

# Cumarin- und DBD-Farbstoffe als Fluoreszenzsonden

## Fluoreszenzimmunassays und Förster-Resonanz-Energietransfer

### Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin Physikalische Chemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

vorgelegt von  
Ursula Eisold

Potsdam, September 2017

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-405833  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-405833>

# Publikationsliste

## Preise

Posterpreis

18. JCF-Frühjahrssymposium 2016, Kiel – Deutschland

## Veröffentlichungen

U. Eisold, F. Sellrie, H. Memczak, A. Andersson, J.A. Schenk, M.U. Kumke: “Dye tool box for a fluorescence enhancement immune assay (FenIA)” (eingereicht, Manuskript ID: bc-2017-00297f)

U. Eisold, N. Behrends, P. Wessig, M. U. Kumke: “Rigid rod-based FRET probes for membrane sensing applications” *Journal of Physical Chemistry B* **120**, 9935-9943 (2016)

P. Wessig, N. Behrends, M. U. Kumke, U. Eisold: “FRET pairs with fixed relative orientation of chromophors” *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, 4476-4486 (2016), **Cover Paper**

P. Wessig, N. Behrends, M. U. Kumke, U. Eisold, T. Meiling, C. Hille: “Two-Photon FRET pairs based on coumarin and DBD dyes” *RSC Advances* **6**, 33510-33513 (2016)

U. Eisold, F. Sellrie, J.A. Schenk, C. Lenz, W.F.M. Stöcklein, M.U. Kumke: “Bright or dark immune complexes of anti-TAMRA antibodies for adapted fluorescence-based bioanalysis” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 3313-3323 (2015)

U. Eisold, A. Kupstat, D. Klier, P.-A. Primus, M. Pschenitzka, R. Niessner, D. Knopp, M. U. Kumke “Probing the physicochemical interactions of 3-hydroxybenzo[a]pyrene with different monoclonal and recombinant antibodies by use of fluorescence line-narrowing spectroscopy” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**, 3387-3394 (2014)

D. T. McQuade, A. G. O'Brien, M. Dörr, R. Rajaratnam, U. Eisold, B. Monnanda, T. Nobuta, H.-G. Löhmansröben, E. Meggers, P. H. Seeberger: “Continuous synthesis of pyridocarbazoles and initial photophysical and bioprobe characterization” *Chemical Science* **4**, 4067-4070 (2013)

## Vorträge

U. Eisold, N. Behrends, P. Wessig, M. U. Kumke: “FRET-based sensing in membranes using dye-labeled OSK rods“

18. JCF-Frühjahrssymposium 2016, 16.-19.3.2016, Kiel – Deutschland

U. Eisold, N. Behrends, M.-J. Monks, P. Wessig, M. U. Kumke: “Coumarin derivatives and molecular rods as fluorescence probes for membrane characterization“

OSA Biomedical Optics and Photonics Congress: Optics in the Life Sciences 2015, 12.-15.4.2015, Vancouver – Kanada

## Posterbeiträge

U. Eisold, N. Behrends, P. Wessig, M. U. Kumke: “FRET-based sensing in membranes using dye-labeled OSK rods“

18. JCF-Frühjahrssymposium 2016, 16.-19.3.2016, Kiel – Deutschland

U. Eisold, N. Behrends, P. Wessig, M. U. Kumke: “Dynamics of fluorophore-labeled oligospiroketal rods in membranes“

17. JCF-Frühjahrssymposium 2015, 25.-28.3.2015, Münster – Deutschland

U. Eisold, N. Behrends, M.-J. Monks, P. Wessig, M. U. Kumke: “Charakterisierung von Membraneigenschaften mithilfe von Cumarinderivaten und molekularen Stäben als Fluoreszenzsonden“

Anakon 2015, 23.-26.3.2015, Graz - Österreich

U. Eisold, A. Kupstat, D. Klier, P.-A. Primus, M. Pschenitza, R. Niessner, D. Knopp, M. U. Kumke: “Untersuchung der Wechselwirkungen von 3-Hydroxybenzo[a]-pyren mit verschiedenen Antikörpern mittels Fluorescence-Line-Narrowing-Spektroskopie“

Bunsentagung 2015, 29.-31.5.2014, Hamburg – Deutschland

U. Eisold, A. Kupstat, D. Klier, P.-A. Primus, M. Pschenitza, R. Niessner, D. Knopp, M. U. Kumke: “Characterizing specific physicochemical interactions of 3-hydroxybenzo[a]pyrene with different antibodies using fluorescence-line-narrowing spectroscopy“

16. JCF-Frühjahrssymposium 2014, 26.-29.3.2014, Jena – Deutschland

D. Klier, U. Eisold, M. U. Kumke: “Characterization of the interactions between 3-hydroxybenzo[a]pyrene and monoclonal antibodies using fluorescence-line-narrowing spectroscopy“

Photochemietagung 2012, 8.-10.10.2012, Potsdam – Deutschland

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden drei Themen im Zusammenhang mit den spektroskopischen Eigenschaften von Coumarin- (Cou) und DBD-Farbstoffen ([1,3]Dioxolo[4,5-f][1,3]benzodioxol) behandelt. Der erste Teil zeigt die grundlegende spektroskopische Charakterisierung von 7-Aminocumarinen und ihre potentielle Anwendung als Fluoreszenzsonde für Fluoreszenzimmunassays. Im zweiten Teil werden mit die photophysikalischen Eigenschaften der Coumarine genutzt um Cou- und DBD-funktionalisierte Oligo-Spiro-Ketal-Stäbe (OSTK) und ihre Eigenschaften als Membransonden zu untersuchen. Der letzte Teil beschäftigt sich mit der Synthese und der Charakterisierung von Cou- und DBD-funktionalisierten Polyprolinen als Referenzsysteme für schwefelfunktionalisierte OSTK-Stäbe und ihrer Kopplung an Goldnanopartikel.

Immunochemische Analysemethoden sind in der klinischen Diagnostik sehr erfolgreich und werden heute auch für die Nahrungsmittelkontrolle und Überwachung von Umweltfragen mit einbezogen. Dadurch sind sie von großem Interesse für weitere Forschungen. Unter den verschiedenen Immunassays zeichnen sich lumineszenzbasierte Formate durch ihre herausragende Sensitivität aus, die dieses Format für zukünftige Anwendungen besonders attraktiv macht. Die Notwendigkeit von Multiparameterdetektionsmöglichkeiten erfordert einen Werkzeugkasten mit Farbstoffen, um die biochemische Reaktion in ein optisch detektierbares Signal umzuwandeln. Hier wird bei einem Multiparameteransatz jeder Analyt durch einen anderen Farbstoff mit einer einzigartigen Emissionsfarbe, die den blauen bis roten Spektralbereich abdecken, oder eine einzigartige Abklingzeit detektiert. Im Falle eines kompetitiven Immunassayformats wäre für jeden der verschiedenen Farbstoffe ein einzelner Antikörper erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wird ein leicht modifizierter Ansatz unter Verwendung einer Coumarineinheit, gegen die hochspezifische monoklonale Antikörper (mAb) erzeugt wurden, als grundlegendes Antigen präsentiert. Durch eine Modifikation der Stammcoumarineinheit an einer Position des Moleküls, die für die Erkennung durch den Antikörper nicht relevant ist, kann auf den vollen Spektralbereich von blau bis tiefrot zugegriffen werden. In dieser Arbeit wird die photophysikalische Charakterisierung der verschiedenen Coumarinderivate und ihrer entsprechenden Immunkomplexe mit zwei verschiedenen, aber dennoch hochspezifischen, Antikörpern präsentiert. Die Coumarinfarbstoffe und ihre Immunkomplexe wurden durch stationäre und zeitaufgelöste Absorptions- sowie Fluoreszenzmissionsspektroskopie charakterisiert. Darüber hinaus wurden Fluoreszenzdepolarisationsmessungen durchgeführt, um die Daten zu vervollständigen, die die verschiedenen Bindungsmodi der beiden Antikörper betonten. Im Gegensatz zu häufig eingesetzten Nachweissystemen wurde eine massive Fluoreszenzverstärkung bei der Bildung des Antikörper-Farbstoffkomplexes bis zu einem Faktor von 50 gefunden. Wegen der leichten Emissionsfarbenänderung durch das Anpassen der Coumarinsubstitution in der für die

Antigenbindung nicht relevanten Position des Elternmoleküls, ist eine Farbstoff-Toolbox vorhanden, die bei der Konstruktion von kompetitiven Multiparameterfluoreszenzverstärkungssimmunassays verwendet werden kann.

Oligo-Spiro-Thio-Ketal-Stäbe werden aufgrund ihres hydrophoben Rückgrats leicht in Doppellipidschichten eingebaut und deshalb als optische Membransonde verwendet. Wegen ihres geringen Durchmessers wird nur eine minimale Störung der Doppellipidschicht verursacht. Durch die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen sind neuartige Förster-Resonanz-Energietransfersonden mit hoch definierten relativen Orientierungen der Übergangsdipolmomente der Donor- und Akzeptorfarbstoffe zugänglich und macht die Klasse der OSTK-Sonden zu einem leistungsstarken, flexiblen Werkzeugkasten für optische Biosensorenanwendungen. Mit Hilfe von stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzexperimenten wurde der Einbau von Cumarin- und DBD markierten OSTK-Stäben in großen unilamellaren Vesikeln untersucht und die Ergebnisse durch Fluoreszenzdepolarisationsmessungen untermauert.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und Charakterisierung von Cou- und DBD-funktionalisierten Polyprolinen und ihrer Kopplung an Goldnanopartikel. Die farbstoffmarkierten Polyproline konnten erfolgreich hergestellt werden. Es zeigten sich deutlich Einflüsse auf die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe durch die Bindung an die Polyprolinhelix. Die Kopplung an die 5 nm großen AuNP konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Erfahrungen, die durch die Kopplung der Polyproline an die AuNP, gewonnen wurde, ist die Basis für eine Einzelmolekül-AFM-FRET-Nanoskopie mit OSTK-Stäben.

## Abstract

In this thesis, three topics are discussed in connection with the spectroscopic properties of coumarin (Cou) and DBD ([1,3]dioxolo[4,5-f][1,3]benzodioxole) dyes. The first part shows the basic spectroscopic characterization of 7-aminocoumarins and their advantage as a fluorescence probe for fluorescence immunoassays. In the second part, the photophysical properties of the coumarins are used to investigate Cou- and DBD-functionalized oligo-spiro-ketal rods (OSTK) and their properties as membrane probes. The last part deals with the synthesis and characterization of Cou- and DBD-functionalized polyprolines as reference systems for sulfur-functionalized OSTK rods and their coupling to gold nanoparticles.

The fact that immunochemical analysis methods are very successful in clinical diagnostics and are now also included for food control and monitoring of environmental questions they are of great interest for further research. Among the various immunoassays, luminescence-based formats are distinguished by their outstanding sensitivity, which makes this format particularly attractive for future applications. The need for multiparameter detection capabilities requires a toolbox of dyes to convert the biochemical response to an optically detectable signal. Here, in the case of a multiparameter approach, each analyte is detected by another dye with a unique emission color which covers the blue to red spectral range or a unique decay time. In the case of a competitive immunoassay format, a single antibody would be required for each of the different dyes. In the present work, a slightly modified approach is presented as a basic antigen using a coumarin moiety against which highly specific antibodies have been produced. By modifying the parent coumarin moiety at a site of the molecule which is not relevant for recognition by the antibody, the full spectral range from blue to deep red can be accessed. This work presents the photophysical characterization of the different coumarin derivatives and their corresponding immuno complexes with two different but nevertheless highly specific monoclonal antibodies (mAb). The coumarin dyes and their immunocomplexes were characterized by steady-state time-resolved absorption and fluorescence emission spectroscopy. In addition, fluorescence depolarization measurements were performed to complete the data emphasizing the different binding modes of the two antibodies. In contrast to frequently used detection systems, a massive fluorescence enhancement was found in the formation of the antibody dye complex up to a factor of 50. Because of the slight change in the emission by adjusting the coumarin substitution in the position of the parent molecule which is not relevant for the antigen binding, a dye toolbox which can be used for the construction of competitive multiparameter fluorescence enhancement immunoassays has been created. Due to their hydrophobic backbone, oligospirothioketal rods (OSTK) are easily incorporated into lipid bilayers and are therefore used as an optical membrane probe. Because of

their narrow diameter, only a minimal disturbance of the lipid bilayer is caused. By labeling with fluorescent dyes, novel Förster resonance energy transfer probes are available with highly defined relative orientations of the transition dipole moments of the donor and acceptor dyes, making the class of the OSTK probes into a powerful, flexible toolbox for optical biosensor applications. The incorporation of cumarin and [1,3]-dioxolo[4,5-f][1,3]benzodioxol-labeled OSTK rods in large unilamellar vesicles was investigated using steady-state and time-resolved fluorescence experiments and the results were confirmed by fluorescence depolarization measurements.

The last part of this work deals with the synthesis and characterization of Cou- and DBD-functionalized polyprolines and their coupling to gold nanoparticles. The dye-labeled polyprolines were successfully synthesized. Influences on the spectroscopic properties of the dyes by binding to the polyproline helix were found. The coupling to 5 nm AuNP was successfully carried out. The experience gained by the coupling of the polyprolines to the AuNP can be used as a good basis for the investigation of a single molecule FRET AFM nanoscopy using OSTK rods.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>7</b>
2.1	Spektroskopische Grundlagen . . . . .	7
2.1.1	Absorption und Fluoreszenz . . . . .	7
2.1.2	Förster-Resonanz-Energietransfer . . . . .	10
2.1.3	Der Orientierungsfaktor $\kappa^2$ . . . . .	12
2.1.4	Fluoreszenzanisotropie . . . . .	15
2.1.5	Transienten-Absorption . . . . .	18
2.2	Photophysik der Cumarine . . . . .	20
2.3	Photophysik der DBD-Farbstoffe . . . . .	24
2.4	Oligo-Spiro-Thio-Ketal-Stäbe . . . . .	25
2.5	Phospholipidvesikel . . . . .	26
2.6	Hapten-Antikörper-Bindung . . . . .	27
2.7	Polyproline . . . . .	29
2.8	Goldnanopartikel . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1	Materialien und Probenvorbereitung . . . . .	33
3.1.1	7-Aminocumarine und Antikörper . . . . .	33
3.1.2	OSTK-Stäbe . . . . .	34
3.1.3	Polyproline . . . . .	36
3.2	Spektroskopische Methoden . . . . .	39
3.2.1	Stationäre Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	39
3.2.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	39
3.2.3	Transienten-Absorptionsspektroskopie . . . . .	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1	7-Aminocumarine und Antikörper . . . . .	43
4.1.1	Variation der Ligandeneigenschaften . . . . .	48
4.1.2	Charakterisierung der Bindungswechselwirkungen . . . . .	51

4.2	OSTK-Stäbe . . . . .	55
4.2.1	Cou-OSTK-Stäbe . . . . .	55
4.2.2	DBD-OSTK-Stäbe . . . . .	58
4.2.3	FRET-OSTK-Stäbe . . . . .	60
4.2.4	OSTK-Gelenkstäbe . . . . .	66
4.2.5	OSTK-Stäbe in Vesikeln . . . . .	69
4.3	Cou- und DBD-funktionalisierte Polyproline . . . . .	77
4.3.1	Cys-x-Pro-Cou . . . . .	78
4.3.2	Cys-x-Pro-DBD . . . . .	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>83</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>103</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>107</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>109</b>

# 1 Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit war die detaillierte photophysikalische Untersuchung einer neuen Klasse von fluoreszierenden Sensorstäben für abstands-, umgebungs- und kraftsensitive Messungen basierend auf Oligospirothioetal-(OSTK)-Stäben, sowie Cumarin- (Cou) und [1,3]-Dioxolo-[4,5-f] [1,3]benzodioxol-(DBD)-Fluorophoren. Diese Untersuchungen sind die Grundlage für eine Einzelmolekül-AFM-FRET-Nanoskopie mit OSTK-Stäben.

Rastkraftmikroskopie (AFM, engl. atomic force microscopy) und Einzelmolekül-Kraft-Spektroskopie wurden bereits für die Untersuchung von Proteinkonformationen und -aktivitäten unter physiologischen Bedingungen spezifiziert eingesetzt.<sup>1,2</sup> Eine Kombination mit Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie als Einzelmolekül-AFM-FRET-Nanoskopie ist ideal, um strukturelle Informationen zu erhalten oder die Wirkung der äußeren mechanischen Störung auf ein Protein und die damit verbundene enzymatische Aktivität in Echtzeit zu beobachten.<sup>3-7</sup> Genetisch kodierte FRET-Kraftsensoren erlauben Messungen von örtlichen Spannungen bestimmter Proteine in vivo und in Echtzeit, wodurch ihre Belastungsfähigkeit gemessen werden kann. Dabei werden DNA-Helices verwendet, die Donor und Akzeptor mit einer Kraft von 5 – 7 pN auseinanderdrücken und eine veränderte FRET-Effizienz bewirken.<sup>8</sup>

Da die photophysikalischen Eigenschaften von Cumarinen stark von der Polarität, der Viskosität, dem pH-Wert und der Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Mikroumgebung abhängen, sind sie für optische Anwendungen von hohem Interesse.<sup>9-13</sup> So wurde im ersten Kapitel eine ausführliche Charakterisierung der photophysikalischen Eigenschaften von verschiedenen 7-Aminocumarinen durchgeführt. Aus den spektroskopischen Parametern, wie zum Beispiel dem Fluoreszenzspektrum oder der Fluoreszenzabklingzeit, können qualitative (z.B. die chemische Umgebung) und quantitative (z.B. die Konzentration) Informationen über den beobachteten Farbstoff erhalten werden. Spezifische Wechselwirkungen, wie die Bindung des Farbstoffs durch Antikörper, können die spektroskopischen Parameter deutlich verändern und können anschließend in bioanalytischen Methoden als Detektionsprinzip, zum Beispiel in Fluoreszenzimmunassays, eingesetzt werden.<sup>14,15</sup> Um möglichst viele Vorteile der Fluoreszenzmethoden zu nutzen, müssen die verwendeten Farbstoffe mehrere Kriterien, wie hohe Fluoreszenzquantenausbeuten und Photostabilität erfüllen, aber auch der für die Anregung und den Nachweis verwendete Spektralbereich sowie ein leichtes Einbringen der Farbstoffe in das zu unter-

suchende biologische System sind wichtige Schlüsselparameter.

In Bezug auf die technischen Geräte wie Filter und Laserquellen, die häufig im handelsüblichen Fluoreszenzaufbauten oder optischen Mikroskopen verwendet werden, eignen sich die 7-Aminocumarine gut als Fluoreszenzsonden. Daher kann die Entwicklung von bioanalytischen Tests, wie zum Beispiel Fluoreszenzimmunassays, auf der Basis von 7-Aminocumarinderivaten, eine vielversprechende Grundlage für eine flexible optische Biosensorplattform sein. Fluoreszenzimmunassays (FIA) sind in der klinischen Diagnostik gut etabliert und werden heutzutage als Werkzeuge für analytische Anwendungen in der Lebensmittel- und Umweltkontrolle verwendet.<sup>16</sup> Um dem schnell wachsenden Bedarf an Multiparameter-FIA in den unterschiedlichen Anwendungsbereichen nachzukommen, wächst die Nachfrage nach hochspezifischen Antikörpern für die jeweiligen Analyten rasant und andererseits ist eine Sammlung von spektral maßgeschneiderten Farbstoffen unentbehrlich, um die parallele Detektion verschiedener Analyten in einem Multiparametertestschema zu ermöglichen. Folglich ist auch die Suche nach geeigneten Farbstoffen, die den Anforderungen an die Multiparametererfassung entsprechen, ein sehr wichtiges und dynamisches Forschungsthema. Für die Farbstoffmoleküle müssen einige Ausgangskonditionen erfüllt sein. Einer der Schlüsselparameter ist eine ausreichende spektrale Trennung der farbstoffspezifischen Emissionsbanden zur klaren Identifikation. Diese werden durch die Gruppe der Cumarine erfüllt, die eine Feinabstimmung der Fluoreszenzeigenschaften durch die Veränderung des Substitutionsmusters an dem Cumarinringsystem ermöglichen.<sup>17,18</sup>

In dieser Arbeit wird die Bindung von zwei monoklonalen Anti-DEAC-(7-(Diethylamino)coumarin-3-carbonsäure)-Antikörpern, G100-HB9 und G100-AG7, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Photophysik verschiedener 7-Aminocumarinderivate, charakterisiert. Der Einfluss dieser Antikörper auf die photophysikalischen Eigenschaften der verschiedenen Typen von 7-Aminocumarinen wurde detailliert untersucht, um die Basis für eine bioanalytische Anwendung zu erzeugen. Die 7-Aminocumarine und ihre Immunkomplexe wurden durch stationäre und zeitaufgelöste Absorptions- sowie Fluoreszenzemissionspektroskopie charakterisiert. Darüber hinaus wurden Fluoreszenzdepolarisationsmessungen durchgeführt, um die Daten zu vervollständigen, die die verschiedenen Bindungsmodi der beiden Antikörper betonen.

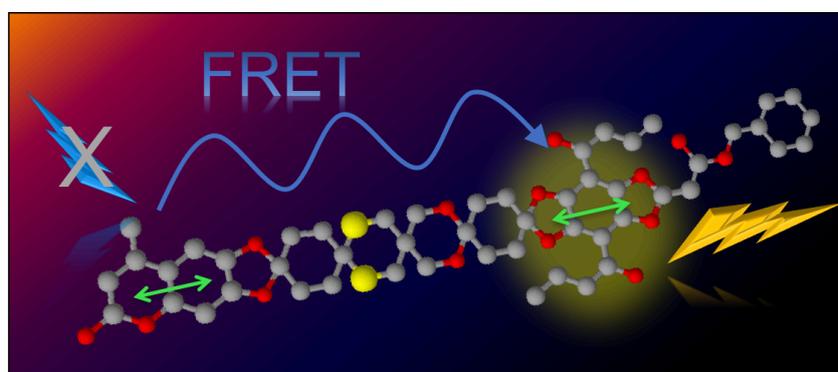
Durch die ausführliche Charakterisierung der Photophysik der Cumarine und deren Veränderung durch äußere Einflüsse, konnten im nächsten Schritt Cou- und DBD-markierte OSTK-Stäbe als Membransonden untersucht werden. Die Zellmembran ist wahrscheinlich die wichtigste biologische Grenze, die das Innere einer Zelle vom äußeren Medium abschirmt und ist auch der erste Kontakt für äußere Reize. Außerdem ist die Zellmembran mit ihren verschiedenen Komponenten, wie Proteinen oder Zuckergruppen, der primäre Partner für eine Vielfalt unterschiedlicher Wechselwirkungen mit dem äußeren Medium.

Chemische, elektrische und mechanische Signalwege können bei der Auslösung biochemischer Prozesse innerhalb einer Zelle wirksam sein. Um die Interaktion auf molekularer und zellulärer Ebene zu überwachen, sind spezifische maßgeschneiderte Sonden erforderlich. Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine der führenden experimentellen Techniken bei der Untersuchung zellulärer Prozesse. Der Erfolg von fluoreszenzbasierten Techniken für die Analyse zellulärer Prozesse ist aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Methoden und der Fülle von maßgeschneiderten Fluoreszenzsonden, die die Untersuchung biochemischer Prozesse mit präziser räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichen, durch andere Techniken nicht zu übertreffen.<sup>19–21</sup> Molekulare Stäbe, also Moleküle mit einem großen Seitenverhältnis, werden zunehmend in verschiedenen Anwendungen eingesetzt, zum Beispiel in Biowissenschaften und Materialwissenschaften.<sup>22–27</sup> Oligo-Spiro-Ketal-Stäbe sind eine Klasse von molekularen Stäben, die auf spirocyclisch verbundenen sechsgliedrigen Ringen basieren. Die Ringe sind durch Kondensation von 1,3-Diolen und Ketonen verbunden.<sup>28</sup> Die OSK-Stäbe weisen im Vergleich zu anderen molekularen Stäben eine hohe Steifigkeit auf und können durch flexible Kombinationen verschiedener Bausteine zu Stäben mit unterschiedlichen Längen kombiniert werden.<sup>29</sup> OSK-Stäbe wurden bereits erfolgreich als Anker in biologischen Membranen und als Linker in FRET-Paaren verwendet.<sup>30–33</sup> Diese OSK-Stäbe sind im Vergleich zu bisherigen gängigen Abstandshaltern basierend auf DNA oder Polypeptiden verändert. Dadurch werden einerseits die molekularen Dimensionen des Abstandshalters nachhaltig reduziert, wodurch der Einbau biologische Systeme wie Membranen ungestört lässt. Außerdem fördert die vergleichsweise hydrophobe Oberfläche der OSK-Stäbe einen effektiven Einbau und somit dient der Abstandhalter im Zusammenhang mit Membranen bzw. Membranmodellen wie Liposomen als „molekularer Anker“. Die Möglichkeiten von spezifischen chemischen Wechselwirkungen, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, werden dadurch minimiert bzw. können gezielt chemisch vorgegeben werden. Durch die Einführung von Schwefel anstelle von Sauerstoff wird die Synthese von längeren Oligo-Spiro-Thio-Ketal-Stäbe (OSTK) ermöglicht,<sup>34</sup> was besonders im Hinblick auf die Verwendung der OSTK-Stäbe als Transmembransonden für Untersuchung von Signaltransduktion an Membranen von großem Interesse ist. Die starke Umgebungssensitivität der Photophysik beider Farbstoffe zeigt das große Potential der OSTK-Stäbe als Sensoren für Polaritäts- und Viskositätsbestimmungen.

Unter den verschiedenen Klassen von Fluoreszenzsonden wird häufig das Konzept der nichtstrahlenden Resonanz-Energieübertragung auf der Basis einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Fluorophoren, die allgemein als Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) bekannt ist, angewendet, um den Abstand zwischen zwei Molekülen (Donor und Akzeptor) zu überwachen. Das FRET-Konzept wird auch als molekulares Lineal bezeichnet, was die Analyse von Konformationsänderungen in Makromolekülen oder den Nachweis eines Bindungsereignisses, beispielsweise zwischen einem Antigen und

einem Antikörper, ermöglicht.<sup>35,36</sup> Neben der Skalierbarkeit des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor wird durch die steife Verbindung zwischen den Farbstoffen und der Stabeinheit die Möglichkeit gegeben, auch fundamentalere Aspekte zum FRET zu untersuchen, wie den Einfluss des Orientierungsfaktors  $\kappa^2$  oder die Punktdipol-Annahme für die Farbstoffe, die bei kleinen Abständen bekanntermaßen fehlschlägt. Durch die verbesserte Anbindung der Farbstoffe an den Abstandshalter sowie die insgesamt erhöhte Rigidität der Sonden wird der verfügbare Aufenthaltsraum der Farbstoffe verkleinert, so dass im Vergleich zu bisher etablierten Systemen, wie zum Beispiel Polyprolinen, deutlich verbesserte Abstandverteilungen verfügbar sind und damit ein Set von Sonden mit wohldefinierten Donor-Akzeptor-Abständen geschaffen wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten FRET-Paare (Beispiel siehe Abbildung 1.1), sowie die einfachmarkierten Donor- und Akzeptormoleküle, wurden in verschiedenen organischen Lösungsmitteln hinsichtlich ihrer grundlegenden photophysikalischen Eigenschaften charakterisiert. Um die OSTK-Stäbe für die Anwendungen in den Biowissenschaften zu verwenden, wurden sie aber vor allem in wässrigen Systemen untersucht. Es wurden einfach- und doppeltmarkierte OSTK-Stäbe, sowie Gelenkstäbe, die einen Cumarin- und einen DBD-Farbstoff enthielten, untersucht. Aus dem Vergleich mit den jeweiligen Stammverbindungen wurde der Einfluss des OSTK-Gerüsts auf die Photophysik des Farbstoffmoleküls ausgewertet. Außerdem wurden die OSTK-Stäbe in große unilamellare Vesikel (LUV, engl. large unilamellar vesicles) eingebaut, die als einfache biomimetrische Systeme für Zellmembranen verwendet wurden. Dabei wurde die Änderungen der Photophysik der Sonden bei der Einlagerung in die Vesikel untersucht. Die doppeltmarkierten Stäbe (flexibel, starr und Gelenkstäbe) wurden hinsichtlich ihrer FRET-Effizienz in den unterschiedlichen molekularen Umgebungen charakterisiert.<sup>37</sup>



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des FRET in einem OSTK-Stab

Auch bei der Immobilisierung auf Goldoberflächen wird der Abstandshalter als Anker genutzt werden, wobei das eine Ende des OSTK-Stabes mit einer SH-Einheit modifiziert wer-

den muss. Damit können Konstrukte unterschiedlicher Flexibilität hinsichtlich lateraler Auslenkung generiert werden. Durch die Variation der OSTK-Stablänge und der Flexibilität über Gelenke kann der Abstand zwischen Fluorophor und Oberfläche bestimmt werden und so Fluoreszenzverstärkung bzw. -löschung erhalten werden. Hierbei kann die Rasterkraftmikroskopie als „Kraftgeber“ gezielt zur Manipulation, also „Verbiegen“, der Stäbe eingesetzt werden. Damit werden neue molekulare Werkzeuge für optische Kraftmessungen an Grenzflächen bis hin zu einer Einzelmolekül-AFM-FRET-Nanoskopie entwickelt, bei der gezielt die Konformation einzelner Moleküle (z.B. Proteine) durch Krafteinwirkung manipuliert kann und gleichzeitig FRET-Messungen durchgeführt werden können.<sup>3</sup> Im Hinblick auf die Kopplung von schwefelfunktionalisierten SH-OSTK-Stäben an Goldoberflächen wurden farbstofffunktionalisierte Polypropylinderivate hergestellt und analysiert. Polyproline bilden eine Helix, die durch eine ausgeprägte Starrheit gekennzeichnet ist und sind somit gut als Referenzsysteme für die OSTK-Stäbe geeignet. Sie wurden erstmals im Rahmen von FRET-Experimenten in der Arbeit von Stryer und Haugland eingesetzt, die experimentell die Abstandsabhängigkeit untersuchten und dabei das Polyprolin als starren Stab annahmen.<sup>38</sup> Goldnanopartikel (AuNP) sind unter anderem durch ihre leichte Oberflächenfunktionalisierungsschemie sowie der skalierbaren optischen Eigenschaften häufige Partner in Sensorikanwendungen. Die in dieser Arbeit verwendeten AuNP hatten einen Durchmesser von 5 nm, womit die entsprechende Plasmonenresonanz gut mit der Emission des gewählten Cumarinderivats überlappte. Die farbstofffunktionalisierten Polyproline unterschiedlicher Länge wurden als Referenzsystem für zukünftige Arbeiten mit SH-OSTK-Stäben an Goldoberflächen in der Einzelmolekül-AFM-FRET-Nanoskopie untersucht.



# 2 Theorie

## 2.1 Spektroskopische Grundlagen

Im Folgenden werden die spektroskopischen Grundlagen dieser Arbeit erläutert, die zur Auswertung der durchgeführten Messungen genutzt wurden.

### 2.1.1 Absorption und Fluoreszenz

Unter Absorption versteht man die Aufnahme von Energie durch ein Atom oder Molekül bei Bestrahlung mit elektromagnetischer Strahlung. Ist die Energiedifferenz zweier Zustände im Molekül gleich der Energie der eingestrahlten elektromagnetischen Strahlung, kann ein Teil der Strahlung absorbiert werden. Das Molekül befindet sich anschließend in einem Schwingungszustand eines angeregten, energetisch höheren Zustands. Die Energie  $\Delta E$ , die von dem Molekül absorbiert wird, wird mithilfe des Planck'schen Wirkungsquantums  $h$  und der eingestrahlten Frequenz  $\nu$  durch die Bohr'sche Frequenzbedingung (Gleichung 2.1) beschrieben.

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (2.1)$$

Die Messgröße für die Absorption ist die Transmission  $T$ , die das Verhältnis der Intensität der eingestrahlten Strahlung ( $I_0$ ) zur Intensität der Strahlung nach dem Verlassen der Probe ( $I$ ) beschreibt.

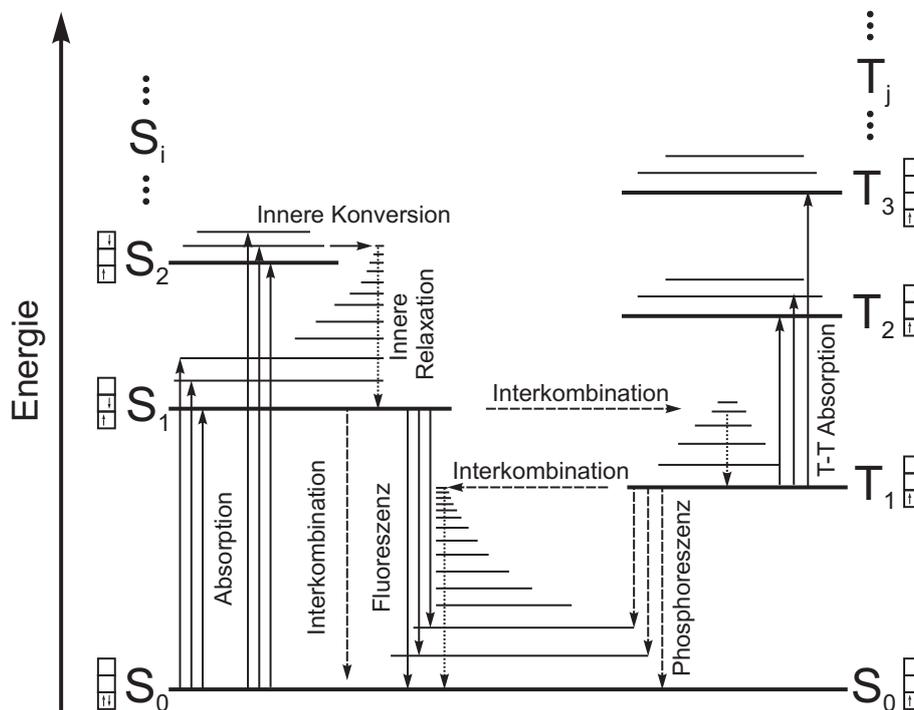
$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.2)$$

Aus der Transmission lässt sich mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gleichung 2.3) die Extinktion  $E$  berechnen, welche proportional zur Konzentration  $c$  des Analyten ist. Die Extinktion ist ebenfalls proportional zur Schichtdicke der Küvette  $d$  und zu dem wellenlängenabhängigen, dekadischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon(\lambda)$ , der substanzspezifisch ist und unter anderem von dem pH-Wert und dem verwendeten Lösungsmittel abhängen kann.

$$E(\lambda) = \lg \frac{1}{T} = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (2.3)$$

Das Lambert Beer'sche Gesetz besagt, dass die Intensität der elektromagnetischen Strahlung mit einer bestimmten Frequenz exponentiell mit der Konzentration der Probe und der Dicke der Küvette abnimmt.<sup>39</sup>

Die angeregten Zustände, in denen sich ein Molekül nach der Absorption von elektromagnetischer Strahlung befinden kann, sind jedoch nicht stabil und so geht es von den energetisch höheren Zuständen durch strahlungslose Relaxation in einen energetisch tieferen bzw. den Grundzustand über. Die verschiedenen Möglichkeiten lassen sich anhand eines Jablonski-Termschemas (siehe Abbildung 2.1) erklären.



**Abbildung 2.1:** Vereinfachtes Jablonski-Termschema (S = Singulettzustand, T = Triplettzustand)<sup>40</sup>

Wird die Energie bei dem Übergang vom ersten angeregten Singulettzustand ( $S_1$ ) in den Grundzustand ( $S_0$ ) in Form eines Photons wieder abgegeben, spricht man von Fluoreszenz. Sie verläuft typischerweise innerhalb von einigen Nanosekunden nach der Anregung in den angeregten Singulettzustand und erfolgt unter Spinerhaltung. Die Fluoreszenz findet in der Regel bei einer kleineren Frequenz als die Absorption statt, weil das Molekül einen Teil seiner Energie durch strahlungslose Desaktivierung abgibt, indem es mit Molekülen in seiner Umgebung zusammenstößt und so in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustandes gelangt. Die Emission der Energie kann nach der Regel von Kasha immer nur aus dem Schwingungsgrundzustand des  $S_1$ -Zustands erfolgen.<sup>41</sup> Die Frequenzverschiebung durch eine veränderte Geometrie im  $S_1$ -Zustand im Vergleich zum Grundzustand wird als Stokesverschiebung bezeichnet.<sup>40</sup>

Der Übergang in den Grundzustand kann auch durch innere Konversion (IC, engl. internal conversion) und innere Relaxation (IR) geschehen. Dabei geht das Molekül aus dem Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustands zunächst in einen höheren Schwingungszustand des Grundzustands über und von dort in den Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustands. Hierbei wird die Energie in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben.<sup>39</sup>

Die mittlere Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand verbringt bevor es ein Photon emittiert und in den Grundzustand zurückkehrt, wird als Fluoreszenzabklingzeit bezeichnet. Die zeitabhängige Fluoreszenzintensität  $I(t)$  hat nach Gleichung 2.4 einen monoexponentiellen Verlauf, wenn sie einer Kinetik 1. Ordnung folgt.

$$I(t) = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.4)$$

Dabei ist  $I_0$  die Fluoreszenzintensität direkt nach der Anregung,  $t$  die Zeit und  $\tau$  die Fluoreszenzabklingzeit. Diese setzt sich aus den Ratenkonstanten der fluoreszierenden ( $k_F$ ) und strahlungslosen ( $k_{NR}$ ) Desaktivierungsprozesse zusammen (siehe Gleichung 2.5).<sup>39</sup>

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{NR}} \quad (2.5)$$

Typische Fluoreszenzabklingzeiten verschiedener organischer Moleküle liegen im Bereich von Pikosekunden bis hin zu Nanosekunden.<sup>40</sup>

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\phi$  ist das Verhältnis zwischen der Anzahl der absorbierten Photonen und der von der Probe emittierten Photonen. Da ein Teil der durch Absorption von Photonen aufgenommenen Energie in Form von strahlungslosen Deaktivierungen abgegeben wird (Gleichung 2.6), ist die Anzahl der absorbierten Photonen immer größer als die Anzahl der emittierten Photonen. Daher kann die Fluoreszenzquantenausbeute eines Fluorophors nur Werte  $\leq 1$  annehmen.

$$\phi = \frac{k_F}{k_F + k_{NR}} \quad (2.6)$$

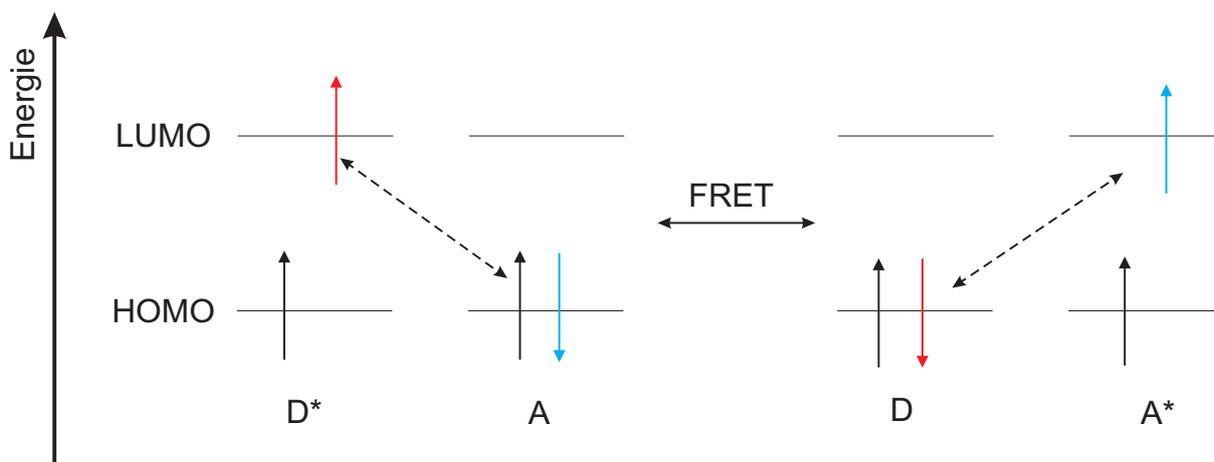
Aus Gleichungen 2.5 und 2.6 folgt Gleichung 2.7 als Zusammenhang zwischen Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer.

$$\phi = k_F \cdot \tau \quad (2.7)$$

Anstatt des Übergangs in den Grundzustand kann es auch zu einer Interkombination (Intersystemcrossing, ISC) mit einem Übergang in einen Schwingungszustand des Triplettzustands unter Spinumkehr kommen. Im Triplettzustand erfolgen wiederum Stöße und strahlungslose Energieabgabe an die Umgebung, sodass sich das Molekül anschließend im Schwingungsgrundzustand des angeregten Triplettzustands befindet. Die Rückkehr in den Grundzustand ist spinverboten. Kehrt das Molekül nun trotzdem in den Grundzustand zurück, kann die Energie in Form von Photonen sehr langsam abgegeben werden. Dies wird als Phosphoreszenz bezeichnet, die im Gegensatz zur Fluoreszenz aufgrund des Spinverbots Millisekunden bis hin zu Stunden andauern kann. Fluoreszenz und Phosphoreszenz sind Vorgänge der spontanen Emission und werden unter dem Begriff Lumineszenz zusammengefasst. Sie laufen ab, ohne dass bereits Photonen der Übergangsfrequenz vorhanden sein müssen.<sup>42</sup> Ob ein Molekül Fluoreszenz oder Phosphoreszenz zeigt, wird nach Fermis Goldener Regel durch die Lage der elektronischen Niveaus und die Übergangswahrscheinlichkeiten bestimmt.<sup>43</sup>

### 2.1.2 Förster-Resonanz-Energietransfer

Die Ursache des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET) sind weitreichende Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Coulomb-Wechselwirkungen) zwischen einem Donormolekül (D) im angeregten Zustand und einem Akzeptormolekül (A) im Grundzustand. Der angeregte Zustand des Donormoleküls ( $D^*$ ) wird durch strahlungslosen Energietransfer (ET) auf das Akzeptormolekül desaktiviert, welches dadurch in den angeregten Zustand ( $A^*$ ) übergeht. Durch die Anregung des Donors, kann so die Fluoreszenz des Akzeptors ausgelöst werden (siehe Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung des Förster-Resonanz-Energietransfers

Die FRET-Effizienz hängt von den photophysikalischen Eigenschaften des Donors und des Akzeptors ab. Der spektrale Überlapp wird quantitativ durch das Überlappungsintegral  $J(\lambda)$  des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors beschrieben (siehe Gleichung 2.8). Dabei ist  $\varepsilon_A$  der Extinktionskoeffizient des Akzeptors.<sup>39,40</sup>

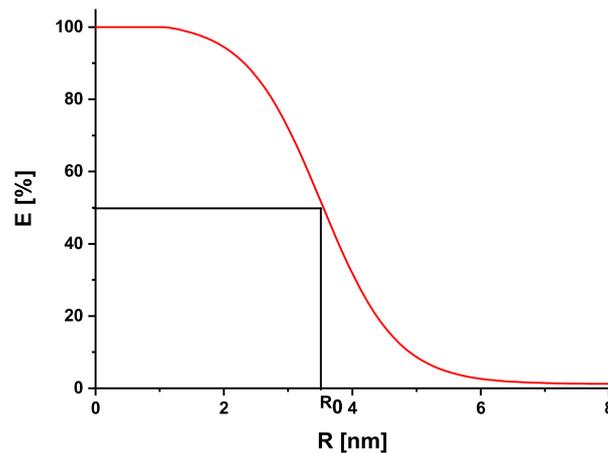
$$J(\lambda) = \int I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.8)$$

$I_D(\lambda)$  ist die Fluoreszenzintensität des Donors normiert auf einer Wellenlängenskala, wobei  $F_D$  die Donorfluoreszenz pro Einheit des Wellenlängenintervalls ist und sich das Integral über den relevanten Bereich der Donoremissionsbande erstreckt (siehe Gleichung 2.9).

$$I_D(\lambda) = \frac{F_D(\lambda)}{\int F_D(\lambda) d\lambda} \quad (2.9)$$

Der Försterabstand  $R_0$ , bei dem die FRET-Effizienz  $E_{\text{FRET}} = 50\%$  beträgt (siehe Abbildung 2.3), ist außer von dem Überlappungsintegral, von der Quantenausbeute des Donors  $\phi_D$ , der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der Fluorophore  $\kappa^2$  und dem Brechungsindex des Mediums  $n$  abhängig (siehe Gleichung 2.10).

$$R_0 = \left( \frac{9 \cdot \ln 10 \cdot \kappa^2 \cdot \phi_D \cdot J(\lambda)}{128 \cdot \pi^5 \cdot N \cdot n^4} \right)^{\frac{1}{6}} \quad (2.10)$$



**Abbildung 2.3:** Abhängigkeit der FRET-Effizienz  $E$  vom Donor-Akzeptor-Abstand  $R$ <sup>39</sup>

Die Energietransferrate  $k_{\text{FRET}}$  für diesen Mechanismus wird mit der Abklingzeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors  $\tau_D$  nach Gleichung 2.11 beschrieben.

$$k_{\text{FRET}}(R) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (2.11)$$

Mithilfe des Försterabstands und Gleichung 2.12 lässt sich eine theoretische FRET-Effizienz  $E_{\text{theor}}$  für ein Donor-Akzeptor-Paar mit dem Abstand  $R$  berechnen.

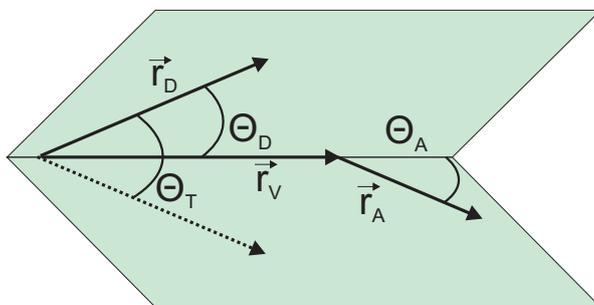
$$E_{\text{theor}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (2.12)$$

Experimentell wird die FRET-Effizienz  $E_{\text{exp}}$  sowohl aus den Intensitäten der Fluoreszenz-emissionsspektren des Donors in Anwesenheit ( $I_{\text{DA}}$ ) und in Abwesenheit des Akzeptors ( $I_{\text{D}}$ ) als auch aus den Quantenausbeuten ( $\phi_{\text{DA}}, \phi_{\text{D}}$ ) oder den Fluoreszenzabklingzeiten ( $\tau_{\text{DA}}, \tau_{\text{D}}$ ) bestimmt (siehe Gleichung 2.13).<sup>40</sup>

$$E_{\text{exp}} = 1 - \frac{I_{\text{DA}}}{I_{\text{D}}} = 1 - \frac{\phi_{\text{DA}}}{\phi_{\text{D}}} = 1 - \frac{\tau_{\text{DA}}}{\tau_{\text{D}}} \quad (2.13)$$

### 2.1.3 Der Orientierungsfaktor $\kappa^2$

Der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  für ein Donor-Akzeptor-Paar, ist von drei Orientierungen abhängig: Der Orientierung des Übergangsdipolmoments der Emission des Donormoleküls  $\vec{r}_{\text{D}}$ , der Orientierung des Übergangsdipolmoments der Absorption des Akzeptormoleküls  $\vec{r}_{\text{A}}$  sowie dem Verbindungsvektor  $\vec{r}_{\text{V}}$  zwischen den Zentren der beiden Fluorophore (siehe Abbildung 2.4).<sup>44,45</sup>



**Abbildung 2.4:** Einfluss der Orientierung der Übergangsdipolmomente auf  $\kappa^{246}$

Dabei ist  $\Theta_{\text{T}}$  der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der Emission des Donors und der Absorption des Akzeptor und  $\Theta_{\text{D}}$  und  $\Theta_{\text{A}}$  sind die Winkel zwischen beiden Übergangsdipolmomenten und dem Verbindungsvektor  $\vec{r}_{\text{V}}$  zwischen Donor- und Akzeptormolekül.  $\kappa$  wird nach Gleichung 2.14 definiert.<sup>47–49</sup>

$$\kappa = \cos \Theta_{\text{T}} - 3 \cos \Theta_{\text{D}} \cos \Theta_{\text{A}} \quad (2.14)$$

Die Ebenen, die durch  $\vec{r}_{\text{D}}$  und  $\vec{r}_{\text{A}}$ ,  $\vec{r}_{\text{D}}$  und  $\vec{r}_{\text{V}}$  und durch  $\vec{r}_{\text{A}}$  und  $\vec{r}_{\text{V}}$  gebildet werden, sind die  $\vec{r}_{\text{D}}\vec{r}_{\text{A}}$ -Ebene, die  $\vec{r}_{\text{D}}\vec{r}_{\text{V}}$ -Ebene bzw. die  $\vec{r}_{\text{A}}\vec{r}_{\text{V}}$ -Ebene. Der Winkel zwischen der  $\vec{r}_{\text{D}}\vec{r}_{\text{V}}$ -Ebene

und der  $\vec{r}_A\vec{r}_V$ -Ebene ist  $\Theta_T$ . So kann man  $\kappa^2$  auf drei verschiedenen Wege in Bezug auf die verschiedenen Winkel berechnen:

$$\kappa^2 = (\cos \Theta_T - 3 \cos \Theta_D \cos \Theta_A)^2 \quad (2.15)$$

$$\kappa^2 = (\sin \Theta_D \sin \Theta_A \cos \gamma - 2 \cos \Theta_D \cos \Theta_A)^2 \quad (2.16)$$

$$\kappa^2 = \cos^2 \omega (1 + 3 \cos^2 \Theta_D) \quad (2.17)$$

Der Orientierungsfaktor kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Sind die Übergangsdipolmomente exakt kollinear zueinander orientiert, wird ein Wert von  $\kappa^2 = 4$  erreicht. Bei paralleler Anordnung ist  $\kappa^2 = 1$  und sind sie senkrecht zueinander angeordnet ist  $\kappa^2 = 0$ . Für freibewegliche Moleküle, deren Rotation in Lösung sehr schnell ist, wird  $\kappa^2 = \frac{2}{3}$  angenommen.<sup>46</sup> Die Gleichung 2.17 für  $\kappa^2$  hängt nur von den beiden Variablen  $\omega$  und  $\Theta_D$  ab. Diese Formel für  $\kappa^2$  bezieht sich auf das elektrische Feld des Donors.  $\kappa^2$  ist proportional zum Quadrat dieses Feldes, das den Faktor  $1 + 3 \cos^2 \Theta_D$  ergibt, und ist außerdem proportional zu  $\cos \omega$  wobei  $\omega$  der Winkel zwischen diesem Feld und dem Übergangsdipolmoment des Akzeptors ist. Das bedeutet, wenn man einen Punkt für den Ort des Akzeptors in Bezug auf den Donor im Ursprung auswählt, dann ergibt die Ausrichtung der Akzeptororientierung  $\vec{r}_A$  mit der elektrischen Feldlinie des Donors, die durch diesen Punkt führt, den höchst möglichen  $\kappa^2$ -Wert in diesem Punkt:  $1 + 3 \cos^2 \Theta_D$ .

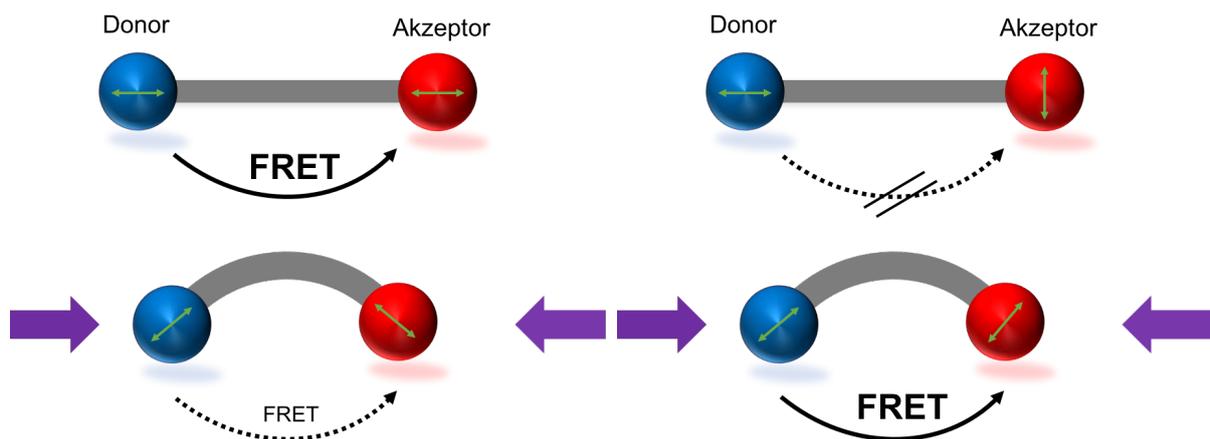
**Tabelle 2.1:** Mögliche Kombinationen von Degenerationen für Donor- und Akzeptor-Dipolübergangsmoment sowie resultierende Wertebereiche, wahrscheinlichste und unwahrscheinlichste Werte für  $\kappa^2$  (L = lineares Übergangsmoment, P = planares Übergangsmoment, I = isotropes Übergangsmoment)

Kombination der Degenerationen (Donor-Akzeptor)	Wertebereich für $\kappa^2$	Wahrscheinlichster Wert für $\kappa^2$	Unwahrscheinlichster Wert für $\kappa^2$
L – L	0 – 4	0	4
L – P oder P – L	0 – 2	$\frac{1}{2}$	2
L – I oder I – L	$\frac{1}{3} - \frac{4}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{4}{3}$
P – P	$\frac{1}{4} - \frac{5}{4}$	unbekannt	$\frac{5}{4}$
P – I oder I – P	$\frac{1}{3} - \frac{5}{6}$	$\frac{5}{6}$	$\frac{1}{3}$
I – I	$\frac{2}{3}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{2}{3}$

Die  $\cos^2$ -Proportionalität impliziert, dass  $\kappa^2$  null ist, wenn  $\vec{r}_A$  entlang einer Linie senkrecht zu einer elektrischen Feldlinie ist. Da der Mittelwert des  $\cos^2$  eines Polarwinkels  $\frac{1}{3}$  ist und  $\omega$  und  $\Theta_D$  unabhängige Polarwinkel sind, folgt nach Gleichung 2.17, dass der Mittelwert von  $\kappa^2$   $\frac{2}{3}$  ist, wenn  $\vec{r}_D$ ,  $\vec{r}_A$  und  $\vec{r}_V$  zufällig angeordnet sind. Aus den Gleichungen 2.15-2.17 und den Definitionen der Winkel in diesen Gleichungen, ergibt sich, dass sich die Werte für  $\kappa^2$  nicht ändern, wenn die folgenden Vorgänge durchgeführt werden:<sup>45,50</sup>

- Das Übergangsdipolmoment des Donors umkehren:  $\vec{r}_D \rightarrow -\vec{r}_D$
- Das Übergangsdipolmoment des Akzeptors umkehren:  $\vec{r}_A \rightarrow -\vec{r}_A$
- Das Tauschen der Plätze von Donor und Akzeptor:  $\vec{r}_V \rightarrow -\vec{r}_V$
- Das Vertauschen der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor :  $\vec{r}_A \leftrightarrow \vec{r}_D$

In Abhängigkeit von der Degeneration der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor führt die Verwendung von  $\kappa^2 = \frac{2}{3}$  zu unnötigen Fehlern wie Tabelle 2.1 zeigt. Von isotropen (I) Übergangsdipolmomenten wird ausgegangen, wenn alle Orientierungen des Dipolmoments gleichermaßen wahrscheinlich sind. Ein planares (P) Dipolmoment ist dann vorhanden, wenn das Übergangsmoment in einer Ebene senkrecht zur Achse degeneriert ist. Durch die Verwendung von Fluorophoren mit linearen (L) Übergangsdipolmomenten, die rigide, z.B. über einen molekularen Stab (siehe Kapitel 2.4), miteinander verbunden sind, könnten abstandsabhängige Kraftmessungen leichter kontrolliert werden. Nach diesem Prinzip können zwei Grenzfälle unterschieden werden, die in Abbildung 2.5 dargestellt sind.



**Abbildung 2.5:** Prinzipien der kraftabhängigen FRET-Stäbe (grüne Pfeile = Übergangsdipolmoment, violette Pfeile = äußere Kraft)<sup>51</sup>

In Abbildung 2.5 links sind die Übergangsdipolmomente (grüne Pfeile) von Donor und Akzeptor kollinear zueinander. Dadurch erreicht  $\kappa^2$  das Maximum von 4. Wird der FRET-Stab durch eine äußere Kraft (violette Pfeile) verbogen, ändert sich die Orientierung

der Übergangsdipolmomente zueinander.  $\kappa^2$  und damit auch die FRET-Effizienz werden kleiner. Zur gleichen Zeit wird jedoch zusätzlich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor verringert, was wiederum die FRET-Effizienz erhöht. Theoretische Berechnungen zeigen, dass der Einfluss von  $\kappa^2$  auf die FRET-Effizienz bei einer geringen Verbiegung größer ist als der Einfluss des Donor-Akzeptor-Abstands.<sup>51</sup> In Abbildung 2.5 rechts sind die Übergangsdipolmomente orthogonal zueinander.  $\kappa^2$  und die FRET-Effizienz betragen null. Durch Verbiegung nimmt der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten ab, dadurch wird  $\kappa^2$  größer und ein FRET-Signal ist messbar. Für diesen Modellfall werden in einem Experiment Fluorophore benötigt, die sich rigide an einen molekularen Stab anbringen lassen und deren Übergangsdipolmomente im 0°- oder 90°-Winkel zur Stab-Achse stehen.<sup>51</sup> Dass die rigide Verbindung der Fluorophore von entscheidender Bedeutung ist, ist bereits literaturbekannt. Langhals et al. zeigten ein FRET-Paar aus Benzoperylen und Perylen, das sie über einen kurzen Abstandshalter so miteinander verknüpften, dass die Übergangsdipolmomente orthogonal zueinander stehen. Obwohl nach theoretischen Berechnungen kein FRET standen finden sollte, wurde eine fast 100%ige FRET-Effizienz beobachtet, die auf molekulare Schwingungen der Fluorophore zurückzuführen ist.<sup>48</sup>

### 2.1.4 Fluoreszenzanisotropie

Die Übergangsdipolmomente der Absorption und der Emission fluoreszierender Stoffe sind zueinander orientiert. Ist das Übergangsdipolmoment der Absorption eines fluoreszierenden Stoffes in z-Richtung zum elektrischen Feldvektor  $E$  orientiert, kann linear polarisiertes Licht absorbiert werden. Je nach räumlicher Ausrichtung und Orientierung zum elektrischen Feldvektor  $E$  kann dann ebenfalls linear polarisiertes Licht emittiert werden. Die Detektion erfolgt in horizontaler ( $I_{\perp}$ ) und vertikaler ( $I_{\parallel}$ ) Orientierung zur z-Achse (siehe Abbildung 2.6).

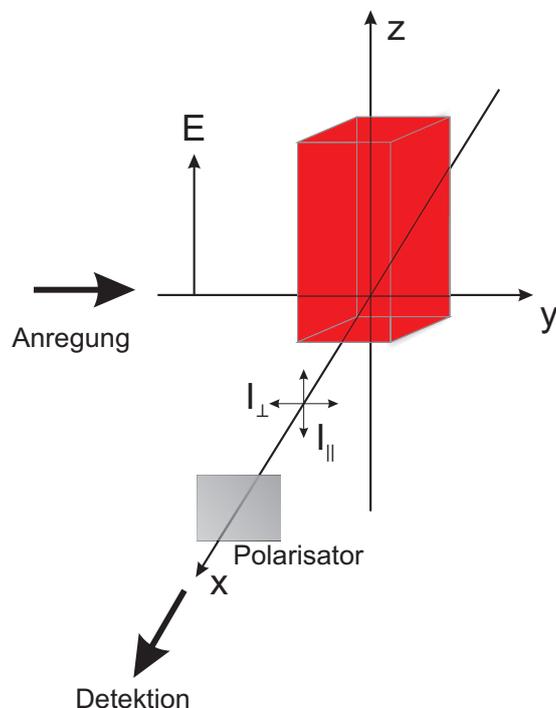
Diese Fluoreszenzpolarisation wird durch die Fluoreszenzanisotropie  $r$  beschrieben (siehe Gleichung 2.18). Der G-Faktor ( $G$ ) ist eine gerätespezifische Größe, die aus den Intensitäten bei horizontaler Anregung und horizontaler sowie vertikaler Detektion bestimmt wird.<sup>40</sup>

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot G \cdot I_{\perp}} \quad (2.18)$$

Der Wert der Anisotropie hängt sowohl von dem Winkel der Übergangsdipolmomente zueinander als auch ihrem Winkel  $\theta_P$  zur Polarisation des eingestrahnten Lichts ab. Daraus ergibt sich für ein Molekül mit parallelen Dipolmomenten, das in Richtung des eingestrahnten Lichts (z-Richtung) rotiert, ein Anisotropiewert von 1.

In einer Lösung sind die Übergangsdipolmomente zufällig verteilt und die Anregungswahrscheinlichkeit ist proportional zu  $\cos^2 \theta$ . Durch diese PhotoSelektion wird für gleichmäßig

um die Polarisationssebene des Anregungslichts orientierte Moleküle mit parallelen Übergangsdipolmomenten ein maximaler Anisotropiewert von 0,4 erreicht.



**Abbildung 2.6:** Schematischer Aufbau zur Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie<sup>52</sup>

Wenn die Übergangsdipolmomente nicht parallel zueinander orientiert sind, ist die Anisotropie zusätzlich vom Winkel  $\beta$  zwischen den Übergangsdipolmomenten abhängig (siehe Gleichung 2.19).

$$r = \frac{2}{5} \left( \frac{3 \cdot \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (2.19)$$

Jedes Fluorophor besitzt als spezifische Eigenschaft den Wert der fundamentalen Anisotropie  $r_0$ . Dieser ergibt sich, wenn zwischen Absorption und Emission keine depolarisierenden Prozesse, wie Rotation oder Energietransfer, stattfinden.<sup>40</sup>

Die stationäre Depolarisationsmessung bildet einen Mittelwert der Anisotropie über die gesamte Abklingzeit  $\tau$ . Der Zusammenhang zwischen der Rotationskorrelationszeit  $\varphi$  eines Moleküls und der stationären Anisotropie ist durch die Perrin-Gleichung (siehe Gleichung 2.20) gegeben.<sup>39</sup>

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left( 1 + \frac{\tau}{\varphi} \right) \quad (2.20)$$

Die Interpretation der Anisotropie ist jedoch allein mit den stationären Messungen schwierig. Mithilfe der zeitaufgelösten Anisotropie  $r(t)$  werden Details wie Geschwindigkeit und

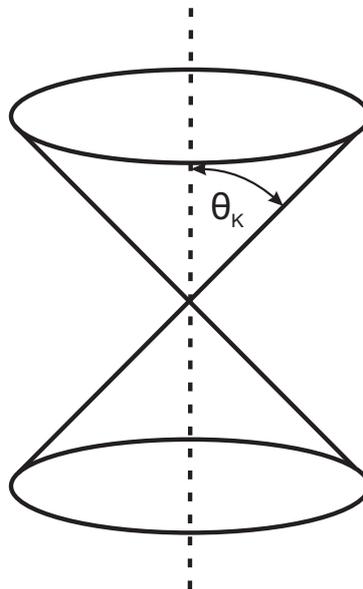
Art der Rotation deutlich. Für die Bestimmung von  $r(t)$  werden die Fluoreszenzabklingkurven, die mit vertikal polarisiertem Licht aufgenommen und vertikal ( $I_{\parallel}$ ) bzw. horizontal ( $I_{\perp}$ ) detektiert wurden, für die Auswertung verwendet (siehe Gleichung 2.21).

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - G \cdot I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2 \cdot G \cdot I_{\perp}(t)} \quad (2.21)$$

Der zeitliche Verlauf der Anisotropie wird vor allem durch die Geschwindigkeit der Rotationsdiffusion eines Fluorophors beeinflusst, dessen Form, Größe und Mikroumgebung dabei entscheidende Faktoren sind.

Kleine, nicht sphärische Moleküle klingen in homogener Umgebung multiexponentiell von dem Wert der fundamentalen Anisotropie  $r_0$  beim Zeitpunkt  $t = 0$  ab, sodass sich maximal drei Rotationskorrelationszeiten ergeben. Diese weichen bei kleinen Molekülen jedoch so wenig voneinander ab, dass die Abklingkurve meist monoexponentiell mit einer mittleren Rotationskorrelationszeit angepasst werden kann.

Wird ein Molekül in seiner Rotation eingeschränkt, z.B. durch die Bindung an einen Antikörper, kann es zu einer nicht vollständigen Depolarisation kommen, sodass die Fluoreszenzanisotropie gegen eine Grenzanisotropie  $r_{\infty}$  geht. Rotiert das Molekül in seiner Umgebung nur noch bis zu einem Winkel  $\theta_K$ , so kann der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie mit dem *wobble-in-a-cone*-Modell beschrieben werden (siehe Abbildung 2.7 und Gleichung 2.22).<sup>53-55</sup>



**Abbildung 2.7:** Schematische Darstellung der Rotation eines Moleküls nach dem *wobble-in-a-cone*-Modell mit dem halben Öffnungswinkel des Kegels  $\theta_K$ <sup>39</sup>

$$r(t) = r_0 \left[ (1 - A_{\infty}) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\phi}\right) + A_{\infty} \right] \quad (2.22)$$

Die Hinderung der Rotation wird durch  $A_\infty$  beschrieben und ist eine Funktion des halben Öffnungswinkels des Kegels ( $0^\circ \leq \theta_K \leq 90^\circ$ ), in dem das Fluorophor noch rotieren kann (siehe Gleichung 2.23).

$$A_\infty = \frac{r_\infty}{r_0} = \left[ \frac{1}{2} \cdot \cos \theta_K (1 + \cos \theta_K) \right]^2 \quad (2.23)$$

Bei einer starken Hinderung der Rotation geht der  $A_\infty$ -Wert gegen 1 und  $\theta_K$  gegen  $0^\circ$ . Bei einem halben Öffnungswinkel des Kegels von  $90^\circ$  kann das Molekül frei rotieren und  $A_\infty$  geht gegen 0.

### 2.1.5 Transienten-Absorption

Bei der Transienten-Absorption (TTA) handelt es sich um die Absorption von Licht durch Moleküle, die sich bereits im angeregten Zustand befinden. Alle Intermediate, die nach der Photoanregung gebildet werden und Licht absorbieren, sind in der transienten Absorption messbar. Es handelt sich dabei z.B. um Moleküle im Triplettzustand und photochemische Produkte wie zum Beispiel Radikale.

Prinzipiell lässt sich auch die TTA mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz beschreiben. Der wichtigste Unterschied zur stationären Absorptionsspektroskopie besteht dabei in der Zeitabhängigkeit der transienten Absorption. Zur Messung der TTA wird die Probe mit einem kurzen Laserpuls angeregt (Pumpimpuls) und die Absorption mit einem sehr kurzen Probepuls, der in der Zeit relative zum Pumpimpuls verschoben ist, gemessen. Nach der Photoanregung durch den Laserpuls ändert sich bei den Wellenlängen transienter Absorptionsbanden das Absorptionsverhalten der Probe. Es handelt sich um ein sogenanntes *Test-Impuls-Experiment*.<sup>56</sup>

$$\Delta OD(t, \lambda) = \lg \left( \frac{I_0}{I_T(t, \lambda)} \right) \cong \varepsilon_T(\lambda) \cdot c_T(t) \cdot d \quad (2.24)$$

Das gemessene Signal wird in  $\Delta OD$ , die Änderung der optischen Dichte, umgerechnet. Die Werte von  $\Delta OD$  ergeben, analog zur Extinktion, gegen die Wellenlänge aufgetragen, ein Absorptionsspektrum der transienten Spezies. Auch bei der transienten Absorption bildet der dekadischen Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_T$  der transienten Spezies die Proportionalitätskonstante zwischen  $\Delta OD$  und der Konzentration der jeweiligen transienten Spezies  $c_T$  bei einer Schichtdicke  $d$ . Zu beachten ist dabei eine homogene Ausleuchtung des Probevolumens, da die Konzentration der transienten Spezies direkt proportional zur Anregungsintensität  $I_0$  ist.<sup>57,58</sup> Die Veränderungen, die durch die Anregung passieren, können zeitaufgelöst detektiert werden, wobei verschiedene Effekte beobachtet werden.

**Triplet-Triplett-Absorption** Eine Ursache für das Auftreten einer transienten Absorptionsbande kann die Triplet-Triplett-Absorption sein (siehe Abbildung 2.1). Wenn nach Photoanregung des Analyten dieser durch *ISC* in den Triplettzustand übergeht, können Moleküle aus dem Triplettzustand Licht absorbieren und in einen höheren Triplettzustand angeregt werden. Die Messung der Triplet-Triplett-Absorption eröffnet zum Beispiel Zugang zu Triplettlebenszeiten auch bei nicht oder nur schwach phosphoreszierenden Proben. Des Weiteren können aus den Triplet-Triplett-Absorptionsspektren die energetische Lage der Übergänge, die Peakbreite und viele weitere spektrale Informationen gewonnen werden.<sup>56</sup>

**Grundzustandsverarmung** Als Grundzustandsverarmung (Ground-State Depletion, auch Photobleaching) wird das Phänomen bezeichnet, wenn die optische Dichte einer Probe durch Photoanregung sinkt. Bei der Messung der transienten Absorption zeigt sich dieser Effekt durch negative Messwerte für  $\Delta OD$ . Der Grund dafür liegt in der geringeren Anzahl an Molekülen, die nach der Photoanregung im elektronischen Grundzustand verbleiben. Mit der geringen Zahl an Molekülen im Grundzustand ergibt sich eine geringe Absorption durch Moleküle im Grundzustand. Aus dem Verhältnis von  $\frac{I_0}{I_T} < 1$  ergibt sich nach Gleichung 2.24 ein negativer Wert für  $\Delta OD$ . Dieser Fall tritt ein, wenn durch Grundzustandsverarmung die transmittierte Intensität nach Photoanregung  $I_T$  größer ist als die transmittierte Intensität vor Photoanregung  $I_0$ . Grundzustandsverarmung ist natürlich nur bei Wellenlängen messbar, bei denen der Analyt aus dem Grundzustand absorbiert, sprich eine Absorptionsbande zeigt. Des Weiteren kann die Grundzustandsverarmung von einer stärkeren transienten Absorptionsbande überlagert werden.<sup>56</sup>

**Lumineszenz** Wie die Grundzustandsverarmung, führt auch die Lumineszenz der Probe zu negativen Werten von  $\Delta OD$  bei den Emissionswellenlängen. Die Lumineszenz lässt sich jedoch leicht von der Grundzustandsverarmung unterscheiden, indem das Experiment mit und ohne den Abfragestrahl wiederholt wird.

Die Lumineszenz einer Probe auch zeitaufgelöst gemessen werden und mit dem gewählten Aufbau können auswertbare Abklingkurven schon mit sehr wenigen Photoanregungen erhalten werden (typischerweise etwa 100 Photoanregungen).<sup>56</sup>

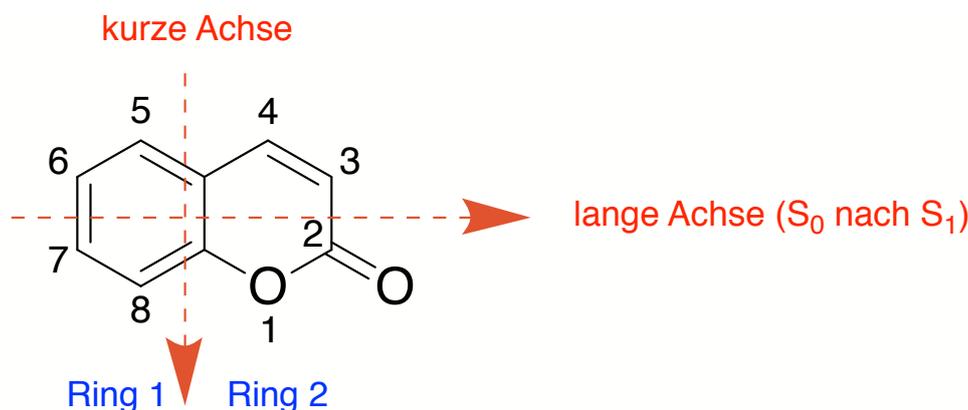
**Photochemische Produkte** Durch die hohen Leistungsdichten bei der Laseranregung können instabile Analyten in beträchtlichem Maße photochemische Produkte bilden. Dabei handelt es sich vor allem um Radikale, Radikationen sowie solvatisierte Elektronen. Wenn eines der photochemischen Produkte bei der Detektionswellenlänge Licht absorbiert, ist ein  $\Delta OD$  messbar. Mitunter kann sogar der Reaktionsverlauf beobachtet werden. Gegebenenfalls lassen sich photochemische Effekte durch Veränderung der Anregungswel-

lenlänge und der Leistungsdichte des Pumpstrahls verringern.<sup>56</sup>

## 2.2 Photophysik der Cumarine

Cumarinfarbstoffe sind eine Klasse von fluoreszierenden Farbstoffen die ursprünglich für die Verwendung in Farbstofflasern entwickelt wurden. Sie finden aber auch Verwendung als polaritäts-, pH- und viskositätssensitive Fluorophore, sowie als Fluoreszenzmarker. Es handelt sich bei ihnen um Derivate von Cumarin, einem natürlich vorkommenden sekundären Pflanzenstoff.<sup>59</sup>

Cumarin selbst zeigt bei Raumtemperatur keine Fluoreszenz und hat nur eine geringe Absorption im nahen UV-Bereich. Aber wenn in C6- oder C7-Position (siehe Abbildung 2.8) des Moleküls eine Elektronendonorguppe (wie Hydroxyl- oder Aminogruppe) substituiert wird, erscheint eine intensive blau-grüne Emission. Dies geschieht aufgrund eines *Push-Pull*-Effekts zwischen der Elektronendonorguppe an C6 bzw. C7 und dem elektronenziehenden Lactonrest.



**Abbildung 2.8:** Strukturformel von Cumarin<sup>60</sup>

Eine schematische Zeichnung des CumarinGrundgerüsts (2H-Chromen-2-on) zusammen mit der verwendeten Atommarkierung ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Darüber hinaus wird der aromatische Ring, bestehend aus 6 Kohlenstoffatomen, als Ring 1 und der Lactonring als Ring 2 definiert.

Cumarinderivate sind als photostabile Fluoreszenzfarbstoffe mit großen Stokesverschiebungen und hohen Fluoreszenzquantenausbeuten in den Lebenswissenschaften gut etabliert. Diese Strukturen zeigen große Unterschiede zwischen den äquilibrierten Geometrien und den Dipolmomenten im Grundzustand und im angeregten Zustand. Das bedeutet, dass im angeregten Zustand ein intramolekularer Ladungstransfer (*ICT*, engl. internal charge transfer) erfolgen kann.<sup>61</sup> Dieser *ICT* ist stark vom Lösungsmittelkäfig des Cumarins abhängig. Je nach Polarität des verwendeten Lösungsmittels verändert sich die

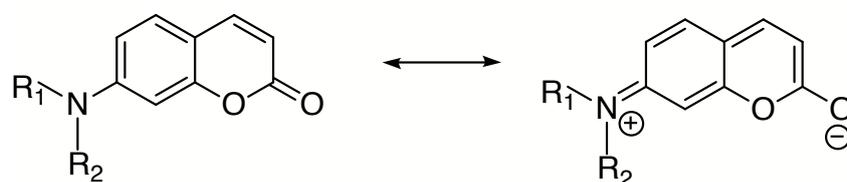
Stokesverschiebung des Cumarins. Diese Polaritätsabhängigkeit der Stokesverschiebung kann mit Hilfe der *Lippert-Mataga*-Beziehung (Gleichung 2.25) ausgewertet werden.<sup>40</sup>

$$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_E = \frac{2\Delta f}{hc} \cdot \frac{(\mu_e - \mu_g)}{a^3} \quad (2.25)$$

Hierbei sind  $\tilde{\nu}_A$  und  $\tilde{\nu}_E$  die Wellenzahlen der Absorption bzw. der Emission,  $h$  ist das Planck'sche Wirkungsquantum und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit. Außerdem gehen die Dipolmomente im Grundzustand ( $\mu_g$ ) und im angeregten Zustand ( $\mu_e$ ), sowie der Radius des Lösungsmittelkäfigs ( $a$ ) in die Berechnung ein.  $\Delta f$  ist die Orientierungspolarisierbarkeit, die ein Maß für die Polarität des jeweiligen Lösungsmittels ist. Sie lässt sich aus der Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) und dem Brechungsindex ( $n$ ) nach Gleichung 2.26 für jedes Lösungsmittel berechnen.<sup>40</sup>

$$\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (2.26)$$

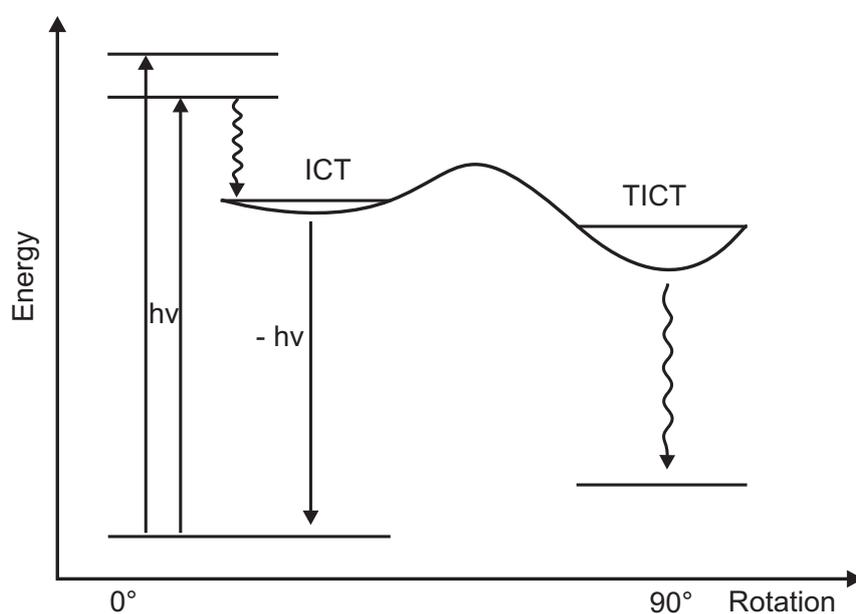
7-Aminocumarine haben sowohl eine Aminogruppe, die als Elektronendonator wirkt, als auch eine Carbonylgruppe, die als Elektronenakzeptor wirkt.



**Abbildung 2.9:** Strukturformeln eines 7-Aminocumarins

Beide Gruppen sind durch konjugierte Doppelbindungen verbunden. Durch die rotierende Aminogruppe wird das Energieniveau des Zustands gesenkt. In der Regel nehmen die Fluoreszenzeffizienzen von 7-Aminocumarinen in hochpolaren Lösungsmitteln (z.B. in wässrigen Puffersystemen) ab. Diese Reduktion ist besonders stark, wenn die Aminogruppe dialkyliert ist und keine Wasserstoffbrücken mit Lösungsmittelmolekülen bilden kann. Bei Anregung der Farbstoffe mit weniger starren Geometrien kann eine innere Konversion des anfänglichen *ICT*-Zustands durch eine Rotation der Aminogruppen in einen nicht emittierenden verdrehten intramolekularen *charge-transfer* Zustand (*TICT*, engl. twisted intramolecular charge transfer) mit vollständiger Ladungstrennung erfolgen (siehe Abbildung 2.10).<sup>62-64</sup> Dieser Zustand wird durch elektronenziehende Gruppen an C3 oder C4 und durch elektrostatische Wechselwirkungen mit Molekülen eines polaren Lösungsmittels stabilisiert. Als Ergebnis haben Cumarine mit frei drehenden 7-Dialkylaminogruppen schlechte Fluoreszenzquantenausbeuten in wässrigen und alkoholischen Medien. Wie erwartet, führt die Versteifung des Fluorophors durch Einbeziehung der Aminogruppe in

ein oder zwei mit dem  $\pi$ -System verschmolzene Ringe zu einer beträchtlichen Verbesserung der Fluoreszenzeffizienz, da in diesem Fall die Anregung einen einfachen, planaren *ICT*-Zustand ergibt. Außerdem ist bekannt, dass es keine Notwendigkeit für eine Fixierung gibt, wenn die Aminogruppe nur eine Alkylgruppe trägt. Die starren Aminogruppen haben einzelne Elektronenpaare, die mit dem  $\pi$ -Elektronensystem des Farbstoffs effizient überlappen. Diese planaren Aminogruppen sind stärkere Elektronendonatoren als verdrehte Dimethyl- oder Diethylaminogruppen. Daher sind sie direkt mit einem Elektronenakzeptorteil des Cumarinfluorophors konjugiert und der voll entwickelte *Push-Pull*-Effekt verschiebt die Absorptions- und Emissionsbanden weiter zu längeren Wellenlängen.<sup>61</sup>



**Abbildung 2.10:** Energieniveaus inkl. *ICT* und *TICT*

Die Bildung des *TICT*-Zustands führt zur Fluoreszenzlöschung, da die Rotation der Gruppe einen zusätzlichen, nicht strahlenden Deaktivierungskanal bereitstellt. Polare Lösungsmittel, wie PBS, stabilisieren diesen Zustand, indem sie die Energieniveaus des angeregten Zustands senken.<sup>64,65</sup>

Unter vielen handelsüblichen Cumarinen besteht eine populäre Designstrategie darin, einen elektronenschiebenden Substituenten an der 7-Position und eine andere elektronenziehende oder -schiebende Gruppe entweder in der 3-Position oder der 4-Position einzuführen. Diese Strategie kann den *Push-Pull*-Effekt effektiv anpassen und die UV-VIS-Spektren von Cumarinen durch einfaches Austauschen der Substituenten nach ihrer variierenden elektronenschiebenden oder -ziehenden Kraft verändern.<sup>17,66</sup> Des Weiteren ist bekannt, dass das Anbringen einer elektronenziehenden Gruppe an der 3-Position anstelle der 4-Position zu einer größeren Rotverschiebung der UV-VIS-Absorptionsspektren und einem nahezu verdoppelten molaren Extinktionskoeffizienten führt.<sup>17,18</sup>

Die ersten angeregten Zustände von Cumarinen beinhalten überwiegend die HOMO  $\rightarrow$  LUMO Elektronenübergänge. Die atomaren Beiträge zu ihren HOMO- und LUMO-Elektronendichten wurden in der Literatur über Dichtefunktionaltheorierechnungen (DFT) berechnet.<sup>60</sup> In der 4-Position ist die Elektronendichte im HOMO sehr gering, steigt aber im LUMO erheblich an. Daher sorgt das Anbringen einer elektronenziehenden Gruppe an der 4-Position dafür das LUMO stark zu stabilisieren und die Energiebandlücke des Cumarins zu reduzieren.<sup>67</sup>

Im Gegensatz dazu zeigt die Elektronendichte an der 3-Position während des HOMO  $\rightarrow$  LUMO-Übergangs wenig Veränderung. Dementsprechend verursacht eine an dieser Position angebrachte elektronenziehende Gruppe ähnliche Stabilisierungseffekte sowohl für das HOMO als auch für das LUMO, sodass die Gesamtveränderung in der Energiebandlücke relativ klein sein soll. Zum genaueren Verständnis ist deswegen eine eingehendere Struktur-Eigenschaftsbeziehung erforderlich.

Die Energiebandlücke ( $E_g$ ) einer Verbindung wird überwiegend durch fünf Faktoren bestimmt (siehe Gleichung 2.27).<sup>68</sup>

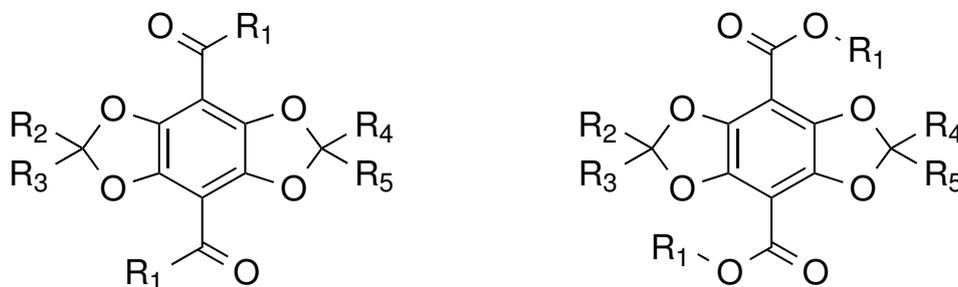
$$E_g = E_{\text{sub}} + E_{\text{BLW}} + E_{\text{res}} + E_{\theta} + E_{\text{int}} \quad (2.27)$$

Der erste Faktor ( $E_{\text{sub}}$ ) beinhaltet die elektronenschiebende bzw. -ziehende Kraft eines Substituenten, der oft durch Hammett-Werte quantifiziert wird. Dieser Faktor spielt eine wichtige Rolle bei der spektralen Verschiebung des zweiten Faktors durch den ein Bindungslängenwechsel (BLW) dargestellt wird. BLW berechnet die Differenz der durchschnittlichen Einfachbindungslänge und der mittleren Doppelbindungslänge in der konjugierten Alkylkette eines Moleküls. Ein kleinerer BLW-Wert entspricht einem höheren Grad der Elektronendelokalisierung und einer kleineren Bandlücke. Der dritte Faktor ( $E_{\text{res}}$ ) betrifft die Resonanzenergie in einem typischen konjugierten Ringsystem. Beispielsweise beinhaltet die optische Anregung eines aromatischen Farbstoffs den *ICT* und den Übergang des Benzolrings auf eine para-quinoidale Form. Umgekehrt neigt die Resonanzenergie dazu, die  $\pi$ -Elektronen innerhalb des Benzolrings einzuschränken und arbeitet gegen den *ICT*.<sup>68</sup> Die Resonanzenergie  $E_{\text{res}}$  kann mit der Grundzustandmolekülstruktur eines aromatischen Farbstoffs zusammenhängen. Nach der Resonanztheorie wird die tatsächlich beobachtete Molekülstruktur eines Moleküls durch alle möglichen Resonanzzustände kollektiv beschrieben und der beobachtete Benzolring in diesem Farbstoff ist nicht absolut aromatisch. Vielmehr zeigen sie aufgrund der Beiträge für den para-quinoidischen Resonanzzustand quinoidähnliche Muster. Die Beiträge aus diesen verschiedenen Resonanzzuständen können durch das empirische HOSE-Modell (engl. harmonic oscillator stabilization energy) quantifiziert werden.<sup>69</sup> Insbesondere der Beitrag aus dem para-quinoiden Resonanzzustand in die Grundzustandsstruktur gibt einen guten Hinweis auf die Resonanzenergie.

Das heißt, ein höherer para-dioidaler Beitrag entspricht der niedrigeren Resonanzenergie. Der vierte Faktor  $E_\theta$  kann als der Diederwinkel  $\theta$  zwischen dem Substituenten und dem Cumaringerüst verstanden werden. Dies ist besonders wichtig, wenn dieser Substituent an dem konjugierten  $\pi$ -System teilnehmen oder es erweitern kann. Ein kleiner Winkel  $\theta$  führt zu einer planaren Struktur und einer größeren  $\pi$ -Elektronendelokalisierung, was ein kleineres  $E_\theta$  verursacht. Der letzte Faktor ( $E_{\text{int}}$ ) ist für intermolekulare Wechselwirkungen verantwortlich. Haben alle Cumarine denselben Substituenten, der aber an verschiedenen Positionen gebunden ist, die gleiche molekulare Formel und ähnliche Volumina und werden vor allem in Lösung verwendet, so ist der Beitrag aus den intermolekularen Wechselwirkungen im Wesentlichen die Lösungsmittel-Analyt-Wechselwirkungen. Am Ende ist es wichtig, dass diese fünf Faktoren nicht separat betrachtet werden können, sondern dass sie zusammenhängen. Eine Erhöhung des *Push-Pull*-Effekts durch die Wahl von mehr bzw. stärker elektronenschiebenden oder -ziehenden Substituenten führt dazu,  $E_{\text{sub}}$  zu verringern. Gleichzeitig wird die molekulare Struktur des resultierenden Farbstoffs paraquinoid, was zu einem niedrigeren  $E_{\text{res}}$  führt.<sup>18</sup>

## 2.3 Photophysik der DBD-Farbstoffe

DBD([1,3]dioxolo[4,5-f][1,3]benzodioxol)-Farbstoffe sind eine Klasse neuartiger Fluoreszenzfarbstoffe. Sie zeichnen sich vor allem durch große Stokesverschiebungen ( $\Delta\lambda > 100$  nm), lange Fluoreszenzabklingzeiten ( $\tau > 20$  ns) und eine hohe Stabilität gegenüber Photobleichen aus.<sup>70-73</sup> Die photophysikalischen Eigenschaften der DBD-Farbstoffe unterscheiden sich deutlich, wenn Substituenten am Grundgerüst ausgetauscht werden. So sind bisher DBD-Farbstoffe 1. Generation (Acyl-DBD) und 2. Generation (Esther-DBD) bekannt (siehe Abbildung 2.11).



**Abbildung 2.11:** Strukturformeln eines Acyl- (links) und eines Esther- (rechts) DBD-Farbstoffs

Besonders die Acyl-DBD-Farbstoffe zeigen eine starke Abhängigkeit in ihrer Fluoreszenzquantenausbeute und -abklingzeit von der Polarität des verwendeten Lösungsmittels. In

Wasser ist die Fluoreszenz nahezu gelöscht, wohingegen in unpolaren Lösungsmitteln hohe Fluoreszenzquantenausbeuten und -abklingzeiten beobachtet werden können.<sup>71</sup> Daher eignen sich diese sehr gut als Fluoreszenzsonden um den Einbau in die hydrophobe Doppellipidschicht von großen unilamellaren Vesikeln zu untersuchen und wurden daher für diese Arbeit ausgewählt.

Es ist bereits bekannt, dass sich die kritische Mizellbildungskonzentration (cmc) verschiedener Tenside durch das Erfassen der Änderung der Fluoreszenzabklingzeit von Acyl-DBD-Farbstoffen bestimmen lässt. Dadurch, dass die Fluoreszenz in Wasser nahezu gelöscht ist, kann durch die Zugabe der lipophilen Detergenzien die cmc anhand der ansteigenden Fluoreszenzlebensdauer bestimmt werden.<sup>70</sup>

Des Weiteren wurden Acyl-DBD-Farbstoffe in verschiedene Zellen eingebracht. Auf Grund ihrer geringen molekularen Größe und ihrer Lipophilie sind sie in der Lage sich in lipophilen Biomembransystemen anzureichern. Die verschiedene Zelllinien geben, je nach Bereich der Zelle, in FLIM-Messungen (engl. fluorescence life imaging microscopy) unterschiedliche Fluoreszenzabklingzeiten von jeder intrazellulären Membran.<sup>70</sup>

## 2.4 Oligo-Spiro-Thio-Ketal-Stäbe

Molekulare Stäbe sind starre Moleküle mit einem großen Seitenverhältnis (siehe Abbildung 2.12), die in den letzten Jahrzehnten immer mehr Bedeutung gewonnen haben. Die hohe Festigkeit der Moleküle ist mit der Dimensionsstabilität verbunden und stellt eine wesentliche Voraussetzung für Anwendungen dar, die auf der wohldefinierten Form der Moleküle basieren. Molekulare Stäbe haben sich aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften in einer Vielzahl von Anwendungen bewährt, vor allem im Bereich der modernen Biowissenschaften, der Nanowissenschaften und der Nanotechnologien.<sup>22-27</sup>

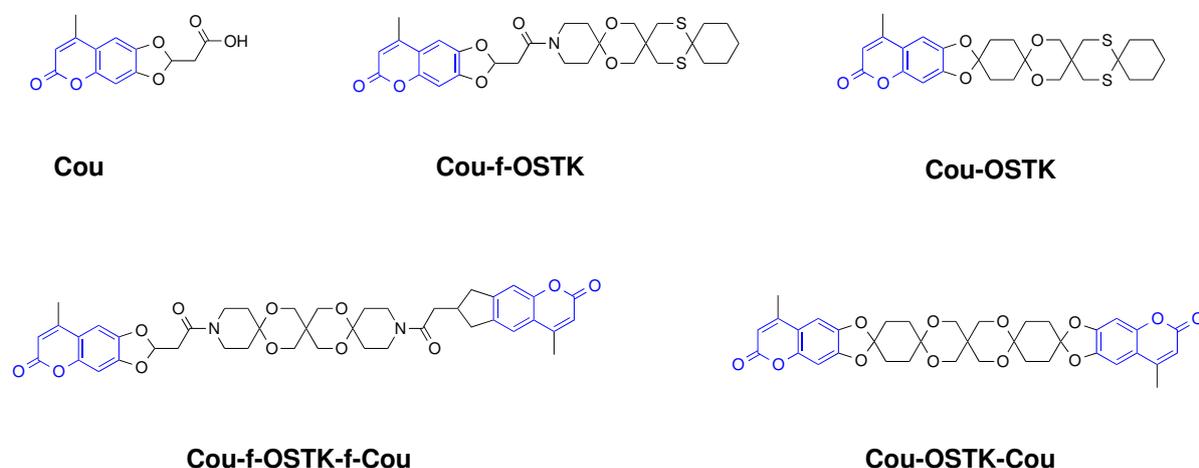
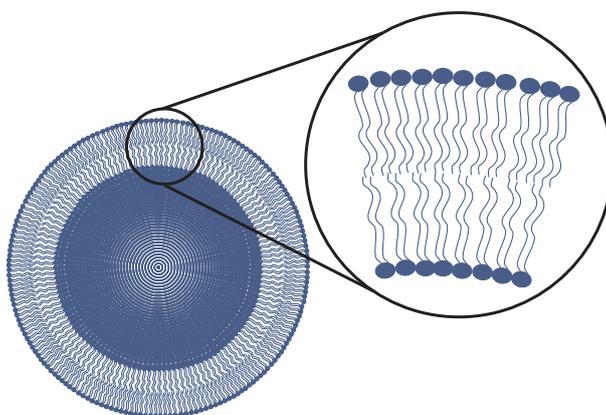


Abbildung 2.12: Strukturformeln der Cou-OSTK-Stäbe

Oligo-Spiro-Ketal-Stäbe (OSK) sind auf spirocyclisch verbundenen sechsgliedrigen Ringen basierend. Die Ringe sind durch Kondensation von 1,3-Diolen und Ketonen miteinander verbunden.<sup>29</sup> OSK-Stäbe weisen im Vergleich zu anderen molekularen Stäben eine hohe Steifigkeit auf und durch flexible Kombination verschiedener Bausteine sind Stäbe mit unterschiedlichen Längen zugänglich. Solche OSK-Stäbe wurden erfolgreich als Anker in biologischen Membranen verwendet.<sup>30–32</sup> Eine Einschränkung bei der Synthese der OSK-Stäbe ist die maximale Anzahl an Ketalresten. Die reversible Bildung dieser funktionellen Gruppen kompliziert die Synthese längerer Stäbe erheblich. Der Austausch von Sauerstoff durch Schwefel, der die wesentlich stabileren Thioketale liefert, löst dieses Problem und ist die Basis der in dieser Arbeit verwendeten Oligo-Spiro-Thio-Ketal-Stäbe (OSTK).<sup>74</sup>

## 2.5 Phospholipidvesikel

In wässriger Phase assoziieren Amphiphile, wie Phospholipide, spontan zu ausgedehnten bimolekularen Doppelschichten, die auch als Lamellen bezeichnet werden. Dabei orientieren sich die hydrophilen Kopfgruppen nach außen zum wässrigen Medium und die hydrophoben Ketten ins Innere der Doppelschicht.<sup>75</sup> Wenn sich eine solche Lamelle einstülpt und im gebildeten Innenraum ein Teil der umgebenden wässrigen Lösung eingeschlossen wird, entsteht ein unilamellares Vesikel. Abbildung 2.13 zeigt schematisch ein Vesikel im Querschnitt. Die Größenverhältnisse sind hierbei nicht originalgetreu. Tatsächlich ist die Membran extrem dünn im Verhältnis zum Vesikeldurchmesser. Um dies zu verdeutlichen soll ein POPC-Vesikel (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) mit dem Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  als Beispiel dienen. Die Dicke der POPC-Doppelschicht beträgt hierbei etwa 4 nm. Dies entspricht etwa einem Verhältnis von Vesikeldurchmesser zu Membrandicke von 1000:1.<sup>76</sup>



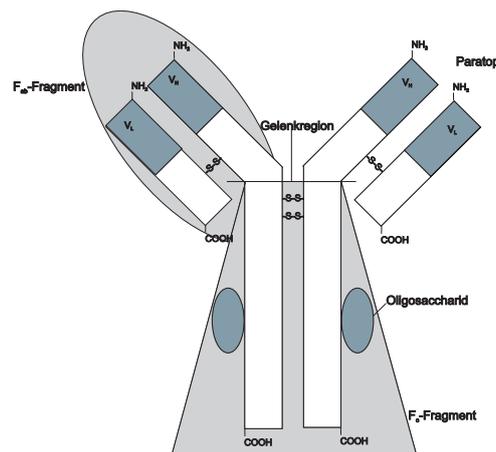
**Abbildung 2.13:** Schematische Darstellung eines unilamellaren Vesikels

Vesikelmembranen bzw. Phospholipiddoppelschichten zeigen ein temperaturabhängiges Phasenverhalten. Allgemein wird zwischen einer festen Gel-Phase  $L_{\beta}$  und einer flüssig-

kristallinen Phase  $L_\alpha$  unterschieden. Je nach Lipid treten verschiedene Zwischenphasen auf. Der Wechsel zwischen diesen Phasen wird als Phasenübergang bezeichnet. Die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  hängt von Faktoren wie der Kettenlänge, dem Sättigungsgrad sowie der Position der Doppelbindung des Lipides ab. Deswegen weisen alle Lipide charakteristische Phasenübergangstemperaturen  $T_m$  auf.<sup>77</sup>

## 2.6 Hapten-Antikörper-Bindung

Haptene sind kleine Moleküle, wie z.B. Cumarine, an die Antikörper (siehe Abbildung 2.14) binden können. Sie rufen jedoch keine Immunantwort hervor, was die Herstellung von Antikörpern, die gegen sie gerichtet sind, schwierig macht. Um trotzdem gezielt Antikörper gegen Haptene zu erhalten, können diese an Trägermoleküle gebunden werden. Die erhaltenen Antikörper binden auch an die freien Haptene.<sup>78</sup>



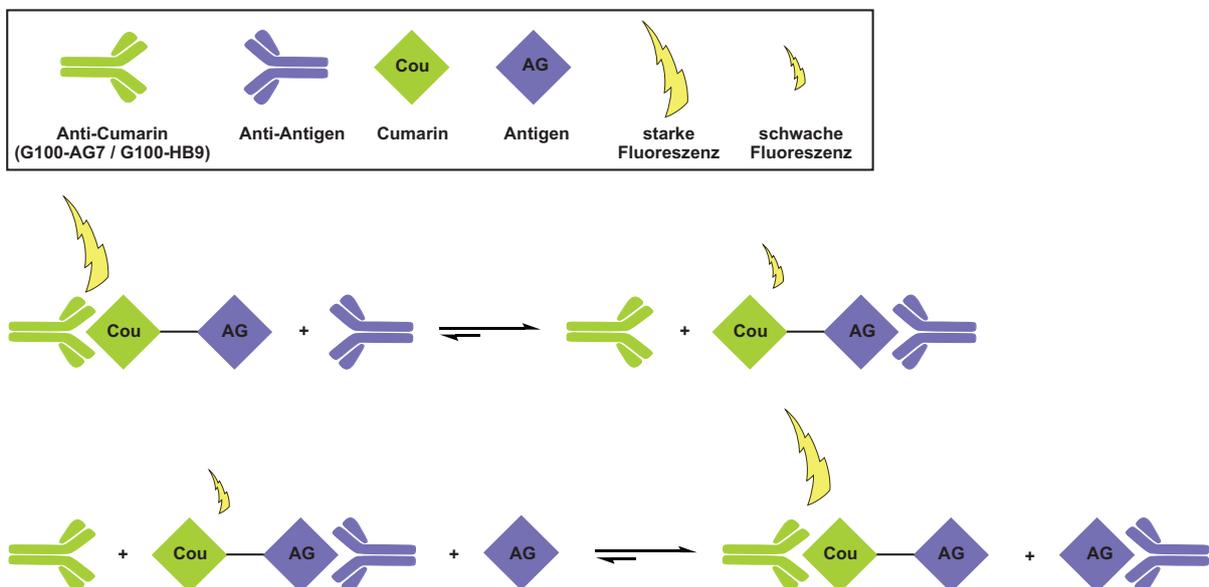
**Abbildung 2.14:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Antikörpers

Antikörper binden mit ihrer Bindungsregion, dem Paratop (siehe Abbildung 2.14) an das Epitop des Antigens bzw. Haptens, relativ spezifisch nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Dies beschreibt die Funktion von zwei oder mehreren komplementären Strukturen, die räumlich zueinander passen müssen, um eine bestimmte biochemische Funktion erfüllen zu können.<sup>79</sup> Zwischen Antikörper und Antigen bilden sich normalerweise keine kovalenten Bindungen aus, sodass die Bindung dem Massenwirkungsgesetz unterliegt. Bei einer hohen Spezifität entsteht eine Vielzahl von elektrostatischen Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen. Bindet ein Antikörper außer dem Antigen, gegen das er eigentlich gerichtet ist, weitere Antigene, spricht man von Kreuzreaktivität. Diese kann durch Ähnlichkeiten in der Epitopstruktur erklärt werden und tritt häufig bei niedermolekularen Verbindungen auf.<sup>78,80</sup>

Homogene Fluoreszenzimmunassays unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern,

die gegen Fluorophore gerichtet sind, sind literaturbekannt.<sup>81</sup> Das Prinzip von kompetitiven Fluoreszenzimmunassays verwendet zwei Antikörper: der eine bindet den Analyten und der andere bindet den Fluorophor, während durch Bindung des Fluorophors die Fluoreszenz gelöscht wird. Ein Konjugat, bestehend aus dem Analyten und dem Fluorophor, ist durch einen der Antikörper gebunden. Die Bindung von beiden Antikörpern gleichzeitig ist aufgrund der sterischen Hinderung nicht möglich. Wenn die Probe zugegeben wird, ändert der Analyt aus dieser Probe das Gleichgewicht der beiden Antikörperbindungen an das Konjugat und die Menge an Analyt kann aus der Änderung der Fluoreszenzintensität berechnet werden. Dieses Prinzip wurde bereits mit polyklonalen Antikörpern bewiesen.<sup>82,83</sup>

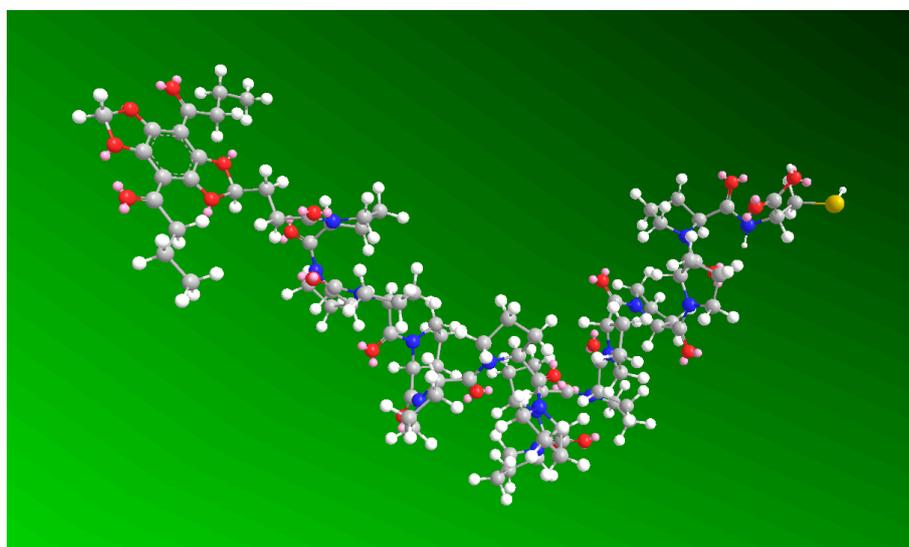
Während das Löschen der Fluoreszenz durch die Antikörperbindung häufig beobachtet wird, scheint die Erhöhung der Fluoreszenz ein sehr seltenes Ereignis zu sein. Es gibt jedoch einige wenige Antikörper gegen Rhodaminfarbstoffe<sup>9</sup> und ein fluoreszierendes Nukleotidanalogen,<sup>10</sup> bei denen die Bindung des Antikörpers zu einer Verbesserung der Fluoreszenz und einer Verschiebung der Fluoreszenz führte.<sup>84</sup> Eine Schematische Darstellung für ein konkurrenzfähiges FIA auf der Basis der Fluoreszenzverstärkung zeigt Abbildung 2.15.



**Abbildung 2.15:** Schematische Darstellung eines fluoreszenzverstärkenden Immunassays

## 2.7 Polyproline

L-Prolin wird im menschlichen Körper z. B. für die Bildung von Kollagen benötigt, um Bindegewebe und Knochen aufzubauen. Häufig wird es als „Helixbrecher“ bezeichnet und findet sich oft am Übergang einer Alpha-Helix zu einer anderen Sekundärstruktur wieder.<sup>85</sup> Mehrere Proline in einer Reihe können eine Polyprolinhelix erzeugen. Eine Polyprolinhelix ist eine Art von Proteinsekundärstruktur, die in Proteinen mit wiederholenden Prolinresten auftritt. Eine linksdrehende Polyprolin-II-Helix wird gebildet, wenn die sequentiellen Reste alle Rückgrat-Diederwinkel von etwa  $-75^\circ - 150^\circ$  annehmen und sie trans-Isomere der Peptidbindungen haben. Die Polyprolin-II-Helix hat drei Prolin-einheiten pro Umdrehung und der Anstieg pro Rest beträgt ca. 3,1 Å. Sie ist relativ offen und hat keine internen Wasserstoffbrückenbindungen, im Gegensatz zu den allgemeineren helixförmigen Sekundärstrukturen, wie z.B. der  $\alpha$ -Helix. Die Amid-Stickstoff- und Sauerstoffatome sind zu weit auseinander (ca. 3,8 Å) und sind für eine Wasserstoffbrückenbindung falsch ausgerichtet. Darüber hinaus sind diese Atome beide Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren. Deshalb gibt es, aufgrund der zyklischen Seitenkette, keinen Wasserstoffbrückenbindungsdonoren.<sup>86</sup>



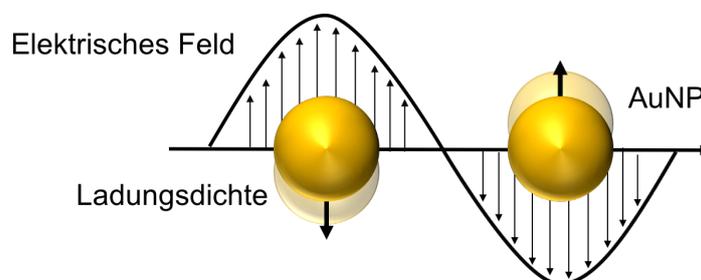
**Abbildung 2.16:** 3D-Darstellung der Strukturformel eines Polyprolins mit 14 Prolin-einheiten und Cystein an dem einen, sowie DBD an dem anderen Ende

Polyproline wurden erstmals im Rahmen von FRET in der Arbeit von Stryer und Haugland eingesetzt, die experimentell die Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz untersuchten und dabei das Polyprolin als starren Stab annahmen.<sup>38</sup> Für die längeren Polyproline (mehr als 12 Prolin-einheiten) sind jedoch die End-to-End-Abstandsverteilungen, die aus Langevin-Molekulardynamiksimulationen erhalten wurden, nicht die eines starren Stabes, sondern sind viel mehr wie die Verteilungen einer wurmartigen Kette. Im Bereich

der kleinen Peptidlängen, die von Stryer und Haugland (bis zum Dodecamer) verwendet werden, kann ein Polyprolin durch einen starren Stab angenähert werden.<sup>87</sup>

## 2.8 Goldnanopartikel

Im Jahre 1908 löste Gustav Mie die Maxwellgleichungen für die Wechselwirkung der elektromagnetischen Lichtwelle mit kleinen metallischen Kugeln (z.B. Teilchen, die kleiner als die Wellenlänge des Lichts sind), wie zum Beispiel mit Goldnanopartikeln.<sup>88</sup> Wenn die Leitungselektronen in einem kleinen Teilchen einem externen Antriebsfeld unterworfen werden, beginnen die Leitungselektronen zu oszillieren. Diese oszillierenden Elektronen können wiederum elektromagnetische Strahlung erzeugen. Dieser Vorgang wird als Streuung bezeichnet. Das Teilchen kann auch die Energie des Anregungslichts absorbieren. Die totale Extinktion des Lichtstrahls durch das Partikel enthält Beiträge der Streu- und Absorptionsvorgänge. Die Effizienz der Extinktion ist daher die Summe der Absorptions- und Streueffizienz. Dieses Merkmal kann durch Spektroskopie mit dem Vorhandensein von Absorptionsbanden, der sogenannten Oberflächenplasmonenbanden, im sichtbaren Bereich nachgewiesen werden. Darüber hinaus kann die Extinktionseffizienz (Streu- und Absorptionserscheinungen) von Goldnanopartikeln (AuNP) so intensiv sein, dass ihre Detektion auch bei extrem niedrigen Konzentrationen möglich wird.<sup>89,90</sup>



**Abbildung 2.17:** Schematische Darstellung der Oberflächenplasmonenresonanz<sup>91</sup>

Bei der Oberflächenplasmonenresonanz werden durch longitudinal einfallendes Licht die Elektronen der äußeren Schalen angeregt. Da es bei den Goldnanopartikeln keine ausgedehnten Leitungsbänder gibt, handelt es sich um eine lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz. Die Anregung findet durch polarisiertes Licht statt, das parallel zur Einfallsebene auf die Nanopartikel trifft. Das einfallende Licht induziert einen Dipol und es kommt zu einer Ladungsinduzierung an der Oberfläche des Nanopartikels. Diese wirkt als rückstellende Kraft und es wird ein oszillierender Prozess hervorgerufen.<sup>92</sup> Die Oberflächenplasmonenbande von Goldnanopartikeln wird durch mehrere Faktoren wie die Größe, die Form, die Dielektrizitätskonstante der Umgebung und die Anwesenheit von benach-

barten Partikeln beeinflusst.<sup>93–97</sup> Außerdem können die Oberflächenplasmonenbanden und das von den Nanopartikeln erzeugte elektrische Feld stark mit einem nahe gelegenen Farbstoff, der zum Beispiel an die Oberfläche gekoppelt wurde, wechselwirken, sodass seine optischen Eigenschaften wie Fluoreszenzintensität, Abklingzeit und Quantenausbeute verändert werden.

Heutzutage wird eine breite Palette von Nanostrukturen beschrieben bei denen es möglich ist, die spektrale Überlappung zwischen der Oberflächenplasmonenbande und der Emission eines Farbstoffs zu nutzen.<sup>98–102</sup> Das Hauptziel ist die Gestaltung von hybriden Nanoobjekten mit neuen photophysikalischen Eigenschaften, die ein breites Spektrum an Möglichkeiten in den Bereichen Photonik, Katalyse und Biologie bieten.<sup>103–105</sup>

Im Falle eines nanopartikelbasierenden Oberflächenenergie transfer (NSET, engl. nanoparticle-based surface energy transfer),<sup>106</sup> einem Energietransfer zwischen Metallnanopartikel und Farbstoffmolekül, kann anhand des Perssonmodells der Abstand zwischen Donor (Farbstoff) und Akzeptor (AuNP) nach Gleichung 2.28 berechnet werden.<sup>107</sup>

$$d_0 = \left( \frac{0,255c^3\phi_D}{\omega_d^2\omega_F k_F} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (2.28)$$

Hierbei ist  $d_0$  der Abstand zwischen Farbstoff und Nanopartikel, bei dem ein Farbstoff die gleiche Wahrscheinlichkeit für die Energieübertragung und die spontane Emission zeigt. Hier ist  $\phi_D$  die Quantenausbeute des Donorfarbstoffs,  $\omega_d$  die Frequenz des elektronischen Donorübergangs,  $\omega_F$  die Fermifrequenz und  $k_F$  der Fermiwellenvektor des Metalls.<sup>108</sup>

Die Quanteneffizienz der Energieübertragung im Oberflächenenergie transferprozess kann nach Gleichung 2.29 beschrieben werden. Dabei ist  $d$  der Abstand zwischen Donorfarbstoff und Akzeptormetall.<sup>109</sup>

$$\phi_D = \frac{1}{1 + \left( \frac{d}{d_0} \right)^4} \quad (2.29)$$

Wegen der starken Affinität zwischen Gold und Schwefel können Goldnanopartikel mit organischen Molekülen, die Schwefelatome, z.B. als Thiole, tragen, leicht funktionalisiert und stabilisiert werden.<sup>110–112</sup> Da die Wechselwirkungen von fluoreszierenden Farbstoffen mit einer metallischen Oberfläche ihre photophysikalischen Eigenschaften stark beeinflussen, ist die genaue Kontrolle und das Verständnis solcher Wechselwirkungen im Fokus vieler Arbeiten, die zu einer großen Anzahl an Veröffentlichungen über das Löschen<sup>113–116</sup> oder Verstärken<sup>117–119</sup> der Fluoreszenz führten.

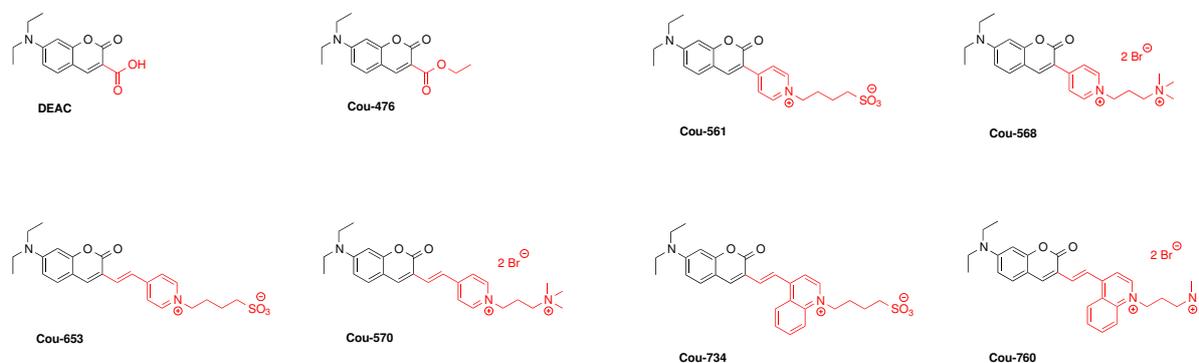


# 3 Materialien und Methoden

## 3.1 Materialien und Probenvorbereitung

### 3.1.1 7-Aminocumarine und Antikörper

Für die stationären als auch für die zeitaufgelösten Messungen wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 3 mm (Hellma GmbH) verwendet. Es wurden je 150  $\mu\text{L}$  Probenvolumen hergestellt. Dieses bestand aus einer  $10^{-4}$  M Lösung des Fluorophors in DMSO (2  $\mu\text{L}$ ), der Antikörperlösung in PBS (0  $\mu\text{L}$  (Referenzproben), 20  $\mu\text{L}$  (G100-HB9, G100-AG7) und einem entsprechenden Volumen an PBS. Die Proben wurden in kleinen Eppendorfgefäßen vorbereitet. Dabei wurde zunächst der Farbstoff in PBS vorgelegt und die Antikörperlösung hinzugegeben. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnten die Proben vermessen werden.



**Abbildung 3.1:** Strukturformeln der verwendeten 7-Aminocumarine

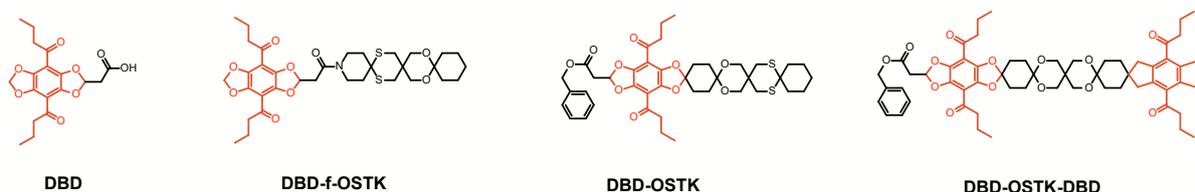
Die Strukturformeln der verwendeten 7-Aminocumarine sind in Abbildung 3.1 dargestellt und die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

**Tabelle 3.1:** Liste der verwendeten Chemikalien im Zusammenhang mit den 7-Aminocumarinen

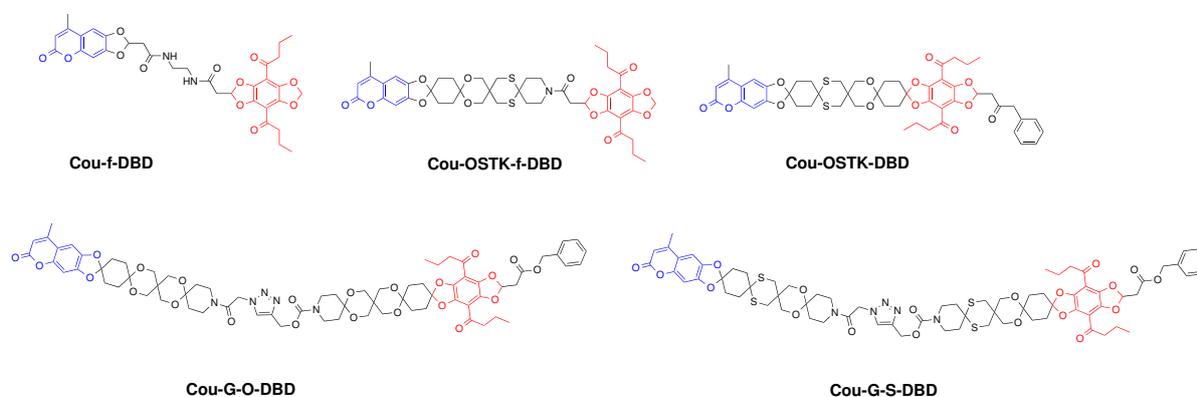
Verbindung	Abkürzung	Hersteller	Reinheit
Phosphatpuffer	PBS	Amresco LLC	Biotech. Grad
Dichlormethan	DCM	Carl Roth GmbH & Co. KG	≥ 99,9 %
Methanol		Carl Roth GmbH & Co. KG	≥ 99,9 %
monoklonaler Antikörper	G100-AG7	Sellrie et al. <sup>a</sup>	
monoklonaler Antikörper	G100-HB9	Sellrie et al. <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>Hybrotec GmbH, Am Mühlenberg 11, 14476 Potsdam

### 3.1.2 OSTK-Stäbe

**Abbildung 3.2:** Strukturformeln der DBD-OSTK-Stäbe

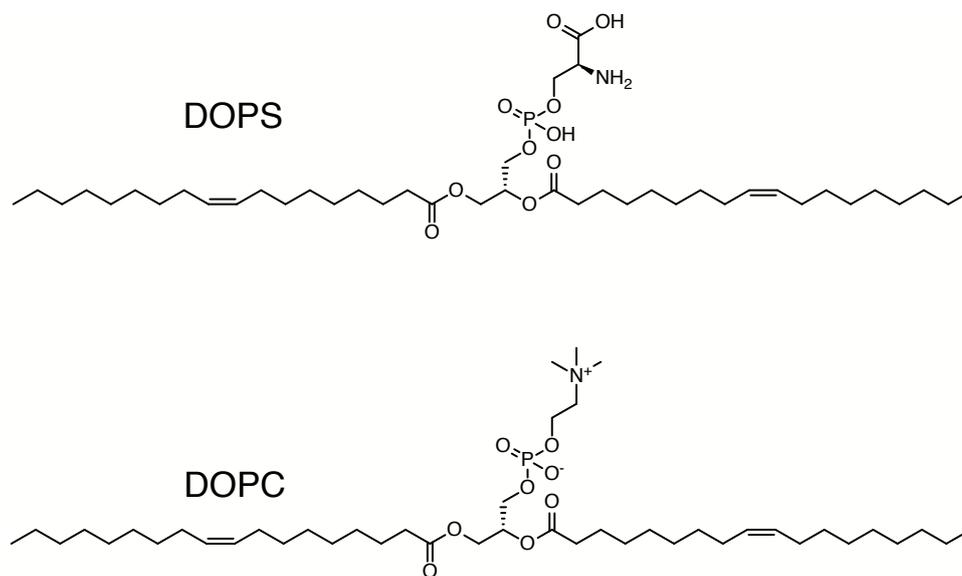
In Abbildung 2.12, 3.2 und 3.3 sind die Strukturen der verwendeten OSTK-Stäbe und ihrer Vorläufer zu sehen. Die Cumarineinheit ist jeweils blau und die DBD-Einheit rot markiert. Die Farbstoffe wurden von Nicole Behrends aus der Arbeitsgruppe von Prof. Wessig synthetisiert.<sup>74</sup> Für die Untersuchungen in verschiedenen Lösungsmitteln wurden Konzentrationen von  $10^{-5}$  M verwendet. Die stationären und zeitaufgelösten Messungen wurden in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm (Hellma GmbH) durchgeführt. Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

**Abbildung 3.3:** Strukturformeln der FRET-Paare mit Cou (blau) als Donor und DBD (rot) als Akzeptor

**Tabelle 3.2:** Liste der verwendeten Chemikalien im Zusammenhang mit den OSTK-Stäben

Verbindung	Abkürzung	Hersteller	Reinheit
Phosphatpuffer	PBS	Amresco LLC	Biotech. Grad
Aceton		Carl Roth GmbH & Co. KG	$\geq 99,9\%$
Chloroform	$\text{CHCl}_3$	Carl Roth GmbH & Co. KG	$\geq 99,9\%$
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	DOPC	Avanti Polar Lipids	$> 99,0\%$
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin	DOPS	Avanti Polar Lipids	$> 99,0\%$

**Vesikelpräparation** Die Phospholipide 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DOPC) und 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin (DOPS) (siehe Abbildung 3.4) von Avanti Polar Lipids, Inc. wurden für die Herstellung der großen unilamellaren Vesikel (LUV) verwendet. Es wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mg/mL in Chloroform hergestellt. Die Stammlösungen der OSTK-Stäbe wurden in Chloroform und Aceton mit einer Konzentration von  $10^{-3}$  M hergestellt.

**Abbildung 3.4:** Strukturformeln der verwendeten Phospholipide DOPS und DOPC

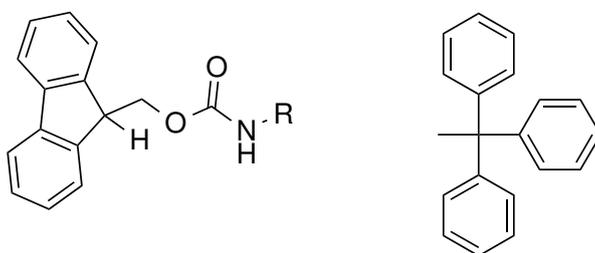
Zur Herstellung der LUV-Proben wurde zunächst ein Lipidfilm aus DOPC und DOPS im Verhältnis 4:1 hergestellt. Dafür wurden 100  $\mu\text{L}$  der DOPS-Stammlösung zu 400  $\mu\text{L}$  einer DOPC-Stammlösung pipettiert und mit 500  $\mu\text{L}$  Chloroform verdünnt. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  der OSTK-Stammlösung wurde das Gemisch durch Schütteln vermischt und im Stickstoffstrom getrocknet. Zur gründlichen Entfernung des Chloroforms wurde der Lipidfilm eine Stunde unter Hochvakuum getrocknet. Der Lipidfilm wurde in 2 mL PBS aufgenommen, sodass die resultierende Gesamtlipidkonzentration 2,5 g/L und 3,15 mol/L betrug.

Die Mischung wurde in einem Trockenofen bei 40°C für 1 Stunde erwärmt. Anschließend wurden 5 *freeze-and-thaw*-Zyklen durchgeführt und die Lösung dann mindestens 35 Mal durch eine Membran mit einem Porendurchmesser von 100 nm eines Mini-Extruders (Avanti Polar Lipids) gepresst. Die resultierende Farbstoffkonzentration betrug  $5 \cdot 10^{-7}$  M.

### 3.1.3 Polyproline

**Peptidsynthese** Die synthetisierten Polyproline wurden als Cys-x-Pro-Cou bzw. Cys-x-Pro-DBD bezeichnet. Cys bezeichnet die Cysteineinheit, x steht für die jeweilige Anzahl an Prolineinheiten und Cou bzw. DBD zeigt an, mit welchem Farbstoff das Peptid funktionalisiert wurde.

Für die Festphasensynthese von Cys-5-Pro-Cou (siehe Abbildung 3.6) wurde 1 g eines Wang-Harzes, das mit 0,7 mmol Fmoc-Cys(Trt) beladen war, verwendet. In einem für die Peptidsynthese geeigneten Gefäß wurde das Harz 3 Minuten unter Schütteln in 10 mL DMF (Dimethylformamid) gequollen und das Lösungsmittel im Anschluss entfernt. Zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe (siehe Abbildung 3.5 links) wurde das Harz in 10 mL einer 20%igen Piperidinlösung in DMF 5 Minuten geschüttelt und dieser Schritt noch einmal mit 10 mL der Abspalllösung für 15 Minuten wiederholt. Anschließend wurde das Harz fünfmal mit je 10 mL DMF durch einminütiges Schütteln gewaschen.



**Abbildung 3.5:** Strukturformeln der Fmoc- (links) und der Trt-Schutzgruppe (rechts)

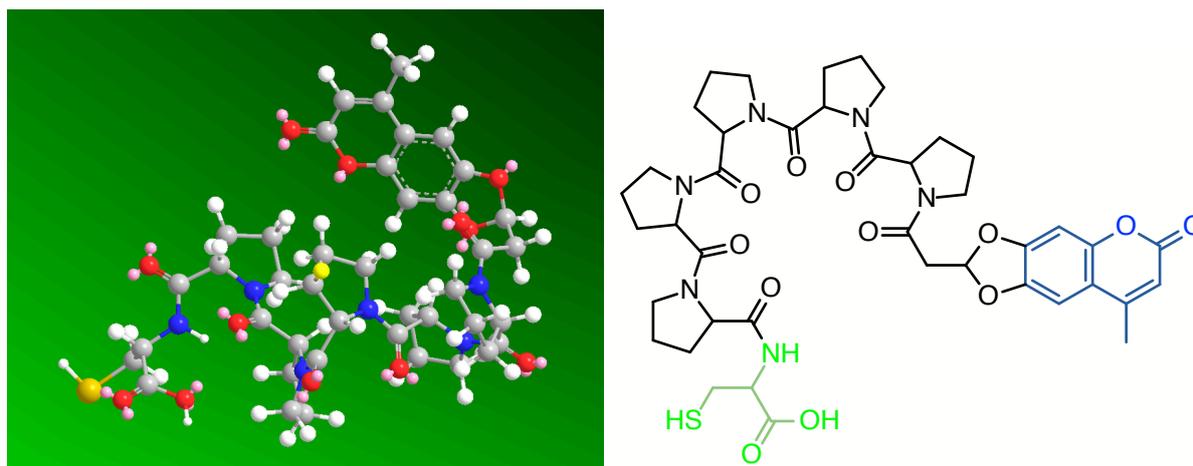
Je 1,4 mmol Fmoc-Prolin, TBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat) und HOBt (Hydroxybenzotriazol) wurden in 10 mL DMF gelöst und zu dem Harz in das Schüttelgefäß gegeben. Dazu wurden außerdem 3,5 mmol DIPEA (Diisopropylethylamin) gegeben und das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde geschüttelt. Nach Entfernen der Reaktionslösung wurde das Harz fünfmal mit je 10 mL DMF gewaschen.

Für die weiteren Kupplungen wurde bisher Beschriebenes, begonnen mit dem Schritt des Abspaltens der Fmoc-Schutzgruppe, fünfmal wiederholt. Dabei war zu beachten, dass im letzten Schritt anstatt Fmoc-Prolin, 1,4 mmol Cou verwendet wurde. Zum Schluss wurde das Harz dreifach mit 10 mL DCM (Dichlormethan) gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet.

Nach jeder Kupplung wurde die Beladung des Harzes getestet. Dafür wurde 1 mg des Harzes aus dem Reaktionsgefäß entnommen und mit 3 mL der Abspalllösung behandelt. Von dieser Lösung wurde die Absorption von Prolin und somit die Extinktion bei 290 nm ( $\epsilon = 5253 \frac{\text{L}}{\text{mol cm}}$ ) gemessen und die Beladung nach Gleichung 3.1 bestimmt.

$$\text{Beladung} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{E(290 \text{ nm})}{m[\text{mg}] \cdot 1,75} \quad (3.1)$$

Die Abspaltung der Trt-Schutzgruppe (siehe Abbildung 3.5 rechts) sowie die Abspaltung der Peptids vom Harz erfolgten in einem Schritt über drei Stunden unter Schütteln mit 5 mL einer Abspalllösung aus TFA, TIS, Wasser und EDT in dem Verhältnis 94:1:2,5:2,5. Das Produkt konnte durch Absaugen in einen Schlenkkolben vom Harz getrennt werden. Zur vollständigen Abspaltung des Produkts wurde das Harz anschließend zweimal mit je 4 mL TFA gewaschen.



**Abbildung 3.6:** Strukturformel von Cys-5-Pro-Cou als 3D-Struktur (links) und als 2D-Struktur mit Cystein (grün) und Cumarin (blau) (rechts)

Das Produkt wurde aus dem Schlenkkolben in 100 mL kalten Diethylether überführt und 30 Minuten mit einem Eisbad gekühlt. Die Suspension wurde dann 30 Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert, das Lösungsmittel abdekantiert und der Feststoff erneut in Diethylether aufgenommen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Das isolierte Produkt wurde im Hochvakuum getrocknet.

Die anderen Polyproline wurden ähnlich, und zum großen Teil von Nicole Behrends aus der Arbeitsgruppe von Prof. Wessig, hergestellt. Je nach Kettenlänge wurde der Kupplungsschritt entsprechend oft wiederholt. Für die DBD-Proline, wurde anstelle von Cou DBD verwendet. Alle verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

**Goldnanopartikel** Zur Kupplung der Polyproline an Goldnanopartikel (AuNP) wurde nach dem Protokoll von Prinz et al. vorgegangen.<sup>120,121</sup> Dafür wurden in einem Eppendorfggefäß 22 µL einer 10<sup>-4</sup> M Stammlösung des Peptids in PBS vorbereitet. Dazu wurden 25 µL phosphinierte AuNP (5 nm) und 2,5 µL 10fach TAE gegeben. In Alufolie gehüllt wurde die Mischung für eine Stunde geschüttelt. Anschließend wurden 0,5 µL einer 0,2 M NaOH dazugegeben und eine Woche lang geschüttelt.

Dann wurde die Mischung in einen Zentrifugenfilter mit einer Porengröße von 100 kDa überführt, 100 µL 1fach TAE zugegeben und 10 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Weitere viermal wurden 200 µL 1fach TAE zugegeben und wiederum 10 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Filter umgedreht und das Produkt, durch 7 minütiges Zentrifugieren bei 7000 rpm, in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Zum Vermessen der Proben wurden sie jeweils mit 1 mL PBS verdünnt. Alle verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

**Tabelle 3.3:** Liste der verwendeten Chemikalien im Zusammenhang mit den Polyprolinen

Verbindung	Abkürzung	Hersteller	Reinheit
Fmoc-Cys(Trt)-Wang-Harz (0,7 mmol/g)		Sigma-Aldrich	
Dimethylformamid	DMF	Sigma-Aldrich	≥ 99,9 %
Piperidin		Sigma-Aldrich	≥ 99,9 %
Fmoc-Prolin		Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %
O-(Benzotriazol-1-yl)- N,N,N',N'-tetramethyl- uronium tetrafluoroborat	TBTU	Sigma-Aldrich	≥ 98,0 %
Hydroxybenzotriazol	HOBt	Sigma-Aldrich	≥ 97,0 %
Diisopropylethylamin	DIPEA	Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %
Dichlormethan	DCM	Carl Roth GmbH & Co. KG	≥ 99,9 %
Farbstoff	Cou	Nicole Behrends <sup>a</sup>	
Farbstoff	DBD	Nicole Behrends <sup>a</sup>	
Trifluoressigsäure	TFA	Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %
Triisopropylsilan	TIS	Sigma-Aldrich	≥ 98,0 %
Ethandithiol	EDT	Sigma-Aldrich	≥ 98,0 %
Diethylether		Carl Roth GmbH & Co. KG	≥ 99,9 %
Phosphatpuffer	PBS	Amresco LLC	Biotech. Grad
5 nm Goldnanopartikel	AuNP	BBI Solutions	
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG	≥ 99,0 %
Natriumhydroxid	NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG	≥ 99,0 %

<sup>a</sup>Professur für Bioorganische Chemie, Universität Potsdam

## 3.2 Spektroskopische Methoden

### 3.2.1 Stationäre Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie

Die Absorptionsspektren wurden in einem Zweistrahlabsorptionsspektrometer Lambda 750 (Perkin Elmer) aufgenommen. Vor den Messungen der Proben wurde eine Basislinienkorrektur mit Luft gegen Luft, sowie die Messungen der jeweiligen Lösungsmittel gegen Luft, durchgeführt. Die Proben wurden anschließend ebenfalls gegen Luft vermessen und der Untergrund des Lösungsmittels wurde anschließend herausgerechnet.

Die stationären Fluoreszenzmessungen wurden bei 21°C an einem Fluoromax-4 (Horiba Jobin Yvon GmbH) durchgeführt.

Die Fluoreszenzspektren wurden im 90°-Winkel zu dem Anregungslicht aufgenommen und sowohl mit einem Referenzsignal als auch durch eine Quantenkorrektur korrigiert.

Für die Fluoreszenzanisotropiemessungen wurden die Proben mit vertikal polarisiertem Licht angeregt, das jeweils horizontal und vertikal detektiert wurde. Mit Gleichung 3.2 wurde ein Gerätefaktor bestimmt. Dafür wurden die Proben mit horizontal polarisiertem Licht angeregt und die Fluoreszenz vertikal ( $i_{\perp}$ ) und horizontal ( $i_{\parallel}$ ) detektiert. Die Anisotropie wurde nach Gleichung 2.18 berechnet.

$$G = \frac{i_{\perp}}{i_{\parallel}} \quad (3.2)$$

Die Quantenausbeuten  $\phi$  wurden mit einem Photolumineszenzquantenausbeutemesssystem (C9920, Hamamatsu Photonics) unter Verwendung einer Ulbrichtkugel für eine integrierte Emissionsintensitätssammlung bestimmt. Die Proben, mit einer OD = 0,1, wurden jeweils im Absorptionsmaximum angeregt. Die Daten wurden mit dem kommerziellen Softwarepaket von Hamamatsu analysiert.

### 3.2.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die zeitaufgelösten Messungen wurden mit der Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) durchgeführt.<sup>122</sup> Dafür wurde ein Spektrofluorometer FL920 (Edinburgh Instruments) mit einer Vielkanalplatte (MCP, engl. multi channel plate) (Europhoton) und der Software F900 verwendet. Für die Anregungen bei  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  nm wurde ein gepulster Diodenlaser EPL-375 (Edinburgh Instruments) mit einer Repetitionsrate von 10 MHz verwendet. Außerdem wurde für die Anregungen ab  $\lambda_{\text{ex}} = 400$  nm eine Weißlichtquelle SC450-AOTF (Fianium) mit einer Repetitionsrate von 5 MHz bis 20 MHz genutzt. Das Emissionslicht wurde im 90°-Winkel zur Anregung gemessen.

Für die Fluoreszenzabklingzeiten wurden die Proben mit vertikal polarisiertem Licht angeregt und das Signal unter *Magic-Angle*-Bedingungen ( $54,8^\circ$ ) gemessen. Dadurch wird das Signal unabhängig von der Anisotropie.<sup>122</sup> Die erhaltenen Fluoreszenzabklingkurven  $I(t)$  wurden unter Verwendung der IRF (engl. instrument response function), die mithilfe einer Streuprobe aufgenommen wurde, mit der *FAST*-Software (Edinburgh Instruments) entfaltet und mit Gleichung 3.3 mono- oder biexponentiell ( $n = 2$ ) angepasst.

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) + \text{const.} \quad (3.3)$$

Es wurden Abklingzeiten  $\tau_1, \tau_2$  erhalten. Bei mehreren Komponenten kann mit Gleichung 3.4 und den Amplituden  $\alpha$  der Anteil der jeweiligen Komponente an der Fluoreszenzabklingzeit bestimmt werden.

$$A_i = \frac{\alpha_i \cdot \tau_i}{\sum_{j=1}^n \alpha_j \cdot \tau_j} \quad (3.4)$$

Für die zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiekurven wurde der Gerätefaktor  $G$  nach Gleichung 3.5 bestimmt. Dafür wurden die Proben mit horizontal polarisiertem Licht angeregt und die Fluoreszenzemission horizontal ( $i_{||}(t)$ ) und vertikal ( $i_{\perp}(t)$ ) je 1200 Sekunden lang gemessen.

$$G = \frac{i_{\perp}(t)}{i_{||}(t)} \quad (3.5)$$

Die Fluoreszenzanisotropie  $r(t)$  wurde nach Gleichung 2.21 bestimmt, wofür die Proben je 1200 Sekunden lang mit vertikal polarisiertem Licht angeregt wurden und die Fluoreszenzemission vertikal ( $I_{||}(t)$ ) und horizontal ( $I_{\perp}(t)$ ) detektiert wurde.

### 3.2.3 Transienten-Absorptionsspektroskopie

Für die Anregung wurde ein Ti:Saphir-Laser (Spectra-Physics Spitfire Pro 35) verwendet, der mit einer Repetitionsrate von 1 kHz arbeitet und 35 fs-Impulse erzeugt, die um 800 nm zentriert sind. Lichtimpulse von 1 mJ wurden in das TTA-Spektrometer (TAS, Newport) geleitet. Bei einem *Pump-Probe*-Experiment wurde die Probe durch einen 400 nm fs-Puls angeregt, der durch Frequenzverdopplung mit einem SHG-Kristall erzeugt wurde und als Pumpimpuls bezeichnet wird. Dies führte zu Änderungen des Absorptionsspektrums der Probe, die anschließend als Funktion der Zeit durch den Weißlicht-Superkontinuums-Probenpuls überwacht wurden. Das Weißlicht wurde mit einem  $\text{CaF}_2$ -Kristall im TAS

erzeugt. Die Spektren wurden mit zunehmender Zeitverzögerung relativ zu dem Pumpimpuls in Schritten von 10 fs für die ersten 5 ps und 100 fs für die nächsten 45 ps sowie 1 ps-Schritte für eine Gesamtverzögerung von 1 ns gemessen. Die *Pump-Probe*-Experimente wurden in Küvetten mit 1 mm optischer Weglänge bei einer  $OD_{400} = 0,4$  durchgeführt.

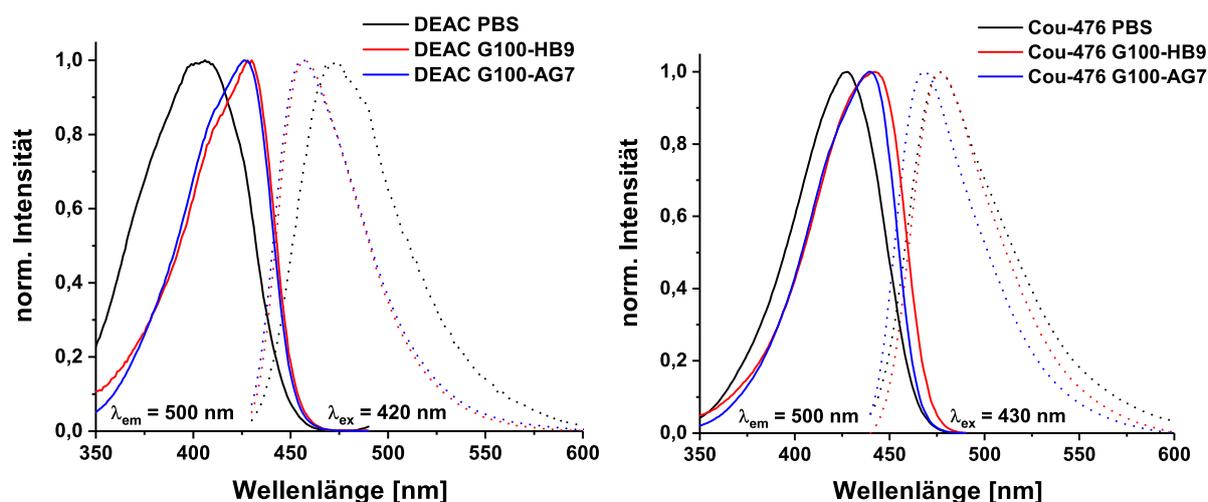


## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 7-Aminocumarine und Antikörper

DEAC (7-(Diethylamino)cumarin-3-carboxylsäure) wurde als Ausgangsverbindung für die Erzeugung der monoklonalen Antikörper (mAb) G100-HB9 und G100-AG7 verwendet. Die anderen in Abbildung 3.1 dargestellten 7-Aminocumarine sind ebenfalls mit einer Diethylaminogruppe funktionalisiert, die als Epitopstruktur von den Antikörpern erkannt wird, und tragen in 3-Position unterschiedliche Gruppen (siehe Abbildung 3.1). Durch diese Funktionalisierung wurde die spektrale Position des jeweiligen Fluoreszenzemissionsmaximums in einem großen Spektralbereich von  $470 \text{ nm} < \lambda_{\text{max,em}} < 760 \text{ nm}$  variiert. Hierbei sollten die Auswirkungen der Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der verschiedenen 7-Aminocumarine, wie z.B. die elektronische Struktur, die sterische Hinderung oder die Ladung, auf die Bindung der mAbs, die anfänglich gegen DEAC gerichtet waren, durch die Beobachtung der Änderung der photophysikalischen Eigenschaften, untersucht werden. Aus Fluoreszenzdepolarisationsmessungen wurde die Anisotropie berechnet und zur Kontrolle der Bindung der mAbs an die verschiedenen 7-Aminocumarine verwendet. Die Bindung sollte ferner aus qualitativer Sicht charakterisiert werden, wobei die Position der Absorptions- und Emissionsmaxima sowie eine Fluoreszenzlöschung oder -verstärkung verglichen wurden.

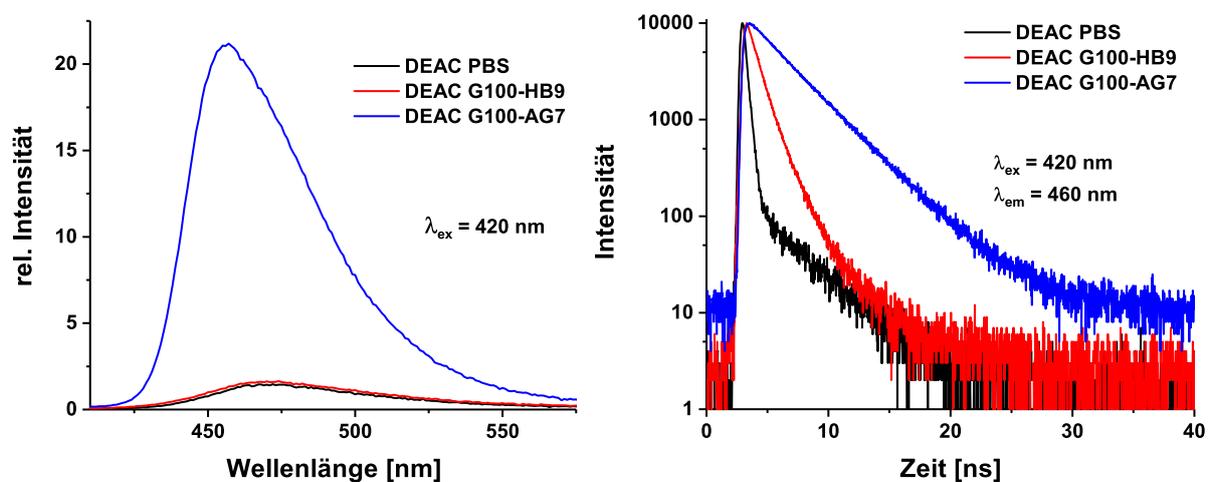
Die photophysikalischen Eigenschaften von 7-Aminocumarinen hängen stark von der Polarität, der Viskosität, dem pH-Wert und der Wasserstoffbrückenbindungsfähigkeit der Mikroumgebung ab. Daher sind sie von großem Interesse für (bio-)chemische Sensoranwendungen.<sup>9,10</sup> Das grundlegende Prinzip hinter der beobachteten Photophysik ist, wie bereits erläutert, dass der angeregte Zustand bei elektronischer Anregung einen intramolekularen *charge-transfer*-Zustand (*ICT*) bildet, der durch den *Push-Pull*-Charakter des konjugierten Systems zustande kommt.<sup>40</sup> Als Besonderheit einiger 7-Aminocumarinderivate kann sich die Aminogruppe einer zusätzlichen inneren Rotation bei der Photoanregung unterziehen. Diese ist abhängig von der Möglichkeit der jeweiligen Gruppe Elektronen aufzunehmen bzw. abzugeben, was zu einer vollständigen Ladungstrennung durch ein senkrecht orientiertes Donororbital, in Bezug auf die Orbitale des Akzeptors, führt.<sup>39,123</sup> Dies wird als *twisted-intramolecular-charge-transfer*-(*TICT*)-Zustand bezeichnet.



**Abbildung 4.1:** Fluoreszenzanregungs- (durchgezogen) und -emissionsspektren (gestrichelt) von DEAC ( $\lambda_{ex} = 420$  nm,  $\lambda_{em} = 500$  nm) (links) und Cou-476 ( $\lambda_{ex} = 430$  nm,  $\lambda_{em} = 500$  nm) (rechts) in PBS (schwarz) und mit mAb G100-HB9 (rot) und G100-AG7 (blau)

Seine Bildung wird in polaren Lösungsmitteln begünstigt und die anschließend erhöhte strahlungslose Relaxation führt zu einer Abnahme der Emission aus dem *ICT*-Zustand.<sup>124–126</sup>

Die Molekülstruktur von DEAC und Cou-476 ist sehr ähnlich (siehe Abbildung 3.1) und unterscheidet sich nur durch eine Ethylgruppe (Carboxylsäure verändert in einen Ethylester). Im Fall von DEAC ist der Einfluss von mAb G100-HB9 und G100-AG7 für die Fluoreszenzanregungs- sowie -emissionsspektren ähnlich (siehe Abbildung 4.1, links).



**Abbildung 4.2:** Fluoreszenzemissionsspektren ( $\lambda_{ex} = 420$  nm) (links) und Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{ex} = 420$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm) (rechts) von DEAC in PBS (schwarz) und mit mAb G100-HB9 (rot) und G100-AG7 (blau)

Während die Anregungsspektren bathochrom verschoben sind, wird in den Emissionsspektren eine hypsochrome Verschiebung gegenüber dem Farbstoff in PBS beobachtet. Infolgedessen ist die Stokesverschiebung von  $3533 \text{ cm}^{-1}$  in PBS auf  $1374 \text{ cm}^{-1}$  (G100-HB9) bzw.  $1592 \text{ cm}^{-1}$  (G100-AG7) verringert (siehe Tabelle 4.1). Abbildung 4.1 zeigt rechts die Fluoreszenzanregungs- ( $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ ) und -emissionsspektren ( $\lambda_{\text{ex}} = 430 \text{ nm}$ ) von Cou-476. Da im Vergleich zu DEAC nur eine zusätzliche Ethylgruppe in diesem Molekül vorhanden ist (siehe Abbildung 3.1) und deshalb nur ein kleiner Unterschied in Bezug auf die sterischen Ansprüche zu sein scheint, wurden weitere leichte Unterschiede in den beobachteten Parametern bei der Bindung an mAb G100-HB9 und an mAb G100-AG7 in Bezug auf die Stokesverschiebung und die Veränderung der Fluoreszenzeffizienz beobachtet (siehe Tabelle 4.2 und 4.1).

**Tabelle 4.1:** Spektroskopische Eigenschaften der 7-Aminocumarine DEAC und Cou-476 und deren jeweiligen Immunkomplexen mit mAb G100-HB9 und G100-AG7 mit  $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$  (DEAC) und  $\lambda_{\text{ex}} = 430 \text{ nm}$  (Cou-476) für  $\lambda_{\text{max,em}}$ . Die Abklingzeiten ( $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ ) wurden in *Pump-Probe*-Experimenten mit verbesserter Zeitaufösung bestimmt

	$\lambda_{\text{max,abs}} [\text{nm}]$ $\nu_{\text{max,abs}} [\text{cm}^{-1}]$			$\lambda_{\text{max,em}} [\text{nm}]$ $\nu_{\text{max,em}} [\text{cm}^{-1}]$		
	PBS	G100-HB9	G100-AG7	PBS	G100-HB9	G100-AG7
DEAC	406 24630	430 23256	426 23474	474 21097	457 21882	457 21882
Cou-476	428 23364	442 22624	442 22624	476 21008	476 21008	468 21368

	$\Delta\lambda [\text{nm}]$ $\Delta\nu [\text{cm}^{-1}]$			$\tau [\text{ns}]$		
	PBS	G100-HB9	G100-AG7	PBS	G100-HB9	G100-AG7
DEAC	68 3533	27 1374	31 1592	0,2	1,1	3,3
Cou-476	48 2356	34 1616	28 1256	0,2	0,7	2,2

Fehlerangaben:  $\sigma(\lambda) = \pm 2 \text{ nm}$ ,  $\sigma(\Delta\lambda) = \pm 2 \text{ nm}$ ,  $\sigma(\tau) = \pm 0,1 \text{ ns}$

Obwohl die Veränderung in der spektralen Positionen des Absorptions- und Emissionsmaximums durch die Bindung der mAb an DEAC für beide Antikörper gleich ist, sind die Fluoreszenzabklingkinetiken unterschiedlich (siehe Abbildung 4.2, rechts).

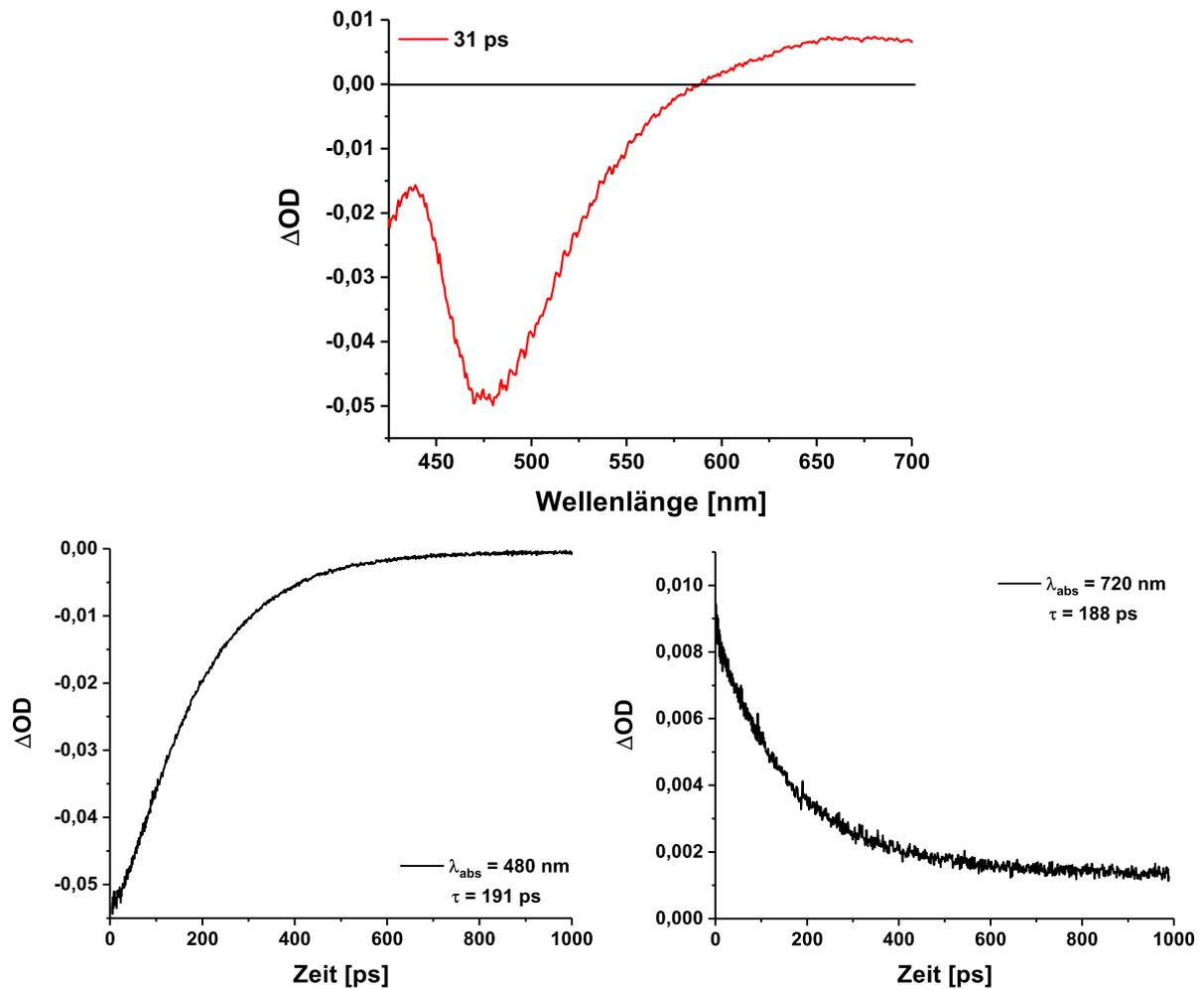
In Gegenwart der monoklonalen Antikörper wurde für beide mAb ein allgemeiner Trend beobachtet. Durch die Bindung an die Antikörper wurde eine Erhöhung der Fluoreszenzabklingzeit der Cumarine beobachtet. Für DEAC steigt sie von  $\tau = 0,2$  ns auf  $\tau = 1,1$  ns (G100-HB9) bzw.  $\tau = 3,3$  ns (G100-AG7) und für Cou-476 von  $\tau = 0,2$  ns auf  $\tau = 0,7$  ns (G100-HB9) bzw.  $\tau = 2,2$  ns (G100-AG7). Außerdem wurde die Fluoreszenz in Gegenwart des mAb verstärkt. Um diese Verstärkung zu quantifizieren wurden Fluoreszenzverstärkungsfaktoren bestimmt (siehe Abbildung 4.2, links und Tabelle 4.2). Diese wurde aus den Fluoreszenzintensitäten der Immunkomplexe relativ zu den Fluoreszenzintensitäten der freien Farbstoffe in PBS bestimmt. Die Auswirkung war am stärksten für die Bindung des Antikörpers G100-AG7. Hier wurde für DEAC und Cou-476 eine Erhöhung um die Faktoren 15,5 bzw. 46 bestimmt.

**Tabelle 4.2:** Faktoren für die Fluoreszenzverstärkung durch mAb G100-HB9 und G100-AG7, berechnet aus den Fluoreszenzintensitäten

	DEAC	Cou-476	Cou-561	Cou-568
G100-HB9	1,1	1,0	1,0	1,3
G100-AG7	15,5	46,0	30,0	45,0
	Cou-570	Cou-653	Cou-734	Cou-760
G100-HB9	1,2	2,0	2,0	1,8
G100-AG7	53,0	5,4	20,0	40,0

In Abwesenheit der mAb zeigte die Fluoreszenzkinetik für die Cumarine DEAC und Cou-476 einen sehr schnellen Verlauf ( $\tau = 0,2$  ns), was auf die gute Stabilisierung des *TICT*-Zustands in PBS zurückzuführen ist. Deshalb wurden für DEAC als Ausgangsverbindung komplementär zu den Fluoreszenzmessungen *Pump-Probe*-Versuche in einem TAS durchgeführt, um die Kinetik im angeregten Zustand mit einer höheren Zeitauflösung genauer zu analysieren. In Abbildung 4.3 (oben) ist das transiente Absorptionsspektrum von DEAC bei einer Verzögerungszeit von 31 ps nach dem Pumpimpuls dargestellt.

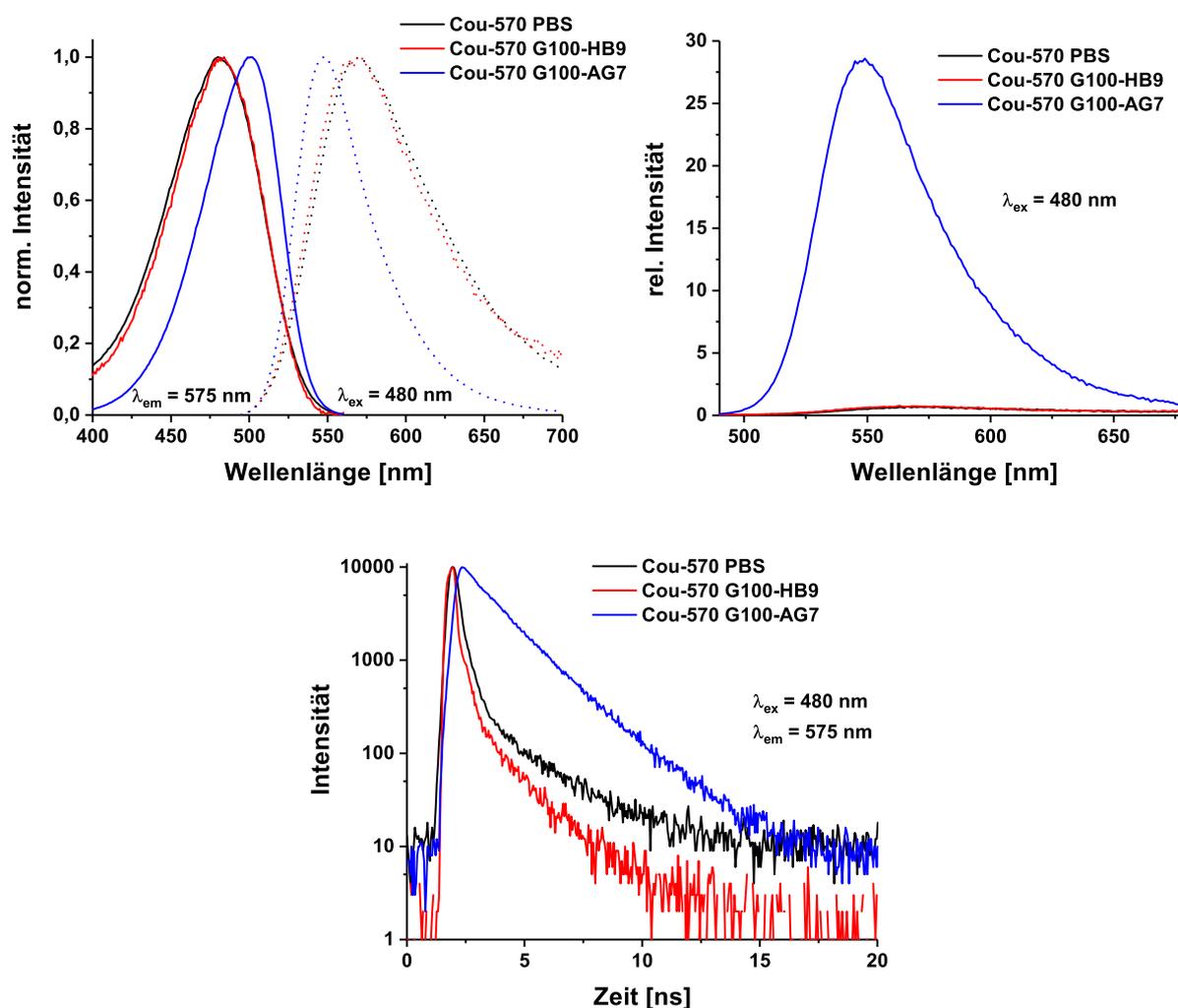
Zwei transiente Signale entsprechend der Fluoreszenz des *ICT*-Zustands (bei  $\lambda < 550$  nm) und ein weiteres kann dem *TICT*-Zustand bei  $\lambda > 600$  nm zugeschrieben werden. In Abbildung 4.3 (unten) sind die entsprechenden Kinetiken dargestellt, für die eine Abklingzeit von  $\tau = 190$  ps bestimmt wurde, die mit der schnellen Fluoreszenzabklingzeit für die freien Farbstoffe (DEAC und Cou-476) in PBS übereinstimmt. Ergänzend zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität wurden auch die Fluoreszenzabklingzeiten durch die mAb-Bindung erhöht. Für DEAC wurde eine Erhöhung um den Faktor 15 für die Bindung durch mAb G100-AG7 bestimmt, die in ausgezeichneter Übereinstimmung mit der beobachteten Intensitätsverstärkung ist.



**Abbildung 4.3:** TTA-Spektrum von DEAC in PBS nach 31 ps (oben) sowie Kinetiken bei  $\lambda_{\text{abs}} = 480 \text{ nm}$  (unten links) und  $\lambda_{\text{abs}} = 720 \text{ nm}$  (unten rechts)

### 4.1.1 Variation der Ligandeneigenschaften in 3-Position der Cumarine und ihr Einfluss auf die mAb-Bindung

In Abbildung 4.4 (oben links) sind die normierten Fluoreszenzanregungs- ( $\lambda_{em} = 575$  nm) und -emissionsspektren ( $\lambda_{ex} = 480$  nm) des 7-Aminocumarins Cou-570 in PBS (schwarz) und ihren jeweiligen Immunkomplexen mit den monoklonalen Antikörpern G100-HB9 (rot) und G100-AG7 (blau) dargestellt.



**Abbildung 4.4:** Fluoreszenzanregungs- ( $\lambda_{em} = 575$  nm) (durchgezogen) und -emissionsspektren ( $\lambda_{ex} = 480$  nm) (gestrichelt) (oben) und Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{ex} = 480$  nm,  $\lambda_{em} = 575$  nm) (unten) für Cou-570 in PBS (schwarz) und mit mAb G100-HB9 (rot) und G100-AG7 (blau)

Die Bindung von mAb G100-HB9 an Cou-570 hat keinen signifikanten (oder nur einen sehr geringen) Einfluss auf die spektrale Position bzw. auf die spektrale Intensitätsverteilung der Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektren. Durch die Bindung von

mAb G100-AG7 sind die Banden der Fluoreszenzanregungsspektren von Cou-570 um etwa 21 nm ( $873 \text{ cm}^{-1}$ ) bathochrom verschoben, während die Fluoreszenzemission um etwa 23 nm ( $738 \text{ cm}^{-1}$ ) hypsochrom verschoben ist. Infolgedessen wird die Stokesverschiebung von ca.  $3300 \text{ cm}^{-1}$  (in PBS und gebunden an mAb G100-HB9) auf ca.  $1700 \text{ cm}^{-1}$ , wenn mAb G100-AG7 gebunden ist, verringert (siehe Tabelle 4.3).

Aus den in Tabelle 4.3 zusammengefassten spektralen Daten der 7-Aminocumarine ist ersichtlich, dass es einen allgemeinen Trend gibt. Während der mAb G100-HB9 keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Stokesverschiebung im Vergleich zu PBS hat, wird durch die Bindung des mAb G100-AG7 eine deutliche Verringerung der Stokesverschiebung des jeweiligen Cumarins induziert. Dies ist das Ergebnis der bathochromen Verschiebung der Absorption und der hypsochromen Verschiebung der Emission, wodurch die Stokesverschiebung um ca. 40% oder mehr, je nach Cumarinderivat, geringer wird (siehe Tabelle 4.3).

Abbildung 4.4 zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren (oben rechts) ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ), die um die Detektorquanteneffizienz korrigiert wurden, und die Fluoreszenzabklingkinetik ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ ) (unten) von Cou-570 in PBS (schwarz) und die jeweiligen Immunkomplexe mit mAb G100-HB9 (rot) und mAb G100-AG7 (blau).

Zusätzlich zu dem Einfluss auf die spektrale Lage der Maxima in Absorption und Emission wurden auch die Fluoreszenzintensität sowie die Fluoreszenzabklingkinetik von Cou-570 bei der Bindung der mAb unterschiedlich beeinflusst. Während mAb G100-HB9 kaum einen Einfluss auf die Gesamtintensität hat, zeigte mAb G100-AG7 eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität und eine Zunahme der Fluoreszenzabklingzeit von  $\tau = 0,7 \text{ ns}$  in PBS auf  $\tau = 1,7 \text{ ns}$  (siehe Tabelle 4.3).

Im Vergleich mit den Ergebnissen von DEAC und Cou-470, bei denen beide mAb die allgemeine Wirkung einer Fluoreszenzverstärkung zeigten, wurde ein klarer Unterschied für den Einfluss der beiden mAb auf die Fluoreszenzintensität, die spektrale Verschiebung sowie die Abklingkinetik für die anderen untersuchten 7-Aminocumarine (Cou-561, Cou-568, Cou-653, Cou-734 und Cou-760) festgestellt. Der mAb G100-HB9 zeigte kaum einen Einfluss. Im Gegensatz dazu zeigte mAb G100-AG7 eine deutliche Erhöhung aller Parameter, je nach Farbstoff, mit Fluoreszenzverstärkungsfaktoren von bis zu 50.

**Tabelle 4.3:** Spektroskopische Eigenschaften der 7-Aminocumarine Cou-561, Cou-568, Cou-653, Cou-570, Cou-734 und Cou-760 und deren jeweiligen Immunkomplexen mit mAb G100-HB9 und G100-AG7

	$\lambda_{\max, \text{abs}}$ [nm]			$\lambda_{\max, \text{em}}$ [nm]		
	$\nu_{\max, \text{abs}}$ [cm <sup>-1</sup> ]			$\nu_{\max, \text{em}}$ [cm <sup>-1</sup> ]		
	PBS	G100-HB9	G100-AG7	PBS	G100-HB9	G100-AG7
Cou-561	480 20833	480 20833	496 20161	561 17825	561 17825	540 18519
Cou-568	483 20704	483 20704	502 19920	568 17606	568 17606	550 18182
Cou-653	500 20000	504 19841	503 19881	653 15314	613 16313	548 18248
Cou-570	480 20833	480 20833	501 19960	570 17544	572 17483	547 18282
Cou-734	527 18975	533 18762	550 18182	734 13624	730 13699	682 14663
Cou-760	544 18382	550 18182	558 17921	760 13158	800 12500	694 14409

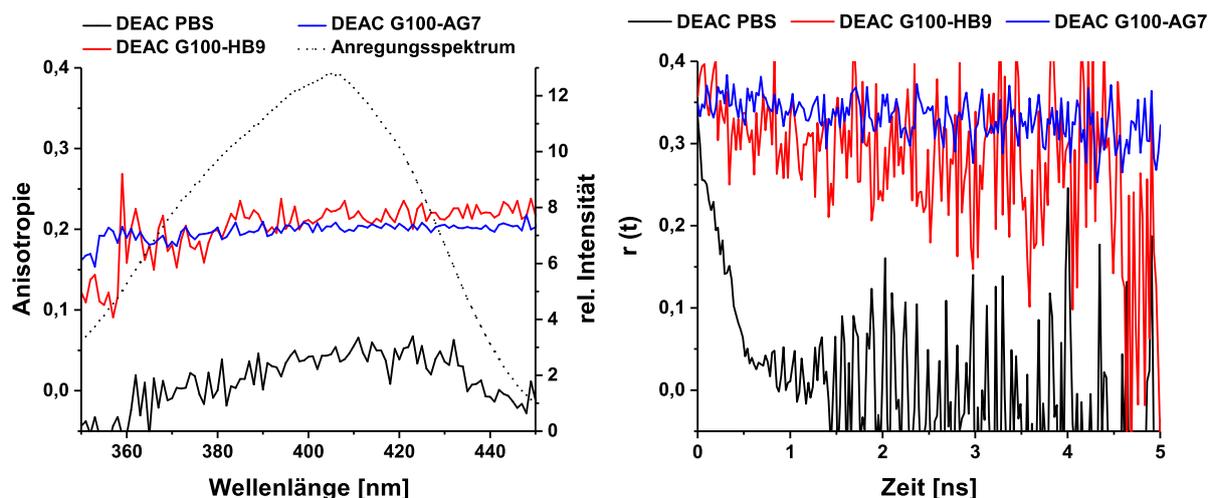
  

	$\Delta\lambda$ [nm]			$\tau$ [ns]		
	$\Delta\nu$ [cm <sup>-1</sup> ]					
	PBS	G100-HB9	G100-AG7	PBS	G100-HB9	G100-AG7
Cou-561	81 3008	81 3008	44 1642	0,9	0,2	2,5
Cou-568	85 3098	85 3098	48 1738	2,3	0,3	1,7
Cou-653	153 4686	109 3528	45 1633	0,6	1,9	1,7
Cou-570	90 3289	92 3350	46 1678	0,7	0,6	1,7
Cou-734	207 5351	197 5063	132 3519	0,3	0,9	2,0
Cou-760	216 5224	250 5682	136 3512	0,2	1,9	1,8

Fehlerangaben:  $\sigma(\lambda) = \pm 2$  nm,  $\sigma(\Delta\lambda) = \pm 2$  nm,  $\sigma(\tau) = \pm 0,1$  ns

### 4.1.2 Charakterisierung der Bindungswechselwirkungen zwischen 7-Aminocumarinen und mAb

Um die Bindung der verschiedenen 7-Aminocumarine an die beiden mAb zu bewerten, wurden Fluoreszenzdepolarisationsexperimente durchgeführt. Die Fluoreszenzanisotropie wurde nach Gleichung 2.18 und 2.21 berechnet.



**Abbildung 4.5:** Stationäre Anisotropiekurven ( $\lambda_{em} = 460$  nm) (links) und zeitaufgelöste Anisotropiekurven ( $\lambda_{ex} = 420$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm) (rechts) von DEAC in PBS (schwarz) und mit mAb G100-HB9 (rot) und G100-AG7 (blau).

In Abbildung 4.5 ist die stationäre (links) und zeitaufgelöste (rechts) Fluoreszenzanisotropie  $r$  von DEAC in PBS und in Gegenwart der beiden mAb gezeigt. Es ist ersichtlich, dass sowohl mAb G100-HB9 als auch mAb G100-AG7 die Fluoreszenzanisotropie gleichermaßen erhöhen. Während der freie Farbstoff in PBS keine Anisotropie ( $r = 0$ ) zeigt und durch eine schnelle Rotationsbewegung (dargestellt durch eine kleine Rotationskorrelationszeit  $\varphi = 0,1$  ns, siehe Tabelle 4.4) gekennzeichnet ist, zeigen die entsprechenden Immunkomplexe eine deutliche Zunahme sowohl in  $r$  ( $r(\text{G100-HB9}) = 0,21$ ,  $r(\text{G100-AG7}) = 0,20$ ) als auch in der Rotationskorrelationszeit ( $\varphi(\text{G100-AG7}) = 6,4$  ns). Dies kann als allgemeiner Trend für alle untersuchten 7-Aminocumarine beobachtet werden. Bei der Bildung der Immunkomplexe sind die stationäre Anisotropie  $r$  und die entsprechende Rotationskorrelationszeit erhöht (siehe Tabelle 4.4). Die zeitaufgelösten Anisotropiekinetiken wurden nach Gleichung 2.22 und 2.23 analysiert. Die ungebundenen Farbstoffe in PBS zeigen schnelle Rotationskorrelationszeiten von  $0,4 \text{ ns} \leq \varphi \leq 1,1 \text{ ns}$  und keine Grenzanisotropie ( $r_{\infty} = 0$ ). Für DEAC und Cou-476 gibt es keine Unterschiede in den Anisotropieparametern, was in guter Übereinstimmung mit den anderen Fluoreszenzdaten steht, die zeigen, dass die Bindung an den mAb aufgrund der zusätzlichen Ethylgruppe von

Cou-476 nicht signifikant verändert wird. Der Kegelwinkel, in dem die Farbstoffe noch rotieren können, ist für beide Farbstoffe in beiden Immunkomplexen gleich ( $\theta_K \approx 20^\circ$ ). Die Immunkomplexe der anderen 7-Aminocumarine mit mAb G100-AG7 zeigen auch eine Erhöhung der Rotationskorrelationszeiten (bis zu  $\varphi = 7,6$  ns für Cou-561 + G100-AG7) und der Grenzanisotropiewerte (bis zu  $r_\infty = 0,33$  für Cou-760 + G100-AG7).

**Tabelle 4.4:** Anisotropieparameter der 7-Aminocumarine DEAC, Cou-476, Cou-561, Cou-568, Cou-653, Cou-570, Cou-734 und Cou-760 und deren jeweiligen Immunkomplexen mit mAb G100-HB9 und G100-AG7

	r			r <sub>∞</sub>		
	PBS	G100-HB9	G100-AG7	PBS	G100-HB9	G100-AG7
DEAC	0	0,21	0,20	0	0,28	0,28
Cou-476	0	0,27	0,28	0	0,28	0,30
Cou-561	0	0,21	0,20	0	0,17	0,31
Cou-568	0	0,19	0,21	0	0,28	0,29
Cou-653	0	0,19	0,22	0	0,07	0,30
Cou-570	0	0,18	0,21	0	0,10	0,29
Cou-734	0	0,19	0,20	0	0,12	0,31
Cou-760	0	0,20	0,35	0	0,05	0,33

	φ [ns]			θ <sub>K</sub> [°]		
	PBS	G100-HB9	G100-AG7	PBS	G100-HB9	G100-AG7
DEAC	0,1	0,1	6,4	-	22	22
Cou-476	0,3	0,2	1,8	-	22	18
Cou-561	0,5	1,5	7,6	-	40	16
Cou-568	0,4	0,1	3,1	-	22	20
Cou-653	1,1	0,9	7,3	-	55	18
Cou-570	0,8	0,5	5,4	-	50	20
Cou-734	0,4	0,7	4,2	-	46	16
Cou-760	0,2	1,1	1,7	-	60	11

Fehlerangaben:  $\sigma(r) = \pm 0,02$ ,  $\sigma(r_\infty) = \pm 0,02$ ,  $\sigma(\varphi) = \pm 0,1$  ns,  $\sigma(\theta_K) = \pm 5^\circ$

Darüber hinaus werden die 7-Aminocumarine in ihrer Rotation stark eingeschränkt, wenn sie an diesen Antikörper gebunden sind, wie durch die kleinen Kegelwinkel ( $\theta_K \approx 20^\circ$ ) deutlich wird. Andererseits hat die Bindung von mAb G100-HB9 nur einen sehr geringen Einfluss auf die Rotationskorrelationszeiten der Farbstoffe und ist nur geringfügig erhöht im Vergleich zu PBS. Die Grenzanisotropiewerte sind aber bis zu  $r_\infty = 0,28$  im Vergleich zu den freien Farbstoffen erhöht. Im Vergleich zu den Immunkomplexen mit mAb G100-AG7 zeigten die berechneten Kegelwinkel von  $40^\circ \leq \theta_K \leq 60^\circ$  für Cou-561, Cou-568, Cou-653, Cou-570, Cou-734 und Cou-760, dass die Bindungswechselwirkung

weniger stark ist, was ein höheres Rotationsvolumen für die jeweiligen Farbstoffe zulässt. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Ergebnissen der anderen Fluoreszenzmessungen, wie zum Beispiel den Fluoreszenzverstärkungsfaktoren (siehe Tabelle 4.2) überein.

Um die Mikroumgebung der verschiedenen Farbstoffe in ihren Immunkomplexen weiter zu charakterisieren, wurde zunächst die Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$  verschiedener Lösungsmittel nach Gleichung 2.26 bestimmt, die eine Funktion der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  und des Brechungsindex  $n$  des umgebenden Mediums<sup>127</sup> ist (siehe Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5:** Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ , Brechungsindex und Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$  für Dichlormethan, Methanol und PBS

	$\epsilon$	$n$	$\Delta f$
Dichlormethan	9,1	1,42	0,22
Methanol	32,6	1,33	0,31
PBS	80,2	1,33	0,32

Basierend auf den Orientierungspolarisierbarkeiten der verschiedenen Lösungsmittel und den beobachteten Stokesverschiebungen für die Cumarine in den Lösungsmitteln, sowie in den jeweiligen Immunkomplexen wurde die Orientierungspolarisierbarkeit nach Gleichung 2.25 bestimmt (siehe Tabelle 4.6).

**Tabelle 4.6:** Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$  für mAb G100-HB9 und G100-AG7, berechnet nach Gleichung 2.25

	$\Delta f$ (G100-HB9)	$\Delta f$ (G100-AG9)
DEAC	0,17	0,19
Cou-476	0,22	0,17
Cou-561	0,32	0,17
Cou-568	0,32	0,18
Cou-570	0,25	0,13
Cou-653	0,24	0,11
Cou-734	0,32	0,22
Cou-760	0,36	0,23

Im Allgemeinen wurde hier für G100-AG7 für alle untersuchten Farbstoffe ein kleinerer Wert für  $\Delta f$  um 0,20 bestimmt, woraus auf eine weniger polare Mikroumgebung des Cumarinderivats in seinem jeweiligen Immunkomplex im Vergleich zu PBS ( $\Delta f = 0,32$ ) geschlossen werden kann. Für G100-HB9 wurde eine größere Variation der  $\Delta f$ -Werte für die verschiedenen Farbstoffe gefunden. Während für DEAC sowie Cou-476 ein ähnlicher

$\Delta f$ -Wert wie für G100-AG7 bestimmt werden konnte ( $\Delta f \approx 0,20$ ), wurden für die anderen Cumarine deutlich größere  $\Delta f$ -Werte bis zu 0,36 berechnet, was die Unterschiede in den Bindungswechselwirkungen der beiden mAbs mit den Cumarinen verdeutlicht. Dass sich im Falle von G100-HB9 die  $\Delta f$ -Werte den Werten von PBS annähern, lässt auf eine weniger kompakte Bindung schließen. Dies schließt eine erhöhte Exposition des Farbstoffs in seinem Immunkomplex zu dem Puffer ein, was mit den Ergebnissen der Depolarisationsmessungen übereinstimmt. Des Weiteren lässt sich eine hydrophile Bindungstasche vermuten. Da jedoch für die kleineren Farbstoffe (DEAC, Cou-476) beide mAbs nahezu identische  $\Delta f$ -Werte zeigten, kann man die Ergebnisse bei den Immunkomplexen der Cumarine mit einer erhöhten sterischen Anforderung der Seitengruppe, die die Bindung durch G100-HB9 beeinflusst, darauf zurückführen, dass die Bindung schwächer ist, die Farbstoffmoleküle nicht sehr tief in die Bindungstasche gelangen und somit stärker der Wasserphase ausgesetzt sind.

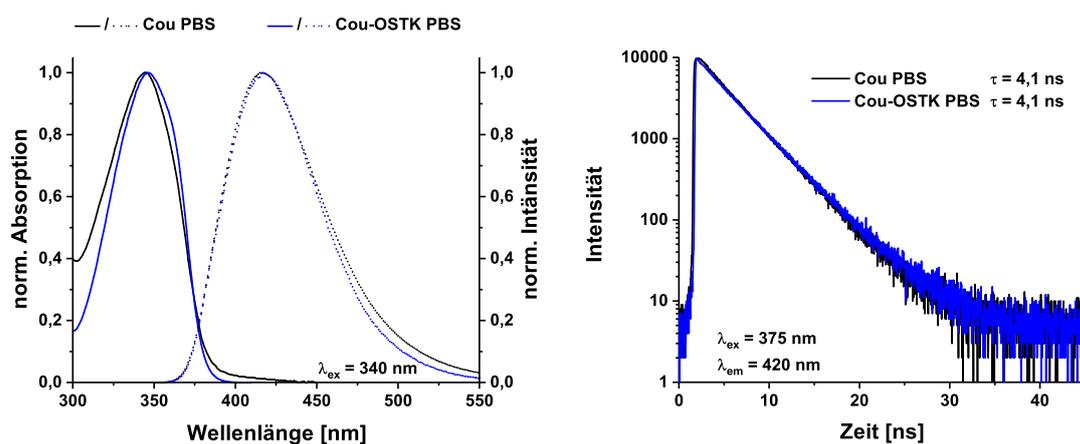
Der Effekt der Fluoreszenzverstärkung beider Antikörper ist sehr interessant für die Entwicklung eines Fluoreszenzimmunassays. Mit Faktoren der Fluoreszenzerhöhung von etwa 50, ist daher ein universelles Werkzeug zur Konstruktion einer kompetitiven Immunassay-Toolbox für die Multianalytendetektion mit unterschiedlichen Cumarinderivaten, die bei verschiedenen Wellenlängen emittieren, vorhanden. Ein allgemeines Layout für eine solches fluoreszenzverstärkendes Immunassays ist in Abbildung 2.15 gezeigt.

## 4.2 OSTK-Stäbe

### 4.2.1 Cumarin-OSTK-Stäbe

Durch die ausführliche Charakterisierung der 7-Aminocumarine in Kapitel 4.1 ist nun die Charakterisierung der Cou-funktionalisierten OSTK-Stäbe möglich.

Die verwendeten Cou-Verbindungen können zu den 6,7-Dialkoxycumarinen gezählt werden. Bei Cou (dem Cumarinvorläufer) wurde das Absorptionsmaximum in Puffer bei  $\lambda_{\text{max,abs}} = 344 \text{ nm}$  und das entsprechenden Fluoreszenzemissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{max,em}} = 416 \text{ nm}$  detektiert. Die spektroskopischen Eigenschaften des Cumarins werden durch die Bindungen an das starre OSTK-Grundgerüst nicht verändert (siehe Tabelle 4.7). Gegenüber dem Cumarinvorläufer wurde keine signifikante Verschiebung in den Absorptions- und in den Fluoreszenzemissionsspektren gefunden (Abbildung 4.6, links).



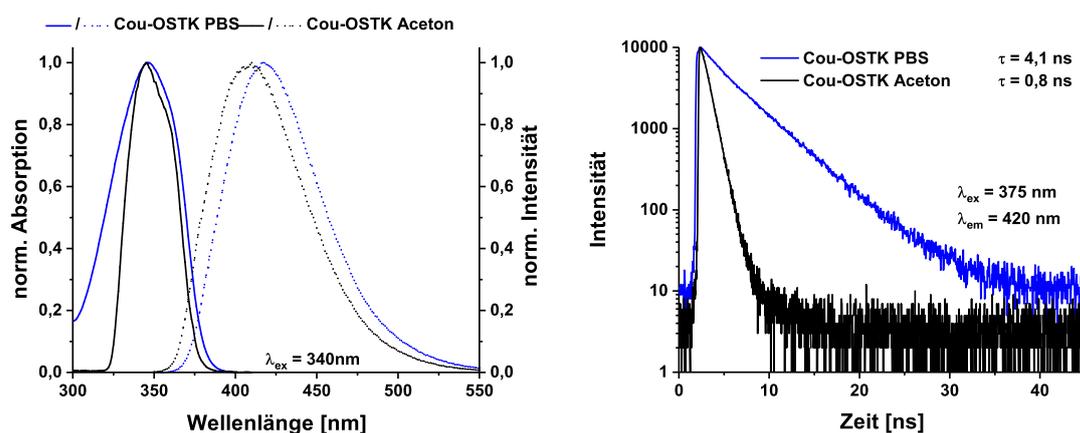
**Abbildung 4.6:** Absorptions- (durchgezogen) und Fluoreszenzemissionsspektren ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ) (gestrichelt) (links) und Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) (rechts) von Cou (schwarz) und Cou-OSTK (blau) in PBS

Aus den zeitaufgelösten Fluoreszenzdaten konnte auch keine Veränderung der Abklingkinetik festgestellt werden (siehe Abbildung 4.6, rechts). Die Fluoreszenzabklingzeit ( $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) in Puffer liegt bei  $\tau = 4,1 \text{ ns}$ . Darüber hinaus zeigt der Vergleich der stationären Anisotropiewerte in Puffer für Cou und Cou-OSTK, dass auch bei der molekularen Rotation der beiden Moleküle kein Unterschied besteht, da die Gesamtgröße des OSTK-Stabes noch relativ klein ist, was eine vollständige Depolarisation ermöglicht. Dies wird durch die zeitaufgelösten Depolarisationsmessungen unterstützt, die keine Unterschiede in der Rotationskorrelationszeit ( $\varphi = 0,3 \text{ ns}$ ) sowie in den Grenzanisotropiewerten ( $r_{\infty} = 0$ ) beider Verbindungen zeigen.

Die Cou-OSTK-Stäbe (Strukturformeln siehe Abbildung 2.12), die jeweils mit zwei Cou-

Farbstoffen funktionalisiert sind (Cou-f-OSK-f-Cou und Cou-OSK-Cou), und der OSTK-Stab, der flexibel an das Cumarin gebunden wurde (Cou-f-OSTK), zeigen ebenfalls ähnliche Ergebnisse für die spektroskopischen Eigenschaften  $\lambda_{\max, \text{abs}}$ ,  $\lambda_{\max, \text{em}}$ ,  $\phi$  und den Anisotropieparametern (siehe Tabelle 4.7). Im Folgenden werden die weiteren Ergebnisse daher beispielhaft an Cou-OSTK erläutert.

Die spektroskopischen Eigenschaften von Cumarinen sind häufig stark lösungsmittelabhängig (vergleiche Kapitel 2.2 und 4.1). Im Vergleich zu anderen 6,7-Dialkoxycumarinen ist der beobachtete Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf die spektrale Position der Absorptions- und Emissionsmaxima ähnlich.<sup>51,73</sup> Beispiele dieser Lösungsmittelabhängigkeit für die Cou-OSTK-Stäbe sind in Abbildung 4.7 und Tabelle 4.7 zu sehen. In dem Fluoreszenzemissionsspektrum ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ) in Abbildung 4.7 (links) ist eine leichte bathochrome Verschiebung für den Cou-OSTK-Stab in PBS ( $\lambda_{\max, \text{em}} = 417 \text{ nm}$ ) im Vergleich zum Cou-OSTK-Stab in Aceton ( $\lambda_{\max, \text{em}} = 410 \text{ nm}$ ) zu beobachten.



**Abbildung 4.7:** Absorptions- (durchgezogen) und Fluoreszenzemissionsspektren ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ) (gestrichelt) (links) und Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) (rechts) von Cou-OSTK in PBS (blau) und Aceton (schwarz)

Für 6,7-Alkoxycumarine wurde die Bildung eines intramolekularen Ladungstransferzustands (*ICT*) bei der elektronischen Anregung als Grund dafür identifiziert.<sup>128,129</sup> Innerhalb der Cumarineinheit ist ein *Push-Pull*-System zwischen dem elektronenreichen Liganden an 7-Position (Elektronendonator) und der Lactoncarbonylgruppe (Elektronenakzeptor) wirksam. Die Cou-Einheit im elektronisch angeregten Zustand mit ihrem erhöhten Dipolmoment wird in polaren Lösungsmitteln besser stabilisiert. Dies wird durch die Lösungsmittelabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute sowie der Fluoreszenzabklingzeit für 6,7-Alkoxycumarine deutlich. Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, führte eine Erhöhung der Stabilisierung in polaren Lösungsmitteln zu einer Änderung der Energie des  $^1(\pi\pi^*)$ -Fluoreszenzzustandes relativ zum ersten Triplettzustand  $^3(n\pi^*)$ .<sup>130</sup>

In unpolaren bzw. weniger polaren Lösungsmitteln liegt der  $^1(\pi\pi^*)$ -Zustand etwas oberhalb des  $^3(n\pi^*)$ -Zustands und so ist die *ISC*-Rate sehr effizient. Dies wird auch durch die geringen Quantenausbeute des Cou-OSTK-Stabs in Aceton deutlich ( $\phi = 0,12$ ). In polaren Lösungsmitteln ist die Energie des jeweiligen  $^1(\pi\pi^*)$ -Zustands niedriger als für den  $^3(n\pi^*)$ -Tripletzustand, wodurch der *ISC* weniger wirksam wird, woraus eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute für den Cou-OSTK-Stab in PBS ( $\phi = 0,34$ ) resultiert.<sup>10</sup>

**Tabelle 4.7:** Spektroskopische Eigenschaften der Cou-/Cou-OS(T)K-Verbindungen in verschiedenen Lösungsmitteln mit  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm für  $\lambda_{\text{max,em}}$  und  $\phi$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm für  $\tau$ ,  $r_\infty$ ,  $\varphi$  und  $\theta_K$ , sowie  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm für  $r$

	$\lambda_{\text{max,abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max,em}}$ [nm]	$\tau$ [ns]	$\phi$	$r$	$r_\infty$	$\varphi$ [ns]	$\theta_K$ [°]
Cou PBS	344	416	4,1	0,58	0	0	0,3	—
Cou CHCl <sub>3</sub>	347	400	1,7	0,45	0	0	0,3	—
Cou Aceton	346	409	0,8	0,21	0	0	0,2	—
Cou Vesikel	344	414	3,8	0,64	0	0	0,2	—
Cou-f-OSTK PBS	347	419	4,2	0,19	0	0	0,2	—
Cou-f-OSTK CHCl <sub>3</sub>	346	400	1,8	0,19	0	0	0,2	—
Cou-f-OSTK Aceton	346	409	0,9	0,11	0	0	0,2	—
Cou-f-OSTK Vesikel	347	407	3,4	0,17	0,35	0,26	0,2	25
Cou-OSTK PBS	346	416	4,1	0,34	0	0	0,3	—
Cou-OSTK CHCl <sub>3</sub>	348	400	1,7	0,27	0	0	0,3	—
Cou-OSTK Aceton	346	410	0,8	0,12	0	0	0,3	—
Cou-OSTK Vesikel	346	408	3,4	0,71	0,08	0,1	0,2	50
Cou-f-OSK-f- Cou PBS	346	420	4,1	0,38	0	0	0,2	—
Cou-f-OSK-f-Cou CHCl <sub>3</sub>	347	401	1,7	0,20	0	0	0,3	—
Cou-f-OSK-f-Cou Aceton	346	409	0,8	0,11	0	0	0,3	—
Cou-f-OSK-f-Cou Vesikel	346	408	3,4	0,19	0,31	0,24	0,3	23
Cou-OSK-Cou PBS	346	415	4,3	0,56	0	0	0,3	—
Cou-OSK-Cou CHCl <sub>3</sub>	347	401	1,8	0,31	0	0	0,2	—
Cou-OSK-Cou Aceton	346	409	0,9	0,13	0	0	0,2	—
Cou-OSK-Cou Vesikel	346	408	3,4	0,28	0,32	0,23	0,2	27

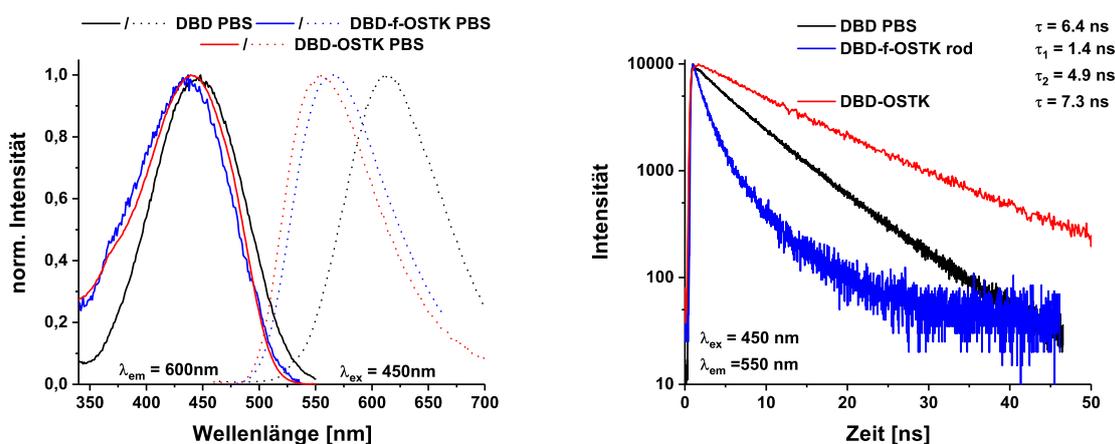
Fehlerangaben:  $\sigma(\lambda) = \pm 2$  nm,  $\sigma(\tau) = \pm 0,1$  ns,  $\sigma(\phi) = 5\%$ ,  $\sigma(r) = \pm 0,02$ ,  $\sigma(r_\infty) = \pm 0,02$ ,  
 $\sigma(\varphi) = \pm 0,1$  ns,  $\sigma(\theta_K) = \pm 5^\circ$

Die Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{\text{ex}} = 375$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm) der Cou-OSTK-Stäbe (siehe Abbildung 4.7, rechts) zeigen ein monoexponentielles Verhalten in polaren und unpolaren Lösungsmitteln. Die Fluoreszenzabklingzeit des Cou-OSTK-Stabs in Aceton ( $\tau = 0,8$  ns) ist wesentlich kürzer als in PBS ( $\tau = 4,1$  ns). Dies stimmt mit den Ergebnissen der stationären Fluoreszenzmessungen und der Quantenausbeuten überein und wird durch

die unterschiedlichen Wirkungsgrade des *ISC* in polaren oder unpolaren Lösungsmitteln verursacht.

### 4.2.2 DBD-OSTK-Stäbe

Der DBD-Farbstoff wurde an der OSTK-Stabeinheit sowohl flexible (DBD-f-OSTK) oder als auch direkt (DBD-OSTK) befestigt (Strukturformeln siehe Abbildung 3.2).



**Abbildung 4.8:** Fluoreszenzanregungs- ( $\lambda_{em} = 600\text{ nm}$ ) (durchgezogen) und -emissionsspektren ( $\lambda_{ex} = 450\text{ nm}$ ) (gestrichelt) (links) und Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{ex} = 450\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 550\text{ nm}$ ) (rechts) von DBD (schwarz), DBD-f-OSTK (blau) und DBD-OSTK (rot) in PBS

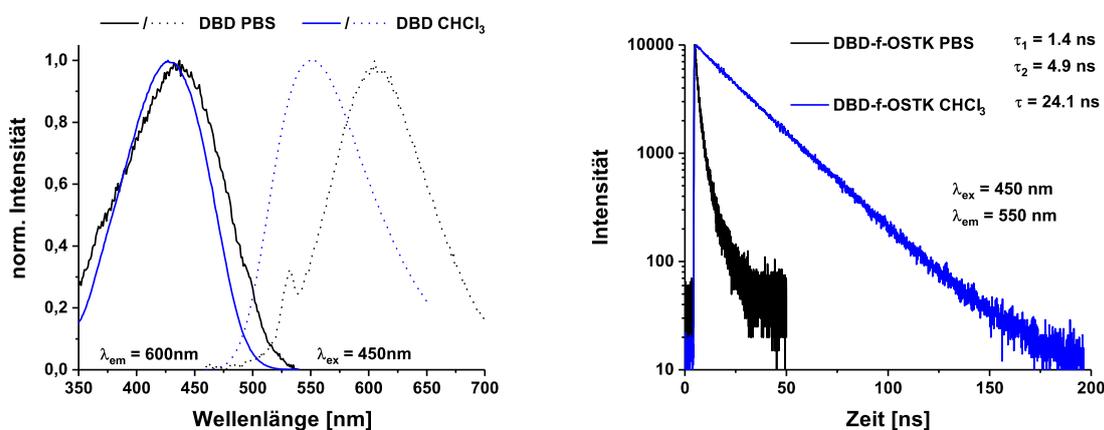
In Abbildung 4.8 sind die Fluoreszenzanregungs- ( $\lambda_{em} = 600\text{ nm}$ ) und die -emissionsspektren ( $\lambda_{ex} = 450\text{ nm}$ ) von DBD, DBD-f-OSTK und DBD-OSTK in PBS dargestellt. Die hohe Sensitivität der spektroskopischen Eigenschaften von DBD-Farbstoffen gegenüber Lösungsmittelpolaritäten wurde bereits ausgiebig untersucht.<sup>72</sup>

Im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln wie Chloroform zeigen die Fluoreszenzanregungs- und insbesondere die Fluoreszenzemissionsspektren für DBD in PBS eine signifikante bathochrome Verschiebung (siehe Abbildung 4.9 links).

Die Stokesverschiebung ( $\Delta\lambda$ ) für DBD ist mit  $\Delta\lambda = 124\text{ nm}$  ( $\lambda_{max,abs} = 427\text{ nm}$ ,  $\lambda_{max,em} = 551\text{ nm}$ ) in Chloroform bereits sehr groß und beläuft sich in PBS sogar auf  $\Delta\lambda = 164\text{ nm}$  ( $\lambda_{max,abs} = 448\text{ nm}$ ,  $\lambda_{max,em} = 612\text{ nm}$ ). Für DBD-f-OSTK sowie DBD-OSTK wurde ebenfalls eine große Stokesverschiebung von  $\Delta\lambda = (123 \pm 7)\text{ nm}$  sowie  $\Delta\lambda = (117 \pm 3)\text{ nm}$  erhalten.

Anders als im Fall von Cou hat die Bindung des OSTK-Grundgerüsts an den DBD-Farbstoff einen deutlichen Einfluss auf einige seiner photophysikalischen Eigenschaften. Durch die Bindung an den OSTK-Stab wird die Stokesverschiebung (berechnet aus den

Maxima der Absorption und Emission) geringer. Für DBD-f-OSTK und DBD-OSTK wurden jeweils  $\Delta\lambda = 128$  nm und  $\Delta\lambda = 114$  nm in PBS bestimmt, die im Vergleich zur Stammverbindung ( $\Delta\lambda = 164$  nm) kleiner sind. Während die Absorptionsmaxima nur eine geringe hypsochrome Verschiebung zeigen (437 nm für DBD-f-OSTK bzw. 441 nm für DBD-OSTK), wurde in den Emissionsspektren beider Verbindungen (565 nm und 555 nm für DBD-f-OSTK und DBD-OSTK im Vergleich zu 612 nm für DBD) eine viel stärkere hypsochrome Verschiebung beobachtet, was als Hauptgrund für die deutlich verringerte Stokesverschiebung aufzuführen ist (siehe Tabelle 4.8).



**Abbildung 4.9:** Fluoreszenzanregungs- ( $\lambda_{em} = 600$  nm) (durchgezogen) und -emissionsspektren ( $\lambda_{ex} = 450$  nm) (gestrichelt) von DBD (links) und Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{ex} = 450$  nm,  $\lambda_{em} = 550$  nm von DBD-f-OSTK (rechts) in PBS (schwarz) und Chloroform (blau)

Die Fluoreszenzabklingkinetik von DBD folgt einem monoexponentiellen Verlauf mit einer Fluoreszenzabklingzeit von  $\tau = 6,4$  ns in PBS (siehe Abbildung 4.11, rechts). Die Bindung des OSTK-Stabs beeinflusst auch die Kinetik der Fluoreszenzabklingzeit. Während die Fluoreszenzabklingkinetik des DBD-f-OSTK in PBS eine biexponentielle Kinetik mit zwei Fluoreszenzabklingzeiten  $\tau_1 = 1,4$  ns (77%) und  $\tau_2 = 4,9$  ns (23%) zeigt, wurde für DBD-OSTK eine monoexponentielle Kinetik mit  $\tau = 7,3$  ns bestimmt, was gegenüber DBD leicht erhöht ist.

Außerdem hat die Polarität des Lösungsmittels einen großen Einfluss auf die Fluoreszenzabklingkinetiken der verwendeten DBD-Farbstoffe. Je unpolarer das Lösungsmittel ist, desto länger ist die Fluoreszenzabklingzeit. So hat, wie bereits erwähnt, DBD-OSTK in PBS eine Abklingzeit von  $\tau = 7,3$  ns. In Aceton hingegen erhöht sie sich auf  $\tau = 19,3$  ns und in Chloroform auf  $\tau = 22,5$  ns. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzabklingkinetik für DBD-f-OSTK, sowie für alle anderen Proben, in unpolaren Lösungsmitteln, monoexponentiell verläuft (siehe Abbildung 4.9 rechts).

Ein ähnlicher Trend ist für die Quantenausbeuten aller DBD-Farbstoffe zu sehen. Die

Quantenausbeute ist in PBS (0,01 – 0,04) sehr gering und nimmt mit abnehmender Polarität stark zu. In Aceton beträgt sie somit 0,54 – 0,59 und in Chloroform 0,65 – 0,70 (siehe Tabelle 4.8).

Für DBD sowie für die mit DBD markierten Stäbe wurde in allen Lösungsmitteln keine Fluoreszenzanisotropie gefunden, was durch die schnelle Rotationsbewegung der Farbstoffe in homogener Lösung verursacht wird (siehe Tabelle 4.8).

**Tabelle 4.8:** Spektroskopische Eigenschaften der DBD-(OSTK-)Verbindungen in verschiedenen Lösungsmitteln mit  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  nm für  $\lambda_{\text{max,em}}$  und  $\phi$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 550$  nm für  $\tau$ ,  $r_{\infty}$ ,  $\varphi$  und  $\theta_K$ , sowie  $\lambda_{\text{em}} = 600$  nm für  $r$

	$\lambda_{\text{max, abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max,em}}$ [nm]	$\tau$ [ns]	$\phi$	$r$	$r_{\infty}$	$\varphi$ [ns]	$\theta_K$ [°]
DBD PBS	448	612	6,4	0,01	0	0	0,1	–
DBD CHCl <sub>3</sub>	435	547	22,7	0,70	0	0	0,1	–
DBD Aceton	425	535	19,7	0,59	0	0	0,1	–
DBD Vesikel	448	612	7,0	0,01	0	0,05	0,2	60
DBD-f-OSTK PBS	437	565	1,4(77%) 4,9(23%)	0,04	0	0	0,1	–
DBD-f-OSTK CHCl <sub>3</sub>	427	551	24,1	0,65	0	0	0,1	–
DBD-f-OSTK Aceton	419	536	22,5	0,54	0	0	0,1	–
DBD-f-OSTK Vesikel	440	570	8,2	0,17	0,06	0,07	0,8	55
DBD-OSTK PBS	441	555	7,3	0,04	0	0	0,1	–
DBD-OSTK CHCl <sub>3</sub>	436	550	22,5	0,65	0	0	0,1	–
DBD-OSTK Aceton	416	536	19,3	0,56	0	0	0,1	–
DBD-OSTK Vesikel	434	558	11,1	0,32	0,09	0	0,2	–

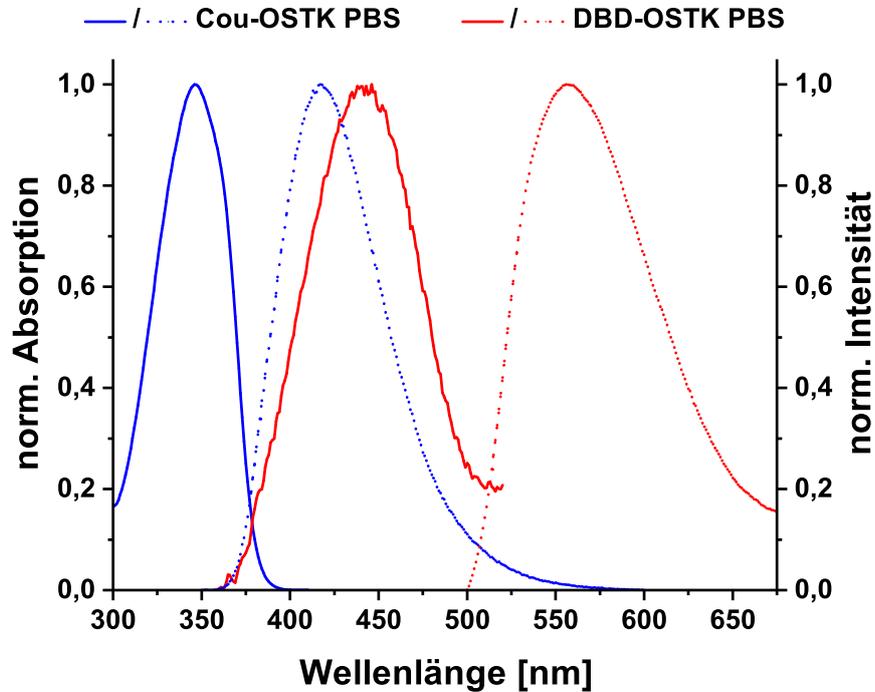
Fehlerangaben:  $\sigma(\lambda) = \pm 2$  nm,  $\sigma(\tau) = \pm 0,1$  ns,  $\sigma(\phi) = 5\%$ ,  $\sigma(r) = \pm 0,02$ ,  $\sigma(r_{\infty}) = \pm 0,02$ ,  
 $\sigma(\varphi) = \pm 0,1$  ns,  $\sigma(\theta_K) = \pm 5^\circ$

### 4.2.3 FRET-OSTK-Stäbe

Der Donor (Cou) und der Akzeptor (DBD) wurden ausführlich charakterisiert. In Abbildung 4.10 sind die Absorptions- und Emissionsspektren von Cou-OSTK und DBD-OSTK dargestellt. Es ist die deutliche Überlappung des Emissionsspektrums von Cou-OSTK, als Donor, und des Absorptionsspektrums von DBD-OSTK, als Akzeptor, zu sehen. Damit ist eine wesentliche Voraussetzung für die folgenden FRET-Experimente gegeben.

Basierend auf der jeweiligen Donoremision und Akzeptorabsorption wurde mithilfe der Software *PhotochemCAD* das spektrale Überlappungsintegral  $J$  berechnet (siehe Tabelle 4.9). Die Berechnungen wurden für Cou-f-DBD, Cou-OSTK-f-DBD und Cou-OSTK-DBD durchgeführt, um die durch die Bindung an das OSTK-Gerüst induzierten Än-

derungen der Spektraldaten zu berücksichtigen. Der Parameter  $\kappa^2$  bezieht sich auf die relative Orientierung des Übergangsdipolmoments von Cou und DBD im Raum (siehe Gleichung 2.15).



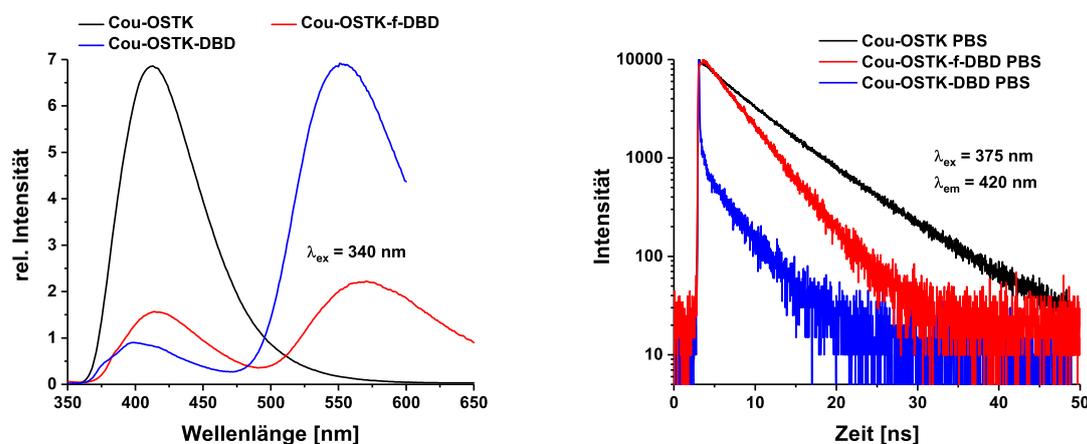
**Abbildung 4.10:** Absorptions- und Emissionsspektren von Cou-OSTK ( $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm) (blau) und DBD-OSTK ( $\lambda_{\text{ex}} = 450$  nm) (rot) in PBS zur Veranschaulichung des spektralen Überlapps

Je nach Art der Bindung der DBD-Einheit an den Stab (starr gegenüber flexibel) liegt für Cou-OSTK-DBD ein Orientierungsfaktor von  $\kappa^2 = 3,9$  (nahe dem theoretischen Maximum von 4)<sup>51</sup>, bei dem die Orientierung der Dipolmomente nahezu kollinear ist, bzw.  $\kappa^2 = 2/3$  für Cou-OSTK-f-DBD sowie für Cou-f-DBD vor, die für die Berechnungen von  $R_0$  und  $E_{\text{theo}}$  verwendet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

**Tabelle 4.9:** Parameter  $\kappa^2$  (Orientierungsfaktor),  $J$  (Überlappungsintegral),  $R_0$  (Försterabstand),  $R_{\text{theo}}$  (theoretischer Donor-Akzeptor-Abstand) und  $E_{\text{theo}}$  (theoretische FRET-Effizienz) der verschiedenen FRET-Paare in PBS

	$\kappa^2$	$J$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	$R_0$ [nm]	$R_{\text{theo}}$ [nm]	$E_{\text{theo}}$
Cou-f-DBD	2/3	$4,5 \cdot 10^{-15}$	3,3	1,5	0,99
Cou-OSTK-f-DBD	2/3	$5,0 \cdot 10^{-15}$	3,2	2,2	0,90
Cou-OSTK-DBD	3,9	$4,2 \cdot 10^{-15}$	4,1	1,9	0,99

Der theoretische Försterabstand für Cou-OSTK-DBD wurde nach Gleichung 2.10 mit  $\kappa^2 = 3,9$  berechnet und beträgt  $R_0 = 4,1$  nm. Die Försterabstände der beiden anderen Verbindungen (Cou-OSTK-f-DBD bzw. Cou-f-DBD) sind mit  $R_0 = 3,2$  nm –  $3,3$  nm deutlich kleiner. Hier war der  $\kappa^2$ -Wert der entscheidende Faktor, da die Überlappungsintegrale bei der Verbindungen ähnlich bzw. sogar etwas größer waren. Im Vergleich zu häufig verwendeten FRET-Paaren waren die  $R_0$ -Werte am unteren Ende und im Bereich der üblicherweise verwendeten Farbstoffpaare wie Fluorescein und Rhodamin ( $4,5 \leq R_0 \leq 5,6$  nm).<sup>22</sup> Basierend auf den Strukturen wurden die Abstände zwischen den Zentren der beiden Farbstoffe für die verschiedenen FRET-Paare berechnet ( $R_{\text{theo}}(\text{Cou-f-DBD}) = 1,5$  nm,  $R_{\text{theo}}(\text{Cou-OSTK-f-DBD}) = 2,2$  nm und  $R_{\text{theo}}(\text{Cou-OSTK-DBD}) = 1,9$  nm. Die Annahme einer erweiterten Konfiguration, die durch mögliche Bewegung für die flexiblen Verbindung Cou-f-DBD bzw. Cou-OSTK-f-DBD zustande kommen könnte, wurde in den Berechnungen vernachlässigt. Aufgrund der spektralen Daten und den relativ kleinen Försterabständen, sind die erwarteten FRET-Effizienzen ( $E_{\text{theo}}(\text{Cou-f-DBD}) = 0,99$ ,  $E_{\text{theo}}(\text{Cou-OSTK-f-DBD}) = 0,90$  und  $E_{\text{theo}}(\text{Cou-OSTK-DBD}) = 0,99$  sehr hoch (siehe Tabelle 4.9).



**Abbildung 4.11:** Fluoreszenzemissionsspektren ( $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm) (links) sowie die entsprechenden Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm) (rechts) von Cou-OSTK (schwarz), Cou-OSTK-f-DBD (rot) und Cou-OSTK-DBD (blau) in PBS

In Abbildung 4.11 links sind die Fluoreszenzemissionsspektren ( $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm) des Donors Cou-OSTK und der FRET-Paare Cou-OSTK-f-DBD und Cou-OSTK-DBD in PBS dargestellt. Die Löschung der Donorfluoreszenz und die starke Fluoreszenz des Akzeptors sind deutlich zu erkennen.

Die Fluoreszenzabklingkurven der FRET-Paare zeigen in fast allen Lösungsmitteln eine biexponentielle Fluoreszenzabklingkinetik des Donors (siehe Tabelle 4.11). Die starke Löschung der Donorfluoreszenz ergibt eine sehr kurze Fluoreszenzabklingzeit für Cou-OSTK-

DBD in PBS von  $\tau_1 = 0,1$  ns (56 %). Der Beitrag der zweiten Abklingzeit  $\tau_2 = 3,9$  ns (44 %) kann einer geringen Menge an ungebundenem Cumarinvorläufer in der Probe zugeschrieben werden (siehe Abbildung 4.11 rechts).

**Tabelle 4.10:** Experimentelle FRET-Effizienzen ( $E(\phi)$  und  $E(\tau)$ ) und Donor-Akzeptor-Abstände ( $R_{\text{exp}}(\phi)$  und  $R_{\text{exp}}(\tau)$ ) der FRET-Paare in verschiedenen Lösungsmitteln

	$E(\phi)$	$R_{\text{exp}}(\phi)$ [nm]	$E(\tau)$	$R_{\text{exp}}(\tau)$ [nm]
Cou-f-DBD PBS	$0,93 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,10$	$>0,95 \pm 0,01$	$<2,0 \pm 0,12$
Cou-f-DBD $\text{CHCl}_3$	$0,96 \pm 0,01$	$1,9 \pm 0,10$	$>0,95 \pm 0,01$	$<2,0 \pm 0,12$
Cou-f-DBD Aceton	$0,92 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,10$	$>0,95 \pm 0,01$	$<2,0 \pm 0,12$
Cou-f-DBD Vesikel	$0,95 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,09$	$>0,95 \pm 0,01$	$<2,0 \pm 0,12$
Cou-OSTK-f-DBD PBS	$0,88 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,12$	$0,85 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,11$
Cou-OSTK-f-DBD $\text{CHCl}_3$	$0,81 \pm 0,02$	$2,5 \pm 0,11$	$0,30 \pm 0,01$	$3,7 \pm 0,12$
Cou-OSTK-f-DBD Aceton	$0,83 \pm 0,02$	$2,4 \pm 1,10$	$0,38 \pm 0,02$	$3,8 \pm 0,15$
Cou-OSTK-f-DBD Vesikel	$0,88 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,11$	$0,88 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,12$
Cou-OSTK-DBD PBS	$0,97 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,12$	$>0,95 \pm 0,01$	$<2,5 \pm 0,13$
Cou-OSTK-DBD $\text{CHCl}_3$	$0,96 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,10$	$>0,95 \pm 0,02$	$<2,5 \pm 0,14$
Cou-OSTK-DBD Aceton	$0,92 \pm 0,01$	$2,7 \pm 0,11$	$>0,88 \pm 0,05$	$<2,9 \pm 0,13$
Cou-OSTK-DBD Vesikel	$0,96 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,09$	$>0,95 \pm 0,01$	$<2,5 \pm 0,15$

Fehlerangaben:  $\sigma(E) = \pm 0,01$ ,  $\sigma(R_{\text{exp}}) = \pm 0,1$  nm

Die experimentellen FRET-Effizienzen für die verschiedenen doppeltmarkierten Sonden wurden durch Gleichung 2.13 unter Verwendung von Fluoreszenzquantenausbeuten sowie der Fluoreszenzabklingzeiten berechnet und sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

Mit dem Cou-OSTK-f-DBD-Stab wurde eine Verbindung untersucht, bei der der DBD-Farbstoff mit einem flexiblen Linker an den OSTK-Stab gebunden ist. Somit hat dieser einen deutlich höheren Freiheitsgrad in Bezug auf die Rotation des DBD-Farbstoffs, relativ zum Cou-Farbstoff. Der maximale Gesamtabstand zwischen Donor und Akzeptor war ähnlich ( $R_{\text{theo}} = 2,2$  nm), aber wegen der größeren Flexibilität wurde der  $\kappa^2$ -Wert auf  $\frac{2}{3}$  reduziert, was einen kleineren  $R_0$ -Wert von 3,2 nm in PBS ergab. Folglich wurde eine reduzierte FRET-Effizienz erwartet. Aus Tabelle 4.10 ist ersichtlich, dass für Cou-OSTK-f-DBD in Aceton und Chloroform die berechneten FRET-Effizienzen auf Basis der Fluoreszenzquantenausbeuten und der Fluoreszenzabklingzeiten deutlich unterschiedlich sind. Die FRET-Effizienz die aus den Fluoreszenzabklingzeiten des Donors berechnet wurde betrug 0,30 – 0,38. Die aus den Fluoreszenzquantenausbeuten des Donors berechneten FRET-Effizienz ist mit 0,81 – 0,83 deutlich höher. Dieser beobachtete Unterschied der FRET-Effizienzen kann ein Hinweis auf die Bildung eines Gleichgewichts zwischen zwei limitierenden Formen von Cou-OSTK-f-DBD sein. Das eine Konformer wird da-

durch dargestellt, dass die DBD-Farbstoffeinheit so gedreht wird, dass sie näher an den OSTK-Stab und die Cumarineinheit herankommt. Hier ist der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen stark reduziert. Gleichzeitig könnte jedoch die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente  $\kappa^2$  weniger effizient sein.

Das zweite Konformer ist eine langgestreckte Form, in der der Abstand größer ist. Aber aufgrund einer fast kollinearen Orientierung der Übergangsdipolmomente, sodass  $\kappa^2$  ungefähr 4 ist, kann trotzdem ein effizienterer FRET stattfinden (siehe Abbildung 2.5). Wenn im Fall einer sehr effizienten Energieübertragung die entsprechende Fluoreszenzabklingzeit extrem kurz und folglich nicht auflösbar ist, kann wiederum bei einer weniger effizienten Energieübertragung eine verkürzte Fluoreszenzabklingzeit gemessen werden. Für ein solches System tragen nur bei den Quantenausbeutemessungen beide Konformere zur Berechnung der FRET-Effizienz bei. Bei den Abklingzeitmessungen trägt die „Dunkelform“ nicht dazu bei und eine kleinere FRET-Effizienz wird ermittelt. Die spektroskopischen Eigenschaften von Cou-OSTK-f-DBD, verglichen mit Cou-OSTK-DBD, unterstreichen den starken Einfluss von  $\kappa^2$  auf die FRET-Effizienz. Es ist zu beachten, dass sowohl für Cou-OSTK-f-DBD als auch in Cou-OSTK-DBD der Abstand zwischen Donor und Akzeptor klein ist ( $< 5$  nm) und die Dipolnäherung der FRET-Theorie nicht vollständig anwendbar ist. Die relative Orientierung von Donor und Akzeptor ist vor allem in Cou-OSTK-DBD stark fixiert, wodurch Fehler in  $\kappa^2$  nahezu ausgeschlossen werden können, was die gute Übereinstimmung zwischen der theoretischen ( $E_{\text{theo}} = 0,99$ , siehe Tabelle 4.9) und der experimentellen FRET-Effizienz ( $E_{\text{exp}} = 0,88 - 0,97$ , siehe Tabelle 4.10) für Cou-OSTK-DBD besonders interessant macht.

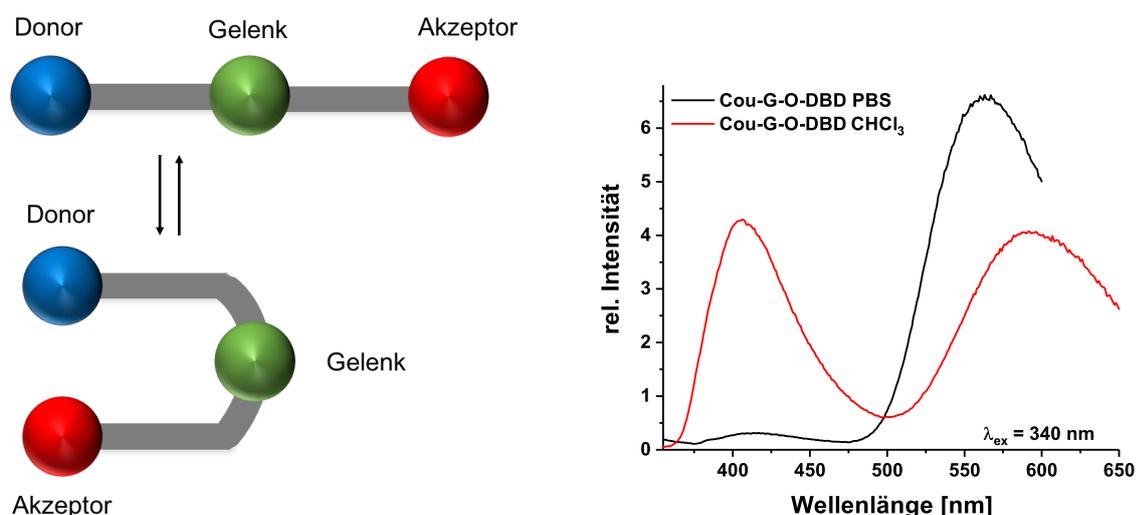
**Tabelle 4.11:** Spektroskopische Eigenschaften der FRET-Paare in verschiedenen Lösungsmitteln mit  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm für  $\lambda_{\text{max,em}}$  und  $\phi$ , sowie  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm für  $\tau$  des Donors und  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  nm für  $\lambda_{\text{max,em}}$  und  $\phi$ , sowie  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 550$  nm für  $\tau$  des Akzeptors

Donor	$\lambda_{\text{max,abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max,em}}$ [nm]	$\tau$ [ns]		$\phi$
Cou-f-DBD PBS	346	413	< 0,1	(76%)	0,04
			3,6	(24%)	
Cou-f-DBD CHCl <sub>3</sub>	346	409	< 0,1		0,01
Cou-f-DBD Aceton	346	403	< 0,1		0,01
Cou-f-DBD Vesikel	346	400	< 0,1	(88%)	0,03
			3,4	(12%)	
Cou-OSTK-f-DBD PBS	346	417	0,6	(28%)	0,04
			3,9	(72%)	
Cou-OSTK-f-DBD CHCl <sub>3</sub>	347	405	1,2		0,05
Cou-OSTK-f-DBD Aceton	346	406	0,5		0,02
Cou-OSTK-f-DBD Vesikel	346	408	0,4	(12%)	0,08
			3,0	(88%)	
Cou-OSTK-DBD PBS	346	416	< 0,1	(56%)	0,01
			3,9	(44%)	
Cou-OSTK-DBD CHCl <sub>3</sub>	349	400	< 0,1	(93%)	0,01
			1,8	(7%)	
Cou-OSTK-DBD Aceton	346	404	< 0,1	(68%)	0,01
			1,2	(32%)	
Cou-OSTK-DBD Vesikel	346	403	< 0,1	(92%)	0,03
			2,7	(8%)	
Akzeptor	$\lambda_{\text{max,abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max,em}}$ [nm]	$\tau$ [ns]		$\phi$
Cou-f-DBD PBS	456	580	7,0		0,09
Cou-f-DBD CHCl <sub>3</sub>	435	560	25,7		0,40
Cou-f-DBD Aceton	426	555	23,1		0,55
Cou-f-DBD Vesikel	436	542	10,4		0,35
Cou-OSTK-f-DBD PBS	442	570	6,2		0,06
Cou-OSTK-f-DBD CHCl <sub>3</sub>	434	550	22,5		0,74
Cou-OSTK-f-DBD Aceton	425	549	18,1		0,60
Cou-OSTK-f-DBD Vesikel	435	558	8,3		
Cou-OSTK-DBD PBS	456	610	5,1		0,14
Cou-OSTK-DBD CHCl <sub>3</sub>	440	541	22,3		0,71
Cou-OSTK-DBD Aceton	432	531	18,9		0,58
Cou-OSTK-DBD Vesikel	449	569	< 0,1	(57%)	0,35
			11,7	(43%)	

### 4.2.4 OSTK-Gelenkstäbe

Die FRET-Gelenkstäbe bestehen aus Cou-OSTK und DBD-OSTK, die durch ein Triazol-Gelenk verbunden sind (Cou-G-S-DBD) und bei dem Schwefel zum Teil durch Sauerstoff ausgetauscht wurde (Cou-G-O-DBD), wodurch es sich hier um OSK-Stäbe handelt (siehe Abbildung 3.3 unten und 4.12 links).

Die Lagen der Absorption- und Emissionsbanden entsprechen für beide Stäbe ungefähr denen von Cou-OSTK-DBD und Cou-OSTK-f-DBD (siehe Tabelle 4.13).



**Abbildung 4.12:** Schematische Darstellung der Gelenkstäbe (links) Fluoreszenzemissionsspektren ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ) für Cou-G-O-DBD in PBS (schwarz) und in CHCl<sub>3</sub> (rot) (rechts)

Von Wessig *et al.* wurden anhand von *Molecular Dynamics Simulation* (Programm MOE 2010.10, Kraftfeld MMFF94x) die Donor-Akzeptor-Abstände berechnet. Die Gelenkstäbe können in einer gestreckten und einer geknickten Form vorliegen. Die Berechnungen ergaben für die geknickte Form einen Abstand von  $R = 0,7 \text{ nm}$  und für die gestreckte Form einen Abstand von  $R = 3,9 \text{ nm}$ .<sup>74</sup>

Da sich die Fluorophore, trotz ihrer starren Bindung an die OSTK-Stäbe, durch Rotation und „Klappen“ relativ frei zwischen beiden Konformationen bewegen können, wurde für Berechnung der Försterabstände nach Gleichung 2.10 ein  $\kappa^2 = \frac{2}{3}$  angenommen. Mit Hilfe der Försterabstände und Gleichung 2.12 kann der Abstand ( $R_{\text{exp}}$ ) zwischen Donor und Akzeptor bestimmt werden. Diese Werte sind in Tabelle 4.12 zusammengefasst und schließen einen Bereich von  $R_{\text{exp}} = 2,1 \text{ nm}$  für Cou-G-O-DBD in Chloroform, sowie Cou-G-S-DBD in Aceton und  $R_{\text{exp}} = 2,7 \text{ nm}$  für Cou-O-G-DBD in PBS ein.

Aus den Ergebnissen sind nun die mittleren Abstände ersichtlich. Es gibt keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Lösungsmitteln. Das liegt sehr wahrscheinlich daran,

dass ein Gleichgewicht zwischen der geknickten und gestreckten Form vorliegt. Allerdings wurden diese Abstände aus den experimentellen FRET-Effizienzen bestimmt, welche sich je nach Lösungsmittel stark unterscheiden. So ergibt sich für die Gelenkstäbe in Aceton nur eine FRET-Effizienz von 50 – 76%, wohingegen in PBS eine FRET-Effizienz von 90 % erreicht wird. Wegen der starken Lösungsmittelabhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften von Donor und Akzeptor unterscheiden sich die Försterabstände deutlich, sodass die Donor-Akzeptor-Abstände trotz verschiedener Lösungsmittel für beide Gelenkstäbe im Bereich von  $R_{\text{exp}} = 2,1 \text{ nm} - 2,7 \text{ nm}$  liegen.

**Tabelle 4.12:** Experimentelle FRET-Effizienzen und Donor-Akzeptor-Abstände der verschiedenen FRET-Gelenkstäbe in verschiedenen Lösungsmitteln

	E ( $\phi$ )	$R_{\text{exp}}$ ( $\phi$ ) [nm]	E ( $\tau$ )	$R_{\text{exp}}$ ( $\tau$ ) [nm]
Cou-G-O-DBD PBS	$0,90 \pm 0,01$	$2,2 \pm 0,10$	$0,76 \pm 0,01$	$2,7 \pm 0,11$
Cou-G-O-DBD $\text{CHCl}_3$	$0,82 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,10$	$0,71 \pm 0,01$	$2,2 \pm 0,11$
Cou-G-O-DBD Aceton	$0,67 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,10$	$0,50 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,11$
Cou-G-O-DBD Vesikel	$0,80 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,12$	$0,79 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,12$
Cou-G-S-DBD PBS	$0,83 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,10$	$0,85 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,12$
Cou-G-S-DBD $\text{CHCl}_3$	$0,73 \pm 0,01$	$2,2 \pm 0,11$	$0,65 \pm 0,01$	$2,3 \pm 0,12$
Cou-G-S-DBD Aceton	$0,76 \pm 0,01$	$2,1 \pm 1,10$	$0,50 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,11$
Cou-G-S-DBD Vesikel	$0,80 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,12$	$0,79 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,12$

Fehlerangaben:  $\sigma(E) = \pm 0,01$ ,  $\sigma(R_{\text{exp}}) = \pm 0,01 \text{ nm}$

**Tabelle 4.13:** Spektroskopische Eigenschaften der FRET-Gelenkstäbe in verschiedenen Lösungsmitteln mit  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm für  $\lambda_{\text{max,em}}$  und  $\phi$ , sowie  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm für  $\tau$  des Donors und  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  nm für  $\lambda_{\text{max,em}}$  und  $\phi$ , sowie  $\lambda_{\text{ex}} = 450$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 550$  nm für  $\tau$  des Akzeptors

Donor	$\lambda_{\text{max,abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max,em}}$ [nm]	$\tau$ [ns]		$\phi$
Cou-G-O-DBD PBS	348	417	1,0	(7%)	0,06
			4,2	(91%)	
Cou-G-O-DBD CHCl <sub>3</sub>	348	415	0,5	(79%)	0,08
			5,6	(21%)	
Cou-G-O-DBD Aceton	344	410	0,4	(91%)	0,07
			4,8	(9%)	
Cou-G-O-DBD Vesikel	350	408	0,8	(44%)	0,13
			3,4	(56%)	
Cou-G-S-DBD PBS	348	416	0,6	(33%)	0,10
			4,1	(67%)	
Cou-G-S-DBD CHCl <sub>3</sub>	348	414	0,6	(81%)	0,12
			8,0	(19%)	
Cou-G-S-DBD Aceton	346	405	0,4	(92%)	0,05
			7,0	(8%)	
Cou-G-S-DBD Vesikel	349	407	0,8	(70%)	0,13
			3,4	(30%)	
Akzeptor	$\lambda_{\text{max,abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max,em}}$ [nm]	$\tau$ [ns]		$\phi$
Cou-G-O-DBD PBS	429	548	5,2	(36%)	0,27
			14,1	(64%)	
Cou-G-O-DBD CHCl <sub>3</sub>	435	549	23,1		0,22
Cou-G-O-DBD Aceton	426	542	19,2		0,19
Cou-G-O-DBD Vesikel	426	554	12,0		0,13
Cou-G-S-DBD PBS	438	548	5,3	(23%)	0,35
			16,5	(77%)	
Cou-G-S-DBD CHCl <sub>3</sub>	436	556	22,4		0,40
Cou-G-S-DBD Aceton	426	540	18,6		0,30
Cou-G-S-DBD Vesikel	427	553	12,0		0,19

Fehlerangaben:  $\sigma(\lambda) = \pm 2$  nm,  $\sigma(\tau) = \pm 0,1$  ns,  $\sigma(\phi) = 5\%$

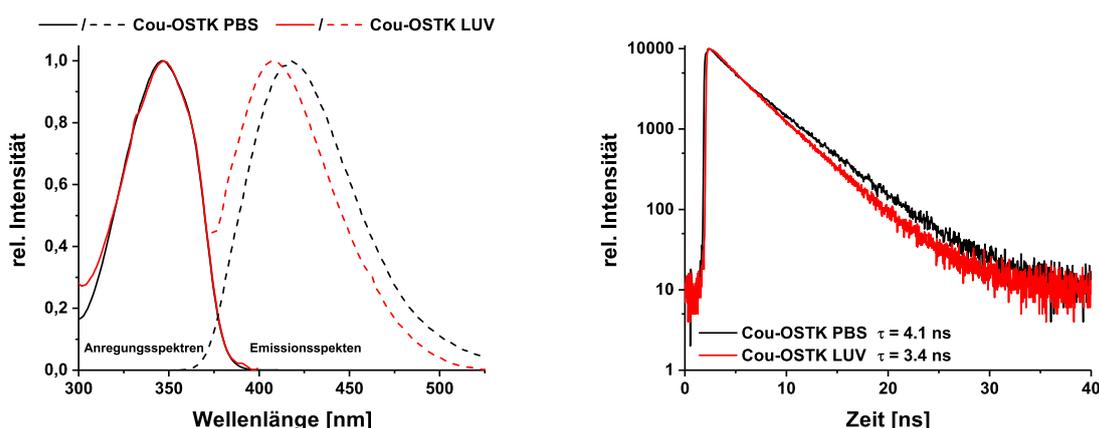
### 4.2.5 OSTK-Stäbe in Vesikeln

Mit den Erkenntnissen über die photophysikalischen Eigenschaften der einfach- und doppeltmarkierten OSTK-Stäbe, sowie der OSTK-Gelenkstäbe kann die Einlagerung der OSTK-Stäbe in die Doppellipidschicht von DOPC:DOPS-Vesikeln charakterisiert werden.

#### *Cumarin-OSTK-Stäbe in Vesikeln*

Die spektralen Eigenschaften der Cou-OSTK-Stäbe im Vesikel bleiben nahezu unverändert, verglichen mit den Eigenschaften in PBS. Für das Fluoreszenzemissionsspektrum ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ) des OSTK-Stabs im Vesikel ( $\lambda_{\text{max,em}} = 408 \text{ nm}$ ) wird nur eine leichte hypsochrome Verschiebung im Vergleich zu dem Spektrum in PBS ( $\lambda_{\text{max,em}} = 416 \text{ nm}$ ) beobachtet.

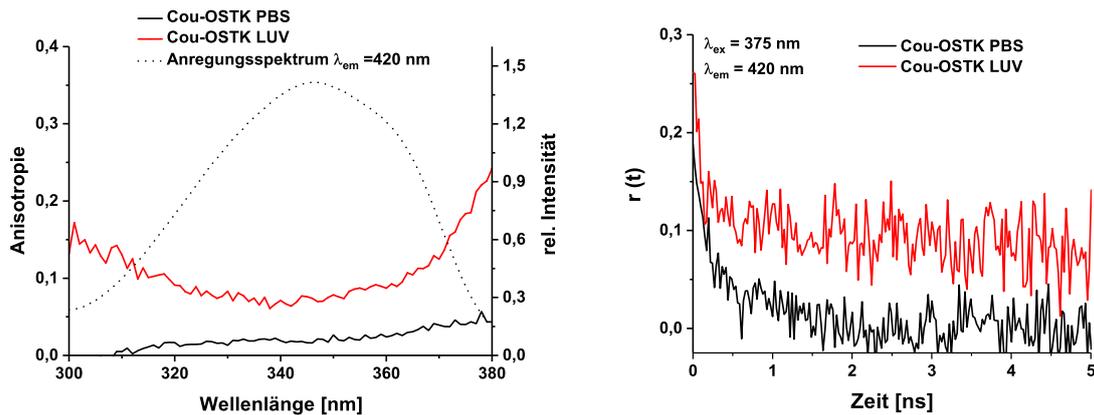
Die Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) zeigen einen monoexponentiellen Verlauf für die Cou-OSTK-Stäbe in PBS als auch eingebaut in Vesikel (siehe Abbildung 4.13 rechts). Die Fluoreszenzabklingzeit der Cou-OSTK-Stäbe in Vesikeln ( $\tau = 3,4 \text{ ns}$ ) ist kürzer als in PBS ( $\tau = 4,1 \text{ ns}$ ). Für 6,7-Alkoxycumarine wurde, wie bereits beschrieben, die Bildung eines intramolekularen Ladungstransfer- (*ICT*)-Status durch die elektronische Anregung als Grund dafür genannt.<sup>128</sup> Durch die unpolare Mikroumgebung des Cou-OSTK-Stabs im Vesikel wird das *Push-Pull*-System des Cou im Vergleich zu PBS weniger stabilisiert, was zu einer erhöhten *ISC*-Rate und somit zu einer kürzeren Fluoreszenzabklingzeit führt.



**Abbildung 4.13:** Fluoreszenzanregungs- ( $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) (durchgezogen) und -emissionsspektren ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ) (gestrichelt) für Cou-OSTK in PBS (schwarz) und in LUV (rot) (links) und die zugehörigen Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) (rechts)

In Anbetracht des amphiphilen Charakters der Cou-OSTK-Stäbe ist anzunehmen, dass die OSTK-Einheit in die Doppellipidschicht eingebaut wird, während sich das Cumarin

im Grenzflächenbereich des Vesikels befindet. Dies führt insgesamt dazu, dass sich der Cou-OSTK-Stab in einer weniger polaren Umgebung befindet und somit eine veränderte Stabilisierung der verschiedenen elektronischen Zustände eine Abnahme der Fluoreszenzabklingzeit induziert. Auch die Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften durch die Einlagerung in die Doppellipidschicht, die im Vergleich zu den verwendeten Lösungsmitteln Aceton und Chloroform relativ gering sind, unterstreichen diese Annahme.



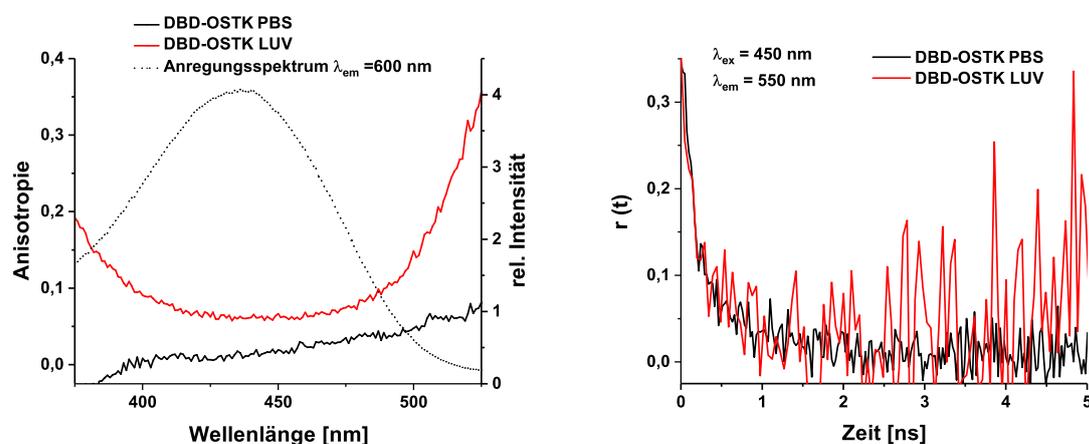
**Abbildung 4.14:** Stationäre ( $\lambda_{em} = 420$  nm) (links) und zeitaufgelöste ( $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $\lambda_{em} = 420$  nm) (rechts) Anisotropiekurven von Cou-OSTK in PBS (schwarz) und in LUV (rot)

Der erfolgreiche Einbau der Cou-OSTK-Stäbe in die Vesikel wird durch die Fluoreszenzdepolarisationsmessungen unterstützt. Aus den Werten der stationären Anisotropie sowie aus der Rotationskorrelationszeit ist ersichtlich, dass beide Parameter im Vergleich zu den Werten der Messungen in PBS erhöht sind. Der nach Gleichung 2.18 ermittelte Wert für die stationäre Anisotropie betrug für Cou-OSTK 0,08 und ist somit höher als für den freien Stab in PBS, für den der Wert nahezu 0 beträgt (siehe Abbildung 4.14) links. Die Einschränkung der Rotationsfreiheit des Cou-OSTK-Stabs ist auf den Einbau in die Doppellipidschicht zurückzuführen. Für die Analyse der zeitaufgelösten Anisotropie wurde das *wobble-in-a-cone*-Modell (Gleichung 2.22) angewendet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass das Fluorophor durch den Einbau in die Doppellipidschicht in seiner Rotation eingeschränkt ist und nur in einem Kegel mit einem definierten Kegelwinkel rotieren kann (Gleichung 2.23). Die Rotationskorrelationszeit für den Cou-OSTK-Stab im Vesikel ( $\varphi = 0,2$  ns) ist sehr schnell und nahezu gleich der des freien Cou-OSTK-Stabs in PBS. Die Rotation wird jedoch eingeschränkt und die Anisotropiekurve erreicht einen Grenzanisotropiewert ( $r_{\infty} = 0,1$ ) (siehe Abbildung 4.14 rechts), woraus sich ein Kegelwinkel von  $\theta_K = 50^\circ$  ergibt (siehe Tabelle 4.14). Dies betont, dass der Cou-OSTK-Stab erfolgreich in die hydrophobe Doppellipidschicht des Vesikels eingebaut ist, da die Werte im Bereich, anderer organischer Farbstoffe, die an Phospholipide gekoppelt sind, wie

DPH-PC und NBD-PE, in DOPC- und DPPC-Vesikeln liegen.<sup>131</sup>

### DBD-OSTK-Stäbe in Vesikeln

Im Folgenden werden Einlagerungen der DBD-OSTK-Stäbe in die Vesikel untersucht. Die spektroskopischen Eigenschaften zeigen, dass die OSTK-Stäbe in die Vesikel eingelagert werden. Allerdings ist im Vergleich zu PBS nur ein geringer Einfluss auf die Lage der Absorptions- ( $\lambda_{\max, \text{abs}}$  (DBD-f-OSTK) = 440 nm,  $\lambda_{\max, \text{abs}}$  (DBD-OSTK) = 434 nm) sowie Emissionsmaxima ( $\lambda_{\max, \text{em}}$  (DBD-f-OSTK) = 570 nm,  $\lambda_{\max, \text{em}}$  (DBD-OSTK) = 558 nm) durch den Einbau in die Vesikel zu erkennen.



**Abbildung 4.15:** Stationäre ( $\lambda_{\text{em}} = 600$  nm) (links) und zeitaufgelöste ( $\lambda_{\text{ex}} = 450$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 550$  nm) (rechts) Anisotropiekurven von DBD-OSTK in PBS (schwarz) und in LUV (rot)

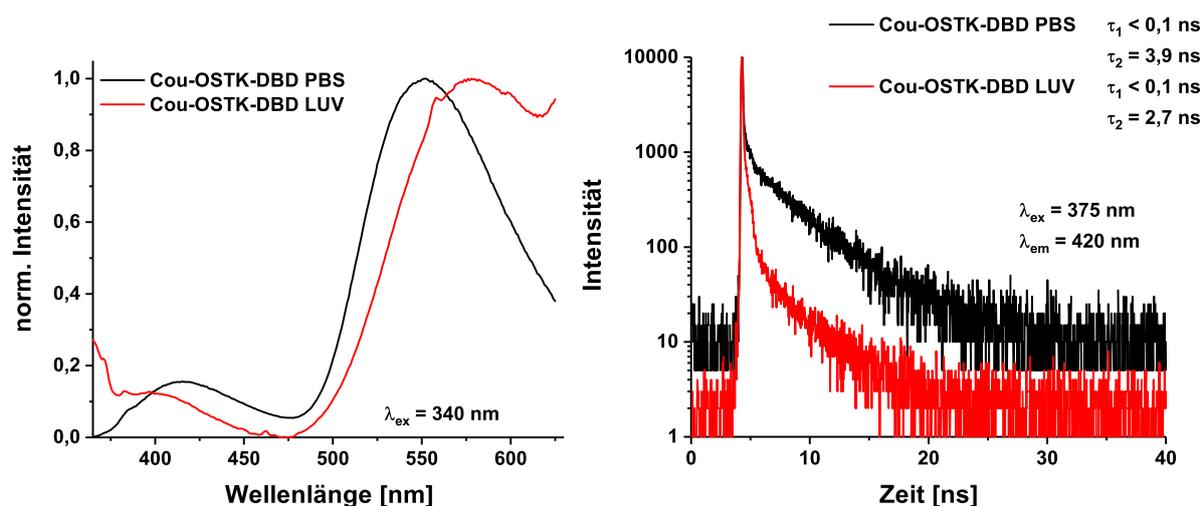
Es wird jedoch ein starker Einfluss auf die Fluoreszenzabklingzeiten und die -quantenausbeuten deutlich. Die Fluoreszenzabklingkurve des DBD-f-OSTK-Stabs im Vesikel zeigt einen monoexponentiellen Verlauf mit einer Fluoreszenzabklingzeit von  $\tau = 8,2$  ns. Der freie DBD-f-OSTK-Stab in PBS zeigte hingegen einen biexponentiellen Verlauf ( $\tau_1 = 1,4$  ns,  $\tau_2 = 4,9$  ns). Möglicherweise gibt es in PBS eine schnelle Rotation um die Einzelbindung, durch die DBD an den OSTK-Stab gebunden ist, die in gestreckter Form sehr schnell und in einer geklappten Form weniger schnell ist. Da im Vesikel nur eine, vermutlich gestreckte Form vorliegt und sich das Molekül in einer unpolaren Mikroumgebung befindet, folgt daraus ein monoexponentieller Verlauf mit einer längeren Fluoreszenzabklingzeit als in PBS. Durch die unpolare Umgebung wird auch die Fluoreszenzquantenausbeute von 0,04 auf 0,17 erhöht. Der größte Einfluss wurde für den DBD-OSTK-Stab gefunden, für den ein Anstieg der Fluoreszenzabklingzeit von 7,3 ns auf 11,1 ns und der Fluoreszenzquantenausbeute von 0,04 auf 0,32, durch die Einlagerung in die Vesikel, bestimmt wurde. Da die Doppellipidschicht, wie bereits bei den Cou-OSTK-Stäben zu sehen war, eine höhere

Polarität als Chloroform und Aceton aufweist, ist die Auswirkung auf die spektrale Lage der Absorptions- und Emissionsbanden auch deutlich geringer. Die längeren Fluoreszenzabklingzeiten bzw. die höheren Fluoreszenzquantenausbeuten zeigen jedoch deutlich eine unpolare Mikroumgebung des Farbstoffs, im Gegensatz zu PBS, die durch die Einlagerung in die Vesikel verursacht wird.

Die stationäre Anisotropie der DBD-OSTK-Stäbe im Vesikel zeigen eine leichte Zunahme der Anisotropie ( $r = 0,06 - 0,09$ ) gegenüber des freien Stabs in Lösung ( $r = 0$ ) (siehe Abbildung 4.15 links). Dies zeigt, dass die Drehung des Farbstoff durch die Interkalation in die Membran der Vesikel eingeschränkt ist. Diese Beobachtung wird zum Teil durch die zeitaufgelösten Messungen bestätigt. Die Rotationskorrelationszeit der freien DBD-OSTK-Stäbe in PBS beträgt  $\varphi = 0,1$  ns und steigt durch die Einlagerung des Stabs in die Doppellipidschicht der Vesikel für DBD-f-OSTK auf  $\varphi = 0,8$  ns (siehe Tabelle 4.14). Die relativ kleinen Werte zeigen jedoch, dass der Farbstoff, trotz Interkalation in die Membran, zwar in seiner Rotation eingeschränkt ist, aber dennoch relativ frei rotieren kann.

#### *FRET-OSTK-Stäbe in Vesikeln*

Abbildung 4.16 links zeigt das Fluoreszenzemissionsspektrum ( $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm) von Cou-OSTK-DBD in PBS verglichen mit dem Spektrum von Cou-OSTK-DBD im Vesikel. Da die Cou-Einheit bei allen OSTK-Stäben in einem starren Bindungsmotiv an den OSTK-Stab fixiert ist und der Donor-Akzeptor-Abstand sehr kurz ist, wird ein ähnlicher Einfluss wie für die einfachmarkierten Stäbe durch das Einlagern in die Vesikel beobachtet.



**Abbildung 4.16:** Fluoreszenzemissionsspektren ( $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm) für Cou-OSTK-DBD in PBS (schwarz) und in LUV (rot) (links) und die zugehörigen Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm) (rechts)

Die Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm) von Cou-OSTK-DBD in

PBS und LUV sind in Abbildung 4.16 rechts dargestellt. Diese zeigen, wie die stationären Messungen, ähnlich Ergebnisse für Cou-OSTK-DBD in PBS ( $\tau_1 < 0,1$  ns,  $\tau_2 = 3,9$  ns) und Cou-OSTK-DBD im Vesikel ( $\tau_1 < 0,1$  ns,  $\tau_2 = 2,7$  ns), im Vergleich zu den einfachmarkierten OSTK-Stäben. Die lange Komponente der Fluoreszenzabklingzeit wird durch die unpolarere Mikroumgebung und die daraus resultierende höhere *ISC*-Rate kürzer.

Die Parameter der stationären Anisotropie (siehe Tabelle 4.14) zeigen den Einfluss auf die Rotation aller doppeltmarkierter OSTK-Stäbe durch die Interkalation in die Vesikel. Der Einfluss auf die Rotation der Farbstoffe der doppeltmarkierten OSTK-Stäbe in den Vesikeln ist stärker als für die einfachmarkierten OSTK-Stäbe. Der Wert der stationären Anisotropie für den Cumarin-Teil von Cou-OSTK-DBD ( $r = 0,12$ ) im Vesikel ist höher als für den einfachmarkierten Cou-OSTK-Stab ( $r = 0,08$ ). Der Einfluss auf die Rotation des DBD-Teils von Cou-OSTK-DBD ( $r = 0,07$ ), der aufgrund der Interkalation in die Membran stattfindet, scheint fast der gleiche zu sein, wie für den einfachmarkierten DBD-OSTK-Stab in dem Vesikel ( $r = 0,06$ ) (siehe Tabelle 4.14).

Dies zeigt, dass sich der DBD-Teil der Stäbe auch für die doppeltmarkierten Stäbe in die Vesikelmembran einlagert. Und aufgrund der Bindung an den DBD-OSTK Stab kann der Cumarin-Teil des FRET-OSTK-Stabs tiefer in die Membran gelangen, wodurch die Drehung stärker gehindert wird, als für den einfachmarkierten Cou-OSTK-Stab.

Die Werte der zeitaufgelösten Anisotropie für Cou-OSTK-DBD im Vesikel im Vergleich zu den Daten für Cou-OSTK-DBD in PBS sind ebenfalls in Tabelle 4.14 zusammengefasst. Sowohl für den Cumarin-Teil als auch für den DBD-Teil ist ein großer Einfluss auf die Rotation sichtbar und zeigt, dass sich Cou-OSTK-DBD sehr gut in die Doppellipidschicht der Vesikel einlagert, sich die Werte für die stationäre Anisotropie im Bereich der schon oben erwähnten DPH-PC und NBD-PE in DOPC- und DPPC-Vesikeln befinden ( $r = 0,08 - 0,15$ ).<sup>131</sup>

Beim Vergleich der Rotationskorrelationszeiten für den einfachmarkierten Cou-OSTK-Stab ( $\varphi = 0,2$  ns) und dem Cumarin-Teil von Cou-OSTK-DBD ( $\varphi = 2,1$  ns) wird ein Anstieg der Rotationskorrelationszeit für das Cumarin von Cou-OSTK-DBD deutlich. Dies unterstreicht die Aussage, dass das Cumarin durch die Bindung an Cou-OSTK-DBD tiefer in die Membran gelangt. Anhand der Werte der zeitaufgelösten Anisotropie wird außerdem deutlich, dass der DBD-Teil von Cou-OSTK-DBD durch die Bindung an den Cou-markierten Stab stark in seiner Rotation in dem Vesikel beeinflusst wird, was aus den stationären Messungen nicht hervorging. Die Rotationskorrelationszeit ist wesentlich länger als die Fluoreszenzabklingzeit, sodass die Berechnung eines genauen Wertes nicht möglich ist. Aus dem Wert der Grenzanisotropie kann jedoch ein Kegelwinkel von  $\theta_K = 35^\circ$  berechnet werden (siehe Tabelle 4.14). Dieser ist deutlich kleiner als für den einfachmarkierten DBD-OSTK-Stab im Vesikel und zeigt, dass auch die Rotation des DBD-Teils von Cou-OSTK-DBD durch die Bindung an den Cou-markierten Stab bei der Einlagerung in

die Doppellipidschicht beeinflusst wird. Die FRET-Effizienzen sowie die Donor-Akzeptor-Abstände hingegen sind für alle FRET-Paar sehr nah an den Ergebnissen in PBS (siehe Tabelle 4.10). Daher sind die Ergebnisse der FRET-Paare im Vesikel ausschließlich auf die Einflüsse der Doppellipidschicht zurückzuführen und nicht etwa auf eine Änderung des Donor-Akzeptor-Abstands.

**Tabelle 4.14:** Anisotropieparameter der einfach- und doppeltmarkierten OSTK-Stäbe in PBS und in Vesikeln mit  $\lambda_{em} = 420$  nm für r, sowie  $\lambda_{ex} = 375$  nm und  $\lambda_{em} = 420$  nm für  $r_\infty$ ,  $\varphi$  und  $\theta_K$  des Donors und  $\lambda_{em} = 600$  nm für r, sowie  $\lambda_{ex} = 450$  nm und  $\lambda_{em} = 550$  nm für  $r_\infty$ ,  $\varphi$  und  $\theta_K$  des Akzeptors

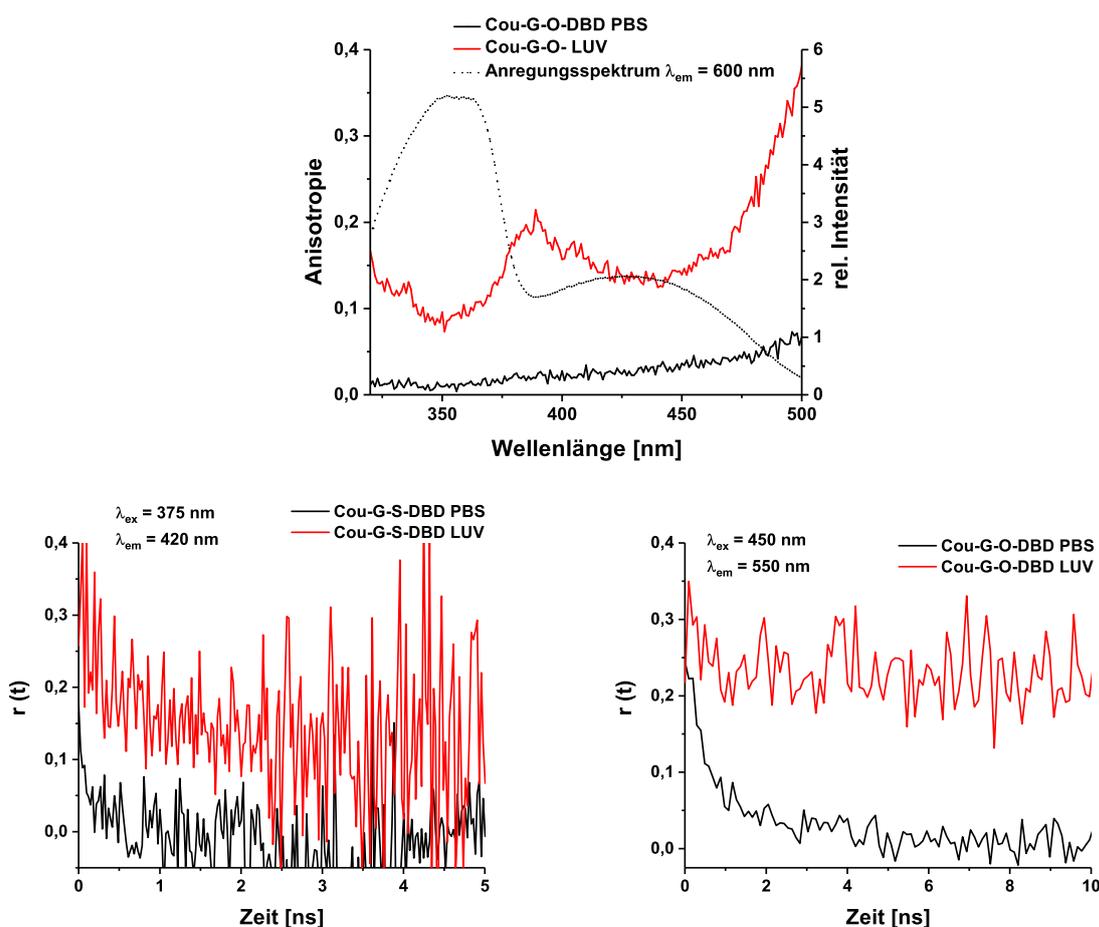
	r		$r_\infty$		$\varphi$ [ns]		$\theta_K$ [°]	
	Cou	DBD	Cou	DBD	Cou	DBD	Cou	DBD
Cou PBS	0	–	0	–	0,3	–	–	–
Cou Vesikel	0	–	0	–	0,2	–	–	–
Cou-OSTK PBS	0	–	0	–	0,3	–	–	–
Cou-OSTK Vesikel	0,08	–	0,10	–	0,2	–	50	–
DBD PBS	–	0	–	0	–	0,1	–	–
DBD Vesikel	–	0	–	0,05	–	0,2	–	60
DBD-f-OSTK PBS	–	0	–	0	–	0,1	–	–
DBD-f-OSTK Vesikel	–	0,06	–	0,07	–	0,8	–	55
DBD-OSTK PBS	–	0	–	0	–	0,3	–	–
DBD-OSTK Vesikel	–	0,09	–	0	–	0,2	–	–
Cou-f-DBD PBS	0	0	0	0	0,3	0,2	–	–
Cou-f-DBD Vesikel	0,09	0,07	0,10	0,07	0,3	0,3	50	55
Cou-OSTK-f-DBD PBS	0	0	0	0	0,2	0,1	–	–
Cou-OSTK-f-DBD Vesikel	0,12	0,18	0,10	0,08	0,4	0,3	50	50
Cou-OSTK-DBD PBS	0	0	0	0	0,2	0,3	–	–
Cou-OSTK-DBD Vesikel	0,12	0,07	0,04	0,15	2,1	*	60	35
Cou-G-O-DBD PBS	0	0	0	0	0,6	0,8	–	–
Cou-G-O-DBD Vesikel	0,10	0,15	0,12	0,20	0,3	1,4	40	30
Cou-G-S-DBD PBS	0	0	0	0	0,7	0,2	–	–
Cou-G-S-DBD Vesikel	0,19	0,14	0,12	0,11	0,8	0,4	40	40

\* wesentlich länger als die Fluoreszenzabklingzeit, daher nicht bestimmbar  
Fehlerangaben:  $\sigma(r) = \pm 0,02$ ,  $\sigma(r_\infty) = \pm 0,02$ ,  $\sigma(\varphi) = \pm 0,1$  ns,  $\sigma(\theta_K) = \pm 5^\circ$

#### Gelenkstäbe in Vesikeln

In Kapitel 4.2.4 wurde davon ausgegangen, dass die Gelenkstäbe in einem Gleichgewicht zwischen einer geknickten und einer gestreckten Konformation vorliegen. Bei den Werten der in Vesikel eingelagerten Gelenkstäbe kann nun jedoch davon ausgegangen werden, dass die Moleküle nicht in geknickter Form vorliegen. Die lange Komponente der Fluo-

reszenzabklingzeit ( $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) entspricht mit  $\tau_2 = 3,4 \text{ ns}$  jeweils dem Wert für Cou-OSTK im Vesikel. Aus den kurzen Komponenten, sowie aus den Fluoreszenzquantenausbeuten, wurden die FRET-Effizienzen und die Donor-Akzeptor-Abstände berechnet. Die Werte für  $R_{\text{exp}}$  in den Vesikeln (siehe Tabelle 4.12) sind mit  $2,5 - 2,6 \text{ nm}$  die größten Abstände für Donor und Akzeptor (ausgenommen  $R_{\text{exp}}(\phi)$  für Cou-G-O-DBD in PBS) und zeigen, dass die Gelenkstäbe in der gestreckten Form vorliegen.



**Abbildung 4.17:** Stationäre ( $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$ ) (oben) und zeitaufgelöste ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$  (links) und  $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$  (rechts)) (unten) Anisotropiekurven der Gelenkstäbe in PBS (schwarz) und in LUV (rot)

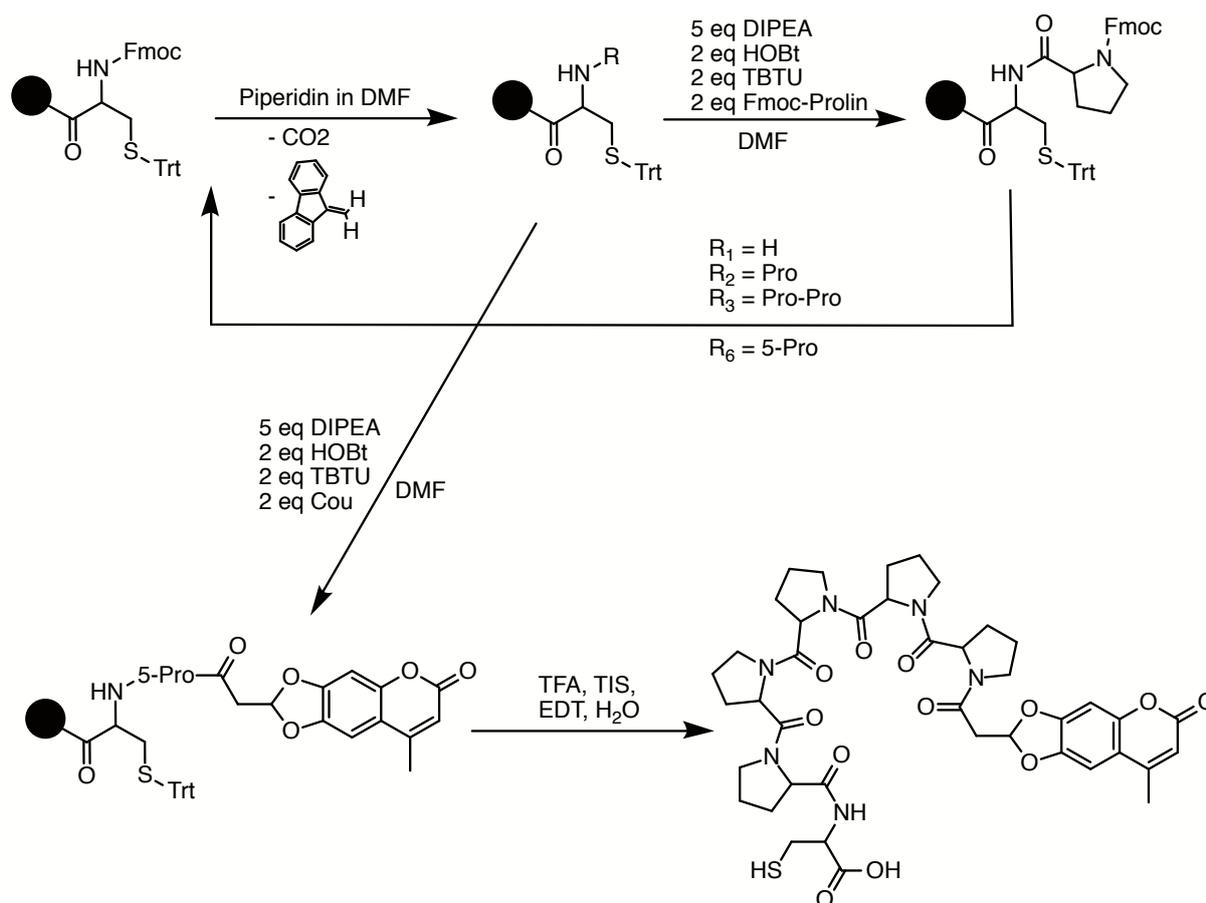
Um die Interkalation der Gelenkstäbe genauer zu untersuchen, wurden die stationären und zeitaufgelösten Depolarisationsmessungen mit den Gleichungen 2.18, 2.21, 2.22 und 2.23 ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.14 zusammengefasst. In Abbildung 4.17 oben sind die Anisotropiekurven der stationären Depolarisationsmessungen von dem Gelenkstab Cou-G-O-DBD in PBS (schwarz) und im Vesikel (rot), die bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$  aufgenommen wurden, zu sehen. Die Kurve für den

Gelenkstab in PBS zeigt eine Anisotropiewerte um 0, weil der Farbstoff frei in der Lösung rotieren kann. Dieser Wert verändert sich deutlich, wenn der Farbstoff in die Vesikel eingelagert wurde. Der mittlere Wert für die Anisotropie des Cou-Teils des Stabs zeigt eine deutliche Hinderung der Rotation mit Werten von  $r = 0,10$  für Cou-G-O-DBD und  $r = 0,19$  für Cou-G-S-DBD. Auch der DBD-Teil der Moleküle ist stark in seiner Rotation eingeschränkt, sodass die Anisotropie Werte von  $0,14 - 0,15$  erreicht. Die Werte sind gut mit denen der anderen FRET-Paar zu vergleichen und zeigen, dass der Einfluss der Membran auf die Rotation der Gelenkstäbe ähnlich ist, wie für die kürzeren FRET-OSTK-Stäbe.

Aus den Werten der zeitaufgelösten Anisotropie, die nach dem *wobble-in-a-cone*-Modell angepasst wurden, ist nur ein kleiner Einfluss auf die Rotationskorrelationszeiten von Cou und DBD zu erkennen. Allerdings ist die deutliche Einschränkung der Rotation durch die jeweilige Grenzanisotropie ( $r_\infty = 0,11 - 0,20$ ) und die daraus resultierenden Kegelwinkel zu erkennen. Aus den Werten ergibt sich, dass sowohl der Cou- als auch der DBD-Teil nur noch in einem Kegelwinkel von  $\theta_K = 30^\circ - 40^\circ$  rotieren können (siehe Tabelle 4.14). Das bedeutet, dass die Farbstoffe zwar in ihrer Rotation eingeschränkt sind und nur noch in dem jeweiligen Kegelwinkel rotieren können. Diese Einschränkung hat jedoch keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Rotation, die sich in der Rotationskorrelationszeit widerspiegelt.

### 4.3 Cou- und DBD-funktionalisierte Polyproline an Goldnanopartikeln

Die Reaktionsgleichung für die Festphasenpeptidsynthese von Cys-5-Pro-Cou ist in Abbildung 4.18 dargestellt (Strukturformel siehe Abbildung 3.6).



**Abbildung 4.18:** Reaktionsgleichung für die Synthese von Cys-5-Pro-Cou

Im ersten Schritt wird mit Hilfe von Piperidin die Fmoc-Schutzgruppe am Cystein abgespalten. Während der Kupplungsreaktion mit DIPEA, HOBT und TBTU wird die erste Fmoc-geschützte Prolineinheit durch die Bildung einer Peptidbindung an das Cystein gekoppelt. Durch mehrfaches Wiederholen der ersten beiden Schritte, wird die Polyprolinkette bis zur gewünschten Länge synthetisiert. Wird im Kopplungsschritt Cou bzw. DBD anstatt Prolin verwendet, wird die Polyprolinkette mit dem Farbstoff funktionalisiert. Mit TFA, TIS, EDT und Wasser wird das Polyprolin von dem Wang-Harz abgespalten und gleichzeitig wird die Trt-Schutzgruppe abgespalten.

Im Folgenden werden die synthetisierten, farbstoffmarkierten Polyproline in PBS charakterisiert. Als Modell für die spätere Verwendung von OSTK-Stäben in einer Einzelmolekül-

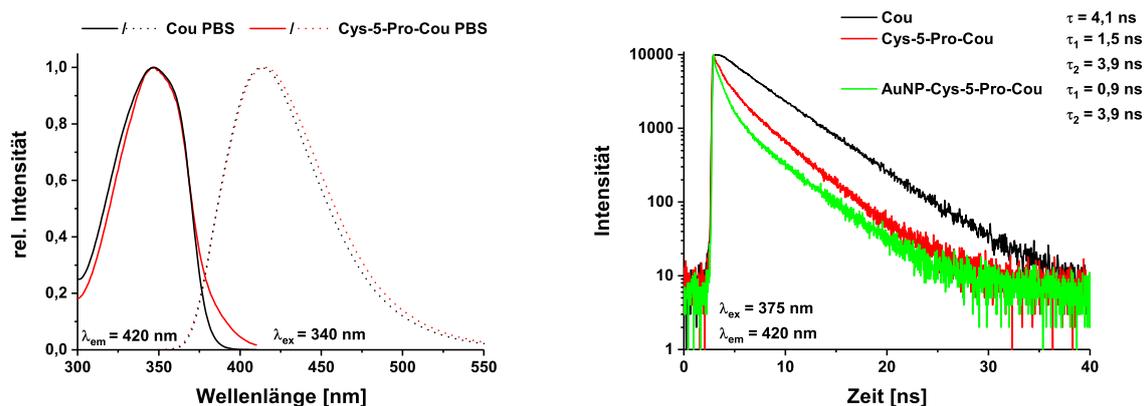
FRET-AFM-Nanoskopie wurden sie an Goldnanopartikel gekoppelt. Dabei wurde der Einfluss der AuNP auf die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe, z.B. hinsichtlich eines nanopartikelbasierten Oberflächenenergietransfer, untersucht.

### 4.3.1 Cys-x-Pro-Cou

In diesem Kapitel werden die spektroskopischen Eigenschaften der mit Cou funktionalisierten Polyproline erläutert und ihre Bindung an 5 nm große AuNP untersucht.

#### *Cys-x-Pro-Cou in PBS*

Die Verbindungen mit 5, 8, 11 und 14 Prolineinheiten, die mit Cumarin funktionalisiert wurden, zeigten keine Unterschiede in den Fluoreszenzanregungs- ( $\lambda_{em} = 420$  nm) und -emissionsspektren ( $\lambda_{ex} = 340$  nm) verglichen mit dem freien Farbstoff Cou. Das Absorptionsmaximum liegt um  $\lambda_{max,abs} = 346$  nm und das Fluoreszenzmaximum liegt um  $\lambda_{max,em} = 415$  nm (siehe Tabelle 4.15 und Abbildung 4.19 links).



**Abbildung 4.19:** Fluoreszenzanregungs- ( $\lambda_{em} = 420$  nm) (durchgezogen) und -emissionsspektren ( $\lambda_{ex} = 340$  nm) (gestrichelt) für Cou in PBS (schwarz) und Cys-5-Pro-Cou (rot) (links) und Fluoreszenzabklingkurven ( $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $\lambda_{em} = 420$  nm) für Cou, Cys-5-Pro-Cou und AuNP-Cys-5-Pro-Cou (grün) (rechts)

Betrachtet man jedoch den Verlauf der jeweiligen Fluoreszenzabklingkurve ( $\lambda_{ex} = 375$  nm,  $\lambda_{em} = 420$  nm) in Abbildung 4.19 rechts (beispielhaft für Cys-5-Pro-Cou) wird deutlich, dass sich der Verlauf von einem monoexponentiellen Verlauf mit einer Abklingzeit von  $\tau = 4,1$  ns des freien Cou in PBS zu einem biexponentiellen Verlauf, durch die Bindung an die Prolineinheiten, verändert.

Die Anpassung der Abklingkinetiken nach Gleichung 2.4 ergeben eine kurze Komponente um  $\tau_1 = 0,7 - 1,5$  ns und eine längere Komponente  $\tau_2 = 3,8 - 3,9$  ns, die sehr nah an der

Abklingzeit des freien Cou in PBS liegt. Wie in Kapitel 4.2.1 bereits beschrieben, zeigt der Cumarinvorläufer Cou eine starke Umgebungssensitivität auf. In unpolarer Umgebung liegt der  $^1(\pi\pi^*)$ -Zustand oberhalb des  $^3(n\pi^*)$ -Zustands und so ist die ISC-Rate sehr effizient, was durch eine kurze Fluoreszenzabklingzeit deutlich wird. Die lange Komponente ist für alle vier Verbindungen der Cumarineinheit in PBS zuzuordnen. Für die kurzen Komponenten lässt sich schlussfolgern, dass sich der Farbstoff durch seine freie Rotation auf bzw. in die Helixstruktur der Polyproline einbettet, was zu einer unpolaren Umgebung führt und wodurch Wechselwirkungen mit den Prolineinheiten möglich sind. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass die kurze Komponente der Abklingzeiten mit zunehmender Kettenlänge des Polyprolins kürzer wird. Das bedeutet, dass die Mikroumgebung des Cumarins unpolarer wird bzw. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Prolineinheiten und der Cumarineinheit gebildet werden. Dass sowohl die Abklingzeit für Cou in PBS als auch eingebettet in das Polyprolin ermittelt wurde, lässt den Schluss zu, dass beide Strukturen in der Lösung vorliegen.

#### *Cys-x-Pro-Cou und Goldnanopartikel*

Durch die hohe Affinität von Schwefel zu Gold ist es möglich, die Polyproline über die Cysteineinheit an Gold zu binden. Da die Emissionsbande des Cys-5-Pro-Cou in PBS gut mit der Plasmonenbande der 5 nm großen AuNP überlappt, wurde die Möglichkeit eines Energietransfers auf die Goldnanopartikel erwogen. Der Energietransfer der Goldnanopartikel zeigt hierbei, wie FRET, eine Abstandabhängigkeit. Diese ist jedoch nicht  $R^{-6}$ , sondern  $R^{-4}$  (siehe Gleichung 2.28 und 2.29). Da die Polyproline in ihrer Form als  $\alpha$ -Helix als gute Abstandshalter zwischen Goldnanopartikel und Cou fungieren, wurden Untersuchungen zu einer Energieübertragung auf einen „dunklen“ Akzeptor durchgeführt. Wie aus Tabelle 4.15 hervorgeht, gibt es keinen Einfluss auf die Lage der Absorptions- und Fluoreszenzbanden des Farbstoffs Cou. Weiterhin gibt es nur einen geringen Einfluss auf die Fluoreszenzabklingzeiten. Es wäre zu erwarten, dass die Fluoreszenzabklingzeit durch den Energietransfer von Cou auf die AuNP kürzer wird. In Abbildung 4.19 rechts ist ein erster Trend in diese Richtung zu erkennen. Durch die Anbindung von Cys-5-Pro-Cou an die AuNP wird die kurze Komponente von  $\tau_1 = 1,5$  ns auf  $\tau_1 = 0,9$  ns verkürzt. Dieser Trend lässt sich jedoch nicht fortsetzen, da die kurze Komponente für alle Polyproline gebunden an AuNP bei  $\tau_1 \approx 1,0$  ns liegt. Es ist zu vermuten, dass die Abstände des Farbstoffs zu dem AuNP, durch die freie Beweglichkeit von Cou bzw. die Interkalation in die Helix, im Mittel für alle Polyproline gleich war. Dadurch ließ sich kein Unterschied der Abklingzeiten oder der Fluoreszenzintensität herausarbeiten. Gibt es keine abstandsabhängige Veränderung der spektroskopischen Eigenschaften von Cou gekoppelt an Polyprolineinheiten, ist dies im Hinblick auf die Entwicklung einer Einzelmolekül-FRET-AFM-Nanoskopie besonders von Vorteil, da vorhandene Einflüsse auf die Fluoreszenz in

einem solchen Beispiel vermutlich ausschließlich durch FRET zustande kommen.

**Tabelle 4.15:** Spektroskopische Eigenschaften Cys-x-Pro-Cou-Verbindungen in PBS und an AuNP mit  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm für  $\lambda_{\text{max,abs}}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 340$  nm für  $\lambda_{\text{max,em}}$ , sowie  $\lambda_{\text{ex}} = 375$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm für  $\tau$

	$\lambda_{\text{max,abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max,em}}$ [nm]	$\tau$ [ns]
Cou PBS	346	415	4,1
Cys-5-Pro-Cou PBS	348	416	1,5 (33 %)
			3,9 (67 %)
Cys-8-Pro-Cou PBS	345	414	0,9 (28 %)
			3,9 (72 %)
Cys-11-Pro-Cou PBS	344	415	0,9 (33 %)
			3,8 (67 %)
Cys-14-Pro-Cou PBS	346	414	0,7 (56 %)
			3,9 (44 %)
Cys-5-Pro-Cou AuNP	344	418	0,9 (41 %)
			3,9 (59 %)
Cys-8-Pro-Cou AuNP	345	417	1,1 (44 %)
			5,6 (56 %)
Cys-11-Pro-Cou AuNP	358	416	1,1 (39 %)
			5,8 (61 %)
Cys-14-Pro-Cou AuNP	339	417	1,0 (43 %)
			5,8 (57 %)

Fehlerangaben:  $\sigma(\lambda) = \pm 2$  nm,  $\sigma(\tau) = \pm 0,1$  ns

### 4.3.2 Cys-x-Pro-DBD

Im Folgenden werden die spektroskopischen Eigenschaften der mit DBD funktionalisierten Polyproline erläutert und ihre Bindung an 5 nm große AuNP untersucht.

#### *Cys-x-Pro-DBD in PBS*

Wie bereits in Kapitel 4.2.2 erläutert wurde, sind die spektroskopischen Eigenschaften von DBD sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen, wie Substitution von einflussnehmenden Gruppen oder der Polarität des Lösungsmittels.

Wie Tabelle 4.16 zu entnehmen ist, hat die Bindung an die Polyprolineinheiten einen deutlichen Einfluss auf die photophysikalischen Eigenschaften des Farbstoffs. Die Absorption wird durch die Bindung um 100 nm und die Emission um 60 – 90 nm (siehe Abbildung 4.20 links) hypsochrom verschoben. Daraus resultiert, dass die Stokesverschiebung von  $\Delta\lambda = 164$  nm bis hin zu  $\Delta\lambda = 219$  nm größer wird. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Umgebung des Farbstoffs unpolarer wird.

**Tabelle 4.16:** Spektroskopische Eigenschaften Cys-x-Pro-DBD-Verbindungen in PBS und an AuNP mit  $\lambda_{em} = 600$  nm für  $\lambda_{max,abs}$ ,  $\lambda_{ex} = 400$  nm für  $\lambda_{max,em}$ , sowie  $\lambda_{ex} = 400$  nm und  $\lambda_{em} = 500$  nm für  $\tau$

	$\lambda_{max,abs}$ [nm]	$\lambda_{max,em}$ [nm]	$\tau$ [ns]
DBD PBS	448	612	6,4
DBD-5-Pro-DBD PBS	351	531	2,3 (54 %)
			13,2 (46 %)
DBD-8-Pro-DBD PBS	344	563	1,5 (60 %)
			12,0 (40 %)
DBD-11-Pro-DBD PBS	345	525	1,4 (59 %)
			14,4 (41 %)
DBD-14-Pro-DBD PBS	348	526	1,7 (62 %)
			13,2 (38 %)
DBD-5-Pro-DBD AuNP	398	463	5,9
DBD-8-Pro-DBD AuNP	401	463	6,0
DBD-11-Pro-DBD AuNP	400	463	6,0
DBD-14-Pro-DBD AuNP	401	463	5,9

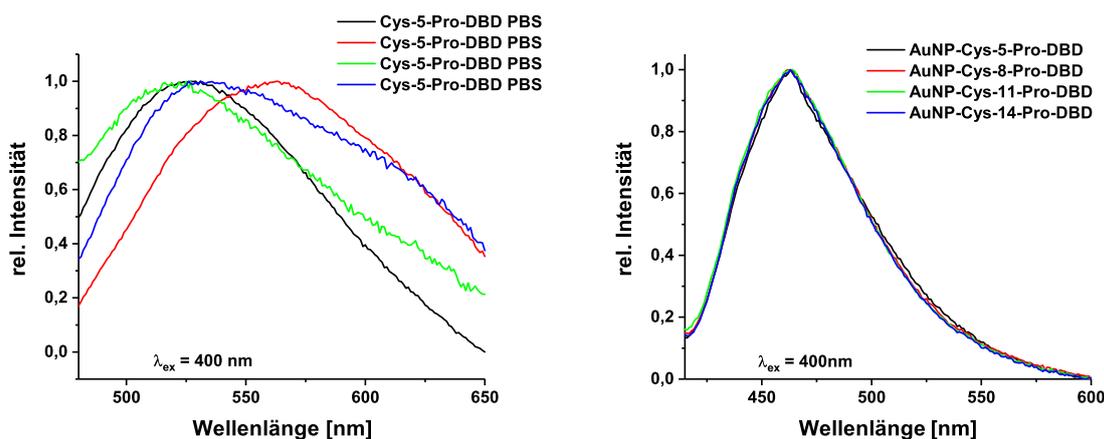
Fehlerangaben:  $\sigma(\lambda) = \pm 2$  nm,  $\sigma(\tau) = \pm 0,1$  ns

In den Fluoreszenzabklingzeiten (siehe Tabelle 4.16) ist ein ähnliches Verhalten wie für die mit Cou funktionalisierten Polyproline zu erkennen. Durch die Bindung an die Polyprolinhelix wird ein biexponentielles Fluoreszenzabklingverhalten des Farbstoffs sichtbar. Dies kann durch die Bindung verursacht worden sein. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei DBD-f-OSTK in Kapitel 4.2.2 deutlich. Dort zeigte sich in PBS ein biexponentielles Abklingverhalten für den Farbstoff, der flexibel an den OSTK-Stab gebunden war. Die mit DBD funktionalisierten Polyproline zeigen ein ähnliches Verhalten. Es gibt eine kurze Komponente  $\tau_1 = 1,4 - 2,3$  ns und eine lange Komponente  $\tau_2 = 12,0 - 14,4$  ns. Die zweite Komponente zeigt deutlich eine unpolare Umgebung für DBD, die durch das Polyprolingrundgerüst bzw. Wechselwirkungen mit diesem, verursacht wird. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Polyprolinen-DBD-Farbstoffen sind vermutlich eher auf Verunreinigungen aus der Synthese, als auf die unterschiedliche Kettenlänge zurückzuführen.

#### *Cys-x-Pro-DBD und Goldnanopartikel*

Da für den DBD-Farbstoff die Emission nicht mit der Plasmonenbande der AuNP überlappt, ist hier auch keine abstandsabhängige Beeinflussung der Fluoreszenz zu erwarten. Gebunden an die AuNP zeigen die Cys-x-Pro-DBD aber ein interessantes Verhalten. Scheinen die Fluoreszenzemissionsbanden der Cys-x-Pro-DBD in PBS zueinander etwas willkürlich verschoben, so zeigen sie, gebunden an die AuNP, identische Fluoreszenzemis-

sionsspektren mit der gleichen Intensität (siehe Abbildung 4.20). Sollte in den Proben in PBS noch kleine Mengen an ungebundenen Farbstoff vorhanden sein, so wäre dieser in den Fluoreszenzmessungen sichtbar. Durch die Aufarbeitung nach der Kupplung an die AuNP mit einem 100 kDa-Zentrifugenfilter kann nun in diesen Proben nur noch funktionalisiertes Peptid vorhanden sein, dass an AuNP gebunden ist, da der freie Farbstoff kleiner als 100 kDa ist. Daraus resultieren identische Fluoreszenzemissionsspektren für alle AuNP-Cys-x-Pro-DBD.



**Abbildung 4.20:** Fluoreszenzemissionsspektren ( $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ ) Cys-x-Pro-DBD (links) und AuNP-Cys-x-Pro-DBD (rechts)

Auch die Fluoreszenzabklingkurven zeigen für alle Cys-x-Pro-DBD gekoppelt an die AuNP das gleiche Verhalten. Verglichen zu den Proben in PBS zeigen sie nun ein monoexponentielles Abklingverhalten mit einer Abklingzeit  $\tau \approx 6,0 \text{ ns}$ , die sehr nah an dem Wert des freien Farbstoffs in PBS liegt. Im Allgemeinen scheint die Bindung an die AuNP dafür zu sorgen, dass nur eine Form des jeweiligen Cys-x-Pro-DBD vorliegt und der DBD-Farbstoff sich nicht in das Peptid einlagert, sondern mit dem Puffer wechselwirken kann. Wie für die Cou-funktionalisierten Polyproline, die an AuNP gekoppelt wurden, zeigt sich, dass auch die DBD-Farbstoffe sehr gut für die Verwendung in einer Einzelmolekül-FRET-AFM-Nanoskopie eignen. Nach der Bindung an die Goldnanopartikel gibt es keinen abstandsabhängigen Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften der DBD-markierten Polyproline. So kann bei FRET-Untersuchungen ein Einfluss des Goldes ausgeschlossen werden und Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften auf eine Energieübertragung zurückgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Basis für die Entwicklung einer Einzelmolekül-AFM-FRET-Nanoskopie basierend auf Cumarin- (Cou) und DBD-funktionalisierten OSTK-Stäben gelegt.

Im ersten Teil wurde dafür die Photophysik der Cumarine ausführlich untersucht und dabei außerdem der Vorteil von 7-Aminocumarinen als Fluoreszenzsonde für Fluoreszenzimmunassays in den Mittelpunkt gestellt. Die Bindung von monoklonalen Antikörpern mAb G100-AG7 und mAb G100-HB9 an acht verschiedene 7-Aminocumarine (siehe Abbildung 3.1) wurde mit verschiedenen fluoreszenzspektroskopischen Methoden charakterisiert. Aufgrund der zunehmenden räumlichen Anforderungen, durch die sperrigen Seitenketten, wurde eine Abnahme der Wechselwirkungsstärke zwischen dem jeweiligen Farbstoff und den beiden Antikörpern erwartet. Die spektroskopischen Untersuchungen der Immunkomplexe zeigen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Antikörpern in Bezug auf Veränderungen in den Fluoreszenzeigenschaften, wie die Verstärkungsfaktoren, die spektrale Verschiebung der Absorptions- und Fluoreszenzemissionsbanden, die Veränderung der Fluoreszenzabklingzeiten sowie der Anisotropie. Für G100-AG7 wurde im Allgemeinen eine starke Fluoreszenzverstärkung in Kombination mit einer starken Abnahme der Stokesverschiebung in den Immunkomplexen mit den verschiedenen Farbstoffen gefunden. Im Gegensatz dazu wurde keine, bzw. nur eine geringfügige, Verstärkung der Fluoreszenzintensität für die G100-HB9-Immunkomplexe beobachtet. Darüber hinaus ist auch die Stokesverschiebung im Vergleich zu den jeweiligen Farbstoffen in PBS für diesen Antikörper nur geringfügig beeinflusst. Diese Ergebnisse wurden durch die Anisotropieergebnisse ergänzt. Für den mAb G100-AG7 sind die Anisotropieparameter ( $r_\infty$  und  $\varphi$ ) der verschiedenen Farbstoffen in den jeweiligen Immunkomplexen sehr ähnlich und unterscheiden sich deutlich von den Werten in PBS, die eine Bindung des Farbstoffs mit einer signifikanten Verringerung seiner Beweglichkeit des Farbstoff oder Teilen davon, angeben. Andererseits werden für mAb G100-HB9 die beobachteten Parameter kleiner und sind nur geringfügig anders als die jeweiligen Werte in PBS. Dies zeigt, dass die Farbstoffe zwar an den mAb G100-HB9 gebunden waren, aber anders im Vergleich zu mAb G100-AG7, z.B. mit einer geringeren Einschränkung der Farbstoffbeweglichkeit.

Die Photophysik der Cumarinfarbstoffe zeichnet sich durch die Bildung eines fluoreszierenden intramolekularen Ladungstransfer-Zustands (*ICT*) aus. Die Polarität der mo-

lekularen Umgebung spielt eine Schlüsselrolle in Bezug auf die Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima. Im speziellen Fall der 7-Aminocumarine stellt die Bildung eines *TICT*-Zustands einen wirksamen konkurrierenden nichtstrahlenden Deaktivierungskanal dar. Aufgrund der Bindung an mAb G100-AG7 ist die Rotation der Aminogruppe der Cumarinfarbstoffe stark eingeschränkt und die Bildung des *TICT*-Zustands wird eingeschränkt. Daraus folgen eine stärkere Fluoreszenz, längere Fluoreszenzabklingzeiten und kleinere Stokesverschiebungen. Für mAb G100-HB9 wird nur für DEAC und Cou-476 eine ähnlich starke Veränderungen in den Anisotropieparametern gefunden, was eine vergleichbare starke Bindung dieser beiden Farbstoffe durch den Antikörper anzeigt. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass diese beiden Farbstoffe im Grunde die Stammverbindung darstellen, die verwendet wurde, um beide mAb zu generieren.

Mit seinen fluoreszenzverstärkenden Merkmalen kann der Antikörper G100-AG7, und für einige Fluorophore auch mAb G100-HB9, in homogenen Fluoreszenzimmunassays eingesetzt werden. Die Fluoreszenzzunahme der verwendeten Cumarinfarbstoffen durch die Antikörper ist interessanterweise viel höher als für die bereits Bekannten, die für den Nachweis von einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA mit fluoreszenzverstärkenden Antikörpern gezeigt wurde bei der die Erhöhung nur bis zu einem Faktor 4 erreicht wurden.<sup>132</sup> Mit dem mAb G100-AG7 kann eine Verstärkung um den Faktor 50 erreicht werden, was die Empfindlichkeit des Assays drastisch erhöhen würde. Da mAb G100-AG7 verschiedene Cumarinfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen bindet und deren Fluoreszenzintensität erhöht, ist dieser Antikörper für Multiplexanwendungen geeignet. In einem Fluoreszenzimmunassay könnte die Bindung von nur einem Antikörper die Signale von mehreren Farbstoffen, die jeweils spezifisch für ein anderes Analytmolekül wären, unterschiedlich stark erhöhen. Somit ist ein universelles Werkzeug zur Konstruktion eines kompetitiven Immunassays für die Multianalytendetektion mit unterschiedlichen Cumarinderivaten, die bei verschiedenen Wellenlängen emittieren, vorhanden (siehe Abbildung 2.15).

Ein mögliches Hindernis für die Anwendung dieser homogenen Assays als Biosensor oder in der klinischen Diagnostik ist der Einfluss eines „Proteinhintergrunds“ durch die Autofluoreszenz der Probenmatrix, sodass die Messung im Serum schwierig sein könnte. Für einen Löschassay wurde deshalb zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie verwendet, um dies zu überwinden.<sup>133</sup> Ein zeitaufgelöstes Nachweisverfahren könnte möglicherweise auch für die vorliegenden Cumarinfarbstoffe in Kombination mit Lanthanoiden als Partner in einem Sandwich-Immunassay verwendet werden. Hier wird die Bindung durch eine Veränderung der FRET-Effizienz angezeigt. Durch Verschieben bzw. Verstärken der Fluoreszenz des Farbstoffs würde die Überlappung mit dem Lanthanoidion verändert und aufgrund der Zunahme der Quanteneffizienz des Immunkomplexes würde auch der effektive Försterradius erhöht werden, was eine verbesserte FRET-Effizienz ergeben würde.

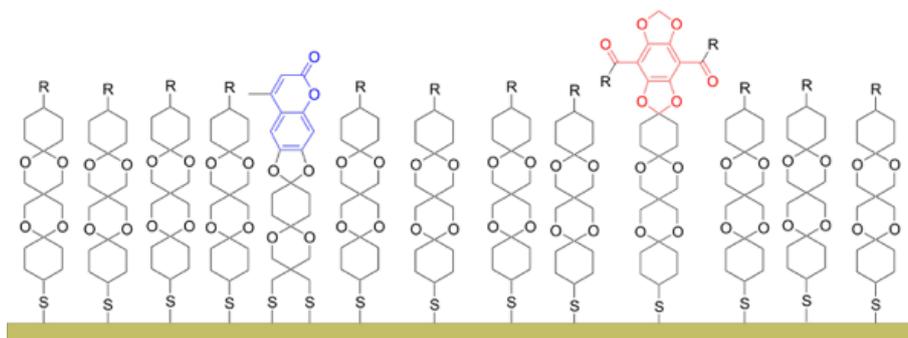
Eine andere, leicht modifizierte, Anwendung wäre der Nachweis von einzelsträngiger oder doppelsträngiger DNA. Der Nachweis der Hybridisierung wurde bereits mit fluoreszenzlöschenden Antikörpern und fluoreszenzverstärkenden Antikörpern gezeigt.<sup>132</sup>

Mit dem Wissen über die spektroskopischen Eigenschaften der Cumarine, konnte eine Charakterisierung funktionalisierter Oligo-Spiro-Ketal-Stäbe und ihrer Eigenschaften als Membransonden durchgeführt werden. Die Bindung von Cou an die OSTK-Einheit hat nur einen geringen Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften des Cou-Farbstoffs. Bei den DBD-markierten Stäben wurde die Stokesverschiebung durch die Bindung an das OSTK-Gerüst reduziert, was einen positiven Effekt auf die spektrale Überlappung mit dem als Donor fungierenden Cou-Farbstoff hatte, was für die gesamte FRET-Effizienz vorteilhaft war. Alle Cou- und DBD-markierten Stäben konnten leicht in die Doppellipidschichten der LUV eingebaut werden, was aus der Veränderung der spektralen und anderer photophysikalischer Eigenschaften, wie der Fluoreszenzdepolarisation, der Cou- und DBD-markierten Farbstoffe durch den Vergleich mit den jeweiligen Daten in PBS, hervorging. Während DNA und Peptide, die häufig als Abstandshalter in FRET-Paaren, verwendet werden, eine große Anzahl von funktionellen Gruppen, wie Amino- und Carboxylatgruppen, Phosphate und Zucker, enthalten, ist die Oberfläche der OSTK-Stäbe hydrophob und minimiert die Optionen für starke spezifische Wechselwirkungen, wie die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Dies macht die OSTK-Stäbe zu Abstandshaltern, die sich ideal zur Interkalation in eine Doppellipidschicht eignen. Wegen der spezifischen chemischen Eigenschaften der Farbstoffe befindet sich der Cou-Teil vorzugsweise an der Lipid-Wasser-Grenzfläche, während der DBD-Farbstoff in die Doppelschicht eingebaut wird. Mit den Cou-DBD-FRET-Paaren kann ein Bereich von  $2 \text{ nm} < R < 8 \text{ nm}$ , was  $0,5 R_0 < R < 2 R_0$  entspricht, abgedeckt werden, der sich ideal für Membranstudien eignet, da biologische Membranen eine Dicke von ca. 5 – 8 nm aufweisen.<sup>80</sup>

DBD-Farbstoffe als Akzeptor zeigen einzigartige spektroskopische Eigenschaften, wie große Stokesverschiebungen, einen starken Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf die Position des Emissionsmaximums sowie auf die Fluoreszenzabklingzeit. Vor allem die unterschiedliche Lösungsmittelabhängigkeit könnte den Weg für weitere Anwendungen ebnen. Es könnte eine Veränderung der FRET-Effizienz aufgrund einer Variation in der molekularen Umgebung des Akzeptors geben, was eine verschiebungsbezogene Veränderung der spektralen Überlappung bewirkt, was besonders bei den Gelenkstäben deutlich wurde. Die nachfolgende Veränderung der FRET-Effizienz könnten für die Polaritätserfassung oder in Bindungsassays, bei dem bei der Bindung eines Antikörpers die lokale Umgebung des Farbstoffs verändert wird, verwendet werden. Da beide Farbstoffe starke Indikatoren für Veränderungen in der molekularen Umgebung sind und sie über die Verbindung durch die OSTK-Stäbe in der Doppellipidschicht streng co-lokalisiert ist, sind leistungsfähige multidimensionale Transmembransonden verfügbar. Mit ihnen kön-

nen zukünftig Veränderungen im Inneren und außerhalb einer Membran gleichzeitig und unabhängig voneinander detektiert werden. Mit den OSTK-Stäben als Abstandshalter ist ein Werkzeugkasten vorhanden, um die Länge des Stabs an das zu untersuchende System anzupassen.

Der letzte Teil beschäftigte sich mit der Synthese und Charakterisierung von Cou- und DBD-funktionalisierten Polyprolinen und ihrer Kopplung an Goldnanopartikel. Die farbstoffmarkierten Polyproline konnten erfolgreich hergestellt werden. Es zeigten sich deutlich Einflüsse auf die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe durch die Bindung an die Polyprolinhelix. Die Kopplung an die 5 nm großen AuNP konnte erfolgreich durchgeführt werden. Ein nanopartikelbasierter Oberflächenenergietransfer konnte nicht nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Entwicklung einer Einzelmolekül-FRET-AFM-Nanoskopie ist dies besonders wichtig. Dadurch, dass es keine Wechselwirkungen der Farbstoffe mit den Goldnanopartikeln gibt, können möglich Änderungen der spektroskopischen Eigenschaften auf den Energietransfer zurückgeführt werden.



**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung der an eine Goldoberfläche gekoppelten SH-OSTK-Stäbe

Die Erfahrungen, die durch die Kopplung der Polyproline an die AuNP, gewonnen wurde, kann als gute Grundlage für weitere Arbeiten dienen, bei denen SH-OSTK-Stäbe zunächst auf Goldoberflächen (siehe Abbildung 5.1) aufgebracht werden. Durch die Verknüpfung von Rasterkraftmikroskopie und optischen Verfahren können neben der Ramanspektroskopie auch fluoreszenzbasierte Methoden zur Bestimmung von Kräften auf molekularen Skalen verstärkt entwickelt werden.<sup>134–136</sup> Durch das Anbringen eines DBD-SH-OSTK-Stabs an eine AFM-Spitze und das Anregen eines an die Probe gebundenen Cou-OSTK-Stabs, kann die Rasterkraftmikroskopie mit FRET kombiniert werden. Dabei findet ein strahlungsloser Energietransfer von dem angeregten Donor zu dem an der Spitze immobilisierten Akzeptor statt. Wegen der  $1/R^6$ -Abstandsabhängigkeit des FRET zeigen nur diejenigen Farbstoffe eine starke Wechselwirkung, die sich am äußersten Ende der AFM-Spitze befinden und somit der Probe am nächsten sind.<sup>137</sup> Mit der Einzelmolekül-

AFM-FRET-Nanoskopie ist es daher möglich, gezielt die Konformation einzelner Moleküle durch Krafteinwirkung zu manipulieren und gleichzeitig FRET-Messungen durchzuführen.<sup>3</sup> Diese FRET-Kraftsensoren erlauben Messungen von örtlichen Spannungen bestimmter Proteine in vivo und in Echtzeit, wodurch ihre Belastungsfähigkeit gemessen werden kann. Dabei können OSTK-Stäbe verwendet werden, die Donor und Akzeptor mit einer Kraft von einigen Piconewton auseinanderdrücken und eine veränderte FRET-Effizienz bewirken.<sup>8</sup>



# Literaturverzeichnis

- [1] J. P. Junker, F. Ziegler, M. Rief, “Ligand-Dependent Equilibrium Fluctuations of Single Calmodulin Molecules”, *Science* **323**, 633 LP – 637 (2009).
- [2] J. P. Junker, M. Rief, “Single-molecule force spectroscopy distinguishes target binding modes of calmodulin.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14361–14366 (2009).
- [3] Y. He, M. Lu, J. Cao, H. P. Lu, “Manipulating Protein Conformations by Single-Molecule AFM-FRET Nanoscopy”, *ACS Nano* **6**, 1221–1229 (2012).
- [4] A. Sarkar, R. B. Robertson, J. M. Fernandez, “Simultaneous atomic force microscope and fluorescence measurements of protein unfolding using a calibrated evanescent wave”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 12882–12886 (2004).
- [5] T. Kodama, H. Ohtani, H. Arakawa, A. Ikai, “Mechanical perturbation-induced fluorescence change of green fluorescent protein”, *Applied Physics Letters* **86**, 43901 (2005).
- [6] A. Gaiduk, R. Kühnemuth, S. Felekyan, M. Antonik, W. Becker, V. Kudryavtsev, C. Sandhagen, C. A. M. Seidel, “Fluorescence detection with high time resolution: From optical microscopy to simultaneous force and fluorescence spectroscopy”, *Microscopy Research and Technique* **70**, 433–441 (2007).
- [7] M. S. Z. Kellermayer, Á. Karsai, A. Kengyel, A. Nagy, P. Bianco, T. Huber, Á. Kulcsár, C. Niedetzky, R. Proksch, L. Grama, “Spatially and Temporally Synchronized Atomic Force and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy for Imaging and Manipulating Cells and Biomolecules”, *Biophysical Journal* **91**, 2665–2677 (2006).
- [8] F. Meng, F. Sachs, “Visualizing dynamic cytoplasmic forces with a compliance-matched FRET sensor”, *Journal of Cell Science* **124**, 261–269 (2011).
- [9] M. Cigán, J. Donovalová, V. Szöcs, J. Gaspar, K. Jakusová, A. Gáplovsky, “7-(Dimethylamino)coumarin-3-carbaldehyde and Its Phenylsemicarbazone: TICT Ex-

- cited State Modulation, Fluorescent H-Aggregates, and Preferential Solvation”, *The Journal of Physical Chemistry A* **117**, 4870–4883 (2013).
- [10] B. D. Wagner, “The use of coumarins as environmentally-sensitive fluorescent probes of heterogeneous inclusion systems”, *Molecules* **14**, 210–237 (2009).
- [11] S. Verma, H. N. Ghosh, “Tuning Interfacial Charge Separation by Molecular Twist: A New Insight into Coumarin-Sensitized TiO<sub>2</sub> Films”, *The Journal of Physical Chemistry C* **118**, 10661–10669 (2014).
- [12] L. He, Q. Xu, Y. Liu, H. Wei, Y. Tang, W. Lin, “Coumarin-Based Turn-On Fluorescence Probe for Specific Detection of Glutathione over Cysteine and Homocysteine”, *ACS Applied Materials & Interfaces* **7**, 12809–12813 (2015).
- [13] C. Wang, C. Wu, J. Zhu, R. H. Miller, Y. Wang, “Design, Synthesis, and Evaluation of Coumarin-Based Molecular Probes for Imaging of Myelination”, *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 2331–2340 (2011).
- [14] X. Yan, H. Li, Y. Yan, X. Su, “Developments in pesticide analysis by multi-analyte immunoassays: a review”, *Analytical Methods* **6**, 3543–3554 (2014).
- [15] T. F. McGrath, C. T. Elliott, T. L. Fodey, “Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 75–92 (2012).
- [16] Y.-F. Li, Y.-M. Sun, R. C. Beier, H.-T. Lei, S. Gee, B. D. Hammock, H. Wang, Z. Wang, X. Sun, Y.-D. Shen, J.-Y. Yang, Z.-L. Xu, “Immunochemical techniques for multianalyte analysis of chemical residues in food and the environment: A review”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **88**, 25–40 (2017).
- [17] X. Liu, J. M. Cole, P. G. Waddell, T.-C. Lin, J. Radia, A. Zeidler, “Molecular Origins of Optoelectronic Properties in Coumarin Dyes: Toward Designer Solar Cell and Laser Applications”, *The Journal of Physical Chemistry A* **116**, 727–737 (2012).
- [18] X. Liu, J. M. Cole, P. G. Waddell, T.-C. Lin, S. McKechnie, “Molecular Origins of Optoelectronic Properties in Coumarins 343, 314T, 445, and 522B”, *The Journal of Physical Chemistry C* **117**, 14130–14141 (2013).
- [19] M. Schäferling, “Nanoparticle-based luminescent probes for intracellular sensing and imaging of pH”, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **8**, 378–413 (2016).

- [20] Z. Liu, L. Lavis, E. Betzig, "Imaging Live-Cell Dynamics and Structure at the Single-Molecule Level", *Molecular Cell* **58**, 644–659 (2015).
- [21] Y. Cui, J. Irudayaraj, "Inside single cells: Quantitative analysis with advanced optics and nanomaterials", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **7**, 387–407 (2015).
- [22] J. M. Tour, "Conjugated Macromolecules of Precise Length and Constitution. Organic Synthesis for the Construction of Nanoarchitectures", *Chemical Reviews* **96**, 537–554 (1996).
- [23] P. F. H. Schwab, M. D. Levin, J. Michl, "Molecular Rods. 1. Simple Axial Rods", *Chemical Reviews* **99**, 1863–1934 (1999).
- [24] M. D. Levin, P. Kaszynski, J. Michl, "Bicyclo[1.1.1]pentanes, [n]Staffanes, [1.1.1]Propellanes, and Tricyclo[2.1.0.0<sup>2,5</sup>]pentanes", *Chemical Reviews* **100**, 169–234 (2000).
- [25] J. M. Tour, "Molecular Electronics. Synthesis and Testing of Components", *Accounts of Chemical Research* **33**, 791–804 (2000).
- [26] P. F. H. Schwab, J. R. Smith, J. Michl, "Synthesis and Properties of Molecular Rods. 2. Zig-Zag Rods", *Chemical Reviews* **105**, 1197–1280 (2005).
- [27] N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, "Rigid-Rod Molecules in Biomembrane Models - From Hydrogen-Bonded Chains to Synthetic Multifunctional Pores", *Accounts of Chemical Research* **38**, 79–87 (2005).
- [28] P. Wessig, K. Möllnitz, C. Eiserbeck, "Oligospiroketal as Novel Molecular Rods", *Chemistry - A European Journal* **13**, 4859–4872 (2007).
- [29] P. Wessig, K. Möllnitz, "Building blocks for oligospiroketal (OSK) rods and evaluation of their influence on rod rigidity", *Journal of Organic Chemistry* **77**, 3907–3920 (2012).
- [30] P. Müller, J. Nikolaus, S. Schiller, A. Herrmann, K. Möllnitz, S. Czapla, P. Wessig, "Molekulare Stäbe mit Oligospiroketal-Rückgrat als Anker in Biomembranen", *Angewandte Chemie* **121**, 4497–4500 (2009).
- [31] J. Nikolaus, S. Czapla, K. Möllnitz, C. T. Höfer, A. Herrmann, P. Wessig, P. Müller, "New molecular rods - Characterization of their interaction with membranes", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**, 2781–2788 (2011).

- [32] C. Grimm, T. Meyer, S. Czaplá, J. Nikolaus, H. a. Scheidt, A. Vogel, A. Herrmann, P. Wessig, D. Huster, P. Müller, “Structure and dynamics of molecular rods in membranes: Application of a spin-labeled rod”, *Chemistry - A European Journal* **19**, 2703–2710 (2013).
- [33] A. Techen, S. Czaplá, K. Möllnitz, D. Budach, P. Wessig, M. U. Kumke, “Synthesis and Spectroscopic Characterization of Fluorophore-Labeled Oligospiroketal Rods”, *Helvetica Chimica Acta* **96**, 2046–2067 (2013).
- [34] P. Wessig, M. Gerngroß, D. Freyse, P. Bruhns, M. Przewdziaak, U. Schilde, A. Kelling, “Molecular Rods Based on Oligo-spiro-thioketals”, *The Journal of Organic Chemistry* **81**, 1125–1136 (2016).
- [35] M. Sustarsic, A. N. Kapanidis, “Taking the ruler to the jungle: single-molecule FRET for understanding biomolecular structure and dynamics in live cells”, *Current Opinion in Structural Biology* **34**, 52–59 (2015).
- [36] U. Eisold, F. Sellrie, J. A. Schenk, C. Lenz, W. F. M. Stöcklein, M. U. Kumke, “Bright or dark immune complexes of anti-TAMRA antibodies for adapted fluorescence-based bioanalysis”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 3313–3323 (2015).
- [37] U. Eisold, N. Behrends, P. Wessig, M. U. Kumke, “Rigid Rod-Based FRET Probes for Membrane Sensing Applications”, *The Journal of Physical Chemistry B* **120**, 9935–9943 (2016).
- [38] L. Stryer, R. P. Haugland, “Energy transfer: a spectroscopic ruler”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **58**, 719–726 (1967).
- [39] B. Valeur, *Molecular fluorescence: principles and applications*, 2002.
- [40] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3. Auflage, 2006.
- [41] B. Y. M. Kasha, “Characterization of electronic transitions in complex molecules”, *Discussions of the Faraday Society* **9**, 14–19 (1950).
- [42] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, WILEY-VCH Verlag GmbH, 4. Auflage, 2006.
- [43] N. Straumann, *Quantenmechanik: Ein Grundkurs über nichtrelativistische Quantentheorie*, Springer-Verlag, 2. Auflage, 2013.

- [44] R. E. Dale, J. Eisinger, W. E. Blumberg, "The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer.", *Biophysical Journal* **26**, 161–193 (1979).
- [45] B. W. Van Der Meer, "Kappa-squared: From nuisance to new sense", *Reviews in Molecular Biotechnology* **82**, 181–196 (2002).
- [46] I. Medintz, N. Hildebrandt, *FRET- Förster Resonance Energy Transfer*, WILEY-VCH Verlag GmbH, 2014.
- [47] D. B. VanBeek, M. C. Zwier, J. M. Shorb, B. P. Krueger, "Fretting about FRET: Correlation between  $\kappa$  and R", *Biophysical Journal* **92**, 4168–4178 (2007).
- [48] H. Langhals, A. J. Esterbauer, A. Walter, E. Riedle, I. Pugliesi, "Förster Resonant Energy Transfer in Orthogonally Arranged Chromophores", *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 16777–16782 (2010).
- [49] B. W. van der Meer, "Förster Theory", in *FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications*, 23–62, 2013.
- [50] B. W. van der Meer, D. M. van der Meer, S. S. Vogel, "Optimizing the Orientation Factor Kappa-Squared for More Accurate FRET Measurements", in *FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From Theory to Applications*, 63–104, 2013.
- [51] P. Wessig, N. Behrends, M. U. Kumke, U. Eisold, "FRET Pairs with Fixed Relative Orientation of Chromophores", *European Journal of Organic Chemistry* (2016).
- [52] F. Luschtinetz, *Cyaninfarbstoffe als Fluoreszenzsonden in biomimetischen und biologischen Systemen Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Fluoreszenzanisotropie-Untersuchungen*, Dissertation, Universität Potsdam, 2010.
- [53] K. Kinoshita, A. Ikegami, S. Kawato, "On the wobbling-in-cone analysis of fluorescence anisotropy decay", *Biophysical Journal* **37**, 461–464 (1982).
- [54] G. Lipari, A. Szabo, "Effect of librational motion on fluorescence depolarization and nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules and membranes.", *Biophysical Journal* **30**, 489–506 (1980).
- [55] K. Kinoshita, S. Kawato, A. Ikegami, "A theory of fluorescence polarization decay in membranes", *Biophysical Journal* **20**, 289–305 (1977).
- [56] R. Berera, R. van Grondelle, J. T. M. Kennis, "Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems", *Photosynthesis Research* **101**, 105–118 (2009).

- [57] U. Megerle, I. Pugliesi, C. Schrieffer, C. F. Sailer, E. Riedle, “Sub-50 fs broadband absorption spectroscopy with tunable excitation: putting the analysis of ultrafast molecular dynamics on a solid ground”, *Applied Physics B* **96**, 215–231 (2009).
- [58] A. Maciejewski, R. Naskrecki, M. Lorenc, M. Ziolk, J. Karolczak, J. Kubicki, M. Matysiak, M. Szymanski, “Transient absorption experimental set-up with femtosecond time resolution. Femto- and picosecond study of DCM molecule in cyclohexane and methanol solution”, *Journal of Molecular Structure* **555**, 1–13 (2000).
- [59] M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Ensemble to Single Molecules*, Wiley, 2011.
- [60] X. Liu, Z. Xu, J. M. Cole, “Molecular Design of UV-vis Absorption and Emission Properties in Organic Fluorophores: Toward Larger Bathochromic Shifts, Enhanced Molar Extinction Coefficients, and Greater Stokes Shifts”, (2013).
- [61] M. V. Sednev, V. N. Belov, S. W. Hell, “Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: a review”, *Methods and Applications in Fluorescence* **3**, 042004 (2015).
- [62] G. Jones, W. R. Jackson, A. M. Halpern, “Medium effects on fluorescence quantum yields and lifetimes for coumarin laser dyes”, *Chemical Physics Letters* **72**, 391–395 (1980).
- [63] G. Jones, W. R. Jackson, C. Y. Choi, W. R. Bergmark, “Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism”, *The Journal of Physical Chemistry* **89**, 294–300 (1985).
- [64] K. Rechthaler, G. Köhler, “Excited state properties and deactivation pathways of 7-aminocoumarins”, *Chemical Physics* **189**, 99–116 (1994).
- [65] T. López Arbeloa, F. López Arbeloa, M. J. Tapia, I. López Arbeloa, “Hydrogen-Bonding Effect on the Photophysical Properties of 7-Aminocoumarin Derivatives”, *Journal of Physical Chemistry* **97**, 4704–4707 (1993).
- [66] G. A. Reynolds, K. H. Drexhage, “New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers”, *Optics Communications* **13**, 222–225 (1975).
- [67] K. Higashiguchi, K. Matsuda, Y. Asano, A. Murakami, S. Nakamura, M. Irie, “Photochromism of Dithienylethenes Containing Fluorinated Thiophene Rings”, *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 91–97 (2005).

- [68] J. Roncali, “Molecular Engineering of the Band Gap of  $\pi$ -Conjugated Systems: Facing Technological Applications”, *Macromolecular Rapid Communications* **28**, 1761–1775 (2007).
- [69] I. Turowska-Tyrk, T. M. Krygowski, M. Gdaniec, G. Häfelinger, G. Ritter, “Crystallographic studies and physicochemical properties of  $\pi$ -electron compounds”, *Journal of Molecular Structure* **172**, 401–412 (1988).
- [70] R. Wawrzinek, P. Wessig, K. Möllnitz, J. Nikolaus, R. Schwarzer, P. Müller, A. Herrmann, “DBD dyes as fluorescent probes for sensing lipophilic environments”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **22**, 5367–5371 (2012).
- [71] R. Wawrzinek, J. Ziomkowska, J. Heuveling, M. Mertens, A. Herrmann, E. Schneider, P. Wessig, “DBD dyes as fluorescence lifetime probes to study conformational changes in proteins”, *Chemistry - A European Journal* **19**, 17349–17357 (2013).
- [72] P. Wessig, R. Wawrzinek, K. Möllnitz, E. Feldbusch, U. Schilde, “A new class of fluorescent dyes based on 1,3-benzodioxole and [1,3]-dioxolo[4.5-f]benzodioxole”, *Tetrahedron Letters* **52**, 6192–6195 (2011).
- [73] P. Wessig, N. Behrends, M. U. Kumke, U. Eisold, T. Meiling, C. Hille, “Two-photon FRET pairs based on coumarin and DBD dyes”, *RSC Adv.* **6**, 33510–33513 (2016).
- [74] N. Behrends, *Funktionalisierte OS(T)K-Stäbe und Sensorfluorophore zur optischen Sensorik*, Dissertation, Universität Potsdam, 2017.
- [75] U. Pfüller, *Mizellen - Vesikel - Mikroemulsionen: Tensidassoziate und ihre Anwendung in Analytik und Biochemie*, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1.. Auflage, 1986.
- [76] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, P. Stano, “Giant Vesicles: Preparations and Applications”, *ChemBioChem* **11**, 848–865 (2010).
- [77] M. Goniotaki, S. Hatziantoniou, K. Dimas, M. Wagner, C. Demetzos, “Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **56**, 1217–1224 (2004).
- [78] B. Hock, “Immunchemische Verfahren in der Umweltanalytik und ihre Perspektiven”, *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* **5**, 309–319 (1993).
- [79] J. Groth, *Meine Moleküle - Deine Moleküle: Von der molekularen Individualität*, Rhombos, 2004.

- [80] T. Kreutzig, *Kurzlehrbuch Biochemie*, Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH, 12. Auflage, 2006.
- [81] F. Sellrie, A. Warsinke, B. Micheel, “Homogeneous indirect fluorescence quenching immunoassay for the determination of low molecular weight substances”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**, 206–210 (2006).
- [82] E. J. Shaw, R. A. Watson, J. Landon, D. S. Smith, “Estimation of serum gentamicin by quenching fluoroimmunoassay.”, *Journal of Clinical Pathology* **30**, 526–531 (1977).
- [83] I. Hemmilä, O. Malminen, H. Mikola, T. Lövgren, “Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay of thyroxin in serum”, *Clinical Chemistry* **34**, 2320 LP – 2322 (1988).
- [84] S. Inal, J. D. Kolsch, F. Sellrie, J. A. Schenk, E. Wischerhoff, A. Laschewsky, D. Nehler, “A water soluble fluorescent polymer as a dual colour sensor for temperature and a specific protein”, *Journal of Materials Chemistry B* **1**, 6373–6381 (2013).
- [85] K. Drauz, A. Kleemann, J. Martens, “Induktion von Asymmetrie durch Aminosäuren”, *Angewandte Chemie* **94**, 590–613 (1982).
- [86] A. A. Adzhubei, M. J. E. Sternberg, “Left-handed Polyproline II Helices Commonly Occur in Globular Proteins”, *Journal of Molecular Biology* **229**, 472–493 (1993).
- [87] B. Schuler, E. a. Lipman, P. J. Steinbach, M. Kumke, W. a. Eaton, “Polyproline and the spectroscopic ruler” revisited with single-molecule fluorescence.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2754–2759 (2005).
- [88] G. Mie, “Beitrage zur optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallosungen”, *Annalen der Physik* **330**, 377–445 (1908).
- [89] J. R. G. Navarro, M. H. V. Werts, “Resonant light scattering spectroscopy of gold, silver and gold-silver alloy nanoparticles and optical detection in microfluidic channels.”, *The Analyst* **138**, 583–92 (2013).
- [90] M. H. V. Werts, V. Raimbault, R. Texier-Picard, R. Poizat, O. Français, L. Griscorn, J. R. G. Navarro, “Quantitative full-colour transmitted light microscopy and dyes for concentration mapping and measurement of diffusion coefficients in microfluidic architectures”, *Lab on a Chip* **12**, 808 (2012).

- [91] E. Hutter, J. H. Fendler, “Exploitation of localized surface plasmon resonance”, *Advanced Materials* **16**, 1685–1706 (2004).
- [92] S. K. Ghosh, T. Pal, “Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles - From Theory to Applications”, *Chemical Reviews* **107**, 4797–4862 (2007).
- [93] M. C. Daniel, D. Astruc, “Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology”, *Chemical Reviews* **104**, 293–346 (2004).
- [94] G. Frens, “Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution”, *Nature Physical Science* **241**, 20–22 (1973).
- [95] P. N. Njoki, I.-I. S. Lim, D. Mott, H.-Y. Park, B. Khan, S. Mishra, R. Sujakumar, J. Luo, C.-J. Zhong, “Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles”, *The Journal of Physical Chemistry C* **111**, 14664–14669 (2007).
- [96] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, “Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited”, *The Journal of Physical Chemistry B* **110**, 15700–15707 (2006).
- [97] S. D. Perrault, W. C. W. Chan, “Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50–200 nm”, *Journal of the American Chemical Society* **131**, 17042–17043 (2009).
- [98] D. Steinigeweg, S. Schlucker, “Monodispersity and size control in the synthesis of 20–100 nm quasi-spherical silver nanoparticles by citrate and ascorbic acid reduction in glycerol-water mixtures”, *Chemical Communications* **48**, 8682–8684 (2012).
- [99] K. Park, L. F. Drummy, R. C. Wadams, H. Koerner, D. Nepal, L. Fabris, R. A. Vaia, “Growth Mechanism of Gold Nanorods”, *Chemistry of Materials* **25**, 555–563 (2013).
- [100] A. J. Mieszawska, W. J. M. Mulder, Z. A. Fayad, D. P. Cormode, “Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease”, *Molecular Pharmaceutics* **10**, 831–847 (2013).
- [101] X. Ye, C. Zheng, J. Chen, Y. Gao, C. B. Murray, “Using Binary Surfactant Mixtures To Simultaneously Improve the Dimensional Tunability and Monodispersity in the Seeded Growth of Gold Nanorods”, *Nano Letters* **13**, 765–771 (2013).

- [102] T. Placido, G. Aragay, J. Pons, R. Comparelli, M. L. Curri, A. Merkoçi, “Ion-Directed Assembly of Gold Nanorods: A Strategy for Mercury Detection”, *ACS Applied Materials & Interfaces* **5**, 1084–1092 (2013).
- [103] P. V. Kamat, “Photophysical, Photochemical and Photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles”, *The Journal of Physical Chemistry B* **106**, 7729–7744 (2002).
- [104] A. S. Thakor, J. Jokerst, C. Zavaleta, T. F. Massoud, S. S. Gambhir, “Gold Nanoparticles: A Revival in Precious Metal Administration to Patients”, *Nano Letters* **11**, 4029–4036 (2011).
- [105] R. A. Sperling, P. Rivera Gil, F. Zhang, M. Zanella, W. J. Parak, “Biological applications of gold nanoparticles”, *Chemical Society Reviews* **37**, 1896–1908 (2008).
- [106] A. K. Singh, S. A. Khan, Z. Fan, T. Demeritte, D. Senapati, R. Kanchanapally, P. C. Ray, “Development of a long-range surface-enhanced raman spectroscopy ruler”, *Journal of the American Chemical Society* **134**, 8662–8669 (2012).
- [107] B. N. J. Persson, N. D. Lang, “Electron-hole-pair quenching of excited states near a metal”, *Physical Review B* **26**, 5409–5415 (1982).
- [108] E. Kazuma, J. Jung, H. Ueba, M. Trenary, Y. Kim, “Direct Pathway to Molecular Photodissociation on Metal Surfaces Using Visible Light”, *Journal of the American Chemical Society* **139**, 3115–3121 (2017).
- [109] T. Sen, K. K. Haldar, A. Patra, “Au Nanoparticle-Based Surface Energy Transfer Probe for Conformational Changes of BSA Protein”, *The Journal of Physical Chemistry C* **112**, 17945–17951 (2008).
- [110] G. H. Woehrle, L. O. Brown, J. E. Hutchison, “Thiol-Functionalized, 1.5-nm Gold Nanoparticles through Ligand Exchange Reactions - Scope and Mechanism of Ligand Exchange”, *Journal of the American Chemical Society* **127**, 2172–2183 (2005).
- [111] A. Caragheorghopol, V. Chechik, “Mechanistic aspects of ligand exchange in Au nanoparticles”, *Physical Chemistry Chemical Physics* **10**, 5029–5041 (2008).
- [112] M. Schulzendorf, C. Cavelius, P. Born, E. Murray, T. Kraus, “Biphasic Synthesis of Au@SiO<sub>2</sub> Core-Shell Particles with Stepwise Ligand Exchange”, *Langmuir* **27**, 727–732 (2011).
- [113] N. Nerambourg, R. Praho, M. H. V. M.H.V. Werts, D. Thomas, M. Blanchard-Desce, “Hydrophilic monolayer-protected gold nanoparticles and their functionalisation with fluorescent chromophores”, *International Journal of Nanotechnology* **5**, 722–740 (2008).

- [114] M. H. V. Werts, H. Zaim, M. Blanchard-Desce, “Excimer probe of the binding of alkyl disulfides to gold nanoparticles and subsequent monolayer dynamics”, *Photochemical & Photobiological Sciences* **3**, 29–32 (2004).
- [115] E. Dulkeith, M. Ringler, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Muñoz Javier, W. J. Parak, “Gold Nanoparticles Quench Fluorescence by Phase Induced Radiative Rate Suppression”, *Nano Letters* **5**, 585–589 (2005).
- [116] G. P. Acuna, M. Bucher, I. H. Stein, C. Steinhauer, A. Kuzyk, P. Holzmeister, R. Schreiber, A. Moroz, F. D. Stefani, T. Liedl, F. C. Simmel, P. Tinnefeld, “Distance Dependence of Single-Fluorophore Quenching by Gold Nanoparticles Studied on DNA Origami”, *ACS Nano* **6**, 3189–3195 (2012).
- [117] J. Zhang, J. R. Lakowicz, “Metal-enhanced fluorescence of an organic fluorophore using gold particles”, *Optics Express* **15**, 2598–2606 (2007).
- [118] S. S. Dasary, U. S. Rai, H. Yu, Y. Anjaneyulu, M. Dubey, P. C. Ray, “Gold nanoparticle based surface enhanced fluorescence for detection of organophosphorus agents”, *Chemical Physics Letters* **460**, 187–190 (2008).
- [119] J. Wang, J. Moore, S. Laulhe, M. Nantz, S. Achilefu, K. a. Kang, “Fluorophore-gold nanoparticle complex for sensitive optical biosensing and imaging”, *Nanotechnology* **23**, 095501 (2012).
- [120] J. Prinz, B. Schreiber, L. Olejko, J. Oertel, J. Rackwitz, A. Keller, I. Bald, “DNA Origami Substrates for Highly Sensitive Surface-Enhanced Raman Scattering”, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **4**, 4140–4145 (2013).
- [121] B. Ding, Z. Deng, H. Yan, S. Cabrini, R. N. Zuckermann, J. Bokor, “Gold Nanoparticle Self-Similar Chain Structure Organized by DNA Origami”, *Journal of the American Chemical Society* **132**, 3248–3249 (2010).
- [122] D. V. O’Connor, D. Phillips, *Time-Correlated Single Photon Counting*, Academic Press, London, 1984.
- [123] B. Raju, T. S. Varadarajan, “Substituent and Solvent Effects on the Twisted Intramolecular Charge Transfer of Three New 7- (Diethylamino)coumarin-3-aldehyde Derivatives”, *Journal of Physical Chemistry* **98**, 8903–8905 (1994).
- [124] A. Nag, K. Bhattacharyya, “Role of twisted intramolecular charge transfer in the fluorescence sensitivity of biological probes: Diethylaminocoumarin laser dyes”, *Chemical Physics Letters* **169**, 12–16 (1990).

- [125] C. Tablet, I. Matei, E. Pincu, V. Meltzer, M. Hillebrand, “Spectroscopic and thermodynamic studies of 7-diethylamino-coumarin-3-carboxylic acid in interaction with  $\beta$ - and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins”, *Journal of Molecular Liquids* **168**, 47–53 (2012).
- [126] G. Ramakrishna, H. N. Ghosh, “Efficient electron injection from twisted intramolecular charge transfer (TICT) state of 7-diethyl amino coumarin 3-carboxylic acid (D-1421) dye to TiO<sub>2</sub> nanoparticle”, *Journal of Physical Chemistry A* **106**, 2545–2553 (2002).
- [127] W. M. Haynes, *CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data*, CRC Press, 96. Auflage, 2015.
- [128] A. Takadate, T. Masuda, C. Murata, T. Tanaka, M. Irikura, S. Goya, “Fluorescence Characteristics of Methoxycoumarins as Novel Fluorophores.”, *Analytical Sciences* **11**, 97–101 (1995).
- [129] T. Hinohara, K. Amano, K. Matsui, “Fluorescence of 7-substituted coumarins”, *Nippon Kagaku Kaishi* **1976**, 247 – 251 (1976).
- [130] K. Muthuramu, V. Ramamurthy, “7-Alkoxy Coumarins as Fluorescence Probes for Microenvironments”, *Journal of Photochemistry* **26**, 57–64 (1984).
- [131] A. Gidwani, D. Holowka, B. Baird, “Fluorescence Anisotropy Measurements of Lipid Order in Plasma Membranes and Lipid Rafts from RBL-2H3 Mast Cells”, *Biochemistry* **40**, 12422–12429 (2001).
- [132] F. Sellrie, E. Graser, C. Lenz, T. Hillebrand, J. A. Schenk, “Specific DNA detection using antibody mediated fluorescence quenching”, *Biosensors and Bioelectronics* **42**, 512–515 (2013).
- [133] F. Sellrie, M. Beck, N. Hildebrandt, B. Micheel, “A homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) using antibody mediated luminescence quenching”, *Anal. Methods* **2**, 1298–1301 (2010).
- [134] S. F. Heucke, E. M. Puchner, S. W. Stahl, A. W. Holleitner, H. E. Gaub, P. Tinnefeld, “Nanoapertures for AFM-based single-molecule force spectroscopy”, *International Journal of Nanotechnology* **10**, 607–619 (2013).
- [135] M. Lucas, E. Riedo, “Combining scanning probe microscopy with optical spectroscopy for applications in biology and materials science”, *Review of Scientific Instruments* **83** (2012).

- [136] H. Gump, S. W. Stahl, M. Strackharn, E. M. Puchner, H. E. Gaub, “Ultra-stable combined atomic force and total internal fluorescence microscope”, *Review of Scientific Instruments* **80**, 63704 (2009).
- [137] S. A. Vickery, R. C. Dunn, “Combining AFM and FRET for high resolution fluorescence microscopy”, *Journal of Microscopy* **202**, 408–412 (2001).



# Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Akzeptor
<b>A*</b>	Akzeptor im angeregten Zustand
<b>A<sub>∞</sub></b>	Hinderung der Rotation
<b>AFM</b>	Rasterkraftmikroskopie, engl. atomic force microscopy
<b>AG</b>	Antigen
<b>AuNP</b>	Goldnanopartikel
<b>c</b>	Konzentration
<b>c<sub>T</sub></b>	Konzentration der transienten Spezies
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroform
<b>cmc</b>	kritische Mizellbildungskonzentration (engl. critical micelle concentration)
<b>Cou</b>	Cumarinvorläufer
<b>Cys</b>	Cystein
<b>D</b>	Donor
<b>D*</b>	Donor im angeregten Zustand
<b>d</b>	Abstand zwischen Farbstoff und Nanopartikel
<b>d<sub>0</sub></b>	Abstand zwischen Farbstoff und Nanopartikel, bei gleicher Wahrscheinlichkeit für die Energieübertragung und die spontane Emission des Farbstoffs
<b>DBD</b>	[1,3]Dioxolo[4,5-f][1,3]benzodioxol
<b>DCM</b>	Dichlormethan
<b>DEAC</b>	7-(Diethylamino)coumarin-3-carbonsäure
<b>DIPEA</b>	Diisopropylethylamin
<b>DMF</b>	Dimethylformaid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DOPC</b>	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
<b>DOPS</b>	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin
<b>E<sub>BLW</sub></b>	Faktor für den Bindungslängenwechsel
<b>E<sub>exp</sub></b>	experimentelle FRET-Effizienz
<b>E<sub>FRET</sub></b>	FRET-Effizienz
<b>E<sub>g</sub></b>	Energiebandlücke
<b>E<sub>int</sub></b>	intermolekulare Wechselwirkungen

<b>E<sub>res</sub></b>	Resonanzenergie
<b>E<sub>sub</sub></b>	elektronenschiebende bzw -ziehende Kraft eines Substituenten
<b>E<sub>theo</sub></b>	theoretische FRET-Effizienz
<b>E<sub>θ</sub></b>	Diederwinkel zwischen dem Substituenten und dem Cumaringerüst
<b>E(λ)</b>	Extinktion
<b>ΔE</b>	Energie
<b>EDT</b>	Ethandithiol
<b>FIA</b>	Fluoreszenzimmunassay
<b>FLIM</b>	engl. fluorescence lifetime imaging microscopy
<b>FRET</b>	Förster-Resonanz-Energietransfer
<b>G</b>	G-Faktor
<b>h</b>	Planck'sches Wirkungsquantum
<b>HOBt</b>	Hydroxybenzotriazol
<b>HOMO</b>	höchstes besetztes Molekülorbital, engl. highest occupied molecular orbital
<b>I</b>	Intensität
<b>I<sub>⊥</sub></b>	Fluoreszenzintensität horizontal zur z-Achse
<b>I<sub>D</sub></b>	Fluoreszenzintensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
<b>I<sub>DA</sub></b>	Fluoreszenzintensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
<b>I<sub>T</sub></b>	Intensität der transienten Spezies
<b>I<sub>  </sub></b>	Fluoreszenzintensität vertikal zur z-Achse
<b>I<sub>0</sub></b>	Intensität der eingestrahlten Strahlung
<b>I(t)</b>	zeitabhängige Fluoreszenzintensität
<b>I(t)<sub>⊥</sub></b>	zeitabhängige Fluoreszenzintensität horizontal zur z-Achse
<b>I(t)<sub>  </sub></b>	zeitabhängige Fluoreszenzintensität vertikal zur z-Achse
<b>IC</b>	innere Koverision, engl. internal conversion
<b>ICT</b>	intramolekularer charge-transfer, engl. intramolecular charge transfer
<b>IR</b>	innere Relaxation
<b>J(λ)</b>	Überlappungsintegral
<b>k<sub>F</sub></b>	Fermiwellenvektor des Metalls
<b>k<sub>F</sub></b>	Ratenkonstanten der fluoreszierenden Desaktivierungsprozesse
<b>k<sub>NR</sub></b>	Ratenkonstanten der strahlungslosen (engl. non-radiative) Desaktivierungsprozesse
<b>L<sub>α</sub></b>	kristalline Phase
<b>L<sub>β</sub></b>	feste Gel-Phase
<b>LUMO</b>	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital, engl. lowest unoccupied molecular orbital
<b>LUV</b>	große unilamellare Vesikel, engl. large unilamellar vesicles
<b>mAb</b>	monoklonaler Antikörper

<b>n</b>	Brechungsindex
<b>N</b>	Avogadrokonstante
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NSET</b>	nanopartikelbasierenden Oberflächenenergietransfer, engl. nanoparticle-based surface energy transfer)
<b>OD</b>	optische Dichte
<b><math>\Delta</math>OD</b>	Änderung der optischen Dichte
<b>OSK</b>	Oligo-Spiro-Ketal
<b>OSTK</b>	Oligo-Spiro-Thio-Ketal
<b>PBS</b>	Phosphatpuffer
<b>POPC</b>	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
<b>Pro</b>	Prolin
<b>R</b>	Donor-Akzeptor-Abstand
<b>r</b>	Anisotropie
<b><math>R_{\text{exp}}</math></b>	experimenteller Donor-Akzeptor-Abstand
<b><math>R_{\text{theo}}</math></b>	theoretischer Donor-Akzeptor-Abstand
<b><math>r_{\infty}</math></b>	Grenzanisotropie
<b><math>R_0</math></b>	Försterabstand
<b><math>r_0</math></b>	fundamentale Anisotropie
<b><math>\vec{r}_D, \vec{r}_A, \vec{r}_V</math></b>	Verbindungsvektoren
<b><math>r(t)</math></b>	zeitabhängige Anisotropie
<b>S</b>	Singulettzustand
<b>T</b>	Tripletzustand
<b>t</b>	Zeit
<b><math>T_m</math></b>	Phasenübergangstemperatur
<b>TAS</b>	Transiente Absorptionsspektrometer
<b>TBTU</b>	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborat
<b>TCSPC</b>	zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung, engl. time-correlated single photon counting
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>TICT</b>	verdrehter intramolekularer charge-transfer, engl. twisted intramolecular charge transfer
<b>TIS</b>	Triisopropylsilan
<b>TRIS</b>	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TTA</b>	Transienten-Absorption
<b><math>\alpha</math></b>	Amplitude
<b><math>\beta</math></b>	Winkel zwischen Übergangsdipolmomenten
<b><math>\epsilon(\lambda)</math></b>	wellenlängenabhängiger, dekadischer Extinktionskoeffizient

$\varepsilon_A$	Extinktionskoeffizient des Akzeptors
$\varepsilon_T$	Extinktionskoeffizient der transienten Spezies
$\theta_K$	Kegelwinkel
$\theta_P$	Winkel des eingestrahnten Lichts
$\Theta_T, \Theta_D, \Theta_A$	Winkel zwischen Übergangsdipolmomenten
$\kappa^2$	Orientierungsfaktor
$\lambda$	Wellenlänge
$\Delta\lambda$	Stokesverschiebung
$\lambda_{\max, \text{abs}}$	Absorptionsmaximum
$\lambda_{\max, \text{em}}$	Fluoreszenzemissionsmaximum
$\lambda_{\text{em}}$	Fluoreszenzemissionswellenlänge
$\lambda_{\text{ex}}$	Fluoreszenzanregungswellenlänge
$\nu$	Frequenz
$\phi$	Fluoreszenzquantenausbeute
$\phi_A$	Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors
$\phi_D$	Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
$\phi_{DA}$	Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
$\varphi$	Rotationskorrelationszeit
$\tau$	Fluoreszenzabklingzeit
$\tau_A$	Fluoreszenzabklingzeit des Akzeptors
$\tau_D$	Fluoreszenzabklingzeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
$\tau_{DA}$	Fluoreszenzabklingzeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
$\omega_d$	Frequenz des elektronischen Donorübergangs
$\omega_F$	Fermifrequenz

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Vereinfachtes Jablonski-Termschema . . . . .	8
2.2	Schematische Darstellung des Förster-Resonanz-Energietransfers . . . . .	10
2.3	Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Donor-Akzeptor-Abstand . . . . .	11
2.4	Einfluss der Orientierung der Übergangsdipolmomente . . . . .	12
2.5	Schematische Darstellung der kraftabhängigen FRET-Stäbe . . . . .	14
2.6	Schematischer Aufbau zur Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie . . . . .	16
2.7	<i>Wobble-in-a-cone</i> -Modell . . . . .	17
2.8	Strukturformel von Cumarin . . . . .	20
2.9	Strukturformeln eines 7-Aminocumarins . . . . .	21
2.10	Energieniveaus inkl. <i>ICT</i> und <i>TICT</i> . . . . .	22
2.11	Strukturformeln eines Acyl- und eines Esther-DBD-Farbstoffs . . . . .	24
2.12	Strukturformeln der Cou-OSTK-Stäbe . . . . .	25
2.13	Schematische Darstellung eines unilamellaren Vesikels . . . . .	26
2.14	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Antikörpers . . . . .	27
2.15	Schematische Darstellung eines fluoreszenzverstärkenden Immunassays . . . . .	28
2.16	3D-Darstellung von Cys-14-Pro-DBD . . . . .	29
2.17	Schematische Darstellung der Oberflächenplasmonenresonanz . . . . .	30
3.1	Strukturformeln der verwendeten 7-Aminocumarine . . . . .	33
3.2	Strukturformeln der DBD-OSTK-Stäbe . . . . .	34
3.3	Strukturformeln der FRET-Paare . . . . .	34
3.4	Strukturformeln von DOPS und DOPC . . . . .	35
3.5	Strukturformeln der Fmoc- und der Trt-Schutzgruppe . . . . .	36
3.6	Strukturformeln von Cys-5-Pro-Cou . . . . .	37
4.1	Spektren und Abklingkurven von DEAC und Cou-476 mit mAb . . . . .	44
4.2	Emissionsspektren und -abklingkurven von DEAC mit mAb . . . . .	44
4.3	TTA von DEAC in PBS . . . . .	47
4.4	Spektren und -abklingkurven von Cou-570 mit mAb . . . . .	48
4.5	Anisotropie von DEAC mit mAb . . . . .	51
4.6	Spektren und Abklingkurven von Cou und Cou-OSTK in PBS . . . . .	55
4.7	Spektren und Abklingkurven von Cou-OSTK in PBS und Aceton . . . . .	56

4.8	Spektren und Abklingkurven von DBD, DBD-f-OSTK und DBD-OSTK . . .	58
4.9	Spektren von DBD und Abklingkurven von DBD-f-OSTK . . . . .	59
4.10	Spektraler Überlapp von Cou-OSKT und DBD-OSTK in PBS . . . . .	61
4.11	Emissionsspektren und Abklingkurven von Cou-OSTK, Cou-OSTK-f-DBD und Cou-OSTK-DBD . . . . .	62
4.12	Schema Gelenkstab und Emissionsspektren für Cou-G-O-DBD . . . . .	66
4.13	Spektren und Abklingkurven für Cou-OSTK in PBS und LUV . . . . .	69
4.14	Stationäre und zeitaufgelöste Anisotropie für Cou-OSTK in PBS und LUV	70
4.15	Stationäre und zeitaufgelöste Anisotropie für DBD-OSTK in PBS und LUV	71
4.16	Emissionsspektren und Abklingkurven für Cou-OSTK in PBS und LUV . .	72
4.17	Stationäre und zeitaufgelöste Anisotropie der Gelenkstäbe . . . . .	75
4.18	Reaktionsgleichung für die Synthese von Cys-5-Pro-Cou . . . . .	77
4.19	Spektren und Abklingkurven für Cou, Cys-5-Pro-Cou und AuNP-Cys-5- Pro-Cou . . . . .	78
4.20	Emissionsspektren und Abklingkurven Cys-x-Pro-DBD und AuNP-Cys-x- Pro-DBD . . . . .	82

# Tabellenverzeichnis

2.1	Wahrscheinlichste und unwahrscheinlichste Werte für $\kappa^2$ . . . . .	13
3.1	Chemikalienliste 7-Aminocumarine . . . . .	34
3.2	Chemikalienliste OSTK-Stäbe . . . . .	35
3.3	Chemikalienliste Polyproline . . . . .	38
4.1	Spektroskopische Eigenschaften von DEAC und Cou-476 mit mAb . . . . .	45
4.2	Faktoren für die Fluoreszenzverstärkung durch die Antikörperbindung . . . . .	46
4.3	Spektroskopische Eigenschaften der 7-Aminocumarine mit mAb . . . . .	50
4.4	Anisotropieparameter der 7-Aminocumarine mit mAb . . . . .	52
4.5	Parameter für Orientierungspolarisierbarkeit . . . . .	53
4.6	Orientierungspolarisierbarkeit . . . . .	53
4.7	Cou-(OS(T)K-)Verbindungen in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	57
4.8	DBD-(OSTK-)Verbindungen in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	60
4.9	FRET -Parameter in PBS . . . . .	61
4.10	FRET-Effizienzen und Donor-Akzeptor-Abstände der FRET-Paare . . . . .	63
4.11	FRET-Paare in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	65
4.12	FRET-Effizienzen und Donor-Akzeptor-Abstände der Gelenkstäbe . . . . .	67
4.13	FRET-Gelenkstäbe in verschiedenen Lösungsmitteln . . . . .	68
4.14	Anisotropieparameter für OSTK-Stäbe in PBS und in Vesikeln . . . . .	74
4.15	Spektroskopische Eigenschaften Cys-x-Pro-Cou-Verbindungen . . . . .	80
4.16	Spektroskopische Eigenschaften Cys-x-Pro-DBD-Verbindungen . . . . .	81



### **Erklärung**

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet zu haben.

Potsdam, September 2017