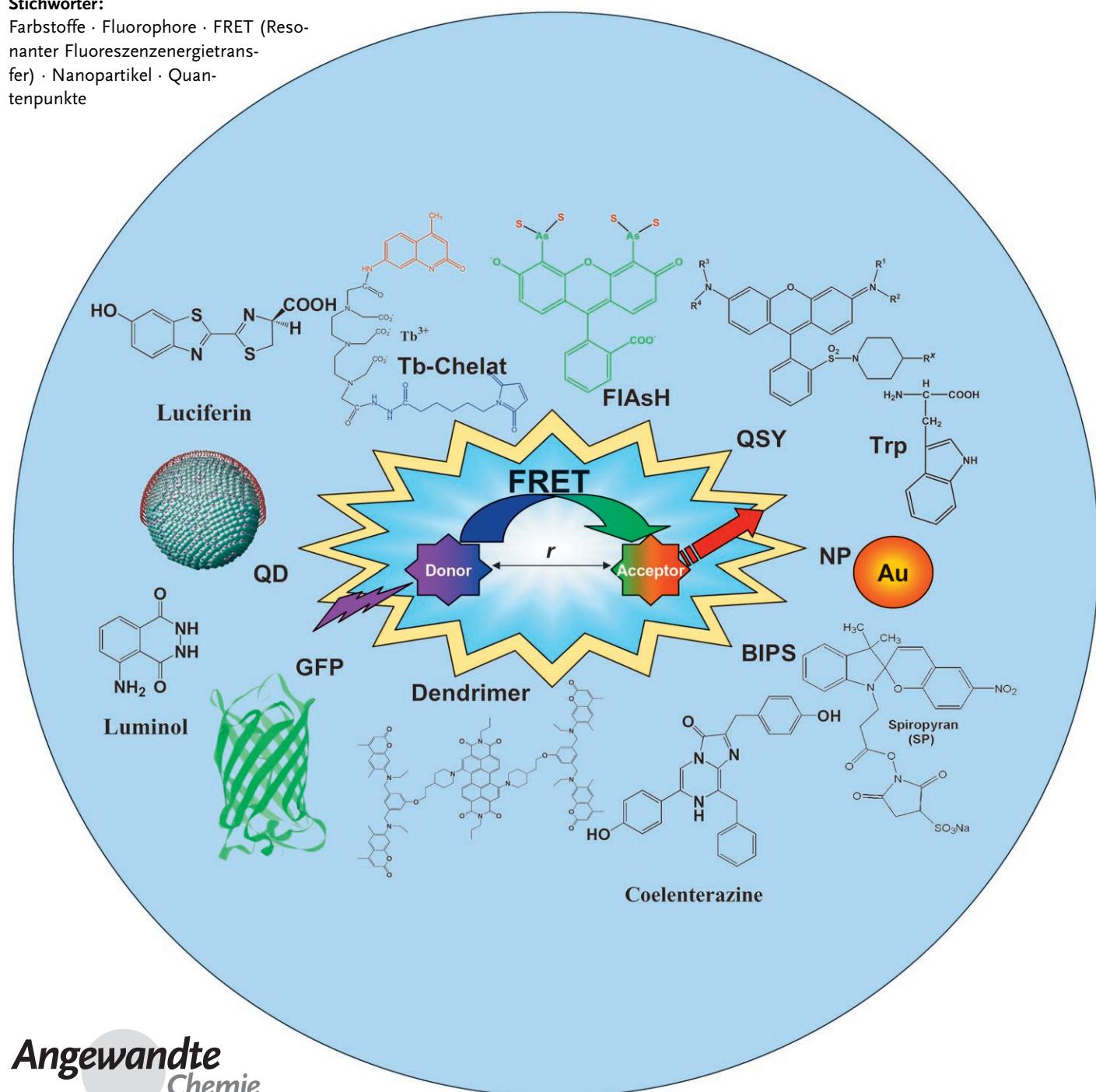


Materialien für den resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET): jenseits klassischer Donor-Acceptor-Kombinationen**

Kim E. Sapsford, Lorenzo Berti und Igor L. Medintz*

Stichwörter:

Farbstoffe · Fluorophore · FRET (Resonanter Fluoreszenzenergietransfer) · Nanopartikel · Quantenpunkte



Der resonante Förster- oder Fluoreszenzenergietransfer (FRET) wird seit über 50 Jahren als Grundlage spektroskopischer Techniken genutzt. Eine Suche im ISI Web of Science mit dem Begriff „FRET“ liefert mehr als 2300 Literaturzitate aus so unterschiedlichen Bereichen wie Strukturaufklärung biologischer Moleküle, In-vitro-Tests, In-vivo-Überwachung in zellulären Systemen, Nucleinsäureanalysen, Signaltransduktion, lichtsammelnde und metallische Nanomaterialien etc. Der entscheidende Faktor für die weite Verbreitung von FRET-Methoden war und ist die Entwicklung von neuartigen Fluorophortypen einschließlich Nanokristallen, Nanopartikeln, Polymeren und genetisch codierten Proteinen, zusammen mit der Einführung hochentwickelter Apparaturen. Dieser Aufsatz gibt einen kritischen Überblick über die Hauptklassen fluorophorer Materialien, die als Donoren, Aczeptoren oder beides in FRET-Anordnungen dienen können. Insbesondere betrachten wir die Vorteile und Grenzen dieser Materialien und ihrer Kombinationen sowie die verfügbaren Verfahren zur Biokonjugation.

1. Einleitung

1.1. Der FRET-Mechanismus

Der resonante Fluoreszenzenergietransfer (FRET; fluorescence resonance energy transfer) ist ein strahlungsfreier Prozess, bei dem ein Donor D (meist ein Fluorophor) im angeregten Zustand Energie auf einen benachbarten Acceptor A im Grundzustand über weitreichende Dipol-Dipol-Wechselwirkungen überträgt (Abbildung 1).^[1,2] Der Acceptor muss bei der Emissionswellenlänge des Donors Energie aufnehmen können, muss sie aber nicht zwangsläufig in Form von Fluoreszenz abstrahlen („dark quenching“). Der Anteil der übertragenen Energie hängt von vielen Faktoren ab, z. B. vom Grad der spektralen Überlappung, von der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente und vor allem vom Abstand zwischen Donor- und Acceptorgruppen.^[2] Eine ausführliche Beschreibung der physikalischen Grundlagen des FRET, die den Rahmen dieses Aufsatzes sprengen würde, findet sich z. B. in Lit. [2].

FRET findet normalerweise über Entferungen in der Größenordnung der meisten biologischen Makromoleküle statt, also bei etwa 10 bis 100 Å. Zunehmend häufiger werden Anordnungen beschrieben, in denen mehrere Donoren und Aczeptoren wechselwirken (siehe z. B. Lit. [3–5]); die folgenden Gleichungen beziehen sich allerdings nur auf die Energieübertragung zwischen einem einzelnen gekoppelten D/A-Paar mit einem festen Abstand r und gehen auf die theoretischen Betrachtungen Försters zurück.^[2,6,7] Die Energieübertragungsgeschwindigkeit $k_T(r)$ zwischen Donor und Acceptor eines Paares hängt vom Abstand r zwischen den beiden ab und kann mithilfe des Förster-Abstandes R_0 ausgedrückt werden. R_0 ist die Entfernung zwischen D und A, bei der 50% der angeregten Donormoleküle über den Mechanismus der Energieübertragung zerfallen, während die andere Hälfte über andere strahlende oder strahlungslose

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4677
2. Organische Verbindungen	4680
3. Biologische Materialien	4685
4. Anorganische Materialien	4691
5. Multi-FRET-Systeme	4697
6. Neue Materialien	4699
7. Zusammenfassung und Ausblick	4699

Wege zerfällt. R_0 lässt sich aus den spektralen Eigenschaften von D und A berechnen, wie es in Gleichung (1) angegeben ist.

$$R_0 = 9.78 \times 10^3 [\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)]^{1/6} \text{ (in } \text{\AA}) \quad (1)$$

Der Faktor κ^2 beschreibt die Orientierung des D/A-Übergangsdipolmoments und kann zwischen 0 (senkrecht) und 4 (kollinear-parallel) liegen. Welche Werte man der Dipolorientierung bei bestimmten FRET-Formaten zuordnen soll, ist immer wieder Gegenstand der Diskussion gewesen. Nur in wenigen Fällen konnten die Kristallstrukturen der D/A-Moleküle ermittelt werden. Ansonsten gibt keine verlässliche experimentelle Methode, um absolute oder feste κ^2 -Werte zu bestimmen, sodass die Rechnungen mit Unsicherheiten behaftet sein können.^[2,8,9] Glücklicherweise kann aus einer Vielzahl von Hinweisen aber abgeschätzt werden, dass die Beweglichkeit und statistische Dynamik der Farbstoff-Linker zu einem κ^2 -Wert von etwa 2/3 in biologischen Systemen

[*] K. E. Sapsford,^[+] Dr. I. L. Medintz

Center for Bio/Molecular Science and Engineering
U.S. Naval Research Laboratory, Code 6910
4555 Overlook Ave, SW Washington, DC 20375 (USA)
Fax: (+1) 202-767-9594
E-mail: Imedintz@cbmse.nrl.navy.mil

K. E. Sapsford^[+]
George Mason University
10910 University Blvd, MS 4E3, Manassas, VA 20110 (USA)

L. Berti^[+]
S3-INFM-CNR
National Research Center on nanoStructures and bioSystems at
Surfaces
Via Campi 213/A, 41100 Modena (Italien)

[†] Die Autoren trugen gleichermaßen zu diesem Aufsatz bei.

[**] Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (eine Liste von Firmen, deren Produkte in diesem Aufsatz erwähnt werden) sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

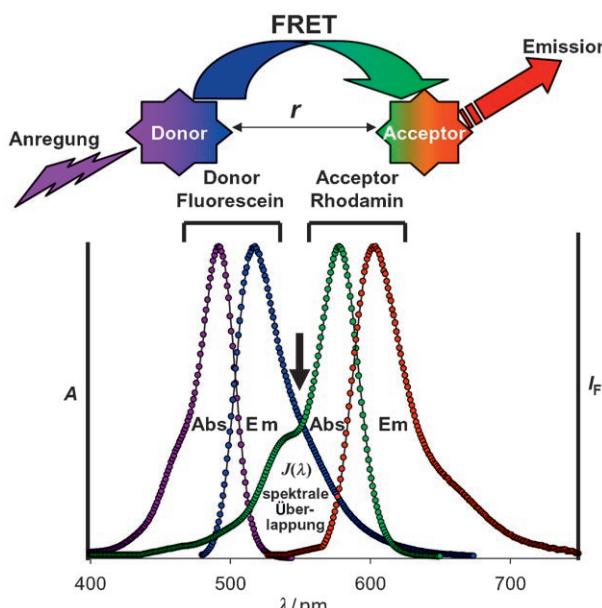


Abbildung 1. Schema des FRET-Prozesses: Ein durch Strahlung angeregtes Donormolekül überträgt strahlungslos Energie auf ein benachbartes Acceptor-Molekül im Abstand r . Der Acceptor kann die Energie entweder durch Fluoreszenz abstrahlen oder durch strahlungslose Übergänge abgeben. Die Spektren zeigen die Absorptions- (Abs) und Emissionsprofile (Em) eines der am meisten verwendeten FRET-Paare: Fluorescein als Donor und Rhodamin als Acceptor.^[8,9] Fluorescein kann bei 480 nm effizient angeregt werden und emittiert bei ca. 520 nm. Die spektrale Überlappung zwischen der Emission von Fluorescein und der Absorption von Rhodamin, definiert durch $J(\lambda)$, liegt bei 500–600 nm. Der Förster-Abstand R_0 für dieses Paar beträgt 55 Å. Bei einer optimalen Konfiguration ($r < 55$ Å) kann mit der Anregung von Fluorescein bei unter 500 nm eine deutliche FRET-Emission des Rhodamins bei > 600 nm hervorgerufen werden. A = normalisierte Absorption, I_F = normalisierte Fluoreszenz.

men führt. Damit liegt die obere Fehlergrenze für berechnete Entferungen bei 35%.^[2] Ausgezeichnete Übersichten hierzu finden sich bei dos Remedios und Moens^[9] sowie Stryer.^[10] Der Brechungsindex n des Mediums wird mit 1.4 für Biomoleküle in wässrigem Medium angenommen. Q_D ist die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Acceptors, und $J(\lambda)$ ist das Überlappungsintegral, das das Ausmaß der spektralen Überlappung zwischen der Emission des Donors und der Absorption des Acceptors beschreibt. Die Werte für

$J(\lambda)$ und R_0 nehmen mit steigendem Extinktionskoeffizienten des Acceptors und stärkerer Überlappung zwischen dem Emissionspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Acceptors zu.

Ob FRET bei einem bestimmten Abstand r wirksam ist, kann mit der Faustregel $R_0 \pm 50\% R_0$ für die obere und untere Grenze des Förster-Abstandes abgeschätzt werden.^[8,9] Die Effizienz der Energieübertragung lässt sich aus dem Fließgleichgewicht [Gl. (2)] oder aus zeitaufgelösten Messungen [Gl. (3)] bestimmen.

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (2)$$

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (3)$$

Dabei ist F die relative Fluoreszenz des Donors ohne (F_D) und mit Acceptor (F_{DA}) und τ die Lebensdauer der Fluoreszenz des Donors ohne (τ_D) und mit Acceptor (τ_{DA}).

Was FRET für die Bioanalytik so interessant macht, ist die Empfindlichkeit gegen winzige Änderungen des Abstandes zwischen D und A (proportional zu r^6). Die Anwendungen entsprechender FRET-Testsysteme reichen von der Untersuchung der Antigen-Bindung an einen Antikörper in vitro bis hin zur Echtzeitabbildung der Proteinfaltung in vivo.^[11,12] Die zahlreichen aktuell genutzten FRET-Techniken werden in mehreren Übersichtsartikeln behandelt.^[8,13,14] Wir wollen uns in diesem Aufsatz vor allem auf die Fluorophore konzentrieren, die in der FRET-gestützten Bioanalytik zum Einsatz kommen. Hierbei können mehrere Materialklassen unterschieden werden: organische Verbindungen, zu denen die „traditionellen“ Fluoreszenzfarbstoffe, Dark Quencher und Polymere gehören; anorganische Verbindungen wie Metallchelatkomplexe, Metall- und Halbleiternanokristalle; Fluorophore biologischen Ursprungs wie fluoreszierende Proteine und Aminosäuren; biologische Verbindungen, die enzymatisch katalysierte Biolumineszenz erzeugen. Die Materialien können als FRET-Donoren, FRET-Acceptoren oder beides fungieren, je nach experimentellem Aufbau. Ein Hauptaugenmerk liegt auf FRET-Prozessen zwischen unterschiedlichen Materialklassen; hierfür werden wir ausgewählte Beispiele diskutieren. Darüber hinaus betrachten wir mögliche FRET-Materialien, für die noch keine praktische Anwendung aufgezeigt wurde. Bei der Flut von Veröffentli-



Igor L. Medintz, geboren 1968, studierte Chemie und Forensik am John Jay College of Criminal Justice an der City University of New York und promovierte dort 1998 in Molekularbiologie bei Prof. Corinne Michels am Queens College. Als Postdoc bei Prof. Richard A. Mathies (UC Berkeley) arbeitete er an der Entwicklung FRET-basierter Testsysteme für mikrotechnische Apparate zur Genanalyse. Seit 2002 ist er Forscher am Center for Bio/Molecular Science and Engineering des US Naval Research Laboratory, wo er sich in Zusammenarbeit mit Dr. Hedi Mattoussi mit der Entwicklung von Biosensoren auf der Basis von Quantenpunkten befasst.



Kim E. Sapsford, geboren 1974, studierte Chemie an der University of East Anglia (Norwich) und promovierte dort 2001 in analytischer Chemie bei Prof. David A. Russell. Seit 2001 forscht sie am Center for Bio/Molecular Science and Engineering des US Naval Research Laboratory an der Entwicklung fluoreszenzbasierter Biosensoren. Grundlage ihrer Arbeiten ist die von Dr. Frances Ligler entwickelte Array-Biosensor-Technologie.

Tabelle 1: Häufige reaktive Gruppen und Methoden zur Kupplung von Fluorophoren an Biomoleküle.^[18, 19]

Zielstruktur	reaktive Gruppe	Bemerkung
Thiol primäres Amin	Maleimid, Iodacetyl, Pyridyldisulfid ^[a] Succinimidylester, Sulfonylchlorid, Iso(thio)cyanat, Carbonylazid ^[a]	ortsspezifisch, benötigt aber ein freies Cystein im Protein Proteine können viele primäre Amingruppen enthalten
Carboxygruppe Hydroxygruppe	Carbonyldiimidazol, Carbodiimid ^[b] Carbonyldiimidazol, Periodat, Disuccinimidylcarbonat ^[b]	ermöglicht zusätzliche Kupplung an Amine ermöglicht zusätzliche Kupplung an Amine
Kohlenhydrate	Periodat ^[b]	oxidiert Zucker und führt reaktive Aldehydgruppen ein, die sich an Amine kuppeln lassen
intrazelluläre Proteine	FlAsH ^[22]	erfordert Klonierung
intrazelluläre Proteine	SNAP-Tag/HaloTag ^[25]	erfordert Klonierung und kommerzielle Liganden
intrazelluläre Proteine	fluoreszierende Proteine ^[14, 20, 21]	erfordert Klonierung und Chimärenbildung

[a] Die reaktiven Gruppen können auch Amin- bzw. Thiol-modifizierte DNA angreifen. [b] Mehrstufige Modifizierungen.

chungen können wir nicht allen Entwicklungen umfassend gerecht werden, und für die unvermeidlichen Auslassungen möchten wir uns entschuldigen.

1.2. Konjugation von Fluorophoren an Biomoleküle

Für FRET-Anwendungen ist es erforderlich, Fluorophore an genau festgelegte Positionen in Biomolekülen konjugieren zu können. Einige Verfahren sollen im Folgenden betrachtet werden. Die am häufigsten verwendeten Reagenzien für ortsspezifische Markierungen sind kommerziell erhältliche Fluorophore mit einer reaktiven Succinimidylester- oder Maleimidgruppe, die an primäre Amino- oder Thiolgruppen in Biomolekülen wie Proteinen oder DNA angreifen. Da Proteine sehr viele primäre Aminogruppen enthalten (meist an Lysinresten), ergeben sich relativ unspezifische Markierungen an dieser Gruppe mit variablen Farbstoff-Protein-Verhältnissen. Die Markierung von Thiolen an Cysteinresten mit Maleimid ist meist spezifischer, da diese eigens zu diesem Zweck leicht rekombinant in Proteine eingeführt werden können.^[15] Ein häufiges Problem besteht allerdings darin, dass bereits im Protein befindliche Disulfidbrücken wichtig für die Konformation sein können und zusätzliche Cysteinreste eventuell die Proteinstruktur zerstören. Außerdem bilden Proteine, die an ihrer Oberfläche auch nur ein einzelnes exponiertes Thiol exprimieren, bei der Reinigung Dimere, sodass man vor der Markierung einen Reduktions-

schritt benötigt. Die Chemie der Proteinmarkierung wurde von Gregorio Weber entwickelt, und viele der von ihm eingeführten Marker sind noch heute in Gebrauch.^[2]

Gewöhnlich ist die Markierung von DNA und RNA einfacher, da diese so synthetisiert werden können, dass sie ortsspezifische Thiole oder Amine enthalten, oder auch Nucleotide, die mit einer Reihe von Fluorophoren oder Fluoreszenzlösichern modifiziert sein können.^[16, 17] Damit lässt sich zum einen eine differenzierende Markierung und zum anderen eine exakte Positionierung der Fluorophore innerhalb der Oligonucleotidstruktur erreichen. In Tabelle 1 sind die häufigsten Fluorophorgruppen, die zur Markierung von Biomolekülen dienen, zusammen mit ihren Zielstrukturen aufgeführt.

Es gibt eine Vielzahl von Versuchsprotokollen zur Einführung spezifischer funktioneller Gruppen in Biomoleküle. Die vielleicht beste Quelle ist die Monographie *Bioconjugate Techniques* von Hermanson.^[18] Ebenfalls empfehlenswert ist das Handbuch *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* von Haugland (das unentgeltlich von Molecular Probes bezogen werden kann).^[19] Nichtkovalente oder elektrostatische Strategien zur Konjugation von Fluorophoren an Biomoleküle existieren zwar ebenfalls, sind aber für FRET-Anwendungen nicht sonderlich geeignet.^[2, 19]

Neuere Methoden für die ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung von Proteinen zielen meist auf Anwendungen in vivo ab. Fluoreszierende Proteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) können mit molekularbiologischen Methoden an vorliegende Proteine angehängt werden, sodass eine fluoreszierende Proteinchimäre endogen exprimiert wird (siehe Abschnitt 3.2).^[14, 20, 21] Die durch Tsien entwickelte FlAsH-Methode (FlAsH = 4',5'-Bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)fluorescein) ermöglicht die spezifische In-vivo-Kupplung eines nichtfluoreszierenden zellgängigen Diarsen-Fluorophors an Proteine, die eine Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys-Sequenz exprimieren. Nur der gekuppelte Fluorophor emittiert Strahlung. Die FlAsH-Markierung wurde bereits für FRET-Anwendungen in vivo eingesetzt (Abbildung 2).^[21–24]

Die HaloTag-Methode nutzt ein Fusionprotein mit einer Dehalogenasedomäne, an die durch Substitution einer Chloridfunktion ein fluoreszierender Ligand konjugiert.^[25] Ein anderes System, das ebenfalls auf einem Fusionsprotein beruht und sowohl in vivo als auch in Lösung eingesetzt



Lorenzo Berti, geboren 1971, studierte Chemie an der Universität Bologna (Italien) und promovierte dort im Jahr 2000 in organischer Chemie. Als Postdoc bei Prof. Richard A. Mathies an der UC Berkeley arbeitete er an der Entwicklung von universellen FRET-Markern zur DNA-Sequenzierung und Genotypisierung. Seit 2003 ist er Forscher am INFM-CNR in Modena. Seine Forschungsinteressen gelten Strategien zur Verknüpfung von Biomolekülen mit anorganischen Materialien und zur Konstruktion von DNA-Nanostrukturen.

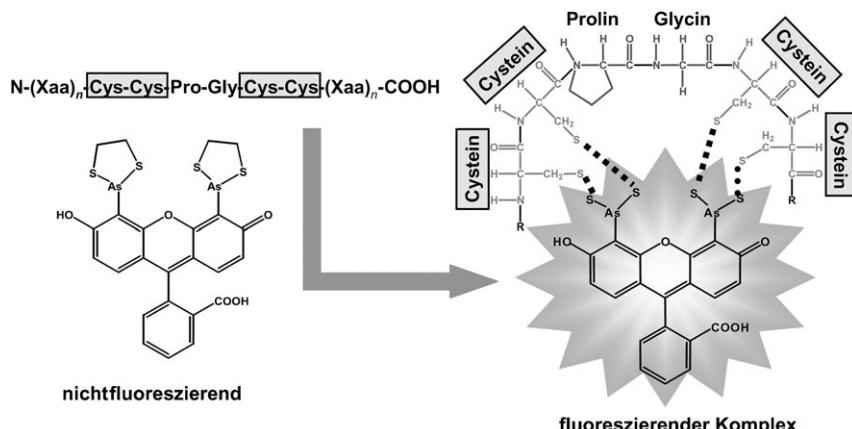


Abbildung 2. Struktur des Fluoresceinderivats FlAsH in seiner nichtfluoreszierenden Form und das optimierte Haarnadelmotiv mit den hervorgehobenen Cysteingruppen, an die der Fluorophor bindet (Xaa: beliebige Aminosäurereste). Nach Konjugation an diese Peptidsequenz *in vivo* emittiert der gebundene Fluorophor Strahlung.^[22,23]

Die Verbindungen einiger Farbstoff-Familien, etwa die Cyanine (Cy), haben eng verwandte Strukturen, während sich andere wie die Alexa-Fluor-Verbindungen relativ stark voneinander unterscheiden. Alle Farbstoff-Familien haben eng beieinander liegende, breite Absorptions- und Emissionsprofile (geringe Stokes-Verschiebung) – und alle haben ihre spezifischen Vor- und Nachteile je nach beabsichtigter Verwendung. So zeichnen sich FAM-Farbstoffe durch hohe Quantenausbeuten, Löslichkeit und unkomplizierte Biokonjugation aus; außerdem lässt sich die Fluoreszenz einfach mit einem Argonionenlaser (488 nm) anregen. Andererseits wird FAM leicht ausgebleicht, ist pH-empfindlich (was bisweilen von Vorteil ist, siehe Abschnitt 2.3) und kann sich bei hohem Substitutionsgrad an Biomolekülen selbst löschen. Bei anderen Fluorophoren wie den

werden kann, ist SNAP-Tag. Dieses verwendet eine modifizierte Alkyguanin-DNA-Alkyltransferase, die mit einem *p*-Benzylguanin-modifizierten Fluorophor unter Bildung einer Thioesterbindung reagiert. Eine von Hellinga et al. beschriebene Methode für die sequenzielle/orthogonale Markierung mehrerer Thiole in gereinigten Proteinen beruht auf einer Metallkoordination und der Bildung von Disulfidbrücken zum reversiblen Schutz von Cysteinen in einer Cys₂His₂-Zinkfingerdomäne.^[26] Eine zukünftige Strategie könnte die Erzeugung singulärer Markierungspositionen durch *In-vivo*-Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren sein.^[27]

Unabhängig von der gewählten FRET-Methode muss es mit Blick auf die Analyse der experimentellen Daten stets das oberste Ziel sein, Donoren und Acceptor an wohldefinierten Positionen im Biomolekül anzubringen. Dies an einem Einzelmolekül vorzunehmen, ist jedoch eine technisch höchst anspruchsvolle Aufgabe.

2. Organische Verbindungen

2.1. UV-, Vis- und IR-emittierende Farbstoffe

Organische Farbstoffe, die im Ultravioletten (UV), Sichtbaren (Vis) und Nahinfraroten (IR) emittieren, gelten als „klassische“ FRET-Farbstoffe. Sie werden am häufigsten als D/A-Paare eingesetzt und sind auch die erste Wahl, wenn es gilt, Kombinationen mit neuen, „nichtklassischen“ Materialien zu testen. Im Wesentlichen hat man es mit einigen strukturell verwandten Farbstoffklassen zu tun, deren Emissionsspektren vom UV bis zum nahen IR reichen (Abbildung 3). Die Farbstoffe sind als reaktive, zur Biokonjugation geeignete Derivate in Form ihrer NHS-Ester, Maleimide, Hydrazide oder Amine kommerziell erhältlich. Die UV-emittierenden Farbstoffe haben typischerweise Pyren-, Naphthalin- oder Cumarin-Grundkörper, während sich unter den Vis- und NIR-emittierenden Farbstoffen eine Reihe von Fluorescein(FAM)-, Rhodamin- und Cyanin-Derivaten befindet (Schema 1).

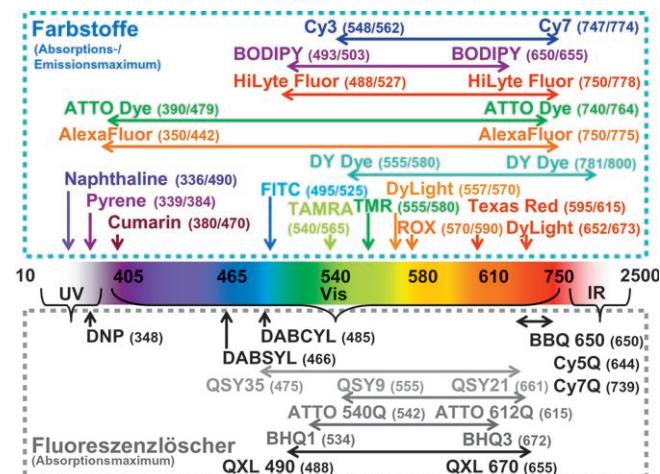
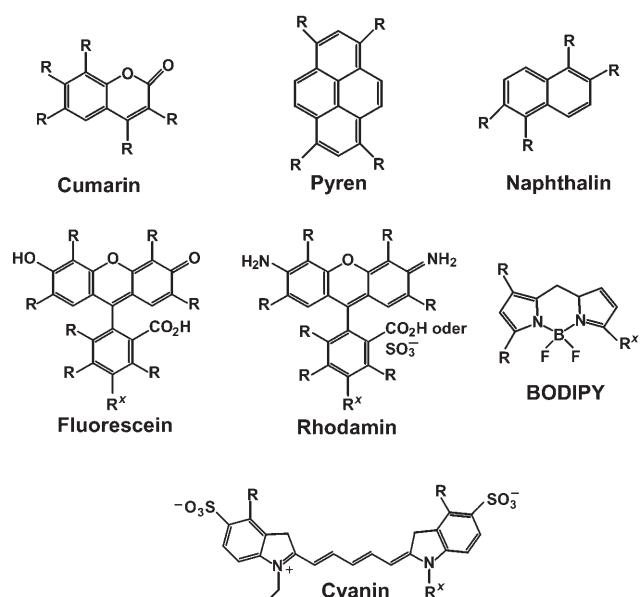


Abbildung 3. Häufig verwendete Familien von Fluoreszenzfarbstoffen und Fluoreszenzlöscher (Quenchern); fast alle diese Verbindungen sind bereits für FRET-Messungen eingesetzt worden. Absorptions- und Emissionsmaxima und die Regionen des Spektrums, die von einer bestimmten Farbstoff-Familie abgedeckt werden, sind angegeben. Tetramethylrhodamin (TMR), Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) und Carboxy-X-rhodamin (ROX) leiten sich von Rhodamin ab. Die häufigsten Donor/Acceptor-Kombinationen sind: Cumarin/Fluorescein, Fluorescein/Rhodamin und Cy3.5/Cy5. Übliche Farbstoff/Quencher-Kombinationen bestehen aus Rhodamin/Dabcyl und Cy3/QSY9. Wichtigste Anbieter sind die Firmen Molecular Probes (Fluorescein, Rhodamin, AlexaFluor, BODIPY, Oregongrün, Texasrot, QSY-Fluoreszenzlöscher), Amersham Biosciences (Cy-Farbstoffe sowie Fluoreszenzlöscher Cy5Q und Cy7Q), AnaSpec (HiLyte Fluor, QXL-Quencher), ATTO-TEC (ATTO), Molecular Biotechnology (DY-Farbstoffe), Pierce (DyLight 547 und 647), Berry (BlackBerry) und Biosearch Technologies (Black Hole). FITS = Fluoresceinisothiocyanat.

Oregongrünfarbstoffen (fluorinierte FAM-Analoga), den AlexaFluor-Verbindungen, der Cy-Familie und den BODIPY-Verbindungen entfallen manche dieser Nachteile. Bei einigen der roten Farbstoffe kann die schlechte Löslichkeit in wässrigem Medium zum Problem werden, da bei zu starker Markierung die Proteine ausgefällt werden. Speziell bei FRET-Anwendungen führen die breiten Absorptions-



Schema 1. Strukturen verbreiteter UV/Vis-fluoreszierender Farbstoffe. Typische Substituenten an den Positionen R sind CO_2^- , SO_3^- , OH, OCH_3 , CH_3 und NO_2 ; R^x markiert die typische Position des Linkers für die Biokonjugation.

und Emissionsprofile und die geringen Stokes-Verschiebungen oft zu einer direkten Anregung des Acceptors, was die anschließende Analyse erschwert. Zu den allgemeinen Vorteilen dieser Fluorophore gehören die kommerzielle Verfügbarkeit, die geringen Kosten, das Vorhandensein etablierter Methoden zur Biokonjugation und, am wichtigsten, die ausführliche Darstellung der FRET-Eigenschaften in der Literatur.

Zur Suche nach passenden D/A-Paaren steht eine Vielzahl von Quellen zur Verfügung, darunter eine Reihe von Übersichtsartikeln über FRET.^[2,15,28,29] Bei Wu und Brand^[30] findet sich eine ausführliche Zusammenstellung von Donor-Acceptor-Farbstoffpaaren und den dazugehörigen R_0 -Werten. Eine weitere hervorragende Quelle ist das schon erwähnte *Handbook* von Haugland.^[19] Web-basierte Programme der Firmen Invitrogen (<http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>) und Biorad (<http://microscopy.biorad.com/fluorescence/fluorophoreDatab.htm>) ermöglichen die Auftragung von Absorptions-Emissions-Profilen zum Auffinden optimaler spektraler Überlappungen sowie zur Auswahl geeigneter Filter. Eine sehr gute Übersicht über die physikalischen und spektroskopischen Eigenschaften rot absorbierender Farbstoffe wird von Buschmann gegeben.^[31]

Klassische Donor-Acceptor-Kombinationen in FRET-Anordnungen geben für viele Analysevorhaben noch immer den Stand der Technik vor.^[2,8] Enzyme, speziell entworfene Substrate und Zelloberflächenrezeptoren, die mit organischen D/A-Paaren markiert sind, wurden *in vitro* und *in vivo* verwendet, um vielfältige biochemische Prozesse zu verfolgen, so etwa die Bildung von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP),^[32] die Aktivität von Phosphodiesterase^[33] und β -Lactamase,^[34] die Integrinbindung^[35,36] sowie Konformationsänderungen und elektrische Vorgänge an

einzelnen Ionenkanälen.^[37] Darüber hinaus wurden Anwendungen als FRET-basierte Biosensoren beschrieben, darunter hydrogelverkapselte Glucosesensoren^[38] und Sensoren für Lysozym,^[39] Zink^[40] und Choleratoxin.^[41]

Ein Gebiet, in dem FRET-Anordnungen mit Donor-Acceptor-Farbstoffen intensiv genutzt wurden, ist die Nukleinsäureanalytik und insbesondere die Sequenzierung und Genotypisierung von DNA.^[16,28,29,42] Mathies und Glazer erkannten, dass sich der instrumentelle Aufwand für die DNA-Sequenzierung durch Einsatz von FRET-Anordnungen stark vereinfachen lässt. Mit einem gemeinsamen Donor und vier unterschiedlichen Aczeptoren (einem für jede DNA-Base), die an gemeinsame DNA-Primer gekuppelt wurden, erzeugten sie vier gut unterscheidbare spektrale Emissionsfenster, die nur über eine einzige Wellenlänge angeregt werden.^[43-45] Mit diesen Primern konnte durch FRET die Emission des Acceptors auf mehr als das 20fache gegenüber direkt angeregten Kontrollproben ohne FRET gesteigert werden. Diese FRET-Strategie wurde das Kernelement der modernen DNA-Analytik und findet sich auch in Genotypisierungs-techniken wie dem Taqman-Test wieder.^[16] Eine Kassetten-Version der ET-Primer lässt sich an beliebige thioetherisierte Primer oder Oligonucleotide kuppeln (Abbildung 4).^[17] Mit FRET-basierten DNA-Sensoren lassen sich pH-Veränderungen in lebenden Zellen während der Apoptose verfolgen.^[46]

Umgekehrt wurden auch DNA-Strukturen eingesetzt, um grundlegende Fragen zur Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der Orientierung der D/A-Farbstoffe zu klären.^[47] Die Immobilisierung FRET-basierter DNA-Sonden auf Glas^[48] und Gold,^[49] die für künftige Hochdurchsatzanwendungen wichtig sein wird (analog zu DNA-Mikroarrays), wurde kürzlich untersucht.

Vorerst ist sicher, dass klassische FRET-Anordnungen mit Donor-Acceptor-Farbstoffen auch in Zukunft die wichtigste Rolle spielen werden, dennoch ist davon auszugehen, dass andere Fluorophorklassen dort eingesetzt werden, wo die Nachteile organischer Farbstoffe überwiegen.

2.2. Fluoreszenzlöscher

Fluoreszenzlösrende Acceptor-moleküle werden immer häufiger in FRET-Anwendungen eingesetzt. Der Vorteil dieser Moleküle gegenüber fluoreszierenden Aczeptoren besteht darin, dass keine Hintergrundfluoreszenz auftritt, die entweder von einer direkten Anregung des Acceptors oder einer Reemission herrühren kann.

Als Fluoreszenzlöscher finden organische Moleküle oder aber Metalle wie Gold Verwendung (Abschnitt 4.2). Viele organische Fluoreszenzlöscher sind außerdem kommerziell erhältlich (Abbildung 3 und Schema 2). Dabcyl (4-(4'-Dimethylaminophenylazo)benzoësäure) und Dabsyl (4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonyl) sind zwei der häufigsten nicht-fluoreszierenden Aczeptoren mit Absorptionsmaxima bei 485 bzw. 466 nm. Andere Klassen von Fluoreszenzlöschen sind QSY, QXL, ATTO, BlackBerry und Black Hole. Die meisten haben breite Absorptionsspektren, sodass sie für eine Bandbreite von Farbstoffen als Aczeptoren fungieren können.

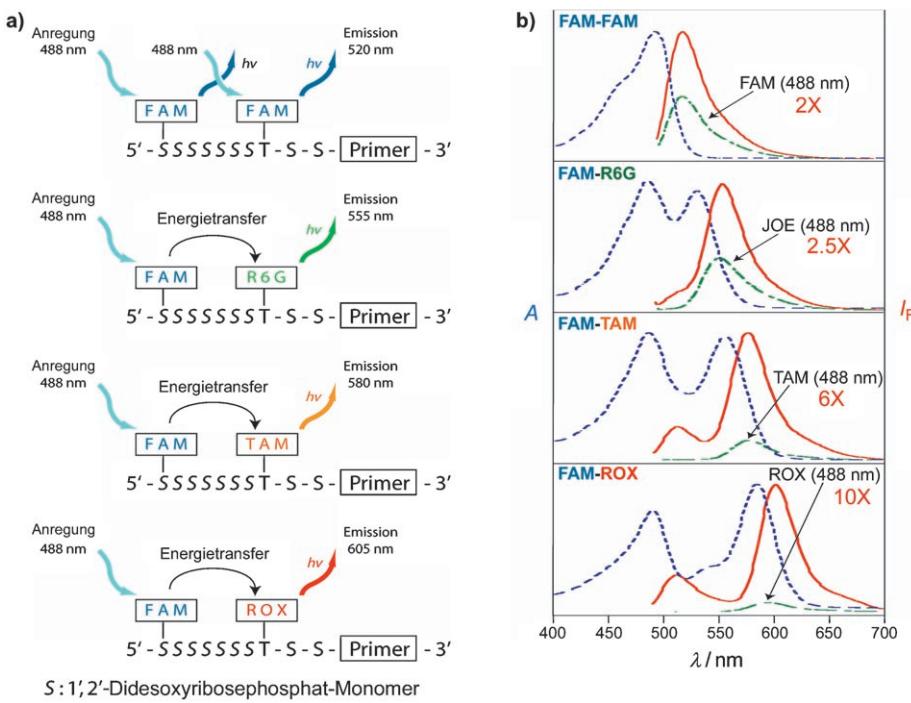
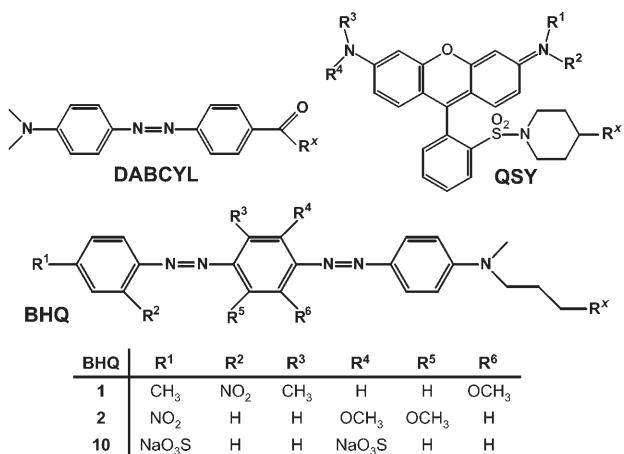


Abbildung 4. a) Funktionsweise der Energietransfer(ET)-Kassettenprimer:^[17] Jede der Kassetten basiert auf einem gemeinsamen modifizierten Zuckernukleotid-Rückgrat. Mit unterschiedlichen Aczeptoren wurden vier spektral getrennte Emissionsfenster bei 520, 550, 580 und 605 nm erzeugt. Die ET-Kassetten sind über Thiolbrücken an die thio-derivatisierten Primer gekuppelt. R6G = 6-Carboxyrhodamin-6-G; TAM = Carboxytetramethylrhodamin. b) Normalisierte Absorptions- (blau) und Emissionsspektren (rot) für jede der vier Farben der ET-Kassetten (Anregungen bei 488 nm), verglichen mit direkten Anregungen der Acceptorfarbstoffe (grün) bei gleicher Konzentration. Der Faktor, um den die Emission bei der FRET-Anordnung gegenüber der aus einem einzelnen Farbstoff bestehenden Kontrollprobe verstärkt wird, ist jeweils angegeben. Die Abbildung wurde von R. Mathies, UC Berkeley, zur Verfügung gestellt.

Donorfarbstoffen (siehe die Übersichtsartikel von Tan^[28,29] und Didenko).^[16] Der prinzipielle Vorteil einer solchen Anordnung besteht darin, dass man den Donorkanal alleine detektieren kann. Bei ausreichender spektraler Auflösung besteht auch die Möglichkeit, mehrere Donor/Fluoreszenzlöscher-Paare parallel zu schalten. Abgesehen von Anwendungen in der DNA-basierten Diagnostik wurden molekulare Leuchtmarker auch zur Messung der DNA-Permeabilität dünner Polyelektrolytfilme^[50] und zum Nachweis von Pb-Ionen mit katalytischen DNA-Biosensoren eingesetzt.^[51] Mit Fluoreszenzlöschern markierte Substratanaloga wurden auch in Verbindung mit farbstoffmarkierten Proteinen in FRET-basierten Verdrängungsbiosensoren für Nährstoffe genutzt.^[52] Eines der wenigen Beispiele von FRET-Messungen, bei denen organische Fluoreszenzlöscher an nichtorganische Fluorophore konjugiert wurden, betrifft den Einsatz von Quantenpunkten als Donoren (siehe Abschnitt 4.3).



Schema 2. Strukturen verbreiteter organischer Fluoreszenzlöscher. Die Substituenten R sind in der Tabelle angeführt; R^x markiert die Position des Linkers für die Biokonjugation.

Fluoreszenzlöscher werden oft in der DNA-Analyse eingesetzt, vor allem in molekularen Leuchtmakern („molecular beacons“) als Acceptoren in Verbindung mit organischen

2.3. Umgebungsempfindliche Fluorophore

Umgebungsempfindliche Fluorophore ändern ihre Absorptions- und Emissionseigenschaften in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen wie pH-Wert, Ionenkonzentration und -sorte (z. B. Ca^{2+} , Cl^-), O_2 -Sättigung, Solvation und Polarität. Es ist schwierig, daraus eine eigenständige Klasse von Fluorophoren zu definieren, denn im Grunde reagieren fast alle Fluorophore auf Störungen in ihrer Umgebung.^[2, 19] Man definiert umgebungsempfindliche Fluorophore daher meist über den Analyten oder die Bedingung, auf die sie am empfindlichsten reagieren (z. B. pH- oder Calcium-Indikatoren).^[19]

Eines der bekanntesten Beispiele für umgebungsempfindliche Fluorophore ist Fluorescein (FAM; Schema 1), dessen Absorption und Emission über das Ionisierungsgleichgewicht auf Änderungen im pH-Wert reagieren (Abbildung 5).^[19] Dieses Verhalten wurde unter anderem zur Überwachung von intrazellulären pH-Werten genutzt, wobei eine Reihe von FAM-Estern verwendet wurde, die zellpermeabel sind und nach Esterhydrolyse das FAM in der Zelle freisetzen. Mit am häufigsten verwendet wird das von Tsien et al. entwickelte Derivat BCECF.^[53] Zur Überwachung des pH-Wertes bietet Molecular Probes eine Vielzahl reaktiver

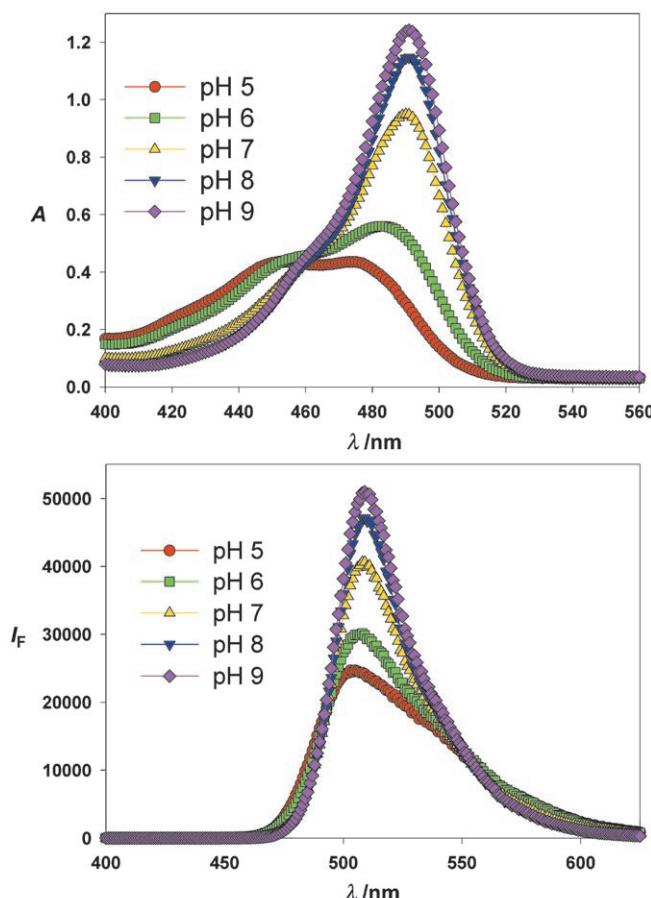


Abbildung 5. Vom pH-Wert abhängige Absorptions- (oben) und Emissionsspektren (unten) von Fluorescein. Die größte Änderung tritt zwischen pH 6 und 7 auf.

FAM-Analoga sowie Seminaphthorhodafluore (SNARF), Seminaphthofluoresceine (SNAFL) und ihre Ester an.^[19] Der optimale Arbeitsbereich dieser Fluorophore liegt bei pH 5–9. Für saure Lösungen sind Oregongrün und Lysosensor besser geeignet.^[19]

Die Emission der genannten Farbstoffe ist allerdings auf den sichtbaren und nahinfraroten Bereich beschränkt. Die meisten sind außerdem nur unfunktionalisiert erhältlich, sodass umfangreiche chemische Modifikationen erforderlich sind, um sie an Biomoleküle oder andere Farbstoffmoleküle zu kuppeln. Auch hier bietet Hauglands *Handbook*^[19] eine gute Fundstelle für spezielle Fluorophore, die für pH-Wert, NO_2^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , Cl^- , K^+ und das Membranpotential optimiert sind.

Andere Farbstoffe wie Acrylodan und Pyren wurden als Biosensoren verwendet, um Änderungen in anheftenden Proteinen zu registrieren.^[15] Lakowicz nutzte FRET mit umgebungsempfindlichen Aczeptoren, um den pH-Wert sowie CO_2^- und NH_3 -Konzentrationen mit phasenmodulierter Fluorometrie zu messen.^[54,55] Im Allgemeinen werden FRET-Anordnungen mit umgebungsempfindlichen Fluorophoren eher selten eingesetzt, da die meisten Fluorophore bereits alleine ihre Sensorfunktion erfüllen. Zukünftige Anwendun-

gen für umgebungsempfindliche FRET-Sensoren könnten sich bei räumlich-zeitlich korrelierten Mehrfarbmessungen in Zellen ergeben.

2.4. Farbstoffmarkierte Mikro- und Nanopartikel

Ein Nachteil herkömmlicher Fluoreszenztests besteht darin, dass es schwierig ist, mehr als ein Fluorophor an ein Zielprotein zu kuppeln. Durch Konjugation von mehreren Fluorophoren könnten stärkere Signale und niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden, allerdings ist es möglich, dass dabei die Funktion des zu untersuchenden Biomoleküls beeinträchtigt wird. In einem Ansatz zur Lösung des Problems wurden funktionalisierte Mikropartikel mit Fluorophoren „getränkt“, wobei stark fluoreszierende Nano- und Mikropartikel erhalten wurden. Abgesehen von der stärkeren Fluoreszenz ergeben sich noch weitere Vorteile: So lassen sich z.B. auch wasserunlösliche oder unfunktionalisierte Fluorophore auf Mikropartikel laden. Fluoreszierende Mikropartikel in Größen zwischen 2 μm und 200 \AA , die vom UV bis zum NIR absorbieren und emittieren, werden z.B. von Molecular Probes, Bangs Laboratories und Polysciences angeboten. Molecular Probes bietet auch Mikropartikel mit Farbstoffkombinationen an, die auf große Stokes-Verschiebungen hin optimiert sind (TransFluospheres).^[56] Fluoreszierende Mikropartikel gibt es in funktionalisierter Form mit diversen Oberflächengruppen (Biotin, Avidin, Kollagen, Amine, Aldehyde, Sulfate, Carboxylate), die eine einfache Biokonjugation an die gewünschte Zielstruktur ermöglichen. Man hat außerdem die Möglichkeit, funktionalisierte Mikropartikel kommerziell zu beziehen und nach publizierten Verfahren mit Farbstoffen zu tränken.^[57,58]

Fluoreszierende Mikropartikel wurden vielfach in FRET-Analysen eingesetzt, besonders bei der Durchfluscytometrie^[59–61] und der SNP-Genotypisierung.^[62] Es gibt mit Eubasierten Fluorophoren beladene Mikropartikel, die für zeitaufgelöste Messungen der Energieübertragung eingesetzt werden (Abschnitt 4.1).^[63] Abgesehen vielleicht von der Durchfluscytometrie sind FRET-Testsysteme mit fluoreszierenden Mikropartikeln technisch noch längst nicht ausgereift. Eigenschaften wie die hohe Fluoreszenzintensität, breite Absorption bei multiplen Emissionsfarben, vielfältige Chemie und kommerzielle Verfügbarkeit machen fluoreszierende Mikropartikel aber zu vielversprechenden Donoren insbesondere für Multiplex-FRET.

2.5. Dendrimere und Polymere

Dendrimere sind hochverzweigte Polymere. Sie werden durch schrittweise Synthese hergestellt.^[64] Ein typisches Dendrimer enthält ein zentrales Monomer, von dem mehrere Zweige ausgehen. Jeder Zweig kann weiter aufgefächert werden, indem weitere Schalen von Monomer angefügt werden.^[65] Es besteht die Möglichkeit, Fluorophore und andere funktionelle Gruppen, die sich weiter modifizieren lassen, an die äußere Schale von Dendrimeren zu konjugieren, wodurch hochfluoreszierende Dendrimere entste-

hen.^[66–71] Auch inhärent fluoreszierende Dendrimere wurden bereits synthetisiert.^[72, 73]

Durch die Platzierung der Farbstoffmoleküle in einer bestimmten Orientierung kann die Energie, die an der Peripherie des Dendrimers absorbiert wird, durch intramolekulare Energieübertragung auf einen gemeinsamen Acceptor im Kern des Moleküls kanalisiert werden, sodass das Molekül als künstliche Lichtsammelantenne wirkt (Abbildung 6, oben).^[74-77] Die Hauptvorteile von Fluorophoren auf Den-

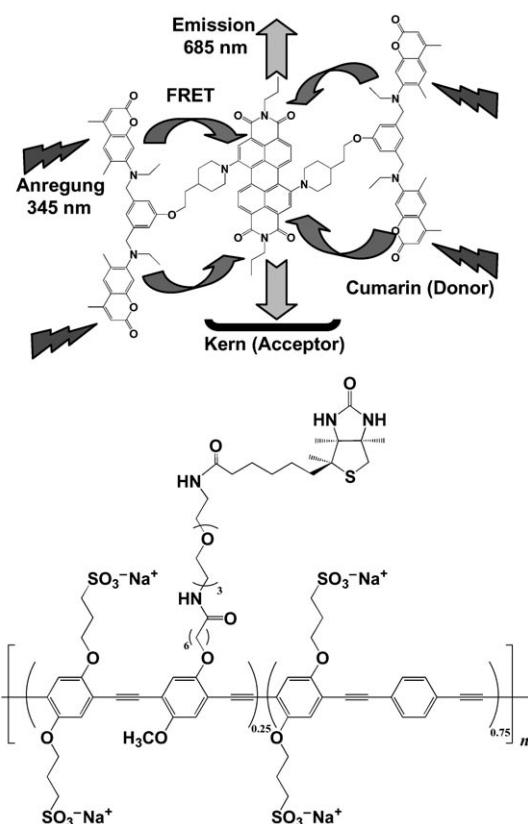


Abbildung 6. Oben: Struktur eines FRET-Dendrimers mit einem Perylenbis(dicarboximid)-Acceptor als Kern und einer Cumarin-funktionalisierten Hülle als Donor.^[76] UV-Licht (345 nm) wird an der Peripherie absorbiert, in Form von elektronischer Energie zum Acceptor im Kern weitergeleitet und dort im nahen IR emittiert (685 nm) (99% Energieübertragungseffizienz). Unten: Struktur eines Biotin-Polymer-Konjugates, das zum Nachweis von DNA-Hybridisierungen verwendet wird.^[98]

dimerbasis in biologischen Testsystemen sind der große Absorptionsquerschnitt und die hohe Fluoreszenzintensität.^[78,79] Da außerdem die Löslichkeit hauptsächlich durch das Dendrimer bestimmt wird, kann man einen Wirkstoff oder ein Fluorophor in eine Umgebung bringen, in der das Molekül sonst unlöslich wäre.^[80] Dendrimere wurden z. B. als Trägersysteme für unterschiedliche Marker wie Metallnanopartikel^[81,82] und Oligonukleotide^[83] sowie als In-vitro-Sonden und Wirkstofftransporter genutzt.^[84,85] Einige wenige Beispiele für intermolekulare Energieübertragungen zwischen Dendrimeren und anderen Donoren oder Aczeptoren sind bekannt. Beschrieben wurde der FRET von Dendrimeren auf

Pyrenpolymere in Langmuir-Blodgett-Schichten^[86] und zwischen Dendrimeren.^[87]

Es sind auch funktionalisierte Dendrimere erhältlich (Dendritech und Dendritic Nanotechnologies), die sich je nach Bedarf vom Anwender weiter modifizieren lassen. Außerdem erhältlich sind DNA-basierte Dendrimere, die für Hybridisierungen und den Nachweis von Genen mit niedriger Kopienzahl dienen (Genisphere), Dendrimere für die Zelltransfektion, die sowohl an DNA wie auch an Zellen binden (Qiagen), sowie Monomere, mit denen hochverzweigte synthetische DNA-Dendrimere aufgebaut werden können,^[88,89] die zur Markierung von Oligonucleotiden mit Fluorophoren dienen (Glen Research). Solche mehrfach markierten Dendrimerprimer können in hochempfindlichen PCR-Analysen (PCR = Polymerasekettenreaktion) eingesetzt werden. Die entsprechenden Synthesemethoden sind gut dokumentiert.^[64]

Eine verwandte Klasse von Fluorophoren sind fluoreszierende Polymere, die entweder selbst fluoreszieren (konjugierte Polymere) oder mit Fluorophorgruppen derivatisiert sind.^[90-94] Ähnlich wie Dendrimere zeichnen sich auch fluoreszierende Polymere durch hohe molekulare Absorptionskoeffizienten aus und fungieren als effiziente Lichtsammelantennen. Als nachteilig für Anwendungen als Fluoreszenzmarker in Biokonjugaten erweisen sich jedoch die Größe und Polydispersität der Polymere. Die Emission fluoreszierender Polymere lässt sich nicht genau lokalisieren, da die Energieübertragungsprozesse entlang der gesamten Polymerkette ablaufen und daher diffus sind.^[95] Als punktuelle Donoren in FRET-Anordnungen können Polymere daher nicht genutzt werden. Breite Anwendung fanden fluoreszierende Polymere dagegen als fluoreszierende Schichten und dünne Filme in Biosensoren.^[96, 97]

Polymerbasierte FRET-Anordnungen werden in hochempfindlichen Biotestsystemen eingesetzt, wobei man ein als „Superquenching“ bekanntes Phänomen nutzt. Dieses beruht darauf, dass bestimmte fluoreszierende Polymere, die elektrostatische Wechselwirkungen mit niedermolekularen Verbindungen eingehen, als starke Fluoreszenzlöscher fungieren.^[98] Das Superquenching kommt durch einen sehr effizienten Energieübertragungsmechanismus zustande, der in Lösung und auf Oberflächen möglich ist. Der Effekt wurde zum Nachweis von DNA-Hybridisierungen (Abbildung 6, unten),^[98] für SNP-Analysen^[99] und Proteasenachweise^[100] genutzt. Basierend auf diesem Konzept entwickelten Swager und Mitarbeiter Polymersensoren mit verstärkter Fluoreszenz („amplified fluorescent polymer sensors“) zum Nachweis von Sprengstoffen und biologischen Rückständen.^[97,101,102] Superquenching tritt auch in Konjugaten aus Gold-Nanopartikeln und fluoreszierenden Polymeren auf;^[103] derartige Systeme sind für Biotests interessant.

2.6. Photochrome Farbstoffe

Jovin definiert photochrome Verbindungen als „Verbindungen mit der Eigenschaft, auf eine Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge mit einem reversiblen Übergang zwischen zwei Strukturen zu reagieren, wobei die Strukturen unterschiedliche Absorptionsspektren (und in einigen Fällen

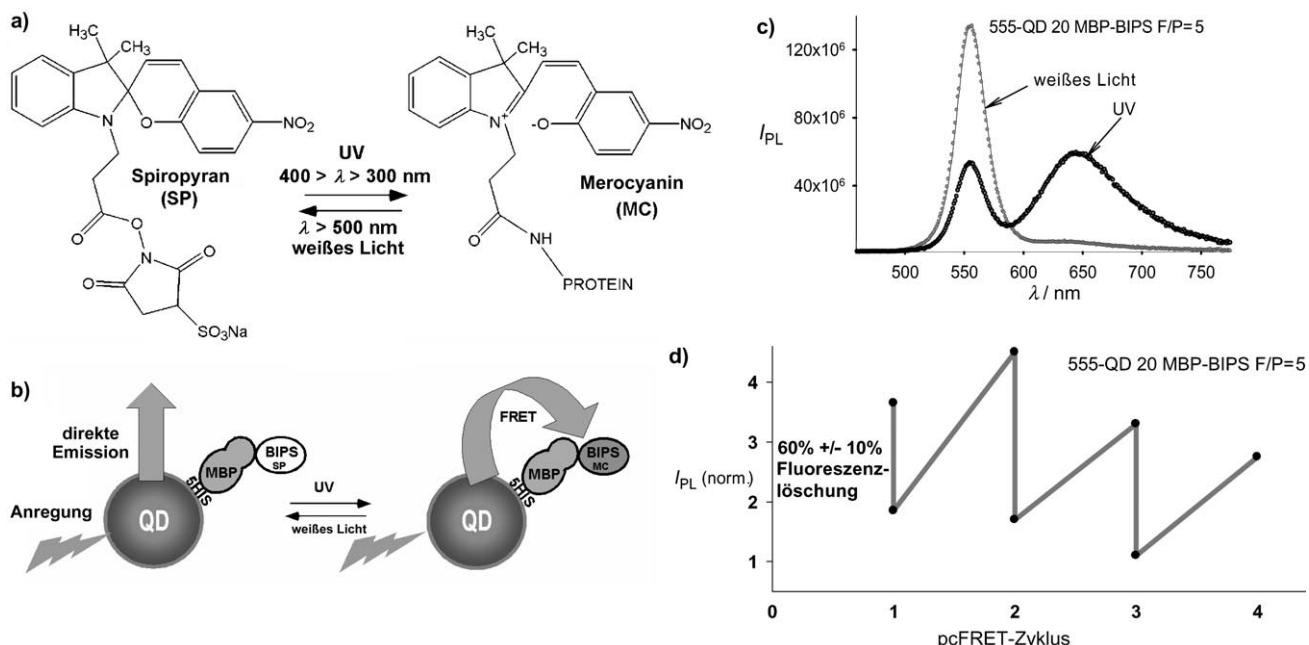


Abbildung 7. a) Struktur von Sulfo-NHS-BIPS (Sulfo-NHS = *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz; BIPS = 1',3',3'-Trimethylspiro[2H-1-benzopyran-2,2'-indolin]) in der Spiropyranform vor (links) und in der Merocyaninform nach der Konjugation an ein Protein (rechts). b) Quantenpunkt(QD)-Modulation durch photochromen FRET nach Wechselwirkung mit MBP-BIPS (MBP = maltosebindendes Protein). Wenn BIPS mit UV-Licht in die Merocyaninform umgelagert wird, wird die QD-Emission durch FRET-Fluoreszenzlösung verhindert. Nach erneuter Photokonversion mit weißem Licht zur Spiropyranform nimmt die direkte Emission des QD deutlich zu. c) Photolumineszenzspektren des bei 555 nm lumineszierenden Systems QD-20MBP-BIPS mit einem Farbstoff/Protein-Verhältnis = 5 nach Photokonversion der SP- zur MC-Form. d) Effekt von pcFRET auf die Photolumineszenz eines Quantenpunkts (zunächst Weißlicht zu UV). Wiedergabe in veränderter Form nach Lit. [106] mit Genehmigung der American Chemical Society.

Fluoreszenzspektren) aufweisen.“^[104] Was photochrome Farbstoffe zu besonders interessanten FRET-Acceptoren macht, ist die Möglichkeit, den Acceptor (und damit den FRET-Vorgang) mit Licht reversibel an- und ausschalten zu können. Aufbauend auf diesem Konzept lassen sich viele interessante FRET-Anordnungen entwerfen.

Zu den bekanntesten photochromen Verbindungen zählen die Spiropyane und funktionell verwandte Moleküle. Die Moleküle liegen in geschlossenen Spiroformen vor (Absorption < 400 nm), die bei Belichtung eine intramolekulare Umlagerung zu einer offenen Merocyaninform (Absorption 500–700 nm) eingehen (Abbildung 7a).^[105]

Jovin et al. haben eine Gruppe substituierter Diheteroarylethene entwickelt, die als lichtschaltbare Acceptor in einem als photochromer FRET (pcFRET) bezeichneten Prozess fungieren. Mit Lucifer Yellow als Donor wurde eine FRET-Effizienz von 100% in 40 aufeinander folgenden pcFRET-Schaltvorgängen ohne photophysikalische Ermüdung erzielt.^[104] Ein weiteres pcFRET-System besteht aus einem Nitrospiropyran-Acceptor, der mit einem Porphyrin-Donor in Form der freien Base oder im Komplex mit Zink verknüpft ist.^[105]

Ein System bestehend aus einem Quantenpunkt als Donor, der von mehreren Spiropyran-Acceptoren umgeben ist, wurde ebenfalls für pcFRET-Anordnungen untersucht (Abbildung 7b–d).^[106] Über die Zahl der Acceptor um den zentralen QD-Donor wird die pcFRET-Effizienz zwischen 25 und 50% moduliert. Andere photochrome Farbstoffe sind

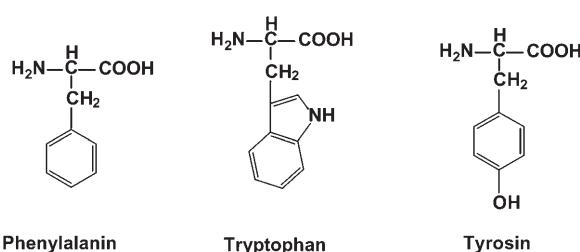
substituiertes Perfluorocycloponenten, Dithienylethene, substituierte Oxazolylfulgide und Bismutvanadat-Pigmente.^[107–109] Die Firma James Robinson bietet eine Auswahl von Spiro-naphthoxazinen und Naphthopyranen in mehr als zwanzig Farben an (Reversacole).

pcFRET hat einige unmittelbare Vorteile. Durch die Umschaltmöglichkeit stehen zwei ineinander umwandelbare FRET-Sensoren mit unterschiedlichen photophysikalischen Eigenschaften in einer einzigen Anordnung zur Verfügung. Die Wellenlänge für den Schaltvorgang kann so gewählt werden, dass sie nicht mit der Absorption des Donors überlappt. Jovin sagt voraus, dass pcFRET-Anordnungen wichtige Probleme bei der quantitativen zellbasierten FRET-Analyse lösen können (hohe lokale Sensordichten, irreversibles Ausbleichen des Farbstoffs bei kontinuierlichen Messvorgängen).^[104] Eine echte Anwendung des pcFRET-Verfahrens in einem biologischen System steht bislang aber noch aus.

3. Biologische Materialien

3.1 Natürliche Fluorophore

Es gibt viele natürlich vorkommende fluoreszierende Biomoleküle, darunter verschiedene enzymatische Cofaktoren und die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe), die hier im Mittelpunkt stehen (Schema 3).^[2] Der größte Vorteil, den diese Amino-



Schema 3. Struktur der drei fluoreszierenden aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe: $\text{QY}=0.02$, $\tau \approx 7 \text{ ns}$, $\lambda_{\text{ex}} \approx 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \approx 282 \text{ nm}$), Tryptophan (Trp: $\text{QY}=0.13$, $\tau \approx 3 \text{ ns}$, $\lambda_{\text{ex}} \approx 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \approx 353 \text{ nm}$) und Tyrosin (Tyr: $\text{QY}=0.14$, $\tau = 3-4 \text{ ns}$, $\lambda_{\text{ex}} \approx 275 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \approx 304 \text{ nm}$).^[2, 110]

säuren als Fluorophore bieten, ist ihre endogene Präsenz in Proteinen und Peptiden und die Leichtigkeit, mit der sie rekombinant in Proteine oder durch Synthese in naszierende Peptide eingeführt werden können. Die starke UV-Absorption von Proteinen bei 280 nm (die meist zur Quantifizierung verwendet wird) und die Emission bei 340–360 nm röhren hauptsächlich vom Indolring des Tryptophans her, während Tyrosin und Phenylalanin nur einen geringen Anteil beitragen.^[2]

Wegen der fast vernachlässigbaren Quantenausbeute von ca. 0.02 ist Phenylalanin für FRET-Anwendungen weniger geeignet, außer vielleicht für Anordnungen innerhalb von Proteinen. Tyrosin ist anfällig für Fluoreszenzlösungen und geht Energieübertragungen auf Tryptophan ein. Damit verbleibt Trp als die am besten geeignete Aminosäure für FRET-Anwendungen (siehe Übersichtsartikel sowie Lit. [2, 20, 110]). Ein mögliches Problem bei einer FRET-Anordnung mit Trp liegt darin, dass die Anregungslinien und alle D/A-Farbstoffe auf den UV-Bereich beschränkt sind. Die Trp-Fluoreszenz ist außerdem umgebungsempfindlich, sodass eine Platzierung tief im Inneren eines Proteins zu anderen Ergebnissen führt als etwa die Markierung eines kleinen Peptids. Als ein Beispiel für Proteinfluoreszenz sind in Abbildung 8 die Absorptions- und Emissionspektren des maltosebindenden Proteins (MBP) gezeigt. MBP gehört zur Su-

perfamilie der bakteriellen periplasmatischen Bindeproteine (bPBPs) und enthält 8 Trp-, 15 Tyr- und 15 Phe-Reste.^[15]

Es gibt eine große Zahl von Beispielen, die die vielseitigen Möglichkeiten dieser endogenen Fluorophore belegen. So wurde eine FRET-Anordnung mit Trp als Donor und Dansyl als Acceptor genutzt, um die Helix-Helix-Assoziation von Bacteriopsin zu bestimmen.^[111] Mit Trp als Donor lassen sich auch die Bindungsaffinitäten für die DEAD-Box-RNA-Helicase DdpA mit fluoreszierenden Nucleotidanalogen als Aczeptoren messen.^[112] Ein Trp-Rest im Zentrum einer Reduktase zusammen mit dem Coenzym NADPH als Fluoreszenzlöscher wurde zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten genutzt.^[113] Trp-Reste innerhalb der Melibose-Permease von *E. coli*, die als Energielieferanten für ein fluoreszierendes Zuckeranalogon fungieren, wurden durch sequenzielle Mutagenese identifiziert.^[114] Mit einem FRET-System bestehend aus einem Trp-Rest als Donor und einem modifizierten 3-Nitrotyrosin als Acceptor im menschlichen α -Synuclein-Protein konnte nachgewiesen werden, dass die verlängerte Struktur einer Mutante mit der Parkinsonschen Krankheit zusammenhängt.^[115] Trp wurde auch als Acceptor für ein Nitrilphenylalanin als Donor eingesetzt, um die Konformation eines 14 Reste langen amphipathischen Peptids zu untersuchen.^[116] Die Abstände zwischen den Helices im transmembranären M13-Procoat-Protein wurden mit Tyr als Donor und Trp als Acceptor durch FRET gemessen.^[117] Bei anderen FRET-Anordnungen dient Trp als Donor und eine Chrom(III)-Gruppe als Acceptor,^[118] oder es findet ein FRET-Homotransfer zwischen zwei Trp-Resten statt.^[119]

FRET zwischen einzelnen Aminosäureresten ist am wirksamsten bei Abständen unter etwa 50 Å, was ideal für Untersuchungen innerhalb eines Proteinmoleküls ist. Die Förster-Abstände R_0 für 14 Kombinationen mit Trp als Donor und einem Farbstoff als Acceptor sind in Lit. [30] tabelliert; sie decken einen Bereich von 12 bis 40 Å ab.^[30] Verallgemeinert lässt sich angeben, dass Trp-Reste, die an einer fast beliebigen Stelle in einem kleineren Protein vorliegen (Durchmesser < 30 Å; $M_r < 30000$), mit einem geeigneten, innerhalb der Proteinstruktur verankerten Farbstoff als Donor oder Acceptor wirken können. Sind mehrere Trp-Reste vorhanden, so tragen diese in unterschiedlichem Ausmaß entsprechend ihrem Abstand zum FRET bei. Bei der vergleichsweise einfachen Einführung von Mutationen in Proteine sollte die Entwicklung von Modulen mit fluoreszierenden Resten, die man an interessierende Proteine anhängt, kein größeres Problem darstellen. Diese könnten als effiziente Donoren mit einem sehr großen Absorptionsquerschnitt das Signal eines FRET-basierten Biosensorproteins verstärken oder als Tandemdonor für ein fluoreszierendes Protein oder als Lichtsammelkomplex wirken. Beim gegenwärtigen Interesse an den Strukturen und Funktionen von Proteinen sind die Möglichkeiten dieser endogenen Fluorophore sicher noch nicht ausgeschöpft.

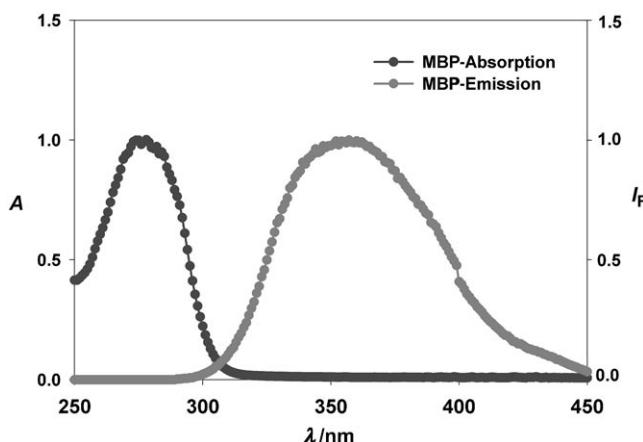


Abbildung 8. Normalisiertes Absorptions- und Emissionsprofil ($\lambda_{\text{ex}} \approx 280 \text{ nm}$) des maltosebindenden Proteins (MBP; $M_r \approx 44.000$).^[4, 15, 129]

3.2. Fluoreszierende Proteine

Fluoreszierende Proteine (FPs) werden immer häufiger in FRET-Anwendungen eingesetzt, und die Techniken und

Materialien werden ständig verbessert. Das Konzept, ein Fluorophor molekularbiologisch an das für das Zielprotein codierende Gen anzuhängen und so ein fluoreszierendes Fusionsprotein zu erzeugen, hat klare Vorteile: Fluorophor und Protein werden gemeinsam intrazellulär exprimiert und wenn man sie sichtbar macht, lassen sich Lokalisierung und relative Expressionshöhe ableiten.^[14,20,21]



Abbildung 9. Bandstruktur des grün fluoreszierenden Proteins (GFP).

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) (Abbildung 9) aus der Qualle *Aequorea victoria* ist der Prototyp eines fluoreszierenden Proteins, und mithilfe von GFP-Systemen wurden viele Aspekte der Zellbiologie aufgeklärt.^[120] Eine ausgezeichnete Übersicht über das GFP und seine photo-physikalische Funktion stammt von Tsien.^[20] Das GFP wurde vor mehr als 40 Jahren erstmals beschrieben, kloniert wurde es allerdings erst in den frühen 90er Jahren. Entscheidend für seine breite Anwendung war der Nachweis, dass das Gen in anderen Organismen exprimiert werden kann, weil die codierende Sequenz allein alles enthält, um den Chromophor reifen und funktionieren zu lassen.^[20] Die entscheidenden Gruppen im Innern des Proteins werden während der Reifung modifiziert; dabei wird der *p*-Hydroxybenzylidenimidazolinon-Chromophor gebildet, der sich in der zentralen, von elf β -Strängen umgebenen Helix befindet (β -Fass-Struktur).

Es gibt viele GFP-Varianten, die sich in ihren Protein- und Chromophorstrukturen und infolge dessen auch in ihren Absorptions- und Emissionsprofilen unterscheiden.^[20] Durch Mutation und Selektion gelang es, ein stärker fluoreszierendes und stabileres GFP zu erzeugen. Darüber hinaus wurden Varianten erhalten, die blau, cyan und gelb fluoreszieren (BFP, CFP bzw. YFP).^[21] Das rot fluoreszierende Protein DS Red wurde 1999 kloniert. Es stellte sich als obligates Tetramer heraus, das langsam von grün nach rot reift.^[21,121,122] Tsien entwickelte ein monomeres rot fluoreszierendes Protein (mRFP) und mehrere andere rote Fluorophore, die er nach den Farben von Früchten benannte.^[21,123] Andersfarbige FPs wurden aus Korallen kloniert; diese scheinen ebenfalls tetramer zu sein.^[21] In Abbildung 10 sind die Absorptions- und Emissionsprofile repräsentativer FPs dargestellt.

Daneben gibt es kommerziell erhältliche FPs, wie etwa die rote/grüne Reihe der von den Phycobilisomen abgeleiteten

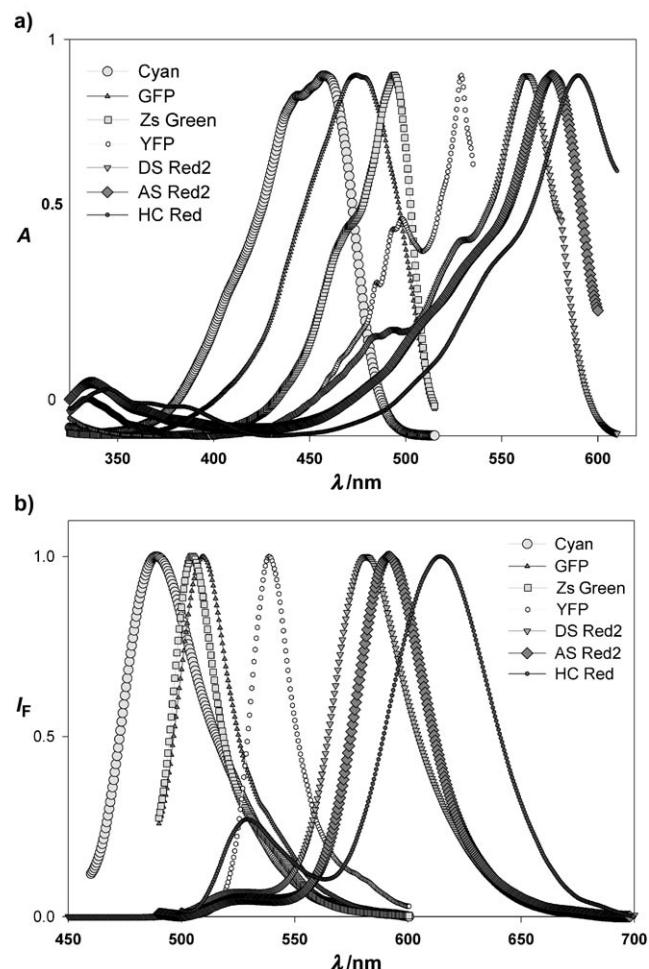


Abbildung 10. a) Normalisierte Absorptions- und b) Fluoreszenzemissionsprofile fluoreszierender Proteine: cyan fluoreszierendes Protein, GFP, Zs Green, gelb fluoreszierendes Protein (YFP) und drei Varianten von rot fluoreszierendem Protein (DS Red2, AS Red2 und HC Red). Wiedergabe mit Genehmigung von Clontech.^[14]

PBXL-Fluorophore.^[124] Bei diesen handelt es sich um stabilisierte multichromophore supramolekulare Proteinkomplexe, die mit Proteinen vernetzt werden können. Die größere Zahl von Fluorophoren sorgt für eine erheblich höhere Empfindlichkeit.

Fluoreszierende Proteine werden vorwiegend zur In-vivo-Markierung von Zellen eingesetzt. Sie sind in plasmidcodierter Form erhältlich und so konstruiert, dass man Proteine entweder N- oder C-terminal anbringen kann. Die Plasmide ermöglichen die kontrollierte Expression in einer Vielzahl von Zellen und Organismen, darunter Bakterien, Hefen und Eukaryoten. Die Quantenausbeuten sind im Allgemeinen gut; sie reichen von etwa 0.17 für ein BFP bis etwa 0.79 für ein Wildtyp-GFP und hängen hauptsächlich davon ab, welche Mutationen vorgenommen wurden und wie die endgültige Struktur des Chromophors aussieht.^[21] Die meisten FPs sind relativ große Proteine (25 bis 30 kDa und größer); ein Protein dieser Größe an ein anderes Protein zu binden, kann dessen funktionelle Integrität beeinträchtigen.

gen.^[24] FPs können auch im Zentrum eines Proteins oder an intra- oder extrazellulären Domänen platziert werden, dabei lassen sich korrekte Faltung, Insertion und Fluoreszenz allerdings nie gewährleisten. FPs, die Dimere und Tetramere bilden, können zur Erzeugung von difunktionellen Chimären dienen.^[21,121] Es kann oft mehrere Stunden dauern, bis ein FP vollständig gereift und der endgültige Chromophor gebildet ist, und in dieser Zeit können sich Absorption und Emission noch verschieben. FPs reagieren auch auf pH-Wert, Temperatur, O₂-Konzentration und andere Umgebungsbedingungen.^[20] Viele FPs sind empfindlich gegen Ausbleichen, was aber kein Nachteil sein muss. Es gibt sogar einige Bildgebungstechniken wie FRAP (Fluoreszenzregenerierung nach Photobleichung; fluorescence recovery after photobleaching), die solche Effekte nutzen.^[125] Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, können die meist breiten Absorptions-Emissions-Profilen eine Multiplexanalyse behindern.

Tsiens Strategie für FRET-basierte FP-Indikatoren war der Ausgangspunkt für eine neue Klasse genetisch codierter Sensoren zur Überwachung intrazellulärer Analyte.^[126,127] Die ursprünglichen Konstrukte („Chamäleons“) waren für die Bestimmung von Calcium gedacht und bestanden aus linearen Fusionaten aus BFP oder CFP als Donoren und verstärkten GFP- oder YFP-Acceptoren, die Calmodulin und das calmodulinbindende Peptid flankieren.^[127] Bei der Bindung von Ca²⁺ wickelt sich Calmodulin um das Peptid, sodass die flankierenden FPs näher zusammenkommen und der FRET verstärkt wird. Nach dieser Strategie entwickelten Frommer und Mitarbeiter eine Serie intrazellulärer Sensoren bestehend aus FPs, die an die N- und C-Termini von bPBPs fusioniert waren.^[128–130] Der Prototyp bestand aus MBP, das mit einem verstärkten CFP-Donor (ECFP) am N-Terminus und einem YFP-Acceptor am C-Terminus fusioniert war (Abbildung 11).^[129] MBP gehört einer Überfamilie von Bindepoteinen an, die über eine zentrale Gelenkregion binden. Bei der Bindung von Maltose kommt es im Bereich dieser Gelenkregion zu einer Konformationsänderung. Durch die Bewegung rücken die beiden FPs enger zusammen und verstärken die FRET-Effizienz, was sich in einem steigenden

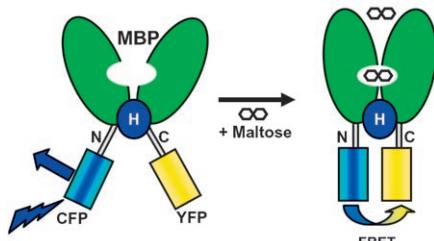


Abbildung 11. Modifiziertes MBP, das die Bindung von Maltose durch Fluoreszenz anzeigt. ECFP als Donor wurde mit dem N-Terminus des MBP fusioniert und YFP als FRET-Acceptor mit dem C-Terminus. H („hinge“) kennzeichnet die Gelenkregion zwischen den beiden Domänen des MBP. Die zentrale Bindestelle des MBP befindet sich zwischen den beiden Domänen. Ohne Maltose nehmen die beiden FPs die Konformation mit maximalem Abstand ein, und der FRET ist minimal. Wenn Maltose gebunden wird, durchläuft das MBP eine Konformationsänderung, die die beiden FPs räumlich annähert; dadurch steigt der FRET an, was sich anhand des Verhältnisses der YFP- und CFP-Emissionen verfolgen lässt (vgl. Abbildung 12).^[129]

Emissionsverhältnis von Acceptor zu Donor niederschlägt (Abbildungen 11 und 12).

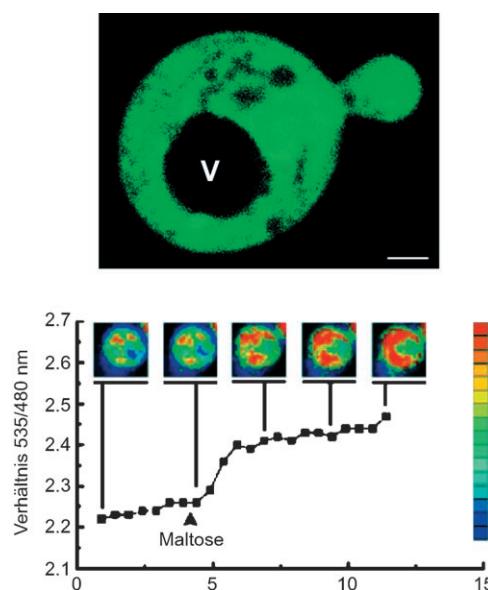


Abbildung 12. a) Konfokales Bild eines in Hefe exprimierten Maltose-FP-Sensors. Die Fluoreszenz wird im Cytosol emittiert, nicht aber in der Vakuole. Maßstab 1 μ m. b) Änderung der Maltosekonzentration im Cytosol einer Hefe, die einen Maltosesensor mit einem K_d -Wert von 25 μ m exprimiert. Die Kurve zeigt das Emissionverhältnis als Funktion der Maltoseaufnahme für eine einzelne Hefezelle. Die Abbildung wurde von W. Frommer, Stanford University, zur Verfügung gestellt; Wiedergabe mit Genehmigung der National Academy of Sciences USA.^[129]

Andere Sensoren registrieren Glucose und Ribose, allerdings bewegen sich hier die FPs bei Bindung des Analyten voneinander weg, sodass das D/A-Fluoreszenzverhältnis steigt.^[128,130] Die überlappenden Absorptions- und Emissionsspektren in FP-Mehrfachfusionaten ergeben nur geringfügige Signaländerungen in FRET-Anordnungen, weshalb eine empfindliche optische Ausrüstung erforderlich ist. Biosensoren, die auf diesem allgemeinen Tandem-FP-Design basieren, sind inzwischen auch für Kinasen, Ligasen, verschiedene intrazelluläre Second Messenger und Proteasen entwickelt worden.^[120]

Rice beschrieb eine FRET-Anordnung, bei der ein GFP, das an einen zweiten Fluorophor gekuppelt war, mit dem C-Terminus von Kinesin fusioniert wurde. Das Kinesin wurde auf diese Weise mit Tetramethylrhodamin markiert, wodurch die Konformationsänderung des Proteins bei der Bindung von Nucleotiden durch FRET-Analyse verfolgt werden konnte.^[131] Hoffmann et al. beschrieben eine Kombination von CFP mit dem FlAsH-System zur Markierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptorsystems.^[24] Die zweifache Markierung dieses Rezeptors mit CFP und YFP ermöglichte zwar noch die Rezeptoraktivierung, verhinderte aber die Signalweiterleitung ins Zellinnere. Ersetzt man YFP durch einen FlAsH-Farbstoff, so wird die normale Signalweiterleitung zugelassen.^[24]

Für die praktische Handhabung solcher FPs kann auf mehrere Handbücher zurückgegriffen werden.^[21,132] Das zu-

nehmende Interesse an FPs für intrazelluläre FRET-Anwendungen hat zur ständigen Verbesserung und zur Entwicklung von verstärkten GFPs geführt, die weniger empfindlich gegen Umgebungseinflüsse sind.^[20] Durch Mutation und Selektion ließen sich monomere RFPs aus den ursprünglichen Tetrameren und Dimeren entwickeln.^[123,133] Nguyen und Daugherty entwickelten ein optimiertes CFP-YFP-Paar mit einem 20fachen FRET-Signalverhältnis (verglichen mit einem dreifachen Verhältnis beim ursprünglichen Konstrukt).^[134] Mit diesem D/A-Paar sollte es möglich sein, FP-FRET-Sensoren auch in Fällen einzusetzen, in denen Donor und Acceptor keine optimale Position zueinander haben. Inzwischen wurden auch FPs aus unterschiedlichen Spezies mit neuen Farben und interessanten Eigenschaften wie Photokonversion kloniert.^[135]

3.3. Enzymatisch erzeugte Biolumineszenz

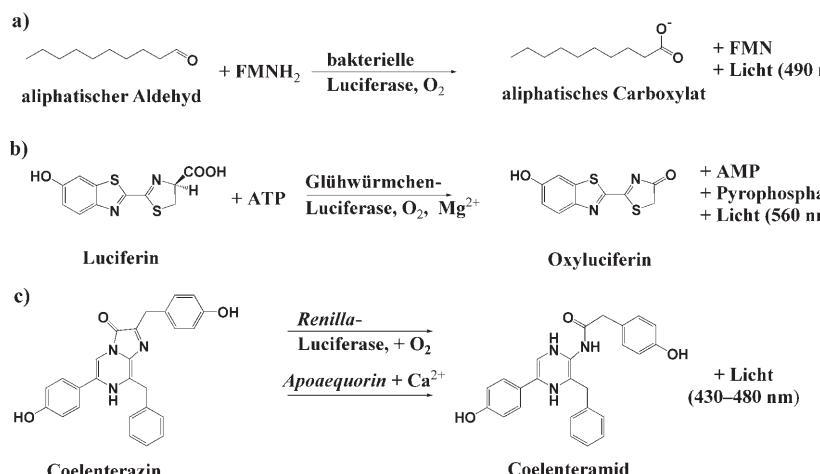
Enzymatisch erzeugte Biolumineszenz (BL) ist eine natürliche Erscheinung, die sich bei manchen Käfern, Bakterien und Meeresorganismen findet. Bei der Biolumineszenz wird das Substrat Luciferin durch das Enzym Luciferase in Gegenwart von O_2 und eventuell einem Cofaktor wie ATP oxidiert.^[136-139] Bei der Oxidation von Luciferin entsteht ein angeregtes Molekül, das unter Lichtemission zerfällt (Schema 4). Die Biolumineszenz wird in vielen biologischen Testsystemen als Messgröße genutzt.^[140-143]

Licht, das von einem BL-System emittiert wird, kann auf einen Acceptor übertragen werden.^[144-147] Dieser als BRET (resonanter Biolumineszenzenergietransfer) bezeichnete Prozess ist eine Variante von FRET und ist ähnlich effizient wie dieser bei Donor-Acceptor-Abständen von 10 bis 100 Å.^[141] Bei BRET-Systemen mit einer Luciferase als Donor wird in den meisten Fällen GFP als Acceptor verwendet, das auch der physiologische Acceptor bei lumineszierenden Organismen ist.^[148,149] Der wichtigste Vorteil von BRET-Anordnungen besteht darin, dass keine Lichtquelle zur

Anregung des Donors nötig ist, sodass Probleme wie Lichtstreuung, hohe Hintergrundstrahlung und direkte Anregung des Acceptors entfallen.^[146] Da außerdem der Donor oder auch Donor *und* Acceptor in der Zelle als Fusionsproteine exprimiert werden können und die Anregung auf ein lokalisiertes Ereignis hin erfolgt (die Freisetzung von Luciferin), kann die Analytspartikel spezifisch angeregt werden, was besonders bei Anwendungen *in vivo* wichtig ist.^[145]

Mit BRET-Reporterpaaren wurden Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* verfolgt, darunter das Zusammenwirken von Clock-Proteinen,^[144] Insulin-Rezeptor-Aktivitäten^[150-152] und die Echtzeitüberwachung der intrazellulären Ubiquitinierung.^[145,153] Während als Acceptor normalerweise GFP oder eine seiner Varianten dient, wird die als Donorkomponente fungierende Luciferase oft variiert. Am häufigsten werden Luciferasen aus terrestrischen oder marinen Bakterien, dem eukaryotischen Glühwürmchen und aus der Koralle *Renilla* eingesetzt (Tabelle 2). Luciferasen katalysieren die Oxidation von reduziertem Flavinmononucleotid (FMNH₂) und einem langkettigen aliphatischen Aldehyd in Gegenwart von O_2 unter Abstrahlung von blauem Licht (Schema 4a).^[154,155] Weil FMNH₂ an der Luft schnell oxidiert wird, erzeugt diese Luciferase kein kontinuierliches Leuchten, sondern nur kurze Lichtblitze.^[137] Zusammen mit der Tatsache, dass die Expression der entsprechenden Gene in Sägerzellen keine einfache Prozedur ist, schränkt dies die Verwendung der bakteriellen Luciferasen stark ein. Bis heute gibt es keine Berichte über BRET-Anwendungen mit bakteriellen Luciferasen.

Am häufigsten wird das Luciferase/Luciferin-Paar aus Glühwürmchen als BL-Reportersystem eingesetzt. Die Glühwürmchen-Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin in Gegenwart von ATP unter Abstrahlung von gelb-grünem Licht (Schema 4b).^[156] Zunächst wird sehr intensives Licht emittiert, das dann in eine langanhaltende Lumineszenz übergeht. Die Zugabe von Coenzym A kann helfen, eine stabile, sehr intensive Lumineszenz zu erhalten, die über mehrere Minuten zerfällt.^[157] Eingekapseltes Luciferin, das speziell für eine intrazelluläre Freisetzung konzipiert wurde, ist kommerziell erhältlich.^[158] Nach Transport in die Zelle kann das Luciferin entweder durch UV-Licht oder durch intrazelluläre Esterasen aktiviert werden. Das Luciferase/Luciferin-System aus Glühwürmchen ist wahrscheinlich am besten für BRET-basierte Donoren geeignet, denn es hat eine hohe Quantenausbeute (0.88) und lässt sich in *E. coli* einfach exprimieren. Da sein Emissionsmaximum jedoch etwa bei 560 nm liegt, sind GFP und einige seiner Varianten nicht als Acceptoren geeignet. Andere Aczeptoren wie Cy3/Cy5 und das fluoreszierende Protein DS Red wurden schon getestet, um Antigen-Antikörper-Bindungen zu verfolgen^[159] oder Protein-Protein-Wechselwirkungen sichtbar zu machen.^[160]



Schema 4. Biolumineszenzsubstrate sowie enzymatische Reaktionen verbreiteter Luciferasen: a) aliphatisches Aldehydsubstrat der bakteriellen Luciferase; b) Struktur und Reaktion von Luciferin, dem Substrat der Glühwürmchen-Luciferase; c) Coelenterazin, das Substrat der auch im *Apoaequorin* vorkommenden *Renilla*-Luciferase.

Tabelle 2: Charakteristika verbreiteter Enzyme, die biolumineszente und chemilumineszente Reaktionen katalysieren.

Enzym	Gen	M_w [kDa]	Substrat	Cofaktoren	λ_{em}	Bemerkungen	Lit.
Biolumineszenz							
bakterielle Luciferase (<i>Vibrio</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Xenorhabdus</i>)	<i>Lux</i>	80 (Dimer)	aliphatische Aldehyde	FMNH_2 , O_2	490	begrenzte Einsatzmöglichkeiten	[136, 154, 155]
Glühwürmchen-Luciferase (<i>Photinus pyralis</i>)	<i>Luc</i>	61 (Monomer)	Luciferin ^[a] , verkapseltes Luciferin ^[b]	ATP	560	Coenzym A verstärkt Lumineszenz; BRET-Acceptoren: Cy3/Cy5, DS Red	[156–160]
<i>Renilla</i> -Luciferase	<i>Ruc</i> , <i>hRluc</i>	35 (Monomer)	Coelenterazin, Coelenterazin (<i>h</i> , <i>n</i>), ^[c] Coelenterazin <i>cp</i> , <i>f</i> , ^[d] DeepBlueC	keine	475 442–473 395	Autolumineszenz	[138, 147, 164, 165]
<i>Gaussia</i> -Luciferase	<i>hGluc</i>	20 (Monomer)	Coelenterazin	keine	480	[e]	[167–169]
<i>Aequorin</i> (aus <i>Aequorea victoria</i> oder rekombinant)		22 (Monomer)	Coelenterazin, <i>f</i> , <i>h</i> , <i>hcp</i> , <i>cp</i> und <i>n</i>	Ca^{2+}	445–475	[f]	[139, 172]
Chemilumineszenz							
Meerrettichperoxidase		44 (Glycoprotein)	Luminol, Isoluminol, Lumigen, Acridan	H_2O_2 ^[g]	411–425	[h]	[183–185]
alkalische Phosphatase (<i>Pandalus borealis</i>)		106 (Homo-dimer)	1,2-Dioxetane (Lumigen, Lumi-Phos, CDP-Star)	keine	480, 530	[i]	[191, 192]

Luciferin = [a] D-(-)-2-(6'-Hydroxy-2'-benzothiazolyl)thiazolin-4-carbonsäure. [b] Erhältlich von Molecular Probes, Promega. [c] Molecular Probes, Biotium. [d] Perkin Elmer (BRET2). [e] Prolume und NEB. [f] Lux Biotech und Molecular Probes. [g] Verstärker: Luciferin, Fluorescein, Phenole. [h] Aureon Biosystems, Vector Labs, Alpha Innotech. [i] Michigan Diagnostics.

Die *Renilla*-Luciferase (RLuc) katalysiert die Oxidation von Coelenterazin zu Coelenterazin unter Aussendung von blauem Licht (Schema 4c).^[138] Die Quantenausbeute von RLuc ist zwar deutlich niedriger als die der Glühwürmchen-Luciferase (0.07), doch sind die Experimente einfach durchzuführen, weil keine Cofaktoren benötigt werden. Andererseits zeigt RLuc eine gewisse Autolumineszenz, was die Empfindlichkeit der Messungen beeinträchtigt. Trotz dieser Einschränkungen ist das *Renilla*-Luciferase/Coelenterazin-System der erste und wahrscheinlich am meisten verwendete Donor für BRET-Anordnungen.^[144] Beispiele für seine Anwendung umfassen die Visualisierung der Dimerisierung des β -adrenergen Rezeptors^[161, 162] und der Bindung des insulinähnlichen Wachstumsfaktors II an das zugehörige Bindeprotein in lebenden Zellen.^[163] Auch zwei neue *Renilla*-Gene mit der Bezeichnung *hRluc*, die für die Expression in Säugerzellen optimiert sind, wurden entwickelt (Tabelle 2). Die Emission der *Renilla*-Luciferase kann über das Coelenterazin-Substrat moduliert werden, und es sind mehrere Analoga mit unterschiedlichen Emissionsspektren verfügbar.^[164, 165]

Perkin-Elmer hat ein eigenes BRET2-Testsystem entwickelt, das aus *Renilla*-Luciferase, dem Coelenterazin-Substrat DeepBlueC (Emission bei 395 nm) und einem optimierten GFP2 als Acceptor besteht. Das System funktioniert nach dem normalen BRET-Verfahren, hat allerdings eine höhere spektrale Auflösung zwischen Donor und Acceptor.

Eine Luciferase aus *Gaussia* (hGluc) wurde für die Expression in bakteriellen und Säugerzellen optimiert.^[166, 167] Bei

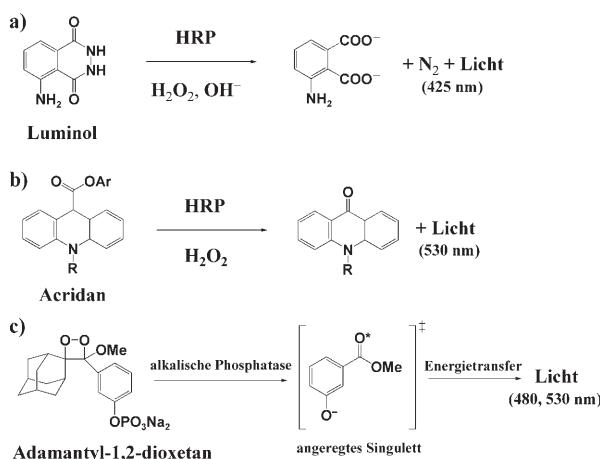
einem Molekulargewicht von nur 20 kDa (verglichen mit 35 kDa bei *Renilla*) weist hGluc ähnliche spektrale Eigenheiten auf wie Rluc und vermeidet dabei Probleme im Zusammenhang mit sterischen Hinderungen, wie sie bei chimaeren Fusionaten oft auftreten. In Säugerzellen exprimierte *Gaussia*-Luciferase leuchtet bis zu 1000-mal heller als Luciferase aus nativer *Renilla*.^[168] hGluc wurde als Reporter genutzt, um DNA-Hybridisierungen zu verfolgen^[167] und Bakterienzellen zu überwachen;^[169] über eine Verwendung als BRET-Donor gibt es dagegen keine Berichte. Auch andere Luciferasen sind inzwischen isoliert worden, darunter die 19-kDa-Luciferase aus dem Leuchtkrebs *Oplophorus gracilirostris*, die die Oxidation von Coelenterazin katalysiert. Dabei wird Licht von 454 nm mit hoher Quantenausbeute bei Temperaturen bis zu 40 °C emittiert.^[170]

Aequorin aus Quallen ist ein Ca^{2+} -empfindliches biolumineszierendes Photoprotein, das aus der Luciferase Apoaequorin im Komplex mit seinem Substrat Coelenterazin besteht (Schema 4c).^[171] Die blaue Biolumineszenz von *Aequorin* wird durch Ca^{2+} -Ionen ausgelöst.^[139, 172] Mit *Aequorin* als BRET-Donor wurde die Wechselwirkung zwischen Streptavidin (fusioniert mit *Aequorin*) und einem Biotin-Carboxylcarrierprotein (fusioniert mit einem EGFP-Acceptor) nachgewiesen.^[173] In einem modifizierten BRET-Test wurde ein mit Dabcyl oder QSY-7 beladenes Avidin eingesetzt, das die Biolumineszenz von biotinyliertem *Aequorin* nach Zugabe von Ca^{2+} unterdrückte.^[174]

Im Allgemeinen wird BRET mit den beschriebenen enzymatischen Donoren für In-vivo-Untersuchungen verwendet. Darüber hinaus ergeben sich Einsatzmöglichkeiten für die Entwicklung von Biosensoren, die ohne Anregungsquelle auskommen.

3.4. Enzymatisch erzeugte Chemilumineszenz

Enzymatisch erzeugte Chemilumineszenz (CL) ist eng verwandt mit der Biolumineszenz, mit dem Unterschied, dass der Luminophor im ersten Fall ein synthetisches Substrat ist, das durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion in einen angeregten Zustand überführt wird.^[143] In Schema 5 und Tabelle 2 sind einige CL-Substrate zusammen mit ihren Enzy-



Schema 5. Chemilumineszenzsubstrate sowie enzymatische Reaktionen von Meerrettichperoxidase (HRP) und alkalischer Phosphatase. a) Luminol; b) Acridan (auch verestert erhältlich); c) Adamantyl-1,2-dioxetan (Substrat für alkalische Phosphatase und andere Enzyme).

men aufgeführt. Im Allgemeinen ist bei der Chemilumineszenz die Quantenausbeute geringer als bei der Biolumineszenz. Chemilumineszenz wurde bei vielen Gelegenheiten als empfindliche Eigenschaft eingesetzt, unter anderem beim Wirkstoff-Screening, in der Kapillarelektrophorese und bei Immunassays.^[140–143, 175–177] Einige Beispiele für resonanten Chemilumineszenzenergietransfer (CRET) sind zwar bekannt,^[178–182] insgesamt ist das Konzept aber wenig erforscht. Analog zu den BRET-Systemen kommen CL-Marker prinzipiell als Donoren in CRET-Anordnungen infrage.

Meerrettichperoxidase (HRP) ist wahrscheinlich das am meisten eingesetzte Enzym zur CL-Detektion. Es gibt eine Reihe von chemilumineszenten Substraten für HRP, wobei am häufigsten Luminol und seine Derivate verwendet werden (Schema 5a).^[183–185] In Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert HRP Luminol zu einer lumineszierenden Verbindung, die blaues Licht emittiert (425 nm). Luminol wird meist in Kombination mit einem Verstärker wie Luciferin, Fluorescein oder einem Phenol eingesetzt.^[186, 187] Acridanderivate werden durch HRP zu lumineszierenden instabilen Acridinestern umgesetzt, die unter Aussendung von gelbem Licht (530 nm) zerfallen (Schema 5b); ihre Lumineszenzintensität

ist dabei größer als die von Luminol.^[188–190] Alkalische Phosphatase wird oft genutzt, um die Oxidation von 1,2-Dioxetanen als luminogenen Substraten zu katalysieren (Schema 5c).^[191, 192] Da 1,2-Dioxetane sehr instabil sind, wurden stabilere Substrate wie Adamantyl-1,2-dioxetanphosphat entwickelt (Michigan Diagnostics). Dioxetane werden meist in Verbindung mit Verstärkern geliefert, die die Stabilität und Lichtausbeute steigern und auch den Spektralbereich durch Energieübertragung auf einen anderen Fluorophor verbreitern. Auf diese Weise können zwei Emissionswellenlängen erhalten werden (480 und 530 nm). Dioxetane werden auch von anderen Enzymen wie β -D-Galactosidase, β -Glucosidase, β -Glucuronidase, Arylesterase, Arylsulfatase und Neuramidase umgesetzt.

Bislang wird CRET noch vorwiegend für Reportersysteme genutzt, jedoch bietet die große Zahl verfügbarer rekombinanter Enzyme in Verbindung mit preisgünstigen kommerziellen Substraten und der möglichen Kontrolle der Emissionswellenlänge genügend Anreiz, eine Anwendung von CRET-Anordnungen z.B. in Biosensoren zu untersuchen.

4. Anorganische Materialien

4.1. Metallchelatkomplexe und langlebige Farbstoffe

Lumineszente Lanthanoide sind die wichtigste Klasse langlebiger Farbstoffe für Energietransferanwendungen in der biophysikalischen Forschung. bahnbrechende Arbeiten auf diesem Gebiet stammen von Selvin und Mitarbeitern.^[193] Es gibt vier Lanthanoide – Terbium, Europium, Samarium und Dysprosium –, die im sichtbaren Bereich emittieren. Wegen ihrer höheren Intensität werden meist Tb- und Eu-Kationen verwendet.

Für biophysikalische Anwendungen werden Lanthanoid-Kationen typischerweise mit einem Chelatliganden kompliziert, der unterschiedliche Funktionen erfüllen muss (Abbildung 13): 1) Das Lanthanoid muss einen festen Komplex mit dem Liganden bilden, damit hohe thermodynamische und photochemische Stabilitäten gewährleistet sind, und gleichzeitig muss es von den fluoreszenzlöschen Einflüssen der umgebenden Lösung abgeschirmt sein. Als Chelatliganden dienen oft Polyaminocarboxylate, Pyridine oder Salicylsäuren.^[193, 194] 2) Lanthanoid-Ionen haben sehr viel niedrigere Extinktionskoeffizienten ($\approx 1\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) als herkömmliche Farbstoffe, weshalb sie schwer direkt anzuregen sind. Daher muss der Chelatligand einen organischen Chromophor enthalten, der als Lichtsammelantenne oder Sensibilisator fungiert und sich in unmittelbarer Umgebung des Ions befindet. Der Sensibilisator absorbiert einfallendes Licht und überträgt die Energie auf das Lanthanoid-Kation. 3) Der Chelatligand sollte eine reaktive Gruppe zur Konjugation an ein Biomolekül tragen.

Gegenwärtige Forschungsschwerpunkte betreffen die Verbesserung der Antennengruppen und die Entwicklung von Methoden zur direkten Konjugation von Antennen und Chelatliganden an Termini oder Seitenketten wachsender Peptide.^[195, 196] Die zurzeit verwendeten Abstandhalter zur

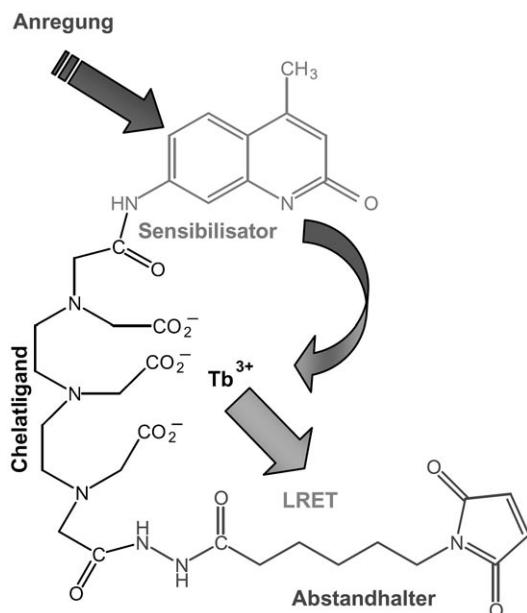


Abbildung 13. Struktur der Lanthaseen-Tb-Sonde von Invitrogen; die einzelnen Funktionalitäten sind hervorgehoben. Als Linker dient meist ein NHS-Ester oder eine Isothiocyanat/Maleimid-Gruppe.

Konjugation der Sonden sind relativ lang und flexibel, was zu einer gewissen Ungenauigkeit in den Analysen führt. Direkt angebrachte Sonden sollten genauere Messungen der D-A-Abstände zulassen. Lanthanoidsonden sind unter anderem erhältlich bei CIS-Bio International (Cryptat-Sonden), Perkin Elmer, InVitrogen (Lanthaseen) und Amersham Biosciences (Europium-TMT-Chelate).

Langlebige Donoren (Fluoreszenzlebensdauern $\tau > 100$ ns bis mehrere ms) haben eine Reihe technischer Vorteile gegenüber konventionellen Fluoreszenzfarbstoffen ($\tau = 1-5$ ns). Am wichtigsten ist die Möglichkeit, durch zeitaufgelöste Messungen Hintergrundfluoreszenz auszuschließen (direkte Anregung, Streuung und Autofluoreszenz von Zellen und Biomolekülen) und damit die Empfindlichkeit drastisch zu erhöhen. Lanthanoidsonden haben außerdem mehrere diskrete und scharfe Emissionsbanden und große Stokes-Verschiebungen, sodass die D/A-Emission weit weg von der Anregungswellenlänge gemessen werden kann (Abbildung 14). Dadurch ist es möglich, Lanthanoidsonden mit einer Vielzahl von Acceptorfarbstoffen zu kombinieren. Terbium zeigt beispielsweise eine gute spektrale Überlappung mit Fluorescein, Rhodamin und Cy3. Eine Liste passender Farbstoffe mit den zugehörigen Förster-Abständen R_0 findet sich in der Übersicht von Selvin.^[193]

Der resonante Energietransfer mit Lanthanoid-Donoren wird richtiger als resonanter Lumineszenzenergietransfer (LRET) bezeichnet, weil die Lanthanoid-Emission physikalisch gesehen keine Fluoreszenz ist. Letztlich finden beim LRET-Prozess jedoch die gleichen elektrischen Dipolübergänge statt wie bei konventionellen Farbstoffen, sodass auch die gleiche Abhängigkeit von r^6 auftritt wie bei FRET. Wegen der hohen Quantenausbeute der Lanthanoidsonden (0.1–0.4) liegen die Förster-Abstände R_0 bei bis zu 100 Å. Bei der Bestimmung der spektralen Überlappung ist jedoch Vorsicht

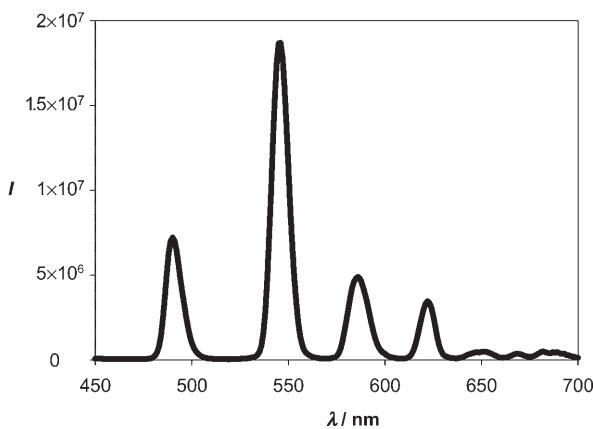
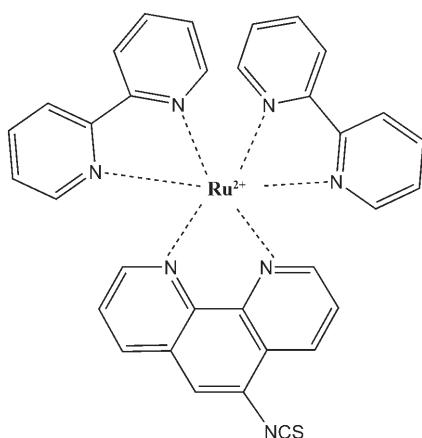


Abbildung 14. Emissionsprofil der Lanthaseen-Tb-Sonde ($\lambda_{ex,max} \approx 343$ nm).

geboten, weil einige der Emissionsbanden durch kombinierte magnetische und elektrische Dipolübergänge entstehen, wobei nur die elektrischen Übergänge eine nennenswerte Energieübertragung ermöglichen.^[197] Für zeitaufgelöste Messungen sind komplexere Geräteaufbauten als für statische Messungen nötig. Da die Fluoreszenz jedoch langlebig ist (μ s bis ms), können immerhin einfache Apparaturen verwendet werden als bei konventionellen Farbstoffen, deren Fluoreszenz im Bereich von ns zerfällt. So gibt es bereits viele Lesegeräte für Mikrotiterplatten, die im genannten Zeitfenster Messungen der Fluoreszenzlebensdauer ermöglichen.

In LRET-Experimenten mit Lanthanoidsonden werden meist konventionelle Farbstoffe als Acceptor verwendet.^[193] Gemessen wurden z. B. die Aktivitäten von Enzymen, darunter Telomerase, Caspase, Helicase und Phosphatase.^[198,199] Ein Eu/Cy5-D/A-Paar wurde zum Hochdurchsatz-Screening auf antimikrobielle Wirkstoffe genutzt.^[200] Das gleiche Eu/Cy5-Paar wurde außerdem für kompetitive Immunassays auf Albumin im Urin und für nichtkompetitive Assays auf Morphin eingesetzt.^[201,202] Tsourkas et al. entwickelten molekulare Leuchtmarker mit Tb- und Eu-markierten DNA-Donoren und zeigten, dass zeitaufgelöste Messungen mit diesem LRET-Paar weder einen Fluoreszenzlöscher noch eine Haarnadelstruktur an der lanthanoidmarkierten Sonde erfordern.^[203] Mit LRET zwischen Tb als Donor und Cy3 als Acceptor ließ sich auch die Hybridisierung von DNA verfolgen.^[204] Lanthanoidsonden wurden außerdem zur Aufklärung biologischer Strukturen eingesetzt, z. B. zur Bestimmung von Konformationsänderungen von Ionenkanälen und Enzymen, zum Nachweis einer transmembranären Signalübertragung durch spannungsempfindliche Segmente innerhalb eines funktionellen Kaliumkanals und zur Abstandsmessung in dünnen Muskelfilamenten.^[193,205-207]

Sigma-Aldrich bietet eine Serie reaktiver Ruthenium-Komplexe an (Schema 6), die ursprünglich von Lakowicz als Anisotropiemarker zur Messung der Rotationsdynamik von Proteinen entwickelt wurden.^[208,209] Diese Ru-Komplexe haben Lebensdauern von ca. 500 ns und befinden sich in dieser Hinsicht näher an den organischen Farbstoffen als an den Lanthanoiden. Ähnlich wie bei den Lanthanoidsonden besteht der Hauptvorteil darin, dass man die Fluoreszenz



Schema 6. Struktur des kommerziell erhältlichen Ru-Komplexes, der standardmäßig in Messungen mit langlebiger Fluoreszenz eingesetzt wird.

selektiv bestimmen kann, nachdem die Hintergrundfluoreszenz abgeklungen ist. Ru-Komplexe haben verhältnismäßig niedrige Extinktionskoeffizienten ($14\,500\,M^{-1}\,cm^{-1}$) und niedrige Quantenausbeuten (0.05), doch das wird wieder ausgeglichen durch die lange Lebensdauer, die hohe Lichtstabilität, relativ große Stokes-Verschiebung und eine Absorption fast im gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich (Abbildung 15). In LRET-Anwendungen wurden Ru-Kom-

plexe als Donoren in direkten und kompetitiven Immunsays auf humanes Serumalbumin genutzt.^[209] In einem anderen Fall wurde ein umgebungsempfindlicher Sudan-III-Diazo-Acceptorfarbstoff an einen Ru-Komplex in Silicagel gekuppelt und zum LRET-Nachweis von CO_2 verwendet.^[210] In einem seltenen Beispiel für die Verwendung des Komplexes als Acceptor wurde ein glucosebindendes Protein mit einem umgebungsempfindlichen Acrylodanfarbstoff und einem Ru-Komplex markiert.^[211] Das Acrylodan reagiert indirekt auf die Glucose (die zugleich die Proteinkonformation beeinflusst), nicht dagegen der Ru-Komplex, der daher als interner Standard für ratiometrische Messungen diente.

4.2. Gold-, Metall- und Silicium-Nanopartikel

4.2.1. Gold

Gold-Nanopartikel werden immer häufiger in FRET-Anwendungen eingesetzt, meist wegen ihrer ungewöhnlich effizienten Fluoreszenzlösung. Gold und andere Edelmetalle zeigen einige Besonderheiten, z.B. Plasmonresonanz im sichtbaren Bereich (meist mit großen Extinktionskoeffizienten um $10^5\,M^{-1}\,cm^{-1}$), stabile, nichtfluktuierende Signalintensitäten und Resistenz gegen Ausbleichung. Eine ausgezeichnete Übersicht über die Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln, einschließlich der etwas unklaren Unterscheidung zwischen Clustern und Kolloiden, findet sich bei Daniel und Astruc.^[212]

Neben den üblichen Randbedingungen für FRET-Anordnungen spielen Größe und Form der Gold-Nanopartikel eine wichtige Rolle. In detaillierten Studien wurde zum einen die Fluoreszenzlösung von Farbstoffen bestimmt, die in festem Abstand von der Oberfläche verschieden großer Gold-Nanopartikel (1–30 nm) angebracht waren, sowie umgekehrt von Farbstoffen, die in unterschiedlichen Abständen (2–16 nm) von der Oberfläche 6 nm großer Gold-Nanopartikel fixiert waren.^[213] Es wurde gefunden, dass fast alle Gold-Nanopartikel nicht nur den strahlunglosen Zerfall des angeregten Farbstoffzustandes verstärken, sondern auch die Strahlungsemision verringern, wobei bereits 1 nm große Partikel eine Effizienz von >99 % Fluoreszenzlösung erreichten.

Gold-Nanopartikel können in unterschiedlichen Größen entweder durch Citratreduktion (16–147 nm Durchmesser) oder nach dem Brust-Schiff-Verfahren (1.5–5.2 nm) hergestellt werden.^[212] Einer der wichtigsten Vorteile von Gold-Nanopartikeln besteht darin, dass Biomoleküle mit expanierten Thiolgruppen über die Bildung einer Gold-Schwefel-Bindung direkt an die Nanopartikel angeheftet werden können. Gold-Nanopartikel können auch mit schwefelhaltigen Liganden zur Reaktion gebracht werden, die spezielle terminale Gruppen enthalten (z.B. Carbonsäuren oder Aminen), die ihrerseits für die nachfolgende Biokonjugation verwendet werden können. Alternativ dazu bietet Nanopropes 1.4 nm große Gold-Nanocluster an, die entweder mit einem einzelnen Succinimidylester oder mit Maleimid aktiviert sind.

Gold-Nanopartikel wurden insbesondere in FRET-Anordnungen mit molekularen Markern zur DNA-Detektion eingesetzt (Abbildung 16). Hier waren sie 100-mal empfindlicher als zuvor verwendete Farbstoffkombinationen.^[214,215] Krauss und Mitarbeiter entwickelten ein System, bei dem der molekulare Marker, meist ein organischer Farbstoff, auf einer

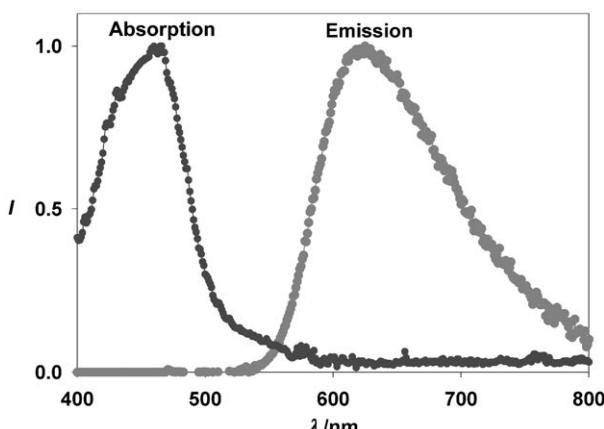


Abbildung 15. Absorptions- und Emissionsprofil des in Schema 6 gezeigten Ru-Komplexes.

plex als Donoren in direkten und kompetitiven Immunsays auf humanes Serumalbumin genutzt.^[209] In einem anderen Fall wurde ein umgebungsempfindlicher Sudan-III-Diazo-Acceptorfarbstoff an einen Ru-Komplex in Silicagel gekuppelt und zum LRET-Nachweis von CO_2 verwendet.^[210] In einem seltenen Beispiel für die Verwendung des Komplexes als Acceptor wurde ein glucosebindendes Protein mit einem umgebungsempfindlichen Acrylodanfarbstoff und einem Ru-Komplex markiert.^[211] Das Acrylodan reagiert indirekt auf die Glucose (die zugleich die Proteinkonformation beeinflusst), nicht dagegen der Ru-Komplex, der daher als interner Standard für ratiometrische Messungen diente.

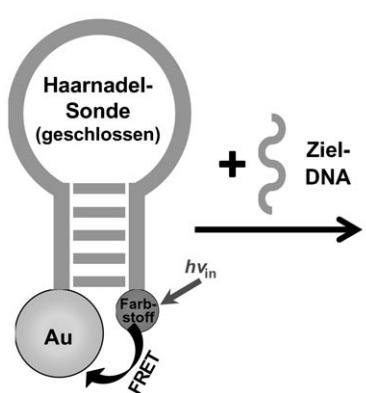


Abbildung 16. Aufbau einer Gold-Nanopartikelsonde: Wenn sich die geschlossene Haarnadelstruktur bildet und dadurch Donor und Acceptor in unmittelbare räumliche Nähe gebracht werden, wird die Fluoreszenz des Farbstoffs gelöscht.^[214] Eine Hybridisierung mit der einzelsträngigen Ziel-DNA öffnet die Struktur der molekularen Sonde und bewirkt eine räumliche Trennung des Gold-Nanopartikels und des Farbstoffs, wodurch die Fluoreszenz steigt.

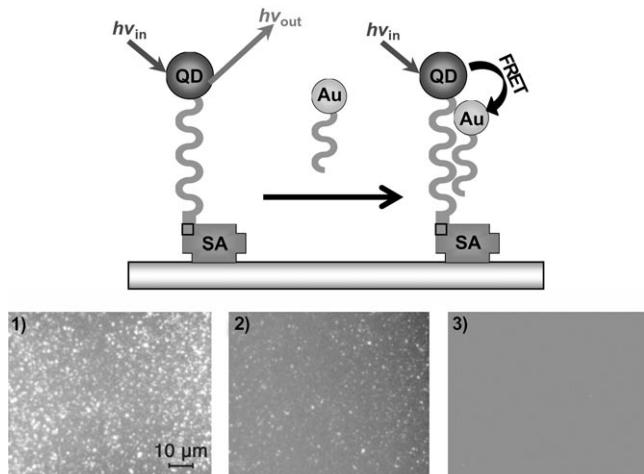


Abbildung 18. Testsystem zur Detektion der DNA-Hybridisierung anhand der Fluoreszenzlösung bei der Anbindung einer goldmarkierten einzelsträngigen Ziel-DNA. 1-3) Fluoreszenzsignal der Oberfläche nach Zugabe des Goldtargets nach $t=0$ min (1), 5 min (2), 15 min (3). Die Abbildung wurde von T. Melvin zur Verfügung gestellt; Wiedergabe mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.^[218]

Goldoberfläche immobilisiert ist.^[49,216] Die an Gold-Nanopartikeln oder Gold-Oberflächen angebrachten Marker reagieren sehr empfindlich auf Fehlpaarungen einzelner Basen. Seidel et al. beschrieben einen FRET-basierten Immunassay zum Nachweis des Pestizids Atrazin mithilfe von goldbeschichteten Mikrotiterplatten (Abbildung 17).^[217] Kürzlich

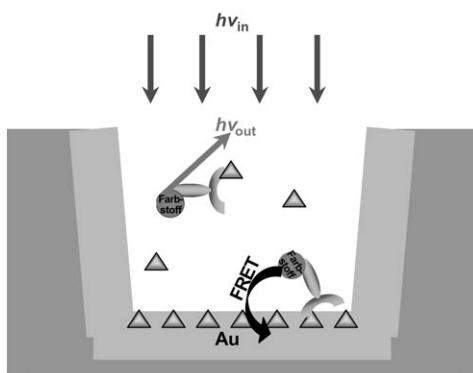


Abbildung 17. Goldbeschichtete Mikrotiterplatte für den kompetitiven Immunassay zur Detektion von Atrazin.^[217] Sobald die farbstoffmarkierten Antikörper an das immobilisierte Atrazin auf der Goldoberfläche binden, kommt es zur Fluoreszenzlösung des Farbstoffs. Freies Atrazin in Lösung konkurriert mit dem Toxin auf der Goldoberfläche, verhindert damit die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche und steigert die Farbstoff-Fluoreszenz.

wurden Gold-Nanopartikel auch als Fluoreszenzlöscher für Halbleiter-Quantenpunkte (QDs) getestet (siehe Abschnitt 4.3). Die Hybridisierung zweier komplementärer einzelsträngiger DNA-Stücke, von denen eines mit einem QD, das andere mit einem 1.4 nm großen Gold-Nanopartikel verbunden war, wurde mittels FRET verfolgt (Abbildung 18).^[218,219] Auch die Bildung von nanoskaligen Assoziationen zwischen entgegengesetzten geladenen QDs und Gold-Nanopartikeln in Lösung wurde mit FRET nachgewiesen.^[220] Ebenfalls beschrieben wurde ein Inhibierungs-Assay mit

Streptavidin-beschichteten QDs und Biotin-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln (Abbildung 19).^[221] Die Ergebnisse dieser Studien weisen darauf hin, dass solche FRET-Anordnungen ein erhebliches Anwendungspotenzial haben. Hauptsächliche Vorteile sind das niedrige Hintergrundsignal, die verbesserte Empfindlichkeit sowie die Möglichkeit, sowohl die Gold-Nanopartikel als auch die QDs mit biologisch aktiven Gruppen zu beladen.

Normalerweise werden Goldpartikel wegen ihrer fluoreszenzlöschenenden Eigenschaften eingesetzt; eine andere Anwendungsmöglichkeit, bei der stark fluoreszierende Gold-QDs verwendet werden, wurde kürzlich von Dickinson und Mitarbeitern beschrieben.^[222,223] Ähnlich wie Halbleiter-QDs haben diese Gold-QDs durchstimmbare Emissionsmaxima, die mit zunehmender Größe der Nanocluster in den längerwelligen Bereich verschoben werden. Fluoreszierende Gold-QDs können in FRET-Anordnungen als Donoren und Aczeptoren eingesetzt werden, und wenn man die Oberflächen mit Poly(amidoamin)-Dendrimeren (PAMAM) stabilisiert, könnten die freien Aminogruppen des Dendrimers für Bio-konjugationen genutzt werden. Klar ist, dass Gold-Nanopartikel und Gold-Oberflächen für FRET-Messungen noch wenig erforscht sind, dass aber viele neue Anwendungen in naher Zukunft erwartet werden können.

4.2.2. Metall- und Silicium-Nanopartikel

Das Interesse an optoelektronischen Einzelmolekülmaterialien führte zu einer intensiven Erforschung der Fluoreszenzeigenschaften kleiner metallischer Nanopartikel.^[222,224] Stabilisierte Cluster aus nur wenigen Edelmetallatomen zeigen interessante Emissionseigenschaften.^[225,226] Die Fluoreszenz von Edelmetall-Nanopartikeln kann sehr intensiv sein, es ist aber schwer, die Emissionswellenlängen gezielt abzustimmen.^[227] Neben Gold-Nanopartikeln haben auch Silber-Nanopartikel interessante optische Eigenschaften wie

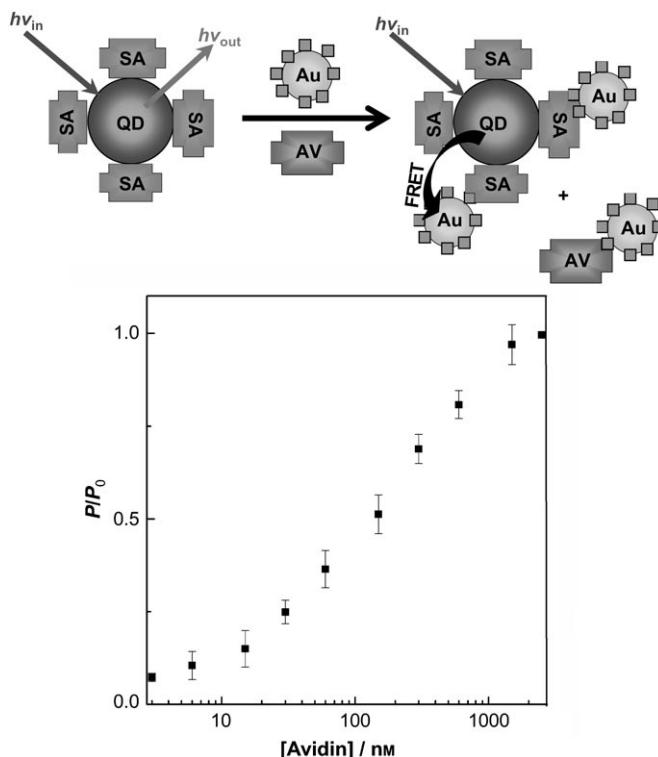


Abbildung 19. Oben: Kompetitiver Inhibition-Assay zum Nachweis von Avidin anhand der Fluoreszenzlösung von Quantenpunkten in Gegenwart von Gold-Nanopartikeln. Durch die Bindung der Biotinfunktionalisierten Goldpartikel gelangen diese in räumliche Nähe zu den Streptavidin-markierten QDs; es kommt zu FRET und dem Nachlassen der Photolumineszenz der QDs. Avidin in Lösung konkurriert mit den Streptavidin-QDs um die Biotin-Goldpartikel und ändert dabei den FRET. Unten: Dosis-Wirkungs-Kurve des Assays. Die Abbildung wurde von E. Oh zur Verfügung gestellt; Wiedergabe mit Genehmigung der American Chemical Society.^[221]

formabhängige Absorption und sehr intensive Fluoreszenz.^[228–233] Kupfer-Nanopartikel sind weniger gut untersucht; sie weisen einen großen Plasmonresonanzpeak im Sichtbaren und ungewöhnliche nichtlineare optische Eigenschaften auf.^[234–236]

Ein weiteres Material mit ebenfalls interessanten optischen Eigenschaften sind Silicium-Nanopartikel, die sich durch eine intensive Größenabhängige Photolumineszenz und breite Anregungsspektren auszeichnen.^[237–240] Wegen ihrer Brillanz und ihrer Resistenz gegen Ausbleichung wurden Si-Nanopartikel als Fluoreszenzmarker für DNA überprüft,^[241,242] und aufgrund ihrer nichttoxischen Eigenschaften könnten sie Halbleitermaterialien für In-vivo-Anwendungen ersetzen.^[243] Die Synthese und Stabilisierung von Si-Nanopartikeln bleibt schwierig, wenngleich es inzwischen einige praktikable Methoden gibt.^[244,245]

Wiesner und Mitarbeiter entwickelten als CU-Dots bezeichnete Hybridnanopartikel (CU: Cornell University) mit fluoreszierendem Kern und einer Siliciumhülle.^[246] Zur Synthese dieser Hybride werden Farbstoffmoleküle kovalent an eine Siliciumvorstufe gekuppelt und zu einem farbstofffreien Kern kondensiert. Anschließend werden Silicium-Sol-Gel-Monomere zugegeben, um an der Außenseite ein dichtes Siliciumnetzwerk aufzubauen. Wegen ihrer Lichtstabilität, Anpassungsfähigkeit und einfacher Oberflächenmodifikation ist mit Anwendungsmöglichkeiten von Si-basierten Nanopartikeln als FRET-Donoren zu rechnen.

Besonders erwähnenswert sind mit fluoreszierenden Farbstoffen beschichtete Metall-Nanopartikel, bei denen Plasmonverstärkereffekte in vielen Versuchen bestätigt wurden.^[247–251] Hierbei findet ein Energietransfer vom angeregten Zustand des Fluorophors zur Plasmonresonanz der nächstliegenden Metallocberfläche oder des nächstliegenden Metallpartikels statt, wodurch die Anregungs- und Emissionseigenschaften des Fluorophors stark verändert werden.^[249,251] Die Plasmonverstärkung verkürzt außerdem die Lebenszeit des angeregten Zustandes des Fluorophors, wodurch dessen Stabilität verbessert wird (verminderter Ausbleichung). Metalltyp, Größe des Nanopartikels und Größe des Fluorophors haben alle einen Einfluss auf diesen komplexen Vorgang, aber der allgemeine Effekt ist, dass die Quantenausbeute des Fluorophors drastisch zunimmt, besonders bei Fluorophoren mit niedriger Quantenausbeute.^[253–259] Damit die Plasmonverstärkung funktioniert, muss der Abstand zwischen Fluorophor und Metall sorgfältig eingestellt werden.^[256–259] Der Effekt wurde bereits genutzt, um die FRET-Effizienz zwischen DNA-gebundenen Fluorophoren zu steigern,^[260] und es ist sicher nur eine Frage der Zeit, bis robustere Anordnungen entwickelt werden.

4.3. Halbleiter-Nanokristalle

In einigen bahnbrechenden Studien wurde der Nachweis erbracht, dass sich kolloidale lumineszente Halbleiter-Nanokristalle oder -Quantenpunkte zum Nachweis von Proteinen oder DNA in der biophysikalischen Analyse eignen.^[261,262] Ausführliche Übersichten hierzu finden sich in Lit. [263–268]. QDs haben einzigartige photophysikalische Eigenschaften, die sie als Marker für biologische Systeme interessant machen, darunter relativ hohe Quantenausbeuten, molare Extinktionskoeffizienten, die zehn- bis hundertmal höher sind als die von organischen Farbstoffen, und eine hohe Resistenz gegen Ausbleichung und chemischen Abbau.^[263–265] Im direkten Vergleich mit organischen Farbstoffen gibt es mehrere Eigenschaften, durch die sich Quantenpunkte besonders auszeichnen: 1) Größenabhängige Photolumineszenzemission; 2) breite Absorptionsspektren und große Stokes-Verschiebungen, was die Anregung von gemischten QD-Populationen mit nur einer Wellenlänge und weit von den Emissionswellenlängen entfernt ermöglicht (Abbildung 20).^[263–265,269,270]

Für FRET-Anwendungen bedeutet dies, dass QDs über ihre Partikelgröße abgestimmt oder „angewählt“ werden können, um eine möglichst optimale spektrale Überlappung mit einem Acceptorfarbstoff zu erzielen (Abbildung 21).^[271] Mit zunehmender spektraler Überlappung nimmt auch der Förster-Abstand R_0 zu, was zusammen mit der hohen Quantenausbeute der QDs FRET-Anordnungen über größere Abstände ermöglicht. Da sich QDs bei fast jeder Wellenlänge unterhalb der Emissionswellenlänge anregen lassen, können Anregungswellenlängen gewählt werden, die einem Absorp-

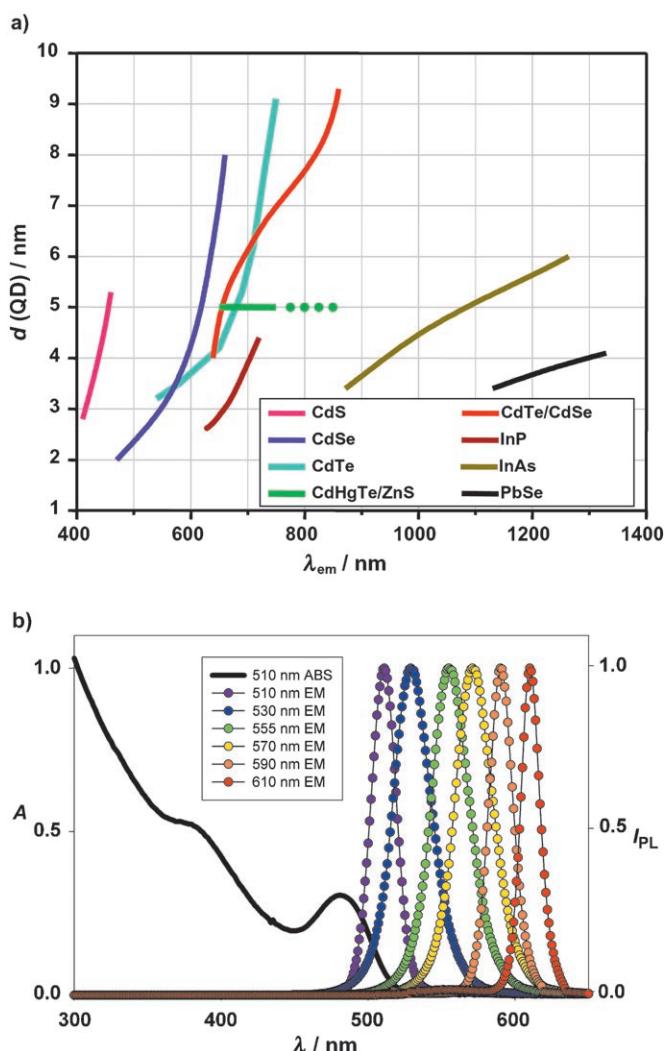


Abbildung 20. a) Korrelation zwischen Emissionsmaxima und der Größe von QDs aus binären und ternären Halbleitern. b) Absorption und Emission von sechs QDs (in Puffer), die für verschiedene Testsysteme genutzt wurden.^[263] Die schwarze Kurve zeigt die Absorption der bei 510 nm emittierenden QDs. Zu beachten ist, dass die Absorption zum UV hin ansteigt. Die Abbildung wurde von X. Michalet zur Verfügung gestellt; Wiedergabe mit Genehmigung von *Science*.^[265]

tionsminimum des Acceptors entsprechen, sodass die direkte Anregung minimiert wird.

QDs für biologische Testsysteme sind kommerziell erhältlich (Quantum Dot Corporation und Evident Technologies). Zur Vereinfachung der Biokonjugation gibt es QDs mit Avidin- oder anderen Proteinbeschichtungen. QD-Synthesen sind in mehreren Übersichten ausführlich beschrieben.^[227,270,272-274] Die gegenwärtig besten QDs für biologische Anwendungen bestehen aus einem CdSe-Kern und einer ZnS-Hülle (siehe z.B. Abbildung 22). Die Hülle passiviert den Kern, schützt ihn vor Oxidation und Auslaugung und verbessert gleichzeitig die Photolumineszenz.^[263-265,270] Da QDs meist ausgehend von unlöslichen Salzen synthetisiert werden, sind sie nicht selbst wasserlöslich. Daher müssen die ursprünglich für die Synthese verwendeten organischen Liganden gegen eine difunktionelle Hülle ausgetauscht werden,

die zum einen an den QD bindet und zum anderen löslichkeitsvermittelnd wirkt und mögliche Anknüpfungspunkte für eine Biokonjugation zur Verfügung stellt. Dazu gibt es eine Vielzahl von Liganden, von denen jeder seine eigenen Vor- und Nachteile hat. So ist bei einigen Liganden die Dispersion der QDs auf den basischen pH-Bereich beschränkt, während bei anderen die Partikelgröße deutlich zunimmt. Übersichten finden sich in Lit. [263,265].

Es gibt mehrere Strategien zur Anbindung von QDs an Biomoleküle, z. B. kovalente Kupplung,^[261,262] elektrostatisch vermittelte oder metallaffinitätsvermittelte Selbstorganisation und Biotin-Avidin-Reaktionen.^[263,265,267,268,275,276] Andere binäre und ternäre Halbleitermaterialien, die zur Herstellung von QDs herangezogen wurden, sind ZnS, CdS, CdTe, PbSe und CdHgTe mit Emissionswellenlängen, die vom UV bis zum IR reichen (Abbildung 20a).^[263-265]

Die geringe Größe der Quantenpunkte führt zu einem interessanten Dilemma, denn sie kann einen Vorteil und eine Einschränkung zugleich bedeuten: Die Größe der zweischichtigen CdSe/ZnS-QDs, deren Emissionspektren in Abbildung 20b gezeigt sind, reicht von ca. 50 Å Durchmesser für die 510-nm-QDs bis etwa 80 Å für die 610-nm-QDs (nicht gerechnet die umhüllenden Liganden, die nochmals zwischen 20 und 100 Å zur Gesamtgröße beitragen können).^[263,271,276,277] Für viele Biokonjugate, die mit einem QD als Donor und einem farbstoffmarkierten Protein als Acceptor versehen sind, kann der Förster-Abstand R_0 innerhalb des QD-Radius liegen, wodurch die FRET-Effizienz für ein Paar aus einem einzelnen QD-Donor und einem einzelnen Acceptor relativ niedrig wird.^[4,271] Es wurde jedoch nachgewiesen, dass man durch Beladen eines zentralen QD-Donors mit mehreren Protein-Acceptoren die FRET-Effizienz proportional mit dem Wirkungsquerschnitt der FRET-Acceptoren erhöhen kann.^[263,271]

Bahnbrechende Arbeiten auf dem Gebiet der QD-FRET-Biotestsysteme stammen von Mattoissi und Mitarbeitern. Die Studien umfassen Donor-Acceptor-Paare aus QDs und farbstoffmarkierten Proteinen,^[271,277] QD-basierte Sensoren für Maltose und TNT,^[4,278] oberflächenfixierte QD-FRET-Nanoassoziate,^[279] QD-FRET-basierte reagensfreie Biosensoren,^[280] die photochrome Farbstoffkontrolle von QD-Donor-FRET^[106] und die FRET-basierte Strukturaufklärung von QD-Protein-Biokonjugaten (Abbildung 23).^[281] Darüber hinaus wurde untersucht und aufgezeigt, wie man zwei sehr unterschiedliche Fluorophorklassen mit einem Größenunterschied von mehreren Größenordnungen in FRET-Systmen einsetzen kann.

Weitere QD-FRET-Ansätze nutzen die komplementären Bindungseigenschaften von DNA, um Gold-Fluoreszenzlöscher an QDs zu binden,^[219] oder greifen auf die Fluoreszenzlösung von QDs durch Gold zurück, um Avidin-Biotin-Wechselwirkungen zu verfolgen.^[221] Die Dynamik der Replikation und Telomerisierung von DNA wurde mit QD-Donoren verfolgt, die zusammen mit fluoreszierenden Nucleotid-Acceptoren an DNA-Primer konjugiert waren.^[282] QDs wurden auch als mögliche FRET-Donoren für molekulare Leuchtmarker untersucht.^[283] QDs, die tief in Lipidvesikeln eingebettet waren, wurden als Donoren für den Test auf Wechselwirkungen mit anderen fett- und wasserlöslichen

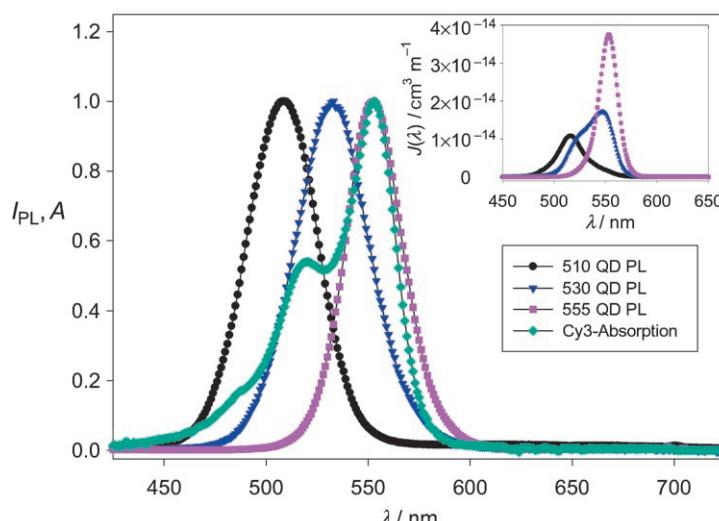


Abbildung 21. Normalisiertes Absorptionsspektrum von Cy3 und Emissionsspektren dreier QD-Lösungen. Der Einschub zeigt die Überlagerungsfunktionen $J(\lambda)$, die die Möglichkeit verdeutlichen, die QD-Emission über eine Größenveränderung zu beeinflussen und so die spektrale Überlappung mit dem Acceptor zu optimieren. Wiedergabe mit Genehmigung der American Chemical Society.^[271]

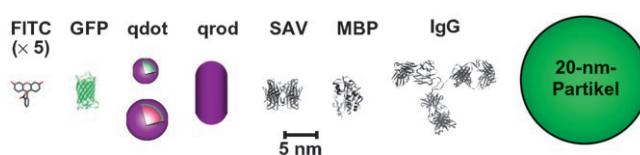


Abbildung 22. Größenvergleich zwischen QDs und vergleichbaren Objekten: FITC (Fluoresceinisothiocyanat), grün fluoreszierendes Protein, CdSe/ZnS-QD (grün: 4 nm, rot: 6.5 nm Durchmesser), qrod (stäbchenförmiger QD), SAV (Streptavidin), maltosebindendes Protein, MBP (Maltosebindendes Protein), IgG (Immunglobulin G). Die Abbildung wurde von X. Michalet zur Verfügung gestellt; Wiedergabe mit Genehmigung von *Science*.^[265]

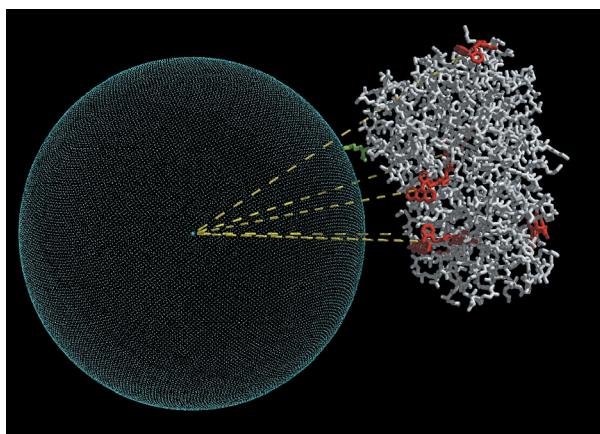


Abbildung 23. Seitenansicht einer MBP-Struktur, die sich an der Oberfläche eines QD anordnet. Sechs Rhodaminrot-Einheiten sind rot hervorgehoben. Die Entferungen vom QD-Zentrum zu jeder der Farbstoffpositionen wurden mit FRET bestimmt (gelb). Die kristallographischen Koordinaten des MBP wurden zusammen mit diesen sechs Abständen verwendet, um die Struktur des MBP-Biokonjugats aufzulösen. Wiedergabe mit Genehmigung der National Academy of Sciences USA.^[281]

Farbstoffen verwendet.^[284] Seit längerem wird die Möglichkeit diskutiert, QD-Donoren als FRET-Photosensibilisatoren in der photodynamischen Tumortherapie einzusetzen.^[285,286]

Weit weniger Beispiele gibt es für die Verwendung von QDs als Aczeptoren. Dies könnte zwei Gründe haben: 1) Das breite Absorptionsprofil und die hohen Extinktionskoeffizienten von QDs führen dazu, dass ein QD ebenso gut oder gar besser angeregt werden kann als die meisten anderen Donoren. 2) QDs haben eine längere Lebensdauer ($\tau = 10\text{--}50\text{ ns}$) als typische fluoreszierende Farbstoffe ($\tau = 1\text{--}5\text{ ns}$).^[277] Damit ergibt sich die Chance, eine andere Klasse von Fluorophoren, etwa langlebige Lanthanoid-Chelatkomplexe, gezielt als Donoren einzusetzen, um eine Eigenschaft, die sich bei klassischen organischen Farbstoffen nicht findet, für einen FRET-Prozess zu nutzen. Aufgrund der einzigartigen photophysikalischen Eigenschaften der QDs kann davon ausgegangen werden, dass FRET-basierte biologische Testsysteme künftig verstärkt Anwendung finden.

5. Multi-FRET-Systeme

Natürlich vorkommende Multi-FRET-Systeme finden sich beispielsweise in den Lichtsammelkomplexen der Phycobilisomen.^[287\text{--}291] Die Funktion dieser supramolekularen Komplexe, die in blaugrünen Cyanobakterien, Rotalgen und kryptomonaden Algen auftreten, besteht darin, den Wellenlängenbereich für die Photosynthese in marinen Biotopen zu verbreitern. Phycobilisomen bestehen aus zahlreichen Phycobiliprotein-Untereinheiten, die pigmentiert oder farblos sein können; ihre Zusammensetzung variiert stark je nach Lichtqualität und Organismus.^[287\text{--}291]

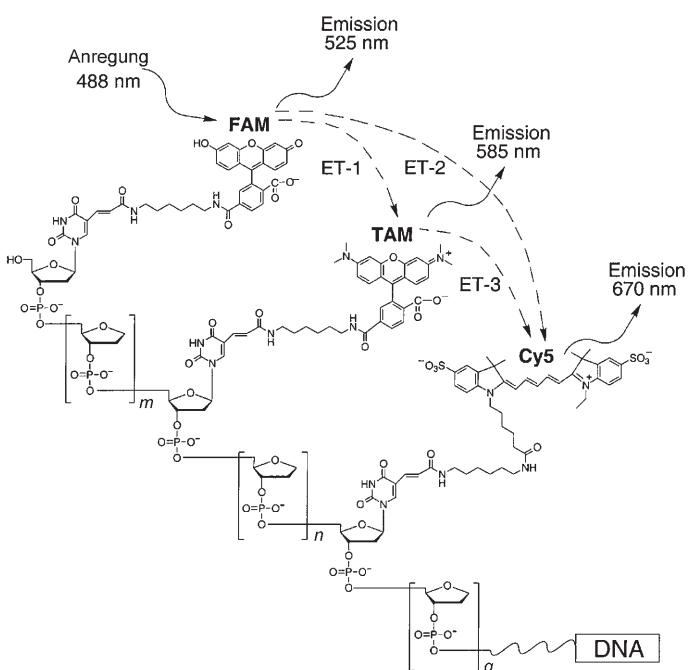
Ein Beispiel für eine Multi-FRET-Funktion in einem Phycobilisom ist die Lichtabsorption durch das Phycobiliprotein R-Phycoerythrin mit anschließendem Energietransfer auf C-Phycocyanin und von dort aus auf Allophycocyanin. Letzteres ist wiederum über einen Chromophor mit dem Photosystem II des Photosynthesekomplexes verbunden. Glazer und Stryer zeigten, dass diese Tandem-FRET-Sonden für Anwendungen als empfindliche zelluläre Markierungen und Immunassays angepasst werden können.^[292,293] Einzeln sind diese Fluorophore in der kommerziell erhältlichen PBXL-Serie enthalten.^[123] Die Energieübertragungseffizienz in diesem System liegt bei fast 100 %.

Biologisch inspirierte synthetische Multi-FRET-Systeme sind vor allem in zwei komplementären Anordnungen eingesetzt worden. Im ersten Fall werden definierte biologische Strukturen herangezogen, um Fluorophore präzise zu platzieren oder auszurichten.^[5,47,294,296] Im zweiten, umgekehrten Fall nutzt man definierte angebrachte Fluorophore, um biologische Strukturen aufzuklären.^[3,297]

Die am besten geeignete biologische Struktur für Multi-FRET-Anwendungen ist DNA. Diese bietet mehrere Vorteile: 1) vorhersagbare Strukturen und Reaktionen; 2) Fluorophore können an spezifischen Positionen eingeführt werden;^[5] 3) mit mehreren Farbstoffen markierte Oligonuc-

leotide können an einen komplementären Strang hybridisiert werden;^[298] 4) die Orientierung der angehefteten Fluorophore kann gesteuert werden.^[47]

Es besteht die Möglichkeit, DNA-Moleküle mit Fluorophoren oder Thiol-, Amin-, Biotin- und anderen Modifikationen an spezifischen terminalen oder internen Positionen zu synthetisieren. Eine Veränderung des D-A-Abstandes ist in dieser Anordnung einfach und ermöglicht eine Feinabstimmung der FRET-Effizienz.^[299,300] Solche mehrfach markierten DNA-Strukturen wurden als kombinatorische Fluoreszenzenergietransfermarker (CFET-Marker) zur Informationscodierung vorgeschlagen. Tong et al. konstruierten acht CFET-Einheiten, indem sie die Abstände zwischen drei Fluorophoren an einem Desoxyribose-Rückgrat veränderten und so unterschiedliche Emissionsraten für jede Farbe erzeugten (Schema 7). In dieser Anordnung gelingt es, mit einer einzigen Wellenlänge anzuregen und unterschiedliche Emissionsraten als spezifische FRET-Signaturen auszuwerten. Die CFET-Marker haben sich bereits in Genotypisierungstests bewährt.^[295,296]



Schema 7. Struktur eines CFET-Markers, der durch Kupplung der Chromophore an modifizierte Thymidinreste eines Nucleotid-Rückgrats erzeugt wird. Der FAM-Donor wird bei 488 nm angeregt und überträgt Energie auf das proximale TAM und das terminale Cy5. TAM wirkt als „Zwischenträger“, der die Energie zum Cy5 weiterleitet. Der Abstand zwischen FAM und TAM wird über die Zahl der Zuckerphosphatreste m eingestellt, während die Zahl n den Abstand zwischen TAM und Cy5 festlegt. Durch Verändern der Abstände lässt sich die Emission steuern, sodass eine spezifische ratiometrische Signatur entsteht. Der CFET-Marker kann am Punkt q an die DNA angehängt werden; auch dieser Abstand lässt sich einstellen.^[295,296] Das Schema wurde von A. Tong zur Verfügung gestellt.

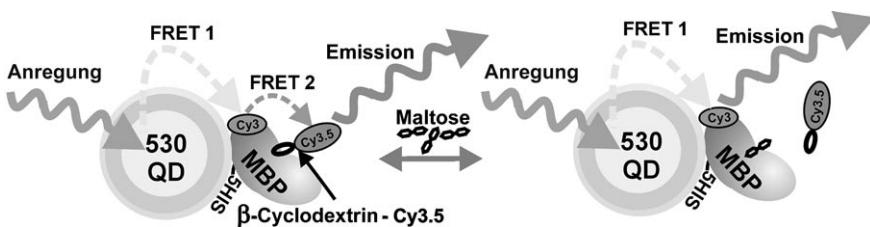


Abbildung 24. Funktionsschema eines Multi-FRET-QD-Maltosesensors. Ein 530-nm-QD wird von etwa zehn MBPs umgeben (nur eines ist dargestellt), die jeweils mit einem einzelnen Cy3-Molekül markiert sind (Absorptionsmaximum 556 nm, Emissionsmaximum 570 nm). β -Cyclodextrin, ein Analogon des primären Analyten Maltose, wird mit Cy3.5 markiert (β -CD-Cy3.5, Absorptionsmaximum 575 nm, Emissionsmaximum 595 nm); es bindet spezifisch in der MBP-Bindetasche und vervollständigt den Sensorkomplex. Eine Anregung des QD löst die FRET-1-Anregung des MBP-Cy3 aus; die Energie wird durch FRET-2 auf β -CD-Cy3.5 weitergeleitet. Bei Zugabe von Maltose wird β -CD-Cy3.5 verdrängt, und die Emission von Cy3 steigt an.

Mit MBP wurden auch mehrere proteinbasierte Multi-FRET-Anordnungen getestet.^[26,52] Hellinga et al. nutzten eine orthogonale Proteinmarkierung, um ein dreifach markiertes MBP zu erzeugen: FAM, Tetramethylrhodamin (TMR) und Cy5 bildeten eine FRET-Staffette, die auf Maltose mit der Änderung des FRET-Verhältnisses zwischen FAM und Cy5 reagierte, während das zentrale TMR als Zwischenstation fungierte.^[26] In einem anderen Ansatz wurde ein Cy3-MBP-Konjugat als Zwischenträger zwischen einem Quantenpunkt und einem mit Cy3.5 markierten Maltoseanalogon in der zentralen MBP-Bindetasche verwendet (Abbildung 24). Die Maltosemessung in diesem QD-MBP-Verdrängungssensor beruht auf der Änderung des FRET-Verhältnisses zwischen der MBP-Cy3- und MBP-Cy3.5-Emission, wobei der Sensor durch den primär angeregten Quantenpunkt betrieben wird (Abbildung 25). Mithilfe dieses Ansatzes konnten Längenbeschränkungen der Analytensysteme, die durch die begrenzten D-A-Abstände verursacht werden, überwunden werden.^[52] Mit einer Multi-FRET-Anordnung aus 148 Donoren und 24 Aczeptoren wurde die Struktur des Tarantel-Hämocyanins aufgeklärt.^[301] Eine FRET-Anordnung mit drei Fluorophoren wurde auch in einem Hochdurchsatz-Wirkstoffscreening eingesetzt.^[302] In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden drei organische Farbstoffe in Silicium-Nanopartikel eingebaut, wobei die

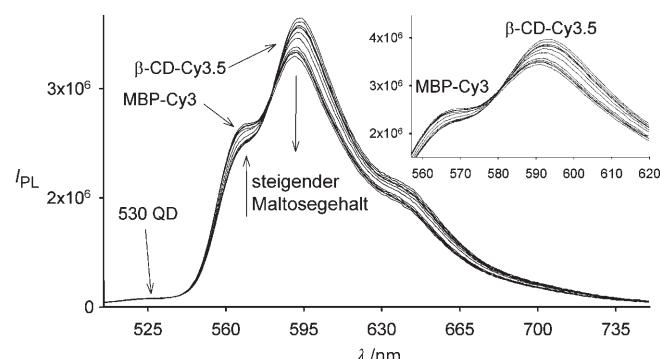


Abbildung 25. Messung des Maltosegehalts mit der in Abbildung 24 gezeigten Anordnung. Einschub: Vergrößerung der MBP-Cy3- und β -CD-Cy3.5-Fluoreszanteile. Wiedergabe mit Genehmigung der Nature Publishing Group.^[4]

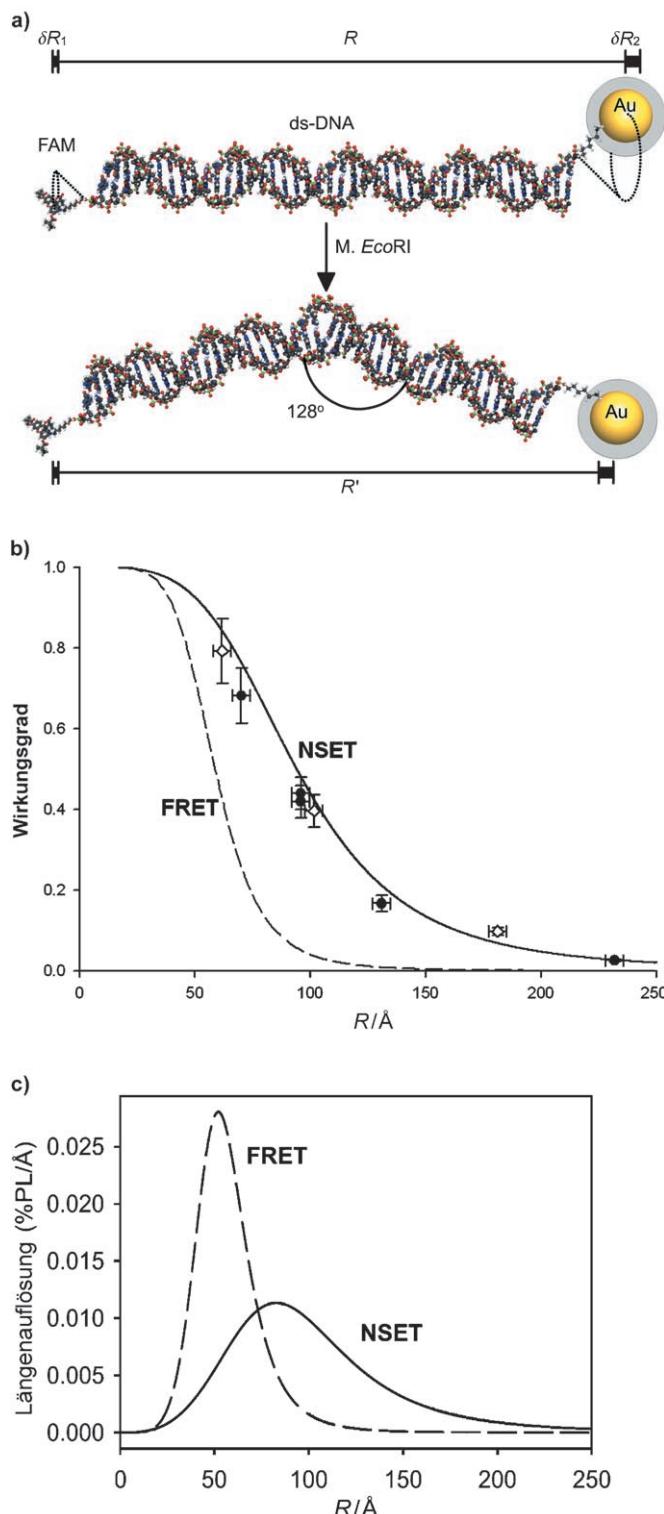


Abbildung 26. a) Aufbau des FAM-DNA-Gold-Systems: Ein Ende der DNA wird mit FAM, das andere mit einem 1.4 nm großen Goldpartikel versehen. Flexible C₆-Linker sorgen dafür, dass die anhängenden Reste beweglich sind (Unschärfekegel δR). Die Bindung von M. EcoRI-Methyltransferase biegt die DNA um 128°, wobei der Abstand R in R' übergeht, sodass sich auch der D-A-Abstand ändert. b) Energietransfereffizienz als Funktion des FAM-Au-Abstandes R . Gefüllte Symbole entsprechen DNA-Längen von 15, 20, 30 und 60 bp; offene Symbole stellen die Wirkungsgrade nach Bindung von M. EcoRI dar. Die gestrichelte Linie markiert die theoretische FRET-Effizienz, die durchgezogene Linie die theoretische SET-Effizienz. c) Abstandsabhängige Längenauflösung bei FRET- und SET-Mechanismen. Der Kreuzungspunkt der Kurven ist die Entfernung, bei der beide Methoden gleiche Auflösung haben. Die Abbildung wurde von G. Strouse zur Verfügung gestellt; Wiedergabe mit Genehmigung der American Chemical Society.^[304]

FRET-Emissionssignaturen über das Verhältnis der Farbstoffanteile abgestimmt wurden.^[303] Diese Strategie setzt auf ein funktionelles Hybrid, das Silicium-Nanopartikel,^[237–240] CU-Dots^[246] und TransFluospheres^[56] miteinander kombiniert.

Multi-FRET-Systeme haben ein riesiges Potenzial zur Aufklärung von Proteinstrukturen und -wechselwirkungen, und eine lohnende Strategie für ihren Aufbau beruht insbesondere auf der Kombination von unterschiedlichen Typen funktionalisierter Fluorophore.

6. Neue Materialien

Seit einigen Jahren gibt es zunehmende Bestrebungen, die Längenbeschränkungen konventioneller FRET-Anwendungen ($R_0 = 60\text{--}90\text{ \AA}$, $r = 100\text{--}120\text{ \AA}$) aufzuheben. Zum Beispiel wurde erkannt,^[13] dass manche FRET-Parameter, einschließlich R_0 , „plastischer“ reagieren als man anhand der experimentellen Anordnungen erwartet hätte. Insbesondere bei einer Energieübertragung von einem Punkt auf eine Ebene könnte sich die Längenabhängigkeit nur mit der 4. Potenz des Abstandes anstatt mit der 6. Potenz ändern.^[13] Strouse et al. untersuchten diesen Aspekt, indem sie DNA variabler Länge an einem Ende mit FAM und am anderen Ende mit einem 1.4 nm großen Goldcluster markierten (Abbildung 26).^[304] Der Goldcluster wirkt als Dipoloberfläche und weist eine Entfernungsabhängigkeit des Oberflächenenergietransfers (SET; surface-energy transfer) von R^{-4} auf. Analog zu R_0 kann man einen SET-Radius d_0 extrapoliieren.^[304] SET-Anordnungen können eine Entfernungsauflösung von bis zu 220 Å und mehr erreichen, was den Längenbereich konventioneller FRET-Paare verdoppelt.

In einem verwandten Ansatz, der allerdings nicht unmittelbar auf einem Energietransfer basiert, entwickelten Alivisatos et al. ein „molekulares Lineal“, dessen Funktion auf der Plasmonkopplung einzelner Gold- oder Silbernanopartikel beruht.^[305] Durch Plasmonkopplung lassen sich einzelne Nanopartikelpaare bis zu einer Entfernung von 700 Å registrieren, allerdings wird die Ableitung der absoluten Entfernung durch Faktoren wie den Brechungsindex und die Lichtstreuung kompliziert. Interessanterweise greifen beide Prozesse auf andere Fluorophore als organische Farbstoffe zurück.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Trotz der vielen Beispiele für FRET-Analysen, die in diesem Aufsatz präsentiert wurden, handelt es sich um eine nach wie vor selten genutzte und leider unterschätzte Technik. Mögliche Einsatzgebiete sind zahlreich; so greifen die meisten kommerziellen DNA-Sequenzierer auf Energietransferprimer oder -terminatoren für die Fluoreszenzmar-

ne Linie die theoretische SET-Effizienz. c) Abstandsabhängige Längenauflösung bei FRET- und SET-Mechanismen. Der Kreuzungspunkt der Kurven ist die Entfernung, bei der beide Methoden gleiche Auflösung haben. Die Abbildung wurde von G. Strouse zur Verfügung gestellt; Wiedergabe mit Genehmigung der American Chemical Society.^[304]

kierung zurück, da dies den optischen Geräteaufbau vereinfacht.^[16,306–308] Es gibt nur wenige andere bioanalytische Techniken, die in so vielen experimentellen Formaten konstante und genaue intramolekulare Abstandsmessungen im Nanometerbereich liefern. Hinzu kommt, dass heute nicht nur empfindliche Nachweisgeräte zur Verfügung stehen, sondern auch viele Materialien, die als Donoren, Acceptor oder beides für FRET-Anwendungen geeignet sind. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Methoden zur Markierung von Biomolekülen. Besonders der Einsatz ungewöhnlicher Kombinationen mit anderen Materialien als den üblichen organischen Donor-Acceptor-Farbstoffen wird den Einsatzbereich der FRET-Analyse erweitern. Wir prognostizieren, dass in nächster Zukunft vor allem sechs Bereiche von der FRET-Technik profitieren werden: 1) Kinetik der Protein- und Peptidfaltung; 2) Aufklärung makromolekularer Wechselwirkungen; 3) Mehrfarbanalysen, vor allem *in vivo*; 4) klinische und *In-vitro*-Testsysteme; 5) Nanomaterialien; 6) Einzelmolekül-FRET-Analysen.^[310,311]

Addendum

Seit Einreichen des Manuskripts sind mehrere wichtige Arbeiten erschienen, die noch erwähnt werden sollen. In einem interessanten Beispiel für einen FRET zwischen unterschiedlichen Materialklassen nutzten So und Mitarbeiter einen BRET-Prozess zur Anregung von QDs.^[312] Eine externe Anregung war nicht erforderlich, und es wurde gezeigt, dass sich der Ansatz zur *In-vivo*-Bildgebung von Tiefengewebe eignet. Eine Multi-FRET-Anordnung bestehend aus fünf Perylenbisimid-Farbstoffen an einem Calixaren-Rückgrat wurde für mögliche Anwendungen in Lichsammleinheiten entwickelt.^[313] Eine weitere interessante Studie befasste sich mit simultanem Multiplex-FRET mit bis zu vier QD-Donoren.^[314] Schließlich ist eine sehr informative Übersicht über BRET-Anwendungen zur Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen erschienen.^[315]

Abkürzungen

BFP	blau fluoreszierendes Protein
BL	Biolumineszenz
QD	Quantenpunkt
BRET	resonanter Biolumineszenztransfer
CFET	kombinatorischer Fluoreszenzenergietransfer
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CL	Chemilumineszenz
CRET	resonanter Chemilumineszenzenergietransfer
D/A	Donor/Acceptor
FAM	Fluorescein
FP	fluoreszierendes Protein
FRET	resonanter Fluoreszenzenergietransfer, Förster-Energietransfer
QY	Quantenausbeute
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HRP	Meerrettichperoxidase
MBP	Maltosebindeprotein

NP	Nanopartikel
pcFRET	photochromer FRET
R_0	Förster-Abstand
SET	Oberflächenenergietransfer
SNP	Einzelnucleotidpolymorphismus
τ	Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Zustandes
YFP	gelb fluoreszierendes Protein

I.M. und K.S. danken dem US Naval Research Laboratory.

Eingegangen am 2. November 2005
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] „10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation“: T. Förster, *Disc. Faraday Soc.* **1959**, 27, 7.
- [2] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Aufl., Kluwer/Plenum, New York, **1999**.
- [3] H. M. Watrob, C. P. Pan, M. D. Barkley, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7336.
- [4] I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoossi, E. R. Goldman, B. Fisher, J. M. Mauro, *Nat. Mater.* **2003**, 2, 630.
- [5] A. K. Tong, S. Jockusch, Z. M. Li, H. R. Zhu, D. L. Akins, N. J. Turro, J. Y. Ju, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12923.
- [6] T. Förster, *Z. Naturforsch. A* **1949**, 4, 321.
- [7] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55.
- [8] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Minerva Biol.* **2005**, 16, 253.
- [9] C. G. dos Remedios, P. D. Moens, *J. Struct. Biol.* **1995**, 115, 175.
- [10] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 819.
- [11] U. Schobel, H. J. Egelhaaf, A. Brecht, D. Oelkrug, G. Gauglitz, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 1107.
- [12] M. P. Lillo, B. K. Szpikowska, M. T. Mas, J. D. Sutin, J. M. Beechem, *Biochemistry* **1997**, 36, 11273.
- [13] E. Jares-Erijman, T. Jovin, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1387.
- [14] A. Miyawaki, A. Sawano, T. Kogure, *Nat. Cell Biol.* **2003**, S1.
- [15] R. M. De Lorimier, J. J. Smith, M. A. Dwyer, L. L. Looger, K. M. Sali, C. D. Paavola, S. S. Rizk, S. Sadigov, D. W. Conrad, L. Loew, H. W. Hellinga, *Protein Sci.* **2002**, 11, 2655.
- [16] V. V. Didenko, *Biotechniques* **2001**, 31, 1106.
- [17] L. Berti, J. Xie, I. L. Medintz, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Anal. Biochem.* **2001**, 292, 188.
- [18] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [19] R. P. Haugland, *The Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10. Aufl., Invitrogen, San Diego, **2005**.
- [20] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509.
- [21] R. Y. Tsien, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 927.
- [22] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 281, 269.
- [23] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6063.
- [24] C. Hoffmann, G. Gaietta, M. Bunemann, S. R. Adams, S. Oberdorff-Maass, B. Behr, J. P. Vilardaga, R. Y. Tsien, M. H. Eisman, M. J. Lohse, *Nat. Methods* **2005**, 2, 171.
- [25] G. V. Los, A. Darzins, N. Karassina, C. Zimprich, R. Learish, M. G. McDougall, L. P. Encell, R. Friedman-Ohana, M. Wood, G. Vidugiris, K. Zimmerman, P. Otto, D. H. Klaubert, K. V. Wood, *Cell Notes* **2005**, 11, 2.
- [26] J. J. Smith, D. W. Conrad, M. J. Cuneo, H. W. Hellinga, *Protein Sci.* **2005**, 14, 64.
- [27] I. Chen, A. Y. Ting, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 35.

- [28] L. Tan, Y. Li, T. J. Drake, L. Moroz, K. M. Wang, J. Li, A. Munteanu, C. Y. J. Yang, K. Martinez, W. H. Tan, *Analyst* **2005**, *130*, 1002.
- [29] W. H. Tan, K. M. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547.
- [30] P. G. Wu, L. Brand, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 1.
- [31] V. Buschmann, K. D. Weston, M. Sauer, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 195.
- [32] S. R. Adams, A. T. Harootunian, Y. J. Buechler, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, *Nature* **1991**, *349*, 694.
- [33] H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1653.
- [34] G. Zlokarnik, P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burres, L. X. Feng, M. Whitney, K. Roemer, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *279*, 84.
- [35] A. Chigaev, T. Buranda, D. C. Dwyer, E. R. Prossnitz, L. A. Sklar, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3951.
- [36] R. S. Larson, T. Davis, C. Bologa, G. Semenuk, S. Vijayan, Y. Li, T. Oprea, A. Chigaev, T. Buranda, C. R. Wagner, L. A. Sklar, *Biochemistry* **2005**, *44*, 4322.
- [37] P. R. Selvin, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1.
- [38] R. J. Russell, M. V. Pishko, C. C. Gefrides, M. J. McShane, G. L. Cote, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3126.
- [39] H. Ueda, K. Kubota, Y. Wang, K. Tsumoto, W. Mahoney, I. Kumagai, T. Nagamune, *Biotechniques* **1999**, *27*, 738.
- [40] H. A. Godwin, J. M. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6514.
- [41] X. D. Song, J. Shi, J. Nolan, B. Swanson, *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 133.
- [42] D. Klostermeier, D. Millar, *Biopolymers* **2002**, *61*, 159.
- [43] A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 94.
- [44] J. Y. Ju, C. C. Ruan, C. W. Fuller, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4347.
- [45] J. Y. Ju, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 246.
- [46] T. Ohmichi, Y. Kawamoto, P. Wu, D. Miyoshi, H. Karimata, N. Sugimoto, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7125.
- [47] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10002.
- [48] O. Piestert, H. Barsch, V. Buschmann, T. Heinlein, J. P. Kneymeyer, K. D. Weston, M. Sauer, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 979.
- [49] H. Du, C. M. Strohsahl, J. Camera, B. L. Miller, T. D. Krauss, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7932.
- [50] A. P. R. Johnston, F. Caruso, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10014.
- [51] J. W. Liu, Y. Lu, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6666.
- [52] I. L. Medintz, E. R. Goldman, M. E. Lassman, J. M. Mauro, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 909.
- [53] A. M. Paradiso, R. Y. Tsien, T. E. Machen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 7436.
- [54] Q. Chang, J. Sipior, J. R. Lakowicz, G. Rao, *Anal. Biochem.* **1995**, *232*, 92.
- [55] J. R. Lakowicz, H. Szmacinski, M. Karakelle, *Anal. Chim. Acta* **1993**, *272*, 179.
- [56] D. V. Roberts, B. P. Wittmershaus, Y. Z. Zhang, S. Swan, M. P. Klinosky, *J. Lumin.* **1998**, *29*, 225.
- [57] S. Niehren, W. Kinzelbach, S. Seeger, J. Wolfrum, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2666.
- [58] J.-S. Hsiao, S. E. Webber, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8289.
- [59] J. Szollosi, S. Damjanovich, L. Matyus, *Cytometry* **1998**, *34*, 159.
- [60] G. Horvath, M. Petras, G. Szentesi, A. Fabian, J. W. Park, G. Vereb, J. Szollosi, *Cytometry Part A* **2005**, *65*, 148.
- [61] E. Zahavi, M. Fisher, A. Bromberg, U. Olshevsky, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 2330.
- [62] K. V. N. Rao, P. W. Stevens, J. G. Hall, V. Lyamichev, B. P. Neri, D. M. Kelso, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e66.
- [63] A. Valanne, H. Lindroos, T. Lovgren, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *539*, 251.
- [64] S. M. Grayson, J. M. J. Frechet, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819.
- [65] C. Gorman, *Nature* **2002**, *415*, 487.
- [66] G. M. Stewart, M. A. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4354.
- [67] A. Andronov, P. R. L. Malenfant, J. M. J. Frechet, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1463.
- [68] T. Gensch, J. Hofkens, A. Herrmann, K. Tsuda, W. Verheijen, T. Vosch, T. Christ, T. Basche, K. Müllen, F. De Schryver, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3970; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3752.
- [69] S. Onclin, J. Huskens, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Small* **2005**, *1*, 852.
- [70] V. Balzani, P. Ceroni, S. Gestermann, M. Gorka, C. Kaufmann, F. Vögtle, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 629.
- [71] V. Vicinelli, P. Ceroni, M. Maestri, V. Balzani, M. Gorka, F. Vögtle, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6461.
- [72] B. R. Kaafarani, B. Wex, F. Wang, O. Catanescu, L. C. Chien, D. C. Neckers, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5377.
- [73] D. Wang, T. Imae, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13204.
- [74] V. Balzani, P. Ceroni, M. Maestri, C. Saudan, V. Vicinelli, *Top. Curr. Chem.* **2003**, *288*, 159.
- [75] V. Balzani, P. Ceroni, M. Maestri, V. Vicinelli, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 657.
- [76] J. M. Serin, D. W. Brousmiche, J. M. J. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11848.
- [77] J. M. Serin, D. W. Brousmiche, J. M. J. Frechet, *Chem. Commun.* **2002**, 2605.
- [78] A. W. Bosman, H. M. Janssen, E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665.
- [79] Y. Kim, S. C. Zimmerman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 733.
- [80] H. Yoo, R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4225.
- [81] H. C. Choi, W. Kim, D. Wang, H. Dai, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 12361.
- [82] K. R. Gopidas, J. K. Whitesell, M. A. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6491.
- [83] P. Chaltin, A. Margineanu, D. Marchand, A. Van Aerschot, J. Rozenski, F. De Schryver, A. Herrmann, K. Müllen, R. L. Juliano, M. H. Fisher, H. Kang, S. De Feyter, P. Herdewijn, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 827.
- [84] J. R. Morgan, M. J. Cloninger, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2002**, *5*, 966.
- [85] U. Boas, P. M. Heegard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43.
- [86] U. Oertel, D. Appelhans, P. Friedel, D. Jehnichen, H. Komber, B. Pilch, B. Hänel, B. Voit, *Langmuir* **2002**, *18*, 105.
- [87] U. Hahn, M. Gorka, F. Vögtle, V. Vicinelli, P. Ceroni, M. Maestri, V. Balzani, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3747; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3595.
- [88] M. Shchepinov, K. U. Mir, J. K. Elder, M. D. Frank-Kamenetskii, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3035.
- [89] M. S. Shchepinov, I. A. Udalova, A. J. Bridgman, E. M. Southern, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4447.
- [90] S. Yamaguchi, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12087.
- [91] S. C. Ng, H. F. Lu, H. S. O. Chan, A. Fujii, T. Laga, K. Yoshino, *Macromolecules* **2001**, *34*, 6895.
- [92] G. Lange, B. Tieke, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 106.
- [93] M. D. Disney, J. Zheng, T. M. Swager, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13343.
- [94] C. Ego, D. Marsitzky, S. Becker, J. Y. Zhang, A. C. Grimsdale, K. Müllen, J. D. MacKenzie, C. Silva, R. H. Friend, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 437.
- [95] M. Wohlgenannt, W. Graupner, F. P. Wenzl, S. Tasch, E. J. W. List, G. Leising, M. Graupner, A. Hermetter, U. Rohr, P. Schlichting, Y. Geerts, U. Scherf, K. Müllen, *Chem. Phys.* **1998**, *227*, 99.
- [96] V. V. Didenko, V. C. Moore, D. S. Baskin, R. E. Smalley, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1563.
- [97] J. S. Yang, T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5321.

- [98] S. A. Kushon, K. D. Ley, K. Bradford, R. M. Jones, D. McBranch, D. Whitten, *Langmuir* **2002**, *18*, 7245.
- [99] S. A. Kushon, K. Bradford, V. Marin, C. Suhrada, B. A. Armistage, D. McBranch, D. Whitten, *Langmuir* **2003**, *19*, 6456.
- [100] S. Kumarasamy, T. Bergstedt, X. B. Shi, F. Rininsland, S. A. Kushon, W. S. Xia, K. D. Ley, K. Achyuthan, D. McBranch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7511.
- [101] S. W. Thomas, J. P. Amara, R. E. Bjork, T. M. Swager, *Chem. Commun.* **2005**, 4572.
- [102] D. T. McQuade, A. E. Pullen, T. M. Swager, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2537.
- [103] C. Fan, S. Wang, J. Hong, G. C. Bazan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6297.
- [104] L. Giordano, T. M. Jovin, M. Irie, E. A. Jares-Erijman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7481.
- [105] J. L. Bahr, G. Kodis, L. de la Garza, S. Lin, A. L. Moore, T. A. Moore, D. Gust, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7124.
- [106] I. L. Medintz, S. A. Trammell, H. Mattoussi, J. M. Mauro, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 30.
- [107] A. Tucks, H. P. Beck, *J. Solid State Chem.* **2005**, *178*, 1145.
- [108] S. Z. Pu, T. S. Yang, J. K. Xu, L. Shen, G. Z. Li, Q. Xiao, B. Chen, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6623.
- [109] R. Matsushima, H. Morikane, Y. Kohno, *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 302.
- [110] A. P. Demchenko, *Ultraviolet Spectroscopy of Proteins*, Springer, New York, **1981**.
- [111] S. J. Nannepaga, R. Gavalapu, D. Velasquez, R. Renthal, *Biochemistry* **2004**, *43*, 550.
- [112] M. A. Talavera, E. M. De La Cruz, *Biochemistry* **2005**, *44*, 959.
- [113] H. E. Townley, R. B. Sessions, A. R. Clarke, T. R. Dafforn, W. T. Griffiths, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2001**, *44*, 329.
- [114] E. Cordat, I. Mus-Veteau, G. Leblanc, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33198.
- [115] J. C. Lee, R. Langen, P. A. Hummel, H. B. Gray, J. R. Winkler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16466.
- [116] M. J. Tucker, R. Oyola, F. Gai, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4788.
- [117] M. Eisenhauer, S. Cattarinussi, A. Kuhn, H. Vogel, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12321.
- [118] H. Y. Shrivastava, B. U. Nair, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 991.
- [119] P. D. J. Moens, M. K. Helms, D. M. Jameson, *Protein J.* **2004**, *23*, 79.
- [120] J. A. Schmid, H. Neumeier, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1149.
- [121] G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11984.
- [122] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 969.
- [123] R. E. Campbell, O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7877.
- [124] J. P. Morseman, M. W. Moss, S. J. Zoha, F. C. T. Allnutt, *Bio-techniques* **1999**, *26*, 559.
- [125] D. Sinnecker, P. Voigt, N. Hellwig, M. Schaefer, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7085.
- [126] A. Miyawaki, O. Griesbeck, R. Heim, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 2135.
- [127] A. Miyawaki, J. Liopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien, *Nature* **1997**, *388*, 882.
- [128] M. Fehr, D. W. Ehrhardt, S. Lalonde, W. B. Frommer, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*, 345.
- [129] M. Fehr, W. B. Frommer, S. Lalonde, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9846.
- [130] M. Fehr, S. Lalonde, I. Lager, M. W. Wolff, W. B. Frommer, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19127.
- [131] K. G. Rice, *Anal. Biochem.* **2001**, *297*, 117.
- [132] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 905.
- [133] N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567.
- [134] A. W. Nguyen, P. S. Daugherty, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 355.
- [135] V. V. Verkhusha, K. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 289.
- [136] E. A. Meighen, *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 123.
- [137] K. V. Wood, *Promega Notes* **1998**, *65*, 14.
- [138] W. W. Lorenz, R. O. McCann, M. Longiaru, M. J. Cormier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 4438.
- [139] J. M. Kendall, M. N. Badminton, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 216.
- [140] A. Roda, M. Guardigli, E. Michelini, M. Mirasoli, P. Pasini, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 462A.
- [141] A. Roda, M. Guardigli, P. Pasini, M. Mirasoli, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 826.
- [142] A. Roda, P. Pasini, M. Mirasoli, E. Michelini, M. Guardigli, *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 295.
- [143] C. Dodeigne, L. Thunus, R. Lejeune, *Talanta* **2000**, *51*, 415.
- [144] Y. Xu, D. W. Piston, C. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 151.
- [145] Y. Xu, A. Kanauchi, A. G. von Arnim, D. W. Piston, C. H. Johnson, *Biophotonics Part A* **2003**, *360*, 289.
- [146] N. Boute, R. Jockers, T. Issad, *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 351.
- [147] N. Boute, K. Pernet, T. Issad, *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 640.
- [148] Y. Ohmiya, T. Hirano, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 333.
- [149] J. G. Morin, J. W. Hastings, *J. Cell. Physiol.* **1971**, *77*, 313.
- [150] „Cell Signaling, Transcription, and Translation as Therapeutic Targets“: T. Issad, N. Boute, K. Pernet, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *973*, 120.
- [151] T. Issad, N. Boute, K. Pernet, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 813.
- [152] L. S. Laursen, C. Oxvig, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1723.
- [153] J. Perroy, S. Pontier, P. G. Charest, M. Aubry, M. Bouvier, *Nat. Methods* **2004**, *1*, 203.
- [154] W. A. Francisco, H. M. Abu-Soud, T. O. Baldwin, F. M. Rauschel, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24734.
- [155] T. O. Baldwin, J. A. Christopher, F. M. Rauschel, J. F. Sinclair, M. M. Ziegler, A. J. Fisher, I. Rayment, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 798.
- [156] J. R. de Wet, K. V. Wood, D. R. Helinski, M. DeLuca, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7870.
- [157] R. L. Airth, W. C. Rhodes, W. D. McElroy, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *27*, 519.
- [158] J. Yang, D. B. Thomason, *Biotechniques* **1993**, *15*, 848.
- [159] Y. Yamakawa, H. Ueda, A. Kitayama, T. Nagamune, *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, *93*, 537.
- [160] R. Arai, H. Nakagawa, A. Kitayama, H. Ueda, T. Nagamune, *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, *94*, 362.
- [161] S. Angers, A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairet, D. Chelsky, M. Dennis, M. Bouvier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3684.
- [162] J. F. Mercier, A. Salahpour, S. Angers, A. Breit, M. Bouvier, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44925.
- [163] Y. Wang, G. Wang, D. J. O’Kane, A. A. Szalay, *Mol. Gen. Genet.* **2001**, *264*, 578.
- [164] S. Inouye, O. Shimomura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *233*, 349.
- [165] C. Wu, H. Nakamura, A. Murai, O. Shimomura, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2997.
- [166] B. J. Bryan, C. S. Szent-Gyorgyi, US Patent 6232107, **2001**.
- [167] M. Verhaegen, T. K. Christopoulos, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4378.
- [168] B. A. Tannous, D. E. Kim, J. L. Fernandez, R. Weissleder, X. O. Breakefield, *Mol. Ther.* **2005**, *11*, 435.
- [169] S. Wiles, K. Ferguson, M. Stefanidou, D. B. Young, B. D. Robertson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3427.

- [170] S. Inouye, K. Watanabe, H. Nakamura, O. Shimomura, *FEBS Lett.* **2000**, *481*, 19.
- [171] A. Chiesa, E. Rapizzi, V. Tosello, P. Pinton, M. De Virgilio, K. E. Fogarty, R. Rizzuto, *Biochem. J.* **2001**, *355*, 1.
- [172] J. Alvarez, M. Montero, *Cell Calcium* **2002**, *32*, 251.
- [173] A. Y. Gorokhovatsky, N. V. Rudenko, V. V. Marchenkov, V. S. Skosyrev, M. A. Arzhanov, N. Burkhardt, M. V. Zakharov, G. V. Semisotnov, L. M. Vinokurov, Y. B. Alakhov, *Anal. Biochem.* **2003**, *313*, 68.
- [174] M. Adamczyk, J. A. Moore, K. Shreder, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1797.
- [175] L. J. Kricka, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500*, 279.
- [176] Y. M. Liu, J. K. Cheng, *J. Chromatogr. A* **2002**, *959*, 1.
- [177] I. Weeks, M. L. Sturgess, J. S. Woodhead, *Clin. Sci.* **1986**, *70*, 403.
- [178] M. L. Grayeski, P. A. Moritzen, *Langmuir* **1997**, *13*, 2675.
- [179] E. J. Williams, A. K. Campbell, *Anal. Biochem.* **1986**, *155*, 249.
- [180] A. K. Campbell, A. Patel, *Biochem. J.* **1983**, *216*, 185.
- [181] A. Patel, A. K. Campbell, *Clin. Chem.* **1983**, *29*, 1604.
- [182] A. Patel, C. J. Davies, A. K. Campbell, F. McCapra, *Anal. Biochem.* **1983**, *129*, 162.
- [183] I. Durrant, *Methods Mol. Biol.* **1994**, *31*, 147.
- [184] G. Messeri, A. Orlandini, M. Pazzagli, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, *4*, 154.
- [185] S. J. Richards, F. S. Wusteman, *J. Biolumin. Chemilumin.* **1989**, *3*, 175.
- [186] P. M. Easton, A. C. Simmonds, A. Rakishev, A. M. Egorov, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6619.
- [187] A. N. Diaz, F. G. Sanchez, J. A. G. Garcia, *Anal. Chim. Acta* **1996**, *327*, 161.
- [188] H. Akhavan-Tafti, R. de Silva, R. A. Eickholt, R. S. Handley, M. Mazelis, M. Sandison, *Talanta* **2003**, *60*, 345.
- [189] H. Akhavan-Tafti, R. DeSilva, Z. Arghavani, R. A. Eickholt, R. S. Handley, B. A. Schoenfelter, K. Sugioka, Y. Sugioka, A. P. Schaap, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 930.
- [190] A. M. Osman, G. Zomer, C. Laane, R. Hilhorst, *Luminescence* **2000**, *15*, 189.
- [191] S. Beck, H. Koster, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2258.
- [192] A. P. Schaap, H. Akhavan-Tafti, L. J. Romano, *Clin. Chem.* **1989**, *35*, 1863.
- [193] P. R. Selvin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, *31*, 275.
- [194] C. X. Sun, J. H. Yang, L. Li, X. Wu, Y. Liu, S. F. Liu, *J. Chromatogr. B* **2004**, *803*, 173.
- [195] C. F. W. Becker, D. Clayton, G. Shapovalov, H. A. Lester, G. G. Kochendoerfer, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1118.
- [196] H. K. Lee, H. Cao, T. M. Rana, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 279.
- [197] P. R. Selvin, J. E. Hearst, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10024.
- [198] M. Gabourdes, V. Bourgine, G. Mathis, H. Bazin, W. Alpha-Bazin, *Anal. Biochem.* **2004**, *333*, 105.
- [199] J. Karvinen, V. Laitala, M. L. Mäkinen, O. Mulari, J. Tamminen, J. Hermonen, P. Hurskainen, I. Hemmila, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1429.
- [200] V. Bergendahl, T. Heyduk, R. R. Burgess, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1492.
- [201] T. Pulli, M. Hoyhtya, H. Soderlund, K. Takkinen, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2637.
- [202] Q. P. Qin, O. Peltola, K. Pettersson, *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1105.
- [203] A. Tsourkas, M. A. Behlke, Y. Q. Xu, G. Bao, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3697.
- [204] S. Sueda, J. L. Yuan, K. Matsumoto, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 200.
- [205] X. D. Chen, X. B. Wang, L. Liu, D. C. Yang, L. Fan, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 144.
- [206] T. Heyduk, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 292.
- [207] D. J. Posson, P. H. Ge, C. Miller, F. Bezanilla, P. R. Selvin, *Nature* **2005**, *436*, 848.
- [208] E. Terpetschnig, H. Szmacinski, H. Malak, J. R. Lakowicz, *Biophys. J.* **1995**, *68*, 342.
- [209] H. J. Youn, E. Terpetschnig, H. Szmacinski, J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.* **1995**, *232*, 24.
- [210] C. von Bultzingslowen, A. K. McEvoy, C. McDonagh, B. D. MacCraith, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *480*, 275.
- [211] X. D. Ge, L. Tolosa, G. Rao, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2004**, *227*, U128.
- [212] M. C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293.
- [213] E. Dulkeith, M. Ringler, T. A. Klar, J. Feldmann, A. M. Javier, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 585.
- [214] B. Dubertret, M. Calame, A. J. Libchaber, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 680.
- [215] D. J. Maxwell, J. R. Taylor, S. M. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9606.
- [216] H. Du, M. D. Disney, B. L. Miller, T. D. Krauss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4012.
- [217] M. Seidel, D. M. Dankbar, G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 904.
- [218] L. Dyadyusha, H. Yin, S. Jaiswal, T. Brown, J. J. Baumberg, F. P. Booy, T. Melvin, *Chem. Commun.* **2005**, 3201.
- [219] Z. Gueroui, A. Libchaber, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 166108.
- [220] R. Wargnier, A. V. Baranov, V. G. Maslov, V. Stsiapura, M. Artemyev, M. Pluot, A. Sukhanova, I. Nabiev, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 451.
- [221] E. Oh, M. Y. Hong, D. Lee, S. H. Nam, H. C. Yoon, H. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3270.
- [222] T. H. Lee, J. I. Gonzales, J. Zheng, R. M. Dickson, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 534.
- [223] J. Zheng, C. W. Zhang, R. M. Dickson, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 077402.
- [224] J. Zheng, J. T. Petty, R. M. Dickson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7780.
- [225] J. Zheng, R. M. Dickson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13982.
- [226] L. A. Peyser, A. E. Vinson, A. P. Bartko, R. M. Dickson, *Science* **2001**, *291*, 103.
- [227] C. Burda, X. B. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1025.
- [228] A. Maali, T. Cardinal, M. Treguer-Delapierre, *Phys. E* **2003**, *17*, 559.
- [229] J. T. Petty, J. Zheng, N. V. Hud, R. M. Dickson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5207.
- [230] D. D. Evanoff, G. Chumanov, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 1221.
- [231] C. Felix, C. Sieber, W. Harbich, J. Buttet, I. Rabin, W. Schulze, G. Ertl, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *313*, 105.
- [232] C. Felix, C. Sieber, W. Harbich, J. Buttet, I. Rabin, W. Schulze, G. Ertl, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 2992.
- [233] J. P. Gao, J. Fu, C. K. Lin, J. Lin, Y. C. Han, X. Yu, C. Y. Pan, *Langmuir* **2004**, *20*, 9775.
- [234] R. A. Ganeev, A. I. Ryasnyansky, A. L. Stepanov, T. Usmanov, *Phys. Solid State* **2004**, *46*, 351.
- [235] H. H. Huang, F. Q. Yan, Y. M. Kek, C. H. Chew, G. Q. Xu, W. Ji, P. S. Oh, S. H. Tang, *Langmuir* **1997**, *13*, 172.
- [236] N. A. Dhas, C. P. Raj, A. Gedanken, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 1446.
- [237] G. Belomoin, J. Therrien, M. Nayfeh, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 779.
- [238] G. Belomoin, J. Therrien, A. Smith, S. Rao, R. Twesten, S. Chaieb, M. H. Nayfeh, L. Wagner, L. Mitas, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 841.
- [239] V. Kapaklis, C. Politis, P. Poulopoulos, P. Schweiss, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *87*.
- [240] S. Prusty, H. S. Mavi, A. K. Shukla, *Phys. Rev. B* **2005**, *71*.
- [241] L. Wang, V. Reipa, J. Blasic, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 409.
- [242] D. P. Singh, A. K. Singh, N. Srivastava, *Indian J. Sci. Ind. Sect. A* **2004**, *78*, 197.
- [243] Z. F. Li, E. Ruckenstein, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1463.

- [244] X. G. Li, Y. Q. He, S. S. Talukdar, M. T. Swihart, *Langmuir* **2003**, *19*, 8490.
- [245] J. Zou, R. K. Baldwin, K. A. Pettigrew, S. M. Kauzlarich, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1181.
- [246] H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, U. Wiesner, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 113.
- [247] H. G. Craighead, A. M. Glass, *Opt. Lett.* **1981**, *6*, 248.
- [248] I. Cohanoschi, F. E. Hernandez, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14506.
- [249] K. Aslan, I. Gryczynski, J. Malicka, E. Matveeva, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 55.
- [250] K. Aslan, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 926.
- [251] D. S. Wang, M. Kerker, *Phys. Rev. B* **1982**, *25*, 2433.
- [252] O. Stranik, H. M. McEvoy, C. McDonagh, B. D. MacCraith, *Sens. Actuators B* **2005**, *107*, 148.
- [253] J. Zhang, J. R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 8701.
- [254] J. Zhang, J. Malicka, I. Gryczynski, J. R. Lakowicz, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 7643.
- [255] J. Lukomska, J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Leonenko, J. R. Lakowicz, *Biopolymers* **2005**, *77*, 31.
- [256] J. Malicka, I. Gryczynski, J. Y. Fang, J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.* **2003**, *317*, 136.
- [257] J. Malicka, I. Gryczynski, C. D. Geddes, J. R. Lakowicz, *J. Biomed. Opt.* **2003**, *8*, 472.
- [258] J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, J. R. Lakowicz, *Bioophys. J.* **2003**, *84*, 290 A.
- [259] J. R. Lakowicz, J. Malicka, I. Gryczynski, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *77*, 604.
- [260] J. Malicka, I. Gryczynski, J. Fang, J. Kusba, J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.* **2003**, *315*, 160.
- [261] M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013.
- [262] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016.
- [263] I. Medintz, H. Uyeda, E. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435.
- [264] C. J. Murphy, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 520A.
- [265] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538.
- [266] P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 47.
- [267] W. J. Parak, D. Gerion, T. Pellegrino, D. Zanchet, C. Micheel, S. C. Williams, R. Boudreau, M. A. Le Gros, C. A. Larabell, A. P. Alivisatos, *Nanotechnology* **2003**, *14*, R15.
- [268] W. J. Parak, T. Pellegrino, C. Plank, *Nanotechnology* **2005**, *16*, R9.
- [269] C. A. Leatherdale, W. K. Woo, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7619.
- [270] B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 9463.
- [271] A. R. Clapp, I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 301.
- [272] H. Mattoussi, K. Kuno, E. R. Goldman, G. P. Anderson, J. M. Mauro in *Optical Biosensors: Present and Future* (Hrsg.: F. S. Ligler, C. A. Rowe Tait), Elsevier, San Diego, **2002**, S. 537.
- [273] M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468.
- [274] Z. A. Peng, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 183.
- [275] F. Pinaud, D. King, H.-P. Moore, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6115.
- [276] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142.
- [277] A. R. Clapp, L. I. Medintz, R. B. Fisher, G. P. Anderson, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1242.
- [278] E. Goldman, I. Medintz, J. Whitley, A. Hayhurst, A. Clapp, H. Uyeda, J. Deschamps, M. Lassman, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6744.
- [279] K. E. Sapsford, I. L. Medintz, J. P. Golden, J. R. Deschamps, H. T. Uyeda, H. Mattoussi, *Langmuir* **2004**, *20*, 7720.
- [280] I. L. Medintz, A. R. Clapp, J. S. Melinger, J. R. Deschamps, H. Mattoussi, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2450.
- [281] I. L. Medintz, J. H. Konnert, A. R. Clapp, I. M. Stanish, M. E. Twigg, H. Mattoussi, J. M. Matthew, J. R. Deschamps, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9612.
- [282] F. Patolsky, R. Gill, Y. Weizmann, T. Mokari, U. Banin, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13918.
- [283] J. H. Kim, D. Morikis, M. Ozkan, *Sens. Actuators B* **2004**, *102*, 315.
- [284] J. A. Kloepfer, N. Cohen, J. L. Nadeau, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 17042.
- [285] A. C. S. Samia, X. Chen, C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15736.
- [286] R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, M. Ishikawa, Y. Baba, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1360.
- [287] A. N. Glazer, *J. Appl. Physcol.* **1994**, *6*, 105.
- [288] A. N. Glazer, *Methods Enzymol.* **1988**, *167*, 291.
- [289] A. N. Glazer, J. H. Clark, *Biophys. J.* **1986**, *49*, 115.
- [290] A. N. Glazer, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1985**, *14*, 47.
- [291] D. J. Lundell, R. C. Williams, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 3580.
- [292] A. N. Glazer, L. Stryer, *Biophys. J.* **1983**, *43*, 383.
- [293] A. N. Glazer, L. Stryer, *Trends Biochem. Sci.* **1984**, *9*, 323.
- [294] Y. Ohya, K. Yabuki, M. Hashimoto, A. Nakajima, T. Ouchi, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1057.
- [295] A. K. Tong, J. Y. Ju, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*.
- [296] A. K. Tong, Z. M. Li, G. S. Jones, J. J. Russo, J. Y. Ju, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 756.
- [297] G. F. Schröder, H. Grubmüller, *Comp. Phys. Commun.* **2004**, *158*, 150.
- [298] S. Kawahara, T. Uchimaru, S. Murata, *Chem. Commun.* **1999**, *563*.
- [299] S. C. Hung, R. A. Mathies, A. N. Glazer, *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 78.
- [300] S. C. Hung, R. A. Mathies, A. N. Glazer, *Anal. Biochem.* **1998**, *255*, 32.
- [301] W. Erker, R. Hubler, H. Decker, *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **2004**, *33*, 386.
- [302] D. Klostermeier, P. Sears, C. H. Wong, D. P. Millar, J. R. Williamson, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2707.
- [303] L. Wang, W. Tan, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 84.
- [304] C. S. Yun, A. Javier, T. Jennings, M. Fisher, S. Hira, S. Peterson, B. Hopkins, N. O. Reich, G. F. Strouse, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3115.
- [305] C. Sonnichsen, B. J. Reinhard, J. Liphardt, A. P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 741.
- [306] L. J. Kricka, *Ann. Clin. Biochem.* **2002**, *39*, 114.
- [307] I. G. Gut, *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 475.
- [308] I. Kheterpal, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 31A.
- [309] C. S. Lim, J. N. Miller, J. W. Bridges, *Anal. Chim. Acta* **1980**, *114*, 183.
- [310] P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2698; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2642.
- [311] S. Weiss, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 724.
- [312] M. K. So, C. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, J. Rao, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 339.
- [313] C. Hippius, F. Schlosser, M. O. Vysotsky, V. Böhmer, F. Würthner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3870.
- [314] A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. T. Uyeda, B. R. Fisher, E. R. Goldman, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18212.
- [315] K. D. Pfleger, K. A. Eidne, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 165.