

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Fakultät für Physik

der

Universität Bielefeld



vorgelegt von

Diplom-Physiker Ralf Brune

aus Bielefeld

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 2009

Inauguraldissertation

**Grenzen und Möglichkeiten
des Förster
Resonanz-Energietransfer**

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopische
Untersuchung an starren Systemen

Ralf Brune

Bielefeld, 29. Juni 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Absorption und Emission	5
2.1.1	Lambert-Beer Gesetz	6
2.1.2	Franck-Condon-Prinzip	7
2.1.3	Interne Konversion	10
2.1.4	Interkombination	12
2.1.5	Stokes-Verschiebung und Spiegelbildregel	12
2.1.6	Anisotropie	13
2.1.7	Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute . .	14
2.1.8	Fluoreszenzlöschung	17
2.2	Chromophore	28
2.3	Mikroskopie	33
2.3.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	36
3	Material und Methoden	41
3.1	Proben	41
3.1.1	Oligo- und Polyprolin	41
3.1.2	Oligo(<i>para</i> -phenylenethinylen)	47
3.2	Messmethoden	50
3.2.1	Stationäre und zeitaufgelöste Spektroskopie	50
3.2.2	Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie mit alternierender Anregung	53
3.3	Datenaufnahme und Datenauswertung	57
3.3.1	Ensemblespektroskopie	57
3.3.2	Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie	59
4	Ergebnisse und Diskussion	63
4.1	Oligo- und Polyprolin	63
4.1.1	Intramolekulare Farbstoff-Farbstoff Wechselwirkungen . . .	78
4.2	Oligo(<i>para</i> -phenylenethinylen)	89
5	Zusammenfassung und Ausblick	101
	Literaturverzeichnis	105

1 Einleitung

Mikroskope ermöglichen Einblicke in, dem Menschen ohne Hilfsmittel, verborgene Bereiche. Gerade diese kleinen Strukturen faszinieren die Menschen jedoch schon seit Jahrtausenden. Der wahre Siegeszug der Lichtmikroskopie seit ihrer Entstehung zu Beginn des 17. Jahrhunderts, der bis heute vorangetrieben wird durch die Entwicklung immer neuer, höher auflösender Techniken, kann mit dem menschlichen Bedürfnis nach visueller Bestätigung erklärt werden. Das Lichtmikroskop erzeugt ein Bild des beobachteten Gegenstands, das das menschliche Auge so abbildet, wie einen realen Gegenstand. Dadurch entsteht beim Betrachter das Gefühl von Begreifen.

Prinzipiell werden mit einem Lichtmikroskop Strukturen aufgelöst, die nicht kleiner als etwa 200 nm sind. Dies folgt aus den Berechnungen von Abbe (1873), nach denen zwei Strukturen im Mikroskop gerade noch aufgelöst werden können, wenn sie einen Abstand haben, der dem Verhältnis aus Lichtwellenlänge und doppelter Brechzahl des Mediums mal Sinus des halben Öffnungswinkels des Objektivs entspricht.

In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie werden fluoreszierende Sonden eingesetzt, um Strukturen auflösen zu können. Die Auflösung wird dadurch erhöht, dass durch eine Lochblende im Strahlengang nur Licht aus dem Fokus zum Detektor gelangt. Üblicherweise werden Laser als Anregungslichtquelle eingesetzt. Der Laserstrahl wird mit einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur, also großem Öffnungswinkel, auf ein Volumen von etwa einem Femtoliter fokussiert. Die aus diesem kleinen Detektionsvolumen emittierten Photonen werden dann meist mit Lawinenphotodioden detektiert, die Einzelphotonenergienisse aufzeichnen können. Das Bild der Probe entsteht hierbei nicht direkt, sondern muss durch Rastern der Probe aus einzelnen Punkten zusammengesetzt werden.

Mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie können einzelne, fluoreszierende Moleküle in Lösung bis zu picomolaren Konzentrationen

nachgewiesen werden. Dazu muss gewährleistet sein, dass der Hintergrund keinen zu starken Beitrag leistet und zudem müssen geeignete Fluorophore verwendet werden.

Werden Messungen an einem Ensemble von Molekülen durchgeführt, wird der Mittelwert der gemessenen Größe bestimmt. Einzelmolekülmessungen hingegen zeichnen direkt die Veränderungen auf, die durch statische oder dynamische Prozesse hervorgerufen werden. Biologische Systeme weisen häufig statische oder dynamische Inhomogenitäten auf, und oft sind gerade diese Inhomogenitäten der Schlüssel zum Verständnis ihrer Funktion. Unterscheiden sich die Veränderungen von Molekül zu Molekül kann die Messung eines Ensembles die Veränderung nicht auflösen. Daher werden Einzelmolekültechniken verwendet, um die Inhomogenität der Proben zu diskriminieren.

Zur weiteren Erhöhung der Auflösung wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, die Abbildungen unterhalb der Beugungsgrenze ermöglichen. Dazu zählen sowohl die STED-Mikroskopie (engl. stimulated emission depletion) als auch STORM (engl. stochastic optical reconstruction microscopy). Bei der STED-Mikroskopie wird das Detektionsvolumen durch stimulierte Emission eingeschränkt. Die Auflösungserhöhung bei STORM wird durch stochastisches Ein- und Ausschalten der Fluorophore erreicht. Im Gegensatz zu diesen Techniken zählt der FÖRSTER Resonanz-Energietransfer (FRET) nicht zu den bildgebenden Verfahren. FRET beruht auf einer strahlungslosen Dipol-Dipol Wechselwirkung durch die die Energie eines elektronisch angeregten Donorfarbstoffs auf einen spektral passenden Akzeptorfarbstoff übertragen wird und kann genutzt werden, um Abstände im Bereich von 2 nm bis 10 nm zu bestimmen.^[14;18;45] Die FRET-Effizienz ist abhängig von:

- der spektralen Überlappung von Donoremissionsspektrum und Akzeptorabsorptionsspektrum,
- der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors,
- dem Absorptionskoeffizienten des Akzeptors,
- dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor,
- der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der Fluorophore

und kann aus spektroskopischen Messungen bestimmt werden. Aufgrund der Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der inversen sechsten

Potenz des Abstands können aus den FRET-Effizienzen die Abstände der Fluorophore mit hoher Sensitivität berechnet werden. So wird FRET vielfach zur Abstandsmessung in biologisch relevanten Molekülen eingesetzt. Dazu werden diese mit einem Donor- und einem Akzeptorfluorophor markiert.

Viele Informationen, über die Funktion von Biomolekülen, können bereits aus relativen Abstandsmessungen gewonnen werden. Dennoch ist die Bestimmung von exakten Abständen im Bereich einiger Nanometer mittels FRET wünschenswert. Die Grundlage für exakte Abstandsmessungen auf Nanometerskalen sind stäbchenförmige Moleküle, die an beiden Enden geeignete Fluorophore tragen. Die Starrheit der Moleküle ist dabei, ebenso wie die definierte Ausrichtung der Dipolmomente der Fluorophore, entscheidend für die Präzision der Abstandsbestimmung. Zur Validierung der von Stryer und Haugland (1967) als „spektroskopisches Lineal“ (engl. spectroscopic ruler) bezeichneten Technik werden molekulare Lineale benötigt.^[49]

Stryer und Haugland nutzten Oligoprolin Moleküle mit ein bis zwölf Prolineinheiten als molekulare Lineale und konnten damit die Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der inversen sechsten Potenz des Abstands nachweisen. Eine exakte absolute Abstandsmessung erfolgte jedoch nicht.^[49]

Die Nutzung von Fluorophoren mit großem Absorptionskoeffizienten und hoher Fluoreszenzquantenausbeute ermöglicht auch die FRET-Messung an einzelnen Molekülen.^[2;19;54] Insbesondere können so dynamische Prozesse wie Faltungskinetiken dargestellt werden.^[41]

In dieser Arbeit soll FRET durch Ensemble- und Einzelmolekülmessungen vollständig charakterisiert werden. Dazu werden FRET-Messungen an Oligo- und Polyprolinen und an formtreuen Oligo(*para*-phenylenethinylen) (OligoPPE) Molekülen verglichen. OligoPPE sind extrem starre, organische Stäbchenmoleküle, bei denen eine definierte Orientierung der Übergangsdipolmomente der endständig gekoppelten Fluorophore erreicht werden kann. Durch einen Vergleich der FRET Effizienz, bestimmt aus Fluoreszenzspektroskopie, zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie und Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie mit alternierender Anregung (ALEX), werden die Grenzen der Zuverlässigkeit von FRET-Messungen ausgelotet und Konkurrenzprozesse wie fluo-

reszenzlöschende Dimerbildung identifiziert. Zudem wird der Einfluss der Orientierung der Übergangsdipolmomente auf FRET aufgezeigt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass einzelmolekülempfindliche Messungen an stäbchenförmigen Molekülen Informationen über Längenskalen im Bereich von einigen Nanometern liefern können. Solche stäbchenförmigen Moleküle zeichnen sich durch intrinsische Steifigkeit und Formstabilität aus.

Mit der Aminosäure Prolin gibt es ein natürliches Molekül, dass durch Polymerisation starre Polymere ausbilden kann. Aus kristallographischen Untersuchungen sind zwei mögliche helikale Strukturen bekannt, die aus Prolin Einheiten aufgebaut sind.^[6] Diese beruhen auf dem Auftreten von zwei energetisch favorisierten Orientierungen der Monomere zueinander und werden als Typ I und Typ II Helix bezeichnet. In wässrigen Lösungen kommt überwiegend die Typ II Helix vor, wobei jedoch etwa 30 % der Peptidbindungen in (Z)-Stellung vorliegen.^[3]

Für FRET-Messungen an solchen Oligo- und Polyprolin Molekülen wurden, konformativ flexibel, an die Enden der Peptidkette Fluorophore gekoppelt. Die aus den spektroskopischen Messungen im Ensemble berechneten FRET-Effizienzen zeigen ein uneinheitliches Bild, die erwartete Steigerung der Akzeptorfluoreszenz bleibt aus. Die Verminderung der Donorfluoreszenz kann jedoch ausgewertet werden und ergibt FRET-Effizienzen nahe den erwarteten Werten. Insbesondere die Spektren der kurzen Oligoprolin Moleküle, mit 2, 4 und 6 Prolineinheiten, zeigen Hinweise auf die Bildung von nicht fluoreszierenden H-Dimeren. Diese sind dadurch charakterisiert, dass die Absorption gegenüber dem Monomer erhöht und hypsochrom verschoben ist und keine Fluoreszenz auftritt.

ALEX-Messungen zeigen, insbesondere für das Farbstoffpaar Atto488 und Atto565, für die kurzen Oligoprolin Moleküle zu geringe Transfereffizienzen. Dies kann damit erklärt werden, dass für relativ zur Ausdehnung der Chromophore kurze Abstände die Punkt-Dipol-Näherung, die zu den einfachen Formeln der FÖRSTER Theorie führt (Abschnitt 2.1.8),

nicht mehr gilt.^[43] Zudem können Löschprozesse, die die Gesamtquantenausbeute vermindern, dazu führen, dass die Transfereffizienz verringert wird. Für das Molekül aus 20 Prolin Einheiten ergibt sich eine, relativ zur Vergleichskurve, höhere FRET-Effizienz. Diese läßt sich mit dem Auftreten von Knicken in der helikalen Struktur, durch Peptidbindungen in (Z)-Stellung, und der damit verbundenen Verminderung des interchromophoren Abstands, erklären.^[3;10;54] Um den Einfluss dieser Knicke zu untersuchen, könnten Messungen in z. B. Trifluorethanol durchgeführt werden, da in diesem Lösungsmittel die Peptidbindungen nicht in (Z)-Stellung vorliegen und damit eine gestreckte Typ II Helix zu erwarten ist.^[3] Durch Hinzugabe von Lithiumchlorid (LiCl) kann der Anteil Peptidbindungen in (Z)-Stellung auf 40 % bis 70 % angehoben werden.^[28]

Zur Untersuchung der interchromophoren Wechselwirkung wurde das Molekülsystem bis auf eine einzelne Aminosäure (Cystein) verkürzt, die mit unterschiedlichen Fluorophorpaaren gekoppelt wurde. Die Farbstoffe sind dabei in VAN DER WAALS Kontakt. Es zeigt sich eine deutlich verstärkte Wechselwirkung der Chromophore, mit dem Resultat einer ausgeprägten Dimerbildung in Wasser, die in dem weniger polaren Ethanol nicht auftritt. Die Wechselwirkung konnte für unterschiedliche Farbstoffklassen nachgewiesen werden.

Die festgestellte Fluoreszenzlöschung durch kontaktinduzierte Prozesse kann die Beobachtung von dynamischen Prozessen in Biomolekülen beeinflussen. Besonders, wenn die Wechselwirkung, aufgrund schneller Konformationsdynamik, weniger statisch ist, können beobachtete FRET-Effizienzen verfälscht werden.

Die N-terminale Kopplung von Farbstoffen an Cystein zeigt den möglichen Einfluß der Zielmoleküle der Kopplung auf die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs. Bei der Kopplung an Cystein kann es zu einer elektronischen Wechselwirkung zwischen dem elektronischen System des Chromophors und dem in Wasser auftretenden Thiolation kommen. In dem unpolaren Lösungsmittel Ethanol ist die Bildung des Thiolations vermindert und die Fluoreszenzlöschung tritt nicht auf. Zur genauen Aufklärung des Mechanismus könnten pH-abhängige Untersuchungen beitragen, da so die Bildung des Thiolations beeinflusst werden kann.

Um die in den Oligo- und Polyprolin Molekülen auftretenden Hetero-

genitäten zu vermeiden, und die Orientierung der Übergangsdipolmomente der Chromophore zu fixieren, wurden FRET-Proben entwickelt, die eine hohe Starrheit aufweisen.^[17] Zudem konnten die verwendeten Chromophore mit unterschiedlicher Orientierung endständig fixiert werden.

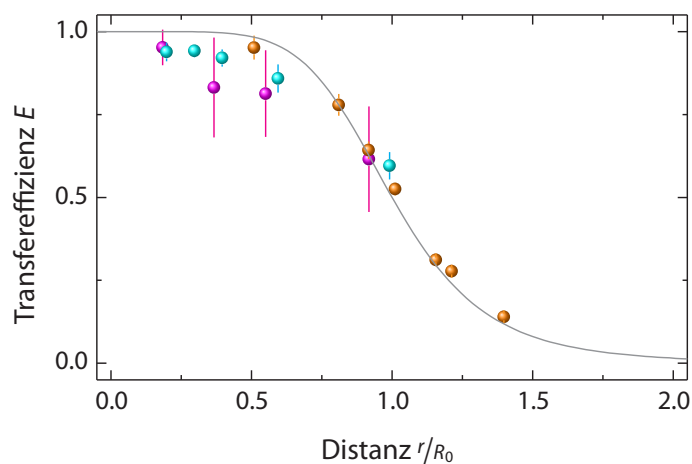


Abbildung 5.1: FRET-Effizienzen der OligoPPE, Oligo- und Polyprolin Proben. Dargestellt sind die jeweils gemittelten FRET-Effizienzen aus den Abbildungen 4.10 und 4.22 und die Standardfehler der Mittelung für die Atto565 – Pro – Atto488 (cyan), Atto647N – Pro – Atto565 (magenta) und PMI – PPE – PMI(OAr)₃ (orange) Proben.

Die spektroskopische Untersuchung der FRET-Effizienz dieser OligoPPE Proben ergab eine hohe Übereinstimmung mit der theoretischen Vorhersage aus einem einfachen Modell¹. Zudem kommt es in diesem System nicht zu starken Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren, die zur Verringerung der Gesamtfluoreszenzquantenausbeute führen. So konnte die FRET-Effizienz übereinstimmend sowohl aus der verminderten Donorfluoreszenz als auch aus der erhöhten Akzeptorfluoreszenz ermittelt werden. Auch die Abhängigkeit von der Orientierung

¹Abstand der Chromophore additiv aus Gleichgewichtsbindungsängen

der Übergangsdipolmomente konnte bestätigt werden.

In Abbildung 5.1 sind die zusammengefassten Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchung der Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz dargestellt. Die Mittelwerte der Messungen für die OligoPPE zeigen, bei geringer Schwankung, eine gute Übereinstimmung mit der theoretischen Kurve. Die Abweichungen können mit der eingeschränkten Gültigkeit der Punkt-Dipol-Näherung (kürzestes OligoPPE) und einer restlichen Flexibilität der Kette (lange OligoPPE) erklärt werden. Zur genauen Untersuchung der Restflexibilität sollen die Ergebnisse mit EPR-Messungen an mit Spinsonden markierten OligoPPE und Simulationen verglichen werden.

Die Ergebnisse der Oligo- und Polyprolin Proben zeigen bei größerer Schwankung der Mittelwerte, den, durch die Verringerung der Abstände erzeugten, abgeflachten Verlauf der Transfereffizienzkurve.^[43]

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, bei Verwendung geeigneter starrer Systeme, die Näherungen der Förster Theorie mit den Messergebnissen übereinstimmen. Die auftretenden Abweichungen können mit dem Auftreten von Knicken in der Helix (Oligo- und Polyprolin) oder der Restflexibilität der Kette (OligoPPE) erklärt werden, da diese zu einem geringeren interchromophoren Abstand führen.