

Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung
Arbeitsgruppe Nanopolyphotonik

Quantenpunktbasiertes spektroskopisches Lineal mit Terbium-Komplexen als Donoren für optische FRET-Multiplexmessungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Physikalische Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Frank Morgner

Potsdam, August 2012

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2013/6357/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-63576](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-63576)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-63576>

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2009 bis August 2012 am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung in Potsdam unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben, Universität Potsdam
Prof. Dr. Pablo Wessig, Universität Potsdam
Prof. Dr. Janina Kneipp, Humboldt-Universität Berlin
Prof. Dr. Eckart Rühl, Freie Universität Berlin

Für Anna, Felina und Emilia.

Ohne euch wäre alles nichts.

*Ich kann's bis heute nicht verwinden,
deshalb erzähl ich's auch nicht gern:
den Stein der Weisen wollt' ich finden
und fand nicht mal des Pudels Kern.*

Heinz Erhard

Danksagung

Ogleich mein Name an der Stelle des Verfassers dieser Dissertation steht, ist sie nicht allein das Produkt meiner Arbeit, sondern Ergebnis der Bemühungen vieler Personen, ohne deren Anteil, so klein er auch sein mochte, das vorliegende Werk nicht entstanden wäre. Zum Glück war ich kein einsamer Streiter, sondern Teil einer Gemeinschaft, deren Beitrag ich nicht hoch genug schätzen kann. Mein Dank geht daher nicht nur an die im Folgenden namentlich Genannten sondern auch an die, die aus Vergeßlichkeitsgründen hier nicht erwähnt werden.

Zuerst danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben für die herzliche Wiederaufnahme in den Schoß der Arbeitsgruppe „Physikalische Chemie“ der Universität Potsdam und die Bereitstellung des höchst interessanten Forschungsthemas sowie le Professeur Dr. Niko Hildebrandt für die fachliche Resozialisierung, die anregenden Diskussionen und seinen grenzenlosen Tatendrang in jedweder Hinsicht, der wissenschaftlichen, wie der menschlichen. In letzterem bereitwillig unterstützt von den anderen beiden Gründungsmitgliedern der Fraunhofer-Arbeitsgruppe NanoPolyPhotonik (NPP), (endlich)-Dr. Torsten Rabe und (auch schon)-Dr. Sebastian Döring, denen ich hiermit meinen innigen Dank dafür ausdrücken möchte, dass ich jeden Tag mit einem Lächeln zur Arbeit ging. Dr. Stefan Stufler, der meine Dissertation und die NPP eine Zeitlang begleitete, betreute und am Leben hielt, gilt ebenfalls ein ganz großes Dankeschön in dieser Hinsicht sowie außerdem für die fachlichen Anregungen und Denkanstöße, auf die sonst niemand gekommen wäre. Ich hoffe, es liegt nicht an mir, dass alle drei Letztgenannten Golm inzwischen verlassen haben.

Dr. Daniel Geißler danke ich für die intensive Zusammenarbeit, das gemeinsame Spiel mit dem runden Leder und die ausgiebige Stärkung der Beweglichkeit und Kraft meiner *Digitus medius* infolge fortwährender Nutzung. Weiterhin danke ich der Felidae-Beauftragten Cindy Ast für die Ermöglichung diverser Familienurlaube und Wochen der Erholung, die absolut notwendig waren. Diana Hill, André Geßner, Mark Bennemann und Franziska Ebert danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und dem Kaffeefullautomaten des Fraunhofer IBMT für die Bereitstellung des besten Kaffees auf dem eurasischen Kontinent.

Meiner Familie und all meinen Freunden danke ich für ihr Da-sein, ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und Anregung. Besonders aber danke ich euch, Anna, Felina und Emilia, die ihr mir täglich die Augen öffnetet, für das, was wichtig ist im Leben. Danke für das Lachen, danke für das Weinen und danke für eure Liebe.

Und schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken: Danke dafür, dass ihr an mich geglaubt und mich meinen Weg habt gehen lassen auch wenn es nicht immer der eure war.

<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
KURZZUSAMMENFASSUNG	IX
ABSTRACT	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1 ÜBERBLICK UND MOTIVATION	1
1.2 ZIEL UND AUFBAU DER ARBEIT	4
2. THEORETISCHE UND PRAKTISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1 FÖRSTER-RESONANZENERGIETRANSFER (FRET).....	5
2.1.1 <i>Einleitung</i>	5
2.1.2 <i>Theoretische Betrachtung der FRET-Parameter</i>	6
Überlappungsintegral J	11
Brechungsindex n	13
Lumineszenzquantenausbeute Q_D	13
Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor κ^2	14
2.1.3 <i>Anwendung der FRET-Theorie zur Abstandsberechnung</i>	17
2.1.4 <i>Andere Lösmechanismen</i>	19
2.2 HABLEITERNANOKRISTALLE (QUANTENPUNKTE)	21
2.2.1 <i>Einleitung</i>	21
2.2.2 <i>Theoretische Beschreibung der besonderen Eigenschaften von Quantenpunkten</i>	22
Das Absorptions-Übergangsdipolmoment von Quantenpunkten	25
2.2.3 <i>Kern-Schale-Quantenpunkte</i>	26
2.2.4 <i>Anwendungen biokompatibler Quantenpunkte</i>	27
2.3 LANTHANOIDKOMPLEXE	28
2.3.1 <i>Einleitung</i>	28
2.3.2 <i>Das freie Terbium-Ion und seine spektroskopischen Eigenschaften</i>	29
Elektronische Konfiguration.....	29
Optische Übergänge und Auswahlregeln.....	30
2.3.3 <i>Der Terbiumkomplex Lumi4Tb</i>	33
Das Emissions-Übergangsdipolmoment von Lumi4-Tb.....	35
2.3.4 <i>Biochemische Anwendungen von Lanthanoid-Komplexen</i>	36
2.4 FRET-BASIERTE ANWENDUNGEN: IMMUNOASSAYS UND MOLEKULARES LINEAL	36
2.4.1 <i>Immunoassays</i>	36
Heterogene Assays.....	37
Homogene Assays	37
2.4.2 <i>Molekulares Lineal</i>	38
2.4.3 <i>Biotin-Streptavidin-System</i>	39
2.4.4 <i>Zink-Histidin-System</i>	42
3. EXPERIMENTALTEIL.....	43
3.1 PUFFER.....	43

3.2	FRET-AKZEPTOREN UND –DONOREN	43
3.2.1	<i>Biotin-Streptavidin-System</i>	43
3.2.2	<i>Zink-Histidin-System</i>	44
3.3	EXPERIMENTELLE METHODEN	45
3.3.1	<i>Absorptions- und Lumineszenzspektroskopie</i>	45
3.3.2	<i>Zeitaufgelöste Fluoroimmunoassays</i>	45
3.4	DURCHFÜHRUNG DER FRET-ASSAYS	46
3.4.1	<i>Biotin-Streptavidin-Assays</i>	46
3.4.2	<i>Zink-Histidin-Assays</i>	47
3.5	DATENAUSWERTUNG UND -EVALUATION	47
4.	ABSTANDS- UND LEBENSZEITVERTEILUNGEN	49
4.1	EINLEITUNG	49
4.2	VERTEILUNGSFUNKTIONEN	50
4.2.1	<i>Gauß-Wahrscheinlichkeitsverteilung (Normalverteilung)</i>	50
4.2.2	<i>Logarithmische Normalverteilung</i>	51
4.2.3	<i>Singular Value Decomposition (Singularwertzerlegung)</i>	52
4.2.4	<i>Andere Verteilungen</i>	53
5.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	57
5.1	CHARAKTERISIERUNG DER FRET-DONOREN	57
5.1.1	<i>Absorptionsspektren</i>	57
5.1.2	<i>Emissionsspektren</i>	58
5.1.3	<i>Lumineszenzabklingkurven</i>	59
5.2	CHARAKTERISIERUNG DER FRET-AKZEPTOREN	61
5.2.1	<i>Absorptionsspektren</i>	61
5.2.2	<i>Emissionsspektren</i>	62
5.2.3	<i>Lumineszenzabklingkurven</i>	62
5.3	FRET-PARAMETER DER QD-LUMI4TB-PAARE.....	65
5.4	ERWARTETE ABSTANDSVERTEILUNGEN FÜR LUMI4TB-PEP-ITK-QD UND RESULTIERENDE LEBENSZEITVERTEILUNGEN.....	66
5.4.1	<i>Allgemeines</i>	66
5.4.2	<i>Lumi4Tb-Pep und ITK-QD525</i>	66
5.4.3	<i>Lumi4Tb-Pep und ITK-QD565</i>	71
5.4.4	<i>Lumi4Tb-Pep und ITK-QD605</i>	74
5.4.5	<i>Lumi4Tb-Pep und ITK-QD655</i>	77
5.4.6	<i>Lumi4Tb-Pep und ITK-QD705</i>	78
5.5	DAS FRET-SYSTEM LUMI4TB-PEP-ITK-QD IM EXPERIMENT	80
5.5.1	<i>Allgemeines</i>	80
5.5.2	<i>Lumi4Tb und QD525</i>	83
5.5.3	<i>Lumi4Tb und QD565</i>	87
5.5.4	<i>Lumi4Tb und QD605</i>	90
5.5.5	<i>Lumi4Tb und QD655</i>	93
5.5.6	<i>Lumi4Tb und QD705</i>	96

5.5.7	<i>Schlußfolgerungen</i>	99
5.6	ERWARTETE ABSTANDSVERTEILUNGEN FÜR LUMI4Tb-STREP-BIOT-QD UND RESULTIERENDE LEBENSZEITVERTEILUNGEN.....	104
5.6.1	<i>Allgemeines</i>	104
5.6.2	<i>Lumi4Tb-Strep und Biot-QD525</i>	106
5.6.3	<i>Lumi4Tb-Strep und Biot-QD565</i>	107
5.6.4	<i>Lumi4Tb-Strep und Biot-QD605</i>	108
5.6.5	<i>Lumi4Tb-Strep und Biot-QD655</i>	110
5.6.6	<i>Lumi4Tb-Strep und Biot-QD705</i>	111
5.7	DAS FRET-SYSTEM LUMI4Tb-STREP-BIOT-QD IM EXPERIMENT	112
5.7.1	<i>Lumi4Tb und QD525</i>	112
5.7.2	<i>Lumi4Tb und QD565</i>	118
5.7.3	<i>Lumi4Tb und QD605</i>	123
5.7.4	<i>Lumi4Tb und QD655</i>	127
5.7.5	<i>Lumi4Tb und QD705</i>	131
5.7.6	<i>Fazit</i>	135
6.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	137
6.1	ZUSAMMENFASSUNG.....	137
6.2	AUSBLICK	141
	LITERATURVERZEICHNIS.....	I
A.	ANHANG.....	XIII
A.1	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	XIII
A.2	PROBENVORBEREITUNG	XIV
A.3	ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE DICHROITISCHE SPIEGEL UND BANDPASS-FILTER.....	XVI
A.4	KORREKTUR DES CROSSTALKS UND HINTERGRUNDS DER LUMINESZENZSIGNALE	XVII
A.5	EXCEL-DATENBLATT ZUR BERECHNUNG DER ABSTANDSVERTEILUNGEN MIT DEM EXCEL-TOOL SOLVER	XVIII
A.6	ERMITTELTE LEBENSZEIT- UND ABSTANDSVERTEILUNGEN DER ZINK-HISTIDIN-ASSAYS	XXI
A.7	ERMITTELTE LEBENSZEIT- UND ABSTANDSVERTEILUNGEN DER BIOT-STREP-ASSAYS.....	XXVI

Publikationen

Artikel:

F. Morgner, D. Geißler, K. Susumu, Oh, E.; I.L. Medintz, N. Hildebrandt “Quantum Dots as FRET acceptors in biosensors - A Luminescence-lifetime study to reveal the FRET distance dependence“, *in Vorbereitung*

F. Morgner, S. Stufler, D. Geißler, I.L. Medintz, W.R. Algar, K. Susumu, M.H. Stewart, J.B. Blanco-Canosa, P.E. Dawson, N. Hildebrandt “Terbium to quantum dot FRET bioconjugates for clinical diagnostics: Influence of human plasma on optical and assembly properties“, *Sensors* **2011**, *11* (10), 9667-9684.

a) F. Morgner, D. Geißler, N.G. Butlin, H-G. Löhmannsröben, N. Hildebrandt, “A Quantum Dot-Based Molecular Ruler for Multiplexed Optical Analysis“, *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49* (41), 7570-7574.

b) F. Morgner, D. Geißler, N.G. Butlin, H-G. Löhmannsröben, N. Hildebrandt, “Ein Quantenpunkt-basiertes molekulares Lineal zur optischen Multiplexanalyse“, *Angew Chem* **2010**, *122* (41), 7732-7736.

Poster:

D. Geißler, F. Morgner, H-G. Löhmannsröben, N. Hildebrandt, “Multiplexed diagnostics and spectroscopic ruler measurements with semiconductor quantum dots as FRET acceptors“, 22. Lecture Conference on Photochemistry Erlangen, Deutschland, **2010**

Kurzzusammenfassung

Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) liefert einen wichtigen Beitrag bei der Untersuchung kleinskaliger biologischer Systeme und Prozesse. Möglich wird dies durch die r^{-6} -Abhängigkeit des FRET, die es erlaubt Abstände und strukturelle Änderungen weit unterhalb der Beugungsgrenze des Lichts mit hoher Sensitivität und geringem Aufwand zu bestimmen. Die besonderen photophysikalischen Eigenschaften von Terbiumkomplexen (LTC) und Quantenpunkten (QD) machen sie zu geeigneten Kandidaten für hochsensitive und störungsarme Multiplex-Abstandsmessungen in biologischen Systemen und Prozessen. Die Abstandsbestimmungen setzen jedoch eine genaueste Kenntnis des Mechanismus des Energietransfers von LTC auf QD ebenso voraus, wie das Wissen um Größe und Gestalt letzterer. Quantenpunkte haben im Vergleich zu biologischen Strukturen ähnliche Dimensionen und können nicht als punktförmig betrachtet werden, wie es bei einfacheren Farbstoffen möglich ist. Durch ihre Form kommt es zu einer Abstandsverteilung innerhalb des Donor-Akzeptorsystems. Dies beeinflusst den Energietransfer und damit die experimentellen Ergebnisse. In dieser Arbeit wurde der Energietransfer von LTC auf QD untersucht, um zu einer Aussage hinsichtlich des Mechanismus der Energieübertragung und der dabei zu berücksichtigenden photophysikalischen und strukturellen Parameter von LTC und QD zu gelangen. Mit der Annahme einer Abstandsverteilung sollten die Größen der Quantenpunkte bestimmt und der Einfluss von Form und Gestalt auf den Energietransfer betrachtet werden. Die notwendigen theoretischen und praktischen Grundlagen wurden eingangs dargestellt. Daran schlossen sich Messungen zur photophysikalischen Charakterisierung der Donoren und Akzeptoren an, die Grundlage der Berechnung der FRET-Parameter waren. Die Förster-Radien zeigten die für den FRET von LTC auf QD typischen extrem hohen Werte von bis zu 11 nm. Zeitaufgelöste Messungen der FRET-induzierten Lumineszenz der Donoren und Akzeptoren in den beiden biomolekularen Modellsystemen Zink-Histidin und Biotin-Streptavidin beschloss den praktischen Teil. Als Donor wurde Lumi4Tb gebunden an ein Peptid bzw. Streptavidin genutzt, Akzeptoren waren fünf verschiedene, kommerziell erhältliche Quantenpunkte mit Carboxyl- bzw. Biotinfunktionalisierung. Bei allen Donor-Akzeptor-Paarungen konnte FRET beobachtet und ausgewertet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die gesamte Emission des Terbiums zum Energietransfer beiträgt und der Orientierungsfaktor κ^2 den Wert $2/3$ annimmt. Die Charakterisierung der Bindungsverhältnisse innerhalb der FRET-Paare von LTC und QD über Verteilungsfunktionen bietet über die Form der Verteilungskurve die Möglichkeit Aussagen über die Gestalt der FRET-Partner zu treffen. So war es möglich, die mittlere Form der Quantenpunkte als Sphäre zu bestimmen. Dies entsprach, insbesondere bei den in z-Richtung des Kristallgitters elongierten Quantenpunkten, nicht den Erwartungen. Dieser Befund ermöglicht daher bei zukünftigen Messungen eine Verbesserung der Genauigkeit bei Abstandsbestimmungen mit Quantenpunkten. Neben der Ermittlung der die FRET-Verteilung bestimmenden Gestalt der Quantenpunkte konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand vergleichender Messungen die Dicke der Polymerhülle der QD bestimmt und so gezeigt werden, dass FRET-Paare aus lumineszenten Terbiumkomplexen und Quantenpunkten in der Lage sind, Abstände im Nano- bis Sub-Nanometerbereich aufzulösen.

Abstract

Förster resonance energy transfer (FRET) plays an important role in the study of small-scale biological systems and processes. This is made possible by the r^{-6} -dependence of FRET, which allows for determination of distances and structural changes far below the diffraction limit of light with high sensitivity and low costs. The unique photophysical properties of terbium complexes (LTC) and quantum dots (QDs) make them suitable candidates for high-sensitivity, low-noise multiplex distance measurements in biological systems and processes. Estimating distances with these FRET-pairs requires a precise knowledge of the mechanism of energy transfer from LTC to QD as well as the knowledge of size and shape of the latter. Quantum dots have, compared to biological structures, similar dimensions and therefore can not be considered as point-like, as it is possible with smaller dyes. Due to their shape, there is a distance distribution within the donor-acceptor system. This influences the energy transfer and hence the experimental results. In this work, the energy transfer from LTC to QD was examined to come to a conclusion regarding the mechanism of energy transfer and the photophysical and structural parameters of LTC and QD to be considered. The adoption of a FRET-distance distribution due to a size distribution of quantum dots should yield to a size estimation of the nanoparticles as well as a conclusion of the influence of shape and form on energy transfer. The necessary theoretical and practical principles were described at the outset of this work. This description of the basic concepts was followed by the photophysical characterization of the donors and acceptors and the calculation of FRET parameters. The calculated Förster radii were typical for the FRET from LTC to QD and showed extremely high values of up to 11 nm. Time-resolved measurements of the FRET-induced luminescence of donors and acceptors in two biomolecular model binding systems namely zinc-histidine and biotin-streptavidin binding rounded the practical part. FRET-donors used were commercially available Lumi4Tb complexes bound to streptavidin or a peptide, respectively. As FRET-acceptors five different commercially available quantum dots with carboxyl- or biotin-functionalisation were used. For all donor-acceptor pairs FRET could be observed and evaluated. It could be shown that the whole emission of terbium contributes to energy transfer. Furthermore the orientation factor κ^2 was estimated to have a value of $2/3$ when using LTC as FRET-donors and QD as FRET-acceptors. The characterization of the bonding within the FRET pairs of LTC and QD with distribution functions allows for statements about the shape of the FRET partners via shape of the distribution curves. It was possible to determine the average shape of the quantum dots as a sphere. This outcome was, especially for (in z-direction of the crystal lattice) elongated quantum dots, in the contrary to the expectations. This finding therefore allows for improving the accuracy of distance determinations with quantum dots. Based on comparative measurements it was also possible to determine the thickness of the polymer shell of the QD demonstrating that FRET pairs of luminescent terbium complexes and quantum dots are capable of determining distances in the nanometer to sub-nanometer range.

1. Einleitung

1.1 Überblick und Motivation

In der modernen Analytik biologischer Systeme *in vitro* und *in vivo* werden immer höhere Anforderungen an die Empfindlichkeit und Genauigkeit optischer Untersuchungsmethoden gestellt, sei es bei der Aufklärung von Proteinstrukturen, der Verfolgung biologischer Reaktionen *in situ* oder dem Nachweis von Krankheitsmarkern in Immunoassays. Insbesondere bei Untersuchungen mit dem Ziel der Aufklärung biologischer Strukturen und Prozesse, die sich meist im Bereich weniger Nanometer bewegen, stoßen herkömmliche optische Methoden allerdings an ihre Grenzen bzw. sind mit großem apparativen Aufwand und/oder hohen Kosten verbunden [1].

Anwendungen auf der Basis des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) liefern hier einen wichtigen Beitrag bei der Untersuchung kleinskaliger biologischer Systeme und Prozesse in Biologie, Biochemie, und Medizin [2-5]. Möglich wird dies durch die r^{-6} -Abhängigkeit des FRET, die es erlaubt Abstände und strukturelle Änderungen weit unterhalb der Beugungsgrenze des Lichts mit hoher Sensitivität und geringem Aufwand zu bestimmen. Man spricht von Förster-Resonanzenergietransfer wenn Energie über Coulomb-Wechselwirkungen strahlungslos von einem angeregten Donor auf einen Akzeptor in räumlicher Nähe übertragen wird [6,7].

FRET als „molekulares Lineal“ wurde erstmals vor 40 Jahren von Stryer et al. [8,9] genutzt und wird bis heute *in* und *ex vivo* bis hinunter auf Einzelmolekülebene für Untersuchungen inter- und intramolekularer Wechselwirkungen angewandt [10-12]. Dabei kommen hauptsächlich FRET-Paare verschiedener Farbstoffe, fluoreszente Proteine, seltener auch Nanopartikel, vor allem aus Edelmetallen oder Halbleitern wie Cadmiumselenid, zur Anwendung [13-15]. Der Einsatz von Farbstoffen und fluoreszenten Proteinen als FRET-Sonden bietet viele Vorteile: Sie sind über einen langen Zeitraum und in einer Vielzahl verschiedener Medien chemisch stabil und einfach zu handhaben. Es gibt unzählige Kombinationen von Farbstoffen und fluoreszenten Proteinen mit unterschiedlichsten photophysikalischen Eigenschaften, so dass für jedes zu untersuchende System die passenden Sonden eingesetzt werden können. Weiterhin haben Farbstoffmoleküle eine geringe Größe, was es erleichtert, diese einerseits an die zu untersuchenden Biomoleküle zu binden und andererseits das zu untersuchende System möglichst wenig zu beeinflussen. Abgesehen von ihrer Größe trifft das Genannte ebenfalls auf fluoreszente Proteine zu [16,17]. Diesen Vorteilen stehen einige Nachteile gegenüber, die bei der Planung und Durchführung von Struktur- und Abstandsuntersuchungen per FRET berücksichtigt werden müssen: Die Lumineszenzlebenszeiten von Farbstoffen und fluoreszenten Proteinen liegen im Nanosekundenbereich. Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen der Autofluoreszenz des biologischen Mediums, die im selben Zeitbereich stattfindet, schwierig [18]. Dies umso mehr, als eine schmale Stokes-Verschiebung zwischen Absorption und Emission von Farbstoffen und fluoreszenten Proteinen sowie breite Emissionsspektren derselben zur Folge haben, dass das gewünschte FRET-Signal

zusätzlich von der nicht durch Energietransfer induzierten Lumineszenz überlagert wird. Letztlich muß das Signal sowohl von der Autofluoreszenz als auch von der nicht durch FRET verursachten Emission unterschieden werden, was äußerst schwierig sein kann. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass der Förster-Radius, die Donor-Akzeptor-Entfernung, bei der die FRET-Effizienz 50 Prozent beträgt, von Farbstoffen und fluoreszenten Proteinen selten sechs Nanometer übersteigt [19], was für viele Untersuchungen in biologischen Systemen zu kurz ist. Nicht zuletzt ist auch das Ausbleichen ein Problem vieler Farbstoffe und fluoreszenter Proteine. Dies führt zu einer Verfälschung des Meßsignals, da die Sonden zwar nicht mehr fluoreszieren, jedoch weiterhin absorbieren und an ihre FRET-Partner binden können.

Die Verwendung von Nanopartikeln, insbesondere aus Halbleitermaterialien, in FRET-Experimenten ermöglicht es größere Abstände zu detektieren, denn ihre im Vergleich zu Farbstoffen und fluoreszenten Proteinen wesentlich höheren Extinktionskoeffizienten machen größere Förster-Radien möglich [16]. Auch sind Nanopartikel unempfindlicher gegenüber einem Ausbleichen und, bei geeigneter Beschichtung, ebenso biokompatibel und problemlos zu handhaben wie Farbstoffe und fluoreszente Proteine. Da in den letzten Jahren zahlreiche Methoden zur Biofunktionalisierung von Nanopartikeln etabliert wurden, ist die Untersuchung biologischer Systeme mit Hilfe von FRET-Donor-Akzeptor-Paaren aus Nanopartikeln inzwischen verbreitet [20-22]. Das Problem der mangelnden Trennbarkeit des FRET-Signals von der Lumineszenz der biologischen Probe und der nicht durch FRET verursachten Emission des Akzeptors bleibt allerdings auch bei diesen FRET-Sonden bestehen.

Die Kombination von lumineszenten Terbiumkomplexen (LTC) als FRET-Donoren mit Halbleiter-Quantenpunkten (QD) als FRET-Akzeptoren vereint die beschriebenen Vorteile von Nanopartikeln (photophysikalische Stabilität, extrem hohe Extinktionskoeffizienten) mit der Möglichkeit der hintergrundsignalfreien Aufnahme des FRET-Signals durch zeitverzögerte Detektion, die sich durch die langlebige Lumineszenz der Terbiumkomplexe bis in den Millisekundenbereich ergibt [23-26]. Die lange Lumineszenzabklingzeit der LTC hat ihren Grund darin, dass die Emission der Komplexe aus $f-f$ Übergängen des zentralen Terbium-Ions resultiert, die nach den Auswahlregeln verboten sind (siehe Abschnitt 2.3.2). Diese verbotenen Übergänge besitzen allerdings nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, was dazu führt, dass der Extinktionskoeffizient des freien Terbium-Ions sehr klein ist. In Verbindung mit geeigneten Komplexliganden, die das zentrale Terbium-Ion zum einen hervorragend vor Löscheffekten durch Wasser und andere biologische Medien schützen, zum anderen aber vor allem als lichtsammelnde Antennen fungieren (Antenneneffekt, siehe Abschnitt 2.3.3) werden jedoch gute Extinktionskoeffizienten erreicht und ein Einsatz der LTC als FRET-Sonden möglich [27,28]. Die Förster-Radien von LTC-QD-Paaren betragen bis zu 11 nm [22,29,31], so dass Abstände und Strukturänderungen im Bereich von 1 – 20 nm mit diesen FRET-Systemen gut beobachtet werden können. Neben den beschriebenen Vorteilen besitzen die FRET-Paare aus LTC und QD noch einen weiteren Vorzug, der insbesondere bei der Messung mehrerer Abstände und Abstandsänderungen gleichzeitig, dem sogenannten Multiplexing, von Nutzen ist: Die Lage des schmalbandigen Maximums der Quantenpunktemission ist von deren Größe abhängig, so dass es möglich ist, die Emissionsmaxima der Nanopartikel in einer Weise zu verschieben, dass sie genau zwischen den einzelnen, gut separierten Emissionsbanden des Terbium-Ions liegen. Dadurch kann die FRET-induzierte QD-Akzeptoremission unabhängig von der Emission des LTC-Donors detektiert werden, was die

Sensitivität dramatisch verbessert [31]. All diese Vorteile ermöglichen Messungen im Bereich sub-nanomolarer Konzentrationen, was insbesondere bei der Beobachtung intrazellulärer Vorgänge und dem Nachweis von Biomarkern ein erheblicher Vorteil ist.

Die Form und Größe der Nanopartikel sind bei der Untersuchung intrazellulärer Vorgänge von großer Bedeutung, beeinflussen diese Eigenschaften doch die Wechselwirkungen mit dem zu untersuchenden biologischen System. Dies kann z.B. die Durchlässigkeit der Zellmembran für die Nanopartikel oder das Ausmaß struktureller Änderung durch die Bindung der Nanosensoren an die Zielmoleküle sein. Während es einige Untersuchungen zum FRET von lumineszenten Terbiumkomplexen auf Quantenpunkte in verschiedenen Puffern und biologischen Medien gibt, ist das Wissen um den Einfluss der Orientierung von Donor und Akzeptor zueinander sowie der unterschiedlichen Gestalt der Quantenpunkte auf die FRET-Intensität gering. Es ist zwar möglich, die Größe und Form des Halbleiterkerns der Nanopartikel mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit guter Genauigkeit zu messen, allerdings finden diese Messungen nicht unter physiologischen Bedingungen statt, wie sie z.B. in einer lebenden Zelle herrschen [32], und sind daher nicht immer übertragbar. Hinzu kommen die mit dem Einsatz der TEM verbundenen hohen Kosten. Noch schwieriger ist die Bestimmung der Gesamtgröße des biokompatiblen Nanopartikels, das sich nicht nur aus dem Halbleiterkern und einer anorganischen Schale, sondern meist noch aus einer Polymerhülle und einer zusätzlichen Biofunktionalisierung, zusammensetzt, da die zusätzlichen Schichten auf TEM-Bildern nicht zu erkennen sind. Grundsätzlich ist die Dotierung der äußeren biokompatiblen und/oder Polymerhüllen mit Metallpartikeln vorstellbar, was eine Darstellung auf TEM-Bildern möglich macht [33], der Aufwand dafür ist jedoch relativ hoch. Eine andere Methode der Größenbestimmung ist die Ermittlung des hydrodynamischen Radius mittels Größenausschlußchromatographie über HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) bei der die Größe über die Retentionszeit in Relation zu einer Standardverteilung von Proteinen bestimmt wird [34]. Weiterhin sind verschiedene Sedimentations-, Elektrophorese- und Dialysemethoden in der Anwendung [33,35-37]. Da bei diesen Methoden jedoch Größe und Form relativ zu einem Standard bestimmt werden, ist es nur in Maßen möglich, die Gestalt des Quantenpunkts dabei angemessen zu berücksichtigen, was insbesondere bei nichtsphärischen Quantenpunkten oder der Hydratisierung der äußeren Hüllen zu erheblichen Abweichungen der Ergebnisse von der tatsächlichen Größe führen kann [38]. Da die meisten Quantenpunkte nicht sphärisch sind [39,40], können also diese Methoden der Größenbestimmung nur ungefähre sein. Die Größenbestimmung mit Hilfe des FRET bietet die Möglichkeit der exakteren Bestimmung, da bei der Bestimmung des Abstands von Donor und Akzeptor alle Schalen des Quantenpunkts einfließen und die ermittelten FRET-Lebenszeitverteilungen direkt abhängig von der Form sind.

Kürzlich wurde, als Teil dieser Arbeit, bereits die grundsätzliche Anwendbarkeit zeitaufgelöster Messungen des FRET von LTC-QD-Paaren und einer multiexponentiellen Auswertung der Messdaten zur Größenbestimmung demonstriert [29]. Aufgrund der großen Förster-Radien der LTC-QD-Paare können Nanopartikel verschiedenster Größe, mit und ohne Polymerschale, vermessen werden. Die Anforderungen an Meßsystem und Probenvorbereitung sind gering, da alle Messungen unter physiologischen Bedingungen mit einer Standardlaborausstattung (z.B. ein kommerziell erhältliches Fluoreszenzspektrometer oder ein Fluoreszenz-Multititerplattenleser) durchgeführt werden können. Multiplex-Messungen, d.h. die

gleichzeitige Bestimmung der Abstände verschiedener LTC-QD-Paare, können aufgrund der beschriebenen spektroskopischen Eigenschaften der FRET-Donoren und –Akzeptoren unkompliziert durchgeführt werden [41,42], was zum einen die Meßzeit erheblich verringert, zum anderen die gleichzeitige, intrazelluläre Messung verschiedenster Parameter möglich macht. Die FRET-Abstandsbestimmung in LTC-QD-Paaren ist daher, besonders im Hinblick auf bioanalytische Applikationen, ein attraktiver Weg Form und Gestalt von Nanopartikeln relativ exakt zu bestimmen [30].

1.2 Ziel und Aufbau der Arbeit

Aufbauend auf den langjährigen Erfahrungen auf dem Gebiet des Resonanzenergietransfers von lumineszenten Terbiumkomplexen (LTC) auf Halbleiternanokristalle oder Quantenpunkte (QD) der Arbeitsgruppe Physikalische Chemie der Universität Potsdam sollen in der vorliegenden Arbeit die Bindungsverhältnisse innerhalb verschiedener LTC-QD-Paare genauer untersucht werden. Diese Untersuchungen sollen die Voraussetzung dafür sein, die Anwendbarkeit der FRET-Theorie auf diese Donor-Akzeptor-Paare zu beurteilen, sowie zu klären, in welcher Form die FRET-Parameter Überlappungsintegral und Orientierungsfaktor zu berücksichtigen sind.

Dazu wird zunächst ein Überblick über die zugrunde liegende FRET-Theorie sowie die photophysikalischen Eigenschaften der beteiligten Chromophore gegeben. Die Eigenschaften der verwendeten Bindungssysteme werden dargestellt und Grundlagen der Bindungen in biologischen Assays aufgezeigt. Anschließend werden die verwendeten biologischen und chemischen Materialien benannt und die genutzten experimentellen Meßmethoden sowie die Methoden der Datenauswertung erläutert.

Im Hauptteil der Arbeit erfolgt zunächst die theoretische Betrachtung der Bindungsverhältnisse innerhalb der einzelnen LTC-QD-Paare, die zu erwartenden Abstands- und Lebenszeitverteilungen werden abgeleitet. An diesen theoretischen Teil schließt sich die Auswertung der Messdaten an, innerhalb derer die gemessenen Abstands- und Lebenszeitverteilungen dargestellt und mit den theoretisch erwarteten verglichen werden.

Zuletzt erfolgen eine Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse und eine abschließende Bewertung unter Berücksichtigung der eingangs formulierten Zielstellung. Ein Ausblick auf mögliche Anwendungen sowie noch anstehende Untersuchungen beschließt die Arbeit.

2. Theoretische und praktische Grundlagen

Dieses Kapitel befasst sich neben den Grundlagen zur Beschreibung der photophysikalischen Eigenschaften der verwendeten Chromophore mit der Theorie des Resonanzenergietransfers (RET). Die Informationen dazu sind zum großen Teil den Büchern „Resonance Energy Transfer – Theory and Data“ von B. Wieb van der Meer et al. [19] sowie „Principles of Fluorescence Spectroscopy“ von Joseph R. Lakowicz [7] entnommen.

2.1 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

2.1.1 Einleitung

Ein angeregtes Molekül kann auf vielerlei Arten mit seiner Umgebung interagieren um Energie abzugeben. Eine Möglichkeit davon ist der strahlungslose Energietransfer auf ein anderes Teilchen. Man spricht dann von Resonanzenergietransfer, oder RET, wenn dieser Transfer ohne direkten Kontakt zwischen dem energieabgebenden Donor und dem energieaufnehmenden Akzeptor und ohne Umwandlung in thermische Energie über Abstände erfolgt, die größer sind als die interatomaren Abstände der beteiligten Moleküle [19].

Die Grundlage zum Verständnis des RET wurde von Jean-Baptiste Perrin und seinem Sohn Francis Perrin gelegt, die sowohl eine erste klassische (J.-B. Perrin) als auch quantenmechanische (F. Perrin) Beschreibung des Energietransfers versuchten [43]. Leider lieferten diese Theorien nur ungenaue Ergebnisse und waren schwierig in der Anwendung. Theodor Förster fand 1946 eine Beschreibung des Resonanzenergietransfers im Rahmen der klassischen Physik, die auf experimentell einfach zugänglichen Größen wie Absorption, Fluoreszenz und Lumineszenzlebenszeiten basierte [6]. 1948 veröffentlichte Förster eine quantenmechanische Beschreibung seiner Theorie, die sich alsbald als Standard etablierte [44]. Sein Name ist bis heute auf das Engste mit dem Resonanzenergietransfer verknüpft, der daher meist als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet wird. Diese Benennung wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Neben der Bezeichnung als Förster-Resonanzenergietransfer sind weitere Bezeichnungen gebräuchlich, die je nach Forschungsgebiet teilweise von anderen oder zusätzlichen Voraussetzungen ausgehen, aber denselben Mechanismus beschreiben: LRET (Lumineszenz-Resonanzenergietransfer), BRET (Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer) oder FET (Fluoreszenzenergietransfer) [19,45,46].

Der RET ist eine hochsensitive Methode zur Berechnung intra- oder intermolekularer Abstände und findet als solche Anwendung in der qualitativen und quantitativen Analyse in allen naturwissenschaftlichen Bereichen (siehe Abschnitt 2.1.3).

2.1.2 Theoretische Betrachtung der FRET-Parameter

Befindet sich ein elektronisch angeregtes Molekül (Donor) in räumlicher Nähe zu einem anderen Molekül (Akzeptor), so kann es, neben verschiedenen Prozessen strahlender und strahlungsloser Deaktivierung, unter bestimmten Bedingungen zu einem weiteren Deaktivierungsprozess kommen, dem resonanten Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor (Abbildung 2.1) [7,19]:

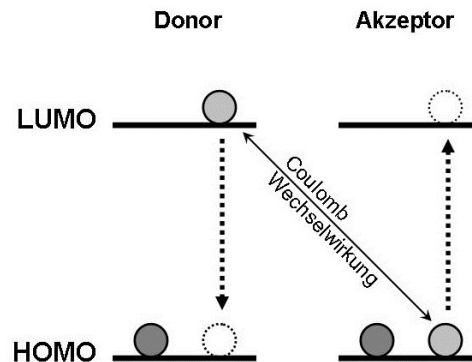


Abbildung 2.1. Darstellung des Mechanismus des RET: ein angeregter Donor (links) überträgt Energie durch Coulomb-Wechselwirkung auf einen Akzeptor (rechts) und regt diesen an.

Energie wird dabei von einem oszillierenden Dipoldonor auf einen in derselben Frequenz oszillierenden Dipolakzeptor übertragen. Dieser Transfer von Energie zwischen dem Donormolekül und dem Akzeptormolekül ist zuerst einmal abhängig davon, dass die Möglichkeit zur Resonanz zwischen den beteiligten Molekülen gegeben ist, die Energiedifferenz ΔE zwischen HOMO (Highest Occupied Molecule Orbital) und LUMO (Lowest Unoccupied Molecule Orbital) von Akzeptor (A) und Donor (D) also übereinstimmt.

$$\Delta E(D \rightarrow D^*) = \Delta E(A^* \rightarrow A) \quad \text{Gleichung (2.1)}$$

Das Emissionsspektrum des Donors muss folglich mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Je größer dieser spektrale Überlapp ist, desto effizienter ist der Energietransfer (Abbildung 2.2, siehe auch Kapitel 2.1.2. Überlappintegral J).

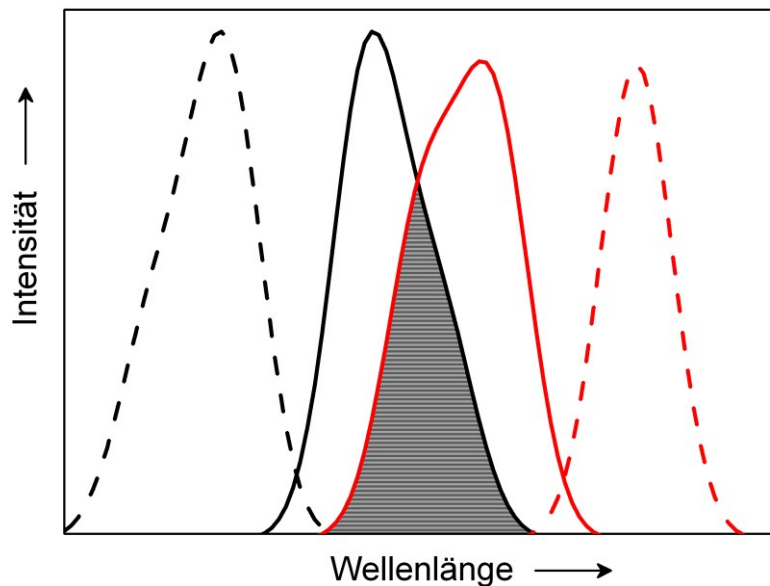
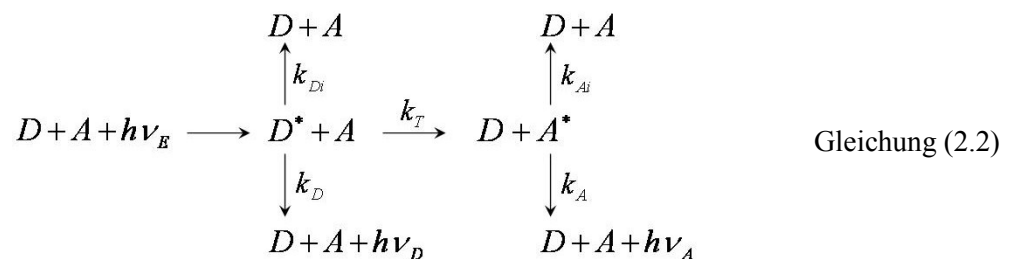


Abbildung 2.2. Schematische Darstellung des Überlapps zwischen Donoremission und Akzeptorabsorption. Der Überlapp ist die Fläche, die von der Emission des Donors (schwarze Linie) und der Absorption des Akzeptors (rote Linie) gemeinsam gebildet wird (schraffierte Fläche). Je mehr Donoremission und Akzeptorabsorption überlappen, desto größer wird der Überlapp und desto effizienter der Resonanzenergieübertrag. Eine Anregung des Donors im Bereich seiner Absorption (schwarze Striche) führt zu Donoremission sowie zum Energietransfer auf die Akzeptorabsorption und zuletzt der Emission der absorbierten Energie im Bereich der Akzeptoremission (rote Striche).

FRET ist zudem in hohem Maße von der räumlichen Anordnung der beteiligten Moleküle abhängig, wobei sowohl der Abstand, der zwischen ca. 1 – 20 nm betragen sollte, als auch die Orientierung der Übergangsdipolmomente der Moleküle zueinander von Bedeutung sind (siehe auch Abschnitt 2.1.2 Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor κ^2).

Sind alle genannten Voraussetzungen erfüllt, kommt es, wie bereits erwähnt, zu Energietransfer als einem weiteren Konkurrenzprozess der Deaktivierung des angeregten Donors [19].



k sind Geschwindigkeitskonstanten (mit k_T für den Energietransfer, k_D für die strahlende Deaktivierung des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, k_{Di} für die strahlungslose Deaktivierung des Donors, k_A für die strahlende Deaktivierung des Akzeptors, k_{Ai} für die strahlungslose Deaktivierung des Akzeptors), ν_E , ν_D und

ν_A stellen die Frequenzen für die Anregung des Donors, die Donoremission und die (durch Energietransfer angeregte) Akzeptoremission dar, h ist das Plancksche Wirkungsquantum.

Die Transfereffizienz E , d.h. das Maß dafür, wie viele der vom Donor absorbierten Photonen per FRET zum Akzeptor übergehen, lässt sich aus dem Verhältnis der Transfereffizienzkennkonstanten zur Gesamtsumme der Geschwindigkeitskonstanten aller Deaktivierungsprozesse des Donors bilden.

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_D + k_{Di}} \quad \text{Gleichung (2.3)}$$

Wovon ist aber nun die Geschwindigkeit des Energietransfers und damit dessen Effizienz abhängig?

Der klassisch-physikalische Ansatz, den Förster 1951 veröffentlichte [178], geht zur Beantwortung dieser Frage von der Beschreibung eines Moleküls als einer Gruppe von Dipolen, die innerhalb eines Frequenzbereichs schwingen, aus. Van der Meer beschreibt diesen Ansatz so [19]:

Wenn ein elektrischer Dipol, orientiert entlang der x-Achse, exakt dieselbe Frequenz besitzt wie ein externes elektrisches Feld, welches in derselben Richtung oszilliert, dann kann die Energie, die vom Dipol nach der Zeit t absorbiert wird, bestimmt werden mit

$$W = \frac{e^2 E_{0x}^2}{8m} t^2 \quad \text{Gleichung (2.4).}$$

e ist hier die elektrische Ladung, E_{0x} die Amplitude des elektrischen Feldes und m die Masse des Oszillators.

Ein oszillierender Donor produziert ein elektrisches Feld, dessen Komponente in Richtung eines Akzeptordipols, der parallel zur x-Achse ausgerichtet ist, eine Amplitude E_{0x} der Größe

$$E_{0x} = \frac{\kappa e a}{n^2 R^3} \quad \text{Gleichung (2.5)}$$

besitzt. κ ist der Orientierungsfaktor von Donor- und Akzeptordipol zueinander (siehe Kapitel 2.1.2 Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor κ^2), e ist die elektrische Ladung, a die Amplitude des Oszillators, n der Brechungsindex des Mediums, in dem sich Donor und Akzeptor befinden und R ist der Abstand beider zueinander.

Das Einsetzen der Gleichung 2.5 in Gleichung 2.4 ermöglicht es, die durch die Wechselwirkung mit einem angeregten Donor vom Akzeptor absorbierte Energie W_A nach einer Zeit t zu bestimmen.

$$W_A = \frac{\kappa^2 e^4 a^2}{8n^4 m R^6} t^2 \quad \text{Gleichung (2.6)}$$

Diese Energie kann mit der Energie W_D des Donordipols in Beziehung gesetzt werden, die sich aus

$$W_D = \frac{k}{2} a^2 = \frac{m}{2} \omega^2 a^2 \quad \text{Gleichung (2.7)}$$

mit der Amplitude a , der Masse m , der Federkonstanten k und der Frequenz $\nu = \frac{\omega}{2\pi} = \sqrt{\frac{k}{m}} \frac{1}{2\pi}$ ergibt.

Ein Umstellen von Gleichung 2.7 nach a^2 und anschließendem Einsetzen in Gleichung 2.6 führt zu folgender Beziehung von absorbierte Akzeptorenergie und der Energie des Donordipols.

$$W_A = \frac{\kappa^2 e^4}{4n^4 m^2 \omega^2 R^6} W_D t^2 \quad \text{Gleichung (2.8)}$$

Die bisherigen Betrachtungen gehen von einer perfekten Resonanz zwischen einem einzelnen Donor- und einem einzelnen Akzeptordipol aus. Da Donor- und Akzeptorspektren aber typischerweise eine Energieverteilung darstellen, da sie nicht linienförmig sind, werden sowohl Donor, als auch Akzeptor als Summe von Oszillatoren mit verschiedenen Frequenzen beschrieben. Daher werden im Folgenden Oszillatorstärken für die Emissionsdipole des Donors $f_{eD}(\omega)$ und die Absorptionsdipole des Akzeptors $f_{aA}(\omega)$ eingeführt, die die Oszillatorenverteilungen berücksichtigen.

Der Anteil $f_{aA}(\omega)d\omega$ der Akzeptordipole mit einer Kreisfrequenz zwischen ω und $\omega+d\omega$ kann Energie nur von solchen Donordipolen absorbieren, die eine sehr ähnliche Frequenz besitzen. Akzeptor- und Donordipole sind dann in Resonanz. Die Breite des Frequenzbereichs der Donordipole variiert mit der Dipoloszillation und ist daher zeitabhängig.

$$f_{aA}(\omega)d\omega \leftrightarrow f_{eD}(\omega) \frac{2\pi}{t} \quad \text{Gleichung (2.9)}$$

Um die Gesamtenergie zu erhalten, die der Akzeptor durch resonante Dipol-Dipol-Wechselwirkung absorbiert, multipliziert man die rechte Seite von Gleichung 2.8 mit denjenigen Anteilen von Akzeptor- und Donordipolen, die miteinander resonant sind, und erhält

$$W_A = \frac{\pi \kappa^2 e^4}{2n^4 m^2 R^6} W_D t \int_0^\infty f_{eD}(\omega) f_{aA}(\omega) \frac{d\omega}{\omega^2} \quad \text{Gleichung (2.10)}$$

Die übertragene Leistung ist eine Ableitung dieser Energie nach der Zeit

$$\frac{d}{dt} W_A = P_{aA} = P_{eD} = \frac{d}{dt} W_D \quad \text{Gleichung (2.11)}$$

mit P_{aA} als der vom Akzeptor absorbierten und P_{eD} der vom Donor emittierten Leistung.

Die übertragene Leistung kann auch in Abhängigkeit von der Transferrate k_T dargestellt und als durchschnittliche Anzahl an Transfers pro Zeiteinheit (bei gleichzeitiger ständiger Neuankündigung der Donoren) aufgefasst werden.

$$\frac{d}{dt}W_D = k_T W_D \quad \text{Gleichung (2.12)}$$

Die Transferrate k_T lässt sich, unter Kombination der Gleichungen 2.10-2.12, und mit der linearen Frequenz $\nu = \omega / (2\pi)$ als

$$k_T = \frac{\kappa^2 e^4}{16\pi^2 n^4 m^2 R^6} \int_0^\infty f_{eD}(\nu) f_{aA}(\nu) \frac{d\nu}{\nu^2} \quad \text{Gleichung (2.13)}$$

darstellen. Die Oszillatorstärke $f_{eD}(\nu)$ ist hierbei proportional zum Fluoreszenzspektrum $f_D(\nu)$ des Donors und $f_{aA}(\nu)$ steht im Verhältnis zum molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_A(\nu)$ des Akzeptors [19,178].

$$f_{aA}(\nu) = \frac{3000mc n (\ln 10)}{\pi N_{AV} e^2} \epsilon_A(\nu) \quad \text{Gleichung (2.14)}$$

$$f_{eD}(\nu) = \frac{3mc^3 Q_D}{8\pi^2 n e^2 \tau_D} \frac{f_D(\nu)}{\nu^2} \quad \text{Gleichung (2.15)}$$

mit der Masse m , der Lichtgeschwindigkeit c , der Avogadro-Konstanten N_{AV} , der elektrischen Ladung e , sowie der Lumineszenzquantenausbeute Q_D und Lumineszenzlebenszeit τ_D des Donors jeweils in Abwesenheit des Akzeptors. Die bis hierher gewonnen Erkenntnisse lassen sich nun zur wohlbekannteren Förster-Gleichung zusammenfassen (Gleichung 2.16a), indem man die beiden Ausdrücke für die Oszillatorstärken in Gleichung 2.13 durch Gleichung 2.14 bzw. 2.15 ersetzt. Dabei ist allerdings zu beachten, dass der Faktor 9000 seine Berechtigung nur bei der Angabe von $\epsilon_A(\nu)$ in der Einheit $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ besitzt, bei der üblicherweise verwendete Einheit $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ hingegen zwingend der Faktor 9 zu verwenden ist (Gleichung 2.16b) [181].

$$k_T = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D J}{128\pi^5 n^4 N_{AV} \tau_D R^6} \quad \text{Gleichung (2.16a)}$$

$$k_T = \frac{9(\ln 10)\kappa^2 Q_D J}{128\pi^5 n^4 N_{AV} \tau_D R^6} \quad \text{Gleichung (2.16b)}$$

Das Überlappungsintegral J ist hier in der frequenzabhängigen Form angegeben: $J = c^4 \int_0^\infty \frac{f_D(\nu)\varepsilon_A(\nu)d\nu}{\nu^4}$.

Die Rate des Energietransfers hängt also zum einen von der Lumineszenzquantenausbeute Q_D und der Lumineszenzlebenszeit τ_D des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, der Orientierung κ^2 von Akzeptor und Donor zueinander, dem Brechungsindex n des umgebenden Mediums und nicht zuletzt vom Donor-Akzeptor-Abstand R sowie dem Überlappungsintegral J des Fluoreszenzspektrums $f_D(\nu)$ des Donors mit dem Extinktionskoeffizienten-spektrum $\varepsilon_A(\nu)$ des Akzeptors ab.

Dieses theoretische Fundament zur Charakterisierung des Resonanzenergietransfers gelegt zu haben ist das große Verdienst Theodor Försters. So trägt nicht nur der FRET seinen Namen zu Recht, sondern es wird auch der für jedes Donor-Akzeptor-System charakteristische Radius R_0 , bei dem die Geschwindigkeit des Energietransfers genauso groß ist wie die strahlende Desaktivierung, also 50% der Donorfluoreszenz transferiert werden, als Förster-Radius bezeichnet. Mit dieser Annahme $k_T = k_D = 1/\tau_D$, folgt aus Gleichung 2.16b für den Förster-Radius

$$R_0^6 = \frac{9(\ln 10)\kappa^2 Q_D J}{128\pi^5 n^4 N_{AV}} \quad \text{Gleichung (2.17)}$$

Da für die meisten Anwendungen die Angabe des Abstands im Vergleich zur Angabe der Geschwindigkeitskonstante die praktischere und besser darstellbare ist, soll im Weiteren von Gleichung 2.17 als Grundlage zur mathematischen Beschreibung des FRET ausgegangen werden.

Die Bestimmung des Förster-Radius R_0 ist im Hinblick auf die Anwendung der FRET-Theorie von grundlegender Bedeutung, da ohne Kenntnis der Größe von R_0 keine Abstandsberechnung erfolgen kann (siehe auch Kapitel 2.1.3 Anwendung der FRET-Theorie zur Abstandsberechnung). Der korrekten Berechnung der dazu notwendigen Größen Überlappungsintegral, Brechungsindex, Quantenausbeute und Orientierungsfaktor (Gleichung 2.17) kommt daher eine Schlüsselrolle zu. Da diese aber gleichzeitig mit vielen Unwägbarkeiten verbunden ist, sollen im Folgenden die genannten Größen erläutert und Bestimmungsfehler abgeschätzt werden.

Überlappungsintegral J

Das Überlappungsintegral erlaubt einerseits eine qualitative Aussage darüber, ob ein Donor in der Lage ist, einen potentiellen FRET-Akzeptor anzuregen, und gibt andererseits quantitativ Auskunft darüber, wie gut ein Akzeptor die vom Donor emittierte Lumineszenz absorbieren kann. Je größer der spektrale Überlapp ist, desto wahrscheinlicher und effizienter ist ein Energietransfer (siehe Abbildung 2.3).

Der spektrale Überlapp J bestimmt sich, wie bereits erwähnt, aus der Donoremision $f_D(\lambda)$ und der Akzeptorabsorption $\varepsilon_A(\lambda)$ und stellt das Integral beider über den gesamten Wellenlängenbereich λ dar.

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^{\infty} f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} f_D(\lambda) d\lambda} \quad \text{Gleichung (2.18)}$$

Bei der Berechnung ist zu berücksichtigen, dass entweder das auf Eins normierte Emissionsspektrum des Donors verwendet oder aber der für das Überlappungsintegral berechnete Wert durch die Fläche unter der Kurve der Donoremission geteilt wird [19]. In Abhängigkeit der verwendeten Einheiten von $\varepsilon_A(\lambda)$ und λ ($f_D(\lambda)$ ist dimensionslos) nimmt auch $J(\lambda)$ unterschiedliche Einheiten an:

$$\varepsilon_A(\lambda) \text{ in } \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{ und } \lambda \text{ in nm} \rightarrow J(\lambda) \text{ in } \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{nm}^4$$

$$\varepsilon_A(\lambda) \text{ in } \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{ und } \lambda \text{ in cm} \rightarrow J(\lambda) \text{ in } \text{M}^{-1} \text{cm}^3$$

Unsicherheiten bei der Bestimmung des Überlappungsintegrals entstehen vor allem durch Gerätefehler, wie die wellenlängenabhängige Monochromatorempfindlichkeit oder die ebenfalls wellenlängenabhängige Transmission der verwendeten Linsen und Filter sowie durch Abweichungen von Probe zu Probe bei der Erfassung der Donor- und Akzeptorspektren. Da das Überlappungsintegral mit der 6-ten Wurzel in den Förster-Radius eingeht, führen selbst große Ungenauigkeiten bei der Bestimmung aber zu geringen Absolutänderungen (siehe Abbildung 2.3).

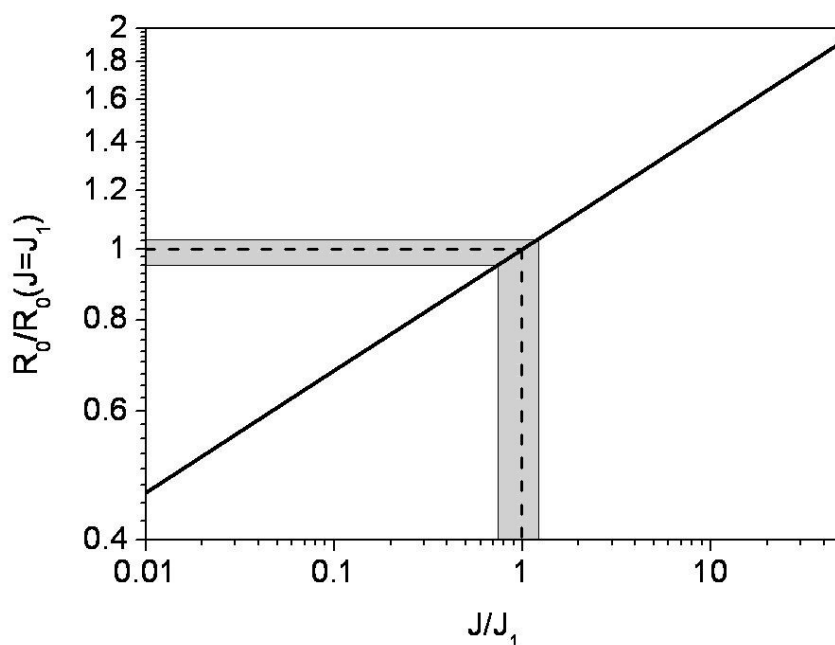


Abbildung 2.3. Relative Änderung des Förster-Radius in Abhängigkeit von der relativen Änderung des Überlappungsintegrals J (R_0 = Förster-Radius, $R_0(J=1)$ = Förster-Radius für Überlappungsintegral $J=1$).

So verursacht ein Fehler bei der Bestimmung des Überlappungsintegrals von 25 Prozent eine maximale Abweichung des Förster-Radius um 5%. Im Rahmen der angesprochenen Messungenauigkeiten für Donor- und Akzeptorspektren kann der Wert des Überlappungsintegrals daher als exakt angesehen werden.

Brechungsindex n

Der Brechungsindex des das FRET-Paar umgebenden Mediums wurde von Förster eingeführt, um Wechselwirkungen zwischen den Dipolen in einem kontinuierlichen, isotropen Medium zu berücksichtigen. Je größer der Brechungsindex dabei ist, desto besser werden die Dipole abgeschirmt und desto kleiner wird der Förster-Radius. In den meisten Fällen ist das Medium zwischen Donor und Akzeptor allerdings weder kontinuierlich noch isotrop, der Brechungsindex daher ortsabhängig. Nichtsdestotrotz kann mit guter Genauigkeit ein mittlerer Brechungsindex angenommen werden. Der mittlere Wert für den Brechungsindex bewegt sich in der Praxis im Bereich von 1.33 (Brechungsindex von Wasser) bis 1.6 [47-49] und wird für FRET-Experimente in biologischen Systemen mit 1.4 angenommen.

Im Gegensatz zum Überlappungsintegral geht eine Änderung des Brechungsindex mit $n^{-2/3}$ in den Förster-Radius ein, so dass Abweichungen hier zu einem größeren Fehler führen. Dieser überschreitet jedoch für den Bereich $n = 1.33 - 1.6$ nie 10% (Abbildung 2.4) [19].

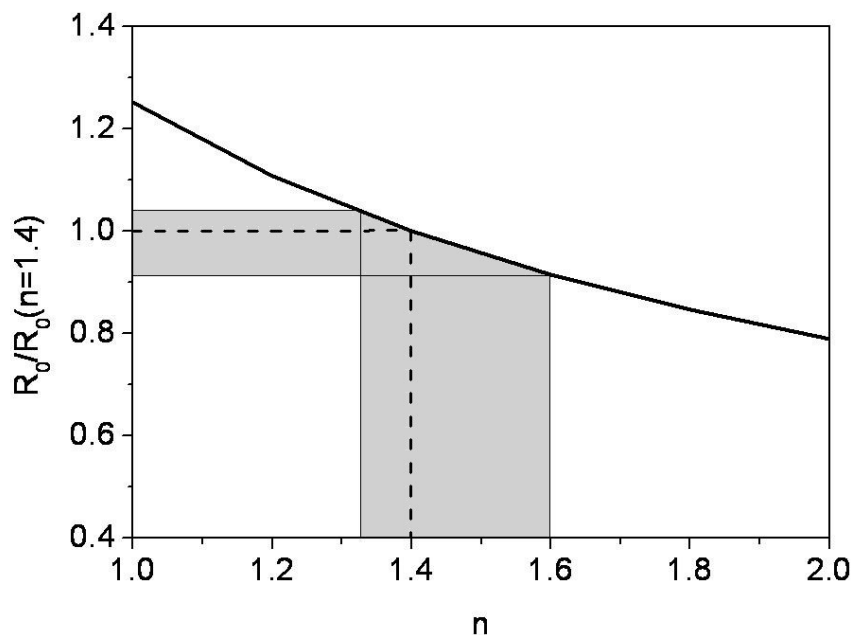


Abbildung 2.4. Relative Änderung des Förster-Radius in Abhängigkeit von der relativen Änderung des Brechungsindex n (R_0 = Förster-Radius, $R_0(n=1.4)$ = Förster-Radius für Brechungsindex $n=1.4$).

Lumineszenzquantenausbeute Q_D

Die Lumineszenzquantenausbeute eines Donormoleküls gibt an, wie viel der absorbierten Photonen vom Molekül als Lumineszenz wieder emittiert werden. Sie kann Werte zwischen Null und Eins annehmen und

ist stark abhängig von der jeweiligen Umgebung und der Meßmethode [50]. Daher ist es schwierig, für ein einzelnes Molekül exakt dessen Quantenausbeute anzugeben. Da eine höhere Quantenausbeute zu einer stärkeren Lumineszenz des Donoren bei gleich bleibender Anregungsenergie führt, steigt dadurch die Effizienz des FRET (bei gleich bleibender Anregungsenergie).

Die Bestimmung der Quantenausbeute erfolgt in der vorliegenden Arbeit relativ durch die Bestimmung der Lumineszenzlebenszeit des Donorkomplexes gegenüber der Lebenszeit eines Standards (siehe Kapitel 2.3.2). Die Lebenszeitbestimmung des Donors ist mit großer Genauigkeit möglich, so dass Fehler in der Quantenausbeute durch eine fehlerhafte Referenzmessung zustande kommen. Die dadurch hervorgerufene Abweichung beträgt aber in der vorliegenden Arbeit in jedem Fall weniger als 20%. Da die Quantenausbeute wie das Überlappungsintegral mit der sechsten Wurzel in den Förster-Radius eingehen, kann der durch Abweichungen in der Quantenausbeute des Donors verursachte Fehler für die Bestimmung des Förster-Radius maximal 2 Prozent betragen (siehe Abbildung 2.5).

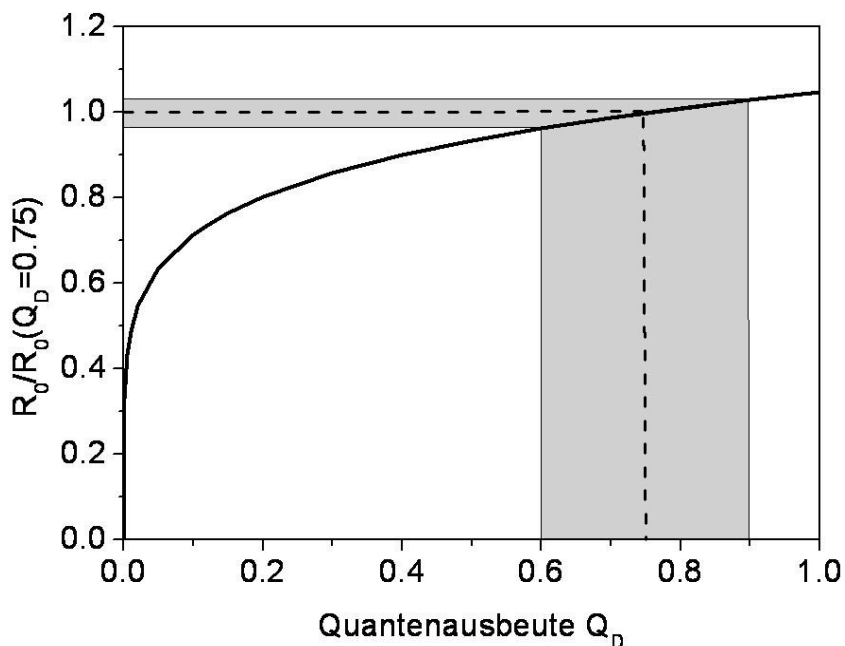


Abbildung 2.5. Relative Änderung des Förster-Radius in Abhängigkeit von der relativen Änderung der Quantenausbeute Q_D (R_0 = Förster-Radius, $R_0(Q_D=0.75)$ = Förster-Radius für Quantenausbeute $Q_D = 0.75$ [typische Quantenausbeute für Tb^{3+} in Komplexen]).

Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor κ^2

Kein anderer Parameter der FRET-Theorie ist so intensiv diskutiert worden wie der Orientierungsfaktor κ^2 [12,51-54], was daran liegt, dass bisher keine Möglichkeit existiert, ihn im Experiment zu bestimmen. Im Umkehrschluss heißt dies, dass alle angegebenen Werte des Orientierungsfaktors Ergebnisse theoretischer Betrachtungen sind und als solche nur Näherungen der Realität darstellen. Einzig durch NMR oder

Röntgenkristallstrukturanalyse erhält man Zugang zur Orientierung von Donor- und Akzeptordipolen. In solchen Fällen sind die Abstände allerdings bekannt und der Nutzen der FRET-Theorie daher begrenzt [7].

Der Orientierungsfaktor κ^2 kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen, je nach Anordnung von Donor- und Akzeptordipol zueinander. κ^2 ist dabei definiert als

$$\kappa^2 = (\cos \alpha - 3 \cos \beta \cos \gamma)^2 \quad \text{Gleichung (2.19)}$$

mit α als Winkel zwischen dem Donoremissions-Übergangsdipolmoment und dem Akzeptorabsorptions-Übergangsdipolmoment, sowie β und γ als Winkel zwischen der Verbindungslinie von Donor und Akzeptor und den Übergangsdipolmomenten von Donor und Akzeptor (siehe Abbildung 2.6) [7,19].

Es ist jedoch möglich durch Depolarisationsmessungen für das verwendete FRET-System eine untere und obere Grenze für den möglichen Wert des Orientierungsfaktors festzulegen und so die Genauigkeit der Bestimmung des Förster-Radius zu erhöhen. Interessierte Leser seien zur näheren Erläuterung an dieser Stelle auf das Buch von Lakowicz (Seiten 452-453) [7] verwiesen.

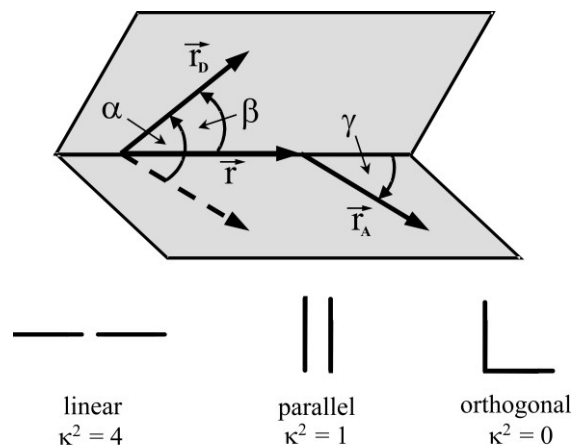


Abbildung 2.6. Darstellung der Orientierung von Donor- (\vec{r}_D) und Akzeptorübergangsdipolmoment (\vec{r}_A) sowie der Einfluss der relativen Anordnung beider zueinander auf den Orientierungsfaktor κ^2 [103]

Da Donor- und/oder Akzeptor-Übergangsdipolmoment in den meisten Fällen nicht starr zueinander orientiert sind, sondern sich innerhalb des Donor-Akzeptor-Bindungskomplexes frei oder mit Einschränkungen bewegen können, ist es realistischer, einen mittleren Wert für den Orientierungsfaktor anzugeben. Dabei sind allerdings zwei verschiedene Mittelungsprozesse zu unterscheiden. Der erste stellt eine Mittelung dynamischer, der zweite statischer Art dar. Von dynamischer Mittelung spricht man, wenn Donor und Akzeptor während der, die FRET-Lebenszeit bestimmenden, Lumineszenz-Abklingzeit des angeregten Donorzustands alle im jeweiligen System möglichen Orientierungen einnehmen können. Der Orientierungsfaktor nimmt dann innerhalb der oberen und unteren Grenzen für κ^2 den Mittelwert an. Ist hingegen die Änderung der Orientierungen von Donor und Akzeptor langsam im Verhältnis zur Abklingzeit des angeregten Donorzustands, dann kann man die Probe als ein Ensemble von FRET-Paaren mit jeweils

unterschiedlichem Orientierungsfaktor auffassen. Man spricht in diesem Fall von statischer Mittelung [7,19]. Der mittlere Wert für κ^2 hängt dann vom Abstand der FRET-Partner zueinander ab.

$$\kappa^2 = \begin{cases} 0.2 & \text{für } R < 0.2R_0\left[\frac{2}{3}\right] \\ 0.4 & \text{für } R = R_0\left[\frac{2}{3}\right] \\ 2/3 & \text{für } R > 2R_0\left[\frac{2}{3}\right] \end{cases} \quad \text{Gleichung (2.20)}$$

$R_0\left[\frac{2}{3}\right]$ sei hier der Förster-Radius, der sich bei einem Wert von $\frac{2}{3}$ für den Orientierungsfaktor ergibt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist, aufgrund der langen Abklingzeit des verwendeten Donorkomplexes und der daraus resultierenden langen Transferzeiten für das FRET-System, allerdings nur die dynamische Mittelung von Relevanz. Unter der Voraussetzung, dass die beteiligten Chromophore sphärisch sind bzw. sich aufgrund ihrer, im Verhältnis zur Abklingzeit des angeregten Donorzustands schnellen und in allen Raumrichtungen ungehinderten, Umorientierung wie Sphären verhalten (isotrope Degeneration), nimmt κ^2 den Wert $\frac{2}{3}$ an [12,54]. Dieser Wert findet Eingang im Großteil der Literatur zur Berechnung des Förster-Radius, da er für die meisten FRET-Systeme der wahrscheinlichste ist. Nichtsdestotrotz ist von der unkritischen Verwendung von $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ abzuraten, denn in Abhängigkeit von der Degeneration der Dipolübergangsmomente von Donor und Akzeptor führt dies zu unnötigen Fehlern wie Tabelle 2.1 zeigt.

Tabelle 2.1 Mögliche Kombinationen von Degenerationen für Donor- und Akzeptor-Dipolübergangsmoment sowie resultierende Wertebereiche, wahrscheinlichste und unwahrscheinlichste Werte für κ^2 (L = lineares Übergangsmoment, P = planares Übergangsmoment, I = isotropes Übergangsmoment) [19].

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

Der für die Bestimmung des Förster-Radius resultierende Fehler aus möglichen Abweichungen des angenommenen vom tatsächlichen Orientierungsfaktor lässt sich wie in Abbildung 2.7 darstellen. Er überschreitet 10% im Allgemeinen nicht [12].

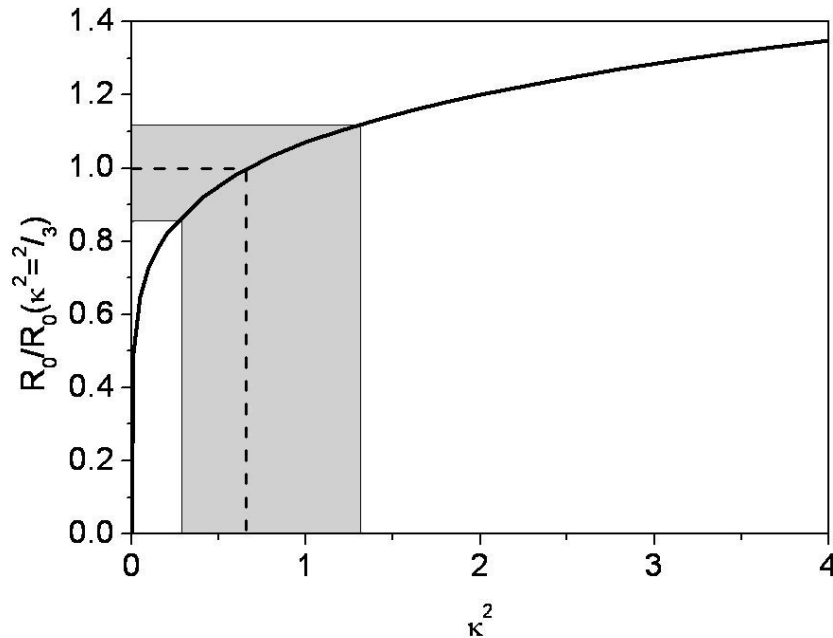


Abbildung 2.7. Relative Änderung des Förster-Radius in Abhängigkeit von der relativen Änderung des Orientierungsfaktors κ^2 (R_0 = Förster-Radius, $R_0(\kappa^2=2/3)$ = Förster-Radius für Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$). Grau unterlegt ist der Wertebereich, den der Orientierungsfaktor in der vorliegenden Arbeit theoretisch annehmen kann.

2.1.3 Anwendung der FRET-Theorie zur Abstandsberechnung

Die Bestimmung des Förster-Radius R_0 , wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, liefert die Grundvoraussetzung zur Berechnung des Donor-Akzeptor-Abstandes mittels FRET. Der Bestimmungsfehler beträgt als Summe der Fehler der einzelnen Parameter etwa 33 Prozent, d.h. ein Drittel des Wertes des Förster-Radius. Mit Kenntnis der Transfereffizienz E lässt sich nun eine Aussage über den Abstand der FRET-Partner treffen.

Die Transfereffizienz ist experimentell leicht zugänglich und kann über verschiedene Wege bestimmt werden. Ausgangspunkt ist hier die Definition der Effizienz über Gleichung 2.3 als Anteil der Deaktivierung des angeregten Donors mittels Energietransfer an der Gesamtsumme aller Deaktivierungsprozesse.

Berücksichtigt man nun, dass die Lumineszenzquantenausbeute Q_D des Donors in Abwesenheit des Akzeptors mit

$$Q_D = \frac{k_D}{k_D + k_{Di}} \quad \text{Gleichung (2.21)}$$

und Q_{DA} , die Lumineszenzquantenausbeute des Donors in Anwesenheit des Akzeptors, mit

$$Q_{DA} = \frac{k_D}{k_T + k_D + k_{Di}} \quad \text{Gleichung (2.22)}$$

bestimmt sind, dann lässt sich, ausgehend von Gleichung 2.3, leicht erkennen, dass die Transfereffizienz experimentell durch die Messung der beiden Quantenausbeuten erhalten werden kann:

$$E = 1 - \frac{Q_{DA}}{Q_D} \quad \text{Gleichung (2.23)}$$

Neben dieser Möglichkeit kann man die Transfereffizienz E auch über die Lebenszeiten des Donors τ_D in Ab- und τ_{DA} in Anwesenheit eines Akzeptors ermitteln, da diese Lebenszeiten folgendermaßen in Verbindung mit den Geschwindigkeitskonstanten stehen:

$$\tau_D = \frac{1}{k_D + k_{Di}} \quad \text{Gleichung (2.24)}$$

$$\tau_{DA} = \frac{1}{k_T + k_D + k_{Di}} \quad \text{Gleichung (2.25)}$$

Die Transfereffizienz E lässt sich dann darstellen als

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad \text{Gleichung (2.26)}$$

Die Effizienz E kann nicht nur über die Lumineszenzlebenszeiten des Donors sondern auch des Akzeptors berechnet werden, nämlich dann, wenn die natürliche Lumineszenzlebenszeit des Akzeptors sehr viel kürzer ist als die Lebenszeit des Donors [55]. Dies ist der Fall, wenn der Donor ein Lanthanoid-Komplex und der Akzeptor ein Quantenpunkt ist, wie in der vorliegenden Arbeit. Die FRET-Lebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors τ_{DA} ist dann gleich der Lebenszeit des FRET-aktivierten Akzeptors τ_{AD} .

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{\tau_{AD}}{\tau_D} \quad \text{Gleichung (2.27)}$$

Es ist nicht zuletzt möglich, die Transfereffizienz über die Intensitäten und Intensitätsänderungen der Donor- und Akzeptor-Signale mit und ohne FRET zu bestimmen [19]. Da im Rahmen dieser Arbeit die Effizienz auf Basis der Gleichungen 2.26 und 2.27 ermittelt wird, soll dies aber nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Die Verbindung von Förster-Radius R_0 , Abstand des Donor-Akzeptor-Paares R und Transfereffizienz E erfolgt unter Berücksichtigung der Förster-Gleichung (Gleichung 2.17) für die Transfereffizienz eines Donor-Akzeptor-Paares bei einem Abstand R

$$k_T = (k_D + k_{Di}) \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad \text{Gleichung (2.28)}$$

und ergibt sich nach Einsetzen von Gleichung 2.28 in Gleichung 2.3 zu

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad \text{Gleichung (2.29)}$$

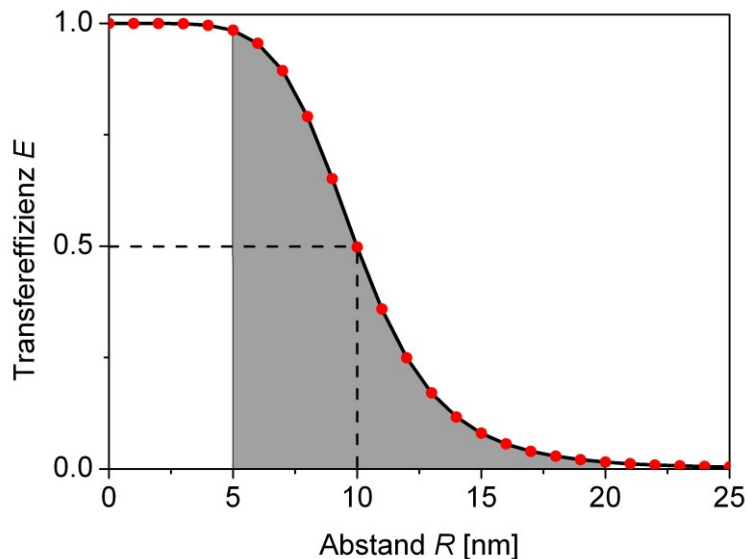


Abbildung 2.8. Abhängigkeit der Transfereffizienz E vom Donor-Akzeptor-Abstand (nach Gleichung 2.29) am Beispiel eines für LTC-QD-Systeme typischen FRET-Paares mit einem Förster-Radius von $R_0 = 10$ nm. Dargestellt ist außerdem der Bereich von $0.5 R_0 - 2 R_0$, in dem sich Abstände über die Transfereffizienz relativ exakt bestimmen lassen.

2.1.4 Andere Lösmechanismen

Neben dem Löschen durch Resonanzenergietransfer gibt es weitere Mechanismen, die die Lumineszenzintensitäten und -lebenszeiten von Chromophoren verändern und die Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor übertragen können. Man unterscheidet hierbei zwischen statischem (z.B. durch Komplexbildung hervorgerufenem) und dynamischem (z.B. durch diffusionskontrollierten Zusammenstoß von Donor und Akzeptor herbeigeführtem) Löschen sowie Reabsorption. Je nach Art der Löschung können diese aber durch zeitlich und spektral aufgelöste Messungen vom RET unterschieden werden.

Tabelle 2.2 Charakteristische Merkmale der verschiedenen Löschemechanismen und Möglichkeiten der Unterscheidung [56]

Eigenschaften	RET	Reabsorption	Komplexbildung (stat. Löschung)	Stoßdeaktivierung (dynam. Löschung)
Veränderung mit zunehmendem Volumen	---	+ (Zunahme)	---	---
Veränderung mit zunehmender Viskosität	---	---	---	+ (Abnahme)
Donorlebenszeit	+	---	---	+
Veränderung infolge Löschung Donor- Fluoreszenzspektrum	(Abnahme) ---	+	---	(Abnahme) ---
Veränderung infolge Löschung Donor- Absorptionsspektrum	---	---	+	---
Veränderung infolge Löschung				

Meist tritt nicht nur rein dynamische oder rein statische Fluoreszenzlöschung auf, sondern es kommt zu einer Mischform der verschiedenen Arten des Transfers der Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor [57,58].

2.2 Halbleiternanokristalle (Quantenpunkte)

2.2.1 Einleitung

Halbleiter-Nanokristalle (typischerweise aus Halbleitermaterialien wie CdSe, CdTe oder InGaAs), die aus lediglich 10 – 1000 Atomen bestehen werden Quantenpunkte oder quantum dots (QD) genannt. Aufgrund ihrer geringen Größe besitzen diese Kristalle als quasi-null-dimensionale Strukturen einzigartige photophysikalische Eigenschaften, die sie für FRET-Anwendungen interessant machen [59,60]. Dazu gehören im Gegensatz zu herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen extrem hohe Extinktionskoeffizienten über einen breiten Spektralbereich sowie größenabhängige, sehr schmale und symmetrische Emissionsbanden (siehe Abbildung 2.9). Die Lumineszenzquantenausbeute dieser Nanopartikel ist zudem meist hoch ($Q \geq 0.5$). Die Forschung auf dem Feld der Quantenpunkte und deren größenabhängigen Eigenschaften ist vergleichsweise jung und begann in den frühen 1980er Jahren [61-63]. Ihre besonderen Eigenschaften machten Halbleiter-Nanokristalle seitdem zum Gegenstand unzähliger Forschungsarbeiten und auch in der Gegenwart erfreuen sich Quantenpunkte ungebrochenen Interesses [60,64,65,68], nicht zuletzt zur Untersuchung des Resonanzenergie transfers in biologischen Systemen [69-71].

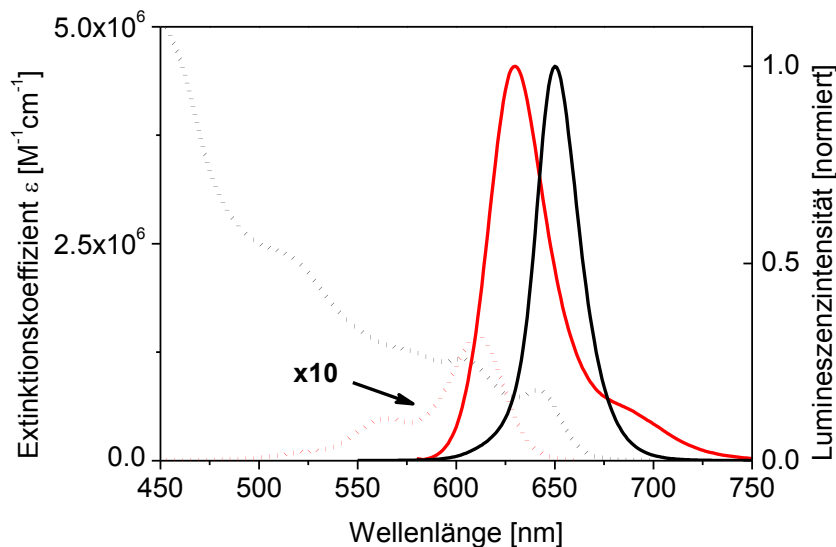


Abbildung 2.9. Quantenpunktabsorption und –emission (Quantenpunkt mit zentraler Emissionswellenlänge bei 655 nm, QD655) im Vergleich zur Absorption bzw. Emission eines Fluoreszenzfarbstoffs (AlexaFluor610) (schwarz-gepunktet: QD-Absorption, rot-gepunktet: Farbstoff-Absorption [zur besseren Darstellung multipliziert mit dem Faktor 10], schwarz: normierte QD-Emission, rot: normierte Farbstoff-Emission)

Zum besseren Verständnis der Eigenschaften von Quantenpunkten, soll im Folgenden ein kurzer Überblick über die zugrunde liegende Theorie gegeben werden. Für detaillierte Herleitungen der in Kapitel 2.2.2 aufgeführten Beschreibungen sei auf die Bücher [72,73] verwiesen. An die Theorie anschließend wird in

Kapitel 2.2.3 und 2.2.4 näher auf den Aufbau der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanokristalle eingegangen. Weiterhin werden Anwendungsbeispiele genannt.

2.2.2 Theoretische Beschreibung der besonderen Eigenschaften von Quantenpunkten

Quantenpunkte bestehen, wie bereits erwähnt, aus Halbleitermaterialien. Halbleiter sind anorganische, kristalline Feststoffe, bei denen die Orbitale der einzelnen Atome überlappen und kontinuierliche Energiebänder bilden, die durch eine Bandlücke E_g der Größe $\sim 0.5 - 3.5$ eV, voneinander getrennt sind [74]. Die bindenden Orbitale des Halbleiters bilden das Valenzband und die antibindenden Orbitale das Leitungsband (siehe Abbildung 2.10). Die Größe der Bandlücke unterscheidet Halbleiter von anderen kristallinen, anorganischen Feststoffen (Leitern, Isolatoren). Die Energiedifferenz zwischen Valenz- und Leitungsband entspricht im Falle der Halbleiter nun der Energie des Lichtes im Wellenlängenbereich von 350 nm (Energie ~ 3.5 eV) – 2500 nm (Energie ~ 0.5 eV). Wird ein Halbleiter also mit Licht der Energie $h\nu > E_g$ bestrahlt, so kann unter Absorption eines Photons ein Elektron vom Valenzband ins Leitungsband überführt werden. Der Halbleiter befindet sich im angeregten Zustand. Im Valenzband bleibt dabei ein Elektronenloch zurück. Durch Rekombination von Elektron und Loch kann der Halbleiter, bei gleichzeitiger Emission eines Photons in den Grundzustand zurückkehren. Im angeregten Zustand können das negativ geladene Elektron und das positiv geladene Loch über Coulomb-Kräfte miteinander wechselwirken. Dabei entsteht ein Quasipartikel, welches als Exciton bezeichnet wird. Der Abstand von Elektron und Loch innerhalb eines Excitons, der Excitonen-Bohr-Radius $a_{E\alpha}$ lässt sich aus

$$a_{E\alpha} = \frac{4\pi\epsilon_0\epsilon\hbar^2}{\mu e^2} \quad \text{Gleichung (2.30)}$$

mit ϵ als Dielektrizitätskonstante des Halbleiters, ϵ_0 als Dielektrizitätskonstante des Vakuums, \hbar als reduziertem Planckschen Wirkungsquantum, e als Elementarladung und μ als reduzierter Masse des Elektronen-Loch-Paares berechnen. Die reduzierte Masse wird über

$$\mu = \frac{m_e^* m_h^*}{m_e^* + m_h^*} \quad \text{Gleichung (2.31)}$$

aus den, für viele Halbleiter bekannten, effektiven Massen für Elektron m_e^* und Loch m_h^* gebildet.

Der Excitonen-Bohr-Radius für die meisten Halbleiter liegt etwa im Bereich von 1-100 nm ($a_{E\alpha}$ von CdSe = 49 nm [76]) und entspricht der Größe der Quantenpunkte. Dies hat zur Folge, dass die Bewegungsfreiheit der Excitonen in allen drei Raumrichtungen eingeschränkt ist, da die Begrenzung durch die räumliche Ausdehnung der Nanokristalle wie eine Potentialbarriere für die Ladungsträger wirkt. Das Exciton kann als Teilchen im Kasten aufgefasst werden. Es treten dann quantenmechanische Phänomene auf. Wesentlich zum Verständnis der Eigenschaften von Quantenpunkten ist hier vor allem der Größenquantisierungseffekt [75]. Dieser beschreibt zum einen eine Vergrößerung der Bandlücke des Halbleiters mit abnehmender Partikelgröße. Diese Energieverschiebung kann unter Berücksichtigung der räumlichen Ausdehnung mit

$$\Delta E = \frac{h^2}{8} \left(\frac{1}{m_x d_x^2} + \frac{1}{m_y d_y^2} + \frac{1}{m_z d_z^2} \right) \quad \text{Gleichung (2.32)}$$

bestimmt werden. m_x , m_y und m_z sind hier die effektiven Massen des Elektron-Loch-Paares und d_x , d_y , d_z die jeweilige Größe der Partikel in der angegebenen Raumrichtung. Je stärker die Teilchen in ihrer Ausdehnung beschränkt sind, desto größer wird die Energiedifferenz. Gleichzeitig erlaubt diese Abhängigkeit der Größe der Bandlücke und damit der Absorptions- und Emissionseigenschaften der Quantenpunkte von deren räumlicher Ausdehnung (siehe Abbildung 2.11) eine zielgerichtete Beeinflussung der photophysikalischen Eigenschaften während der Synthese der Nanokristalle. Zum anderen beschreibt der Größenquantisierungseffekt auch eine abnehmende Anzahl von Energiezuständen in Leitungs- und Valenzband durch die insgesamt geringere Anzahl an Atomen im Quantenpunkt verglichen mit einem ausgedehnten Halbleiter. Es kommt zur Ausbildung diskreter Energieniveaus in den Energiebändern (siehe Abbildung 2.10) [74,75].

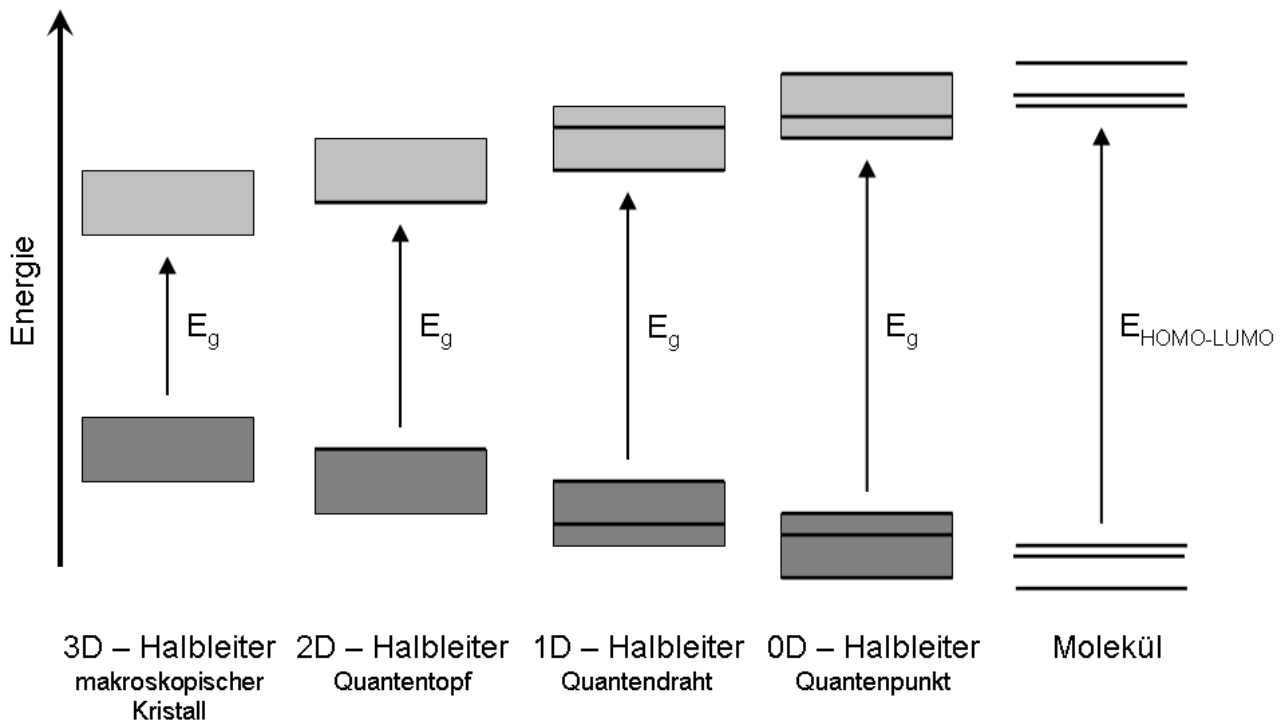


Abbildung 2.10. Darstellung des Größenquantisierungseffektes bei Halbleiternanokristallen beim Übergang von ausgedehnten Kristallen (3D) zu Quantenpunkten (0D) anhand eines vereinfachten Energieniveau-Diagramms im Vergleich zu Molekülen. Die Beweglichkeit des Excitons wird ausgehend vom ausgedehnten Halbleiterkristall hin zum Quantenpunkt nacheinander in allen drei Raumrichtungen eingeschränkt. Dunkelgrau dargestellt ist das Valenzband, hellgrau das Leitungsband, E_g ist die Energielücke zwischen beiden. Es ist eine zunehmende Diskretisierung der Energieniveaus innerhalb der Energiebänder mit abnehmender Halbleitergröße zu erkennen. Im Molekül schließlich existieren nur noch diskrete Energieniveaus. Die elektronische Struktur des Quantenpunktes liegt zwischen der eines makroskopischen Kristalls und eines Moleküls.

Es existieren selbstverständlich noch weitere Einflüsse, wie Temperatur, Oberflächenfunktionalisierung, Kontakt mit Sauerstoff, die die photophysikalischen Eigenschaften der Quantenpunkte mitbestimmen [76], dies jedoch in geringem Maße. Daher kann der hier beschriebene Größenquantisierungseffekt neben dem Material, aus dem der Halbleiter-Nanokristall besteht, als grundsätzlich für das Absorptions- und Emissionsverhalten der Quantenpunkte aufgefasst werden.

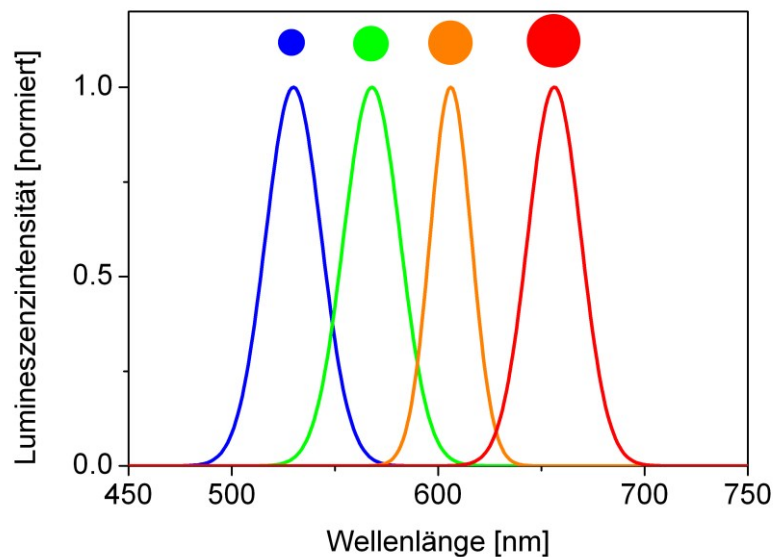


Abbildung 2.11. Charakteristische Emissionspektren von Quantenpunkten gleichen Materials aber verschiedener Größe. Die Emissionswellenlänge nimmt mit der Größe der Quantenpunkte zu.

Das Absorptions-Übergangsdipolmoment von Quantenpunkten

Zur Berechnung des Förster-Radius R_0 ist die Kenntnis des Orientierungsfaktors κ^2 wichtig (siehe Kapitel 2.1.2), der sich aus der Lage von Übergangsdipolmoment des Donors und Übergangsdipolmoment des Akzeptors, sowie der jeweiligen Art der Degeneration der Übergangsdipolmomente, ergibt. Die Frage, die in diesem Zusammenhang beantwortet werden muss, ist, welcher Art das Absorptions-Übergangsdipolmoment von Quantenpunkten ist.

In der Literatur besteht in dieser Hinsicht leider keine Einigkeit. Während für sphärische Quantenpunkte planare (2D) bzw. isotrope Übergangsmomente angenommen werden [77-80], werden für ellipsoidale Quantenpunkte in Abhängigkeit vom Formfaktor (Verhältnis der langen zur kurzen Ellipsoidenachse) im Allgemeinen lineare Übergangsmomente beobachtet [81,82]. Zusätzlich können Oberflächenmodifikationen durch Ladungstransfer in Richtung der Quantenpunktoberfläche eine Änderung der Übergangsdipolmomente bewirken [83-84]. Allen Nanokristallen gemein ist die Lage der Übergangsdipolmomente. Lineare Momente sind entlang der z-Achse des Kristallgitters orientiert, planare senkrecht dazu (Abbildung 2.12).

Die erwähnten Degenerationen der Übergangsdipolmomente entsprechen den in Tabelle 2.1 aufgeführten Degenerationen, die bei der Bestimmung des Orientierungsfaktors berücksichtigt werden müssen: 1D-Übergangsdipolmoment = L, 2D-Übergangsdipolmoment = P und isotropes Übergangsdipolmoment = I.

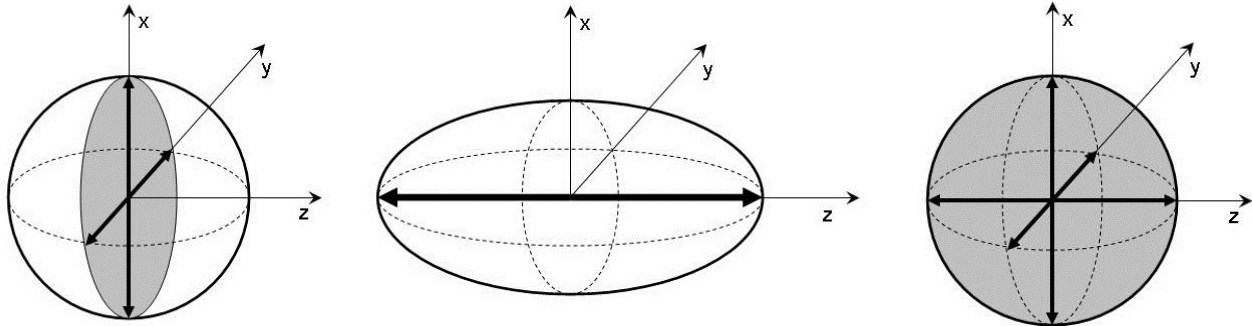


Abbildung 2.12. Darstellung der möglichen Übergangsmomente in Halbleiternanokristallen. Links: planares (2D) Absorptions-Übergangsdipolmoment, Mitte: lineares Übergangsdipolmoment, Rechts: isotropes Übergangsdipolmoment. Das planare Übergangsmoment kann als Fläche, die von zwei entlang der x- und y-Achse orientierten Vektoren aufgespannt wird, aufgefasst werden. Das isotrope Übergangsdipolmoment von Quantenpunkten ist eine Sphäre, die von drei entlang der Raumachsen orientierten Vektoren aufgespannt wird.

2.2.3 Kern-Schale-Quantenpunkte

Je kleiner ein Körper ist, desto größer ist im Verhältnis zum Volumen seine Oberfläche. Quantenpunkte besitzen aufgrund ihrer geringen Größe ein extrem hohes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis. Daher hat die Oberfläche der Nanokristalle ebenfalls einen starken Einfluss auf deren photophysikalische Eigenschaften.

Trotzdem Halbleiter-Nanokristalle theoretisch in geordneter Gitterstruktur aufgebaut sein sollten, ist dem in der Praxis nicht so. Vielmehr kristallisieren sie, abhängig vom Halbleitermaterial, den Synthesebedingungen und dem umgebenden Lösungsmittel, in verschiedensten Gittern und Gittermodifikationen, die teilweise hochkomplex sein können. Hinzu kommen mögliche Gitterdefekte, verursacht durch Lücken im Metallgitter, den Einbau von Fremdatomen oder an der Oberfläche adsorbierten Molekülen. Eine Oxidation der Quantenpunktoberfläche muss ebenfalls in Betracht gezogen werden [59,85,179]. Die erwähnten Oberflächenveränderungen führen zu einer Veränderung der zu erwartenden optischen Eigenschaften. Es kommt zu einer Rotverschiebung der Emission, zur Verbreiterung der Emissionsbande und mit Lumineszenzverminderung einhergehender Verschlechterung der Quantenausbeute.

Um diese negativen Effekte auszuschließen, schützt man den Quantenpunkt üblicherweise mit einer passivierenden Schale. Diese kann entweder aus anorganischem Material oder organischen Schichten bestehen. Während die absorptiven Eigenschaften des Quantenpunkts von der Verschalung kaum beeinflusst werden, sind die emissiven Eigenschaften stark von der Schutzhülle abhängig, da diese die bereits erwähnten Oberflächenveränderungen durch Gitterdefekte und Oxidation unterbindet [86]. Eine Umhüllung mit einer passivierenden Schicht ist daher die einfachste Möglichkeit, stabile Quantenpunkte mit hervorragenden optischen Eigenschaften zu erzeugen. Die so geschaffenen Nanokristalle werden nach ihrem Aufbau Kern-

Schale-Quantenpunkte genannt (siehe Abbildung 2.13). Im Vergleich zu organischen Schalen, die aus Molekülen wie TOPO (tri-*n*-Octylphosphinoxid), DHLA (Dihydroliponsäure) oder OPV (Oligo-Phenyl-Vinyl-Phosphinoxid) bestehen können, sind anorganische Schalen besser geeignet stabile und hochlumineszente Kern-Schale-Quantenpunkte zu erzeugen [60,87,88]. Dafür müssen allerdings zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Das Schalenmaterial muss eine dem Quantenpunktkern möglichst ähnliche Gitterstruktur haben, damit durch die Schale keine zusätzlichen Gitterdefekte entstehen, und es muss weiterhin eine größere Bandlücke als das Kernmaterial besitzen. Letzteres ist notwendig, da ansonsten die Schale in der Lage wäre nicht nur das Anregungslicht sondern auch die vom Quantenpunkt emittierte Lumineszenz zu absorbieren, was zu einer Verschlechterung der optischen Eigenschaften des Nanokristalls führen würde. Das am weitesten verbreitete und für die Quantenpunkte im Rahmen dieser Arbeit verwendete Schalenmaterial ist Zinksulfid (ZnS), da es die genannten Voraussetzungen gut erfüllt.

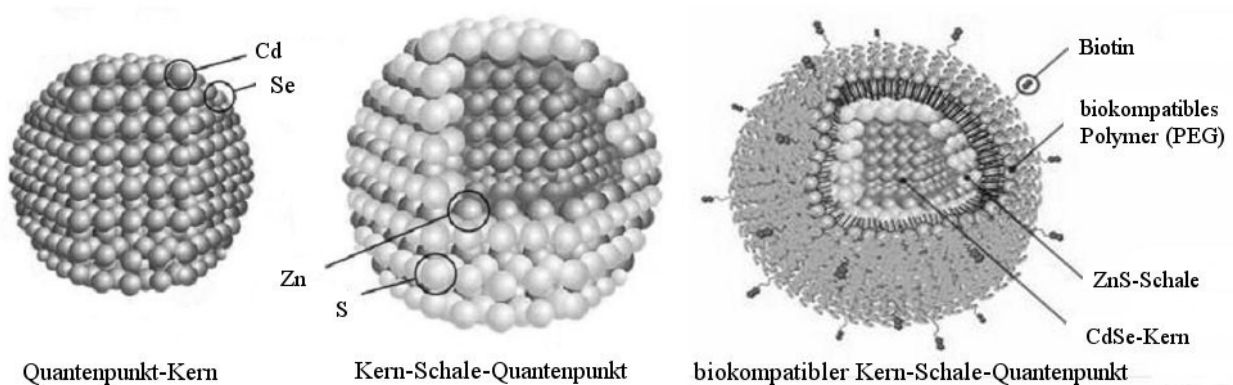


Abbildung 2.13. Schematische Darstellung des Aufbaus eines Kern-Schale-Quantenpunkts. Links: CdSe-Quantenpunkt-Kern, Mitte: CdSe/ZnS-Kern/Schale-Quantenpunkt, Rechts: mit zusätzlicher biokompatibler Polymerschale aus Polyethylenglykol (PEG) umhüllter Kern/Schale-Quantenpunkt mit Biotin-Funktionalisierung. Letzterer wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet. [66,67].

2.2.4 Anwendungen biokompatibler Quantenpunkte

Biokompatible Quantenpunkte bestehen neben dem emittierenden Halbleiterkern und einer passivierenden Schale (siehe Kapitel 2.2.3) aus einer zusätzlichen Hülle, die die an sich für biologische Proben toxischen Nanokristalle biokompatibel, wasserlöslich und funktionalisierbar macht (siehe Abbildung 2.13). Dies ist insbesondere für intrazelluläre Messungen *in vitro* oder *in vivo* und diagnostische Anwendungen in der Medizin von Interesse, um eine Beeinträchtigung oder gar ein Absterben der biologischen Substanz zu vermeiden. Üblicherweise werden Polymere, Proteine, Peptide oder wasserlösliche Moleküle an die Quantenpunktoberfläche gekoppelt um diese biokompatibel zu machen [68,89]. Es zeigte sich, dass die Umhüllung der Nanokristalle mit einer wasserlöslich machenden Schale auch die toxischen Eigenschaften dieser vermindert. Daher ist es ausreichend, neben der passivierenden Schutzschicht eine weitere Schale aufzubringen, um die Halbleiter-Nanokristalle erfolgreich in biologischen Systemen einsetzen zu können, was die Synthese erheblich vereinfacht. Da diese äußere Hülle leicht mit den verschiedensten

Funktionalisierungen versehen werden kann [90] sind die möglichen Anwendungen für Nanokristalle in biologischen Assays nahezu unbegrenzt.

Biokompatible Quantenpunkte haben inzwischen ein breites Anwendungsspektrum und werden neben der Strukturaufklärung in komplexen biologischen Strukturen, zur Sichtbarmachung biologischer Prozesse, speziell für *in vivo*-Imaging, Zell-Assays sowie eine Vielzahl weiterer biologischer Assays eingesetzt [65,69,90,91]. Neuere Arbeiten zeigen vermehrt auch Anwendungen in der medizinischen Diagnostik, bei denen die herausragenden optischen Eigenschaften der Quantenpunkte Multiplex-Messungen (den simultanen Nachweis mehrerer Krankheitsmarker), Nachweisgrenzen im pikomolaren Bereich und so eine Früherkennung von Krankheiten möglich machen [31].

2.3 Lanthanoidkomplexe

2.3.1 Einleitung

Die Entdeckung der chemischen Elemente aus der Gruppe der Lanthanoide (auch Seltene Erden genannt) nahm 1794 mit der Charakterisierung des 1787 in der schwedischen Grube Ytterby gefundenen Minerals Ytterbit ihren Anfang, aus dem man 1839-1843 Oxide der Lanthanoide Cer, Terbium und Erbium gewinnen konnte. Weitere Elemente der Seltenen Erden konnten in den darauf folgenden Jahren isoliert und nachgewiesen werden, das letzte, Promethium, im Jahre 1945 [92].

Die chemischen Elemente der Gruppe der Lanthanoide (Ordnungszahlen $Z = 57$ [Lanthan] bis $Z = 71$ [Lutetium]) zeichnen sich dadurch aus, dass sie untereinander sehr ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften besitzen. Dieses Phänomen ist vor allem auf die Elektronenkonfiguration $[\text{Xe}]6s^24f^x$ mit ($x = 2-14$, Ausnahmen Lanthan, Gadolinium und Lutetium) der Lanthanoide zurückzuführen. Während bei vielen Elementen mit zunehmender Ordnungszahl vermehrt die äußeren Atomorbitale besetzt werden, wird bei den Seltenen Erden zuerst die 4f-Schale befüllt. Da die äußeren Orbitale aber für die Eigenschaften maßgeblich sind, hat die Zunahme der Elektronenbesetzung der 4f-Schale darauf nur einen geringen Einfluss. Die Unterschiede in den Eigenschaften der Lanthanoide sind vielmehr durch Gewicht und Größe bedingt. Mit zunehmender Ordnungszahl steigt das Gewicht, sinkt aber die Größe. Diese Lanthanoiden-Kontraktion hat ihre Ursache in der stärkeren Anziehung zwischen der Elektronenwolke und der Kernladung der Atome mit zunehmender Ordnungszahl. Allen Lanthanoiden gemein ist, dass sie im Wesentlichen als dreiwertige Ionen vorliegen [92,93].

Die dreiwertigen Lanthanoid-Ionen besitzen besondere spektrale Eigenschaften, die durch elektronische Übergänge innerhalb der 4f-Orbitale hervorgerufen werden. Diese werden von den gefüllten 5s- und 5p-Orbitalen nach außen abgeschirmt, wodurch es nur zu minimalen Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium und anderen Molekülen, wie Ionen und Dipolen, kommt. Die elektronischen f-f-Übergänge innerhalb eines Lanthanoid-Ions verlaufen daher nahezu störungsfrei und resultieren in äußerst schmalen Absorptions- und Emissionsbanden mit Lebenszeiten des angeregten Zustandes, die mehrere Millisekunden erreichen können [94,95].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden auf dem dreiwertigen Terbium-Ion Tb^{3+} basierende Lanthanoid-Komplexe als FRET-Donoren verwendet. Daher soll im Folgenden speziell auf dieses Lanthanoid eingegangen werden.

2.3.2 Das freie Terbium-Ion und seine spektroskopischen Eigenschaften

Elektronische Konfiguration

Die elektronische Konfiguration des freien Terbium-Ions lautet $[\text{Xe}]6s^2f^8$. Da allein aus dieser Angabe keine befriedigende Aussage über die optischen Eigenschaften des Ions getroffen werden kann, ist es notwendig die elektronischen Energieniveaus, die die Elektronen innerhalb des Ions einnehmen können, und die daraus resultierenden optischen Übergänge, genauer anzugeben. Eine ausführliche Betrachtung für das Terbium-Ion ist in der Literatur zu finden, an die an dieser Stelle verwiesen werden soll [95,180]. Da beim Terbium-Ion nur wenige Energieniveaus an den optisch wichtigsten 4f-Übergängen beteiligt sind, soll an dieser Stelle lediglich ein kurzer Überblick über die zugrunde liegende Theorie gegeben werden.

Zur genauen Beschreibung der elektronischen Zustände bzw. der Quantenzustände von Ionen oder Atomen werden Termsymbole der Form $^{(2S+1)}L_J$ verwendet. L stellt hier den Bahndrehimpuls, S den Spin bzw. $2S+1$ die Spinmultiplizität und J den Gesamtdrehimpuls des Systems dar. Anhand dieser drei Quantenzahlen kann jeder elektronische Zustand eindeutig zugeordnet werden. Die Energieniveaus der Lanthanoiden-Ionen sind hochgradig degeneriert. Im Falle des dreiwertigen Terbium-Ions wird die Elektronenkonfiguration $[\text{Xe}]6s^2f^8$ durch interelektronische Abstoßung in 119 $^{(2S+1)}L$ Terme aufgespalten. Die Spin-Bahn-Kopplung, die durch den Gesamtdrehimpuls J als Kombination des Spins S und des Bahndrehimpulses L ausgedrückt wird, führt zu einer weiteren Aufspaltung in 295 $^{(2S+1)}L_J$ Niveaus, von denen das 7F_6 Niveau das energieärmste ist. Zusätzlich zu diesen intramolekularen Wechselwirkungen führen auch intermolekulare Wechselwirkungen zu Aufspaltungen der Energieniveaus. Im Falle eines Tb^{3+} -Komplexes bedingt das Ligandenfeld des das Ion umgebenden Liganden eine weitere Feinaufspaltung. Diese als Stark-Effekt bekannte Wechselwirkung spaltet jedes energetische Niveau in Abhängigkeit von der Symmetrie des Komplexes in nochmals bis zu $2J+1$ so genannte Stark-Niveaus auf. Es ergeben sich für das dreiwertige Terbium-Ion so bis zu 3003 mögliche Zustände [96]. Abbildung 2.14 zeigt den für die wichtigsten Übergänge wesentlichen Ausschnitt aus dem Energiediagramm von Tb^{3+} .

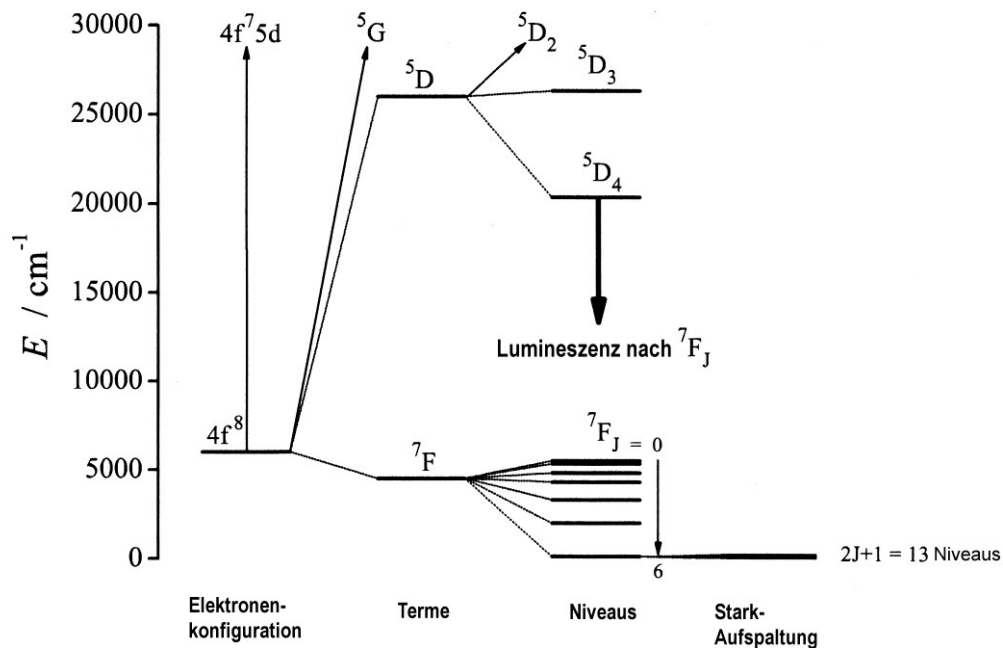


Abbildung 2.14. Darstellung der für die Lumineszenz des Tb³⁺ bedeutsamen ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ -Übergänge ($J=0-6$) im Energiediagramm.

Elektronenübergänge können unter Berücksichtigung der Auswahlregeln zwischen allen Niveaus stattfinden, von Bedeutung für die spektroskopische Untersuchung der Absorption und Emission von Tb³⁺ sind allerdings nur die Übergänge zwischen dem 5D_4 - und den 7F_J -Niveaus. Jedem dieser Elektronenübergänge lässt sich ein optischer Übergang zuordnen (siehe Tabelle 2.3).

Optische Übergänge und Auswahlregeln

Die spektroskopisch interessanten Übergänge im Tb³⁺ besitzen nur eine sehr geringe Intensität. So liegen die Extinktionskoeffizienten des Tb³⁺ in Lösung bei etwa $\epsilon_{\max} = 1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (zum Vergleich: der Extinktionskoeffizient eines Fluoreszenz-Farbstoffs liegt bei etwa $10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [95]. Woher kommt diese außergewöhnlich geringe Signalintensität der optischen Übergänge?

Die Wahrscheinlichkeit eines elektronischen Übergangs (und damit seine Intensität) wird von verschiedenen Auswahlregeln bestimmt. Die beiden wichtigsten für das Terbium-Ion sind die Spin-Multiplizitäts-Regel und die Laporte-Regel. Erstere besagt, dass Übergänge zwischen Zuständen unterschiedlicher Spin-Multiplizität (siehe vorheriger Abschnitt) verboten sind, letztere, dass nur Übergänge zwischen Zuständen unterschiedlicher Parität erlaubt, zwischen gleicher Parität hingegen verboten sind. Parität meint in diesem Zusammenhang die Symmetrie-Eigenschaften der Atomorbitale bezüglich einer Spiegelung an ihrem Inversionszentrum. In dieser Beziehung symmetrische Orbitale besitzen eine gerade Parität (g), unsymmetrische eine ungerade (u) (siehe Abbildung 2.15).

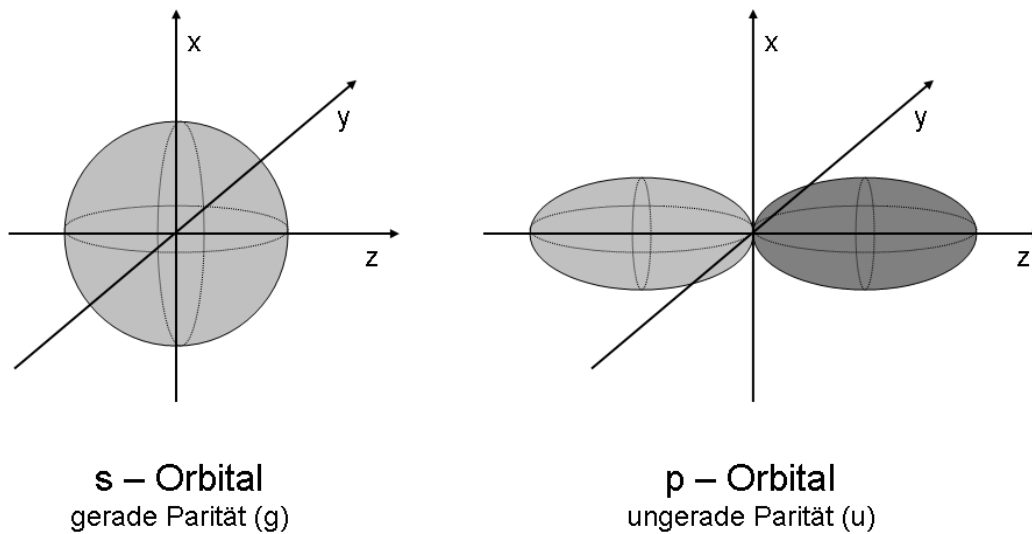


Abbildung 2.15. Darstellung von Atomorbitalen zur Veranschaulichung des Begriffs der Parität. Unterschiedliche Farben stellen hier die unterschiedlichen Vorzeichen der Wellenfunktion des Orbitals dar. Das Inversionszentrum liegt im Koordinatenursprung. Es wird ersichtlich, dass eine Spiegelung am Inversionszentrum beim s-Orbital ein deckungsgleiches Spiegelbild liefert, beim p-Orbital hingegen nicht.

Die elektronischen f-f-Übergänge im Tb^{3+} sind paritätsverboten, da sie zwischen Orbitalen gleicher Parität erfolgen. Durch Wechselwirkung der 4f-Elektronen mit dem Ligandenfeld des Ions ist es aber möglich, dass andere Paritäten in die 4f-Wellenfunktion gemischt werden. Es kommt zur Veränderung der Orbitale, die sich dann in ihrer Parität unterscheiden und so einen Übergang der Elektronen möglich machen. Da die 4f-Elektronen allerdings effektiv von der 5s- und 5p-Schale abgeschirmt werden, ist der Einfluss des Ligandenfelds gering und Übergänge aufgrund der durch Liganden implizierten Veränderungen der Wellenfunktion unwahrscheinlich. Sie treten daher nur mit geringer Intensität auf. Ein weiterer Grund für die schwachen Signalintensitäten der optischen Übergänge liegt darin, dass diese auch nach der Spin-Multiplizitäts-Regel verboten sind, denn ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_j$ -Übergänge im Tb^{3+} besitzen eine Quintett \rightarrow Septett-Multiplizität. Es kommt aber auch hier zu Aufweichungen, in diesem Fall durch die Spin-Bahn-Kopplung, die dazu führen, dass trotz des Spin-Verbots Übergänge das dreiwertige Terbium-Ion eine schwache Lumineszenz (da der Begriff Fluoreszenz üblicherweise für spin-erlaubte Übergänge verwendet wird, wird die Emission des Terbiums allgemeiner als Lumineszenz bezeichnet) zeigen [97,98].

Je nachdem, mit welcher Feldkomponente (der magnetischen oder der elektrischen) des Lichts das Tb^{3+} interagiert, unterscheidet man magnetische Dipol-Übergänge und induzierte elektrische Dipol-Übergänge. Es besteht theoretisch zusätzlich die Möglichkeit, dass elektrische Quadrupol-Übergänge existieren, jedoch konnten dies experimentell bisher nicht nachgewiesen werden [99]. Die Mehrzahl der optischen Übergänge des Terbium-Ions ist induziert elektrischer Natur (siehe Tabelle 2.3).

Die Unterscheidung in magnetische und elektrische Dipol-Übergänge ist im Rahmen der FRET-Theorie für die Bestimmung des Überlappungsintegrals von Bedeutung. Da der resonante Energietransfer über Coulomb-Wechselwirkungen erfolgt, sollten theoretisch nur die elektrischen Dipol-Übergänge bei der Berechnung des Förster-Radius Anwendung finden. Höchstwahrscheinlich tragen in der Praxis auch die magnetischen Dipol-Übergänge zum Energietransfer bei. Zur Berechnung des Überlappungsintegrals und damit des Förster-Abstands wird daher in erster Näherung das gesamte Emissionsspektrum von Tb^{3+} herangezogen.

Die Merkmale der einzelnen f-f-Übergänge des Tb^{3+} sind im Folgenden noch einmal zusammengefasst:

Tabelle 2.3 Merkmale der verschiedenen optischen Übergänge des dreiwertigen Terbium-Ions. Intensitäten: vs = sehr stark, s = stark, m = mittel, w = schwach, vw = sehr schwach. Dipolcharakter: ED = elektrischer Dipolcharakter, MD = magnetischer Dipolcharakter; aus [98].

Übergang	Spektralbereich	Relative Intensität	Dipolcharakter	Kommentare
${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$	480 – 505	m – s	ED	Geringe Abhängigkeit der Intensität von der Umgebung des Ions
$\rightarrow {}^7F_5$	540 – 560	s – vs	MD	Starke optische Aktivität Stärkster Übergang
$\rightarrow {}^7F_4$	575 – 600	m – s	ED	Unabhängig von der Umgebung des Ions
$\rightarrow {}^7F_3$	610 – 630	w – m	MD	Starke optische Aktivität, Aufspaltung unter bestimmten Bedingungen beobachtbar
$\rightarrow {}^7F_2$	640 – 655	w	ED	Abhängigkeit der Intensität von der Umgebung des Ions
$\rightarrow {}^7F_1$	660 – 670	vw	ED	
$\rightarrow {}^7F_0$	675 – 680	vw	ED	

2.3.3 Der Terbiumkomplex Lumi4Tb

Die Intensität der optischen Übergänge des freien Tb^{3+} ist, wie bereits erwähnt, sehr schwach, sie besitzen einen kleinen Extinktionskoeffizienten. Das macht die direkte Anregung im Experiment sehr ineffizient. Um trotzdem die Vorteile der Tb^{3+} -Lumineszenz (schmale Emissionsbanden, lange Lumineszenzlebenszeit) nutzen zu können, greift man daher auf einen Mechanismus zurück, der als „Antennen-Effekt“ 1942 erstmals von Weissman beschrieben wurde [100]. Dabei wird das freie Terbium-Ion mit Liganden komplexiert, die in der Lage sind, ihre Anregungsenergie auf das Tb^{3+} zu transferieren. Hierbei wird also nicht das Terbium direkt angeregt sondern vielmehr der Ligand in einen ersten angeregten Zustand versetzt. Es wird angenommen, dass dieser anschließend unter Intersystem-Crossing (ISC) in einen angeregten Triplet-Zustand übergeht, jedoch könnte der Energietransfer auch aus angeregten Singulett oder Charge-Transfer-Zuständen erfolgen [101,102]. Von diesem angeregten Triplet-Zustand aus findet dann der Energietransfer zum Tb^{3+} , und damit die Anregung des Ions, statt (siehe Abbildung 2.16). Geeignete Antennen-Liganden haben Extinktionskoeffizienten von bis zu $30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, was im Vergleich zum freien Terbium-Ion etwa um den Faktor 10^5 größer ist.

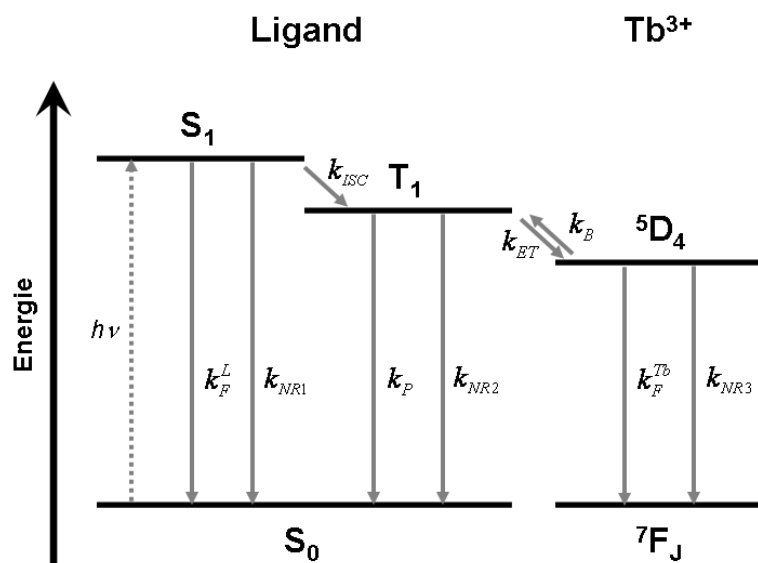


Abbildung 2.16. Prinzip des Antenneneffekts, dargestellt sind die zum Verständnis wichtigen Energieniveaus und Geschwindigkeitskonstanten. S_0 Singulett-Grundzustand des Liganden, S_1 angeregter Singulett-Zustand des Liganden, T_1 angeregter Triplet-Zustand des Liganden, 5D_4 angeregter Quintett-Zustand des Tb^{3+} von dem die Lumineszenz ausgeht, 7F_J J-fach aufgespaltene Septett-Grundzustände des Tb^{3+} , $h\nu$ Absorption von Licht der Wellenlänge ν , k Geschwindigkeitskonstanten (k_F^L Fluoreszenz des Liganden, k_F^{Tb} Fluoreszenz des Terbiums $k_{\text{NR}1}$, $k_{\text{NR}2}$, $k_{\text{NR}3}$ strahlungslose Deaktivierung, k_{ISC} Intersystem-Crossing, k_B Rücktransfer und k_{ET} Energietransfer) [103].

Ein Komplexligand, der effektiv als „Antenne“ wirken soll, muss mehrere Eigenschaften besitzen:

- einen möglichst langlebigen Triplett-Zustand, von dem die Energie auf das Terbium-Ion übertragen werden kann
- effizientes Intersystem-Crossing, durch welches der Liganden-Triplett-Zustand bevölkert wird
- einen geeigneten Energieunterschied zwischen dem Triplett-Zustand des Liganden und dem 5D_4 -Zustand des Tb^{3+} , der weder zu groß sein darf (Energietransfer zum Terbium ineffizient oder unmöglich), noch zu klein (Rücktransfer vom Terbium zum Antennenmolekül wird wahrscheinlicher und verringert Anregung des Tb^{3+}) [27,104]

Neben diesen Eigenschaften, die die Anordnung der Energieniveaus innerhalb des Antennen-Liganden beschreiben, sollte dieser weitere notwendige physikalische und chemische Merkmale besitzen, um den Terbium-Komplex für FRET-Experimente nutzen zu können. Die Antennen-Moleküle und der entstehende Terbium-Komplex müssen sowohl thermodynamisch als auch kinetisch stabil sein. Die Antennen-Moleküle sollten das Tb^{3+} vor der Komplexierung durch Wassermoleküle schützen, da diese aufgrund ihrer O-H-Schwingungen und deren Obertönen ein effektiver Löscher der Tb^{3+} -Lumineszenz sind [105,106], und nicht zuletzt muss der Ligand zur Bindung an andere Moleküle befähigt sein. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit Untersuchungen in FRET-basierten Immunoassays (siehe Kapitel 2.4) durchgeführt wurden, bedeutet dies, dass der Antennen-Ligand einfach an biologische Moleküle binden kann, also funktionelle Gruppen wie Maleimid, NHS-Ester oder Aminogruppen tragen sollte.

Lumi4Tb ist ein solcher, für Untersuchungen im biologischen Medium hervorragend geeigneter, Terbium-Komplex, dessen Liganden makrotrizyklische, bifunktionale 2-Hydroxyisophthalamide sind, die einen Käfig um das Tb^{3+} -Zentralion bilden (siehe Abbildung 2.17) und effizient als Antenne und Abschirmung von Wassermolekülen wirken.

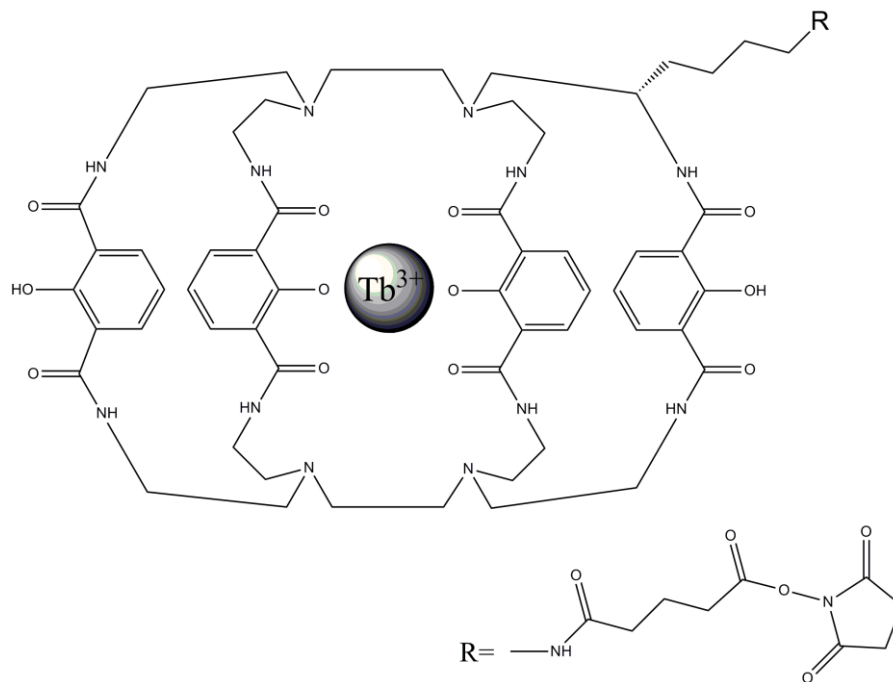


Abbildung 2.17. Aufbau des Lumi4Tb-Chelat-Komplexes. Dargestellt ist hier der NHS-Ester des Komplexes. [107]

Solche Tb^{3+} -Chelat-Komplexe sind aufgrund ihrer optischen Eigenschaften hervorragende FRET-Donoren. Sie verfügen über eine starke Absorption (zur Bereitstellung von FRET-Energie), lange Lumineszenzabklingzeiten (für hochsensitive, zeitaufgelöste Messungen und leichte Unterscheidung zur kurzlebigen Autofluoreszenz und nicht durch FRET-induzierten ebenfalls kurzlebigen Akzeptorlumineszenz), große „Stokes“-Verschiebung (selektive Anregung des Donors), sowie schmale Emissionsbanden im Bereich des sichtbaren Lichts (genaue Angaben zu den optischen Eigenschaften sind in Kapitel 5.2 zu finden), welches eine selektive Akzeptordetektion in den Emissionslücken des Spektrums ermöglicht.

Das Emissions-Übergangsdipolmoment von Lumi4-Tb

Wie bei den Quantenpunkten das Absorptions-Übergangsdipolmoment so spielt auch das Emissions-Übergangsdipolmoment des beteiligten Terbium-Komplexes als Donor eine Rolle bei der Bestimmung des Orientierungsfaktors. Die Anisotropie der Emission des Tb^{3+} wird im Allgemeinen, aufgrund der großen Anzahl an Übergangsdipolmomenten der einzelnen Mikrozustände im Ion, als Null angenommen [108]. Die Emission des Lumi4Tb-Komplexes ist also nicht richtungsabhängig, er besitzt daher ein isotrop degeneriertes Emissions-Übergangsdipolmoment.

2.3.4 Biochemische Anwendungen von Lanthanoid-Komplexen

Der Vorteil bei der Verwendung von Lanthanoid-Komplexen liegt vor allem in den langen Lumineszenzlebenszeiten, die eine Unterscheidung von kurzlebigen Hintergrundsignalen (z.B. der eingesetzten biologischen Substrate, der verwendeten Filter, des Probenraumes etc.) durch zeitverzögerte Messungen (Beginn der Detektion einige Mikrosekunden nach der Anregung) möglich machen. Durch diese hintergrundfreie Detektion der Lanthanoiden-Signale ist ein sehr sensitiver Nachweis sowohl steady-state über zeitverzögerte Intensitätsmessungen als auch zeitaufgelöst möglich. Dies macht man sich in einem breiten Anwendungsbereich zunutze, der eine Vielzahl hetero- und homogener Assays (Begriffsklärung siehe Kapitel 2.4.1 und 2.4.2), kombinatorische Pharmasynthesen, Chiralitätssensorik, Strukturaufklärung, chromatographische Trennverfahren und bildgebende Untersuchungsverfahren umfasst [94,109-112]. Am weitesten verbreitet sind hier Anwendungen auf Basis von Europium- und Terbium-Komplexen, da diese im sichtbaren Wellenlängenbereich effizient emittieren, seltener Samarium- und Dysprosium-Komplexe.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zeitaufgelöste Immunoassays mit den Modellbindungssystemen Biotin-Streptavidin (Erläuterung siehe Kapitel 2.4.3) für spezifische sowie Zink-Histidin (Erläuterung siehe Kapitel 2.4.4) für unspezifische Bindungen durchgeführt.

2.4 FRET-basierte Anwendungen: Immunoassays und molekulares Lineal

Die wichtigsten Anwendungsgebiete des Resonanzenergietransfers sind die Detektion von Molekülen, wie Krankheitsmarkern, in Immunoassays sowie die Strukturaufklärung in biologischen Systemen. Der große Vorteil bei letzterem liegt darin, dass man mit Hilfe des FRET Abstände bestimmen kann, die unter der optischen Auflösungsgrenze von Mikroskopen liegen. Es existieren zwar verschiedene Ansätze, diese Grenze zu überwinden (STORM = Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, PALM = Photo Activation Localization Microscopy, STED = Stimulated Emission Depletion), trotz aller Bemühungen sind die damit erreichbaren Auflösungen im Vergleich zum FRET nach wie vor begrenzt (STED = 5.8 nm, FRET bis < 1 nm) [1,113-115]. Im Folgenden sollen die beiden Hauptanwendungen des FRET beschrieben werden. Bezug nehmend auf die Experimente in dieser Arbeit werden anschließend das Biotin-Streptavidin-Modellsystem und das Zink-Histidin-Modellsystem vorgestellt, sowie deren Eigenschaften erläutert.

2.4.1 Immunoassays

Als Immunoassays bezeichnet man bioanalytische Tests, die sich zum Nachweis eines Analyten der hochsensitiven und starken Bindung von Antikörpern an die entsprechenden Antigene nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip bedienen. In Abhängigkeit vom Aufbau des Assays können sowohl Antigene als auch Antikörper die nachzuweisenden Analyten sein. Die Nachweismethode kann von Assay zu Assay unterschiedlich sein und ist keineswegs auf optische Methoden beschränkt [116,117]. Diese, und dabei insbesondere die Fluoreszenz, erlauben jedoch einen höchst sensitiven Nachweis der Analyten bei gleichzeitig geringem instrumentellem Aufwand. FRET-basierte Immunoassays bieten zusätzlich den

Vorteil, dass ein Molekül im Assay angeregt wird, ein anderes hingegen emittiert. Dies erlaubt einen noch eindeutigeren Nachweis, da es nur zum FRET kommt, wenn eine Bindung mit dem Analyten vorliegt.

Heterogene Assays

In heterogenen Assays ist einer der Bindungspartner an einer festen Phase immobilisiert. Je nach Art des heterogenen Assays (siehe Abbildung 2.18) kann dies das Antigen oder der Antikörper sein. Nach Zugabe der Probe, jedoch vor der Detektion, erfolgt in heterogenen Assays immer mindestens ein Waschvorgang, bei dem nicht gebundene Assaybestandteile abgetrennt werden. Das Waschen ist bei heterogenen Assays Vor- und Nachteil zugleich, denn durch die Abtrennung der nicht gebundenen Bestandteile werden Störsignale minimiert und so die Empfindlichkeit des Assays deutlich verbessert, gleichzeitig aber der zeitliche und apparative Aufwand erhöht [117,119].

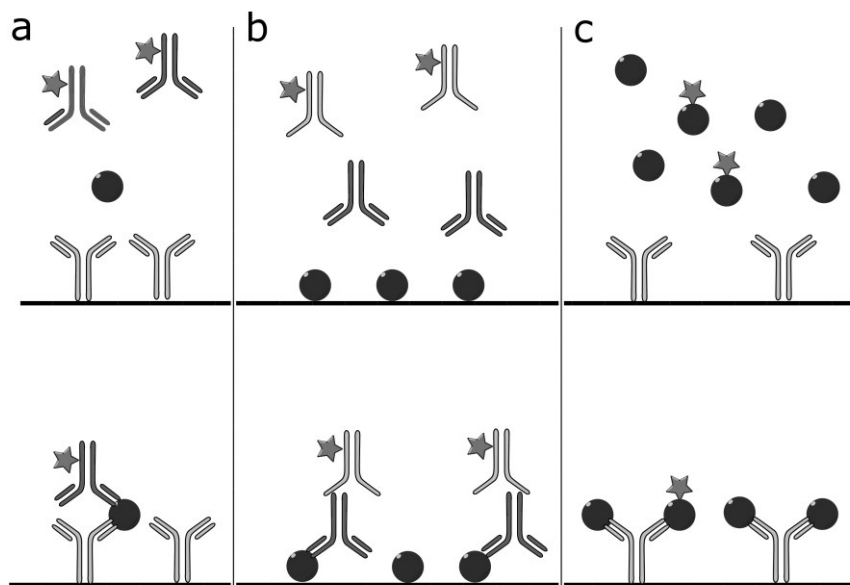


Abbildung 2.18. a) Immunometrischer Assay zur Antigen-Detektion, oben: zu den an einer festen Phase immobilisierten Antikörpern (grau) werden Antigene (Kugeln) und markierte Antikörper (dunkelgrau mit Stern) gegeben, unten: nach Inkubation und Waschen wird das Signal der gebundenen markierten Antikörper gemessen; b) Immunometrischer Assay zur Antikörper-Detektion, oben zu den an einer festen Phase immobilisierten Antigenen werden Analyt-Antikörper und markierte Antikörper gegeben, unten: nach Inkubation und Waschen wird das Signal der gebundenen markierten Antikörper gemessen; c) kompetitiver Assay zur Detektion kleiner Analytmoleküle, oben: zu den an einer festen Phase immobilisierten Antikörpern werden Antigene und markierte Antigene gegeben, unten: nach Inkubation und Waschen wird das Signal der markierten Antikörper-Antigen-Komplexe gemessen.

Homogene Assays

Man spricht von homogenen Assays, wenn keiner der an der Bindung beteiligten Partner an einer festen Phase immobilisiert ist. Nach Zugabe der Probe erfolgt kein Trennungsschritt mehr, die Detektion des Analyten findet direkt im Probenvolumen statt [116,117].

Homogene FRET-Immunoassays basieren darauf, dass ein Bindungspartner im Assay mit dem FRET-Donor und ein anderer mit dem FRET-Akzeptor markiert ist. Bei einem sogenannten „Sandwich-Komplex“ (siehe Abbildung 2.19) zum Beispiel ist ein Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen mit dem FRET-Donor und ein anderer Antikörper mit dem FRET-Akzeptor markiert. Befindet sich ein Antigen in der Probe binden beide Antikörper an das Antigen. Donor und Akzeptor gelangen so in räumliche Nähe und ein Resonanzenergietransfer wird möglich.

Der Vorteil homogener FRET-Assays liegt darin, dass ein FRET-Signal nur entsteht, wenn es zur Bindung zwischen den markierten Antigenen oder Antikörpern kommt. Dadurch sind im Vergleich zum heterogenen Assay höhere Sensitivität, deutlich kürzere Inkubationszeiten (die Antikörper-Antigen-Bindungen finden zeitgleich im gesamten Probenvolumen und nicht nur an der Oberfläche einer festen Phase statt) und eine geringere Fehleranfälligkeit gegeben. Ein möglicher Nachteil ist, dass nicht abgetrennte Assaybestandteile zu Störungen des Probensignals führen können. Im Allgemeinen sind homogene Assays den heterogenen aufgrund der einfacheren Durchführung aber vorzuziehen. FRET ist dabei eine der sensitivsten Nachweismethoden [118].

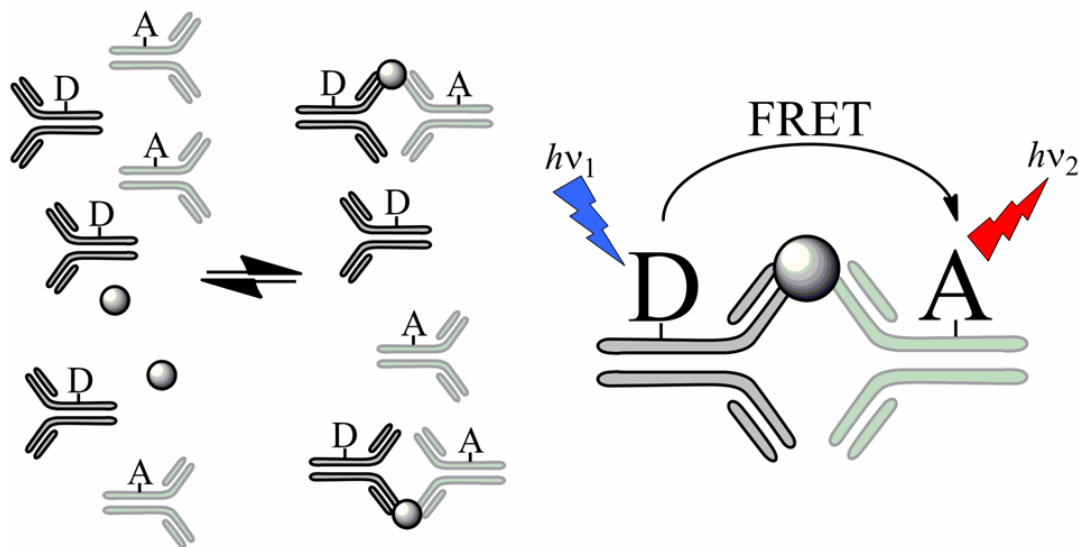


Abbildung 2.19. Prinzip homogener Assays am Beispiel eines FRET-Immunoassays. **Links:** Zwei verschiedene Antikörper für ein Antigen sind mit FRET-Donor (D) bzw. -Akzeptor (A) markiert, nach Zugabe des Antigens (Kugel) bilden sie mit diesem einen Sandwich-Komplex; **rechts:** Die Bildung des Sandwich-Komplexes bringt Donor und Akzeptor in räumliche Nähe, nach Anregung des Donors mit der Anregungsenergie der Wellenlänge ν_1 überträgt dieser mittels FRET Energie auf den Akzeptor, der diese in Form von Lumineszenz der Wellenlänge ν_2 wieder abgeben kann.

2.4.2 Molekulares Lineal

Anwendungen auf der Grundlage des FRET spielen bei der Bestimmung von Abständen im Nanometerbereich in Biologie, Biochemie und Medizin eine wichtige Rolle. Strukturen und Strukturveränderungen molekularer Systeme können im Bereich 1-20 nm mit sehr hoher Genauigkeit und

weit unterhalb der Beugungsbegrenzung des Lichts bestimmt werden. Die Abstandsbestimmung erfolgt dabei aus den bereits beschriebenen Intensitäts- und/oder Lebenszeitveränderungen von Donor und Akzeptor, die mit der Förster-Theorie ausgewertet werden können (siehe Kapitel 2.1.3). Zusätzlich zu den Ansprüchen, die Donor und Akzeptor in diesem Fall erfüllen müssen, um ein ausreichendes FRET-Signal zu generieren, ist bei der Anwendung als spektroskopisches Lineal zu beachten, dass Wechselwirkungen mit dem Molekül, bei dem Abstände bestimmt werden sollen, möglich sind. Veränderungen in den spektroskopischen Eigenschaften von Donor und Akzeptor können auftreten, die Farbstoffe in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden, was eine Änderung des Orientierungsfaktors κ^2 bedingt [120,121]. Beides führt zu Signalveränderungen, die nur scheinbar eine Abstandsabhängigkeit besitzen und das Ergebnis daher verfälschen. Des Weiteren muss die Anordnung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander innerhalb des zu untersuchenden Systems berücksichtigt werden. Daher ist es erforderlich, ein FRET-Paar vor dem Einsatz als Abstandssonde auf diese möglichen Interaktionen mit dem Zielmolekül hin zu testen. Dem Einfluss möglicher Einschränkungen in der Beweglichkeit der FRET-Partner auf die Abstandsbestimmung wird in der Praxis auf zwei mögliche Arten begegnet. Zum einen lassen sich Donor und Akzeptor mittels flexibler Linker am zu untersuchenden Makromolekül befestigen, so dass deren Beweglichkeit uneingeschränkt ist. Der Orientierungsfaktor beträgt dann $2/3$ [122]. Zum anderen kann man auch den entgegen gesetzten Weg beschreiten und die FRET-Partner mit einer rigiden Bindung an das Zielmolekül binden, so dass die Orientierung der Übergangsdipolmomente und damit der Orientierungsfaktor bekannt sind [123].

2.4.3 Biotin-Streptavidin-System

Streptavidin ist, im Gegensatz zu Avidin, kein Glykoprotein. Es wurde zuerst aus Bakterien der Art *Streptomyces avidinii* isoliert. Es besitzt eine molare Masse von etwa 66 kDa und ist aus vier monomeren Untereinheiten aufgebaut, wobei jeweils zwei Monomere durch Wasserstoffbrückenbindungen ein Dimer bilden. Jedes der vier identischen Untereinheiten besitzt eine Bindungstasche für ein Molekül Biotin (Vitamin H) (siehe Abbildung 2.20). Die herausragende Eigenschaft des tetrameren Streptavidin besteht in seiner hohen Bindungsaffinität zum Biotin. Die Bindungskonstante K_a dieser spezifischen Bindung beträgt ungefähr 10^{13} L/mol [124] und ist damit eine der stärksten bekannten nonkovalenten Bindungen in der Natur. Die hohe Bindungsaffinität macht man sich in einer Reihe von Anwendungen in Biologie, Biochemie und Medizin zunutze [125-129]. Gleichzeitig dient das Biotin-Streptavidin als eines der bestuntersuchten Bindungssysteme [129] als Modell für biologische Bindungen in der Grundlagenforschung.

Neben dem Bindungsverhalten gibt es weitere spezifische Eigenschaften, die das System für molekularbiologische Anwendungen interessant machen. Zu diesen gehören ein nahezu neutraler isoelektrischer Punkt und ein Mangel an Kohlenhydrat-Modifikationen, was zu geringer unspezifischer Bindung im Assay verglichen mit anderen Proteinen führt [128,130]. Des Weiteren ermöglicht das kleine Molekül Biotin ($M = 244$ g/mol) eine Bindung an biologische Makromoleküle wie Enzyme oder Proteine ohne deren biologische Aktivität zu verändern. Da diese Biotinylierungsreaktion kovalent an der Seitenkette des Biotin erfolgt, wird die Biotin-Streptavidin-Bindung sterisch nicht beeinträchtigt. Das Biotin-Streptavidin-System ermöglicht also, bei vergleichsweise geringer unspezifischer Bindung innerhalb des

Probenraums, eine Bindung an biologische Makromoleküle ohne deren biologische Funktion zu beeinträchtigen.

Es existiert eine Vielzahl an Streptavidin-Modifikationen, die sich meist in ihren Seitenketten unterscheiden. Natürlich vorkommendes Streptavidin besteht aus 159 Aminosäuren pro Untereinheit. Die am häufigsten verwendete Modifikation ist das so genannte „Kern“-Streptavidin, welches C- und N-terminal gekürzt ist und 125 – 127 Aminosäuren pro Untereinheit enthält ($M \sim 53$ kDa) [131]. Es vereint die Vorteile besserer Wasserlöslichkeit und besserer Zugänglichkeit der Biotin-Bindungstasche für sterisch anspruchsvolle biotinylierte Moleküle [132].

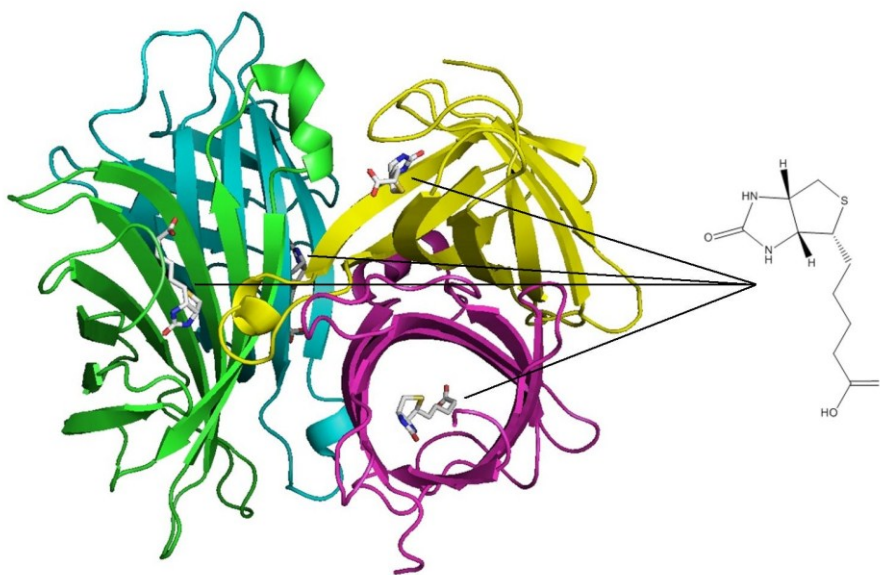


Abbildung 2.20. Aufbau des Biotin-Streptavidin-Systems. Links Struktur von „Kern“-Streptavidin, rechts von D-Biotin. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software PyMOL und des PDB-Datensatzes 3MG5 erstellt (Protein Data Bank (PDB) of the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB), „An Information Portal to Biological Macromolecular Structures, <http://www.rcsb.org/pdb/>“).

Die extrem starke Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung wird hauptsächlich durch drei Mechanismen ermöglicht und ist in der Literatur ausführlich beschrieben worden [124,133]. Verantwortlich sind hier vor allem eine Vielzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Heteroatomen des Biotins und den Aminosäureresten des Streptavidins. Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen dem Biotin und Tryptophanresten des jeweiligen Monomers bzw. einer benachbarten Untereinheit spielen außerdem eine Rolle, wobei letztere von großer Wichtigkeit ist, da ein Streptavidinmonomer aufgrund des Fehlens dieser Wechselwirkung wesentlich geringere Bindungsaffinität zu Biotin zeigt (siehe Abbildung 2.21). Außerdem trägt auch die Konformationsänderung einer Protein-Bindungsschleife (Aminosäuren 45-52) zur hohen Bindungsaffinität bei. Im ungebundenen Zustand liegt diese ungeordnet in einer offenen Konformation vor, faltet sich aber nach der Bindung über die Biotin-Bindungstasche und schirmt diese ab (siehe Abbildung 2.21) [131,134,135].

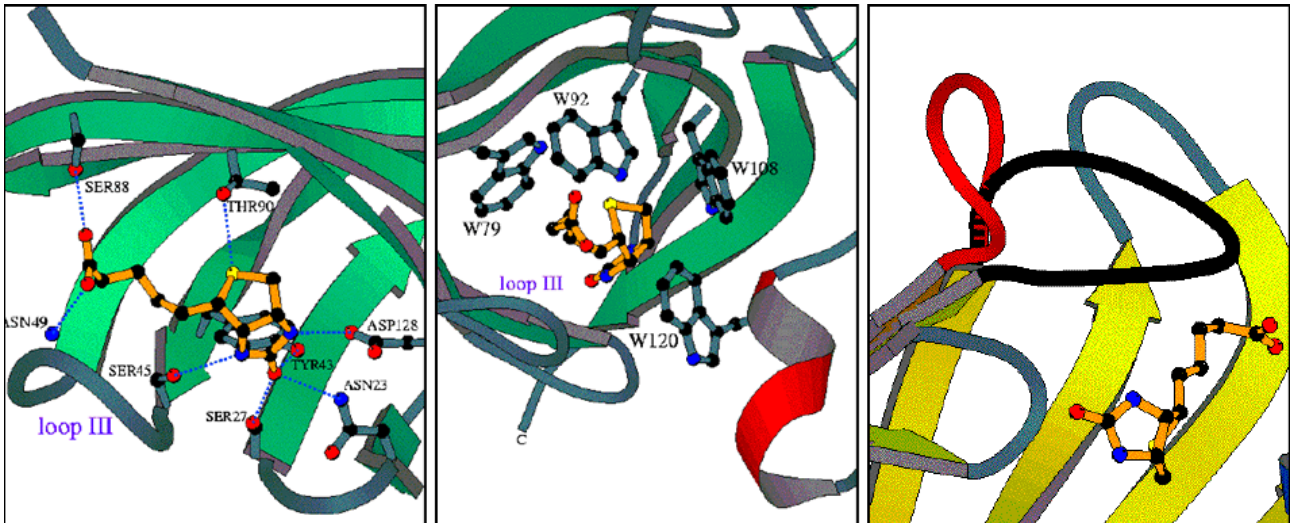


Abbildung 2.21. Darstellung der an der Biotin-Streptavidin-Bindung beteiligten Mechanismen. **Links:** Wasserstoffbrückenbindungen; **mitte:** Van-der-Waals-Wechselwirkungen, **rechts:** Konformationsänderung der Protein-Bindungsschleife (rot = offen, schwarz = geschlossen) [136].

Es konnte durch Röntgenkristallstrukturanalysen gezeigt werden, dass die Bindung von Biotin an Streptavidin dessen Quartärstruktur verändert. Die vier Untereinheiten des Komplexes sind im Vergleich zum ungebundenen Streptavidin abgeflacht und stärker aneinander gebunden [124,137]. Diese strukturelle Veränderung stabilisiert den Biotin-Streptavidin-Komplex zusätzlich. Es wird weiterhin diskutiert, ob die Bindung des Biotins an das Streptavidin kooperativ (die Bindung eines Biotin-Moleküls beeinflusst die Bindungsstärken aller weiteren Biotin-Streptavidin-Bindungen) oder nicht-kooperativ ist. Die Literatur ist in dieser Hinsicht uneins, die Mehrzahl der Quellen geht aber von einer nicht-kooperativen Biotin-Streptavidin-Bindung aus [138-141].

2.4.4 Zink-Histidin-System

Im Gegensatz zur höchst spezifischen Bindung des Biotins mit Streptavidin gibt es im Zink-Histidin-System keinerlei spezifische Bindungsstellen zwischen den beteiligten Molekülen. Die Bindung erfolgt hier durch die Koordination einer metallaffinen Histidin-Gruppe eines Moleküls an Zink-Ionen eines anderen Moleküls (siehe Abbildung 2.22). In der vorliegenden Arbeit sind dies die Zink-Ionen der ZnS-Schale der verwendeten Quantenpunkte. Diese alternative Biokonjugationsmethode wird in zunehmendem Maße zur Bindung von Proteinen, Peptiden oder sogar DNS an Quantenpunkte mit verschiedensten Oberflächen und Funktionalisierungen genutzt [142-145], da Histidin mit hoher Affinität nicht nur Zink- sondern viele weitere Metall-Ionen, z.B. Nickel, Kupfer, Eisen, Mangan oder Kobalt bindet.

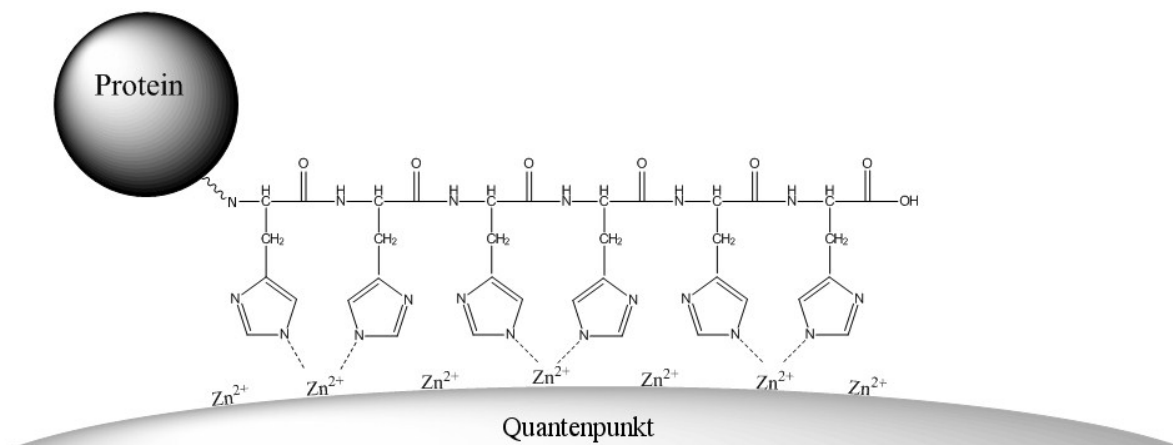


Abbildung 2.22. Prinzip der unspezifischen Zink-Histidin-Bindung am Beispiel eines Proteins mit His₆-Tag und eines CdS/ZnS-Quantenpunkts. Die Bindung erfolgt koordinativ über jeweils zwei Histidine pro Zn²⁺ der ZnS-Hülle des Quantenpunkts.

Die Elektronen des Imidazol-Rings des Histidins interagieren dabei mit den elektronenarmen Orbitalen der Übergangsmetalle und bilden eine sehr stabile Bindung aus. So beträgt die Bindungskonstante für die Zink-Histidin-Bindung $\sim 10^9$ L/mol [146]. Die ZnS-Hülle von Quantenpunkten mit ihrem hohen Gehalt an Zn²⁺-Ionen ist bestens geeignet Histidin-funktionalisierte Moleküle zu binden. In dieser Arbeit handelt es sich dabei um einen Lumi4Tb-Komplex, an den ein Peptid mit His₆-Tag gebunden wurde. Das Peptid (Pep-411) hat die Sequenz H₂N-G•SGAAAGLS•(His)₆-amid und lässt sich in drei Untereinheiten gliedern. Das N-terminale Amin am G-Rest bindet an den NHS-Lumi4Tb-Komplex, die SGAAAGLS Sequenz agiert als kurzer Abstandshalter, mit der Form einer alpha-Helix um die zentralen Alanine, und das C-terminale (His)₆ bindet schließlich an die Quantenpunktoberfläche. Dieses Pep-411 mit einer Länge von nur 1.1 nm ist sehr rigide und sorgt so für einen definierten und geringen Abstand des Lumi4Tb-Komplexes zum Quantenpunkt und dadurch äußerst effizienten FRET.

3. Experimentalteil

3.1 Puffer

Für die Experimente mit Lumi4Tb-gelabeltem Streptavidin (Lumi4Tb-Strep) und biotinylierten Quantenpunkten (Biot-QD) wurde TRIS-Puffer [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan] mit 0.5% BSA (bovines Serumalbumin) und einem pH-Wert von 7.4 hergestellt. Die Versuche mit Lumi4Tb-Pep411 und ITK-QD (Innovator's Tool Kit) wurden in Natrium-Tetraboratpuffer (pH 8.5) ohne weitere Zusätze durchgeführt.

3.2 FRET-Akzeptoren und -Donoren

3.2.1 Biotin-Streptavidin-System

Tabelle 3.1 Verwendete FRET-Donoren und -Akzeptoren mit Angabe der Abkürzungen, des Herstellers sowie der Konzentration und weiterer Eigenschaften der Stammlösungen.

FRET-Donor	Bezeichnung	Quelle	Eigenschaften
Lumi4Tb-Streptavidin-Komplex	Lumi4Tb-Strep	Lumiphore Inc. 4677 Meade Street, Suite 216 Richmond, California 94804 USA	4.4 Lumi4Tb pro Streptavidin 18µM Stammlösung
FRET-Akzeptor			
QD525-Biotin-Konjugat	Biot-QD525	Life Technologies Ltd 3 Fountain Drive Inchinnan Business Park Paisley PA4 9RF, UK	5 – 7 Biotin/QD 2 µM Stammlösung in Puffer (pH 8.3, 2% BSA, NaCN)
QD565-Biotin-Konjugat	Biot-QD565		
QD605-Biotin-Konjugat	Biot-QD605		
QD655-Biotin-Konjugat	Biot-QD655		
QD705-Biotin-Konjugat	Biot-QD705		

3.2.2 Zink-Histidin-System

Der von Lumiphore bezogene Lumi4Tb-Komplex wurde nach Vorschrift des Herstellers an das Peptid Pep-411 gebunden [147], lyophilisiert und anschließend bei -20°C gelagert. Für die Messungen wurde das Lyophilisat in Natriumtetraboratpuffer aufgenommen und als Stammlösung verwendet.

Tabelle 3.2 Verwendete FRET-Donoren und –Akzeptoren mit Angabe der Abkürzungen, des Herstellers sowie der Konzentration und weiterer Eigenschaften der Stammlösungen.

FRET-Donor	Bezeichnung	Quelle	Eigenschaften
Lumi4Tb-Pep411-Komplex	Lumi4Tb-Pep	Lumiphore Inc. 4677 Meade Street, Suite 216 Richmond, California 94804 USA	1 Lumi4Tb pro Peptid
FRET-Akzeptor			
QD525 mit Carboxylat-funktionalisierung	ITK-QD525	Life Technologies Ltd 3 Fountain Drive Inchinnan Business Park Paisley PA4 9RF, UK	8 μM Stammlösung in Puffer (pH 8.3, 2% BSA, NaCN)
QD565 mit Carboxylat-funktionalisierung	ITK-QD565		
QD605 mit Carboxylat-funktionalisierung	ITK-QD605		
QD655 mit Carboxylat-funktionalisierung	ITK-QD655		
QD705 mit Carboxylat-funktionalisierung	ITK-QD705		

3.3 Experimentelle Methoden

3.3.1 Absorptions- und Lumineszenzspektroskopie

Die Absorptionsmessungen wurden in 10-mm-Quartzküvetten an einem UV-VIS-Spektrometer (Lambda35, PerkinElmer, USA) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten gegen Luft als Standard. Für die Korrektur von Absorption und Streuung der Puffer wurden diese ebenfalls gegen Luft vermessen und bei der Auswertung abgezogen.

Die Lumineszenzspektren (Emission und Anregung) sowie die Lebenszeiten der Donor-Komplexe und Quantenpunkte wurden in 3 mm-Quartzküvetten mit einem Fluoreszenz-Spektrometer (FLS920, Edinburgh Instruments, UK) aufgenommen. Die Lebenszeitmessungen der Donor-Komplexe erfolgten mit einer Anregung durch eine Xe-Blitzlichtlampe (50 Hz Wiederholungsrate bei 340 nm), die der Nano-Kristalle mit einem Dioden-Laser (405.6 nm Wellenlänge, 2 MHz Wiederholfrequenz, 5 mW maximale Leistung). Die Aufnahme der Lumineszenzspektren erfolgte im 90°-Aufbau, mit systeminterner Quantenkorrekturfunktion. Im Emissions-Strahlengang wurde ein UV-Filter (Longpass 340 nm) zur Unterdrückung gestreuten Anregungslichts platziert.

3.3.2 Zeitaufgelöste Fluoroimmunoassays

FRET-Assays des Biotin-Streptavidin-Systems wurden mit einem Immunoassay-Platereader (IOM Nanoscan LF500, Berthold Detection Systems, Germany) mit zwei Detektionskanälen (Photoelektronenvervielfacher, PMT) und wechselbaren Bandpass-Filtern (Semrock, USA) durchgeführt. Alle Proben wurden mit einem Stickstoff-Laser bei 337.1 nm zentraler Wellenlänge (LTB Lasertechnik Berlin, Germany) mit 128 Pulsen bei 30 Hz Wiederholrate und einer Pulsenergie von ca. 30 μ J (in der Probe) angeregt. Nach einstündiger Inkubation und dreißigsekündigem Schütteln der Wellplatte mit der im Reader integrierten Schüttelfunktion wurde die Donor- und Akzeptoremission simultan in den beiden Detektionskanälen gemessen, wobei zur spektralen Trennung des Donorsignals vom Akzeptorsignal ein Bandpass-Filterset von Semrock in Verbindung mit Neutraldichtefiltern desselben Herstellers (siehe Anhang A3) verwendet wurde. Die Lumineszenzabklingkurven wurden von 0 - 10 ms nach dem Anregungspuls in 1000 Bins zu je 10 μ s Breite aufgenommen. Der Strahlengang innerhalb des Readers ist Abbildung 3.1 zu entnehmen. Die Proben wurden in einer Mikrotiterplatte mit 384 Wells und einem Probenvolumen von 20 μ l vermessen.

Die Messungen der Lumineszenz der FRET-Assays des Zink-Histidin-Systems wurden aufgrund der erwarteten und im Vergleich wesentlich kürzeren FRET-Lebenszeiten mit dem Fluoreszenz-Spektrometer (FLS920, Edinburgh Instruments, UK) in einem 90°-Aufbau durchgeführt, da dieses die erforderliche zeitliche Auflösung ermöglicht. Als Anregungslichtquelle kam ein Stickstoff-Laser mit 337.1 nm zentraler Wellenlänge (LSI Laser Science Inc., USA) und einer Wiederholrate von 20 Hz zur Anwendung. Die Proben wurden mit einer Pulsenergie von ca. 60 μ J (in der Probe) angeregt. Die Detektion von Akzeptor- und Donorlumineszenz erfolgte nacheinander. Im Emissions-Strahlengang kam ein UV-Filter (Longpass 340 nm) zur Unterdrückung gestreuten Anregungslichts zur Anwendung.

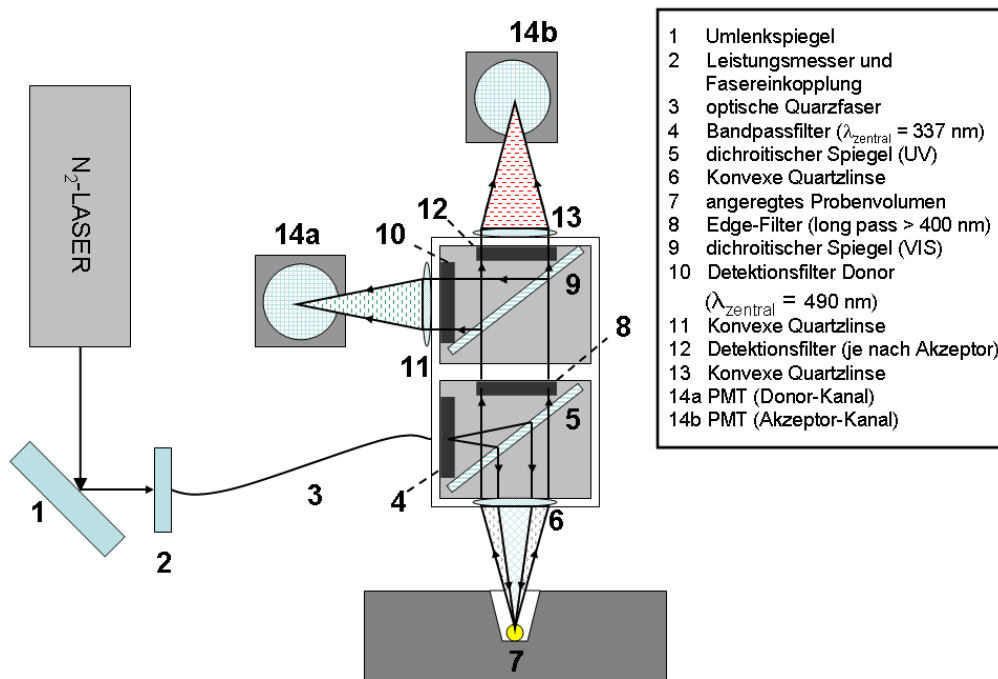


Abbildung 3.1. Schematischer Aufbau des NANOSCAN Immunoreaders.

3.4 Durchführung der FRET-Assays

In diesem Abschnitt der Arbeit soll eine Beschreibung der Durchführung der Biotin-Streptavidin- bzw. Zink-Histidin-Assays gegeben werden. Die für die einzelnen Assays verwendeten Pipettierschemata mit Volumen- und Konzentrationsangaben sind dem Anhang A.2 zu entnehmen.

3.4.1 Biotin-Streptavidin-Assays

In einer schwarzen Polystyren-Multititerplatte (Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland) mit 384 Probenräumen und nichtbindender Oberfläche wurde zuerst der TRIS-Puffer vorgelegt. Dann wurden Quantenpunkte in wässriger TRIS-Pufferlösung so dazugegeben, dass die Konzentrationen in den Probenräumen 0,2, 0,4, 2, 4 bzw. 16 nM betragen. Anschließend wurde das lumineszente Lumi4Tb-Strep ebenfalls in wässriger TRIS-Pufferlösung dazupipettiert. Die Konzentration des LTC im Probenvolumen war stets 2 nM. Das Assayvolumen betrug immer 20 μl . Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde jede Probe 16x mit dem Nanoscan LF500 vermessen. Gleichzeitig wurden für jeden Assay Kontrollmessungen durchgeführt, in denen nur Quantenpunkte und nur Terbiumkomplexe vermessen wurden.

3.4.2 Zink-Histidin-Assays

In einer Quarzküvette (3x3 mm) wurde zuerst der Tetraborat-Puffer vorgelegt. Dann wurden Quantenpunkte in wässriger Tetraborat-Pufferlösung so dazugegeben, dass die Konzentrationen im Probenvolumen 1.5 nM betrug. Anschließend wurde das lumineszente Lumi4Tb-Pep ebenfalls in wässriger Tetraborat-Pufferlösung dazupipettiert. Die Konzentration des LTC im Probenvolumen war stets 667 nM. Das Assayvolumen betrug immer 150 µl. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde jede Probe 8x am Edinburgh-Spektrometer vermessen. Gleichzeitig wurden für jeden Assay Kontrollmessungen durchgeführt, in denen nur Quantenpunkte und nur Terbiumkomplexe mit einer dem Assay identischen Konzentration vermessen wurden.

3.5 Datenauswertung und -evaluation

Die experimentell ermittelten Lumineszenzabklingkurven der FRET-Donoren und –Akzeptoren wurden vor der Auswertung noch korrigiert. Dies war erforderlich, da das gemessene Signal nicht nur aus der jeweiligen Donor- bzw. Akzeptorlumineszenz bestand, sondern durch Fluoreszenz des verwendeten Puffers und der Mikrotiterplatte sowie Apparatesignale und „Durchbluten“ (Detektion des Donor-Signals im Akzeptorkanal und umgekehrt) verfälscht wurde. Um dieses Hintergrundsignal und Rauschen zu eliminieren, wurden die detektierten Signale des reinen Puffers in der Mikrotiterplatte und des „Durchblutens“ vor der eigentlichen Messung ermittelt und anschließend vom Meßsignal subtrahiert, so dass die reine Donor- bzw. Akzeptorabklingkurve erhalten wurde (siehe Anhang A.4).

Die Lumineszenzabklingkurven der Lumi4Tb-Komplexe wurden dann mittels biexponentiellen Fits aus den

Abklingkurven ermittelt ($I(t) = \sum_{i=1}^2 A(\tau_i) \exp\left[-\frac{t}{\tau_i}\right]$). Die Lebenszeitverteilungen der FRET-Donoren und

–Akzeptoren im FRET-Assay wurden über einen multiexponentiellen Ansatz der Form

$I(t) = \sum_{i=1}^N A(\tau_i) \exp\left[-\frac{t}{\tau_i}\right]$ mit $N = 50 - 200$, $A(\tau_i)$, $\tau_i > 0$ bestimmt. Diese Kurvenanpassungen wurden mit

der Software FASTTM (Edinburgh Instruments) durchgeführt. Weiterhin erfolgte eine Anpassung der Lebenszeitverteilungen an die Lumineszenzabklingkurven über Fits mit vorgegebenen Kurvenformen. Dazu wurden die erwarteten Abstandsverteilungen der FRET-Systeme bestmöglichst angefitet. Die Ergebnisse dieses Fits bildeten die Grundlage der Lebenszeitverteilungsauswertung. Diese Kurvenanpassungen wurden mit dem Analyse-Tool Solver der Software MS Excel durchgeführt.

4. Abstands- und Lebenszeitverteilungen

4.1 *Einleitung*

In seltenen Fällen besitzen alle FRET-Paare einer zu untersuchenden Probe einen oder zwei identische diskrete Donor-Akzeptor-Abstände. Dies kann z.B. bei der Untersuchung von Konformationsänderungen kleiner Moleküle möglich sein. Eine Abstandsauswertung ist dann mit einem mono-, bi- oder triexponentiellen Fit der FRET-Lebenszeiten von Donor und/oder Akzeptor mit großer Genauigkeit möglich. Gerade bei FRET-Untersuchungen in biologischen Systemen existiert jedoch eine Vielzahl möglicher Abstände der FRET-Paare bedingt durch z.B. Größenverteilungen der beteiligten Moleküle, Rotation und Vibration der intramolekularen Bindungen, Fehlstellen im Aufbau der Oberfläche oder unterschiedlichen Bindungsstellen der Fluoreszenzmarker. Die Abstandsbestimmung lässt sich mit diskret exponentiellen Fits der FRET-Lebenszeiten dann nur mit großer Ungenauigkeit durchführen. Die Ergebnisse stellen in diesen Fällen lediglich eine Mittelung über alle Abstände und grobe Näherung der realen Abstandsverteilung dar. Daher ist es vorteilhaft, die Bandbreite der möglichen FRET-Abstände und –Lebenszeiten mit Verteilungsfunktionen zu beschreiben. Abhängig vom FRET-System kommen verschiedenste Funktionen in Betracht [7,148-150], die diskreter oder stetiger Art sein können. Obwohl in jeder zu untersuchenden Probe eine endliche Anzahl an FRET-Paaren vorhanden ist, was eine Beschreibung mittels diskreter Verteilungen möglich machen würde, ist die Zahl der Paare üblicherweise so groß, dass die Abstands- und Lebenszeitverteilungen nicht nur mit diskreten, sondern oft einfacher mit stetigen Verteilungsfunktionen beschrieben werden können. Im Folgenden sollen einige Verteilungsfunktionen, die zur Beschreibung von FRET-Experimenten verwendet werden können, vorgestellt werden. Eingegangen wird auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verteilungsfunktionen Normalverteilung und asymmetrische Doppelsigmoidalverteilung sowie die Singular Value Decomposition (SVD). Letztere ist allerdings keine Verteilungsfunktion im eigentlichen Sinne, sondern eine mathematische Möglichkeit aus Fluoreszenzspektren die wahrscheinlichste zugrunde liegende FRET-Abstandsverteilung zu ermitteln. Andere weniger häufig genutzte Verteilungen zur Analyse von FRET-Abständen werden vorgestellt.

4.2 Verteilungsfunktionen

4.2.1 Gauß-Wahrscheinlichkeitsverteilung (Normalverteilung)

Die wichtigste Wahrscheinlichkeitsverteilungsfunktion bei der Analyse von FRET-Abstandsverteilungen ist die Normalverteilung, auch Gauß-Verteilung genannt [7]. Es handelt sich hierbei um eine symmetrische Funktion, bei der die Zufallsvariablen um einen Mittelwert herum verteilt sind (siehe Abbildung 4.1). Dabei haben die Variablenwerte eine umso höhere Wahrscheinlichkeit je näher sie am Mittelwert liegen. Die besondere Bedeutung der Normalverteilung folgt aus dem zentralen Grenzwertsatz, der aussagt, dass die Summe einer großen Zahl von unabhängigen Variablen stets eine stabile Verteilung befolgt. Bei endlicher Varianz der Zufallsvariablen ist diese eine Normalverteilung. Da die meisten biologischen Prozesse und natur-, wirtschafts- und ingenieurwissenschaftlichen Vorgänge die Eigenschaft endlicher Varianz einer hohen Zahl unabhängiger Variablen aufweisen, erklärt sich so die herausragende Bedeutung der Normalverteilung.

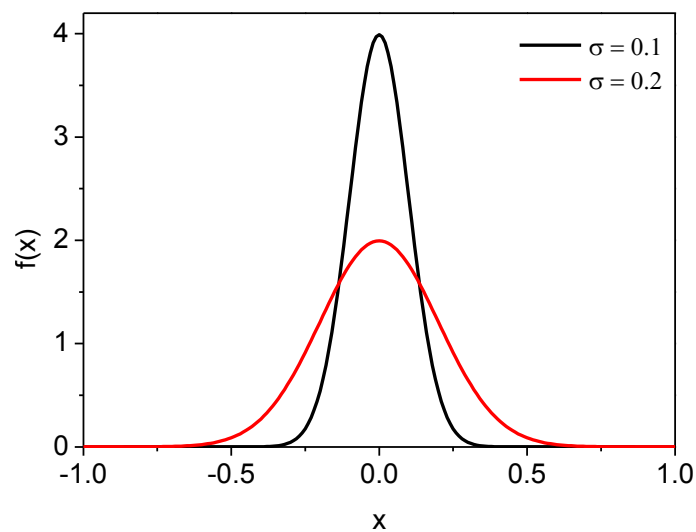


Abbildung 4.1. Darstellung der Dichtefunktion von Normalverteilungen unterschiedlicher Varianz um einen Erwartungswert $\mu = 0$.

Die Normalverteilung einer stetigen Zufallsvariablen x ist gegeben durch die Dichtefunktion

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}}$$

Gleichung (4.1)

mit μ als dem Erwartungswert (Mittelwert der Verteilungsfunktion) und σ^2 als Varianz der Verteilung. Diese Dichtefunktion ist die erste Ableitung der Verteilungsfunktion

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad \text{Gleichung (4.2)}$$

Da die Normalverteilung alle möglichen Zustände einer Variablen beschreibt, ist die Fläche unter der Kurve als Summe aller Wahrscheinlichkeiten eins. Die Normalverteilung ist daher normiert. Dies bedeutet, dass bei gleichem Mittelwert zweier Normalverteilungen diejenige mit einer größeren Varianz breiter, dafür aber flacher verläuft als diejenige mit kleiner Varianz (siehe Abbildung 4.1). Normalverteilungen werden durch Angabe von Erwartungswert und Varianz vollständig beschrieben. Die Standardabweichung σ einer Normalverteilung ist die Quadratwurzel der Varianz und beschreibt die Breite der Verteilung. Für σ gilt näherungsweise, dass im Intervall der Abweichung $\pm\sigma$ 68.27 % der Werte, im Intervall der Abweichung $\pm 2\sigma$ 95.45 % und im Intervall der Abweichung $\pm 3\sigma$ 99.73 % der möglichen Werte der Zufallsvariablen zu finden sind.

4.2.2 Logarithmische Normalverteilung

Die Zufallsvariablen in Normalverteilungen, gleich welcher Erwartungswerte und Varianzen, können theoretisch auch negative Werte annehmen. Viele Zufallsgrößen, wie z.B. der Abstand in einem FRET-System, können jedoch nur positive Werte annehmen, per Definition also nicht als exakt normalverteilt gelten. Eine Normalverteilung lässt sich mit guter Näherung in solchen Fällen dann anwenden, wenn der Mittelwert mindestens dreimal größer ist als die Standardabweichung, denn dann ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines negativen Ereignisses vernachlässigbar. Andernfalls oder wenn, wie bei vielen biologischen Prozessen, die Verteilungsdichte nicht mehr symmetrisch sondern ausgeprägt schief ist, kann man beobachten, dass die transformierte Zustandsgröße $y = \log x$ (mit x als Zufallsvariable) normalverteilt ist. Dies bedeutet, dass nicht die beobachteten Zufallsvariablen sondern deren logarithmierte Transformation einer Normalverteilung entsprechen. Die zufällig verteilte Variable heißt dann logarithmisch normalverteilt.

Die Dichtefunktion der logarithmischen Normalverteilung ist für $x \geq 0$ mit der Varianz σ^2 gegeben durch

$$f(x) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}} \quad \text{Gleichung (4.3)}$$

Die logarithmische Normalverteilung ist eine nichtsymmetrische Verteilungsfunktion und, wie erwähnt, bei biologischen Prozessen von Bedeutung.

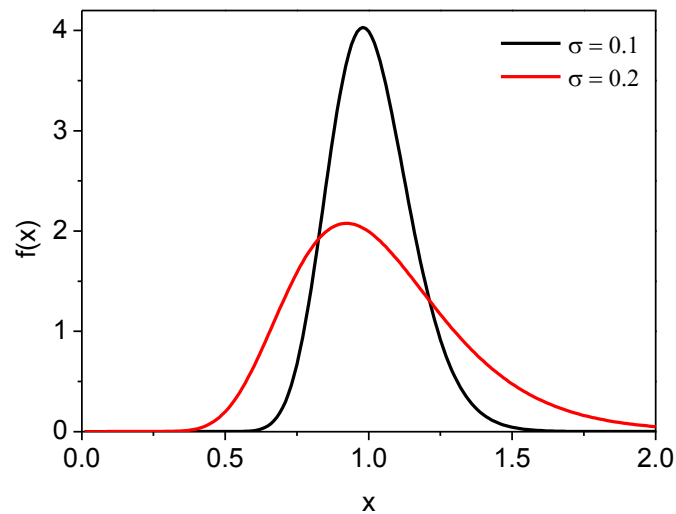


Abbildung 4.2. Darstellung der Dichtefunktion von logarithmischen Normalverteilungen unterschiedlicher Varianz um einen Erwartungswert $\mu = 0$.

4.2.3 Singular Value Decomposition (Singulärwertzerlegung)

Sind die Abstände der FRET-Partner unbekannt oder lassen sich die Verteilungen nur ungenau mit gängigen Verteilungsfunktionen beschreiben, kann es sinnvoll sein, zu anderen mathematischen Beschreibungen zu greifen. Ein weit verbreiteter Ansatz ist dabei, die tatsächliche Verteilung durch eine Vielzahl diskreter Exponentialfunktionen anzunähern. Beispiele hierfür sind die Maximum-Entropie-Methode, die Exponential-Serien-Methode oder eben die Singulärwertzerlegung [151-153]. Die Schwierigkeit bei all diesen Methoden ist, dass ein Rückschluss aus den Fluoreszenzabklingkurven auf die Form der Lebenszeitverteilung ein nichttriviales Problem in der numerischen Analyse darstellt, welches eng mit der Laplace'schen Rücktransformation verknüpft ist. Diese ist immer schlecht konditioniert, d.h. selbst kleine Variationen der Variablen führen zu extrem großen Streuungen, ändern die Form der Lebenszeitverteilung also stark [151]. Daher ist es von großer Wichtigkeit, eine robuste mathematische Methode zu verwenden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die richtige Lebenszeitverteilung an die Daten anpasst. Allen Methoden gemein ist, dass es sich um Minimierungs- bzw. Maximierungsmethoden handelt, d.h. ein bestimmter Wert wird versucht so gering bzw. so groß wie möglich zu halten. Die letztendliche Lösung des Problems ist dann nicht die mit dem besten Fit, sondern die, deren Fit gut genug und die stabil genug ist, also einen optimalen Kompromiss zwischen Güte und Stabilität (Anfälligkeit gegenüber kleinen Änderungen der experimentellen Daten) darstellt.

Bei der Singulärwertzerlegung wird versucht, die euklidische Norm $A*x=b$ eines nicht eindeutig lösbaeren Gleichungssystems $A*x=b$ so gering wie möglich zu halten. Viele mathematische Probleme, wie die Anpassung einer Serie exponentieller Funktionen an Fluoreszenzabklingkurven, können auf solche Gleichungssysteme zurückgeführt werden. Die Singulärwertzerlegung liefert über die Bestimmung der

verallgemeinerten Pseudoinversen mögliche Lösungen. Die im Rahmen dieser Arbeit benutzte Software FAST arbeitet mit einer nichtnegativen Singulärwertzerlegung, die automatisch die Lebenszeitverteilungen minimaler Energie als euklidischer Norm liefert (siehe Abbildung 4.3).

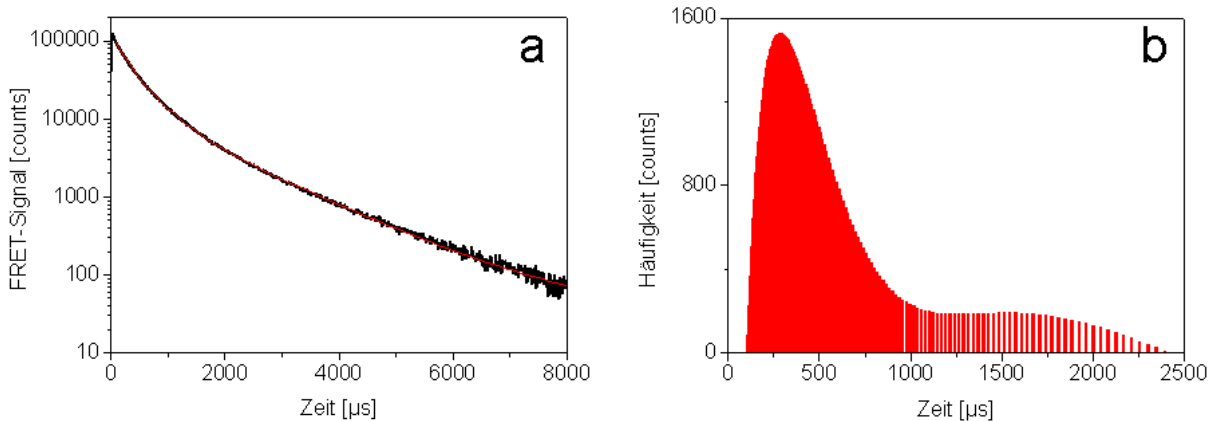


Abbildung 4.3. Beispiel einer durch Singulärwertzerlegung angepassten Lebenszeitverteilung an Fluoreszenzabklingdaten mit der Software FAST. **a)** experimentell gewonnene Fluoreszenzabklingkurve (schwarz) und Fit-Kurve (rot); **b)** Lebenszeitverteilung aus 200 Exponentialfunktionen, die die Fit-Kurve bilden. Die Lebenszeit jeder Exponentialfunktion ist gemittelt über ein bestimmtes Zeitintervall, wobei die Mittelungsintervalle mit zunehmender Lebenszeit größer werden.

4.2.4 Andere Verteilungen

Werden symmetrische Abstands- oder Lebenszeitverteilungen angenommen, wie z.B. wenn ein mittlerer Abstand existiert, um den herum die Abstände der einzelnen FRET-Partner zufällig verteilt sind, ist die Normalverteilung zur Beschreibung des Mittelwertes der Wahl. Daneben wird selten auch noch die Lorentz-Verteilung (Cauchy-Verteilung) verwendet (siehe Abbildung 4.4) [7]:

$$f(x) = \frac{1}{\pi} \frac{\sigma}{\sigma^2 + (x - \mu)^2} \quad \text{Gleichung (4.4)}$$

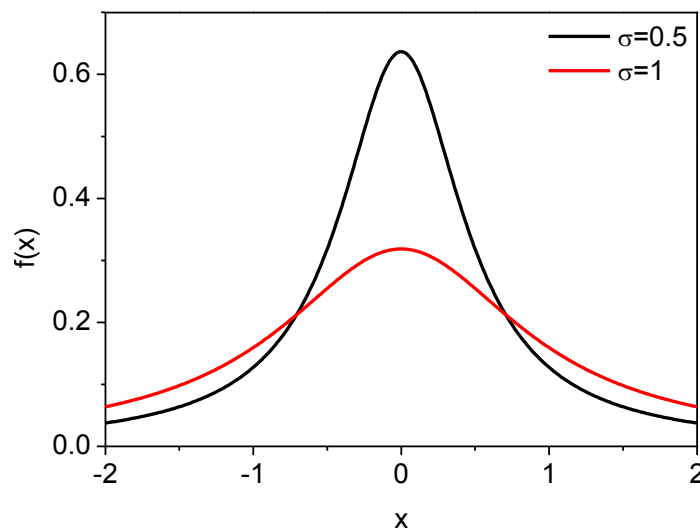


Abbildung 4.4. Darstellung der Dichtefunktion der Lorentz-Verteilung mit dem Zentrum $\mu = 0$ und verschiedenen Breiten σ .

Diese wird aber vor allem zur Beschreibung optischer Spektren herangezogen, wo sie die universelle Verteilungsfunktion ist. Die Lorentz-Verteilung ist, ebenso wie die Normalverteilung, normiert.

Zur Beschreibung asymmetrischer Verteilungen innerhalb eines FRET-Systems wurden in der Vergangenheit zahllose Formeln angewandt, von denen die meisten empirisch erarbeitet wurden [148,150,154]. Asymmetrische Verteilungen existieren z.B. dann, wenn nahe eines FRET-Donors in einem Makromolekül viele Bindungsstellen existieren und in größerer Entfernung wenige. Die asymmetrische Doppel-Sigmoidalfunktion (ADS), die zu den meist verwendeten empirischen asymmetrischen Verteilungsfunktionen gehört, ist eine davon (siehe Abbildung 4.5) [149,155,156]:

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{\frac{x - x_{MAX} + \omega_1}{\omega_2}}} \left(1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{x - x_{MAX} - \omega_1}{\omega_3}}} \right) \quad \text{Gleichung (4.5)}$$

Daneben gibt es weitere asymmetrische Standard-Verteilungen wie die Gumbel- oder die Weibull-Verteilung. Letztere ist, mit dem Spezialfall der Exponentialverteilung, die am häufigsten für Lebensdaueranalysen verwendete Verteilung (siehe Abbildung 4.6). Alle diese Verteilungen sind Spezialfälle der Extremwertverteilungen und werden nur sehr selten zur Analyse von FRET-Verteilungen angewandt. Daher sollen sie hier nur erwähnt werden.

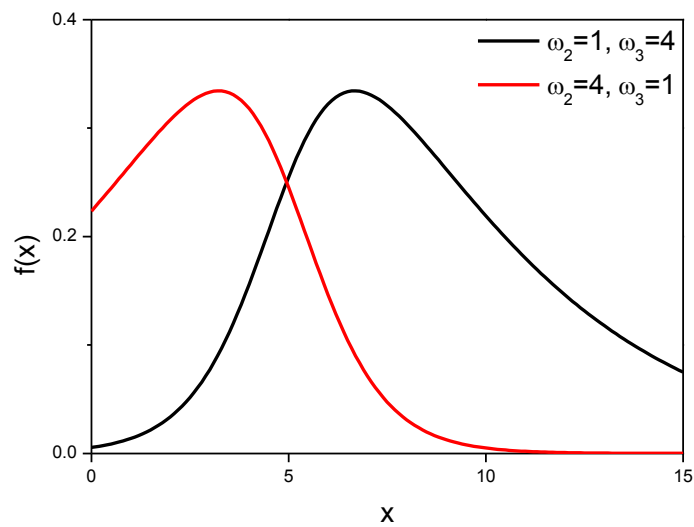


Abbildung 4.5. Darstellung der Dichtefunktion verschiedener asymmetrischer Doppelsigmoidal-Verteilungen (ADS) mit einem wahrscheinlichsten $x_{\max} = 5$ und den Formfaktoren ω_1 , ω_2 und ω_3 (ω_1 ist hier konstant 0.1). ω_2 definiert die Form der Verteilungskurve bei kleinen x , ω_3 hingegen die Form der Verteilungskurve bei großen x . Der Vorteil der ADS liegt in ihrer hohen Flexibilität, die einen Fit sowohl links- als auch rechtsschiefer Verteilungen unterschiedlichster Verteilungsbreiten ermöglicht.

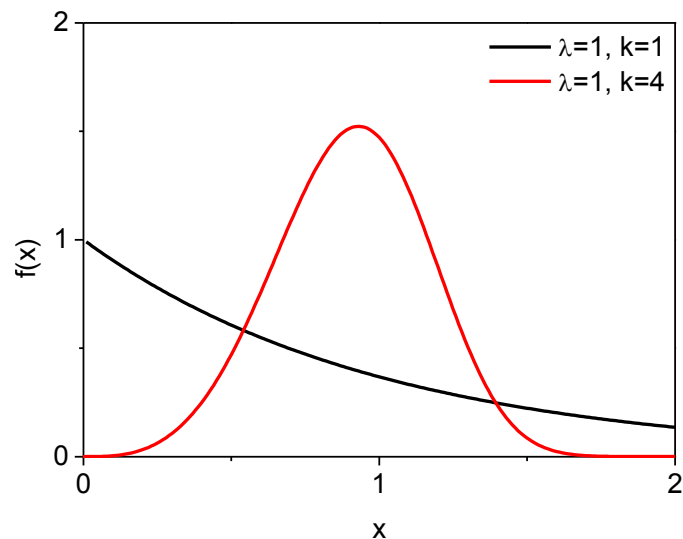


Abbildung 4.6. Darstellung der Dichtefunktion der Weibull-Verteilung mit dem Skalierungsfaktor $\lambda = 1$ und verschiedenen Formfaktoren k , der Spezialfall $\lambda = 1$ und $k = 1$ stellt die Exponentialverteilung dar.

5. Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel befasst sich mit der Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften der verwendeten FRET-Donoren und Akzeptoren. Daran anschließend folgt die Berechnung und Darstellung der FRET-Parameter für die einzelnen FRET-Paare. Anschließend werden anhand der bekannten photophysikalischen Parameter und Formen der Terbiumkomplexe und Quantenpunkte sowie der Eigenschaften der verwendeten Bindungssysteme die zu erwartenden Lebenszeit- und Abstandsverteilungen ermittelt. Abschließend werden die experimentell gewonnenen Daten dargestellt und unter Zuhilfenahme der in den vorherigen Kapiteln dargestellten FRET-Theorie und erwarteten Eigenschaften und Verteilungen der jeweiligen FRET-Paare diskutiert.

5.1 Charakterisierung der FRET-Donoren

Als FRET-Donor wurde im Rahmen dieser Arbeit der kommerziell erhältliche lumineszente Terbiumkomplex Lumi4Tb von Lumiphore Inc. (siehe Kapitel 2.3.3) verwendet. Für die Biotin-Streptavidin-Assays konnte dabei auf den bereits an Streptavidin gelabelten Lumi4Tb-Komplex zurückgegriffen werden. Die Zink-Histidin-Assays hingegen wurden mit Lumi4Tb durchgeführt, welches von der Gruppe um Igor Medintz (Naval Research Lab, Washington, USA) an das Peptid Pep-411 gelabelt wurde.

5.1.1 Absorptionsspektren

Wie in Kapitel 2.3.3 bereits erläutert macht man sich bei der Nutzung von Terbium-Komplexen für FRET-Assays den „Antennen-Effekt“ zunutze, d.h. man regt den als „Antenne“ wirkenden Ligand an, der die Anregungsenergie dann auf das komplexierte Terbium-Ion überträgt. Dieses wird dadurch angeregt und relaxiert anschließend unter Aussendung eines Photons wieder. Dies hat zur Folge, dass die Absorption durch das Komplexgerüst bestimmt wird, die Emission hingegen durch das zentrale Terbium-Ion.

Die in Abbildung 5.1 gezeigten Absorptionsspektren der verwendeten Komplexe Lumi4Tb-Strep und Lumi4Tb-Pep sind mit ihren Maxima bei 340 nm Wellenlänge und einem Extinktionskoeffizienten von etwa $26000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ daher charakteristisch für den Komplex-Liganden. Sie unterscheiden sich aus diesem Grunde nicht, was Lage und Form der Absorptionsbande des Komplex-Liganden betrifft. Die Differenzen in den Absorptionsspektren für Wellenlängen unter 300 nm werden durch die unterschiedlichen biologischen Moleküle verursacht, an die die Terbium-Komplexe gelabelt sind. Die Absorptionsbande bei 280 nm ist charakteristisch für Streptavidin und andere biologische Moleküle, die die Aminosäuren Tryptophan bzw. Tyrosin enthalten [163]. Da diese beim Peptid-411 fehlen, absorbiert es in diesem Wellenlängenbereich nicht.

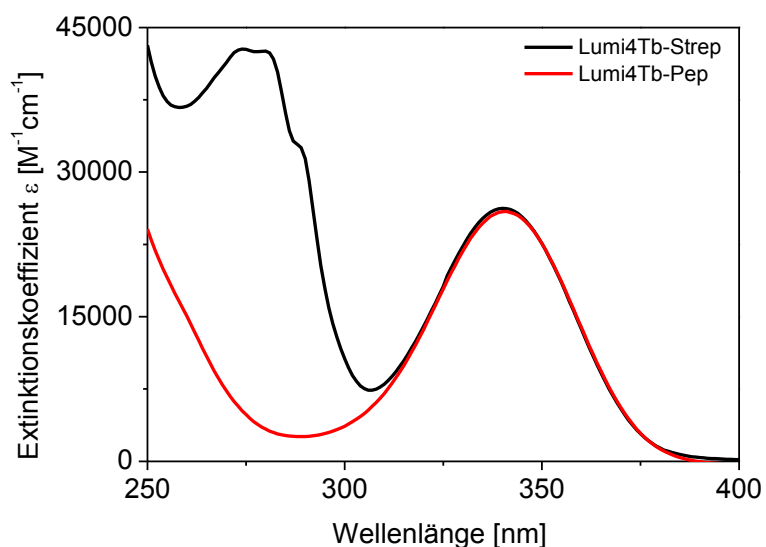


Abbildung 5.1. Absorptionsspektren von Lumi4Tb-Strep (schwarz) und Lumi4Tb-Pep (rot) in TRIS-Puffer (pH 7.4).

5.1.2 Emissionsspektren

Da die Emission der Lumi4Tb-Komplexe charakteristisch für das bei beiden identische Zentral-Ion Tb^{3+} ist, unterscheiden sich die Emissionsspektren der verwendeten Komplexe kaum voneinander (siehe Abbildung 5.2). Es sind die für das dreiwertige Terbium-Ion charakteristischen Übergänge $^5D_4 \rightarrow ^7F_J$ mit insgesamt sieben Banden zu erkennen (siehe Tabelle 2.3).

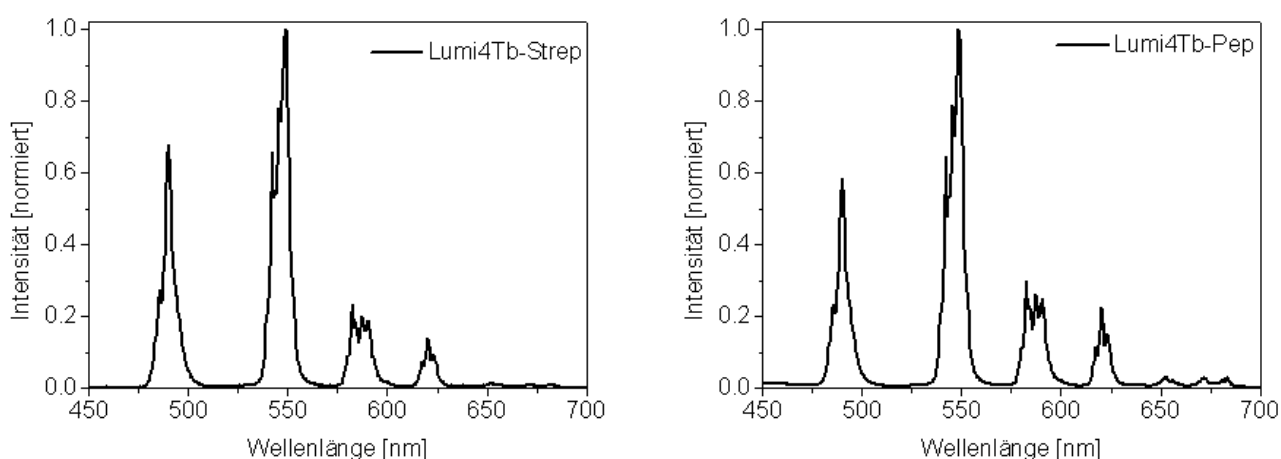


Abbildung 5.2. Emissionsspektren von Lumi4Tb-Strep (**links**) und Lumi4Tb-Pep (**rechts**) in TRIS-Puffer (pH 7.4)

Die ersten vier Banden bei etwa 490 nm, 545 nm, 585 nm und 620 nm sind deutlich ausgeprägt, drei weitere zwischen 640 und 700 nm weisen nur geringe Intensitäten auf. Die Lage der Emissionsmaxima ist bei beiden Terbiumkomplexen identisch, die Feinstruktur der einzelnen Emissionsbanden unterscheidet sich hingegen leicht. Die Ursache dafür liegt vor allem in der Bindung an verschiedene organische Moleküle begründet, die einen geringen Einfluss auf die Komplexgeometrie besitzt. Dadurch kommt es zu einer minimalen Änderung der Lage der Energieniveaus und so zur Veränderung der Feinstruktur. Die spektrale Lage der Emissionsmaxima bleibt dabei gleich [96,164].

5.1.3 Lumineszenzabklingkurven

Aufgrund der aus „verbotenen“ f-f-Übergängen herrührenden Emission (vgl. Kapitel 2.3.2) besitzt das komplexierte Tb^{3+} eine außergewöhnlich lange Lumineszenzlebenszeit im Mikro- bis Millisekundenbereich.

Die Lumineszenzlebenszeit ist, wie die Feinstruktur der Emission, abhängig vom verwendeten Lösungsmittel und einer Konjugation an Biomoleküle. Die daraus resultierenden Unterschiede in den Lumineszenzlebenszeiten sind für die beiden hier verwendeten Terbiumkomplexe gering. Die gemessenen Abklingkurven zeigen ein Verhalten, welches sich mit einem biexponentiellen Fit der Form

$$I(t) = \sum_{i=1}^2 A(i) \exp\left[-\frac{t}{\tau_i}\right] \quad \text{Gleichung (5.1)}$$

mit einem großen Anteil langer und einem kleineren Anteil kurzer Lebenszeit in sehr guter Übereinstimmung beschreiben lässt (siehe Abbildung 5.3 und Tabelle 5.1).

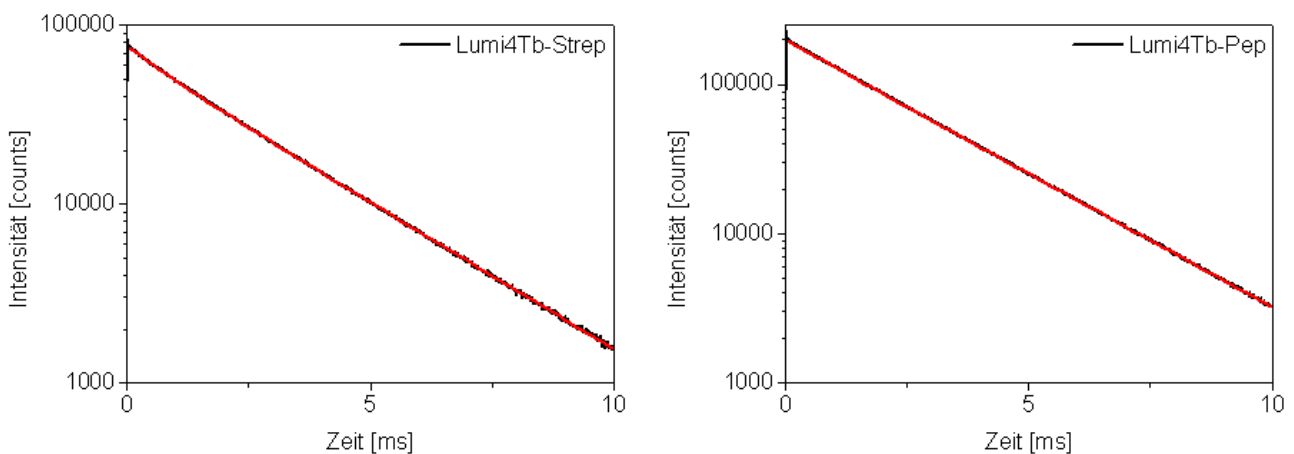


Abbildung 5.3. Lumineszenzabklingkurven von Lumi4Tb-Strep (**links**) und Lumi4Tb-Pep (**rechts**) in TRIS-Puffer (pH 7.4). Rot dargestellt sind die jeweiligen biexponentiellen Fits, deren Ergebnisse in Tabelle 5.1 zusammengefasst sind.

Zur Berechnung des Förster-Radius R_0 (siehe Kapitel 2.1.2, Gleichung 2.17) muss neben dem normierten Emissionsspektrum des Donors auch seine Lumineszenzquantenausbeute Q_D bekannt sein. Der Donor ist

hier nicht der Komplex sondern das Terbium-Ion allein, da es sich um die emittierende Spezies handelt. Daher ist $Q_D = Q_{Tb}$. Die Quantenausbeute Q_{Tb} des Tb^{3+} berechnet sich aus

$$Q_{Tb} = Q_{REF} \frac{\langle \tau \rangle_{INT}}{\tau_{REF}} \approx \frac{\langle \tau \rangle_{INT}}{\tau_0} \quad \text{Gleichung (5.2)}$$

mit Q_{REF} als der Lumineszenzquantenausbeute einer Referenzprobe, $\langle \tau \rangle_{INT}$ der intensitätsgewichteten Lebenszeit des Terbium-Ions, τ_{REF} der Lebenszeit der Referenzprobe und τ_0 der intrinsischen Fluoreszenzlebenszeit des komplexierten Terbium-Ions. Als Referenzprobe dient hier die Lumineszenz des Terbiumkomplexes bei tiefen Temperaturen im Lösungsmittel D_2O . Grundlage dieser Berechnung ist die Annahme, dass bei tiefen Temperaturen in D_2O die Deaktivierung des angeregten Terbium-Ions allein durch strahlende Prozesse erfolgt, die Quantenausbeute also nahe 1 ist. Die gemessene Referenzlebenszeit τ_{REF} entspricht dann der intrinsischen Lebenszeit τ_0 des komplexierten Terbium-Ions. Für den Lumi4Tb-Komplex wurde eine intrinsische Lebenszeit von $\tau_0 = 3450 \mu s$ gemessen [165]. Da das Tb^{3+} im Lumi4Tb-Komplex kein mono- sondern biexponentielles Abklingverhalten zeigt, müssen die experimentell ermittelten Lebenszeiten gewichtet werden. Dies kann amplituden- bzw. intensitätsgewichtet geschehen. Im Fall der Berechnung der Quantenausbeute ist eine Gewichtung nach der Intensität notwendig, da die Quantenausbeute nicht vom relativen Anteil der emittierenden Moleküle sondern von der Anzahl der emittierten Photonen abhängt, die proportional zur Intensität ist. Die gemessenen Lebenszeiten und die sich daraus ergebenden intensitätsgewichteten Lebenszeiten sowie die Donor-Quantenausbeuten sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt.

Tabelle 5.1 Lumineszenzlebenszeiten τ_i und deren Amplituden A_i sowie die für die Berechnung des Förster-Radius bestimmte Lumineszenzquantenausbeute Q_D der verwendeten LTC in TRIS-Puffer (pH 7.4).

	τ_i	A_i	$\langle \tau \rangle_{INT}$	Q_D
Lumi4Tb-Strep	830 ± 17	0.12 ± 0.002	2575 ± 10	0.77 ± 0.1
	2649 ± 3	0.88 ± 0.002		
Lumi4Tb-Pep	534 ± 39	0.02 ± 0.0008	2423 ± 9	0.7 ± 0.1
	2432 ± 1	0.98 ± 0.0007		

5.2 Charakterisierung der FRET-Akzeptoren

Als FRET-Akzeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit die kommerziell erhältlichen Quantenpunkte von Invitrogen (Life Technologies) (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4) verwendet. Sowohl für die Biotin-Streptavidin- als auch für die Zink-Histidin-Assays konnte dabei auf bereits gelabelte Nanokristalle QD525, QD565, QD605, QD655 und QD705 zurückgegriffen werden.

5.2.1 Absorptionsspektren

Der Vorteil bei der Verwendung von Quantenpunkten als FRET-Akzeptoren liegt in ihrer starken Absorption über einen breiten Wellenlängenbereich (dargestellt in Abbildung 5.4). Dadurch wird ein guter Überlapp mit FRET-Donoren möglich, was zu extrem großen Förster-Radien führen kann.

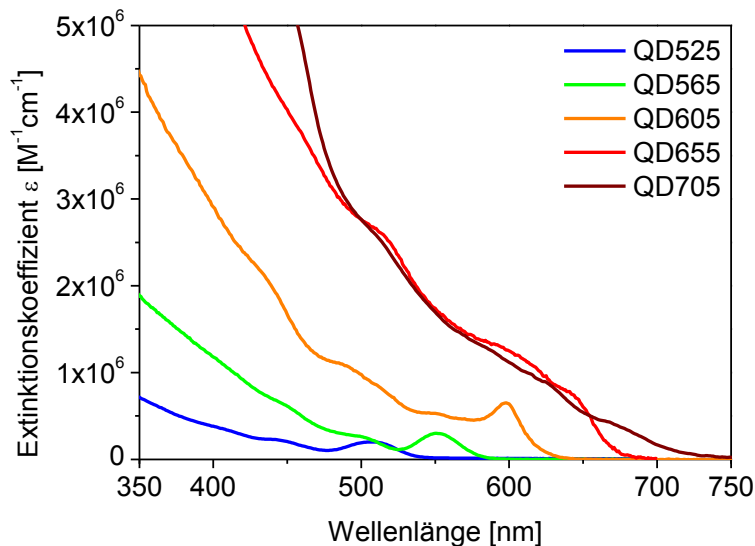


Abbildung 5.4. Absorptionsspektren der Quantenpunkte in TRIS-Puffer (pH 7.4).

Die Absorptionsspektren der Invitrogen-Quantenpunkte sind typisch für Halbleiter-Nanokristalle und zeigen, in Abhängigkeit von ihrer Größe, einen Beginn der Absorption bei verschiedenen Wellenlängen im Bereich des sichtbaren Lichts und einen kontinuierlichen Anstieg der Absorption bis weit in den UV-Bereich hinein. Es werden sehr große Extinktionskoeffizienten erreicht, die um den Faktor 10 bis 1000 höher sind als bei Fluoreszenzfarbstoffen. Deutlich zu erkennen sind bei allen Quantenpunkten die Excitonenpeaks im sichtbaren Wellenlängenbereich, der in der Nähe der jeweiligen Emissionswellenlänge liegt. Die Absorption der biotinylierten und carboxylierten Quantenpunkte unterscheidet sich im angegebenen Wellenlängenbereich nicht, da die organischen Labelling-Moleküle erst bei Wellenlängen von $\lambda < 300$ nm zur Absorption beitragen.

5.2.2 Emissionsspektren

Ebenso wie die Absorptions- so zeigen auch die Emissionsspektren der verwendeten Quantenpunkte eine für Halbleiter-Nanokristalle typische Form. Charakteristisch ist eine schmale und symmetrische Emissionsbande deren Lage abhängig von der Quantenpunktgröße ist (siehe Abbildung 5.5). Die typischen Halbwertbreiten (full width at half maxima; *FWHM*) liegen im Bereich von 20 – 30 nm, beim Quantenpunkt mit der Emissionswellenlänge 705 nm beträgt sie etwa 60 nm. Da die Quantenpunktemission vom Halbleiterkern abhängt, sind die Emissionsspektren der biotinylierten bzw. der carboxylierten Nanokristalle identisch.

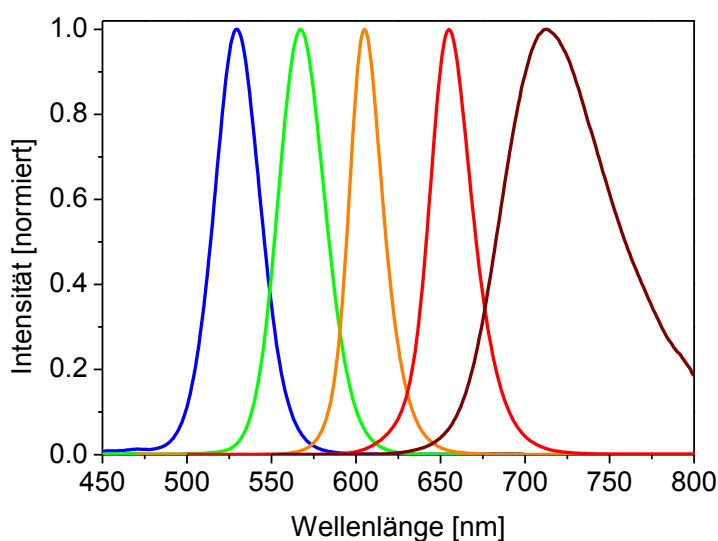


Abbildung 5.5. Emissionsspektren der Quantenpunkte in TRIS-Puffer (pH 7.4); von links nach rechts: QD525, QD565, QD605, QD655 und QD705.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Quantenpunkte wurden ausgewählt, da ihre Emission zwischen den Banden des Emissionsspektrums des Terbium-Komplexes liegt. Dadurch ist es möglich, Donor- und Akzeptorsignal unabhängig voneinander zu detektieren.

5.2.3 Lumineszenzabklingkurven

Abbildung 5.6 zeigt die Lumineszenzabklingkurven der verwendeten Quantenpunkte. Deutlich erkennbar ist ein bei allen Nanokristallen multiexponentielles Abklingverhalten. Dieses wird verursacht durch das Auftreten verschiedener Emissionsübergänge innerhalb des Quantenpunkts sowie eine Größen- und Formverteilung innerhalb einer Quantenpunktprobe, da eine Synthese der Halbleiter-Nanokristalle mit identischer Gestalt nicht möglich ist. Hinzu kommen durch kleine Oberflächenmodifikationen und unterschiedliche Wechselwirkungen mit der Umgebung zwischen den Quantenpunkten entstehende Unterschiede im optischen Verhalten. Die Lumineszenzlebenszeiten betragen einige 10 – 100 ns und sind

verglichen mit den Abklingzeiten der Terbium-Komplexe sehr kurz, verglichen mit denen organischer Fluoreszenzsonden jedoch relativ lang.

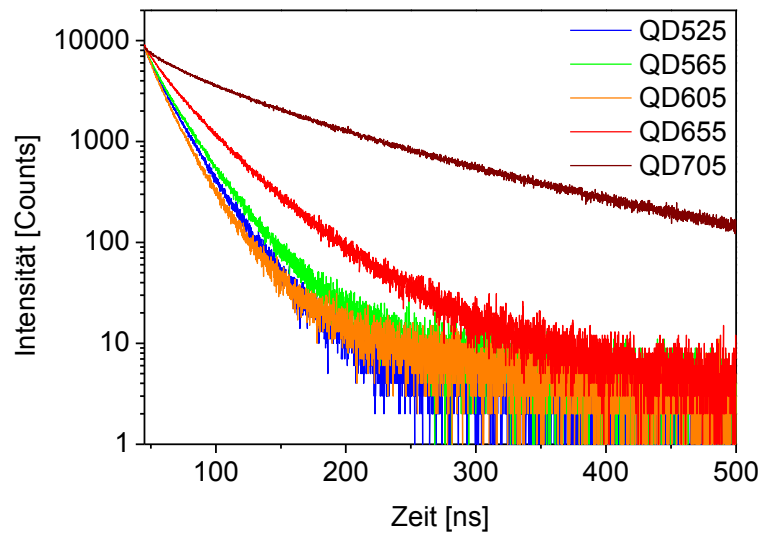


Abbildung 5.6. Lumineszenzabklingkurven der verwendeten Quantenpunkte in TRIS-Puffer am Beispiel der Biot-QD.

Eine Erklärung für das relativ langsame Abklingen der Quantenpunktlumineszenz liefert die Theorie der „dark states“. Diese geht davon aus, dass das niedrigste angeregte Energieniveau ein so genannter „dark state“ ist, von dem aus der Übergang in den Grundzustand verboten ist. Der „dark state“ ist jedoch thermisch an ein höher liegendes Energieniveau gekoppelt, von dem aus der Übergang erlaubt ist. Der thermisch aktivierte Übergang vom „dark state“ in dieses höher liegende Energieniveau ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Lumineszenz der Quantenpunkte und dauert etwa 10 – 100 ns, was der Abklingzeit entspricht.

Tabelle 5.2 faßt die spektralen Eigenschaften der Quantenpunkte, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, zusammen.

Tabelle 5.2 Absorptions- und Emissionscharakteristika der verwendeten Quantenpunkte. Die Maxima von Absorption (des Excitonenpeaks) und Emission wurden aus gemessenen Spektren ermittelt, die Werte für Extinktionskoeffizienten ϵ und Quantenausbeuten Q sind Angaben des Herstellers Invitrogen (Life Technologies).

	Absorptions- maximum [nm]	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$] $\lambda_{ex} = 405$ nm	Emissions- maximum Excitonenpeak [nm]	Q
QD525	507	$3.6 \cdot 10^5$	530	0.52
QD565	550	$1.1 \cdot 10^6$	567	0.75
QD605	598	$2.8 \cdot 10^6$	605	0.7
QD655	642	$5.7 \cdot 10^6$	655	0.64
QD705	675	$8.3 \cdot 10^6$	712	0.5

5.3 FRET-Parameter der QD-Lumi4Tb-Paare

In Tabelle 5.3 sind die ermittelten Werte für das Überlappungsintegral und den Förster-Radius der verwendeten FRET-Paare dargestellt. Der Überlapp wurde dabei unter Verwendung von Gleichung 2.18, der Förster-Radius mit Hilfe der Gleichung 2.17 bestimmt. Dabei wird, wie in Abschnitt 2.1.2 dargestellt, das flächennormierte Emissionsspektrum des Terbium-Komplexes als Donor, das Extinktionskoeffizientenspektrum des Akzeptors und ein konstanter Brechungsindex $n = 1.4$ berücksichtigt. Um einen Eindruck von der Größe des Förster-Radius zu bekommen wird der Orientierungsfaktor κ^2 ebenfalls als konstant $2/3$ angenommen, obgleich die theoretischen Betrachtungen auch variierende Werte erwarten lassen (siehe Kapitel 2.2.2). Die Lumineszenzquantenausbeuten Q_D des Donors fließen jeweils mit den in Tabelle 5.1 (Seite 59) für die beiden Terbiumkomplexe angegebenen Werten ein.

Tabelle 5.3 Überlappungsintegrale $J(\lambda)$ und Förster-Radien R_0 der verwendeten FRET-Paare.

FRET-Donor	FRET-Akzeptor	Überlappungsintegral $J(\lambda)$		Förster-Radius R_0	
		[nm ⁴ M ⁻¹ cm ⁻¹]		für $\kappa^2 = 2/3$ [nm]	
		ED + MD- Übergänge Tb-Emission	ED- Übergänge Tb-Emission	ED + MD- Übergänge Tb-Emission	ED- Übergänge Tb-Emission
Lumi4Tb-Strep	Biot-QD525	$3.21 \cdot 10^{15}$	$2.30 \cdot 10^{15}$	5.7	5.4
	Biot-QD565	$1.63 \cdot 10^{16}$	$4.75 \cdot 10^{15}$	7.5	6.1
	Biot-QD605	$4.91 \cdot 10^{16}$	$2.58 \cdot 10^{16}$	9.1	8.1
	Biot-QD655	$1.57 \cdot 10^{17}$	$7.40 \cdot 10^{16}$	11.0	9.7
	Biot-QD705	$1.55 \cdot 10^{17}$	$7.39 \cdot 10^{16}$	11.0	9.7
Lumi4Tb-Pep	ITK-QD525	$3.74 \cdot 10^{15}$	$2.88 \cdot 10^{15}$	5.7	5.6
	ITK-QD565	$1.70 \cdot 10^{16}$	$5.95 \cdot 10^{15}$	7.5	6.3
	ITK-QD605	$5.12 \cdot 10^{16}$	$2.92 \cdot 10^{16}$	9.1	8.2
	ITK-QD655	$1.60 \cdot 10^{17}$	$8.21 \cdot 10^{16}$	10.9	9.8
	ITK-QD705	$1.58 \cdot 10^{17}$	$8.22 \cdot 10^{16}$	10.9	9.8

5.4 Erwartete Abstandsverteilungen für Lumi4Tb-Pep-ITK-QD und resultierende Lebenszeitverteilungen

Ausgehend von den beschriebenen Eigenschaften des Zink-Histidin-Systems, den photophysikalischen Parametern der FRET-Donoren und Akzeptoren und unter Berücksichtigung der FRET-Theorie sollen in diesem Kapitel die theoretisch erwarteten Abstandsverteilungen und die daraus resultierenden Lebenszeitverteilungen für jeden verwendeten Quantenpunkt hergeleitet werden, um im daran anschließenden Kapitel die experimentellen Ergebnisse einordnen zu können.

5.4.1 Allgemeines

Wie im Kapitel 2.4.4 erläutert, bindet das Peptid, an welches der Lumi4Tb-Komplex gelabelt wurde, direkt an die Quantenpunktoberfläche. Die Anzahl der gebundenen Peptide ist äquivalent zu der Anzahl der gebundenen Lumi4Tb-Komplexe, da jedes Peptid nur einen Lumi4Tb-Komplex trägt. Andere Bindungsstellen können aufgrund der Selektivität der His₆-Tag-Bindung mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden [166,167].

Da das Peptid mit einer Länge von 1.1 nm sehr rigide ist, bildet die zu erwartende Lumi4Tb-Verteilung die Form des Quantenpunktes ab, so dass die entstehenden Bindungsverhältnisse der jeweiligen Quantenpunktausdehnung vergrößert um die Länge des Peptids entsprechen.

Die im Rahmen der Zink-Histidin-Assays verwendeten Quantenpunkte sind in Form und photophysikalischen Eigenschaften identisch mit den für die Biotin-Streptavidin verwendeten, verfügen jedoch nicht über eine zusätzliche Biotinfunktionalisierung. Die zu erwartenden Abstände sind im Vergleich kleiner, da das Peptid, an das der Lumi4Tb-Komplex gebunden wurde, direkt an den Quantenpunkt bindet, wohingegen im Biotin-Streptavidin-Assay die Bindung an der Oberfläche der Polymerhülle erfolgt.

5.4.2 Lumi4Tb-Pep und ITK-QD525

Die Emissionswellenlänge eines Quantenpunkts ist von seiner Größe abhängig (siehe Kapitel 2.2.2). Da die zentrale Emissionswellenlänge des ITK-QD525 von $\lambda = 525$ nm die kurzweiligste hier verwendete Emission ist, ist der Halbleiter-Nanokristall auch der kleinste der verwendeten Kristalle. Er ist sphärisch aufgebaut (siehe Abbildung 5.7). Die Analyse der Aufnahmen, die mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gemacht wurden, zeigt einen durchschnittlichen Radius des Quantenpunkts von 2.0 ± 0.2 nm (Angabe Invitrogen: 1.5-2 nm).

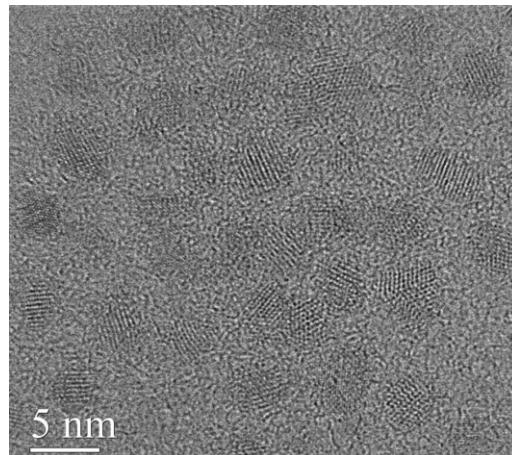


Abbildung 5.7. TEM-Aufnahme des Quantenpunkts QD525. Die innerhalb der Quantenpunkte (dunkle Kugeln) zu erkennenden kontrastreichen Strukturen repräsentieren die Ebenen des Kristallgitters der Quantenpunkte.

Davon ausgehend erhält man eine normalverteilte Abstandsverteilung der Lumi4Tb-Komplex-Donoren vom Zentrum des Quantenpunktakzeptors mit einem Maximum bei $3.1 \text{ nm} \pm 0.2 \text{ nm}$ (Abbildung 5.8).

Um zu den aus der Abstandsverteilung resultierenden FRET-Lebenszeiten zu gelangen, werden die Abstände unter Zuhilfenahme der Gleichungen 2.27 und 2.29 in eine Lebenszeitverteilung überführt. Voraussetzung dafür ist die Bestimmung des Förster-Radius des Systems, der die Kenntnis des Überlappungsintegrals, der Quantenausbeute des Donors, des Orientierungsfaktors κ^2 zwischen Donor und Akzeptor sowie des Brechungsindex des Mediums zwischen beiden voraussetzt (siehe Kapitel 2.1.2). Die Größe des Überlappungsintegrals hängt nun davon ab, ob nur die elektronischen Dipolübergänge der Donoremission oder auch die magnetischen Übergänge berücksichtigt werden (siehe Kapitel 2.3.2). Der Wert für den Orientierungsfaktor ist abhängig vom Absorptions-Übergangsdipolmoment des Quantenpunkts ITK-QD525, welches sowohl planar als auch isotrop sein kann (siehe Kapitel 2.2.2). Die Quantenausbeute des Lumi4Tb-Pep und der Brechungsindex des Mediums sind bekannt. Für das System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD525 ergeben sich so vier mögliche Szenarien für die Berechnung des Förster-Radius:

- Isotropes Absorptionsmoment ($\kappa^2 = 2/3$) des Quantenpunkts, Berücksichtigung der elektronischen Dipolübergänge der Tb-Emission zur Berechnung des Überlappungsintegrals
- Isotropes Absorptionsmoment ($\kappa^2 = 2/3$) des Quantenpunkts, Berücksichtigung aller Übergänge der Tb-Emission zur Berechnung des Überlappungsintegrals
- Planares Absorptionsmoment ($\kappa^2 = 1/3 - 5/6$) des Quantenpunkts, Berücksichtigung der elektronischen Dipolübergänge der Tb-Emission zur Berechnung des Überlappungsintegrals
- Planares Absorptionsmoment ($\kappa^2 = 1/3 - 5/6$) des Quantenpunkts, Berücksichtigung aller Übergänge der Tb-Emission zur Berechnung des Überlappungsintegrals

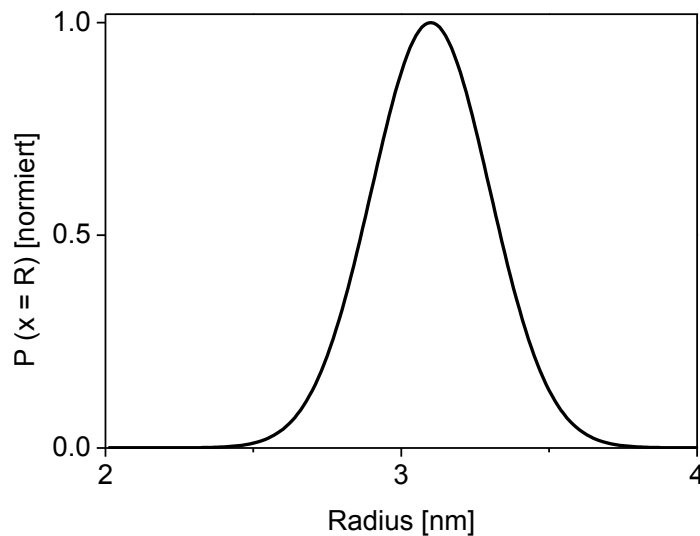


Abbildung 5.8. Erwartete Abstandsverteilung zwischen Donor und Akzeptor für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD525.

Während bei einem isotropen Absorptions-Übergangsdipolmoment des Quantenpunkts der Orientierungsfaktor κ^2 unabhängig von der Bindungsstelle des Lumi4Tb-Pep an den Quantenpunkt stets $2/3$ beträgt, variiert er für planare Absorptions-Übergangsdipolmomente in Abhängigkeit vom Ort der Bindung des Lumi4Tb-Komplexes an der Oberfläche des Nanokristalls (siehe Abbildung 5.9).

Der Orientierungsfaktor ergibt sich für die Kombination aus planarem Absorptions-Übergangsdipolmoment des Akzeptors und isotropem Emissions-Übergangsdipolmoment des Donors als Skalarprodukt des Normalenvektors \hat{n}_D des planaren Absorptions-Übergangsdipolmoments und des Vektors \hat{r} der Verbindungslinie von Donor und Akzeptor [19]:

$$\kappa^2 = \frac{5}{6} - \frac{1}{2}(\hat{n}_D \cdot \hat{r})^2 \quad \text{Gleichung (5.3)}$$

Da die Länge der beiden Vektoren \hat{n}_D und \hat{r} für die Bestimmung des Orientierungsfaktors ohne Belang ist, können diese als Einheitsvektoren angenommen werden. Die Änderung des Orientierungsfaktors hängt dann allein vom Kosinus des von ihnen eingeschlossenen Winkels α ab:

$$\kappa^2 = \frac{5}{6} - \frac{1}{2}\cos^2 \alpha \quad \text{Gleichung (5.4)}$$

Daraus ergibt sich eine Verteilung des Orientierungsfaktors zwischen $1/3$ und $5/6$ in Abhängigkeit vom Winkel (siehe Abbildung 5.9).

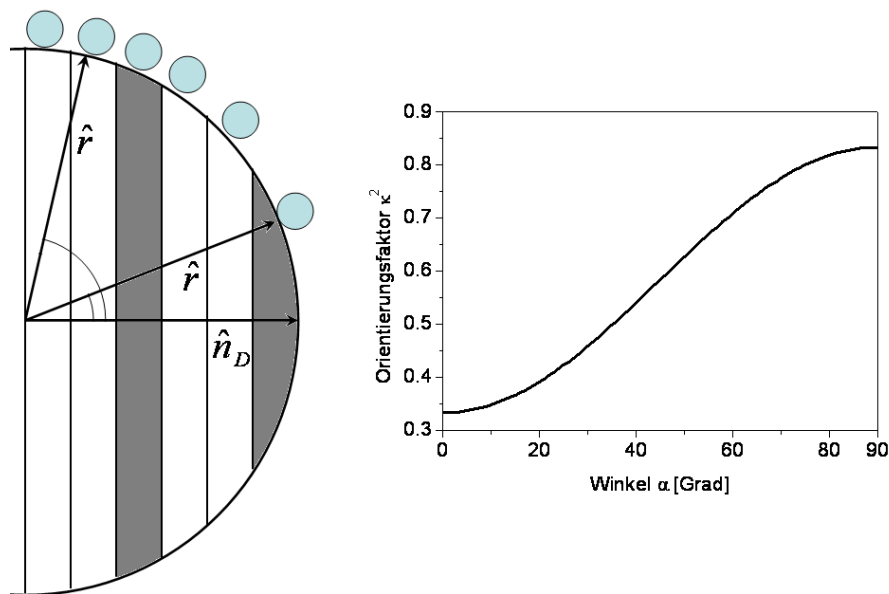


Abbildung 5.9. Abhängigkeit des Orientierungsfaktors κ^2 vom Bindungsort des Lumi4Tb-Komplexes (blaue Kugeln) an einen sphärischen Quantenpunkt. Unterteilt man den Quantenpunkt in beliebig viele Segmente der Höhe dh lässt sich jeder Schicht ein mittlerer Winkel und damit ein Orientierungsfaktor zuordnen. Alle Kugelsegmente haben dieselbe Oberfläche, daher ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Lumi4Tb-Komplexes für alle Segmente gleich. Die mittleren Winkel der Segmente sind allerdings nicht gleich verteilt, sondern bevorzugen höhere Werte. Daher kommen Orientierungsfaktoren zwischen $\frac{3}{6}$ und $\frac{5}{6}$ häufiger vor.

Aus der Verteilung des Orientierungsfaktors in Abhängigkeit vom Ort der Bindung an der Quantenpunktoberfläche resultiert eine Verteilung des Förster-Radius für jedes Segment der Quantenpunktoberfläche und damit eine Verteilung der FRET-Lebenszeiten. Falls von einem planaren Absorptions-Dipolübergangsmoment des Nanokristalls ausgegangen wird, muß diese zusätzlich zur FRET-Lebenszeitverteilung, die durch die Größenverteilung der Kristalle verursacht wird, berücksichtigt werden. Die Umrechnung äquidistanter Abstände in Lebenszeiten liefert infolge des nichtlinearen Zusammenhangs der beiden Größen Lebenszeitwerte, die nicht äquidistant sind. Um zu einer Aussage über die Verteilung von Lebenszeiten zu gelangen, ist es daher erforderlich, die in Abhängigkeit vom Abstand erhaltenen Lebenszeiten äquidistant zu ordnen. Dies erfolgt durch eine Histogrammbildung. Dazu werden die berechneten FRET-Lebenszeiten in je $10\mu\text{s}$ breiten Intervallen aufaddiert und anschließend mit der Abstandsverteilung multipliziert. Die so erhaltenen Lebenszeitverteilungen für die vier beschriebenen FRET-Szenarien sind in Abbildung 5.10 dargestellt.

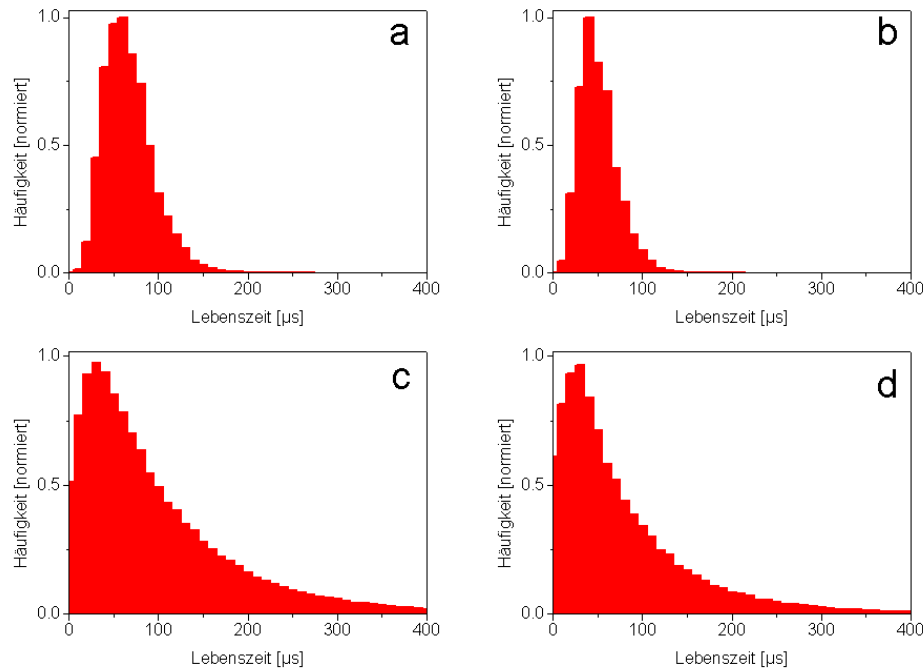


Abbildung 5.10. Erwartete Lebenszeitverteilungen für FRET von Lumi4Tb-Pep auf ITK-QD525 in Abhängigkeit von den zugrundeliegenden Annahmen für das Überlappungsintegral und den Orientierungsfaktor, die Normierung erfolgt auf die Häufigkeit für die wahrscheinlichste Lebenszeit; **a)** $\kappa^2 = 2/3$, nur elektronische Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **b)** $\kappa^2 = 2/3$, alle Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **c)** $\kappa^2 = 1/3 - 5/6$, nur elektronische Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **d)** $\kappa^2 = 1/3 - 5/6$, alle Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} .

Im Gegensatz zum biotinylierten Quantenpunkt Biot-QD525 (siehe Abschnitt 5.6.2) führen die verschiedenen Annahmen hinsichtlich des Überlappungsintegrals und des Orientierungsfaktors κ^2 hier aufgrund der geringeren Abstände innerhalb des FRET-Systems zu stärkeren Änderungen der einzelnen Abstandsverteilungen. Der Überlapp wird hier hauptsächlich zwischen der kurzwelligsten Emissionsbande des Terbioms und der Absorption des Quantenpunkts gebildet. Die längerwelligen Emissionsbanden des Terbioms tragen hingegen nur minimal dazu bei. Daher führt die Berücksichtigung aller optischen Übergänge des Terbioms bei der Berechnung des Überlappungsintegrals bei gleicher Verteilungsform lediglich zu einer leichten Verschiebung des Maximums der Lebenszeitverteilung in Richtung kürzerer Lebenszeiten (vergleiche hier Abbildung 5.10 a und b sowie c und d). Wesentlich größer ist der Einfluss des Orientierungsfaktors auf die Form und Lage der Lebenszeitverteilungen. Die Annahme eines von der Bindungsstelle des Lumi4Tb-Donors an der Quantenpunktoberfläche abhängigen Orientierungsfaktors führt im Vergleich zu $\kappa^2 = 2/3$ zu einer deutlichen Aufweitung der Verteilung, deren rechte Flanke dann stark verbreitert ist und erst bei vergleichsweise langen Lebenszeiten ausläuft. Das Maximum der Lebenszeitverteilung ist zu kürzeren Zeiten hin verschoben (siehe Abbildung 5.10 a und c sowie b und d).

5.4.3 Lumi4Tb-Pep und ITK-QD565

Der Quantenpunkt mit der Emissionswellenlänge 565 nm ist, wie auf den TEM-Bildern (Abbildung 5.11) zu erkennen ist, nicht ganz sphärisch sondern zeigt eine leichte Elongation in z-Richtung.

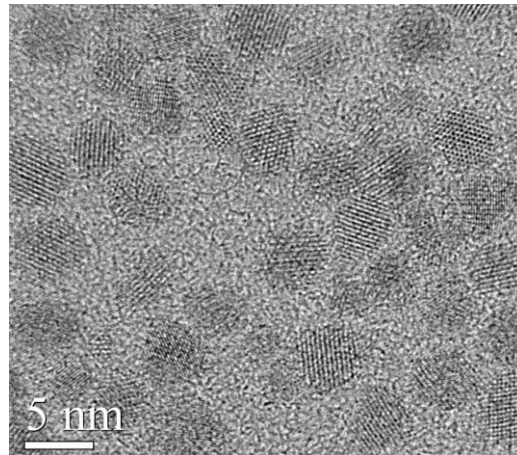


Abbildung 5.11. TEM-Aufnahme des Quantenpunkts QD565.

Der Durchmesser des Nanokristalls ohne Polymerhülle wird vom Hersteller mit 4.6 nm angegeben (mittlere Größe aus TEM-Aufnahmen: 5.1 ± 0.3 nm). Unter Berücksichtigung der leichten Elongation wird von einer kurzen Halbachse von 2.1 ± 0.2 nm und einer langen Halbachse von 2.3 ± 0.2 nm ausgegangen [29].

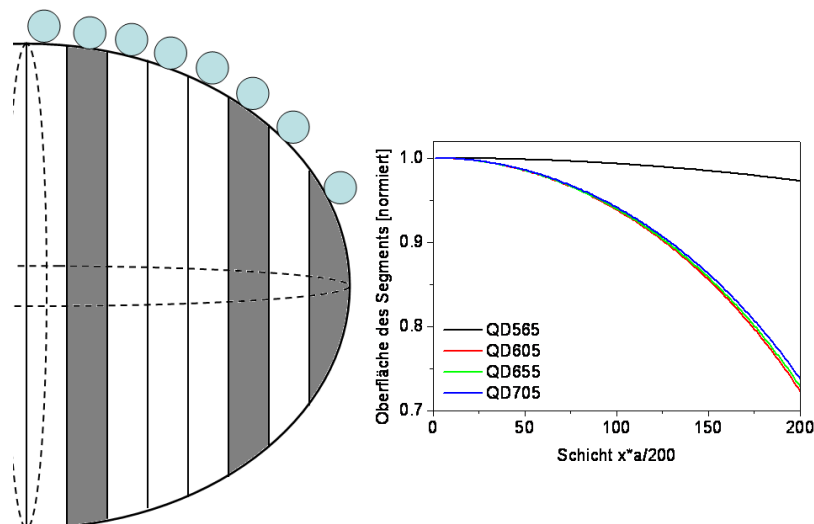


Abbildung 5.12. Abhängigkeit der Oberflächengröße eines Ellipsoidsegmentes (grau) von seiner Lage auf der langen Halbachse a des Ellipsoiden für die verwendeten ellipsoidalen Quantenpunkte (QD565, QD605, QD655 und QD705) (**rechts**). Die Oberfläche ist hier in 200 Schichten mit der jeweiligen Höhe $h = a/200$ unterteilt (**links**). Die Normierung erfolgte auf die Oberfläche des zentrumsnächsten und größten Segments.

Im Gegensatz zu Sphären sind die Oberflächensegmente von ellipsoidalen Körpern nicht gleich groß, vielmehr nimmt ihre Größe vom Zentrum ausgehend nach außen hin ab (siehe Abbildung 5.12). Bei ellipsoidalen Quantenpunkten muss daher neben der Größenverteilung des Quantenpunktes noch die Verteilung der gebundenen Lumi4Tb-Komplexe auf der Oberfläche berücksichtigt werden. Da im Vergleich zu den stark elongierten Quantenpunkten QD605, QD655 und QD705 die Form des Quantenpunkts QD565 nur leicht ellipsoidal ist, beträgt der Größenunterschied der zentrumsnächsten Oberflächenschicht und der Oberfläche der Ellipsoidenkappen mit identischer Höhe lediglich etwa 4 %. Daher kann für die Berechnung der Lebenszeitverteilung in guter Näherung von einer Gleichverteilung der Bindungen an der Quantenpunktoberfläche ausgegangen werden. Das bedeutet, dass für die Bestimmung der erwarteten Lebenszeitverteilung eine kugelförmige Gestalt des Quantenpunkts QD565 angenommen wird.

Es ergeben sich unter diesen Voraussetzungen für den Quantenpunkt ITK-QD565 die in Abbildung 5.13 dargestellten normalverteilten Abstände mit dem Verteilungsmaximum bei 3.4 ± 0.2 nm.

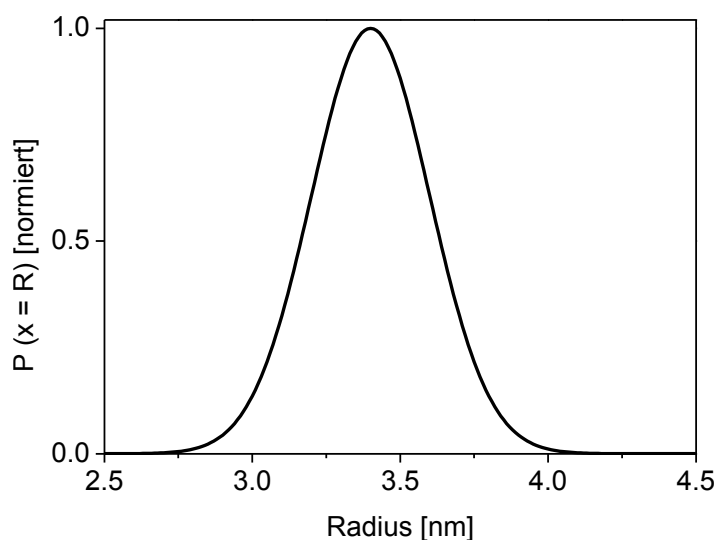


Abbildung 5.13. Erwartete Abstandsverteilung zwischen Donor und Akzeptor für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD565.

Die vier sich in Abhängigkeit von den Annahmen für Überlappungsintegral und Verhalten des Orientierungsfaktors κ^2 ergebenden unterschiedlichen Lebenszeitverteilungen sind Abbildung 5.14 zu entnehmen.

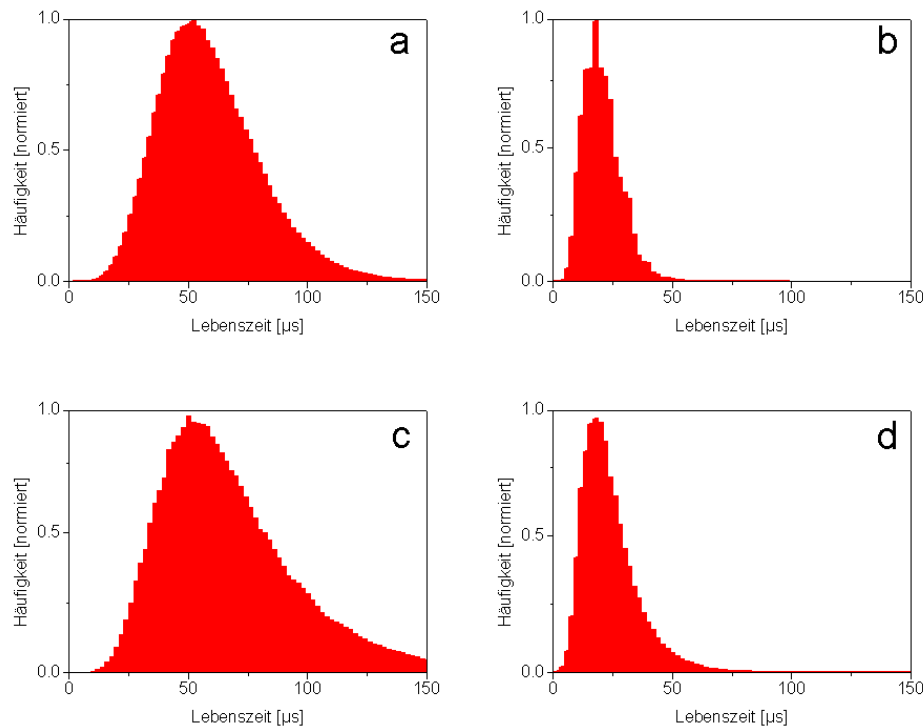


Abbildung 5.14. Erwartete Lebenszeitverteilungen für FRET von Lumi4Tb-Pep auf ITK-QD565 in Abhängigkeit von den zugrundeliegenden Annahmen für das Überlappungsintegral und den Orientierungsfaktor, die Normierung erfolgt auf die Häufigkeit für die wahrscheinlichste Lebenszeit; **a)** $\kappa^2 = 2/3$, nur elektronische Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **b)** $\kappa^2 = 2/3$, alle Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **c)** $\kappa^2 = 1/3 - 5/6$, nur elektronische Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **d)** $\kappa^2 = 1/3 - 5/6$, alle Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} .

Die erwarteten Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD565 sind sehr stark abhängig von der Größe des Überlappungsintegrals. Dies hängt mit der Überlappung der Absorption des Quantenpunkts mit den ersten beiden Emissionsbanden des Terbiiums zusammen, die gleichzeitig die Übergänge mit den höchsten Wahrscheinlichkeiten sind. Da die erste Bande elektronischen, die zweite hingegen magnetischen Charakter hat, machen sich Unterschiede in der Berücksichtigung der Emissions-Dipolübergänge für die Berechnung des Überlappungsintegrals außergewöhnlich stark bemerkbar (siehe Tabelle 5.3). Für den angenommenen Fall der Beteiligung aller Emissions-Dipolübergänge am Energietransfer kommt es dadurch, verglichen mit dem angenommenen Fall der Beteiligung nur der elektronischen Übergänge, zu einer deutlichen Verschiebung hin zu kürzeren Lebenszeiten bei gleichzeitiger Verringerung der Peakbreite (siehe Abbildung 5.14 a und b sowie c und d). Im Gegensatz zum Quantenpunkt mit der Emissionswellenlänge $\lambda = 525 \text{ nm}$ ist beim QD565 ein Unterschied zwischen Lebenszeitverteilungen mit dem Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$ und einem mit der Bindungsstelle variierenden κ^2 kaum zu erkennen (siehe Abbildung 5.14 a und c sowie b und d).

5.4.4 Lumi4Tb-Pep und ITK-QD605

Der Quantenpunkt Biot-QD605 ist, wie auf dem TEM-Bild (Abbildung 5.15) zu erkennen, stark ellipsoidal mit einer kurzen Halbachse von 2 nm und einer langen Halbachse von 4.7 nm (Angaben Invitrogen, Bestimmung aus TEM-Aufnahmen: kurze Halbachse 2.2 ± 0.2 nm; lange Halbachse 5.0 ± 0.7 nm).

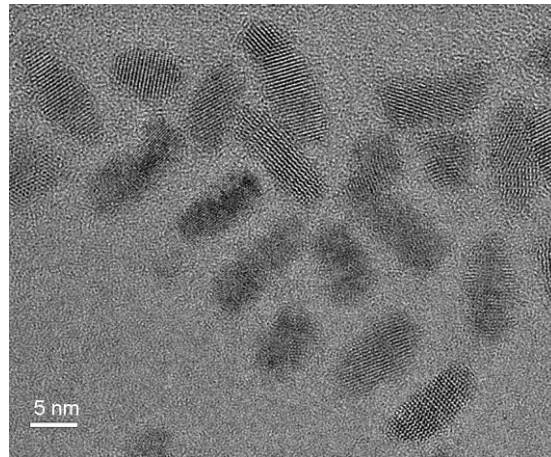


Abbildung 5.15. TEM-Aufnahme des Quantenpunkts QD605.

Im Gegensatz zu den vorher erläuterten resultierenden Abstandsverteilungen der sphärischen Quantenpunkte, bei denen von einer Gleichverteilung der Bindungswahrscheinlichkeiten für die einzelnen Oberflächensegmente ausgegangen werden konnte, ist beim Quantenpunkt QD605 zusätzlich zu berücksichtigen, dass bereits ein einzelner Quantenpunkt durch die ellipsoide Form und den damit je nach Bindungsstelle unterschiedlichen Radius eine Abstandsverteilung besitzt und die einzelnen Oberflächensegmente eine nach außen hin abnehmende Größe haben (siehe Abbildung 5.12). Die Größennormalverteilung wird also durch zwei weitere Wahrscheinlichkeitsverteilungen überlagert, die intrinsische Quantenpunktabstandsverteilung, die asymmetrisch ist, sowie ein Aufenthaltswahrscheinlichkeitsverteilung in Abhängigkeit vom Ort der Bindung des Lumi4Tb-Pep-Konjugats.

Bedingt durch die ellipsoide Form kommt es zu einer Abstandsverteilung, die nicht nur von der Größennormalverteilung innerhalb der Quantenpunktpopulation abhängig ist, sondern vom Ort der Bindung des Lumi4Tb-gelabelten Peptids an der Oberfläche des Nanokristalls (siehe vorheriger Abschnitt und Abbildung 5.12). Die resultierenden Abstände sind nicht normalverteilt, sondern lassen sich am besten mit einem asymmetrischen Doppelsigmoidal-Fit (ADS, siehe Kapitel 4.2.4) beschreiben. Das Maximum der FRET-Abstandsverteilung liegt bei einem Abstand von 3.4 nm (Abbildung 5.16).

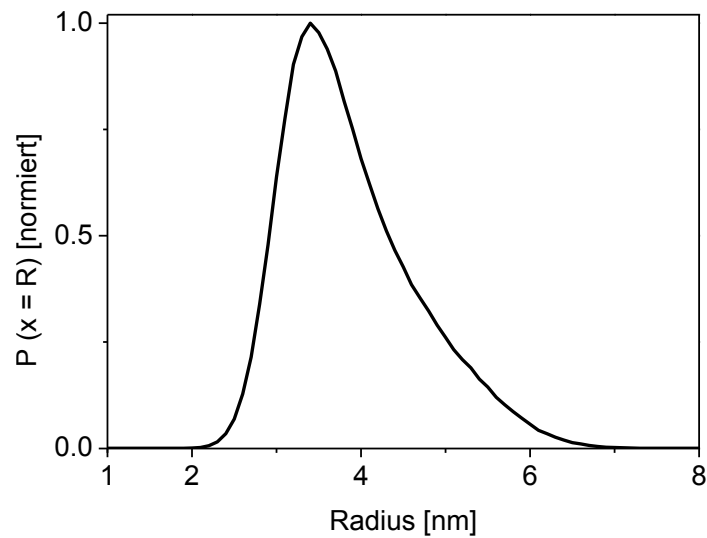


Abbildung 5.16. Erwartete Abstandsverteilung zwischen Donor und Akzeptor für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD605. Die nicht normalverteilten Abstände resultieren aus der ellipsoidalen Form des Quantenpunkts.

Im Gegensatz zu den sphärischen Quantenpunkten, kann das Absorptions-Übergangsdipolmoment bei stark ellipsoidalen Quantenpunkten entweder isotrop oder linear entlang der z-Achse des Nanokristalls orientiert sein. Der Orientierungsfaktor κ^2 für das FRET-System Lumi4Tb-Pep und ellipsoidalem Quantenpunkt ergibt sich dann für ersteren Fall zu $2/3$ und in letzterem Fall als Kombination aus linearem Absorptions-Übergangsdipolmoment des Akzeptors und isotropem Emissions-Übergangsdipolmoment des Donors als Skalarprodukt des Vektors \hat{a} des linearen Absorptions-Übergangsdipolmoments und des Vektors \hat{r} der Verbindungslinie von Donor und Akzeptor:

$$\kappa^2 = \frac{1}{3} + (\cos\alpha)^2 \quad \text{Gleichung (5.5)}$$

und kann in Abhängigkeit des von den Vektoren eingeschlossenen Winkels α zu:

$$\kappa^2 = \frac{1}{3} + \cos^2\alpha \quad \text{Gleichung (5.6)}$$

bestimmt werden. Der Orientierungsfaktor κ^2 kann bei ellipsoidalen Quantenpunkten also Werte zwischen $1/3$ und $4/3$ annehmen.

Der Einfluss eines vom Ort der Bindung abhängigen Orientierungsfaktors ist im Vergleich zu einem Orientierungsfaktor mit dem Wert $2/3$ allerdings sehr gering wie Abbildung 5.17 zeigt (vergleiche Abbildung 5.17 a und c sowie b und d). Ebenso gering ist die Abhängigkeit der Lebenszeitverteilungen von den

Unterschieden in den Annahmen für die Berechnung des Überlappungsintegrals (siehe Abbildung 5.17 a und b sowie c und d). Ein größeres Überlappungsintegral führt erwartungsgemäß zu kleineren FRET-Lebenszeiten bei gleichzeitig geringerer Verteilungsbreite.

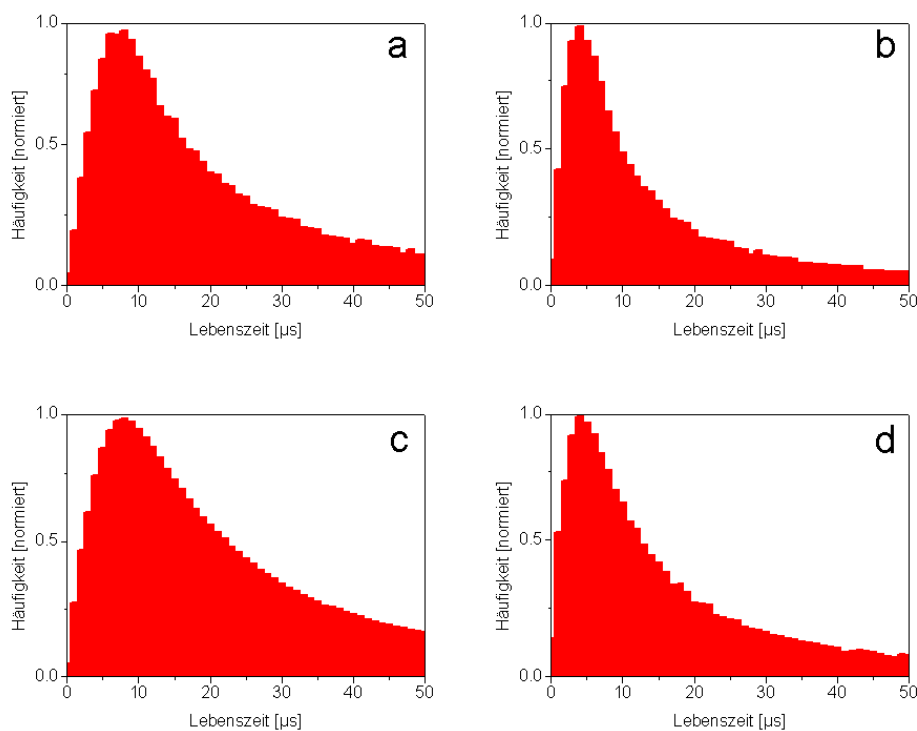


Abbildung 5.17. Erwartete Lebenszeitverteilungen für FRET von Lumi4Tb-Pep auf ITK-QD605 in Abhängigkeit von den zugrundeliegenden Annahmen für das Überlappungsintegral und den Orientierungsfaktor, die Normierung erfolgt auf die Häufigkeit für die wahrscheinlichste Lebenszeit; **a)** $\kappa^2 = 2/3$, nur elektronische Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **b)** $\kappa^2 = 2/3$, alle Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **c)** $\kappa^2 = 1/3 - 5/6$, nur elektronische Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **d)** $\kappa^2 = 1/3 - 5/6$, alle Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} .

Ein vom Ort der Bindung des Lumi4Tb-Komplexes abhängiger Orientierungsfaktor führt zu einer Aufweitung der FRET-Lebenszeitverteilungen bei gleich bleibendem Maximum. Diese Verbreiterung ist aber gering und daher vernachlässigbar. Die mit der ellipsoidalen Form der Nanokristalle verbundene asymmetrische Abstandsverteilung mit einer breit auslaufenden rechten Flanke (siehe Abbildung 5.16) führt dazu, dass FRET-Lebenszeiten bis in den Millisekundenbereich erwartet werden. Auf eine Darstellung derselben wird an dieser Stelle aber verzichtet, da der Anteil dieser langlebigen FRET-Lebenszeiten im Vergleich zu den in Abbildung 5.17 dargestellten sehr klein ist. Nichtsdestotrotz ist dies bei der Auswertung zu berücksichtigen.

5.4.5 Lumi4Tb-Pep und ITK-QD655

Der Quantenpunkt QD655 weist eine ellipsoidale Form (siehe TEM-Aufnahme Abbildung 5.18) mit einer kurzen Halbachse von 3 nm und einer langen Halbachse von 6 nm (Angaben Invitrogen, Bestimmung aus TEM-Aufnahmen: kurze Halbachse 3 ± 0.2 nm; lange Halbachse 6.4 ± 0.7 nm) auf.

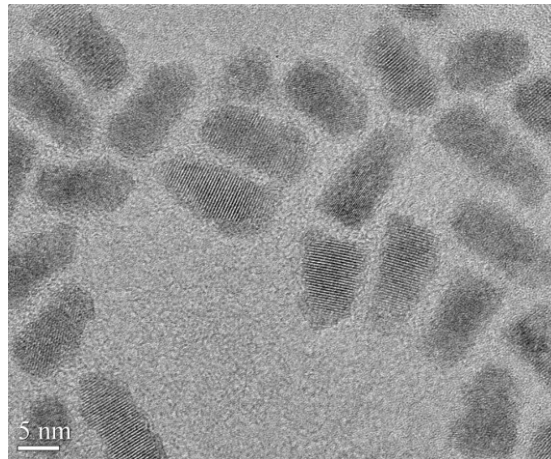


Abbildung 5.18. TEM-Aufnahme des Quantenpunkts QD655.

Analog zu den Betrachtungen für den Quantenpunkt ITK-QD605 ergibt sich aus Gestalt und Größe eine asymmetrische Abstandsverteilung (siehe Abbildung 5.19) mit dem Maximum bei einem Abstand von 4.5 nm.

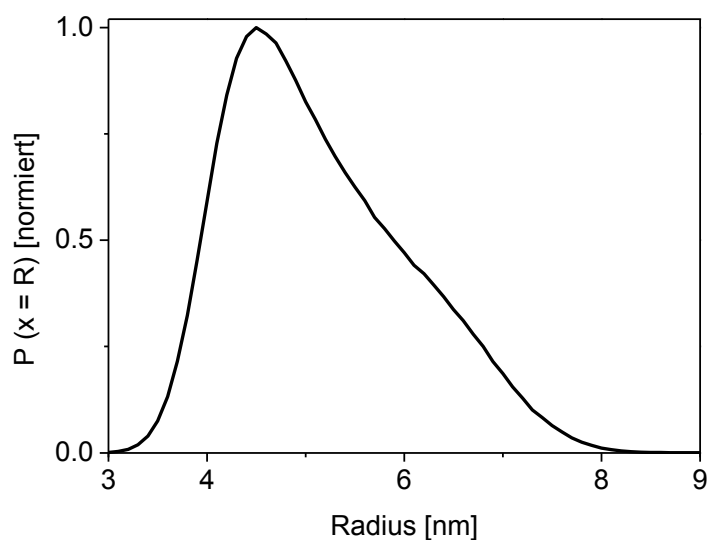


Abbildung 5.19. Erwartete Abstandsverteilung zwischen Donor und Akzeptor für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655.

Auch im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655 führt ein größerer Wert für das Überlappungsintegral zu einer Verschiebung des Maximums der erwarteten FRET-Lebenszeitverteilung in Richtung kleinerer Werte (vergleiche Abbildung 5.20 a und b sowie c und d) verbunden mit einer Verringerung der Verteilungsbreite. Die Unterschiede zwischen einem konstanten κ^2 und einem vom Bindungsort abhängigen Orientierungsfaktor von Akzeptor und Donor zueinander sind für das FRET-Paar vernachlässigbar (vergleiche Abbildung 5.20 a und c sowie b und d). Die ellipsoide Form des Quantenpunkts bedingt auch hier FRET-Lebenszeiten, die verhältnismäßig lang (bis zu mehrere Hundert Mikrosekunden) sind. Da deren Anteil an der Gesamtverteilung allerdings gering ist, wird an dieser Stelle der Übersichtlichkeit halber auf eine Darstellung verzichtet.

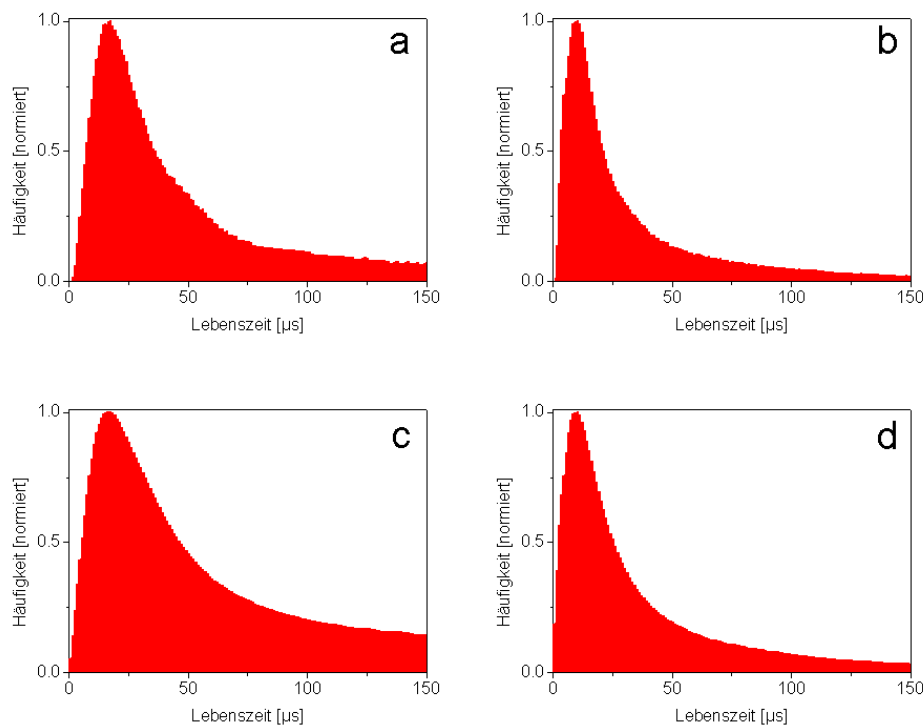


Abbildung 5.20. Erwartete Lebenszeitverteilungen für FRET von Lumi4Tb-Pep auf ITK-QD655 in Abhängigkeit von den zugrundeliegenden Annahmen für das Überlappungsintegral und den Orientierungsfaktor, die Normierung erfolgt auf die Häufigkeit für die wahrscheinlichste Lebenszeit; **a)** $\kappa^2 = 2/3$, nur elektronische Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **b)** $\kappa^2 = 2/3$, alle Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **c)** $\kappa^2 = 1/3 - 5/6$, nur elektronische Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} ; **d)** $\kappa^2 = 1/3 - 5/6$, alle Emissions-Dipolübergänge des Tb^{3+} .

5.4.6 Lumi4Tb-Pep und ITK-QD705

Als einziger der verwendeten Quantenpunkte besitzt der Biot-QD705 einen Halbleiterkern aus CdSeTe (Cadmium-Selentellurid). Durch dessen Verwendung kommt es, trotz der mit dem Quantenpunkt QD655 identischen Form und Größe (siehe Abbildung 5.21), zu einer Veränderung der optischen Eigenschaften, sowohl der Absorption als auch der Emission, die im Vergleich rotverschoben sind. Die kurze Halbachse des

QD705 hat laut Hersteller (Invitrogen) eine Länge von 3 nm, die lange Halbachse von 6 nm (Maße laut TEM-Aufnahmen: kurze Halbachse 3.2 ± 0.3 nm; lange Halbachse 6.5 ± 0.8 nm).

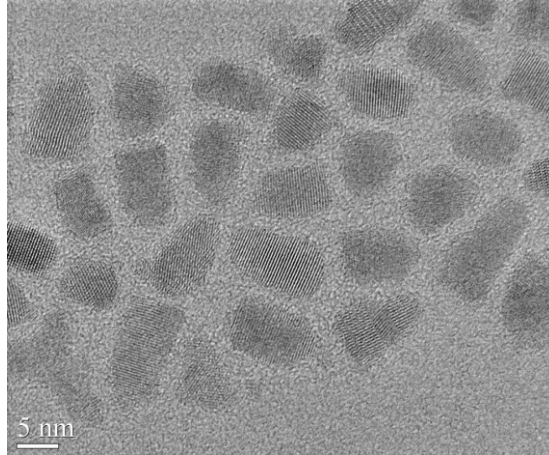


Abbildung 5.21. TEM-Aufnahme des Quantenpunkts QD705.

Obgleich sich der Quantenpunkt mit dem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von etwa 705 nm durch seinen Aufbau von den anderen verwendeten Nanokristallen unterscheidet, ist er in seinen FRET-Eigenschaften und der Gestalt dem QD655 derart ähnlich, dass für das FRET-Paar Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655 sowohl eine mit dem FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655 übereinstimmende FRET-Abstandsverteilung als auch identische FRET-Lebenszeitverteilungen zu erwarten sind. Daher sei dazu an dieser Stelle auf das vorhergehende Kapitel 5.4.5 verwiesen.

5.5 Das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD im Experiment

5.5.1 Allgemeines

In vorhergehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Quantenpunkte effiziente FRET-Akzeptoren sind, wenn lumineszente Terbiumkomplexe (LTC) als Donoren verwendet werden [24,31,103,165]. Ebenso war es möglich, erste Abstandsberechnungen in QD-LTC-FRET-Systemen durchzuführen, bei denen die Biotin-Streptavidin-Bindung als Modellbindung im Hinblick auf einen Einsatz in Immunoassays fungierte [29]. Eine genauere Berücksichtigung der FRET-Abstandsverteilung innerhalb der LTC-QD-FRET-Paare unterblieb bisher allerdings.

Alle folgenden Untersuchungen wurden am Fluoreszenzspektrometer FLS920 von Edinburgh Instruments (UK) bei einer Anregungswellenlänge von 337.1 nm durchgeführt, da das Absorptionsmaximum des Lumi4Tb-Komplexes bei etwa 340 nm liegt. Die Inkubationszeit der Assays betrug stets eine Stunde bei Raumtemperatur, was aufgrund der großen Bindungskonstante ausreichend war um zu konstanten Bindungsverhältnissen innerhalb der Proben zu gelangen. Die Detektion der Lumineszenzsignale erfolgte für Donor und Akzeptor separat, bei einer Schlitzbreite von 2 nm (Donor) bzw. 3 nm (Akzeptor) im Emissionsstrahlengang. Ein UV-Sperrfilter zur Unterdrückung der Detektion des Anregungssignals wurde im Emissionsstrahlengang verwendet. Die Meßzeit betrug bei allen Experimenten eine Stunde. Die Aufnahme der Lumineszenzsignale von Donor und Akzeptor wurde bei der Wellenlänge der jeweiligen Emissionsmaxima durchgeführt (Lumi4Tb: $\lambda_{Em} = 490$ nm, Werte für die Quantenpunkte sind Tabelle 5.2 [Seite 63] zu entnehmen).

Die Auswertung der Experimente erfolgte an den korrigierten Lumineszenzabklingkurven. Dazu wurden die gemessenen Donor- und Akzeptorsignale zuerst mittels der in Anhang A.4 erläuterten Methode von Störsignalen befreit. Anschließend wurden die Lebenszeit- bzw. Abstandsverteilungen über zwei voneinander unabhängige Vorgehensweisen bestimmt, die im Folgenden erläutert werden sollen und für alle FRET-Paare Gültigkeit besitzen. Da im vorherigen Kapitel 5.4 gezeigt werden konnte, dass die Lebenszeitverteilungen mit einem variierenden Orientierungsfaktor sich, abgesehen vom Quantenpunkt QD525 von den Verteilungen mit einem Orientierungsfaktor von $\kappa^2 = 2/3$ praktisch nicht unterscheiden, wird der Orientierungsfaktor für die folgenden Auswertungen als konstant $2/3$ angesehen.

Bestimmung der Bindungsverhältnisse über Lebenszeitverteilungen

Bei der Auswertung mit der Software FASTTM erfolgt eine Kurvenanpassung mit Hilfe einer Quasi-Verteilung aus 200 einzelnen Exponentialfunktionen, die mittels der in Kapitel 4.2.3 erläuterten mathematischen Optimierung an die Lumineszenzabklingkurve angepasst wird. Typischerweise entsteht dabei eine Lebenszeitverteilung aus einem oder mehreren Wahrscheinlichkeitspeaks (siehe Abbildung 5.22a). Zu beachten ist hierbei, dass FAST jede Verteilung auf der Basis einer exponentiellen Zeitskala angibt, d.h. für kurze Lebenszeiten liegen die einzelnen diskreten Exponentialfunktionen wesentlich dichter beieinander als für längere Lebenszeiten. Dies führt zu einer Verfälschung der Darstellung im Vergleich zu

einer äquidistanten Zeitachse der Verteilungskurve. Die Maxima bei längeren Lebenszeiten erscheinen größer, als sie tatsächlich sind, die Maxima bei kürzeren Lebenszeiten dagegen kleiner. Daher ist es notwendig, die erhaltenen Verteilungskurven in einem weiteren Schritt in solche umzuwandeln, die eine äquidistante Lebenszeitskala zur Basis haben. Dies erfolgte über eine Histogrammbildung mit Lebenszeitintervallen von je $10 \mu\text{s}$ (siehe Abbildung 5.22b). Die so gewonnene Darstellung lässt sich nun mit der theoretisch zu erwartenden Lebenszeitverteilung vergleichen.

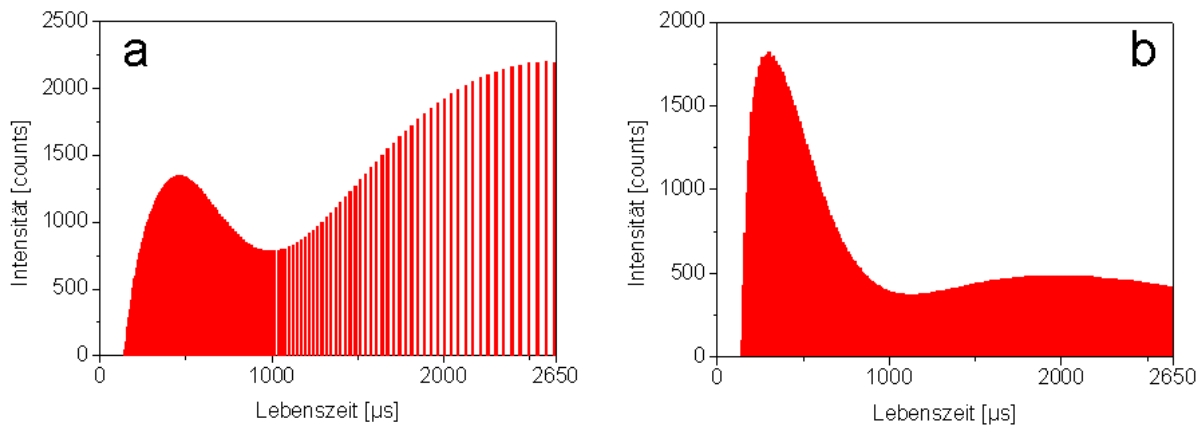


Abbildung 5.22. Beispiel für aus einer Lumineszenzabklingkurve des Donors ermittelte Lebenszeitverteilungen im System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655 **a)** Darstellung der durch FAST bestimmten Lebenszeitverteilung mit exponentiell zunehmender Zeitskala **b)** Histogramm der durch FAST bestimmten Lebenszeitverteilung auf einer äquidistanten Zeitskala.

Da bei dieser Vorgehensweise kein Bezug auf den Energietransfer genommen wird, sondern eine rein mathematische Kurvenanpassung erfolgt, sollte auf diese Weise sichtbar werden, welche der in Kapitel 5.4 getroffenen Annahmen hinsichtlich des Überlappungsintegrals und des Orientierungsfaktors zutreffend sind. Dabei ist allerdings zu beachten, dass lediglich die Lebenszeitverteilungen der Donoremission ohne weiteres zur Auswertung herangezogen werden können, die der Akzeptoremission hingegen nicht. Der Grund dafür liegt in der Abhängigkeit der Intensität der FRET-induzierten Akzeptoremission von der Transfereffizienz E . Kurze Lebenszeiten stehen nach Gleichung 2.26 für eine hohe Effizienz des Energietransfers, lange hingegen für eine niedrige. Dies bedeutet nichts anderes, als dass für kurze FRET-Lebenszeiten ein wesentlich größerer Teil der Anregungsenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen wird als bei langen FRET-Lebenszeiten. Bei der FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors sind Maxima kürzerer Lebenszeiten im Vergleich zu Maxima längerer Lebenszeiten daher, je nach FRET-System, mehr oder minder stark überrepräsentiert (siehe Abbildung 5.23). Die Intensität des durch FRET bedingten Akzeptorsignals entspricht daher nicht der tatsächlichen FRET-Verteilung, sondern muß ebenfalls noch korrigiert werden.

Die Beziehung zwischen Donor- und Akzeptorsignalintensität entspricht dabei

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{D_1 \cdot k_{T-1}}{D_2 \cdot k_{T-2}} = \frac{D_1 \cdot \left(\frac{1}{\tau_{DA1}} - \frac{1}{\tau_D} \right)}{D_2 \cdot \left(\frac{1}{\tau_{DA2}} - \frac{1}{\tau_D} \right)} = \frac{D_1 \cdot \left(\frac{\tau_D}{\tau_{DA1}} - 1 \right)}{D_2 \cdot \left(\frac{\tau_D}{\tau_{DA2}} - 1 \right)} \quad \text{Gleichung (5.7)}$$

A_1 und D_1 sind hier die Amplituden des Akzeptor- bzw. Donorsignals mit der Lebenszeit τ_{DA1} , A_2 und D_2 die Amplituden des Akzeptor- bzw. Donorsignals mit der Lebenszeit τ_{DA2} , k_{T-1} und k_{T-2} stellen die Geschwindigkeitskonstanten der beiden korrespondierenden Lebenszeiten dar. Ein beispielhafter Vergleich der unkorrigierten mit der korrigierten Lebenszeitverteilung ist in Abbildung 5.23 dargestellt.

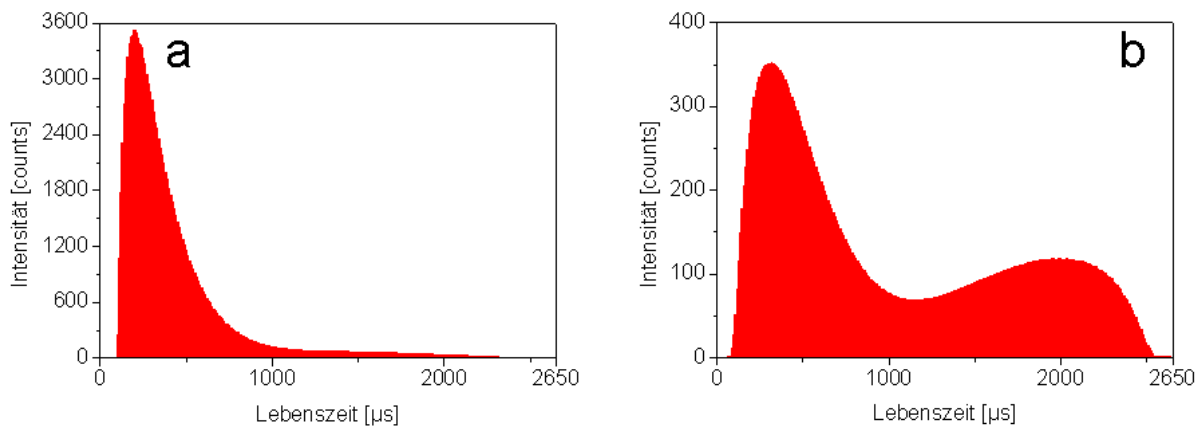


Abbildung 5.23. Beispiel für den Einfluss der Transfereffizienz E auf das FRET-Signal des Akzeptors im System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655 **a)** Darstellung der ermittelten Lebenszeitverteilung ohne Berücksichtigung des Einflusses der Transfereffizienz **b)** korrigierte Lebenszeitverteilung der Lumineszenz des FRET-Akzeptors.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Effizienz des Energietransfers nicht nur einen Einfluss auf die Signalintensität sondern auch auf die Lage der Wahrscheinlichkeitsmaxima der Lebenszeitverteilung hat. Rechnet man die Effizienz aus der Verteilung heraus, so verschiebt sich die Lage der Maxima der Verteilung in Richtung höherer Werte. Vergleicht man die Verteilung der Lebenszeiten des Akzeptors in Abbildung 5.23 mit der des Donors in Abbildung 5.22 innerhalb desselben FRET-Systems, ist die gute Übereinstimmung sowohl der Lage der Maxima der korrigierten Kurven des Donors und des Akzeptors als auch deren Verhältnis zueinander und damit die Notwendigkeit der beschriebenen Korrekturen erkennbar. Der Beschreibungsansatz über die Software FAST liefert eine FRET-Lebenszeitverteilung, die sich mit den in Kapitel 5.4 für jedes FRET-System beschriebenen Lebenszeitverteilungen vergleichen lässt.

Bestimmung der Bindungsverhältnisse über Abstandsverteilungen

Neben der Auswertung mithilfe von FAST wurde ein weiterer Ansatz zur Ermittlung der Lebenszeitverteilungen der Lumineszenzabklingkurven genutzt. Mit Hilfe des Analyse-Tools Solver der Software MS Excel wurden die experimentell ermittelten Lumineszenzabklingkurven von Akzeptor und Donor über Gleichung 5.8 bzw. 5.9 angepaßt. Die einzige Ausnahme hiervon bildete das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525, bei dem der Donor aufgrund des geringen Unterschieds zwischen der Lebenszeit des ungebundenen Donors und der langlebigen FRET-Lebenszeitkomponente mit Gleichung 5.8 gefittet wurde.

$$I_{\text{DA}}(t) = \int_{R=0}^{\infty} P(R) \exp\left[-\frac{t}{\tau_{\text{D}}} - \frac{t}{\tau_{\text{D}}}\left(\frac{R_0}{R}\right)^6\right] dR \quad \text{Gleichung (5.8)}$$

$$I_{\text{DA}}(t) = \int_{R=0}^{\infty} P(R) \exp\left[-\frac{t}{\tau_{\text{D}}} - \frac{t}{\tau_{\text{D}}}\left(\frac{R_0}{R}\right)^6\right] dR + I_{\text{D}}^0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{D}}}\right) \quad \text{Gleichung (5.9)}$$

$I_{\text{DA}}(t)$ ist die Lebenszeitabklingkurve des FRET-Donors in Anwesenheit des Akzeptors bzw. des FRET-angeregten Akzeptors, R_0 ist der Förster-Radius des FRET-Paares, τ_{D} die Lebenszeit des ungelöschten Donors, R der Abstand und $P(R)$ eine Wahrscheinlichkeitsverteilungsfunktion. Da davon ausgegangen werden muß, dass ein gewisser Anteil ungebundenen Donors im Probenvolumen vorliegt, wird die Bestimmungsfunktion für die Donor-Lumineszenz um einen Anteil erweitert, der diese Signalintensität beschreibt. I_{D}^0 ist hierbei die Intensität des ungebundenen Donors zum Zeitpunkt $t = 0$. Der Lösungsansatz geht davon aus, dass eine bestimmte Abstandsverteilung innerhalb des FRET-Paares, mit einem bekannten Förster-Radius R_0 , vorliegt, der durch eine ebenfalls bekannte Verteilungsfunktion $P(R)$ beschrieben werden kann. Resultierend aus dieser Abstandsverteilung kommt es zu einer Lebenszeitverteilung, die in ihrer Gesamtheit das FRET-Signal beschreibt. Bei den untersuchten FRET-Systemen wurde zur Bestimmung der zugrunde liegenden Verteilungsfunktion die erwartete und im Kapitel 5.4 für jedes System beschriebene Abstandsverteilung bestmöglich gefittet. Diese Fitfunktion gibt die Form der zu bestimmenden Abstandsverteilung vor, die Verteilungsmaxima sind zu bestimmen. Zur Ermittlung des Förster-Radius nach Gleichung 2.17 wurde der Orientierungsfaktor κ^2 als konstant $2/3$ angenommen sowie das gesamte Emissionsspektrum des Lumi4Tb bei der Berechnung des Überlappungsintegrals $J(\lambda)$ berücksichtigt. Als Ergebnis der Berechnungen erhält man hier eine Abstandsverteilung, die sich mit den theoretisch erwarteten Abstandsverteilungen vergleichen lässt. Auch hier muß bei der Akzeptorabstandsverteilung der Einfluss der Transfereffizienz berücksichtigt werden. Das Excel-Sheet zur Berechnung der Abstandsverteilung ist dem Anhang A.5 zu entnehmen.

5.5.2 Lumi4Tb und QD525

Die Proben wurden entsprechend der im Anhang A2. zu findenden Beschreibung präpariert und anschließend, wie in Kapitel 3.3.2 dargestellt, am Fluoreszenz-Spektrometer vermessen. Die Korrektur der

Lumineszenzabklingkurven mittels der in Anhang A.4 erläuterten Methode liefert die Lumineszenzsignale des Donors Lumi4Tb-Pep sowie des Akzeptors ITK-QD525 im FRET-Assay (Abbildung 5.24).

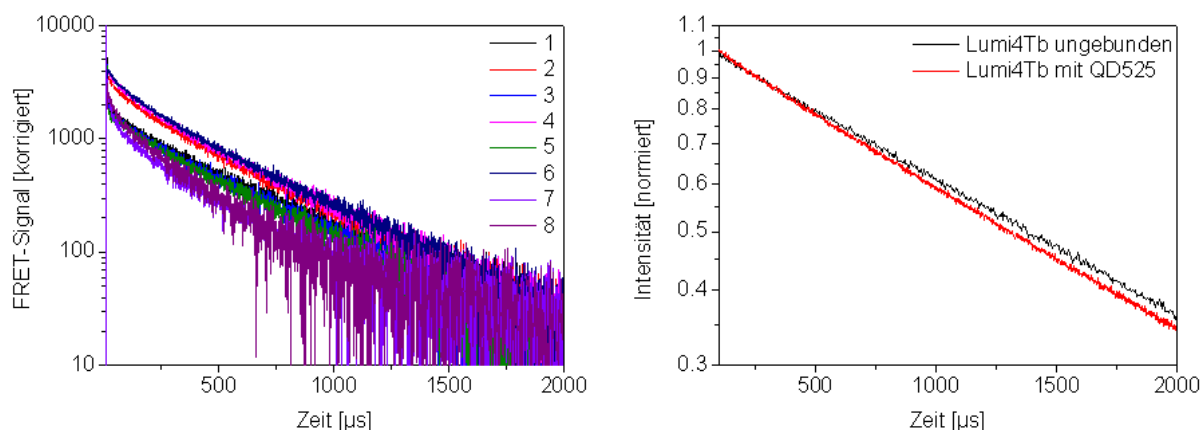


Abbildung 5.24. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay **links:** korrigiertes FRET-Signal der Quantenpunkte QD525 für die acht Messungen **rechts:** gemittelte Lumineszenzabklingkurve des Lumi4Tb-Pep im Vergleich zum ungebundenen Donor, normiert auf Intensität bei $t = 0$.

Aufgrund des hohen Überschusses an Terbiumkomplexen im Probenvolumen (Verhältnis Lumi4Tb-Pep zu Quantenpunkt 445:1) und der maximalen Bindung von etwa 10 Lumi4Tb-gelabelten Peptiden pro Quantenpunkt [169] überlagert das Lumineszenzsignal des ungebundenen Donors das des gebundenen Donors im Donorkanal (Abbildung 5.24 rechts), so dass für das Donorsignal keine quantitative Aussage hinsichtlich einer FRET-induzierten Lebenszeitveränderung möglich ist.

Die Auswertung der Lumineszenzabklingkurven des Akzeptors mit FAST ist hingegen möglich und resultiert in der in Abbildung 5.25 dargestellten Lebenszeitverteilung. Neben einem Maximum im Bereich der erwarteten Lebenszeiten [$\sim 50 \mu\text{s}$] fällt hier ein weiteres Lebenszeitsignal auf, dessen Maximum bei $345 \mu\text{s}$ liegt und das wesentlich zur FRET-induzierten Lumineszenz des Quantenpunkts QD525 beiträgt, da der Anteil dieser langen Lebenszeitkomponente an der Gesamtintensität über 90 % beträgt. Obwohl zu berücksichtigen ist, dass diese Lebenszeitkomponente durch die Korrektur der Akzeptorlebenszeitverteilung eventuell überrepräsentiert ist stellt sich die Frage, woher dieser Anteil längerer Lebenszeit kommt, da das His₆-Tag des Peptids, an das der Lumi4Tb-Komplex gelabelt ist, spezifisch an die Quantenpunktoberfläche bindet (siehe Abschnitt 2.4.4). Wahrscheinlich ist das Auftreten langer FRET-Lebenszeiten eine Folge der Aggregation der Quantenpunkte in der Probenlösung. Es ist bekannt, dass Quantenpunkte, abhängig vom pH-Wert, der Elektrolytkonzentration und ihrer Oberflächenladungen zur Aggregation neigen [170-173], wobei diese Aggregate bis zu $\sim 150 \text{ nm}$ groß sein können [172]. Kleinere Quantenpunkte aggregieren dabei deutlich leichter als große [173].

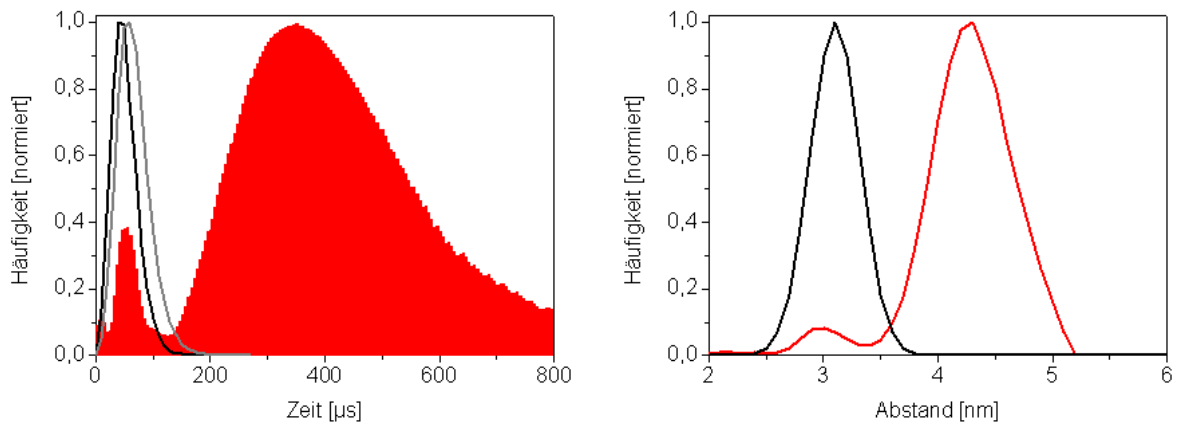


Abbildung 5.25. links: mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD525, gemittelt über alle Messungen (rote Kurve) im Vergleich zu den theoretisch erwarteten (schwarz = gesamte Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$, grau = nur elektronische Übergänge der Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$) **rechts:** aus der FAST-Lebenszeitverteilung resultierende Abstandsverteilung (rot) im Vergleich zur theoretisch erwarteten (schwarz) unter Berücksichtigung aller Emissionsbanden des Lumi4Tb sowie eines Orientierungsfaktors $\kappa^2 = 2/3$.

Durch die Aggregation kommt es, abhängig von der Größe der Aggregate, einerseits zu einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Energietransfers, da ein Donor seine Energie auf mehrere Akzeptoren übertragen kann, andererseits aber auch zu einer Vergrößerung des mittleren Abstands zwischen Lumi4Tb-Komplexen und den Quantenpunkten (siehe Abbildung 5.26), was eine niedrigere FRET-Effizienz und damit längere FRET-induzierte Lumineszenzabklingzeiten zur Folge hat.

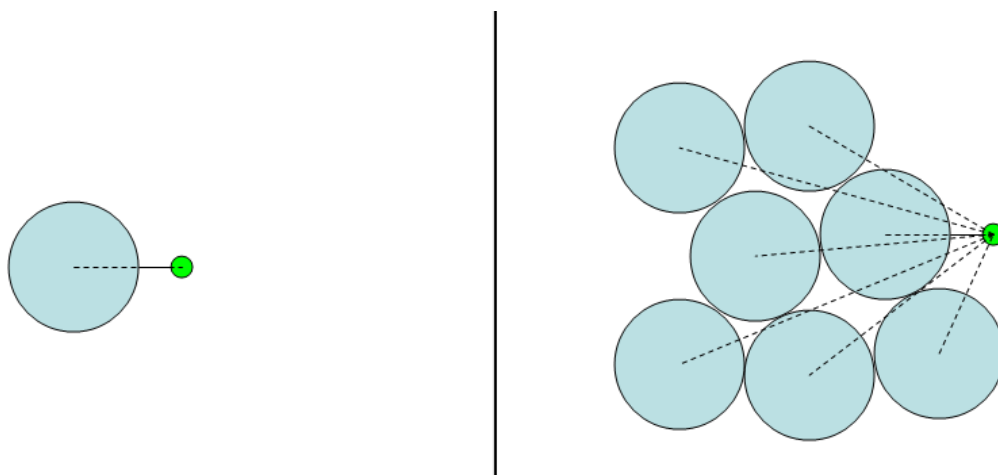


Abbildung 5.26. links: einzelnes Donor-Akzeptor-Paar. Der FRET-Abstand ist als gestrichelte Linie dargestellt. **rechts:** Akzeptor-Aggregat mit individuellem Donor (grüner Punkt), der mittlere Abstand resultiert aus der Summe des FRET aller möglichen Donor-Akzeptor-Paarungen (gestrichelte Linien).

Die Aggregation führt infolgedessen dazu, dass die FRET-Lebenszeitverteilung nicht, wie erwartet, nur ein Maximum, sondern ein weiteres bei längeren Lebenszeiten zeigt. Der hohe Anteil dieser langen Lebenszeitkomponente innerhalb der FRET-Lebenszeitverteilung gibt Hinweise darauf, dass der Quantenpunkt QD525 innerhalb des Probenvolumens überwiegend aggregiert vorliegt. Da er im Vergleich der hier verwendeten Nanopartikel die geringste Größe besitzt, scheint er dadurch von der Aggregation am meisten betroffen. Die für das FRET-Paar Lumi4Tb-Pep-ITK-QD525 aus der FAST-Lebenszeitverteilung errechneten Abstände sind in Abbildung 5.25 (rechts) dargestellt. Sie stimmen mit der Abstandsverteilung, die mit Hilfe des Excel-Tools SOLVER erhalten wurde (siehe Abbildung 5.27) gut überein. Auch hier ist ein großer Anteil an FRET zu erkennen, der vom Lumi4Tb-Donor auf aggregierte QD525-Akzeptoren. Tabelle 5.4 stellt die experimentell bestimmten Abstände den erwarteten gegenüber.

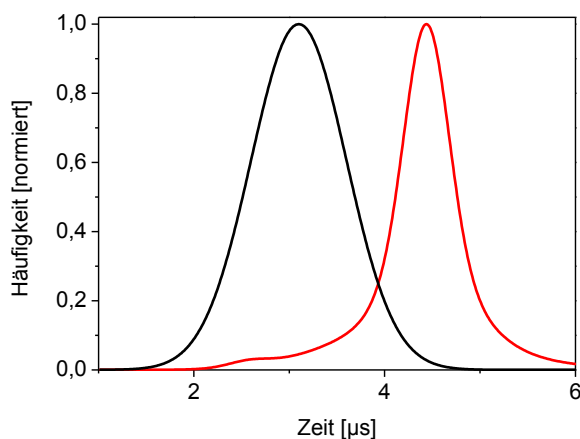


Abbildung 5.27. Mit Hilfe von SOLVER ermittelte Abstandsverteilung (rot) im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD525, gemittelt über alle Messungen im Vergleich mit der erwarteten Verteilung der Abstände innerhalb des FRET-Paares (schwarz) unter Berücksichtigung aller Emissionsbanden des Lumi4Tb und eines Orientierungsfaktors $\kappa^2 = 2/3$.

Tabelle 5.4 Vergleich der mit SOLVER und FAST aus der Akzeptorlumineszenz ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD525.

	Maximum Abstandsverteilung 1	Maximum Abstandsverteilung 2	Peak- bzw. Amplitudenverhältnis
Erwartet	3.1 ± 0.2 nm	-	-
FAST	3.2 ± 0.2 nm	4.4 ± 0.2 nm	0.06 : 1
SOLVER	2.8 ± 0.3 nm	4.4 ± 0.1 nm	0.025 : 1
<i>Biexponentieller Fit</i>	3.5 ± 0.1 nm	4.6 ± 0.1 nm	$0.1 : 1$

Der Anteil der langlebigen Abstände mit einem Maximum bei etwa 4.3 - 4.4 nm repräsentiert hier den FRET von Lumi4Tb-Donoren auf die aggregierten Quantenpunktakzeptoren. Es handelt sich um einen scheinbaren Abstand, der daher nicht berücksichtigt wird. Das kurzlebige Maximum bei ~ 3.0 nm stellt die Abstandsverteilung der Lumi4Tb-Komplexe auf der Oberfläche eines einzelnen Quantenpunkts dar und stimmt gut mit dem erwarteten Wahrscheinlichkeitsmaximum überein. Ein Vergleich mit dem üblichen diskreten Fit mittels einer oder mehrerer, in diesem Fall zweier, Exponentialfunktionen zeigt, dass dieser ebenfalls in der Lage ist, die Bindungsverhältnisse im FRET-System wiederzugeben. Im Gegensatz zur Bestimmung über Verteilungsfunktionen werden die Abstände dabei leicht überbestimmt. Die Amplituden der Kurvenanpassung über diskrete Exponentialfunktionen entsprechen der Fläche der einzelnen Verteilungen. Deren Verhältnis zueinander ist dabei in guter Übereinstimmung mit dem Peakverhältnis der Abstandsverteilungen.

Zusammenfassung

Für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD525 konnte eine Abstandsdoubletverteilung ermittelt werden, deren erstes Maximum etwa im Bereich des zu erwartenden liegen. Der Abstand zwischen Lumi4Tb-Donor und Quantenpunktzentrum wurde zu etwa 2.9 nm bestimmt. Der zweite und größere Peak bei längeren Abständen war hingegen unerwartet und wurde als Folge von FRET zwischen Lumi4Tb-Pep und Quantenpunkttaggregaten interpretiert. Die Analyse des FRET-induzierten Lumineszenzsignals ermöglicht nicht nur einen Vergleich mit den Erwartungen sondern gibt auch Hinweise auf zunächst unerwartete Formen, wie Aggregationen. Aufgrund der geringen zeitlichen Separierung der erwarteten Lebenszeitverteilungen mit unterschiedlichen Annahmen hinsichtlich des Überlappungsintegrals und des Orientierungsfaktors kann weder eine Aussage getroffen werden, ob alle Emissionsbanden des Terbiums am FRET beteiligt sind, noch welche Annahme für den Orientierungsfaktor zutreffend ist. Die gute Übereinstimmung der ermittelten Abstandsverteilungen mit der erwarteten gibt allerdings einen Hinweis darauf, dass alle Emissionsbanden des Lumi4Tb-Komplexes zum Überlapp beitragen. Eine Kurvenanpassung durch den Fit mit zwei Exponentialfunktionen liefert sehr ähnliche Ergebnisse und ist im Falle des FRET-Paares Lumi4Tb-Pep-ITK-QD525 ebenfalls anwendbar.

5.5.3 Lumi4Tb und QD565

Das Lumineszenzsignal des Donors und die korrigierten Lumineszenzabklingkurven des Akzeptors sind in Abbildung 5.28 zu erkennen. Auch für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD565 ist eine Auswertung der Lumineszenz des Donors aufgrund des hohen Überschusses an ungebundenem Lumi4Tb-Pep nicht möglich. Obwohl eine Änderung der Lumineszenzabklingkurve erkennbar ist, lässt sich diese Änderung qualitativ nicht erfassen, so dass sich die Auswertung auf die FRET-induzierte Lumineszenz des Akzeptors beschränkt.

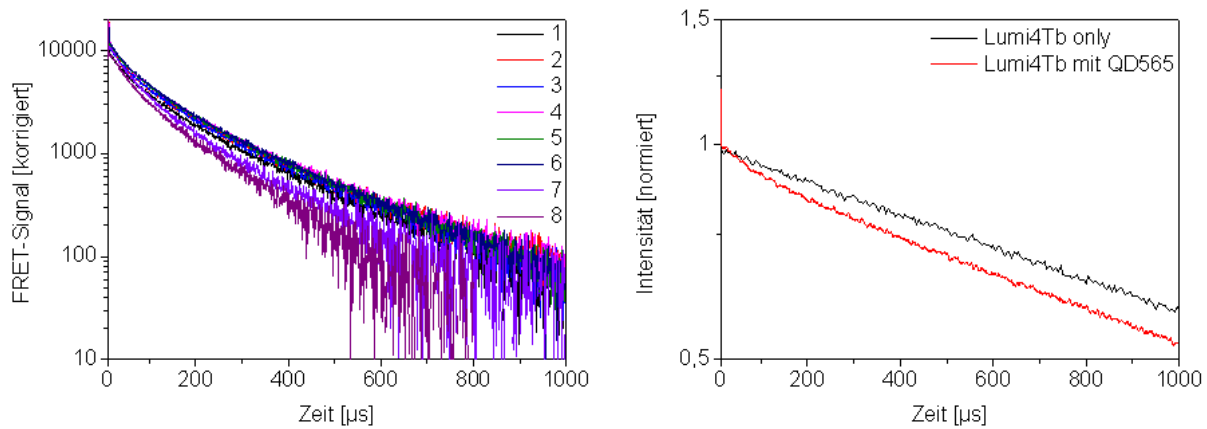


Abbildung 5.28. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay **links:** korrigiertes FRET-Signal der Quantenpunkte QD565 für die acht Messungen **rechts:** gemittelte Lumineszenzabklingkurve des Lumi4Tb-Pep im Vergleich zum ungebundenen Donor, normiert auf Intensität bei $t = 0$.

Die Bestimmung der Lebenszeitverteilungen mit Hilfe von FAST sowie die anschließende Transfereffizienz-Korrektur liefert die in Abbildung 5.29 links dargestellte Lebenszeitverteilung.

Auch beim FRET-Paar Lumi4Tb-Pep-ITK-QD565 ist in der Lebenszeitverteilung neben einem kleineren Anteil kurzer Lebenszeiten mit einem Maximum bei etwa $25 \mu\text{s}$ ein großer Anteil längerer Lebenszeiten zu erkennen, der ein Maximum bei $\sim 130 \mu\text{s}$ aufweist und knapp 90 % der Gesamtintensität besitzt.

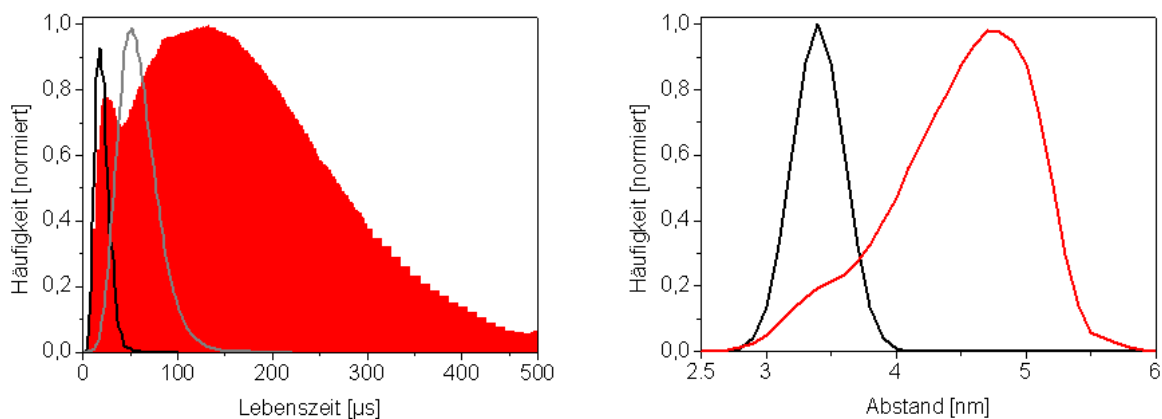


Abbildung 5.29. **links:** mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD565, gemittelt über alle Messungen (rote Kurve) im Vergleich zu den theoretisch erwarteten (schwarz = gesamte Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$, grau = nur elektronische Übergänge der Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$) **rechts:** aus der FAST-Lebenszeitverteilung resultierende Abstandsverteilung (rot) im Vergleich zur theoretisch erwarteten (schwarz) unter Berücksichtigung aller Emissionsbanden des Lumi4Tb sowie eines Orientierungsfaktors $\kappa^2 = 2/3$.

Dies lässt sich wiederum durch die Aggregation der Quantenpunkte erklären, die zu einer Erhöhung des mittleren FRET-Abstandes und damit einer Verlängerung der FRET-Lebenszeiten führt. Das Ausmaß der Aggregation ist, verglichen mit dem Quantenpunkt QD525 geringer, was zu erwarten ist, da der Quantenpunkt QD565 größer ist und daher tendenziell weniger zur Aggregation neigen sollte.

Die aus der FAST-Lebenszeitverteilung gewonnene Abstandsverteilung ist in Abbildung 5.29 rechts zu sehen. Sie stimmt mit der durch SOLVER ermittelten (Abbildung 5.30) sehr gut überein. Tabelle 5.5. stellt die aus den FRET-Lebenszeitverteilungen ermittelten Abstände der Lumi4Tb-Schicht den erwarteten Abständen gegenüber. Außerdem werden als Vergleich die durch einen diskreten Fit mit zwei exponentiellen Funktion ermittelten Abstände und deren Amplituden aufgeführt.

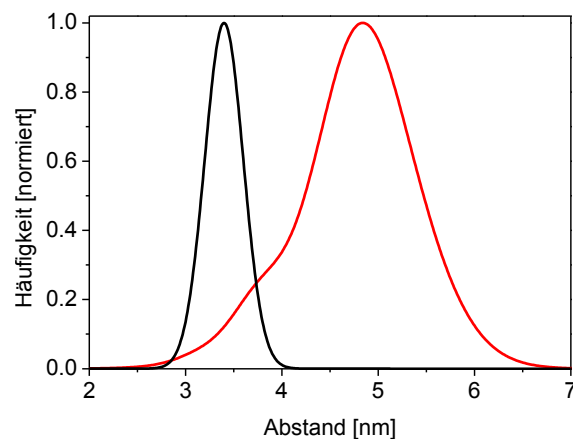


Abbildung 5.30. Mit Hilfe von SOLVER ermittelte Abstandsverteilung (rot) im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD565, gemittelt über alle Messungen im Vergleich mit der erwarteten Verteilung der Abstände innerhalb des FRET-Paares (schwarz) unter Berücksichtigung aller Emissionsbanden des Lumi4Tb und eines Orientierungsfaktors $\kappa^2 = 2/3$.

Da die interessante Abstandsverteilung durch die größere Abstandsverteilung zwischen dem Donor und den Akzeptoraggregaten überlagert wird, ist die Bestimmung von Form und Lage des kurzen Abstandsanteils mit Unsicherheiten verbunden. Die Maxima von erwarteter Abstandsverteilung und ermittelten Verteilungen stimmen überein, was ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass tatsächlich alle Emissionsbanden des Terbioms zum Überlapp beitragen und der Orientierungsfaktor in guter Näherung als konstant angesehen werden kann. Rückschlüsse auf die Form der Abstandsverteilung lassen sich nicht ziehen. Das Peakverhältnis illustriert deutlich, wie hoch der Anteil des FRET zwischen den Donoren und den Quantenpunkttaggregaten ist, der hier durch die Abstandsverteilung mit dem Maximum bei 4.7 – 4.8 nm repräsentiert wird. Ein Vergleich mit dem üblichen Fit mittels zweier diskreter Exponentialfunktionen verdeutlicht den Vorteil der Verwendung von Verteilungen bei der Abstandsbestimmung, denn im Vergleich sind die Abstandsabweichungen bei

einem biexponentiellen Fit deutlich größer. Der Anteil der nicht aggregierten Akzeptoren am FRET wird außerdem überbestimmt und das Ergebnis gibt die Bindungsverhältnisse im Probenvolumen nicht so genau wieder, wie eine Anpassung der Lumineszenzabklingkurven über Verteilungsfunktionen.

Tabelle 5.5. Vergleich der mit SOLVER und FAST aus der Akzeptorlumineszenz ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD565.

	Maximum Abstandsverteilung 1	Maximum Abstandsverteilung 2	Peak- bzw. Amplitudenverhältnis
Erwartet	3.4 ± 0.2 nm	-	-
FAST	3.6 ± 0.2 nm	4.7 ± 0.3 nm	0.11 : 1
SOLVER	3.6 ± 0.3 nm	4.8 ± 0.3 nm	0.076 : 1
<i>Biexponentieller Fit</i>	4.2 ± 0.2 nm	5.3 ± 0.1 nm	0.3 : 1

Zusammenfassung

Die Auswertung der FRET-induzierten Lumineszenzsignale des FRET-Systems Lumi4Tb-Pep-ITK-QD565 ergab eine Abstandsdoppelverteilung, deren kürzeres Maximum sehr gut mit der erwarteten Verteilung übereinstimmt. Der Abstand wurde zu ~ 3.6 nm bestimmt. Diese gute Übereinstimmung mit den Erwartungen lässt den Schluß zu, dass die Annahmen hinsichtlich einer Beteiligung aller Emissionsbanden des Lumi4Tb-Komplexes am Energietransfer bei der Berechnung des Förster-Radius zutreffend sind. Lebenszeit- und Abstandsverteilungen des FRET-Paares geben weiterhin einen Hinweis auf das Vorliegen von Akzeptoraggregaten im Probenvolumen, die sich durch einen unerwarteten und hohen Anteil unverhältnismäßig langer FRET-induzierter Lebenszeiten äußern. Der Vergleich der Kurvenanpassung durch Verteilungsfunktionen mit der durch einen diskreten Fit zweier Exponentialfunktionen zeigt, dass eine Abstandsverteilung die erwarteten Bindungsverhältnisse besser darstellt.

5.5.4 Lumi4Tb und QD605

Die experimentell gewonnenen, korrigierten Lumineszenzabklingkurven des Akzeptorsignals sowie die Abklingkurve des Donors im Vergleich zu ungebundenem Lumi4Tb-Pep für das FRET-Paar Lumi4Tb-Pep-ITK-QD605 sind in Abbildung 5.31 dargestellt. Aufgrund der Übereinstimmung des Lumineszenzsignals im Donorkanal des FRET-Assays mit dem des ungebundenen Donors beschränkt sich die folgende Auswertung hinsichtlich FRET-Lebenszeit- und Abstandsverteilungen auf das Lumineszenzsignal der Akzeptoren.

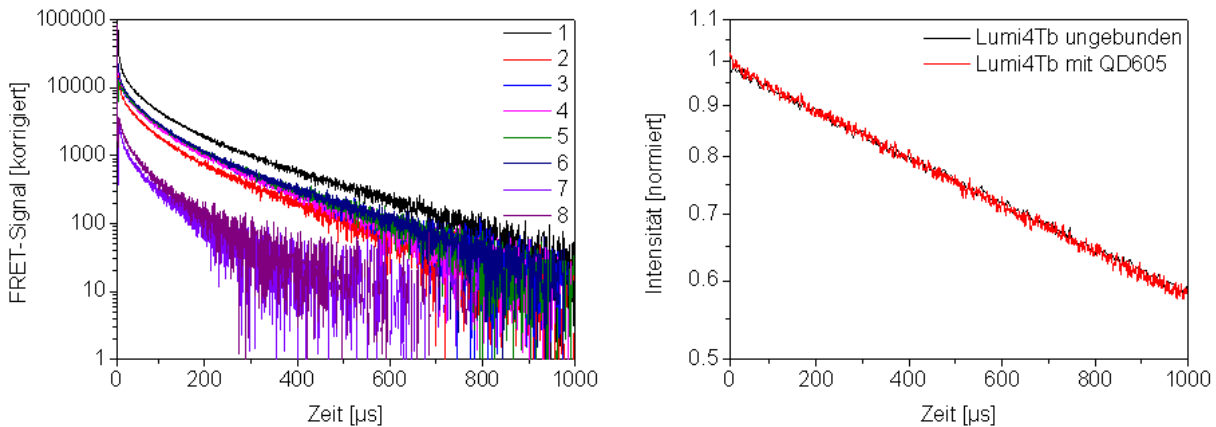


Abbildung 5.31. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay **links:** korrigiertes FRET-Signal der Quantenpunkte QD605 für die acht Messungen **rechts:** gemittelte Lumineszenzabklingkurve des Lumi4Tb-Pep im Vergleich zum ungebundenen Donor, normiert auf Intensität bei $t = 0$.

Abbildung 5.32 links zeigt die durch FAST ermittelten Lebenszeitverteilungen im Vergleich mit den theoretisch erwarteten. Es ist eine sehr gute Übereinstimmung des ersten Maxima der experimentell ermittelten Verteilung ($\sim 3.4\mu\text{s}$) mit der Verteilung zu erkennen, bei der alle Emissionsbanden des Terbiumkomplexes berücksichtigt wurden ($\sim 3.8\mu\text{s}$). Die experimentell ermittelte Verteilung weicht in ihrer Form hingegen deutlich von der erwarteten ab, da ein zweites Maximum bei ca. $50\mu\text{s}$ Lebenszeit auftritt und auch die Breite des Peaks mit dem Maximum bei $3.4\mu\text{s}$ wesentlich schmäler ist als erwartet.

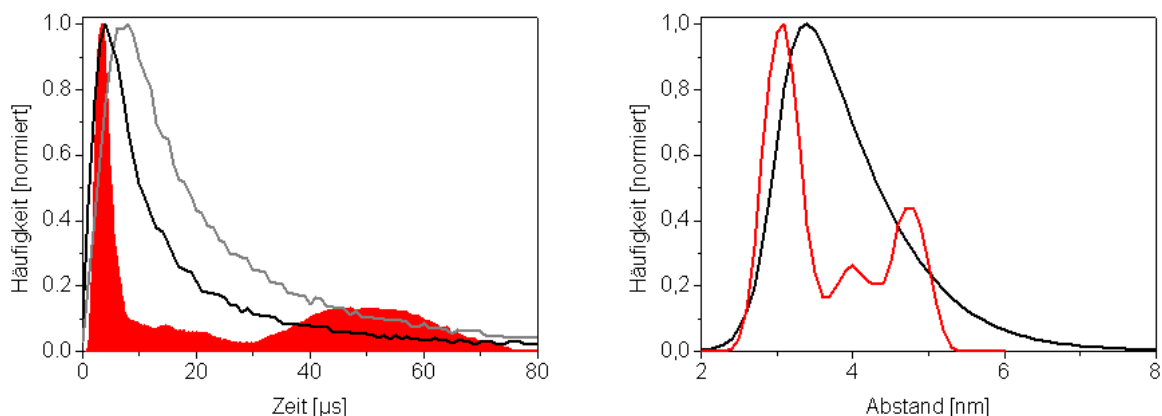


Abbildung 5.32. **links:** mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD605, gemittelt über alle Messungen (rote Kurve) im Vergleich zu den theoretisch erwarteten (schwarz = gesamte Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$, grau = nur elektronische Übergänge der Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$) **rechts:** aus der FAST-Lebenszeitverteilung resultierende Abstandsverteilung (rot) im Vergleich zur theoretisch erwarteten (schwarz).

Dies kann zweierlei Gründe haben. Zum einen könnten auch die Quantenpunkte QD605 im Probenvolumen in, wenn auch geringerem Anteil, aggregiert vorliegen, womit sich das zweite Verteilungsmaximum bei ca. 50 μs erklären ließe. Zum anderen ist zu berücksichtigen, dass FAST bei der Kurvenanpassung die mathematisch bestmögliche Kurve ausgibt und in diesem Fall eine Verteilung mit einem schmalen kurzlebigen Maximum und einem langlebigen, breiterem Maximum das mathematische Optimum bildet, auch wenn die tatsächlichen Bindungsverhältnisse etwas anderes erwarten lassen. Dies lässt sich durch eine Kurvenanpassung mittels des Excel-Tools SOLVER überprüfen. Da hier die Kurvenform vorgegeben ist, sollte sich bei einer Aggregation der Quantenpunkte ein weiteres Abstandsmaximum bei längeren Abständen zeigen, wohingegen die Form der Abstandsverteilung ähnlich der erwarteten sein sollte, wenn die Abweichung der durch FAST ermittelten Lebenszeitverteilung nur mathematischer Natur ist. Wie in Abbildung 5.33 zu erkennen ist, zeigt die durch SOLVER ermittelte Abstandsverteilung ein weiteres Maximum bei einem Abstand von etwa 5.2 nm, die Verteilung stimmt gut mit der aus der FAST-Lebenszeitverteilung ermittelten Abstandsverteilung überein (vergleiche Abbildung 5.32 rechts).

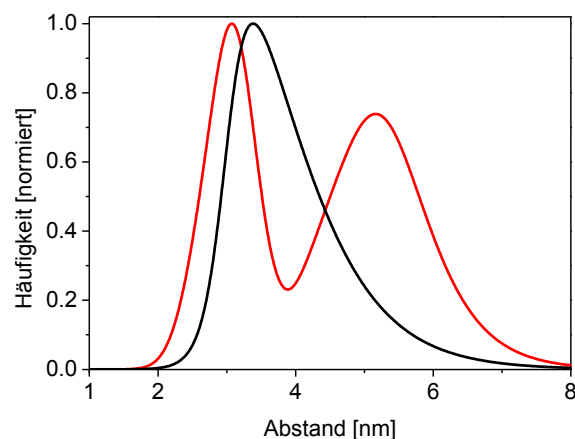


Abbildung 5.33. Mit Hilfe von SOLVER ermittelte Abstandsverteilung (rot) im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD605, gemittelt über alle Messungen im Vergleich mit der erwarteten Verteilung der Abstände innerhalb des FRET-Paares (schwarz) unter Berücksichtigung aller Emissionsbanden des Lumi4Tb und eines Orientierungsfaktors $\kappa^2 = 2/3$.

Daher ist davon auszugehen, dass auch der Quantenpunkt QD605 aggregiert vorliegt. Im Vergleich zu den QD525 und QD565 ist er größer und reagiert damit weniger sensitiv auf Umwelteinflüsse. Die Neigung zur Aggregation ist im Vergleich aus diesem Grund geringer, was sich aus dem Verhältnis der beiden Abstandswahrscheinlichkeitspeaks erkennen lässt. In Tabelle 5.6 sind die ermittelten Abstandsmaxima dem erwarteten gegenübergestellt und mit den durch eine diskret-exponentielle Kurvenanpassung erhaltenen Abständen verglichen. Die Unterbestimmung des Abstands der Lumi4Tb-Komplexe vom Quantenpunktzentrum (ermittelt: 3.1 nm, erwartet: 3.5 nm) ist eine direkte Folge der geringeren Breite des Lebenszeitverteilungspeaks im Vergleich zur erwarteten Lebenszeitverteilung, wodurch die längeren FRET-Lebenszeiten unterrepräsentiert sind und so nicht zur Abstandsverteilung beitragen können. Im Vergleich dazu gelingt es durch eine triexponentielle Kurvenanpassung den erwarteten Abstand sehr genau aus den

Lumineszenzabklingkurven zu rekonstruieren, allerdings mit sehr geringer Amplitude, deren Anteil an der Gesamtintensität weniger als 3% beträgt, wohingegen die beiden anderen Lebenszeitanteile dominieren. Dies entspricht nicht den tatsächlichen Bindungsverhältnissen und macht, ohne Berücksichtigung der ermittelten Abstandsverteilungen, eine Beurteilung der Ergebnisse schwierig.

Tabelle 5.6 Vergleich der mit SOLVER und FAST aus der Akzeptorlumineszenz ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD605.

	Maximum Abstandsverteilung 1	Maximum Abstandsverteilung 2	Peak- bzw. Amplitudenverhältnis
Erwartet	3.5 nm	-	-
FAST	3.2 ± 0.1 nm	4.6 ± 0.3 nm	2 : 1
SOLVER	3.2 ± 0.1 nm	5.2 ± 0.1 nm	0.75 : 1
<i>Triexponentieller Fit</i>	3.4 ± 0.1 nm	4.8 ± 0.1 nm 6.1 ± 0.1 nm	$0.04 : 0.6 : 1$

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die Kurvenanpassung durch Lebenszeit- bzw. Abstandsverteilungen für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD605 eine Doppelverteilung liefert, deren erstes Maximum den Abstand der Lumi4Tb-Komplexe vom Quantenpunktzentrum repräsentiert und dass im Vergleich zum erwarteten leicht kleiner ist. Dies ist eine Folge der Form der ermittelten Abstandsverteilung, die mit einem schmalen kurzen Anteil und einem breiten langen Anteil deutlich von der erwarteten abweicht, wobei der Anteil längerer Abstände durch die Aggregation der FRET-Akzeptoren zu erklären ist. Der Abstand der Lumi4Tb-Komplexe vom Quantenpunktzentrum wurde zu 3.1 nm bestimmt. Da dieser unter der Annahme der Beteiligung aller Emissionsbanden des Terbium am FRET bestimmt wurde, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass diese Annahmen zutreffend sind. Ein diskret-exponentieller Fit mit drei Exponentialfunktionen, der als Vergleich durchgeführt wurde, zeigte neben zwei längeren Abstandskomponenten durch die FRET-Akzeptoraggregation, eine größere Übereinstimmung des ermittelten Abstands mit dem erwarteten, unterscheidet sich im Amplitudenverhältnis jedoch. Die tatsächlichen Bindungsverhältnisse werden durch einen Verteilungsfit daher besser dargestellt.

5.5.5 Lumi4Tb und QD655

Die Lumineszenzabklingkurven des FRET-Systems Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655 sind in Abbildung 5.34 zu sehen. Das Donorlumineszenzsignal ist, wie bei den vorherigen Messungen aufgrund der hohen Konzentration des ungebundenen Donors nicht auswertbar, so dass zur Auswertung die korrigierten

Abklingkurven des Akzeptors (Abbildung 5.34 links) herangezogen werden, die ein stark multiexponentielles Abklingen zeigen. Dies ist ein Hinweis auf eine Abstandsverteilung im FRET-System.

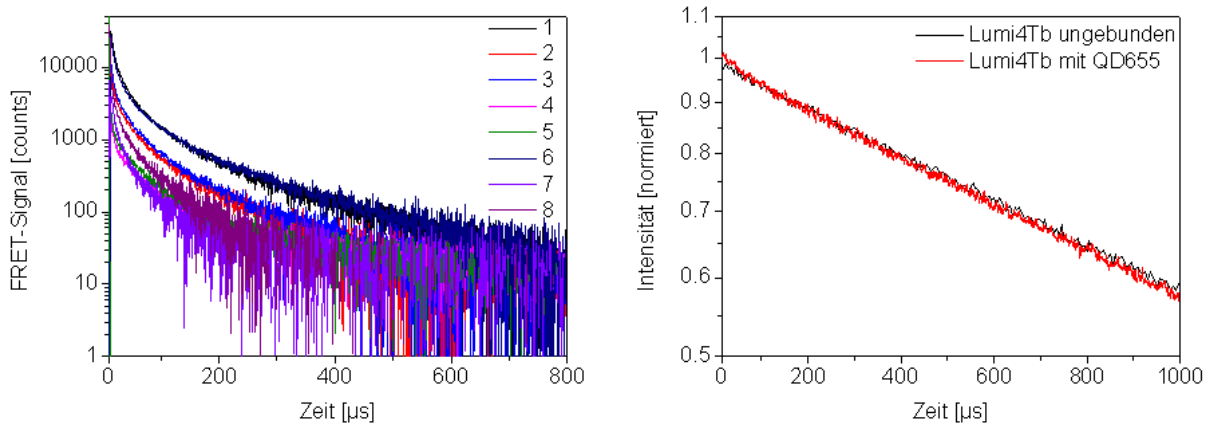


Abbildung 5.34. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay **links:** korrigiertes FRET-Signal der Quantenpunkte QD655 für die acht Messungen **rechts:** gemittelte Lumineszenzabklingkurve des Lumi4Tb-Pep im Vergleich zum ungebundenen Donor, normiert auf Intensität bei $t = 0$.

Die mit Hilfe von FAST an die Lumineszenzabklingkurven angepasste FRET-Lebenszeitverteilung ist in Abbildung 5.35 links dargestellt und stimmt gut mit der für die Beteiligung aller Emissionsübergänge des Terbium und einem konstanten Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$ erwartete Verteilung (schwarze Kurve) überein. Das Verteilungsmaximum stimmt innerhalb der Meßunsicherheiten überein (erwartet: $7 \mu\text{s}$, bestimmt: $6 \mu\text{s}$).

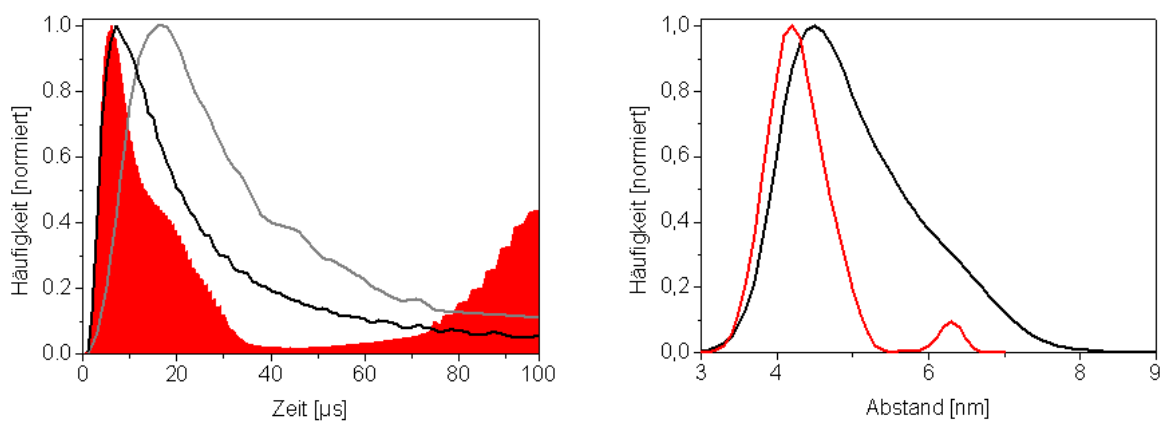


Abbildung 5.35. **links:** mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655, gemittelt über alle Messungen (rote Kurve) im Vergleich zu den theoretisch erwarteten (schwarz = gesamte Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$, grau = nur elektronische Übergänge der Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$) **rechts:** aus der FAST-Lebenszeitverteilung resultierende Abstandsverteilung (rot) im Vergleich zur theoretisch erwarteten (schwarz).

Die Form der ermittelten Lebenszeitverteilung unterscheidet sich von der erwarteten, da die rechte Flanke deutlich schmaler ist und bei einer Lebenszeit von ca. 35 μs ausläuft, wohingegen die erwartete Lebenszeitverteilung erst bei Zeiten größer 100 μs endet. Auch in diesem FRET-Assay ist ein Verteilungsanteil längerer Lebenszeiten sichtbar (Maximum bei $\sim 110 \mu\text{s}$), der aus Gründen der Übersichtlichkeit nur teilweise abgebildet ist. Bedingt durch die geringere Breite der Lebenszeitverteilung weist die sich daraus ergebende Abstandsverteilung (Abbildung 5.35 rechts) ein in Richtung geringerer Abstände verschobenes Maximum und eine ebenfalls schmalere Verteilungsbreite auf. Während das Verteilungsmaximum also exakt bestimmt angesehen werden kann, weicht die Form der ermittelten Verteilung deutlich von der erwarteten Abstandsverteilung ab. Während sich bei der Bestimmung der FRET-Abstandsverteilung mit Hilfe von SOLVER (siehe Abbildung 5.36) die Form des Verteilungsmaximums aus den Lumineszenzabklingkurven rekonstruieren lässt, unterscheidet sich die Lage des Maximums deutlicher von dem der erwarteten Abstandsverteilung. Auch hier ist eine weitere Abstandsverteilung zu erkennen, die zum FRET beiträgt und als Energietransfer zwischen Lumi4Tb-Komplexen und aggregierten Quantenpunkten aufgefasst werden kann. Dieser Anteil tritt bei der Bestimmung mit Hilfe von SOLVER wesentlich stärker heraus als bei der Kurvenanpassung mit FAST.

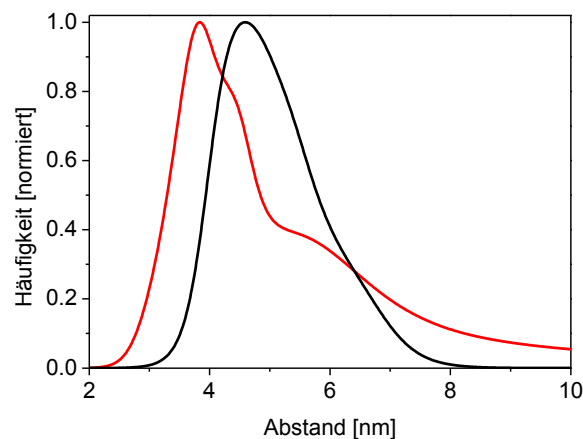


Abbildung 5.36. Mit Hilfe von SOLVER ermittelte Abstandsverteilung (rot) im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655, gemittelt über alle Messungen im Vergleich mit der erwarteten Verteilung der Abstände innerhalb des FRET-Paares (schwarz) unter Berücksichtigung aller Emissionsbanden des Lumi4Tb und eines Orientierungsfaktors $\kappa^2 = 2/3$.

In Tabelle 5.7 sind die ermittelten und erwarteten Abstände gegenübergestellt. Zusätzlich dazu ist das Ergebnis einer Kurvenanpassung mit Hilfe dreier Exponentialfunktionen, wie sie üblicherweise erfolgt, aufgeführt. Der Anteil des FRET zwischen Lumi4Tb-Donoren und aggregierten Quantenpunktakzeptoren ist durch das Peak- bzw. Amplitudenverhältnis charakterisiert und unterscheidet sich je nach Art der Kurvenanpassung deutlich. Eine triexponentielle Anpassung der Lumineszenzabklingkurven liefert das am meisten von den Erwartungen abweichende Ergebnis, da nicht nur der Wert für den tatsächlichen Abstand deutlich zu gering ist, sondern dieser auch den geringsten Anteil an der Gesamtintensität ($\sim 5\%$) besitzt.

Tabelle 5.7 Vergleich der mit SOLVER und FAST aus der Akzeptorlumineszenz ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655.

	Maximum Abstandsverteilung 1	Maximum Abstandsverteilung 2	Peak- bzw. Amplitudenverhältnis	
Erwartet	4.6 nm	-	-	
FAST	4.3 ± 0.1 nm	6.3 ± 0.2 nm	10 : 1	
SOLVER	4.2 ± 0.5 nm	6.3 ± 1.4 nm	2 : 1	
<i>Triexponentieller Fit</i>	3.9 ± 0.2 nm	5.4 ± 0.2 nm	7.1 ± 0.5 nm	$0.1 : 0.85 : 1$

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Kurvenanpassung durch FAST für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655 eine Abstandsverteilung existiert, deren Maximum etwa im Bereich des zu erwartenden liegt. Der Abstand zwischen Lumi4Tb-Schicht und Quantenpunktzentrum wurde zu etwa 4.3 nm bestimmt. Die Form der Abstandsverteilung konnte auf diese Weise aber nicht befriedigend rekonstruiert werden. Die Kurvenanpassung mittels des SOLVER-Tools ergibt eine der erwarteten Verteilung ähnlichere Form. Das bestimmte Maximum unterscheidet sich aber deutlicher als bei der Bestimmung durch FAST. Beide Kurvenanpassungen liefern bessere Ergebnisse als ein diskreter Kurvenfit mit Hilfe dreier Exponentialfunktionen. Auch für das FRET-Paar Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655 lassen die Ergebnisse den Rückschluß zu, dass alle Emissionsbanden des Terbiiums zum FRET beitragen.

5.5.6 Lumi4Tb und QD705

Wie in den vorherigen Abschnitten 5.1-5.5.5 angemerkt, lässt der große Überschuß an ungebundenen Donormolekülen im Probenvolumen eine Auswertung der Donorlumineszenzabklingkurven nicht zu. Daher erfolgt die Abstandsberechnung an den in Abbildung 5.37 links dargestellten Akzeptorlumineszenzabklingkurven.

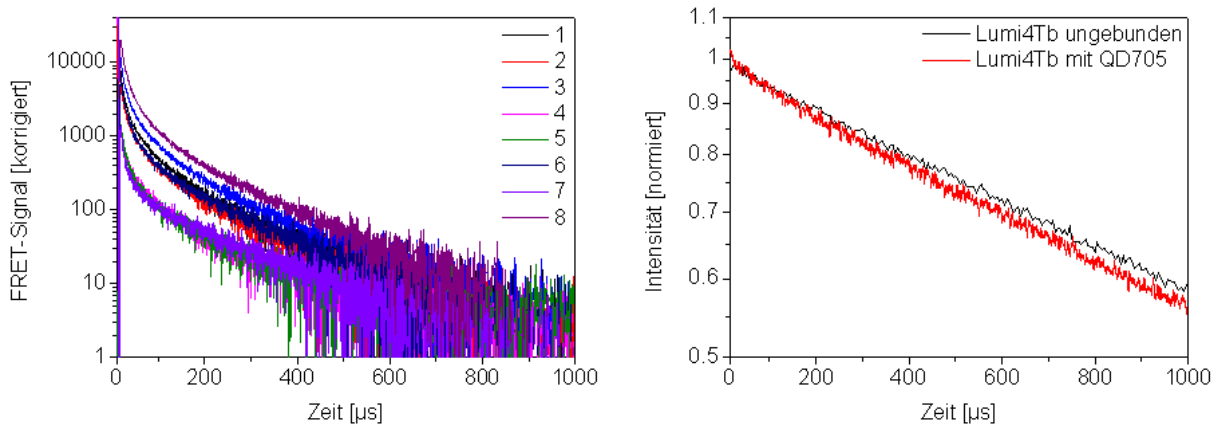


Abbildung 5.37. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay **links:** korrigiertes FRET-Signal der Quantenpunkte QD705 für die acht Messungen **rechts:** gemittelte Lumineszenzabklingkurve des Lumi4Tb-Pep im Vergleich zum ungebundenen Donor, normiert auf Intensität bei $t = 0$.

Da der Quantenpunkt QD705, wie in Abschnitt 5.4.6 dargelegt eine dem Quantenpunkt QD655 sehr ähnliche Gestalt besitzt und auch in seinen FRET-Parametern mit diesem nahezu übereinstimmt (siehe Tabelle 5.3), sollte die sich für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD705 ergebende Abstandsverteilung derjenigen des FRET-Paares Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655 sehr ähnlich sein. Tatsächlich gibt es, wie in Abbildung 5.38 zu erkennen ist, eine gute Übereinstimmung der durch FAST ermittelten FRET-Zeitverteilung für den Quantenpunkt QD705 mit derjenigen des Quantenpunkts QD655 (Abbildung 5.35).

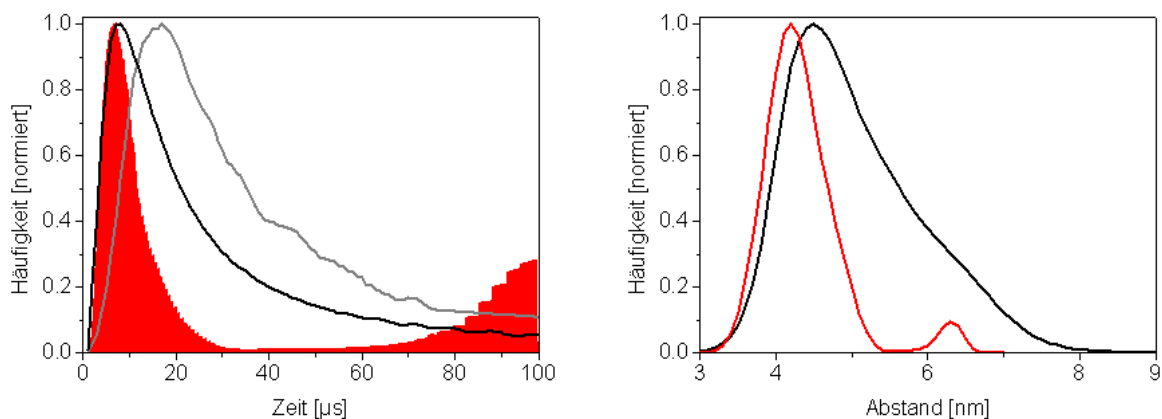


Abbildung 5.38. **links:** mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD705, gemittelt über alle Messungen (rote Kurve) im Vergleich zu den theoretisch erwarteten (schwarz = gesamte Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$, grau = nur elektronische Übergänge der Terbiumemission, $\kappa^2 = 2/3$) **rechts:** aus der FAST-Lebenszeitverteilung resultierende Abstandsverteilung (rot) im Vergleich zur theoretisch erwarteten (schwarz).

Abbildung 5.38 ist weiterhin zu entnehmen, dass die Maxima von ermittelter und erwarteter Lebenszeitverteilung übereinstimmen (ermittelt: 7.0 μs , erwartet: 7.2 μs), die Form der ermittelten Lebenszeitverteilung aber eine wesentlich geringere Breite aufweist und bereits bei einer Lebenszeit von ca. 30 μs ausläuft, während die erwartete Zeitverteilung erst bei Lebenszeiten größer als 100 μs ausklingt. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis für den Quantenpunkt QD655 ist auch hier ein weiteres Lebenszeitverteilungsmaximum bei ~ 110 μs sichtbar, das dem FRET zwischen Lumi4Tb und Quantenpunktenaggregaten zugeordnet wird. Die aus der FRET-Lebenszeitverteilung für das FRET-Paar Lumi4Tb-Pep und QD705 abgeleitete Abstandsverteilung ist in Abbildung 5.38 rechts dargestellt und zeigt zwei Verteilungsmaxima. Das erste und maßgebliche liegt bei 4.2 nm, ein zweites, welches den FRET auf Quantenpunktaggregate darstellt, bei 6.3 nm. Bedingt durch die geringere Lebenszeitverteilungsbreite ist die resultierende Abstandsverteilung im Vergleich zur erwarteten sehr viel schmäler und zeigt keine asymmetrische, sondern eher normalverteilte Form. Im Vergleich zu der mit Hilfe von SOLVER ermittelten Abstandsverteilung (Abbildung 5.39) weist die durch FAST bestimmte Verteilung aber eine größere Ähnlichkeit mit der erwarteten auf.

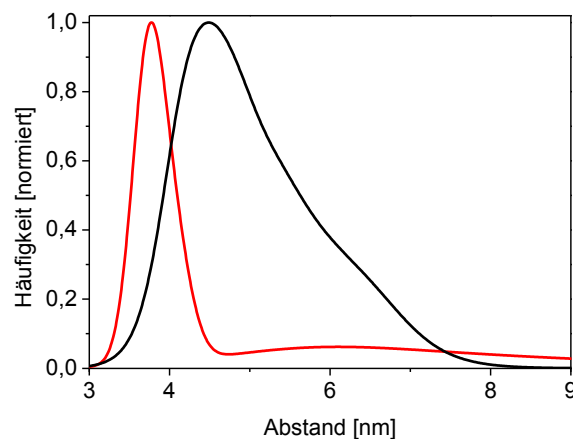


Abbildung 5.39. Mit Hilfe von SOLVER ermittelte Abstandsverteilung (rot) im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD705, gemittelt über alle Messungen im Vergleich mit der erwarteten Verteilung der Abstände innerhalb des FRET-Paares (schwarz) unter Berücksichtigung aller Emissionsbanden des Lumi4Tb und eines Orientierungsfaktors $\kappa^2 = 2/3$.

Das Maximum der durch SOLVER ermittelten Abstandsverteilung weicht durch ihre Form mit einem sehr schmalen, symmetrischen Peak (Maximum 3.8 nm) und einem sehr breiten, flachen Peak (Maximum 6.1 nm) deutlich von der erwarteten Abstandsverteilung ab.

Die Ergebnisse der ermittelten Verteilungen sind in Tabelle 5.8 mit der erwarteten verglichen und einer Kurvenanpassung mit Hilfe eines Fits aus drei Exponentialfunktionen gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass alle Formen der Kurvenanpassung ein weiteres Verteilungsmaximum besitzen, welches sich als FRET zwischen Lumi4Tb-Komplexen und aggregierten Quantenpunkten deuten lässt. Eine Anpassung an die Lumineszenzkurven mit Hilfe von FAST entspricht den Erwartungen am ehesten. Auch ein triexponentieller Fit liefert Abstandswerte, die den Erwartungen relativ nahe kommen, wobei die kürzere

Abstandskomponente den FRET-Abstand zwischen Lumi4Tb-Komplexen und einzelnen Quantenpunkten, die beiden längeren Abstandskomponenten den mittleren Abstand des FRET zwischen Lumi4Tb-Komplexen und Quantenpunkttaggregaten darstellt.

Tabelle 5.8 Vergleich der mit SOLVER und FAST aus der Akzeptorlumineszenz ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD705.

	Maximum Abstandsverteilung 1	Maximum Abstandsverteilung 2	Peak- bzw. Amplitudenverhältnis	
Erwartet	4.5 nm	-	-	
FAST	4.2 ± 0.2 nm	6.3 ± 0.2 nm	25 : 1	
SOLVER	3.9 ± 0.1 nm	6.4 ± 0.2 nm	2 : 1	
<i>Triexponentieller Fit</i>	4.1 ± 0.1 nm	5.5 ± 0.9 nm	7.0 ± 0.6 nm	$0.45 : 0.75 : 1$

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass sich für das FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD705 die Bindungsverhältnisse durch Abstandsverteilungen beschreiben lassen. Die ermittelten Abstandsverteilungen unterscheiden sich aber vor allem in ihrer Form deutlich von der erwarteten. Die erwartete Abstandsverteilung lässt sich aus den Lumineszenzabklingkurven des Akzeptors am ehesten durch einen Lebenszeitverteilungsfitt rekonstruieren, wohingegen ein Abstandsverteilungsfitt unbefriedigende Ergebnisse liefert, die deutlicher von den Erwartungen abweichen, als dies eine Kurvenanpassung mit Hilfe dreier diskrete Exponentialfunktionen, wie sie üblicherweise eingesetzt wird, tut. Die relativ gute Übereinstimmung der ermittelten mit dem erwarteten Verteilungmaximum lässt den Schluß zu, dass die bei der Berechnung berücksichtigte Annahme einer Beteiligung aller Emissionsbanden des Terbiumkomplexes am Energietransfer zutreffend ist.

5.5.7 Schlußfolgerungen

Es wurden die in Abschnitt 5.4 aus den photophysikalischen Eigenschaften, den FRET-Parametern und der Gestalt der Quantenpunkte erwarteten FRET-Lebenszeiten für die FRET-Paarungen von Lumi4Tb-Pep mit den Quantenpunkten ITK-QD525, ITK-QD565, ITK-QD605, ITK-QD655 und ITK-QD705 untersucht und die experimentell ermittelten Lumineszenzabklingkurven jedes FRET-Systems über eine Lebenszeitverteilung (FAST) bzw. eine Abstandsverteilung (SOLVER) angepasst. Als Vergleich wurde zusätzlich ein diskreter Fit mit zwei (QD525 und QD565) bzw. drei (QD605, QD655 und QD705) Exponentialfunktionen durchgeführt.

Die Ergebnisse der FRET-Paare zeigen, dass alle Emissionsbanden des Terbiumkomplexes am Resonanzenergietransfer auf die Quantenpunkte beteiligt sind und weiterhin ein konstanter Orientierungsfaktor von $k^2 = 2/3$ die Orientierung der Lage der Absorptionsdipolübergangsmomente des Akzeptors und der Emissionsdipolübergangsmomente des Donors sehr gut beschreibt. Für die in Kapitel 5.6 folgenden Berechnungen für das spezifische FRET-Bindungsassay Lumi4Tb-Strep-Biot-QD werden daher nur noch Verteilungen, die unter Verwendung dieser Eigenschaften berechnet wurden, berücksichtigt. Im Gegensatz zur Anpassung einer Abstandsverteilung oder eines diskreten bi- bzw. triexponentiellen Fits an die FRET-induzierten Lumineszenzabklingkurven ergab bei allen FRET-Paaren die Anpassung einer Lebenszeitverteilung zuverlässig die Abstandsverteilungen, die die größte Übereinstimmung mit den in Abschnitt 5.4 dargestellten Erwartungen zeigten. Während die Maxima der aus den Lebenszeitverteilungen bestimmten Abstandsverteilungen die Maxima der erwarteten Abstandsverteilungen wiedergaben, unterschied sich die Form der ermittelten Verteilungen deutlich von den Erwartungen. Insbesondere die bei den Quantenpunkten QD605, QD655 und QD705 durch die ellipsoidale Form erwarteten längeren Lebenszeitanteile konnten durch die Kurvenanpassungen nicht rekonstruiert werden. Sowohl die ermittelten Lebenszeit- als auch die daraus berechneten Abstandsverteilungen waren symmetrischer als erwartet.

Dies kann im mathematischen Modell begründet liegen, mit dem gearbeitet wurde. Die Anwendung der Singulärwertzerlegung (siehe Abschnitt 4.2.3) mit Hilfe derer aus den Lumineszenzabklingkurven eine Lebenszeitverteilung rekonstruiert wurde, passt diese Verteilung mathematisch möglichst optimal an, was aber nicht den tatsächlichen Gegebenheiten entsprechen muß. Unter Umständen wird die Lebenszeitverteilung mathematisch besser durch einen schmalen, kurzlebigen Anteil und einen breiteren langlebigen Anteil beschrieben als durch eine einzige Lebenszeitverteilung mit langsam auslaufender rechter Flanke. Die Abweichungen der Form der ermittelten von der erwarteten Verteilung sind dann allein durch die Anpassung verursacht.

Eine weitere Erklärung für die Abweichung ist, dass die Annahme einer ellipsoidalen Form der Quantenpunkte die tatsächlichen Verhältnisse nicht widerspiegelt. Betrachtet man sich Übersichtsaufnahmen mehrerer Quantenpunkte einer Emissionswellenlänge (Abbildung 5.40) ist zu erkennen, dass neben den ellipsoidalen tatsächlich weitere Formen existieren. Selbst bei identischer Gestalt der Quantenpunkte, beispielsweise als Ellipsoid, sind Unterscheidungen bezüglich der Ausrichtung des Kristallgitters sichtbar, die die absorptiven Eigenschaften, insbesondere die Lage des Absorptions-Übergangsdipolmoments bestimmen (lineares Übergangsdipolmoment ist entlang der z-Achse des Kristallgitters orientiert, planares senkrecht dazu).

Dies ist eine Folge der Synthesebedingungen, die sich nicht für jede Quantenpunkt exakt einstellen lassen. Durch lokale Unterschiede in der Kristallisationsumgebung wird das Wachstum der Quantenpunktgitterstruktur beeinflusst. Neben der bevorzugten Wachstumsrichtung in z-Richtung des Kristallgitters [174-176] sind dann weitere Richtungen des Gitterwachstums möglich [175-177]. Es kommt zu einer Vielzahl verschiedener Formen der Nanokristalle, wie in Abbildung 5.40 zu erkennen.

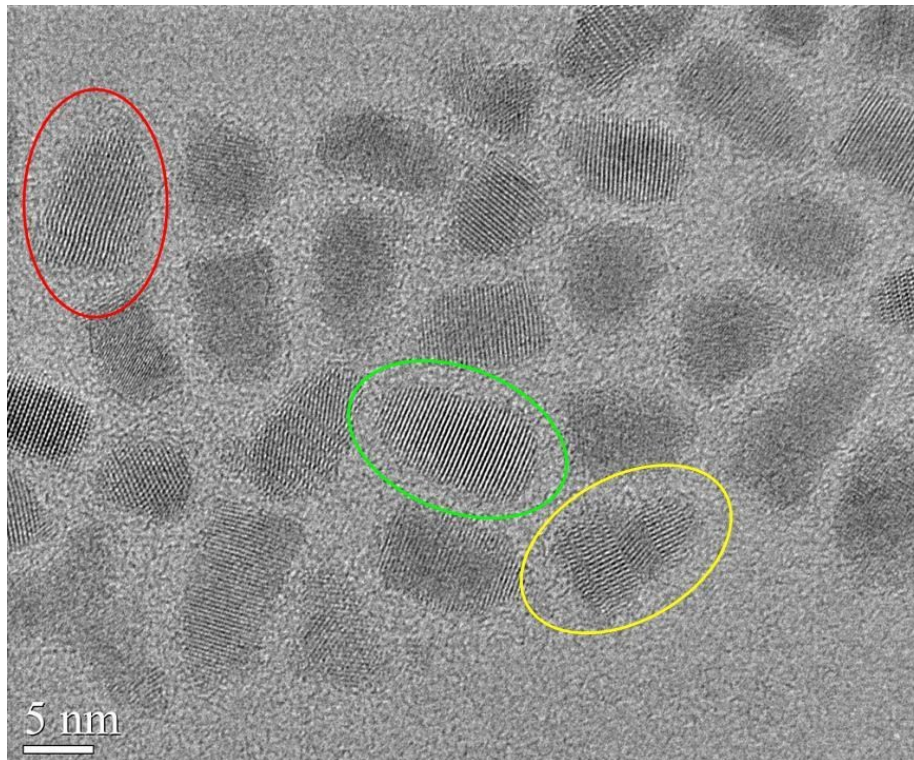


Abbildung 5.40. TEM-Übersichtsaufnahme von Quantenpunkten QD705. Neben ellipsoidalen Quantenpunkten treten auch kegliche, quaderförmige oder runde Formen auf. Die Striche innerhalb der Quantenpunktstrukturen stellen jeweils eine Gitterschicht in x-y-Richtung des CdSeTe-Kristallgitters dar. Die bevorzugte Wachstumsrichtung der Kristallgitter aller Quantenpunkte ist die z-Richtung. Den idealen Quantenpunkt stellt daher ein in z-Richtung elongierter Ellipsoid dar (grüner Kreis). Da allerdings aufgrund unterschiedlicher Kristallisationsumgebung auch andere als die bevorzugte Wachstumsrichtung existieren, gibt es eine Vielzahl weiterer Quantenpunkte, die sich, obgleich ellipsoidal, in der Gitterlage unterscheiden (in x-Richtung elongierter Nanokristall [rot umrandet], ellipsoidaler Quantenpunkt mit mehreren Wachstumsrichtungen [gelb umrandet]).

Bildet man ein Gestaltsmittel all dieser verschiedenen Formen und Ausrichtungen des Kristallgitters innerhalb der Quantenpunkte einer Emissionswellenlänge entspricht die mittlere Form der Nanokristalle innerhalb des Probenvolumens einer Sphäre (Abbildung 5.41). Selbst bei ellipsoidalen Quantenpunkten wie den QD605, QD655 und QD705 ist es daher realistischer, von einer sphärischen Gestalt auszugehen. Durch die Vielzahl der mit der Lage der Gitter innerhalb der Quantenpunkte verbundenen Ausrichtungen der Absorptions-Übergangsdipolmomente ist im Mittel der Quantenpunktgesamtheit die Annahme einer isotropen Verteilung nahe liegend. Der Orientierungsfaktor κ^2 beträgt daher $2/3$.

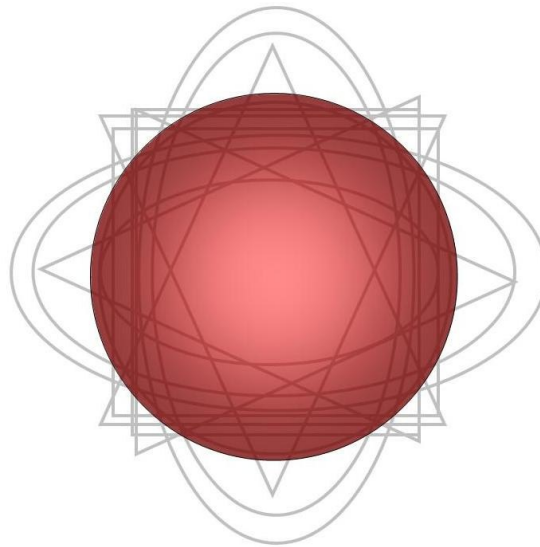


Abbildung 5.41. Modellhafte Darstellung der mittleren Form einer Quantenpunktpopulation. Die Überlagerung der Vielzahl verschiedener Quantenpunktformen (graue Linien) ergibt eine mittlere Form für die Gesamtheit der Quantenpunkte im Probenvolumen (roter Kreis), die einer Kugel nahe kommt. Der Radius der Kugel ist dabei etwas größer als die kurze Halbachse (x - und y -Richtung des Kristallgitters) aber deutlich kürzer als die lange Halbachse (z -Richtung des Kristallgitters) des idealen ellipsoidalen Quantenpunkts.

Abbildung 5.42 stellt die Lebenszeitverteilungen, die sich aufgrund dieser Annahme für die Quantenpunkte QD605, QD655 und QD705 ergeben den in Abschnitt 5.4 erwarteten gegenüber und vergleicht sie mit den aus den FRET-induzierten Lumineszenzabklingkurven ermittelten für jeden Quantenpunkt. Für den mittleren Sphärenradius r wird in Analogie zur normalen Größenverteilung der Quantenpunkte von einer Halbwertbreite $FWHM$ ausgegangen. Der Sphärenradius r und die $FWHM$ wurden intuitiv ermittelt und sollen lediglich einen ungefähren Hinweis auf den Einfluss der Gestalt der Quantenpunkte hinsichtlich der Form der Lebenszeitverteilung liefern.

Es wird deutlich, dass die Annahme einer kugelförmigen Gestalt der Quantenpunktgesamtheit dazu führt, dass die Lebenszeitverteilung schmaler wird, was insbesondere einer deutlichen Abnahme längerer Lebenszeiten geschuldet ist. Insgesamt steigt die Übereinstimmung zwischen den erwarteten und den ermittelten Lebenszeitverteilungen, zum Teil deutlich (QD705).

Um diese Überlegungen zu prüfen, werden im folgenden Abschnitt 5.6 für FRET von Lumi4Tb auf Quantenpunkte im Biotin-Streptavidin-Bindungssystem neben den Lebenszeitverteilungen für ellipsoidale Quantenpunkte daher auch die Lebenszeitverteilungen, die bei angenommener sphärischer Gestalt der Quantenpunkte QD605, QD655 und QD705 zu erwarten sind, dargestellt und mit den ermittelten verglichen.

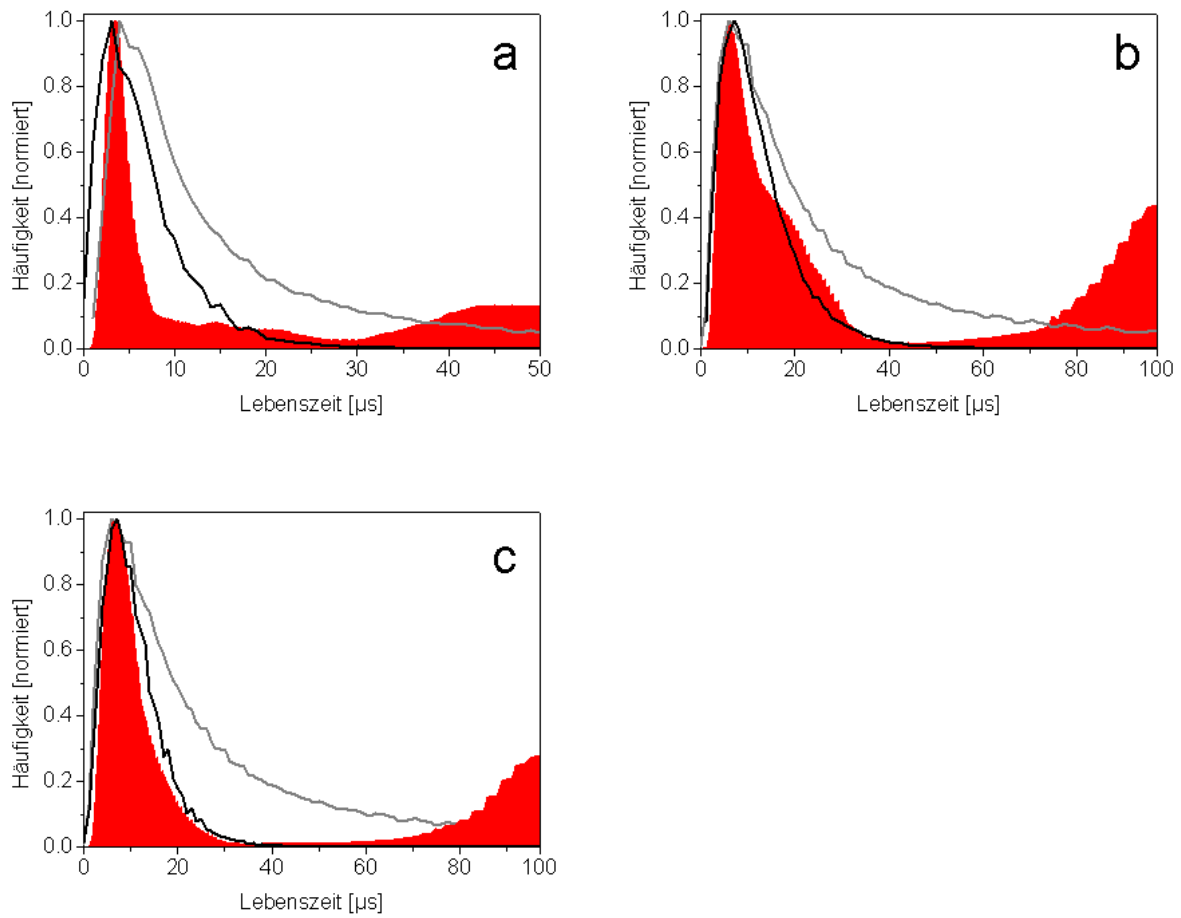


Abbildung 5.42. Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilungen (rot) mit den erwarteten Lebenszeitverteilungen für ellipsoidale Quantenpunkte (grau) und sphärische Quantenpunkte (schwarz). **a)** Lumi4Tb-Pep-ITK-QD605 (schwarz = Kugel mit mittlerem Kugeldurchmesser $r = 3.3$ nm, FWHM = 0.4 nm) **b)** Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655 (schwarz = Kugel mit mittlerem Kugeldurchmesser $r = 4.5$ nm, FWHM = 0.4 nm) **c)** Lumi4Tb-Pep-ITK-QD705 (schwarz = Kugel mit mittlerem Kugeldurchmesser $r = 4.4$ nm, FWHM = 0.4 nm).

5.6 Erwartete Abstandsverteilungen für Lumi4Tb-Strep-Biot-QD und resultierende Lebenszeitverteilungen

Analog zu den im Abschnitt 5.4 dargestellten Betrachtungen für die Abstände von Lumi4Tb und Quantenpunkten im Zink-Histidin-Assay sollen im Folgenden die erwarteten Bindungsverhältnisse für die Biotin-Streptavidin-Assays der einzelnen Quantenpunkte erläutert und die zu erwartenden Bindungsverhältnisse abgeleitet werden.

5.6.1 Allgemeines

Kommt es zu einer Bindung von Lumi4Tb-Streptavidin-Molekülen und biotinylierten Quantenpunkten bildet sich innerhalb kurzer Zeit eine äußerst stabile Biotin-Streptavidin-Bindung aus, die im Rahmen der experimentellen Bedingungen dieser Arbeit als irreversibel angesehen werden kann. Unterhalb eines Verhältnisses von 6 Lumi4Tb-Streptavidin-Komplexen pro Quantenpunkt verteilen sich diese statistisch auf der Oberfläche des Quantenpunktes. Ab einem Verhältnis von 6 zu 1 kann von einer Besetzung aller möglichen Bindungsstellen (Biotin-Moleküle) am Quantenpunkt ausgegangen werden. Die Biotin-Streptavidin-Bindung ist zwar äußerst stark, jedoch kann das Biotin innerhalb seiner Bindungstasche im Streptavidin rotieren [157], sofern es sterisch nicht gehindert ist. Im Falle der Bindung eines biotinylierten Quantenpunktes jedoch, der räumlich sehr ausgedehnt ist, kann von einer vollständigen Hinderung dieser Rotation ausgegangen werden, die daher keinen Einfluss auf eine Abstandsverteilung hat. Die Verteilung der Lumi4Tb-Komplexe innerhalb des Streptavidins hingegen ist bei der theoretischen Betrachtung möglicher Abstandsverteilungen unbedingt zu berücksichtigen, da bedingt durch die Größe des Streptavidins (4.5 nm x 5 nm x 5 nm) hier große Unterschiede auftreten können.

Eine Bindung der Lumi4Tb-Komplexe an das Streptavidin-Molekül erfolgt immer über die freien Amino-Gruppen der Aminosäure Lysin, die je dreimal pro Monomer in der Proteinsequenz des Streptavidins auftaucht (siehe Abbildung 5.43). Die räumliche Anordnung der Lumi4Tb-Bindungsstellen im Streptavidin in Bezug auf die Quantenpunktoberfläche lässt zwei Abstandsverteilungen erkennen. Obgleich die tatsächlichen Bindungsverhältnisse damit nicht hundertprozentig wiedergegeben werden, lässt sich die Verteilung der freien Aminogruppe der Lysine in guter Näherung folgendermaßen beschreiben: Eine Hälfte der zwölf freien Aminogruppen der Lysine ist normalverteilt um einen Abstand von etwa 0.5 ± 0.3 nm zur Quantenpunktoberfläche, die andere Hälfte befindet sich, ebenfalls normalverteilt, in einem Abstand von etwa 3.5 ± 0.3 nm zur Oberfläche des Nanokristalls.

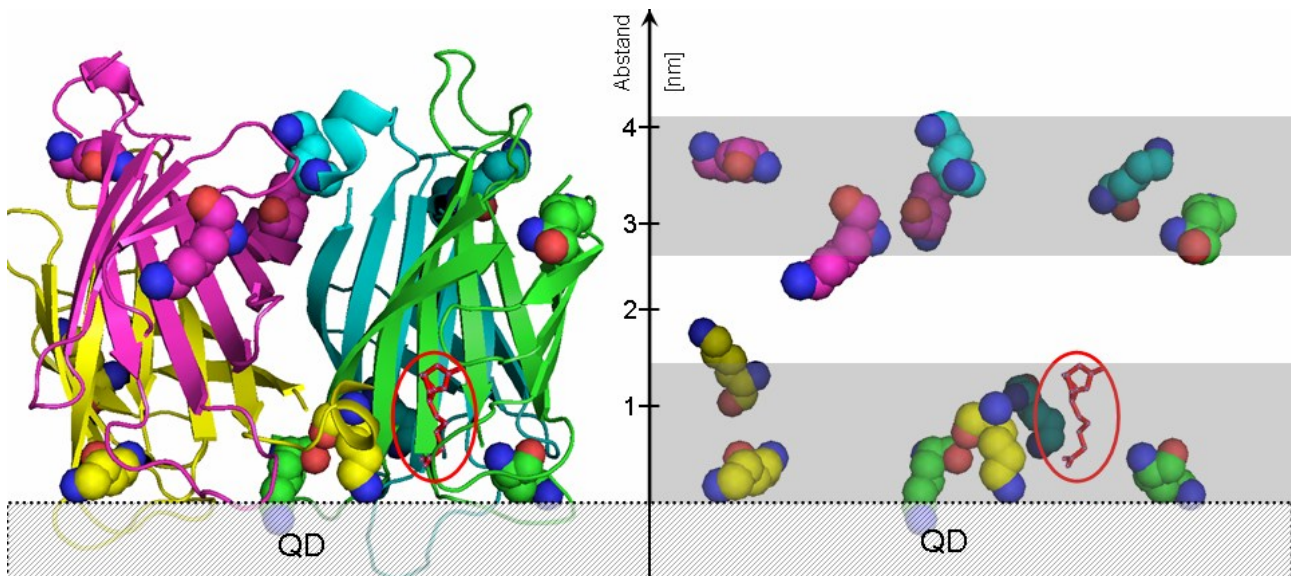


Abbildung 5.43. Darstellung der Bindungsstellen des Lumi4Tb-Komplexes im Streptavidin und Abstand zur Quantenpunktoberfläche. **Links:** Ansicht des Streptavidin-Moleküls gebunden an ein Biotin an der QD-Oberfläche (roter Kreis) und den zwölf Lysin-Einheiten, an die die Bindung des Lumi4Tb-Komplexes erfolgt (Kalotten) **rechts:** zur besseren Übersicht Kalottendarstellung der zwölf Lysin-Einheiten ohne Streptavidin-Gerüst, räumliche Anordnung wie links. Es sind zwei Abstandsverteilungen erkennbar, eine an der Quantenpunktoberfläche und eine in größerer Entfernung dazu (jeweils hellgrau markiert).

Die hier verwendeten kommerziell erhältlichen Kern-Schale-Quantenpunkte sind mit einer Polymerhülle versehen, an der die Biotin-Moleküle direkt gebunden sind. Diese Hülle besteht aus Polyethylenglykol-Molekülen (PEG-Spacer) mit einer Länge von etwa fünf Nanometern (**Quelle: Invitrogen**). PEG-Spacer haben den Vorteil, dass sie in definierter Länge produziert werden können sowie wasserlöslich und biologisch sehr verträglich sind. Ihr Nachteil bei der Bestimmung der intramolekularen Abstände ist ihre Flexibilität. Obgleich einige Quellen von einer größtenteils rigiden Gestalt der PEG-Moleküle ausgehen [158,159], konnte in der Mehrzahl der Untersuchungen eine Knäuelbildung der PEG-Spacer beobachtet werden [160-162]. Das Ausmaß der Knäuelbildung ist dabei von der Konzentration der PEG-Moleküle auf der Oberfläche der Nanopartikel abhängig [161]. Da die Polymerhülle der biotinylierten Quantenpunkte von Invitrogen aus dicht gepackten PEG-Spacern besteht, sollte die Dicke der Hülle nur wenig kleiner sein, als die Länge der Spacer vermuten läßt. Für die Bestimmung der erwarteten Abstands- und Lebenszeitverteilungen wird aber von einer Hülle aus starren Polymeren mit einer Länge von 5 nm ausgegangen, da das tatsächliche Ausmaß der Längenreduktion durch die Variabilität der PEG-Ketten für die verwendeten Quantenpunkte nicht bekannt ist.

Aufgrund der Übereinstimmung in Form und Eigenschaften soll im Folgenden für jeden Quantenpunkt dazu nur noch ein kurzer Überblick gegeben werden. Zur ausführlichen Darstellung sei auf Abschnitt 5.4 verwiesen.

5.6.2 Lumi4Tb-Strep und Biot-QD525

Die Analyse der Aufnahmen, die mittels TEM gemacht wurden, zeigt einen durchschnittlichen Radius des Quantenpunkts von 2.0 ± 0.2 nm (Angabe Invitrogen: 1.5-2 nm). Da die Polymerhülle der Quantenpunkte auf TEM-Bildern funktionsbedingt nicht ohne weiteres zu erkennen ist, muss deren Größe dazu gerechnet werden. Bei einem angenommenen mittleren Fehler der Ausdehnung der Polymerschale von 10% und ohne Berücksichtigung einer durch die Flexibilität der PEG-Spacer verursachten Verringerung der Hüllendicke (siehe vorheriger Abschnitt) besitzt der Biot-QD525 Quantenpunkt einen tatsächlichen Radius von etwa 7.0 ± 0.7 nm.

Ausgehend von den Betrachtungen des vorhergehenden Kapitels erhält man für den Abstand der Lumi4Tb-Komplex-Donoren vom Zentrum des Quantenpunktakzeptors zwei normalverteilte Abstände mit den Maxima 7.5 ± 1.0 nm bzw. 10.5 ± 1.0 nm.

Abbildung 5.44 zeigt die Abstandsverteilung als Summe dieser zwei Normalverteilungen für das System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525.

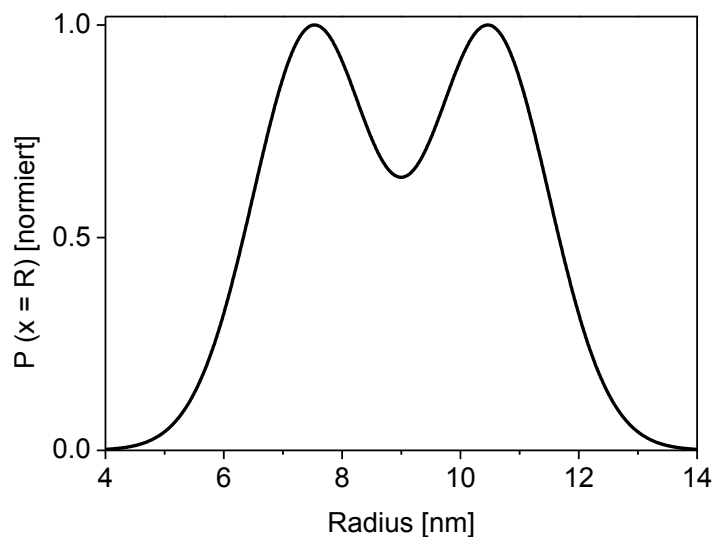


Abbildung 5.44. Erwartete Abstandsverteilung zwischen Donor und Akzeptor für das FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525.

Aus der Abstandsverteilung ergibt sich die in Abbildung 5.45 dargestellte Lebenszeitverteilung, deren Basis sehr breit ist und die bei Lebenszeiten um $2600 \mu\text{s}$ ein schmalbandiges Maximum besitzt.

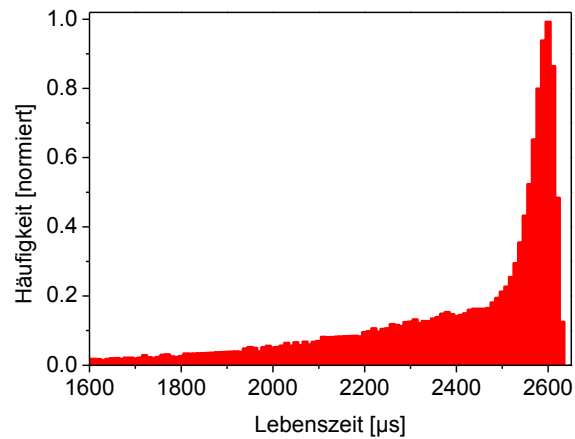


Abbildung 5.45. Erwartete Lebenszeitverteilungen für das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525.

5.6.3 Lumi4Tb-Strep und Biot-QD565

Der Quantenpunkt mit der Emissionswellenlänge $\lambda = 565$ nm zeigt eine leichte Elongation in z-Richtung (siehe Abbildung 4.12). Die daraus resultierenden Besetzungsunterschiede der einzelnen Quantenpunktsegmente durch die nach außen hin abnehmende Größe kann vernachlässigt werden, so dass der Quantenpunkt näherungsweise als kugelförmig angesehen werden kann (siehe Abschnitt 5.4.3). Der Durchmesser des Nanokristalls wird vom Hersteller mit 4.6 nm angegeben (mittlere Größe aus TEM-Bildern: 5.1 ± 0.3 nm). Der Gesamtradius des Quantenpunktes mit Polymerhülle beträgt etwa 7.3 ± 0.7 nm. Es ergeben sich für den Biot-QD565 zwei Abstandsverteilungen mit den Maxima 7.8 ± 1.0 nm und 10.8 ± 1.0 nm (Abbildung 5.46).

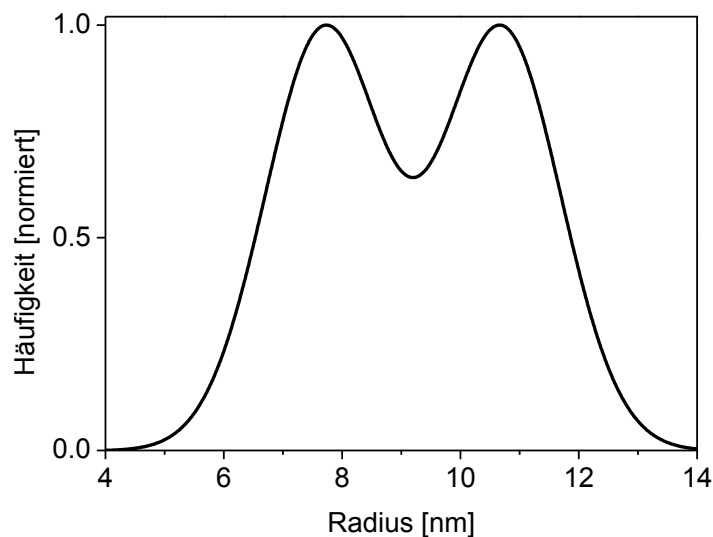


Abbildung 5.46. Erwartete Abstandsverteilung zwischen Donor und Akzeptor für das FRET-System Lumi4Tb-Strep-

Biot-QD565.

Die Abstandsverteilung lässt sich in eine Lebenszeitverteilung überführen, die, mit der Annahme der Beteiligung aller Emissionsbanden des Terbioms am FRET und eines Orientierungsfaktors $\kappa^2 = 2/3$, die in Abbildung 5.47 dargestellte Form hat.

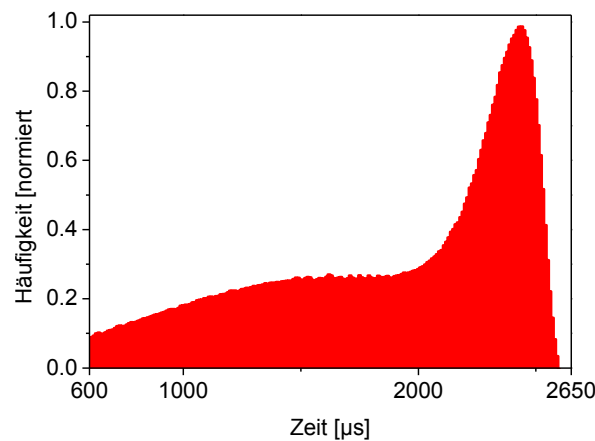


Abbildung 5.47. Erwartete Lebenszeitverteilung für das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD565.

Im Gegensatz zur Lebenszeitverteilung des FRET-Paares Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525 sorgt der wesentlich größere Förster-Radius hier für effizienteren FRET, so dass kürzere Lebenszeiten einen höheren Anteil an der Gesamtverteilung besitzen. Neben einem relativ schmalen, gut ausgeprägtem Maximum bei 2450 μs , ist ein breites, wenig ausgeprägter Anteil kürzerer Lebenszeiten mit einem Maximum bei etwa 1500 μs zu erkennen.

5.6.4 Lumi4Tb-Strep und Biot-QD605

Der Quantenpunkt ITK-QD605 ist stark ellipsoidal (Exzentrizitätsfaktor 0.845) mit einer kurzen Achse von 2 nm und einer langen Achse von 4.7 nm (Angaben Invitrogen, Bestimmung aus TEM-Aufnahmen: kurze Achse 2.2 ± 0.2 nm; lange Achse 5.0 ± 0.7 nm). Eine Darstellung des Quantenpunkts ist in Abbildung 5.15 zu finden.

Nimmt man eine ellipsoide Form als Ideal der Quantenpunktgesamtheit an, kommt es, wie in Kapitel 5.4.4 dargestellt, zu einer Abstandsverteilung, die nicht nur von der Größennormalverteilung innerhalb der Quantenpunktpopulation abhängig ist, sondern vom Ort der Bindung des Lumi4Tb-gelabelten Biomoleküls an der Oberfläche des Nanokristalls. Die resultierenden Abstände sind nicht normalverteilt, sondern lassen sich am besten mit einem asymmetrischen Doppelsigmoidal-Fit (ADS, siehe Kapitel 4.2.4) beschreiben. Unter Berücksichtigung der Polymerhülle ergibt sich die in Abbildung 5.48 links dargestellte asymmetrische Abstandsverteilung als Summe der Verteilungen mit den Maxima 8.5 nm und 11.5 nm.

Eine mittlere sphärische Form (siehe Abschnitt 5.5.6) der Quantenpunktgesamtheit hat, unter Berücksichtigung der in Abbildung 5.42 bestimmten Größenverteilung dieser mittleren Quantenpunktform, die in Abbildung 5.48 rechts dargestellten normalverteilten Abstände zwischen Lumi4Tb-Strep und dem Quantenpunktzentrum mit den Verteilungsmaxima 7.7 nm und 10.7 nm zur Folge.

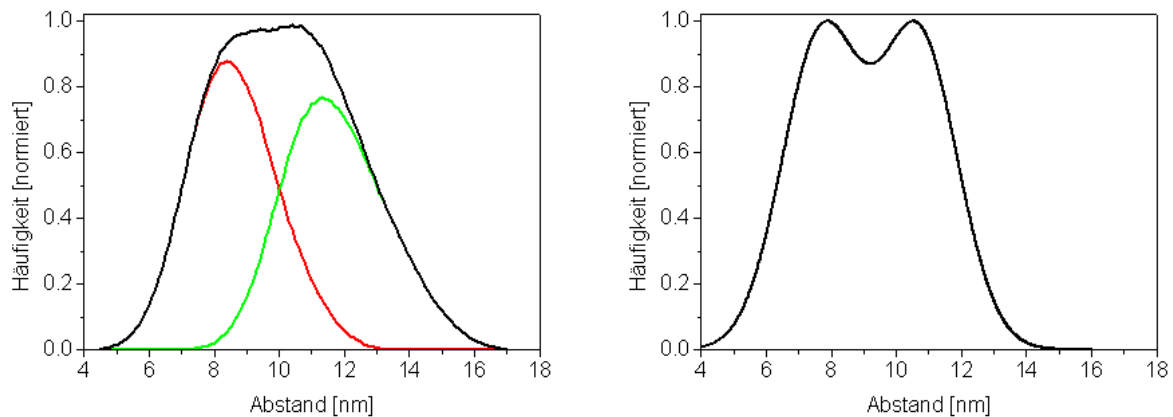


Abbildung 5.48. Erwartete Abstandsverteilungen zwischen Donor und Akzeptor für das FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD605. **links:** Dargestellt sind die aus der ellipsoidalen Form resultierenden, nicht normalverteilten Abstände für die oberflächennahe Lumi4Tb-Strep-Schicht (rot), die oberflächenferne Lumi4Tb-Strep-Schicht (grün) sowie deren Summe (schwarz), **rechts:** Dargestellt sind die aus einer mittleren sphärischen Form resultierenden, normalverteilten Abstände.

Für den Biot-QD605 ergeben sich in Abhängigkeit von den beiden Abstandsverteilungen die Lebenszeitverteilungen, die in Abbildung 5.49 dargestellt sind.

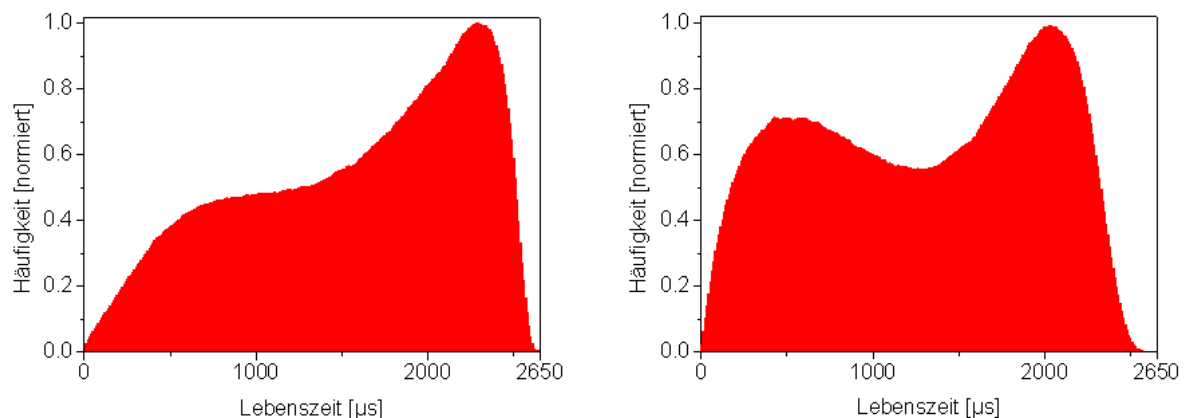


Abbildung 5.49. Erwartete Lebenszeitverteilungen für das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD605 in Abhängigkeit von der Abstandsverteilung im FRET-Paar, die Normierung erfolgt auf die wahrscheinlichste Lebenszeit. **links:** ellipsoidale Form der Quantenpunktgesamtheit; **rechts:** mittlere sphärische Form der Quantenpunktgesamtheit.

Wie in Abbildung 5.49 sichtbar wird, hat die Gestalt der Quantenpunkte einen erheblichen Einfluss auf die erwartete Lebenszeitverteilung. Während bei der Annahme einer ellipsoidalen Gestalt die Lebenszeitverteilung zwei Maxima bei etwa 800 μs und 2300 μs zeigt, bei der das kurze Lebenszeitmaximum kaum ausgeprägt ist, das längere Lebenszeitmaximum hingegen wesentlich deutlicher und ebenfalls einen größeren Anteil an der Gesamtverteilung besitzt, zeigt die Lebenszeitverteilung für den Fall mittlerer sphärischer Form der Quantenpunktgesamtheit eine deutliche Verschiebung in Richtung kürzerer Lebenszeiten. Die beiden Maxima liegen bei etwa 550 μs bzw. 2050 μs , der Anteil kurzlebiger Komponenten ist hier wesentlich größer, der Peak stärker akzentuiert.

5.6.5 Lumi4Tb-Strep und Biot-QD655

Der Quantenpunkt QD655 weist eine ellipsoidale Form (siehe TEM-Aufnahme Abbildung 5.18) mit einer kurzen Halbachse von 3 nm und einer langen Halbachse von 6 nm (Angaben Invitrogen, Bestimmung aus TEM-Aufnahmen: kurze Halbachse 3 ± 0.2 nm; lange Halbachse 6.4 ± 0.7 nm) auf. Mit Polymerhülle liegt der Gesamtradius des Nanokristalls bei $8 \text{ nm} \pm 0.7$ nm (kurze Halbachse) bzw. $11.4 \text{ nm} \pm 1.2$ nm (lange Halbachse).

Analog zu den Betrachtungen für den Quantenpunkt Biot-QD605 ergeben sich aus Gestalt und Größe zwei Abstandsverteilungen (siehe Abbildung 5.50), eine asymmetrische mit den Verteilungsmaxima 9.5 nm und 12.9 nm und eine aus zwei Normalverteilungen bestehende, deren Maxima bei 8.9 nm und 11.9 nm zu finden sind.

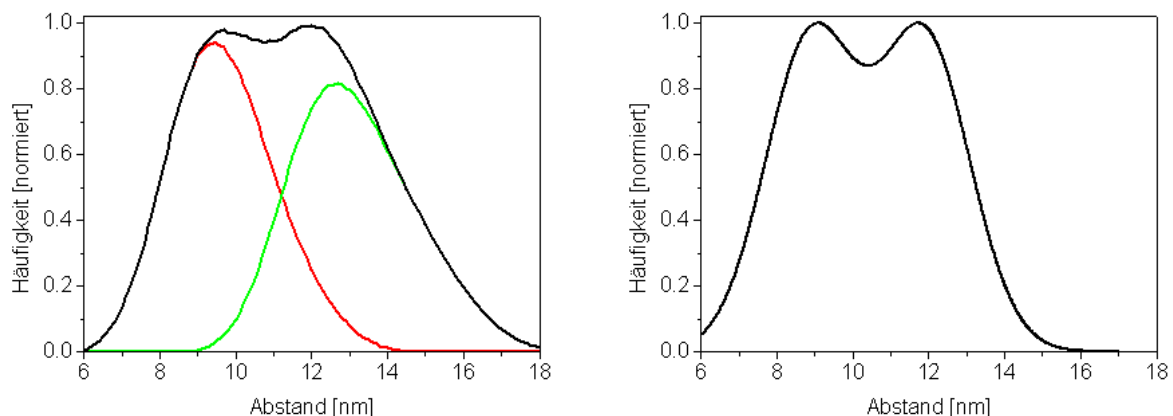


Abbildung 5.50. Erwartete Abstandsverteilungen zwischen Donor und Akzeptor für das FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655. **links:** Dargestellt sind die aus der ellipsoidalen Form resultierenden, nicht normalverteilten Abstände für die oberflächennahe Lumi4Tb-Strep-Schicht (rot), die oberflächenferne Lumi4Tb-Strep-Schicht (grün) sowie deren Summe (schwarz), **rechts:** Dargestellt sind die aus einer mittleren sphärischen Form resultierenden, normalverteilten Abstände.

Die Abstandsverteilung ergibt, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Annahmen hinsichtlich der Form und Gestalt der Quantenpunktgesamtheit, die in Abbildung 5.50 dargestellten Lebenszeitverteilungen.

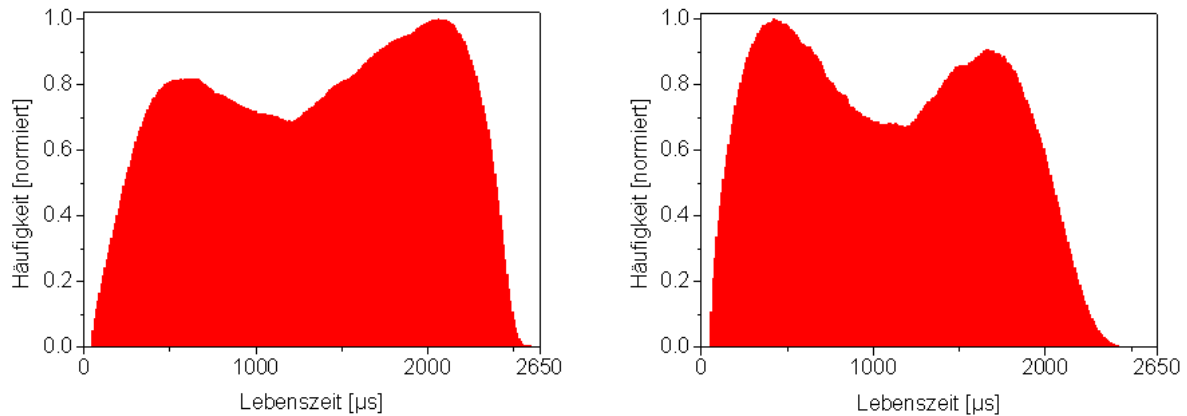


Abbildung 5.51. Erwartete Lebenszeitverteilungen für das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655 in Abhängigkeit von der Abstandsverteilung im FRET-Paar, die Normierung erfolgt auf die wahrscheinlichste Lebenszeit. **links:** ellipsoidale Idealform der Quantenpunktgesamtheit; **rechts:** mittlere sphärische Form der Quantenpunktgesamtheit.

Auch hier führt die Annahme sphärischer Gestalt im Vergleich zur ellipsoidalen Idealform zu einer Verschiebung der Lebenszeitverteilungen in Richtung kürzerer Lebenszeiten (erstes Maximum $\sim 430 \mu\text{s}$ statt $\sim 570 \mu\text{s}$, zweites Maximum $\sim 1680 \mu\text{s}$ statt $\sim 2070 \mu\text{s}$) und zu einer stärkeren Ausprägung des Anteils der kurzen Lebenszeiten, die, gemessen an der Gesamtverteilung im Falle sphärischer Form überwiegen, während bei ellipsoidaler Form das Maximum bei längeren Lebenszeiten anteilig stärker ist.

5.6.6 Lumi4Tb-Strep und Biot-QD705

Als einziger der verwendeten Quantenpunkte besitzt der Biot-QD705 einen Halbleiterkern aus CdSeTe (Cadmium-Selentellurid). Durch dessen Verwendung kommt es, trotz der mit dem Biot-QD655 identischen Form und Größe (siehe Abbildung 5.21), zu einer Veränderung der optischen Eigenschaften, sowohl der Absorption als auch der Emission, die im Vergleich rotverschoben sind. Die kurze Halbachse des QD705 hat laut Hersteller (Invitrogen) eine Länge von 3 nm, die lange Halbachse von 6 nm (Maße laut TEM-Aufnahmen: kurze Halbachse $3.2 \pm 0.3 \text{ nm}$; lange Halbachse $6.5 \pm 0.8 \text{ nm}$).

Da in Form und Gestalt dem Quantenpunkt QD655 sehr ähnlich, sind die resultierenden Abstandsverteilungen für die Annahme ellipsoidaler Idealform sowie mittlerer sphärischer Form der Quantenpunktgesamtheit gleich, ebenso wie die daraus resultierenden Lebenszeitverteilungen. Daher sei an dieser Stelle auf die entsprechenden Abbildungen (Abbildung 5.50 Abstandsverteilung, Abbildung 5.51 Lebenszeitverteilung) des vorherigen Abschnitts 5.6.5 verwiesen.

5.7 Das FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD im Experiment

Alle FRET-Untersuchungen wurden am Nanoscan LF 500 bei einer Anregungswellenlänge von 337.1 nm durchgeführt, da das Absorptionsmaxima des Lumi4Tb-Komplexes bei etwa 340 nm liegt. Die Inkubationszeit der Assays betrug stets eine Stunde bei Raumtemperatur, was aufgrund der großen Bindungskonstante ausreichend war um zu konstanten Bindungsverhältnissen innerhalb der Proben zu gelangen. Die Detektion der Lumineszenzsignale erfolgte gleichzeitig für Donor und Akzeptor in unterschiedlichen Detektionskanälen mit einem Bandpass-Filtersatz von Semrock (Strahlengang innerhalb des Geräts siehe Abbildung 3.1), wobei je nach Akzeptor verschiedene Filter verwendet wurden (siehe Anhang A.3). Der Bandpass-Filter zur Detektion der Donor-Lumineszenz war stets derselbe ($\lambda_{\text{zentral}} = 490$ nm, $FWHM = 10$ nm).

Die Auswertung der Lebenszeitverteilungen erfolgte an den korrigierten Lumineszenzabklingkurven. Dazu wurden die gemessenen Donor- und Akzeptorsignale mittels der in Anhang A.4 erläuterten Methode von Störsignalen befreit.

5.7.1 Lumi4Tb und QD525

Die Proben wurden entsprechend der im Anhang A2. zu findenden Beschreibung präpariert und anschließend wie in Kapitel 3.3.2 dargestellt am Fluoreszenz-Reader vermessen. Abbildung 5.52 stellt die korrigierten Lumineszenzabklingkurven von Akzeptor und Donor dar.

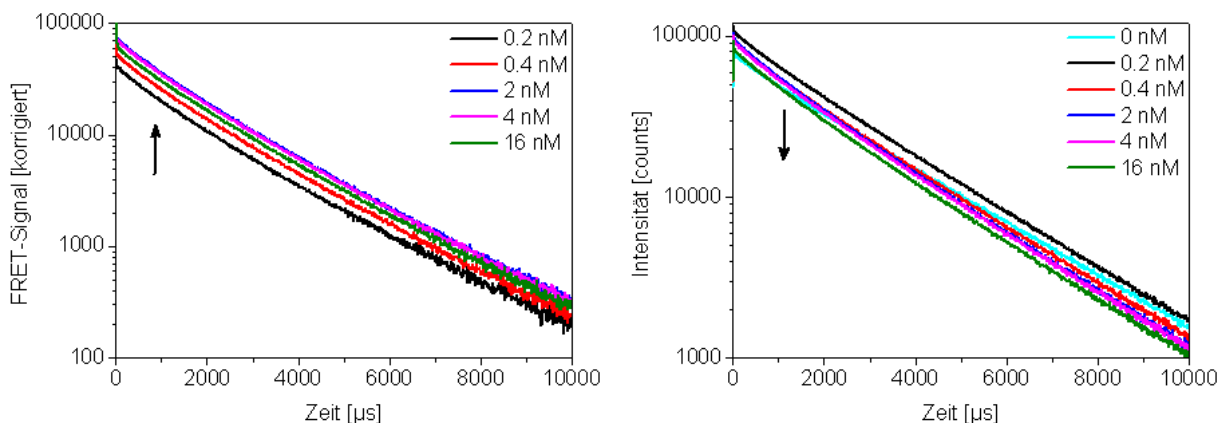


Abbildung 5.52. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay in Abhängigkeit von der Quantenpunktkonzentration **links:** FRET-Signal der biotinylierten Quantenpunkte QD525 **rechts:** Lumineszenzabklingkurven des Lumi4Tb-Strep.

Die Abklingkurven zeigen einen Anstieg der FRET-Signalintensität mit abnehmendem Verhältnis von Lumi4Tb-Strep zu Biot-QD525, d.h. zunehmender Quantenpunktkonzentration bei konstanter Anzahl an Donoren im Probenvolumen. Die Signalintensität erreicht ein Maximum bei einem Verhältnis von weniger

als 5 Lumi4Tb-Streptavidinmolekülen pro Quantenpunkt. Dies begründet sich darin, dass bei Verhältnissen mit geringerer Signalintensität aufgrund der beschränkten Anzahl an Biotinmolekülen auf der Quantenpunktoberfläche (Herstellerangabe: 5 – 7 Biotine pro Quantenpunkt) nicht alle Lumi4Tb-Strep an Quantenpunkte binden und so zum FRET beitragen können. Die experimentellen Ergebnisse stehen damit im Einklang mit den Bindungsverhältnissen im FRET-System. Wie erwartet steht einer Zunahme der FRET-Signalintensität des Akzeptors (Abbildung 5.52 links) eine Abnahme der Signalintensität des Donors (Abbildung 5.52 rechts) gegenüber.

Aus dem Vergleich von Akzeptor- und Donor-Abklingkurven wird deutlich, dass die FRET-Lebenszeiten nicht wesentlich unter der Lebenszeit des Donors ohne FRET liegen. Dies ist zu erwarten, da der Überlapp zwischen Donor-Emission und Akzeptor-Absorption für das Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525-System vergleichsweise klein und der Abstand zwischen Donor und Akzeptor größer als der Förster-Radius für das FRET-Paar ist. Nach der FRET-Theorie resultieren daraus geringe FRET-Effizienzen und daher lange FRET-Lebenszeiten.

Die für das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525 mit Hilfe von FAST erhaltenen FRET-Verteilungen sind als Mittelwerte der Ergebnisse aller Assays in Abbildung 5.53 sowohl für den Donor als auch den Akzeptor dargestellt. Die Verteilungen der einzelnen Assays sind Anhang A.7 zu entnehmen. Die ermittelte Lebenszeitverteilung des Donors lässt zwei Maxima erkennen, von denen eines nach Vergleich mit der Lebenszeitverteilung des Donors in Abwesenheit von Energietransfer dem kleinen Anteil kürzerer Lebenszeit des ungequenchten Lumi4Tb-Komplexes zugeordnet werden kann (Abbildung 5.53a). Von Bedeutung für den FRET ist daher nur der breitere Teil der Wahrscheinlichkeitsverteilung, der ein Maximum bei etwa 2600 μs besitzt. Die FRET-Verteilung ist wenig strukturiert und lässt daher kaum Aussagen über die tatsächlichen FRET-Bedingungen zu. Es lässt sich daraus lediglich erkennen, dass die Abstände beider FRET-Partner zueinander etwa im Bereich der Erwartungen liegen (Abbildung 5.53b). Eine größere Übereinstimmung mit der erwarteten Verteilung weist die ermittelte FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors auf (Abbildung 5.53c und d), die mit zunehmender Lebenszeit ansteigt und bei 2650 μs ihr Maximum erreicht.

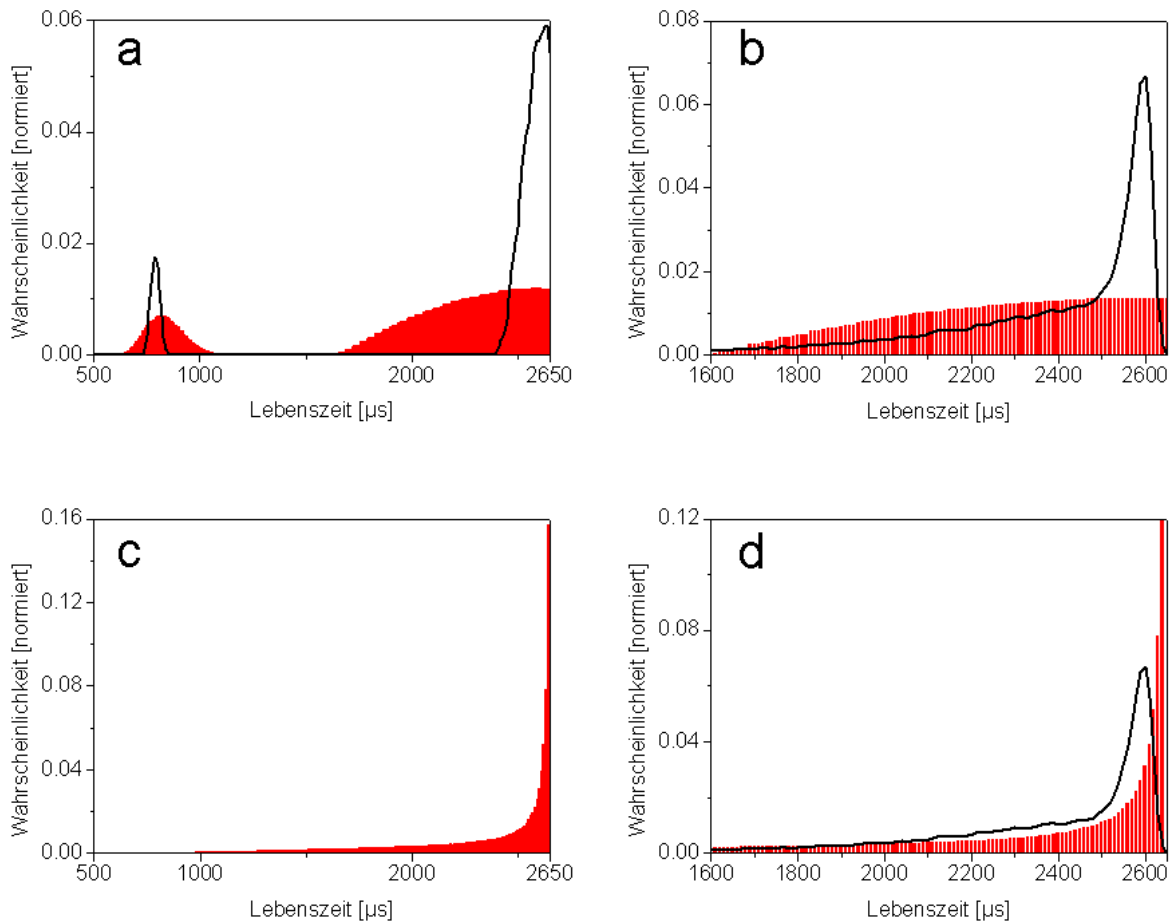


Abbildung 5.53. Mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525, gemittelt über alle Messungen **a)** Lebenszeitverteilung des Donors in Anwesenheit (rot) und Abwesenheit des Akzeptors (schwarz) **b)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Donors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz) **c)** ermittelte FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors **d)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz).

Ogleich die Form der experimentell ermittelten Verteilung ähnlich der erwarteten FRET-Lebenszeitverteilung ist und damit einen Hinweis auf Übereinstimmungen zwischen tatsächlichen und theoretischen Bindungsverhältnissen liefert, lassen sich genauere Aussagen über die Eigenschaften des FRET-Systems anhand der Akzeptordaten nicht treffen, da das Verteilungsmaximum bei 2650 μs FRET-Lebensdauer mit der Lumineszenzlebenszeit des ungequenchten Donors übereinstimmt und einen unendlich großen Abstand bedeuten würde. Die Form der Verteilungskurve ist hier vielmehr eine Folge der Korrektur der Akzeptorverteilung, die notwendig ist um den Einfluss der Transfereffizienz auf die Akzeptorlumineszenz herauszurechnen (vergleiche Abschnitt 5.5.1). Insbesondere der Anteil längerer Lebenszeiten wird dabei stark überkorrigiert und ergibt so einen Verlauf der Lebenszeitverteilung, deren längere Komponenten einen größeren Anteil an der Gesamtverteilung haben, als dies tatsächlich der Fall ist.

Ein Grund für die große Abweichung der Ergebnisse von den Erwartungen liegt in der niedrigen Transfereffizienz innerhalb des FRET-Paares. Dadurch kommt es einerseits zu langen FRET-Lebenszeiten, die im Bereich der natürlichen Lebenszeit des Donors liegen, andererseits sind selbst relativ große Abstandsdifferenzen mit vergleichsweise kleinen Lebenszeitänderungen verbunden (der Lebenszeitunterschied zwischen einem Abstand von 9 nm und einem Abstand von 12 nm beträgt 120 μs [2500 μs vs. 2620 μs], was einem zeitlichen Unterschied von etwa 5% entspricht). Dies führt dazu, dass die mathematische Transformation der Lumineszenz- in Lebenszeitverteilungsdaten mit hohen Unsicherheiten verbunden ist. Verschiedene Abstände lassen sich mathematisch nur schwer voneinander und vom Donorsignal unterscheiden. Dies hat zur Folge, dass die ermittelten Verteilungen zwar von hoher Fit-Güte und mathematisch korrekt, physikalisch aber nicht begründbar sind. Der Ansatz, durch FAST zu einer genaueren Aussage über die Bindungsverhältnisse im FRET-System zu gelangen, scheitert daher hier.

Die für das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525 mit Hilfe des SOLVER-Tools erhaltenen FRET-Abstandsverteilungen sind in Abbildung 5.54 als Mittelwerte der Ergebnisse aller Assays sowohl für Akzeptor als auch Donor dargestellt. Die Ergebnisse für alle Assays sind Anhang A.7 zu entnehmen. Als Wahrscheinlichkeitsverteilungsfunktion $P(R)$ wurde eine Bi-Gaußverteilung angenommen.

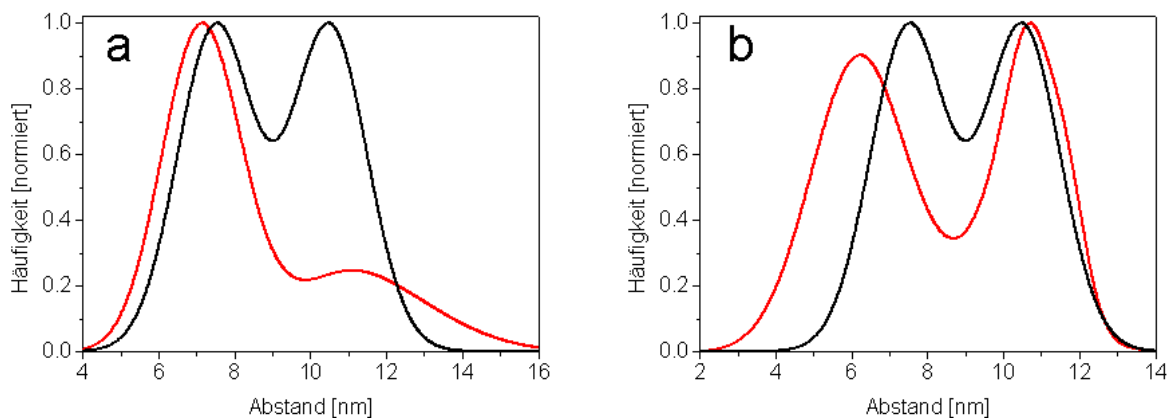


Abbildung 5.54. Mit Hilfe von SOLVER ermittelte Abstandsverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525, gemittelt über alle Messungen **a)** Vergleich der korrigierten ermittelten FRET-Abstandsverteilung des Akzeptors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz) **b)** Vergleich der ermittelten FRET-Abstandsverteilung des Donors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz)

Es ist erkennbar, dass die Maxima der ermittelten Abstände mit denen der theoretisch begründeten Abstandsverteilungen im Rahmen der Fehler gut übereinstimmen (siehe Tabelle 5.9). Während der mittlere Abstand für die oberflächennahe Lumi4Tb-Schicht etwa 0.5 – 1 nm kleiner ist als erwartet, ist der mittlere Abstand der oberflächenfernen Schicht gleich dem erwarteten Wert. Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass durch die ungenügende Trennung der FRET-Lebenszeiten von denen des ungequenchten Donors die mathematische Rekonstruktion der Abstandsverteilungen nur mit großem Fehler möglich ist und die

Übereinstimmung der Werte für die oberflächenferne Lumi4Tb-Verteilung mit den theoretischen Werten zufällig sein kann.

Tabelle 5.9 Vergleich der durch FAST und SOLVER aus Akzeptor- und Donorlumineszenzabklingkurven ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525.

		Maximum	Maximum	Peakverhältnis
		Abstandsverteilung 1	Abstandsverteilung 2	
	Erwartet	$7.5 \pm 1.0 \text{ nm}$	$10.5 \pm 1.0 \text{ nm}$	1 : 1
Akzeptor	FAST	-	-	-
	SOLVER	$7.1 \pm 2.0 \text{ nm}$	$11.1 \pm 3.9 \text{ nm}$	2.1 : 1
	<i>Bi-exp. Fit</i>	$7.1 \pm 0.2 \text{ nm}$	$5.2 \pm 0.2 \text{ nm}$	12 : 1
Donor	FAST	-	-	-
	SOLVER	$6.3 \pm 2.7 \text{ nm}$	$10.7 \pm 2.0 \text{ nm}$	1.25 : 1
	<i>Bi-exp. Fit</i>	$6.4 \pm 0.2 \text{ nm}$	$4.4 \pm 0.1 \text{ nm}$	5 : 1

Im Gegensatz zum vorherigen Lösungsansatz lassen sich auf diesem Weg jedoch Ergebnisse erzielen, die Rückschlüsse auf die Bindungsverhältnisse innerhalb des FRET-Systems zulassen. Obgleich die Anzahl der mathematischen Freiheitsgrade bei der Kurvenanpassung im Vergleich zum Fitten mit der Software FAST durch die Vorgabe der Wahrscheinlichkeitsverteilung und des Förster-Radius verringert wurden, sind auch hier Unterschiede zwischen den aus der Akzeptorlumineszenz und den aus der Donorlumineszenz ermittelten Abstandsverteilungen zu erkennen. Wie bereits erwähnt sind dafür größtenteils die geringe Transfereffizienz und die daraus resultierenden geringen Lebenszeitunterschiede verschiedener Abstände verantwortlich. Erstere führt zu einer sehr geringen Lumineszenzintensität längerer FRET-Lebenszeiten im Akzeptorkanal, die auch durch eine Intensitätskorrektur nicht vollständig berücksichtigt werden kann. Daher ist das zweite Maximum der Abstandsverteilung bei der Akzeptorlumineszenz unterrepräsentiert. Bei der Donorlumineszenz ist zu berücksichtigen, dass, wie in Abbildung 5.53a erkennbar, die kurzlebige Komponente des ungequenchten Donors ebenfalls merklich zur Lumineszenz beiträgt. Da die Lebenszeit der kurzen Komponente des Lumi4Tb-Komplexes $830 \mu\text{s}$ beträgt und damit kürzer ist als die FRET-Lebenszeit zwischen oberflächennaher Lumi4Tb-Schicht und Quantenpunkt führt dies dazu, dass sich das Maximum der ersten Abstandsverteilung scheinbar zu kleineren Abständen verschiebt, als es tatsächlich der Fall ist. Die ermittelten Halbwertsbreiten der einzelnen Abstandsverteilungen sind höher als vermutet, die Verteilungen gehen ineinander über und sind nicht separiert. Dies hängt offensichtlich damit zusammen, dass die

Lokalisation der Lumi4Tb-Komplexe innerhalb des Streptavidins nicht so eindeutig ist, wie in Kapitel 5.6.1 beschrieben. Da die Aminosäure Lysin, an die die Lumi4Tb-Komplexe binden, überwiegend in den Seitenketten der Proteinstruktur und nicht im Zentrum des Streptavidins auftritt (siehe Abbildung 5.43), besitzt diese die Möglichkeit sich innerhalb des Moleküls relativ frei zu bewegen, wobei diese Bewegung hauptsächlich thermisch induziert ist und sich vor allem als Rotation um die Bindungen darstellen lässt. Dadurch kommt es zu größeren Abstandsvariationen zwischen FRET-Akzeptor und –Donor, die zu einer größeren Halbwertbreite der FRET-Abstände und damit der FRET-Lebenszeitverteilungen führen.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass für das FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525 Abstandsverteilungen existieren, deren Maxima etwa im Bereich der zu erwartenden liegen. Der Abstand zwischen oberflächennaher Schicht und Quantenpunktzentrum wurde zu etwa 7 nm, der zwischen der oberflächenfernen Schicht und dem Zentrum des Nanokristalls zu etwa 11 nm bestimmt. Dies läßt den Schluss zu, daß die durchschnittliche Größe der Nanopartikel etwa einen halben Nanometer kleiner ist als vom Hersteller angegeben. Dies steht in Übereinstimmung mit der in Abschnitt 5.6.1 angesprochenen Flexibilität der PEG-Spacer der Polymerhülle, die zu einer Verringerung der Dicke der Hülle und damit des Donor-Akzeptorabstands führt. Gleichzeitig scheint durch intramolekulare Abstandsänderungen im Streptavidin die oberflächenferne Schicht aus Terbiumkomplexen etwas weiter vom Quantenpunktzentrum entfernt zu sein. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß aufgrund der schwierigen Separierung des FRET-Signals der einzelnen Abstandsverteilungen untereinander und vom Signal des ungequenchten Donors die Abstandsangaben nur ungefähre sind. Die Abstandsverteilungen scheinen aufgrund intramolekularer Bewegungen im Streptavidin breiter und weniger separiert. Anders als die Bindungsverhältnisse im Streptavidin erwarten lassen sind die Lumi4Tb-Komplexe offensichtlich nicht gleichmäßig zwischen oberflächennaher und oberflächenferner Schicht verteilt, sondern scheinen sich bevorzugt oberflächennah aufzuhalten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Reihenfolge der Zugabe der Assaybestandteile bei der Vorbereitung der Messung. Die Quantenpunkte liegen hier in der Lösung vor, die Terbiumkomplexe werden dazu pipettiert. Es liegt also bei jedem Mischungsverhältnis zuerst immer ein Überschuß an biotinylierten Quantenpunkten vor. Es ist nun möglich, dass aufgrund der beschriebenen starken Bindung zwischen Biotin und Streptavidin sich die Quantenpunkte an das erste Streptavidin-Molekül binden, welches sie in ihrer Umgebung vorfinden. Da gerade zum Beginn der Zugabe der Terbiumkomplexe nicht viele Streptavidin-Moleküle in der Lösung sind, binden dann mehrere Quantenpunkte an ein Streptavidin, da dieses insgesamt vier Biotin-Bindungsstellen besitzt, die jeweils gepaart an den offenen Enden des Streptavidin-Moleküls sitzen (siehe auch Abbildungen 2.20 und 4.7). Bindet mehr als ein Quantenpunkt pro Streptavidin hat das zur Folge, dass die beiden Verteilungen von Terbiumkomplexen innerhalb des Streptavidins oberflächennah zum jeweiligen Quantenpunkt orientiert sind. Insgesamt sind also mehr Terbiumkomplexe in geringerem Abstand zum Quantenpunkt im Untersuchungsvolumen vorhanden als in größerem (siehe Abbildung 5.67, Seite 134). Ein Vergleich der Kurvenanpassung mittels Abstandsverteilungsfunktionen mit den Ergebnissen eines biexponentiellen Fits der Lumineszenzabklingkurven zeigt eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse für den Bereich kürzerer Abstände. Die Abstandsverteilung der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht kann mit einem biexponentiellen Fit hingegen nicht aufgelöst werden.

5.7.2 Lumi4Tb und QD565

Die erhaltenen Lumineszenzsignale des Donors und des Akzeptors sind für jedes Verhältnis im Assay beispielhaft in Abbildung 5.55 dargestellt. Im Unterschied zum vorher erläuterten FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525 resultiert aus der höheren Transfereffizienz eine stärker sichtbarer Einfluss des Resoanzenenergietransfers auf die Lumineszenz des Donors. Es ist ein deutliches Quenching zu erkennen, welches durch FRET verursacht wird. Gleichzeitig ändert sich die Kurvenform und es treten deutlich kurzlebige FRET-Lebenszeiten hervor. Die FRET-Lumineszenz des Biot-QD565-Akzeptors besitzt erkennbar kürzere Lebenszeiten als der ungequenchte Donor, was ebenfalls ein Hinweis auf effizienteren FRET ist.

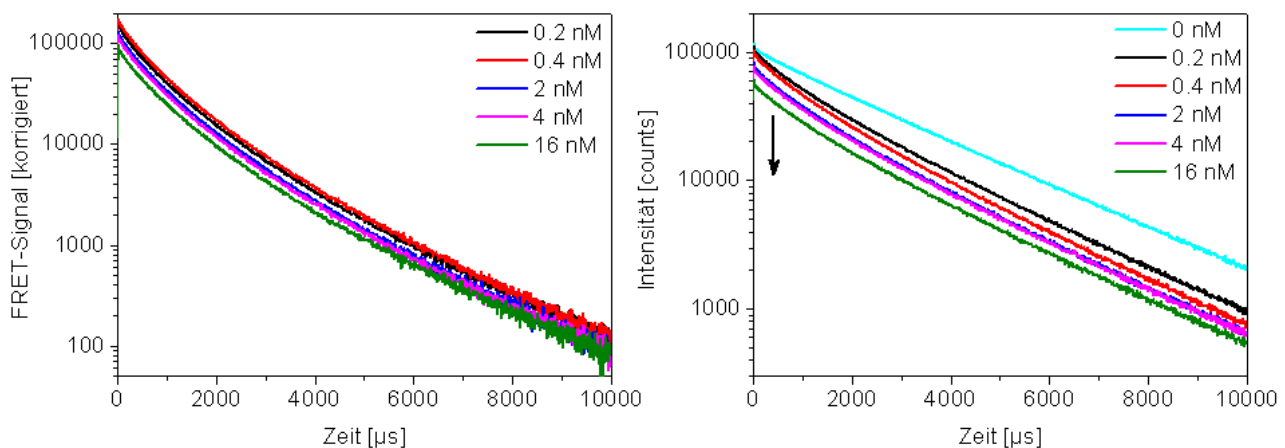


Abbildung 5.55. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay in Abhängigkeit von der Quantenpunktkonzentration **links:** FRET-Signal der biotinylierten Quantenpunkte QD565 **rechts:** Lumineszenzabklingkurven des Lumi4Tb-Streptavidinkomplexes.

Die Auswertung der Lumineszenzabklingkurven von Donor und Akzeptor mit Hilfe von FAST und der bereits beschriebenen Vorgehensweise ergibt die in Abbildung 5.56 dargestellten Lebenszeitverteilungen. Ein Vergleich der Donor-Lebenszeitverteilung in Anwesenheit des Akzeptors mit der des ungebundenen Donors zeigt im Falle des FRET-Systems Lumi4Tb-Strep-Biot-QD565, dass der Anteil der kurzen Lebenszeit des ungebundenen Donors an der FRET-Lebenszeitverteilung nicht erkennbar ist (Abbildung 5.56a). Ursache dafür ist die durch den effizienten FRET bedingte hohe Intensität des FRET-gelöschten Donorsignals, die die schwache, kurzlebige Komponente der Donorlumineszenz überlagert. Diese kann daher bei der Auswertung der Lebenszeitverteilungen unberücksichtigt bleiben. Die Lebenszeitauswertung sowohl des Akzeptors als auch des Donors liefert Verteilungen, bei denen ein Anteil kurzlebigen FRET-Signals mit einem Maximum bei etwa 800 μs erkennbar ist (Abbildung 5.56 b und c). Dieser Anteil repräsentiert die Lebenszeiten des Energietransfers zwischen oberflächennaher Lumi4Tb-Schicht und Quantenpunkt. Während die Analyse der Donorlumineszenz ein weiteres Verteilungmaximum erkennen lässt, das sich sowohl aus dem Energietransfer zwischen oberflächenferner Lumi4Tb-Schicht und

Quantenpunkt als auch der Lumineszenzlebenszeitverteilung des ungequenchten Donors zusammensetzt, kann das Signal dieser zweiten, oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht aus der Akzeptorlumineszenz nicht rekonstruiert werden. Die niedrige Effizienz des Energietransfers von oberflächenferner Schicht zum Quantenpunkt ist die Ursache dafür, da sie dazu führt, dass der Anteil dieses Energietransfers an der gesamten Akzeptorlumineszenz sehr klein ist (Erläuterung siehe vorheriger Abschnitt). Eine Korrektur nach Gleichung 5.7 bedingt dann eine überproportionale Vergrößerung selbst kleiner Abweichungen des Lumineszenzanteils des Energietransfers von oberflächenferner Lumi4Tb-Schicht auf den Quantenpunkt. Es kommt, insbesondere bei Lebenszeiten nahe der des ungequenchten Donors, so zu Überkorrekturen (siehe Abbildung 5.56 c), die es unmöglich machen, Aussagen über den langlebigen Anteil der Lebenszeitverteilung zu treffen.

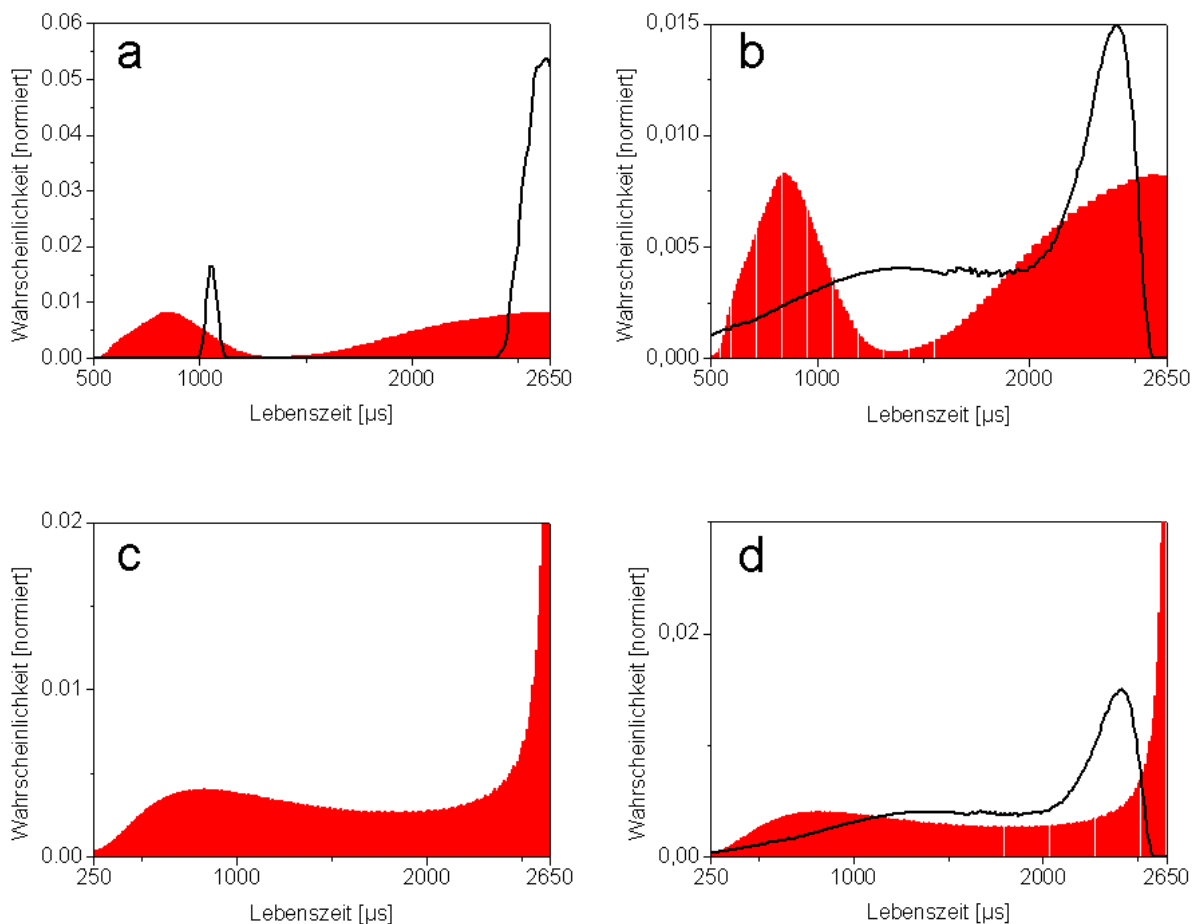


Abbildung 5.56. Mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD565, gemittelt über alle Messungen **a)** Lebenszeitverteilung des Donors in Anwesenheit (rot) und Abwesenheit des Akzeptors (schwarz) **b)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Donors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz) **c)** ermittelte FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors **d)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz).

Das spiegelt sich in den Abstandsverteilungen wider, in die sich die durch FAST ermittelten FRET-Lebenszeitverteilungen überführen lassen (Abbildung 5.57). Während sich aus den Akzeptorlumineszenzabklingkurven lediglich die Abstandsverteilung der oberflächennahen Schicht rekonstruieren lässt, ermöglicht die Anpassung der Donorlumineszenzabklingkurven eine Auflösung der gesamten Abstandsverteilung. Ein Vergleich der ermittelten mit den erwarteten Abständen ist in Tabelle 5.10 zu finden. Ähnlich dem FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525 sind auch hier die ermittelten Abstände der einzelnen Lumi4Tb-Schichten etwa 1 nm kleiner als erwartet.

Die Anpassung der Lumineszenzabklingkurven mittels eines Doppelgaußfits mit dem Excel-Tool SOLVER liefert, mit der Annahme des Förster-Radius $R_0 = 7.5$ nm (siehe Tabelle 5.3), die in Abbildung 5.57 dargestellten Lebenszeitverteilungen für das FRET-System Lumi4Tb-Strep-BiotQD565.

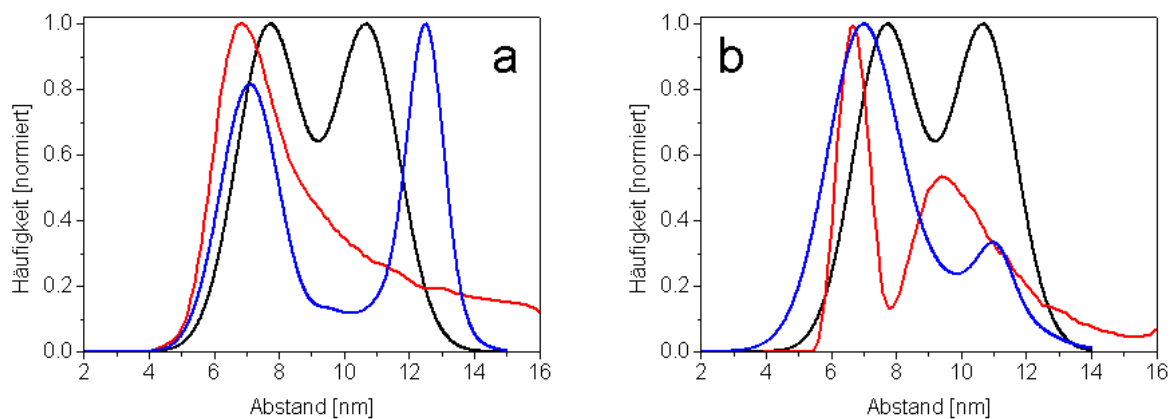


Abbildung 5.57. Ermittelte Abstandsverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD565, gemittelt über alle Messungen (FAST = rot, SOLVER = blau) im Vergleich mit den erwarteten Abstandsverteilungen **a)** Vergleich der korrigierten ermittelten FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors mit der theoretisch erwarteten **b)** Vergleich der ermittelten FRET-Abstandsverteilungen des Donors mit der theoretisch erwarteten.

Tabelle 5.10. stellt die aus den FRET-Lebenszeitverteilungen ermittelten Abstände der Lumi4Tb-Schichten den erwarteten Abständen gegenüber.

Tabelle 5.10. Vergleich der durch FAST und SOLVER aus Akzeptor- und Donorlumineszenzabklingkurven ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD565.

		Maximum	Maximum	Peakverhältnis
		Abstandsverteilung 1	Abstandsverteilung 2	
	Erwartet	$7.7 \pm 0.5 \text{ nm}$	$10.7 \pm 0.5 \text{ nm}$	1 : 1
Akzeptor	FAST	$6.9 \pm 1.6 \text{ nm}$	-	-
	SOLVER	$7.1 \pm 1.9 \text{ nm}$	$12.5 \pm 1.3 \text{ nm}$	2.1 : 1
	<i>Bi-exp. Fit</i>	$6.3 \pm 0.1 \text{ nm}$	$8.3 \pm 0.1 \text{ nm}$	2 : 1
Donor	FAST	$6.7 \pm 0.9 \text{ nm}$	$9.5 \pm 1.9 \text{ nm}$	0.6 : 1
	SOLVER	$7.1 \pm 2.4 \text{ nm}$	$10.8 \pm 2.1 \text{ nm}$	1.25 : 1
	<i>Bi-exp. Fit</i>	$5.8 \pm 0.1 \text{ nm}$	$7.8 \pm 0.1 \text{ nm}$	0.4 : 1

Während alle Kurvenanpassungen für den Abstand der oberflächennahen Lumi4Tb-Schicht ähnliche Abstände ergeben, schwanken die errechneten Werte für den Abstand der oberflächenfernen Schicht stark. Auch hier liegt der ermittelte Abstand für die oberflächennahe Lumi4Tb-Schicht niedriger (ca. 0.7 nm) als erwartet, während sich der mittlere Abstand der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht (mit einem wesentlich höheren Bestimmungsfehler) nur unwesentlich vom erwarteten unterscheidet. Während die Verteilung der Lumi4Tb-Komplexe zwischen den beiden Schichten für die aus der Donorlumineszenz gewonnene Abstandsverteilung im Bereich der Erwartungen liegt (Gleichverteilung, siehe Abschnitt 5.6.1), weicht die ermittelte Verteilung für die aus der Akzeptorlumineszenz gewonnenen Abstände diesbezüglich stark ab. Der Anteil der Terbiumkomplexe, die oberflächenfern gebunden sind, ist scheinbar wesentlich kleiner. Offensichtlich führt der geringe Unterschied zwischen FRET-Lebenszeiten und Lebenszeit des ungequenchten Donors (2500 μs gegenüber 2650 μs , was einer Differenz von lediglich ca. 5% entspricht) dazu, dass der Lumineszenzanteil des ungequenchten Donors bei der Kurvenanpassung über Gleichung 5.5 falsch bestimmt wird, was zur Folge hat, dass die Intensität des FRET von der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht auf den Quantenpunkt kleiner erscheint als sie ist. Nichtsdestotrotz scheint auch hier ein größerer Anteil der Lumi4Tb-Komplexe aus den bereits erwähnten Gründen (siehe Abschnitt 5.7.1) oberflächennah gebunden zu sein.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass für das FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD565 Abstandsverteilungen existieren, die in ihrer Form gut mit den erwarteten Verteilungen übereinstimmen. Der Abstand zwischen oberflächennaher Schicht und Quantenpunktzentrum wurde 0.5 – 1 nm kleiner als erwartet zu etwa 7 nm

bestimmt. Der Abstand zwischen der oberflächenfernen Schicht und dem Zentrum des Nanokristalls lag mit etwa 11 nm im Bereich der Erwartungen. Sowohl die Anpassung durch FAST als auch über Excels SOLVER führten zu ähnlichen Ergebnissen für die mittleren Abstände. Die in Abschnitt 5.6.1 gezogenen Schlussfolgerungen hinsichtlich der Größe der Nanokristalle und der Verteilung der Lumi4Tb-Komplexe innerhalb des Streptavidinmoleküls lassen sich auf das FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD565 übertragen. Aufgrund der niedrigen Effizienzen und langen Lebenszeiten des FRET von oberflächenferner Schicht auf den Nanokristall sind die Ergebnisse für diesen Bereich der Abstandsverteilungen aber nur als ungefähr anzusehen, da aus den oben erwähnten Gründen die mathematischen Fehler zu groß für eine verlässliche Aussage sind. Die vergleichsweise durchgeführte Kurvenanpassung über einen diskreten Fit mit zwei Exponentialfunktionen führt, verglichen mit der Anwendung von Verteilungsfunktionen, zu größeren Abweichungen des Ergebnisses von den Erwartungen, da der Abstand der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht nicht rekonstruiert werden kann, die Abstandsverteilung der oberflächennahen Lumi4Tb-Schicht vom Quantenpunktzentrum hingegen durch zwei Abstände beschrieben wird. Ohne Berücksichtigung der Überlegungen zur Abstandsverteilung würde die Interpretation dieser Ergebnisse daher zu falschen Rückschlüssen in Bezug auf die Bindungsverhältnisse im FRET-Paar führen. Bei einer Kurvenanpassung mit Hilfe von Verteilungen ist dies nicht der Fall.

5.7.3 Lumi4Tb und QD605

Die experimentell gewonnenen, korrigierten Lumineszenzabklingkurven für das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD605 sind für jedes Verhältnis von Lumi4Tb zu QD605 exemplarisch in Abbildung 5.58 dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass ein effizienter FRET auch bei diesem Bindungspaar zur Abnahme der Lumineszenzintensität des Donors bei gleichzeitiger Änderung der Kurvenform durch den höheren Anteil kurzer FRET-Lebenszeiten führt. Das stark multiexponentielle Abklingverhalten der Akzeptorlumineszenz ist ein deutlicher Hinweis auf Abstandsverteilungen im FRET-System.

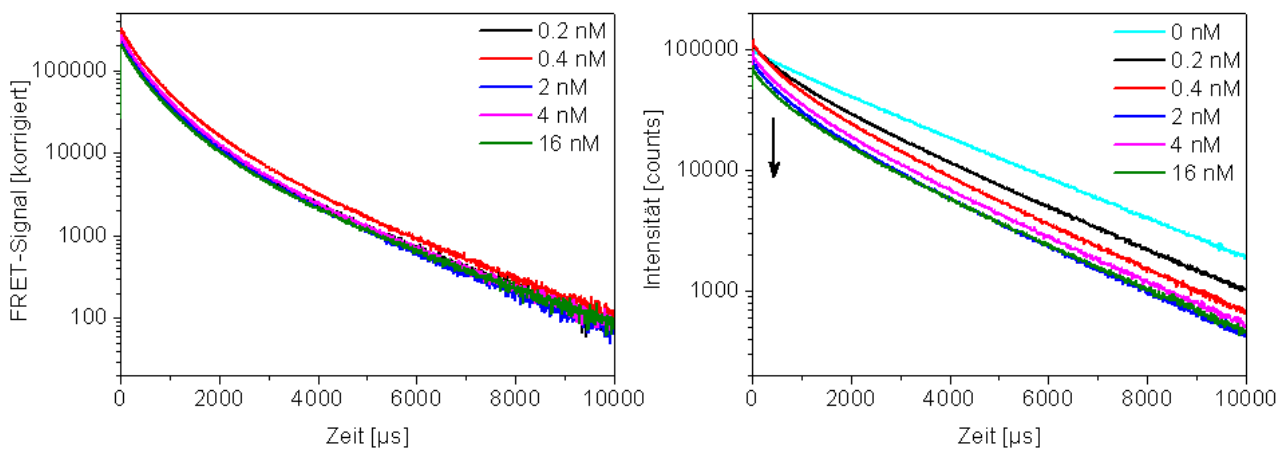


Abbildung 5.58. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay in Abhängigkeit von der Quantenpunktkonzentration **links:** FRET-Signal der biotinylierten Quantenpunkte QD605 **rechts:** Lumineszenzabklingkurven des Lumi4Tb-Streptavidinkomplexes

Die durch FAST ermittelten Lebenszeitverteilungen sind in Abbildung 5.59 dargestellt. Auch hier überlagert ein intensives FRET-Signal im Donorkanal den schwachen Anteil kurzer Lebenszeit des ungebundenen Donors deutlich (Abbildung 5.59a), so dass dieser bei der Analyse der Lebenszeitverteilungen unberücksichtigt bleiben kann. Die Lebenszeitauswertung sowohl des Akzeptors als auch des Donors liefert insbesondere hinsichtlich des Anteils kurzlebigen FRET-Signals mit einem Maximum bei etwa 800 μs (Abbildung 5.59 b und c) Verteilungen, die miteinander gut übereinstimmen. Das erwartete zweite Maximum der Lebenszeitverteilungen stimmt bei den ermittelten Verteilungen für Donor und Akzeptor nur bedingt überein. Es lässt sich aber bei beiden der Verteilungsanteil erkennen, der die Lebenszeiten des Energietransfers zwischen oberflächennaher Lumi4Tb-Schicht und Quantenpunkt repräsentiert. Vergleicht man die ermittelten FRET-Lebenszeitverteilungskurven von Akzeptor- und Donorlumineszenz mit den für ellipsoide bzw. sphärische Quantenpunkte erwarteten, so fällt sowohl für Akzeptor als auch Donor eine deutlichere Übereinstimmung mit der Lebenszeitverteilung, die bei mittlerer sphärischer Form der Quantenpunktgesamtheit zu erwarten ist, auf (Abbildung 5.59 b sowie c), sowohl in Bezug auf die Lage der Maxima als auch die allgemeine Verteilungsform.

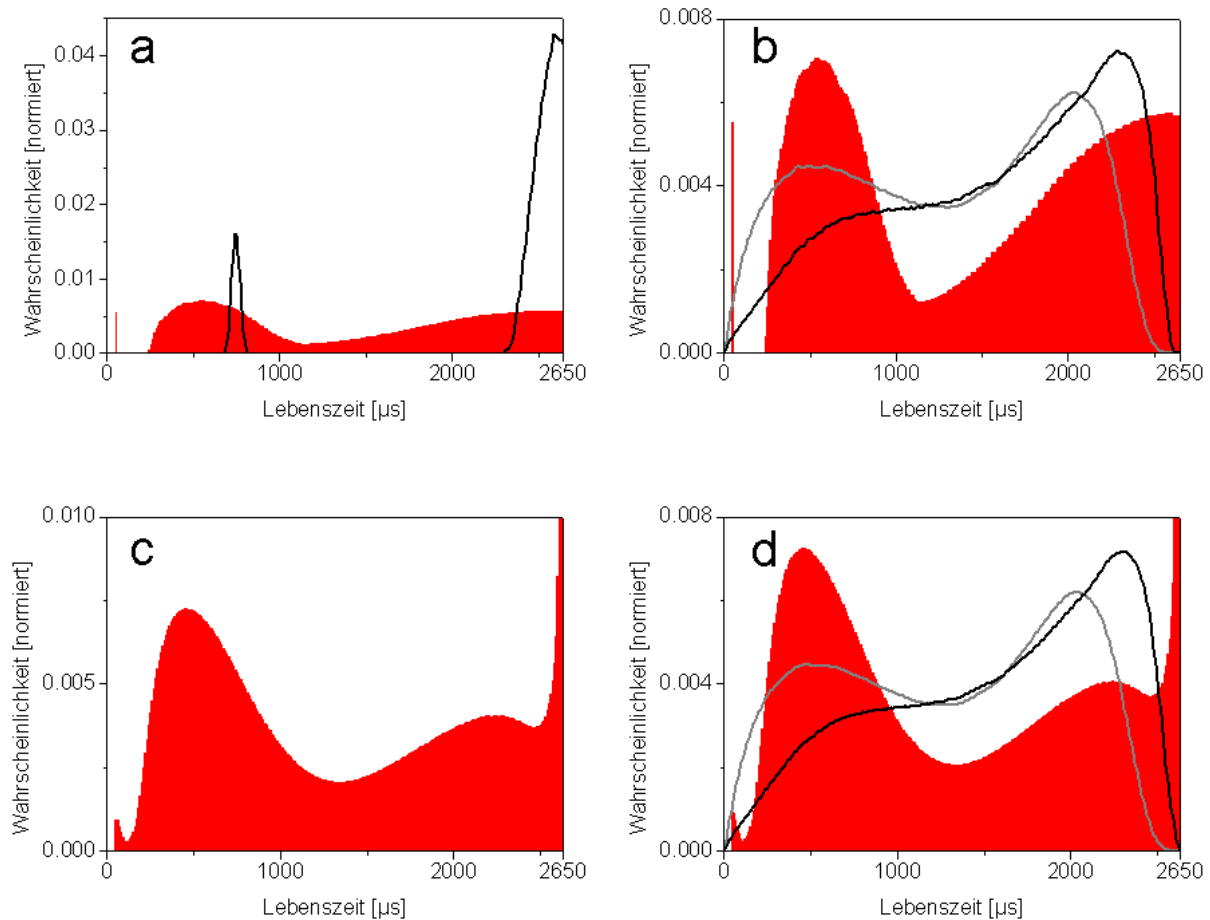


Abbildung 5.59. Mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD605, gemittelt über alle Messungen **a)** Lebenszeitverteilung des Donors in Anwesenheit (rot) und Abwesenheit des Akzeptors (schwarz) **b)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Donors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz = ellipsoidale Form, grau = sphärische Form) **c)** ermittelte FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors **d)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz = ellipsoidale Form, grau = sphärische Form).

Die sich aus der FRET-Lebenszeitverteilung ergebende Abstandsverteilung für das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD605 ist in Abbildung 5.60 der mit dem Excel-Tool SOLVER ermittelten gegenübergestellt und mit den erwarteten Abstandsverteilungen verglichen. Während sich für die Akzeptorlumineszenz Abstandsverteilungen anpassen lassen, die beide erwarteten Abstandsmaxima wiedergeben, ist dies für die Donorlumineszenz nicht ohne weiteres möglich, die Abstandsberechnung mit Hilfe von SOLVER versagt hier. Dies ist vor allem ein mathematisches Problem, welches durch die mangelnde zeitliche Trennung des FRET-Signals von oberflächenferner Lumi4Tb-Schicht auf den Quantenpunkt und dem Signal des ungebundenen Donors entsteht. Offensichtlich wird das Signal des ungebundenen Donors überbestimmt und infolgedessen das FRET-Signal, welches die längere Komponente der Abstandsverteilung repräsentiert, unterbestimmt.

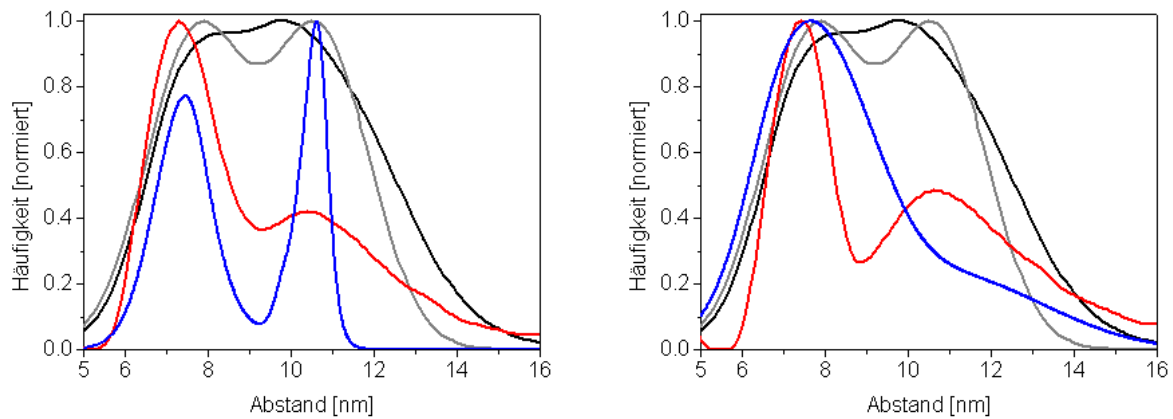


Abbildung 5.60. Ermittelte Abstandsverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD605, gemittelt über alle Messungen (FAST = rot, SOLVER = blau) im Vergleich mit den erwarteten Abstandsverteilungen (schwarz = ellipsoidale Form, grau = sphärische Form der Quantenpunktgesamtheit **a**) Vergleich der ermittelten FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors mit den theoretisch erwarteten **b**) Vergleich der ermittelten FRET-Abstandsverteilungen des Donors mit den theoretisch erwarteten.

Tabelle 5.11 faßt die ermittelten und erwarteten Abstände und das Verhältnis der Peakflächen zusammen.

Tabelle 5.11 Vergleich der durch FAST und SOLVER aus Akzeptor- und Donorlumineszenzabklingkurven ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD605.

		Maximum	Maximum	Peakverhältnis
		Abstandsverteilung 1	Abstandsverteilung 2	
Erwartet	Ellipse	8.5 nm	11.5 nm	1 : 1
	Kugel	7.7 ± 1.2 nm	10.7 ± 1.2 nm	1 : 1
Akzeptor	FAST	7.3 ± 1.5 nm	10.5 ± 4.2 nm	1 : 1
	SOLVER	7.4 ± 1.4 nm	10.8 ± 0.7 nm	1.5 : 1
	<i>Tri-exp. Fit</i>	6.5 ± 0.1 nm	7.8 ± 0.1 nm	10.6 ± 0.1 nm
Donor	FAST	7.4 ± 1.3 nm	10.6 ± 3.6 nm	1.2 : 1
	SOLVER	7.7 ± 2.5 nm	11.6 ± 4.7 nm	3 : 1
	<i>Tri-exp. Fit</i>	6.1 ± 0.1 nm	7.5 ± 0.1 nm	9.8 ± 0.1 nm

Vergleicht man die Lage der Maxima und die Form der ermittelten Abstandsverteilungen mit den erwarteten, ist, wie auch beim Vergleich der FRET-Lebenszeitverteilungen, die Ähnlichkeit zu den für Quantenpunktsphären erwarteten Abständen deutlicher als zu den für ellipsoide Quantenpunkte erwarteten.

Zusammenfassung

Es wurden für das FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD Abstandsverteilungen ermittelt, deren Maxima im Bereich der zu erwartenden liegen. Der Abstand zwischen oberflächennaher Schicht und Quantenpunktzentrum wurde zu etwa 7.4 nm, der zwischen der oberflächenfernen Schicht und dem Zentrum des Nanokristalls zu etwa 10.8 nm bestimmt. Die Abstandsverteilungen stimmen in ihrer Form besser mit den für sphärische Quantenpunkte erwarteten Abständen überein, wobei der für die oberflächennahe Schicht bestimmte mittlere Abstand vom Quantenpunktzentrum dann ca. 0.3 nm kleiner ist, wohingegen der für die oberflächenferne Lumi4Tb-Schicht bestimmte mittlere Abstand etwa genauso groß ist wie erwartet. Die aufgrund der Flexibilität der PEG-Spacer zu erwartende geringere Dicke der Polymerhülle sowie ein mittlerer größerer Abstand der oberflächenfernen Schicht vom Quantenpunktzentrum aufgrund intramolekularer Bewegungen können die Abweichungen erklären. Beide mittleren Abstände geben daher die realen Abstände im FRET-System annähernd exakt wieder. Ein Vergleich mit der Abstandsbestimmung mit Hilfe eines diskreten Fits aus drei Exponentialfunktionen zeigt, dass dieser ebenfalls in der Lage ist, die Bindungsverhältnisse im FRET-Paar zu rekonstruieren. Die Abstandsverteilung der oberflächennahen Lumi4Tb-Schicht vom Quantenpunktzentrum wird hierbei durch zwei diskrete Abstände repräsentiert, der Anteil der oberflächenfernen Schicht durch einen Abstand. Alle bestimmten Abstände stimmen auch mit ihrem Verhältnis mit den über Verteilungsfunktionen bestimmten Abständen überein. Beide Ansätze der Kurvenanpassung liefern hier ähnliche Ergebnisse, was die Ergebnisse der Auswertung über Verteilungsfunktionen stützt.

5.7.4 Lumi4Tb und QD655

Die aufgenommenen und korrigierten Lumineszenzabklingkurven des FRET-Paares Lumi4Tb-Strep und Biot-QD655 sind Abbildung 5.61 zu entnehmen. Das stark multiexponentielle Abklingen sowohl des Akzeptors als auch des Donors bei Vorhandensein von FRET gibt einen ersten Hinweis auf eine tatsächlich vorliegende Verteilung von Abständen innerhalb des FRET-Systems.

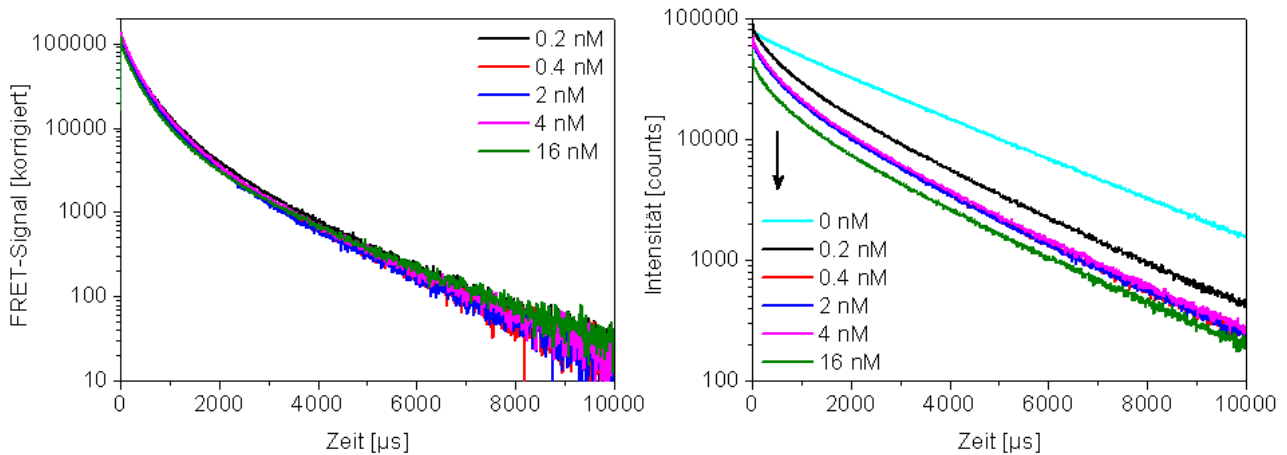


Abbildung 5.61. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay in Abhängigkeit von der Quantenpunktkonzentration **links:** FRET-Signal der biotinylierten Quantenpunkte QD655 **rechts:** Lumineszenzabklingkurven des Lumi4Tb-Streptavidinkomplexes

Die abgebildeten Lumineszenzabklingkurven von Donor und Akzeptor sind Ausgangspunkt für die Berechnung sowohl von FRET-Lebenszeit- als auch von Abstandsverteilungen. Die mit FAST ermittelten Lebenszeitverteilungen sind in Abbildung 5.62 für Donor und Akzeptor dargestellt. Ein Vergleich der FRET-induzierten Donorlumineszenz mit der des ungebundenen Donors zeigt, dass der Anteil der kurzlebigen Lumineszenzkomponente des ungebundenen Donors von der wesentlich intensiveren kurzlebigeren FRET-induzierten Lumineszenzlebenszeit überlagert wird und daher bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt werden muss. Abbildung 5.62 b stellt die ermittelte FRET-Lebenszeitverteilung für die Donorlumineszenz, Abbildung 5.62d die für die Akzeptorlumineszenz bestimmte FRET-Lebenszeitverteilung den erwarteten Verteilungen gegenüber. Beide aus den experimentellen Daten ermittelte FRET-Verteilungen stimmen gut miteinander überein und zeigen einen ausgeprägten schmaleren Verteilungsspeak mit einem Maximum bei etwa 300 μs sowie einen breiten, für die Donorlumineszenz wenig ausgeprägten, Lebenszeitanteil mit einem Maximum bei ca. 2000 μs (Akzeptor 1850 μs , Donor 2030 μs). Da die ermittelte Lebenszeitverteilung des Donors auch das Signal des ungebundenen Donors berücksichtigt, weist sie einen Anteil langer Lebenszeiten (ca. 2400 – 2650 μs) auf, die nicht zum FRET beitragen, sondern lediglich die Lumineszenz des ungebundenen Donors repräsentieren.

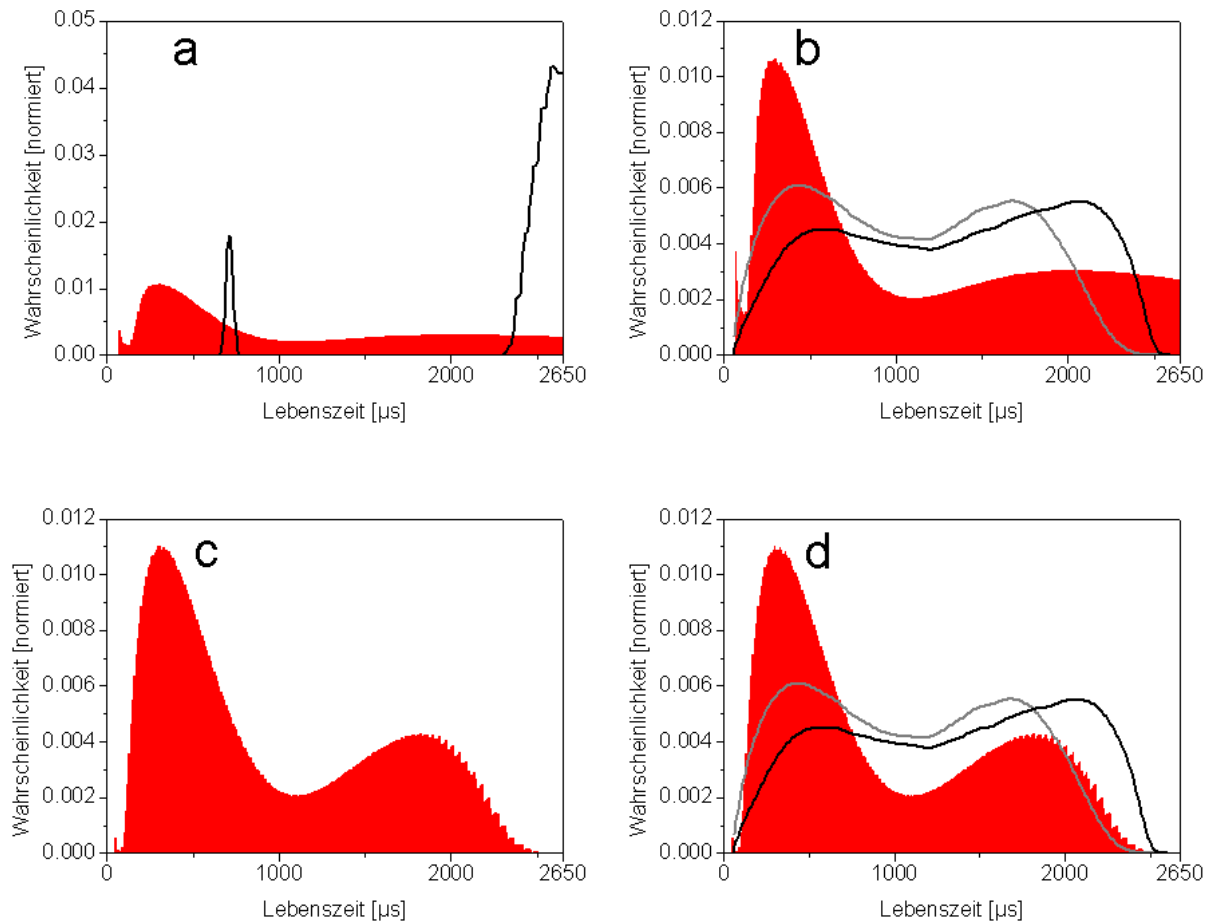


Abbildung 5.62. Mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655, gemittelt über alle Messungen **a)** Lebenszeitverteilung des Donors in Anwesenheit (rot) und Abwesenheit des Akzeptors (schwarz) **b)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Donors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz = ellipsoide Form, grau = sphärische Form) **c)** ermittelte FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors **d)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz = ellipsoide Form, grau = sphärische Form).

Insgesamt steht die für sphärische Quantenpunkte erwartete FRET-Lebenszeitverteilung in besserer Übereinstimmung mit den ermittelten Verteilungen als die für eine ellipsoide Form der Quantenpunkte erwartete. Die Maxima der Verteilungen stimmen besser überein und auch die Form, die durch zwei akzentuierte Verteilungsspeaks bestimmt wird, wobei der Anteil kurzer Lebenszeiten größer ist als der Anteil langer Lebenszeiten, spricht eher für die Annahme einer mittleren sphärischen Gestalt der Quantenpunktgesamtheit.

Die FRET-Lebenszeitverteilungen der Akzeptor- und Donorlumineszenz lassen sich in Abstandsverteilungen für das FRET-Paar überführen. Abbildung 5.63 stellt diese Verteilungen sowie die mit SOLVER ermittelte

dar und vergleicht sie mit den erwarteten Abstandsverteilungen für ellipsoide Idealform und mittlere sphärische Form der Quantenpunktgesamtheit.

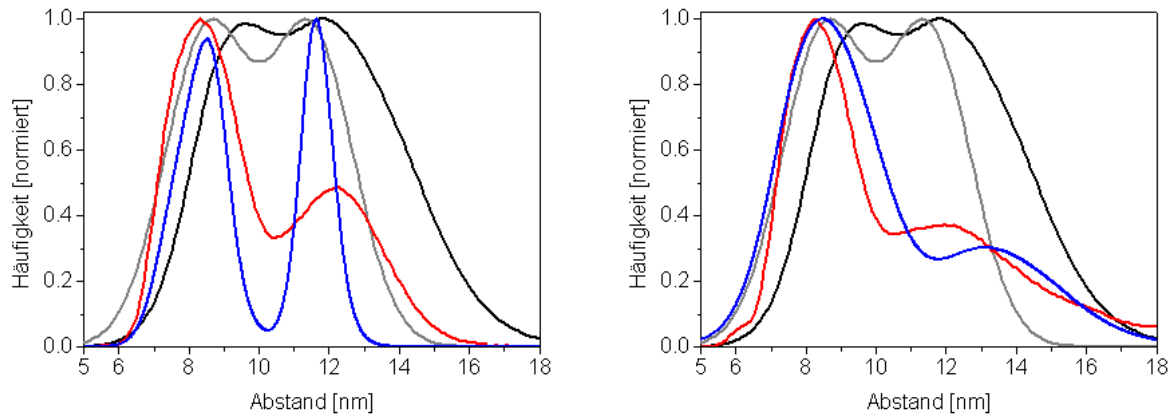


Abbildung 5.63. Ermittelte Abstandsverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655, gemittelt über alle Messungen (FAST = rot, SOLVER = blau) im Vergleich mit den erwarteten Abstandsverteilungen (schwarz = ellipsoide Form, grau = sphärische Form der Quantenpunktgesamtheit **a**) Vergleich der ermittelten FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors mit den theoretisch erwarteten **b**) Vergleich der ermittelten FRET-Abstandsverteilungen des Donors mit den theoretisch erwarteten.

Auch hier sind sowohl Form der Abstandsverteilungen als auch Lage der Maxima der für sphärische Quantenpunkte erwarteten Verteilung sehr viel ähnlicher als der für ellipsoide Quantenpunkte erwarteten. Der Anteil kurzer Lebenszeit, der durch den FRET von oberflächennaher Lumi4Tb-Schicht auf den Quantenpunkt entsteht, hat sowohl bei der durch FAST als auch durch SOLVER ermittelten Abstandsverteilung einen größeren Anteil an den Gesamtabständen. Das weist, wie in Abschnitt 5.7.1 dargelegt, darauf hin, dass im FRET-Assay, als Folge des Pipettierschemas, mehr Lumi4Tb-Komplexe oberflächennah gebunden sind als zu erwarten ist (siehe auch Abbildung 5.67, Seite 134). Tabelle 5.12 faßt die Eigenschaften der ermittelten Abstandsverteilungen zusammen und stellt sie den erwarteten Abständen gegenüber.

Tabelle 5.12 Vergleich der durch FAST und SOLVER aus Akzeptor- und Donorlumineszenzabklingkurven ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655.

		Maximum	Maximum	Peakverhältnis
		Abstandsverteilung 1	Abstandsverteilung 2	
Erwartet	Ellipsoid	9.5 nm	12.9 nm	1 : 1
	Kugel	8.9 ± 1.2 nm	11.9 ± 1.2 nm	1 : 1
Akzeptor	FAST	8.3 ± 1.9 nm	12.1 ± 2.9 nm	1.3 : 1
	SOLVER	8.4 ± 1.5 nm	11.7 ± 0.9 nm	1.5 : 1
	<i>Tri-exp. Fit</i>	7.5 ± 0.2 nm	8.9 ± 0.2 nm	11.9 ± 0.2 nm
Donor	FAST	8.4 ± 1.7 nm	11.8 ± 5.3 nm	1 : 1
	SOLVER	8.6 ± 2.6 nm	13.2 ± 4.1 nm	2.5 : 1
	<i>Tri-exp. Fit</i>	7.4 ± 0.2 nm	8.9 ± 0.2 nm	11.6 ± 0.1 nm

Zusammenfassung

Die für das FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655 ermittelten Abstandsverteilungen besitzen zwei Verteilungsmaxima, die mit etwa 8.4 nm (Abstand der oberflächennahen Lumi4Tb-Schicht vom Quantenpunktzentrum) bzw. etwa 11.9 nm (Abstand der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht vom Zentrum des Nanokristalls, ohne Berücksichtigung des SOLVER-Ergebnisses für diesen Abstand) ca. 0.5 nm kleiner (oberflächennahe Schicht) bzw. im Bereich der Erwartungen (oberflächenferne Schicht) sind. Unter Berücksichtigung einer durch die flexiblen PEG-Spacer der Polymerhülle verursachten Verringerung der Hüllendicke, welche vor allem den Abstand der oberflächennahen Lumi4Tb-Schicht beeinflusst, und intramolekularer Bewegungen innerhalb des Streptavidins, die die oberflächenfern gebundenen Lumi4Tb-Komplexe betrifft und deren mittlere Abstände vergrößert, stimmen die ermittelten Abstände mit der im Assay tatsächlich existierenden Abstandsverteilung wahrscheinlich gut überein. Der kurzlebige Anteil der Abstandsverteilungen ist im Vergleich zu den Erwartungen überrepräsentiert, was, wie in Abschnitt 5.7.1 erläutert, wahrscheinlich auf die Reihenfolge der Zugabe von Donor und Akzeptor zum Assay zurückzuführen ist. Die Annahme einer mittleren sphärischen Gestalt der Quantenpunkte trifft die ermittelten Abstände wesentlich besser als die Annahme einer ellipsoidalen Idealform. Der parallel durchgeführte diskrete Fit der Lumineszenzabklingkurven mit drei Exponentialfunktionen lieferte den Ergebnissen der Kurvenanpassung durch Verteilungsfunktionen ähnliche Werte für den mittleren Abstand der beiden

Lumi4Tb-Schichten vom Quantenpunktzentrum und das Verteilungsverhältnis der Lumi4Tb-Komplexe innerhalb dieser beiden Schichten. Die Abstandsverteilung der kürzeren Abstände wurde dabei durch zwei diskrete Werte repräsentiert, der Abstand der oberflächenfernen Schicht durch einen Abstand. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Lösungsansätze spricht für eine korrekte Rekonstruktion der Abstandsverteilungen im FRET-System über Verteilungsfunktionen.

5.7.5 Lumi4Tb und QD705

In den Lumineszenzabklingkurven von Akzeptor und Donor des FRET-Paares Lumi4Tb-Strep-Biot-QD705 ist der Einfluss des effizienten FRET gut zu erkennen (Abbildung 5.64). Die Donorlumineszenzabklingkurven zeigen mit zunehmender Quantenpunktkonzentration eine deutliche Formänderung, die kurzlebigen FRET-induzierten Lumineszenzlebenszeiten führen zu einem schnelleren Abklingen der Lumineszenz, das Abklingverhalten ist multiexponentiell. Dieses multiexponentielle Verhalten ist bei den Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren noch besser zu erkennen, gleichzeitig sind die FRET-induzierten Lebenszeiten der Akzeptorlumineszenz, im Vergleich zu der Lumineszenzabklingzeit des Donors wesentlich kürzere.

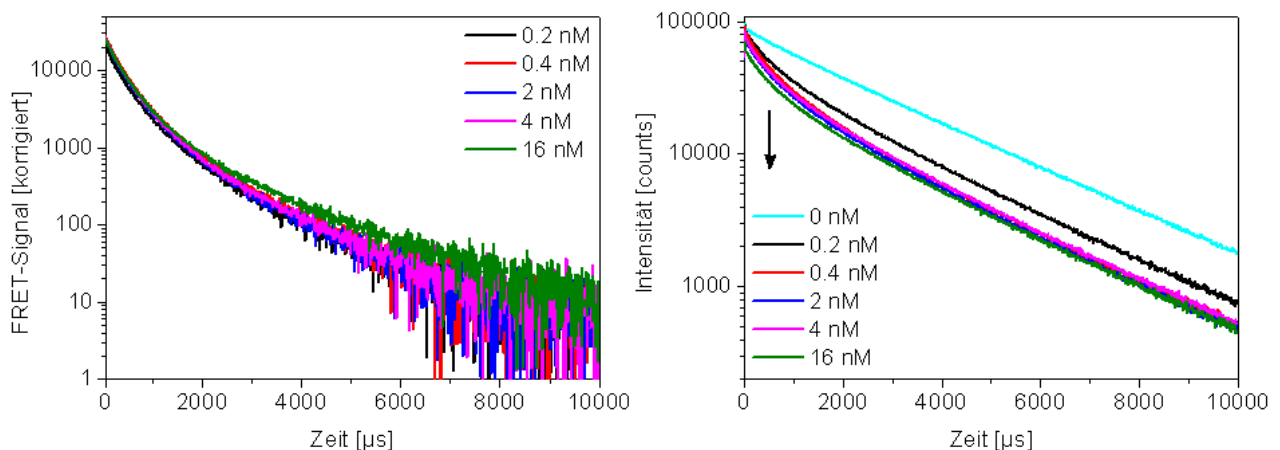


Abbildung 5.64. Lumineszenzabklingkurven der Akzeptoren und Donoren im FRET-Assay in Abhängigkeit von der Quantenpunktkonzentration **links:** FRET-Signal der biotinylierten Quantenpunkte QD705 **rechts:** Lumineszenzabklingkurven des Lumi4Tb-Streptavidinkomplexes

Die Kurvenanpassung durch eine Lebenszeitverteilung ergab für Donor und Akzeptor die in Abbildung 5.65 dargestellten Verteilungen. Die Auswertung sowohl der Akzeptor- als auch der Donorlumineszenzsignale liefert auch hier eine FRET-Lebenszeitverteilung, die zwei Maxima aufweist, ein schmales und gut ausgeprägtes, mit auslaufender rechter Flanke mit einem Maximum bei Lebenszeiten um 330 μs (Akzeptor) bzw. 430 μs (Donor) sowie ein breiteres, weniger akzentuierteres Maximum bei 1600 μs (Akzeptor) bzw. 2450 μs (Donor), dessen Gesamtanteil an der Lebenszeitverteilung insgesamt kleiner ist. Die aus Donor- und Akzeptorlumineszenz ermittelten Lebenszeitverteilungen unterscheiden sich insbesondere im Anteil längerer

Lebenszeiten deutlich, wohingegen Form und Lage des kurzlebigen Anteils recht ähnlich sind. Die Unterschiede in den Verteilungen lassen sich zum einen darauf zurückführen, dass die Lumineszenzintensität des Akzeptors im Assay insgesamt recht niedrig war (vgl. Abbildung 5.64 mit Abbildung 5.61 für das sehr ähnliche System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655, die FRET-induzierte Lumineszenzintensität liegt um den Faktor 5 niedriger), wodurch die langen FRET-induzierten Lebenszeiten durch das daraus resultierende wesentlich schlechtere Signal-Rausch-Verhältnis mathematisch nicht gut rekonstruiert werden können. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Lebenszeitverteilung des Donors die Lumineszenzlebenszeiten des ungebundenen Donors, der zu einem gewissen Anteil im Probenvolumen vorliegt, mit berücksichtigt und dadurch das Verteilungsmaximum im Vergleich zum tatsächlichen in Richtung längerer Lebenszeiten verschoben ist. Die Lebenszeitverteilungen zeigen eine wesentlich größere Übereinstimmung mit den Lebenszeiten, wie sie im Falle sphärischer Gestalt der Quantenpunkte erwartet werden.

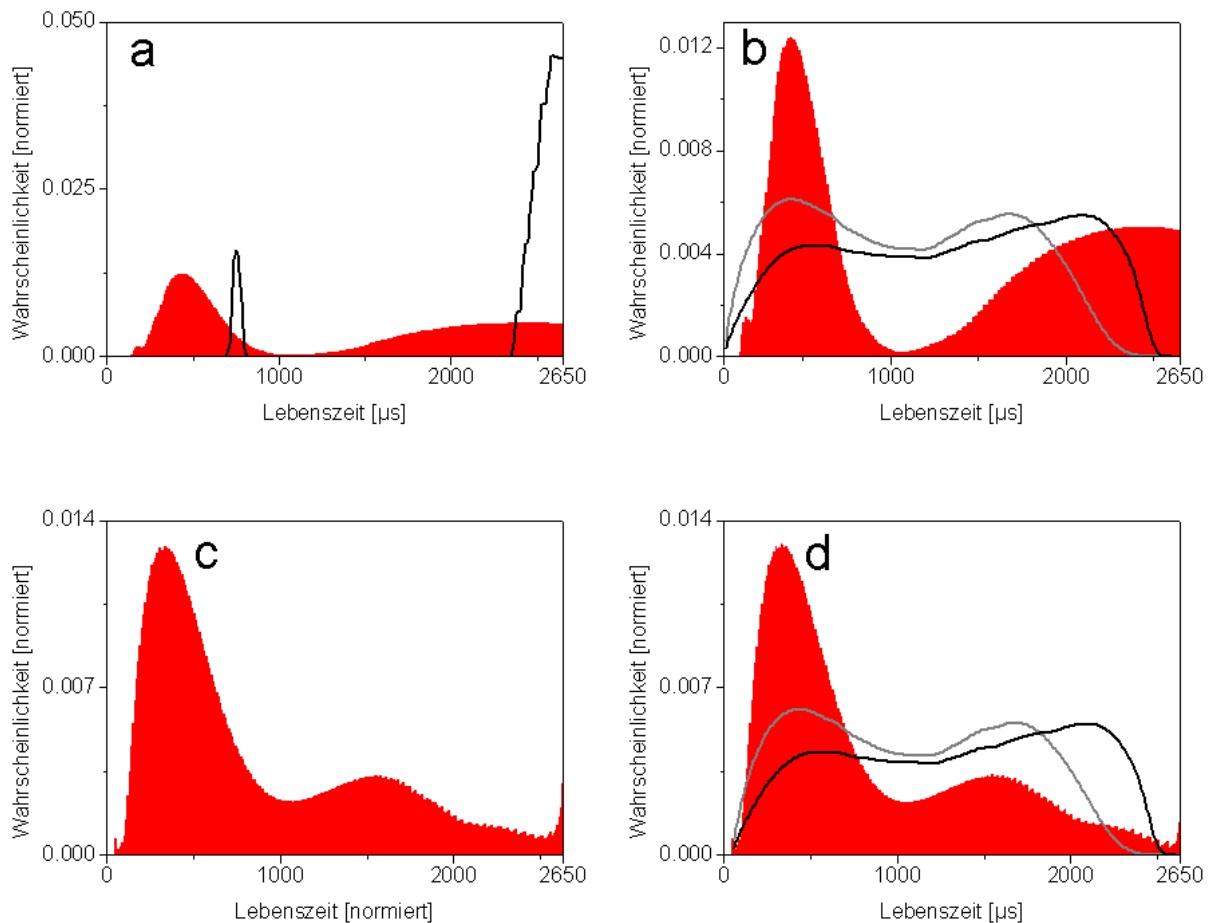


Abbildung 5.65. Mit Hilfe von FAST ermittelte Lebenszeitverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD705, gemittelt über alle Messungen **a)** Lebenszeitverteilung des Donors in Anwesenheit (rot) und Abwesenheit des Akzeptors (schwarz) **b)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Donors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz = ellipsoidale Form, grau = sphärische Form) **c)** ermittelte FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors **d)** Vergleich der ermittelten FRET-Lebenszeitverteilung des Akzeptors (rot) mit der theoretisch erwarteten (schwarz = ellipsoidale Form, grau = sphärische Form).

Abbildung 5.66 zeigt die aus den FRET-Lebenszeitverteilungen errechneten sowie die mit SOLVER ermittelten Abstandsverteilungen und stellt diese den Verteilungen, die für eine ellipsoidale bzw. sphärische Form der Quantenpunkte erwartet werden gegenüber. Die Lage der Maxima sowie das Peakverhältnis sind für bestimmte und erwartete Verteilungen in Tabelle 5.13 aufgeführt. Die geringe Signalintensität führt zu Unsicherheiten bei der Bestimmung der längeren Anteile der Abstandsverteilung für beide Bestimmungsmethoden. Infolgedessen weichen die Ergebnisse stark voneinander ab. Der Anteil der kürzeren Abstände der oberflächennahen Lumi4Tb-Schicht vom Quantenpunktzentrum kann im Vergleich dazu mit geringerem Fehler bestimmt werden. Ein Vergleich der ermittelten mit den erwarteten Abständen zeigt eine wesentlich bessere Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Erwartungen für den Fall einer mittleren sphärischen Gestalt der Quantenpunkte im Assay. Die einzelnen, die Lumi4Tb-Schichten repräsentierenden, Abstandsanteile sind allerdings nicht gleich groß, die kürzeren Abstände treten wahrscheinlicher auf, d.h. es sind mehr Lumi4Tb-Komplexe oberflächennah zum Quantenpunkt gebunden als erwartet.

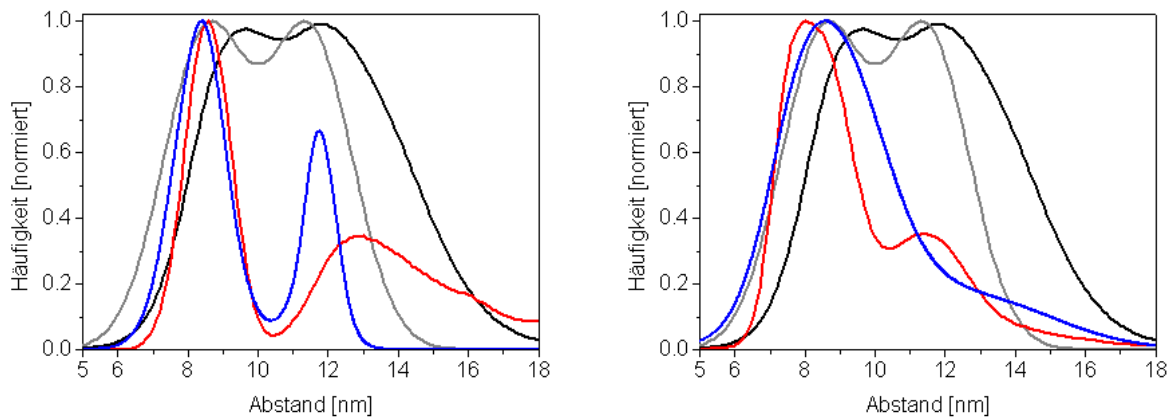


Abbildung 5.66. Ermittelte Abstandsverteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD705, gemittelt über alle Messungen (FAST = rot, SOLVER = blau) im Vergleich mit den erwarteten Abstandsverteilungen (schwarz = ellipsoidale Form, grau = sphärische Form der Quantenpunktgesamtheit **a**) Vergleich der ermittelten FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors mit den theoretisch erwarteten **b**) Vergleich der ermittelten FRET-Abstandsverteilungen des Donors mit den theoretisch erwarteten.

Tabelle 5.13 Vergleich der durch FAST und SOLVER aus Akzeptor- und Donorlumineszenzabklingkurven ermittelten mit den erwarteten Abständen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD705.

		Maximum	Maximum	Peakverhältnis
		Abstandsverteilung 1	Abstandsverteilung 2	
Erwartet	Ellipsoid	9.5 nm	12.9 nm	1 : 1
	Kugel	8.9 ± 1.2 nm	11.9 ± 1.2 nm	1 : 1
Akzeptor	FAST	8.2 ± 1.7 nm	11.4 ± 3.4 nm	2.1 : 1
	SOLVER	8.4 ± 1.5 nm	11.8 ± 1.0 nm	2.3 : 1
	<i>Tri-exp. Fit</i>	7.3 ± 0.1 nm	8.6 ± 0.1 nm	11.2 ± 0.2 nm
Donor	FAST	8.5 ± 1.3 nm	13.0 ± 4.0 nm	1.4 : 1
	SOLVER	8.7 ± 2.7 nm	13.5 ± 5.1 nm	4 : 1
	<i>Tri-exp. Fit</i>	7.1 ± 0.3 nm	8.7 ± 0.2 nm	11.2 ± 0.1 nm

Bei der Bestimmung mit dem Excel-Tool SOLVER traten Schwierigkeiten der Unterscheidung zwischen den Lumineszenzsignalen des FRET von oberflächenferner Lumi4Tb-Schicht auf den Quantenpunkt und der Lumineszenzlebenszeit des ungebundenen Donors auf, wodurch der ermittelte Abstandsanteil im Donorkanal unterrepräsentiert und das Maximum rechtsverschoben ist. Dieses Ergebnis bleibt daher unberücksichtigt.

Zusammenfassung

Aus den Lumineszenzabklingkurven sowohl des Akzeptors als auch des Donors lassen sich für das FRET-Paar Lumi4Tb-Strep-Biot-QD705 Abstandsverteilungen ermitteln, die in der Lage der Maxima und ihrer Form mit den für sphärische Quantenpunkte erwarteten Abständen gut übereinstimmen. Die beiden Abstandsmaxima im FRET-System wurden zu 8.4 nm (Abstand zwischen oberflächennaher Schicht der Lumi4Tb-Komplexe und Quantenpunktzentrum) bzw. zu etwa 12.1 nm (Abstand der zwischen der oberflächenfernen Schicht und dem Zentrum des Nanokristalls, ohne Berücksichtigung des SOLVER-Ergebnisses für diesen Abstand) bestimmt. Der mittlere Abstand der oberflächennahen Lumi4Tb-Schicht ist daher etwa 0.5 nm kleiner, der mittlere Abstand der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht hingegen etwa genauso groß wie erwartet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der durch die Flexibilität der PEG-Spacer erwarteten Verringerung der Dicke der Polymerhülle und der durch intramolekulare Bewegungen im Streptavidin verursachten Vergrößerung des mittleren Abstands der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht. Eine Kurvenanpassung der Lumineszenzabklingkurven über Verteilungsfunktionen scheint daher in der Lage

zu sein, die im Assay herrschenden Bindungsverhältnisse annähernd korrekt wiederzugeben. Gestützt wird dies vom Vergleich der Ergebnisse mit den durch einen diskreten Fit der Lumineszenzabklingkurven aus drei Exponentialfunktionen ermittelten mittleren Abständen im FRET-System, die ähnliche Werte besitzen. Auch das Verteilungsverhältnis der Lumi4Tb-Komplexe zwischen beiden Schichten wurde durch einen diskreten Fit ähnlich bestimmt.

5.7.6 Fazit

Es wurden die in Abschnitt 5.6 aus den photophysikalischen Eigenschaften, den FRET-Parametern und der Gestalt der Quantenpunkte erwarteten FRET-Lebenszeiten für die FRET-Paarungen von Lumi4Tb-Pep mit den Quantenpunkten Biot-QD525, Biot-QD565, Biot-QD605, Biot-QD655 und Biot-QD705 dargestellt und die experimentell ermittelten Lumineszenzabklingkurven jedes FRET-Systems über eine Lebenszeitverteilung (FAST) bzw. eine Abstandsverteilung (SOLVER) angepasst. Dabei wurden die aus den Untersuchungen der FRET-Paare von Lumi4Tb-Pep mit den fünf ITK-Quantenpunkten gewonnenen Erkenntnisse zum Beitrag aller Emissionsbanden des Terbiumkomplexes zum Energietransfer ebenso berücksichtigt, wie die Schlussfolgerungen, die anhand der Ergebnisse des Abschnitts 5.5 hinsichtlich der mittleren Form der Quantenpunkte im Probenvolumen gezogen wurden. Da der Orientierungsfaktor κ^2 der Emissions-Übergangsdipolmomente der Donoren und der Absorptions-Übergangsdipolmomente der Akzeptoren zueinander für den Energietransfer von Terbiumdonoren auf die Quantenpunkte zu $2/3$ bestimmt werden konnte, wurde dieser Wert ebenfalls als Standard angenommen. Ein Vergleich der aus den Lumineszenzsignalen von Donor und Akzeptor in den Biotin-Streptavidin-Assays ermittelten Abstandsverteilungen mit den Erwartungen zeigte auch hier, dass die FRET-Theorie zur Erklärung des Energietransfers von Terbiumkomplexen auf Quantenpunkte herangezogen werden kann, da eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit den erwarteten Abständen bei einer r^6 -Abhängigkeit des Energietransfers erkennbar ist. Weiterhin zeigten die ermittelten Abstandsverteilungen die größte Übereinstimmung zu den erwarteten Verteilungen, die unter Berücksichtigung einer mittleren sphärischen Gestalt der Quantenpunktgesamtheit berechnet wurden. Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den in Abschnitt 5.5.6 dargelegten Schlussfolgerungen. Neben Aussagen zur Gestalt der Quantenpunkte und der Größe der FRET-Parameter Überlappungsintegral und Orientierungsfaktor lassen sich aus den Abstandsverteilungen, die für die Lumi4Tb-Strep-Biot-QD-Assays ermittelt wurden weitere Rückschlüsse ziehen: Die aus fünf Nanometern langen PEG-Spacern bestehende Polymerhülle der Quantenpunkte weist eine etwas geringere Dicke auf. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der in Abschnitt 5.6.1 dargelegten erwarteten Reduktion der Dicke der Polymerhülle. Der Abstand zwischen oberflächennaher Lumi4Tb-Schicht und der oberflächenfernen wurde im Mittel mit 3.5 nm größer bestimmt als erwartet. Dies scheint eine Folge intramolekularer Bewegungen innerhalb des Streptavidinmoleküls zu sein, bei der sich die an die Lysin-Seitenketten der oberflächenfernen Streptavidinmonomere gebundenen Lumi4Tb-Komplexe durch Rotationen um die Bindungen im Lysin weiter entfernt vom Quantenpunktzentrum aufhalten, als die statische Struktur des Streptavidins es vermuten lässt. Da die Effizienz des Energietransfers von der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht auf den Quantenpunkt aber niedrig ist, führen selbst kleine Differenzen hier zu großen Änderungen des ermittelten Abstands. Während der Abstand der oberflächennahen Schicht

relativ exakt bestimmt werden kann, ist dies für die Abstände der oberflächenfernen Schicht nicht ohne weiteres möglich. Die hier getroffenen Schlussfolgerungen hinsichtlich des Abstands der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schicht sind daher vorläufiger Natur und als Arbeitshypothesen zu sehen.

Nicht zuletzt ermöglichen die ermittelten Abstandsverteilungen auch eine Aussage zur Verteilung der Lumi4Tb-Komplexe innerhalb der beiden möglichen Schichten. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, daß mehr Lumi4Tb-Komplexe nahe der Quantenpunktoberfläche gebunden sind. Dieses Ergebnis ist aber durch Strukturanalysen nicht erklärbar, da die Lumi4Tb-Komplexe innerhalb des Streptavidin-Moleküls statistisch verteilt sind und keine der vier möglichen Biotinbindungen bevorzugt wird. Die bevorzugte oberflächennahe Bindung scheint daher durch die Pipettierreihenfolge verursacht zu sein. Da zuerst die Quantenpunkte im Probenvolumen vorliegen und dann die Lumi4Tb-gelabelten Streptavidin-Moleküle zugegeben werden, scheint es am Ort der Bindung jeweils einen lokalen Überschuß an Quantenpunkten zu geben, so dass ein Streptavidin-Molekül im Mittel mehr als ein Quantenpunkt bindet und so pro Streptavidin zwei oberflächennahe Lumi4Tb-Schichten entstehen (siehe Abbildung 5.67).

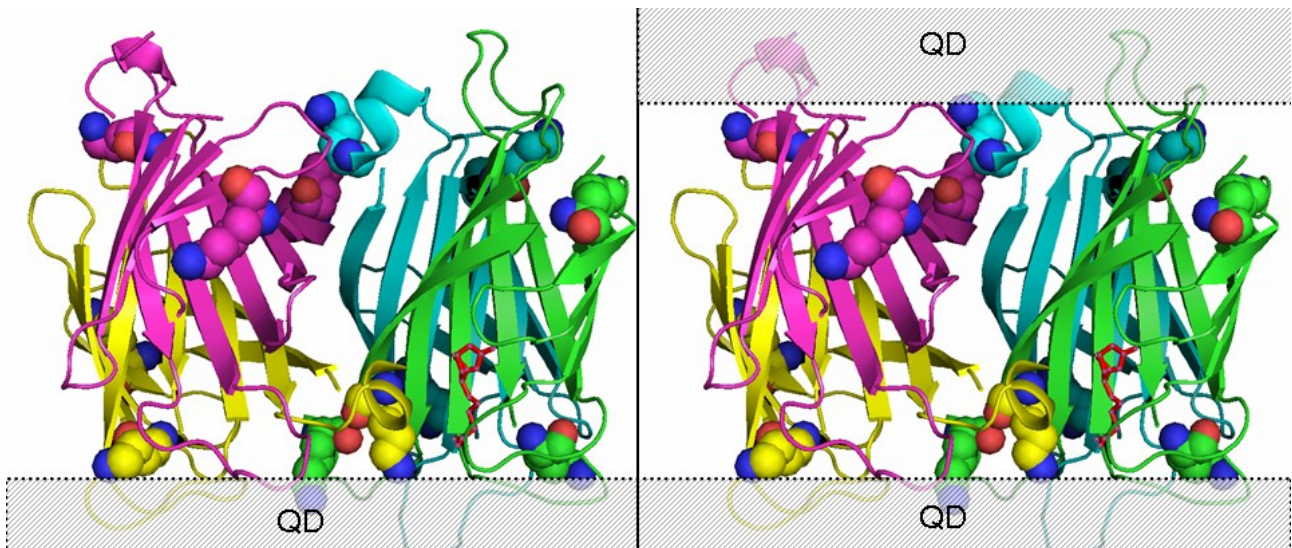


Abbildung 5.67. Ursache der Entstehung eines Überschusses an oberflächennah gebundenen Lumi4Tb-Komplexen infolge der Pipettierreihenfolge. Es erfolgt die Zugabe von Lumi4Tb-gelabeltem Streptavidin zu einer Lösung von Quantenpunkten. Am Ort der Mischung herrscht ein Quantenpunktüberschuß. **links:** erwartetes Bindungsverhältnis von einem Quantenpunkt pro Streptavidinmoleküle. Es befinden sich Lumi4Tb-Komplexe in zwei Schichten oberflächennah und oberflächenfern. **rechts:** aufgrund des Quantenpunktüberschusses am Ort der Mischung binden zwei Quantenpunkte pro Streptavidin. Da die Nanokristalle aufgrund ihrer Größe nur an gegenüberliegenden Biotinbindungsstellen binden können, existieren im Streptavidin-Molekül zwei oberflächennahe Lumi4Tb-Verteilungen. Gleichzeitig ist die Zahl ungebundener Streptavidin-Moleküle im Probenvolumen größer als die Bindungskonstante der Biotin-Streptavidin-Bindung erwarten lässt.

6. Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Die genaue Kenntnis des strahlungslosen Energieübertrags von lumineszenten Terbiumkomplexen auf Quantenpunkte ist aufgrund der besonderen Eigenschaften dieses Donor-Akzeptor-Systems von großem Interesse. Die langlebige Lumineszenz der Terbiumkomplexe und die intensive, schmalbandige und innerhalb des gesamten sichtbaren Spektralbereichs einstellbare Emission der Quantenpunkte machen sie zu geeigneten Kandidaten, um hochsensitive und störungsarme Multiplex-Abstandsmessungen in biologischen Systemen und Prozessen durchzuführen. Die gleichzeitige Detektion mehrerer Abstandsmarker in einer Messung reduziert nicht nur die Analysedauer erheblich, sondern ermöglicht die genaue Auflösung dreidimensionaler Prozesse im Nanometerbereich, etwas, das das Verständnis komplexer biologischer Vorgänge erheblich verbessern würde. Diese Abstandsbestimmungen setzen jedoch eine genaueste Kenntnis des Mechanismus des Energietransfers von lumineszenten Terbiumkomplexen auf Halbleiternanokristalle ebenso voraus, wie das Wissen um Form und Gestalt letzterer. Da diese Quantenpunkte im Vergleich zu biologischen Strukturen eine ähnliche Größe besitzen, können sie nicht als punktförmig betrachtet werden, wie es bei einfacheren Farbstoffen möglich ist. Durch ihre Form und Gestalt kommt es notwendigerweise zu einer Abstandsverteilung innerhalb des Donor-Akzeptorsystems. Dies beeinflusst den Energietransfer und damit die experimentell ermittelten Ergebnisse.

In dieser Arbeit wurde der Energietransfer zwischen lumineszenten Terbiumkomplexen als Donoren und Halbleiternanokristallen als Akzeptoren untersucht, um zu einer Aussage hinsichtlich des genauen Mechanismus der Energieübertragung und der dabei zu berücksichtigenden photophysikalischen Parameter der Terbiumkomplexe und der Nanokristalle zu gelangen. Mit der Annahme einer Abstandsverteilung innerhalb der Energietransfersysteme sollten die Größen der Quantenpunkte bestimmt und der Einfluss von Form und Gestalt auf den Energietransfer betrachtet werden.

Die dazu notwendigen Messungen gliederten sich in drei Teile, die Charakterisierung der photophysikalischen Eigenschaften der verwendeten Donoren und Akzeptoren, die Zink-Histidin-Assays zur Bestimmung der FRET-Parameter sowie der Form und Gestalt des anorganischen Quantenpunktkerns und die Biotin-Streptavidin-Assays zur Bestimmung der komplexeren Form und Gestalt biokompatibler Quantenpunkte mit Polymerhülle sowie zur Überprüfung der Ergebnisse der Zink-Histidin-Assays und der aufgestellten Hypothesen.

Im ersten Teil der Messungen wurden die Quantenpunkte und Terbiumkomplexe durch Absorptions- und Lumineszenzspektroskopie (stationär und zeitaufgelöst) charakterisiert. Die Donorkomplexe zeigten dabei ein typisches Absorptionsmaximum bei 340 nm sowie spektral gut getrennte, schmale Emissionsbanden im Wellenlängenbereich 490 - 650 nm. Die Lumineszenzlebenszeiten der beiden Donorkomplexe wurden zu 2430 μ s (Lumi4Tb-Pep) bzw. 2650 μ s (Lumi4Tb-Strep) bestimmt, die für die Berechnung des Förster-

Radius notwendige Quantenausbeute wurde aus den Lumineszenzlebenszeiten zu 0.7 bzw. 0.77 berechnet. Die Absorption der Quantenpunkte ergab jeweils ein sehr breites Absorptionsspektrum, wobei die Absorptivität in Richtung kürzerer Wellenlängen stark anstieg, die ermittelten Extinktionskoeffizienten betragen $> 10^5\text{-}10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Emission der Halbleiternanokristalle war gekennzeichnet durch ein schmalbandiges, symmetrisches und von der Größe der Quantenpunkte abhängiges Emissionsmaximum. Aus den photophysikalischen Parametern wurden die Überlappungsintegrale $J(\lambda)$ und Förster-Radien R_0 der Energietransfer-Paare unter Annahme einer r^6 -Abhängigkeit des Energietransfers berechnet. Die Förster-Radien zeigten die für den FRET von LTC auf QD typischen extrem hohen Werte von bis zu 11 nm.

Im zweiten Teil der Messungen wurde der Energietransfer von dem an das Peptid Pep-411 gelabelten Lumi4Tb-Komplex auf ITK-Quantenpunkte untersucht. Dazu wurden für jedes FRET-Paar acht Messungen mit jeweils demselben Konzentrationsverhältnis von Donor zu Akzeptor durchgeführt. Die erhaltenen Lumineszenzabklingkurven des Akzeptors wurden nach der im Anhang A.4 beschriebenen Korrektur von Störsignalen befreit und anschließend über FRET-Lebenszeit- und Abstandsverteilungen ausgewertet. Um die Ergebnisse einordnen zu können wurden dazu vorher die für jede Kombination von Lumi4Tb-Pep mit ITK-Quantenpunkten erwarteten Lebenszeit- und Abstandsverteilungen anhand der photophysikalischen Parameter von Donor und Akzeptoren sowie der durch TEM-Bilder und Herstellerangaben bekannten Gestalt und Größe der Quantenpunkte ermittelt. Theoretischer Ausgangspunkt dafür war auch hier die FRET-Theorie, also die r^6 -Abhängigkeit der Effizienz des Energietransfers. Da eine Aussage hinsichtlich der Beteiligung der Emissionsbanden des Terbiums mit elektronischem oder magnetischem Charakter am Energietransfer getroffen und außerdem der Nachweis darüber geführt werden sollte, ob die Annahme eines Orientierungsfaktors κ^2 mit dem Wert $2/3$ für den Energietransfer von LTC auf Quantenpunkte zutreffend ist, wurden für die verschiedenen Annahmen erwartete Lebenszeitverteilungen berechnet. Ein multiexponentielles Abklingen der Lumineszenz der Akzeptoren in den jeweiligen Assays lieferte einen ersten Hinweis auf eine Abstandsverteilung in den FRET-Systemen. Dieses konnte durch die Auswertung bestätigt werden. Während der Fit mit Hilfe zweier (QD525 und QD565) bzw. dreier (QD605, QD655, QD705) diskreter Exponentialfunktionen, welcher der übliche Ansatz zur Beschreibung von FRET-sensitiver Lumineszenz ist, je nach FRET-Paar Ergebnisse unterschiedlicher Güte lieferte, ließen sich die Lumineszenzabklingkurven mit guter Genauigkeit in allen FRET-Systemen durch Lebenszeitverteilungen beschreiben. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Annahmen hinsichtlich eines Energietransfers nach Förster unter Beteiligung aller Emissionsbanden des Terbiums am Transfer zutreffend waren und ein Orientierungsfaktor κ^2 von konstant $2/3$ die Lage der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptoren zueinander mit guter Genauigkeit beschrieb. Neben der im Mittel höheren Genauigkeit besaß die Kurvenanpassung über Verteilungsfunktionen noch einen weiteren Vorteil, denn dadurch ließen sich dem Lumineszenzsignal zusätzliche Informationen entnehmen, die insbesondere zur Bestimmung der Form der Quantenpunkte in der Probe von Interesse waren. Ein Vergleich der ermittelten mit den erwarteten FRET-Lebenszeitverteilungen lieferte einen Hinweis darauf, dass bei den als ellipsoidal angenommenen Quantenpunkten im Mittel der Probengesamtheit eher von sphärischer Gestalt auszugehen war, da die ermittelten Lebenszeitverteilungen in Richtung längerer Lebenszeiten wesentlich schneller abklangen, als dies erwartet wurde. Eine Berücksichtigung mittlerer, sphärischer Gestalt der Quantenpunktgesamtheit führte

hingegen zu einer wesentlich größeren Übereinstimmung von ermittelten und erwarteten Lebenszeitverteilungen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden für den dritten Teil der Messungen die Abstands- und daraus resultierenden FRET-induzierten Lebenszeitverteilungen nicht nur für ellipsoidale Formen sondern auch für den Fall einer mittleren sphärischen Gestalt der Halbleiter-Nanokristalle durchgeführt. Des Weiteren konnte anhand der Kurvenanpassung über eine Lebenszeitverteilung die Aggregation von Quantenpunkten im Probenvolumen festgestellt werden, die mit zunehmender Größe der Nanopartikel erwartungsgemäß abnahm.

Der dritte Teil der Messungen hatte die Untersuchung des Energietransfers von Lumi4Tb-gelabeltem Streptavidin auf biotinylierte Quantenpunkte zum Inhalt. Dabei wurden für jedes FRET-Paar die Donor- und Akzeptorlumineszenz von Assays mit vier verschiedenen Verhältnissen von Donor zu Akzeptoren mehrmals zeitaufgelöst vermessen und anschließend die gemittelten und korrigierten Lumineszenzabklingkurven über FRET-Lebenszeit- und Abstandsverteilungen angepasst. Die aus dem vorherigen Teil der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bildeten die Grundlage zur Berechnung der erwarteten Abstands- und Lebenszeitverteilungen der fünf FRET-Paarungen von Lumi4Tb-gelabeltem Streptavidin und den biotinylierten Quantenpunkten, mit denen die Ergebnisse der Messungen verglichen werden sollten. Ein diskreter Fit der Lumineszenzsignale mit zwei (QD525 und QD565) bzw. drei (QD605, QD655, QD705) Exponentialfunktionen wurde als Vergleich und zur Überprüfung der Ergebnisse zusätzlich durchgeführt. Die auf Grundlage der Messungen ermittelten FRET-Lebenszeitverteilungen zeigten, wie erwartet, zwei Lebenszeitmaxima, die die beiden um die Quantenpunktakzeptoren verteilten Donorschichten repräsentierten. Das Verhältnis dieser beiden Peaks unterschied sich allerdings von den Erwartungen, da kurze und lange Lebenszeitanteile nicht gleichverteilt auftraten, sondern der Anteil kurzer Lebenszeiten höher war. Außerdem war das experimentell bestimmte kurzlebige Maximum im Vergleich zum erwarteten zu kürzeren Lebenszeiten hin verschoben. Die aus den FRET-Verteilungen resultierenden Abstandsverteilungen spiegelten diese Abweichungen wider. Auch hier war der Anteil oberflächennah gebundener Lumi4Tb-Komplexe höher als erwartet. Der Abstand dieser Schicht lag im Mittel um 0.5 Nanometer niedriger als vermutet, wohingegen der Abstand der oberflächenfernen Schicht zum Zentrum des Quantenpunkts den Erwartungen entsprach. Der im Vergleich zu den Erwartungen erniedrigte Abstand zwischen oberflächennaher Donorschicht und Quantenpunktzentrum ließ sich mit der Flexibilität der die Polymerhülle des Quantenpunkts bildenden PEG-Moleküle erklären. Diese verursacht eine Gestaltänderung der PEG-Moleküle. Sie ordnen sich nicht in einer starren, ausgedehnten Struktur, sondern möglichst kompakt um den Halbleiterkern des Nanokristalls an, wodurch die Polymerhülle dünner wird, als die Länge der PEG-Moleküle erwarten lässt. Der intramolekulare Abstand der beiden Donorschichten im Streptavidin war im Mittel mit 3.5 Nanometern etwas größer als vermutet (3.0 nm). Bei der Bewertung dieser Abweichung ist zu berücksichtigen, dass durch die geringere Effizienz des Energietransfers von oberflächenferner Donorschicht auf den Quantenpunkt die Genauigkeit der Abstandsbestimmung sowohl aus der Akzeptor- als auch der Donorlumineszenz geringer war als bei der Bestimmung der Abstände der oberflächennahen Schicht vom Zentrum des Halbleiter-Nanokristalls. Die Abweichung lag daher im Rahmen der Bestimmungsfehler. Da der Abstand der beiden Donorschichten im Streptavidin aber bei jedem FRET-Paar systematisch größer war als vermutet, ist dies nichtsdestotrotz ein Hinweis darauf, dass durch Rotation

um die Bindungen innerhalb des Streptavidin-Moleküls sich die oberflächenfern im Streptavidin gebundenen Lumi4Tb-Komplexe im Mittel weiter vom Quantenpunkt entfernt befinden als erwartet. Diese Arbeitshypothese muß allerdings durch weitere Messungen bestätigt werden. Die Ungleichverteilung der Donor-Komplexe innerhalb der beiden Schichten wurde dem Pipettierschema zugeschrieben, welches dazu führt, dass viele Streptavidine mehr als einen Quantenpunkt binden, wodurch mehr Lumi4Tb-Komplexe oberflächennah zu einem Quantenpunkt gebunden sind. Gleichzeitig liegen mehr ungebundene Lumi4Tb-Donoren im Probenvolumen vor als erwartet. Die als Vergleich durchgeführte Kurvenanpassung über zwei bzw. drei diskrete Exponentialfunktionen lieferte im Gegensatz zu den Zink-Histidin-Assays für alle FRET-Paare im Biotin-Streptavidin-Bindungssystem ebenfalls Abstandsergebnisse, die mit den Erwartungen gut übereinstimmen. Jedoch scheitert der Versuch, mit Hilfe diskreter Fits Aussagen zur Gestalt der Quantenpunkte zu treffen. Über die Form der Verteilungskurve ist es hingegen möglich durch Abstandsverteilungen Aussagen in dieser Hinsicht zu treffen. So ist die Übereinstimmung der Form der ermittelten Verteilungen mit der Form der erwarteten für eine mittlere sphärische Gestalt der Quantenpunktgesamtheit wesentlich größer und steht damit in Übereinstimmung zu den aufgrund der Ergebnisse des FRET von Lumi4Tb-Pep auf ITK-Quantenpunkte getroffenen Vermutungen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Theorie des Förster-Resonanzenergietransfers auf FRET-Paare von lumineszenten Terbium-Komplexen als Donoren mit Quantenpunkten als Akzeptoren anwendbar ist. Dabei tragen alle Emissionsbanden des Donors zum Energietransfer bei, der Orientierungsfaktor κ^2 nimmt dabei aufgrund isotroper Verteilungen sowohl des Donor- als auch des Akzeptor-Übergangsdipolmoments den Wert $2/3$ an. Der Abstand zwischen LTC-Donoren und QD-Akzeptoren lässt sich zuverlässig mit Hilfe von Abstandsverteilungen aus den FRET-Lumineszenzsignalen bestimmen, wohingegen eine Kurvenanpassung durch diskret-exponentielle Fits nicht immer ein aussagekräftiges Ergebnis liefert. Die Charakterisierung der Bindungsverhältnisse innerhalb der FRET-Paare von LTC und QD über Verteilungsfunktionen bietet über die Form der Verteilungskurve die Möglichkeit Aussagen über die Gestalt der FRET-Partner zu treffen. Während der kleine Lumi4Tb-Komplex als punktförmig angenommen werden kann, hat die Gestalt der Quantenpunkte einen Einfluss auf die erwarteten Abstands- und FRET-Lebenszeitverteilungen. So war es möglich, die mittlere Form der Quantenpunkte als Sphäre zu bestimmen. Dies entsprach, insbesondere bei den in z-Richtung des Kristallgitters elongierten Quantenpunkten, nicht den Erwartungen. Dieser Befund ermöglicht daher bei zukünftigen Messungen eine Verbesserung der Genauigkeit bei Abstandsbestimmungen mit Quantenpunkten. Neben der Bestimmung der die FRET-Verteilung bestimmenden Gestalt der Quantenpunkte konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand vergleichender Messungen die Dicke der Polymerhülle der Quantenpunkte bestimmt und so gezeigt werden, dass FRET-Paare aus lumineszenten Terbium-Komplexen und Quantenpunkten in der Lage sind, Abstände im Nano- bis Sub-Nanometerbereich aufzulösen. Die geringe FRET-Effizienz des Energietransfers für Abstände > 10 nm macht deren Bestimmung mit Hilfe von lumineszenten Terbiumkomplexen und Quantenpunkten allerdings schwierig, was infolge eines Quantenpunktradius von > 7 nm dem Einsatz von FRET-Systemen aus LTC und QD zur Abstandsbestimmung Grenzen setzt. Diese Beschränkung wurde bei der Bestimmung der Abstände der oberflächenfernen Lumi4Tb-Schichten im Streptavidin-Biotin-System deutlich.

6.2 Ausblick

Der Energietransfer von lumineszenten Terbiumkomplexen auf Quantenpunkte bietet aufgrund der einzigartigen photophysikalischen Eigenschaften der beteiligten Donoren und Akzeptoren die Möglichkeit Abstandsmessungen in biologischen Systemen mit hoher Präzision bei geringem zeitlichen Aufwand durch gleichzeitige Detektion der Lumineszenz mehrerer FRET-Sonden (Multiplexing) durchzuführen. Der Einsatz solcher FRET-Paare erfreut sich daher zunehmender Beliebtheit. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist es nun möglich, die Genauigkeit der Abstandsbestimmung durch die Berücksichtigung der Form der Quantenpunkte und einer Kurvenanpassung über Abstandsverteilungen weiter zu verbessern. Dies kann jedoch nur ein erster Schritt gewesen sein, den FRET von LTC auf QD als Mittel der Wahl zur Abstandsbestimmung in biologischen Systemen zu etablieren, denn weiterhin sind verschiedene Fragen offen. Erst einmal ist es notwendig, die hier dargelegten Ergebnisse der Bestimmung der Polymerhüllendicke durch vergleichende TEM-Aufnahmen zu verifizieren. Weiterhin muß ein geeignetes Pipettierschema entwickelt werden, um den Anteil ungebundener Donor-Komplexe im Probenvolumen zu minimieren und so die Genauigkeit der Abstandsbestimmung mit Hilfe der verbreiteten Biotin-Streptavidin-Bindung sowie der unspezifischen Zink-Histidin-Bindung aus den Donorlumineszenzabklingkurven zu erhöhen. Durch eine geeignetere Mischung von Akzeptoren und Donoren sollte es auch möglich sein, das FRET-induzierte Lumineszenzsignal des Donors im Zink-Histidin-Assay, dessen Analyse in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, ebenfalls zu verwerten und so die vorgestellten Ergebnisse zu bekräftigen. Weiterhin muß es ein Ziel sein, biokompatible und gleichzeitig stabile Quantenpunkte zu entwickeln, die eine möglichst dünne äußere Schutzhülle besitzen. Die hier verwendeten biokompatiblen Quantenpunkte sind zwar in hohem Maße stabil, die Dicke der Polymerhülle schränkt jedoch die Verwendbarkeit zur Abstandsbestimmung stark ein, da ab einem Abstand der LTC-Donoren zum Quantenpunktzentrum von etwa 10 nm aufgrund der r^6 -Abhängigkeit des Energietransfers die Genauigkeit der Messungen stark sinkt. Abstandsmessungen mit den hier verwendeten FRET-Paaren sind effektiv also nur in einem Bereich von < 3 nm möglich. Eine Bindung der FRET-Donoren über ein His₆-Tag direkt an den Quantenpunkt, wie im Zink-Histidin-Assay der vorliegenden Arbeit, würde dieses Problem zwar umgehen, allerdings ist dies nur bei kleinen Molekülen, die die Polymerhülle der Quantenpunkte passieren können möglich und in biologischen Systemen mit Molekülgrößen von mehreren Nanometern in der Regel nicht realisierbar. Eine Reduktion der Ausdehnung der Quantenpunktschutzhülle ist daher von besonderem Interesse.

Ist diese Synthese kleinerer und damit effizienterer Quantenpunkt-Sonden möglich, so kann das FRET-System von LTC und QD aufgrund seiner Eigenschaften, der physikalischen und chemischen Stabilität und der vielseitigen Biofunktionalisierungsmöglichkeiten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt werden, um durch Multiplex-Messungen Abstände in biologischen Systemen genauestens zu bestimmen und so einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung biologischer Strukturen und Prozesse in Biochemie, Biologie, Medizin und Bioanalytik zu leisten.

Literaturverzeichnis

- [1] Lemmer, P.; Gunkel, M.; Baddeley, D.; Kaufmann, R.; Urich, A.; Weiland, Y.; Reymann, Y.; Müller, P.; Hausmann, M.; Cremer, C. "SPDM: Light Microscopy with Single-Molecule Resolution at the Nanoscale", *Appl Phys B* **2008**, *93*, 1-12.
- [2] Varghese, S. S.; Zhu, Y.; Davis, T.J.; Trowell, S.C. "FRET for Lab-on-a-Chip Devices — Current Trends and Future Prospects", *Lab Chip* **2010**, *10*, 1355-1364.
- [3] Medintz, I.L.; Matoussi, H. "Quantum dot-based Resonance Energy Transfer and its growing Application in Biology", *Phys Chem Chem Phys* **2009**, *11*, 17-45.
- [4] Miller, J.N. "Fluorescence Energy Transfer Methods in Bioanalysis", *Analyst* **2005**, *130*, 265-270.
- [5] Sahoo, H. "Förster Resonance Energy Transfer – A Spectroscopic Nanoruler: Principle and Applications", *J Photochem Photobiol C Photochem Rev* **2011**, *12*, 20-30.
- [6] Förster, T. "Energiewanderung und Fluoreszenz", *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166-175.
- [7] Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, **2006**, 3. Auflage
- [8] Stryer, L.; Haugland, R.P. "Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler", *Proc Natl Acad Sci USA* **1967**, *58*, 716.
- [9] Stryer, L. "Energy Transfer: A Spectroscopic Ruler", *Annu Rev Biochem* **1978**, *47*, 819.
- [10] Didenko, V.V. "DNA Probes using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications", *Biotechniques* **2001**, *31*, 1106.
- [11] Schuler, B. "Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy of Protein Folding", *Chem Phys Chem* **2005**, *6*, 1206.
- [12] dos Remedios, C. G.; Moens, P. D. "Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor", *J Struct Biol* **1995**, *115*, 175-85.
- [13] Sapsford, K.E.; Berti, L.; Medintz, I.L. "Materials for Fluorescence Energy Transfer Analysis: Beyond traditional Donor-Acceptor Combinations", *Angew Chem Int Ed* **2006**, *45*, 4562-4588.
- [14] Wu, P.; Brand, L. "Resonance Energy Transfer: Methods and Applications", *Anal Biochem* **1994**, *218*, 1-13.
- [15] Sönnichsen, C.; Reinhard, B.M.; Liphardt, J.; Alivisatos, A.P. "A molecular ruler based on plasmonic coupling of gold and silver nanoparticles", *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 741-745.
- [16] Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. "Quantum Dots versus Dyes as fluorescent Labels", *Nat Method* **2008**, *5*, 763-775.

-
- [17] Chudakov, D.M.; Matz, M.V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K.A. “Fluorescent Proteins and their Applications in imaging living Cells and Tissues”, *Physiol Rev* **2010**, *90*, 1103-1163.
- [18] Woehler, A.; Wlodarczyk, J.; Neher, E. “Signal/Noise Analysis of FRET-based Sensors”, *Biophys J* **2010**, *99*, 2344-2354.
- [19] Van der Meer, B. W.; Coker, G.; Chen, S. Y. S. *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*, VCH, New York; Cambridge, **1994**.
- [20] Medintz, I.L.; Uyeda, H.T.; Goldman, E.R.; Matoussi, H. “Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing”, *Nature Mat* **2005**, *4*, 435-446.
- [21] Clapp, A.R.; Medintz, I.L.; Fisher, B.R.; Anderson, G.P.; Matoussi, H. “Can luminescent Quantum Dots be efficient Energy Acceptors with organic Dye Donors?”, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 1242-1250.
- [22] Hildebrandt, N.; Charbonnière, L.J.; Beck, M.; Ziessel, R.F.; Löhmansröben, H.G. “Quantum Dots as efficient Energy Acceptors in a time-resolved Fluoroimmunoassays”, *Angew Chem Int Ed* **2005**, *44*, 7612-7615.
- [23] Hagan, A.K.; Zuchner, T. “Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays”, *Anal Bioanal Chem* **2011**, *400*, 2847-2864.
- [24] Charbonnière, L.J.; Hildebrandt, N. “Lanthanide Complexes and Quantum Dots: A bright Wedding for Resonance Energy Transfer”, *Eur J Inorg Chem* **2008**, *2008*, 3244-3251.
- [25] Hildebrandt, N.; Löhmansröben, H.G. “Quantum dot nanocrystals and supramolecular lanthanide complexes - energy transfer systems for sensitive In vitro diagnostics and high throughput screening in chemical biology”, *Curr Chem Biol* **2007**, *1*, 167-186.
- [26] Gudgin Dickson, E.F.; Pollak, A.; Diamandis, E.P. “Ultrasensitive bioanalytical Assays using Time-resolved Fluorescence Detection”, *Pharmacol Ther* **1995**, *66*, 207-235.
- [27] Moore, E.G.; Samuel, A.P.S.; Raymond, K.N. “From Antenna to Assay: Lessons learned in Lanthanide Luminescence”, *Acc Chem Res* **2009**, *42*, 542-552.
- [28] Bünzli, J.C.G. “Luminescent Lanthanide Probes as Diagnostic and Therapeutic Tools”, In Sigel, A. (Ed.); Sigel, H. (Ed.) *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 42: Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents*, Marcel Dekker Inc., New York **2004**, *42*, 39-75.
- [29] Morgner, F.; Geißler, D.; Stufler, S.; Butlin, N.G.; Löhmansröben, H.G.; Hildebrandt, N. “A Quantum-Dot based Molecular Ruler for multiplexed optical Analysis”, *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49*, 7570-7574.
- [30] Charbonnière, L.J.; Hildebrandt, N.; Ziessel, R.F.; Löhmansröben, H.G. “Lanthanides to Quantum Dots Resonance Energy Transfer in Time-resolved Fluoroimmunoassays and Luminescence Microscopy”, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 12800-12809.
- [31] Geißler, D.; Charbonnière, L.; Ziessel, R.; Butlin, N.; Löhmansröben, H.-G.; Hildebrandt, N., “Quantum-Dot Biosensors for ultrasensitive multiplexed Diagnostics”, *Angew Chem Int Ed*, **2010**, *49*, 1396–1401.

-
- [32] De Jonge, N.; Ross, F.M. "Electron microscopy of specimen in liquids", *Nat Nanotechnol*, **2011**, *6*, 695-704.
- [33] Erickson, H.P. "Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy", *Biol Proced Online*, **2009**, *11*, 32–51.
- [34] Mori, S.; Barth, H.G. *Size Exclusion Chromatography*, Springer, Berlin; Heidelberg, **1999**.
- [35] McGuinness, E.T. "Estimation of Protein Size, Weight and Asymmetry by Gel Chromatography", *J Chem Edu*, **1973**, *50*, 826-830.
- [36] Hames, B. D. (Ed.) *Gel Electrophoresis of Proteins: A classical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **2002**, *3. Auflage*.
- [37] Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L.; "Section 4.1 The Purification of Proteins is an essential first Step in understanding their Function", In *Biochemistry*, W.H. Freeman, New York, **2002**, *5. Auflage*
- [38] Van de Sande, W.; Persoons, A. "The Size and Shape of macromolecular Structures: Determination of the Radius, the Length, and the Persistence Length of Rodlike Micelles of Dodecyltrimethylammonium Chloride and Bromide", *J Phys Chem*, **1985**, *89*, 404-406.
- [39] Giepmans, B.N.G.; Derrinck, T.J.; Smarr, B.L.; Jones, Y.Z.; Ellisman, M.H. "Correlated light and electron microscoping imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots", *Nat Meth*, **2005**, *2*, 743-749.
- [40] Jauffred, L.; Oddershede, L.B. "Two-Photon Quantum Dot Excitation during Optical Trapping", *Nano Lett*, **2010**, *10*, 1927-1930.
- [41] Kim, G.B.; Kim Y.P. "Analysis of Protease Activity Using Quantum Dots and Resonance Energy Transfer", *Theranostics*, **2012**, *2*, 127-138.
- [42] Algar, W.R.; Krull U.J. "New Opportunities in multiplexed optical bioanalyses using quantum dots and donor-acceptor interactions", *Anal Bioanal Chem*, **2010**, *398*, 2439-2449.
- [43] Berberan-Santos, M.N. "Section 2 Pioneering Contributions of Jean and Francis Perrin to Molecular Luminescence", In Valeur, B. (Ed); Brochon, J.C. (Ed) *New Trends in Fluorescence Spectroscopy: Applications to Chemical and Life Sciences*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2001**.
- [44] Förster, T. "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz", *Ann Phys-Berlin* **1948**, *437*, 55-75.
- [45] Boute, N.; Jockers, R.; Issad, T. "The use of resonance energy transfer in high throughput screening: BRET versus FRET", *TRENDS Pharm Scie* **2002**, *23*, 351-354.
- [46] Selvin, P.R.; Rana, T.M.; Hearst, J.E. "Luminescence Resonance Energy Transfer", *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 6029-6030.
- [47] Kleima, F.J.; Hofmann, E.; Gobets, B.; van Stokum, I.H.M.; van Grondele, R.; Diederichs, K.; van Amerongen, H. "Förster Excitation Energy Transfer in Peridinin-Chlorophyll-a-Protein", *Biophys J* **2000**, *78*, 344-355.

- [48] Moog, R.S.; Kuki, A.; Fayer, M.D.; Boxer, S.G. "Excitation Transport and Trapping in a synthetic Chlorophyllide substituted Hemoglobin: Orientation of the Chlorophyll S₁ Transition Dipole", *Biochemistry* **1984**, *23*, 1564-1571.
- [49] Steinberg, I.Z. "Long-Range Nonradiative Transfer of electronic Excitation Energy in Proteins and Polypeptides", *Annu Rev Biochem* **1971**, *40*, 83-114.
- [50] Demas, J.N.; Crosby, G.A. "The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields", *J Phys Chem* **1971**, *75*, 991-1024.
- [51] Corry, B.; Jayatilaka, D.; Martinacs, B.; Rigby, P. "Determination of the Orientational Distribution and Orientation Factor for Transfer between Membrane-Bound Fluorophores using a Confocal Microscope", *Biophys J* **2006**, *91*, 1032-1045.
- [52] Iqbal, A.; Arslan, S.; Okumus, B.; Wilson, T.J.; Giraud, G.; Norman, D.G.; Ha, T.; Lilley, D.M.J. "Orientation dependence in fluorescent energy transfer between Cy3 and Cy5 terminally attached to double-stranded nucleic acids", *PNAS* **2008**, *105*, 11176-11181.
- [53] Dale, R.E.; Eisinger, J. "Intramolecular Distances Determined by Energy Transfer. Dependence on Orientational Freedom of Donor and Acceptor", *Biopolymers* **1974**, *13*, 1573-1605.
- [54] van der Meer, B.W. "Kappa-squared: from Nuisance to new Sense", *Rev Mol Biotechnol Chem* **2002**, *82*, 181-196.
- [55] Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [56] Förster, Th. "Transfer Mechanisms of Electronic Excitation", *Discuss Faraday Soc* **1959**, *27*, 7-17.
- [57] Annand, U.; Jash, C.; Boddepalli, R.K.; Shrivastava, A.; Mukhjeree, S. "Exploring the Mechanism of Fluorescence Quenching in Proteins Induced by Tetracycline", *J Phys Chem B* **2011**, *115*, 6312-6320.
- [58] Hashimoto, S. "Mechanism of Fluorescence Quenching of Pyrene with Purines in Polar Media. Formation of the Pyrene Triplet State via Exciplex Formation", *Discuss Faraday Soc* **1993**, *97*, 3662-3667.
- [59] Alivisatos, A.P. "Semiconductor Cluster, Nanocrystals, and Quantum Dots", *Science* **1996**, *271*, 933-937.
- [60] Murphy, C.J.; Coffey, J.L. "Quantum Dots: A Primer", *Appl Spectrosc* **2002**, *56 (1)*, 16-27.
- [61] Ekimov, A.I.; Onushchenko, A.A. "Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals", *JETP Lett* **1981**, *34*, 345-349.
- [62] Efros, A.L.; Efros, A.L. "Interband absorption of light in a semiconductor sphere", *Sov Phys Semicond* **1982**, *16*, 772-775.
- [63] Brus, L.E. "Electron-electron and electronhole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state", *J Chem Phys* **1984**, *80*, 4403-4409.

-
- [64] Clapp, A.R.; Pons, T.; Medintz, I.L.; Delehanty, J.B.; Melinger, J.S.; Tiefenbrunn, T.; Dawson, P.E.; Fisher, B.R.; O'Rourke, B.; Matoussi, H. "Two-Photon Excitation of Quantum-Dot-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer and Its Applications", *Adv Mater* **2007**, *19*, 1921-1926.
- [65] Michalet, X.; Pinaud, F.F.; Bentolila, L.A.; Tsay, J.M.; Doose, S.; Lee, J.J.; Sundaresan, G.; Wu, A.M.; Gambhir, S.S.; Weiss, S. "Quantum Dots for Live Cells, in vivo Imaging, and Diagnostics", *Science* **2005**, *307*, 538-544.
- [66] Evident Technologies, <http://www.observatorynano.eu/project/document/103> (letzter Zugriff: 23.07.2012)
- [67] Patel, H.R., <http://ceramics.org/ceramicstechnology/tag/quantum-dots> (letzter Zugriff: 23.07.2012)
- [68] Walling, M.A.; Novak, J.A.; Shepard, J.R.E. "Quantum Dots for Live Cell and In Vivo Imaging", *Int J Mol Sci* **2009**, *10*, 441-491.
- [69] Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I. "Semiconductor Quantum Dots for Bioanalysis", *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47*, 7602-7625.
- [70] Curutchet, C.; Franceschetti, A.; Zunger, A.; Scholes, G.D. "Examining Förster Energy Transfer for Semiconductor Nanocrystalline Quantum Dot Donors and Acceptors", *J Phys Chem C* **2008**, *112*, 13336-13341.
- [71] Clapp, A.R.; Medintz, I.L.; Matoussi, H. "Förster Resonance Energy Transfer Investigations using Quantum Dot Fluorophores", *Chem Phys Chem* **2006**, *7*, 47-57.
- [72] Atkins, P.W.; de Paula, J. *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, 3. Auflage.
- [73] Davydov, A.S. *Quantum Mechanics*, Pergamon Press, Oxford, **1965**.
- [74] Steigerwald, M.L.; Brus, L.E. "Semiconductor Crystallites: A class of large Molecules", *Acc Chem Res* **1990**, *23*, 183-188.
- [75] Wang, Y.; Herron, N. "Nanometer-Sized Semiconductor Clusters: Materials Synthesis, Quantum Size Effects, and Photophysical Properties", *J Phys Chem* **1991**, *95*, 525-532.
- [76] Gaponenko, S.V. *Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals*, Cambridge University Press, Cambridge, **2005**.
- [77] Empedocles, S.A.; Neuhauser, R.; Bawendig, M.G. "Three-dimensional orientation measurements of symmetric single chromophores using polarization microscopy", *Nature* **1999**, *399*, 126-130.
- [78] Vion, C.; Spinicelli, P.; Coolen, L.; Schwob, C.; Frigerio, J.M.; Hermier, J.P.; Maitre, A. "Controlled modification of single colloidal CdSe/ZnS nanocrystal fluorescence through interactions with a gold surface", *Opt Express* **2010**, *18*, 7440-7455.
- [79] Schuster, R.; Barth, M.; Gruber, A.; Cichos, F. "Defocused wide field fluorescence imaging of single CdSe/ZnS quantum dots", *Chem Phys Lett* **2005**, *413*, 280-283.

- [80] Chung, I.; Shimizu, K.T.; Bawendi, M.G. "Room temperature measurements of the 3D orientation of single CdSe quantum dots using polarization microscopy", *PNAS* **2003**, *100*, 405-408.
- [81] Hu, J.; Wang, L.W.; Li, L.S.; Yang, W.; Alivisatos, A.P. "Semiempirical Pseudopotential Calculation of Electronic States of CdSe Quantum Rods", *J Phys Chem B* **2001**, *106*, 2447-2452.
- [82] Cantele, G.; Piacente, G.; Ninno, D.; Iadonisi, G. "Optical anisotropy of ellipsoidal quantum dots", *Phys Rev B* **2002**, *66*, 113308.
- [83] Sudeep, P.K.; Early, K.T.; McCarthy, K.D.; Odoi, M.Y.; Barnes, M.D.; Emrick, T. "Monodisperse Oligo(phenylene vinylene) Ligands on CdSe Quantum Dots: Synthesis and Polarization Anisotropy Measurements", *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 2384-2385.
- [84] Early, K.T.; McCarthy, K.D.; Odoi, M.Y.; Sudeep, P.K.; Emrick, T.; Barnes, M.D. "Linear Dipole Behavior in Single CdSe-Oligo(phenylene vinylene) Nanostructures ", *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 2384-2385.
- [85] Murray, C.B.; Norris, D.J.; Bawendi, M.G. "Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites", *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 8706-8715.
- [86] Hines, M.A.; Guyot-Sionest, P. "Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals", *J Phys Chem* **1996**, *100*, 468-471.
- [87] Gerion, D.; Pinaud, F.; Williams, S.C.; Parak, W.J.; Zanchet, D.; Weiss, S.; Alivisatos, A.P. "Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots", *J Phys Chem B* **2001**, *105*, 8861-8871.
- [88] Correa-Duarte, M.A.; Giersig, M.; Liz-Marzán, L.M. "Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photodegradation by a silica coating procedure", *Chem Phys Lett* **1998**, *286*, 497-501.
- [89] Algar, W.R.; Susumo, K.; Delehanty, J.B.; Medintz, I.L. "Semiconductor Quantum Dots in Bioanalysis: Crossing the Valley of Death", *Anal Chem* **2011**, *83*, 8826-8837.
- [90] Algar, W.R.; Prasuhn, D.E.; Stewart, M.H.; Jennings, T.L.; Blanco-Canosa, J.B.; Dawson, P.E.; Medintz, I.L. "The Controlled Display of Biomolecules on Nanoparticles: A Challenge Suited to Bioorthogonal Chemistry", *Bioconjugate Chem* **2011**, *22*, 825-858.
- [91] Bruchez, M.P. "Turning all the lights on: quantum dots in cellular assays", *Curr Opin Chem Biol* **2005**, *9*, 533-537.
- [92] Holleman, A.F.; Wiberg, E. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, deGruyter, Berlin, New York **1995** *101. Auflage*.
- [93] Görller-Walrand, C.; Binnemans, K. "Chapter 155 Rationalization of Crystal-Field Parametrization", In Gschneidner Jr., K.A. (Ed); Eyring, L. (Ed) *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths Volume 23*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1996**.

-
- [94] Bünzli, J.-C.G.; Piguet, C. "Taking advantage of luminescent lanthanide ions", *Chem Soc Rev* **2005**, *34*, 1048-1077.
- [95] Carnall, W.T. "Chapter 24 The Absorption and Fluorescence Spectra of Rare Earth Ions in Solution", In Gschneidner Jr., K.A. (Ed); Eyring, L. (Ed) *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, North Holland Publishing Group, Amsterdam, **1979**.
- [96] Bünzli, J.-C. G. "Luminescent Probes", In: Bünzli, J.-C. G. (Ed.); Choppin, G. R. (Ed.): *Lanthanide Probes in Life, Chemical, and Earth Sciences: Theory and Practice*, Elsevier, Amsterdam, New York, **1989**
- [97] Bünzli, J.-C.G. "Lanthanide Luminescence for Biomedical Analysis and Imaging", *Chem Rev* **2010**, *110*, 2729-2755.
- [98] Richardson, F.S. "Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminescent Probes and Stains for Biomolecular Systems", *Chem Rev* **1982**, *82*, 541-552.
- [99] Chrysochoos, J.; Evers, A. "Effect of the primary and secondary Solvation Spheres of Eu^{3+} upon the electric-quadrupole Transitions ($\Delta J= 2$)", *Chem Phys Lett* **1972**, *18*, 115-119.
- [100] Weissman, S.I. "Intramolecular Energy Transfer: The Fluorescence of Complexes of Europium", *J Chem Phys* **1942**, *10*, 214-217.
- [101] D'Aléo, A.; Picot, A.; Beeby, A.; Williams, J.A.G.; Le Guennic, B.; Andraud, C.; Maury, O. "Efficient Sensitization of Europium, Ytterbium, and Neodymium Functionalized Tris-Dipicolinate Lanthanide Complexes through Tunable Charge-Transfer Excited States", *Inorg Chem* **2008**, *47*, 10258-10268.
- [102] Schlyer, B.D.; Steel, D.G.; Gafni, A. "Direct Kinetic Evidence for Triplet State Energy Transfer from *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase Tryptophan 109 to Bound Terbium", *J Biol Chem* **1995**, *270*, 22890-22894.
- [103] Hildebrandt, N. "Lanthanides and Quantum Dots - Time-Resolved Laser Spectroscopy of Biochemical Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Systems", Dissertation, Universität Potsdam **2006**.
- [104] Latva, M.; Takalo, H.; Mukkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodriguez-Ubis, J.C.; Kankare, J. "Correlation between the lowest triplet state energy level of the ligand and lanthanide(III) luminescence quantum yield", *J Lumin* **1997**, *75*, 149-169.
- [105] Kropp, J.L.; Windsor, M.W. "Enhancement of Fluorescence Yield of Rare Earth Ions by Heavy Water", *J Chem Phys* **1963**, *39*, 2769-2770.
- [106] Stein, G.; Würzberg, E. "Energy gap law in the solvent isotope effect on radiationless transitions of rare earth ions", *J Chem Phys* **1975**, *62*, 208-213.
- [107] Xu, J.; Corneillie, T.M.; Moore, E.G.; Law, G.-L.; Butlin, N.G.; Raymond, K.N. "Octadentate Cages of Tb(III) 2-Hydroxyisophthalamides: A New Standard for Luminescent Lanthanide Labels", *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 19900-19910.
- [108] Reifenberger, J.G.; Snyser, G.E.; Baym, G.; Selvin, P.R. "Emission Polarization of Europium and Terbium Chelates", *J Phys Chem B* **2003**, *107*, 12862-12873.

- [109] Selvin, P.R. "Principles and Biophysical Applications of Lanthanide-based Probes", *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2002**, *31*, 275-302.
- [110] Bünzli, J.-C.G.; "Luminescent Lanthanide Probes as Diagnostic and Therapeutic Tools", In: Sigel, A. (Ed.); Sigel, H. (Ed.): *Metal Ions in Biological Systems, Vol 42: Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents* Vol. 42, Marcel Dekker Inc., New York, **2004**.
- [111] Yuan, J.; Wang, G. "Lanthanide Complex-based Fluorescence Label for Time-Resolved Fluorescence Bioassay", *J Fluoresc* **2005**, *15*, 559-568.
- [112] Horrocks, Jr., W.D.; Sudnick, D.R. "Lanthanide Ion Luminescence Probes of the Structure of Biological Macromolecules", *Acc Chem Res* **1981**, *14*, 384-392.
- [113] Patterson, G.H. "Fluorescence microscopy below the diffraction limit", *Semin Cell Dev Biol* **2009**, *20*, 886-893.
- [114] Hell, S.W. "Far-Field optical nanoscopy", *Science* **2007**, *316*, 1153-1158.
- [115] Heilemann, M.; van de Linde, S.; Schüttpelz, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P.; Sauer, M. "Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes", *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47*, 6172-6176.
- [116] Wild, D. *The Immunoassay Handbook*, Natur Pub Group, London **2001**, *2. Auflage*.
- [117] Diamandis, E.P. "Analytical Methodology for Immunoassays and DNA Hybridization Assays - Current Status and Selected Systems - Critical-Review", *Clin Chim Acta* **1990**, *194*, 19-50.
- [118] Diamandis, E.; Immunoassays with Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy: Principles and Applications, *Clin Biochem* **1988**, *21*, 139-150.
- [119] Wollenberger, U.; Renneberg, R.; Bier, F.F.; Scheller, F.W. *Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen*, Wiley-VCH, Weinheim **2003**.
- [120] Börjesson, K.; Preus, S.; El-Sagheer, A.H.; Brown, T.; Albinsson, B.; Wilhemsson, L.M. "Nucleic Acid Base Analog FRET-Pair Facilitating Detailed Structural Measurements in Nucleic Acid Containing Systems", *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 4288-4293.
- [121] Wozniak, A.K.; Schröder, G.F.; Grubmüller, H.; Seidel, C.A.M.; Oesterhelt, F. "Single-molecule FRET measures bends and kinks in DNA", *PNAS* **2008**, *105*, 18337-18342.
- [122] Best, B.B.; Merchant, K.A.; Gopich, I.V.; Schuler, B.; Bax, A.; Eaton, W.A. "Effect of flexibility and cis residues in single-molecule FRET studies of polyproline", *PNAS* **2007**, *104*, 18964-18969.
- [123] Dolgih, E.; Ortiz, W.; Kim, S.; Krueger, B.P.; Kraus, J.L.; Roitberg, A.E. "Single-molecule FRET measures bends and kinks in DNA", *J Phys Chem A* **2009**, *113*, 4639-4646.
- [124] Weber, P.C.; Ohlendorf, D.H.; Wendoloski, J.J.; Salemme, F.R. "Structural Origins of high-affinity Biotin Binding to Streptavidin", *Science* **1989**, *243*, 85-88.
- [125] Wilchek, M.; Bayer, E. A. "The Avidin Biotin Complex in Immunology", *Immunol Today* **1984**, *5*, 39-43.

-
- [126] Wilchek, M.; Bayer, E. A. "The Avidin Biotin Complex in Bioanalytical Applications", *Anal Biochem* **1988**, *171*, 1–32.
- [127] Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K. "The Biotin (Strept)Avidin System – Principles and Applications in Biotechnology", *Clin Chem* **1991**, *37*, 625–636.
- [128] Green, N. M. "Avidin and Streptavidin", *Methods Enzymol* **1990**, *184*, 51–67.
- [129] Loosli, A.; Rusbandi, U.E.; Gradinaru, J.; Bernauer, K.; Schlaepfer, C.W.; Meyer, M.; Mazurek, S.; Novic, M.; Ward, T.R. "(Strept)avidin as Host for Biotinylated Coordination Complexes: Stability, Chiral Discrimination, and Cooperativity", *Inorg Chem* **2006**, *45*, 660–668.
- [130] Bayer, E.A.; Ben-Hur, H.; Wilchek, M. "Isolation and Properties of Streptavidin", *Method Enzymol* **1990**, *184*, 80-89.
- [131] Hendrickson, W.A.; Pähler, A.; Smith, J.L.; Satow, Y.; Merrit, E.A.; Phizackerley, R.P. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation", *Proc Natl Acad Sci* **1989**, *86*, 2190-2194.
- [132] Pähler, A.; Hendrickson, W.A.; Gawinowicz Kolks, M.A.; Argarana, C.E.; Cantor, C.R. "Characterization and Crystallization of core Streptavidin", *J Biol Chem* **1987**, *262*, 13933-13937.
- [133] Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L.; Stayton, P.S.; Stenkamp, R.E. "Structural studies of the streptavidin binding loop", *Protein Sci* **1997**, *6*, 1157-1166.
- [134] Freitag, S.; Le Trong, I.; Chilkoti, A.; Klumb, L.A.; Stayton, P.S.; Stenkamp, R.E. "Structural Studies of Binding Site Tryptophan Mutants in the High-affinity Streptavidin±Biotin Complex", *J Mol Biol* **1998**, *279*, 211-221.
- [135] Chu, V.; Freitag, S.; Le Trong, I.; Stenkamp, R.E.; Stayton, P.S. "Thermodynamic and structural consequences of flexible loop deletion by circular permutation in the streptavidin-biotin system", *Protein Sci* **1998**, *7*, 848-859.
- [136] Freitag, S.: <http://faculty.washington.edu/stenkamp/stefanieweb/abstract.html> (letzter Zugriff: 19.07.2012)
- [137] Katz, B.A. "Binding of Biotin to Streptavidin Stabilizes Intersubunit Salt Bridges between Asp61 and His87 at Low pH", *J Mol Biol* **1997**, *274*, 776-800.
- [138] Sano, T.; Cantor, C. R. "Cooperative Biotin Binding by Streptavidin" *J Biol Chem* **1990**, *265*, 3369-3373.
- [139] González, M.; Bagatolli, L.A.; Echabe, I.; Arrondo, J.L.R.; Argarana, C.E.; Cantor, C.R.; Fidelio, G.D. "Interaction of Biotin with Streptavidin: Thermostability and Conformational Changes upon Binding" *J Biol Chem* **1997**, *272*, 11288-11294.
- [140] Jones, M.L.; Kurzban, G.P. "Noncooperativity of Biotin Binding to Tetrameric Streptavidin" *Biochem* **1995**, *34*, 11750-11756.

- [141] Kada, G.; Falk, H.; Gruber, H.J. “Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate” *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1427*, 33-43.
- [142] Dennis, M.A.; Bao, G. “Quantum Dot-Fluorescent Protein Pairs as Novel Fluorescence Resonance Energy Transfer Probes” *Nano Lett* **2008**, *8*, 439-1445.
- [143] Dennis, A.M.; Sotito, D.; Mei B.C.; Medintz, I.L.; Mattoussi, H.; Bao, G. “Surface Ligand Effects on Metal-affinity Coordination to Quantum Dots: Implications for Nanoprobe Self-assembly”, *Bioconjugate Chem* **2010**, *21*, 1160-1170.
- [144] Prasuhn, D.E.; Blanco-Canosa, J.B.; Vora, G.J.; Delehanty, J.B.; Susumu, K.; Mei, B.C.; Dawson, P.E.; Medintz, I.L. „Combining chemoselective Ligation with Polyhistidine-driven Self-assembly for the modular Display of Biomolecules on Quantum Dots“, *ACS Nano* **2010**, *4*, 267-278.
- [145] Medintz, I.L.; Stewart, M.H.; Trammell, S.A.; Susumu, K.; Delehanty, J.B.; Mei, B.C.; Melinger, J.S.; J.B.; Blanco-Canosa, J.B.; Dawson, P.E.; Mattoussi, H. Quantum Dot Dopamine Bioconjugates function as redox coupled Assemblies for in vitro and intracellular pH Sensing. *Nat Mater* **2010**, *9*, 676-684.
- [146] Sapsford, K.E.; Pons, T.; Medintz, I.L.; Higashiya, S.; Brunel, F.M.; Dawson, P.E.; H. Mattoussi “Kinetics of Metal-affinity driven Self-assembly between Proteins or Peptides and CdSe-ZnS Quantum Dots”, *J Phys Chem C* **2007**, *111*, 11528-11538.
- [147] Sapsford, K.E.; Farrell, D.; Steven Sun, S.; Rasooly, A.; Mattoussi, H.; I.L. Medintz. “Monitoring of enzymatic Proteolysis on a electroluminescent-CCD Microchip Platform using Quantum Dot-Peptide Substrates”, *Sensor Actuat B-Chem* **2009**, *139*, 13–21.
- [148] Haas, E.; Wilchek, M.; Katchalski-Katzir, E.; Steinberg, I.Z. “Distribution of End-to-End Distances of Oligopeptides in Solution as Estimated by Energy Transfer”, *Proc Acad Nat Sci* **1975**, *72*, 1807-1811.
- [149] Gehne, S. “Photophysik gekoppelter RET-Paare: Spektroskopische Untersuchung DNA-basierter Drei-Farben-RET-Systeme“, Masterarbeit, Universität Potsdam **2011**.
- [150] Backowic, M.; Price, E.S.; Johnson, C.K.; Ralston, J.P. “A distribution-based method to resolve single-molecule Förster resonance energy transfer observations”, *J Chem Phys* **2011**, *134*, 145101.
- [151] Siemiarczuk, A.; Wagner, B.D.; Ware, R.W. “Comparison of the Maximum Entropy and Exponential Series Methods for the Recovery of Distributions of Lifetimes from Fluorescence Lifetime Data”, *J Phys Chem* **1990**, *94*, 1661-1666.
- [152] Landl, G. “Distribution of Event Times in Time- Resolved Fluorescence: The Exponential Series Approach-Algorithm, Regularization, Analysis”, *J Comput Phys* **1991**, *95*, 1-28.
- [153] Klema, V.C.; Laub, A.J. “The Singular Value Decomposition: Its Computation and Some Applications”, *IEEE T Automat Contr* **1980**, *25*, 164-176.

-
- [154] Churchman, L.S.; Flyvbjerg, H.; Spudich, J.A. “A Non-Gaussian Distribution Quantifies Distances Measured with Fluorescence Localization Techniques”, *Biophys J* **2006**, *90*, 668-671.
- [155] Marinov, D.; Rey, J.M.; Müller, M.G.; Sigrist, M.W. “Spectroscopic investigation of methylated amines by a cavity-ringdown-based spectrometer”, *Appl Optics* **2007**, *46*, 3981-3986.
- [156] Krustok, J.; Collan, H.; Yakushev, M.; Hjelt, K. “The Role of Spatial Potential Fluctuations in the Shape of the PL Bands of Multinary Semiconductor Compounds”, *Phys Scripta* **1999**, *79*, 179-182.
- [157] Luschtinetz, F. “Cyaninfarbstoffe als Fluoreszenzsonden in biomimetischen und biologischen Systemen: Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Fluoreszenzanisotropie-Untersuchungen“, Dissertation, Universität Potsdam **2010**.
- [158] Michel, B.E.; Kaufmann, M.R. “The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000”, *Plant Physiol* **1973**, *51*, 914-916.
- [159] Couper, A.; Stepto, R.F.T. “Diffusion of Low-Molecular Weight Poly(ethylene oxide) in Water”, *T Farad Soc* **1969**, *0*, 2486-2496.
- [160] Kuga, S. “Pore Size Distribution Analysis of Gel Substances by Size Exclusion Chromatography”, *J Chromatogr* **1980**, *206*, 449-461.
- [161] Torchilin, V.P.; Papisov, M.I. “Why do Polyethylene Glycol-coated Liposomes circulate so long?”, *J Lipos Res* **1994**, *4*, 725-739.
- [162] Anne, A.; Moiroux, J. “Quantitative Characterization of the Flexibility of Poly(ethylene glycol) Chains Attached to a Glassy Carbon Electrode”, *Macromolecules* **1999**, *32*, 5829-5835.
- [163] Pace, C.N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. “How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein”, *Protein Sci* **1995**, *4*, 2411-2423.
- [164] Carlos, L.D.; Ferreira, R.A.S.; de Zea Bermudez, V.; Ribeiro, S.J.L. “Lanthanide-Containing Light-Emitting Organic-Inorganic Hybrids: A Bet on the Future”, *Adv Mater* **2009**, *21*, 509-534.
- [165] Algar, W.R.; Wegner, D.; Huston, A.L.; Blanco-Canosa, J.B.; Stewart, M.H.; Armstrong, A.; Dawson, P.E.; Hildebrandt, N.; Medintz, I.L. “Quantum Dots as Simultaneous Acceptors and Donors in Time-Gated Förster Resonance Energy Transfer Relays: Characterization and Biosensing”, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 1876-1891.
- [166] Evers, T.H.; Appelhof, M.A.M.; Meijer, E.W.; Merkx, M. “His-tags as Zn(II) binding motifs in a protein-based fluorescent sensor”, *Protein Eng Des Sel* **2008**, *21*, 529-536.
- [167] Bornhorst, J.A.; Falke, J.J. “Purification of Proteins using Polyhistidine Affinity Tags”, *Method Enzymol* **2000**, *326*, 245-254.

- [168] Blanco, W.R.; Wegner, D.; Huston, A.L.; Blanco-Canosa, J.B.; Stewart, M.H.; Armstrong, A.; Dawson, P.E.; Hildebrandt, N.; Medintz, I.L. "Quantum Dots as Simultaneous Acceptors and Donors in Time-Gated Förster Resonance Energy Transfer Relays: Characterization and Biosensing", *J Phys Chem B* **2005**, *109*, 15958-15967.
- [169] Morgner, F.; Stufler, S.; Geißler, D.; Medintz, I.L.; Algar, W.R.; Susumu, K.; Stewart, M.H.; Blanco-Canosa, J.B.; Dawson, P.E.; Hildebrandt, N. "Terbium to quantum dot FRET bioconjugates for clinical diagnostics: Influence of human plasma on optical and assembly properties", *Sensors* **2011**, *11*, 9667-9684.
- [170] Noh, M.; Kim, T.; Lee, H.; Kim, C.-K.; Joo, S.-W.; Lee, K. "Fluorescence quenching caused by aggregation of water-soluble CdSe quantum dots", *Colloid Surface A* **2010**, *359*, 39-44.
- [171] Zhang, Y.; Mi, L.; Wang, P.-N.; Ma, J.; Chen, J.-Y. "pH-dependent aggregation and photoluminescence behavior of thiol-capped CdTe quantum dots in aqueous solutions", *J Lumin* **2008**, *128*, 1948-1951.
- [172] Narayanan, S.S.; Pal, S.K. "Aggregated CdS Quantum Dots: Host of Biomolecular Ligands", *J Phys Chem B* **2006**, *110*, 24403-24409.
- [173] Hirst, L.S.; Kirchoff, J.; Inman, R.; Ghosh, S. "Quantum dot self-assembly in liquid crystal media", *Proc SPIE* **2010**, *7618*, 76180F (7 Seiten).
- [174] Laudise, R.A.; Ballman, A.A. "Hydrothermal Synthesis of Zinc Oxide and Zinc Sulfide", *J Phys Chem* **1960**, *64*, 688-691.
- [175] Peng, X.; Manna, L.; Yang, W.; Wickham, J.; Scher, E.; Kadavanich, A.; Alivisatos, A.P. "Shape control of CdSe Nanocrystals", *Nature* **2000**, *404*, 59-61.
- [176] Peng, X. "Shape control of CdSe Nanocrystals", *Adv Mater* **2003**, *15*, 459-463.
- [177] Tronc, P.; Vennéguès, P. "Symmetry of wurtzite nanostructures with the *c*-axis in the layer plane", *Phys Rev B* **2008**, *77*, 075336 (7 Seiten).
- [178] Förster, Th., Scheibe, G. (Ed.) *Fluoreszenz organischer Verbindungen*, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen, **1951**, 3. Auflage
- [179] Dabbousi, B.O.; Rodriguez-Viejo, J.; Mikulec, F.V.; Heine, J.R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, K.F.; Bawendi, M.G. "(CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites", *J Phys Chem B* **1997**, *101*, 9463-9475.
- [180] Görller-Walrand, C.; Binnemans, K. "Chapter 167 Spectral Intensities of f-f-Transitions", In Gschneidner Jr., K.A. (Ed); Eyring, L. (Ed) *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths Volume 25*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1998**.
- [181] Braslavsky, S.E.; Fron, F.; Rodriguez, H.B.; San Román, E.; Scholes, G.D.; Schweitzer, G.; Valeur, B.; Wirz, J. "Pitfalls and limitations in the practical use of Förster's theory of resonance energy transfer", *Photochem Photobiol Sci* **2008**, *7*, 1444-1448.

A. Anhang

A.1 *Verwendete Abkürzungen*

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
A	Akzeptor
ADS	asymmetrischer Doppelsigmoidal-Fit
Biot	Biotin
BRET	Biolumineszenzresonanzenergietransfer
BSA	Bovines Serumalbumin
CdSe	Cadmiumselenid
CdTe.	Cadmiumtellurid
D	Donor
DHLA	di-Hydroliponsäure
ED	elektrischer Dipol
FET	Fluoreszenzenergietransfer
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FWHM	<i>full width at half maximum</i>
g	gerade
His	Histidin
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
InGaAs	Indium-Galliumarsenid
ISC	<i>intersystem crossing</i>
ITK	<i>innovator's tool kit</i>
LRET	Lumineszenzresonanzenergietransfer
LTC	Lumineszente Terbiumkomplexe
Lumi4Tb	Tb ³⁺ -Komplex der Firma Lumiphore Inc.
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
m	mittel
MD	magnetischer Dipol
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OPV	Oligo-Phenyl-Vinyl-Phosphinoxid
PALM	Photo Activation Localization Microscopy
PDB	<i>protein data bank</i>

PEG	Polyethylenglykol
Pep	Peptid-411
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
QD	Quantenpunkt oder Quantenpunkte
QD525	Quantenpunkt, der bei 525 nm emittiert
QD565	Quantenpunkt, der bei 565 nm emittiert
QD605	Quantenpunkt, der bei 605 nm emittiert
QD655	Quantenpunkt, der bei 655 nm emittiert
QD705	Quantenpunkt, der bei 705 nm emittiert
RCSB	<i>research collaboratory for structural bioinformatics</i>
RET	Resonanzenergietransfer
s	stark
STED	Stimulated Emission Depletion
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
Strep	Streptavidin
SVD	Singulärwertzerlegung
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TOPO	tri- <i>n</i> -Octylphosphinoxid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	ungerade
UV	Ultravioletter Spektralbereich
Vis	Sichtbarer Spektralbereich
vs	sehr stark
vw	sehr schwach
w	schwach
ZnS	Zinksulfid

A.2 Probenvorbereitung

Biotin-Streptavidin-Assays

Die Stammlösungen von Donor und Akzeptoren (siehe Kapitel 3.2) wurden in Eppendorf-Gefäßen mit TRIS-Puffer verdünnt. Die Donorkonzentration betrug im Anschluß an diesen Verdünnungsschritt 40 nM, die der Akzeptoren jeweils 20 nM. Anschließend wurden alle Biotin-Streptavidin-Assays nach der in Tabelle A.1 aufgeführten Zusammensetzung pipettiert. Dabei wurde zuerst das Puffervolumen in einer 384-Well-Platte (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit schwarzer, nichtbindender Oberfläche vorgelegt, dann die verdünnte Akzeptorstammlösung im angegebenen Volumen zugegeben und zuletzt der Donor dazu pipettiert. Das Probenvolumen betrug immer 20 µl. Dieses Pipettierschema stellte sicher, dass die Mikroumgebung von Donor und Akzeptor für alle Proben so identisch wie möglich und

Verdünnungsfehler durch Konzentrationsabweichungen so gering wie möglich waren. Die Konzentration des Lumi4Tb-Komplexes in der Probenlösung betrug für alle Biot-Strep-Assays konstant 2 nM, die der Akzeptoren variierte je nach Verhältnis zwischen 0.2 und 16 nM. Es wurde darauf geachtet, dass die Mehrzahl der Proben Verhältnisse von weniger als sechs aufwiesen, um sicherzustellen, dass möglichst viele der Donoren an die Quantenpunkte binden konnten und so die Konzentration ungebundener Lumi4Tb-Strep bzw. Lumi4Tb-Pep im Probenvolumen so gering wie möglich war. Im Anschluß inkubierten die Proben in der abgedeckten Wellplatte für eine Stunde bei Raumtemperatur und wurden anschließend vermessen.

Tabelle A.1. Pipettierschema für die Lumi4Tb-Strep-Biot-QD-Assays. Für jedes Lumi4Tb-QD-Verhältnis wurden drei Proben pipettiert.

Proben-Nr.	Lumi4Tb-Strep [μ l]	QD [μ l]	Puffer [μ l]	c(Lumi4Tb) [nM]	c(QD) [nM]	Verhältnis Tb:QD
1	1	0.2	18.8	2	0.2	10
2	1	0.4	18.6	2	0.4	5
3	1	2	17	2	2	1
4	1	4	5	2	4	0.5
5	1	16	4	2	16	0.125

Zink-Histidin-Assays

Die Stammlösungen der Akzeptoren wurden mit Natrium-Tetraboratpuffer in Eppendorf-Gefäßen auf jeweils 225 nM verdünnt. Anschließend wurden die Assays nach der in Tabelle A.2 aufgeführten Zusammensetzung pipettiert, wobei zuerst der Puffer in den Quarzküvetten vorgelegt wurde, dann die Quantenpunkte dazugegeben wurden und als letztes der Terbiumkomplex zupipettiert wurde. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde

Tabelle A.2. Pipettierschema für die Lumi4Tb-Pep-QD-Assays. Pro Lumi4Tb-QD-Paar wurden vier Proben pipettiert.

Proben-Nr.	Lumi4Tb-Pep [μ l]	QD [μ l]	Puffer [μ l]	c(Lumi4Tb) [nM]	c(QD) [nM]	Verhältnis Tb:QD
1	1	5 (10)	139	667	1.5	445

Da die Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich liegt, wurde ein hoher Überschuss an Terbiumkomplexen eingesetzt, um eine gute Bindung an die Quantenpunktoberfläche zu gewährleisten.

A.3 Übersicht über verwendete dichroitische Spiegel und Bandpass-Filter

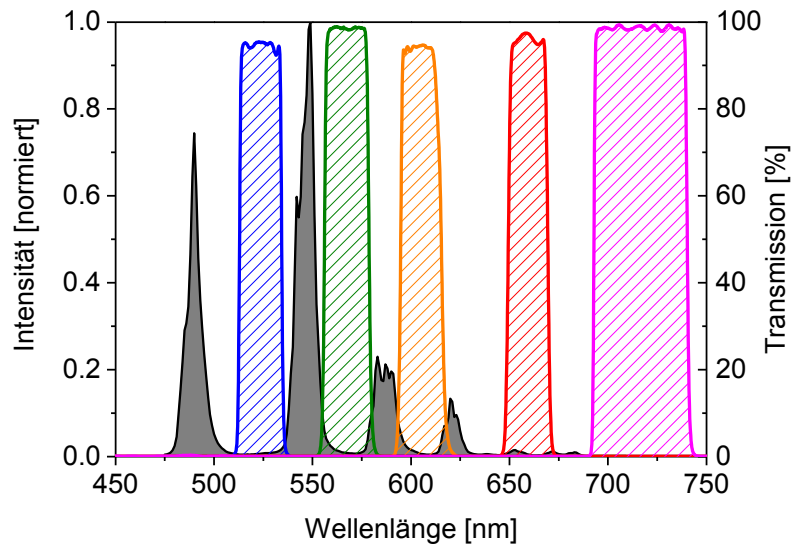


Abbildung A.1. Transmissionsspektren (Einfallswinkel des Lichts 90°) der am Nanoscan-Immunoreader verwendeten Bandpassfilter im Vergleich zum Emissionsspektrum des Lumi4Tb-Donorkomplexes (grau): Semrock SR525/15 (blau), Semrock SR567/15 (grün), Semrock SR605/15 (orange), Semrock SR660/13 (rot), Semrock SR716/40 (magenta).

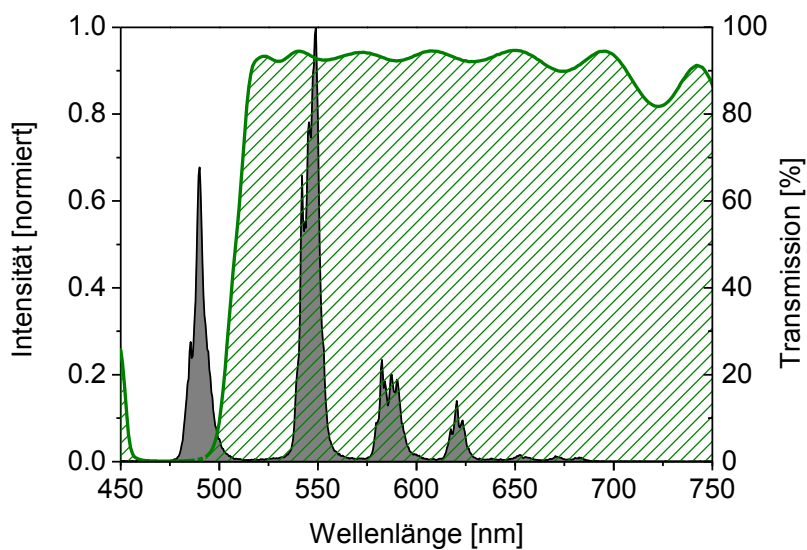


Abbildung A.2. Transmissionsspektrum (Einfallswinkel des Lichts 45°) des am Nanoscan-Immunoreader verwendeten Dichroitischen Chroma 505DCLP im Vergleich zum Emissionsspektrum des Lumi4Tb-Donorkomplexes (grau).

A.4 Korrektur des Crosstalks und Hintergrunds der Lumineszenzsignale

Eine vollständige spektrale Trennung der Donor- von den Akzeptorsignalen ist nicht zu erreichen, da die Spektren der FRET-Partner zum einen teilweise überlappen, zum anderen die verwendeten Filter und Spiegel bis zu einem bestimmten Prozentsatz immer auch für Licht anderer Wellenlängenbereiche durchlässig sind als den angegebenen (siehe auch Spektren der Bandpass-Filter im vorhergehenden Abschnitt A4.) . Daraus resultiert eine Signalüberlagerung des Donorsignals mit dem des Akzeptors und umgekehrt. Hinzu kommt weiterhin vom Messgerät und Strahlengang sowie dem Puffer induziertes Signalrauschen. All diese Einflussgrößen beeinträchtigen die Güte des Meßsignals und erschweren eine Auswertung.

Daher wurde vor der Analyse der gemessenen Abklingkurven eine Bearbeitung der Meßkurven mit dem Ziel der Entfernung der nicht gewünschten Lumineszenzkomponenten durchgeführt. Dazu wurde für jedes FRET-Paar wie folgt vorgegangen:

1. Aufnahme der Lebenszeitabklingkurven des ungebundenen Donors $I_D(\text{ChA})$ und $I_D(\text{ChD})$, des ungebundenen Akzeptors $I_A(\text{ChA})$ und $I_A(\text{ChD})$ sowie des Puffers $I_P(\text{ChA})$ und $I_P(\text{ChD})$ für beide Detektionskanäle ChA und ChD.
2. Bestimmung der Verhältnisse F_D als Maß für den Cross-Talk des Donors in den Akzeptorkanal sowie F_A als Maß für den Cross-Talk des Akzeptors in den Donorkanal

$$F_D = \frac{I_D(\text{ChA}) - I_P(\text{ChA})}{I_D(\text{ChD}) - I_P(\text{ChD})} \quad \text{Gleichung (A.1)}$$

$$F_A = \frac{I_A(\text{ChA}) - I_P(\text{ChA})}{I_A(\text{ChD}) - I_P(\text{ChD})} \quad \text{Gleichung (A.2)}$$

3. Aufnahme der Lebenszeitabklingkurven der LTC-QD-Assays $I_{\text{Assay}}(\text{ChA})$ und $I_{\text{Assay}}(\text{ChD})$.
4. Korrektur der Messsignale im Akzeptorkanal ChA ergibt das FRET-Signal für den Akzeptor I_{Akzeptor}

$$I_{\text{Akzeptor}} = I_{\text{Assay}}(\text{ChA}) - F_D \cdot [I_{\text{Assay}}(\text{ChD}) - I_P(\text{ChD})] - I_P(\text{ChA}) \quad \text{Gleichung (A.3)}$$

5. Korrektur der Messsignale im Donorkanal ChD ergibt das FRET-Signal für den Donor I_{Donor}

$$I_{\text{Donor}} = I_{\text{Assay}}(\text{ChD}) - F_A \cdot [I_{\text{Assay}}(\text{ChA}) - I_P(\text{ChA})] - I_P(\text{ChD}) \quad \text{Gleichung (A.4)}$$

A.5 Excel-Datenblatt zur Berechnung der Abstandsverteilungen mit dem Excel-Tool Solver

Die Erstellung des Excel-Sheets zur Berechnung der Abstandsverteilungen mit Excels Solver-Tool wurde nach Vorlage des Artikels von Blanco et. al. (2005) (**Blanco2005**) geschrieben. Abbildung A.3. zeigt beispielhaft das Excel-Sheet mit den folgenden Eigenschaften:

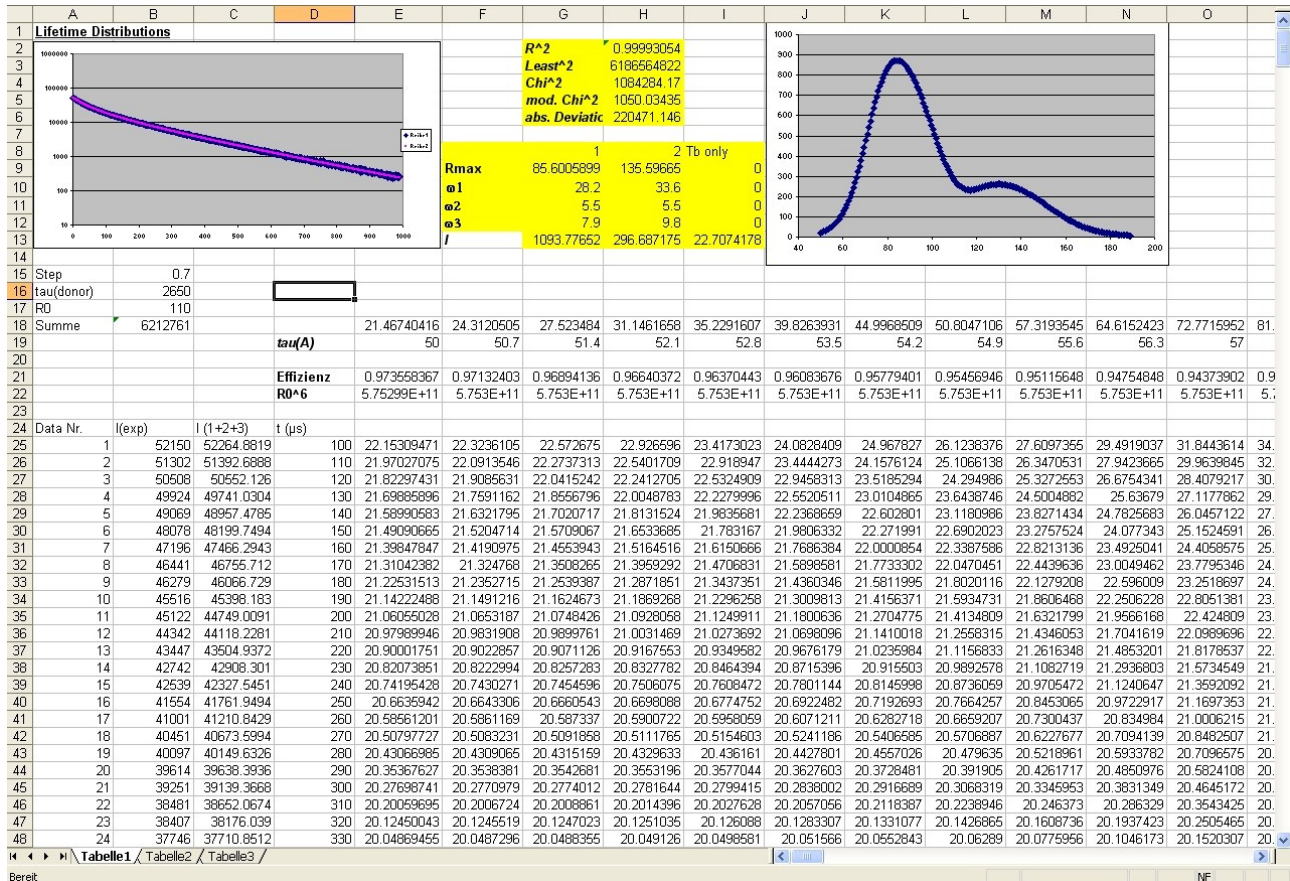


Abbildung A.3. Darstellung des Excel-Sheets zur Bestimmung der FRET-Abstandsverteilungen am Beispiel eines ADS-Fits. Zu erkennen sind die wichtigsten Felder, die nachfolgend erläutert werden.

Das Worksheet setzt sich aus folgenden Elementen und deren Eigenschaften zusammen:

- Eine Grafik mit der Darstellung der Lumineszenzabklingkurven ([A2: E13]), experimentell ermittelte (schwarz) und gefittete (rot).
- Eine Grafik mit der Darstellung der gefitteten Lebenszeitverteilung ([J1:N14]).
- Darstellung der Güte des Fits (minimized least square [H3], χ^2 [H4], modifiziertes χ^2 [H5], Durchschnitt des Mittelwerts der maximalen und minimalen Absolutabweichungen [H6]. Alle der Parameter wurden mit 1000 multipliziert, um die Genauigkeit des Fits zu verbessern.). Der von Excel ermittelte Korrelationskoeffizient ist ebenfalls dargestellt [H2].

- Eine Tabelle mit den von Solver zu anzupassenden Parametern für jede Verteilung ([G9:H13]) plus der ebenfalls an die Kurve anzupassenden Intensität der Lumineszenz des ungequenchten Donors ([I13]): Maximum der Lebenszeitverteilung ([G9:H9]), Breiten der Verteilungen ([G10:H12]), Höhe der Verteilung ([G13:H13]).
- Der Abstand ([B15]) der den Abstandsbereich (in Å) der zu fittenden Verteilung bestimmt ([E19:GV19]).
- Lebenszeit des ungequenchten Donors ([B16]), Förster-Radius des FRET-Paares ([B17]), Gesamtintensität der experimentel ermittelten Lumineszenzabklingkurve ([B18]).
- Eine Zeile ([E19:GV19]) mit den x-Werten der Lebenszeitverteilungen, die durch den Abstand ([B15]) generiert werden.
- Eine Zeile ([E21:GV21]) mit den Werten der Transfereffizienz für die jeweiligen Abstände ([E19:GV19]).
- Eine Zeile ([E22:GV22]) mit der 6ten Potenz des Förster-Radius des FRET-Paares.
- Nummerierung ([A22:A221]) der einzelnen Datenpunkte (max. 1000).
- Eine Zeile ([E18:GV18]) mit der Summe der gefitteten Lebenszeitverteilungen.
- Eine Spalte ([D22:D221]) mit den Zeitwerten der experimentell ermittelten Abklingkurven.
- Eine Spalte ([B22:B221]) mit den Intensitäten der experimentell ermittelten Abklingkurven.
- Eine Spalte ([C22:C221]) mit den gefitteten Intensitäten. Diese ist das Ergebnis der Solver-Berechnungen als Summe der gesamten Zeile ([Ex:CVx]).
- Eine Spalte ([GW22:GW222]) mit den Quadraten der Abweichungen zwischen experimentellen und berechneten Intensitäten für jedes t . Die Summe des Quadrates, multipliziert mit 1000 ist in ([H3]) dargestellt.
- Eine Spalte ([GX22:GX222]) mit den relativen Quadraten der Abweichungen für jedes t . Die Summe dieser, multipliziert mit 1000 ist in ([H4]) dargestellt.
- Eine Spalte ([GY22:GY222]) mit den Quadraten der Abweichungen für jedes t geteilt durch das Quadrat der experimentell ermittelten Intensitäten für jedes t . Die Summe dieser, multipliziert mit 1000 ist in ([H5]) dargestellt.
- Eine Spalte ([GZ22:GZ222]) mit den Absolutabweichungen zwischen experimentellen und gefitteten Intensitäten für jedes t . Maximum und Minimum dieser Spalte sind in den Zellen ([GZ18]) und ([GZ19]), deren Mittelwert in Zelle ([H6]) dargestellt.

Gleichungen in den Zellen:

- [H2] = BESTIMMTHEITSMASS(B22:B221,C22:C221)
- [H3] = SUMME(GW22:GW222)*1000
- [H4] = SUMME(GX22:GX222)*1000
- [H5] = SUMME(GY 22:GY 222)*1000
- [H6] = (GZ18 + GZ19)/2*1000
- [E19:GV19] = E19 (Anfangswert für den Abstand); a19 = (a-1)19+\$B\$15 (a=F bis GV)

- [E18: GV18] = $\frac{G_{13}}{(1+\exp(-(a_{19}-G_{9}+G_{10}/2)/G_{11}))} \cdot (1 - \frac{1}{(1+\exp(-(a_{19}-G_{9}-G_{10}/2)/G_{12})))} + \frac{H_{13}}{(1+\exp(-(a_{19}-H_{9}+H_{10}/2)/H_{11}))} \cdot (1 - \frac{1}{(1+\exp(-(a_{19}-H_{9}-H_{10}/2)/H_{12})))}$ (a=E to GV). Asymmetrischer Doppelsigmoidalfit
- [E18: GV18] = $\frac{G_{11}}{(G_{10} \cdot \sqrt{2 \cdot \pi})} \cdot \exp(-0.5 \cdot ((G_{9} - a_{19})/G_{10})^2) + \frac{H_{11}}{(H_{10} \cdot \sqrt{2 \cdot \pi})} \cdot \exp(-0.5 \cdot ((H_{9} - a_{19})/H_{10})^2)$ (a=E bis GV). Doppelgaußfit
- [C22: C221] = SUMME(Ex: GVx) (x=22 bis 221).
- [GW22: GW221]) $(B_x - C_x)^2$ (x=22 bis 221).
- [GX22: GX221]) G_{Wx}/B_x (x=22 bis 221).
- [GY22: GY221]) $G_{Wx}/(B_x^2)$ (x=22 bis 221).
- [GZ22: GZ221]) $\text{ABS}(B_x - C_x)$ (x=22 bis 221).
- [GZ18]) $\text{MAX}(G_{Z19}; G_{Z221})$
- [GZ19]) $\text{MIN}(G_{Z22}; G_{Z221})$

A.6 Ermittelte Lebenszeit- und Abstandsverteilungen der Zink-Histidin-Assays

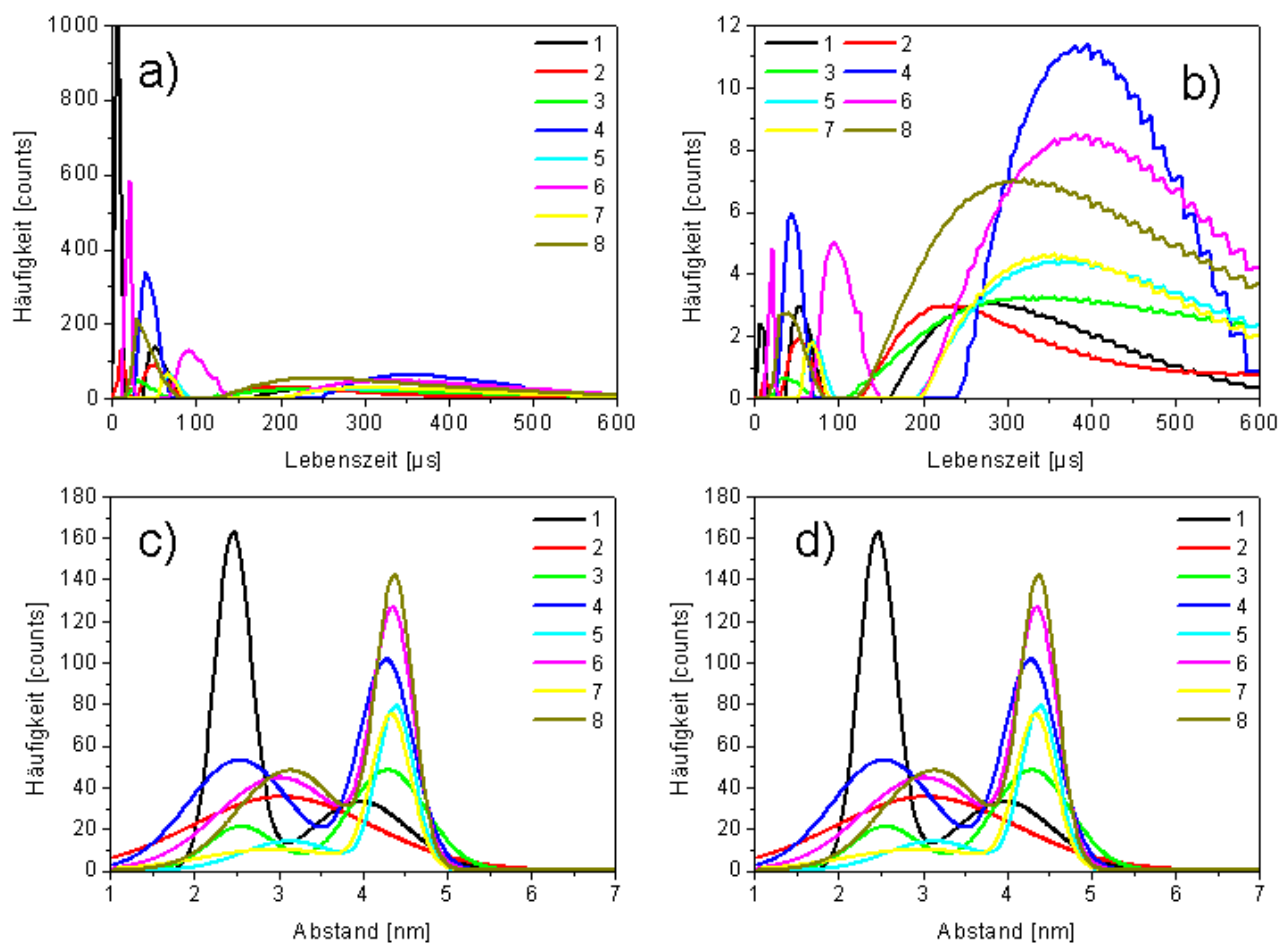


Abbildung A.4. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD525 für jede der acht Messungen **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors.

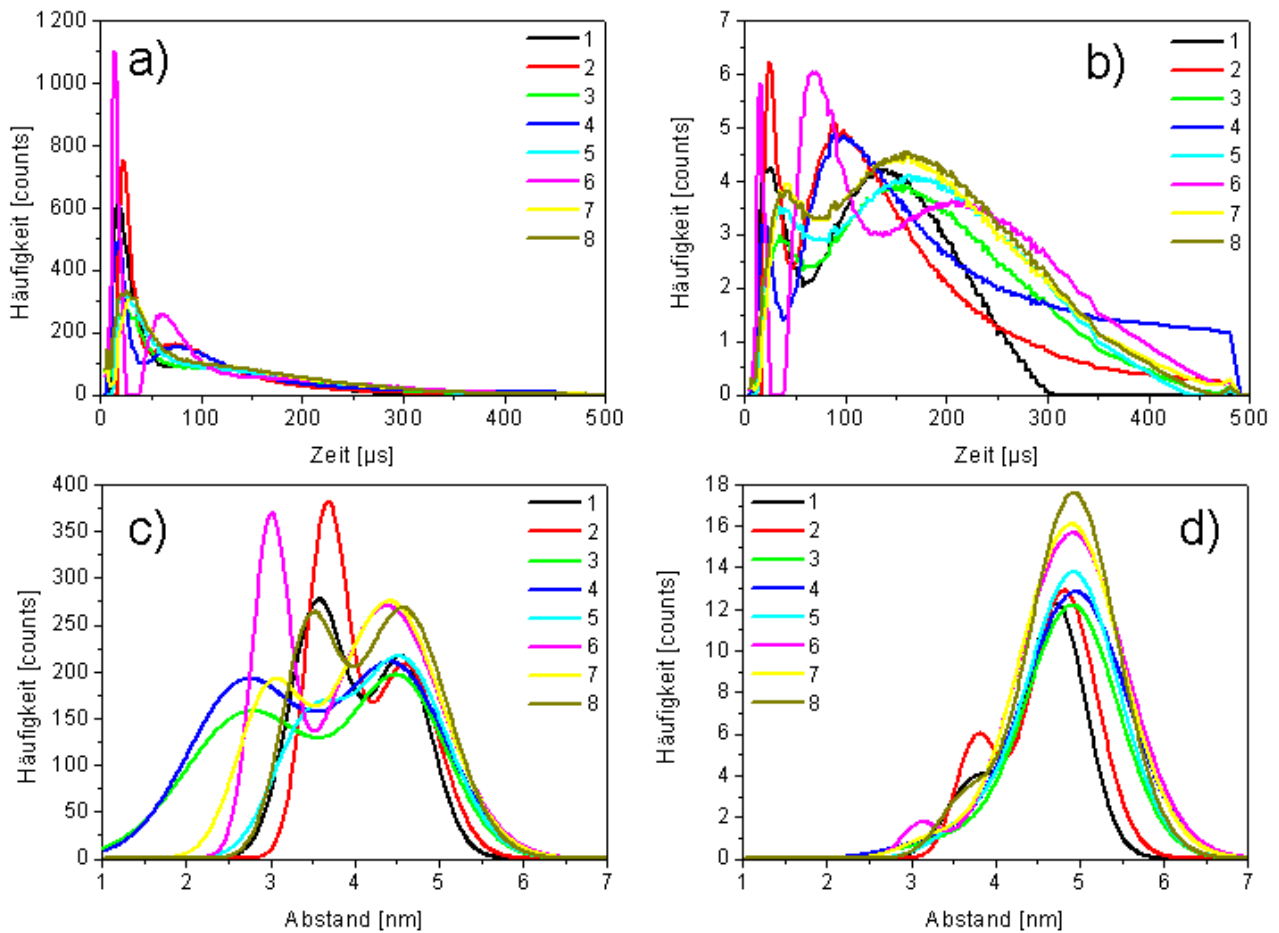


Abbildung A.5. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD565 für jede der acht Messungen **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors.

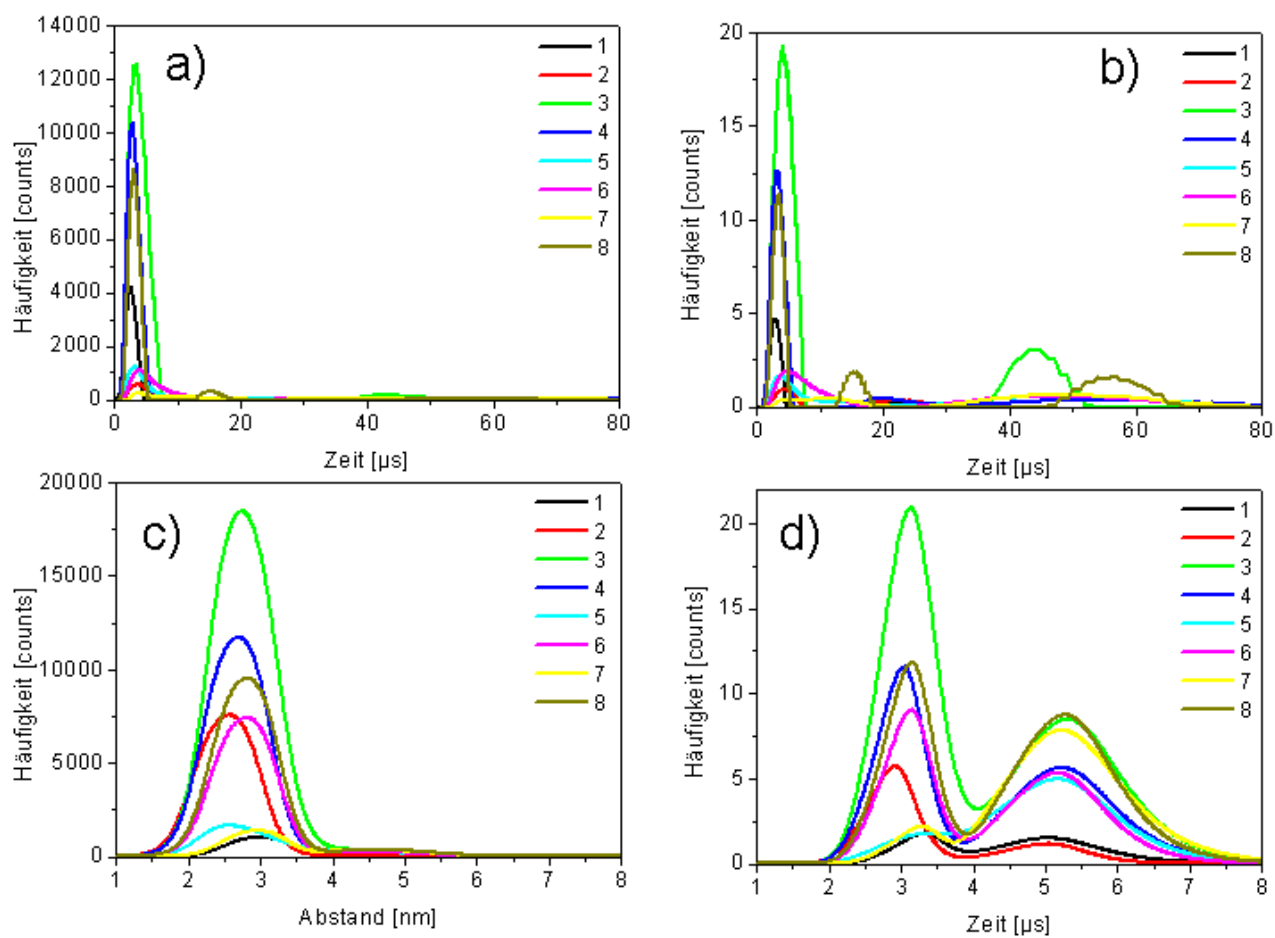


Abbildung A.6. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD605 für jede der acht Messungen **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors.

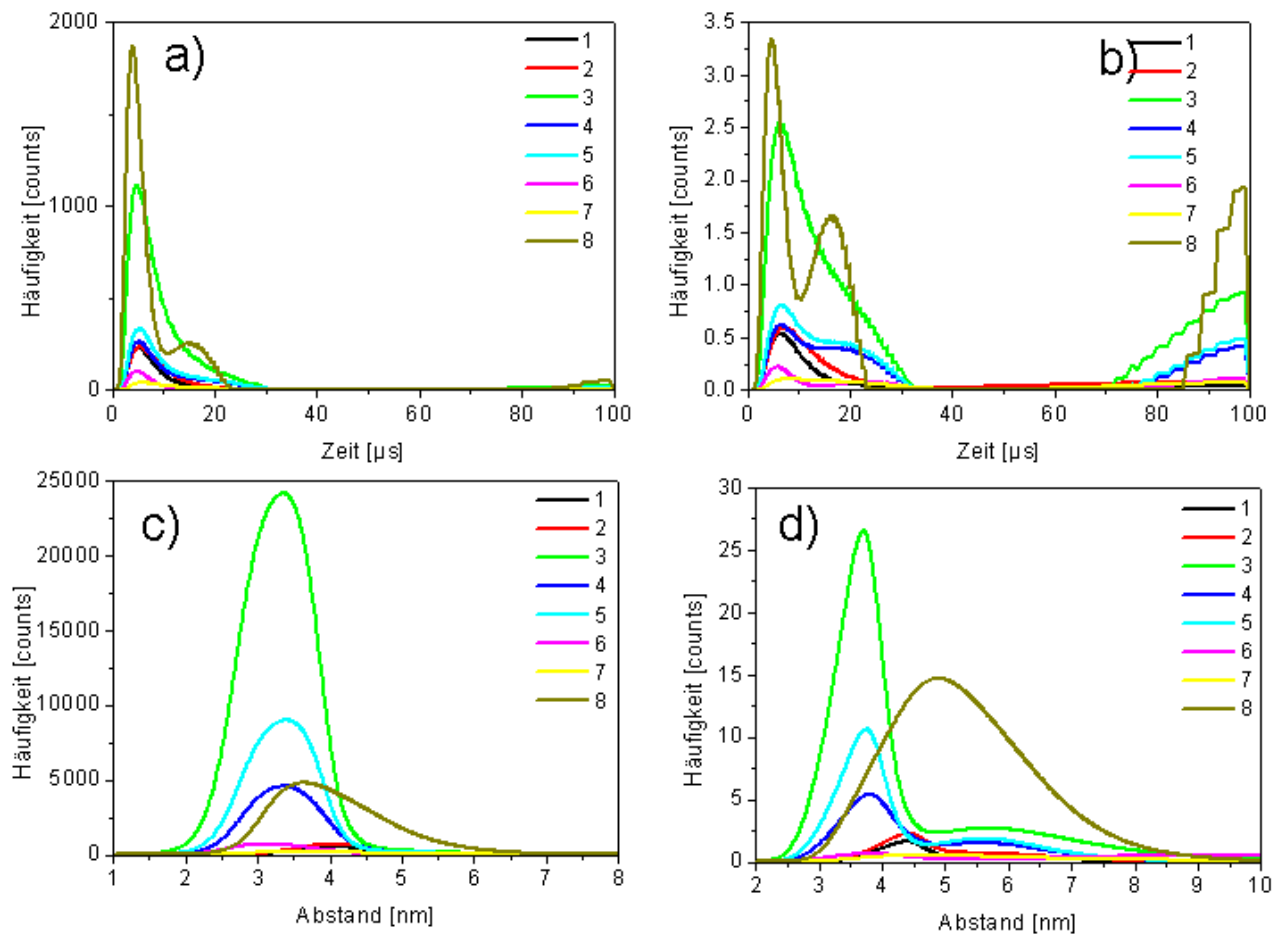


Abbildung A.7. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD655 für jede der acht Messungen **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors.

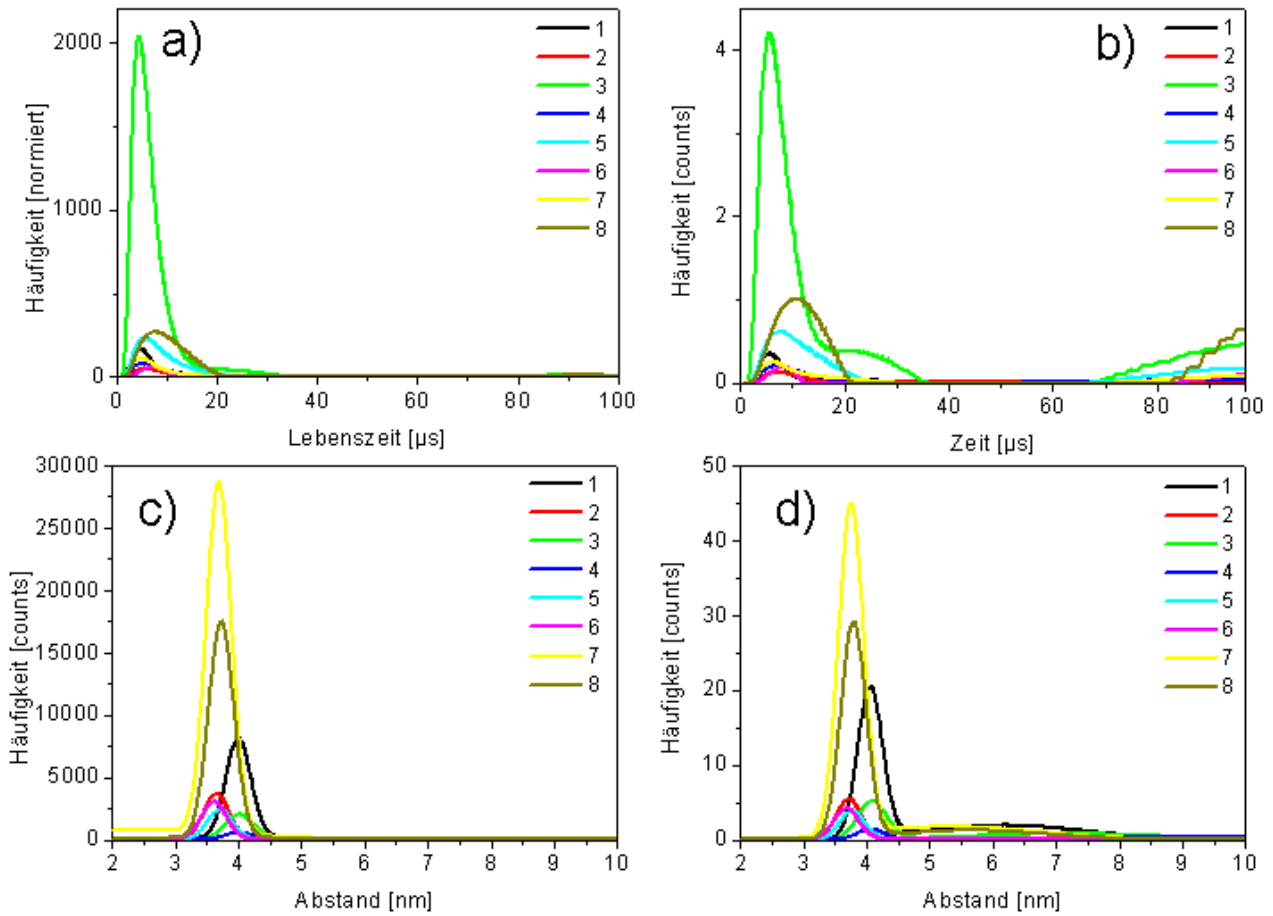


Abbildung A.8. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Pep-ITK-QD705 für jede der acht Messungen **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors.

A.7 Ermittelte Lebenszeit- und Abstandsverteilungen der Biot-Strep-Assays

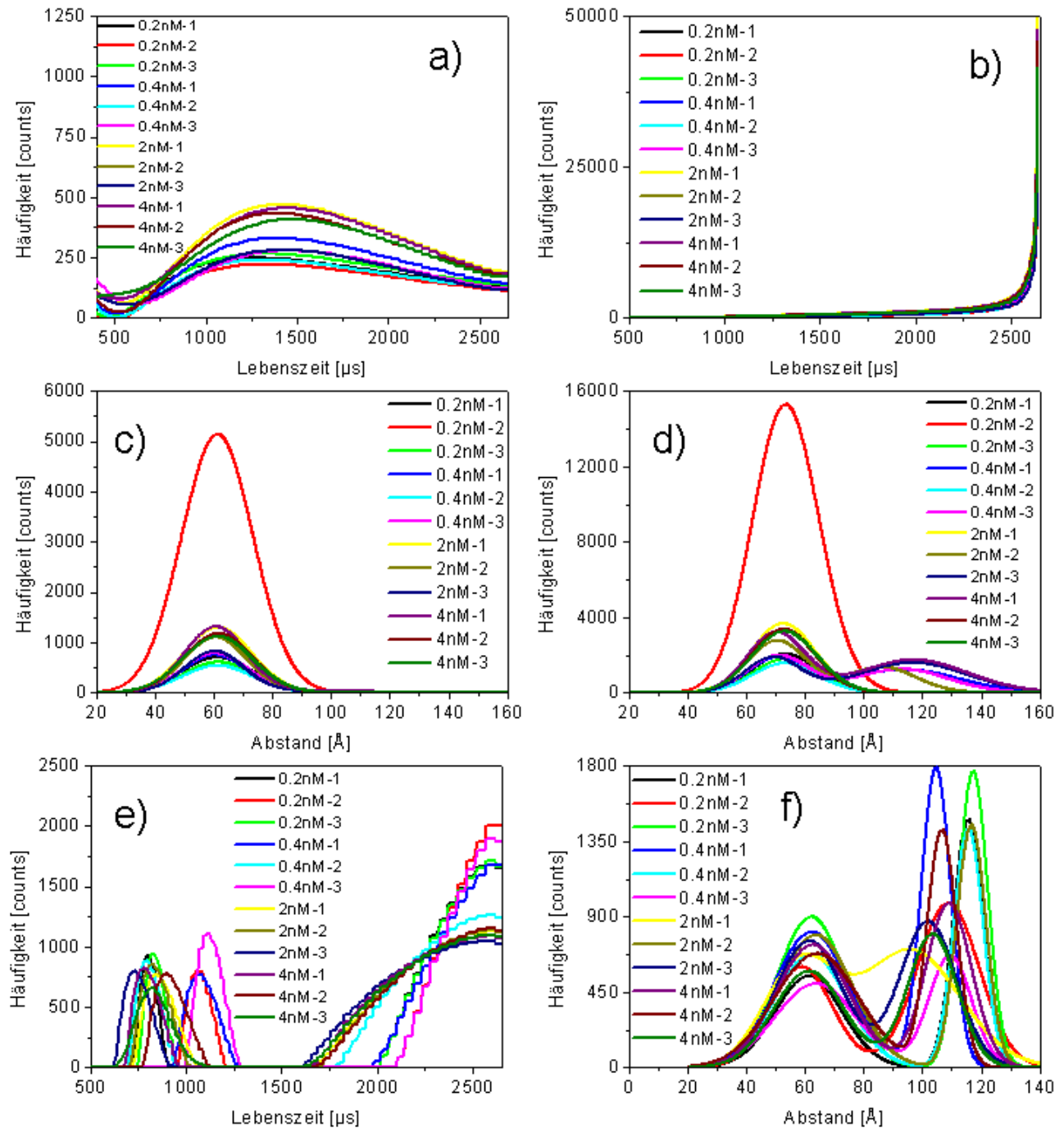


Abbildung A.9. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD525 für unterschiedliche QD-Konzentrationen bei konstanter Lumi4Tb-Konzentration (2nM) **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **e)** FRET-Lebenszeitverteilungen des Donors **f)** FRET-Abstandsverteilungen des Donors.

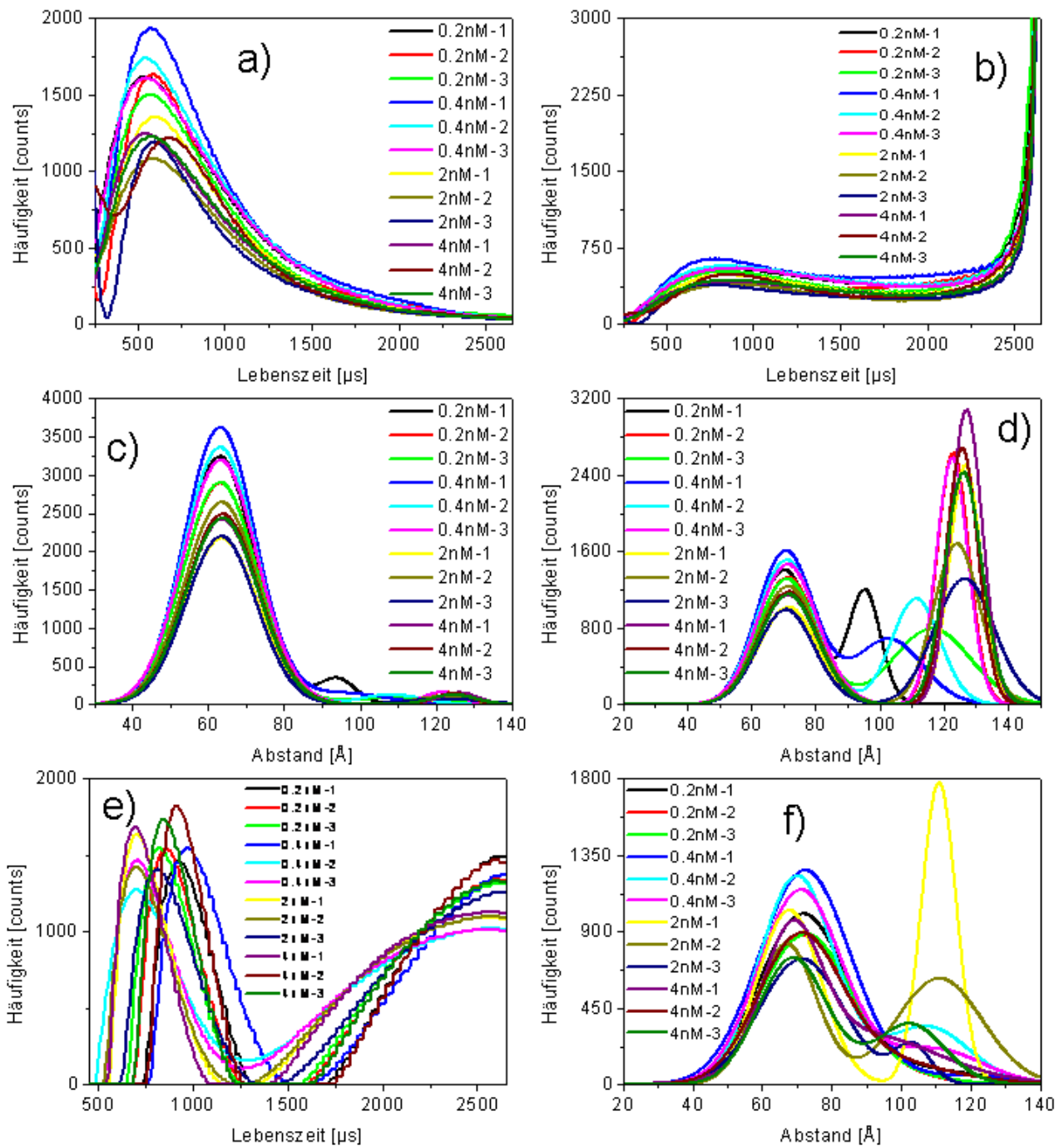


Abbildung A.10. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD565 für unterschiedliche QD-Konzentrationen bei konstanter Lumi4Tb-Konzentration (2nM) **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **e)** FRET-Lebenszeitverteilungen des Donors **f)** FRET-Abstandsverteilungen des Donors.

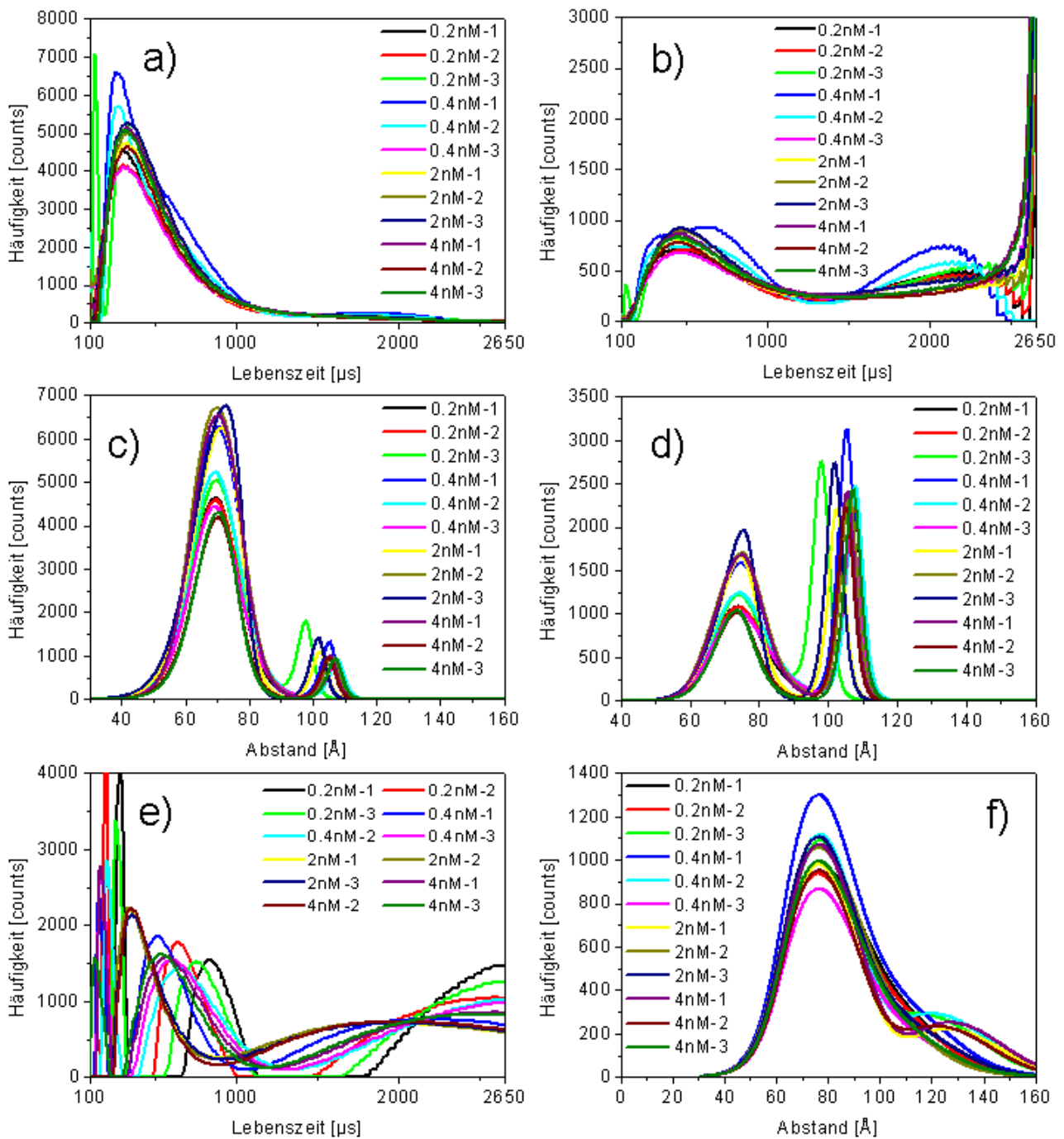


Abbildung A.11. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD605 für unterschiedliche QD-Konzentrationen bei konstanter Lumi4Tb-Konzentration (2nM) **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **e)** FRET-Lebenszeitverteilungen des Donors **f)** FRET-Abstandsverteilungen des Donors.

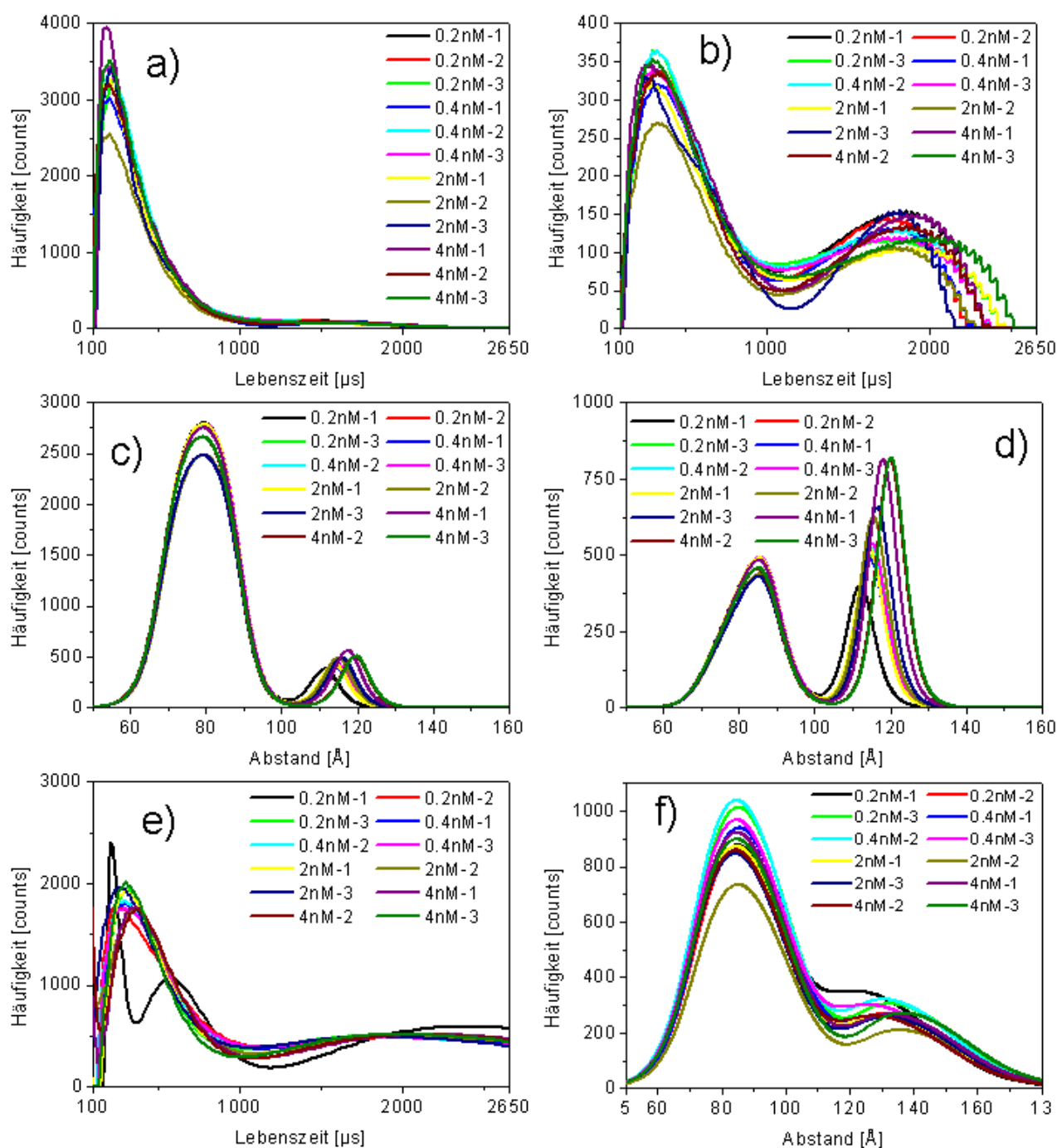


Abbildung A.12. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD655 für unterschiedliche QD-Konzentrationen bei konstanter Lumi4Tb-Konzentration (2nM) **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **e)** FRET-Lebenszeitverteilungen des Donors **f)** FRET-Abstandsverteilungen des Donors.

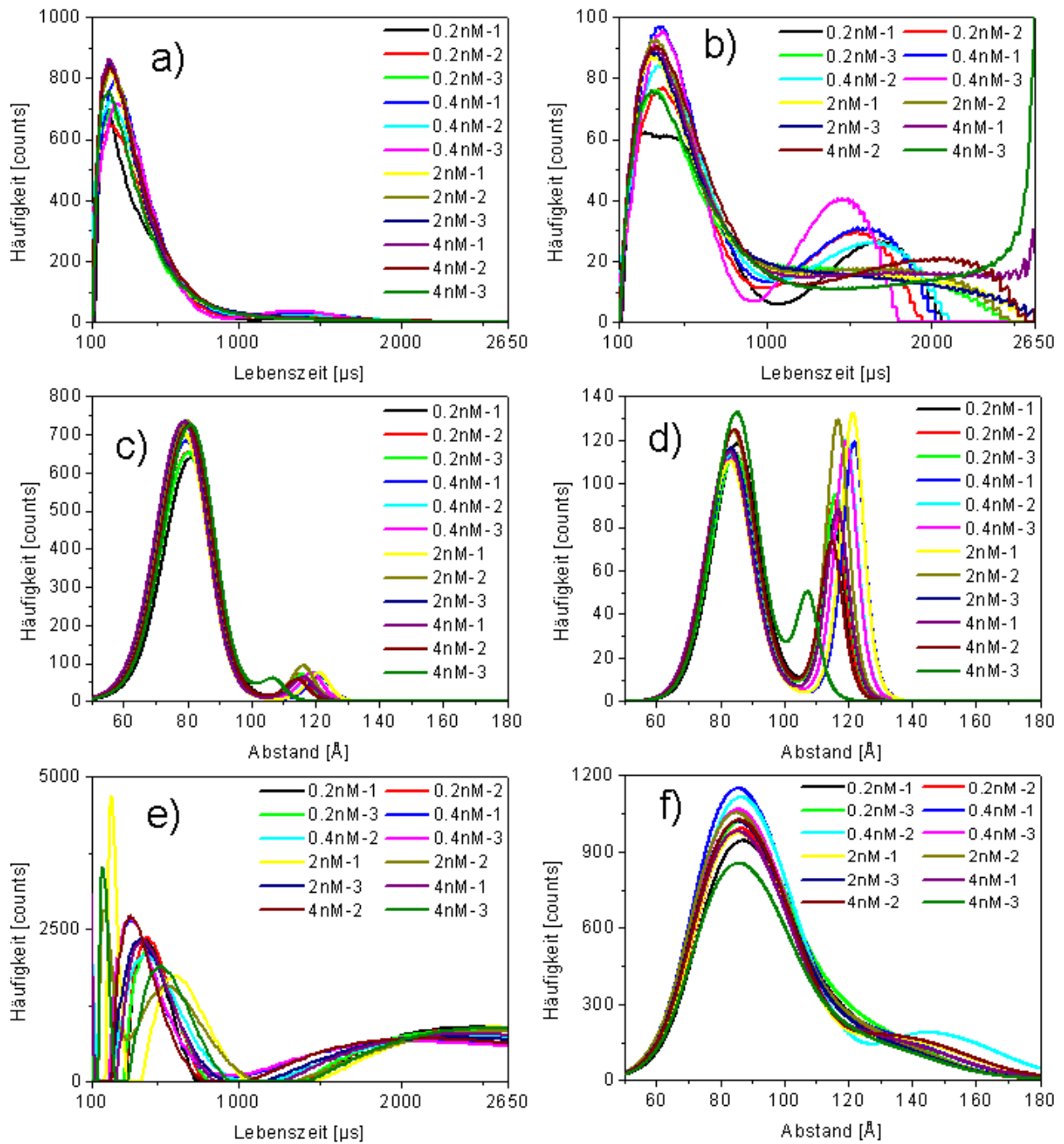


Abbildung A.13. Ermittelte FRET-Verteilungen im FRET-System Lumi4Tb-Strep-Biot-QD705 für unterschiedliche QD-Konzentrationen bei konstanter Lumi4Tb-Konzentration (2nM) **a)** unkorrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **b)** korrigierte FRET-Lebenszeitverteilungen des Akzeptors **c)** unkorrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **d)** korrigierte FRET-Abstandsverteilungen des Akzeptors **e)** FRET-Lebenszeitverteilungen des Donors **f)** FRET-Abstandsverteilungen des Donors.

Erklärung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig durchgeführt und keine anderen als die ausdrücklich angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Potsdam, 04. September 2012

Frank Morgner