

### 3 Experimente und Ergebnisse

Um Aussagen über Peptid-gekoppelte Farbstoffe an Oberflächen treffen zu können, wurden spektroskopische Messungen der Farbstoffe und Farbstoff-Peptide in Lösung (Ensemble-Messungen) und an Glasoberflächen vorgenommen.

#### 3.1 Ensemble-Messungen in Lösung

Um die Lebensdauern der frei beweglichen Farbstoffe und Farbstoff-Peptide zu erhalten, wurden deren Lösungen in Wasser/Acetonitril und reinem Acetonitril im Konzentrationsbereich von  $10^{-6}$ ... $10^{-7}$  M mit dem Fluoreszenz-Spektrometer IBH gemessen.

Substanz	molare Masse M	Absorptionsmaximum		Konz. c	Fluoreszenz-/Emissionsmaximum			Fluoreszenz-Lebensdauer	
	[g/mol]	$\lambda$ [nm]	OD <sup>(c)</sup>	[ $10^{-6}$ M]	$\lambda$ [nm]	FI <sup>(a)</sup>	norm. FI <sup>(b)</sup>	$\tau_1$ [ns]	$\tau_2$ [ns]
MR121-NHS	503,570	649	0,0562	0,562	663	857,9	1526,5	4,4	-
Cy5-NHS	752,876	652	0,1191	0,476	670	13,8	29,0	0,2	0,9 <sup>(*)</sup>
ATTO650-NHS	652,759	652	0,0174	0,174	669	213,6	1227,6	4,3	-
JF9a-NHS	778,741	620	0,0100	0,100	647	107,4	1074,0	4,5	-
TMR-ITC	444,527	550	0,0076	0,076	574	46,7	614,5	2,1	-
TMR-CS-NHS (5)	528,533	554	0,0399	0,399	582	417,7	1046,9	2,2	-
TMR-CS-NHS (6)	528,533	557	0,0291	0,291	588	263,3	904,8	2,3	-
Malachitgrün-ITC	386,534	580	0,0367	0,367	-	-	-	-	-

<sup>(a)</sup> Fluoreszenzintensität;

<sup>(b)</sup> normierte Fluoreszenzintensität = Fluoreszenzintensität / gemessenes Absorptionsmaximum (OD)

<sup>(c)</sup> gemessene „optische Dichte“

Tabelle 3.1-1: Übersicht zu Absorptions- und Emissionsmaxima sowie Lebensdauern und Fluoreszenz-Intensitäten der gemessenen Fluoreszenz-Farbstoffe in Acetonitril.

<sup>(\*)</sup>  $A = -0,081$ ;  $B_{\tau_1} = 0,063$ ;  $B_{\tau_2} = 0,090$

Hier wurden die Aktiv-Ester der um 650 nm absorbierenden Farbstoffe MR121, Cy5, ATTO650 und JF9a sowie der um 560 nm absorbierenden Farbstoffe TMR, TMR-Carbonsäure (5- und 6-Isomer) und Malachitgrün hinsichtlich ihrer spektroskopischen Daten vermessen. Malachitgrün zeigt im Vergleich zu den anderen Farbstoffen praktisch keine Fluoreszenz, so dass nur Absorptionsdaten erhalten werden konnten und sich dieser Farbstoff damit nicht für weitere Versuche eignete.

In der Tabelle sieht man die Absorptionsdaten, die mit dem UV/Vis-Spektrometer Carey 500 Scan erhalten wurden, wie die Wellenlänge des Absorptionsmaximums ( $\lambda_{\text{Abs}}$ ) sowie die relative Absorption der gemessenen Lösung (OD) mit der daraus berechneten Konzentration der Lösung (c). Hierfür können in sehr guter Näherung die Extinktionskoeffizienten für alle Rhodamin- und Oxazin-Farbstoffe  $\epsilon = 10^5 \text{ M cm}^{-1}$  und für den Carbocyanin-Farbstoff Cy5  $\epsilon = 2,5 \times 10^5 \text{ M cm}^{-1}$  verwendet werden:

$$c = \frac{OD}{\epsilon d}$$

mit der Schichtdicke d, die aufgrund der Küvetten-Dimension stets 1 cm

beträgt. Daher kann man meist 0,1 OD mit 1  $\mu\text{M}$  abschätzen.

Die Daten der Wellenlängen der Fluoreszenzmaxima ( $\lambda_{\text{Em}}$ ) sowie die Fluoreszenz-Intensitäten (FI) wurden mit dem Fluoreszenz-Spektrometer LS 100 gemessen. Da die Fluoreszenz-Intensität ein Maß für die Stärke der Fluoreszenz und damit Konzentrations-abhängig ist, wurde als Vergleichswert die auf die Konzentration

normierte Fluoreszenz-Intensität errechnet:  $norm. FI = \frac{FI}{c}$

Der Cyanin-Farbstoff hat zwar eine im Vergleich zu Rhodamin- und Oxazin-Farbstoffen 2,5-fach höhere Absorptionsstärke, die normierte Fluoreszenz-Intensität zeigt jedoch eine etwa 20...50mal geringere Fluoreszenz als die verwendeten Rhodamin- und Oxazin-Farbstoffe.

Die Stokes-Verschiebungen der Fluoreszenz-Maxima zu den Absorptions-Maxima liegen zwischen 14 und 31 nm für MR121 bzw. TMR-CS (6-Isomer).

Die Fluoreszenzlebensdauern wurden mit dem Fluoreszenz-Spektrometer IBH gemessen. Mit monoexponentieller Anpassung der Lebensdauern wurden hinreichende Genauigkeiten erreicht, wie anhand der  $\chi^2 = 0,99...1,43$  erkennbar war. Lediglich die Lebensdauern von Cy5-NHS und ATTO650-NHS konnte man etwas besser mittels biexponentieller Anpassung darstellen.

### 3.2 Kovalent gekoppelte Farbstoffe auf Deckgläschen

Um Aussagen über Änderungen in den spektroskopischen Eigenschaften der kovalent an Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe und Farbstoff-Peptide treffen zu können, wurden die beschichteten Deckgläschen mittels zeitaufgelöster Einzel-molekül-Spektroskopie (siehe 2.2.4) abgetastet und die Intensitäts- und Lebensdauer-Daten als zweidimensionales Bild dargestellt, wobei ein Bildpixel  $50 \text{ nm} \times 50 \text{ nm}$  entspricht. Standardmäßig wurden Scannbereiche von  $10 \text{ }\mu\text{m} \times 10 \text{ }\mu\text{m}$ , bisweilen auch  $20 \text{ }\mu\text{m} \times 20 \text{ }\mu\text{m}$  untersucht.

Die Detektions-Effizienz dieses konfokalen Aufbaus liegt bei etwa 10% für trockene Glasoberflächen [Heilemann 2001].

Die resultierenden Abbildungen ermöglichen Aussagen zur Bedeckungsdichte mit fluoreszierenden Molekülen sowie deren Intensitäts- und Lebensdauer-Verteilungen.

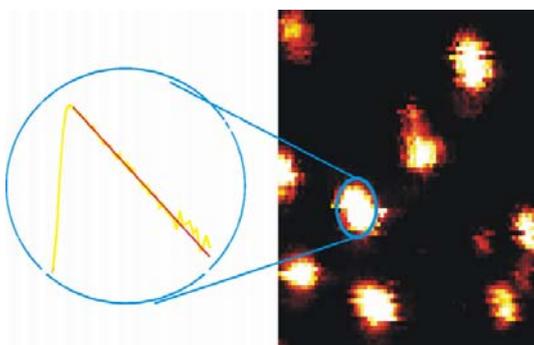


Abbildung 3.2-1: Intensitätsbild einer Glasoberfläche mit Fluoreszenz-Spots eines Farbstoffs und schematische Darstellung der daraus erhältlichen Fluoreszenzlebensdauer (Abklingkurve).

Die beiden folgenden Bilder sind typische Beispiele für Intensitäts-Abbildungen der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffe Cy5 und MR121.

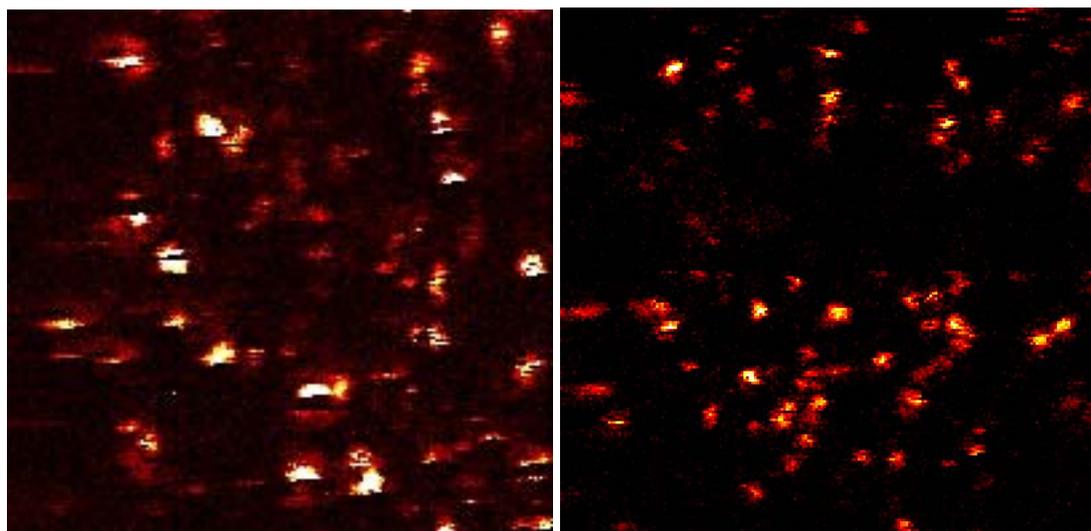


Abbildung 3.2-2: Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121.

Es zeigte sich, dass trotz gleicher Präparation der Oberflächen der Bedeckungsgrad recht unterschiedlich und nicht proportional zur verwendeten Lösungskonzentration (LK) ist. Es wurden Moleküldichten (MD) von  $0,26 \dots 0,83 \mu\text{m}^{-2}$  mit durchschnittlich  $0,54 \mu\text{m}^{-2}$  für Cy5 und Dichten von  $0,21 \dots 1,60 \mu\text{m}^{-2}$  mit durchschnittlich  $0,66 \mu\text{m}^{-2}$  für MR121 gefunden. Diese entsprechen Verhältnissen von  $\text{MD} : \text{LK} = 56 \dots 2600 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  für Cy5 bzw.  $5 \dots 600 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  für MR121 im Vergleich zu den verwendeten Lösungs-Konzentrationen (LK), wodurch die großen Unterschiede in den Präparationsresultaten sichtbar werden. Man muss jedoch beachten, dass die ausgewerteten Scannflächen willkürlich ausgewählte Bereiche der Oberflächen sind, von denen anzunehmen war, dass sie gute Belegungsdichten hatten.

In den Intensitätsbildern erkennt man deutlich Unterbrechungen in den Fluoreszenz-Spots. Befinden sich diese innerhalb eines Fluoreszenz-Bereiches, handelt es sich um sogenanntes „Blinken“. Die Intensität der Unterbrechungsbereiche kann entweder bis zum Hintergrundrauschen absinken oder nur viel dunkler erscheinen. Im ersten Fall spricht man vom „off-Zustand“, im zweiten vom „dim-Zustand“. Desweiteren findet man Fluoreszenz-Bereiche, die abrupt aufhören zu fluoreszieren. In diesem Fall handelt es sich um Photo-Zerstörung. Das Molekül wurde durch das Laserlicht angeregt und chemisch so verändert, dass das Chromophorgerüst zerstört wurde. Das ist ein allgemein akzeptierter Beweis für die Beobachtung einzelner Chromophor-Moleküle.

Mithilfe des Computer-Programms DaVis können die Fluoreszenz-Bereiche hervorgehoben und der Hintergrund ausgeblendet werden. Die ausgeblendeten

Hintergrundintensitäten („background“) liegen für alle ausgewerteten Messungen zwischen 10 und 60 counts, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 100...1000 counts je nach Messung. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 6...1 : 33. Die Daten der Intensitäten bzw. Lebensdauern der einzelnen abgebildeten, fluoreszierenden Moleküle werden durch Farbabstufungen von dunkelblau über hellblau, grün und gelb bis rot veranschaulicht.

Die beiden Beispielbilder zeigen obige Intensitätsbilder mit count-Skalen in DaVis. Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten liegen für die folgenden beiden Bilder unter 30 counts für Cy5 und 25 counts für MR121, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 900 counts für Cy5 und 200 counts für MR121. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 10 bzw. 1 : 8.

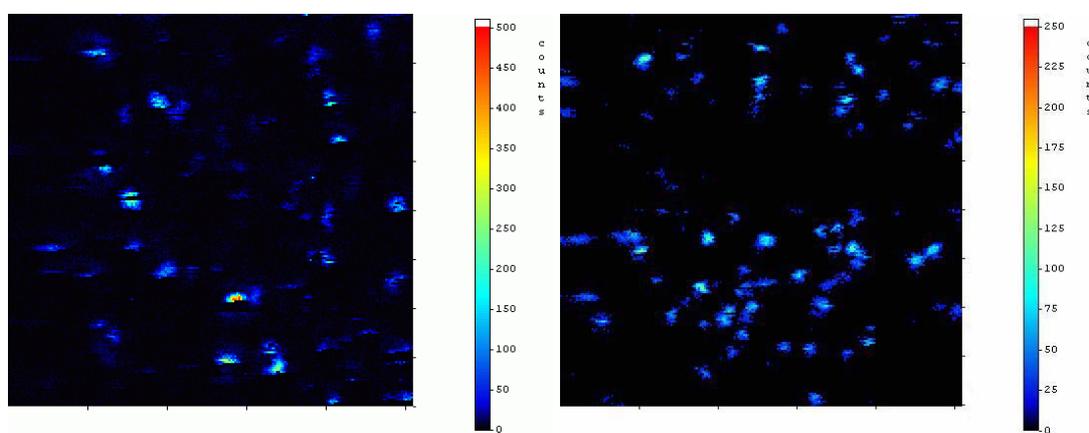


Abbildung 3.2-3: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121.

Die zugehörigen, Hintergrund-ausgeblendeten Lebensdauerbilder zeigen sehr gut die typischen Lebensdauer-Bereiche der Fluoreszenz-Farbstoffe Cy5, kovalent gebunden auf Glasoberflächen, von 1,45 ns bis 2,26 ns mit durchschnittlich 2,05 ns in fünf exemplarischen Messungen und den Bereich für MR121 von 3,36 ns bis 3,91 ns, durchschnittlich 3,68 ns in zehn Messungen.

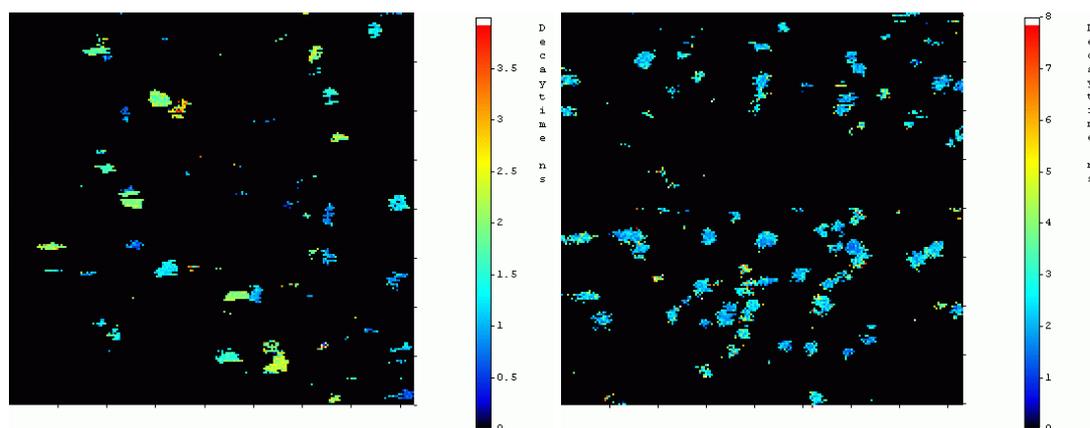


Abbildung 3.2-4: Lebensdauerbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121.

Man sieht hier sehr deutlich, dass der Carbocyanin-Farbstoff Cy5 kurze Lebensdauern um  $\tau = 2,0$  ns und der Oxazin-Farbstoff Lebensdauern um  $\tau = 3,7$  ns bei kovalenter Bindung auf Glasoberflächen besitzt.

Auf diese Proben wurden jeweils 100  $\mu$ l einer Flüssigkeit, die die Molekülketten, die im trockenen Zustand in der Regel flach auf der Glasoberfläche liegen, von dieser löst, ihnen zusätzliche Bewegungsfreiheitsgrade und Deaktivierungskanäle ermöglicht und dadurch die Lebensdauern der Farbstoffe verändert, zugegeben. Der Femtotip-Puffer, der aus Tris-Borat-Puffer (20 mM in H<sub>2</sub>O; pH 8,4), 30% Glycerol, 3% PVP K90 und 0,1% Tween 20 besteht, löst durch seine oberflächenaktiven Tensid-Bestandteile effektiv Moleküle von Oberflächen, vermindert die Diffusion der zu beobachtenden Moleküle durch seine Viskosität und löst dennoch wasserlösliche Substanzen durch seinen hydrophilen Charakter. Diese Flüssigkeit wurde in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich zur Trennung von Tetramethylrhodaminthiohydantoin-Aminosäuren mittels Kapillargelelektrophorese [Neuweiler 1998] sowie als fließendes Medium zur Einzelmolekülspektroskopie in Femtotip<sup>®</sup>-Spitzen angewandt, woher auch die Bezeichnung stammt.

Durch diese Mobilisierung würden sich nicht kovalent gekoppelte, also adsorbierte Farbstoff-Moleküle wegbewegen, was in den Intensitätsbildern sichtbar wäre. Als exemplarisches Beispiel sieht man hier den Farbstoff JF9 adsorbtiv auf einer Glasoberfläche, trocken bzw. unter einem Wassertropfen. Auf trockener Oberfläche sieht man sehr deutlich die Fluoreszenz-Signale, unter Flüssigkeit nimmt trotz 5-facher Anregungs-Intensität die Detektionseffizienz stark ab (2...3%). Außerdem sieht man, dass die meisten Moleküle so beweglich sind, dass man keine fixierten, runden Fluoreszenz-Spots mehr erhält [Heilemann 2001].

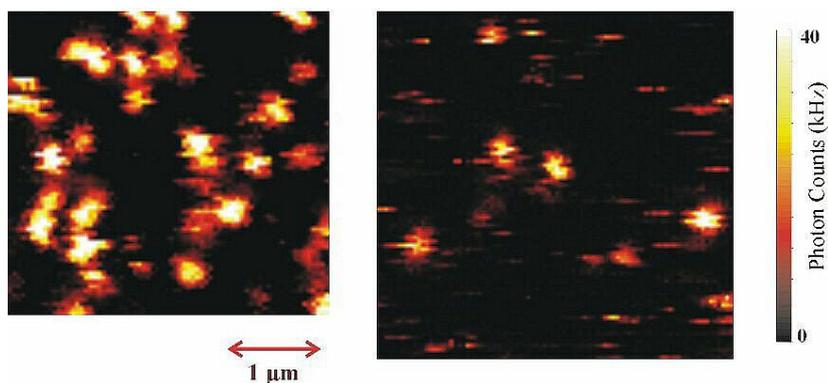


Abbildung 3.2-5: adsorptiv gebundener Rhodamin-Farbstoff JF9 auf Glasoberfläche, links: trocken, rechts: unter Wassertropfen.

Allerdings war es nicht möglich, vor allem aufgrund der oft schlechten Detektionseffizienz, für alle Proben mit FTP Intensitätsbilder zu erhalten. Diese Bilder sind durch die Flüssigkeit unschärfer als die Bilder der trockenen Proben; die Signale sind weniger intensiv und der Hintergrund leuchtet stärker.

Man findet auswertbare Belegungsdichten von  $0,14 \dots 1,03 \mu\text{m}^{-2}$  mit durchschnittlich  $0,34 \mu\text{m}^{-2}$  für Cy5 und  $0,08 \dots 0,60 \mu\text{m}^{-2}$  mit durchschnittlich  $0,32 \mu\text{m}^{-2}$  für MR121 unter FTP. Diese entsprechen Verhältnissen von  $\text{MD} : \text{LK} = 2 \dots 2100 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  für Cy5 und  $1 \dots 270 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  für MR121.

Die folgenden Bilder zeigen solche Scannflächen für Cy5 und MR121 nach Zugabe von FTP.

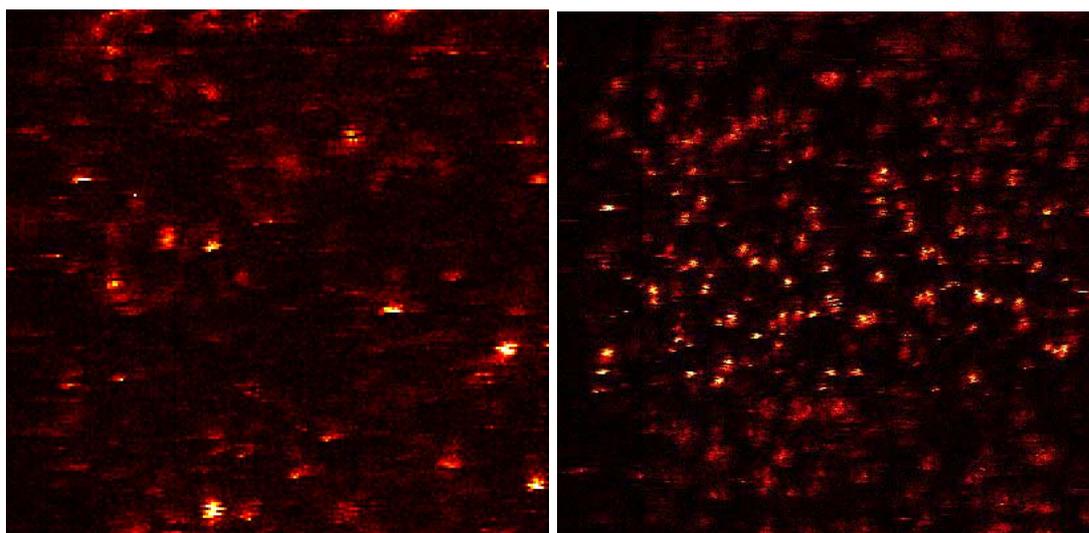


Abbildung 3.2-6: Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121 nach Zugabe von FTP.

(Cy5-Bild:  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ ; MR121-Bild:  $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ )

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten liegen für die folgenden beiden Bilder unter 30 counts für Cy5 und 15 counts für MR121, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 300 counts für Cy5 und 150 counts für MR121, jeweils unter FTP. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von jeweils 1 : 10.

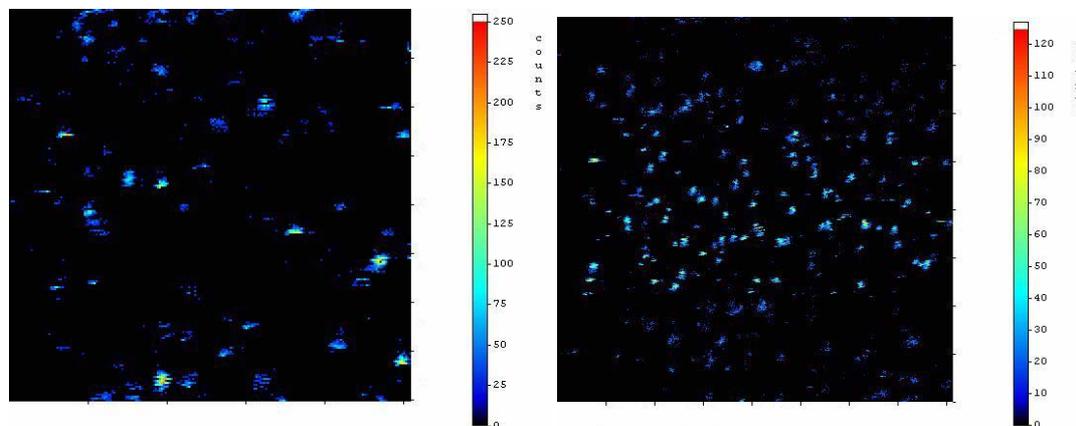


Abbildung 3.2-7: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121 nach Zugabe von FTP. (Cy5-Bild: 10  $\mu\text{m}$   $\times$  10  $\mu\text{m}$ ; MR121-Bild: 20  $\mu\text{m}$   $\times$  20  $\mu\text{m}$ )

Die Lebensdauern für kovalent auf Glasoberflächen gekoppeltes Cy5 unter FTP beträgt durchschnittlich  $\tau = 2,15$  ns im Bereich von 1,91 ns bis 2,65 ns bei sieben Messungen. Für MR121 findet man durchschnittliche Lebensdauern von  $\tau = 3,06$  ns im Bereich 2,54 ns bis 3,34 ns in drei Messungen.

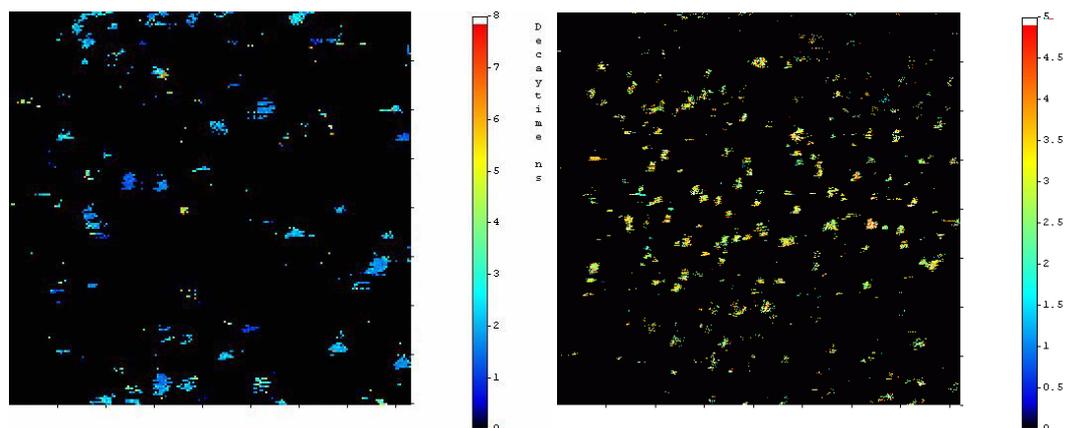


Abbildung 3.2-8: Lebensdauerbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121 nach Zugabe von FTP.

Wenn man beide Farbstoffe, Cy5 und MR121, gemeinsam auf die Glasoberfläche bindet, sind die Belegung und die Anteile beider Farbstoff noch schwieriger vorauszusagen. So findet man Belegungsdichten von  $0,16...0,66 \mu\text{m}^{-1}$  mit durchschnittlich  $0,45 \mu\text{m}^{-1}$  und Dichte-zu-Konzentration-Verhältnisse von  $\text{MD} : \text{LK} = 15...600 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ .

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten des DaVis-Bildes liegen für das rechte der folgenden beiden Bilder unter 30 counts für Cy5 und MR121 zusammen, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 1000 counts. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 33.

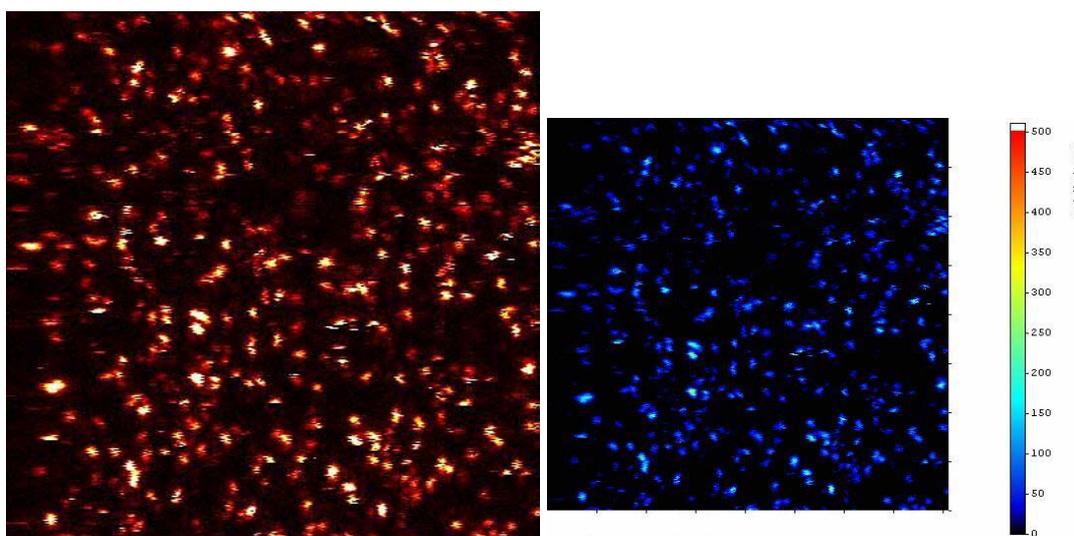


Abbildung 3.2-9: Intensitätsbilder beider kovalent auf Glasoberflächen gekoppelter Farbstoffe Cy5 und MR121 ( $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ ); links: Intensitätsbild der Rohdaten aus MultiFluorImage; rechts: Hintergrund-korrigiertes Bild aus DaVis.

Der Durchschnitt der gemessenen Lebensdauern mit  $2,97 \text{ ns}$  spiegelt sehr gut die Anteile der beiden Farbstoffe wider, wobei ein Bereich von  $2,47...3,61 \text{ ns}$  in sieben Messungen gefunden wurde.

Die folgende Tabelle fasst die bisherigen Durchschnittswerte für die Lebensdauern der reinen, auf Glas gebundenen Farbstoffe Cy5 und MR121 noch einmal zusammen.

$\tau_g$ (MW <sup>(a)</sup> )	Lösung/Ensemble		Oberfläche		
	[ns]	(H <sub>2</sub> O/MeCN 1:1)	(MeCN)	trocken	FTP <sup>(b)</sup>
Cy5		1,0	1,0	2,0	2,2
Cy5/MR121		-	-	3,0	-
MR121		2,9	4,4	3,7	3,1

<sup>(a)</sup> MW: Mittelwert; <sup>(b)</sup> „Femtotip-Puffer“

Tabelle 3.2-1: durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_g$  der Farbstoffe Cy5 und MR121 in Lösung (Ensemble-Messung) sowie auf Glasoberfläche, trocken und unter FTP-Lösung.

### 3.3 Kovalent gekoppelte Farbstoff-Peptide auf Deckgläschen

Das Modellpeptid Uni370 enthält ein Tryptophan (Trp) als vierte Aminosäure, gezählt vom N-Terminus. Dieser Tryptophan-Rest kann Fluoreszenz-Farbstoffe löschen. Das Peptid Uni371 enthält anstelle des Tryptophan einen Phenylalanin-Rest (Phe), weshalb die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe praktisch nicht beeinflusst werden sollten.

Für das Cy5- bzw. MR121-markierte Modellpeptid Uni370 zeigen die beiden folgenden Abbildungen typische Intensitätsbilder der abgetasteten Glasoberflächen:

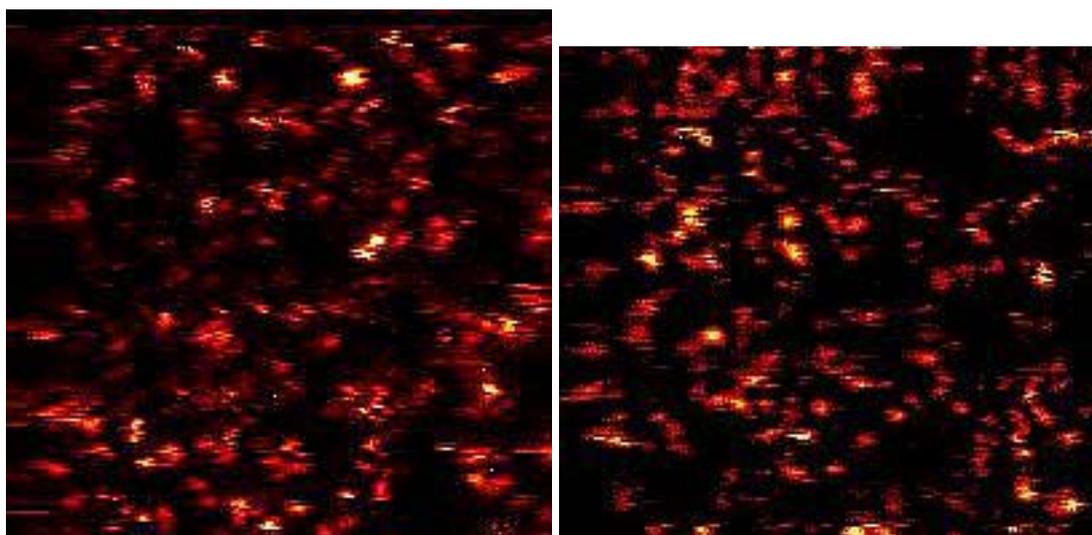


Abbildung 3.3-1: Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121.

(Cy5-Bild: 10  $\mu\text{m}$   $\times$  10  $\mu\text{m}$ ; MR121-Bild: 10  $\mu\text{m}$   $\times$  9,5  $\mu\text{m}$ )

Hier findet man Belegungsdichten von  $0,43 \dots 1,34 \mu\text{m}^{-1}$  mit durchschnittlich  $0,85 \mu\text{m}^{-1}$  und Dichte-zu-Konzentration-Verhältnisse von  $\text{MD} : \text{LK} = 79 \dots 430 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  für das Cy5-markierte Modellpeptid Uni370-Cy5. Für Uni370-MR121 findet man Belegungsdichten von  $0,23 \dots 1,07 \mu\text{m}^{-1}$  mit durchschnittlich  $0,68 \mu\text{m}^{-1}$  bzw.  $\text{MD} : \text{LK} = 75 \dots 467 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ .

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten liegen für die folgenden beiden Bilder unter 60 counts für Uni370-Cy5 und 50 counts für Uni370-MR121, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 600 counts für Uni370-Cy5 und 500 counts für Uni370-MR121. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 10.

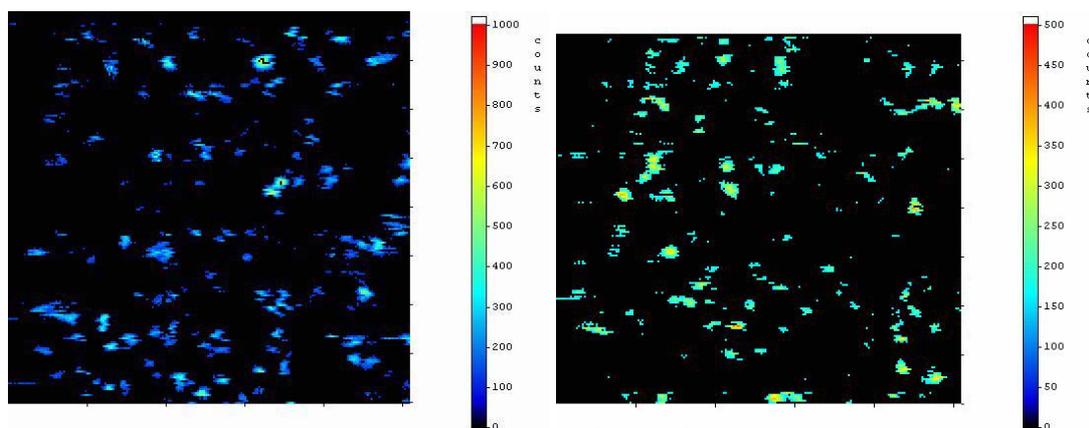


Abbildung 3.3-2: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 mit Intensitätsskalen in DaVis.

(Cy5-Bild:  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ ; MR121-Bild:  $10 \mu\text{m} \times 9,5 \mu\text{m}$ )

Die Lebensdauern für kovalent auf Glasoberflächen gekoppelte Uni370-Cy5 beträgt durchschnittlich  $\tau = 2,25 \text{ ns}$  im Bereich von  $1,95 \text{ ns}$  bis  $2,75 \text{ ns}$  in drei Messungen. Für Uni370-MR121 findet man durchschnittliche Lebensdauern von  $\tau = 3,16 \text{ ns}$  im Bereich  $3,08 \text{ ns}$  bis  $3,28 \text{ ns}$  in drei Messungen.

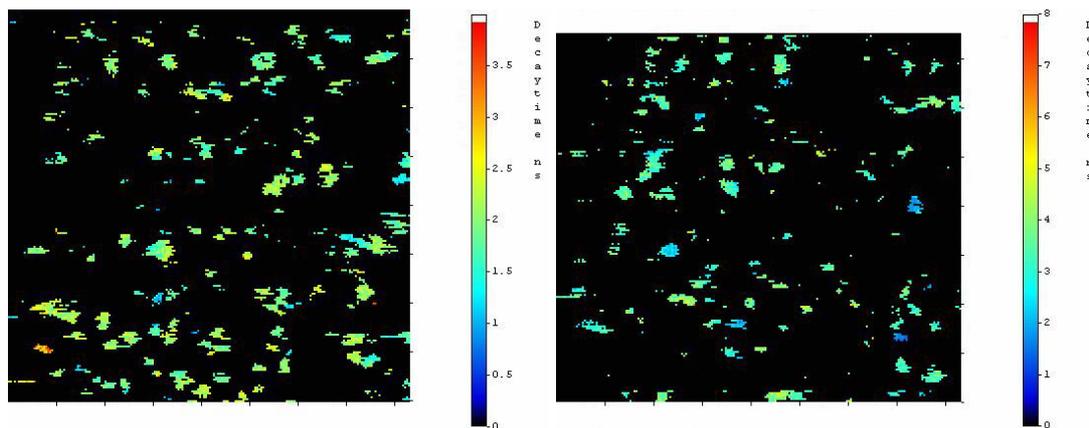


Abbildung 3.3-3: Hintergrund-korrigierte Lebensdauerbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 (MR121-Bild:  $10\ \mu\text{m} \times 9,5\ \mu\text{m}$ ).

Um die Kopplungsverhalten zweier verschieden markierter Peptide auf gemeinsamer Oberfläche zu beobachten und deren Eigenschaften zu untersuchen, wurde ein Gemisch aus Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 gemeinsam auf die modifizierte Glasoberfläche gebunden.

Für diese gemischt gebundenen Substanzen Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 erhält man Intensitätsbilder wie das folgende:

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten des DaVis-Bildes liegen für das rechte der folgenden beiden Bilder unter 30 counts für Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 zusammen, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 300 counts. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 10.

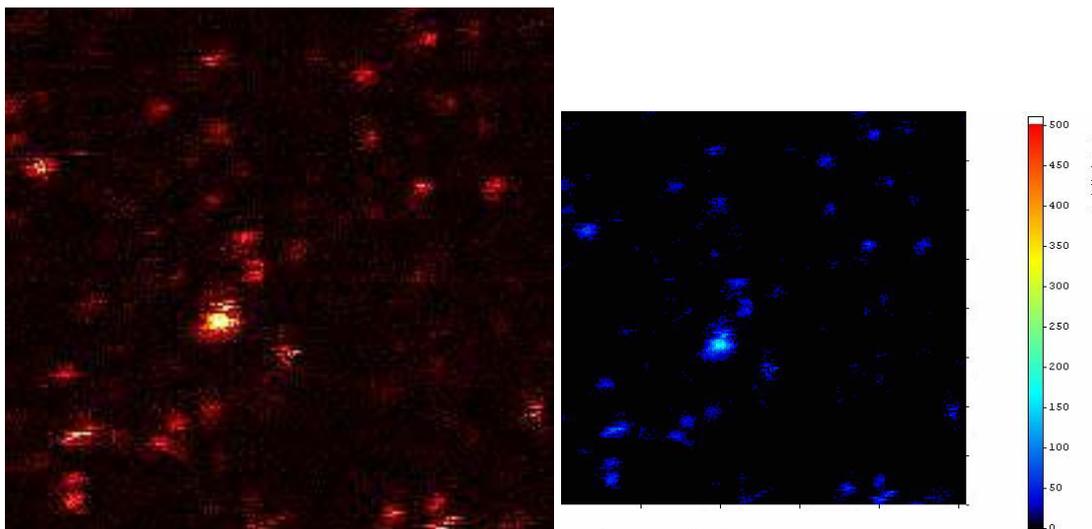


Abbildung 3.3-4: Links: Intensitätsbild der beiden gemeinsam kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121; Rechts: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbild mit Intensitätsskalen in DaVis.

Hier findet man Belegungsdichten von  $0,26 \mu\text{m}^{-1}$  und Dichte-zu-Konzentrations-Verhältnisse von  $\text{MD} : \text{LK} = 173 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  für beide Modellpeptide Uni370, markiert mit Cy5 und MR121.

Die durchschnittliche Lebensdauer beider markierter Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 beträgt  $\tau = 3,34 \text{ ns}$  in einer Messung.

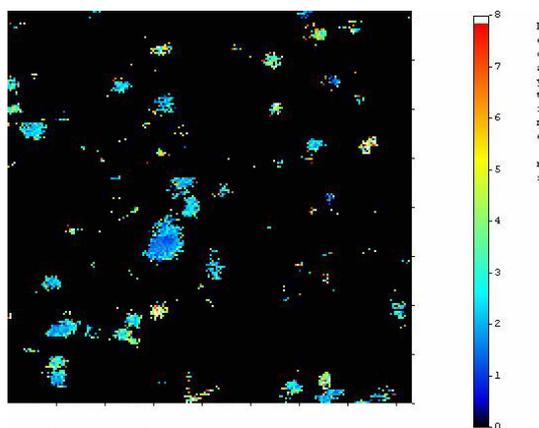


Abbildung 3.3-5: Hintergrund-korrigierte Lebensdauerbilder der beiden gemeinsam gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121.

Die beiden folgenden Abbildungen sind typische Intensitätsbilder für Uni371-Cy5 bzw. Uni371-MR121:

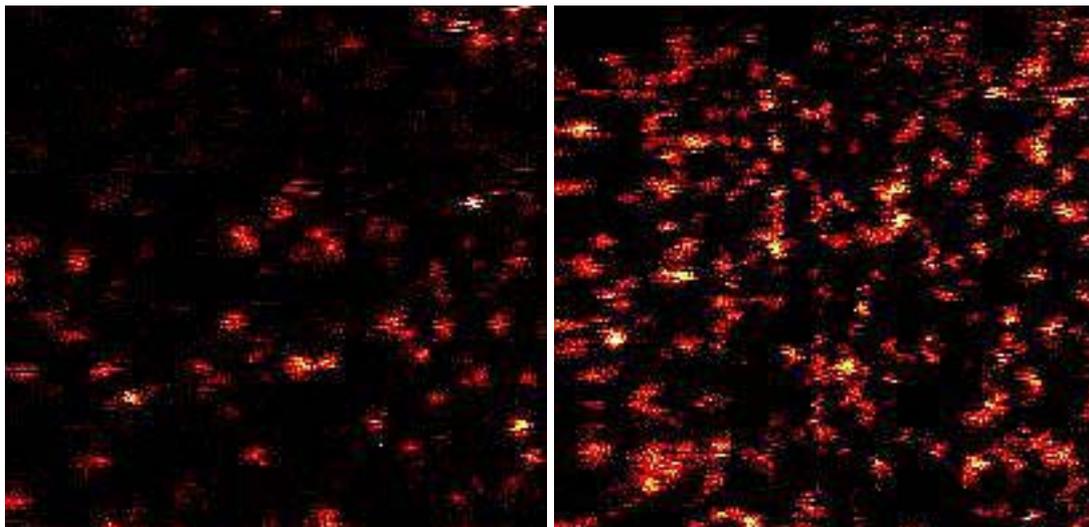


Abbildung 3.3-6: Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121.

Hier findet man Belegungsdichten von  $0,34 \dots 0,19 \mu\text{m}^{-1}$  mit durchschnittlich  $0,77 \mu\text{m}^{-1}$  und Dichte-zu-Konzentration-Verhältnisse von  $\text{MD} : \text{LK} = 119 \dots 340 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  für das Cy5-markierte Modellpeptid Uni370-Cy5. Für Uni370-MR121 findet man Belegungsdichten von  $0,07 \dots 0,70 \mu\text{m}^{-1}$  mit durchschnittlich  $029 \mu\text{m}^{-1}$  bzw.  $\text{MD} : \text{LK} = 40 \dots 1400 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ .

Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten liegen für die folgenden beiden Bilder unter 25 counts für Uni371-Cy5 und 10 counts für Uni371-MR121, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 300 counts für Uni371-Cy5 und 300 counts für Uni371-MR121. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 12 bzw. 1 : 30.

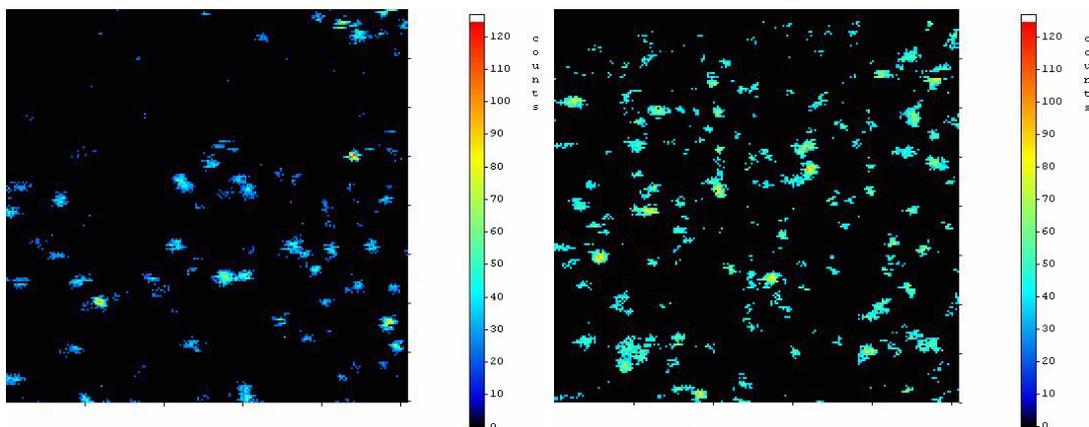


Abbildung 3.3-7: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 mit Intensitäts-skalen in DaVis.

Die Lebensdauern für kovalent auf Glasoberflächen gekoppelte Uni371-Cy5 beträgt durchschnittlich  $\tau = 3,27$  ns im Bereich von 1,95 ns bis 4,60 ns in zwei Messungen. Für Uni371-MR121 findet man durchschnittliche Lebensdauern von  $\tau = 4,02$  ns im Bereich 2,68 ns bis 4,85 ns in fünf Messungen.

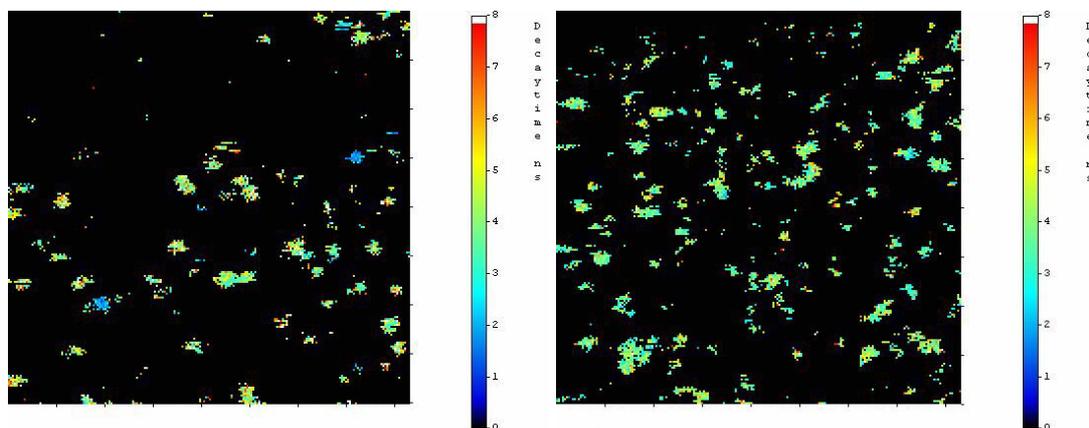


Abbildung 3.3-8: Hintergrund-korrigierte Lebensdauerbilder der kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten Uni371-Cy5 und Uni371-MR121.

Um die Kopplungsverhalten zweier verschieden markierter Peptide auf gemeinsamer Oberfläche zu beobachten und deren Eigenschaften zu untersuchen, wurde ein Gemisch aus Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 gemeinsam auf die modifizierte Glasoberfläche gebunden.

Für diese gemischt gebundenen Substanzen Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 erhält man Intensitätsbilder wie das folgende:

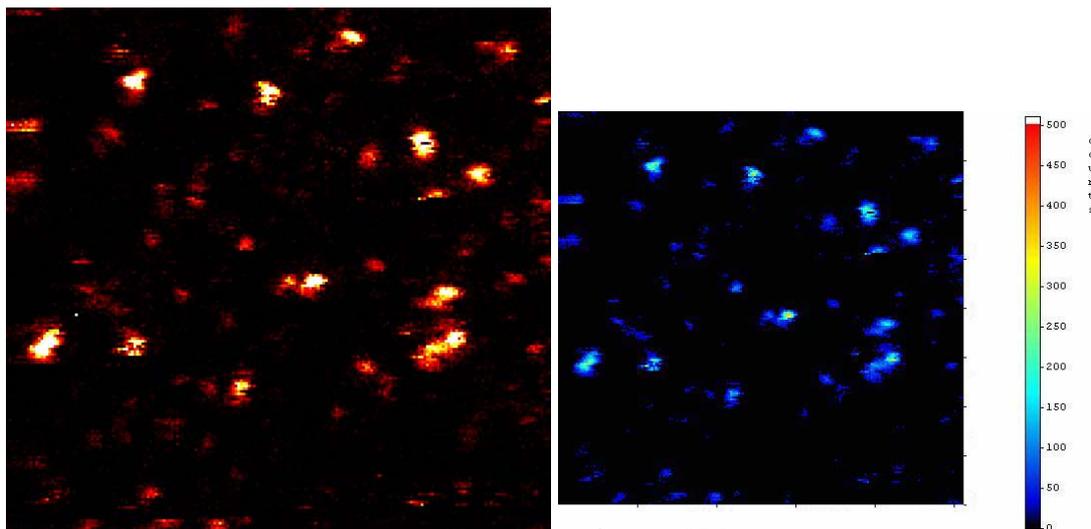


Abbildung 3.3-9: Links: Intensitätsbild der beiden gemeinsam kovalent auf Glasoberflächen gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121; Rechts: Hintergrund-korrigierte Intensitätsbild mit Intensitätsskalen in DaVis.

Hier findet man Belegungsdichten von  $0,05 \dots 0,44 \mu\text{m}^{-1}$  mit durchschnittlich  $0,21 \mu\text{m}^{-1}$  und Dichte-zu-Konzentration-Verhältnisse von  $\text{MD} : \text{LK} = 33 \dots 293 \mu\text{m}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  für beide Modellpeptide Uni371, markiert mit Cy5 und MR121. Die ausgeblendeten Hintergrundintensitäten des DaVis-Bildes liegen für das rechte der obigen beiden Bilder unter 10 counts für Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 zusammen, die Fluoreszenz-Signale haben Intensitätsmaxima von 300 counts. Das ergibt Hintergrund-zu-Maximum-Verhältnisse von 1 : 30.

Die durchschnittliche Lebensdauer beider markierter Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 beträgt zusammen  $\tau = 3,93 \text{ ns}$  im Bereich von 3,36 ns bis 4,46 ns in fünf Messung.

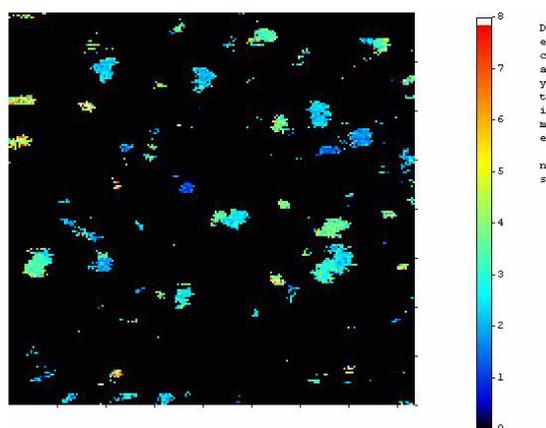


Abbildung 3.3-10: Hintergrund-korrigierte Lebensdauerbilder der beiden gemeinsam gekoppelten, farbstoffmarkierten Modellpeptide Uni371-Cy5 und Uni371-MR121.

Die folgende Tabelle fasst noch einmal die Durchschnittswerte für die Lebensdauern der Peptid-gebundenen Farbstoffe Cy5 und MR121 zusammen.

$\tau_g$ (MW <sup>(a)</sup> ) [ns]	Lösung/Ensemble		Oberfläche
	(H <sub>2</sub> O/MeCN 1:1)	(MeCN)	trocken
371C <sup>(1)</sup>	1,2	1,1	3,3
370C <sup>(1)</sup>	1,1	1,1	2,3
371M <sup>(1)</sup>	3,0	3,9	4,0
370M <sup>(1)</sup>	2,6	3,6	3,2
371C/M <sup>(1)</sup>	-	-	3,9
370C/M <sup>(1)</sup>	-	-	3,3

<sup>(a)</sup> MW: Mittelwert

Tabelle 3.3-1: durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_g$  der untersuchten Farbstoff-Peptide in Lösung (Ensemble-Messung) sowie an trockenen Glasoberflächen.

<sup>(1)</sup> C und M charakterisieren Cy5 bzw. MR121; 370 und 371 charakterisieren die Peptide Uni370 bzw. Uni371)

### 3.4 Kovalent gekoppeltes Tetramethylrhodamin-isothiocyanat auf Gold-Oberfläche

Goldbeschichtete Siliziumplättchen mit Aminogruppen in regelmäßigen Abständen wurden mit TMR-ITC kovalent gekoppelt.

Die Oberflächen wurden mittels zeitaufgelöster Einzelmolekül-Spektroskopie (siehe Kapitel 2.2.4) abgetastet und die Intensitäts-Daten als zweidimensionales Bild dargestellt. Die Laserleistung betrug hierzu 5  $\mu$ W am Objektiv.

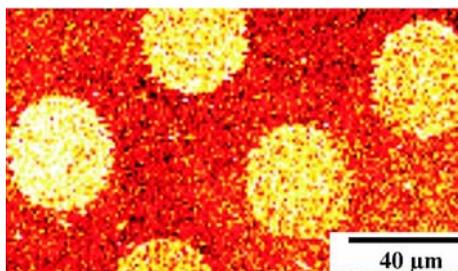


Abbildung 3.4-1: Ausschnitt aus einem Intensitätsbild von TMR-gebundenen Regionen einer Goldoberfläche mit 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol-Monoschicht, selektiv mittels Elektronenstrahl reduziert zu Aminofunktionen.