

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.