

Institut für Chemie
Physikalische Chemie

Cyaninfarbstoffe als Fluoreszenzsonden
in biomimetischen und biologischen Systemen

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und
Fluoreszenzanisotropie-Untersuchungen

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

von

Franziska Lushtinetz

Potsdam, Mai 2010

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4847/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-48478](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-48478)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-48478>

Publikationsliste

Veröffentlichungen

K. Kolokassidou, F. Luschtinetz, S. Eidner, I. Pashalidis, M.U. Kumke, „Effect of metal ion complexation on humic acid conformation“, *Technical Report – Svensk Kaernbraenslehantering AB TR-07-05*, 361–366 (2007).

F. Luschtinetz, M. Kumke, C. Dosche, „Influence of Streptavidin on the Absorption and Fluorescence Properties of Cyanine Dyes“, *Bioconjugate Chemistry* **20**(3), 576–582 (2009).

F. Luschtinetz, C. Dosche, „Determination of micelle diffusion coefficients with fluorescence correlation spectroscopy (FCS)“, *Journal of Colloid & Interface Science*, **338**(1), 312–315 (2009).

F. Luschtinetz, M. Kumke, C. Dosche, „Time-resolved fluorescence measurements of cyanine dyes in biomimetic systems“, *Proc SPIE: Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications II*. **7576**, 757619–11 (2010).

Vorträge

F. Luschtinetz, C. Dosche, M.U. Kumke „Protein dynamics: novel fluorescence probes for single molecule spectroscopy“, 9. JCF-Frühjahrssymposium, Chemnitz, 22.–24.03.2007.

F. Luschtinetz, „Einzelmolekülspektroskopie: Kann man einzelne Moleküle sehen?“, 1. Doktorandensymposium der Universität Potsdam, 09.12.2008 (1. Vortragspreis).

F. Luschtinetz, C. Dosche, „Determination of micelle diffusion coefficients with fluorescence correlation spectroscopy (FCS)“, 4th European Young Investigator Conference (EYIC), Slubice, Polen, 18.–21.06.2009 (1. Vortragspreis).

F. Luschtinetz, M. Kumke, C. Dosche, „Time-resolved fluorescence measurements of cyanine dyes in biomimetic systems“, SPIE Photonics West, San Francisco, USA, 23.–28.01.2010.

Poster

F. Luschtinetz, M.U. Kumke, H.-G. Löhmannsröben, „Characterization of new fluorescence probes for single molecule detection in biological applications“, 105. Bunsentagung in Erlangen, 25.–27.05.2006.

F. Luschtinetz, C. Dosche, M.U. Kumke, „New perspectives on fluorescence probes for protein single molecule spectroscopy“, 234. ACS National Meeting in Boston, USA, 19.–23.07.2007.

F. Luschtinetz, C. Dosche, M.U. Kumke, „Fluorescence probes for protein single molecule spectroscopy“, 8. Chitose International Forum on Photonics Science and Technology, Chitose, Japan, 29.–30.11.2007 (Posterpreis).

F. Luschtinetz, C. Dosche, O. Karthaus, „Photophysical Characteristics of cyanine dyes in colloidal and polymer systems“, 8. International Symposium on Functional Pi-Electron Systems, Graz, Österreich, 21.–25.07.2008.

F. Luschtinetz, C. Dosche, „Characterisation of Colloidal Systems with Fluorescence Correlation Spectroscopy“, 15. Anniversary International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences“, PicoQuant GmbH, Berlin, 15.–18.09.2009.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2004 bis Mai 2010 am Institut für Chemie der Universität Potsdam angefertigt. Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. habil. Michael Kumke für die interessante Themenstellung, seine ständige Gesprächsbereitschaft sowie für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen. Herrn Prof. Dr. Löhmannsröben danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für seine Unterstützung und natürlich für die „Anregungen, Ideen und Verbesserungsvorschläge“. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Carsten Dosche für die vielen Diskussionen und Anregungen. Herr Prof. Dr. Olaf Karthaus bin ich dankbar für seine außerordentliche Unterstützung während meines Aufenthaltes am Chitose Institute of Science and Technology in Japan. Ich möchte weiterhin Sascha Eidner und André Geßner für die vielen anregenden Diskussionen und unser gutes Arbeitsklima im Büro (bzw. Container) danken. Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Katlen Brennenstuhl, die mir mit zahlreichen Messungen, (essbarer) „Motivation“ und viel guter Laune so manchen Tag gerettet hat. Schließlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Löhmannsröben bedanken, die mich sowohl bei vielen kleinen Fragestellungen und Messungen als auch bei Gesprächen im G0.01 und „bei den Sonnenkindern“ immer unterstützt haben. Dorit Munzke danke ich für ihre Unterstützung, die aufmunternden Worte und ihre Geduld mit dem ein oder anderen Fehlerteufel. Ich danke Katha und Björn, die es, jede/r auf ihre/seine Art und Weise, immer wieder schaffen, mich in verzwickte „fachliche“ Diskussionen zu verwickeln und mich dadurch von meinem Laboralltag ablenken. Abschließend möchte ich meiner Familie und meinem Freund Paul für ihre Unterstützung danken.

Liste der verwendeten Symbole

A_∞	Ausmaß der Rotationshinderung
A_i	partieller Anteil der Komponente i and der Fluoreszenzabklingzeit τ_i
A	Amplitude der Korrelationsfunktion
a/b	Achsenverhältnis
c	Konzentration
c_M	Monomerkonzentration
c_D	Dimerkonzentration
c_{Tensid}	Tensidkonzentration
c_F	Farbstoffkonzentration
c_{Mi}	Mizellkonzentration
c'	Lichtgeschwindigkeit
$c.m.c.$	Kritische Mizellbildungskonzentration
d	Schichtdicke
D	Diffusionskoeffizient der Translation
D_\perp, D_\parallel	Rotationsdiffusionskoeffizienten eines gestreckten Rotationsellipsoiden
\mathbf{E}	elektrischer Feldvektor des eingestrahnten Lichtes
$E(\lambda)$	Extinktion
$E_F(\lambda)$	Extinktion der Farbstoffe in wässriger Lösung
$E_{\text{FMi}}(\lambda)$	Extinktion der mizellgebundenen Farbstoffe
$\Delta E(\lambda)$	Differenz der Extinktion
$\Delta \mathcal{E}$	Wechselwirkungsenergie bei der Dimerbildung
\mathcal{E}_G	Energie im Grundzustandes
\mathcal{E}_A	Energie im ersten angeregten Zustandes
G	Gerätekorrekturfaktor bei einer Anisotropiemessung
$G(\tau)$	Korrelationsfunktion
h	<i>Plancksches</i> Wirkungsquantum
I_\parallel	Fluoreszenzintensität in vertikaler Richtung (bei vertikal polarisierter Anregung)
I_\perp	Fluoreszenzintensität in horizontaler Richtung (bei vertikal polarisierter Anregung)
I_{vv}	beobachtete Intensität in vertikaler Richtung (bei vertikal polarisierter Anregung)
I_{vh}	beobachtete Intensität in horizontaler Richtung (bei vertikal polarisierter Anregung)
k_B	<i>Boltzmann</i> -Konstante
k_d	Geschwindigkeitskonstante: diffusionskontrollierter Eintritt von Farbstoff in Mizelle
k_F	Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz
k_{nr}	Geschwindigkeitskonstante strahlungsloser Desaktivierungsprozesse
K_A	Gleichgewichtskonstante: Assoziation Farbstoffe mit Mizellen
K_D	Gleichgewichtskonstante: Dimerisierung
K_a	Bindungskonstante

M_r	Molekulargewicht
n	Brechungsindex
N_A	<i>Avogadro</i> -Konstante
\mathbf{M}	Übergangsdipolmoment
N_{agg}	Aggregationszahl: Anzahl der Tensidmoleküle pro Mizelle
NA	Numerische Apertur
P	Anregungsleistung
$P(k)$	Wahrscheinlichkeit für k Fluorophore in einer Mizelle
$P(n, N)$	Wahrscheinlichkeit für n Fluorophore (N : durchschnittlichen Anzahl der Fluorophore)
$p(r)$	Helligkeitsprofil
r	Fluoreszenzanisotropie
r_D	Abstand zwischen den Schwerpunkten der Monomere in einem H-Dimer
r_0	Fundamentale Fluoreszenzanisotropie
R_h	Hydrodynamischer Radius
S_v	Detektionsempfindlichkeit in vertikaler Polarisation
S_h	Detektionsempfindlichkeit in horizontaler Polarisation
T	Temperatur
V_{eff}	Beobachtungsvolumen in einem FCS-Experiment
V_0	Volumen einer nichthydratisierten Mizelle
w_0	effektiver Radius bei $1/e^2$ der maximalen Intensität in lateraler Richtung
z_0	effektiver Radius bei $1/e^2$ der maximalen Intensität entlang der opt. Achse

Griechische Symbole:

α_i	Amplitude der Komponente i
β	Winkel der Übergangsdipolmomente
δ	Verhältnis Wasser zu Tensid in einer Mizelle ($m(\text{Wasser})/m(\text{Tensid})$)
$\epsilon(\lambda)$	Extinktionskoeffizient
η	Viskosität
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
$\theta_{A,E}$	Winkel der Übergangsdipolmomente zur Polarisationsrichtung des eingestrahnten Lichtes
θ_c	Halber Öffnungswinkel eines Kegels
τ_i	Fluoreszenzabklingzeit
τ_D	Diffusionszeit
τ_R	mittlere Korrelationszeit
Φ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
ϕ	Rotationskorrelationszeit
v	spezifisches Volumen
ρ_0	Dichte des Lösungsmittels

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	7
2.1	Cyaninfarbstoffe	7
2.1.1	Polymethinfarbstoffe	7
2.1.2	Aggregatbildung	8
2.2	Das System Biotin-Streptavidin	9
2.2.1	Allgemeines	9
2.2.2	Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung	11
2.3	Fluoreszenzanisotropie	12
2.3.1	Grundlagen	12
2.3.2	Einfache Modelle zur Beschreibung der Anisotropieabklingfunktion	15
2.3.3	Komplexe Anisotropiemodelle	18
2.4	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	21
2.4.1	Prinzip eines FCS-Experimentes	21
2.4.2	Physikalische Modelle zur Interpretation der Autokorrelationsfunktion	23
2.4.3	Technische Realisierung eines Einzelmolekülexperimentes	25
3	Experimentelles	29
3.1	Verwendete Chemikalien und Probenherstellung	29
3.2	Absorptions- und Fluoreszenzmessungen	30
3.3	Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen	31
3.3.1	Experimenteller Aufbau	31
3.3.2	Messung von Fluoreszenzabklingzeiten	31
3.3.3	Bestimmung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie	32
3.4	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	33
3.4.1	Experimenteller Aufbau	33
3.4.2	Gerätecharakterisierung	34
3.4.3	Anpassung der Autokorrelationsfunktion	36
3.5	Charakterisierung von Tween-20-Mizellen	37
3.5.1	Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration	37
3.5.2	Bestimmung der Mizellgröße	37

3.5.3	Berechnung der Aggregationszahl	38
3.6	Sonstiges	38
3.6.1	Temperatur	38
3.6.2	Datenverarbeitung und Anpassung von Funktionen	39
4	Ergebnisse und Diskussion	41
4.1	Aggregationsverhalten in wässriger Lösung	41
4.2	Modellsystem: Biotin-Streptavidin	48
4.2.1	Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen	48
4.2.2	Farbstoff-Protein-Wechselwirkungen	52
4.2.3	Beweglichkeit der Fluoreszenzsonde	61
4.3	Modellsystem: Mizellen	73
4.3.1	Charakterisierung des Modellsystems Tween20	73
4.3.2	Assoziationsgleichgewicht: Farbstoff-Mizelle	77
4.3.3	Wechselwirkungen: Farbstoff-Mizelle	84
4.3.4	Diffusionseigenschaften	87
4.3.5	Beweglichkeit der Fluoreszenzsonde	91
5	Zusammenfassung und Ausblick	97
	Literaturverzeichnis	103
A	Anhang	i
A.1	Gleichungen	i
A.1.1	Rotationskorrelationszeiten eines gestreckten Rotationsellipsoiden	i
A.1.2	Auswertung der Autokorrelationsfunktion unter Berücksichtigung der Austauschkinetik	ii
A.1.3	Fehlerbetrachtung	iii
A.2	Experimentelles	iv
A.3	Ergebnisse	vii
A.3.1	Diagramme	vii
A.3.2	Tabellen	xxii

1 Einleitung

Durch eine biologische Membran wird das Zytoplasma im Inneren einer lebenden Zelle vom umgebenden Medium abgegrenzt. Die Zellmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht und darin ein- und aufgelagerten Proteinen. Damit bildet sie zum einen eine natürliche Barriere für Ionen und viele polare Substanzen, zum anderen ermöglicht sie die Kommunikation zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung sowie zwischen verschiedenen Zellen und Zellorganellen. Die Funktionsweise einer biologischen Membran wird maßgeblich von der Struktur und von den dynamischen Eigenschaften der Lipiddoppelschicht beeinflusst. Erst durch eine spezifische Lipid- und Proteinzusammensetzung ist ein kontrollierter Stoff- und Signaltransport möglich [1, S. 177]. Dazu zählen z.B. die Aufnahme und Abgabe von Nährstoffen sowie der Transport von elektrischen Signalen in Nervenzellen. Membranproteine spielen eine entscheidende Rolle in physiologischen Prozessen. So können durch Veränderungen dieser Proteine lebenswichtige Transportmechanismen beeinträchtigt sein und dadurch Krankheiten verursacht werden. Die Stoffwechselkrankheit Mukoviszidose wird bspw. durch die Veränderung eines Chlorid-Transporterproteins verursacht [1, S. 313]. Die in einer Biomembran vorhandenen Lipide und Proteine können lateral innerhalb der Membran diffundieren. Sowohl diese Beweglichkeit der Membrankomponenten als auch die Durchlässigkeit für Arzneistoffe hängt von den Fließeigenschaften im Inneren der Lipiddoppelschicht ab. Auch die Aktivität von Membranenzymen und Transportproteinen kann stark von der Mikroviskosität der Membran beeinflusst werden [2]. Das Verständnis über den Aufbau und die Funktionsweise biologischer Membranen ist von fundamentaler Bedeutung in der Biologie und Medizin. Dieser Stellenwert zeigt sich u.a. in den Arbeiten von Peter Agre und Roderick MacKinnon, die 2003 den Nobelpreis in Chemie „für die Entdeckung von Wasserkanälen“ und „für strukturelle und mechanistische Studien an Ionenkanälen“ verliehen bekamen [3].

Um Prozesse in biologischen Systemen auf molekulare Ebene zu untersuchen, haben sich vor allem fluoreszenzspektroskopische Methoden bewährt. Die Möglichkeit, einzelne Moleküle zu beobachten, hat zu einem deutlichen Fortschritt im Verständnis von elementaren biochemischen Prozessen geführt. Zu einer der bekanntesten Methoden der Einzelmolekülspektroskopie zählt die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), mit deren Hilfe intramolekulare und diffusionsgesteuerte Prozesse in einem Zeitbereich von μs bis ms untersucht werden können.

Durch die Verwendung von sog. Fluoreszenzsonden können Informationen über deren molekulare Mikroumgebung erhalten werden [4, 5]. Insbesondere für die konfokale Mikroskopie

und die Einzelmolekülspektroskopie werden Fluoreszenzfarbstoffe mit einer hohen Photostabilität und hohen Fluoreszenzquantenausbeuten benötigt [6]. Biologische Systeme zeigen häufig eine intrinsische Fluoreszenz im ultravioletten und sichtbaren Bereich des Lichtes, wodurch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erheblich beeinträchtigt werden können [7]. Darüber hinaus wird Licht kürzerer Wellenlänge stärker gestreut als sichtbares Licht und kann nicht so tief in biologisches Gewebe eintreten. Durch die Verwendung von Farbstoffen, deren Absorptionsmaximum im roten und nahinfraroten Spektralbereich liegt, können diese Probleme der Autofluoreszenz und Streulichteffekte reduziert werden. Weiterhin wird bei der Untersuchung von biologischen Systemen bei Anregungswellenlängen oberhalb von 600 nm das Risiko von Zellschädigungen verringert.

Aufgrund ihrer hohen Fluoreszenzquantenausbeute und der Möglichkeit, „maßgeschneiderte“ Farbstoffe in einem breiten Spektralbereich für die Absorption und Fluoreszenz zu entwickeln, sind Cyaninfarbstoffe von besonderem Interesse für bioanalytische Anwendungen. Als Fluoreszenzmarker finden diese Farbstoffe insbesondere in der klinischen Diagnostik und den Lebenswissenschaften Verwendung [8–13]. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe DY-635 und DY-647 sind zwei typische Vertreter dieser Farbstoffklasse (vgl. Abb. 1.1). Durch Modifizierung können die Farbstoffe kovalent an biologisch relevante Moleküle gebunden werden. Aufgrund ihres Absorptionsmaximums oberhalb von 630 nm können sie insbesondere in der Bioanalytik eingesetzt werden.

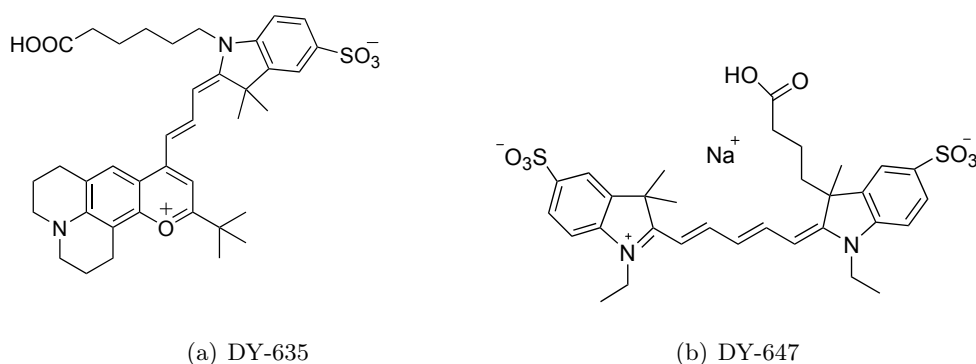


Abb. 1.1: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe.

Um Fluoreszenzsonden wie die Cyaninfarbstoffe in speziellen biologischen Anwendungen einzusetzen und auch gezielt zu synthetisieren, ist es von Bedeutung, grundlegende molekulare Wechselwirkungen der Farbstoffe zu verstehen. So zeigen viele Cyaninfarbstoffe in bestimmten Lösungsmitteln oder bei höherer Konzentration eine ausgeprägte Neigung, Aggregate zu bilden [14–16]. In diesem Fall werden häufig Änderungen des Absorptionsspektrums und eine Abweichung vom *Lambert-Beerschen* Gesetz beobachtet. Das Verständnis dieser Aggregatbildung ist u.a. für bioanalytische Anwendungen relevant. Es ist bekannt, dass Farbstoff-

Farbstoff-Wechselwirkungen auftreten können, wenn Cyanine an DNA gebunden werden. Dabei wurde die Bildung von Farbstoffdimeren und H-Aggregaten beobachtet [8]. Die Bindung von Fluoreszenzmarkern an Proteine kann die Fluoreszenzeigenschaften des jeweiligen Farbstoffes erheblich beeinflussen. So wurde für den häufig verwendeten Farbstoff Atto 655 Fluoreszenzlöschung beobachtet, wenn dieser an Streptavidin gekoppelt wird [17]. Darüber hinaus können Streptavidin-gebundene Farbstoffe mit benachbarten freien Bindungsstellen des Proteins wechselwirken und diese so für andere Farbstoffmoleküle blockieren [18].

Wird ein Fluoreszenzfarbstoff an ein Protein gekoppelt, können mittels der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie sowohl Aussagen über die Rotationsbewegung des Proteins als auch über die Beweglichkeit des gebundenen Farbstoffes gemacht werden [19]. Jedoch ist es notwendig, dass die Bewegung des Farbstoffes mit der des Proteins gekoppelt ist. Ist eine Fluoreszenzsonde z.B. durch einen Abstandshalter zu weit außerhalb des Proteins gebunden, kommt es zu einer freien Rotation der Sonde und es können keine Informationen über die Proteindynamik erhalten werden. Wird die biotinylierte Form des Farbstoffes Alexa Fluor 594 an Avidin gebunden, so hängt der Verlauf der Anisotropieabklingfunktion signifikant vom Abstand des Farbstoffes zum Protein ab [20]. In den letzten Jahren hat sich die Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie zur Charakterisierung von Proteinen und des Rotationsverhaltens etabliert. Bei den bisherigen Studien wurden jedoch hauptsächlich Systeme betrachtet, bei denen alle Sondenmoleküle an das Protein gebunden sind [19–22]. In komplexen biologischen Systemen liegen die Farbstoffe häufig in mehr als einer Mikroumgebung vor bzw. gibt es mehr als eine Art von Farbstoff. In diesem Fall können die Fluoreszenzanisotropieabklingkurven meist nicht mehr durch einfache Modelle beschrieben werden.

Bevor die Farbstoffe als Fluoreszenzsonden in komplexen zellulären Strukturen eingesetzt werden können, ist es notwendig, sie in einfacher aufgebauten Systemen zu charakterisieren. Die Verwendung von Modellsystemen ermöglicht die Fokussierung auf bestimmte Aspekte eines komplexen biologischen Systems.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Wechselwirkungen der Farbstoffe DY-635 und DY-647 in zwei Modellsystemen untersucht werden:

- (1) Biotin-Streptavidin
- (2) Mizellen

Zu (1): Die Eigenschaften des Systems Biotin-Streptavidin sind in der Literatur gut beschrieben [23–25]. Es soll daher im Rahmen dieser Arbeit als Modellsystem für spezifische Protein-Ligand-Wechselwirkungen verwendet werden. Zur Bindung der Farbstoffe an Streptavidin wird hierbei die biotinylierte Form der Farbstoffe eingesetzt. Eine detaillierte Einführung des Systems „Biotin-Streptavidin“ erfolgt in Abschn. 2.2.

Zu (2): Mizellen bilden eines der einfachsten Systeme, um die Mikroumgebung einer biologischen Membran nachzuahmen. Für den Einsatz als Modellsystem haben diese Strukturen

mehrere Vorteile: Mizellen sind im Allgemeinen kleiner als Vesikel, haben eine definierte Größe und sind optisch transparent. Tenside sind grenzflächenaktive Substanzen, die einen hydrophilen (polaren) und hydrophoben (unpolaren) Molekülteil enthalten. Aufgrund dieser amphiphilen Struktur können diese Moleküle z.B. in wässriger Lösung spontan definierte Strukturen ausbilden [26, S. 373] (vgl. Abb. 1.2). Oberhalb einer charakteristischen Tensidkonzentration kommt es durch Aggregation der Tensidmoleküle zur Ausbildung von Mizellen. Dabei ordnen sich die Moleküle so an, dass die polaren Kopfgruppen zur wässrigen Phase hin orientiert sind und sich die hydrophoben Teile vom Wasser abgeschirmt im Mizellkern befinden. Die Konzentration, bei der die Mizellbildung einsetzt, wird als kritische Mizellbildungskonzentration bezeichnet (*c.m.c.*) [27, S. 166]. Neben Temperatur und eingesetztem Lösungsmittel beeinflussen vor allem die Tensidkonzentration und -geometrie die Struktur der Mizellen. Bei höheren Konzentrationen treten vor allem zylindrische Mizellen und lamellare Strukturen auf [28]. Im Gegensatz dazu bestehen Liposomen (Vesikel) aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten, welche um einen Wasserkern angeordnet sind [26, S. 317].

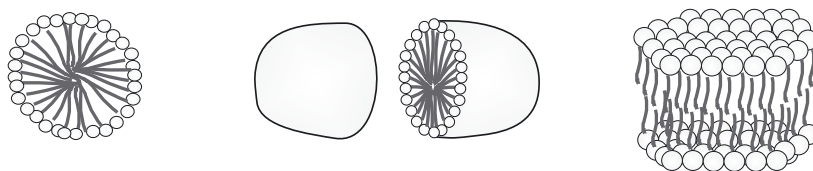


Abb. 1.2: Modellvorstellungen zur Struktur von Mizellen nach [28, S. 45]. [links] sphärisch. [Mitte] stäbchenförmig. [rechts] lamellar.

Die Verwendung von nichtionischen Tensiden für ein mizellares Modellsystem hat den Vorteil, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den in dieser Arbeit verwendeten kationischen Farbstoffen und hydrophilen Kopfgruppen vermieden werden [29]. Zusätzlich dazu bilden nichtionische Tenside häufig schon bei geringen Konzentrationen mizellare Strukturen aus. So sind die Werte der *c.m.c.* für nichtionische Tenside um etwa ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als die ionischer Tenside mit vergleichbaren hydrophoben Gruppen [26, S. 380]. Um die Diffusions- und Rotationseigenschaften des Modellsystems anhand einfacher Modelle beschreiben zu können, wurde ein Tensid benötigt, das kugelförmige Mizellen bildet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das nichtionische Tensid mit dem Handelsnamen „Tween-20“ als Modellsystem verwendet (Abb. 1.3), da es annähernd sphärische Mizellen ausbildet [30]. Aufgrund der geringen Toxizität¹ wird Tween-20 häufig in der Lebensmittelindustrie eingesetzt². Das Tensid ist ein Polyethylenglykolsorbitolester mit 20 Ethylenglykoleinheiten als hydrophile Kopfgruppe. Der unpolare Teil von Tween-20 ist ein Ester der gesättigten Fettsäure Laurinsäure.

¹Für die mittlere letale Dosis wurde ein Wert von $LD_{50} \leq 38 \text{ g/kg}$ (orale Aufnahme, Ratte) ermittelt [31].

²Lebensmittelzusatzstoffnummer: E432 [32].

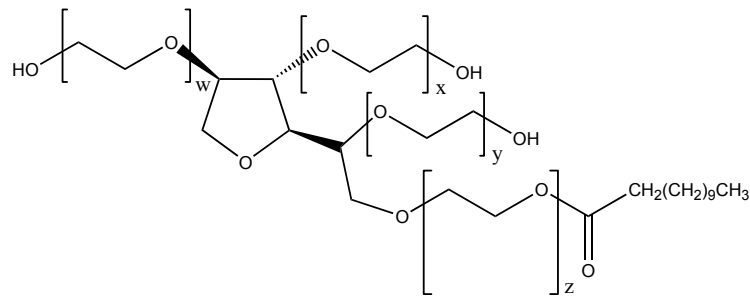


Abb. 1.3: Struktur des nichtionischen Tensids Tween-20 (Polyethyleneglykolsorbitanmonolaurat). Es enthält 20 Ethylenglykol-Einheiten ($w + x + y + z = 20$).

Damit die Mizellen als Modellsystem verwendet werden können, müssen ihre hydrodynamischen Eigenschaften bekannt sein. Dabei sind insbesondere der hydrodynamische Radius R_h , die Aggregationszahl N_{agg} und die *c.m.c.* von Interesse. Für das Tensid Tween-20 finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben über die Aggregationszahl N_{agg} (Anzahl der Tensidmoleküle pro Mizelle). So wurde in [33] eine deutliche Abhängigkeit von N_{agg} von der Tensidkonzentration gefunden. Demgegenüber wurde durch andere Autoren im gleichen Konzentrationsbereich kein Zusammenhang zwischen der Tensidkonzentration und Mizellgröße festgestellt [34].

In einer Lösung von Farbstoff und Mizellen, können die Farbstoffmoleküle in die Mizellen diffundieren. Dabei bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Farbstoffmolekülen in wässriger Phase und in Mizellen aus. Um die Farbstoffe als Fluoreszenzsonden für Mizellen und biologische Membranen einsetzen zu können, muss bekannt sein, inwiefern sich die Fluoreszenzeigenschaften des jeweiligen Farbstoffes verändern. So ist für einige Fluoreszenzfarbstoffe bekannt, dass eine Dimerisierung der Farbstoffe innerhalb von Mizellen oder Vesikel zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität führen kann [35–37]. Zusätzlich dazu können dynamische Löschprozesse stattfinden [35]. Die Diffusionskoeffizienten von Mizellen können mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bestimmt werden, wobei die Diffusion etwa durch die Mizellgröße und Interaktion mit anderen Molekülen beeinflusst wird. Dabei muss jedoch zunächst untersucht werden, ob sich die Struktur und Größe der Mizellen durch die Fluoreszenzsonde verändern. So wurde ein Einfluss von fluoreszenzmarkierten Phospholipiden auf die Mizellgröße beschrieben [38].

Für die Untersuchung der Farbstoffe DY-635 und DY-647 ergeben sich folgende Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

1. Aggregationsverhalten der Farbstoffe (Abschn. 4.1)

Mittels Absorptionsspektroskopie wird ein mögliches Aggregationsverhalten der Farbstoffe DY-635 und DY-647 in wässriger Lösung untersucht.

2. Modellsystem: Biotin-Streptavidin (Abschn. 4.2)

Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen (Abschn. 4.2.1): Anhand von stationären Absorptions- und Fluoreszenzmessungen wird untersucht, ob es zu Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen kommt, wenn mehr als ein Farbstoffmolekül an einem Streptavidintetramer gebunden ist.

Farbstoff-Protein-Wechselwirkungen (Abschn. 4.2.2): In einem nächsten Schritt werden mögliche Farbstoff-Protein-Wechselwirkungen analysiert. Als Untersuchungsmethoden dienen zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen und die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Es soll geklärt werden, ob alle vier Bindungsstellen des Streptavidintetramers durch biotinylierte Farbstoffmoleküle besetzt bzw. ob unbesetzte, benachbarte Bindungsstellen im Protein durch Wechselwirkungen mit gebundenen Farbstoffmolekülen blockiert werden können.

Beweglichkeit der Fluoreszenzsonde (Abschn. 4.2.3): Mit Hilfe von zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiemessungen wird die Rotationsbewegung der Streptavidin-gebundenen Farbstoffe analysiert. Dabei soll insbesondere festgestellt werden, inwiefern eine Konformationsänderung im Streptavidin einen Einfluss auf die Beweglichkeit der Farbstoffe hat. Weiterhin werden Mischungen von freien und Streptavidin-gebundenen Farbstoffmolekülen charakterisiert, wobei geeignete Modelle zur Beschreibung der Anisotropieabklingfunktion gefunden werden sollen.

3. Modellsystem: Mizellen (Abschn. 4.3)

Charakterisierung des Modellsystems (Abschn. 4.3.1) Um Tween-20-Mizellen als Modellsystem zu verwenden, wird zunächst das Modellsystem selbst charakterisiert. Mittels fluoreszenzspektroskopischer Methoden werden der hydrodynamische Mizellradius R_h und die Aggregationszahl N_{agg} für verschiedene Tensidkonzentrationen bestimmt. Die *c.m.c.* ist für Tween-20 in Wasser bekannt [34, 39, 40]. Da in dieser Arbeit die Untersuchungen in PBS-Puffer durchgeführt wurden, wird die *c.m.c.* in diesem Lösungsmittel ermittelt.

Assoziationsgleichgewicht (Abschn. 4.3.2): Um zu untersuchen, inwiefern sich die Farbstoffe und ihre biotinylierte Form in Tween-20-Mizellen einlagern, wird das Assoziationsgleichgewicht zwischen Farbstoff und Mizellen spektroskopisch charakterisiert.

Wechselwirkungen: Farbstoff-Mizelle (Abschn. 4.3.3): Es soll mit Hilfe von stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen analysiert werden, welchen Einfluss die Einlagerung der Farbstoffe in die Mizellen auf ihre spektralen Eigenschaften und photophysikalische Desaktivierungsprozesse hat.

Diffusionseigenschaften (Abschn. 4.3.4): Die Diffusionseigenschaften der Farbstoffe in wässriger und mizellarer Phase werden mittels FCS untersucht. Dabei soll geklärt werden, inwiefern die Einlagerung der Farbstoffe in die Mizellen einen Einfluss auf deren hydrodynamische Eigenschaften hat. Des Weiteren sollen photophysikalische Prozesse, die im μ s-Zeitbereich zu einem Abfall der Korrelationsfunktion führen, analysiert werden.

Beweglichkeit der Fluoreszenzsonde (Abschn. 4.3.5): Mit Hilfe von zeitaufgelösten Anisotropiemessungen wird die Beweglichkeit der in die Mizellen eingelagerten Farbstoffmoleküle untersucht.

2 Grundlagen

2.1 Cyaninfarbstoffe

2.1.1 Polymethinfarbstoffe

Eine wichtige Farbstoffklasse für biologische und technische Anwendungen stellt die Gruppe der Polymethine dar. Das gemeinsame Strukturelement dieser Farbstoffe ist hierbei eine Kette von Methingruppen¹ (=CH-), die ein konjugiertes Bindungssystem bilden [42, 43].

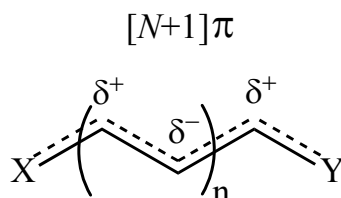


Abb. 2.1: Allgemeine Polymethinstruktur ($n=1,2,3,\dots$).

Das Chromophor besteht aus einer Kette von N Atomen, auf der $(N \pm 1)\pi$ -Elektronen so verteilt sind, dass (im „idealen Polymethinzustand“) innerhalb der Kette die Bindungsordnung identisch ist, während die Ladungsdichten alternieren [41]. Häufig sind X und Y Heteroatome (N , O , S) bzw. heterocyclische Endgruppen. Je nach Art der Kettenendgruppen X und Y werden kationische, anionische und neutrale Polymethine unterschieden [43]. Photophysikalische Eigenschaften der Polymethinfarbstoffe wie z.B. die Lage des Absorptionsmaximums können durch gezielte Veränderung der Struktur beeinflusst werden. Damit erstreckt sich der spektrale Bereich der Absorptions- und Fluoreszenzspektren vieler Polymethine von etwa 340 nm bis 1400 nm [44]. Hierbei spielen insbesondere Substituenten am Ring oder der Polymethinkette, die Auswahl der Heteroatome (X, Y) und die Länge der Polymethinkette eine wichtige Rolle. Innerhalb einer vinylogenen Reihe führt eine Verlängerung der Kette um zwei Methingruppen zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von etwa 100 nm in den langwelligeren Spektralbereich [42–44].

¹Im Allgemeinen zählen zu den Polymethinen auch =CR- - Gruppen, wobei R verschiedene Substituenten und Atome der IV., V. oder VI. Hauptgruppe des Periodensystems sein können. Polymethinfarbstoffe im „engeren“ Sinn (nach Dähne [41]) bestehen aus einer ungeraden Anzahl von Methinketten (Abb. 2.1).

Die Gruppe der Cyanine gehört zu den kationischen Polymethinen. Cyaninfarbstoffe enthalten Azomethin-Gruppierungen [45]. Aufgrund ihrer Eigenschaft, die Lichtempfindlichkeit von Silberhalogeniden im langwelligen Spektralbereich (bis zu 1300 nm) zu erhöhen, gehören Cyanine zu den wichtigsten photographischen Sensibilisatoren [42]. In letzter Zeit werden Cyaninfarbstoffe vor allem in der Bioanalytik eingesetzt [8–13].

2.1.2 Aggregatbildung

Für viele Polymethine in wässrigen Lösungsmitteln ist insbesondere bei hohen Konzentrationen die experimentell ermittelte Extinktion E bei einer Wellenlänge λ nicht proportional zur Farbstoffkonzentration c . Weiterhin werden häufig ausgeprägte Änderungen im Absorptionsspektrum beobachtet. Dabei nimmt im Absorptionsspektrum die Intensität der Hauptabsorptionsbande mit steigender Konzentration ab, während neue Banden bei anderen Wellenlängen hervortreten. Diese Abweichung vom *Lambert-Beerschen Gesetz* ([5, S. 23], $\epsilon(\lambda)$: molarer dekadischer Extinktionskoeffizient, d : Schichtdicke) kann in vielen Fällen auf Assoziation der Farbstoffe sowie die Bildung von Dimeren und höheren Aggregaten zurückgeführt werden [15, 16].

$$E(\lambda) = \epsilon(\lambda)cd \quad (2.1)$$

Die Veränderung der Absorptionsspektren (Bandenverschiebung bzw. -aufspaltung) bei der Bildung von Farbstoffaggregaten kann mit Hilfe der *Molekularen Exziton*-Theorie beschrieben werden [14, 46]. Im Folgenden soll kurz auf molekulare Farbstoffdimere und deren Absorptionsspektrum eingegangen werden. Zwischen den an der Dimerbildung beteiligten Farbstoffmolekülen kommt es zu einer Kopplung der Übergangsdipolmomente und einer sog. „exzitonischen“ Aufspaltung des angeregten Zustandes des Dimers. Abb. 2.2 zeigt diese Aufspaltung für Dimere in verschiedenen geometrischen Anordnungen.

Sind die Farbstoffmoleküle im Dimer parallel zu einander orientiert (Abb. 2.2 [links]), ist nur der elektronische Übergang in den energetisch höheren² Zustand \mathcal{E}'' erlaubt und in den energetisch abgesenkten Zustand \mathcal{E}' symmetrieverboten [46]. Im Absorptionsspektrum dieser parallelen Dimere wird daher eine hypsochrome Verschiebung der Hauptabsorptionsbande beobachtet [43, 46]. Diese Molekülanordnungen werden auch als H-Aggregate (bzw. H-Dimere) bezeichnet [47] und treten häufig bei Cyaninfarbstoffen in wässrigen Lösungsmitteln bei höheren Konzentration auf [15]. Die Neigung, in Lösung Dimere bzw. Aggregate zu bilden, hängt sowohl von der Struktur der Farbstoffe als auch von der Lösungsumgebung (z.B. pH-Wert, Polarität) ab [14].

Die Fluoreszenzquantenausbeuten der H-Aggregate sind im Allgemeinen sehr gering, da Desaktivierung aus dem energetisch höher angeregten Zustand \mathcal{E}'' in den schwingungsrelaxierten S_1 -Zustand (hier \mathcal{E}') für gewöhnlich strahlungslos durch innere Relaxation und innere

²relativ zur Energie des angeregten Zustandes des Monomers.

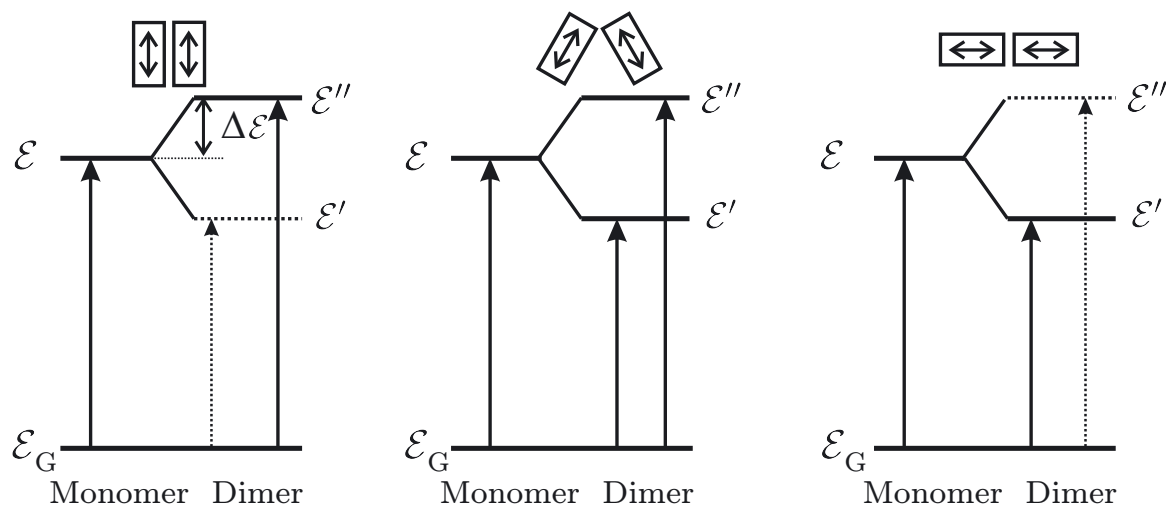


Abb. 2.2: Aufspaltung des angeregten Zustandes von Farbstoffdimeren für verschiedene geometrische Anordnungen. Energieniveaus des Grundzustandes (\mathcal{E}_G) und des angeregten Zustandes (\mathcal{E}' und \mathcal{E}''). Die durchgezogenen Pfeile stellen die erlaubten Übergänge dar. $\Delta\mathcal{E}$ beschreibt die Wechselwirkungsenergie bei der Bildung der Dimere. [links] Parallele Anordnung. [Mitte] Schräge Anordnung („oblique“). [rechts] Lineare „head-to-tail“-Anordnung (Kopf-Schwanz).

Umwandlung erfolgt. Der strahlende Übergang aus dem S_1 -Zustand ist verboten und die Geschwindigkeitskonstante k_F der Fluoreszenz kann bis zu sechs Größenordnungen abnehmen [46, 48]. Gleichzeitig können andere Desaktivierungsprozesse aus dem \mathcal{E}' -Niveau wie die strahlungslose Interkombination (Spinumkehr) dominieren und zu einer erhöhten Besetzung des Triplett-Zustands führen [43, 49].

Ist die Geometrie des Dimers nicht vollständig parallel, führt dies zu einer teilweisen Aufhebung der Auswahlregel für den Übergang in das Energieniveau \mathcal{E}' , und es können verglichen mit der Monomerabsorption auch schwach ausgeprägte Absorptionsbanden bei höheren Wellenlängen beobachtet werden (z.B. Abb. 2.2 [Mitte]) [46, 50]. Sind die Farbstoffe in „head-to-tail“-Anordnung orientiert, ist der Übergang in den energetisch niedrigeren Zustand \mathcal{E}' erlaubt und in den höheren Zustand \mathcal{E}'' verboten (Abb. 2.2 [rechts]).

2.2 Das System Biotin-Streptavidin

2.2.1 Allgemeines

Streptavidin ist ein tetrameres, biotin-bindendes Protein, das ursprünglich aus *Streptococcus*-Bakterien³ isoliert wurde. Durch Wasserstoffbrückenbindungen bilden jeweils zwei Protein-Untereinheiten ein Dimer in antiparalleler Orientierung [52, 53].

³*Streptomyces avidinii* [51].

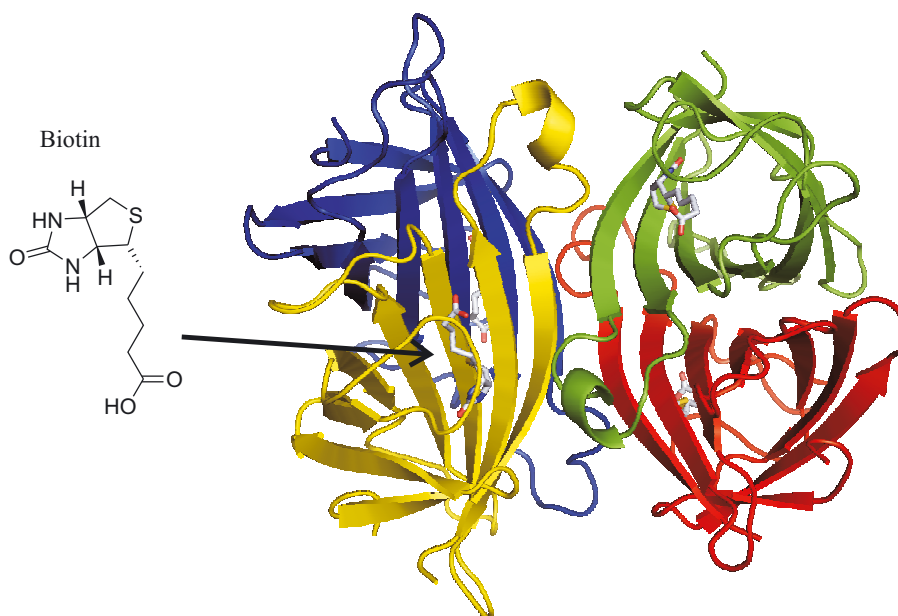


Abb. 2.3: [links] Molekülstruktur von *D*-Biotin. [rechts] „core“ Streptavidin (siehe Text) als Tetramer mit vier Biotin-Bindungstaschen. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software PyMOL 1.1 [54] und dem PDB-Datensatz 1SWD [55, 56] erstellt.

Jedes der vier identischen Monomere enthält eine spezifische Bindungstasche für Biotin⁴ (Abb. 2.3). Charakteristisch für diese Bindung an Biotin ist die ungewöhnlich große Bindungskonstante ($K_a \approx 10^{13}$ L/mol [24]). Aufgrund der hohen Affinität und Stabilität der Bindung wird Streptavidin-Biotin häufig in bioanalytischen Verfahren und der klinischen Diagnostik verwendet (z.B. Affinitätschromatographie und Immunoassays [24, 57, 58]). Zusätzlich zu diesem spezifischen Bindungsverhalten verfügt das Rezeptor/Ligand-Paar Streptavidin-Biotin über weitere Vorteile für molekularbiologische Anwendungen. Biologisch aktive Makromoleküle wie Enzyme oder Antikörper können an das relativ kleine Biotin-Molekül (244 g/mol) gebunden werden, ohne dass ihre biologische Aktivität beeinträchtigt wird [57]. Da die Biotinylierung durch kovalente Bindung an die Seitenkette des Biotins erfolgt, wird die Biotin-Streptavidin-Kopplung im Allgemeinen sterisch nicht behindert.

Natives Streptavidin besteht aus 159 Aminosäuren pro Monomer und hat ein Molekulargewicht von $M_r = 66$ kDa). Bei kommerziell erhältlichem und in dieser Arbeit verwendetem Streptavidin handelt es sich in der Regel um eine N- und C-terminal gekürzte Form (125-127 Aminosäuren, $M_r = 52,8$ kDa), welche in der Literatur als „core“ Streptavidin bezeichnet wird [59, 60]. Im Vergleich zu nativem Streptavidin ist diese verkürzte Form gut wasserlöslich und die Biotin-Bindungstasche ist für sterisch anspruchsvolle biotinylierte Makromoleküle leichter zugänglich [61].

⁴Vitamin H.

2.2.2 Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung

Der strukturelle Ursprung der starken Bindung zwischen Biotin und Streptavidin wurde durch Analyse der Kristallstrukturen des Proteins weitreichend beschrieben [53, 62]. Die starke Wechselwirkung wird hauptsächlich durch drei Bindungsmechanismen ermöglicht [55, 63–65]. Die Bindung wird durch ein ausgedehntes Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Heteroatomen des Biotins und Aminosäureresten des Streptavidins stabilisiert. Ein weiteren Anteil an der Bindung haben hydrophobe *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen (Abb. 2.4 [rechts]) zwischen Biotin und Tryptophanresten des jeweiligen Monomers (Trp79, Trp92, Trp108) bzw. einer benachbarten Untereinheit im Tetramer (Trp120). Die hydrophobe Wechselwirkung mit Trp120 spielt eine wesentliche Rolle für die Stärke der Bindung. Beispielsweise zeigt ein isoliertes Streptavidinmonomer aufgrund der fehlenden Wechselwirkungen zu Trp120 im Vergleich zu einem Tetramer eine deutlich geringere Bindungsaffinität zu Biotin ($K_a \approx 10^8$ L/mol [66]). Im ungebundenen Streptavidin (apo-Streptavidin) liegt eine der Protein-Bindungsschleifen (Aminosäurereste 45-52) zum größten Teil ungeordnet in einer offenen Konformation vor. Nach Bindung des Biotins faltet sich die Peptidkette über die Biotin-Bindungstasche (Abb. 2.4 [links]).



Abb. 2.4: [links] Region der Protein-Bindungsschleife des Streptavidins („binding surface loop“). Die Aminosäurereste 45-52 sind farbig markiert. blau: offene Konformation (ohne Biotin), rot: geschlossene Konformation (Biotin gebunden). [rechts] Hydrophobe Wechselwirkungen des Biotins mit vier Tryptophanresten der eigentlichen (Trp79, Trp92, Trp108) und einer benachbarten Bindungstasche (Trp120). Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software PyMOL 1.1 [54] und dem PDB-Datensatz 1SWD [55, 56] erstellt.

Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass sich durch Biotinbindung die Quartärstruktur des Streptavidintetramers ändert [53, 67]. Im Vergleich zum apo-Streptavidin hat der Biotin-Streptavidin-Komplex eine kompaktere Form. Die Untereinheiten sind abgeflacht und stärker aneinander gebunden [53]. Diese Konformationsänderung und dabei Stabilisierung des Biotin-gebundenen Tetramers erfolgt hierbei sowohl über hydrophobe Wechselwirkungen des Biotins mit Trp120 einer benachbarten Untereinheit als auch über ionische Wechselwirkungen zwischen Glu51 und Arg84 von benachbarten Untereinheiten („Salzbrücke“) [53, 67, 68].

2.3 Fluoreszenzanisotropie

2.3.1 Grundlagen

Für fluoreszierende Stoffe sind die Übergangsdipolmomente der Absorption und Fluoreszenz zueinander orientiert. Werden diese Fluorophore durch linear polarisiertes Licht angeregt, so ist das emittierte Licht je nach räumlicher Ausrichtung der Moleküle ebenfalls polarisiert. Das Ausmaß dieser Emissionspolarisation wird durch die Fluoreszenzanisotropie⁵ r beschrieben. Der Aufbau einer Fluoreszenzanisotropiemessung ist in Abb. 2.5 dargestellt.

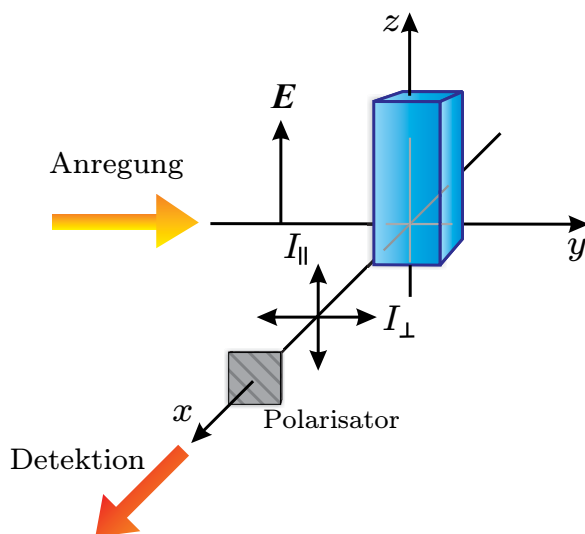


Abb. 2.5: Schematischer Aufbau zur Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie im sog. L-Format. Die Probe wird mit linear polarisiertem Licht angeregt (\mathbf{E} : elektrischer Feldvektor des eingestrahlt Lichtes). Die Emission in horizontaler und vertikaler Richtung wird nacheinander in einem Kanal detektiert.

Die Probe wird mit linear polarisiertem Licht, dessen elektrischer Feldvektor \mathbf{E} in z-Richtung orientiert ist, angeregt. Mit Hilfe eines Polarisators erfolgt die Detektion der Fluoreszenzintensität sowohl in vertikaler (I_{\parallel}) als auch horizontaler Richtung (I_{\perp}) bezüglich der z-Achse. Die Fluoreszenzanisotropie ist definiert als [69]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.2)$$

Der Wert der momentanen Anisotropie r wird durch die Lage der Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmomente \mathbf{M}_A und \mathbf{M}_E des Fluorophors bestimmt. Hierbei spielen sowohl der Winkel β der Übergangsdipolmomente zueinander als auch deren Winkel θ bezüglich der Polarisationsrichtung des eingestrahlt Lichtes (z-Achse) eine Rolle. Aus geometrischen Betrachtungen kann ein Zusammenhang zwischen dem Winkel θ und der Fluoreszenzanisotropie r abgeleitet werden (Abb. 2.6).

⁵Kurz: Anisotropie.

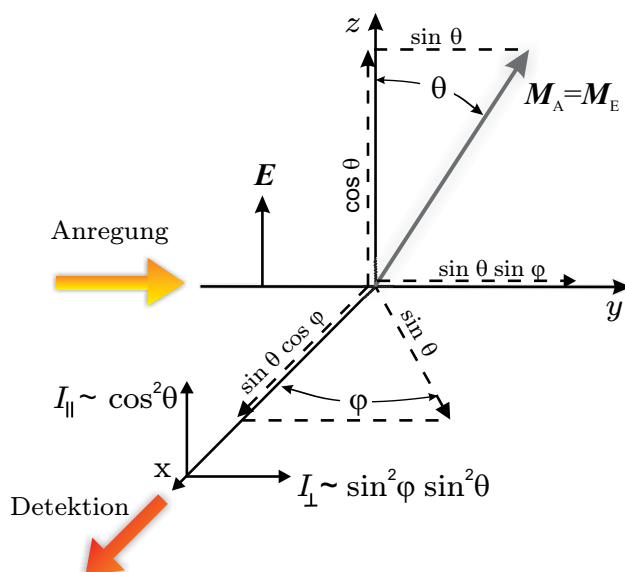


Abb. 2.6: Fluoreszenzintensität in horizontaler und vertikaler Richtung bezüglich des eingestrahlten Lichtes eines Fluorophors in einem Koordinatensystem für den Fall, dass die Übergangsdipolmomente der Absorption M_A und Emission M_E parallel zueinander orientiert sind [5].

Für ein in z-Richtung orientiertes Molekül ($\theta = 0^\circ$) mit parallelen Übergangsdipolmomenten ergibt sich für die Anisotropie⁶ ein theoretischer Wert von $r = 1$ [69, S. 356].

Photoselektion In einer Lösung, in der alle Fluorophore zufällig orientiert sind, ist bei Anregung mit vertikal polarisiertem Licht die Anregungswahrscheinlichkeit nicht für alle Moleküle gleich groß, sondern proportional zu $\cos^2 \theta$. Moleküle, die parallel zur z-Achse ausgerichtet sind ($\theta = 0^\circ$), absorbieren bevorzugt Licht. In einer Lösung von symmetrisch um die z-Achse verteilten Fluorophoren mit parallelen Übergangsdipolmomenten ($\theta_A = \theta_E$) wird durch diese sog. *Photoselektion* lediglich ein Anisotropiewert von $r = 0,4$ erreicht⁷ [5, 69].

Für den Fall, dass die Übergangsdipolmomente nicht parallel zueinander orientiert sind ($\theta_A \neq \theta_E$), ist die Fluoreszenzanisotropie r vom Winkel β abhängig (Abb. 2.7) und es gilt [5]:

$$r = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (2.3)$$

Der Winkel β zwischen den Übergangsdipolmomenten und damit der Wert für die Anisotropie r wird prinzipiell durch zwei Faktoren beeinflusst: (1) spezifische, intrinsische Eigenschaften des Fluorophors (fundamentale Anisotropie) und (2) extrinsische Depolarisationsprozesse.

⁶Dies gilt nur bei Einphotonenabsorption. Bei Zwei- oder Dreiphotonenabsorption können auch größere Werte für die Anisotropie erreicht werden [69].

⁷Durch die statistische Verteilung der Fluorophore in Lösung ergibt sich bei $\theta_A = \theta_E$ für $\cos^2 \theta$ ein durchschnittlicher Wert von $\langle \cos^2 \theta \rangle = 3/5$. $r = 0,5 \times (3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1) = 0,4$ [69, S. 357].

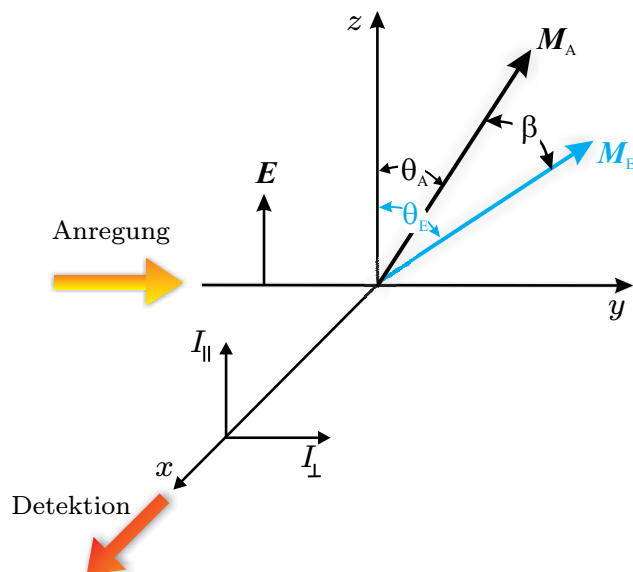


Abb. 2.7: Fluoreszenzintensität in horizontaler und vertikaler Richtung bezüglich des eingestrahlten Lichtes eines Fluorophors in einem Koordinatensystem für den Fall, dass die Übergangsdipolmomente der Absorption M_A und Emission M_E nicht parallel zueinander orientiert sind. β - Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten [5].

Fundamentale Anisotropie Finden zwischen Absorption und Emission keine depolarisierenden Prozesse wie z.B. Rotation oder Energietransfer statt, so wird der Winkel β ausschließlich durch photophysikalische Moleküleigenschaften bestimmt. Der daraus resultierende Wert für die Fluoreszenzanisotropie ist eine spezifische Eigenschaft des Fluorophors und wird als fundamentale Anisotropie r_0 bezeichnet [69].

Fluoreszenzdepolarisation Kommt es innerhalb der Fluoreszenzabklingzeit τ zur diffusionsbedingten Rotation der Fluorophore, so führt dies zu einer Verringerung der Emissionspolarisation. Diese Fluoreszenzdepolarisation ist sowohl von der Größe und Form des Fluorophors als auch von der Viskosität des umgebenden Mediums abhängig. Der Zusammenhang zwischen der stationären Anisotropie r und der Rotationskorrelationszeit ϕ eines sphärischen Moleküls kann durch die *Perrin*-Gleichung beschrieben werden [5, S. 147]:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\phi} \right) \quad (2.4)$$

Gerätekorrektur Zur Messung der Fluoreszenzanisotropie wird häufig das sog. L-Format verwendet (vgl. Abb. 2.5). Hierbei wird die Emission in horizontaler und vertikaler Richtung nacheinander im gleichen Emissionskanal detektiert (Abb. 2.5). Da der Emissionsmonochromator im Allgemeinen für vertikal und horizontal polarisiertes Licht eine unterschiedliche Transmissionseffizienz aufweist, müssen die ermittelten Intensitäten korrigiert werden. Für vertikal polarisierte Anregung (Index v) ist die beobachtete Intensität in vertikaler (I_{vv}) bzw.

horizontaler (I_{vh}) Richtung gegeben durch [69, S. 362]:

$$I_{vv} = kS_v I_{\parallel} \quad (2.5a)$$

$$I_{vh} = kS_h I_{\perp} \quad (2.5b)$$

Dabei sind S_v und S_h jeweils die Detektionsempfindlichkeit für den Emissionskanal in vertikaler und horizontaler Polarisation und k ein Proportionalitätsfaktor. Experimentell wird häufig ein allgemeiner Gerätekorrekturfaktor G verwendet. Diese gerätespezifische Größe wird ermittelt, indem die Probe mit horizontal polarisiertem Licht (Index h) angeregt wird [69]:

$$G = \frac{S_v}{S_h} = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad (2.6)$$

Für die Fluoreszenzanisotropie ergibt sich damit:

$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh}G}{I_{vv} + 2I_{vh}G} \quad (2.7)$$

Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie Die stationäre Fluoreszenzanisotropie r , welche unter kontinuierlicher Bestrahlung der Probe ermittelt wird, stellt nur einen Mittelwert der Anisotropie über die gesamte Fluoreszenzabklingzeit dar. Ohne zusätzliche Informationen über die Zeitabhängigkeit der Anisotropie erweist sich die Interpretation von r im Allgemeinen als schwierig [69]. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ liefert häufig detaillierte Informationen über die Geschwindigkeit und Art der Rotation, insbesondere, wenn die Anisotropie durch die Rotation mehrerer Komponenten definiert wird. Zur Bestimmung von $r(t)$ wird die Probe mit einem vertikal polarisiertem Lichtpuls angeregt. Mit Hilfe der Intensitätsabklingkurven $I_{vv}(t)$ und $I_{vh}(t)$ ergibt sich für $r(t)$:

$$r(t) = \frac{I_{vv}(t) - I_{vh}(t)G}{I_{vv}(t) + 2I_{vh}(t)G} \quad (2.8)$$

2.3.2 Einfache Modelle zur Beschreibung der Anisotropieabklingfunktion

Der zeitliche Verlauf der Anisotropie $r(t)$ wird hauptsächlich durch die Geschwindigkeit der Rotationsdiffusion eines Fluorophors beeinflusst. Hierbei spielen sowohl die Form und Größe der Fluorophore selbst als auch die jeweilige Mikroumgebung, in der sich das Molekül befindet, eine wichtige Rolle.

Rotation kleiner Moleküle Im Allgemeinen klingt in einer homogenen (isotropen) Umgebung die Anisotropie eines starren, nicht-sphärischen Moleküls ausgehend vom Wert der fundamentalen Fluoreszenzanisotropie r_0 (zum Zeitpunkt $t = 0$) multiexponentiell ab [5, 69]:

$$r(t) = \sum_j \beta_j \exp\left(-\frac{t}{\phi_j}\right) \text{ mit } j \leq 5 \quad (2.9)$$

Hierbei sind ϕ_j die individuellen Rotationskorrelationszeiten. Die Vorfaktoren β_j beschreiben den Anteil jeder Rotationskomponente an der Fluoreszenzdepolarisation. Die Summe der β_j -Terme ist der Wert der fundamentalen Anisotropie⁸ r_0 . Für ein sphärisches (symmetrisches) Molekül sind die Rotationsgeschwindigkeiten um alle drei Hauptträgheitsachsen gleich und das Abklingverhalten der Fluoreszenzanisotropie ist monoexponentiell ($j = 1$).

In asymmetrischen Molekülen unterscheiden sich die Rotationsgeschwindigkeiten um die Hauptträgheitsachsen ($j = 3$). Sind für diese Rotationsellipsoide die Übergangsdipolmomente nicht in Richtung der Hauptträgheitsachsen orientiert, ist die Anisotropieabklingkurve $r(t)$ eine Summe aus fünf Exponentialtermen ($j = 5$). Da diese Terme miteinander in Beziehung stehen, lassen sich in der Praxis maximal drei Rotationszeitszeiten unterscheiden [5, 70–72]. Für kleine Moleküle in Lösung ist der Unterschied der Rotationsgeschwindigkeiten im Allgemeinen so gering, dass die Anisotropieabklingkurve durch einen monoexponentiellen Verlauf mit einer mittleren Rotationskorrelationszeit ϕ angepasst werden kann [5].

Rotation von Makromolekülen Makromolekulare Systeme, z.B. Proteine, Mizellen oder Vesikel, rotieren häufig anisotrop mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten um ihre verschiedenen Achsen (z.B. a und b). Je nach Achsenverhältnis a/b kommt es bei gleicher molarer Masse zu einer Abweichung der Rotationskorrelationszeit ϕ_i vom Wert ϕ_{sph} eines sphärischen Moleküls ($a/b = 1$). In Abb. 2.8 ist das Verhältnis der Rotationszeiten ϕ_i/ϕ_{sph} in Abhängigkeit vom Achsenverhältnisses a/b dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten makromolekularen Systeme, das Protein Streptavidin und Tween-20-Mizellen, können als gestreckte Rotationsellipsoide betrachtet werden, wobei sich die Hauptachsen in ihrer Länge nur geringfügig unterscheiden. Streptavidin hat eine Größe von $50 \text{ \AA} \times 45 \text{ \AA} \times 45 \text{ \AA}$ ($a/b = 1,1$ [69, 73]) und für Tween-20 bei einer Temperatur von 298 K wird in der Literatur ein Achsenverhältnis von $a/b = 1,064$ angegeben [30]. Theoretisch ist die Anisotropieabklingkurve $r(t)$ in diesem Fall eine Summe aus drei Exponentialtermen mit den Rotationskorrelationszeiten ϕ_1, ϕ_2 und ϕ_3 [69, S. 423]. Jedoch unterscheiden sich die Rotationskorrelationszeiten ϕ_i vom Wert ϕ_{sph} eines sphärischen Moleküls um maximal 5 % (vgl. Abb. 2.8). Daher wird im weiteren Verlauf

⁸Wenn die Anisotropieabklingfunktion Komponenten enthält, die durch den Geräteaufbau nicht aufgelöst werden können, kann der Anfangswert der Anisotropie zum Zeitpunkt $t = 0$ kleiner als r_0 sein. In der Literatur wird daher auch die Bezeichnung $r(0)$ verwendet, um den Anfangswert der Anisotropieabklingfunktion zu bezeichnen und diesen von der fundamentalen Anisotropie abzugrenzen [69].

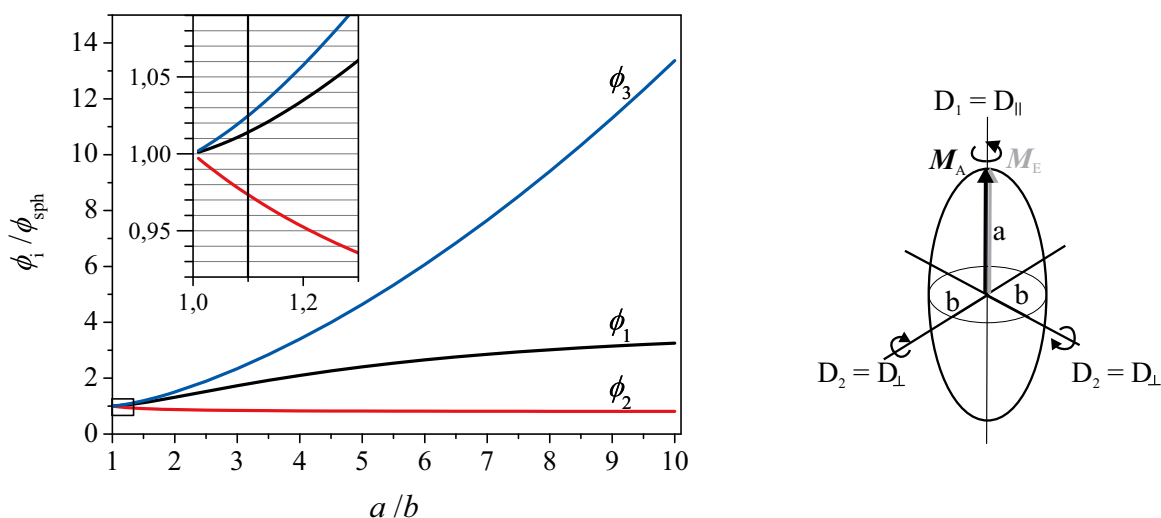


Abb. 2.8: [links] Relative Rotationskorrelationszeit ϕ_i/ϕ_{sph} eines gestreckten Umdrehungsellipsoiden bei verschiedenen Achsenverhältnissen a/b (Berechnung: siehe Abschn. A.1.1). Das Inset zeigt eine vergrößerte Darstellung für einen Bereich von $a/b = 1 \dots 1,3$. Die relativen Rotationskorrelationszeiten für Streptavidin ($a/b = 1,1$) unterscheiden sich um maximal 5%. [rechts] Schematische Darstellung der Rotationsdiffusionskoeffizienten D_{\perp} und D_{\parallel} eines gestreckten Rotationsellipsoiden ($a > b$). $M_{A,E}$ Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment.

für das Protein Streptavidin und für Mizellen des Tensides Tween-20 lediglich eine mittlere Rotationszeit verwendet.

Für sphärische Makromoleküle kann anhand ihrer Rotationskorrelationszeit ϕ bei einer bestimmten der Temperatur T ihr hydrodynamischer Radius R_h ermittelt werden [5, S. 147]:

$$R_h = \sqrt[3]{\frac{3k_B T \phi}{4\pi\eta}} \quad (2.10)$$

Hierbei ist k_B die *Boltzmann-Konstante* und η die Viskosität des Lösungsmittels.

Gehinderte Rotation in anisotropen Umgebungen Im Gegensatz zur Untersuchung des Rotationsverhaltens in isotropen Lösungen soll nun die Rotation von Fluorophoren betrachtet werden, deren räumliche Orientierung eingeschränkt ist. Die Hinderung der Rotation wird dabei durch eine anisotrope Molekülumgebung verursacht, bspw. wenn das Fluorophor in einer Lipiddoppelschicht eingelagert oder an ein Makromolekül gebunden ist [74]. In diesem Fall kommt es nicht zu einer vollständigen Depolarisation und die Fluoreszenzanisotropie geht mit der Zeit nicht auf Null zurück [5, 72]. Der Restwert der Anisotropie zu großen Zeiten wird als Grenzanisotropie r_{∞} bezeichnet.

Eine einfache Methode zur Beschreibung der gehinderten Rotation von Fluorophoren liefert das sog. „wobble-in-a-cone“-Modell [74, 75]. Dabei wird angenommen, dass das Fluorophor nur bis zu einem bestimmten Winkel θ_c innerhalb eines Kegels rotieren kann (Abb. 2.9). Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ kann durch dieses Modell näherungsweise nach Gl. 2.11 beschrieben werden [72]:

$$r(t) = r_0 \left[(1 - A_\infty) \exp\left(-\frac{t}{\phi}\right) + A_\infty \right] \quad \text{mit } A_\infty = \frac{r_\infty}{r_0} \quad (2.11)$$

Der Parameter A_∞ beschreibt das Ausmaß der Rotationshinderung und ist eine Funktion des halben Öffnungswinkels θ_c des Kegels:

$$A_\infty = \left[\frac{1}{2} \cos \theta_c (1 + \cos \theta_c) \right]^2 \quad \text{mit } 0^\circ \leq \theta_c \leq 90^\circ \quad (2.12)$$

Ein hoher Wert für A_∞ entspricht einem kleinen Winkel θ_c und einer stark eingeschränkten Beweglichkeit des Fluorophors. Kann das Molekül hingegen ungehindert rotieren ($\theta_c \rightarrow 90^\circ$), geht A_∞ gegen Null. In diesem Fall hat die zeitaufgelöste Anisotropie $r(t)$ einen monoexponentiellen Verlauf.

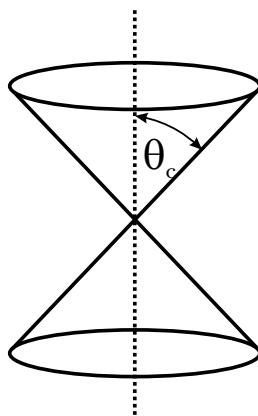


Abb. 2.9: Schematische Darstellung des „wobble-in-a-cone“-Modells zur Beschreibung der Fluoreszenzanisotropie einer gehinderten Rotation. Das Fluorophor kann innerhalb eines Kegels mit dem Winkel $0 \leq \theta \leq \theta_c$ rotieren [5, S. 150].

2.3.3 Komplexe Anisotropiemodelle

In Abschn. 2.3.2 wurden stark vereinfachte Modelle diskutiert. Um die Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ von Farbstoffen in biologischen und makromolekularen Systemen zu erklären, müssen Verallgemeinerungen getroffen werden. Dazu zählt bspw. die Einbeziehung der Gesamtrotation des Makromoleküls. Weiterhin sollen die Fälle berücksichtigt werden, in denen nicht alle Fluorophore an das Makromolekül gebunden sind, sondern ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen Mikroumgebungen vorliegt.

Anisotropie einer segmentweisen Rotation Mit Gl. 2.11 kann der Einfluss der Rotationshinderung eines Fluorophors auf die Anisotropieabklingfunktion $r(t)$ beschrieben werden. Ist das Fluorophor an ein wesentlich größeres Makromolekül gebunden, z.B. an ein Protein oder eine Mizelle, muss die Gesamtrotation des „Farbstoff-Makromolekül-Komplexes“ mit einer Rotationskorrelationszeit ϕ_M miteinbezogen werden. Es wird angenommen, dass die segmentweise Rotation des gebundenen Farbstoffes ϕ_{seg} unabhängig von der Makromolekülrotation ϕ_M erfolgt. In diesem Fall ist die Anisotropie zu jedem Zeitpunkt t ein Produkt der depolarisierenden Prozesse (Rotation des Farbstoffes und des Makromoleküls) [19, 22, 69, 75]:

$$r(t) = r_0 \left[(1 - A_\infty) \exp\left(-\frac{t}{\phi_{\text{seg}}}\right) + A_\infty \right] \exp\left(-\frac{t}{\phi_M}\right) \quad \text{mit } A_\infty = \frac{r_\infty}{r_0} \quad (2.13)$$

Für den Fall, dass die segmentweise Rotation des Farbstoffes vollständig gehindert ist, kann Gl. 2.13 einen monoexponentiellen Verlauf annehmen. Sie beschreibt damit die Rotation des Makromoleküls ($A_\infty = 1$):

$$r(t) = r_0 \exp\left(-\frac{t}{\phi_M}\right) \quad \text{für } A_\infty = 1 \quad (2.14)$$

Verschiedene Mikroumgebungen - assoziatives Anisotropiemodell Zur Beschreibung der Anisotropieabklingfunktion $r(t)$ von Farbstoff-Makromolekül-Komplexen wurde in den bisher diskutierten Modellen davon ausgegangen, dass eine homogene Farbstoffverteilung vorliegt, z.B. wenn alle Farbstoffe an Makromoleküle gebunden sind. Für Farbstoffe, die sich in verschiedenen Mikroumgebungen befinden, kann der zeitliche Verlauf der Anisotropie $r(t)$ häufig nicht durch einen einfachen exponentiellen Ansatz (vgl. Gl. 2.9) beschrieben werden.

Im Folgenden wird das System „Streptavidin/biotinylierter Farbstoff“ betrachtet. In Abwesenheit des Proteins befinden sich ausschließlich „freie“ (ungebundene) Farbstoffmoleküle mit einer Fluoreszenzabklingzeit τ_1 und Rotationskorrelationszeit $\phi_{f,1}$ in der Lösung. In einer Mischung aus freien und an Streptavidin gebundenen Farbstoffmolekülen liegen diese in zwei verschiedenen Mikroumgebungen vor. Die Mikroumgebungen seien im weiteren Verlauf mit den Indizes 1 und 2 gekennzeichnet. Mikroumgebung 1 stellt hierbei die des freien, ungebundenen Farbstoffes und Mikroumgebung 2 des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes dar.

Keine Eigenrotation des Farbstoffes Es soll zunächst angenommen werden, dass durch die Fixierung des biotinylierten Farbstoffes am Streptavidin eine (segmentweise) Eigenrotation des Farbstoffes selbst nicht mehr möglich ist. In diesem Fall trägt ausschließlich das wesentlich voluminösere Streptavidin-Molekül zur Rotation und damit zur Depolarisation bei. Die Rotationszeit des gesamten Farbstoff-Streptavidin-Komplexes sei hierbei durch $\phi_{M,2}$ gegeben. Zusätzlich zum Rotationsverhalten kann durch die Bindung der Farbstoffe an das Protein auch die Fluoreszenzabklingzeit τ beeinflusst werden. Für die Analyse der Anisotropieabklingfunktion $r(t)$ eines solchen Systems aus freiem und gebundenem Farbstoff wird das

assoziative Anisotropiemodell verwendet [76, 77]. Dabei wird angenommen, dass bestimmte Fluoreszenzabklingzeiten mit bestimmten Rotationskorrelationszeiten assoziiert sind.

In der Mikroumgebung 1 seien τ_1 mit $\phi_{f,1}$ und in Umgebung 2 τ_2 mit $\phi_{M,2}$ miteinander verknüpft. Es gibt keine Farbstoffmoleküle, die eine Fluoreszenzabklingzeit des freien Farbstoffes (τ_1) besitzen und gleichzeitig mit einer Korrelationszeit des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes $\phi_{M,2}$ rotieren. Die Anisotropieabklingkurve $r(t)$ hat folgenden Verlauf [69, S. 415][76–78]:

$$r(t) = \frac{\alpha_1\beta_1 \exp\left[-t\left(\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\phi_{f,1}}\right)\right] + \alpha_2\beta_2 \exp\left[-t\left(\frac{1}{\tau_2} + \frac{1}{\phi_{M,2}}\right)\right]}{\alpha_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \alpha_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)} \quad (2.15)$$

Die Anisotropie hat hierbei einen nichtexponentiellen Verlauf. Nur für den Fall, dass sich die Fluoreszenzabklingzeiten in beiden Mikroumgebungen nicht unterscheiden ($\tau_1 = \tau_2$), vereinfacht sich Gl. 2.15 zu einem biexponentiellen Verlauf und $r(t)$ ist unabhängig von τ_i .

Gehinderte segmentweise Rotation des Farbstoffes In Gl. 2.15 wurde angenommen, dass die Rotation des gebundenen Farbstoffes durch die Bewegung des gesamten Farbstoff-Protein-Komplexes beschrieben wird ($\phi_{M,2}$) und sich der Farbstoff selbst nicht bewegen kann. Häufig wird jedoch die Beweglichkeit der an Makromoleküle gebundenen Farbstoffmoleküle nur teilweise eingeschränkt. In diesem Fall muss im assoziativen Anisotropiemodell die gehinderte Rotation des Farbstoffes um seinen Abstandshalter mitberücksichtigt werden. Die gehinderte segmentweise Rotation des gebundenen Farbstoffes wird durch die Korrelationszeit $\phi_{\text{seg},2}$ und den Parameter A_∞ beschrieben. Mit Hilfe von Gl. 2.13 und Gl. 2.15 ergibt sich für die Anisotropieabklingfunktion $r(t)$:

$$r(t) = \frac{\alpha_1\beta_1 \exp\left[-t\left(\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\phi_{f,1}}\right)\right] + \alpha_2\beta_2 \left[r_s(t)\right] \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)}{\alpha_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \alpha_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)} \quad (2.16)$$

Der Anteil der segmentweisen Rotation $r_s(t)$ ergibt sich hierbei aus Gl. 2.13:

$$r_s(t) = \frac{r(t)}{r_0} = \left[(1 - A_\infty) \exp\left(-\frac{t}{\phi_{\text{seg},2}}\right) + A_\infty \right] \exp\left(-\frac{t}{\phi_{M,2}}\right) \quad (2.17)$$

2.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

2.4.1 Prinzip eines FCS-Experimentes

Die Methode der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) beruht auf der Beobachtung von einzelnen oder wenigen fluoreszierenden Molekülen in Lösung bei ihrer Bewegung durch ein kleines Beobachtungsvolumen V_{eff} . Dieses Volumen wird durch einen fokussierten Laserstrahl und einen konfokalen Versuchsaufbau erzeugt (Abschn. 2.4.3).

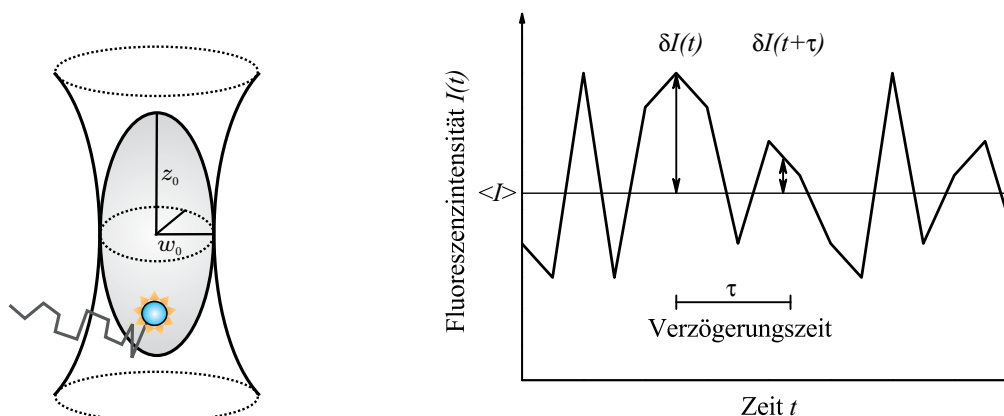


Abb. 2.10: Schematische Darstellung eines FCS-Experimentes. [links] Das Beobachtungsvolumen V_{eff} (grau schattiert) unter fokussierter Anregung (*Gaußprofil*) und konfokaler Detektion ist ein entlang der optischen Achse gestreckter Ellipsoid. w_0 und z_0 sind die effektiven Radien bei $1/e^2$ der maximalen Intensität (w_0 : lateral, z_0 : entlang der optischen Achse). Moleküle (hier dargestellt durch den blauen Kreis) können frei in und aus dem Beobachtungsvolumen diffundieren. [rechts] Fluktuation der Fluoreszenzintensität $\delta I(t)$ um einen Mittelwert $\langle I \rangle$. Die Fluoreszenzintensität $I(t)$ spiegelt die Anzahl der Moleküle in V_{eff} wider [79, S. 26].

Das Prinzip eines FCS-Experimentes ist in Abb. 2.10 dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wird innerhalb von V_{eff} als Funktion der Zeit gemessen ($I(t)$). Aufgrund dynamischer Prozesse wie Translationsdiffusion der Fluorophore in und aus dem Beobachtungsvolumen kommt es zu zeitabhängigen Intensitätsfluktuationen. Die Fluktuation $\delta I(t)$ um einen Mittelwert $\langle I \rangle$ ist definiert als [5, S. 364]:

$$\delta I(t) = I(t) - \langle I \rangle \quad (2.18)$$

Diffundiert ein fluoreszierendes Molekül in den fokussierten Lichtstrahl, kann durch mehrere Anregungs-Emissions-Zyklen desselben Fluorophors ein Fluoreszenzsignal beobachtet werden. Die Dauer dieses sog. „bursts“ ist an die Diffusionszeit des Moleküls τ_D durch das Volumen V_{eff} gekoppelt.

Poisson-Statistik Bei der statistischen Betrachtung einer FCS-Messung wird von einer Poisson-Verteilung der Fluorophore ausgegangen. Die Wahrscheinlichkeit $P(n, N)$, dass sich

im Beobachtungsvolumen n Fluorophore befinden, ist abhängig von der durchschnittlichen Anzahl N der Fluorophore im Volumen und definiert als [69, S. 798]:

$$P(n, N) = \frac{N^n}{n!} e^{-N} \quad (2.19)$$

Wird eine Lösung von Fluorophoren mit einer Konzentration von $c = 1 \text{ nM}$ in einem typischen Beobachtungsvolumen von $V_{\text{eff}} = 1 \text{ fL}$ betrachtet, so befinden sich im Mittel $N = 0,6$ Farbstoffmoleküle in V_{eff} ⁹. Ausgehend von Gl. 2.19 befindet sich im Beobachtungsvolumen mit einer Wahrscheinlichkeit von 55% kein Fluorophor. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Fluorophor liegt bei 33% und für zwei bei 10%.

Beobachtungsvolumen Abb. 2.10 zeigt den geometrischen Aufbau des Beobachtungsvolumens V_{eff} . Das Helligkeitsprofil $p(r)$ kann durch eine dreidimensionale *Gaußverteilung* beschrieben werden [69, S. 801]:

$$p(r) = I_0 \exp \left[-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_0^2} \right] \exp \left[-\frac{2z^2}{z_0^2} \right] \quad (2.20)$$

x , y und z sind die kartesischen Koordinaten. Die effektiven Radien w_0 (lateral in x - und y -Richtung) und z_0 (entlang der optischen Achse z) entsprechen dem Abstand, bei dem $p(r)$ auf $1/e^2$ der maximalen Intensität I_0 abgefallen ist. Die Oberfläche des Volumens ist nicht scharf begrenzt. Daher entspricht das „effektive“ Beobachtungsvolumen nicht exakt dem Volumen eines Ellipsoides, sondern [69, S. 802]:

$$V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} w_0^2 z_0 \quad (2.21)$$

Die Autokorrelationsfunktion Um die Zeitabhängigkeit der Intensitätsfluktuation auszuwerten, kann die Intensität zu einer bestimmten Zeit $I(t)$ mit einem Wert zu einem geringfügig späteren Zeitpunkt $I(t + \tau)$ verglichen werden. Die Beziehung zwischen $I(t)$ und $I(t + \tau)$ über einen weiten Bereich von Verzögerungszeiten τ wird in Form einer (normierten) Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ beschrieben¹⁰ [5, S. 364]:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (2.22)$$

⁹ $N = cV_{\text{eff}}N_A = 10^{-9} \text{ mol/L} \cdot 10^{-15} \text{ L} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \approx 0,6$.

¹⁰ Hierbei ist nur der zeitabhängige Teil der Autokorrelationsfunktion angegeben, wobei für die vollständige Autokorrelationsfunktion gilt:

$$G'(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} + 1$$

In der Literatur werden beide Terme als Autokorrelationsfunktion bezeichnet [5, 69]. Zur Vereinfachung soll im Folgenden nur der zeitabhängige Teil $G(\tau)$ verwendet werden.

2.4.2 Physikalische Modelle zur Interpretation der Autokorrelationsfunktion

Zur Auswertung der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ werden generell zwei Informationen genutzt. Die Ordinatenabschnitt $G(0)$, der Wert der Korrelationsfunktion zum Zeitpunkt $\tau = 0$, beschreibt das Ausmaß der Fluktuation und ist indirekt proportional zur durchschnittlichen Anzahl der Farbstoffmoleküle N im Beobachtungsvolumen. Die Amplitude von $G(\tau)$ nimmt im zeitlichen Verlauf ab und erreicht bei $\tau \rightarrow \infty$ Null. Anhand der Geschwindigkeit und der Form der zeitlichen Abnahme von $G(\tau)$ können Informationen über Transport- und kinetische Prozesse der Moleküle erhalten werden. Während Translationsdiffusion im Allgemeinen die Hauptkomponente der Autokorrelationsfunktion darstellt, können die Intensitätsfluktuationen auch durch Rotationsbewegungen, chemische Reaktionen oder photophysikalische Prozesse (z.B. photoinduzierte cis-trans-Isomerisierung oder Triplett-Übergänge) verursacht werden (vgl. Abb. 2.11).

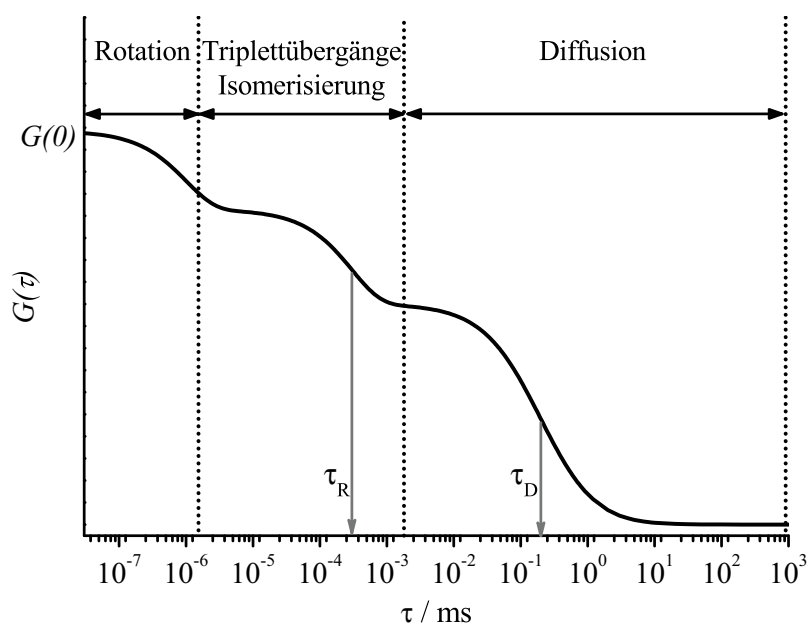


Abb. 2.11: Typischer Verlauf einer Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ einer FCS-Messung. τ_D ist die Diffusionszeit der Moleküle durch das Beobachtungsvolumen (μs bis ms -Zeitbereich). Fluorophore können durch intramolekulare photophysikalische Prozesse in einen nicht-fluoreszierenden („dunklen“) Zustand übergehen. Dabei ist τ_R die mittlere Zeit, die ein Molekül in diesem „dunklen“ Zustand verbringt (μs -Zeitbereich).

Da aufgrund der Zeitaufösung des in dieser Arbeit verwendeten FCS-Aufbaus keine Rotationsbewegungen beobachtet werden konnten, soll im Folgenden lediglich auf den Einfluss von Diffusion und photophysikalischen Prozessen eingegangen werden.

Translationsdiffusion Eine der Hauptanwendungen der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist die Untersuchung von Translationsdiffusion. Für den Fall einer dreidimensionalen Diffusion der Fluorophore ist $G(\tau)$ definiert als [80, 81]:

$$G(\tau) = G_D = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_0^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}\right)^{-1/2} \quad (2.23)$$

G_D beschreibt damit den Diffusionsanteil einer Autokorrelationsfunktion. D ist der Diffusionskoeffizient der Translation. Die Diffusionszeit τ_D ist die mittlere Verweildauer der Fluorophore im Beobachtungsvolumen und definiert als [69, S. 802]:

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4D} \quad (2.24)$$

Mittels der *Stokes-Einstein-Gleichung* kann aus dem Diffusionskoeffizienten D , der dynamischen Viskosität η des Lösungsmittel und der *Boltzmann*-Konstante k_B der hydrodynamische Radius R_h bei einer bestimmten Temperatur T ermittelt werden:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2.25)$$

Photophysikalische Prozesse Neben Diffusionsvorgängen der Fluorophore durch das Beobachtungsvolumen können auch photophysikalische Prozesse Intensitätsfluktuationen verursachen, wenn die Fluorophore in einen nicht-fluoreszierenden „dunklen“ Zustand übergehen (vgl. Abb. 2.12). Insbesondere bei höheren Anregungsintensitäten kommt es durch Spinumkehr (ISC: „intersystem crossing“) zum Übergang vom ersten angeregten Singulett-Zustand (S_1) in einen Triplett-Zustand (T) [79, 82]. Die Moleküle im Triplett-Zustand werden durch Fluoreszenzmessungen nicht detektiert, was zu einem Abfall der beobachteten Anzahl der Moleküle im Volumen V_{eff} führt [82, 83]. Die Autokorrelationsfunktion ist in diesem Fall das Produkt aus dem Diffusionsbeitrag G_D und einem Triplettbeitrag G_T :

$$G(\tau) = G_D \times G_T = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_0^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}\right)^{-1/2} \times \left[1 + \frac{A_T}{1 - A_T} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T}\right)\right] \quad (2.26)$$

Hierbei ist A_T der durchschnittliche Anteil an Molekülen im Beobachtungsvolumen, die sich im Triplett-Zustand befinden und τ_T die charakteristische Korrelationszeit des Triplett-Übergangs. Die Größenordnung von τ_T liegt im μs -Zeitbereich. Bspw. wurden für den Farbstoff Rhodamin 6G Werte von 0,5... 1,2 μs ermittelt [82].

Zusätzlich zur Spinumkehr tritt in vielen Cyaninfarbstoffen eine photoinduzierte cis-trans-Isomerisierung auf [43, S. 157ff.]. Abb. 2.12 zeigt die möglichen Desaktivierungsprozesse für den Farbstoff Cy5 [84]. Im Grundzustand nehmen die meisten Cyaninfarbstoffe eine all-trans-Konformation ein [85]. Nach Anregung der Moleküle in den ersten angeregten Zustand

(S_1^{trans}) findet neben einer Spinumkehr (ISC) in den Triplett-Zustand (T) auch eine Isomerisierung¹¹ in den cis-Grundzustand statt ($S_1^{\text{trans}} \rightarrow S_0^{\text{cis}}$: ISO). Ausgehend von der cis-Form können die Moleküle durch photoinduzierte Rückisomerisierung (BISO) wieder in den trans-Grundzustand übergehen.

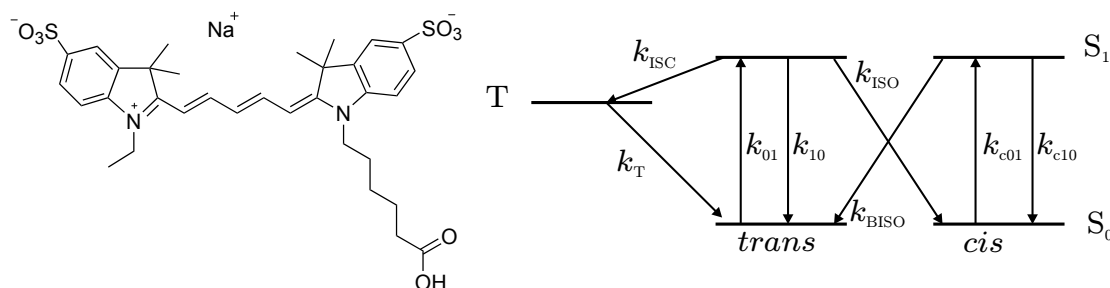


Abb. 2.12: [links] Strukturformel von Cy5 [rechts] Schematische Darstellung der Desaktivierungsprozesse von Cy5 aus dem ersten angeregten Zustand in trans-Konformation S_1^{trans} : Spinumkehr (ISC) und damit verbunden der Übergang in den Triplett-Zustand (T), photoinduzierte Isomerisierung in den Grundzustand in cis-Konformation ($S_1^{\text{trans}} \rightarrow S_0^{\text{cis}}$) und Rückisomerisierung ($S_1^{\text{cis}} \rightarrow S_0^{\text{trans}}$) [84]. Kommt es während der Diffusion der Moleküle durch das Beobachtungsvolumen zu einem Übergang in einen nicht-fluoreszierenden „dunklen“ Zustand (cis-Konformation, Triplett-Zustand), so werden bei der FCS-Messung zusätzliche Intensitätsfluktuationen beobachtet, was sich in einer zusätzlichen Abklingkomponente der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ im μs -Zeitbereich äußert.

Für diesen Fall der Isomerisierung kann der „schnelle“ Reaktionsbeitrag G_R der Autokorrelationsfunktion nicht mehr durch einen monoexponentiellen Verlauf beschrieben werden und ist abhängig von der Anregungsenergie (vgl. [84]):

$$G(\tau) = G_D \times G_R = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_0^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}\right)^{-1/2} \times [{}^1N + A_2 \exp \lambda_2 \tau + A_3 \exp \lambda_3 \tau] \quad (2.27)$$

mit

$$A_2, A_3, \lambda_2, \lambda_3 = f(k_{\text{ISC}}, k_{\text{ISO}}, k_{\text{BISO}}, k_{\text{T}}) \quad (2.28)$$

1N ist der Anteil der Moleküle mit trans-Konformation. Die Ermittlung der verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten erfolgt durch eine globale Anpassung von Autokorrelationsfunktionen bei verschiedenen Anregungsenergien nach [84].

2.4.3 Technische Realisierung eines Einzelmolekülexperimentes

Aufbau der Detektionsoptik Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ ist indirekt proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Teilchen N im Beobachtungsvolumen, d.h.

¹¹Es wird angenommen, dass sich durch Drehung um eine der Doppelbindungen in der Polymethinkette eine mono-cis-Form bildet [84, 85].

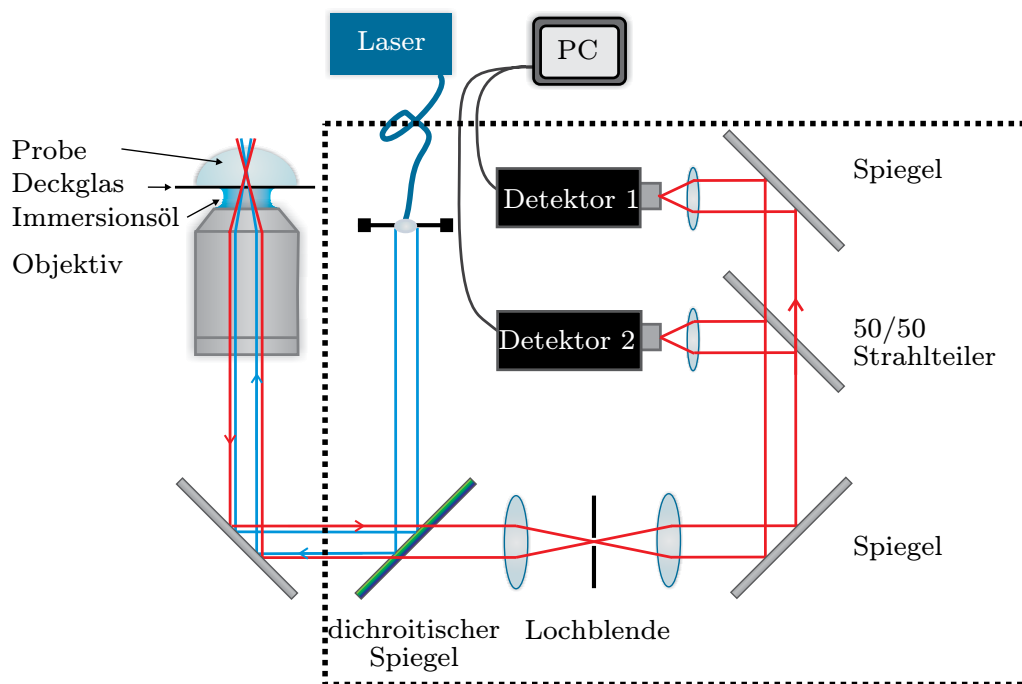


Abb. 2.13: Aufbau eines FCS-Experimentes mit einem konfokalen Epifluoreszenzmikroskop. Blau: Strahl des Anregungslichtes, Rot: Strahlengang des Emissionslichtes.

auftretende Intensitätsfluktuationen sind am größten, wenn N in der Lösung minimal ist. Eine der Anforderungen an ein FCS-Experiment stellt daher die Verkleinerung des Beobachtungsvolumens V_{eff} dar. Dies wird hauptsächlich durch die Fokussierung des Anregungslichtes und durch Verwendung eines konfokalen Aufbaus realisiert. Der grundsätzliche Aufbau eines FCS-Experimentes mit einem Epifluoreszenzmikroskop ist in Abb. 2.13 skizziert.

Die Probe, im Allgemeinen eine wässrige Lösung von frei diffundierenden Fluorophoren, wird auf einem Deckglas platziert. Der Lichtstrahl eines Anregungslasers wird in das Objektiv eines inversen Mikroskops eingekoppelt und auf die Probe fokussiert. Moleküle, die durch den Strahl des Lasers diffundieren, werden angeregt und emittieren Licht. Das Fluoreszenzlicht wird durch das gleiche Objektiv eingesammelt, über einen dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht selektiert und in der Detektionseinheit durch eine Lochblende auf die Detektoren geleitet. Durch den Einsatz der Lochblende wird nur Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene detektiert. Fluoreszenzsignale von ober- und unterhalb der Fokusebene werden damit herausgefiltert (Abb. 2.14 [rechts]). Für FCS-Messungen hat die Lochblende im Allgemeinen einen Durchmesser zwischen $30\ \mu\text{m}$ und $100\ \mu\text{m}$.

Die laterale Auflösung wird vor allem durch die Wahl des Objektivs und der Anregungswellenlänge λ bestimmt, wobei das Auflösungsvermögen proportional zu λ und indirekt pro-

portional zur numerischen Apertur NA ist [86, S. 353]. Um ein möglichst kleinen effektiven Fokusradius w_0 zu erhalten, werden in der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie Objektive mit einer hohen numerischen Apertur NA eingesetzt. Dadurch wird ein hoher Wert für den maximale Öffnungswinkel α_{\max} in der Abbildungsoptik erreicht [86, S. 352] (Abb. 2.14 [links]):

$$NA = n_0 \sin \alpha_{\max} \quad (2.29)$$

Hierbei ist n_0 der Brechungsindex des Mediums, das an die Objektivlinse angrenzt. Wird zwischen Objektiv und Deckglas als Immersionsmedium Luft verwendet, kann aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes von Luft und Glas¹² für die effektive numerische Apertur des Systems maximal ein Wert von $NA \approx 1$ erreicht werden. Um eine Brechung des Anregungslichtes an der Luft/Deckglas-Grenzfläche zu vermeiden (Abb. 2.14 [Mitte]), wird zwischen Objektiv und Deckglas Immersionsöl mit einem Brechungsindex von Glas ($n_0 \approx 1,52$) verwendet.

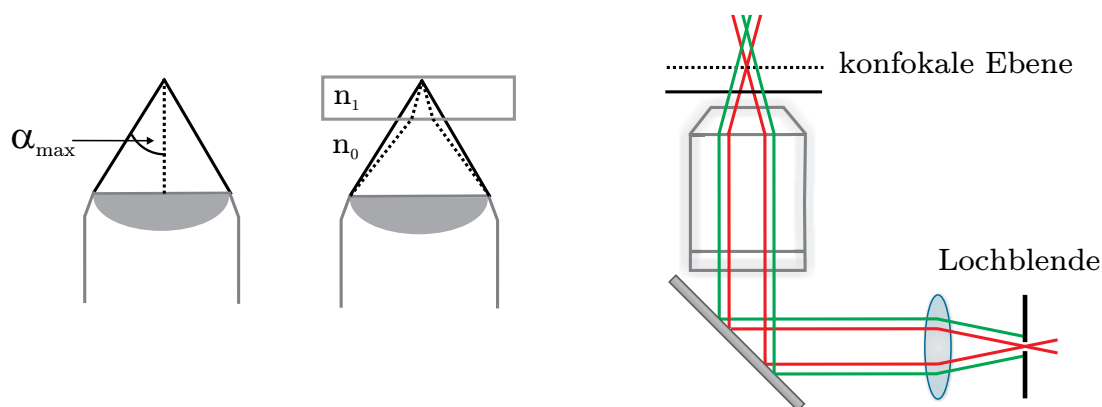


Abb. 2.14: [links] Definition des maximalen halben Öffnungswinkels α_{\max} . [Mitte] Einfluss des Brechungsindex n_0 auf die numerische Apertur NA . [rechts] Durch Verwendung einer Lochblende wird nur Fluoreszenzsignal aus der Fokusebene (rot) zur Detektionseinheit geleitet. Signale von ober- und unterhalb dieser Ebene (grün) werden herausgefiltert.

Kreuzkorrelationsfunktion Eine Schwierigkeit bei der Interpretation eines FCS-Experimentes sind durch die Detektoren hervorgerufene Artefakte. Aufgrund von Detektorrauschen und sog. Nachpuls-Effekten (engl. *after pulsing*) können unerwünschte Nachpulse nach einem „echten“ Signalpuls auftreten [87–89]. Liegt die Zeitspanne zwischen Puls und Nachpuls im μs -Bereich, wird in der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ eine zusätzliche Abklingkomponente beobachtet. Durch Verwendung von zwei Detektoren können Signale durch solche statistisch auftretenden Prozesse eliminiert werden, wenn ausschließlich simultan eintreffende Impulse gewertet werden. Bei dieser Kreuzkorrelation führen damit nur Ereignisse, die in beiden

¹²Bei einer Wellenlänge von 589nm hat Luft einen Brechungsindex von $n = 1,00029$ [86, S.163] und das Borosilikatglas der verwendeten Deckgläser $n = 1,5230$ (Spezifikation des Herstellers: Carl Roth GmbH).

Detektionskanälen auftreten, zu einer Übereinstimmung. Die Kreuzkorrelationsfunktion ist definiert als [90, S. 102]:

$$G_{1,2}(\tau) = \frac{\langle \delta I_1(t) \delta I_2(t + \tau) \rangle}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle} \quad (2.30)$$

Hierbei sind $I_1(t)$ und $I_2(t)$ jeweils die Fluoreszenzintensität von Detektor 1 und 2 zum Zeitpunkt t .

Kreuzkorrelation wird häufig für Zwei-Farben-Experimente verwendet (engl. *dual color FCS*, FCCS¹³). Dabei messen beide Detektoren die Emission bei verschiedenen Wellenlängen und die Fluoreszenzintensität der zwei Spektralbereiche wird kreuzkorreliert [79, 90, 91]. Im Rahmen dieser Arbeit werden nur Signale gleicher Emissionswellenlängen miteinander korreliert. Um eine Verwechslung mit FCCS zu vermeiden, wird im Folgenden weiterhin der Begriff „FCS“ und für die Kreuzkorrelationsfunktion bei gleichen Wellenlängen der Begriff „Korrelationsfunktion“ $G(\tau)$ verwendet.

¹³Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy.

3 Experimentelles

3.1 Verwendete Chemikalien und Probenherstellung

Tab. 3.1: Verwendete Chemikalien

Name	Reinheit	Bezug	Sonstiges
Atto 655	≥ 85 %	Sigma-Aldrich GmbH	
9,10-Bis(phenylethynyl)anthracen	≥ 97 %	Sigma-Aldrich GmbH	CAS: 10075-85-1
Biotin	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich GmbH	CAS: 58-85-5
Cyclohexan	≥ 99,9 %	Carl Roth GmbH	CAS: 110-82-7
DY-635		Dyomics GmbH	CAS: 375396-02-4
DY-635B (biotinyliert)		Dyomics GmbH	
DY-647		Dyomics GmbH	CAS: 709668-85-9
DY-647B (biotinyliert)		Dyomics GmbH	
Glycerin	≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH	CAS: 56-81-5
PBS-Puffertabletten		Sigma-Aldrich GmbH	pH = 7,4
Pyren	≥ 99 %	Sigma-Aldrich GmbH	CAS: 129-00-0
Rhodamin 6G	≥ 99 %	Sigma-Aldrich GmbH	CAS: 989-38-8
Streptavidin		Promega	CAS: 9013-20-1
Tween-20		Sigma-Aldrich GmbH	CAS: 9005-64-5

Als Puffer wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Zur Herstellung wurde jeweils eine PBS-Puffertablette in 200 mL entionisiertem Wasser gelöst (Phosphatpuffer: 10 mmol/L, NaCl: 137 mmol/L, 2,7 mmol/L). Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit diesem Puffer hergestellt.

Einfluss von unmarkiertem Biotin Um den Einfluss von unmarkiertem Biotin auf die Fluoreszenzeigenschaften der Streptavidin-gebundenen Farbstoffe zu untersuchen, wurden die Mischungen an biotinyliertem Farbstoff (DY-635B bzw. DY-647B) in Anwesenheit von Biotin hergestellt (vgl. Tab.3.2). Dazu wurde eine Lösung von Biotin in PBS-Puffer vorgelegt und unter Rühren eine Streptavidin-Stammlösung hinzugegeben und bei 298 K gerührt. Durch Verwendung eines mehr als dreifachen Überschusses an Biotin wird davon ausgegangen, dass an jedem Streptavidintetramer mindestens drei der vier Biotinbindungsstellen blockiert sind. Nach 30 min wurden 20 µL einer Farbstoff-Stammlösung hinzugegeben und die Mischung für weitere 60 s gerührt. Für die FCS-Messungen wurden die Mischungen auf eine Konzentration von 5 nmol/L verdünnt.

Tab. 3.2: Farbstoff-Streptavidin-Mischungen in Ab- und Anwesenheit von unmarkiertem Biotin. Stoffmenge n , Konzentration c und Volumen V der eingesetzten Stammlösungen und PBS-Puffer (pH 7,4).

Mischung	Farbstoff	Streptavidin	Biotin	PBS
Biotin/ Strept. +	c (n)	$(1,8 \times 10^{-5} \text{ mol/L})$ V (n)	$(7,8 \times 10^{-4} \text{ mol/L})$ V (n)	V
DY-635B	$3,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (0,6 nmol)	500 μL (9,0 nmol)	40,0 μL (31 nmol)	1460 μL
DY-647B	$4,3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ (0,9 nmol)	333 μL (5,6 nmol)	25 μL (19 nmol)	1475 μL

Größenausschlusschromatographie In einem Kontrollexperiment wurden Lösungen von Streptavidin-gebundenen Farbstoffen mittels Größenausschlusschromatographie mit PBS-Puffer (pH 7,4) als Elutionsmittel aufgereinigt, um eventuell vorhandene nichtgebundene Farbstoffmoleküle abzutrennen [92, 105] [93, S. 135]. Als Trennphase wurde dabei *Sephadex 25* (GE Healthcare) verwendet (Abtrennung von Molekülen mit einer molaren Masse $M_r < 5000 \text{ g/mol}$).

3.2 Absorptions- und Fluoreszenzmessungen

Die Aufnahme der Absorptionsmessungen erfolgte bei Raumtemperatur in einem Zweistrahlabsorptionsspektrometer gegen eine mit Lösungsmittel gefüllte Küvette im Referenzstrahlengang (Schrittweite: 0,5- 1 nm, Basislinienkorrektur, Nullabgleich, vgl. Tab. 3.3).

Die Fluoreszenzspektren wurden bei 25°C in einer 90° Geometrie aufgenommen und mit der Extinktion bei der Anregungswellenlänge λ_{Ex} und dem Referenzsignal des Anregungsstrahlenganges korrigiert (Schrittweite: 0,5- 1 nm). Für Spektren in wässrigen Lösungen wurden Kunststoffküvetten (PMMA, Carl Roth GmbH) und für alle anderen Lösungsmittel Quarzküvetten (Hellma GmbH) verwendet (Schichtdicke 10 mm \times 10 mm). Um innere Filtereffekte bei der Aufnahme von Fluoreszenzspektren und der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F zu vermeiden, wurden die Konzentrationen der Lösungen so eingestellt, dass die optische Dichte der Farbstofflösung bei der entsprechenden Anregungswellenlänge nicht größer als 0,1 war. Zur Aufnahme polarisierter Fluoreszenzanregungsspektren (Fluoreszenz anisotropie) wurden Wollaston-Polarisatoren verwendet. Die Proben wurden sowohl mit vertikal als auch horizontal polarisiertem Licht angeregt, um den Gerätefaktors G zu bestimmen. (vgl. Abschn. 2.3.1). Die Berechnung der stationären Anisotropie r erfolgte für jede Wellenlänge nach Gl. 2.7. Zur Bestimmung der fundamentalen Fluoreszenzanisotropie r_0 wurden die jeweiligen Farbstoffe in Glycerin gelöst und auf 223 K abgekühlt.

Tab. 3.3: Verwendete Absorptions- und Fluoreszenzspektrometer und Geräteparameter. Absorption: Vorschubgeschwindigkeit v , Fluoreszenz: spektrale Bandbreite $\Delta\lambda$ (Anregungs- / Emissionsstrahlengang), Integrationszeit t

Absorption	Gerät	$v / \text{nm min}^{-1}$	
	Cary 500 (Varian GmbH)	200	
	Lambda 750 (Perkin Elmer Inc.)	187	
Fluoreszenz		$\Delta\lambda / \text{nm}$	t / s
Emissionsspektren	Fluoromax 3	1,5 / 1,5	0,5
Anregungsspektren	(Horiba Jobin Yvon GmbH)	4 / 4	1,0
Anisotropie		4 / 4	1,0
Fluoreszenz-		$\lambda_{\text{Ex}} / \text{nm}$	$c / \text{mol L}^{-1}$
quantenausbeute	C9920-02 (Hamamatsu GmbH)	610	$2 \dots 5 \times 10^{-7}$

3.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen

3.3.1 Experimenteller Aufbau

Zur Messung von Fluoreszenzabklingkurven wurde die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC¹) verwendet [72]. Die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurden am Fluoreszenzlebenszeitspektrometer *FL920* mit der Software *F900* (beides Edinburgh Instruments Ltd.) im TCSPC-Modus durchgeführt. Dabei wurden zur Anregung der Probe verschiedene Anregungslichtquellen eingesetzt (Tab. 3.4). Bei Verwendung des Weißlichtlasers erfolgte die Wellenlängenselektion des Anregungslichtes durch den Anregungsmonochromator des FL920. Das Fluoreszenzlicht wurde in 90°-Geometrie mittels einer Mikrokanalplatte² (ELDY EM1-132/300, Europhoton GmbH) detektiert. Die Aufnahme der Instrument-Antwort-Funktion (IRF³) erfolgte mit einer Streuprobe⁴.

3.3.2 Messung von Fluoreszenzabklingzeiten

Um Polarisierungseffekte während der Aufnahme der Fluoreszenzabklingkurven zu vermeiden, wurden die Proben bei diesen Messungen mit vertikal polarisiertem Licht angeregt und der Emissionspolarisator auf 54,8° eingestellt. Unter diesen sog. „magic angle“-Bedingungen ist das am Detektor ankommende Signal unabhängig von der Anisotropie r [72]. Die erhaltenen Fluoreszenzabklingkurven wurden mit Hilfe der Software *F900* bzw. *FAST* (beides Edinburgh Instruments Ltd.) durch Entfaltung mit der Instrument-Antwort-Funktion ausgewertet. Die Güte der Anpassung wurde jeweils durch die Berechnung des χ^2_{R} -Wertes beurteilt

¹TCSPC: time correlated single photon counting

²MCP: micro channel plate

³IRF: instrument response function

⁴Milchglas bzw. wässrige Tensid-Lösung (nicht fluoreszierend im untersuchten Spektralbereich)

Tab. 3.4: Anregungslichtquellen der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen (Anregungswellenlänge λ_{Ex} , Halbwertsbreite des Laserpulses FWHM^a).

Anregungslichtquelle	Laserdiode LDH-P-635 PicoQuant GmbH	Weißlichtlaser SC400-PP Fianium Ltd.
λ_{Ex}	635 nm	470 - 635 nm
Repetitionsrate	2,5 MHz	20 MHz
FWHM	90 ps	30 ps
Polarisator Anregung	0° (vertikal, fest installiert)	Glenn-Thomson (variabel)
Polarisator Emission	Glenn-Thomson (variabel)	Glenn-Thomson (variabel)

^a full width half maximum.

(Abschn. 3.6.2). Die Fluoreszenzabklingkurven $I(t)$ wurden anhand eines mono- oder biexponentiellen Verlaufes angepasst (Gl. 3.1):

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) + B \text{ mit } i = 1, 2 \quad (3.1)$$

Hierbei ist α_i die Amplitude der Komponente i mit der dazugehörigen Fluoreszenzabklingzeit τ_i und der Parameter B beschreibt das Untergrundsignal. In einem System mit mehreren Komponenten kann der jeweils partielle Anteil A_i an der Fluoreszenzabklingzeit nach Gl. 3.2 berechnet werden:

$$A_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_{j=1}^n \alpha_j \tau_j} \text{ mit } i, j = 1 \dots 2 \quad (3.2)$$

3.3.3 Bestimmung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie

Bestimmung des Gerätekorrekturfaktors Je nach experimentellem Aufbau und der verwendeten Anregungslichtquelle kann der gerätespezifische Korrekturfaktor G durch verschiedene Methoden bestimmt werden [72, S. 263]. Ist die Polarisationsrichtung des Lasers frei drehbar bzw. das Anregungslicht nicht polarisiert, kann der G -Faktor nach Methode 1 (s.u.) ermittelt werden. Bei der Verwendung fest installierter Anregungslichtquellen mit vorgegebener Polarisationsrichtung ist es häufig nicht möglich, deren Polarisationsrichtung zu verändern. Hierbei findet Methode 2 Anwendung.

Methode 1: horizontale Anregung Die Polarisationsrichtung des verwendeten Weißlichtlasers (Fianium Ltd, siehe Tab. 3.4) wurde durch den Polarisator im Anregungsstrahlengang des Fluoreszenzlebenszeitspektrometers FL920 eingestellt. Zur Bestimmung von G wurde die Probe, wie bei der Messung der stationären Fluoreszenzanisotropie, mit horizontal polarisiertem Licht angeregt (Abschn. 2.3.1). Die Fluoreszenzintensität in horizontaler I_{hh} und verti-

kaler I_{hv} Richtung wurden für je 60 s gemessen und G nach Gl. 2.6 berechnet. Bedingt durch Instabilität der Laserintensität bzw. Ausbleichen der Probe kann es während der Messung zu Veränderungen der Gesamtfluoreszenzintensität kommen. Um diese möglichen Schwankungen auszugleichen, wurde die Polarisationsrichtung im Emissionsstrahlengang während einer Messung drei- bis fünfmal gedreht. Die Aufsummierung der einzelnen Messreihen zu einem Gesamtsignal erfolgte durch die Gerätesoftware.

Methode 2: Berechnung der Fluoreszenzabklingfunktion Diese Methode wurde beim Einsatz der Laserdiode LDH-P-635 (PicoQuant GmbH, siehe Tab. 3.4) angewandt. Bei vertikaler Anregung der Probe gilt für die Fluoreszenzabklingfunktion $I(t)$:

$$I(t) = I_{vv}(t) + 2GI_{vh}(t) \quad (3.3)$$

Zur Berechnung des Gerätefaktors G wurde die jeweils ermittelte Fluoreszenzabklingkurve $I(t)$ (Emissionspolarisator bei $54,8^\circ$) mit den gemessenen Fluoreszenzabklingkurven bei vertikaler bzw. horizontaler Ausrichtung des Emissionspolarisators ($I_{vv}(t)$ und $I_{vh}(t)$) nach Gl. 3.3 angepasst.

Datenanalyse bei zeitaufgelösten Anisotropiemessungen

Für die Bestimmung von $r(t)$ wurden nach vertikal polarisierter Anregung der Probe die Fluoreszenzabklingkurven bei vertikaler bzw. horizontaler Ausrichtung des Emissionspolarisators ($I_{vv}(t)$ und $I_{vh}(t)$) aufgenommen. Anhand dieser Fluoreszenzabklingkurven wurde die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ nach Gl. 2.8 berechnet. Die zur Anpassung der experimentell ermittelten Daten benötigte Wichtungsfunktion w_i ist definiert als [72, S. 271]:

$$w_i = \frac{3[I_{vv}(t_i) + 2I_{vh}(t_i)]}{2 + r(t_i) + 5[r(t_i)]^2 - 2[r(t_i)]^3} \quad (3.4)$$

Globale Analyse Bei Anwendung des *assoziativen Anisotropiemodells* (vgl. Abschn. 2.3.3) wurden die Fluoreszenz- und Anisotropieabklingkurven $I(t)$ und $r(t)$ in einer globalen Analyse angepasst. Dabei werden die Fluoreszenzabklingzeiten τ_i , die Rotationszeiten ϕ_j und der Parameter β_i für alle untersuchten Datensätze global festgelegt und nur α_i für jeden Datensatz individuell angepasst.

3.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

3.4.1 Experimenteller Aufbau

Die FCS-Messungen wurden an einem Einzelmolekülspektrometer (MicroTime 200, PicoQuant GmbH) durchgeführt. Der Anregungslaserstrahl wurde durch einen dichroitischen

Tab. 3.5: Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS): Experimenteller Aufbau und verwendete Komponenten für verschiedene Methoden.

Experiment-Name	Methode 1	Methode 2	Methode 3
Lichtquelle	He-Ne-Laser (8mW)	Weißlichtlaser SC400-2 (Fianium Ltd.)	
λ_{Ex}	633 nm	470 nm	630 nm
Leistung P	30...400 μW	5...30 μW	5...80 μW
PC-Modul ^a	HydraHarp 400	TimeHarp 200	TimeHarp 200
Objektiv	Öl-Immersion	Wasser-Immersion	Öl-Immersion
Typ	Zeiss	Zeiss	Zeiss
Name	PlanApo	W Plan-Apochromat	PlanApo
Vergrößerung	100x, NA 1,4	63x, NA 1,0	100x, NA 1,4
Deckglas	(0,145 \pm 0,015) mm ^b	ohne Deckglas	(0,145 \pm 0,015) mm ^b
Temperatur	(20,0 \pm 0,5) °C	(21,0 \pm 0,5) °C	(21,0 \pm 0,5) °C
Dichroit	z467/638rpc ^b	z467/638rpc ^c	z467/638rpc ^c
Filter - Anregung	-	HC470-22 ^c	
Filter - Detektion	RG655 ^d	LP500 ^b	RG655 ^d
Lochblende	50 μm	30 μm	30 μm
Referenzfarbstoff	Atto 655	Rh6G	Atto 655
Diff.-koeffizient (21,0 \pm 0,5°C)	3,84 \times 10 ⁻¹⁰ m ² /s [94]	3,95 \times 10 ⁻¹⁰ m ² /s [95]	3,84 \times 10 ⁻¹⁰ m ² /s [94]

^a PicoQuant GmbH, Berlin.^b Carl Roth GmbH, Karlsruhe.^c AHF Analysentechnik GmbH, Tübingen.^d CVI Melles Griot, Bensheim.

Spiegel in ein Mikroskop (IX-71, Olympus GmbH) eingekoppelt und durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert (vgl. Abb. 2.13). Zur Detektion wurde das Fluoreszenzlicht durch das gleiche Objektiv gesammelt und durch den dichroitischen Spiegel und einen Langpassfilter auf zwei Einzelphoton-Avalanche-Photodioden (SPCM-AQR-13 und SPCM-CD-2801, Perkin Elmer) geleitet. Mit Hilfe der Gerätesoftware SymPhoTime (Version 5.13, PicoQuant GmbH) wurde die Korrelationsfunktion $G(\tau)$ jeweils durch Kreuzkorrelation der Signale aus beiden Detektoren ermittelt (vgl. Gl. 2.30, Abschn. 2.4.3). Zur Anregung wurden verschiedene Laserquellen verwendet. Die verwendeten Einstellungen und optischen Komponenten sind für jede Anregungslichtquelle in Tab. 3.5 zusammengefasst.

Die Leistung des Anregungslichtes wird anhand der Software in willkürlichen Einheiten (a.u.) angegeben [96]. Zur Ermittlung der Leistung (in μW) wurde bei jeder verwendeten Anregungswellenlänge eine Kalibrierfunktion aufgenommen (vgl. Abb. A.1, A.2).

3.4.2 Gerätecharakterisierung

Kalibrierung und Bestimmung des Beobachtungsvolumens Die Größe des Beobachtungsvolumens V_{eff} (w_0, z_0) wurde durch Verwendung von Referenzfarbstoffen mit bekannten Dif-

fusionskoeffizienten D ermittelt. Je nach Spektralbereich wurden die Farbstoffe Rhodamin 6G (kurz Rh6G) bzw. Atto 655 in Wasser ($c = 10^{-9}$ mol/L) verwendet (Tab. 3.5). Diese Kalibrierung erfolgte jeweils zu Beginn und am Ende einer Messreihe.

Abschätzung von Messungenauigkeiten Um den Fehler bei einer FCS-Messung abzuschätzen, wurden für die Referenzlösung Rhodamin 6G in Wasser 12 Wiederholungsmessungen mit jeweils neuem Deckglas und Immersionsöl durchgeführt. Die ermittelten Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ wurden nach Gl. 2.23 angepasst, wobei der Diffusionskoeffizient D von Rh6G verwendet wurde. Die daraus ermittelten lateralen Radien w_0 des Beobachtungsvolumen sind in Abb. A.3 dargestellt. Für alle Messungen ergab sich ein mittlerer Wert von $\bar{w}_0 = 0,293 \mu\text{m}$ mit einem Größtfehler von $|\Delta w_0| = 0,027 \mu\text{m}$. Diese Abweichung von 9,2 % wurde für alle weiteren FCS-Experimente als Fehler für den lateralen Radius des Beobachtungsvolumens w_0 verwendet. Einer der Hauptursachen für die Messungenauigkeit liegen in den Abweichungen der Deckglasstärke von $\pm 15 \mu\text{m}$ [97].

Fehlerquellen und Artefakte Bei einer FCS-Messung können Fehler durch experimentelle Artefakte auftreten [97, 98]. Zu den häufigsten Fehlerquellen zählen insbesondere der Einfluss von Laserstrahlastigmatismus, der Justage der Lochblende und des Brechungsindex des Lösungsmittels.

Astigmatismus ist ein Abbildungsfehler, bei dem ein Strahlenkegel nicht symmetrisch auf eine sphärische Linse trifft [86, S. 426]. Nach der Brechung wird der Querschnitt des Strahlenbündels mit zunehmender Entfernung von der Linse elliptisch. Das Profil des Laserstrahls ist in diesem Fall nicht mehr radialsymmetrisch, sondern erscheint verzerrt. Bei der Messung der Autokorrelationsfunktion führt dies zu einer scheinbaren Abnahme des Diffusionskoeffizienten D bei Zunahme der Teilchenzahl N [97]. Um im FCS-Experiment Abbildungsfehler durch Astigmatismus zu vermeiden, wurde bei dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau das Anregungslicht über eine polarisationserhaltende „Singlemode“-Faser eingekoppelt und durch eine Kollimatorlinse geleitet [96]. Der Laserstrahl trifft am Mikroskop astigmatismusfrei mit einem radialsymmetrischen Profil auf (vgl. Abb. A.5).

Eine weitere Fehlerquelle stellt insbesondere bei Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur die Position der Lochblende entlang der optischen Achse dar [98]. Die Justage der Lochblende erfolgte für jedes Objektiv über die z -Position der Tubuslinse vor der Lochblende im Detektionskanal [96]. Da bei dem in dieser Arbeit verwendeten FCS-Aufbau sowohl für die FCS-Messung der Referenzsubstanz als auch der Probe die gleiche Position der Lochblende verwendet wurde, spielte dieser Fehler nur eine untergeordnete Rolle [98].

Der Brechungsindex n des verwendeten Lösungsmittels beeinflusst die Größe des Beobachtungsvolumens. Dadurch kann das Zentrum des Fokus entlang der optischen Achse verschoben sein [98]. Jedoch konnte in der Literatur gezeigt werden, dass Abweichungen mi-

nimiert werden können, wenn das Beobachtungsvolumen nahe der Oberfläche positioniert wird [97]. Bei einer Differenz der Brechungsindizes⁵ von $\Delta n = 0,05$ fanden die Autoren einen Unterschied im Diffusionskoeffizienten von 1% [98]. In dieser Arbeit wurden entionisiertes Wasser als Lösungsmittel der Referenzfarbstoffe und eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4) für die zu untersuchenden Farbstoffe verwendet. Die Brechungsindizes dieser Lösungsmittel unterscheiden sich je nach verwendeter Anregungswellenlänge um $\Delta n = 0,003 \dots 0,005$ ⁶. Der durch diese Abweichungen im Brechungsindex eingebrachte Fehler für w_0 liegt im Rahmen der Messgenauigkeit des FCS-Experimentes. Für den Referenzfarbstoff Rhodamin 6G wurde das Beobachtungsvolumen in Wasser und PBS-Puffer bestimmt ($\lambda_{\text{Ex}} = 470 \text{ nm}$). Dabei wurde für die ermittelten Werte des lateralen Radius w_0 ein Unterschied von $\leq 6\%$ bestimmt ($w_0(\text{Wasser}) = 0,290 \mu\text{m}$, $w_0(\text{PBS}) = 0,274 \mu\text{m}$).

Um einen möglichen Einfluss der Laserintensität auf die Größe des Beobachtungsvolumens auszuschließen, wurden die Kalibrierung und die eigentliche Messung jeweils bei gleicher Leistung P des Anregungslasers durchgeführt. Die Abweichung für den ermittelten lateralen Radius w_0 des Beobachtungsvolumens lagen für unterschiedliche Werte der Leistung im Rahmen der Messgenauigkeit (Abb. A.4)

3.4.3 Anpassung der Autokorrelationsfunktion

Die experimentell ermittelten Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ wurden je nach Farbstoff mit unterschiedlichen Modellen angepasst. Die Wichtungsfunktion w_i zur Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Abschn. 3.6.2) wurde durch die verwendete Geräte-Software (SymPhoTime 5.13, PicoQuant GmbH) berechnet und ergibt sich aus dem Kehrwert der Standardabweichung der Korrelationsfunktion $G(\tau)$ [99].

Für die Untersuchung der Cyaninfarbstoffe wurde aufgrund des komplexen Zeitverhaltens der Autokorrelationsfunktion und der gleichen Größenordnung der Geschwindigkeitskonstanten (μs^{-1}) im Rahmen dieser Arbeit lediglich eine „mittlere“ Korrelationszeit der photophysikalischen Prozesse (τ_R) ermittelt⁷ [100]:

$$G(\tau) = G_D \times G_R = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-1/2} \times \left[1 + \frac{A}{1-A} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_R}\right) \right] \quad (3.5)$$

Die Amplitude A entspricht dem Anteil der Farbstoffmoleküle in einem nicht-fluoreszierenden „dunklen“ Zustand und τ_R die durchschnittliche Zeit, die sich ein Molekül in diesem Zustand aufhält.

⁵z.B. Wasser: 1,33; biologische Zellen: 1,38 [98].

⁶470 nm: $n_{\text{Wasser}} = 1,334$, $n_{\text{PBS}} = 1,339$; 633 nm: $n_{\text{Wasser}} = 1,330$, $n_{\text{PBS}} = 1,333$ (vgl. Abb. A.6).

⁷Die Zeitaufösung für die Verzögerungszeit des in dieser Arbeit verwendeten FCS-Aufbaus ist zu gering ($\tau_{\text{min}} = 0,05 \mu\text{s}$), um die Geschwindigkeitskonstanten eindeutig auflösen zu können ($[k_i] = 0,1 \dots 100 \mu\text{s}$ [84]).

3.5 Charakterisierung von Tween-20-Mizellen

3.5.1 Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration

Zur Bestimmung der *c.m.c.* von Tween-20 in PBS-Puffer (pH 7,4) wurde in dieser Arbeit die Polaritätssonde Pyren verwendet. Die Konzentration an Pyren lag mit 10^{-6} mol/L deutlich unter der zu erwartenden Mizellbildungskonzentration ($\approx 10^{-5}$ mol/L). Dadurch wurde ein Einfluss der Polaritätssonde auf die *c.m.c.* vermieden und die Wahrscheinlichkeit verringert, dass sich mehr als ein Farbstoffmolekül pro Mizelle aufhält. Es wurden die Fluoreszenzspektren von Pyren in PBS-Puffer bei verschiedenen Tensidkonzentrationen (10^{-7} ... 10^{-2} mol/L) gemessen ($\lambda_{\text{Ex}} = 353$ nm) und das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzbanden bei 373 nm (I_1) und 384 nm (I_3) gegen die Tensidkonzentration aufgetragen.

3.5.2 Bestimmung der Mizellgröße

Zur Bestimmung der Mizellgröße wurde der Farbstoff 9,10-Bis(phenylethynyl)anthracen als Fluoreszenzsonde verwendet (BPEA). Um den Farbstoff in den Mizellen zu lösen, wurde eine BPEA-Stammlösung in Cyclohexan mit einer Konzentration von $0,3 \mu\text{mol/L}$ verwendet. Es wurden $10 \mu\text{L}$ der Stammlösung vorgelegt und das Lösungsmittel abgedampft. Nach der Zugabe von jeweils 2 mL einer Tween-20-Lösung ($0,1 \dots 10$ mmol/L in PBS-Puffer) wurden die Lösungen jeweils für 3 Tage gerührt. Aufgrund der sehr geringen Farbstoffkonzentration von $1,5 \times 10^{-9}$ mol/L lagen deutlich mehr Tensidmoleküle als Farbstoffmoleküle in Lösung vor; das Tensid/Farbstoff-Verhältnis war größer als 10^4 . Damit wird die Wahrscheinlichkeit, dass sich in einer Mizelle mehr als ein Farbstoffmolekül befindet, stark reduziert und mögliche Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen verhindert.

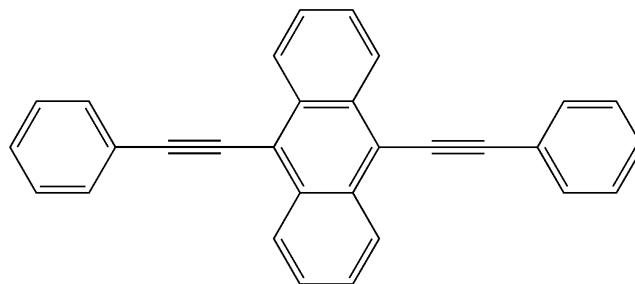


Abb. 3.1: Struktur der Fluoreszenzsonde 9,10-Bis(phenylethynyl)anthracen (BPEA).

Die FCS-Messungen wurden nach Methode 2 bei einer Temperatur von $22,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durchgeführt. Zur Bestimmung des Beobachtungsvolumens wurde der Referenzfarbstoff Rhodamin 6G eingesetzt. Die Anpassung der Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ erfolgte anhand des Standardmodells für eine dreidimensionale Diffusion nach Gl. 2.23. Da sich die Viskosität der verdünnten Tween-20-Lösung nur geringfügig von der Viskosität von Wasser unterscheidet, wurden bei der Berechnung von R_h der Wert von Wasser verwendet (vgl. Gl. 2.25).

Referenzmethode: Lichtstreuung Die Mizellgröße wurde zusätzlich mittels Lichtstreuung an einem Zetasizer Nano bei einer Wellenlänge von 633 nm bestimmt (ZEN 3600, Malvern Instruments). Vor der Herstellung der mizellaren Lösung wurden sowohl PBS-Puffer als auch reines Tween-20 durch einen Membranfilter (Porendurchmesser $< 0,2 \mu\text{m}$) gefiltert. Um Mehrfachstreueffekte zu minimieren, erfolgte die Detektion unter einem Winkel von 173° . Aufgrund der niedrigen Streuintensität bei kleinen Tensid-Konzentrationen konnte die Größenbestimmung durch Lichtstreuung nur für Konzentrationen oberhalb von $1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ durchgeführt werden.

3.5.3 Berechnung der Aggregationszahl

Bei einer Temperatur von 298 K hat das axiale Verhältnis von Tween20-Mizellen (a/b) einen Wert von 1.064 [30]. Daher wird bei allen weiteren Betrachtungen von kugelförmigen Mizellen ausgegangen. Die Aggregationszahl N_{agg} lässt mit Hilfe der Hydratation δ ($m(\text{Wasser})/m(\text{Tensid})$) und des hydrodynamischen Radius R_{h} berechnen. Die Hydratation ist definiert als [34, 101]:

$$\delta = \left[\left(\frac{R_{\text{h}}}{R_0} \right)^3 - 1 \right] v \rho_0 \quad (3.6)$$

Anhand des partiellen spezifischen Volumens des Tensids v , der Dichte des Lösungsmittels ρ_0 und der Hydratation ($v = 0,8851 \text{ mL/g}$, $\rho_0 = 0,997047 \text{ g/mL}$, $\delta = 0,37$ [34]) kann der Radius R_0 und das Volumen V_0 von nichthydratisierten Mizellen berechnet werden. Für die Aggregationszahl gilt dann:

$$N_{\text{agg}} = \frac{V_0 N_{\text{A}}}{v M_{\text{r}}} = \frac{4\pi R_0^3 N_{\text{A}}}{3v M_{\text{r}}} \quad (3.7)$$

Dabei ist M_{r} das Molekulargewicht von Tween-20 ($M_{\text{r}} = 1227,72 \text{ g/mol}$) und N_{A} die Avogadro-Konstante.

3.6 Sonstiges

3.6.1 Temperatur

Zur Temperierung der Proben während der stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurde ein Thermostat (Lauda Ecoline RE 104, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG) sowie ein temperierbarer Probenhalter verwendet. Die Messungen der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tieftemperaturmessungen Zur Bestimmung der stationären Fluoreszenzanisotropie bei 223 K wurde die Probe mit einem stickstoffgekühlten Kryostaten (Optistat DN1704) mit externer Temperatursteuerung (ITC4, beides Oxford Instruments) temperiert.

3.6.2 Datenverarbeitung und Anpassung von Funktionen

Zur Anpassung einer Reihe von n Messwerten $y(x_i)$ anhand von m physikalischen Parametern wurde die Methode der kleinsten Fehlerquadrate durch Minimierung der Funktion χ_R^2 verwendet. χ_R^2 ist definiert als Summe der gewichteten quadratischen Abweichung der Messwerte von den Werten einer berechneten Anpassungsfunktion $Y(x_i)$ [72, S. 171]:

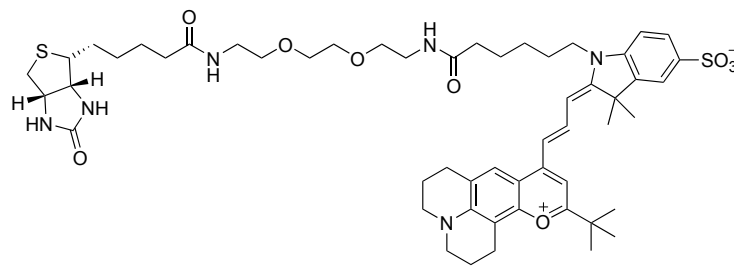
$$\chi_R^2 = \frac{1}{\nu} \sum_{i=1}^n w_i [y(x_i) - Y(x_i)]^2 \quad (3.8)$$

Hierbei ist w_i der Wichtungsfaktor für jeden i ten Datenpunkt, n die Gesamtzahl dieser Datenpunkte und ν die Anzahl der Freiheitsgrade ($\nu = n - m$). Die Anpassung erfolgte mit den Programmen Excel (Funktion "Solver", Microsoft) bzw. Origin (Funktion "Nichtlinearer Fit", OriginLabCorporation).

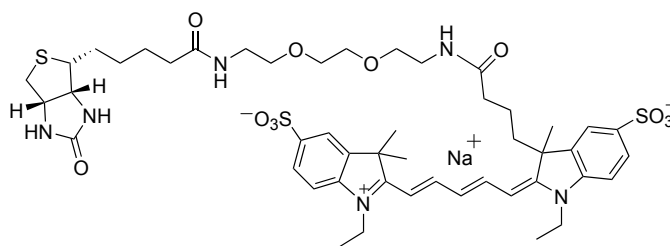
4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Aggregationsverhalten in wässriger Lösung

Zur Untersuchung der Aggregatbildung in PBS-Puffer wurden die Absorptionsspektren der Farbstoffe und ihrer biotinylierten Form bei verschiedenen Konzentrationen aufgenommen und überprüft, inwiefern eine Abweichung vom *Lambert-Beerschen-Gesetz* auftritt. Zusätzlich zu den Farbstoffen als Carbonsäure wurden ihre Biotin-Derivate eingesetzt. Über einen Abstandhalter aus Ethylenglykol-Gruppen sind die Farbstoffe kovalent an Biotin gebunden (Abb. 4.1).



(a) DY-635B



(b) DY-647B

Abb. 4.1: Strukturformeln der biotinylierten Farbstoffe DY-635B und DY-647B.

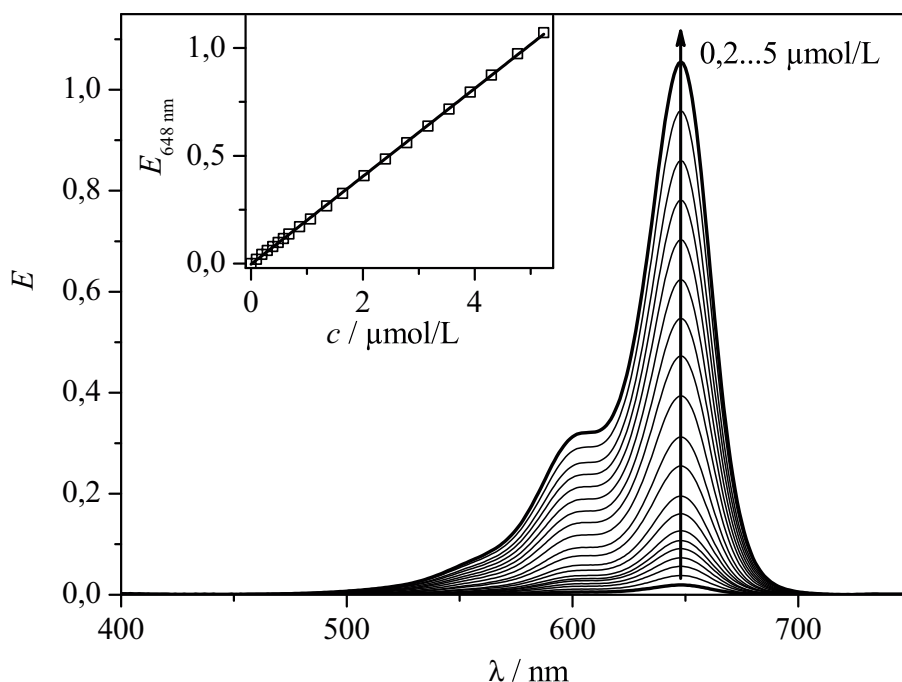


Abb. 4.2: Absorptionsspektren von DY-647 in PBS-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen. Inset: Abhängigkeit der Extinktion $E_{648 \text{ nm}}$ von DY-647 bei 648 nm von der Farbstoffkonzentration c und die dazugehörige lineare Anpassung.

DY-647 und DY-647B Abb. 4.2 zeigt die Absorptionsspektren von DY-647 bei zunehmender Farbstoffkonzentration. Für den Farbstoff DY-647 und seine biotinylierte Form hängt die gemessene Extinktion E im untersuchten Konzentrationsbereich ($c = 0,2 \dots 5 \mu\text{mol/L}$) linear von der Konzentration ab (DY-647B: vgl. Abb. A.7) und es tritt keine Verschiebung der Hauptabsorptionsbande auf. Es kann daher angenommen werden, dass es zu keiner Aggregatbildung kommt. Der Farbstoff DY-647 besitzt zwei Sulfonsäuregruppen in je einer der beiden heterocyclischen Endgruppen (Abb. 1.1). Hierdurch wird nicht nur die Wasserlöslichkeit, sondern auch die elektrostatische Abstoßung zwischen zwei Farbstoffmolekülen erhöht. Infolgedessen ist die Tendenz zur Bildung von Dimeren herabgesetzt [69, S. 74].

Monomer- und Dimerspektrum der Farbstoffe DY-635 und DY-635B Im Gegensatz zu DY-647 kommt es beim Farbstoff DY-635 und seiner biotinylierten Form zu einer deutlichen Veränderung des Absorptionsspektrums bei Erhöhung der Farbstoffkonzentration. Abb. 4.3 zeigt für DY-635B die Abhängigkeit der Extinktion $E_{640 \text{ nm}}$ von der Farbstoffkonzentration c_0 . Oberhalb einer Konzentration von $0,5 \mu\text{mol/L}$ ($E_{640 \text{ nm}} \approx 0,07$) tritt eine systematische Abweichung vom linearen Verhalten auf (Anpassung nach Gl. 2.1). Abb. 4.4 zeigt die durch die Farbstoffkonzentration c_0 dividierten Extinktionsspektren für DY-635B in PBS-Puffer bei verschiedenen Konzentrationen (DY-635: vgl. Abb. A.8). Mit steigender Farbstoffkonzentration

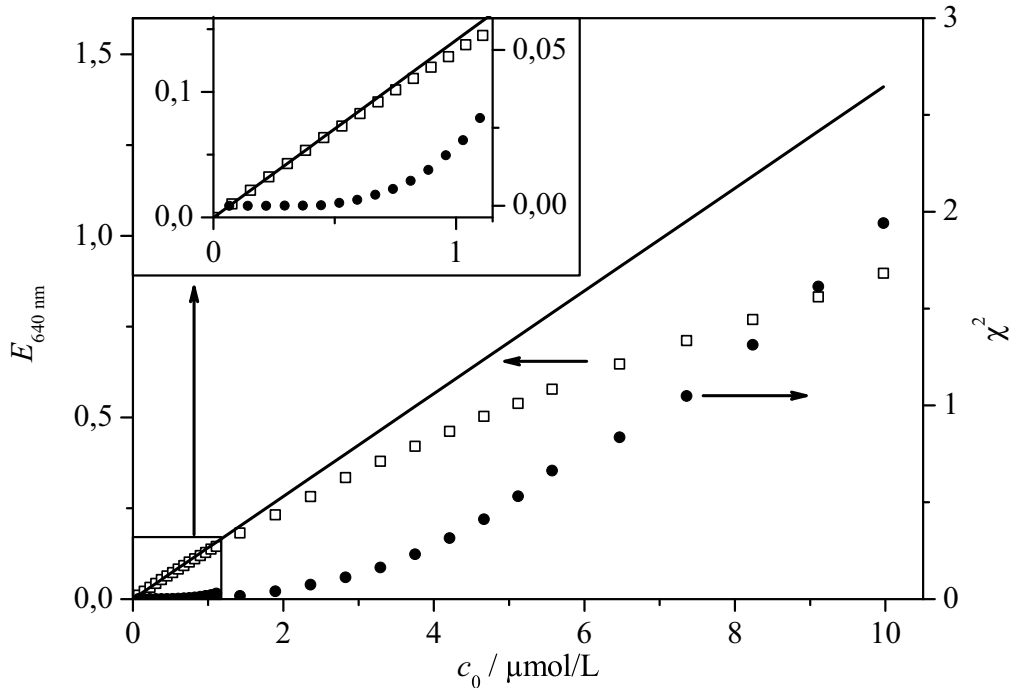


Abb. 4.3: Abhängigkeit der Extinktion $E_{640 \text{ nm}}$ von DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) bei 640 nm von der Farbstoffkonzentration c_0 und die dazugehörige lineare Anpassung nach Gl. 2.1 (linke Achse). χ^2 für die lineare Anpassung (rechte Achse).

on nimmt die Intensität der Hauptabsorptionsbande bei 640 nm ab. Gleichzeitig kommt es zur Herausbildung eines neuen Extinktionsmaximums bei kürzeren Wellenlängen (ca. 600 nm). Die Extinktion E steigt in diesem Fall für verschiedene Wellenlängen λ nicht linear mit der Gesamtkonzentration c_0 an. Dieses Verhalten ist auf die Bildung von H-Dimeren zurückzuführen, in denen die Farbstoffmoleküle parallel zueinander orientiert sind (Abb. 2.2, [links]), und wurde in der Literatur bereits für andere Cyaninfarbstoffe beschrieben [15, 16, 50, 102]. Im gesamten Konzentrationsbereich treten in den Absorptionsspektren von DY-635B zwei isosbestische Punkte auf: bei 614 nm und bei 678 nm. Jedoch zeigen sich bei Wellenlängen oberhalb der Hauptabsorptionsbande nur geringe Veränderungen im Spektrum mit einem schwach ausgebildeten isosbestischen Punkt bei 678 nm. Es soll daher im folgenden davon ausgegangen werden, dass es sich in dem untersuchten Konzentrationsbereich um ein Gleichgewicht von zwei verschiedenen Spezies handelt (Monomere und Dimere) [15, 50].

Um die Konzentration an Monomer und Dimer bei einer bestimmten Farbstoffkonzentration zu ermitteln, ist die Kenntnis der Spektren der einzelnen Spezies notwendig. Im Folgenden soll das Gleichgewicht zwischen Farbstoffmonomeren (M) und -dimeren (D) betrachtet werden:



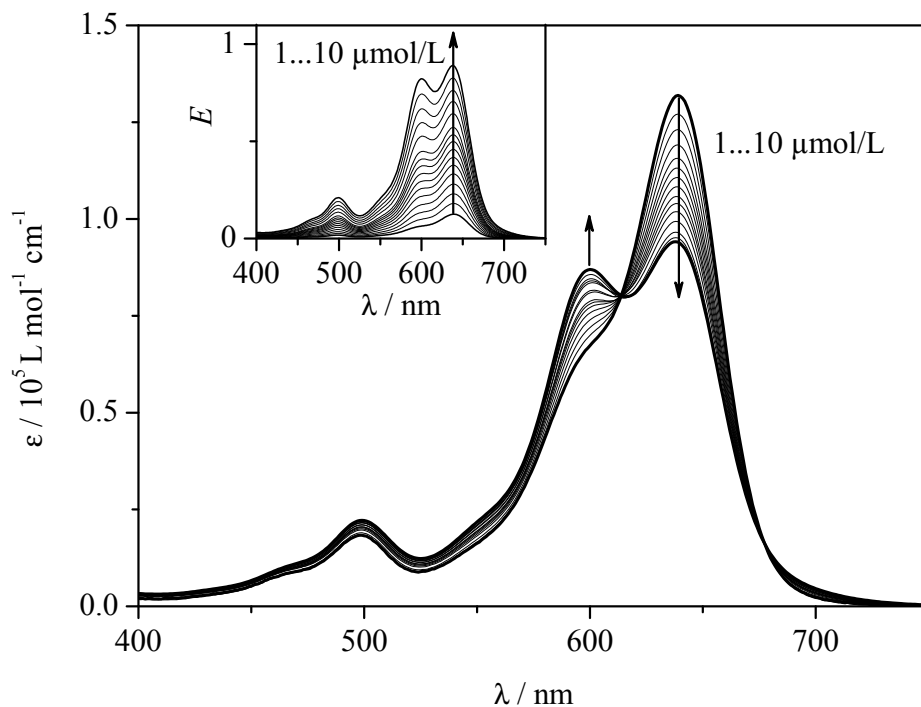


Abb. 4.4: Durch die eingesetzte Farbstoffkonzentration c_0 geteilten Extinktionsspektren ($\epsilon = E/c_0$) von DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen ($c_0 = 1 \dots 10 \mu\text{mol/L}$). Inset: zugehörige Absorptionsspektren.

Das Massenwirkungsgesetz für das Monomer/Dimer-Gleichgewicht mit der Gleichgewichtskonstante K_D der Dimerisierung ergibt sich aus der jeweiligen Monomer- und Dimerkonzentration im Gleichgewicht (c_M und c_D):

$$K_D = c_D/c_M^2 \quad (4.2)$$

Für den Fall, dass nur Monomere und Dimere in Lösung vorliegen, sind die gemessenen Absorptionsspektren eine Linearkombination des Monomer- und Dimerspektrums. Damit ergibt sich der Extinktionswert E für jede Wellenlänge λ bei einer eingesetzten Farbstoffkonzentration c_0 aus [103]:

$$E(\lambda) = [\epsilon_M(\lambda)c_M + 2\epsilon_D(\lambda)c_D]d \quad (4.3)$$

Hierbei sind $\epsilon_M(\lambda)$ und $\epsilon_D(\lambda)$ die Extinktionskoeffizienten der Monomere bzw. Dimere. Der molare dekadische Extinktionskoeffizient ϵ_D ist dabei definiert als Extinktionskoeffizient pro Monomereinheit [103]. d ist die Schichtdicke. Die Konzentration der Dimere c_D ist gegeben als:

$$c_D = \frac{c_0 - c_M}{2} \quad (4.4)$$

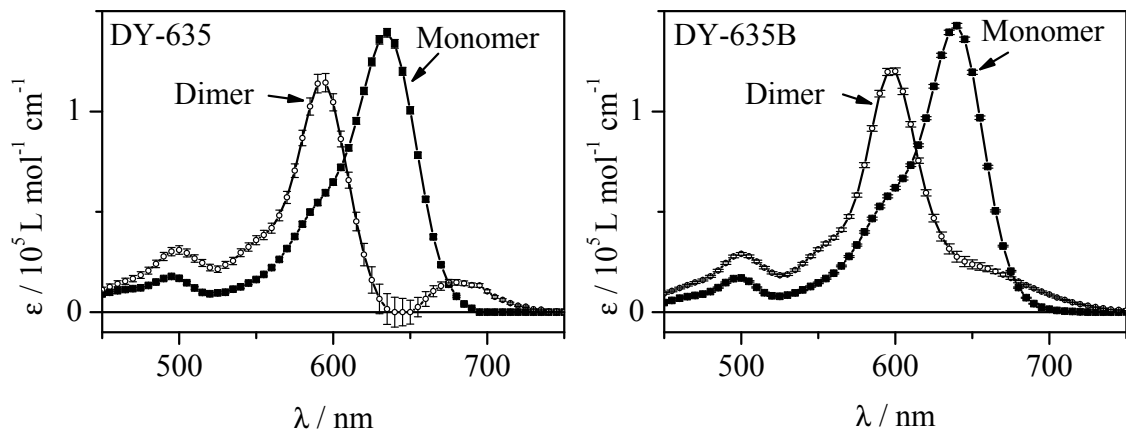


Abb. 4.5: Monomer- und Dimerspektrum von DY-635 und DY-635B (angepasst nach Gl. 4.3-4.5). Die Fehlerbalken entsprechen dem Fehler der Anpassung.

Aus Gl. 4.2-4.4 kann die Konzentration der Monomere c_M in der Lösung hergeleitet werden¹:

$$c_M = -\frac{1}{4K_D} + \sqrt{\left(\frac{1}{4K_D}\right)^2 + \frac{c_0}{2K_D}} \quad (4.5)$$

Für die Ermittlung der Dimerspektren wurden die Absorptionsspektren von DY-635 und DY-635B für jeweils alle eingesetzten Ausgangskonzentrationen c_0 nach Gl. 4.3-4.5 in einer globalen Analyse für den Wellenlängenbereich $450 \text{ nm} < \lambda < 750 \text{ nm}$ angepasst. Für die Auswertung wurde jeder fünfte Messwert verwendet ($\Delta\lambda = 5 \text{ nm}$). Die Gleichgewichtskonstante K_D der Dimerisierung ist unabhängig von der Absorptionswellenlänge und wurde daher als globaler Parameter angepasst. Für $\epsilon_M(\lambda)$ wurde zunächst das experimentell ermittelte molare Extinktionsspektrum der Farbstoffe in verdünnten Lösungen ($c_0 \leq 0,5 \mu\text{mol/L}$) eingesetzt². In einem weiteren Schritt wurden alle Parameter $\epsilon_M(\lambda)$, $\epsilon_D(\lambda)$ und K_D variiert.

Abb. 4.5 zeigt die daraus ermittelten molaren Extinktionsspektren der Monomere und Dimere. Im Absorptionsspektrum der Dimere ist die Hauptabsorptionsbande im Vergleich zum Monomerspektrum um etwa 40 nm hypsochrom verschoben. Diese Bande entspricht dem Übergang aus dem Grundzustand in den energetisch höheren angeregten Zustand \mathcal{E}'' im Dimer (Abb. 2.2).

Die Energiedifferenz $\Delta\mathcal{E}$ zwischen Monomer und Dimer kann anhand der Absorptionsmaxima λ_M und λ_D , des *Plancksches* Wirkungsquantums h und der Lichtgeschwindigkeit c' ermittelt werden:

$$\Delta\mathcal{E} = hc' \left(\frac{1}{\lambda_D} - \frac{1}{\lambda_M} \right) \quad (4.6)$$

¹Bei der Lösung der quadratischen Gleichung ergeben sich zwei Lösungen. Physikalisch sinnvoll ist hierbei nur das Plus, da andererseits der Wert für c_M negativ wäre.

²Die vom Hersteller angegebenen Extinktionskoeffizienten für das Absorptionsmaximum der Monomerform betragen $140.000 \text{ L}/(\text{mol cm})$.

Diese bei der Dimerbildung auftretende Wechselwirkungsenergie $\Delta\mathcal{E}$ kann mit Hilfe der *Molekularen Exzitonen*-Theorie beschrieben werden (vgl. Abschn. 2.1.2) [46]:

$$\Delta\mathcal{E} = -\frac{|\mathbf{M}|^2}{r_{\text{D}}^3} \quad (4.7)$$

Hierbei ist \mathbf{M} das Übergangsdipolmoment der Monomere vom Grundzustand in den ersten angeregten Zustand und r_{D} der Abstand zwischen den Schwerpunkten der beiden Moleküle. Unter der Annahme, dass die Farbstoffmoleküle im Dimer parallel angeordnet sind, kann mit Hilfe der Oszillatorstärke f , der Wellenzahl des Monomerabsorptionsmaximums $\tilde{\nu}$ (in cm^{-1}) und der Energiedifferenz $\Delta\mathcal{E}$ (in eV) der Abstand r_{D} (in nm) berechnet werden [50, 102]:

$$r_{\text{D}} = 10 \left(\frac{2,12f}{\Delta\mathcal{E}\tilde{\nu}} \right)^{1/3} \quad (4.8)$$

Da der Extinktionskoeffizient ϵ_{D} Werte um $10^5 \text{ mol}/(\text{L cm})$ hat, kann für die Oszillatorstärke ein Wert von $f \approx 1$ angenommen werden [5, 50, 102]. Anhand der aus den Monomer- und Dimerspektren ermittelten Werte für $\Delta\mathcal{E}$ und $\tilde{\nu}$ ergibt sich für die Farbstoffe DY-635 und DY-635B ein intramolekularer Abstand von $r_{\text{D}} = 1,0 \text{ nm}$ (Tab. 4.1). Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit Literaturwerten für andere H-Dimere (Rhodamin 6G in Ethanol: 1,1 nm [104], Thiocarbocyanine in Wasser: 0,94 nm [50]).

Im Absorptionsspektrum der Dimere von DY-635 und DY-635B tritt zusätzlich zu der hypsochromen Verschiebung der Hauptabsorptionsbande (verglichen mit der Monomerabsorption) eine schwach ausgeprägte, langwelligere Bande zwischen 650 nm und 700 nm auf (vgl. Abb. 4.5). Dieses Absorptionsverhalten kann seinen Ursprung in der Dimergeometrie haben, wenn die Farbstoffe nicht genau parallel zueinander orientiert sind, sondern in einer gewinkelten Form vorliegen („oblique“-Geometrie, vgl. Abb. 2.2). In diesem Fall wird die Auswahlregel für den verbotenen Übergang vom Grundzustand \mathcal{E}_{G} in den energetisch niedrigeren Zustand \mathcal{E}' teilweise aufgehoben (vgl. Abschn. 2.1.2, [15, 50]). Eine Abweichung von der parallelen Ausrichtung kann sowohl durch elektrostatische Wechselwirkungen (Sulfonsäuregruppe am Indolring) als auch durch sterisch anspruchsvolle Gruppen (*tert*-Butylgruppe) verursacht werden (Abb. 1.1). Da zum einen in diesem Wellenlängenbereich eine starke Überlappung mit

Tab. 4.1: Spektroskopische Parameter^a der Monomer- und Dimere von DY-635 und DY-635B.

Substanz	$\lambda_{\text{M}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{D}} / \text{nm}$	$K_{\text{D}} / \text{L mol}^{-1}$	$\Delta\mathcal{E} / \text{eV}$	r_{D} / nm
DY-635	633	593	$(11 \pm 2) \times 10^4$	0,14	1,0
DY-635B	640	598	$(7 \pm 1) \times 10^4$	0,13	1,0

^a λ_{M} , λ_{D} : Absorptionsmaximum der Monomere und Dimere, K_{D} : Gleichgewichtskonstante der Dimerbildung (Gl. 4.1), $\Delta\mathcal{E}$: Wechselwirkungsenergie bei der Dimerbildung, r_{D} : Abstand zwischen den Schwerpunkten der beiden Moleküle in einem Dimer.

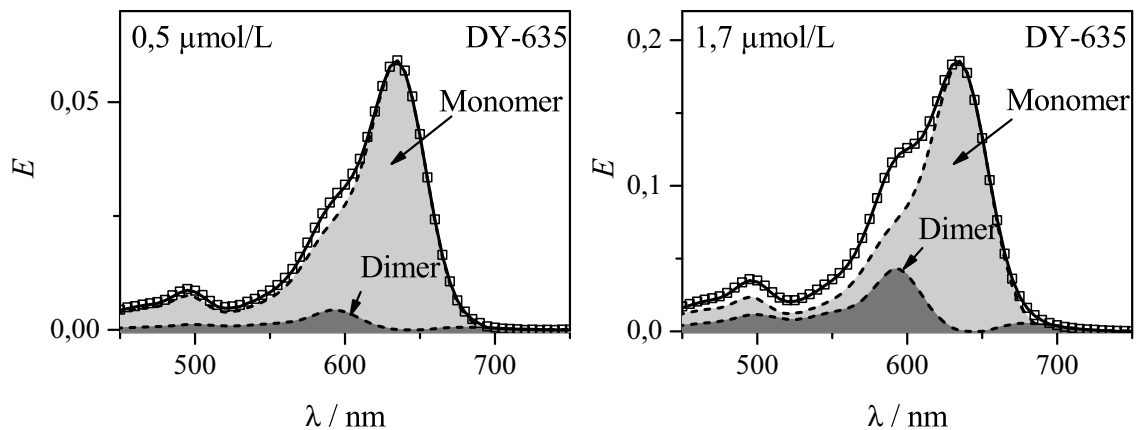


Abb. 4.6: Gemessene Absorptionsspektren von DY-635 (\square) und deren Anpassung (—) bei verschiedenen Konzentrationen. [links] $0,5 \mu\text{mol/L}$. [rechts] $1,7 \mu\text{mol/L}$. Weiterhin sind die jeweiligen Anteile des Monomer- und Dimerspektrums dargestellt (- - -). Während bei einer Lösung mit einer Konzentration von $0,5 \mu\text{mol/L}$ 91% der Moleküle in Monomerform vorliegen, sind es bei $c_0 = 1,7 \mu\text{mol/L}$ noch 77% (Gl. 4.9).

der Monomerabsorptionsbande auftritt, zum anderen die Intensität im Spektrum sehr gering ist, kann diese bathochrom verschobene Absorptionsbande nicht genau aufgelöst werden.

Tab. 4.1 zeigt die ermittelten Werte für die Dimerisierungskonstante K_D sowie die Absorptionsmaxima der Monomere und Dimere (λ_M und λ_D). Die ermittelten Werte für K_D liegen im Bereich von 10^4 L/mol und sind in Übereinstimmung mit Literaturwerten für ähnliche Cyaninfarbstoffe [15, 105]. Die Tendenz, in wässriger Lösung Dimere zu bilden, ist für die biotinylierte Form DY-635B etwas geringer ausgeprägt ($K_D = (7 \pm 1) \times 10^4 \text{ L/mol}$) als für den reinen Farbstoff DY-635 ($K_D = (11 \pm 2) \times 10^4 \text{ L/mol}$) und kann durch einen größeren sterischen Anspruch des Abstandshalters und des Biotins begründet sein (Abb. 4.1).

Abb. 4.6 zeigt die gemessenen Absorptionsspektren von DY-635 in PBS-Puffer bei zwei Farbstoffkonzentrationen ($0,5 \mu\text{mol/L}$ und $1,7 \mu\text{mol/L}$) und die jeweiligen Monomer- und Dimeranteile. Anhand der Gleichgewichtskonstanten für die Dimerisierung K_D kann der Anteil der Monomerkonzentration an der Gesamtkonzentration berechnet werden ($\alpha = c_M/c_0$):

$$K_D = \frac{1 - \alpha}{2\alpha^2 c_0} \quad (4.9)$$

Während bei einer Lösung mit einer Konzentration von $0,5 \mu\text{mol/L}$ 91% der Moleküle in Monomerform vorliegen, sind es bei $c_0 = 1,7 \mu\text{mol/L}$ lediglich noch 77%. Bei der Herstellung von Probenlösungen und der Bestimmung von Farbstoffkonzentrationen muss diese Abweichung vom *Lambert-Beerschen* Gesetz berücksichtigt werden.

4.2 Modellsystem: Biotin-Streptavidin

4.2.1 Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen

Einfluss der Biotinylierung Zur Bindung der Farbstoffe an Streptavidin wurden die Biotin-Derivate DY-635B und DY-647B eingesetzt. Es wurden zunächst die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe DY-635 und DY-647 und ihrer biotinylierten Form untersucht (Abb. 4.7). Bis auf eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von DY-635B um 7 nm im Vergleich zur Carbonsäure führt die kovalente Bindung der Farbstoffe an Biotin zu keinen signifikanten Änderungen ihrer spektralen Eigenschaften (Tab. 4.2).

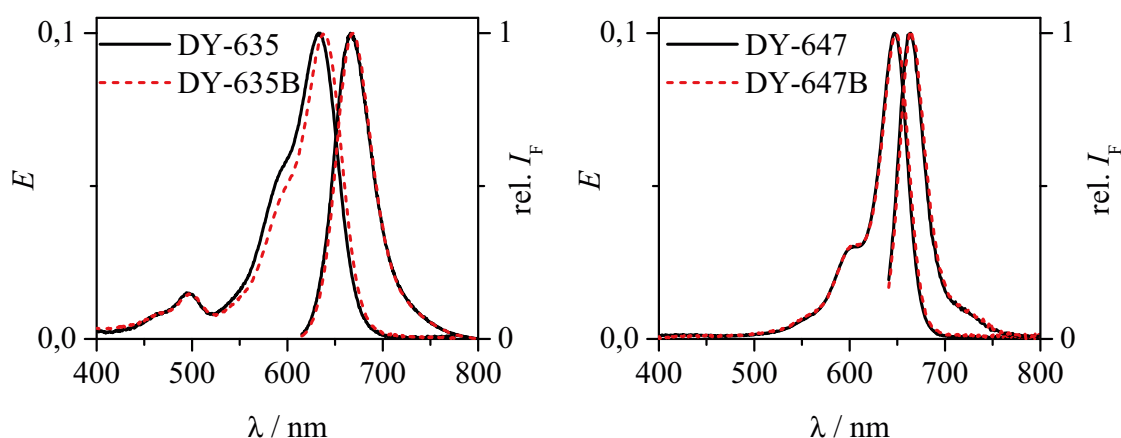


Abb. 4.7: Absorptions- und Fluoreszenzspektren (auf 1 normiert) der Farbstoffe DY-635 und DY-647 bzw. deren biotinylierter Form (DY-635B und DY-647B) in PBS-Puffer bei pH 7,4. Farbstoffkonzentrationen: $c(\text{DY-635}) = 0,7 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{DY-647}) = 0,5 \mu\text{mol/L}$. Anregungswellenlänge für die Fluoreszenzspektren: $\lambda_{\text{Ex}}(\text{DY-635}) = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Ex}}(\text{DY-647}) = 620 \text{ nm}$.

Abb. 4.8 zeigt die Fluoreszenzabklingkurven für die Farbstoffe DY-635 und DY-647 als (nicht-biotinylierte) Carbonsäure sowie in biotinylierter Form in PBS-Puffer. Die Fluoreszenzabklingzeit für die Carbonsäureform beträgt $\tau = 0,4 \text{ ns}$ für DY-635 bzw. $\tau = 0,9 \text{ ns}$ für DY-647. Durch die Biotinylierung der Farbstoffe erhöht sich sowohl die Fluoreszenzabklingzeit auf $0,9 \text{ ns}$ (DY-635B) bzw. $1,1 \text{ ns}$ (DY-647B) als auch die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_{F} (Tab. 4.2). Diese Erhöhung kann auf eine veränderte Mikroumgebung des Farbstoffes zurückgeführt werden, wenn dieser an Biotin gebunden ist. Zur genaueren Betrachtung wurden anhand von τ und Φ_{F} die Geschwindigkeitskonstanten k_{F} und k_{nr} der Fluoreszenz und der strahlungslosen Desaktivierung berechnet. Können intermolekulare Löschprozesse vernachlässigt werden, ist die Fluoreszenzabklingzeit τ zur Summe der Geschwindigkeitskonstanten k_i aller intramolekularen Desaktivierungskanäle indirekt proportional [5, S. 72]:

$$\tau = \frac{1}{k_{\text{F}} + k_{\text{nr}}} \quad (4.10)$$

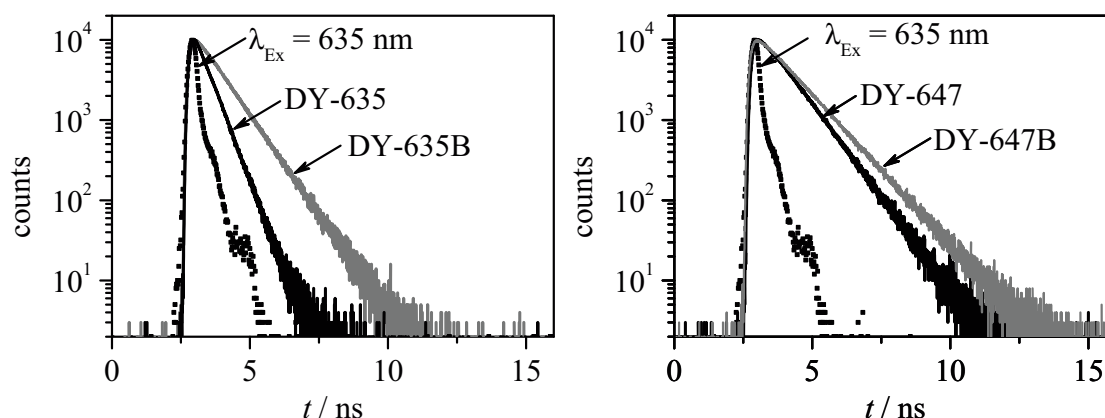


Abb. 4.8: Fluoreszenzabklingkurven der Farbstoffe DY-635 ($\tau = 0,4$ ns) und DY-647 ($\tau = 0,9$ ns) und deren biotinylierter Formen DY-635B ($\tau = 0,9$ ns) und DY-647B ($\tau = 1,1$ ns) in PBS-Puffer (pH 7,4; $\lambda_{Em} = 680$ nm). Fluoreszenzanregung: $\lambda_{Ex} = 635$ nm (Instrumentenfunktion Laserdiode: schwarze Punkte).

Anhand der ermittelten Fluoreszenzabklingzeiten τ und der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F können die Geschwindigkeitskonstanten k_F und k_{nr} hergeleitet werden:

$$\Phi_F = \tau k_F \quad (4.11)$$

Während die kovalente Bindung der Farbstoffe an Biotin keinen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante k_F der Fluoreszenz hat, verringert sich die Geschwindigkeitskonstante k_{nr} der strahlungslosen Desaktivierungsprozesse für DY-635 um 57 % und für DY-647 um 22 % (Tab. 4.2). Diese Abnahme kann durch eine verringerte Flexibilität des an Biotin gebundenen Farbstoffes verursacht sein, was zu einer Abnahme der Geschwindigkeit der photoinduzierten cis-trans-Isomerisierung um die Polymethinkette führt. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für den Farbstoff Cy3 nach Kopplung an Biotin beobachtet [106].

Farbstoff-Streptavidin-Komplexe Aufgrund der schnellen Bildung und langsamen Dissoziationsgeschwindigkeit der Biotin-Streptavidin-Bindung können je nach experimentellen Bedingungen die gebildeten Farbstoff-Streptavidin-Komplexe in einer Verteilung vorliegen, die nicht der Gleichgewichtsverteilung entspricht [107]. Bei der Mischung von Streptavidin mit biotinylierten Farbstoffen spielt die Reihenfolge der Zugabe daher eine entscheidende Rolle. Wird zu einer Streptavidinlösung eine Lösung von biotinyliertem Farbstoff hinzugefügt, kommt es am Ort der Zugabe zu einem lokalen Überschuss an Farbstoff. Bei einer langsamen Durchmischung (verglichen mit der Bildung des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes) können Streptavidintetramere in der Nähe durch biotinylierten Farbstoff gesättigt werden, was zu einer Veränderung im Absorptionsspektrum führt (Abb. A.9). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Herstellung der Farbstoff-Streptavidin-Komplexe daher durch Zugabe von

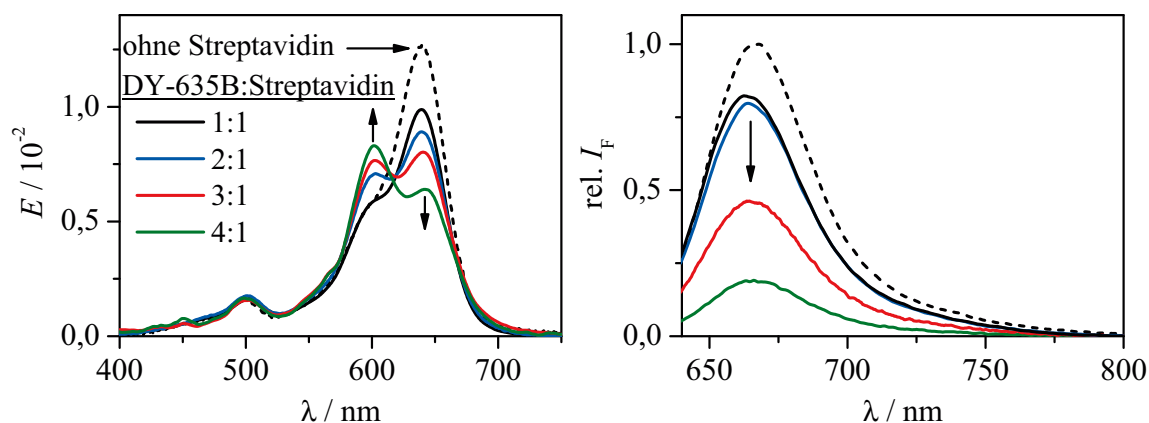


Abb. 4.9: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von DY-635B ($c = 9 \times 10^{-8}$ mol/L): Farbstoff ohne Streptavidin (gestrichelte Linie) und an Streptavidin gebunden (durchgezogene Linien) bei verschiedenen Farbstoff/Streptavidin-Verhältnissen (schwarz 1:1, blau 2:1, rot 3:1, grün 4:1). Anregungswellenlänge für die Fluoreszenzspektren: $\lambda_{\text{Ex}} = 620$ nm.

Streptavidin zu biotinyliertem Farbstoff.

Die Bindung der biotinylierten Farbstoffe DY-635B und DY-647B an Streptavidin führt zu Veränderungen ihrer spektralen Eigenschaften (vgl. Abb. 4.9 und 4.10). Hierbei hat das Farbstoff/Streptavidin-Verhältnis einen wesentlichen Einfluss auf die Absorptions- und Fluoreszenzintensität sowie auf die spektrale Position des dazugehörigen Maximums.

Im Vergleich zu freiem, biotinyliertem Farbstoff nimmt die Absorptionsintensität um etwa 20% ab, wenn Streptavidin in einem Verhältnis von 1:1 zu der Farbstofflösung gegeben wird. Nach Bindung an Streptavidin verschiebt sich für DY-635B das Fluoreszenzspektrum hypsochrom (5 nm), während das Absorptionsmaximum dem des freien biotinylierten Farbstoffes entspricht (Abb. 4.9). Für DY-647B wird eine bathochrome Verschiebung der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima um 6 nm beobachtet (Abb. 4.10, Tab. 4.3 auf S. 54).

Tab. 4.2: Spektroskopische Parameter^a der Farbstoffe als Carbonsäure (DY-635 und DY-647) und ihrer biotinylierten Form (DY-635B und DY-647B)

Substanz	$\lambda_{\text{Abs}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{Em}} / \text{nm}$	τ / ns	Φ_{F}	$k_{\text{F}} / 10^9 \text{s}^{-1}$	$k_{\text{nr}} / 10^9 \text{s}^{-1}$
DY-635	633	668	0,4	$0,07 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,07$	$2,3 \pm 0,2$
DY-635B	640	668	0,9	$0,12 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,2$
DY-647	648	665	0,9	$0,26 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,03$	$0,82 \pm 0,03$
DY-647B	649	666	1,1	$0,30 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,08$	$0,64 \pm 0,03$

^a λ_{Abs} : langwelligstes Absorptionsmaximum, λ_{Em} : Emissionsmaximum, τ : Fluoreszenzabklingzeit (Anregung bei $\lambda_{\text{Ex}} = 635$ nm), Φ_{F} : Fluoreszenzquantenausbeute, k_{F} : Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz, k_{nr} : Geschwindigkeitskonstante aller strahlungslosen intramolekularen Desaktivierungsprozesse.

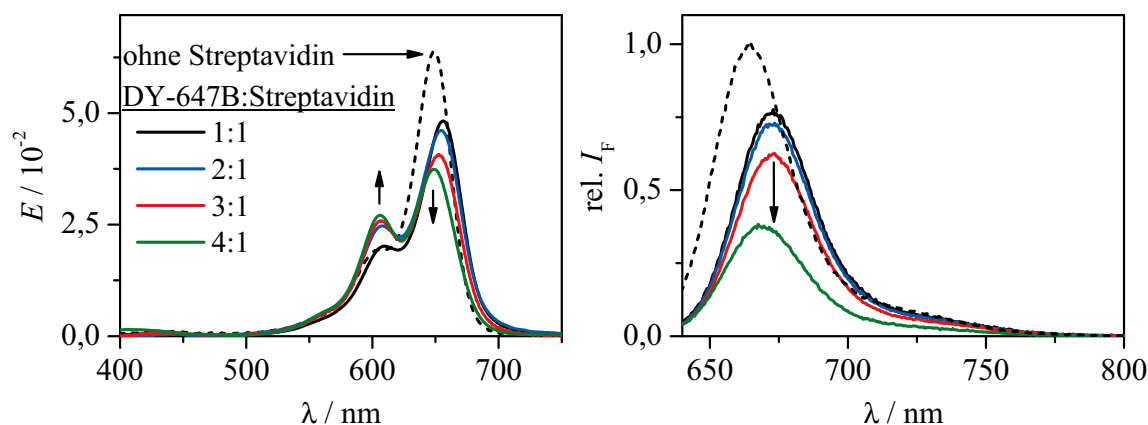


Abb. 4.10: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von DY-647B ($c = 3 \times 10^{-7}$ mol/L): Farbstoff ohne Streptavidin (gestrichelte Linie) und an Streptavidin gebunden (durchgezogene Linien) bei verschiedenen Farbstoff/Streptavidin-Verhältnissen (schwarz 1:1, blau 2:1, rot 3:1, grün 4:1). Anregungswellenlänge für die Fluoreszenzspektren: $\lambda_{\text{Ex}} = 620$ nm.

Die Veränderung in den spektralen Eigenschaften treten wesentlich deutlicher hervor, wenn jeweils mehr als ein Farbstoffmolekül an ein Streptavidintetramer gebunden ist. Mit steigendem Farbstoff/Streptavidin-Verhältnis nimmt die Intensität der Hauptabsorptionsbande ab, wohingegen sich bei einer Wellenlänge von $\lambda \approx 600$ nm eine neue Absorptionsbande herausbildet. Diese entspricht dem Absorptionsmaximum λ_{D} der Dimere, welches für den Farbstoff DY-635B in wässriger Lösung ermittelt wurde. Es wird daher angenommen, dass die Veränderungen im Absorptionsspektrum vorrangig durch Wechselwirkungen von benachbarten Farbstoffen verursacht werden. Sind zwei oder mehr Farbstoffmoleküle an das gleiche Streptavidintetramer gebunden, können sich Dimere bilden. Es handelt sich hierbei um H-Dimere, da sowohl eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums als auch eine Verringerung der Fluoreszenzintensität auftritt (vgl. Abschn. 2.1.2).

Es zeigt sich bereits bei einem eingesetzten Farbstoff/Streptavidin-Verhältnis von 1:1 eine Herausbildung der Absorptionsbande bei 600 nm, die z.B. durch eine statistische Verteilung der Farbstoffe verursacht sein kann, so dass auch bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 (biotinylierter Farbstoff:Streptavidin) noch eine (geringe) Wahrscheinlichkeit besteht, dass sich Farbstoff-Streptavidin-Komplexe höherer Stöchiometrie bilden.

Die spektrale Veränderung in den Absorptions- und Fluoreszenzspektren lässt sich im Wesentlichen auf Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen zurückführen. Ähnliche Effekte wurden bereits für andere, an Biomoleküle gebundene Cyaninfarbstoffe beschrieben [10, 108–110]. Zusätzlich zur Dimerisierung könnten auch Farbstoff-Protein-Wechselwirkungen zu einer Veränderung der spektralen Eigenschaften führen. Diese möglichen Wechselwirkungen sollen im Folgenden betrachtet werden.

4.2.2 Farbstoff-Protein-Wechselwirkungen

Fluoreszenzabklingverhalten

In Abwesenheit von Streptavidin zeigen die Farbstoffe DY-635B und DY-647B jeweils ein monoexponentielles Abklingverhalten (in PBS-Puffer, pH 7,4, vgl. Abb. 4.8). Nach Zugabe von Streptavidin binden die biotinylierten Farbstoffmoleküle an eine der vier Bindungsstellen des Proteins, so dass bei einem Überschuss an Streptavidin angenommen werden kann, dass alle Farbstoffmoleküle gebunden vorliegen. In diesem Fall erhöht sich die Fluoreszenzabklingzeit τ der Farbstoffmoleküle von 0,9 ns auf 2,2 ns (DY-635B) bzw. von 1,1 ns auf 1,7 ns (DY-647B). Diese Zunahme von τ kann auf die reduzierte Flexibilität der gebundenen Farbstoffmoleküle zurückgeführt werden, wodurch sich die Geschwindigkeit von strahlungslosen Desaktivierungskanälen verringert [109]. Die nach Gl. 4.10 ermittelten Werte für die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz (k_F) und der strahlungslosen Desaktivierung (k_{nr}) sind in Tab. 4.3 gezeigt. Für den Farbstoff DY-635B sinkt k_{nr} um 60% und für DY-647B um 40% nach Bindung an Streptavidin. Demgegenüber konnte im Rahmen der Messgenauigkeit keine signifikante Änderung von k_F festgestellt werden, was darauf hinweist, dass sich die intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe nicht ändern und es zu keinen elektronischen Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Protein kommt. Die Fluoreszenzabklingkurve $I(t)$ zeigt für Streptavidin-gebundene Farbstoffe keinen monoexponentiellen Verlauf, sondern wurde biexponentiell mit einer zusätzlichen kürzeren Abklingzeit τ_1 (des freien Farbstoffes in Lösung) angepasst (vgl. Tab. 4.3). Der relative Anteil A_1 an dieser kürzeren Abklingzeit ist mit 6% für DY-635B bzw. 14% für DY-647B gering und kann auf eine heterogene Umgebung der Farbstoffe am Protein zurückzuführen sein. So ist für den strukturell ähnlichen Cyaninfarbstoff Cy5 bekannt, dass dieser nach Bindung an Streptavidin aufgrund unterschiedlicher Konformationen zwei verschiedene Fluoreszenzabklingzeiten zeigt [111]. Die ermittelte Fluoreszenzabklingzeit der Streptavidin-gebundenen Farbstoffe entspricht daher vielmehr einer mittleren Abklingzeit einer Verteilung. Für die weitere Betrachtung wird für die Streptavidin-gebundenen Farbstoffe nur die Fluoreszenzabklingzeit τ_2 berücksichtigt.

Wird ein Überschuss an biotinyliertem Farbstoff eingesetzt, sind nicht alle Farbstoffmoleküle an Streptavidin gebunden. Bis zu einem Streptavidin/Farbstoff-Verhältnis von 0,25 liegen in Lösung sowohl gebundene als auch ungebundene Farbstoffmoleküle vor. Die Fluoreszenzabklingkurve $I(t)$ kann in diesem Fall durch einen biexponentiellen Verlauf beschrieben werden (Abb. 4.11 [links]). Die Auswertung der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen erfolgte für verschiedene Streptavidin/Farbstoffverhältnisse nach einer globalen Anpassung. Dabei wurden die Fluoreszenzabklingzeiten τ_1 und τ_2 der ungebundenen und gebundenen Farbstoffe als globale Parameter verwendet.

Die Verteilung zwischen der gebundenen und ungebundenen Form kann jeweils durch den entsprechenden Anteil A_i an der Fluoreszenzabklingzeit τ_i verdeutlicht werden (Gl. 3.2).

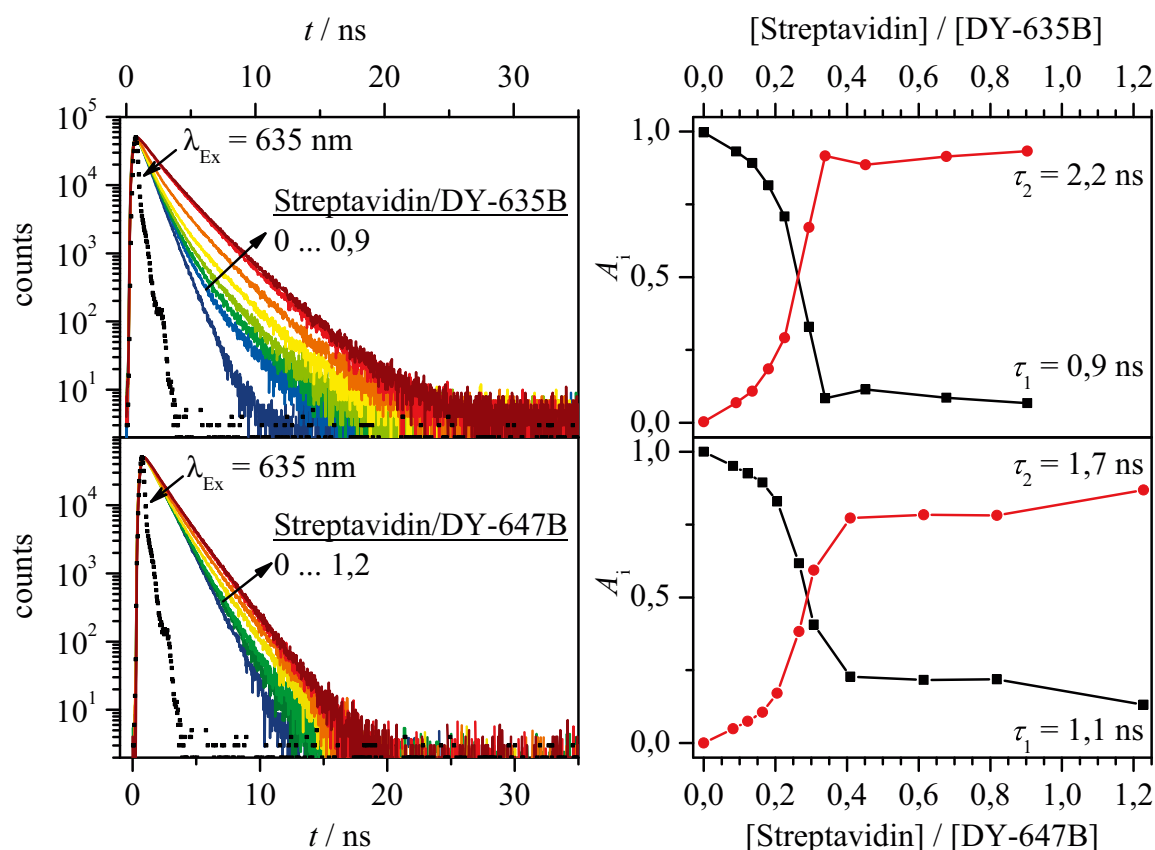


Abb. 4.11: Fluoreszenzabklingverhalten von DY-635B (oben) und DY-647B (unten) in PBS-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Streptavidin-Konzentrationen. $c(\text{DY-635B}) = 1,3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $c(\text{DY-647B}) = 2,3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$. [links] Fluoreszenzabklingkurven. Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 635 \text{ nm}$ (Instrumentenfunktion Laserdiode: schwarze Punkte). Fluoreszenzemission: $\lambda_{\text{Em}} = 670 \text{ nm}$. [rechts] Anteile an der jeweiligen Fluoreszenzabklingzeit A_i (Gl. 3.2). Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte durch globale Anpassung nach Gl. 3.1. Globale Parameter waren die Fluoreszenzabklingzeit der freien (DY-635B: $\tau_1 = 0,9 \text{ ns}$; DY-647B: $\tau_1 = 1,1 \text{ ns}$) und der Streptavidin-gebundenen Farbstoffe (DY-635B: $\tau_2 = 2,2 \text{ ns}$; DY-647B: $\tau_2 = 1,7 \text{ ns}$).

Abb. 4.11 [rechts] zeigt jeweils den Anteil A_i als Funktion des Streptavidin/Farbstoff-Verhältnisses. Bei kleinen Konzentrationen an Streptavidin liegt der Großteil der biotinylierten Farbstoffe frei in Lösung vor, sodass der Anteil A_2 an der Fluoreszenzabklingzeit τ_2 kleine Werte annimmt. Mit steigender Streptavidinkonzentration kommt es zu einer Erhöhung von A_2 , wobei bei einem Streptavidin/Farbstoff-Verhältnis von 0,25 ein Wendepunkt beobachtet werden kann. Dies entspricht einem Bindungsverhältnis von vier Farbstoffmolekülen pro Streptavidintetramer und ist ein Hinweis darauf, dass alle vier Bindungsstellen im Protein durch biotinylierte Farbstoffmoleküle belegt werden können. Oberhalb dieses Verhältnisses ist der Großteil der biotinylierten Farbstoffe in der Lösung an Streptavidin gebunden, weshalb der Anteil A_2 jeweils einen konstanten Wert erreicht.

Tab. 4.3: Spektroskopische Eigenschaften^a der freien, biotinylierten Farbstoffe und in Anwesenheit eines 5-fachen Überschuss an Streptavidin (S) in PBS-Puffer (pH 7,4)

Farbstoff	$\lambda_{\text{Abs}} /$ nm	$\lambda_{\text{Em}} /$ nm	$\tau_1 /$ ns	A_1	$\tau_2 /$ ns	A_2	Φ_{F}	$k_{\text{F}} /$ 10^9s^{-1}	$k_{\text{nr}} /$ 10^9s^{-1}
DY-635B	640	668	0,9	1,00	-	-	0,12	$0,13 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,2$
DY-635B+S	640	663	0,9	0,06	2,2	0,94	0,18	$0,09 \pm 0,06$	$0,4 \pm 0,1$
DY-647B	649	666	1,1	1,00	-	-	0,30	$0,27 \pm 0,08$	$0,64 \pm 0,03$
DY-647B+S	655	672	1,1	0,14	1,7	0,86	0,34	$0,20 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,05$

^a λ_{Abs} : langwelligstes Absorptionsmaximum, λ_{Em} : Emissionsmaximum, τ_i : Fluoreszenzabklingzeit (Anregung bei $\lambda_{\text{Ex}} = 635 \text{ nm}$), A_i : Anteil an der Fluoreszenzabklingzeit, Φ_{F} : Fluoreszenzquantenausbeute, k_{F} : Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz, k_{nr} : Geschwindigkeitskonstante aller strahlungslosen intramolekularen Desaktivierungsprozesse. Bei der Berechnung von k_{F} und k_{nr} der Farbstoff/Streptavidin-Komplexe wurde jeweils τ_2 verwendet.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) wurden zunächst die Korrelationskurven $G(\tau)$ der ungebundenen Farbstoffe als Carbonsäure mit denen der biotinylierten Form verglichen. In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss der Streptavidinbindung auf die Diffusionszeit τ_D und die Korrelationszeit τ_R analysiert. Um Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen durch Dimerbildung zu vermeiden, wurde ein zehnfacher Überschuss an Streptavidin eingesetzt. In diesem Fall kann angenommen werden, dass pro Streptavidintetramer maximal ein Farbstoffmolekül gebunden ist.

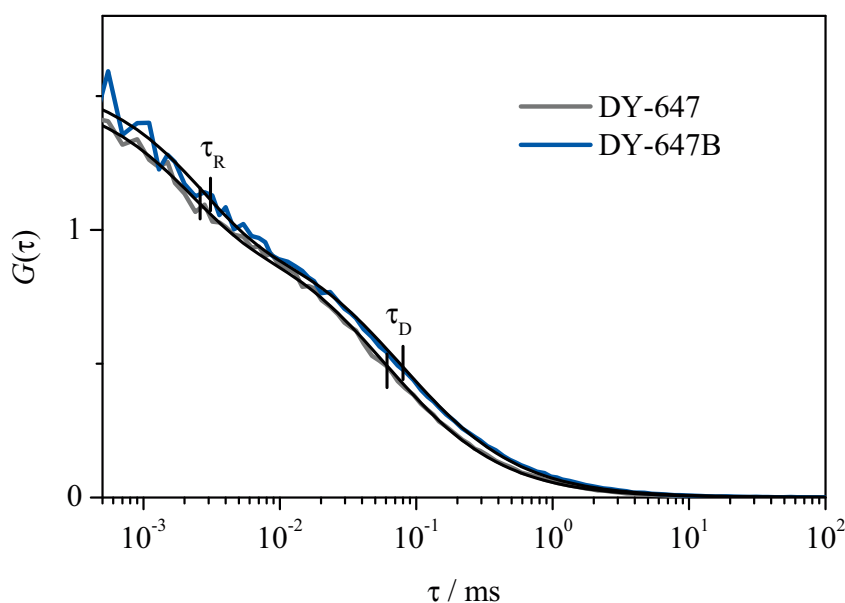


Abb. 4.12: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von DY-647 und DY-647B in Wasser ($c = 10^{-9}$ mol/L) und die entsprechenden angepassten Kurven (schwarze Linien). Die Anpassung erfolgte nach Gl. 3.5. Die ermittelten Werte für die Diffusionszeit τ_D durch das Beobachtungsvolumen (Gl. 2.24) sowie die mittlere Zeit der photophysikalischen Desaktivierung τ_R sind jeweils markiert. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 630$ nm mit einer Leistung von $53 \mu\text{W}$ angeregt (Methode 3, vgl. Abschn. 3.5).

FCS-Kurven der ungebundenen Farbstoffe Abb. 4.12 zeigt die Korrelationsfunktion $G(\tau)$ für den Farbstoff DY-647 und dessen biotinylierte Form DY-647B (DY-635 und DY-635B; vgl. A.10). Aufgrund des um etwa 50% höheren Molekulargewichtes M_T kommt es zu einer verlangsamten Diffusion der Biotinderivate im Vergleich zu ihrer Carbonsäure. Die nach Gl. 3.5 ermittelten Diffusionskoeffizienten sind erwartungsgemäß für die biotinylierten Farbstoffe kleiner als für die freien Carbonsäuren (Tab. 4.4 auf S. 60).

Neben dem Diffusionsanteil (im ms-Zeitbereich) kann bei kurzen Korrelationszeiten ($< 10 \mu\text{s}$) zusätzlich ein schneller Abfall der Korrelationsfunktion beobachtet werden. Diese „schnelle“ Komponente kann auf intramolekulare Desaktivierungsprozesse zurückgeführt werden

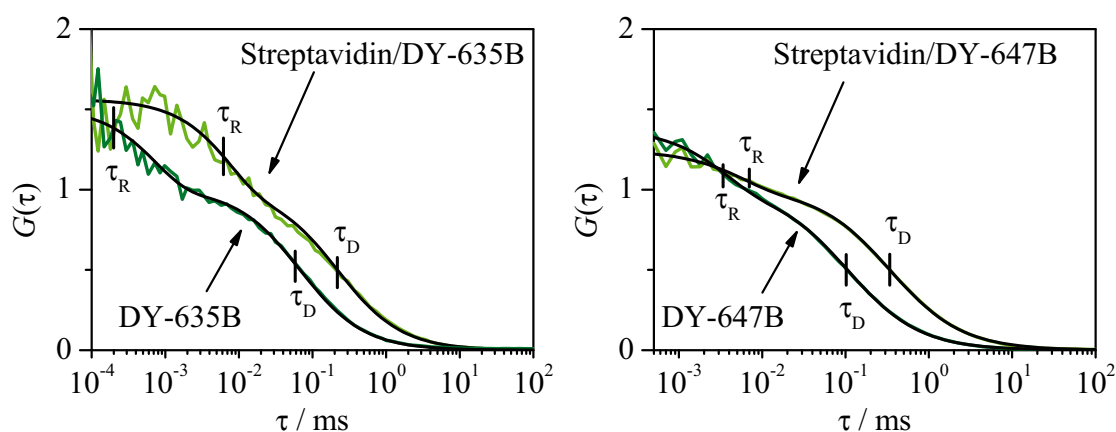


Abb. 4.13: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von DY-635B [links] und DY-647B [rechts] in PBS-Puffer (pH 7,4) ($c = 10^{-9}$ mol/L) und der entsprechenden Farbstoff-Streptavidin-Komplexe. Für die Untersuchung der Farbstoff/Streptavidin-Komplexe wurde ein zehnfacher Überschuss an Streptavidin eingesetzt, so dass maximal ein Farbstoffmolekül pro Streptavidintetramer gebunden ist. Die Anpassung (schwarze Linien) erfolgte nach Gl. 3.5. Die ermittelten Werte für die Diffusionszeit τ_D durch das Beobachtungsvolumen (Gl. 2.24) und die mittlere Zeit der photophysikalischen Desaktivierung τ_R sind jeweils markiert (vgl. Tab. 4.4). Die Anregung von DY-635B erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 633$ nm und einer Laseranregungsleistung von $P = 35 \mu\text{W}$ (Methode 1) und für DY-647B bei $\lambda_{Ex} = 630$ nm und $P = 35 \mu\text{W}$ (Methode 3, vgl. Abschn. 3.5).

[82, 84]. Dabei gehen die Moleküle während der Diffusion durch das Beobachtungsvolumen durch photoinduzierte cis-trans-Isomerisierung oder Spinumkehr (ISC) in einen nicht-fluoreszierenden Zustand über (vgl. Abschn. 2.4.2).

FCS-Kurven der Farbstoff-Streptavidin-Komplexe Die Abb. 4.12 und A.10 verdeutlichen, dass die Biotinylierung keine signifikanten Änderungen der photophysikalischen Desaktivierungsprozesse (Triplet-Übergänge, cis-trans-Isomerisierung) oder Diffusionseigenschaften der Farbstoffe nach sich zieht. Im Gegensatz dazu hat die Bindung der biotinylierten Farbstoffe an Streptavidin einen deutlichen Einfluss auf die Korrelationsfunktion $G(\tau)$ (Abb. 4.13), wobei sich besonders die Diffusionseigenschaften verändern. Der Diffusionskoeffizient D der biotinylierten Farbstoffe verringert sich nach der Bindung an das Protein um einen Faktor von etwa vier (Tab. 4.4). Anhand der *Stokes-Einstein*-Gleichung (Gl. 2.25) ergibt sich für den hydrodynamischen Radius von Streptavidin damit ein Wert von $R_h = (2,5 \pm 0,2)$ nm. Der für die Streptavidin-gebundenen Farbstoffe ermittelte Wert für D stimmt gut mit dem Wert überein, der in der Literatur für reines Streptavidin angegeben wird ($1,2 \times 10^{-10}$ m²/s [112]). Nach der Bindung an Streptavidin erhöht sich zusätzlich zur Diffusionszeit τ_D die Korrelationszeit τ_R der intramolekularen Desaktivierungsprozesse. Insbesondere für den Farbstoff DY-635B steigt τ_R bei einer Anregungsleistung von $35 \mu\text{W}$ von $0,2 \mu\text{s}$ auf $6,2 \mu\text{s}$ (Abb. 4.13, Tab. 4.4). Diese Zunahme wurde bereits für andere an Makromoleküle gebundene Cyanin-

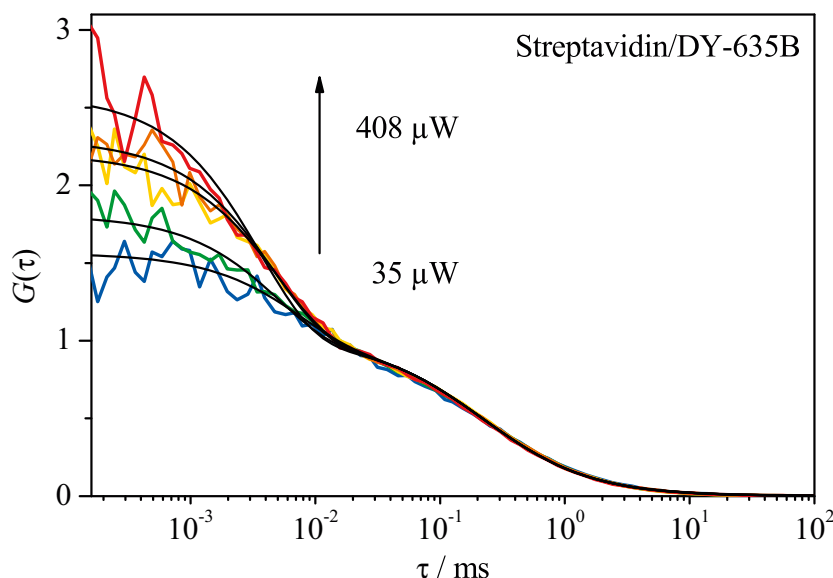


Abb. 4.14: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ (bunte Linien) und die entsprechenden angepassten Kurven (schwarze Linien) von Streptavidin-gebundenem DY-635B in PBS-Puffer bei pH 7,4 in Abhängigkeit der Laseranregungsleistung P (35...400 μW). Für die Untersuchung der Farbstoff/Streptavidin-Komplexe wurde ein zehnfacher Überschuss an Streptavidin eingesetzt, so dass maximal ein Farbstoffmoleküle pro Streptavidintetramer gebunden ist ($c(\text{DY-635B}) = 10^{-9} \text{ mol/L}$). Die Anpassung erfolgte nach Gl. 3.5. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 633 \text{ nm}$ angeregt (Methode 1, vgl. Abschn. 3.5).

farbstoffe beschrieben [84] und stimmt mit den Ergebnissen der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen überein, bei denen eine Verringerung der Geschwindigkeitskonstante k_{nr} beobachtet wurde (Tab. 4.3). Die Abnahme der Geschwindigkeit von Desaktivierungsprozessen über einen nicht-fluoreszierenden Zustand und die damit verbundene Zunahme von τ_{R} kann mehrere Ursachen haben. Zum einen kann die Geschwindigkeit für die photoinduzierte cis-trans-Isomerisierung um die Polymethinkette verringert sein, bspw. wenn die Beweglichkeit der Streptavidin-gebundenen Farbstoffe im Vergleich zu ungebundenem Farbstoff eingeschränkt ist. Zum anderen ist es möglich, dass die gebundenen Farbstoffmoleküle am Streptavidin besser abgeschirmt sind und der Triplett-Zustand weniger stark z.B. durch Sauerstoff gelöscht wird (längere Abklingzeit des Triplettzustandes).

Einfluss der Anregungsleistung Um die zusätzliche Abklingkomponente im μs -Zeitbereich der Korrelationsfunktion weitergehend zu untersuchen, wurden FCS-Experimente unter Variation der Laseranregungsleistung P durchgeführt. Der Diffusionskoeffizient D bleibt dabei unverändert [84, 113]. Demgegenüber hat P einen Einfluss auf photophysikalische Desaktivierungsprozesse, wie z.B. Isomerisierung oder Triplett-Übergänge, die über einen nicht-fluoreszierenden Zustand ablaufen. Es wird erwartet, dass sich der Wert der Amplitude A ,

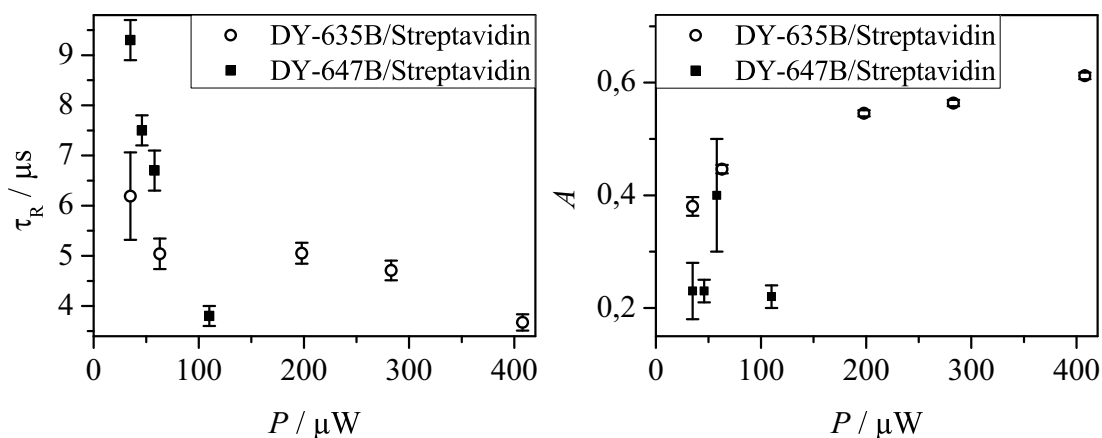


Abb. 4.15: Einfluss der Leistung P des Anregungslasers auf die Korrelationszeit τ_R [links] und die Amplitude A [rechts]. Die Werte wurden durch Anpassung der FCS-Kurven nach Gl. 3.5 erhalten. Für die Untersuchung der Farbstoff/Streptavidin-Komplexe wurde ein zehnfacher Überschuss an Streptavidin eingesetzt, so dass maximal ein Farbstoffmoleküle pro Streptavidintetramer gebunden ist ($c(\text{Farbstoff}) = 10^{-9} \text{ mol/L}$).

ein Maß für den Anteil der Moleküle im nicht-fluoreszierenden Zustand, erhöht während die Korrelationszeit τ_R abnimmt [84, 113] (vgl. Gl. 3.5).

Für die ungebundenen Farbstoffe konnte bei Veränderung der Anregungsleistung keine signifikante Änderung der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ bzw. der Parameter A und τ_R beobachtet werden (vgl. Abb. A.11 und A.12). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass aufgrund der kleinen Werte der Korrelationszeit ($\tau_R < 5 \mu\text{s}$) die Zeitauflösung des experimentellen Aufbaus nicht ausreicht, um die Komponente im μs -Zeitbereich eindeutig auflösen zu können.

In Abb. 4.14 sind die Korrelationsfunktionen für Streptavidin-gebundenes DY-635B gezeigt. Im Gegensatz zum ungebundenen Farbstoff werden die FCS-Kurven der Farbstoff-Streptavidin-Komplexe erheblich von der Anregungsleistung P beeinflusst. Dabei nimmt mit steigendem P die Amplitude A zu, was einer höheren Besetzung von nicht-fluoreszierenden Zuständen entspricht. Darüber hinaus nimmt die Korrelationszeit τ_R der photophysikalischen Desaktivierung mit zunehmender Anregungsleistung P ab (Tab. 4.4, Abb. 4.15).

Absättigung unbesetzter Bindungsstellen durch unmarkiertes Biotin Es wurde untersucht, ob die Korrelationszeit τ_R durch Wechselwirkungen der gebundenen Farbstoffe mit Tryptophanresten von benachbarten Bindungsstellen verursacht wird [113]. Hierzu wurden nichtbesetzte Bindungsstellen im Streptavidintetramer durch Zugabe eines dreifachen Überschusses an unmarkiertem Biotin blockiert. Abb. 4.16 zeigt die Korrelationsfunktion von Streptavidin-gebundenem DY-635B in An- und Abwesenheit von unmarkiertem Biotin. Die Bindung von Biotin hatte keinen Einfluss auf die Diffusionszeit τ_D . Des Weiteren wurden keine Auswirkungen auf den photophysikalischen Desaktivierungsprozess und die entspre-

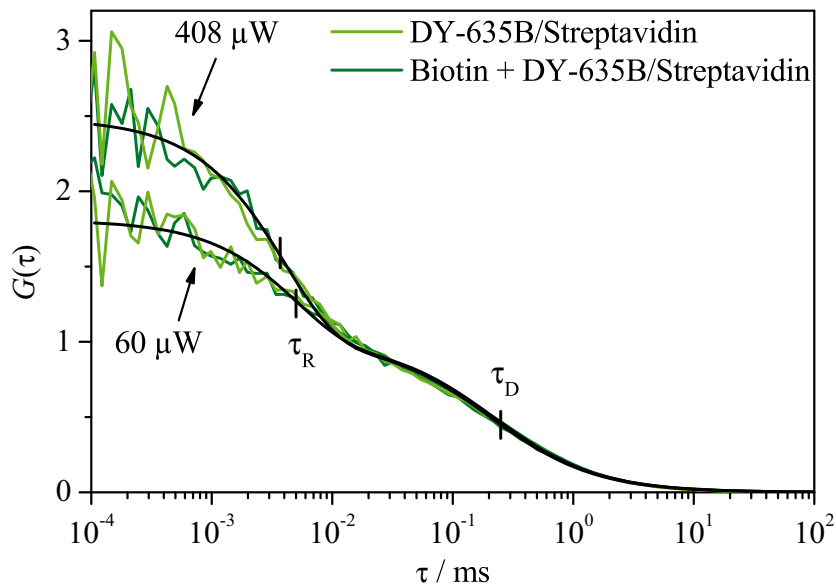


Abb. 4.16: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von Streptavidin-gebundenem DY-635B in PBS-Puffer bei pH 7,4 in An- und Abwesenheit von unmarkiertem Biotin bei unterschiedlicher Anregungsleistung P . Die Anpassung erfolgte nach Gl. 3.5. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 633 \text{ nm}$ angeregt (Methode 1, vgl. Abschn. 3.5).

chenden Korrelationszeit τ_R der Streptavidin-gebundenen Farbstoffe DY-635B und DY-647B beobachtet. Dieser fehlende Einfluss von unmarkiertem Biotin auf die Korrelationsfunktion $G(\tau)$ deutet darauf hin, dass das Auftreten der Korrelationszeit τ_R in den Farbstoff-Streptavidin-Komplexen nicht durch Wechselwirkungen mit unbesetzten Bindungsstellen verursacht wird, sondern intramolekular entweder durch photoinduzierte Isomerisierung oder durch eine Spinumkehr aus dem ersten angeregten Zustand in einen Triplett-Zustand.

Einen Hinweis auf die Art des Desaktivierungsprozesses könnten die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiemessungen liefern, die im nächsten Abschnitt näher erläutert werden. Dabei wird u.a. die Beweglichkeit der an Streptavidin gebundenen Farbstoffe untersucht. Für den Fall, dass bei Absättigung mit unmarkiertem Biotin (durch Konformationsänderungen im Streptavidin) eine reduzierte Beweglichkeit der gebundenen Farbstoffe beobachtet wird, können die photophysikalischen Desaktivierungsprozesse im μs -Zeitbereich der FCS-Experimente nicht durch eine cis-trans-Isomerisierung verursacht sein. Denn durch die sterische Hinderung müsste sich bei Absättigung mit Biotin die Geschwindigkeit dieser Isomerisierung verringern und die Korrelationszeit τ_R steigen.

Tab. 4.4: Parameter^a der Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ der untersuchten Cyaninfarbstoffe (DY-635 und DY-647), ihrer biotinylierten Form und den dazugehörigen Farbstoff/Streptavidin-Komplexen DY-635B+S und DY-647B+S (vgl. Abb. 4.12, A.10). Konzentration an Farbstoff: $c = 10^{-9}$ mol/L. Für die Untersuchung der Farbstoff/Streptavidin-Komplexe wurde ein zehnfacher Überschuss an Streptavidin ($c = 10^{-8}$ mol/L) eingesetzt, so dass maximal ein Farbstoffmoleküle pro Streptavidintetramer gebunden war. Die Anpassung erfolgte nach Gl. 3.5. Der angegebene Fehler entspricht dem Fehler der Anpassung. Die Proben DY-635 und DY-647, DY-647B und DY-647B+S wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 630$ nm angeregt (Methode 3, vgl. 3.5). Alle anderen Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 633$ nm mit einer Leistung von $35 \mu\text{W}$ angeregt (Methode 1, vgl. 3.5).

Farbstoff	$M_r /$ g mol^{-1}	$D /$ $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	$P / \mu\text{W}$	A	$\tau_R / \mu\text{s}$
DY-635	659	$4,1 \pm 0,5$	53	$0,3 \pm 0,1$	4 ± 3
DY-635B	1014	$3,2 \pm 0,2$	35	$0,6 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
		$3,2 \pm 0,2$	408	$0,5 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
DY-635B+S	≈ 53800	$0,9 \pm 0,1$	35	$0,38 \pm 0,02$	$6,2 \pm 0,8$
		$0,9 \pm 0,1$	408	$0,61 \pm 0,01$	$3,7 \pm 0,4$
DY-647	666	$4,2 \pm 0,9$	53	$0,3 \pm 0,1$	3 ± 2
DY-647B	1021	$3,5 \pm 0,5$	35	$0,4 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,6$
		$3,5 \pm 0,6$	110	$0,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,3$
DY-647B+S	≈ 53800	$1,0 \pm 0,2$	35	$0,23 \pm 0,05$	$9,3 \pm 0,4$
		$1,0 \pm 0,2$	110	$0,21 \pm 0,02$	$3,8 \pm 0,2$

^a Diffusionskoeffizient D , Amplitude A und mittlere Korrelationszeit τ_R der photophysikalischen Desaktivierungsprozesse.

4.2.3 Beweglichkeit der Fluoreszenzsonde

Für die Untersuchungen der Beweglichkeit der an Streptavidin-gebundenen Farbstoffe wurde zunächst die fundamentale Fluoreszenzanisotropie r_0 der Farbstoffe DY-635B und DY-647B bestimmt. Die Rotationszeit und Mobilität der frei diffundierenden und an Streptavidin gebundenen Farbstoffmoleküle wurde anhand von zeitaufgelösten Anisotropiemessungen $r(t)$ untersucht. Dazu wurden in einem ersten Schritt jeweils nur die reinen Komponenten (freie bzw. gebundene Farbstoffe) analysiert. Da die Bindung von Biotin an Streptavidin im Protein eine Konformationsänderung bewirkt (vgl. Abschn. 2.2.2), wurde zusätzlich ein möglicher Einfluss auf die Beweglichkeit der gebundenen Farbstoffe geprüft. Hierzu wurden die Anisotropieabklingkurven der Streptavidin-gebundenen Farbstoffe in Ab- und Anwesenheit von reinem (unmarkiertem) Biotin aufgenommen und analysiert. Darüber hinaus wurden Mischungen von freiem und streptavidin-gebundenem Farbstoff betrachtet. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten zeitaufgelösten Fluoreszenz(anisotropie)-Messungen spielt die Bildung von H-Dimeren der Farbstoffe DY-635 und DY-635B kaum eine Rolle, da diese eine sehr geringe Fluoreszenzquantenausbeute aufweisen (vgl. Abschn. 2.1.2). Die Farbstoffkonzentration hatte bspw. keinen Einfluss auf die Anisotropieabklingkurve $r(t)$ oder die Fluoreszenzabklingzeit (Abb. A.13 bzw. A.14)

Bestimmung der fundamentalen Fluoreszenzanisotropie

Um die fundamentale Fluoreszenzanisotropie r_0 der Farbstoffe zu bestimmen, wurden Fluoreszenzanisotropiespektren von DY-635B und DY-647B in Glycerin bei 223 K aufgenommen. Bei dieser Temperatur wird eine Rotationsdiffusion der Moleküle vermieden, und die ermittelte stationäre Fluoreszenzanisotropie entspricht dem Wert r_0 bei dem dazugehörigen Übergang [69]. Anhand der Anisotropiespektren (Abb. 4.17) wird deutlich, dass bei einer Anregungswellenlänge von $520 \leq \lambda_{\text{Ex}} \leq 650$ nm nur ein elektronischer Übergang beobachtet wird (S_0 - S_1). In diesem Wellenlängenbereich wurde für die Fluoreszenzanisotropie r_0 jeweils ein Wert nahe des theoretisch maximalen Wertes von 0,4 ermittelt (vgl. Tab. 4.5). Daraus resultiert, dass für diesen Übergang die Übergangsdipolmomente der Absorption und Fluoreszenz nahezu parallel ausgerichtet sind³. Bei kürzeren Anregungswellenlängen wurden im Anisotropiespektrum höhere elektronische Übergänge (S_0 - S_n) beobachtet [115]. Die experimentell ermittelten Anisotropiewerte stimmen gut mit Literaturdaten für andere Cyaninfarbstoffe überein [106, 115–117].

Anhand der *Perrin*-Gleichung (Gl. 2.4) kann aus der Rotationszeit ϕ , der Fluoreszenzabklingzeit τ (beides bei einer Temperatur T) und der fundamentalen Anisotropie r_0 der zu erwartende Wert der stationären Fluoreszenzanisotropie r_{calc} berechnet werden. In PBS-Puffer

³Die Differenz zwischen dem maximalen Wert von $r_0 = 0,4$ und den experimentell ermittelten Werten von 0,39 bzw. 0,37 kann auf Torsionsschwingungen bzw. Änderungen der Molekülgeometrie im angeregten Zustand zurückgeführt werden [5, 114, 115].

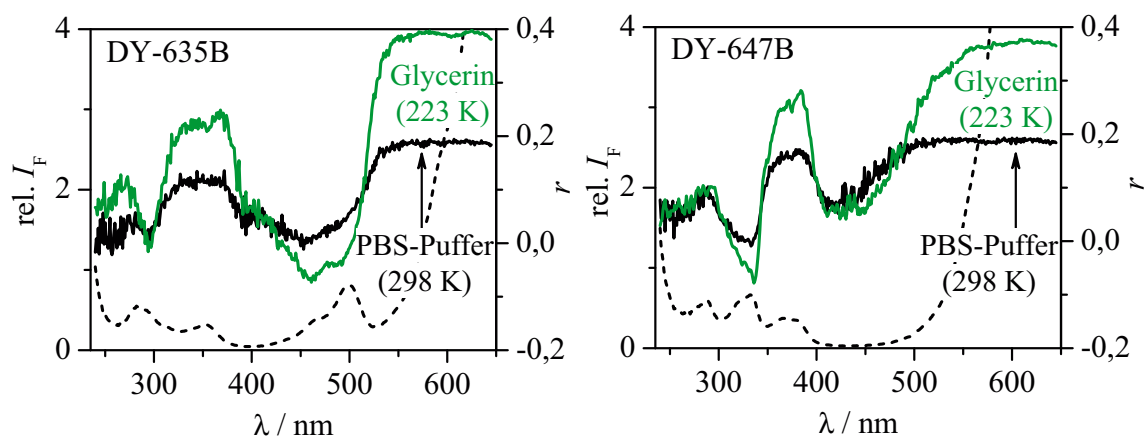


Abb. 4.17: Fluoreszenzangregungs- und anisotropiespektren von DY-635B und DY-647B in PBS-Puffer (pH 7,4) bei 298 K (gestrichelte bzw. durchgezogene, schwarze Linie). Fluoreszenzanisotropiespektrum in Glycerin bei 223 K (grün).

wurden für den S_0 - S_1 -Übergang bei 298 K Anisotropiewerte von 0,19 (0,18) für DY-635B (DY-647B) ermittelt (Abb. 4.17). Die gemessenen Anisotropiewerte stimmen gut mit den berechneten Werten r_{calc} überein (Tab. 4.5).

$$r_{\text{calc}} = r_0 \left(\frac{1}{1 + \tau/\phi} \right) \quad (4.12)$$

Tab. 4.5: Fundamentale Anisotropie r_0 (gemessen bei 223 K in Glycerin), gemessene stationäre Anisotropie r der biotinylierten Farbstoffe sowie der aus der Perrin-Gleichung theoretisch zu erwartende Wert für die Anisotropie bei 298 K r_{calc} in PBS-Puffer (pH 7,4) für den S_0 - S_1 -Übergang (im Wellenlängenbereich $520 \leq \lambda \leq 650$ nm).

Farbstoff	τ / ns ^a	ϕ / ns ^b	r_0	r	r_{calc}
DY-635B	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	$0,39 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,05$
DY-647B	$1,1 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	$0,37 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,05$

^a Fluoreszenzabklingzeit τ (Anregung bei 635 nm)

^b Rotationskorrelationszeit ϕ

Einfluss von Konformationsänderungen auf die Beweglichkeit

Abb. 4.18 und A.15 zeigen die horizontalen und vertikalen Komponenten der Fluoreszenzabklingkurven ($I_{\text{vv}}(t)$ und $I_{\text{vh}}(t)$) sowie die daraus ermittelte zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ für DY-635B bzw. DY-647B in PBS-Puffer. In Abwesenheit von Streptavidin hat $r(t)$ für die biotinylierten Farbstoffe jeweils einen monoexponentiellen Verlauf mit einer Rotationszeit von je $\phi = 0,8$ ns (Tab. 4.5).

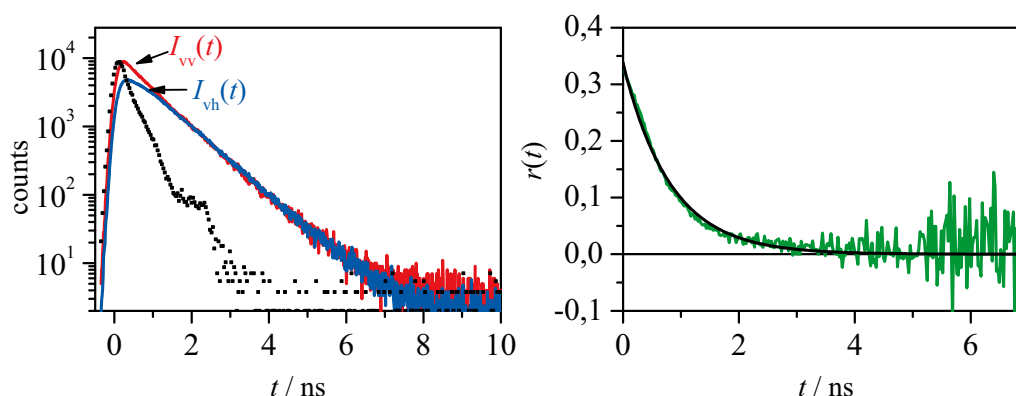


Abb. 4.18: Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessung von DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) ($c(\text{DY-635B}) = 4,3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$). [links] Fluoreszenzabklingkurven (G-faktor-korrigiert): $I_{vv}(t)$ (rote Linie) und $I_{vh}(t)$ (blaue Linie). Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 635 \text{ nm}$ (Instrumentenfunktion Weißlichtlaser: schwarze Punkte). Fluoreszenzemission: $\lambda_{\text{Em}} = 670 \text{ nm}$. [rechts] Anisotropieabklingkurve $r(t)$ (grüne Linie) und die entsprechende monoexponentielle Anpassung nach Gl. 2.9 (schwarze Linie). Für die Rotationszeit des freien Farbstoffes wurde ein Wert von $\phi = 0,8 \text{ ns}$ ermittelt.

In einer Lösung von biotinyliertem Farbstoff und einem zehnfachen Überschuss an Streptavidin kann angenommen werden, dass alle Farbstoffmoleküle an das Protein gebunden sind⁴. In diesem Fall wird erwartet, dass die Farbstoffe nicht mehr frei in Lösung diffundieren und folglich in der Anisotropieabklingkurve $r(t)$ nur die Rotationskomponenten des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes auftreten.

DY-635B In Abb. 4.19 ist der Verlauf der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie für an Streptavidin gebundene DY-635B-Moleküle in An- und Abwesenheit von unmarkiertem Biotin dargestellt. Für beide Lösungen nimmt bei Zeiten oberhalb von $t > 2 \text{ ns}$ die Anisotropie $r(t)$ im Vergleich zum freien Farbstoff mit einer langsameren Rotationszeit ab. Dieses Zeitverhalten kann der Rotation des gesamten Farbstoff-Protein-Komplexes zugeordnet werden. In Abwesenheit von unmarkiertem Biotin (Kurve (a)) kommt es zunächst zu einem schnellen zeitlichen Abfall der Fluoreszenzanisotropie, wobei die Zeitskala der Rotationszeit der freien Farbstoffmoleküle entspricht. Diese zusätzliche kurze Rotationszeit kann dabei zwei Ursachen haben: (1) die Anwesenheit von ungebundenen Farbstoffmolekülen, z.B. (nichtbiotinylierte) Farbstoffe als Carbonsäureform, die frei in Lösung rotieren können, (2) eine Rotation der an Streptavidin gebundenen Farbstoffe. Je nach Ursprung des Abklingverhaltens müssen unterschiedliche Anisotropiemodelle bei der Anpassung verwendet werden. Die beiden Fälle sind in Abb. 4.20 schematisch dargestellt.

Im Fall 1 befinden sich die Farbstoffe in verschiedenen Mikroumgebungen (Streptavidin-

⁴Bei einer Bindungskonstante von $K_a = 10^{13} \text{ L/mol}$ und den verwendeten Konzentrationen sind mehr als 99,9999% der Farbstoffmoleküle gebunden ($c(\text{DY-635B}) = 4,3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $c(\text{Streptavidin}) = 4,3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$).

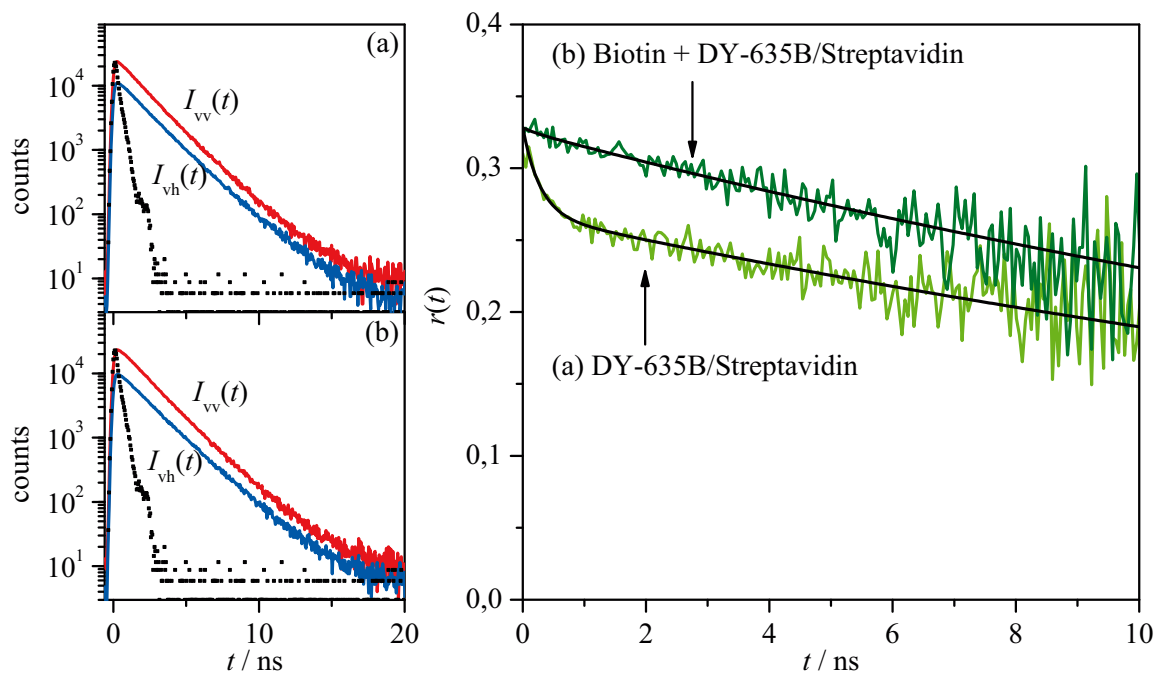


Abb. 4.19: Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen von Streptavidin-gebundenem DY-635B in PBS-Puffer bei pH 7,4 ($c(\text{DY-635B}) = 4,3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $n(\text{DY-635B}) = 0,9 \text{ nmol}$, $n(\text{Streptavidin}) = 9 \text{ nmol}$) in PBS-Puffer (a) und nach Zusatz von unmarkiertem Biotin ($n(\text{Biotin}) = 31 \text{ nmol}$) (b). [links] Fluoreszenzabklingkurven (G-faktor-korrigiert): $I_{vv}(t)$ (rote Linien) und $I_{vh}(t)$ (blaue Linien). Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 635 \text{ nm}$ (Instrumentenfunktion Weißlichtlaser: schwarze Punkte). Fluoreszenzemission: $\lambda_{\text{Em}} = 670 \text{ nm}$. [rechts] Anisotropieabklingkurven $r(t)$ und die entsprechenden Anpassungen (schwarze Linie). Die experimentellen Daten wurden global mit Gl. 2.13 ausgewertet.

gebundene und freie Farbstoffe in Lösung). Hierbei wird das einfache assoziative Anisotropiemodell zur Auswertung verwendet (Gl. 2.15), wobei hier vereinfacht angenommen werden soll, dass keine segmentweise Eigenrotation des Farbstoffes am Protein auftritt (Abb. 4.20, [links]). Für den zweiten Fall wird nur eine Mikroumgebung betrachtet (Farbstoff-Streptavidin-Komplex), jedoch muss zur Gesamtrotation mit einer Rotationszeit ϕ_M zusätzlich die segmentweise Rotation ϕ_{seg} des gebundenen Farbstoffes berücksichtigt werden (Gl. 2.13, Abb. 4.20, [rechts]).

Werden die übrigen Bindungsstellen im Streptavidin durch unmarkiertes Biotin blockiert, verändert sich der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes signifikant (Abb. 4.19, Kurve (b)). Dabei zeigt $r(t)$ ein monoexponentielles Abklingverhalten mit einer langen Rotationszeit, welche der Gesamtrotation des Farbstoff-Protein-Komplexes ϕ_M zugeordnet wurde. Da in Anwesenheit von unmarkiertem Biotin die schnelle Rotationskomponente in der Anisotropieabklingkurve $r(t)$ nicht mehr vorhanden ist, kann diese nicht ungebundenen Farbstoffmolekülen zugeordnet werden (Fall 1), sondern entspringt einer gehinderten Rotationsbewegung der Streptavidin-gebundenen Farbstoff-

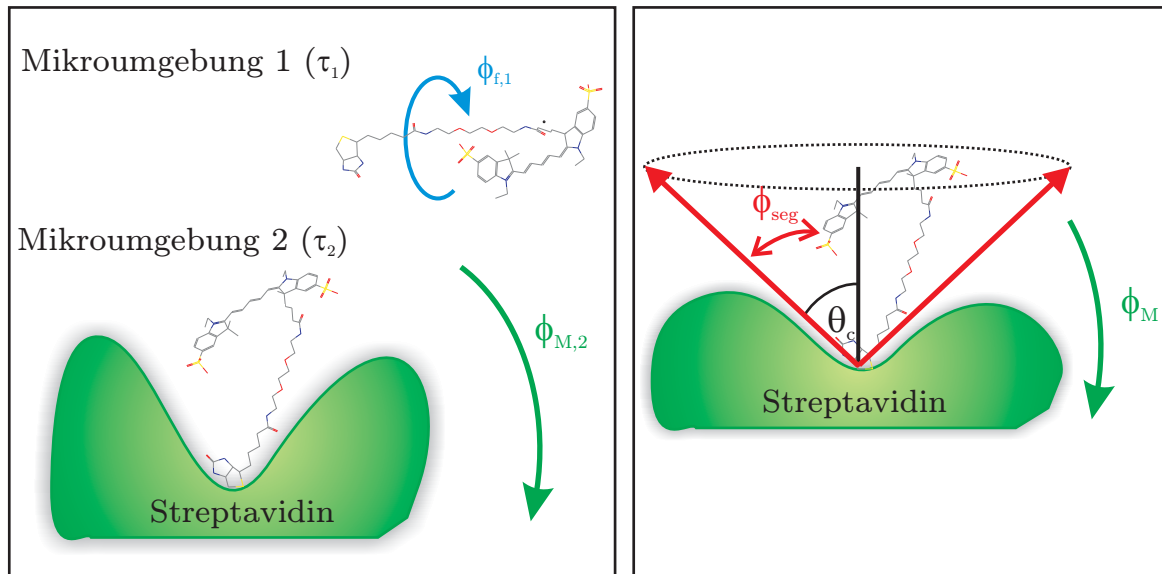


Abb. 4.20: Schematische Darstellung zur Beschreibung der Fluoreszenzanisotropie eines an Streptavidin gebundenen Farbstoffmoleküls (hier: DY-647B). Bei der Betrachtung der Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ können zwei verschiedene Fälle unterschieden werden [links] Es sind nicht alle Farbstoffmoleküle an das Streptavidintetramer gebunden (Fall 1, siehe Text). In Mikroumgebung 1: Rotation von ungebundenen Farbstoffmolekülen $\phi_{f,1}$. In Mikroumgebung 2: die Gesamtrotation des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes $\phi_{M,2}$ [rechts] Alle Farbstoffmoleküle sind an Streptavidin gebunden und können mit einer Rotationskorrelationszeit ϕ_{seg} um ihren Abstandshalter rotieren (Fall 2). Dabei wird von einer gehinderten Rotation des Farbstoffes ausgegangen („Wackelbewegung“), dessen Grenzfall eine ungehinderte Rotation ist ($\phi_c \geq 90^\circ$). ϕ_M : Gesamtrotation des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes.

fe (Fall 2). Sowohl für DY-635B als auch für DY-647B wurden zusätzlich in einem Kontroll-experiment eventuell vorhandene freie Farbstoffmoleküle mittels Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Die gereinigte Lösung enthielt ausschließlich Streptavidin-gebundene Farbstoffmoleküle. Für beide Farbstoffe wurde nach Reinigung der Lösung keine Veränderung im Anisotropieabklingverhalten der Farbstoff-Streptavidin-Komplexe beobachtet, was die Annahme stützt, dass alle Farbstoffe an Streptavidin gebunden sind (vgl. Abb. A.16, A.17). Zur Auswertung von $r(t)$ wurde daher das Anisotropiemodell der segmentweisen Rotation verwendet (Abb. 4.20 [rechts], Gl. 2.13).

DY-647B Wird der Farbstoff DY-647B an Streptavidin gebunden, nimmt die Anisotropie $r(t)$ ebenfalls nicht monoexponentiell ab, sondern muss mit zwei Rotationszeiten angepasst werden (Abb. 4.21). Im Gegensatz zu DY-635B hat die Zugabe von unmarkiertem Biotin einen geringen Einfluss auf die Anisotropieabklingkurve $r(t)$ von DY-647B.

Anisotropiemodell: segmentweise Rotation Die in Abb. 4.19 und 4.21 dargestellten Anisotropieabklingkurven wurden für die Streptavidin-gebundenen Farbstoffe in An- und Ab-

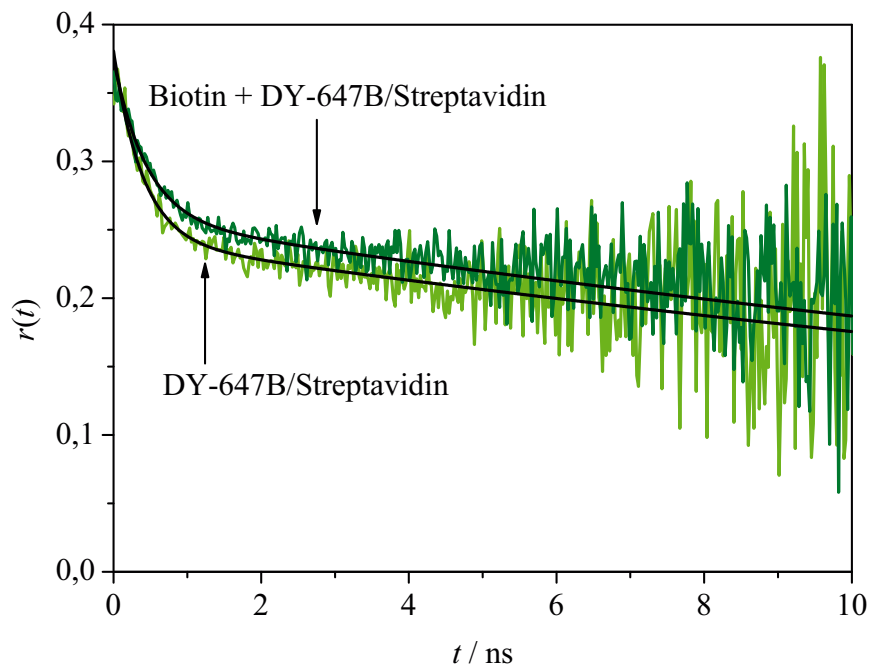


Abb. 4.21: Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen von Streptavidin-gebundenem DY-647B in PBS-Puffer pH 7,4 ($c(\text{DY-647B}) = 3 \times 10^{-7}$ mol/L, $n(\text{DY-647B}) = 0,6$ nmol, $n(\text{Streptavidin}) = 6$ nmol) ohne Biotin und nach Zusatz von reinem Biotin (19 nmol). Dargestellt sind die Fluoreszenzanisotropieabklingkurven $r(t)$ und die entsprechenden Anpassungen (schwarze Linie). Die experimentellen Daten wurden global mit Gl. 2.13 ausgewertet. Fluoreszenzangregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 635$ nm. Fluoreszenzemission: $\lambda_{\text{Em}} = 670$ nm.

wesenheit von unmarkiertem Biotin global nach Gl. 2.13 angepasst. Die Rotationszeit des Farbstoff-Protein-Komplexes ϕ_M wurde dabei als globaler Parameter verwendet. Die angepassten Anisotropieparameter sind in Tab. 4.6 zusammengefasst. Für die gehinderte Rotationsbewegung der gebundenen Farbstoffe DY-635B und DY-647B wurde in Abwesenheit von Biotin eine Rotationszeit von $\phi_{\text{seg}} = 0,3$ ns bzw. $0,4$ ns ermittelt. Ähnliche Werte wurden bereits für andere Streptavidin-gebundene Farbstoffe gefunden [20, 22].

Für den Ordnungsparameter A_∞ , einem Maß für die Rotationshinderung, wurde für DY-635B ein Wert von $0,82$ bestimmt. In Hinblick auf das *wobble-in-a-cone*-Modell ist die Rotation der gebundenen Farbstoffmoleküle damit auf einen Kegel mit einem Winkel von $\theta_c = 20^\circ$ beschränkt. Der Farbstoff DY-647B kann nach der Kopplung an Streptavidin noch um einen Winkel von 31° rotieren.

Nach Absättigung der freien Bindungsstellen mit Biotin ist die Rotation von gebundenem DY-635B soweit eingeschränkt, dass nur noch die Gesamtrotation des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes beobachtet wird ($\phi_M = 29$ ns). Der Ordnungsparameter erreicht einen Wert von nahezu eins und die Anisotropieabklingkurve $r(t)$ kann durch einen monoexponentiellen Verlauf angepasst werden. Dieses Verhalten deutet auf eine zusätzliche sterische Hinderung der gebundenen Farbstoffmoleküle hin und kann auf Konformationsänderungen im Streptavidin

Tab. 4.6: Anisotropieparameter^a der zeitaufgelösten Anisotropiemessungen von Streptavidin-gebundenem DY-635B und DY-647B in Ab- und Anwesenheit von unmarkiertem Biotin in PBS-Puffer (pH 7,4) bei 298 K. Die Fluoreszenzabklingzeit τ beträgt für die Streptavidin-gebundenen Farbstoffe 2,2 ns für DY-635B (94%) und 1,7 ns für DY-647B (86%; vgl. Abschn. 4.2.2)

Farbstoff-Lösung	ϕ_M / ns	ϕ_{seg} / ns	A_∞	$\theta_c / ^\circ$
DY-635B/Streptavidin	29 ± 2	$0,3 \pm 0,1$	$0,82 \pm 0,01$	20 ± 1
Biotin + DY-635B/Streptavidin	29 ± 2	$(0,3 \pm 0,1)$	$0,99 \pm 0,01$	5 ± 5
DY-647B/Streptavidin	31 ± 8	$0,4 \pm 0,1$	$0,64 \pm 0,01$	31 ± 1
Biotin + DY-647B/Streptavidin	31 ± 8	$0,5 \pm 0,1$	$0,67 \pm 0,01$	29 ± 1

^a Rotationskorrelationszeit des Farbstoff-Protein-Komplexes ϕ_M (globaler Parameter) und für die segmentweise Rotation des Farbstoffes ϕ_{seg} . Der Faktor A_∞ beschreibt das Ausmaß der Rotationshinderung des Farbstoffes und θ_c ist der zugehörige halbe Öffnungswinkel des Kegels (Gl. 2.12).

bei der Bindung von Biotin zurückzuführen sein, da der Biotin-Streptavidin-Komplex im Vergleich zum apo-Streptavidin eine kompaktere Form aufweist (Abschn. 2.2.2).

Werden beim Farbstoff-Streptavidin-Komplex von DY-647B die freien Bindungsstellen blockiert, ändert sich der Verlauf der Fluoreszenzanisotropieabklingkurve $r(t)$ minimal. Der Winkel θ_c bleibt nahezu konstant. Das Ausmaß der Rotationshinderung durch die Änderung der Proteinkonformation ist für diesen Farbstoff nicht so stark ausgeprägt wie für DY-635B und deutet darauf hin, dass es zu weniger starken Wechselwirkungen zwischen DY-647B und Streptavidin kommt. Ursache dafür kann die unterschiedliche Struktur bzw. Geometrie der beiden Farbstoffe sein. Bspw. enthält DY-647B zwei Sulfonsäuregruppen, die zu elektrostatischer Abstoßung führen können.

Vergleich mit den Ergebnissen der FCS Anhand von Gl. 2.10 und der Rotationszeit von $\phi_M = 29$ ns ergibt sich für den hydrodynamischen Radius des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes ein Wert von $R_h = (3,2 \pm 0,2)$ nm. Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit dem mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bestimmten Wert ($R_h = (2,5 \pm 0,2)$ nm; vgl. Abschn. 4.2.2).

Die Einschränkung der Beweglichkeit von Streptavidin-gebundenem DY-635B bei der Absättigung der benachbarten Bindungsstellen im Streptavidintetramer führte zu keiner Änderung der Korrelationsfunktion $G(\tau)$ im FCS-Experiment (vgl. Abschn. 4.2.2). Daher ist es wahrscheinlicher, dass die Korrelationszeit τ_R im μs -Zeitbereich der Korrelationsfunktion auf einen Übergang in den Triplett-Zustand zurückzuführen ist (als auf eine photoinduzierte cis-trans-Isomerisierung).

Abschätzung der Rotationskorrelationszeit von Streptavidin Um die Rotationszeit von Streptavidin theoretisch abzuschätzen, wird von einer kugelförmigen Geometrie des Proteins

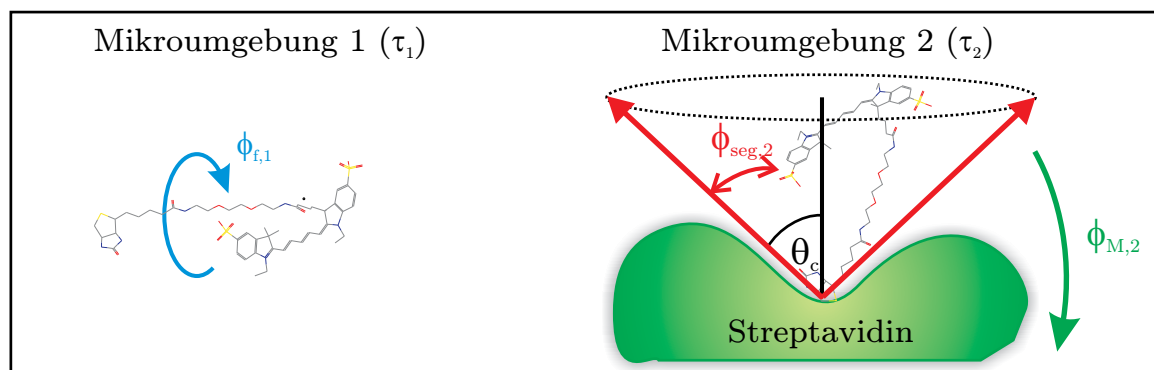


Abb. 4.22: Schematische Darstellung zur Beschreibung der Fluoreszenzanisotropie von Streptavidin-gebundenen Farbstoffmolekülen (hier: DY-647B) bei einem Überschuss an biotinyliertem Farbstoff, so dass nicht alle Farbstoffmoleküle an Streptavidin gebunden sind. In Mikroumgebung 1: Rotation von ungebundenen Farbstoffmolekülen $\phi_{f,1}$. In Mikroumgebung 2: die Gesamtrotation des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes $\phi_{M,2}$ segmentweise Rotation des Farbstoffes um seinen Abstandshalter („Wackelbewegung“): $\phi_{seg,2}$

ausgegangen und Gl. 4.13 verwendet [69, S. 367][118]:

$$\phi_M = \frac{\eta M}{RT}(\bar{v} + h) \quad (4.13)$$

Hierbei stellen \bar{v} und h Hydratationseigenschaften des Proteins dar. Werden hierfür typische Werte für Proteine (spezifisches Volumen des Proteins $\bar{v} = 0,71$ mL/g und Hydratation $h = 0,23$ mL/g [69, S. 367]) eingesetzt, ergibt sich bei einer Temperatur von 298 K, einer dynamischen Viskosität⁵ von $\eta_{298K} = 0,89$ mPa·s für Streptavidin mit der molaren Masse von $M_r \approx 52.800$ g/mol eine Rotationskorrelationszeit von $\phi_M = 19$ ns. Unter Berücksichtigung, dass die verwendeten Hydratationseigenschaften lediglich Näherungswerte sind, stimmen die experimentell ermittelten Werte von 29 ± 2 ns bzw. 31 ± 8 ns (vgl. Tab. 4.6) relativ gut mit dem erwarteten Wert überein. Beschränkt durch die Fluoreszenzabklingzeit τ der Streptavidin-gebundenen Farbstoffe (2,2 ns bzw. 1,7 ns) ist der Zeitbereich für die Anisotropiemessung nicht ausreichend groß genug, um die lange Rotationszeit des Proteins exakt zu bestimmen.

Mischungen aus freiem und Streptavidin-gebundenen Farbstoff

Bei den bisherigen Untersuchungen wurden Systeme betrachtet, in denen die Farbstoffe jeweils nur in einer Mikroumgebung (frei oder gebunden) vorliegen. Abb. 4.23 zeigt den Verlauf der zeitaufgelösten Anisotropie $r(t)$ von DY-635B und DY-647B bei verschiedenen Streptavidin/Farbstoff-Verhältnissen. Bei einem Überschuss an Streptavidin sind alle biotinylierten Farbstoffmoleküle an das Protein gebunden und Anisotropieabklingkurve $r(t)$ konnte mit einem einfachen Modell der segmentweisen Rotation (Gl. 2.13) angepasst werden.

⁵Für das Lösungsmittel Wasser.

Wird jedoch ein Überschuss an biotinyliertem Farbstoff verwendet, sind nicht alle Farbstoffe an das Protein gebunden. Bis zu einem Streptavidin/Farbstoff-Verhältnis von 0,25 liegen in Lösung sowohl gebundene als auch ungebundene Farbstoffmoleküle vor und sind daher in unterschiedlichen Mikroumgebungen lokalisiert (vgl. Abb. 4.22). Je nach Umgebung weisen die Farbstoffe charakteristischen Rotations- und Fluoreszenzabklingzeiten auf. Die „Mikroumgebung 1“ bezeichnet dabei freie, ungebundene Farbstoffmoleküle in Lösung mit einer Fluoreszenzabklingzeit τ_1 und Rotationskorrelationszeit $\phi_{f,1}$. Sind die Farbstoffe an Streptavidin gebunden („Mikroumgebung 2“), müssen zwei Rotationszeiten berücksichtigt werden: die segmentweise (gehinderte) Rotation der Farbstoffe mit $\phi_{seg,2}$ und die Gesamtrotation des Farbstoff-Streptavidin-Komplexes mit $\phi_{M,2}$.

Bei kurzen Zeiten nimmt die Anisotropie zunächst mit einer kurzen Rotationszeit ab, was auf die Bewegung der gebundenen Farbstoffe ($\phi_{seg,2}$) bzw. der ungebundenen Farbstoffe in Lösung ($\phi_{f,1}$) zurückzuführen ist. Für Streptavidin/Farbstoff-Verhältnisse $\leq 0,25$ wird nach 2 ns (nach Anregungspuls) ein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ beobachtet. Dieses Verhalten bei längeren Zeiten ist mit der Rotation der Farbstoff-Streptavidin-Komplexe ($\phi_{M,2}$) verknüpft, die deutlich langsamer rotieren.

Assoziatives Anisotropiemodell Im Gegensatz zu den reinen Farbstoffen (vgl. Abb. 4.19 und A.15) können die Anisotropieabklingkurven $r(t)$ von Mischungen bestehend aus gebundenem und freiem Farbstoff nicht mehr durch einen exponentiellen Verlauf beschrieben werden. Stattdessen kann hierbei das *assoziative Anisotropiemodell* in Verbindung mit einer gehinderten Rotation des gebundenen Farbstoffes eingesetzt werden (Gl. 2.16). Unter Verwendung einer globalen Analyse wurden die Anisotropie- und Fluoreszenzabklingkurven $r(t)$ und $I(t)$ für alle Streptavidin/Farbstoff-Verhältnisse gleichzeitig angepasst und sowohl die Rotationszeiten ($\phi_{f,1}$, $\phi_{seg,2}$, $\phi_{M,1}$) als auch die Fluoreszenzabklingzeiten (τ_1 , τ_2) als globale Parameter festgelegt (Tab. A.1). Die entsprechenden angepassten Kurven für einige Farbstoff/Streptavidin-Mischungen sind in Abb. 4.23 für DY-635B und DY-647B dargestellt. Der komplexe zeitliche Verlauf der Anisotropie $r(t)$, der bei einem Überschuss an biotinyliertem Farbstoff auftritt, soll im Folgenden am Beispiel von DY-635B bei einem Streptavidin/Farbstoff-Verhältnis von 0,1 erläutert werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzabklingzeiten τ_i des Farbstoffes in den beiden Mikroumgebungen muss in der Auswertung der Anisotropieabklingkurve $r(t)$ der Anteil $f_i(t)$ der Komponente i an der Gesamtintensität zum Zeitpunkt t berücksichtigt werden [69, S. 393]:

$$f_i(t) = \frac{\alpha_i \exp(-t/\tau_i)}{\alpha_1 \exp(-t/\tau_1) + \alpha_2 \exp(-t/\tau_2)} \quad (4.14)$$

Abb. 4.24 zeigt die biexponentielle Fluoreszenzabklingkurve [links] und die daraus ermittelten zeitabhängigen Anteile an der Fluoreszenz $f_i(t)$ [rechts]. Aufgrund der kurzen Abklingzeit des freien Farbstoffes ($\tau_1 = 0,9$ ns) nimmt der Anteil $f_1(t)$ nach wenigen ns ab, während der

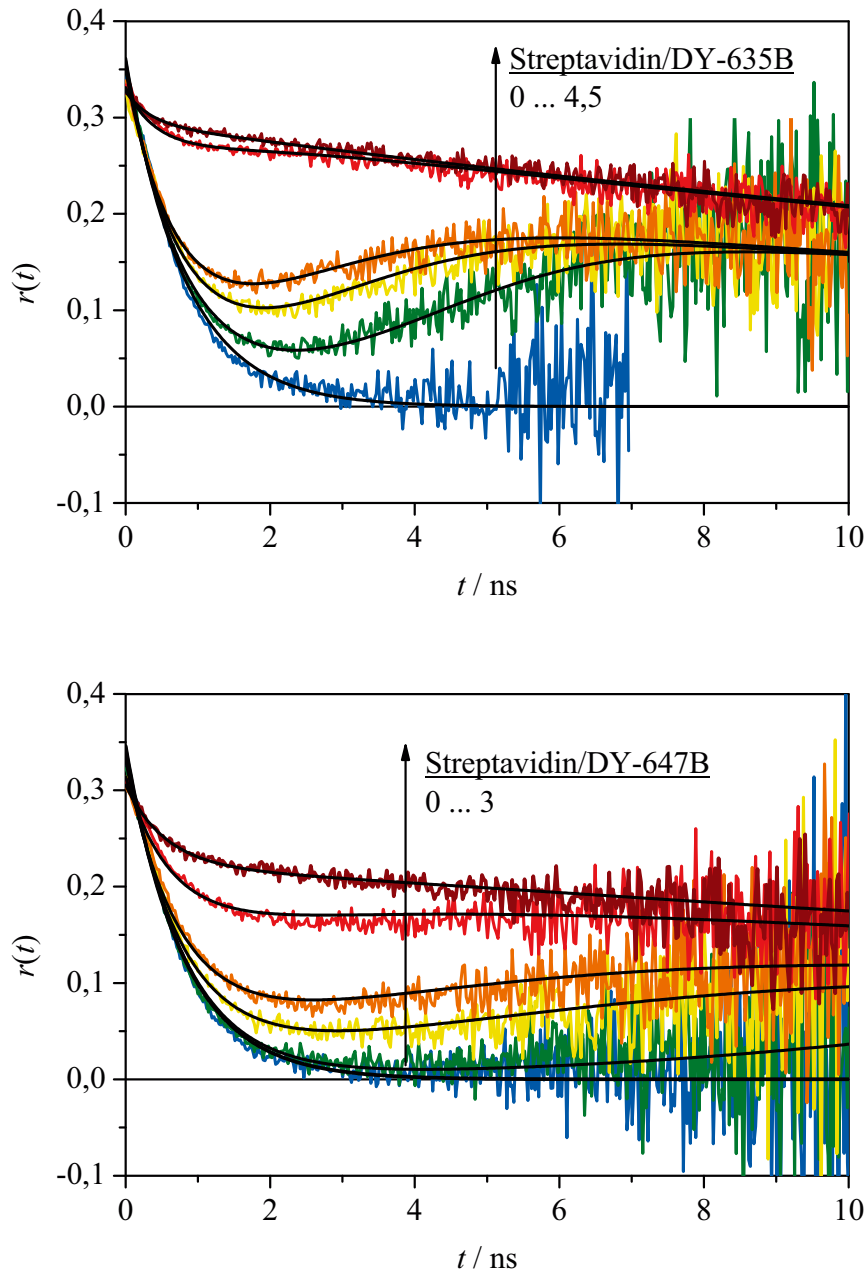


Abb. 4.23: Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessung von DY-635B (oben) und DY-647B (unten) in PBS-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Streptavidin-Konzentrationen ($c(\text{DY-635}) = 1,3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, $c(\text{DY-647}) = 2,3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) und die entsprechende globale Anpassung nach Gl. 2.16. Verwendete Streptavidin/DY-635B-Verhältnisse: 0; 0,10; 0,18; 0,23; 0,30; 4,5 (oben), Streptavidin/DY-647B-Verhältnisse: 0; 0,08; 0,16; 0,20; 0,27; 3,0 (unten). Für DY-635B wurden die Fluoreszenzabklingzeiten ($\tau_1 = 0,9 \text{ ns}$, $\tau_2 = 2,2 \text{ ns}$) verwendet und die Parameter $\phi_{f,1} = 0,8 \text{ ns}$, $\phi_{\text{seg},2} = 0,3 \text{ ns}$ und $\phi_{M,2} = 29 \text{ ns}$ global bestimmt. DY-647B: $\phi_{f,1} = 0,8 \text{ ns}$, $\phi_{\text{seg},2} = 0,5 \text{ ns}$, $\phi_{M,2} = 32 \text{ ns}$ (globale Parameter). $\tau_1 = 1,1 \text{ ns}$, $\tau_2 = 1,7 \text{ ns}$ (Tab. A.1). Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 635 \text{ nm}$ (Laserdiode). Fluoreszenzemission: $\lambda_{\text{Em}} = 670 \text{ nm}$.

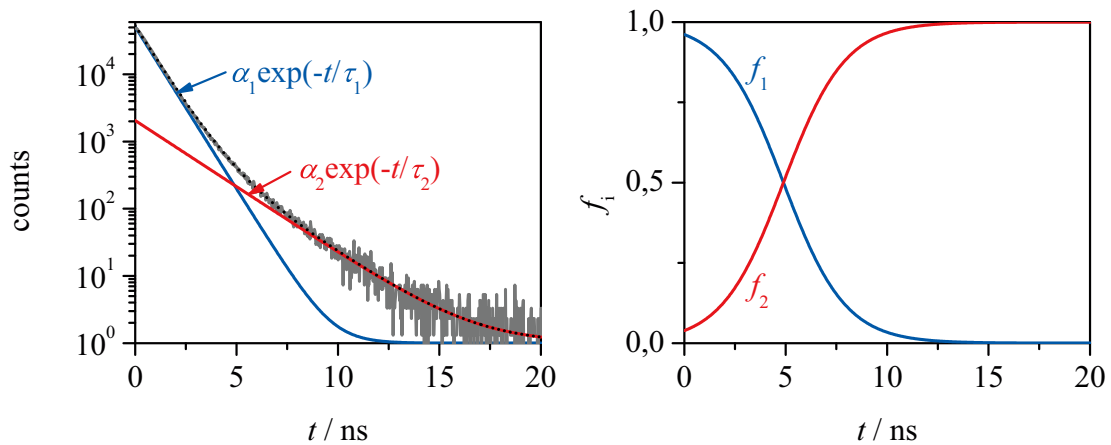


Abb. 4.24: [links] Fluoreszenzabklingkurve $I(t)$ von DY-635B in Anwesenheit von Streptavidin (10facher Überschuss an Farbstoff) und die entsprechende biexponentielle Anpassung (schwarze Linie). Die Fluoreszenzabklingzeiten $\tau_1 = 0,9 \text{ ns}$ und $\tau_2 = 2,2 \text{ ns}$ können der freien (Komponente 1) bzw. der Streptavidin-gebundenen Form (Komponente 2) zugeordnet werden. [rechts] zeitabhängiger Anteil $f_i(t)$ der Komponenten 1 und 2 an der Gesamtintensität.

Anteil $f_2(t)$ der gebundenen Form ansteigt. Da die längere Fluoreszenzabklingzeit τ_2 mit der langsameren Rotation des Farbstoff/Streptavidin-Komplexes assoziiert ist, tritt im zeitlichen Verlauf der Anisotropie $r(t)$ bei langen Zeiten zunächst ein Anstieg auf (Abb. 4.23).

Unter der Annahme, dass in einer Mischung aus Fluorophoren, die sich in zwei verschiedenen Mikroumgebungen befinden, jede Fluoreszenzabklingzeit τ_i mit einer Rotationskorrelationszeit ϕ_i assoziiert ist (vgl. Abschn. 2.3.3), ist die Fluoreszenzanisotropie die Summe aus den intensitätsgewichteten Anteilen der Anisotropie beider Komponenten [69, S. 393 u. 413]:

$$r(t) = f_1(t)r_1(t) + f_2(t)r_2(t) \quad (4.15)$$

Abb. 4.25 [links] zeigt die gemessenen Anisotropieabklingkurven jeweils für die einzelnen Komponenten (ungebundene und Streptavidin-gebundene DY-635B-Moleküle) und die entsprechenden Anpassungen (vgl. Tab. 4.6). Für die Streptavidin-gebundenen Farbstoffe wurde ein zehnfacher Überschuss an Streptavidin verwendet, um sicherzustellen, dass alle Farbstoffmoleküle an Streptavidin gebunden sind.

In Abb. 4.25 [rechts] sind die Anisotropieabklingkurve einer Mischung aus ungebundenen und gebundenen Farbstoffmolekülen bei einem Farbstoff/Streptavidin-Verhältnis von 0,1 dargestellt. Um den komplexen Verlauf dieser Abklingkurve anzupassen, wurden die zeitabhängigen Anteile $f_i(t)$ der beiden Komponenten an der Gesamtintensität, welche aus den Fluoreszenzabklingkurven der Mischung erhalten wurden (Abb. 4.24), mit den Anisotropieabklingkurven $r_i(t)$ der einzelnen Komponenten multipliziert. Die damit berechneten intensi-

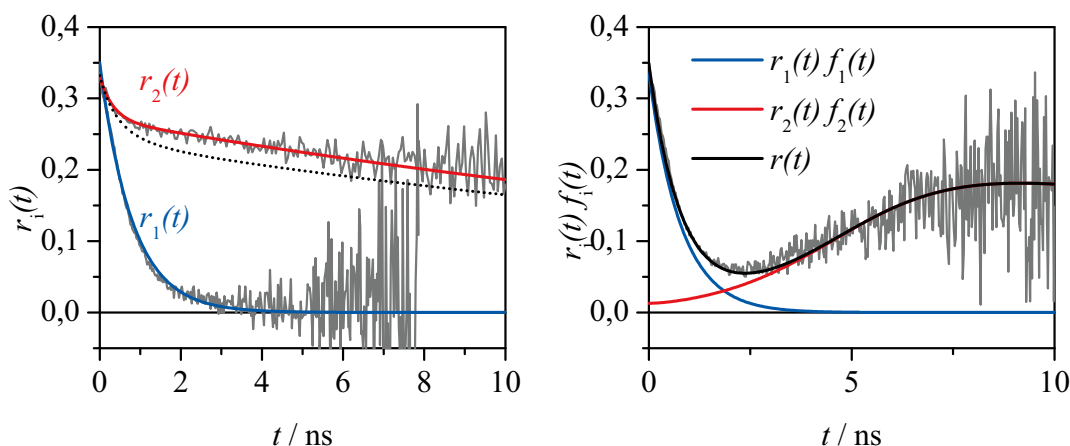


Abb. 4.25: [links] gemessene Anisotropieabklingkurven (graue Linien) von freiem ($r_1(t)$) und Streptavidin-gebundenem DY-635B ($r_2(t)$) und deren Anpassung (vgl. Tab. 4.6). Freier Farbstoff: monoexponentielle Anpassung nach Gl. 2.9 (blaue Linie, $\phi_{f,1} = 0,8$ ns). Streptavidin/Farbstoff-Komplex: gehinderte segmentweise Rotation des Farbstoffes nach Gl. 2.13 (rote Linie, $\phi_{M,2} = 29$ ns, $\phi_{\text{seg},2} = 0,3$ ns, $A_\infty = 0,82$ ns). Für den Fall, dass die Fluoreszenzabklingzeiten τ_i in den beiden Mikroumgebungen gleiche Werte annehmen, ist der jeweilige Anteil an der Fluoreszenz nicht zeitabhängig $f_i(t) = f_i$ und der zeitliche Abfall der Fluoreszenzanisotropie einer Mischung folgt einem biexponentiellen Verlauf (---). [rechts] gemessene Anisotropieabklingkurve (graue Linie) einer Mischung aus freiem und Streptavidin-gebundenen Farbstoff DY-635B (bei einem 10fachen Überschuss an Farbstoff). Es sind weiterhin die intensitätsgewichteten Anteile der Fluoreszenzanisotropie $f_i(t)r_i(t)$ für die einzelnen Komponenten gezeigt. Der zeitliche Verlauf der Anisotropie $r(t)$ ergibt sich aus der Summe von $f_1(t)r_1(t)$ und $f_2(t)r_2(t)$ (schwarze Linie).

tätsgewichteten Anteile der Anisotropie $f_i(t)r_i(t)$ sind in Abb. 4.25 [rechts] dargestellt (blaue und rote Linien). Werden die beiden Anteile summiert, ergibt sich unmittelbar der Verlauf der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ für die Mischung (Abb. 4.25, schwarze Linie). Befindet sich ein Fluorophor in zwei verschiedenen Mikroumgebungen, wird ein solcher nicht-exponentieller Verlauf der Anisotropie nur dann beobachtet, wenn sich die Fluoreszenzabklingzeiten τ_i für jede Umgebung unterscheiden. Für den Fall, dass die Fluoreszenzabklingzeiten τ_i in den beiden Mikroumgebungen gleiche Werte annehmen, ist der jeweilige Anteil an der Fluoreszenz nicht zeitabhängig $f_i(t) = f_i$ und der zeitliche Abfall der Fluoreszenzanisotropie folgt einem biexponentiellen Verlauf. Für die betrachtete Mischung an DY-635B und Streptavidin ist dieser hypothetische Verlauf in Abb. 4.25 [links] gezeigt (---).

4.3 Modellsystem: Mizellen

4.3.1 Charakterisierung des Modellsystems Tween20

Kritische Mizellbildungskonzentration

Zur Bestimmung der *c.m.c.* von Tween-20 in PBS-Puffer (pH 7,4) wurde in dieser Arbeit die Polaritätssonde Pyren verwendet [119, 120]. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der ersten I_1 (373 nm) und dritten Bande I_3 (384 nm) im Emissionsspektrum von Pyren geben Aufschluss über die Polarität der molekularen Umgebung des Farbstoffes [28, S. 211][119, 121, 122].

Abb. 4.26 zeigt die Fluoreszenzspektren von Pyren in PBS-Puffer und Tween-20. Das Intensitätsverhältnis I_1/I_3 der ersten und dritten Bande im Emissionsspektrum von Pyren beträgt in PBS-Puffer 1,68. Durch Zugabe von Tween-20 kommt es bei Konzentrationen oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration *c.m.c.* zu einer Verteilung des Farbstoffes zwischen wässriger und mizellarer Phase. Durch die veränderte Polarität der Farbstoffumgebung verringert sich das Intensitätsverhältnis zu einem Wert von $I_1/I_3 = 1,18$.

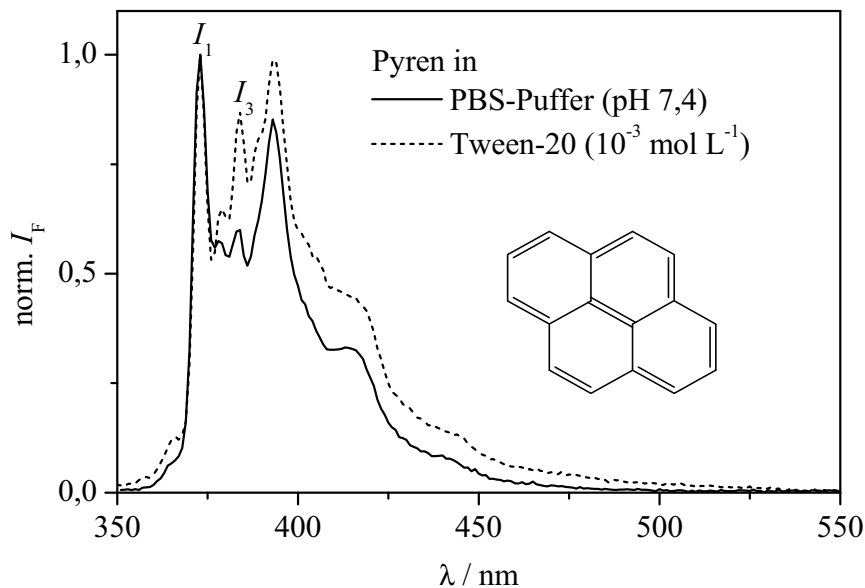


Abb. 4.26: Auf Eins normierte Fluoreszenzspektren von Pyren in Tween-20 ($c(\text{Tween-20}) = 10^{-3}$ mol/L und PBS-Puffer (pH 7,4). $c(\text{Pyren}) = 10^{-6}$ mol/L. Anregungswellenlänge: $\lambda_{\text{Ex}} = 353$ nm. Verhältnis der Fluoreszenzbanden I_1 und I_3 in PBS-Puffer: $I_1/I_3 = 1,68 \pm 0,01$, in Tween-20 (10^{-2} mol/L): $I_1/I_3 = 1,18 \pm 0,01$.

Die Auftragung des Intensitätsverhältnisses I_1/I_3 als Funktion der Tensidkonzentration konnte mit Hilfe einer sigmoidalen Funktion angepasst werden, wobei der Wendepunkt der kritischen Mizellbildungskonzentration *c.m.c.* entspricht (Abb. 4.27). Für das System Tween-20

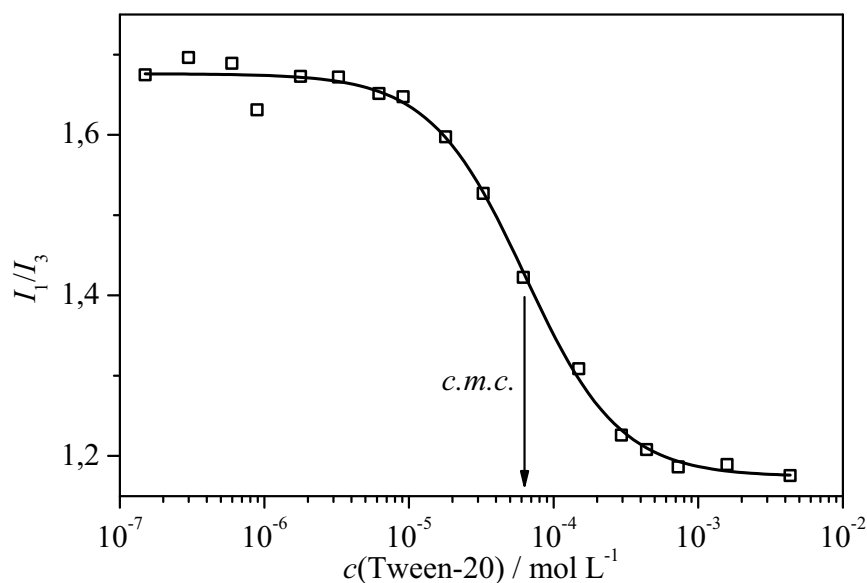


Abb. 4.27: Verhältnis der Fluoreszenzbanden I_1 und I_3 als Funktion der Tensidkonzentration ($c(\text{Tween-20})$) und die entsprechende sigmoidale Anpassung. Der Wendepunkt entspricht der kritischen Mizellbildungskonzentration $c.m.c.$. Für Tween-20 wurde eine $c.m.c.$ von $(6,3 \pm 0,5) \times 10^{-5}$ mol/L ermittelt.

in PBS-Puffer wurde für die $c.m.c.$ ein Wert von $(6,3 \pm 0,5) \times 10^{-5}$ mol/L ermittelt. Dieser Wert stimmt gut mit Literaturwerten überein, die für Tween-20 in Wasser angegeben werden ($4,9 \times 10^{-5} \dots 1,2 \times 10^{-4}$ mol/L [34, 39, 40]). Für nichtionische Tenside hat die Ionenstärke des Lösungsmittels im Allgemeinen nur einen geringen Einfluss auf $c.m.c.$ [26].

Bestimmung der Größe von Tween-20-Mizellen

Der hydrodynamische Radius R_h von Tween-20-Mizellen in PBS-Puffer (pH 7,4) wurde mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) bestimmt. Dazu wurde 9,10-Bis(phenylethynyl)anthracen (BPEA) als Fluoreszenzsonde verwendet [123] (Abb. 3.1). Der Farbstoff BPEA ist in Wasser unlöslich und lagert sich daher ausschließlich in den hydrophoben Teil der Mizelle ein. Mit einer Länge von ca. 2 nm ist das Farbstoffmolekül im Vergleich zum erwarteten Mizelldurchmesser (6 nm) klein. Eine mögliche Veränderung der mizellaren Struktur durch die Fluoreszenzsonde selbst kann daher vernachlässigt werden.

In Abb. 4.28 sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von BPEA in Cyclohexan und Tween-20-Lösung dargestellt. Die Auflösung der Schwingungsstruktur der Hauptabsorptionsbande (350–450 nm) gibt Aufschluss über die Rotation der Phenylgruppen bezüglich der Anthracen-Ebene [123, 124]. In Cyclohexan ist diese Bande breit und wenig strukturiert, da verschiedene Konformationen gleichzeitig auftreten. Im Absorptionsspektrum führt dies zu einer Überlappung der Schwingungsübergänge [123].

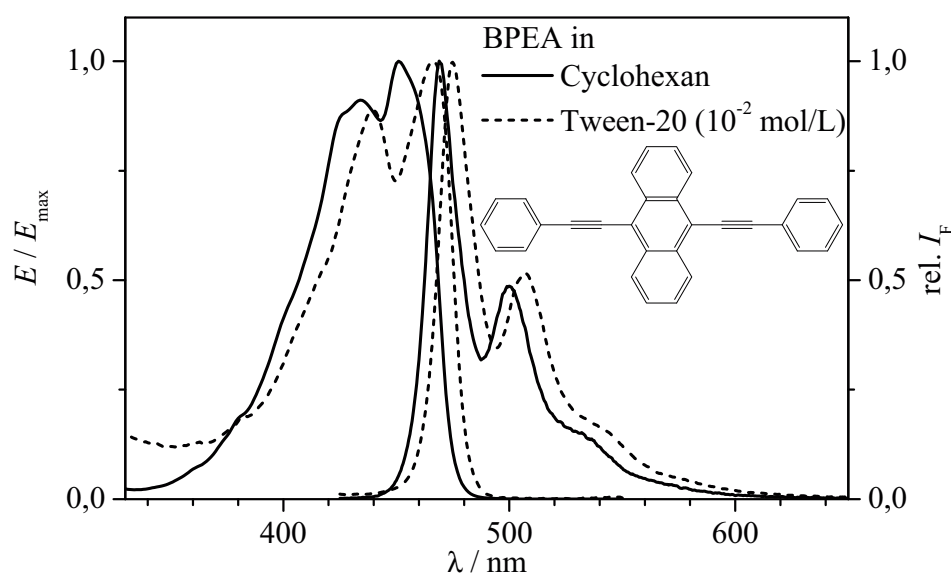


Abb. 4.28: Auf Eins normierte Absorptions- und Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{Ex}} = 410 \text{ nm}$) von BPEA in Cyclohexan und Tween-20-Mizellen (10^{-2} mol/L) in PBS-Puffer. $c(\text{BPEA}) = 2,5 \mu\text{mol/L}$.

Ist der Farbstoff in Tween-20-Mizellen eingelagert, verschiebt sich das Absorptionsmaximum bathochrom um 15 nm und zeigt eine höhere Auflösung der Schwingungsstruktur im Vergleich zum Spektrum in Cyclohexan. Dieses stärker strukturierte Absorptionsspektrum deutet darauf hin, dass der Farbstoff in Tween-20-Mizellen in nur einer Konformation auftritt. Ähnliche Ergebnisse wurden für BPEA in einem gestreckten Polyethylenfilm gefunden [123]. Dabei wird angenommen, dass der Farbstoff eine parallele Form annimmt, bei der alle aromatischen Ringe in einer Ebene liegen [124].

Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von BPEA können anhand der FCS-Messungen einer wässrigen BPEA/Tween-20-Lösung unmittelbar Aussagen über die Diffusionsbewegung der Mizellen gemacht werden. Diese Methode hat z.B. gegenüber vielen Lichtstreuexperimenten den Vorteil, dass sie nicht auf einen Konzentrationsbereich beschränkt ist, sondern insbesondere für hochverdünnte mizellare Systeme angewendet werden kann. Abb. 4.29 zeigt die normierten Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von mit BPEA markierten Tween-20-Mizellen bei verschiedenen Tensidkonzentrationen. Aufgrund der langsamen Diffusion der Mizellen nimmt im Vergleich zum Referenzfarbstoff Rhodamin 6G der Diffusionskoeffizient um einen Faktor 5 ab. Durch Anpassung nach Gl. 2.23 wurde ein Diffusionskoeffizient von $(7,7 \pm 0,9) \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ermittelt, wobei oberhalb der *c.m.c.* kein Einfluss der Tensidkonzentration festgestellt werden konnte (Tab. A.2). Dieses Ergebnis steht teilweise im Widerspruch mit Literaturdaten, wie z.B. zu den in [33] gezeigten Daten. Die Autoren hatten dabei eine Abhängigkeit der Mizellgröße von der Tensidkonzentration beschrieben.

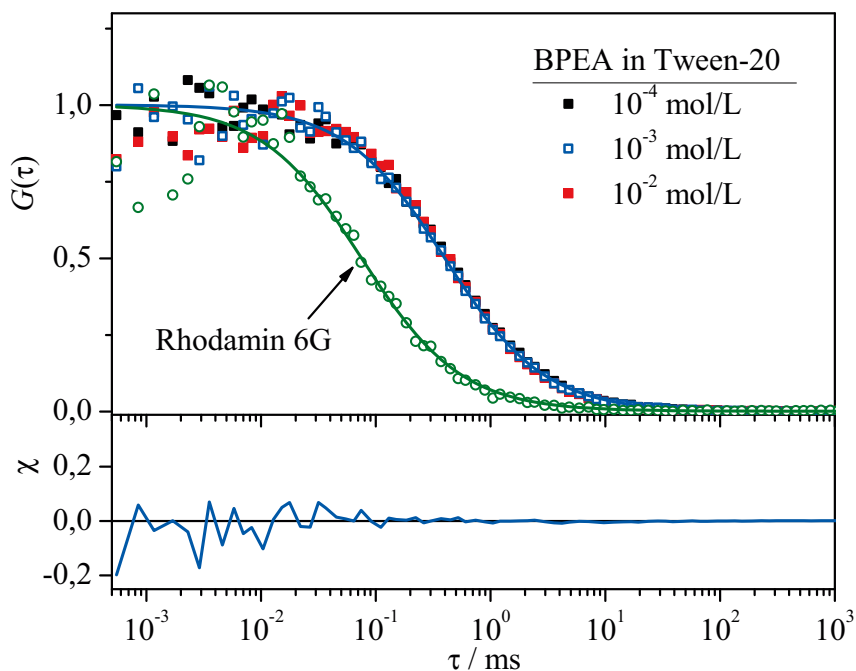


Abb. 4.29: Normierte Korrelationsfunktion $G(\tau)$ von mit BPEA markierten Tween-20-Mizellen bei unterschiedlicher Tensidkonzentration (0,1 bis 10 mmol/L) und des Referenzfarbstoffes Rhodamin 6G in Wasser. Für eine Tensidkonzentration von 1 mmol/L sind zusätzlich die Anpassung nach Gl. 2.23 und die dazugehörigen Residuen χ dargestellt.

Für den hydrodynamischen Radius R_h der Mizellen ergibt sich nach der *Stokes-Einstein*-Gleichung ein mittlerer Wert von $(2,8 \pm 0,4)$ nm (vgl. Gl. 2.25). Der ermittelte Radius stimmt sowohl mit den Werten überein, die in der Literatur für Tween-20-Mizellen in Wasser angegeben werden⁶ als auch mit den Vergleichswerten, die mittels Lichtstreuung bei einer Tween-20-Konzentration von 10^{-2} mol/L gefunden wurden (Z-gemittelter Radius: $(3,6 \pm 0,2)$ nm, Polydispersitätsindex PdI: 0,07). Anhand des hydrodynamischen Radius R_h ergibt sich nach Gl. 3.7 für die Aggregationszahl ein Wert von $N_{\text{agg}} = 35 \pm 14$, der gut mit dem Literaturwert von 31 übereinstimmt [34]. Im weiteren Verlauf wird angenommen, dass sowohl die Aggregationszahl N_{agg} als auch der hydrodynamische Radius R_h im untersuchten Tensidkonzentrationsbereich (10^{-4} ... 10^{-2} mol/L) konstant bleiben. Die Werte für die kritische Mizellbildungskonzentration und die hydrodynamischen Eigenschaften für Tween-20 in PBS-Puffer (pH 7,4) sind in Tab. 4.7 zusammengefasst.

⁶2,7 nm [34], 3,1 nm [30], 3,0 nm [125]

Tab. 4.7: Kritische Mizellbildungskonzentration *c.m.c.* und hydrodynamische Eigenschaften von Tween-20 in PBS-Puffer (pH 7,4) bei einer Temperatur von $22,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. R_h , D und N_{agg} wurden für eine Tensidkonzentration von 0,1 bis 10 mmol/L bestimmt. (vgl. Tab. A.2).

Eigenschaft	Symbol	Wert
Kritische Mizellbildungskonzentration	<i>c.m.c.</i>	$(6,3 \pm 0,5) \times 10^{-5} \text{ mol/L}$
Hydrodyn. Radius	R_h	$(2,8 \pm 0,4) \text{ nm}$
Diffusionskoeffizient	D	$(7,7 \pm 0,9) \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$
Aggregationszahl	N_{agg}	35 ± 14

4.3.2 Assoziationsgleichgewicht: Farbstoff-Mizelle

Anzahl der Farbstoffe pro Mizelle Für die Untersuchung des Assoziationsprozesses zwischen Farbstoff und Mizellen soll angenommen werden, dass sich maximal ein Farbstoffmolekül in einer Mizelle befindet. Um die benötigten Konzentrationen an Farbstoff c_F und Tensid c_{Tensid} abzuschätzen, wurde von einer Poisson-Verteilung ausgegangen. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich in einer Mizelle eine Anzahl von k Farbstoffmolekülen aufhalten, ist definiert als [126]:

$$P(k, l) = \frac{l^k e^{-l}}{k!} \text{ mit } l = \frac{c_F}{c_{\text{Mi}}} \quad (4.16)$$

Die Mizellkonzentration $c_{\text{Mi},0}$ ergibt sich aus der Tensidkonzentration c_{Tensid} , der kritischen Mizellbildungskonzentration *c.m.c.* und der Aggregationszahl N_{agg} :

$$c_{\text{Mi},0} = \frac{c_{\text{Tensid}} - c.m.c.}{N_{\text{agg}}} \quad (4.17)$$

Ausgehend von einer Farbstoffkonzentration von $c_F = 0,5 \mu\text{mol/L}$ und einer Aggregationszahl von $N_{\text{agg}} = 35$ wurden für verschiedene Tensidkonzentrationen c_{Tensid} die Wahrscheinlichkeiten $P(0)$ bzw. $P(1)$ berechnet (Abb. 4.30). Die Summe dieser Werte $P(0) + P(1)$ ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich in einer Mizelle entweder ein oder kein Farbstoffmolekül befindet. Da oberhalb einer Tensidkonzentration von 10^{-4} mol/L dieser Wert größer als 95% ist, wurde für die Auswertung der Absorptionsspektren nur der Konzentrationsbereich $c_{\text{Tensid}} \geq 10^{-4} \text{ mol/L}$ berücksichtigt.

DY-635 und DY-635B Für die Charakterisierung des Gleichgewichtes, das die Verteilung der Farbstoffe zwischen wässriger Phase und den Mizellen beschreibt, wurden die Absorptionsspektren der Farbstoffe in PBS-Puffer bei pH 7,4 in Abwesenheit von Tensid ($E_0(\lambda)$) und bei verschiedenen Konzentrationen an Tween-20 ($E(\lambda)$) gemessen. In Abb. 4.31 ist der Einfluss der Tensidkonzentrationen $c(\text{Tween-20})$ auf das Absorptionsspektrum von DY-635

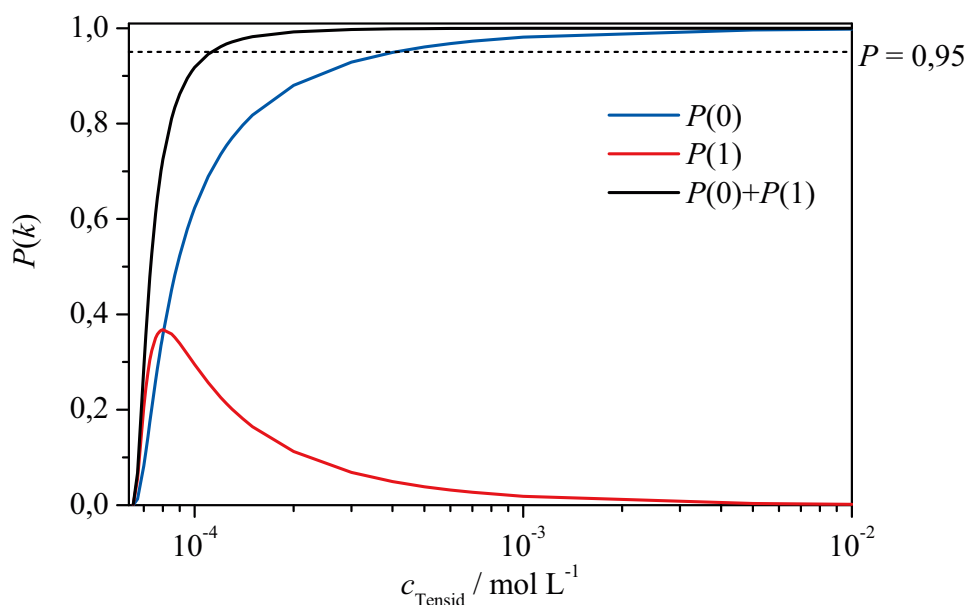


Abb. 4.30: Poisson-Verteilung für ein Gleichgewicht von Farbstoff in wässriger und mizellarer Phase. Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit $P(k)$ in Abhängigkeit der Tensidkonzentration c_{Tensid} , dass sich in einer Mizelle ein ($P(1)$ mit $k=1$) oder kein Farbstoffmolekül ($P(0)$ mit $k=0$) befindet.

gezeigt (DY-635B: vgl. 4.32). Bei Tensidkonzentrationen oberhalb der *c.m.c.* kommt es zu einer bathochromen Verschiebung der Hauptabsorptionsbande während gleichzeitig die gemessene Extinktion E_{max} zunimmt. Nach weiterer Zugabe von Tensid kommt es oberhalb einer bestimmten Tensidkonzentration zu keiner weiteren Veränderung der Absorptionsspektren. Das Auftreten eines isosbestischen Punktes bei $\lambda = 637$ nm macht deutlich, dass es sich hierbei um ein Gleichgewicht zwischen zwei verschiedenen Spezies handelt: Farbstoff in PBS-Puffer und in mizellarer Umgebung. Für den biotinylierten Farbstoff DY-635B wurde ein ähnliches Absorptionsverhalten bei Zugabe von Tween-20 beobachtet (vgl. Abb. 4.32).

Die bathochrome Verschiebung des langwelligsten Absorptionsmaximums kann auf Lösungsmittelleffekte zurückgeführt werden. So liegen die Farbstoffe im Vergleich zum PBS-Puffer in der Mizelle in einer unpolaren Mikroumgebung vor. Ähnliche Effekte sind bereits für andere Cyaninfarbstoffe beschrieben worden [36].

Um abzuschätzen, inwiefern sich die Farbstoffe in den Tween-20-Mizellen einlagern, soll zunächst das Gleichgewicht zwischen frei in Lösung diffundierendem Farbstoff (F) und der in Mizellen eingelagerten Form (FMi) untersucht werden. Der Assoziationsprozess von Farbstoff und Mizellen wird beschrieben durch:



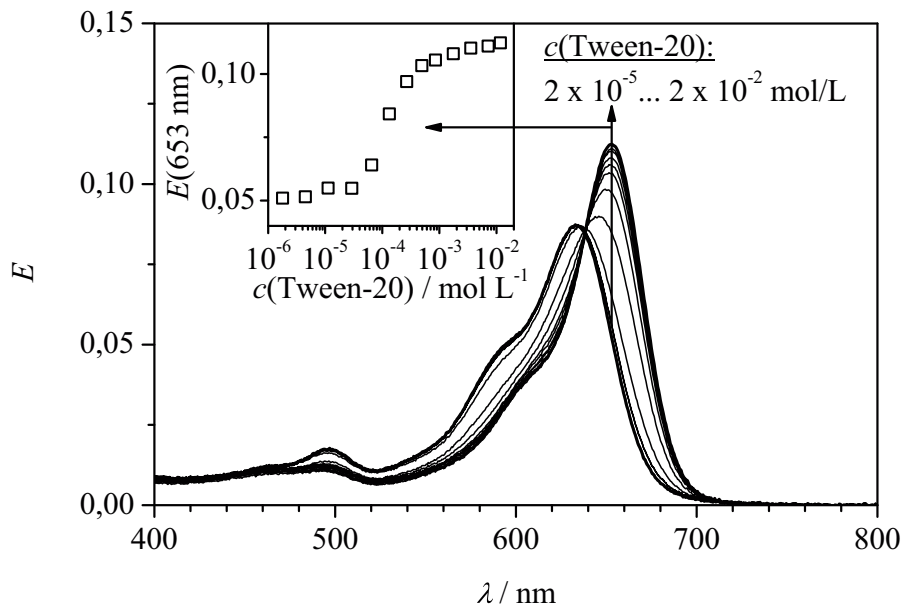


Abb. 4.31: Absorptionsspektren von DY-635 in PBS-Puffer (pH 7,4) unter der Zugabe des nichtionischen Tensids Tween-20. Oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration kommt es zu einer Verschiebung des Spektrums in den roten Spektralbereich und zu einer Zunahme der Extinktion. Die Farbstoffkonzentration lag bei $0,65 \mu\text{mol/L}$.

Es wird angenommen, dass sich maximal ein Farbstoffmolekül in einer Mizelle befindet. Die Gleichgewichtskonstante K_A für die Reaktion 4.18 ist:

$$K_A = \frac{c_{\text{FMi}}}{c_{\text{F}} \cdot c_{\text{Mi}}} = \frac{c_{\text{FMi}}}{(c_{\text{F},0} - c_{\text{FMi}})(c_{\text{Mi},0} - c_{\text{FMi}})} \quad (4.19)$$

Die Gleichgewichtskonzentration für die freien Farbstoffe c_{F} und Mizellen c_{Mi} kann jeweils anhand der eingesetzten Gesamtkonzentration $c_{\text{F},0}$ und $c_{\text{Mi},0}$ berechnet werden. Die Konzentration der Farbstoffe in den Mizellen c_{FMi} ist damit gegeben durch⁷:

$$c_{\text{FMi}} = \frac{1}{2} \left(c_{\text{F},0} + c_{\text{Mi},0} + \frac{1}{K_A} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \left(c_{\text{F},0} + c_{\text{Mi},0} + \frac{1}{K_A} \right)^2 - c_{\text{F},0} c_{\text{Mi},0}} \quad (4.20)$$

Da sich die Absorptionsspektren der Farbstoffe in wässriger von denen in mizellarer Phase unterscheiden, kann die Gleichgewichtskonstante K_A photometrisch bestimmt werden. Dazu werden die Differenzabsorptionsspektren $\Delta E(\lambda)$ verwendet, die für den Farbstoff DY-635 bei verschiedenen Tensidkonzentrationen in Abb. 4.33 dargestellt sind (DY-635B: vgl. Abb. A.18).

⁷Hierbei ist nur eine Lösung der quadratischen Gleichung dargestellt, da nur die Differenz physikalisch sinnvoll ist.

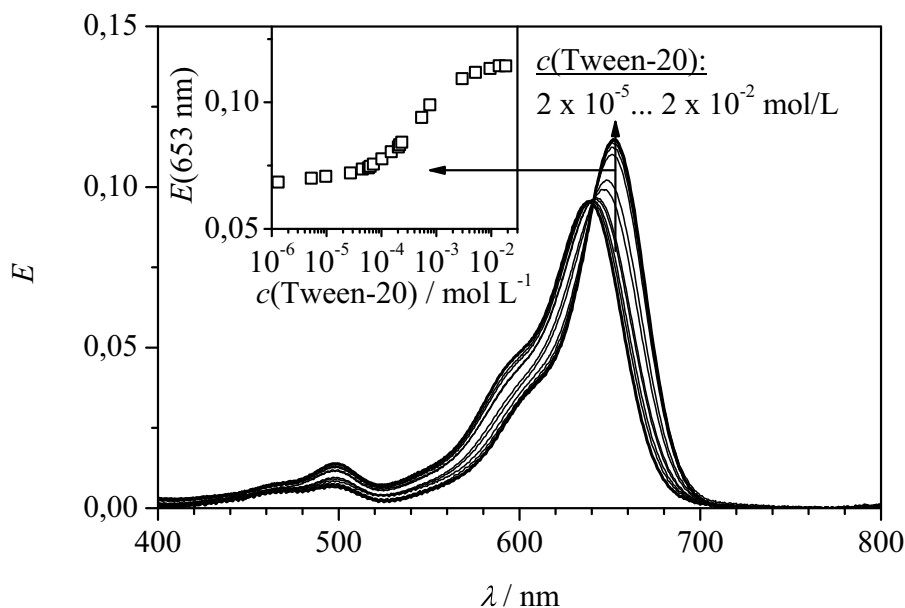


Abb. 4.32: Absorptionsspektren von DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) unter der Zugabe des nicht-ionischen Tensids Tween-20. Oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration kommt es zu einer Verschiebung des Spektrums in den roten Spektralbereich und zu einer Zunahme der Extinktion. Die Farbstoffkonzentration lag bei $0,65 \mu\text{mol/L}$.

Das Differenzspektrum $\Delta E(\lambda)$ ist die Differenz des gemessenen Spektrums $E(\lambda)$ bei einer bestimmten Tensidkonzentration und dem Ausgangsspektrum $E_0(\lambda)$ des Farbstoffes in Abwesenheit von Tensid:

$$\Delta E(\lambda) = E(\lambda) - E_0(\lambda) \quad (4.21)$$

Unter der Annahme, dass das Tensid im untersuchten Wellenlängenbereich kein Licht absorbiert, setzt sich die gemessene Extinktion $E(\lambda)$ additiv aus der Extinktion $E_F(\lambda)$ und $E_{FMi}(\lambda)$ der beiden Farbstoffspezies im Gleichgewicht zusammen und es gilt:

$$\Delta E(\lambda) = E_F(\lambda) + E_{FMi}(\lambda) - E_0(\lambda) = \epsilon_F(\lambda)c_F d + \epsilon_{FMi}(\lambda)c_{FMi}d - \epsilon_F(\lambda)c_{F,0}d \quad (4.22)$$

Hierbei sind $\epsilon_F(\lambda)$ und $\epsilon_{FMi}(\lambda)$ die jeweils die molaren Extinktionskoeffizienten der Spezies F und FMi und d die Schichtdicke. Nach Einsetzen der Konzentration $c_F = c_{F,0} - c_{FMi}$ ergibt sich:

$$\Delta E(\lambda) = (\epsilon_{FMi}(\lambda) - \epsilon_F(\lambda))c_{FMi}d \quad (4.23)$$

Mit Hilfe von Gl. 4.20 und Gl. 4.23 konnten anhand der Differenzabsorptionsspektren $\Delta E(\lambda)$ die Gleichgewichtskonstante K_A und das molare Extinktionsspektrum $\epsilon_{FMi}(\lambda)$ der Farbstoffe

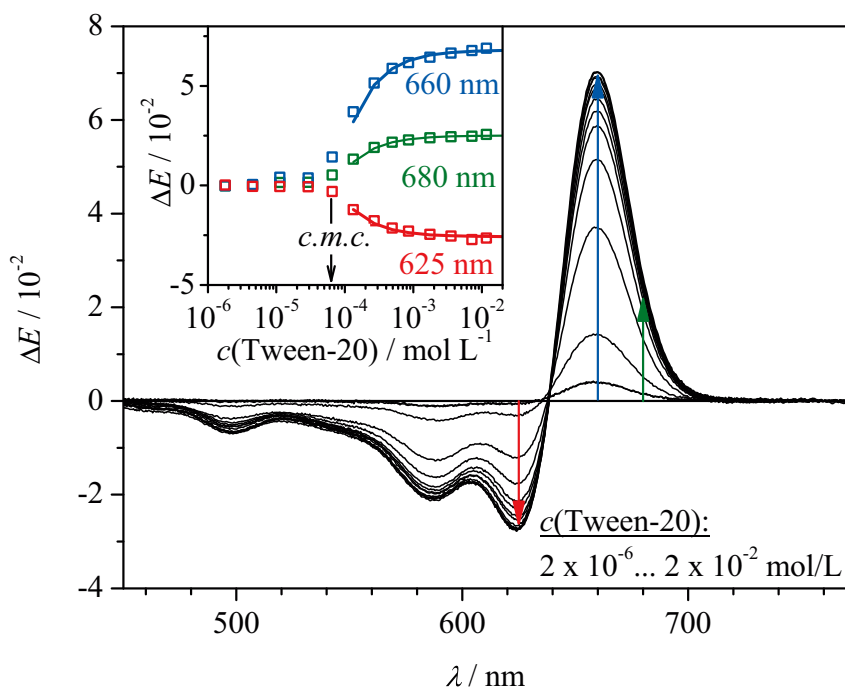


Abb. 4.33: Differenzabsorptionsspektren von DY-635 in PBS-Puffer (pH 7,4) unter der Zugabe des nichtionischen Tensids Tween-20. Die Farbstoffkonzentration lag bei 0,65 $\mu\text{mol/L}$. Inset: Werte für ΔE bei den markierten Wellenlängen und die dazugehörige Anpassung (Gl. 4.24).

in Mizellen ermittelt werden:

$$\Delta E(\lambda) = (\epsilon_{\text{FMi}}(\lambda) - \epsilon_{\text{F}}(\lambda))d \cdot \left(\frac{1}{2} \left(c_{\text{F},0} + c_{\text{Mi},0} + \frac{1}{K_{\text{A}}} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \left(c_{\text{F},0} + c_{\text{Mi},0} + \frac{1}{K_{\text{A}}} \right)^2 - c_{\text{F},0}c_{\text{Mi},0}} \right) \quad (4.24)$$

Da K_{A} unabhängig von der Absorptionswellenlänge ist, können die Spektren global für den gesamten Wellenlängenbereich (hier: 520... 700 nm) angepasst werden. Dabei wurde K_{A} global und ϵ_{FMi} bei allen Wellenlängen variabel gesetzt. Das molare Extinktionsspektrum der Farbstoffe $\epsilon_{\text{F}}(\lambda)$ in wässriger Phase wurde jeweils aus dem gemessenen Absorptionsspektrum in Abwesenheit von Tensid $E_0(\lambda)$ berechnet (Gl. 2.1). In Abb. 4.34 sind die molaren Extinktionsspektren der Farbstoffe DY-635 und DY-635B in PBS-Puffer (ϵ_{F}) und die angepassten Spektren in Tween-20-Mizellen (ϵ_{FMi}) dargestellt (vgl. Tab. 4.8). In PBS-Puffer ist das langwelligste Absorptionsmaximum für die biotinylierte Form DY-635B im Vergleich zur Carbonsäure um 7 nm bathochrom verschoben, was darauf hindeutet, dass sich die molekulare Um-

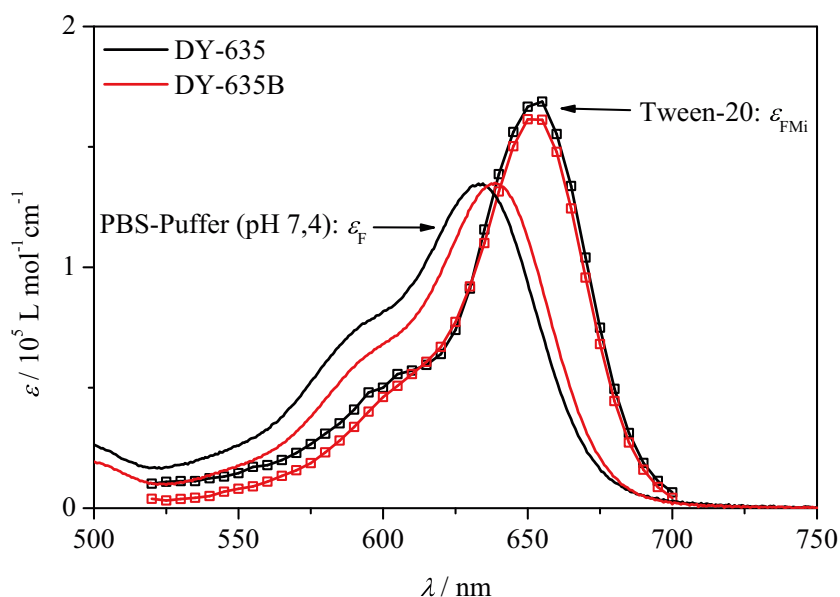


Abb. 4.34: Gemessene molare Extinktionsspektren der Farbstoffe DY-635 und DY-635B in wässriger Phase (ϵ_F) und die angepassten Spektren in Tween-20-Mizellen (ϵ_{FMi}). Die Anpassung erfolgte durch Auswertung der Differenzabsorptionsspektren nach Gl. 4.24.

gebung des Farbstoffes durch die kovalente Bindung an Biotin ändert (vgl. Abschn. 4.2.1). Im Gegensatz zu PBS-Puffer zeigen beide Farbstoffe in Tween-20-Mizellen das gleiche Absorptionsverhalten, was auf eine ähnliche molekulare Umgebung beider Farbstoffe in den Mizellen schließen lässt. Es ist möglich, dass durch den sterischen Anspruch des Abstandshalters sich die biotinylierte Form des Farbstoffes nicht vollständig im hydrophilen Teil der Mizelle einlagert, bzw. sich die Biotingruppe innerhalb der Mizelle in einer anderen molekularen Umgebung befindet als der Farbstoff (z.B. an der Mizelloberfläche in der wässrigen Phase). Für die Gleichgewichtskonstante K_A wurde für DY-635 ein Wert von $(4,9 \pm 0,7) \times 10^5$ L/mol ermittelt. Der Wert für die biotinylierte Form DY-635B ist um das 5-fache kleiner (vgl. Tab. 4.8). Da sowohl Biotin als auch der Farbstoff selbst Heteroatome enthält, ist es wahrscheinlich, dass sich der Farbstoff im hydrophilen Teil der Mizelle einlagert. Aufgrund eines sterischen Anspruch des Abstandshalters zwischen Biotin und Farbstoff könnte die Einlagerung von DY-635B behindert sein und damit den geringeren Wert von K_A verursachen.

DY-647 und DY-647B Im Gegensatz zu Farbstoffen DY-635 und der biotinylierten Form DY-635B konnte im untersuchten Konzentrationsbereich kein signifikanter Einfluss des Tensids Tween-20 auf die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe DY-647 und DY-647B festgestellt werden (Abb. A.19 u. A.20). Abb. 4.35 zeigt die Fluoreszenzspektren des Farbstoffes DY-647 in PBS-Puffer nach Zugabe von Tween-20. Bis zu einer Tween-20-Konzentration von 3×10^{-3} mol/L tritt keine Veränderung der Fluoreszenzspektren auf. Oberhalb dieser

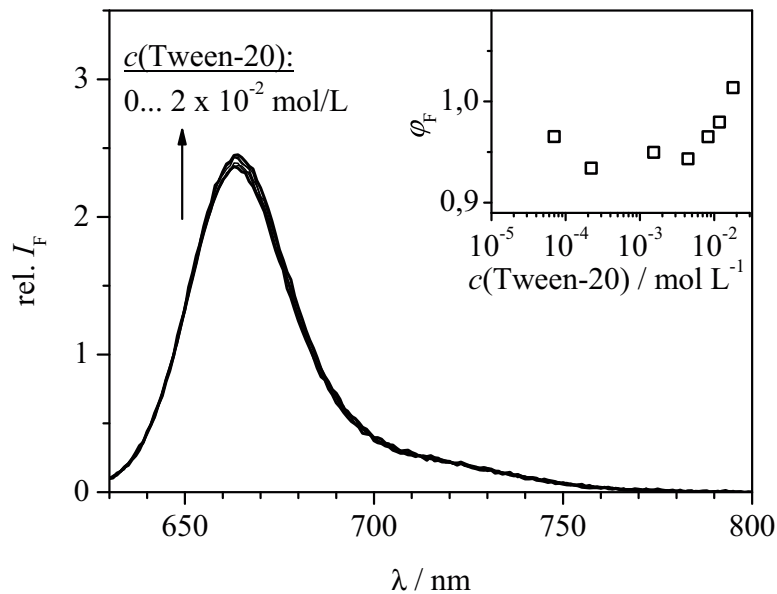


Abb. 4.35: Fluoreszenzspektrien von DY-647 in PBS-Puffer bei pH 7,4 und in einer Lösung von Tween-20 in PBS-Puffer. Inset: relative Quanteneffizienz φ_F bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen. Bis zu einer Tween-20-Konzentration von 3×10^{-3} mol/L wurde kein signifikanter Einfluss auf die Fluoreszenzintensität festgestellt. Oberhalb dieser Konzentration kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz.

Konzentration konnte sowohl ein leichter Anstieg der Fluoreszenzintensität als auch eine höhere Fluoreszenzabklingzeit τ beobachtet werden (vgl. Abb. A.22). Dieses Verhalten kann darin begründet sein, dass die Farbstoffe DY-647 und DY-647B sich zwar in den Mizellen einlagern, allerdings ihre Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften nur marginal beeinflusst werden. In diesem Fall würden die veränderten Diffusionseigenschaften der Farbstoffe in den Mizellen (*FMi*) einen Einfluss auf die FCS- und zeitaufgelöste Anisotropiemessungen nach sich ziehen. Jedoch wurde kein signifikanter Einfluss von Tween-20 auf die normierte Korrelationsfunktion $G(\tau)$ von DY-647 (DY-647B) beobachtet (vgl. Abb. 4.36, A.25). Ebenso wurde kein Einfluss von Tween-20 auf die Anisotropieabklingkurve der Farbstoffe festgestellt (Abb. A.24). Da sich weder die spektroskopischen noch die Diffusionseigenschaften der Farbstoffe DY-647 und DY-647B bei hohen Konzentration an Tween-20 ändern, kann davon ausgegangen werden, dass das Assoziationsgleichgewicht mit Tween-20-Mizellen für DY-647 und DY-647B im verwendeten Tensidkonzentrationsbereich sehr weit auf der Seite der in wässriger Phase gelösten Farbstoffe (*F*) liegt. In diesem Fall ist es nicht möglich, die spektroskopischen Eigenschaften der mizellar gebundenen Form eindeutig zu ermitteln. Daher sollen im Folgenden ausschließlich die Wechselwirkungen der Farbstoffe DY-635 und DY-635B mit Tween-20 betrachtet werden.

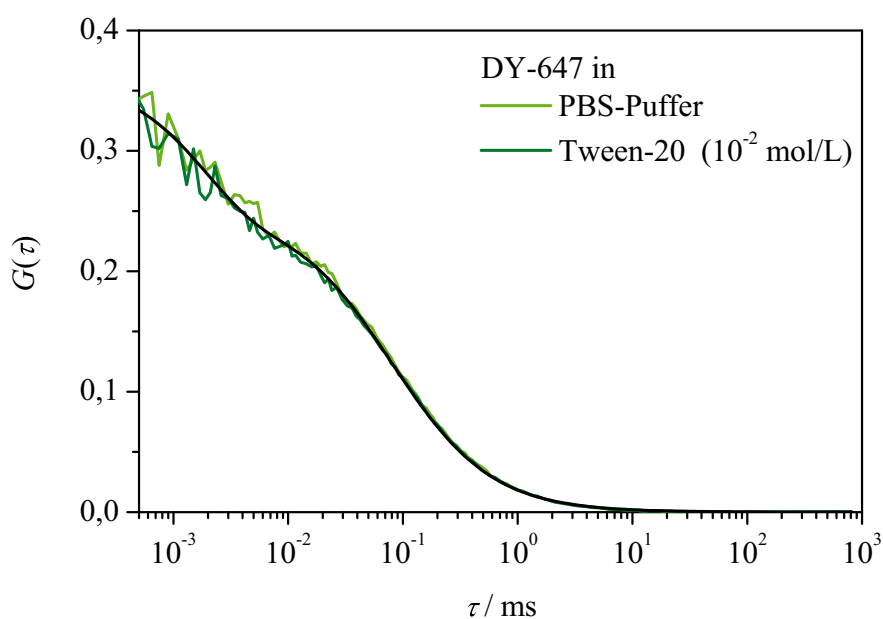


Abb. 4.36: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von DY-647 ($c(\text{DY-647}) = 10^{-9} \text{ mol/L}$) in PBS-Puffer (pH 7,4) und in Tween-20 ($c(\text{Tween-20}) = 10^{-2} \text{ mol/L}$). Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 630 \text{ nm}$ und einer Laserleistung von $P = 35 \mu\text{W}$ (Methode 3, vgl. 3.5). Die Anpassung (schwarze Linien) erfolgte nach Gl. 3.5.

4.3.3 Wechselwirkungen: Farbstoff-Mizelle

Einfluss auf stationären Fluoreszenzspektren Der Einfluss von Tween-20 auf das Fluoreszenzspektrum von DY-635 ist in Abb. 4.37 dargestellt (DY-635B: vgl. A.26). Die Fluoreszenzintensität steigt oberhalb der *c.m.c.* stark an und das Fluoreszenzmaximum λ_{Em} ist um 8 nm bathochrom verschoben. Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_{F} steigt für die Farbstoffe DY-635 (DY-635B) ausgehend von 7 % (12 %) in PBS-Puffer auf Werte von 49 % (50 %) in Mizellen an (vgl. Tab. 4.8). Diese Zunahme kann auf eine erhöhte Mikroviskosität in mizellarer Umgebung zurückgeführt werden, wodurch es zu einer reduzierten Flexibilität der Farbstoffe innerhalb dieser Umgebung kommt. Für andere Cyaninfarbstoffe ist bekannt, dass die Geschwindigkeit der nichtstrahlenden Desaktivierungsprozesse eng mit der photoinduzierten *cis-trans*-Isomerisierung aus dem ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 verknüpft ist [117, 127]. Da diese Isomerisierung mit strahlenden Prozessen (Fluoreszenz) konkurriert, zeigen Cyaninfarbstoffe häufig eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute in wässriger Lösung [36]. Wird die Geschwindigkeit der intramolekularen Rotation um die Doppelbindung, z.B. durch eine größere Viskosität, verringert, kann dies zu einem Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute führen. Um abzuschätzen, inwiefern sich durch die mizellare Umgebung die Geschwindigkeit der strahlungslosen Desaktivierungsprozesse der Farbstoffe ändert, soll im Folgenden der Einfluss der mizellaren Umgebung auf das Fluoreszenzabklingverhalten der

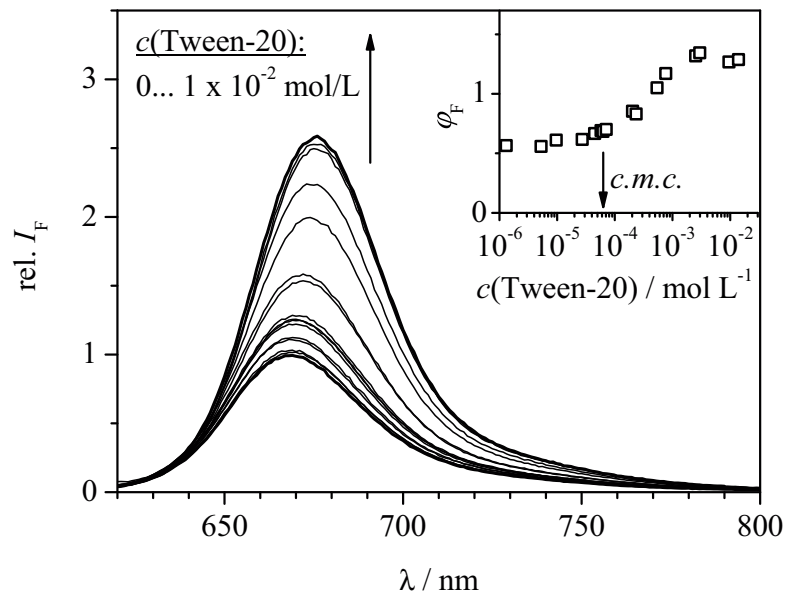


Abb. 4.37: Fluoreszenzspektren von DY-635 in PBS-Puffer bei pH 7,4 unter der Zugabe von Tween-20. Die Farbstoffkonzentration lag bei $0,65 \mu\text{mol/L}$. Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 610 \text{ nm}$. Inset: relative Quanteneffizienz φ_{F} bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen. Oberhalb der *c.m.c.* wird ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet.

Farbstoffe diskutiert werden.

Fluoreszenzabklingverhalten In Abb. 4.38 sind die Fluoreszenzabklingkurven für den Farbstoff DY-635B in PBS-Puffer bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen dargestellt. In PBS-Puffer kann der Verlauf von $I(t)$ monoexponentiell angepasst werden. Nach Zugabe von Tween-20 zeigen die Fluoreszenzabklingkurven ein biexponentielles Verhalten, wobei die Fluoreszenzabklingzeit für beide Farbstoffe in Mizellen größer ist. Für den Farbstoff DY-635 wurde ein Anstieg der Fluoreszenzabklingzeit von $\tau_1 = 0,4 \text{ ns}$ in PBS-Puffer auf $\tau_2 = 1,8 \text{ ns}$ in Tween-20-Mizellen beobachtet (vgl. Tab. 4.8, Abb. A.27). Für die biotinylierte Form erhöht sich die Fluoreszenzabklingzeit von $\tau_1 = 0,9 \text{ ns}$ auf $\tau_2 = 1,9 \text{ ns}$. Die Zunahme der Fluoreszenzabklingzeit steht im Einklang mit der Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe in Mizellen. Mit Hilfe von Gl. 4.10 wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz (k_{F}) und der strahlungslosen Desaktivierung (k_{nr}) berechnet (vgl. Tab. 4.8). Für den Farbstoff DY-635 sinkt k_{nr} um 87 % und für DY-635B um 70 %, wenn die Farbstoffe in Tween-20-Mizellen eingelagert sind. Im Rahmen der Messgenauigkeit konnte kein Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz k_{F} beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Veränderungen der spektralen Eigenschaften durch die veränderte Umgebung der Farbstoffe verursacht wird (Erhöhung der Mikroviskosität). In Mizellen ist die Flexibilität der Polymethinkette reduziert, wodurch die Geschwindigkeit der Inneren Umwandlung verringert

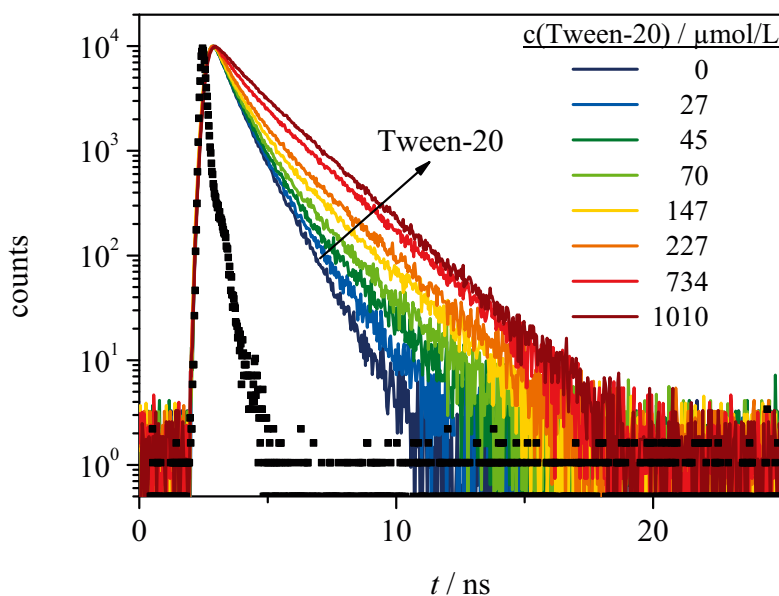


Abb. 4.38: Fluoreszenzabklingkurven von DY-635B in PBS-Puffer bei pH 7,4 bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen. $c(\text{DY-635B}) = 0,7 \mu\text{mol/L}$. Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 630 \text{ nm}$ (Instrumentenfunktion Weißlichtlaser: schwarze Punkte). Fluoreszenzemission: $\lambda_{\text{Em}} = 670 \text{ nm}$.

ist. Die Verteilung des Farbstoffes zwischen den beiden Mikroumgebungen kann durch den relativen Anteil A_i an der Fluoreszenzabklingzeit τ_i veranschaulicht werden. Abb. 4.39 zeigt jeweils den Anteil A_i für die Fluoreszenzabklingzeit von DY-635 und DY-635B in Abhängigkeit der Tween-20-Konzentration. Bereits bei Konzentrationen unterhalb der Kritischen Mizellbildungskonzentration ($c.m.c. = 63 \mu\text{mol/L}$) kommt es zu einer Veränderung der Fluoreszenzabklingkinetik. In diesem „prä-mizellaren“ Bereich kann es zu Wechselwirkungen der Tensidmoleküle mit den Farbstoffmolekülen kommen, wie es schon in der Literatur für andere Farbstoff/Tensidsysteme beschrieben wurde [128–130].

Tab. 4.8: Spektroskopische Eigenschaften^a der Farbstoffe DY-635 und DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) und nach Zugabe des Tensids Tween-20 ($c(\text{Tween-20}) = 0,01 \text{ mol/L}$)

Farbstoff		$\lambda_{\text{Abs}} /$ nm	$\lambda_{\text{Em}} /$ nm	$\tau /$ ns	Φ_{F}	$K_{\text{A}} /$ L mol^{-1}	$k_{\text{F}} /$ 10^9 s^{-1}	$k_{\text{nr}} /$ 10^9 s^{-1}
DY-635	PBS	633	668	0,4	0,07	-	$0,17 \pm 0,07$	$2,3 \pm 0,2$
DY-635	Tween-20	653	676	1,8	0,49	$(4,9 \pm 0,7) \times 10^5$	$0,27 \pm 0,08$	$0,3 \pm 0,2$
DY-635B	PBS	640	668	0,9	0,12	-	$0,13 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,2$
DY-635B	Tween-20	652	676	1,9	0,50	$(8,6 \pm 0,6) \times 10^4$	$0,26 \pm 0,07$	$0,3 \pm 0,1$

^a λ_{Abs} : langwelligstes Absorptionsmaximum, λ_{Em} : Emissionsmaximum, τ : Fluoreszenzabklingzeit (Anregung bei $\lambda_{\text{Ex}} = 619 \text{ nm}$), Φ_{F} : Fluoreszenzquantenausbeute, K_{A} : Gleichgewichtskonstante für die Reaktion 4.18, k_{nr} : Geschwindigkeitskonstante aller strahlungslosen intramolekularen Desaktivierungsprozesse.

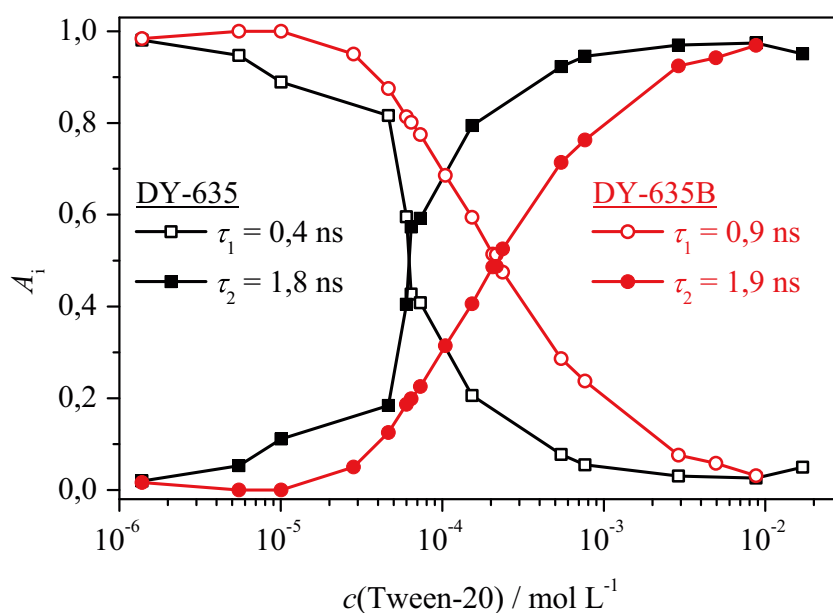


Abb. 4.39: Anteil A_i an der Fluoreszenzabklingzeit τ_i von DY-635 und DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) nach Zugabe des nichtionischen Tensids Tween-20 (vgl. Gl. 3.2). Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte durch globale Anpassung nach Gl. 3.1. Die Fluoreszenzabklingzeiten τ_i wurden dabei als globale Parameter verwendet.

4.3.4 Diffusionseigenschaften

Der Einfluss von Tween-20 auf die normierte Korrelationsfunktion $G(\tau)$ von DY-635 ist in Abb. 4.40 dargestellt. Die FCS-Kurven wurden mit Hilfe von Gl. 3.5 angepasst. Anhand des ermittelten mittleren Diffusionskoeffizienten \bar{D} wurde nach Gl. 2.24 die mittlere Diffusionszeit $\bar{\tau}_D$ berechnet. Oberhalb der *c.m.c.* kommt es mit steigender Konzentration an Tensid $c(\text{Tween-20})$ zu einem deutlichen Anstieg von $\bar{\tau}_D$ im ms-Zeitbereich. Für die biotinylierte Form DY-635B wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet (vgl. Abb. A.28).

Die Zunahme von $\bar{\tau}_D$ ist auf die Bildung von Farbstoff-Mizell-Assoziaten FMi zurückzuführen, welche in wässriger Lösung langsamer diffundieren als der Farbstoff F . Die mittlere Diffusionszeit $\bar{\tau}_D$ setzt sich in diesem Fall aus den Diffusionszeiten $\tau_{D,F}$ und $\tau_{D,FMi}$ der einzelnen Komponenten zusammen [131]:

$$\bar{\tau}_D = \tau_{D,F}X_F + \tau_{D,FMi}X_{FMi} \quad (4.25)$$

Dabei sind X_F und X_{FMi} jeweils die Anteile der einzelnen Komponenten. Der Anteil X_i der Komponente i ergibt sich aus mittlerer Anzahl der Moleküle in wässriger Phase N_F und in Mizellen N_{FMi} :

$$X_i = N_i / (N_F + N_{FMi})$$

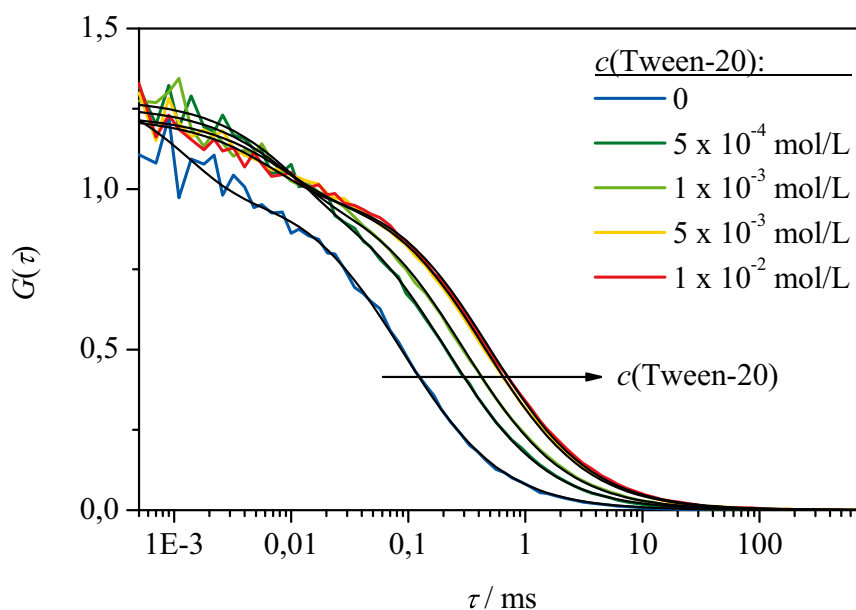


Abb. 4.40: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ (bunte Linien) und die entsprechenden angepassten Kurven (schwarze Linien) von DY-635 in PBS-Puffer bei pH 7,4 bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 630 \text{ nm}$ angeregt und die Anreizleistung des Lasers betrug: $P = 65 \mu\text{W}$ (Methode 3, vgl. Abschn. 3.5). Die Anpassung erfolgte nach Gl. 3.5.

Abb. 4.41 zeigt die Abhängigkeit der mittleren Diffusionszeit $\bar{\tau}_D$ von der Konzentration an Tween-20 für die Farbstoffe DY-635 und DY-635B. Der Verlauf ist abhängig von der Gleichgewichtskonstante K_A für die Assoziation von Farbstoff und Mizelle (Gl. 4.18) und der eingesetzten Mizellkonzentration $c_{\text{Mi},0}$ [131, 132]:

$$\bar{\tau}_D = \frac{\tau_{D,F} (1 + K_A c_{\text{Mi},0})}{1 + \frac{\tau_{D,F}}{\tau_{D,\text{FMi}}} K_A c_{\text{Mi},0}} \quad (4.26)$$

Für K_A wurden die in Abschn. 4.3.2 ermittelten Werte für DY-635 und DY-635B verwendet. Durch Anpassung nach Gl. 4.26 wurde für die Diffusionszeit von mizellar gebundenem DY-635 ein Wert von $\tau_{D,\text{FMi}} = (0,52 \pm 0,09) \text{ ms}$ bestimmt. Für den Diffusionskoeffizienten ergibt sich damit sowohl für DY-635 als auch dessen biotinylierte Form DY-635B ein Wert von $D_{\text{FMi}} = (0,7 \pm 0,1) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, welcher gut mit dem Wert übereinstimmt, der für Tween-20-Mizellen ermittelt wurde (vgl. Tab. 4.7 auf S. 77). Die ermittelten Werte für D_{FMi} spiegeln die Translationsbewegung von Tween-20-Mizellen in PBS-Puffer wider. Daher kann angenommen werden, dass die Verwendung der Farbstoffe DY-635 und DY-635B keinen Einfluss auf die hydrodynamischen Eigenschaften der Mizellen hat.

Zusätzlich zu Diffusionsvorgängen, welche im ms-Zeitbereich stattfinden, führen im μs -Zeitbereich weitere Prozesse zu einem zeitlichen Abfall der Korrelationsfunktion $G(\tau)$. Abb. 4.42

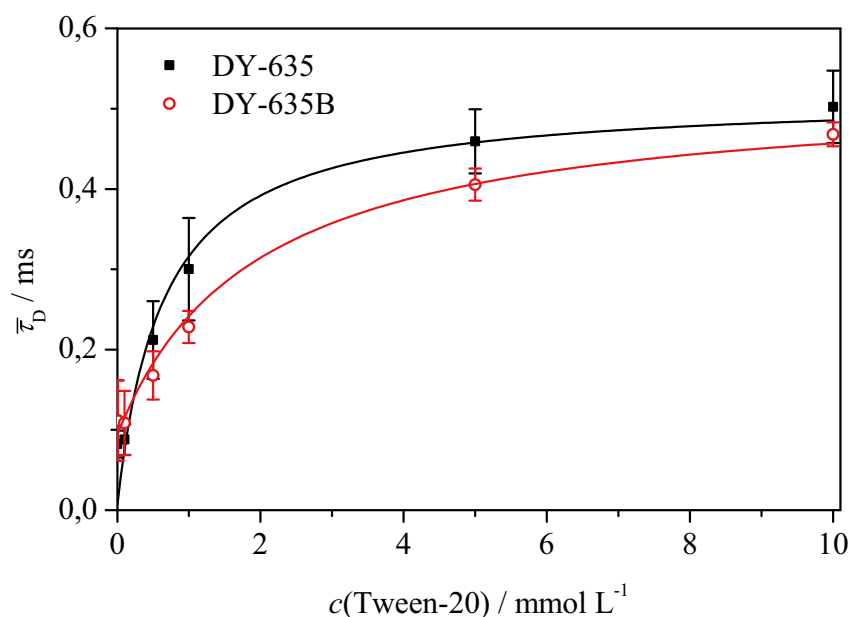


Abb. 4.41: Mittlere Diffusionszeit $\bar{\tau}_D$ für DY-635 und DY-635B in PBS-Puffer bei pH 7,4 bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen. Die Anpassung (durchgezogene Linien) erfolgte nach Gl. 4.26.

zeigt die entsprechende „mittlere“ Korrelationszeit τ_R dieser Prozesse und die dazugehörige Amplitude A der Korrelationsfunktion (vgl. Gl. 3.5). Mit steigender Tensidkonzentration kommt es zunächst zu einem Anstieg der Korrelationszeit τ_R von $2,3 \mu\text{s}$ (DY-635) bzw. $1,3 \mu\text{s}$ (DY-635B) für die Farbstoffe in PBS-Puffer auf Werte von $9,5 \mu\text{s}$ (DY-635) bzw. $7,5 \mu\text{s}$ (DY-635B). Oberhalb einer Konzentration von 10^{-3} mol/L nimmt τ_R mit steigender Konzentration leicht ab.

Bei den bisherigen Betrachtungen wurde davon ausgegangen, dass der Abfall von $G(\tau)$ im μs -Bereich ausschließlich durch photophysikalische Desaktivierungsprozesse der Farbstoffe verursacht wird (z.B. Isomerisierung, Triplett-Übergänge, vgl. Abschn. 2.4.2). Für den Fall, dass die Farbstoffmoleküle zwischen wässriger (F) und mizellarer Phase (FMi) verteilt sind, liefern die Austauschprozesse (Assoziation und Dissoziation, vgl. Gl. 4.18) einen weiteren Beitrag zur Korrelationsfunktion $G(\tau)$ [131, 132] (vgl. Abschn. A.1.2).

Bei einer hohen Tensidkonzentration ($c(\text{Tween-20}) = 10^{-2} \text{ mol/L}$) befinden sich nahezu alle Farbstoffmoleküle in Mizellen⁸ und der Beitrag der Austauschprozesse an der Autokorrelationsfunktion kann in diesem Fall vernachlässigt werden (vgl. A.1.2). Im Vergleich zum freien Farbstoff F in PBS-Puffer ist die Korrelationszeit τ_R der Farbstoffe in Mizellen FMi um das drei- bzw. vierfache erhöht. Dieses Verhalten ist bereits für andere Farbstoffe in Mizellen in der Literatur beschrieben worden [131]. Die photophysikalischen Desaktivierungsprozesse, die im μs -Zeitbereich zu einem Abfall der Korrelationsfunktion $G(\tau)$ führen, sind für die

⁸Bei der verwendeten Farbstoffkonzentration von $c(\text{DY-635}) = 10^{-9} \text{ mol/L}$ beträgt das Verhältnis von Farbstoff in mizellarer Phase zu wässriger Phase bei $c_{FMi}/c_F > 99,9999\%$ (vgl. Gl. 4.19).

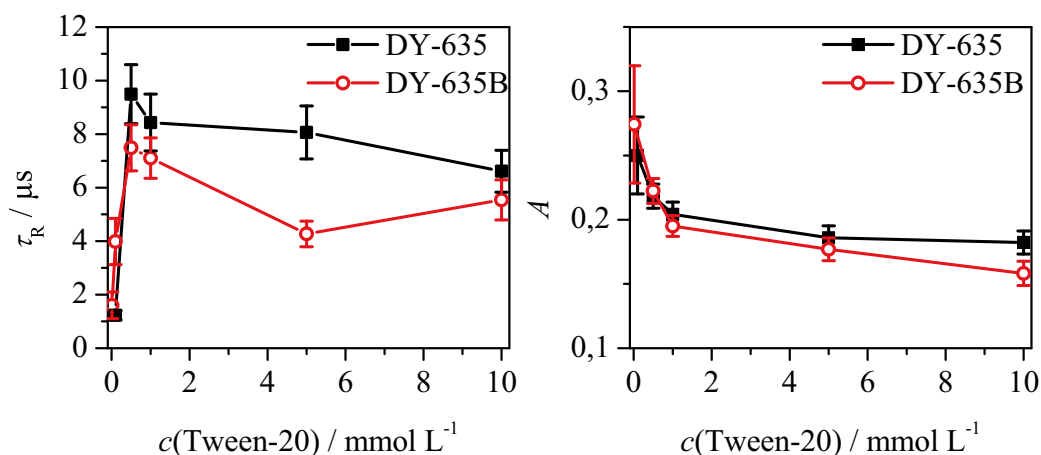


Abb. 4.42: Mittlere Korrelationszeit τ_R und Amplitude A von DY-635 und DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen $c(\text{Tween-20})$. Die Werte wurden durch Anpassung der FCS-Kurven nach Gl. 3.5 erhalten.

Farbstoffe in Mizellen verlangsamt. Ursache dafür kann die erhöhte Mikroviskosität in den Mizellen sein, wodurch die Geschwindigkeit der photoinduzierten cis-trans-Isomerisierung abnimmt [117]. Weiterhin ist es möglich, dass der Triplett-Zustand der Farbstoffe in Mizellen durch eine bessere Abschirmung weniger stark gelöscht wird und die Moleküle sich für eine längere Zeit in einem nicht-fluoreszierenden Zustand (Triplett) befinden.

Die Amplitude A der Korrelationsfunktion $G(\tau)$ verringert sich mit steigender Tensidkonzentration, was darauf hindeutet, dass sich in den Mizellen der Anteil der Farbstoffmoleküle, die sich in einem nicht-fluoreszierenden Zustand befinden, verringert. Weiterhin führt der Beitrag der Austauschkinetik zu einer Verringerung der Amplitude A (vgl. Gl. A.11). Für eine differenziertere Betrachtung der Prozesse im μs -Zeitbereich ist die Zeitaufösung des experimentellen Aufbaus zu gering.

Tab. 4.9: Angepasste Parameter^a der Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von DY-635 und DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) und in Anwesenheit eines Überschusses an Tween-20 ($c(\text{Tween-20}) = 10^{-2} \text{ mol/L}$). Die Anpassung erfolgte nach Gl. 3.5. Weiterhin ist die Diffusionszeit der Farbstoffe $\tau_{D,F}$ in PBS-Puffer bzw. der mizellar gebundenen Form $\tau_{D,FMi}$ angegeben ($\tau_{D,i}$), die anhand von Gl. 4.26 ermittelt wurden. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 630 \text{ nm}$ mit einer Leistung von $65 \mu\text{W}$ angeregt (Methode 3, vgl. 3.5, $T = 294 \text{ K}$).

Farbstoff	$\tau_{D,i} / \text{ms}$	$D / 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$	A	$\tau_R / \mu\text{s}$
DY-635	$0,08 \pm 0,01$	$4,2 \pm 0,7$	$0,28 \pm 0,08$	$2,3 \pm 0,5$
DY-635/Tween-20	$0,52 \pm 0,09$	$0,7 \pm 0,1$	$0,18 \pm 0,02$	$6,6 \pm 0,8$
DY-635B	$0,11 \pm 0,01$	$3,1 \pm 0,2$	$0,38 \pm 0,07$	$1,3 \pm 0,4$
DY-635B/Tween-20	$0,53 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,1$	$0,16 \pm 0,01$	$5,5 \pm 0,7$

^a Diffusionskoeffizient D , Amplitude A und mittlere Korrelationszeit τ_R der Desaktivierungsprozesse im μs -Bereich.

4.3.5 Beweglichkeit der Fluoreszenzsonde

Die Beweglichkeit der Farbstoffe innerhalb der Tween-20-Mizellen wurde anhand zeitaufgelöster Fluoreszenzanisotropiemessungen untersucht. Bei einer Tensidkonzentration im Bereich $c.m.c. < c(\text{Tween-20}) < 10^{-2} \text{ mol/L}$ sind die Farbstoffmoleküle DY-635 und DY-635B jeweils zwischen wässriger Phase (F) und Mizellen (FMi) verteilt (Assoziationsgleichgewicht: Gl. 4.18). Die Anisotropieabklingkurven $r(t)$ zeigen einen komplexen Verlauf (Abb. 4.45 und 4.46). Bevor das Anisotropieverhalten für die Farbstoffe im Gleichgewicht analysiert wird, soll daher zunächst der Verlauf von FMi betrachtet werden.

Bei einer Tensidkonzentration von $c(\text{Tween-20}) = 10^{-2} \text{ mol/L}$ liegt das Assoziationsgleichgewicht auf der Seite von FMi ⁹. Abb. 4.43 zeigt die Anisotropieabklingkurven $r(t)$ der Farbstoffe DY-635 und DY-635B in PBS-Puffer und in Anwesenheit dieses deutlichen Überschusses an Tween-20.

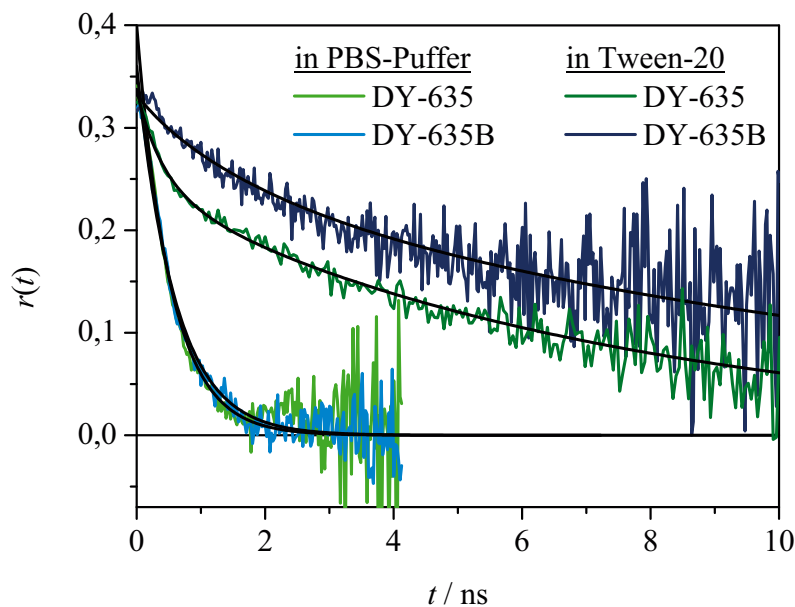


Abb. 4.43: Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen der Farbstoffe DY-635 und DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) bei Ab- und Anwesenheit des nichtionischen Tensides Tween-20. Verwendete Konzentrationen: $c(\text{Tween-20}) = 10^{-2} \text{ mol/L}$, $c(\text{DY-635}) = 0,65 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c(\text{DY-635B}) = 0,7 \text{ } \mu\text{mol/L}$.

In PBS-Puffer zeigt $r(t)$ jeweils einen monoexponentiellen Abfall mit einer Abklingzeit von $\phi = 0,6 \text{ ns}$ (DY-635) bzw. $\phi = 0,7 \text{ ns}$ (DY-635B). Dies entspricht dem Verlauf für frei diffundierende Farbstoffe. Nach Zugabe von Tween-20 fällt die Fluoreszenzanisotropie beider Farbstoffe mit der Zeit deutlich langsamer ab und $r(t)$ kann nicht mehr monoexponentiell angepasst werden. Zur Auswertung wurde das Modell der segmentweisen Rotation (Gl. 2.13)

⁹Bei den verwendeten Konzentrationen von Farbstoff und Tensid sind 99% (DY-635) bzw. 96% (DY-635B) der Farbstoffmoleküle mizellar eingelagert (vgl. Gl.4.18, $c(\text{DY-635}) = 0,65 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $c(\text{DY-635B}) = 0,7 \text{ } \mu\text{mol/L}$).

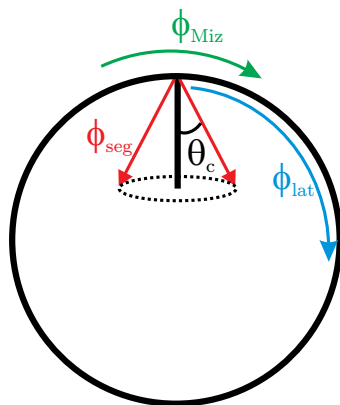


Abb. 4.44: Schematische Darstellung zur Beschreibung der Fluoreszenzanisotropie eines Farbstoffes, der in einer Mizelle eingelagert ist. Bei der Betrachtung der Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ müssen drei unabhängige Bewegungen berücksichtigt werden: die „Wackelbewegung“ des eingelagerten Farbstoffes ϕ_{seg} , die laterale Diffusion des Farbstoffes entlang der Mizelloberfläche ϕ_{lat} und die Gesamttrotation der Mizelle ϕ_{Miz} .

verwendet. In diesem allgemeinen Modell wird berücksichtigt, dass die Beweglichkeit der mizellar eingelagerten Farbstoffmoleküle möglicherweise nicht völlig eingeschränkt ist, sondern mindestens eine Art Wackelbewegung – entsprechend dem „wobble-in-a-cone“-Modell – stattfinden kann [133–136].

Für die Rotationszeit ϕ_{seg} dieser Bewegung wurde ein Wert von 0,7 ns für DY-635 und 2,1 ns für DY-635B ermittelt. Der Parameter A_{∞} , ein Maß für die Rotationshinderung der mizellar eingebundenen Farbstoffe DY-635 (DY-635B), beträgt 0,73 (0,74) und stimmt gut mit Werten übereinstimmt, die in der Literatur für andere Farbstoffe in nichtionischen Mizellen angegeben werden [136]. Der entsprechende halbe Öffnungswinkel θ_c des Kegels von 26° (25°) veranschaulicht die eingeschränkte räumliche Orientierung der Farbstoffe in der Mizelle. Relativ zur Mizelloberfläche haben die Farbstoffe eine Vorzugsrichtung. Obwohl sich θ_c für beide Farbstoffe kaum unterscheidet, deutet die langsamere Rotationszeit ϕ_{seg} von DY-635B darauf hin, dass durch die kovalente Bindung über einen Abstandshalter an Biotin die Diffusionseigenschaften des Farbstoffes innerhalb der Mizelle beeinflusst werden (vgl. Abb. 4.1). Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Farbstoff und den hydrophilen Kopfgruppen der Mizellen kann die Diffusionsgeschwindigkeit herabgesetzt sein.

Im Modell der segmentweisen Rotation entspricht ϕ_M der Rotationszeit des gesamten „Farbstoff-Makromolekül-Komplexes“. Bei der Anpassung der Anisotropieabklingkurven der mizellar gebundenen Farbstoffe wurden für ϕ_M Werte von 7,4 ns (DY-635) und 11,7 ns (DY-635B) bestimmt (vgl. Tab. 4.10). Jedoch sind diese Werte kleiner als für Tween-20-Mizellen erwartet wird, denn nach Gl. 2.10 ergibt sich aus dem hydrodynamischen Radius der Tween-20-Mizellen ($R_h = 2,8$ nm) bei einer Temperatur von $T = 298$ K für die Mizell-Rotationszeit ein Wert von $\phi_{\text{Miz}} = 19,9 \text{ ns}^{10}$. Dieses Phänomen wird in der Literatur durch eine laterale Dif-

¹⁰Hierbei wird für die Viskosität das Lösungsmittel (PBS-Puffer) bei 298 K der Wert von Wasser verwendet: $\eta_{298\text{K}} = 0,89 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ [137].

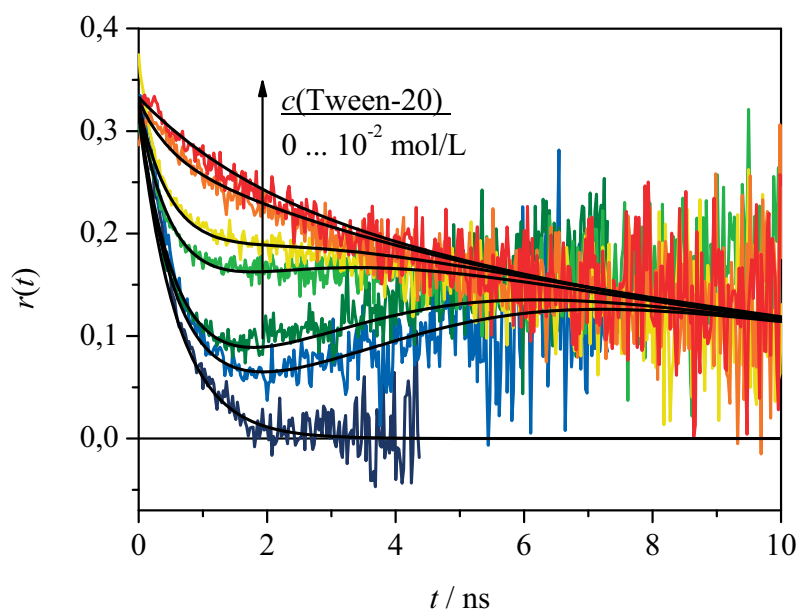


Abb. 4.45: Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen von DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Konzentrationen des an Tween-20. $c(\text{Tween-20}) = 0; 63 \mu\text{mol/L}; 100 \mu\text{mol/L}; 500 \mu\text{mol/L}; 1 \text{ mmol/L}; 5 \text{ mmol/L}; 10 \text{ mmol/L}$. Die Auswertung der Anisotropieabklingkurven erfolgte nach dem assoziativen Anisotropiemodell (Gl. 2.16). Dabei wird von zwei Mikroumgebungen ausgegangen: 1. PBS-Puffer, 2. Tween-20-Mizellen. Die Fluoreszenzabklingzeit τ_1 hat in Mikroumgebung 1 (PBS-Pufferlösung) einen Wert von 0,9 ns und in Mikroumgebung 2 (Tween-20) von 1,9 ns.

fusion der Farbstoffmoleküle entlang der zweidimensionalen Oberfläche der kugelförmigen Mizelle diskutiert [133–136]. Dabei wird angenommen, dass die Farbstoffmoleküle sich nicht im hydrophoben Kern sondern an der Oberfläche der Mizelle befinden. Aufgrund ihrer Struktur kann diese Annahme für die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe getroffen werden¹¹. Infolgedessen wird der zeitliche Abfall der Fluoreszenzanisotropie $r(t)$ durch drei unabhängige Bewegungen verursacht: die „Wackelbewegung“ des eingelagerten Farbstoffes ϕ_{seg} , die laterale Diffusion des Farbstoffes entlang der Mizelloberfläche ϕ_{lat} und die Gesamtrotation der Mizelle ϕ_{Miz} . Diese drei Bewegungen sind in Abb. 4.44 illustriert.

Das Modell der segmentweisen Rotation (Gl. 2.13) wird erweitert, indem sich die langsame Komponente der Rotation ϕ_{M} aus der Mizellrotation ϕ_{Miz} und der lateralen Diffusion ϕ_{lat} ergibt [133–136, 138]:

$$\frac{1}{\phi_{\text{M}}} = \frac{1}{\phi_{\text{Miz}}} + \frac{1}{\phi_{\text{lat}}} \quad (4.27)$$

Wird für die Mizellrotationszeit der Wert $\phi_{\text{Miz}} = 19,9 \text{ ns}$ vorgegeben, kann die Diffusionszeit

¹¹DY-635 und DY-647 enthalten Heteroatome und zeigen eine relativ gute Wasserlöslichkeit, die jeweils durch die Sulfonsäuregruppen in der heterocyclischen Endgruppe erhöht wird (vgl. Abb. 4.1). Eine Einlagerung im hydrophoben Teil der Tween-20-Mizellen ist daher höchst unwahrscheinlich.

ϕ_{lat} berechnet werden. Für den Farbstoff DY-635 ergibt sich damit ein Wert von $\phi_{\text{lat}} = 12 \text{ ns}$. Der biotinylierte Farbstoff DY-635B bewegt sich mit einer Diffusionszeit von $\phi_{\text{lat}} = 41 \text{ ns}$ deutlich langsamer entlang der Mizelloberfläche. Diese langsamere Bewegung steht im Einklang mit größeren Rotationszeit ϕ_{seg} von DY-635B im Vergleich zu DY-635.

Liegen die Farbstoffe nicht ausschließlich in Mizellen vor (*FMi*) sondern auch frei in PBS-Puffer (*F*), können die Anisotropieabklingkurven nicht mehr mit Hilfe eines einfachen bi-exponentiellen Abfalls beschrieben werden. Abb. 4.45 zeigt den Verlauf von $r(t)$ für den Farbstoff DY-635B bei verschiedenen Konzentrationen an Tween-20. Im Gegensatz zu den Anisotropieabklingkurven der „reinen“ Komponenten (Abb. 4.43) muss hierbei das *assoziative Anisotropiemodell* verwendet werden. Die globale Anpassung der Anisotropieabklingkurven erfolgte dabei nach Gl. 2.16. Dabei wird das Fluoreszenzabklingverhalten $I(t)$ der Farbstoffe in den beiden Mikroumgebungen mitberücksichtigt. In PBS-Puffer (Mikroumgebung 1) hat die Fluoreszenzabklingzeit der Farbstoffe DY-635 (DY-635B) einen Wert von $\tau_1 = 0,4 \text{ ns}$ (0,9 ns) und mizellar gebunden (Mikroumgebung 2) von $\tau_2 = 1,8 \text{ ns}$ (1,9 ns).

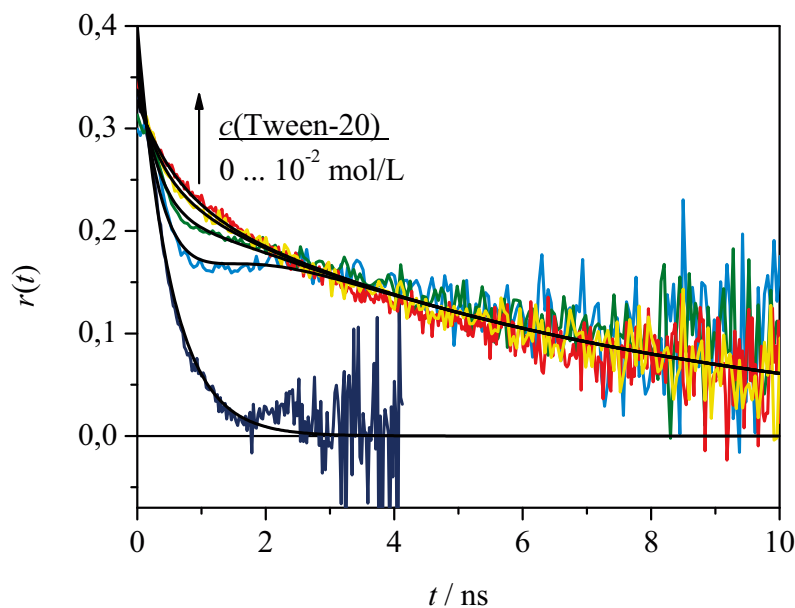


Abb. 4.46: Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen von DY-635 in PBS-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Konzentrationen des an Tween-20. $c(\text{Tween-20}) = 0; 110 \mu\text{mol/L}; 200 \mu\text{mol/L}; 640 \mu\text{mol/L}; 10 \text{ mmol/L}$. Die Auswertung der Anisotropieabklingkurven erfolgte nach dem assoziativen Anisotropiemodell (Gl. 2.16). Dabei wird von zwei Mikroumgebungen ausgegangen: 1. PBS-Puffer, 2. Tween-20-Mizellen. Die Fluoreszenzabklingzeit τ_1 hat in Mikroumgebung 1 (PBS-Pufferlösung) einen Wert von 0,4 ns und in Mikroumgebung 2 (Tween-20) von 1,8 ns.

Tab. 4.10: Parameter^a der Anisotropieabklingfunktion $r(t)$ von DY-635 und DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen bei 298 K und der Fehler der Anpassung. Die Berechnung der lateralen Diffusionszeit $\phi_{\text{lat},2}$ erfolgte nach Gl. 4.27 mit einer Mizellrotationszeit von $\phi_{\text{Miz}} = 19,9$ ns. Die Auswertung der Anisotropieabklingkurven erfolgte nach dem assoziativen Anisotropiemodell (Gl. 2.16). Dabei wird von zwei Mikroumgebungen ausgegangen: 1. PBS-Puffer, 2. Tween-20-Mizellen. Die Fluoreszenzabklingzeit τ_1 für den jeweiligen Farbstoff in Mikroumgebung 1 (PBS-Pufferlösung) beträgt 0,4 ns (DY-635) bzw. 0,9 ns (DY-635B) und in Mikroumgebung 2 (Tween-20) 1,8 ns (DY-635) bzw. 1,9 ns (DY-635B).

Farbstoff	$\phi_{f,1}$	$\phi_{M,2}$ / ns	$\phi_{\text{lat},2}$ / ns	$\phi_{\text{seg},2}$ / ns	A_∞	θ_c
DY-635	$0,6 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,7$	12 ± 1	$0,7 \pm 0,2$	$0,73 \pm 0,05$	$26^\circ \pm 4$
DY-635B	$0,7 \pm 0,1$	$13,4 \pm 0,8$	41 ± 3	$2,1 \pm 0,4$	$0,74 \pm 0,04$	$25^\circ \pm 4$

^a Mikroumgebung 1 (PBS-Puffer) $\phi_{f,1}$: Rotationszeit der Farbstoffe,

Mikroumgebung 2 (Tween-20-Mizellen) $\phi_{M,2}$: Rotationszeit des „Farbstoff-Makromolekül-Komplexes“, $\phi_{\text{lat},2}$: laterale Diffusion des Farbstoffes entlang der Mizelloberfläche, $\phi_{\text{seg},2}$: Rotationszeit für die „Wackelbewegung“ des eingelagerten Farbstoffes.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die spektroskopischen Eigenschaften der Cyaninfarbstoffe DY-635 und DY-647 in biomimetischen und biologischen Modellsystemen untersucht. Zur Charakterisierung wurden dabei neben der Absorptionsspektroskopie insbesondere fluoreszenzspektroskopische Methoden verwendet. Dazu zählen die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung zur Ermittlung des Fluoreszenzabklingverhaltens, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zur Beobachtung von Diffusionsprozessen und photophysikalischen Desaktivierungsprozessen im μs -Zeitbereich und die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie zur Untersuchung der Rotationsdynamik und Beweglichkeit der Farbstoffe im jeweiligen Modellsystem. Das Biotin-Streptavidin-System wurde als Modellsystem für die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen verwendet, da der Bindungsmechanismus weitgehend aufgeklärt ist. Es ist bekannt, dass während der Bindung des Liganden (Biotin) an das Protein eine Konformationsänderung auftritt. Für die Untersuchung der Wechselwirkungen am System Biotin-Streptavidin wurden die biotinylierten Farbstoffe eingesetzt. In diesen Biotinderivaten sind die Farbstoffe über einen Abstandshalter aus Ethylenglykolgruppen kovalent an Biotin gebunden.

Für den Farbstoff DY-635 und die biotinylierte Form DY-635B zeigt sich in den Absorptionsspektren der wässrigen Lösungen bereits bei Farbstoffkonzentrationen oberhalb von $1 \mu\text{mol/L}$ eine Abweichung vom *Lambert-Beerschen-Gesetz*, wobei die Extinktion nicht linear mit der Konzentration ansteigt. Dieses Absorptionsverhalten ist auf die Bildung von sog. H-Dimeren zurückzuführen, in denen die Farbstoffe parallel zueinander orientiert sind. Unter Verwendung des Massenwirkungsgesetzes wurde das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren betrachtet und durch globale Anpassung der Absorptionsspektren bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen die Gleichgewichtskonstante K_D der Dimerisierung ermittelt. Die biotinylierte Form des Farbstoffes zeigt eine geringere Tendenz zu Dimerbildung, was durch den sterischen Anspruch des Abstandshalters und des Biotins begründet wird. Zusätzlich dazu wurde anhand der Abhängigkeit der Extinktion von der Farbstoffkonzentration das molare Extinktionsspektrum der Dimere angepasst. Das Absorptionsmaximum ist für die Dimere im Vergleich zur Monomerform um etwa 40 nm hypsochrom verschoben, was durch die *Molekulare Exzitonen* Theorie beschrieben werden kann. Die dieser Verschiebung zugrundeliegende Wechselwirkungsenergie $\Delta\mathcal{E}$ bei der Bildung der Dimere ermöglicht die Berechnung des intermolekularen Abstandes im Dimer. Im Gegensatz zu DY-635 wurde für die Farbstoffe DY-647 und DY-647B innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches keine Bildung von

Dimeren beobachtet. Es ist anzunehmen, dass durch elektrostatische Abstoßungskräfte der Sulfonsäuregruppen in den heterocyclischen Endgruppen die Tendenz zur Aggregatbildung bei diesen Farbstoffen herabgesetzt ist.

Durch die kovalente Bindung der Farbstoffe an Biotin kommt es zu keiner signifikanten Änderung im Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum. Aufgrund der reduzierten Flexibilität der an Biotin gebundenen Farbstoffe verringert sich die Geschwindigkeitskonstante k_{nr} der strahlungslosen Desaktivierungsprozesse und die Fluoreszenzabklingzeit τ ist im Vergleich zur Carbonsäureform erhöht. Nach der Bindung der Farbstoffe an Streptavidin wurde eine erhebliche Veränderung in den Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften beobachtet, die umso deutlicher wird, je mehr Farbstoffmoleküle an ein Streptavidintetramer gebunden sind. Es wird angenommen, dass diese spektralen Veränderungen durch Wechselwirkungen zwischen benachbarten, an ein Streptavidintetramer gebundenen Farbstoffmolekülen verursacht wird. Als Ursache deuten dabei sowohl die hypochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums als auch die Verringerung der Fluoreszenzintensität auf die Bildung von H-Dimeren hin.

Cyaninfarbstoffe können nach Anregung in den ersten elektronisch angeregten Zustand durch cis-trans-Isomerisierung um die Polymethinkette und Triplett-Übergänge in einen nicht-fluoreszierenden Zustand übergehen. Die Geschwindigkeit strahlungsloser intramolekularer Desaktivierungsprozesse nimmt für die Farbstoffe DY-635B und DY-647B nach Bindung an Streptavidin ab, was sich durch eine reduzierte Flexibilität der gebundenen Farbstoffe begründen lässt. Dies äußert sich zum einen in der Erhöhung der Fluoreszenzabklingzeit τ , zum anderen wird im FCS-Experiment eine Zunahme der Korrelationszeit τ_R im μ s-Zeitbereich von $G(\tau)$ beobachtet. Um zu untersuchen, ob die Korrelationszeit τ_R im FCS-Experiment durch Wechselwirkungen der gebundenen Farbstoffe mit Tryptophanresten von benachbarten Bindungsstellen verursacht wird, wurden nichtbesetzte Bindungsstellen im Streptavidintetramer durch Zugabe eines dreifachen Überschusses an unmarkiertem Biotin blockiert. Diese Belegung der benachbarten Bindungsstellen im Streptavidintetramer hat keinen Einfluss auf die Korrelationszeit τ_R . Dies ist ein Hinweis darauf, dass es zwischen den Streptavidin-gebundenen Farbstoffen und den benachbarten Bindungsstellen zu keinen Wechselwirkungen kommt bzw. diese Bindungsstellen nicht durch die Farbstoffe „blockiert“ werden. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen gestützt, die bei verschiedenen Streptavidin/Farbstoff-Verhältnissen durchgeführt wurden. Dabei wurde ein Bindungsverhältnis von vier Farbstoffmolekülen pro Streptavidintetramer ermittelt.

Bei der Auswertung der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiemessungen von Streptavidin-gebundenen Farbstoffen wurde sowohl die Rotation des gesamten Farbstoff-Streptavidin-Komplexes als auch die Beweglichkeit des gebundenen Farbstoffes berücksichtigt. Durch Anpassung der Anisotropieabklingkurven nach dem Modell einer segmentweisen Rotation wurde festgestellt, dass die an das Streptavidin gebundenen Farbstoffe nicht frei rotieren, sondern sich um ihren Abstandshalter in einer gehinderten Rotation bewegen können. Diese

Art „Wackelbewegung“ innerhalb eines Kegels wird durch das sog. *wobble-in-a-cone*-Modell beschrieben. Liegt eine Mischung von ungebundenem und Streptavidin-gebundenem Farbstoff vor, können die Anisotropieabklingkurven nicht mehr nach einem exponentiellen Verlauf angepasst werden. In diesem Fall erfolgte die Auswertung anhand des *Assoziativen Anisotropiemodells*. Damit war es möglich, den Verlauf der Anisotropieabklingfunktion für verschiedene Streptavidin/Farbstoff-Verhältnisse in einer globalen Auswertung anzupassen.

Durch die Konformationsänderung im Streptavidintetramer, die durch eine Besetzung der freien unbesetzten Bindungsstellen mit unmarkiertem Biotin verursacht wird, kommt es zum Teil zu einer starken Einschränkung der Beweglichkeit der Farbstoffe. Das Ausmaß dieser Rotationshinderung durch die Konformationsänderung im Protein ist für den Farbstoff DY-635B stark ausgeprägt während die Beweglichkeit von Streptavidin-gebundenem DY-647B kaum beeinflusst wird.

Als zweites Modellsystem dieser Arbeit wurden Mizellen des nichtionischen Tensids Tween-20 eingesetzt. Mizellen bilden eines der einfachsten Systeme, um die Mikroumgebung einer biologischen Membran nachzuahmen. Der hydrodynamische Radius der Mizellen wurde für verschiedene Tensidkonzentrationen oberhalb der *c.m.c.* mit Hilfe der FCS bestimmt. Dabei wurde der Farbstoff 9,10-Bis(phenylethynyl)anthracen (BPEA) verwendet, welcher in Wasser unlöslich ist und sich ausschließlich im hydrophoben Teil der Mizelle einlagert. Anhand der Korrelationsfunktion des mizellar eingelagerten BPEA kann unmittelbar der Diffusionskoeffizient und der hydrodynamische Radius der Mizellen bestimmt werden. Im Widerspruch zu einigen in der Literatur angegebenen Ergebnissen wurde im untersuchten Konzentrationsbereich keine Abhängigkeit der Mizellgröße von der Tensidkonzentration festgestellt. Zur weiteren Charakterisierung der Tween-20-Mizellen wurde die *c.m.c.* im verwendeten Lösungsmittel (PBS-Puffer, pH 7,4) mittels stationärer Fluoreszenzspektroskopie mit Pyren als Fluoreszenzsonde ermittelt.

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Farbstoffe in den Mizellen einlagern, wurden die Gleichgewichtskonstante dieser Assoziation photometrisch anhand der Absorptionsspektren bestimmt und das molare Extinktionsspektrum Farbstoffe in Mizellen ermittelt. Die Farbstoffe DY-635 und DY-635B haben in mizellarer Umgebung ähnliche Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften, was darauf hindeutet, dass sie sich in einer ähnlichen Mikroumgebung befinden. Aufgrund der erhöhten Mikroviskosität innerhalb der Mizelle ist die Flexibilität der in die Mizellen eingelagerten Farbstoffe reduziert und die Geschwindigkeit von strahlungslosen Desaktivierungsprozessen verringert. Anhand zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen wurde gezeigt, dass die Geschwindigkeitskonstante k_{nr} dieser Prozesse im Vergleich zu PBS-Puffer für die mizellar eingelagerten Farbstoffe um bis zu 87 % sinkt.

Für den Farbstoff DY-647 und das entsprechende Biotin-Derivat konnten in Anwesenheit von Tween-20 keine signifikanten Veränderungen in den Absorptions- und Fluoreszenzspektren beobachtet werden. Es wird angenommen, dass das Assoziationsgleichgewicht zwischen Farbstoff und Mizellen in diesem Fall sehr weit auf der Seite der ungebundenen Farbstoffes liegt.

Diese Annahme wird durch die FCS- und zeitaufgelösten Anisotropiemessungen gestützt, bei denen keine Änderung der Diffusionseigenschaften der Farbstoffe in Anwesenheit von Tween-20 festgestellt wurde. Für weitere Betrachtungen der Wechselwirkung zwischen Farbstoffen und Mizellen wurden im Rahmen dieser Arbeit daher ausschließlich die Farbstoffe DY-635 und DY-635B verwendet.

Sind die Farbstoffe in den Mizellen eingelagert, so kommt es zu keiner Veränderung der Mizellgröße. Die ermittelten Werte des Diffusionskoeffizienten der mizellar eingelagerten Farbstoffe spiegeln demzufolge die Translationsbewegung der Tween-20-Mizellen wider. Im FCS-Experiment wird sowohl für die freien Farbstoffe als auch für die Farbstoffe in Mizellen im μs -Zeitbereich ein Abfall der Korrelationsfunktion beobachtet. Die „mittlere“ Korrelationszeit für die in diesem Zeitbereich stattfindenden Vorgänge ist dabei für Farbstoffe in den Mizellen erhöht und kann auf die reduzierte Geschwindigkeit der strahlungslosen Desaktivierungsprozesse zurückgeführt werden. Neben photophysikalischen Desaktivierungsprozessen, wie z.B. photoinduzierter cis-trans-Isomerisierung und Triplett-Übergängen, müssen bei der Betrachtung der FCS-Kurven von Farbstoffen, die zwischen wässriger und mizellarer Phase verteilt sind, noch die Austauschprozesse der Farbstoffe zwischen beiden Phasen mitberücksichtigt werden. Aufgrund der geringen Zeitauflösung des in dieser Arbeit verwendeten Gerätes war es nicht möglich, diese Prozesse differenziert zu beschreiben.

Die Beweglichkeit der Farbstoffe innerhalb der Tween-20-Mizellen wurde durch zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen untersucht. Die Anisotropieabklingkurven können nicht monoexponentiell angepasst werden, da die Beweglichkeit der Farbstoffe nicht vollständig eingeschränkt ist. Neben der „Wackelbewegung“, entsprechend dem wobble-in-a-cone-Modell, wird zusätzlich noch die laterale Diffusion der Farbstoffe entlang der Mizelloberfläche beschrieben. Für den biotinylierten Farbstoff wurde eine deutlich langsamere Diffusionszeit für diesen Prozess gefunden, was durch einen größeren sterischen Anspruch des Moleküls und die Ausbildung von zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Biotin und den hydrophilen Kopfgruppen der Mizellen begründet werden kann.

Bei neuartigen hochauflösenden Fluoreszenztechniken in der Mikroskopie, wie „STORM“ (stochastic optical reconstruction microscopy), werden optisch reversibel schaltbare Moleküle verwendet [139]. Dabei sind insbesondere Cyaninfarbstoffe von Interesse, da hierbei ein reversibles Schalten zwischen einem fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zustand möglich ist. Für die weitere Entwicklung dieser Methode ist das Verständnis der photophysikalischen Desaktivierungsprozesse von Cyaninfarbstoffen unentbehrlich. In weiterführenden Arbeiten könnten mehr Informationen über die Prozesse im μs -Zeitbereich erhalten werden, indem die Zeitauflösung im FCS-Experiment für die Verzögerungszeit τ erhöht wird.

Ein experimenteller Ansatz zur Unterscheidung von z.B. ungebundenen und gebundenen Farbstoffen im FCS-Experiment könnte die sog. „Fluoreszenz-Lebensdauer-Korrelations-Spektroskopie“ (FLCS) darstellen. Da sich die Farbstoffe je nach ihrer molekularen Umgebung in ihrer Abklingzeit unterscheiden, könnten mit Hilfe der FLCS zum einen die FCS-Kurven der

einzelnen Komponenten ausgewertet werden, zum anderen könnten z.B. Bindungsprozesse genauer beschrieben werden.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Hasilik, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag, 2007.
- [2] R. Learmonth, E. Gratton, „Assessment of membrane fluidity in individual yeast cells by Laurdan generalised polarisation and multi-photon scanning fluorescence microscopy“, in *Fluorescence spectroscopy, imaging and probes: new tools in chemical, physical and life sciences.*, R. Kraayenhof, A. Visser, H. Gerritsen (Herausgeber), Springer Series on Fluorescence: Methods and Applications (2), 241–252, Springer-Verlag, 2002.
- [3] Die Königlich Schwedische Akademie der Wissenschaften, „Pressemitteilung: Der Nobelpreis in Chemie 2003“, 08.10.2003, http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003 [letzter Zugriff: 20.04.2010].
- [4] A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot, „Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization“, *Pharmaceutical Research* **25**, 1487–1499 (2008).
- [5] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, 2001.
- [6] J. E. Berlier, A. Rothe, G. Buller, J. Bradford, D. R. Gray, B. J. Filanoski, W. G. Telford, S. Yue, J. Liu, C.-Y. Cheung, W. Chang, J. D. Hirsch, J. M. Beechem, R. P. Haugland, R. P. Haugland, „Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates.“, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **51**, 1699–1712 (2003).
- [7] O. Wolfbeis, M. Bohmer, A. Durkop, J. Enderlein, M. Gruber, I. Klimant, C. Krause, J. Kurner, G. Liebsch, Z. Lin, B. Oswald, M. Wu, „Advanced luminescent labels, probes and beads and their application to luminescence bioassay and imaging“, in *Fluorescence spectroscopy, imaging and probes: new tools in chemical, physical and life sciences.*, R. Kraayenhof, A. Visser, H. Gerritsen (Herausgeber), Springer Series on Fluorescence: Methods and Applications (2), 3–42, Springer-Verlag, 2002.
- [8] J. B. Randolph, A. S. Waggoner, „Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes.“, *Nucleic Acids Research* **25**, 2923–2929 (1997).

- [9] T. G. Deligeorgiev, D. A. Zaneva, S. H. Kim, R. W. Sabnis, „Preparation of Monomethine Cyanine Dyes for Nucleic Acid Detection“, *Dyes and Pigments* **37**, 205–211 (1998).
- [10] H. J. Gruber, C. D. Hahn, G. Kada, C. K. Riener, G. S. Harms, W. Ahrer, T. G. Dax, H.-G. Knaus, „Anomalous Fluorescence Enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus Anomalous Fluorescence Loss of Cy5 and Cy7 upon Covalent Linking to IgG and Noncovalent Binding to Avidin“, *Bioconjugate Chemistry* **11**, 696–704 (2000).
- [11] H. Schindler, K. Kaiser, M. Marek, H. J. Gruber, „Biotin-Fluorophore Conjugates with Poly(ethylene glycol) Spacers Retain Intense Fluorescence after Binding Avidin and Streptavidin“, *Bioconjugate Chemistry* **8**, 552–559 (1997).
- [12] M. Y. Berezin, H. Lee, W. Akers, G. Nikiforovich, S. Achilefu, „Ratiometric Analysis of Fluorescence Lifetime for Probing Binding Sites in Albumin with Near-Infrared Fluorescent Molecular Probes“, *Photochemistry and Photobiology* **83**, 1371–1378 (2007).
- [13] C. R. Guest, R. A. Hochstrasser, C. G. Dupuy, D. J. Allen, S. J. Benkovic, D. P. Millar, „Interaction of DNA with the Klenow fragment of DNA polymerase I studied by time-resolved fluorescence spectroscopy“, *Biochemistry* **30**, 8759–8770 (1991).
- [14] A. Mishra, R. K. Behera, K. Behera, Pradipta, B. K. Mishra, G. B. Behera, „Cyanines during the 1990s: A Review“, *Chemical Reviews* **100**, 1973–2011 (2000).
- [15] W. West, S. Pearce, „The Dimeric State of Cyanine Dyes“, *The Journal of Physical Chemistry* **69**, 1894–1903 (1965).
- [16] R. McKay, „Visible absorption spectra of some cationic dyes in solution. Effect of dye aggregation“, *Transactions of the Faraday Society* **61**, 1787–1799 (1965).
- [17] N. Marmè, J.-P. Knemeyer, M. Sauer, J. Wolfrum, „Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan.“, *Bioconjugate Chemistry* **14**, 1133–1139 (2003).
- [18] N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, P. J. M. Mahesh K. Bhalgat, F. Mao, W.-Y. Leung, R. P. Haugland, „Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates“, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **47**, 1179–1188 (1999).
- [19] G. F. Schröder, U. Alexiev, H. Grubmüller, „Simulation of fluorescence anisotropy experiments: probing protein dynamics.“, *Biophysical Journal* **89**, 3757–3770 (2005).
- [20] S. Balme, J.-M. Janot, P. Déjardin, P. Seta, „Highly efficient fluorescent label unquenched by protein interaction to probe the avidin rotational motion“, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **184**, 204 - 211 (2006).

- [21] M. A. Hink, R. A. Griep, J. W. Borst, A. van Hoek, M. H. Eppink, A. Schots, A. J. Visser, „Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein.“, *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 17556–17560 (2000).
- [22] A. Fürstenberg, O. Kel, J. Gradinaru, T. R. Ward, D. Emery, G. Bollot, J. Mareda, E. Vauthey, „Site-Dependent Excited-State Dynamics of a Fluorescent Probe Bound to Avidin and Streptavidin“, *ChemPhysChem* **10**, 1517–1532 (2009).
- [23] N. Green, „Thermodynamics of the Binding of Biotin and some Analogues by Avidin“, *Biochemical Journal* **101**, 774–780 (1966).
- [24] M. Wilchek, E. A. Bayer, „Introduction to avidin-biotin technology“, *Methods in Enzymology* **184**, 5–13 (1990).
- [25] M. Wilchek, E. A. Bayer, „Applications of avidin-bioitin technology: Literature survey“, *Methods in Enzymology* **184**, 14–45 (1990).
- [26] H. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*, Springer, 2002.
- [27] D. Everett, I. Findenegg, *Grundzüge der Kolloidwissenschaft*, Steinkopff Verlag Darmstadt, 1992.
- [28] Y. Moroi, *Micelles: theoretical and applied aspects*, Springer, 1992.
- [29] C. Peyratout, E. Donath, L. Daehne, „Electrostatic interactions of cationic dyes with negatively charged polyelectrolytes in aqueous solution“, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **142**, 51–57 (2001).
- [30] S. Moulik, A. Mandal, S. Gupta, „Characterisation of Tween 20 & Tween 80 Micelles in Aqueous Medium from Transport Studies“, *Indian Journal of Chemistry* **24A**, 670-673 (1985).
- [31] WHO, „Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents.“, in *WHO Food Additives Series No. 5*, 1974.
- [32] R. Wood, *Analytical methods for food additives*, CRC Press, 2004.
- [33] K. R. Acharya, S. C. Bhattacharya, S. P. Moulik, „The surfactant concentration-dependent behaviour of safranin T in Tween (20, 40, 60, 80) and Triton X-100 micellar media“, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **109**, 29–34 (1997).

- [34] C. C. Ruiz, Molina-Bolivar, J. Molina-Bolivar, Aguiar, J. Aguiar, MacIsaac, G. MacIsaac, Moroze, S. Moroze, Palepu, R. Palepu, „Effect of ethylene glycol on the thermodynamic and micellar properties of Tween 20“, *Colloid & Polymer Science* **281**, 531–541 (2003).
- [35] R. F. Chen, J. R. Knutson, „Mechanism of Fluorescence Concentration Quenching of Carboxyfluorescein in Liposomes: Energy Transfer to Nonfluorescent Dimers“, *Analytical Biochemistry* **172**, 61–77 (1988).
- [36] A. K. Chibisov, V. I. Prokhorenko, H. Görner, „Effects of surfactants on the aggregation behaviour of thiocarbocyanine dyes“, *Chemical Physics* **250**, 47–60 (1999).
- [37] A. S. Tatikolov, S. M. B. Costa, „Photophysics and photochemistry of hydrophilic cyanine dyes in normal and reverse micelles.“, *Photochem Photobiol Sci* **1**, 211–218 (2002).
- [38] M. A. Hink, A. van Hoek, A. J. W. G. Visser, „Dynamics of Phospholipid Molecules in Micelles: Characterization with Fluorescence Correlation Spectroscopy and Time-Resolved Fluorescence Anisotropy“, *Langmuir* **15**, 992–997 (1999).
- [39] S. Hait, S. Moulik, „Determination of critical micelle concentration (CMC) of nonionic surfactants by donor-acceptor interaction with iodine and correlation of CMC with hydrophile-lipophile balance and other parameters of the surfactants“, *Journal of Surfactants and Detergents* **4**, 303–309 (2001).
- [40] B. Farhadieh, „Determination of cmc and partial specific volume of polysorbates 20, 60, and 80 from densities of their aqueous solutions“, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **62**, 1685–1688 (1973).
- [41] S. Dähne, „Der ideale Polymethinzustand“, *Chimia* **45**, 288–296 (1991).
- [42] J. Fabian, „Polymethinfarbstoffe mit Lichtabsorption im Nahen Infrarot“, *Journal für Praktische Chemie* **333**, 197–222 (1991).
- [43] N. Tyutyulkov, J. Fabian, A. Mehlhorn, F. Dietz, A. Tadjer, *Polymethine Dyes - Structures and Properties*, St. Kliment Ohridski University Press, 1991.
- [44] M. Matsuoka, *Infrared absorbing dyes*, Topics in Applied Chemistry, Plenum Press, 1990.
- [45] „Römpp-Lexikon Online: Chemie, <http://www.roempp.com/prod>“, [letzter Zugriff: 10.05.2010].
- [46] M. Kasha, „Molecular excitons in small aggregates“, in *The Spectroscopy of the Excited State*, NATO Advanced Study Institutes Series, Plenum Press, 1976.

- [47] G. Scheibe, „Über die Veränderlichkeit der Absorptionsspektren in Lösungen und die Nebenvalenzen als ihre Ursache“, *Angewandte Chemie* **50**, 212–219 (1937).
- [48] M. Kasha, R. H.R., M. Ashraf El-Bayoumi, „The exciton model in molecular spectroscopy“, *Pure Applied Chemistry* **11**, 371–392 (1965).
- [49] E. G. McRae, M. Kasha, „Enhancement of Phosphorescence Ability upon Aggregation of Dye Molecules“, *The Journal of Chemical Physics* **28**, 721–722 (1958).
- [50] A. Chibisov, „Photonics of dimers of cyanine dyes“, *High Energy Chemistry* **41**, 200–209 (2007).
- [51] L. Chaiet, F. J. Wolf, „The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomycetes“, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **106**, 1–5 (1964).
- [52] C. Grunwald, „A Brief Introduction to the Streptavidin-Biotin System and its Usage in Modern Surface Based Assays“, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **222**, 789–821 (2008).
- [53] P. C. Weber, J. Wendoloski, F. Salemme, „Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin“, *Science* **243**, 85–88 (1989).
- [54] PyMol 1.1 Molecular Graphics System, „3D-Grafikprogramm, <http://www.pymol.org/>“, [letzter Zugriff: 08.01.2010].
- [55] S. Freitag, I. L. Trong, L. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, „Structural studies of the streptavidin binding loop.“, *Protein Science* **6**, 1157–1166 (1997).
- [56] Protein Data Bank (PDB) of the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB), „An Information Portal to Biological Macromolecular Structures, <http://www.rcsb.org/pdb/>“, [letzter Zugriff 08.01.2010].
- [57] E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, „The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology.“, *Clinical Chemistry* **37**, 625–636 (1991).
- [58] H. Schettters, „Avidin and streptavidin in clinical diagnostics.“, *Biomolecular Engineering* **16**, 73–78 (1999).
- [59] T. G. Schmidt, A. Skerra, „One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the Strep-tag and immobilized recombinant core streptavidin“, *Journal of Chromatography A* **676**, 337–345 (1994).
- [60] A. Pähler, W. A. Hendrickson, M. A. Kolks, C. E. Argaraña, C. R. Cantor, „Characterization and crystallization of core streptavidin.“, *Journal of Biological Chemistry* **262**, 13933–13937 (1987).

- [61] E. A. Bayer, H. Ben-Hur, Y. Hiller, M. Wilchek, „Postsecretory modifications of streptavidin.“, *Biochemical Journal* **259**, 369–376 (1989).
- [62] W. A. Hendrickson, A. Pähler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt, R. P. Phizackerley, „Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 2190–2194 (1989).
- [63] S. Freitag, I. L. Trong, A. Chilkoti, L. A. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, „Structural studies of binding site tryptophan mutants in the high-affinity streptavidin-biotin complex.“, *Journal of Molecular Biology* **279**, 211–221 (1998).
- [64] S. Freitag, I. L. Trong, L. A. Klumb, V. Chu, A. Chilkoti, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, „X-ray crystallographic studies of streptavidin mutants binding to biotin“, *Biomolecular Engineering* **16**, 13–19 (1999).
- [65] P. S. Stayton, S. Freitag, L. A. Klumb, A. Chilkoti, V. Chu, J. E. Penzotti, R. To, D. Hyre, I. L. Trong, T. P. Lybrand, R. E. Stenkamp, „Streptavidin-biotin binding energetics“, *Biomolecular Engineering* **16**, 39–44 (1999).
- [66] M. H. Qureshi, S.-L. Wong, „Design, production, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins“, *Protein Expression and Purification* **25**, 409–415 (2002).
- [67] B. A. Katz, „Binding of biotin to streptavidin stabilizes intersubunit salt bridges between Asp61 and His87 at low pH“, *Journal of Molecular Biology* **274**, 776–800 (1997).
- [68] G. P. Kurzban, G. Gitlin, E. A. Bayer, M. Wilchek, P. M. Horowitz, „Biotin binding changes the conformation and decreases tryptophan accessibility of streptavidin“, *Journal of Protein Chemistry* **9**, 673–682 (1990).
- [69] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3.. Auflage, 2006.
- [70] E. W. Small, I. Isenberg, „Hydrodynamic properties of a rigid molecule: rotational and linear diffusion and fluorescence anisotropy.“, *Biopolymers* **16**, 1907–1928 (1977).
- [71] G. G. Belford, R. L. Belford, G. Weber, „Dynamics of fluorescence polarization in macromolecules.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **69**, 1392–1393 (1972).
- [72] D. V. O’Connor, D. Phillips, *Time-Correlated Single Photon Counting*, Academic Press, 1984.

- [73] A. Arakaki, S. Hideshima, T. Nakagawa, D. Niwa, T. Tanaka, T. Matsunaga, T. Osaka, „Detection of biomolecular interaction between biotin and streptavidin on a self-assembled monolayer using magnetic nanoparticles“, *Biotechnology and Bioengineering* **88**, 543–546 (2004).
- [74] K. Kinoshita, S. Kawato, A. Ikegami, „A theory of fluorescence polarization decay in membranes.“, *Biophysical Journal* **20**, 289–305 (1977).
- [75] 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).
- [76] C. N. Bialik, B. Wolf, E. L. Rachofsky, J. B. Ross, W. R. Laws, „Dynamics of biomolecules: assignment of local motions by fluorescence anisotropy decay.“, *Biophysical Journal* **75**, 2564–2573 (1998).
- [77] L. Brand, J. Knutson, L. Davenport, J. Beechem, R. Dale, D. Walbridge, A. Kowalczyk, *Some applications of associative behaviour to studies of proteins and membranes*, Spectroscopy and the Dynamics of Molecular Biological Systems, Academic Press, London, 1985.
- [78] P. Wahl, „Analysis of fluorescence anisotropy decays by a least square method“, *Biophysical Chemistry* **10**, 91–104 (1979).
- [79] C. Gell, D. Brockwell, D. Smith, *Handbook of single molecule fluorescence spectroscopy*, Oxford University Press, USA, 2006.
- [80] R. Rigler, A. Mets, J. Widengren, P. Kask, „Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion“, *European Biophysics Journal* **22**, 169–175 (1993).
- [81] S. Aragon, R. Pecora, „Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics“, *The Journal of Chemical Physics* **64**, 1791 (1976).
- [82] J. Widengren, R. Rigler, Ü. Mets, „Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy“, *Journal of Fluorescence* **4**, 255–258 (1994).
- [83] J. Widengren, U. Mets, R. Rigler, „Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study“, *The Journal of Physical Chemistry* **99**, 13368–13379 (1995).
- [84] J. Widengren, P. Schville, „Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy“, *The Journal of Physical Chemistry A* **104**, 6416–6428 (2000).

- [85] W. West, S. Pearce, F. Grum, „Stereoisomerism in Cyanine Dyes-meso-Substituted Thiocarbocyanines“, *Journal of Physical Chemistry* **71**, 1316–1326 (1967).
- [86] E. Hecht, *Optik*, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2005.
- [87] J. Enderlein, I. Gregor, „Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy“, *Review of Scientific Instruments* **76**, 033102 (2005).
- [88] G. Nishimura, M. Kinjo, „Dead-time distortion in fluorescence correlation measurements“, *Applied Optics* **44**, 3458–3467 (2005).
- [89] M. Zhao, L. Jin, B. Chen, Y. Ding, H. Ma, D. Chen, „Afterpulsing and Its Correction in Fluorescence Correlation Spectroscopy Experiments“, *Applied Optics* **42**, 4031–4036 (2003).
- [90] C. Zander, J. Enderlein, R. Keller, *Single Molecule Detection in Solution - Methods and Applications*, Wiley-VCH: Berlin, 2002.
- [91] P. Schwille, F. J. Meyer-Almes, R. Rigler, „Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution.“, *Biophysical Journal* **72**, 1878–1886 (1997).
- [92] M. H. Gey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*, Springer-Lehrbuch, Springer Berlin Heidelberg, 2. Auflage, 2008.
- [93] W. J. Thieman, M. A. Palladino, *Biotechnologie*, Pearson Studium, 2007.
- [94] T. Dertinger, V. Pacheco, I. von der Hocht, R. Hartmann, I. Gregor, J. Enderlein, „Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for accurate and absolute diffusion measurements.“, *ChemPhysChem* **8**, 433–443 (2007).
- [95] A. J. García-Saèz, P. Schwille, „Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions“, *Methods* **46**, 116–122 (2008), *New Methods in Membrane Protein Research*.
- [96] PicoQuant GmbH, „MicroTime 200 - Fluorescence Lifetime Microscope: User’s Manual and Technical Data v3.1“, Technical report, PicoQuant GmbH, 2004.
- [97] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, T. Dertinger, U. B. Kaupp, „Performance of fluorescence correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration.“, *ChemPhysChem* **6**, 2324–2336 (2005).

- [98] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, J. Fitter, „Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy“, *Current Pharmaceutical Biotechnology* **5**, 155–161 (2004).
- [99] T. Wohland, R. Rigler, H. Vogel, „The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy“, *Biophysical Journal* **80**, 2987–2999 (2001).
- [100] X. Michalet, S. Weiss, M. Jäger, „Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics“, *Chemical Reviews* **106**, 1785–1813 (2006).
- [101] H. Schott, „Hydration of micellar nonionic detergents“, *Journal of Colloid and Interface Science* **24**, 193 - 198 (1967).
- [102] G. Zakharova, A. Chibisov, „Spectral Investigation of the Monomer-Dimer Equilibrium for Thiocarbocyanine Dyes“, *High Energy Chemistry* **32**, 403–406 (1998).
- [103] A. R. Monahan, D. F. Blossey, „Aggregation of arylazonaphthols. I. Dimerization of Bonadur Red in aqueous and methanolic systems“, *The Journal of Physical Chemistry* **74**, 4014–4021 (1970).
- [104] R. R. Ojeda, I. A. K. Amashta, J. R. Ochoa, I. L. Arbeloa, „Excitonic treatment and bonding of aggregates of Rhodamine 6G in ethanol“, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **84**, 1–8 (1988).
- [105] A. K. Chibisov, G. V. Zakharova, H. Görner, „Photoprocesses in dimers of thiocarbocyanines“, *Physical Chemistry Chemical Physics* **1**, 1455–1460 (1999).
- [106] M. E. Sanborn, B. K. Connolly, K. Gurunathan, M. Levitus, „Fluorescence properties and photophysics of the sulfoindocyanine Cy3 linked covalently to DNA.“, *The Journal of Physical Chemistry B* **111**, 11064–11074 (2007).
- [107] M. L. Jones, G. P. Kurzban, „Noncooperativity of Biotin Binding to Tetrameric Streptavidin“, *Biochemistry* **34**, 11750–11756 (1995).
- [108] U. Schobel, H. J. Egelhaaf, A. Brecht, D. Oelkrug, G. Gauglitz, „New donor-acceptor pair for fluorescent immunoassays by energy transfer.“, *Bioconjugate Chemistry* **10**, 1107–1114 (1999).
- [109] M. Cooper, A. Ebner, M. Briggs, M. Burrows, N. Gardner, R. Richardson, R. West, „Cy3B: improving the performance of cyanine dyes.“, *Journal of Fluorescence* **14**, 145–150 (2004).
- [110] M. Y. Losytskyy, K. D. Volkova, V. B. Kovalska, I. E. Makovenko, Y. L. Slominskii, O. I. Tolmachev, S. M. Yarmoluk, „Fluorescent properties of pentamethine cyanine dyes with cyclopentene and cyclohexene group in presence of biological molecules.“, *Journal of Fluorescence* **15**, 849–857 (2005).

- [111] I. Gregor, J. Enderlein, „Time-resolved methods in biophysics. 3. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy“, *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**, 13–18 (2007).
- [112] L. Zhang, K. Dammann, S. Bae, S. Granick, „Ligand–receptor binding on nanoparticle-stabilized liposome surfaces“, *Soft Matter* **3**, 551–553 (2007).
- [113] V. Buschmann, K. D. Weston, M. Sauer, „Spectroscopic Study and Evaluation of Red-Absorbing Fluorescent Dyes“, *Bioconjugate Chemistry* **14**, 195–204 (2003).
- [114] L. B.-A. Johansson, „Limiting Fluorescence Anisotropies of Perylene and Xanthene Derivatives.“, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **86**, 2103 (1990).
- [115] R. S. Lepkowicz, C. M. Cirloganu, O. V. Przhonska, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, M. V. Bondar, Y. L. Slominsky, A. D. Kachkovski, E. I. Mayboroda, „Absorption anisotropy studies of polymethine dyes“, *Chemical Physics* **306**, 171–183 (2004).
- [116] M. Levitus, R. M. Negri, P. F. Aramendia, „Rotational Relaxation of Carbocyanines. Comparative Study with the Isomerization Dynamics.“, *The Journal of Physical Chemistry* **99**, 14231–14239 (1995).
- [117] P. F. Aramendía, R. M. Negri, E. San Román, „Temperature Dependence of Fluorescence and Photoisomerization in Symmetric Carbocyanines. Influence on Medium Viscosity and Molecular Structure“, *The Journal of Physical Chemistry* **98**, 3165–3173 (1994).
- [118] P. A. van den Berg, A. van Hoek, A. J. Visser, „Evidence for a Novel Mechanism of Time-Resolved Flavin Fluorescence Depolarization in Glutathione Reductase.“, *Biophysical Journal* **87**, 2577–2586 (2004).
- [119] E. D. Goddard, N. J. Turro, P. L. Kuo, „Fluorescence probes for critical micelle concentration determination“, *Langmuir* **1**, 352–355 (1985).
- [120] G. B. Ray, I. Chakraborty, S. P. Moulik, „Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity“, *Journal of Colloid and Interface Science* **294**, 248–254 (2006).
- [121] N. J. Turro, P. L. Kuo, „Fluorescence probes for aqueous solutions of nonionic micelles“, *Langmuir* **1**, 170–172 (1985).
- [122] K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, „Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems“, *Journal of the American Chemical Society* **99**, 2039–2044 (1977).

- [123] M. Levitus, M. A. Garcia-Garibay, „Polarized Electronic Spectroscopy and Photophysical Properties of 9,10-Bis(phenylethynyl)anthracene“, *The Journal of Physical Chemistry A* **104**, 8632–8637 (2000).
- [124] A. Beeby, K. S. Findlay, A. E. Goeta, L. Porrã’s, S. R. Rutter, A. L. Thompson, „Engineering a twist in 9,10-diethynylanthracenes by steric interactions.“, *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**, 982–986 (2007).
- [125] B. N. Khlebtsov, E. M. Chumakov, S. V. Semyonov, M. I. Chumakov, N. G. Khlebtsov, „Study of complex micellar systems by static and dynamic light scattering“, in *Coherent Optics of Ordered and Random Media IV*, D. A. Zimnyakov (Herausgeber), 5475, 12–20, SPIE, 2004.
- [126] L. Yu, M. Tan, B. Ho, J. L. Ding, T. Wohland, „Determination of critical micelle concentrations and aggregation numbers by fluorescence correlation spectroscopy: Aggregation of a lipopolysaccharide“, *Analytica Chimica Acta* **556**, 216–225 (2006), Young Analytical Faculty in Asia.
- [127] H. S. Muddana, T. T. Morgan, J. H. Adair, P. J. Butler, „Photophysics of Cy3-Encapsulated Calcium Phosphate Nanoparticles“, *Nano Letters* **9**, 1559–1566 (2009).
- [128] A. Mishra, R. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, „Dye-surfactant interaction: chain folding during solubilization of styryl pyridinium dyes in sodium dodecyl sulfate aggregates“, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **121**, 63–73 (1999).
- [129] L. Sahoo, J. Sarangi, P. K. Misra, „Organization of Amphiphiles, Part 1: Evidence in Favor of Pre-micellar Aggregates through Fluorescence Spectroscopy“, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **75**, 859–865 (2002).
- [130] M. Sowmiya, A. K. Tiwari, S. K. Saha, „Fluorescent probe studies of micropolarity, pre-micellar and micellar aggregation of non-ionic Brij surfactants“, *Journal of Colloid and Interface Science* **344**, 97 - 104 (2010).
- [131] M. Novo, S. Felekyan, C. A. M. Seidel, W. Al-Soufi, „Dye-Exchange Dynamics in Micellar Solutions Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy“, *The Journal of Physical Chemistry B* **111**, 3614–3624 (2007).
- [132] W. Al-Soufi, B. Reija, S. Felekyan, C. A. M. Seidel, M. Novo, „Dynamics of Supramolecular Association Monitored by Fluorescence Correlation Spectroscopy“, *ChemPhysChem* **9**, 1819–1827 (2008).

- [133] G. B. Dutt, „Rotational Diffusion of Nondipolar Probes in Triton X-100 Micelles: Role of Specific Interactions and Micelle Size on Probe Dynamics“, *The Journal of Physical Chemistry B* **106**, 7398–7404 (2002).
- [134] G. B. Dutt, „Rotational Diffusion of Hydrophobic Probes in Brij-35 Micelles: Effect of Temperature on Micellar Internal Environment“, *The Journal of Physical Chemistry B* **107**, 10546–10551 (2003).
- [135] G. B. Dutt, „Do ionic and hydrophobic probes sense similar microenvironment in Triton X-100 nonionic reverse micelles?“, *The Journal of Chemical Physics* **129**, 014501 (2008).
- [136] N. C. Maiti, M. M. G. Krishna, P. J. Britto, N. Periasamy, „Fluorescence Dynamics of Dye Probes in Micelles“, *The Journal of Physical Chemistry B* **101**, 11051–11060 (1997).
- [137] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 88th Edition*, CRC Press, 2007.
- [138] A. Mahata, D. Sarkar, D. Bose, D. Ghosh, A. Girigoswami, P. Das, N. Chattopadhyay, „Photophysics and rotational dynamics of a beta-carboline analogue in nonionic micelles: effect of variation of length of the headgroup and the tail of the surfactant.“, *Journal of Physical Chemistry B* **113**, 7517–7526 (2009).
- [139] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, „Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes.“, *Angewandte Chemie (International Edition)* **47**, 6172–6176 (2008).
- [140] D. Munzke, „Diplomarbeit“, 2009.

A Anhang

A.1 Gleichungen

A.1.1 Rotationskorrelationszeiten eines gestreckten Rotationsellipsoiden

Die drei Rotationszeiten ϕ_i im Vergleich zu der eines sphärischen Rotators ϕ_{sph} werden anhand der Rotationsdiffusionskoeffizienten berechnet [69, S. 420]:

$$\frac{\phi_1}{\phi_{\text{sph}}} = \frac{6D}{(D_{\parallel} + 5D_{\perp})} \quad (\text{A.1})$$

$$\frac{\phi_2}{\phi_{\text{sph}}} = \frac{6D}{(4D_{\parallel} + 2D_{\perp})} \quad (\text{A.2})$$

$$\frac{\phi_3}{\phi_{\text{sph}}} = \frac{6D}{(6D_{\perp})} \quad (\text{A.3})$$

Die Diffusionskoeffizienten ergeben sich durch das Achsenverhältnis $\rho = a/b > 1$ [69]:

$$\frac{D_{\parallel}}{D} = \frac{3\rho(\rho - S)}{2(\rho^2 - 1)} \quad (\text{A.4})$$

$$\frac{D_{\perp}}{D} = \frac{3\rho[(2\rho^2 - 1)S - \rho]}{2(\rho^4 - 1)} \quad (\text{A.5})$$

$$S = (\rho^2 - 1)^{-1/2} \ln \left[\rho + (\rho^2 + 1)^{1/2} \right] \quad (\text{A.6})$$

A.1.2 Auswertung der Autokorrelationsfunktion unter Berücksichtigung der Austauschkinetik

Die Gleichgewichtskonstante K_A des Assoziationsgleichgewichtes zwischen Mizellen und Farbstoff setzt sich aus der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_+) und Dissoziation (k_-) zusammen:

$$K_A = \frac{k_+}{k_-} \quad (\text{A.7})$$

Die Relaxationszeit τ_{rel} für die Austauschprozesse ist gegeben durch [131]:

$$\tau_{\text{rel}} = \frac{1}{k_+ c_{\text{Mi},0} + k_-} \quad (\text{A.8})$$

Unter der Annahme, dass die Assoziation der Farbstoffe mit nichtionischen Tensiden diffusionskontrolliert ist [131], ergibt sich für DY-635 anhand der *Smulochowski*-Gleichung eine Geschwindigkeitskonstante von [131]:

$$k_+ = k_d = 4\pi D_{\text{DM}} R_{\text{DM}} N_A = 12,4 \times 10^9 \text{ L}/(\text{mol s}) \quad (\text{A.9})$$

Dabei sind D_{DM} und R_{DM} die Summen der Diffusionskoeffizienten und hydrodynamischen Radien der Farbstoffe und Tween-20-Mizellen und N_A die *Avogadro*-Konstante. Unter Annahme, dass die Austauschreaktion sehr viel schneller ist als die Diffusionsprozesse ($\tau_{\text{rel}} \ll \tau_{\text{D,F}}, \tau_{\text{D,FMi}}$) und finden keine weiteren photophysikalischen Desaktivierungsprozesse in einen nichtfluoreszierenden Zustand statt, gilt für die Korrelationsfunktion [131]:

$$G_{\text{DR}}(\tau) = \frac{1}{N_{\text{F}} + N_{\text{F}}} \left(1 + \frac{\tau}{\bar{\tau}_{\text{D}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{w_0^2}{z_0^2} \frac{\tau}{\bar{\tau}_{\text{D}}}\right)^{-1/2} \left(1 + A_{\text{rel}} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{\text{rel}}}\right)\right) \quad (\text{A.10})$$

Die Amplitude A_{rel} ist definiert als [131]:

$$A_{\text{rel}} = \frac{K_A c_{\text{Mi},0} (1 - q)^2}{(1 + q K_A c_{\text{Mi},0})^2} \quad (\text{A.11})$$

Dabei ist q das Verhältnis der Quantenausbeute von F und FMi . Für eine Tensidkonzentration von $c(\text{Tween-20}) = 10^{-2} \text{ mol/L}$, einer *c.m.c.* von $6,3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, einer Gleichgewichtskonstanten $K_A = 4,9 \times 10^5 \text{ L/mol}$ und $q = 6$ ergibt sich für die Amplitude ein Wert von $A_{\text{rel}} = 000414$ (Gl. 4.17).

A.1.3 Fehlerbetrachtung

Fluoreszenzanisotropie

Perrin-Gleichung (Gl. 4.12)

$$dr_{\text{calc}} = \left| \frac{\partial r_{\text{calc}}}{\partial r_0} dr_0 \right| + \left| \frac{\partial r_{\text{calc}}}{\partial \tau} d\tau \right| + \left| \frac{\partial r_{\text{calc}}}{\partial \phi} d\phi \right| \quad (\text{A.12})$$

$$= \left| \left(\frac{1}{1 + \tau/\phi} \right) dr_0 \right| + \left| \frac{-r_{\text{calc}}}{\phi + \tau} d\tau \right| + \left| \frac{r_{\text{calc}}\tau}{\phi^2 (1 + \tau/\phi)} d\phi \right| \quad (\text{A.13})$$

Charakterisierung von Tween20

Hydrodynamischer Radius R_h (Gl. 2.25)

$$dR_h = \left| \frac{\partial R_h}{\partial T} dT \right| + \left| \frac{\partial R_h}{\partial D} dD \right| + \left| \frac{\partial R_h}{\partial \eta} d\eta \right| \quad (\text{A.14})$$

$$= \frac{k_B}{6\pi\eta D} \left(dT + \frac{T dD}{D} + \frac{T d\eta}{\eta} \right) \quad (\text{A.15})$$

verwendete Abweichungen:

$$dT = 0,5 \text{ K}$$

$$dD = (2 \dots 9) \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s} \text{ (Fehler der Anpassung)}$$

$$d\eta = 1,15 \times 10^{-5} \text{ Pa s [137]}$$

Aggregationszahl N_{agg} (Gl. 3.7)

$$N_{\text{agg}} = \frac{4\pi R_h^3}{3} \left(\frac{\delta}{v\rho_0} + 1 \right)^{-1} \frac{N_A}{vM_r} \quad (\text{A.16})$$

$$dN_{\text{agg}} = \left| \frac{\partial N_{\text{agg}}}{\partial R_h} dR_h \right| \quad (\text{A.17})$$

$$= \left| 4\pi R_h^2 \left(\frac{\delta}{v\rho_0} + 1 \right)^{-1} \frac{N_A}{vM_r} dR_h \right| \quad (\text{A.18})$$

A.2 Experimentelles

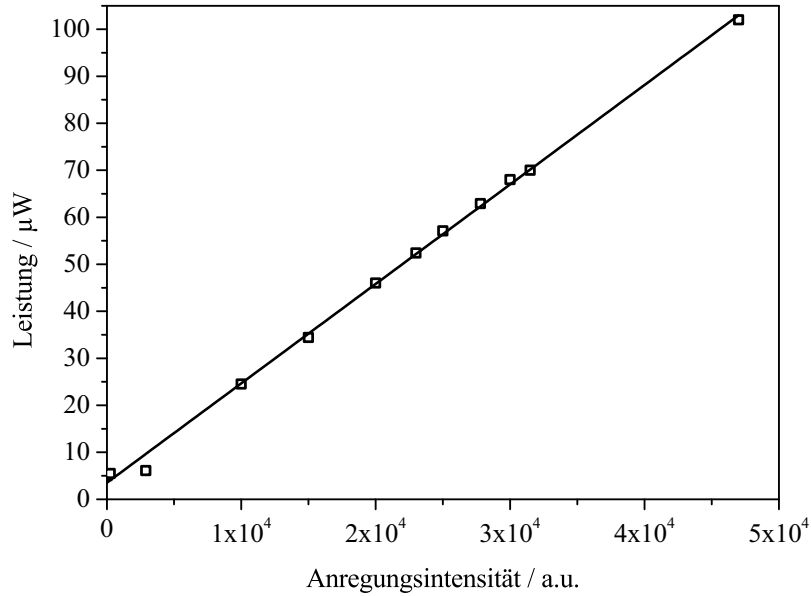


Abb. A.1: Leistung des Anregungslasers bei 630 nm. Aufgetragen ist die gemessene Laserleistung (in μW) gegen die von der Gerätesoftware ermittelte Intensität (in a.u.).

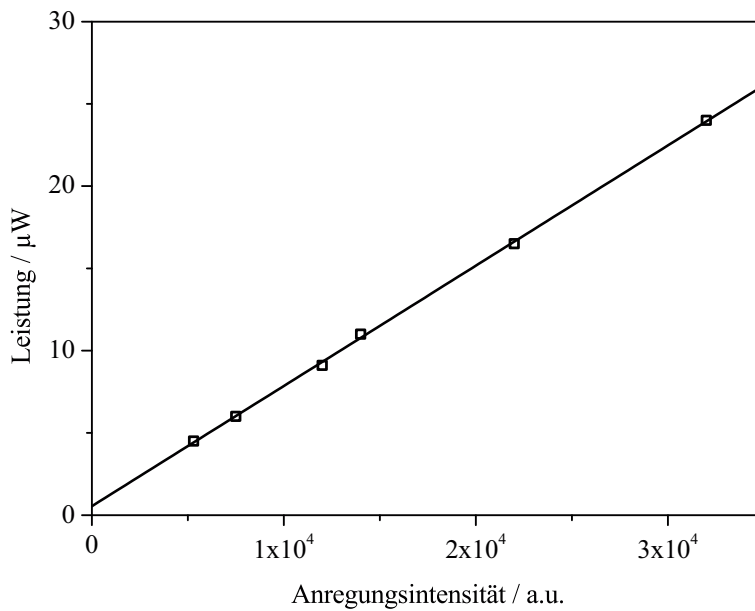


Abb. A.2: Leistung des Anregungslasers bei 470 nm. Aufgetragen ist die gemessene Laserleistung (in μW) gegen die von der Gerätesoftware ermittelte Intensität (in a.u.).

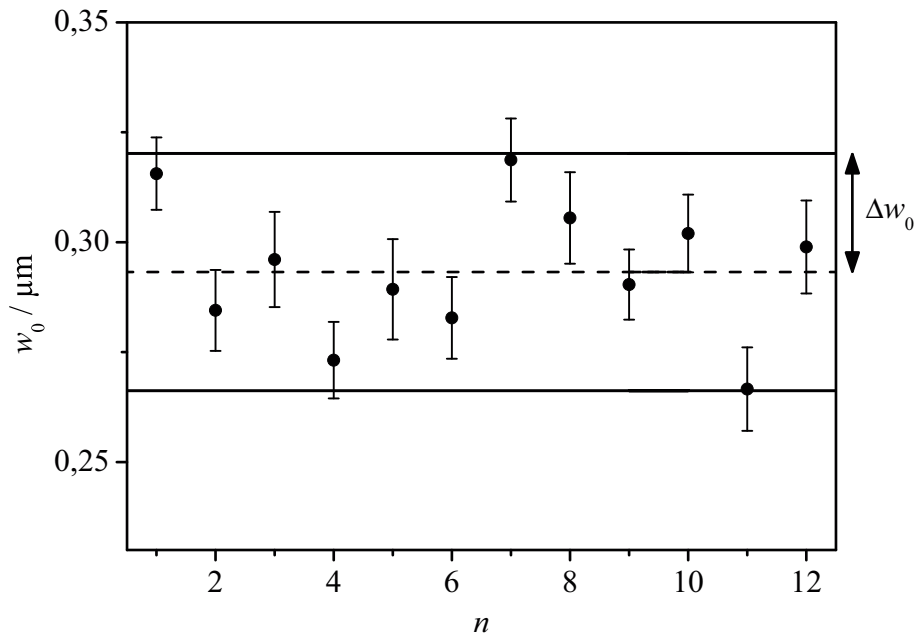


Abb. A.3: Rhodamin 6G in Wasser ($c = 10^{-9} \text{ mol/L}$). Angepasster Radius w_0 des Beobachtungsvolumens für 12 Messungen ($n = \text{Nummer der Messung}$) und der daraus berechnete Mittelwert (---) und der Größtfehler von w_0 (—). Höhe über Deckglas: $h = 30 \mu\text{m}$. Anregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 470 \text{ nm}$, Leistung des Anregungslasers: $21 \mu\text{W}$ (Methode 2, Tab. 3.5). Die Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ wurden global angepasst, mit dem Diffusionskoeffizienten D als globalen Parameter. Die Fehlerbalken jeder Messung sind die Fehler der Anpassung.

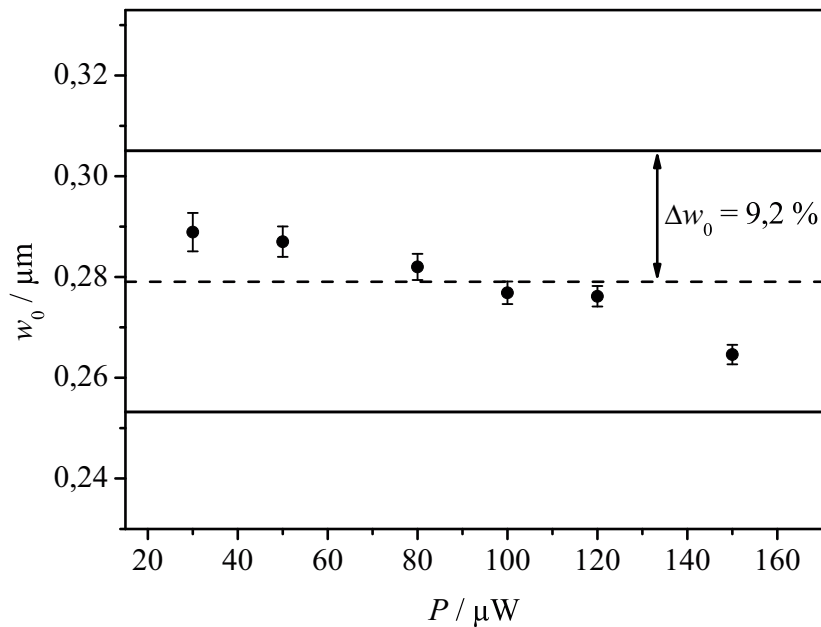


Abb. A.4: Ermittelter lateraler Radius w_0 des Beobachtungsvolumens einer $0,1 \text{ nM}$ Atto 655-Lösung in Wasser in Abhängigkeit der Laserintensität P . Anregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 635 \text{ nm}$ (Methode 3, Tab. 3.5). Mittelwert (---) und der Größtfehler von w_0 (—).

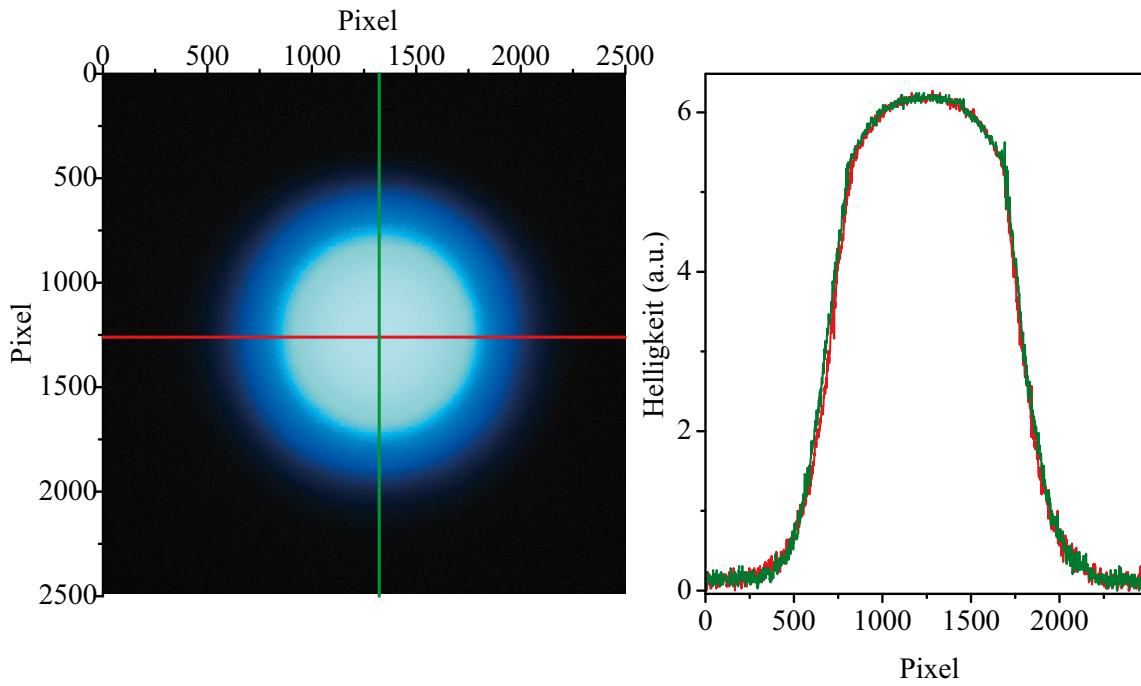


Abb. A.5: [links] Foto des radialsymmetrischen Profils des Laserstrahls (470 nm) im FCS-Aufbau vor dem Eintreffen in das Objektiv. [rechts] Bildprofil in horizontaler (rot) und vertikaler (grün) Richtung.

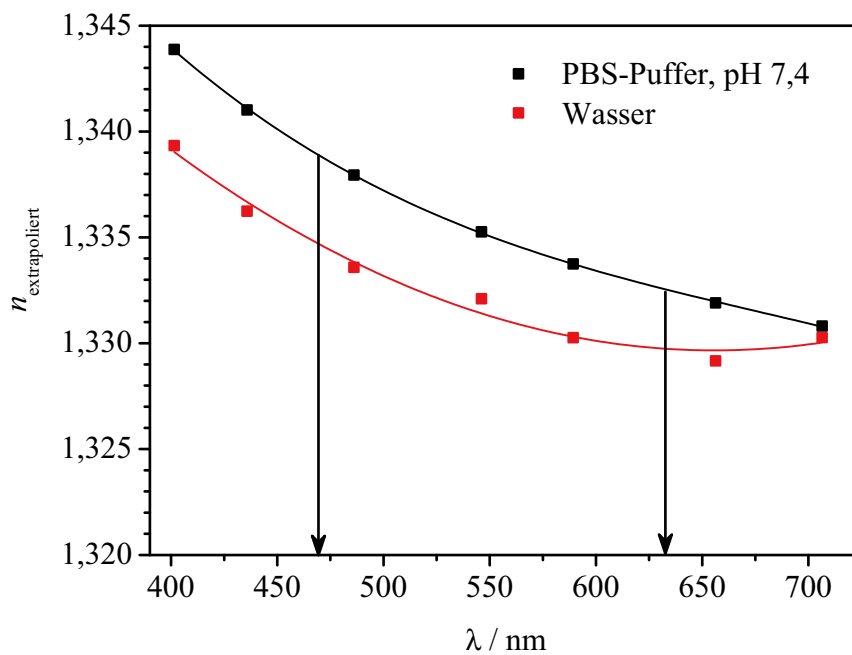


Abb. A.6: Brechungsindizes n von Wasser und PBS-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich und die daraus extrapolierten Werte. Die Messwerte wurden [140] entnommen.

A.3 Ergebnisse

A.3.1 Diagramme

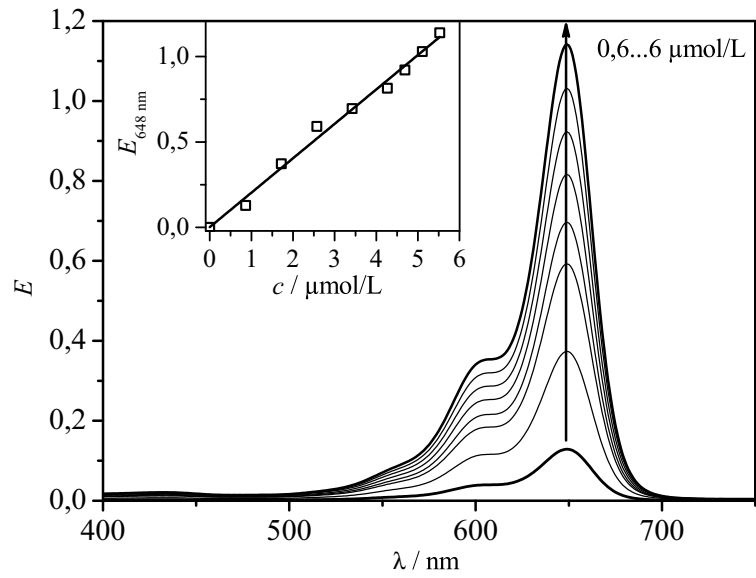


Abb. A.7: Absorptionsspektren von DY-647B in PBS-Puffer (pH 7,4) bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen. Inset: Abhängigkeit der Extinktion $E_{648 \text{ nm}}$ von DY-647B bei 648 nm von der Farbstoffkonzentration c und die dazugehörige lineare Anpassung.

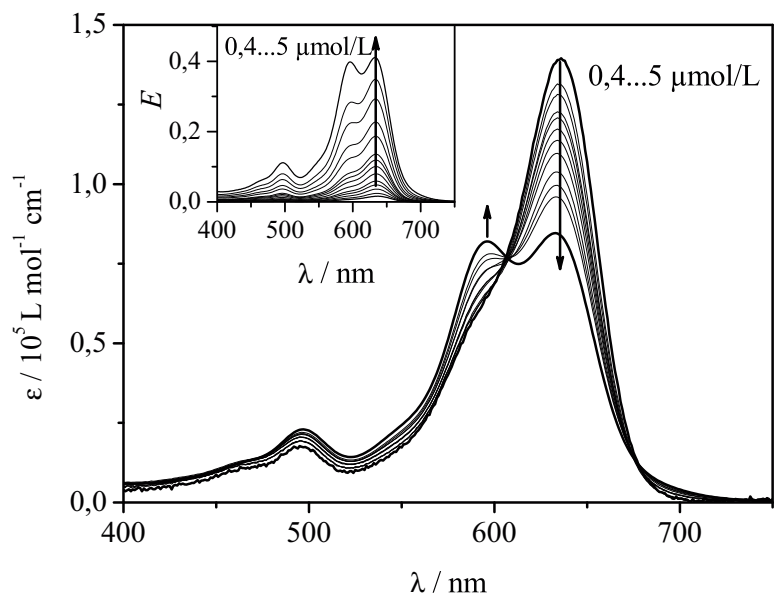


Abb. A.8: Durch die eingesetzte Farbstoffkonzentration c_0 geteilten Extinktionsspektren ($\epsilon = E/c_0$) von DY-635 bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen ($c_0 = 0,4 \dots 5 \mu\text{mol/L}$). Inset: zugehörige Extinktionsspektren

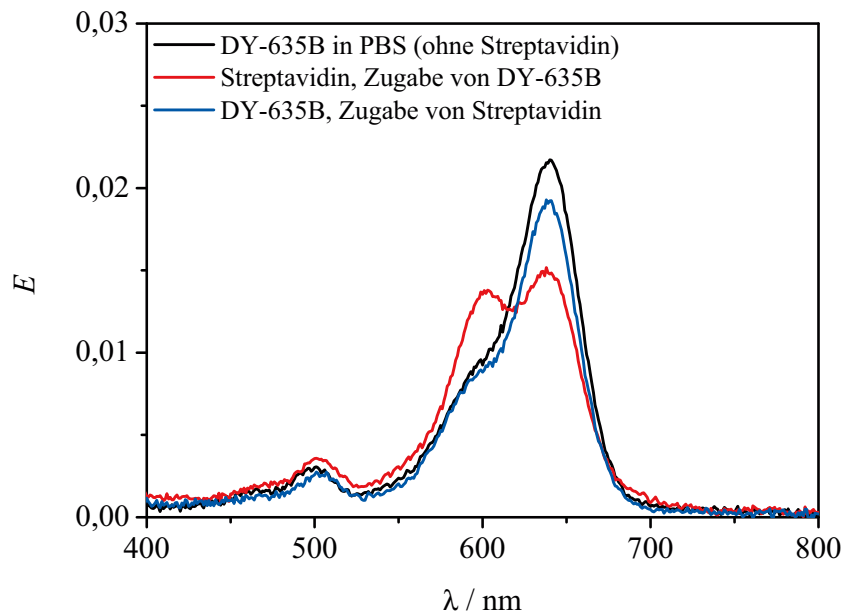


Abb. A.9: Einfluss der Reihenfolge der Mischung bei der Herstellung der Biotin-Streptavidin-Komplexe. Absorptionsspektrum des biotinylierten Farbstoffes DY-635B ($10 \mu\text{L}$ Stammlösung) in PBS-Puffer bei Abwesenheit von Streptavidin (schwarz) und mit einem zehnfachen Überschuss an Streptavidin (blau, rot). Blau: Die Lösung des biotinylierten Farbstoffes wurde in PBS-Puffer ($1,8 \text{ mL}$) vorgelegt und unter Rühren $200 \mu\text{L}$ der Streptavidin-Stammlösung zugegeben. Rot: Hierbei wurden zunächst $200 \mu\text{L}$ Streptavidin-Stammlösung in PBS-Puffer vorgelegt und im Anschluss $10 \mu\text{L}$ Farbstofflösung zugegeben. Das Absorptionsspektrum dieser Mischung zeigt eine verringerte Absorption der Hauptabsorptionsbande. Gleichzeitig ist die Absorption bei einer Wellenlänge um 600 nm erhöht. Dieses Verhalten deutet auf die Bildung von Farbstoffdimeren hin. (Konzentrationen der Stammlösungen: $c(\text{DY-635B}) = 2,9 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $c(\text{Streptavidin}) = 1,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$).

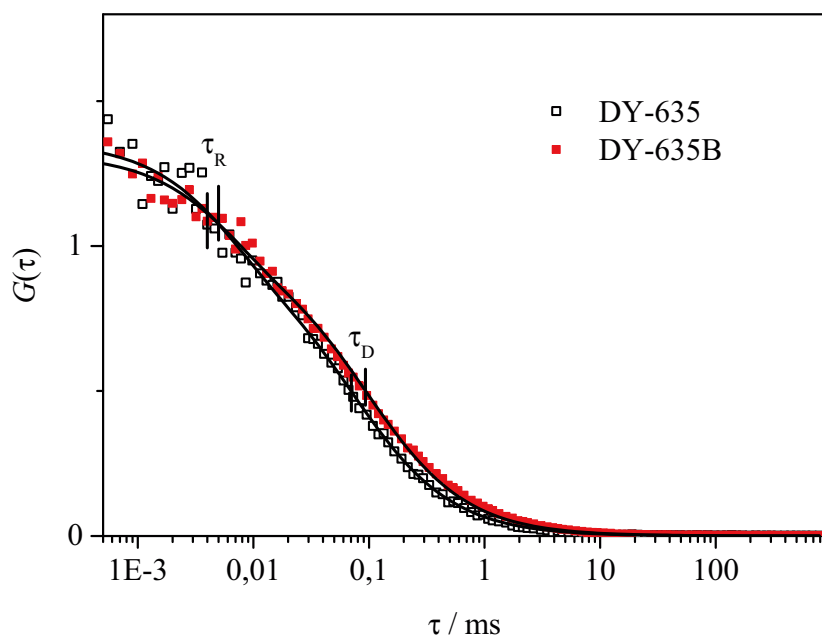


Abb. A.10: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von DY-635 und DY-635B in Wasser ($c = 10^{-9}$ mol/L) und die entsprechenden angepassten Kurven (schwarze Linien). Die Anpassung erfolgte nach Gl. 3.5. Die ermittelten Werte für die Diffusionszeit τ_D durch das Beobachtungsvolumen (Gl. 2.24) und die mittlere Zeit der photophysikalischen Deaktivierung τ_R sind jeweils markiert. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 630$ nm mit einer Leistung von $53 \mu\text{W}$ angeregt (Methode 3, vgl. Abschn. 3.5).

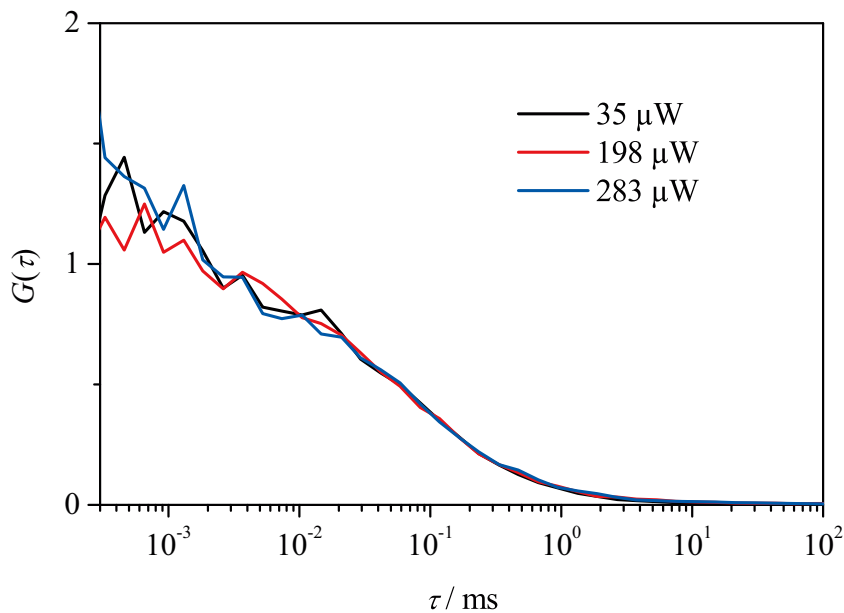


Abb. A.11: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von DY-635B in PBS-Puffer ($c = 2 \times 10^{-9}$ mol/L) bei unterschiedlicher Laserleistung: $35 \mu\text{W}$ (rote Linie) und $283 \mu\text{W}$ (schwarze Linie). Die Probe wurden bei 293 K und einer Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 633$ nm angeregt (Methode 1, vgl. Abschn. 3.5).

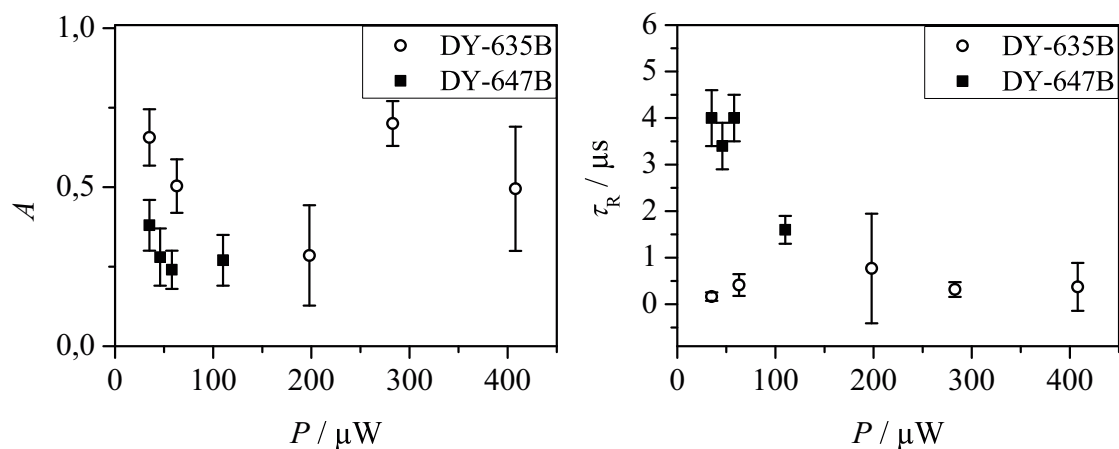


Abb. A.12: Parameter der photophysikalischen Desaktivierungsprozesse für DY-635B und DY-647B in PBS-Puffer ($c = 10^{-9} \text{ mol/L}$) bei unterschiedlicher Leistung P des Anregungslasers. Aufgetragen sind jeweils die Amplitude A der Korrelationsfunktion [links] bzw. die mittlere Korrelationszeit τ_R [rechts]. Die Anregung von DY-635B erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 633 \text{ nm}$ (Methode 1) und für DY-647B bei $\lambda_{\text{Ex}} = 630 \text{ nm}$ (Methode 3, vgl. Abschn. 3.5).

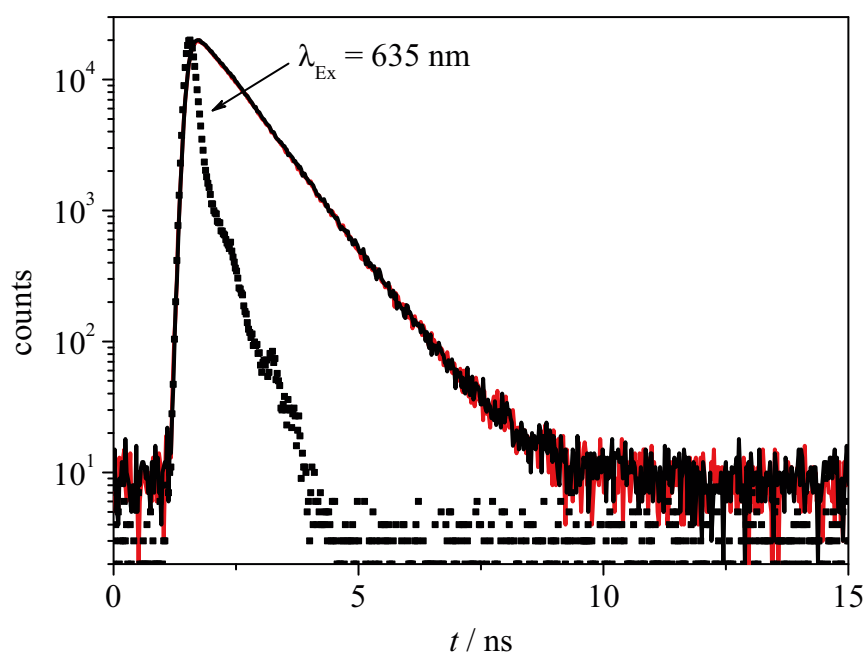


Abb. A.13: Die Farbstoffkonzentration hat keinen Einfluss auf die Fluoreszenzabklingkurve von DY-635B in PBS-Puffer. Rote Linie: $0,08 \mu\text{mol/L}$, schwarze Linie: $1,2 \mu\text{mol/L}$.

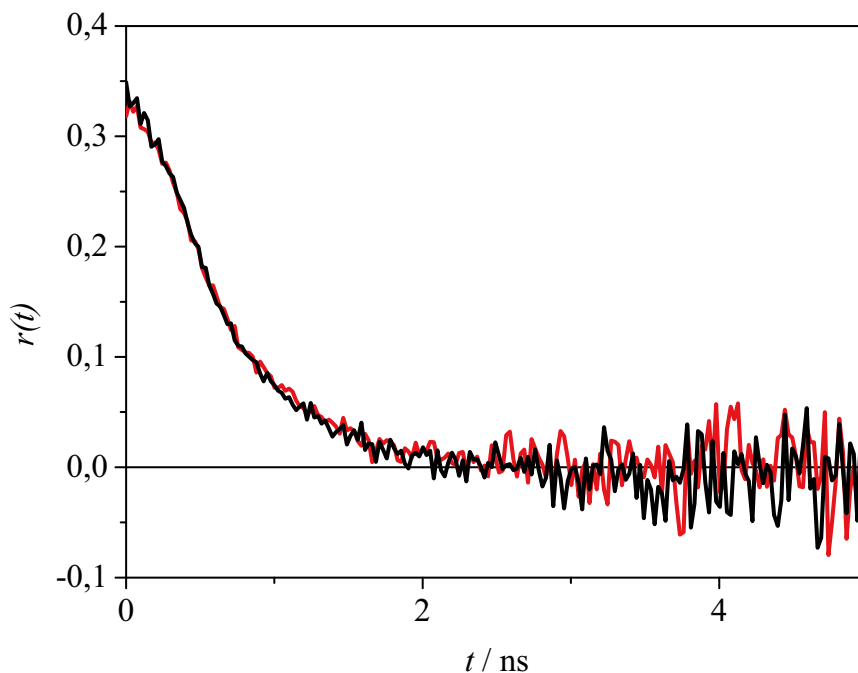


Abb. A.14: Die Farbstoffkonzentration hat keinen Einfluss auf die Fluoreszenzanisotropie von DY-635B in PBS-Puffer. Rote Linie: $0,08 \mu\text{mol/L}$, schwarze Linie: $1,2 \mu\text{mol/L}$

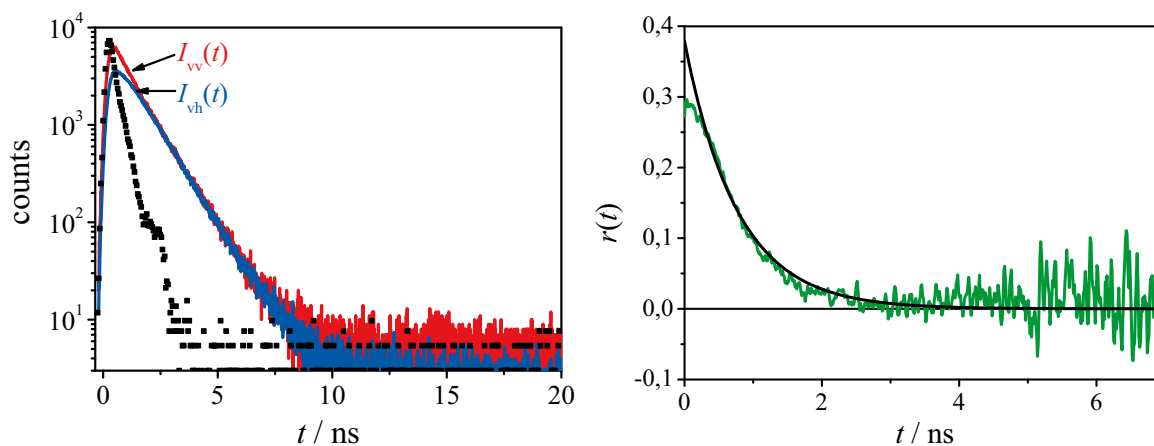


Abb. A.15: Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessung von DY-647B in PBS-Puffer pH7,4 ($c(\text{DY-647}) = 2,3 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$). [links]: Fluoreszenzabklingkurven (G-faktor-korrigiert): $I_{vv}(t)$ (rote Linie) und $I_{vh}(t)$ (blaue Linie). Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 635 \text{ nm}$ (Instrumentenfunktion Weißlichtlaser: schwarze Punkte). Fluoreszenzemission: $\lambda_{\text{Em}} = 670 \text{ nm}$. [rechts]: Anisotropieabklingkurve $r(t)$ (grüne Linie) und die entsprechende mono-exponentielle Anpassung nach Gl. 2.9 (schwarze Linie). Für die Rotationszeit des freien Farbstoffes wurde ein Wert von $\phi_f = 0,8 \text{ ns}$ ermittelt.

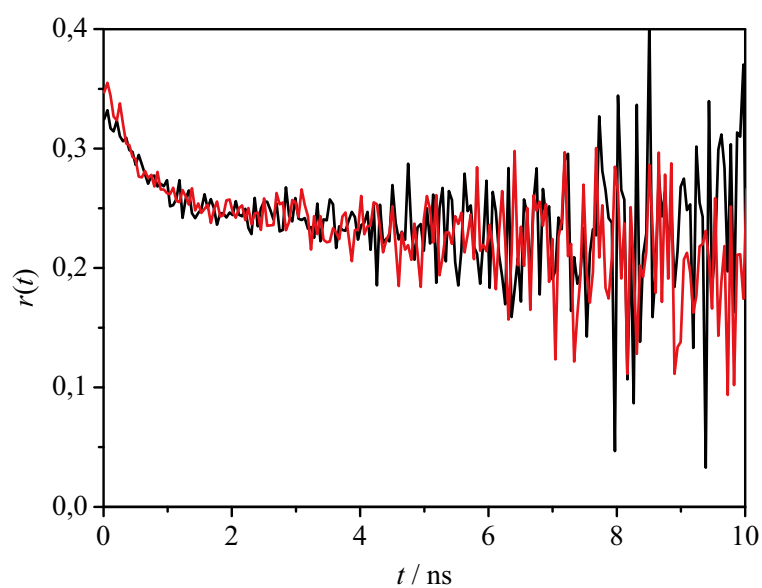


Abb. A.16: Kontrollexperiment zum Nachweis von eventuell vorhandenen freien Farbstoffmolekülen in einer Lösung von Streptavidin-gebundenem DY-647B in PBS-Puffer pH7,4. Fluoreszenzanisotropieabklingkurve $r(t)$ vor (schwarz) und nach der Reinigung (rot) der Lösung durch Größenausschlusschromatographie. ($c(\text{DY-647B}) = 1,6 \times 10^{-7}$ mol/L, $n(\text{DY-647B}) = 0,31$ nmol, Streptavidin: 7,2 nmol). Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 625$ nm (Weißlichtlaser). Fluoreszenzemission: $\lambda_{\text{Em}} = 670$ nm. Da sich die beiden Lösungen in ihrem Anisotropieabklingverhalten nicht unterscheiden, wird angenommen, dass alle DY-647B-Moleküle an Streptavidin gebunden sind.

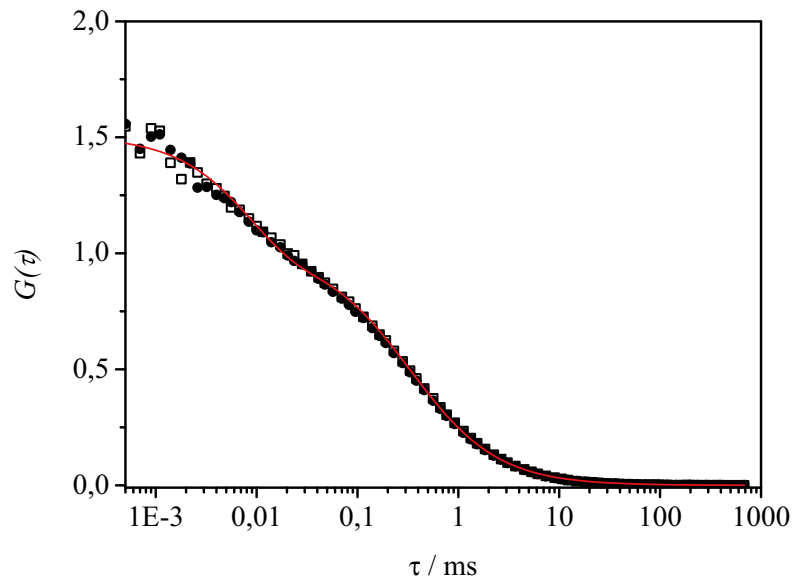


Abb. A.17: Kontrollexperiment zum Nachweis von eventuell vorhandenen freien Farbstoffmolekülen in einer Lösung von Streptavidin-gebundenem DY-635B in PBS-Puffer pH7,4. FCS-Kurve $r(t)$ vor (●) und nach der Reinigung (□) der Lösung durch Größenausschlusschromatographie. ($c(\text{DY-635B}) = 1,8 \times 10^{-7}$ mol/L, $n(\text{DY-635B}) = 0,36$ nmol, Streptavidin: 7,2 nmol). Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 625$ nm (Weißlichtlaser).

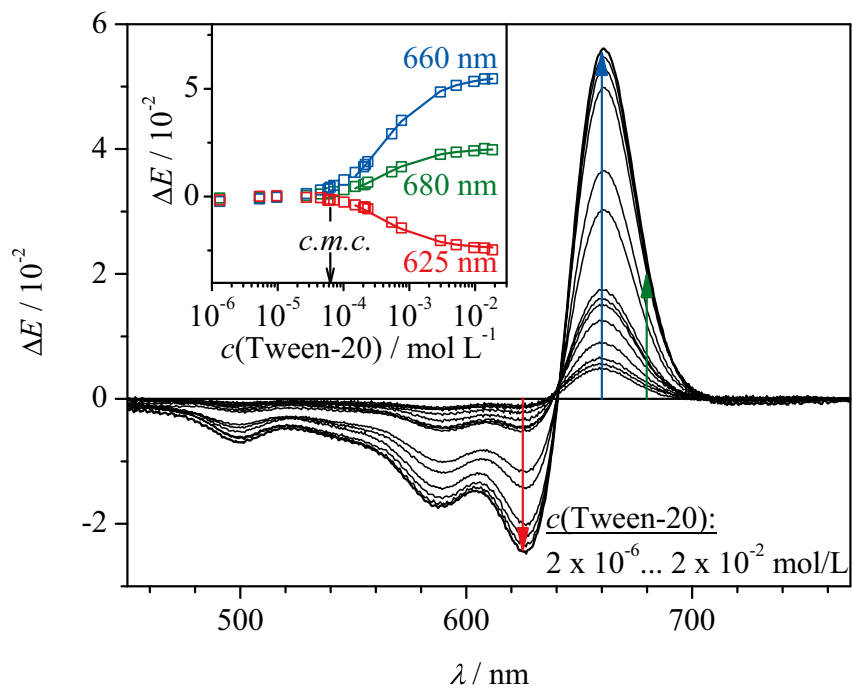


Abb. A.18: Differenzabsorptionsspektren von DY-635B in PBS-Puffer (pH 7,4) unter der Zugabe des nichtionischen Tensids Tween-20. Die Farbstoffkonzentration lag bei $0,65 \mu\text{mol/L}$. Inset: Werte für ΔE bei den markierten Wellenlänge und die dazugehörige Anpassung.

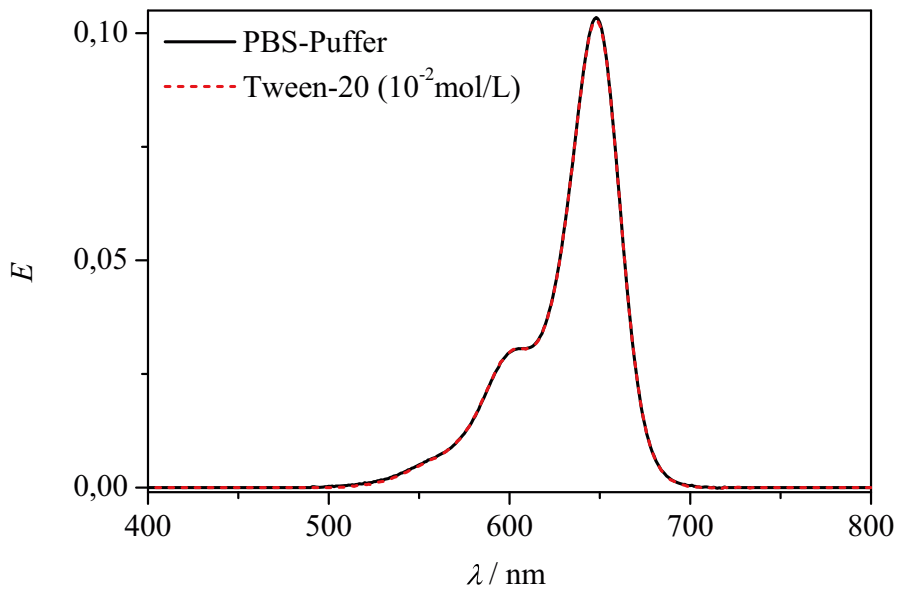


Abb. A.19: Absorptionsspektren von DY-647 in PBS-Puffer bei pH 7,4 und in einer Lösung von Tween-20 in PBS-Puffer. Es wurde kein signifikanter Einfluss des Tensids auf die Absorptionseigenschaften des Farbstoffes festgestellt. $c(\text{DY-647B}) = 0,5 \mu\text{mol/L}$.

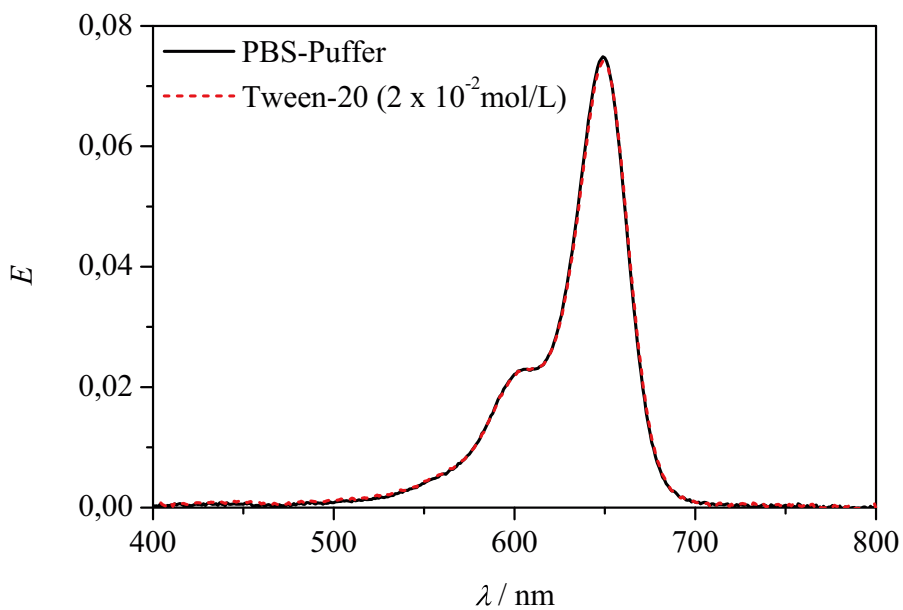


Abb. A.20: Absorptionsspektren von DY-647B in PBS-Puffer bei pH 7,4 und in einer Lösung von Tween-20 in PBS-Puffer. Es wurde kein signifikanter Einfluss des Tensids auf die Absorptionseigenschaften des Farbstoffes festgestellt. $c(\text{DY-647B}) = 0,4 \mu\text{mol/L}$.

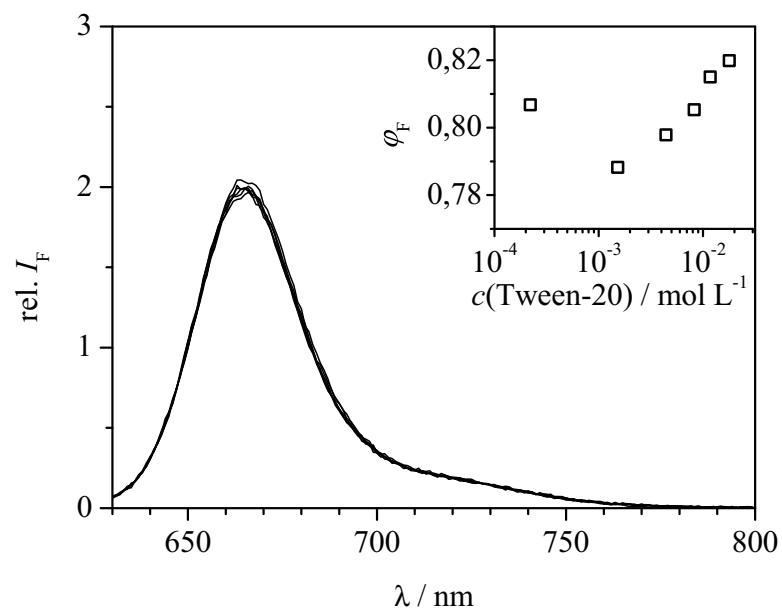


Abb. A.21: Fluoreszenzspektren von DY-647B in PBS-Puffer bei pH 7,4 und in einer Lösung von Tween-20 in PBS-Puffer. Inset: relative Quanteneffizient φ_F bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen. $c(\text{DY-647B}) = 0,4 \mu\text{mol/L}$. Oberhalb der *c.m.c.* wird ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Bis zu einer Tween-20-Konzentration von $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ wurde kein signifikanter Einfluss auf die Fluoreszenzintensität festgestellt. Oberhalb dieser Konzentration kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz.

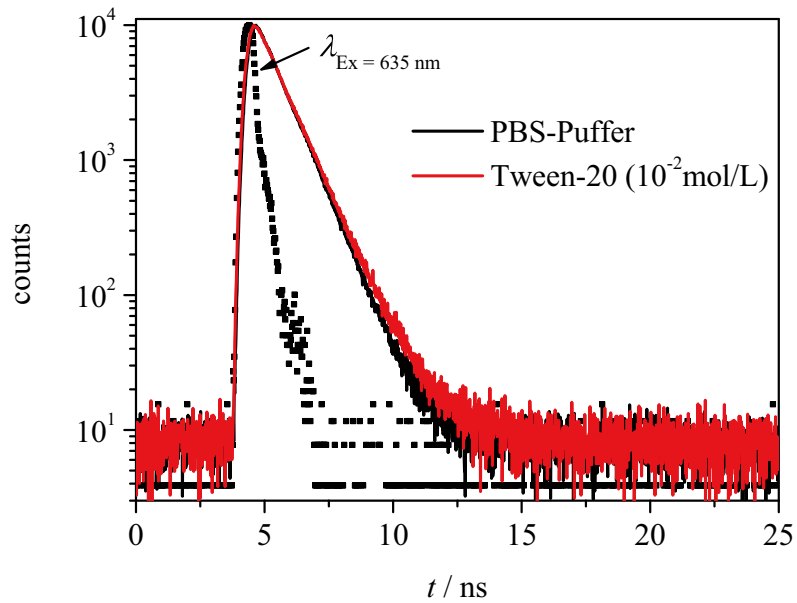


Abb. A.22: Fluoreszenzabklingkurven von DY-647 in PBS-Puffer (pH 7,4) und nach Zugabe von Tween-20. $c(\text{DY-647}) = 0,45 \mu\text{mol/L}$. Fluoreszenzanregung: $\lambda_{Ex} = 635$ nm (Instrumentenfunktion Weißlichtlaser: schwarze Punkte). Fluoreszenzemission: $\lambda_{Em} = 680$ nm.

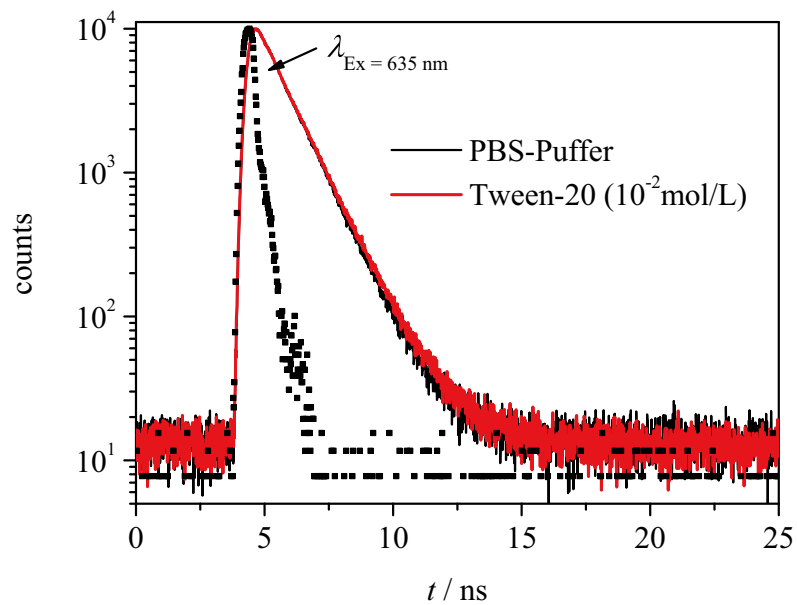


Abb. A.23: Fluoreszenzabklingkurven von DY-647B in PBS-Puffer (pH 7,4) und nach Zugabe von Tween-20. $c(\text{DY-647B}) = 0,4 \mu\text{mol/L}$. Fluoreszenzanregung: $\lambda_{Ex} = 635$ nm (Instrumentenfunktion Weißlichtlaser: schwarze Punkte). Fluoreszenzemission: $\lambda_{Em} = 680$ nm.

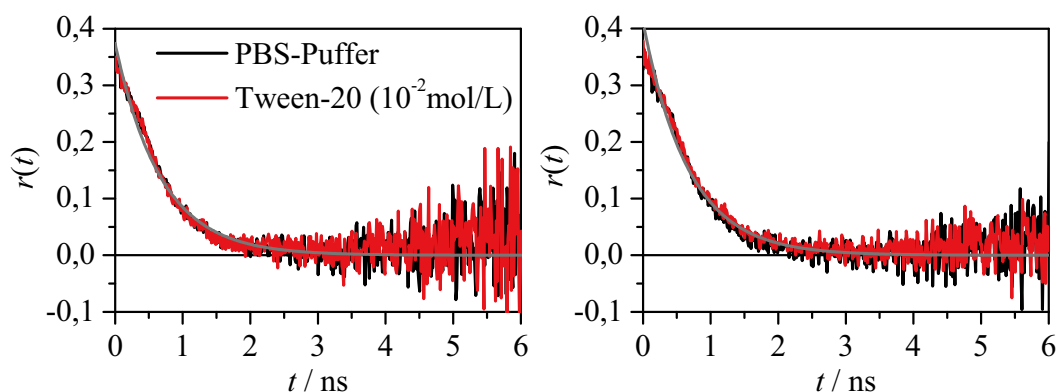


Abb. A.24: Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessung von DY-647 [links] und DY-647B [rechts] in PBS-Puffer bei pH 7,4 und in einer Lösung von Tween-20 in PBS-Puffer. Im Konzentrationsbereich bis $c(\text{Tween-20}) = 10^{-2} \text{ mol/L}$ wurde kein Einfluss auf die Anisotropieabklingkurve beobachtet.

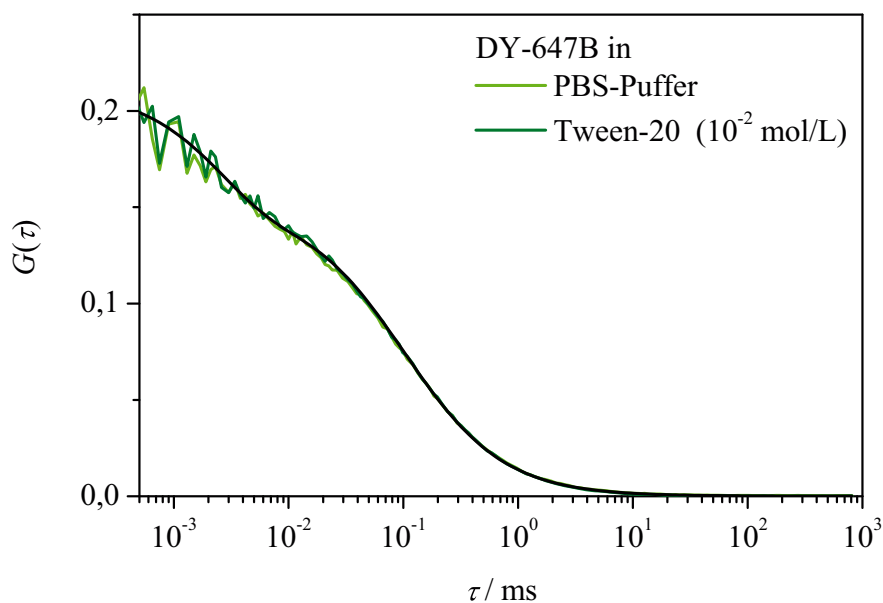


Abb. A.25: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ von DY-647B ($c(\text{DY-647B}) = 10^{-9} \text{ mol/L}$) in PBS-Puffer (pH 7,4) und in Tween-20 ($c(\text{Tween-20}) = 10^{-2} \text{ mol/L}$). Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{EX}} = 630 \text{ nm}$ und einer Laserleistung von $P = 35 \mu\text{W}$ (Methode 3, vgl. 3.5). Die Anpassung (schwarze Linien) erfolgte nach Gl. 3.5.

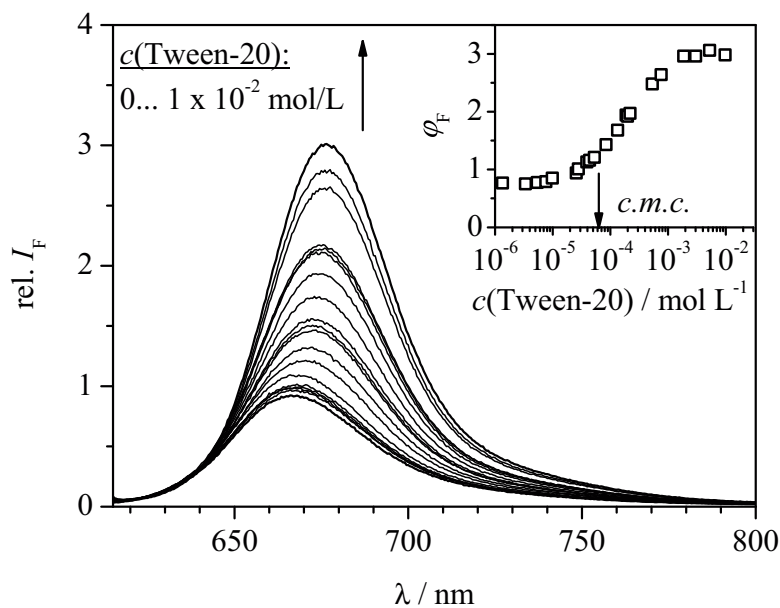


Abb. A.26: Fluoreszenzspektren von DY-635B in PBS-Puffer bei pH 7,4 unter der Zugabe von Tween-20. Die Farbstoffkonzentration lag bei $0,65 \mu\text{mol/L}$. Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 610 \text{ nm}$. Inset: relative Quanteneffizienz φ_F bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen. Oberhalb der $c.m.c.$ wird ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet.

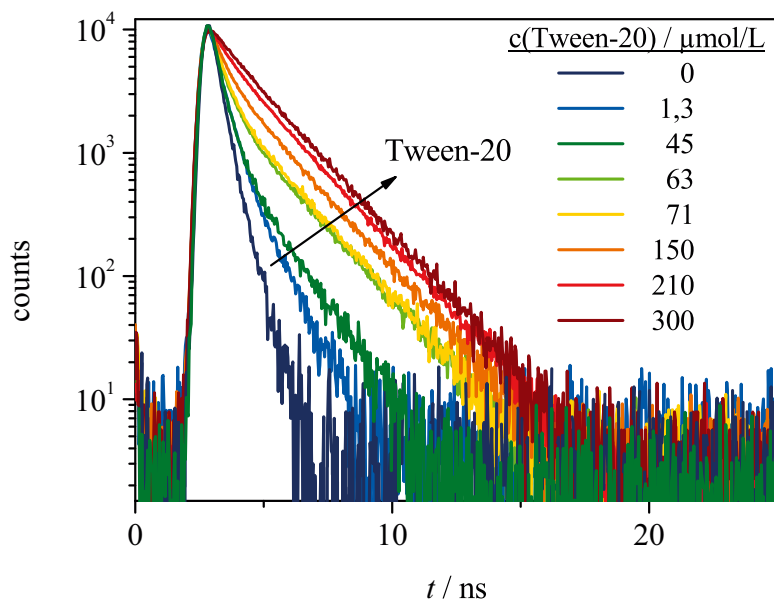


Abb. A.27: Fluoreszenzabklingkurven von DY-635 in PBS-Puffer bei pH 7,4 bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen. $c(\text{DY-635}) = 0,72 \mu\text{mol/L}$. Fluoreszenzanregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 630 \text{ nm}$. Fluoreszenzemission: $\lambda_{\text{Em}} = 670 \text{ nm}$.

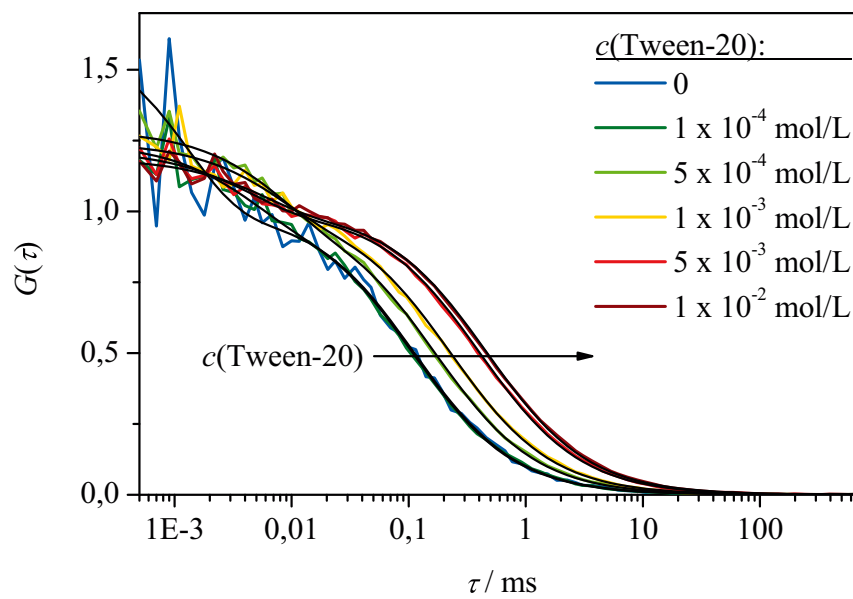


Abb. A.28: Normierte Korrelationsfunktionen $G(\tau)$ (bunte Linien) und die entsprechenden angepassten Kurven (schwarze Linien) von DY-635B in PBS-Puffer bei pH 7,4 bei verschiedenen Tween-20-Konzentrationen. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 630 \text{ nm}$ angeregt und die Anreizungsleistung des Lasers betrug: $P = 65 \mu\text{W}$ (Methode 3, vgl. Abschn. 3.5). Die Anpassung erfolgte nach Gl. 3.5.

A.3.2 Tabellen

Tab. A.1: Anisotropieparameter^a der zeitaufgelösten Anisotropiemessungen von Mischungen an freiem und Streptavidin-gebundenem DY-635B und DY-647B in PBS-Puffer (pH7,4) bei 298 K und unterschiedlichen Streptavidin/Farbstoff-Verhältnissen. Die Auswertung erfolgte nach Gl. 2.16 anhand einer globalen Anpassung. Es sind jeweils die angepassten Werte und der jeweilige Fehler der Anpassung angegeben.

Farbstoff	$\phi_{f,1}$ / ns	$\phi_{seg,2}$ / ns	$\phi_{M,2}$ / ns	A_∞ ^b	τ_1 / ns	τ_2 / ns
DY-635B	$0,8 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	27 ± 3	$0,84 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
DY-647B	$0,8 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$	32 ± 5	$0,68 \pm 0,05$	$1,1 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$

^a Rotationskorrelationszeit des freien Farbstoffes $\phi_{f,1}$, des Farbstoff-Protein-Komplexes $\phi_{M,2}$ und für die segmentweise Rotation des Farbstoffes $\phi_{seg,2}$ und die dazugehörigen Fluoreszenzabklingzeiten (τ_1 und τ_2).

^b Der Parameter A_∞ wurde für die Lösungen mit einem Streptavidin/Biotin-Verhältnis > 1 global angepasst (in der Tabelle angegebener Wert). Hierbei wird angenommen, dass jeweils nur ein Farbstoffmolekül am Streptavidin gebunden ist.

Tab. A.2: Diffusionskoeffizient D und hydrodynamischer Radius R_h von Tween-20-Mizellen bei unterschiedlichen Tensidkonzentrationen (Bestimmung durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie)

$c(\text{Tween } 20)$ (mol/L)	$D \times 10^{11}$ (m ² /s)	R_h (nm)
1×10^{-4}	$7,6 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,4$
5×10^{-4}	$8,0 \pm 0,7$	$2,7 \pm 0,4$
1×10^{-3}	$8,0 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,4$
5×10^{-3}	$8,3 \pm 0,7$	$2,6 \pm 0,4$
1×10^{-2}	$7,8 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,4$

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht worden ist sowie selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Mitteln angefertigt wurde.

Potsdam, Mai 2010

Franziska Luschnitz