

Aus dem Institut für Physik
der Universität zu Lübeck
Direktor:
Prof. Dr. Christian G. Hübner

Konformationsänderung und enzymatische Aktivität am einzelnen Molekül

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

Vorgelegt von
Maria Ott
geb. Wunderlich
aus Oelsnitz i.V.

Lübeck, 2008

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Christian G. Hübner

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Peters

Datum der Disputation: 12. Januar 2009

Lübeck, den 6. Januar 2010

gez. Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Motivation	3
2.1	Der Konformationsraum eines Proteins	3
2.2	Adenylatkinase <i>Aquifex aeolicus</i>	5
2.3	Adenylatkinase und Fluoreszenzspektroskopie	7
2.4	Fragestellungen für die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie	8
3	Grundlagen konfokaler Mikroskopie	9
3.1	Geschichtlicher Abriss der konfokalen Mikroskopie und der Anwendung in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie	9
3.2	Konfokales Prinzip	9
3.3	Auflösungsvermögen	10
3.4	Konfokales Volumen	12
3.5	Photonenrauschen	13
3.6	Vor- und Nachteile konfokaler Mikroskopie	14
4	Photophysikalische Grundlagen	15
4.1	Eigenschaften von Fluorophoren	15
4.2	Energieniveauschema	16
4.3	Photophysikalische Eigenschaften der Fluorophore	18
4.3.1	Natürliche Fluoreszenzlebensdauer	18
4.3.2	Quantenausbeute	18
4.3.3	Fluoreszenzsättigung	19
4.3.4	Photophysikalische Lebensdauer und Photobleichen	19
4.4	Wechselwirkungen mit der Umgebung	20
4.4.1	Spektrale Fluktuationen und Ionisationen	20
4.4.2	Fluoreszenzlöschung	21
4.4.3	Triplettenquenchen	22

4.4.4	Induziertes Photobleichen	22
4.5	Strahlungsloser Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren	23
4.5.1	Orientierung der Dipolmomente	23
4.5.2	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer	23
4.5.3	Singulett-Triplett-Annihilation	25
5	Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie	27
5.1	Einzelmolekül-FRET Experimente	27
5.2	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie	27
5.2.1	Korrelationsfunktion des Fluoreszenzsignals	28
5.2.2	Diffusion	29
5.2.3	Diffusion in einem vom Gaußprofil abweichenden Fokusvolumen	31
5.2.4	Triplettdynamik	32
5.2.5	Fluoreszenzsättigung	33
5.3	Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsspektroskopie	34
5.3.1	Afterpulsing der Detektoren	35
5.3.2	FRET und Diffusion	36
5.3.3	FRET und interne Dynamik	36
6	Messsystem	39
6.1	Messapparatur	39
6.2	Laser	41
6.3	Scantisch	41
6.4	Objektive	41
6.5	Detektoren	43
6.6	Datenformate und Datenverarbeitung	43
6.7	Verwendete Fluorophore und Filter	44
6.8	Justage	45
6.9	Konfokales Volumen	46
6.10	Adenylatkinase	47
6.10.1	Bindungsstellen der Farbstoffe	47
6.10.2	Eigenschaften der Mutante	48
6.10.3	Pufferlösung	48
6.10.4	Diffusionskonstante der Adenylatkinase	48
6.10.5	Verwendete Nukleotide	48
6.11	Verfahren zur Immobilisierung	49
6.12	MC-Simulationen	51

7	Photophysik von AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633	53
7.1	Absorptions- und Emissionsspektren	53
7.2	Fluoreszenzlebensdauer und Rotationskorrelationszeit	55
7.2.1	Natürliche Fluoreszenzlebensdauer von AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633	55
7.2.2	Bestimmung der Rotationskorrelationszeit und Fluoreszenzlebensdauer	55
7.2.3	AlexaFluor 488	58
7.2.4	AlexaFluor 633	59
7.3	Beidseitig markierte Adk-Moleküle	60
7.3.1	Försterradius	62
7.3.2	Intermolekulare Wechselwirkungen	62
7.4	Triplettdynamik und Fluoreszenzsättigung	63
7.4.1	Durchführung der Experimente	64
7.4.2	Simulationen	65
7.4.3	AlexaFluor 488	66
7.4.4	AlexaFluor 633	67
7.4.5	Triplettdynamik und Energietransfer	70
7.5	Spektrale Fluktuationen von AlexaFluor 488	71
7.6	Photostabilität	72
7.6.1	Photonenrauschen und die Analyse von Dunkelzuständen	73
7.6.2	AlexaFluor 488 an Apo-Adk	74
7.6.3	AlexaFluor 488 an Adk mit Inhibitor	75
7.6.4	AlexaFluor 488 an Adk unter Stoffumsatz	76
7.6.5	AlexaFluor 633	77
7.7	Experimente zur Erhöhung der Photostabilität	79
7.7.1	Durchführung der Experimente	79
7.7.2	Verwendete Substanzen	79
7.7.3	Ascorbinsäure	82
7.7.4	GOD	83
7.7.5	Trolox	84
7.7.6	MEA	85
7.7.7	Weitere Experimente mit MEA	87
7.8	Zusammenfassung und Diskussion	92
8	Konformation und Funktion der Adenylatkinase	95
8.1	Untersuchungen zur Aktivität	95
8.1.1	Durchführung der Experimente	95

8.1.2	Diffundierende Moleküle	97
8.1.3	Immobilisierte Moleküle	98
8.2	Burstexperimente	99
8.2.1	Anregung bei Einzelmolekül-Burstexperimenten	99
8.2.2	Identifikation der Fluorophore	101
8.2.3	Bestimmung der Konformationspopulationen	102
8.2.4	Konformationskinetik bei Einzelmolekül-Burstexperimenten	108
8.2.5	Bestimmung der Raten der Konformationskinetik	110
8.3	Immobilisierte Moleküle	112
8.3.1	Zeitaufgelöste Einzelmolekül-FRET-Experimente	112
8.3.2	Zustandsanalyse zeitaufgelöster Einzelmolekül-FRET-Experimente	113
8.3.3	Korrelationsanalyse zeitaufgelöster Einzelmolekül-FRET-Experimente	115
8.3.4	Ergebnis für die Apo-Adk	116
8.3.5	Ergebnis für die Inhibitor-gebundene Adk	120
8.4	Adk unter Stoffumsatz	122
8.4.1	Burstexperimente	122
8.4.2	Immobilisierte Moleküle	124
8.5	Zusammenfassung und Diskussion	130
9	Zusammenfassung und Ausblick	133
	Literaturverzeichnis	135
	Danksagung	147
	Lebenslauf	147

Abkürzungsverzeichnis

Adk	Adenylatkinase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPPNP	Adenosin-imidotriphosphat
AP5A	Di-Adenosinpentaphosphat
APD	Avalanche Photodiode
ATP	Adenosintriphosphat
CEF	Collection Efficiency Function
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device
FAMS	Fluorescence Aided Molecule Sorting
FCCS	Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
GOD	Glukoseoxidase
GODKAT	Glukoseoxidase+Katalase
IC	Internal Conversion
IRF	Instrument Response Function
ISC	Intersystem Crossing
KAT	Katalase
MC	Monte Carlo
MD	Molekulardynamik
MDE	Molecule Detection Function
MEA	Mercaptoethylamin

NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
POE	Pulsed Overlaid Excitation
PSF	Point Spread Function
smFRET	single molecule FRET
STA	Singulett-Triplett-Annihilation
Trolox	Hydroxytetramethylchromancarbonsäure
TTTR	Time Tag Time Resolved

Kapitel 1

Einleitung

Die besondere Relevanz von Einzelmolekülexperimenten liegt darin, dass sie auf die Frage der detaillierten Funktionsweise eines Moleküls Antworten geben können und Informationen zur Heterogenität eines Molekülensembles liefern.

Die Ableitung mikroskopischer Vorgänge aus makroskopischen Beobachtungen erfolgt stets unter der Annahme der Ergodizität. Es stellt sich jedoch die Frage, ob der Mittelwert des Molekülensembles der zeitlichen Mittelung eines einzelnen Moleküls entspricht oder ob diese leicht unterschiedliche (statische Heterogenität) oder sich zeitlich ändernde (dynamische Heterogenität) Eigenschaften haben.

Eine direkte Beobachtung einzelner Moleküle stellte bisher aufgrund ihrer Größe unterhalb des optischen Auflösungsvermögens eine der größten Herausforderungen in der biologischen Forschung dar. Obwohl bereits im Jahr 1960 die prinzipielle Durchführbarkeit von Einzelmolekülexperimenten durch Richard P. Feynman postuliert wurde [53], gelang es erst 1976 nach weiteren technischen Entwicklungen Thomas Hirschfeld einen einzelnen mit 80 – 100 Fluoreszinfarbstoffen versehenen Antikörper zu detektieren [70]. 1990 konnten erstmals einzelne Moleküle des Rhodaminfarbstoffs in wässriger Lösung detektiert werden [136].

Technische Verbesserungen und die Verwendung der Konfokalmikroskopie führten seit den 90er Jahren zu einer rasanten Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie und zu einem breiten Spektrum von Anwendungen [158]. Beispiele dafür sind Untersuchungen zur Funktionsweise molekularer Motoren [113], des Myosins [173], der tRNA [125], des Ribozyms [174, 45, 107], verschiedene Enzyme [105, 2, 140, 97] sowie zu Faltungsreaktionen [95, 119, 89, 91, 59] und Isomerisationen von Polyprolinen [17].

Die Adenylatkinase, ein Enzym, das in besonderer Weise geeignet ist, den Zusammenhang zwischen Funktion und Konformation aufzuklären, ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Seine Aktivität ist an eine große strukturelle Änderung gekoppelt [169].

Die Konformationsänderungen beinhalten entsprechend der bekannten Kristallstrukturen [16, 154, 64] intramolekulare Abstandsänderungen, die mit der Methode des Fluoreszenzresonanz-Energietransfers zugänglich sind [139, 138]. So können an ausgezeichneten Stellen fluoreszente Marker angebracht und über die Höhe des Energietransfers die Konformationsänderungen untersucht werden.

Bezug nehmend auf Ergebnisse von Ensemblemessungen aus der NMR-Spektroskopie, kann eine zuverlässige Interpretation der Einzelmolekülexperimente gewährleistet werden.

In der vorliegenden Arbeit werden auf Grundlage der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie Methoden vorgestellt, die den Zusammenhang von Funktion und Konformation der Adenylatkinase am einzelnen Molekül verdeutlichen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Einzelmolekülexperimente werden im Kapitel 8 beschrieben.

Die Verwendung von einzelnen Fluorophoren als Marker erfordert eine Kenntnis der photophysikalischen Eigenschaften, um korrekte Interpretationen der Ergebnisse zu ermöglichen. Diese Untersuchungen werden im Kapitel 7 dargestellt.

Theoretische Grundlagen zur Spektroskopie, Photophysik und den Methoden der Fluoreszenzspektroskopie werden in den Kapiteln 3 bis 5 gelegt. Im Kapitel 6 wird auf die verwendete Messapparatur und die Methoden zur Markierung und Immobilisierung der Adenylatkinase eingegangen.

Eine ausführliche Betrachtung der Eigenschaften der Adenylatkinase befindet sich im folgenden Kapitel.

Kapitel 2

Motivation

Der Begriff Protein bedeutet so viel wie „das Wichtigste“, denn Proteine zählen zu den Grundbausteinen aller Zellen und sind nahezu an jedem biologischen Prozess beteiligt, der zur Lebenserhaltung und Funktion unseres Körpers notwendig ist.

Die Tatsache, dass ihre Funktion eng an ihre räumliche Struktur gekoppelt ist, führte in den letzten Jahrzehnten zu einer starken Entwicklung der Strukturaufklärung. So sind bis heute über 50.000 Strukturen verschiedener Proteine bekannt [10].

Eine der zuverlässigsten Methoden hierfür ist die Röntgenkristallographie. Obwohl dafür hoch geordnete und daher meist nur schwierig erhältliche Proteinkristalle benötigt werden, wurden mit dieser Methode ca. 86% aller bisher bekannten Strukturen entschlüsselt. Der Nachteil dabei ist, dass in den Kristallen zusätzliche intermolekulare Kontakte entstehen können und die Kristallstruktur unter Umständen von der unter physiologischen Bedingungen vorliegenden Form abweicht.

Seit 1958 steht mit der hochauflösenden NMR-Spektroskopie eine Methode zur Verfügung, mit der Proteinstrukturen auch in Lösung aufgeklärt werden können [28]. Dies spielt besonders bei kleinen (bis 10 kDa) oder teilweise unstrukturierten Proteinen eine wichtige Rolle. Die NMR-Spektroskopie ist zudem in der Lage, Änderungen in der chemischen Umgebung einzelner Aminosäuren, den Bausteinen der Proteine, zu erkennen. Dies ermöglicht nicht nur Untersuchungen bezüglich der gefalteten Struktur, sondern dient auch der Aufklärung der Proteinfunktion. So können für verschiedene Zeitbereiche die Dynamik und die Flexibilität der Strukturelemente analysiert werden [65].

2.1 Der Konformationsraum eines Proteins

Kenntnisse über die Flexibilität des Proteins sowie die Dynamik bestimmter Teilbereiche sind neben der räumlichen Struktur unerlässlich, um die Funktionsweise von Proteinen zu verstehen [77].

Wird in einem Protein mit N Atomen ein Atom bewegt, ändern sich die Wechselwirkungen mit den anderen Atomen des Moleküls. Die freie Energie des Systems wird verändert. Aufgrund der Möglichkeit eines jeden Atoms, in jede der drei Raumrichtungen bewegt zu werden, besitzt es drei Freiheitsgrade der Translation. Auf diese Weise entsteht ein $3N$ -dimensionaler Konformationsraum, eine so genannte „Energiewandlung“ des Proteins, die alle möglichen Bewegungen umfasst. Diese Landschaft enthält

Gebirgszüge, deren Gipfel Konformationszuständen hoher Energie entsprechen, in denen zum Beispiel Bindungen überdehnt werden oder Atome aneinander stoßen und Täler, die Regionen mit niedrigen Energien darstellen, in denen die Atome in energetisch günstige Wechselwirkungen treten (vgl. Abb. 2.1).

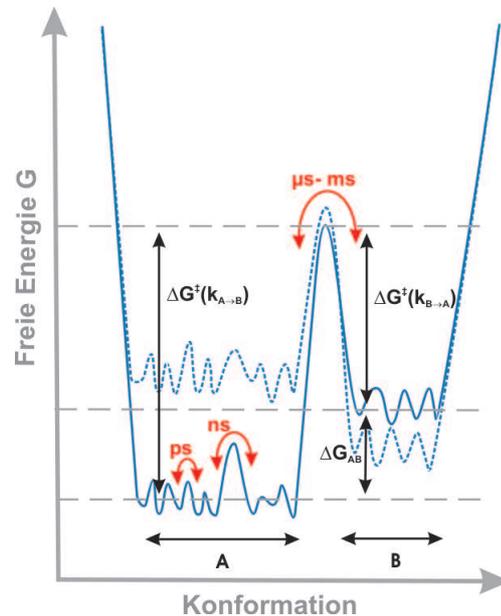


Abbildung 2.1: Stark vereinfachte Darstellung einer Landschaft der freien Energie G eines Proteins mit zwei Hauptzuständen **A** und **B** und diversen Subzuständen (blau, durchgezogene Linie). Die Höhe der Energiebarrieren ΔG^\ddagger bestimmt hierbei die Übergangsraten und die Differenz der „Talsohlen“ ΔG die Größe der Populationen. Wird die Landschaft z.B. durch das Lösungsmittel oder Binden eines Liganden verändert, werden die Raten sowie die Populationen der Zustände beeinflusst (blau, gestrichelte Linie). Bild analog zu Abb. 1 in [65].

Da mechanische Systeme bestrebt sind, ihre Energie zu minimieren, werden stets die Konformationszustände der „Energietäler“ bevorzugt. Die Energiebarriere ΔG^\ddagger zwischen zwei Zuständen beschreibt dabei die Energie, die aufgebracht werden muss, um in einen anderen Zustand zu gelangen. Durch ihre Höhe werden die Wahrscheinlichkeit des Übergangs und somit auch die Raten der Konformationsänderung bestimmt. Die Differenz zweier Zustände ΔG legt entsprechend der Boltzmannverteilung die Größe beider Populationen fest.

Während Konformationsänderungen im Zeitbereich von Femto- bis Nanosekunden, wie Bindungsvibrationen und Rotationen einzelner Seitenketten, stark lokalisiert sind und keine Änderungen der Funktion bewirken, sind Bewegungen gesamter Abschnitte des Proteins von funktioneller Bedeutung. Diese kollektiven Bewegungen finden im Mikro- bis Millisekundenbereich statt [6, 42, 84, 14, 65].

Änderungen in der Energielandschaft können beispielsweise durch das Binden eines Substrates an ein Enzym, aber auch durch intensive Zustandsgrößen wie Temperatur und Druck induziert werden. Dabei werden die Energiebarrieren und die relativen Differenzen der Talsohlen verändert, woraus eine Verschiebung der Raten sowie der Populationen resultiert.

2.2 Adenylatkinase *Aquifex aeolicus*

Die Adenylatkinase (Adk) ist ein kleines ubiquitäres Protein mit einer molaren Masse zwischen 22 kDa und 30 kDa und gehört zu den Transferasen. Diese weisen eine besonders hohe Flexibilität auf, denn um geladene Gruppen zwischen zwei Substratmolekülen übertragen zu können, muss das aktive Zentrum effektiv von Wasser abgeschirmt werden [77, 128].

Die Adk katalysiert als Phosphotransferase die Reaktion [112]:



und reguliert auf diese Weise den intrazellulären Gehalt von ATP (Adenosinriphosphat), ADP (Adenosindiphosphat) und AMP (Adenosinmonophosphat) [123]. ATP ist ein wichtiger Energiespeicher und Regulator energieabhängiger Prozesse und für jedes Lebewesen essentiell.

Die Struktur der Adk besitzt neben einer unflexiblen Domäne, dem „Core“, zwei höchst bewegliche Untereinheiten, die als „Lid“ bezeichnet werden. Sie enthalten jeweils eine Bindungsstelle für ATP bzw. AMP und werden dem entsprechend als ATP-Lid und AMP-Lid bezeichnet.

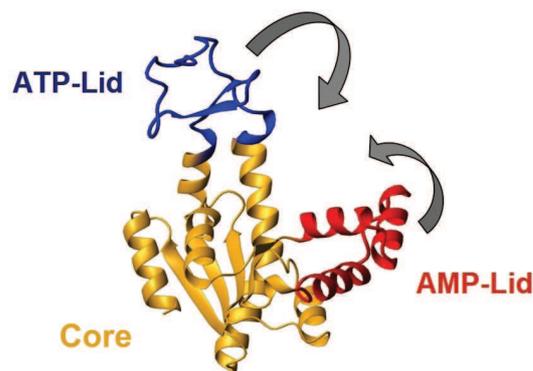


Abbildung 2.2: Struktureller Aufbau der *E. coli* Adenylatkinase bestehend aus einer relativ starren Domäne, dem Core (gelb), und zwei sehr flexiblen Lids (blau bzw. rot) mit Bindungsstellen für ATP bzw. AMP.

Die Kristallstruktur in Abb. 2.2 stellt das Enzym in der so genannten „geöffneten“ Konformation dar. In diesem Zustand können an den Bindungsstellen der beiden Lids die Substrate andocken.

Während der Katalysereaktion bewegen sich die Lids mit einer Art Kippbewegung aufeinander zu und verringern so den relativen Abstand der gebundenen Substratmoleküle und schirmen diese vom Lösungsmittel ab. Befinden sich die Lids in ihrer Endstellung, findet der Übertrag des Phosphatrestes statt. Dieser Zustand wird auch als „geschlossene“ Konformation bezeichnet. Anschließend gehen beide Lids zurück in den geöffneten Zustand und entlassen das Produkt (siehe Abb. 2.3).

Das Öffnen ist hierbei der langsamste und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [169]. Es ist bis jetzt noch nicht geklärt, an welchem der beiden Lids das Substrat zuerst bindet, ob es überhaupt eine Reihenfolge gibt und ob die Bewegung der Lids gemeinsam oder nacheinander erfolgt.

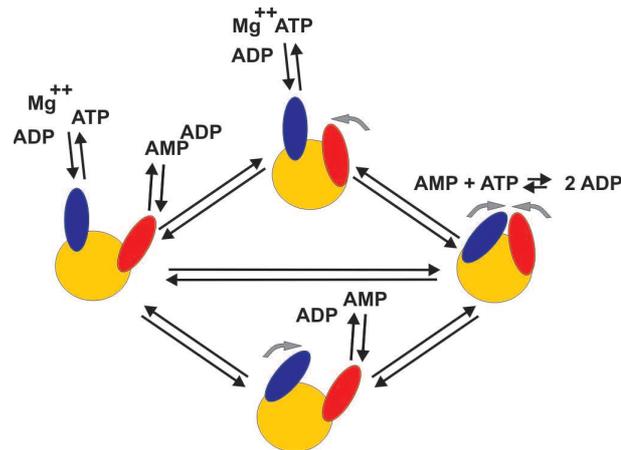


Abbildung 2.3: Schema der involvierten Prozesse bei der enzymatischen Katalyse durch die Adenylatkinase.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Zusammenhang zwischen Konformation und enzymatischer Aktivität der thermophilen Adenylatkinase untersucht. Sie entstammt dem Bakterium *Aquifex aeolicus*, welches eines der bekanntesten thermophilen Bakterien ist. Es hat seine maximale Temperaturtoleranz bei 95 °C. Die 1998 entschlüsselte Aminosäuresequenz der thermophilen Adk unterscheidet sich nur in wenigen Aminosäuren von dem mesophilen Homologen des Bakteriums *E. coli* [33]. Bei 20 °C beträgt die Aktivität und auch die Rate des Öffnens im Vergleich zum mesophilen Enzym fast nur ein Zehntel [169].

Im Unterschied zur Adk des *E. coli*-Bakteriums zeigt der Enzymkristall des thermophilen Apoenzyms¹ drei Subzustände der offenen Konformation, die durch verschiedene Positionen der Lids gekennzeichnet sind. Sie werden durch acht Regionen besonderer Flexibilität hervorgerufen, die für die Lidbewegung eine Art „Scharnierfunktion“ (*Hinge*) besitzen und eine Bewegung der Lids ermöglichen [66] (siehe Abb. 2.4).

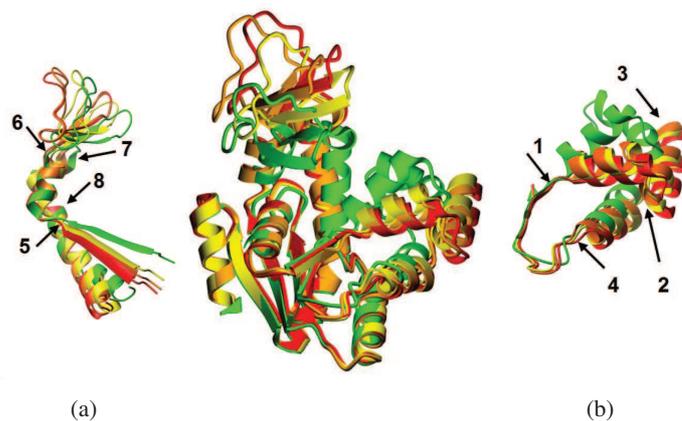


Abbildung 2.4: Gemeinsame Darstellung der drei vorliegenden Kristallstrukturen des Apoenzyms (rot, orange, gelb) und der Struktur mit gebundenem Inhibitor (grün) der Adenylatkinase *Aquifex aeolicus*. Am ATP-Lid (a) und am AMP-Lid (b) befinden sich jeweils vier Regionen besonderer Flexibilität, die eine Bewegung der Lids ermöglichen. Entnommen aus [67].

¹Das Apoenzym ist das Enzym ohne gebundene Substrate.

Diese Subzustände des Apoenzyms sind nur durch geringe Energiebarrieren voneinander getrennt. In einer Molekulardynamik-Simulation (MD-Simulation) von 10 ns wurden alle drei Subzustände innerhalb des Zeitfensters eingenommen [67]. Weiterhin zeigten sich für diese kleinen Konformationsänderungen nur schwache Korrelationen zwischen den Bewegungen der beiden Lids. Dies lässt eine gewisse Unabhängigkeit der beiden Lidbewegungen vermuten (siehe Abb. 2.5).

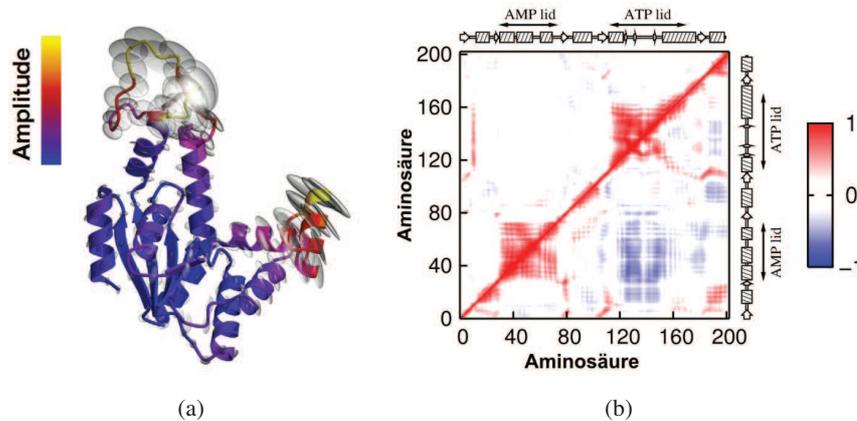


Abbildung 2.5: Amplitude und Richtung der Konformationsänderungen der Adenylatkinase *Aquifex aeolicus* (a) berechnet aus einer Normalmoden-Analyse einer Molekulardynamiksimulation von 10 ns Länge. Die Korrelationsamplituden der Bewegung der einzelnen Aminosäuren in einer zweidimensionalen Darstellung (b) zeigt keine Korrelation der Lid-Regionen. Entnommen aus [67].

2.3 Adenylatkinase und Fluoreszenzspektroskopie

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften ist die Adk bestens geeignet, um den Zusammenhang zwischen Konformationsänderung und Funktion zu untersuchen.

NMR-Experimente können verwendet werden, um Fragestellungen zur Flexibilität [152, 145, 132] sowie zur Dynamik zu beantworten [169]. Doch aufgrund der für diese Experimente notwendigen hohen Molekülkonzentrationen wird nur der Mittelwert des Ensembles und keine Verteilung bestimmt.

Mit den Methoden der Fluoreszenzspektroskopie können dagegen auch einzelne Moleküle untersucht und Subpopulationen bestimmt werden [35]. Sie bilden daher eine ideale Ergänzung zu den Ergebnissen der NMR-Spektroskopie.

Zur Bestimmung von Abständen und Abstandsänderungen von bis zu 10 nm eignet sich die Anwendung des 1948 erstmalig von Theodor Förster beschriebenen Phänomens des Fluoreszenzresonanz-Energietransfers (FRET) [54]. Es beruht auf einem stark abstandsabhängigen strahlungslosen Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren (vgl. Abb. 2.6).

Zeitaufgelöste FRET-Experimente wurden bereits in den 90er Jahren in der Arbeitsgruppe von Elisha Haas verwendet, um den geschlossenen Zustand der Adenylatkinase *E. coli* zu untersuchen [139, 138, 59]. Zwar handelte es sich hierbei nicht um Einzelmolekülexperimente, doch konnte bereits nach der Bindung von der Substrate AMP und ATP sowie des Inhibitors eine tendenzielle Verkleinerung der intramolekularen Abstände festgestellt werden.

Die Anzahl der allein in den letzten drei Jahren erschienenen Publikationen aus den Bereichen der Einzelmolekülspektroskopie, der NMR-Spektroskopie sowie der MD-Simulationen zeigen zum einen das un-

gebrochene Interesse an der Funktionsweise des Enzyms und zum anderen, dass bezüglich des Verständnisses der Konformationsänderungen noch einige Fragen offen sind [59, 7, 61, 64, 66, 161, 97, 108, 160]

2.4 Fragestellungen für die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie

Aus den beschriebenen Eigenschaften der Adk und den derzeitigen Möglichkeiten der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie ergeben sich Fragestellungen bezüglich der

1. Existenz von Subpopulationen,
2. Konformationskinetik der beiden Lids und
3. Veränderung der Populationen und Raten bei Bildung von Substrat-Enzym-Komplexen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde die Adk jeweils an den beiden Lids mit einem geeigneten Fluorophor markiert (siehe Abb. 2.6) und der Energietransfer als ein Maß für relativen Abstand verwendet.

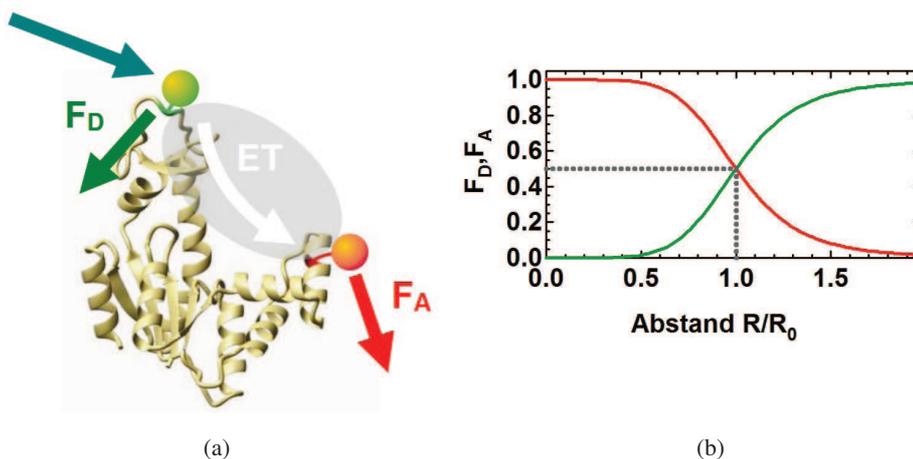


Abbildung 2.6: Prinzip des Fluoreszenzresonanz-Energietransfers: Ein angeregtes Fluorophor (grün) gibt als Donor in Abhängigkeit vom Abstand zu einem zweiten Fluorophor, dem Akzeptor (rot), einen Teil der absorbierten Energie (weißer Pfeil) strahlungslos weiter (a). Infolgedessen verändert sich der Anteil der Fluoreszenzintensität des Donors F_D und der des Akzeptors F_A in Abhängigkeit des Abstands R (b) und kann als spektroskopisches „Lineal“ verwendet werden. R_0 ist eine charakteristische Länge, die durch die Wahl der Fluorophore bestimmt wird.

Kapitel 3

Grundlagen konfokaler Mikroskopie

3.1 Geschichtlicher Abriss der konfokalen Mikroskopie und der Anwendung in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie

Die größte Hürde für die Durchführung von Einzelmolekülexperimenten an einzelnen Fluorophoren beruhte in dem hohen Hintergrundsignal des Lösungsmittels, welches aufgrund von Rayleigh- und Raman-Streuung sowie der Autofluoreszenz von Verunreinigungen entsteht. Ein Meilenstein zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses gelang zu Beginn der 90er Jahre durch die starke Reduktion des Beobachtungsvolumens unter Verwendung und Weiterentwicklung der konfokalen Mikroskopie [120].

Das Grundprinzip der konfokalen Mikroskopie war zu diesem Zeitpunkt keine neue Erfindung. Es wurde bereits in den 50er Jahren von Marvin Minsky entwickelt und führte schon sehr bald zum Bau eines ersten mechanischen Rastermikroskops, mit dessen Hilfe Zellen dargestellt werden konnten [30].

Aufgrund verbesserter Lasertechnologien und digitaler Bildverarbeitung wuchs in den 70er Jahren das Interesse an der konfokalen Mikroskopie [55, 135] und führte 1985 bereits zu ersten Anwendungen an fluoreszierenden Präparaten [4]. In den 90er Jahren führten stabile und leistungsstarke Laser sowie Fortschritte in der Qualität optischer Bauelemente und elektronischer Geräte (z.B. Detektoren) zum Durchbruch der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie.

Die mit der Konfokalmikroskopie erzielte Verkleinerung des Beobachtungsvolumens hat jedoch den Nachteil, dass jeweils nur ein Volumenelement in der Größe des Laserfokus von weniger als einem Femtoliter zur gleichen Zeit beobachtet werden kann. Daher wurden Scaneinrichtungen entwickelt, bei denen entweder der Laser (*Confocal Laser Scanning Microscopy* [134]) oder der Objektträger (*Confocal Sample Scanning Microscopy* [55]) relativ zum Objektiv bewegt wird. Mit Hilfe spezieller Steuerungseinheiten ist es bei bestimmten Objekten sogar möglich, dass der Fokus selbst der Bewegung folgt (*Particle Tracking*, z.B. [5]).

3.2 Konfokales Prinzip

Das konfokale Prinzip eines Mikroskops beruht auf der Verwendung desselben Objektivs zur Anregung wie auch zur Detektion. Das entstehende beugungsbegrenzte Fokusvolumen wird zusätzlich durch eine

Lochblende in seiner axialen Ausdehnung begrenzt. Sie kann sich im Fokus vor dem Detektor oder an einer gleichwertigen Stelle im Strahlengang befinden.

In Abb. 3.1 wird das ursprünglich von Minsky entwickelte Prinzip gezeigt.

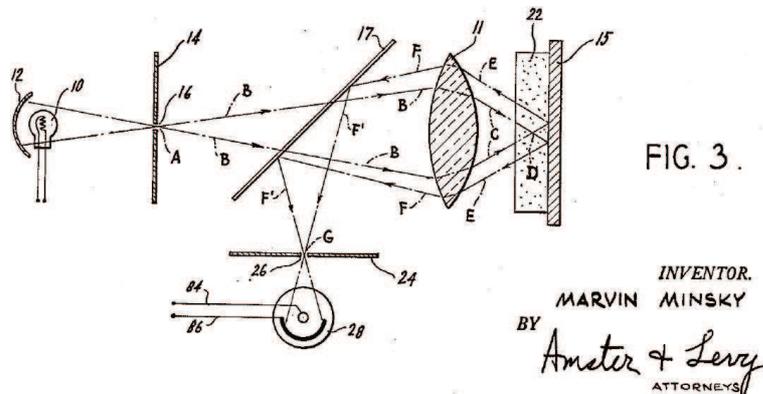


Abbildung 3.1: Konfokaler Aufbau nach Minsky. US Patent No. 3013467: Die Lichtquelle befindet sich links, H ist das Objektiv, A und G die Lochblenden, die Nr. 17 der dichroitische Filter und D die Probe. Die Nr. 28 kennzeichnet den Detektor.

3.3 Auflösungsvermögen

Bei Anregung mit einem kohärenten, kollimierten Strahl entsteht im Fokus des Objektivs aufgrund der endlichen Apertur ein beugungsbegrenztes Anregungsvolumen hoher Intensität.

Das im Laserfokus entstehende Beugungsmuster kann durch die Punktspreizfunktion (PSF)

$$P(r) = P(z, \rho)$$

beschrieben werden. Dabei ist \mathbf{r} der Einheitsvektor für den dreidimensionalen Raum, der aus Symmetriegründen in die zwei Koordinaten ρ , für die radiale Richtung, und z , für die Richtung entlang der optischen Achse, separiert werden kann. Streng genommen gilt die Separation nur für paraxiale Systeme, d.h. für Systeme mit kleiner numerischer Apertur NA . Sie ist definiert durch:

$$NA = n \sin \vartheta, \tag{3.1}$$

mit n als Brechungsindex des Mediums und ϑ als dem halben Winkel des Lichtkegels, der zu einem Punkt hin konvergiert oder von einem Punkt weg divergiert.

Dennoch ist die PSF die gebräuchlichste Näherung, wobei die Intensitätsverteilung des Hauptmaximums in lateraler Richtung als Airy-Scheibe bezeichnet und zur Beschreibung der lateralen Auflösung verwendet wird (siehe Abb. 3.2). Sie ist ringförmig von Nebenmaxima und -minima höherer Ordnung umgeben [156].

Die PSF ist rotationssymmetrisch zur optischen Achse. Für $z = 0$ gilt:

$$P(z = 0, \rho) = \frac{2J_1^2(\rho)}{\rho^2}. \tag{3.2}$$

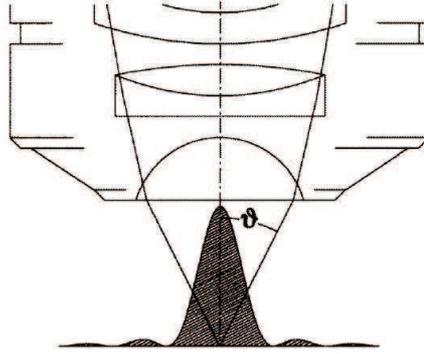


Abbildung 3.2: Radiale Intensitätsverteilung im Fokus eines Objektivs mit dem Öffnungswinkel ϑ . Entnommen [156].

J_1 ist dabei die sphärische Besselfunktion erster Ordnung mit:

$$\rho = \frac{2\pi r}{\lambda} \frac{r}{V} NA \quad (3.3)$$

als der reduzierten Variable entlang der zur optischen Achse transversalen Ebene. r entspricht dabei dem Abstand zur optischen Achse, V der Vergrößerung des Objektivs und λ der Wellenlänge des Lichts.

Die axiale Intensitätsverteilung kann über die Näherung:

$$P(z, \rho = 0) = \frac{\sin(\zeta/4)}{\zeta/4} \quad (3.4)$$

mit:

$$\zeta = \frac{2\pi r}{n\lambda} \frac{r}{V} NA^2 z \quad (3.5)$$

als entsprechende reduzierte Variable für die z -Richtung bestimmt werden.

Die laterale Auflösung ist gemäß dem Rayleigh-Kriterium als Radius der Airy-Scheibe definiert. So kann die Auflösung eines konventionellen beugungsbegrenzten Mikroskops über:

$$r_0 = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \text{ und} \quad (3.6)$$

$$z_0 = 2 \frac{\lambda n}{NA^2}. \quad (3.7)$$

beschrieben werden. Das Verhältnis R der axialen zur lateralen Auflösung ist demnach $R = 3,28 n NA$.

Bei der konfokalen Mikroskopie entspricht die Funktion der Detektion - aufgrund der gleichzeitigen Verwendung des Objektivs zur Anregung und zur Detektion, gekoppelt mit einer geeigneten Lochblende im Detektionskanal - im Idealfall ebenfalls der PSF der Anregung. Somit gilt [156]:

$$P^{konf}(\zeta, \rho) = P(\zeta, \rho)^2$$

und damit ist:

$$r_0^{konf} = \frac{0,61 \lambda}{\sqrt{2} NA} \text{ und} \quad (3.8)$$

$$z_0^{konf} = 1,5 \frac{\lambda n}{NA^2}. \quad (3.9)$$

Für das Konfokalmikroskop bedeutet dies eine Verbesserung der lateralen Auflösung um 30% und der axialen um 25%. Es bewirkt jedoch im Vergleich zu einem herkömmlichen Mikroskop ein größeres Verhältnis R um 6% : $R^{konf} = 3,48 n NA$.

3.4 Konfokales Volumen

Die in Abschnitt 3.3 verwendeten Gleichungen gelten unter der Annahme, dass das Licht nur durch die Linse des Objektivs selbst begrenzt wird. Dies entspricht einer Überfüllung des Objektivs mit Licht homogener Intensität, was durch Laser nicht gewährleistet werden kann. Der Laserstrahl besitzt einen gaußförmigen Querschnitt der Form:

$$I(\rho) = I_0 e^{-2\rho^2/\omega^2}, \quad (3.10)$$

wobei der Parameter ω als Strahlbreite oder auch als Strahltaile bezeichnet wird und den Strahlenradius bei einer Intensität von I_0/e^2 beschreibt. Wird dieser gaußförmige Strahl durch ein Objektiv fokussiert, dessen Radius größer als ω ist, entsteht eine so genannte Unterfüllung des Objektivs. In diesem Fall ist der starke Einfluss der NA auf das Fokusvolumen verringert, wodurch der Strahlenquerschnitt gaußförmig bleibt. Nachteilig ist dabei der Verlust an lateraler und vor allem axialer Auflösung. Ein teilweise gefülltes oder überfülltes Objektiv dagegen enthält neben dem gaußförmigen Strahl eine Reihe weiterer störender Beugungsmuster, wodurch die Intensität im Fokus ebenso abnimmt [69].

Nichtsdestotrotz wird bei theoretischen Betrachtungen das Anregungsvolumen in lateraler Richtung meist als gaußförmiges Strahlenprofil angenommen. In axialer Richtung entspricht es aufgrund der Form der PSF (siehe Gleichung 3.4) einem Lorentzprofil [120]:

$$I_A(\rho, z) = \frac{2P}{\pi\omega^2(z)} \exp\left(-2\frac{\rho^2}{\omega^2(z)}\right) \quad (3.11)$$

mit P , der Leistung des Anregungsstrahles und $\omega(z)$, der Änderung der Strahltaile entlang der axialen Achse [131]:

$$\omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z\lambda}{\pi\omega_0^2}\right)^2}. \quad (3.12)$$

Die Geometrie des Detektionsvolumens wird durch die Funktion der molekularen Detektionseffizienz $MDE(r)$ beschrieben, welche aus der Anregungsintensität, multipliziert mit der Funktion der Sammeleffizienz $CEF(r)$, berechnet werden kann [90]:

$$MDE(r) = CEF(r) \cdot I_A(r) \quad (3.13)$$

Die CEF ist beeinflusst von der Form und Position der konfokalen Lochblende und der Beugungsei-

genschaft des Objektivs. Beide Bauelemente sind für die Projektion des Fluoreszenzlichtes aus dem Objektraum in den Bildraum verantwortlich. Somit beschreibt die MDE die detektierte relative Fluoreszenzintensität eines Moleküls in Abhängigkeit von der räumlichen Verteilung der Anregungsintensität bzw. Sammeleigenschaften des Systems.

Die über das gesamte Detektionsvolumen integrierte Fluoreszenz $F(t)$ lässt sich berechnen über:

$$F(t) = \eta \int dr MDE(r)C(r,t). \quad (3.14)$$

Dabei sind zusätzliche Verluste durch optische Elemente wie Filter und Strahlteiler nicht berücksichtigt. Die Funktion $C(r,t)$ beschreibt die räumliche und zeitliche Verteilung der fluoreszierenden Teilchen im Raum und der Parameter η deren Helligkeit. η ist abhängig von der Quanteneffizienz des Systems g , dem Absorptionsquerschnitt σ_A und der Quantenausbeute Q der einzelnen Fluorophore und es gilt:

$$\eta = g \sigma_A Q. \quad (3.15)$$

Die molekulare Helligkeit gibt die detektierte Photonenzahl pro Molekül und Zeiteinheit an. Sie ist ein wichtiger Parameter, da sie proportional zum Signal-Rausch-Verhältnis (siehe Abschnitt 3.5) ist.

3.5 Photonenrauschen

Zufällige und diskrete Ereignisse werden, wenn sie selten auftreten, durch die Poisson-Statistik beschrieben. Daraus folgt, dass nach einer zeitlichen Integration der Ankunftszeiten detektierter Photonen die erhaltene Photonenzahl pro Zeiteinheit Poisson-verteilt ist:

$$P(n,N) = \frac{N^n}{n!} e^{-N}. \quad (3.16)$$

In dieser Gleichung beschreibt $P(n,N)$ die Wahrscheinlichkeit, dass n Photonen in einem bestimmten Zeitfenster detektiert werden, wenn N Photonen der Erwartungswert bzw. Mittelwert sind. Für die Standardabweichung der Poisson-Verteilung σ gilt:

$$\sigma = \sqrt{N}. \quad (3.17)$$

Daraus folgt, dass das Photonenrauschen oder auch Quantenrauschen jeweils der Wurzel der Anzahl der detektierten Photonen entspricht.

Für die Fluoreszenzspektroskopie ist es, wie zu Beginn des Kapitels erwähnt, von größter Bedeutung, dass das Fluoreszenzsignal der einzelnen Fluorophore das Hintergrundsignal übersteigt und auch selbst größer als das Poisson-Rauschen ist.

Das Signal-Rausch-Verhältnis SRV lässt sich über die Beziehung [156]:

$$SRV = \frac{\varepsilon \langle F \rangle}{\sqrt{\varepsilon \langle F \rangle + \langle B \rangle + \langle D \rangle}} \quad (3.18)$$

mit $\langle F \rangle$ dem zeitlichen Mittel des Fluoreszenzsignals, ε der Detektionseffizienz, $\langle B \rangle$ dem Hintergrund-

signal der Umgebung und $\langle D \rangle$ dem Dunkelstrom des Detektors abschätzen. Während D konstant bleibt, wächst B linear mit steigender Anregungsintensität an. Da bei dem Fluoreszenzsignal jedoch Sättigungseffekte auftreten, gibt es entsprechend der photophysikalischen Eigenschaften des Moleküls eine Anregungsintensität, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis optimal ist.

3.6 Vor- und Nachteile konfokaler Mikroskopie

Zum Schluss dieses Kapitels sollen kurz die Vor- und Nachteile der konfokalen Mikroskopie erwähnt werden:

Vorteile:

- ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis durch Reduktion des Hintergrundsignals
- eine exakte Überlagerung des Anregungs- und Detektionsvolumens durch Verwendung eines Objektivs zur Anregung und zur Detektion

Nachteile:

- zur Darstellung einer Fläche oder eines Volumenelements ist eine Scaneinrichtung erforderlich
- eine geringe Tiefenschärfe

Die Verwendung der konfokalen Mikroskopie in der Fluoreszenzspektroskopie wird im Kapitel 5 beschrieben. Im folgenden Kapitel soll zunächst auf photophysikalischen Grundlagen eingegangen werden.

Kapitel 4

Photophysikalische Grundlagen

Die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie basiert auf dem Fluoreszenzsignal einzelner fluoreszenter Moleküle, den Fluorophoren. Sie werden, wenn sie nicht selbst Ziel der Untersuchungen sind, als Sensoren oder Marker verwendet.

Während für Sensoren die hohe Sensibilität der spektralen Eigenschaften bezüglich der lokalen Umgebung von Interesse ist (siehe auch Abschnitt 4.4.1), sollen Marker eine große photophysikalische und photochemische Stabilität aufweisen. Sie werden zur Untersuchung von nicht fluoreszierenden Systemen z.B. Proteinen verwendet, indem sie an diese angebracht werden. Die Absorptions- und Emissionseigenschaften bestimmen dabei den Wellenlängenbereich der Anregung und die mögliche Verwendung des Fluorophors als Donor bzw. Akzeptor in Experimenten mit Energietransfer.

4.1 Eigenschaften von Fluorophoren

Aus physikalischer Sicht entspricht ein Fluorophor einem System, welches ein Absorptions- und ein Emissionsdipol besitzt (Abb. 4.1(a)). Die Orientierungen der Dipolmomente werden dabei durch die chemische Struktur bestimmt.

Chemisch gesehen gehören die meisten Fluorophore zu den konjugierten Molekülen. Sie bestehen aus Systemen aromatischer Ringe (siehe Abb. 4.1(b)), deren π - Orbitale über viele Atome hinweg ein gemeinsames delokalisiertes Molekülorbital bilden. Dieses Orbital ist energetisch gesehen der Grundzustand des Moleküls.

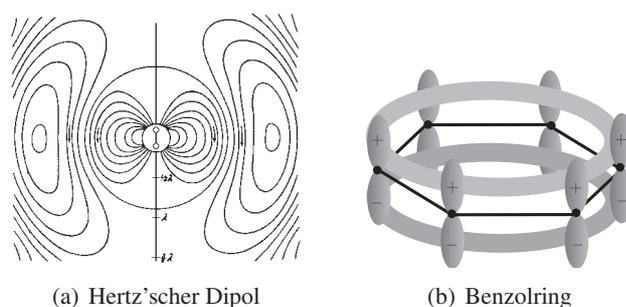


Abbildung 4.1: Das elektrische Feld eines Hertz'schen Dipols [68] (a) und die Skizze eines delokalisierten π -Molekülorbitals eines Benzolrings (b).

Wird durch Absorption von Energie diese Elektronenwolke angeregt, verändert sich die Dichteverteilung der π -Elektronen und infolge die Abstände zwischen den Kohlenstoffatomen. Dies führt zu Schwingungen.

Werden die Moleküle stärker angeregt, können sich Elektronen aus dem Orbital des Grundzustands lösen und Orbitale höherer Energie besetzen. Erfolgt die Anregung durch elektromagnetische Strahlung, ist die Wahrscheinlichkeit Energie zu absorbieren maximal, wenn das Absorptionsdipolmoment parallel zum elektrischen Feld der Anregung orientiert ist. Eine Emission von Fluoreszenzlicht erfolgt typischerweise bei Übergang aus dem angeregten Zustand mit der geringsten Energie (Kasha Regel) [90]. Die Orientierung des Emissionsdipolmoments ist dabei meist in Übereinstimmung mit dem Dipolmoment der Absorption.

4.2 Energieniveauschema

Die Prozesse, die zwischen der Absorption und Emission stattfinden, werden häufig mit Hilfe des Jablonski-Diagramms dargestellt [1].

Zur Beschreibung der energetischen Zustände von Fluorophoren wird dabei meist das vereinfachte Schema mit drei energetischen Zuständen verwendet. Es berücksichtigt den Singulett-Grundzustand, sowie einen angeregten Singulett- und Triplettzustand (siehe Abb. 4.2). Die Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus sind stets dabei stets mit Schwingungszuständen gekoppelt. Die Übergangsraten zwischen den Zuständen sind von dem System und den experimentellen Bedingungen abhängig.

Das Fluorophor kann über Absorption eines Photons vom Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Singulettzustand S_1 gebracht werden. Meist erfolgt dieser Übergang entsprechend des Franck-Condon-Prinzips zunächst in einen der vibronischen Zustände von S_1 mit anschließender schneller Relaxation auf das S_1 -Grundniveau (die Rate liegt im Größenbereich von $10^{11} - 10^{14} \text{ s}^{-1}$). Werden höhere Singulett-Zustände S_n besetzt, erfolgt ein ebenso schneller Übergang in den S_1 -Zustand. Von diesem Niveau aus gelangt das Molekül hauptsächlich über strahlende (*Fluoreszenz*) und nichtstrahlende (z.B. *Internal Conversion*, IC) Übergänge zurück in den Grundzustand. Die Raten hierfür betragen $10^7 - 10^9 \text{ s}^{-1}$.

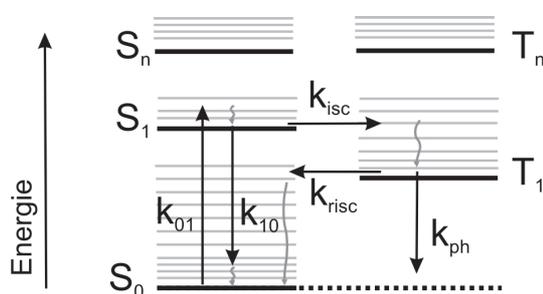


Abbildung 4.2: Jablonski-Diagramm, welches den Grundzustand S_0 und zwei angeregte Zustände S_1 bzw. T_1 eines Fluorophors (schwarze horizontale Linien), die jeweiligen Schwingungszustände (graue horizontale Linien) und Übergänge zwischen den Zuständen (Pfeile) beschreibt. Dabei ist k_{01} die Anregungsrate, k_{10} die Rate aller strahlenden und nichtstrahlenden Übergänge von S_1 zu S_0 , k_{isc} die ISC-Rate von S_1 in den Triplettzustand T_1 , k_{risc} die reversible (strahlungslose) ISC-Rate und k_{ph} die Übergangsrate aus dem Triplettzustand zurück in den Grundzustand unter Abgabe eines Photons. IC-Übergänge innerhalb der Schwingungszustände sind grau dargestellt. Die höheren angeregten Zustände S_n und T_n sind nicht besetzt.

Die Emissionsbande ist aufgrund des Energieverlustes durch Relaxationsprozessen des Lösungsmittels und IC-Übergänge aus höheren S_n -Zuständen im Vergleich zur Absorption hin zu größeren Wellenlängen verschoben (*Stokes-Verschiebung*). Diese Verschiebung wird zur spektralen Trennung der Fluoreszenzmission vom Anregungslicht ausgenutzt.

Besonderes Interesse gilt den quantenmechanisch verbotenen Übergängen zwischen Singulett- und Triplettzuständen des Systems (*Intersystem Crossing, ISC*). Die dafür nötige Spinumkehr führt zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit dieser Übergänge und zu einer hohen Lebensdauer der Triplettzustände. Die ISC-Rate k_{isc} liegt im Bereich von 10^6 bis 10^{10} s^{-1} , der Wert der reversiblen ISC-Rate k_{risc} kann sich zwischen 10^6 und 10^{-2} s^{-1} bewegen. Phosphoreszenz wird bei gelösten Fluorophoren aufgrund der typischerweise langsamen Rate k_{ph} von $10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$ und der hohen Wahrscheinlichkeit für konkurrierende nichtstrahlende Depopulationsprozesse z.B. durch Wechselwirkung mit anderen Molekülen (*Quenchen*) im allgemeinen nicht beobachtet [90].

Unter der Bedingung, dass k_{risc} sehr viel größer als k_{ph} ist, gilt für die Ratengleichung des in Abb. 4.2 beschriebenen Systems:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ T_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{01} & k_{10} & k_{risc} \\ k_{01} & -k_{10} - k_{isc} & 0 \\ 0 & k_{isc} & -k_{risc} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ T_1 \end{pmatrix}. \quad (4.1)$$

Die Lösung des Gleichungssystems im Gleichgewicht führt zu einer Population der Zustände mit [165]:

$$\begin{aligned} S_0^G &= \frac{(k_{10} + k_{isc})k_{risc}}{k_{01}(k_{isc} + k_{risc}) + (k_{10} + k_{isc})k_{risc}}, \\ S_1^G &= \frac{k_{01}}{(k_{10} + k_{isc})} S_0^G \quad \text{und} \\ T_1^G &= \frac{k_{isc}}{k_{risc}} S_1^G. \end{aligned} \quad (4.2)$$

Die Anregungsrate k_{01} ist das Produkt aus der Photonenflussdichte $\rho(\nu)$ und dem Absorptionsquerschnitt des Fluorophors $\sigma_a(\nu)$:

$$k_{01} = \sigma_a(\nu)\rho(\nu). \quad (4.3)$$

Die Photonenflussdichte des Anregungsstrahls ist abhängig von der Anregungsintensität I und der Strahlungsenergie $h\nu$

$$\rho(\nu) = \langle I \rangle / h\nu. \quad (4.4)$$

Dabei ist h das Planck'sche Wirkungsquantum und ν die Frequenz. Der Absorptionsquerschnitt berechnet sich aus dem molaren (dekadischen) Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\nu)$ über [32]:

$$\sigma_a(\nu) \approx 3.82 \cdot 10^{-21} \text{ M cm}^3 \epsilon(\nu). \quad (4.5)$$

Während sich das Fluorophor im Triplettzustand befindet, kann es kein Photon absorbieren und ist folglich photoinaktiv. Diese Dunkelzeiten führen zu starken Schwankungen in der Fluoreszenz, dem so genannten Triplett-Blinken [11]. Die Zeiten, in denen das Fluorophor nicht anregbar ist, sind exponentiell verteilt und werden durch die Triplettzeit τ_T charakterisiert. Die Tripletttrate k_T ist die Inverse der Tri-

pletzeit und setzt sich additiv aus der apparenten ISC-Rate k_{isc}^{app} und k_{risc} zusammen:

$$k_T = k_{isc}^{app} + k_{risc} \quad (4.6)$$

$$k_{isc}^{app} = \frac{k_{01}k_{isc}}{k_{10} + k_{01}} \quad (4.7)$$

Die Rate des Übergangs vom ersten angeregten Singulettzustand in den Triplettzustand k_{isc}^{app} ist von der Population des Singulettzustands abhängig und daher kleiner als k_{isc} , solange sich das System nicht im Gleichgewicht befindet. Dies tritt erst bei hohen Anregungsraten auf (siehe Abschnitt 4.3.3).

Die Triplettlebensdauer, die Inverse von k_{risc} , bleibt dabei unverändert, kann jedoch durch Stöße mit so genannten „Triplettquenchern“ verkürzt werden (siehe Abschnitt 4.4.3).

4.3 Photophysikalische Eigenschaften der Fluorophore

4.3.1 Natürliche Fluoreszenzlebensdauer

Unter Abwesenheit nichtstrahlender Zerfallsprozesse des angeregten Zustands S_1 ist die Fluoreszenzlebensdauer die Inverse der Strahlungsrate Γ des Fluorophors. Sie entspricht in diesem Fall der natürlichen Fluoreszenzlebensdauer τ_n :

$$\tau_n = \Gamma^{-1}. \quad (4.8)$$

Die Strahlungsrate Γ kann für Singulett-Singulett Übergänge entsprechend dem Einsteinkoeffizienten aus dem Absorptionsspektrum $\varepsilon(\bar{\nu})$ und dem Emissionsspektrum $F(\bar{\nu})$ berechnet werden [143]:

$$\Gamma = 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \frac{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu} / \bar{\nu}^3} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu}. \quad (4.9)$$

Dabei ist n die Brechzahl des Mediums und $\bar{\nu}$ die Wellenzahl in cm^{-1} .

4.3.2 Quantenausbeute

Die Quantenausbeute Q ist der Quotient aus absorbierten und emittierten Photonenanzahl und charakterisiert den Anteil nichtstrahlender Zerfallsprozesse. Verwendet man zur Beschreibung die Übergangsraten so ist:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (4.10)$$

Dabei ist k_{nr} die Gesamtrate aller konkurrierenden nichtstrahlenden Übergänge in den Grundzustand. Sie führt zu einer Fluoreszenzlebensdauer τ , die im Vergleich zu τ_n verringert ist:

$$\tau = Q\tau_n. \quad (4.11)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer τ ist folglich die invertierte Summe aller strahlenden und strahlungslosen Übergangsraten:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (4.12)$$

und es gilt der Zusammenhang:

$$\tau = Q/\Gamma. \quad (4.13)$$

Fluorophore, die für die Fluoreszenzspektroskopie verwendet werden, sollten möglichst eine hohe Quantenausbeute besitzen.

4.3.3 Fluoreszenzsättigung

Die Fluoreszenzausbeute ist trotz Erhöhung der Anregungsleistung nicht beliebig steigerbar. Bei hohen Anregungsraten tritt eine Sättigung angeregter Zustände auf. Ist dies der Fall ist die Fluoreszenz F ist nicht mehr linear von der Anregungsleistung I abhängig, sondern entspricht:

$$F = C \frac{k_{10}}{1 + Q_T} \frac{I/I_S}{1 + I/I_S} \quad (4.14)$$

wobei I_S die Sättigungsintensität und Q_T die Quantenausbeute für Übergänge in den Tripletzustand beschreibt [32]. Dabei beinhaltet C die Sammel- und Detektionseffizienz des Systems sowie die Quantenausbeute der Fluoreszenz.

Bei einer Sättigung befinden sich die Moleküle vermehrt im angeregten Zustand. Dies können sowohl Singulett- als auch Tripletzustände oder aber Photoisomerisationen in einen nichtfluoreszenten Zustand sein. Die reine Singulett-sättigung tritt erst bei hohen Anregungsleistungen auf und ist daher für Experimente mit geringeren Anregungsleistungen von untergeordneter Bedeutung. Werden jedoch auch Tripletzustände besetzt, treten aufgrund der im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer längeren Tripletlebensdauer schon bei geringeren Anregungsleistungen Sättigungseffekte auf (so genanntes Triplet-Pumpen). Dies ist für die Bestimmung der geeigneten Anregungsleistung mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis bedeutend (vgl. Gleichung 3.18).

Ausgehend von Gleichung 4.2 gilt unter der Voraussetzung der Gültigkeit des Systems von Abb. 4.2 für die Fluoreszenzintensität der folgende Zusammenhang [58]:

$$F = \frac{Ck_{01}}{1 + k_{01}/k_{sat}} \quad \text{mit} \quad k_{sat} = \frac{k_{10}}{1 + k_{isc}/k_{risc}}. \quad (4.15)$$

Für Systeme ohne Tripletzustände entspricht k_{sat} der Rate k_{10} .

4.3.4 Photophysikalische Lebensdauer und Photobleichen

Eine hohe Photostabilität von Fluorophoren ist ein wichtiges Kriterium für ihre Verwendung als Marker, wenn hohe Emissionsraten benötigt werden bzw. die Fluoreszenz des Farbstoffes über einen langen Zeitraum beobachtet werden soll. Unter Bleichen versteht man eine irreversible Zerstörung des π -Systems des Fluorophors und der daraus folgenden Photoinaktivität.

Bei niedrigen Anregungsraten $k_{01} \ll k_{10} + k_{isc}$ sind die angeregten Zustände S_1 und T_1 hinsichtlich der Bleichvorgänge gleichberechtigt und die Bleichrate ist intensitätsunabhängig [44]. Diese Rate wird durch die begrenzte photophysikalische Lebensdauer des Fluorophors bestimmt, die durch die Anzahl der Absorptions- und Emissionszyklen n_F beschrieben wird:

$$n_F = \Phi_F / \Phi_D. \quad (4.16)$$

Der Quotient enthält mit Φ_F den Anteil der Zyklen unter Fluoreszenz und Φ_D den Anteil der Zyklen, die zu einer Photodestruktion führen. n_F liegt bei den meisten Farbstoffen im Bereich $10^5 - 10^6$ Photonen [166].

Bei höheren Anregungsraten wird die Wahrscheinlichkeit der Absorption eines zweiten Photons erhöht und es werden die S_n bzw. T_n -Zustände besetzt (so genannte Leiterprozesse). In polaren Lösungsmitteln koppeln diese höher angeregten Zustände sehr stark mit dem ionischen Zustand des Fluorophors, so dass es neben der Relaxation zum ersten angeregten Zustand auch zur Bildung eines Kationenpaares (F^+, e^+) kommt [44]. Das Elektron kann nun entweder mit dem Fluorophor rekombinieren oder aber in das Lösungsmittel entweichen. Der Farbstoff wird über diesen Prozess unabhängig von der photophysikalischen Lebensdauer gebleicht. Die Quantenausbeute für die Ionisation sowie das Lösen des Elektrons wächst dabei bei steigenden Anregungsraten [44].

4.4 Wechselwirkungen mit der Umgebung

4.4.1 Spektrale Fluktuationen und Ionisationen

In einigen Anwendungen wie z.B. bei FRET-Experimenten bilden die spektralen Absorptions- und Emissionseigenschaften der Fluorophore die Grundlage für äußerst sensible Methoden zur Bestimmung von inter- und intramolekularen Abständen verwendet. Treten nun spektrale Fluktuationen oder Änderungen der Quantenausbeute in der Zeitskala der Dynamik des zu untersuchenden Systems auf, kann dies leicht zu Fehlinterpretationen führen.

Die photochemische und photophysikalische Stabilität der Fluorophore oder zumindest die genaue Kenntnis der Eigenschaften ist daher von besonderer Bedeutung. Letzteres führt zu neuen Anwendungen bestimmter Fluorophore als Sensoren z.B. bezüglich von pH-Werten [74] oder der Temperatur [157].

Weitere wichtige Einflüsse der Umgebung auf das Emissionsverhalten von Fluorophoren sind die Polarität und Viskosität des Lösungsmittels. Eine erhöhte Polarität des Lösungsmittels führt zu einer Vergrößerung der Stokes-Verschiebung [9, 101]. Ebenso hat bei vielen gebundenen Farbstoffmolekülen eine Erhöhung der Viskosität eine Vergrößerung der Quantenausbeute zur Folge, da die Wechselwirkungshäufigkeit mit anderen Molekülen reduziert ist [75].

Neben intermolekularen Wechselwirkungen sind aber auch interne Ladungsverschiebungen [21] und Konformationsänderungen [168] des Fluorophors selbst möglich. So wurden spektrale Diffusionen des Emissionsspektrums sowie des Absorptionsspektrums bereits innerhalb der Lebensdauer einzelner Fluorophore beobachtet [96, 150].

Verschiebungen im Absorptionsspektrum können durch Bindungen der Fluorophore mit anderen Mole-

külen hervorgerufen werden [130] und können von Molekül zu Molekül differieren [150]. Sie spielen vor allem bei geringen Temperaturen eine Rolle, da durch schmale Absorptionsbanden schon geringe spektrale Verschiebungen zu drastischen Veränderungen des Absorptionsquerschnitts führen.

Eine weitere Möglichkeit der Interaktion des Fluorophors mit der Umgebung ist die der Ionisation, welche zuerst bei Nanokristallen beobachtet wurde [110]. Dabei gelangt im angeregten Zustand ein Elektron vom Fluorophor in eine Elektronen Falle des umgebenden Mediums. Dieser Prozess ist reversibel und das Elektron kann vom Fluorophor wieder aufgenommen werden. Der Ladungstransfer führt jedoch zu starken Fluktuationen des Fluoreszenzsignals zwischen fluoreszenten und nichtfluoreszenten Zuständen, wobei die Dunkelzeiten von einigen Millisekunden an bis zu Sekunden dauern können [159, 60, 25, 124, 172]. Die Verteilung der fluoreszenten bzw. nichtfluoreszenten Zeiten τ verlaufen dabei aufgrund des „Tunnelns“ des Elektrons durch die Energiebarriere nichtexponentiell. Sie werden durch eine Potenzfunktion [88]:

$$P(\tau) \propto 1/\tau^m \quad (4.17)$$

beschrieben. Der Exponent $m = 1 + \alpha$ drückt dabei die Größe der Energiebarriere (Arrhenius Modell) bzw. den räumlichen Abstand (Elektronen-Hopping-Modell) aus. Für Dunkelzustände ist der Exponent von der Umgebung des Fluorophors abhängig [60] und im Gegensatz zu den fluoreszenten Zuständen unabhängig von der Anregungsleistung. Die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang in einen nichtfluoreszenten Zustand steigt mit der Population der angeregten Zustände an [44, 172].

4.4.2 Fluoreszenzlöschung

Eine enorme Vielfalt von intermolekularen Wechselwirkungen führt zu einer Verringerung der Fluoreszenz. Jeder dieser Prozesse wird als Fluoreszenzlöschung bzw. Fluoreszenzquenchen bezeichnet. Der wohl bekannteste ist das Quenchen durch gelöste Sauerstoffmoleküle über Stöße mit dem Fluorophor [83].

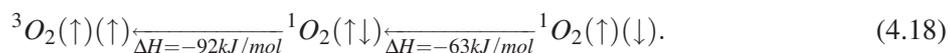
Die Fluoreszenzlöschung findet nur über kurze Distanzen hin statt, da die Elektronenwolken der beiden beteiligten Moleküle selbst interagieren müssen. Die benötigten Abstände sind in der Größenordnung der van-der-Waals'schen Radien ($\sim 1\text{\AA}$). Die drei Hauptmechanismen des Quenchens sind [90]

1. Induzierte ISC-Übergänge in den Tripletzustand bei Wechselwirkung mit schweren Halogenatomen oder Sauerstoffmolekülen [82].
2. Elektronenaustausch bzw. Dexter-Wechselwirkung, bei der das Fluorophor im angeregten Zustand als Elektronendonator für den Quencher fungiert. Der Akzeptor ist nun im angeregten Zustand und transferiert im Austausch dazu ein eigenes Elektron aus dem Grundzustand zum Fluorophor [38].
3. Beim Photoinduzierten Elektronentransfer PET wird ein Komplex zwischen Fluorophor und Quencher gebildet, aufgrund dessen das Fluorophor strahlungslos in den Grundzustand zurückkehren kann. Dabei kann das Fluorophor als Elektronendonator sowie als -akzeptor fungieren [85].

4.4.3 Triplettenquenchen

Das Quenchen des Tripletzustands ist im Gegensatz zur Fluoreszenzlöschung meist ein gewünschter Effekt. Mit ihm können lange Triplettlebenszeiten, die zur Reduktion der Fluoreszenzemission und zu Sättigungseffekten führen, deutlich verkürzt werden. Der häufigste Triplettenquencher ist das Sauerstoffmolekül selbst. Es wird angenommen, dass seine Wirkung aus einer Kombination von induzierten ISC-Übergängen, Elektronenaustausch und PET beruht [22, 115, 86]. An dieser Stelle soll besonders auf die ISC-Übergänge eingegangen werden.

Sauerstoff ist unter normalen Bedingungen reaktionsträge, doch lässt er sich auf photochemischem Weg in eine sehr reaktionsfreudige Form, den „Singulett-Sauerstoff“ 1O_2 , umwandeln. Er unterscheidet sich von dem normalerweise vorliegenden „Triplet-Sauerstoff“ 3O_2 in der Weise, dass die Spins der beiden Außenelektronen antiparallel zueinander stehen. Der Singulett-Sauerstoff geht bei Abwesenheit geeigneter Reaktionspartner rasch in den Triplet-Sauerstoff über, wobei die freigesetzte Energie durch Licht der Wellenlänge 633 nm oder 703 nm emittiert wird. Diese beiden Wellenlängen sind auf die zwei - entsprechend der Besetzung der Molekülorbitale - unterschiedlichen energetischen Formen des Singulett-Sauerstoff zurückzuführen. Der energiereichere Singulett - Sauerstoff $^1O_2(\uparrow)(\downarrow)$ ist sehr kurzlebig ($< 10^{-9}s$) und verwandelt sich unter Energieabgabe in den vergleichsweise langlebigen ($10^{-4}s$) und chemisch wirksamen Singulett-Sauerstoff $^1O_2(\uparrow\downarrow)$:



Befindet sich das Fluorophor im Tripletzustand T_1 , kann es bei Kollisionen mit dem Triplet-Sauerstoff Energie übertragen und strahlungslos in den Grundzustand zurückkehren [56]:



Der bei der Reaktion in Gleichung 4.19 entstehende reaktionsfreudige Singulett-Sauerstoff kann aber nun zu einer oxidativen Destruktion der fluoreszenten Eigenschaften des Farbstoffs führen (siehe Abschnitt 4.4.4). Deshalb kann es von Vorteil sein, den Sauerstoff zu entfernen und andere geeignete Triplettenquencher einzusetzen [162, 118].

4.4.4 Induziertes Photobleichen

Wie im Abschnitt 4.3.4 beschrieben, wird die Anzahl der Photonen, die ein Fluorophor emittieren kann, durch seine photophysikalische Lebensdauer begrenzt. Doch können äußere Einflüsse die Lebensdauer zusätzlich verkürzen, d.h. zu einem Übergang in einen irreversiblen nichtfluoreszenten Zustand führen (Photobleichprozesse).

Ein Faktor, der die Rate des Photobleichens stark beeinflusst, ist die Konzentration von gelöstem hochreaktiven Singulett-Sauerstoff, der durch das Quenchen der Tripletzustände (Gleichung 4.19) entsteht. Singulett-Sauerstoff kann mit Fluorophoren im Grund- sowie im angeregten Zustand reagieren, welches meist die Zerstörung des π -Elektronensystems der Farbstoffe zur Folge hat. Weiterhin wird auch eine Reaktion des Triplet-Sauerstoffs mit den Fluorophoren im Tripletzustand vermutet, die zu einem

semioxydierten Zustand X führt [81]:



Aufgrund dessen sind in Anwesenheit des Sauerstoffs die Bleichrate des Fluorophors und k_{isc} für viele Farbstoffe proportional zueinander [166]. Nach Zusatz geeigneter Tripletquencher kann die Verwendung von desoxygenierten Lösungen daher zu einer Erhöhung der Photostabilität und der photophysikalischen Lebensdauer führen [162, 118].

4.5 Strahlungsloser Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren

Strahlungsloser Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren kann bis zu Abständen von 10 nm stattfinden und ist daher als kontaktloser Energietransfer über größere Distanzen geeignet. Er beruht auf einem elektrodynamischen Prinzip, der Dipol-Dipol Wechselwirkung, zwischen dem Emissionsdipol eines Donorfluorophors und dem Absorptionsdipol eines Akzeptors (siehe Abschnitt 4.1).

4.5.1 Orientierung der Dipolmomente

Gemäß den Eigenschaften von Dipolen ist die Stärke der Energieübertragung auch von der Orientierung zueinander abhängig. Als Parameter zur Beschreibung der relativen Lage wird der Orientierungsfaktor κ^2 verwendet [13]:

$$\kappa^2 = (3\cos^2\theta + 1)\cos^2\varphi \quad (4.21)$$

mit θ als Winkel zwischen Donor-Dipolmoment und Verbindungsachse zum Akzeptor sowie φ als Winkel zwischen dem Akzeptor-Dipolmoment und dem vom Donor induzierten elektrischen Feld. Am größten ist der Orientierungsfaktor ($\kappa^2 = 4$), wenn die Dipolmomente hintereinander ($\longrightarrow\longrightarrow$) angeordnet sind. Stehen sie senkrecht zueinander ($\longrightarrow\uparrow$), ist κ^2 in den meisten Fällen Null. Ist die Rotation der Farbstoffmoleküle schneller als die Fluoreszenzlebensdauer des Donormoleküls, kann der dynamische Grenzfall angenommen werden und κ^2 ist $2/3$. Auch wenn einer der Dipole frei rotieren kann, verringert sich dieser Wert nur geringfügig zu $0,63$ [13]. Sind beide Farbstoffmoleküle in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt, kann κ^2 für jedes FRET-Paar einen anderen Wert zwischen 0 und 4 annehmen.

4.5.2 Fluoreszenzresonanz-Energietransfer

Beim Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET), auch wegen der ersten theoretischen Betrachtung durch Theodor Förster [54] als Förster-Resonanz-Energietransfer bezeichnet, ist die Stärke des Energieübertrags von den spektralen Emissionseigenschaften des Donormoleküls $F_D(\lambda)$ und den Absorptionseigenschaften des Akzeptormoleküls $\epsilon_A(\lambda)$ abhängig. Die dazu notwendige Überlappung der Spektren wird durch das Integral $J(\lambda)$ charakterisiert [90]:

$$J_\lambda = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda)}. \quad (4.22)$$

Die Energietransferrate k_{ET} vom Donor zum Akzeptor ist zudem sehr stark vom intermolekularen Abstand der beiden Farbstoffe abhängig und lässt sich über eine $1/r^6$ -Abhängigkeit beschreiben [90]:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_F^{Donor}} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6, \quad (4.23)$$

dabei ist τ_F^{Donor} die Fluoreszenzlebensdauer des Donors ohne die Gegenwart des Akzeptors und R_0 der so genannte Försterradius. Bei diesem Abstand ist der Energietransfer zu 50 % effizient.

R_0 wird die Eigenschaften des Fluorophorenpaar bestimmt und hängt von κ^2 , J_λ , der Brechzahl n , der Avogadrokonstante N_A und der Quantenausbeute des Donors Q_D ab [90]:

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N_A n^4} J(\lambda)}. \quad (4.24)$$

Die Rate des Energietransfers steht für das Donormolekül konkurrierend zur Rate k_{10} als ein weiterer Pfad zur Abgabe der Anregungsenergie zur Verfügung (siehe Abb. 4.3). Infolgedessen verkürzt sich seine Fluoreszenzlebensdauer.

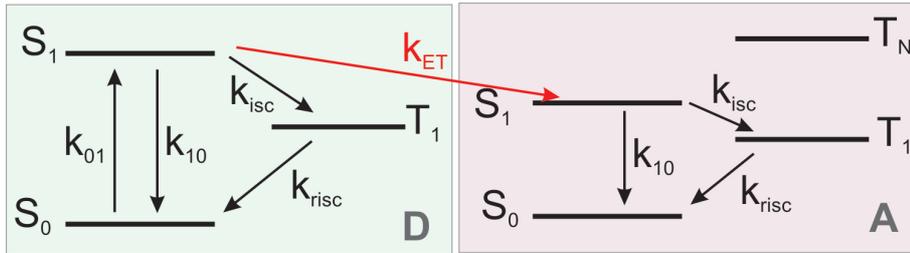


Abbildung 4.3: Energieniveauschema bei Energietransfer zwischen einem Donor- **D** und einem Akzeptorfluorophor **A**. Für das Molekül im S_1 -Zustand eröffnet sich neben der ISC-Rate k_{isc} ein weiterer Energiepfad. Für den Donor sowie für den Akzeptor sind auch Übergänge in die jeweiligen Triplettzustände möglich.

Die Energietransfereffizienz E_{ET} wird aus dem Quotienten der Transferrate und der Summe aller Depopulationsraten des ersten angeregten Singulettzustands des Donors bestimmt:

$$E_{ET} = \frac{k_{ET}}{k_{10} + k_{isc} + k_{ET}}, \quad (4.25)$$

und ist gemäß

$$E_{ET} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (4.26)$$

mit dem Försterradius verknüpft. Die Anregungsrate des Akzeptors k_{01}^A berechnet sich aus der Anregungsrate des Donors k_{01}^D [167] entsprechend:

$$k_{01}^A = \frac{k_{01}^D k_{ET}}{k_{01}^D + k_{10}^D + k_{isc} + k_{ET}} \approx \frac{k_{01}^D k_{ET}}{k_{10}^D + k_{isc} + k_{ET}} = k_{01}^D E_{ET}, \quad (4.27)$$

unter der Bedingung, dass die Anregungsrate k_{01}^D , sehr viel kleiner als die Summe $k_{10}^D + k_{isc} + k_{ET}$ ist. Dieser Zusammenhang führt dazu, dass die Energietransfereffizienzen auch direkt aus den Fluoreszenzin-

tensitäten des Donors (F_A) und des Akzeptors (F_D) berechnet werden können:

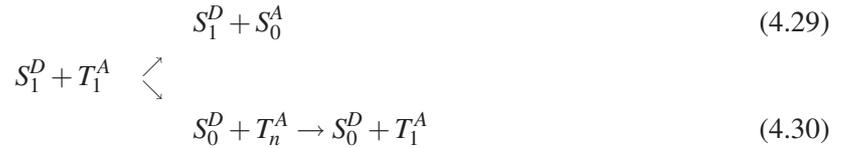
$$E_{ET} = \frac{F_A}{F_A + \gamma F_D}. \quad (4.28)$$

Der Faktor γ korrigiert die Unterschiede der Fluorophore bezüglich Detektionseffizienz und Quantenausbeute [36].

4.5.3 Singulett-Triplett-Annihilation

Neben FRET gibt es entsprechend den spektralen Eigenschaften des Donors und Akzeptors analoge Möglichkeiten des strahlungslosen Energietransfers, die über das gleiche Abstandsgesetz mit einem entsprechenden R_0^x beschrieben sind. Darunter zählen Singulett-Singulett-Annihilation (SSA), Singulett-Triplett-Annihilation (STA) und Triplett-Triplett-Annihilation (TTA) [62, 148, 71, 133].

Befindet sich der Donor im Singulettzustand S_1 und der Akzeptor im Triplettzustand T_1 , kann der Akzeptor entweder über den reversiblen ISC-Übergang zum Grundzustand zurückkehren (vgl. Gleichung 4.29) oder aber durch strahlungslosen Energietransfer die Anregungsenergie des Donors aufnehmen und einen höheren Triplettzustand besetzen [62] (vgl. Gleichung 4.30):



Letzteres wird auch als Singulett-Triplett Annihilation (STA) bezeichnet und hat zur Folge, dass bei vollständiger STA während der Triplettzeit des Akzeptors der Donor nicht fluoreszent ist. Zur Berechnung des Försterradius R_0^{STA} wird die Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum und dem Spektrum der Triplettabsorption benötigt.

Kapitel 5

Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie

5.1 Einzelmolekül-FRET Experimente

Nachdem Stryer und Haugland 1967 den Fluoreszenzresonanz-Energietransfer als ein Hilfsmittel zur Bestimmung relativer Abstände auf molekularer Ebene entdeckt hatten [144], entwickelte sich aus den anfänglichen Ensemblemessungen die Anwendung von FRET-Experimenten an einzelnen Molekülen (*Single Molecule FRET* oder kurz *smFRET*). Das Ziel war vor allem, Abstandsveränderungen zwischen zwei Fluorophoren frei diffundierender oder an Oberflächen gebundener Moleküle sichtbar zu machen. Bei genauer Kenntnis der physikalischen Eigenschaften der Farbstoffe sind auch absolute Abstände im Bereich von 20 – 100 Å bestimmbar. Anwendungen sind unter anderem Konformationen und Konformationsänderungen, Faltungs- und Entfaltungsprozesse und intermolekulare Wechselwirkungen [59, 26, 127, 126, 158, 35, 89, 100, 140, 45, 155, 170, 171].

Im Grunde gibt es zwei Ansätze für spektroskopische Einzelmolekülexperimente:

1. Die Aufnahme sehr vieler kurzer „Photos“ bzw. „Kurzfilme“ einzelner Moleküle hochverdünnter Proben, deren Dauer durch die Verweilzeit der Moleküle im Fokusbereich eingeschränkt wird. Hierzu muss über eine große Anzahl von einzelnen Molekülen gemittelt werden (siehe Abb. 5.1(a)).
2. Das „Filmen“ einzelner, auf Oberflächen immobilisierter Moleküle (direkter Kontakt oder über Verwendung diverser Linker). Die Länge dieser Messungen wird maßgeblich durch die photophysikalische Lebensdauer der Farbstoffe bestimmt (siehe Abb. 5.1(b))

5.2 Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie

Unter Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS) versteht man die Analyse von Intensitätsfluktuationen des Fluoreszenzsignals bezüglich ihrer zeitlichen Korrelationen [46, 120]. Charakteristische Abklingkurven der Korrelationsfunktion liefern Informationen bezüglich der Diffusionszeit von Fluorophoren, Triplettzuständen [165], Isomerisationen [168], Rotationsverhalten von Molekülen [164] sowie interne Dynamik [149].

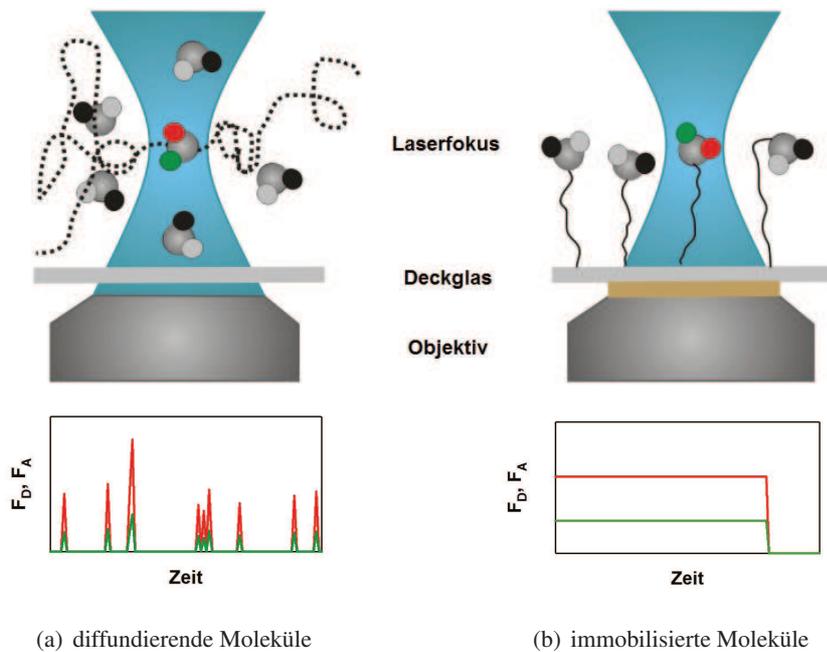


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Experimente an diffundierenden Molekülen in Lösung (a, oben) und auf dem Deckglas immobilisierten Molekülen (b, oben). Die dargestellten Moleküle sind mit einem Donor (grün) und einem Akzeptor (rot) markiert. Die zugehörigen Zeitspuren (unten) zeigen die Photonenbursts (a) bzw. die Fluoreszenz bis zum Photobleichen der Farbstoffe (b). Das konfokale Prinzip ermöglicht sehr kleine Anregungs- und Detektionsvolumina, so dass die Fluoreszenz von einzelnen im Laserfokus befindlichen Fluorophoren detektiert werden kann.

5.2.1 Korrelationsfunktion des Fluoreszenzsignals

Die zeitliche Korrelation der Fluoreszenzintensität $F(t)$ bei einer Korrelationszeit τ wird bestimmt durch den zeitlichen Mittelwert des Produktes $F(t) \cdot F(t + \tau)$ über die Messzeit T :

$$\langle F(t)F(t + \tau) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T dt F(t)F(t + \tau). \quad (5.1)$$

Die normierte Korrelationsfunktion $G(\tau)$ ist definiert durch:

$$G(\tau) := \frac{\langle F(t)F(t + \tau) \rangle}{\langle F \rangle^2}. \quad (5.2)$$

Jedoch sind für die Korrelationsfunktion nicht die mittlere Intensität, sondern vielmehr die Fluktuationen der Fluoreszenzemission $\delta F(t)$, d.h. die Abweichungen der Fluoreszenzintensität $F(t)$ von dem zeitlichen Mittelwert, ausschlaggebend: $F(t) = \delta F(t) + \langle F(t) \rangle$. Mit Hilfe dieser Beziehung kann $G(\tau)$ auch geschrieben werden als:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta F(0)\delta F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2}. \quad (5.3)$$

Die Amplitude der Korrelationsfunktion ist ein Maß für die relative Fluktuation. Kurze positive Intensitätsfluktuationen bewirken im Vergleich zu negativen Fluktuationen eine größere Amplitude der Korrelationsfunktion (siehe Abb. 5.2).

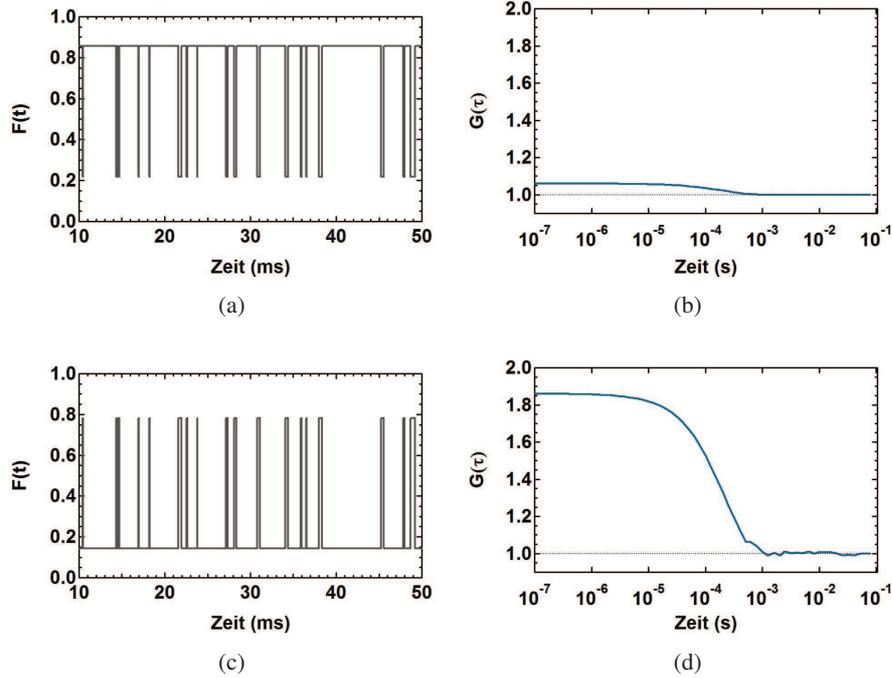


Abbildung 5.2: Zeitspuren der Fluoreszenz mit kurzzeitigen negativen (a) und positiven (c) Intensitätsschwankungen. Die zugehörigen Autokorrelationsfunktionen zeigen einen kleinen (b) bzw. einen großen (d) Korrelationsterm.

5.2.2 Diffusion

Eine der gebräuchlichsten Anwendungen der Korrelationsspektroskopie ist die Bestimmung der translationalen Diffusion. Sie erfolgt durch die konfokale Anregung einer Probe, welche frei diffundierende Fluorophore enthält. Aufgrund der Brown'schen Bewegung [141] bewegen sich diese frei und ungeordnet im gesamten Messvolumen und können dabei das Fokusbereich passieren (vgl. Abb. 5.1(a)). Während ihres Aufenthalts im Fokus (so genannte Diffusionszeit) werden sie angeregt und können Photonen emittieren. Diese Photonen werden auch als Photonenburst oder Photonenschauer bezeichnet. In verdünnten Lösungen, bei denen sich im Mittel wesentlich weniger als ein Molekül im Fokus befindet, ähnelt die aufgenommene Fluoreszenzzeitpur Abb. 5.2(c)).

Für ein konfokales Mikroskop gilt entsprechend der Gleichung 3.14 für $\delta F(t)$ bei konstanter Anregungsintensität:

$$\delta F(t) = \eta \int dr MDE(r) \delta C(r, t) \quad (5.4)$$

und ist somit bei konstanten photophysikalischen Eigenschaften nur von den Konzentrationsschwankungen der fluktuierenden Fluorophore im Fokus abhängig. Für die Korrelationsfunktion folgt daraus:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\eta^2 \int \int dr dr' MDE(r) MDE(r') \langle \delta C(r, 0) \delta C(r', \tau) \rangle}{|BC \int dr MDE(r)|^2} \quad (5.5)$$

mit r als Ort zum Zeitpunkt $t = 0$ und r' zum Zeitpunkt $t = \tau$. Die Funktion $MDE(r)$ beschreibt das Detektionsvolumen, welches von dem Anregungsvolumen und von den Sammeleigenschaften des Systems abhängt (siehe Gleichung 3.13).

Das Anregungsvolumen entspricht bei einem unterfüllten Objektiv mit einer dünnen Linse und niedriger Apertur einer Gaußverteilung in radialer und einer Lorentzverteilung in axialer Richtung (vgl. Gleichung 3.11).

Bei der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie werden Linsen mit hoher numerischer Apertur verwendet. Die Form des Anregungs- sowie Detektionsvolumens als dreidimensionale Gaußfunktion angenommen:

$$I_A(\rho, z) = I_0 \exp\left(-2\frac{\rho^2}{\omega_0^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{z_0^2}\right). \quad (5.6)$$

Dabei ist $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$ der Einheitsvektor für die radiale und z für die axiale Komponente, ω_0 die Strahltaile und z_0 die axiale Ausdehnung. Das Fokusvolumen ist durch die Ellipse mit:

$$I = I_0 e^{-2} \quad (5.7)$$

gegeben und beträgt

$$V_{Fokus} = \pi^{3/2} \omega_0^2 z_0. \quad (5.8)$$

Die Abweichung der Gaußfunktion von der realen axialen Intensitätsverteilung kann in Kauf genommen werden, da die Diffusionszeit hauptsächlich durch die laterale Fokausdehnung bestimmt wird. Bei sehr genauen Kalkulationen sollten diese Abweichungen jedoch berücksichtigt werden [69].

Für eine dreidimensionale Diffusion mit einem Diffusionskoeffizienten D gilt für die zeitliche Fluktuation der Konzentration im Fokusvolumen [46]:

$$\frac{\partial \delta C(r, \tau)}{\partial \tau} = D \nabla^2 \delta C(r, \tau). \quad (5.9)$$

Damit ist der Korrelationsterm:

$$\langle \delta C(r, 0) \delta C(r', \tau) \rangle = \bar{C} (4\pi D \tau)^{3/2} \exp\left(-\frac{|r - r'|^2}{4D\tau}\right) \quad (5.10)$$

und es folgt unter Verwendung des Volumens als dreidimensionales Gaußprofil:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \tau/\tau_D}\right) \left(\frac{1}{1 + S^2(\tau/\tau_D)}\right)^{1/2}, \quad (5.11)$$

wobei N die mittlere Anzahl der Moleküle im Fokusvolumen sind und:

$$\tau_D = \omega_0^2 / 4D \quad (5.12)$$

die charakteristische translaterale Diffusionszeit ist.

Soll der Diffusionskoeffizient berechnet werden, ist das Ergebnis von der genauen Kenntnis des Profils des Fokusvolumens und bei größeren Makromolekülen von der Form der diffundierenden Teilchen abhängig. Daher ist eine Referenzmessung an bekannten Molekülen zu empfehlen. Mit Messapparaturen, die zwei parallele Foki aufweisen, ist eine absolute Diffusionskonstante jedoch sehr genau zu bestimmen [37].

Die mittlere Teilchenzahl im Fokus ist das Produkt aus der Konzentration der Teilchen und dem effektiven Volumen V_{eff} , welches dem konfokalen Detektionsvolumen $V_{eff} = \int dr MDE(r)$ entspricht. Der Strukturfaktor S beschreibt das Verhältnis zwischen der axialen und der lateralen Fokusaussdehnung ω_0/z_0 . Die Amplitude der Korrelationsfunktion ergibt sich aus der Poisson-Statistik mit:

$$G(0) - 1 = \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle}. \quad (5.13)$$

Die molekulare Helligkeit η ist die mittlere Photonenemission pro Sekunde und Molekül (vgl. Gleichung 3.15). Sie lässt sich direkt aus der Amplitude und der mittleren Zählrate, die der detektierten Fluoreszenzintensität in Photonen pro Sekunde entspricht, bestimmen [87, 23]:

$$\eta = A \langle F \rangle / \langle N \rangle. \quad (5.14)$$

Dabei beinhaltet A Faktoren und Korrekturen bezüglich der Anregungswahrscheinlichkeit, Quantenausbeute, Detektionseffizienz usw.

Für Messungen, bei denen die Hintergrundfluoreszenz F_{BG} nicht vernachlässigt werden kann, ist die Amplitude verkleinert. N wird aus der scheinbaren mittleren Anzahl der Moleküle im Fokus N' über die Gleichung berechnet [32]:

$$N = N' / \left(1 + \frac{\langle F_{BG} \rangle}{\langle F_{gesamt} \rangle} \right)^2 \quad (5.15)$$

5.2.3 Diffusion in einem vom Gaußprofil abweichenden Fokusvolumen

Eine genaue Kenntnis der Geometrie des Fokusvolumens ist besonders für die Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie von großer Bedeutung. Um eine aussagekräftige Interpretation der Korrelationskurven zu gewährleisten, müssen die Annahmen, die zur Beschreibung der Geometrie verwendet wurden, stets kritisch geprüft werden. Denn gerade das konfokale Volumen ist extrem sensibel gegenüber einer genauen Justage der Apparatur, den verwendeten optischen Elementen und Fluoreszenzeigenschaften des zu untersuchenden Systems [50, 69]:

1. Einfluss optischer Elemente/Systemkomponenten:

- Ausdehnung des Anregungsstrahls in Bezug auf den Durchmesser des Objektivs
- Objektiv (Immersionsart, spektrale Abhängigkeiten der Sammeleffizienz,)
- Dicke des Deckglases bzw. Einstellung des Korrekturrings am Objektiv
- polarisations- und wellenlängenabhängige Transmissionsunterschiede einzelner Komponenten
- Durchmesser und Lage der verwendeten Lochblende
- Detektoreigenschaften: Quanteneffizienz, Sättigung

2. Systembedingte Abweichungen:

- Hintergrund (Rayleigh- bzw. Ramanstreuung des Mediums)
- Messtiefe, bei Brechzahlunterschieden
- Polarisation
- Brechzahl des Mediums
- Fluoreszenzsättigung: z.B. durch Triplettzustände, Isomerisationen
- Ionisation und Fotodestruktion der Fluorophore
- Größe der untersuchten Objekte in Bezug auf Fokausdehnung

Weicht das Fokusvolumen vom Gaußvolumen ab, kann die veränderte Form des diffusiven Abfalls durch die Einführung eines weiteren Parameters β , der die Abweichung vom gaußförmigen Volumen charakterisiert, korrigiert werden. Dieser Faktor wurde unter anderem auch für die Beschreibung der anomalen Diffusion langer Polymerketten verwendet [98].

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + (\tau/\tau_D)^\beta} \right) \left(\frac{1}{1 + S^2(\tau/\tau_D)^\beta} \right)^{1/2}. \quad (5.16)$$

5.2.4 Triplettodynamik

Werden neben Singulettzuständen ($\tau_F \sim 1$ ns) auch Triplettzustände besetzt, entstehen auf der Zeitskala der Triplettlebensdauer je nach Besetzungswahrscheinlichkeit zusätzliche Fluktuationen der Fluoreszenzintensität während des Durchquerens des Detektionsvolumens. Das verursacht einen weiteren korrelierten Term in den Korrelationsfunktionen, der durch die Triplettzeit τ_T charakterisiert ist (siehe Abb. 5.3).

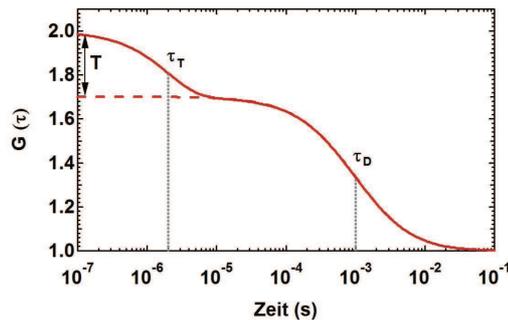


Abbildung 5.3: Korrelationsfunktion der Fluoreszenz eines Fluorophors unter Besetzung von Triplettzuständen (rot, durchgezogene Linie) in einer halb-logarithmischen Darstellung. Der Triplettanteil T beschreibt den prozentualen Anteil der Moleküle, die sich im Triplettzustand befinden. Die Triplettkinetik wird durch die Triplettzeit τ_T und die Diffusion durch die Diffusionszeit τ_D charakterisiert.

Unter der Bedingung, dass eine zeitliche Separation der Triplettodynamik von der Diffusion möglich ist, kann für die Korrelationsfunktion folgende Gleichung hergeleitet werden [165]:

$$G(\tau) = \frac{1}{N(1 - T_1^G)} \left(\frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \right) \left(\frac{1}{1 + S^2(\tau/\tau_D)} \right)^{1/2} (1 - T_1^G + T_1^G \exp(-\tau/\tau_T)). \quad (5.17)$$

Dabei ist T_1^G die Fraktion der diffundierenden Moleküle im Triplettzustand und τ_T die Triplettzeit. Für die Triplettzeit und den Triplettanteil gilt weiterhin (vgl. Abschnitt 4.2):

$$1/\tau_T = k_{risc} + \frac{\sigma_a \langle I \rangle k_{isc}}{k_{10} + \sigma_a \langle I \rangle} \quad \text{sowie} \quad (5.18)$$

$$T_1^G = \frac{\sigma_a \langle I \rangle k_{isc}}{\sigma_a \langle I \rangle (k_{risc} + k_{isc}) + k_{10} k_{risc}}. \quad (5.19)$$

Die Annahme der zeitlichen Separation der Diffusion und Triplettodynamik bedeutet, dass während der Triplettübergänge das Molekül als stationär angesehen und im Zeitbereich der Diffusion die Singulett-Triplett-Zustände als im Gleichgewicht angenommen werden. Des Weiteren müssen die folgenden Bedingungen erfüllt sein, um die Gültigkeit der Gleichungen zu gewährleisten [165]:

- Vernachlässigung der thermischen Relaxation (ps-Bereich)
- Vernachlässigung des Absorptionsquerschnitts höherer Singulettzustände und Übergänge höherer Singulettzustände zum ersten angeregten Singulettzustand (Subpikosekunden-Bereich)
- keine Übergänge vom ersten Singulett- bzw. niedrigsten Triplettzustand zu Singulett- oder Triplettzuständen höherer Ordnung
- Vernachlässigung von stimulierter Emission
- Vernachlässigung von Triplett-Triplett Absorption
- isotrope Strahlung aufgrund einer Rotation der Fluorophore im Subnanosekundenbereich
- Der Triplettzustand wird als nichtfluoreszenter Zustand aufgefasst, da die Quantenausbeute des Triplets sehr niedrig und die Triplettlebensdauer sehr groß im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer ist.
- Die photochemische Lebensdauer des Farbstoffmoleküls ist erheblich größer als die Lebensdauer angeregter Zustände (keine Photobleichprozesse).

5.2.5 Fluoreszenzsättigung

Liegen die Anregungsraten in dem Bereich der Fluoreszenzsättigung (siehe Abschnitt 4.3.3), tritt in der Korrelationsfunktion neben dem Triplettanteil auch eine scheinbare Vergrößerung des Fokusvolumens auf (vgl. Abb. 5.3).

Dieser Effekt wurde bereits vielfach untersucht [15, 50, 58, 111, 106] und ist darauf zurückzuführen, dass eine auch schon teilweise Sättigung des Fluoreszenzsignals die Form des Detektionsvolumens ändert (vgl. Gleichung 3.13). Der Grund dafür ist, dass das diffundierende Farbstoffmolekül entsprechend des Anregungsprofils an jedem Ort eine andere Photonenflussdichte und folglich eine andere Anregungsrate erfährt (siehe Gleichung 4.3). Daher ist im Zentrum des Fokus die Sättigung größer als in peripheren Bereichen, so dass das Profil der Emission bei zunehmender Anregungsintensität einer abgeflachten Exponentialfunktion entspricht [15] (siehe Abb. 5.4).

In den Korrelationsfunktionen folgt daraus neben einer Vergrößerung der Diffusionszeit auch eine Zunahme der mittleren Anzahl der Moleküle im Fokus [31] und verhindert eine Berechnung der molekularen Helligkeit entsprechend der Gleichung 5.14.

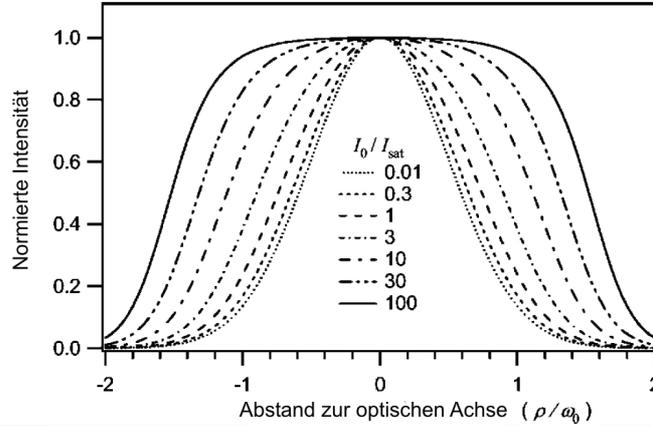


Abbildung 5.4: Das Fokusprofil des Detektionsvolumens bei unterschiedlichen Anregungsleistungen I_0 relativ zur Sättigungsintensität. Entnommen aus [106].

5.3 Fluoreszenz-Kreuzkorrelationspektroskopie

Ähnlich der Korrelation einer Zeitspur mit sich selbst (Autokorrelation) können auch zwei unterschiedliche Zeitspuren miteinander korreliert werden (Kreuzkorrelation). Unterscheiden sie sich z.B. im Emissionsspektrum oder in der Polarisationssebene, können die Zeitspuren auf dynamische Änderungen dieser Eigenschaften hin untersucht werden [163].

Die Kreuzkorrelation in der FCCS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) wird analog zu Gleichung 5.5 berechnet und ist gegeben durch [129]:

$$G_{12}(\tau) = 1 + \frac{\eta^2 \int \int dr dr' MDE_1(r) MDE_2(r') \langle \delta C_1(r, 0) \delta C_2(r', \tau) \rangle}{B_1 C_1 B_2 C_2 \int dr MDE_1(r) MDE_2(r)}. \quad (5.20)$$

Es ist wichtig zu erwähnen, dass der Informationsgehalt der Kreuzkorrelationsfunktion von dem der Autokorrelation abweicht. Während eine positive Amplitude darüber Auskunft gibt, dass diese Fluktuationen gleichgerichtet (*korreliert*) stattfinden, zeigt eine negative Amplitude entgegengesetzte (*antikorrelierte*) Intensitätsänderungen auf (vgl. Abb. 5.5). Die Amplitude wird hierbei von der Dauer der Zustände hoher und niedriger Intensitäten und den Amplituden der Fluktuationen bestimmt [121]. Bleibt ein Signal konstant, während dem sich das andere ändert, wird die Kreuzkorrelationsfunktion nicht beeinflusst.

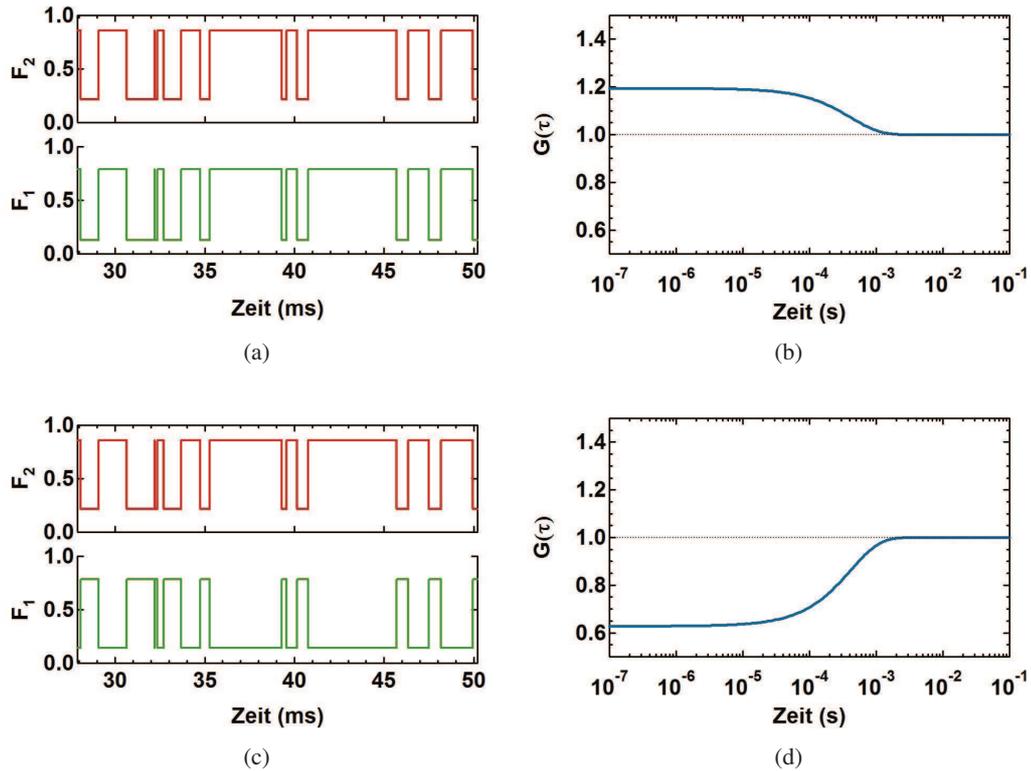


Abbildung 5.5: Zeitspuren der Fluoreszenz zweier Fluorophore bei kollektiven (a) und entgegengesetzten (c) Intensitätsschwankungen. Die zugehörige Kreuzkorrelationsfunktion zeigt einen korrelierten (b) bzw. einen antikorrelierten (d) Term.

5.3.1 Afterpulsing der Detektoren

Nach jedem detektierten Fluoreszenzphoton besteht durch eine Rückkopplung des Detektors die Wahrscheinlichkeit ein zweites, „virtuelles“ Photon zu detektieren. Dieses Phänomen wird auch als „Afterpulse“ bezeichnet und hängt von dem Material der Detektoren und von den Bedingungen der Umgebung ab [99]. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieser Photonen sinkt exponentiell zur Ankunftszeit des detektierten Photons und spielt vor allem bei geringen Zählraten eine Rolle.

In der Autokorrelation äußern sich diese Photonen durch einen zusätzlichen Korrelationsterm im Bereich von $5 \mu\text{s}$, der die Gewinnung von Informationen über Fluoreszenzfluktuationen in diesem Zeitbereich verhindert. Da die virtuellen Photonen zweier Detektoren jedoch nicht korreliert sind, tritt in der Kreuzkorrelation des Signals beider Detektoren kein zusätzlicher Term auf.

Dies kann genutzt werden, indem das Fluoreszenzsignal aufgetrennt und beide Detektionskanäle miteinander korreliert werden. In Abb. 5.6 ist die Auto- und Pseudo-Autokorrelationsfunktion von Alexa-Fluor 633 bei niedriger Anregungsleistung dargestellt. Der Nachteil der Trennung des Signals ist das verschlechterte Signal-Rausch-Verhältnis. So wurden auch andere Methoden entwickelt, um den Anteil der virtuellen Photonen zu eliminieren (z.B. [49, 80]). Auf sie soll an dieser Stelle aber nicht genauer eingegangen werden.

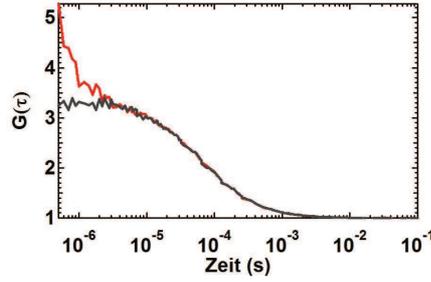


Abbildung 5.6: Auto- und Pseudo-Autokorrelationsfunktion (rot bzw. grau) von AlexaFluor 633 bei Anregung mit $2 \mu\text{W}$.

5.3.2 FRET und Diffusion

Sind Moleküle mit einem FRET-Paar markiert, beschreibt die Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion analog zu Gleichung 5.13 die mittlere Anzahl der Moleküle im Fokus, die einen Energietransfer vom Donor D zum Akzeptor A zeigen [129]:

$$G_{DA}(0) - 1 = \frac{\eta_{DA} \langle C_{DA} \rangle}{V_{eff} (\eta_D \langle C_D \rangle + \eta_{DA} \langle C_{DA} \rangle)^2} \quad (5.21)$$

mit $\langle C_{ij} \rangle$ als zeitliches Mittel der Konzentrationen der Moleküle mit gebundenen Fluorophoren, deren Fluoreszenz im Kanal i bzw. j detektiert wird und η_{ij} , den zugehörigen molekularen Helligkeiten. Dies gilt, sofern keine Triplettkinetik vorhanden ist und keine Abstandsänderungen zwischen den Fluorophoren auftreten.

Bei Anregung des Donors D und eines Energietransfers zum Akzeptor A beträgt für die Kreuzkorrelation der Detektionskanäle des Donors und des Akzeptors die Amplitude. Das effektive Volumen V_{eff} und daher auch die Diffusionszeit berechnet sich aus dem Mittelwert der beiden Detektionsvolumina:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} (\omega_{0,D}^2 + \omega_{0,A}^2) (\omega_{z,D}^2 + \omega_{z,A}^2)^{1/2} / 2^{3/2}. \quad (5.22)$$

Die gemittelte Diffusionszeit beträgt demzufolge:

$$\tau_D = (\omega_{0,D}^2 + \omega_{0,A}^2) / (4D \cdot 2). \quad (5.23)$$

5.3.3 FRET und interne Dynamik

Ist ein Molekül mit einem Donor- und einem Akzeptorfluorophor versehen und treten während der Beobachtungszeit im Fokus relative Abstandsänderungen auf, so ändert sich die Fluoreszenzemission des Donor- bzw. Akzeptormoleküls entsprechend der Gleichungen 4.26 und 4.28.

Da sich in diesem Falle die Donor- und Akzeptorintensitäten in entgegengesetzte Richtungen ändern, führt dies zu einer Antikorrelation (siehe Abb. 5.5(c) und (d)). Dieser Term gibt Auskunft über die Dynamik der Abstandsänderung [100].

Im Fall von zwei Konformationszuständen (1) und (2) mit den Energietransfereffizienzen E_1 und E_2 und

den Raten k_{12} und k_{21} :



gelten für die Intensitätsfluktuationen des Donors bzw. Akzeptors entsprechend Gleichung 5.4:

$$\delta F_i^{D,A}(t) = \eta_i^{D,A} \int dr MDE(r) \delta C_i(r, t). \quad (5.25)$$

Die molekulare Helligkeit des Donors η^D und des Akzeptors η^A wird hierbei durch die Energietransfereffizienzen des jeweiligen Zustands bestimmt. Es besteht der Zusammenhang:

$$\eta_{1,2}^D = g^D \varepsilon^D Q^D (1 - E_{1,2}) \quad (5.26)$$

$$\eta_{1,2}^A = g^A \varepsilon^D Q^A E_{1,2}. \quad (5.27)$$

Der Parameter g beschreibt die Detektionseffizienz und Q die Quantenausbeute des Donors D bzw. des Akzeptors A . ε^D ist der Extinktionskoeffizient des Donors.

Entsprechend Gleichung 5.9 entsteht für dieses System das Differentialgleichungssystem [46]:

$$\frac{\partial \delta C_l(r, \tau)}{\partial \tau} = \sum_k^m M_{lk} \delta C_k(r, \tau) \quad l, k = 1, 2 \quad (5.28)$$

mit der Transfermatrix $M_{lk} = D_l \nabla^2 \delta_{lk} + T_{lk}$. Die Elemente der Matrix T_{lk} bestehen aus den jeweiligen Raten zwischen den Zuständen und den Diffusionskonstanten D_l . Im Fall von interner Konformationsänderung, bei der eine Änderung des hydrodynamischen Radius vernachlässigbar ist, können die jeweiligen Diffusionskonstanten durch D ersetzt werden:

$$\mathbb{M} = \begin{pmatrix} D\nabla^2 - k_{12} & k_{21} \\ k_{12} & D\nabla^2 - k_{21} \end{pmatrix}. \quad (5.29)$$

Wird weiterhin von der Möglichkeit der Separation des diffusiven Anteils von der internen Dynamik ausgegangen, so dass gilt:

$$G^{xy}(\tau) = 1 + G_{Diff}(\tau) G_{Dyn}^{xy}(\tau), \quad (5.30)$$

sind aus den Eigenwerten und Eigenvektoren von \mathbb{M} die Korrelationsfunktionen der Dynamik $G_{Dyn}^{xy}(\tau)$ erhältlich [46]. Für sie gilt nach der Normierung $\lim_{\tau \rightarrow \infty} G_{Dyn}^{xy}(\tau) = 1$ [149]:

$$G_{Dyn}^{xy} = 1 + \frac{f_1 f_2 (\eta_2^x / \eta_1^x - 1) (\eta_2^y / \eta_1^y - 1)}{(f_1 + f_2 \eta_2^x / \eta_1^x) (f_1 + f_2 \eta_2^y / \eta_1^y)} e^{-(k_{12} + k_{21})\tau}. \quad (5.31)$$

Die Fraktionen $f_1 = k_{12}/(k_{12} + k_{21})$ und $f_2 = k_{21}/(k_{12} + k_{21})$ beschreiben hierbei die Population der verschiedenen Konformationen. Wird dieser Zusammenhang verwendet, folgt für die Auto- und Kreuz-

korrelationen:

$$G_{Dyn}^{DD}(\tau) = 1 + \frac{k_{12}k_{21}(E_1 - E_2)^2}{[k_{21}(1 - E_1) + k_{12}(1 - E_2)]^2} e^{-(k_{12}+k_{21})\tau}, \quad (5.32)$$

$$G_{Dyn}^{AA}(\tau) = 1 + \frac{k_{12}k_{21}(E_1 - E_2)^2}{(k_{21}E_1 + k_{12}E_2)^2} e^{-(k_{12}+k_{21})\tau} \quad \text{und} \quad (5.33)$$

$$G_{Dyn}^{DA}(\tau) = 1 - \frac{k_{12}k_{21}(E_1 - E_2)^2}{[k_{21}(1 - E_1) + k_{12}(1 - E_2)](k_{21}E_1 + k_{12}E_2)} e^{-(k_{12}+k_{21})\tau}. \quad (5.34)$$

Das Ergebnis zeigt, dass der zusätzlich auftretende antikorrelierte bzw. korrelierte Term als exponentieller Abfall die Gesamtrate der Kinetik beinhaltet und nicht durch die Effizienzen des Energietransfers beeinflusst wird. Die Amplitude der Funktion dagegen enthält die Energietransfereffizienzen beider Zustände sowie die Raten.

Werden Quotienten, wie z.B. $G^{DD}(\tau)/G^{DA}(\tau)$ gebildet, kann mit Hilfe dieses Ergebnisses die interne Dynamik auch ohne Kenntnis der Funktion des diffusiven Terms bestimmt werden. Einflüsse durch zusätzliche Prozesse wie z. B. die Triplettkinetik werden hierbei jedoch nicht berücksichtigt.

Kapitel 6

Messsystem

6.1 Messapparatur

Alle Messungen wurden an einem selbstgebauten konfokalen Rastermikroskop durchgeführt, dessen Aufbau in Abb. 6.1 schematisch dargestellt ist.

Die Anregung konnte wahlweise mit verschiedenen Lasern und auch Laserkombinationen erfolgen (siehe Abschnitt 6.2). Das Strahlenbündel, welches aus einem Laserstrahl oder aus zwei mittels dichroischer Spiegel übereinandergelegten Laserstrahlen bestand, wurde zur Erzeugung einer Punktquelle über einen Laserstrahl-Koppler (60 SMS, Schäfer & Kirchhoff) in eine polarisationserhaltende Einzelmodenfasern (Schäfer & Kirchhoff) eingekoppelt. Die Polarisation konnte zuvor über ein $\lambda/2$ - bzw. $\lambda/4$ -Phasenplättchen (Melles Griot) eingestellt werden. Ein Analysator zur Kontrolle der Polarisation sowie ein Leistungsmessgerät konnten bei Bedarf direkt vor dem Objektiv in den Strahlengang gestellt werden.

Die Kollimation des divergenten Strahlenbündels nach der Auskopplung erfolgte mittels eines ersten Objektivs ($4\times$, UPlan Apochromat, 0,16 NA, Olympus), um chromatische Aberration, speziell bei Mehrfarbenexperimenten, zu vermindern. Eine Lochblende gewährleistete eine optimale Breite für den Gaußstrahl, um eine Über- oder Unterfüllung des Messobjektivs zu verhindern [69].

Nach Reflexion an einem multichromatischen Strahlteiler (z405/470/633, Chroma) wurde der Laserstrahl in die rückseitige Apertur des Mikroskopobjektivs (siehe Abschnitt 6.4) eingekoppelt und in die Probe fokussiert. Dabei ermöglichte eine x-y-Scaneinheit eine laterale Veränderung der Probenposition und ein Piezo-Aktuator die Verschiebung des Objektivs entlang der optischen Achse.

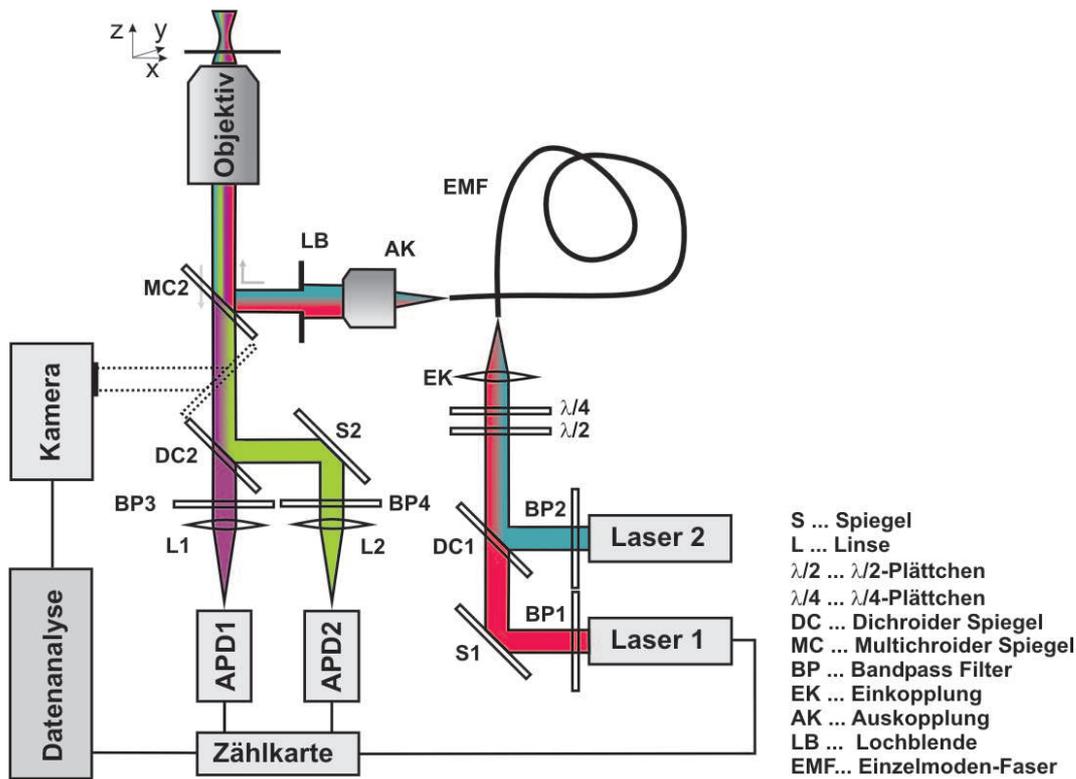


Abbildung 6.1: Schematischer Aufbau der Messapparatur.

Die im Fokus entstandene Fluoreszenz wurde nun durch dasselbe Objektiv, das auch zur Anregung verwendet wurde, gesammelt und gelangte als Parallelstrahl erneut zum multichroischen Strahlteiler. Aufgrund der Stokes-Verschiebung konnte das Fluoreszenzlicht diesen passieren und wurde anschließend nach gewünschten Eigenschaften aufgetrennt, bevor es auf die Detektoren fokussiert wurde. Falls benötigt konnte der Detektionsstrahl an dieser Stelle auch auf eine EMCCD-Kamera (C9100-02, Hamamatsu Photonics) umgelenkt werden.

Entsprechend der durchgeführten Experimente wurden zur Auftrennung des Strahls ein 50/50 Strahlteiler (03 BSC, Melles Griot), ein polarisierender Strahlteiler (03 PBB, Melles Griot) oder verschiedene dichroische Strahlteiler verwendet. Vor bzw. nach dem Strahlteiler wurden geeignete Bandpassfilter oder Langpassfilter positioniert, um das Streulicht der Anregung, das Fluoreszenzlicht anderer Fluorophore und die Ramanstreuung von Wasser zu unterdrücken (siehe Abschnitt 6.7).

Anschließend wurden die Strahlenbündel über achromatische Sammellinsen auf hochempfindliche Avalanche Photodioden (SPCM AQ14, Perkin-Elmer, siehe Abschnitt 6.5) fokussiert, wobei die aktiven Detektoroberflächen mit einem Durchmesser von 175 μm als Lochblenden zur räumlichen Filterung des Fokusvolumens dienten (vgl. Abschnitt 3.2).

Die von der Zählkarte (TimeHarp200, Picoquant) registrierten Pulse der Detektoren wurden im TTTR-Format in eine Datei ausgeschrieben (siehe Abschnitt 6.6).

Das gesamte Mikroskop wurde mittels eines programmierbaren Systems zur Steuerung digitaler Signale (ADWin Gold, Jäger) und einer selbst geschriebenen Software (LabView, National Instruments) bedient.

6.2 Laser

Dauerstrichlaser

Für die Wellenlänge von 488 nm wurde ein frequenzverdoppelter Diodenlaser (Protera, Novalux) verwendet. Er enthielt einen internen Kreislauf zur Leistungsstabilisierung. Für die Wellenlänge von 633 nm wurde ein Helium-Neon Gaslaser (JDS Uniphase) verwendet.

Gepulste Laser

Die Anregung bei 470 nm bzw. 635 nm erfolgte durch Diodenlaser (LDH-P-C-470 bzw. LDH-P-635, Picoquant) mit einer Pulsbreite von weniger als 500 ps. Mit der Steuerungseinheit (PD 808, Picoquant) konnten die Leistung sowie die Pulsfrequenz im Bereich von 2 - 40 MHz eingestellt werden. Die Laserwellenlängen wurden mittels Bandpassfilter (470/10 bzw. 635/10, Chroma) auf eine spektrale Breite von 10 nm begrenzt.

6.3 Scantisch

Zum Scannen der x-y-Ebene wurde ein durch Piezoelemente gesteuerter Scantisch (P-734, Physik-Instrumente) verwendet, mit dem die Probe relativ zum Objektiv bewegt werden konnte. Bewegungen in der axialen Richtung wurden durch Änderung der vertikalen Position des Objektivs über eine ebenfalls durch Piezoelemente gesteuerte Einheit (PiFoc, Physik-Instrumente) erreicht. Über geschlossene Regelkreise der Piezokristalle konnte auf diese Weise innerhalb eines Volumens von $100 \times 100 \times 100 \text{ } (\mu\text{m})^3$ eine im Nanometerbereich präzise und beliebig oft reproduzierbare Positionierung gewährleistet werden.

6.4 Objektive

Die Messungen wurden mit einem Wasserimmersionsobjektiv (Nikon CFI Plan Apochromat 60×1.2) und einem Ölimmersionsobjektiv (Nikon, CFI Plan Apochromat 100×1.4) durchgeführt.

Sammeleffizienzen

Die Sammeleffizienz eines Objektivs beschreibt den Anteil der Photonen einer isotropen Punktquelle im Detektionsvolumen, der über die Linse des Objektivs gesammelt werden kann [47]. Sie entspricht dem auf 4π bezogenen Raumwinkel Ω der Detektion mit

$$\Omega = 2\pi(1 - \cos\vartheta). \quad (6.1)$$

Der halbe Öffnungswinkel ϑ des Objektivs ist der maximale Winkel relativ zur optischen Achse, unter dem noch Photonen in das Objektiv gelangen können. Er hängt von der numerischen Apertur des Objektivs NA und der Brechzahl des Immersionsmediums n ab (Gleichung 3.1). Für das Ölimmersionsobjektiv

($n = 1,515$, $NA = 1,4$) ist demnach der halbe Öffnungswinkel $\vartheta_{\text{Öl}} = 68^\circ$ und für das Wasserimmersionsobjektiv ($n = 1,33$, $NA = 1,2$) $\vartheta_{\text{Wasser}} = 64^\circ$. Dies zeigt, dass die Sammeleffizienzen Y

$$Y = \Omega/4\pi = (1 - \cos\vartheta)/2 \quad (6.2)$$

mit 31% bzw. 28% für beide Objektive vergleichbar sind.

Vergleich der Objektive und ihre Verwendung

Für Messungen in wässrigen Lösungen mit größeren Abständen zur Deckglasoberfläche ist das Wasserimmersionsobjektiv aufgrund der Übereinstimmung der Brechzahlen zwischen Immersion und Medium bestens geeignet. Wichtig ist dabei die Korrektur der Deckglasdicke mit dem am Objektiv befindlichen Korrekturring. In Abb. 6.2 ist die Abhängigkeit der molekularen Helligkeit und der mittleren Teilchenanzahl im Fokus bei verschiedenen Einstellungen dargestellt.

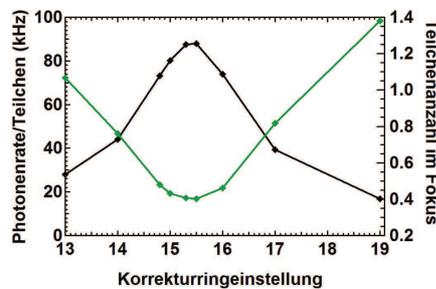


Abbildung 6.2: Einfluss der Stellung des Korrekturrings am Wasserimmersionsobjektiv auf die gemessene Fluoreszenz (schwarz) von Tetraspeck-Latexkügelchen bzw. die Teilchenanzahl im Fokus (grün).

Wird das Ölimmersionsobjektiv für Experimente in wässriger Lösung verwendet, führt der Brechzahlunterschied zu einer sphärischen Aberration. Sie nimmt in Abhängigkeit vom der numerischen Apertur und der Messtiefe zu. Neben einer Abnahme der räumlichen Auflösung und einer axialen Verschiebung des Fokus führt es zu nicht geringen Verlusten des Fluoreszenzsignals [63, 20]. In Abb. 6.3 ist die Tiefenabhängigkeit der Fluoreszenz für das Öl- und das Wasserimmersionsobjektiv vergleichend dargestellt. Deutlich ist beim Ölimmersionsobjektiv für beide Wellenlängen (488 und 635 nm) die starke Abnahme

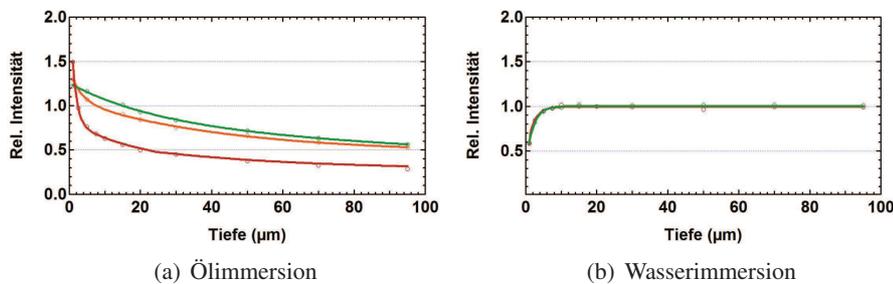


Abbildung 6.3: Tiefenabhängigkeit der Fluoreszenz für das Öl- (a) bzw. Wasserimmersionsobjektiv (b), gemessen an einer konzentrierten Moleküllösung (1 µM), die mit AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 gelabelt war. Die Anregung für AlexaFluor 488 erfolgte bei 488 nm (grün) bzw. für AlexaFluor 633 bei 635 nm (rot). Die Intensität von AlexaFluor 633 nach FRET ist orange dargestellt. Die Kurven wurden jeweils auf die Fluoreszenz des Wasserobjektivs in einer Tiefe von 20 µm normiert.

der Fluoreszenz zu erkennen. Das Wasserimmersionsobjektiv dagegen weist ab $10\ \mu\text{m}$ keine Veränderungen mehr auf. Der Abfall der Intensität in Deckglasnähe entsteht aufgrund der Verkleinerung des Messvolumens, wenn sich das Deckglas innerhalb des Fokusbereichs befindet. Werden die Ergebnisse zwischen Donor- und Akzeptoremission unter FRET verglichen, zeigt sich beim Wasserimmersionsobjektiv in $20\ \mu\text{m}$ Tiefe eine um 5% bessere Sammeleffizienz im roten Spektralbereich.

In Deckglasnähe zeigt das Ölimmersionsobjektiv jedoch aufgrund der höheren Apertur auch in wässrigen Lösungen eine bessere laterale Auflösung r^{konf} (vgl. Gleichung 3.8) und ist demnach für Messungen an immobilisierten Objekten sowie zur Justage der Messapparatur besser geeignet.

6.5 Detektoren

Als Detektoren wurden Avalanche Photodioden (APD, SPCM AQ14, Perkin-Elmer) verwendet. Sie zeichnen sich durch einen extrem niedrigen Dunkelstrom ($< 100\ \text{s}^{-1}$) aus und können für den gesamten sichtbaren und NIR Spektralbereich eingesetzt werden (400 – 1060 nm).

6.6 Datenformate und Datenverarbeitung

Die Ankunftszeiten der einzelnen detektierten Photonen wurden im TTTR-Format (*Time Tag Time Resolved*) gespeichert (siehe Abb. 6.4). Dieses enthält die Informationen über

1. die Ankunftszeit (globale Zeit), gemessen vom Start des Experiments mit einer Auflösung von 100 ns,
2. die TCSPC-Zeit (*Time Correlated Single Photon Counting*), welche in einem umgekehrten Start-Stop Modus die Ankunftszeit in Bezug zu das Triggersignal des Laserpulses enthält (Zeitauflösung: 35 ps), sowie
3. den Detektionskanal.

Die Daten wurden mit dem Programm Igor 6.0 (Wavemetrics) eingelesen, weiterverarbeitet und analysiert.

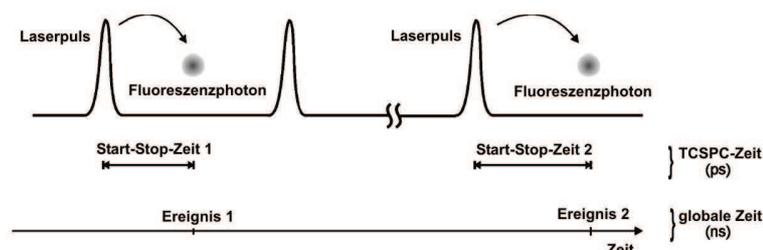


Abbildung 6.4: Für jedes registrierte Photon wurden zwei Zeiten, zum einen die TCSPC-Zeit in Bezug auf den Laserpuls und zum anderen eine globale Ankunftszeit in Bezug auf den Messstart gespeichert. Entnommen aus [12].

6.7 Verwendete Fluorophore und Filter

Für die Untersuchung der Adenylatkinase wurde diese mit einem Donor- und einem Akzeptorfluorophor versehen. Auf photophysikalische Eigenschaften der gebundenen Farbstoffe wird im Kapitel 7 detailliert eingegangen.

AlexaFluor 488

Als Donormolekül wurde das AlexaFluor 488-maleimide (Molecular Probes) verwendet. Die Fluoreszenzlebensdauer wird vom Hersteller in einem Puffer mit pH 7,4 bei 20°C mit 4,1 ns angegeben, der Extinktionskoeffizient bei 494 nm mit $73.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Die Struktur ist in Abb. 6.5 dargestellt.

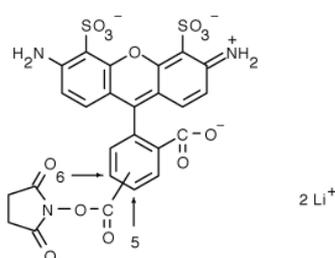


Abbildung 6.5: Chemische Struktur von AlexaFluor 488 maleimide.

AlexaFluor 488 kann bei den Wellenlängen 488 nm sowie 470 nm angeregt werden, wobei bei der letzteren die Extinktion nur 50% der maximal möglichen beträgt. Zur Detektion des Farbstoffes wurde ein Bandpassfilter 532/70 (HQ532/70, Chroma) für den Bereich zwischen 500 und 570 nm gewählt (siehe Abb. 6.6). So kann im kurzwelligeren Bereich das Streulicht des Anregungsstrahls und bei Anregung mit 488 nm im langwelligeren Bereich das Ramanlicht von Wasser effektiv vermieden werden. Das Ramanlicht liegt bei einer Anregung bei 488 nm zwischen 570 und 588 nm und bei 470 nm zwischen 547 nm und 563 nm.

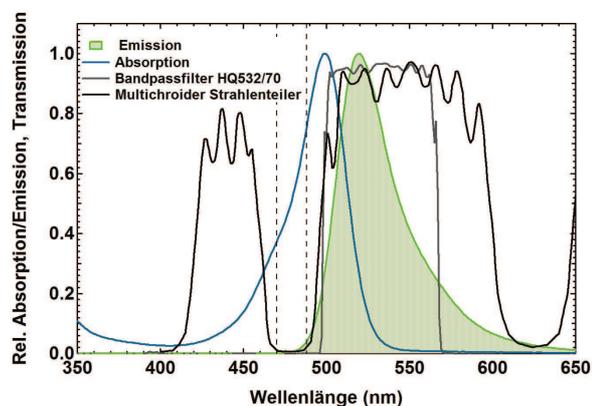


Abbildung 6.6: Die spektrale Absorption (blau) und Emission (grün) von AlexaFluor 488 zusammen mit dem verwendeten Bandpassfilter (grau) und dem multichroiden Strahlteiler (schwarz). Die Wellenlängen 470 nm bzw. 488 nm, welche zur Anregung des Farbstoffs verwendet wurden, sind als gestrichelte Linien angedeutet.

Die verwendeten Filter und Strahlteiler sowie die Detektionseffizienz der Detektoren verringern die durch das Objektiv gesammelte Fluoreszenz um 62%. Wird die Sammeffizienz des Objektivs mit 30% berücksichtigt (siehe Abschnitt 6.4), werden bei optimaler Einstellung 12% der emittierten Photonen detektiert.

AlexaFluor 633

AlexaFluor 633-maleimide (Molecular Probes) wurde als Akzeptor verwendet. Die Fluoreszenzlebensdauer wird vom Hersteller mit 3,2 ns in Wasser bei 20°C und der Extinktionskoeffizient bei 632 nm mit $100.000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angegeben. Die chemische Struktur ist nicht veröffentlicht.

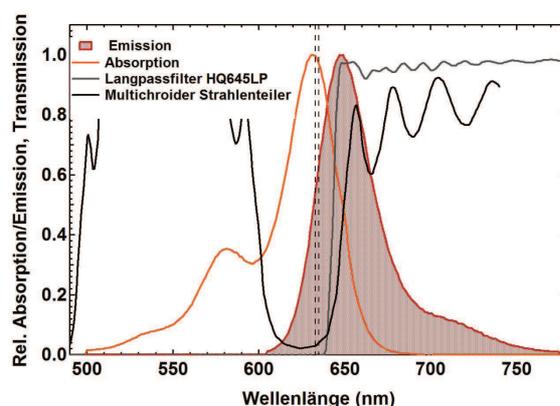


Abbildung 6.7: Die spektrale Absorption (orange) und Emission (rot) von AlexaFluor 633 zusammen mit dem verwendeten Bandpassfilter (grau) und dem multichroiden Strahlteiler (schwarz). Die Wellenlängen 633 nm bzw. 635 nm, welche zur Anregung des Farbstoffes verwendet wurden, sind als gestrichelte Linien angedeutet.

Zur Detektion der Fluoreszenz bei Anregung durch den Laser wurde zur Unterdrückung des Streulichtes ein Langpassfilter bei 645 nm (HQ645LP, Chroma) verwendet. Zusätzlich wurde ein Bandpassfilter 650/100 (HQ650/100, Chroma) zur Reduzierung des Ramanstreulichts von Wasser, das im Bereich von 781 nm bis 813 nm liegt, eingesetzt.

Obwohl die Quanteneffizienz der Detektoren für den roten Spektralbereich sehr gut ist (70%), werden aufgrund der geringen Stokes-Verschiebung des Farbstoffes bereits 68% des gesammelten Fluoreszenzlichts durch die verwendeten Filter und Strahlenteiler absorbiert (siehe Abb. 6.7). Bei Berücksichtigung der Sammeffizienz des Objektivs werden 10% der vom Fluorophor emittierten Photonen detektiert.

6.8 Justage

Zur Kalibrierung des Setups wurden neben Messungen an ungebundenen Farbstoffen (vgl. Abschnitt 6.9) ebenso Messungen an fluoreszenten Latexkügelchen (Tetraspeck 0,1 μm , Molecular Probes) durchgeführt. Der Vorteil der Latexkügelchen ist ihre hohe Photostabilität, der konstante intrinsische Energietransfer, die homogene Photonenemission (kein Blinken) und der große Absorptionsquerschnitt, woraus schon bei geringen Anregungsraten eine hohe Photonenrate resultiert.

Zur Überprüfung, dass die Messungen im Shot-Noise-Limit für Einzelphotonmessungen erfolgen (vgl. Abschnitt 3.5 und [109]), wurde die Fluoreszenz diffundierender Latexkugeln mit Monte Carlo Simulationen verglichen. In der Simulation wurden Poisson-verrauschte Zeitspuren erzeugt und daraus eine Verteilung der Energietransfereffizienzen erstellt.

Die Fluoreszenz der Latexkugeln wurde entsprechend der FRET-Experimente spektral getrennt (siehe Abschnitt 6.7) und aus dem Verhältnis der Detektionskanäle konntw über die Gleichung 4.28 der intrinsische Energietransfer berechnet werden. Die Energietransfereffizienz beträgt im Mittel 0,74.

Die experimentell gemessene Verteilung der Energietransfereffizienzen und die Simulation zeigen in Abb. 6.8 eine sehr gute Übereinstimmung. Daher ist die Genauigkeit der Ergebnisse des konfokalen Mikroskops allein durch Shot-Noise begrenzt.

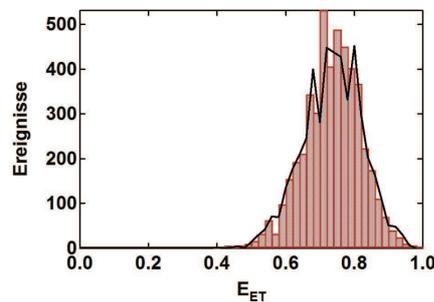


Abbildung 6.8: Vergleich der Histogramme der Energietransfereffizienzen von Tetraspeck-Latexkugeln (rot) und einer theoretischen, Shot-Noise limitierten Verteilung (schwarz). Die mittlere Photonenzahl pro Burst beträgt 30.

6.9 Konfokales Volumen

Zur Bestimmung des konfokalen Volumens V_{eff} des Wasserimmersionsobjektivs entsprechend Gleichung 5.8, wurden für die verwendeten Wellenlängen die Diffusionszeiten einzelner Farbstoffe und fluoreszierender Latexkugeln untersucht.

Die Messungen ergaben bei einer Anregung mit 488 nm eine laterale Ausdehnung des effektiven Volumens von (187 ± 10) nm und bei einer Anregung mit 635 nm von (222 ± 10) nm (siehe Tabelle 6.1). Das Verhältnis $\omega_0^{635} / \omega_0^{470}$ beträgt 1,19. Die nach Gleichung 3.8 theoretisch erwarteten Werte sind $r_{488}^{konf} = 168$ nm für 488 nm und $r_{633}^{konf} = 218$ nm für 633 nm mit einem Verhältnis von 1,35.

Wird die Ausdehnung des Fokus über in Agarosegel eingebettete Latexkugeln bestimmt, findet man für das Wasserimmersionsobjektiv bei Anregung mit 488 nm $\omega_0 = (190 \pm 20)$ nm und $z_0 = (600 \pm 50)$ nm [52]. Der Strukturfaktor S , der das Verhältnis der lateralen zur axialen Ausbreitung beschreibt, ist demnach 0,31. Für die Berechnung von V_{eff} wird der Strukturfaktor als wellenlängenunabhängig angenommen.

Die Abweichung zu den experimentell bestimmten Werten entsteht, da als räumlicher Filter des konfokalen Volumens die aktive Detektorfläche selbst verwendet wurde. Im Bereich längerer Wellenlängen ist der konfokale Effekt größer, und somit entspricht das experimentell bestimmte Fokusvolumen dem theoretischen Wert.

	λ_{exc} in nm	D in $(\mu\text{m})^2\text{s}^{-1}$	τ_D in ms	ω_0 in nm	V_{eff} in fl
AlexaFluor 488	488	196 [116]	$0,045 \pm 0,005$	188 ± 10	0,12
Rh 110-dCTP	488	224 [94]	$0,038 \pm 0,005$	185 ± 10	0,12
AlexaFluor 633	633	135 [153]	$0,091 \pm 0,005$	222 ± 10	0,20
Tetraspeck	470	4,40	$4,30 \pm 0,05$	273 ± 10	0,37
Tetraspeck	635	4,40	$5,79 \pm 0,05$	315 ± 10	0,58

Tabelle 6.1: Diffusionszeiten τ_D freier Farbstoffe des an das Nukleotid dCTP gebundenen Rhodamins 110 und fluoreszenter Tetraspeck-Kügelchen zur Bestimmung der lateralen Fokusaussdehnung ω_0 und des effektiven Volumens V_{eff} bei Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen λ_{exc} . Der Diffusionskoeffizient der Tetraspeck-Kügelchen wurde über die Stokes-Einstein- Beziehung (Gleichung 6.3) bestimmt. Der Radius betrug 50 nm.

Der Vorteil der Messung mit Tetraspeck (Molecular Probes) ist, dass das emittierte Licht den gesamten visuellen Spektralbereich oberhalb der Anregungswellenlänge umfasst und daher ideal geeignet ist, um spektrale Änderungen des Messvolumens zu untersuchen. Die Diffusionskonstante D kann über die Stokes-Einstein Relation:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (6.3)$$

bei Kenntnis des hydrodynamischen Radius R berechnet werden. Dabei entspricht η der dynamischen Viskosität des Mediums, k_B der Boltzmann-Konstante und T der absoluten Temperatur.

Der Nachteil ist, dass sie mit einem Durchmesser von 100 nm nicht mehr als Punktquellen angesehen werden können. Die Werte in Tab. 6.1 wurden zwar entsprechend Gleichung 15 in [142] korrigiert, bestimmen aber das Volumen trotzdem nur unzureichend. Es können jedoch auch Akkumulationen der Kügelchen vorliegen, welche zu einer größeren Diffusionszeit führen. Bei einer Anregung mit 470 nm wurde ein lateraler Fokusquerschnitt ω_0 von (273 ± 10) nm und mit 635 nm von (316 ± 10) nm ermittelt. Dies ergab ein mit den Ergebnissen der freien Farbstoffe vergleichbares Verhältnis rot:grün von 1,17.

6.10 Adenylatkinase

Die Adenylatkinase wurde im Labor von Dorothee Kern, Brandeis University, Waltham, MA, U.S.A hergestellt sowie mit den Fluorophoren markiert [67].

6.10.1 Bindungsstellen der Farbstoffe

Als Bindungsstellen für die Farbstoffe wurden das Tyrosin als die 52. und das Valin als die 145. Aminosäure der Adk ausgewählt (siehe Abb. 6.9). Diese Positionen zeichnen sich durch eine relative Abstandsänderung bei Konformationsänderungen von 10 nm aus und gebundene Farbstoffe zeigen kaum Wechselwirkungen mit den Bindungsstellen der Nukleotide [67]. Zur Markierung wurden die Aminosäuren jeweils durch Cystein ersetzt, an welche sich die Maleimide der Farbstoffe binden konnten. Die Prozedur wurde ausführlich in [67] beschrieben. Für die Fluoreszenzmarkierung mit einem Donor und einem Akzeptor wurden beide Farbstoffe zu gleichen Anteilen und im Überschuss zu dem Molekül gegeben, so dass es sich um eine kompetitive Bindungsreaktion handelte.

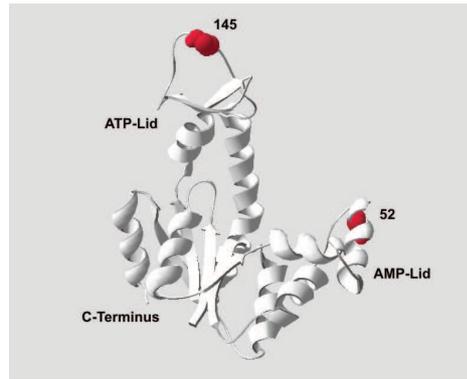


Abbildung 6.9: Positionen der als Bindungsstellen für Fluorophore verwendeten Aminosäuren in der räumlichen Struktur der Adenylatkinase.

6.10.2 Eigenschaften der Mutante

Die Y52C/V145C Mutante der Adk besitzt 35% der Aktivität des Wildtyps und zeigt in NMR-Dispersionsexperimenten trotz gebundener Fluorophore äquivalente Konformationsänderungen und Kinetik [67]. Am C-Terminus enthielt die Mutante zusätzlich sechs Histidine, welche als His-Tag zur Bindung an Metallionen verwendet wurden (siehe 6.11).

6.10.3 Pufferlösung

Alle spektroskopischen Messungen wurden in TRIS-Puffer (20 mM TRIS, 50 mM NaCl) bei pH 7,0 durchgeführt. Zusätzlich wurde 0,01% Tween20 (Roth) hinzugegeben, um eine Adsorption an das Deckglas zu vermeiden.

6.10.4 Diffusionskonstante der Adenylatkinase

Die Korrelationszeit der Rotation τ_R unmarkierter Apoenzym-Moleküle in freier Lösung beträgt 18,22 ns [27]. Entsprechend des Zusammenhangs mit dem hydrodynamischen Radius R :

$$\tau_R = \frac{1}{6D_R} = \frac{4}{3} \frac{\eta \pi R^3}{k_B T}, \quad (6.4)$$

wobei η der Viskosität des Mediums, k_B der Boltzmann-Konstante und T der absoluten Temperatur entsprechen, kann der Radius des Moleküls mit 2,62 nm bestimmt werden. Bei Adk-Molekülen mit gebundenem Inhibitor AP₅A verringert sich aufgrund von Konformationsänderungen τ_R auf 14,00 ns und R beträgt nunmehr 2,40 nm. Dies entspricht einer Verringerung des Durchmessers um 10%.

Unter Verwendung der Stokes-Einstein-Relation von Gleichung 6.3 entsprechen diese Radien Diffusionskonstanten D von 83,8 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ für das Apoenzym und 91,6 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ bei gebundenem Inhibitor.

6.10.5 Verwendete Nukleotide

Zur Untersuchung der Konformationsdynamik wurden die Substrate Adenosin-5'-monophosphat (AMP) und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) von Sigma verwendet. Die Substrate bestehen jeweils aus einem

Adenin-Rest, dem Zucker Ribose und ein bzw. zwei Phosphaten (siehe Abb. 6.10). Letztere bestimmen die Größenunterschiede der Nukleotide (siehe Tab. 6.2).

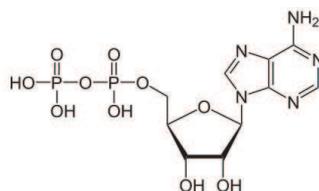


Abbildung 6.10: Chemische Struktur von Adenosin-5'-diphosphat.

Des Weiteren wurden Untersuchungen mit dem ATP-Substratanalogon β , γ -imidoadenosin-5'-triphosphat (AMPPNP) und dem Inhibitor P^1, P^2 -di(adenosin-5')-pentaphosphat (AP_5A) durchgeführt (Strukturen siehe Abb. 6.11).

Die Konzentrationen wurden über Absorptionsmessungen bei 259 nm bestimmt. Für Nukleotide mit einem Adenin wurde der Extinktionskoeffizient von $15.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und für AP_5A von $30.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet [19].

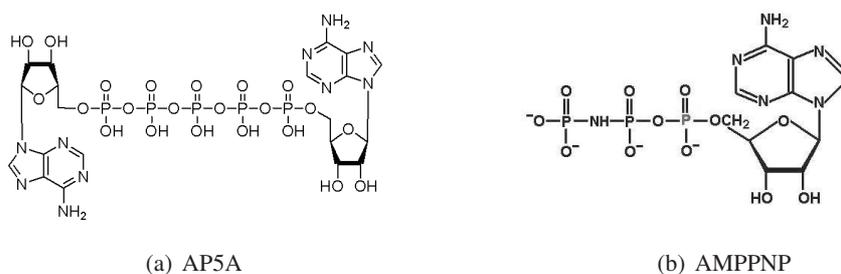


Abbildung 6.11: Chemische Struktur von AP_5A und AMPPNP.

Abkürzung	Name	Molare Masse (g mol^{-1})
AMP	Adenosin -5'-monophosphat	347,2
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	427,2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	507,2
AMPPNP	β , γ -imidoadenosin-5'-triphosphat	529,9
AP_5A	P^1, P^2 -di(adenosin-5')-pentaphosphat	1001,5

Tabelle 6.2: Verwendete Nukleotide und ihre molare Masse.

6.11 Verfahren zur Immobilisierung

Um die Enzymmoleküle auf der Deckglasoberfläche zu immobilisieren, wurde die Bildung eines stabilen Chelat-Komplexes des am C-terminus befindlichen His₆-Tags mit Ni²⁺-Ionen ausgenutzt. Dazu wurde ein langkettiger NTA-Chelator mit einer Trimethylsilylgruppe (N-((3-trimethoxysilyl)propyl)ethylendi-amin -Tri-Essigsäure, Fluorochem) verwendet. Die Silanisierung an der Deckglasoberfläche erfolgte über eine mehrstündige Inkubation der Deckgläser in einer 0,4% (w/w)-Lösung in Wasser. Nach gründlichem Spülen mit bidestilliertem Wasser wurde durch Zugabe von 10 mM NiSO₄ und 5 mM Glycerin bei einem

pH-Wert von 8,0 [78] eine Raumbindung zwischen den Nickelionen und den deprotonierten Carboxylgruppen sowie Stickstoffatomen aufgebaut (siehe Abb. 6.12). Zum Schluss wurden die Deckgläser erneut sorgfältig gespült und getrocknet.

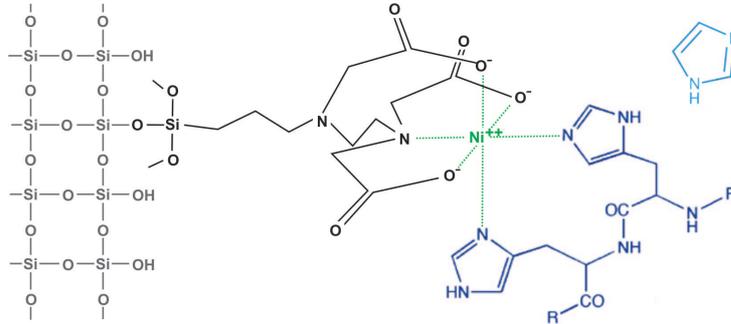


Abbildung 6.12: N-((3-trimethoxysilyl)propyl)ethylen-diamin -Tri-Essigsäure (schwarz) gebunden an die Glasoberfläche (grau) mit gebundenem Ni^{2+} -Ion (grün), His₂-Tag (blau) und Imidazol (hellblau).

Eine erfolgreiche Silanisierung und Bindung des Nickelions an die Stickstoffatome des His-Tags kann mit Hilfe von Imidazol aufgrund seiner ähnlichen Struktur überprüft werden (siehe Abb. 6.12). Sind die Bindungsstellen funktionalisierter Deckgläser bereits mit Imidazol gesättigt, haben die Adk-Moleküle keine Möglichkeit über die Histidine anzudocken. Das Ergebnis in Abb. 6.13(b) zeigt zudem, dass unspezifische Adsorptionen auf der funktionalisierten Deckglasoberfläche überwiegend ausgeschlossen werden können.

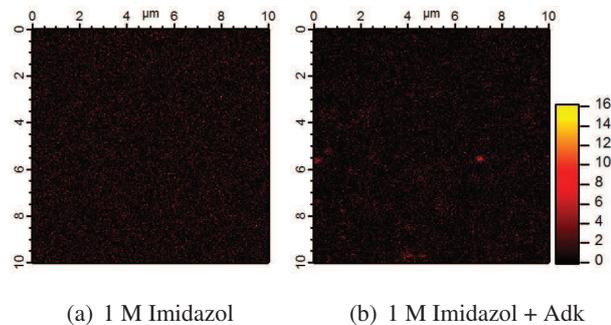


Abbildung 6.13: Scanbilder der Fluoreszenzintensität einer funktionalisierten Deckglasoberfläche nach Inkubation mit 1 M Imidazol vor (a) und nach (b) der Zugabe von Adk-Molekülen. Die Anregung erfolgte bei 100 nW (488 nm), die Integrationszeit pro Pixel betrug 2 ms.

Sind Enzymmoleküle bereits gebunden, konkurrieren die Imidazol-Moleküle um die Bindungsplätze, woraus bei hohen Konzentrationen von Imidazol eine kompetitive Verdrängung der Enzyme folgt (siehe Abb. 6.14). Benachbarte Bereiche der gescannten Deckglasfläche wiesen ebenfalls keine gebundenen Adk-Moleküle mehr auf, so dass ein „Verschwinden“ der Fluorophore durch Bleichen ausgeschlossen werden konnte. In Vergleichsmessungen mit adsorbierten Enzymmolekülen an nicht-funktionalisierten Deckgläsern wurde dagegen kein Ablösen der Adk-Moleküle festgestellt.

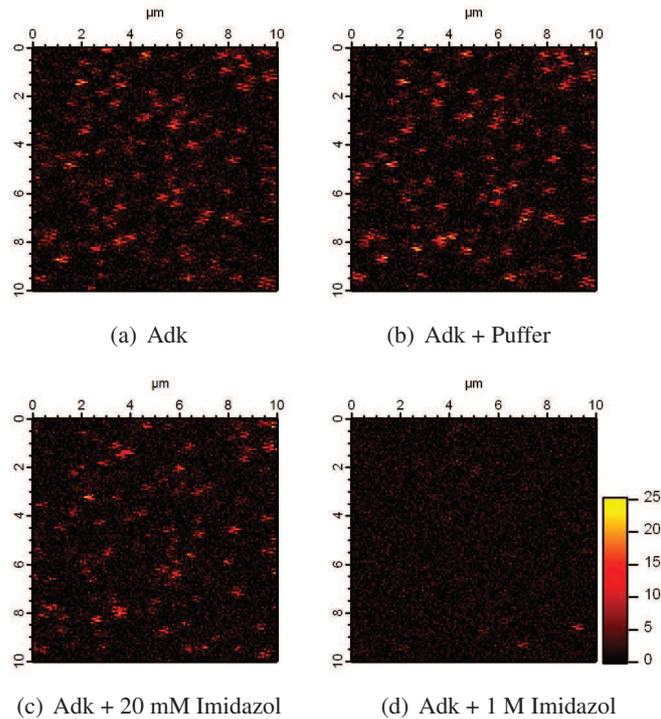


Abbildung 6.14: Scanbilder der Fluoreszenzintensität einer funktionalisierten Deckglasoberfläche mit gebundenen Adk-Molekülen vor (a) und nach (b) dem Spülen mit Pufferlösung und nach der Zugabe von 20 mM (c) bzw. 1 M (d) Imidazol. Die Anregung erfolgte bei 100 nW (488 nm), und die Integrationszeit pro Pixel betrug 2 ms.

6.12 MC-Simulationen

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden Monte-Carlo-Simulationen (MC-Simulationen) durchgeführt [103]. Dazu wurde die Fluoreszenzemission diffundierender Moleküle, die eine beliebige Anzahl verschiedener Fluorophore tragen konnten, simuliert. Das Intensitätsprofil des Fokus wurde hierbei über eine dreidimensionale Gaußfunktion definiert (siehe Gleichung 5.6). Eine ausführliche Beschreibung findet sich in [72].

Für die Simulation der Photophysik wurde ein Modell mit einem Grundzustand und zwei angeregten Zuständen (siehe Abschnitt 4.2) gewählt. Als Eingabeparameter konnten die Raten k_{01} , k_{isc} und k_{risc} sowie die Fluoreszenzlebensdauer verändert werden. Die Singulett-sättigung wurde über die Verwendung von Zeitintervallen, die der Lebensdauer entsprechen, erreicht. Innerhalb dieses Intervalls konnte das Fluorophor nur maximal einmal angeregt werden.

Befand sich ein Akzeptor in der Nähe eines Donors, so wurde über den relativen Abstand zueinander und den Försterradius eine Energietransferrate k_{ET} berechnet. Es wurde stets eine vollständige Singulett-Triplett-Annihilation vorausgesetzt (siehe Abschnitt 4.5.3).

Kapitel 7

Photophysik von AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633

Die Adenylatkinase wurde an der 52. und 145. Aminosäure jeweils im Bereich des AMP- bzw. ATP-Lids mit einem Fluorophor versehen (siehe Abschnitt 6.10). Im Folgenden sollen nun photophysikalische Eigenschaften der gebundenen Fluorophore in Abhängigkeit von der Bindungsstelle untersucht und mit dem freien, d.h. ungebundenen Farbstoff verglichen werden.

7.1 Absorptions- und Emissionsspektren

Die spektrale Absorption wurde mittels eines Standardspektrometers (Jasco V-560 UV/VIS, Jasco Labor- und Datentechnik) in dem Wellenlängenbereich von 350 bis 700 nm bestimmt. Als Molekülkonzentration wurde 1 μM verwendet. Die Spektren wurden bezüglich des Absorptionsspektrums der Pufferlösung und des wellenlängenabhängigen Hintergrunds aufgrund transienter Aggregationen korrigiert (siehe unten). Die spektrale Emission wurde mit einem Fluorometer (Fluoro Max 2, Horiba Yvon Jobin) gemessen. Zur Anregung wurde für AlexaFluor 488 die Wellenlänge 488 nm und für AlexaFluor 633 von 633 nm gewählt.

Die Absorptionsspektren wurden jeweils für das Fluorophor in ungebundener und an das AMP- bzw. ATP-Lid der Adk gebundener Form aufgenommen. Der auftretende wellenlängenabhängige Hintergrund (siehe Abb. 7.1) entstand durch transiente Aggregationen der Enzymmoleküle aufgrund der im Vergleich zur Fluoreszenzspektroskopie verwendeten hohen Konzentration (mind. 1 μM). Diese waren jedoch notwendig, um eine gut messbare Extinktion zu erhalten. Diese Aggregationen sind konzentrationsabhängig [114] und bei Einzelmolekülexperimenten im nano- oder pikomolaren Bereich demnach nicht zu erwarten. Der erhöhte Hintergrund, der auftrat, wenn die Fluorophore an das ATP-Lid gebunden waren, kann durch die Flexibilität des Loops und der daraus folgenden erhöhten Kontaktwahrscheinlichkeit mit Nachbarmolekülen erklärt werden. Wurde der Hintergrund abgezogen, konnten die Absorptionsmaxima durch Anpassung mit einer Gaußfunktion bestimmt werden (siehe Tab.7.1). Für AlexaFluor 633 traten zwei Absorptionsmaxima auf, die einer Anregung des S_1 - und des S_2 -Zustands entsprechen.

Die Absorptionsspektren der gebundenen Fluorophore zeigten im Vergleich zum freien Farbstoff stets eine Verschiebung zu größeren Wellenlängen (siehe Tabelle 7.1). Bei beiden Farbstoffen war diese am

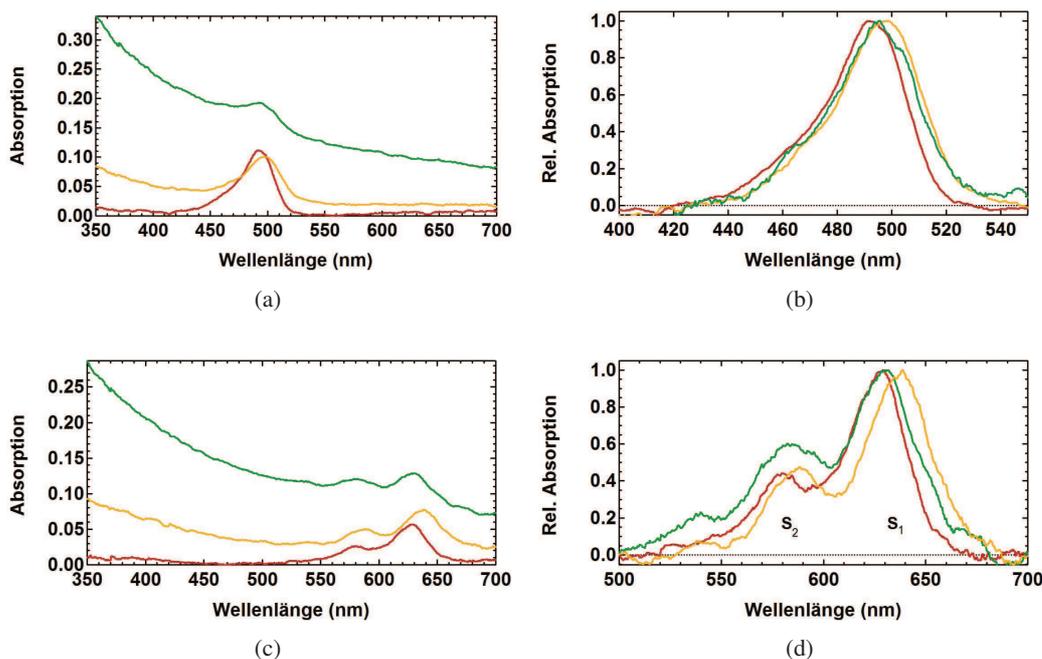


Abbildung 7.1: Absorptionsspektren von AlexaFluor 488 (a,b) und AlexaFluor 633 (c,d) ohne und mit Hintergrundkorrektur und Normierung in ungebundener Form (rot) sowie gebunden an das ATP-Lid (grün) bzw. an das AMP-Lid (gelb). Die Spektren von AlexaFluor 633 zeigen neben der Absorptionsbande des S_1 -Zustands auch die für S_2 .

ATP-Lid mit +2 nm nur gering, doch am AMP-Lid betrug die Differenz zum freien Farbstoff ca. +10 nm. Eine Kontrollmessung an einem anderen Spektrometer führte zu einem vergleichbaren Ergebnis.

Der Grund hierfür können schwache Wechselwirkungen der lokalen Umgebung mit dem Fluorophor sein. Diese werden offenbar durch die Anregung geschwächt, da die Verschiebung in den Emissionsspektren (siehe Abb. 7.2) nicht zu erkennen war.

Die unterschiedlichen relativen Amplituden der S_2 -Absorptionsbande am ATP-Lid können durch eine unzureichende Hintergrundkorrektur verursacht sein und werden nicht beachtet.

	Abs.-Max. (nm)	Em.-Max. (nm)
AlexaFluor 488 frei in TRIS	493±1	514±1
AlexaFluor 488 am AMP-Lid in TRIS	497±1	516±1
AlexaFluor 488 am ATP-Lid in TRIS	495±1	515±1
AlexaFluor 633 frei in TRIS	580±1	628±1
AlexaFluor 633 am AMP-Lid in TRIS	588±1	637±1
AlexaFluor 633 am ATP-Lid in TRIS	586±1	648±1

Tabelle 7.1: Absorptions- und Emissionsmaxima von AlexaFluor 488 und 633.

Im Gegensatz zu den Absorptionsspektren sind die Emissionsspektren nur geringfügig verschieden (siehe Abb. 7.2). Die Emissionsspektren werden vor allem durch Eigenschaften des Lösungsmittels, wie Brechzahl und Dielektrizitätskonstante beeinflusst. Der Einfluss der verwendeten Pufferlösung auf die untersuchten Farbstoffe ist aber nur sehr schwach.

Aufgrund der geringen Stokes-Verschiebung und der Anregung bei 633 nm konnte das Emissionsspektrum bei AlexaFluor 633 erst ab 645 nm gemessen werden und die Emissionsmaxima durch einen Ver-

gleich mit der veröffentlichten Kurve des Herstellers nur geschätzt werden. Doch der Verlauf der Kurve ab 650 nm zeigt keine signifikanten Unterschiede, so dass die Emissionsspektren sowohl des AlexaFluor 633 als auch des AlexaFluor 488 von der Bindung weitgehend unabhängig sind.

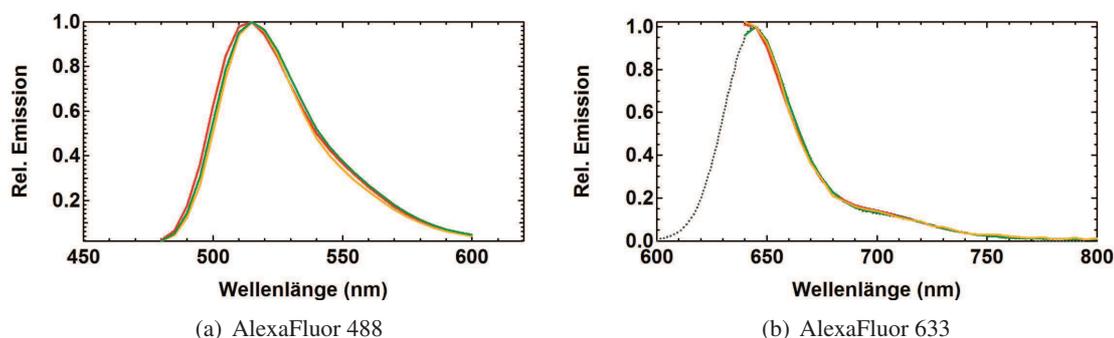


Abbildung 7.2: Emissionsspektren des AlexaFluor 488 (a) und AlexaFluor 633 (b) ungebunden (rot) und gebunden an das ATP-Lid (grün) sowie an das AMP-Lid (gelb).

Zusammenfassung:

Die Absorptionsspektren von AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 weisen in Abhängigkeit von der Bindungsstelle Unterschiede auf. Während bei Fluorophoren, die am ATP-Lid gebunden sind, nur eine geringe Verschiebung von 2 nm hin zu größeren Wellenlängen auftritt, zeigen am AMP-Lid gebundene Farbstoffe eine größere Verschiebung von bis zu 10 nm. Die Ursache hierfür können schwache lokale Wechselwirkungen mit dem Enzym sein. Im angeregten Zustand der Fluorophore sind diese jedoch aufgebrochen und beeinflussen die Emissionsspektren nicht.

7.2 Fluoreszenzlebensdauer und Rotationskorrelationszeit

7.2.1 Natürliche Fluoreszenzlebensdauer von AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633

Die natürliche Fluoreszenzlebensdauer kann entsprechend der Gleichung 4.8 berechnet werden und entspricht der Fluoreszenzlebensdauer ohne jegliche Verluste durch nichtstrahlende Prozesse. Sie beträgt bei Verwendung der Herstellerangabe für den Extinktionskoeffizienten von $73.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (bei einer Wellenlänge von 494 nm) für das AlexaFluor 488 4,57 ns. AlexaFluor 633 hat eine natürliche Lebensdauer von 6,41 ns (bei Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $100.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 632 nm).

7.2.2 Bestimmung der Rotationskorrelationszeit und Fluoreszenzlebensdauer

7.2.2.1 Durchführung

Experimente zur zeitaufgelösten Messung der Fluoreszenzlebensdauer und zur Bestimmung der Rotationskorrelationszeit wurden an diffundierenden Molekülen unter Verwendung des Wasserimmersionsobjektivs (Messtiefe 20 μm) durchgeführt.

Die Datengewinnung für den zeitabhängigen Zerfall der Fluoreszenzintensität wird durch Anregung mit repetitiven Laserpulsen und deren Triggerung mit der Zählkarte gewährleistet (TCSPC-Daten, siehe auch Abschnitt 6.6). Dabei wurden je nach molekularer Helligkeit der Farbstoffe und der verwendeten Anregungsleistung die Farbstoffkonzentrationen so gewählt, dass sich die Zählraten zwischen 10 kHz und 50 kHz befanden. Dieser Bereich zeigte ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis und es musste kein „Pileup“ aufgrund zu hoher Zählraten befürchtet werden [31].

Zur Durchführung der Experimente wurden die Proben mit linear polarisiertem Licht angeregt und das Fluoreszenzlicht mit einem polarisierenden Strahlteiler (Melles Griot) in einen Strahl senkrecht und parallel zur Polarisationsrichtung des Anregungslichtes aufgeteilt. Zur Anregung wurden die gepulsten Diodenlaser verwendet.

Der Strahlteiler konnte sowohl für Anregung bei 470 nm als auch bei 635 nm verwendet werden. Dabei traten in der Reflexion und Transmission für den senkrecht sowie den parallel polarisierten Strahlenanteil Verluste von weniger als 5% auf. Weitere polarisationsabhängige Verluste entstehen jedoch auch an dem multichroischen Strahlteiler und den verwendeten Bandpassfiltern. Um die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der beiden Detektionskanäle auszugleichen, wurden die Messungen bei 0° und mit einer um 90° gedrehten, linear polarisierten Anregung durchgeführt.

Die Depolarisation des Anregungslichts im Fokus des Objektivs ist aufgrund der hohen numerischen Apertur zwar im geringen Maße vorhanden [8], soll jedoch für diese Messungen vernachlässigt werden.

7.2.2.2 Anisotropie

Die elektrischen Felder der Emissionsdipole führen bei einer linear polarisierten Anregung zu einer Anisotropie des emittierten Fluoreszenzlichts in Bezug auf das Anregungslicht. Die stationäre Anisotropie ist durch die relative Differenz der senkrechten (F_{\perp}) bzw. parallelen (F_{\parallel}) Intensitätskomponente mit:

$$r = \frac{\langle F_{\parallel} \rangle - \langle F_{\perp} \rangle}{\langle F_{\parallel} \rangle + 2 \langle F_{\perp} \rangle} \quad (7.1)$$

gegeben. Für die Berechnung wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Polarisationsrichtung nach Anregung bei 0° und 90° addiert.

7.2.2.3 Rotationskorrelationszeit

Die Rotationskorrelationszeit τ_R kann aus der stationäre Anisotropie bestimmt werden [90]:

$$\tau_R = \frac{\tau_F}{r/r_0 - 1}. \quad (7.2)$$

Dabei ist τ_F die Fluoreszenzlebensdauer und r_0 die fundamentale Anisotropie, die der stationären Anisotropie entspricht, wenn keine zusätzlichen Rotationsfreiheitsgrade vorhanden sind. Sie beträgt für Fluorophore mit kollinearen Anregungs- und Emissionsdipolmomenten 0,4 [90].

7.2.2.4 Fluoreszenzlebensdauer

Um bei der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer einen Einfluss der Anisotropie auszuschließen, wurde die Summe der senkrecht und parallel polarisierten Fluoreszenz mit:

$$F(t) = F_{\parallel}(t) + 2F_{\perp}(t) \quad (7.3)$$

verwendet. Dazu war eine Korrektur des optischen Weglängenunterschieds zwischen den Detektionskanälen notwendig (siehe Abb. 7.3(a)). Mit Hilfe von Tangenten am ansteigenden Abschnitt der Fluoreszenzantwort konnte der jeweilige Schnittpunkt mit der x-Achse bestimmt und als neuer Koordinatenursprung verwendet werden. Bei größeren Anregungsleistungen trat in Abhängigkeit der Photoemissionsraten eine Verschiebung des anfänglichen Anstiegs der Fluoreszenzantwort zu kürzeren Zeiten auf (siehe Abb. 7.3(b)). Diese entsteht durch die größere molekulare Helligkeit der Fluorophore.

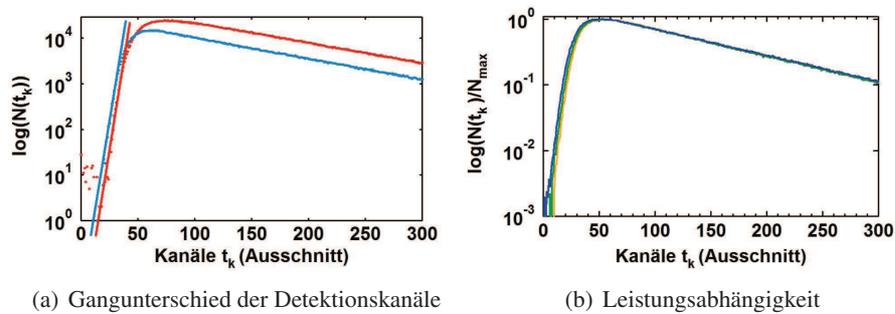


Abbildung 7.3: Typischer Verlauf des Fluoreszenzzerfalls. (a) Tangenten zur Bestimmung des Gangunterschieds zwischen dem Detektionskanal der APD1 (rot) und APD2 (grün). (b) Linksverschiebung bei Erhöhung der Anregungsleistung bei Anregung mit 470 nm: 1 μ W (gelb), 5 μ W (grün), 35 μ W (blau).

7.2.2.5 Prozedur zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer

Da bei Ensemblemessungen an diffundierenden Molekülen der Mittelwert über alle Moleküle gebildet wird, setzt sich der Fluoreszenzzerfall additiv aus den einzelnen Komponenten zusammen. Im Falle eines exponentiellen Zerfallsgesetzes gilt:

$$F(t) = \sum_i F_0^i \exp(-t/\tau_i). \quad (7.4)$$

Für eine korrekte Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer sollte die Pulsbreite der Anregung sowie der Abfall der Systemantwort (*Instrument Response Function*, IRF) kürzer als der Fluoreszenzzerfall selbst sein. Ist dies der Fall, genügt zur Bestimmung der Zerfallskonstante ein sogenannter „Tailfit“. Er entspricht einer exponentiellen Anpassung in der Region, bei der die IRF einen konstanten Wert hat bzw. Null ist und keinen Einfluss auf den Verlauf der Fluoreszenzantwort hat.

Für schnelle Depopulationsprozesse ist jedoch die Berücksichtigung der Abweichung der Impulsantwort von einer Deltafunktion von Bedeutung, denn die gemessene Intensität $N(t)$ ist das Ergebnis einer

Faltung der IRF $K(t)$ mit der Fluoreszenzintensität $F(t)$ [48]:

$$N(t) = \int_{-\infty}^t F(t-t')K(t')dt'. \quad (7.5)$$

Im Experiment sind dies die Funktionen $K(t_k)$ und $F(t_k)$, wobei t_k die einzelnen Messkanäle mit einer Breite von Δt bezeichnet. Es gilt somit:

$$N(t_k) = \sum_{t=0}^{t=t_k} F(t-t_k)K(t_k) \Delta t. \quad (7.6)$$

Für die Faltung und Anpassung wurde eine selbst geschriebene Routine (Igor 6.0, Wavemetrics) verwendet. Dazu wurden die Parameter einer geeigneten Funktion $F(t)$ (siehe Gleichung 7.4) mit der experimentell bestimmten IRF gefaltet und durch eine rekursive Annäherung an die experimentellen Daten bestimmt (siehe Abb. 7.4). Zur Anpassung wurde die Methode der kleinsten Fehlerquadrate verwendet (*Least-Square*) [90]:

$$\chi^2 = \sum_k \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_k \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)}. \quad (7.7)$$

Der zu minimalisierende Wert χ^2 ist die Summe der quadratischen Abweichungen zwischen der gemessenen Funktion $N(t)$ und der Anpassungsfunktion $N_c(t)$, wobei für die Standardabweichung der Photonenanzahl pro Kanal der Wert für eine Poisson-Verteilung, $\sigma_k = \sqrt{N(t_k)}$, verwendet wurde.

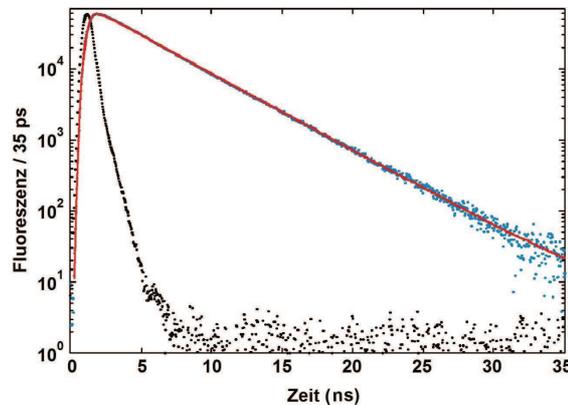


Abbildung 7.4: Die Anpassungsfunktion (rot) unter Berücksichtigung der Faltung des Fluoreszenzsignals (blau) mit der IRF (schwarz) zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer. Dargestellt sind Daten des frei diffundierenden Farbstoffs AlexaFluor 488 bei einer Anregung mit 1 μ W bei 470 nm.

7.2.3 AlexaFluor 488

Die Fluoreszenzlebensdauer des freien, ungebundenen Fluorophors AlexaFluor 488 betrug in Pufferlösung $(4,0 \pm 0,1)$ ns in Übereinstimmung mit den Angaben des Herstellers von 4,1 ns. Es musste darauf geachtet werden, dass die Bindungsstelle des Farbstoffes vollständig hydrolysiert war und aus einer konzentrierten Stammlösung (> 1 mM) hergestellt wurde. Farbstoffmoleküle, die nicht vollständig hydrolysiert waren, hatten eine geringere Fluoreszenzlebensdauer: Lösungen, die frisch aus einer DMSO-Stammlösung hergestellt wurden, wiesen eine Fluoreszenzlebensdauer von nur 2,8 ns auf.

Bei gebundenen Farbstoffmolekülen verkürzte sich die Lebensdauer auf $(3,9 \pm 0,1)$ ns (ATP-Lid) bzw. $(3,8 \pm 0,1)$ ns (AMP-Lid). Entsprechend Gleichung 4.13 betrug die Quantenausbeute nun 0,86 bzw. 0,84 (vgl. Tab. 7.2). Verantwortlich dafür sind zusätzliche strahlungslose Übergänge vom angeregten Zustand in den Grundzustand.

Die Rotationskorrelationszeiten der gebundenen Farbstoffe unterschieden sich deutlich vom freien Farbstoff, doch waren sie stets kleiner als 1 ns. Dies zeigt, dass die Beweglichkeit zwar eingeschränkt, aber nicht vollständig verhindert ist. Dabei ist τ_R für das am AMP-Lid gebundene Fluorophor im Vergleich zum ATP-Lid fast doppelt so groß. Die Ursache hierfür kann sein, dass die Bindungsstelle am ATP in einem sehr flexiblen Loop liegt, während sich die Bindungsstelle am AMP-Lid innerhalb einer Helix befindet (vgl. Abb. 6.9).

Unter Zugabe der Nukleotide ADP oder AP₅A, die das Gleichgewicht hin zum geschlossenen Zustand verschieben, wurden nur geringfügig erhöhte Werte von Q festgestellt. Die überwiegende Population der geschlossenen Konformation blieb auch ohne signifikanten Einfluss auf die Rotationskorrelationszeit (siehe Tab. 7.2).

Die Fluoreszenzlebensdauer der Farbstoffe sowie die Anisotropie wiesen bis 30 μ W keine Leistungsabhängigkeiten auf. Diese Werte für die Anisotropie sind mit Ref. [167] vergleichbar, in welcher für das ungebundene AlexaFluor 488 eine Anisotropie von 0,018 und für den an DNA gebundenen Farbstoff eine Anisotropie von 0,050 bestimmt wurde.

AlexaFluor 488	τ_F (ns)	Q	r	τ_R (ns)
TRIS-Puffer				
ungebunden	$4,00 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,03$	$0,015 \pm 0,003$	$0,15 \pm 0,03$
AMP-Lid	$3,84 \pm 0,02$	$0,84 \pm 0,03$	$0,078 \pm 0,005$	$0,93 \pm 0,10$
ATP-Lid	$3,93 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,03$	$0,049 \pm 0,005$	$0,55 \pm 0,05$
4mM Ap5A, 2mM MgCl				
AMP-Lid	$3,98 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,03$	$0,068 \pm 0,005$	$0,82 \pm 0,08$
ATP-Lid	$3,90 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,03$	$0,057 \pm 0,005$	$0,65 \pm 0,06$

Tabelle 7.2: Fluoreszenzlebensdauer τ_F , Quanteneffizienz Q , Rotationskorrelationszeit τ_R und Anisotropie r des freien und gebundenen Farbstoffs AlexaFluor 488 in TRIS-Puffer und in 4 mM AP₅A.

7.2.4 AlexaFluor 633

Ungebundene, frei diffundierende Moleküle von AlexaFluor 633 hatten bei vollständig hydrolysierten Bindungsstellen eine Fluoreszenzlebensdauer von $(3,2 \pm 0,1)$ ns, was den Herstellerangaben entspricht. Im Unterschied zu AlexaFluor 488 wiesen gebundene Farbstoffmoleküle eine höhere Lebensdauer als die ungebundenen auf, was eine ebenso erhöhte Quanteneffizienz zur Folge hat (siehe Tab. 7.3). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass der gebundene Farbstoff stärker vom Lösungsmittel abgeschirmt war. Die Lebensdauer am ATP-Lid mit $(3,4 \pm 0,1)$ ns war dabei leicht geringer als am AMP-Lid mit $(3,5 \pm 0,1)$ ns (siehe Tab. 7.3).

Das Molekül AlexaFluor 633 besitzt einen größeren hydrodynamischen Radius als AlexaFluor 488 und zeigte daher auch eine Verlangsamung in der Rotation. Während der am ATP-Lid gebundene Farbstoff eine Rotationskorrelationszeit von unterhalb 1 ns aufwies, betrug diese am AMP-Lid mehr als 2 ns. Sie verdeutlicht die hydrophoben Wechselwirkungen des im Vergleich zu AlexaFluor 488 größeren Moleküls

mit der Helix des AMP-Lids. Würde der Farbstoff aber vollständig an der Adk haften, würde τ_R im Bereich von 14 – 18 ns liegen (siehe Abschnitt 6.10.4).

In Bezug zur Fluoreszenzlebensdauer des Donors von 3,9 ns betrug die mittlere Rotationskorrelationszeit jedoch nur die Hälfte. Es könnte daher zu Einschränkungen beim Energietransfer kommen (siehe Abschnitt 4.5.1), da die Verwendung des Wertes von $2/3$ für den Orientierungsfaktor κ^2 eine im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer des Donors schnelle Rotation voraussetzt. Doch solange einer der beiden Fluorophore diese Bedingung erfüllt, wäre der Wert für κ^2 mit 0,63 nur unwesentlich kleiner (siehe Abschnitt 4.5.1). Da dies für AlexaFluor 488 erfüllt ist und AlexaFluor 633 in seiner Bewegungsfreiheit nicht vollständig verhindert ist, kann eine Abweichung des Orientierungsfaktor $2/3$ vernachlässigt werden.

Bei Zugabe von Nukleotiden (AP₅A bzw. ADP), die eine geschlossene Konformation des Adk-Moleküls begünstigen, war die Lebensdauer sowie die Rotationskorrelationszeit der Farbstoffmoleküle nur geringfügig erhöht oder unverändert. Die Fluoreszenzlebensdauer der Farbstoffe sowie die Anisotropie wiesen dabei bis 10 μ W keine von der Anregungsleistung abhängigen Unterschiede auf.

AlexaFluor 633	τ_F (ns)	Q	r	τ_R (ns)
TRIS-Puffer				
ungebunden	3,15±0,02	0,49±0,03	0,028±0,005	0,24±0,05
AMP-Lid	3,52±0,02	0,55±0,03	0,154±0,005	2,20±0,10
ATP-Lid	3,41±0,02	0,53±0,03	0,056±0,005	0,56±0,05
10mM ADP, 10mM MgCl				
AMP-Lid	3,56±0,02	0,55±0,03	0,155±0,005	2,25±0,10
ATP-Lid	3,45±0,02	0,54±0,03	0,050±0,005	0,49±0,05

Tabelle 7.3: Fluoreszenzlebensdauer τ_F , Quanteneffizienz Q , Rotationskorrelationszeit τ_R und Anisotropie r des freien und gebundenen Farbstoffes AlexaFluor 633 in Puffer und 10 mM Mg·ADP-Lösung.

Zusammenfassung:

AlexaFluor 488 zeigte im gebundenen Zustand eine geringfügig verringerte Fluoreszenzlebensdauer bzw. Quantenausbeute. Die Rotationsfreiheit war kaum eingeschränkt.

Die gebundenen Fluorophore des AlexaFluor 633 zeigten im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff dagegen eine erhöhte Quantenausbeute. Die Rotationsfreiheit am ATP-Lid war nur geringfügig, am AMP-Lid stärker eingeschränkt.

7.3 Beidseitig markierte Adk-Moleküle

Zum Binden der Farbstoffe an die Cysteine der Adk-Mutante wurden jeweils in einem 15-fachen Überschuss AlexaFluor 488 maleimide und AlexaFluor 633 maleimide hinzugefügt. Beide Fluorophore konkurrierten hierbei um die beiden Bindungsstellen am Enzym. Als Ergebnis entstanden Moleküle, die zwei Donormoleküle, zwei Akzeptormoleküle oder ein Donor und ein Akzeptormolekül jeweils am ATP-Lid bzw. am AMP-Lid tragen konnten.

Entsprechend der Prozedur, die zur Markierung der Adk verwendet wurde (siehe Abschnitt 6.10), war zu erwarten, dass beide Farbstoffe entsprechend der beiden Bindungsstellen gleichverteilt sind. Daraus würde folgen, dass 50% der Moleküle beide Farbstoffe und jeweils 25% einen Farbstoff zweifach tragen. Die Bindungseffizienz der Farbstoffe nach der Markierungsprozedur betrug 99 - 100% und das Verhältnis der gebundenen Farbstoffe AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 war 1:0,9.

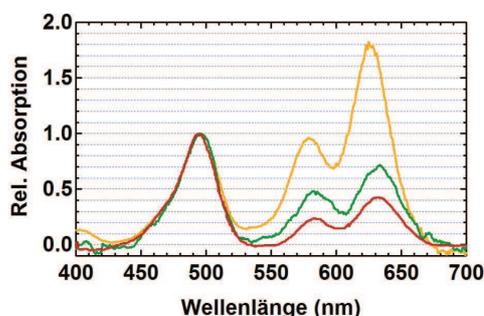


Abbildung 7.5: Absorptionsspektrum beidseitig markierter Adk direkt nach dem Markieren mit den Fluorophoren (gelb), nach 2 Wochen unter O₂-Atmosphäre (rot), nach 12 Monaten unter N₂-Atmosphäre (grün). Normiert wurde auf das Absorptionsmaximum von AlexaFluor 488, um die relativen Verhältnisse darzustellen.

Aus den Spektren in Abb. 7.5 ist ersichtlich, dass sich in Sauerstoff-gesättigten Pufferlösungen das Verhältnis zwischen Donor- und Akzeptormolekülen infolge von Oxidationen schon nach wenigen Wochen stark veränderte. AlexaFluor 633 scheint für Oxidationsprozesse besonders anfällig zu sein. Infolgedessen wurden für die Messungen die markierten Proben in mit Stickstoff gesättigten Lösungen aufbewahrt. In Abb. 7.6 sind die Absorptionsspektren der Farbstoffe an den Lids zusammen mit dem Absorptionsspektrum einer zweifachmarkierten Probe dargestellt.

Für AlexaFluor 488 lag das Maximum der Absorption mit (497 ± 1) nm zwischen den Maxima der einfachmarkierten Proben (vgl. Tab. 7.1), so dass davon ausgegangen werden kann, dass weder das AMP- noch das ATP-Lid als Bindungsstelle bevorzugt wird.

Die Lage des Absorptionsmaximums der S₁-Bande von AlexaFluor 633 entsprach jedoch bei der zweifachmarkierten Probe mit (631 ± 1) nm dem Maximum des am ATP-Lid gebundenen Farbstoffs. Auch die Fluoreszenzlebensdauer von $(3,42 \pm 0,02)$ ns stimmte mit den am ATP-Lid einzelmarkierten Proben

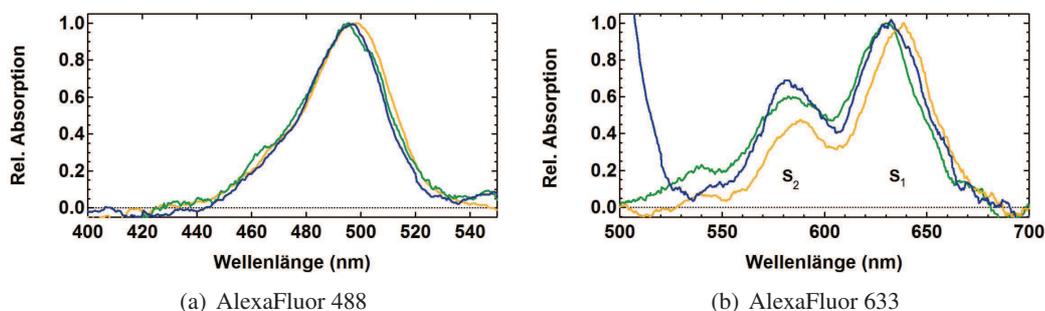


Abbildung 7.6: Vergleich der Absorptionsspektren für AlexaFluor 488 (a) und AlexaFluor 633 (b) gebunden am ATP-Lid (grün), AMP-Lid (gelb) und der mit beiden Farbstoffen an beiden Bindungsmöglichkeiten markierten Adenylatkinase (blau).

überein. Es lässt sich daher vermuten, dass dieses Fluorophor entweder eine schlechtere Bindungseffizienz für das AMP-Lid besitzt oder an dieser Bindungsstelle eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Oxidation aufweist.

Diese Betrachtungen legen den Schluss nahe, dass sich bei FRET-Experimenten der Donor, AlexaFluor 488, überwiegend am AMP-Lid und der Akzeptor, AlexaFluor 633, am ATP-Lid befindet.

7.3.1 Försterradius

Aus dem Emissionsspektrum des Donors $F_D(\lambda)$ und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors $\epsilon_A(\lambda)$ kann nun das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ bestimmt werden. Es wurden hierfür die vom Hersteller angegebenen Spektren verwendet und entsprechend der experimentell ermittelten Maxima verschoben.

Für das Fluorophorenpaar AlexaFluor 488 am AMP-Lid ($Q_D = 0,84$) und das AlexaFluor 633 am ATP-Lid konnte für den Orientierungsfaktor κ^2 aufgrund der im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer schnelleren Rotation der Wert $2/3$ verwendet werden (siehe Abschnitt 4.5.2). Der Försterradius R_0 berechnet sich entsprechend den Gleichungen 4.22 und 4.24 und ist $R_0^{AMP,ATP} = 48,7 \text{ \AA}$.

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich AlexaFluor 488 am ATP-Lid ($Q_D = 0,86$) und AlexaFluor 633 am AMP-Lid befindet, nur gering. Wird das Überlappungsintegral unter Berücksichtigung der Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima berechnet und für den Orientierungsfaktor $2/3$ verwendet, so beträgt $R_0^{ATP,AMP} = 48,2 \text{ \AA}$. Da die Rotationsfreiheit von AlexaFluor 633 am AMP-Lid eingeschränkt war, wäre R_0 im Grenzfall, dass sich das Dipolmoment relativ zu dem des AlexaFluor 488 nicht mehr bewegt, um 2% kleiner (vgl. Abschnitt 4.5.1).

Zur Berechnung der Energietransfereffizienzen der Adk wird im Weiteren ein Försterradius von $48,5 \text{ \AA}$ verwendet.

7.3.2 Intermolekulare Wechselwirkungen

Um zu überprüfen, ob die in den Absorptionsspektren auftretenden transienten Aggregationen (vgl. Abschnitt 7.1) eine Auswirkung auf die photophysikalischen Eigenschaften haben, wurden intermolekulare Wechselwirkungen bei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Eine sehr empfindliche Messgröße dafür ist die Quantenausbeute bzw. Fluoreszenzlebensdauer.

Eine Untersuchung des intermolekularem Energietransfers ist aufgrund der größeren Reichweite von besonderer Bedeutung. Daher wurde die Fluoreszenzlebensdauer von gebundenem AlexaFluor 488 bei verschiedenen Konzentrationen von Adk-Molekülen untersucht, die mit AlexaFluor 633 markiert waren. Die Farbstoffe waren jeweils am ATP-Lid gebunden, da an dieser Bindungsstelle die transienten Aggregationen der Adk-Moleküle am häufigsten auftraten (vgl. Absorptionsspektren in Abb. 7.1). Die zur Untersuchung verwendeten Konzentrationen lagen in einem für die Fluoreszenzspektroskopie relevanten Bereich.

Die Ergebnisse zeigten im Konzentrationsbereich von bis zu 500 nM innerhalb der Fehlergrenzen keine Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer (siehe Abb. 7.7). Damit schließen sich intermolekulare Wechselwirkungen, die die Fluoreszenzlebensdauer und die Quantenausbeute beeinflussen aus. Dieses Ergebnis gilt auch für AlexaFluor 633.

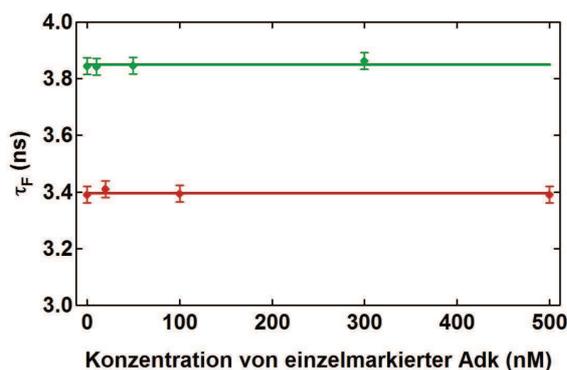


Abbildung 7.7: Fluoreszenzlebensdauer τ_F von mit AlexaFluor 488 (grün) und AlexaFluor 633 (rot) einzelmarkierten Adk-Molekülen (10 nM) bei unterschiedlichen Konzentrationen von einzelmarkierter Adk mit gebundenem AlexaFluor 633 bzw. AlexaFluor 488. Die Fluorophore befinden sich jeweils am ATP-Lid.

Zusammenfassung:

Bei zweifachmarkierten Adk-Molekülen gibt es einen hohen Anteil von Molekülen ohne einen fluoreszenten Akzeptorfluorophor. Dies kann an unterschiedlichen Bindungseffizienzen des Akzeptors bezüglich der Bindungsstellen liegen, wird aber vorwiegend durch eine starke Reduktion der photochemischen Lebensdauer durch gelösten Sauerstoff hervorgerufen.

Ein Vergleich der photophysikalischen Eigenschaften mit einfachmarkierten Adk-Molekülen weist weiterhin auf eine hohe Wahrscheinlichkeit hin, dass AlexaFluor 488 am AMP und AlexaFluor 633 am ATP-Lid gebunden ist. Der Försterradius für den Energietransfer beträgt $(48,5 \pm 0,5) \text{ \AA}$.

Des Weiteren konnten intermolekulare Wechselwirkungen, die die Quantenausbeute beeinflussen, für den Konzentrationsbereich von bis zu 500 nM ausgeschlossen werden

7.4 Triplettodynamik und Fluoreszenzsättigung

Die Voraussetzung für die Durchführung von Einzelmolekülexperimenten ist ein möglichst großes Signal-Rausch-Verhältnis des Fluoreszenzsignals (siehe Abschnitt 3.5). Dieses ist jedoch von der Anregungsleistung abhängig, so dass zur Bestimmung der optimalen Anregungsintensität die Kenntnis des Sättigungsverhaltens der Fluorophore wichtig ist. Die Sättigungseigenschaften der Farbstoffe und die damit verbundenen Übergangsraten zwischen Singulett und Triplettzuständen sollen in diesem Abschnitt in Abhängigkeit von den Bindungsstellen der Fluorophore untersucht werden.

Die einfachste Methode ist die Bestimmung der Sättigungsintensität aus der Abhängigkeit zwischen Fluoreszenzemission und der Anregungsleistung. Entsprechend Gleichung 4.15 können daraus die Sättigungsintensität sowie das Verhältnis der Raten k_{isc} und k_{risc} ermittelt werden.

Diese Methode ist jedoch eher für Ensemblemessungen und unempfindlichere Detektoren geeignet. Bei Messungen am konfokalen Setup treten bei der Bestimmung der Fluoreszenzemission Schwierigkeiten auf. Eine Bestimmung der molekularen Helligkeit aus der Amplitude der Korrelationsfunktionen entspre-

chend Gleichung 5.13 ist nicht mehr möglich, da die Amplitude ebenfalls durch die Sättigung beeinflusst ist [32].

Bei hohen Anregungsraten ist die mittlere Fluoreszenzintensität aufgrund des erhöhten Hintergrundsignals und der - um Sättigungseffekte der Detektoren zu vermeiden - benötigten geringen Molekülkonzentrationen nur schwer zuverlässig zu bestimmen. Zudem können auftretende Konzentrationsschwankungen z.B. durch Adsorptionen nicht erkannt werden.

Da eine Bestimmung von charakteristischen Zeiten gegenüber Messfehlern robuster ist, wurden die Sättigungsintensitäten aus der Abhängigkeit der Tripletraten von der Anregungsrate berechnet (vgl. Abschnitt 5.3.3).

7.4.1 Durchführung der Experimente

Für diese Experimente wurden Messungen an gelösten Farbstoffmolekülen oder Farbstoff-markierten Adk-Molekülen bei unterschiedlichen Anregungsleistungen durchgeführt (vgl. Abb. 5.1(a)). Die Konzentration der Moleküle wurde jeweils so eingestellt, dass sich im Mittel ein Molekül im Fokus befand. Die entstehenden Zeitspuren des Fluoreszenzsignals der durch den Laserfokus diffundierenden Moleküle wurden korreliert (siehe Abschnitt 5.2.2).

Hierfür wurden Kreuzkorrelationsfunktionen des Signals nach Auftrennung mit einem 50/50-Strahlteiler berechnet (siehe Abschnitt 5.3.1). Um möglichst glatte Korrelationskurven zu erhalten, betrug die Messdauer pro Anregungsrate jeweils 15 - 30 min.

Werden die Korrelationsfunktionen entsprechend der Gleichung 5.17 gefittet, kann die Tripletrate aus $k_T = \tau_T^{-1}$ und der Anteil der Moleküle T , die sich im Triplettzustand befinden, in Abhängigkeit von den Anregungsraten bestimmt werden. Die Parameter wurden hierbei über Fitroutinen von Igor 6.0 unter Verwendung des Marquardt-Levenberg Algorithmus bestimmt.

In den Anpassungsfunktionen wurde entsprechen Gleichung 5.16 bei 488 nm für den Diffusionsterm ein zusätzlicher Parameter β von 0,83 bzw. für 633 nm von 0,9 verwendet. Dies war notwendig, da die Fokussierung auf die aktive Detektoroberfläche nur bedingt der Funktion einer Lochblende entspricht und daher die Bedingungen für ein konfokales Volumenelement nicht vollständig erfüllt wurden. Dies hat besonderen Einfluss auf den diffusiven Abfall von Korrelationsfunktionen mit kleinen Amplituden. Bei der Anregung bei 633 nm sind aufgrund des größeren Fokusvolumens die Bedingungen besser erfüllt und daher liegt β näher an eins.

Zur Bestimmung der ISC-Rate und der rISC-Rate wurde der Zusammenhang von Gleichung 4.6 verwendet. Die Anregungsrate k_{01} wird über die Gleichung 4.3 berechnet und beträgt für AlexaFluor 488, das bei Anregung mit 488 nm entsprechend Gleichung 4.5 einen Absorptionsquerschnitt von $\sigma_A = 2,71 \cdot 10^{-16} \text{cm}^{-2}$ besitzt, $606 \text{ kHz } \mu\text{W}^{-1}$. Diese theoretisch berechnete Rate wurde in der erfolgten Anpassung unter Verwendung eines zusätzlichen Faktors korrigiert. Die Rate k_{10} entspricht der Inverse der natürlichen Lebensdauer und ist $2,18 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abschnitt 7.2).

Der Absorptionsquerschnitt von AlexaFluor 633 beträgt bei 633 nm $3,82 \cdot 10^{-16} \text{cm}^{-2}$ und die Anregungsrate $k_{01} = 788 \text{ kHz } \mu\text{W}^{-1}$. Die Rate k_{10} ist $1,56 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$.

7.4.2 Simulationen

Um die Zuverlässigkeit der Anpassungsfunktion von Gleichung 5.17 zu untersuchen, wurden zunächst MC-Simulationen diffundierender Fluorophore mit Triplettkinetik durchgeführt (siehe dazu auch Abschnitt 6.12).

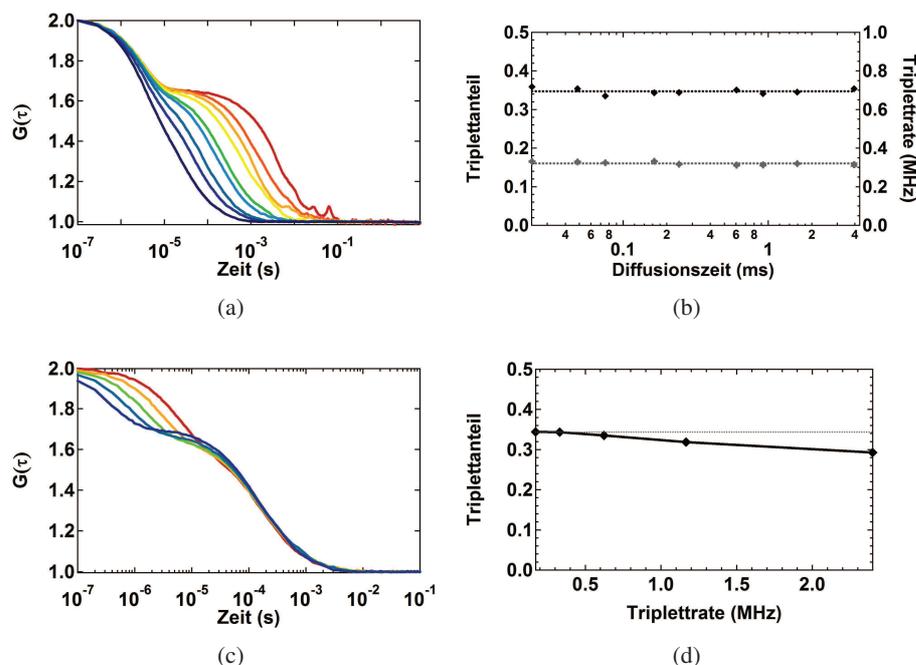


Abbildung 7.8: MC-Simulationen diffundierender Fluorophore mit Triplett-Kinetik bei unterschiedlichen Diffusionszeiten (a,b) und bei unterschiedlichen Triplett-Raten (c,d). Es sind die normierten Korrelationsfunktionen (a,c) und die durch die Anpassungsfunktion erhaltenen Werte (b,d) für den Triplettanteil (schwarz) und die Triplett-Rate (grau) dargestellt.

Die Graphen in Abb. 7.8(a,b) zeigen, dass eine Bestimmung der Triplett-Rate sowie des Triplettanteils unabhängig vom diffusiven Abfall sehr gut möglich ist. Dies gilt sofern die Diffusionszeit länger ist als die Zeit im Triplettzustand und der Triplettanteil nicht zu gering ist ($>10\%$).

Bei schnellen Raten ist der Triplettanteil jedoch nicht mehr genau bestimmbar (siehe Abb. 7.8 (c,d)). Dies liegt an der durch die Zählkarte diktierten Zeitauflösung von 100 ns, die bei schnellen Raten verhindert, dass das Plateau bei kurzen Zeiten erreicht wird. Wird für die Simulationen unter Beibehaltung der Raten eine bessere Zeitauflösung gewählt, tritt dieser Effekt nicht auf. Bei experimentell gewonnenen Korrelationsfunktionen kommt hinzu, dass gerade der Zeitbereich bis 1 μ s aufgrund der schlechten Photonstatistik besonders großes Rauschen aufweist. Dies kann zur Folge haben, dass bei leistungsabhängigen Messungen der Triplettanteil schon bei geringeren Anregungsraten ein Sättigungsverhalten zeigt. Eine Bestimmung der Zeitkonstanten der Korrelationsfunktion ist jedoch weitestgehend unabhängig von Einflüssen, die sich auf die Amplitude der Kurve auswirken. Sollen nun die ISC-Raten der Triplett-Dynamik bestimmt werden, ist der geeignete Messparameter daher die Triplett-Rate k_T .

7.4.3 AlexaFluor 488

In Abb. 7.9 sind die Korrelationsfunktionen des Fluoreszenzsignals von AlexaFluor 488 an den beiden unterschiedlichen Bindungsstellen im Vergleich zum freien, ungebundenen Farbstoff dargestellt.

Der gebundene Farbstoff AlexaFluor 488 besitzt einen Diffusionskoeffizienten von $91,6 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ und sollte daher entsprechend Gleichung 5.12 eine um 2,4-fach längere Aufenthaltsdauer im Fokus besitzen (vgl. Tab. 7.2).

FCS-Experimente ergaben jedoch bei einer Anregungsleistung von $10 \mu\text{W}$ mit dem 488 nm-Dauerstrichlaser eine scheinbare Diffusionszeit des Adk-Moleküls, die im Größenbereich des freien Farbstoffes lag. Die Diffusionszeit des ungebundenen Fluorophors betrug $(45 \pm 1) \mu\text{s}$, die Diffusionszeit für den Farbstoff am ATP-Lid des Adk-Moleküls $(55 \pm 1) \mu\text{s}$ und gebunden an das AMP-Lid $(61 \pm 1) \mu\text{s}$.

Die Ursache für dieses Verhalten ist unklar, es kann aber unter Umständen durch einen Übergang in einen (reversiblen) nichtfluoreszenten Zustand während des Aufenthalts im Laserfokus verursacht sein (siehe dazu Abschnitt 4.3.3).

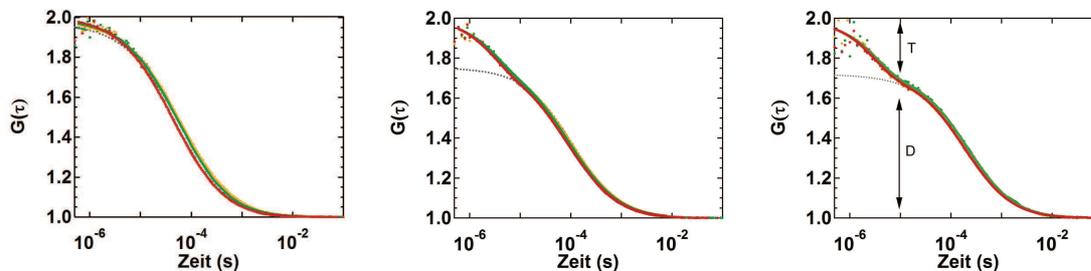


Abbildung 7.9: Normierte Korrelationsfunktionen bei $10 \mu\text{W}$ (a), $100 \mu\text{W}$ (b) und $500 \mu\text{W}$ (c) zeigen das von der Bindungsstelle unabhängige Sättigungsverhalten von AlexaFluor 488, ungebunden (rot), gebunden an das ATP-Lid (grün) und AMP-Lid (gelb), bei Anregung mit dem 488 nm- Dauerstrichlaser. Deutlich ist bei $100 \mu\text{W}$ und $500 \mu\text{W}$ die Komponente der Triplettdynamik (T) vom diffusiven Anteil (D) zu unterscheiden.

Wird die Anregungsleistung von $10 \mu\text{W}$ auf $100 \mu\text{W}$ erhöht, vergrößert sich die Diffusionszeit aufgrund des durch die Sättigung abgeflachten Detektionsvolumens (siehe Abschnitt 7.4). Dabei bleibt das Verhältnis der Diffusionszeiten für AlexaFluor 488, gebunden am ATP, zu AlexaFluor 488, gebunden am AMP-Lid, bestehen. Dieses Ergebnis ist ein erstes Indiz dafür, dass das Sättigungsverhalten von AlexaFluor 488 nicht von der Bindungsstelle abhängt. Der einzige Unterschied ist der, dass die Fluoreszenzausbeute am AMP-Lid im Vergleich zu dem ATP-Lid um ca. 5% verringert ist. Dies liegt jedoch an dem erhöhten Anteil von nichtstrahlenden Übergängen vom S_1 -Zustand in den Grundzustand bei der Bindung am AMP-Lid, was auch durch die um 3% verkürzte Fluoreszenzlebensdauer verdeutlicht wird (siehe Abschnitt 7.2).

Die Abb. 7.10 zeigt die Abhängigkeit der Triplettraten von der Anregungsrate. Da es sehr schwer möglich ist, Anregungsraten theoretisch genau zu bestimmen, wurde in der Anpassungsfunktion der Triplettraten von Gleichung 5.18 ein zusätzlicher Korrekturfaktor zu der im Abschnitt 7.4.1 berechneten Umrechnung der Laserleistung eingeführt. Dieser betrug für den 488 nm-Laser 2,5. Somit entspricht die Anregungsleistung von $1 \mu\text{W}$ einer Anregungsrate von 1,52 MHz.

Aus dem leistungsabhängigen Verlauf der Triplettraten konnten nun die Raten k_{isc} und k_{risc} bestimmt und mit Hilfe der Gleichung 4.15 die Sättigungsrate berechnet werden (siehe Tab. 7.4). Langsame Raten

bei kleinen Triplettanteilen traten bis zu Anregungsleistungen von 40 μW auf und wurden aufgrund der großen Unsicherheiten ihrer Bestimmung ausgeschlossen (vgl. Abb. 7.9(a)). Die Ergebnisse von Tab. 7.4 sind mit den Raten des Fluorophors Rhodamin 110 mit $k_{isc} = 201$ kHz und $k_{risc} = 500$ kHz vergleichbar [102].

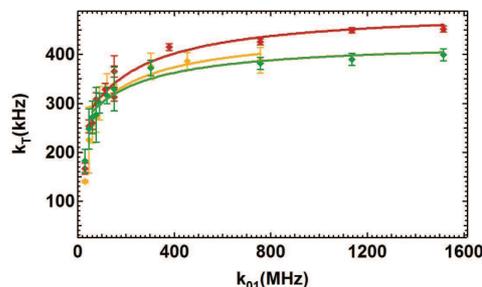


Abbildung 7.10: Die Triplett-Rate von AlexaFluor 488 als ungebundener Farbstoff (rot) sowie gebunden am ATP-Lid (grün) und AMP-Lid (gelb) in Abhängigkeit von der Anregungsrate. Die Fehlerbalken entsprechen den Unsicherheiten bei der Bestimmung der Parameter aus den Korrelationsfunktionen. Die durchgezogenen Linien stellen Anpassungsfunktionen entsprechend der Gleichung 5.18 dar, die die Raten von Tab. 7.4 enthalten.

Die reversible ISC-Rate k_{risc} des ungebundenen Farbstoffes stimmt mit der des gebundenen überein. Das bedeutet, dass die Triplettlebensdauer von AlexaFluor 488 unabhängig vom Bindungszustand des Fluorophors ist. Sie beträgt $(4,1 \pm 0,2)$ μs .

Die Raten für die Übergänge in den Triplettzustand sind bei den gebundenen Farbstoffen leicht verringert. Die Unterschiede sind jedoch so gering, dass die Sättigungsintensitäten kaum voneinander abweichen. Sie befinden sich zwischen 74 und 81 μW . Die Sättigungsintensität für AlexaFluor 488 ohne Besetzung der Triplettzustände, d.h. für den Fall $k_{sat} = k_{10}$ ist 143 μW (vgl. Gleichung 4.15).

AlexaFluor 488	k_{isc} (kHz)	k_{risc} (kHz)	τ_T (μs)	k_{sat} (MHz)	I_{sat} (μW)
ungebunden	234 ± 20	251 ± 10	$4,0 \pm 0,2$	113 ± 10	74 ± 5
AMP-Lid	204 ± 20	242 ± 20	$4,1 \pm 0,4$	118 ± 10	78 ± 5
ATP-Lid	185 ± 20	243 ± 10	$4,1 \pm 0,2$	123 ± 10	81 ± 5

Tabelle 7.4: ISC- und rISC-Raten sowie die berechnete Triplettlebensdauer τ_T , Sättigungsrate k_{sat} und Sättigungsintensität I_{sat} für AlexaFluor 488 ungebunden und gebunden am AMP- bzw. ATP-Lid.

7.4.4 AlexaFluor 633

Für AlexaFluor 633 standen ein Dauerstrichlaser mit 633 nm und ein gepulster 635 nm-Laser zur Anregung zur Verfügung. Die Diffusionszeit bei einer Anregung von 2 μW beträgt für das freie, ungebundene Farbstoffmolekül 91 μs . Ist es an das ATP-Lid der Adk gebunden, erhöht sich τ_D auf 160 μs . Dieser Wert entspricht in etwa der kleineren Diffusionskonstante der Adk. Das Verhältnis der Diffusionszeit des freien AlexaFluor 633 ($D = 135$ (μm)²/s) zur Adenylatkinase beträgt 1,6 (vgl. Abschnitt 6.10.4). Bei dem an das AMP-Lid gebundenen Farbstoff beträgt die Diffusionskonstante 260 μs und ist damit deutlich höher als erwartet. Dies kann einerseits an Aggregationen, andererseits aber auch an Sättigungseffekten liegen, da beim AMP-Lid auch schon bei niedrigen Anregungsleistungen Triplettanteile auftraten.

7.4.4.1 Anregung mit HeNe-Laser, 633 nm

Bereits bei einer Anregung von $2 \mu\text{W}$ bis $10 \mu\text{W}$ zeichnet sich bei der Korrelationsfunktion am AMP-Lid gebundener Farbstoffe ein beginnender Tripletterm ab. Bei höheren Anregungsleistungen ist, wie in den Korrelationsfunktionen in Abb. 7.11 ersichtlich, auch der Tripletterm am ATP-Lid im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff erhöht. Diese Unterschiede sind auch im Bereich der Fluoreszenzsättigung zu erkennen und deuten auf eine von der Bindung abhängige Triplettrate hin.

Zur Bestimmung der leistungsabhängigen Triplettraten wurden Korrelationsfunktionen ab einer Anregungsleistung von $10 \mu\text{W}$ verwendet. Der Faktor zur Korrektur der Anregungsrate betrug 1,76. Somit entspricht die Anregungsleistung von $1 \mu\text{W}$ einer Anregungsrate von 1,32 MHz. Die Ergebnisse von Tab. 7.5 sind denen des Farbstoffs Atto 565 mit $k_{isc} = 5,6 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ und $k_{risc} = 1,7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ ähnlich [172].

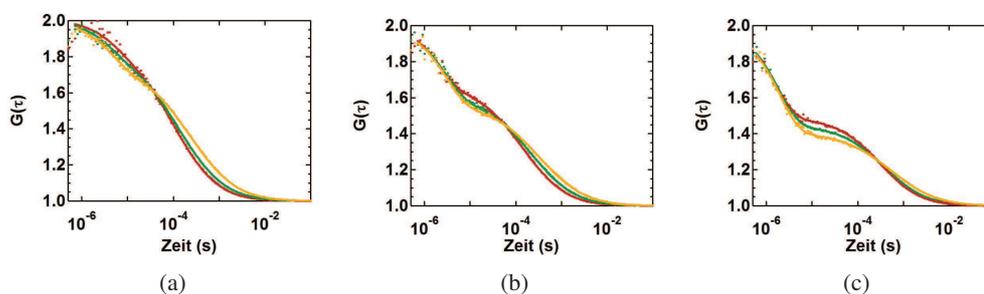


Abbildung 7.11: Normierte Korrelationsfunktionen von AlexaFluor 633 ungebunden (rot), sowie gebunden am ATP-Lid (grün) und AMP-Lid (gelb) bei $10 \mu\text{W}$ (a), $50 \mu\text{W}$ (b) und $500 \mu\text{W}$ (c) bei Anregung mit dem HeNe- Laser (633 nm).

Aus den Ergebnissen der leistungsabhängigen Bestimmung der Triplettraten ist erkennbar, dass die reversible ISC-Rate des Farbstoffs am AMP-Lid mit 177 kHz tatsächlich im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff (208 kHz) und am ATP-Lid gebundenen Farbstoff (206 kHz) kleiner ist. Diese Rate entspricht einer Triplettlebensdauer von $5,6 \mu\text{s}$ und bestimmt den auch schon bei niedrigen Leistungen aufgetretenen Unterschied des Tripletterms. Vergleichsweise beträgt die Triplettlebensdauer des ungebundenen bzw. am ATP-Lid gebundenen Farbstoffs $4,9 \mu\text{s}$.

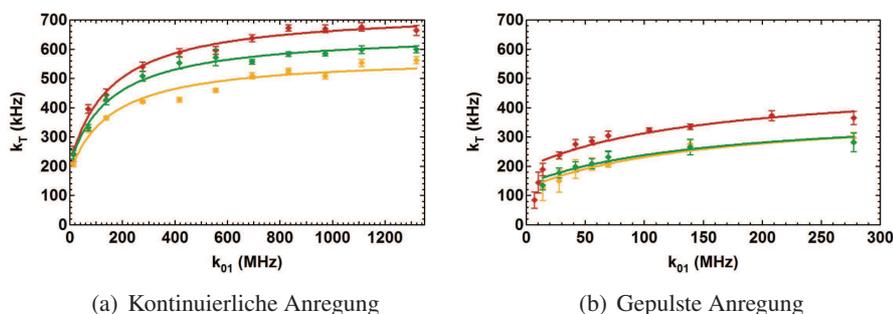


Abbildung 7.12: Tripletanteil von AlexaFluor 633 in Abhängigkeit von der Anregungsrate bei kontinuierlicher (a) und gepulster Anregung (b) für den ungebundenen Farbstoff (rot), sowie gebunden am ATP-Lid (grün) und am AMP-Lid (gelb). Die durchgezogenen Linien sind Anpassungsfunktionen entsprechend der Gleichung 5.18 und den Parametern von Tab. 7.5.

Die ISC-Raten in den Triplettzustand sind bei den gebundenen Farbstoffen im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff kleiner (siehe Abb. 7.12 und Tab. 7.5). Die Sättigungsintensitäten der Farbstoffe liegen im Bereich von 35 μW . Bei reiner Singulett-sättigung, $k_{sat} = k_{10}$, würden sie entsprechend Gleichung 4.15 112 μW betragen.

AlexaFluor 633	k_{isc} (kHz)	k_{risc} (kHz)	τ_T (μs)	k_{sat} (MHz)	I_{sat} (μW)
Dauerstrichlaser					
ungebunden	525 \pm 30	208 \pm 20	4,8 \pm 0,4	44 \pm 5	32 \pm 5
AMP-Lid	399 \pm 30	177 \pm 20	5,6 \pm 0,5	48 \pm 5	35 \pm 5
ATP-Lid	450 \pm 30	206 \pm 20	4,9 \pm 0,4	49 \pm 5	35 \pm 5
gepulster Laser					
ungebunden	300 \pm 30	195 \pm 10	5,2 \pm 0,4	61 \pm 5	44 \pm 5
AMP-Lid	273 \pm 30	124 \pm 10	8,1 \pm 0,5	49 \pm 5	35 \pm 5
ATP-Lid	250 \pm 30	139 \pm 10	7,2 \pm 0,5	56 \pm 5	40 \pm 5

Tabelle 7.5: ISC- und rISC-Raten sowie die berechnete Triplettlebensdauer τ_T , Sättigungsrate k_{sat} und Sättigungsintensität I_{sat} für AlexaFluor 633 ungebunden und gebunden am AMP- bzw. ATP-Lid. Ergebnisse für eine kontinuierliche und gepulste Anregung.

7.4.4.2 Gepulste Anregung

Die Messungen wurden bei Anregung mit einem gepulsten Laser bei einer Frequenz von 40 MHz und einer Pulsbreite von 0,5 ns wiederholt. Die Ergebnisse in Abb. 7.12 zeigen bereits im Triplettanteil einen deutlichen Unterschied.

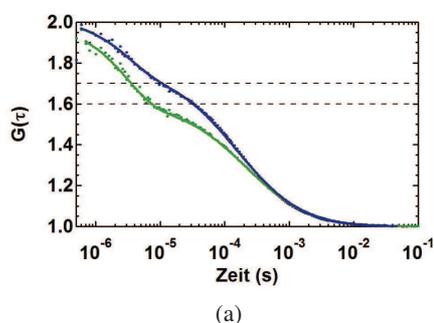


Abbildung 7.13: Normierte Korrelationsfunktionen von AlexaFluor 633 am ATP-Lid nach kontinuierlicher (grün) und gepulster (blau) Anregung bei einer mittleren Anregungsintensität von 50 μW . Die gestrichelten Linien zeigen den Amplitudenunterschied des Triplettterms.

Dies liegt daran, dass während des Pulses mit viel größeren Leistungen angeregt wird und somit die Wahrscheinlichkeit der Anregung von höheren Singulett- und Triplettzuständen größer als bei kontinuierlicher Anregung ist. Befindet sich das Molekül in einem T_n -Zustand, kann es in den T_1 -Zustand oder aber zum S_1 -Zustand übergehen [62, 146, 51]. Wird ersteres favorisiert, verlängert sich die Triplettlebensdauer, bei letzterem ist sie verkürzt.

Werden aus Abb. 7.12(b) die Raten bestimmt, so ist eine verringerte reversible ISC-Rate erkennbar. Sie wird durch die Übergänge $T_n \rightarrow S_1$ verursacht. Für AlexaFluor 633 am ATP-Lid bzw. AMP-Lid beträgt die Triplettlebensdauer ca. 150% im Vergleich zur kontinuierlichen Anregung (siehe Tab. 7.5). Bei freiem Farbstoff ist sie nur geringfügig erhöht.

Die ISC-Raten sind ebenso verringert. Es bedeutet, dass die Moleküle in höher angeregten S_n -Zuständen eine geringere Wahrscheinlichkeit für einen Übergang in einen Triplettzustand T_n besitzen. Dies wirkt sich in der leichten Erhöhung der Sättigungsintensität aus und wird durch die kleinere Amplitude des Triplettterms bestätigt (siehe Abb. 7.11). Befinden sich die Fluorophore in der Sättigung tritt in den Korrelationsfunktionen nach gepulster Anregung ein bis zu 50% verringerter Triplettanteil auf.

7.4.5 Triplettodynamik und Energietransfer

Enthalten die Moleküle einen Donor und einen Akzeptor, entstehen neue Möglichkeiten für elektronische Übergänge (siehe Abb. 4.3 und Abschnitt 4.5).

In Abb. 7.14 sind die Kreuzkorrelationsfunktionen der Fluoreszenz von AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 dargestellt. Die Versuche wurden unter Zugabe des Inhibitors (4 mM AP₅A, 2 mM MgCl₂) durchgeführt, da die geschlossene Konformation der Adk den relativen Abstand zwischen den Fluorophoren verkleinert und somit die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit der Farbstoffe erhöht.

Eine Kreuzkorrelation zweier Intensitätssignale enthält Informationen bezüglich gleichgerichteter oder entgegengesetzter Änderungen. Diese spiegeln sich in der Amplitude und den Zeitbereichen der Kurve wieder (siehe dazu Abschnitt 5.3).

Geht der Donor in einen Triplettzustand über, findet kein Energietransfer mehr statt und der Akzeptor zeigt während dieser Zeit keine Fluoreszenz. Es handelt sich hierbei um eine kollektive Änderung, die jedoch unabhängig von der Triplettodynamik des Akzeptors ist.

Die Kreuzkorrelationskurve mit zusätzlicher Akzeptoranregung zeigt jedoch, dass sich bei einer Erhöhung der Anregungsrate des Akzeptors ein Korrelationsterm im Zeitbereich der Triplettodynamik ausbildet. Dies ist ein Indiz für die im Abschnitt 4.5.3 beschriebene Singulett-Triplett-Annihilation, bei der die Fluoreszenz des Donors durch einen Übergang des Akzeptors in einen höher angeregten Triplettzustand gequencht wird. Dies hat zur Folge, dass der Donor - solange sich der Akzeptor im ersten angeregten Triplettzustand befindet - ebenso keine Photonen emittiert.

Die Abstandsabhängigkeit dieses Prozesses wird daran deutlich, dass beim Apoenzym mit einem im Mittel geringeren Abstand der Fluorophore der Triplettanteil nur 12% im Vergleich zu 22% des Inhibitor-gebundenen Enzyms beträgt (weitere Informationen zu den mittleren Abständen siehe Abschnitt 8.2.3).

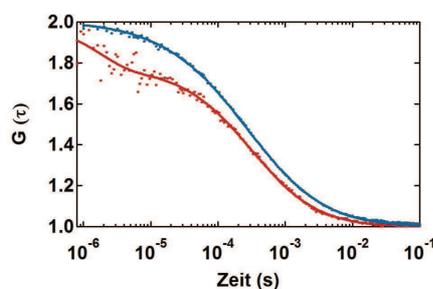


Abbildung 7.14: Normierte Kreuzkorrelationsfunktionen zweifachmarkierter Adk mit gebundenen Inhibitor bei einer Anregung des Donors mit 30 μ W (488 nm) ohne (blau) bzw. mit (rot) zusätzlicher Anregung des Akzeptors mit 10 μ W (gepulst, 635 nm).

Zusammenfassung:

Die Sättigungseigenschaften von AlexaFluor 488 unterscheiden sich von denen des AlexaFluor 633. Für AlexaFluor 488 beträgt die Sättigungsintensität für die gebundenen Farbstoffe $80 \mu\text{W}$. Sie ist im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff aufgrund der kleineren ISC-Raten um $5 \mu\text{W}$ größer.

Ist AlexaFluor 633 gebunden, zeigt im Vergleich zu dem freien Farbstoff ebenfalls eine kleinere ISC-Raten. Ein gleichzeitiger Anstieg der Triplettlebensdauer bewirkt jedoch eine mit dem gebundenen Farbstoff vergleichbare Sättigungsintensität von $35 \mu\text{W}$. Bei Anregung mit dem gepulsten Laser ist die Sättigung geringfügig verringert, die Sättigungsintensität betragen entsprechend der Bindungszustände zwischen 35 und $44 \mu\text{W}$.

Bei zweifachmarkierten Adk-Molekülen beeinflusst die Triplettkinetik des Akzeptors den Donor, so dass der Donor ein stärkeres Sättigungsverhalten aufweist. Der Vorteil der Singulett-Triplett-Annihilation liegt in den kollektiven Übergängen in einen Dunkelzustand, wenn einer der beiden Farbstoffe in den Triplettzustand geht. Dies erlaubt die Berechnung der Energietransfereffizienzen aus zeitlich integrierten der Fluoreszenzsignalen.

7.5 Spektrale Fluktuationen von AlexaFluor 488

Spektrale Fluktuationen des Emissionslichts sind für die Bestimmung einer zeitlichen Änderung des Energietransfers zwischen einem Donor- und einem Akzeptormolekül sehr hinderlich, wenn sie auf der gleichen Zeitskala wie die zu beobachtende Dynamik stattfinden (siehe Abschnitt 4.4.1).

Um die Emission des Donormoleküls AlexaFluor 488 hinsichtlich spektraler Fluktuationen zu untersuchen, wurde das Fluoreszenzlicht von einzelnen, auf dem Deckglas immobilisierten und nur mit dem Donor markierten Adk-Molekülen spektral aufgetrennt. Die Immobilisierung erfolgte über das His₆-Tag der Adenylatkinase (siehe Abb. 5.1(b) und Abschnitt 6.11).

Zur spektralen Auftrennung wurde zusätzlich zum Bandpassfilter ein Strahlteiler (dcxr520, Chroma) bei 520 nm verwendet. Diese Wellenlänge ist besonders gut geeignet, da das Emissionsmaximum bei

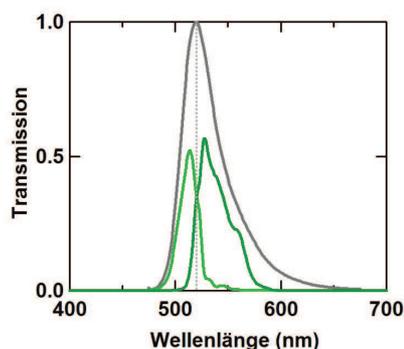


Abbildung 7.15: Transmissionseigenschaften der beiden Detektionskanäle.

520 nm liegt und somit jede spektrale Fluktuation das Emissionsmaximum in den einen oder anderen Detektionskanal verschiebt.

Nach der Korrektur der Verluste der Donoremission bezüglich der verwendeten Filter und Strahlteiler sowie der Quanteneffizienz der Detektoren, beträgt das Verhältnis der Intensitäten der Detektionskanäle $F_{500-520}/F_{520-570} = 0,6$ (siehe Abb. 7.15). Eine Kreuzkorrelation beider Kanäle sollte Auskunft über etwaige spektrale Änderungen geben, die z.B. mit Konformationsänderungen der Adk einhergehen können. Kennzeichen dafür ist stets ein antikorrelierter Kurvenverlauf. Schwankungen, die nur in einem Kanal auftreten, sind in den Korrelationsfunktionen nicht sichtbar.

In Abb. 7.16(a) ist die spektral aufgetrennte Fluoreszenz eines Fluorophors dargestellt. Da die zugehörige Kreuzkorrelation in Abb. 7.16(b) keinen antikorrelierten Term aufweist, können zeitlich periodische Ereignisse spektraler Fluktuationen ausgeschlossen werden. Alle der insgesamt 20 untersuchten Zeitspuren zeigten das gleiche Ergebnis.

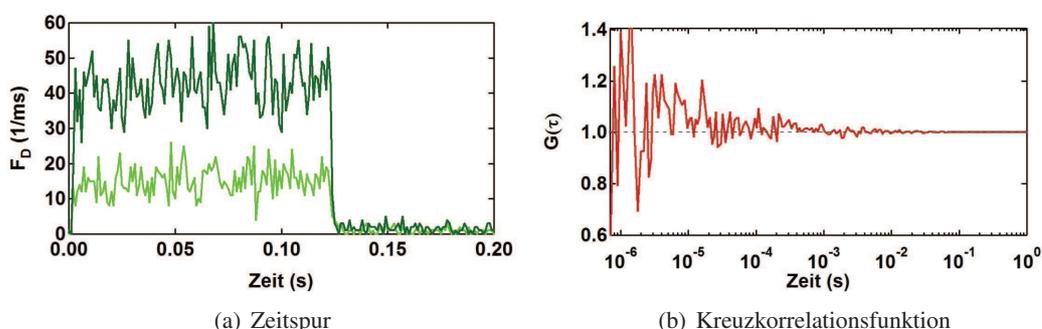


Abbildung 7.16: Die Photoemission eines einzelnen Farbstoffmoleküls AlexaFluor 488 bei Anregung mit $2 \mu\text{W}$ bei 488 nm bis zum Photobleichen (bei 130 ms) unter spektraler Trennung des Fluoreszenzsignals (a). Die Ankunftszeiten der detektierten Photonen im Bereich von 500 - 520 nm (hellgrün) wurde anschließend mit denen vom langwelligen Bereich (520 - 570 nm) korreliert. Die normierte Kreuzkorrelation beider Detektionskanäle (b) zeigt kein antikorreliertes Verhalten.

Zusammenfassung:

Das Fluoreszenzsignal des gebundenem AlexaFluor 488 wurde hinsichtlich möglicher spektraler Fluktuationen untersucht. Die Ergebnisse von Messungen an einzelnen Molekülen zeigen, dass auftretende Schwankungen mit einer charakteristischen Zeit von mehr als $10 \mu\text{s}$ ausgeschlossen werden können

7.6 Photostabilität

Zur Untersuchung der Photostabilität der verwendeten Fluorophore wurden aufgrund der längeren Beobachtungszeit Messungen an immobilisierten Molekülen durchgeführt. Im Folgenden wird das Fluoreszenzsignal einzelner Moleküle bezüglich auftretender Fluktuationen untersucht und der Einfluss des Inhibitors AP_5A bzw. des Substrats ADP beschrieben.

7.6.1 Photonenrauschen und die Analyse von Dunkelzuständen

Die Zeitspuren der Fluoreszenz einzelner Farbstoffe des Adk-Moleküls ohne gebundene Substrate (Apoenzym) zeigen in der Regel Fluktuationen, die auf die Poisson-Verteilung der Photonen zurückgeführt werden können (siehe auch Abschnitt 3.5 und 6.8).

In Abb. 7.17 sind Zeitspuren der beiden gebundenen Fluorophore bei unterschiedlichen Photonenemissionsraten dargestellt. Die Fluktuationsbreiten der experimentell gewonnenen Daten stimmen mit simulierten Zeitspuren, die entsprechend der Poisson-Statistik verrauscht wurden, überein. Des Weiteren traten aber auch zusätzliche Fluktuationen nichtfluoreszenter Zustände auf, deren Charakteristika in den folgenden Kapiteln untersucht werden sollen.

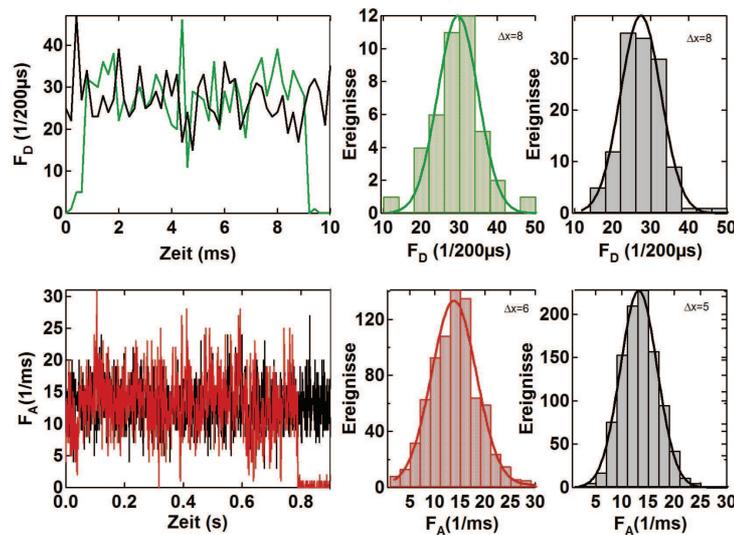


Abbildung 7.17: Vergleich der Fluoreszenzfluktuationen immobilisierter Moleküle des AlexaFluor 488 (grün) und AlexaFluor 633 (rot) im Vergleich mit einer Poisson-verrauschten Zeitspur gleicher mittlerer Intensität (schwarz). Die dazugehörigen Histogramme (jeweils rechts) zeigen eine Übereinstimmung in der durch Gaußfunktionen bestimmten Verteilungsbreite. Die Anregungsleistungen betragen für AlexaFluor 488 10 μ W und für AlexaFluor 633 1 μ W.

Zur Bestimmung der Zeiten, in denen sich das Molekül im fluoreszenten oder im nichtfluoreszenten Zustand befindet, wurde von einzelnen immobilisierten Fluorophoren der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz bis zum Photobleichen aufgenommen. Zur Auswertung der Zeitspuren wurde zunächst das Plateau des fluoreszenten Zustands \bar{F} des jeweiligen Moleküls bestimmt. Fällt das Fluoreszenzsignal unter die Schwelle der doppelten Standardabweichung $\bar{F} - 2\sqrt{\bar{F}}$, wird ein Übergang in den Dunkelzustand „detektiert“. Diese Schwelle wurde gewählt, da für diesen Wert die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein zufälliges Ereignis entsprechend der Poisson-Verteilung handelt, nur 5% beträgt. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Ereignisse, wie z.B. Triplettzustände oder Fluktuationen des Photonensrauschens, mit einfließen.

Die Histogramme der Lebenszeiten der Zustände wurden entsprechend Gleichung 4.17 mit einem Potenzgesetz gefittet (Marquardt-Levenberg Algorithmus, Fitroutine von Igor 6.0) und der Exponent bestimmt. Um die Anregung von AlexaFluor 488 mit dem 470 nm-Laser und dem 488 nm-Laser vergleichen zu können, wurde für 470 nm die Laserleistung verdoppelt (siehe auch Abschnitt 6.7).

7.6.2 AlexaFluor 488 an Apo-Adk

In Abb. 7.18(a) wird eine Zeitspur der detektierten Fluoreszenzphotonen gezeigt. Deutlich sind neben dem irreversiblen Bleichen und dem Poisson-Rauschen die kurzen Dunkelzustände zu erkennen.

Im Schnitt zeigte nur jede zweite Zeitspur einen erkennbaren Dunkelzustand, was auf eine hohe Photostabilität der Farbstoffe hinweist. Doch kann aufgrund der fehlenden langen Dunkelzeiten auch vermutet werden, dass die Übergänge in den nichtfluoreszenten Zustand vorhanden, die Verweilzeiten aber meist kürzer als die gewählte Auflösung von 1 ms sind.

Für kleinere Zeitauflösungen müssten höhere Anregungsraten verwendet werden. Diese würden jedoch zu einem schnelleren Bleichen des Farbstoffs führen und eine Analyse der langen fluoreszenten Zeiten verhindern.

In Abb. 7.18(b) und (c) sind die Histogramme der Zeiten im fluoreszenten und nichtfluoreszenten Zustand in doppelt logarithmischer Darstellung zu sehen.

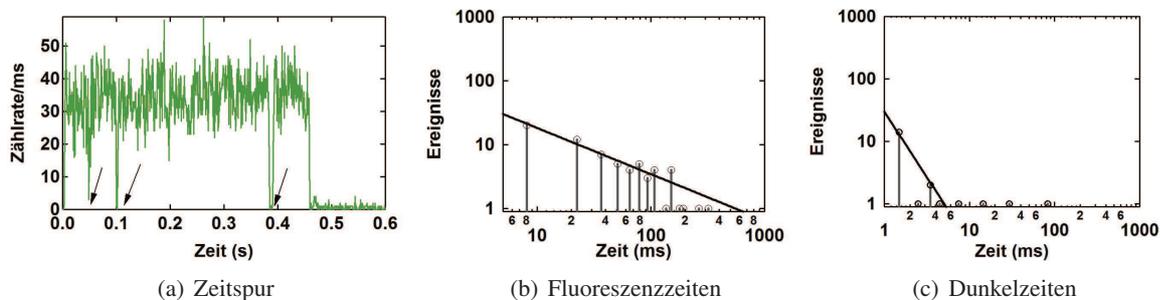


Abbildung 7.18: Zeitspur der detektierten Fluoreszenz von AlexaFluor 488 am ATP-Lid eines immobilisierten Adk-Moleküls bei Anregung mit $2 \mu\text{W}$ bei 488 nm (a). Die Pfeile markieren die Dunkelzeiten. Die Histogramme der Fluoreszenzzeiten (b) und Dunkelzeiten (c) von 46 Zeitspuren. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede, ob mit $4 \mu\text{W}$ bei 470 nm (gepulst, 40 MHz) oder mit einem Dauerstrichlaser bei 488 nm mit $2 \mu\text{W}$ angeregt wurde. Die Anpassungsfunktion für die fluoreszenten Zeiten ergibt den Exponenten $m_f = 0,7 \pm 0,1$ und für die Dunkelzeiten $m_d = 2,1 \pm 0,2$.

Die Länge der Zeitspuren und die Dauer der Dunkelzustände unterschieden sich bei Anregung mit dem Dauerstrichlaser und dem gepulsten Laser bei gleicher Anregungsrate nicht, so dass aufgrund der geringen Häufigkeit der Dunkelzustände die Ergebnisse von insgesamt 46 Zeitspuren in 7.18(b) und (c) zusammen dargestellt sind. Die Achsen wurden hierbei so gewählt, dass ein Vergleich der Histogramme mit den nachfolgenden Experimenten möglich ist.

Die Anregungsrate betrug $3,0 \text{ MHz}$ und entspricht einer Leistung von $2 \mu\text{W}$, wenn eine Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet wird, und $4 \mu\text{W}$ bei 470 nm (siehe Abschnitt 6.7).

Anschließend wurden entsprechend des Potenzgesetzes von Gleichung 4.17 die Exponenten der histogrammierten Zeiten der fluoreszenten Zustände bestimmt. Da der Exponent m_f jedoch kleiner als eins ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Daten sich mit den Ereignissen des irreversiblen Photo-bleichens überlappen. Die Wahrscheinlichkeit für Bleichprozesse ist exponentiell verteilt [44].

Die mittlere Anzahl der detektierten Photonen pro Zeitspur bei Anregung mit dem Dauerstrichlaser betrug 3.000 ± 1.600 und für den gepulsten Laser 2.200 ± 800 . Die Fehlergrenzen zeigen hierbei den Vertrauensbereich des Mittelwertes an.

Das Ergebnis zeigt somit eine leicht geringere Anzahl von Photonen nach gepulster Anregung, obwohl die gleichen Anregungsraten verwendet wurden. Dies ist ein Hinweis für das Auftreten von internen Leiterprozessen in höher angeregte Energieniveaus und die daraus resultierende erhöhte Wahrscheinlichkeit für Photobleichprozesse [44].

Werden die detektierten Photonen entsprechend den Eigenschaften des Systems (siehe Abschnitt 6.7) korrigiert, sind es in etwa $2,5 \cdot 10^4$ bzw. $1,8 \cdot 10^4$ emittierte Photonen pro Fluorophor.

Wird die Laserleistung des 488 nm - Lasers auf das Fünffache gesteigert ($10 \mu\text{W}$), verringert sich die mittlere Länge der Zeitspuren vom Start der Messung bis zum Bleichen von (110 ± 40) ms auf (18 ± 14) ms (20%). Aufgrund der erhöhten Bleichrate verringert sich die Photonenzahl pro Zeitspur auf 1200 ± 600 (40%). Bei einer vierfachen Erhöhung der Leistung des 470 nm-Lasers auf $16 \mu\text{W}$ wird die Länge der Zeitspuren ebenfalls um ca. 20% (15 ± 8 ms) verkürzt und die Photonenzahl pro Zeitspur auf 680 ± 180 (40%) verringert.

Die Verringerung der mittleren Photonenzahl pro Farbstoff weist auf die Zunahme von Zweiphotonenprozessen hin, die eine Besetzung der höher angeregten Zustände beinhalten. In diesen Zuständen ist die Wahrscheinlichkeit für Photobleichprozesse, aber auch für die Bildung von Kation-Elektron-Paaren erhöht. Aus den ionisierten Zuständen entsteht bei Verlust des Elektrons an das Lösungsmittel ein zweiter Pfad für Bleichprozesse (siehe Abschnitt 4.3.4).

7.6.3 AlexaFluor 488 an Adk mit Inhibitor

Nach Zugabe des Inhibitors AP_5A wurden erneut Zeitspuren der Fluorophore aufgenommen, da im geschlossenen Zustand der Adk ein Einfluss des gebundenen Nukleotids durch seine unmittelbare Nähe zu den Fluorophoren nicht ausgeschlossen werden kann. Die Pufferlösung enthielt hierfür 2 mM MgCl_2 und $4 \text{ mM AP}_5\text{A}$.

Die Zeitspuren zeigen einen deutlichen Unterschied. Es treten längere Dunkelzustände im Bereich von 100 ms auf (vgl. Abb. 7.19). Die Gesamtlänge der Zeitspuren betrug im Mittel $(160 \pm 60) \text{ ms}$ und sie sind damit fast doppelt so lang wie beim Apo-Molekül (vgl. Tab. 7.6). Sie wiesen außerdem mehr als dreimal so häufig Dunkelzustände auf.

Das Histogramm in Abb. 7.19(b) zeigt einen zu Apo-Molekülen vergleichbaren Exponenten m_d von 1,9.

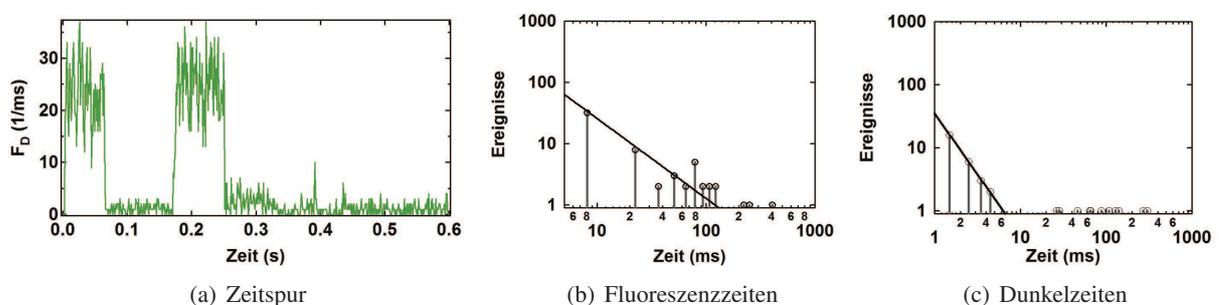


Abbildung 7.19: Zeitspur der detektierten Fluoreszenz von AlexaFluor 488 am ATP-Lid eines immobilisierten Adk-Moleküls mit Inhibitor bei Anregung mit $2 \mu\text{W}$ bei 488 nm (a). Die Histogramme der Fluoreszenzzeiten (b) und Dunkelzeiten (c) von 23 Zeitspuren. Die Anpassungsfunktionen ergeben entsprechend Gleichung 4.17 die Exponenten $m_f = 1,2 \pm 0,1$ und $m_d = 1,9 \pm 0,1$.

Daraus folgt, dass die Anwesenheit des AP₅A -Moleküls nur die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Dunkelzustände erhöht, die Rekombination der ionisierten Fluorophore bleibt unverändert.

Die fluoreszenten Zustände sind im Vergleich zum Apo-Molekül nicht mehr durch die Länge der Zeitspuren bestimmt. So zeigt das Histogramm in Abb. 7.19(b) einen Abfall mit einem Exponenten m_f von 1,2. Die Zeitspuren enthielten im Mittel 2.200 ± 1.000 Photonen (siehe Tab. 7.6).

Die stabilisierende Wirkung des fluoreszenten Zustands wird auch bei Erhöhung der Laserleistung auf das Fünffache ($10 \mu\text{W}$, 488 nm) deutlich. Die mittlere Länge der Zeitspuren ist im Vergleich zum Apo-Molekül nur halbiert ($90 \pm 70 \text{ ms}$) und die Anzahl detektierter Fluoreszenzphotonen mit 3.400 ± 1.500 sogar erhöht.

7.6.4 AlexaFluor 488 an Adk unter Stoffumsatz

Nun wurde anstelle des Inhibitors das Verhalten nach Zugabe des Substrats Mg-ADP in einer Konzentration von 10 mM untersucht. Die Zeitspur, die in Abb. 7.20(a) dargestellt wird, zeigt exemplarisch die verstärkt auftretenden Fluktuationen der Fluoreszenz.

Die Zeitspuren sind dabei mit $(610 \pm 300) \text{ ms}$ vierfach so lang wie bei der Adk mit gebundenem Inhibitor und sechsfach so lang wie beim Apo-Molekül. Doch treten pro Zeitspur ca. 11 Übergänge in den Dunkelzustand auf, und es werden 5.500 ± 2.000 Photonen pro Fluorophor detektiert, das Doppelte im Vergleich zur AP₅A-gebundenen Adk (siehe Tab. 7.6).

Das Histogramm der fluoreszenten Zeiten zeigt einen deutlich schnelleren Übergang in den Dunkelzustand, der Exponent m_f beträgt nun 1,4. Der Wert für α_f ist doppelt so groß (vgl. Gleichung 4.17). Vielleicht spielen dabei die fast zehnfach erhöhten Raten der Konformationsdynamik eine Rolle (siehe Tab. 8.4).

Im Gegensatz dazu bleibt der Exponent der Dunkelzustände m_d mit 2,0 mit den Experimenten des Apoenzyms und des Inhibitor-gebundenen Enzyms vergleichbar, d.h. die Rückkehr aus dem Dunkelzustand ist in ihrer Wahrscheinlichkeit unverändert.

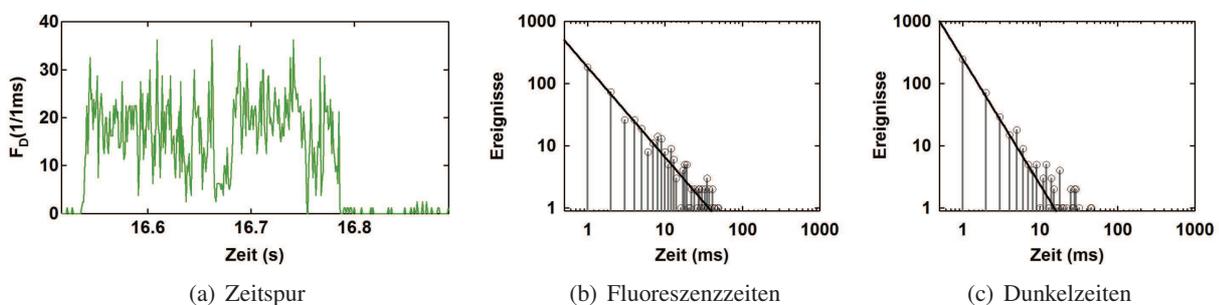


Abbildung 7.20: Zeitspur der detektierten Fluoreszenz von AlexaFluor 488 am ATP-Lid eines immobilisierten Adk-Moleküls mit Mg-ADP bei Anregung mit $2 \mu\text{W}$ bei 488 nm (a). Die Histogramme der Fluoreszenzzeiten (b) und Dunkelzeiten (c) von jeweils 45 Zeitspuren. Die Anpassungsfunktionen ergeben entsprechend Gleichung 4.17 die Exponenten mit $m_f^{\text{ADP}} = 1,4 \pm 0,1$ und $m_d^{\text{ADP}} = 2,0 \pm 0,1$.

7.6.5 AlexaFluor 633

AlexaFluor 633 wurde in ähnlicher Weise untersucht, und im Folgenden sollen die Ergebnisse im Vergleich mit AlexaFluor 488 diskutiert werden.

In Abb. 7.21(a) ist eine Zeitspur, die die Apoenzyme sowie die Inhibitor-gebundenen Moleküle charakterisiert, dargestellt.

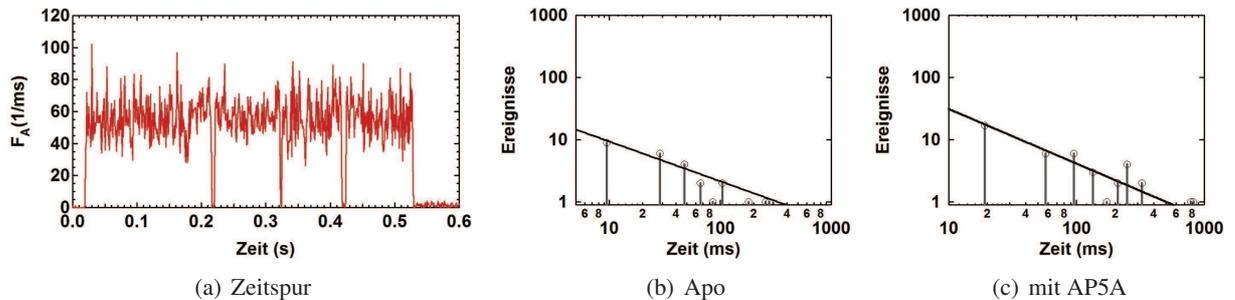


Abbildung 7.21: Zeitspur der detektierten Fluoreszenz von AlexaFluor 633 am ATP-Lid eines immobilisierten Adk-Moleküls mit Inhibitor bei Anregung mit $3 \mu\text{W}$ bei 635 nm (gepulster Laser) (a). Die Histogramme der Fluoreszenzzeiten (b) und Dunkelzeiten (c) von jeweils 10 Zeitspuren. Die Anpassungsfunktionen ergeben entsprechend Gleichung 4.17 die Exponenten $m_f^{Apo} = 0,6 \pm 0,1$ und $m_f^{Ap5a} = 0,9 \pm 0,1$.

Die Zeitspurenlängen variierten sehr stark. Beim Apo-Molekül betrug die mittlere Länge $200 \pm 150 \text{ ms}$ mit einer mittleren Photonenzahl von 5.000 ± 4.000 pro Zeitspur. Wird diese Zahl entsprechend der Eigenschaften des optischen Systems (siehe Abschnitt 6.7) korrigiert, entspricht dies in etwa $5,0 \cdot 10^4$ Photonen pro Fluorophor. Dies ist trotz der geringeren Quantenausbeute für AlexaFluor 633 ungefähr das zweifache verglichen mit AlexaFluor 488 (siehe Tab. 7.6). Die Anregungsraten waren für AlexaFluor 633 mit $4,2 \text{ MHz}$ leicht größer als für AlexaFluor 488 mit $3,0 \text{ MHz}$ (für Umrechnungen vgl. Abschnitt 7.4).

Es deutet darauf hin, dass AlexaFluor 633 gegenüber Photobleichprozessen und reversiblen Dunkelzuständen nicht so anfällig wie AlexaFluor 488 ist. Das zeigen auch die Histogramme der fluoreszenten Zustände in Abb. 7.21(b) und (c). Die Exponenten m_f sind jeweils kleiner als eins, was auf seltene Dunkelzustände und einen starken Einfluss des Photobleichens auf die Länge der Zeitspur hinweist.

Die Histogramme der Dunkelzeiten des Apoenzyms und auch der Moleküle mit Inhibitor konnten nicht nach dem Potenzgesetz gefittet werden und werden daher nicht gezeigt. Die gemessenen Dunkelzeiten waren jedoch zu 95% kürzer als 10 ms .

Mit gebundenem Inhibitor traten ähnlich zu AlexaFluor 488 sehr vereinzelt auch längere Dunkelzeiten im Bereich von $100 - 600 \text{ ms}$ auf. Ebenso war die photochemische Lebensdauer erhöht, so dass die Länge der Zeitspuren im Mittel $460 \pm 300 \text{ ms}$ und die Anzahl der detektierten Photonen pro Zeitspur 14.000 ± 8.000 betrug. Trotz schlechter Statistik ist eine ähnliche Tendenz wie für AlexaFluor 488 erkennbar.

Dies gilt ebenso für das Verhalten des Fluorophors, wenn das Adk-Molekül unter Stoffumsatz steht. Eine Auswertung von 42 Zeitspuren zeigte zwar eine im Vergleich zum Inhibitor-gebundenen Molekül gleichbleibende photophysikalische Lebensdauer mit 13.000 ± 6.000 detektierten Photonen und einer

durchschnittlichen Länge der Zeitspuren von 570 ± 250 ms, doch ist aus den Histogrammen der fluoreszenten und nichtfluoreszenten Zeiten ein deutlicher Einfluss der Nukleotide sichtbar (siehe Abb. 7.22).

Der Exponent m_f von 1,2 bestätigt wiederum die höhere Photostabilität von AlexaFluor 633 im Vergleich zum AlexaFluor 488. Der Exponent m_d ist mit 1,5 jedoch kleiner und bedeutet, dass die nichtfluoreszenten Zustände zwar seltener auftreten, aber wenn das Fluorophor sich in dem Dunkelzustand befindet, dieser in der Regel länger andauert.

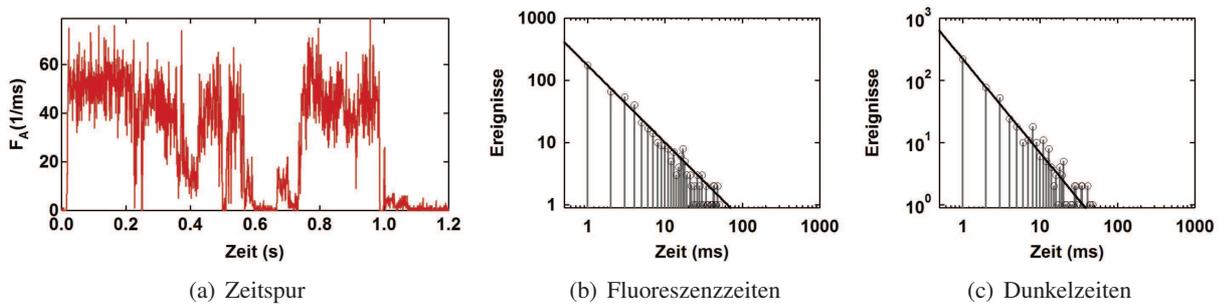


Abbildung 7.22: Zeitspur der detektierten Fluoreszenz von AlexaFluor 633 am ATP-Lid eines immobilisierten Adk-Moleküls mit Mg-ADP mit $3 \mu\text{W}$ bei 635 nm (a). Die Histogramme der Fluoreszenzzeiten (b) und Dunkelzeiten (c) von 42 Zeitspuren. Die Anpassungsfunktionen ergeben entsprechend Gleichung 4.17 die Exponenten $m_f^{ADP} = 1,24 \pm 0,05$ und $m_d^{ADP} = 1,47 \pm 0,04$.

	Nukleotid	T (ms)	N	m_f	m_d
AlexaFluor 488	—	110 ± 40	3.000 ± 1.600	$0,7 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$
	AP ₅ A	160 ± 60	2.200 ± 1.000	$1,2 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$
	ADP	610 ± 300	5.500 ± 2.000	$1,4 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
AlexaFluor 633	—	200 ± 150	5.000 ± 4.000	$0,6 \pm 0,1$	—
	AP ₅ A	460 ± 300	14.000 ± 8.000	$0,9 \pm 0,1$	—
	ADP	570 ± 250	13.000 ± 6.000	$1,24 \pm 0,05$	$1,47 \pm 0,04$

Tabelle 7.6: Die mittlere Länge der Zeitspur bis zum Bleichen T und die mittlere detektierte Photonenzahl pro Zeitspur N (Mittelwert \pm Vertrauensbereich des Mittelwertes) sowie die Exponenten der Potenzfunktionen für die fluoreszenten Zeiten m_f und Dunkelzeiten m_d (Mittelwert \pm Standardabweichung) für AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 gebunden an das Apoenzym bzw. Enzym mit gebundenem Inhibitor oder Substrat. Die Anregung erfolgte bei $2 \mu\text{W}$ (AlexaFluor 488, 488 nm) und $3 \mu\text{W}$ (AlexaFluor 633, 635 nm).

Zusammenfassung:

Neben dem Photonenrauschen und der Triplettkinetik beeinflussen auch Zustände mit niedrigen Quanteneffizienzen die Fluoreszenz der Farbstoffe. Die Übergänge in die Dunkelzustände treten verstärkt auf, wenn Substrate gebunden sind oder in der Lösung vorliegen und schränken die Fluorophore in ihrer Funktion als Marker ein. AlexaFluor 633 zeigt hierbei im Vergleich zu AlexaFluor 488 eine höhere Photostabilität.

7.7 Experimente zur Erhöhung der Photostabilität

Wie bereits mehrfach erwähnt, sind ein konstantes Fluoreszenzsignal und eine hohe photophysikalische Lebensdauer der Fluorophore für deren Verwendung als Marker notwendig. In diesem Kapitel soll es nicht mehr schwerpunktmäßig um die soeben beschriebenen Dunkelzustände sondern vielmehr um die Verbesserung der photophysikalischen Lebensdauer durch eine Umgebung reaktionsträger Substanzen und der Erhöhung der Photoemission durch effiziente Triplettquencher gehen.

Wie in den Abschnitten 4.4.1 und 4.3.4 beschrieben, spielt bei diesen Fragen der in Wasser gelöste Sauerstoff eine zentrale Rolle. Der Triplett-Sauerstoff ist als effizienter Triplettquencher oft erwünscht, der Singulett-Sauerstoff wird jedoch aufgrund seiner Reaktionsfreudigkeit und den damit verbundenen negativen Einflüssen auf die photochemische Lebensdauer gern vermieden (siehe Abschnitt 4.4.4).

Um eine höhere Lebensdauer der Fluorophore zu erhalten, wurden Experimente mit Ascorbinsäure und mit einem Sauerstofffängersystem Glukoseoxidase (GOD) durchgeführt. Die nach dem Entzug von Sauerstoff notwendigen Triplettquencher Trolox und MEA wurden bezüglich ihrer Wirkung auf die Fluoreszenz von AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 getestet. Für FRET-Experimente ist besonders darauf zu achten, dass der Triplettquencher für beide verwendete Farbstoffe die geeignet sind.

7.7.1 Durchführung der Experimente

Alle Untersuchungen zur Photostabilität wurden in einer 600 μl großen Messkammer durchgeführt, die luftdicht verschlossen werden kann. Sie wurde vollständig mit der Messlösung gefüllt. Mittels einer Kanüle wurden über eine Gummimembran die Substanzen eingebracht. Die Diffusionsmessungen wurden mit Hilfe des Wasserimmersionsobjektivs in einer Tiefe von 40 μm von der Glasoberfläche durchgeführt. Für oberflächennahe Messungen an immobilisierten Molekülen wurde das Ölimmersionsobjektiv verwendet.

Zur Anregung für AlexaFluor 488 wurde der Dauerstrichlaser (488 nm) verwendet und für AlexaFluor 633 die gepulste Anregung (635 nm), da diese Laserkombination auch für die Untersuchung der zweifachmarkierten Moleküle (FRET-Experimente) eingesetzt war (siehe Kapitel 8.2.1).

Die Untersuchung des Einflusses von den im nächsten Abschnitt vorgestellten Substanzen auf die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe wurde mit Hilfe von Burstexperimenten durchgeführt. Meist wurde neben den aus den Korrelationsfunktionen gewonnenen Triplettraten und dem Triplettanteil auch die molekulare Helligkeit entsprechend Gleichung 5.14 bestimmt und unter Verwendung von Gleichung 5.15 bezüglich des Hintergrunds korrigiert.

Die Korrelationsfunktionen selbst wurden wie bei den Experimenten zur Fluoreszenzsättigung (siehe Abschnitt 7.4.1) unter Verwendung eines 50/50-Strahlteilers gewonnen.

7.7.2 Verwendete Substanzen

Um die photophysikalische Lebensdauer und somit die Fluoreszenzausbeute beider Farbstoffe, des Donors sowie des Akzeptors, zu erhöhen, wurden verschiedene Substanzen getestet.

7.7.2.1 Ascorbinsäure

Die Ascorbinsäure (Vitamin C) ist als starker Radikalfänger bekannt. Sie enthält in ihrer Struktur (siehe Abb. 7.23) vier Hydroxylgruppen und kann bei der Reaktion zur Dehydroascorbinsäure zwei Wasserstoffradikale freisetzen, die ihrerseits mit Sauerstoffradikalen zu Wasserstoffperoxid reagieren.

Die verwendete Ascorbinsäure (Sigma, Deutschland) wurde in Puffer gelöst und der pH-Wert auf 7.0 eingestellt. Anschließend wurden bei Konzentrationen von 10 μM , 100 μM , 1 mM und 10 mM die Kreuzkorrelationsfunktionen des Fluoreszenzsignals (50/50-Strahlteiler) des gebundenen AlexaFluor 488 bei 488 nm, 80 μW und des AlexaFluor 633 bei 635 nm, 10 μW , bestimmt.

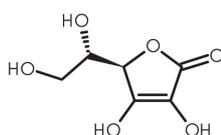
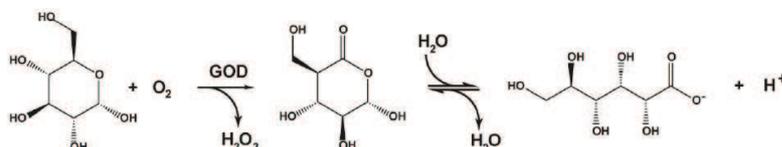


Abbildung 7.23: Chemische Struktur der Ascorbinsäure.

7.7.2.2 Glukoseoxidase

Zur Verminderung der gelösten Konzentration des gesamten Sauerstoffs wurde das Glukoseoxidase - Katalase - System verwendet. Die enzymatische Entfernung von Sauerstoff durch Glukoseoxidase (GOD) läuft in zwei Schritten ab. Zunächst katalysiert das Flavoenzym die Umsetzung von Sauerstoff und Glukose zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid:



Wasserstoffperoxid ist jedoch ein sehr starkes Oxidationsmittel, welches die Fluorophore sofort oxidiert. Daher ist die Verwendung einer Katalase (KAT) notwendig, die zwei Wasserstoffperoxidmoleküle unter Freisetzung eines Sauerstoffmoleküls in Wasser umwandelt:



Folglich wird beim zweimaligen Durchlaufen der ersten Reaktion unter der Wirkung der Katalase insgesamt eines der gelösten Sauerstoffmoleküle verbraucht und die O_2 -Konzentration gemindert. Der Nachteil dieses Systems ist der, dass die Glukoseoxidase für Wellenlängen bis 520 nm fluoreszent ist (siehe Abb. 7.24). Dies führt bei Anregung in diesem Bereich zu störenden Erhöhungen des Hintergrunds.

Zur Entfernung von Sauerstoff wurde 0,4% (w,w) β -D-Glukose, 10 U/ml Glukoseoxidase (Sigma) und 2000 U/ml Katalase (Sigma) verwendet. Die Glukose und die Katalase hatten dabei keine Einflüsse auf das Fluoreszenzsignal oder die Triplettkinetik der untersuchten Farbstoffe. Nur die Diffusionszeit erhöhte sich leicht aufgrund der Viskositätserhöhung nach Zusatz von Glukose. Messungen bei höheren

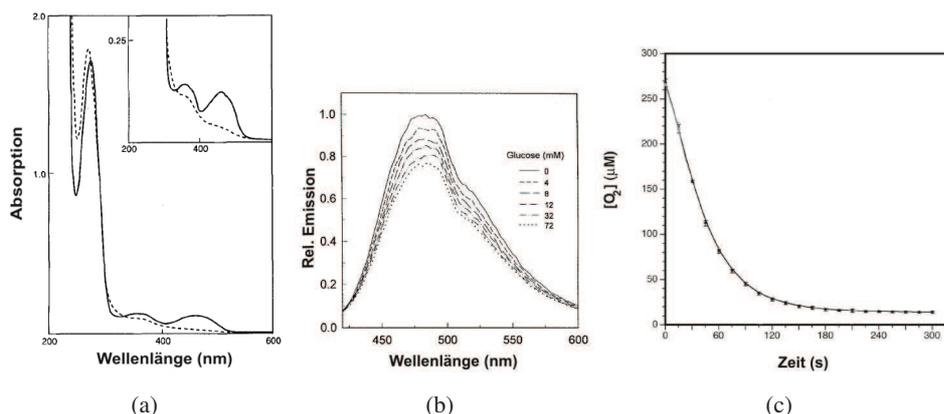


Abbildung 7.24: Spektrale Absorption (a) und Emission (b) der Glukoseoxidase und die zeitliche Abnahme der Sauerstoffkonzentration bei Zugabe von 100 nM GOD, 1,5 μM Katalase und 56 mM Glukose (c). Die durchgezogene Kurve in (b) gilt für eine Glukosekonzentration von 10 mM. In (c) ist die Abnahme der Sauerstoffkonzentration nach Zugabe von GODKAT bei vergleichbaren Ausgangskonzentrationen dargestellt. Entnommen aus [137], [29] und [3].

Konzentrationen von GOD waren aufgrund der hohen Fluoreszenz der Glukoseoxidase bei Anregung bei 488 nm nicht möglich.

Die Sauerstoffkonzentration im Wasser beträgt bei Raumtemperatur und Normaldruck ca. 500 μM. D.h., dass sich in einem abgeschlossenen Gefäß mit 600 μl Puffer ca. 0,8 μmol Sauerstoff befinden. Da eine Konzentration von 10 U/ml GOD für dieses Volumen einen Umsatz von 6 μmol Sauerstoff pro Minute bedeutet, sollte diese Aktivität genügen, wenn nach der Zugabe einige Minuten gewartet wird (vgl. Abb. 7.24(c)). Kontrollmessungen am Fluorophor ergaben nach der Zugabe der GOD und Katalase sowie 5 Minuten Wartezeit einen sehr großen Triplettanteil, der beliebig durch Zugabe von Triplettquenchern verringert werden konnte. Daher kann von einem für den Versuch ausreichenden Grad der Desoxygenierung ausgegangen werden. Vergleichsweise werden in [118] 165 U/ml verwendet, die Messungen jedoch an immobilisierten Farbstoffen durchgeführt. Nach Zugabe des GODKAT-Systems nahm die molekulare Helligkeit der gebundenen Farbstoffe stark ab und der Hintergrund stieg bei Anregung mit 488 nm im Donorkanal um das Fünffache an. Daher ähnelt die Korrelationsfunktion von AlexaFluor 488 in diesem Fall dem korrelierten Hintergrundsignal (siehe Abb. 7.25). Für den Akzeptorkanal dagegen blieb der Zusatz von GOD ohne Auswirkungen auf das Hintergrundsignal.

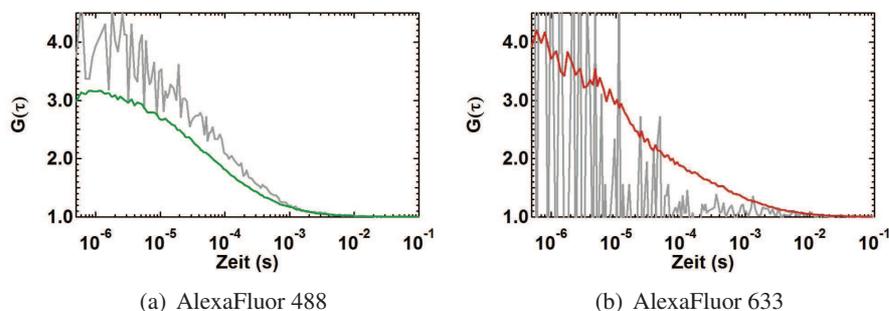


Abbildung 7.25: Korrelationsfunktionen der Fluoreszenz des AlexaFluor 488 (a) und AlexaFluor 633 (b) gebunden am ATP-Lid in GODKAT (grün bzw. rot) im Vergleich 78 dem Korrelationssignal der Lösung ohne Farbstoffe.

7.7.2.3 Triplettquencher

Als Triplettquencher bei Messungen in desoxygenierten Lösungen wurde zum einen 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Sigma), auch Trolox genannt, verwendet (siehe Abb. 7.26). Da die Sättigungskonzentration bei Raumtemperatur nur 2 mM beträgt, wurde mit TRIS-Puffer eine von Trolox gesättigte Lösung hergestellt, die nach einer Filtration (0,1 μm) als neue Pufferlösung verwendet wurde. Zum anderen wurde der Triplettquencher 2-Mercaptoethylamin, MEA, (Sigma) verwendet. Diese Versuche wurden bei verschiedenen Konzentrationen (0,5 - 8 mM) durchgeführt.

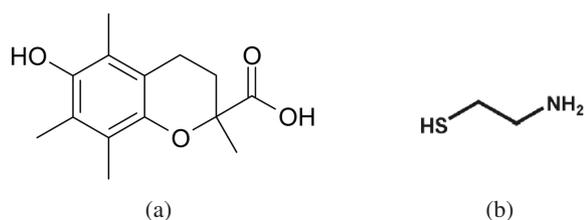


Abbildung 7.26: Chemische Struktur von Trolox (a) und MEA (b).

7.7.3 Ascorbinsäure

Ascorbinsäure, auch bekannt als Vitamin C, ist ein starker antioxidativer Wirkstoff und dient als Radikalfänger. Seine positive Wirkung auf die Lebensdauer und Quantenausbeute von Fluorophoren wurde bereits beschrieben [162, 39].

Zur Untersuchung der Fluoreszenzausbeute wurde die Fluoreszenzemission von AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 korreliert. Dieser Versuch wurde an doppelt markierter Adk und unter Anregung mit zwei Lasern, jeweils für den Donor und für den Akzeptor, durchgeführt (siehe dazu Abschnitt 8.2.1).

Vergleicht man die Korrelationsfunktionen ohne und mit 10 mM Ascorbinsäure (siehe Abb. 7.27), fällt auf, dass die Ascorbinsäure für AlexaFluor 488 und 633 die Triplett sättigung erhöht. Die mittlere Anzahl der Moleküle im Triplettzustand wird verdoppelt. Für AlexaFluor 488 steigt der Triplettanteil von 23% auf 47% und bei AlexaFluor 633 von 31% auf ca. 70%.

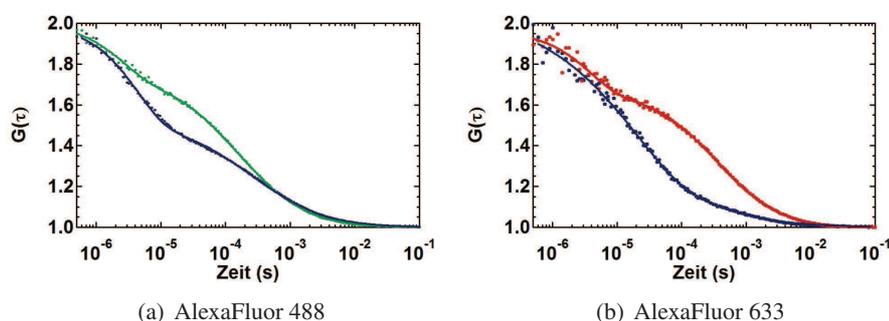


Abbildung 7.27: Normierte Korrelationsfunktionen der Fluorophore AlexaFluor 488 (a) und 633 (b) gebunden an der Adk ohne (grün bzw. rot) und mit 10 mM Ascorbinsäure (blau). Die Anregung erfolgte mit 40 μW (488 nm) und 10 μW (635 nm).

Der Anstieg im Triplettanteil tritt bereits ab Ascorbinsäurekonzentrationen von 100 μM auf und es ist nicht geklärt, ob dies auf eine Interaktion mit dem Farbstoff selbst oder eine Reduzierung der Effizienz

von Sauerstoffmolekülen als Triplettquencher zurückzuführen ist. Da die gelöste Sauerstoffkonzentration bei Normaldruck und Raumtemperatur ca. 500 μM beträgt [151], sind diese hohen Konzentrationen von Ascorbinsäure jedoch notwendig. In [118] beispielsweise wurden 100 mM Ascorbinsäure für ein ähnliches Experiment verwendet.

Die vermehrte Population des Triplettzustands verringert jedoch die Fluoreszenzausbeute drastisch und macht eine Verwendung der Farbstoffe als fluoreszente Marker unter diesen Bedingungen zunichte.

7.7.4 GOD

Weiterhin wurden Experimente mit dem Sauerstofffängersystem Glukoseoxidase und Katalase (GOD-KAT) durchgeführt. Der Entzug des Sauerstoffs soll die photophysikalische Lebensdauer des Farbstoffes erhöhen (Details siehe Abschnitt 7.7.2.2).

In Abb. 7.28 sind die Korrelationsfunktionen von AlexaFluor 488 und 633 gebunden an das ATP-Lid der Adk mit und ohne Zusatz des Sauerstofffängers GOD in der verwendeten Pufferlösung zu sehen. Die für das Sauerstofffängersystem verwendete Glukose erhöhte die Diffusionszeit um etwa 1%, die Katalase hatte keinen messbaren Einfluss.

Der Anstieg des Triplettanteils ist nach der Reduktion des Sauerstoffgehaltes dramatisch. Die molekulare Helligkeit sinkt von 55.000 auf ca. 3.000 Photonen/s für AlexaFluor 488 und von 26.000 auf ca. 4.000 Photonen/s für AlexaFluor 633. Das Signal-Rausch-Verhältnis war nach Zugabe von GOD so niedrig, dass die molekulare Helligkeit nur abgeschätzt werden konnte. Gerade für die Anregung mit 488 nm war je nach GOD-Konzentration ein starker Anstieg des Hintergrunds zu verzeichnen (siehe auch Abschnitt 7.7.2.2).

Die starke Besetzung der Triplettzustände zeigt zum einen die ausreichende Desoxygenierung des Puffers für photophysikalische Effekte und zum anderen den starken Einfluss von Sauerstoff als Triplettquencher. Die Reversibilität des Ergebnisses wurde durch das nachträgliche Hinzufügen von Triplettquenchern (z.B. MEA) überprüft. Nach der Zugabe verringerte sich der Triplettanteil und das Fluoreszenzsignal kehrte zurück.

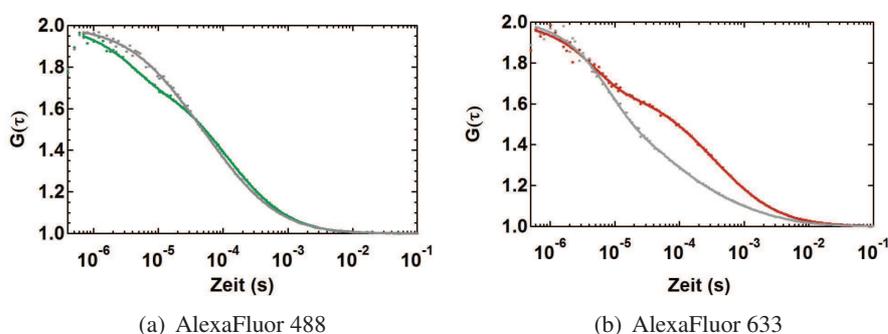


Abbildung 7.28: Normierte Korrelationsfunktionen der Fluoreszenz von gebundenem AlexaFluor 488 (a) und 633 (b) vor (grün bzw. rot) und nach (grau) der Zugabe des GOD-Sauerstofffängersystems zeigen die Effektivität des Sauerstoffs als Triplettquencher. Die Anregung erfolgte bei 100 μW (488 nm) und 50 μW (635 nm).

7.7.5 Trolox

Hydroxytetramethylchromancarbonsäure, oder auch als Trolox bekannt, soll nun in desoxygeniertem Puffer die Funktion des Sauerstoffs als Triplettquencher ersetzen. Trolox wurde dabei in seiner Sättigungskonzentration von 2 mM verwendet. In Abb. 7.29 ist das Ergebnis für das ungebundene AlexaFluor 488 mit und ohne Sauerstoff sowie mit Trolox als neuem Triplettquencher dargestellt.

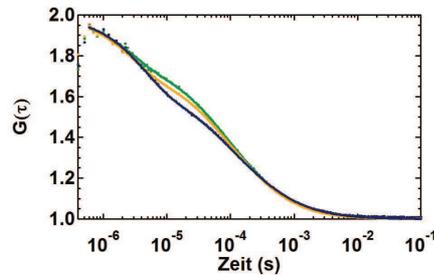


Abbildung 7.29: Normierte Korrelationsfunktionen von ungebundenem AlexaFluor 488 in Puffer mit Glukose und Katalase (grün), mit 2 mM Trolox vor (gelb) und nach (blau) der Zugabe von GOD. Die Anregungen erfolgten bei 488 nm mit 100 μ W.

In einer 2 mM-Trolox Lösung ist bei unveränderter Sauerstoffkonzentration in Bezug auf Puffer ohne Trolox ein leichter Anstieg des Triplettanteils von 21% auf 25% zu verzeichnen. Wird der Pufferlösung der Sauerstoff entzogen, werden die Triplettzustände des ungebundenen Farbstoffes durch die Trolox-Moleküle zwar weiterhin gequencht, aber sie sind weniger effektiv. Der Sauerstoff und der Triplettanteil beträgt 32%.

An gebundenen Farbstoffmolekülen ist Trolox noch ineffizienter (siehe Abb. 7.30(a)). Der Triplettanteil von gebundenem AlexaFluor 488 steigt in Gegenwart von Trolox auf 39% und nach der Zugabe von GOD auf 49%. Die molekulare Helligkeit des gebundenen Farbstoffes ist von ursprünglich 58.000 Photonen/s (mit Sauerstoff) auf 43.000 Photonen/s gefallen (vgl Tab. 7.7).

Die Unterschiede zwischen gebundenen und ungebundenen Farbstoffen können durch Veränderungen der elektronischen Zustände durch die unmittelbare Umgebung verursacht werden und zeigen die Komplexität der Photophysik. Es wurden keine Unterschiede zwischen der Bindungsstelle am AMP- oder am ATP-Lid festgestellt.

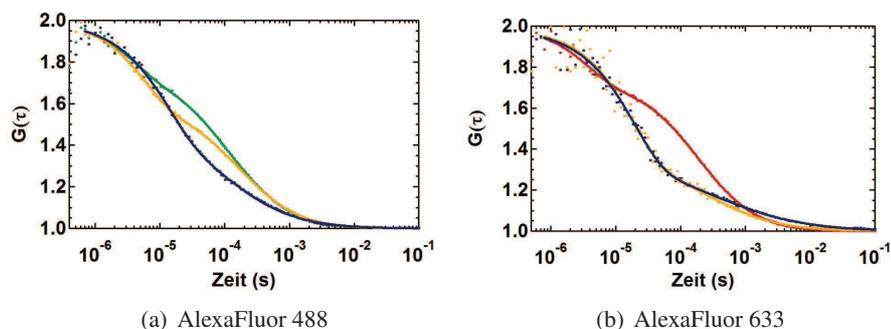


Abbildung 7.30: Normierte Korrelationsfunktionen von gebundenem AlexaFluor 488 (a) und AlexaFluor 633 (b) in Puffer mit Glukose und Katalase (grün), mit 2 mM Trolox vor (gelb) und nach (blau) der Zugabe von GOD. Die Anregungen erfolgten bei 488 nm und 100 μ W bzw. bei 635 nm und 50 μ W.

Die Ergebnisse für das gebundene AlexaFluor 633 verhalten sich sehr ähnlich (siehe Abb. 7.30(b)). Es fällt jedoch auf, dass schon die Konzentration von 2 mM Trolox in einer mit Sauerstoff gesättigten Pufferlösung die Zunahme des Triplettanteils von 31% auf 58% verursacht. Die Tripletrate sinkt und die molekulare Helligkeit fällt von 26.000 Photonen/s auf 16.000 Photonen/s. Durch zusätzlichen Sauerstoffentzug verringert sie sich auf 10.000 Photonen/s. Auch bei AlexaFluor 633 konnte keine Lid-Spezifität festgestellt werden.

Aufgrund der schlechten Effizienzen von Trolox als Triplettquencher kommt dieser für die Fluoreszenzspektroskopie nicht in Frage.

gebundenes AlexaFluor 488	T (%)	k_T (kHz)	η (Photonen/s)	Beurteilung
—	23	284	55.000	+
Ascorbinsäure	47	224	k. A.	—
Trolox	39	176	48.000	—
MEA	3 (*)	570 (*)	68.000	++
Glukose + KAT	24	299	58.000	+
Glukose+ GODKAT	80 (*)	133 (*)	3.000 (**)	— — —
Trolox + Glukose + GODKAT	49 (*)	68 (*)	43.000 (**)	— —
MEA + Glukose + GODKAT	1 (*)	560 (*)	67.000 (**)	++

gebundenes AlexaFluor 633	T (%)	k_T (kHz)	η (Photonen/s)	Beurteilung
—	31	203	24.000	+
Ascorbinsäure	70 (*)	16 (*)	k. A.	— —
Trolox	58 (*)	76 (*)	16.000	—
MEA	25	312	32.000	++
Glukose + KAT	30	216	26.000	+
Glukose + GODKAT	51 (*)	64 (*)	4.000 (**)	— — —
Trolox + Glukose + GODKAT	58 (*)	59 (*)	10.000 (**)	— —
MEA + Glukose + GODKAT	42	146	20.000 (**)	—

Tabelle 7.7: Triplettanteile T , Tripletttraten k_T und molekulare Helligkeit η für gebundenes AlexaFluor 488 und 633 unter unterschiedlichen Bedingungen bei Anregung mit 100 μ W (488 nm, Dauerstrichlaser) bzw. 50 μ W (635 nm, gepulster Laser). Die Experimente mit der Ascorbinsäure wurden abweichend dazu mit 40 μ W (488 nm) und 10 μ W (635 nm) durchgeführt. Die Standardabweichung des Triplettanteils beträgt 1%, die der Tripletttraten und der molekularen Helligkeiten 5%. Ein Stern (*) bedeutet, dass diese Werte mit der verwendeten Anpassungsfunktion mit hohem bzw. niedrigem Triplettanteil nur sehr schlecht zu ermitteln waren und daher die Fehlergrenzen größer sind. Zwei Sterne (**) bedeuten, dass nur eine Abschätzung der molekularen Helligkeit aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses möglich war. Die Plus- bzw. Minuszeichen geben eine Beurteilung der Wirkung der verwendeten Messlösung auf die Photoemissionsrate der Fluorophore an.

7.7.6 MEA

2-Mercaptoethylamin (MEA) wurde bereits erfolgreich als Triplettquencher für Rhodaminfarbstoffe eingesetzt [162, 39].

Auch für AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 ist nach Zugabe von 2 mM MEA eine deutliche Verbesserung der Fluoreszenzausbeute im Vergleich zu Trolox zu erkennen. Bei geringeren Konzentrationen als 2 mM MEA ist die Wirkung von der Konzentration abhängig.

Für AlexaFluor 488 scheint MEA sogar ein besserer Triplettquencher als Sauerstoff zu sein. Der sicht-

bare Triplettanteil in den Korrelationsfunktionen verschwindet trotz der Anregungsleistung von $100 \mu\text{W}$ vollständig und verändert sich auch nach dem Entzug von Sauerstoff nicht (siehe Abb. 7.31(a)). Die molekulare Helligkeit nahm bei der Zugabe von MEA von 55.000 Photonen/s auf 68.000 Photonen/s zu (vgl. Tab. 7.7).

Bei Anregungsleistungen von 1 mW betrug bei einer Kombination von Sauerstoff und 2 mM MEA der Triplettanteil 12% und 16% nach Zugabe von GODKAT. Dies ist für eine so hohe Anregungsrate ein sehr geringer Anteil. In sauerstoffgesättigtem Puffer beträgt der Triplettanteil in diesem Anregungsbereich vergleichsweise 30% .

Auch AlexaFluor 633 zeigte bei Anregung mit dem gepulsten Laser unter Sauerstoffsättigung und Zugabe von 2 mM MEA eine Abnahme des Triplettanteils von 31% auf 25% . Doch nach Entfernung des Sauerstoffs stieg dieser Anteil auf 42% . Die molekularen Helligkeiten betragen unter Sauerstoffsättigung 26.000 Photonen/s und mit GODKAT 20.000 Photonen/s. Dieser Verlust an Photonen sollte FRET-Experimente mit hohem Energietransfer jedoch nicht einschränken und daher wäre MEA auch zur Verbesserung der Fluoreszenzausbeute bei FRET-Experimenten geeignet.

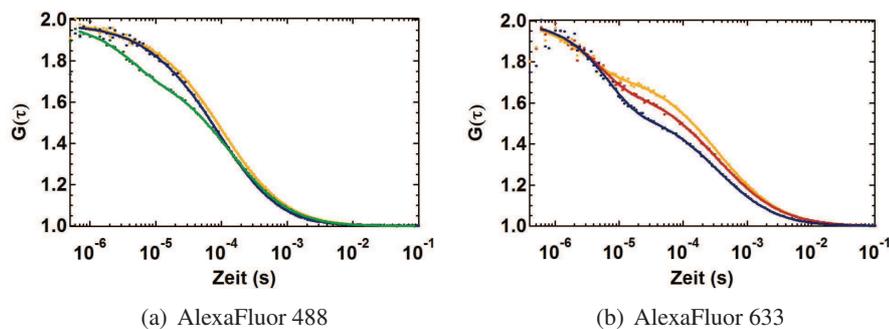


Abbildung 7.31: Normierte Korrelationsfunktionen von gebundenem AlexaFluor 488 (a) und AlexaFluor 633 (b) in Puffer mit Glukose und Katalase (grün bzw. rot), mit 2 mM MEA vor (gelb) und nach (blau) der Zugabe von GOD. Die Anregungen erfolgten bei 488 nm und $100 \mu\text{W}$ bzw. bei 635 nm und $50 \mu\text{W}$.

Bei Anregung mit dem HeNe-Laser ergibt sich für AlexaFluor 633 interessanterweise ein anderes Bild. Da nun vorwiegend T_1 -Zustände besetzt werden, ist im sauerstoffgesättigten Puffer die rISC-Rate langsamer und der Anteil der Moleküle im Triplett größer als bei Anregung mit dem gepulsten Laser.

Bei gleicher Anregungsleistung von $50 \mu\text{W}$ reduziert sich unter Zugabe von 2 mM MEA der Triplettanteil von 39% wie bei Anregung mit dem gepulsten Laser zunächst auf 24% (siehe Abb. 7.32(a)). Wird der Sauerstoff jedoch entzogen, erhöht sich dabei der Triplettanteil im Gegensatz zum gepulsten Laser nicht.

Wird die Anregungsleistung des HeNe-Lasers erhöht, nimmt die Wahrscheinlichkeit für Leiterprozesse in höhere Triplettzustände zu. Das Plateau in Abb. 7.33(a) entspricht der Tripletttsättigung unter gepulster Anregung mit Sauerstoff als Triplettquencher. Bei $750 \mu\text{W}$ beträgt der Triplettanteil 42% .

Für die Anregung mit dem 633 nm Laser konnten durch leistungsabhängige Messungen (vgl. Abschnitt 7.4.4) die rISC-Raten bestimmt werden (Abb. 7.33). Wie erwartet war die Rate, bei der Sauerstoff und MEA im Lösungsmittel vorhanden waren mit $k_{risc}^{O_2, MEA} = 551 \text{ kHz}$ am größten. Dies entspricht einer Triplettlebensdauer von $1,8 \mu\text{s}$. Im Vergleich zu Sauerstoff mit $k_{risc}^{O_2} = 206 \text{ kHz}$ ($\tau_T = 4,9 \mu\text{s}$) war MEA mit $k_{risc}^{MEA} = 392 \text{ kHz}$ ($\tau_T = 2,6 \mu\text{s}$) der bessere Triplettquencher.

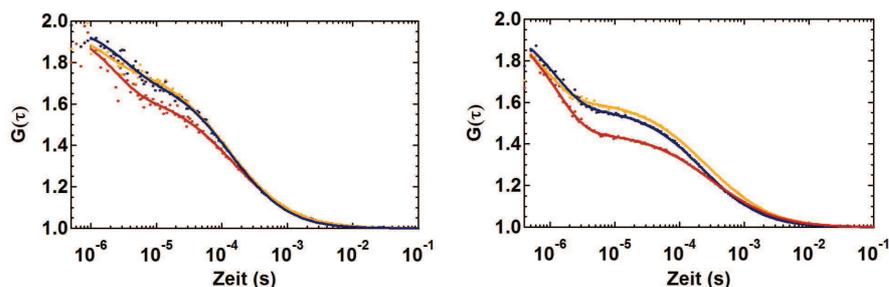


Abbildung 7.32: Normierte Korrelationsfunktionen von AlexaFluor 633 gebunden am ATP-Lid in Puffer (rot), mit 2mM MEA vor (gelb) und nach (blau) der Zugabe von GOD. Anregung mit dem HeNe-Laser bei 50 μ W (a) und 750 μ W (b).

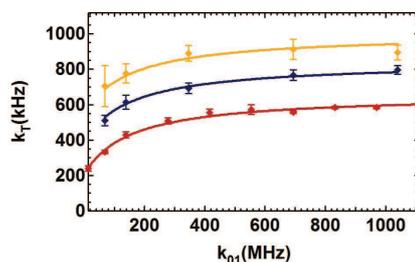


Abbildung 7.33: Tripletrate von AlexaFluor 633 gebunden am ATP-Lid in Puffer (rot) und unter Zugabe von 8 mM MEA (gelb) und GOD (blau) in Abhängigkeit von der Anregungsrate bei Verwendung des gepulsten Lasers. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungsfunktionen, die die Raten $k_{risc}^{O_2} = (206 \pm 10)$ kHz, $k_{risc}^{O_2, MEA} = (551 \pm 10)$ kHz und $k_{risc}^{MEA} = (392 \pm 10)$ kHz enthalten, wobei die Rate $k_{isc} = 450$ kHz, die für das Fluorophor AlexaFluor 633 bestimmt wurde (Tab. 7.5), festgehalten wurde.

Zusammenfassung:

Die Ergebnisse zeigen, dass Trolox im Vergleich zu gelöstem Sauerstoff und MEA ein schlechter Triplettquencher ist. Der erhöhte Triplettanteil führt zu einer Verschlechterung der Fluoreszenzausbeute. Auch die Ascorbinsäure erhöht den Triplettanteil, im besonderen von AlexaFluor 633, und kann somit als Radikalfänger nicht verwendet werden.

Ein geeigneter Triplettquencher ist dagegen MEA. Bei AlexaFluor 488 ist der Triplettanteil im Bereich der Anregungsintensitäten bis zu 100 μ W fast vollständig eliminiert. Für AlexaFluor 633 ist der Triplettanteil entsprechend des verwendeten Laser zur Anregung leicht erhöht bzw. erniedrigt. Dies ermöglicht eine Verwendung von MEA zur Verbesserung der Fluoreszenzintensitäten bei FRET-Experimenten.

7.7.7 Weitere Experimente mit MEA

Aufgrund der guten Ergebnisse von MEA als Triplettquencher sollen nun im Folgenden zwei weitere wichtige Kriterien untersucht werden: die Ionisationshäufigkeit und die photophysikalische Lebensdauer. Es gibt Beispiele, bei denen die Untersuchung der Rate des Bleichens über FCS-Messungen bestimmt wurde [166, 44, 39, 40, 43, 162]. Die Schwierigkeit darin besteht die Fluoreszenzsättigung, bei der

die Diffusionszeit steigt, von dem durch das Bleichen verkürzte Fluoreszenzdauer zu unterscheiden. So wurden für diese Untersuchungen zunächst die Photonenbursts der diffundierenden Moleküle statistisch untersucht.

7.7.7.1 Burstexperimente

In Abb. 7.34 (a) ist eine Zeitspur diffundierender, einfach markierter Adk-Moleküle mit einer zeitlichen Auflösung von 1 ms und ein Ausschnitt eines Bursts mit einer zeitlichen Auflösung von 100 μ s dargestellt. Dies zeigt, dass für eine exakte Bestimmung der Photonen der einzelnen Burstereignisse eine Zeitaufösung in Größenordnung der Diffusionszeit - oder geringer - notwendig ist. Bei langen Messzeiten führt dies jedoch leicht zu sehr großen Datenmengen. Daher wurde eine Methode entwickelt, die die Ankunftszeiten der detektierten Photonen bezogen auf den Startpunkt der Messung direkt verwendet. Die Photonen wurden dabei entsprechend der Photonendichte n gefiltert, so dass die mit einer bestimmten Anzahl von Nachbarphotonen in einem bestimmten Zeitintervall selektiert werden konnten. Im Weiteren werden diese Photonen als Burstphotonen bezeichnet.

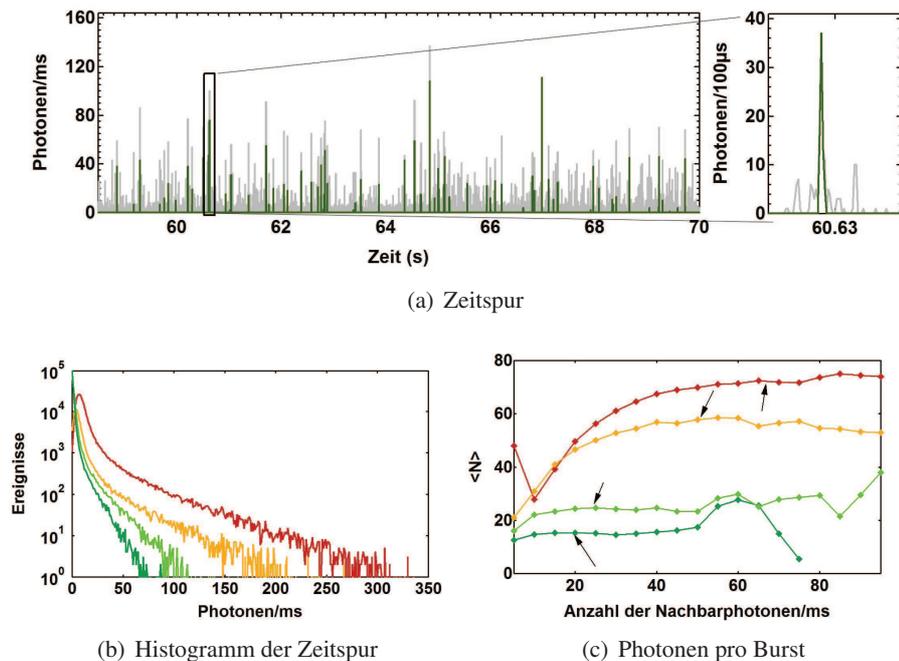


Abbildung 7.34: Zeitspur diffundierender Adk-Moleküle mit einem am ATP-Lid gebundenen AlexaFluor 488 bei einer Anregung von 100 μ W (a) mit einer Zeitaufösung von 1 ms (links) und als Ausschnitt mit einer Auflösung von 100 μ s (rechts) ohne (grau) und mit (grün) der Filterung von $n \geq 25$ Nachbarphotonen pro ms. Weiterhin ein Vergleich der Histogramme von mit 1 ms gebinteten Zeitspuren (b) und der mittleren Photonenzahl pro Burst in Abhängigkeit des Schwellenwertes von Nachbarphotonen pro ms (c) bei einer Anregung von 50 μ W (dunkelgrün), 100 μ W (hellgrün), 500 μ W (gelb) und 1 mW (rot). Pfeile markieren die mittlere Photonenzahl des Plateaus.

Zur statistischen Auswertung der Burstphotonen wurde die mittlere Ankunftszeit \bar{t} , der Burstschwerpunkt t_S , die Burstbreite w und die Photonenzahl pro Burst N berechnet. Um kleinere Bursts mit einer schlechten Statistik auszuschließen, wurden nur Ergebnisse von Bursts mit einer Mindestanzahl von 10 Photonen verwendet.

Die Burstbreite w bezeichnet hierbei nicht die Halbwertsbreite, sondern den zeitlichen Abstand zwischen dem ersten und letzten Photon eines Bursts. Zur Bestimmung von Bleichprozessen wurden die Zeitspuren weiterhin auf eine mögliche Verschiebung der mittleren Ankunftszeit relativ zum Intensitätsschwerpunkt hin untersucht: $\Delta t = \bar{t} - t_S$. Dies beruht auf des unsymmetrischen Fluoreszenzsignals, wenn das Fluorophor innerhalb des Fokus in einer Stufe bleicht. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzemission beim „Betreten“ bzw. „Verlassen“ des Fokusvolumens entspricht ohne Bleichen gemäß der MDE-Funktion einer Gaußkurve.

In Abb. 7.34 werden die Histogramme der Zeitspuren (b) und das Ergebnis der Burstanalyse (c) bei unterschiedlichen Anregungsleistungen verglichen. Zur Bestimmung der mittleren Anzahl der Burstphotonen wurde der Mittelwert der Burstphotonen der Zeitspur $\langle N \rangle$ für verschiedene Schwellenwerte von n dargestellt. Zu Beginn zeigt die Kurve in (c) einen Anstieg aufgrund des Einflusses kleinerer Photonenbursts, die der Autofluoreszenz des Lösungsmittels entstammen. Der Plateauwert wurde als die die Zeitspur charakterisierende mittlere Anzahl von Burstphotonen verwendet.

7.7.7.2 Ergebnisse der Burstexperimente

In Abb. 7.35 sind die Ergebnisse der Burstanalyse für AlexaFluor 488 mit 2 mM MEA mit und ohne GOD dargestellt.

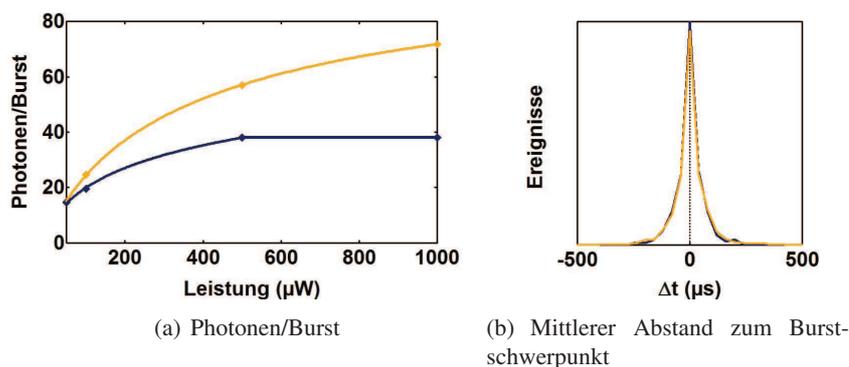


Abbildung 7.35: Burstanalyse von leistungsabhängigen Diffusionsmessungen an AlexaFluor 488 am ATP-Lid nach der Zugabe von 2 mM MEA (gelb) und 2 mM MEA und GOD (blau). (a) zeigt die mittlere Anzahl der Photonen pro Burst in Abhängigkeit von der Anregungsleistung bei 488 nm und (b) zeigt normierte Histogramme der mittleren Abstände der Photonen eines Bursts zum Schwerpunkt des Bursts bei 500 μW .

Stimmten bei einer Anregungsleistung von 50 μW die mittlere Anzahl der Photonen pro Burst in den Messungen bei 2 mM MEA mit und ohne GOD überein, so wurde bei einer Anregungsleistung von 1 mW nur noch die Hälfte der Photonen ermittelt, wenn GOD in der Lösung vorlag (siehe Abb. 7.35(a)). Diese Änderungen sind nicht auf Sättigungseffekte zurückzuführen, da die Tripletanteile sich auch bei 1 mW Anregungsleistung kaum unterschieden (siehe Abschnitt 7.7.6). Auch Bleichprozesse konnten für diesen Effekt ausgeschlossen werden.

Weiterhin zeigte sich im Vergleich der mittleren Abstände der Photonen der Bursts zu den jeweiligen Burstschwerpunkten bei jeder Anregungsleistung bis 1 mW eine Symmetrie zum Nullpunkt (siehe Abb. 7.35(b)). Würden Bleichprozesse vorliegen, gäbe es eine Verschiebung des Maximums hin zu negativen

Werten. Daraus folgt jedoch auch, dass die Dunkelzustände symmetrisch zum Burstmittelpunkt auftreten. Die Ursache für die verringerte Photonenemission liegt in den scheinbaren Diffusionszeiten des gebundenen AlexaFluor 488 (siehe Abb. 7.36(a)). Während die Unterschiede der scheinbaren Diffusionszeiten zwischen gebundenen Fluorophoren in Puffer und in 2 mM MEA aufgrund der veränderten Triplettkinetik durch Sättigungseffekte verursacht sein können, trifft diese Erklärung nicht für die Kurve nach Zugabe von GOD zu. Die Triplettkinetik von AlexaFluor 488 änderte sich in Gegenwart von MEA nach Zugabe von GOD nur sehr gering (siehe Tab. 7.7). Trotzdem sind die Diffusionszeiten erheblich kürzer, wenn GOD in der Lösung vorliegt (siehe Abb. 7.36(a)), blaue Kurve). Da verstärkte Bleichprozesse entsprechend der Abb. 7.35(b) ausgeschlossen werden können, ist die Verkürzung der Lebensdauer nur durch Übergänge in lange Dunkelzustände zu erklären, die vermehrt in Gegenwart von GOD und unter hohen Anregungsleistungen auftreten.

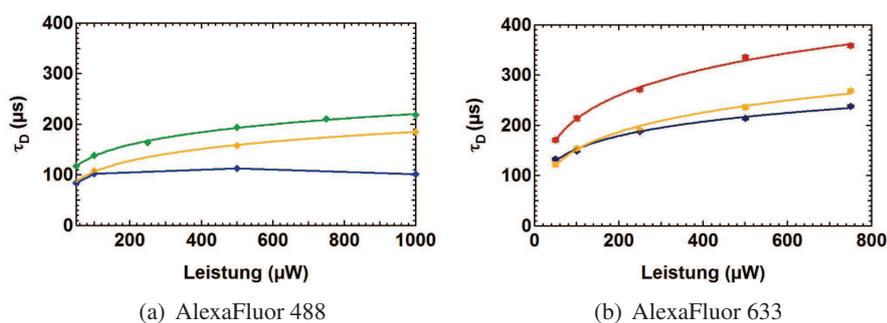


Abbildung 7.36: Diffusionszeiten von gebundenem AlexaFluor 488 (grün) bzw. AlexaFluor 633 (rot) in Abhängigkeit von der Anregungsleistung eines Dauerstrichlasers in Gegenwart von 2 mM MEA ohne (gelb) und mit (blau) GOD.

Für gebundenes AlexaFluor 633 konnten für Leistungen von bis zu 750 μW bei Anregung mit dem Dauerstrichlaser ebenso keine Bleicheffekte festgestellt werden. Doch die Kurvenverläufe der Diffusionszeiten in Abb. 7.36(b) sind in Gegenwart von MEA mit und ohne GOD im Gegensatz zu AlexaFluor 488 sehr ähnlich. Dies lässt auf eine geringere Ionisationsfreudigkeit schließen und ist in Übereinstimmung mit den Messungen immobilisierter Farbstoffe (vgl. Abschnitt 7.6).

Nur ab 500 μW traten in den gemessenen Diffusionszeiten leichte Abweichungen auf. Die gemessenen Unterschiede der scheinbaren Diffusionszeiten zwischen Molekülen in Puffer und in 2 mM MEA können dagegen auf Sättigungseffekte zurückgeführt werden.

7.7.7.3 Experimente an immobilisierten Molekülen

Um die Dunkelzustände und das photoinduzierte Bleichen des gebundenen AlexaFluor 633 nach Zugabe von GOD zu untersuchen, wurden die Adk-Moleküle immobilisiert und mit einer Geschwindigkeit von 2,5 $\mu\text{m/s}$ abgerastert. Bei einer Flächendichte von 0,15 Molekülen pro $2,5 \times 2,5 (\mu\text{m})^2$ kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass jeweils nur die Fluoreszenz eines Moleküls detektiert wurde. Als Anregungsleistung wurden für AlexaFluor 633 10 μW verwendet, so dass die Wahrscheinlichkeit, dass das Farbstoffmolekül während des Scannens gebleicht wird, groß war. Zur Auswertung wurde die für Diffusionsmessungen entwickelte Burstanalyse verwendet. In Abb. 7.37(a)

sind Beispiele für drei Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Charakteristik gezeigt. Deutlich sind die Dunkelzustände (Mitte) sowie das photoinduzierte Bleichen (rechts) zu erkennen.

Abb. 7.37(b) zeigt die Histogramme der Zeiten im fluoreszenten Zustand in doppelt-logarithmischer Darstellung. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach Zugabe von MEA und GOD die Häufigkeit der Dunkelzustände zunimmt. Die Zeiten können entsprechend dem Potenzgesetz mit einem negativen Exponenten von 2,24 gefittet werden. Demnach ist $\alpha_f^{MEA,GOD} = 1,24 \pm 0,03$ und sehr viel größer als bei Zugabe von Substraten. Bei 10 mM Mg·ADP betrug α_f^{MgADP} vergleichsweise $0,24 \pm 0,05$ (siehe Abschnitt 7.6.5).

Bei Messungen ohne jegliche Zusätze zum Puffer entsteht im Histogramm im Bereich von bis zu 80 ms ein vergleichbarer Abfall entsprechend dem Potenzgesetz. Bei längeren Zeiten aber folgen die Daten einem exponentiellen Abfall mit einer charakteristischen Zeit von 270 ms. Sie ist durch die Scange- schwindigkeit bestimmt: Wird von einem Fokusquerschnitt von 500 nm ($\omega_0 = 250$ nm) ausgegangen, kann ein Fluorophor innerhalb eines Abstandes von 500 nm vor und 500 nm nach dem Punkt angeregt werden, auf dem es sich im Fokuspunkt befindet. Bei einer Geschwindigkeit von 2,5 $\mu\text{m/s}$ entspricht diese Distanz von 1 μm einer Zeit von 400 ms. Für Fluorophore, die sich nicht im Mittelpunkt befinden, ist die Zeit entsprechend kürzer.

Dies bedeutet, dass sich die einzelnen Fluorophore entweder nur für kurze Zeiten im fluoreszenten Zustand befinden oder aber gar keine Fluktuationen aufweisen. Die mittlere detektierte Photonenzahl pro Molekül, deren Fluoreszenz unter anderem auch mehrere Dunkelzeiten aufweisen konnte, nimmt nach Zugabe von MEA und GOD von 8.500 Photonen auf 3.300 Photonen ab.

Die vermehrten Übergänge in die Dunkelzustände wiederum verhindern eine Verwendung von MEA als geeigneten Tripletquencher für immobilisierte Messungen. Da augenscheinlich GOD oder die Substanzen der Abbaureaktion (siehe Abschnitt 7.7.2.2) für diese Ionisationen verantwortlich sind, wäre eine Desoxygenierung des Lösungsmittels z.B. durch eine Stickstoffatmosphäre anstelle von GODKAT besser geeignet.

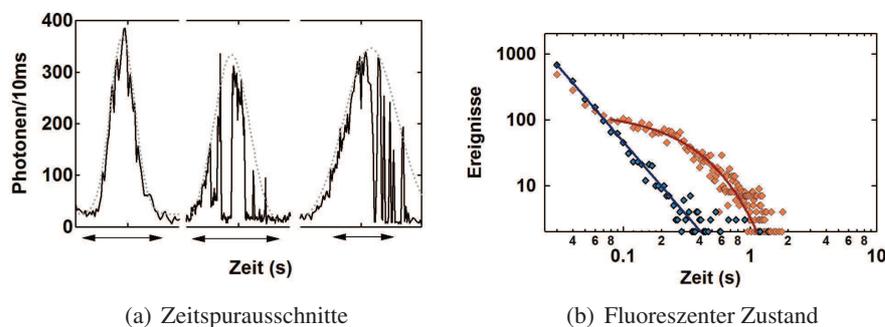


Abbildung 7.37: Fluoreszenzsignal (a) von AlexaFluor 633 während des Scannens immobilisierter Adk-Moleküle in TRIS-Puffer. Die Pfeile stellen zum Vergleich der verwendeten Zeitachsen ein Intervall von 0,5 s dar. Die ermittelten Histogramme der fluoreszenten Zeiten (b) von Messungen in Pufferlösung vor (orange) und nach Zugabe von 4 mM MEA und GOD (blau). Die Kurven sind Anpassungsfunktionen nach dem Potenzgesetz von Gleichung 4.17 mit einem Exponenten von $m_f = 2,24 \pm 0,03$ (rot) und einer Exponentialfunktion mit einer mittleren Zeit von 270 ± 10 ms.

Zusammenfassung:

Der Tripletquencher MEA zeigt neben der Erniedrigung keinen Einfluss auf die Übergänge von AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 in lange nichtfluoreszente Zustände.

Das Sauerstofffängersystem GODKAT, das zur Entfernung des reaktiven Singulett-Sauerstoffs verwendet wurde, begünstigt jedoch diese Zustände. Bei AlexaFluor 488 sind die Wechselwirkungen besonders stark. Zur Desoxygenierung des Puffers sollten daher andere Methoden verwendet werden.

7.8 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurden die photophysikalischen Eigenschaften der verwendeten Fluorophore AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 im ungebundenen und gebundenen Zustand untersucht.

Die Farbstoffe sind im gebundenen Zustand in ihrer Rotationsfreiheit kaum eingeschränkt. Doch treten besonders am AMP-Lid hydrophobe oder vergleichbare Wechselwirkungen mit dem Adk-Molekül auf. Schon das Absorptionsspektrum der Farbstoffe am AMP-Lid unterscheidet sich durch eine leichte Verschiebung hin zu größeren Wellenlängen.

Befinden sich die Moleküle im angeregten Zustand, sind diese Wechselwirkungen vermindert, da das Emissionsspektrum keine signifikanten Unterschiede zum ungebundenen und zu dem am ATP-Lid gebundenen Farbstoff mehr aufweist. Trotzdem sind für AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 die Quantenausbeuten an beiden Lids leicht verschieden, wobei immer das AMP-Lid am weitesten von dem Wert des freien Farbstoffs abweicht. Die Unterschiede bewegen sich jedoch in einem Rahmen, der ohne großen Einfluss auf den Försterradius ist. Er konnte für beide Bindungsvarianten mit AlexaFluor 488 am AMP-Lid und AlexaFluor 633 am ATP-Lid mit $R_0^{AMP,ATP} = 48,2 \text{ \AA}$ und für die vertauschten Bindungsplätze mit $R_0^{ATP,AMP} = 48,7 \text{ \AA}$ bestimmt werden.

Neben der schlechteren Bindungseffizienz während des Markierungsvorgangs - speziell am AMP-Lid - ist AlexaFluor 633 besonders anfällig für Oxidationen, die zu einer irreversiblen Photoinaktivierung führen. Dies verschiebt das Verhältnis der zweifachmarkierten Moleküle in Richtung des AlexaFluor 488. In der Regel ist das Verhältnis von Molekülen, die nur fluoreszentes AlexaFluor 488 tragen, zu Adk-Molekülen, bei denen beide Farbstoffmoleküle intakt sind, 10 : 1.

Es kann davon ausgegangen werden, dass hauptsächlich AlexaFluor 488 am ATP-Lid und AlexaFluor 633 am AMP-Lid gebunden ist.

Hinsichtlich der Photostabilität hat AlexaFluor 488 eine im Vergleich zu AlexaFluor 633 größere Wahrscheinlichkeit in einen Zustand mit niedrigen Quantenausbeuten (Dunkelzustände) überzugehen. Dies wird besonders deutlich, wenn an die Adenylatkinase zusätzlich Substrate binden.

Für FRET-Experimente sind die im Vergleich zu den Tripletzeiten langen Dunkelzustände von besonderer Bedeutung. Unterscheidet sich beispielsweise das Absorptionsverhalten des Akzeptors im Dunkelzustand vom fluoreszenten Zustand, führt dies zu einer Veränderung des aus den Intensitäten berechneten Energietransfers, ohne dass das Messsystem selbst verändert ist. In diesem Fall wäre das Fluorophorenpaar nicht mehr zur Bestimmung relativer Abstände geeignet.

Weiterhin zeigen beide Farbstoffe ein unterschiedliches Sättigungsverhalten. Bei Anregung mit einem Dauerstrichlaser beträgt die Sättigungsintensität für AlexaFluor 633 $35 \mu\text{W}$ und für AlexaFluor 488 $80 \mu\text{W}$. Sie ist weitestgehend unabhängig von der Bindungsstelle der Fluorophore.

Die Wechselwirkung des von AlexaFluor 633 mit AlexaFluor 488 bei einem zweifachmarkierten Molekül reduziert die Sättigungsintensität des Donors zusätzlich. Der Vorteil der Singulett-Triplett-Anihilation sind die kollektiven Übergänge, wenn der Donor oder der Akzeptor in den Triplettzustand geht. Über die Effizienz dieses abstandsabhängigen Prozesses kann keine Aussage getroffen werden.

Bei der Verwendung von Substanzen, die die Photostabilität und die photophysikalische Lebensdauer erhöhen sollen, zeigt sich, dass für AlexaFluor 633 sowie für AlexaFluor 488 MEA der beste Triplettquencher ist. Unter Zugabe von MEA kann nun auch in desoxygenierten Lösungen gemessen werden. Dies hat den Vorteil, dass der Triplett-Sauerstoff als Triplettquencher nicht mehr benötigt wird und zusammen mit dem reaktionsfreudige Singulett-Sauerstoff entfernt werden kann. Dadurch kann die photochemische und photophysikalische Lebensdauer der Farbstoffe erhöht werden. Jedoch zeigen AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 negative Wechselwirkungen mit dem verwendeten Sauerstofffängersystem Glukoseoxidase und Katalase, so dass eine besser geeigneten Methode der Desoxygenierung (z.B. Stickstoffgesättigte Pufferlösungen) benötigt wird.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 als FRET-Paar zur Untersuchung der Konformationskinetik der Adenylatkinase gut geeignet sind.

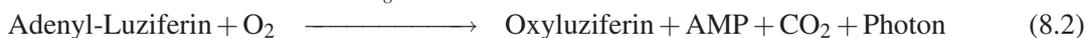
Kapitel 8

Konformation und Funktion der Adenylatkinase

In diesem Kapitel werden die Konformationszustände und die Konformationskinetik der Adenylatkinase untersucht und mit der enzymatischen Funktion verknüpft. Dafür soll zunächst die Aktivität der markierten Adk-Mutante bestimmt werden.

8.1 Untersuchungen zur Aktivität

Zur Überprüfung der Aktivität von markierten Adk-Molekülen wurde die Entstehung von ATP bei der Katalyse der Rückreaktion $2 \text{ ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$ genutzt. Schon geringe Stoffmengen von ATP (bis 10^{-12} mol) können über den Abbau von Luziferin, dem Leuchtstoff des Leuchtkäfers, quantitativ bestimmt werden [92]. Bei der Nachweisreaktion reagiert in der ersten Stufe Luziferin zusammen mit ATP zu Adenyl-Luziferin, welches im zweiten Schritt unter Freisetzung von Licht oxidiert [34]. Das Emissionsmaximum des entstehenden Lichts liegt bei 575 nm [76]:



8.1.1 Durchführung der Experimente

Die Aktivität der markierten Adenylatkinase sollte in Lösung und immobilisiert auf der Deckglasoberfläche untersucht werden. Als Nachweisreagenz wurde das System FL-AA von Sigma-Aldrich verwendet, welches Luziferase, Luziferin und einen ATP-Standard zur Kalibrierung enthält.

Messungen an diffundierenden Adk-Molekülen wurden in einem auf dem Deckglas befindlichen Tropfen ($V = 20 \mu\text{l}$) in einer Messtiefe von $40 \mu\text{m}$ durchgeführt (siehe Abb. 8.1). Die Molekülkonzentrationen der diffundierenden Moleküle wurden aus einer Verdünnungsreihe einer Stammlösung bekannter Konzentration bestimmt. Eine Fehlbestimmung der Konzentration durch Adsorption an Pipetten und Eppen-

dorfgefäßen ist dabei nicht ausgeschlossen, würde jedoch stets zu einer Unterbestimmung der Aktivität führen.

Für die Messungen immobilisierter Moleküle wurde eine Glasküvette mit Ni-NTA-funktionalisiertem Boden verwendet (siehe Abb. 8.1). Das Verfahren der Immobilisierung wird in Abschnitt 6.11 beschrieben. Die Grundfläche betrug 25 (mm)^2 und das Puffervolumen $50 \mu\text{l}$. Nach erfolgter Immobilisierung der markierten Adk-Moleküle wurden durch mehrfaches Spülen alle frei diffundierenden Moleküle entfernt und mittels FCS-Messungen in verschiedenen Tiefen die Pufferlösung auf frei diffundierende Moleküle hin kontrolliert. Die Oberflächendichte der immobilisierten Moleküle wurde über Anregung der gebundenen Donorfluorophore (488 nm , $1 \mu\text{W}$) und dem Vergleich der integrierten Photonenausbeute mit Messungen bekannter Oberflächendichten berechnet. Eine Partikelanalyse war aufgrund der hohen Oberflächendichte und den daraus folgenden Überlappungen der Punktspreizfunktionen (siehe Abschnitt 3.3) der Fluorophore nicht möglich. Die bei den Reaktionen entstehende Biolumineszenz wurde in einer Tiefe von $5 \mu\text{m}$ gemessen.

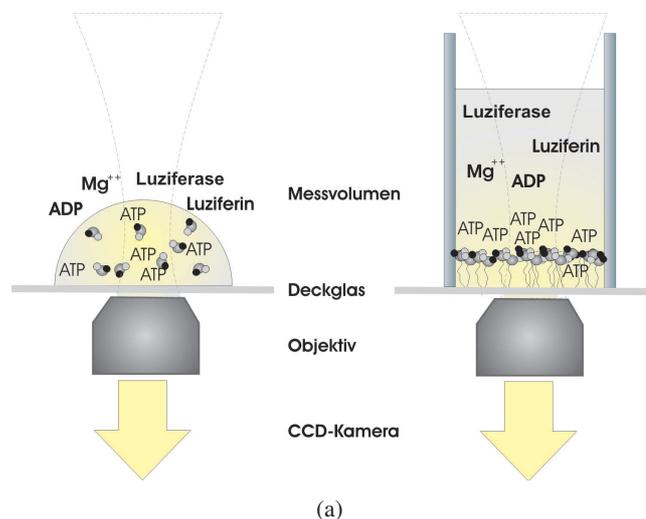


Abbildung 8.1: Messaufbau zur quantitativen Bestimmung der Biolumineszenz an diffundierenden (links) und immobilisierten (rechts) Molekülen.

Nach Zugabe von 2 mM Mg-ADP zu den im Puffer befindlichen Substanzen Luziferin und Luziferase wurde die Messung gestartet. Ein Teil der durch die chemische Reaktion erzeugten Photonen wurde über das Wasserimmersionsobjektiv gesammelt und auf die Oberfläche einer EMCCD-Kamera (C9100-02, Hamamatsu Photonics) projiziert. Diese Kamera besitzt für jedes Pixel einen eigenen Verstärker, der die Anzahl der ausgelösten Elektronen durch Stoßionisation, erhöht (EM steht für *Electron Multiplier*). Sie ist daher für besonders empfindliche Messungen geeignet. Die einzelnen Bilder wurden mit einer Integrationszeit von 1 s aufgenommen und als Film gespeichert. Anschließend wurde das Summensignal der Bilder in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt und die Werte hinsichtlich des Hintergrundsignals der Umgebung korrigiert.

Die Kurven der Zählraten gehen von einem linearen Anstieg in ein Sättigungsverhalten über, welches auf eine Sättigung der freien Reaktionspartner zurückzuführen ist. Zur Bestimmung des Anstiegs wurde der lineare Teil zu Beginn der Kurve verwendet. Zur Kalibrierung der Photonenausbeute wurde die Biolumineszenz bei verschiedenen ATP-Konzentrationen des Standards bestimmt (siehe Abb. 8.2).

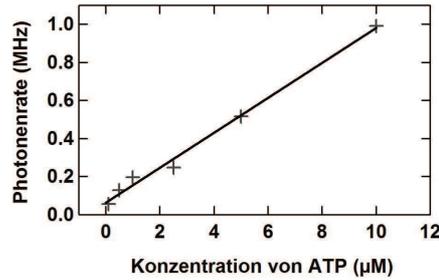


Abbildung 8.2: Messungen des ATP-Standards zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der detektierten Photonenrate und der ATP-Konzentration. Der Anstieg beträgt (92 ± 5) Hz/nM.

8.1.2 Diffundierende Moleküle

Zur Bestimmung der Aktivität der markierten Adk-Mutanten wurde zu einer Pufferlösung, die sowohl Luziferin als auch Luziferase enthielt, 2 mM Mg-ADP hinzugegeben und der zeitliche Verlauf der Biolumineszenz aufgenommen (siehe Abb. 8.3). Der anfängliche Anstieg der detektierten Photonen beschreibt die wachsende Konzentration von ATP-Molekülen, die durch die katalytische Unterstützung aktiver Adk-Moleküle entstehen. Die sich daran anschließende Sättigung hängt von der Stoffmenge der ATP-Moleküle ab. Aus den Messungen kann ein linearer Zusammenhang zwischen dem Anstieg und der Enzymkonzentration festgestellt werden. Über Referenzmessungen bekannter ATP-Konzentrationen (siehe Abschnitt 8.1.1) kann die Aktivität eines einzelnen zweifach-markierten diffundierenden Adk-Moleküls bestimmt werden. Sie beträgt (7 ± 2) s⁻¹.

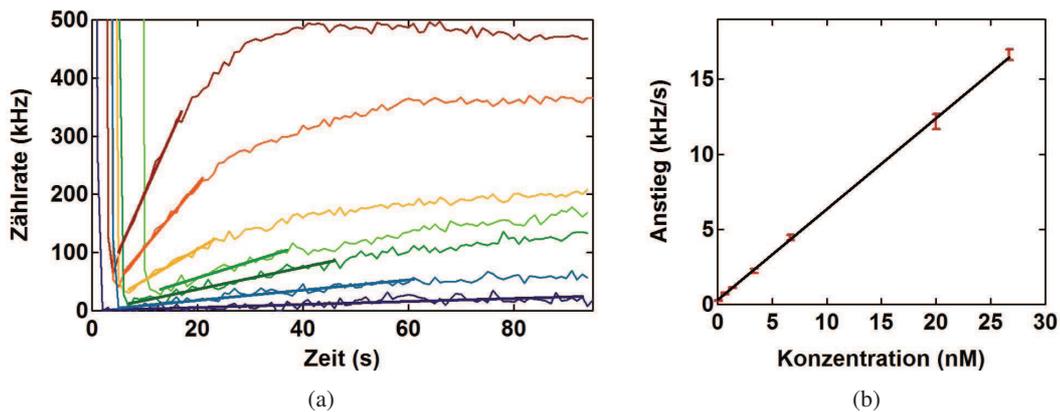


Abbildung 8.3: Zeitverlauf der Biolumineszenz (a) nach Zugabe von 2 mM Mg-ADP zu diffundierenden Adk-Molekülen bei Konzentrationen zwischen 0.1 nM (blau) und 25 nM (rot). Die hohen Zählraten zu Beginn entstehen durch die unvollständige Verdunkelung direkt nach dem Messstart. Die Anstiege (b) sind linear von der Konzentration abhängig.

Dieser Wert stimmt mit anderen Messungen überein, bei der die Aktivität der markierten Mutante bei 35% des Wildtyps lag [27]. Nichtmutierte und unmarkierte Adk-Moleküle besitzen vergleichsweise eine Aktivität von (30 ± 10) s⁻¹[169].

8.1.3 Immobilisierte Moleküle

Zur Bestimmung der Aktivität immobilisierter Adk-Moleküle wurden Untersuchungen an einer Messkammer mit funktionalisiertem Boden durchgeführt (siehe Abb. 8.1 und Abschnitt 6.11).

Nach dem Auftragen einer hohen Molekülkonzentration wurde die Messküvette mehrfach gespült, so dass der Puffer nur geringste Konzentrationen von frei diffundierenden Molekülen enthielt. Aus der Amplitude von Korrelationsfunktionen konnte entsprechend Gleichung 5.13 die Konzentration mit kleiner als 20 pM abgeschätzt werden werden. Dies entspricht einer Anzahl von maximal $5 \cdot 10^8$ Enzymmolekülen, die in der gesamten Pufferlösung verblieben sind. Zusammen mit den adsorbierten Molekülen an der Küvettenwand sind sie jedoch weitestgehend unabhängig von der Anzahl der immobilisierten Moleküle. Beide würden einem konstanten Hintergrund, wenn die Aktivität der immobilisierten Moleküle in Abhängigkeit von der Oberflächendichte bestimmt wird, entsprechen.

Nach der Zugabe von 2 mM Mg-ADP zu den in der Pufferlösung enthaltenen Luziferin und Luziferase wurde entstehende Biolumineszenz für drei verschiedene Oberflächendichten bestimmt (siehe Abb. 8.4). Die Gesamtanzahl der immobilisierten Moleküle belief sich hierbei auf das Zehn- bis Zwanzigfache hinsichtlich der verbliebenen Moleküle in Lösung.

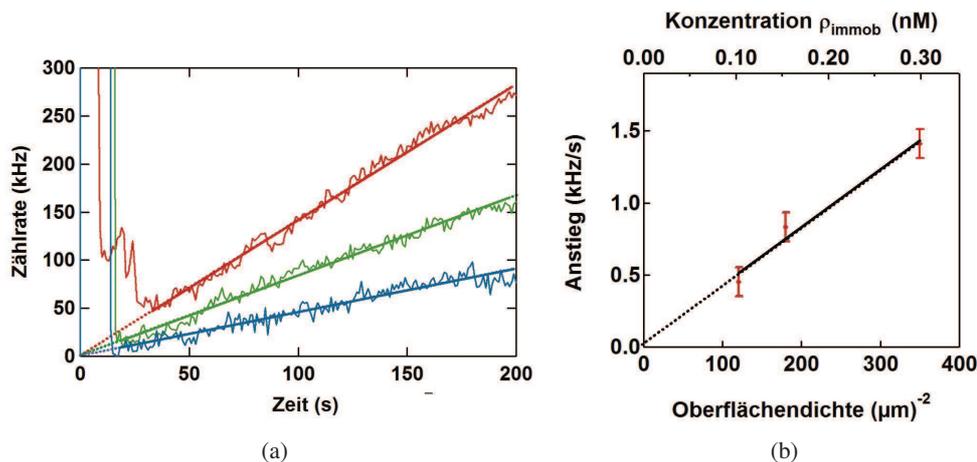


Abbildung 8.4: Anstieg der Zählrate (a) nach Zugabe von ADP zu immobilisierten Adk-Molekülen bei Oberflächendichten von $120 \mu\text{m}^{-2}$ (blau), $180 \mu\text{m}^{-2}$ (grün) und $350 \mu\text{m}^{-2}$ (rot). Die hohen Zählraten zu Beginn entstehen durch eine unvollständige Verdunkelung direkt nach dem Messstart. Die Anstiege (b) sind linear von der Oberflächendichte abhängig.

Aus der Anzahl der immobilisierten Adk-Moleküle kann eine auf das Probenvolumen bezogene Dichte ρ_{immob} berechnet werden. Die Voraussetzung dafür ist eine ungehinderte und schnelle Diffusion der ATP-Moleküle von der Oberfläche in das gesamte Probenvolumen. Dass diese Bedingung hinreichend erfüllt ist, zeigten Messungen in 100 μm Tiefe, die im Vergleich zur Messung in Oberflächennähe eine Abweichung des Anstiegs von nur 10% aufwiesen. Durch den Vergleich von ρ_{immob} mit Referenzmessungen bekannter ATP-Konzentrationen (Abschnitt 8.1.1) kann die Aktivität eines einzelnen immobilisierten Adk-Moleküls mit $(42 \pm 10) \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt werden.

Weiterhin zeigt die lineare Anpassung in Abb. 8.4(b) einen Durchgang durch den Koordinatenursprung. Dies bedeutet, dass alle von der Oberflächendichte unabhängigen Effekte nur einen vernachlässigbar kleinen Einfluss auf die gemessene Biolumineszenz haben.

Zusammenfassung:

Das Enzym verliert seine Aktivität weder durch die gebundenen Fluorophore noch durch das Binden an Ni-NTA. Für immobilisierte Moleküle wurde dabei eine Umsatzrate k_{cat} von $(42 \pm 10) \text{ s}^{-1}$, für frei in Lösung befindliche von $(7 \pm 2) \text{ s}^{-1}$ bestimmt.

Eine Erklärung für den Unterschied der Aktivitäten wird erst durch die Ergebnisse der Konformationsdynamik im Abschnitt 8.4 gegeben.

8.2 Burstexperimente

8.2.1 Anregung bei Einzelmolekül-Burstexperimenten

Die Anregung des Donors und des Akzeptors erfolgte bei Diffusionsmessungen durch eine Kombination des 488 nm Dauerstrichlasers und des gepulsten 635 nm-Lasers bei einer Repetitionsrate von 10 MHz. Dieses Verfahren wird im Weiteren mit POE (*Pulsed Overlaid Excitation*) bezeichnet¹ und kann mit PIE (*Pulsed Interleaved Excitation* [104]) bzw. nsALEX (*nanosecond Alternating Laser Excitation* [91, 93]) verglichen werden. Für die letztgenannten Methoden werden jedoch zwei gepulste Laser benötigt. Eine Anregung mit dem gepulsten 470 nm-Laser war aufgrund der geringen Leistung, die in die verwendete Einzelmodenfasern eingekoppelt werden konnte, und dem geringeren Absorptionsquerschnitt von AlexaFluor 488 bei dieser Wellenlänge nicht möglich.

Zur Anregung wurden 40 μW (488 nm) und 10 μW (635 nm) verwendet. Bei diesen Anregungsleistungen war das Signal-Rausch-Verhältnis ideal, ohne bereits eine starke Sättigung der Fluoreszenz hervorzurufen (vgl. Abschnitt 7.4). Die Konzentrationen der markierten Enzymmoleküle wurden so gewählt, dass sich im Mittel weniger als 0,1 Moleküle im Fokus befanden (entsprechend Gleichung 5.13).

Die niedrigen Konzentrationen im Bereich von 0,1 pM ermöglichten eine ideale Separation der einzelnen Photonenbursts. Pro Sekunde traten im Schnitt 30 Bursts auf, die genügend Photonen aufwiesen und potentiell zur Berechnung der Energietransfereffizienzen verwendet werden konnten.

Die zusätzliche gepulste Anregung des Akzeptors hat die Aufgabe, das diffundierende Enzym während des Aufenthalts im Laserfokus auf die Anwesenheit eines gebundenen Akzeptors hin zu überprüfen. Photonen, die bis zu 20 ns nach dem roten Laserpuls detektiert wurden (rot schraffierter Bereich in Abb. 8.5(a)), wurden nur für diese Identifikationszwecke und nicht zur Berechnung der Fluoreszenz nach Donoranregung (F_D^{488}, F_A^{488}) und der Energietransfereffizienzen verwendet. Zur Berechnung der Intensitätszeitspur des Akzeptors bei gepulster Anregung (F_A^{635}) wurde die Zahl der detektierten Photonen um den Anteil des in diesem Zeitfenster erfolgten Energietransfers (rot gestrichelte Linie in Abb. 8.5(a)) korrigiert. Durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach erfolgter spektraler und zeitlicher Filterung können die Moleküle mit intaktem Donor-Akzeptorpaar (**DA**), mit zwei Donormolekülen (**DD**) bzw. einem Donor- und einem photoinaktiven Akzeptorfluorophor und mit zwei Akzeptormolekülen (**AA**) identifiziert werden (siehe Abb. 8.5(b)).

¹Diese Methode wurde 2007 auch unter der Bezeichnung PAX (*Periodic Acceptor eXcitation*) von der Arbeitsgruppe von A. N. Kapanidis veröffentlicht. [41].

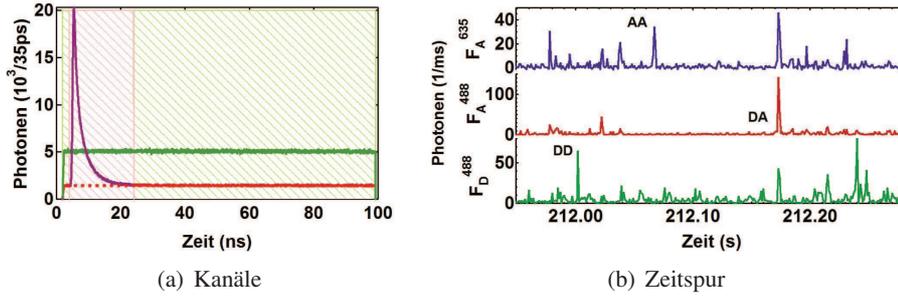


Abbildung 8.5: Histogramm der detektierten Photonen (a) im Donor- (grün) und Akzeptorkanal (rot bzw. lila) nach Anregung mittels des 488 nm Dauerstrichlasers bzw. des gepulsten 635 nm-Lasers bzgl. des Triggerpulses. Die entsprechenden Intensitätszeitspuren der Photonen (b) zeigen die unterschiedlichen Variationsmöglichkeiten der Farbstoffe an den beiden Bindungsstellen: **DD**, **DA** und **AA**.

Zur Berechnung der Energietransfereffizienzen wurden die Ankunftszeiten der Photonen integriert ($t_{bin} = 500 \mu\text{s}$) und die gewonnenen Zeitspuren hinsichtlich der Hintergrundfluoreszenz und der systembedingten bzw. Fluorophor-spezifischen Faktoren korrigiert.

Die Filterung der Bursts erfolgte durch Setzen von Schwellenwerten für die Summe $F_D^{488} + F_A^{488}$ und für F_A^{635} . Die Summenschwelle diente dabei zur Entfernung kleinerer Bursts des Lösungsmittels und die zweite Schwelle zur Filterung der Moleküle bezüglich des Akzeptorfluorophors.

Desweiteren verursachten die diskreten Werte von F_D^{488} und F_A^{488} störende Häufungspunkte in den Verteilungen der Energietransfereffizienzen E_{ET} . Die Verteilungen wurden durch Addition einer gaußverteilten Zufallsvariable ($\sigma = 0,5$ Photonen) zu den Fluoreszenzintensitäten stark reduziert (siehe auch Abb. 8.6) und vgl. [109].

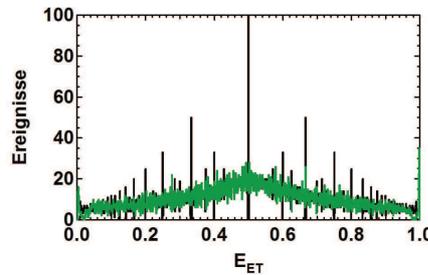


Abbildung 8.6: Häufigkeitsspitzen bei der Berechnung von E_{ET} ohne (schwarz) und mit (grün) verrauschten Fluoreszenzintensitäten F_D^{488} und F_A^{488} unter Verwendung natürlicher Zahlen bis 100.

Wird von einer reinen Shot-Noise verursachten Verbreiterung der E_{ET} -Verteilung ausgegangen (siehe Abschnitt 3.5), können die Kurven mit Mittelwerten zwischen 0,1 und 0,9 sehr gut durch eine Gaußfunktion beschrieben werden (siehe Abb. 8.7(a)). Es zeigt sich jedoch, dass die Breite der Verteilung trotz gleicher Gesamtintensität I_{sum} der beiden Kanäle variiert. Ist die Standardabweichung bei einer Energietransfereffizienz von 90% beispielsweise 0,06, beträgt sie bei 50% mit 0,10 fast das Doppelte.

Der Grund hierfür liegt in der Fehlerfortpflanzung. Für ΔE_{ET} gilt entsprechend der Beziehung in Gleichung 4.28 und den Gesetzen der Fehlerfortpflanzung:

$$\Delta E_{ET} = \frac{1}{(F_D + F_A)^2} (F_A \Delta F_D + F_D \Delta F_A). \quad (8.3)$$

F_D kann dabei durch den Term $F_{sum} - F_A$, ΔF_A durch $\sqrt{F_A}$ und ΔF_D durch $\sqrt{F_{sum} - F_A}$ ersetzt werden. Bei einer Intensität von $F_A = F_{sum}/2$ sind die Bedingungen $(\partial/\partial F_A)\Delta E_{ET} \stackrel{!}{=} 0$ und $(\partial^2/\partial F_A^2)\Delta E_{ET} > 0$ für ein Maximum erfüllt. Die Symmetrie von F_A und F_D in Gleichung 8.3 zeigt bereits die stark symmetrische Verteilung der Breiten von Abb. 8.7(b).

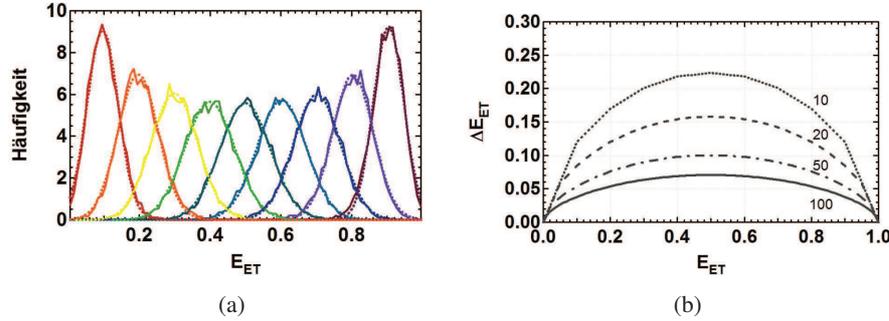


Abbildung 8.7: Simulation (durchgezogene Linie) und Gaußverteilungen (gestrichelte Linie) der Energietransfereffizienzen unter Shot-Noise Bedingungen (a) bei unterschiedlichen Mittelwerten und einer mittleren Photonenzahl von 50 pro Zeiteinheit. Die nach Gleichung 8.3 berechneten Verteilungsbreiten der Energietransfereffizienzen (b) bei einer Gesamtintensität von 10, 20, 50 und 100 Photonen pro Zeiteinheit.

8.2.2 Identifikation der Fluorophore

Das Binden der Donor- und der Akzeptorfluorophore erfolgte kompetitiv an den zwei Bindungsmöglichkeiten des Adk-Moleküls. Dadurch entstanden neben Molekülen, die einen Donor und einen Akzeptor tragen, auch Moleküle mit zwei Donor- bzw. Akzeptormolekülen. Die nur mit Donorfarbstoffen markierten Moleküle treten in einem E_{ET} -Histogramm als störende Werte bei kleinen Energietransfereffizienzen auf und können eine Interpretation des Histogramms erschweren. Daher wurden die Donorfluorophore der diffundierenden Moleküle mit einem Dauerstrichlaser und die Akzeptormoleküle zur Überprüfung zusätzlich mit einem gepulsten roten Laser angeregt.

Nach erfolgter Zweifarbenanregung diffundierender Adk-Moleküle wurde die in Abschnitt 8.2.1 beschriebene Filterung durchgeführt. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Identifikation der gebundenen Fluorophore und Trennung der Moleküle hinsichtlich der Farbstoffe wurden FAMS-Diagramme erstellt (siehe Abb. 8.8).

FAMS (*Fluorescence-Aided Molecule Sorting* [79]) ist ein zweidimensionales Diagramm mit E_{ET} auf der horizontalen und dem Stöchiometriefaktor S auf der vertikalen Achse. Zur Berechnung der Energietransfereffizienzen wurde die Gleichung 4.28 verwendet. S berechnet sich aus dem Quotienten der Emission nach Donoranregung ($F_D^D + F_A^D$) und der gesamten Emission, einschließlich der detektierten Photonen nach direkter Anregung des Akzeptors F_A^A :

$$S = \frac{F_D^D + F_A^D}{F_D^D + F_A^D + F_A^A}. \quad (8.4)$$

Daher ist S geeignet, um zwischen Molekülen mit und ohne Akzeptor zu unterscheiden.

Mit Hilfe der Diagramme lässt sich zeigen, dass ohne die Akzeptor-selektive Auswahl die Moleküle mit gebundenen Donormolekülen, die kein FRET zeigen, überwiegen (grüner Kreis, Abb. 8.8(a)). Der

Anteil der Moleküle, die ein FRET-Paar tragen, ist gering (roter Kreis, Abb. 8.8(b)) und das Verhältnis zwischen Donor- und Donor-Akzeptor-markierten Molekülen ist 10:1. Die fehlenden Werte innerhalb des Bereiches für nur Donor-markierte Moleküle nach der Selektion (grüner Kreis, Abb. 8.8(b)) geben Hinweis auf eine erfolgreiche Identifikation und Trennung mit POE.

Bei älteren Proben von wenigen Wochen tauchte im Bereich von $S = 0,6$ eine weitere Population auf, die keinen oder nur sehr geringen Energietransfer zeigten. Sie ist wahrscheinlich aggregierten Molekülen zuzuordnen, die noch einzelne intakte Fluorophore, aber kein FRET-Paar besitzen.

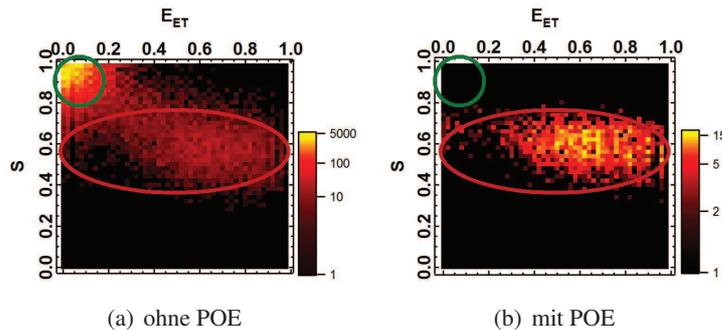


Abbildung 8.8: FAMS-Diagramme von mit Donor und Akzeptor markierten, diffundierenden Adk-Molekülen ohne (a) und mit (b) Akzeptor-selektiver Filterung (logarithmische Skala). Sie verdeutlichen die erfolgreiche Trennung des großen Anteils der Moleküle, die ein oder mehrere Donormoleküle (grün) tragen und Moleküle mit einem FRET-Paar (rot).

8.2.3 Bestimmung der Konformationspopulationen

Im Folgenden werden nun die Energietransfereffizienzen der FRET-Paare unter Zusatz verschiedener Substrate, dem Substratanalogon AMPPNP und Inhibitor AP₅A, bestimmt (siehe Abschnitt 6.10.5). Ziel ist es, verschiedene Konformationen zu identifizieren und den Einfluss der Nukleotide auf deren Population zu untersuchen.

Aus der Kristallstruktur können die relativen Abstände der Bindungsstellen von vier möglichen Hauptkonformationen ermittelt werden, bei denen sich die Lids in der geöffneten bzw. geschlossenen Konformation befinden (siehe Tab. 8.1 und Abb. 8.9).

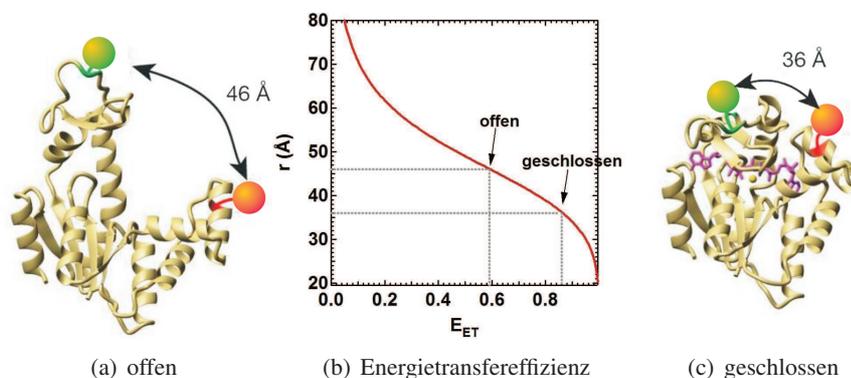


Abbildung 8.9: Positionen der Farbstoffe an der Apo-Adk (a) und Inhibitor-gebundenen Adk (c) sowie der Zusammenhang zwischen Abstand und Energietransfereffizienz (b).

Entsprechend der Kristallstrukturen wird die offene Konformation am besten durch das Apoenzym repräsentiert und die geschlossene Konformation durch das Binden des Inhibitors AP₅A, der die Bindungsstellen beider Lids besetzt.

AMP-Lid	ATP-Lid	Abstand (Å)	E_{ET}
offen	offen	46	0,58
offen	geschlossen	42	0,70
geschlossen	offen	36	0,86
geschlossen	geschlossen	36	0,86

Tabelle 8.1: Abstände der Bindungsstellen der Farbstoffe und theoretisch berechnete Energietransfereffizienzen bei unterschiedlichen Konformationszuständen der Adk. Zur Berechnung wurde ein Försterradius von 48,5 Å verwendet.

8.2.3.1 Korrekturfaktoren zur Berechnung der Energietransfereffizienzen

In NMR-Experimenten zeigten die Inhibitor-gebundenen Adk-Moleküle eine starke Population des geschlossenen Zustands (93%). Die bestimmten Raten waren sehr langsam, so dass während der Diffusionszeit von ca. 100 µs nur selten Mittelungen über zwei Zustände auftreten sollten. So eignet sich das Inhibitor-gebundene Molekül gut als Referenz, um von den Energietransfereffizienzen auf Abstände schließen zu können.

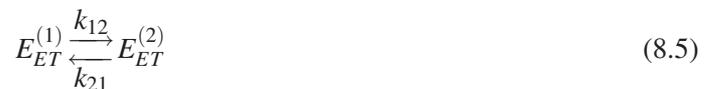
Die Energietransfereffizienz kann entsprechend Gleichung 4.28 berechnet werden. Um jedoch die unterschiedlichen Quanteneffizienzen sowie optischen Eigenschaften der Detektionskanäle zu berücksichtigen, muss der Wert von γ bestimmt werden.

Dieser wurde mit Hilfe des E_{ET} -Histogramms der Adk, gemessen mit 4 mM AP₅A und 2 mM MgCl₂, durchgeführt. Beträgt γ 1,25, so stimmt der Häufungspunkt der Verteilung exakt bei dem aus dem Försterradius berechneten Wert von 0,86 überein (Abb. 8.10(b)). Die Breite der Verteilung beträgt bei Anpassung mittels einer Gaußkurve $\sigma = 0,13$. Da von einer einzigen geschlossenen Konformation ausgegangen werden kann, ist diese Breite einzig auf Shot-Noise Fluktuationen des Signals zurückzuführen (vgl. Abschnitt 6.8).

8.2.3.2 Histogramme der Energietransfereffizienzen: Zweizustandmodell

Wird zunächst von einem Zweizustandmodell mit einer vollständig geöffneten und einer geschlossenen Konformation ausgegangen, kann das Histogramm der Energietransfereffizienzen über zwei Gaußverteilungen gefittet werden. Bedingung für die Verwendung der Gaußverteilung ist, dass die Energietransfereffizienzen nicht größer als 0,9 oder kleiner als 0,1 sind (vgl. Abb. 8.7).

Das Zweizustandmodell entspricht der Gleichung:



mit $E_{ET}^{(1)}$ und $E_{ET}^{(2)}$ den Energietransfereffizienzen des offenen bzw. völlig geschlossenen Zustands und k_{12} und k_{21} den Raten des Schließens bzw. Öffnens.

Zur Anpassung des Histogramms der Energietransfereffizienzen des Apoenzym (siehe Abb. 8.10(a)), wird die Breite der Gaußfunktion der geschlossenen Konformation aus dem Ergebnis der Messung am Inhibitor-gebundenen Molekül übernommen (siehe Abschnitt 8.2.3.1). Aufgrund der Verbreiterung der Verteilung bei E_{ET} -Werten um 0,6 wird entsprechend Gleichung 8.3 für die Gaußfunktion der offenen Konformation eine Breite von $\sigma = 0,20$ verwendet. Die Lage der Maxima wurde daraufhin durch Anpassung des Histogramms mit Hilfe der Gaußfunktionen bestimmt. Sie liegen bei den Energietransfereffizienzen von $0,59 \pm 0,01$ und $0,86 \pm 0,02$.

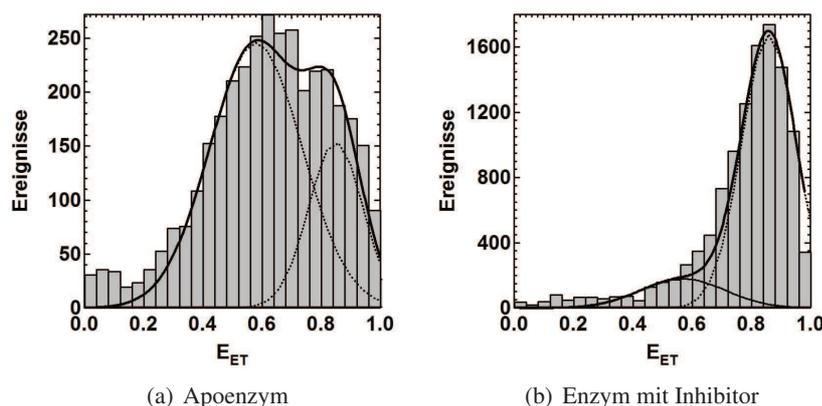


Abbildung 8.10: Histogramme der Energietransfereffizienzen (grau) für das Apo- (a) und das mit Inhibitor AP₅A gebundene Enzym (b) zusammen mit der Anpassungsfunktion zweier Gaußverteilungen (schwarz).

Bei schnellen Raten wird über die Energietransfereffizienzen der Zustände teilweise gemittelt. Werden Simulationen mit den im Abschnitt 8.2.4 bestimmten Raten durchgeführt, folgt eine Verschiebung der Energietransfereffizienz des völlig offenen Zustands um $+0,02$ und des geschlossenen Zustands um $-0,01$.

Wird dies berücksichtigt, stimmen die Maxima des E_{ET} -Histogramms des Apoenzym mit den theoretisch erwarteten Werten von Tab. 8.1 überein. Die Population der offenen Konformation betrug für das Apoenzym 76% (siehe Tab. 8.3). Der Anteil bei sehr niedrigen Energietransfereffizienzen entsteht durch Alterungsprozesse der Probe und wird höchstwahrscheinlich durch Aggregationen von Molekülen verursacht, welche zwar fluoreszente Farbstoffe enthalten, aber keinen Energietransfer zeigen.

Auch beim E_{ET} -Histogramm des Inhibitor-gebundenen Moleküls kann neben dem geschlossenen Zustand bei 0,86 ein offener Zustand bei 0,57 gefittet werden. Die Population des offenen Zustands beträgt 15% und stimmt mit der durch NMR-Messungen ermittelten Population von 5 - 15% überein [67].

Die verwendeten Fitfunktionen zeigen für das Apoenzym wie auch für das Inhibitor-gebundene Enzym jedoch eine nur unzureichende Anpassung. Da Hinweise auf unkorrelierte Bewegungen der Lids beim Apoenzym bereits bei MD-Simulationen auftraten (siehe Abb. 2.5), kann es auf einen zusätzlichen halbgeschlossenen Zustand bei $E_{ET} = 0,70$ hindeuten.

8.2.3.3 Histogramme der Energietransfereffizienzen: Dreizustandmodell

Mit dem Zweizustandmodell konnten die zwei Hauptkonformationen der Adenylatkinase identifiziert werden. Nun sollen die Enzyme hinsichtlich der halbgeschlossenen Zustände untersucht werden. Das ist von großer Bedeutung, da die Konformation mit geschlossenem AMP-Lid nicht vom vollständig geschlossenen Zustand unterschieden werden kann (siehe Tab. 8.1).

Zur Untersuchung der Histogramme treten nun drei mögliche Populationen auf, die mit Hilfe von drei Gauß-Funktionen entsprechend den theoretischen Werten des zu erwartenden Energietransfers bestimmt werden sollen:

1. beide Lids im geöffneten Zustand
2. ATP-Lid im geschlossenen Zustand und
3. AMP-Lid oder beide Lids im geschlossenen Zustand.

Die Untersuchungen wurden mit Substraten durchgeführt, die jeweils nur an einem Lid binden und das Schließen des jeweiligen Lids verstärken sollten. Als Substrate wurden für das ATP-Lid Mg-AMPPNP und für das AMP-Lid AMP verwendet. Die Affinität von AMPPNP ist hierbei mit ATP vergleichbar. Während AMP sehr spezifisch bindet, kann AMPPNP mit einer noch unbekannt, aber geringen Wahrscheinlichkeit auch an das AMP-Lid binden [27]. Liegen beide Substrate in der Lösung vor, ist die Gesamtrate trotz des fehlenden Stoffumsatzes mit Messungen mit ADP vergleichbar [169].

Die Abb. 8.11(a) zeigt, dass sich nach der Zugabe von 1 mM AMP die Energietransfereffizienzen im Vergleich zum Apoenzym nicht verändern.

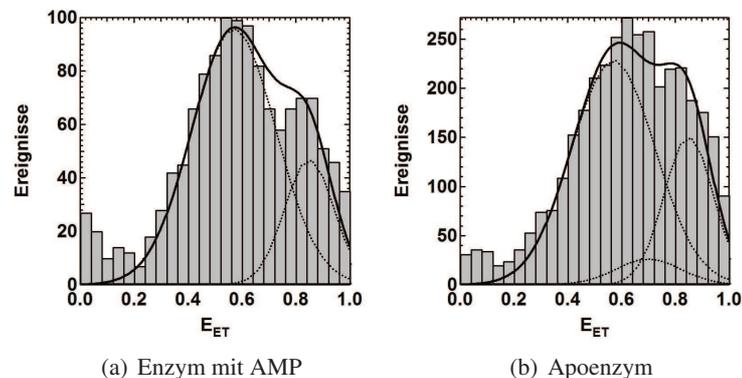


Abbildung 8.11: Histogramme der Energietransfereffizienzen (grau) für das nur am AMP-Lid gebundene AMP (a) und das Apoenzym (b) zusammen mit der Anpassungsfunktion als Einhüllende dreier Gauß-Verteilungen (schwarz).

Eine vermehrte Population des halbgeschlossenen Zustands (nur AMP-Lid geschlossen) würde eine Erhöhung der Population um 0,86 zur Folge haben. Die Population des geöffneten Zustands beträgt jedoch 78% und ist mit dem Apo-Molekül vergleichbar (siehe Tab. 8.2). Auch in NMR-Experimenten wurde eine Übereinstimmung der Ergebnisse mit dem Apoenzym festgestellt [27], so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Binden von AMP keine Auswirkung auf das Gleichgewicht zwischen dem geschlossenen und geöffneten Zustand hat. Der Anteil des halbgeschlossenen Zustands bei 0,70 konnte

im Vergleich zum Apoenzym (siehe Abb. 8.11(b)) jedoch nicht gefittet werden, was bedeutet, dass das Binden von AMP sogar unkorrelierte Bewegungen des ATP-Lids unterdrückt.

Auch die Zugabe von 1 mM Mg-AMPPNP erhöht nicht wie erwartet die Population des halbgeschlossenen Zustands des bindenden Lids (siehe Abb. 8.12(a)). Für den Fall, dass nur das ATP-Lid geschlossen ist, liegen die Energietransfereffizienzen bei 0,70. Vielmehr zeigt das Histogramm im Gegensatz zu den Experimenten mit AMP eine große Population bei der Energietransfereffizienz des vollständig geschlossenen Zustands.

Wird vergleichsweise das Histogramm des Moleküls mit gebundenem AP₅A mit dem Dreizustandmodell gefittet (siehe Abb. 8.12(b)), so beträgt der Anteil des halbgeschlossenen Zustands 19% und ist sogar größer als beim AMPPNP-gebundenen Molekül (7%).

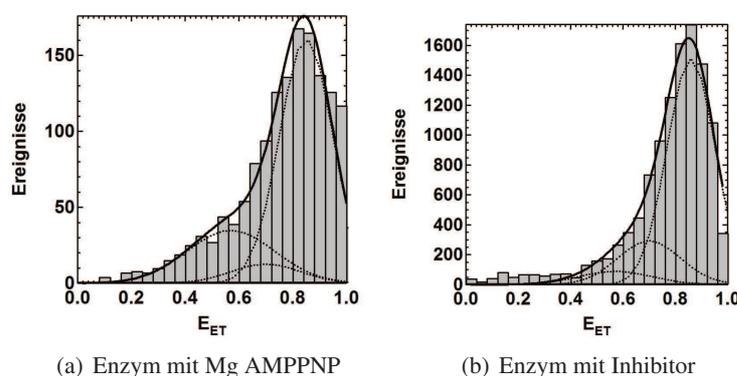


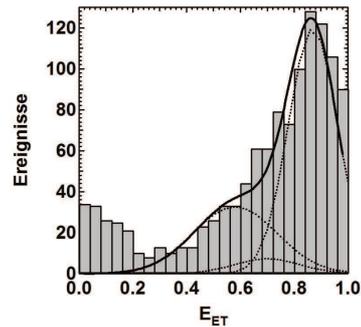
Abbildung 8.12: Histogramme der Energietransfereffizienzen (grau) für das Enzym mit gebundenem Mg-AMPPNP (a) und Inhibitor (b) zusammen mit der Anpassungsfunktion als Einhüllende dreier Gaußverteilungen (schwarz).

Das AMPPNP-gebundene Molekül weist weiterhin im Vergleich zum AP₅A-gebundenen mit 25% eine höhere Population des offenen Zustands auf. Dies wurde durch NMR-Messungen bestätigt [27] und kann an der, wenn auch geringen, Wahrscheinlichkeit liegen, dass AMPPNP auch an das AMP-Lid bindet. Sind AMPPNP-Moleküle an beiden Lids gebunden, kann aufgrund ihrer Größe der Übergang in den geschlossenen Zustand erschwert sein.

Werden nun beide Nukleotide, AMP und Mg-AMPPNP, in einer jeweiligen Konzentration von 1 mM hinzugegeben, zeigt sich analog zu den Experimenten mit Mg-AMPPNP eine in Richtung des geschlossenen Zustands verschobene Verteilung (siehe Abb. 8.13). Der Anteil der Moleküle im offenen Zustand

Nukleotid	2 Zustände		3 Zustände		
	$P_1(\%)$	$P_2(\%)$	$P_1(\%)$	$P_*(\%)$	$P_2(\%)$
∅	76 ± 5	24 ± 5	64 ± 5	13 ± 5	23 ± 5
AP ₅ A	15 ± 5	85 ± 5	5 ± 5	19 ± 5	74 ± 5
AMPPNP	22 ± 5	78 ± 5	25 ± 5	7 ± 5	69 ± 5
AMP	79 ± 5	21 ± 5	78 ± 5	0 ± 5	22 ± 5
AMPPNP + AMP	32 ± 5	68 ± 5	31 ± 5	5 ± 5	64 ± 5

Tabelle 8.2: Ergebnis der Populationen des offenen Zustands P_1 und der halb- bzw. vollständig geschlossenen Zustände bzw. P_2 bei Verwendung eines Zwei- bzw. Dreizustandmodells. Der halbgeschlossene Zustand bei $E_{ET} = 0,7$ wird als P_* bezeichnet. Die Werte entsprechen den Flächenverhältnissen der Gaußfunktionen. Die Fehlerbreite resultiert aus der Abschätzung der Breite der Verteilungen.



(a) 3 Zustände

Abbildung 8.13: Histogramm der Energietransfereffizienzen (grau) für das Enzym mit gebundenen AMP und Mg-AMPPNP zusammen mit der Anpassungsfunktion als Einhüllende dreier Gaußverteilungen (schwarz).

beträgt dabei 30% und im vollständig geschlossenen 64%. Der halbgeschlossene Zustand des ATP-Lids ist ebenfalls mit den Messungen mit AMPPNP vergleichbar und beträgt 5% (vgl. Abb. 8.12). Er wird durch unkorrelierte Bewegungen der Lids verursacht. Alle Ergebnisse sind in Tab. 8.2 zusammenfasst.

Sie zeigen, dass die halbgeschlossenen Zustände für eine Zustandsanalyse von Adk-Molekülen mit gebundenen Substraten eine untergeordnete Rolle spielen und dass Bursts mit einer Energietransfereffizienz um 0,86 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit von völlig geschlossenen Enzymmolekülen stammen. Hier ist auch die Sonderstellung des Apo- und des Inhibitor-gebundenen Enzyms zu erkennen, bei denen die Population des halbgeschlossenen Zustands des ATP-Lids größer als 10% ist.

Zusammenfassung:

Die Histogramme der Energietransfereffizienzen bestätigen die zwei ausgezeichneten Zustände der offenen und der geschlossenen Konformation.

Ist kein Substrat gebunden oder sind beide Bindungsstellen der Lids besetzt, so gibt es einen geringen Anteil des Zustands, bei dem nur das ATP-Lid geschlossen ist. Dies ist ein Hinweis auf unter diesen Bedingungen auftretende unkorrelierte Bewegungen. Über den Anteil des halbgeschlossenen Zustands des AMP-Lids kann aufgrund des mit dem geschlossenen Zustand vergleichbaren Energietransfers keine Aussage gemacht werden.

Das Apoenzym befindet sich zu 64% im vollständig geöffneten Zustand. Bei gebundenem Inhibitor beträgt dieser nur noch 5%.

Das Gleichgewicht zwischen dem geschlossenen und geöffneten Zustand kann durch das Binden von Substraten beeinflusst werden. Dabei induziert das Binden am ATP-Lid das Schließen des AMP-Lids, während ein Binden am AMP-Lid das ATP-Lid nicht beeinflusst. Diese Korrelation lässt die Verwendung eines Zweizustandmodells zur Beschreibung der Konformationskinetik zu. Sind Mg-AMPPNP und AMP gebunden, befindet sich das Molekül zu 60% im geschlossenen Zustand.

8.2.4 Konformationskinetik bei Einzelmolekül-Burstexperimenten

Die Konformationsänderungen diffundierender Moleküle beeinflussen den Verlauf der Auto- und Kreuzkorrelation der Donor- und Akzeptorfluoreszenz (siehe Abschnitt 5.3.3). Daher können aus den Zeitspuren diffundierender Moleküle die Raten der Konformationsänderungen bestimmt werden, sofern die einzelnen Zustände kürzer als die Diffusionszeit sind oder sich zumindest in deren Größenordnung befinden (siehe Abschnitt 5.3.3).

Die Korrelationsfunktionen der Fluoreszenzzeitspuren enthalten die Raten sowie die Energietransfereffizienzen der Zustände. Zur Berechnung der Korrelationsfunktionen wurden nur Photonen von Molekülen, die einen Donor und einen Akzeptor tragen, verwendet.

Zusätzlich wurden neben den Photonen des ausgewählten Bursts auch die benachbarten Photonen mit einem Abstand von max. 5 ms zum Burstmittelpunkt verwendet (siehe Abb. 8.14(a)). Würden nur die jeweiligen Photonen der Bursts selektiert, würde es zu einer störenden Überlagerung der Konformationsdynamik mit dem korrelativen Abfall aufgrund der Länge des Zeitspurenabschnitts kommen.

Mit Hilfe der Burstanalyse (siehe Abschnitt 7.7.7.1) wurden weiterhin nur Bursts mit ähnlichen Burstbreiten ausgewählt, um eine Verschmierung der Korrelation durch stark unterschiedliche Diffusionszeiten zu verhindern (siehe Abb. 8.14(b)).

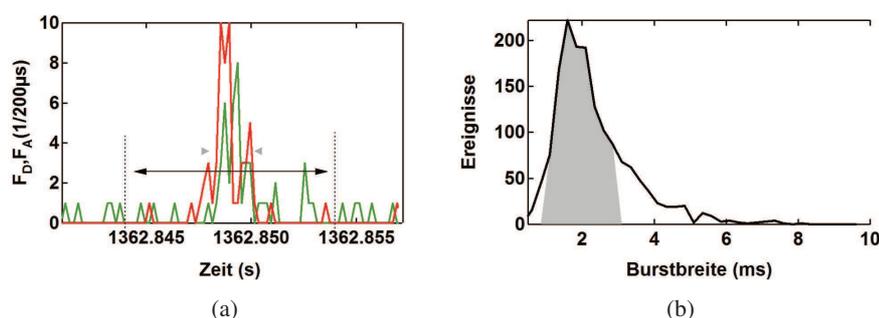


Abbildung 8.14: Fluoreszenz des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) während der Diffusion durch den Fokus (a). Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Bereich, aus dem die Photonen für die Korrelation verwendet werden. Die grauen Pfeile markieren die Breite des Bursts. Entsprechend der Verteilung der Burstbreiten (b) wurde ein Bereich (grau) zur Filterung ausgewählt.

In Abb. 8.15 sind die Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen des diffundierenden Apoenzyms vor und nach der Filterung der Photonen entsprechend den genannten Kriterien dargestellt. Deutlich ist die größere scheinbare Diffusionszeit des Akzeptors aufgrund von Sättigungseffekten zu erkennen. Die Diffusionszeit des Akzeptors beträgt $\tau_D^A = 270 \mu\text{s}$ im Vergleich zum Donor mit $\tau_D^D = 80 \mu\text{s}$.

Nach der Filterung erhöht sich zudem die Amplitude der Autokorrelation des Donors und der Kreuzkorrelation (siehe Abb. 8.15(b)). Dies beruht auf der Reduktion des fluoreszenten aber unkorrelierten Hintergrundsignals. Der Abfall bei 10 ms entsteht durch die gewählte Breite der verwendeten Zeitspurenabschnitte (siehe Abb. 8.14 (a)).

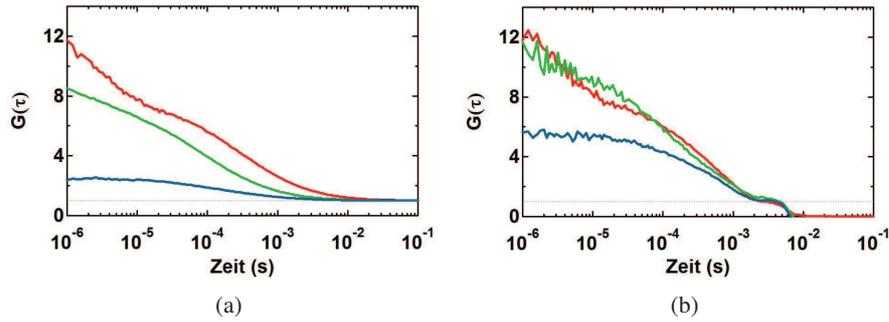


Abbildung 8.15: Autokorrelation des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) nach Anregung der Donormoleküle und deren Kreuzkorrelation (blau) vor (a) und nach (b) der Filterung mittels POE und Selektion entsprechend der Burstbreiten.

In Abb. 8.16(a) sind Korrelationsfunktionen einer simulierten Zeitspur von Molekülen mit einer Konformationsdynamik mit den Raten $k_{12} = 2.200 \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = 6.200 \text{ s}^{-1}$ zwischen den Zuständen $E_{ET}^{(1)} = 0,57$ und $E_{ET}^{(2)} = 0,86$ dargestellt. Die simulierte Triplettkinetik beinhaltet gleiche Tripletttraten und eine vollständige Singulett-Triplett-Annihilation. Die Diffusionszeit der simulierten Moleküle betrug $200 \mu\text{s}$. Der Unterschied zur Kreuzkorrelation der experimentellen Daten liegt vor allem in der größeren Amplitude. Dies ist durch Einflüsse von unkorrelierten Photonen begründet. Desweiteren zeigt die simulierte Kreuzkorrelationsfunktion bei $1 \mu\text{s}$ einen leichten Triplettanteil. Dieser Unterschied beruht auf der im Experiment nur unvollständigen Singulett-Triplett-Annihilation (siehe dazu Abschnitt 7.4.5).

Zur Analyse der Zustände und der Konformationskinetik wird der diffusive Bestandteil der Korrelationsfunktionen durch die Bildung der Quotienten der Autokorrelationen mit der Kreuzkorrelation entfernt. Aus den Quotienten können entsprechend den Gleichungen 5.32 bis 5.34 die Energietransfereffizienzen der Konformationszustände und die Raten der Konformationsdynamik ermittelt werden. In der verwendeten Anpassungsfunktion wurde ein zusätzlicher Offset für die y-Achse eingefügt.

Bei vollkommen freier Parameterwahl war die Konformationsdynamik aus den simulierten Daten jedoch nur mit großen Fehlergrenzen zu ermitteln. Zur Reduzierung der Unsicherheit wurden die Energietransfereffizienzen als feste Parameter mit $E_{ET}^{(1)} = 0,57$ und $E_{ET}^{(2)} = 0,86$ verwendet. Über die Anpassungs-

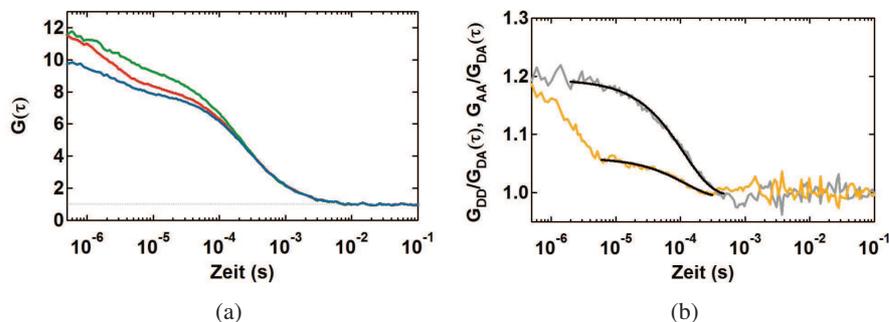


Abbildung 8.16: Autokorrelation des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) und deren Kreuzkorrelation (blau) einer simulierten Zeitspur mit den Zuständen $E_{ET}^{(1)} = 0,57$ und $E_{ET}^{(2)} = 0,85$ und den Raten $k_{12} = 2.200 \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = 6.200 \text{ s}^{-1}$ (a). Die Quotienten aus der Autokorrelation des Donors (grau) bzw. des Akzeptors (gelb) mit der Kreuzkorrelation und die jeweiligen Fitfunktionen entsprechend den Gleichungen 5.32 bis 5.34 (schwarz)(b).

funktionen entsprechend der Gleichungen 5.32 bis 5.34 können für den Quotienten für $G_{Dyn}^{DD}(\tau)/G_{Dyn}^{DA}(\tau)$ die Raten $k_{12} = 2.218 \pm 70 \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = 6.203 \pm 250 \text{ s}^{-1}$ sowie für $G_{Dyn}^{AA}(\tau)/G_{Dyn}^{DA}(\tau)$ die Raten $k_{12} = 1.126 \pm 90 \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = 6.163 \pm 1000 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden.

Die größere Abweichung der Raten des Quotienten, der die Autokorrelation des Akzeptors enthält, entsteht durch die unterschiedlichen Tripletanteile in der Auto- und Kreuzkorrelation. Die Raten, die unter Verwendung der Autokorrelation des Donors gewonnen wurden, stimmen dagegen sehr gut mit den in der Simulation verwendeten Raten überein.

Für die experimentellen Daten war die Bildung des Quotienten aus der Autokorrelation des Akzeptors $G_{Dyn}^{AA}(\tau)/G_{Dyn}^{DA}(\tau)$ aufgrund der größeren Diffusionszeit nicht möglich. Bei dem Donor trat das Problem der stark unterschiedlichen Tripletterme nicht auf. Der Tripletanteil der Autokorrelation des Donors betrug 20% und die der Kreuzkorrelation 10%. In den Anpassungsfunktionen für $G_{Dyn}^{DD}(\tau)/G_{Dyn}^{DA}(\tau)$ wurde weiterhin zuerst nur $E_{ET}^{(2)}$ bei dem Wert von 0,86 festgehalten. Nach der Bestimmung von $E_{ET}^{(1)}$ wurde auch dieser zu Ermittlung der Raten als fester Parameter verwendet.

8.2.5 Bestimmung der Raten der Konformationskinetik

In Abb. 8.17(a) ist der Quotient der Korrelationsfunktionen für das Apoenzym dargestellt. Eine Anpassungsfunktion entsprechend den Gleichungen 5.32 und 5.34 ergibt bei festem Parameter $E_{ET}^{(2)}$ von 0,86 eine Energietransfereffizienz $E_{ET}^{(1)}$ von 0,31. Die zugehörigen Raten werden mit $k_{12} = (2.200 \pm 140) \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = (6.300 \pm 330) \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Der Wert für $E_{ET}^{(1)}$ weicht hierbei von dem erwarteten Wert von 0,57 ab. Dieser Unterschied wird durch Abweichungen der Amplituden der experimentell gewonnenen Korrelationsfunktionen von den theoretischen Modellen hervorgerufen. Ursachen hierfür sind z.B. unterschiedliche Tripletterme und ein unkorreliertes Hintergrundsignal.

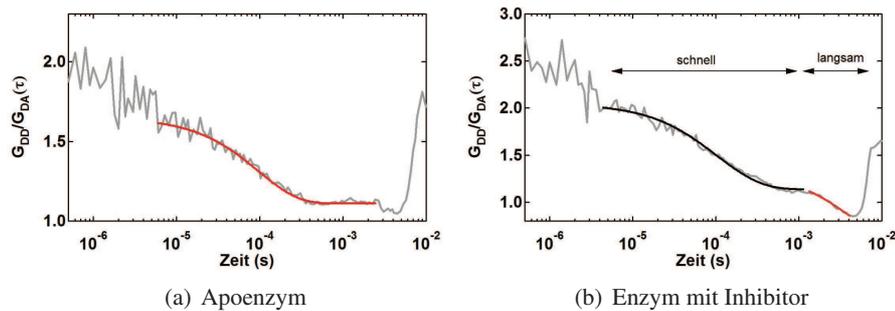


Abbildung 8.17: Quotient der Autokorrelation des Donors $G_{DD}(\tau)$ mit der Kreuzkorrelation des Donors mit dem Akzeptor $G_{AD}(\tau)$ (grau) des Apoenzyms (a) und des Enzyms mit Inhibitor (b) und die Anpassungsfunktionen (rot).

Im Weiteren wird der Einfluss nach Zugabe der Nukleotide AP_5A , AMP und AMPPNP untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tab. 8.3 mit Populationen der Burstexperimente zusammengefasst.

Für das Inhibitor-gebundene Enzym gibt es in der Funktion $G_{DD}/G_{DA}(\tau)$ zwei Zeitbereiche (siehe Abb. 8.17(b)). Der langsame Bereich entspricht den Raten $k_{12} = (190 \pm 5) \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = (25 \pm 2) \text{ s}^{-1}$ sowie den beiden Zuständen $E_{ET}^{(1)} = 0,39$ und $E_{ET}^{(2)} = 0,86$ und kann eindeutig dem Zeitbereich der Konformationsänderungen zugeordnet werden. Jedoch ist die Gesamtrate dieses Prozesses so langsam, dass bereits

eine Überlappung mit dem gewählten Zeitfenster der Bursts von 10 ms vorhanden ist. Das Fenster kann aber nicht größer gewählt werden, da aufgrund der Burstsdichte die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass dann benachbarte Bursts von Molekülen ohne Energietransfer innerhalb der ausgewählten Zeitfenster liegen. Dadurch würden die Korrelationsfunktionen ihren Informationsgehalt bezüglich der Dynamik verlieren. Bei einer Anpassung des schnellen Bereichs von Abb. 8.17(b) werden Raten mit $k_{12} = (200 \pm 10) \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = (8.000 \pm 400) \text{ s}^{-1}$ sowie die Zustände $E_{ET}^{(1)} = 0,04$ und $E_{ET}^{(2)} = 0,86$ erhalten. Der niedrige Wert von $E_{ET}^{(2)}$ deutet bereits darauf hin, dass es sich höchstwahrscheinlich um Übergänge in einen Zustand ohne Energietransfer handelt. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um die Übergänge des Donors und des Akzeptors in einen Zustand geringer Quantenausbeute.

Ist der Donor im Dunkelzustand, kann kein Energietransfer stattfinden und auch der Akzeptor ist „dunkel“. Dies ist ein korrelierter Prozess beider Fluorophore mit einer Energietransfereffizienz von Null. Befindet sich der Akzeptor im Dunkelzustand, bleibt das Donorsignal konstant oder vergrößert sich je nach den Absorptionseigenschaften des Akzeptors. Im ersten Fall ist die Intensitätsänderung nicht korreliert und würde keinen Beitrag in der Kreuzkorrelationsfunktion liefern. Im zweiten Fall würde ein antikorrelierter Term entstehen. In beiden Fällen wäre die aus den Fluoreszenzintensitäten berechenbare „scheinbare“ Energietransfereffizienz Null.

Bindet die Adenylatkinase an Mg-AMPPNP, tritt erneut auf zwei Zeitskalen eine Dynamik auf. Die Gesamtrate der schnellen Fluktuationen in einen Zustand ohne Energietransfer beträgt 21.000 s^{-1} . Dies deutet auf eine erhöhte Ionisationsfreudigkeit der Farbstoffe nach dem Binden des Nukleotids hin. Die langsamen Raten der Konformationsänderung sind jedoch aufgrund der geringen Photonenzahl pro Burst und dem damit verbundenen Rauschen nur abzuschätzen und betragen $k_{12} = (1.200 \pm 1.000) \text{ s}^{-1}$ sowie $k_{21} = (20 \pm 40) \text{ s}^{-1}$ (vgl. Tab. 8.3). Trotz der großen Fehlerbereiche ist jedoch eine Aussage bezüglich der Größenordnung der Raten möglich. Bindet zusätzlich das AMP am AMP-Lid, bleibt die Öffnungsrate gleich, nur die Schließungsrate ist verlangsamt. Die Raten betragen $k_{12} = (630 \pm 250) \text{ s}^{-1}$ sowie $k_{21} = (25 \pm 30) \text{ s}^{-1}$.

Bindet dagegen nur das Substrat AMP an das AMP-Lid, bevorzugt das Enzym weiterhin den offenen Zustand und die Raten sind mit denen des Apoenzyms identisch (vgl. Abb. 8.11).

Aus den Raten können für das Gleichgewicht die entsprechenden Populationen der Konformationszustände P_i :

$$P_i = \frac{k_{ji}}{k_{ij} + k_{ji}} \quad (8.6)$$

mit i bzw. j für die Zustände 1 bzw. 2 berechnet werden. In Tab. 8.3 sind sie zusammen mit den Ergebnissen der Histogramme für die verwendeten Nukleotide vergleichend dargestellt. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung für das Apoenzym, das AMP-gebundene und das Inhibitor-gebundene Enzym. Bindet AMPPNP, stimmen die Ergebnisse nicht mehr überein. Die Population des geöffneten Zustands ist in den Histogrammen zehnfach größer. Aufgrund der großen Unsicherheiten in der Bestimmung der Raten kann aber an dieser Stelle noch keine Schlussfolgerung gezogen werden.

Es ist jedoch deutlich sichtbar, dass besonders die Rate des Öffnens durch eine Bindung an das ATP-Lid um den Faktor 300 verlangsamt wird, während die Schließungsraten nur um den Faktor zwei variieren. Der Inhibitor nimmt allerdings eine Sonderrolle ein. Aufgrund seiner Größe und der Bedingung, dass beide Bindungsstellen der Lids an ein Molekül binden, ist auch die Schließungsrate stark verlangsamt.

Nukleotid	E_{ET} - Histogramme		Korrelationsfunktionen			
	$P_1(\%)$	$P_2(\%)$	k_{12}/s^{-1}	k_{21}/s^{-1}	$P_1(\%)$	$P_2(\%)$
\emptyset	76 ± 5	24 ± 5	2.200 ± 130	6.400 ± 330	74 ± 2	26 ± 1
AMPPNP	22 ± 5	78 ± 5	1.200 ± 1.000	20 ± 40	2 ± 1	98 ± 5
AMP	79 ± 5	21 ± 5	2.100 ± 110	6.500 ± 260	75 ± 2	25 ± 1
AMPPNP + AMP	32 ± 5	68 ± 5	630 ± 250	25 ± 30	4 ± 1	96 ± 6
AP ₅ A	15 ± 5	85 ± 5	190 ± 5	25 ± 2	12 ± 1	88 ± 1

Tabelle 8.3: Vergleich der Populationen P_i , die aus den Verteilungen der Energietransfereffizienzen und aus den Raten k_{ij} unter Verwendung des Zweizustandmodells für die offene (1) und die geschlossene (2) Konformation bestimmt wurden. Die Werte geben die Mittelwerte und Standardabweichungen an.

Zusammenfassung:

Aus den Zeitspuren der in Lösung diffundierenden Moleküle konnten nicht nur die Verteilungen der Energietransfereffizienzen, sondern unter Verwendung des Zweizustandmodells auch die Raten der Konformationsänderungen abgeschätzt werden.

Es zeigt sich, dass das Binden der Nukleotide vor allem die Öffnungsrate beeinflusst. Die Schließungsrate befindet sich im Bereich von $1000 - 2000 \text{ s}^{-1}$. Die Ausnahme bildet das Inhibitor-gebundene Enzym mit einer Rate von $190 \pm 5 \text{ s}^{-1}$. Die aus den Raten berechneten Populationen stimmen hierbei in ihrer Tendenz mit den Populationen der E_{ET} -Histogramme überein.

8.3 Immobilisierte Moleküle

8.3.1 Zeitaufgelöste Einzelmolekül-FRET-Experimente

Bei Burstexperimenten wird über viele einzelne Moleküle, die nur während der Diffusion durch den Laserfokus „sichtbar“ sind, gemittelt. Der Vorteil ist die gute Statistik, der Nachteil, dass die Diffusionszeit das Beobachtungsfenster für die Kinetik limitiert.

Um nun das Verhalten einzelner Enzyme zu untersuchen, wurde der zeitliche Verlauf der Donor- und Akzeptorfluoreszenz von immobilisierten Adk-Molekülen aufgenommen. Die begrenzte Anzahl von Absorptions- und Emissionszyklen begrenzt hierbei maßgeblich die Länge der Zeitspuren.

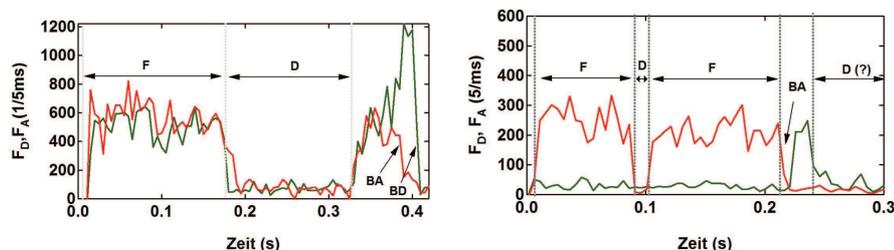


Abbildung 8.18: Fluoreszenzzeitverläufe des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) immobilisierter Adk-Moleküle ohne (a) und mit (b) dem Substrat ADP bei einer zeitlichen Auflösung von 5 ms. Die Symbole F und D stehen für fluoreszente bzw. nichtfluoreszente Zustände, BD und BA markieren die Zeit des Bleichens des Donors bzw. Akzeptors. Die Anregungsleistungen betragen $10 \mu\text{W}$ für (a) und $5 \mu\text{W}$ für (b).

In Abbildung 8.18 sind exemplarisch zwei Zeitspuren mit einer Zeitauflösung von 5 ms dargestellt. Deutlich ist der stufenartige Abfall der Fluoreszenz durch Ionisationsereignisse und Photobleichen zu erkennen. In den meisten Fällen bleicht der Akzeptor vor dem Donor. Bei effizienten Energietransfer (Abbildung 8.18(b)) und den daraus folgenden hohen Photonenemissionsraten des Akzeptors sind die Zeitspuren kürzer.

Es lassen sich verschiedene Arten von Dunkelzuständen der Fluorophore feststellen. In der Zeitspur (a) ist ein Beispiel für einen Übergang des Donors in einen Dunkelzustand zu erkennen. Daraus folgt, dass der Akzeptor während dieser Zeit nicht angeregt wird und demzufolge dunkel ist.

Befindet sich der Akzeptor in einen photoinaktiven Zustand, wie z.B. in der Zeitspur in (b), erhöht sich während dieser Zeit in fast allen Fällen die Fluoreszenz des Donors nicht. Dies deutet darauf hin, dass AlexaFluor 633 auch im Dunkelzustand als Akzeptor die vom Donor übertragene Energie aufnimmt. Diese Eigenschaft wurde auch an anderen Fluorophoren beobachtet [147].

Dieser Fakt ist sehr wichtig für die Analyse der Zeitspuren mit Hilfe der Kreuzkorrelationsfunktion (vgl. Kapitel 5.3). Während Übergänge des Donors in den Dunkelzustand einen korrelativen Term (d.h. positive Amplitude) zur Folge haben, hat, solange sich die Donorfluoreszenz nicht ändert, ein Dunkelzustand des Akzeptors keinerlei Auswirkungen. Eine Konformationsänderung dagegen führt zu einem antikorrelierten Term.

Zur Ermittlung der Kinetik der Konformationsänderungen werden Zeitspuren mit einer geringeren Zeitauflösung als 5 ms erstellt. Zur Analyse wurde ein Zweizustandmodell verwendet (siehe auch Gleichung 8.5), wobei die Werte für die Zustände $E_{ET}^{(i)}$ aus den Ergebnissen der Burstanalyse verwendet wurden.

Alle Ergebnisse der Konformationskinetik in der Tabelle Tab. 8.4 mit den Ergebnissen der Burstexperimente sowie NMR-Spektroskopie vergleichend dargestellt.

8.3.2 Zustandsanalyse zeitaufgelöster Einzelmolekül-FRET-Experimente

Zur Gewinnung der Fluoreszenz-Zeitspuren von Fluorophoren wurde die Deckglasoberfläche mit einer geringen Dichte von immobilisierten Adk-Molekülen von 5 - 20 Moleküls pro $10 \times 10 \text{ (}\mu\text{m)}^2$ versehen. Dazu wurde auf die Deckgläser eine Lösung mit Molekülkonzentrationen von weniger als 100 pM aufgetragen und anschließend mit Pufferlösung gespült.

Zur Lokalisation der einzelnen Moleküle wurden die Deckgläser bei einer niedrigen Anregungsleistung von 100 nW mit dem 488 nm-Laser gescannt. Dabei wurde eine Integrationszeit von 2 ms pro Pixel (die Fläche betrug $80 \times 80 \text{ (nm)}^2$) verwendet und je ein Bild für die beiden Detektionskanäle erstellt. Dies ermöglichte erste Aussagen bezüglich der An- bzw. Abwesenheit des Akzeptors an den einzelnen Adk-Molekülen. Danach wurde der Laserfokus genau auf das Maximum der Punktspreizfunktion gesetzt (siehe Abschnitt 3.3).

Die Aufnahme der Zeitspuren wurde je nach gewünschter Emissionsrate bei unterschiedlichen Anregungsleistungen durchgeführt. Zeitspuren, die die Fluoreszenz von adsorbierten Bestandteilen der Pufferlösung oder mehreren Fluorophoren enthielten bzw. starke Intensitätsschwankungen aufwiesen, wurden verworfen. Bestandteile des Puffers zeigten einen graduell abnehmende Fluoreszenzintensität und waren daher leicht zu erkennen.

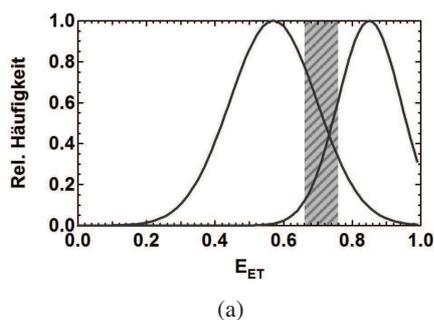


Abbildung 8.19: Als Grundlage für die Zustandsanalyse dienen die Energietransferverteilungen (schwarz) zweier distinkter Zustände und die unbestimmte Zone (grau) (a).

Konformationszustände mit unterschiedlichen relativen Abständen der gebundenen Fluorophore können über die Änderung der Energietransfereffizienz nachgewiesen werden. (vgl. Gleichung 4.26). Für die Zustandsanalyse der Adk wurde ein Modell mit zwei Zuständen $E_{ET}^{(1)}$ und $E_{ET}^{(2)}$ verwendet. Die mögliche zeitliche Auflösung der Zeitspuren wurde durch die Photonenemissionsrate, durch die charakteristische mittlere Anzahl der Emissions- und Absorptionszyklen der Fluorophore und die mittlere Verweilzeit in den Zuständen diktiert. Sie wurde in der Regel so gewählt, dass die Gesamtphotonenanzahl pro Zeiteinheit 20 – 40 Photonen betrug.

Aus Energietransfer-Histogrammen der Diffusionsmessungen konnte für den geöffneten Zustand ein Maximum bei $E_{ET}^{(1)} = 0,57$ und für den geschlossenen Zustand bei $E_{ET}^{(2)} = 0,85$ bestimmt werden (vgl. Abschnitt 8.2.3). Aufgrund des Photonenrauschens überlappen die Verteilungen der Energietransferzustände, und es gibt eine Zone, in der eine Zuordnung des Energietransfers zu einem der beiden Zustände nicht möglich ist. Die Lage der Zone wurde durch die beiden Maxima bestimmt und ihre Breite betrug $1/3$ des Abstands der Maxima. Wurde die Zone überschritten, wurde dies als Übergang in einen anderen Zustand gewertet (siehe Abb. 8.19).

Die gewonnenen Aufenthaltszeiten in den beiden Zuständen wurden histogrammiert und konnten mit einer einfachen Exponentialfunktion gefittet werden. Die resultierende Zeitkonstante entspricht der mittleren Aufenthaltsdauer τ in dem jeweiligen Zustand. Durch die begrenzte zeitliche Auflösung werden jedoch kürzere Ereignisse „verpasst“ (*Missed Events*) und folglich sind die aus der Zustandsanalyse gewonnenen Raten nur apparent. Ist eine Rate sehr viel langsamer als die andere, können Korrekturen entsprechend [18] verwendet werden.

Unterscheiden sich beide Raten jedoch nur wenig und gibt es noch weitere Einflussfaktoren, ist eine Korrektur über diese Gleichungen nicht möglich. Daher wurden zur Verifikation der Ergebnisse Monte-Carlo-Simulationen der Fluoreszenz immobilisierter Moleküle durchgeführt (siehe Abschnitt 6.12). In ihnen wurde neben den Konformationsänderungen auch die begrenzte Photonenemissionsrate und die Tripletrate berücksichtigt. Aus den simulierten Zeitspuren wurden nun ebenfalls über die Zustandsanalyse die scheinbaren Raten ermittelt. Durch eine rekursive Prozedur konnten die Ergebnisse mit den Resultaten des Experiments verglichen werden. Stimmen diese überein, entsprechen die wahren Raten den Eingabeparametern der Simulation.

Veränderungen der indifferenten Zone (vgl. Abb. 8.19) in Bezug auf Breite und Lage führen zwar zu einer Verschiebung der apparenten Raten, doch durch den Abgleich mit den simulierten Daten ist dieser

Einfluss für die Bestimmung der „wahren“ Raten ohne Bedeutung.

Um die Zustandsanalyse hinsichtlich der Empfindlichkeit auf zufällige, messbedingte Fluktuationen der Fluoreszenz zu untersuchen, wurden Zeitspuren eines Adk-Moleküls simuliert, bei dem sich der relative Abstand der Farbstoffe nicht änderte. Die Photonennrate wurde dabei so gewählt, dass sie mit den Experimenten vergleichbar war. Wurden auf diese Zeitspuren die Zustandsanalyse oder die Korrelationsanalyse angewandt, so unterschieden sich die Ergebnisse signifikant von denen der Experimente. Das verdeutlicht eine weitestgehende Unabhängigkeit der Methoden in Bezug auf zufällig auftretende Fluktuationen.

8.3.3 Korrelationsanalyse zeitaufgelöster Einzelmolekül-FRET-Experimente

In den Korrelationsfunktionen sind aufgrund des antikorrelierten Verhaltens der Donor- und Akzeptorfluoreszenz bei Änderung des relativen Abstandes die Konformationsänderungen enthalten. Die Größe des antikorrelierten Terms ist von den Energietransfereffizienzen sowie von dem Verhältnis der Rate abhängig (siehe Gleichung 5.32 bis 5.34). Die größten Amplituden treten bei gleichen Raten k_{12} und k_{21} und großen Unterschieden der Energietransfereffizienzen auf. Neben den Konformationsänderungen sind aber auch korrelierte Anteile, die z.B. durch Übergänge in Dunkelzustände entstehen. Um den durch die endliche Länge der Zeitspur bedingten Abfall zu eliminieren wurde eine Funktion $f(t)$ eingeführt, die den Abfall auf eins normiert (siehe Abb. 8.20, vgl. [100]).

Die zusätzlich auftretende Triplettkinetik wurde in der globalen Anpassungsfunktion mit einbezogen. Für die Autokorrelationsfunktion des Donors bzw. des Akzeptors $AC(t)$ und die Kreuzkorrelationsfunktion $CC(t)$ gilt demnach:

$$AC(t) = 1 - f(t) + A + \frac{B}{(1-C)(1-T)} (1 - C + C \exp(-k_{konf}t)) \times (1 - T + T \exp(-k_T t)) \quad \text{und} \quad (8.7)$$

$$CC(t) = 1 - f(t) + A + \tilde{B} (1 + C \exp(-k_{konf}t)) (1 + T \exp(-k_T t)). \quad (8.8)$$

Dabei beschreibt C je nach Vorzeichen den korrelativen bzw. antikorrelativen Anteil und T den Tripletanteil mit der Rate k_T . Die Gesamtrate k_{konf} entspricht der Summe von k_{12} und k_{21} (vgl. 5.3.3). Auf die Bedeutung der Amplitude von Kreuzkorrelationen wurde in Abschnitt 5.3 eingegangen.

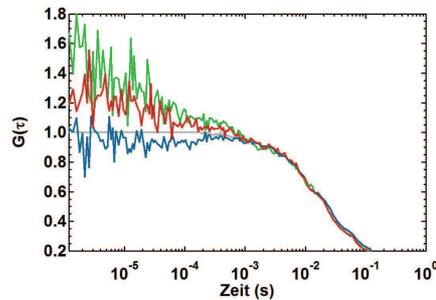


Abbildung 8.20: Mittelwerte der Autokorrelation des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) zusammen mit der Kreuzkorrelation (blau) von Zeitspuren des immobilisierten Apoenzyms. Die Funktion $f(t)$ (grau) beschreibt den durch die Länge der Messspur bedingten Abfall und wird zur Normierung verwendet.

8.3.4 Ergebnis für die Apo-Adk

8.3.4.1 Zustandsanalyse

Aufgrund der schnellen Raten der Konformationsänderungen, die entsprechend der NMR-Messungen und den Korrelationsfunktionen der Bursts im Bereich von bis zu 8000 s^{-1} liegen, wurde eine möglichst hohe zeitliche Auflösung angestrebt. Die dafür notwendigen Photonennraten führen jedoch zu einer hohen Wahrscheinlichkeit für Ionisations- und Bleichprozesse und daher zu kurzen Zeitspuren. Zur Untersuchung der Raten ist aber eine Zeitspur, die möglichst viele Wechsel zwischen den Zuständen aufweist, notwendig. Das Optimum wurde für die Apo-Adk bei einer Anregungsleistung von $10 \mu\text{W}$ erreicht. So konnte eine Auflösung von bis zu $200 \mu\text{s}$ bei einer mittleren Länge von 100 ms erreicht werden.

Entsprechend den Maxima der Histogramme der Energietransfereffizienzen und der erwarteten zeitlichen Mittelung wurden für die Zustandsanalyse die Werte $E_{ET}^{(1)} = 0,59$ und $E_{ET}^{(2)} = 0,84$ als die jeweiligen Häufungspunkte der E_{ET} -Verteilungen verwendet.

Die Zeitspuren enthalten neben dem irreversiblen Bleichen auch reversible Ionisationseffekte (siehe Abschnitt 7.6). Während lange Dunkelzeiten der Ionisationszustände im Bereich von $10 - 100 \text{ ms}$ leicht erkannt und aus der Zustandsanalyse ausgeschlossen werden können, sind es gerade die kurzen Dunkelzeiten, die einen Einfluss auf die Zustandsanalyse haben. Obwohl das Enzym in dem Zustand verharret, wird durch einen kurzen Dunkelzustand ein Wechsel in einen Zustand mit geringerem Energietransfer suggeriert. Um diese Ereignisse auszuschließen, werden Ereignisse unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes beider Detektionskanäle ignoriert. Die Gefahr hierbei ist, dass eine kurze Zustandsänderung während der Dunkelzeit nicht erkannt wird.

In Abb. 8.21 ist ein Ausschnitt einer Zeitspur des Apoenzymys dargestellt. Die für jeden Zeitabschnitt berechnete Energietransfereffizienz zeigt die Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen an.

Aufgrund der Shot-Noise-bedingten Breite der Verteilungen ändert sich ein Zustand nicht, solange der indifferente Bereich, bei dem keine eindeutige Zuordnung möglich ist, nicht überschritten wird (siehe auch Abschnitt 8.3.3). Die niedrigen Energietransfereffizienzen unterhalb von $0,3$ weisen auf Ionisationsereignisse hin (vgl. mit Abschnitt 8.2.4). Das E_{ET} -Histogramm aus 20 Zeitspuren entspricht dabei

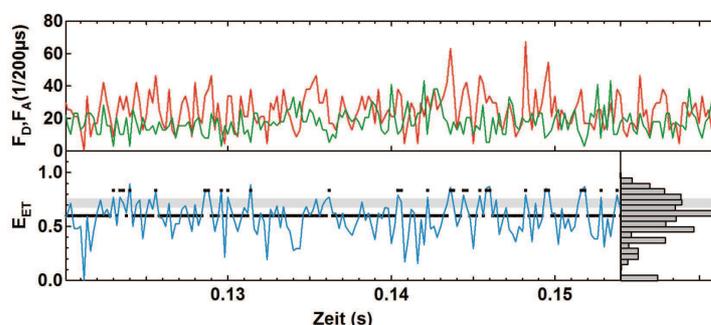


Abbildung 8.21: Ausschnitt einer Zeitspur der Donor- und Akzeptorfluoreszenz (grün, rot) eines Apo-Moleküls bei einer zeitlichen Auflösung von $0,2 \text{ ms}$. Der Verlauf der Energietransfereffizienz (blau) zeigt Übergänge zwischen den zwei Zuständen (schwarz). Die Länge der horizontalen schwarzen Balken gibt die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Zuständen an. Die graue Zone markiert den unbestimmten Bereich, der aufgrund der Breite der Verteilungen entsteht. Das E_{ET} -Histogramm (grau) wurde aus 20 Zeitspuren gebildet. Die Anregung erfolgte mit $10 \mu\text{W}$ (488 nm).

dem Ergebnis der Burstexperimente und zeigt die Ergodizität der Moleküle bezüglich ihrer Konformationen.

Mit Hilfe der Zustandsanalyse können weiterhin die Zeiten ermittelt werden, in denen sich das Molekül in dem geöffneten bzw. geschlossenen Zustand befindet (siehe Abschnitt 8.3.3). Die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Zuständen wird durch die Länge der horizontalen schwarzen Balken angegeben. Die Histogramme der Aufenthaltszeiten in Abb. 8.22(a) und (b) zeigen einen einfachen exponentiellen Abfall. Da infolge der begrenzten Auflösung kurze Ereignisse verpasst oder durch zufällige Fluktuationen Ereignisse erzeugt werden können, sind die aus den Histogrammen bestimmten Raten nur apparent. Sie betragen $k_{12}^* = (1.070 \pm 30) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21}^* = (2.650 \pm 90) \text{ s}^{-1}$.

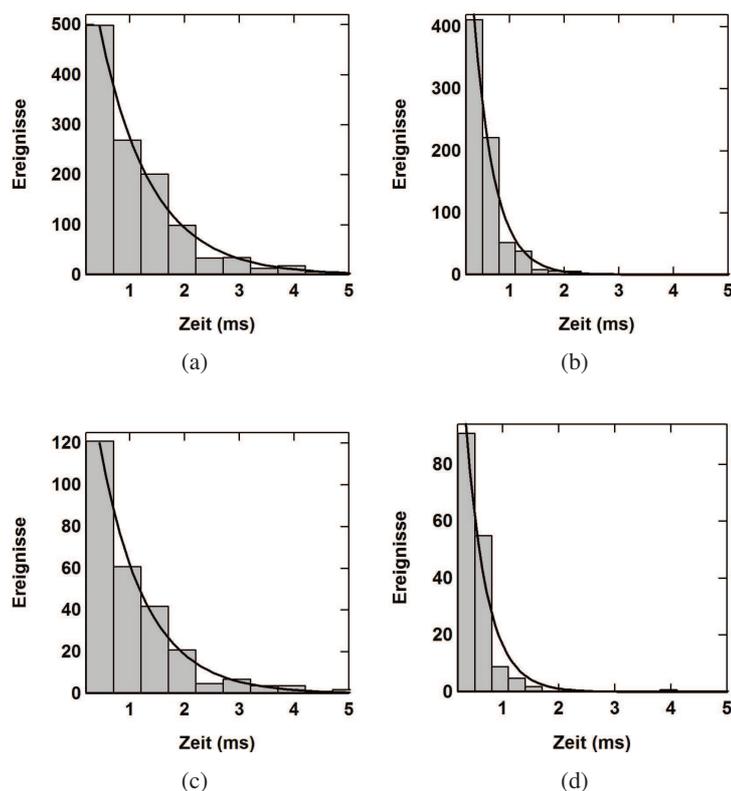
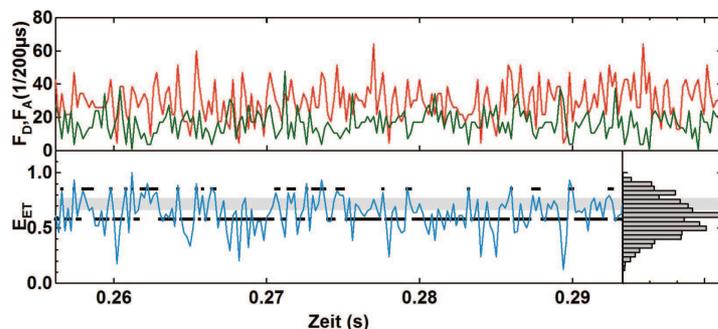


Abbildung 8.22: Histogramme der Aufenthaltsdauer im geöffneten (a) und geschlossenen (b) Zustand von 20 Zeitspuren immobilisierter Apoenzyme. Die exponentiellen Anpassungsfunktionen enthalten die apparenten Raten von $k_{12}^* = (1.070 \pm 30) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21}^* = (2.650 \pm 90) \text{ s}^{-1}$. Die Anregung erfolgte mit $10 \mu\text{W}$ bei 488 nm . Erfolgt die Anregung bei $30 \mu\text{W}$, enthalten die zugehörigen Histogramme des geöffneten (c) und geschlossenen (d) Zustands von sechs Zeitspuren ebenfalls vergleichbare Raten mit $k_{12}^* = (1.100 \pm 30) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21}^* = (2.650 \pm 140) \text{ s}^{-1}$.

Um die Methode nun hinsichtlich des Einflusses kurzer Dunkelzustände zu untersuchen, wurden die Messungen bei dreifacher Anregungsleistung wiederholt und die gleiche Zustandsanalyse wie bei $10 \mu\text{W}$ durchgeführt (Abb. 8.22(c) und (d)). Die Zeitspuren sind kürzer und pro Zeitspur traten daher weniger Wechsel zwischen den Konformationszuständen und häufiger Übergänge in den Dunkelzustand auf. Trotzdem sind nach erfolgter Zustandsanalyse die apparenten Raten mit $k_{12}^* = 1.100 \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21}^* = 2.650 \text{ s}^{-1}$ mit den Zeitspuren geringerer Anregungsleistung identisch. Dies zeigt eine erfolgreiche Eliminierung der Einflüsse kurzer Ionisationszustände.

Um von den apparenten Raten auf die wahren Raten der Konformationsänderung zu schließen, wur-

den mittels MC-Simulationen Zeitspuren mit vergleichbaren apparenten Raten erzeugt (siehe Abschnitt 6.12). Abb. 8.23(a) zeigt einen Ausschnitt einer solchen Simulation dargestellt, und in Abb. 8.23(b) und (c) werden die zugehörigen Histogramme dargestellt. Die Simulation enthielt eine Triplettkinetik mit $\tau_T = 4 \mu\text{s}^{-1}$ und einem Tripletanteil von 40%.



(a) Simulierte Zeitspur

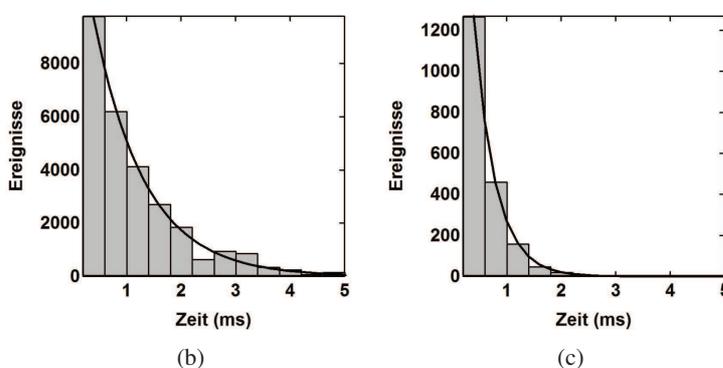


Abbildung 8.23: Ausschnitt einer Simulation der Zeitspur der Donor- und Akzeptorfluoreszenz (grün, rot) eines Apo-Moleküls mit den Raten $k_{12} = 2.200 \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21} = 6.200 \text{ s}^{-1}$ bei einer zeitlichen Auflösung von 0,2 ms (a). Das E_{ET} -Histogramm ist grau dargestellt. Der Verlauf der Energietransfereffizienz (blau) zeigt Übergänge zwischen den zwei Zuständen (schwarz). Die Länge der horizontalen schwarzen Balken gibt die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Zuständen an. Die graue Zone markiert den unbestimmten Bereich, der aufgrund der Breite der Verteilungen entsteht. Die Histogramme der Aufenthaltsdauer im geöffneten (b) und geschlossenen (c) Zustand enthalten die exponentiellen apparenten Raten $k_{12}^* = (1.070 \pm 20) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21}^* = (2.650 \pm 10) \text{ s}^{-1}$.

Mit Hilfe der Simulation kann auf die wahren Raten der Konformationsänderung mit $k_{12} = (2.200 \pm 200) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21} = (6.200 \pm 500) \text{ s}^{-1}$ geschlossen werden. Aus ihnen folgt eine Gesamtrate von $k_{konf} = (8.400 \pm 700) \text{ s}^{-1}$ und eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Apoenzyms im offenen Zustand von 74%. Dieses Ergebnis stimmt mit den Raten und Populationen der diffundierenden Moleküle recht gut überein (Abschnitt 8.2.3).

8.3.4.2 Korrelationsanalyse

Aufgrund der Tatsache, dass aus den relativen Abstandsänderungen ein antikorreliertes Verhalten der Donor- und Akzeptorfluoreszenz folgt, enthalten die Korrelationsfunktionen wichtige Informationen bezüglich der Konformationsdynamik. Auf diese Weise können Populationen und Raten der Konformationsänderungen bestimmt werden (siehe Kapitel 5.3.3). Der robusteste Parameter ist dabei die charakteristische Zeitkonstante des antikorrelierten oder korrelierten Terms. Sie entspricht der Gesamtrate der

Kinetik. Die Amplituden der Korrelationsfunktionen enthalten die Populationen (siehe dazu auch Abschnitt 5.3.3), können aber durch Einflüsse des Messsystems stärker verfälscht werden.

Aus allen Messungen an immobilisierten Apo-Molekülen wurden die längsten sechs Zeitspuren ausgewählt und der Mittelwert der Korrelationsfunktionen berechnet. In Abb. 8.24 sind die normierten Korrelationsfunktionen der experimentellen und simulierten Daten dargestellt.

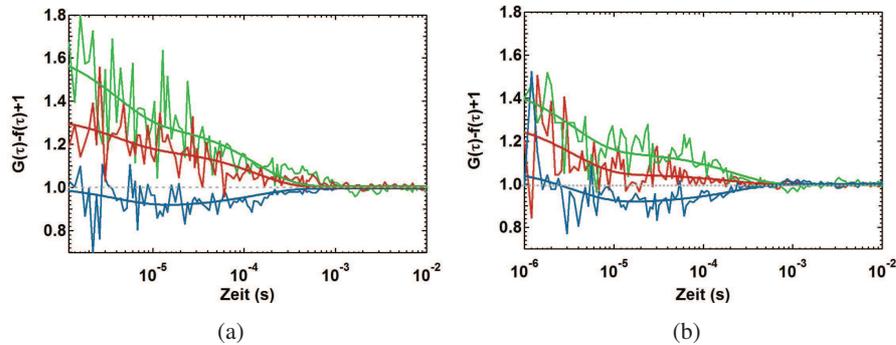


Abbildung 8.24: Mittelwerte der normierten Autokorrelation des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) zusammen mit der Kreuzkorrelation (blau) von experimentellen Daten (a) und einer mit gleicher Anzahl von Photonen simulierten Zeitspur (b) des immobilisierten Apoenzym. Zur Simulation der Triplettkinetik wurden ein Tripletanteil von $T = 0,4$ und eine Tripletzeit von $\tau_T = 4 \mu\text{s}$ verwendet. Eine globale Anpassung bestimmt die Zeitkonstante der Konformationsänderungen mit $k_{konf}^{exp} = (7.500 \pm 1.200) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{konf}^{sim} = (7.100 \pm 1.000) \text{ s}^{-1}$.

Aus den experimentellen Daten kann mit Hilfe von Anpassungsfunktionen entsprechend Gleichung 8.7 die Gesamtrate $k_{konf} = (7.500 \pm 1.200) \text{ s}^{-1}$ als globaler Parameter aller drei Korrelationsfunktionen bestimmt werden. Das Ergebnis ist mit der Gesamtrate der Zustandsanalyse von rund 8.400 s^{-1} vergleichbar (siehe Tab. 8.3).

Werden die simulierten Daten der Raten $k_{12} = 2.200 \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21} = 6.200 \text{ s}^{-1}$ korreliert (Abb. 8.24(b)), erhält man eine Gesamtrate von $k_{konf} = (7.100 \pm 1.000) \text{ s}^{-1}$.

Neben der Rate stimmt auch die Amplitude des antikorrelierten Anteils der experimentellen und simulierten Kurven überein. Die Amplituden der Autokorrelationsfunktionen sind jedoch bei den simulierten Daten deutlich kleiner.

Das kann auf einen weiteren korrelativen Prozess zurückgeführt werden, der sich vorwiegend auf die Autokorrelationen auswirkt. In Kapitel 7.6.2 wurde beschrieben, dass für Farbstoffe am Apoenzym zusätzlich Dunkelzustände auftreten können. Diese sind, wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, entweder korreliert - falls der Donor in den Dunkelzustand geht - oder haben keine Auswirkung auf die Kreuzkorrelation, weil sich die Donorfluoreszenz während der Dunkelzustände des Akzeptors nicht ändert. Aufgrund des Energietransfers ist die Wahrscheinlichkeit für Dunkelzustände des Donors jedoch geringer, so dass vorwiegend Fluktuationen erwartet werden, die ohne Auswirkung auf die Kreuzkorrelation bleiben.

Für die Autokorrelationen gilt jedoch, dass die Übergänge in kurzzeitige Dunkelzustände aufgrund der Amplitude der Intensitätsänderung einen viel größeren Einfluss als die Konformationsänderung hat. Dies schlägt sich in den Amplituden der Autokorrelationen von Abb. 8.24 nieder. Die experimentellen Amplituden sind im Vergleich zu den simulierten größer, während die Kreuzkorrelationsfunktionen gleichen.

Sie wird also auch von Übergängen in den Dunkelzustand beeinflusst. In der Zustandsanalyse konnten diese erfolgreich ausgeschlossen werden (siehe vorheriger Abschnitt).

Der korrelative Term der Kreuzkorrelation im μs -Bereich zeigt einen weiteren wichtigen Aspekt. Die positive Amplitude im Zeitbereich der Tripletzustände bedeutet, dass sich die Fluoreszenz von Donor und der Akzeptor gleichgerichtet ändert. Dies ist auf den Einfluss der Triplettdynamik des Akzeptors auf die Fluoreszenz des Donors zurückzuführen und ein weiterer Hinweis für eine effiziente Singulett-Triplett-Annihilation (siehe dazu Abschnitt 7.4.5).

8.3.5 Ergebnis für die Inhibitor-gebundene Adk

Für das Enzym mit gebundenem Inhibitor AP₅A wurden vergleichbare Messungen durchgeführt. NMR-Messungen ergaben Austauschraten des mutierten und markierten Enzyms von $k_{konf} = (600 \pm 300) \text{ s}^{-1}$ sowie einer Population des geöffneten Zustands von 5-15% [67].

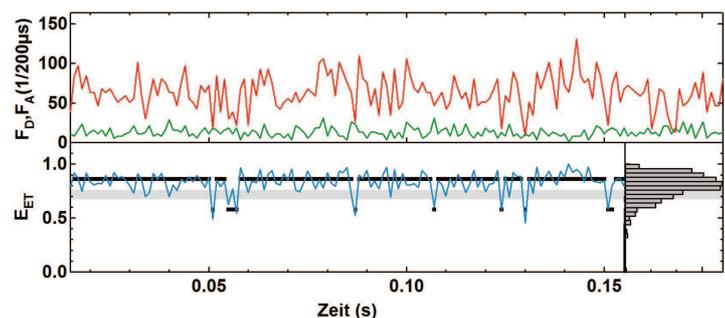
Die Raten sind sehr viel langsamer als beim Apoenzym, so dass längere Zeitspuren benötigt werden. Erschwert wird dies jedoch durch den hohen Energietransfer und das damit verbundene schnelle Bleichen des Akzeptors. Als Anregungsleistung wurden daher 2 μW gewählt. Die höchstmögliche zeitliche Auflösung bei dieser Anregungsleistung betrug 1 ms.

8.3.5.1 Zustandsanalyse

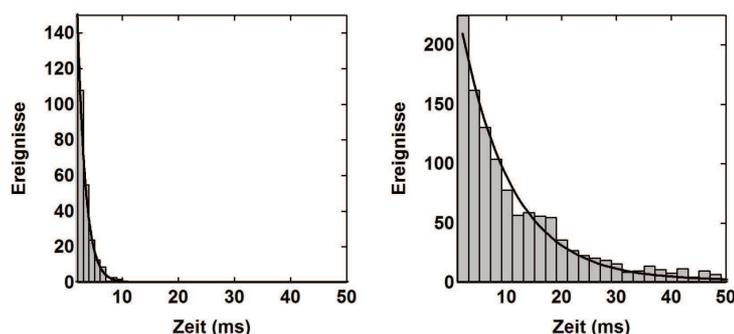
Entsprechend der relativ langen Aufenthaltsdauer in der geschlossenen Konformation kann für diesen Zustand der Wert $E_{ET}^{(2)} = 0,86$ verwendet werden. Die kurzen Übergänge im offenen Zustand werden auch bei einer Auflösung von 1 ms nur leicht gemittelt. Dies bewirkt eine Verschiebung des Häufungspunktes für $E_{ET}^{(1)}$ um +0,01 gegenüber dem aus der Kristallstruktur erwarteten Wert von 0,57.

Trotz der fünffach geringeren Anregung waren die Zeitspuren im Vergleich zum Apoenzym im Mittel nicht länger. Aufgrund des hohen Energietransfers zum Akzeptor bleichte dieser sehr schnell, so dass es sehr viele Zeitspuren ohne einen einzigen Übergang in den offenen Zustand gab. Die mittlere Länge der ausgewerteten Zeitspuren betrug 0,3 s. In Abb. 8.25 ist eine Zeitspur exemplarisch dargestellt. Aufgrund der langsamen Kinetik stimmt trotz der Zeitauflösung von 1 ms das Histogramm der Energietransfereffizienzen sehr gut mit dem des Burstexperimentes überein.

Als Ergebnis der durchgeführten Zustandsanalyse an 26 Zeitspuren einzelner Inhibitor-gebundener Moleküle werden apparente Raten von $k_{12}^* = (705 \pm 50) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21}^* = (110 \pm 5) \text{ s}^{-1}$ erhalten (siehe Abb. 8.25). Ein analog zum Apoenzym durchgeführter Vergleich mit MC-Simulationen ergibt die Raten $k_{12} = (350 \pm 50) \text{ s}^{-1}$ für das Schließen und $k_{21} = (40 \pm 10) \text{ s}^{-1}$ für das Öffnen. Das entspricht einer Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 90% im vollständig geschlossenen Zustand. Dieser Wert ist mit dem Ergebnis der NMR-Messungen sowie der Burstexperimente vergleichbar.



(a) Zeitspur



(b)

(c)

Abbildung 8.25: Ausschnitt einer Zeitspur der Donor- und Akzeptorfluoreszenz (grün, rot) eines Moleküls mit gebundenem Inhibitor bei einer zeitlichen Auflösung von 1 ms (a). Das E_{ET} -Histogramm (grau) wurde aus 25 Zeitspuren gebildet. Der Verlauf der Energietransfereffizienz (blau) zeigt Übergänge zwischen den zwei Zuständen (schwarz). Die Länge der horizontalen schwarzen Balken gibt die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Zuständen an. Die graue Zone markiert den unbestimmten Bereich, der aufgrund der Breite der Verteilungen entsteht. Die exponentiellen Anpassungsfunktionen der Histogramme der Aufenthaltsdauer im geöffneten (b) und geschlossenen (c) Zustand von 25 Zeitspuren enthalten die apparenten Raten von $k_{12}^* = (705 \pm 50) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21}^* = (110 \pm 5) \text{ s}^{-1}$. Die Anregung erfolgte mit $2 \mu\text{W}$ bei 488 nm.

8.3.5.2 Korrelationsanalyse

Werden die Zeitspuren des Inhibitor-gebundenen Moleküls korreliert, sind diese aufgrund der geringen Photonenrate des Donors, besonders im Bereich bis zu 1 ms, sehr stark verrauscht. Die Kurven in Abb. 8.26 (a) entsprechen dem Mittelwert aus 10 Zeitspuren.

Der antikorrelierte Term der Kreuzkorrelation ($k \approx 800 \text{ s}^{-1}$) liegt in der Größenordnung des zu erwartenden Wertes für die Gesamtrate der Konformationsänderung. Aber durch das starke Rauschen und durch die Überlagerung mit der korrelierten Ionisationskinetik der Farbstoffe ist eine genaue Bestimmung nicht möglich. Die Amplitude des antikorrelierten Terms beträgt ca. 0,03 und stimmt mit dem Wert aus der Simulation überein (siehe Abb. 8.26 (b)).

Im Bereich von $k \approx 3.000 \text{ s}^{-1}$ ist in den Autokorrelationen des Donors und des Akzeptors ein deutlich schnellerer Term, der Ionisationsereignissen zuzuschreiben ist, ersichtlich (siehe oben). Er überwiegt aufgrund der Größe der Fluktuationen gegenüber den Konformationsänderungen.

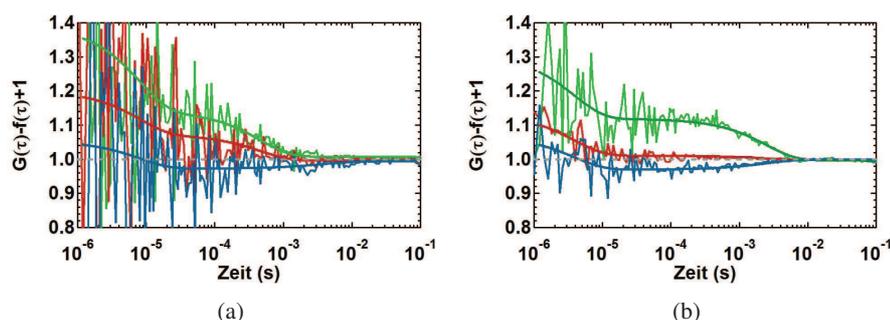


Abbildung 8.26: Normierte Autokorrelation des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) und die Kreuzkorrelation beider Kanäle (blau) immobilisierter Enzyme mit gebundenem Inhibitor (a) im Vergleich zu den simulierten Kurven (b). Die Simulation erfolgte für Konformationsänderungen der Raten $k_{12} = 350 \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = 40 \text{ s}^{-1}$ und einer Triplettkinetik mit $T = 0,4$ und $\tau_T = 4 \text{ }\mu\text{s}$.

Zusammenfassung:

Fluoreszenzzeitpuren immobilisierter Moleküle zeigen für das Apoenzym und das Inhibitor-gebundene Enzym eine zu den Burstexperimenten vergleichbare Kinetik. Die geringe Lebensdauer der Farbstoffe und Übergänge in Dunkelzustände erschweren jedoch die Analyse.

Weiterhin wurde festgestellt, dass AlexaFluor 633 während seiner Dunkelzeiten ein Akzeptor bleibt. Zudem wurde die Singulett-Triplett-Annihilation während der Tripletzeit des Akzeptors bestätigt. Beides ist für die Verwendung von integralen Energietransfereffizienzen (z.B. bei Burstexperimenten) als Parameter für den relativen Abstand der Fluorophore von zentraler Bedeutung.

8.4 Adk unter Stoffumsatz

Im letzten Abschnitt soll nun die Adenylatkinase während der Katalyse untersucht werden. In Ensemblemessungen von NMR-Experimenten wurden die Raten der Konformationsänderung mit $k_{12} = (1.570 \pm 100) \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = (44 \pm 20) \text{ s}^{-1}$ bestimmt [169]. Daraus würde eine Population des geschlossenen Zustands von 2% folgen. Diese Raten unterschieden sich nur geringfügig von den nach Zugabe von Mg·AMPPNP und AMP gewonnenen Raten mit $k_{12} = (1.370 \pm 100) \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = (40 \pm 20) \text{ s}^{-1}$ [169]. Daher wurde eine starke Ähnlichkeit zu diesen Ergebnissen erwartet. Alle Ergebnisse der Konformationskinetik werden in Tab. 8.4 zum Vergleich gegenübergestellt.

8.4.1 Burstexperimente

Das Histogramm der Energietransfereffizienzen unterscheidet sich nach Zugabe von 2 mM Mg·ADP (Abb. 8.27(a)) stark von dem Ergebnis, wenn AMPPNP und AMP binden (vgl. Abb. 8.13). Bei Verwendung einer höheren Konzentration von ADP (z.B. 10 mM Mg·ADP) war aufgrund der zahlreichen photoinaktiven Zustände eine Auswertung der Burstexperimente nicht möglich. Es legt aber auch die Vermutung nahe, dass die Dunkelzustände vorwiegend durch Stöße mit frei diffundierenden Molekülen als durch das gebundene Substrat verursacht werden.

Abb. 8.27(a) zeigt eine Verteilung mit einem Maximum bei 0,72. Dieser Wert würde einem halbgeschlossenen Zustand des ATP-Lids entsprechen. Für die dargestellten Gaußverteilungen der Subpopulationen wurden die Parameter für die Lage des Maximums und die Breite verwendet, die auch schon für die anderen Histogramme benutzt wurden. Sie sollen nur die Relationen, nicht aber exakte Populationen darstellen. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass in diesem Fall die Öffnungs- und Schließungsraten sowie zusätzliche unkorrelierte Bewegungen zu einer Mittelung der Energietransfereffizienzen während des Aufenthalts im Fokus führen und eine Analyse des E_{ET} -Histogramms unmöglich machen.

Verwendet man trotzdem das Zweizustandmodell mit $E_{ET}^{(1)} = 0,3$ und $E_{ET}^{(2)} = 0,86$, erhält man aus den Korrelationsfunktionen der Zeitspuren die Raten $k_{12} = (1.900 \pm 200) \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = (210 \pm 240) \text{ s}^{-1}$. Im Vergleich zu den den Ergebnissen des Enzyms mit gebundenen Nukleotiden AMP und AMPPNP sowie zu Ensemblemessungen der NMR-Spektroskopie unterscheidet sich besonders die Rate des Öffnens (siehe Tabelle 8.4).

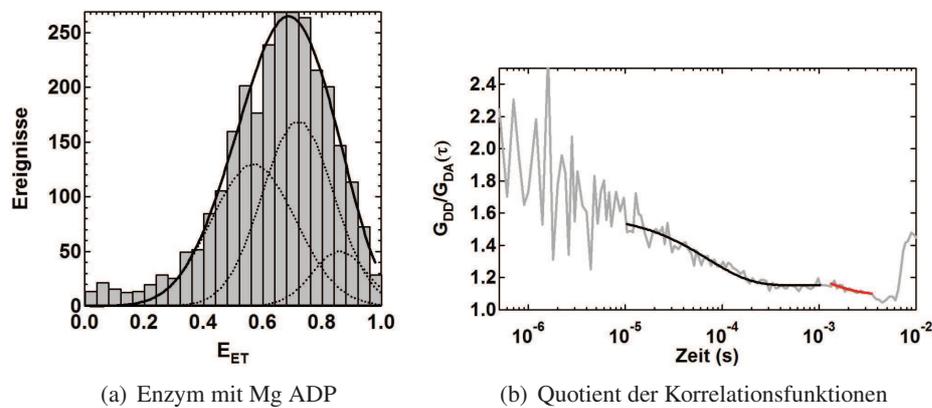


Abbildung 8.27: Histogramme der Energietransfereffizienzen unter Zusatz von 1 mM Mg·ADP zusammen mit der Anpassungsfunktion als Einhüllende dreier Gaußverteilungen (schwarz) (a). Der Quotient der Autokorrelation des Donors $G_{DD}(\tau)$ mit der Kreuzkorrelation $G_{DA}(\tau)$ (grau) des Enzyms unter Stoffumsatz (b) und die Anpassungsfunktionen (rot).

Die Diskrepanz zu den NMR-Daten von [169] ist darin begründet, dass Einzelmolekülexperimente nicht im Gleichgewicht der Substrate stattfinden. Bei einer Molekülkonzentration von 100 pM werden bei einer ausreichend hohen Konzentration von ADP und einer zeitlich konstanten Rate k_{cat} von 30 s^{-1} in einer Stunde ca. $10 \text{ }\mu\text{M}$ ATP und AMP gebildet. Diese Konzentration beträgt jedoch nur ein Hundertstel der verwendeten Konzentration von ADP, so dass während der gesamten Zeit der Einzelmolekülmessungen ein Ungleichgewicht in der Lösung bestehen bleibt.

Ergebnisse von NMR-Titrationsexperimenten zeigen bei hohen ADP-Konzentrationen jedoch eine Öffnungsrate in Übereinstimmung mit den Einzelmolekül-Burstexperimenten. Sie beträgt nun ungefähr das Dreifache der Rate unter Gleichgewichtsbedingungen [27].

Ist in diesem Fall die Aktivität so wie im Gleichgewicht mit der Rate des Öffnens [169] verknüpft, würde daraus eine erhöhte Aktivität und eine Verschiebung der Gleichgewichtskonstante der Reaktion in Richtung der Bildung von ATP und AMP abzuleiten sein. Doch die über alle Enzyme ge-

mittelte chemische Verschiebung² erreichte bei den NMR-Titrationsexperimenten nur die Hälfte des Wertes, der nach Zugabe von ATP und AMP gefunden wurde. Daraus folgt, dass bei hohen ADP-Konzentrationen die Population des geschlossenen Zustands verringert ist. Dies ist ebenso in Übereinstimmung mit den Einzelmolekül-Burstexperimenten und steht im Gegensatz zu einer erhöhten Aktivität. Das E_{ET} -Histogramm verdeutlicht dabei, dass es durch eine erhöhte Population des halbgeschlossenen Zustands hervorgerufen wird.

Die Ursache für die halbgeschlossenen Zustände ist nicht geklärt. Sie kann jedoch in den unterschiedlichen Öffnungsraten der Lids beruhen. Aus NMR-Messungen ist bekannt, dass das AMP-Lid im Vergleich zum ATP-Lid schneller öffnet [27]. Im Falle von einer hohen ADP-Konzentration kann nun die Situation eintreten, dass nach der erfolgten Katalyse am AMP-Lid bereits ein neues ADP-Molekül bindet, bevor sich das ATP-Molekül am ATP-Lid lösen konnte. Die Adk trägt nun am AMP-Molekül ein ADP-Molekül und am ATP-Lid ein ATP-Molekül. In diesem Zustand kann sich das Molekül nicht vollständig schließen, weil die beiden Nukleotide zusammen fünf Phosphate besitzen. Diese Situation kann zu einer vermehrten Population der halbgeschlossenen Konformation und zu einer Erniedrigung der Aktivität führen. Aufgrund des fehlenden Stoffumsatzes und der spezifischen Bindung ist dieser Zustand bei hohen Konzentrationen von AMP und AMPPNP nicht vorhanden.

8.4.2 Immobilisierte Moleküle

Für Experimente an immobilisierten Molekülen waren hohe Konzentrationen des Substrats kein Problem, da die Beobachtungszeit im Vergleich zu den Burstexperimenten nicht nur 100 μ s betrug.

Die Zeitspuren an immobilisierten Molekülen unter FRET zeigen nach Zugabe von 10 mM Mg-ADP ebenso wie die Messungen an einzelmarkierten Molekülen ein stark blinkendes Verhalten des Donors und des Akzeptors. Die Dunkelzeiten betragen hierbei meist 1-10 Millisekunden, wodurch eine Zustandsanalyse sehr erschwert wurde (siehe Abb. 8.28).

Als Anregungsleistung wurde 5 μ W gewählt, weil aufgrund der im Vergleich zum Inhibitor-gebundenen Molekül schnelleren Schließungsrate eine Auflösung von 500 μ s benötigt wurde.

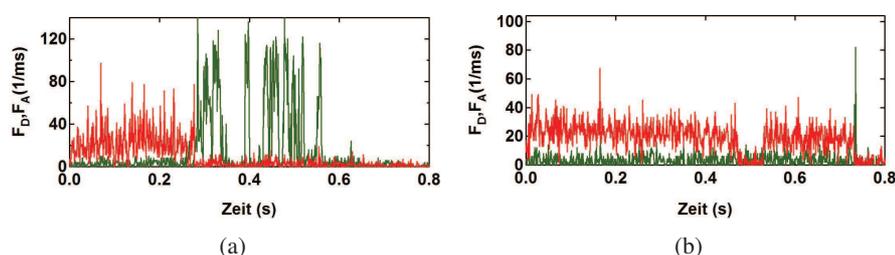


Abbildung 8.28: Fluoreszenzzeitstrahlen des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) immobilisierter Enzyme nach Zugabe von 10 mM Mg-ADP mit vielen (a) und wenigen (b) Übergängen in den Dunkelzustand. Die Anregung erfolgte mit 5 μ W bei 488 nm.

Zur Untersuchung der Kinetik der nichtfluoreszenten Zeiten wurde aus 33 Zeitspuren die Summenfluoreszenz beider Kanäle hinsichtlich des Blinkens untersucht (vgl. Abschnitt 7.5). Werden die Histogramme der Zeiten entsprechend einem Potenzgesetz gefittet, betragen die Exponenten $m_f = 1,5 \pm 0,1$ und

²Die chemische Verschiebung ist bei NMR-Experimenten ein Maß für die Amplitude der Konformationsänderung.

$m_d = 1,9 \pm 0,1$ (siehe Abb. 8.29). Vergleicht man diese Werte mit Ergebnissen der Messungen der einzelmarkierten Adk (siehe Abschnitt 7.6), so ist der Exponent m_f vergleichbar mit den Ergebnissen des Donors von $1,4 \pm 0,1$. Der Exponent der nichtfluoreszenten Zeiten m_d , der hauptsächlich von der Umgebung bestimmt wird, stimmt mit den Einzelmessungen beider Farbstoffe überein.

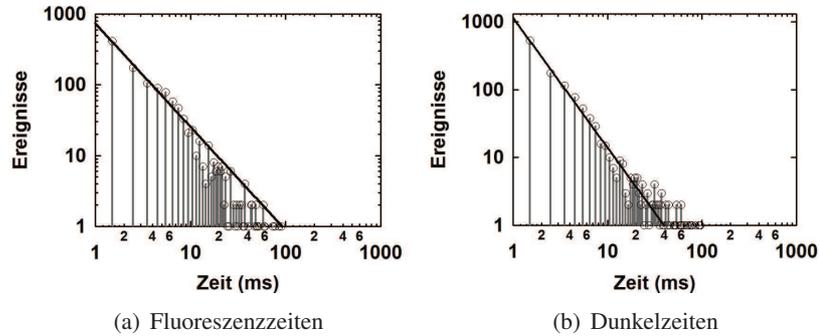


Abbildung 8.29: Die Histogramme der Fluoreszenzzeiten (a) und Dunkelzeiten (b) von 33 Zeitspuren. Die Anpassungsfunktionen ergeben die Exponenten $m_f = 1,5 \pm 0,1$ und $m_d = 1,9 \pm 0,1$.

8.4.2.1 Zeitspuren mit hohem Energietransfer

Für 15 ausgewählten Zeitspuren, die nur wenige Ionisationen und einen hohen Energietransfer aufwiesen wurde eine Zustandsanalyse durchgeführt. In Abb. 8.30 ist eine Zeitspur und das Ergebnis beispielhaft dargestellt.

Deutlich sind antikorrelierte und unkorrelierte Fluktuationen zusammen mit Dunkelzeiten von mehreren Millisekunden zu erkennen. Die Histogramme der Zustandsanalyse ergeben apparente Raten von $k_{12}^* = (1.550 \pm 20) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21}^* = (240 \pm 60) \text{ s}^{-1}$ (siehe Abb. 8.30). Die Schließungsrate kann dabei durch zusätzliche Dunkelzeiten, die mit Hilfe des Summenkriteriums nicht ausgeschlossen werden konnten, verlangsamt sein (siehe Abb. 8.30, bei $t = 90 \text{ ms}$).

Werden Zeitspuren simuliert, deren apparente Raten mit den apparenten Raten des Experiments übereinstimmen, so kommen als mögliche reale Raten $k_{12} = (1.000 \pm 500) \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = (40 \pm 10) \text{ s}^{-1}$ in Betracht. Der große Fehler der schnellen Rate entsteht aufgrund des großen Verhältnisses der Raten zueinander. Es liegt klar zwischen 20: 1 und 30: 1 und ein Verhältnis von 10:1, wie es beim Inhibitor-gebundenen Enzym auftritt, kann ausgeschlossen werden.

Die Öffnungsrate ist im Vergleich zu den Burstexperimenten langsamer und vergleichbar mit den Ergebnissen der NMR-Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen (siehe Tab. 8.4). Dies zeigt, dass in Oberflächennähe des Deckglases der Austausch der Substrate verlangsamt ist und ein lokales Gleichgewicht existiert. Werden nun die Zeitspuren mit hohem Energietransfer selektiert, erhält man die Raten für das Gleichgewicht.

Zur Kontrolle des Unterschiedes zum Inhibitor-gebundenen Enzym ist eine Korrelationsanalyse unerlässlich, da diese eine verlässliche Methode zur Bestimmung der Gesamtrate ist.

Die in Abb. 8.31(a) dargestellten Korrelationsfunktionen entsprechen gemittelten und normierten Kurven aus zehn Zeitspuren. Die Kreuzkorrelation der Akzeptor- und Donorfluoreszenz zeigt jedoch keine Antikorrelation. Werden Daten mit den Raten $k_{12} = 1.000 \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = 30 \text{ s}^{-1}$ oder $k_{12} = 1.550 \text{ s}^{-1}$ und

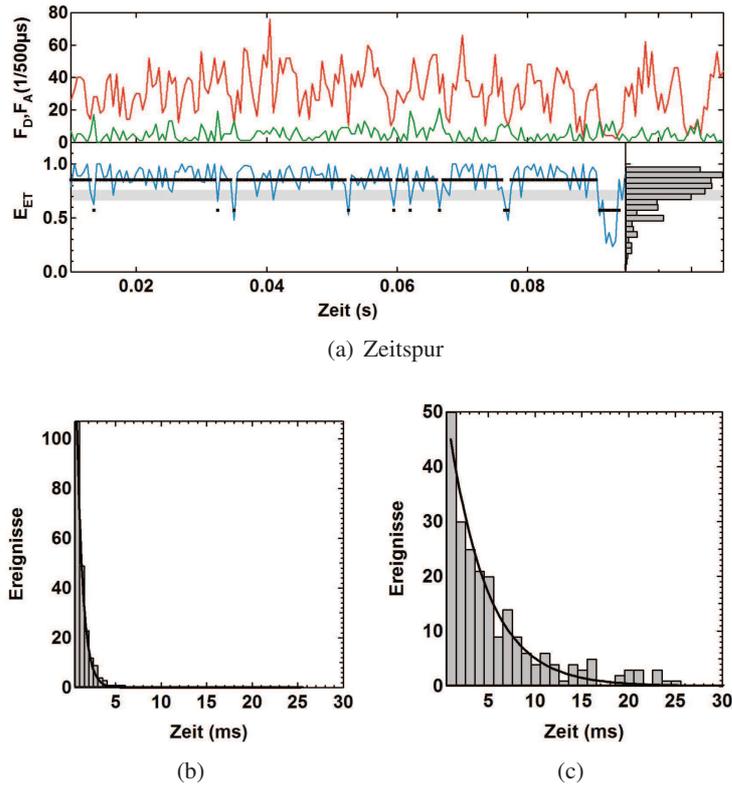


Abbildung 8.30: Ausschnitt einer Zeitspur der Donor- und Akzeptorfluoreszenz (grün, rot) eines Adk-Moleküls nach Zugabe von 10 mM Mg-ADP (a). Das E_{ET} -Histogramm (grau) wurde aus 15 Zeitspuren gebildet. Der Verlauf der Energietransfereffizienz (blau) zeigt Übergänge zwischen den zwei Zuständen (schwarz). Die Länge der horizontalen schwarzen Balken gibt die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Zuständen an. Die graue Zone markiert den unbestimmten Bereich, der aufgrund der Breite der Verteilungen entsteht. Die exponentiellen Anpassungsfunktionen der Histogramme der Aufenthaltsdauer im geöffneten (b) und geschlossenen (c) Zustand von 15 Zeitspuren enthalten die apparenten Raten von $k_{12}^* = (1.550 \pm 20) \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{21}^* = (240 \pm 60) \text{ s}^{-1}$. Die Anregung erfolgte mit $5 \mu\text{W}$ bei 488 nm.

$k_{21} = 30 \text{ s}^{-1}$ simuliert, beträgt die Amplitude der Antikorrelation nur jeweils 0,01 (vgl. Abb. 8.31(b)) und ist im Vergleich zu 0,03 des Inhibitor-gebundenen-Moleküls kleiner.

Daher ist das Verschwinden des antikorrelierten Terms ein Hinweis auf ein höheres Verhältnis der Raten und eine Verringerung der Population des offenen Zustands im Vergleich zum Inhibitor-gebundenen Mo-

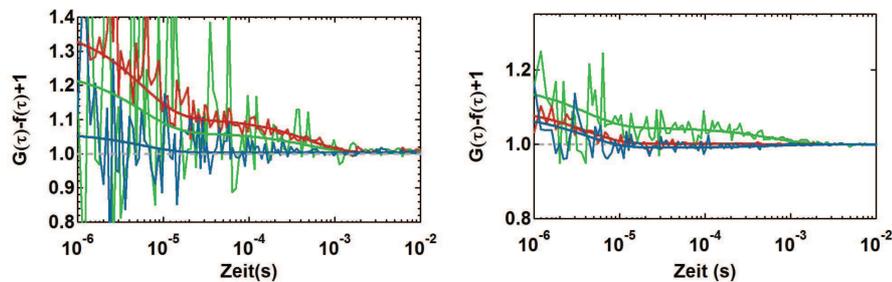


Abbildung 8.31: Normierte Autokorrelation des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) und die Kreuzkorrelation beider Kanäle (blau) immobilisierter Enzyme unter Stoffumsatz (a) im Vergleich mit simulierten Daten (b). Die Simulation erfolgte für Konformationsänderungen der Raten $k_{12} = 1.550 \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = 30 \text{ s}^{-1}$ sowie der Triplettkinetik der experimentellen Zeitspur mit $T = 0,4$ und $\tau_T = 5 \mu\text{s}$.

lekül. Der erhöhte Korrelationsanteil in der Autokorrelation der Akzeptorfluoreszenz mit $k \approx 2000 \text{ s}^{-1}$ entsteht aufgrund der Ionisationen (vgl. Abb. 8.31(b)). Dieser ist beim Akzeptor aufgrund der größeren Photonenrate größer.

8.4.2.2 Zeitspuren mit niedrigem Energietransfer

Neben den Zeitspuren mit hohem Energietransfer traten erwarteterweise auch Zeitspuren auf, die eine mittlere Energietransfereffizienz von 0,7 aufwiesen. In Abb. 8.32 sind zwei Zeitspuren exemplarisch dargestellt. In der oberen Zeitspur befindet sich das Molekül bis zu 40 ms vorwiegend in der offenen Konformation und wechselt dann in einen Zustand, in dem es jeweils nur kurz die geschlossenen Konformation übergeht. Dies bedeutet, dass das Molekül eine größere Öffnungsrate als die zuvor untersuchten Zeitspuren besitzt.

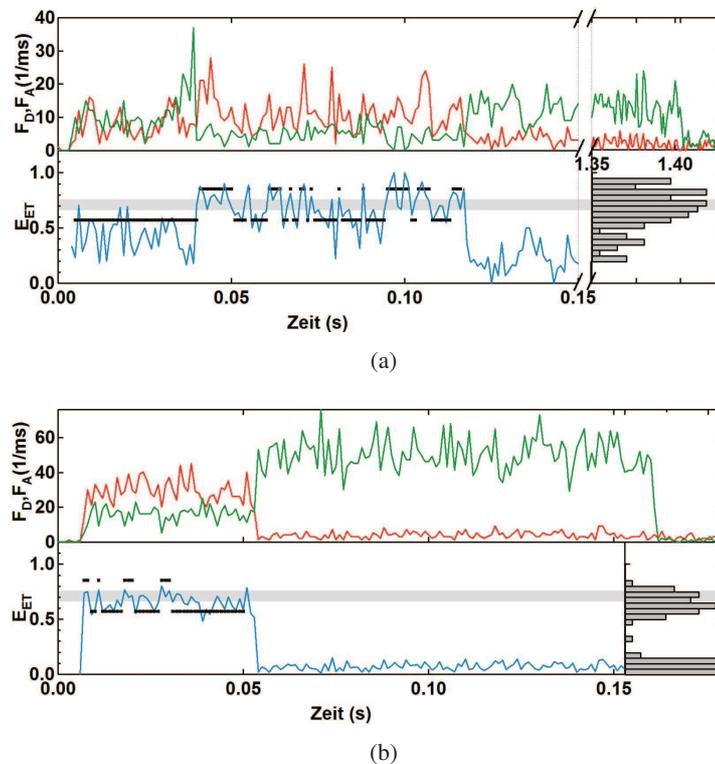


Abbildung 8.32: Ausschnitte von Zeitspuren der Donor- und Akzeptorfluoreszenz (grün, rot) eines Adk-Moleküls nach Zugabe von 10 mM Mg-ADP. Der Verlauf der Energietransfereffizienz (blau) zeigt Übergänge zwischen den zwei Zuständen (schwarz). Die Länge der horizontalen schwarzen Balken gibt die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Zuständen an. Die graue Zone markiert den unbestimmten Bereich, der aufgrund der Breite der Verteilungen entsteht. Die E_{ET} -Histogramm (grau) entsprechen der Verteilung des Energietransfereffizienzen der jeweiligen Zeitspur.

Eine Zustandsanalyse dieser Zeitspuren versagte, weil das Zweizustandmodell nicht mehr anwendbar war. Wurde sie dennoch durchgeführt, enthielt das Ergebnis von 15 Zeitspuren die apparenten Raten $k_{12} = (700 \pm 100) \text{ s}^{-1}$ und $k_{21} = (1.000 \pm 200) \text{ s}^{-1}$, d.h. die Öffnungsrate war größer als die Schließungsrate. Dies liegt an den Exkursionen der Moleküle vom offenen in den halbgeschlossenen Zustand und zurück. Dies wird an der unteren Zeitspur in Abb. 8.32 sehr gut deutlich.

Die Energietransfereffizienzen dieser Enzyme entsprechen dem Ergebnis der Burstexperimente und wei-

sen einen Häufungspunkt um 0,7 auf. Aufgrund der unkorrelierten Bewegung des ATP-Lids besteht eventuell eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass das AMP-Lid unabhängig vom ATP-Lid die Stellung der geschlossenen Konformation einnimmt. In dieser halbgeschlossenen Konformation besitzen die Farbstoffe einen relativen Abstand von 36 Å und der Energietransfer beträgt 0,86 (vgl. Tab. 8.1). Dieser Zustand kann von der vollständig geschlossenen Konformation nicht unterschieden werden. Um die Funktionsweise des Moleküls zu verstehen, sollten die Kinetiken der einzelnen Lids untersucht werden. Dafür müssten für die Fluorophore andere Positionen im Enzym, beispielsweise der N-Terminus und jeweils ein Lid, gewählt werden.

Zusammenfassung:

Die Untersuchungen der enzymatischen Aktivität ergeben bei Sättigung der Bindungsstellen mit ADP eine Erhöhung der Öffnungsrate.

Dies ist weiterhin mit einer erhöhten Population des halbgeschlossenen Zustands verbunden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Öffnungsrate den Übergängen aus dem halbgeschlossenen Zustand entsprechen. Der vollständig geschlossene Zustand ist nur wenig populiert. Die genauen Pfade der Konformationsänderungen können über die relative Abstandsbestimmung zwischen den Lids aber nicht ausreichend erklärt werden und bedürfen anderer Positionen der Farbstoffe am Molekül.

Messungen an immobilisierten Molekülen konnten Populationen mit langsamen wie auch mit schnellen Öffnungsraten zeigen. Für die Moleküle, die langsame Öffnungsraten aufwiesen, konnten mit Hilfe des Zweizustandmodells die Raten der Konformationsänderung bestimmt werden. Sie entsprechen dem Ergebnis von Ensemblemessungen, wenn die Substrate im Gleichgewicht vorliegen.

Nukleotid	bevorzugte Bindungsstelle	E_{ET} -Histogramm		Korrelationsanalyse (Diff./Immob.)		Zustandsanalyse		NMR	
		$P_1(\%)$	$P_2(\%)$	k_{12}/s^{-1}	$k_{12}+k_{21}/s^{-1}$	k_{12}/s^{-1}	k_{21}/s^{-1}	k_{12}/s^{-1}	k_{21}/s^{-1}
\emptyset	—	64 ± 5	13 ± 5	2.200 ± 130	7.500 ± 1.200	2.200 ± 50	6.200 ± 200	2.000	7.000
AMP	AMP-Lid	78 ± 5	0 ± 5	2.100 ± 110	6.500 ± 260	—	—	—	—
Mg-AMPPNP	ATP-Lid	25 ± 5	7 ± 5	1.200 ± 1.000	20 ± 40	—	—	—	—
AMP, Mg-AMPPNP	beide Lids	31 ± 5	5 ± 5	630 ± 250	25 ± 30	—	1.200 ± 300	1.370 ± 100	40 ± 20
Mg-ADP	beide Lids	43 ± 5	46 ± 5	900 ± 50	210 ± 240	> 1.000	1.000 ± 500	1.570 ± 100	44 ± 20
Mg-AP ₅ A	beide Lids	5 ± 5	19 ± 5	190 ± 5	25 ± 2	≈ 500	350 ± 50	150 ± 10	30 ± 10

Tabelle 8.4: Übersichtstabelle der Mittelwerte der Populationen P_1, P_2, P_1^*, P_2^* und Raten k_{12}, k_{21} der Konformationsänderung der verwendeten Methoden im Vergleich (Mittelwerte \pm Standardabweichung). Die Nukleotide lagen in den Einzelmolekülexperimenten stets im Überschuss vor (1 mM - 10 mM). Die Ergebnisse im Reaktionsgleichgewicht der Katalyse sind kursiv dargestellt.

8.5 Zusammenfassung und Diskussion

Zu Beginn des Kapitels konnte die Aktivität der markierten Adenylatkinase in Lösung und immobilisiert auf dem Deckglas nachgewiesen werden. Es bildet die Voraussetzung für die Durchführung der Experimente zur Konformationskinetik und enzymatischen Aktivität.

Untersuchungen hinsichtlich der Konformationszustände ergaben in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Kristallographie zwei ausgezeichnete Zustände mit relativen Abständen der Fluorophore bei 36 Å und 46 Å.

Das Enzym befindet sich hierbei auch ohne gebundene Substrate zu 23% in dem geschlossenen Zustand (siehe Tab. 8.4). Dies steht in Übereinstimmung mit Ensemblemessungen von E. Haas, der die Population der geschlossenen Konformation mit 10 – 20% abschätzte [59]. Dieses Phänomen wurde auch schon bei einer anderen Transferase gefunden [117].

Zusätzlich zu den Hauptkonformationen kann sich das Apoenzym sowie das Enzym mit gebundenem Inhibitor AP₅A mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 10% in einem Zustand befinden, in dem nur das ATP-Lid geschlossen ist.

Dieser halbgeschlossene Zustand wird jedoch weniger stark populiert, wenn AMPPNP gebunden ist. Bindet nur AMP, tritt er überhaupt nicht auf. Es ist weiterhin erkennbar, dass in diesen Fällen beide Lids eine starke Korrelation aufweisen. Dabei begünstigt das Binden des Substrates am ATP-Lid das Schließen des AMP-Lids. Aussagen über halbgeschlossene Zustände des AMP-Lids können aufgrund des gleichen Abstands der Farbstoffe wie beim vollständig geschlossenen Enzym nicht getroffen werden.

Aufgrund der Korrelation der Lids wurde für die Beschreibung der Raten ein Zweizustandsmodell mit einer geschlossenen und eine geöffneten Konformation verwendet, dass die Energietransfereffizienzen $E_{ET}^{(1)} = 0,57$ bzw. $E_{ET}^{(2)} = 0,86$ sowie die entsprechenden Raten des Öffnens und Schließens charakterisiert.

Bei dem Vergleich der gewonnenen Raten (Tab. 8.4) wird deutlich, dass sich die Rate des Schließens stets zwischen 500 s^{-1} und 2.000 s^{-1} befindet und durch Binden der Substrate kaum beeinflusst wird. Die Öffnungsrate hingegen verlangsamt sich, wenn die Bindungsstelle des ATP-Lids besetzt ist um einen Faktor von 300.

Der Inhibitor AP₅A nimmt hierbei eine Sonderstellung ein, da durch ihn zusätzlich die Schließungsrate verlangsamt wird. Das kann durch seine Größe - er enthält fünf Phosphatreste - begründet sein. Außerdem ist es möglich, dass das Binden eines einzigen Molekül an beide Lids einige ungünstige Übergangskonformationen erfordert, die ein Dehnen bzw. Strecken von Molekülbindungen beinhalten. Die Rate des Öffnens entspricht der verlangsamt Rate mit $(25 \pm 2) \text{ s}^{-1}$.

Eine Rate von ca. 25 s^{-1} tritt auch auf, wenn das Substratanalogon Mg·AMPPNP und das Substrat AMP gebunden werden. Sie ist kleiner als die Öffnungsrate von $(44 \pm 20) \text{ s}^{-1}$, die unter Gleichgewichtsbedingungen der Substrate aus der NMR-Spektroskopie erhalten wurde [169]. Der geringere Wert kann auf eine inhibierende Wirkung von AMP zurückzuführen sein, die mit steigender AMP-Konzentration - bei *E. coli*-Adk ab 0,3 mM - zunimmt [57]. Doch auch bei sehr geringen Konzentrationen von AMP findet die Katalysereaktion verlangsamt statt [57], und so wurden ohne Zusatz von AMP ebenfalls langsame Raten von ca. 20 s^{-1} bestimmt. Die Ursache hierfür kann an der geringen Wahrscheinlichkeit liegen,

dass AMPPNP auch an das AMP-Lid bindet. Um diesen Effekt besser zu verstehen, sind jedoch weitere Experimente bei unterschiedlichen Konzentrationen von AMP erforderlich.

Dagegen ist nach dem Binden von ADP-Molekülen die aus Experimenten an diffundierenden Molekülen bestimmte Öffnungsrate mit Werten um 200 s^{-1} erhöht. Entsprechend der Ergebnisse im Gleichgewicht, in dem die Öffnungsrate die Aktivität bestimmt, sollte nun auch ein höherer Stoffumsatz zu verzeichnen sein. Doch dies ist nicht der Fall. Die experimentell bestimmte Aktivität der diffundierenden Moleküle nach Zugabe von ADP betrug nur $(7 \pm 2) \text{ s}^{-1}$ pro Adk-Molekül und ist geringer im Vergleich zu $(30 \pm 10) \text{ s}^{-1}$ im Gleichgewicht [169]. Das Histogramm der Energietransfereffizienzen zeigt weiterhin eine Notwendigkeit eines Dreizustandmodells. Die Enzyme befinden sich zumeist im offenen und im halbgeschlossenen Zustand. Das würde bedeuten, dass die schnellere Öffnungsrate nicht - wie im Zweizustandmodell angenommen - aus dem völlig geschlossenen, sondern nur aus dem halbgeschlossenen Zustand stattfindet. Die damit verbundene geringere Population des geschlossenen Zustands führt zu einer Erniedrigung der Aktivität.

Ergebnisse von NMR-Messungen unterstützen das Ergebnis der höheren Öffnungsraten sowie eine im Mittel geringere Amplitude der Konformationsänderung [27]. Trotzdem kann dieses Ergebnis ohne weitere Experimente, die die Bewegung der Lids spezifisch untersuchen, noch nicht vollständig verstanden werden.

Messungen an immobilisierten Molekülen zeigen nach Zugabe von ADP eine starke Heterogenität der Enzyme. Neben solchen Enzymen, die sich vorwiegend im offenen und halbgeschlossenen Zustand befinden, populierte die Mehrzahl der Enzyme vorwiegend den geschlossenen Zustand.

Eine Zustandsanalyse der letzteren ergibt für die Öffnungsrate einen Wert von $(40 \pm 10) \text{ s}^{-1}$. Diese ist mit der ebenfalls an immobilisierten Molekülen, jedoch bei höheren Oberflächendichten bestimmten mittleren Aktivität pro Molekül von $(42 \pm 10) \text{ s}^{-1}$, in Übereinstimmung. Beide Werte entsprechen wiederum der Rate von $(44 \pm 20) \text{ s}^{-1}$, die aus Ensemblemessungen für das Gleichgewicht bestimmt wurden [169]. So kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass bei diesen immobilisierten Molekülen ein lokales Gleichgewicht der Substrate existiert.

Um den Einfluss der Substrate jedoch besser zu verstehen, sollten Experimente in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Verhältnissen der Substrate durchgeführt werden. Zusätzlich würden Untersuchungen der einzelnen Lids Aufschluss über die Kinetik der Subzustände geben. Dazu werden jedoch andere Positionen der Farbstoffe im Enzym benötigt.

Theoretisch ist auch denkbar, drei Farbstoffe anzubringen und die Abstandsänderungen zwischen den drei Fluorophoren zu analysieren. Drei-Farben-FRET-Experimente wurden bereits an anderen Systemen durchgeführt [24, 73, 93, 122], doch sind sie bei der Adenylatkinase aufgrund der kleinen intramolekularen Abstände und der geringen konformationsbedingten Abstandsänderungen mit den zur Zeit erhältlichen Fluorophoren nicht möglich.

Kapitel 9

Zusammenfassung und Ausblick

Unter Verwendung der Methoden der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig Subpopulationen unterschiedlicher Konformation der Adenylatkinase *Aquifex aeolicus* direkt nachgewiesen und die Konformationsdynamik einzelner Enzyme bei unterschiedlichen Bedingungen bestimmt.

Zur näheren Bestimmung des Zusammenhangs zwischen Konformation und enzymatischer Aktivität wurde die Adenylatkinase (Adk) an zwei ausgezeichneten Stellen mit fluoreszenten Markern versehen und Einzelmolekül-FRET-Experimente an frei diffundierenden und an der Deckglasoberfläche immobilisierten Enzymen durchgeführt. Als Farbstoffpaar wurden die Fluorophore AlexaFluor 488 und AlexaFluor 633 gewählt. Sie sind aufgrund des kleinen Försterradius von nur 48 Å hervorragend geeignet, um als Donor und Akzeptor Konformationsänderungen der Adk aufzuzeigen. Sie erfüllen auch im gebundenen Zustand zwei wesentliche Voraussetzungen für Einzelmolekül-FRET-Experimente, indem sie eine hohe Quantenausbeute der Fluoreszenz sowie eine freie Beweglichkeit an den Bindungsstellen aufweisen.

Da photophysikalische Prozesse den Energietransfer beeinflussen können, wurden die photophysikalischen Eigenschaften beider Fluorophore detailliert untersucht. Sind Substrate am Enzym gebunden oder in hohen Konzentrationen im Lösungsmittel vorhanden, werden durch Wechselwirkungen mit dem Fluorophor Übergänge in nichtfluoreszente, reversible Zustände induziert. Die Ursache hierfür können Ionisationen des Farbstoffs mit anschließender Rekombination mit dem Elektron sein [44]. Die Absorptionseigenschaften des Akzeptors werden im Dunkelzustand jedoch nicht verändert.

Des Weiteren treten Übergänge in kurzlebige, ebenfalls photoinaktive Tripletzustände auf. Die Lebensdauer dieser Zustände beträgt je nach Farbstoff und Anregung zwischen 4 und 8 μs . Befindet sich der Akzeptor im Tripletzustand, so ist der Energietransfer vom Donor stärker, so dass der Donor während dieser Zeit nicht fluoreszent ist (Singulett-Triplett-Annihilation).

Zur Verbesserung der Photostabilität und Erhöhung der photochemischen Lebensdauer wurden Untersuchungen mit Ascorbinsäure sowie mit verschiedenen Tripletquenchern in Kombination mit dem Sauerstofffängersystem Glukoseoxidase-Katalase durchgeführt. Für beide Farbstoffe war Mercaptoethylamin als Tripletquencher am besten geeignet, doch verhinderten Wechselwirkungen mit der Glukoseoxidase die Anwendung in FRET-Experimenten. Dafür werden geeignetere Methoden zur Desoxygenierung der Pufferlösung benötigt.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die verwendete Farbstoff-markierte Mutante der Adk eine enzymatische Aktivität besitzt, die mit der des Wildtyps vergleichbar ist. Während der Katalyse befindet sich das Enzym - entsprechend der Stellung der beiden beweglichen Lid-Domänen - in zwei Hauptkonformationen. In der offenen Konformation können die Substrate binden und in der geschlossenen findet der katalysierte Phosphotransfer statt. Die relativen Abstände der Fluorophore betragen für die offene und die geschlossene Konformation entsprechend der Kristallstrukturen 46 Å und 36 Å.

Einzelmolekül-Burstexperimente ermöglichten für das Apoenzym und die verschiedenen Enzym-Substrat-Komplexe sowohl eine Bestimmung der Population der verschiedenen Konformationszustände als auch der Raten der Konformationsänderung. Es konnte gezeigt werden, dass die Bewegung der beiden Lids nicht unkorreliert stattfindet, sondern dass das Binden eines Substrats am ATP-Lid das Schließen des AMP-Lids verursacht. Unkorrelierte Bewegungen der Lids treten nur auf, wenn entweder keine der beiden oder beide Bindungsstellen besetzt sind. Sie sind besonders stark ausgeprägt, wenn der Inhibitor AP₅A gebunden ist.

Zusätzlich konnten aus Einzelmolekül-FCS-Experimenten sowie von einzelnen immobilisierten Enzymen unter Verwendung eines Zweizustandmodells die Raten der Konformationsänderung gewonnen werden. Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass ein Besetzen der Bindungsstellen des Enzyms die Rate aus dem geschlossenen in den geöffneten Zustand verändert, jedoch die Rate vom geöffneten in den geschlossenen Zustand kaum beeinflusst. Dabei ist es ein Unterschied, ob das Substratanalogon für ATP (AMPPNP) und das Substrat AMP, oder andererseits zwei ADP-Moleküle binden.

Während ersteres das Gleichgewicht stark zur geschlossenen Konformation hin verschiebt, wird im zweiten Fall ein Zustand mit nur geschlossenem ATP-Lid bevorzugt. Zusätzlich bewirkt das Binden von zwei ADP-Nukleotiden eine erhöhte Öffnungsrate, in der sich wahrscheinlich nur die Kinetik des ATP-Lids widerspiegelt. Dies bewirkt, dass bei Verwendung des Zweizustandmodells die Öffnungsrate nicht länger mit der Aktivität korreliert ist, so wie es unter Gleichgewichtsbedingungen der Substrate der Fall ist [169]. Die Rate des Stoffumsatzes, bezogen auf die Rate des Öffnens, beträgt nur 4%. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen an immobilisierten Enzymen sowie den Ensemblemessungen aus der NMR-Spektroskopie überein.

Eine Untersuchung der Kinetik der einzelnen Lids sowie Experimente mit unterschiedlichen Verhältnissen der Substrate, werden zu einer weiteren Aufklärung unkorrelierter Bewegungen führen. Dafür sind jedoch andere Positionen der Fluorophore im Enzym erforderlich, da der halbgeschlossene Zustand des AMP-Lids mit den für diese Arbeit gewählten Positionen nicht vom vollständig geschlossenen Zustand unterschieden werden kann. Veränderte Farbstoffpositionen können auch zu einer Aufklärung der inhibierenden Wirkung höherer AMP-Konzentrationen verwendet werden und so bleibt die Konformationsdynamik der Adenylatkinase auch in der Zukunft ein spannendes Gebiet der Biophysik.

Literaturverzeichnis

- [1] A., J. Über den mechanismus der photolumineszenz von farbstoffphosphoren. *Z Phys* 94 (1935), 38–46.
- [2] ABBONDANZIERI, E. A., G. W. J. S. J. W. L. R. A. B. S. M. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature* 438 (2005), 460–465.
- [3] AITKEN, C. E., MARSHALL, R. A., AND PUGLISI, J. An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophys. J.* (2007), bio-physj.107.117689.
- [4] AMOS, W. B., AND WHITE, J. G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biology of the Cell* 95, 6 (Sept. 2003), 335–342.
- [5] ANDERSSON, S. B. Tracking a single fluorescent molecule with a confocal microscope. *Applied Physics B: Lasers and Optics* 80, 7 (June 2005), 809–816.
- [6] ANSARI, A., BERENDZEN, J., BOWNE, S. F., FRAUENFELDER, H., IBEN, I. E. T., SAUKE, T. B., SHYAMSUNDER, E., AND YOUNG, R. D. Protein states and proteinquakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 15 (1985), 5000–5004.
- [7] ARORA, K., AND BROOKS, C. L. Large-scale allosteric conformational transitions of adenylate kinase appear to involve a population-shift mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 47 (2007), 18496–18501.
- [8] BAHLMANN, K., AND HELL, S. W. Depolarization by high aperture focusing. *Appl. Phys. Lett.* 77, 5 (July 2000), 612–614.
- [9] BAKHSHIEV, N. Universal molecular interactions and their effect on the position of the electronic spectra of molecules in 2-component solutions .6. dipole moments and structure of molecules of some phthalimide derivatives in their basic and 1st excitation electronic states. *Optika i spektroskopiia* 13 (1962), 192–199.
- [10] BANK, P. D. Tech. rep., Rutgers, the State University of New Jersey, 2008.
- [11] BASCHE, T., KUMMER, S., AND BRAUCHLE, C. Direct spectroscopic observation of quantum jumps of a single molecule. *Nature* 373, 6510 (Jan. 1995), 132–134.

- [12] BENDA A, HOF M, W. M. P. M. E. R. K. P. Tscpc upgrade of a confocal fcs microscope. *Rev Sci Instrum* 76 (2005), 033106.
- [13] BERBERAN-SANTOS, M., AND PRIETO, M. J. E. Monte carlo simulation of orientational effects on direct energy transfer. *The Journal of Chemical Physics* 88, 10 (1988), 6341–6349.
- [14] BERENDSEN, H. J., AND HAYWARD, S. Collective protein dynamics in relation to function. *Current Opinion in Structural Biology* 10, 2 (Apr. 2000), 165–169.
- [15] BERLAND, K., AND SHEN, G. Excitation saturation in two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Appl. Opt.* 42, 27 (Sept. 2003), 5566–5576.
- [16] BERRY MB, MEADOR B, B. T. L. P. G. M. P. J. G. The closed conformation of a highly flexible protein: the structure of e. coli adenylate kinase with bound amp and amppnp. *Proteins* 19 (1994), 183–189.
- [17] BEST, R. B., MERCHANT, K. A., GOPICH, I. V., SCHULER, B., BAX, A., AND EATON, W. A. Effect of flexibility and cis residues in single-molecule fret studies of polyproline. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 48 (Nov. 2007), 18964–18969.
- [18] BLATZ, A. L., AND MAGLEBY, K. L. Correcting single channel data for missed events. *Biophys. J.* 49, 5 (May 1986), 967–980.
- [19] BOCK, R. M., L. N.-S. M. S. A. L. S. H. Ultraviolet absorption spectra of adenosine-5'-triphosphate and related 5'-ribonucleotides. *Arch. Biochem. Biophys.* 62 (1956), 253–264.
- [20] BOOTH, M. J., AND WILSON, T. Refractive-index-mismatch induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction. *J. Biomed. Opt.* 6, 3 (July 2001), 266–272.
- [21] BROZIS, M., AND TOMIN, V. Luminescence of molecules with internal charge transfer upon longwave excitation. *Journal of Applied Spectroscopy* 70, 4 (July 2003), 522–525.
- [22] CAMYSHAN, S. V., GRITSAN, N. P., KOROLEV, V. V., AND BAZHIN, N. M. Quenching of the luminescence of organic compounds by oxygen in glassy matrices. *Chemical Physics* 142, 1 (Mar. 1990), 59–68.
- [23] CHEN, Y., MULLER, J. D., SO, P. T. C., AND GRATTON, E. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.* 77, 1 (1999), 553–567.
- [24] CLAMME, J.-P., AND DENIZ, A. A. Three-color single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *ChemPhysChem* 6, 1 (2005), 74–77.
- [25] CLIFFORD, J., BELL, T., TINNEFELD, P., HEILEMANN, M., MELNIKOV, S., HOTTA, J.-I., SLIWA, M., DEDECKER, P., SAUER, M., HOFKENS, J., AND YEOW, E. Fluorescence of single molecules in polymer films: Sensitivity of blinking to local environment. *J. Phys. Chem. B* 111, 25 (June 2007), 6987–6991.

- [26] CORNISH, P. V., AND HA, T. A survey of single-molecule techniques in chemical biology. *ACS Chem. Biol.* 2, 1 (2007), 53–61.
- [27] D, K. Department of biochemistry, brandeis university, waltham, ma, u.s.a., unveröffentlichte daten.
- [28] D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN, S. M. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 1958 30 (1958), 1190–1206.
- [29] D'AURIA, S., HERMAN, P., ROSSI, M., AND LAKOWICZ, J. R. The fluorescence emission of the apo-glucose oxidase from aspergillus niger as probe to estimate glucose concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263 (1999), 550–553.
- [30] DAVIDOVITS, P., AND EGGER, M. D. Photomicrography of corneal endothelial cells in vivo. *Nature* 224 (1973), 336–367.
- [31] DAVIS, C. C., AND KING, T. A. Correction methods for photon pile-up in lifetime determination by single-photon counting. *Journal of Physics A: General Physics* 3, 1 (1970), 101–109.
- [32] DAVIS, LLOYD M.; SHEN, G. Accounting for triplet and saturation effects in fcs measurements. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7 (2006), 287–301.
- [33] DECKERT G, WARREN PV, G. T. Y. W. L. A. G. D. O. R. S. M. K. M. A. M. H. R. F. R. S. J. O. G. R. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium aquifex aeolicus. *1998 392* (1998), 353–358.
- [34] DELUCA, M., WANNLUND, J., AND MCELROY, W. D. Factors affecting the kinetics of light emission from crude and purified firefly luciferase. *Analytical Biochemistry* 95, 1 (May 1979), 194–198.
- [35] DENIZ, A. A., DAHAN, M., GRUNWELL, J. R., HA, T., FAULHABER, A. E., CHEMLA, D. S., WEISS, S., AND SCHULTZ, P. G. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of forster distance dependence and subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 7 (1999), 3670–3675.
- [36] DENIZ, A. A., LAURENCE, T. A., DAHAN, M., CHEMLA, D. S., SCHULTZ, P. G., AND WEISS, S. Ratiometric single-molecule studies of freely diffusing biomolecules. *Annual Review of Physical Chemistry* 52, 1 (2001), 233–253.
- [37] DERTINGER, T., PACHECO, V., VON DER HOCHT, I., HARTMANN, R., GREGOR, I., AND ENDERLEIN, J. Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: A new tool for accurate and absolute diffusion measurements. *ChemPhysChem* 8, 3 (2007), 433–443.
- [38] DEXTER, D. L. A theory of sensitized luminescence in solids. *J. Chem. Phys.* 21, 5 (May 1953), 836–850.
- [39] DITTRICH, P., AND SCHWILLE, P. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis. with one- and two-photon excitation. *Applied Physics B: Lasers and Optics* 73, 8 (Dec. 2001), 829–837.

- [40] DIX, J., HOM, E., AND VERKMAN, A. Fluorescence correlation spectroscopy simulations of photophysical phenomena and molecular interactions: A molecular dynamics/monte carlo approach. *J. Phys. Chem. B* 110, 4 (2006), 1896–1906.
- [41] DOOSE, S., HEILEMANN, M., MICHALET, X., WEISS, S., AND KAPANIDIS, A. Periodic acceptor excitation spectroscopy of single molecules. *European Biophysics Journal* 36, 6 (July 2007), 669–674.
- [42] EATON, W., HENRY, E., AND HOFRICHTER, J. Application of linear free energy relations to protein conformational changes: The quaternary structural change of hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 10 (1991), 4472–4475.
- [43] EGGELING, C., WIDENGREN, J., BRAND, L., SCHAFFER, J., FELEKYAN, S., AND SEIDEL, C. Analysis of photobleaching in single-molecule multicolor excitation and förster resonance energy transfer measurements. *J Phys Chem* (2006).
- [44] EGGELING, C., WIDENGREN, J., RIGLER, R., AND SEIDEL, C. Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis. *Anal. Chem.* 70, 13 (1998), 2651–2659.
- [45] ELLIOT TAN, TIMOTHY J. WILSON, M. K. N. R. M. C. D. M. J. L., AND HA, T. A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate. *PNAS* 100 (2003), 9308–9313.
- [46] ELSON, E. L., AND MAGDE, D. Fluorescence correlation spectroscopy. i. conceptual basis and theory. *Biopolymers* 13, 1 (1974), 1–27.
- [47] ENDERLEIN, J., AND AMBROSE, W. P. Optical collection efficiency function in single-molecule detection experiments. *Appl. Opt.* 36, 22 (Aug. 1997), 5298–5302.
- [48] ENDERLEIN, J., AND ERDMANN, R. Fast fitting of multi-exponential decay curves. *Optics Communications* 134, 1-6 (Jan. 1997), 371–378.
- [49] ENDERLEIN, J., AND GREGOR, I. Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 76, 3 (Mar. 2005), 033102–5.
- [50] ENDERLEIN J, GREGOR I, P. D. F. J. Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol* 5 (2004), 231–41.
- [51] ENGLISH, D., HARBRON, E., AND BARBARA, P. Probing photoinduced intersystem crossing by two-color, double resonance single molecule spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* 104, 40 (2000), 9057–9061.
- [52] ERLICH, N. *Einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen an hochmarkierter DNS in Hinblick auf Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung*. PhD thesis, Universität zu Lübeck, 2008.
- [53] FEYNMAN, R. P. There is plenty of room at the bottom. *Eng. and Sci.* 23 (1960), 22–36.

- [54] FÖRSTER, T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 1-2 (1948), 55–75.
- [55] G. J. BRAKENHOFF, P. B., AND BAREND, P. Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses,. *Journal of Microscopy* 117 (1979), 219–232.
- [56] GAIGALAS, A., WANG, L., COLE, K., AND HUMPHRIES, E. Photodegradation of fluorescein in solutions containing n-propyl gallate. *J. Phys. Chem. A* 108, 20 (May 2004), 4378–4384.
- [57] GILLES, A., MARLIERE, P., ROSE, T., SARFATI, R., LONGIN, R., MEIER, A., FERMANDJIAN, S., MONNOT, M., COHEN, G., AND BARZU, O. Conservative replacement of methionine by norleucine in escherichia coli adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* 263, 17 (1988), 8204–8209.
- [58] GREGOR, I., PATRA, D., AND ENDERLEIN, J. Optical saturation in fluorescence correlation spectroscopy under continuous-wave and pulsed excitation. *ChemPhysChem* 6, 1 (2005), 164–170.
- [59] HAAS, E. The study of protein folding and dynamics by determination of intramolecular distance distributions and their fluctuations using ensemble and single-molecule fret measurements. *ChemPhysChem* 6, 5 (2005), 858–870.
- [60] HAASE, M., HUBNER, C., REUTHER, E., HERRMANN, A., MULLEN, K., AND BASCHE, T. Exponential and power-law kinetics in single-molecule fluorescence intermittency. *J. Phys. Chem. B* 108, 29 (2004), 10445–10450.
- [61] HANSON, J. A., DUDERSTADT, K., WATKINS, L. P., BHATTACHARYYA, S., BROKAW, J., CHU, J.-W., AND YANG, H. Illuminating the mechanistic roles of enzyme conformational dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 46 (2007), 18055–18060.
- [62] HÜBNER, C. G., ZUMOFEN, G., RENN, A., HERRMANN, A., MÜLLEN, K., AND BASCHÉ, T. Photon antibunching and collective effects in the fluorescence of single bichromophoric molecules. *Phys. Rev. Lett.* 91, 9 (Aug. 2003), 093903–.
- [63] HELL, S. W. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd ed. SpringerScience+Business Media, New York, 2006.
- [64] HENZLER-WILDMAN, K. A., LEI, M., THAI, V., WOLF-WATZ, M., KERNS, J., WUNDERLICH, M., HÜBNER, C., AND KERN, D. Linkage between multiple-timescale dynamics, activity, and stability. *Biophysical Journal* (Jan 2007), 176A–176A. ISI Document Delivery No.: 132WATimes Cited: 0 Cited Reference Count: 0 Suppl. S.
- [65] HENZLER-WILDMAN, K., AND KERN, D. Dynamic personalities of proteins. *Nature* 450, 7172 (Dec. 2007), 964–972.
- [66] HENZLER-WILDMAN, K. A., LEI, M., THAI, V., KERNS, S. J., KARPLUS, M., AND KERN, D. A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* 450, 7171 (Dec. 2007), 913–916.

- [67] HENZLER-WILDMAN, K. A., THAI, V., LEI, M., OTT, M., WOLF-WATZ, M., FENN, T., POZHARSKI, E., WILSON, M. A., PETSKO, G. A., KARPLUS, M., HUBNER, C. G., AND KERN, D. Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature* 450, 7171 (Dec. 2007), 838–844.
- [68] HERTZ, H. Die kräfte elektrischer schwingungen, behandelt nach der maxwellschen theorie. *Wiedemanns Ann.* 36 (1888), 1.
- [69] HESS, S. T., AND WEBB, W. W. Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 83, 4 (2002), 2300–2317.
- [70] HIRSCHFELD, T. *Appl Optics* 15 (1976), 2965–2966.
- [71] HOFKENS, J., COTLET, M., VOSCH, T., TINNEFELD, P., WESTON, K. D., EGO, C., GRIMSDALE, A., MULLEN, K., BELJONNE, D., BREDAS, J. L., JORDENS, S., SCHWEITZER, G., SAUER, M., AND DE SCHRYVER, F. Revealing competitive forster-type resonance energy-transfer pathways in single bichromophoric molecules. *PNAS* 100, 23 (2003), 13146–13151.
- [72] HOHLBEIN, J. *Single Molecule Fluorescence Detection in Nanoscale Confinement*. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle, 2008.
- [73] HOHNG, S., JOO, C., AND HA, T. Single-molecule three-color fret. *Biophys. J.* 87, 2 (Aug. 2004), 1328–1337.
- [74] HUITINK, G. M. ph-dependent spectral behavior of substituted quinolones: potential fluorophore for metallofluorescent indicators. *Talanta* 46, 5 (Aug. 1998), 1065–1072.
- [75] IWAKI, T., TORIGOE, C., NOJI, M., AND NAKANISHI, M. Antibodies for fluorescent molecular rotors. *Biochemistry* 32, 29 (1993), 7589–7592.
- [76] JEAN-PAUL STEGHENS, K.-L. M., AND BERNENG, J.-C. Firefly luciferase has two nucleotide binding sites: effect of nucleoside monophosphate and coa on the light-emission spectra. *Biochem J* 336 (1998), 109–113.
- [77] JENCKS, W. P. Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: The circe effect. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, A. Meister, Ed. 1975, pp. 219–410.
- [78] KAIM, G., PRUMMER, M., SICK, B., ZUMOFEN, G., RENN, A., WILD, U. P., AND DIMROTH, P. Coupled rotation within single f0f1 enzyme complexes during atp synthesis or hydrolysis, Aug. 2002.
- [79] KAPANIDIS, A. N., LEE, N. K., LAURENCE, T. A., DOOSE, S., MARGEAT, E., AND WEISS, S. Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 24 (June 2004), 8936–8941.
- [80] KAPUSTA, P., WAHL, M., BENDA, A., HOF, M., AND ENDERLEIN, J. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence* 17, 1 (Jan. 2007), 43–48.

- [81] KASCHE, V., AND LINDQVIST, L. Reactions between the triplet state of fluorescein and oxygen. *J. Phys. Chem.* 68, 4 (1964), 817–823.
- [82] KASHA, M. Collisional perturbation of spin-orbital coupling and the mechanism of fluorescence quenching. a visual demonstration of the perturbation. *J. Chem. Phys.* 20, 1 (Jan. 1952), 71–74.
- [83] KAUTSKY, H. Quenching of luminescence by oxygen. *Trans Faraday Soc* 35 (1939), 216–219.
- [84] KITAO A, G. N. Investigating protein dynamics in collective coordinate space. *Curr Opin Struct Biol* 9 (1999), 164–169.
- [85] KNIBBE H, REHM D, W. A. Intermediates and kinetics of fluorescence quenching by electron transfer. *BERICHTE DER BUNSEN-GESELLSCHAFT FUR PHYSIKALISCHE CHEMIE* 72 (1968), 257.
- [86] KOICHI KIKUCHI, CHIKA SATO, M. W. H. I. Y. T., AND MIYASHI, T. New aspects of fluorescence quenching by molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993), 5180–5184.
- [87] KOPPEL, D. E. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. A* 10, 6 (Dec. 1974), 1938–.
- [88] KUNO, M., FROMM, D. P., HAMANN, H. F., GALLAGHER, A., AND NESBITT, D. J. Nonexponential “blinking” kinetics of single cdse quantum dots: A universal power law behavior. *J. Chem. Phys.* 112, 7 (Feb. 2000), 3117–3120.
- [89] KUZMENKINA, E. V., HEYES, C. D., AND NIENHAUS, G. U. Single-molecule forster resonance energy transfer study of protein dynamics under denaturing conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 43 (Oct. 2005), 15471–15476.
- [90] LAKOWICZ, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3 ed. Springer Science+Buisness Media, LLC, 2006.
- [91] LAURENCE, T. A., KONG, X., JAGER, M., AND WEISS, S. Probing structural heterogeneities and fluctuations of nucleic acids and denatured proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 48 (Nov. 2005), 17348–17353.
- [92] LEACH, F. R. Atp determination with firefly luciferase. *J. Appl. Biochem.* 3 (1981), 473–517.
- [93] LEE, NAM KI, K. A. N. K. H. R. K. Y. H. S. O. K. Y. G. N. K. S. K. W. S. Three-color alternating-laser excitation of single molecules: Monitoring multiple interactions and distances. *Biophys. J.* 92 (2007), 303–312.
- [94] LEVENE, M. J., KORLACH, J., TURNER, S. W., FOQUET, M., CRAIGHEAD, H. G., AND WEBB, W. W. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science* 299, 5607 (2003), 682–686.
- [95] LIPMAN, E. A., SCHULER, B., BAKAJIN, O., AND EATON, W. A. Single-molecule measurement of protein folding kinetics. *Science* 301, 5637 (2003), 1233–1235.

- [96] LU, H. P., AND XIE, X. S. Single-molecule spectral fluctuations at room temperature. *Nature* 385, 6612 (Jan. 1997), 143–146.
- [97] LU, Q., AND WANG, J. Single molecule conformational dynamics of adenylate kinase: Energy landscape, structural correlations, and transition state ensembles. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 14 (2008), 4772–4783.
- [98] LUMMA, D., KELLER, S., VILGIS, T., AND RÄDLER, J. O. Fcs, dynamic. *Phys. Rev. Lett.* 90, 21 (May 2003), 218301–.
- [99] M. ZHAO, L. JIN, B. C. Y. D. H. M., AND CHEN, D. Afterpulsing and its correction in fluorescence correlation spectroscopy experiments. *Appl. Opt.* 42 (2003), 4031–4036.
- [100] MARGITTAI, M., WIDENGREN, J., SCHWEINBERGER, E., SCHRODER, G. F., FELEKYAN, S., HAUSTEIN, E., KONIG, M., FASSHAUER, D., GRUBMULLER, H., JAHN, R., AND SEIDEL, C. A. M. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *PNAS* 100, 26 (Dec. 2003), 15516–15521.
- [101] MATAGA N, KAIFU Y, K. M. Solvent effects upon fluorescence spectra and the dipolemoments of excited molecules. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 28 (1956), 465–470.
- [102] MENZEL, R., AND THIEL, E. Intersystem crossing rate constants of rhodamine dyes: influence of the amino-group substitution. *Chemical Physics Letters* 291, 1-2 (July 1998), 237–243.
- [103] METROPOLIS, N., ROSENBLUTH, A. W., ROSENBLUTH, M. N., TELLER, A. H., AND TELLER, E. Equation of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.* 21, 6 (June 1953), 1087–1092.
- [104] MULLER, B. K., ZAYCHIKOV, E., BRAUCHLE, C., AND LAMB, D. C. Pulsed interleaved excitation. *Biophys. J.* 89, 5 (Nov. 2005), 3508–3522.
- [105] MYONG, S., R. I. J. C. L. T., AND HA, T. Repetitive shuttling of a motor protein on dna. *Nature* 437 (2005), 1321–1325.
- [106] NAGY, A., WU, J., AND BERLAND, K. M. Characterizing observation volumes and the role of excitation saturation in one-photon fluorescence fluctuation spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 10, 4 (July 2005), 044015–9.
- [107] NAHAS, M. K., WILSON, T. J., HOHNG, S., JARVIE, K., LILLEY, D. M. J., AND HA, T. Observation of internal cleavage and ligation reactions of a ribozyme. *Nat Struct Mol Biol* 11, 11 (Nov. 2004), 1107–1113.
- [108] NGUYEN, P. Q., LIU, S., THOMPSON, J. C., AND SILBERG, J. J. Thermostability promotes the cooperative function of split adenylate kinases. *Protein Engineering, Design and Selection* 21, 5 (2008), 303–310.
- [109] NIR, E., MICHALET, X., HAMADANI, K., LAURENCE, T., NEUHAUSER, D., KOVCHegov, Y., AND WEISS, S. Shot-noise limited single-molecule fret histograms: Comparison between theory and experiments. *J. Phys. Chem. B* 110, 44 (2006), 22103–22124.

- [110] NIRMAL, M., DABBOUSI, B. O., BAWENDI, M. G., MACKLIN, J. J., TRAUTMAN, J. K., HARRIS, T. D., AND BRUS, L. E. Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. *Nature* 383, 6603 (Oct. 1996), 802–804.
- [111] NISHIMURA, G., AND KINJO, M. Systematic error in fluorescence correlation measurements identified by a simple saturation model of fluorescence. *Anal. Chem.* 76, 7 (2004), 1963–1970.
- [112] NODA, L. *The Enzymes*, vol. 8. Academic Press, New York, 1973.
- [113] NOJI, H., YASUDA, R., YOSHIDA, M., AND KINOSHITA, K. Direct observation of the rotation of f1-ATPase. *Nature* 386, 6622 (Mar. 1997), 299–302.
- [114] NOOREN, I. M. A., AND THORNTON, J. M. Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *Journal of Molecular Biology* 325, 5 (Jan. 2003), 991–1018.
- [115] PARMENTER, C. S., AND RAU, J. D. Fluorescence quenching in aromatic hydrocarbons by oxygen. *J. Chem. Phys.* 51, 5 (Sept. 1969), 2242–2246.
- [116] PRISTINSKI, D., KOZLOVSKAYA, V., AND SUKHISHVILI, S. A. Fluorescence correlation spectroscopy studies of diffusion of a weak polyelectrolyte in aqueous solutions. *J. Chem. Phys.* 122, 1 (Jan. 2005), 014907–9.
- [117] R. D. BANKS, C. C. F. BLAKE, P. R. E. R. H. D. W. R. G. W. H. M. M. A. W. P. Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature* 279 (1979), 773–777.
- [118] RASNIK, I., MCKINNEY, S. A., AND HA, T. Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging. *Nat Meth* 3, 11 (Nov. 2006), 891–893.
- [119] RHOADES, E., GUSSAKOVSKY, E., AND HARAN, G. Watching proteins fold one molecule at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 6 (Mar. 2003), 3197–3202.
- [120] RIGLER, R., METS, ., WIDENGREN, J., AND KASK, P. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal* 22, 3 (Aug. 1993), 169–175.
- [121] RIGLER R, FOLDES-PAPP Z, M.-A. F. S. C. V. M. S. A. Fluorescence cross-correlation: a new concept for polymerase chain reaction. *J Biotechnol* 63, 2 (1998), 97–109.
- [122] ROSS, J., BUSCHKAMP, P., FETTING, D., DONNERMEYER, A., ROTH, C., AND TINNEFELD, P. Multicolor single-molecule spectroscopy with alternating laser excitation for the investigation of interactions and dynamics. *J. Phys. Chem. B* 111, 2 (2007), 321–326.
- [123] RUAN Q, CHEN Y, G. E.-G. M. M. W. Cellular characterization of adenylate kinase and its isoform: Two-photon excitation fluorescence imaging and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 83 (2002), 3177–3187.

- [124] SABANAYAGAM, C. R., EID, J. S., AND MELLER, A. Long time scale blinking kinetics of cyanine fluorophores conjugated to dna and its effect on förster resonance energy transfer. *J. Chem. Phys.* 123, 22 (Dec. 2005), 224708–7.
- [125] S.C. BLANCHARD, H.D. KIM, R. G. J. J. P., AND CHU, S. trna dynamics on the ribosome during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004), 12893–12898.
- [126] SCHULER, B. Single-molecule fluorescence spectroscopy of protein folding. *ChemPhysChem* 6 (2005), 1206–1220.
- [127] SCHULER B, LIPMAN EA, S. P. K. E. W. Polyproline and the 'spectroscopic ruler' revisited with single-molecule fluorescence. *Proc Natl Acad Sci* 105, 8 (2005), 2754–2759.
- [128] SCHULZ, G. E., MÜLLER, C. W., AND DIEDERICHS, K. Induced-fit movements in adenylate kinases. *Journal of Molecular Biology* 213, 4 (June 1990), 627–630.
- [129] SCHWILLE, P., MEYER-ALMES, F. J., AND RIGLER, R. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.* 72, 4 (1997), 1878–1886.
- [130] SEKIYA, K., AND TONOMURA, Y. Change in ultraviolet absorption spectrum of h-meromyosin induced by its binding with substrate and competitive inhibitor. *J Biochem* 61, 6 (1967), 787–795.
- [131] SELF, S. A. Focusing of spherical gaussian beams. *Appl. Opt.* 22, 5 (Mar. 1983), 658–.
- [132] SHAPIRO, Y., SINEV, M., SINEVA, E., TUGARINOV, V., AND MEIROVITCH, E. Backbone dynamics of escherichia coli adenylate kinase at the extreme stages of the catalytic cycle studied by 15n nmr relaxation. *Biochemistry* 39, 22 (2000), 6634–6644.
- [133] SHAW, G., AND PAPANIKOLAS, J. Triplet-triplet annihilation of excited states of polypyridyl ru(ii) complexes bound to polystyrene. *J. Phys. Chem. B* 106, 24 (2002), 6156–6162.
- [134] SHEPPARD, C. J. R., AND SHOTTON, D. M. *Confocal Laser Scanning Microscopy*. United Kingdom: BIOS Scientific Publishers, Oxford, 1997.
- [135] SHEPPARD, C. J. R., AND WILSON, T. Effect of spherical aberration on the imaging properties of scanning optical microscopes. *Applied Optics* 18 (1979), 1058.
- [136] SHERA EB, SEEITZINGER NK, D. L. K. R. S. S. Detection of single fluorescent molecules. *Chem Phys Lett* 174, 6 (1990), 553–557.
- [137] SHIN, K.-S., YOUN, H.-D., HAN, Y.-H., KANG, S.-O., AND HAH, Y. C. Purification and characterisation of d-glucose oxidase from white-rot fungus pleurotus ostreatus. *European Journal of Biochemistry* 215, 3 (1993), 747–752.
- [138] SINEV, M. A., SINEVA, E. V., ITTAH, V., AND HAAS, E. Towards a mechanism of amp-substrate inhibition in adenylate kinase from escherichia coli. *FEBS Letters* 397, 2-3 (Nov. 1996), 273–276.

- [139] SINEV MA, SINEVA EV, I. V. H. E. Domain closure in adenylate kinase. *Biochem* 35 (1996), 6425–6437.
- [140] SMILEY, R. D., COLLINS, T. R. L., HAMMES, G. G., AND HSIEH, T.-S. Single-molecule measurements of the opening and closing of the dna gate by eukaryotic topoisomerase ii. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 12 (Mar. 2007), 4840–4845.
- [141] SMOLUCHOWSKI, M. Zur kinetischen theorie der brownischen molekularbewegung und der suspensionen. *Annalen der Physik* 21 (1906), 756–780.
- [142] STARCHEV, K., ZHANG, J., AND BUFFLE, J. Applications of fluorescence correlation spectroscopy– particle size effect. *Journal of Colloid and Interface Science* 203, 1 (July 1998), 189–196.
- [143] STRICKLER, S. J., AND BERG, R. A. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *J. Chem. Phys.* 37, 4 (Aug. 1962), 814–822.
- [144] STRYER, L., AND HAUGLAND, R. P. Energy transfer: A spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58, 2 (1967), 719–726.
- [145] TEMIZ NA, MEIROVITCH E, B. I. Escherichia coli adenylate kinase dynamics: Comparison of elastic network model modes with mode-coupling 15n-nmr relaxation data. *Proteins* (2004), 468–480.
- [146] TINNEFELD, P., BUSCHMANN, V., WESTON, K., AND SAUER, M. Direct observation of collective blinking and energy transfer in a bichromophoric system. *J. Phys. Chem. A* 107, 3 (2003), 323–327.
- [147] TINNEFELD, P., HEILEMANN, M., AND SAUER, M. Design of molecular photonic wires based on multistep electronic excitation transfer. *ChemPhysChem* 6, 2 (2005), 217–222.
- [148] TINNEFELD, P., HOFKENS, J., HERTEN, D.-P., MASUO, S., VOSCH, T., COTLET, M., HABUCHI, S., MÜLLEN, K., SCHRYVER, F. C. D., AND SAUER, M. Higher-excited-state photophysical pathways in multichromophoric systems revealed by single-molecule fluorescence spectroscopy. *ChemPhysChem* 5, 11 (2004), 1786–1790.
- [149] TORRES, T., AND LEVITUS, M. Measuring conformational dynamics: A new fcs-fret approach. *J. Phys. Chem. B* 111, 25 (2007), 7392–7400.
- [150] TRAUTMAN, J. K., MACKLIN, J. J., BRUS, L. E., AND BETZIG, E. Near-field spectroscopy of single molecules at room temperature. *Nature* 369, 6475 (May 1994), 40–42.
- [151] TROMANS, D. Temperature and pressure dependent solubility of oxygen in water: a thermodynamic analysis. *Hydrometallurgy* 48, 3 (May 1998), 327–342.
- [152] TUGARINOV V, SHAPIRO YE, L. Z. F. J. M. E. A novel view of domain flexibility in e. coli adenylate kinase based on structural mode coupling 15 nmr relaxation. *J Mol Biol* 315 (2002), 155–170.

- [153] VAN DEN BOGAART, G., KRASNIKOV, V., AND POOLMAN, B. Dual-color fluorescence-burst analysis to probe protein efflux through the mechanosensitive channel mscl. *Biophys. J.* (2006), biophysj.106.088708.
- [154] VORNHEIN, C; SCHLAUDERER, G. J. S. G. E. Movie of the structural changes during a catalytic cycle of nucleoside monophosphate kinases. *Structure* 3 (1995), 483–490.
- [155] WATROB, H., PAN, C.-P., AND BARKLEY, M. Two-step fret as a structural tool. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 24 (2003), 7336–7343.
- [156] WEBB, R. H. Confocal optical microscopy. *Rep. Prog. Phys.* 59 (1996), 427–471.
- [157] WEBER, G., AND FARRIS, F. J. Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* 18, 14 (1979), 3075–3078.
- [158] WEISS, S. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science* 283 (1999), 1676.
- [159] WESTON, K. D., CARSON, P. J., METIU, H., AND BURATTO, S. K. Room-temperature fluorescence characteristics of single dye molecules adsorbed on a glass surface. *J. Chem. Phys.* 109, 17 (Nov. 1998), 7474–7485.
- [160] WHITFORD, P. C., GOSAVI, S., AND ONUCHIC, J. N. Conformational transitions in adenylate kinase: Allosteric communication reduces misligation. *J. Biol. Chem.* 283, 4 (2008), 2042–2048.
- [161] WHITFORD, P. C., MIYASHITA, O., LEVY, Y., AND ONUCHIC, J. N. Conformational transitions of adenylate kinase: Switching by cracking. *Journal of Molecular Biology* 366, 5 (Mar. 2007), 1661–1671.
- [162] WIDENGREN, J., CHMYROV, A., EGGELING, C., LOFDAHL, P.-A., AND SEIDEL, C. Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* 111, 3 (Jan. 2007), 429–440.
- [163] WIDENGREN, J., AND METS, L. Conceptual basis of fluorescence correlation spectroscopy and related techniques as tools in bioscience. In *Single Molecule Detection in Solution*, R. A. K. Christoph Zander, Jörg Enderlein, Ed. 2003, pp. 69–120.
- [164] WIDENGREN, J., METS, L., AND RIGLER, R. Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Chemical Physics* 250, 2 (Dec. 1999), 171–186.
- [165] WIDENGREN, J., METS, U., AND RIGLER, R. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.* 99, 36 (Sept. 1995), 13368–13379.
- [166] WIDENGREN, J., AND RIGLER, R. Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Bioimaging* 4, 3 (1996), 149–157.

- [167] WIDENGREN, J., SCHWEINBERGER, E., BERGER, S., AND SEIDEL, C. Two new concepts to measure fluorescence resonance energy transfer via fluorescence correlation spectroscopy: Theory and experimental realizations. *J. Phys. Chem. A* 105, 28 (July 2001), 6851–6866.
- [168] WIDENGREN, J., AND SCHWILLE, P. Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* 104, 27 (2000), 6416–6428.
- [169] WOLF-WATZ M, THAI V, H.-W. K. H. G. E. E. D. Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nature* 11, 10 (2004), 945–949.
- [170] YANG, H., LUO, G., KARNCHANAPHANURACH, P., LOUIE, T.-M., RECH, I., COVA, S., XUN, L., AND XIE, X. S. Protein conformational dynamics probed by single-molecule electron transfer. *Science* 302, 5643 (2003), 262–266.
- [171] YASUDA, R., MASAIKE, T., ADACHI, K., NOJI, H., ITOH, H., AND KINOSITA, KAZUHIKO, J. The atp-waiting conformation of rotating f1-atpase revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 16 (Aug. 2003), 9314–9318.
- [172] YEOW, E., MELNIKOV, S., BELL, T., DESCHRYVER, F., AND HOFKENS, J. Characterizing the fluorescence intermittency and photobleaching kinetics of dye molecules immobilized on a glass surface. *J. Phys. Chem. A* 110, 5 (Feb. 2006), 1726–1734.
- [173] YILDIZ, A., P. H. S. D.-Y. Z. C. L. Q. S. P. R., AND SWEENEY, H. L. Myosin vi steps via a hand-over-hand mechanism with its lever arm undergoing fluctuations when attached to actin. *J. Biol. Chem.* 279 (2004), 37223–37226.
- [174] ZHUANG, X., KIM, H., PEREIRA, M. J. B., BABCOCK, H. P., WALTER, N. G., AND CHU, S. Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules. *Science* 296, 5572 (2002), 1473–1476.

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Christian Hübner danke ich für die Möglichkeit dieses spannende Thema in großer Freiheit bearbeiten zu können, für sein Vertrauen, seine umfassende Unterstützung und nie nachlassende Kreativität.

Frau Prof. Dr. Dorothee Kern, Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, MA, danke ich für die Einführung in die Welt der Proteine, der unablässigen Diskussionsbereitschaft sowie der Möglichkeit die NMR-Spektroskopie vor Ort kennen lernen zu können.

Frau Dr. Katherine Henzler-Wildmann, Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, MA, danke ich für die zeitaufwändigen Markierungen der Adenylatkinase und der Durchführung zahlreicher NMR-Experimente.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Hübner danke ich für die freundliche Atmosphäre, der ständigen Hilfsbereitschaft und den vielen inspirierenden Diskussionen. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Johannes Hohlbein für die Bereitstellung der MC-Simulation, die eine korrekte Interpretation von vielen Daten erst ermöglichte, sowie Frau Verena Hirschfeld für ihre Unterstützung und Gastfreundschaft danken.

Nicht zuletzt gilt ein großes und herzliches Dankeschön meinem Mann Mathias, der mir jederzeit zur Seite stand.

Der Studienstiftung des dt. Volkes danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliches

Name Maria Ott, geb. Wunderlich
Geburtstag 06.06.1980
Geburtsort Oelsnitz i.V.

Bildungsweg

1999 Abitur, Julius-Mosen-Gymnasium, Oelsnitz i.V.
1999 – 2003 Studium: Medizinische Physik, Martin-Luther-Universität Halle
2003 – 2004 Studienaufenthalt am Ontario Cancer Institute, Toronto, Kanada
Thema: Temperaturbedingte Volumenreduktion von Gewebe
2005 Diplom: Physik (Med.-Physik), Martin-Luther-Universität Halle
Diplomarbeitsthema: Dynamische Lichtstreuung in der Retina
2005 – 2008 Promotion, Biophysik, Martin-Luther-Universität Halle / Universität zu Lübeck
Schwerpunkt: Einzelmolekülspektroskopie

Stipendien

Studienstiftung des dt. Volkes, 2002-2004

Studienstiftung des dt. Volkes, 2005-2008 (Promotionsstipendium)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig sowie ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Lübeck, den 6. August 2008

Maria Ott