

Einzelmoleküldetektion

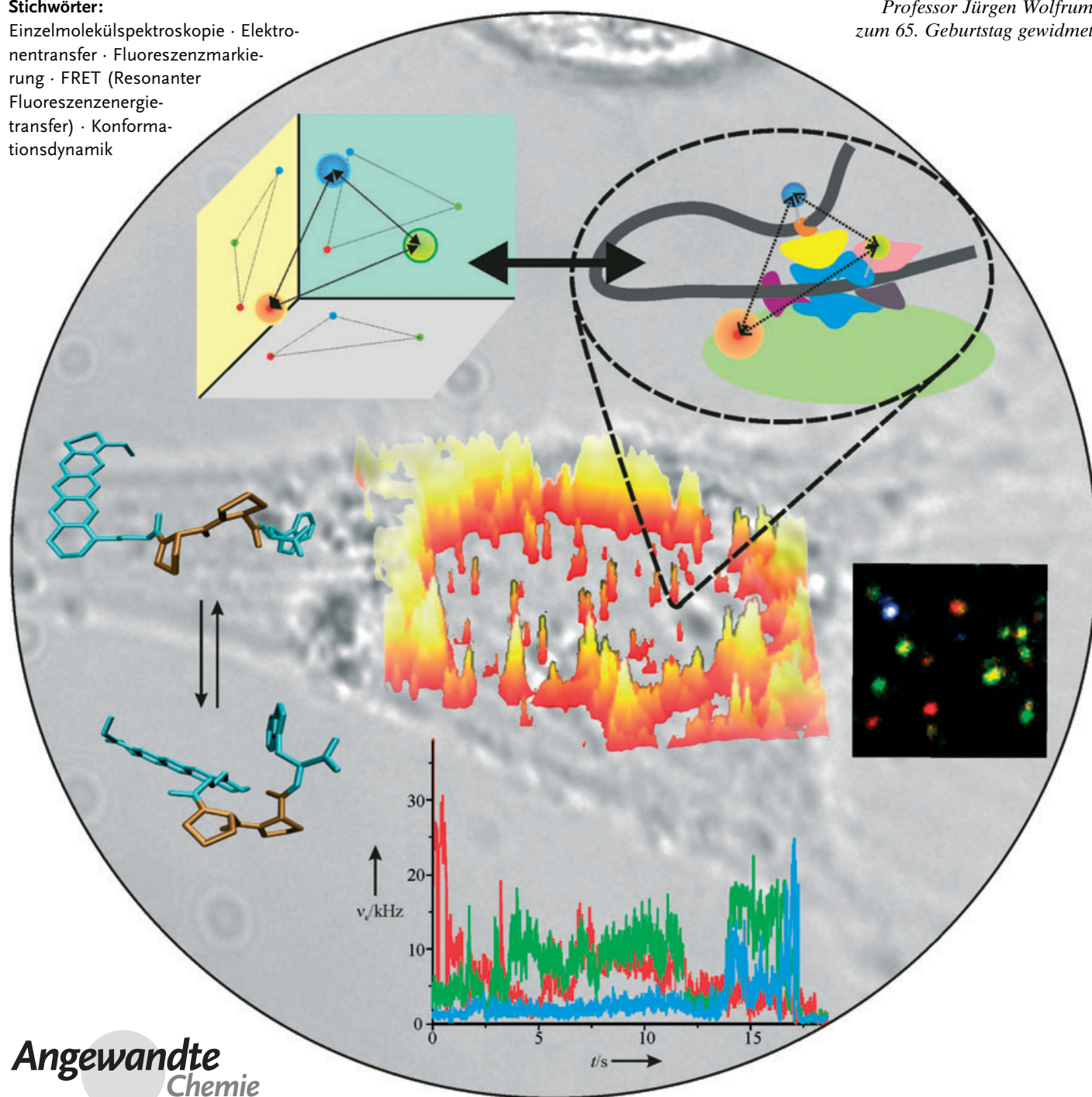
# Neue Wege in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie: Herausforderungen für die Chemie und Einfluss auf die Biologie

Philip Tinnefeld\* und Markus Sauer\*

**Stichwörter:**

Einzelmolekülspektroskopie · Elektronentransfer · Fluoreszenzmarkierung · FRET (Resonanter Fluoreszenzenergietransfer) · Konformationsdynamik

Professor Jürgen Wolfrum  
zum 65. Geburtstag gewidmet



Angewandte  
Chemie

*Im vergangenen Jahrzehnt wurde eine Reihe von fluoreszenzspektroskopischen Messverfahren entwickelt, um einzelne Moleküle unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Mittlerweile helfen etablierte einzelmolekülempfindliche Fluoreszenztechniken bei der Aufklärung komplexer Zusammenhänge in unterschiedlichen Gebieten, von der Materialforschung bis hin zur Zellbiologie. Was früher visionär erschien, etwa die Messung von Beweglichkeit oder strukturellen Veränderungen einzelner Motorproteine, oder der Nachweis von „Single-Copy“-Genen und die Bestimmung ihres Abstands zu Polymerase-Molekülen in den Transkriptionszentren lebender Zellen, gilt nicht länger als unlösbare Aufgabe. In diesem Aufsatz zeigen wir das Potenzial der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie bei der Lösung molekularbiologischer Probleme und diskutieren die Chancen der optischen Einzelmolekültechniken in Verbindung mit intelligenten Markierungsstrategien, um quantitative dreidimensionale Informationen über die dynamische Organisation in lebenden Zellen zu erhalten.*

## 1. Einführung

In den vergangenen 20 Jahren schufen neue Technologien und die Minimierung der Detektionsgrenze von Mikroskopietechniken die Grundlage für die Erfüllung eines lang gehegten Traums: Materie auf atomarer oder molekularer Ebene zu detektieren, zu manipulieren und zu kontrollieren. Erfolgreiche Ansätze zur Detektion und Untersuchung einzelner Atome oder Moleküle auf Oberflächen nutzten in der Rastertunnelmikroskopie (STM)<sup>[1]</sup> oder der Rasterkraftmikroskopie (AFM)<sup>[2]</sup> Nahfeldwechselwirkungen von tunnelnden Elektronen bzw. Kräften mit scharfen Spitzen. Einzelne Moleküle können aber auch mit optischen Methoden beobachtet werden, ohne dass Wechselwirkungen mit einer Spitze erforderlich sind. Fortschritte in der optischen Spektroskopie haben nicht nur die Detektion und Identifizierung frei diffundierender oder immobilisierter Moleküle ermöglicht, sondern es gelangen auch spektroskopische Messungen und die Beobachtung dynamischer Prozesse.

Die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie (single-molecule fluorescence spectroscopy, SMFS) ist besonders deswegen faszinierend, weil sie einen direkteren Ansatz darstellt. Mithilfe von SMFS können wir Modelle, die üblicherweise auf Vorstellungen individueller molekularer Systeme beruhen, direkt mit experimentellen Beobachtungen vergleichen. Im Unterschied zu Ensemblemessungen, mit denen man nur gemittelte Informationen über durchschnittliche Eigenschaften erhält, liefern Einzelmolekülexperimente Informationen über Individuen, Verteilungen und zeitliche Veränderungen von Eigenschaften, die anderenfalls verborgen bleiben. Durch die Beobachtung einer gemittelten Größe kann nicht geklärt werden, ob einzelne Individuen leicht unterschiedliche Eigenschaften zeigen (statische Unordnung), oder sich ihre Eigenschaften mit der Zeit verändern

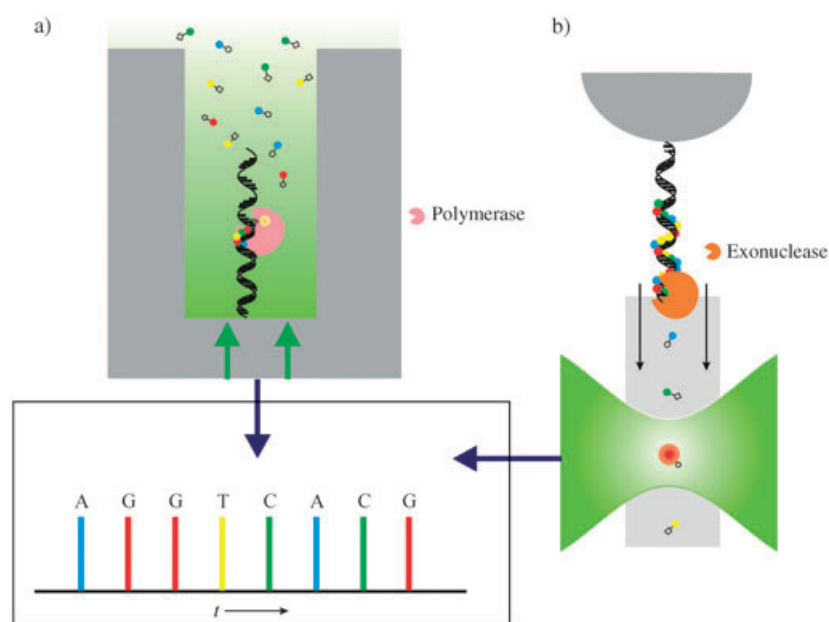
(dynamische Unordnung). Da bei der SMFS nur ein Molekül betrachtet wird, kann auf jegliche Synchronisationsschritte, z. B. zur Einleitung einer Konformationsänderung, verzichtet werden. Die SMFS ist daher eine vielseitige Methode zur Beobachtung der Konformationsdynamik von Biopolymeren, z. B. bei der Proteinfaltung oder der Kontaktbildung in Peptiden, auf Einzelmolekülniveau und auf einer Zeitskala, die von Nanosekunden bis hin zu Sekunden reicht.<sup>[3–5]</sup>

Eine der bekanntesten und reizvollsten SMFS-Anwendungen ist die Sequenzierung eines einzelnen DNA-Strangs. Im Gegensatz zu bisher üblichen DNA-Sequenzierungsmethoden, die auf Sangers enzymatischer Kettenabbruchmethode beruhen, könnte eine Einzelmolekülfluoreszenz-Methode die Sequenz eines einzigen DNA-Fragments von mehreren zehntausend Basen Länge theoretisch mit einer Geschwindigkeit von mehreren hundert Basen pro Sekunde lesen, da man bei diesem Konzept dem schrittweisen Einbau von DNA-Basen in einen einzelnen DNA-Strang durch Polymerase-Enzyme

## Aus dem Inhalt

1. Einführung	2699
2. Grundlagen und technische Entwicklungen in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie	2701
3. Multiparameter-SMFS, Photonenstatistik und Auswertung	2704
4. SMFS zur Untersuchung von Struktur und Dynamik	2707
5. SMFS zur Untersuchung von photophysikalischen Prozessen in Multichromophorsystemen	2710
6. Molekulare photonische Leiter	2712
7. SMFS in der Biologie	2714
8. Colokalisation und Bestimmung des Abstands zwischen einzelnen Molekülen	2717
9. Zusammenfassung und Ausblick	2718

[\*] Dr. P. Tinnefeld, Prof. Dr. M. Sauer  
Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie  
Fakultät für Physik  
Universität Bielefeld  
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)  
Fax: (+49) 521-106-2958  
E-mail: tinnefeld@physik.uni-bielefeld.de  
sauer@physik.uni-bielefeld.de



**Abbildung 1.** Vorschlag für Polymerase- und Exonuclease-vermittelte Sequenzierung eines einzelnen DNA-Moleküls: a) Die Polymerase oder DNA ist in Nullmoden-Wellenleiter (zero-mode waveguide)-Nanostrukturen immobilisiert. Das schnelle Abklingen des einfallenden Lichts am Eingang führt zu einem effektiven Beobachtungsvolumen in der Größenordnung von Zeptolitern ( $10^{-21}$  L).<sup>[6]</sup> Nullmoden-Wellenleiter ermöglichen daher einzelmolekülspektroskopische Experimente mit mikromolaren Konzentrationen, die für die effiziente enzymatische DNA-Synthese benötigt werden.<sup>[302]</sup> Durch das kleine Beobachtungsvolumen liegt die typische Aufenthaltsdauer eines frei diffundierenden fluoreszenzmarkierten Nucleotids im Bereich einiger Mikrosekunden. Diese Aufenthaltsdauer vergrößert sich auf mehrere Millisekunden, wenn die Nucleotide von der DNA-Polymerase erkannt und in den wachsenden DNA-Strang eingebaut werden. Dies ist ausreichend lang für eine fehlerfreie fluoreszenzspektroskopische Identifizierung. b) Bei der Exonuclease-vermittelten Sequenzierung sollte die zu sequenzierende DNA zunächst mit einem biotinylierten Primer, einer DNA-Polymerase und vier Nucleotidtriphosphaten (dNTP) kopiert werden, wobei jeder Basentyp eine andere Fluoreszenzmarkierung erhält. Das einzelne DNA-Fragment wird an einen festen Träger gekoppelt und mechanisch oder durch optisches Trapping in einen fließenden Probenstrom gebracht. Nach Zugabe einer 3'→5'-Exonuclease werden fluoreszierende Nucleotidmonophosphate abgespalten und in den Detektionsbereich überführt, wo sie anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert werden.<sup>[9–11, 82]</sup> Beide Methoden liefern die DNA-Sequenz direkt als eine Folge von detektierten Signalen.

„zuschaut“ (Abbildung 1 a):<sup>[6, 7]</sup> Man identifiziert jede Base, während sie in den DNA-Strang eingebaut wird, und erhält direkt die Sequenz. Analog könnte man den umgekehrten Prozess beobachten: Ein einzelner DNA-Strang wird von

einem Ende aus durch eine Exonuclease abgebaut, und jede Base wird nach der Abspaltung identifiziert (Abbildung 1 b).<sup>[8–11]</sup> Mehrere DNA-Stränge können nicht analysiert werden, da Unterschiede in den Einbau- bzw. Schneidegeschwindigkeiten eine zeitliche Synchronisation verhindern. Diese elegante Alternative zu üblichen Sequenzieretechniken benötigt die denkbar geringste Menge an Ausgangsmaterial.

Obwohl das Konzept einfach erscheinen mag, ist die Einzelmolekülsequenzierung eine der schwierigsten Aufgaben für Biologen, Chemiker und Physiker. Aus biologischer Sicht stellt die Verwendung fluoreszenzmarkierter Nucleotide ein großes Problem dar, denn die sperrigen Fluoreszenzfarbstoffe an den Nucleotiden könnten den von Polymerase oder Exonuclease gesteuerten Einbau bzw. Abbau behindern. Außerdem sind die Auswahl eines einzelnen DNA-Stranges und die sichere Identifizierung jedes einzelnen Nucleotids aufgrund der spektroskopischen Eigenschaften seiner Fluoreszenzmarkierung sehr schwierig. Während das Hauptziel, die Sequenzierung eines einzelnen DNA-Stranges, noch nicht erreicht worden ist, trägt jeder Schritt dorthin zur Entwicklung und Verbesserung von Analysemethoden bei, die in der Lage sind, biochemische Prozesse wie Enzymaktivitäten auf Einzelmolekülebene zu untersuchen.

Die heute bekannten hochauflösenden Methoden wie Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie liefern ein detailliertes Bild der Strukturen von Biomolekülen, sind aber dadurch beschränkt, dass sie eine statische Beschreibung der Moleküle geben und über Ensembles mitteln. Einzelmolekülmethoden bieten sich als Alternative an, da sie eine direktere Sichtweise des Verhaltens von Molekülen liefern, bei der die Funktion nicht aus statischen Strukturen abgeleitet werden muss. Beispielsweise arbeiten viele

molekulare Maschinen, die für das Überleben von Zellen unerlässlich sind und Funktionen wie Replikation, Transkription, Translation oder Proteinfaltung ausüben, nicht synchronisiert und kinetisch unterschiedlich. Um die Wirkungsweise



Philip Tinnefeld, geboren 1974, studierte Chemie in Münster, Montpellier und Heidelberg. Er promovierte 2002 an der Universität Heidelberg unter der Anleitung von Prof. J. Wolfrum. 2001 wurde ihm der Schloemann-Preis der Max-Planck-Gesellschaft für seine Ideen zur Entwicklung eines photonischen Leiters verliehen. Als Postdoktorand erforschte er bei Prof. S. Weiss (UCLA) und Prof. F. C. De Schryver (Leuven) Einzelmolekülfluoreszenztechniken zur dynamischen Untersuchung molekularer Wechselwirkungen. Seit 2003 ist er Gruppenleiter am Institut für Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie der Universität Bielefeld.



Markus Sauer wurde 1965 in Pforzheim geboren. Er studierte Chemie in Karlsruhe, Saarbrücken und Heidelberg und promovierte 1995 an der Universität Heidelberg unter der Anleitung von Prof. J. Wolfrum. Nach einem Aufenthalt am LBNL (Berkeley) in der Gruppe von Prof. S. Weiss wurde er 1998 mit dem BioFuture-Preis für die Erforschung von „Handling, Detektion und Analyse einzelner Biomoleküle“ ausgezeichnet. Er habilitierte 2002 am Institut für Physikalische Chemie in Heidelberg und ist seit 2003 Professor für Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie an der Universität Bielefeld.



solcher biomolekularer Einheiten oder Maschinen zu erklären, müssen Struktur und Funktion der Komponenten lebender Systeme ermittelt werden. Diese als Strukturbioogie bezeichnete Forschungsrichtung ist mehr als alle anderen Teilgebiete der Molekularbiologie auf den Fortschritt hoch entwickelter Instrumente und Markierungsstrategien angewiesen.

Mittlerweile wird die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie in Physik, Chemie und Biologie weitläufig eingesetzt, und zahlreiche Anwendungen sind in hervorragenden Übersichtsartikeln zusammengefasst.<sup>[12–29]</sup> Der anhaltende Erfolg der SMFS stützt sich nicht nur auf die Entwicklung optischer Einzelmolekültechniken, sondern auch auf ausgereifte organische Synthesemethoden und ein großes Repertoire molekularbiologischer Techniken. Dadurch dass Makromoleküle an vielen verschiedenen Positionen spezifisch markiert werden können, wird beispielsweise die Anwendung von Spektroskopietechniken wie dem resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) möglich.<sup>[30]</sup>

Die meisten biologischen SMFS-Studien wurden *in vitro* durchgeführt, d.h. die Moleküle wurden isoliert und oft immobilisiert, um die Untersuchung zu vereinfachen und das Hintergrundsignal zu minimieren. Das wichtigste Ziel ist jedoch die Beobachtung der Moleküle in lebenden Zellen, denn nur unter natürlichen Bedingungen können wir das native Verhalten einzelner Moleküle, beispielsweise unter dem Einfluss von „Molecular Crowding“, beobachten. Kann die SMFS erfolgreich zur Untersuchung von Übertragungswegen, Signalkaskaden oder RNA-Polymerasen während der Transkription im Zellkern einer lebenden Zelle genutzt werden?

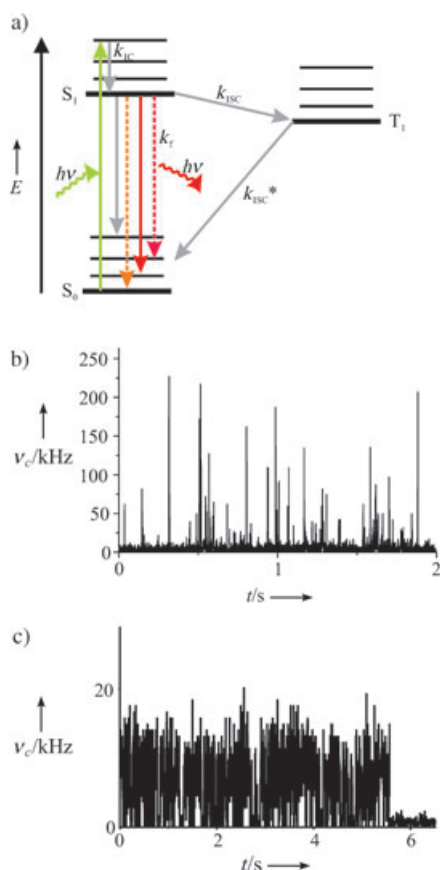
In diesem Aufsatz werden Fortschritte der Einzelmolekülspektroskopie und -mikroskopie vorgestellt; der Schwerpunkt liegt dabei auf biologischen Anwendungen. Zuerst werden die Grundlagen der Detektion und Spektroskopie einzelner fluoreszierender Moleküle erklärt. Im Besonderen werden die Verdienste der Fernfeld- und konfokalen Mikroskopie diskutiert. Anschließend befassen wir uns mit verschiedenen Energietransfermethoden, die es ermöglichen, Abstandsänderungen zwischen einzelnen Molekülen nachzuvollziehen. Hierbei demonstrieren wir, was Multiparameter-SMFS-Techniken, kombiniert mit durchdachter Datenanalyse, bei der Untersuchung und Kontrolle von komplexen Multichromophorsystemen und photonischen Leitern leisten, und wie die Zahl sowie relative Orientierung der wechselwirkenden Moleküle bestimmt werden können. Darüber hinaus beschreiben wir neue Techniken wie die Präzisionsdistanzmikroskopie zur Messung von Abständen zwischen einzelnen Molekülen unterhalb der optischen Auflösungsgrenze. Es werden Beispiele angeführt, wie jeder spektroskopisch zugängliche Parameter das Verständnis von komplexen biologischen Systemen verbessert. Den Abschluss bildet ein Ausblick, wie SMFS in Kombination mit optischen Pinzetten, neuen Markierungsstrategien und anderen Spektroskopietechniken, wie der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie, wichtige Beiträge zur Erforschung lebender Zellen leisten kann.

## 2. Grundlagen und technische Entwicklungen in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie

Wenn man sich all die technischen Entwicklungen und wissenschaftlichen Anstrengungen vor Augen führt, die für die ersten erfolgreichen Detektionen einzelner Moleküle 1989<sup>[31]</sup> und 1990<sup>[32]</sup> nötig waren, so erstaunt es, dass schon das an die Lichtverhältnisse angepasste menschliche Auge und ein Mikroskop mit hoher Sammeleffizienz genügen, um einzelne Rhodamin-Farbstoffmoleküle anhand ihres Fluoreszenzsignals zu detektieren. Daher werden für die SMFS eine Reihe unterschiedlicher Mikroskopietechniken verwendet, unter denen die Fernfeldmikroskopie mit einem modernen CCD-Detektor die einfachste ist.

Wenn unsere „Hauptfigur“, normalerweise ein Farbstoffmolekül, Laserlicht ausgesetzt ist, wird es aus dem Grundzustand,  $S_0$ , in höhere vibronische Niveaus des ersten angeregten Zustands,  $S_1$ , angeregt, worauf eine schnelle strahlungslose Relaxation in den niedrigsten  $S_1$ -Zustand folgt. Die optische Sättigung ist dann erreicht, wenn das Farbstoffmolekül mit der höchstmöglichen Geschwindigkeit zwischen den Zuständen  $S_0$  und  $S_1$  wechselt. Diese Geschwindigkeit hängt von der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_f$  des Farbstoffmoleküls ab (Abbildung 2a). Mehrere Desaktivierungswege in den Triplettzustand, wie das Intersystem Crossing, konkurrieren mit der Fluoreszenzemission und reduzieren so die Zahl emittierter Photonen. Außerdem ist die Zahl der Photonen, die von einem einzelnen Molekül emittiert werden können, durch irreversible Photozerstörungsprozesse begrenzt. Diese Photozerstörung ist eine intrinsische Eigenschaft aller konventionellen organischen Farbstoffmoleküle. Gewöhnliche Farbstoffmoleküle können bis zu  $10^6$  Photonen emittieren, bevor sie irreversibel zerstört werden. Normalerweise wird das Fluoreszenzsignal durch die Auswahl geeigneter Farbstoffe mit einem hohen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon(\lambda)$  bei der Anregungswellenlänge  $\lambda$ , einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  und hoher Photostabilität verbessert. Zusätzlich sollte die Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoff kurz sein (im Nanosekundenbereich), sodass er schnelle Anregungs-Emissions-Zyklen ausführen kann, und er sollte keine oder nur wenige Fluoreszenzunterbrechungen („Aus“-Zustände), etwa durch Übergänge in den Triplettzustand, aufweisen.

Der wichtigste Parameter in der SMFS ist das Signal-Rausch(S/R)-Verhältnis. In Bezug auf das Rauschen des beobachteten Signals ist das Schrotrauschen (shot noise) am wichtigsten, da es das S/R-Verhältnis grundsätzlich begrenzt. Unter realen Bedingungen muss zudem das Hintergrundrauschen (background shot noise) beachtet werden. Wenn das Signal-Hintergrund(S/H)-Verhältnis groß ist, tragen fast alle detektierten Photonen zur Bildinformation bei, und das Signal-Rausch-Verhältnis nähert sich dem Wert  $n^{1/2}$  (für ein Signal aus  $n$  Photonen). Bei kleinen S/H-Verhältnissen kann das erwartete Signal im Hintergrundrauschen untergehen, wobei sich das S/R-Verhältnis null annähert. Der Hintergrund stammt hauptsächlich von elastischen (Rayleigh-) und inelastischen (Raman-)Streuvorgängen an Lösungsmittelmolekülen sowie von autofluoreszierenden Verunreinigungen. Während Rayleigh-Streuung durch optische Filter effektiv unterdrückt werden kann, ist die Raman-Streuung, die direkt von



**Abbildung 2.** a) Ein allgemeines Modell mit drei elektronischen Zuständen beschreibt das photophysikalische Verhalten einzelner fluoreszierender Moleküle im Laserfokus. b) Die Beobachtung von Fluoreszenzsignalen einer  $10^{-11}$  M wässrigen Cy5-Lösung in aufeinander folgenden 1-ms-Zeitfenstern (Zählrate  $v_c$  gegen Zeit  $t$ ), aufgenommen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie mit gepulster Laseranregung bei 635 nm. Durchwandert ein Molekül das Beobachtungsvolumen, so werden bis zu 200 Photonen pro Millisekunde detektiert. c) Fluoreszenzintensitätskurve eines auf einem trockenen Deckglas immobilisierten einzelnen Cy5-Moleküls. Das Beispiel veranschaulicht ein allgemeines Verhalten: Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität einzelner Moleküle, da Quantenübergänge zwischen diskreten „An“- und nicht-emittierenden „Aus“-Zuständen, z. B. Triplettzuständen, mit hoher bzw. niedriger Intensität auftreten. Nach ca. 5.6 s wird der Farbstoff irreversibel photozerstört, was zum plötzlichen Abfallen der Fluoreszenzintensität führt.

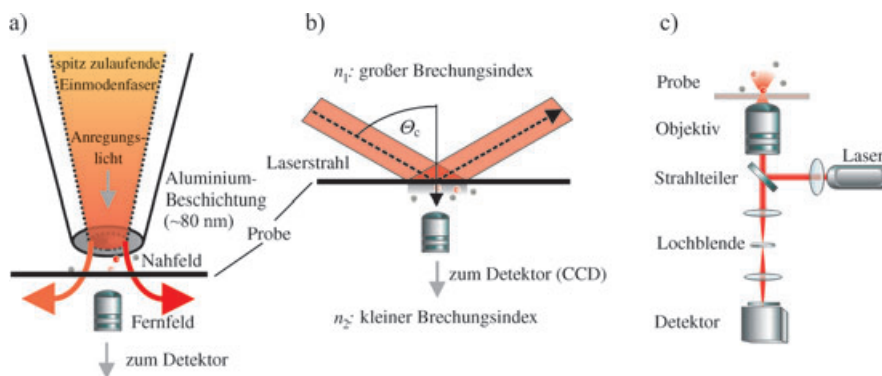
der Zahl der bestrahlten Lösungsmittelmoleküle abhängt, schwerer vollständig zu unterdrücken, da sie teilweise mit der Emissionswellenlänge des Farbstoffs überlappt. Die Autofluoreszenz von Verunreinigungen hängt stark von der Anregungs- und Detektionswellenlänge ab. Besonders in biologischen Proben können fluoreszierende Verunreinigungen die Messempfindlichkeit verringern oder gar den definitiven Nachweis einzelner fluoreszierender Moleküle unmöglich machen. Daher ist es in Ein-

zelmolekülexperimenten wünschenswert, mit Farbstoffen zu arbeiten, die im roten Spektralbereich absorbieren und emittieren. Nur wenige autofluoreszierende Verbindungen sind bekannt, die eine intrinsische Absorption und Emission oberhalb von 600 nm aufweisen.<sup>[33]</sup>

Da der Beitrag der Störquellen direkt proportional zur Zahl der Moleküle im Anregungsvolumen ist, stellt die Reduktion des Anregungs-/Detektionsvolumens den Schlüssel zu einem hohen S/R-Verhältnis dar. Eine SMFS-Methode beruht auf der hydrodynamischen Fokussierung eines Probenstroms in Durchflussküvetten auf  $< 10 \mu\text{m}$  Schichtdicke in Kombination mit gepulster Laseranregung und torgeschalteter Detektion zur Unterdrückung von Raman- und Rayleigh-Streuung.<sup>[33]</sup> Eine weitere Reduktion des Anregungsvolumens gelingt durch Laseranregung in einer 1) konfokalen, 2) evaneszenten oder 3) Nahfeldkonfiguration.

Nahfeldmikroskopie (Near-Field Scanning Optical Microscopy, NSOM) wurde ursprünglich zur Überwindung der optischen Beugungsgrenze entwickelt, die die räumliche Auflösung konventioneller optischer Verfahren auf ungefähr die halbe Wellenlänge des Lichts limitiert.<sup>[34,35]</sup> Mit NSOM erreicht man eine optische Auflösung unterhalb der Beugungsgrenze, in der Größenordnung von 50–100 nm. Dies gelingt dadurch, dass die Probe in einer Entfernung von etwa 5–10 nm zu einer optischen Apertur positioniert wird, die kleiner als die Wellenlänge ist. Somit erfahren die Photonen aus der Apertur keine Beugung (Abbildung 3 a). Den Vorteilen der NSOM, wie der Fähigkeit, spektroskopische mit topographischen Informationen zu verknüpfen, stehen einige Nachteile gegenüber, z. B. die Beeinflussung der Probe durch die nahe Spitze. Die NSOM deckt ein weites Forschungsfeld ab und findet selbst in der Biologie Anwendung, wenn gleichzeitig topographische und einzelmolekülempfindliche Fluoreszenzbilder auf den Membranen lebender Zellen aufgenommen werden sollen.<sup>[36–39]</sup>

Bei der konfokalen Mikroskopie wird ein Laserstrahl in einer Probe mithilfe eines Öl- oder Wasserimmersionsobjektivs hoher numerischer Apertur nahezu beugungsbegrenzt fokussiert.<sup>[40]</sup> Das gleiche Objektiv detektiert die Fluoreszenz und trennt diese mit einem dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht. (Abbildung 3 c). Eine kleine Lochblende (Durchmesser 50–100  $\mu\text{m}$ ) in der Bildebene dient dem Herausfiltern von Licht außerhalb des Laserfokus. Durch diese



**Abbildung 3.** Aufbau von a) optischer Rasternahfeldmikroskopie (NSOM), b) Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) und c) konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

Anordnung wird ein kleines, sphäroides Volumen von 0.5–1.0 Femtolitern in der Probe definiert. Rigler und Mitarbeiter waren die Ersten, die die konfokale Mikroskopie erfolgreich zur Detektion einzelner Moleküle einsetzten.<sup>[41,42]</sup>

Mit konfokaler Optik und Lawinenphotodioden (avalanche photodiodes, APDs) als Detektoren können einzelne Moleküle einfach mit hohem S/R-Verhältnis nachgewiesen werden. Die konfokale Mikroskopie wurde ebenso erfolgreich bei der Zweiphotonenanregung (Two-photon excitation, TPE) einzelner Moleküle eingesetzt.<sup>[43–45]</sup> Webb und Mitarbeiter haben die Prinzipien dieser Zweiphotonenmikroskopie aufgeklärt.<sup>[46]</sup> TPE-Wirkungsquerschnitte sind sehr klein (für die meisten Fluorophore in der Größenordnung von  $10^{-50}$  cm<sup>4</sup>s), sodass hohe Intensitäten und kurze Laserpulse (Pulsbreiten von ca. 100 fs), z. B. von gepulsten Ti:Saphir-Lasern, für eine effiziente TPE notwendig sind.<sup>[47,48]</sup> Die Anregung ist ein nichtlinearer Prozess zweiter Ordnung, und daher hängt die Anregungsrate quadratisch von der Laserintensität ab. Bei der Zweiphotonenanregung werden in der Regel niedrigere Fluoreszenzzählraten erzielt, da als Folge der effizienten Anregung innerhalb des Laserfokus eine ausgeprägte Photozerstörung auftritt (andererseits ist die Photozerstörung außerhalb des Fokus geringer). Da die SMFS auf hohe Fluoreszenzzählraten angewiesen ist, stellt die Einphotonenanregung für die meisten Anwendungen die Methode der Wahl dar. Außerdem führt die hohe Anregungsenergie, die zur Erzeugung des TPE-Fluoreszenzsignals notwendig ist, in einigen Fällen zu anderen nichtlinearen Prozessen, z. B. der Erzeugung eines Kontinuums im Lösungsmittel, die den Hintergrund verstärken und damit die Empfindlichkeit verschlechtern können. Andererseits kann die TPE in Zweifarben-Kreuzkorrelationsexperimenten eingesetzt werden, um die Koloaliation verschiedener Farbstoffe im Beobachtungsvolumen auf Einzelmolekülniveau zu messen.<sup>[49]</sup> Einer der wichtigsten Vorteile der Zweiphotonentechnik besteht in der Möglichkeit, bei unterschiedlichen Wellenlängen emittierende Farbstoffe mit Laserlicht einer einzigen Wellenlänge effizient anzuregen.

In Kombination mit der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) hat die konfokale Fluoreszenzmikroskopie breite Anwendung gefunden, vor allem in der Diagnostik und der evolutionären Biotechnologie.<sup>[50]</sup> FCS nutzt die Brownsche Molekularbewegung zum Transport einzelner oder weniger Moleküle in und aus dem Probenvolumen. Durch Berechnung der Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensitätsfluktuationen kann die zeitabhängige Dynamik genau ermittelt werden. Unterschiede zwischen einzelnen Molekülen können hierbei jedoch nicht detektiert werden, da die Photonenschauer vieler Moleküle zur Berechnung der Autokorrelationsfunktion verwendet werden. Weil die Empfindlichkeit der FCS für nanomolare Konzentrationen optimal ist,<sup>[51]</sup> müssen Zielmoleküle wie DNA oder RNA vor Hybridisierungsexperimenten vervielfältigt werden.

Photonenhistogramme (Photon Counting Histograms, PCHs) und Fluoreszenzintensitätsverteilungsanalyse (Fluorescence Intensity Distribution Analysis, FIDA) sind verwandte Techniken, die die Photonen in festgelegten Intervallen zählen und diese Messungen mit einem theoretischen Modell beschreiben, um Moleküle unterschiedlicher „Hellig-

keiten“ zu erkennen.<sup>[52–54]</sup> Bei Fluoreszenzintensitätsanalysen multipler Verteilungen (FIMDA) wird ein ähnliches Photonenhistogramm verwendet, da man hier aber mit variablen Zeitintervallen arbeitet, erhält man gleichzeitig Informationen über Helligkeit und Diffusion.<sup>[55]</sup> In der neuesten Autokorrelationsmethode, der Intervallverteilung der Photonenankunftszeiten (photon arrival-time interval distribution, PAID) wird der Autokorrelationsansatz der FCS mit einem Photonenhistogramm verknüpft, um Informationen auf mehreren spektralen Kanälen zu erhalten.<sup>[56]</sup>

Fernfeld-CCD-Bildgebung verfügt nicht über die hohe zeitliche Auflösung einer APD (ca. 100 ps) und erreicht nicht die besten S/H-Verhältnisse, da mehr Hintergrundsignal von nicht im Fokus liegenden Quellen gesammelt wird. Andererseits bietet die Technik den Vorteil der parallelen Detektion und die Möglichkeit, statistische Daten über das Verhalten vieler einzelner Moleküle parallel bei einer zeitlichen Auflösung im Millisekundenbereich zu gewinnen.<sup>[57]</sup> Dies ist besonders wichtig, wenn irreversible Reaktionen beobachtet werden, wie etwa bei der Entzwingung immobilisierter DNA-Moleküle durch eine Helicase.<sup>[58]</sup> Bei diesem Experiment beginnen die Helicase-Moleküle nahezu gleichzeitig, die DNA-Moleküle zu entspiralisieren. In einem konfokalen Experiment könnte man bei jeder Probenpräparation nur ein einziges Molekül beobachten.

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung statistischer Daten von vielen einzelnen Molekülen, mit niedriger zeitlicher Auflösung aber hohem S/H-Verhältnis, stellt die Anregung mittels totaler interner Reflektion (Total Internal Reflection, TIR) von Fluoreszenz in der Nähe dielektrischer Übergänge dar (Abbildung 3b).<sup>[59,60]</sup> Normalerweise dient zur evaneszenten Anregung ein Prisma<sup>[61]</sup> oder ein Objektiv<sup>[62]</sup> an einer Glas-Flüssigkeit- oder Flüssigkeit-Luft-Grenzfläche. Am Übergang sinkt die Lichtintensität nicht schlagartig auf null, sondern sie fällt exponentiell in der flüssigen Phase bzw. der Luft ab. Dort können nur Moleküle in einer etwa 200 nm dünnen Schicht am Phasenübergang angeregt werden, sodass nur ein sehr kleines Volumen beleuchtet wird und man daher gute S/H-Verhältnisse erhält. TIR kann besonders gut an Grenzflächen zwischen Phasen mit unterschiedlichen elektromagnetischen Eigenschaften eingesetzt werden, und mit dieser Methode wurden fluoreszenzmarkierte Myosin- und Kinesin-Molekülen beobachtet sowie Reaktionen mit ATP-Umsatz einzeln gemessen.<sup>[61,63–65]</sup> Evaneszente Anregung wurde auch erfolgreich zur zwei- oder dreidimensionalen Messung der strukturellen Dynamik von einzelnen Myosin-V-Motorproteinkomplexen eingesetzt.<sup>[66]</sup>

Prinzipiell können Einzelmolekülexperimente entsprechend ihrer Zielsetzung in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. In vielen Anwendungen, wie der DNA-Sequenzierung, ist es notwendig, die detektierten Fluoreszenzsignale einzelner Moleküle zu klassifizieren und/oder zwischen verschiedenen Molekülen zu unterscheiden. Das bedeutet die Identifizierung und Analyse der statischen Eigenschaften frei diffundierender oder immobilisierter Moleküle. In anderen Anwendungen müssen einzelne Moleküle über lange Zeiträume beobachtet werden, um Informationen über ihre Beweglichkeit und ihre Trajektorien zu erhalten. Schließlich werden Einzelmolekülexperimente zur Untersuchung der

individuellen Dynamik in heterogener Umgebung oder der Konformationsdynamik von Polymeren oder Biomolekülen eingesetzt.

Theoretisch können einzelne fluoreszierende Moleküle anhand einiger charakteristischer Eigenschaften identifiziert werden: 1) der Fluoreszenzintensität, 2) der Fluoreszenzlebensdauer,<sup>[67,68]</sup> 3) des Emissionsspektrums,<sup>[10,69]</sup> 4) des Diffusionskoeffizienten (in Lösung)<sup>[70]</sup> und 5) der Fluoreszenzanisotropie.<sup>[71]</sup> Da aber die Trajektorie jedes frei beweglichen Moleküls durch die Brownsche Molekularbewegung sowie durch Einflüsse der Umgebung bestimmt wird, hat die Zahl der detektierten Fluoreszenzphotonen eine breite statistische Verteilung. Auch wenn die gesamte Fluoreszenzintensitätsverteilung für eine Spezies gut definiert sein kann,<sup>[52,53,55,56]</sup> gilt dies nicht für Einzelereignisse. Daher ist die Fluoreszenzintensität kein adäquater Parameter, um ein einzelnes Molekül zu identifizieren oder die individuelle Dynamik zu bestimmen, da eine Reihe verschiedener Prozesse Intensitätsfluktuationen verursachen können. Hierzu gehören Änderungen der räumlichen Orientierung, „Blinking“ durch photophysikalische oder photochemische Prozesse oder unkorrelierte Veränderungen in der Umgebung des Fluorophors.<sup>[72–79]</sup>

Glücklicherweise helfen andere Eigenschaften von Fluoreszenzphotonen, Veränderungen an den untersuchten Molekülen zu erkennen. Neben den Informationen, die Fluoreszenzlebensdauer, Intensität, Emissionsspektrum und Fluoreszenzanisotropie zur Dynamik des untersuchten Systems liefern, sollte man berücksichtigen, dass ein bestimmter Fluorophor nur eine beschränkte Zahl von Photonen aussenden kann. Ein eleganter Weg, möglichst viel über ein einzelnes fluoreszierendes Molekül zu erfahren, ist die parallele Betrachtung verschiedener Fluoreszenzeigenschaften.<sup>[80–82]</sup> Bei statischen Untersuchungen kann die Zuordnungssicherheit durch verschiedene Parameter verbessert werden,<sup>[71,82]</sup> um einen einzelnen Fluorophor von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden; das ist besonders in Zellen und Gewebe von Interesse,<sup>[83]</sup> oder um lokale Heterogenitäten zu erkennen.<sup>[76,84]</sup> Die parallele Aufzeichnung spektroskopischer Parameter (Multiparameteranalyse) schafft die Grundlage für Einzelmolekültechniken, die unser Verständnis der spektroskopischen Dynamik und der Fluoreszenzwechselwirkungen verbessern.<sup>[78,85–88]</sup> Darüber hinaus bietet die SMFS einen weiteren nützlichen Parameter, der Ensemblemethoden verschlossen bleibt: die Photonenstatistik. Anwendungsbeispiele für Multiparameter-SMFS und insbesondere die Auswertung dieses fünften, nichtklassischen Fluoreszenzparameters werden im Folgenden beschrieben.

### 3. Multiparameter-SMFS, Photonenstatistik und Auswertung

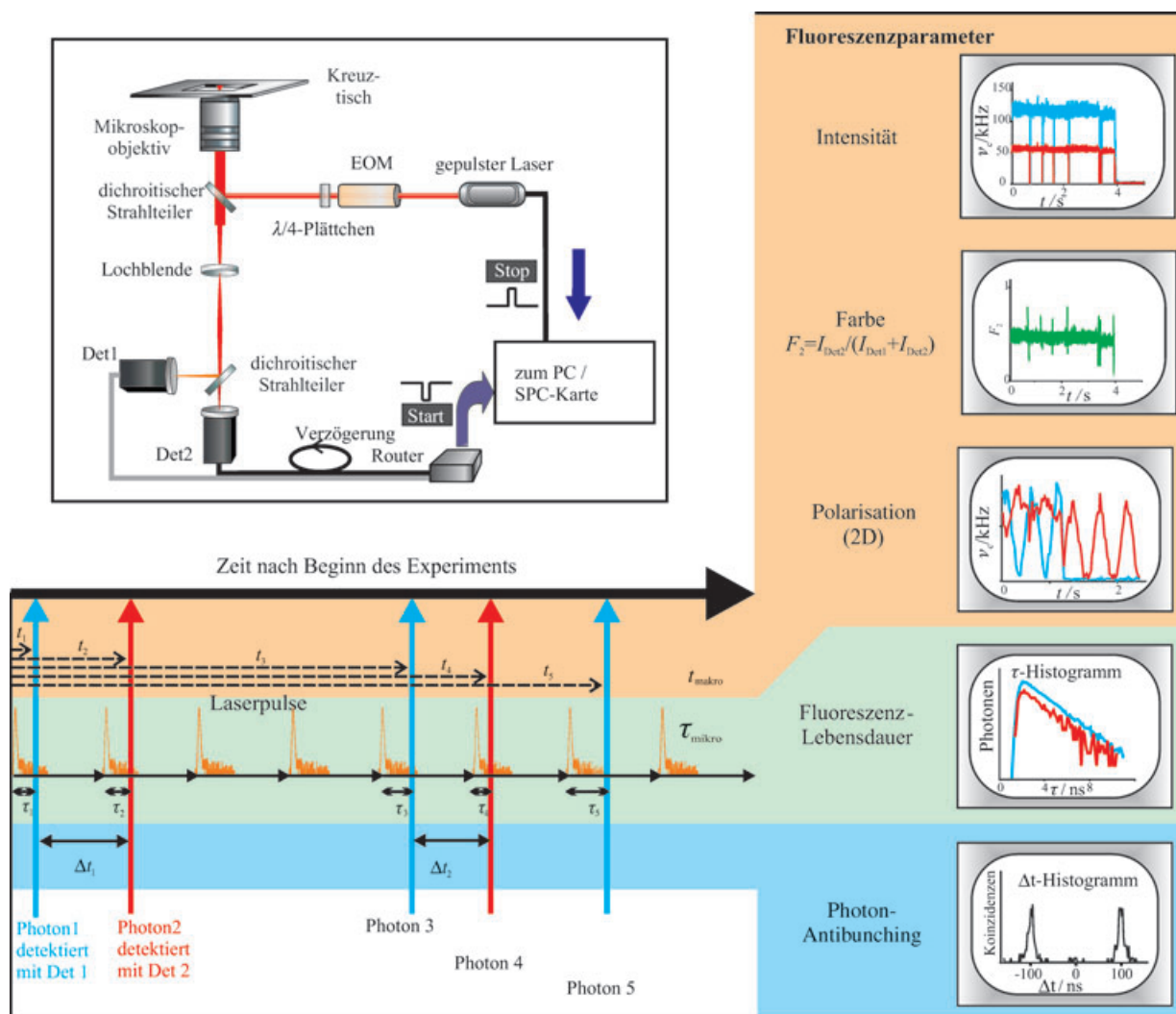
Aus klassischer Sicht können Fluktuationen in der Zahl detektierter Photonen nicht weiter reduziert werden als in einem Lichtfeld, das der Poisson-Statistik unterliegt, d. h. in unkorreliertem Licht. Aus quantenmechanischer Sicht sind aber Zustände möglich, bei denen die Photonenverteilung enger ist als durch die Poisson-Verteilung vorhergesagt. Diese

Zustände haben keine klassische Entsprechung und beweisen direkt die Teilchennatur des Lichts. Um eine Sub-Poisson-Verteilung zu erreichen, müssen die Photonen zeitlich separiert sein. Ein einfaches System, das eine Lichtquelle für nichtklassisches oder Sub-Poisson-Licht darstellen kann, ist ein Zweiniveau-Quantensystem, z. B. das vereinfachte Modell eines einzelnen Fluorophors.

Nach der Emission eines Photons benötigt ein Fluorophor eine gewisse Zeit, um den angeregten Zustand wieder zu bevölkern und das nächste Photon zu emittieren. Dies kann mit einem Histogramm veranschaulicht werden, in dem die Zeitabstände zwischen zwei aufeinander folgenden Photonen dargestellt sind. Bei gepulster Anregung mit Laserpulsen, die wesentlich kürzer sind als die Lebensdauer des angeregten Zustands, werden keine Photonenpaare (Koinzidenzen) innerhalb eines Laserpulses detektiert. Andererseits besteht gemäß der Poisson-Statistik eine Wahrscheinlichkeit, in zwei aufeinander folgenden Laserpulsen zwei Photonen zu detektieren. Für zwei Moleküle ist die Wahrscheinlichkeit, zwei Photonen innerhalb eines Laserpulses zu detektieren, nur halb so groß wie diejenige der Detektion zweier Photonen in aufeinander folgenden Laserpulsen.<sup>[89,90]</sup> Analog beträgt die Wahrscheinlichkeit für drei Moleküle 0.67 und für vier Moleküle 0.75, usw., bis die klassische Grenze von 1 für ein Ensemble erreicht wird. Daher liefert die Wahrscheinlichkeit, zwei Photonen innerhalb eines Laserpulses zu detektieren, Informationen über die Zahl der emittierenden Spezies. Wenn bekannt ist, wie viele Fluorophore vorliegen, kann umgekehrt das Fehlen von Koinzidenzen auf Annihilationsprozesse hindeuten und helfen, molekulare Wechselwirkungen in Multichromophorsystemen aufzuklären.<sup>[85,91]</sup>

Abbildung 4 zeigt schematisch den experimentellen Aufbau für die Multiparameter-SMFS. Üblicherweise wird die Probe von einem gepulsten Laser mit einer bestimmten Repetitionsrate angeregt, die den Abstand zwischen aufeinander folgenden Laserpulsen vorgibt. Das Fluoreszenzsignal wird von einem dichroitischen Spiegel geteilt und von zwei einzelphotonenempfindlichen Lawinendioden (APDs) detektiert. Die Ausgangssignale der APDs (TTL-Pulse) werden in speziell für Einzelmolekülexperimente entwickelte PC-Steckkarten für die zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung (time-correlated single-photon counting, TCSPC) geleitet, die mehrere Detektoren erfassen können und sich durch eine hohe Zeitauflösung bei kleinen Totzeiten auszeichnen (z. B. TimeHarp200 von Picoquant oder SPC-630 von Becker&Hickl). Für jedes detektierte Photon werden drei Informationen gespeichert: 1) die Ankunftszeit nach Beginn der Messung mit einer Zeitauflösung von 50 ns, 2) der zeitliche Abstand zwischen Laserpuls und Photonendetektion mit einer Zeitauflösung von 8 ps (diese werden hier als makroskopische Zeit,  $t_{\text{makro}}$ , bzw. mikroskopische Zeit,  $\tau_{\text{mikro}}$ , bezeichnet) und 3) der Kanal, auf dem das Photon detektiert wurde (Detektor 1 oder 2). Da TCSPC-Karten Totzeiten von 100–300 ns haben, ist es notwendig, eines der beiden APD-Signale elektronisch zu verzögern, um zwei Photonen, die auf denselben Laserpuls folgen, registrieren zu können. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten, die an beiden APDs detektiert werden, wird als anteilige Intensität  $F_2$  ( $F_2 = I_{\text{Det2}} / (I_{\text{Det1}} + I_{\text{Det2}})$ ) bezeichnet und liefert Informationen über das





**Abbildung 4.** Aufbau für Multiparameter-SMFS inklusive Photon-Antibunching und polarisationsmodulierter Anregungsspektroskopie.

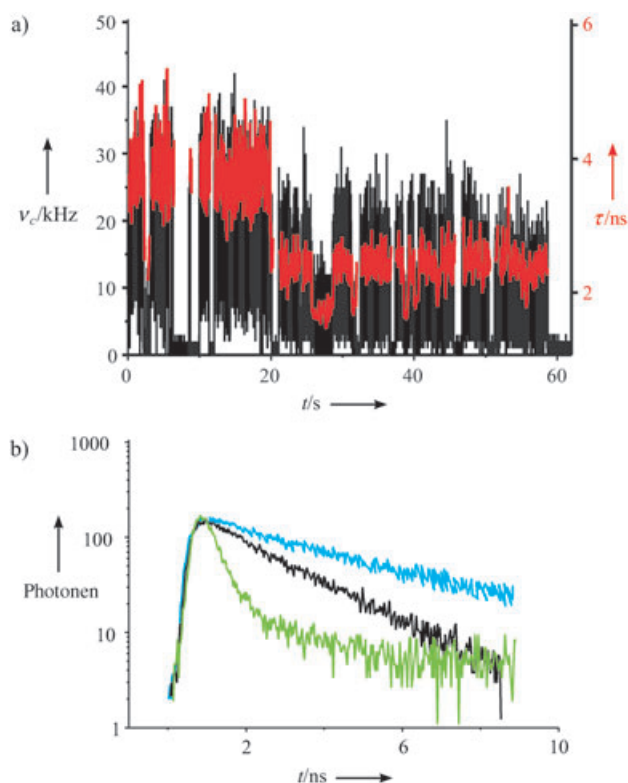
Emissionsmaximum des Fluorophors, was die Beobachtung spektraler Fluktuationen ermöglicht. Wird mit linear polarisiertem Licht angeregt und die Polarisation des Fluoreszenzsignals senkrecht und parallel gemessen, so kann man die Fluoreszenzanisotropie einzelner Moleküle bestimmen. Rotation des linear polarisierten Laserlichts mithilfe eines elektro-optischen Modulators (EOM) liefert Informationen über die Zahl der absorbierenden Spezies und ihre relative Orientierung.<sup>[85,91]</sup> Die Zeitabstände zwischen zwei aufeinander folgenden Photonen, die auf beiden APDs bei zirkular polarisierter Anregung gewonnen werden, führen zu Koinzidenzhistogrammen mit direkten Informationen über die Zahl der emittierenden Spezies (Photon-Antibunching-Experimente).<sup>[90]</sup>

Der beschriebene Aufbau und die Datenerfassung ermöglichen das Erstellen von Fluoreszenzintensitäts- und Lebensdauerkurven für jeden Detektor in einem Schritt. Histogramme der makroskopischen Photonenankunftszeiten in vorher unterteilten Zeitabschnitten veranschaulichen die Intensitätsänderungen mit der Zeit (Abbildung 5). Das Histogramm der mikroskopischen Zeiten entspricht einer Fluor-

reszenzabklingkurve. Bei diesem „Photon-für-Photon“-Detektionsmodus werden Fluoreszenzintensitäten und Lebensdauerkurven entweder mit einem gleitenden Verfahren analysiert (Abbildung 5a),<sup>[92,93]</sup> oder es können zustandsspezifische Fluoreszenzabklingkurven erhalten werden (Abbildung 5b).<sup>[78]</sup> Beim gleitenden Verfahren wird die Signalspur der mikroskopischen Ankunftszeiten in eine Folge von Fluoreszenzhistogrammen mit konstanter Zahl von Ereignissen zusammengefasst (z. B. 500 gezählte Photonen), die daraufhin mit einem Maximum-Likelihood-Schätzer (MLE) analysiert werden.<sup>[94–97]</sup> Zustandsspezifische Fluoreszenzabklingkurven erhält man aus den mikroskopischen Ankunftszeiten, bezogen auf den Laserpuls, wenn alle Photonen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität berücksichtigt werden.

Obwohl man mit zwei Kanälen nur eine schlechte spektrale Auflösung erhält, kann man mit diesem einfachen Aufbau doch leicht spektrale Schwankungen auf der Millisekunden-Zeitskala verfolgen, was die Identifizierungsgenauigkeit für einzelne Fluorophore entscheidend verbessern kann.<sup>[78, 98]</sup> Zwei Detektoren werden auch für Photon-Antibunching-Messungen in einem Aufbau benötigt, der dem

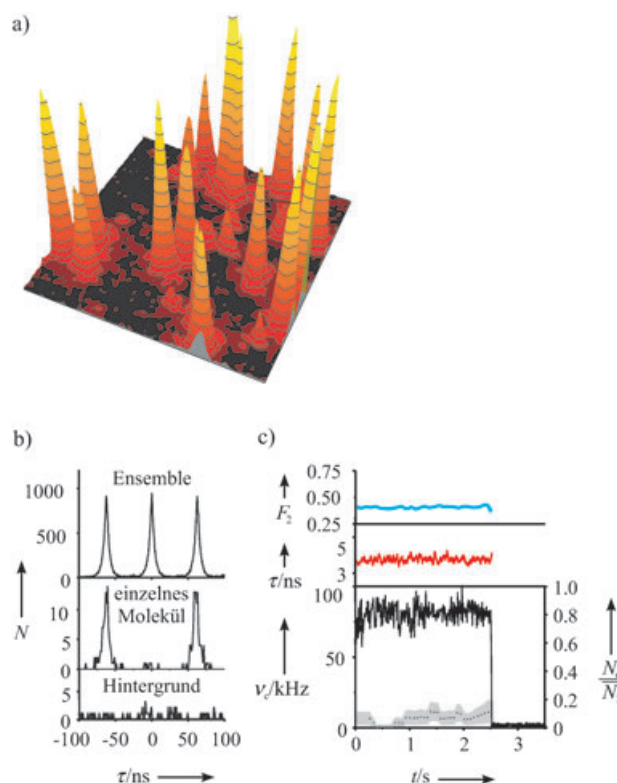




**Abbildung 5.** a) Fluoreszenzintensität (schwarz; Zählrate  $\nu_c$  gegen die Zeit  $t$ ) und Lebensdauer (rot) für ein einzelnes Oxazinmolekül, das auf einem Deckglas adsorbiert und in den Fokus einer gepulsten Laserdiode (635 nm) gebracht wurde. Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern wurden für jeden Datenpunkt 500 aufeinander folgende Photonen analysiert.<sup>[78]</sup> b) Zustandsspezifische Fluoreszenzabklingkurven der drei in a) gezeigten verschiedenen Intensitätsstufen mit  $\nu_c > 22$  kHz (blau), 10–22 kHz (schwarz) und 2–10 kHz (grün).

Experiment von Hanbury-Brown und Twiss ähnelt.<sup>[99]</sup> Hierbei wird die Probe mit zirkular polarisiertem Licht angeregt, und das Signal wird – wahlweise durch einen nichtpolarisierenden 50:50-Strahlteiler oder einen dichroitischen Strahlteiler – auf zwei APDs aufgeteilt. Die Verzögerung zwischen zwei aufeinander folgenden Photonen wird in Interphotonenzeit-Histogrammen dargestellt. Eine angemessene zeitliche Verzögerung für das Signal eines Detektors ermöglicht die Detektion von quasi gleichzeitig ankommenden Photonen. Damit umgeht man die gerätebedingte Totzeit, die von den Detektoren und der Datenaufnahme-Elektronik herrührt.

Die Interphotonenzeiten werden um den Verzögerungsfaktor korrigiert und erkennen direkt Photonenpaare, die vom gleichen Laserpuls ausgelöst wurden. Wie für ein Molekülensemble (eine Poisson-Lichtquelle) erwartet, zeigt das beobachtete Bandenmuster klar das klassische Verhalten: Die Intensität der zentralen Bande  $N_c$  ist ebenso hoch wie diejenige der benachbarten Banden  $N_l$  (Abbildung 6b). Im Einzelmolekülfall verschwindet die zentrale Bande hingegen, da die Wahrscheinlichkeit, mehr als ein Photon pro Laserpuls zu detektieren, vernachlässigbar gering ist. Nur wenige Hintergrund-Hintergrund-, Hintergrund-Signal- und Signal-Hintergrund-Ereignisse tragen zur zentralen Bande bei.



**Abbildung 6.** a) Konfokales Fluoreszenzbild einer  $6 \times 6 \mu\text{m}^2$  großen Fläche mit durchschnittlich ca. 0.5 Rhodamin-Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$ . Fluoreszierende Moleküle im Laserfokus erzeugen zu bestimmten Zeiten Fluoreszenzphotonen, im Beispiel alle 62.5 ns jeweils nach Anregung mit einem Laserpuls (dies entspricht der Anregungsfrequenz von 16 MHz). b) Histogramme der Interphotonenzeiten  $\Delta t$  für ein Ensemble von Rhodamin-Molekülen in Lösung ( $10^{-8}$  M) und einen einzelnen Emittor. c) Multiparameteranalyse der Daten für ein Rhodamin-Molekül: Fluoreszenzintensitätskurve (schwarz; Zählrate  $\nu_c$  gegen die Zeit  $t$ ), Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  (rot) und anteilige Intensität  $F_2 = I_{\text{Det2}} / (I_{\text{Det1}} + I_{\text{Det2}})$ , berechnet aus den Intensitäten, die nach dem Teilen des Strahls von Detektor 1 und Detektor 2 registriert werden (blau). Zusätzlich ist die Antibunching-Signatur durch das Verhältnis der Fläche der Zentralbande zu den Flächen der Seitenbanden ( $N_c/N_l$ ) als graue Punkte abgebildet. Der hellgraue Bereich zeigt den statistischen Fehler für  $N_c/N_l$ .

Bei einer Hintergrundzählrate von ca. 2 kHz kann man für einzelne Rhodamin-Derivate, die auf einer trockenen Oberfläche adsorbiert sind, S/H-Verhältnisse von 30–50 erhalten.<sup>[89]</sup> Daraus resultieren hohe Verhältnisse zwischen den seitlichen und der zentralen Bande bei einem einzelnen Molekül (z. B. 20, entsprechend  $N_c/N_l = 0.05$ , in Abbildung 6b). In früheren Antibunching-Studien wurden entweder Fluorophore in biologisch nicht relevanter Umgebung untersucht,<sup>[100,101]</sup> oder es musste über viele Moleküle gemittelt werden, um eine für Antibunching-Experimente ausreichende Photonenstatistik zu erhalten.<sup>[102,103]</sup> Andererseits liefern Experimente mit gepulster Laseranregung in weniger als einer Sekunde ein Photon-Antibunching-Signal von einzelnen Standardfluorophoren, die bei Raumtemperatur auf einer trockenen Oberfläche adsorbiert sind.<sup>[89]</sup> Der Hauptvorteil dieser Photon-Antibunching-Experimente liegt darin, dass die gewünschte Sättigung der Singulettübergänge des

Moleküls erreicht werden kann, ohne dass der Triplettzustand, der bekanntlich eine Zwischenstufe bei der Photozerstörung darstellt, zu stark besetzt wird.

Wie Abbildung 6c zeigt (graue Quadrate), kann sogar die Dynamik des Strahlungsfelds gemessen werden, die von einer variierenden Zahl von Molekülen im Laserfokus herührt.<sup>[89,90]</sup> Da das Verhältnis  $N_2/N_1$  fast konstant unter 0.2 bleibt, weist die Photonenwahrscheinlichkeitsverteilung während des gesamten Experiments starken Sub-Poisson-Charakter auf, d.h. das gemessene Lichtfeld stammt von einem einzigen Rhodamin-Molekül.

Informationen über die Ausrichtungen der Übergangsdipolmomente der untersuchten Fluorophore können mit verschiedenen Aufbauten erhalten werden. Mit der Kombination eines EOMs und eines  $\lambda/4$ -Plättchens kann man die Polarisationssebene des linear polarisierten Anregungsstrahls drehen, um die Orientierung verankerter Moleküle anhand der Phasenverschiebung des emittierten Lichts aufzuklären.<sup>[76,79,91,104]</sup> Die Anregung mit zirkular polarisiertem Licht und die anschließende Messung der Polarisationsrichtung nach der Emission, z.B. in einem Aufbau mit zwei Detektoren, kann gleichwertige Informationen liefern. Unter Verwendung von linear polarisiertem Licht kann so auch die Polarisationsanisotropie einzelner Moleküle bestimmt werden.<sup>[105]</sup>

Wie bereits erwähnt, können mehrere Fluoreszenzparameter einzelner Moleküle mithilfe von Bildgebungsverfahren parallel erfasst werden. Konfokale Methoden haben jedoch eine höhere Zeitaufösung (gewöhnlich  $\mu\text{s}$  verglichen zu ms bei Bildgebungsverfahren). Außerdem sind nicht alle Parameter in Bildgebungsverfahren zugänglich: Beispielsweise bleiben die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer und das Photon-Antibunching der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie vorbehalten. Obwohl die Fluoreszenzlebensdauer in Bildgebungsverfahren ermittelt werden kann, wenn man eine verstärkte CCD-Kamera mit zeitlicher Torschaltung verwendet, würde dies in Einzelmolekülexperimenten zu sehr langen Messzeiten führen (um die gesamte Abklingkurve im Zeitfenster zu erfassen), die die begrenzte Photostabilität konventioneller Fluorophore überfordern. Andere Parameter wie Farbe und Polarisation können aber gemessen werden, wenn man ein Doppelabbildungsverfahren anwendet, das ursprünglich von der Gruppe von Kinosita entwickelt wurde.<sup>[106]</sup> Hierbei wird das Signal in Bezug auf die zu messende Eigenschaft geteilt (z.B. mit einem dichroitischen Spiegel für Farbe oder einem polarisierenden Strahlteiler für die Polarisation), und nachfolgend auf verschiedenen Bereichen des CCD-Chips abgebildet. Dieser Ansatz hat sich für Multiparametermessungen bewährt und wurde vor kurzem auf die gleichzeitige Detektion von Farbe und Polarisation mit nur einer CCD-Kamera ausgedehnt.<sup>[107]</sup>

#### 4. SMFS zur Untersuchung von Struktur und Dynamik

Ein Trend in der SMFS geht hin zur Untersuchung von Multichromophorsystemen. Hierbei können zwei Kategorien unterschieden werden: die Untersuchung der Grundlagen

molekularer Wechselwirkungen auf Einzelmolekülebene und der Einsatz von Energietransferprozessen zur Messung von Abständen.

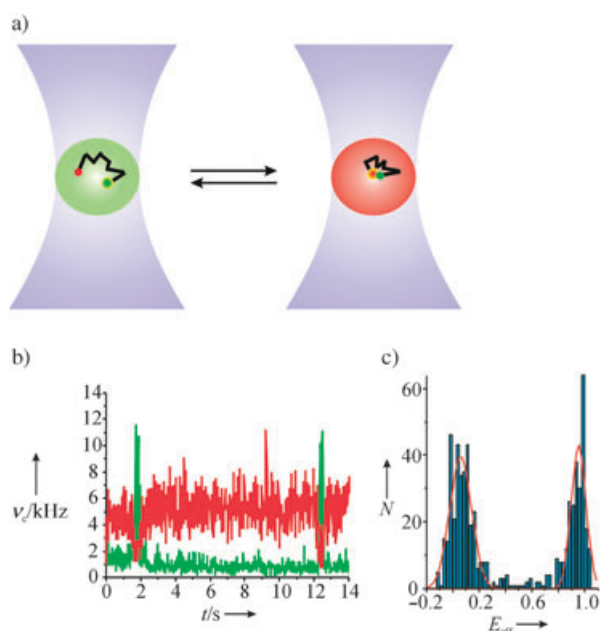
Um die Konformationsdynamik von Biomolekülen zu untersuchen, wie etwa bei der Proteinfaltung, müssen Abstandsänderungen zwischen bestimmten Aminosäuren oder Nucleinsäuren innerhalb der Polymerkette mit hoher Zeitauflösung gemessen werden. Aus spektroskopischer Sicht kann jede abstandsabhängige Methode, Energie-, Protonen- oder Elektronentransfer, verwendet werden, um Konformationsänderungen zu verfolgen – vorausgesetzt, diese führen zu strukturellen Änderungen in der Wechselwirkung mit Sonden-molekülen wie Fluorophoren. In diesem Zusammenhang sind die längerreichweitigen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beim resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) für biologische Systeme besonders wichtig.

##### 4.1. Der resonante Fluoreszenzenergietransfer (FRET)

Beim FRET findet eine strahlungslose Übertragung von Elektronenanregungsenergie von einem angeregten Donor  $D^*$  auf einen Acceptor A statt, der sich im Grundzustand befindet. Die Effizienz dieser Dipol-Dipol-Wechselwirkung hängt vom Abstand der Fluorophore, von der spektralen Überlappung von Donoremmission und Acceptorabsorption (dem Überlappungsintegral), vom Brechungsindex des Mediums, von der Quantenausbeute des Donors und von der relativen Orientierung der beiden Fluorophore ab. Energietransfer nach Förster erfolgt zwischen erlaubten Singulett-Singulett- sowie Singulett-Triplett-Übergängen, wenn die Emission von  $D^*$  und die Absorption von A deutlich überlappen. Für solche Übergänge beträgt der Förster-Radius  $R_0 = 20\text{--}80 \text{ \AA}$ . Der Förster-Radius gibt den Abstand an, bei dem die Transfereffizienz 50% beträgt. Wegen der starken Abstandsabhängigkeit (die Effizienz fällt mit der sechsten Potenz des Abstands ab) ist FRET ideal, um Informationen über Struktur und Dynamik von Biomolekülen zu gewinnen.<sup>[108–114]</sup> In Kombination mit SMFS ist Single-Pair-FRET (spFRET) geeignet, Konformationsänderungen in Proteinketten zu messen, wie eine Reihe von Anwendungen in der „Dynamischen Strukturbiologie“ belegt.<sup>[115,116]</sup>

spFRET ist seit der Einführung im Jahr 1996 zu einer der beliebtesten Methoden in der SMFS aufgestiegen, da der Messbereich von FRET Abstände einschließt, in denen viele wichtige biologische Prozesse ablaufen (Abbildung 7). Insbesondere die Gruppen um Ha und Weiss haben das Potenzial von spFRET für die Untersuchung von Konformationsänderungen an einzelnen Biomolekülen auf der Millisekunden-Zeitskala gezeigt: Beispiele hierfür sind das Entspiralisieren einer DNA durch ein Helicase-Molekül oder die  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige RNA-Dynamik und Proteinfaltung.<sup>[116–124]</sup>

Deniz et al.<sup>[117]</sup> untersuchten mit spFRET die Faltung des Chymotrypsin-Inhibitors 2 (CI2), eines einfachen Proteins mit einer Domäne. CI2 wurde als Modellsystem gewählt, da es in zwei Faltungszuständen vorliegen kann. Gefaltete und ungefaltete Subpopulationen konnten durch die Messung frei diffundierender Proteinmoleküle nachgewiesen werden. Unterschiedliche Donor-Acceptor-Abstände im gefalteten und



**Abbildung 7.** a) Prinzip von spFRET zum Studium der Konformationsdynamik von Biomolekülen. Die untersuchten Moleküle wurden spezifisch mit einem Donor- (grün) und einem Acceptorfarbstoff (rot) markiert. Bei hinreichend kurzem Donor-Acceptor-Abstand wird die Anregungsenergie des Donors auf den Acceptor übertragen. b) Fluoreszenzkurve (Zählrate  $\nu_c$  gegen die Zeit  $t$ ) einer einzelnen Donor-Acceptor-markierten DNA-Haarnadelschleife (Cy3-5'-CCCCTAAGTAGTTC-CTCACT(Cy5)AGGGG-3'), die durch Biotin-Streptavidin-Bindung im Laserfokus immobilisiert wurde. Strukturänderungen wie das Öffnen und Schließen der Haarnadelschleife äußern sich direkt als Änderungen der FRET-Effizienz (z. B. bei  $t \approx 2$  und  $12$  s). c) Hintergrundkorrigierte FRET-Effizienz-Histogramme ( $E_{\text{eff}} = I_A / (I_A + I_D)$ ), gewonnen aus Fluoreszenzsignalen einzelner Cy3/Cy5-markierter Doppelstrang-Oligonucleotide (Donor-Acceptor-Abstand ca.  $3.4$  nm, entsprechend  $10$  Basenpaaren), die frei durch das Beobachtungsvolumen diffundieren, und entsprechende Gauß-Anpassungen. Das große Signal bei  $E_{\text{eff}} = 0$  stammt von nur mit dem Donor markierter DNA (nicht hybridisierte Cy3-Oligonucleotide) und Photozerstörung des Acceptors. Das Erscheinen zweier Maxima im FRET-Effizienz-Histogramm anstelle einer breiten Verteilung impliziert, dass Konformationsfluktuationen zwischen verschiedenen Zuständen mit unterschiedlichen Donor-Acceptor-Orientierungen oder -Abständen langsamer sind als die durchschnittliche Messdauer (typischerweise  $0.5$ – $1$  ms). Wären die Konformationsfluktuationen schneller als die Messdauer (die der Diffusionszeit entspricht), so wäre das Signal für hohe FRET-Effizienz verbreitert oder zu niedrigeren FRET-Effizienzen verschoben.

ungefalteten Zustand führen zu unterschiedlichen FRET-Effizienzen. Diese Subpopulationen können klar unterschieden werden, da jedes Molekül einzeln beobachtet wird.

Eaton und Mitarbeiter studierten die Denaturierung eines Polypeptids durch Messung der spFRET-Effizienzen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Denaturierungsreagens.<sup>[3]</sup> Sie konnten zeigen, dass dynamische Informationen, wie die Geschwindigkeit, mit der sich das Polypeptid umwandelt, aus der Verteilungsbreite der spFRET-Effizienzen abgeleitet werden können. Von der Rekonfigurationszeit kann man wiederum auf die Höhe der Energiebarriere der Faltung schließen. Da Hunderte bis Tausende

Ereignisse innerhalb weniger Minuten registriert werden, können Einzelmolekülstudien gut zwischen den Subpopulationen in Ensembles von Analytmolekülen unterscheiden (Abbildung 7c).<sup>[92,125,126]</sup> Der Wechsel zwischen Haarnadelkurven- (hairpin) und Schleifen-Form (loop) von DNA gehört zu den schnellsten Konformationsänderungen, die bisher auf Einzelmolekülebene beobachtet wurden. Mit einer Kombination aus FRET- und FCS-Experimenten wurden die Geschwindigkeiten für das Öffnen und Schließen von DNA-Haarnadelkurven – in Abhängigkeit von der Größe und Sequenz der Kurve und des Stamms – im  $10$ - $\mu$ s-Bereich bestimmt.<sup>[127–129]</sup>

Informationen zu langsameren Konformationsänderungen von Biopolymeren, etwa die Geschwindigkeiten der Übergänge zwischen unterschiedlich gefalteten Zuständen, sind zugänglich, indem man die Trajektorien einzelner, auf einer modifizierten Glasoberfläche immobilisierter DNA-, RNA- oder Protein-Moleküle in Echtzeit aufzeichnet (Abbildung 7b). Hierbei muss sichergestellt werden, dass das Verhalten durch die Immobilisierung so wenig wie möglich gestört wird.<sup>[130–132]</sup> Vor kurzem wurde eine Immobilisierungsmethode vorgestellt, die die Beobachtung einzelner Proteinemoleküle frei von Oberflächeneffekten möglich macht.<sup>[124]</sup> Rhoades und Mitarbeiter beobachteten die Faltung und Entfaltung von Adenylat-Kinase-Molekülen über mehrere Sekunden. An definierten Stellen D/A-markierte Proteinemoleküle wurden in oberflächenverankerten Lipidvesikeln eingeschlossen. Auf diese Weise wurde eine räumliche Einschränkung erreicht, ohne dass es zu einer Wechselwirkung mit der Oberfläche kam. Ferner können durch die gleichzeitige Bestimmung von Donorlebensdauer, Fluoreszenzintensität und -anisotropie die beiden wichtigsten Fehlerquellen für FRET-Abstandsmessungen, lokale Löscheffekte und eingeschränkte Chromophorbewegung, ausgeschlossen werden.<sup>[105,133]</sup> Verfeinerte Markierungsmethoden und neue Multiparameter-spFRET-Experimente führten zur direkten Beobachtung der durch Protonen angetriebenen Rotation der Untereinheiten in membrangebundenen  $F_0F_1$ -ATP-Synthetase-Molekülen.<sup>[134]</sup>

Diese Studien belegen eindrucksvoll, dass spFRET eine wichtige Methode zur Untersuchung der Heterogenität von Konformationsübergängen, gerade in der „Dynamischen Strukturbiologie“, darstellt. Außerdem können kinetische und statische Eigenschaften von Biopolymeren, sowohl im gefalteten als auch im ungefalteten Zustand, mit spFRET erforscht werden. Darüber hinaus genügt die Messung einer einzigen Größe, wie der FRET-Effizienz, um die Bewegung eines Biopolymers auf seiner Potentialfläche in Echtzeit zu verfolgen.

#### 4.2. Photoinduzierter Elektronentransfer

Andere Konformationsänderungen mit Auswirkungen auf die Funktion von Enzymen sind mit wesentlich kleineren räumlichen Änderungen verbunden (bis zu wenigen Ångström). Um diese Konformationsübergänge von Biopolymeren im Subnanometerbereich sichtbar zu machen, sind photochemisch induzierte Reaktionen von Fluoreszenzfarbstoff-



fen mit molekularen Quenchern von großem Interesse. Im Unterschied zu FRET ist für eine schnelle und effiziente Umwandlung der Energie des elektronisch angeregten Zustands beim Ladungstransfer ein geringer Abstand oder sogar Van-der-Waals-Kontakt zwischen Farbstoff und Quencher erforderlich. Um Fluoreszenzlöschexperimente mit photoinduziertem Elektronentransfer zu interpretieren, müssen der Mechanismus und die Abstandsabhängigkeit des Transfers bekannt sein. Allgemein führt die Löschung eines Fluorophors im ersten angeregten Singulettzustand durch Elektronendonoren oder -acceptoren zur Bildung eines Radikalionenpaares  $A^{\cdot-} D^{\cdot+}$ , das unter Ladungsrekombination wieder in den Grundzustand übergeht. Die Effizienz der Ladungstrennung wird durch die Beziehung zwischen der freien Reaktionsenthalpie, der Reorganisationsenergie und dem Donor-Acceptor-Abstand bestimmt.<sup>[135,136]</sup>

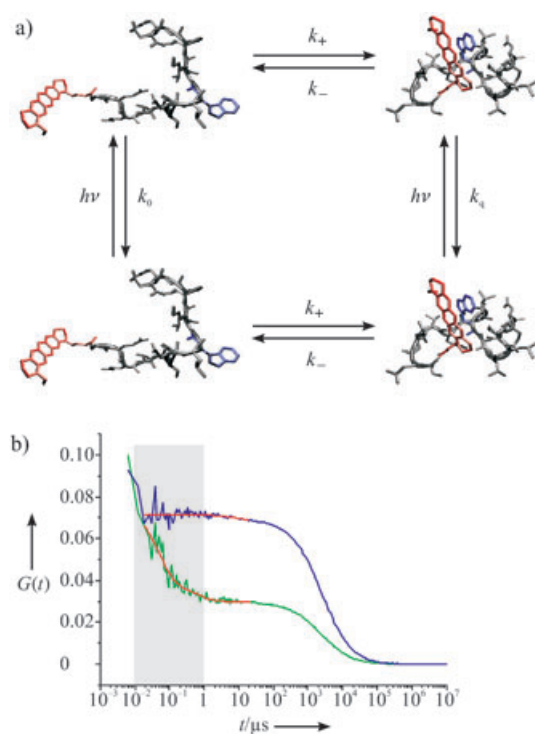
Da sich Donor und Acceptor für einen effizienten Elektronentransfer sehr nahe kommen müssen, ist die Technik ideal geeignet, um kleine Konformationsänderungen in Biomolekülen und im Besonderen Gleichgewichtsfuktuationen in Proteinen zu messen. Chattopadhyay et al. kuppelten beispielsweise Fluorescein selektiv an den hydrophoben Hohlraum eines intestinalen Fettsäuren bindenden Proteins und ermittelten Fluoreszenzfuktuationen auf der Mikrosekundska mithilfe von FCS.<sup>[137]</sup> Da die Fluoreszenz von Fluorescein von einigen Aminosäuren mehr oder weniger effektiv gelöscht wird – besonders stark von Tryptophan-Einheiten<sup>[138,139]</sup> – ist anzunehmen, dass die beobachteten Fluoreszenzfuktuationen auf Änderungen in der relativen Anordnung der Fluorescein-Einheit und einem benachbarten Tryptophanrest zurückzuführen sind. Daher können kleine Konformationsänderungen wie Gleichgewichtsfuktuationen sich direkt auf die Effizienz der Ladungstrennung auswirken. Elektronentransfers befähigen uns also, Konformationsänderungen im Subnanometerbereich für einzelne Proteinmoleküle in ihrem nativen Zustand mit Mikrosekundauföslung zu beobachten.

Vor kurzem nutzten Xie und Mitarbeiter den photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem Tyrosinrest und Flavin-Einheiten als Sonde für Änderungen der Struktur einer Flavin-Reduktase im Ångström-Bereich.<sup>[140]</sup> Durch die Korrelation der an einzelnen Flavinmolekülen gemessenen Schwankungen in der Fluoreszenzlebensdauer konnte die Konformationsdynamik mit Submillisekunden-Auföslung entschlüsselt werden. Das Ergebnis stützt die These, dass sich mehrere Konformere ineinander umwandeln. So lassen sich die Schwankungen in der Aktivität der Flavin-Reduktase erklären. Die Messung von Konformationsänderungen im Subnanometerbereich liefert außerdem die Grundlage für eine quantitative Bestimmung des „Konformationsgedächtnisses“ von Proteinmolekülen.

Alternativ kann der Elektronentransfer zwischen Fluoreszenzfarbstoffen und bestimmten Aminosäuren oder DNA-Nucleotiden benutzt werden, um an Peptiden oder Oligonucleotiden Konformationsänderungen im Submikrosekundenbereich auf Einzelmolekülebene zu verfolgen.<sup>[5,141]</sup> Die Fluoreszenz wird durch Tryptophan- oder Guanosenreste nur dann selektiv gelöscht, wenn diese Einheiten in direktem Kontakt mit dem Fluorophor sind. Alle übrigen Nucleotide und

Aminosäuren löschen deutlich langsamer als Guanosen und Tryptophan.<sup>[138,139,142–146]</sup>

Das Prinzip zur Ermittlung der Reaktionskinetik bei der Bildung intramolekularer Kontakte in Biopolymeren ist in Abbildung 8a dargestellt. Ein geeigneter Fluoreszenzfarbstoff und ein Tryptophan- oder Guanosenrest werden in ein Peptid bzw. Oligonucleotid eingebaut. Die Bewegung des Rückgrats führt zu Konformationen, in denen Farbstoff und Quencher in Kontakt kommen (rechte Strukturen in Abbildung 8a). Nach Anregung emittiert der Farbstoff entweder ein Photon (in Abhängigkeit von der Fluoreszenzquantenausbeute), oder er wird durch einen Elektronentransfer mit dem Tryptophan- bzw. Guanosenrest gelöscht. Je nach Farbstoffstruktur verläuft die Löschung statisch oder dynamisch.<sup>[139]</sup> Wenn es beim Kontakt zwischen Farbstoff und Quencher zur Bildung eines Komplexes mit fast coplanarer Anordnung von Farbstoff und Quencher kommt, wird die Fluoreszenz schnell und effizient gelöscht. Die rechte Struktur in Abbildung 8a kann demnach praktisch als nichtfluo-



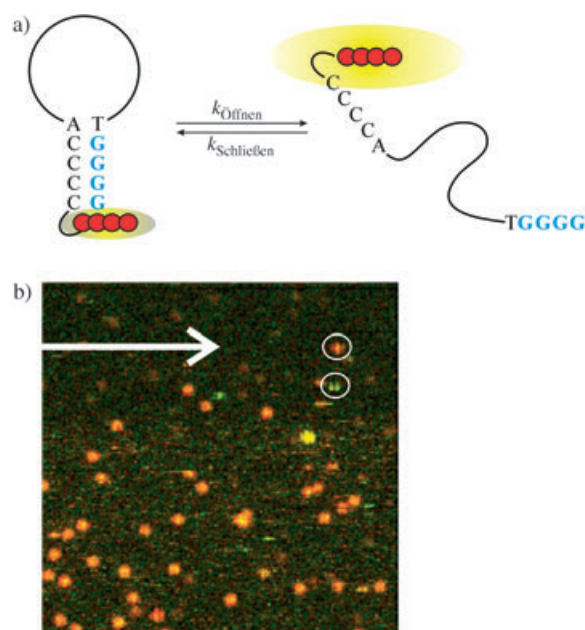
**Abbildung 8.** a) Intramolekulare Kontaktbildung in Peptiden und Oligonucleotiden. Die Dynamik des Rückgrats führt zu Konformationen, bei denen Farbstoff (rot) und Tryptophan oder Guanosen (blau) in Kontakt kommen und einen Komplex bilden. Daraus resultiert eine effiziente Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer von Tryptophan oder Guanosen im Grundzustand zum Farbstoff im ersten angeregten Zustand. Daher sind die rechts abgebildeten Strukturen nichtfluoreszent. b) FCS-Kurven einer  $10^{-9}$  M Lösung der markierten Peptide MR121-SQETFSDDLWKLLEN (grün) und MR121-SQETFS-DLFLKLLEN (blau) in PBS, pH 7.4. Starke statische Lösungsprozesse über photoinduzierten Elektronentransfer bei Kontaktbildung zwischen Farbstoff und Tryptophan zeigt sich im Erscheinen eines kurzen Korrelationsterms im 10–1000-ns-Bereich (grau unterlegt). Abkürzungen der Aminosäuren: A Alanin, D Asparaginsäure, E Glutaminsäure, F Phenylalanin, G Glycin, I Isoleucin, K Lysin, L Leucin, N Asparagin, P Prolin, Q Glutamin, R Arginin, S Serin, T Threonin, W Tryptophan.

reszierend betrachtet werden. Daher liefert die Analyse der Interphotonenzeiten oder FCS die Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation (Bildung des Kontakts),  $k_+$ , und Dissoziation,  $k_-$ .

Das Potenzial dieser Methode zeigte eine Untersuchung zur Geschwindigkeit, mit der ein am N-Terminus angebrachter Oxazin-Farbstoff (MR121) mit einem Tryptophanrest in Kontakt gebracht wird, der sich in einer Peptidkette von 15 oder 20 Aminosäuren Länge befand.<sup>[5]</sup> Bei den Peptiden handelte es sich um lineare Fragmente der aminoterminalen Transaktivierungsdomäne von humanem p53, das die Zielstruktur verschiedener Proteine ist, etwa des TATA-Box-bindenden Proteins (TBP), MDM2 oder von Antikörpern der humoralen Immunabwehr bei Krebspatienten. Schnelle FCS mit zwei Detektoren diente zur Messung der von Tryptophan induzierten Fluoreszenzlöschung in  $10^{-9}$  M Peptidlösungen. Die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten im Bereich von einigen hundert Nanosekunden für beide Peptide sind konsistent mit Daten aus Messungen an unstrukturierten Peptiden, bei denen eine Ensemblemethode verwendet wurde.<sup>[147]</sup> Der Vorteil der Fluoreszenzlöschungsmethode gegenüber bisher verwendeten Techniken liegt in der einfachen Durchführung von Einzelmolekülexperimenten in Wasser und an der Luft. Der Austausch von Tryptophan gegen Phenylalanin führt zum Verschwinden des kurzen Korrelationsterms auf der 100-ns-Zeitskala (Abbildung 8b).

Die außergewöhnliche Empfindlichkeit der beschriebenen Fluoreszenzmethode ist besonders wichtig für „intelligente“ Fluoreszenzsonden, die geringste Mengen an Zielmolekülen in biologischen Proben detektieren. Beide Peptide, die in der Submikrosekunden-Kinetikstudie untersucht wurden, sind Zielstrukturen für p53-Autoantikörper. Diese Epitope für p53-Autoantikörper sind als universelle und hoch spezifische Tumormarker in der Krebsdiagnose bekannt.<sup>[148]</sup> Die fluoreszenzmarkierten Peptid-Epitope können als PET-Biosensoren – Biosensoren, die durch einen photoinduzierten Elektronentransfer (PET) wirken – eingesetzt werden, um einzelne p53-Autoantikörper nachzuweisen.<sup>[149]</sup> Bei spezifischer Bindung an p53-Autoantikörper passt sich die Peptidkonformation der Form des Antikörpers an. Dadurch wird die Kontaktbildung zwischen Tryptophan und MR121 verhindert, und der resultierende Anstieg der Fluoreszenzintensität zeigt Bindungsereignisse an. Die Einzelmolekülempfindlichkeit dieses Assays ermöglicht so den direkten Nachweis von p53-Antikörpern in Blutseren von Krebspatienten.<sup>[146]</sup>

Die selektive Löschung von Oxazin-Farbstoffen wie MR121 oder ATTO 655 durch Guanosenreste über Elektronentransfer hilft bei der Entwicklung von einzelmolekülempfindlichen DNA- oder RNA-Sonden, z. B. DNA-Haarnadelsequenzen (Abbildung 9).<sup>[143]</sup> Wenn die Wechselwirkung zwischen dem Farbstoff, der an das eine Ende des Stamms gekuppelt ist, und den fluoreszenzlöschenden Guanosenresten am anderen Ende aufgehoben wird, etwa durch Bindung der komplementären DNA-Sequenz oder Spaltung durch eine Endo- oder Exonuclease, so wird die Fluoreszenz wiederhergestellt. DNA-Haarnadelsequenzen, die mit einem Oxazin-Farbstoff am 5'-Ende markiert sind, zeigten einen 20fachen Anstieg ihrer Fluoreszenz beim Binden der



**Abbildung 9.** a) Funktionsweise einer DNA-Haarnadelschleife mit selektiver Fluoreszenzlöschung durch Guanosen. Der Fluorophor (rot) wird an das Cytosin am 5'-Ende gekuppelt und durch die Guanosenbasen (blau) über photoinduzierten Elektronentransfer gelöscht. Nach der Hybridisierung mit einer Zielsequenz (die komplementär zur Schleifensequenz ist) wird die Fluoreszenz durch Konformationsänderung wiederhergestellt. b) 3'-Biotinylierte Haarnadelschleifen (MR121-C6-5'-CCCCAT<sub>20</sub>TGGGG-3'), die mit dem Oxazinderivat MR121 markiert und auf einem Deckglas durch Biotin-Streptavidin-Bindung immobilisiert wurden.<sup>[130]</sup> Beim Rastern (von oben links nach unten rechts) wurde die Anregungspolarisation moduliert. Das konfokale Bild ( $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ , 50 nm pro Pixel) zeigt Fluoreszenzpunkte einzelner Haarnadel-DNA-Moleküle, an die die komplementäre Zielsequenz hybridisierte (0–16 Photonen in 3 ms). Der Pfeil zeigt die Zugabe eines Überschusses an Zielsequenz (Oligo(dA)<sub>30</sub>) an. Für die meisten Punkte deutet eine demodulierte Fluoreszenzintensität auf frei rotierende Haarnadel-DNA-Moleküle hin. Die Modulationsstreifen in den beiden durch Kreise markierten Punkten zeigen stationäre Absorptionsdipole der Fluorophore an; diese Fluorophore liegen fest auf der Oberfläche.

komplementären Sequenz. Auf dieser Grundlage wurde ein kostengünstiges und hoch empfindliches DNA/RNA-Nachweisverfahren entwickelt.<sup>[144]</sup> In anderen Studien wurden mit immobilisierten DNA-Haarnadelsequenzen basierend auf photoinduziertem intramolekularem Elektronentransfer von Guanosenbasen auf angeregte Fluorophore einzelne DNA- oder RNA-Moleküle in subpikomolaren Konzentrationen nachgewiesen.<sup>[130]</sup> Die Methode ist daher ideal, um spezifische Zielsequenzen in sehr geringen Konzentrationen aufzuspüren.

## 5. SMFS zur Untersuchung von photophysikalischen Prozessen in Multichromophorsystemen

Im Hinblick auf spektroskopische Einzelmolekülexperimente müssen Eigenschaften wie die digitale Photozerstörung oder das „Blinking“, die früher als charakteristisch für einzelne Chromophore galten, neu überdacht werden. Ein-

zelmolekülstudien molekularer Wechselwirkungen in Multichromophorsystemen haben gezeigt, dass mehrere Chromophore gleichzeitig in „Aus“-Zustände gehen können.<sup>[104,150–153]</sup> Abhängig vom Abstand der Chromophore sind verschiedene Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen denkbar, z. B. Dexter-Energietransfer, Dimer- und Excimer-Bildung, Elektronentransfer, photochemische Prozesse und intermolekulare Fluoreszenzlöschung. Die bisher untersuchten Systeme umfassen natürliche Chromophore wie den Lichtsammelkomplex LH2,<sup>[154,155]</sup> lichtsammlende Proteine wie Phycoerythrin und Allophycocyanine,<sup>[103,156,157]</sup> genetisch codierte Proteine wie DsRed<sup>[24,158–160]</sup> und künstliche Multichromophorsysteme von einfachen Dimeren<sup>[161–163]</sup> bis hin zu komplexen lichtemittierenden konjugierten Polymeren<sup>[150–152,163,164]</sup> und dendritischen oder linearen Systemen.<sup>[85,91,104,156,165,166]</sup>

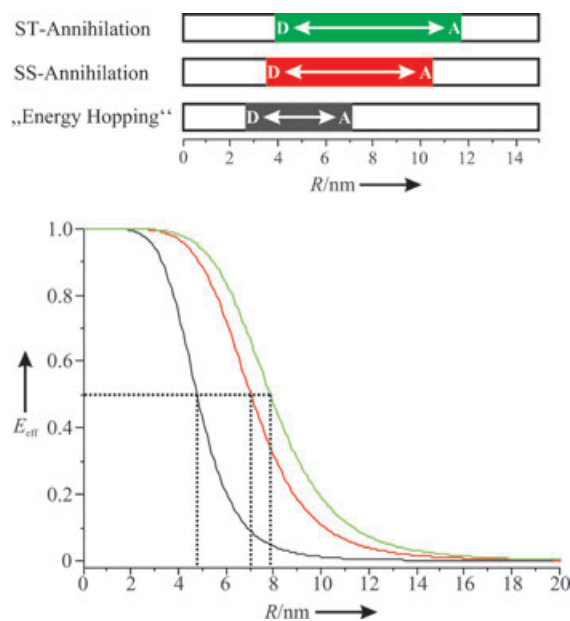
Eine wichtige Eigenschaft vieler Multichromophorsysteme ist das kollektive Blinking, die gleichzeitige komplette Fluoreszenzunterbrechung aller Chromophore. Das Blinking einzelner Moleküle wurde schon früh entdeckt und kann verschiedenen Prozessen zugeschrieben werden. Der wichtigste dieser Prozesse ist das Triplett-Blinking, der reversible Übergang in den Triplettzustand durch Intersystem Crossing.<sup>[167,168]</sup> SMFS hat Erklärungen für das kollektive Blinking geliefert, deren gemeinsame Grundlage darin besteht, dass anfangs nur ein Molekül in den „Aus“-Zustand übergeht und dann die Fluoreszenz der übrigen Chromophore löscht.<sup>[91,150,164]</sup> Dieses Prinzip ist auf das Intersystem Crossing anwendbar, wobei das Molekül im Triplettzustand die Anregungsenergie der anderen Fluorophore durch einen effizienten Energietransfer nach Förster „absorbiert“.<sup>[91,104,156,163]</sup> Demnach ist die Emission ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) des Fluorophors in Resonanz mit dem  $T_1 \rightarrow T_n$ -Übergang des Fluorophors im Triplettzustand. Dies führt zu einem Molekül in einem höher angeregten Triplettzustand,  $T_n$ . Die Energie des  $T_n$ -Zustands wird schnell thermisch verteilt, sodass das Molekül in den  $T_1$ -Zustand relaxiert. Das Molekül im Triplettzustand kann nun schnell zwischen  $T_1$  und  $T_n$  wechseln, bis es schließlich durch Reverse Intersystem Crossing oder Phosphoreszenz in den Grundzustand zurückkehrt.<sup>[163,169]</sup> Der Energietransfer von einem Molekül im Singulett- zu einem Molekül im Triplettzustand, wird üblicherweise als Singulett-Triplett-Annihilation (ST-Annihilation) bezeichnet, da ein Energiequant des  $S_1$ -Anregungszustands scheinbar „vernichtet“ wird.

Außer der ST-Annihilation muss auch das „Energy Hopping“ zwischen identischen Chromophoren in Betracht gezogen werden. Dabei wird Anregungsenergie über schwache Dipol-Dipol-Kopplungen von einem Molekül zum anderen übertragen („Homo-Energietransfer“).<sup>[104,156]</sup> Wegen der unterschiedlichen Überlappung der entsprechenden Spektren sind die  $R_0$ -Werte bzw. Energietransfereffizienzen für das „Energy Hopping“ und die ST-Annihilation in Multichromophorsystemen unterschiedlich.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass noch eine dritte Möglichkeit des resonanten Energietransfers mit einem dritten  $R_0$ -Wert berücksichtigt werden muss: die Singulett-Singulett-Annihilation (SS-Annihilation). Hierbei müssen zwei Farbstoffe fast gleichzeitig angeregt werden. Abhängig von der spektralen Überlappung der  $S_1 \rightarrow S_0$ -Emission und der  $S_1 \rightarrow S_n$ -

Absorption der Chromophore kann Energietransfer auftreten. Als Folge daraus befindet sich ein Molekül im Grundzustand und das andere in einem höher angeregten Zustand  $S_n$ . Über strahlungslose Relaxation geht das zweite Molekül schnell in den ersten angeregten Singulettzustand über. Die Nettoreaktion ist die „Vernichtung“ eines Excitons. Wie gezeigt wurde, kann Singulett-Singulett-Annihilation in Einzelmolekülexperimenten einfach durch Photon-Antibunching nachgewiesen werden, da immer dann Annihilation auftritt, wenn mehr als ein Molekül in einem Multichromophorsystem gleichzeitig angeregt wird.<sup>[85,91,170]</sup> Nur wenn das Multichromophorsystem wesentlich größer als der Förster-Abstand für Singulett-Singulett-Annihilation wird, taucht die verschwundene zentrale Bande im Histogramm der Interphotonenzeiten wieder auf.<sup>[171]</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Multichromophorsysteme in mancher Hinsicht wie einzelne Emittoren verhalten, was kollektive „Aus“-Zustände oder Photon-Antibunching betrifft. Diesen Prozessen liegt ein Energietransfer gemäß der Förster-Theorie zugrunde, durch den die Chromophore in Verbindung stehen, z. B. das „Energy Hopping“, Singulett-Singulett- oder Singulett-Triplett-Annihilation (Abbildung 10). Die Effizienz des „Energy Hoppings“ und der Singulett-Singulett-Annihilation kann durch Ensembleuntersuchungen sowie durch zeitauflösende Einzelmolekülmessungen bestimmt werden, z. B. über die Fluoreszenzlebensdauer und -anisotropie und über Antibunching-Experimente. Andererseits kann die Effizienz der Singulett-Triplett-Annihilation nur auf Einzelmolekülebene durch Analyse der kollektiven „Aus“-Zeiten gemessen werden.



**Abbildung 10.** Berechnete FRET-Effizienz  $E_{\text{eff}}$  bei variablem Donor-Acceptor-Abstand  $R$  für drei Energietransferprozesse nach Förster, die bei identischen Perylenimid-Chromophoren in starren dendritischen Multichromophorsystemen auftreten: „Energy Hopping“, Singulett-Singulett (SS)-Annihilation und Singulett-Triplett (ST)-Annihilation.<sup>[91]</sup> Die  $R_0$ -Werte für die verschiedenen Transferwege wurden aus den Absorptionsspektren  $S_0-S_1$ ,  $S_1-S_n$ ,  $T-T_n$  und den entsprechenden Emissionsspektren des Donors berechnet; für  $\kappa^2$  wurde ein durchschnittlicher Wert von 1.92 angenommen (aus Molekülmechanik-Rechnungen).<sup>[91]</sup>



Durch die Abhängigkeit von  $R^{-6}$  sind Abstände im Bereich von  $0.5 R_0$  bis  $1.5 R_0$ , d.h. FRET-Effizienzen  $E_{\text{eff}}$  zwischen 0.98 und 0.1, für FRET-Messungen geeignet. Bei zwei Perylen-Molekülen entspricht dies Abstandsänderungen von 2.39–7.05 nm für das „Energy Hopping“, 3.52–10.56 nm für die SS-Annihilation und 3.93–11.79 nm für die ST-Annihilation (Abbildung 10).<sup>[91]</sup> Die Verwendung von zwei gleichen Farbstoffen ermöglicht also die Messung von Abständen zwischen 2 und 12 nm.<sup>[91,171]</sup> Zudem ist die Synthese von Molekülen mit zwei gleichen Fluorophoren einfacher als die Synthese von Produkten mit unterschiedlichen Fluorophoren. Wechselwirkungen, die stärker sind als langreichweitige FRETs, können zu zusätzlichen Veränderungen im Fluoreszenzspektrum oder bei der Lebensdauer führen.<sup>[104,172]</sup>

## 6. Molekulare photonische Leiter

Auf den Ergebnissen der photophysikalischen Grundlagenforschung baut die Entwicklung nanoskaliger optischer Geräte wie photonischer Leiter auf. So wie ein elektrischer Leiter Elektronen transportiert, transportiert ein photonischer Leiter elektronische Anregungsenergie. Für molekulare Bauteile ist dies ein großer Vorteil, da man das Verbindungsproblem – den Flaschenhals beim Verknüpfen von molekularen mit makroskopischen Geräten – umgehen kann. Bei photonischen Leitern wird die Anregungsenergie als Licht in den Leiter eingeführt und durch den Leiter transportiert. Schließlich wird sie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge an einem anderen Ort emittiert oder für einen Elektronentransfer verwendet, d.h. die elektronische Anregungsenergie wird in elektrische Ladung umgewandelt.

Die Grundidee eines photonischen Leiters stammt von Lindsay et al.,<sup>[173]</sup> die versuchten, einen photonischen Leiter auf Porphyrin-Basis zu synthetisieren. Abgesehen von dem Problem der Energiesenken, die durch lokale Inhomogenitäten zwischen den stark miteinander koppelnden Porphyrin-Einheiten auftreten, lassen sich Porphyrine wegen ihrer geringen Fluoreszenz- und hohen Triplettquantenausbeute auch nur schwer durch SMFS untersuchen.

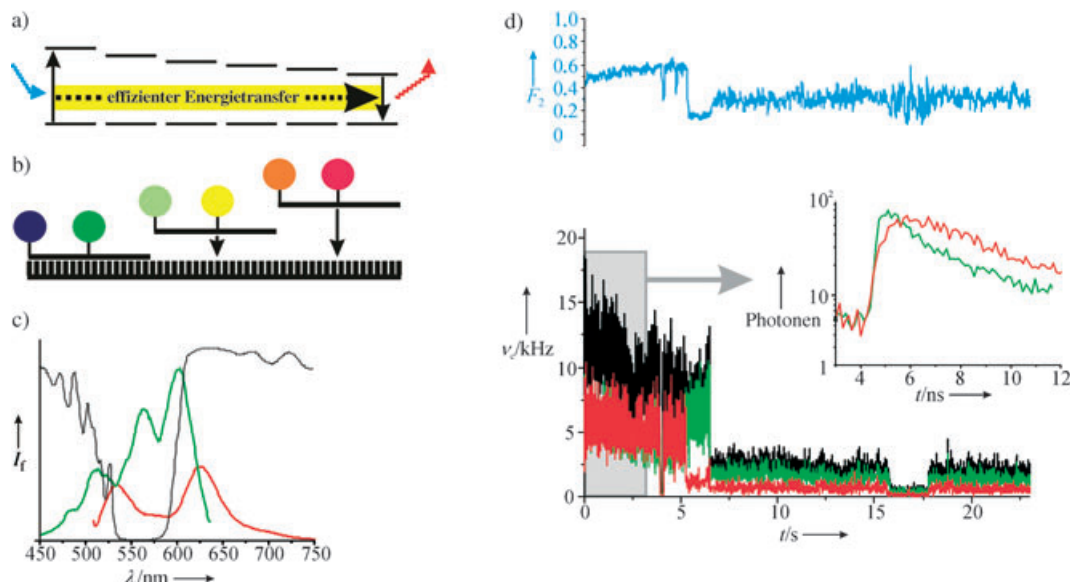
Andererseits müssen die Untereinheiten von Nanobau-elementen der Untersuchung einzeln zugänglich sein. Der ideale photonische Leiter besteht aus einer gleichmäßigen Farbstoffanordnung, die ein einfaches inkohärentes Überspringen der Anregungsenergie ermöglicht. Dabei darf es aber nicht zu Veränderungen der photophysikalischen Eigenschaften der einzelnen Farbstoffe kommen, durch die unerwünschte Energiesenken entstehen könnten. Daher wurde eine alternative Strategie vorgeschlagen, bei der 1) konventionelle Fluorophore mit hohen Quantenausbeuten eingesetzt werden, 2) eine Energiekaskade als treibende Kraft der Anregungsenergie die Übertragungsrichtung sicherstellt, und 3) die Fluorophore in einer Weise angeordnet sind, die starke Wechselwirkungen wie Dimerbildung oder Löschung unterbindet.<sup>[174,175]</sup> Die Energie wird gemäß der Förster-Theorie über schwache Dipol-Dipol-Wechselwirkungen transportiert.

Die Umsetzung dieses Konzepts bedarf einer Synthesestrategie, mit deren Hilfe ein starres Gerüst gezielt mit

verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden kann. Eine Möglichkeit bietet die Verwendung von Doppelstrang-DNA, die mit verschiedenen Fluorophoren markiert ist. Diese transportiert Licht (genauer: Energie) vom Donor zum Acceptor durch verschiedene Dipol-Dipol-Energieübertragungsschritte, bei denen spektral separierte Farbstoffe verwendet werden. Die Fluorophore müssen eine Energiekaskade bilden, d.h. der erste Farbstoff hat die höchste und der letzte Farbstoff die niedrigste Anregungsenergie, damit die Richtung des photonischen Leiters festgelegt ist (Abbildung 11 a). Im optimalen photonischen Leiter wird die Richtung des Energieflusses wie beschrieben sichergestellt, gleichzeitig wird aber der Energieverlust minimiert, z. B. durch einige „Homo-FRET“-Zwischenschritte.<sup>[175,176]</sup>

Wegen ihrer einzigartigen Eigenschaften eignet sich Doppelstrang-DNA ideal für den Aufbau molekularer Nanomaschinen. Mit einer Persistenzlänge von 50 nm stellt sie ein starres Gerüst dar, an das die Fluorophore angebracht werden können.<sup>[177]</sup> Außerdem stehen viele DNA-Markierungsstrategien zur Verfügung, um verschiedene Farbstoffe einzuführen. Die Stärke dieses Ansatzes liegt in der einfachen Synthese, mit der definierte Anordnungen aus vielen Fluorophoren aufgebaut werden können. Ausgehend von einem Einzelstrang-DNA-Fragment kann man Teile der Gegensequenz, die die gewünschten Chromophore tragen, mit dem Einzelstrang hybridisieren (Abbildung 11 b). Vor kurzem demonstrierten wir dies durch die Synthese und spektroskopische Charakterisierung eines gerichteten photonischen Leiters: Zwischen fünf spektral unterschiedlichen, kovalent an Doppelstrang-DNA gebundenen Chromophoren finden vier hoch effiziente Energietransferschritte statt.<sup>[175]</sup> SMFS mit vier spektral separierten Detektoren deckte Subpopulationen auf, die eine Gesamttransfereffizienz bis zu 90 % über 13.6 nm und einen Spektralbereich von ca. 200 nm zeigen. Die Anordnung der Chromophore kann nicht nur in Bezug auf ihren Abstand, sondern auch in Bezug auf ihre relative Orientierung optimiert werden. Durch kürzere Abstände zwischen den Fluorophoren wäre ein sehr schneller Energietransfer über den Dexter-Mechanismus möglich. Einige dieser Ansätze beruhen auf supramolekularer Chemie unter Verwendung von Templaten (z. B. Zeolithen).<sup>[178]</sup>

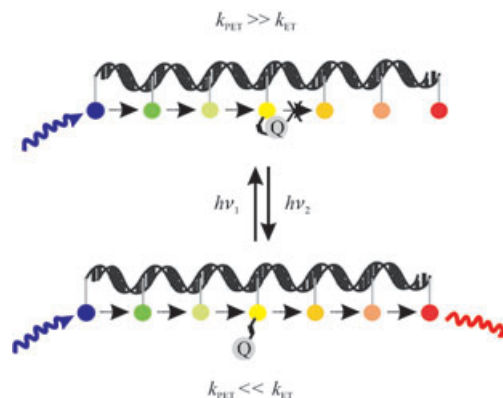
Photonische Drähte sind nur ein komplementäres Bauteil zu molekularen elektronischen Bauteilen. Die nächste Komplexitätsstufe erreicht man durch die Einführung eines Schalters. Vor kurzem haben Irie et al. einen solchen Photonschalter entwickelt.<sup>[179]</sup> Sie zeigten in einem Zweifarbenexperiment, dass ein Fluorophor, der mit einer schaltbaren Löscheinheit (einem Diarylethen-Derivat) verbunden ist, durch Licht mit  $\lambda = 488$  und 325 nm an- bzw. ausgeschaltet werden kann. UV-Licht wurde verwendet, um den Quencher zu aktivieren, Licht mit  $\lambda = 488$  nm desaktivierte den Quencher und führte erneut zur Fluoreszenz. Obwohl die Verwendung der gleichen Wellenlänge (hier  $\lambda = 488$  nm) zum Abfragen und zum Schalten normalerweise einen Nachteil darstellt, war sie in diesem Fall möglich: Da die Desaktivierung (Isomerisierung) ungefähr 1000-mal weniger effizient ist als die Aktivierung des Quenchers, können Abfrage und Schalten, z. B. durch die Intensität des Anregungslichts, kontrolliert werden. In einem perfekten Schalter sollte jedoch das Schal-



**Abbildung 11.** a) Prinzip eines photonischen Leiters. Die Anregungsenergie wird über verschiedene Energietransferschritte von einer Seite zur anderen übertragen. Die Chromophore bilden eine Energiekaskade, um die Richtung des Energietransfers sicherzustellen. b) Synthesestrategie für gerichtete photonische Leiter. Um verschiedene Farbstoffe in der richtigen Reihenfolge anzuordnen, werden kurze farbstoffmarkierte Oligonucleotide an den komplementären DNA-Strang hybridisiert. c) Ensemble-Anregungsspektrum (grün) und Fluoreszenzemissionsspektrum (rot) (relative Fluoreszenzintensität  $I_f$  gegen Wellenlänge  $\lambda$ ) eines auf DNA beruhenden photonischen Leiters mit drei Farbstoffen (Rhodamin 110 (R110), Tetramethylrhodamin (TMR) und ATTO 590), deren Abstand jeweils 10 Basenpaare (ca. 3.4 nm) beträgt; die Transmissionskurve des dichroitischen Strahlteilers, der für die SMFS-Messungen an individuellen photonischen Leitern verwendet wurde, ist grau gezeigt. Für die Gesamt-Energietransfereffizienz vom ersten Donor R110 über TMR zum Endacceptor ATTO 590 erhält man stark unterschiedliche Werte, je nachdem, ob man von der Abnahme der Donorfluoreszenz (ca. 40%) oder von den relativen Intensitäten der Anregungsspektren ausgeht (ca. 60%). Andererseits sollte die Größe und Komplexität des Systems dazu führen, dass verschiedene Orientierungen der Farbstoffe zueinander, ungenügende Hybridisierung und/oder zusätzliche Lösprozesse eine inhomogene Verbreiterung der Transfereffizienz zur Folge haben, die sich in den Ensemblemessungen widerspiegelt. d) Fluoreszenzintensitätskurve eines einzelnen photonischen Leiters adsorbiert auf einer Glasoberfläche, bestimmt durch SFLIM mit Detektionsfenster bei 520–590 nm (grün) und 590–680 nm (rot); schwarze Kurve: Gesamtintensität.<sup>[78]</sup> Während der ersten fünf Sekunden wird das Signal in Übereinstimmung mit den Lebensdauermessungen aufgrund des effizienten Energietransfers vom Endacceptor ATTO 590 geprägt. Die vom kurzwelligen Detektor während der ersten 3 s (grau unterlegt) aufgenommene Fluoreszenzabklingkurve (grün) zeigt starke Löschung, während die auf dem langwelligen Kanal aufgenommene Abklingkurve (rot) eine ausgeprägte Fluoreszenzanstiegszeit sowie eine lange Abklingzeit von ca. 4 ns zeigt, wie es für ATTO 590 erwartet wird. Nach 4 s tritt ein kollektiver „Aus“-Zustand auf. Nach ungefähr 5 s wird der Acceptor ATTO 590 photozerstört, was mit einer abrupten Änderung der anteiligen Intensität  $F_2$  einhergeht. Auf die Photozerstörung von TMR (nach ca. 7 s) folgt ein leichter Anstieg des  $F_2$ -Werts, der auf die Restfluoreszenz von R110 und die Transmissionseigenschaften der verwendeten Filter zurückzuführen ist.

ten völlig unabhängig von der Abfrage des Schalterzustands sein.

Das effiziente Löschen eines Fluorophors durch Elektronentransfer stellt einen geeigneteren Lösmechanismus für Photonenschalter dar. Es wäre auf diese Art möglich, selektiv einzelne Fluorophore innerhalb des photonischen Leiters durch Anhängen eines schaltbaren Elektronendonors oder -acceptors anzusprechen (Abbildung 12). Idealerweise sollten diese Redox-Photonenschalter durch zwei Wellenlängen angesprochen werden, bei denen der Fluorophor nicht absorbiert. Eine dritte Wellenlänge sollte die Stellung des Schalters feststellen. Während der Photoisomerisierung sollte die Einheit ihr Redoxpotential oder die Strukturmerkmale der Donor-Acceptor-Wechselwirkung derart verändern, dass sie in einem Zustand als Quencher für den Fluorophor fungiert, wohingegen der photoinduzierte Elektronentransfer im anderen Zustand thermodynamisch, kinetisch oder durch die Konformation des Redox-Photoschalters verhindert ist (Abbildung 12).



**Abbildung 12.** Idealisierter gerichteter photonischer Leiter mit Redoxschalter: Photoisomerisierung des Linkers, an dem der Elektronentransferquencher (Q) hängt, verändert die Wechselwirkungsgeometrie zwischen Fluorophor und Quencher. Das Schalten des photonischen Leiters wird durch Anregung mit einer zweiten und dritten Wellenlänge erreicht ( $\bar{\nu}_1$  bzw.  $\bar{\nu}_2$ ). Im „Aus“-Zustand (oben) ist der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) zwischen einem Fluorophor und dem Quencher (Q) wesentlich schneller als der Energietransfer (ET) zum nächsten Fluorophor ( $k_{PET} \gg k_{ET}$ ). Durch diese Anordnung lässt sich der Photonendurchsatz selektiv zwischen einem „An“- und einem „Aus“-Zustand schalten.

## 7. SMFS in der Biologie

In den vergangenen Jahren wurden bedeutende Fortschritte auf dem Gebiet hoch organisierter Nanostrukturen, insbesondere molekularer Maschinen, und ihrer Funktionen in lebenden Zellen erzielt.<sup>[180–185]</sup> Obwohl ungefähre Daten über die Zusammensetzung biomolekularer Maschinen und ihre Wechselwirkungen auf molekularer Ebene vorliegen, ist keinesfalls klar, wie der Stoffwechsel im Zellkern, Stoffwechselenzyme oder Regulationsfaktoren organisiert sind. Darüber hinaus wird angenommen, dass die Zellbausteine in vielen dieser molekularen Maschinen nicht synchron reagieren, sondern unterschiedlichen Reaktionskinetiken folgen. Da beispielsweise Polymerase-II-haltige Transkriptionszentren in Säugerzellen nur ca. 40 nm groß sind und im Durchschnitt 8 aktive Polymerasemoleküle enthalten,<sup>[182]</sup> werden Einzelmolekülempfindliche Detektionsmethoden benötigt, um das dynamische Wechselspiel der Zellbausteine sowie ihre präzisen Positionen und Abstände mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung zu untersuchen. Einzelmolekülmethode bieten außerdem die Möglichkeit einer dreidimensionalen Analyse.<sup>[40]</sup> Dennoch erscheinen diese Techniken vielen Forschern zu kompliziert, und in der Biologie überwiegen immer noch genetische und elektronenmikroskopische Untersuchungen.

In den vergangenen Jahrzehnten ist die In-situ-Hybridisierung und -Markierung derart optimiert worden, dass die mikroskopische Detektion spezifischer Protein- oder mRNA-Moleküle durch fluoreszenzmarkierter Nucleinsäuren oder Antikörper möglich wurde.<sup>[186–189]</sup> Derartige Methoden werden für die Anwendung an fixierten Zellen oder Gewebematerial weiterentwickelt, andererseits steigt aber die Nachfrage für Techniken zur Visualisierung von Protein- und RNA-Molekülen in lebenden Zellen. So könnten Zweifel ausgeräumt werden, ob die an fixierten Zellen beobachteten Muster die Situation in lebenden Zellen genau wiedergeben. Fixierung und Zellvorbehandlung könnten die Lokalisierungsmuster stören und die Zellmorphologie verschlechtern.<sup>[190]</sup> Außerdem liefern Untersuchungen an lebenden Zellen die besten Informationen über die Dynamik von DNA-, RNA- oder Protein-Synthese und -Transport.

### 7.1. Fluoreszenzmarkierungsstrategien für die Bildgebung von Zellen

Bei der Untersuchung biologischer Proben werden bestimmte Zielmoleküle mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Entsprechende Fluoreszenzmarkierungen für die SMFS in Zellen müssen besonders hohe Anforderungen an Biokompatibilität und Photostabilität erfüllen und dürfen die biologische Funktion nicht stören. Vorher stellt sich jedoch das Problem der positionsgenauen Markierung in einer lebenden Zelle. Einige neue Techniken hierzu wurden vor kurzem in einer Übersicht besprochen.<sup>[23,191]</sup> Im einfachsten Fall werden die zu untersuchenden Biomoleküle in vitro mit Standardmethoden markiert. Danach werden die Zellen mit bekannten chemischen, elektrischen oder mechanischen Methoden oder mithilfe von Vesikeln beladen. Bei der Lokali-

sierung von RNA in lebenden Zellen muss beispielsweise die Zielsequenz mit einer fluoreszenzmarkierten Gegensequenz als Sonde markiert werden. Ein Problem dieser Fluoreszenz-in-vivo-Hybridisierung (FIVH) besteht in der ausreichenden Zufuhr von Sondenmolekülen an Positionen in der Zelle, wo sie mit der Zielsequenz hybridisieren können. Die direkteste Methode, Sondenmoleküle in eine Zelle einzuführen, ist die Injektion mit einer Mikropipette; alternativ können auch Liposomen verwendet werden.<sup>[192]</sup>

Die Mikroinjektionstechnik beruht auf der Injektion aus einer Mikropipette mit einer sehr dünner Spitze, indem zu einem genau definierten Zeitpunkt Druck ausgeübt wird. Die Reproduzierbarkeit dieser Technik ist jedoch nicht ausreichend für die SMFS, denn es sollen nur wenige Moleküle pro Zelle eingebracht werden. Mithilfe einer Mikropipette wurden kürzlich fluoreszenzmarkierte Oligonucleotide in Zytoplasma und Zellkern lebender 3T3-Mausfibroblasten injiziert.<sup>[83]</sup> Da der Innendurchmesser von  $500 \pm 200$  nm an der Spitze der Mikropipette vergleichbar mit dem Durchmesser des konfokalen Detektionsvolumens war, wurden nahezu alle Moleküle detektiert, die durch die Pipettenöffnung ausströmten.<sup>[9,193,194]</sup> Die injizierten Moleküle konnten gezählt werden, und man erhielt quantitative Informationen.

Eine weitere viel versprechende Methode ist die Proteintransduktion. Einige natürliche Proteine, z.B. das TAT-Protein aus HIV, dringen effizient in Zellen ein.<sup>[195,196]</sup> Die großen Moleküle verdanken diese Fähigkeit dem Vorliegen spezifischer kurzer Sequenzen. Arginin-reiche Peptide sorgen für die effiziente Translokation durch die Plasmamembran und die anschließende Anreicherung im Zellkern. Daher könnten sie nützliche Vektoren sein, um biologisch instabile Wirkstoffe wie Oligonucleotide oder Peptide in Zellen einzuschleusen.<sup>[197]</sup> Die Aufnahme dieser kationischen, membrandurchdringenden Peptide durch Zellen wurde mit einem Mechanismus erklärt, der keine Endozytose einschließt. Penetrationsstudien an nicht fixierten lebenden Zellen (HeLa-Zellen und humanen Oberhautkeratinozyten) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter, Peptidase-resistenter  $\beta$ -Oligoarginine zeigten, dass länger-kettige  $\beta$ -Oligoarginine (aus 8 und 10 Aminosäureeinheiten) in die Zelle eindringen und sich – unabhängig von der Temperatur (bei 37 °C wie bei 4 °C) oder einer Vorbehandlung mit  $\text{NaN}_3$  – im Zellkern, insbesondere in den Nucleoli, anreichern.<sup>[198,199]</sup>

Ein ähnlicher Ansatz nutzt die Affinität eines Zielmoleküls für ein kleineres Molekül, das in vitro synthetisiert werden kann. Diese Strategie ist komplizierter als die In-vitro-Markierung, da eine hohe Affinität zwischen beiden Partnern erforderlich ist, um eine unspezifische Bindung in der Zelle zu vermeiden. Dennoch ist die Methode vorteilhaft, wenn die mit Einzelmolekültechniken zu untersuchende Verbindung nicht gereinigt oder die Lokalisierung des Zielmoleküls nicht einfach reproduziert werden kann. Ein Antikörper oder ein anderer spezifischer Ligand kann diese In-situ-Markierung ausführen.<sup>[200]</sup> Trotzdem ist es immer noch häufig problematisch, bestimmte Strukturen selektiv mit Analytkonzentrationen anzusprechen, die für die Einzelmolekülspektroskopie ausreichen ( $10^{-10}$  M). In einer verbesserten Version der indirekten Markierungsstrategie erkennt daher der Ligand den Bindungsvorgang, und nur die spezifische



Bindung führt zu starker Fluoreszenz.<sup>[143,146]</sup> Alternativ kann die Fluoreszenz an besonderen Positionen in der Zelle durch eine Markierung aktiviert werden, die über einen photoaktiven Linker mit einem Quencher verbunden ist. Nach der Abspaltung des Quenchers durch Photodissoziation des Linkers gewinnt der Farbstoff seine Fluoreszenz zurück. Um etwa die Arbeitsweise eines Protease-Enzyms zu beobachten, könnte ein nichtfluoreszierendes Substrat verwendet werden, das sich nach der Spaltung durch die Protease durch Fluoreszenz zu erkennen gibt.<sup>[201]</sup>

Die eleganteste Methode, Proteine in vivo spezifisch zu markieren, ist die genetische Markierung. Der Fluorophor ist in der Regel ein genetisch codiertes Protein wie das Grün Fluoreszierende Protein (Green Fluorescent Protein, GFP) oder dessen Verwandte. GFP aus der biolumineszenten Qualle *Aequorea victoria* hat viele Teilgebiete von Zellbiologie und Biotechnologie vorangebracht, da es eine direkte genetische Codierung starker Fluoreszenz im sichtbaren Bereich ermöglicht.<sup>[202,203]</sup> GFP kann sowohl N- als auch C-terminal an viele Proteine angehängt werden, ohne deren native Funktion zu beeinträchtigen.<sup>[204,205]</sup> Bei dieser Methode wird die DNA-Gensequenz für GFP direkt neben die Sequenz gesetzt, die das zu untersuchende Protein codiert. GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine zylindrische Struktur; der Fluorophor liegt gut geschützt in der zentralen Helix im Inneren des Zylinders. Dieser Zylinder ist mit einem Durchmesser von 3 nm und einer Länge von ca. 4 nm wesentlich größer als ein normaler Fluorophor ( $\leq 1$  nm).

An GFP- oder YFP-Fusionsproteinen (YFP = Yellow Fluorescent Protein) in Membranen lebender Zellen wurden Einzelmolekülstudien durchgeführt (GFP und YFP fluoreszieren am stärksten und sind am photostabilsten),<sup>[206–209]</sup> doch erwiesen sich ihre komplexe Photophysik und ihre niedrige Photostabilität als problematisch für einzelmolekülspektroskopische Anwendungen.<sup>[24,210–212]</sup>

Die Entdeckung neuer fluoreszierender Proteine aus nichtfluoreszierenden *Anthozoa*-Spezies,<sup>[213]</sup> besonders des rot fluoreszierenden Proteins DsRed, eröffnete neue Möglichkeiten für Mehrfarbenmarkierung und FRET-Anwendungen. Bevor DsRed als In-vivo-Reporter in SMFS-Anwendungen genutzt werden kann, müssen noch große Probleme wie die langsame Reifung und die grüne Restfluoreszenz überwunden werden.<sup>[158–160]</sup> Um die Reifungseigenschaften zu verbessern und die Aggregation zu verhindern, wurde eine Reihe weiterer rot fluoreszierender Proteine und DsRed-Varianten entwickelt, z. B. DsRed2, DsRed-Express, eqFP611 oder HcRed1.<sup>[214–216]</sup> Kürzlich wurde das Problem der DsRed-Oligomerisierung mutagenetisch gelöst (mRFP1).<sup>[217]</sup>

Eine elegante Alternative zu üblichen FRET-Studien stellt die biomolekulare Komplementierung zum Studium von Proteinwechselwirkungen in lebenden Zellen dar. Dieser Ansatz beruht auf der Komplementierung zweier nichtfluoreszierender YFP-Fragmente, die jeweils an ein Protein gebunden sind und durch eine Wechselwirkung zwischen den Proteinen zusammengebracht werden.<sup>[218]</sup>

## 7.2. SMFS in lebenden Zellen

Einzelne fluoreszierende Moleküle können in Lösung oder auf Oberflächen leicht mit hohem S/R-Verhältnis detektiert werden, doch die Entwicklung neuer Einzelmolekülmethode zum Studium komplexer Vorgänge in lebenden Zellen gestaltet sich deutlich schwieriger. Im Unterschied zu klar definierten In-vitro-Bedingungen sieht man sich im Zellinneren mit einem Sammelsurium biologischer Makromoleküle und fluoreszierender Verbindungen wie Porphyrinen oder Flavinen konfrontiert. Diese komplexe Umgebung erzeugt eine intensive Hintergrundfluoreszenz, die so genannte Autofluoreszenz. Daher wurden häufig nanomolare oder höhere Konzentrationen fluoreszenzmarkierter Proteine oder Oligonucleotide eingesetzt, um die Diffusion in Zelle und Zellkern mit FCS zu messen.<sup>[219,220]</sup>

Dennoch wurden in lebenden Zellen mit sehr niedrigen Expressiongeschwindigkeiten die Fluoreszenzsignale einzelner diffundierender EGFR-EGF-Fusionsproteine detektiert.<sup>[221]</sup> Konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde ebenso erfolgreich verwendet, um Fluoreszenzsignale Rhodamin-markierter Oligonucleotidmoleküle in lebenden Zellen zu erfassen.<sup>[222]</sup> Um die bei Anregung mit grünem Licht auftretende Autofluoreszenz des Zellkulturmediums zu vermindern, wurden die meisten Messungen in phosphatgepufferter Kochsalz-Lösung (PBS) durchgeführt. Die ersten intrazellulären Trajektorien einzelner Proteinmoleküle, die mit mehreren Farbstoffen markiert waren, wurden von Kubitschek und Mitarbeitern beobachtet.<sup>[223,224]</sup> Mithilfe eines optimierten Laser-Videomikroskops mit hoher Empfindlichkeit und Aufnahmegeschwindigkeit wurden einzelne Ribonuclease-Proteine sichtbar gemacht und mit einer räumlichen Auflösung von 35 nm bei einer zeitlichen Auflösung von 30 ms verfolgt.

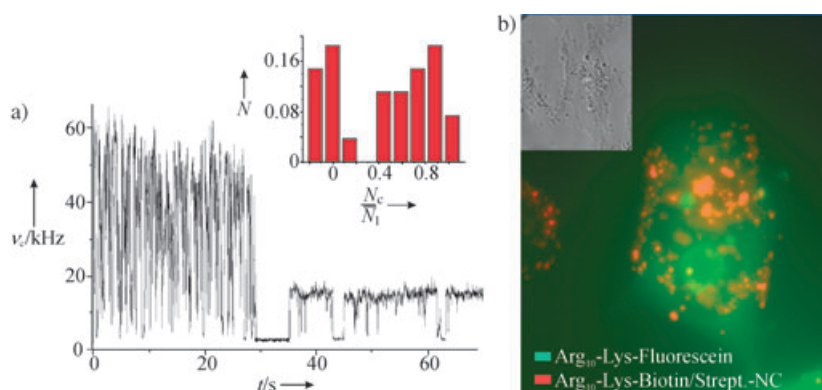
Vor kurzem beobachteten Bräuchle und Mitarbeiter den Infektionsweg einzelner Viren durch Fluoreszenzbildgebung in Echtzeit.<sup>[225]</sup> In einer ähnlichen Studie wurden durch gepulste Laseranregung mit rotem Licht ( $\lambda = 635$  nm) in Kombination mit spektral aufgelöster Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (spectrally-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy, SFLIM) die Fluoreszenzsignale markierter Oligonucleotide vor dem Hintergrund der Autofluoreszenz detektiert. Dies gelang dank der charakteristischen Fluoreszenzlebensdauern und spektralen Eigenschaften der verwendeten Fluorophore.<sup>[83]</sup> SFLIM-Aufnahmen und Fluoreszenzintensitätsmessungen von lebenden 3T3-Mausfibroblasten ergaben, dass von ca. 100–1000 fluoreszenzmarkierten Oligo(dT)-43-meren nach der Mikroinjektion ca. 10–30 % nicht frei im Zellkern diffundieren können, sondern an Teile der Transkriptions-, Spleiß- oder Polyadenylierungsmaschinerie gebunden sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kombination aus konfokaler Bildgebung und Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie es ermöglicht, Transportwege in intakten biologischen Systemen zu untersuchen, Schlüsse über den grundlegenden Aufbau der Zelle zu ziehen, und individuelle Bindungsereignisse ebenso wie Mobilitätsbeschränkungen in lebenden Zellen zu analysieren.

Andererseits werden einzelne Farbstoffmoleküle relativ schnell photozerstört, wenn sie unter nativen Bedingungen

beobachtet werden. Daher reicht die Beobachtungszeit häufig nicht aus, um die gewünschte Information zu erhalten.<sup>[200]</sup> Für In-vitro-Studien markierter Moleküle wurden Bedingungen erarbeitet, unter denen die Photostabilität erhöht wird, sodass Fluorophore minutenlang beobachtet werden können. Die Gruppen von Chu und Ha etablierten ein Glucose-Oxidase/Katalase-System, das Sauerstoff entfernt und die Photostabilität von Cyaninfarbstoffen in vitro um Größenordnungen erhöht.<sup>[58, 226]</sup> Leider können diese Techniken nicht in lebenden Zellen verwendet werden, sodass photostabilere Markierungen erforderlich sind, die gleichzeitig die biologische Funktion nicht beeinflussen.

Eine Fluorophor-Klasse, in die diesbezüglich große Erwartungen gesetzt werden, sind Halbleiter-Nanokristalle (nanocrystals, NCs) wie Kern-Schale-CdSe/ZnS (core-shell CdSe/ZnS).<sup>[227]</sup> Ihre einzigartigen optischen Eigenschaften, abstimmbare enge Emissionsspektren, breite Absorptionsspektren, hohe Photostabilität und eine lange Fluoreszenzlebensdauer (in der Größenordnung einiger zehn Nanosekunden), machen diese Sonden für Experimente mit langen Beobachtungszeiten und Vielfarbenexperimente interessant. Darüber hinaus kann die relativ lange Fluoreszenzlebensdauer der Nanokristalle den Bildkontrast verstärken und die Empfindlichkeit bei biologischen Anwendungen mit torgeschalteter Detektion erhöhen.<sup>[228]</sup> Obwohl die Biokompatibilität von NCs schon vor einigen Jahren nachgewiesen wurde,<sup>[227, 229]</sup> erzielten sie ihren Durchbruch für biologische Anwendungen erst vor kurzem.<sup>[230–236]</sup> Heutzutage können NCs einfach funktionalisiert werden: Beispielsweise kuppeln Streptavidin-funktionalisierte NCs unter milden Bedingungen an biotinylierte Biomoleküle. Immunfluoreszenzmarkierungen von Tumormarkern und anderen Zielmolekülen auf der Oberfläche fixierter und lebender Krebszellen gelangen genauso wie die Markierung von Actin- und Mikrotubuli-Fasern im Zytoplasma und die Detektion von Antigenen im Zellkern.<sup>[235]</sup> Wie erste Erfolge zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass NCs bald eine wichtige Rolle bei In-vivo-Einzelmolekülstudien einnehmen werden.<sup>[237, 238]</sup>

Trotzdem sind NCs kein Allheilmittel für biologische Anwendungen von SMFS und Fluoreszenzbildgebung. Beispielsweise ist es schwierig, NCs mit einzelnen Bindungsstellen auszustatten, sodass sie spezifisch nur ein einziges Zielmolekül binden. Statt dessen tendieren NCs dazu, im Markierungsschritt mehrere Zielmoleküle zu binden. Ein weiteres Problem bildet das Blinking,<sup>[239]</sup> das stark von der Anregungsintensität abhängt (Abbildung 13a), und oft einem Potenzgesetz gehorcht.<sup>[240, 241]</sup> Das Blinking von NCs ist von 1–10 mM Sulfanylethanol effizient verringert, ein solcher Zusatz von Reduktionsmitteln scheidet jedoch für die Bildgebung in lebenden Zellen aus.<sup>[242]</sup> Außerdem lumineszieren



**Abbildung 13.** a) Fluoreszenzintensitätskurve (Zählrate  $\nu_c$  gegen Zeit  $t$ ) eines einzelnen Halbleiter-NCs (Qdot605-Streptavidin-Konjugat), der auf einer trockenen Glasoberfläche mit verschiedenen Laserintensitäten angeregt wurde (488 nm, frequenzverdoppelter Ti:Saphir-Laser mit einer Repetitionsrate von 3.8 MHz). Nach ca. 20 s wurde der Strahl abgeblockt und die durchschnittliche Anregungsenergie von 1 auf 0.2 kWcm<sup>-2</sup> verringert. Blinking des NCs tritt bei niedrigen Anregungsintensitäten weniger häufig auf. Der Einschub zeigt ein normalisiertes Histogramm des hintergrundkorrigierten  $N_c/N_f$ -Verhältnisses, gemessen an 60 einzelnen Qdot605-Streptavidin-Konjugaten, die auf einer trockenen Oberfläche adsorbiert waren. Das recht hohe  $N_c/N_f$ -Verhältnis ( $>0.3$ ) zeigt, dass sich mehr als 50% der untersuchten NCs nicht wie einzelne Emittoren verhalten (eventuell verursacht durch Aggregatbildung). b) Fluoreszenzbild einer HeLa-Zelle in PBS-Puffer, angeregt bei 488 nm. Der Einschub zeigt ein Phasenkontrastbild der Zelle. Die Zellen wurden mit einer 10<sup>-8</sup> M Lösung von Qdot605-Streptavidin-Konjugaten, 10<sup>-6</sup> M biotinyliertem Polyarginin (Arg<sub>10</sub>-Lys) und 10<sup>-6</sup> M fluoreszenzmarkiertem Polyarginin (Arg<sub>10</sub>-Lys-Fluorescein) 20 min inkubiert und anschließend gewaschen. Während die fluoreszenzmarkierten Polyarginine (grün) in die Zelle eindringen und sich in den Nucleoli anreichern,<sup>[198, 199]</sup> binden die mit biotinyliertem Polyarginin bedeckten Streptavidin-überzogenen NCs (rot) auf der Membran, dringen aber nicht in die Zelle ein.

normalerweise nicht alle Halbleiterpartikel, sie können aber photoaktiviert werden.<sup>[243]</sup>

Weiterhin stellt sich die Frage, ob Partikel aus toxischem Material für In-vivo-Studien geeignet sind, ohne die biologische Funktion einzuschränken.<sup>[244]</sup> Beispielsweise sind Kern-Schale-NCs mit einer organischen Oberflächenbeschichtung kommerziell erhältlich, die chemische und photophysikalische Stabilität, Inertheit in verschiedenen Umgebungen und ausreichende Löslichkeit in Puffern gewährleisten soll. Außerdem können auf diese Weise reaktive Gruppen für die Kupplung mit Biomolekülen eingeführt werden. Diese Partikel sind mit 15 bis 25 nm Durchmesser ungefähr 4- bis 5-mal größer als GFP-Derivate und 15- bis 25-mal größer als konventionelle Fluorophore für die Markierung von Biomolekülen. Es ist weiterhin unsicher, ob die Partikel nur aus einem einzigen NC bestehen. Während diese Frage diejenigen Anwender weniger beschäftigt, die primär an der Intensität des Fluoreszenzsignals interessiert sind, erschwert sie die quantitative Analyse des Fluoreszenzsignals, die Informationen über die Zahl der an eine Zielstruktur gebundenen Moleküle liefern soll (Abbildung 13a).

Wir benutzten biotinylierte Polyarginin-Peptide (Arg<sub>10</sub>-Lys), um kommerziell erhältliche Streptavidin-überzogene NCs (Qdot605 streptavidin conjugate) in HeLa-Zellen einzuschleusen. So ist bekannt, dass fluoreszenzmarkierte Polyarginine (Arg<sub>10</sub>-Lys-Fluorescein) in die Zelle eindringen und sich im Zellkern anreichern (Abbildung 13b).<sup>[198, 199]</sup> Die mit Polyargininen versehenen NCs verhalten sich hingegen

anders: Zunächst wurde getestet, dass aus  $10^{-8}$  M Lösungen Streptavidin überzogene NCs nach 24 h weder von HeLa-Zellen aufgenommen werden, noch sich an die Zellmembran anlagern. Bei Zusatz eines Überschusses an biotinylierten Polyarginin-Peptiden ( $10^{-6}$  M Arg<sub>10</sub>-Lys-Biotin) binden die NCs sofort an die Zellmembran, ohne aber in die Zelle zu gelangen (Abbildung 13b). Größe (15–20 nm) und/oder Ladung der verwendeten NCs verhindern daher ihre Aufnahme über peptidspezifische Wege. Alternativ könnte die Peptidkennungssequenz (Arg<sub>10</sub>) teilweise in der Streptavidin-Bindungstasche versteckt sein.<sup>[195,199]</sup>

## 8. Colokalisation und Bestimmung des Abstands zwischen einzelnen Molekülen

SMFS eröffnet neue Wege für die Aufklärung des dreidimensionalen Aufbaus und der Funktion lebender Zellen. Die Informationen verdankt man der geringen Größe der Farbstoffmoleküle: Da Fluorophore wesentlich kleiner sind als die Wellenlänge des von ihnen emittierten Lichts, wirken sie als Punktlichtquellen. Das Zentrum der resultierenden Punktabbildungsfunktion (point spread function, PSF), die das Verhalten des optischen Systems wiedergibt, kann mit der Schwerpunktmethode oder mit einer Gauß-Funktion sehr genau bestimmt werden. Die PSF beschreibt die dreidimensionale Energiedichte im Raum, die von einer Punktlichtquelle erzeugt wird. Mit dieser genauen Lokalisierungsmethode wurde die Bewegung einzelner Motorproteine<sup>[64,245]</sup> sowie die Diffusion von markierten Lipidmolekülen<sup>[246,247]</sup> und von Molekülen in Gelen verfolgt.<sup>[248]</sup> Die hohe Positionsgenauigkeit ist auch nützlich bei der Colokalisation verschiedener Bausteine molekularer Maschinen in Zellen und für die präzise Bestimmung ihrer gegenseitigen Abstände. Eine einzelmolekülempfindliche Colokalisationstechnik mit einer Auflösung von einigen zehn Nanometern könnte die Lücke zwischen der Fernfeldmikroskopie (Auflösung über 200 nm) und FRET (Auflösung ca. 2–8 nm) schließen.

Vor kurzem wurde mit der hochauflösenden Einzelmolekül-Bildgebung mit Photozerstörung (single-molecule high-resolution imaging with photobleaching)<sup>[249]</sup> eine relativ einfache Methode vorgestellt. Sie nutzt die sequenzielle Photozerstörung zweier identischer Fluorophore, um Abstände bis hinab zu 10 nm zu bestimmen. Das beschriebene Verfahren kann jedoch nur die zweidimensionale Projektion des Abstands zwischen Molekülpaares in der xy-Ebene messen. Normalerweise werden die einzelnen Komponenten bei der Colokalisation von Biomolekül-Bausteinen mit Fluoreszenzmarkierungen angefärbt, die zumindest teilweise spektral getrennt werden können. Eine quantitative dreidimensionale Fluoreszenzanalyse gelingt mit konfokaler Vielfarben-Laser-Rastermikroskopie (CLSM) und hoch entwickelten Bildanalyseverfahren.<sup>[250,251]</sup> Bei gewöhnlichen Vielfarbenmethoden verschlechtern sphärische und chromatische Aberrationen im Anregungs- und Detektionsarm die Auflösung.<sup>[252]</sup> Um diese Probleme zu umgehen, präsentierten Lacoste et al. eine neue Methode für die hochauflösende Vielfarben-Colokalisation: Die verwendeten lumineszenten Nanopartikel werden bei einer einzigen Wellenlänge angeregt, emittieren aber bei

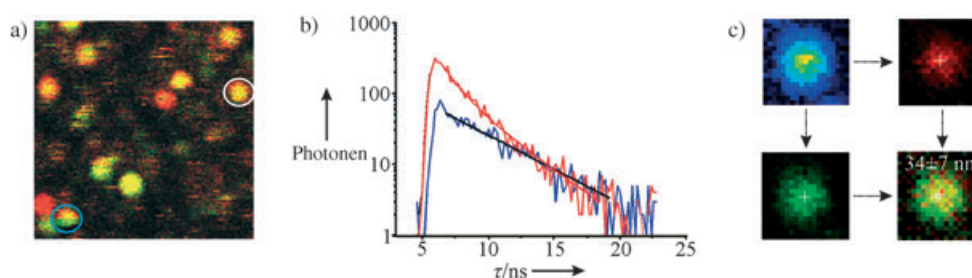
unterschiedlichen Wellenlängen.<sup>[253,254]</sup> In Kombination mit konfokaler Vielfarbenmikroskopie mit „orthogonalen“ Detektionskanälen kann die Fluoreszenz verschiedener Emitter getrennt aufgenommen werden. Da alle Emitter bei der gleichen Wellenlänge angeregt werden, sind chromatische Aberrationen bei der Anregung ausgeschlossen. Die Methode wurde für zwei Arten von Nanopartikeln demonstriert: Halbleiter-NCs und Kügelchen, die bei Energietransfer fluoreszieren (TransFluoSpheres). Allerdings sind die Energietransfer-Kügelchen mit 20–40 nm zu groß für Colokalisationsexperimente in kleinen molekularen Maschinen. Die NCs sind etwas kleiner, zeigen starke Fluoreszenz und sind wesentlich photostabiler als konventionelle Fluorophore, aber ihr Blinking verschlechtert die Bildqualität und damit die Lokalisierungsgenauigkeit.<sup>[254]</sup>

1995 erinnerte Betzig daran, dass jede optisch unterscheidbare Eigenschaft für die Identifizierung eines Farbstoffes genutzt werden kann.<sup>[255]</sup> Da einzelne Farbstoffmoleküle anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer unterscheidbar sind,<sup>[9,68,256]</sup> kann auch die Colokalisation verschiedener Emitter mithilfe von zeitauflösender Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt werden. Die Identifizierung anhand der Fluoreszenzlebensdauer als einzigem Unterscheidungsmerkmal vereinfacht den experimentellen Aufbau drastisch: So genügt ein Detektor, um zwei Farbstoffe mit ähnlichen Absorptions- und Emissionseigenschaften, aber verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern zu unterscheiden. Mit geeigneten Farbstoffen können intermolekulare Abstände bis in den Auflösungsbereich von FRET ohne chromatische Aberration gemessen werden.<sup>[257]</sup>

Bei Präzisionsdistanzmessungen mit zeitauflösender Fluoreszenzspektroskopie treten zwei Fehlerquellen auf: 1) Die detektierten Photonen müssen dem entsprechenden Emitter aufgrund ihrer mikroskopischen Ankunftszeit zugeordnet werden und 2) die beiden PSFs müssen angepasst werden, um die Emitter zu lokalisieren. Den Fehler der Photonenzuordnung zum jeweiligen Emitter könnte eine Kombination aus zeitlicher und spektraler Information vermindern (wie bei der SFLIM), die nanometergenaue Abstandsmessungen zwischen einzelnen konventionellen Farbstoffmolekülen ermöglichen würde (Abbildung 14).

Geeignete Farbstoffe sind für die Zuordnung der Photonen ebenso entscheidend wie für die Lokalisierungsgenauigkeit. Bodipy 630/650 und Cy5.5 bilden eine Farbstoffkombination für Hochpräzisionsdistanzmessungen zwischen einzelnen Molekülen, da sich ihre Fluoreszenzlebensdauern (Bodipy 630/650: ca. 4 ns; Cy5.5: ca. 2 ns) und ihre Fluoreszenzemissionsmaxima (Bodipy 630/650: ca. 660 nm; Cy5.5: ca. 700 nm) unterscheiden. Wenn sie an der Luft auf Glas adsorbiert sind, zeigen beide Farbstoffe kurze „Aus“-Zustände im Mikro- bis Millisekundenbereich (kürzer als die Integrationszeit pro Pixel).<sup>[78,257]</sup> Außerdem können beide Fluorophore durch eine gepulsten Laserdiode mit einer Emissionswellenlänge von 635 nm vergleichbar effizient angeregt werden, da der Extinktionskoeffizient von Cy5.5 größer ist. Verwendet man einen dichroitischen Strahlteiler bei 685 nm, so wird die langlebigere Fluoreszenz von Bodipy 630/650 hauptsächlich auf dem kürzerwelligen Detektor (Det1) detektiert, während das Signal für Cy5.5 mit einer





**Abbildung 14.** a) Falschfarben-SFLIM-Bild einer an beiden Enden markierten Doppelstrang-DNA (148 Basenpaare), immobilisiert in einem Agarosegel. Ein Ende ist mit Bodipy 630/650, das andere mit Cy5.5 markiert. Grüne und rote Punkte bezeichnen DNA-Moleküle, die nur einen Bodipy bzw. Cy5.5-Farbstoff enthalten, gelbe Punkte doppelt markierte DNA-Moleküle. Beim blau eingekreisten Molekül kann man die Photozerstörung eines Cy5.5-Moleküls während der Aufnahme erkennen. b) Fluoreszenzabklingkurven des langwelligeren (rot) und des kurzwelligen Kanals (blau) für den weiß eingekreisten Punkt in (a). c) Colokalisation eines Bodipy- und eines Cy5.5-Moleküls mit einem Abstand von  $34 \pm 7$  nm. Die Zuordnung der beiden separaten Fluoreszenzintensitätsbilder zum Bodipy- (unten links) und zum Cy5.5-Farbstoff (oben rechts) erfolgte durch Mustererkennung anhand der spektroskopischen Eigenschaften ( $F_2$ -Wert und Fluoreszenzlebensdauer).

kürzeren Fluoreszenzlebensdauer ausschließlich auf dem längerwelligen Detektor (Det2) registriert wird (Abbildung 14b). Die Genauigkeit der Methode wird zurzeit durch Präzisionsdistanzmessungen zwischen Bodipy 630/650 und Cy5.5 überprüft, bei denen beide Farbstoffe kovalent, in definierten Abständen zwischen 10 und 200 Basen, an Doppelstrang-DNA gebunden sind (Abbildung 14c).

Verschiedene neue Methoden sollen die räumliche Auflösung der optischen Mikroskopie unter die klassische Auflösungsgrenze verbessern: 4Pi-Mikroskopie,<sup>[258,259]</sup> die optische Rasternahfeldmikroskopie (near-field scanning optical microscopy, NSOM),<sup>[260,261]</sup> die Fluoreszenzmikroskopie mit einem stehenden Wellenfeld (standing-wave fluorescence microscopy, SWFM),<sup>[262–264]</sup> die kohärente optische Dipolkopplung von Einzelmolekülen bei tiefen Temperaturen (coherent optical dipole coupling of individual molecules at low temperature)<sup>[265]</sup> und das Engineering der Punktabbildungsfunktion (PSF) mithilfe von Fluoreszenzlöschung durch stimulierte Emission (stimulated emission depletion, STED).<sup>[266–269]</sup> Am Aussichtsreichsten erscheint das PSF-Engineering mit STED, da es die erste Fernfeldmethode ohne methodisch bedingte räumliche Auflösungsgrenze darstellt. Bei STED wird die beugungsbegrenzte Auflösung des Fluoreszenzspots verbessert, indem die Fluoreszenz durch Sättigung unterdrückt wird. Zu diesem Zweck wird der angeregte Fluorophor an den Rändern des Fokus durch stimulierte Emission gelöscht. Bei STED wurde bisher eine Auflösung von 28 nm für Einzelmoleküle erzielt.<sup>[270]</sup> Da dem Anregungspuls ein Löschpuls folgt, der auf den angeregten Zustand desselben Moleküls wirkt, stellen die Experimente von Westphal et al. die ersten Einzelmolekül-Pump-Probe-Experimente dar.<sup>[270]</sup> Dieser neue Ansatz wird nur durch den Sättigungsgrad limitiert, da er auf gesättigten optischen Übergängen beruht. Eine hohe Sättigung sollte mit niedrigen Lichtintensitäten machbar sein, und daher könnte man der Bildgebung im Nanobereich („Nanoscopy“) mit fokussiertem Licht näher sein als je zuvor.<sup>[268]</sup> Mit STED durch gegenüberstehende Linsen (STED-4Pi) gelang kürzlich die Immunfluoreszenz-Bildgebung mit einer axialen Auflösung von ca. 50 nm, was 1/16 der eingestrahnten Wellenlänge (793 nm) entspricht.<sup>[269]</sup>

## 9. Zusammenfassung und Ausblick

Ohne Zweifel hat die SMFS unser Wissen über biologische Makromoleküle und ihre Struktur-Wirkungs-Beziehungen erweitert. Darüber hinaus lieferten Einzelmolekülstudien wie die Sequenzierung eines einzelnen DNA-Stranges unerwartete Einblicke in das Verhalten einzelner Biomoleküle (z.B. DNA-Polymerasen). Die meisten natürlichen DNA-Polymerasen und Exonucleasen unterscheiden zwischen nativen und farbstoffmarkierten Nucleotiden. Dies könnte auf sterische Hinderung der aktiven Enzymregion durch die sperrige Markierung zurückzuführen sein und/oder darauf, dass fluoreszenzmarkierte Nucleotide oft eine andere Ladung tragen als native Substrate.<sup>[271,272]</sup> Brakmann und Mitarbeiter nutzten die direkte Evolution, um mutierte DNA-Polymerasen zu identifizieren, die markierte Nucleotide hoch effizient und zuverlässig einbauen.<sup>[273]</sup> Sie entdeckten, dass eine geklonte natürliche Polymerase, das nichtmodifizierte Exonuclease-freie Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I 55 aus *Escherichia coli*, aufeinander folgende Tetramethylrhodamin-4-dUTPs in ein künstliches (dA)55-Templat einbaut. Das gleiche Enzym wurde erfolgreich für eine analoge Reaktion mit einem natürlichen Primer-Templat aus 2700 Basenpaaren eingesetzt, um zwei der natürlichen Substrate, dCTP und dTTP, durch Rhodamin-markierte Analoga zu ersetzen.<sup>[274,275]</sup>

Die Tatsache, dass die Reaktionswege unterschiedlicher Moleküle nicht vorbestimmt sind, aber am Schluss zum gleichen Produktzustand führen, ist ein weiteres wichtiges Ergebnis von SMFS-Untersuchungen, das unsere Vorstellung von molekularen Modellsystemen stark verändert hat. Dynamische Strukturuntersuchungen zeigten, dass Reaktionen heterogen auf mehrdimensionalen Potentialflächen ablaufen. Da die unterschiedlichen Wege auf einer breiten Zeitskala, von Femtosekunden bis hin zu Sekunden, ablaufen können, differieren die einzelnen Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich. Mithilfe von SMFS kann man direkt den Reaktionsweg eines einzelnen Moleküls auf seiner Potentialfläche für sehr unterschiedliche Zeitskalen nachvollziehen.<sup>[5,140,276]</sup> Dies gelang durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und kurzreichweitige elektronische Wechselwirkungen zwischen Chromophoren und natürlichen Aminosäuren, d.h. durch photoindu-

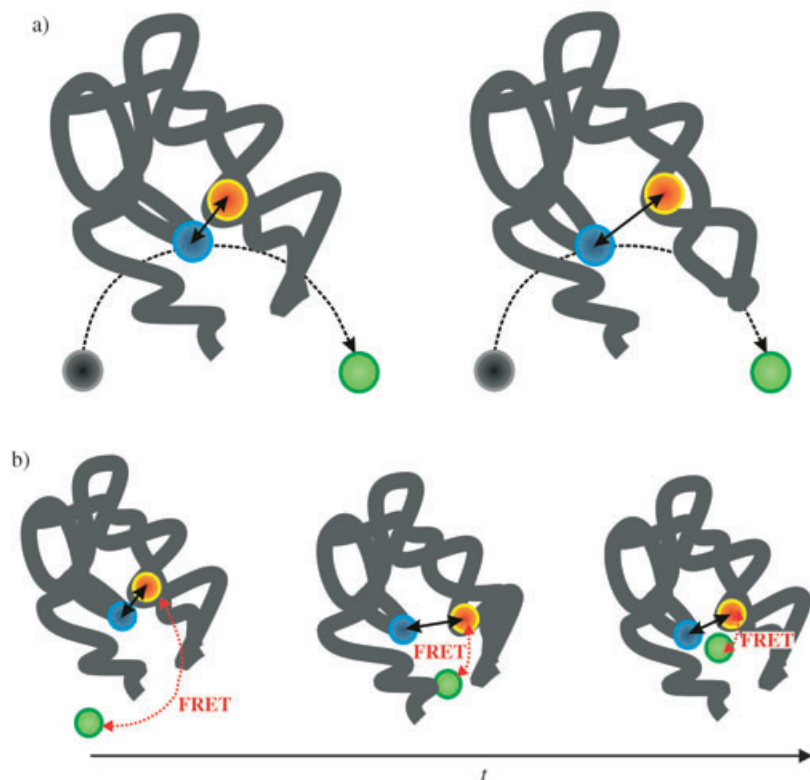
zierte Elektronentransferprozesse. Da für Elektronentransferprozesse Abstände im Subnanometerbereich maßgeblich sind, ergänzen sie die spFRET-Messungen für die Bestimmung größerer Abstände. Die neuesten Techniken machen beispielsweise die Fluktuationen in der Elektronentransfereffizienz zwischen einzelnen Aminosäure- und Fluorophormolekülen auf der Submikrosekundska sichtbar.<sup>[5]</sup> So ist es möglich, die Konformationsdynamik einzelner Biomoleküle im Gleichgewicht unter physiologischen Bedingungen mit einer zeitlichen Auflösung zu verfolgen, die in der Größenordnung aktueller Moleküldynamik-Simulationen liegen.<sup>[277]</sup>

Diesen Resultaten zufolge könnte die Konformationsdynamik direkt mit der Enzymaktivität, ausgedrückt z.B. als Umsatzgeschwindigkeit, in Beziehung gesetzt werden (Abbildung 15). Hierzu müsste das aktive Zentrum eines Enzyms spezifisch mit einem Fluorophor markiert werden, der selektiv von einer direkt benachbarten Aminosäure wie Tryptophan gelöscht wird.<sup>[5,139,146,149]</sup> Darüber hinaus muss der

Konformationsraum in der Nähe des Fluorophors eingeschränkt werden, denn anderenfalls wird die interessierende Dynamik durch Fluktuationen des Farbstoffs am Enzym überlagert. Aus der Brownschen Bewegung des Enzym resultieren für das aktive Zentrum Konformationsänderungen im Subnanometerbereich; die Konformationen entsprechen unterschiedlichen Punkten auf der Potentialfläche (das Enzym „bewegt“ sich auf dieser), was Variationen in der Elektronentransfereffizienz entspricht. Dies spiegelt sich direkt in Fluktuationen der Fluoreszenzintensität und -lebensdauer wider.

Bei einer entsprechenden Zeitauflösung könnte in solchen Experimenten gleichzeitig die Enzymaktivität gemessen werden, etwa durch die Umsetzung eines nichtfluoreszierenden Substrats in ein stark fluoreszierendes Produkt am aktiven Zentrum des Enzyms (Abbildung 15a).<sup>[278,279]</sup> Gibt es eine Beziehung zwischen spezifischen Reaktionswegen und der Bindung und Reaktion des Substrats oder der Freisetzung des Produkts (Abbildung 15b)? Noch ambitionierter ist der Versuch, Informationen über die Potentialfläche zu erhalten, indem man die zeitliche Reihenfolge betrachtet, in der verschiedene Konformationen eingenommen werden.

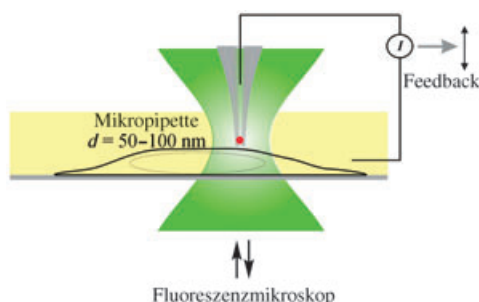
Darüber hinaus muss betont werden, dass das Potenzial von spFRET-Experimenten für biologische Untersuchungen noch nicht ausgeschöpft ist. spFRET ist nicht beschränkt auf die Bestimmung von Wechselwirkungen zwischen zwei Untereinheiten von molekularen Maschinen oder supramolekularen Strukturen. So wie FRET erfolgreich zur Konstruktion eines photonischen Leiters beigetragen hat, könnten SMFS-Techniken Wechselwirkungen von mehr als zwei Komponenten in Mehrstufen-FRET-Experimenten gleichzeitig sichtbar machen. Nichtsdestoweniger ist bei der Interpretation von Kollaborations- oder Mehrstufen-FRET-Daten, die mit mehr als zwei verschiedenen Markierungen gewonnen wurden, Vorsicht geboten. Zunächst müssen Fluorophore sowie Anregungs- und Detektionswellenlängen sorgfältig aufeinander abgestimmt werden, um eindeutige Informationen zu erhalten. Außerdem muss jeder Fluorophor direkt angeregt werden, um das Ausbleiben eines FRET-Signals sicher der Abwesenheit eines Moleküls zuordnen zu können;<sup>[280]</sup> anderenfalls kann es leicht zu Fehlinterpretationen kommen. Mit sorgfältig ausgewählten Fluorophoren, Anregungs- und Detektionstechniken können Vielfarbenexperimente aber vorteilhaft eingesetzt werden, um Wechselwirkungen in Molekülgruppen zu untersuchen und 3D-Abstandskarten für unterschiedlich markierte Proteine in biomolekularen Strukturen zu erstellen.



**Abbildung 15.** Experimente, durch die die Konformationsdynamik mit der Enzymaktivität und der Topographie von Potentialflächen korreliert werden könnte: a) Die Konformationsdynamik wird anhand der Fluoreszenzintensität und -lebensdauer eines Fluorophors (rot) verfolgt, der über Elektronentransfer durch eine Aminosäure wie Tryptophan (blau) gelöscht wird. Gleichzeitig wird die Enzymaktivität als die Geschwindigkeit gemessen, mit der ein nichtfluoreszierendes Substrat in ein stark fluoreszierendes Produkt mit anderer Anregungswellenlänge umgewandelt wird. b) Ein alternativer kombinierter Ansatz aus Elektronentransfer und spFRET. Zeitauflösende Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauer und -intensität eines rot absorbierenden Fluorophors (rot), der spezifisch über einen Elektronentransfer durch eine Aminosäure (blau) gelöscht wird, zeigt die Konformationsdynamik. Schneller Wechsel der Anregungswellenlänge zwischen dem roten Farbstoff im aktiven Zentrum und einem potenziellen FRET-Donor (grün), der an das Substrat gekuppelt ist, liefert gleichzeitig Informationen über Abstandsänderungen im Nanometerbereich zwischen dem aktiven Zentrum des Enzyms und dem Substrat.

Dank der beschriebenen Technologien sind heutzutage Experimente durchführbar, die vor ein paar Jahren noch undenkbar gewesen wären. Über eine reine Beschreibung der strukturellen Dynamik hinaus, muss es das Ziel der Einzelmolekülspektroskopie sein, quantitative Daten für biomolekulare Maschinen zu liefern, die entscheidend sind für das Überleben der Zelle. Wir begnügen uns nicht länger mit der Kolo-kalisation von Biomolekülen in verschiedenen Kompartimenten, sondern wollen vielmehr ihre absoluten Abstände im Bereich von 0.1–200 nm messen sowie ihre relative Orientierung und die Subnanometer-Fluktuationen bestimmen, die für ihre Funktion wichtig sind. Und wir interessieren uns dafür, wieviele Moleküle miteinander wechselwirken.

Darüber hinaus haben wir Einzelmolekültechniken zur Hand, die das Verhalten einer Zelle bei bestimmten Reizen lokal sichtbar machen (Abbildung 16). Durch Kombination



**Abbildung 16.** Mögliche Anwendung von SICM in Kombination mit Einzelmolekülfluoreszenz-Bildgebung zum Studium lokaler Dynamik in Zellen. Bei SICM wird die Oberfläche einer Probe in einer Elektrolytlösung durch eine mit Elektrolyt gefüllte Mikropipette abgerastert.<sup>[281]</sup> Der Abstand Pipette-Probe wird konstant gehalten, indem der Ionenstrom, der aus der Pipettenöffnung fließt, kontrolliert wird. Der gemessene Ionenstrom zeigt topographische Merkmale und/oder lokale Ionenströme an. Die räumliche Auflösung der Technik hängt von der Größe der Pipettenöffnung ab.

von Submikrometerpipetten mit Ionenleitfähigkeitsrastermikroskopie (Scanning Ion Conductance Microscopy, SICM) können hochaufgelöste topographische Bilder von lebenden Zellen erhalten werden.<sup>[281–283]</sup> Gleichzeitig könnten die Zellen an definierten Stellen durch Injektion in Zellplasma oder Zellkern oder durch die Zuführung fluoreszierender Moleküle an die Zellmembran stimuliert werden, während ihr Verhalten simultan an verschiedenen Positionen mit Fluoreszenzraster- oder Bildgebungsverfahren erfasst wird.<sup>[284]</sup> Alternativ könnte SICM einzelne Ionenkanäle in der Membran lokalisieren und ihre Funktion messen,<sup>[285]</sup> während die Bindung fluoreszenzmarkierter Moleküle an die innere oder äußere Membran beobachtet wird.<sup>[286–288]</sup>

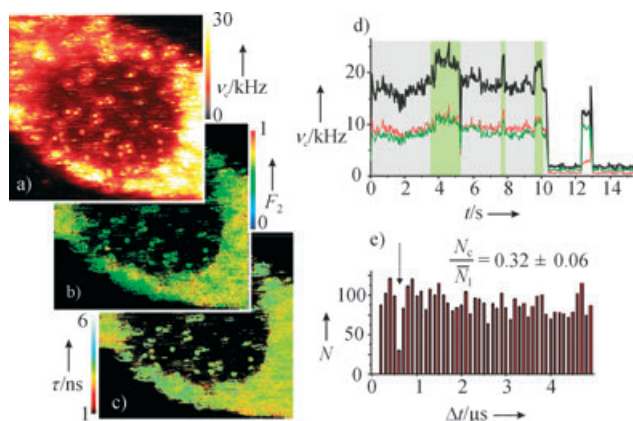
Um quantitative Informationen aus SMFS-Daten von lebenden Zellen abzuleiten, wie etwa die absolute Zahl von Polymerase-Molekülen in einem Transkriptions- oder Replikationszentrum, und die Abstände zwischen wechselwirkenden Molekülen zu messen, müssen einige Hürden genommen werden. Zunächst braucht man eine Methode, die Information über die Zahl der Moleküle im Laserfokus liefert. Bei Einzelmoleküluntersuchungen in lebenden Zellen wurden bisher durch indirekte Methoden (Photozerstörung in

einem einzigen, instantanen Schritt oder die Beobachtung von vorübergehenden „Aus“-Zuständen) sichergestellt, dass die beobachtete Fluoreszenz von einem einzigen Molekül stammt. Polarisationsmodulierte Anregungsspektroskopie oder Photon-Antibunching-Messungen liefern direktere Hinweise für das Vorliegen individueller Moleküle. Außerdem dient das Verhältnis aus der Zahl koinzidenter Photonenpaare und der Zahl nichtkoinzidenter Photonenpaare in Photon-Antibunching-Experimenten als Maß dafür, wieviele Fluorophore in einem gegebenen Zeitintervall unabhängig voneinander emittieren (Abbildung 17).<sup>[89,90,289]</sup> Photon-Antibunching-Experimente eignen sich dann hervorragend zum Zählen fluoreszierender Moleküle im Laserfokus, wenn Wechselwirkungen höherer angeregter Zustände, wie Singulett-Singulett-Annihilation, vernachlässigt werden können.<sup>[85]</sup> Allerdings kann das Hintergrundsignal die Zählung erschweren, da es das Verhältnis zwischen Zentral- und Seitenbanden in Koinzidenzhistogrammen beeinflusst; die Methode versagt auch, wenn mehr als vier Moleküle gleichzeitig erfasst werden müssen.<sup>[90]</sup> Dennoch hat sich die Kombination von SFLIM und Photon-Antibunching-Experimenten bei der Bildgebung und dem Zählen von Molekülen in Zellen bewährt (Abbildung 17). SFLIM eignet sich außerdem zur Bestimmung von Abständen zwischen einzelnen Molekülen weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze.<sup>[257]</sup> Es stehen also bereits einige Techniken für die Quantifizierung biomolekularer Maschinen zur Verfügung.

Da die gezielte Markierung von Biomolekülen wie Proteinen mit einem einzigen Fluorophor für quantitative Messungen grundlegend ist, müssen neue Markierungsstrategien entwickelt werden. Normalerweise werden Proteine wie Antikörper mit einem Farbstoffüberschuss mehrfach markiert (der nicht verbrauchte Fluorophor wird anschließend durch Gelfiltration entfernt). Solche mehrfach markierten Antikörper können jedoch nicht zum Zählen von Molekülen in Photon-Antibunching-Experimenten eingesetzt werden.

Ein Beispiel: Das Zählen von Polymerase-II-Molekülen in Transkriptionszentren erfordert einfach fluoreszenzmarkierte Antikörper. Prinzipiell kann ein durchschnittlicher Markierungsgrad unter eins leicht durch Verringerung der Farbstoffkonzentration bei der Markierungsreaktion erzielt werden. Da aber die Trennung von markierten und nicht markierten Antikörpern fast unmöglich ist, und nicht markierte Antikörper ebenfalls an Polymerase-Moleküle binden, kann man keine quantitative Aussage treffen. Diese Probleme umgingen Lewinska et al. mit einer neuen Methode zur spezifischen Markierung nativer Proteine an einer einzigen Position. Mithilfe einer kommerziell erhältlichen IgA-Protease hängten sie einen synthetischen Peptidabschnitt, der selektiv verändert werden kann, an das N-terminale Ende der Antikörper an.<sup>[290]</sup> Wir entwickeln zurzeit eine Markierungsstrategie für Antikörper, die garantiert, dass praktisch alle Antikörper in der Probe nur ein einziges Fluorophor tragen (bei einem geringen Anteil an Doppelmarkierungen). Die Strategie nutzt die spezifische Bindung des Linkers (z.B. eines Peptids) zwischen Fluorophor und Antikörper an einen weiteren Antikörper. Mit einem Oligohistidin-Linker (Histidin<sub>6–12</sub>, kovalent mit dem N-Terminus an den Fluorophor gebunden) und unter Bedingungen, die einen niedrigen





**Abbildung 17.** Konfokale Fluoreszenzbilder einer fixierten 3T3-Fibroblastenzelle, die mit  $10^{-9}$  M MR121-markierten Oligo(dT)-40-meren inkubiert wurde (Anregung bei 635 nm mit einer gepulsten Laserdiode). Oligo(dT) kann an die Poly(A)-Schwanzsequenz der mRNAs hybridisieren.<sup>[186]</sup> a) Fluoreszenzintensitätsbild, aufgenommen mit einem SFLIM-Mikroskop. Im Zellkern sind helle Punkte mit Fluoreszenzzählraten bis zu 30 kHz erkennbar.<sup>[78]</sup> b) und c) zeigen das entsprechende spektrale ( $F_2$ ) bzw. Lebensdauerbild ( $\tau$ ). Bei der Berechnung des  $F_2$ - und  $\tau$ -Bildes wurden nur Pixel mit mehr als 15 Photonen berücksichtigt. Wegen der spektroskopischen Charakteristik MR121-markierter Oligo(dT)-Moleküle mit einer Fluoreszenzlebensdauer von ca. 3 ns und einem  $F_2$ -Wert von ca. 0.5 können spezifische Signale einfach von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden.<sup>[83]</sup> d) Fluoreszenzintensitätskurve (Zählrate  $\nu_e$  gegen die Zeit  $t$ ) eines Farbstoffs im Kern einer Fibroblastenzelle (schwarz: Gesamtintensität, grün: Detektor 1, rot: Detektor 2). Mit einer Hintergrundzählrate von ca. 2 kHz werden Signal-Hintergrund-Verhältnisse von ca. 9 im Zellkern erreicht. Da mehrere Oligo(dT)-Moleküle an eine einzige Poly(A)-Schwanzsequenz der mRNA hybridisieren können, kann a priori nicht festgestellt werden, ob die beobachteten Intensitätsfluktuationen (graue und grüne Bereiche) eine photophysikalische Ursache haben, oder daraus resultieren, dass eine wechselnde Zahl von Molekülen zum Signal beiträgt. e) Das Interphotonenzeiten(Koinzidenz)-Histogramm aller während der ersten 10 s detektierten Photonen ergibt ein  $N_e/\bar{N}_e$ -Verhältnis von  $0.32 \pm 0.06$ . Andererseits lässt das S/H-Verhältnis ein  $N_e/\bar{N}_e$ -Verhältnis von ca. 0.18 für einen einzelnen Emitter erwarten.<sup>[90]</sup> Separate Interphotonenhistogramme aus den Photonen bei hohen (grün) und niedrigen (grau) Zählraten ergeben zwei  $N_e/\bar{N}_e$ -Verhältnisse von  $0.55 \pm 0.13$  (für den grünen Anteil) und  $0.17 \pm 0.05$  (für den grauen Anteil). Dies zeigt, dass die beobachteten Intensitätsfluktuationen durch eine variierende Zahl von Molekülen im Laserfokus zustande kommen.

Markierungsgrad sicherstellen, werden nach Auftrennung an einer His-Tag-Säule einfach markierte Antikörper erhalten.

Schließlich könnte es durch die Kombination von SMFS-Techniken mit Einzelmolekül-Manipulationstechniken wie der optischen Pinzette<sup>[291]</sup> oder anderen Spektroskopietechniken wie der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (surface-enhanced Raman scattering, SERS) möglich werden, mehrere Observablen biologischer Reaktionen in lebenden Zellen gleichzeitig aufzuzeichnen. Bei der konventionellen Raman-Spektroskopie wird inelastisch gestreutes Licht zur Identifizierung von Molekülen anhand ihrer charakteristischen Anregungsquantenzustände genutzt. SERS verstärkt den schwachen Raman-Effekt (um bis zu 14 Größenordnungen), indem die Moleküle auf nanometergroßen Metallstrukturen adsorbiert werden.

Zur Anwendung von SERS, SMFS und optischen Pinzetten auf Zellen werden ähnliche Geräte benötigt: Ein Laserstrahl wird über Objektive mit hoher Vergrößerung in die Zelle fokussiert. Kneipp und Mitarbeiter brachten 60-nm-Goldpartikel in Zellen als SERS-aktive Nanostrukturen ein, um die verstärkten Raman-Signale der chemischen Verbindungen in einer Zelle zu messen.<sup>[292]</sup> Die SERS-Kartierung einer Zellschicht mit 1  $\mu$ m lateraler Auflösung ergab für fast alle Stellen unterschiedliche Raman-Spektren, was den inhomogenen Aufbau der Zelle widerspiegelt. Diese neuen Spektroskopiemethoden ermöglichen die hoch empfindliche und strukturselektive Detektion chemischer Verbindungen in der Zelle und liefern Informationen über deren intrazelluläre Verteilung.

Die neuen Techniken eröffnen aufregende Perspektiven für zellbiologische und medizinische Studien, es müssen aber verschiedene Probleme überwunden werden. Bei der Kombination von SERS mit optischen Pinzetten und SMFS gestaltet sich einerseits das optische „Trapping“ der für SERS benötigten Metallpartikel schwierig.<sup>[293]</sup> Außerdem kann die Lichtabsorption durch die Metallpartikel zu einer Temperaturerhöhung führen, die die Zellen schädigt („Opticution“).<sup>[294]</sup> Auch für refraktorsch absorbierende Materialien können Aufheizeffekte zu einem Problem werden, da Blasenbildung das „Trapping“ unterbrechen kann.<sup>[295]</sup>

Andererseits könnten zum „optischen Trapping“ Standard-Mikrokügelchen benutzt werden, die mit einer dünnen Metallschicht überzogen sind oder Metallcluster an ihrer Oberfläche tragen. So würde die optische Anregung von Oberflächenplasmonen unterstützt, aber das dreidimensionale „optische Trapping“ bliebe möglich, da die Wärmeentwicklung minimiert wäre. Außerdem müssten die Fluoreszenzsensoren über mehrere Nanometer lange, wasserlösliche Polyethylenglycol(PEG)-Linker angebracht werden, da die Fluoreszenz der Fluorophore durch die Metalloberfläche bis zu einem Abstand von mehreren zehn Nanometern gelöscht wird. Die Löschung beruht auf einem Energietransfer vom Fluorophor zum Metall.<sup>[296–298]</sup> Dieser kombinierte Ansatz könnte eine elegante ortsgenaue Messung von Kräften<sup>[299]</sup> und individuellen Bindungsereignissen mit Fluoreszenzsensoren ermöglichen.<sup>[300]</sup> Gleichzeitig könnte die Konzentration spezieller Biomoleküle in lebenden Zellen durch SERS gemessen werden.<sup>[292]</sup> In einer weiterentwickelten Version könnte eine einzige IR-Laser-Wellenlänge das Kügelchen optisch festhalten, das SERS-Signal erzeugen und den Farbstoff durch Zweiphotonenabsorption anregen.<sup>[301]</sup>

## Addendum (12. Februar 2005)

Auch nach dem Einreichen dieses Aufsatzes hat sich der Trend fortgesetzt, anspruchsvolle biologische Probleme mithilfe der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie anzugehen. Beispiele umfassen die Verbesserung chemischer Verfahren, um den Anforderungen biologischer Systeme besser zu genügen, die Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden für die Dynamik von Biomolekülen und das Studium künstlicher Lichtsammel- und Elektronentransfersysteme. Im Unterschied zu früheren SMFS-Studien, die oft den Charakter

von Machbarkeitsstudien hatten, richtet sich die Aufmerksamkeit zunehmend auf die Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Methoden durch Kontrollen und Gegenproben weiter ausgearbeitet und besser charakterisiert.

Beispielsweise wurde die Immobilisierung von Biomolekülen immer mit viel Skepsis betrachtet, da der Einfluss der Oberfläche auf die Eigenschaften der untersuchten Moleküle nur schwer einzuschätzen war. Kürzlich konnte jedoch die Störung durch die Oberfläche so weit minimiert werden, dass sie die Dynamik der Biomoleküle nicht mehr dominiert. So fanden Okumus und Mitarbeiter keinen Unterschied in der Dynamik von Ribozym-Molekülen, gleich ob sie direkt an einer Oberfläche angebracht oder in Vesikeln eingeschlossen waren.<sup>[303]</sup> Außerdem wurden Anbindungsstrategien durch den Vergleich verschiedener Schemata verbessert. Hierbei zeigte sich, dass ein sternförmiges Polyethylenoxid (PEO) die günstigsten Eigenschaften aufweist.<sup>[304]</sup>

Während sich FRET als SMFS-Technik für komplexere Probleme wie die Untersuchung der Translation<sup>[305,306]</sup> und die Analyse der reversiblen Reaktionswege des Haarnadelschleifen-Ribozyms<sup>[307]</sup> etabliert hat, wird bei der gleichzeitigen Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen mehr als zwei Chromophoren noch unbekanntes Gebiet betreten. Die Möglichkeit, FRETs zwischen drei oder bis zu fünf Chromophoren aufzulösen, wurde kürzlich demonstriert;<sup>[308–310]</sup> die Technik eröffnet somit einen neuen Weg zur Visualisierung der Wechselwirkungen zwischen mehreren Molekülen innerhalb eines biomolekularen Komplexes oder zur Korrelation der Bewegung verschiedener Einheiten eines Komplexes. Das Studium von FRET-Prozessen in Multichromophor-Modellsystemen hat auch zu einem umfassenden Verständnis des Intersystem Crossings und der Photozerstörung von Chromophoren geführt,<sup>[311]</sup> sodass sich aktuelle Arbeiten stärkeren Wechselwirkungen wie der Bildung von Excimer-Zuständen<sup>[312]</sup> und der „Superradiance“ in stark gekoppelten Tetraphenoxypyryliid-Trimern zuwenden.<sup>[313]</sup> Die neuen Ergebnisse sind gerade für die Interpretation der photophysikalischen Eigenschaften technologisch interessanter Moleküle wie  $\pi$ -konjugierter Polymere von enormer Bedeutung.<sup>[314]</sup>

Eindrucksvolle Erfolge belegen, dass SMFS wichtige Informationen über komplexe Prozesse in lebenden Zellen liefern kann. TIRFM wurde zur Visualisierung verschiedener Einzelmolekülprozesse in lebenden Zellen eingesetzt: Beispiele hierfür sind die Aktivierung des G-Proteins Ras<sup>[315]</sup> oder die durch den FcRn-Rezeptor unterstützte Exozytose von IgG.<sup>[316]</sup> Ebenso konnte der Transport einzelner Moleküle durch den Kernporenkomplex in permeabilisierten Zellen direkt verfolgt werden.<sup>[317]</sup> In neuesten Arbeiten gelang die Beobachtung der Katalyse und Substratkinetik einzelner Lipase-Enzyme in Echtzeit – gemäß der von uns in Abbildung 15a vorgeschlagenen Methode konnte also die Aktivität einzelner Enzyme anhand der Hydrolyse nichtfluoreszierender Substrate zu fluoreszierenden Produkten bis zu 2 h lang direkt verfolgt werden.<sup>[318,319]</sup> Um gleichzeitig die Dynamik der Proteinkonformation zu beobachten, die für die Funktion entscheidend ist, müsste das Enzym spezifisch mit einem geeigneten FRET-Paar markiert werden.

Weitere Techniken, die topographische Information auf der Nanometerskala oder anderweitige zusätzliche Information liefern (z. B. AFM und „electrical channel recording“), werden derzeit erfolgreich mit optischen Einzelmolekültechniken kombiniert.<sup>[320,321]</sup> Der Einsatz von NCs in verschiedenen Bereichen der Biologie ist ebenso weitergereift, wobei zytotoxische Effekte<sup>[322,323]</sup> und neue Markierungsstrategien für Anwendungen in lebenden Zellen im Vordergrund stehen.<sup>[324–326]</sup> Vor kurzem beschrieben Lagerholm und Mitarbeiter eine Strategie zum Einbringen von NCs in lebende Zellen; ihre Methode ähnelt der in Abbildung 13 vorgestellten Markierung von QDs mit Peptiden, die mehrere Argininreste enthalten. Interessanterweise fanden sie, dass suspendierte Zellen schnell markiert werden, während in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen bei anhaftenden Zellen hauptsächlich die extrazelluläre Matrix markiert wird.<sup>[325]</sup>

Die Verbesserung der Präzision bei der Lokalisierung und Colokalisation einzelner Biomoleküle weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze bleibt ein grundsätzliches Anliegen der Einzelmolekülspektroskopie. Inwieweit neue Methoden wie die schrittweise Photozerstörung von Chromophoren, die STED-Mikroskopie oder die spektral auflösende Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie für die DNA-Kartierung mit sehr hoher Auflösung und das Studium der Bewegung molekularer Motoren wie Myosin V geeignet sind, wird gerade erforscht.<sup>[327–333]</sup> Des Weiteren diskutieren Wissenschaftler weltweit über die Entwicklung einer Technik für die absolute 3D-Lokalisierung einzelner Moleküle in lebenden Zellen. Das Analogon zum „Globalen Positionierungssystem (GPS)“ auf zellulärer Ebene wäre ein „zelluläres Positionierungssystem (CPS)“ oder ein „Molekülpositionierungssystem (MPS)“, bei dem beispielsweise bestimmte Kompartimente in einer Zelle spezifisch mit Farbstoffen unterschiedlicher spektraler Signatur markiert werden; alternativ könnten Zellen auf einer dreidimensional nanostrukturierten Oberfläche abgelegt werden, auf der mindestens drei Fixpunkte selektiv mit verschiedenen Farbstoffen markiert sind. Theoretisch würde dies die Bestimmung der absoluten Position jedes fluoreszenzmarkierten Biomoleküls in Bezug auf die Fixpunkte ermöglichen.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen deutlich, wie rasch sich die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie weiterentwickelt und wie wenig von ihrer Faszination sie dabei verloren hat.

*Die Autoren danken H. Barsch, V. Buschmann, A. Biebricher, F. C. De Schryver, S. Doose, K. H. Drexhage, J. Enderlein, M. F. Garcia-Parajo, K. T. Han, M. Heilemann, T. Heinlein, D.-P. Herten, J. Hofkens, J. P. Knemeyer, N. Marmé, C. Müller, H. Neuweiler, C. Roth, M. Rüping, C. W. Park, O. Piester, P. Schlüter, A. Schulz, D. Seebach, C. A. M. Seidel, N. F. van Hulst, S. Weiss, K. D. Weston, J. Wolfrum und C. Zander für ihre Beiträge und aktive Unterstützung der Einzelmolekülspektroskopie-Forschung in Heidelberg und Bielefeld. Die Arbeiten wurden vom BMBF, der VW-Stiftung und der DFG gefördert.*

Eingegangen am 29. Dezember 2003

- [1] G. Binnig, H. Rohrer, *Rev. Mod. Phys.* **1987**, *59*, 615–625.
- [2] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930–933.
- [3] B. Schuler, E. A. Lipman, W. A. Eaton, *Nature* **2002**, *419*, 743–747.
- [4] E. A. Lipman, B. Schuler, O. Bakajin, W. A. Eaton, *Science* **2003**, *301*, 1233–1235.
- [5] H. Neuweiler, A. Schulz, M. Boehmer, J. Enderlein, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5324–5330.
- [6] M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb, *Science* **2003**, *299*, 682–686.
- [7] I. Braslavsky, B. Hebert, E. Kartalov, S. R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3960–3964.
- [8] J. H. Jett, R. A. Keller, J. C. Martin, B. L. Marrone, R. K. Moyzis, R. L. Ratliff, N. K. Seitzinger, E. B. Shera, C. C. Stewart, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *7*, 301–309.
- [9] M. Sauer, B. Angerer, W. Ankenbauer, Z. Foldes-Papp, F. Göbel, K. T. Han, R. Rigler, A. Schulz, J. Wolfrum, C. Zander, *J. Biotechnol.* **2001**, *86*, 181–201.
- [10] K. Dorre, S. Brakmann, M. Brinkmeier, K.-T. Han, K. Riebel, P. Schille, J. Stephan, T. Wetzel, M. Lapczynska, M. Stuke, R. Bader, M. Hinz, H. Seliger, J. Holm, M. Eigen, R. Rigler, *Bioimaging* **1997**, *5*, 139–152.
- [11] J. H. Werner, H. Cai, J. H. Jett, L. Reha-Krantz, R. A. Keller, P. M. Goodwin, *J. Biotechnol.* **2003**, *102*, 1–14.
- [12] W. E. Moerner, T. Basche, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 537–557; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 457–476.
- [13] X. S. Xie, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 598–606.
- [14] S. M. Nie, R. N. Zare, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 567–596.
- [15] X. S. Xie, J. K. Trautman, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, *49*, 441–480.
- [16] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, A. Van Orden, J. H. Werner, R. A. Keller, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2929–2956.
- [17] W. E. Moerner, S. Weiss, J. K. Gimzewski, A. D. Mehta, *Science* **1999**, *283*, 1667–1695 (Single Molecule Special Issue).
- [18] C. Zander, *J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 745–751.
- [19] A. A. Deniz, T. A. Laurence, M. Dahan, D. S. Chemla, P. G. Schultz, S. Weiss, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52*, 233–253.
- [20] W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 910–927.
- [21] Y. Jung, E. Barkai, R. J. Silbey, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 10980–10995.
- [22] M. Orrit, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 10938–10946.
- [23] A. N. Kapanidis, S. Weiss, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 10953–10964.
- [24] W. E. Moerner, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 10925–10937.
- [25] X. Sunney Xie, *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 11024–11032.
- [26] R. A. Keller, W. P. Ambrose, A. A. Arias, H. Cai, S. R. Emory, P. M. Goodwin, J. H. Jett, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 316A–324A.
- [27] U. Kubitschek, *Single Mol.* **2002**, *3*, 267–274.
- [28] M. Boehmer, J. Enderlein, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 792–808.
- [29] W. E. Moerner, D. P. Fromm, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 3597–3619.
- [30] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55–75.
- [31] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62*, 2535–2538.
- [32] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *174*, 553–557.
- [33] F. Zarrin, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2690–2692.
- [34] E. Betzig, R. J. Chichester, *Science* **1993**, *262*, 1422–1425.
- [35] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, R. A. Keller, *Science* **1994**, *265*, 364–367.
- [36] T. Enderle, T. Ha, D. S. Chemla, S. Weiss, *Ultramicroscopy* **1998**, *71*, 303–309.
- [37] F. De Lange, A. Cambi, R. Huijbens, B. De Bakker, W. Rensen, M. Garcia-Parajo, N. Van Hulst, C. G. Figdor, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 4153–4160.
- [38] M. Koopman, B. I. de Bakker, M. F. Garcia-Parajo, N. F. van Hulst, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 5083–5085.
- [39] A. Cambi, F. de Lange, N. M. van Maarseveen, M. Nijhuis, B. Joosten, E. M. H. P. van Dijk, B. I. de Bakker, J. A. M. Fransen, P. H. M. Bovee-Geurts, F. N. van Leeuwen, N. F. Van Hulst, C. G. Figdor, *J. Cell Biol.* **2004**, *164*, 145–155.
- [40] J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2. Aufl., Plenum, New York, **1995**.
- [41] R. Rigler, Ü. Mets, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. Proc. SPIE* **1992**, *239*–247.
- [42] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, P. Kask, *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **1993**, *22*, 169–175.
- [43] C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R. M. Williams, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10763–10768.
- [44] J. Mertz, C. Xu, W. W. Webb, *Opt. Lett.* **1995**, *20*, 2532–2534.
- [45] L. Brand, C. Eggeling, C. Zander, K. H. Drexhage, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 4313–4321.
- [46] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, *248*, 73–76.
- [47] A. Fischer, C. Cremer, E. H. K. Stelzer, *Appl. Opt.* **1995**, *34*, 1989–2003.
- [48] C. Xu, W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481–491.
- [49] K. G. Heinze, M. Rabach, M. Jahnz, P. Schwill, *Biophys. J.* **2002**, *83*, 1671–1681.
- [50] M. Eigen, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5740–5747.
- [51] S. Maiti, U. Haupts, W. W. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11753–11757.
- [52] Y. Chen, J. D. Müller, P. T. C. So, E. Gratton, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 553–567.
- [53] P. Kask, K. Palo, D. Ullmann, K. Gall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13756–13761.
- [54] P. Kask, K. Palo, N. Fay, L. Brand, Ü. Mets, D. Ullmann, J. Jungmann, J. Pschorr, K. Gall, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1703–1713.
- [55] K. Palo, Ü. Mets, S. Jäger, P. Kask, K. Gall, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2858–2866.
- [56] T. A. Laurence, A. N. Kapanidis, X. Kong, D. S. Chemla, S. Weiss, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 3051–3067.
- [57] E. S. Yeung, *Chem. Rev.* **2001**, *1*, 123–139.
- [58] T. Ha, I. Rasnik, W. Cheng, H. P. Babcock, G. H. Gauss, T. M. Lohman, S. Chu, *Nature* **2002**, *419*, 638–641.
- [59] D. Axelrod, *Methods Cell Biol.* **1989**, *30*, 245–270.
- [60] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. P. Nolan, *Cytometry* **1999**, *36*, 224–231.
- [61] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, *Nature* **1995**, *374*, 555–559.
- [62] M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane, T. Yanagida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 47–53.
- [63] A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale, P. R. Selvin, *Science* **2004**, *303*, 676–679.
- [64] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Science* **2003**, *300*, 2061–2065.
- [65] R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, T. Yanagida, *Nature* **1996**, *380*, 451–453.
- [66] J. N. Forkey, M. E. Quinlan, M. A. Shaw, J. E. T. Corrie, Y. E. Goldman, *Nature* **2003**, *422*, 399–404.
- [67] C. W. Wilkerson, P. M. Goodwin, W. P. Ambrose, J. C. Martin, R. A. Keller, *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *62*, 2030–2032.
- [68] M. Sauer, J. Arden-Jacob, K. H. Drexhage, F. Göbel, U. Lieberwirth, K. Mühlegger, R. Müller, J. Wolfrum, C. Zander, *Bioimaging* **1998**, *6*, 14–24.
- [69] S. A. Soper, L. M. Davis, E. B. Shera, *J. Opt. Soc. Am. B* **1992**, *9*, 1761–1769.
- [70] A. Van Orden, R. A. Keller, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4463–4471.
- [71] J. Schaffer, A. Volkmer, C. Eggeling, V. Subramaniam, G. Striker, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 331–336.
- [72] F. Stracke, C. Blum, S. Becker, K. Müllen, A. J. Meixner, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *325*, 196–202.



- [73] A. J. Meixner, M. A. Weber, *J. Lumin.* **2000**, 86, 181–187.
- [74] K. D. Weston, S. K. Buratto, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 3635–3638.
- [75] H. P. Lu, X. S. Xie, *Nature* **1997**, 385, 143–146.
- [76] K. D. Weston, L. S. Goldner, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 3453–3462.
- [77] P. Tinnefeld, V. Buschmann, D. P. Herten, K.-T. Han, M. Sauer, *Single Mol.* **2000**, 1, 215–223.
- [78] P. Tinnefeld, D. P. Herten, M. Sauer, *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105, 7989–8003.
- [79] T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 77, 3979–3982.
- [80] M. Prummer, C. G. Hubner, B. Sick, B. Hecht, A. Renn, U. P. Wild, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 443–447.
- [81] M. Prummer, B. Sick, A. Renn, U. P. Wild, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1633–1640.
- [82] D. P. Herten, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Appl. Phys. B* **2000**, 71, 765–771.
- [83] J.-P. Knemeyer, D.-P. Herten, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2147–2153.
- [84] D. S. English, E. J. Harbron, P. F. Barbara, *J. Chem. Phys.* **2001**, 114, 10479–10485.
- [85] P. Tinnefeld, K. D. Weston, T. Vosch, M. Cotlet, T. Weil, J. Hofkens, K. Müllen, F. C. De Schryver, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14310–14311.
- [86] C. Eggeling, S. Berger, L. Brand, J. R. Fries, J. Schaffer, A. Volkmer, C. A. M. Seidel, *J. Biotechnol.* **2001**, 86, 163–180.
- [87] R. Kühnemuth, C. A. M. Seidel, *Single Mol.* **2001**, 2, 251–254.
- [88] A. M. Kelley, X. Michalet, S. Weiss, *Science* **2001**, 292, 1671–1672.
- [89] P. Tinnefeld, C. Müller, M. Sauer, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 345, 252–258.
- [90] K. D. Weston, M. Dyck, P. Tinnefeld, C. Müller, D. P. Herten, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5342–5349.
- [91] T. Vosch, M. Cotlet, J. Hofkens, K. Van Biest, M. Lor, K. Weston, P. Tinnefeld, M. Sauer, L. Latterini, K. Müllen, F. C. De Schryver, *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 6920–6931.
- [92] C. Eggeling, J. R. Fries, L. Brand, R. Günther, C. A. M. Seidel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 1556–1561.
- [93] J. R. Fries, L. Brand, C. Eggeling, M. Köllner, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 6601–6613.
- [94] J. Tellinghuisen, C. W. Wilkerson, Jr., *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1240–1246.
- [95] J. Enderlein, M. Sauer, *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105, 48–53.
- [96] J. Enderlein, P. M. Goodwin, A. Van Orden, W. P. Ambrose, R. Erdmann, R. A. Keller, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 270, 464–470.
- [97] M. Maus, M. Cotlet, J. Hofkens, T. Gensch, F. C. De Schryver, J. Schaffer, C. A. M. Seidel, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2078–2086.
- [98] T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 271, 1–5.
- [99] R. Hanbury Brown, R. Q. Twiss, *Nature* **1956**, 178, 1046–1048.
- [100] T. Basche, W. E. Moerner, M. Orrit, H. Talon, *Phys. Rev. Lett.* **1992**, 69, 1516–1519.
- [101] L. Fleury, J. M. Segura, G. Zumofen, B. Hecht, U. P. Wild, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, 84, 1148–1151.
- [102] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. Enderlein, D. J. Semin, J. C. Martin, R. A. Keller, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 269, 365–370.
- [103] M. Wu, P. M. Goodwin, W. P. Ambrose, R. A. Keller, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 17406–17409.
- [104] J. Hofkens, M. Maus, T. Gensch, T. Vosch, M. Cotlet, F. Kohn, A. Herrmann, K. Müllen, F. De Schryver, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9278–9288.
- [105] P. J. Rothwell, S. Berger, O. Kensch, S. Felekyan, M. Antonik, B. M. Wohrl, T. Restle, R. S. Goody, C. A. M. Seidel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1655–1660.
- [106] K. Kinoshita, Jr., H. Itoh, S. Ishiwata, K. Hirano, T. Nishizaka, T. Hayakawa, *J. Cell Biol.* **1991**, 115, 67–73.
- [107] L. Cognet, G. S. Harms, G. A. Blab, P. H. M. Lommerse, T. Schmidt, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77, 4052–4054.
- [108] L. Stryer, R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 719–726.
- [109] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 819–846.
- [110] W. Veatch, L. Stryer, *J. Mol. Biol.* **1977**, 113, 89–102.
- [111] J. Szollosi, S. Damjanovich, L. Matyus, *Cytometry* **1998**, 34, 159–179.
- [112] F. Stühmeier, J. B. Welch, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, R. M. Clegg, *Biochemistry* **1997**, 36, 13530–13538.
- [113] K. M. Parkhurst, M. Brenowitz, L. J. Parkhurst, *Biochemistry* **1996**, 35, 7459–7465.
- [114] T. Tuschl, C. Gohlke, T. M. Jovin, E. Westhof, F. Eckstein, *Science* **1994**, 266, 785–789.
- [115] S. Weiss, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 724–729.
- [116] T. Ha, *Methods* **2001**, 25, 78–86.
- [117] A. A. Deniz, T. A. Laurence, G. S. Beligere, M. Dahan, A. B. Martin, D. S. Chemla, P. E. Dawson, P. G. Schultz, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5179–5184.
- [118] T. Ha, *Single Mol.* **2001**, 2, 283–284.
- [119] H. D. Kim, G. U. Nienhaus, T. Ha, J. W. Orr, J. R. Williamson, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 4284–4289.
- [120] T. Ha, X. W. Zhuang, H. D. Kim, J. W. Orr, J. R. Williamson, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 9077–9082.
- [121] X. Zhuang, L. E. Bartley, H. P. Babcock, R. Russell, T. Ha, D. Herschlag, S. Chu, *Science* **2000**, 288, 2048–2051.
- [122] E. Tan, T. J. Wilson, M. K. Nahas, R. M. Clegg, D. M. J. Lilley, T. Ha, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 9308–9313.
- [123] M. Borsch, M. Diez, B. Zimmermann, R. Reuter, P. Graber, *FEBS Lett.* **2002**, 527, 147–152.
- [124] E. Rhoades, E. Gussakovsky, G. Haran, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 3197–3202.
- [125] A. A. Deniz, M. Dahan, J. R. Grunwell, T. Ha, A. E. Faulhaber, D. S. Chemla, S. Weiss, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3670–3675.
- [126] M. Sauer, K. H. Drexhage, U. Lieberwirth, R. Müller, S. Nord, C. Zander, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 284, 153–163.
- [127] G. Bonnet, O. Krichinsky, A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 8602–8606.
- [128] N. L. Goddard, G. Bonnet, O. Krichinsky, A. Libchaber, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, 85, 2400–2403.
- [129] M. I. Wallace, L. Ying, S. Balasubramanian, D. Klenerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 5584–5589.
- [130] O. Piester, H. Barsch, V. Buschmann, T. Heinlein, J.-P. Knemeyer, K. D. Weston, M. Sauer, *Nano Lett.* **2003**, 3, 979–982.
- [131] M. A. Osborne, C. L. Barnes, S. Balasubramanian, D. Klenerman, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 3120–3126.
- [132] D. S. Talaga, W. L. Lau, H. Roder, J. Tang, Y. Jia, W. F. DeGrado, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 13021–13026.
- [133] M. Margittai, J. Widengren, E. Schweinberger, G. F. Schroeder, S. Felekyan, E. Haustein, M. Koenig, D. Fasshauer, H. Grubmüller, R. Jahn, C. A. M. Seidel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 15516–15521.
- [134] M. Diez, B. Zimmermann, M. Boersch, M. Koenig, E. Schweinberger, S. Steigmiller, R. Reuter, S. Felekyan, V. Kudryavtsev, C. A. M. Seidel, P. Graeber, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 135–141.
- [135] D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.* **1970**, 8, 259–271.
- [136] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811, 265–322.
- [137] K. Chattopadhyay, S. Saffarian, E. L. Elson, C. Frieden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 14171–14176.
- [138] R. M. Watt, E. W. Voss, Jr., *Immunochem.* **1977**, 14, 533–551.
- [139] N. Marme, J.-P. Knemeyer, M. Sauer, J. Wolfrum, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 1133–1139.

- [140] H. Yang, G. Luo, P. Karnchanaphanurach, T.-M. Louie, I. Rech, S. Cova, L. Xun, X. S. Xie, *Science* **2003**, 302, 262–266.
- [141] H. Neuweiler, M. Sauer, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, 5, 285–298.
- [142] M. Sauer, K. T. Han, R. Müller, S. Nord, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, C. Zander, K. H. Drexhage, *J. Fluoresc.* **1995**, 5, 247–261.
- [143] J. P. Knemeyer, N. Marme, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3717–3724.
- [144] T. Heinlein, J.-P. Knemeyer, O. Piestert, M. Sauer, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 7957–7964.
- [145] A. C. Vaiana, H. Neuweiler, A. Schulz, J. Wolfrum, M. Sauer, J. C. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14564–14572.
- [146] H. Neuweiler, A. Schulz, A. C. Vaiana, J. C. Smith, S. Kaul, J. Wolfrum, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4964–4968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4769–4773.
- [147] L. J. Lapidus, W. A. Eaton, J. Hofrichter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 7220–7225.
- [148] T. Soussi, *Immunol. Today* **1996**, 17, 354–356.
- [149] M. Sauer, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1834–1837; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1790–1793.
- [150] D. A. Van den Bout, W. T. Yip, D. H. Hu, D. K. Fu, T. M. Swager, P. F. Barbara, *Science* **1997**, 277, 1074–1077.
- [151] W. T. Yip, D. H. Hu, J. Yu, D. A. Van den Bout, P. F. Barbara, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 7564–7575.
- [152] T. Huser, M. Yan, L. J. Rothberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 11187–11191.
- [153] J. D. White, J. H. Hsu, S. C. Yang, W. S. Fann, G. Y. Pern, S. A. Chen, *J. Chem. Phys.* **2001**, 114, 3848–3852.
- [154] M. A. Bopp, Y. W. Jia, L. Q. Li, R. J. Cogdell, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10630–10635.
- [155] M. A. Bopp, A. Sytnik, T. D. Howard, R. J. Cogdell, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 11271–11276.
- [156] J. Hofkens, W. Schroeyers, D. Loos, M. Cotlet, F. Kohn, T. Vosch, M. Maus, A. Herrmann, K. Müllen, T. Gensch, F. C. De Schryver, *Spectrochim. Acta Part A* **2001**, 57, 2093–2107.
- [157] L. M. Ying, X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 10399–10409.
- [158] B. Lounis, J. Deich, F. I. Rosell, S. G. Boxer, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 5048–5054.
- [159] M. Cotlet, J. Hofkens, S. Habuchi, G. Dirix, M. Van Guyse, J. Michiels, J. Vanderleyden, F. C. De Schryver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 14398–14403.
- [160] M. F. Garcia-Parajo, M. Koopman, E. M. H. P. Van Dijk, V. Subramaniam, N. F. Van Hulst, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 14392–14397.
- [161] T. Christ, F. Petzke, P. Bordat, A. Herrmann, E. Reuther, K. Mullen, T. Basche, *J. Lumin.* **2002**, 98, 23–33.
- [162] J. Hernando, M. van der Schaaf, E. M. H. P. van Dijk, M. Sauer, M. F. Garcia-Parajo, N. F. van Hulst, *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 43–52.
- [163] P. Tinnefeld, V. Buschmann, K. D. Weston, M. Sauer, *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 323–327.
- [164] J. Yu, D. H. Hu, P. F. Barbara, *Science* **2000**, 289, 1327–1330.
- [165] T. Gensch, J. Hofkens, A. Heirmann, K. Tsuda, W. Verheijen, T. Vosch, T. Christ, T. Basche, K. Müllen, F. C. De Schryver, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3970–3974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3752–3756.
- [166] R. Gronheid, J. Hofkens, F. Kohn, T. Weil, E. Reuther, K. Müllen, F. C. De Schryver, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2418–2419.
- [167] T. Basche, S. Kummer, C. Bräuchle, *Nature* **1995**, 373, 132–134.
- [168] J. Bernard, L. Fleury, H. Talon, M. Orrit, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 850–859.
- [169] D. S. English, E. J. Harbron, P. F. Barbara, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 9057–9061.
- [170] C. G. Hübner, G. Zumofen, A. Renn, A. Herrmann, K. Müllen, T. Basche, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 91, 093903/1–093903/4.
- [171] J. Hofkens, M. Cotlet, T. Vosch, P. Tinnefeld, K. D. Weston, C. Ego, A. Grimsdale, K. Müllen, D. Beljonne, J. L. Bredas, S. Jordens, G. Schweitzer, M. Sauer, F. C. De Schryver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 13146–13151.
- [172] M. Lippitz, C. G. Hübner, T. Christ, H. Eichner, P. Bordat, A. Herrmann, K. Müllen, T. Basche, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 92, 103001/1–103001/4.
- [173] R. W. Wagner, J. S. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9759–9760.
- [174] M. Heilemann, V. Buschmann, O. Piestert, P. Tinnefeld, K. D. Weston, M. Sauer, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2003**, 4962, 38–46.
- [175] M. Heilemann, P. Tinnefeld, G. Sanchez Mosteiro, M. F. Garcia Parajo, N. F. van Hulst, M. Sauer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6514–6515.
- [176] S. Vyawahare, S. Eyal, K. D. Mathews, S. R. Quake, *Nano Lett.* **2004**, 4, 1035–1039.
- [177] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, S. Smith, *Science* **1994**, 265, 1599–1600.
- [178] G. Calzaferri, S. Huber, H. Maas, C. Minkowski, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3860–3888; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3732–3758.
- [179] M. Irie, T. Fukaminato, T. Sasaki, N. Tamai, T. Kawai, *Nature* **2002**, 420, 759–760.
- [180] D. L. Spector, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1993**, 9, 265–315.
- [181] A. I. Lamond, W. C. Earnshaw, *Science* **1998**, 280, 547–553.
- [182] P. R. Cook, *Science* **1999**, 284, 1790–1795.
- [183] T. Cremer, C. Cremer, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, 2, 292–301.
- [184] D. G. Wansink, O. C. Sibon, F. F. Cremers, R. van Driel, L. de Jong, *J. Cell Biol.* **1996**, 62, 10–18.
- [185] A. Pombo, D. A. Jackson, M. Hollinshead, Z. X. Wang, R. G. Roeder, P. R. Cook, *Embo J.* **1999**, 18, 2241–2253.
- [186] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, 280, 585–590.
- [187] J. M. Levsky, S. M. Shenoy, R. C. Pezo, R. H. Singer, *Science* **2002**, 297, 836–840.
- [188] J. B. Lawrence, R. H. Singer, L. M. Marselle, *Cell* **1989**, 57, 493–502.
- [189] R. W. Dirks, *Histochem. Cell Biol.* **1996**, 106, 151–166.
- [190] R. W. Dirks, C. Molenaar, H. J. Tanke, *Histochem. Cell Biol.* **2001**, 115, 3–11.
- [191] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 906–918.
- [192] A. R. Thierry, A. Dritschilo, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 5691–5698.
- [193] C. Zander, K. H. Drexhage, K. T. Han, J. Wolfrum, M. Sauer, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 286, 457–465.
- [194] W. Becker, H. Hickl, C. Zander, K. H. Drexhage, M. Sauer, S. Siebert, J. Wolfrum, *Rev. Sci. Instrum.* **1999**, 70, 1835–1841.
- [195] V. P. Torchilin, R. Rammohan, V. Weissig, T. S. Levchenko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 8786–8791.
- [196] S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S. F. Dowdy, *Science* **1999**, 285, 1569–1572.
- [197] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 16010–16017.
- [198] M. Rueping, Y. Mahajan, M. Sauer, D. Seebach, *ChemBioChem* **2002**, 3, 257–259.
- [199] D. Seebach, K. Namoto, Y. R. Mahajan, P. Bindshädler, R. Sustmann, M. Kirsch, N. S. Ryder, M. Weiss, M. Sauer, C. Roth, S. Werner, H.-D. Beer, C. Munding, P. Walde, M. Voser, *Chem. Biodiversity* **2004**, 1, 65–97.
- [200] G. J. Schütz, V. P. Patuschenko, H. J. Gruber, H. G. Knaus, B. Pragl, H. Schindler, *Single Mol.* **2000**, 1, 25–31.

- [201] N. Marme, J. P. Knemeyer, J. Wolfrum, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3886–3890; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3798–3801.
- [202] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- [203] G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11984–11989.
- [204] S. L. Moores, J. H. Sabry, J. A. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 443–446.
- [205] K. R. Olson, J. R. McIntosh, J. B. Olmsted, *J. Cell Biol.* **1995**, *130*, 639–650.
- [206] G. S. Harms, L. Cognet, P. H. M. Lommerse, G. A. Blab, T. Schmidt, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2396–2408.
- [207] G. S. Harms, L. Cognet, P. H. M. Lommerse, G. A. Blab, H. Kahr, R. Gamsjäger, H. P. Späink, N. M. Soldatov, C. Romanin, T. Schmidt, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 2639–2646.
- [208] R. Iino, A. Kusumi, *J. Fluoresc.* **2001**, *11*, 187–195.
- [209] R. Iino, I. Koyama, A. Kusumi, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2667–2677.
- [210] J. Widengren, B. Terry, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1999**, *249*, 259–271.
- [211] A. Zumbusch, G. Jung, *Single Mol.* **2000**, *1*, 261–270.
- [212] M. Cotlet, J. Hofkens, M. Maus, T. Gensch, M. Van der Auwer, J. Michiels, G. Dirix, M. Van Guyse, J. Vanderleyden, A. Visser, F. C. De Schryver, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4999–5006.
- [213] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zarausky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 969–973.
- [214] B. J. Bevis, B. S. Glick, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1159.
- [215] J. Wiedenmann, A. Schenk, C. Rocker, A. Girod, K.-D. Spindler, G. U. Nienhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11646–11651.
- [216] N. G. Gurskaya, A. F. Fradkov, A. Tersikh, M. V. Matz, Y. A. Labas, V. I. Martynov, Y. G. Yanushevich, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov, *FEBS Lett.* **2001**, *507*, 16–20.
- [217] R. E. Campbell, O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7877–7882.
- [218] C.-D. Hu, Y. Chinenov, T. K. Kerppola, *Mol. Cell* **2002**, *9*, 789–798.
- [219] J. C. Politz, E. S. Browne, D. E. Wolf, T. Pederson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6043–6048.
- [220] P. Schwill, F. J. Meyer-Almes, R. Rigler, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1878–1886.
- [221] R. Brock, G. Vamosi, G. Vereb, T. M. Jovin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10123–10128.
- [222] T. A. Byassee, W. C. Chan, S. Nie, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5606–5611.
- [223] T. Kues, A. Dickmanns, R. Luhrmann, R. Peters, U. Kubitscheck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12021–12026.
- [224] T. Kues, R. Peters, U. Kubitscheck, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2954–2967.
- [225] G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endreß, H. Büning, M. Hallek, C. Bräuchle, *Science* **2001**, *294*, 1929–1932.
- [226] X. Zhuang, H. Kim, M. J. B. Pereira, H. P. Babcock, N. G. Walter, S. Chu, *Science* **2002**, *296*, 1473–1476.
- [227] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013–2016.
- [228] M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, M. Sauer, S. Weiss, *Opt. Lett.* **2001**, *26*, 825–827.
- [229] W. C. W. Chan, S. M. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016–2018.
- [230] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science* **2002**, *298*, 1759–1762.
- [231] J. K. Jaiswal, H. Mattoussi, J. M. Mauro, S. M. Simon, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 47–51.
- [232] B. M. Lingerfelt, H. Mattoussi, E. R. Goldman, J. M. Mauro, G. P. Anderson, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4043–4049.
- [233] E. R. Goldman, E. D. Balighian, H. Mattoussi, M. K. Kuno, J. M. Mauro, P. T. Tran, G. P. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6378–6382.
- [234] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142–12150.
- [235] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 41–46.
- [236] D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, W. W. Webb, *Science* **2003**, *300*, 1434–1437.
- [237] F. Pinaud, D. King, X. Michalet, S. Dooze, S. Weiss, *Eur. Biophys. J.* **2003**, *32*, 261.
- [238] M. Dahan, S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, A. Triller, *Science* **2003**, *302*, 442–445.
- [239] M. Nirmal, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus, *Nature* **1996**, *383*, 802–804.
- [240] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 3117–3120.
- [241] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt, *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 1028–1040.
- [242] S. Hohng, T. Ha, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1324–1325.
- [243] S. R. Cordero, P. J. Carson, R. A. Estabrook, G. F. Strouse, S. K. Buratto, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 12137–12142.
- [244] W. J. Parak, R. Boudreau, M. Le Gros, D. Gerion, D. Zanchet, C. M. Micheel, S. C. Williams, A. P. Alivisatos, C. Larabell, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 882–885.
- [245] I. Sase, H. Miyata, J. E. T. Corrie, J. S. Craik, K. Kinoshita, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 323–328.
- [246] T. Schmidt, G. J. Schütz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17662–17668.
- [247] T. Schmidt, G. J. Schütz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2926–2929.
- [248] R. M. Dickson, D. J. Norris, Y. L. Tzeng, W. E. Moerner, *Science* **1996**, *274*, 966–969.
- [249] M. P. Gordon, T. Ha, P. R. Selvin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6462–6465.
- [250] A. Patwardhan, E. M. M. Manders, *Bioimaging* **1996**, *4*, 17–24.
- [251] A. Esa, P. Edelmann, G. Kreth, L. Trakhtenbrot, N. Amariglio, G. Rechavi, M. Hausmann, C. Cremer, *J. Microsc.* **2000**, *199*, 96–105.
- [252] A. M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G. J. Brakenhoff, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *292*, 183–187.
- [253] T. D. Lacoste, X. Michalet, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9461–9466.
- [254] X. Michalet, T. D. Lacoste, S. Weiss, *Methods* **2001**, *25*, 87–102.
- [255] E. Betzig, *Opt. Lett.* **1995**, *20*, 237–239.
- [256] C. Zander, M. Sauer, K. H. Drexhage, D. S. Ko, A. Schulz, J. Wolfrum, L. Brand, C. Eggeling, C. A. M. Seidel, *Appl. Phys. B* **1996**, *63*, 517–523.
- [257] M. Heilemann, D. P. Herten, R. Heintzmann, C. Cremer, C. Müller, P. Tinnefeld, K. D. Weston, J. Wolfrum, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3511–3517.
- [258] S. Hell, E. H. K. Stelzer, *J. Opt. Soc. Am.* **1992**, *9*, 2159–2166.
- [259] A. Egner, S. Jakobs, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3370–3375.
- [260] T. Enderle, T. Ha, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, C. Magowan, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 520–525.
- [261] H. Gersen, M. F. Garcia-Parajo, L. Novotny, J. A. Veerman, L. Kuipers, N. F. van Hulst, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 5312–5315.
- [262] P. T. So, H. S. Kwon, C. Y. Dong, *J. Opt. Soc. Am. A* **2001**, *18*, 2833–2845.
- [263] B. Albrecht, A. V. Failla, R. Heintzmann, C. Cremer, *J. Biomed. Opt.* **2001**, *6*, 292–299.



- [264] V. Failla Antonio, U. Spoeri, B. Albrecht, A. Kroll, C. Cremer, *Appl. Opt.* **2002**, *41*, 7275–7283.
- [265] C. Hettich, C. Schmitt, J. Zitzmann, S. Kuehn, I. Gerhardt, V. Sandoghdar, *Science* **2002**, *298*, 385–389.
- [266] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8206–8210.
- [267] V. Westphal, C. M. Blanca, M. Dyba, L. Kastrup, S. W. Hell, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 3125–3127.
- [268] S. W. Hell, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1347–1355.
- [269] M. Dyba, S. Jakobs, S. W. Hell, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1303–1304.
- [270] V. Westphal, L. Kastrup, S. W. Hell, *Appl. Phys. B* **2003**, *77*, 377–380.
- [271] Z. Zhu, J. Chao, H. Yu, A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3418–3422.
- [272] H. Yu, J. Chao, D. Patek, R. Mujumdar, S. Mujumdar, A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3226–3232.
- [273] S. Brakmann, P. Nieckchen, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 773–777.
- [274] S. Brakmann, S. Lobermann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3350–3352; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3215–3217.
- [275] S. Brakmann, S. Lobermann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1473–1476; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1427–1429.
- [276] M. Orrit, *Science* **2003**, *302*, 239–240.
- [277] C. D. Snow, H. Nguyen, V. S. Pande, M. Gruebele, *Nature* **2002**, *420*, 102–106.
- [278] L. Edman, Z. Foldes-Papp, S. Wennmalm, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 11–22.
- [279] L. Edman, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8266–8271.
- [280] A. N. Kapanidis, N. K. Lee, T. A. Laurence, S. Doose, E. Margat, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8936–8941.
- [281] P. K. Hansma, B. Drake, O. Marti, S. A. Gould, C. B. Prater, *Science* **1989**, *243*, 641–643.
- [282] Y. E. Korchev, C. L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy, M. J. Lab, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 653–658.
- [283] Y. E. Korchev, M. Raval, M. J. Lab, J. Gorelik, C. R. W. Edwards, T. Rayment, D. Klenerman, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2675–2679.
- [284] M. Ueda, Y. Sako, T. Tanaka, P. Devreotes, T. Yanagida, *Science* **2001**, *294*, 864–867.
- [285] Y. E. Korchev, Y. A. Negulyaev, C. R. W. Edwards, I. Vodyanoy, M. J. Lab, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 616–619.
- [286] A. Sonleitner, L. M. Mannuzzu, S. Terakawa, E. Y. Isacoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12759–12764.
- [287] G. S. Harms, G. Orr, M. Montal, B. D. Thrall, S. D. Colson, H. P. Lu, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1826–1838.
- [288] T. Ide, Y. Takeuchi, T. Yanagida, *Single Mol.* **2002**, *3*, 33–42.
- [289] C. Brunel, B. Lounis, P. Tamarat, M. Orrit, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 2722–2725.
- [290] M. Lewinska, C. Seitz, A. Skerra, F. P. Schmidtchen, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 231–234.
- [291] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, S. Chu, *Opt. Lett.* **1986**, *11*, 288–290.
- [292] K. Kneipp, A. S. Haka, H. Kneipp, K. Badizadegan, N. Yoshizawa, C. Boone, K. E. Shafer-Peltier, J. T. Motz, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 150–154.
- [293] M. Gu, D. Morrish, *J. Appl. Phys.* **2002**, *91*, 1606–1612.
- [294] K. Svoboda, S. M. Block, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 247–285.
- [295] K. C. Neuman, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergman, S. M. Block, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2856–2863.
- [296] H. Kuhn, *J. Chem. Phys.* **1970**, *53*, 101–108.
- [297] H. Imahori, H. Norieda, Y. Nishimura, I. Yamazaki, K. Higuchi, N. Kato, T. Motohiro, H. Yamada, K. Tamaki, M. Arimura, Y. Sakata, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1253–1260.
- [298] H. Yokota, K. Saito, T. Yanagida, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 4606–4609.
- [299] G. V. Soni, F. M. Hameed, T. Roopa, G. V. Shivashankar, *Curr. Sci.* **2002**, *83*, 1464–1470.
- [300] M. J. Lang, P. M. Fordyce, S. M. Block, *J. Biol.* **2003**, *2*:6.
- [301] H. Rubinsztein-Dunlop, T. A. Nieminen, M. E. J. Friese, N. R. Heckenberg, *Adv. Quantum Chem.* **1998**, *30*, 469–492.
- [302] T. A. Laurence, S. Weiss, *Science* **2003**, *299*, 667–668.
- [303] B. Okumus, T. J. Wilson, D. M. J. Lilley, T. Ha, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 2798–2806.
- [304] J. Groll, E. V. Amirgoulova, T. Ameringer, C. D. Heyes, C. Röcker, G. U. Nienhaus, M. Möller, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4234–4239.
- [305] S. C. Blanchard, H. D. Kim, R. L. Gonzalez, Jr., J. D. Puglisi, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12893–12898.
- [306] S. C. Blanchard, R. L. Gonzalez, H. D. Kim, S. Chu, J. D. Puglisi, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1008–1014.
- [307] D. Rueda, G. Bokinsky, M. M. Rhodes, M. J. Rust, X. Zhuang, N. G. Walter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10066–10071.
- [308] S. Hohng, C. Joo, T. Ha, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1328–1337.
- [309] P. Tinnefeld, M. Heilemann, M. Sauer, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 217–222.
- [310] J. P. Clamme, A. A. Deniz, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1–4.
- [311] P. Tinnefeld, J. Hofkens, D.-P. Herten, S. Masuo, T. Vosch, M. Cotlet, S. Habuchi, K. Müllen, F. C. De Schryver, M. Sauer, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1786–1790.
- [312] S. Masuo, T. Vosch, M. Cotlet, P. Tinnefeld, S. Habuchi, T. D. M. Bell, I. Oesterling, D. Beljonne, B. Champagne, K. Müllen, M. Sauer, J. Hofkens, F. C. De Schryver, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 16686–16696.
- [313] J. Hernando, J. P. Hoogenboom, E. M. H. P. van Dijk, J. J. Garcia-Lopez, M. Crego-Calama, D. N. Reinhoudt, N. F. van Hulst, M. F. Garcia-Parajo, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 236404.
- [314] F. Schindler, J. M. Lupton, J. Feldmann, U. Scherf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14695–14700.
- [315] H. Murakoshi, R. Iino, T. Kobayashi, T. Fujiwara, C. Ohshima, A. Yoshimura, A. Kusumi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7317–7322.
- [316] R. J. Ober, C. Martinez, X. Lai, J. Zhou, E. S. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11076–11081.
- [317] W. Yang, J. Gelles, S. M. Musser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12887–12892.
- [318] K. Velonia, O. Flomenbom, D. Loos, S. Masuo, M. Cotlet, Y. Engelborghs, J. Hofkens, A. E. Rowan, J. Klafter, R. J. M. Nolte, F. C. de Schryver, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 566–570; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 560–564.
- [319] O. Flomenbom, K. Velonia, D. Loos, S. Masui, M. Cotlet, Y. Engelborghs, J. Hofkens, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, M. Van der Auweraer, F. C. de Schryver, J. Klafter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, ASAP.
- [320] G. Harms, G. Orr, H. P. Lu, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *84*, 1792–1794.
- [321] A. Sarkar, R. B. Robertson, J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12882–12886.
- [322] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11–18.
- [323] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. M. Javier, H. E. Gaub, S. Stoelzle, N. Fertig, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 331–338.
- [324] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538–544.
- [325] B. C. Lagerholm, M. Wang, L. A. Ernst, D. H. Ly, H. Liu, M. P. Bruchez, A. S. Waggoner, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2019–2022.
- [326] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 961–966.

- [327] X. Qu, D. Wu, L. Mets, N. F. Scherer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11 298–11 303.
- [328] T. Heinlein, A. Biebricher, P. Schlüter, C. Roth, D. P. Herten, J. Wolfrum, M. Heilemann, C. Müller, P. Tinnefeld, M. Sauer, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [329] E. Y. Chan, N. M. Goncalves, R. A. Haeusler, A. J. Hatch, J. W. Larson, A. M. Maletta, G. R. Yantz, E. D. Carstea, M. Fuchs, G. G. Wong, S. R. Gullans, R. Gilmanshin, *Genome Res.* **2004**, *14*, 1137–1146.
- [330] L. Kastrup, S. W. Hell, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6814–6818; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6646–6649.
- [331] S. W. Hell, *Phys. Lett. A* **2004**, *326*, 140–145.
- [332] S. W. Hell, M. Dyba, S. Jakobs, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 599–609.
- [333] L. S. Churchman, Z. Okten, R. S. Rock, J. F. Dawson, J. A. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1419–1423.



## Saved Search Alerts – Quick and Easy

Simply register. Registration is fast and free to all internet users.

### Saved Search Alerts:

You are notified by e-mail whenever content is published online that matches one of your saved searches—complete with direct links to the new material.

To set a Saved Search alert: Run a search on Wiley InterScience, then click

- [Save Search](#) on the results page



Once you have saved the query, login to "My Profile" and go to **SAVED SEARCHES**. Click + [Activate Alert](#) to start getting e-mail results for that query.



WILEY  
InterScience®

[www.interscience.wiley.com/alerts](http://www.interscience.wiley.com/alerts)