

Auf photoinduzierter intramolekularer Ladungstrennung basierende einzelmolekülempfindliche Fluoreszenzsensoren

Markus Sauer*

Stichwörter:

Elektronentransfer · Fluoreszenzsonden · Fluoreszenzspektroskopie · Sensoren · Zeitaufgelöste Spektroskopie

Die Entwicklung und Untersuchung molekularer Systeme und Methoden, welche die Überwachung selektiver Erkennungs- und Bindungsereignisse ermöglichen, ist für ein besseres Verständnis der molekularen Signal- und Informationsübertragung in biologischen Systemen wichtig.^[1] Im Idealfall sollte das molekulare System oder der Sensor ein Bindungsereignis durch die Änderung einer charakteristischen Eigenschaft wie der Fluoreszenz- oder Lumineszenzintensität anzeigen, die einfach mithilfe eines geeigneten Detektors in ein elektronisches Signal umgewandelt werden kann. Neben dem Anzeigen von Bindungsprozessen können Sensoren zur Informationsverarbeitung verwendet werden, wenn das Schalten zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen mit messbaren, charakteristischen Eigenschaften durch Stimulieren von außen gelingt.

Im Allgemeinen können durch photoinduzierten Elektronentransfer (PET) oder elektronischen Energietransfer (EET) diskrete Bindungsereignisse stöchiometrisch in die Änderung eines Fluoreszenzsignals eines Fluorophors umgesetzt werden. Molekulare Systeme, in denen der angeregte Zustand des Fluorophors durch die Redox-Eigenschaften eines kovalent verknüpften

Rezeptormoduls bestimmt werden, sind eine wichtige Klasse chemosensorischer Materialien.^[1] Bis heute werden Chemosensoren gewöhnlich in homogenen Lösungen zur Detektion von Zielmolekülen im mikromolaren bis nanomolaren Konzentrationsbereich eingesetzt.^[1–3] Dabei hat die optische Detektion individueller Bindungsereignisse durch Sensoren die höchste Nachweisempfindlichkeit.

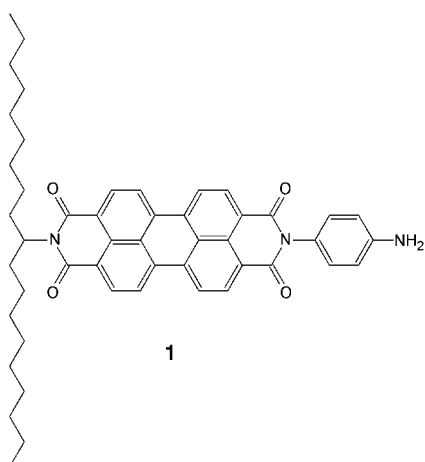
Die Fortschritte in der optische Spektroskopie und Mikroskopie ermöglichen nicht nur die Detektion und Identifizierung einzelner frei diffundierender oder immobilisierter Moleküle, sondern auch deren spektroskopische Untersuchung sowie die Verfolgung dynamischer Prozesse an einzelnen Molekülen. Die Einzelmolekül-Spektroskopie hat sich mittlerweile zu einem wichtigen Hilfsmittel für die Untersuchung des Verhaltens einzelner Moleküle unter Standardbedingungen entwickelt.^[4,5] Dennoch wurden nur wenige Einzelmoleküluntersuchungen mit potenziellen Chemo- oder Biosensoren, d.h. Fluorophoren, die Bindungsereignisse durch eine Änderung ihrer spektroskopischen Eigenschaften anzeigen, durchgeführt. Dies liegt hauptsächlich daran, dass die meisten der in Sensoren genutzten Fluorophore wie Anthracen- oder Cumarinderivate im UV-Bereich angeregt werden müssen und eine geringe Photostabilität aufweisen.^[6] Neben dem Absorptionsquerschnitt der Fluoreszenz- und Triplett-Quantenausbeute spielt die Photostabilität der bei einzelmolekülspektroskopischen Messungen verwendeten Fluorophore we-

gen des irreversiblen Verlustes der Fluoreszenzeigenschaften eine wichtige Rolle.

Um einzelne Moleküle fluoreszenzspektroskopisch sichtbar zu machen, müssen relative hohe Anregungsintensitäten verwendet werden. Normalerweise resultiert daraus die Anregung eines Chromophors in den ersten elektronisch angeregten Singulett- und Triplett-Zustand, S_1 und T_1 , und aufgrund der Absorption eines zweiten Photons auch in höher angeregte Zustände, S_N und T_N . Leider werden durch die Besetzung höher angeregter elektronischer Zustände neue Reaktionskanäle geöffnet, z. B. die Bildung von Farbstoffradikationen und solvatisierten Elektronen.^[6] Diese Zweischritt-Photolyse wird insbesondere bei höheren Anregungsintensitäten im UV-Bereich wichtig. Um die Detektion einzelner Fluoreszenzsensoren zu garantieren, sollten die verwendeten Fluorophore idealerweise im sichtbaren Bereich angeregt werden können und eine ausreichende Fluoreszenzquantenausbeute und Photostabilität haben.

Vor kurzem beschrieben Adams et al. die Verwendbarkeit einer neuartigen Klasse von Fluoreszenzsensoren zur einzelmolekülempfindlichen Untersuchung lokaler Oberflächenstrukturen, reversibler chemischer Reaktionen und Grenzflächenreaktionen wie Elektronentransfer-Reaktionen.^[7] Das in ihrer Untersuchung verwendete Perylen-3,4,9,10-tetracarbonsäurediimid kann im grünen Wellenlängenbereich beispielsweise mit einem Argon-Laser bei 488 nm angeregt werden. Zusätzlich hat

[*] Priv.-Doz. Dr. M. Sauer
Physikalisch-Chemisches Institut
Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 253
69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-544-255
E-mail: sauer@urz.uni-heidelberg.de



es eine hohe Photostabilität und Fluoreszenzquantenausbeute (> 99%). Um einen chemischen Sensor herzustellen, wurde eine p-Aminophenylgruppe direkt mit dem Perylencarbonsäurediimid verknüpft, die die Fluoreszenz des Fluorophors im ungebundenen Zustand effizient über einen intramolekularen PET löscht. Kovalent mit einem Fluorophor verknüpfte p-Aminophenylgruppen wurden vielfach zum Nachweis von Metallionen oder Protonen verwendet.^[1] Hierbei löscht das hochenergetische, nichtbindende Elektronenpaar des Stickstoffatoms effizient den elektronisch angeregten Zustand des Fluorophors durch PET (Abbildung 1). Es folgt der thermisch induzierte Rücktransfer des Elektrons vom LUMO des Fluorophors als eine Art Selbstrepara-

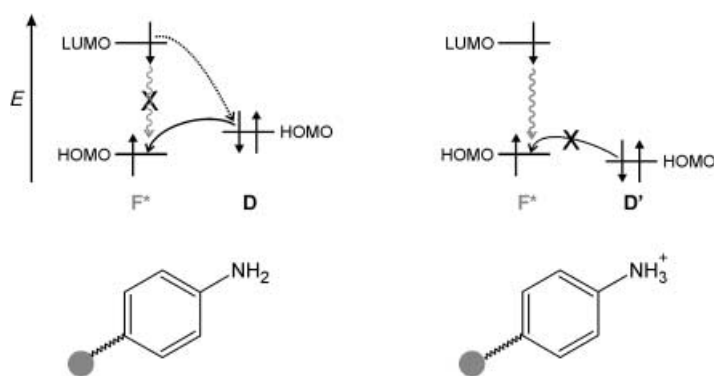


Abbildung 1. Vereinfachtes Grenzorbital-Energiediagramm zur Darstellung der Thermodynamik beim intramolekularen PET für ein Fluorophor, das durch ein kovalent mit dem Fluorophor verknüpftes aromatisches Amin gelöscht wird. Nach Anregung wird die Fluoreszenz effizient durch eine PET vom Elektronendonator zum ersten angeregten Singulett-Zustand des Fluorophors gelöscht. Zur Regenerierung des Grundzustands des Fluorophors findet ein thermisch induzierter Elektronen-Rücktransfer statt. Die Protonierung der Stickstoffgruppe oder Reaktionen mit Metallatomen erniedrigen die Energie des HOMO und verhindern damit den PET. Dies führt zur Regenerierung der Fluoreszenz des Fluorophors.

turmechanismus zur Regenerierung des potenziell zerstörten PET-Sensors. Durch die Protonierung des nichtbindenden Elektronenpaares der Aminogruppe oder die Titration mit Lösungen von ZnCl_2 in THF, von $[\text{Pt}(\text{SEt}_2)_2\text{Cl}_2]$ in CHCl_3 , von TiO_2 -Nanopartikel in THF oder von Aldehyden in CHCl_3 wird die Energie des Elektronenpaares abgesenkt. Dadurch ist der photoinduzierte Elektronentransfer thermodynamisch nicht mehr möglich, die Fluoreszenz des Fluorophors ist wiederhergestellt.

Um herauszufinden, ob dieses Sensorsystem für das lokale Abtasten von Oberflächenstrukturen auf der Nanometerskala verwendet werden kann, wurde das Perylenderivat NDAPP (*N*-(10-Nonadecyl)-*N'*-(*p*-aminophenyl)perylene-3,4,9,10-tetracarbonsäurediimid, **1**) auf Quarz- und Glasabdeckgläsern aufgebracht. Konfokale rasterfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dieser Oberflächen zeigen nur auf Glas helle fluoreszierende Punkte einzelner NDAPP-Moleküle (Abbildung 2a). Dies deutet darauf hin, dass das freie Amin des NDAPP an Metall- oder Metalloxidverunreinigungen wie TiO_2 -, ZnO - oder Al_2O_3 -Zentren im Glas bindet. Da auf frisch gereinigtem Quarz solche Bindungsstellen nicht vorhanden sind, zeigen die NDAPP-Moleküle keine Fluoreszenzsignale (Abbildung 2b). In einem dünnen Polyvinylbutylaldehyd(PVB)-Film verteilte NDAPP-Moleküle zeigen wiederum starke Fluores-

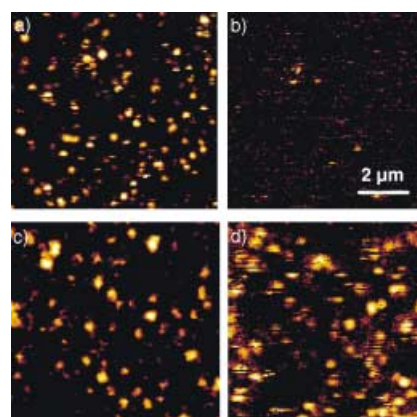


Abbildung 2. Durch Rasterung erzeugte konfokale Einzelmolekülfluoreszenzbilder von NDAPP auf Glas- und Quarzabdeckgläsern. Die Aufnahmen wurden unter Argon-Atmosphäre bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ($\approx 50 \text{ Wcm}^{-2}$) und einer Integrationszeit von 20 ms/bin durchgeführt. a) NDAPP auf Glas (0–316 Photonen/20 ms); b) NDAPP auf Quarz (0–104 Photonen/20 ms); c) NDAPP auf Quarz nach Behandlung mit Dioxan/HCl-Dampf (0–203 Photonen/20 ms); d) NDAPP auf Quarz nach 4–5 Tagen Lagerung an Luft (0–114 Photonen/20 ms). Von Lit. [7], Copyright 2002 American Chemical Society.

zenzsignale, die auf Reaktionen desamins mit dem Butylaldehyd des Polymerrückgrats zurückgehen. Werden die auf Quarz abgelegten NDAPP-Moleküle Dioxan/HCl-Dampf ausgesetzt, wird die Fluoreszenz wegen der Protonierung desamins wiederhergestellt (Abbildung 2c). Darüber hinaus werden helle Fluoreszenzsignale einzelner NDAPP-Moleküle auch auf Quarz generiert, wenn die Probe mehrere Tage lang der Luft ausgesetzt wird (Abbildung 2d). Da die Abdeckgläser vor Verwendung mit Säure gewaschen werden, könnten die Fluoreszenzpunkte durch langsame Diffusion der Moleküle zu protonierten Regionen auf der Oberfläche entstehen.

Die Aufnahme von Fluoreszenzzeitspuren einzelner NDAPP-Moleküle liefert ausführlichere Informationen über den Bindungsprozess. Hierzu werden einzelne NDAPP-Moleküle im Anregungslaser positioniert und die Fluoreszenzintensität bis zu ihrer irreversiblen Photozerstörung registriert (Abbildung 3). Während einzelne NDAPP-Moleküle in dünnen PVB-Schichten oder nach der Protonierung mit Dioxan/HCl-Dampf eine nahezu konstante

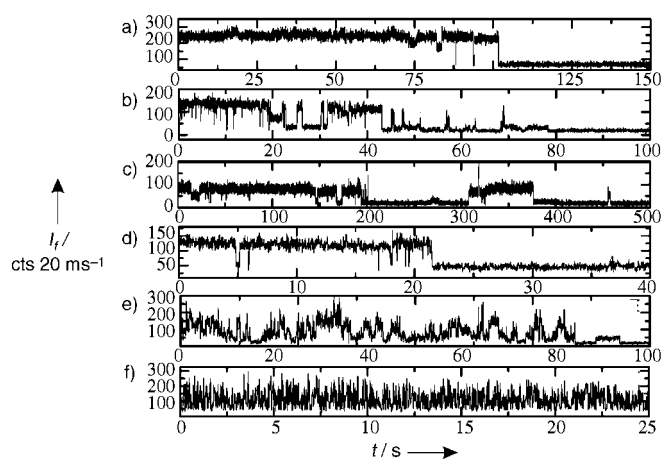


Abbildung 3. Fluoreszenz-Intensitäts-Zeitspuren einzelner NDAPP-Moleküle (Fluoreszenzintensität I_f in Photonenzählern, 20 ms^{-1} , gegen die Zeit t , in Sekunden). a) In einem PVB-Film; b, c) auf Glas; d) auf Quarz nach Behandlung mit Dioxan/HCl-Dampf; e, f) auf Quarz nach 4–5 Tagen Lagerung an Luft. Von Lit. [7], Copyright 2002 American Chemical Society. PVB = Polyvinylbutylaldehyd.

Fluoreszenzintensität mit seltenen Auszeiten wegen der Übergänge in den Triplett-Zustand aufweisen (Abbildung 3a), zeigen NDAPP-Moleküle auf unbehandelten Glasoberflächen längere Auszeiten von bis zu 100 Sekunden (Abbildung 3b, 3c). Wie schon für andere Fluorophore postuliert, können diese langen Auszeiten wahrscheinlich nichtfluoreszierenden ladungstrennten Zuständen wie Radikalkationen oder -Anionen, die durch Elektronentransfer mit einem Metallzentrum entstanden sind, zugeschrieben werden. Die Fluoreszenz, die auf den Quarz-Abdeckgläsern nach mehreren Tagen an der Luft erscheint, zeigt starke Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität auf einer Millisekundenskala zwischen einem Aus- und einem Anzustand (Abbildung 3e, 3f), was auf eine dynamische Bindung des Amins auf der Oberfläche hindeutet. Diese eher klassische Methode der Signalübertragung eines Metallbindungsereignisses in ein Fluoreszenzsignal basiert auf einer durch die Metallbindung induzierten Änderung des Redoxpotentials eines kovalent mit dem Fluorophor verknüpften Rezeptormoleküls.

Im Gegensatz hierzu präsentierten Walkup und Imperiali kürzlich das Design einer fluoreszenzmarkierten synthetischen Polypeptid-Vorlage (Zinkfinger-Domäne), bei der die fluoreszierenden Reporter nicht direkt an der Metallbindung beteiligt sind.^[8] Dennoch zeigt sich

die durch die Metallbindung induzierte Konformationsänderung des Polypeptids in einer Änderung der Fluoreszenzintensität. Diese Art von Sensoren basiert auf der spezifischen Markierung des Sensors mit geeigneten Fluorophoren sowie durch beim Binden ausgelöste Konformationsänderungen, die die EET-Effizienz modifizieren.

Obwohl der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) erfolgreich auf der Einzelmolekülebene eingesetzt wurde, z.B. zur Untersuchung von Konformationsfluktuationen einzelner Biomoleküle,^[5] wurden bisher nur wenige auf FRET basierende potenzielle Biosensoren auf der Einzelmolekülebene beschrieben. Allerdings wurden neuartige PET-Biosensoren entwickelt, die die durch Konformationsänderungen beim Binden resultierende Änderungen der PET-Effizienz zur spezifischen Detektion von DNA- oder RNA-Sequenzen und -Antikörpern auf der Einzelmolekülebene verwenden.^[9,10] Diese Biosensoren nutzen selektive Eigenschaften von natürlich vorkommenden DNA-Nucleotiden und Aminosäuren. Insbesondere werden das niedrige Oxidationspotential der DNA-Base Guanosin und der Aminosäure Tryptophan sowie die Tendenz vieler Fluorophore, in wässriger Umgebung Aggregate zu bilden, ausgenutzt.

Anders als die auf EET beruhenden Systemen, die auf weitreichenden Dipol-Dipol-Wechselwirkungen basieren,

benötigen diese Sensoren einen Kontakt (van-der-Waals-Kontakt) zwischen Fluorophor und Guanosin- oder Tryptophanrest für eine effiziente PET-Reaktion. In Abhängigkeit vom Reduktionspotential des verwendeten Fluorophors findet eine starke Fluoreszenzlöschung durch PET statt (Abbildung 4). Durch ein sorgfältiges Design dieser konformativ flexiblen Sensoren und die Verwendung geeigneter Fluorophore (Rhodamin- und Oxazinfarbstoffe) können einzelmolekülempfindliche PET-Sensoren hergestellt werden. Werden die fluoreszenzlöschenden Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Guanosin- oder Tryptophanrest durch die selektive Bindung an das Zielmolekül zerstört, z.B. durch Bindung an komplementäre DNA oder Antikörper oder durch enzymatischen Verdau durch eine Endonuclease oder eine Protease, wird die Löschung aufgehoben und die Fluoreszenz des Sensors wiederhergestellt. Darüber hinaus kann der durch die Kontaktformation ausgelöste Lösungsprozess zur Bestimmung der intramolekularen Kontaktbildungsgeschwindigkeit in einzelnen Peptiden oder zur direkten Verfolgung der Öffnungs- oder Schließdynamik von individuellen DNA-Hairpins (Haarnadel- oder Schleife/Stammstrukturen auf DNA-Basis) genutzt werden. Sie sind damit für Einzelmoleküluntersuchungen sehr geeignet (Abbildung 4c) und eine elegante Alternative zu den konventionellen auf EET beruhenden Biosensoren.^[9,10]

Dieses Highlight soll zeigen, dass Chemo- und Biosensoren auf der Grundlage intramolekularer PET als einzelmolekülempfindliche Sonden zur selektiven Detektion individueller Bindungsereignisse in Lösung sowie auf Oberflächen oder in Polymeren verwendet werden können. Genaue Information über die Wechselwirkung dieser Sensoren mit ihrer Umgebung können aus Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren einzelner Moleküle gewonnen werden. Weitere Verbesserungen der Selektivität in Kombination mit neuartigen einzelmolekülempfindlichen Detektionsmethoden, z.B. der polarisationsmodulierten oder der spektral aufgelösten Fluoreszenzlebensdauer-Spektroskopie, sind damit in greifbare Nähe gerückt: die Detektion bestimmter Zielmoleküle im sub-pikomolaren Bereich und die

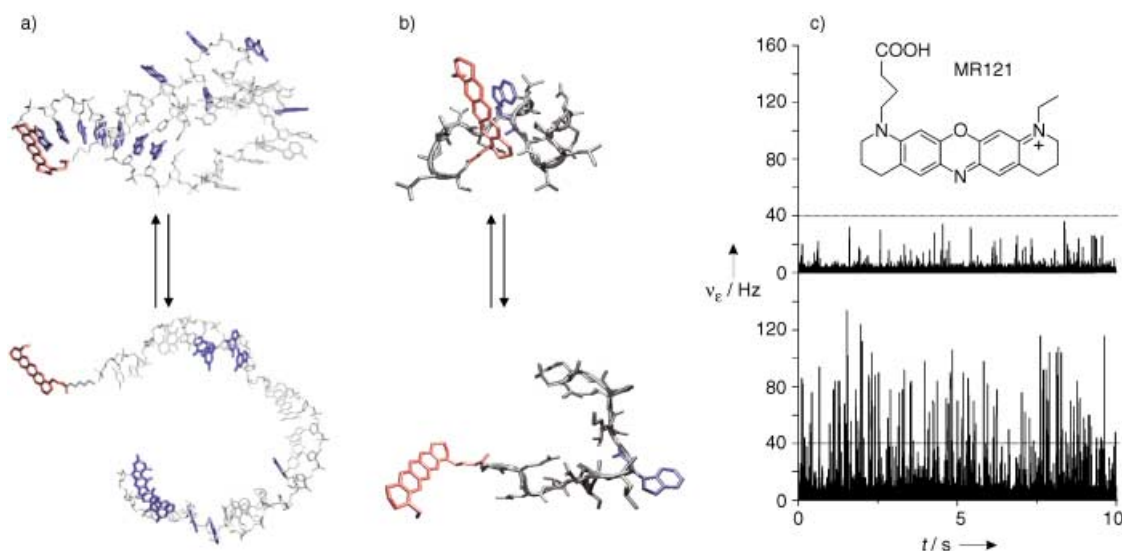


Abbildung 4. Prinzip der Funktionsweise der auf PET basierenden Biosensoren unter Verwendung des rot absorbierenden Oxazinderivats MR121 ($\lambda_{\text{abs}} = 661 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 673 \text{ nm}$). a) DNA-Hairpins, die auf der selektiven Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs MR121 (rot) durch die DNA-Base Guanosen (blau) beruhen. Der Fluorophor ist am 5'-Ende des Cytosin enthaltenden doppelsträngigen Stammes angebracht und wird über PET durch die komplementären Guanosinreste gelöscht. Durch Hybridisierung der Schleife an die komplementäre Zielsequenz werden der Fluorophor und die Guanosinreste auseinandergerissen und die Fluoreszenzlöschung aufgehoben.^[9] b) Fluoreszenzmarkierte, aus der immundominanten Region des menschlichen p53-Proteins abgeleitete Peptid-Epitope können als PET-Biosensor zur Detektion einzelner p53-Autoantikörper verwendet werden. Das Peptid nimmt eine durch hydrophobe Wechselwirkungen verursachte Konformation ein, in der der Farbstoff MR121 (rot) eine Fluoreszenzlöschung über PET durch den Tryptophanrest (blau) erfährt. Durch die spezifische Bindung an p53-Autoantikörper und der daraus resultierenden Konformationsänderung steigt die Fluoreszenzintensität stark an.^[10] c) Einzelmolekülsignale (Zählrate ν_c , in kHz gegen Zeit t in Sekunden) einer $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ Lösung des auf PET beruhenden DNA-Hairpin-Sensors (es wurde eine 635 nm Laserdiode zur Anregung verwendet) in Abwesenheit (oben) und Gegenwart eines Überschusses (unten) der komplementären Gegensequenz. In Abwesenheit der Zielsequenz ist die Fluoreszenzintensität des Oxazinfarbstoffs effizient durch PET mit den Guanosinresten im komplementären Stamm gelöscht. Nach Zugabe der Zielsequenz kann durch das einfache Abzählen der Einzelmolekülfluoreszenzsignale oberhalb eines gewissen Schwellwertes quantitativ die Konzentration der Zielmoleküle bestimmt werden.^[9]

direkte Verfolgung der Bindungskinetik eines PET-Sensors mit einer zeitlichen Auflösung wie sie mit den neuartigen Methoden der Moleküldynamik-Simulation erreicht werden.

[1] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.

[2] S. C. Burdette, G. K. Walkup, B. Spingler, R. Y. Tsien, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7831–7841.

[3] R. E. Gawley, S. Pinet, C. M. Cardona, P. K. Datta, T. Ren, W. C. Guida, J. Nydick, R. M. Leblanc, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13448–13453.

[4] X. S. Xie, J. K. Trautman, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, *49*, 441–480.

[5] S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676–1683.

[6] C. Eggeling, L. Brand, C. A. M. Seidel, *Bioimaging* **1997**, *5*, 105–115.

[7] L. Zang, R. Liu, M. W. Holman, K. T. Nguyen, D. M. Adams, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10640–10641.

[8] G. K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3053–3054.

[9] J. P. Knemeyer, N. Marmé, M. Sauer, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3717–3724.

[10] H. Neuweiler, A. Schulz, A. C. Vaiana, J. C. Smith, S. Kaul, J. Wolfrum, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4964–4968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4769–4773.