

DISS. ETH No. 14444

Multi-parameter Fluorescence Spectroscopy: Illuminating Single Proteins

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

For the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
MICHAEL PRUMMER
Dipl. Phys., University of Heidelberg

born July 12, 1972
in Pfaffenhofen, Germany

Accepted on the recommendation of:
Prof. Dr. Urs P. Wild, Examiner
Prof. Dr. Peter Dimroth, Co-Examiner
Dr. Alois Renn, Co-Examiner

2002

Abstract

Models used in physics, chemistry and biology are often based on a single-molecule description. During the last decade it became possible to detect single chromophores and to measure some of their physical and chemical properties. Measurements on single molecules directly provide the distribution and the time trajectory of an observable. This is an essential advantage over ensemble experiments, which yield only mean values, averaged over a whole population of molecules. In this thesis, established and newly developed methods in single-molecule fluorescence spectroscopy are applied to study single membrane proteins.

A new method is presented to determine the three-dimensional orientation of single molecules by wide-field microscopy, called three-dimensional optical polarization tomography (3D-OPTO). The molecules are sequentially illuminated from two different directions of incidence with altogether five polarization directions. The detected single-molecule intensity in these five images gives sufficient information to determine the 3D orientation of the absorption dipole of single fluorophores, embedded in a thin polymer film.

In confocal microscopy molecules are analyzed one after the other. Compared to wide-field microscopy it has a higher signal-to-background ratio and offers the possibility to investigate much more parameters with multi-channel detection. Using pulsed laser excitation and time-correlated single photon counting (TCSPC), the determination of 13 independent parameters of one single molecule by multi-parameter fluorescence spectroscopy (MFS) is demonstrated. Time-resolved emission spectroscopy is performed on single chromophores for the first time.

In order to identify and distinguish single fluorophores, the ability to discriminate different dyes after a low number of detected photons is important due to the relatively high bleaching rate of dyes used in biological applications. Including the spectral characteristics of different dyes to the analysis of their different fluorescence lifetime the single molecule identification efficiency could be improved by one order of magnitude. On average less than 500 photons provide 99.9% confidence to identify one type of dye out of four.

Exploiting multi-parameter fluorescence spectroscopy, conformational changes of a membrane protein are investigated *in vitro* by fluorescence quenching. The sodium dependent citrate carrier CitS is labeled close to the putative citrate binding site. Upon addition of citrate complete fluorescence quenching of the majority of molecules is observed, indicating a citrate-induced conformational change of loop X-XI of CitS. Strong evidence for a homodimeric association of CitS is provided from a two-color experiment and dual-labeling of CitS.

Rotation of ATP synthase F_0F_1 is studied during ATP synthesis for the first time. The holoenzyme is incorporated in liposomes, immobilized, and labeled by a single fluorophore at one of the c subunits. Structural integrity is confirmed by specific inhibition of the rotation, which was not possible in previous experiments. The functionally active F_0F_1 holoenzyme shows a coupled rotational behaviour during ATP hydrolysis: with no Na^+ present in the buffer, rotation can not be observed even at high ATP levels. Monte-Carlo simulations suggest that under Na^+ and ATP saturated conditions, the ATP/ADP turnover is rate-limiting in both modes, ATP synthesis and hydrolysis.

Zusammenfassung

Modelle in Physik, Chemie und Biologie basieren oft auf einer Einzelmolekülbeschreibungen. Während des letzten Jahrzehnts wurde es möglich, einzelne Farbstoffmoleküle zu detektieren und einige ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften zu messen. Messungen an einzelnen Molekülen ermöglichen die Bestimmung der Verteilung und der Zeitreihe einer Observablen. Dies ist ein essenzieller Vorteil gegenüber Experimenten an Ensembles, die nur Mittelwerte über eine ganze Population von Molekülen liefern. In dieser Arbeit werden etablierte und neu entwickelte Methoden der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie angewandt, um einzelne Membranproteine zu studieren.

Eine neue Methode wird präsentiert, um die dreidimensionale Orientierung einzelner Moleküle durch Weitfeldmikroskopie zu bestimmen, die sogenannte Dreidimensionale Optische Polarisationstomographie (3D-OPTO). Die Moleküle werden nacheinander unter zwei verschiedenen Einfallrichtungen mit insgesamt fünf Polarisationsrichtungen beleuchtet. Die detektierte Intensität der einzelnen Moleküle in diesen fünf Bildern gibt ausreichend Information, um die dreidimensionale Orientierung des Absorptionsdipols einzelner Farbstoffmoleküle, die in einem dünnen Polymerfilm eingebettet sind, zu bestimmen.

In der Konfokalmikroskopie wird ein Molekül nach dem anderen analysiert. Verglichen mit Weitfeldmikroskopie erreicht man ein höheres Verhältnis von Signal zu Hintergrund, und es eröffnet die Möglichkeit mehrere Parameter durch Vielkanaldetektion zu untersuchen. Unter Benutzung von gepulster Laseranregung und zeitkorrelierter Einzelphotonendetektion wird die Bestimmung von 13 unabhängigen Parametern eines einzelnen Moleküls durch Multiparameterfluoreszenzspektroskopie

(MFS) demonstriert. Zeitaufgelöste Emissionsspektroskopie wird zum ersten mal an einzelnen Farbstoffmolekülen durchgeführt.

Um einzelne Farbstoffmoleküle zu identifizieren und zu unterscheiden ist es aufgrund der relativ hohen Bleichrate der in biologischen Anwendungen verwendeten Farbstoffe notwendig verschiedene Farbstoffe schon nach wenigen Photonen voneinander trennen zu können. Durch Berücksichtigung der spektralen Charakteristik verschiedener Farbstoffe zusätzlich zu den verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern konnte die Identifizierungseffizienz einzelner Moleküle um eine Größenordnung verbessert werden. Durchschnittlich weniger als 500 Photonen reichen aus, um mit einer Sicherheit von 99.9% einen bestimmten Farbstoff aus einer Menge von vier zu identifizieren.

Unter Verwendung von Multiparameterfluoreszenzspektroskopie werden Konformationsänderungen eines Membranproteins mit Hilfe von Fluoreszenzlöschung untersucht. Der natriumabhängige Zitrattransporter CitS ist nahe der mutmasslichen Zitratbindungsstelle markiert. Nach Zugabe von Zitrat wurde die vollständige Löschung der Fluoreszenz bei der Mehrheit der Moleküle beobachtet, was auf eine zitratinduzierte Konformationsänderung der Schleife X-XI von CitS hindeutet. Anhand eines eines Zweifarbexperiments können starke Hinweise für eine homodimerische Assoziation von CitS erbracht werden.

Die Rotation von ATP Synthase F_0F_1 wird zum ersten mal während der Synthese von ATP studiert. Das Holoenzym ist in Liposomen eingebettet, immobilisiert und mit einem einzelnen Farbstoffmolekül an einer der c-Untereinheiten markiert. Die strukturelle Integrität wird durch spezifische Inhibition der Drehung bestätigt, was in bisherigen Experimenten nicht gelang. Das funktionell aktive F_0F_1 Holoenzym zeigt gekoppeltes Rotationsverhalten während der ATP Hydrolyse: Unter der Abwesenheit von Na^+ im Puffer konnte sogar bei einer hohen ATP Konzentration keine Rotation beobachtet werden. Monte-Carlo Simulationen weisen darauf hin, dass unter Na^+ und ATP gesättigten Bedingungen der ATP/ADP Umsatz in beiden Modi ratenlimitierend ist, sowohl während ATP Synthese, als auch während ATP Hydrolyse.