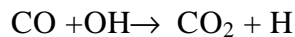
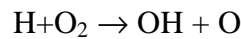


Laser in Chemie und Biologie – vom Wasserstoffatom zum Genom

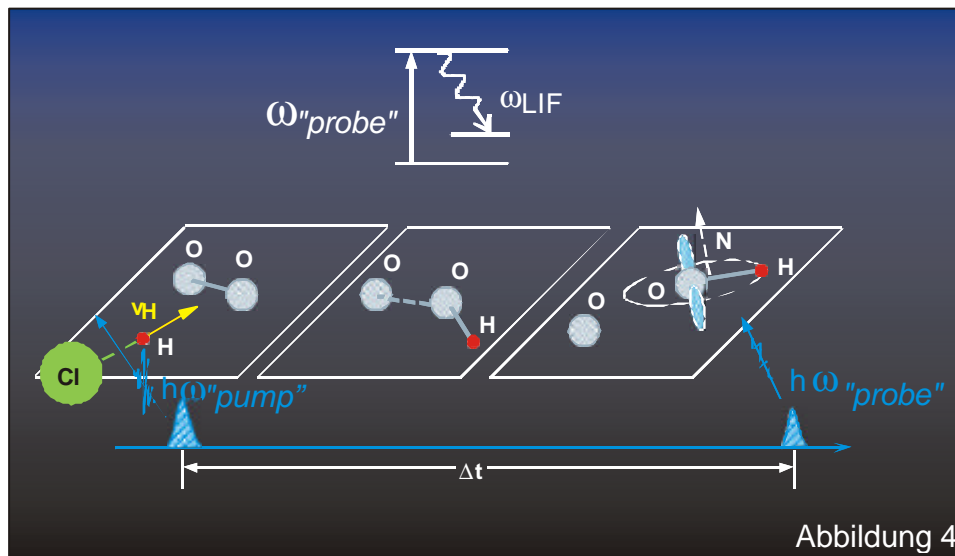
Jürgen Wolfrum, Heidelberg

Licht kann in vielfacher Weise mit chemischen Prozessen in Wechselwirkung treten. Das bekannteste Beispiel ist die Photosynthese der Pflanzen. Daneben ist Licht und allgemein elektromagnetische Strahlung in einem weiten Wellenlängenbereich das wichtigste Hilfsmittel, um Struktur, Eigenschaften und die Dynamik von Molekülen zu ermitteln. Pionierarbeiten auf diesem Gebiet leistete der Chemiker Robert Wilhelm Bunsen in Zusammenarbeit mit dem Physiker Gustav Kirchhoff in Heidelberg durch die Entwicklung der Spektralanalyse in der Mitte des vergangenen Jahrhunderts. Noch ganz unter dem Eindruck dieser neuen Entdeckung schrieb Bunsen am 15. November 1859 an seinen englischen Freund Henry Roscoe [1]: "Im Augenblick bin ich und Kirchhoff mit einer gemeinsamen Arbeit beschäftigt, die uns nicht schlafen lässt. Kirchhoff hat nämlich eine wunderschöne, ganz unerwartete Entdeckung gemacht, indem er die Ursache der dunklen Linien im Sonnenspektrum aufgefunden hat. Hierdurch ist der Weg gegeben, die stoffliche Zusammensetzung der Sonne und der Fixsterne mit derselben Sicherheit nachzuweisen, mit welcher wir Schwefelsäure, Chlor u.s.w. durch unsere Reagentien bestimmen". Eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg der Forschungsarbeiten war die nichtleuchtende Gasflamme des Bunsenbrenners. In die heiße Flamme dieses Brenners gab Bunsen verschiedene Wasserproben, die er auf seinen Wanderungen gesammelt hatte. Auf diese Weise gelang es, leuchtende Dämpfe der im Wasser enthaltenen Salze zu erzeugen. Durch Vorsetzen eines Spaltes vor die Flamme und Betrachtung des durch ein Prisma spektral zerlegten Lichtes mit Hilfe eines Fernrohres auf einer Skala wurde von Kirchhoff die Möglichkeit der quantitativen Analyse der Spektren geschaffen. So zeigt das Element Lithium rote, das Element Natrium gelbe, das Element Kalium blau-grüne Spektrallinien in der Flamme. Die sorgfältige Analyse von Spektrallinien ermöglichte Bunsen die Entdeckung und Isolierung einer Reihe bis dahin unbekannter Elemente, wie z. B. des Cäsiums, mit seinen kräftigen blauen (lat. "caesius") Linien im Spektrum. Durch die stürmische Entwicklung der Lasertechnik in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts ist es nun möglich geworden, in einer Bunsenbrennerflamme nicht nur das Eigenleuchten zugesetzter chemischer Substanzen zu beobachten, sondern auch die während der Verbrennung nur sehr kurzzeitig auftretenden chemisch instabilen Teilchen mit Laserlicht zum Aufleuchten zu bringen und damit Einblick in den mikroskopischen Reaktionsablauf in der Flamme zu erhalten [2].

Beispiel Daten für die Elementarreaktion $\text{CO} + \text{OH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}$ [3]. Die in derartigen Experimenten gewonnenen Arrhenius-Parameter der Geschwindigkeitskoeffizienten enthalten jedoch nur wenig Informationen über den mikroskopischen Reaktionsablauf und sind damit für den detaillierten Vergleich mit theoretischen Vorhersagen weniger geeignet. Hierzu müssen Untersuchungen außerhalb des thermischen Gleichgewichtes mit zustandsselektierten Reaktanten ausgeführt werden. Bei diesen Experimenten konzentriert man sich z. Zt. auf ausgewählte Elementarschritte von herausragender Bedeutung. Diese lassen sich durch eine Empfindlichkeitsanalyse [4] der Geschwindigkeitskoeffizienten des in Abb. 2 dargestellten kinetischen Systems ermitteln. Dabei zeigt sich, dass wichtige makroskopische Eigenschaften des Verbrennungsvorgangs, z. B. die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Flammenfront und die lokale Energiefreisetzung, von den relativ einfachen Elementarschritten, wie z. B.



kontrolliert werden. In Abb. 4 ist schematisch eine Anordnung zur zustandspezifischen Untersuchung dieser Reaktionen gezeigt. Durch Photolyse von Halogenwasserstoffen und



H_2O_2 mit Hilfe von Excimerlasern können Wasserstoffatome (H) und Hydroxylradikale (OH) mit definierter Translationsenergie erzeugt werden. Der zustandspezifische und zeit-aufgelöste Nachweis der erzeugten Radikale bzw. Atome mit Hilfe der laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie (LIF-Spektroskopie) erlaubt die Untersuchung der Reaktionen unter Einzelstoßbedingungen. Eine Modellierung der Reaktionsdynamik kann dann einmal durch Anwendung der Quantenmechanik über die Lösung der zeitabhängigen Schrödinger-Gleichung in drei Raumdimensionen oder durch schrittweise Integration der klassischen Bewegungsgleichung der Atome auf den ab initio berechneten Potentialhyperflächen erfolgen.

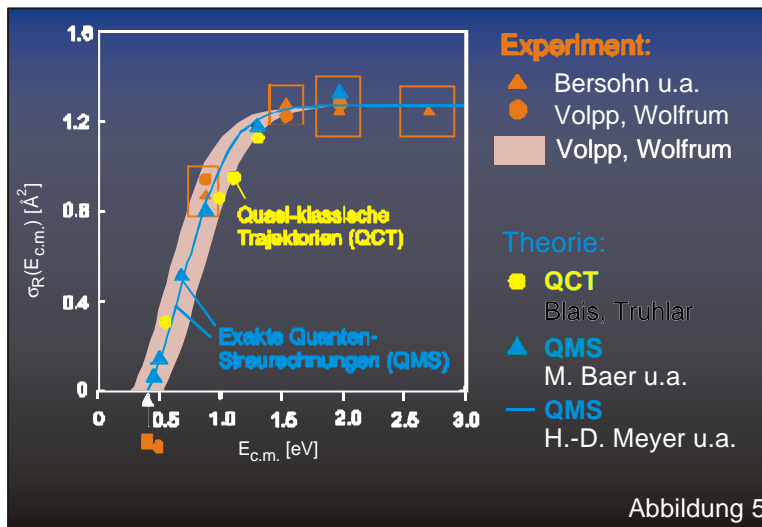


Abb. 5 zeigt den Vergleich von quantenmechanisch und klassisch berechneten Reaktionsquerschnitten für die einfachste biomolekulare chemische Reaktion neutraler Teilchen, die Wasserstoff-Austauschreaktion $D+H_2 \rightarrow HD +H$, bei der der fundamentale Prozess des Bindungsbruches unter dem

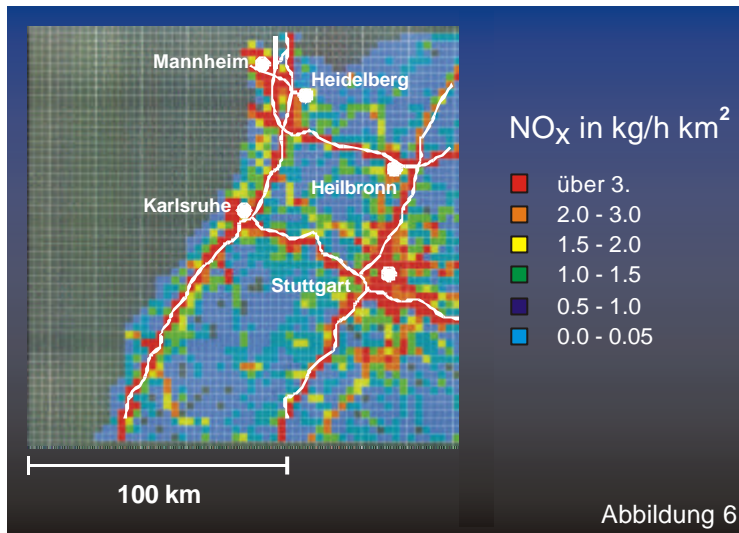
Einfluss der Neubildung einer chemischen Bindung beobachtet werden kann [5]. Das überraschende Ergebnis ist, dass die experimentellen Werte für den Anstieg der Reaktionswahrscheinlichkeit mit höherer Stoßenergie der Teilchen sowohl mit den klassischen wie auch mit den quantenmechanischen Berechnungen sehr gut übereinstimmen. Dies lässt sich wahrscheinlich durch einen Doppelfehler bei der klassischen Rechnung erklären. Die klassische Behandlung unterliegt nicht den Beschränkungen durch die Nullpunktsenergie berücksichtigt aber andererseits auch nicht den Tunneleffekt. Beide Fehler heben sich offenbar zufällig gerade auf.

Im technischen Verbrennungsprozess kommt es nun zu einer komplexen mehrdimensionalen und zeitabhängigen Wechselwirkung zwischen der großen Zahl von chemischen Elementarreaktionen und verschiedenen Transportvorgängen für Masse, Impuls und Energie [4]. Zur Erhöhung der Geschwindigkeit des chemischen Umsatzes werden meist turbulente Strömungen eingesetzt. Turbulente reaktive Strömungen lassen sich, in Analogie zum laminaren Fall, durch Lösung der Erhaltungsgleichungen für Masse, Impuls, Energie und Teilchenmassen simulieren, doch ist der Rechenaufwand bei einer direkten numerischen Simulation (DNS) außerordentlich hoch. Zunächst müssen die kleinsten Längenskalen der turbulenten Strömung bei der Ortsdiskretisierung aufgelöst werden. Eine turbulente Strömung kann man durch ein Spektrum von Wirbeln darstellen, welches sich typischerweise über 3 Größenordnungen erstreckt. Mit abnehmender Wirbelgröße nehmen die Geschwindigkeitsgradienten zu, so dass bei den kleinsten auftretenden Wirbeln die viskosen Kräfte etwa den Trägheitskräften entsprechen. Für die Beschreibung der reinen turbulenten Strömung benötigt man daher zur örtlichen Auflösung der kleinsten Strukturen dreidimensionaler Probleme etwa 10^9 Gitterpunkte. Betrachtet man nun die reaktive Strömung

in einer Flamme, so sind neben den Erhaltungsgleichungen für das Strömungsfeld gekoppelte Erhaltungsgleichungen für alle an der Reaktion beteiligten Spezies zu lösen. Selbst bei einfachen Systemen, wie in der bereits betrachteten Erdgasflamme, sind dies über 10^2 zusätzliche Gleichungen. Bei chemisch komplexen Systemen (wie z.B. der Verbrennung von Benzin-Luft Mischungen im Ottomotor) benötigt man 10^3 - 10^4 Gleichungen. Zur Beschreibung des Ablaufs der chemischen Reaktionen müssen Zeitschnitte in der Größenordnung von 10^{-7} Sekunden und Integrationszeiten im Bereich 10^{-3} bis 10^{-2} Sekunden benutzt werden. Damit kommt man insgesamt auf 10^{15} bis 10^{18} Rechenoperationen. Die leistungsfähigsten Parallelrechner erreichen zur Zeit etwa 10^{12} Rechenoperationen in der Sekunde. Hinzu kommt, dass man in der Praxis meist nicht an momentanen Strukturen, sondern an globalen Ergebnissen, wie z.B. mittleren Temperaturen oder Zusammensetzungen, interessiert ist. Damit solche Aussagen getroffen werden könnten, müssten zahlreiche direkte numerische Simulationen für verschiedene Eingangsparameter ausgeführt werden. Außerdem entstehen Probleme durch die Kopplung der Reaktion mit der Turbulenz. Dies ist hauptsächlich durch die großen Dichteänderungen während der Verbrennung bedingt, die das Strömungsfeld maßgeblich verändern können. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den nächsten Jahren eine praktikable mathematische Beschreibung technischer Verbrennungsprozesse nur dann möglich ist, wenn sowohl die Turbulenz als auch die chemische Reaktion durch vereinfachte, jedoch in ihren Gültigkeitsbereichen klar beurteilbare Modelle beschrieben werden können [6].

Der Motor im Laserlicht

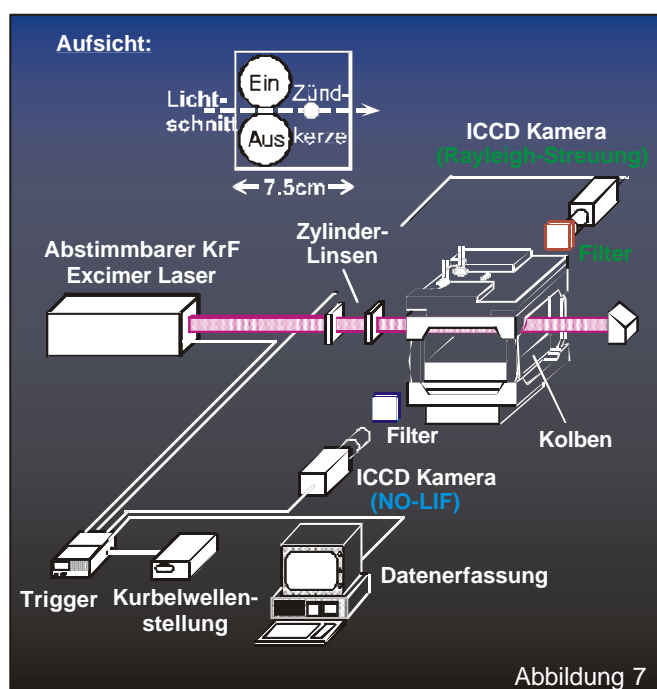
1886 hat Carl Benz in einer kleinen Garage in Ladenburg bei Heidelberg das erste Automobil gebaut. Er wäre sicher überrascht, wenn er sehen würde, wie seine Erfindung inzwischen das Angesicht der Welt verändert hat. Nicht er selbst, sondern seine Frau Berta hat mit ihren beiden Söhnen am 4. August 1888 die erste Automobilreise von Ladenburg nach Pforzheim unternommen. Es gab keine Tankstellen, man musste an Apotheken anhalten, um Benzin zu kaufen, die Verstopfung der Benzinleitung wurde mit Hilfe von Bertas Hutnadel, ein Kurzschluss in der elektrischen Anlage mit Hilfe eines Strumpfbandes beseitigt. Immer noch ist ein Ende des Anstieges der Verkehrsdichte in Deutschland, insbesondere im Hinblick auf Erweiterungen der EG, nicht abzusehen. Aber neben den sichtbaren Veränderungen, sind es insbesondere weniger direkt sichtbare Wirkungen, die bedenklich stimmen. Abbildung 6 zeigt ein solches Beispiel, das ich den Herren Kollegen Fiedler (Karlsruhe) und Voß (Stuttgart)



verdanke. Dargestellt sind lokale Emissionen von Stickoxiden (NO_x) im Norden von Baden-Württemberg.

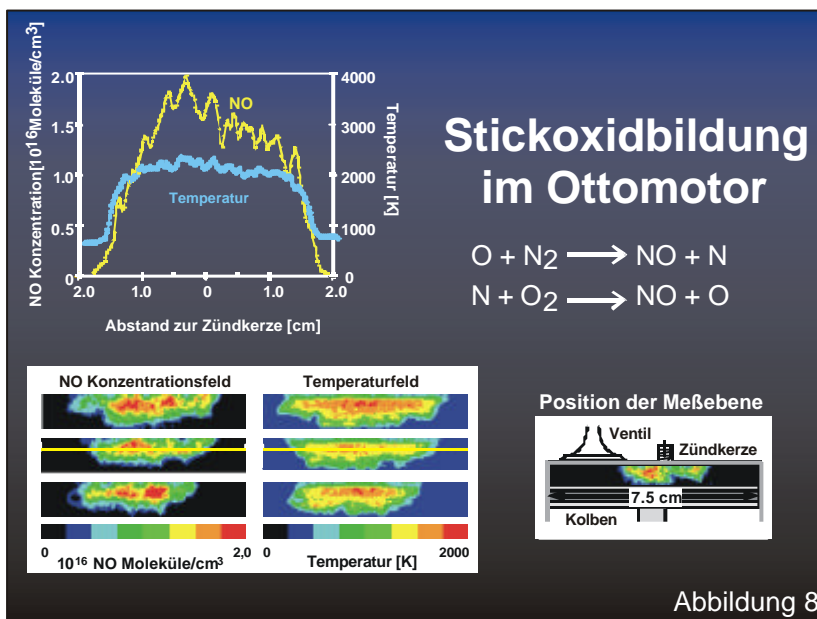
Bisherige Konzepte zur Minderung des Schadstoffausstoßes bei Verbrennungsprozessen beruhen in erster Linie auf dem Einsatz sekundärer Maßnahmen wie Rauchgaswäsche und

Abgaskatalysatoren. Diese sekundären Maßnahmen führen jedoch in vielen Fällen zu einer Senkung des Wirkungsgrades oder bedingen unwirtschaftliche Betriebsbedingungen. Weitaus effektiver sind primäre Maßnahmen, die bereits die Bildung der Schadstoffe im Verbrennungsprozess unterdrücken. Da technische Verbrennungsprozesse meist hochturbulent sind, haben mittlere Konzentrationswerte, wie sie beispielsweise im Abgas gemessen werden können, nur eine beschränkte Aussagekraft. Vielmehr ist es entscheidend, im Prozess selbst Konzentrationen und Temperaturen mit hoher Zeit- und Ortsauflösung zu bestimmen. In den Verbrennungsraum eingebrachte Sonden stören dabei die Strömungs- und Temperaturbedingungen. Zur Messung des unbeeinflussten Verbrennungsprozesses sind daher berührungsfrei arbeitende optische Verfahren wesentlich besser geeignet. Zweidimensionale, momentane Konzentrations- und Temperaturfelder können auf spektroskopischem Weg mit Hilfe der „Laser-Lichtschnitt-Technik“ bestimmt werden. Die Laser-Lichtschnitt-Technik (Abb. 7) hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug in der Motorforschung entwickelt, um zweidimensionale Informationen über die Verteilung von Konzentrationen, Temperaturen sowie Kraftstofftröpfchengrößen und Gasgeschwindigkeiten im Motorbrennraum zu erhalten [2]. Dazu wird ein Laserstrahl mit Hilfe von Zylinderlinsen zu einem Lichtband



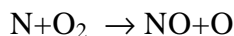
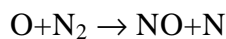
mit einigen Zentimetern Höhe, aber typischerweise nur einem halben Millimeter Dicke geformt. Dieses Lichtband regt die Teilchen entlang des Querschnittes zu Fluoreszenz- und Streuprozessen an. Das dabei emittierte Licht wird durch Filter separiert und mit bildverstärkten Kameras detektiert. Häufig werden dazu Excimer-Gaslaser verwendet, deren gepulster Anregungsstrahl auch das Signallicht nur für kurze Zeit auftreten lässt. Dies ermöglicht die zeitliche Separation des Signals von kontinuierlichen Strahlungsprozessen wie beispielsweise dem Eigenleuchten der Flamme. Die selektive Detektion bestimmter Spezies wird durch Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF) ermöglicht, wenn die Anregungswellenlänge in Resonanz mit einem elektronischen Übergang des gewünschten Moleküls ist. Darüber hinaus muss auch auf der Seite der Signaldetektion mit Hilfe von Filtern ein spektrales Fenster zur Detektion genutzt werden, in dem nur die gewünschte Teilchenart emittiert. Gerade bei Hochdruckanwendungen, wie der motorischen Verbrennung, ist es aufgrund der spektralen Linienverbreiterung unerlässlich, sowohl bei der Anregung, als auch der Detektion, auf maximale Selektivität zu achten. Es gilt, eine geeignete Anregungswellenlänge zu finden, bei der z.B. das Schadstoff-Molekül Stickoxid (NO) auch in Anwesenheit störender Spezies (vor allem Sauerstoff und Kohlenwasserstoffe) unter Hochdruckbedingungen selektiv angeregt werden kann und die von einem Lasersystem in ausreichender Intensität geliefert wird. Darüber hinaus muss ein geeigneter spektraler Bereich zur Detektion gefunden werden, in dem Interferenzen durch andere Moleküle und durch Streuprozesse ausgeschlossen werden. Absorptionsspektren ändern mit dem Druck ihre Form und damit ändert sich auch die spektrale Überlappung von Laserprofil und Absorptionslinie. Für eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten muss dieser Effekt genau bekannt sein, ebenso wie die Grenzen der linearen Signalabhängigkeit von der Anregungsintensität. Diese Daten konnten für den Nachweis von Stickoxid (NO) durch Untersuchungen an einem Hochdruckbrenner (100 bar) gewonnen werden [7]. Dabei zeigte sich, dass die Detektion des zu kürzeren Wellenlängen verschobenen NO-Fluoreszenzlichts ("Anti-Stokes-Detektion") den störungsfreien NO-Nachweis nach Anregung der NO A-X (0,2) Bande im ultravioletten Spektralbereich erlaubt [8]. Hierbei werden OH-Interferenzen vermieden, der Sauerstoff-Einfluss, die Kohlenwasserstoff-Fluoreszenz und die Ramanstreuung in fetten Flammen weitgehend unterdrückt, da bei diesen Prozessen überwiegend zu längeren Wellenlängen verschobenes Streu- und Fluoreszenzlicht auftritt. Die Abschwächung von Anregungs- und Signallicht im Brennraum durch Absorption kann detailliert untersucht und bei der Signalauswertung berücksichtigt werden [9]. Dieses NO-Detektionsschema wurde erstmals an einem optisch zugänglichen Ottomotor eingesetzt und quantitative, zweidimensionale

Stickoxidkonzentrationsfelder gewonnen. Der Forschungsmotor der Firma DaimlerChrysler (Abb. 7) gewährt optischen Zugang zum gesamten Verbrennungsraum. Auf einen Einzylindermotor (Hatz) ist eine Verbrennungskammer mit quadratischem Querschnitt aufgesetzt, deren Wände aus miteinander verklebten, 2 cm starken Quarzplatten bestehen. Der Motor arbeitet nach dem Viertakt-Prinzip mit einem Kompressionsverhältnis von 10:1. Die Anordnung von Ventilen und Zündkerze ist oben in Abb. 7 zu sehen. Der Verbrennungsmotor kann mit gasförmigen und mit flüssigen Brennstoffen betrieben werden und erzeugt unter den hier untersuchten Betriebsbedingungen Spitzendrücke um 20 bar. Abb. 8 zeigt eine Gegenüberstellung der simultan aufgenommenen Einzelpulsmessung von quantitativen NO-Konzentrationsverteilungen und Temperaturfeldern. Bei Aufnahmen (Detektionszeitpunkt



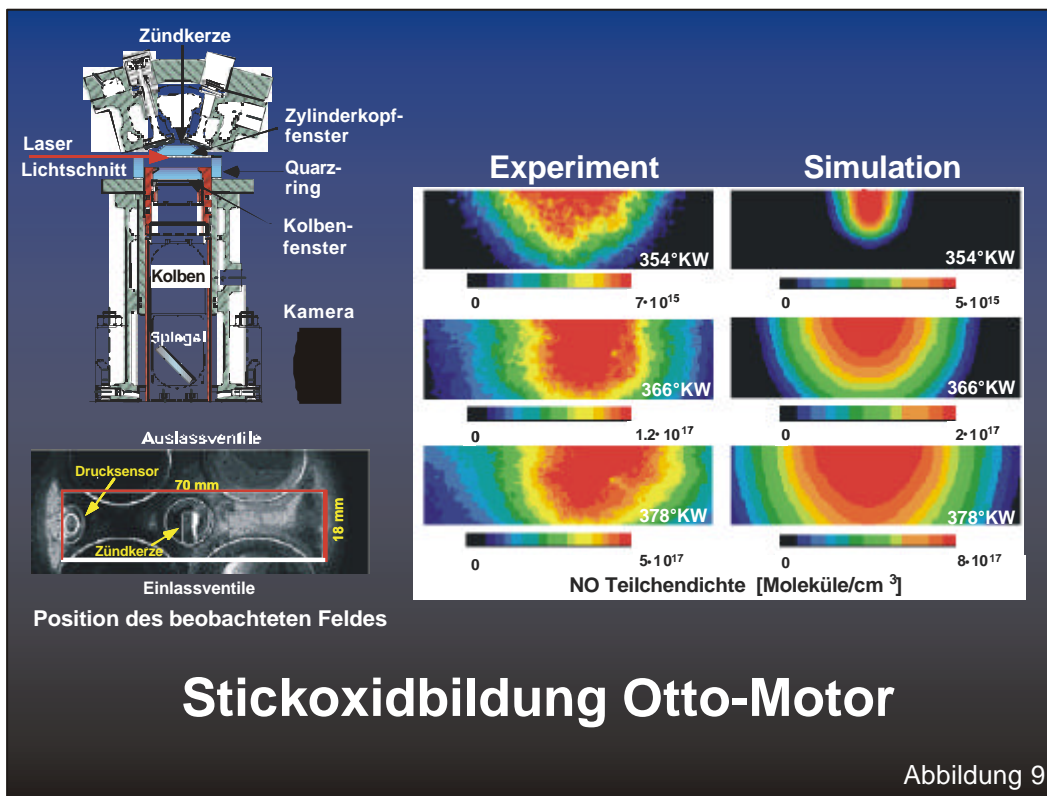
352° Kurbelwinkel (KW), 12° KW nach Zündung) unter den gleichen Betriebsbedingungen nach Zündung einer stöchiometrischen ($\lambda = 1,0$) Propan/Luft-Mischung sind starke Schwankungen sowohl der räumlichen Struktur als auch der Konzentration der NO-Verteilung zu sehen. Dabei

folgt der Bereich, innerhalb dessen NO detektiert werden kann, deutlich der Zone hoher Temperatur, wie aufgrund des NO-Bildungsmechanismus nach Zeldovich [10], der die stark temperaturabhängige Umsetzung des während der Verbrennung gebildeten atomaren Sauerstoffs (O) mit dem Luftstickstoff (N₂)



beschreibt. Die NO-Konzentrationsverteilung zeigt in vielen Fällen innere Strukturen und Inhomogenitäten, denen Analoga in der Temperaturverteilung fehlen. Das Stickoxid-Konzentrationsfeld dokumentiert aufgrund seiner geringen Bildungsgeschwindigkeit die Temperaturgeschichte der Flammenentwicklung. Zonen, die im Verlauf der Flammenausbreitung kurzzeitig überdurchschnittlich heiß waren, sind auch nach Ausgleich der Temperaturinhomogenität an einer erhöhten NO-Konzentration zu erkennen. Dies wird

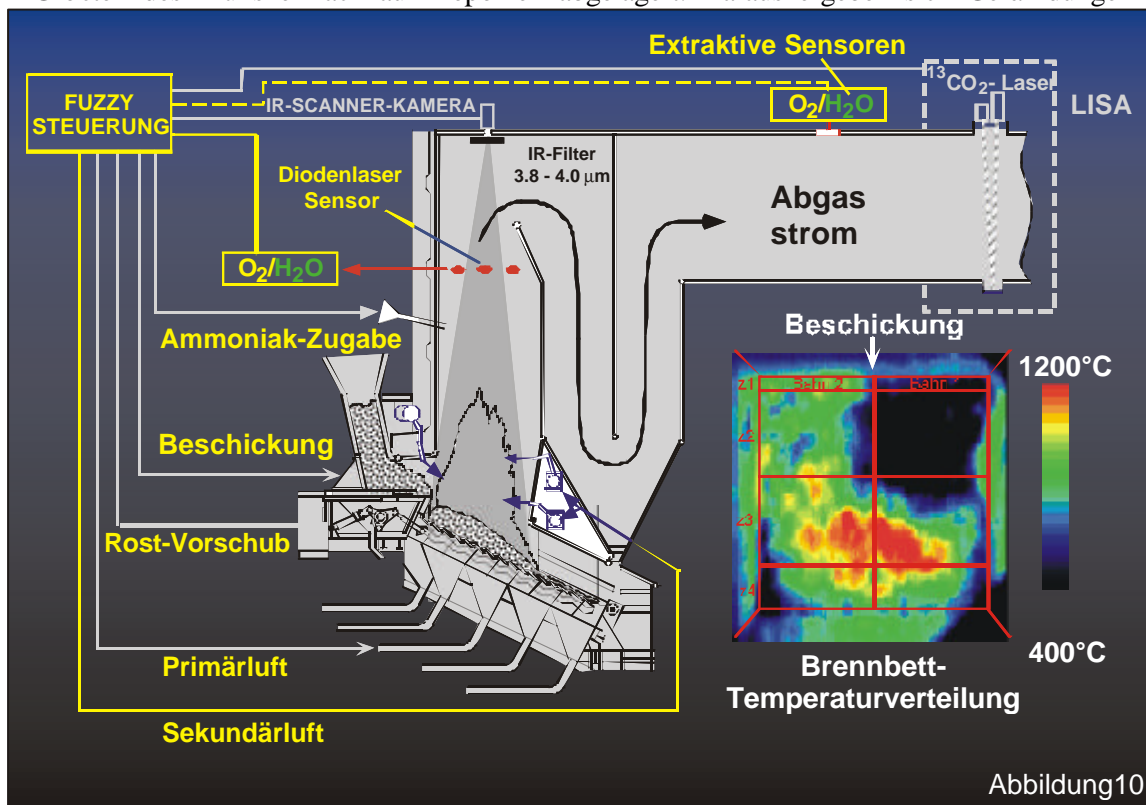
besonders deutlich, wenn Profile der simultan ermittelten NO-Konzentrations- und Temperaturfelder verglichen werden (Abb. 8). Es ist zu erkennen, dass die Temperatur hinter der Flammenfront (innerhalb von weniger als 5 mm) einen nahezu homogenen Wert um 2000 K bei Schwankungen um 100 K erreicht. Gleichzeitig durchläuft die NO-Konzentration ein ausgeprägtes Maximum in der Mitte des Brennraumes. Hier begann die Flamme ihre Entwicklung, es stand also für die längste Zeit die für die NO-Bildung notwendige hohe Temperatur zur Verfügung. Die gleichzeitig auftretenden starken Schwankungen der NO-Konzentrationsverteilung und die NO-Konzentrationspitzen lassen sich zum überwiegenden Anteil nicht mit momentanen Temperaturmaxima korrelieren. Sie sind eine Folge von Temperatur- und Strömungsinhomogenitäten während der Ausbreitung der Flamme. Durch detaillierte Modellierung und sorgfältige Kontrolle der Strömungs- und Verbrennungsbedingungen im Motor (z.B. Abgasrückführung) sollte sich daher eine bessere Homogenisierung und Absenkung der Temperaturverteilung und damit eine wesentliche Reduktion der primären NO-Bildung erreichen lassen. Abb. 9 zeigt, dass inzwischen experimentelle Ergebnisse und Modellrechnungen, die im Rahmen einer europäischen Zusammenarbeit mit der Firma Volvo (Schweden) an einem realistischen Otto-Motor erhalten wurden, gut übereinstimmen. Kürzlich gelang auch erstmals die quantitative Bestimmung von Stickoxidkonzentrationen in einem seriennahen Dieselmotor (DaimlerChrysler [9]). Insgesamt ist der Beitrag moderner Laserdiagnostik zur Beobachtung der Gemischerzeugung, Zündung, Verbrennung und Schadstoffbildung insbesondere bei der Entwicklung moderner



direkt einspritzender Otto- und Dieselmotoren mit geringem Kraftstoffverbrauch und niedrigen Emissionswerten, nicht mehr wegzudenken.

Müllverbrennung unter optischer Kontrolle

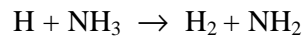
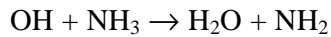
Ein weiteres wichtiges Ziel moderner Verbrennungsforschung ist die Erarbeitung von Strategien zur nachhaltigen Ressourcenschonung und Minderung der CO₂-Emissionen. Einen wichtigen Beitrag kann hier die Entwicklung neuer Kraftwerkstechnologien mit hohem Wirkungsgrad in Form der kombinierten Gas- und Dampfturbinensysteme (GUD) und der Aufbau von Anlagen mit Kraft-Wärme-Kopplung leisten. Auf diesem Wege kann auch der regenerative Energieträger Abfall optimal in die Energieversorgung eingebunden werden. Immer noch wird in Deutschland ein Großteil des Mülls einfach auf Deponien abgelagert. Daraus ergeben sich Gefährdungen des



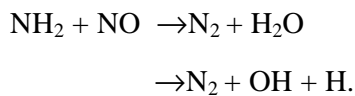
Grundwassers, aber daneben auch noch ein weiterer negativer Umwelteffekt: Die organischen Bestandteile des Abfalls wandeln sich nur teilweise in Kohlendioxid (CO₂), zu einem großen Teil in Methan (CH₄) oder andere Kohlenwasserstoffe um. CH₄ hat gegenüber CO₂ ein um einen Faktor 28 höheres Treibhauspotential. Es ist also sinnvoller, diese organischen Bestandteile zu verbrennen. In dem gegenwärtig gültigen Kreislauf- Wirtschaftsgesetz wird die thermische Entsorgung von Abfall unter Ausnutzung des Energieinhaltes auf die gleiche Stufe gestellt wie die Wiederverwendung, so dass in Zukunft über 30 Millionen Tonnen Müll thermisch entsorgt, d.h.

verbrannt werden müssen. Um eine Reduzierung des Abfallvolumens um bis zu 90 % und eine wirksame Zersetzung organischer Komponenten zu erreichen, muss die Verbrennung vollständig sein. Ein besonderes Problem ist dabei die starke Inhomogenität der Brennstoffe Müll, Klärschlamm und Biomasse. Für ein Minimum an Schadstofffreisetzung und eine Nutzung der entstehenden Reststoffe, z.B. der Schlacke im Straßenbau, muss der gesamte Verbrennungsprozess ständig in einem optimierten Zustand betrieben werden. In Zusammenarbeit mit der Firma Martin in München wurde vom Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg im Rahmen eines Projektes der Heidelberger Akademie der Wissenschaften ein neues Konzept zur Feuerungsregelung von Müllverbrennungsanlagen entwickelt (Abb. 10). Hierzu wurde zunächst eine Infrarot-Kamera an der Decke des Feuerraumes der Müllverbrennungsanlage installiert. Mit Hilfe eines schmalbandigen optischen Filters kann die Kamera durch die Flammen hindurch die Wärmestrahlung des brennenden Mülls ungestört von der Strahlung heißer Verbrennungsabgase oder der Emission von Ruß erfassen [11]. Ein Bildverarbeitungsprogramm bestimmt aus den Infrarotaufnahmen momentane Temperaturverteilungen auf dem Brennbett. Die schnelle Ansprechzeit des Kamerasystems erlaubt die Auflösung von Temperaturschwankungen, die mit konventionellen Thermoelementen im Feuerraum nicht nachvollzogen werden können. Die bildgebenden Eigenschaften der Infrarotkamera werden nun benutzt, um entsprechend den jeweiligen Temperaturwerten die Verbrennungsluft zwischen den einzelnen Rostbereichen so umzuverteilen, dass eine Vergleichmäßigung des Verbrennungsablaufs eintritt. Als Steuerung wird dabei eine "fuzzy" Regelung eingesetzt. Hiermit können nicht nur zwei oder drei sondern Hunderte von Parametern gleichzeitig erfasst werden. Dabei ist es nicht notwendig, die mathematisch-physikalischen Zusammenhänge im Detail zu kennen, sondern es wird eine der menschlichen Sprache und Denkweise nahekommende "unscharfe" Beurteilung {wie. z.B. wenig/normal/viel) benutzt. Anschaulich lässt sich das Vorgehen am Beispiel des Verhaltens eines Autofahrers in der Kurve erläutern. Dieser handelt nicht nach dem Motto: drehe das Lenkrad bei einem Kurvenradius von 187 m und einer Geschwindigkeit von 83 km/Std. auf den Winkel 16 Grad 23 Min. Er kennt auch nicht die mathematisch formelmäßige Darstellung der momentanen Bewegung seines Automobils. Er handelt vielmehr "fuzzy" nach dem Konzept: kommt der Straßenrad zu nahe, dann schlage ich das Lenkrad noch ein Stück weiter ein. Insgesamt erhält man durch Einsatz der Kamera verglichen mit konventioneller Anlagenfahrweise verminderte Emissionen und eine Verbesserung der Schlackequalität, so dass diese ohne aufwendige Nachbehandlungsverfahren {wie z.B. energieaufwendige Einschmelzung) für den Einsatz im Straßenbau geeignet ist. Der stabile und gleichmäßige Verbrennungsprozess minimiert die Schadstoffe im Abgas und vermindert auch deren Konzentrationsschwankungen, so dass die nachgeschalteten Reinigungsanlagen optimal arbeiten können. Für die während der Müllverbrennung gebildeten Stickoxide können katalytische Verfahren eingesetzt werden, die

jedoch einen hohen Investitionsaufwand erfordern (20 – 30 Millionen DM in einem Großkraftwerk für die Installation des Katalysators, der zudem nur eine begrenzte Lebensdauer hat). Durch Einsatz von mathematischer Modellierung und Lasermesstechnik lassen sich kostengünstigere nichtkatalytische Verfahren entwickeln. Ein einfach zu handhabendes Reduktionsmittel ist Harnstoff ((NH₂)₂CO)), der durch Hydrolyse in NH₃ und CO₂ umgewandelt werden kann. NH₃ liefert über die Elementarreaktionen



NH₂-Radikale, die in nur wenigen gaskinetischen Stößen NO zu molekularem Stickstoff reduzieren.



Dabei entstehen freie H und OH-Radikale, so dass sich in einer Kettenreaktion aus NH₃ wieder NH₂-Radikale nachbilden können. Abb. 11 zeigt das Ergebnis einer numerischen Lösung des Systems der gewöhnlichen Differentialgleichungen für die chemischen Elementarschritte bei der Reduktion von NO durch Zugabe von Harnstoff zusammen mit der algebraischen idealen

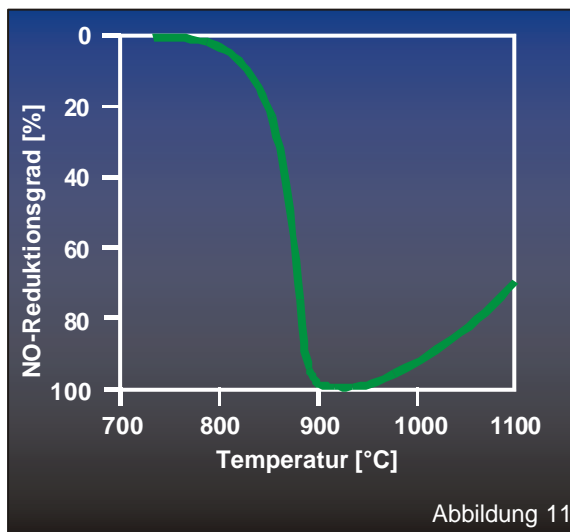


Abbildung 11

Gasgleichung für die im Rauchgas nach der Verbrennung vorhandenen Randbedingungen (konstante Temperatur und Druck). Unter diesen Bedingungen entfällt die Lösung der Impuls- und Energieerhaltungsgleichungen. Man erkennt die Ausbildung eines charakteristischen „Temperaturfensters“ für die nichtkatalytische selektive Reduktion von NO. Bei tiefen Temperaturen (unterhalb 750 °C) ist die Radikalkonzentration im Rauchgas zu klein,

so dass keine NH₂-Radikale zur Reduktion von NO gebildet werden können. Auf der Hochtemperaturseite (ab ca. 950 °C) setzen die Oxidationsreaktionen des NH₃ ein, die bei weiterer Temperaturerhöhung zur zusätzlichen Bildung von NO aus NH₃ führen. Beim Einsatz des nichtkatalytischen Verfahrens muss jedoch gewährleistet sein, dass im Rauchgas kein NH₃ verbleibt. NH₃ kann mit SO₃, das ebenfalls oft im Rauchgas vorhanden ist, zu Ammoniumhydrogensulfat reagieren und als korrosiver Feststoff ausfallen und die Anlagen schädigen. Benutzt man zum NH₃-Nachweis eine chemische Analyse mit Absaugvorrichtung, so erhält man lange Messzeiten (> 60 min), und es besteht die Gefahr von Fehlmessungen aufgrund der langsamen Einstellung der Gas-Oberflächen-Gleichgewichte für NH₃ und

möglicher heterogener Reaktionen. Für eine in-situ-NH₃-Konzentrationsmessung im Rauchgaskanal wurde daher auf der Basis eines ¹³C₂O₂-Wellenleiterlasers ein Laser-Meßsystem entwickelt [12]. Durch Auswahl eines spektralen Fensters (geringe Absorption von H₂O und ¹²C₂O₂ im Rauchgas), Ausnutzung der Koinzidenz zwischen der ¹³C₂O₂-Laserlinie und der NH₃-Absorptionslinie sowie Einsatz der differentiellen Absorption können NH₃-Konzentrationen von 1 ppm (10⁻⁶) berührungsfrei kontinuierlich nachgewiesen werden. Die gegenüber einer chemischen Analyse wesentlich verkürzte Messzeit ermöglicht den Einsatz des Gerätes zur Regelung der Reduktionsmittelzugabe bei den stark schwankenden Verbrennungsbedingungen, wie sie in Müllheizkraftwerken vorkommen. Durch Überlagerung der Strahlung zweier Halbleiterlaser bei 760 bzw. 812 nm ist in ähnlicher Weise auch ein simultaner in-situ-Nachweis für Sauerstoff und Wasser mit großer Genauigkeit und guter Zeitauflösung (1 Sekunde verglichen mit einer Verzögerungszeit von ca. 100 Sekunden bei extraktiven Standardsensoren, s. Abb. 10) möglich. Mit den in Abb. 10 dargestellten optischen Regelsystemen [13] lassen sich die Emissionen von Dioxinen und Furanen bei der Müllverbrennung auf unter 10 Pico(10⁻¹²)-Gramm pro Kubikmeter Rauchgas reduzieren. Dieser Wert liegt um einen Faktor 10 unter der Menge, die aus einer einzigen Zigarette kommt! Aber dieses Argument allein kann die emotionalen oder ideologischen Bedenken in der Öffentlichkeit meist nicht zerstreuen. Es müssen andere Ebenen angesprochen werden. Als Mitglied einer Beratergruppe der Stadt Wien, in der nach einem Brand (an der falschen Stelle!) in der Müllverbrennungsanlage die Gefahr bestand, dass man die Anlage ganz schließt, konnte ich miterleben, dass der eigentliche Durchbruch in der öffentlichen Akzeptanz nicht durch die technische Optimierung der Anlage, sondern durch die Umsetzung der bei einem Besuch in Japan beobachteten Konzepte erfolgte. In Japan nutzt man die Abwärme der Müllverbrennung zum Betrieb verschiedener Einrichtungen der kommunalen Infrastruktur wie etwa Schwimmbäder, Kindergärten, Seniorenwohnanlagen u.a. Dadurch besteht in der Öffentlichkeit eine deutlich positivere Haltung gegenüber Müllverbrennungsanlagen und jeder Stadtbereich bemüht sich um eine solche Einrichtung. Die entsprechende Lösung der Stadt Wien zeigt Abbildung 12. Nach der äußerlichen Gestaltung der Anlage durch den Künstler Friedensreich Hundertwasser ist diese Verbrennungsanlage nun ein Teil der touristischen Attraktionen der Stadt Wien.

Das einzelne Molekül im Laserfokus

Verglichen mit den Leistungen mechanischer und elektrischer Maschinen der heutigen Technik zeigt die Natur in Form der während der Evolution entwickelten „molekularen Maschinen“ wie man mit einem um Größenordnungen reduzierten spezifischen Material- und Energieaufwand bei gleichzeitig geringem Platzbedarf überlegene Lösungen realisieren kann. Da die optische Auflösungsgrenze eines guten Mikroskops bei ca. 500 Nanometern (500 Millionstel Millimeter) liegt, stellt sich zunächst die Frage, wie man molekulare Maschinen und einzelne Moleküle mit einer Größe von wenigen Nanometern in Lösung sichtbar machen kann? Elektronen- oder Kraftfeld- Mikroskopieverfahren sind nur bei ruhenden Proben einsetzbar. Eine elegante Lösung ist, ein zusätzliches „leuchtendes“ Molekül zu benutzen, dessen Licht durch einen Detektor wahrgenommen werden kann. Als leuchtende Moleküle dienen Farbstoffe, die als Fluoreszenzmarker chemisch an das interessierende Biomolekül gekoppelt werden. Gute Fluoreszenzfarbstoffe geben ihre Energie nahezu vollständig in Form von Licht innerhalb weniger Nanosekunden (10^{-9} Sekunden) an die Umgebung ab. Dabei ist das vom Farbstoff abgegebene Fluoreszenzlicht leicht rotverschoben, d. h. es besitzt eine geringere Energie und kann somit spektral vom energiereicheren, kurzwelligeren Anregungslicht diskriminiert werden. Wird zur effizienten Fluoreszenzanregung von Farbstoffen ein Laser verwendet, so kann man die schon in der Verbrennungsdiagnostik bewährte Laser-Induzierter-Fluoreszenz (LIF)-Spektroskopie einsetzen. Die erste erfolgreiche Fluoreszenzdetektion eines einzelnen Moleküls in Lösung gelang T. Hirschfeld im Jahre 1976 [14]. Er fokussierte einen Laserstrahl in eine Lösung, die in einer sehr geringen Konzentration hochmarkierte Proteine (jedes Proteinmolekül war mit 80-100 Fluoreszenzfarbstoffen markiert) enthielt. Wenn einzelne Proteine zufällig den Laserfokus aufgrund ihrer „Brownschen Molekularbewegung“ (freie Diffusion) durchwanderten, konnte Fluoreszenzlicht der Farbstoffe mit einem empfindlichen Detektor registriert werden. Man kann sich jedoch leicht vorstellen, dass ein derartig mehrfach markiertes Protein in seiner biologischen Aktivität stark durch die Farbstoffmoleküle beeinträchtigt wird. In den folgenden Jahren wurden daher neue Verfahren zur Fluoreszenzdetektion einzelner Farbstoffmoleküle in Lösung entwickelt und optimiert. Es zeigte sich schnell, dass die Möglichkeit, ein einzelnes Farbstoffmolekül in Lösung zu detektieren, nicht so sehr eine Frage der empfindlichen Detektion der Fluoreszenzphotonen, sondern vielmehr eine Frage der effizienten Unterdrückung des Hintergrundsignals ist. Es gibt im wesentlichen drei verschiedene Hintergrundsignalquellen: (a) elastisch gestreutes Laserlicht (Rayleigh-Streuung) bei der Laserwellenlänge, das sehr gut durch entsprechende Filter abgetrennt

werden kann, (b) unelastisch gestreutes Laserlicht (Raman-Streuung), das proportional zur Anzahl der bestrahlten Lösungsmittelmoleküle ist und nicht vollständig spektral abgetrennt werden kann, und (c) die Hintergrundfluoreszenz der Probe, die durch fluoreszierende Verunreinigungen oder Autofluoreszenz (Moleküle, die ohne Fluoreszenzmarker fluoreszieren) verursacht wird. Es dauerte daher bis ca. 1990, als es der Gruppe um R. A. Keller [15] in Los Alamos gelang, die Fluoreszenz einzelner Farbstoffmoleküle beim Durchtritt durch den Laserfokus zu detektieren. Zur Steigerung des Signal-zu-Hintergrund Verhältnisses bei Einzelmolekülmessungen in Lösung hat sich in den letzten Jahren die „konfokale Fluoreszenzmikroskopie“ als erfolgreiche Technik etabliert. Hierbei wird der Laserstrahl beugungsbegrenzt über ein Mikroskopobjektiv in die Probe fokussiert, das resultierende Fluoreszenzlicht wird mit dem gleichen Objektiv gesammelt, räumlich mit Hilfe einer Lochblende gefiltert und auf einen hochempfindlichen Halbleiterdetektor abgebildet. Das resultierende Beobachtungsvolumen liegt hierbei im Bereich von einem Femtoliter (10^{-15} Liter, dies entspricht einem Würfel mit der Kantenlänge von einem Tausendstel Millimeter). In einem Femtoliter befinden sich nur noch ca. 10^{10} Lösungsmittelmoleküle, so dass der Beitrag der Raman-Streuung gering gehalten wird. Dieses geringe Beobachtungsvolumen erlaubt die Detektion individueller Farbstoffmoleküle beim Arbeiten mit 10^{-9} bis 10^{-11} molaren Lösungen [16]. Wenn ein fluoreszierendes Molekül nun den fokussierten Laserstrahl aufgrund der Brownschen Molekularbewegung durchwandert, durchläuft es in Abhängigkeit von der eingestrahlteten Laserintensität eine bestimmte Anzahl von Anregungs- und Emissionszyklen zwischen dem elektronischen Grundzustand und dem ersten elektronisch angeregten Zustand. Die maximale Anzahl

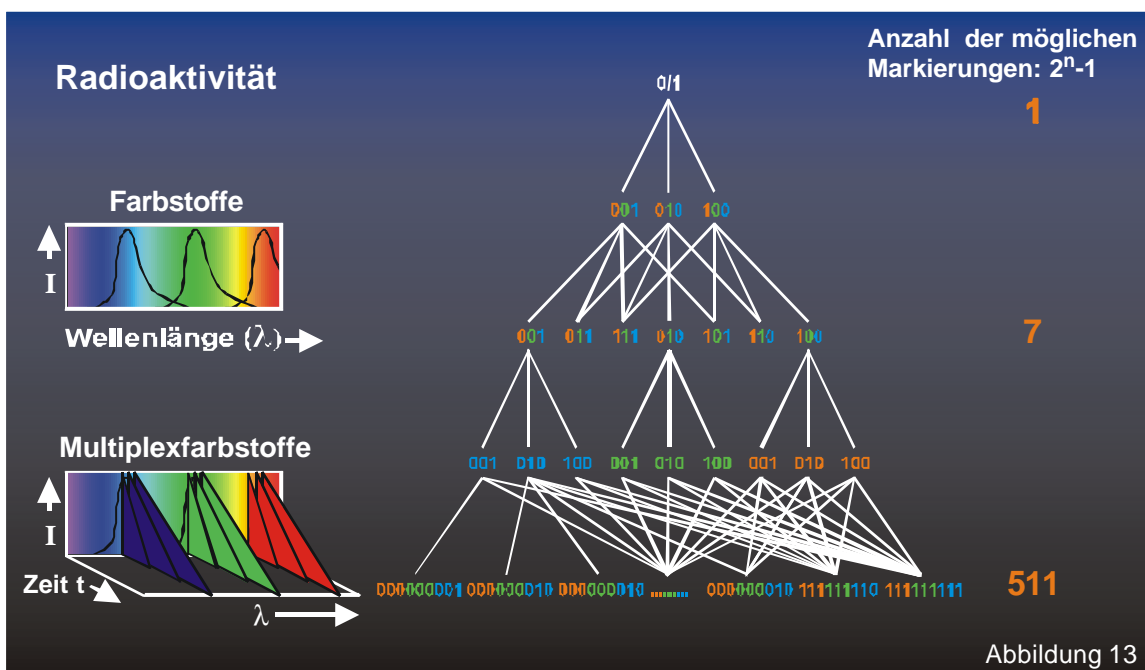


Abbildung 13

emittierter Photonen wird hierbei durch die Durchtrittszeit durch das Beobachtungsvolumen, die Fluoreszenzabklingdauer und die Fluoreszenzquantenausbeute (Anzahl emittierter Photonen/Anzahl absorbierter Photonen) des Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt. Mit einer Verweildauer im Beobachtungsvolumen von etwa 1 Millisekunde können von einem Farbstoffmolekül bei einer typischen optischen Detektionseffizienz von ca. 1-2% wenige hundert Fluoreszenzphotonen als sogenannter „Photonenschauer“ („Burst“) detektiert werden. Die Identifizierung der Farbstoffe kann entweder aufgrund ihrer unterschiedlichen Farbe (spektral) oder aufgrund ihrer charakteristischen Fluoreszenzabklingdauer in Kombination mit der Technik des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (TCSPC, time-correlated single-photon counting) erfolgen. Hierbei wird ein hochrepetierender, gepulster Laser als Anregungsquelle verwendet, dessen kurze Lichtpulse im Pikosekundenbereich (10^{-12} Sekunden) die Fluoreszenzfarbstoffe mehrere tausend mal pro Millisekunde anregen. Im Experiment werden die zeitlichen Abstände zwischen Laserpuls und Detektion des emittierten Fluoreszenzphotons statistisch erfasst. Es resultiert eine Fluoreszenzabklingkurve im Nanosekundenbereich, die für jeden Farbstoff eine andere Form oder Steilheit besitzt. Mit Hilfe eines „Multiplexprinzips“, d. h. einer Kombination aus spektraler und zeitaufgelöster Information, kann die mit der klassischen radioaktiven Markierung nur mögliche ja/nein Identifizierung bei Einsatz eines binären Codes auf wesentlich mehr Markierungsmöglichkeiten erweitert werden [Abb. 13]. Benutzt man zur Unterscheidung einzelner Farbstoffmoleküle ein Mustererkennungsverfahren [17] für die experimentell

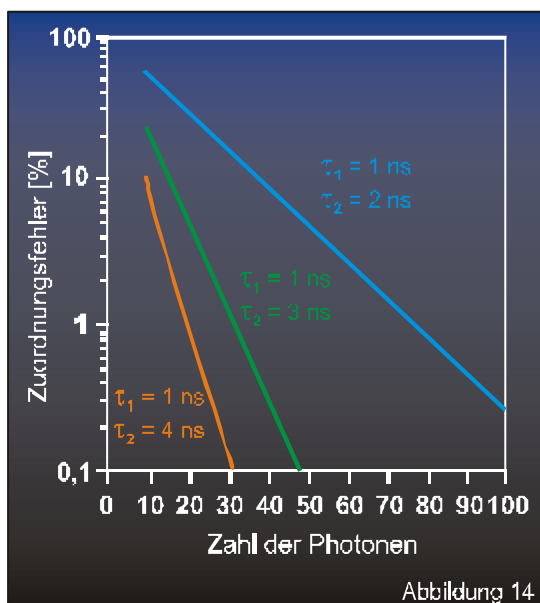


Abbildung 14

beobachteten Fluoreszenzabklingkurven, so lässt sich z.B. für die beiden Farbstoffmoleküle bei Fluoreszenzlebensdauern von einer und vier Nanosekunden (10^{-9} Sekunden) bereits bei 30 detektierten Fluoreszenzphotonen ein Zuordnungsfehler unter 10^{-3} (1‰) erreichen [Abb. 14]. Damit kann man über die optische Einzelmoleküldetektion mit Hilfe einer Fluoreszenzmarkierung nun einzelnen molekularen Maschinen bei der Arbeit zusehen. So können bei Enzymen beispielsweise bestimmte Subpopulationen mit leicht veränderten Eigenschaften einen entscheidenden Reaktionsweg katalysieren oder verhindern. Ebenso ist die Überprüfung der Homogenität bzw. Heterogenität einer Probe oder die Identifizierung von reaktionsentscheidenden

Konformationen, die in Ensemblemessungen „verwaschen“ werden, durch das Studium einzelner Moleküle zugänglich. Auch in der „molekularen Fabrik“ der lebenden Zelle laufen die Reaktionen auf Einzelmolekülebene ab. Welchen Abstand haben z. B. Substrat und Enzym oder zwei Enzyme bei einem kooperativen Reaktionsmechanismus? Arbeiten Enzyme prozessiv? Hier werden fluoreszenzbasierende Einzelmolekülstudien im Laufe der nächsten Jahre entscheidende Einblicke geben [18].

Unabhängig von der jeweiligen Problemstellung verhindert die störende Autofluoreszenz in biologisch relevanten Proben (wie beispielsweise Blutseren) oft eine sichere Einzelmoleküldetektion. Zusätzlich erschweren große und kostenaufwendige Laserapparaturen, wie sie in der Verbrennungsdiagnostik benutzt werden, die Akzeptanz derartiger neuer Spektroskopietechniken und Analyseverfahren für biologische Fragestellungen. Deshalb wurden von uns erstmals kleine gepulste Diodenlaser, die im roten Spektralbereich emittieren, für Einzelmolekülexperimente eingesetzt [19]. Sehr gut eignen sich hierfür die als Pointer verwendeten Diodenlaser, die neben ihrer Robustheit und ihrem geringen Kostenaufwand erhebliche Vorteile bei der Detektion in biologischen Medien aufweisen: Einerseits nimmt die Hintergrundfluoreszenz im roten Spektralbereich (> 600 nm) stark ab, da dort nur noch wenige biologisch aktive Moleküle Licht absorbieren, andererseits wirkt sich die Abnahme der Rayleigh-Streuung, die proportional zur vierten Potenz der eingestrahnten Frequenz ist, positiv auf die Nachweisempfindlichkeit aus. Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Abklingdauern, die sich im roten Spektralbereich mit einem Diodenlaser bei 630-650 nm effizient anregen lassen und auf dem Markt kaum erhältlich sind, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. K.H. Drexhage (Universität Siegen) entwickelt [20].

Eine sehr reizvolle Anwendung des Einzelmolekülnachweises in Lösung ist die Sequenzierung eines einzelnen DNS-Stranges. Bereits 1989 wurde von R.A. Keller ein solcher Vorschlag zur Sequenzierung von bis zu 100 000 DNS-Bausteinen (100 kB) gemacht. Auch nach den jüngsten spektakulären Erfolgen bei der Sequenzierung des menschlichen Genoms sind auf diesem Gebiet noch über Jahre erhebliche Forschungsanstrengungen notwendig. Bisher benutzt man zur Sequenzierung vorwiegend die Methode nach Sanger, die eine Amplifizierung des genetischen Materials voraussetzt und auf der gelelektrophoretischen Auftrennung verschieden langer enzymatisch erzeugter DNS-Fragmente beruht. Zur Realisierung der Einzelmolekülsequenzierung müssen nun mehrere Hürden genommen werden:

- (a) von der zu sequenzierenden DNS muss mit Hilfe von farbstoffmarkierten DNS-Bausteinen und einer Polymerase ein farbstoffmarkierter komplementärer

Tochterstrang synthetisiert werden, dabei muss jeder der 4 unterschiedlichen DNS-Bausteine mit einem anderen Farbstoff für eine eindeutige Zuordnung markiert sein..

- (b) ein einzelner farbstoffmarkierter DNS-Strang muss selektiert und zur Detektionsapparatur überführt werden.
- (c) durch die Zugabe einer Exonuklease muss der DNS-Strang von einem Ende her abgebaut werden.
- (d) die abgebauten farbstoffmarkierten DNS-Bausteine müssen unter Wahrung der Reihenfolge zum Detektionsvolumen transportiert und über das Farbstoffsignals identifiziert werden.

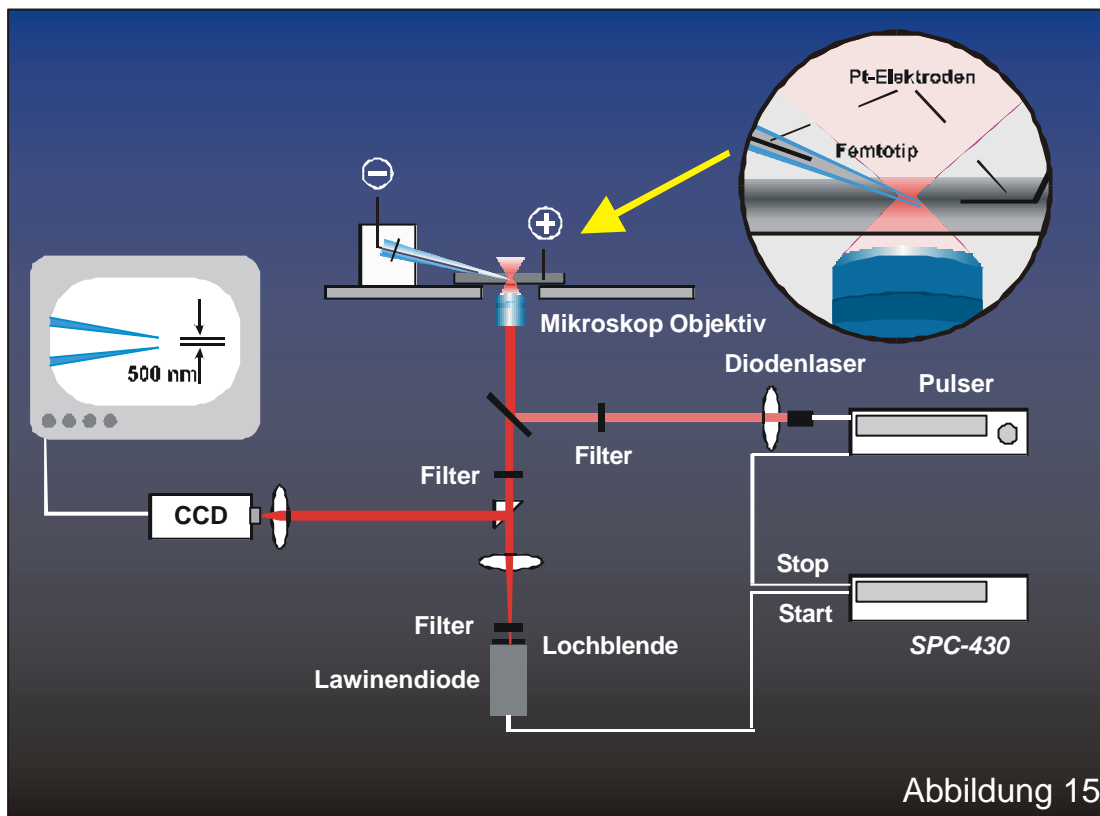


Abbildung 15

Abb. 15 zeigt einen experimentellen Aufbau zur Sequenzierung eines einzelnen DNS-Moleküls in einer Submikrometerkapillare (Femtotip) mit Hilfe von gepulsten Halbleiterlasern. Das an Biotin gefundene DNS-Molekül wird mit einer am Ende mit Streptavidin beschichteten optischen Faser selektiert und immobilisiert. Nach Zugabe des Schneideenzym (Exonuklease) in die Mikrokapillare werden die einzelnen abgespaltenen DNS-Bausteine aufgrund ihrer negativen Ladung und eines angelegten elektrischen Feldes aus der Kapillare heraus zur Anode gezogen, im Beobachtungsvolumen detektiert und aufgrund der charakteristischen Fluoreszenzabklingdauer der angebrachten Farbstoffe identifiziert. Abb. 16 zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes, das im Rahmen eines von R. Rigler (Stockholm) koordinierten Verbundprojektes ausgeführt wurde [21]. Da der Laser auf das dünne Ende der Kapillare (Innenmesser ist hier 500 nm, das entspricht der

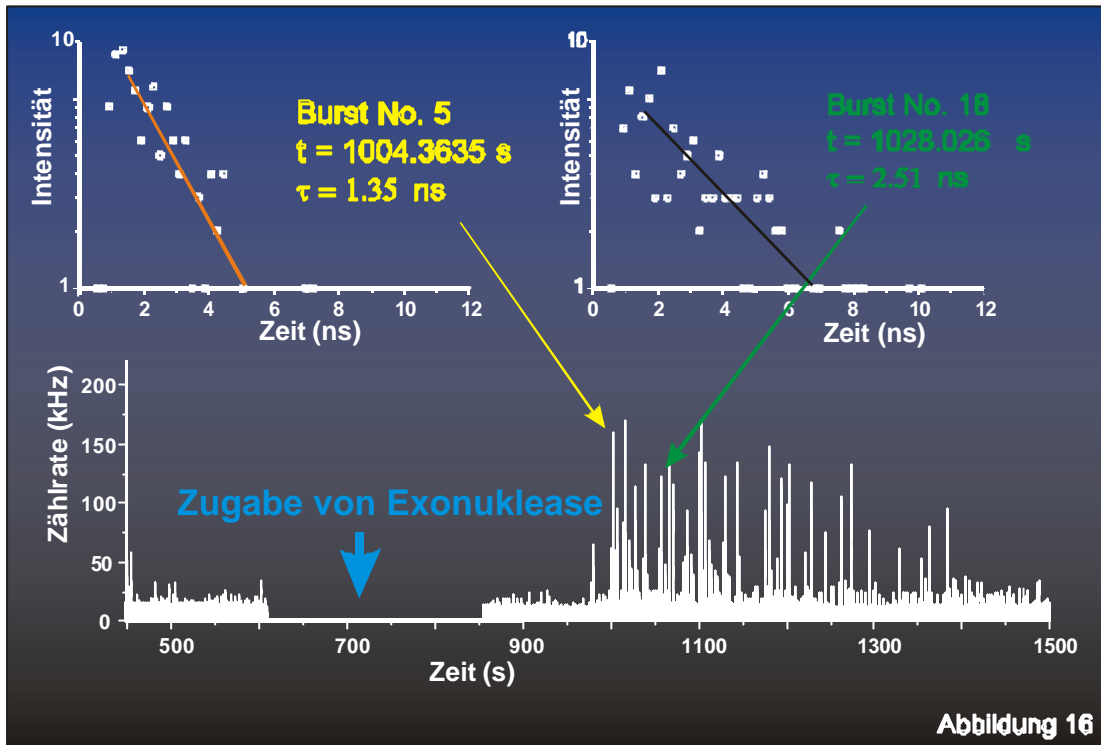


Abbildung 16

Hälfte des Detektions-querschnitts des konfokalen Mikroskops) fokussiert wird, muss jedes vorbei-schwimmende Molekül detektiert werden. Neben der Bestimmung der Schneideraten verschiedener Exonukleasen zeigen diese Experimente, dass die bisher verwendeten Schneideenzyme an farbstoffmarkierter DNS nicht prozessiv arbeiten, das Enzym macht mehrere, verschieden lange Pausen. Obwohl der enzymatische Aufbau einer vollständig markierten DNS mit Hilfe einer Polymerase mit Problemen behaftet ist, erscheint eine teilweise Markierung mit Farbstoffen (z. B. der Ersatz von 2 nativen durch 2 fluoreszenzmarkierte DNS-Bausteine) möglich. Die vollständige Abfolge der DNS-Bausteine

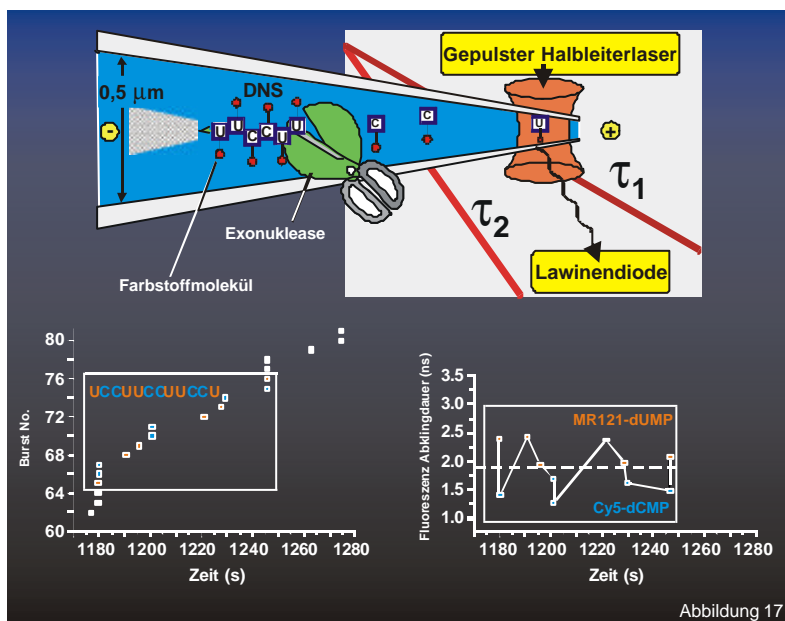
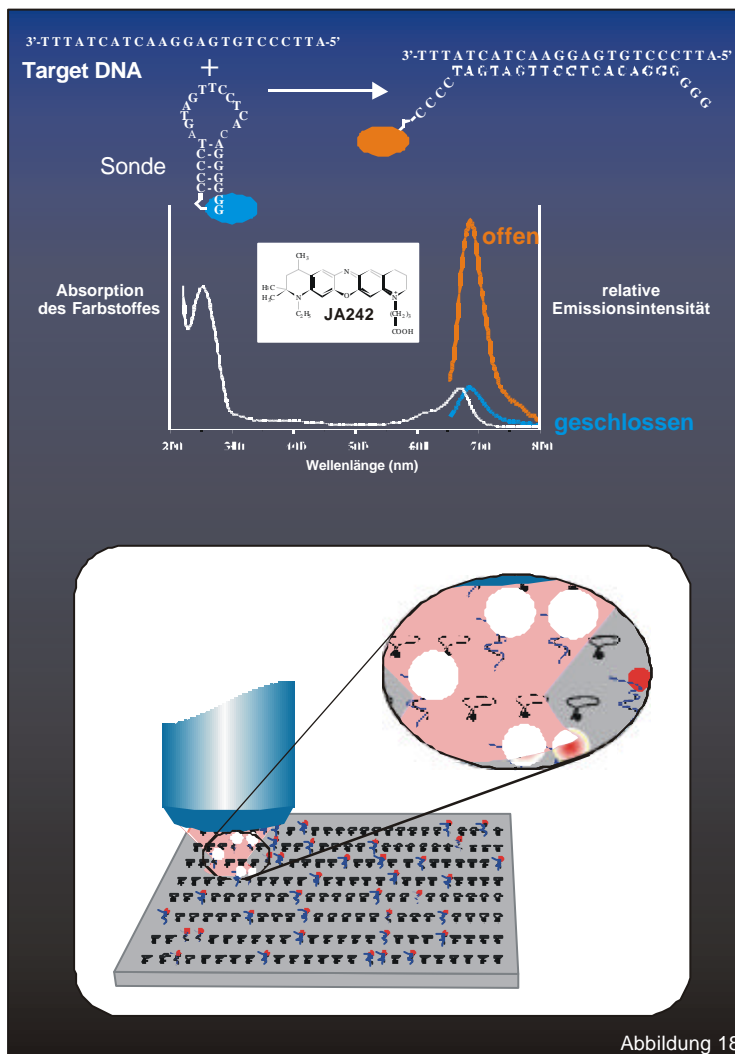


Abbildung 17

kann dann durch mehrmaliges sequenzieren der gleichen DNS mit unterschiedlichen Kombinationen von fluoreszenzmarkierten DNS-Bausteinen erhalten werden.

Die bisher beschriebenen Grundlagenuntersuchungen zur ultraempfindlichen Analytik von Biomolekülen in Lösung führen zu zahlreichen interessanten Anwendungen,

von denen zwei hier noch vorgestellt werden sollen. Die beste Methode zur hochempfindlichen Detektion eines Zielmoleküls (Nukleinsäure oder Protein) wäre sicherlich, wenn man eine farbstoffmarkierte Sonde entwickeln könnte, die nur bei Gegenwart des Zielmoleküls fluoresziert. Man könnte hohe Konzentrationen der Sonde verwenden und damit die Wahrscheinlichkeit der Auffindung des Zielmoleküls gerade bei sehr niedrigen Konzentrationen drastisch steigern. Zudem tragen alle freien Sonden nicht zum gemessenen Signal bei. Bei der Suche nach einem geeigneten Verfahren zur Konstruktion einer „intelligenten“ Sonde, die nur dann leuchtet, wenn sie spezifisch an ihr Zielmolekül gebunden hat, zeigte sich, dass Fluoreszenzfarbstoffe selektiv durch den DNS-Baustein Guanin in ihrer Fluoreszenz gelöscht werden können. Unter Ausnutzung dieser Fluoreszenzlöschung können nun farbstoffmarkierte Oligonukleotide mit einer Schleife-Stamm- oder „Haarnadel“-Struktur synthetisiert werden, die an einem Ende mehrere Guanin- und am anderen Ende mehrere Cytosinbausteine tragen. Zwischen den Cytosin- und Guaninbausteinen befindet sich die Nukleinsäuresequenz, die spezifisch an die Zielsequenz binden kann. Aufgrund der



komplementären Bausteine an den Enden des Oligonukleotids kommt es zur Ausbildung einer Schleifenstruktur: Die Guaninbausteine hybridisieren mit den Cytosinbausteinen wodurch der endständig an den Cytosinbausteinen angebrachte Farbstoff in seiner Fluoreszenz gelöscht wird. Sind in der Lösung Nukleinsäuresequenzen, die komplementär zur Schleifensequenz sind, bindet das Oligonukleotid unter Aufhebung seiner Haarnadelstruktur an die Zielsequenz. Der räumlich nahe Kontakt und damit die Löschung zwischen Farbstoffmolekül und Guaninbausteinen geht verloren, der Farbstoff fluoresziert. Da diese

farbstoffmarkierten Oligonukleotide ihre mikroskopische Umgebung selektiv erkennen, kann man sie als „intelligente“ Fluoreszenzsonden bezeichnen (Abb. 18). Mit diesem sowohl schnellen, als auch einfachen Verfahren gelingt eine Tausendfache Empfindlichkeitssteigerung beim Nachweis von bestimmten Nukleinsäuresequenzen. In einem homogenen Test, d. h. ohne Waschschriffe, konnte die Hybridisierung im pikomolaren Bereich (10^{-12} M) neben einem 1000-fachen Überschuss nicht-hybridisierter „intelligenter“ Fluoreszenzsonden in wenigen Sekunden sicher nachgewiesen werden [22]. Unabhängig von der Fragestellung, ob ein bestimmtes Protein oder eine spezielle Nukleinsäuresequenz hochempfindlich in einem schnellen homogenen Test nachgewiesen werden soll, tritt immer das Problem der Diskriminierung zwischen freien, farbstoffmarkierten Sonden und gebundenen Sonden auf. Nicht bei allen Bindepartnern ist die Entwicklung einer markierten Sonde möglich, die nur nach spezifischer Anbindung an das Zielmolekül leuchtet. Es können aber auch noch andere Moleküleigenschaften zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit in homogenen Tests eingesetzt werden. So können gebundene Sonden eine andere Nettoladung als freie Sonden besitzen. Wie in Abb. 19 für das System

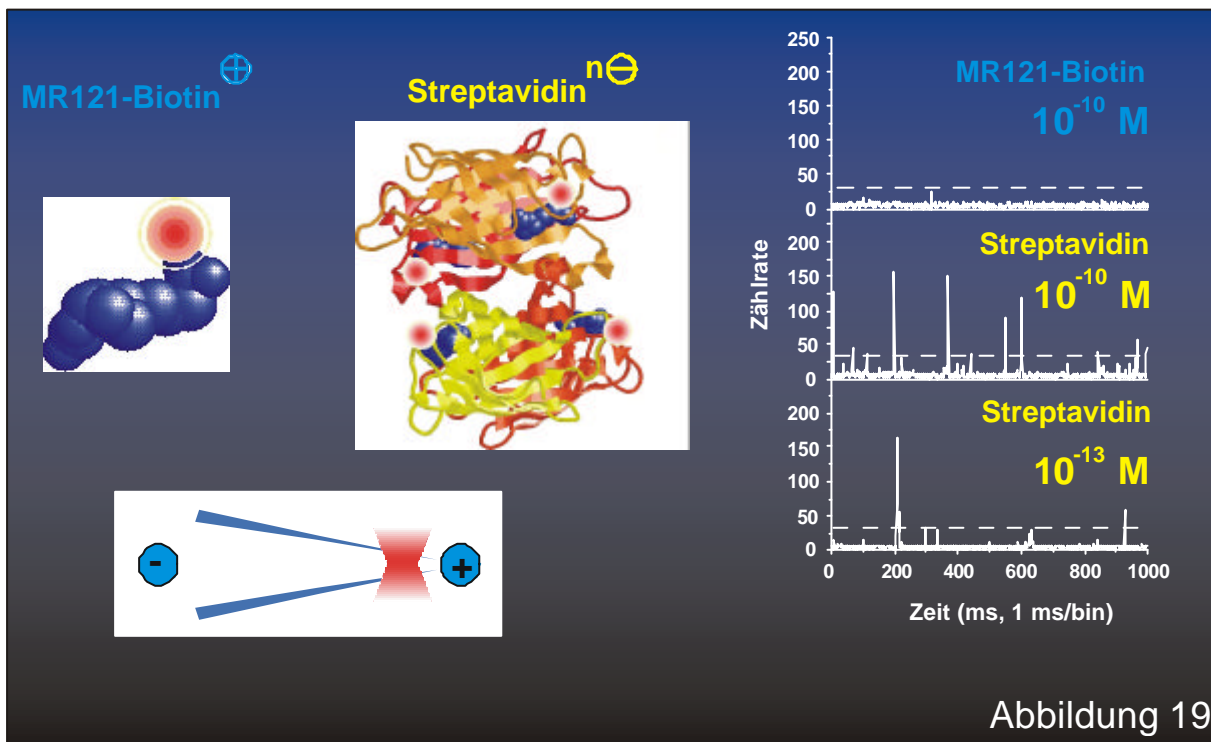


Abbildung 19

Biotin-Streptavidin gezeigt, können damit wenige gebundene Sonden aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung von einem großen Überschuss an freien Sonden in einem elektrischen Feld getrennt werden. Als Anwendungsbeispiel in der Medizin sei hier die Früherkennung eines Brusttumors und dessen Verlaufskontrolle mit Hilfe eines schnellen hochempfindlichen homogenen Tests beschrieben. Dabei soll die Konzentration an humanen Antikörpern (Anti-MUC1), die gegen ein tumorassoziiertes Protein (unterglykosiliertes

MUC1) gerichtet sind, in Blutseren bestimmt werden. Tumorassoziierte Proteine sind Einweißstoffe, die vermehrt von Tumorzellen produziert und in die Blutbahn abgegeben werden. Aufgrund der erhöhten Produktion dieser Proteine vermag die Tumorzelle nicht mehr alle Proteine mit einer kompletten Kohlenhydrathülle auszustatten, das Protein ist unterglykosiliert. Gegen die auf der Proteinoberfläche frei liegenden Aminosäuren reagiert nun das körpereigene Immunsystem mit der Produktion von humanen Antikörpern. Im Falle des Brusttumors werden humane Anti-MUC1 Antikörper gebildet. Da die Konzentration der humanen Antikörper in Blutseren das Tumorstadium widerspiegelt, kann damit ein neuer Test zur Früherkennung und Verlaufskontrolle einer Tumorerkrankung entwickelt werden. Zu diesem Zweck werden in einer Kooperation mit der Universitätsfrauenklinik in Heidelberg immunogen wirkende kurze Peptide (5-20 Aminosäuren) die bei unterglykosilierten MUC1 Proteinen frei liegen synthetisiert. Diese MUC1-Epitope, die als Erkennungssequenz für die humanen Anti-MUC1-Antikörper dienen werden mit einem Farbstoff und zusätzlichen Argininbausteinen markiert. Arginin ist eine basische Aminosäure, d. h. Argininbausteine tragen bei neutralen pH-Werten eine positive Ladung. Hierdurch wird erreicht, dass im Gegensatz zu den meisten natürlichen Proteinen das farbstoffmarkierte Epitop in einem elektrischen Feld aufgrund seiner positiven Ladung bei neutralen pH-Werten zur Kathode wandert. Sind hingegen humane Anti-MUC1-Antikörper in der Probe vorhanden, binden die im starken Überschuss zugegebenen Epitope an den Bindungsstellen wodurch die positive

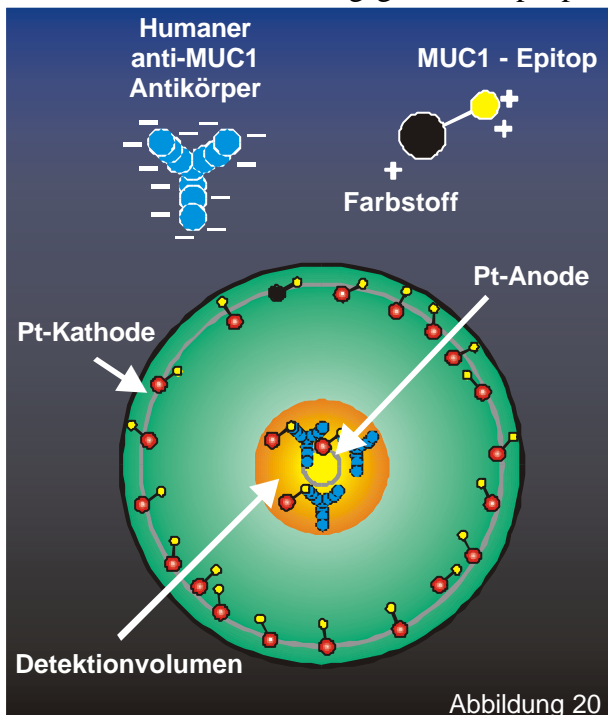
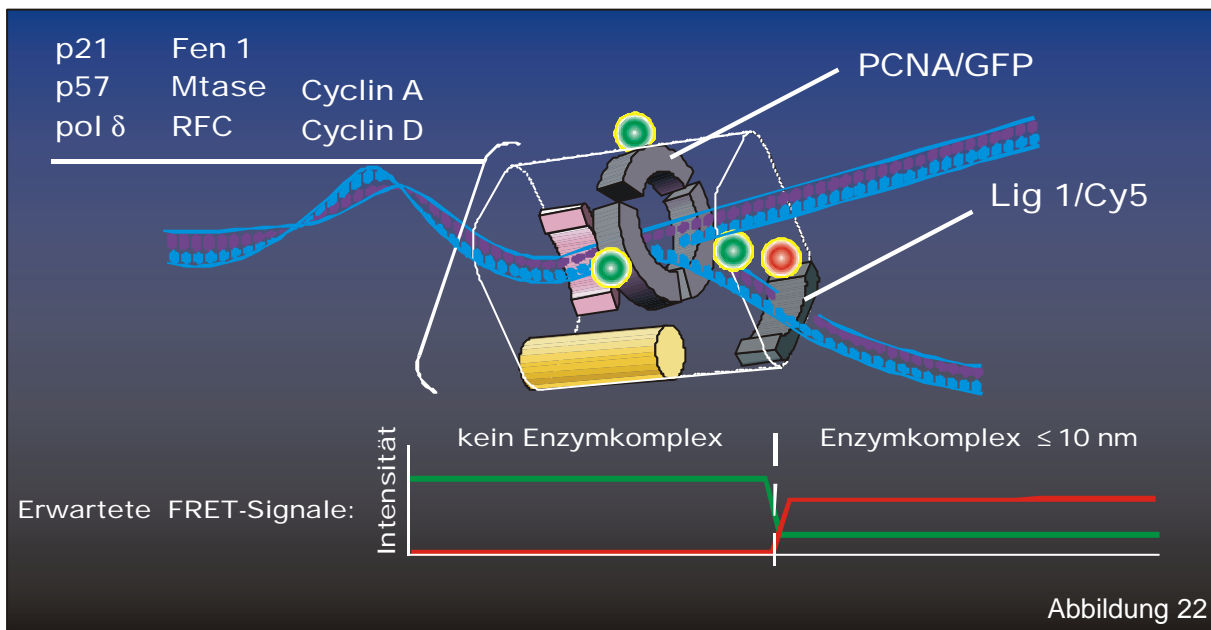
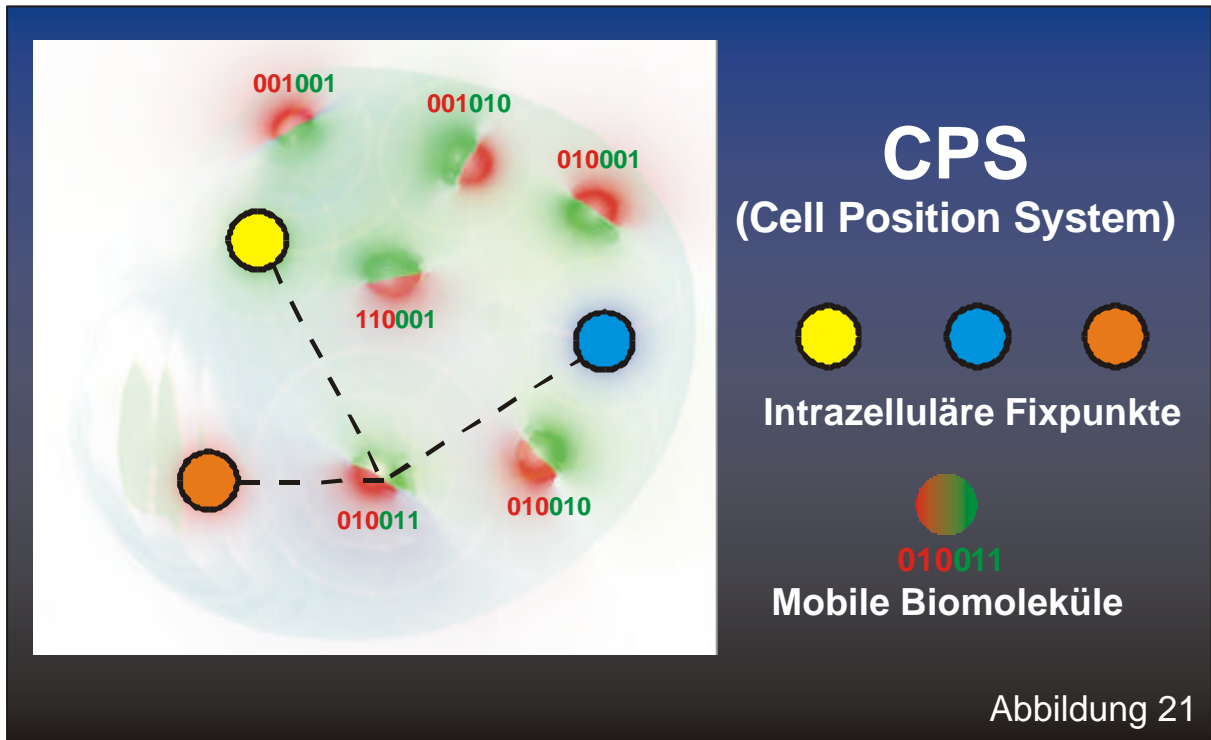


Abbildung 20

Ladung der Epitope durch den Überschuss an negativen Ladungen des natürlichen Antikörpers kompensiert wird. Durch das gezielte Handling einzelner Moleküle im elektrischen Feld, können die gebundenen farbstoffmarkierten Epitope in kurzer Zeit von den freien Epitopen getrennt und an der Anode detektiert werden (Abb. 20). Erste von uns durchgeführte Versuche zeigen, dass mit diesem Test eine ca. Tausendfache Steigerung der Nachweisempfindlichkeit gegenüber konventionellen Verfahren erreicht wird [23].



Danksagung:

Für die wertvolle Hilfe bei der Abfassung des Manuskripts danke ich den Herren C. Schulz und M. Sauer. Die hier beschriebenen Arbeiten wurden von der DFG, VW Stiftung, dem BMBF, Land Baden-Württemberg (Arbeitsgemeinschaft TECFLAM, Akademie der Wissenschaften, Heidelberg), FCI, Roche (BM), der DaimlerChrysler AG sowie der Kommission der Europäischen Gemeinschaft im JOULE-Programm unterstützt.

Literatur:

- [1] Ostwald, W.: Robert W. Bunsen, Sammlung Meister 3. Bd., Feuer Verlag, Leipzig 1910).
- [2] Wolfrum, J.: Lasers in Combustion: From Basic Theory to Practical Devices (Hottel Plenary Lecture). Proceedings of the Combustion Institute, Vol. 27, 1-42 (1998).
- [3] Troe, J.: Modeling the Temperature and Pressure Dependence of the Reaction HO+CO. Proceedings of the Combustion Institute, Vol. 27, 167-175 (1998).
- [4] Warnatz, J., Maas, U., Dibble, R.W.: Combustion. Springer, New York, 1996
- [5] Brownsword, R.A. , Hillenkamp, M. ,Laurent,T., Volpp, H.-R., Wolfrum, J., Vatsa, R.K., Yoo, H.-S.: Excitation function and reaction threshold of isotope exchange reactions: $H + D_2 \rightarrow D + HD$ and $H + D_2 O \rightarrow D + HOD$. J. Phys. Chem. A 101, 6448-6454 (1997).
- [6] Buschmann, A., Maas, U., Warnatz, J., Wolfrum, J.: Das Feuer im Computer und im Laserlicht. Phys. Bl. 52, Nr. 3, 213-218 (1996).
- [7] Schulz, C., Sick, V., Heinze, J., Stricker, W.: Laser-induced fluorescence detection of nitric oxide in high-pressure flames using A-X(0,2) excitation. Appl. Opt. 36, 3227-3232 (1997).
- [8] Schulz, C., Yip, B., Sick, V., Wolfrum, J.: A laser-induced fluorescence scheme for imaging nitric oxide in engines. Chem. Phys. Lett. 242, 259-264 (1995).
- [9] Hildenbrand, F., Schulz, C., Wolfrum, J., Keller, F., Wagner, E.: Laser diagnostic analysis of NO formation in a DI Diesel engine with PLN and CR injection systems: Proceedings of the Combustion Institute, Vol. 28 (2000).
- [10] Zeldovich, Y.B.: The oxidation of nitrogen in combustion and explosions. Acta Physicochim. USSR 21:577 (1946).
- [11] Schuler, F., Rampp, F., Martin, J., Wolfrum, J.: TACCOS - A Thermography-Assisted Combustion Control System for Waste Incinerators. Combustion and Flame 99, 431-439 (1994).
- [12] Meienburg, W., Neckel, H., Wolfrum, J.: In Situ measurement of ammonia with a $^{13}CO_2$ waveguide laser system. Appl. Phys. B51, 94-98 (1990).
- [13] Ebert, V., Fitzer, J., Gerstenberg, I., Pleban, K.U., Pitz, H., Wolfrum, J., Jochem, M., Martin, J.: Simultaneous Laser based in-situ-Detection of Oxygen and Water in a Waste Incinerator for Active Combustion Control Purposes. Proceedings of the Combustion Institute, Vol. 27, 1301-1308 (1998).
- [14] Hirschfeld, T.: Optical microscopic observation of single small molecules. Appl.

- Opt.15, 2965 (1976).
- [15] Shera, E.B., Seitzinger, N.K., Davis, L.M., Keller, R.A., Soper, S.A.: Detection of single fluorescent molecules. *Chem. Phys. Lett.* 174, 553-7 (1990).
 - [16] Rigler, R., Mets, Ü.: Diffusion of single molecules through a Gaussian laser beam. *SPIE Proc.* 1921, 239-48 (1992).
Nie, S.; Chiu, D.T., Zare, R.N.: Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy. *Science* 266, 1018-21 (1994).
 - [17] Köllner, M., Fischer, A., Arden-Jacob, J., Drexhage, K.-H., Müller, R., Seeger, S., Wolfrum, J.: Fluorescence pattern recognition for ultrasensitive molecule identification: comparison of experimental data and theoretical approximations. *Chem. Phys. Lett.* 250, 355-360 (1996).
 - [18] Weiss, S.: Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. *Science* 283, 1676-83 (1999).
 - [19] Müller, R., Zander, C., Sauer, M., Deimel, M., Ko, D.-S., Siebert, S., Arden-Jacob, J., Deltau, G., Marx, N.J., Drexhage, K.H., Wolfrum, J.: Time-resolved identification of single-molecules in solution with a pulsed semiconductor diode laser. *Chem. Phys. Lett.* 262, 716-722 (1996).
 - [20] Sauer, M., Arden-Jacob, J., Deltau, G., Han, K.-T., Marx, N.J., Müller, R., Nord, S., Schulz, A., Seeger, S., Wolfrum, J., Zander, C., Drexhage, K.H.: New fluorescent dyes in the red region for biodiagnostics. *Journal of Fluorescence* 5, 247-261 (1995).
 - [21] Sauer, M., Ankenbauer, W., Angerer, B., Földes-Papp, Z., Göbel, F., Han, K.-T., Rigler, R., Wolfrum, J., Zander, C.: Single molecule DNA sequencing in submicrometer channels: state of the art and future prospects. *J. Biotechnology*, (in press, 2000).
 - [22] Knemeyer, J.-P., Marmé, N., Sauer, M.: Probes for detection of specific DNA sequences at the single molecule level. *Anal. Chem.* 72, 3717-3724 (2000).
 - [23] Sauer, M.: Neue Lasertechnik enttarnt Krebszellen. *Ruperto Carola* 2, 24-31 (2000).