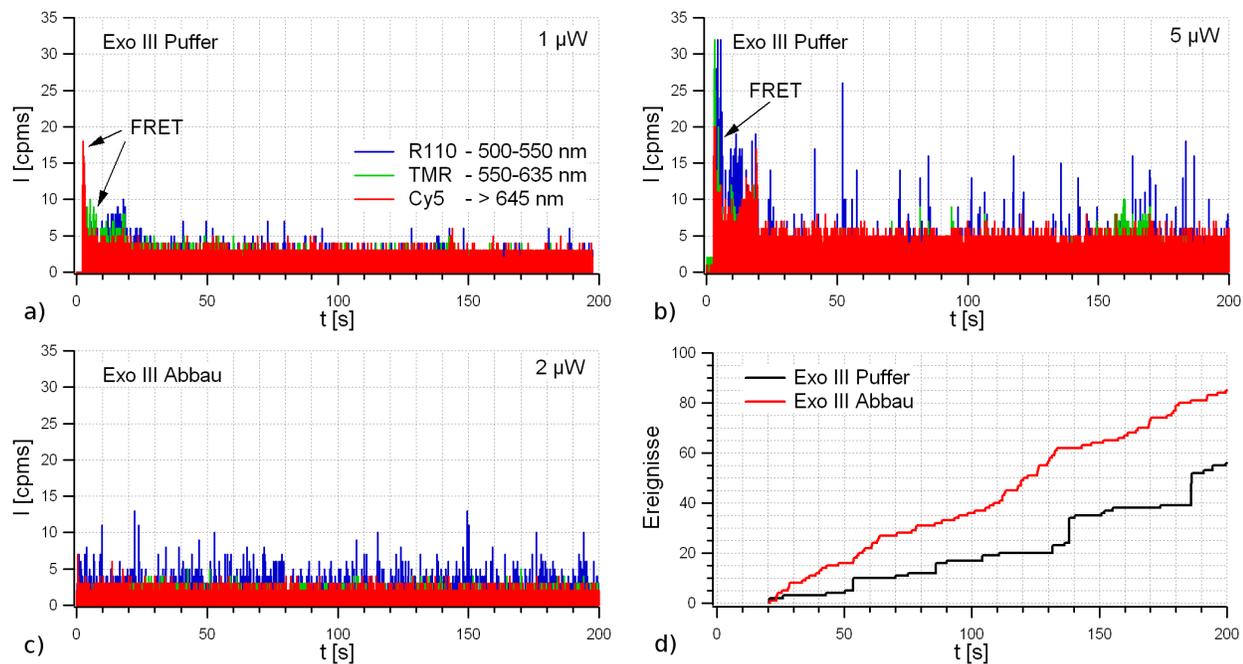


Abbildung 61: Intensitätszeitspur von immobilisierter, zweifach mit R110-dCTP und TMR-dUTP sowie terminal mit Cy5 markierter DNS-Moleküle in Exo III Puffer bei einer Anregung mit dem 488 nm Laser mit Leistungen von **a)** 1 μ W, **b)** 5 μ W und **c)** nach Zugabe von Exo III bei 2 μ W. Mit Erhöhung der Anregungsleistung sind aufgrund von fluoreszierenden Verunreinigungen im Reaktionspuffer gehäuft Ereignisse sichtbar. In **d)** wird die Anzahl der Fluoreszenzereignisse aus **b)** und **c)** miteinander verglichen (Erläuterungen siehe Text).

größer. Nach 200 Sekunden Messzeit werden beim Exo III-Abbau 85 und bei der Hintergrundmessung 55 Ereignisse gezählt. Werden die Hintergrundereignisse abgezogen, bleiben beim exonukleolytischen Abbau 30 Ereignisse übrig. Dies entspräche einer R110-dCTP-Freisetzungsrate von 0,167 pro Sekunde und damit einer Abbaurrate der immobilisierten DNS von 0,67 Nukleotiden pro Sekunde. Dies liegt im Bereich der bestimmten Abbaurrate von hochmarkierter DNA in Lösung 4.7.1, als auch der durch FCS-Messungen bestimmten Abbaurrate von hochmarkierter immobilisierter DNA 4.7.2.

Für eine Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung ist das Bleichen der hochmarkierten DNS-Moleküle sehr problematisch. Denn mit der Photozerstörung der Fluoreszenzfarbstoffe ist die Detektion und Identifikation der einzelnen Basen nicht mehr möglich und eine Sequenzanalyse damit hinfällig. In Hinblick auf die Einzelmoleküldetektion und -identifikation der freigesetzten fluoreszenzmarkierten Basen ist es desweiteren vonnöten, die Konzentration fluoreszierender Verunreinigungen in den Reaktionslösungen drastisch zu verringern, da diese fälschlicherweise als freigesetzte Basen erkannt werden könnten. Desweiteren muss sichergestellt sein, dass die detektierten Basen nur von einem DNS-Molekül stammen. Dies kann durch eine starke Verringerung der Flächendichte der immobilisierten DNS auf der Deckglasoberfläche erreicht werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Machbarkeit einer Einzelmolekül-Sequenzierung von auf einer Deckglasoberfläche immobilisierten DNS-Molekülen durch sequentielle Abspaltung, Detektion und Identifikation einzelner mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter Basen. Dafür sollte mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie sowie Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) nachgewiesen werden, dass ein Abbau von hochmarkierter DNS in Lösung sowie immobilisiert möglich ist, und welchen Einfluss dabei die eingebauten fluoreszenzmarkierten Basen haben.

Zunächst wurde in Hinblick auf die Detektion von Molekülen an Grenzflächen für das verwendete konfokale Fluoreszenzrastermikroskop eine evaneszente Anregung erprobt (Abschnitt 4.2). Dies wurde prismenlos durch seitliches Einkoppeln des Laserstrahls in ein hochnumerisches Objektiv realisiert. Dafür wurde eine spezielle Blende in den Anregungsstrahlengang platziert (Abschnitt 3.3). Mittels FCS-Messungen konnte dabei ein evaneszentes Anregungsvolumen von 0,12 fl bestimmt werden.

Für eine Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung ist neben der Detektion der freiwerdenden Base ebenfalls deren eindeutige Identifikation erforderlich. Hierfür wurde eine Methode verwendet, die auf der Betrachtung von Wahrscheinlichkeitsverteilungen basiert (Abschnitt 4.3). Dabei wird jedem detektierten Photon eine Wahrscheinlichkeit für jede fluoreszenzmarkierte Base zugeordnet. Diese Wahrscheinlichkeiten wurden anhand der Emissionscharakteristik der Farbstoffe bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode eine eindeutige Identifikation schon bei einer relativ geringen Anzahl an detektierten Fluoreszenzphotonen möglich ist.

Für die Detektion einzelner DNS-Moleküle wurden diese terminal mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Der Einbau der fluoreszenzmarkierten Basen in die doppelsträngige DNS erfolgte durch Primerverlängerung (*primer extension*) (Abschnitt 3.5), während der die natürlichen Basen durch die entsprechenden Analoga ersetzt werden. Untersucht wurden DNS-Proben mit unterschiedlichem Markierungsgrad: Native DNS, in der keine fluoreszenzmarkierten Basen eingebaut wurden, einfach markierte DNS, in der ein Basentyp durch ein fluoreszenzmarkiertes Analogon ersetzt wurde, sowie zweifach markierte DNS, in der zwei Basentypen durch entsprechende fluoreszenzmarkierte Analoga ersetzt wurden. Desweiteren wurden für vergleichende Untersuchungen DNS-Proben mit einem interkalierenden Farbstoff markiert.

In dieser Arbeit wurden DNS-Moleküle von 500 bis 3000 bp Länge untersucht. In diesem Längenbereich ließ sich dabei keine eindeutige Zuordnung nativer DNS zu einem Polymermodell finden (Abschnitt 4.6.1), da im unteren betrachteten Längenbereich sich die DNS aufgrund ihrer großen Persistenzlänge wie ein Stab und im oberen wie eine semiflexible Kette verhält. Am besten konnte das Zimm-Modell, welches neben der Bewegung der einzelnen Segmente im Polymer auch hydrodynamische Wechselwirkung mitberücksichtigt, den Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizienten und Anzahl der Basenpaare beschreiben. Bei den einfach sowie zweifach markierten DNS-Proben konnte eine Verringerung der Diffusionszeit gegenüber gleich langer, nativer DNS

festgestellt werden (Abschnitt 4.6.1). Der Einbau der fluoreszenzmarkierten Basen führt vermutlich zu einer Reduktion des hydrodynamischen Radius der DNS-Moleküle. Dabei scheint die Länge und damit die Flexibilität der DNS-Moleküle eine Rolle zu spielen, da deutliche Verringerungen in der Diffusionszeit vor allem bei längeren DNS-Molekülen zu beobachten waren.

Der Einbau der fluoreszenzmarkierten Basen in die DNS führt desweiteren dazu, dass die Fluoreszenz der an den Basen gekoppelten Farbstoffe stark unterdrückt wird (Abschnitt 4.6.1). So konnte gezeigt werden, dass zweifach markierte DNS-Proben in Lösung nicht über die eingebauten fluoreszenzmarkierten Basen detektierbar sind. Diese Fluoreszenzunterdrückung sollte bei immobilisierten DNS-Molekülen genutzt werden, um die Freilassung der fluoreszenzmarkierten Basen direkt am DNS-Molekül zu beobachten. Jedoch zeigte sich, dass bei den immobilisierten DNS-Proben ein Fluoreszenzsignal von den eingebauten fluoreszenzmarkierten Basen detektierbar ist (Abschnitt 4.6.2). Die Platzierung des Laserfokus auf die immobilisierten DNS-Moleküle führte zum Bleichen und damit zur Photozerstörung der eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe. Dabei wiesen die Bleichkurven einzelner hochmarkierter DNS-Moleküle jedoch nur ein bis drei diskrete Stufen auf. Da aufgrund der hohen Anzahl eingebauter Fluoreszenzfarbstoffe deutlich mehr Bleichstufen beziehungsweise eine kontinuierlich abfallende Bleichkurve zu erwarten gewesen wäre, könnte dies auf eine elektronische Kopplung der eingebauten Farbstoffe hindeuten. Zudem konnte ein Energietransfer der fluoreszenzmarkierten Basen auf den terminalen Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen werden.

Für die Abspaltung einzelner Basen aus der DNS wurde die Exonuklease III (Exo III) aus *E. coli* verwendet. Exo III baut einen Einzelstrang eines doppelsträngigen DNS-Moleküls vom 3'-Ende her Base für Base ab. Da sich an den beiden Enden eines doppelsträngigen DNS-Moleküls jeweils ein 3'-Ende eines der beiden Einzelstränge befindet, findet auch an beiden Enden eine Umwandlung von doppelsträngigem in einzelsträngigen Bereich statt. Mit Hilfe einer DNS-Probe, die mit einem interkalierenden Farbstoff markiert wurde, konnte als Endprodukt des exonukleolytischen Abbaus von DNS in Lösung ein DNS-Molekül bestimmt werden, welches zwar noch Doppelstrangbereiche besitzt, diese jedoch drastisch im Vergleich zum Ausgangszustand verringert sind (Abschnitt 4.7.1). So lässt sich ein DNS-Molekül vermuten, welches aus zwei einzelsträngigen Bereichen besteht, die über einen kurzen Doppelstrangbereich miteinander verbunden sind. Beim Abbau von hochmarkierter DNS konnte gezeigt werden, dass diese in Lösung verglichen mit nativer DNS um ein Drittel bis ein Viertel langsamer abgebaut wird (Abschnitt 4.7.1). Durch Immobilisierung der hochmarkierten DNS auf der Deckglasoberfläche konnte keine Verringerung der Abbaurate (Abschnitt 4.7.2) festgestellt werden. Hierbei konnte zudem nachgewiesen, dass von der immobilisierten DNS im Gegensatz zur DNS in Lösung nur einer der beiden Einzelstränge abgebaut wird.

In dieser Arbeit wurden die Grundvoraussetzungen für die Untersuchung des exonukleolytischen Abbaus von auf Deckglasoberfläche immobilisierter DNS auf Einzelmolekülniveau und der Detektion und Identifikation der dabei abgespaltenen fluoreszenzmarkierten Basen geschaffen. Der

Einfluss der eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe auf die DNS und deren exonukleolytischen Abbau wurden dabei mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass die Unterdrückung der Fluoreszenz der eingebauten fluoreszenzmarkierten Basen sich nicht wie erhofft direkt für eine Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung von immobilisierter DNS nutzen lässt.

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wird folgende Herangehensweise einer DNS-Einzelmolekülsequenzierung vorgeschlagen (Abbildung 62): Die DNS wird anhand der in dieser Arbeit angewandten und verfeinerten Prozedur auf einer Deckglasoberfläche immobilisiert. Als nächster Schritt wird das fluoreszenzmarkierte Enzym Exo III ohne den Cofaktor Mg^{2+} auf die immobilisierte DNS gegeben. Dadurch bindet die Exo III an die DNS, kann diese aber noch nicht abbauen. Über das fluoreszenzmarkierte Exo III werden die immobilisierten, abbaubaren DNS-Moleküle lokalisiert. Für die Detektion der einzelnen fluoreszenzmarkierten Basen wird das Beobachtungsvolumen des konfokalen Mikroskopsystems neben dem immobilisierten DNS-Molekül platziert. Durch Zugabe von Mg^{2+} wird der Abbauprozess gestartet und die freigesetzten fluoreszenzmarkierten Basen werden über einen elektro-osmotischen Fluss (EOF) Richtung Beobachtungsvolumen transportiert. Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Detektion und Identifikation von Einzelmolekülen kann dabei zur Bestimmung der einzelnen Fluoreszenzereignisse angewandt werden.

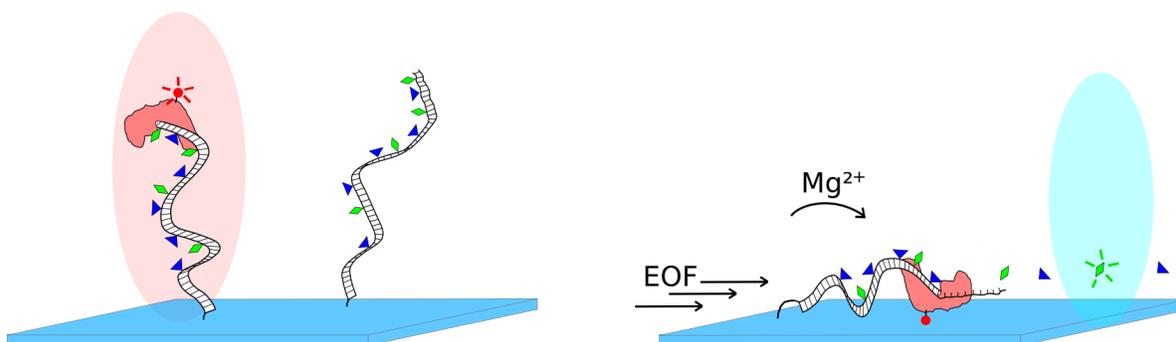


Abbildung 62: Mögliche Herangehensweise einer Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung von auf einer Deckglasoberfläche immobilisierten DNS auf Basis der sequentiellen Abspaltung fluoreszenzmarkierter Basen. Hochmarkierte auf einer Deckglasoberfläche immobilisierte DNS-Moleküle werden über die an ihnen gebundene und fluoreszenzmarkierte Exo III lokalisiert (linkes Bild). Der exonukleolytische Abbau wird durch die Zugabe des Cofaktors Mg^{2+} gestartet. Die freigesetzten Basen werden mittels eines elektro-osmotischen Flusses in Richtung Beobachtungsvolumen transportiert, wo sie anhand ihrer Fluoreszenzfarbstoffe detektiert und identifiziert werden (rechtes Bild).

Literatur

- [1] ALFRED-WEGENER-INSTITUT FÜR POLAR- UND MEERESFORSCHUNG: *Der Klimawandel und das Leben im Südlichen Ozean - Forschungsschiff Polarstern startet antarktische Forschungsaison*. http://www.awi.de/de/aktuelles_und_presse/pressemitteilungen/. 2007. – [Online; Stand 23. Januar 2008]
- [2] SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci* 74 (1977), S. 5463–5467
- [3] VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; MYERS, E.W.; LI, P.W.; MURAL, R.J.; SUTTON, G.G.; SMITH, H.O.; YANDELL, M.; EVANS, C.A.; HOLT, R.A.; ET.AL.: The sequence of the Human Genome. *Science* 291 (2001), S. 1304–1351
- [4] INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 (2004), S. 931–945
- [5] COLLINS, F.S.; MORGAN, M.; PATRINOS, A.: The human genome project: lessons from large-scale biology. *Science* 300 (2003), S. 286–290
- [6] JONEITZ, E.: Personal genomes. *Technol. Rev.* 104 (2001), S. 30
- [7] PRAY, L.: A cheap personal genome? *The Scientist* [online] <http://www.biomedcentral.com/news/20021004/04> (2002)
- [8] PENNISIS, E.: Gene researchers hunt bargains, fixer-uppers. *Science* 298 (2002), S. 735–736
- [9] SALISBURY, M.W.: Fourteen sequencing innovations that could change the way you work. *Genome Technol.* 35 (2003), S. 40–47
- [10] JETT, J.H.; KELLER, R.A.; MARTIN, J.C.; MARRONE, B.L.; MOYZIS, R.K.; RATLIFF, R.L.; SEITZINGER, N.K.; SHERA, E.B.; STEWART, C.C.: High Speed DNA Sequencing: An Approach upon Fluorescence Detection of Single Molecules. *J. of Biomolecular Structure & Dynamics* 7 (1989), S. 301–309
- [11] DÖRRE, K.; BRAKMANN, S.; BRINKMEIER, M.; HAN, K.-T.; RIEBESEEL, K.; SCHWILLE, P.; STEPHAN, J.; WETZEL, T.; LAPCZYNA, M.; STUKE, M.; BADER, R.; HINZ, M.; HARTMUT, S.; HOLM, J.; EIGEN, M.; RUDOLF, R.: Techniques for single molecule sequencing. *Bioimaging* 5 (1997), Nr. 5, S. 139–152
- [12] JETT, J. H.; KELLER, R. A.; MARTIN, J. C.; SEITZINGER, N. K.; SHERA, E. B.: Single Molecule Detection in Flowing Sample Streams as an Approach to DNA Sequencing. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 198 (1989), September, S. 41
- [13] BRAKMANN, S.; NICKCHEN, P.: The large fragment of Echerichia coli DNA Polymerase I Can Synthesize DNA Exclusively from fluorescently labeled nucleotides. *ChemBioChem* 2 (2001), Nr. 10, S. 773–777
- [14] BRAKMANN, S.; LÖBERMANN, S.: High-Density Labeling of DNA: Preparation and Characterization of the Target Material for Singel-Molecule Sequencing. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 40 (2001), Nr. 8, S. 1427–1429
- [15] BRAKMANN, S.; LOBERMANN, S.: A further step towards single-molecule sequencing: Escherichia coli exonuclease III degrades DNA that is fluorescently labeled at each base pair. *Angew. Chem-Int Ed Engl* 41 (2002), Nr. 17, S. 3215–3217

- [16] EIGEN, M.; RIGLER, R.: Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 4 (1994), Nr. 91, S. 5740–5747
- [17] MAGDE, D.; ELSON, E.L.; WEBB, W.W.: Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System-Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* 29 (1972), Nr. 11, S. 705–708
- [18] ELSON, E.L.; MAGDE, D.: Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biopolymers* 13 (1974), Nr. 13, S. 1–27
- [19] MAGDE, D.; ELSON, E.L.; WEBB, W.W.: Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization. *Biopolymers* 13 (1974), Nr. 13, S. 29–61
- [20] NGUYEN, D.C.; KELLER, R.A.; JETT, J.H.; MARTIN, J.C.: Detection of Single Molecules of Phycocerythrin in Hydrodynamically Focused Flows by Laser-induced Fluorescence. *Anal. Chem.* 59 (1987), Nr. 59, S. 2158–2161
- [21] RIGLER, R.; WIDENGREN, J.: Ultrasensitive Detection of Single Molecules by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Bioscience* 3 (1990), S. 180–183
- [22] RIGLER, R.; METS, Ü: Diffusion of single molecule through a gaussian laser beam. *SPIE* 1921 (1992), S. 239–242
- [23] FOLDES-PAPP, Z.; ANGERER, B.; ANKENBAUER, W.; RIGLER, R.: Fluorescent high-density labeling of DNA: error-free substitution for a normal nucleotide. *J. Biotechnol.* 86 (2001), April, Nr. 3, S. 237–253
- [24] WÖHRLE, D.; TAUSCH, T.; STOHRER, W.: *Photochemie*. Wiley-VCH, Weinheim, 1998
- [25] JABLONSKI, A.: Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Z. Phys.* 94 (1935), S. 38–46
- [26] DOOSE, S.: *Single molecule characterization of photophysical and colloidal properties of biocompatible quantum dots*, Heidelberg, Ruprecht-Karl-Universität, Diss., 2003
- [27] LAKOWICZ, J.R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Phenum Publisher, 1999
- [28] WIDENGREN, J.; SCHWILLE, P.: Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* 104 (2000), Juli, Nr. 27, S. 6416–6428
- [29] HEINZE, K.G.: *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Zweiphotonenanregung in der biomolekularen Analytik*, Oldenburg, Carl-von-Ossietzky-Universität, Diss., 2002
- [30] SEIDEL, C.: *Laserspektroskopische Untersuchungen molekularer Aspekte der nukleobasenspezifischen Lösung von Fluoreszenzfarbstoffen*, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Diss., 1992
- [31] BECKER, H.G.O.: *Einführung in die Photochemie*. Thieme-Verlag, Stuttgart-New-York, 1983
- [32] SOPER, S.A.; NUTTER, H.L.; KELLER, R.A.; DAVIS, L.M.; SHERA, E.B.: The photophysical constants of several fluorescent dyes pertaining to ultrasensitive fluorescent spectroscopy. *Photochemistry & Photobiology* 57 (1993), S. 972–977
- [33] NIE, S.M.; CHIU, D.T.; ZARE, R.N.: Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy. *Science* 266 (1994), S. 1018–1021

- [34] SCHMIDT, T.; SCHÜTZ, G.J.; BAUMGARTNER, W.; GRUBER, H.J.; SCHINDLER, H.: Characterization of Photophysics and Mobility of Single Molecules in a Fluid Lipid Membrane. *J. Phys. Chem.* 99 (1995), S. 17662–17668
- [35] DOORNBOS, R.M.P.; DEGROOTH, B.G.; GREVE, J.: Experimental and model investigations of bleaching and saturation of fluorescence in flow cytometry. *Cytometry* 29 (1997), S. 204
- [36] EGGELING, C.; WIDENGREN, J.; RIGLER, R.; SEIDEL, C.A.M.: Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single molecule detection - evidence of two-step-photolysis. *Anal. Chem.* 70 (1998), S. 2651–2659
- [37] KELLER, S.: *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in Polymerlösung*. München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2004. – 147– S
- [38] EGGELING, C.; WIDENGREN, J.; RIGLER, R.; SEIDEL, C. A. M.; RETTIG, R. (Hrsg.); SCHRADER, S. (Hrsg.); STREHMEL, B. (Hrsg.); SEIFERT, H. (Hrsg.): *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*. Springer, Berlin, 1999
- [39] FÖRSTER, T.: Energy transport and fluorescence. *Naturwissenschaften* 6 (1946), S. 165–177
- [40] FÖRSTER, T.: *Fluorescence of organic compounds*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht, 1951, S. 312
- [41] CLEGG, R.M.: Fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6 (1995), S. 103–110
- [42] RIGLER, R.; METS, Ü.; WIDENGREN, J.; KASK, P.: Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translation diffusion. *European Biophysics Journal* (1993), Nr. 22, S. 169–175
- [43] QIAN, H.; ELSON, E.L.: Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy. *Appl. Opt.* 30 (1991), S. 1185–1195
- [44] GOODWIN, P. M.; AMBROSE, W. P.; KELLER, R. A.: Single-molecule detection in liquids by laser-induced fluorescence. *Acc. Chem. Res.* 29 (1996), Dezember, Nr. 12, S. 607–613
- [45] LERMER, N.; BARNES, M.D.; KUNG, C.Y.; WHITTEN, W.B.; RAMSEY, J.M.: High efficiency molecular counting in solution - single molecule detection in electrostatically focussed microdroplet streams. *Anal. Chem.* 69 (1997), S. 2115–2121
- [46] NIE, S.M.; CHIU, D.T.; ZARE, R.N.: Real-time detection of single molecules in solution by confocal fluorescence microscopy. *Anal. Chem.* 67 (1995), S. 2849–2857
- [47] Kap. 2 In: HÜBNER, C.; BASCHÉ, T.: *Optical Microscopy and Spectroscopy of Single Molecules*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2006, S. 5–47
- [48] TSIIVALIARIS, G.; MANSTEIN, D.J.: TIRF-Mikroskopie und ihre Anwendung in der Biologie. *Biospektrum* 9 (2003), Nr. 5, S. 596
- [49] CHON, J.W.M.; GU, M.: Scanning total internal reflection fluorescence microscopy under one-photon and two-photon excitation: image formation. *Appl. Opt.* 43 (2004), Nr. 5, S. 1063
- [50] WIENER, N.: *Extrapolation Interpolation and Smoothing of Stationary Time Series*. MIT Press, Cambridge (1949)
- [51] EHRENBERG, M.; RIGLER, R.: Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. *Chem. Phys.* 4 (1974), S. 390–401

- [52] WIDENGREN, J.; METS, Ü.; RIGLER, R.: Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution - a theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.* 99 (1995), S. 13368–13379
- [53] METS, Ü.; WIDENGREN, J.; RIGLER, R.: Application of the antibunching in dye fluorescence - measuring the excitation rates in solution. *Chem. Phys.* 218 (1997), S. 191–198
- [54] Kap. Fluorescence Correlation Spectroscopy In: THOMPSON, N.L.: *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. New York: Lakowicz, JR, 1991, S. 337–378
- [55] MAITI, S.; HAUPTS, U.; WEBB, W.W.: Fluorescence correlation spectroscopy - Diagnostics for sparse molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997), S. 11753–11757
- [56] SCHWILLE, P.; BIESCHKE, J.; OEHLENSCHLAGER, F.: Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy - the analytical and diagnostic potential of diffusion studies. *Biophys. Chem.* 66 (1997), S. 211–228
- [57] SCHWILLE, P.; MEYER-ALMES, F.J.; RIGLER, R.: Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.* 72 (1997), S. 1878–1886
- [58] MULLER, B. K.; ZAYCHIKOV, E.; BRAUCHLE, C.; LAMB, D. C.: Pulsed interleaved excitation. *Biophysical Journal* 89 (2005), November, Nr. 5, S. 3508–3522
- [59] WIDENGREN, J.; RIGLER, R.; METS, Ü.: Triplet-State Monitoring by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J. Fluoresc.* 4 (1994), S. 255–258
- [60] HÖBEL, M.; RICKA, J.: Dead-time and afterpulsing correction in multiphoton timing with nonideal detectors. *Rev. Sci. Instrum.* 65 (1994), S. 2326–2336
- [61] ZHAO, M.; L., Jin; CHEN, B.; DING, Y.; MA, H.; CHEN, D.: Afterpulsing and its corrections in fluorescence correlations spectroscopy experiments. *Appl. Opt.* 42 (2003), S. 4031–4036
- [62] ENDERLEIN, J.; GREGOR, I.: Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy. *Review in Scientific Instruments* 73 (2005), S. 033102
- [63] KOPPEL, D.E.: Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review A* 10 (1974), Nr. 6, S. 1938
- [64] MILON, S.; HOVIUS, R.; VOGEL, H.; WOHLAND, T.: Factors influencing fluorescence correlation spectroscopy measurements on membranes: simulations and experiments. *Chem. Phys.* (2002), S. 171–186
- [65] CARL ZEISS: *ConfoCor 3 – Detektionsmodul für die Fluoreszenz-Fluktuationsanalyse*. [http://www.zeiss.de/C1256CFB00332E16/0/5C192FB11A2FE50EC12570A10042E53B/\\$file/45-0057_d.pdf](http://www.zeiss.de/C1256CFB00332E16/0/5C192FB11A2FE50EC12570A10042E53B/$file/45-0057_d.pdf). 2008. – [Online; Stand 11. Januar 2008]
- [66] CHANDRASHEKAR, S.: Stochastic Problems in Physics and Astronomy. *Rev. Mod. Phys.* 15 (1943), S. 1–89
- [67] SMOLUCHOWSKY, M.V.: Zusammenfassende Bearbeitung. *Physik* 17 (1916), S. 557/585
- [68] LI, L.-Q.; DAVIS, L.M.: Rapid and efficient detection of single chromophore molecules in aqueous solution. *Appl. Opt.* 34 (1995), Nr. 18, S. 3208–3218
- [69] HÄNNINEN, P.E.; SOINI, J.T.; SOINI, E.: Photonen-Burst Analysis in Two-Photon Fluorescence Excitation Flow Cytometry. *Cytometry* 36 (1999), S. 183–188

- [70] FRIES, J.R.; BRAND, L.; EGGELING, C.; KÖLLNER, M.; SEIDEL, C.A.M.: Quantitative identification of different single molecules by selective time-resolved confocal fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem.* 102 (1998), S. 6601–6613
- [71] HAAB, B.B.; MATHIES, R.A.: Single Molecule Fluorescence Burst Detection of DNA Fragments Separated by Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 67 (1995), S. 3253–3260
- [72] KELLER, R.A.; AMBROSE, W.P.; JETT, J.H.; MARTIN, J.C.; WU, M.: Single molecule fluorescence analysis in Solution. *Appl. Spectrosc.* 50 (1996), S. A12–A32
- [73] CHEN, D.Y.; DOVICH, N.J.: Single Molecule Detection in Capillary Electrophoresis: Molecular Shot Noise as a Fundamental Limit of Chemical Analysis. *Anal. Chem.* 68 (1996), S. 690–696
- [74] ENDERLEIN, J.; ROBBINS, D.L.; AMBROSE, W.P.; GOODWIN, P.M.; KELLER, R.A.: The statistics of Single molecule detection: an overview. *Bioimag.* 5 (1997), S. 88–98
- [75] PRUMMER, M.; HÜBNER, C.G.; SICK, B.; BERT, H.; RENN, A.; WILD, U.P.: Single-molecule Identification by Spectrally and Time-Resolved Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* 72 (2000), Nr. 72, S. 443–447
- [76] BAYES, T.: An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 53 (1763), S. 370–418
- [77] WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C.: Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171 (1953), S. 137–138
- [78] LEWIN, B.: *Molekularbiologie der Gene*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1998
- [79] SMITH, S.B.; CUI, Y.J.; BUSTAMANTE, C.: Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA Molecules. *Science* 271 (1996), S. 795–799
- [80] YAN, J.; MARKO, J.F.: Localized single-stranded bubble mechanism for cyclization of short double helix DNA. *Physics Review Letters* 93 (2004), S. 108108
- [81] FLORY, P.J.: *Statistical mechanics of chain molecules*. New York: Interscience Publishers, 1969
- [82] ROUSE, P.E.: A theory of the linear viscoelastic properties of dilute solution of coiling polymers. *J. Chem. Phys.* 21 (1953), S. 1272–1280
- [83] ZIMM, B.H.: Dynamics of polymer molecules in dilute solution: viscoelasticity, flow birefringence and dielectric loss. *J. Chem. Phys.* 24 (1956), S. 269–278
- [84] KRATKY, O.; POROD, G.: Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Recueil des Travaux Chimiques des Bays-Bas* 68 (1949), S. 1106–1122
- [85] TIRADO, M.M.; MARTINEZ, C.L.; TORRE, J.G.D.: Comparison of theories for the translational and rotational diffusion-coefficient of rod-like macromolecules - application to short DNA fragments. *J. Chem. Phys.* 81 (1984), S. 2047–2052
- [86] HARNAU, L.; WINKLER, R.G.; REINEKER, P.: Dynamic structure factor of semiflexible macromolecules in dilute solution. *J. Chem. Phys.* 104 (1996), S. 6355–6368
- [87] HARNAU, L.: *Zur Theory dynamischer und statischer Strukturfaktoren von Makromolekülen unterschiedlicher Molekülsteifigkeit*, Universität Ulm, Diss., 1998
- [88] MANNING, G.S.: Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions. I. Colli-gative Properties. *J. Chem. Phys.* 51 (1969), S. 924–934

- [89] MANNING, G.S.: Polyelectrolytes. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 23 (1972), S. 117
- [90] MANNING, G.S.; SELEGNY, E. (Hrsg.): *Polyelectrolytes*. J. Reichel Publ. Comp. Dordrecht, 1974
- [91] ODIJK, T.: Polyelectrolytes Near Rod Limit. *J. Polym. Sci. Phys. Ed.* 15 (1977), S. 477
- [92] ODIJK, T.: Electrostatic persistence length and its relation to a unified theory of polyelectrolyte. *Polymer* 19 (1978), S. 989–990
- [93] SKOLNICK, J.; FIXMAN, M.: Electrostatic persistence length of a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules* 10 (1977), S. 944–948
- [94] MAXAM, A.M.; GILBERT, W.: A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (1977), S. 560–566
- [95] SMITH, L.M.; SANDERS, J.Z.; KAISER, R.J.; HUGHES, P.; DODD, C.; CONNELL, C.R.; HEINER, C.; KENT, S.B.; HOOD, L.E.: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321 (1986), S. 674–679
- [96] SWERDLOW, H.; GESTELAND, R.: Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nuc. Ac. Res.* 18 (1990), S. 1415–1419
- [97] LUCKEY, J.A.; DROSSMAN, H.; KOSTICHKA, A.J.; MEAD, D.A.; D’CUNHA, J.; NORRIS, T.B.; SMITH, L.M.: High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nuc. Ac. Res.* 18 (1990), S. 4417–4421
- [98] COHAN, A.S.; NAJARIAN, D.R.; KARGER, B.L.: Separation and analysis of DNA sequence reaction products by capillary gel electrophoresis. *J. Chrom.* 516 (1990), S. 49–60
- [99] TAN, H.D.; YEUNG, E.S.: Automation and integration of multiplexed online sample preparation with capillary electrophoresis for high-throughput DNA sequencing. *Anal. Chem.* 70 (1998), S. 4044–4053
- [100] BEHR, S.; MATZIG, M.; LEVIN, A.; EICKHOFF, H.; HELLER, C.: A fully automated multicapillary electrophoresis device for DNA analysis. *Electroph.* 20 (1999), S. 1492–1507
- [101] KHETERPAL, I.; MATHIES, R.A.: Capillary array electrophoresis DNA sequencing. *Anal. Chem.* 71 (1999), S. 31A–37A
- [102] MULLIKIN, J.C.; MCMURRAY, A.A.: DNA sequencing - Sequencing the genome fast. *Science* 283 (1999), S. 1867–1868
- [103] WEBER, J.L.; MYERS, E.W.: Human Whole-Genome Shotgun Sequencing. *Genome Res.* 7 (1997), S. 401–409
- [104] GREEN, P.: Against a Whole-Genome Shotgun. *Genome Res.* 7 (1997), S. 410–417
- [105] EMRICH, C.A.; TIAN, H.; MEDINTZ, I.L.; MATHIES, R.A.: Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. *Anal. Chem.* 74 (2002), S. 5076–5083
- [106] KOUTNY, L.; SCHMALZING, D.; SALAS-SOLANO, O.; EL-DIFRAWY, S.; ADOURIAN, A.; BUONOCORE, S.; ABBEY, K.; MCEWAN, P.; MATSUDAIRA, P.; EHRLICH, D.: Eight hundred-base sequencing in a microfabricated electrophoretic device. *Anal. Chem.* 72 (2000), S. 3388–3391
- [107] PAEGEL, B.M.; BLAZEJ, R.G.; MATHIES, R.A.: Microfluidic devices for DNA sequencing: sample preparation and electrophoretic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003), S. 42–50

- [108] BENTLEY, D.R.: Whole genome re-sequencing. *ScienceDirect* 16 (2006), S. 545–552
- [109] SCHMALZING, D.; TSAO, N.; KOUTNY, L.; CHISHOLM, D.; SRIVASTAVA, A.; ADOURIAN, A.; LINTON, L.; MCEWAN, P.; MATSUDAIRA, P.; EHRlich, D.: Toward real-world sequencing by microdevice electrophoresis. *Genome Res.* 9 (1999), S. 853–858
- [110] LIU, S.R.; SHI, Y.N.; JA, W.W.; MATHIES, R.A.: Optimization of high-speed DNA sequencing on microfabricated capillary electrophoresis channels. *Anal. Chem.* 71 (1999), S. 566–573
- [111] DRMANAC, R.; DRMANAC, S.; STREZOSKA, Z.; PAUNESKU, T.; LABAT, I.; ZEREMSKI, M.; SNODDY, J.; FUNKHOUSER, W.K.; KOOP, B.; HOOD, L.; ET.AL.: DNA sequence determination by hybridization: a strategy for efficient large-scale sequencing. *Science* 260 (1993), S. 1649–1652
- [112] SCHOLLER, P.; HEBER, S.; HOHEISEL, J.D.: Optimization and automation of fluorescence based DNA hybridization for high-throughput clone mapping. *Electroph.* 19 (1998), S. 504–508
- [113] CANTOR, C.R.: Lightening up hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14 (1996), S. 264
- [114] BLANCHARD, A.P.; KAISER, R.J.; HOOD, L.E.: High-density oligonucleotide arrays. *Biosensors & Bioelectronics* 11 (1996), S. 687–690
- [115] CHEE, M.; YANG, R.; HUBBELL, E.; BERNO, A.; HUANG, X.C.; STERN, D.; WINKLER, J.; LOCKHART, D.J.; MORRIS, M.S.; FODOR, S.P.: Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274 (1996), S. 610–614
- [116] Kap. Untersuchungen an komplexen Genomen: Gene des Menschen In: KNIPPERS, R.: *Molekulare Genetik*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1995, S. 420–470
- [117] PATIL, N.; BERNO, A.J.; HINDS, D.A.; BARRETT, W.A.; DOSHI, J.M.; HACKER, C.R.; KAUTZER, C.R.; LEE, D.H.; MARJORIBANKS, C.; MCDONOUGH, D.P.; NGUYEN, B.T.N.; NORRIS, M.C.; SHEEHAN, J.B.; SHEN, N.; STERN, D.; STOKOWSKI, R.P.; THOMAS, D.J.; TRULSON, M.O.; VYAS, K.R.; FRAZER, K.A.; FODOR, S.P.A.; COX, D.R.: Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science* 294 (2001), S. 1719–1723
- [118] DRMANAC, S.: Accurate sequencing by hybridization for DNA diagnostic and individual genomics. *Nature Biotechnol.* 16 (1998), S. 54–58
- [119] DRMANAC, R.; DRMANAC, S.; BAIER, J.; CHUI, G.; COLEMAN, D.; DIAZ, R.; GIETZEN, D.; HOU, A.; JIN, H.; UKRAINCZYK, T.; XU, C.: DNA sequencing by hybridization with arrays of samples or probes. *Methods Mol. Biol.* 170 (2001), S. 173–179
- [120] AKESON, M.; BRANTON, D.; KASIANOWICZ, J.J.; BRANDIN, E.; DEAMER, D.W.: Microsecond Time-Scale Discrimination Among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments Within Single RNA Molecules. *Biophys. J.* 77 (1999), S. 3227–3233
- [121] ANDERSEN, O.S.: Sequencing and the Single Channel. *Biophys. J.* 77 (1999), S. 2899–2901
- [122] KORLACH, J.; LEVENE, M.; TURNER, S.W.; LARSON, D.R.; FOQUET, M.; CRAIGHARD, H.G.; WEBB, W.W.: A new strategy for sequencing individual molecules of DNA. *Biophys. J.* 80 (2001), S. Part2 (Annual Meeting Abstracts) 65501
- [123] KARTALOV, E. P.: *Single-molecule detection and DNA sequencing-by-synthesis*. California, California Institute of Technology, Diss., 2004

- [124] AMBROSE, W.P.; GOODWIN, P.M.; JETT, J.H.; JOHNSON, M.E.; MARTIN, J.C.; MARRONE, B.L.; SCHECKER, J.A.; WILKERSON, C.W.; KELLER, R.A.; HACES, A.; SHIH, P.J.; HARDING, J.D.: Application of Single Molecule Detection to DNA Sequencing and Sizing. *Ber. Bunsen Phys. Chem.* (1993), S. 1–23
- [125] SAUER, M.; ANGERER, B.; HAN, K-T.; ZANDER, C.: Detection and identification of single dye labeled mononucleotide molecules released from an optical fiber in a microcapillary: First steps towards a new single molecule DNA sequencing technique. *PhysChemChemPhys* (1999), Nr. 1, S. 2471–2477
- [126] SOPER, S.A.; MATTINGLY, Q.; LEGENDRE, B.; WILLIAMS, D.; FLANAGAN, J.; HAMMER, R.: Ultrasensitive NIR Fluorescence Detection and its Application to Analysis of DNA. *Spie* 1895 (1993), S. 113–122
- [127] WERNER, J.W.; CAI, H.; JETT, J.H.; REHA-KRANTZ, L.; KELLER, R.A.; GOODWIN, P.M.: Progress towards single-molecule DNA sequencing: a one color demonstration. *J. Biotechnol.* 102 (2003), S. 1–14
- [128] JETT, J.H.; KELLER, R.A.; MARTIN, J.C.; POSNER, R.G.; MARRONE, B.L.; HAMMOND, L.M.; SIMPSON, D.J.: Method for Rapid Base Sequencing in DNA and RNA with Two Base Labeling. *United States Patent* (1995)
- [129] FOLDES-PAPP, Z.; ANGERER, B.; THYBERG, P.; HINZ, M.; WENNMALM, S.; ANKENBAUER, W.; SELIGER, H.; HOLMGREN, A.; RIGLER, R.: Fluorescently labeled model DNA sequences for exonucleolytic sequencing. *J. Biotechnol.* 86 (2001), Nr. 86, S. 203–224
- [130] REHA-KRANTZ, L.J.; GOODMAN, M.F.: Variant DNA polymerase. *United States Patent 5,928,919* (1999)
- [131] REHA-KRANTZ, L.J.; GOODMAN, M.F.: Synthesis of fluorophore-labeled DNA. *United States Patent 5,945,312* (1999)
- [132] DÖRRE, K.: *Machbarkeitsstudien zur DNA-Einzelmolekülsequenzierung in Mikrostrukturen*, Naturwissenschaftliche Fakultät TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Diss., 2000
- [133] RICHARDSON, C.C.; LEHMAN, R.; KORNBERG, A.: A Deoxyribonucleic Acid Phosphatase-Exonuclease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239 (1964), S. 251–258
- [134] RICHARDSON, C.C.; KORNBERG, A.: Deoxyribonucleic Acid Phosphatase-Exonuclease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 239 (1964), S. 242–250
- [135] LEE, H. J.; WARK, A. W.; GOODRICH, T. T.; FANG, S. P.; CORN, R. M.: Surface enzyme kinetics for biopolymer microarrays: a combination of Langmuir and Michaelis-Menten concepts. *Langmuir* 21 (2005), April, Nr. 9, S. 4050–4057
- [136] WEISS, B.: Endonuclease-II of *Escherichia coli* is Exonuclease-III. *J. Biol. Chem.* 251 (1976), S. 1896–1901
- [137] ROGERS, S.G.; WEISS, B.: Exonuclease III of *Escherichia coli* K-12, an AP endonuclease. *Methods Enzymol.* 65 (1980), S. 201–211
- [138] WEISS, B.; BOYER, P.O. (Hrsg.): *The Enzymes*. Academic Press, 1981
- [139] MASAMUNE, Y.; FLEISCHMANN, R.A.; RICHARDSON, C.C.: Enzymatic Removal and Replacement of Nucleotides at Single Strand Breaks in Deoxyribonucleic Acid. *J. Biol. Chem.* 246 (1971), S. 2680–2691

- [140] TAYLOR, J.D.; HALFORD, S.E.: *Biochemistry* 31 (1992), S. 90–97
- [141] WINKLER, F.K.; D' ARCY, A.; BLOCKER, H.; FRANK, R.; VAN BOOM, J.H.: *J.Mol.Biol.* 217 (1991), S. 235–238
- [142] HOHEISEL, J.D.: On the Activities of Escherichia coli Exonuclease III. *Anal. Biochem.* 209 (1993), S. 238–246
- [143] DONELSON, J.E.; WU, R.: Nucleotide Sequence Analysis Of Deoxyribonucleic Acid. 7. Characterization of Escherichia-coli Exonuclease-III Activity for Possible Use in Terminal Nucleotide Sequence Analysis of Duplex Deoxyribonucleic Acid. *Biol. Chem.* 247 (1972), S. 4661–4668
- [144] WU, R.; RUBEN, G.; SIEGEL, B.; JAY, E.; SPIELMAN, P.: Synchronous Digestion of SV40 DNA by Exonuclease III. *Biochemistry* 15 (1976), S. 734–740
- [145] HENIKOFF, S.: Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA-sequencing. *Gene* 28 (1984), S. 351–359
- [146] LINXWEILER, W.; HÖRZ, W.: Sequence specificity of exonuclease III from E. coli. *Nucleic Acid Research* 10 (1982), S. 4845–4859
- [147] THOMAS, K.R.; OLIVERA, B.M.: Processivity of DNA Exonuclease. *J. Biol. Chem.* 253 (1978), S. 424–429
- [148] SMITH, A.J.H.: The use of exonuclease III for preparing single stranded DNA for use as a template in the chain terminator sequencing method. *Nucleic Acid Research* 6 (1979), S. 831–848
- [149] OKANO, K.; KAMBARA, H.: DNA Probe Assay Based on Exonuclease III Digestion of Probes Hybridized on Target DNA. *Analytic Biochemistry* 228 (1995), S. 101–108
- [150] WEST, W.; PEARCE, S.; GRUM, F.: Stereoisomerism of cyanine dyes-meso-substituted thiacyanines. *J. Phys. Chem.* 71 (1967), S. 1316–1326
- [151] SEIDEL, C.A.M.; SCHULZ, A.; SAUER, M.H.M.: Nucleobase-specific Quenching of Fluorescent Dyes. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies. *J. Phys. Chem.* 100 (1996), Nr. 100, S. 5541–5553
- [152] KÖNIG, M.: *Multiparameter-fluoreszenzspektroskopische Untersuchung zur molekularen Dynamik an einzelnen Biomolekülen*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diss., 2005
- [153] LEYTUS, S.P.; MELHADO, L.L.; MANGEL, W.E.: Rhodamin-based compound as fluorogenic substrate for serine proteinase. *Biochem. J.* 209 (1983), Nr. 209, S. 299–307
- [154] INVITROGEN CORPORATION: *Spectraviewer*. <http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer>. 2007. – [Online; Stand 22. Dezember 2007]
- [155] LEVENE, M.J.; KORLACH, J.; TURNER, S.W.; FOQUET, M.; CRAIGHAID, H.G.; WEBB, W.W.: Zero-Mode Waveguides for Single Molecule Analysis at High Concentration. *Science* (2003), Nr. 299, S. 682
- [156] BIRGE, R.R. *Kodak Laser Dyes*. Eastman Kodak Company, Rochester, NY. 1987
- [157] KUBIN, R.F.; FLETCHER, A.N.: Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *J. Luminescence* 27 (1982), S. 455–462

- [158] DANIEL, D. C.; THOMPSON, M.; WOODBURY, N. W.: Fluorescence intensity fluctuations of individual labeled DNA fragments and a DNA binding protein in solution at the single molecule level: A comparison of photobleaching, diffusion, and binding dynamics. *J. Phys. Chem. B* 104 (2000), Februar, Nr. 6, S. 1382–1390
- [159] GENAXXON BIOSCIENCE GMBH: *Genaxxon BioScience: 5-(and 6) Carboxy-Tetramethylrhodamine (mixed isomers) data sheet*. http://www.genaxxon.com/docs/pdf/tamra_data.pdf. – [Online; Stand 26. Februar 2008]
- [160] MUJUMDAR, R. B.; ERNST, L. A.; MUJUMDAR, S. R.; LEWIS, C. J.; WAGGONER, A. S.: Cyanine Dye Labeling Reagents - Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjugate Chemistry* 4 (1993), März, Nr. 2, S. 105–111
- [161] PAPPAERT, K.; BIESEMANS, J.; CLICQ, D.; VANKRUNKELSVEN, S.; DESMET, G.: Measurements of diffusion coefficients in 1-D micro- and nanochannels using shear-driven flows. *Lab On A Chip* 5 (2005), Nr. 10, S. 1104–1110
- [162] GREEN, F.J.: *Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*. 1990
- [163] PICOQUANT GMBH: *Timeharp100*. <http://www.picoquant.com/getfs.htm?products/timeharp100/>. 2007. – [Online; Stand 20. Dezember 2007]
- [164] OLYMPUS AMERICA INC.: *Fluorescence Emission at the Reflection Interface*. <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfintro.html>. 2008. – [Online; Stand 4. Januar 2008]
- [165] ATTO-TEC GMBH. *Product Information: Dino 2*. Datenblatt. 2005
- [166] KUSNEZOW, W.; JACOB, A.; WALIJEW, A.; DIEHL, F.; HOHEISEL, J.D.: Antibody microarrays: An evaluation of production parameters. *Proteomics* 3 (2003), Nr. 3, S. 254–264
- [167] BUSCHMANN, V.; KRÄMER, B.; KOBERLING, F.; MACDONALD, R.; RÜTTINGER, S.: *Quantitative FCS: Determination of the Confocal Volume by FCS and Bead Scanning with the MicroTime 200*. http://www.picoquant.com/products/microtime200/appnote_quant_fcs.pdf. 2007. – [Online; Stand 25. Januar 2008]
- [168] RIGLER, R.; FOLDES-PAPP, Z.; MEYER-ALME, F. J.; SAMMET, C.; VOLCKER, M.; SCHNETZ, A.: Fluorescence cross-correlation: A new concept for polymerase chain reaction. *Journal Of Biotechnology* 63 (1998), August, Nr. 2, S. 97–109
- [169] WEIDEMANN, T.; WACHSMUTH, M.; TEWES, M.; RIPPE, K.; LANGOWSKI, J.: Analysis of ligand binding by two-colour fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Single Molecules* 3 (2002), Nr. 1, S. 49–61
- [170] Kap. Cross-correlation analysis in FCS. In: SCHWILLE, P.: *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications*. Springer, 2001, S. 360–378
- [171] ENDERLEIN, J.; GREGOR, I.; PATRA, D.; FITTER, J.: Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 5 (2004), April, Nr. 2, S. 155–161
- [172] ENDERLEIN, J.; GREGOR, I.; PATRA, D.; DERTINGER, T.; KAUP, U.B.: Performance of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Measuring Diffusion and Concentration. *Chem. Phys. Chem.* 6 (2005), S. 2324–2336
- [173] GREGOR, I.; PATRA, D.; ENDERLEIN, J.: Optical Saturation in Fluorescence Correlation Spectroscopy under Continuous-Wave and Pulse Excitation. *ChemPhysChem* (2005), Nr. 6, S. 164–

- [174] OHEIM, M.; SCHAPPER, F.: Non-linear evanescent-field imaging. *J. Phys. D: Appl. Phys* 38 (2005), Nr. 38, S. R185–R197
- [175] BARNES, M.D.; WHITTEN, W.B.; RAMSEY, J.M.: Detecting single molecules in liquids. *Anal. Chem.* 67 (1995), S. A 418–A 423
- [176] SAUER, M.; HAN, K.-T.; MÜLLER, R.; NORD, S.; SCHULZ, A.; SEEGER, S.; WOLFRUM, J.; ARDEN-JACOB, J.; DELTAU, G.; MARX, N.J.; ZANDER, C.; DREXHAGE, K.H.: New Fluorescent Dyes in the Red Region for Biodiagnostics. *Journal of Fluorescence* 5 (1995), S. 247
- [177] BAYER, J.P.A.: *Vom Oligomer zu supramolekularen Strukturen: Studien zur freien Diffusion, Selbstassemblierung und Elektrophorese von DNA und DNA-Chromophor-Hybriden*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2005
- [178] NKODO, A. E.; GARNIER, J. M.; TINLAND, B.; REN, H. J.; DESRUISSEAU, C.; MCCORMICK, L. C.; DROUIN, G.; SLATER, G. W.: Diffusion coefficient of DNA molecules during free solution electrophoresis. *Electrophoresis* 22 (2001), August, Nr. 12, S. 2424–2432
- [179] BENSIMON, A.; SIMON, A.; CHIFFAUDEL, A.; CROQUETTE, V.; HESLOT, F.; BENSIMON, D.: Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* 5181 (1994), S. 2096–2098
- [180] PERKINS, T.T.; SMITH, D.E.; LARSON, R.G.; CHU, S.: Stretching of a single tethered polymer in a uniform-flow. *Science* 5207 (1995), S. 83–87
- [181] BAKAJIN, O. B.; DUKE, T. A. J.; CHOU, C. F.; CHAN, S. S.; AUSTIN, R. H.; COX, E. C.: Electrohydrodynamic stretching of DNA in confined environments. *Phys. Rev. Lett.* 12 (1998), S. 2737–2740
- [182] SHIMIZU, M.; SASAKI, S.; TSURUOKA, M.: DNA length evaluation using cyanine dye and fluorescence correlation spectroscopy. *Biomacromolecules* 5 (2005), S. 2703–2707
- [183] DEEGAN, R.D.; BAKAJIN, O.; DUPONT, T.F.; HUBER, G.; NAGEL, S.R.; WITTEN, T.A.: Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nat. Biotechnol.* (1997), S. 827
- [184] DEEGAN, R.D.; BAKAJIN, O.; DUPONT, T.F.; HUBER, G.; NAGEL, S.R.; WITTEN, T.A.: Contact line deposits in an evaporating drop. *Physical Review* 62 (2000), Nr. 1, S. 756
- [185] DIEHL, F.; GRAHLMANN, S.; BEIER, M.; HOHEISEL, J.D.: Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001), Nr. 7
- [186] HEILEMANN, M.; TINNEFELD, P.; MOSTEIRO, G. S.; PARAJO, M. G.; VAN HULST, N. F.; SAUER, M.: Multistep energy transfer in single molecular photonic wires. *Journal Of The American Chemical Society* 126 (2004), Juni, Nr. 21, S. 6514–6515
- [187] HEILEMANN, M.; KASPER, R.; TINNEFELD, P.; SAUER, M.: Dissecting and reducing the heterogeneity of excited-state energy transport in DNA-Based photonic wires. *Journal Of The American Chemical Society* 128 (2006), Dezember, Nr. 51, S. 16864–16875
- [188] VANDENBOUT, D. A.; YIP, W. T.; HU, D. H.; FU, D. K.; SWAGER, T. M.; BARBARA, P. F.: Discrete intensity jumps and intramolecular electronic energy transfer in the spectroscopy of single conjugated polymer molecules. *Science* 277 (1997), August, Nr. 5329, S. 1074–1077
- [189] BARBARA, P. F.; GESQUIERE, A. J.; PARK, S. J.; LEE, Y. J.: Single-molecule spectroscopy of conjugated polymers. *Accounts Of Chemical Research* 38 (2005), Juli, Nr. 7, S. 602–610
- [190] HÜBNER, C.G.; RENN, A.; RENGE, U.P.: Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen. *J. Chem. Phys.* 115 (2001), S. 9619–9622

- [191] NISHIMURA, G.; RIGLER, R.; KINJO, M: Number analysis of fluorescence correlation spectroscopy for the cleaving process of fluorescence labeled DNA. *Bioimaging* 5 (1997), S. 129–133
- [192] FOLDESPAPP, Z.; THYBERG, P.; BJORLING, S.; HOLMGREN, A.; RIGLER, R.: Exonuclease degradation of DNA studied by fluorescence correlation spectroscopy. *Nucleosides & Nucleotides* 16 (1997), Nr. 5-6, S. 781–787
- [193] BJORLING, S.; KINJO, M.; FOLDES-PAPP, Z.; HAGMAN, E.; THYBERG, P.; RIGLER, R.: Fluorescence correlation spectroscopy of enzymatic DNA polymerization. *Biochemistry* 37 (1998), September, Nr. 37, S. 12971–12978
- [194] LEE, H. J.; LI, Y.; WARK, A. W.; CORN, R. M.: Enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging detection of DNA by exonuclease III digestion of DNA microarrays. *Analytical Chemistry* 77 (2005), August, Nr. 16, S. 5096–5100
- [195] FERMENTAS. *Exonuclease III*. 2004

Lebenslauf

persönliche Daten

Name: Nicky Ehrlich
geb.: 11. August 1979 in Leipzig
Familienstand: ledig
Staatsangehöriger: Deutsch

Ausbildung

2004 - Promotion in Biophysik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und seit 01.08 2007 an der Universität zu Lübeck bei Prof. Dr. C.G. Hübner

07.04.04 Abschluss des Studiengangs mit Diplomarbeit zum Thema:
„Vergleichende Immunocytochemie zur Charakterisierung von Subcommissuralorganen und floor plate bei Larven von *Xenopus laevis* und *Brachydanio rerio*“

1998 - 2004 Studium Biologie (Diplom) an der Universität Leipzig

1998 Abitur am Gymnasium Humboldt-Schule in Leipzig

Publikationen

Veröffentlichungen in Vorbereitung

- “Exonucleolytic Degradation of High Density-labelled DNA Measured with FCS-method.“
Nicky Ehrlich, Katrin Anhalt, Susanne Brakmann and Christian Hübner
- “Exonucleolytic Degradation of Immobilized High Density-labelled DNA Measured in real-time.“ Katrin Anhalt, Nicky Ehrlich, Christian Hübner and Susanne Brakmann

Vorträge

- “Characterization and Exonucleolytic Degradation of High Density Labelled dsDNA by FCS“; Picoquant, “13th Workshop on Single Molecule Spectroscopy“, Berlin, Germany, 2007

Poster

- “Detection and discrimination of labelled nucleotides by confocal fluorescence microscopy towards single-molecule DNA sequencing“, Nicky Ehrlich, Katrin Anhalt, Susanne Brakmann and Christian Hübner; Picoquant, “11th Workshop on Single Molecule Spectroscopy“, Berlin, Germany, 2005
- “Attachment of fluorescently labelled DNA to glass slides and successive degradation by exonuclease III – a contribution to single molecule sequencing“, Katrin Anhalt, Nicky Ehrlich, Christian Hübner, Susanne Brakmann; Biotechnologische-Biomedizinisches Zentrum, “5. Biotechnologietag“, Leipzig, Germany, 2006
- “Exonucleolytic degradation of fluorescently labelled DNA in solution or bound to glass surfaces – a contribution to single molecule sequencing“, Nicky Ehrlich, Katrin Anhalt, Susanne Brakmann and Christian Hübner; Picoquant, “12th Workshop on Single Molecule Spectroscopy“, Berlin, Germany, 2006
- “Transport of small and macromolecules through nanopores“, D. Kahra, N. Ehrlich, C. Löw, M. Steinhart, C. Hübner; “12th european conference on the spectroscopy of biological molecules“, Paris (Bobigny), France, 2007

Danksagung

An dieser Stelle will ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Prof. Dr. Christian Hübner danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können. Für sein Vertrauen, seine Unterstützung bei immer wieder auftauchenden Fragen und Problemen, sowie die Möglichkeit das vorliegende Thema in großer Freiheit bearbeiten zu können.

Meinen Kooperationspartnern aus der Biologie der Arbeitsgruppe von PD Dr. Susanne Brakmann danke ich für die Probenpräparation und stete Diskussionsbereitschaft. Vor allem bei Dr. Katrin Anhalt, die keinen Aufwand gescheut und viel Zeit im Labor verbracht hat, um mir meine Wunsch-DNS herzustellen sowie PD Dr. Susanne Brakmann selbst für die Anmerkungen zum Manuskript.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Hübner (Verena Hirschfeld, Johannes (Hanz) Hohlbein, Maria Ott, Silke Agte, Henning Seidel, Dana Kahra) danke ich für die freundliche Atmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft. Nicht zu vergessen sind die Kaffeepausen und damit verbundenen fachlichen und gelegentlich auch nicht-fachlichen Diskussionsrunden.

Ein großes und herzliches Dankeschön gilt meiner Familie, die ich immer hinter mir weiß und natürlich meiner Katrin für so vieles.