

# Einzelmolekülchemie ist mehr als superauflösende Fluoreszenzmikroskopie

Michel Orrit\*



Michel Orrit  
Universität Leiden

Die ersten rastertunnelmikroskopischen Bilder von einzelnen Atomen auf Oberflächen verblüfften die Wissenschaftswelt 1982. Aber es war auch klar, dass erst der Nachweis von einzelnen Molekülen im kondensierten Zustand die Vorteile gründlichen und nichtinvasiven Untersuchens aus der Ferne mit sich brächte. Allerdings waren in den frühen 1980er Jahren optische Techniken noch durch das Abbe-Limit begrenzt, das etwa tausendmal größer ist als atomare Skalen. Gelöst wurde dieses Problem mithilfe der optischen Resonanz, bei der nicht nur die Position des Moleküls mit dem Laserstrahl genau getroffen wird, sondern auch eine Übergangsenergie des Moleküls mit der Energie der Laserphotonen. Ist die Konzentration der resonanten Moleküle so gering, dass sich maximal eines von ihnen im beugungsbeschränkten Fleck befindet, wird dieses einzelne Molekül mit dem Laserlicht wechselwirken. Solche Experimente waren erstmals 1989 bei kryogener und 1990 bei Raumtemperatur erfolgreich und entwickelten sich rasch zu einem vollwertigen Gebiet, der Einzelmoleküloptik.

Nach 25 Jahren optischer Experimente an Einzelmolekülen ist es an der Zeit, über die Erkenntnisse und die Anwendungen nachzudenken, die die Einzelmoleküloptik, oder allgemeiner die Einzelmolekülchemie, uns gebracht hat. Für viele Wissenschaftler sind die Einzelmolekülexperimente nur ein Weg zur superaflösenden Fluoreszenzmikroskopie, oder Nanoskopie, gewesen, wie der Chemie-Nobelpreis 2014 unterstreicht, den Eric Betzig, Stefan W. Hell

und William E. Moerner für die Entwicklung der superaflösenden Fluoreszenzmikroskopie erhielten (siehe dazu auch die auf ihren Vorträgen in Stockholm basierenden Aufsätze der Nobelpreisträger in diesem Heft).

Der Spruch „Sehen ist Glauben“ spiegelt die Bedeutung wider, die unsere Zeit Bildern und Filmen zumisst. Auch wenn die Bedeutung von Bildern für das Aufdecken und Verstehen der Strukturen und Mechanismen komplexer und insbesondere biologischer Materie nicht überschätzt werden kann, erzählen Bilder für sich genommen keine verlässlichen Geschichten: Um ihre Bedeutung – ihre Geheimnisse – zu entschlüsseln, sind Interpretation und gründliches Nachdenken nötig. Es steckt viel mehr in Einzelmolekülen als die superaflösenden Fluoreszenzflecken, die wir dank Laser- und Computer/Bildbearbeitungstechnik mit unseren Augen wahrnehmen. Detaillierte Informationen können aus der Vielfalt an Signalen extrahiert werden, die uns diese Einzelmoleküle aus ihrer nanometerskaligen Umgebung vermitteln, seien es physikalische – elektrische Felder, Magnetfelder, Temperatur, Druck, Spannung –, chemische – pH-Wert, Redoxpotential, Nachweis kleiner Moleküle – oder Symmetriebrechungen. Ich möchte diese Behauptung mit einigen Erfolgsgeschichten illustrieren, die zeigen, welche neuen Informationen Einzelmolekülexperimente liefern.

## Überraschende Erkenntnisse

Die molekulare Dynamik lässt sich mithilfe von Bildern grundsätzlich schlecht vermitteln, selbst wenn es sich dabei um Filme handelt. Räumliche Heterogenität, die in superaflösten Bildern direkt sichtbar wird, erhält ihre

volle Bedeutung nur, wenn die Zeitvariable mit dem Raum in Verbindung gebracht wird. So können die einzelnen Schritte molekularer Motoren sowohl zeitlich als auch räumlich aufgelöst werden; einzelne Farbstoffmoleküle können verfolgt werden, während sie durch die komplexen Strukturen poröser Oxid- oder Katalysatoroberflächen diffundieren. Das Auftreten statistischer Fluktuationen bedeutet, dass das ganze Gebiet der Dynamik für eine quantitative Evaluierung Zeitspuren und Korrelationsfunktionen braucht, vor allem wenn die Entwicklungsgeschwindigkeiten sehr unterschiedlich lang und einige davon viel kürzer als die Videoaufzeichnungsgeschwindigkeit sind. Einzelmolekülsignale liefern direkt Zeitabhängigkeiten, ohne dass eine Ensemblesynchronisation notwendig ist. In vielen Fällen haben Einzelmolekülstudien eine verblüffende Verteilung der Reaktionsgeschwindigkeiten in realen Systemen ergeben, die traditionell als Systeme mit guter Durchmischung der Reaktanten und einfachen Kinetiken niedriger Ordnung mit gut definierten, konstanten Reaktionsgeschwindigkeiten galten. Eine solche zeitaufgelöste Information lässt sich von einem Ensemble schwierig oder gar nicht erhalten. Einzelmoleküle bieten einen direkten Zugang zu dieser Heterogenität zeitaufgelöst an einer definierten Position oder räumlich korreliert an unterschiedlichen Positionen.

Die Geschwindigkeitsverteilung kann immer dann extrem werden, wenn der Reaktionsweg hohe oder breite Barrieren aufweist. Ein eindrucksvolles Beispiel lieferte die auf X. Sunney Xie und H. Peter Lu zurückgehende Untersuchung einzelner Enzymmoleküle (Einzelmolekül-Enzymologie). Beim Ver-

[\*] Prof. Dr. M. Orrit  
Huygens Laboratorium  
Universiteit Leiden  
2300 RA Leiden (Niederlande)  
E-Mail: orrit@physics.leidenuniv.nl

folgen eines Enzymmoleküls über längere Zeit entdeckten sie große Änderungen in der Umsatzgeschwindigkeit; es gab „geschäftige“ und „faule“ Perioden. Diese überraschenden Beobachtungen werfen wichtige Fragen zur Funktionsweise von molekularen Maschinen auf, die heftige Störungen durch die Brownsche Bewegung auf Nanometerskalen nicht nur vermeiden, sondern buchstäblich nutzen. Ist nicht die raue Hyperfläche der freien Energie von Proteindynamiken, wie erstmals von Hans Frauenfelder vorgeschlagen, essenziell, um die Unversehrtheit der Proteinstruktur zu gewährleisten? Könnte die Hierarchie von konformativen Barrieren eine notwendige Konsequenz des Kompromisses zwischen struktureller Unversehrtheit und der erforderlichen Flexibilität sein? Ähnliche Überlegungen könnten auch für komplexe Systeme in kondensierter weicher Materie gelten, z. B. für Gläser, deren Struktur und Dynamik ein noch immer ungelöstes Problem ist.

Eine neue Entwicklung in der Spektroskopie ist die Untersuchung der Dynamik einzelner Moleküle bei Raumtemperatur mithilfe ultrakurzer Puls-techniken. Pump-Sonden-Experimente der Gruppe von Niek van Hulst an Farbstoffmolekülen mit einer Subpikosekunden-Auflösung ergaben eine unerwartet lange Kohärenzlebensdauer vibronischer Übergangszustände. Später fand die Gruppe in bakteriellen Lichtsammelkomplexen, sogar unter physiologischen Bedingungen, eine überraschend langlebige Quantenkohärenz. Da diese die Anregungsamplituden in unterschiedlichen Bereichen des Komplexes bestimmt, könnte sie Energieübertragungswege gegen thermische Störungen und Fehlordnung schützen und damit letztlich die Effizienz der Photosynthese erhöhen. Solche Erkenntnisse könnten für die Photovoltaik sehr wichtig sein.

Als nahezu isolierte Quantensysteme wurden Einzelmoleküle für Quantenmanipulationen genutzt. Viele der derzeitigen Experimente mit Stickstoff-Fehlstellen-Farbzentren in Diamant oder mit Halbleiterquantenpunkten wurden zunächst mit organischen Einzelmolekülen durchgeführt. Einige Bei-

spiele der letzten zehn Jahre stammen von Vahid Sandoghdar und seiner Gruppe. Bei kryogenen Temperaturen und in sehr gut geordneten Molekulkristallen ist der optische Übergang eines Gastmoleküls während der Lebensdauer der spontanen Emission weitgehend gegen Störungen durch die Umgebung abgeschirmt, was ihm eine Qualität ähnlich der eines kalten Atoms in der Gasphase verleiht. Dieses Merkmal findet man in der kondensierten Materie nur bei Molekülen. Moleküle könnten sich damit als die fehlenden Übermittler von Quanteninformationen zwischen Materie-Qubits und den fliegenden Qubits von Photonen erweisen.

Da Moleküle sehr klein sind, sind sie als punktförmige Sonden für optische Nahfelder auf Nanometerskalen, wie die um plasmonische Nanostrukturen, geeignet. Einer der attraktivsten Effekte in der Plasmonik ist die Fluoreszenzverstärkung, die den bislang durchschlagendsten wirtschaftlichen Erfolg ermöglicht hat: die Einzelmolekül-DNA-Sequenzierung in Zero-Mode-Waveguides. Während DNA durch eine DNA-Polymerase aufgebaut wird, die in einem Loch in einem Aluminiumfilm immobilisiert ist, wird die Fluoreszenz der nacheinander prozessierten farbstoffmarkierten Nucleotide durch Metallplasmonen verstärkt. Aus den detektierten Signalen folgt die Sequenz der Basenpaare. Eine weitere spannende potenzielle Anwendung ist die oberflächen- und spitzenverstärkte Raman-Streuung, die chemische Informationen bis hinunter auf das Einzelmolekülniveau liefert. Sind erst einmal reproduzierbare Substrate und Verknüpfungsmethoden gefunden, dürfte dies ein Standardanalysenverfahren werden. Analog bietet die Fluoreszenzverstärkung durch eine Vielzahl an Metallnanostrukturen die Aussicht, auch schwache und langlebige Emittoren zu untersuchen.

Auch wenn die Fluoreszenz noch viele Jahre das Arbeitspferd für die optische Untersuchung von Einzelmolekülen und Einzelnanopartikeln bleiben wird, wurden andere optische Signale ebenfalls bereits als geeignet identifiziert. In sauber hergestellten Durchflusszellen oder -kapillaren können kleine metallische oder dielektrische Partikel, selbst

in Gegenwart eines Hintergrunds, durch Streuung detektiert werden, und zwar bis hinunter zu einzelnen Proteinmolekülen. Absorbierende Spezies können mithilfe eines photothermischen Kontrastverfahrens mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden, und mit plasmonischen Nahfeldern lassen sich Einzelmoleküle registrieren.

## Das geistige Auge

Die Einzelmolekülchemie ist weit davon entfernt, nur ein Weg zur Nanoskopie zu sein; sie hat vielmehr eine Vielzahl an neuartigen Methoden hervorgebracht, die Detailinformationen über die räumliche Anordnung hinaus liefern. Ihnen verdanken wir eine ununterbrochene Reihe von Erkenntnissen, darunter das überraschende Ausmaß an Heterogenität auf der Nanoskala. Eigentlich hatte man erwartet, dass das Fixieren auf einzelne Moleküle zu einer drastischen Vereinfachung führt, doch die Natur hat uns wieder überrascht, indem sie auf Submikrometerskalen genauso komplex wie sonst erscheint. Man kann darauf wetten, dass die Einzelmolekülrevolution noch nicht vorbei ist. Das Arsenal an Einzelmolekülmethoden, mit denen die Chemie auf kurzen Längen- und Zeitskalen entwirrt wird, braucht noch feinere und schnellere Instrumente. Experimente an einzelnen Nano- und Subnanopartikeln werden nicht nur ein Sehen ermöglichen, sondern auch ein mechanistisches Verstehen von komplexen Systemen. Die Manipulation von Nanopartikeln mithilfe von Licht, die vor kurzem an optisch angetriebenen Nanoschwimmern gezeigt wurde, wird Allgemeingut werden. Der nächste Schritt wird die Kombination dieser genauen Werkzeuge mit Nanoskopie-Bildern sein. Man könnte die Aussage des Fuchses in Antoine de Saint-Exupéry's *Der kleine Prinz* etwas umformulieren: Man sieht nur mit dem Verstand gut. Das Wesentliche ist sogar für die *superauflösenden* Augen unsichtbar.

### Zitierweise:

Angew. Chem. Int. Ed. **2015**, 54, 8004–8005  
Angew. Chem. **2015**, 127, 8116–8117