

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopische Beobachtung der Bildung und des Zerfalls individueller Metallkomplexe**

Alexander Kiel, Janos Kovacs, Andriy Mokhir, Roland Krämer und Dirk-Peter Herten*

Professor Peter Hofmann zum 60. Geburtstag gewidmet

Vor allem im Bereich der Biochemie und der Molekularbiologie ist die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie (SMFS) zu einer wertvollen Untersuchungsmethode für komplexe Strukturen und Prozesse herangereift.^[1] Neben ihrem Einsatz in der Analytik war ihre Anwendung in der Chemie bislang auf die Untersuchung von Polymeren, den photophysikalischen Eigenschaften von Chromophoren und der Diffusion organischer Verbindungen in mesoporösen Materialien beschränkt.^[2–6] Im Unterschied zu biochemischen und molekularbiologischen Systemen mangelt es bei chemischen Reaktionen an etablierten Beobachtungsmethoden für einzelne molekulare Ereignisse. In der heterogenen Katalyse konnte diese Schwelle kürzlich durch eine zukunftsweisende Einzelmolekülstudie über die räumliche Heterogenität der Kinetik der Esterspaltung an katalytisch aktiven Kristalloberflächen überschritten werden.^[7]

Metallkomplexe sind eine chemische Verbindungsklasse mit wichtigen Anwendungen in der homogenen Katalyse. Der Einfluss vieler Metallkomplexe auf die spektroskopischen Eigenschaften von Farbstoffen brachte uns auf die Idee, sie als photochemische Schalter einzusetzen und damit die Reaktionschritte einzelner Moleküle in der Koordinations-sphäre von Metallionen zu beobachten. Zunächst haben wir eine Fluoreszenzsonde für Metallionen entwickelt, die auf Glasoberflächen immobilisiert werden kann und es ermöglicht, den an das Metallion koordinierenden Liganden und den Reporterfarbstoff unabhängig voneinander zu variieren. Hier zeigen wir zum ersten Mal, dass sich derartige Systeme ausgezeichnet zur mikroskopischen Beobachtung individueller Assoziations- und Dissoziationsereignisse von Kupfer(II)-Bipyridin-Chelatkomplexen eignen. Dabei nutzen wir die

intramolekulare Löschung von Tetramethylrhodamin (TMR) durch Kupfer(II)-Bipyridin-Komplexe, in Analogie zu bereits beschriebenen Kupfersonden auf Fluorescein-Basis.^[8,9]

Auf der Grundlage der Hybridisierung zweier modifizierter Oligonucleotide haben wir ein Farbstoff-Ligand-Konjugat entwickelt (siehe Hintergrundinformationen), an dem wir die Assoziation und Dissoziation des Metallkomplexes verfolgen können. Strang 1 trägt am 5'-Ende die 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure (dcbpy) als zweizähnigen Liganden zur Bindung der Cu^{2+} -Ionen. Der dazu komplementäre Strang 2 ist am 5'-Ende über eine Hexaethylglycol-(HEG)-Brücke mit Biotin funktionalisiert und am 3'-Ende mit TMR markiert. Durch Hybridisierung der beiden Oligonucleotide gelangen Farbstoff und Ligand in unmittelbare Nähe zueinander, sodass die Fluoreszenz von TMR durch Bindung eines Cu^{2+} -Ions an dcbpy gelöscht werden kann (siehe Hintergrundinformationen).^[9] Wie in Abbildung 1 gezeigt, wurden die Oligonucleotide über einen Biotin-Streptavidin-Komplex auf einer Glasoberfläche immobilisiert, um zeitaufauflösende Einzelmolekülstudien zu ermöglichen. Die Oberfläche wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) passiviert, das zur Bindung von rekombinantem Streptavidin zu ungefähr 10 % biotinyliert war. Zur Immobilisierung einzelner Sonden auf der Oberfläche setzten wir eine optimierte

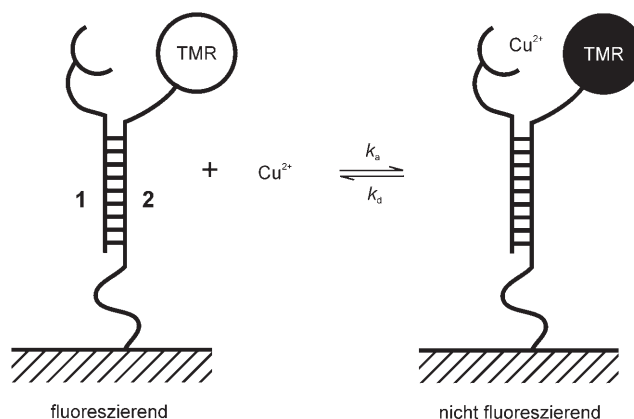


Abbildung 1. Das TMR-dcbpy-Konjugat wird durch Hybridisierung zweier modifizierter Oligonucleotide gebildet. Strang 1 trägt am 5'-Ende den Liganden dcbpy als Bindungsstelle für Metallionen. Der komplementäre Strang 2 ist am 3'-Ende mit TMR markiert und am 5'-Ende über eine Hexaethylglycol-Brücke an Biotin gekuppelt, sodass die Immobilisierung an mit Streptavidin belegten Oberflächen möglich wird. Bildung und Zerfall von $[\text{Cu}(\text{dcbpy})]^{2+}$ -Komplexen wurden mit spektroskopischen Standardmethoden in wässriger Lösung untersucht, während für Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie-Studien die Immobilisierung an Glasoberflächen notwendig war.

[*] A. Kiel, Dr. D.-P. Herten
Physikalisch-Chemisches Institut
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 253, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-544-255
E-Mail: dirk-peter.herten@urz.uni-hd.de

J. Kovacs, Dr. A. Mokhir, Prof. R. Krämer
Anorganisch-Chemisches Institut
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 271, 69120 Heidelberg (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (SFB 623) finanziell unterstützt. Für fruchtbare Diskussionen und die kritische Durchsicht des Manuskripts danken wir M. Heilemann und J. Wolfrum.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Konzentration von 50 μM biotinyliertem TMR-dcbpy-Konjugat in wässriger Lösung ein, mit der wir eine Dichte von ca. 10–20 Konjugaten pro 100 μm^2 erreichten (Abbildung 2). Das DNA-Grundgerüst erfüllt zusätzlich die Funktion des Ab-

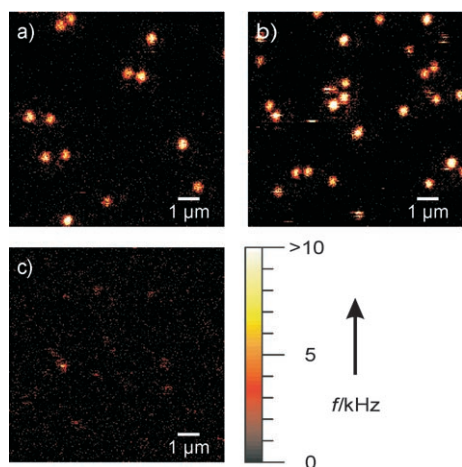


Abbildung 2. Rasterbilder von immobilisierten TMR-dcbpy-Konjugaten in 10 mM MOPS-Puffer (pH 7, Anregung: 532 nm, 5 μW , Auflösung: 50 nm pixel⁻¹, Scangeschwindigkeit: 2 ms pixel⁻¹) ohne Zugabe von CuSO₄ (a) sowie nach Zugabe von 2 μM (b) und 50 μM CuSO₄ (c).

standhalters, um Liganden und Farbstoff in einem gelösten Zustand zu bewahren und die unspezifische Absorption an der Oberfläche zu vermeiden – eine Komplikation, die häufig mit kürzeren oder weniger hydrophilen funktionellen Gruppen beobachtet wird. Zur experimentellen Bestätigung der freien Rotation des immobilisierten Konjugats haben wir die modulierte Polarisationsanregung eingesetzt (siehe Hintergrundinformationen).^[10,11]

Die einzelnen Sonden können mithilfe eines konfokalen Mikroskops auf der Glasoberfläche lokalisiert werden. Dabei wird mit zirkular polarisiertem Licht angeregt, um eine isotrope Anregung aller Sonden zu erreichen. Abbildung 2 zeigt Mikroskopiebilder der Fluoreszenzintensität immobilisierter TMR-dcbpy-Konjugate bei verschiedenen CuSO₄-Konzentrationen in MOPS-gepufferter wässriger Lösung (MOPS: 3-(N-Morpholino)propan sulfonsäure). Da die Aufnahmen zeilenweise (von links oben nach rechts unten) im Rasterverfahren aufgezeichnet wurden, kann man zeitliche Prozesse wie Unterbrechungen in der Fluoreszenzemission in einigen Punktabbildungsfunktionen (PSFs) in Abbildung 2b erkennen. Im Vergleich zu kupferfreien Proben (Abbildung 2a) führt eine Konzentration von 2 μM CuSO₄ bei einigen Sonden zu einer geringeren Fluoreszenzemission und zu längeren Aus-Zuständen (Abbildung 2b, dunkle Streifen innerhalb einiger PSFs). Bei einer Konzentration von 50 μM CuSO₄ ist die Fluoreszenzemission dann fast vollständig gelöscht (Abbildung 2c). Der beobachtete Einfluss der CuSO₄-Konzentration

auf die molekulare Helligkeit und die Muster der PSFs legt einen dynamischen Prozess nahe, der mit der Assoziation und Dissoziation von Kupfer(II)-Komplexen in Verbindung steht.

Zur Erfassung der Kinetik der beobachteten Dynamik haben wir die Unterbrechungen der Fluoreszenzemission einzelner Sondenmoleküle untersucht. Dazu wurden die Sonden zunächst mithilfe eines Mikroskopiebilds lokalisiert und nach Zugabe von CuSO₄ zur Gewinnung zeitaufgelöster Fluoreszenzemissionsdaten im Laserfokus positioniert. Abbildung 3 zeigt repräsentative Spuren verschiedener Proben mit unterschiedlichen CuSO₄-Konzentrationen. Das TMR-dcbpy-Konjugat zeigt ohne Cu²⁺ eine Fluoreszenzemission von ca. 3 kHz bis zu seiner Photozerstörung (Abbildung 3a). Kurzzeitfluktuationen, z. B. Triplett-Blinken, kann man hierbei nicht erkennen, da sie auf einer wesentlich kürzeren Zeitskala ablaufen. Nach Zugabe von 0.5 μM oder 4 μM CuSO₄ (Abbildung 3b bzw. c) treten stochastische Fluktuationen der Fluoreszenzemission mit teilweise sekundenlangen Aus-Zuständen auf. Die Intensität der Messungen variiert, weil die Moleküle nicht genau im Laserfokus positioniert werden können. Die Verkürzung der An-Zustände bei höheren CuSO₄-Konzentrationen (Abbildung 3c) deutet auf einen Zusammenhang zwischen den Fluoreszenzfluktuationen und der Assoziationskinetik des [Cu(dcbpy)]²⁺-Komplexes hin. Diese Annahme wird durch Experimente mit TMR-

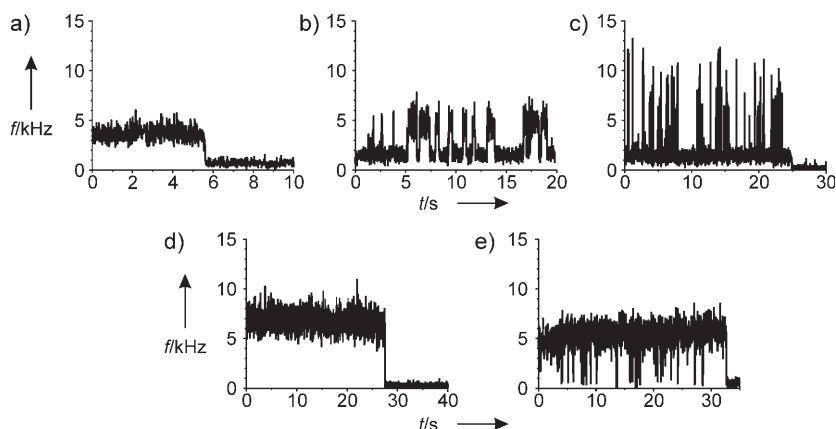


Abbildung 3. a)–c) Zeitaufgelöste Fluoreszenzemission des TMR-dcbpy-Konjugats bei verschiedenen CuSO₄-Konzentrationen: a) 0 μM , b) 0.5 μM , c) 4 μM . Die Kontrolllexperimente mit einem TMR-Konjugat ohne Liganden sind für CuSO₄-Konzentrationen von 2 μM (d) und 6 μM (e) gezeigt. Zur Präsentation und Analyse wurden die Daten mit einer Zeitaufauflösung von 20 ms generiert.

DNA-Konjugaten gestützt, die keinen chelatisierenden Liganden tragen (Abbildung 3d und e). Zugabe von 2 μM CuSO₄ führt offensichtlich zu keinen Änderungen in der Fluoreszenzemission dieses TMR-DNA-Konjugats (Abbildung 3d). Erst bei höheren Konzentrationen werden kurze Aus-Zustände im Millisekundenbereich beobachtet (Abbildung 3f). Da kein Ligand vorhanden ist, sind die kurzen Aus-Zustände auf die dynamische Löschung durch Kollisionen mit solvatisierten Cu²⁺-Ionen zurückzuführen. Dies wird durch Ensemblestudien bestätigt, bei denen sich die Löschung von TMR-DNA-Konjugaten durch Cu²⁺ und [Cu(bpy)]²⁺ um zwei Größenordnungen schwächer erweist als die Löschung des dcbpy-DNA-Konjugats durch CuSO₄ (siehe Hintergrundin-

formationen). Der Vergleich der unterschiedlichen Konjugate (Abbildung 3a–c und 3d,e) und die Ensembleexperimente führen uns zu der Schlussfolgerung, dass eine direkte Wechselwirkung zwischen TMR und Kupfer(II)-Ionen erst bei hohen CuSO_4 -Konzentrationen zu beobachten ist. Dagegen liegen die langen Aus-Zustände des TMR-dcbpy-Konjugats im Bereich mehrerer Sekunden, wofür wir einzelne Bindungsereignisse von Cu^{2+} -Ionen an dcbpy verantwortlich machen. Aufgrund dessen sollten sich die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten des $[\text{Cu}(\text{dcbpy})]^{2+}$ -Komplexes aus der statistischen Analyse der beobachteten An- und Aus-Zeiten ergeben.

Hierzu wurden für jeweils eine CuSO_4 -Konzentration aus den Zeitspannen Δt der einzelnen An- und Aus-Zustände die zugehörigen Häufigkeitsverteilungen erstellt und in entsprechende empirische Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P(\Delta t)$ umgerechnet (siehe Abbildung 4 und die Hintergrundinformationen). Während die Aus-Zeiten keine Abhängigkeit von der CuSO_4 -Konzentration erkennen lassen (Abbildung 4a), nehmen die An-Zeiten mit zunehmender CuSO_4 -Konzentration ab (Abbildung 4b). Entsprechend Gleichung (1) und

$$P_{\text{an}}(\Delta t) = e^{-k_a c(\text{Cu}^{2+})\Delta t} = e^{-v_{\text{an}}\Delta t} \quad (1)$$

$$P_{\text{aus}}(\Delta t) = e^{-k_d c(\text{Cu}^{2+})\Delta t} = e^{-v_{\text{aus}}\Delta t} \quad (2)$$

(2) wurden die zugehörigen An- bzw. Aus-Geschwindigkeiten v_{aus} bzw. v_{an} durch die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Zeitspannen von $P_{\text{an}}(\Delta t)$ bzw. $P_{\text{aus}}(\Delta t)$ mit mono-exponentiellen Modellfunktionen angenähert. Die dabei auftretenden

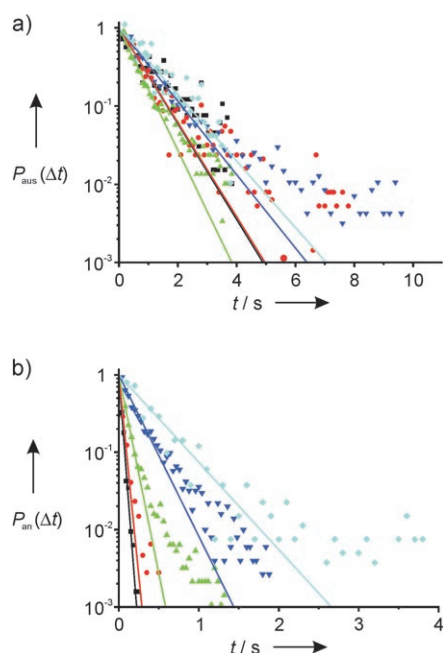


Abbildung 4. Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Zeitspannen der Aus-Zustände (a) und der An-Zustände (b) für fünf verschiedene CuSO_4 -Konzentrationen (schwarz 0,5 μM , rot 2 μM , grün 4 μM , blau 6 μM , cyan 10 μM). Das mono-exponentielle Modell passt gut zu den kurzen An-/Aus-Zeiten, wohingegen einige Verteilungen zu längeren An-/Aus-Zeiten eine Abweichung vom mono-exponentiellen Verhalten aufweisen.

Abweichungen vom mono-exponentiellen Modell zu längeren An- und Aus-Zeiten, die vermutlich auf Änderungen der Konformation oder der Bewegungen der Sonde zurückzuführen sind, weisen auf eine komplexere Kinetik hin. Für die vorgestellte Assoziations- und Dissoziationskinetik erscheint die Verwendung des mono-exponentiellen Modells jedoch hinreichend, da die Abweichungen auf seltene Ereignisse zurückzuführen sind (logarithmische Achse in Abbildung 4) und komplexere Modelle, z.B. die Verwendung zweier Exponenten, keinen klaren Trend zeigen.

In Abbildung 5 sind die Reaktionsgeschwindigkeiten v_{an} und v_{aus} gegen die eingesetzte CuSO_4 -Konzentration aufgetragen: v_{an} (Quadrate) spiegelt die nach Gleichung (1) zu

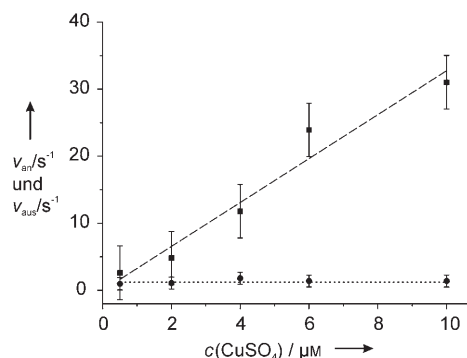


Abbildung 5. Die Auftragung der gemessenen Assoziationsgeschwindigkeiten v_{an} gegen die eingesetzte CuSO_4 -Konzentration (Quadrate) zeigt die erwartete lineare Beziehung für die Bildung von $[\text{Cu}(\text{dcbpy})]^{2+}$. Die zugehörigen Dissoziationsgeschwindigkeiten v_{aus} (Kreise) sind unabhängig von der eingesetzten CuSO_4 -Konzentration.

erwartende lineare Abhängigkeit von der CuSO_4 -Konzentration wider, während v_{aus} entsprechend Gleichung (2) innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs davon unabhängig ist (Kreise). Durch Anpassen einer Geraden an die v_{an} -Werte ergibt sich für die Bildung des Komplexes bei Raumtemperatur und pH 7.0 eine Geschwindigkeitskonstante $k_a = (3.3 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Mittelung der v_{aus} -Werte führt zu einer Geschwindigkeitskonstante $k_d = (1.2 \pm 0.4) \text{ s}^{-1}$ für die Dissoziation.

In Tabelle 1 sind unsere Resultate den Daten für $[\text{Cu}(\text{bpy})]^{2+}$ gegenübergestellt, die mit der Temperatursprung- und der Stopped-Flow-Methode bestimmt wurden.^[12–15] Die Stabilitätskonstante von $(2.7 \pm 0.9) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ aus Einzelmolekülmessungen liegt nahe bei der Löschkonstante $K_{\text{SV}} = (4.2 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, die wir aus Stern-Volmer-Löschexperimenten erhalten haben (siehe Hintergrundinformationen). Beim Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d sowie der Gleichgewichtskonstanten K_s der Kupfer(II)-Komplexe mit den Literaturwerten müssen der elektronenziehende Effekt der Carboxygruppen, der die Basizität des Liganden senkt, und die Konjugation mit DNA, die zur Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken und zu hydrophoben Wechselwirkungen mit dem freien Liganden führen kann, berücksichtigt werden. Daher wird für den entsprechenden $[\text{Cu}(\text{bpy})]^{2+}$ -Komplex eine höhere Stabilität erwartet als für unser $[\text{Cu}(\text{dcbpy})]^{2+}$. Das Fehlen von Fluktuationen

Tabelle 1: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung von $[\text{Cu}(\text{dcbpy})]^{2+}$ aus Einzelmolekülexperimenten mit Literaturwerten für $[\text{Cu}(\text{bpy})]^{2+}$.

Methode	$k_a [\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	$k_d [\text{ s}^{-1}]$	$K_S [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]$
Stern-Volmer-Analyse ^[a]	–	–	4.2 ± 0.3
Einzelmolekül-experimente ^[b]	3.3 ± 0.3	1.2 ± 0.4	2.7 ± 0.9
Literaturwert ^[c]	50	0.09	500

[a] Siehe Hintergrundinformationen. [b] Ligand: dcbpy. $K_S = k_a/k_d$. [c] Ligand: bpy. Werte für k_a und k_d stammen aus Temperatursprungmessungen bei niedrigem pH-Wert,^[9] K_S aus einer spektroskopischen Titration.^[10]

aufgrund dynamischer Konformationsänderungen der C_6 -Brücken führen wir darauf zurück, dass diese wesentlich schneller ablaufen als der Austausch der Metallionen. Diese Vermutung wird durch Studien über Konformationsfluktuationen in DNA-Haarnadelstrukturen gestützt, die kürzlich gezeigt haben, dass eine einzelne Basenpaarung zu einer schnellen Fluktuation im Bereich von 10^{-7} s führt.^[16] Berücksichtigt man dabei, dass ein einzelnes G-C-Basenpaar mit drei Wasserstoffbrücken erheblich stabiler ist als eine mögliche Koordination zwischen TMR und Cu^{2+} , so erscheint es unwahrscheinlich, dass Fluktuationen aufgrund von Konformationsänderungen in der TMR- oder in der dcbpy-Seitenkette die Beobachtung des langsamen Cu^{2+} -Bindungsprozesses stören könnten.

Mit dem Nachweis der Bildung des $[\text{Cu}(\text{dcbpy})]^{2+}$ -Komplexes und durch die quantitative Untersuchung der damit verbundenen Assoziations- und Dissoziationskinetik im thermodynamischen Gleichgewicht haben wir die Anwendung von Konzepten der Einzelmolekülspektroskopie auf die Untersuchung der Koordinationschemie von Metallionen in Lösung demonstriert.

Vor kurzem haben wir nachgewiesen, dass die Fluoreszenzlöschung organischer Farbstoffe durch $[\text{Cu}(\text{bpy})]^{2+}$ freie Koordinationsstellen am Metall voraussetzt: Die Fluoreszenz wird in Gegenwart von Coliganden regeneriert, die die freien Bindungsstellen besetzen.^[8] Dies eröffnet die Perspektive, mit Standard-SMFS-Ausrüstung an einzelnen Molekülen bei einer zeitlichen Auflösung unterhalb 1 μs die Teilschritte von Reaktionen zu verfolgen,^[5] die durch das immobilisierte $\text{M}(\text{L})$ -Fragment vermittelt werden, z.B. die Bindung und Umsetzung von Substraten, die Dissoziation von Reaktionsprodukten, oder auch die Modulation der Reaktivität durch Coliganden. Da die Effizienz der Fluoreszenzlöschung oft auch durch die Oxidationsstufe des Metallions beeinflusst wird, können die Untersuchungen auf metallzentrierte Re-

doxreaktionen ausgeweitet werden. Weitere wertvolle Informationen über die Elementarschritte metallvermittelter Reaktionen können mit Substraten erhalten werden, deren Fluoreszenzintensität oder Emissionswellenlänge sich ändert, wenn sie an das Metallion koordinieren oder dort umgesetzt werden, wie im Fall der kürzlich beschriebenen katalytischen Spaltung fluorogener Ester durch Komplexe des Typs $[\text{Cu}(\text{bpy})]^{2+}$.^[17,18]

Ein derartiges Spektrum an Einzelmoleküluntersuchungsmethoden wird neue Einblicke in die Reaktionsdynamik niedermolekularer Koordinationsverbindungen einschließlich der homogenen Katalyse an Metallzentren liefern.

Eingegangen am 7. Dezember 2006

Online veröffentlicht am 2. April 2007

Stichwörter: Einzelmoleküluntersuchungen · Fluoreszenz · Koordinationschemie · Reaktionskinetik

- [1] P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2689–2728; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2642–2671.
- [2] D. A. Vanden Bout, W. T. Yip, D. Hu, D. K. Fu, T. M. Swager, P. F. Barbara, *Science* **1997**, *277*, 1074–1077.
- [3] Y. J. Lee, D. Y. Kim, J. K. Grey, P. F. Barbara, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 2404–2409.
- [4] H. Uji-i, S. M. Melnikov, A. Deres, G. Bergamini, F. De Schryver, A. Herrmann, K. Müllen, J. Enderlein, J. Hofkens, *Polymer* **2006**, *47*, 2511–2518.
- [5] P. Tinnefeld, D. P. Herten, M. Sauer, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 7989–8003.
- [6] C. Hellriegel, J. Kirstein, C. Bräuchle, *New J. Phys.* **2005**, *7*, 23.
- [7] M. B. J. Roelfaers, B. F. Sels, H. Uji-i, F. De Schryver, P. A. Jacobs, D. E. De Vos, J. Hofkens, *Nature* **2006**, *439*, 572–575.
- [8] J. Brunner, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13626–13627.
- [9] A. Mokhir, A. Kiel, D. P. Herten, R. Krämer, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 5661–5666.
- [10] K. D. Weston, L. S. Goldner, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 3453–3462.
- [11] O. Piester, H. Barsch, V. Buschmann, T. Heinlein, J. P. Kne-meyer, K. D. Weston, M. Sauer, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 979–982.
- [12] I. Fabian, H. Diebler, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 925–928.
- [13] H. Diebler, *Ber. Bunsen-Ges.* **1970**, *74*, 268–276.
- [14] R. H. Holyer, C. D. Hubbard, S. F. A. Kettle, R. G. Wilkins, *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 929–935.
- [15] T. S. Roche, R. G. Wilkins, *J. Chem. Soc. D* **1970**, 1681–1682.
- [16] J. Kim, S. Doose, H. Neuweiler, M. Sauer, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2516–2527.
- [17] R. Kierat, R. Krämer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4824–4827.
- [18] J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410–12411.