

Spektroskopische Eigenschaften kovalent an Glas gebundener Fluoreszenzfarbstoffe und farbstoffmarkierter Peptide



INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Matthias Brunner
aus Adorf/Vogtland

Heidelberg, 1. Februar 2002

*Meinem Opa
für all seine Liebe.*



Gutachter:
Prof. Dr. Jürgen Wolfrum
Prof. Dr. Joachim Spatz

Zusammenfassung

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung der Fluoreszenz-Einzelmolekül-Spektroskopie sowie die schnelle Entwicklung der Biochip-Anwendungen und -Technologien ist es von Bedeutung, die spektroskopischen Eigenschaften farbstoffmarkierter Proteine und Peptide auf Glasträgern zu kennen. Aufgabe dieser Arbeit war es zu zeigen, dass man sowohl unterschiedlich markierte Modellpeptide, als auch gleich markierte Peptide mit und ohne Tryptophan in ihrer spezifischen Umgebung anhand ihrer spektroskopischen Eigenschaften auf Einzelmolekülebene mit hoher Sicherheit identifizieren und unterscheiden kann.

Zu diesem Zweck wurden Markierungsfarbstoffe zunächst in Lösung und anschließend kovalent auf amino-modifizierte Glasoberflächen gebunden untersucht. Farbstoffmarkierte Peptide wurden durch Kopplung von Modellpeptiden mit Fluoreszenzfarbstoffen hergestellt. Hierzu wurden verschiedene chemische Kopplungsmethoden getestet, wobei die HBTU/HOBt-Methode, d.h. die Aktivierung der Carbonsäuregruppe des Peptids mit *O*-(1-Benzotriazolyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat und N-Hydroxybenzotriazol, in den meisten Fällen am erfolgreichsten war. Als günstige Fluoreszenzfarbstoffe in Bezug auf Kopplungsverhalten, Verfügbarkeit und spektralen Bereich erwiesen sich der kommerziell erhältliche Carbocyanin-Farbstoff Cy5 sowie der Oxazin-Farbstoff MR121, der uns durch einen Forschungspartner zur Verfügung gestellt wurde. Die Emissionsmaxima liegen bei 663 nm für MR121 und bei 670 nm für Cy5. Wichtig bei der Wahl der Modellpeptide war, dass sie sich untereinander nur durch eine Aminosäure unterschieden. Ein Modellpeptid enthält Tryptophan, das andere eine beliebige, nicht-kopplungsfähige Aminosäure, z.B. Phenylalanin. Der Farbstoff wurde an einen zur variablen Aminosäure benachbarten Lysin-Rest gebunden. Der Amino-Terminus der Peptide musste Acetyl-geschützt sein, um Mehrfachreaktionen mit Reagenzien, Farbstoffen oder Oberflächen zu vermeiden. Die farbstoffmarkierten Modellpeptide wurden dann über ihren Carboxy-Terminus an amino-modifizierte Glasoberflächen gekoppelt.

Als Modellpeptide wurden Dekapeptide, also 10-Aminosäuren-lange Peptide verwendet, die jeweils nur eine Kopplungsstelle für die Farbstoffe am Lysin-Rest boten, gut wasserlöslich waren und sich nur in einer Aminosäure unterschieden. Viele kleine Proteine bzw. Peptide, die natürlich vorkommen, liegen in dieser Größenordnung. Lysin befand sich in Nachbarschaft zur variablen Aminosäure, für die Tryptophan (Trp), Phenylalanin (Phe) oder Prolin (Pro) gewählt wurde. Die Modellpeptide Uni370 und Uni371 enthielten Tryptophan bzw. Phenylalanin in 4-Position und Lysin in 5-Position. Das Peptid mit Tryptophan ließ im Gegensatz zu

Phenylalanin Farbstoff-Löschung erwarten. Die Modellpeptide Uni355 mit Trp in 3-, Phe in in 4- und Lys in 5-Position sowie Uni356 mit Trp in 3-, Arg in in 4- und Lys in 5-Position und Uni357 mit Pro in 3-, Arg in in 4- und Lys in 5-Position wurden für Vorversuche verwendet, um den Fluoreszenz-löschenden Einfluss von Tryptophan zu untersuchen.

Die auf trockenen Glasoberflächen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe und farbstoffmarkierten Modellpeptide wurden mittels konfokaler spektral-auflösender Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (spectrally-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy, SFLIM) untersucht. Weitere Messungen erfolgten nach Zugabe einer Flüssigkeit (Femtotip-Puffer, FTP), die die auf der Oberfläche liegenden Moleküle aufrichtet und damit eine andere Farbstoffumgebung schafft. Dadurch ließ sich auch überprüfen, ob die Farbstoffe und Peptid-Konjugate kovalent und nicht nur adsorptiv auf die Glasoberflächen gebunden waren. FTP, der aus Tris-Borat-Puffer (20 mM in H₂O; pH 8,4), 30% Glycerol, 3% PVP K90 und 0,1% Tween 20 bestand, entfernt durch seine oberflächenaktiven Tensid-Bestandteile effektiv Moleküle von Oberflächen, vermindert die Diffusion der zu beobachtenden Moleküle durch seine hohe Viskosität und ermöglicht die Aufnahme wasserlöslicher Substanzen durch seinen hydrophilen Charakter. FTP wurde auch erfolgreich zur Trennung von Tetramethylrhodaminthiohydantoin-Aminosäuren mittels Kapillargelelektrophorese sowie als fließendes Medium zur Einzelmolekülspektroskopie in Femtotip[®]-Spitzen verwendet.

Als spektroskopische Größen, die zur Identifizierung und Unterscheidung der fluoreszierenden Spezies geeignet sind, dienen die Fluoreszenzlebensdauer τ und die anteilige Intensität F_2 .

Die anteilige Intensität F_2 ist ein Maß dafür, ob das Maximum der Fluoreszenz eines Moleküls mehr durch die kürzere Wellenlänge ($\lambda(I_1) < 670$ nm) oder die längere Wellenlänge ($\lambda(I_2) > 670$ nm) charakterisiert wird: $F_2 = I_2 / (I_1 + I_2)$. Die Intensität I_1 wurde am Detektor 1, die Intensität I_2 am Detektor 2 detektiert.

Die Fluoreszenzlebensdauer τ erwies sich als geeignetes Unterscheidungs- und Zuordnungskriterium. Der Fluoreszenzfarbstoff MR121 konnte sowohl in seinen verschiedenen Umgebungen erkannt, als auch vom Fluoreszenzfarbstoff Cy5 aufgrund der experimentell bestimmten Lebensdauern sicher unterschieden werden. MR121 besaß in Ensemblemessungen Lebensdauern von 1,9 ns in Wasser, 2,9 ns in Wasser/Acetonitril (1 : 1), 3,7 ns in Ethanol und 4,4 ns in Acetonitril. Auf trockener Oberfläche erhielt man für die Einzelmoleküle 3,7 ns und unter FTP 3,1 ns. Cy5

hingegen besaß eine Lebensdauer um 1,0 ns sowohl in polarer wie in unpolarer Lösung und 2,1 ns als Einzelmolekül auf Glasoberflächen, ohne und mit FTP. Die Cy5-markierten Peptide Uni370-Cy5 und Uni371-Cy5 zeigten in Lösung Lebensdauern um 1,1 ns. Die MR121-markierten Peptide besaßen Lebensdauern von 3,0 ns in Wasser/Acetonitril (1 : 1) und 3,9 ns in Wasser für Uni371 (Phe) und 2,6 ns in Wasser/Acetonitril (1 : 1) und 3,6 ns in Wasser für Uni370 (Trp). Auf trockener Oberfläche zeigten die beiden Cy5-Peptide Lebensdauern von 2,0 ns, die MR121-Peptide 4,0 ns (Uni371) bzw. 3,2 ns (Uni370). An den Modellpeptiden Uni370-MR121 (Phe) und Uni371-MR121 (Trp) war somit ein markanter Abfall der Lebensdauer um 0,8 ns durch die Wechselwirkung mit Tryptophan zu beobachten. Fluoreszenz-Löschung durch Tryptophan bei Oxazin- und Rhodamin-Farbstoffen muss also bei fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen an farbstoffmarkierten Peptiden mit berücksichtigt werden.

Carbocyanin-Farbstoffe wie Cy5 zeigen keine spektroskopischen Unterschiede durch die Nähe zu Tryptophan. Der Fluoreszenz-löschende Einfluss von Tryptophan auf Oxazin-Farbstoffe wie MR121 konnte durch die Experimente bestätigt werden. Allerdings muss sich Tryptophan in unmittelbarer Nachbarschaft zum Farbstoff befinden. Schon eine Aminosäure mehr zwischen Trp (4-Position) und Lys-MR121 (5-Position) verringert die gegenseitige Wechselwirkung so stark, dass praktisch kein Unterschied mehr in den Lebensdauern mit und ohne Trp erkennbar ist. Entsprechende Erkenntnisse wurden aus Vorversuchen mit den Modellpeptiden Uni355, Uni356 und Uni357 erhalten. Ensemble-Messungen in Wasser/Acetonitril (1 : 1) am Fluoreszenz-Spektrometer ergaben Lebensdauern von 3,0 ns für Uni357-MR121 (mit Pro-Arg), 2,8 ns für Uni356-MR121 (mit Trp-Arg) und 2,5 ns für Uni355-MR121 (mit Trp-Phe). Ein leichter Trend ist dahingehend zu sehen, dass das MR121-markierte Peptid ohne löschtfähige Aminosäure die längste Lebensdauer aufweist, mit Tryptophan (Trp) niedriger und mit der zusätzlichen, leicht löschtenden Aminosäure Phenylalanin (Phe) am niedrigsten ist. Die entsprechenden drei Cy5-Derivate zeigten Lebensdauern im Bereich 1,2...1,6 ns. Durch die fehlende deutliche Signifikanz im Bezug auf Tryptophan-Löschung wurden mit diesen Modell-Peptiden keine weiteren Versuche durchgeführt.

Das Emissionsmaximum, ausgedrückt als anteilige Fluoreszenzintensität am Detektor 2, ist wie die Lebensdauer universell für Vergleiche verwendbar. Die gemessenen Intensitäten streuen oft stark, die F_2 -Werte sind homogener und daher für grafische Darstellungen besser geeignet. Der Vergleich der anteiligen Intensitäten zeigte, dass in den Einzelmolekül-Messungen alle Werte für die Farbstoffe Cy5 und MR121 auf trockener Oberfläche im gleichen Bereich von 0,4...0,5 (40...50%)

lagen. Auch war kein Einfluss durch Tryptophan-Löschung oder Gemischtkopplung beider Farbstoffe auf eine Oberfläche sichtbar. Die Werte der Messungen mit FTP waren deutlich höher, über 10% für Cy5 und 20% für MR121; eine Farbstoff-Spezifität ließ sich dadurch aber nicht ableiten. Deshalb konnte der F_2 -Wert allein nicht als Identifizierungskriterium für die verwendeten Farbstoffe Cy5 und MR121 herangezogen werden.

Die reinen Farbstoffe, gemischt auf Glasoberflächen gekoppelt, konnten auf Einzelmolekülebene anhand ihrer charakteristischen Lebensdauer mit einer Zuordnungssicherheit von 92% für Cy5/MR121 insgesamt bzw. 90,4% für Cy5 und 92,9% für MR121 unterschieden werden. Gemeinsam an Glasoberflächen gekoppelte, unterschiedlich markierte Peptide wurden mit einer sehr hohen Sicherheit von über 95% der jeweiligen Spezies zugeordnet. So wurden Sicherheiten von 98,9% für Uni370-Cy5/Uni370-MR121 insgesamt bzw. 99,1% für Uni370-Cy5 und 98,0% für Uni370-MR121 aus der Überlappung der Gauß-Kurven ihrer Lebensdauer-Verteilungen errechnet. Für Uni371-Cy5/Uni371-MR121 wurde eine Zuordnungssicherheit von 98,1% gefunden bzw. 98,5% für Uni371-Cy5 und 95,0% für Uni371-MR121.

Diese Erkenntnisse können beim Aufbau und Design von Peptid- und Protein-Chips, die einer Fluoreszenz-Detektion dienen sollen, einfließen. So kann aufgrund unterschiedlicher, resultierender Fluoreszenzlebensdauern auf unterschiedliche Farbstoffumgebungen, verschiedene Peptide sowie das Vorhandensein von Tryptophan oder auch Phenylalanin geschlossen werden. Ausserdem sind gemeinsame Detektionen von mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Peptiden und Proteinen möglich. Unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche können gering gehalten werden, was der Einfluss durch Tryptophan zeigt. Messungen unter oberflächenaktiven, viskosen Flüssigkeiten unterstreichen diesen Umstand. Aufgrund dieser Möglichkeiten ist der Weg für Multiparameter-Messungen aufgezeigt und geebnet. Da Farbstoffe und farbstoffmarkierte Peptide durch ihre Lebensdauern mit sehr hoher Sicherheit unterschieden und zugeordnet werden können, sind umgebungsempfindliche Fluoreszenzfarbstoffe wie MR121 ideal für das Design von Peptid- und Protein-Chips geeignet.

| | |
|--|----|
| <u>Zusammenfassung</u> | 4 |
| <u>Inhaltsverzeichnis</u> | 8 |
| <u>Einleitung</u> | 12 |
| 1 <u>Theorie</u> | 17 |
| 1.1 <u>Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie</u> | 17 |
| 1.1.1 <u>Absorption und Emission von Farbstoffen</u> | 17 |
| 1.1.2 <u>Stokes-Verschiebung und Lösemittelrelaxation</u> | 19 |
| 1.1.3 <u>Anisotropie</u> | 21 |
| 1.1.4 <u>Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute</u> | 23 |
| 1.1.4.1 Fluoreszenzlebensdauer | 23 |
| 1.1.4.2 Fluoreszenzintensität | 24 |
| 1.1.4.3 Fluoreszenzquantenausbeute | 26 |
| 1.1.4.4 Fluoreszenzgeschwindigkeit und „natürliche“ Lebensdauer | 26 |
| 1.1.5 <u>Fluoreszenzlöschung</u> | 27 |
| 1.1.5.1 Dynamische Löschung | 31 |
| 1.1.5.2 Statische Löschung | 33 |
| 1.1.5.3 Kombinierte statische und dynamische Löschung | 35 |
| 1.1.6 <u>Grundzustandskomplexierung</u> | 36 |
| 1.1.7 <u>Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer</u> | 38 |
| 1.1.7.1 Thermodynamik des photoinduzierten Elektronentransfers | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.1.7.2 | Kinetische Aspekte des photoinduzierten Elektronentransfers..... | 40 |
| 1.1.8 | <u>Farbstoffdimere</u> | 45 |
| 1.1.9 | <u>FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer)</u> | 47 |
| 1.2 | Fluoreszenzfarbstoffe | 50 |
| 1.3 | Aminosäuren und Peptide | 52 |
| 2 | <u>Materialien und Methoden</u> | 57 |
| 2.1 | Chemikalien und Farbstoffe | 57 |
| 2.2 | Geräte | 59 |
| 2.2.1 | <u>Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)</u> | 59 |
| 2.2.2 | <u>Absorptionsspektroskopie</u> | 60 |
| 2.2.3 | <u>Fluoreszenzspektroskopie</u> | 61 |
| 2.2.4 | <u>Zeitaufgelöste Einzelmolekül-Spektroskopie</u> | 64 |
| 2.3 | Kleingeräte und –material | 68 |
| 2.4 | Methoden | 68 |
| 2.4.1 | <u>Herstellung der Aktiv-Ester</u> | 68 |
| 2.4.2 | <u>Kopplung der Farbstoffe an Peptide</u> | 71 |
| 2.4.3 | <u>Aktivierung und Modifizierung von Glasoberflächen</u> | 73 |
| 2.4.4 | <u>Ankopplung der Farbstoffe und Farbstoff-Peptide an Glas- und Gold-Oberflächen</u> | 73 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| 3 | <u>Experimente und Ergebnisse</u> | 76 |
| 3.1 | Ensemble-Messungen in Lösung | 76 |
| 3.2 | Kovalent gekoppelte Farbstoffe auf Deckgläschen | 78 |
| 3.3 | Kovalent gekoppelte Farbstoff-Peptide auf Deckgläschen | 85 |
| 3.4 | Kovalent gekoppeltes TMR-ITC auf Gold-Oberfläche | 93 |
| 4 | <u>Auswertung und Diskussion</u> | 94 |
| 4.1 | Identifizierung und Zuordnung der Spezies durch ihre spektroskopischen Daten | 94 |
| 4.2 | Spektroskopische Effekte in abgebildeten Einzelmolekülen | 111 |
| 4.3 | Tetramethylrhodamin auf Goldoberfläche | 120 |
| 5 | <u>Anhang</u> | 121 |
| 5.1 | Abkürzungen | 121 |
| 5.2 | Chromatogramme und Spektren | 125 |
| 5.2.1 | <u>HPLC-Chromatogramme</u> | 125 |
| 5.2.2 | <u>Massenspektren</u> | 136 |
| 5.2.3 | <u>UV/Vis-Spektren</u> | 147 |

6 **Literatur**..... 155

Danksagung..... 167

Einleitung

Das Human-Genom-Projekt ist weitgehend abgeschlossen, das Genom verschiedenster Organismen ist sequenziert. Die Grundlagen sind geschaffen. Nun stellt sich die eigentlich viel komplexere Frage nach den Genprodukten, nach der Umsetzung der genetischen Information in Proteine. Denn für das Verständnis zellulärer Prozesse nutzt die DNS-Sequenz alleine nichts. Sie bildet die Grundlage, auf der die Proteom-Forschung aufbaut. Was letztendlich interessiert, ist eben das Proteom, das heißt, welche Proteine werden zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen in der Zelle exprimiert, und was ist ihre Funktion? [Przybylski 2001] [Lottspeich 2001] [BIAjournal 2000] Erst damit erhält man Informationen über den Stoffwechselzustand einer Zelle oder eines Gewebes. Das Proteom ändert sich in seiner Zusammensetzung ständig, da Anzahl und Art der Proteine in einer Zelle von zahlreichen, verschiedenen Faktoren abhängig sind. Diese Komplexität macht die Proteom-Analytik ungleich komplizierter als die Genom-Analytik. 2D-Elektrophorese, MALDI, Mikroarray-Techniken sind momentan die Methoden der Wahl. Bis aber Proteom-Forschung wirklich im „High Throughput“ vergleichbar mit der Genom-Forschung möglich wird, muss noch eine Menge Arbeit geleistet werden [Görg 2001].

Mit Hilfe der in den letzten Jahren etablierten DNS-Chip-Technologien ist es bereits heute möglich, das Expressionsmuster von Tausenden von mRNAs aus Geweben oder Zellen routinemäßig auf einem einzigen DNS-Chip qualitativ und quantitativ zu analysieren [Phimister 1999]. DNS-Sequenzen und mRNA-Expressionsdaten alleine sind jedoch nicht ausreichend, um die komplexen, dynamischen Prozesse in Zellen zu erklären. Das gesamte zelluläre Verhalten, das heißt alle intrazellulären Prozesse und interzellulären Wechselwirkungen werden nicht primär über Gene und deren exprimierte mRNA vermittelt, sondern über deren Translationsprodukte, die Proteine und deren vielfältige Interaktionen untereinander gesteuert. Deshalb ist es das erklärte Ziel der Proteom-Forschung, das komplette Proteom einer Zelle oder eines Gewebes, das heißt das Vorkommen, die Menge und die posttranslationalen Modifikationen aller Proteine der Zelle oder des Gewebes zu bestimmten Zeitpunkten zu erfassen [Lopez 2000]. Dadurch sollen die dynamischen Prozesse in Zellen und Geweben auf Proteinebene darstellbar und in ihren molekularen Wechselwirkungen verstehbar werden [Joos 2001]. Dazu gehören komplexe, vernetzte Reaktionskaskaden und regulative Rückkopplungen, ausgehend von den Genen, auf allen Ebenen der Transkription, Translation, Proteinmodifikation, Transport und Interaktionen.

Allerdings reichen die bisher zur Verfügung stehenden Techniken bei weitem nicht aus, um alle Proteine einer Zelle in einem Experiment qualitativ und quantitativ zu

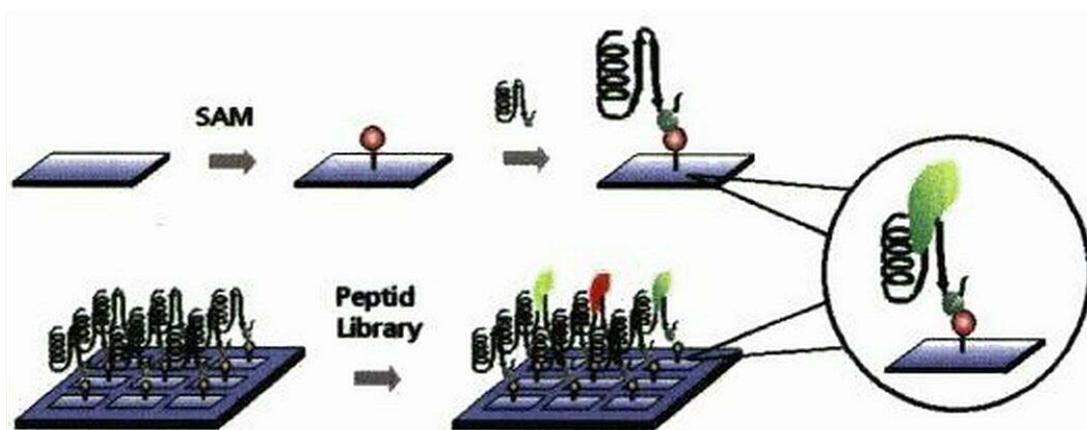
erfassen. Alternativ zu den 2D-Elektrophorese/Massenspektrometrie-basierenden Techniken [Tovar 2001] werden zur Zeit große Anstrengungen unternommen, um die etablierten Methoden der DNS-Chip-Technologie auf Proteine zu übertragen [Abbot 1999].

Alle Proteine des Gesamt-Proteoms werden an bestimmten funktionellen Gruppen (Amino-, Carbonsäure-, Hydroxyl-Gruppen) spezifisch markiert (radioaktiv, Fluorophore, Biotin) und auf einem Mikroarray mit den „Fängermolekülen“ (Sonden) inkubiert. Die an die passenden Fängermoleküle gebundenen, markierten Proteine können nach dem Auswaschen unspezifisch gebundener Proteine orts aufgelöst mit entsprechenden Detektionssystemen nachgewiesen werden [Haab 2001]. Neben diesen Nachweisverfahren werden auch markierungsfreie Detektionsverfahren für die orts aufgelöste, multiple und parallele Detektion von an Fängermoleküle gebundenen Proteinen entwickelt (Oberflächen-Plasmon-Resonanz, SPR). Protein-Mikroarrays werden ihre Anwendung in der Proteom-Analyse und Diagnostik dort finden, wo eine qualitative und quantitative, parallele Bestimmung einer Vielzahl von definierten Proteinen schnell und kostengünstig durchgeführt werden muss.



Das Bild zeigt ein Yeast Pan®-Oligonucleotid-Microarray nach der Hybridisierung mit einem Cy5-markierten Zufallsoligonukleotidmix. Insgesamt enthält der Mikroarray 6348 Sondenpunkte. 6250 Sondenpunkte detektieren jeweils ein unterschiedliches Hefegen. Als Negativkontrolle dienen 7 Arabidopsis thaliana spezifische Sonden, und 91 Hefesonden wurden über das gesamte Mikroarray als Replikate verteilt. Das Vorhandensein von Oligonukleotiden zeigt sich durch ein deutliches Signal nach der Hybridisierung. Die unterschiedliche Intensität der Signale korreliert nicht mit der Menge des gebundenen Oligos. Dies liegt an der unterschiedlichen Kopplungseffizienz während der Oligonukleotidsynthese, welche zu keiner homogenen Sequenzverteilung innerhalb des Zufallsoligonukleotidmix führt [Donner 2001].

Im universitären Bereich werden Peptid-Chips zum Epitop-Screening, Alanin-Scanning und Ligand-Screening genutzt, während Protein-Chips zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen und zum Substrat-Ligand-Screening genutzt werden. Auch ist es möglich, mit Peptid- und Protein-Chips die Proteom-Aktivität zu untersuchen und industrielle Prozesse wie das Metabolismus-Profil von fermentierenden Bakterien zu verfolgen. Eine einfache Anwendung von Protein-Chips besteht beispielsweise in der Ankopplung des Proteins p24 aus dem Kapsid von HIV auf einen Chip. Damit lassen sich anti-HIV-Antikörper in humanen Seren identifizieren. Die gebundenen Antikörper werden über Fluoreszenzmarkierung detektiert [Larbolette 2001]. Die BASF-Tochter Knoll nutzte Protein-Chips bei der Suche nach Inhibitoren für das Target Endothelinkonversionsenzym (ECE), das z.B. beim akuten Nierenversagen eine zentrale Rolle spielt. Das Detektionsprinzip beruhte auf der Fluoreszenzpolarisation [Jäckel 2000].



Proteinchips für die Ligandensuche mit MALDI-MS Analytik: Der Self-Assembled Monolayer (SAM) führt einen Proteinanker ein, an dem ein Proteinrezeptor immobilisiert wird [Tovar 2001].

Wichtige Firmen, die auf dem Gebiet der Protein-Chip-Entwicklung eine Vorreiterrolle spielen und riesige finanzielle Investitionen tätigen, sind z.B. Affymetrix [Brauckmann 1999], Phylos und Zyomyx in den USA, CIPHERgen Biosystems [Eggeling 2000] [George 2001] in Großbritannien, Biacore [BIAjournal 2000] in Schweden, MWG Biotech [Donner 2001] und Graffinity in Deutschland.

Ein fundamentales Postulat der statistischen Mechanik, die Ergodik-Hypothesen, ist, dass der zeitliche Durchschnitt einer physikalischen Größe eines einzelnen Moleküls äquivalent zum Durchschnitt dieser Größe bei der Messung des Ensembles der Moleküle mit gegebener Zeit ist. Man sollte also durch Untersuchung des Ensembles alle Informationen gewinnen können. Damit dieses Postulat jedoch annähernd richtig ist, muss das Ensemble homogen sein, das heißt, aus einheitlichen Bestandteilen

bestehen. Bei inhomogenen Systemen variiert der Durchschnitt der Messungen der Bestandteile mitunter stark und ist nicht mehr äquivalent zum Durchschnitt des Ensembles. Auf der anderen Seite wiederum sind individuelle Phänomene durch unterschiedliche molekulare Nanoumgebungen wie Verteilung von spektralen Positionen und Formen, Photon(anti)bunching, spektrale und Rotationssprünge sowie Photozerstörung einzelner Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle im Ensemble „versteckt“ [Macklin 1996] [Weston 1998 a] [Veerman 1999].

Sehr ausführliche Übersichtsartikel zu Stand, Anwendung und Zukunft der Einzelmolekül-Detektion und Fluoreszenzspektroskopie gibt es von Weiss [Weiss 1999], Barnes et al. [Barnes 1995], Ambrose et al. [Ambrose 1999] sowie Xie und Trautman [Xie 1998].

S. Weiss schreibt in seinem Übersichtsartikel “Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules” über die Geschichte, Markierungsmethoden und physikalische Observablen, Anregungs- und Detektionsmethoden, Reaktionsbedingungen, künftige Verbesserungen und einen Ausblick [Weiss 1999].

M.D. Barnes, W.B. Whitten und J.M. Ramsey beleuchten in ihrem Artikel “Detecting Single Molecules in Liquids” Anwendungsmöglichkeiten, Techniken, die Empfindlichkeitslimitierungen, Detektionskriterien sowie die molekulare Detektionseffizienz [Barnes 1995].

W.P. Ambrose und Kollegen verschaffen in „Single Molecule Fluorescence Spectroscopy at Ambient Temperature“ einen umfangreichen Überblick über die Einzelmolekül-Spektroskopie in fließenden Lösungen mit Methoden und Techniken, Photozerstörung, Daten-Analyse und -Simulation sowie Anwendung, in den nächsten Abschnitten über schwebende Tropfen und konfokale Anregung und Detektion einschließlich Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie in Flüssigkeiten. In weiteren Abschnitten schreiben sie über Detektion in Mikrokapillaren und Mikrostrukturen, über Zwei-Photonen-Anregung und am Ende zu Einzelmolekül-Abbildung mit Kameras unter Umgebungsbedingungen [Ambrose 1999].

X.S. Xie und J.K. Trautman fassen in Ihrem Artikel “Optical Studies of Single Molecules at Room Temperature” aktuelle Entwicklungen in optischen Studien an Einzelmolekülen bei Raumtemperatur zusammen. Sie gehen auf zugrundeliegende Prinzipien, das Potential, Beispiele aus Photochemie und Photophysik mit Einzelmolekül-Messungen, spektralen Schwankungen, Raman-Spektroskopie, Diffusionsbewegung, Konformationsdynamik, FRET, Exciton-Dynamik und Enzymreaktionen ein [Xie 1998].

In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, die spektroskopischen Eigenschaften farbstoffmarkierter Proteine bzw. Modellpeptide auf Glasträgern zu kennen.

Aufgabe dieser Arbeit ist es zu zeigen, dass man sowohl unterschiedlich markierte Peptide, als auch gleich markierte Peptide, die sich durch das Vorhandensein von Tryptophan unterscheiden, anhand ihrer spektroskopischen Eigenschaften und in ihrer spezifischen Umgebung auf Einzelmolekülebene identifizieren und unterscheiden kann.

1 Theorie

1.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

1.1.1 Absorption und Emission von Farbstoffen

Alle Moleküle absorbieren Licht. Jedoch nur eine geringe Anzahl Molekülspezies, normalerweise stabile, konjugierte, polyaromatische Kohlenwasserstoffe oder Heterocyklen, emittiert auch Licht als Ergebnis der Absorption von Licht aus verschiedenen Quellen. Wenn die Emission aus elektronisch angeregten Singulett-Zuständen erfolgt, nennt man dieses Phänomen *Fluoreszenz*.

Fluoreszenz ist die Emission von Licht durch ein Molekül, in dem ein angeregter, also energetisch höherer Zustand besetzt ist. Sie liegt gewöhnlich im ultravioletten bis sichtbaren, teilweise im nah-infraroten Bereich des Spektrums. Die Anregung findet vom elektronischen Grundzustand S_0 zum ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 statt. Das folgende *Jablonski*-Diagramm illustriert diese Vorgänge:

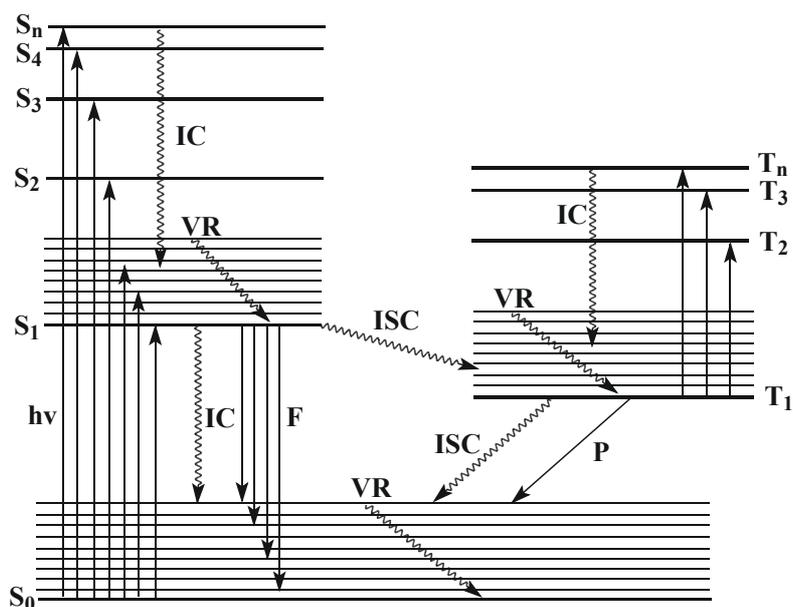


Abbildung 1.1.1-1: Energieniveauschema für organische Farbstoffmoleküle (Jablonski-Diagramm). Zur Vereinfachung wurden keine Rotationsenergieniveaus eingezeichnet.

(IC: internal conversion (strahlungslose Deaktivierung), ISC: intersystem crossing, VR: vibrational relaxation (Schwingungsrelaxation))

Die Energie-Niveaus des Fluorophors sind durch horizontale Linien dargestellt und in Gruppen zusammengefasst. Das niedrigste Band stellt den elektronischen Grundzustand S_0 dar, die niedrigste Energie des ersten angeregten Singulett-Zustands wird S_1 bezeichnet. T_1 ist die niedrigste Energie des Triplett-Zustands.

Während der Anregung absorbieren die Moleküle im energetischen Grundzustand ein Photon und springen in höhere Schwingungsniveaus angeregter Singulett-Zustände. Diese Anregung ist verantwortlich für Absorptionsspektren im UV- und sichtbaren Bereich. Die Absorption des Photons ist hoch spezifisch und findet in Zeitbereichen von etwa 10^{-15} s statt.

Als Photonenquelle dienen externe Lichtquellen wie Quecksilber-Lampen oder Laser.

Die Anregung wird gefolgt von einem Zurückspringen auf niedrigere Schwingungsniveaus (Schwingsrelaxation, VR) des jeweiligen angeregten Zustands.

Der angeregte Zustand selbst hat eine bestimmte Lebensdauer.

Nun relaxieren diese angeregten Zustände in Lösung sehr schnell (10^{-12} s) in die *Boltzmann*-Verteilung der Schwingungszustände des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustands S_1 (*Kasha-Regel* [Kasha 1950]). Diese strahlungslose Relaxation (internal conversion, IC) verläuft isoenergetisch aufgrund vibronischer Kopplung zwischen Schwingungsniveaus eines elektronisch angeregten Singulett-Zustands und Schwingungsniveaus eines niedrigeren Singulett-Zustands. Durch Wechselwirkungen mit benachbarten Lösemittelmolekülen verliert das Molekül Schwingungsenergie.

Die Geometrie des Fluoreszenzfarbstoffs unterscheidet sich zwischen angeregtem und Grundzustand, einige Bindungslängen und -winkel sind verändert (*Franck-Condon*-Prinzip).

Aus dem angeregten Zustand kehrt der Farbstoff in höhere Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustands zurück, indem ein Photon ausgesandt wird, was als Fluoreszenz ($\tau \approx 10^{-8}$ s) zu beobachten ist. Während der Fluoreszenz-Emission bleibt die Spin-Multiplizität erhalten. Außerdem kann eine strahlungslose Deaktivierung vom angeregten zum Grundzustand (internal conversion, IC), wie oben beschrieben, stattfinden.

Die Energie des emittierten Photons hängt direkt von der Energiedifferenz des oberen zum unteren Endniveau zum Zeitpunkt der Emission ab. Das untere Niveau ist nicht unbedingt der Grundzustand, sondern kann einer der angeregten Schwingungszustände sein, von dem das Elektron durch Relaxation (vibrational relaxation, VR) wieder bis in den S_0 -Zustand gelangt.

Photoemission ist ein unimolekularer Vorgang mit erster Ordnung bezüglich der Konzentration des angeregten Zustands. Die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz liegt typischerweise in der Größenordnung von $10^7 \dots 10^9$ s⁻¹.

1.1.2 Stokes-Verschiebung und Lösemittelrelaxation

Als *Stokes-Verschiebung* bezeichnet man den Unterschied in den Wellenlängenmaxima von Absorptions- und Emissionsspektrum. Im Gegensatz zur Fluoreszenz von Atomen in der Gasphase zeigen Moleküle unter gleichen Bedingungen eine energetische Verschiebung der Fluoreszenzübergänge hin zu größeren Wellenlängen relativ zu ihren Absorptionsübergängen.

Strickler und *Berg* gaben 1962 eine Gleichung

$$\tau = \tau_0 \cdot \phi \quad (1.1.2-1)$$

für die Lebensdauer an und wiesen darauf hin, dass nur Atome scharfe Absorptionslinien besitzen, ihre Gleichung also nur unter der Annahme gilt, dass Absorption und Emission bei gleicher Wellenlänge erfolgen. Sie verwendeten die *Boltzmann-Verteilung* für 2 Energieniveaus

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{-\frac{h\nu_{1-2}}{kT}} \quad (1.1.2-2)$$

Die Absorption erfolgt in angeregte Schwingungsniveaus. In kondensierter Phase kommt es durch Energieverlust zur Relaxation in das unterste Schwingungsniveau [Strickler 1962].

Moleküle bestehen aus zahlreichen Atomen und besitzen deshalb Schwingungs- und Rotationsniveaus, die für die *Stokes-Verschiebung* in der Gasphase verantwortlich sind. Das Resultat ist eine Vielzahl eng beieinander liegender Übergänge, welche durch Wechselwirkungen zwischen den Farbstoff- und den Lösemittelmolekülen zu ausgedehnten Absorptions- bzw. Fluoreszenzbanden verbreitert werden.

Außerdem besitzt jedes Farbstoffmolekül in Lösung eine leicht unterschiedlich strukturierte Solvathülle von Lösemittelmolekülen, so dass für jedes Farbstoffmolekül aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen Farbstoffmolekül und den Lösemittelmolekülen der Solvathülle ein etwas unterschiedliches Spektrum resultiert.

Die Verschiebung der Fluoreszenzbande zu längeren Wellenlängen im Vergleich zu der Absorptionsbande hat zwei Ursachen. Zum einen relaxieren die angeregten Singulett-Zustände schnell durch strahlungslose Prozesse in die *Boltzmann-Verteilung* des S_1 -Zustands, von dem aus in der Regel die Fluoreszenz erfolgt (*Kasha-Regel* [Kasha 1950]). Diese schnelle Relaxation geschieht intramolekular durch Umverteilung der Rotations- und Schwingungsenergie und intermolekular durch Stöße. Somit besitzt das aus dem S_1 -Zustand emittierte Fluoreszenzphoton eine geringere Energie als das zuvor absorbierte Photon.

Zusätzlich trägt in Lösung die Relaxation der dem Farbstoffmolekül benachbarten Lösemittelmoleküle zur *Stokes-Verschiebung* bei.

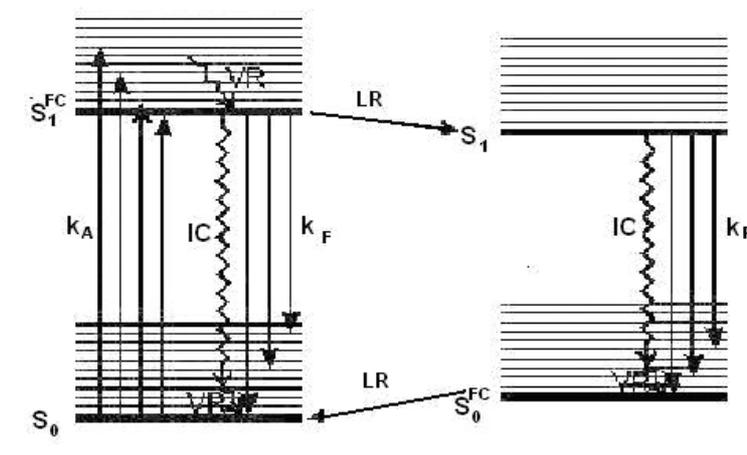


Abbildung 1.1.2-1: vereinfachtes Energieniveauschema mit Lösemittelrelaxation

Im Grundzustand (S_0) befindet sich ein Farbstoffmolekül mit den ihm umgebenden Lösemittelmolekülen im thermischen Gleichgewicht. Die Absorption eines Photons überführt dieses Farbstoffmolekül innerhalb von ca. 10^{-15} s in einen angeregten Zustand, wobei sich auf dieser Zeitskala nur die Elektronenverteilung ändert und die Kernkoordinaten konstant bleiben (*Franck-Condon-Prinzip*). Entsprechend schnell werden die Elektronenverteilungen der umgebenden Lösemittelmoleküle polarisiert. Mit der Anregung ist im allgemeinen auch eine Änderung des Dipolmoments verbunden. Die mit der Anregung erreichte „*Franck-Condon-Konfiguration*“ des angeregten Zustands (S_1^{FC}) relaxiert strahlungslos innerhalb von ca. 10^{-12} s in die *Boltzmann-Verteilung* des S_1 -Zustands. Aufgrund des veränderten Dipolmoments des angeregten Zustands befinden sich die umgebenden Lösemittelmoleküle hinsichtlich der Orientierung ihrer Dipolmomente nicht im thermischen Gleichgewicht mit dem angeregten Farbstoffmolekül. Innerhalb von ca. 10^{-11} s erreichen die Lösemittelmoleküle durch Umorientierung (Drehung) das thermische Gleichgewicht mit dem angeregten Farbstoff. Diese Lösemittelrelaxation (LR) senkt die Energie des angeregten Zustands ab. Da die Fluoreszenz mit ca. 10^{-8} s langsamer ist als die Relaxation, verschiebt sich das Fluoreszenzspektrum mit zunehmender Zeit nach der Anregung hin zu längeren Wellenlängen (*Solvatochromie*). Der Fluoreszenzübergang erfolgt nach dem *Franck-Condon-Prinzip* vertikal in den Grundzustand (S_0^{FC}). Dieser besitzt jedoch die Kernkoordinaten des S_1 -Zustands sowie die entsprechende Orientierung der Lösemittelmoleküle und ist wiederum nicht im thermischen Gleichgewicht mit den umgebenden Lösemittelmolekülen, was eine höhere Energie relativ zum im thermischen Gleichgewicht befindlichen Grundzustand bedeutet.

1.1.3 Anisotropie

Wird eine Farbstofflösung mit linear polarisiertem Licht angeregt, so ist die Fluoreszenzpolarisierung aufgrund der bei der Absorption stattfindenden Photo-selektion durch die relativen Orientierungen der Übergangsmomente der Absorption und der Emission sowie durch die *Brown*'sche Rotationsbewegung der Farbstoffmoleküle beeinflusst. Meist wird zur Beschreibung der Polarisierungseffekte statt der Polarisierung P die Anisotropie r benutzt. In den Gleichungen 1.1.3-1a und 1.1.3-1b sind beide Größen als Funktion der zur Anregungspolarisationsrichtung parallel (\parallel) bzw. senkrecht polarisiert (\perp) gemessenen Fluoreszenzintensitäten dargestellt.

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad \text{bzw.} \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (1.1.3-1a, b)$$

Der elektrische Dipol des Fluorophors muss nicht genau mit der z -Achse ausgerichtet sein, um linear polarisiertes Licht entlang dieser Achse absorbieren zu können (Abbildung 1.1.3-1). Die Wahrscheinlichkeit, mit der das Fluorophor linear polarisiertes Licht absorbiert, ist proportional zu $\cos^2\theta$, wobei θ der Winkel ist, den die Dipole bei der Absorption mit der z -Achse bilden. Diese $\cos^2\theta$ -Verteilung ist außerdem abhängig von der Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül den Winkel θ mit der z -Achse bildet.

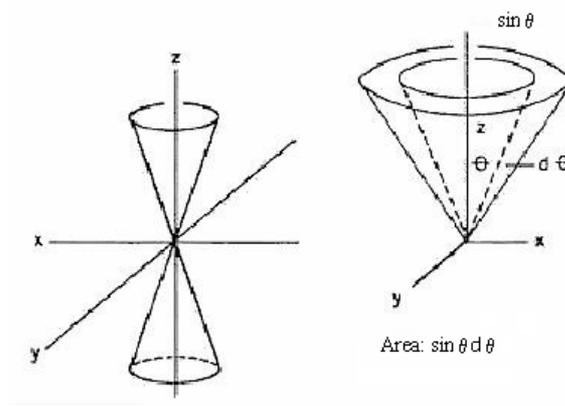


Abbildung 1.1.3-1: Photoselektion und Wahrscheinlichkeitsverteilung von Fluorophoren.

Photoselektion bezeichnet das Phänomen, dass man bei der Anregung mittels entlang der z -Achse polarisierten Lichtes selektiv Fluorophore erhält mit symmetrischer Verteilung um die z -Achse. Die Zahl der Moleküle mit einem Winkel zwischen θ und $\theta + d\theta$ ist proportional zu $\sin\theta d\theta$. Somit ist bei Anregung mit vertikal

polarisiertem Licht die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Moleküle gegeben durch $F(\theta)d\theta = \cos^2\theta \sin\theta d\theta$.

Der maximale Wert für die Anisotropie ist 0,4; er entspricht einer kolinearen Ausrichtung der Absorptions- und Emissionsdipole in Abwesenheit weiterer depolarisierender Einflüsse.

Die Absorptions- und Emissionsdipole der Fluorophore sind im allgemeinen nicht kolinear, sondern bilden in der Ebene der Fluorophore den Winkel α zueinander. Die beobachtete Anisotropie ergibt sich aus dem Produkt der Abnahme der Anisotropie gemäß der Photoselktion (2/5) und ihrer Abnahme, verursacht durch die Winkeländerung zwischen den Dipolen:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right) \quad (1.1.3-2)$$

Die Terme r_0 und P_0 beziehen sich hierbei auf Systeme, die keinen weiteren depolarisierenden Einflüssen ausgesetzt sind. Die r_0 -Werte einer isotropen Lösung liegen zwischen $-0,2 \leq r_0 \leq 0,4$ bzw. $-0,33 \leq P_0 \leq 0,5$.

Ein kompletter Verlust der Anisotropie tritt auch ein, wenn Fluoreszenzintensität unter einer Polarisation von $\alpha = 54,7^\circ$ („magic angle“) zur Anregungspolarisation gemessen wird. Hier besitzen Anisotropie und Polarisation den Wert Null. Für Winkel größer $54,7^\circ$ werden r_0 und P_0 negativ, die maximalen negativen Werte konnten für den Winkel $\alpha = 90^\circ$ gefunden werden.

Da sich die Orientierung des Absorptionsdipols in Abhängigkeit von der Absorptionsbande ändert, variiert auch der Winkel α und somit r_0 mit der Wellenlänge der Anregung.

Die Abhängigkeit von r von der Rotationsbewegung des Fluorophors wird durch die *Perrin-Gleichung*

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \left(\frac{\tau}{\phi} \right) \quad (1.1.3-3)$$

näher beschrieben, wobei τ die Fluoreszenzlebensdauer und ϕ die Rotationskorrelationszeit sind. Für Werte von $\phi \gg \tau$ (stark viskose Lösung) strebt der Quotient r_0/r , also die beobachtete Anisotropie, gegen r_0 . Im umgekehrten Fall, wenn $\phi \ll \tau$ (verdünnte, nicht viskose Lösung), strebt die Anisotropie gegen Null. Es ist keine Anisotropie messbar ($I_{\parallel} = I_{\perp}$ und $r = 0$), man spricht von Depolarisation. Das heißt, je kleiner die Fluoreszenzlebensdauer und je größer die Rotationskorrelationszeiten sind, desto größer ist die Anisotropie.

1.1.4 Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute

1.1.4.1 Fluoreszenzlebensdauer

Da das Farbstoffmolekül aus dem S_1 -Zustand fluoresziert (*Kasha-Regel*), entspricht die Fluoreszenzkinetik der Kinetik des S_1 -Zustands und ist unabhängig von der Anregungswellenlänge (*Vavilov-Regel* [Birks 1970]). Wird eine Farbstofflösung mit einem infinitesimal kurzen Lichtpuls (δ -Puls) angeregt, so beträgt die Konzentration der instantan erzeugten, angeregten Farbstoffmoleküle $[F_0^*]$ (in mol l^{-1}). Diese relaxieren in den Grundzustand gemäß Gleichung 1.1.4.1-1:

$$\frac{d[F_0^*]}{dt} = -k[F^*(t)], \quad (1.1.4.1-1)$$

das heißt, die differentielle Abnahme der Konzentration angeregter Moleküle ist proportional zur augenblicklich vorhandenen Konzentration $[F^*(t)]$. Die Proportionalitätskonstante k entspricht der Fluoreszenzabklinggeschwindigkeit, die sich additiv aus den einzelnen Relaxationsgeschwindigkeiten des S_1 -Zustands, der Fluoreszenzgeschwindigkeit k_f , der Internal-conversion-Geschwindigkeit k_{IC} und der Intersystem-crossing-Geschwindigkeit k_{ISC} , zusammensetzt.

$$k = k_f + k_{IC} + k_{ISC} \quad (1.1.4.1-2)$$

Das zeitliche Verhalten der Konzentration angeregter Moleküle ergibt sich nach Integration mit der Nebenbedingung $[F^*(t=0)] = [F_0^*]$:

$$[F^*(t)] = [F_0^*]e^{-kt} \quad (1.1.4.1-3)$$

Experimentell erfasst wird jedoch nicht die Konzentration der angeregten Moleküle, sondern deren Fluoreszenzintensität $I_F(t)$, das heißt, die Anzahl der pro Sekunde und pro Fläche von der Farbstofflösung emittierten Photonen. Die Fluoreszenzintensität $I_F(t)$ ist proportional zur Konzentration der angeregten Moleküle $[F^*(t)]$:

$$I_F(t) = k_f[F^*(t)], \quad (1.1.4.1-4)$$

mit der Fluoreszenzgeschwindigkeit k_f als Proportionalitätskonstante. Die Proportionalitätskonstante ist die Fluoreszenzgeschwindigkeit k_f (natürliche Strahlungsgeschwindigkeit), da nur angeregte Moleküle zur Fluoreszenzintensität beitragen, die nicht strahlungslos relaxieren. So ergeben sich für die Abnahme

$$\frac{dI_F(t)}{dt} = -kI_F(t) = k_f \frac{d[F^*(t)]}{dt} \quad (1.1.4.1-5)$$

bzw. für den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität.

Die Fluoreszenzlebensdauer τ entspricht der Zeit, nach der die Konzentration des angeregten Zustands $[F^*(t)]$ bzw. die Fluoreszenzintensität $I_F(t)$ auf den e -ten Teil ($1/e \approx 0,3679$) ihres Anfangswertes abgesunken ist:

$$\tau = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (1.1.4.1-6)$$

Zudem repräsentiert die Fluoreszenzlebensdauer die mittlere Verweilzeit $\langle \tau \rangle$ eines Farbstoffmoleküls im angeregten Zustand.

Wechselwirkungen (z.B. Fluoreszenzlöschung) mit der molekularen Umgebung können zu komplexeren Fluoreszenzkinetiken führen. Das Fluoreszenzabklingverhalten der Farbstofflösung setzt sich aus der Überlagerung mehrerer Exponentialfunktionen

$$I_F(t) = \sum_i A_i e^{-k_i t} \quad (1.1.4.1-7)$$

mit $\sum_i A_i = 1$ zusammen.

Prinzipiell lässt sich jedes gemessene Abklingverhalten der Fluoreszenzintensität durch eine Überlagerung von Exponentialfunktionen darstellen. Die durch Datenanpassung (Fit) bestimmten Parameter, die Amplituden A_i und die Fluoreszenzgeschwindigkeiten k_i bzw. Fluoreszenzlebensdauern τ_i , besitzen nicht unbedingt eine physikalisch-chemische Bedeutung, sie müssen nicht mit den spektroskopischen Eigenschaften des untersuchten Systems in Beziehung stehen. Sie sind primär nur das Ergebnis eines mathematischen Optimierungsproblems. Eine physikalisch-chemische Bedeutung bekommen die erhaltenen Parameter A_i und τ_i erst, wenn ein physikalisch-chemisches Modell sie stützt. Das ist zum Beispiel der Fall, wenn i verschiedene, nicht miteinander wechselwirkende Fluorophore zur Fluoreszenz beitragen. Fluorophore können in diesem Zusammenhang verschiedene Farbstoffmoleküle und/oder Farbstoffmoleküle in unterschiedlichen molekularen Umgebungen sein.

Die Fluoreszenzlebensdauer ist empfindlich auf verschiedene chemische und physikalische Faktoren wie pH-Wert, O_2 -Gehalt, Temperatur, Kationen (z.B. Ca^{2+}), Polarität, Bindung an Makromoleküle, Elektronentransfer, Löschmoleküle. Sie ist aber recht unempfindlich gegenüber der Konzentration, z.B. hohe Verdünnung [Lakowicz 1992]. Jedoch tritt bei höheren Konzentrationen Reabsorption und Reemission auf, was die Lebensdauer τ verlängert.

1.1.4.2 Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Gesamtheit der von einer Probe abgegebenen Photonen. Man erhält also ein Maß für die Fluoreszenzintensität, indem man $I_F(t)$ über die Zeit integriert. Stellt man die Fluoreszenzabklingkurve durch eine Schar von monoexponentiellen Abfällen

$$I_F(t) = \sum_i A_i e^{-k_i t} \quad (1.1.4.2-1)$$

dar, ergibt sich für die Intensität F nach einer δ -Puls-Anregung:

$$F \propto \int_0^{\infty} I_F(t) dt = \int_0^{\infty} \sum_i A_i e^{-k_i t} dt = \sum_i A_i \tau_i \quad (1.1.4.2-2)$$

Außerdem ist die Fluoreszenzintensität auch proportional zur Intensität des absorbierten Lichts, wobei die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F die Proportionalitätskonstante ist:

$$F = \Phi_F I_A \quad (1.1.4.2-3)$$

Die absorbierte Lichtintensität ist schwer direkt zu messen. Zweckmäßiger ist es, die Ausgangsintensität I_0 und die Intensität nach Durchstrahlen der Lösung I_T (transmittierte Intensität) zu bestimmen, wobei sich aus der Differenz $I_0 - I_T$ die absorbierte Lichtintensität I_A ergibt:

$$F = \Phi_F (I_0 - I_T) = I_0 \Phi_F \left(\frac{I_0 - I_T}{I_0} \right) \quad (1.1.4.2-4)$$

Der Bruch I_T / I_0 ist für niedrige Konzentrationen mit Hilfe des *Lambert-Beer-Gesetzes*

$$A(\lambda) = \log_{10} \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) c_i d \quad (1.1.4.2-5)$$

zu substituieren:

$$F = \Phi_F I_0 \left(1 - 10^{-\varepsilon(\lambda) c d} \right) \quad (1.1.4.2-6)$$

Für niedrige Konzentrationen ist die Fluoreszenzintensität F also proportional zur Intensität des Anregungslichtes I_0 und zur Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F . Nach Umformungen ergibt sich die Beziehung

$$F \approx 2,303 \Phi_F I_0 \varepsilon(\lambda) c d, \quad (1.1.4.2-7)$$

aus der erkennbar ist, dass für niedrige Konzentrationen an Fluorophoren die Absorption (bzw. optische Dichte $OD = \varepsilon(\lambda) c d$) und die Fluoreszenzintensität F einander ungefähr proportional sind.

Da die Fluoreszenz immer aus dem S_1 -Singulett-Zustand erfolgt und damit eine höherenergetische Anregung keine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften verursachen sollte (*Vavilov-Regel*), ist die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F von der Anregungswellenlänge λ_A unabhängig. Wenn man die Anregungsintensität I_0 , die Konzentration c und die Absorptionsstrecke d konstant hält, ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität F proportional dem Verlauf der Absorption, jeweils in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge λ_A . Es gilt also, dass die auf gleiche Höhe normierte Absorptions- und Anregungsspektren identisch sind für Lösungen,

die lediglich einen Fluorophor enthalten. Existieren in einer Lösung mehrere Fluorophore, die sich entweder in ihrem Absorptions- oder Emissionsspektrum unterscheiden und nicht die gleiche Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F besitzen, so treten Abweichungen zwischen dem Absorptions- und Anregungsspektrum auf. Umgekehrt lässt sich natürlich auch aus Abweichungen zwischen dem Absorptions- und Anregungsspektrum folgern, dass mehrere fluoreszierende Spezies vorliegen oder dass eine Spezies nicht nur aus ihrem S_1 -Singulett-Zustand fluoresziert.

1.1.4.3 Fluoreszenzquantenausbeute

Die Analyse fluoreszenzspektroskopischer Experimente erfordert, die „Stärke“ der Fluoreszenz quantifizieren zu können. Im allgemeinen dient die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F als quantitatives Maß der Fluoreszenz einer Farbstofflösung. Sie ist definiert als Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen N_F zur Anzahl der absorbierten Photonen N_A , unabhängig von deren Energie (Wellenlänge).

$$\Phi_F = \frac{N_F}{N_A} \quad (1.1.4.3-1)$$

Aufgrund der strahlungslosen Relaxationsprozesse des S_1 -Zustands ist $N_A > N_F$ und somit $\Phi_F < 1$. Da jedes von einem Molekül absorbierte Photon bei elektronischer Anregung dieses letztlich in den S_1 -Zustand anregt, ist die Fluoreszenzquantenausbeute auch durch

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k} = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} = k_F \tau = \frac{\tau}{\tau_F} \quad (1.1.4.3-2)$$

(mit $k_{nr} = k_{IC} + k_{ISC}$) gegeben, dem Verhältnis aus der Fluoreszenzgeschwindigkeit („natürliche“ Fluoreszenzgeschwindigkeit) k_F und der Fluoreszenzabklinggeschwindigkeit k ($k_F < k$). Die entsprechenden Fluoreszenzlebensdauern sind τ_F und τ ($\tau_F > \tau$). Die Geschwindigkeit k_{nr} der strahlungslosen Deaktivierung des S_1 -Zustands setzt sich im einfachsten Fall aus der Internal-conversion- k_{IC} und der Intersystem-crossing-Geschwindigkeit k_{ISC} zusammen.

Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt für Rhodamine und Oxazine in etwa $\phi = 0,9$.

1.1.4.4 Fluoreszenzgeschwindigkeit und „natürliche“ Lebensdauer

Neben den Geschwindigkeiten der strahlungslosen Prozesse (k_{IC} , k_{ISC}) ist vor allem die Fluoreszenzgeschwindigkeit k_F für das Verständnis der photophysikalischen

Prozesse innerhalb eines Moleküls von Bedeutung. Diese Geschwindigkeiten bestimmen sowohl die Fluoreszenzquantenausbeute als auch die Fluoreszenzlebensdauer. Dient die Fluoreszenzlebensdauer als Informationsträger für die Diagnostik farbstoffmarkierter Biomoleküle, sollte darüber hinaus die „natürliche“ Fluoreszenzlebensdauer τ_F bekannt sein. Sie stellt eine obere Grenze der Fluoreszenzlebensdauer dar und entspricht der Fluoreszenzlebensdauer bei Abwesenheit aller strahlungslosen Prozesse. Die „natürliche“ Fluoreszenzgeschwindigkeit k_F und die damit verbundene Fluoreszenzlebensdauer τ_F leiteten *Strickler* und *Berg* aus dem Zusammenhang zwischen Lichtabsorption und Lichtemission her [Strickler 1962].

$$k_F = 2,88 \cdot 10^{-12} n^2 \langle \tilde{\nu}_F^{-3} \rangle_{av}^{-1} \int \frac{\varepsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu} \quad (1.1.4.4-1)$$

$$\text{mit } \langle \tilde{\nu}_f^{-3} \rangle_{av}^{-1} = \frac{\int F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int \frac{F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^3}}$$

In dieser *Strickler-Berg-Beziehung* sind n der Brechungsindex des Lösemittels, $\tilde{\nu}$ die Wellenzahl (in cm^{-1}), ε der molare dekadische Extinktionskoeffizient (in $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) und F die stationäre Fluoreszenzintensität. Die Integrale sind über die Hauptabsorptions- bzw. Fluoreszenzbande zu berechnen. Mit Hilfe der *Strickler-Berg-Beziehung* kann der Effekt der molekularen Umgebung auf die Fluoreszenzgeschwindigkeit sowie die „natürliche“ Fluoreszenzlebensdauer abgeschätzt werden.

1.1.5 Fluoreszenzlöschung

Unter Fluoreszenzlöschung versteht man jeden molekularen Prozess, der eine Reduzierung der Fluoreszenzintensität des betrachteten Systems bewirkt. Molekulare Prozesse, die zur Löschung der Fluoreszenz führen, können Energietransfer, Stoßlöschung, chemische Reaktionen aus dem S_1 -Zustand und Komplexbildung im Grundzustand und angeregten Zustand sein.

Beim **Energietransfer** überträgt ein angeregtes Farbstoffmolekül F^* (Donor) seine Anregungsenergie strahlungslos über einen Dipol-Dipol-Mechanismus (*Förster-Transfer*) auf ein geeignetes, in der Nähe befindliches Akzeptor-Molekül.



Für einen Energietransfer muss das Fluoreszenzspektrum des Donormoleküls (Farbstoffmolekül) F mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Moleküls A überlappen [Förster 1948] [Förster 1951].

Bei der **Stoßlöschung**, auch als **dynamische Löschung** bezeichnet, wird die Anregungsenergie des Farbstoffmoleküls F^* durch einen diffusiven Zusammenstoß

mit einem geeigneten Molekül, Ion oder Atom Q auf dieses übertragen. Nach dem Stoß besitzt die Spezies Q erhöhte Translations-, Rotations- oder Schwingungsenergie ($Q \rightarrow Q'$)



Der einfachste Fall der Fluoreszenzlöschung durch **Komplexierung** ist die **statische Löschung** mittels Grundzustandskomplexierung. Hierbei bildet das anzuregende Farbstoffmolekül F mit einem geeigneten Molekül Q einen im Grundzustand stabilen Komplex FQ. Dieser Komplex FQ kann zwar angeregt werden, er fluoresziert jedoch nicht.

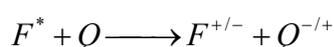
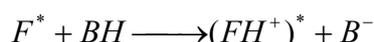


Aufgrund des Gleichgewichts im Grundzustand zwischen Farbstoffmolekül F und Molekül Q auf der einen und Komplex FQ auf der anderen Seite, vermindert sich die Anzahl der in der Lösung befindlichen, zur Fluoreszenz anregbaren Moleküle F. Kompleziert das Molekül Q das Farbstoffmolekül im angeregten Zustand (F^*), spricht man von **Exciplex-Bildung** (excited complex).



Der gebildete Exciplex FQ^* ist nur im angeregten Zustand stabil und zerfällt strahlend und/oder strahlungslos in den jeweiligen Grundzustand der Moleküle F und Q.

Auch **chemische Reaktionen** können den S_1 -Zustand strahlungslos deaktivieren. Hier sind vor allem Umlagerungs-, Protonentransfer- und Elektronentransferreaktionen zu nennen. Diese Reaktionen sind als strahlungslose Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz aus dem S_1 -Zustand von Bedeutung.



Neben dem Studium prinzipieller Phänomene lohnt die Untersuchung der Fluoreszenzlöschung im Hinblick auf biochemische Anwendungen.

Im folgenden werden die dynamische und die statische Fluoreszenzlöschung behandelt. Nachfolgend wird ein umfassenderes Modell zur Fluoreszenzlöschung beschrieben.

Diffusionskontrollierte, bimolekulare Geschwindigkeit

Für intermolekulare Löschexperimente lässt sich die Stoßzahl Z eines Farbstoffmoleküls F mit einem Löschmolekül Q leicht angeben. Die Stoßzahl Z (in s^{-1}) ist proportional zur Konzentration der Löschmoleküle [Q] (in $mol\ l^{-1}$) sowie zur diffusionskontrollierten, bimolekularen Geschwindigkeit k_{diff} ($l\ mol^{-1}\ s^{-1}$).

$$Z = k_{diff}[Q] \quad (1.1.5-1)$$

Die diffusionskontrollierte, bimolekulare Geschwindigkeit k_{diff} kann mit der *Smoluchowski-Gleichung* [Smoluchowski 1917] [Sveshnikoff 1935] [Birks 1973] berechnet werden. Befindet sich innerhalb des Radius R_0 um das Farbstoffmolekül F kein Löschmolekül Q, besteht ein Konzentrationsgradient bezüglich Q. Den Fluss von Q in die durch F und R_0 definierte Kugel beschreibt das *Zweite Fick-Diffusionsgesetz*

$$\frac{\partial[Q]}{\partial t} = D_{F,Q} \nabla^2[Q]. \quad (1.1.5-2)$$

Der Radius R_0 entspricht dem Stoßabstand.

Mit der Nebenbedingung, dass auf der Oberfläche der durch F und R_0 beschriebenen Kugel $[Q] = 0$ gilt, liefert die Lösung von obiger Gleichung die *Smoluchowski-Gleichung*:

$$k_{diff} = k(t) = 4\pi R_0 D_{F,Q} N' \left(1 + \frac{R_0}{\sqrt{\pi D_{F,Q} t}} \right) \quad (1.1.5-3)$$

mit k_{diff} in $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Die Lösung dieser Gleichung ergibt den Fluss

$$\Phi_Q = k(t) [Q], \quad (1.1.5-4)$$

wobei $[Q]$ die Konzentration von Q in mol l^{-1} ist.

Der Diffusionskoeffizient $D_{F,Q}$ berücksichtigt durch $D_{F,Q} = D_F + D_Q$ die simultane Diffusion beider Spezies F und Q, wobei D_F und D_Q die Diffusionskoeffizienten der Moleküle F bzw. Q sind. Um mit letzterer Gleichung k_{diff} (in $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zu erhalten, werden R_0 in cm und $D_{F,Q}$ in $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ eingesetzt, wobei $N' = N_A/1000$ ($N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) verwendet wird. Der Stoßabstand ergibt sich aus der Summe der Molekülradien (*van-der-Waals-Radien*) von F und Q: $R_0 = R_F + R_Q$. Die Diffusionskoeffizienten D_i (i: F, Q) sind entweder experimentell oder theoretisch durch die *Stokes-Einstein-Gleichung*

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_i} \quad (1.1.5-5)$$

(in $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$) mit der Lösemittelviskosität η und dem *van-der-Waals-Radius* R_i (in m) bestimmbar, wobei T die Temperatur und k_B die *Boltzmann-Konstante* ($k_B = 1,3806 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) sind.

Unter Vernachlässigung des zeitabhängigen (transienten) Terms erhält man

$$k_{diff} = 4\pi R_0 D_{F,Q} N' \quad (1.1.5-6)$$

(in $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zur Abschätzung der diffusionskontrollierten, bimolekularen Geschwindigkeit.

Für annähernd gleich große Moleküle F und Q ($R \approx R_F \approx R_Q$) ist mit der *Stokes-Einstein*-Gleichung die diffusionskontrollierte, bimolekulare Geschwindigkeit von der Molekülgröße unabhängig:

$$k_{diff} = \frac{8000RT}{3\eta} \quad (1.1.5-7)$$

(in $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

Bei Raumtemperatur beträgt die diffusionskontrollierte, bimolekulare Geschwindigkeit in Wasser ($\eta = 1 \text{ mPa s}$) $k_{diff} \approx 6,5 \cdot 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Da im allgemeinen nicht jeder Stoß zwischen dem Farbstoffmolekül F und dem Molekül Q „reaktiv“ im Sinne der dynamischen Fluoreszenzlöschung bzw. der Bildung eines Grundzustandskomplexes ist, ist die entsprechend beobachtete Geschwindigkeit k_q geringer als k_{diff} . In Gleichung

$$k_q = \gamma k_{diff} \quad (1.1.5-8)$$

gibt γ den Anteil der „reaktiven“ Stöße an.

Die im folgenden beschriebenen Modelle der Fluoreszenzlöschung gelten für den Fall schwacher Anregung, das heißt, nur ein geringer Bruchteil der vorhandenen Farbstoffmoleküle absorbiert das Anregungslicht und gelangt in den angeregten Zustand. Dadurch ändert sich in guter Näherung die Konzentration der Farbstoffmoleküle im Grundzustand nicht.

Es treten durch die Anregung auch Sättigungseffekte auf.

1.1.5.1 Dynamische Löschung

Relaxiert ein angeregtes Farbstoffmolekül F^* strahlungslos aus dem S_1 -Zustand durch einen Stoß mit einem geeigneten Löschmolekül Q, spricht man von dynamischer Fluoreszenzlöschung. In Abbildung 1.1.5.1-1 ist die dynamische Löschung schematisch dargestellt.

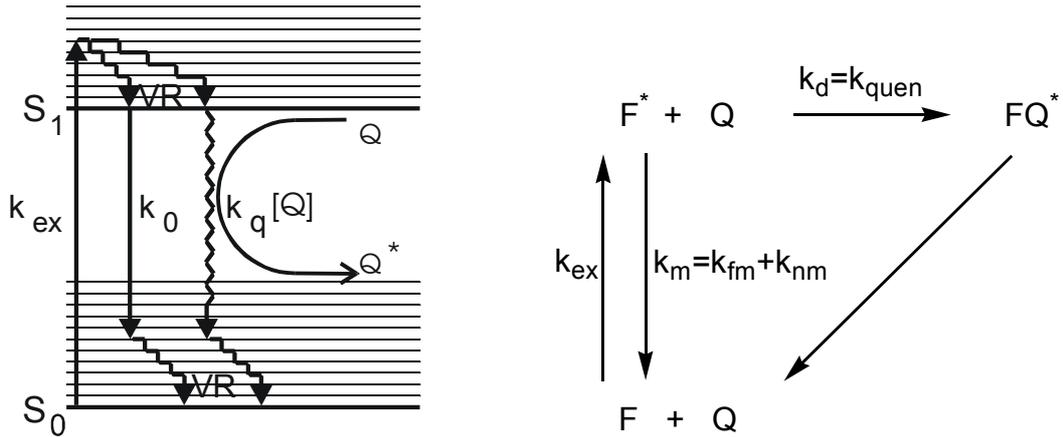


Abbildung 1.1.5.1-1: Vereinfachtes Energieschema und Reaktionsschema der dynamischen Löschung („Stoßlöschung“) eines Fluorophors aus dem ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustand S_1 durch ein Löschmolekül Q .

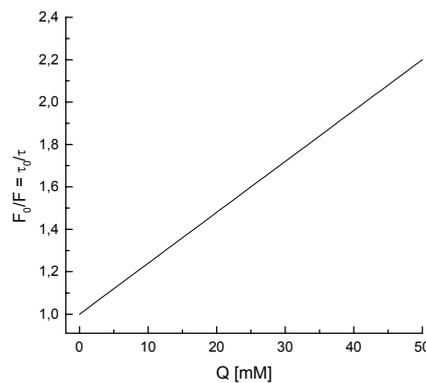


Abbildung 1.1.5.1-2: Dynamische Löschung eines Fluoreszenzfarbstoffes im ersten angeregten Singulett-Zustand S_1 (F^*) durch Löschmoleküle Q . Verlauf von F_0/F und τ_0/τ nach Gleichung 1.1.5.1-14 mit $\tau_0 = 4 \text{ ns}$ und $k_{q,dyn} = 6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Für die Kinetik der Konzentration des S_1 -Zustands $[F^*]$ gilt

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -k[F^*] + I_{ex}(t) \quad (1.1.5.1-1)$$

in Abwesenheit bzw.

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -(k + k_{q,dyn}[Q])[F^*] + I_{ex}(t) \quad (1.1.5.1-2)$$

in Anwesenheit von Löschmolekülen. k entspricht nach $k = k_f + k_{IC} + k_{ISC}$ (Gl. 1.1.4.1-2) der Fluoreszenzabklinggeschwindigkeit der reinen Farbstofflösung unter sonst gleichen Bedingungen. Die zeitabhängige Anregungsintensität ist durch $I_{ex}(t)$ dargestellt.

Erfolgt die Anregung mit einem δ -Puls ($I_{\text{ex}}(t) = I_{\text{ex}}(0)$), so liefert die Integration der beiden Gleichungen unter der Nebenbedingung $[F^*(t=0)] = [F_0^*]$ folgende Konzentrations- bzw. Fluoreszenzintensitätsverläufe:

$$[F^*(t)] = [F_0^*] e^{-kt} \quad (1.1.5.1-3)$$

$$I_F(t) = k_F [F^*(t)] = k_F [F_0^*] e^{-kt} \quad (1.1.5.1-4)$$

$$[F^*(t)] = [F_0^*] e^{-(k+k_{q,\text{dyn}}[Q])t} \quad (1.1.5.1-5)$$

$$I_F(t) = k_F [F^*(t)] = k_F [F_0^*] e^{-(k+k_{q,\text{dyn}}[Q])t} \quad (1.1.5.1-6)$$

Bei Anwesenheit von Löschmolekülen Q relaxiert der S_1 -Zustand neben den in k enthaltenen Prozessen zusätzlich durch Stöße mit der Stoßkonstante $k_{\text{qu}} = k_{q,\text{dyn}} [Q]$ in den Grundzustand (F). Beim Stoß bildet sich ein Begegnungskomplex FQ^* , der schnell in die Grundzustandsmoleküle zerfällt.

Für das Verhältnis der Fluoreszenzabklinggeschwindigkeiten mit und ohne Löschmolekül folgt:

$$\frac{k + k_{q,\text{dyn}}[Q]}{k} = 1 + \tau_0 k_{q,\text{dyn}}[Q] = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (1.1.5.1-7),$$

mit den Fluoreszenzabklingzeiten $\tau = (k + k_{q,\text{dyn}}[Q])^{-1}$ mit Löschmolekül und $\tau = k^{-1}$ ohne Löschmolekül. Mit Hilfe dieser Gleichung kann die Geschwindigkeit der dynamischen Fluoreszenzlöschung $k_{q,\text{dyn}}$ aus den bei verschiedenen Löschmolekülkonzentrationen gemessenen Fluoreszenzlebensdauern bestimmt werden. Die Gleichung ist die *Stern-Volmer*-Gleichung für die dynamische Fluoreszenzlöschung (Stoßlöschung). Durch Auftragung von τ_0 / τ gegen $[Q]$ erhält man aus der Geradensteigung, die der *Stern-Volmer*-Konstanten $K_D = \tau_0 k_{q,\text{dyn}}$ entspricht, die Geschwindigkeit der dynamischen Fluoreszenzlöschung $k_{q,\text{dyn}}$.

Neben der Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer erniedrigt die dynamische Fluoreszenzlöschung die Fluoreszenzintensität I_F und damit die Zählrate beim zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen, wie

$$I_F(t) = k_F [F^*(t)] = k_F [F_0^*] e^{-(k+k_{q,\text{dyn}}[Q])t} \quad (1.1.5.1-8)$$

veranschaulicht. Unter stationären Bedingungen ($I_{\text{ex}}(t) = I_{\text{ex}}$, $-d[F^*]/dt = 0$) folgt aus Gleichung 1.1.5.1-1 bzw. 1.1.5.1-2:

$$0 = k[F^*] - I_{\text{ex}} \quad (1.1.5.1-9)$$

$$0 = (k + k_{q,\text{dyn}}[Q])[F^*] - I_{\text{ex}} \quad (1.1.5.1-10)$$

Durch Umformung nach $[F^*]$ und Multiplikation mit der Fluoreszenzgeschwindigkeit k_f erhält man die jeweilige stationäre Fluoreszenzintensität $F = k_f [F^*]$ ohne (F_0) und mit Löschmolekülen (F).

$$F_0 = \frac{I_{\text{ex}}}{k} \quad (1.1.5.1-11)$$

$$F = \frac{I_{ex}}{k + k_{q,dyn}[Q]} \quad (1.1.5.1-12)$$

Bei gleicher Anregungsintensität liefert die Division von Gleichung 1.1.5.1-11 mit 1.1.5.1-12 die *Stern-Volmer*-Gleichung (1.1.5.1-13) für den stationären Fall. Für dynamische Löschung ist Gleichung 1.1.5.1-13 identisch mit Gleichung 1.1.5.1-7. Somit kann im Falle rein dynamischer Fluoreszenzlöschung die gleiche Information (dynamische Löschkonstante $k_{q,dyn}$) mittels stationärer bzw. zeitaufgelöster Fluoreszenzexperimente gewonnen werden.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \tau_0 k_{q,dyn}[Q] = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (1.1.5.1-13)$$

1.1.5.2 Statische Löschung

Bei statischer Löschung bildet sich zwischen Farbstoffmolekül F und Löschmolekül Q im Grundzustand ein Komplex FQ aus, der Licht absorbieren kann, aber keinerlei Fluoreszenz zeigt. Abbildung 1.1.5.2-1 zeigt schematisch die statische Löschung. Im Grundzustand befinden sich Komplex FQ-, Farbstoff F- und Löschmoleküle Q im thermodynamischen Gleichgewicht. Die Komplexbildungskonstante (Assoziationskonstante) K_g ist gegeben durch

$$K_g = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad (1.1.5.2-1)$$

Bei Anwesenheit von Löschmolekülen der Konzentration [Q] reduziert die Komplexbildung die Konzentration des freien, nicht komplexierten Farbstoffs auf $[F] = [F]_0 - [FQ]$, wobei $[F]_0$ die Anfangskonzentration des Farbstoffs ist. Sowohl der Farbstoff als auch der Komplex werden durch Lichtabsorption angeregt, jedoch zeigt nur der Farbstoff Fluoreszenz. Der angeregte Komplex FQ^* zerfällt sehr schnell (instantan) strahlungslos (k_{nc}) in den Grundzustand. Eine Fluoreszenz des angeregten Komplexes ist nicht vorhanden bzw. auf der Zeitskala des Experimentes nicht nachweisbar. Die Grundzustandskomplexierung beeinflusst nicht die Fluoreszenzkinetik des freien Farbstoffs ($\tau_0 / \tau = 1$), die durch $[F^*(t)] = [F_0^*] e^{-kt}$ beschrieben wird. Jedoch ändert sie die stationäre Fluoreszenzintensität.

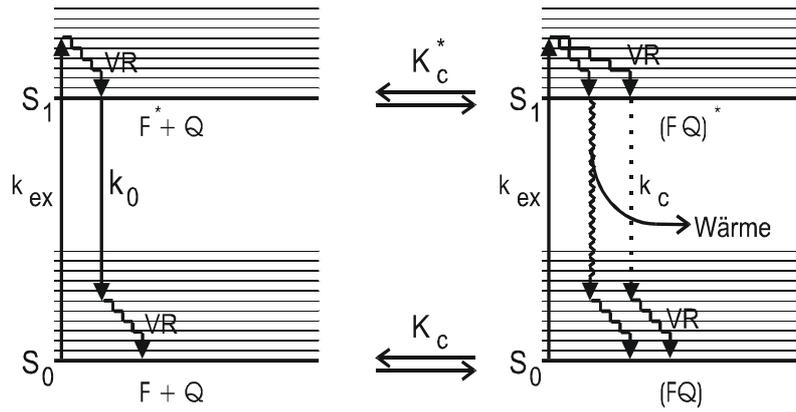


Abbildung 1.1.5.2-1: Vereinfachtes Energieschema der statischen Löschung eines Fluorophors durch Bildung eines Grundzustandskomplexes zwischen Fluorophor und Löschmolekül Q.

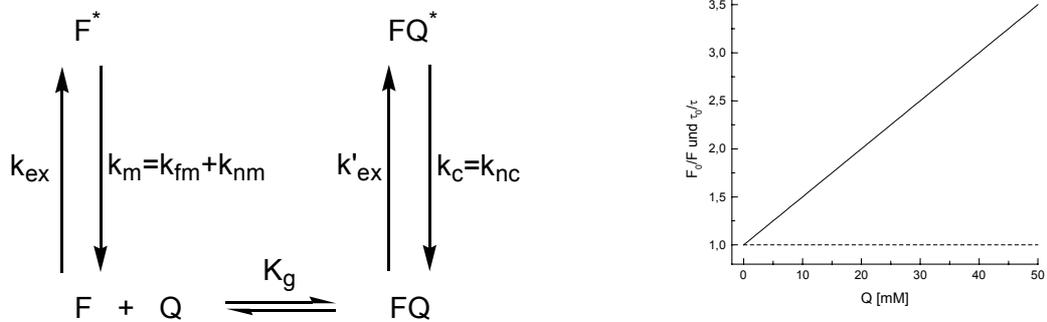


Abbildung 1.1.5.2-2: Statische Löschung eines Fluoreszenzfarbstoffes durch Bildung eines nichtfluoreszierenden Grundzustandskomplex mit einem Löschmolekül Q. Links: Reaktionsschema. Rechts: Verlauf von F_0/F (—) nach Gleichung 1.1.5.2-3 und $\tau_0/\tau = 1$ (- - -) mit $K_S = 50 M^{-1}$.

Aus der Massenbilanz des Farbstoffs $[F]_0 = [F] + [FQ]$ und der Komplexbildungskonstante ergibt sich über

$$K_g = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} \tag{1.1.5.2-2}$$

der folgende Ausdruck für das Konzentrationsverhältnis des nicht komplexierten, fluoreszierenden Farbstoffs unter stationären Bedingungen:

$$\frac{[F]_0}{[F]} = 1 + K_g [Q] \tag{1.1.5.2-3}$$

Da der Komplex nicht fluoresziert, ist die jeweilige stationäre Fluoreszenzintensität der Lösung proportional zur entsprechenden Konzentration des freien Farbstoffs. Man erhält für das Verhältnis der stationären Fluoreszenzintensitäten ohne F_0 und mit Löschmolekülen Q:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_g [Q] = 1 + K_s [Q] \tag{1.1.5.2-4}$$

Die Komplexbildungskonstante K_g kann im Falle rein statischer Löschung durch lineare Auftragung der *Stern-Volmer*-Gleichung (1.1.5.2-3) aus der Geradensteigung erhalten werden. Die statische *Stern-Volmer*-Konstante K_S ist mit der Komplexbildungskonstanten K_G identisch.

1.1.5.3 Kombinierte statische und dynamische Löschung

Häufig wird ein Farbstoff sowohl dynamisch als auch statisch in seiner Fluoreszenz gelöscht. Dies ist in Abbildung 1.1.5.3-1 schematisch dargestellt. Die Komplexbildung eines Teils der ursprünglich vorhandenen Farbstoffmoleküle im Grundzustand durch Löschmoleküle Q nach Gleichung 1.1.5.2-1 reduziert die Zahl der freien, fluoreszenzfähigen Farbstoffmoleküle um den Faktor

$$\alpha = [F] / [F]_0 = (1 + K_g [Q])^{-1} \quad (1.1.5.3-1)$$

(vergleiche Gleichung 1.1.5.2-3).

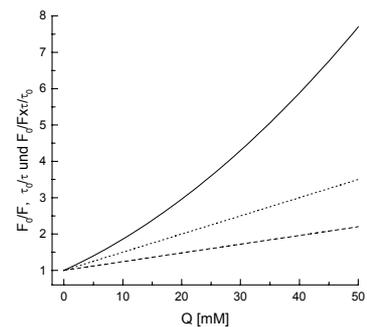
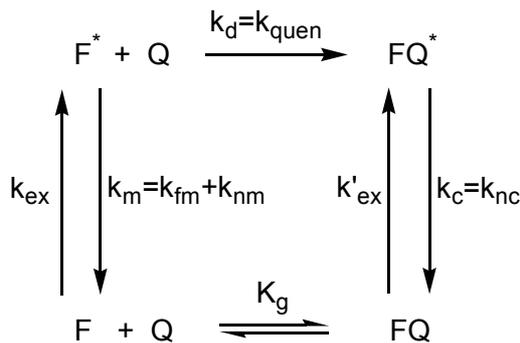


Abbildung 1.1.5.3-1: Statische und dynamische Löschung eines Fluoreszenzfarbstoffes durch Bildung eines nichtfluoreszierenden Grundzustandskomplex mit einem Löschmolekül Q sowie Stoßlöschung des angeregten Farbstoffmoleküls F^* durch Löschmoleküle Q . Links: Reaktionsschema. Rechts: Verlauf von F_0/F (—) nach Gleichung 1.1.5.2-4, τ_0/τ nach Gleichung 1.1.5.1-14 (- - -) und $F_0/Fx \cdot \tau/\tau_0 = 1 + K_S [Q]$ (.....) mit $\tau_0 = 4 \text{ ns}$ und $k_{q,\text{dyn}} = 6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $K_S = 50 \text{ M}^{-1}$.

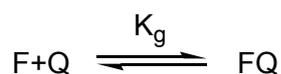
Für eine dynamische Löschung (mit der Geschwindigkeit $k_{\text{quen}} = k_{q,\text{dyn}} [Q]$) steht eine um den Faktor α geringere Konzentration an Farbstoffmolekülen für die Anregung in den S_1 -Zustand und damit zur Fluoreszenz und deren dynamischer Löschung zur Verfügung (Gleichung 1.1.5.2-4). Für das Verhältnis der stationären Fluoreszenzintensitäten ohne F_0 und mit Löschmolekülen Q gilt somit:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_g [Q]) (1 + \tau_0 k_{q,\text{dyn}} [Q]) = (1 + K_g [Q]) \frac{\tau_0}{\tau} \quad (1.1.5.3-2)$$

Im Falle kombinierter statischer und dynamischer Löschung hängt nach Gleichung 1.1.5.3-2 das Verhältnis der stationären Fluoreszenzintensitäten (F_0 / F) quadratisch von der Löschmolekülkonzentration ab, deutlich sichtbar in der zur Ordinate konkaven Abweichen vom linearen Verlauf. Der dynamische Anteil der beobachteten Fluoreszenzlöschung ($\tau_0 / \tau = 1 + \tau_0 k_{q,dyn} [Q]$) kann mit Hilfe von zeitaufgelösten Experimenten bestimmt werden.

1.1.6 Grundzustandskomplexierung

Die Gleichgewichtskonstante K_g des im Grundzustand vorhandenen Gleichgewichts zwischen Farbstoffmolekül F und Löschmolekül Q auf der einen Seite und Farbstoff-Löschmoleküle-Komplex FQ auf der anderen Seite bestimmt man mit einer spektrometrischen Titration. Ausgehend vom Absorptionsspektrum der reinen Farbstofflösung werden die entsprechenden Absorptionsspektren nach definierter Löschmolekül-Zugabe in Abhängigkeit von der jeweiligen Löschmolekül-Konzentration gemessen.



Die Gleichgewichtskonstante K_g ist durch Gleichung 2.3.16 gegeben:

$$K_g = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad (1.1.5.2-1)$$

Für die Absorption des reinen Farbstoffs $A_0(\lambda)$ mit der Anfangskonzentration $[F]_0$ gilt:

$$A_0(\lambda) = \varepsilon_F(\lambda)[F]_0 d \quad (1.1.6-1).$$

Existiert im gesamten Absorptionsspektrum ein Bereich, bei dem nur der Farbstoff und der Komplex, nicht aber der Löschmoleküle zur Gesamtabsorption $A(\lambda)$ beitragen, gibt Gleichung 1.1.6-2 für diesen Bereich die Gesamtabsorption an. Die von der Löschmolekül-Konzentration abhängigen Absorptionen von Farbstoff $A_F(\lambda) = \varepsilon_F(\lambda) [F] d$ und Komplex $A_{FQ}(\lambda) = \varepsilon_{FQ}(\lambda) [FQ] d$ addieren sich zur Gesamtabsorption $A(\lambda)$.

$$A(\lambda) = \varepsilon_F(\lambda) [F] d + \varepsilon_{FQ}(\lambda) [FQ] d \quad (1.1.6-2)$$

Dabei sind $[F]$ und $[FQ]$ die Gleichgewichtskonzentrationen von Farbstoff und Komplex, die sich nach Gleichung 1.1.5.2-1 einstellen, wenn zu einer reinen Farbstofflösung der Konzentration $[F]_0$ Löschmoleküle entsprechend einer Ausgangskonzentration $[Q]_0$ zugegeben wird. Die zugehörigen Extinktionskoeffizienten sind $\varepsilon_F(\lambda)$ bzw. $\varepsilon_{FQ}(\lambda)$, und die Schichtdicke ist d . Für „kleine“ Gleichgewichtskonstanten kann für $[F]_0 \ll [Q]_0$ angenommen werden, dass sich die

Löschmolekül-Konzentration durch die Komplexbildung nicht ändert. Die Löschmolekül-Konzentration $[Q]$ im Gleichgewicht entspricht somit der Ausgangskonzentration $[Q]_0$ der Löschmoleküle. Das heißt, es gilt $[Q] \approx [Q]_0$. Mit den Gleichungen 1.1.6-1 und 1.1.6-2 folgt für das Verhältnis A / A_0 der Absorptionen der Lösung mit Farbstoff und Löschmolekülen zur reinen Farbstofflösung die Gleichung 1.1.6-3.

$$\frac{A(\lambda)}{A_0(\lambda)} = \frac{\varepsilon_F(\lambda) [F] d + \varepsilon_{FQ}(\lambda) [FQ] d}{\varepsilon_F(\lambda) [F]_0 d} \quad (1.1.6-3)$$

Mit Gleichung 1.1.5.2-1 kann die Konzentration des Komplexes $[FQ]$ ersetzt werden.

$$\frac{A(\lambda)}{A_0(\lambda)} = \frac{[F]}{[F]_0} \left(1 + \frac{\varepsilon_{FQ}(\lambda)}{\varepsilon_F(\lambda)} K_g [Q] \right) \quad (1.1.6-4)$$

Anhand von Gleichung 2.3.16 wird auch das Konzentrationsverhältnis $[F] / [F]_0$ mit $1 / (1 + K_g [Q])$ ersetzt.

$$\frac{A(\lambda)}{A_0(\lambda)} = \frac{1}{1 + K_g [Q]} \left(1 + \frac{\varepsilon_{FQ}(\lambda)}{\varepsilon_F(\lambda)} K_g [Q] \right) \quad (1.1.6-5)$$

Durch Umformen ergibt sich die von *Nash* [Nash 1960] hergeleitete Beziehung (Gleichung 1.1.6-6) für die spektrometrische Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_g der oben aufgeführten Gleichgewichtsreaktion.

$$\frac{1}{[Q]} = \left(K_g - \frac{\varepsilon_{FQ}(\lambda)}{\varepsilon_F(\lambda)} K_g \right) \frac{A_0(\lambda)}{A_0(\lambda) - A(\lambda)} - K_g \quad (1.1.6-6)$$

Durch Auftragen von $1 / [Q]$ gegen $A_0(\lambda) / (A_0(\lambda) - A(\lambda))$ erhält man aufgrund der Linearität von Gleichung 1.1.6-6 die Gleichgewichtskonstante K_g direkt aus dem Achsenabschnitt. Somit kann aus der Geradensteigung das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{FQ}(\lambda) / \varepsilon_F(\lambda)$ von Komplex FQ zu Farbstoff F bestimmt werden. Da der Extinktionskoeffizient zumindest bei der Wellenlänge der langwelligsten Absorption bekannt ist, kann dieser aufgrund des Absorptionsspektrums bei jeder Wellenlänge angegeben werden. Mit der Kenntnis des Verhältnisses $\varepsilon_{FQ}(\lambda) / \varepsilon_F(\lambda)$ kann das Absorptionsspektrum des Komplexes $A_{FQ}(\lambda)$ berechnet werden. Die Kombination der Gleichungen 1.1.6-2 und 1.1.5.2-1 liefert die Absorption des Komplexes $A_{FQ}(\lambda)$ im Gleichgewicht.

$$A_{FQ}(\lambda) = A(\lambda) - \frac{A_0(\lambda)}{1 + K_g [Q]} = \varepsilon_{FQ}(\lambda) [FQ] d \quad (1.1.6-7)$$

Bei bekanntem Absorptionsspektrum der reinen Farbstofflösung lässt sich durch Messung der Gleichgewichtskonstanten der Grundzustandskomplexierung des Farbstoffs F durch die Löschmoleküle Q das Absorptionsspektrum des Komplexes FQ ermitteln.

1.1.7 Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer

Die nach Ankopplung an Tryptophan-haltige Peptide oder durch Zugabe von Tryptophan beobachtete Fluoreszenzlöschung wird einer Elektronentransferreaktion zugeschrieben. Die Thermodynamik stützt das Modell des Elektronentransfers zwischen Tryptophan und angeregten Farbstoffmolekülen.

Dieser Abschnitt skizziert die thermodynamischen und die kinetischen Aspekte des photoinduzierten Elektronentransfers.

1.1.7.1 Thermodynamik des photoinduzierten Elektronentransfers

Beim photoinduzierten Elektronentransfer findet die Elektronentransferreaktion (Redoxreaktion) intermolekular zwischen zwei Molekülen oder intramolekular zwischen zwei Teilmolekülen statt, wobei eines zuvor durch Absorption von Licht in den ersten angeregten Zustand überführt wurde, während sich das andere im Grundzustand befindet. Ein im S_1 -Zustand befindliches Molekül besitzt im Vergleich zu seinem Grundzustand neben spektroskopischen Unterschieden veränderte Redox-eigenschaften und kann über einen Elektronentransfer strahlungslos in einen anderen Zustand reagieren. Die veränderten Redox-eigenschaften sind in Abbildung 1.1.7.1-1 schematisch dargestellt.

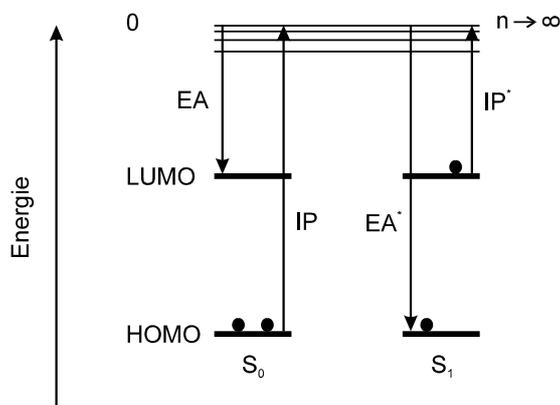


Abbildung 1.1.7.1-1: Vergleich der Redox-eigenschaften eines Moleküls im Grundzustand S_0 und im ersten angeregten Zustand S_1 .

Die Lichtabsorption hebt ein Elektron aus dem HOMO (höchstes besetztes Molekül-orbital) in das LUMO (niedrigstes unbesetztes Molekül-orbital) an. Das Molekül befindet sich nun im ersten angeregten Zustand S_1 . Die im Grundzustand als HOMO und LUMO bezeichneten Molekül-orbitale sind nach der Anregung jeweils mit einem Elektron besetzt. Dadurch wird bei der Anlagerung eines Elektrons aus unendlicher

Entfernung mehr Energie frei als beim entsprechenden Prozess im Grundzustand. Für die Elektronenaffinitäten im S_0 - und S_1 -Zustand gilt $EA > EA^*$, wobei $EA, EA^* < 0$ sind. Die Ionisierung, das heißt die Entfernung eines Elektrons, erfordert wie in Abbildung 1.1.7.1-1 dargestellt im S_1 -Zustand eine geringere Energie als im Grundzustand ($IP > IP^*$). Ein Molekül im S_1 -Zustand wird somit um die Energiedifferenz $E_{0,0}$ zwischen $S_0(v=0)$ - und $S_1(v=0)$ -Zustand sowohl leichter reduziert als auch oxidiert. Die Übergangsenergie $E_{0,0}$ ist der Mittelwert aus der Photonenenergie des langwelligsten Absorptionsmaximums und des kurzwelligsten Emissionsmaximums [Grabowski 1976]. Für die Redoxpotentiale des angeregten Farbstoffes gilt:

$$E_{Ox}^0 = E^0(F^+ / F^*) = E^0(F^+ / F) - E_{0,0} \quad (1.1.7.1-1)$$

$$E_{Red}^0 = E^0(F^* / F^-) = E^0(F / F^-) + E_{0,0} \quad (1.1.7.1-2)$$

Der Ablauf einer Redoxreaktion hängt von den Redoxeigenschaften der Reaktionspartner ab. Wie in Abbildung 1.1.7.1-2 dargestellt, oxidiert ein Akzeptor-Molekül A ein angeregtes Farbstoffmolekül F^* , während ein Donormolekül D es reduziert.

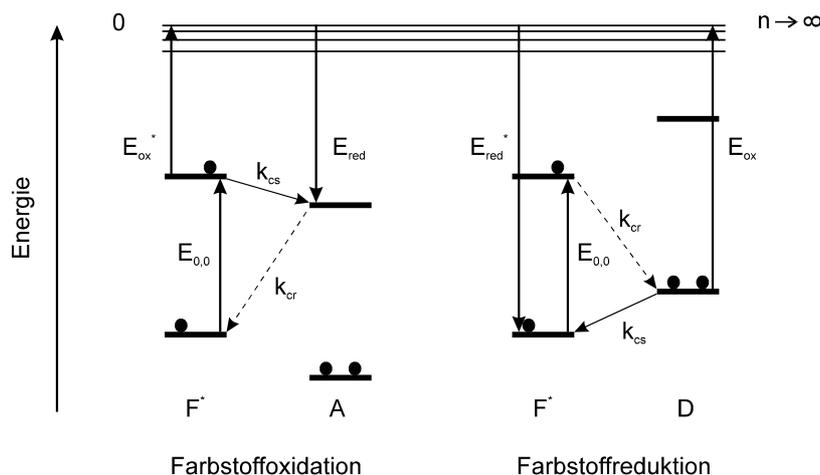


Abbildung 1.1.7.1-2: Energieschema für den photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem angeregten Farbstoffmolekül F^* und einem Akzeptor-Molekül A bzw. einem Donormolekül D.

Der Ablauf der Elektronentransferreaktion hängt von der Freien Reaktionsenthalpie der Ladungstrennung (charge separation) ΔG_{cs}^0 ab. In der Gasphase bestimmt die Elektronenaffinität und die Ionisierungsenergie des Donor-Akzeptor-Paares ΔG_{cs}^0 . Beim photoinduzierten Elektronentransfer verändert die Übergangsenergie $E_{0,0}$ des angeregten Moleküls ΔG_{cs}^0 zusätzlich. In Lösung müssen statt der Ionisierungsenergie und der Elektronenaffinität entsprechend die elektrochemischen Oxidations- und Reduktionspotentiale, welche die Solvatationsterme ($\Delta G_D^{0+}, \Delta G_A^{0-}$) der

entstandenen Ionen (D^+ , A^-) enthalten, verwendet werden [Julliard 1983] [Chanon 1988] [Tanner 1989] [Kavarnos 1993].

$$IP = E^0(D^+ / D) - \Delta G_{D^+}^0 + const. \quad (1.1.7.1-3)$$

$$EA = E^0(A / A^-) + \Delta G_{A^-}^0 + const. \quad (1.1.7.1-4)$$

Die Freie Reaktionsenthalpie der Ladungstrennung ΔG_{cs}^0 nach der Farbstoffanregung kann mit der *Rehm-Weller*-Gleichung (1.1.7.1-5) berechnet werden [Rehm 1969]. Für $\Delta G_{cs} < 0$ läuft die Reaktion spontan ab.

$$\Delta G_{cs}^0 = E_{Ox}^0 - E_{Red}^0 - E_{0,0} + \Delta G_{solv}^0 \quad (1.1.7.1-5)$$

Für eine Farbstoffoxidation ist $E_{Ox}^0 = E^0(F^+ / F)$ und $E_{Red}^0 = E^0(A / A^-)$.

Für eine Farbstoffreduktion ist $E_{Ox}^0 = E^0(D^+ / D)$ und $E_{Red}^0 = E^0(F / F^-)$.

Der Term ΔG_{solv}^0 beinhaltet das *Coulomb*-Potential zwischen D^+ und A^- sowie Korrekturen bezüglich der Lösemittelpolarität, falls die Redoxpotentiale nicht im gleichen Lösemittel bestimmt wurden, in dem ΔG_{cs}^0 des photoinduzierten Elektronentransfer berechnet werden soll [Weller 1982].

1.1.7.2 Kinetische Aspekte des photoinduzierten Elektronentransfers

Intermolekularer Fall

Die kinetischen Aspekte des intermolekularen photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem angeregtem Akzeptor-Molekül A^* und einem Donormolekül D sind in Abbildung 1.1.7.2-1 schematisch dargestellt.

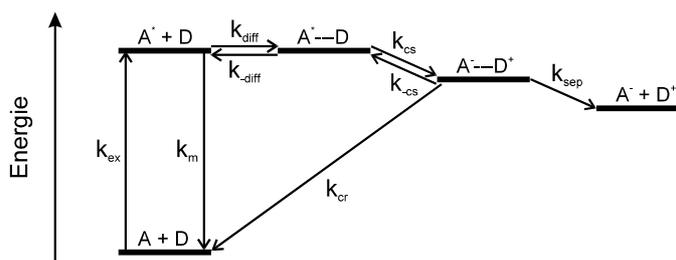


Abbildung 1.1.7.1-2: Energieschema für den intermolekularen photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem angeregtem Akzeptor-Molekül A^* und einem Donormolekül D .

Mit der farbstoffeigenen (vergleiche Abbildung 1.1.5.1-2), unimolekularen Relaxation k_m des S_1 -Zustands konkurriert die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante k_q der Stoßlöschung des angeregten Farbstoffs A^* durch Löschmoleküle D . Hierzu müssen die Stoßpartner A^* und D über Diffusion zu einem Begegnungskomplex $A^* \cdots D$ innerhalb eines Solvenskäfigs zusammentreffen. Der Zentren-

abstand der Moleküle innerhalb diese Komplexes beträgt typischerweise ca. 7 Å entsprechend dem Kontaktabstand sphärischer Moleküle mit einem Radius von 3...4 Å. Planare Moleküle können bedingt durch ihre Geometrie einen kürzeren Abstand zueinander einnehmen. Während der Lebensdauer des Begegnungskomplexes $A^* \cdots D$ von ca. $10^{-9} \dots 10^{-10}$ s ereignen sich zahlreiche Stöße zwischen den beiden Molekülen A^* und D , die reaktiv oder dissoziativ sein können [Kavarnos 1993].

Die für die Stoßlöschung erforderliche Begegnung erfolgt bimolekular aufgrund der Diffusion beider Moleküle mit der Geschwindigkeit k_{diff} . Der entstandene Begegnungskomplex $A^* \cdots D$ kann nun wieder in seine Vorläufermoleküle A^* und D mit der Dissoziationskonstante k_{-diff} zerfallen, oder es findet innerhalb des Begegnungskomplexes ein Elektronentransfer zu einem ladungstrennten Komplex $A^- \cdots D^+$ mit der Geschwindigkeit k_{cs} statt. Im Falle von Abbildung 1.1.7.1-2 ist das Löschmolekül der Elektronendonator und das angeregte Farbstoffmolekül der Elektronenakzeptor. Der Komplex $A^- \cdots D^+$ kann bezüglich der Ladungstrennung mit der Geschwindigkeit k_{cr} in den Grundzustand rekombinieren (charge recombination) oder in die getrennten Ionen $A^- + D^+$ mit der Geschwindigkeit k_{sep} dissoziieren.

Die Kinetik des S_1 -Zustands des Farbstoffs beschreibt Gleichung 1.1.7.2-1.

$$-\frac{d[A^*(t)]}{dt} = k_m[A^*(t)] + k_{diff}[D][A^*(t)] - k_{-diff}[A^* \cdots D(t)] - I_{ex}(t) \quad (1.1.7.2-1)$$

Mit der Annahme der Quasistationarität für den Begegnungskomplex $A^* \cdots D$ und den ladungstrennten Komplex $A^- \cdots D^+$ folgt eine Löschgeschwindigkeit k_q (Gleichung 1.1.7.2-3), für die Gleichung 1.1.7.2-1 in 1.1.7.2-2 umgeschrieben werden kann.

$$-\frac{d[A^*(t)]}{dt} = k_m[A^*(t)] + k_q[D][A^*(t)] - I_{ex}(t) \quad (1.1.7.2-2)$$

$$k_q = \frac{k_{diff}}{1 + \frac{k_{-diff}}{k_{cs}} \left(1 + \frac{k_{-cs}}{k_{sep} + k_{cr}} \right)} \quad (1.1.7.2-3)$$

Die dem Geschwindigkeitskoeffizienten der *Stern-Volmer*-Gleichung (1.1.5.1-14) der dynamischen Fluoreszenzlöschung entsprechende Löschgeschwindigkeit k_q gibt lediglich an, wie schnell das angeregte Farbstoffmolekül A^* gelöscht wird. Sie kann jedoch im Hinblick auf den Mechanismus der Reaktion eine unterschiedliche Bedeutung haben [Becker 1991]. Aufgrund der Geschwindigkeit photochemischer Reaktionen muss die Diffusion der beteiligten Moleküle zum Begegnungskomplex im Mechanismus und damit in der Löschgeschwindigkeit einbezogen sein, da die eigentliche Löschung innerhalb des Begegnungskomplexes erfolgt (vergleiche Gleichung 1.1.7.2-3).

Verläuft der Elektronenrücktransfer k_{-cs} langsamer als die Ladungsrekombination k_{cr} bzw. die Dissoziation k_{sep} in $A^- + D^+$, vereinfacht sich Gleichung 1.1.7.2-3 mit $k_{-cs} \ll k_{cr}, k_{sep}$ zu

$$k_q = \frac{k_{diff} k_{cs}}{k_{-diff} + k_{cs}} \quad (1.1.7.2-4)$$

Für Gleichung 1.1.7.2-4 lassen sich zwei extreme Fälle bezüglich der Geschwindigkeitskonstanten k_{cr} und k_{diff} unterscheiden.

$$k_q = \frac{k_{diff} k_{cs}}{k_{-diff}} = K_{eq} k_{cs} \quad (1.1.7.2-5)$$

für $k_{cs} \ll k_{-diff}$.

$$k_q = k_{diff} \quad (1.1.7.2-6)$$

für $k_{cs} \gg k_{-diff}$.

Im ersten Fall hängt die bimolekulare Löschgeschwindigkeit k_q im wesentlichen von der Elektronentransfergeschwindigkeit k_{cs} ab (Gleichung 1.1.7.2-5). Die Gleichgewichtskonstante $K_{eq} = k_{diff} / k_{-diff}$ beschreibt nur das der Elektronentransferreaktion vorgelagerte schnelle Gleichgewicht der Moleküle A^* und D zum Begegnungskomplex $A^* \cdots D$. Geschwindigkeitsbestimmend ist allein der Elektronentransferschritt mit der Geschwindigkeit k_{cs} . Die Löschreaktion verläuft reaktionskontrolliert. Die Geschwindigkeit ($K_{eq} k_{cs}$) kann aus der experimentell bestimmten bimolekularen Löschgeschwindigkeit $k_{q,dyn}$ der *Stern-Volmer*-Gleichung (1.1.5.1-14) und der nach Gleichung 1.1.5-6 oder 1.1.5-7 bestimmten Diffusionsgeschwindigkeit k_{diff} berechnet werden, da mit Gleichung 1.1.7.2-4 und 1.1.5.1-14 folgt:

$$\frac{1}{k_{q,dyn}} = \frac{1}{k_q} = \frac{1}{k_{diff}} + \frac{1}{K_{eq} k_{cs}} \quad (1.1.7.2-7)$$

Im zweiten Fall verläuft die Löschreaktion diffusionskontrolliert. Die Löschgeschwindigkeit k_q entspricht der Diffusionsgeschwindigkeit k_{diff} , da der Elektronentransferschritt innerhalb des Begegnungskomplexes sehr viel schneller ist als seine Dissoziation in A^* und D . Die Diffusionsgeschwindigkeit geben die Gleichungen 1.1.5-6 und 1.1.5-7 an.

Intramolekularer Fall

Löscht ein photoinduzierter Elektronentransfer an einem intramolekularen System $A \cdots D$ die Fluoreszenz, so muss das in Abbildung 1.1.7.1-2 dargestellte Reaktionsschema modifiziert werden. Im Falle eines starren Systems $A \cdots D$ entfällt der Diffusionsschritt zwischen Akzeptor und Donor. Es kann kein Begegnungskomplex,

wie im intermolekularen Fall, gebildet werden. Dieser Fall ist in Abbildung 1.1.7.2-2 schematisch dargestellt.

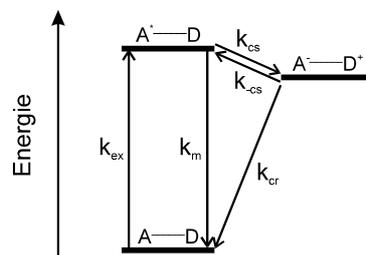


Abbildung 1.1.7.2-2: Energieschema für den intramolekularen photoinduzierten Elektronentransfer in einem starren Akzeptor-Donor-System A---D, wobei der Akzeptor durch Lichtabsorption angeregt wird.

Sind dagegen Akzeptor und Donor miteinander flexibel verbrückt, können sich beide einander über Konformationsänderungen nähern. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{diff} und $k_{-\text{diff}}$ sind deshalb im Reaktionsschema der Abbildung 1.1.7.2-1 durch die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten k_{kon} und $k_{-\text{kon}}$ der Konformationsänderungen zwischen den Extremkonformationen der getrennten A—D und der angenäherten, wechselwirkenden Konformation A-D zu ersetzen (vergleiche Abbildung 1.1.7.2-3).

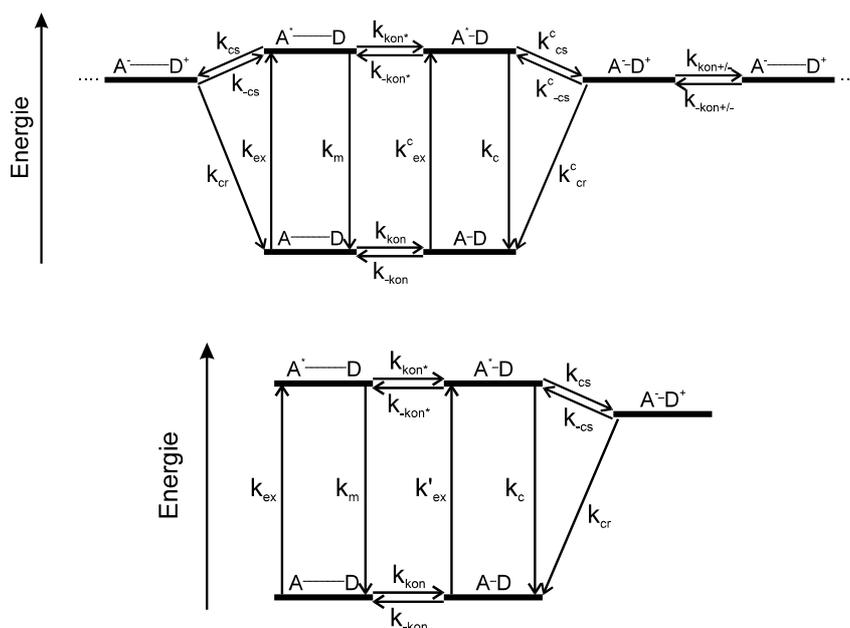


Abbildung 1.1.7.2-3: Energieschema für den intramolekularen, photoinduzierten Elektronentransfer in einem flexiblen Akzeptor-Donor-System A---D, wobei der Akzeptor durch Lichtabsorption angeregt wird. Oben: allgemeiner Fall zweier sowohl im S₀- als auch im S₁-Zustand ineinander umwandelbarer Konformere. Im angeregten Zustand S₁ zeigen beide Konformere Fluoreszenz, die jeweils durch Elektronentransfer gelöscht werden kann. Auch die jeweils aus dem Elektronentransfer entstandenen ladungstrennten Konformere können sich ineinander umwandeln. Unten: vereinfachter Fall, bei dem innerhalb des Konformers mit dem größeren Donor-Akzeptor-Abstand kein Elektronentransfer stattfindet. Weiterhin zerfällt der ladungstrennte Zustand schnell, so dass keine weitere Separierung der Ladungen aufgrund einer Konformationsumwandlung erfolgen kann.

Für die Kinetik des S₁-Zustands der getrennten Konformation A—D gilt analog zu Gleichung 1.1.7.2-1:

$$\frac{d[A^* \text{---} D(t)]}{dt} = -k_m[A^* \text{---} D(t)] - k_{kon*}[A^* \text{---} D(t)] + k_{kon}[A^* - D(t)] + I_{ex}(t) \tag{1.1.7.2-8}$$

Elektronentransfer-Geschwindigkeit

Die Elektronentransfer-Geschwindigkeit k_{cs} lässt sich in geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Kern- und der elektronischen Faktoren zerlegen. Erstere beinhalten die Kernbewegung, letztere die elektronischen Wechselwirkungen zwischen Donor und Akzeptor des Elektronentransfers. Beide Faktoren sind für k_{cs} geschwindigkeitsbestimmend. Gleichung 1.1.7.2-9 beschreibt die Geschwindigkeit des Elektronentransfers als Produkt aus der Frequenz der Kernschwingungen ν_n , des elektronischen κ_e und des vibratorischen Transferkoeffizienten κ_n .

$$k_{cs} = \nu_n \kappa_n \kappa_e \tag{1.1.7.2-9}$$

Die Frequenz der Kernschwingungen ν_n beträgt ca. $10^{12} \dots 10^{14} \text{ s}^{-1}$. Die Transferkoeffizienten κ_e und κ_n sind dimensionslos und liegen zwischen Null und Eins [Ebersson 1982] [Kavarnos 1993]. Nach der klassischen Theorie des Elektronentransfers [Marcus 1956] können in Lösung elektronische Barrieren vernachlässigt werden, und es ist $\kappa_e = 1$. Der quantenmechanische Ansatz berücksichtigt elektronische Barrieren ($\kappa < 1$). Nach der *Marcus*-Theorie wird der Kernfaktor κ_n in Form von Gleichung 1.1.7.2-10 angegeben.

$$\kappa_n = e^{\left(\frac{\Delta G_{cs}^*}{RT}\right)} \quad (1.1.7.2-10)$$

Mit der Freien Enthalpie der Aktivierung der Elektronentransferreaktion ΔG_{cs}^* folgt Gleichung 1.1.7.2-11 für die Elektronentransfargeschwindigkeit k_{cs} nach der klassischen Theorie von *Marcus*.

$$k_{cs} = \nu_n e^{\left(\frac{\Delta G_{cs}^*}{RT}\right)} \quad (1.1.7.2-11)$$

Eine umfangreiche Abhandlung zum intramolekularen Energietransfer zwischen zwei Farbstoffsystemen findet man in einem Übersichtsartikel von *Speiser* [Speiser 1996].

1.1.8 Farbstoffdimere

Wörz und Scheibe [Wörz 1969] untersuchten Farbstoff der Trimethincyanin-Reihe. Sie fanden, dass nur all-trans-Isomere dimerisieren, cis-Isomere nicht.

Sie versuchten eine Einteilung der Aggregationstendenz aufgrund der Farbstoffbeweglichkeit:

- „loose“: Torsionen und Schwingungen erfolgen leicht. Deshalb findet man schlechtes Aggregationsverhalten.
- „compact“: Gibt es Verzahnungen verschiedener Gruppen eines Moleküls, findet man sehr hohe Aggregationstendenz.
- „crowded“: Große Substituenten im Farbstoffmolekül machen eine ebene Struktur unmöglich. Das führt zur Behinderung des Aneinanderlegens der Moleküle. Dadurch findet man sehr schlechte Aggregationstendenz.

Auch hydrophobe Wechselwirkungen haben Einfluss auf die innere Beweglichkeit und somit auf die Aggregationstendenz.

Während der Annäherung der Farbstoffe bei der Aggregation kommt es zur Aufspaltung des ersten angeregten Zustands (*Davidov*-Aufspaltung). Dimerisierung führt zur Aufspaltung in einen längerwelligen und einen kürzerwelligen Term. Aus Symmetriegründen ist nur der kürzerwellige Term in Absorptionsspektren sichtbar (D-Bande). Zusätzliche Substituenten führen zu einer Symmetriestörung, wodurch (vor allem bei tiefen Temperaturen) der langwellige Übergang schwach erkennbar wird. Bei weiterer Aggregation kommt es zur Aufspaltung des ersten angeregten Zustands in ein breites Band. Wenn die Symmetrie erhalten bleibt, nennt man es H-Bande. Der Übergang zur kurzwelligen Seite ist erlaubt, zur langwelligen Seite fällt das Übergangsmoment ab. Durch elektrostatische oder sterische Einflüsse erhält man beliebige unsymmetrische Strukturen, wodurch der Übergang zur langwelligen Seite des Bandes erlaubt wird. Die resultierende, schmale, langwellige Absorptionsbande nennt man J-Bande.

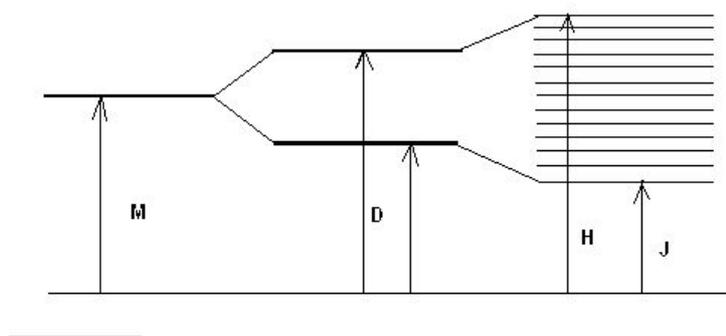


Abbildung 1.1.8-1: Schema der Term aufspaltung und Übergänge bei Farbstoffdimeren-Bildung nach Wörz & Scheibe. (M: Monomer; D: Dimerenband mit λ_{kurz} neben: λ_{lang} (bei tiefen Temperaturen); H: H-Aggregat mit λ_{kurz} (Symmetriefall); J: J-Aggregat mit $\lambda_{kurz,schmal}$ (unsymmetrischer Fall))

Durch Verzerrung der monomolekularen Schicht (senkrechte Moleküle) bilden sich J-Aggregate. Diese J-Aggregate haben in Lösung wohl Helix-Struktur. H-Aggregate liegen parallel und nicht verschoben, meist nur in Lösung vor. H-Aggregate bilden sich aus Lösung auf Oberflächen und können sich in J-Aggregate umwandeln. Teilweise findet man eine niedermolekulare Schicht von waagerechten H-Aggregaten. Die Absorptionswellenlänge λ_H wird größer durch abnehmende Aggregation, Dimeren- und Trimerenbildung.

In den H-Aggregaten liegen die Farbstoffe parallel, direkt nebeneinander; das Absorptionsmaximum liegt bei kürzeren Wellenlängen (Rot-Verschiebung), die Fluoreszenz ist vollständig gelöscht. In J-Aggregaten liegen die Moleküle parallel,

verschoben (treppenförmig) nebeneinander; die Absorptionsmaxima sind zu höheren Wellenlängen verschoben (Blau-Verschiebung).

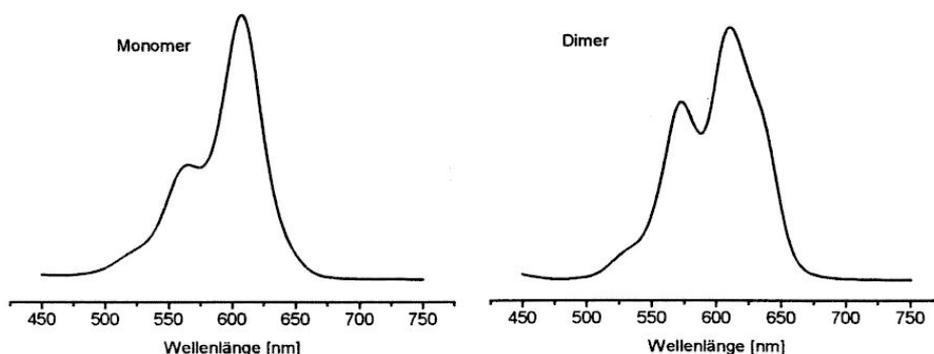


Abbildung 1.1.8-2: Beispiel von Mono- und Dimerenspektren des Rhodamin-Farbstoffs JA133 in Lösung.

Bei unterschiedlichen Farbstoffspezies müssen zusätzlich photoinduzierte Elektronentransfermechanismen in Betracht gezogen werden [Lieberwirth 1997].

Arbeloa et al. beschreiben die Dimerisierung von neutralen und kationischen Formen von Rhodamin B [Arbeloa 1982].

1.1.9 FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer)

Die Gleichungen für den resonanten Energietransfer wurden bereits 1948 von Förster entwickelt [Förster 1948]. Diese Energieübertragung ist strahlungslos und beruht auf einer weitreichenden Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die Messung der Geschwindigkeiten dieser Energieübertragung stellt ein Mittel zur Bestimmung molekularer Distanzen (zwischen Akzeptor und Donor) im Bereich von 1...10 nm bzw. 10...100 Å dar.

Der Formalismus nach Förster basiert auf der Annahme, dass Akzeptor und Donor bezüglich der Zeitskala der Lebensdauer des angeregten Zustands als stationär angesehen werden können. Dadurch ist der Abstand zwischen Akzeptor und Donor konstant und muss nicht als Variable mit einbezogen werden. Ein weiterer Punkt ist, dass der Übergang unter Erhaltung der Gesamtenergie vonstatten geht. Das bedeutet, dass die Energie des angeregten elektronischen Zustands des Akzeptor-Moleküls gleich oder kleiner als die Energie des angeregten elektronischen Zustands des Donor-Moleküls sein muss. Die nach dem Übergang überschüssige elektronische Energie wird zum Beispiel in Form von Schwingungsenergie abgebaut.

Der Resonanzprozess steht in Konkurrenz mit anderen Deaktivierungsprozessen des angeregten Zustands des Donors, einschließlich der Fluoreszenz. Die Geschwindigkeit für den Resonanzprozess ergibt sich unter der Voraussetzung, dass die Wechselwirkung zwischen Akzeptor und Donor rein dipolar ist und dass eine Überlappung zwischen elektronischen Wellenfunktionen des Akzeptors und Donors ausgeschlossen werden kann, nach Förster zu:

$$k_T = \frac{9(\ln 10)\kappa^2 Q_d J}{128\pi^5 n^4 N_A \tau_d R^6} \quad (1.1.9-1)$$

Hierbei ist κ^2 der Orientierungsfaktor für Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, der vom Winkel zwischen dem Dipolmoment von Akzeptor und Donor bestimmt wird, Q_d die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors bei Abwesenheit des Akzeptors, n der Brechungsindex des Mediums zwischen Akzeptor und Donor, N_A die Avogadro-Zahl, τ_d die Fluoreszenzlebensdauer des Donor bei Abwesenheit des Akzeptors, R der Abstand zwischen Akzeptor und Donor und J das normalisierte Überlappungsintegral, das folgendermaßen definiert ist:

$$J = \frac{\int F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_d(\lambda) d\lambda} \quad (1.1.9-2)$$

Hier ist $F_d(\lambda)$ die Fluoreszenzintensität des Donor unter Abwesenheit des Akzeptors bei der Wellenlänge λ , und $\varepsilon_a(\lambda)$ ist der molare Absorptionskoeffizient des Akzeptors bei der Wellenlänge λ . Gleichung 1.1.9-1 ist unabhängig davon gültig, ob Donor und Akzeptor identisch sind und ob die Spektren dieser Moleküle Schwingungsstrukturen aufweisen. Gleichung 1.1.9-2 repräsentiert die Überlappung des Emissionsspektrums des Donor mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, modifiziert mit λ^4 .

Eine alternative Gleichung zur Bestimmung der Geschwindigkeit des Resonanz-Energietransfers ist:

$$k_T = \left(\frac{1}{\tau_d} \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (1.1.9-3)$$

R_0 ist hier der Förster-Abstand, bei dem 50% der Anregungsenergie auf den Akzeptor übertragen wird. Beim Abstand R_0 ist die Wahrscheinlichkeit für eine Deaktivierung des Donor durch FRET gleich der Wahrscheinlichkeit für eine Deaktivierung des Donor durch einen anderen Prozess, der auch in Abwesenheit des Akzeptor stattfinden könnte.

Eine weitere Größe, die Verwendung findet, ist die Effizienz der Energieübertragung E . Diese wird wie folgt definiert:

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_f + k'} \quad (1.1.9-4)$$

k_f ist die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und k' die Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller anderen Deaktivierungsprozesse. Aus Gleichung 1.1.9-3 und 1.1.9-4 ergibt sich auch eine Abhängigkeit von E vom Förster-Abstand und dem tatsächliche Abstand zwischen Akzeptor und Donor:

$$E = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + R^6)} \quad (1.1.9-5)$$

Wichtig zur Berechnungen von FRET ist auch der Orientierungsfaktor κ^2 . Dieser lässt sich bei feststehender Orientierung nach folgender Formel berechnen:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_d \cos\theta_a)^2 \quad (1.1.9-6)$$

Hierbei ist θ_T der Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donor und dem Absorptionsdipol des Akzeptor, θ_d und θ_a sind jeweils die Winkel zwischen dem Verbindungsvektor zwischen Donor und Akzeptor sowie dem Vektor des Emissions- bzw. Absorptionsdipols.

Nehmen Akzeptor und Donor während der Lebensdauer des angeregten Zustands alle möglichen Orientierungen ein (freie Beweglichkeit), so ergibt sich ein Wert für κ^2 von $2/3$ [Förster 1948].

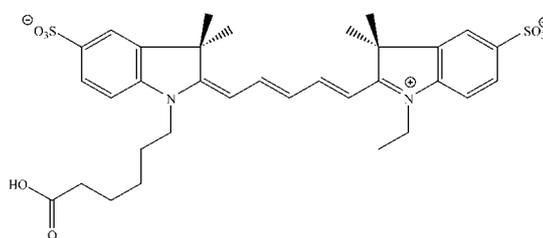
1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Ausgegangen wurde in der Entwicklung von Rhodamin-Farbstoffen (wie Rhodamin 6G oder Rhodamin B), deren o-Carboxyphenyl-Gruppe nahezu senkrecht zur Ebene des Chromophorgerüsts steht [Arden 1989] [Arden 1991] [Arden-Jacob 1992] [Arden-Jacob 1997] [Drexhage 1973] [Sauer 1993] [Sauer 1993 a] [Sauer 1995] [Sauer 1995 a]. Durch Austausch dieser Gruppe durch Phenylsubstituenten mit kleinen Atomen (Wasserstoff, Fluor) in Ortho-Position entstehen die Rosamine, deren Phenyl-Ring sich nach elektronischer Anregung nahezu coplanar zum Chromophorgerüst stellen kann. Dadurch ist eine günstigere Überlappung der Molekülorbitale von Phenylring und Chromophorgerüst (Elektronen-Delokalisierung) möglich, wodurch Ladung ausgetauscht werden kann. Dadurch resultiert dann ein tieferliegender Charge-transfer-Zustand. Von da aus erfolgt strahlungslose Deaktivierung in den Grundzustand, wodurch sowohl die Fluoreszenzlebensdauer als auch die Quantenausbeute reduziert werden. Die Geschwindigkeit dieser Deaktivierung wird durch die Donor/Akzeptor-Stärke der Phenylsubstituenten gesteuert.

Die Rosamine haben gleiche Absorptions- und Emissionsmaxima wie die Rhodamine, aber reduzierte Fluoreszenzlebensdauern und –quantenausbeuten. Durch Steuerung oben genannter Faktoren lassen sich die Verweilzeiten der Farbstoffe im ersten angeregten Zustand steuern.

Bei Verwendung genügend langwellig absorbierender Farbstoffe kann man zur Anregung kostengünstige Dioden-Laser verwenden, mit denen sich die Rhodamin- und Oxazin-Derivate im roten Bereich des Spektrums [Sauer 1993] anregen lassen.

Mit Extinktionskoeffizienten um $\epsilon = 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ihrer planaren Struktur und Rigidität sowie ihrem Absorptionsbereich bei Wellenlängen von Dioden-Lasern eignen sich Oxazin-, Rhodamin-, Rosamin-, Pyronin- und Polymethin- (Carbo-cyanin-) Farbstoffe besonders als Fluoreszenzfarbstoffe.



Cy5

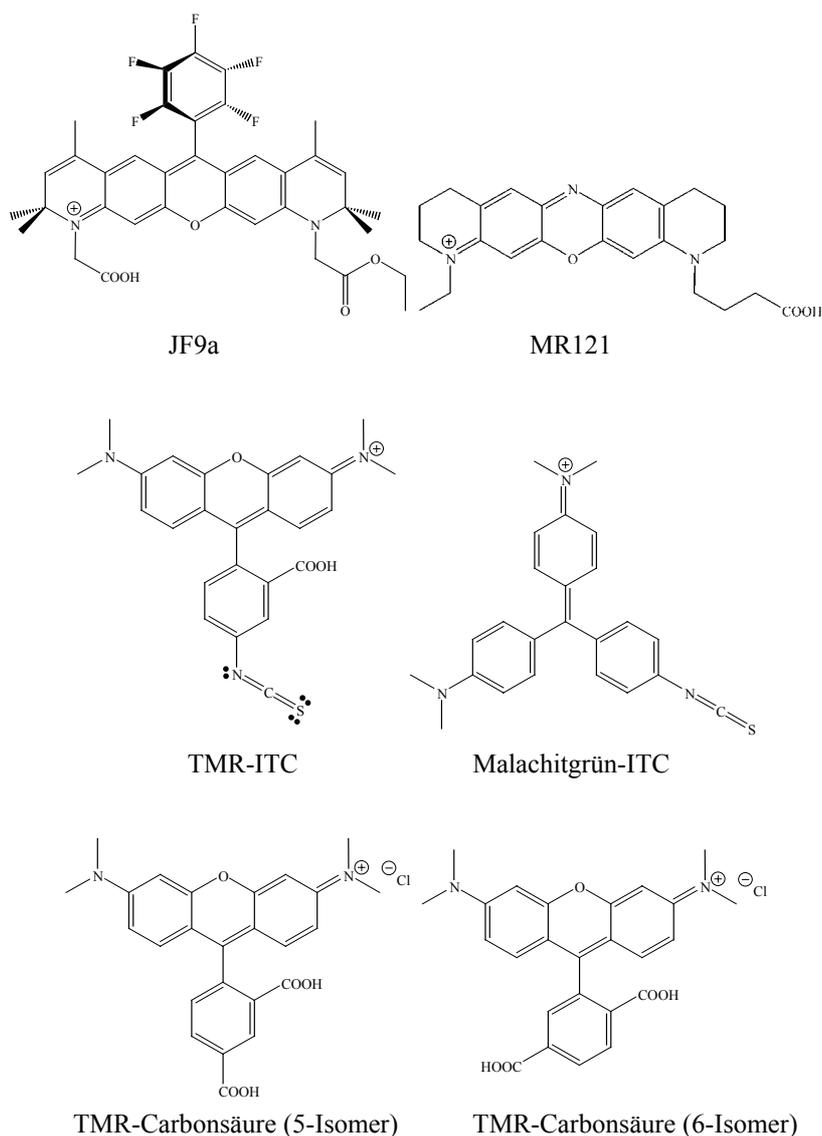


Abbildung 1.2-1: Farbstoffe der beschriebenen Klassen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden: Der Carbocyanin-Farbstoff Cy5 ($C_{33}H_{39}N_2O_8S_2^-$; $M = 655,803$), der Rhodamin-Farbstoff JF9a ($C_{37}H_{34}F_5N_2O_5^+$; $M = 681,668$) und der Oxazin-Farbstoff MR121 ($C_{24}H_{28}N_3O_3^+$; $M = 406,498$), der Rhodamin-Farbstoff TMR-ITC ($C_{25}H_{22}N_3O_3S^+$; $M = 444,527$) und der der Triphenylmethanfarbstoff Malachitgrün-ITC ($C_{24}H_{24}N_3S^+$; $M = 386,534$), sowie die 5- und 6-Isomere von Tetramethylrhodamin-Carbonsäure ($C_{25}H_{23}N_2O_5^+$, $M = 431,461$).

Aus der Gruppe der Carbocyanin-Farbstoffe wurde Cy5 verwendet, da er durch seine spektroskopischen Eigenschaften, zusammen mit seiner guten Kopplungsfähigkeit als NHS-Ester zur Anwendung prädestiniert ist.

1.3 Aminosäuren und Peptide

Die Aminosäuren, 2-Aminocarbonsäuren, sind die Bausteine der Peptide und Proteine. Von den natürlich vorkommenden Aminosäuren sind nur 20, die proteinogenen Aminosäuren, regelmäßig in Proteinen zu finden, weil sie im genetischen Code berücksichtigt sind. Viele weitere Aminosäuren entstehen durch enzymatische Umwandlung der proteinogenen Formen oder am Polypeptid durch posttranslationale Modifizierungen. Die proteinogenen Aminosäuren sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt [Koolman 1994].

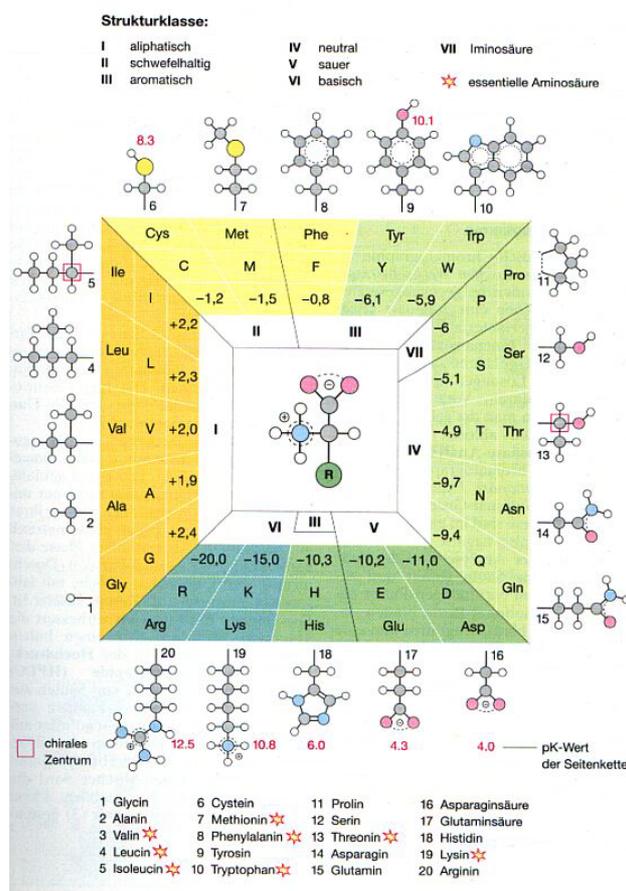


Abbildung 1.3-1: Proteinogene Aminosäuren: Struktur der Seitenketten, pK-Werte der geladenen Aminosäuren, Polaritäten.

In allen Aminosäuren außer Glycin trägt das Kohlenstoff-Atom C-2, oder C_α, vier verschiedene Substituenten: die Carboxylat-Gruppe, die Amino-Funktion, ein H-Atom und den jeweiligen Seitenkettenrest R. An einem solchen chiralen Zentrum sind zwei verschiedene Anordnungen, Konfigurationen, möglich. Diese Enantiomere verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. In der Natur findet man fast ausschließlich die L-Enantiomeren der Aminosäuren.

Nur L-Aminosäuren sind biologisch wirksam. Deshalb stellt man Aminosäuren biologisch mit Hilfe mutierter Mikroorganismen her.

Als proteinogene Aminosäuren bezeichnet man diejenigen 20 Aminosäuren, die durch Translation in Proteine eingebaut werden können.

Die aromatischen Aminosäuren enthalten mesomeriestabilisierte Ringsysteme in der Seitenkette. Tyrosin mit seiner phenolischen Hydroxygruppe und Tryptophan zeigen als einzige Aminosäuren starke Lichtabsorption im UV-Bereich zwischen 250 und 300 nm. Dies wird zur photometrischen Bestimmung von Proteinen genutzt. Nur die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zeigen genügend Fluoreszenzintensität, um direkt in Lösung gemessen werden zu können. Die Fluoreszenz von Proteinen mit diesen Aminosäuren ist ein hoch spezifisches und empfindliches Instrument, um Struktur und Konformation zu studieren. Typische Werte für Lebenszeiten des angeregten Zustands liegen bei 2,6 ns für Tryptophan und 3,6 ns für Tyrosin.

Eine Sonderstellung unter den Aminosäuren nimmt das Prolin ein. Seine Seitenkette bildet zusammen mit dem α -C-Atom und der α -Aminogruppe einen Fünfring. Deshalb ist Prolin eigentlich keine Amino-, sondern eine Iminosäure. Aufgrund ihrer Ringstruktur führen Prolin-Reste in Peptiden und Proteinen zum Abknicken der Peptid-Kette.

Jeder Organismus enthält Tausende verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Aufgaben. Die Funktionen der Proteine kann man in folgende Gruppen einteilen: Strukturbildung und -erhaltung (z.B. α -Keratin, Collagen, Seiden-Fibroin, Histone des Chromatins), Transport (z.B. Hämoglobin der Erythrocyten, Serum-Albumin, Ionenkanäle als Membran-Proteine), Schutz und Abwehr (z.B. Immunoglobulin G, Fibrinogen), Steuerung und Regelung (z.B. Proteohormon Insulin und Insulin-Rezeptor, DNS-bindendes Protein Katabolit-Aktivator-Protein), Katalyse (z.B. Enzyme Lactat-Dehydrogenase und Glutamin-Synthetase), Bewegung (z.B. Actin und Myosin) und Speicherung (Speicherproteine wie die Muskelproteine).

Die Aminosäuren als Bausteine der Peptide und Proteine sind durch Säureamid-Bindungen zwischen Carboxy- und Aminogruppen miteinander verknüpft. Diese Peptid-Bindung ist eben und mesomeriestabilisiert und „nicht frei drehbar“.

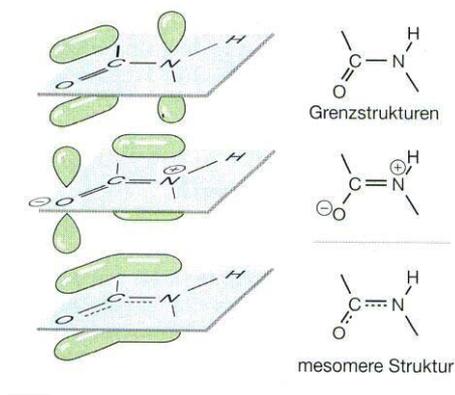


Abbildung 1.3-2: Peptid-Bindung und deren mesomere Grenzstrukturen.

Wegen der eingeschränkten Drehbarkeit der C-N-Bindung sind nur Rotationen um die N-C_α- und die C_α-C-Bindung in Peptiden und Proteinen möglich. Daraus resultieren die Sekundär-Strukturen, die durch H-Brücken innerhalb der Kette oder zu Nachbarketten stabilisiert werden. Die häufigsten, natürlichen Strukturen sind die rechtsgängige α-Helix, die linksgängige Collagen-Helix, antiparallele (β_a) und parallele (β_p) Faltblatt-Strukturen, β-Schleifen (Typen I und II).

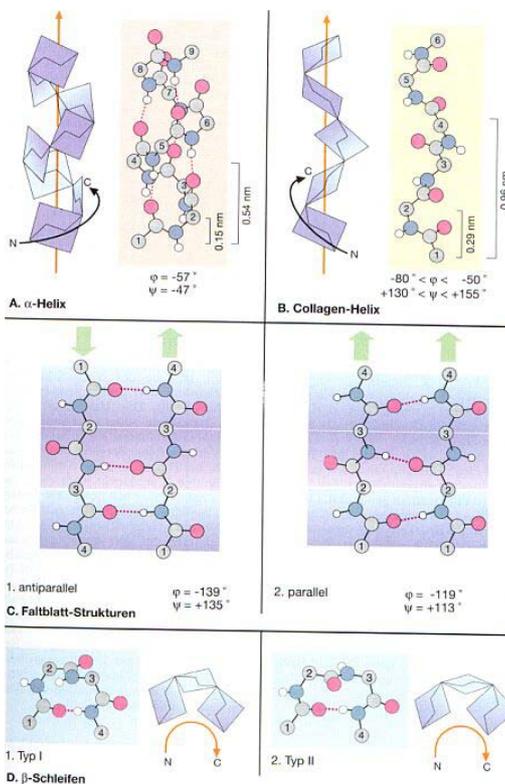


Abbildung 1.3-3: Sekundärstrukturen von Peptiden.

Die dreidimensional gefaltete, biologisch aktive Konformation eines Proteins bezeichnet man als Tertiär-Struktur. Häufig lagern sich einzelne Proteinmoleküle durch nichtkovalente Wechselwirkungen zu symmetrischen Quartär-Komplexen, sogenannte Oligomere mit ihren Untereinheiten, zusammen. Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Struktur der meisten Proteine bilden sich nach der Synthese spontan aus. Offenbar ist die Information für die biologisch aktive – native – Konformation bereits in deren Aminosäure-Sequenz kodiert.

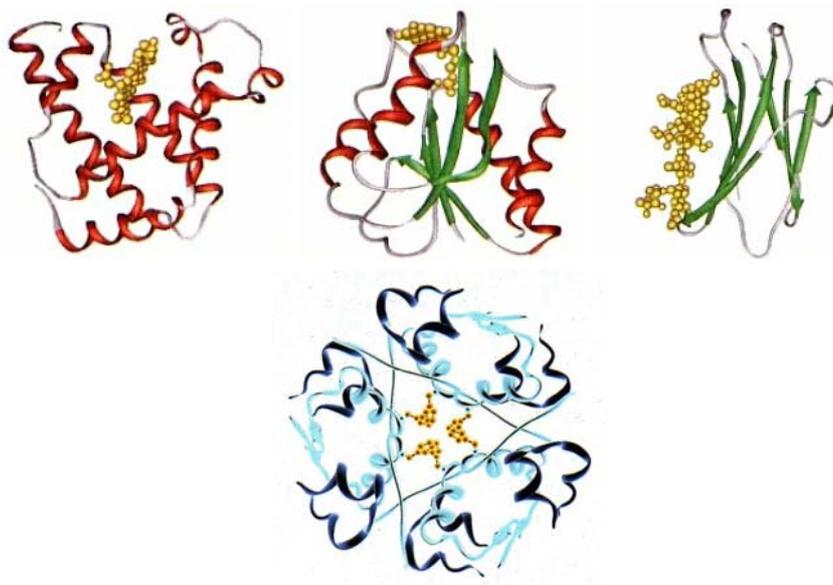


Abbildung 1.3-4: Oben: Tertiärstrukturen von Myoglobin, Flavodoxin und IgG (CH₂-Domäne); Unten: Insulin (Hexamer); Zu sehen sind die helicalen und Faltblatt- sowie ungeordnete Domänen. Gelb sind Oligosaccharid-Bestandteile markiert.

Ein großer Teil der in der DNS niedergelegten, genetischen Informationen kodiert für die Aminosäure-Sequenzen funktioneller Proteine. Bei der Expression gilt für die Translation – „Übersetzung“ – der genetische Code. Da es 20 proteinogene Aminosäuren gibt, muss die DNS mindestens ebenso viele Codons enthalten. Um aus den 4 Basen Arginin, Guanin, Cytidin und Thymin 20 verschiedene Codons bilden zu können, muss jedes Codon mindestens die Länge von 3 Basen haben. Diese 3 aufeinanderfolgenden Basen heißen Triplets und befinden sich auf der Transfer-DNS (tRNS). Da der Code für 20 Aminosäuren $4^3 = 64$ Codons bereitstellt, gibt es für die meisten Aminosäuren mehrere synonyme Codons.

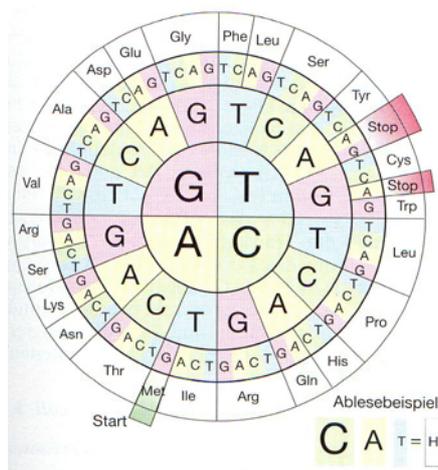


Abbildung 1.3-5: 3-Buchstaben-Bezeichnung der Codons der Aminosäuren-Kodierung.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Farbstoffe

Chemikalien hatten alle die Reinheit „p.a.“, außer wenn anders angegeben.

| | |
|-------|---|
| BOP | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| EDC | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| DIPEA | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| NHS | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| TEA | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| TNTU | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| TFA | „zur Peptid-Sequenzierung“, Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |

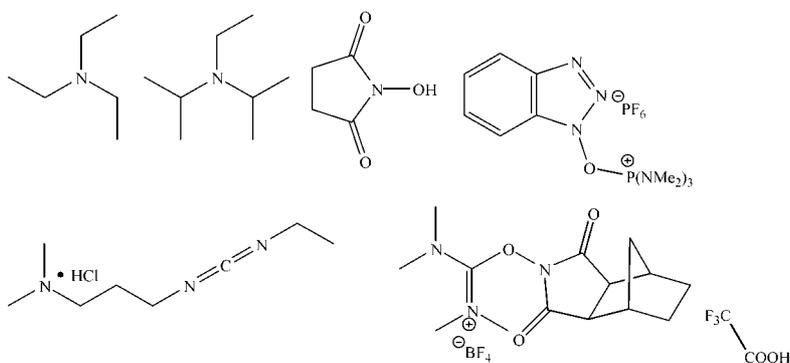


Abbildung 2.1-1: Verwendete Reagenzien von oben links nach unten rechts: die Amine TEA ($C_6H_{15}N$, $M = 101,190$) und DIPEA ($C_8H_{19}N$, $M = 129,243$), die Kopplungs- bzw. Aktivierungsreagenzien NHS ($C_4H_5NO_3$, $M = 115,087$), BOP ($C_{12}H_{22}F_6N_6OP_2$, $M = 442,281$), EDC ($C_8H_{17}N_3$, $M = 155,241$) und TNTU ($C_{14}H_{22}BF_4N_3O_3$, $M = 367,148$) sowie die organische Säure TFA ($C_2HF_3O_2$; $M = 114,023$).

| | |
|---------------------------------------|---|
| MR121 | Prof. K.H. Drexhage, N.J. Marx; Universität-Gesamthochschule Siegen (Siegen, Dtl.) |
| ATTO650 | AttoTec Siegen (Siegen, Dtl.) |
| JF9a | Prof. K.H. Drexhage, J. Frantzeskos; Universität-Gesamthochschule Siegen (Siegen, Dtl.) |
| Cy5 | Amersham-Buchler (Braunschweig, Dtl.) |
| TMR-ITC | Molecular Probes (c/o Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, Dtl.) |
| TMR-Carbonsäure (5/6-Isomerengemisch) | Molecular Probes (c/o Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, Dtl.) |
| Malachitgrün-ITC | Molecular Probes (c/o Mo Bi Tec GmbH, Göttingen, Dtl.) |

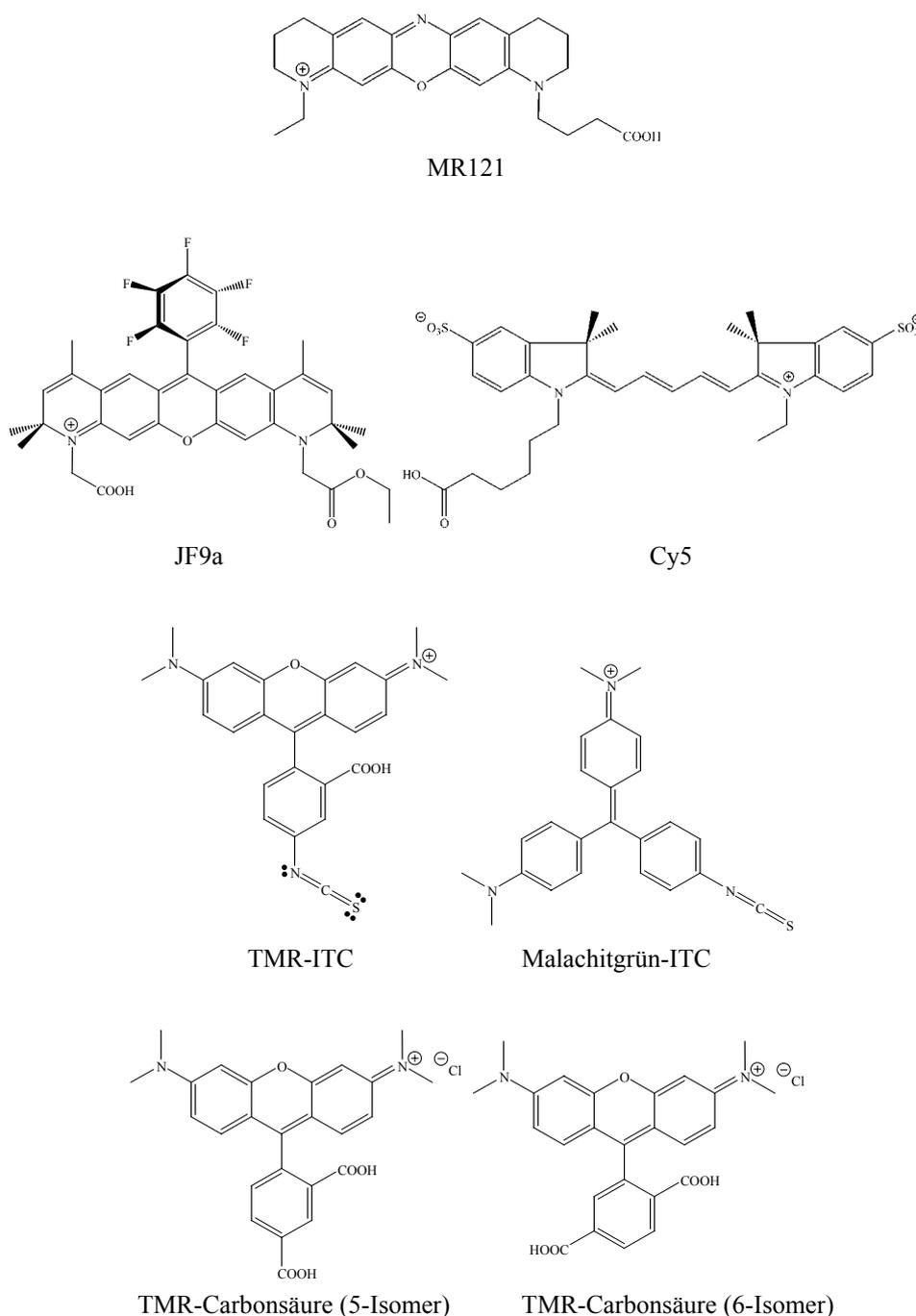


Abbildung 2.1-2: Der Oxazin-Farbstoff MR121 ($C_{24}H_{28}N_3O_3^+$; $M = 406,498$), der Rhodamin-Farbstoff JF9a ($C_{37}H_{34}F_5N_2O_5^+$; $M = 681,668$) und der Carbocyanin-Farbstoff Cy5 ($C_{33}H_{39}N_2O_8S_2^-$; $M = 655,803$), der Rhodamin-Farbstoff TMR-ITC ($C_{25}H_{22}N_3O_3S^+$; $M = 444,527$) und der Triphenylmethanfarbstoff Malachitgrün-ITC ($C_{24}H_{24}N_3S^+$; $M = 386,534$), sowie die 5- und 6-Isomere von Tetramethylrhodamin-Carbonsäure ($C_{25}H_{23}N_2O_5^+$, $M = 431,461$).

| | |
|-------------|--|
| Acetonitril | „for far UV“, Serva (Heidelberg, Dtl.) |
| DMF | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| DMSO | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| „Eisessig“ | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |

| | |
|--------|-----------------------|
| TEA | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| Wasser | bidest. |

2.2 Geräte

2.2.1 Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

HPLC für halbpräparative Trennungen (Entsalzung und Reinigung größerer Mengen Farbstoffs):

System Gold (Beckman, München, Dtl.) mit Gradientenmodul 126, 210 A Injektionsventil, Dioden Array Detektor Modul 168, Analog Interface Modul 406, Fluoreszenzdetektor Shimadzu RF-535

Säule Hypersil ODS (Knauer, Berlin, Dtl.; Länge: 8 × 250 mm, Korngröße: 4 µm)

HPLC für Analysen:

HPLC-Gerät Serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Dtl.)

Entgaser G1322A

binäre Pumpe G1312A

Fluoreszenzdetektor G1321A

Diodenarraydetektor G1315A für Absorptionsspektren zwischen 200 und 900 nm

Säule Hypersil ODS (Knauer, Berlin, Dtl.; Länge: 4 bzw. 8 × 250 mm, Korngröße: 4 µm)

Alle Stofftrennungen in Lösung wurden per HPLC mit einer RP-Säule vorgenommen. Als Säulenmaterial dient ODS („chemisch gebundenes Octadecylsilan“). Umkehrphasen-Chromatographie (reversed phase) liegt vor, wenn die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit der gelösten, zu trennenden Substanzen wird hierbei durch hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt. Je polarer eine Substanz, desto weniger wird sie adsorbiert.

Als mobile Phase (Laufmittel) wurden stets 0,1 M TEAA und Acetonitril mit 25 % TEAA (0,1 M) verwendet und über einen Gradienten gemischt [Meyer].

Die Laufmittel wurden vor der Anwendung filtriert und entgast. Der Mischungsgradient und die Auswertung verliefen computergesteuert [Lieberwirth 1994].

Die Detektion der Kopplungsprodukte und Farbstoffe geschah über einen Fluoreszenzdetektor sowie die Absorptionsspektren. Die Anregungswellenlänge richtete sich nach den Absorptionsmaxima der jeweiligen Farbstoffe. Sie lag im Wellenlängenbereich von 630...650 nm.

Die zu reinigenden bzw. zu trennenden Gemische wurden fast ausschließlich mit folgendem HPLC-Programm bearbeitet:

| Zeit / min | Fluss / ml min ⁻¹ | Eluent-Zusammensetzung |
|------------|------------------------------|---------------------------------|
| 0 ...20 | 2,5 (4 mm-Säule) | 100% → 0% A (linearer Gradient) |
| | 5 (8 mm-Säule) | |
| 20...40 | 2,5 (4 mm-Säule) | 0% A, 100% B |
| | 5 (8 mm-Säule) | |

Laufmittel A: 0,1 M TEAA

Laufmittel B: 0,1 M TEAA, 75 Vol.% Acetonitril

UV-Detektion: 260 nm

Zur Entsalzung der Farbstoff- bzw. Farbstoff-NHS-Lösungen wurde über die 4 mm-Säule ein etwas abgeänderter Laufmittel-Gradient verwendet:

| Zeit / min | Fluss / ml min ⁻¹ | Eluent-Zusammensetzung |
|------------|------------------------------|---------------------------------|
| 0 ...20 | 2,5 (4 mm-Säule) | 100% → 0% A (linearer Gradient) |
| | 5 (8 mm-Säule) | |
| 20...40 | 2,5 (4 mm-Säule) | 0% A, 100% B |
| | 5 (8 mm-Säule) | |

Laufmittel A: 0,1 M TEAA, 5 Vol.% Acetonitril

Laufmittel B: 90 Vol.% Acetonitril, 10 Vol.% Wasser, 0,1 Vol.% TFA

2.2.2 Absorptionsspektroskopie

Quarzglas-Halbmikroküvetten Suprasil (Hellma, Müllheim, Dtl.)

UV/Vis-Spektrometer Carey 500 Scan (Varian, Darmstadt, Dtl.), Lambda 18 (Perkin-Elmer, Berlin, Dtl.)

Die Absorptionsspektren wurden vorzugsweise in Konzentrationen um 10⁻⁶ M wässriger Lösung gemessen. Die genannte Konzentration ist der optimale Messbereich (OD ≈ 0,1), da bei niedrigeren Konzentrationen die Auflösung schlechter wird und bei höheren Konzentrationen vor allem die Farbstoffe zu Dimerenbildung und höheren Konjugaten neigen. Außerdem kann man in diesem Konzentrations-

bereich das *Lambert-Beer-Gesetz* als gültig betrachten, in dem 10^{-6} M gerade dem Absorptionskoeffizienten der meisten Rhodamin- und Oxazin-Farbstoffe von $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ entspricht.

2.2.3 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz-Spektrometer LS 100 (Photon Technology International PTI, Wedel/-Holstein, Dtl.)

Die Fluoreszenzspektren von Farbstoffen bzw. farbstoffmarkierter Peptiden wurden mit dem Fluoreszenz-Spektrometer gemessen. Die Konzentration der Proben liegt hierbei je nach Quantenausbeute in Bereich von $10^{-6} \dots 10^{-8}$ M. Als Anregungslichtquelle dient eine Xenon-Blitzlampe, aus deren breiten Emissionsspektrum die jeweils benötigte Anregungswellenlänge mittels eines Monochromators herausgefiltert wird. Das Spektrometer ist mit einem Referenzphotomultiplier ausgestattet, der es erlaubt, auf die Anregungsintensität zu normieren.

Fluoreszenz-Spektrometer IBH (IBH, Glasgow, UK)

Standard-Quarzglas-Küvetten (Hellma, Müllheim, Dtl.)

Dioden-Laser (635 nm, FWHM 200 ps, 1 MHz Pulsrate, NanoLED, IBH, Glasgow, UK)

NanoLED Pulsed Diode Controller“ (IBH, Glasgow, UK)

Monochromator Modul 5000MC (IBH, Glasgow, UK)

Detektor: Vervielfacher TBX-04 mit Einheit TBX-PS

Steuerung: DataStation 2000 Software (IBH, Glasgow, UK)

Auswertung der Daten: DataAnalysis 2000 (IBH, Glasgow, UK)

Um den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität zu untersuchen und Fluoreszenzlebensdauern zu bestimmen, stehen prinzipiell zwei Methoden zur Verfügung: erstens die *Phasenmodulationsmethode*, bei der die Probe durch eine sinusmodulierte Lichtquelle kontinuierlich angeregt wird. Die auftretende Fluoreszenz ist aufgrund der Fluoreszenzkinetik demoduliert, und die Phase ist relativ zum Anregungslicht verschoben [Lakowicz 1986]. In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzlebenszeiten über die zweite Methode, das *zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen* (time-correlated single photon counting, TCSPC) [O’Conner 1984] bestimmt. Sie beruht auf der wiederholten Zeitmessung zwischen Anregung der Probe durch einen kurzen Lichtpuls (Laser) und der Detektion des

ersten ausgesendeten Photons. Durch vielfache Wiederholung dieser Messung erhält man eine statistische Verteilung der Zeiten zwischen Anregungspuls und Ankunft des ersten Photons. Diese Zeiten entsprechen den Verweilzeiten der Moleküle im angeregten Zustand. Wenn sie als Histogramm aufgetragen werden, erhält man Fluoreszenzabklingkurven. In idealisierter Weise wird hierbei davon ausgegangen, dass bei jedem Anregungspuls höchstens ein Fluoreszenz-Photon am Detektor ankommt. Da aber bei jedem Anregungspuls sehr viele Moleküle angeregt werden, kommen oft mehrere Photonen am Detektor an, von denen aber immer nur das erste ein Stopp-Signal auslöst, so dass eine kürzere Lebensdauer vorgetäuscht wird (Pile-up-Effekt). Um diesen Effekt zu vermeiden und somit eine korrekte Fluoreszenzlebensdauerbestimmung durchführen zu können, darf die Zeit zwischen Start- und Stopp-Signal nicht weniger als 20 ps betragen [Birch 1961].

In dieser Arbeit wurden alle Fluoreszenzlebenszeitmessungen an einem TCSPC-Fluoreszenz-Spektrometer IBH durchgeführt. Angeregt wird die Probe mit einem Dioden-Laser, der von einem „NanoLED Pulsed Diode Controller“ gesteuert wird. Anregungs- und Emissionsmonochromatoren werden von einem Monochromatormodul gesteuert. Als Detektor dient ein Vervielfacher, der von einer TBX-PS-Einheit versorgt wird. Alle Geräte werden über die DataStation 2000-Software gesteuert. Die Auswertung der Daten erfolgt mittels der DataAnalysis 2000-Software.

Da sich die Absorptions- und Emissionsspektren der Rhodamin- und Oxazin-Farbstoffe stark überschneiden, kann es bei höheren Farbstoff-Konzentration durch Reabsorptions- und Reemissionsprozesse dazu kommen, dass eine zu lange Fluoreszenzlebensdauer gemessen wird [Hammond 1979]. Um diesen Effekt auszuschließen, muss die Konzentration der Probe unter 10^{-6} M liegen.

Funktionsweise:

Das Licht des gepulsten Dioden-Lasers passiert den Anregungsmonochromator und einen Polarisator, bevor es die Farbstoffe der Probe anregt. Gleichzeitig gibt der Pulstreiber des Lasers das Start-Signal für den Zeit-zu-Amplitude-Konverter (time-to-amplitude converter, TAC). Nach einiger Zeit (Verweilzeit im angeregten Zustand) sendet der angeregte Farbstoff der Probe ein Photon aus, das einen Polarisator und den Emissionsmonochromator passiert, bevor es auf den Detektor trifft. Dieser gibt dann ein Stopp-Signal an den TAC. Um die Signale für den TAC eindeutig zu gestalten und vom Untergrund zu separieren, werden sie zuvor noch in einem Constant-fraction-Discriminator (CFD) verarbeitet. Der TAC misst die Zeit zwischen Start- und Stopp-Signal, indem er mit dem Eintreffen des Start-Signals solange einen Kondensator auflädt, bis ein Stopp-Signal eintrifft. Die Spannung des Kondensators wird über einen Analog-Digital-Wandler in eine digitale Information übersetzt und mit Hilfe eines Viel-Kanal-Analysators (multi-channel analyzer MCA)

in parallele Zeitkanäle einsortiert. Das entstehende Histogramm ergibt eine Fluoreszenzabklingkurve. Es werden bei allen Messungen 4083 Zeitkanäle mit einer Breite von 12 ps verwendet. Die Messung wird so oft wiederholt, bis sich 2.000...4.000 Ereignisse im Maximumkanal befinden.

Auswertung der Fluoreszenzabklingkurven:

In der Theorie des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens wird idealisiert von einer Anregung durch einen unendlich schmalen δ -Puls und damit einer gleichzeitigen Anregung aller Moleküle ausgegangen. Die Länge des Anregungspulses ist aber im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer der angeregten Fluorophore nicht zu vernachlässigen, was dazu führt, dass immer noch Moleküle angeregt werden, während andere schon wieder in den Grundzustand zurückgekehrt sind, wodurch eine längere Fluoreszenz-Kinetik vorgetäuscht wird. Die eigentlich interessierende Fluoreszenzantwort $F(t)$ ist also mit dem zeitlichen Profil der Anregungsquelle $L(t)$ gefaltet und ergibt somit die gemessene Fluoreszenzantwort $R(t)$. Für die Faltung gilt Gleichung 2.2.3-1 [Lakowicz 1986].

$$R(t) = \int_0^t L(t^*) F(t - t^*) dt^* \quad (2.2.3-1)$$

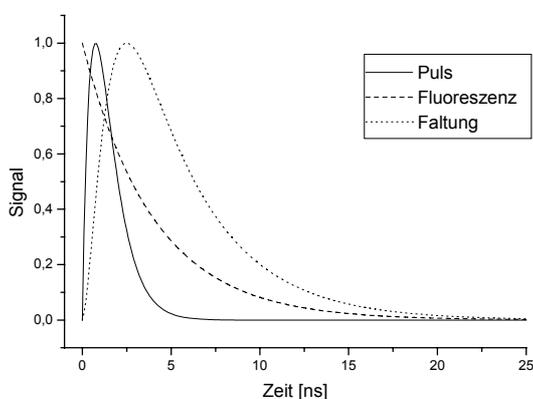


Abbildung 2.2.3-1: Fluoreszenzabklingkurve (Fluoreszenz) sowie die Faltung derselben mit einem Anregungspuls (Puls), der dem des Spektrometers LS-100 entspricht.

Um die tatsächliche Fluoreszenzantwort $F(t)$ und damit die Fluoreszenzlebensdauer zu erhalten, muss die gemessene Fluoreszenz-Abklingkurve entfaltet werden. Da die direkte Entfaltung mathematisch sehr aufwendig ist, werden die Parameter a_i und τ_i mittels eines Anpassungstestes abgeschätzt und dann das Faltungsintegral $R_c(t)$

$$R_c(t) = \int_0^t L(t^*) \left[\sum_i \alpha_i e^{-\frac{(t-t^*)}{\tau_i}} \right] dt^* \quad (2.2.3-2)$$

berechnet.

Das berechnete Faltungintegral $R_c(t)$ wird mit der gemessenen Fluoreszenz-abklingkurve $R(t)$ verglichen. Anschließend werden die Parameter variiert und das entsprechende Faltungintegral neu berechnet. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis die geringste Abweichung erreicht ist. Zur Bestimmung der Abweichung wird die *Methode der kleinsten Abweichungsquadrate* benutzt. Die Güte der Anpassung wird durch das *reduzierte Chiquadrat* (χ^2)

$$\chi^2 = \sum_i \omega_i [R(t) - R_c(t)]^2 \quad (2.2.3-3)$$

mit Wichtungsfaktor $\omega_i = \frac{1}{R_i(t)}$ angegeben.

Eine gute Anpassung der gemessenen Daten ergibt χ^2 -Werte von unter 1,1.

2.2.4 Zeitaufgelöste Einzelmolekül-Spektroskopie

Fluoreszenz-Farbstoffe Cy5 und MR121 auf Glasoberflächen:

Lichtmikroskop Axiovert 100 TV (Zeiss, Dtl.)

x,y-Scanntisch

gepulste Dioden-Laser (PDL 800, 635 nm, 64 MHz, 100 ps; Picoquant, Berlin, Dtl.)

Polarisationsfilter

Anregungsfilter (639DF9, Omega Optics, Brattleboro, VT, USA)

dichroischer Strahlteiler (670 nm; 645DRLP, Omega Optics, Brattleboro, VT, USA)

Öl-Imersionsobjektiv (100 × 1,4 n.a.; Nikon, Japan)

Bandpassfilter (675DF50, Omega Optics, Brattleboro, VT, USA)

Lochblende (50 bzw. 100 µm ID)

2 Lawinen-/Avalanche-Photodioden (SPAD; aktive Fläche: 190 µm × 190 µm, max. Zählrate: 10 MHz, Dunkelzählrate: 130 Hz; AQ-131, EG&G Optoelectronics, Kanada)

TCSPC-Karte (SPC-430, Becker & Hickel, Berlin, Dtl.)

Intensitätsbild („Image“): Fläche: 20 µm × 20 µm entspricht (400 × 400) Pixel; Pixel-Dimension: 50 nm × 50 nm; Scann-Geschwindigkeit: 7 ms/Pixel; Gesamt-Scannzeit: 400 × 2,8 s = 1120 s ≈ 20 min

Abbildungs-Software: MultiFluorImg v.1.0 (D.-P. Herten, Physikal.-Chem. Inst., Universität Heidelberg, Dtl., 1999)

Bildauswertungs-Software: DaVis v.5.4.1 (LaVision GmbH, Göttingen, Dtl., 1999)
 mathematisches Auswertungs-Programm: Origin v.5.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA, 1997)

Um einzelne Moleküle spektroskopisch beobachten zu können, wird der in Abbildung 2.2.4-1 beschriebene konfokale Mikroskop-Aufbau verwendet.

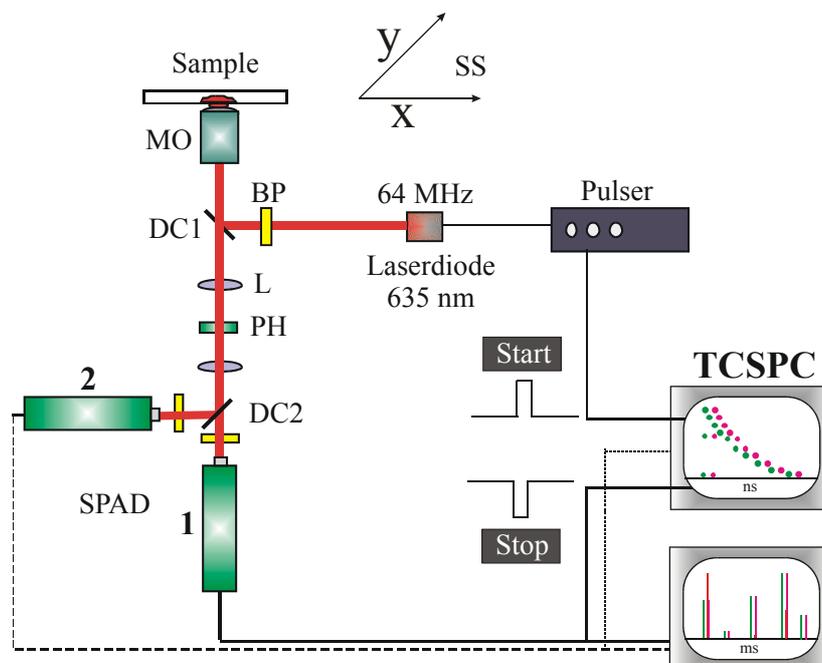


Abbildung 2.2.4-1: Aufbau für die spektral aufgelöste Fluoreszenzlebensdauer-Abbildung (SFLIM)
 SS: Scann-Tisch, MO: Mikroskopobjektiv, DC: dichroischer Strahlteiler, L: Linse, PH: Nadelloch-Blende, BP: Bandpass-Filter, SPAD: Einzel-Photon-Lawinen-Diode, DC2 teilt das emittierte Fluoreszenz-Spektrum in zwei Kanäle: Die niedriger-energetischen Photonen werden transmittiert, während die höher-energetischen Photonen reflektiert werden. Fluoreszenzlebensdauern wurden mit zeit-korreliertem Einzel-Photon-Zähler (TCSPC) gemessen.

Das Grundgerüst bildet das kommerziell erhältliche Lichtmikroskop Axiovert 100 TV. Das Detektionsvolumen wird mithilfe von Lochblenden auf wenige Femtoliter reduziert. Dadurch werden Hintergrundsignale durch Raman- und Anregungslicht-Streuung sowie Autofluoreszenz deutlich reduziert. Die konfokale Mikroskopie erlaubt eine Auflösung bis zur Beugungsgrenze. In der x-y-Ebene wurden Auflösungen von $\delta = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$ erreicht [Webb 1995].

Als Anregungsquelle wird ein gepulster Dioden-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 635 nm, einer Repetitionsrate von 64 MHz und einer Pulsbreite (FWHM) von ca. 100 ps verwendet. Da die numerische Apertur des Objektivs $NA = 1,4$ betrug, führte dies für unsere Messungen zu einer Auflösung von

$\delta = 276 \text{ nm}$. Die Laserleistung kann mit einem Polarisationsfilter variiert werden. Die mittlere Laserleistung beträgt bei allen Experimenten zwischen $3 \mu\text{W}$ und $5 \mu\text{W}$ (gemessen am Objektiv). Der Anregungsstrahl passiert einen Anregungsfilter und wird anschließend über einen dichroischen Strahlteiler in das Öl-Immersionsobjektiv eingekoppelt. Das Fluoreszenzlicht wird über dasselbe Objektiv gesammelt und passiert nach dem Strahlteiler einen Bandpassfilter, der zur Reduzierung des Streulichtes dient. Um ein kleines Detektionsvolumen zu gewährleisten, passiert das Licht eine Lochblende mit einem Durchmesser von $50 \mu\text{m}$, bevor es auf die direkt dahinter positionierten Lawinenphotodioden, geteilt durch einen dichroischen Filter, trifft. Diese Lawinenphotodioden (single-photon avalanche photodiode, SPAD oder APD) besitzen eine aktive Fläche von $190 \mu\text{m} \times 190 \mu\text{m}$, eine maximale Zählrate von 10 MHz und eine Dunkelzählrate von 130 Hz . Die verstärkten Signale aus den Dioden gelangen zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern zur TCSPC-Karte (time correlated single photon counting). Eine der beiden Photodioden misst die niedriger-energetischen Photonen, also Wellenlängen größer 670 nm , die andere detektiert die höher-energetischen Photonen, also kleiner 670 nm . Daher ist das Verhältnis der Intensitäten ein Maß für die Emissionswellenlänge und wird ausgedrückt als „anteilige Intensität“

$$F_2 = \frac{I_{>670\text{nm}}}{(I_{<670\text{nm}} + I_{>670\text{nm}})} = \frac{I_{>670\text{nm}}}{I_{\text{gesamt}}} \quad (2.2.2-1a)$$

Die TCSPC-Karte empfängt ein Start-Signal vom Pulser der Laserdiode und ein Stopp-Signal von der SPAD, zwischen denen es die vergangene Zeit misst. Hier werden die Signale in $500 \mu\text{s}$ -Intervallen gesammelt und aus ihren zum Anregungspuls relativen Zeiten ein Histogramm mit 64 Kanälen zu je $0,24 \text{ ns}$ erstellt.

Da nur nach weniger als einem Prozent der Anregungspulse auch ein Photon detektiert wird, wird die TCSPC-Karte im *invertierten Modus* betrieben, das heißt, dass der Detektor das Start- und der Laser das Stopp-Signal liefert. Da die Abstände zwischen den Laserpulsen immer gleich sind, kann auch so die relative Ankunftszeit des Photons zum vorherigen Anregungspuls berechnet werden. Dieser Modus hat den Vorteil, dass zu jedem Start-Signal auch ein Stopp-Signal existiert und dass die Zeitmessung (Aufladen des Kondensators) weniger oft gestartet werden muss.

Die Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer aus der Ankunftszeit des Photons bezüglich des Laserpulses wird gewöhnlich mittels Maximale-Wahrscheinlichkeits-Abschätzer (MLE) der folgenden Gleichung berechnet [Herten 2000]:

$$\frac{\omega}{1 - e^{-\frac{\omega}{\tau}}} - \frac{m\omega}{e^{-\frac{m\omega}{\tau}} - 1} = \frac{\sum_{i=1}^m i\omega N_i}{N} \quad (2.2.2-2)$$

Hierbei ist N die Anzahl der betrachteten Photonen. Die Summe läuft über m Kanäle der Breite ω bzw. T , wobei der i -te Kanal N_i Photonen enthält.

Mit diesem Aufbau können während einer Messung gleichzeitig mehrere Informationen erhalten und ausgewertet werden:

- Gesamtintensität I und spektral aufgelöste Intensitäten I_1 (kürzere Wellenlänge) und I_2 (längere Wellenlänge)
- Gesamtlebensdauer τ_g (beide Kanäle) sowie τ_1 und τ_2 der beiden einzelnen Kanäle

Aus den entsprechenden Intensitäten kann die „anteilige Intensität“ (fractional intensity)

$$F_2 = \frac{I_2}{I_1 + I_2} = \frac{I_2}{I_{ges}} \quad (2.2.2-1b)$$

zur Einordnung der Wellenlängen der untersuchten Fluoreszenz-Farbstoffe berechnet werden.

Fluoreszenz-Farbstoff Tetramethylrhodamin auf Goldoberflächen:

Lichtmikroskop Axiovert 100 TV (Zeiss, Dtl.)

x,y-Scanntisch

Nd:YAG-Laser (Uniphase, 532 nm, frequenzverdoppelt)

Öl-Immersionsobjektiv ($100 \times 1,4$ n.a.; Nikon, Japan)

dichroischer Strahlteiler (645DRLP, Omega Optics, Brattleboro, VT, USA)

Lochblende (50 μm ID)

Lawinen-/Avalanche-Photodioden SPAD (AQR-14, EG&G Optoelectronics, Kanada)

Bandpassfilter (580DF30, Omega Optics, Brattleboro, VT, USA)

TCSPC-Karte (SPC-640, Becker & Hickel, Berlin, Dtl.)

Intensitätsbild („Image“): Fläche: 150 $\mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$

Pixel-Dimension: 50...500 nm

Scann-Geschwindigkeit: 6 ms/Pixel

Der Aufbau der Aparatur entspricht der oben beschriebenen.

2.3 Kleingeräte und -material

Magnetrührer mit Heizung (IKR Labortechnik, Dtl.)
Glasgeräte (Schott, Mainz, Dtl.)
Safe-Lock Eppendorfggefäße 1 ml (Eppendorf, Dtl.)
Spritzen (B. Braun, Melsungen, Dtl.)
Pipetten (Eppendorf, Dtl.)
Feinwaage ScalTec (Roth, Karlsruhe, Dtl.)
Küvetten aus Quarzglas Suprasil (Hellma, Müllheim, Dtl.)
Digital-pH-Meter Piccolo (Hanna, Dtl.)
Rotationsverdampfer SpeedVac (Eppendorf, Dtl.)
Ultraschallbad Sonorex
Filtrieraufsatz (Millipore, Eschborn, Dtl.)
Filterpapier 0,45 µm (Millipore, Eschborn, Dtl.)

2.4 Methoden

2.4.1 Herstellung der Aktiv-Ester

Carbonsäuren sind zu unreaktiv, als dass sie unter milden Bedingungen zu hohen Ausbeuten mit Aminogruppen reagieren. Statt dessen bilden sich in der Regel die entsprechenden Ammoniumsalze der Säuren. Diese würden erst bei höheren Temperaturen unter Wasserabspaltung zu den Säureamiden reagieren. Deshalb ist es allgemein günstig, die Carbonsäure vorher zu „aktivieren“ [Hermanson 1996]. Diese hier „aktivierte Carbonsäuren“ genannten Carbonsäureester, -anhydride und -chloride sind entsprechend leicht einer Aminolyse zugänglich. Allerdings erweisen sie sich nicht als besonders selektiv und sind deshalb nicht für unsere Zwecke geeignet.

Isothiocyanate:

Werden Isothiocyanate an Aminogruppen gekoppelt, entstehen Thioharnstoffe. Die Kopplung erfolgt bei pH = 9 ... 9,5. Isothiocyanate sind weniger wasserempfindlich als NHS-Ester. Allerdings ist die Stabilität der Kopplungsprodukte oft geringer.

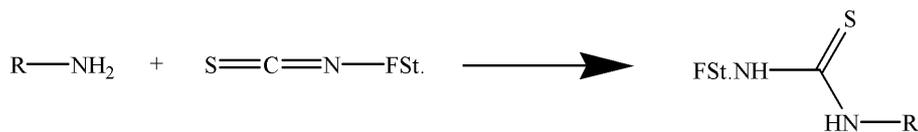


Abbildung 2.4.1-1: Kopplung von primären Aminen mit Farbstoff-Isothiocyanaten.

Da aliphatische Isothiocyanate nicht besonders stabil sind, ist diese Methode oft nicht gut anwendbar.

Die verwendeten Farbstoff-Isothiocyanate wurden kommerziell erworben.

Sulfonylchloride:

Bei der sehr leicht verlaufenden Reaktion von Aminogruppen mit Sulfonylchloriden entstehen stabile Sulfonamidbindungen. Allerdings ist diese Reaktion nicht selektiv genug gegenüber NH_2 -Gruppen.

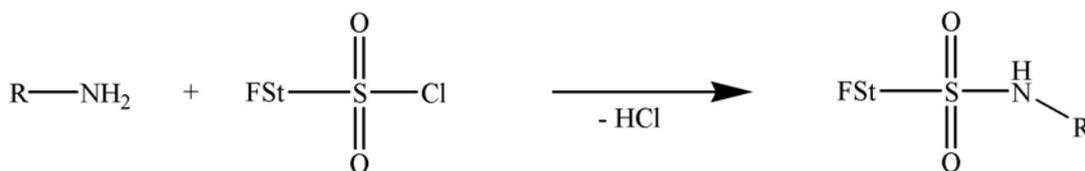


Abbildung 2.4.1-2: Kopplung von primären Aminen mit Farbstoff-Sulfonylchloriden.

Eine in der Peptid-Chemie zur Peptid-Kopplung allgemein angewandte ist die Carbo-diimid-Methode mit Aktivierung durch Addition von $\text{N,N}'$ -Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) [Kurzer 1967] [Wendberger], deren Selektivität aber je nach System auch nicht immer ausreicht.

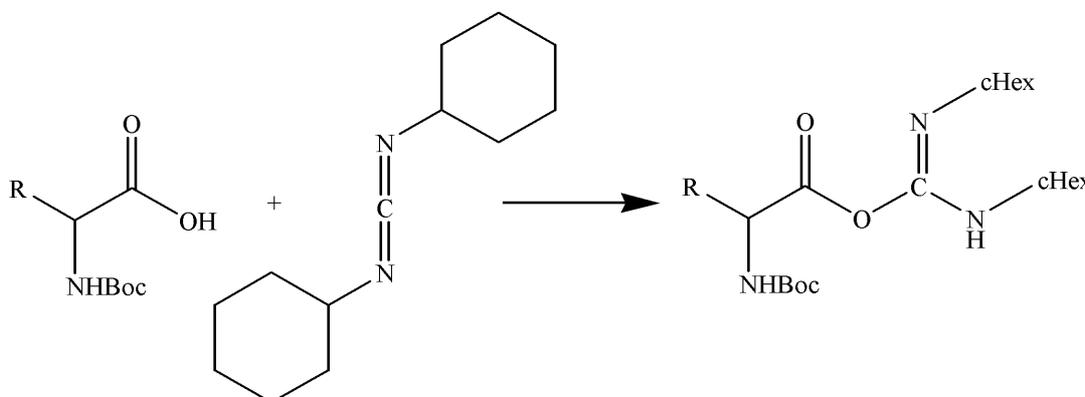


Abbildung 2.4.1-3: Aktivierung von Carbonsäuren mittels der Carbodiimid-Methode.

Die Bildung von N-Hydroxysuccinimidestern (NHS-Ester) ist eine weitere, gut bewährte Methode [Martin 1994]. Diese Ester reagieren selektiv mit aliphatischen Aminogruppen, so dass man auf die Verwendung von Schutzgruppen verzichten kann. Unter schonenden Bedingungen kommt es zum Aufbau stabiler Amidbindungen.

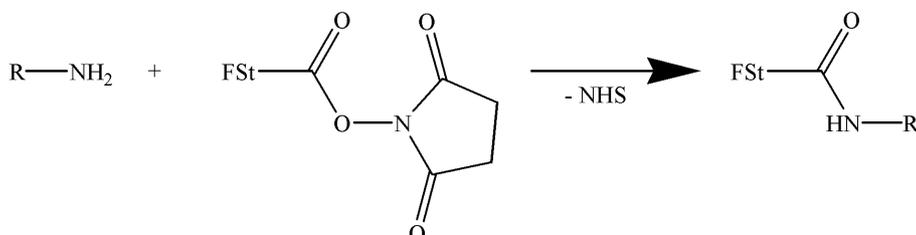


Abbildung 2.4.1-4: Amin-Carbonsäure-Kopplung mittels N-Hydroxysuccinimidylester (FSt: Farbstoff; NHS: N-Hydroxysuccinimid).

Die Kopplungsreaktion verläuft bei neutralem pH-Wert. Über pH = 9 kommt es durch erhöhte OH-Konzentration zusätzlich zur Hydrolyse des gebildeten NHS-Esters [Lomants 1976].

Außer der Grundverbindung N-Hydroxysuccinimid stehen noch zahlreiche spezielle Reagenzien [Knorr et al. 1989] wie (Benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat (BOP) [Castro 1977] [Castro 1975], N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(N-succinimidyl)uronium-tetrafluoroborate (TSTU) [Bannwarth 1991] [Knorr 1989] und 2-(5-Norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3',3'-tetramethyl-uronium-tetrafluorophosphat (TNTU) zur Verfügung, die oft recht hydrolyse-unempfindlich sind und je nach Reaktionsbedingungen bessere Ausbeuten liefern.

Auch wurde berichtet, dass Farbstoffe kovalent auf Hydroxyl- und Phosphorapatit gebunden wurden. Diese Kopplung erfolgte über Isothiocyanat- und Succinimidylester-Gruppen der Farbstoffe [Rumphorst 1994].

Für diese Arbeit wurden Peptid-Kopplungen mit verschiedenen Farbstoffen getestet. Letztendlich erwiesen sich der Oxazin-Farbstoff MR121 und der Carbocyanin-Farbstoff Cy5 als diejenigen, die die besten Kopplungseigenschaften mit primären Aminogruppen der verwendeten Modellpeptide besitzen.

| | |
|---------|--|
| MR121 | Universität-Gesamthochschule Siegen (Siegen, Dtl.) |
| Cy5-NHS | Amersham-Buchler (Braunschweig, Dtl.) |

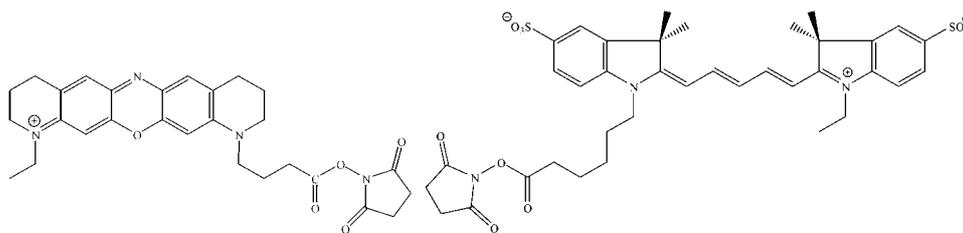


Abbildung 2.4.1-5: Der Oxazin-Farbstoff MR121-NHS ($C_{28}H_{31}N_4O_5^+$; $M = 503,570$) und der Carbocyanin-Farbstoff Cy5-NHS ($C_{37}H_{42}N_3O_{10}S_2^-$; $M = 752,876$).

Der Carbocyanin-Farbstoff Cy5 ist kommerziell als Mono- und Di-NHS-Ester erhältlich.

Zur Aktivierung des Oxazin-Farbstoffs MR121 wurden 1220 nmol in 120 μ l Acetonitril mit 5 Äquivalenten NHS (6,1 μ mol; $M = 115,088$) in 20 μ l Acetonitril und 10 Äquivalenten EDC (12,2 μ mol; $M = 191,704$) in 30 μ l Acetonitril versetzt. Nach intensivem Mischen lässt man über Nacht auf dem Rüttler reagieren. So wurden Ausbeuten von über 90% erreicht. Entsalzung und Aufreinigung wurde mittels halbpräparativer HPLC vorgenommen.

2.4.2 Kopplung der Farbstoffe an Peptide

- Uni370 an Amino-Terminus acetyl-geschütztes Dekapeptid mit Trp an 4-Position, Prof. Pipkorn, DKFZ, Heidelberg. Dtl.
- Uni371 an Amino-Terminus acetyl-geschütztes Dekapeptid mit Phe an 4-Position, Prof. Pipkorn, DKFZ, Heidelberg. Dtl.

Als Modellpeptide wurden zwei 10-Aminosäuren-lange Peptide verwendet, die jeweils nur eine Kopplungsstelle für die Farbstoffe, nämlich am Lysin-Rest in 5 Position, bieten, gut wasserlöslich sind und sich nur im Vorhandensein eines Tryptophans (Trp) bzw. Phenylalanins (Phe) als vierte Aminosäure unterscheiden. Lysin befindet sich also in direkter Nachbarschaft zu Tryptophan bzw. Phenylalanin. Das Peptid mit Tryptophan lässt im Gegensatz zu Phenylalanin Farbstofflöschung erwarten [Vaughan 1970] [Watt 1977] [Karolin 1994] [Emans 1995]. Der N-Terminus war durch einem Acetyl-Rest geschützt, um mehrfache Kopplungen zu vermeiden.

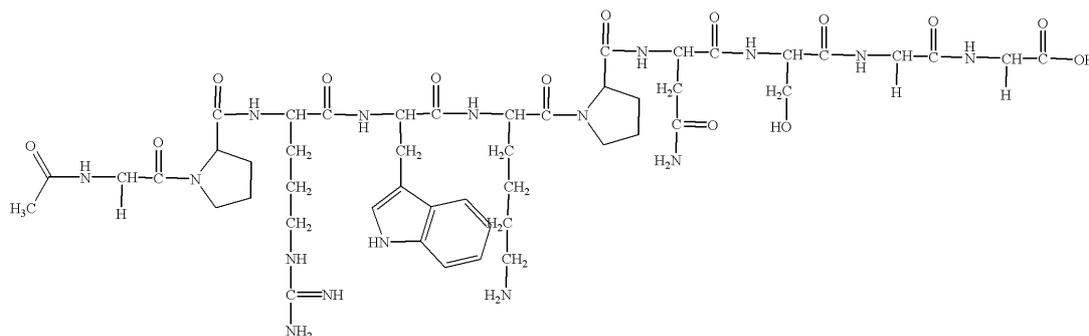


Abbildung 2.4.2-1: Uni370: *Ac-Gly-Pro-Arg-Trp-Lys-Pro-Asn-Ser-Gly-Gly-OH* ($C_{48}H_{72}N_{16}O_{14}$; $M = 1097,185$).

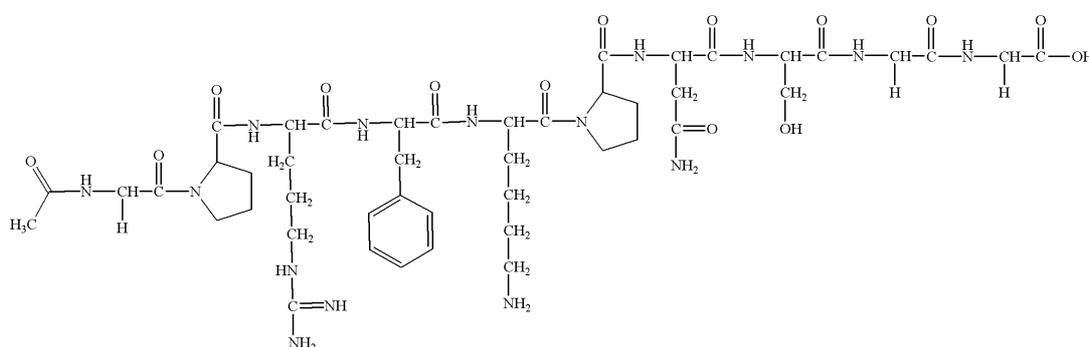


Abbildung 2.4.2-2: Uni371: *Ac-Gly-Pro-Arg-Phe-Lys-Pro-Asn-Ser-Gly-Gly-OH* ($C_{46}H_{71}N_{15}O_{14}$; $M = 1058,149$).

Vom Peptid wurden jeweils 100 nmol in 100 μ l Carbonat-Puffer (0,1 M; pH 8,3) mit dem 1,5-fachen an aktivierten Farbstoff, MR121-NHS bzw. Cy5-NHS, in 20 μ l Acetonitril versetzt, gut vermischt und über Nacht auf dem Rüttler reagieren gelassen. Zur Produktgewinnung wurde die analytische HPLC verwendet. Zusätzlich wurden die Proben zur Identifizierung massenspektrometrisch vermessen. (siehe Anhang 6.2 für Chromatogramme und Spektren)

Zur Kopplung der Modellpeptide mit Isothiocyanaten wurde das 1,5fache des Farbstoffs in DMSO zur Peptid-Lösung gegeben und das 5fache des Gesamtvolumens an Carbonat-Puffer (0,1 M; pH 9,4) hinzugegeben. Sollte es in der Peptid/Isothiocyanat-Lösung zu Fällungen gekommen sein, wurden diese mit einigen Mikrolitern Acetonitril wieder gelöst und anschließend der Carbonat-Puffer zugegeben. Über Nacht erfolgte die Inkubation, die Trennung der Produkte erfolgte mittels analytischer HPLC. (siehe Anhang 6.2 für Chromatogramme)

2.4.3 Aktivierung und Modifizierung von Glasoberflächen

| | |
|-------------------|---|
| Deckgläschen | 24 × 60, 130...170 µm dick (Carl Roth GmbH + Co., Dtl.) |
| HF-Lösung | 3,5% in H ₂ O; H ₂ O über Aktivkohle gelagert |
| Wasser | bidest. |
| Methanol (MeOH) | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| Aminosilan-Lösung | 0,1% APTMOS, 0,1% APTEOS in H ₂ O; H ₂ O über Aktivkohle gelagert |

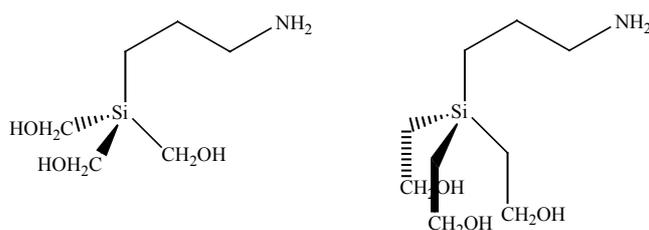


Abbildung 2.4.3-1: APTMOS: 3-Aminopropyltrimethoxysilan ($C_6H_{17}NO_3Si$, $M = 179,290$); APTEOS: 3-Aminopropyltriethoxysilan ($C_9H_{23}NO_3Si$, $M = 221,369$).

Die Deckgläschen wurden mit je einem Tropfen von 20 µl HF-Lösung versehen und nach ca. 2 min mit Wasser gewaschen und mit Methanol gespült. 1,5 h nach Zugabe von 100 µl Aminosilan-Lösung wurde wieder mit Wasser gewaschen, mit Methanol gespült und mit Stickstoff getrocknet. Um eventuell vorhandene Spuren von Farbstoffen zu beseitigen, wurden die aktivierten Deckgläschen ½ h mit UV-Licht bestrahlt.

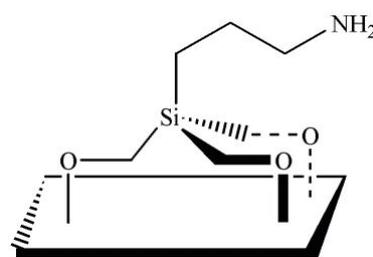


Abbildung 2.4.3-2: Mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMOs) modifizierte Glasoberfläche.

2.4.4 Ankopplung der Farbstoffe und Farbstoff-Peptide an Glas- und Gold-Oberflächen

| | |
|--------------------|-----------------------|
| Methanol (MeOH) | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| Ethanol (EtOH) | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |
| Acetonitril (MeCN) | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) |

| | |
|-------|--|
| HBTU | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) 10 ⁻⁷ M in MeCN für Reaktion |
| HOBT | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) 10 ⁻⁷ M in MeCN für Reaktion |
| DIPEA | Fluka (Neu-Ulm, Dtl.) 12,5% in MeCN für Reaktion |

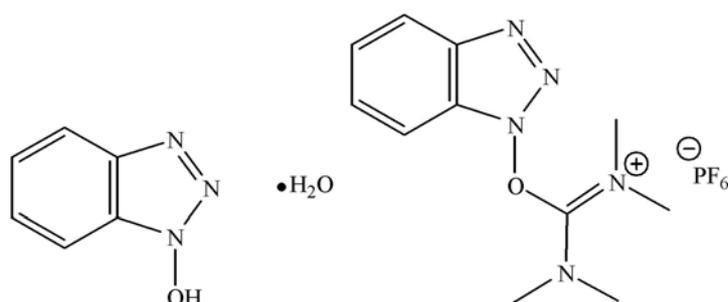


Abbildung 2.4.4-1: Die Kopplungsreagenzien HOBT und HBTU.

Da keine direkte Abhängigkeit zwischen verwendeter Farbstofflösungs-Konzentration und erzielttem Bedeckungsgrad zu beobachten war, wurden von den zu verwendenden aktivierten Farbstoffen und Farbstoff-Peptiden jeweils Verdünnungsreihen und somit verschiedene Deckgläschen-Belegungen hergestellt.

Die hergestellten Konzentrationen lagen zwischen 10⁻³ und 10⁻¹² M, die getesteten zwischen 10⁻⁸ und 10⁻¹² M, jeweils in Acetonitril. 10 µl der jeweiligen Farbstoff-NHS-Lösung wurden mit Carbonat-Puffer (0,1 M; pH 8,3), TMR-ITC mit Carbonat-Puffer (0,1 M; pH 9,4) auf 100 µl aufgefüllt und gut gemischt. Zusätzliche Kopplungsreagenzien sind hier nicht nötig.

10 µl der jeweiligen Farbstoff-Peptid-Lösung in Acetonitril wurden mit je 10 µl frisch bereiteter Lösung von HBTU, HOBT und DIPEA versetzt [Knorr 1989] [Bannwarth 1991] [Dörwald 2000] [Zelder 1999], mit Acetonitril auf 100 µl aufgefüllt und gut gemischt.

Auf entsprechende Weise wurden auch die Ankopplungen zweier, gemischter Farbstoffe bzw. Farbstoff-Peptide erreicht, indem 10 µl der jeweils zwei Farbstoff-Lösungen gewünschter Konzentration verwendet wurden.

Auf die aktivierten Deckgläschen wurden stets diese 100 µl Reaktionslösung aufgegeben, so dass die Benetzungsfläche auf den Deckgläschen jeweils die Fläche dieser 100 µl Lösung einnahm, jedoch unterschiedlich je nach Lösemittel Acetonitril oder Wasser. Nach 2 h wurde mit Wasser/Ethanol (1 : 1) gewaschen, mit Methanol gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Goldbeschichtete Siliziumplättchen Prof. Dr. M. Grunze, PD Dr. A. Götzhäuser,
 Angewandte Physikalische Chemie am
 Physikal.-Chem. Inst., Universität Heidelberg
 TMR-ITC Molecular Probes (c/o Mo Bi Tec GmbH,
 Göttingen, Dtl.)

Goldbeschichtete Siliziumplättchen mit Aminogruppen in regelmäßigen Abständen, hergestellt durch Elektronenstrahl-Reduktion von Nitro-Gruppen einer 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol-Monoschicht durch eine Maske, wurden mit TMR-ITC-Lösung versetzt, um kovalente Kopplungen zu erzielen [Eck 2000] [Geyer 2001]. Die aktiven Zentren hatten Durchmesser von ca. 40 μm .

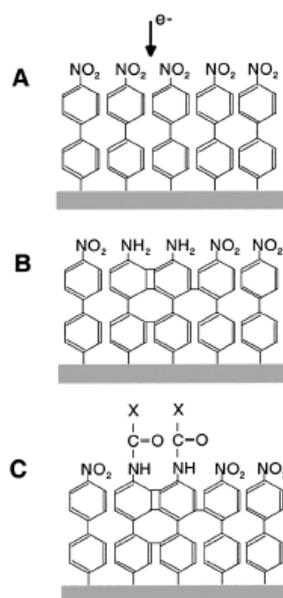


Abbildung 4.3-1: Schema Elektronen-indizierter Prozesse in 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol-Monoschichten auf Goldoberflächen: Die Monoschicht wird mit Elektronen bestrahlt (A) und bildet endständige Aminogruppen, während die darunterliegende Aromatenschicht dehydrogeniert und vernetzt wird (B). Die Aminogruppen der reduzierten Regionen können zur Ankopplung von Molekülen, z.B. Farbstoff-Isothiocyanate, verwendet werden (C).

Dazu wurden 4 μl einer konzentrierten Lösung des Farbstoffs mit 46 μl Pyridin/ H_2O (1 : 1) im ersten Fall bzw. 46 μl Carbonat-Puffer (0,1 M; pH 9,4) im zweiten Fall gemischt und 1 h mit den reaktiven Gruppen der Oberfläche reagieren gelassen. Nach Waschen mit Wasser/Ethanol (1 : 1) und Spülen mit Methanol wurde mit Stickstoff getrocknet.

3 Experimente und Ergebnisse

Um Aussagen über Peptid-gekoppelte Farbstoffe an Oberflächen treffen zu können, wurden spektroskopische Messungen der Farbstoffe und Farbstoff-Peptide in Lösung (Ensemble-Messungen) und an Glasoberflächen vorgenommen.

3.1 Ensemble-Messungen in Lösung

Um die Lebensdauern der frei beweglichen Farbstoffe und Farbstoff-Peptide zu erhalten, wurden deren Lösungen in Wasser/Acetonitril und reinem Acetonitril im Konzentrationsbereich von 10^{-6} ... 10^{-7} M mit dem Fluoreszenz-Spektrometer IBH gemessen.

| Substanz | molare Masse M | Absorptionsmaximum | | Konz. c | Fluoreszenz-/Emissionsmaximum | | | Fluoreszenz-Lebensdauer | |
|------------------|----------------|--------------------|-------------------|----------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| | [g/mol] | λ [nm] | OD ^(c) | [10^{-6} M] | λ [nm] | FI ^(a) | norm. FI ^(b) | τ_1 [ns] | τ_2 [ns] |
| MR121-NHS | 503,570 | 649 | 0,0562 | 0,562 | 663 | 857,9 | 1526,5 | 4,4 | - |
| Cy5-NHS | 752,876 | 652 | 0,1191 | 0,476 | 670 | 13,8 | 29,0 | 0,2 | 0,9 ^(*) |
| ATTO650-NHS | 652,759 | 652 | 0,0174 | 0,174 | 669 | 213,6 | 1227,6 | 4,3 | - |
| JF9a-NHS | 778,741 | 620 | 0,0100 | 0,100 | 647 | 107,4 | 1074,0 | 4,5 | - |
| TMR-ITC | 444,527 | 550 | 0,0076 | 0,076 | 574 | 46,7 | 614,5 | 2,1 | - |
| TMR-CS-NHS (5) | 528,533 | 554 | 0,0399 | 0,399 | 582 | 417,7 | 1046,9 | 2,2 | - |
| TMR-CS-NHS (6) | 528,533 | 557 | 0,0291 | 0,291 | 588 | 263,3 | 904,8 | 2,3 | - |
| Malachitgrün-ITC | 386,534 | 580 | 0,0367 | 0,367 | - | - | - | - | - |

^(a) Fluoreszenzintensität;

^(b) normierte Fluoreszenzintensität = Fluoreszenzintensität / gemessenes Absorptionsmaximum (OD)

^(c) gemessene „optische Dichte“

Tabelle 3.1-1: Übersicht zu Absorptions- und Emissionsmaxima sowie Lebensdauern und Fluoreszenz-Intensitäten der gemessenen Fluoreszenz-Farbstoffe in Acetonitril.

^(*) $A = -0,081$; $B_{\tau_1} = 0,063$; $B_{\tau_2} = 0,090$

Hier wurden die Aktiv-Ester der um 650 nm absorbierenden Farbstoffe MR121, Cy5, ATTO650 und JF9a sowie der um 560 nm absorbierenden Farbstoffe TMR, TMR-Carbonsäure (5- und 6-Isomer) und Malachitgrün hinsichtlich ihrer spektroskopischen Daten vermessen. Malachitgrün zeigt im Vergleich zu den anderen Farbstoffen praktisch keine Fluoreszenz, so dass nur Absorptionsdaten erhalten werden konnten und sich dieser Farbstoff damit nicht für weitere Versuche eignete.

In der Tabelle sieht man die Absorptionsdaten, die mit dem UV/Vis-Spektrometer Carey 500 Scan erhalten wurden, wie die Wellenlänge des Absorptionsmaximums (λ_{Abs}) sowie die relative Absorption der gemessenen Lösung (OD) mit der daraus berechneten Konzentration der Lösung (c). Hierfür können in sehr guter Näherung die Extinktionskoeffizienten für alle Rhodamin- und Oxazin-Farbstoffe $\epsilon = 10^5 \text{ M cm}^{-1}$ und für den Carbocyanin-Farbstoff Cy5 $\epsilon = 2,5 \times 10^5 \text{ M cm}^{-1}$ verwendet werden:

$$c = \frac{OD}{\epsilon d} \text{ mit der Schichtdicke } d, \text{ die aufgrund der Küvetten-Dimension stets } 1 \text{ cm}$$

beträgt. Daher kann man meist 0,1 OD mit 1 μM abschätzen.

Die Daten der Wellenlängen der Fluoreszenzmaxima (λ_{Em}) sowie die Fluoreszenz-Intensitäten (FI) wurden mit dem Fluoreszenz-Spektrometer LS 100 gemessen. Da die Fluoreszenz-Intensität ein Maß für die Stärke der Fluoreszenz und damit Konzentrations-abhängig ist, wurde als Vergleichswert die auf die Konzentration

$$\text{normierte Fluoreszenz-Intensität errechnet: } \text{norm. FI} = \frac{FI}{c}$$

Der Cyanin-Farbstoff hat zwar eine im Vergleich zu Rhodamin- und Oxazin-Farbstoffen 2,5-fach höhere Absorptionsstärke, die normierte Fluoreszenz-Intensität zeigt jedoch eine etwa 20...50mal geringere Fluoreszenz als die verwendeten Rhodamin- und Oxazin-Farbstoffe.

Die Stokes-Verschiebungen der Fluoreszenz-Maxima zu den Absorptions-Maxima liegen zwischen 14 und 31 nm für MR121 bzw. TMR-CS (6-Isomer).

Die Fluoreszenzlebensdauern wurden mit dem Fluoreszenz-Spektrometer IBH gemessen. Mit monoexponentieller Anpassung der Lebensdauern wurden hinreichende Genauigkeiten erreicht, wie anhand der $\chi^2 = 0,99 \dots 1,43$ erkennbar war. Lediglich die Lebensdauern von Cy5-NHS und ATTO650-NHS konnte man etwas besser mittels biexponentieller Anpassung darstellen.

3.2 Kovalent gekoppelte Farbstoffe auf Deckgläschen

Um Aussagen über Änderungen in den spektroskopischen Eigenschaften der kovalent an Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe und Farbstoff-Peptide treffen zu können, wurden die beschichteten Deckgläschen mittels zeitaufgelöster Einzelmolekül-Spektroskopie (siehe 2.2.4) abgetastet und die Intensitäts- und Lebensdauer-Daten als zweidimensionales Bild dargestellt, wobei ein Bildpixel $50 \text{ nm} \times 50 \text{ nm}$ entspricht. Standardmäßig wurden Scannbereiche von $10 \text{ }\mu\text{m} \times 10 \text{ }\mu\text{m}$, bisweilen auch $20 \text{ }\mu\text{m} \times 20 \text{ }\mu\text{m}$ untersucht.

Die Detektions-Effizienz dieses konfokalen Aufbaus liegt bei etwa 10% für trockene Glasoberflächen [Heilemann 2001].

Die resultierenden Abbildungen ermöglichen Aussagen zur Bedeckungsdichte mit fluoreszierenden Molekülen sowie deren Intensitäts- und Lebensdauer-Verteilungen.

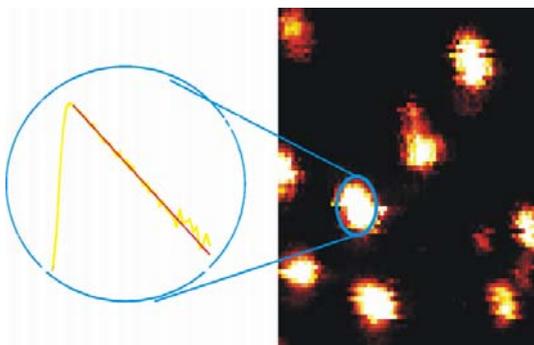


Abbildung 3.2-1: Intensitätsbild einer Glasoberfläche mit Fluoreszenz-Spots eines Farbstoffs und schematische Darstellung der daraus erhältlichen Fluoreszenzlebensdauer (Abklingkurve).

Die beiden folgenden Bilder sind typische Beispiele für Intensitäts-Abbildungen der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffe Cy5 und MR121.

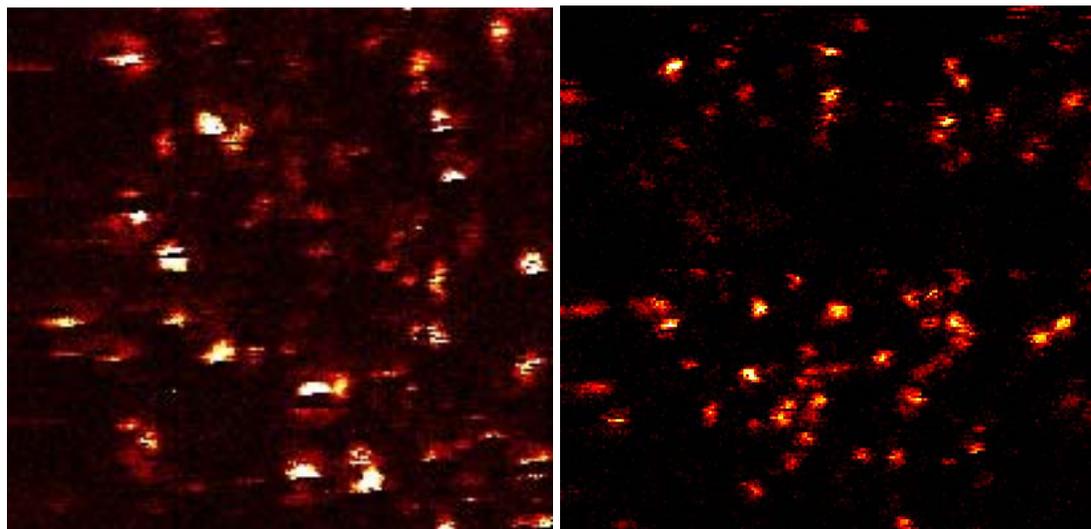


Abbildung 3.2-2: Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121.

Es zeigte sich, dass trotz gleicher Präparation der Oberflächen der Bedeckungsgrad recht unterschiedlich und nicht proportional zur verwendeten Lösungskonzentration (LK) ist. Es wurden Moleküldichten (MD) von $0,26 \dots 0,83 \mu\text{m}^{-2}$ mit durchschnittlich $0,54 \mu\text{m}^{-2}$ für Cy5 und Dichten von $0,21 \dots 1,60 \mu\text{m}^{-2}$ mit durchschnittlich $0,66 \mu\text{m}^{-2}$ für MR121 gefunden. Diese entsprechen Verhältnissen von $\text{MD} : \text{LK} = 56 \dots 2600 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ für Cy5 bzw. $5 \dots 600 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ für MR121 im Vergleich zu den verwendeten Lösungs-Konzentrationen (LK), wodurch die großen Unterschiede in den Präparationsresultaten sichtbar werden. Man muss jedoch beachten, dass die ausgewerteten Scannflächen willkürlich ausgewählte Bereiche der Oberflächen sind, von denen anzunehmen war, dass sie gute Belegungsdichten hatten.

In den Intensitätsbildern erkennt man deutlich Unterbrechungen in den Fluoreszenz-Spots. Befinden sich diese innerhalb eines Fluoreszenz-Bereiches, handelt es sich um sogenanntes „Blinken“. Die Intensität der Unterbrechungsbereiche kann entweder bis zum Hintergrundrauschen absinken oder nur viel dunkler erscheinen. Im ersten Fall spricht man vom „off-Zustand“, im zweiten vom „dim-Zustand“. Desweiteren findet man Fluoreszenz-Bereiche, die abrupt aufhören zu fluoreszieren. In diesem Fall handelt es sich um Photo-Zerstörung. Das Molekül wurde durch das Laserlicht angeregt und chemisch so verändert, dass das Chromophorgerüst zerstört wurde. Das ist ein allgemein akzeptierter Beweis für die Beobachtung einzelner Chromophor-Moleküle.

Mithilfe des Computer-Programms DaVis können die Fluoreszenz-Bereiche hervorgehoben und der Hintergrund ausgeblendet werden. Die ausgeblendeten

Hintergrundintensitäten („background“) liegen für alle ausgewerteten Messungen zwischen 10 und 60 counts, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 100...1000 counts je nach Messung. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 6...1 : 33. Die Daten der Intensitäten bzw. Lebensdauern der einzelnen abgebildeten, fluoreszierenden Moleküle werden durch Farbabstufungen von dunkelblau über hellblau, grün und gelb bis rot veranschaulicht.

Die beiden Beispielbilder zeigen obige Intensitätsbilder mit count-Skalen in DaVis. Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten liegen für die folgenden beiden Bilder unter 30 counts für Cy5 und 25 counts für MR121, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 900 counts für Cy5 und 200 counts für MR121. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 10 bzw. 1 : 8.

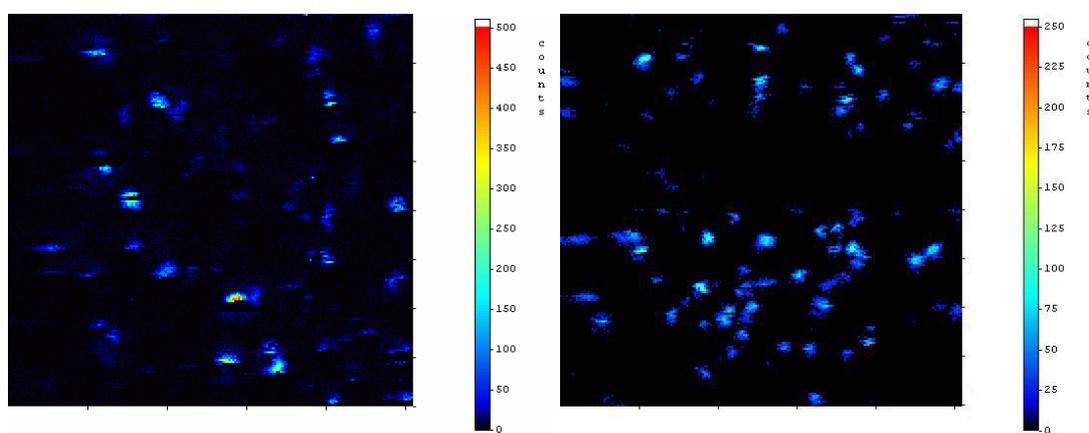


Abbildung 3.2-3: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121.

Die zugehörigen, Hintergrund-ausgeblendeten Lebensdauerbilder zeigen sehr gut die typischen Lebensdauer-Bereiche der Fluoreszenz-Farbstoffe Cy5, kovalent gebunden auf Glasoberflächen, von 1,45 ns bis 2,26 ns mit durchschnittlich 2,05 ns in fünf exemplarischen Messungen und den Bereich für MR121 von 3,36 ns bis 3,91 ns, durchschnittlich 3,68 ns in zehn Messungen.

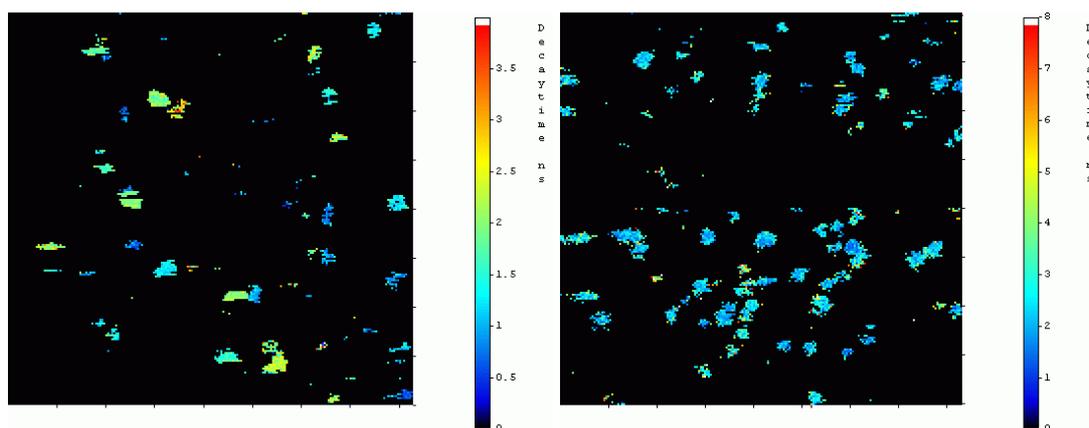


Abbildung 3.2-4: Lebensdauerbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121.

Man sieht hier sehr deutlich, dass der Carbocyanin-Farbstoff Cy5 kurze Lebensdauern um $\tau = 2,0$ ns und der Oxazin-Farbstoff Lebensdauern um $\tau = 3,7$ ns bei kovalenter Bindung auf Glasoberflächen besitzt.

Auf diese Proben wurden jeweils 100 μ l einer Flüssigkeit, die die Molekülketten, die im trockenen Zustand in der Regel flach auf der Glasoberfläche liegen, von dieser löst, ihnen zusätzliche Bewegungsfreiheitsgrade und Deaktivierungskanäle ermöglicht und dadurch die Lebensdauern der Farbstoffe verändert, zugegeben. Der Femtotip-Puffer, der aus Tris-Borat-Puffer (20 mM in H₂O; pH 8,4), 30% Glycerol, 3% PVP K90 und 0,1% Tween 20 besteht, löst durch seine oberflächenaktiven Tensid-Bestandteile effektiv Moleküle von Oberflächen, vermindert die Diffusion der zu beobachtenden Moleküle durch seine Viskosität und löst dennoch wasserlösliche Substanzen durch seinen hydrophilen Charakter. Diese Flüssigkeit wurde in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich zur Trennung von Tetramethylrhodaminthiohydantoin-Aminosäuren mittels Kapillargelelektrophorese [Neuweiler 1998] sowie als fließendes Medium zur Einzelmolekülspektroskopie in Femtotip[®]-Spitzen angewandt, woher auch die Bezeichnung stammt.

Durch diese Mobilisierung würden sich nicht kovalent gekoppelte, also adsorbierte Farbstoff-Moleküle wegbewegen, was in den Intensitätsbildern sichtbar wäre. Als exemplarisches Beispiel sieht man hier den Farbstoff JF9 adsorbtiv auf einer Glasoberfläche, trocken bzw. unter einem Wassertropfen. Auf trockener Oberfläche sieht man sehr deutlich die Fluoreszenz-Signale, unter Flüssigkeit nimmt trotz 5-facher Anregungs-Intensität die Detektionseffizienz stark ab (2...3%). Außerdem sieht man, dass die meisten Moleküle so beweglich sind, dass man keine fixierten, runden Fluoreszenz-Spots mehr erhält [Heilemann 2001].

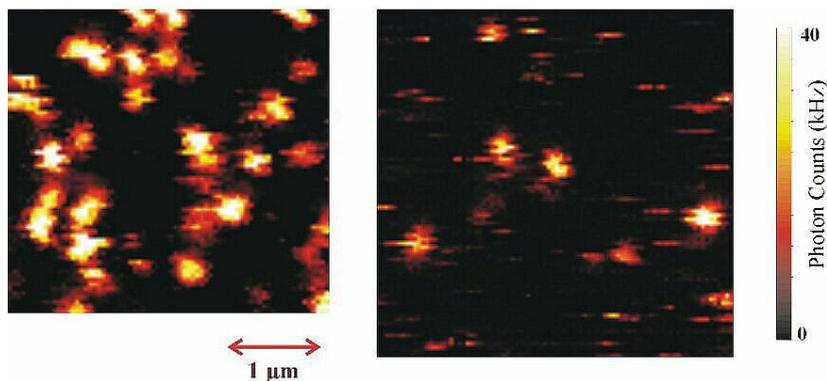


Abbildung 3.2-5: adsorptiv gebundener Rhodamin-Farbstoff JF9 auf Glasoberfläche, links: trocken, rechts: unter Wassertropfen.

Allerdings war es nicht möglich, vor allem aufgrund der oft schlechten Detektionseffizienz, für alle Proben mit FTP Intensitätsbilder zu erhalten. Diese Bilder sind durch die Flüssigkeit unschärfer als die Bilder der trockenen Proben; die Signale sind weniger intensiv und der Hintergrund leuchtet stärker.

Man findet auswertbare Belegungsdichten von $0,14 \dots 1,03 \mu\text{m}^{-2}$ mit durchschnittlich $0,34 \mu\text{m}^{-2}$ für Cy5 und $0,08 \dots 0,60 \mu\text{m}^{-2}$ mit durchschnittlich $0,32 \mu\text{m}^{-2}$ für MR121 unter FTP. Diese entsprechen Verhältnissen von $\text{MD} : \text{LK} = 2 \dots 2100 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ für Cy5 und $1 \dots 270 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ für MR121.

Die folgenden Bilder zeigen solche Scannflächen für Cy5 und MR121 nach Zugabe von FTP.

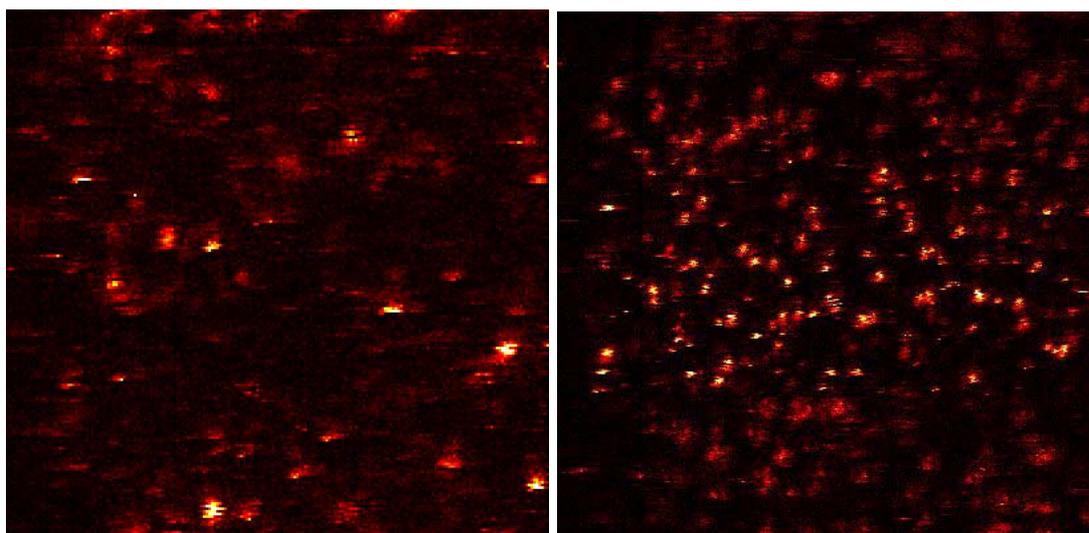


Abbildung 3.2-6: Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121 nach Zugabe von FTP.

(Cy5-Bild: $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$; MR121-Bild: $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$)

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten liegen für die folgenden beiden Bilder unter 30 counts für Cy5 und 15 counts für MR121, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 300 counts für Cy5 und 150 counts für MR121, jeweils unter FTP. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von jeweils 1 : 10.

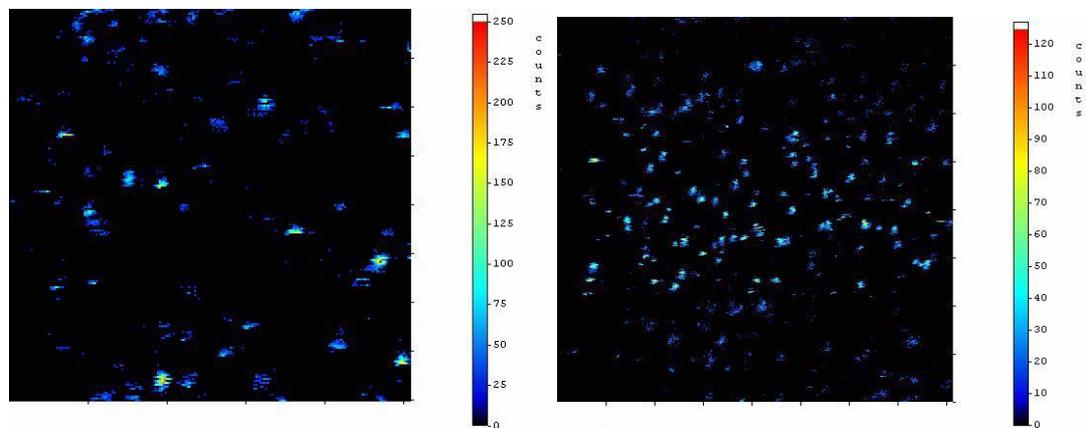


Abbildung 3.2-7: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121 nach Zugabe von FTP. (Cy5-Bild: 10 μm \times 10 μm ; MR121-Bild: 20 μm \times 20 μm)

Die Lebensdauern für kovalent auf Glasoberflächen gekoppeltes Cy5 unter FTP beträgt durchschnittlich $\tau = 2,15$ ns im Bereich von 1,91 ns bis 2,65 ns bei sieben Messungen. Für MR121 findet man durchschnittliche Lebensdauern von $\tau = 3,06$ ns im Bereich 2,54 ns bis 3,34 ns in drei Messungen.

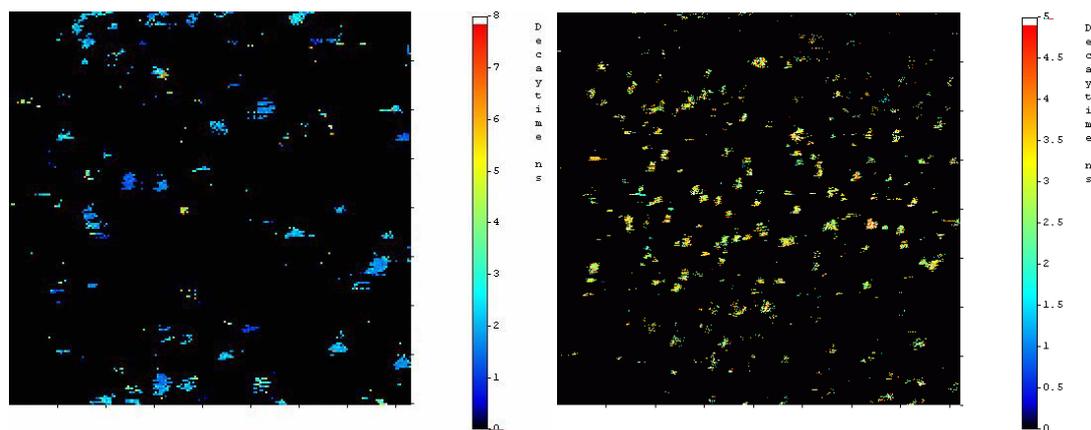


Abbildung 3.2-8: Lebensdauerbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121 nach Zugabe von FTP.

Wenn man beide Farbstoffe, Cy5 und MR121, gemeinsam auf die Glasoberfläche bindet, sind die Belegung und die Anteile beider Farbstoff noch schwieriger vorauszusagen. So findet man Belegungsdichten von $0,16...0,66 \mu\text{m}^{-1}$ mit durchschnittlich $0,45 \mu\text{m}^{-1}$ und Dichte-zu-Konzentration-Verhältnisse von $\text{MD} : \text{LK} = 15...600 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$.

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten des DaVis-Bildes liegen für das rechte der folgenden beiden Bilder unter 30 counts für Cy5 und MR121 zusammen, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 1000 counts. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 33.

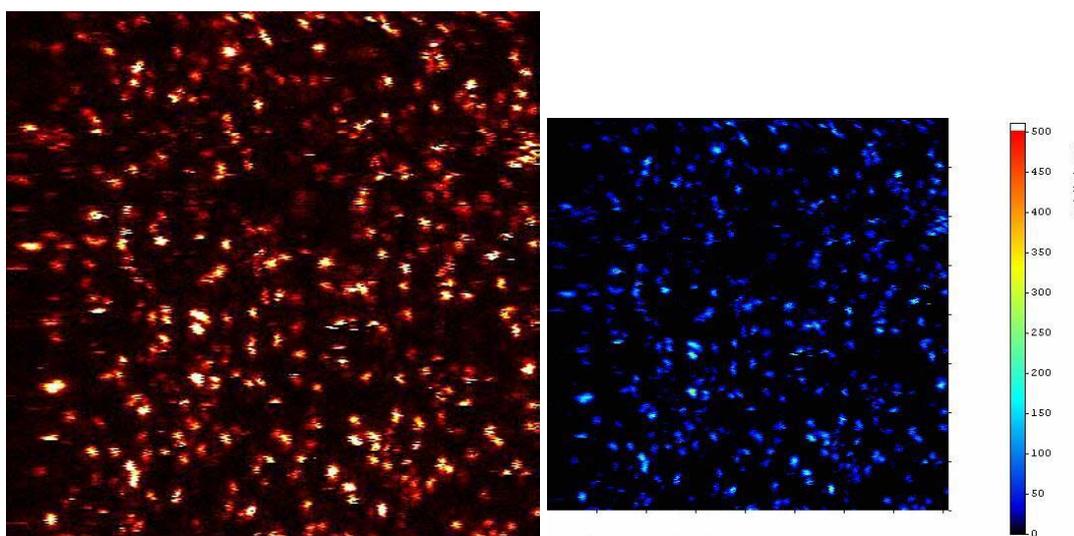


Abbildung 3.2-9: Intensitätsbilder beider kovalent auf Glasoberflächen gekoppelter Farbstoffe Cy5 und MR121 ($20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$); links: Intensitätsbild der Rohdaten aus MultiFluorImage; rechts: Hintergrund-korrigiertes Bild aus DaVis.

Der Durchschnitt der gemessenen Lebensdauern mit $2,97 \text{ ns}$ spiegelt sehr gut die Anteile der beiden Farbstoffe wider, wobei ein Bereich von $2,47...3,61 \text{ ns}$ in sieben Messungen gefunden wurde.

Die folgende Tabelle fasst die bisherigen Durchschnittswerte für die Lebensdauern der reinen, auf Glas gebundenen Farbstoffe Cy5 und MR121 noch einmal zusammen.

| τ_g (MW ^(a)) | Lösung/Ensemble | | Oberfläche | | |
|-------------------------------|-----------------|-----------------------------|------------|---------|--------------------|
| | [ns] | (H ₂ O/MeCN 1:1) | (MeCN) | trocken | FTP ^(b) |
| Cy5 | | 1,0 | 1,0 | 2,0 | 2,2 |
| Cy5/MR121 | | - | - | 3,0 | - |
| MR121 | | 2,9 | 4,4 | 3,7 | 3,1 |

^(a) MW: Mittelwert; ^(b) „Femtotip-Puffer“

Tabelle 3.2-1: durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauern τ_g der Farbstoffe Cy5 und MR121 in Lösung (Ensemble-Messung) sowie auf Glasoberfläche, trocken und unter FTP-Lösung.

3.3 Kovalent gekoppelte Farbstoff-Peptide auf Deckgläschen

Das Modellpeptid Uni370 enthält ein Tryptophan (Trp) als vierte Aminosäure, gezählt vom N-Terminus. Dieser Tryptophan-Rest kann Fluoreszenz-Farbstoffe löschen. Das Peptid Uni371 enthält anstelle des Tryptophan einen Phenylalanin-Rest (Phe), weshalb die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe praktisch nicht beeinflusst werden sollten.

Für das Cy5- bzw. MR121-markierte Modellpeptid Uni370 zeigen die beiden folgenden Abbildungen typische Intensitätsbilder der abgetasteten Glasoberflächen:

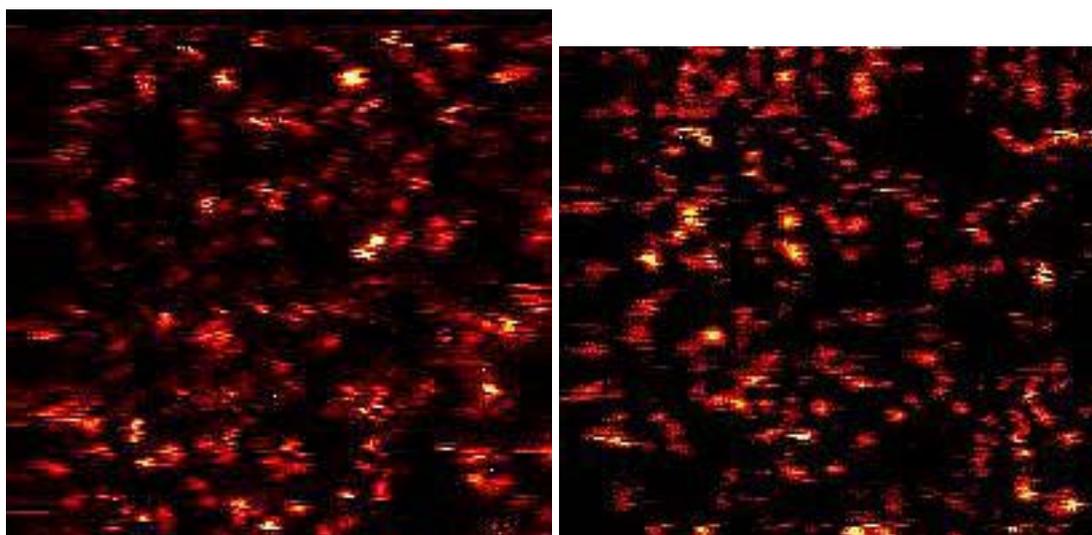


Abbildung 3.3-1: Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121.

(Cy5-Bild: 10 μm \times 10 μm ; MR121-Bild: 10 μm \times 9,5 μm)

Hier findet man Belegungsdichten von $0,43 \dots 1,34 \mu\text{m}^{-1}$ mit durchschnittlich $0,85 \mu\text{m}^{-1}$ und Dichte-zu-Konzentration-Verhältnisse von $\text{MD} : \text{LK} = 79 \dots 430 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ für das Cy5-markierte Modellpeptid Uni370-Cy5. Für Uni370-MR121 findet man Belegungsdichten von $0,23 \dots 1,07 \mu\text{m}^{-1}$ mit durchschnittlich $0,68 \mu\text{m}^{-1}$ bzw. $\text{MD} : \text{LK} = 75 \dots 467 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$.

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten liegen für die folgenden beiden Bilder unter 60 counts für Uni370-Cy5 und 50 counts für Uni370-MR121, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 600 counts für Uni370-Cy5 und 500 counts für Uni370-MR121. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 10.

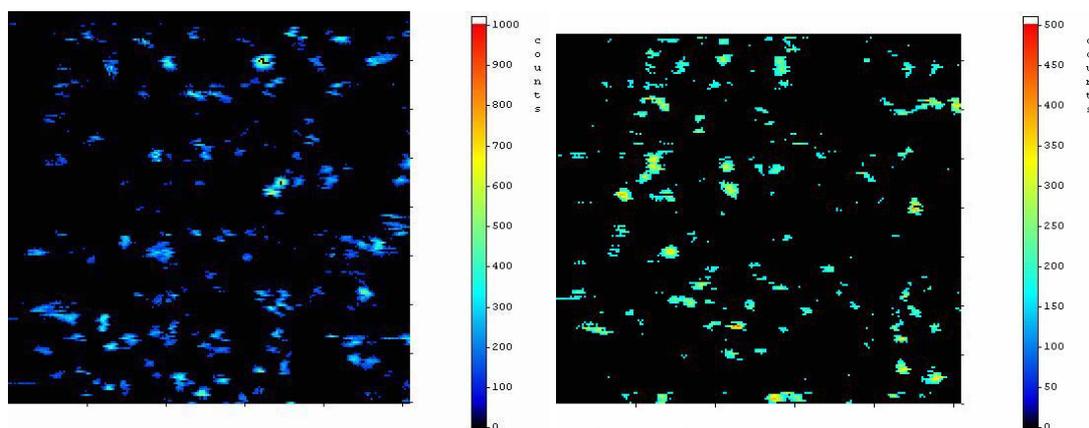


Abbildung 3.3-2: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 mit Intensitätsskalen in DaVis.

(Cy5-Bild: $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$; MR121-Bild: $10 \mu\text{m} \times 9,5 \mu\text{m}$)

Die Lebensdauern für kovalent auf Glasoberflächen gekoppelte Uni370-Cy5 beträgt durchschnittlich $\tau = 2,25 \text{ ns}$ im Bereich von $1,95 \text{ ns}$ bis $2,75 \text{ ns}$ in drei Messungen. Für Uni370-MR121 findet man durchschnittliche Lebensdauern von $\tau = 3,16 \text{ ns}$ im Bereich $3,08 \text{ ns}$ bis $3,28 \text{ ns}$ in drei Messungen.

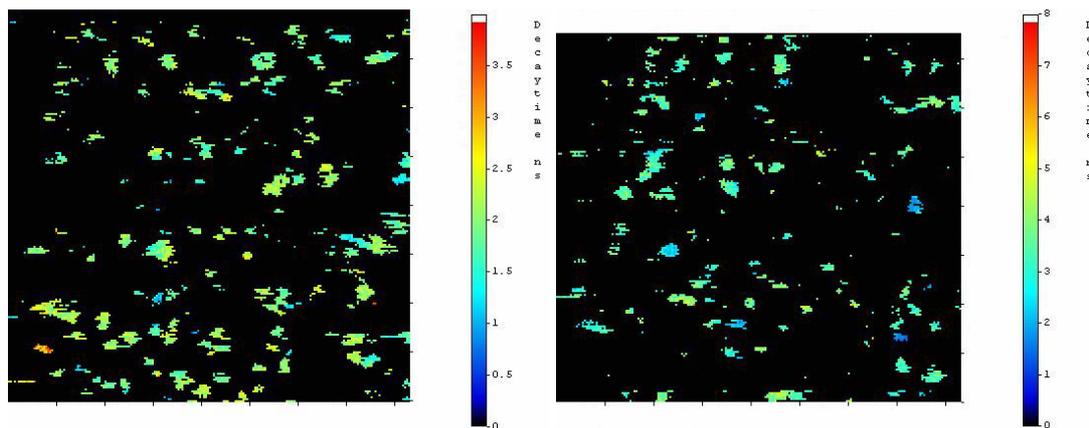


Abbildung 3.3-3: Hintergrund-korrigierte Lebensdauerbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 (MR121-Bild: $10 \mu\text{m} \times 9,5 \mu\text{m}$).

Um die Kopplungsverhalten zweier verschieden markierter Peptide auf gemeinsamer Oberfläche zu beobachten und deren Eigenschaften zu untersuchen, wurde ein Gemisch aus Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 gemeinsam auf die modifizierte Glasoberfläche gebunden.

Für diese gemischt gebundenen Substanzen Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 erhält man Intensitätsbilder wie das folgende:

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten des DaVis-Bildes liegen für das rechte der folgenden beiden Bilder unter 30 counts für Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 zusammen, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 300 counts. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 10.

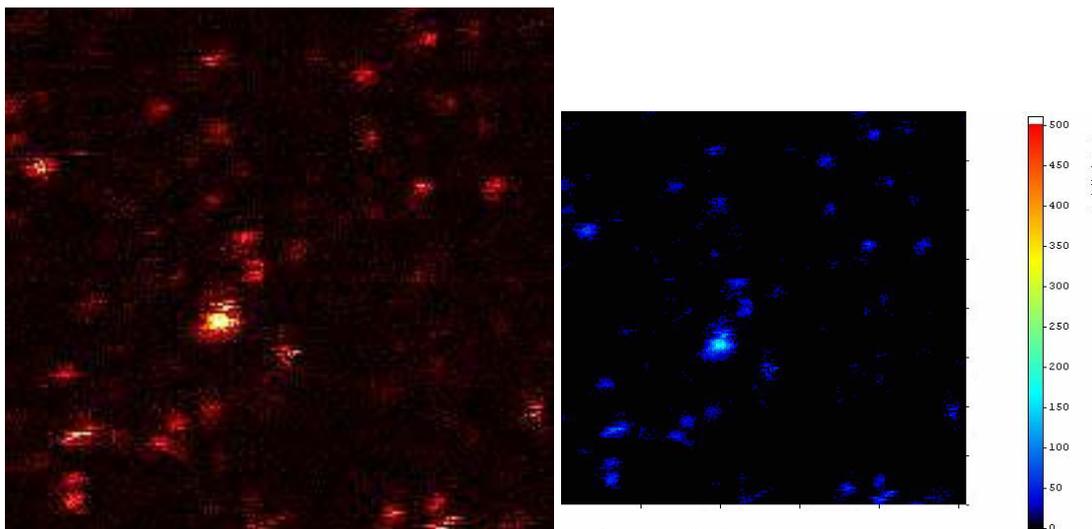


Abbildung 3.3-4: Links: Intensitätsbild der beiden gemeinsam kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121; Rechts: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbild mit Intensitätsskalen in DaVis.

Hier findet man Belegungsdichten von $0,26 \mu\text{m}^{-1}$ und Dichte-zu-Konzentrations-Verhältnisse von $\text{MD} : \text{LK} = 173 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ für beide Modellpeptide Uni370, markiert mit Cy5 und MR121.

Die durchschnittliche Lebensdauer beider markierter Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 beträgt $\tau = 3,34 \text{ ns}$ in einer Messung.

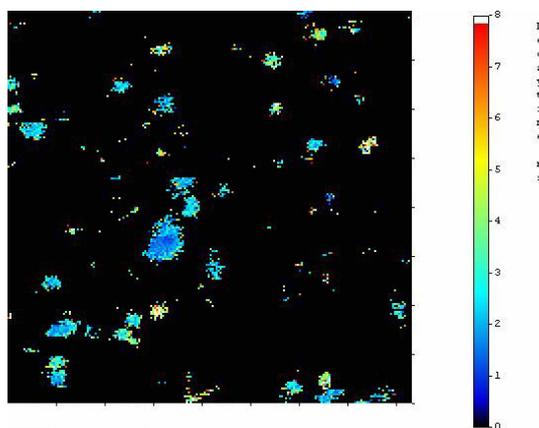


Abbildung 3.3-5: Hintergrund-korrigierte Lebensdauerbilder der beiden gemeinsam gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121.

Die beiden folgenden Abbildungen sind typische Intensitätsbilder für Uni371-Cy5 bzw. Uni371-MR121:

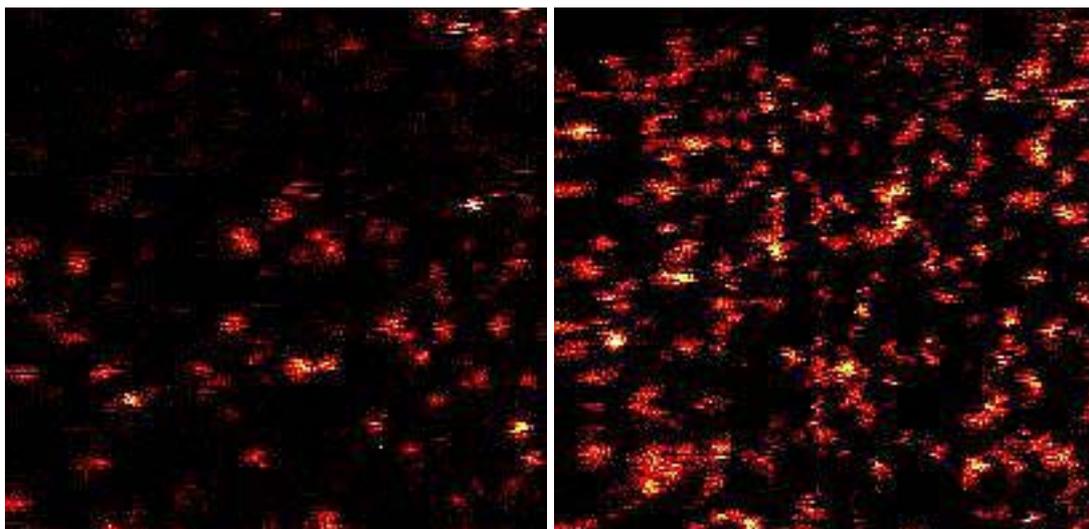


Abbildung 3.3-6: Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121.

Hier findet man Belegungsdichten von $0,34...0,1,19 \mu\text{m}^{-1}$ mit durchschnittlich $0,77 \mu\text{m}^{-1}$ und Dichte-zu-Konzentration-Verhältnisse von $\text{MD} : \text{LK} = 119...340 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ für das Cy5-markierte Modellpeptid Uni370-Cy5. Für Uni370-MR121 findet man Belegungsdichten von $0,07...0,70 \mu\text{m}^{-1}$ mit durchschnittlich $0,29 \mu\text{m}^{-1}$ bzw. $\text{MD} : \text{LK} = 40...1400 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$.

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten liegen für die folgenden beiden Bilder unter 25 counts für Uni371-Cy5 und 10 counts für Uni371-MR121, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 300 counts für Uni371-Cy5 und 300 counts für Uni371-MR121. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 12 bzw. 1 : 30.

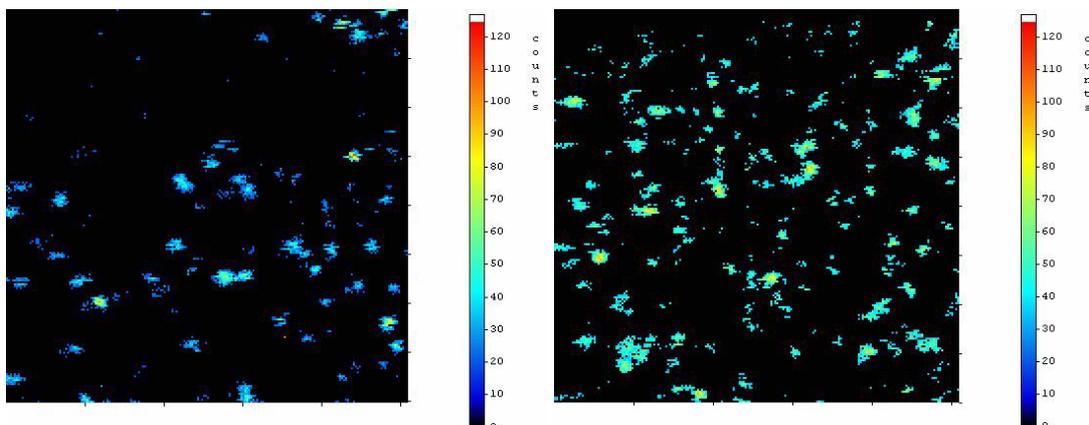


Abbildung 3.3-7: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 mit Intensitäts-skalen in DaVis.

Die Lebensdauern für kovalent auf Glasoberflächen gekoppelte Uni371-Cy5 beträgt durchschnittlich $\tau = 3,27$ ns im Bereich von 1,95 ns bis 4,60 ns in zwei Messungen. Für Uni371-MR121 findet man durchschnittliche Lebensdauern von $\tau = 4,02$ ns im Bereich 2,68 ns bis 4,85 ns in fünf Messungen.

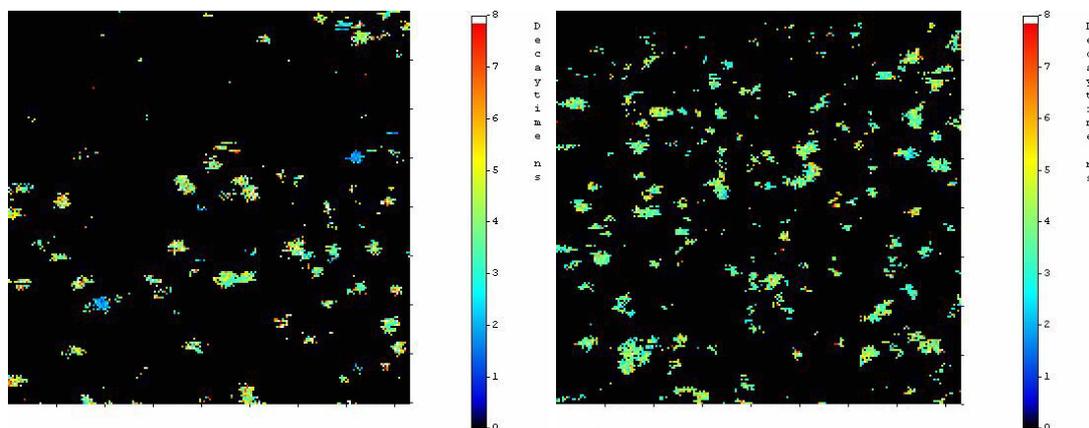


Abbildung 3.3-8: Hintergrund-korrigierte Lebensdauerbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Uni371-Cy5 und Uni371-MR121.

Um die Kopplungsverhalten zweier verschieden markierter Peptide auf gemeinsamer Oberfläche zu beobachten und deren Eigenschaften zu untersuchen, wurde ein Gemisch aus Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 gemeinsam auf die modifizierte Glasoberfläche gebunden.

Für diese gemischt gebundenen Substanzen Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 erhält man Intensitätsbilder wie das folgende:

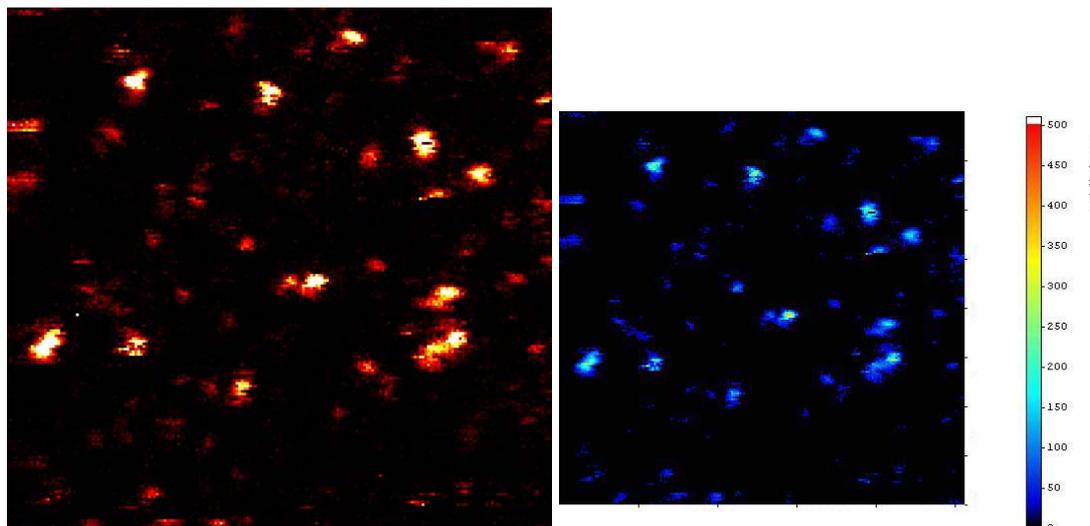


Abbildung 3.3-9: Links: Intensitätsbild der beiden gemeinsam kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121; Rechts: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbild mit Intensitätsskalen in DaVis.

Hier findet man Belegungsdichten von $0,05 \dots 0,44 \mu\text{m}^{-1}$ mit durchschnittlich $0,21 \mu\text{m}^{-1}$ und Dichte-zu-Konzentration-Verhältnisse von $\text{MD} : \text{LK} = 33 \dots 293 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ für beide Modellpeptide Uni371, markiert mit Cy5 und MR121. Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten des DaVis-Bildes liegen für das rechte der obigen beiden Bilder unter 10 counts für Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 zusammen, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 300 counts. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 30.

Die durchschnittliche Lebensdauer beider markierter Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 beträgt zusammen $\tau = 3,93 \text{ ns}$ im Bereich von 3,36 ns bis 4,46 ns in fünf Messung.

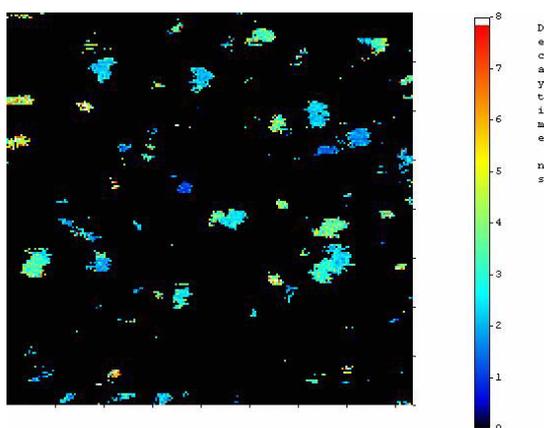


Abbildung 3.3-10: Hintergrund-korrigierte Lebensdauerbilder der beiden gemeinsam gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121.

Die folgende Tabelle fasst noch einmal die Durchschnittswerte für die Lebensdauern der Peptid-gebundenen Farbstoffe Cy5 und MR121 zusammen.

| τ_g (MW ^(a)) [ns] | Lösung/Ensemble | | Oberfläche |
|---------------------------------------|-----------------------------|--------|------------|
| | (H ₂ O/MeCN 1:1) | (MeCN) | trocken |
| 371C ⁽¹⁾ | 1,2 | 1,1 | 3,3 |
| 370C ⁽¹⁾ | 1,1 | 1,1 | 2,3 |
| 371M ⁽¹⁾ | 3,0 | 3,9 | 4,0 |
| 370M ⁽¹⁾ | 2,6 | 3,6 | 3,2 |
| 371C/M ⁽¹⁾ | - | - | 3,9 |
| 370C/M ⁽¹⁾ | - | - | 3,3 |

^(a) MW: Mittelwert

Tabelle 3.3-1: durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauern τ_g der untersuchten Farbstoff-Peptide in Lösung (Ensemble-Messung) sowie an trockenen Glasoberflächen.

⁽¹⁾ C und M charakterisieren Cy5 bzw. MR121; 370 und 371 charakterisieren die Peptide Uni370 bzw. Uni371)

3.4 Kovalent gekoppeltes Tetramethylrhodamin-isothiocyanat auf Gold-Oberfläche

Goldbeschichtete Siliziumplättchen mit Aminogruppen in regelmäßigen Abständen wurden mit TMR-ITC kovalent gekoppelt.

Die Oberflächen wurden mittels zeitaufgelöster Einzelmolekül-Spektroskopie (siehe Kapitel 2.2.4) abgetastet und die Intensitäts-Daten als zweidimensionales Bild dargestellt. Die Laserleistung betrug hierzu 5 μ W am Objektiv.

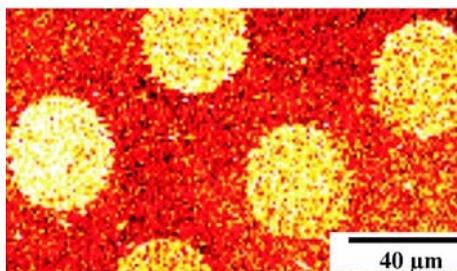


Abbildung 3.4-1: Ausschnitt aus einem Intensitätsbild von TMR-gebundenen Regionen einer Goldoberfläche mit 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol-Monoschicht, selektiv mittels Elektronenstrahl reduziert zu Aminofunktionen.

4 Auswertung und Diskussion

4.1 Identifizierung und Zuordnung der Spezies durch ihre spektroskopischen Daten

Da das Ziel der Untersuchungen war, anhand der unterschiedlichen spektroskopischen Eigenschaften der Fluoreszenz-Farbstoffe in der jeweiligen Umgebung die Proben zu unterscheiden, musste man sich bestimmte Parameter näher ansehen.

Die relevanten Daten, die durch spektral aufgelöste Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (SFLIM) erhalten werden, sind die Intensitäten und die Fluoreszenzlebensdauer, jeweils auf 2 Kanälen (I_1 kleiner bzw. I_2 größer als 670 nm, also 640...670 nm bzw. 670...700 nm) sowie deren Summe. Aus den Intensitäten wurde die *anteilige Intensität* F_2 errechnet, die angibt, ob das beobachtete Molekül eher Cy5 ($\lambda_{Em} = 670$ nm) oder MR121 ($\lambda_{Em} = 663$ nm) zuzurechnen ist. Der F_2 -Wert ist wie die Lebensdauer universell für Vergleiche verwendbar, wohingegen sich die ursprünglichen, gemessenen Intensitäten von Messung zu Messung und selbst während einer Messung verändern können. Der Hauptgrund für letzteren Fall ist die häufige Instabilität der Fokussierung des Objektivs (z-Achse). Die gemessenen Intensitäten streuen also stark, die F_2 -Werte sind homogener.

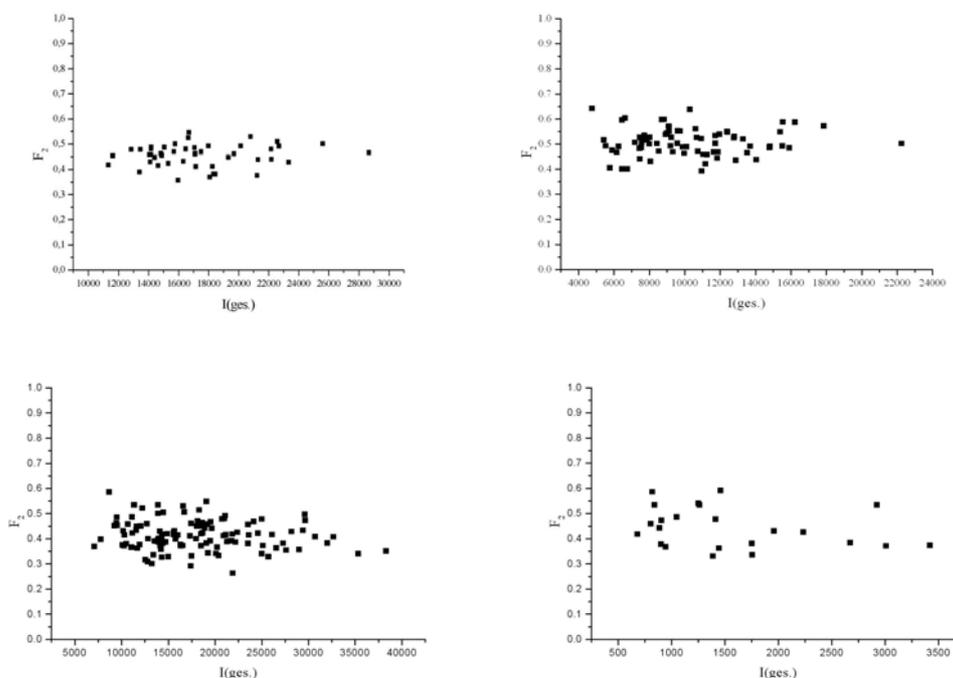


Abbildung 4.1-1: Diagramme der gemessenen Gesamtintensität (Abszisse) im Vergleich zu den zugehörigen F_2 -Werten (Ordinate) am Beispiel von Messungen zu MR121, Uni370-MR121, Uni371-Cy5 und Uni371-Cy5/Uni371-MR121.

An diesen Beispielen sieht man gut, dass sich die Intensitäten, selbst einzelner Messungen, über große Bereiche erstrecken können, der F_2 -Wert aber sehr enge, homogene Bereiche einnehmen kann.

Schon anhand dieser Diagramme ist erkennbar, dass die *anteilige Intensität* F_2 allein, die stets um 0,5 bzw. 50% liegt, keine Aussage bezüglich Zuordnungen der einzelnen Spezies erlaubt.

Es erwies sich als sinnvoll, sich zuerst die Lebensdauer-Verteilung der Farbstoffe und Farbstoff-Peptide anzusehen. Dazu wurden Histogramme der Lebensdauern aus den Fluoreszenzbildern mit den zugehörigen *Gauss*-Kurven erstellt. Dabei ist auch der Unterschied der Lebensdauern der Farbstoffe auf trockenen Glasoberflächen und unter Femtotip-Puffer (FTP) beachtenswert.

Auf den ersten vier Bildern erkennt man, dass sowohl Cy5 als auch MR121 innerhalb ihrer Lebensdauer-Bereiche von 1...3 ns bzw. 2...5 ns Unterschiede aufweisen, je nach dem ob der Farbstoff auf der trockenen Oberfläche liegt oder ob er zusätzliche Freiheitsgrade aufgrund der umgebenden Flüssigkeit hat.

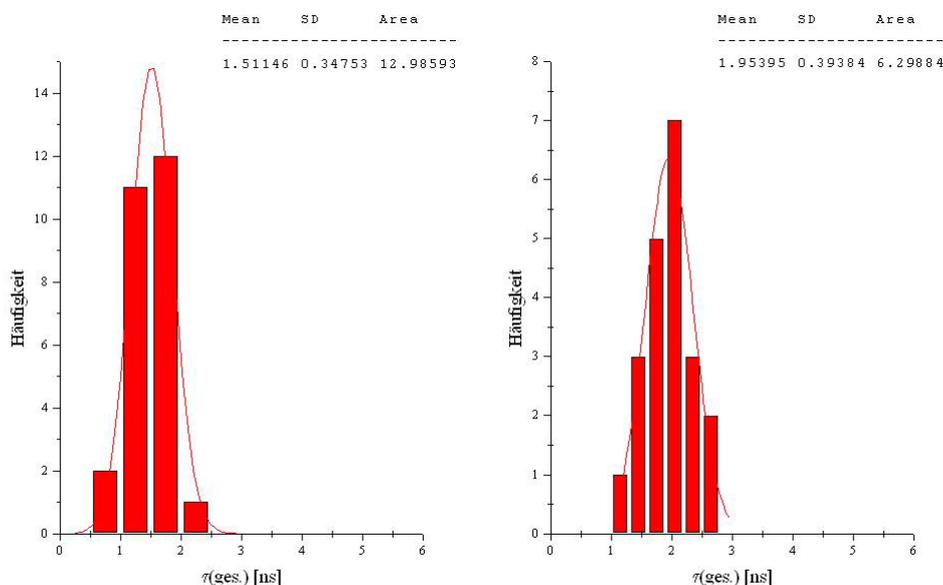


Abbildung 4.1-2: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für Cy5 auf trockener Glasoberfläche und unter FTP.

Die Auswertung der Histogramme aller Messungen ergab für kovalent gekoppeltes Cy5 auf trockener Oberfläche ein mittleres Lebensdauer-Maximum von $(2,0 \pm 0,3)$ ns und $(2,2 \pm 0,4)$ ns unter FTP. Cy5 zeigt – im Vergleich hierzu – eine Lebensdauer von 1,0 ns in Acetonitril wie auch in Wasser/Acetonitril (1 : 1).

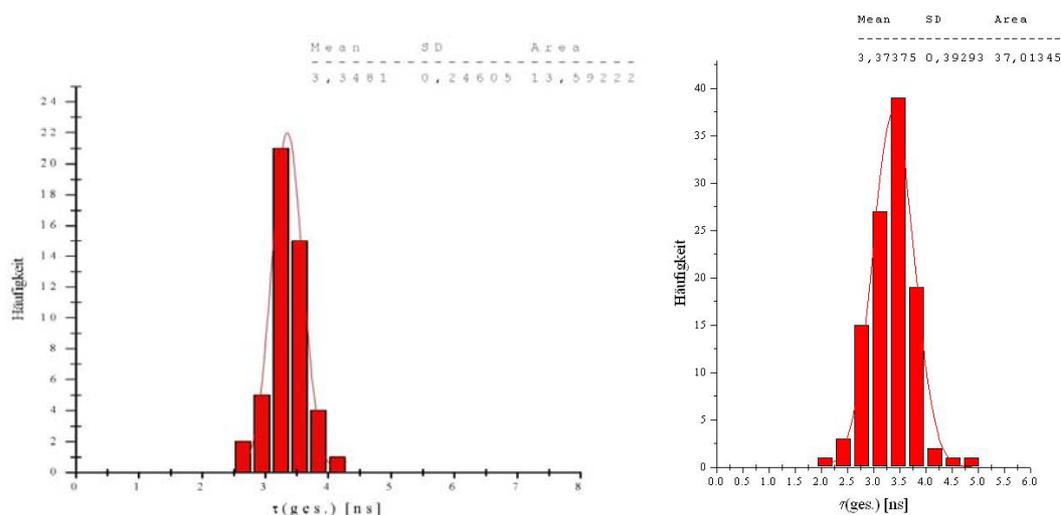


Abbildung 4.1-3: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für MR121 auf trockener Glasoberfläche und unter FTP.

Kovalent gekoppeltes MR121 zeigte mittlere Lebensdauern von $(3,7 \pm 0,2)$ ns auf trockener Oberfläche und $(3,1 \pm 0,4)$ ns unter FTP. Im unpolaren Acetonitril wurde für MR121 eine Lebensdauer von 4,4 ns und in Wasser/Acetonitril (1 : 1) 2,9 ns gefunden.

Wenn man beide Farbstoffe gemeinsam auf die Oberfläche bindet, kann man diese sehr gut anhand ihrer unterschiedlichen Lebensdauern unterscheiden. Das folgende Bild zeigt nicht den erreichten Optimalfall, sondern ein typisches Beispiel für die Überlappungen der *Gauß*-Kurven der Lebensdauern beider Farbstoffe und die viel höhere Ankopplungstendenz von Cy5 an die aminomodifizierte Glasoberfläche gegenüber MR121, ausgedrückt durch die Fläche unter den Kurven.

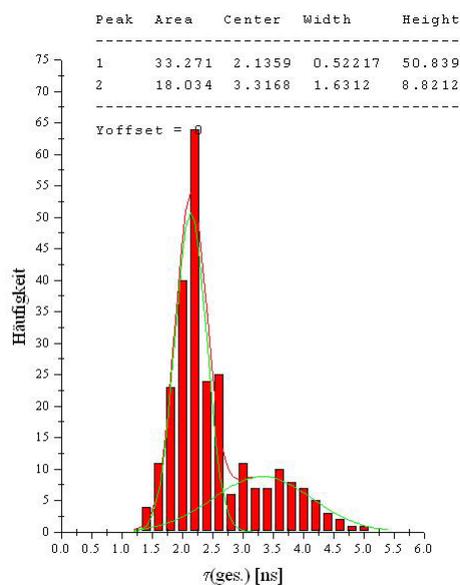


Abbildung 4.1-4: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für gemeinsam gebundene Cy5 (links) und MR121 (rechts) auf trockener Glasoberfläche.

Die Maxima der Lebensdauer-Histogramme von $(2,2 \pm 0,5)$ ns und $(3,6 \pm 1,0)$ ns liegen um durchschnittlich 1,5 ns voneinander entfernt.

In den ausgewerteten Experimenten wurden für die Farbstoffe Zuordnungssicherheiten von 90,4% für Cy5 bezüglich MR121 und 92,9% für MR121 bezüglich Cy5 bzw. 92,0% insgesamt für beide Spezies erreicht.

Die folgende Tabelle fasst diese Lebensdauer-Daten für die Farbstoffe, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gebunden, zusammen.

| Lebensdauer- Verteilungen | 172- C92M9 | 172- C92M9_1 | 172- C92M9_2 | 172- C92M9_3 | 188- M9C10- 5 μ W_1 |
|---|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|
| Integral 1 ¹⁾ | 83,99 | 10,67 | 37,55 | 33,26 | 10,40 |
| Integral Überlappg. von 1 ¹⁾ | 24,03 | 0,21 | 0,00 | 3,94 | 0,57 |
| Integral 2 ²⁾ | 67,47 | 4,92 | 4,62 | 17,85 | 3,79 |
| Integral Überlappg. von 2 ²⁾ | 3,77 | 0,48 | 0,00 | 0,56 | 0,64 |
| Summe Integrale | 151,45 | 15,59 | 42,17 | 51,12 | 14,20 |
| Summe Überlappungen | 27,80 | 0,69 | 0,00 | 4,49 | 1,21 |
| Ident.-unsicher heit 1 [%] ¹⁾ | 28,6 | 2,0 | 0,0 | 11,8 | 5,5 |
| Ident.-unsicher heit 2 [%] ²⁾ | 5,6 | 9,7 | 0,0 | 3,1 | 16,8 |
| Ges.-Ident.-unsicher heit [%] | 18,4 | 4,4 | 0,0 | 8,8 | 8,5 |
| Ident.-sicherh. 1 [%] ¹⁾ | 71,4 | 98,0 | 100,0 | 88,2 | 94,5 |
| Ident.-sicherh. 2 [%] ²⁾ | 94,4 | 90,3 | 100,0 | 96,9 | 83,2 |
| Ges.-Ident.-sicher heit [%] | 81,6 | 95,6 | 100,0 | 91,2 | 91,5 |
| Ø Ident.-sicher heit 1 [%] ¹⁾ | 90,4 | | | | |
| Ø Ident.-sicher heit 2 [%] ²⁾ | 92,9 | | | | |
| Ø Ges.-Ident.-sicher heit [%] | 92,0 | | | | |

Tabelle 4.1-1: Werte repräsentativer Messungen zu Gauß-Integralen der Lebensdauer-Verteilungen und resultierende Zuordnungssicherheiten bzw. -unsicherheiten für Cy5 und MR121 auf trockener Glasoberfläche.

(¹⁾ Cy5; (²⁾ MR121; Ø: Mittelwert; Die „Null-Werte“ unterscheiden sich erst ab der 3. Nachkommastelle.)

Die beiden Cy5- und MR121-markierten Modellpeptide ergaben die folgenden Werte:

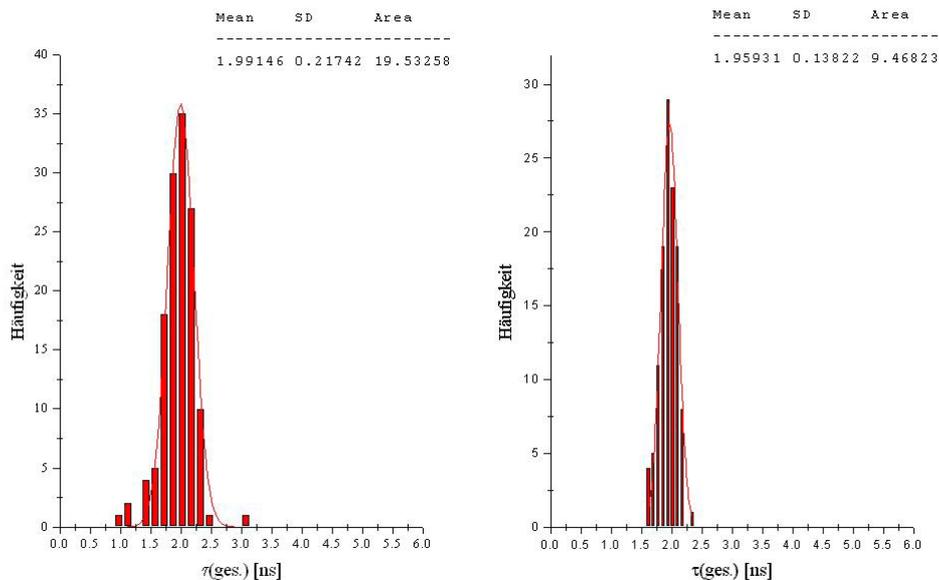


Abbildung 4.1-5: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für Uni370-Cy5 (links) und Uni371-Cy5 (rechts) auf trockener Glasoberfläche.

Kovalent auf Glas gekoppeltes Uni370-Cy5 besitzt eine mittlere Lebensdauer von $(2,0 \pm 0,2)$ ns und Uni371-Cy5 $(2,0 \pm 0,1)$ ns. Bei Ensemble-Messungen in Acetonitril findet man 1,1 ns und 1,2 ns in Wasser/Acetonitril (1 : 1) für Uni371-Cy5 sowie 1,1 ns in Acetonitril wie auch in Wasser/Acetonitril (1 : 1) für Uni370-Cy5.

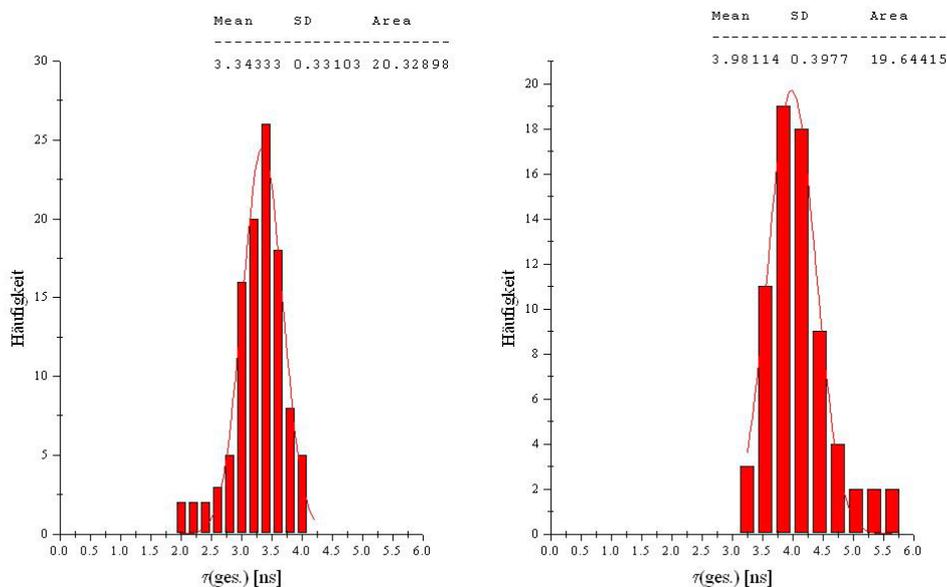


Abbildung 4.1-6: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für Uni370-MR121 (links) und Uni371-MR121 (rechts) auf trockener Glasoberfläche.

Kovalent auf Glas gekoppeltes Uni370-MR121 besitzt eine mittlere Lebensdauer von $(3,2 \pm 0,3)$ ns und Uni371-MR121 $(4,0 \pm 0,4)$ ns. Bei Ensemble-Messungen in Acetonitril findet man 3,6 ns und 2,6 ns in Wasser/Acetonitril (1 : 1) für Uni370-MR121 sowie 3,9 ns in Acetonitril und 3,0 ns in Wasser/Acetonitril (1 : 1) für Uni371-MR121.

Gemeinsam auf modifizierte Glasoberflächen kovalent gekoppelte Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 bzw. Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 lassen sich leicht über ihre Lebensdauern unterscheiden wie die folgenden beiden Bilder veranschaulichen.

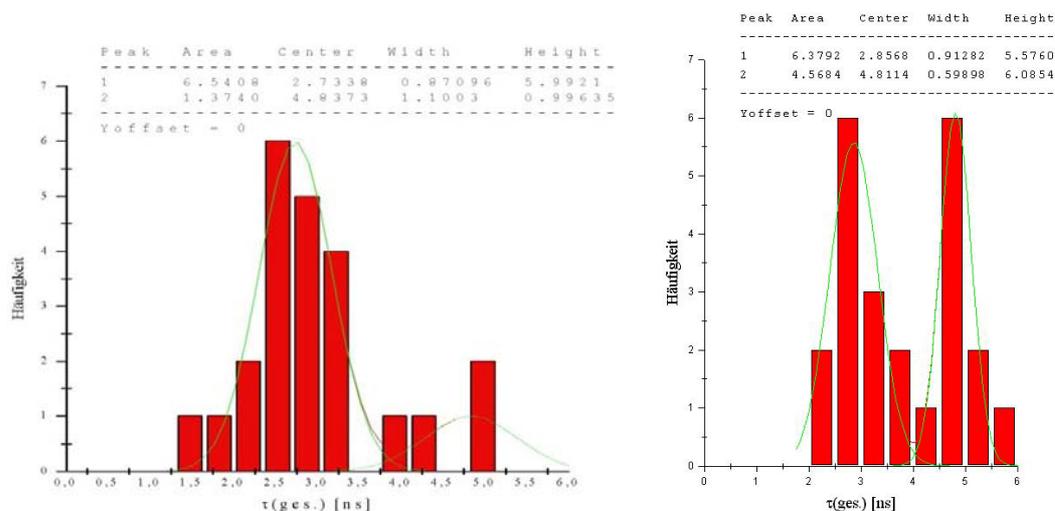


Abbildung 4.1-7: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für gemeinsam auf Glasoberfläche gekoppelte Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 (linkes Bild) sowie Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 (rechtes Bild).

Die Lebensdauern der beiden Farbstoff-Spezies liegen bei $(2,7 \pm 0,9)$ ns und $(4,8 \pm 1,1)$ ns für das markierte Modellpeptid Uni370 und bei $(3,0 \pm 0,8)$ ns und $(4,8 \pm 0,7)$ ns für das markierte Modellpeptid Uni371.

In den ausgewerteten Experimenten wurden für das markierte Modellpeptid Uni370 Zuordnungssicherheiten von 99,1% für Uni370-Cy5 bezüglich Uni370-MR121 und 98,0% für Uni370-MR121 bezüglich Uni370-Cy5 bzw. 98,9% insgesamt für beide Spezies erreicht.

Für das Modellpeptid Uni371 wurden Zuordnungssicherheiten von 98,5% für Uni371-Cy5 bezüglich Uni371-MR121 und 95,0% für Uni371-MR121 bezüglich Uni371-Cy5 bzw. 98,1% für beide Spezies insgesamt erreicht.

Die folgende Tabelle fasst diese Lebensdauer-Daten für die Farbstoffmarkierten Modellpeptide, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gebunden, zusammen.

| Lebensdauer- Verteilungen | 190- 370M92C9H- 4 μ W_1 | 190- 371M92C9H- 4 μ W | 190- 371M92C9H- 4 μ W_3 | 190- 371M92C9H- 4 μ W_5 | 190- 371M92C9H- 5 μ W_4 |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Integral 1 ¹⁾ | 6,54 | 9,20 | 14,73 | 6,33 | 24,53 |
| Integral Über- lappg. von 1 ¹⁾ | 0,06 | 0,33 | 0,10 | 0,02 | 0,38 |
| Integral 2 ²⁾ | 1,37 | 5,50 | 6,75 | 4,57 | 1,95 |
| Integral Über- lappg. von 2 ²⁾ | 0,03 | 0,22 | 0,07 | 0,03 | 0,28 |
| Summe Integrale | 7,91 | 14,70 | 21,48 | 10,90 | 26,47 |
| Summe Über- lappungen | 0,09 | 0,55 | 0,17 | 0,05 | 0,66 |
| Ident.-unsicher- heit 1 [%] ¹⁾ | 0,9 | 3,6 | 0,7 | 0,4 | 1,5 |
| Ident.-unsicher- heit 2 [%] ²⁾ | 2,0 | 4,0 | 1,1 | 0,7 | 14,5 |
| Ges.-Ident.-un- sicherheit [%] | 1,1 | 3,7 | 0,8 | 0,5 | 2,5 |
| Ident.-sicher- heit 1 [%] ¹⁾ | 99,1 | 96,4 | 99,3 | 99,6 | 98,5 |
| Ident.-sicher- heit 2 [%] ²⁾ | 98,0 | 96,0 | 98,9 | 99,3 | 85,5 |
| Ges.-Ident.- sicherheit [%] | 98,9 | 96,3 | 99,2 | 99,5 | 97,5 |
| Ø Ident.-sicher- heit 1 [%] ¹⁾ | 99,1 | 98,5 | | | |
| Ø Ident.-sicher- heit 2 [%] ²⁾ | 98,0 | 95,0 | | | |
| Ø Ges.-Ident.- sicherheit [%] | 98,9 | 98,1 | | | |

Tabelle 4.1-2: Werte repräsentativer Messungen zu Gauß-Integralen der Lebensdauer-Verteilungen und resultierende Zuordnungssicherheiten bzw. –unsicherheiten für Cy5 und MR121 auf trockener Glasoberfläche.

(¹⁾ Cy5; (²⁾ MR121; Ø: Mittelwert; Die hier berücksichtigten Farbstoff-Peptide wurden nach der HBTU/HOBt-Methode an die Glasoberfläche gekoppelt.)

Am besten veranschaulichen Werte-Diagramme von Lebensdauer (τ_{ges}) und *anteiliger Intensität* (F_2) die Unterschiede zwischen den Farbstoffen. Die folgenden „Scatter-Plots“ zeigen die Messwerte der jeweils gemeinsam auf die Glasoberfläche gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffe bzw. deren Peptidkonjugate mit den Modellpeptiden Uni370 und Uni371. Es ist zu erkennen, dass die Messwerte der Lebensdauern für die getrennt gemessenen Spezies in der Regel etwas geringer sind als die Werte für die gemischtgebundenen Spezies.

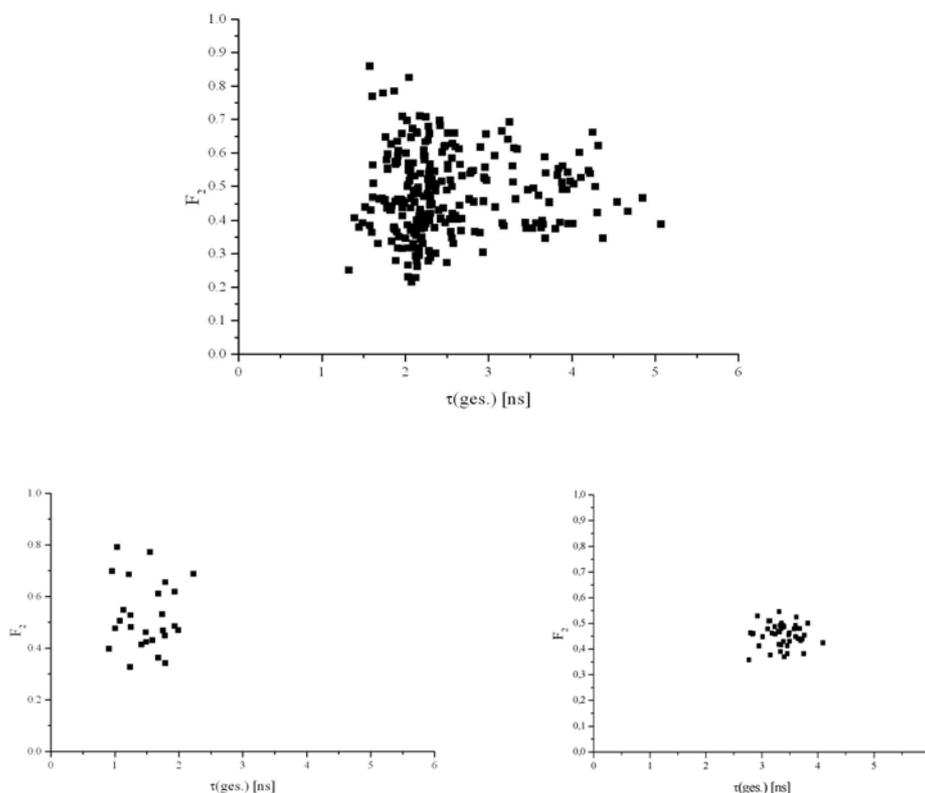


Abbildung 4.1-8: Beispiel eines Lebensdauer- F_2 -Diagramms für die gemeinsam, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121 (oberes Diagramm, linker Bereich um 2 ns: Cy5; rechter Bereich um 4 ns: MR121). Darunter zum Vergleich: Beispiele von Lebensdauer- F_2 -Diagrammen der puren, gebundenen Farbstoffe Cy5 (links) und MR121 (rechts).

Man sieht im Diagramm der gemischt gekoppelten Farbstoff-Spezies, dass sich der Cy5-Bereich in etwa von 1,3 ns bis 3,3 ns erstreckt, der MR121-Bereich von 3,3 ns bis 5,0 ns.

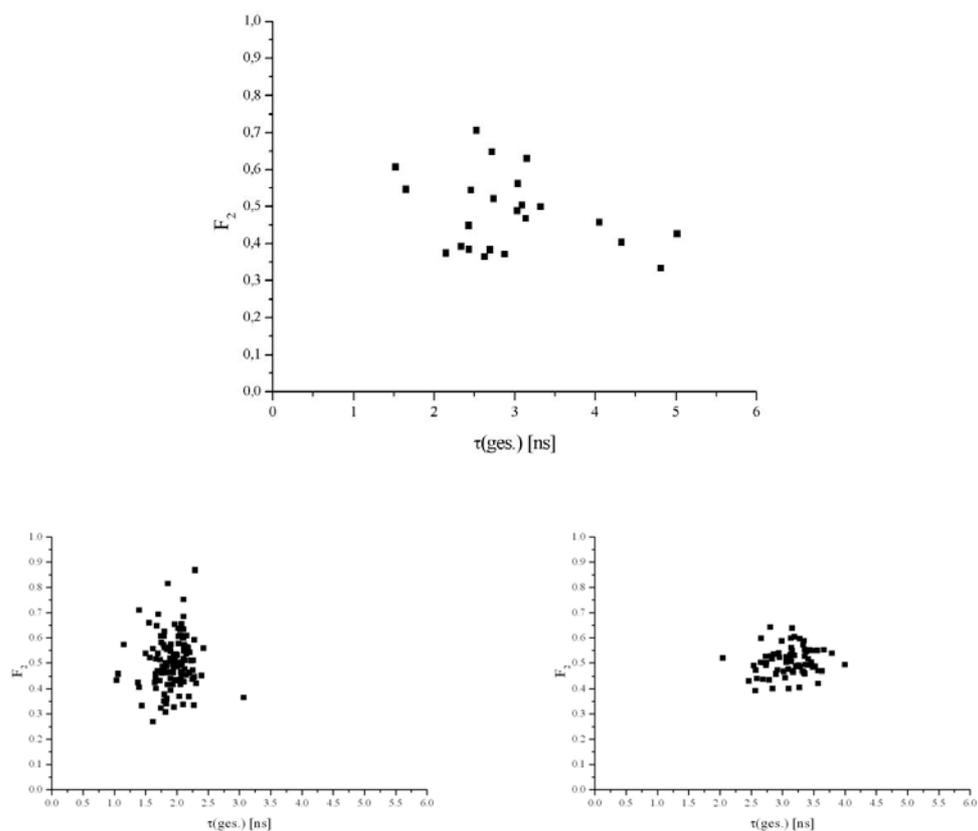


Abbildung 4.1-9: Beispiel eines Lebensdauer- F_2 -Diagramms für die gemeinsam, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gekoppelten Farbstoff-Peptid-Konjugate Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 (oberes Diagramm, linker Bereich um 2,5 ns: Uni370-Cy5; rechter Bereich um 4,5 ns: Uni370-MR121). Darunter zum Vergleich: Beispiele von Lebensdauer- F_2 -Diagrammen der einzelnen, gebundenen Konjugate Uni370-Cy5 (links) und Uni370-MR121 (rechts).

Man sieht im Diagramm der gemischt gekoppelten Konjugat-Spezies, dass sich der Cy5-Bereich in etwa von 2,1 ns bis 3,4 ns erstreckt, der MR121-Bereich von 4,0 ns bis 5,1 ns.

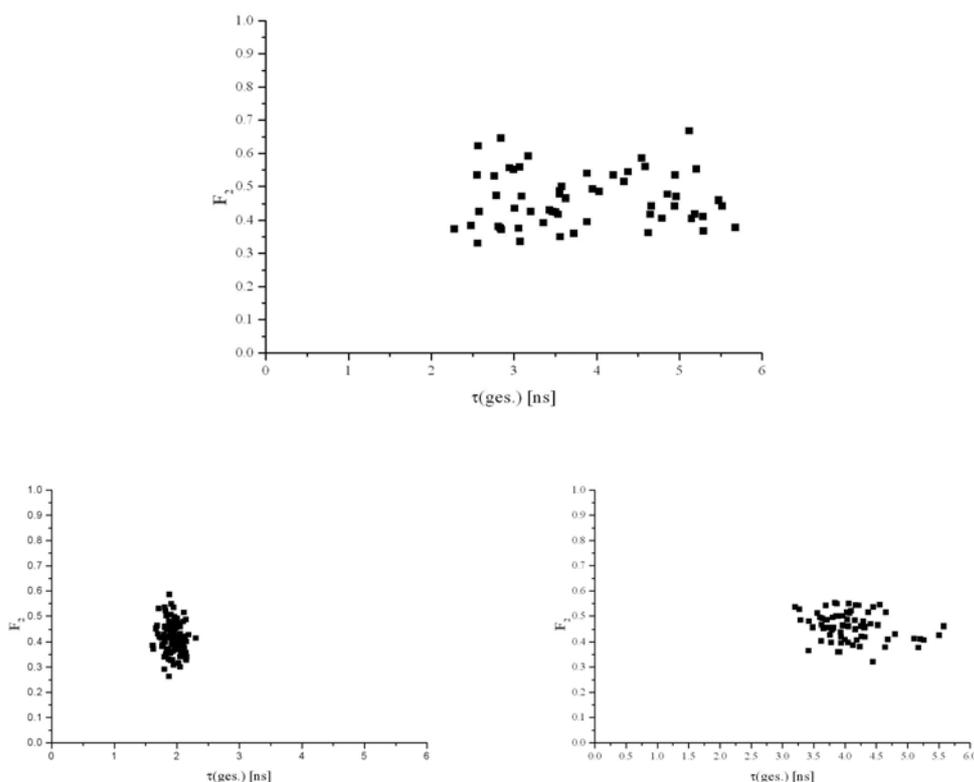


Abbildung 4.1-10: Beispiel eines Lebensdauer- F_2 -Diagramms für die gemeinsam, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gekoppelten Farbstoff-Peptid-Konjugate Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 (oberes Diagramm, linker Bereich um 3 ns: Uni371-Cy5; rechter Bereich um 5 ns: Uni371-MR121). Darunter zum Vergleich: Beispiele von Lebensdauer- F_2 -Diagrammen der einzelnen, gebundenen Konjugate Uni371-Cy5 (links) und Uni371-MR121 (rechts).

Man sieht im Diagramm der gemischt gekoppelten Konjugat-Spezies, dass sich der Cy5-Bereich in etwa von 2,1 ns bis 4,0 ns erstreckt, der MR121-Bereich von 4,2 ns bis 6,0 ns.

Sowohl die Darstellung als „Scatter-Plot“ mit Lebensdauer $\tau_{(\text{ges.})}$ und *anteiliger Intensität* F_2 als auch die Darstellung als Histogramm der Lebensdauer-Verteilung $\tau_{(\text{ges.})}$ eignen sich zur bildlichen Darstellung und Unterscheidung verschiedener, gemeinsam gemessener Spezies. Nur anhand der Histogramme mit *Gauß-Kurven* sind jedoch die mathematisch berechneten Zuordnungssicherheiten möglich.

Zusätzliche Flüssigkeitsüberschichtung mit FTP erschwerte die Messungen so stark, dass kaum verwertbare Abbildungen durch SFLIM möglich waren und im weiteren Verlauf der Messungen auf diese Möglichkeit der Einflussnahme auf die spektroskopischen Parameter verzichtet werden musste.

Da sich die Modellpeptide Uni370 und Uni371 darin unterscheiden, dass erstere als vierte Aminosäure Tryptophan (Trp) und letztere an dieser Position Phenylalanin (Phe) enthält, sollte der Einfluss des Tryptophans auf die spektroskopischen Eigenschaften der Fluoreszenz-Farbstoffe erkennbar sein.

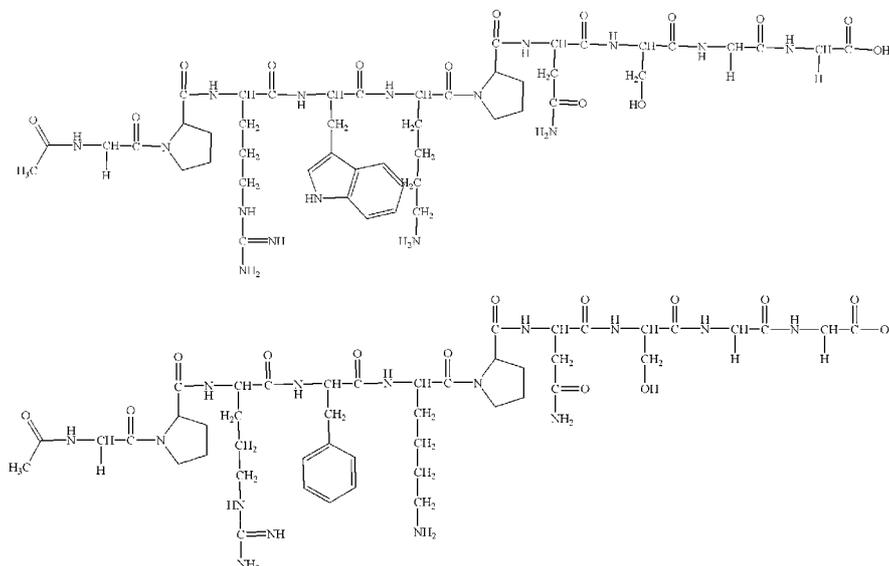


Abbildung 4.1-11: Strukturen der Modellpeptide Uni370 (oben) und Uni371 (unten), mit Tryptophan bzw. mit Phenylalanin.

Tryptophan kann durch seine Wirkung als Fluoreszenz-Löcher auf den an Lysin in direkt benachbarter 5-Position gebundenen Farbstoff Cy5 bzw. MR121 Einfluss nehmen. In einzelnen, separierten Molekülen, wie sie in den hier untersuchten, an Glasoberflächen gekoppelten Farbstoff-Peptiden vorliegen, kann durch statische Löschung sowohl die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt, als auch die Intensität geschwächt werden.

| τ (MW) [ns] | Lösung/Ensemble | | Oberfläche | |
|-------------------------|-----------------------------|------|------------|---------|
| | H ₂ O/MeCN (1:1) | MeCN | trocken | FTP |
| Cy5 | 1,0 | 1,0 | 2,0 (5) | 2,2 (7) |
| Uni371-Cy5 | 1,2 | 1,1 | 2,0 (1) | - |
| Uni370-Cy5 | 1,1 | 1,1 | 2,0 (2) | - |
| MR121 | 2,9 | 4,4 | 3,7 (10) | 3,1 (3) |
| Uni371-MR121 | 3,0 | 3,9 | 4,0 (5) | - |
| Uni370-MR121 | 2,6 | 3,6 | 3,2 (3) | - |
| Cy5/MR121 | - | - | 3,0 (7) | - |
| Uni371-MR121/Uni371-Cy5 | - | - | 3,9 (5) | - |
| Uni370-MR121/Uni370-Cy5 | - | - | 3,3 (1) | - |

Tabelle 4.1-3: Übersicht zu durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauern von Cy5 und MR121 sowie ihrer Peptidkonjugate unter verschiedenen Bedingungen. (Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der verwendeten Messungen an.)

Für Cy5 ist aus Tabelle 4.1-3 ersichtlich, dass seine Fluoreszenzlebensdauer praktisch unabhängig von unterschiedlicher Polarität der Umgebung ist. Cy5 besitzt sowohl im unpolaren Acetonitril, als auch im polaren Wasser/Acetonitril-Gemisch eine Lebensdauer von 1,0 ns, auf trockener oder FTP-überschichteter Glasoberfläche eine Lebensdauer von 2,0...2,2 ns. Cy5 in seinen Peptidkonjugaten wird nicht durch Tryptophan beeinflusst, da Cyanin-Farbstoffe aufgrund ihrer Struktur keinen Elektronentransfer eingehen können, und zeigen eine mittlere Lebensdauer von 2,0 ns. In Lösung liegt die Lebensdauer für Uni370 und Uni371 bei 1,1...1,2 ns sowohl im unpolaren, als auch im polaren Lösemittel, wobei die Obergrenze polaren Medien zuzurechnen ist.

Der Oxazin-Farbstoff MR121 zeigt bereits in Lösung große Unterschiede in seiner jeweiligen Lebensdauer. So besitzt er im relativ unpolaren Wasser/Acetonitril-Gemisch eine mittlere Lebensdauer von 2,9 ns, im unpolaren Acetonitril 4,4 ns. Kovalent auf Glasoberflächen gebunden, besitzt er eine mittlere Lebensdauer von 3,7 ns auf trockener Oberfläche und 3,1 ns unter FTP. Die um 0,6 ns kürzere Lebensdauer unter Flüssigkeit ist auf die höhere Anzahl an Freiheitsgraden, die eine schnellere Entvölkerung der angeregten Zustände ermöglichen, zurückzuführen. Sehr deutlich sieht man hier, dass der Farbstoff nicht mehr an der Oberfläche haftet, da man sonst die gleiche Lebensdauer wie auf trockener Oberfläche finden würde. Seine Peptidkonjugate weisen in Lösung jeweils Unterschiede von 1 ns zwischen polarer und unpolarer Umgebung auf. Im Tryptophan-haltigen Konjugat liegen die Lebensdauern um 0,4 ns (13,5% in polarer, 10,2% in unpolarer Lösung) niedriger als in der Phenylalanin-haltigen Spezies. Auf trockener Oberfläche lag die Lebensdauer

der Tryptophan-haltigen Spezies um 0,8 ns (20%) unter der der Phenylalanin-haltigen.

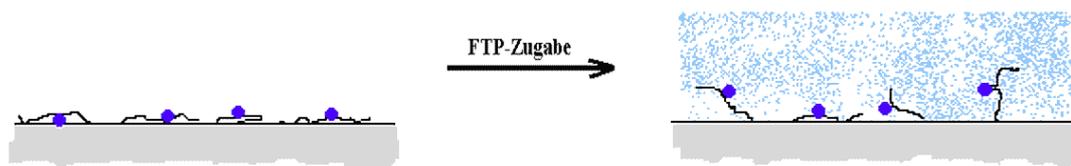


Abbildung 4.1-12: Schema zur Ablösung der Farbstoffmarkierten Peptide von der Glasoberfläche nach Zugabe von FTP.

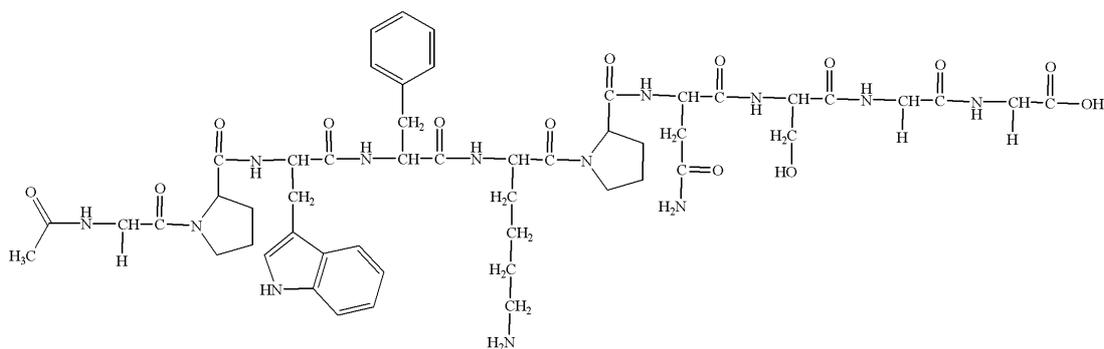
Die Messungen der gemischt gekoppelten, puren Farbstoffe Cy5 und MR121 auf trockener Glasoberfläche zeigten den erwarteten Mittelwert der beiden Spezies (3,0 ns).

Die beiden Modellpeptide Uni370 mit Phe und Uni371 mit Trp eignen sich sehr gut, den Fluoreszenz-löschenden Einfluss von Tryptophan auf Rhodamin- bzw. Oxazin-Farbstoffe sowohl in Lösung, als auch gebunden auf Glasoberflächen zu studieren.

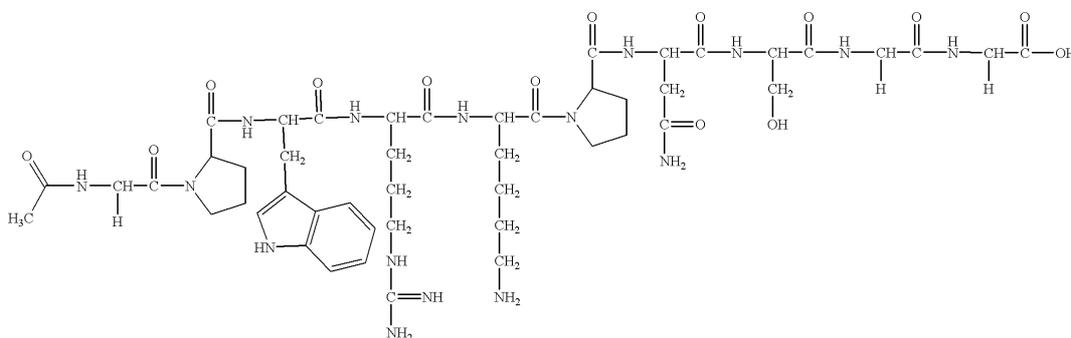
Zusammenfassend kann hier somit gesagt werden, dass der Fluoreszenz-Farbstoff MR121 sowohl selbst in seinen verschiedenen Umgebungen, als auch vom Fluoreszenz-Farbstoff Cy5 in den entsprechenden Umgebungen aufgrund der unterschiedlichen Lebensdauern sicher unterschieden werden kann. MR121 besitzt in polarer Lösung eine Lebensdauer von 2,9 ns, in unpolare Lösung 4,4 ns, auf trockener Oberfläche 3,7 ns und 3,1 ns unter FTP. Cy5 hingegen besitzt eine Lebensdauer um 1,0 ns in Lösung und 2,0...2,2 ns auf Glasoberflächen, ohne und mit FTP. Die Cy5-Peptide zeigen in Lösung Lebensdauern um 1,1 ns, die MR121-Peptide liegen im Bereich 2,6...3,9 ns. Auf trockener Oberfläche zeigen die beiden Cy5-Peptide Lebensdauern von 2,0 ns, die MR121-Peptide 4,0 ns (Phe) bzw. 3,2 ns (Trp).

Weiterhin kann hervorgehoben werden, dass der Fluoreszenz-löschende Einfluss von Tryptophan auf Oxazin-Farbstoffe wie MR121 bewiesen wurde, Carbocyanin-Farbstoffe wie Cy5 aber keine spektroskopischen Unterschiede durch die Nähe zu Tryptophan zeigen. Allerdings muss sich Tryptophan in unmittelbarer Nachbarschaft zum Farbstoff befinden. Schon eine Aminosäure (wie Glycin) mehr zwischen Trp (4-Position) und Lys-MR121 (5-Position) verringert die gegenseitige Wechselwirkung so stark, dass praktisch kein Unterschied mehr in den Lebensdauern mit und ohne Trp erkennbar ist. Entsprechende Vorversuche wurden mit den Modellpeptiden Uni355 mit Trp in 3-, Phe in in 4- und Lys-MR121 in 5-Position sowie Uni356 mit

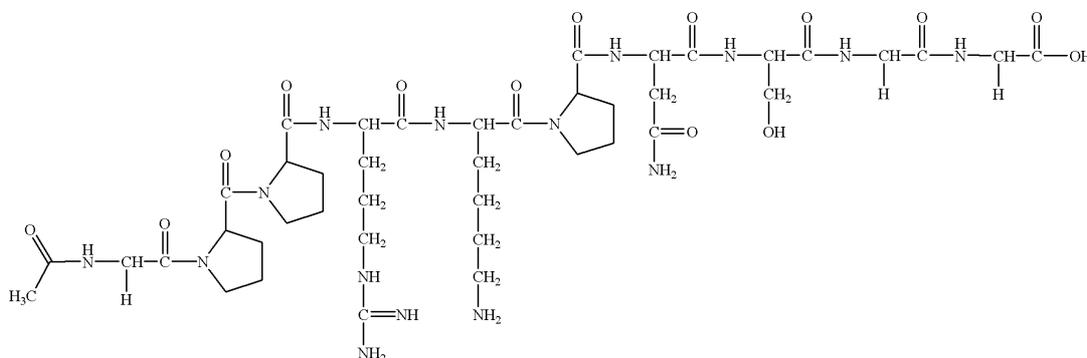
Trp in 3-, Arg in in 4- und Lys-MR121 in 5-Position und Uni357 mit Pro in 3-, Arg in in 4- und Lys-MR121 in 5-Position durchgeführt.



Ac-Gly-Pro-Trp-Phe-Lys-Pro-Asn-Ser-Gly-Gly-OH



Ac-Gly-Pro-Trp-Arg-Lys-Pro-Asn-Ser-Gly-Gly-OH



Ac-Gly-Pro-Pro-Arg-Lys-Pro-Asn-Ser-Gly-Gly-OH

Abbildung 4.1-13: Strukturen der Modellpeptide Uni355 (oben) mit Tryptophan ($C_{51}H_{69}N_{13}O_{14}$, $M = 1088,173$) und Uni356 (Mitte) mit Tryptophan ($C_{48}H_{72}N_{16}O_{14}$, $M = 1097,185$) sowie Uni357 (unten) mit Phenylalanin ($C_{42}H_{69}N_{15}O_{14}$, $M = 1008,090$).

Ensemble-Messungen in Wasser/Acetonitril (1 : 1) am Fluoreszenz-Spektrometer IBH ergaben Lebensdauern von 3,0 ns für Uni357-MR121 (mit Pro-Arg), 2,8 ns für Uni356-MR121 (mit Trp-Arg) und 2,5 ns für Uni355-MR121 (mit Trp-Phe). Ein leichter Trend ist dahingehend zu sehen, dass das Peptid ohne löschtfähige Aminosäure die längste Lebensdauer aufweist, mit Tryptophan (Trp) niedriger und mit der zusätzlichen, leicht löschenden Aminosäure Phenylalanin (Phe) am niedrigsten ist.

Die entsprechenden drei Cy5-Derivate zeigten Lebensdauern im Bereich 1,2...1,6 ns. Durch die fehlende deutliche Signifikanz im Bezug auf Tryptophan-Löschung wurden hierzu keine weiteren Versuche durchgeführt.

Für die Modellpeptide Uni370-MR121 (mit Phe) und Uni371-MR121 (mit Trp) jedoch war ein markanter Abfall der Lebensdauer um 0,8 ns, von 4,0 ns auf 3,2 ns durch die Wechselwirkung mit Tryptophan zu beobachten.

In einer der sehr wenigen Veröffentlichungen zur Fluoreszenz-Löschung von Fluoreszenz-Farbstoffen durch Tryptophan beschreiben Emans et al. [Emans 1995] eine pH-unabhängige BODIPY-Avidin-Fluoreszenz-Verstärkung durch BODIPY-Trp-Wechselwirkung. Die BODIPY-Avidin-Fluoreszenz-Verstärkung um das 10-fache beobachteten sie nach Bindung an Biotin. Die relativ geringe Änderung in der Lebensdauer von BODIPY, verglichen mit hoher Fluoreszenz-Verstärkung, kommt durch die Biotin-Bindung, die eine Konformationsänderung im Avidin induziert, was wiederum zu einer Änderung der BODIPY-Umgebung führt. Sie führten Messungen der intrinsischen Fluoreszenz von Tryptophan in BODIPY-Avidin und Avidin durch. Die Biotin-Bindung führt zu einer Blau-Verschiebung und Erhöhung der Tryptophan-Fluoreszenz in BODIPY-Avidin, aber auch zu einer Reduzierung der Tryptophan-Fluoreszenz in Avidin. Es handelt sich also um eine Wechselwirkung zwischen Tryptophan und BODIPY.

Auch Karolin et al. beschreiben, dass Biotin in eine tiefe Tasche mit zwei von vier Tryptophanresten bindet. Nach der Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, und das Tryptophan bewegt sich in eine abgeschirmte, nichtpolare Umgebung, was zu einer Blau-Verschiebung der Fluoreszenz von Tryptophan in Avidin und BODIPY-Avidin führt. Ausserdem verringert sich die Fluoreszenz von Avidin, die Fluoreszenz von BODIPY-Avidin erhöht sich. Es muss sich um eine statische Wechselwirkung zwischen Tryptophan und BODIPY in Abwesenheit von Biotin handeln, die eine Fluoreszenz-Löschung beider Chromophore bewirkt. Nach der Biotin-Bindung reduzieren sich die Wechselwirkungen, wodurch die Fluoreszenz von Tryptophan und BODIPY ansteigen [Karolin 1994].

Watt und Voss Jr. unternahmen *Stern-Volmer*-Analysen für Lösversuche mit Indol-Strukturen, die ergaben, dass dynamische und statische Löschung bei Tryptophan vorhanden ist, und bestätigten frühere Experimente von Vaughan et al. [Vaughan 1970] [Watt 1977]. Versuche zur Fluorescein-Löschung durch Indol-Strukturen ergaben folgende Effizienzreihe: Trp-amid⁺ (70,6%, pH 8) > L-Trp (62,5%) > 5-Indol-CS (51,3%) > 2-Indol-CS (43,8%) > Phenol (33,8) > L-Met (18,2%) > L-Phe, L-His (5,0%) > L-Ser (1,3%)

Der Vergleich der *anteiligen Intensitäten* F_2 zeigt, dass alle Werte für trockene Oberflächen im gleichen Bereich von 0,4...0,5 liegen, unabhängig vom Farbstoff Cy5 oder MR121. Außerdem ist keine Korrelation zu Löschung oder Gemischt-kopplung sichtbar. Die Werte der Messungen mit FTP sind deutlich höher, über 10% für Cy5 und 20% für MR121; eine Farbstoff-Spezifität lässt sich dadurch aber nicht ableiten. Durch diese Erkenntnisse konnte der F_2 -Wert allein nicht als Identifizierungskriterium herangezogen werden.

| F_2 (MW) | Ober fläche | |
|-------------------------|-------------|----------|
| | trocken | FTP |
| Cy5 | 0,51 (5) | 0,58 (7) |
| Uni371-Cy5 | 0,41 (1) | - |
| Uni370-Cy5 | 0,49 (2) | - |
| MR121 | 0,51 (10) | 0,64 (3) |
| Uni371-MR121 | 0,48 (5) | - |
| Uni370-MR121 | 0,50 (3) | - |
| Cy5/MR121 | 0,52 (7) | - |
| Uni371-MR121/Uni371-Cy5 | 0,47 (5) | - |
| Uni370-MR121/Uni370-Cy5 | 0,47 (1) | - |

Tabelle 4.1-4: Übersicht zu durchschnittlichen F_2 -Werten von Cy5 und MR121 sowie ihrer Peptid-konjugate unter verschiedenen Bedingungen. (Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der verwendeten Messungen an.)

Einige bemerkenswerte Beobachtungen und spektroskopische Effekte mit und ohne Zusatz von FTP sind im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

4.2 Spektroskopische Effekte in abgebildeten Einzelmolekülen

Schon auf den ersten Blick fallen bekannte Phänomene der Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie auf den Scann-Bildern wie Blinken und Fluoreszenz-Zerstörung ins Auge.

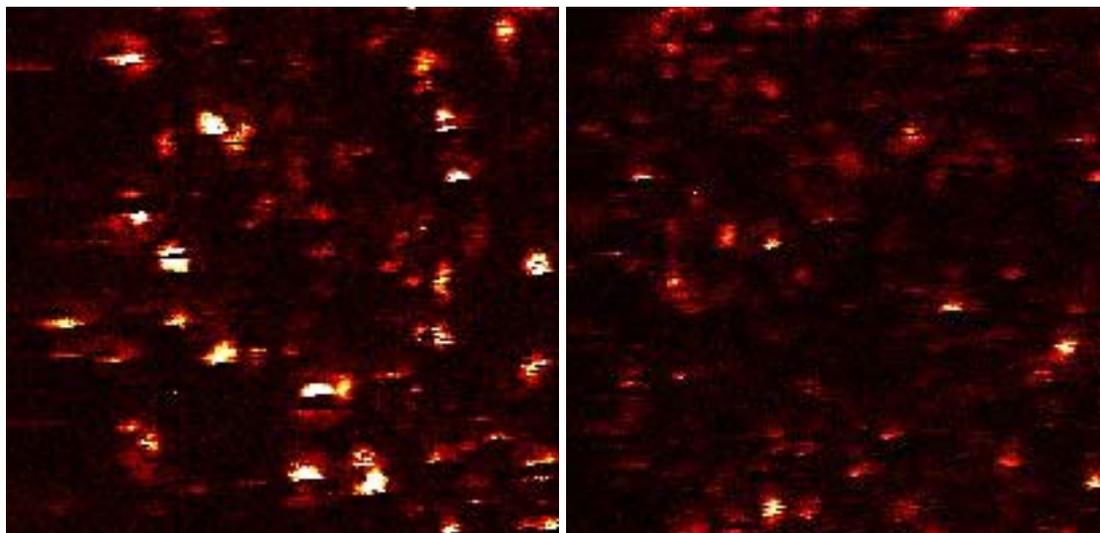


Abbildung 4.2-1: MultiFluorImage-Bilder der Einzelmolekül-Fluoreszenz-Abbildung von kovalent auf Glas gekoppeltem Cy5 ohne (links) und mit Femtotip-Puffer (FTP) (rechts).

Neben der viel schlechteren Bildqualität sind auf dem Fluoreszenzbild von Cy5 mit Femtotip-Puffer (FTP) rechts auch sich bewegende, „hin und her rollende“ Moleküle zu erkennen (z.B. ganz unten).

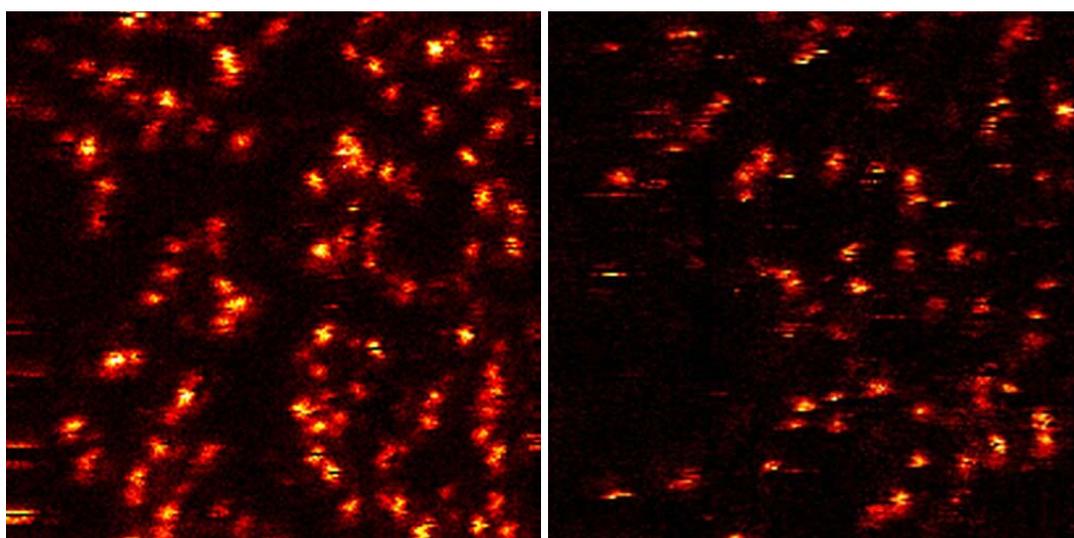


Abbildung 4.2-2: MultiFluorImage-Bilder der Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie von kovalent auf Glas gekoppeltem MR121 ohne (links) und mit Femtotip-Puffer (FTP) (rechts).

Bei MR121 sind neben der etwas schlechteren Bildqualität kaum Unterschiede im Aussehen der abgebildeten Fluoreszenzmoleküle zu sehen.

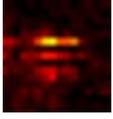
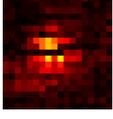
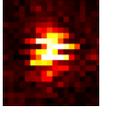
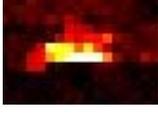
Für alle getätigten Messungen wurden die folgenden Beobachtungen zu Blinken und Fluoreszenz-Zerstörung gemacht und in Tabelle 4.2-1 zusammengefasst. Nicht alle Bilder der Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie konnten hierzu verwendet werden. Für erfolgreiche Messungen mit FTP-Zugabe werden die Beobachtungen ebenfalls angegeben.

| Spezies (Oberflächenzustand) | Anzahl berücksichtigter Messgn. | Anzahl Blinken | Anzahl Photo-Zerstörung | Anteil an Ges.-Molekülen [%] |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------|-------------------------|------------------------------|
| Cy5 (trocken) | 2 | 11 | 8 | 51,3 |
| Cy5 (FTP) | 2 | 7 | 25 | 59,0 |
| MR121 (trocken) | 6 | 8 | 2 | 10,9 |
| MR121 (FTP) | 1 | 10 | 13 | 38,3 |
| Cy5/MR121 (trocken) | 4 | 21 | 8 | 21,3 |
| Cy5/MR121 (FTP) | 0 | - | - | - |
| Uni370-Cy5 (trocken) | 1 | 6 | 2 | 18,6 |
| Uni370-Cy5 (FTP) | 0 | - | - | - |
| Uni370-MR121 (trocken) | 0 | - | - | - |
| Uni370-MR121 (FTP) | 0 | - | - | - |
| Uni370-Cy5/Uni370-MR121 (trock.) | 0 | - | - | - |
| Uni370-Cy5/Uni370-MR121 (FTP) | 0 | - | - | - |
| Uni371-Cy5 (trocken) | 1 | 4 | 1 | 14,7 |
| Uni371-Cy5 (FTP) | 0 | - | - | - |
| Uni371-MR121 (trocken) | 0 | - | - | - |
| Uni371-MR121 (FTP) | 0 | - | - | - |
| Uni371-Cy5/Uni371-MR121 (trock.) | 2 | 4 | 3 | 16,9 |
| Uni371-Cy5/Uni371-MR121 (FTP) | 0 | - | - | - |

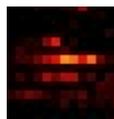
Tabelle 4.2-1: Übersicht zu Anzahl blinkender und photozerstörter Moleküle in ausgewählten Messungen.

Aus Tabelle 4.2-1 ist ersichtlich, dass Cy5 sowohl auf trockener Oberfläche (51%), als auch unter FTP (59%) viel mehr photophysikalische Effekte zeigt als MR121 (trocken: 11%; FTP: 38%). Bemerkenswert ist die starke Erhöhung dieser Zahl nach Zugabe von FTP auf gekoppeltes MR121. Gut zu erkennen ist, dass die Zahl dieser photophysikalischen Ereignisse bei den Farbstoff-Peptiden von Cy5 und MR121 stark reduziert ist. Offensichtlich wirken beide Modellpeptide als wirksame Triplett-Löscher.

Einige typische, visuelle Effekte zeigen die folgenden Ausschnitte von Einzelmolekül-Fluoreszenz-Abbildungen aus MultiFluorImage.

| | | |
|---|---|------------|
| langes Blinken („off“-Zustand) |  | Cy5 |
| mehrfaches Blinken |  | Cy5 |
| mehrfaches, kurzes Blinken |  | Cy5 |
| mehrfaches, relativ kurzes Blinken und Fluoreszenz-Zerstörung |  | Cy5 |
| langes Blinken („dim“-Zustand) und Fluoreszenz-Zerstörung |  | Cy5 |
| Fluoreszenz-Zerstörung |  | Cy5 |
| Blinken |  | MR121 |
| Molekülbewegung („Hin-und-her-Rollen“) |  | MR121 |
| Fluoreszenz-Zerstörung |  | MR121 |
| Molekülbewegung („Hin-und-her-Rollen“) |  | MR121 |
| einmaliges, relativ kurzes Blinken |  | Uni371-Cy5 |

mehrfaches, langes Blinken

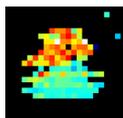


Uni371-MR121

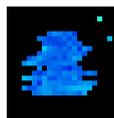
Nur mithilfe einer Bildauswertungssoftware wie DaVis können sehr eng bei einander liegende, unterschiedliche Moleküle identifiziert werden, wie die folgenden Beispiele zeigen.



τ_{ges} :



F_2 :



oben:

$\tau_{\text{ges}} = 5,0 \text{ ns}$

$F_2 = 0,45$

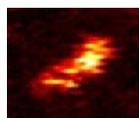
MR121

unten:

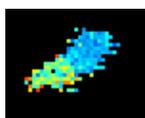
$\tau_{\text{ges}} = 1,7 \text{ ns}$

$F_2 = 0,45$

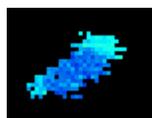
Cy5



τ_{ges} :



F_2 :



oben, rechts: $\tau_{\text{ges}} = 2,0 \text{ ns}$

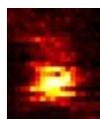
$F_2 = 0,95$

Cy5

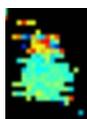
unten, links: $\tau_{\text{ges}} = 4,0 \text{ ns}$

$F_2 = 0,45$

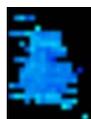
MR121



τ_{ges} :



F_2 :



oben:

$\tau_{\text{ges}} = 5,0 \text{ ns}$

$F_2 = 0,50$

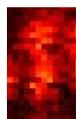
MR121

unten:

$\tau_{\text{ges}} = 2,0 \text{ ns}$

$F_2 = 0,50$

Cy5



τ_{ges} :



F_2 :



oben:

$\tau_{\text{ges}} = 2,0 \text{ ns}$

$F_2 = 0,90$

Cy5

unten:

$\tau_{\text{ges}} = 3,8 \text{ ns}$

$F_2 = 0,55$

MR121

Zahlreiche Autoren beschäftigten sich mit plötzlichen Intensitätsänderungen und –schwankungen (Fluktuationen) fluoreszierender Farbstoff-Einzelmoleküle und ihrer Konjugate mit Biomolekülen.



Abbildung 4.2-3: Beispiel für den „dim“-Zustand in einem Ausschnitt eines Fluoreszenz-Bildes mit einem Cy5-Molekül auf einer Glasoberfläche.

Wie im gezeigten Beispiel eines langen Aufenthaltes im „dim“-Zustand, beschreiben Weston und Buratto die Emission von Einzelmolekülen auf Glasoberflächen mit Wechsel zwischen „on“- und „dim“-Zustand. Dieser korreliert mit der Dynamik im Millisekunden- bis Zehntelsekunden-Bereich. Eine Änderung in Kernkoordinaten wird hervorgerufen durch den Übergang zwischen Minima der Energiepotentialfläche. Das führt zu Änderungen der Emissionsausbeute und des Emissionspektrums. Plötzliche Sprünge in der Emissions-Intensität wurden beobachtet, wie auch häufige schnelle Wechsel. Eine andere Erklärung für schnelle Intensitätsänderungen ist zufällige spektrale Diffusion: Jedes Emissions-Spektrum kommt aus einem Molekül, das verschiedene Potentialminima der Energiefläche besetzt. Die Übergänge zwischen den Potentialminima werden intramolekularen Bewegungen (Konformationsänderungen der Seitenketten) oder intermolekularen Bewegungen (kleine Bewegungen der Matrix) angerechnet. Intensitätsänderungen, die mit spektralen Verschiebungen einhergehen, resultieren aus Änderungen des Absorptionsquerschnitts bei der neuen Resonanzenergie. Eine spezifische Molekülbewegung, die in einer Änderung der Emissionshäufigkeit und Emissionsausbeute resultiert, ist die Drehung (twist) um die konjugierte C-Brücke durch Delokalisierung von Elektronendichte und verbessertem Zugang zu nicht-strahlenden Deaktivierungskanälen [Weston 1998].

Konformations-Fluktuationen von TMR-DNS-Molekülen auf Streptavidin-beschichteten Oberflächen erklärten Weston et al. mit dem Übergang zwischen 2 Konformationszuständen [Weston 1998].

Außerdem untersuchten Weston et al. den Carbocyanin-Farbstoff DiIC₁₂ auf Glasoberflächen und beobachteten diskrete Intensitätsschwankungen mit Korrelationszeiten von 1 ms bis 10 s. Diese Fluktuation erfolgte zwischen „on“- (hohe Intensität) und „dim“-Zustand (niedrige Intensität), also anders als „on/off“-Effekte. Die beschriebenen Schwankungen erfolgten durch kleine Änderungen in den Kernkoordinaten im Chromophor-Gerüst, wie die Drehung um die Konjugationsbrücke, wohl aber nicht durch Reorganisation des Moleküls, da die Behinderung durch die Glasoberfläche zu groß ist. Sie zogen ein 4-Niveau-Modell zur Erklärung heran:

Das 4-Niveau-2-Konfigurationen-Modell geht von zwei gering unterschiedlichen Konfigurationen des elektronischen Grundzustands mit jeweils erstem angeregtem

Zustand aus. Grund- und angeregter Zustand (1 und 2) beschreiben „on“, Grund- und angeregter Zustand (3 und 4) charakterisieren „dim“. Die Trennung besteht durch eine Energiebarriere, deren Überwindung zur plötzlichen Änderung der Emissions-eigenschaften führt [Weston 1998 a].

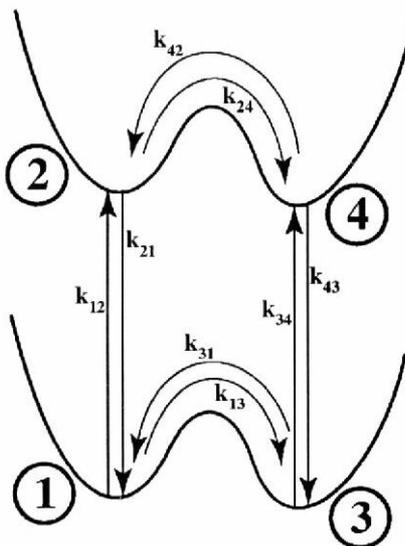


Abbildung 4.2-4: Schema des 4-Niveau-Modells mit Grund- (1) und angeregtem Zustand (2) der „on“-Konfiguration auf der linken Seite sowie Grund- (3) und angeregtem Zustand (4) der „dim“-Konfiguration auf der rechten Seite. k_{12} und k_{21} bezeichnen die Anregungs- bzw. Emissions-Geschwindigkeiten für „on“, k_{34} und k_{43} für „dim“. Die Geschwindigkeiten k_{13} und k_{31} repräsentieren den Übergang zwischen den Grund-, k_{24} und k_{42} zwischen den angeregten Zuständen.

Versuche mit DiIC_{12} auf Oberflächen im Vakuum (10^{-4} Torr) durch Weston et al. zeigten Erhöhungen der Triplet-Lebensdauer τ_T und eine Reduzierung der Photozerstörungsgeschwindigkeit. Fluktuationen in der ISC-Geschwindigkeit und Triplet-Lebensdauer bei konstanter Leistung resultierten offensichtlich aus dem Wechsel zwischen zwei oder mehr Konfigurationen des Farbstoffs. Da kaum Intensitätsabhängigkeit in den Übergangsgeschwindigkeiten zu sehen war, lag wohl eher spontaner als photoinduzierter Übergang vor [Weston 1999].

Später berichten Weston et al. über die Dynamik von Einzelmolekülen in dünnen Polymerfilmen verschiedener Dicke auf Glas. Es gab jeweils eine signifikante Fraktion, die sich durch Rotationsbewegung auszeichnete. Sie fanden einige Beweise, dass die Bewegung photoinduziert sein könnte, aber nicht strikt. Es bestand aber fast keine Abhängigkeit von der Laser-Leistung. Eventuell lag thermische Induzierung vor [Weston 2001].

Ambrose et al. schreiben über plötzliche Photozerstörung von Einzelmolekülen nach Sekunden konstanter Anregung. Zuvor erfolgt oft eine Reorientierung der Moleküle,

sichtbar durch reversible Änderungen (Anstieg und Absinken) der Fluoreszenz. Die zufällige Orientierung der Übergangsdipole in der Ebene führt zu verschiedenen Anregungsgeschwindigkeiten. [Ambrose 1994].

Ha et al. beschreiben längere Dunkelzustände (ms...s) mit sehr niedrigen Übergangseffizienzen ($< 10^{-5}$) von Rhodamin-Einzelmolekülen, die eventuell durch verdrehte Konformationen (twisted) erklärbar sind, wobei einige davon nicht fluoreszieren. Tritt wieder Fluoreszenz auf, dann oft zusammen mit spektralen Änderungen in der Fluoreszenzemission, wohl durch Polaritätsänderung oder O₂-Bewegung [Ha 1997]. Später koppelten Ha et al. TMR über eine C-Kette mit einem DNS-Fragment (Oligo) und adsorbierten dieses Konjugat auf eine Glasoberfläche. Im Gegensatz zur trockenen Oberfläche löste es sich unter Puffer wiederholt von der Oberfläche ab und rotierte schnell um die C-Kette. Diese Spezies waren aufgrund ihrer Rotations-sprünge (rotational jumps) sowie ihre Rückkehr (Readsorption) zu bestimmter Bindungsanordnung erkennbar. Auch lange Dunkelzustände (> 10 ms) durch Blinken (blinking) oder eventuell durch photoinduzierte, nichtfluoreszierende, verdrehte Konformationen wurden beobachtet. Die Rotations-sprung- und die Blink-Geschwindigkeit seien abhängig von der Laser-Leistung, da es zu Photoaktivierung kommen kann. Doch auch spontane Rotations-sprünge wurden bei der Leistung gleich Null registriert. Spontane Sprünge kommen durch thermisch aktivierte Konformationsänderungen vor. Diese ist wohl auch verantwortlich für die schnelle Rotation in Lösung. [Ha 1998].

Xie berichtet von unterschiedlichen Intensitäten beim Farbstoff Oxazin 720 durch unterschiedliche Orientierungen. Beim Carbocyanin-Farbstoff diI sind plötzliche Sprünge charakteristisch für Einzelmolekül-Verhalten. Ein möglicher Mechanismus für Intensitätssprünge ist die molekulare Reorientierung auf der Oberfläche, was zu einer Änderung im Absorptionsquerschnitt bei der Absorptionswellenlänge führt. [Xie 1996].

Später schreiben Lu und Xie über Intensitätsschwankungen, die mit blauverschobener Emission und Absorption einher gehen. Die spektralen Schwankungen kommen wohl durch Änderungen in den Kernkoordinaten, intermolekular oder intramolekular [Lu 1997].

Spektrale und Rotations-sprünge, Photon(anti)bunching und individuelle Photozerstörung sind normalerweise unsichtbar durch den Ensembledurchschnitt. Veerman et al. studierten diese Phänomene an DiIC₁₈ in einer Polymermatrix (PMMA, PS). Sie berichten von plötzlicher Änderung von τ_T und Y_{ISC} in einem Molekül mit plötzlicher Änderung in den Emissionsintensitäten (Intensitätssprünge).

Sie schlossen Bewegung aus und vermuteten spektrale Sprünge, wohl durch die Änderung der lokalen Polarität der Umgebung oder die plötzliche Änderung der Fluoreszenz-Quantenausbeute, vermutlich durch Drehung der konjugierten C-Brücke im Molekül [Veerman 1999].

Tinnefeld et al. beobachteten unter anderem unterschiedliche Lebensdauern von Cy5, die wohl durch Konformationsänderungen, wie Verdrehungen der Konjugationsbrücke, hervorgerufen werden. Ähnliche Effekte beim Rhodamin-Farbstoff JA242 sind vermutlich auf leichte Symmetrieverzerrungen zurückzuführen. Außerdem wurden zwei Moleküle gleichzeitig mit spontanen, spektralen Sprüngen des einen beobachtet, was eventuell durch FRET verursacht wurde [Tinnefeld 2000].

Die anteilige Intensität F_2 ergab unter Lösemittel für den Oxazin-Farbstoffs JF9 relativ homogene spektrale Eigenschaften, für den Rhodamin-Farbstoff JA242 eine breite spektrale Verteilung. Cy5 zeigte eine fast konstante Fluoreszenz-Lebensdauer von ca. 2 ns. Die Lebensdauer war etwas länger, wenn Cy5 auf trockener Oberfläche gemessen wurde, als in Lösung, möglicherweise durch reduzierte Flexibilität in seiner C-Brücke, was zur Erhöhung der S_1 -Lebensdauer führt. Schwache bis gar keine Emission zeigte cis-Cy5. JF9 verhielt sich auf trockener Oberfläche fast gleich wie in Lösung, JA242 zeigte längere Lebensdauern als in Wasser, ähnlich wie in Ethanol. Cy5 zeigte Konfigurationsänderungen in seiner C-Brücke (cis/trans-Isomerisierung) [Tinnefeld 2001 a].

Widengren und Schwille befassten sich mit der photoinduzierten Isomerisierung und Rück-Isomerization des Carbocyanin-Farbstoffs Cy5 [Widengren 2000].

Vámosi et al. berichten über eine TMR-DNS, die zwei Konformationen mit Fluoreszenz-Lebensdauern von 0,5...1 ns und 2,5...3 ns sowie eine nicht-fluoreszierende Konformation aufwies. Die Populationen sind abhängig von Temperatur und Lösemittel [Vámosi 1996].

Das Peptid-Konjugat TMR-S1 untersuchten Wazawa et al. Sie schreiben, dass TMR-Einzelmoleküle auf Glasoberflächen nur minimale Fluktuationen zeigen und die TMR-S1-Fluktuation wahrscheinlich durch spontane Konformationsänderung des Proteins hervorgerufen wird. Es war keine Änderung der Fluktuation bei 5-fach höherer Laser-Leistung zu beobachten. [Wazawa 2000].

Hin-und-her-Bewegung des Moleküls und Abfall von τ (2,5 ns \rightarrow 1,9 ns), konstantes F_2 (0,60) bei Cy5 (unter FTP):



Die Verringerung der Lebensdauer von Cy5, das über eine Kohlenstoffkette an die Glasoberfläche gekoppelt ist, und die Bewegung des Moleküls lassen sich durch effektivere Deaktivierungsmöglichkeiten in der Flüssigkeit erklären.

Plötzlicher Anstieg von τ (0,7 ns \rightarrow 2,4 ns), konstantes F_2 (0,35) und Blinken bei Cy5:



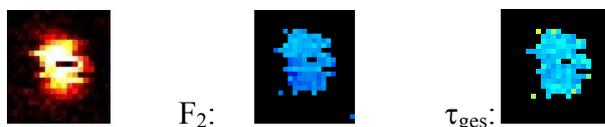
Cy5 scheint seine Lage gegenüber seiner Umgebung geändert zu haben, so dass sich seine Flexibilität (der C-Brücke) und seine Möglichkeiten der effektiven Deaktivierung drastisch verringert haben.

Hin-und-her-Bewegung des Moleküls und Anstieg von τ (3,9 ns \rightarrow 6,5 ns), Abfall von F_2 (0,85 \rightarrow 0,55) bei MR121 (mit Cy5 gebunden):



Offenbar unterliegt hier MR121 einer Konformationsänderung, z.B. durch Verdrehung (twist).

Leichter Abfall von F_2 während Blinken (0,65 \rightarrow 0,55), konstantes τ (2,0 ns) bei Uni371-Cy5 (mit Uni371-MR121 gebunden):



Hier liegt eine leichte spektrale Verschiebung (spectral jump) vor.

Anstieg von F_2 (0,40 \rightarrow 0,70), konstantes τ (2,0 ns) bei Uni370-Cy5:



Diese Bilder sind ein Beispiel für einen spektralen Sprung (spectral jump), hervorgerufen durch Änderungen der lokalen Polarität oder durch Isomerisierung der C-Brücke.

Wie man an den obigen Beispielen sieht, bieten Fluoreszenzbilder von Carbocyanin- und Oxazin-Farbstoffen sowie deren Konjugate mit Peptiden eine Fülle interessanter, spektroskopischer Effekte.

4.3 Tetramethylrhodamin auf Goldoberfläche

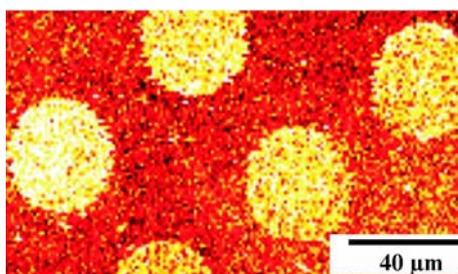


Abbildung 4.3-1: Ausschnitt aus einem Intensitätsbild von TMR-gebundenen Regionen einer Goldoberfläche

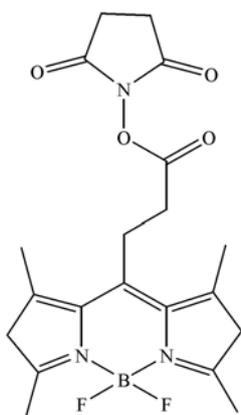
Das Bild der Bindungsregionen von TMR auf der aromatischen Monoschicht auf Gold der zeitaufgelösten Einzelmolekül-Spektroskopie zeigt, dass chemische Lithographie Vorlagen zur Immobilisation von fluoreszenzierenden Molekülen erzeugen kann. Die Anzahl der gebundenen Moleküle wird durch die Größe der Regionen und der Moleküle bestimmt. Die Größe dieser Bindungsregionen kann Dimensionen von ca. 6 nm betragen, wodurch auch einzelne Moleküle gebunden werden könnten [Lercel 1996].

5 Anhang

5.1 Abkürzungen

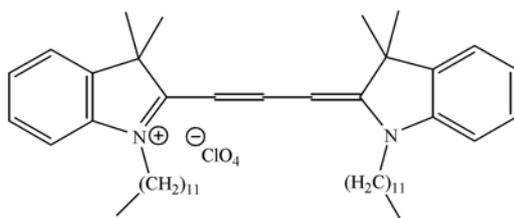
(in dieser Arbeit und der verwendeten Literatur)

| | |
|-----------|---|
| AEAEAPTMO | 3-(2-[2-Aminoethylamino]-ethylamino)-propyl-trimethoxysilan |
| AEAPTMO | 3-(2-Aminoethylamino)-propyl-trimethoxysilan |
| APTMO | 3-Aminopropyl-trimethoxysilan |
| APTEOS | 3-Aminopropyl-triethoxysilan |
| Arg | Arginin |
| BODIPY | Dipyrrromethenboron-difluoride, z.B. BODIPY 493/503-NHS |

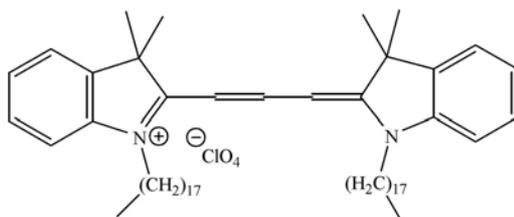


| | |
|------------|--|
| BOP | 1-Benzotriazolyl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat |
| <i>und</i> | Castro-Reagens |
| C-terminal | carboxy-terminal |
| Caro-Säure | Kaliummonopersulfat Tripelsalz |
| <i>und</i> | Kaliumperoxomonosulfat Tripelsalz $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ |
| CCD | ladungsgekoppeltes Gerät |
| CFD | Konstante-Fraktion-Unterscheider |
| CFLIM | konfokale Fluoreszenz-Lebenszeit-Abbildung |
| DCC | N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid |
| diI | 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin |

DiIC₁₂ 1,1'-Didodecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin

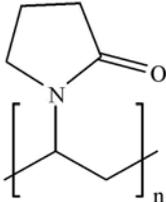


DiI / DiIC₁₈ 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-perchlorat



| | |
|------------------------|---|
| DIPEA | Diisopropyl-ethylamin |
| DMF | N,N'-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDAC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid |
| EDC | N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (HCl) |
| <i>und</i> | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (HCl) |
| EtOH | Ethanol |
| FD | Frequenzbereich |
| FLIM | Fluoreszenz-Lebenszeit-Abbildung |
| FM | Frequenzmodulation |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer |
| FT | Fourier-Transformation |
| FTP | „Femtotip-Puffer“: Tris-Borat-Puffer (20 mM in H ₂ O; pH 8,4); 30% Glycerol; 3% PVP K90; 0,1% Tween 20 |
| H ₂ O (ve.) | „vollentsalztes“ Wasser |
| HATU | O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-PF ₆ |
| HBTU | N-Hydroxybenzotriazolharnstoff-Salz |
| <i>und</i> | O-(1-Benzotriazolyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-PF ₆ |
| HF | Fluorwasserstoffsäure |
| HOAT | N-Hydroxy-7-azabenzotriazol |
| <i>und</i> | 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol |
| HOBT | N-Hydroxybenzotriazol |
| <i>und</i> | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HOMO | höchstes besetztes Molekülorbital |

| | |
|--------------|---|
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie |
| (bzw. | Hochdruckflüssigchromatographie) |
| ID | innerer Durchmesser |
| IRF | Instrument-Antwort-Funktion |
| ISC | Inter System Crossing |
| LIF | laserinduzierte Fluoreszenz |
| LK | Lösemittelkonzentration |
| LUMO | niedrigstes unbesetztes Molekülorbital |
| Lys | Lysin |
| MALDI-TOF-MS | matrixunterstützte Laserdesorptionsionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie |
| MCA | Viel-Kanal-Analysator |
| MCS | Viel-Kanal-Skalar |
| MES | 4-Morpholinethansulfonsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| MeOH | Methanol |
| MW | Molekulargewicht |
| <i>und</i> | molare Masse |
| N-terminal | amino-terminal |
| NEM | N-Ethylmorpholin |
| <i>oder</i> | N-Ethylmaleimid |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| NMM | N-Methylmorpholin |
| NSOM | nahfeld-abtast-optische Mikroskopie |
| OD | äußerer Durchmesser |
| <i>oder</i> | (relative) optische Dichte |
| <i>oder</i> | octadecyl- |
| ODS | Octadecylsilan |
| PB | Phosphat-Puffer |
| PBS | polarisierender Strahlteiler |
| <i>oder</i> | Phosphat-gepufferte, konzentrierte Kochsalzlösung |
| pH | negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration |
| Phe | Phenylalanin |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| Pro | Prolin |

| | |
|------------|--|
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| |  |
| Py | Pyridin |
| RP-HPLC | Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie |
| S/N | Signal-zu-Rausch-Verhältnis |
| SAM | selbstorganisierende Monoschicht |
| SFLIM | spektral-aufgelöste Fluoreszenz-Lebensdauer-Abbildung |
| SFM | Scherkraftmikroskopie |
| SFS | statistische Feinstruktur |
| SM | Einzelmolekül |
| SMD | Einzelmolekülerkennung |
| TAC | Zeit-zu-Amplitude-Konverter |
| TCSPC | zeitkorreliertes Einzel-Photon-Zählen |
| TEA | Triethylamin |
| TFA | Trifluoethansäure |
| TFAcOH | Trifluoethansäure |
| TMR | Tetramethylrhodamin |
| TMR-ITC | Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat |
| TNTU | 2-(5-Norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3',3'-tetramethyl-uronium BF ₄ ⁻ |
| <i>und</i> | O-(5-Norbornen-2,3-dicarboximido)-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium BF ₄ ⁻ |
| Trp | Tryptophan |
| TSTU | N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(N-succinimidyl)uronium BF ₄ ⁻ |
| TTTR | zeit-markiert, zeit-aufgelöst |
| UV/Vis | ultravioletter und sichtbarer Bereich |

5.2 Chromatogramme und Spektren

5.2.1 HPLC-Chromatogramme

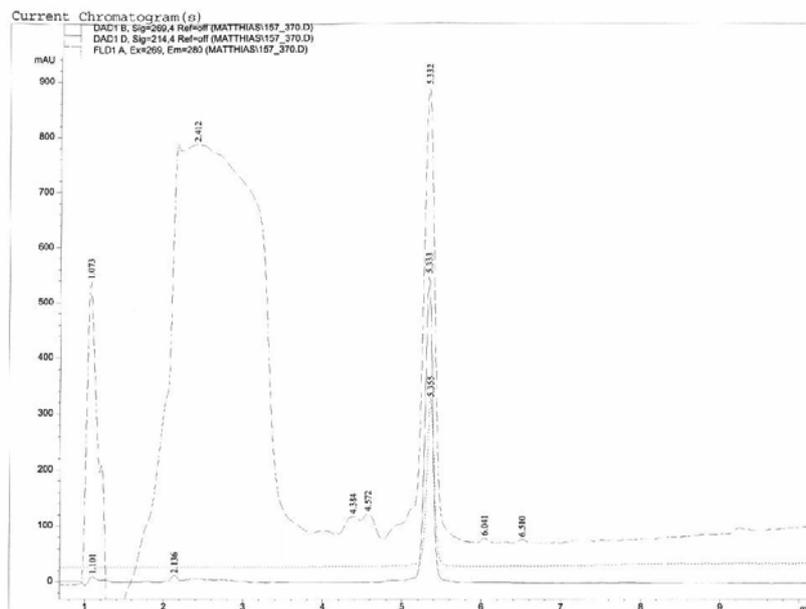


Abbildung 5.2.1-1 Chromatogramm von von Uni370 (50 nmol)

$$t_r(\text{Uni370}) = 5,4 \text{ min}$$

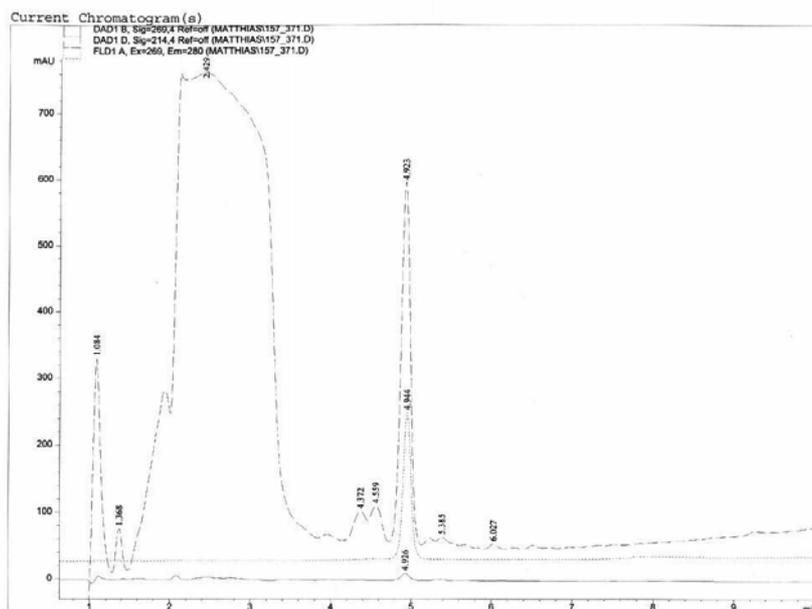


Abbildung 5.2.1-2 Chromatogramm von Uni371 (50 nmol)

$$t_r(\text{Uni371}) = 4,9 \text{ min}$$

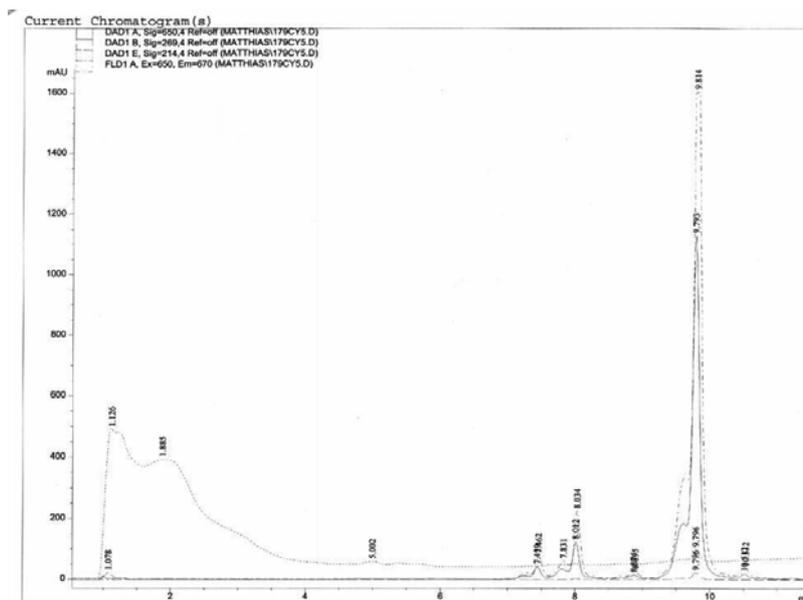


Abbildung 5.2.1-3 Chromatogramm von Cy5

$t_r(\text{Cy5}) = 9,8 \text{ min}$

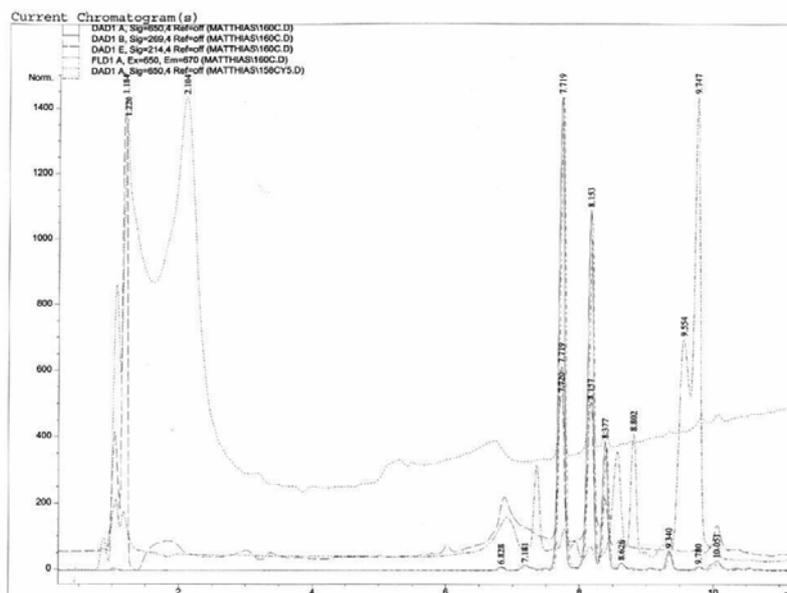


Abbildung 5.2.1-4 Chromatogramm von Cy5-NHS

$t_r(\text{Cy5}(-\text{NHS})_2) = 7,7 \text{ min}$; $t_r(\text{Cy5-NHS}) = 8,2 \text{ min}$, $t_r(?) = 8,4 \text{ min}$

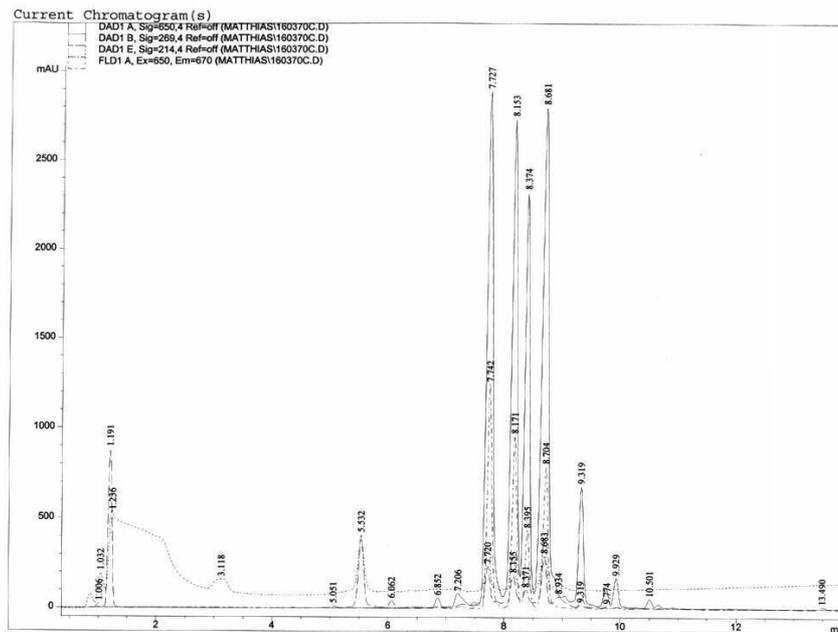


Abbildung 5.2.1-5 Chromatogramm von Uni370-Cy5

$t_r(\text{Cy5(-NHS)}_2) = 7,7 \text{ min}$, $t_r(\text{Cy5-NHS}) = 8,2 \text{ min}$, $t_r(?) = 8,4 \text{ min}$, $t_r(\text{Uni370-Cy5}) = 8,7 \text{ min}$

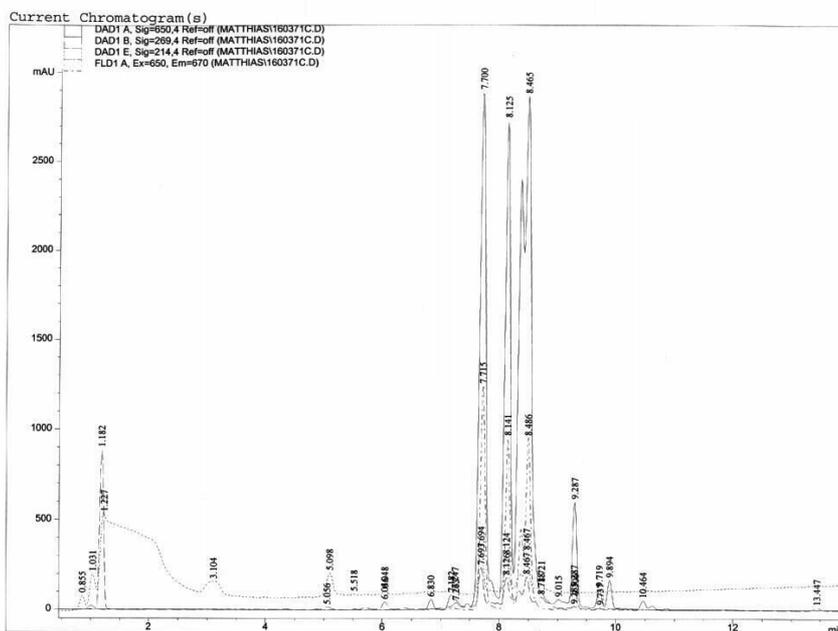


Abbildung 5.2.1-6 Chromatogramm von Uni371-Cy5

$t_r(\text{Cy5(-NHS)}_2) = 7,7 \text{ min}$, $t_r(\text{Cy5-NHS}) = 8,1 \text{ min}$, $t_r(?) = 8,4 \text{ min}$, $t_r(\text{Uni371-Cy5}) = 8,5 \text{ min}$

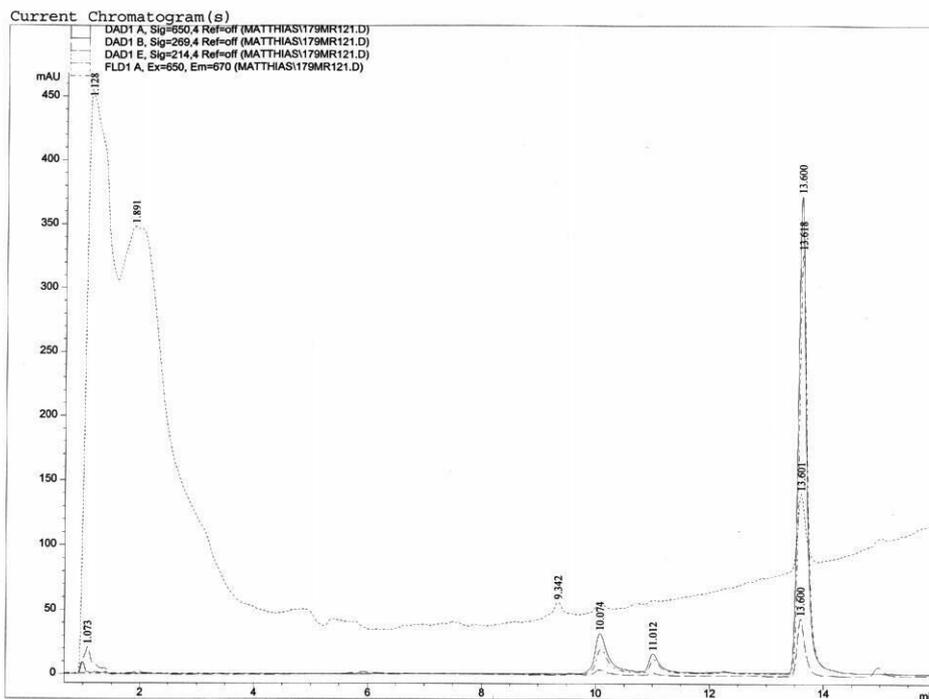


Abbildung 5.2.1-7 Chromatogramm von MR121

$t_r(\text{MR121-Et}) = 10,8 \text{ min}$, $t_r(\text{MR121}) = 13,6 \text{ min}$

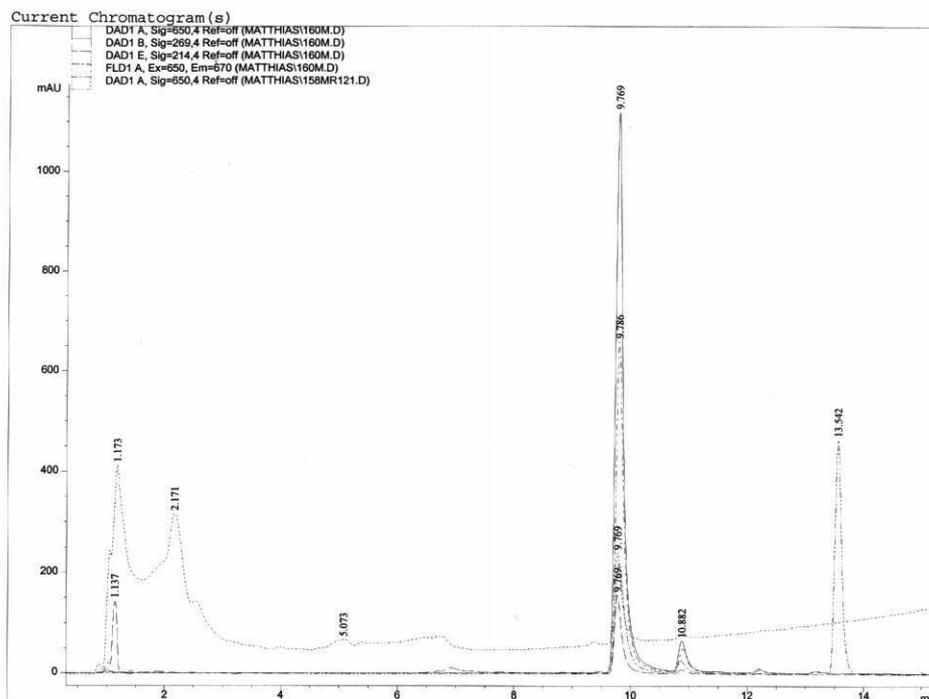


Abbildung 5.2.1-8 Chromatogramm von MR121-NHS

$t_r(\text{MR121-NHS}) = 9,8 \text{ min}$, $t_r(\text{MR121-Et}) = 10,8 \text{ min}$

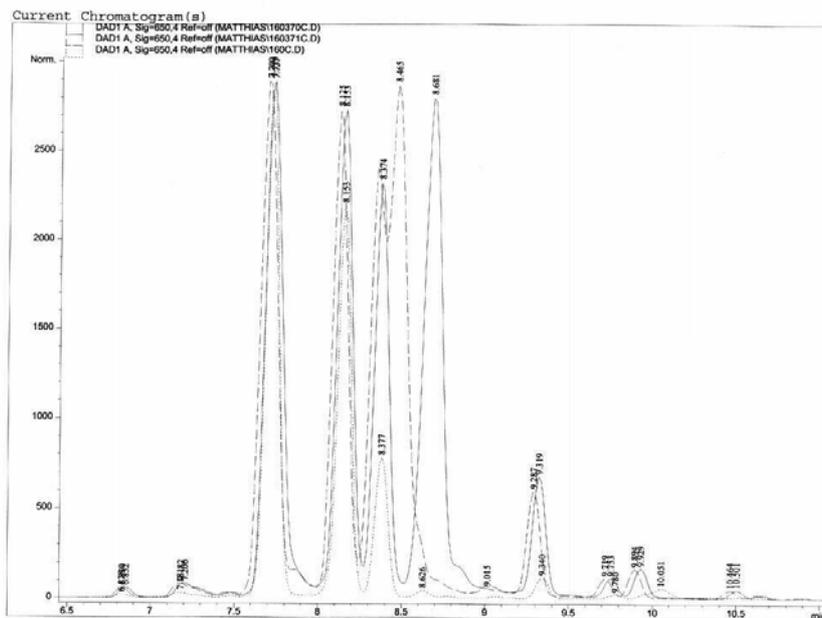


Abbildung 5.2.1-9 Vergleich der Chromatogramme von Uni370-Cy5, Uni371-Cy5 und Cy5 zur Produktidentifizierung

$t_r(\text{Cy5}(-\text{NHS})_2) = 7,7 \text{ min}$, $t_r(\text{Cy5-NHS}) = 8,1 \text{ min}$, $t_r(?) = 8,4 \text{ min}$, $t_r(\text{Uni371-Cy5}) = 8,5 \text{ min}$, $t_r(\text{Uni370-Cy5}) = 8,7 \text{ min}$, $t_r(\text{Cy5}) = 9,3 \text{ min}$

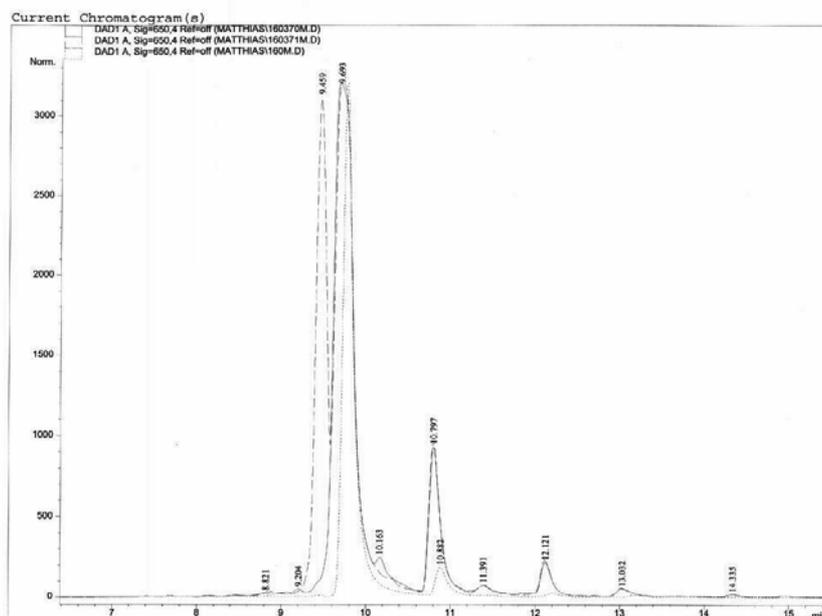


Abbildung 5.2.1-10 Vergleich der Chromatogramme von Uni370-MR121, Uni371-MR121 und MR121 zur Produktidentifizierung

$t_r(\text{Uni371-MR121}) = 9,5 \text{ min}$, $t_r(\text{Uni370-MR121}) = 9,7 \text{ min}$, $t_r(\text{MR121-NHS}) = 10,8 \text{ min}$

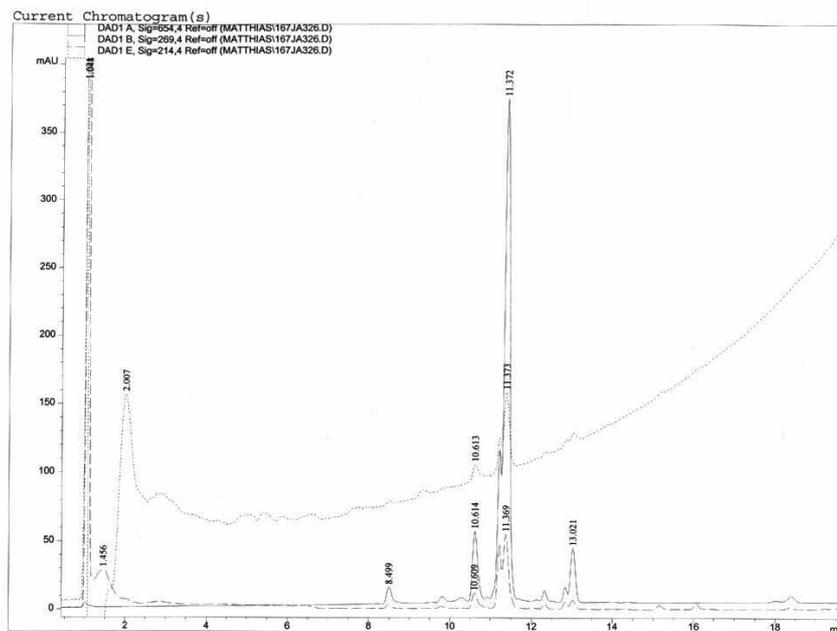


Abbildung 5.2.1-13 Chromatogramm von ATTO650-NHS

$t_r(\text{ATTO650}) = 8,5 \text{ min}$, $t_r(\text{ATTO650-Isomer}) = 10,6 \text{ min}$, $t_r(\text{ATTO650-NHS-Isomer}) = 11,3 \text{ min}$, $t_r(\text{ATTO650-NHS}) = 11,4 \text{ min}$

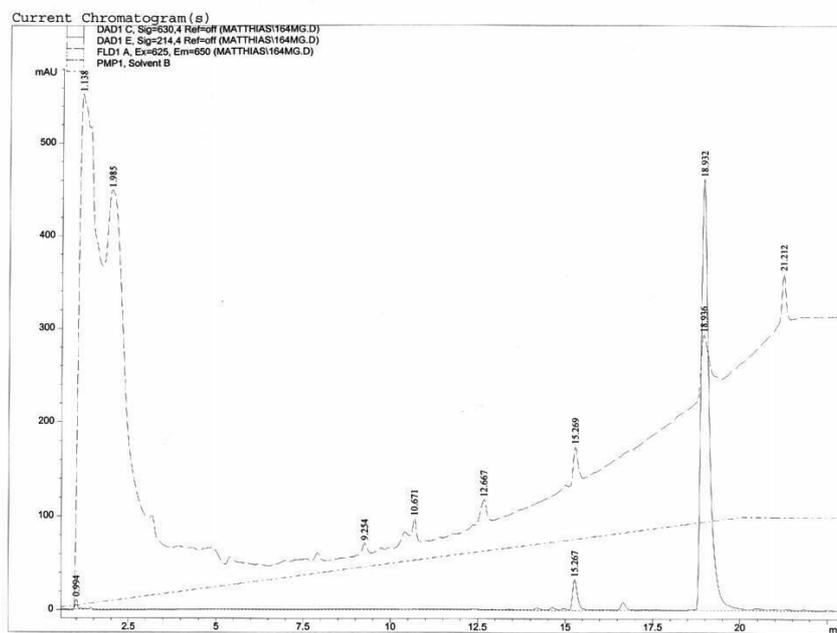


Abbildung 5.2.1-14 Chromatogramm von Malachitgrün-ITC

$t_r(\text{Malachitgrün-ITC}) = 18,9 \text{ min}$

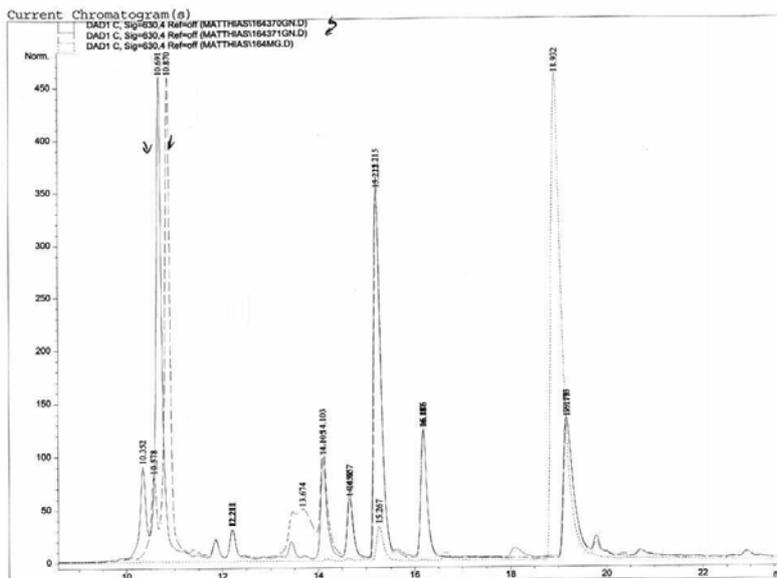


Abbildung 5.2.1-15 Vergleich der Chromatogramme von Uni370-TC-MG, Uni371-TC-MG und MG zur Produktidentifizierung

(MG: Malachitgrün ; Herstellung in 50 MeCN, 2,5 NMM, 12,5 H₂O, 35 MeOH)

$t_r(\text{Uni370-TC-MG}) = 10,9 \text{ min}$, $t_r(\text{Uni371-TC-MG}) = 10,7 \text{ min}$, $t_r(\text{MG-?}) = 15,2 \text{ min}$,
 $t_r(\text{MG-ITC}) = 18,9 \text{ min}$

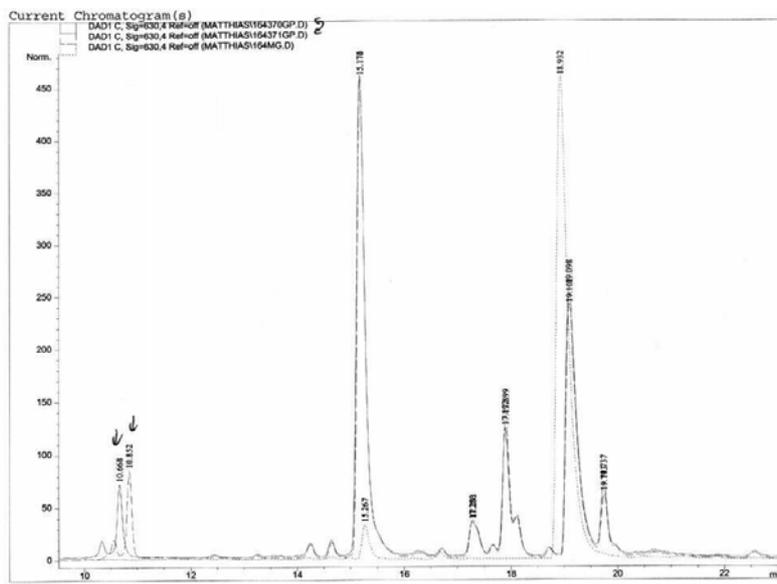


Abbildung 5.2.1-16 Vergleich der Chromatogramme von Uni370-TC-MG, Uni371-TC-MG und MG zur Produktidentifizierung

(MG: Malachitgrün; Herstellung in Pyridin/H₂O (1 : 1))

$t_r(\text{Uni370-TC-MG}) = 10,8 \text{ min}$, $t_r(\text{Uni371-TC-MG}) = 10,7 \text{ min}$, $t_r(\text{MG-?}) = 15,2 \text{ min}$,
 $t_r(\text{MG-ITC}) = 18,9 \dots 19,1 \text{ min}$

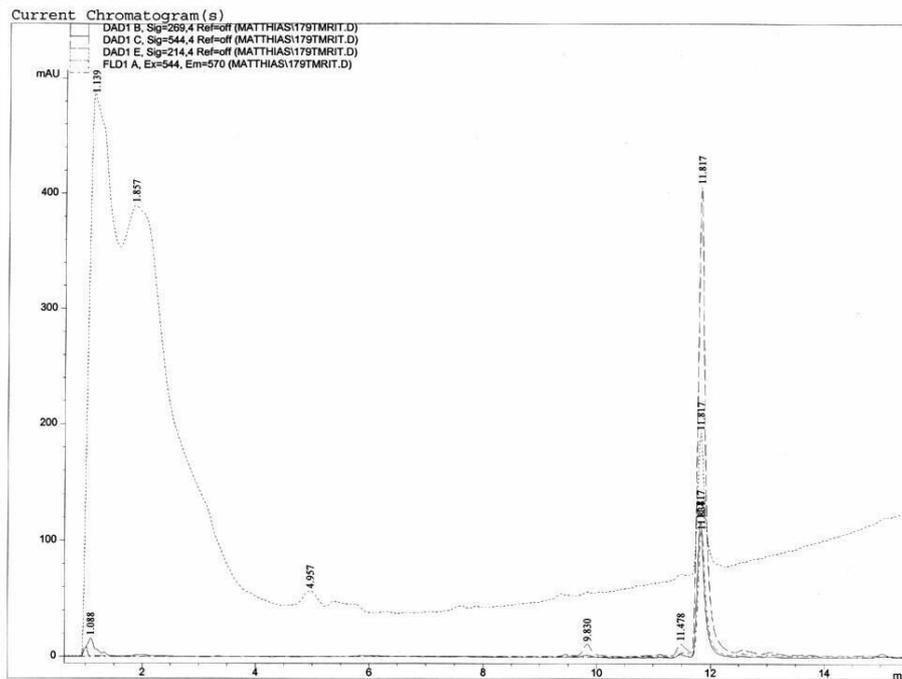


Abbildung 5.2.1-17 Chromatogramm von TMR-ITC

$t_r(\text{TMR-ITC}) = 11,8 \text{ min}$

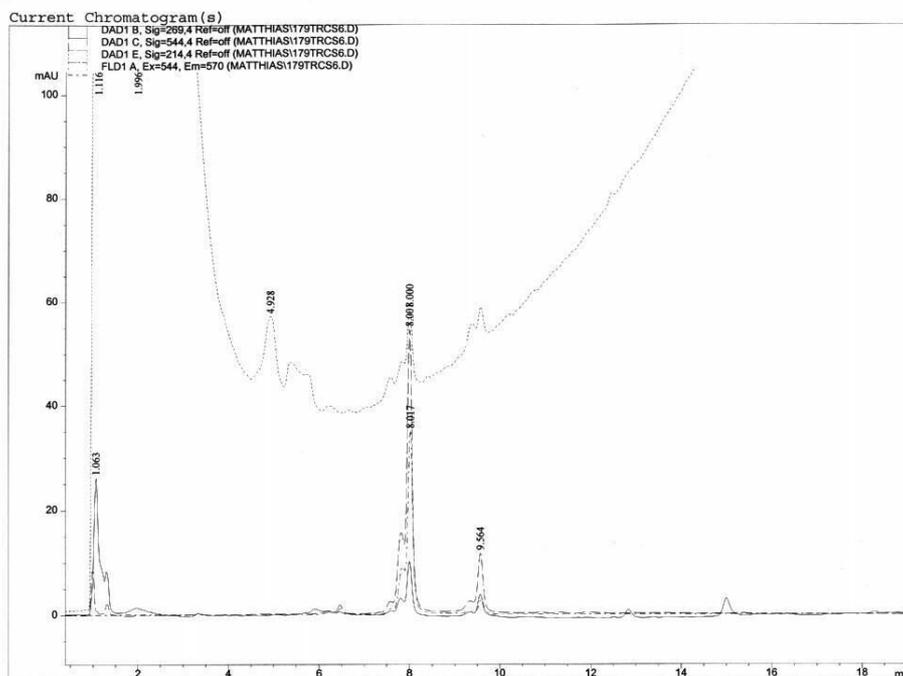


Abbildung 5.2.1-18 Chromatogramm von TMR-CS (5-/6-Isomergemisch, eines angereichert, nicht zugeordnet)

$t_r(\text{TMR-5/6-CS}) = 8,0/9,6 \text{ min}$

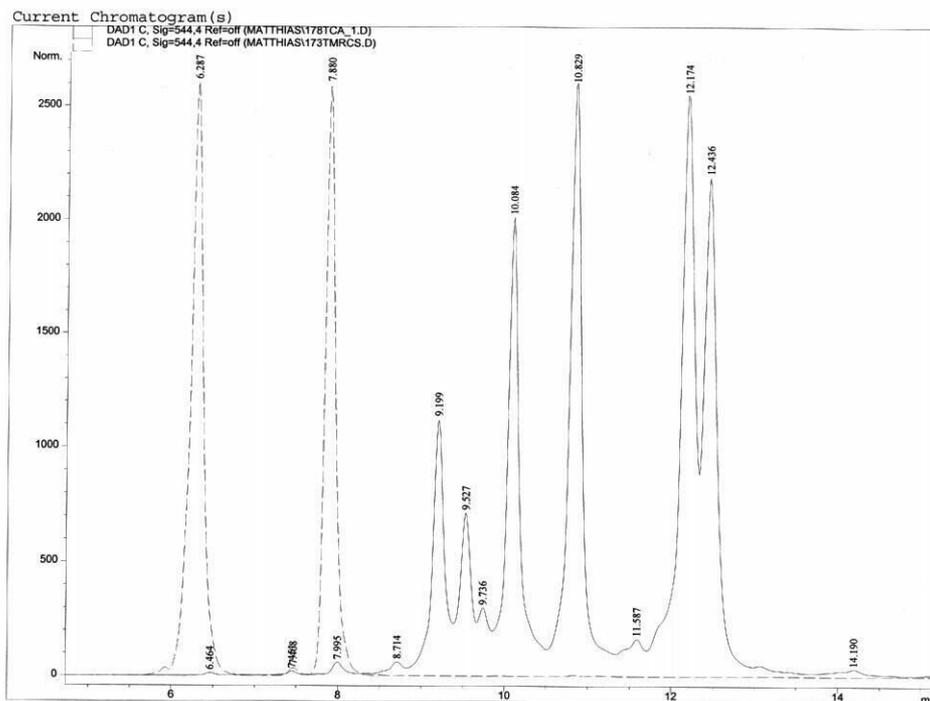


Abbildung 5.2.1-19 Vergleich der Chromatogramme von TMR-CS (5-/6-Isomerengemisch, ---) und des Produktgemisches nach der Aktivierungsreaktion (—)

$t_r(\text{TMR-5/6-CS}) = 6,3/7,9 \text{ min}$, $t_r(\text{TMR-5/6-CS-NHS, -EDC, u.a.}) = 9,2/9,5/10,8/12,2/12,4 \text{ min}$

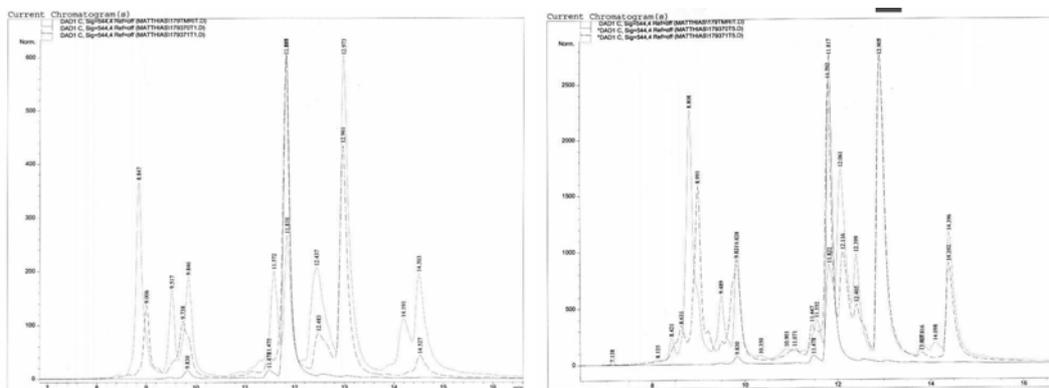


Abbildung 5.2.1-20 Überlagerung der Chromatogramme von Uni370-TC-TMR, Uni371-TC-TMR und TMR zur Identifizierung der Produkte (2 Reaktions-Sets)

$t_r(\text{Uni371-TC-TMR}) = 8,8 \text{ min}$, $t_r(\text{Uni370-TC-TMR}) = 9,0 \text{ min}$, $t_r(\text{TMR-ITC}) = 11,8 \text{ min}$

5.2.2 Massenspektren

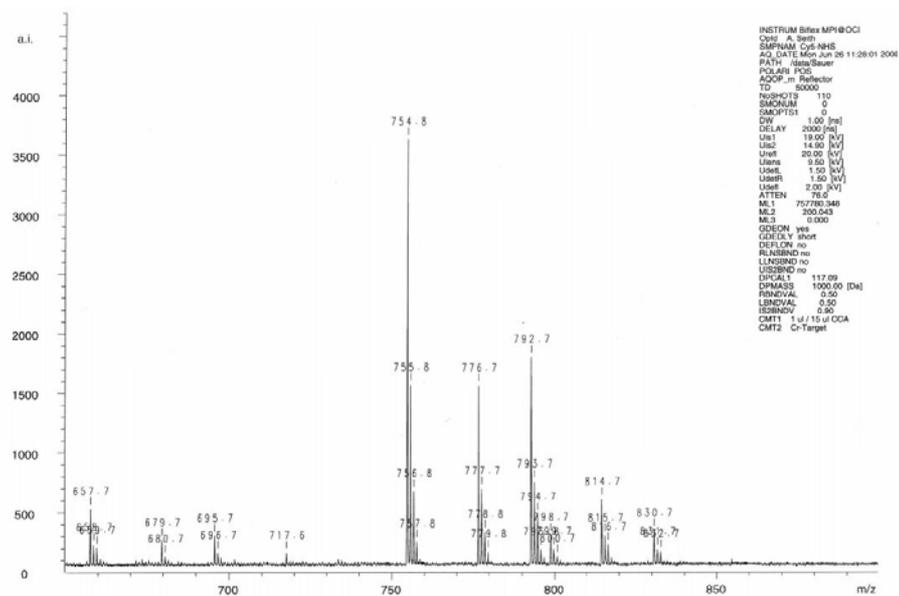


Abbildung 5.2.2-1 Massenspektrum (MALDI-TOF, positive Polarisierung) von Cy5-NHS

MALDI-TOF pos.: m/z 755 ($[M+2H]^+$), 777 ($[M+Na,H]^+$), 793 ($[M+K,H]^+$), 799 ($[M+2Na]^+$), 815 ($[M+Na,K]^+$), 831 ($[M+2K]^+$)
 ($M_{\text{berechnet}} = 753$)

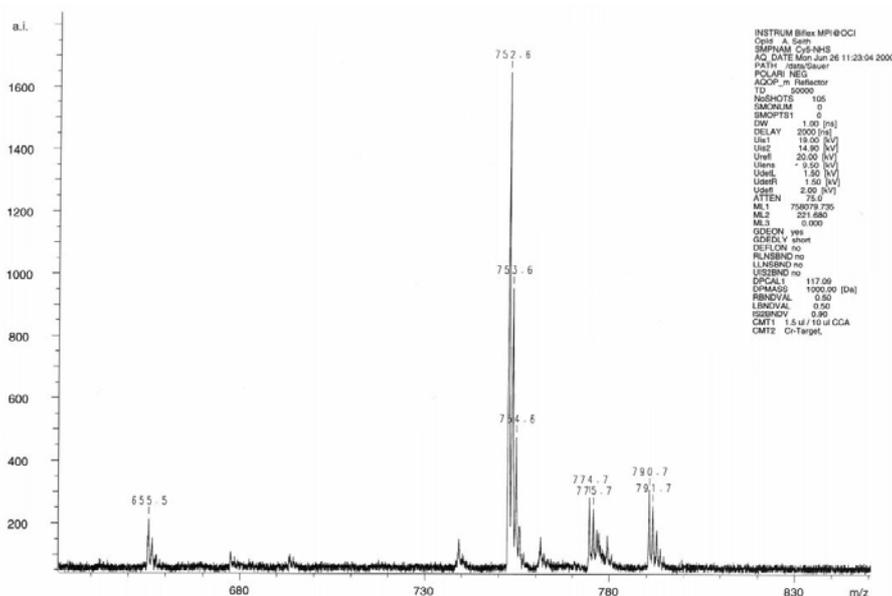


Abbildung 5.2.2-2 Massenspektrum (MALDI-TOF, negative Polarisierung) von Cy5-NHS

MALDI-TOF neg.: m/z 753 ($[M]^+$), 775 ($[M+Na]^+$), 791 ($[M+K]^+$)
 ($M_{\text{berechnet}} = 753$)

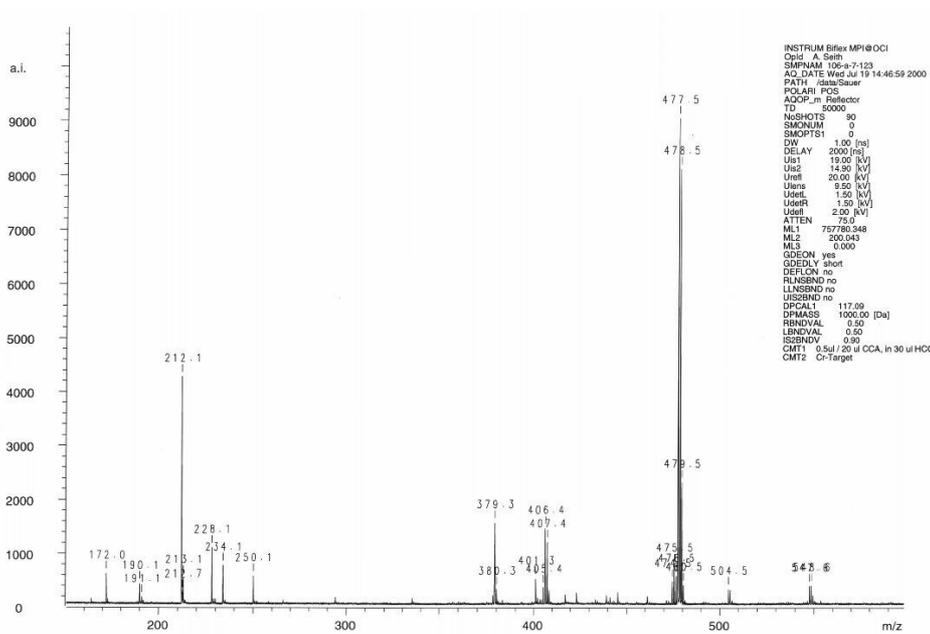


Abbildung 5.2.2-5 Massenspektrum von MR121-NHS

MALDI-TOF pos.: m/z 478 ([M+H]⁺)

(M_{berechnet} = 477)

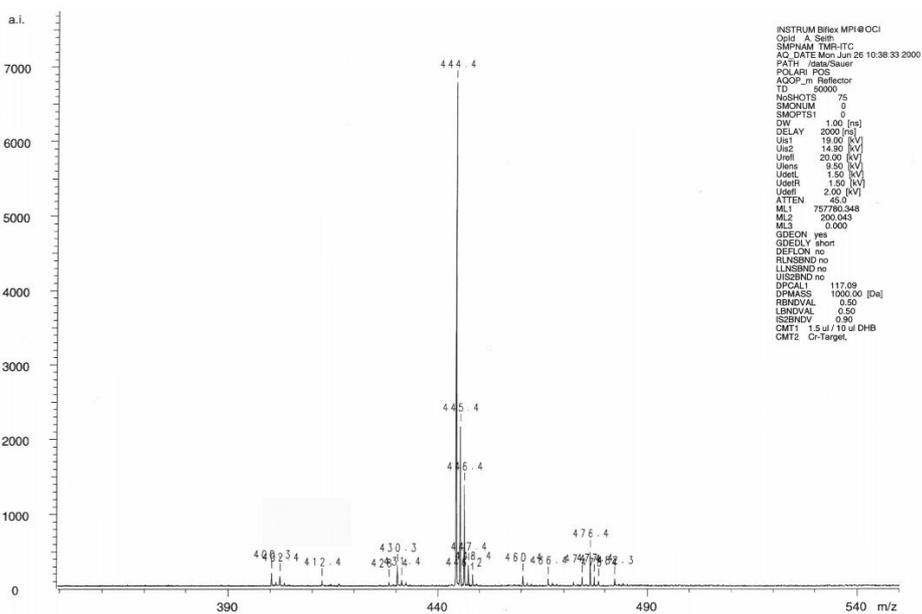


Abbildung 5.2.2-6 Massenspektrum von TMR-ITC

MALDI-TOF pos.: m/z 444 ([M]⁺), 466 ([M+Na, -H]⁺), 482 ([M+K, -H]⁺)

(M_{berechnet} = 444)

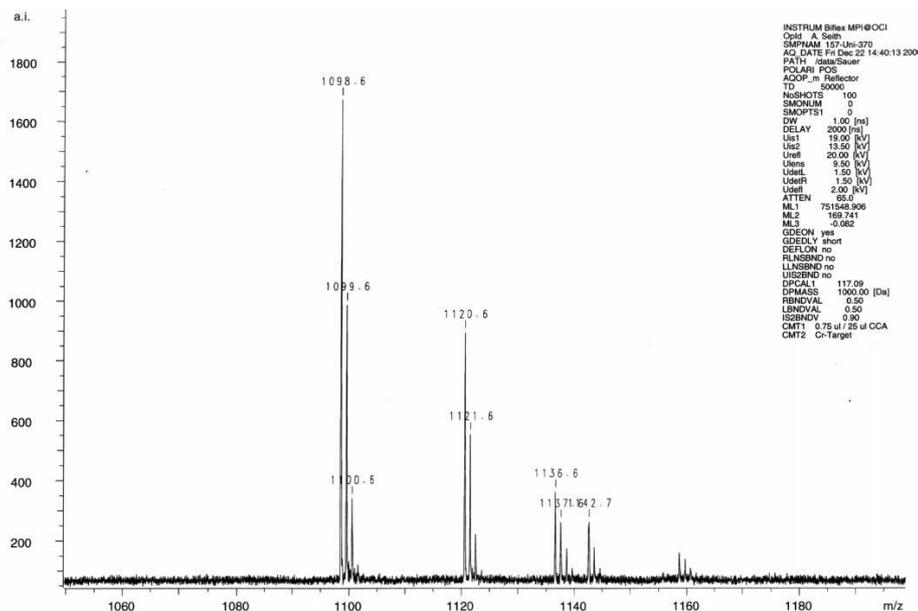


Abbildung 5.2.2-7 Massenspektrum von Uni370

MALDI-TOF pos.: m/z 1099 ($[M+2H]^+$), 1121 ($[M+Na,H]^+$), 1137 ($[M+K,H]^+$),
1143 ($[M+2Na]^+$), 1159 ($[M+Na,K]^+$)
($M_{\text{berechnet}} = 1097$)

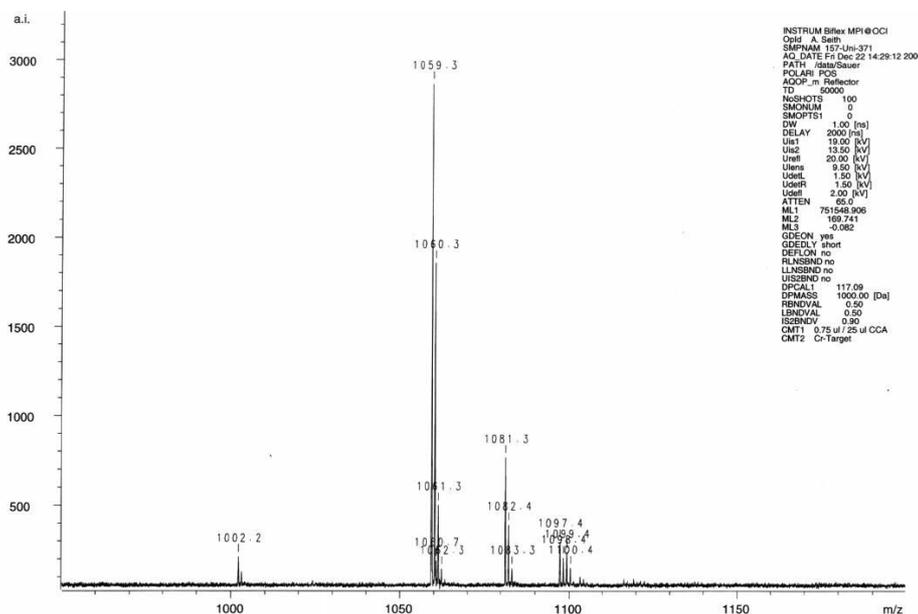


Abbildung 5.2.2-8 Massenspektrum von Uni371

MALDI-TOF pos.: m/z 1059 ($[M+H]^+$), 1081 ($[M+Na]^+$), 1097 ($[M+K]^+$)
($M_{\text{berechnet}} = 1058$)

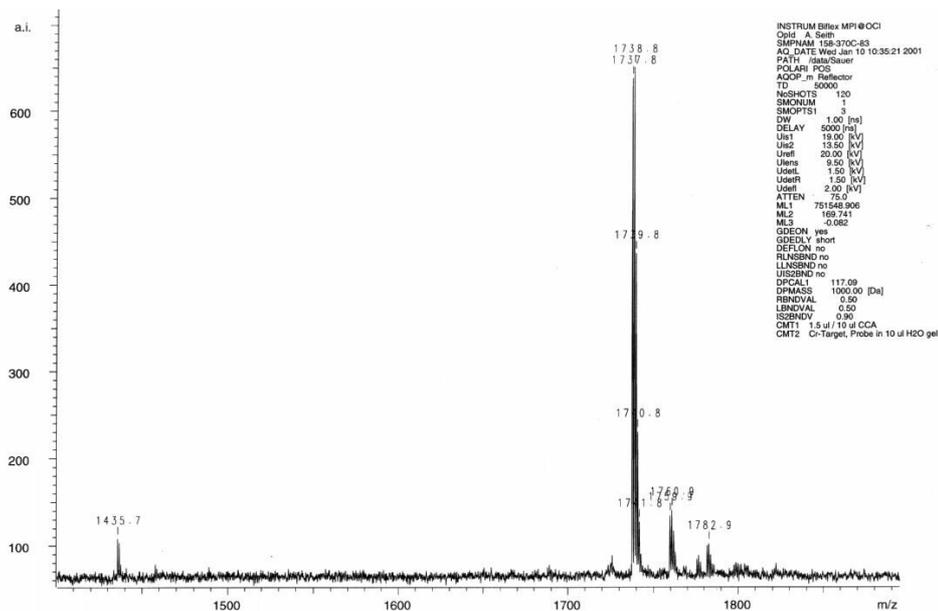


Abbildung 5.2.2-9 Massenspektrum von Uni370-Cy5

MALDI-TOF pos.: m/z 1739 ($[M+4H]^+$), 1761 ($[M+Na,3H]^+$), 1777 ($[M+K,3H]^+$),
 1783 ($[M+2Na]^+$)
 ($M_{berechnet} = 1735$)

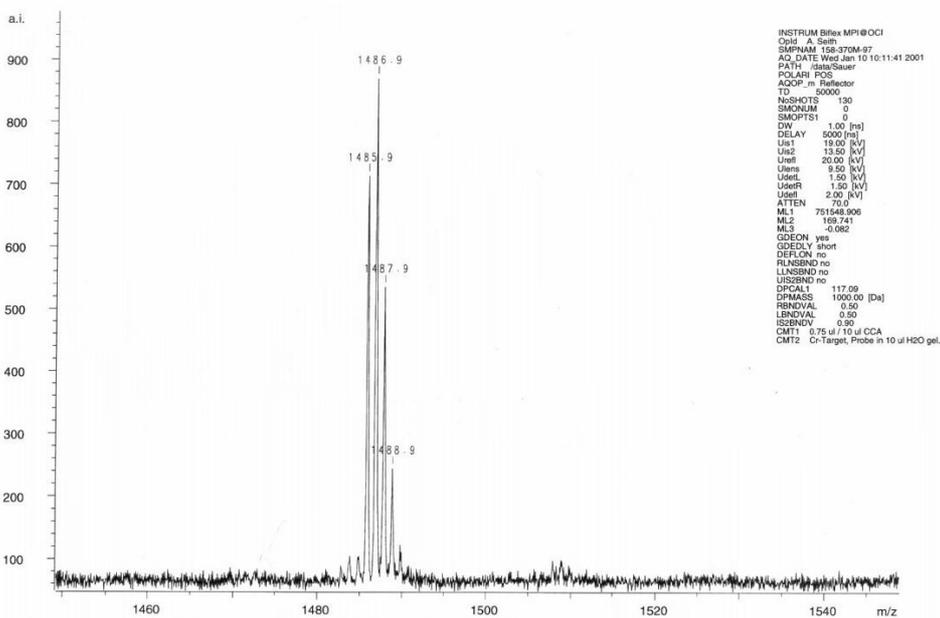


Abbildung 5.2.2-10 Massenspektrum von Uni370-MR121

MALDI-TOF pos.: m/z 1487 ($[M+H]^+$); MR121: 406 (M^+)
 ($M_{berechnet} = 1086$)

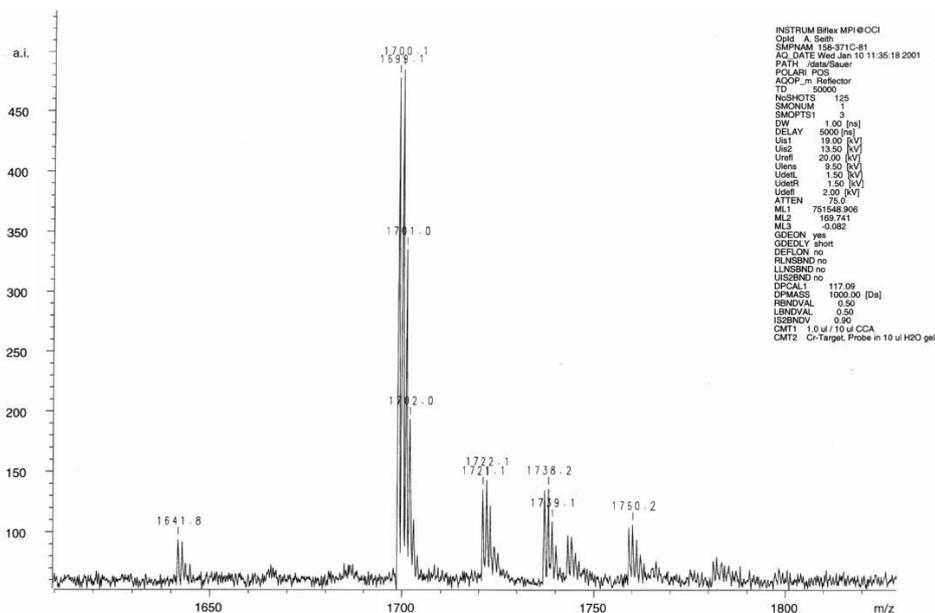


Abbildung 5.2.2-11 Massenspektrum von Uni371-Cy5

MALDI-TOF pos.: m/z 1700 ($[M+4H]^+$), 1722 ($[M+Na,3H]^+$), 1738 ($[M+K,3H]^+$),
 1760 ($[M+Na,K,2H]^+$)
 ($M_{\text{berechnet}} = 1696$)

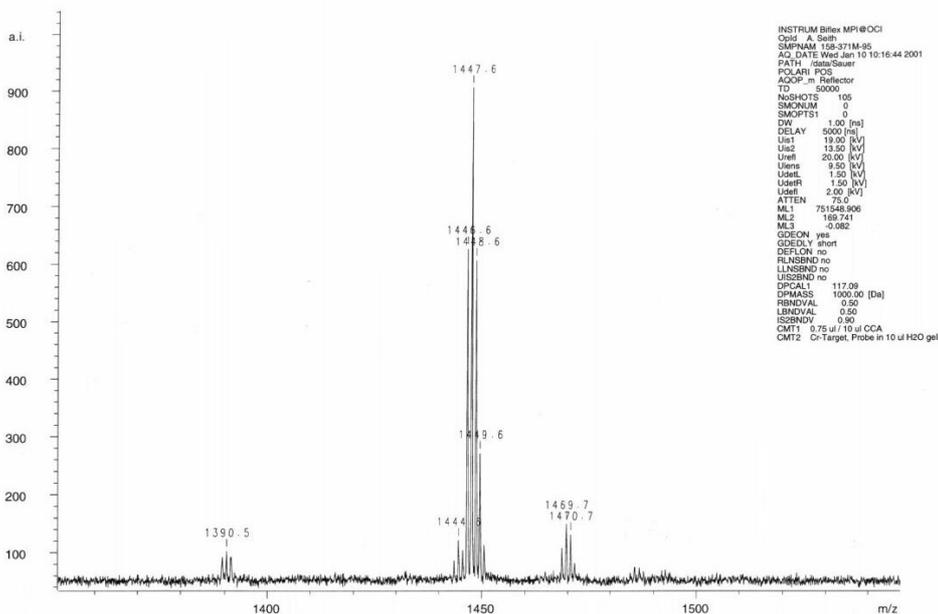


Abbildung 5.2.2-12 Massenspektrum von Uni371-MR121

MALDI-TOF pos.: m/z 1448 ($[M+H]^+$), 1470 ($[M+Na]^+$)
 ($M_{\text{berechnet}} = 1447$)

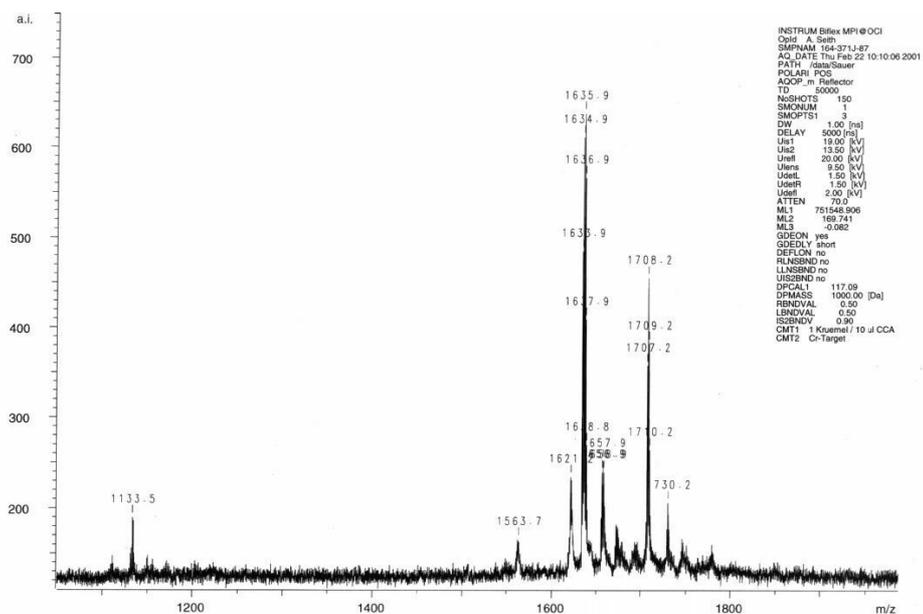


Abbildung 5.2.2-13 Massenspektrum von Uni370-ATTO650

MALDI-TOF pos.: m/z 1636 ($[M+H]^+$), 1658 ($[M+Na]^+$), 1674 ($[M+K]^+$), 1697 ($[M+Na,K]^+$)
 ($M_{berechnet} = 1635$)

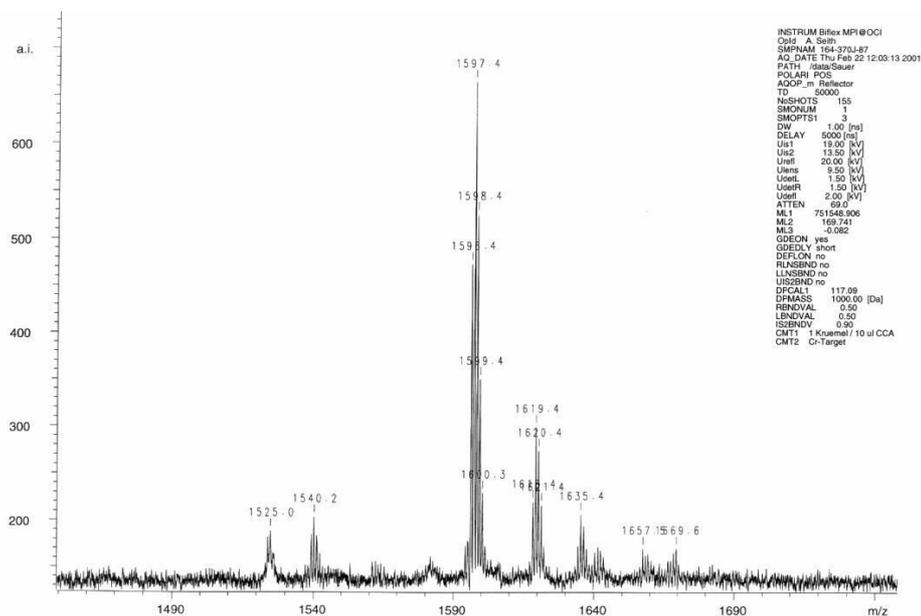


Abbildung 5.2.2-14 Massenspektrum von Uni371-ATTO650

MALDI-TOF pos.: m/z 1597 ($[M+H]^+$), 1619 ($[M+Na]^+$), 1635 ($[M+K]^+$), 1643 ($[M+2Na,-H]^+$), 1657 ($[M+Na,K,-H]^+$), 1670 ($[M+2K,-4H]^+$)
 ($M_{berechnet} = 1596$)

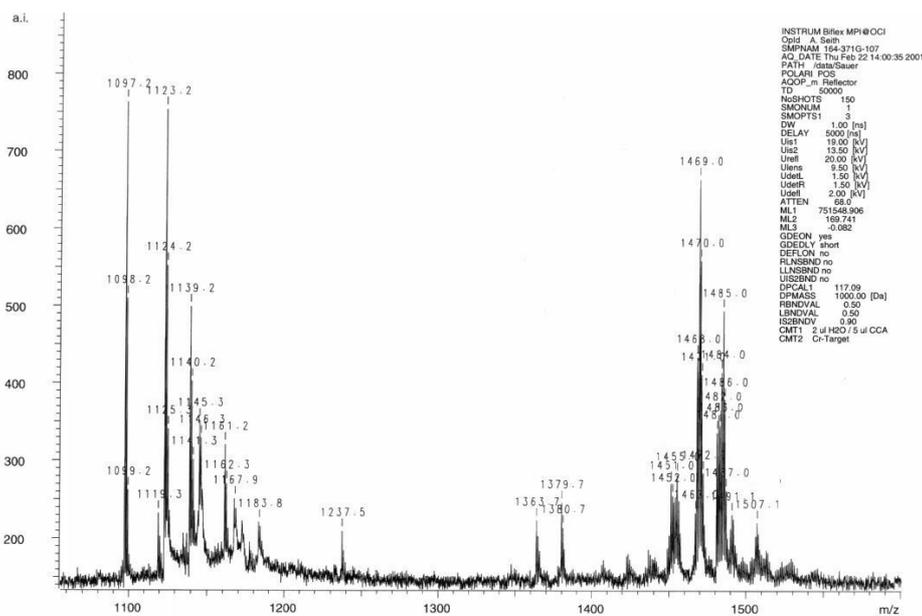


Abbildung 5.2.2-15 Massenspektrum von Uni370-Malachitgrün

MALDI-TOF pos.: m/z 1485 ($[M+H]^+$), 1507 ($[M+Na]^+$), 1469 ($[M-16]^+$)
 ($M_{\text{berechnet}} = 1484$)

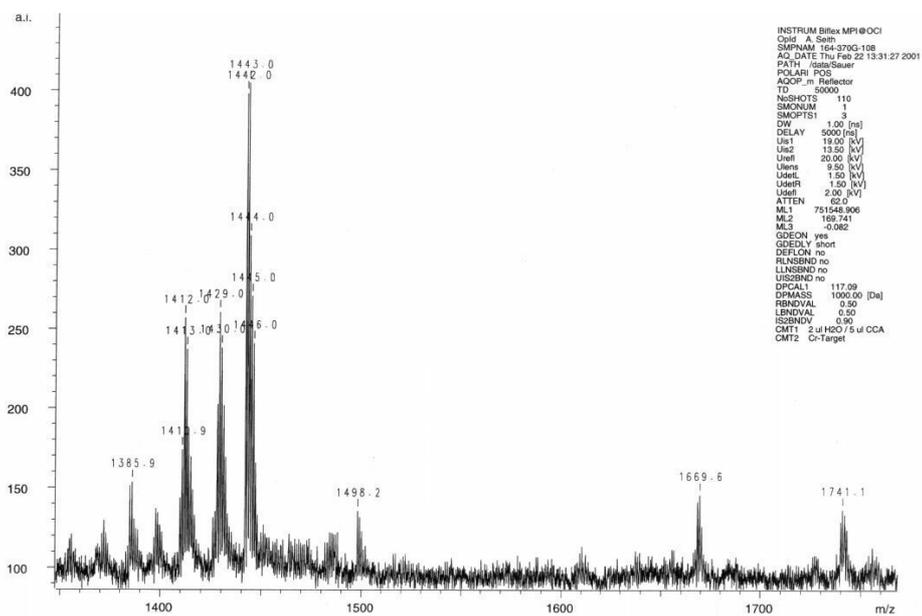


Abbildung 5.2.2-16 Massenspektrum von Uni371-Malachitgrün

MALDI-TOF pos.: m/z 1443 ($[M-2H]^+$)
 ($M_{\text{berechnet}} = 1445$)

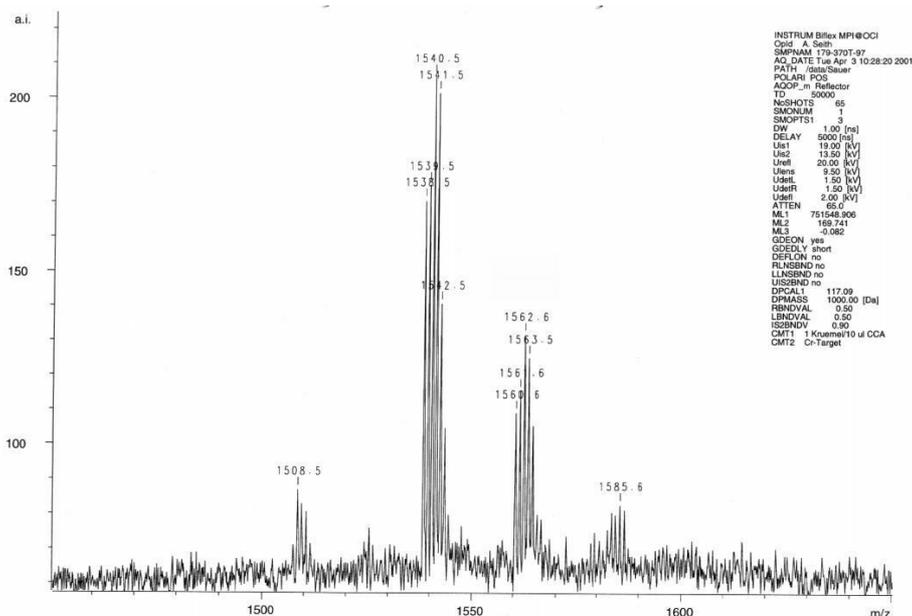


Abbildung 5.2.2-17 Massenspektrum von Uni370-TC-TMR

MALDI-TOF pos.: m/z 1540 ($[M-2H]^+$), 1562 ($[M+Na,-3H]^+$), 1585 ($[M+2Na,-3H]^+$)
 ($M_{berechnet} = 1542$)

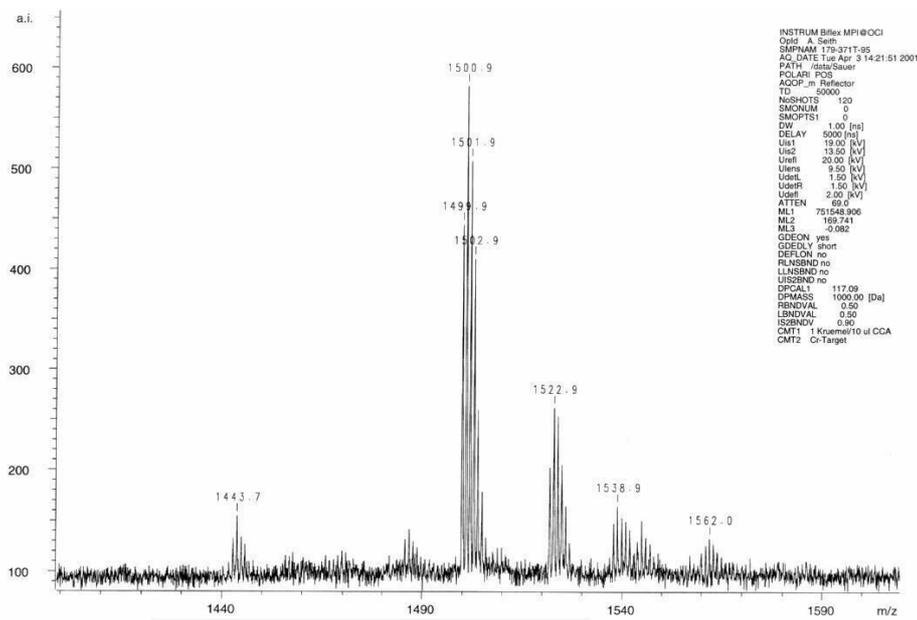


Abbildung 5.2.2-18 Massenspektrum von Uni371-TC-TMR

MALDI-TOF pos.: m/z 1501 ($[M-2H]^+$), 1523 ($[M+Na,-3H]^+$), 1539 ($[M+K,-3H]^+$), 1545 ($[M+2Na,-4H]^+$), 1562 ($[M+Na,K,-3H]^+$)
 ($M_{berechnet} = 1503$)

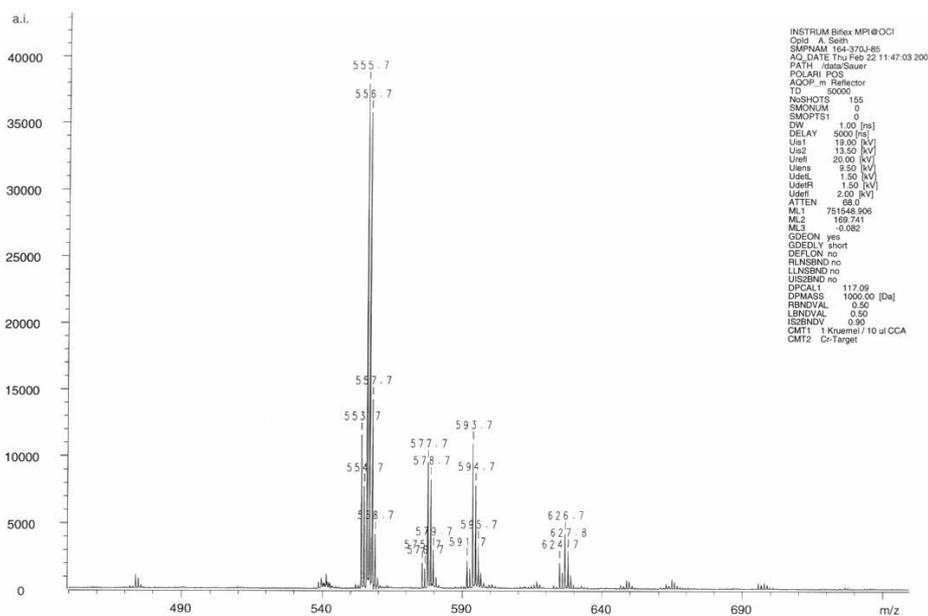


Abbildung 5.2.2-19 Massenspektrum von ATTO650

MALDI-TOF pos.: m/z 556 ($[M]^+$), 578 ($[M+Na,-H]^+$), 594 ($[M+K,-H]^+$), 627 ($[M+3Na,-2H]^+$)
 ($M_{\text{berechnet}} = 556$)

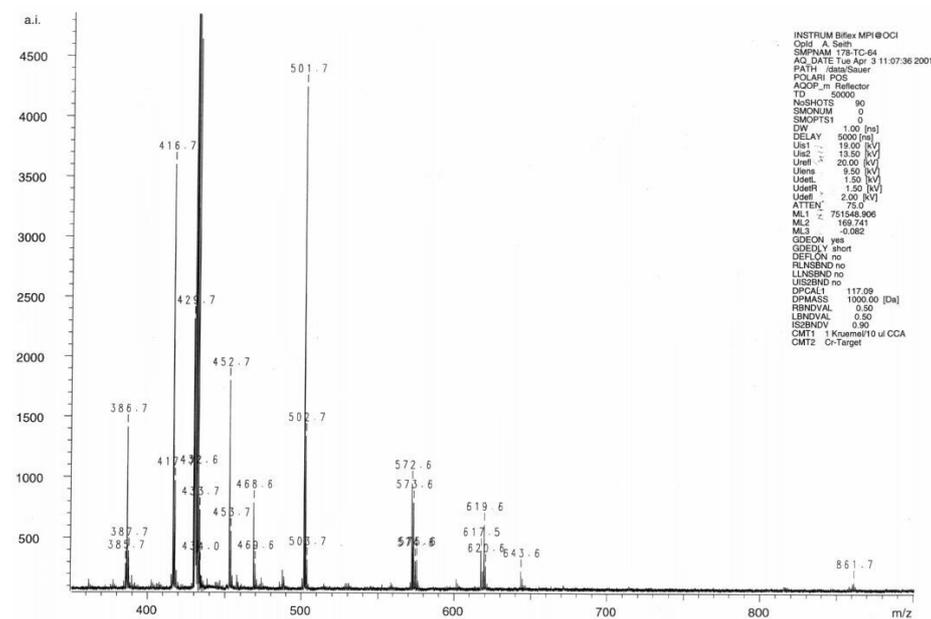


Abbildung 5.2.2-20 Massenspektrum von TMR-CS

MALDI-TOF pos.: m/z 431 ($[M]^+$), 453 ($[M+Na,-H]^+$), 469 ($[M+K,-H]^+$)
 ($M_{\text{berechnet}} = 431$)

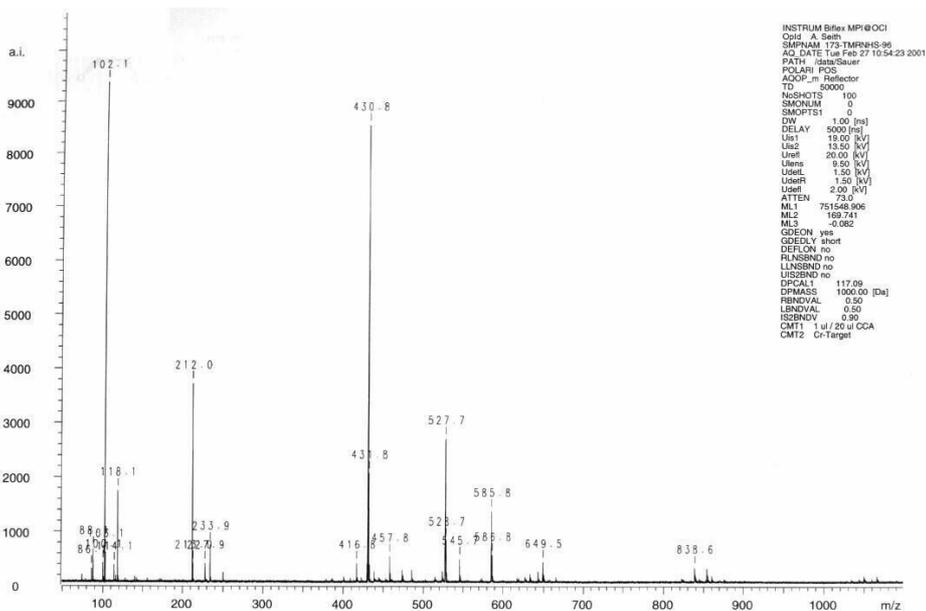


Abbildung 5.2.2-21 Massenspektrum von TMR-CS, NHS-Ester und EDC-Konjugat

MALDI-TOF pos.: TMR-CS: m/z 431 ($[M]^+$); TMR-CS-NHS: 528 ($[M]^+$); TMR-CS-EDC: 586 ($[M-H]^+$)
 (TMR-CS: $M_{\text{berechnet}} = 431$; TMR-CS-NHS: $M_{\text{berechnet}} = 528$; TMR-CS-EDC: $M_{\text{berechnet}} = 587$)

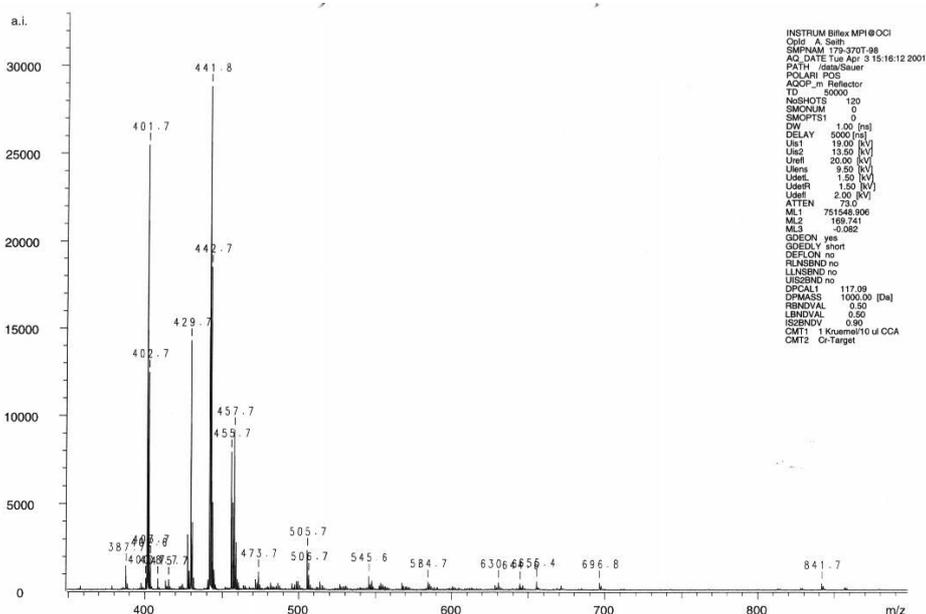


Abbildung 5.2.2-22 Massenspektrum von TMR-NH₂

MALDI-TOF pos.: m/z 402 ($[M]^+$), 442 ($[M+K,H]^+$)
 ($M_{\text{berechnet}} = 402$)

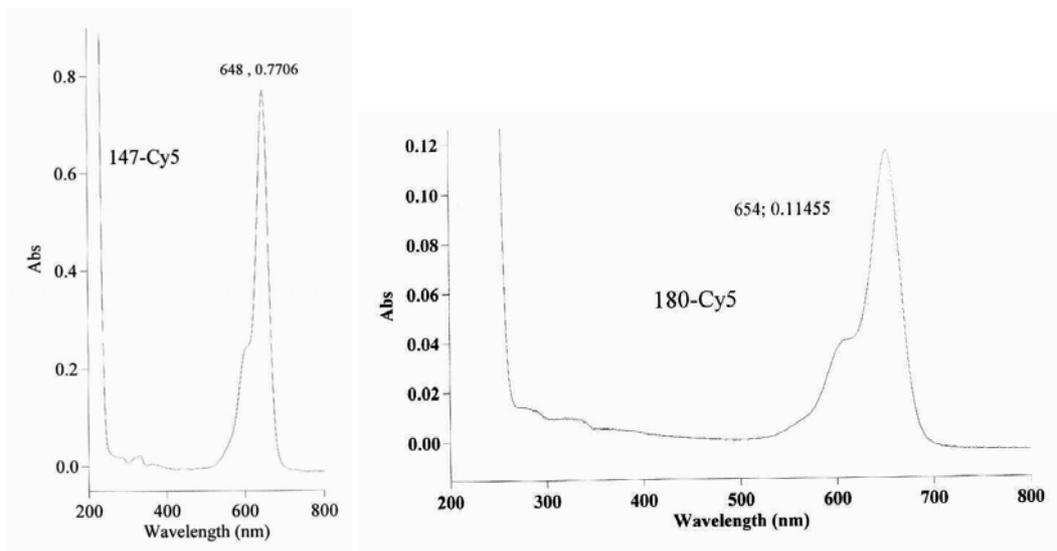
5.2.3 UV/Vis-Spektren

Abbildung 5.2.3-1 UV/Vis-Spektrum von Cy5 in H₂O, MeCN (1 : 1) bzw. MeCN

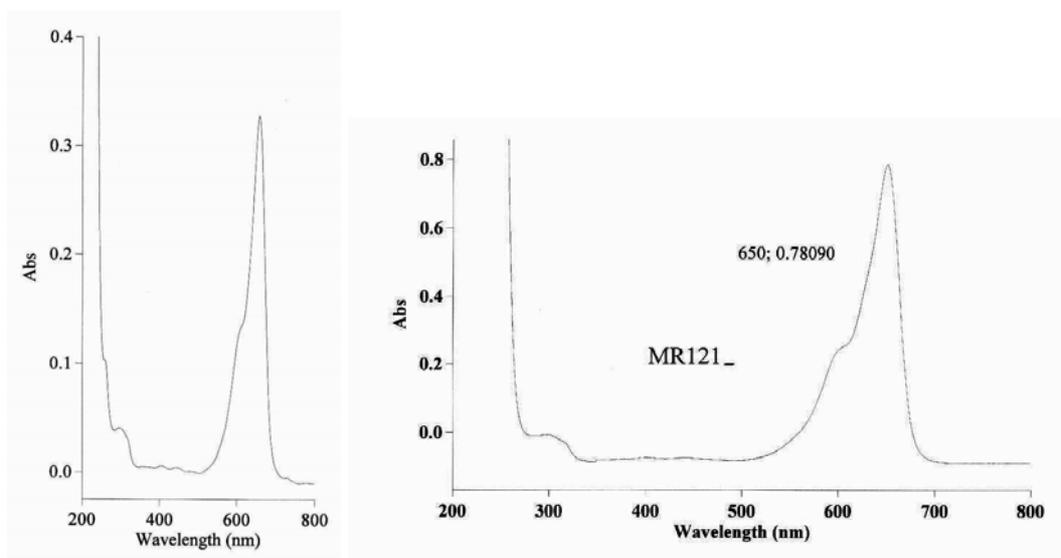


Abbildung 5.2.3-2 UV/Vis-Spektrum von MR121 in H₂O, MeCN (1 : 1) bzw. MeCN

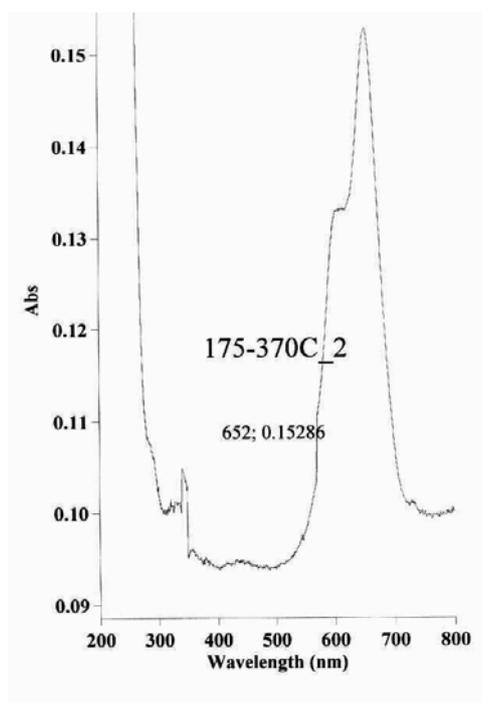


Abbildung 5.2.3-3 UV/Vis-Spektrum von Uni370-Cy5 in MeCN

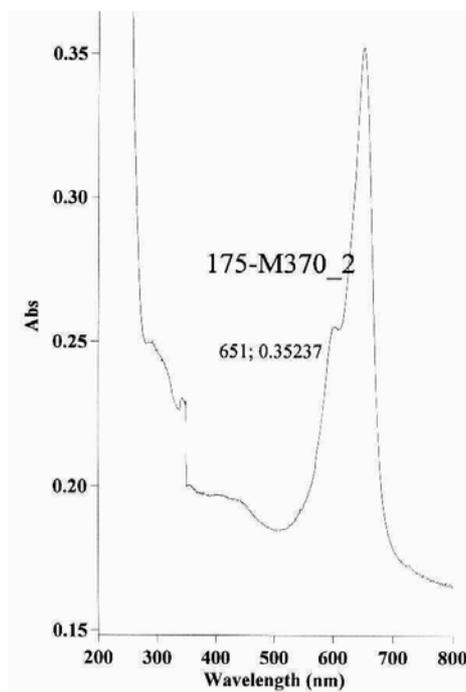


Abbildung 5.2.3-4 UV/Vis-Spektrum von Uni370-MR121 in MeCN

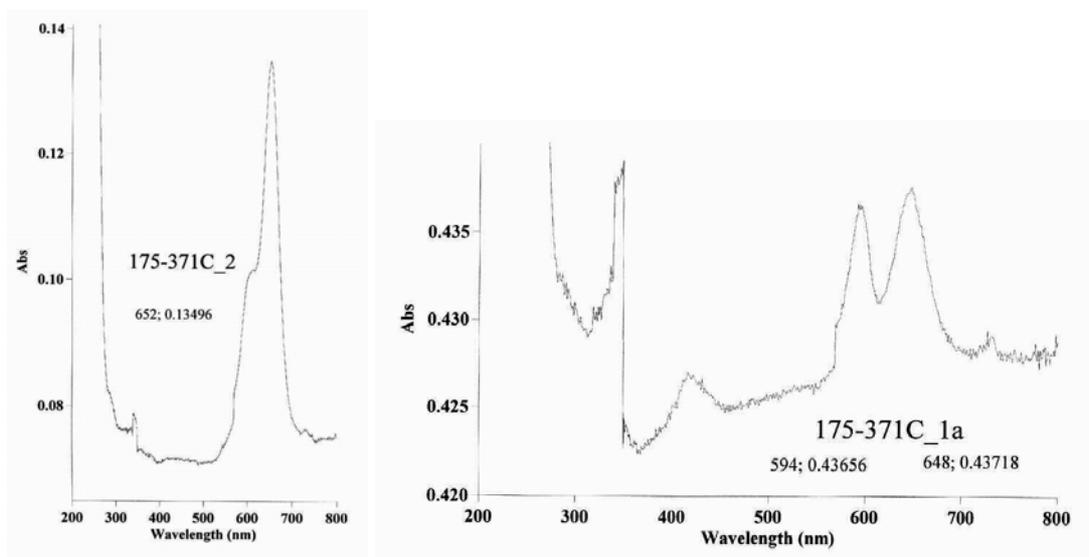


Abbildung 5.2.3-5 UV/Vis-Spektrum von Uni371-Cy5 in MeCN; rechts: Dimerenspektrum

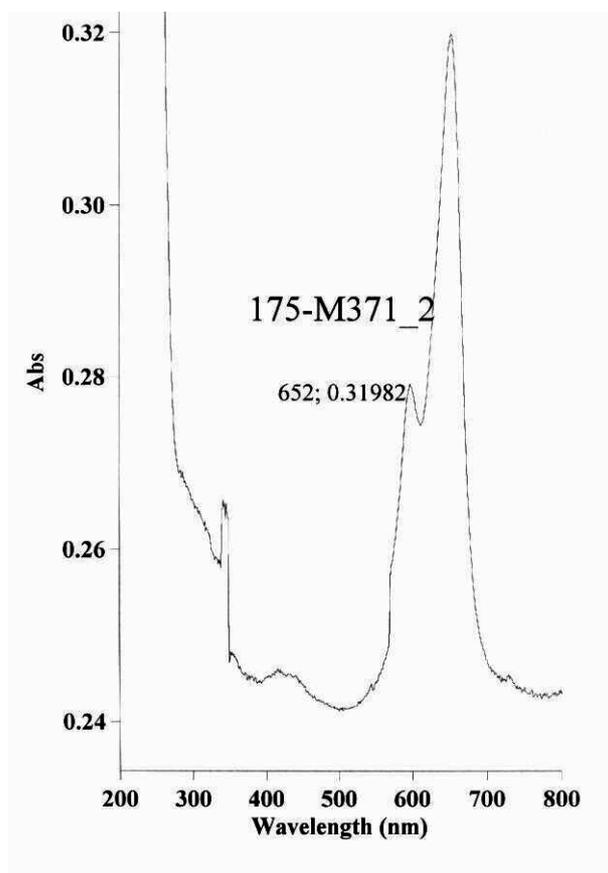


Abbildung 5.2.3-6 UV/Vis-Spektrum von Uni371-MR121 in MeCN

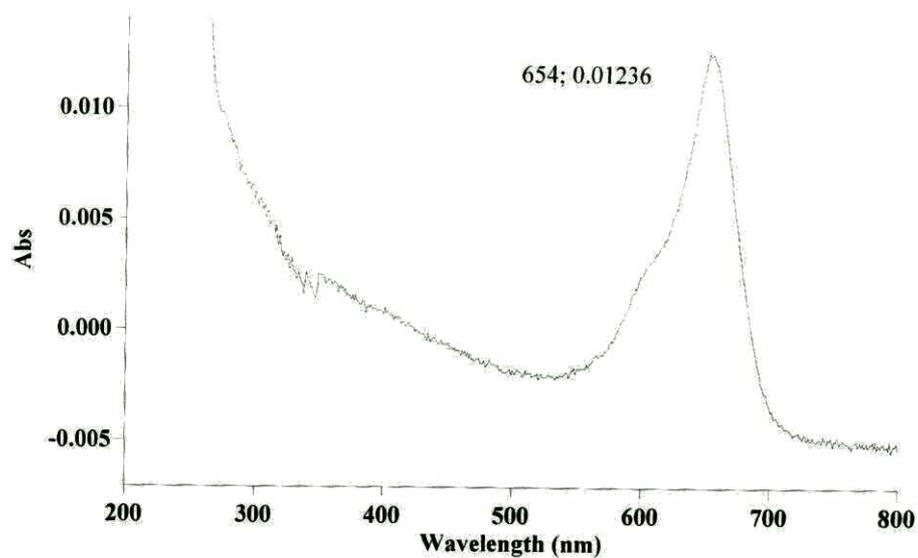


Abbildung 5.2.3-7 UV/Vis-Spektrum von ATTO650-NHS in MeCN

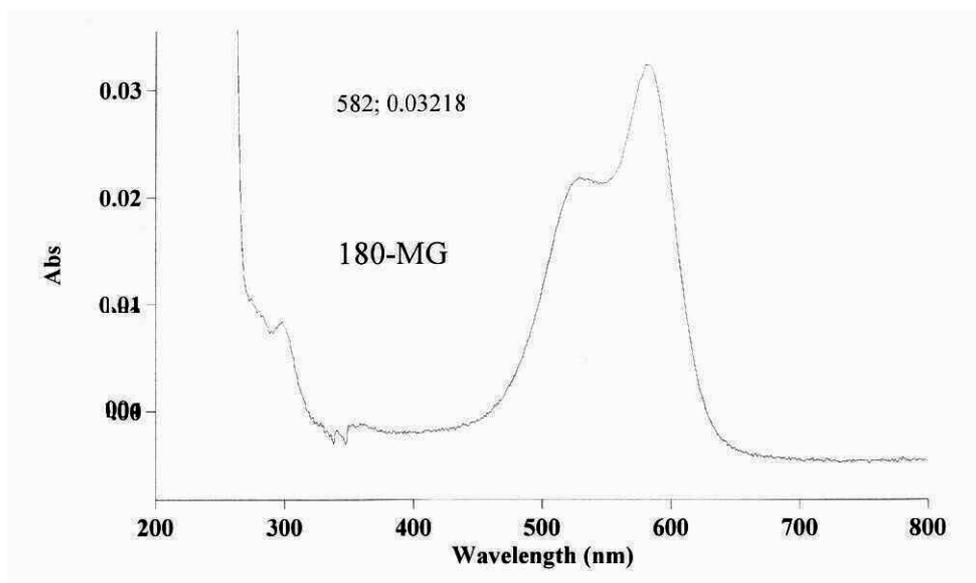


Abbildung 5.2.3-8 UV/Vis-Spektrum von Malachitgrün-ITC in MeCN

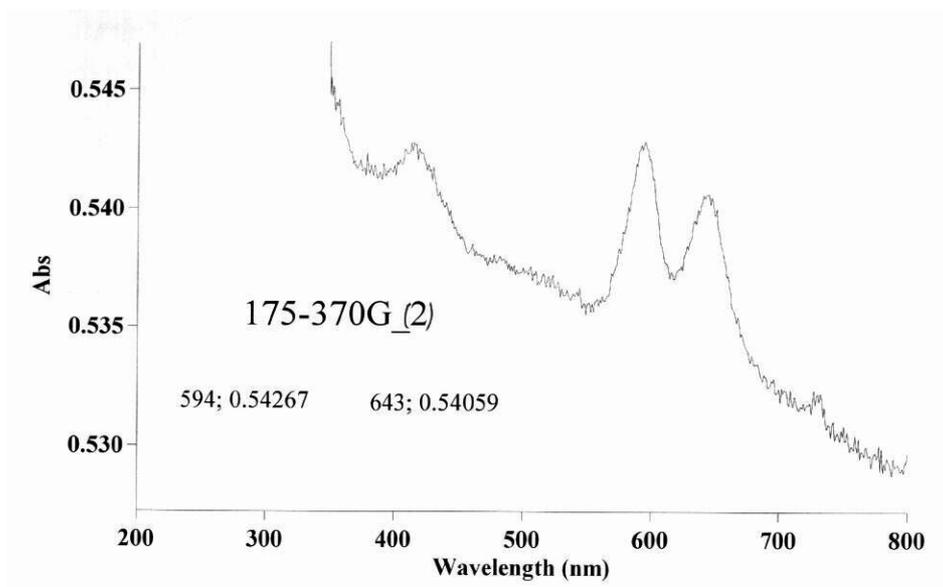


Abbildung 5.2.3-9 UV/Vis-Spektrum von Uni370-TC-Malachitgrün in MeCN (Farbstoff-Dimerenspektrum)

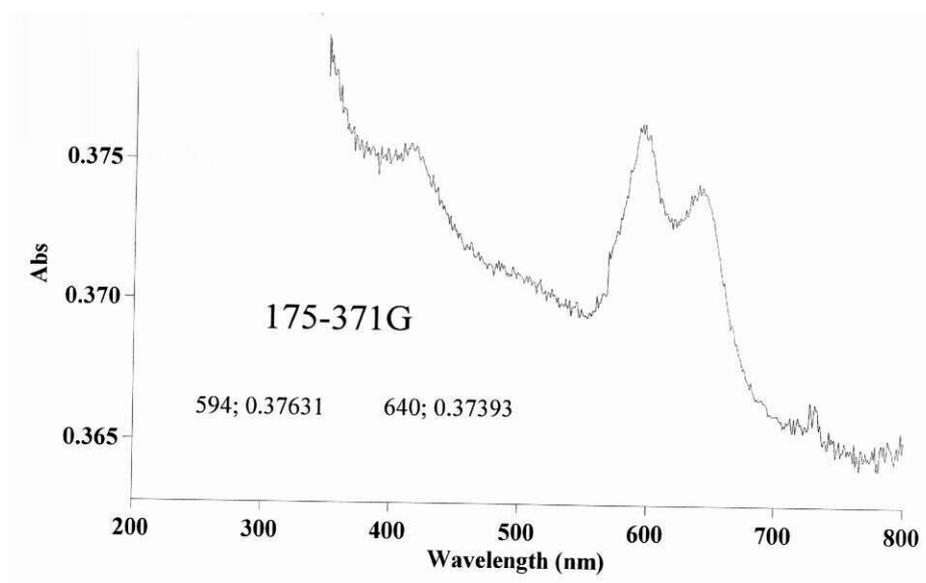


Abbildung 5.2.3-10 UV/Vis-Spektrum von Uni371-TC-Malachitgrün in MeCN (Farbstoff-Dimerenspektrum)

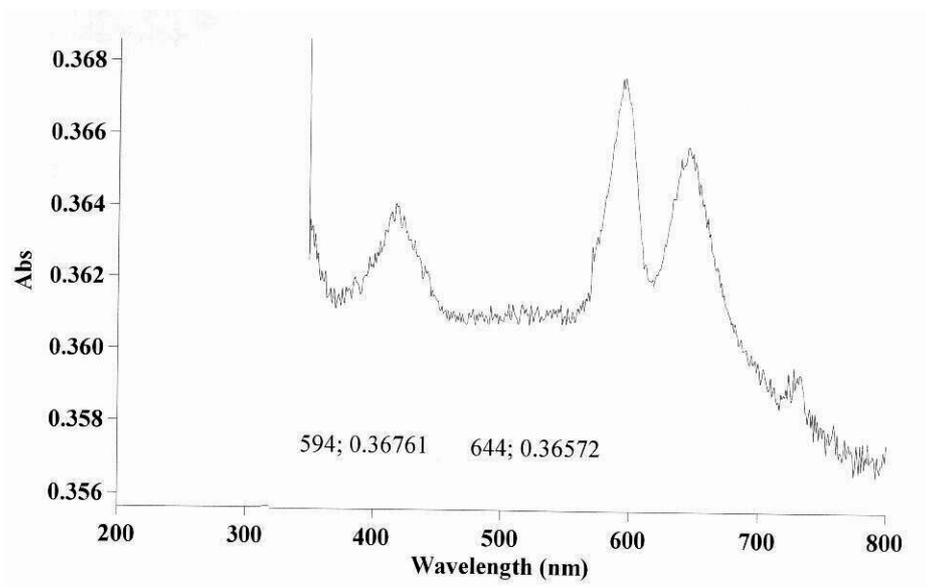


Abbildung 5.2.3-11 UV/Vis-Spektrum von Uni370-ATTO650 in MeCN (Dimerenspektrum)

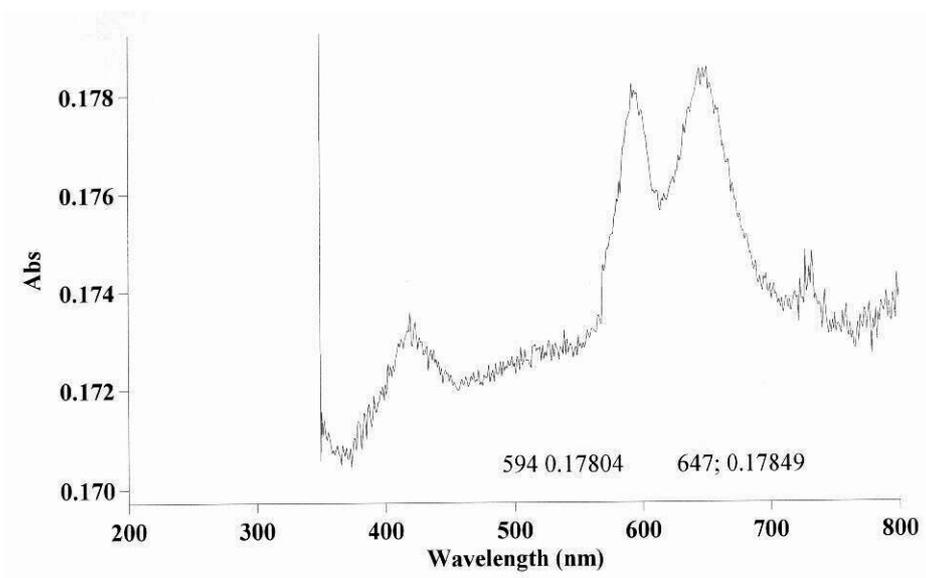


Abbildung 5.2.3-12 UV/Vis-Spektrum von Uni371-ATTO650 in MeCN (Dimerenspektrum)

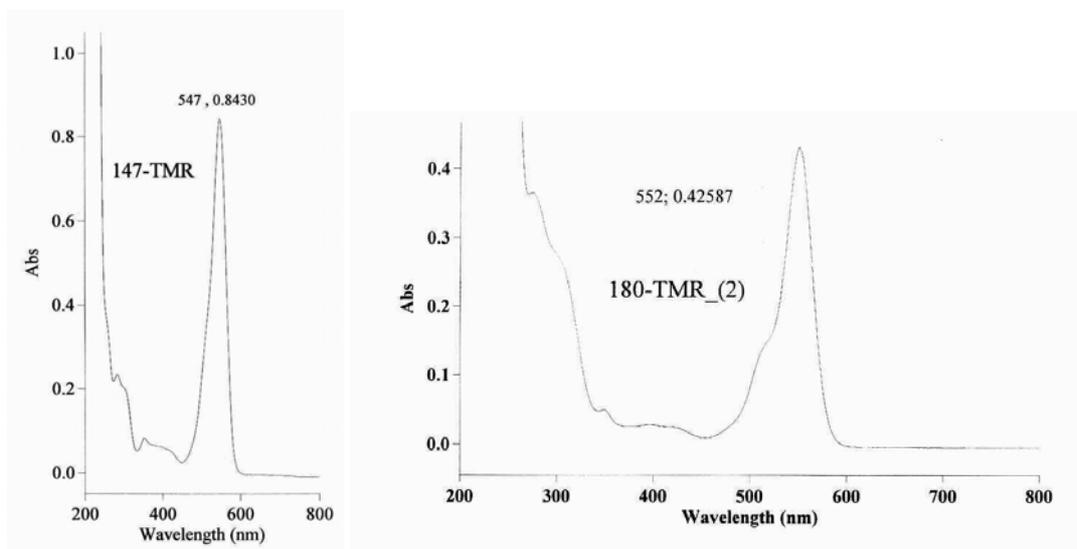


Abbildung 5.2.3-13 UV/Vis-Spektrum von TMR-ITC in H_2O , MeCN (1 : 1) bzw. in MeCN

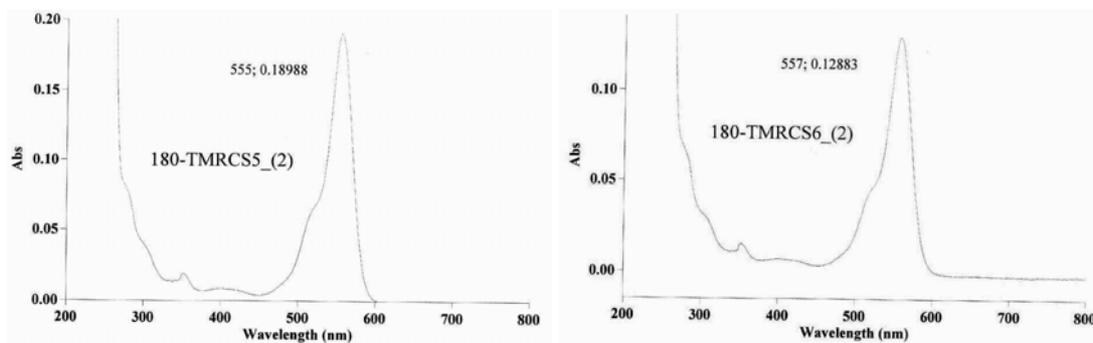


Abbildung 5.2.3-14 UV/Vis-Spektrum von TMR-CS in MeCN (5- und 6-Isomer, nicht zugeordnet)

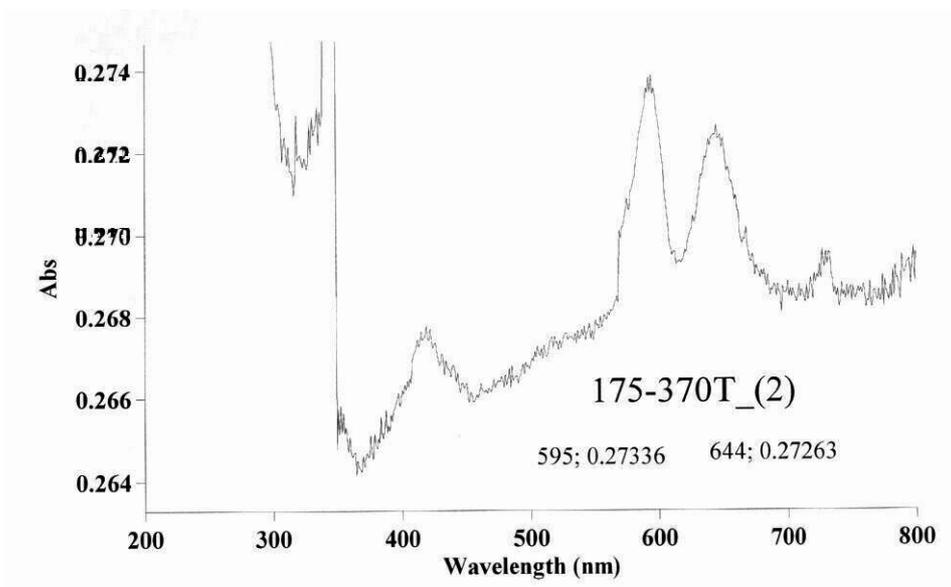


Abbildung 5.2.3-15 UV/Vis-Spektrum von Uni370-TC-TMR in MeCN (Farbstoff-Dimerenspektrum)

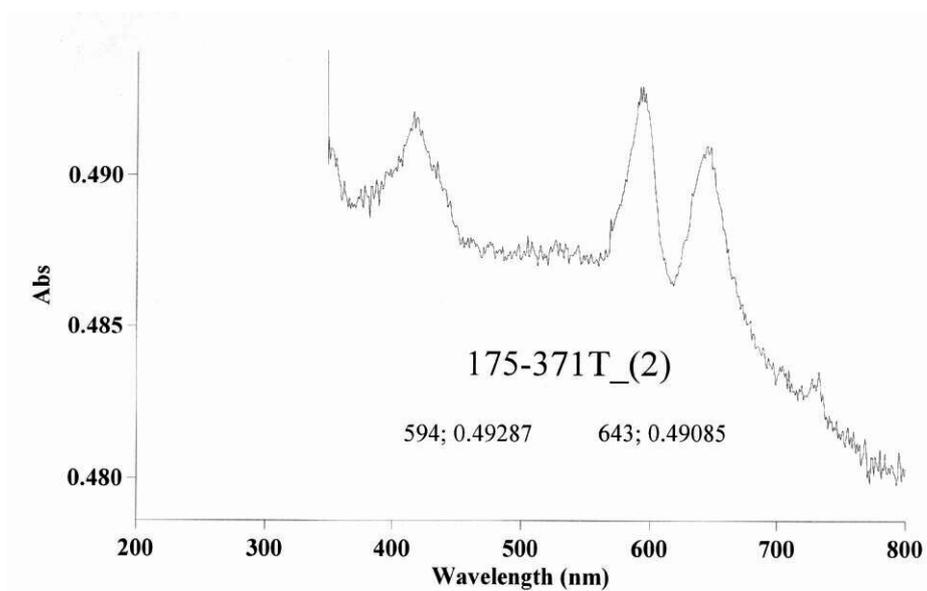


Abbildung 5.2.3-16 UV/Vis-Spektrum von Uni371-TC-TMR in MeCN (Farbstoff-Dimerenspektrum)

6 Literatur

- [Abbot 1999] A. Abbot; Nature 402, 715-720 (1999)
A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis
- [Ambrose 1994] W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, J.C. Martin, R.A. Keller; Phys. Rev. Lett. 72, 160-163 (1994)
Single Molecule Detection and Photochemistry on a Surface Using Near-Field Optical Excitation
- [Ambrose 1999] W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, J.H. Jett, A. van Orden, J.H. Werner, R.A. Keller; Chem. Rev. 99, 2929-2956 (1999)
Single Molecule Fluorescence Spectroscopy at Ambient Temperature
- [Arbeloa 1982] I.L. Arbeloa, P.R. Ojeda; Chem. Phys. Lett. 87, 556-560 (1982)
Dimeric States Of Rhodamine B
- [Arden 1989] J. Arden; Diplomarbeit im Fachbereich Chemie/Biologie der Universität-Gesamthochschule Siegen 1989
Absorption und Fluoreszenz neuer trichromophorer Rhodamin-Farbstoffe
- [Arden 1991] J. Arden, G. Deltau, V. Huth, U. Kringel, D. Peros, K.H. Drexhage; J. of Luminesc. 48&49, 352-358 (1991)
Fluorescence and lasing properties of rhodamine dyes
- [Arden-Jacob 1992] J. Arden-Jacob; Dissertation Universität-Gesamthochschule Siegen, Reihe Chemie, Verlag Shaker, Aachen 1992
Neue langwellige Xanthen-Farbstoffe für Fluoreszenzsonden und Farbstofflaser
- [Arden-Jacob 1997] J. Arden-Jacob, N.J. Marx, K.H. Drexhage; J. Fluoresc. 7, 91S-93S (1997)
New Fluorescent Probes for the Red Spectral Region

- [Bannwarth 1991] W. Bannwarth, R. Knorr; *Tetrahedron Lett.* 32, 1157-1160 (1991)
Formation of Carboxamides with N,N,N',N'-Tetramethyl(succinimido)-Uronium Tetrafluoroborate in Aqueous/Organic Solvent Systems
- [Barnes 1995] M.D. Barnes, W.B. Whitten, J.M. Ramsey; *Anal. Chem.*; 418A-423A (1995)
Detecting Single Molecules in Liquids
- [Basche 1995] T. Basche, S. Kummer, C. Bräuchle; *Nature* 373, 132-134 (1995)
Direct spectroscopic observations of quantum jumps of a single molecule
- [Becker 1991] H.G.O. Becker; 3. bearb. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1991
Einführung in die Photochemie
- [Bernard 1993] J. Bernard, L. Fleury, H. Talon, M. Orrit; *J. Chem. Phys.* 98, 850-859 (1993)
Photon bunching in the fluorescence from single molecules: A probe for intersystem crossing
- [BIAjournal 2000] BIAjournal 7, (2000)
Finding the Missing Link in Proteomics: Life's Rich Tapestry is Now on Show
- [Birch 1961] D.J.S. Birch; R.E. Imhof; *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 1: Techniques, New York, 1961, 1-88
Time-Domain Fluorescence Spectroscopy using Time-Correlated Single Photon Counting
- [Birks 1970] J.B. Birks; Wiley-Interscience, London New York Sydney Toronto 1970
Photophysics of Aromatic Molecules
- [Birks 1973] J.B. Birks, ed.; Wiley-Interscience, London New York Sydney Toronto 1973
Organic Molecular Photophysics, Vol.1

- [Brauckmann 1999] B. Brauckmann; *BIOforum* 10, 600-601 (1999)
Genchips entlarven HIV-Mutanten und Krebsfaktoren
- [Castro 1977] B. Castro, G. Evin, C. Selve, R. Seyer; *Communications*, 413 (1977)
Peptide Coupling Reagents; VIII. A High Yield Preparation of Phenyl Esters of Amino Acids using Benzotriazolylxytris[dimethylamino]-phosphonium Hexafluorophosphate (BOP Reagent)
- [Chanon 1988] M. Chanon, M.D. Hawley, M.A. Fox; in *Photoinduced Electron Transfer Part A* ed. M.A. Fox, M. Chanon; Elsevier Amsterdam 1988
- [Dörwald 2000] F.Z. Dörwald; *Organic Synthesis on Solid Phase*; Wiley-VCh Weinheim 2000
- [Donner 2001] H. Donner; *LABO* (2001)
PAN[®]-Oligonukleotid-Mikroarrays
- [Drexhage 1973] K.H. Drexhage in F.P. Schäfer; *Dye Lasers*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977, 144-179
- [Eck 2000] W. Eck, V. Stadler, W. Geyer, M. Zharnikov, A. Götzhäuser, M. Grunze; *Adv. Mater.* 12, 805-608 (2000)
Generation of Surface Amino Groups on Aromatic Self-Assembled Monolayers by Low Energy Electron Beams - A First Step Towards Chemical Lithography
- [Eggeling 2000] F. von Eggeling, H. Davies, L. Lomas, W. Fiedler, K. Junker, U. Claussen, G. Ernst; *BioTechniques* 29, 1066-1070 (2000)
Tissue-Specific Microdissection Coupled with ProteinChip[®] Array Technologies: Applications in Cancer Research
- [Emans 1995] N. Emans, J. Biwersi, A.S. Verkman; *Biophys. J.* 69, 716-728 (1995)
Imaging of Endosome Fusion in BHK Fibroblasts Based on a Novel Fluorimetric Avidin-Biotin Binding Assay
- [Förster 1948] T. Förster; *Ann. Phys.* 2 (1948), 55-75
Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz

- [Förster 1951] T. Förster; Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen (1951)
Fluoreszenz organischer Verbindungen
- [George 2001] R. George; BIOforum 7-8, 484-485 (2001)
Entdeckung und Charakterisierung von Biomarkern in der
Toxikologie
- [Geyer 2001] W. Geyer, V. Stadler, W. Eck, A. Götzhäuser, M. Grunze, M. Sauer,
T. Weimann, P. Hinze; J. Vac. Sci. Technol. B 19, (2001)
Electron induced chemical nanolithography with self-assembled
monolayers
- [Görg 2001] A. Görg; BIOforum 6, 369 (2001)
Proteomics auf dem Vormarsch
- [Grabowski 1976] Z.R. Grabowski, A. Grabowska; Z. Phys. Chem. Neue Folge 101,
197-208 (1976)
The Förster Cycle reconsidered
- [Ha 1997] T. Ha, T. Enderle, D.S. Chela, P.R. Selvin, S. Weiss; Chem. Phys.
Lett. 271, 1-5 (1997)
Quantum jumps of single molecules at room temperature
- [Ha 1998] T. Ha, J. Glass, T. Enderle, D.S. Chela, S. Weiss; Phys. Rev. Lett. 80,
2093-2096 (1998)
Hindered Rotational Diffusion and Rotational Jumps of Single
Molecules
- [Haab 2001] B.B. Haab, M.J. Dunham, P.O. Brown; Genome Biology 2, 4.1-4.13
(2001)
Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of
specific proteins and antibodies in complex solutions
- [Hammond 1979] P.R. Hammond; J. Chem. Phys. 70, 3884-3894 (1979)
Self-absorption of molecular fluorescence, the design of equipment
for measurement of fluorescence decay, and the decay time of some
laser dyes

- [Heilemann 2001] M. Heilemann; Diplomarbeit, Universität Heidelberg 2001
High-Resolution Colocalization of Single Molecules by Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (SFLIM)
- [Hermanson 1996] G.T. Hermanson; Bioconjugate Techniques ; Academic Press San Diego, 1996; ISBN 0-12-342336-8
- [Herten 2000] D.-P. Herten; Dissertation, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg 1995
Automatisierung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops zur zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion von einzelnen Biomolekülen
- [Huston 1991] A.L. Huston, C.T. Reimann; Chem. Phys. 149, 401-407 (1991)
Photochemical bleaching of adsorbed rhodamine 6G as a probe of binding geometries on a fused silica surface
- [Jäckel 2000] K.-P. Jäckel; LABO Trend, 46-50 (2000)
Analytik in der Wirkstoff-Forschung – Chemische Struktur und biologische Wirkung
- [Joos 2001] T.O. Joos, M. Schrenk, M.F. Templin, D. Stoll; BIOforum 6, 413-414 (2001)
Proteinarray Technologie für Diagnostik und Proteomics – Ein Überblick
- [Julliard 1983] M. Julliard, M. Chanon; Chem Rev. 83, 425-506 (1983)
Photoelectron-Transfer Catalysis: Its Connections with Thermal and Electrochemical Analogues
- [Kasha 1950] M. Kasha; Disc. Faraday Soc. 9, 14-19 (1950)
Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules
- [Karolin 1994] J. Karolin, L.B.A. Johansson, L. Standberg, T. Ny; J. Am. Chem. Soc. 116, 7801-7806 (1994)
Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, liquid membranes, and proteins

- [Kavarnos 1993] G. Kavarnos; VCH Weinheim, 1993
Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer
- [Koolman 1994] J. Koolman, K.-H. Röhm; Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme
Verl. Stuttgart 1994
- [Knorr 1989] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen; Tetrahedron Lett.
30, 1927-1930 (1989)
New Coupling Reagents in Peptide Chemistry
- [Kurzer 1967] F. Kurzer, K. Douraghi-Zadeh; Chemical Reviews 67, ab 107 (1967)
Advances in the Chemistry of Carbodiimides
- [Lakowicz 1986] J.R. Lakowicz; Plenum Press, New York, 1986
Principles of Fluorescence Spectroscopy
- [Lakowicz 1992] J.R. Lakowicz, H. Szmazinski, K. Nowaczyk, K.W. Brandt, M.
Johnson; Analytical Biochemistry 202, 316-330 (1992)
Fluorescence Lifetime Imaging
- [Larbolette 2001] O. Larbolette, T. Laufen; BIOforum 9, 562-563 (2001)
Peptid- und Proteinchips in Forschung und Entwicklung
- [Lercel 1996] M.J. Lercel, H.G. Craighead, A.N. Parikh, K. Seshadri, D.L. Allara;
Appl. Phys. Lett. 68, 1504-1506 (1996)
Sub-10 nm lithography with self-assembled monolayers
- [Lieberwirth 1994] U. Lieberwirth; Diplomarbeit, Universität Heidelberg 1994
Synthese und spektroskopische Untersuchungen von 7-Amino-
coumarin-Nukleosid- und Nukleotidkonjugaten als mögliche Termina-
toren in der DNS-Sequenzierung nach Sanger
- [Lieberwirth 1997] U. Lieberwirth, M. Sauer, J. Arden-Jacob, K.-H. Drexhage, S. Nord,
S. Seeger, A. Schulz, J. Wolfrum; J. Fluorescence 7 Suppl., 59S-61S
(1997)
Development of New Multiplex Dyes: Intramolecular Fluorescence
Quenching of Rhodamine Dyes

- [Lomants 1976] A.J. Lomants, G. Fairbanks; J. Mol. Biol. 104, 243 (1976)
Chemical probes of extended biological structures
- [Lopez 2000] M.F. Lopez; Electrophoresis 21, 1082-1093 (2000)
Better approaches to finding the needle in a haystack: Optimizing proteome analysis through automation
- [Lottspeich 2001] F. Lottspeich; BIOforum 1-2, 20-21 (2001)
Proteomanalyse – Neue Wege zur biologischen Funktion
- [Lu 1997] H.P. Lu, X.S. Xie; Nature 385, 143-146 (1997)
Single-molecule spectral fluctuations at room temperature
- [MacBeath 2000] G. MacBeath, S.L. Schreiber; Science 289, 1760-1763 (2000)
Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination
- [Macklin 1996] J.J. Macklin, J.K. Trautman, T.D. Harris, L.E. Brus; Science 272, 255-258 (1996)
Imaging and Time-Resolved Spectroscopy of Single Molecules at an Interface
- [Martin 1994] M. Martin; Diplom-Arbeit, Universität Heidelberg 1994
Aktivierung und Kopplung von neuen Multiplexfarbstoffen an Immunoglobulin G und Proteine
- [Meyer] V.R. Meyer; Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, 7. Aufl., Springer-Verl.
- [Nash 1960] C.P. Nash; J. Phys. Chem. 64 (1960) 950-953
The Calculation of Equilibrium Constants from Spectrophotometric Data
- [Neuweiler 1998] H. Neuweiler; Diplom-Arbeit, Universität Heidelberg 1994
Darstellung und kapillarelektrophoretische Trennung fluorophor-substituierter Thiohydantoine

- [Nord 1997] S. Nord, M. Sauer, J. Arden-Jacob, K.-H. Drexhage, U. Lieberwirth, S. Seeger, J. Wolfrum; *J. Fluorescence* 7 Suppl., 79S-81S (1997)
Ground and Excited State Reactions of New Red Fluorescent Dyes and the DNA Base Guanosine
- [O'Conner 1984] D.V. O'Conner, D. Phillips; Academic Press New York, 1984
Time-Correlated Single Photon Counting
- [Osborne 2001] M.A. Osborne, C.L. Barnes, S. Balasubramanian, D. Klenerman; *J. Phys. Chem. B* 105, 3120-3126 (2001)
Probing DNA Surface Attachment and Local Environment Using Single Molecule Spectroscopy
- [Phimister 1999] B. Phimister, F.S. Collins, E.S. Lander, et al.; *Nature Genetics* 21, Supplement;
<http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/ng/journal/v21/-n1s/index.html>; 1-60 (1999)
The Chipping Forecast
- [Przybylski 2001] M. Przybylski; *GIT Labor-Fachzeitschrift* 6, 589 (2001)
Genom- und Proteomanalytik – Kenntniskgewinn in der Biochemie und Biotechnologie ermöglicht Durchbruch
- [Rehm 1969] D. Rehm, A. Weller; *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.* 73, 834-839 (1969)
Kinetik und Mechanismus der Elektronenübertragung bei der Fluoreszenzlöschung in Acetonitril
- [Rumphorst 1994] A. Rumphorst, H. Duschner, S. Seeger; *J. Fluorescence* 4, 45-48 (1994)
Optical Determination of pH on Surfaces Using Immobilized Fluorescent Dyes
- [Sauer 1993] M. Sauer, K.-T. Han, R. Müller, A. Schulz, R. Tadday, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N.J. Marx, K.H. Drexhage; *J. Fluorescence* 3, 131-139 (1993)
New Fluorescent Labels for Time-Resolved Detection of Biomolecules

- [Sauer 1993 a] M. Sauer, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, K.H. Drexhage; Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 97, 1734-1737 (1993)
Design of Multiplex Dyes
- [Sauer 1995] M. Sauer, K.-T. Han, R. Müller, S. Nord, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N.J. Marx, C. Zander, K.H. Drexhage; J. Fluorescence 5, 247-261 (1995)
New Fluorescent Dyes in the Red Region for Biodiagnostics
- [Sauer 1995 a] M. Sauer; Dissertation, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg 1995
Entwicklung effizienter Fluoreszenzfarbstoffe für den hochempfindlichen Nachweis von Biomolekülen unter Einsatz zeitaufgelöster LIF-Spektroskopie
- [Smoluchowski 1917] M.V. Smoluchowski; Z. Phys. Chem. 92, 129-168 (1917)
Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen
- [Speiser 1996] S. Speiser; Chem. Rev. 96, 1953-1976 (1996)
Photophysics and Mechanisms of Intramolecular Electronic Energy Transfer in Bichromophoric Molecular Systems: Solution and Supersonic Jet Studies
- [Stern 1919] O. Stern, M. Volmer ; Phys. Z. 20, 183-188 (1919)
Über die Abklingzeit der Fluoreszenz
- [Strickler 1962] S.J. Strickler, R.A. Berg; J. Chem. Phys. 37, 814-822 (1962)
Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules
- [Sveshnikoff 1935] B. Sveshnikoff; Acta Physicochim. U.R.S.S. 3, 257-268 (1935)
On the Theory of Photochemical Reactions and Chemiluminescence in Solutions

- [Tanner 1989] D.D. Tanner, N. Deonarian, A. Kharrat; *Can. J. Chem.* 67, 171-175 (1989)
Electron affinities and Marcus reorganisation energies. A correlation between gas phase electron affinities and solution phase redox potentials
- [Tinnefeld 2000] P. Tinnefeld, V. Buschmann, D.-P. Herten, K.-T. Han, M. Sauer; *Single Molecule* 1, 215-223 (2000)
Confocal Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) at the Single Molecule Level
- [Tinnefeld 2001 a] P. Tinnefeld, D.-P. Herten, M. Sauer; *J. Phys. Chem. A* 105, 7989-8003 (2001)
Photophysical Dynamics of Single Molecules Studied by Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (SFLIM)
- [Tinnefeld 2001 b] P. Tinnefeld, C. Müller, M. Sauer; *Chem. Phys. Lett.* 345, 252-258 (2001)
Time-Varying Photon Probability Distribution of Individual Molecules at Room Temperature
- [Tovar 2001] G.E.M. Tovar, T. Schiestel, C. Hoffmann, J. Schmucker; *BIOforum* 7-8, 474-477 (2001)
Proteinchips für die Affinitäts-MALDI-TOF-Massenspektrometrie
- [Vámosi 1996] G. Vámosi, C. Gohlke, R.M. Clegg; *Biophys. J.* 71, 972-994 (1996)
Fluorescence Characteristics of 5-Carboxytetramethylrhodamine Linked Covalently to the 5' End of Oligonucleotides: Multiple Conformers of Single-Stranded and Double-Stranded Dye-DNA Complexes
- [Vaughan 1970] W.M. Vaughan, G. Weber; *Biochem.* 9, 464-473 (1970)
Oxygen Quenching of Pyrenebutyric Acid Fluorescence in Water. A Dynamic Probe of the Microenvironment
- [Veerman 1999] J.A. Veerman, M.F. Garcia-Parajo, L. Kuipers, N.F. van Hulst; *Phys. Rev. Lett.* 83, 2155-2158 (1999)
Time-Varying Triplet State Lifetime of Single Molecules

- [Weiss 1999] S. Weiss; Science 283, 1676-1683 (1999)
Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules
- [Wendberger] G. Wendberger; Synthese homöomerer Peptide aus Aminosäuren,
Kapitel: Aktivierung mit Carbodiimiden, S. 103-106
- [Weller 1982] A. Weller; Z. Phys. Chem. Neue Folge 133, 93-98 (1982)
Photoinduced Electron Transfer in Solution: Exciplex and Radical Ion
Pair Formation Free Enthalpies and their Solvent Dependence
- [Wennmalm 1997] S. Wennmalm, L. Edman, R. Rigler ; Proc. Natl. Acad. Sci. 94,
10641-10646 (1997)
Conformational fluctuations in single DNA molecules
- [Weston 1998] K.D. Weston, S.K. Buratto; J. Phys. Chem. A 102, 3635-3638 (1998)
Millisecond Intensity Fluctuations of Single Molecules at Room
Temperature
- [Weston 1998 a] K.D. Weston, P.J. Carson, H. Metiu, S.K. Buratto; J. Chem. Phys 109,
7474-7485 (1998)
Room-temperature fluorescence characteristics of single dye
molecules adsorbed on a glass surface
- [Weston 1999] K.D. Weston, P.J. Carson, J.A. DeAro, S.K. Buratto; Chem. Phys.
Lett. 308, 58-64 (1999)
Single-molecule detection fluorescence of surface-bound species in
vacuum
- [Weston 2001] K.D. Weston, L.S. Goldner; J. Phys. Chem. B 105, 3453-3462 (2001)
Orientation Imaging and Reorganisation Dynamics of Single Dye
Molecules
- [Widengren 1996] J. Widengren, R. Rigler; Bioimaging 4, 149-157 (1996)
Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence
correlation spectroscopy

- [Wörz 1969] O. Wörz, G. Scheibe; Z. Naturforschg. 24 b, 381-390 (1969)
Über die Ursachen der Aggregation von Farbstoffen, das Spektrum
der photographischen Sensibilisierung und die biologische Aktivität
[On the reason for aggregation of dyes, the spectrum of photographic
sensitization and biological activity]
- [Xie 1996] X.S. Xie; Acc. Chem. Res. 29, 598-606 (1996)
Single-Molecule Spectroscopy and Dynamics at Room Temperature
- [Xie 1998] X.S. Xie, J.K. Trautman; Annu. Rev. Phys. Chem. 49, 441-480 (1998)
Optical Studies of Single Molecules at Room Temperature
- [Zelder 1999] Felix Zelder, persönliche Mitteilung (1999)

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum danke ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Herrn Dr. Markus Sauer danke ich für die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik, seine stete Hilfsbereitschaft und kameradschaftliche Atmosphäre in seiner Gruppe.

Dipl.-Chem. Philip Tinnefeld und Mike Heilemann danke ich sehr für die Einweisung und Hilfe am konfokalen Mikroskop zur Einzelmolekül-Detektion sowie Dipl.-Chem. Volker Buschmann und Dipl.-Phys. Chong-Woo Park für die Unterstützung bei TMR-Messungen.

Für viele fruchtbare Gespräche und Anregungen danke ich sehr Dipl.-Chem. Hannes Neuweiler, Dipl.-Chem. Volker Buschmann, Dipl.-Chem. Jens-Peter Knemeyer, Dipl.-Phys. Christian Müller und Mike Heilemann sowie Dr. Andreas Schulz für die hervorragende Computerbetreuung und PhD Ken Weston für gut verständliche Fachartikel.

Diese Gelegenheit möchte ich nutzen, Frau Angelika Seith und Herrn Dr. Groß der Massenspektrometrie ganz sehr für Ihre großen Bemühungen zu danken, trotz schwieriger Substanzen gute Messergebnisse zu erzielen.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich hier nicht versäumen, für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre zu danken.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Dr. Markus Sauer und Mike Heilemann.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit unterstützten, sowie meiner Frau Signe, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte.

Außerdem danke ich Herrn Prof. K.-H. Drexhage und Frau Dr. Jutta Arden-Jakob (Universität-Gesamthochschule Siegen) sowie AttoTec für die Fluoreszenz-Farbstoffe, die sie uns freundlicherweise zur Verfügung stellten.

Für die finanzielle Unterstützung danken wir der DFG sowie dem BMBF.

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel ausgeführt habe.“

Heidelberg, Januar 2001