

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.)

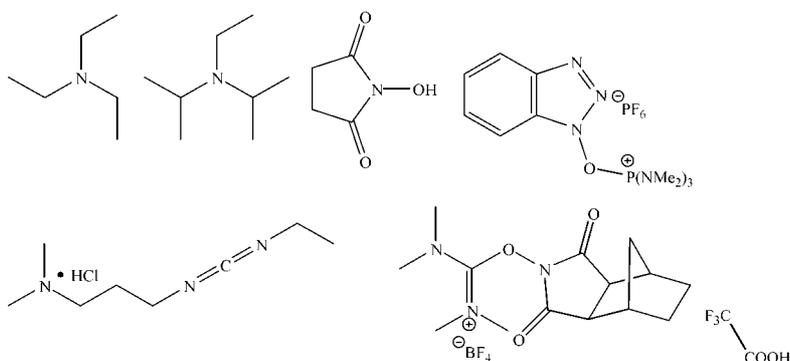


Abbildung 2.1-1: Verwendete Reagenzien von oben links nach unten rechts: die Amine TEA ($C_6H_{15}N$, $M = 101,190$) und DIPEA ($C_8H_{19}N$, $M = 129,243$), die Kopplungs- bzw. Aktivierungsreagenzien NHS ($C_4H_5NO_3$, $M = 115,087$), BOP ($C_{12}H_{22}F_6N_6OP_2$, $M = 442,281$), EDC ($C_8H_{17}N_3$,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

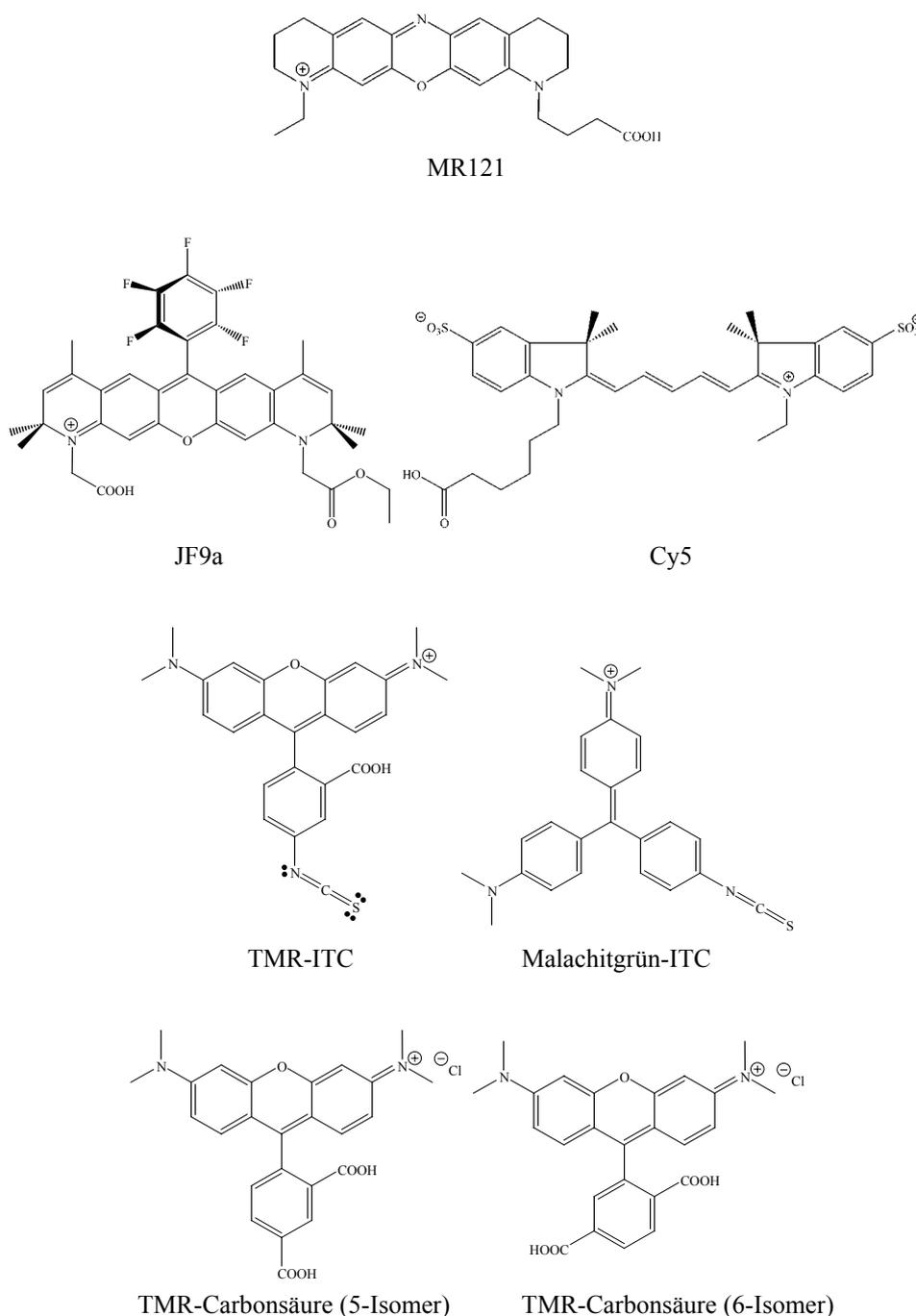


Abbildung 2.1-2: Der Oxazin-Farbstoff MR121 ($C_{24}H_{28}N_3O_3^+$; $M = 406,498$), der Rhodamin-Farbstoff JF9a ($C_{37}H_{34}F_5N_2O_5^+$; $M = 681,668$) und der Carbocyanin-Farbstoff Cy5 ($C_{33}H_{39}N_2O_8S_2^-$; $M = 655,803$), der Rhodamin-Farbstoff TMR-ITC ($C_{25}H_{22}N_3O_3S^+$; $M = 444,527$) 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].

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

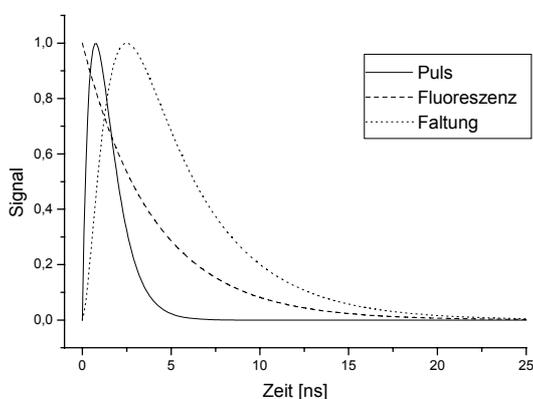


Abbildung 2.2.3-1: Fluoreszenzabklingkurve (Fluoreszenz) sowie die Faltung derselben mit einem Anregungspuls (Puls), der dem des Spektrometers LS-100 entspricht.

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 Fluoreszenzabklingkurve $R(t)$ 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.

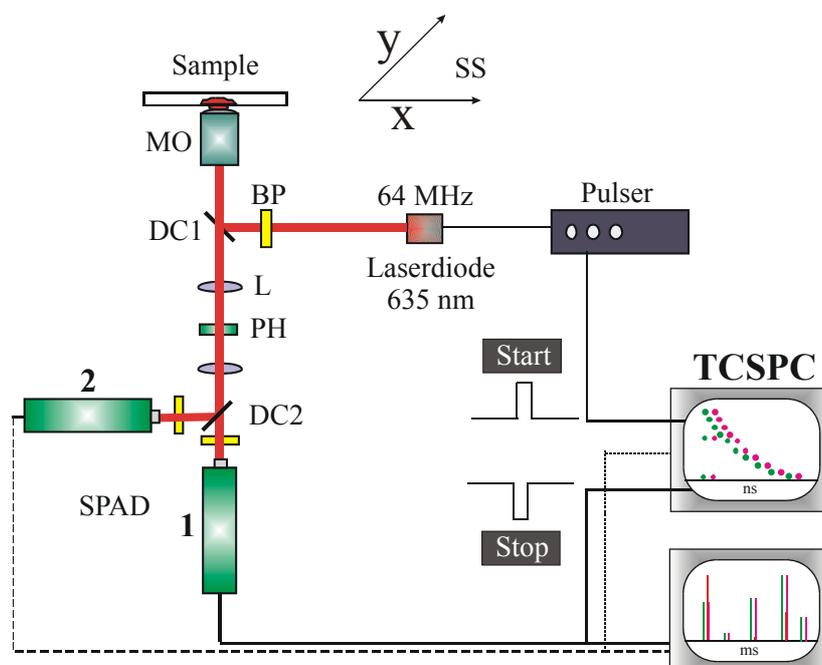


Abbildung 2.2.4-1: Aufbau für die spektral aufgelöste Fluoreszenzlebensdauer-Abbildung (SFLIM)
 SS: Scann-Tisch, MO: Mikroskopobjektiv, DC: dichroischer Strahlteiler, L: Linse, PH: Nadelloch-Blende, BP: Bandpass-Filter, SPAD: Einzel-Photon-Lawinen-Diode, DC2 teilt das emittierte Fluoreszenz-Spektrum 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 Eppendorfgefäße 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.

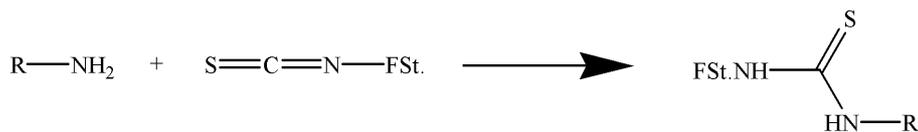


Abbildung 2.4.1-1: Kopplung von primären Aminen mit Farbstoff-Isothiocyanaten.

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.

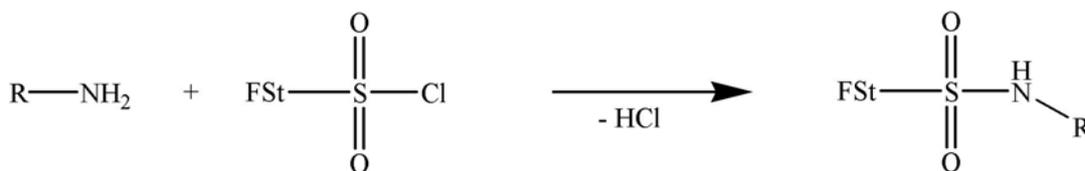


Abbildung 2.4.1-2: Kopplung von primären Aminen mit Farbstoff-Sulfonylchloriden.

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.

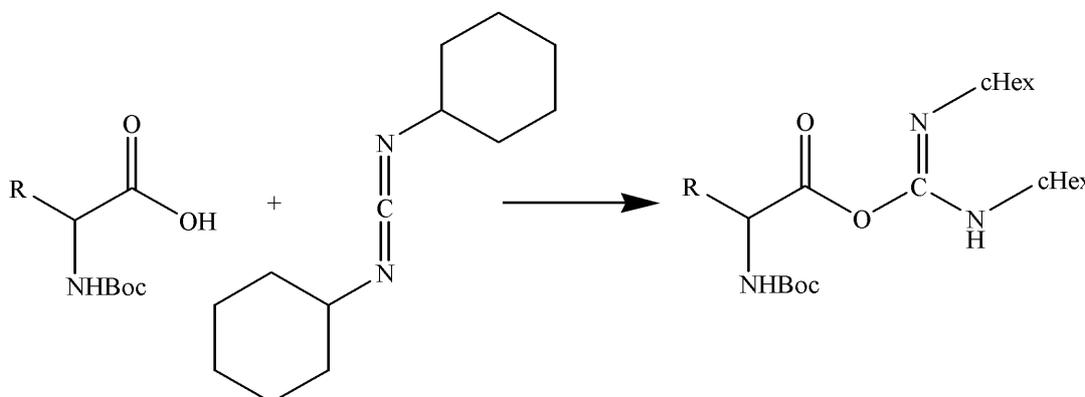


Abbildung 2.4.1-3: Aktivierung von Carbonsäuren mittels der Carbodiimid-Methode.

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.

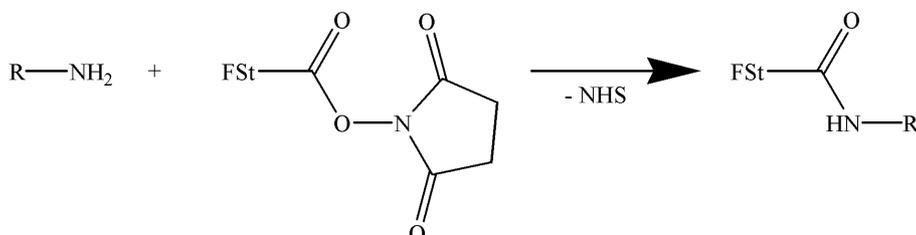


Abbildung 2.4.1-4: Amin-Carbonsäure-Kopplung mittels N-Hydroxysuccinimidylester (FSt: Farbstoff; NHS: N-Hydroxysuccinimid).

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.)

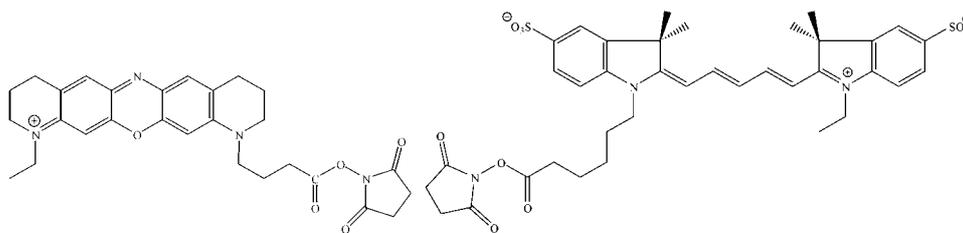


Abbildung 2.4.1-5: Der Oxazin-Farbstoff MR121-NHS ($C_{28}H_{31}N_4O_5^+$; $M = 503,570$) und der Carbocyanin-Farbstoff Cy5-NHS ($C_{37}H_{42}N_3O_{10}S_2^-$; $M = 752,876$).

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.

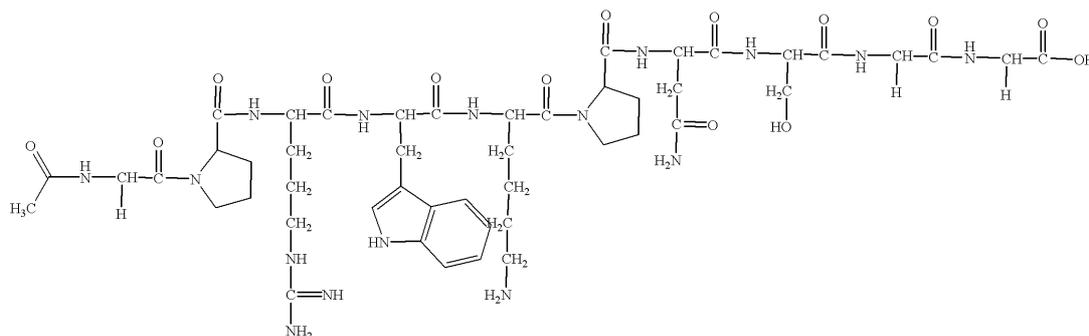


Abbildung 2.4.2-1: Uni370: *Ac-Gly-Pro-Arg-Trp-Lys-Pro-Asn-Ser-Gly-Gly-OH* ($C_{48}H_{72}N_{16}O_{14}$; $M = 1097,185$).

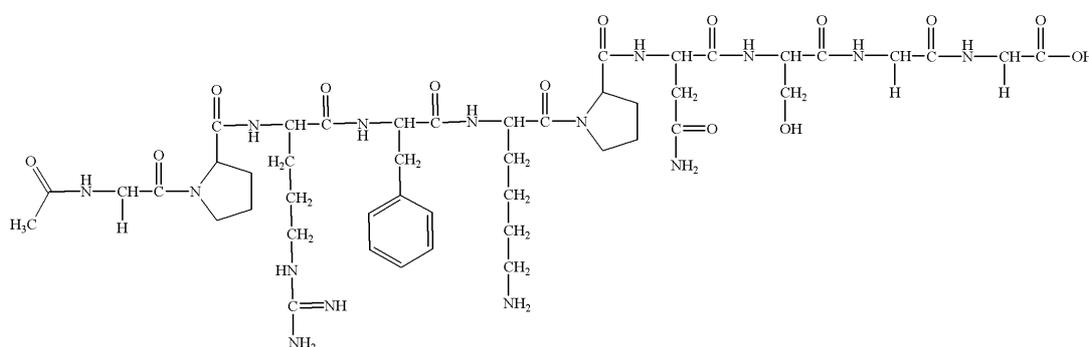


Abbildung 2.4.2-2: Uni371: *Ac-Gly-Pro-Arg-Phe-Lys-Pro-Asn-Ser-Gly-Gly-OH* ($C_{46}H_{71}N_{15}O_{14}$; $M = 1058,149$).

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

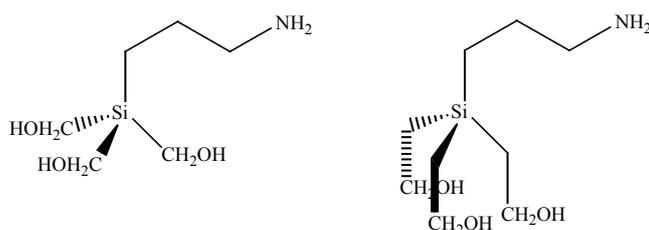


Abbildung 2.4.3-1: APTMOS: 3-Aminopropyltrimethoxysilan ($C_6H_{17}NO_3Si$, $M = 179,290$); APTEOS: 3-Aminopropyltriethoxysilan ($C_9H_{23}NO_3Si$, $M = 221,369$).

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.

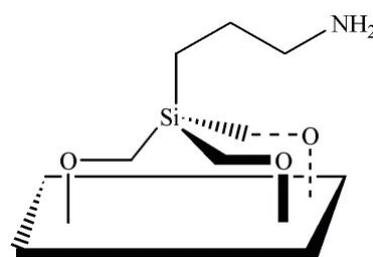


Abbildung 2.4.3-2: Mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMOs) modifizierte Glasoberfläche.

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

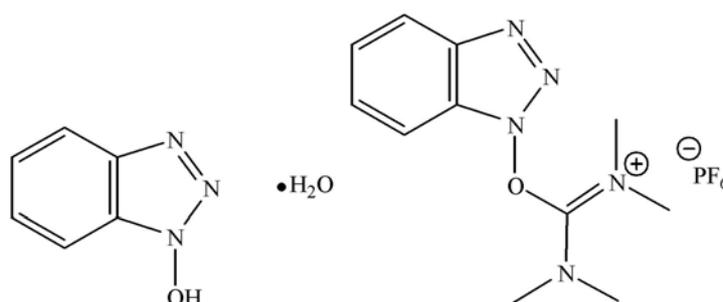


Abbildung 2.4.4-1: Die Kopplungsreagenzien HOBT und HBTU.

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 .

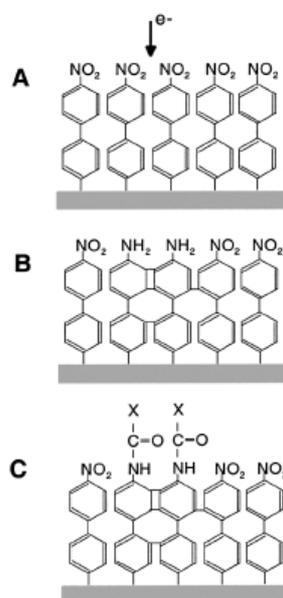


Abbildung 4.3-1: Schema Elektronen-indizierter Prozesse in 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol-Monoschichten auf Goldoberflächen: Die Monoschicht wird mit Elektronen bestrahlt (A) und bildet endständige Aminogruppen, während die darunterliegende Aromatenschicht dehydrogeniert und vernetzt wird (B). Die Aminogruppen 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.