Physikalische Chemie 2000

In den Nanowissenschaften kommt dem Verhalten und der Manipulation einzelner Moleküle eine immer größere Bedeutung zu. Apparative und methodische Entwicklungen erschließen der Festkörper-NMR-Spektroskopie neue Anwendungen. In der Kolloid- und Grenzflächenforschung gewinnen biologische und materialwissenschaftliche Themen an Gewicht.

Fluoreszenzspektroskopie an einzelnen Molekülen

Eine der aufregendsten Entwicklungen in den Naturwissenschaften ist die Möglichkeit, Experimente auf atomarer und molekularer Ebene durchführen zu können. Viele theoretische Modelle von Interaktionen und chemischen Reaktionen werden im allgemeinen auf molekularer Ebene beschrieben, obwohl unser Wissen über die chemische Struktur und Dynamik primär aus der Untersuchung von Molekülensembles stammt. Dabei stellt sich immer die Frage, ob alle Mitglieder des Ensembles auch die gleichen Eigenschaften haben. In dieser Hinsicht versprechen Experimente mit einzelnen Molekülen neue und unerwartete Einsichten, weil die Mittelung über ein Ensemble eliminiert wird und die Informationen über die Heterogenität und Kinetik des Systems direkt erhalten werden. Pionierarbeiten auf unterschiedlichsten Gebieten wie Strommessung an einzelnen Ionenkanälen in Membranen, Visualisierung von einzelnen Atomen und Molekülen mit Rastersondentechniken (Tunnel-, Kraft- und Elektronenmikroskopie) und eine Reihe optischer Spektroskopien zeigen die Breite und die Interdisziplinarität der Einzelmolekül-Arbeiten.

Die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion in einem Mikroskop ist aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Spezifität die bei weitem wichtigste Technik der optischen Einzelmolekülspektroskopie.¹⁾ Nach einer ersten Phase, in der viele Verfahren entwickelt und Methoden validiert wurden, wird die Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie (EMFS) zunehmend als Werkzeug adaptiert und für verschiedenste Problemstellungen eingesetzt. In der Analytik und Diagnostik ist das ultimative Ziel erreicht, einzelne Moleküle zu zählen und diese anhand ihrer charakteristischen physikalischen und chemischen Eigenschaften zu identifizieren.^{2,3)} In den Lebens-⁴⁾ und Materialwissenschaften⁵⁾ werden mit EMFS Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht.

Informationsgehalt der Fluoreszenz

Voraussetzung für die Detektion von Fluoreszenz ist das Vorhandensein eines geeigneten Fluorophors. Deshalb werden meistens effiziente Fluoreszenzfarbstoffe wie Rhodamine oder Cyanine als „Reporter“ an den Analyten kovalent gekoppelt oder spezifisch in die Matrix eingelagert. Allerdings sind in Biomolekülen auch intrinsische Fluorophore wie das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) für die Einzelmolekülspektroskopie geeignet.⁶⁾ In den letzten Jahren wurde die Messung der verschiedenen Fluoreszenzparameter in der EMFS schrittweise zur Molekülcharakterisierung etabliert. Die spektralen Eigenschaften der Absorption und Fluoreszenz $F(\lambda_A, \lambda_F)$,⁷⁾ die Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_{F, \dots}$,⁸⁾ die Fluoreszenzlebensdauer τ ⁹⁾ und die Anisotropie r ^{10,11)} geben spezifische Informationen über die chemische Umgebung, räumliche Orientierung und Beweglichkeit der Fluorophore. Aber auch die zeitlichen Schwankungen der Fluoreszenzintensität $F(t)$, gekennzeichnet durch kurzzeitliche Signalabnahmen oder völlige Dunkelphasen, enthalten wertvolle Informationen. Ein mächtiges statistisches Verfahren zur Rauschanalyse ist die Berechnung einer Autokorrelationsfunktion, die den Bezug eines zur Zeit t detektierten Signals, $F(t)$, zum Wert, $F(t+t_c)$, t_c Sekunden später abfragt (Selbstähnlichkeitsanalyse). Auf diese Weise können mit Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) aus dem „Blinken“ der Fluoreszenz korrelierte molekulare Prozesse herausgearbeitet und Aussagen über Reaktionsgleichgewichte (Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten), spezifische photochemische und photophysikalische Eigenschaften des Fluorophors (Tripletteigenschaften,¹²⁾ Cis-trans-Isomerisierung^{13,14)} und Transporteigenschaften (Rotation und Diffusion) über einen Zeitbereich von vielen Größenordnungen (im allgemeinen 10 ns bis Sekundenbereich) getroffen werden.¹⁵⁾

Vorteilhaft ist die simultane Erfassung aller erwähnten Größen durch die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) unter Einsatz der BIFL-Technik (Burst-Integrated-Fluorescence-Lifetime).^{10,16)}

Bei der Messung von molekularen Interaktionen sind manchmal die Veränderungen der Fluoreszenzparameter eines einzelnen gekoppelten Fluorophors nicht aussagekräftig genug. Hier ermöglicht die Verwendung von zwei fluoreszierenden Reportern neue Meßverfahren durch die Messung der Effizienz, E , des Förster-Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) von einem angeregten Donor- zu einem Acceptorfarbstoff, wodurch die Fluoreszenz des Donors

gelöscht und die des Acceptors sensibilisiert wird. Aufgrund der starken Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Donor-Acceptor-Abstand kann dieser Effekt als „spektroskopischer Maßstab“ genutzt werden. Daher ist FRET eine Schlüsseltechnik in der EMFS, um molekulare Geometrien in einem Bereich von ca. 2 bis 10 nm zu bestimmen und die konformative Dynamik zu verfolgen.^{4,17-19)} Bei einem größeren Donor-Acceptor-Abstand ist die FRET-Effizienz so klein, daß die Anwesenheit des Acceptors nur durch eine zusätzliche direkte Anregung nachgewiesen werden kann. Dann ermöglicht die gleichzeitige, korrelierte Anwesenheit der beiden Farbstoffe den Nachweis des Bindungsereignisses durch eine Kreuzkorrelations-,²⁰⁾ Koinzidenz- oder Kolokalisations-²¹⁾ oder zweidimensionale Fluoreszenzintensitäts-Verteilungsanalyse (2D-FIDA).²²⁾

Experimentelle Anordnungen zur EMFS

Aufgrund der hohen erreichbaren Fluoreszenzintensitäten bis in den MHz-Bereich ist für eine effektive Einzelmoleküldetektion weniger die Nachweispflichtigkeit als vielmehr die Reduktion des unspezifischen Hintergrundsignals entscheidend. Zielsetzung der verschiedenen mikroskopischen Anordnungen zur EMFS ist daher, das Meßvolumen durch Minimierung sowohl des angeregten als auch des beobachteten Volumens zu begrenzen. Die weitaus kleinsten Anregungsvolumina werden mit optischer Nahfeld-Anregung in einem Abstandsbereich kleiner als die optische Wellenlänge durch angespitzte Fasern (Rasternahfeldmikroskop mit einer Apertur ~ 100 nm (SNOM))²³⁾ oder durch totale interne Reflexion (TIR) an dielektrischen Phasengrenzflächen^{24,25)} erreicht. Bei TIR tritt ein mit dem Abstand zur Grenzfläche exponentiell abfallendes Feld (evaneszentes Feld) im optisch dünneren Medium auf, das aufgrund der geringen Eindringtiefe (ca. 100 – 200 nm) hervorragend zur selektiven Fluoreszenzanregung von an Oberflächen immobilisierten Molekülen geeignet ist.

Neueste Entwicklungen zeigen, daß selbst diese Grenzen noch zu unterbieten sind, z.B. durch Benutzung eines einzelnen Moleküls als Lichtquelle²⁶⁾ oder unter Ausnutzung des feldverstärkenden Effektes einer atomar spitzen Siliciumnadel.²⁷⁾ Die noch recht problematische Präparation der benötigten Sonden und die speziellen Anforderungen an die Probe (freie Zugänglichkeit von einer Seite) schränken eine breite Anwendung solcher Verfahren allerdings z. Zt. noch stark ein. Daher werden meistens klassische optische Mikroskope eingesetzt, die Anregungen im Fernfeld realisieren. Das beste Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis läßt sich hierbei mit einer beugungsbegrenzten Fokussierung eines Anregungslasers (ca. halbe Wellenlänge) und einer konfokalen Detektion (Anordnung einer Lochblende in der Fluoreszenzbildebene) erreichen. Trotz verschiedener Techniken zur Anregung wird die Fluoreszenz meistens von leistungsfähigen Mikroskopobjektiven mit hoher numerischer Apertur gesammelt und von Punktdetektoren (Avalanche Photodioden, APDs) bei konfokaler Detektion⁸⁻¹⁰⁾ oder von CCD-Kameras bei einer Weitfeldanregung registriert.²⁸⁾ APDs bieten die höchste Zeitauflösung (bis 100 ps) und werden vor allem bei der zeitaufgelösten Spektroskopie von Einzelmolekülen in Lösung verwendet. Dagegen ist eine Weitfeldanregung und Fluoreszenzdetektion mit Videoauslesegeschwindigkeit geeignet für die Aufnahme eines Films, in dem viele einzelne immobilisierte Moleküle lokalisiert und gleichzeitig beobachtet werden können.²⁹⁻³¹⁾

Freie Einzelmoleküle in Lösung

Eine der Hauptrichtungen bei Fluoreszenzuntersuchungen frei diffundierender einzelner Moleküle in Lösung zielt auf die stichprobenartige Zählung und Charakterisierung auf der Basis der „Schnappschüsse“ während des Aufenthalts im Detektionsvolumen. Dabei werden vorgegebene, zeitlich konstante Parameter des Fluoreszenzreporters gesucht. Im Hinblick auf die Suche nach Molekülen mit speziellen Eigenschaften mit Hochdurchsatz-Screening und die Entwicklung kostengünstiger, effizienter homogener Assays steht ein höchstempfindlicher, schneller und eindeutiger Nachweis von biologisch relevanten Molekülen (DNA, Proteine, Wirkstoffe) im Vordergrund.³²⁾ Um die notwendige Sicherheit der Identifizierung auf molekularer Ebene zu erreichen, muß im allgemeinen eines der bereits eingangs erwähnten Multiparameter-Detektionsverfahren durch simultane Messung mehrerer der möglichen Fluoreszenzparameter ($F(\lambda_A, \lambda_F)$, Φ_F , τ , r , $F(t)$, E) angewendet werden. Abbildung 1 zeigt eine typische MFD-Messung für alle sechs Parameter mit vier Detektoren für eine ca. 10^{-11} M Analytlösung. Deutlich sind die Durchtritte von einzelnen Molekülen durch das konfokale Detektionsvolumen (oben) als Signalspitzen (bursts) in der zeitlichen Spur der Fluoreszenzintensität zu erkennen (Mitte). Für jedes Ereignis können die spektroskopischen Parameter aus Fluoreszenzankunftszeit-Histogrammen bestimmt werden (unten). Am Beispiel einer Mischung der Farbstoffe Rhodamin-123 (Rh123) und Tetramethylrhodamin (TMR) zeigt Abbildung 2 die Vorteile von MFD. Die geringe Zahl der registrierten Photonen für ein Einzelmolekülereignis führt zu relativ breiten, teilweise überlappenden eindimensionalen Häufigkeitsverteilungen für die Fluoreszenzlebensdauer im grünen Spektralbereich τ_G , und das Intensitätsverhältnis in zwei Spektralbereichen F_G/F_R , (Projektionen in Abbildung 2). Doch die Spezifität kann in einem mehrdimensionalen Häufigkeitshistogramm der Parameterpaare erheblich gesteigert werden (der Farbcode repräsentiert die Anzahl), so daß neben TMR und Rh123 sogar zusätzlich geringe Anteile einer fluoreszierenden Verunreinigung V nachgewiesen werden können. So können auch bei geringen Signalstärken

unterschiedliche Farbstoffe,^{10,33)} markierte Mononukleotide³⁴⁾ oder DNA-Sequenzen³⁵⁾ mit hoher Sicherheit spektroskopisch klassifiziert und beim Hochdurchsatz-Screening die Standardabweichungen deutlich vermindert werden.^{22,36)}

Für eine vollständige Analytik des Inhalts von Zellen oder beim Monitoring von Minireaktoren ist ein Einzelmolekülnachweis in Durchflusssystemen^{37,38)} oder Mikrotropfen³⁹⁾ mit MFD notwendig. Im Hinblick auf die Einzelmolekül-DNA-Sequenzierung bleibt abzuwarten, inwieweit die in den letzten Jahren entstandenen Ansätze eine praktische Anwendung finden werden.⁴⁰⁾

Einzelmoleküle an Oberflächen

Der kurze Beobachtungszeitraum von wenigen Millisekunden, der durch den Durchtritt (diffusiv oder aktiver Transport) der Moleküle durch das kleine Detektionsvolumen gegeben ist, ist die größte Limitierung bei der Untersuchung freier Moleküle mit einem konfokalen Aufbau. Deshalb ist die Immobilisierung an Oberflächen bis auf wenige Ausnahmen die Methode der Wahl zum Studium langsamer Prozesse von biologischen Makromolekülen. Damit kann die Beobachtungszeit in den Bereich von Sekunden ausgedehnt werden und ist nur durch die endliche (Photo)stabilität des Chromophors begrenzt. Zeitaufgelöste Untersuchungen spektraler Verschiebungen⁴¹⁾ und zeitlich variierender FRET-Effizienzen^{42,43)} lieferten wertvolle Informationen über thermische Strukturfluktuationen und Faltungs-Entfaltungs-Gleichgewichte von Proteinen. Auch über substratinduzierte Strukturumwandlungen wie im Falle eines Calciumsensors auf Proteinbasis wurde berichtet.⁴⁴⁾ Alternativ zum FRET-Experiment läßt sich abstandssensitive Fluoreszenz auch allein unter Ausnutzung von Löscheffekten erzielen. In einer Variante dieses Verfahrens, in der sich zwei oder mehr identische Fluorophore bei entsprechendem Abstand gegenseitig löschen, wurde zum ersten Mal die Faltung und Entfaltung des Muskelproteins Titin zeitaufgelöst im Fluoreszenzmikroskop beobachtet.⁴⁵⁾

Meilensteinarbeiten zur Dynamik individueller Enzymmoleküle^{6,46)} zeigen übereinstimmend, daß die katalytische Aktivität zeitlich fluktuiert und mit den „Atmungsbewegungen“ der Proteinmatrix korreliert ist. Umsätze einzelner Substratmoleküle sind heutzutage ebenso meßbar wie temporäre Strukturänderungen während des Katalyseprozesses.⁴⁷⁾ Intensiv studiert wurden auch Konformationsänderungen der RNA-Stränge in Ribozymen⁴⁸⁾ oder Ribosomuntereinheiten.²⁹⁾

Ein weiteres zentrales Thema sind Motorproteine. So wurde kürzlich bei der F₁-ATPase, einem molekularen Rotor, eine nahezu vollständige Umsetzung von chemischer in mechanische Energie nachgewiesen.³¹⁾ Fluoreszenzspektroskopie kann mit Nanomanipulationstechniken kombiniert werden, wie am Beispiel der DNA-abhängigen RNA-Polymerase mit Hilfe von optischen Pinzetten demonstriert wurde.³⁰⁾ Das bei all diesen Studien im Hintergrund stehende Ziel, eine möglichst umfassende Beschreibung der Energielandschaft derartiger Makromoleküle, liegt allerdings noch in weiter Ferne.^{46,49,50)}

Einzelmoleküle in Zellen

Das Bild von der Funktion einzelner Biomoleküle wäre unvollständig ohne den finalen Test in ihrer komplexen natürlichen Umgebung innerhalb oder auf lebenden Zellen. Bei den großen experimentellen Problemen, die vor allem im starken unspezifischen Untergrund insbesondere durch Autofluoreszenz, Einführung geeigneter Fluorophore und ihre Lokalisation und Verfolgung in drei Dimensionen bestehen, wurden erste Erfolge erzielt. Als Fluoreszenzreporter in Zellen eignen sich Fluoreszenzfarbstoffe, die längerwellig als ca. 630 nm angeregt werden können,³⁴⁾ und Fusionsproteine mit dem Green Fluorescent Protein (GFP), die gezielt durch molekularbiologische Methoden erzeugt werden können.^{51,52)} Nach einigen Vorstudien an Modellmembranen, in denen z. B. Diffusionskonstanten der Rotation⁵³⁾ und Translation⁵⁴⁾ anhand einzelner Moleküle bestimmt wurden, gibt es nun eine ganze Reihe von entsprechenden Untersuchungen auf den Membranen lebender Zellen.^{55,56)} Zur Minimierung der Photozerstörung und zur Untergrundreduktion hat sich bei FCS-Studien innerhalb von Zellen eine Zweiphotonen-Anregung als vorteilhaft erwiesen.⁵⁷⁾ Aber oft ist auch mit einer entsprechenden Einphotonenanregung ein zur Einzelmoleküldetektion ausreichendes Signal-Hintergrund-Verhältnis erreichbar.⁵⁸⁻⁶⁰⁾

Einzelmoleküle in kristallinen oder amorphen Matrices

Die Einbettung von Fluorophoren in einer Matrix aus festen Kohlenwasserstoffen, Polymeren oder wasserhaltigem Gel bietet ideale Bedingungen zum Studium ihrer optischen, spektroskopischen oder photophysikalischen Eigenschaften. Auf diese Weise können isolierte und immobilisierte Fluorophore als lokale Sonden die Eigenschaften und Stabilität ihrer Umgebung über relativ große Zeitskalen und in einem weiten Temperaturbereich auf nanoskopischer Skala widerspiegeln. Des weiteren konnte bei individuellen Terrylenmolekülen als einzelнем Quantensystem die nichtklassische Photonenstatistik studiert werden.⁶¹⁾ Mit speziellen Beleuchtungsgeometrien unter teilweiser evaneszenter Anregung ließ sich in derartigen Systemen sogar die vollständige dreidimensionale Orientierung von einzelnen Molekülen bestimmen, sowohl im Epifluoreszenz-^{62,63)} als auch im Rasternahfeldmikroskop.⁶⁴⁾

Interessante Einblicke über die Wechselwirkungen in multichromophoren Systemen geben die Untersuchungen einzelner Dendrimere mit acht randständigen Fluorophoren⁶⁵⁾ und photosynthetischer LH2-Protein-Antennenkomplexe bestehend aus zwei ringförmigen Pigmentsystemen (B800 und B850) mit insgesamt 28 Bacteriochlorophyll-a-Molekülen (BChl-a) in der Proteinmatrix.^{66,67)} In Dendrimern wurde im dynamischen Wechsel die Fluoreszenz von nicht interagierenden und interagierenden Chromophoren beobachtet, wobei interessanterweise zusätzlich kollektive Dunkelphasen auftraten, die auch für LH2 charakteristisch sind. Wie sehr die elektronische Kopplung durch die spezifische lokale Ordnung der Proteinmatrix beeinflusst wird, zeigt sich bei LH2: im Pigmentsystem B800 sind die angeregten Zustände primär lokalisiert auf einem BChl-a-Molekül, bei B850 dagegen sind sie komplett über den Ring delokalisiert.

Einzelne Farbstoffmoleküle können auch innerhalb einer Polymermatrix noch starke Strukturfluktuationen zeigen, die sich in spektralen Sprüngen manifestieren.⁶⁸⁾ Die thermische Anregung durch Phononen der Matrix ist erst bei Temperaturen von wenigen Kelvin- oder Millikelvin vernachlässigbar. Phasenrelaxationen^{69,70)} sowie Einflüsse von Inhomogenitäten⁷¹⁾ sind so dem Experiment zugänglich.

Ausblick

Seit den ersten erfolgreichen Fluoreszenzmessungen an einzelnen Molekülen vor nunmehr über zehn Jahren hat sich diese Technik in der Chemie, Biologie und Physik stürmisch ausgebreitet, und EMFS ist zu einer wertvollen Bereicherung der Fluoreszenzmeßtechniken geworden. Es ist zu erwarten, daß sich dieser Trend insbesondere in den Grenzgebieten weiter fortsetzt und EMFS mit anderen Einzelmolekültechniken kombiniert wird. Gerade in den Nanowissenschaften mit der Nanobiotechnologie, supramolekularen Chemie oder Nanoelektronik kommt dem Verhalten und der gezielten Manipulation einzelner Moleküle immer größere Bedeutung zu (Abbildung 3).

Claus Seidel, Ralf Kühnemuth, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen E-Mail cseidel@gwdg.de

- 1) W. E. Moerner, M. Orrit, *Science* 1999, 283, 1670–1676.
- 2) W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, A. van Orden, H. J. Werner, R. A. Keller, *Chem.Rev.* 1999, 99, 2929–2956.
- 3) C. Zander, *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 745–751.
- 4) S. Weiss, *Science* 1999, 283, 1676–1683.
- 5) J. Yu, D. H. Hu, P. F. Barbara, *Science* 2000, 289, 1327–1330.
- 6) H. P. Lu, L. Xun, X. S. Xie, *Science* 1998, 282, 1877–1882.
- 7) P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit, *J. Phys. Chem.* 2000, 104, 1–16.
- 8) P. Kask, K. Palo, D. Ullmann, K. Gall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 13756–13761.
- 9) J. Enderlein, M. Sauer, *J. Phys. Chem. A* 2001, 105, 48–53.
- 10) J. Schaffer, A. Volkmer, C. Eggeling, V. Subramaniam, G. Striker, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* 1999, 103, 331–336.
- 11) T. Ha, T. A. Laurence, D. S. Chemla, S. Weiss, *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 6839–6850.
- 12) D. S. English, E. J. Harbron, P. F. Barbara, *J. Phys. Chem. A* 2000, 104, 9057–9061.
- 13) J. Widengren, P. Schwille, *J. Phys. Chem. A* 2000, 104, 6416–6428.
- 14) J. Widengren, C. A. M. Seidel, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2000, 3, 3435–3441.
- 15) J. Widengren, R. Rigler, *Cell. Mol. Biol.* 1998, 44, 857–879.
- 16) C. Eggeling, S. Berger, L. Brand, J. R. Fries, J. Schaffer, A. Volkmer, C. A. M. Seidel, *J. Biotechnol.* 2001, *im Druck*.
- 17) M. Dahan, A. A. Deniz, T. J. Ha, D. S. Chemla, P. G. Schultz, S. Weiss, *Chem. Phys.* 1999, 247, 85–106.
- 18) S. Weiss, *Nature Struct. Biol.* 2000, 7, 724–729.
- 19) P. Schlichting, B. Duchscherer, G. Seisenberger, T. Basché, C. Bräuchle, K. Müllen, *Chem. Eur. J.* 1999, 5, 2388–2395.
- 20) K. G. Heinze, A. Koltermann, P. Schwille, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 10377–10382.
- 21) T. D. Lacoste, X. Michalet, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 9461–9466.
- 22) P. Kask, K. Palo, N. Fay, L. Brand, Ü. Mets, D. Ullmann, J. Jungmann, J. Pschorr, K. Gall, *Biophys. J.* 2000, 78, 1703–1713.
- 23) B. Hecht, B. Sick, U. P. Wild, V. Deckert, R. Zenobi, O. J. F. Martin, D. W. Pohl, *J. Chem. Phys.* 2000, 112, 7761–7774; *siehe auch C. S. Fokas, Nachr. Chem.Tech. Lab.* 1999, 47, 648.
- 24) W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. P. Nolan, *Cytometry* 1999, 36, 224–231.
- 25) J. Enderlein, *Chem. Phys. Lett.* 1999, 308, 263–266.
- 26) J. Michaelis, C. Hettich, J. Mlynek, V. Sandoghdar, *Nature* 2000, 405, 325–328.
- 27) J. Azoulay, A. Débarre, A. Richard, P. Tchénio, *J. Microsc.* 1999, 194, 486–490.
- 28) L. Cognet, G. S. Harms, G. A. Blab, P. H. M. Lommerse, T. Schmidt, *Appl. Phys. Lett.* 2000, 77, 4052–4054.
- 29) 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.
- 30) Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama, T. Yanagida, *Biophys. J.* 1999, 76, 709–715.
- 31) K. Kinoshita, Jr., R. Yasuda, H. Noji, K. Adachi, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B- Biol. Sci* 2000, 355, 473–489.
- 32) M. Auer, K. J. Moore, F. J. Meyer-Almes, R. Günther, A. J. Pope, K. A. Stoekli, *DDT* 1998, 3, 457–465.
- 33) M. Prummer, C. G. Hübner, B. Sick, B. Hecht, A. Renn, U. P. Wild, *Anal.Chem.* 2000, 72, 443–447.
- 34) D. P. Herten, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Appl. Phys. B* 2000, 71, 765–771.
- 35) J.-P. Knemeyer, N. Marmé, M. Sauer, *Anal. Chem.* 2000, 72, 3717–3724.
- 36) K. Palo, Ü. Mets, S. Jäger, P. Kask, K. Gall, *Biophys. J.* 2000, 79, 2858–2866.
- 37) A. van Orden, R. A. Keller, W. P. Ambrose, *Anal. Chem.* 2000, 72, 37–41.

- 38) Y. F. Ma, M. R. Shortreed, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4640–4645.
- 39) C. Kung, M. D. Barnes, N. Lermer, W. B. Whitten, J. M. Ramsey, *Appl. Opt.* **1999**, *38*, 1481–1487.
- 40) M. Sauer, B. Angerer, K. T. Han, C. Zander, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 2471–2477.
- 41) T. Wazawa, Y. Ishii, T. Funatsu, T. Yanagida, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1561–1569.
- 42) T. Ha, A. Y. Ting, J. Liang, A. A. Deniz, D. S. Chemla, P. G. Schultz, S. Weiss, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 107–118.
- 43) 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.
- 44) S. Brasselet, E. J. G. Peterman, A. Miyawaki, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3676–3682.
- 45) X. Zhuang, T. Ha, H. D. Kim, T. Centner, S. Labeit, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14241–14244.
- 46) L. Edman, Z. Földes-Papp, S. Wennmalm, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 11–22.
- 47) T. Ha, A. Y. Ting, J. Liang, W. B. Caldwell, A. A. Deniz, D. S. Chemla, P. G. Schultz, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 893–898.
- 48) X. Zhuang, L. E. Bartley, H. P. Babcock, R. Russell, T. Ha, D. Herschlag, S. Chu, *Science* **2000**, *288*, 2048–2051.
- 49) L. Edman, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8266–8271.
- 50) J. N. Onuchic, J. Wang, P. G. Wolynes, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 175–184.
- 51) U. Kubitschek, O. Kückmann, T. Kues, R. Peters, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2170–2179.
- 52) J. White, E. Stelzer, *Trends Cell Biol.* **1999**, *9*, 61–65.
- 53) G. S. Harms, M. Sonnleitner, G. J. Schütz, H. J. Gruber, T. Schmidt, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2864–2870.
- 54) A. Sonnleitner, G. J. Schütz, T. Schmidt, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2638–2642.
- 55) Y. Sako, S. Minoguchi, T. Yanagida, *Nature Cell Biol.* **2000**, *2*, 168–172.
- 56) G. J. Schütz, G. Kada, V. P. Pastushenko, H. Schindler, *EMBO J.* **2000**, *19*, 892–901.
- 57) R. H. Köhler, P. Schwille, W. W. Webb, M. R. Hanson, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 3921–3930.
- 58) T. A. Byassee, W. C. W. Chan, S. Nie, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5606–5611.
- 59) M. Goulian, S. M. Simon, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2188–2198.
- 60) Y. Sako, K. Hibino, T. Miyauchi, Y. Miyamoto, M. Ueda, T. Yanagida, *Single Molecules* **2000**, *1*, 159–163.
- 61) L. Fleury, J. M. Segura, G. Zumofen, B. Hecht, U. P. Wild, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 1148–1151.
- 62) A. P. Bartko, R. M. Dickson, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 11237–11241.
- 63) B. Sick, B. Hecht, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 4482–4485.
- 64) N. F. van Hulst, J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajó, L. Kuipers, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 7799–7810.
- 65) J. Hofkens, M. Maus, T. Gensch, T. Vosch, M. Cotlet, F. Köhn, A. Herrmann, K. Müllen, F. De Schryver, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9278–9288.
- 66) M. A. Bopp, A. Sytnik, T. D. Howard, R. J. Cogdell, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11271–11276.
- 67) A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T. J. Aartsma, J. Schmidt, *Science* **1999**, *285*, 400–402.
- 68) F. Stracke, C. Blum, S. Becker, K. Müllen, A. J. Meixner, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *325*, 196–202.
- 69) E. A. Donley, S. Bonsma, V. Palm, V. Burzomato, U. P. Wild, T. Plakhotnik, *J. Lumin.* **2000**, *87–89*, 109–114.
- 70) A. M. Boiron, P. Tamarat, B. Lounis, R. Brown, M. Orrit, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 119–132.
- 71) S. Mais, T. Basché, G. Müller, K. Müllen, C. Bräuchle, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 41–52.

Abb.1. **MFD von frei diffundieren Molekülen in Lösung. Der Durchtritt eines Moleküls durch das konfokale Detektionsvolumen (oben) resultiert in Signalspitzen der Fluoreszenzintensität (Mitte). Das spektral und nach Polarisation aufgespaltene Signal wird von vier Detektoren in Fluoreszenzankunftszeit-Histogrammen registriert (unten).**

Abb. 2. **Zweidimensionales Häufigkeitshistogramm der Fluoreszenzlebensdauer τ_c und des Intensitätsverhältnisses in zwei Spektralbereichen F_c/F_r für eine Mischung der Farbstoffe Rhodamin-123 (Rh123) und Tetramethylrhodamin (TMR) mit geringen Anteilen einer Verunreinigung V (der Farbcode von blau nach dunkelrot repräsentiert die zunehmende Häufigkeit der Wertepaare). Die entsprechenden eindimensionalen Histogramme sind zusätzlich als Projektionen gezeigt.**

Abb. 3. **Eine mögliche Kombination von Einzelmolekül-Techniken ist die simultane Kraft- und Fluoreszenzspektroskopie an einem Protein. Das an eine scharfe Spitze des Kraftmikroskops gebundene Protein wird gedehnt, wobei die induzierten Strukturänderungen durch die Änderung des FRET zwischen einem Donor/Acceptor-Farbstoffpaar verfolgt werden.**