## 4 <u>Auswertung und Diskussion</u>

## 4.1 Identifizierung und Zuordnung der Spezies durch ihre spektroskopischen Daten

Da das Ziel der Untersuchungen war, anhand der unterschiedlichen spektroskopischen Eigenschaften der Fluoreszenz-Farbstoffe in der jeweiligen Umgebung die Proben zu unterscheiden, musste man sich bestimmte Parameter näher ansehen.

Die relevanten Daten, die durch spektral aufgelöste Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (SFLIM) erhalten werden, sind die Intensitäten und die Fluoreszenzlebensdauer, jeweils auf 2 Kanälen (I<sub>1</sub> kleiner bzw. I<sub>2</sub> größer als 670 nm, also 640...670 nm bzw. 670...700 nm) sowie deren Summe. Aus den Intensitäten wurde die *anteilige Intensität* F<sub>2</sub> errechnet, die angibt, ob das beobachtete Molekül eher Cy5 ( $\lambda_{Em} = 670$  nm) oder MR121 ( $\lambda_{Em} = 663$  nm) zuzurechnen ist. Der F<sub>2</sub>-Wert ist wie die Lebensdauer universell für Vergleiche verwendbar, wohingegen sich die ursprünglichen, gemessenen Intensitäten von Messung zu Messung und selbst während einer Messung verändern können. Der Hauptgrund für letzteren Fall ist die häufige Instabilität der Fokusierung des Objektivs (z-Achse). Die gemessenen Intensitäten streuen also stark, die F<sub>2</sub>-Werte sind homogener.



Abbildung 4.1-1: Diagramme der gemessenen Gesamtintensität (Abszisse) im Vergleich zu den zugehörigen F<sub>2</sub>-Werten (Ordinate) am Beispiel von Messungen zu MR121, Uni370-MR121, Uni371-Cy5 und Uni371-Cy5/Uni371-MR121.

An diesen Beispielen sieht man gut, dass sich die Intensitäten, selbst einzelner Messungen, über große Bereiche erstrecken können, der  $F_2$ -Wert aber sehr enge, homogene Bereiche einnehmen kann.

Schon anhand dieser Diagramme ist erkennbar, dass die *anteilige Intensität*  $F_2$  allein, die stets um 0,5 bzw. 50% liegt, keine Aussage bezüglich Zuordnungen der einzelnen Spezies erlaubt.

Es erwies sich als sinnvoll, sich zuerst die Lebensdauer-Verteilung der Farbstoffe und Farbstoff-Peptide anzusehen. Dazu wurden Histogramme der Lebensdauern aus den Fluoreszenzbildern mit den zugehörigen *Gauss*-Kurven erstellt. Dabei ist auch der Unterschied der Lebensdauern der Farbstoffe auf trockenen Glasoberflächen und unter Femtotip-Puffer (FTP) beachtenswert.

Auf den ersten vier Bildern erkennt man, dass sowohl Cy5 als auch MR121 innerhalb ihrer Lebensdauer-Bereiche von 1...3 ns bzw. 2...5 ns Unterschiede aufweisen, je nach dem ob der Farbstoff auf der trockenen Oberfläche liegt oder ob er zusätzliche Freiheitsgrade aufgrund der umgebenden Flüssigkeit hat.



Abbildung 4.1-2: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für Cy5 auf trockener Glasoberfläche und unter FTP.

Die Auswertung der Histogramme aller Messungen ergab für kovalent gekoppeltes Cy5 auf trockener Oberfläche ein mittleres Lebensdauer-Maximum von  $(2,0 \pm 0,3)$  ns und  $(2,2 \pm 0,4)$  ns unter FTP. Cy5 zeigt – im Vergleich hierzu – eine Lebensdauer von 1,0 ns in Acetonitril wie auch in Wasser/Acetonitril (1 : 1).



Abbildung 4.1-3: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für MR121 auf trockener Glasoberfläche und unter FTP.

Kovalent gekoppeltes MR121 zeigte mittlere Lebensdauern von  $(3,7 \pm 0,2)$  ns auf trockener Oberfläche und  $(3,1 \pm 0,4)$  ns unter FTP. Im unpolaren Acetonitril wurde für MR121 eine Lebensdauer von 4,4 ns und in Wasser/Acetonitril (1 : 1) 2,9 ns gefunden.

Wenn man beide Farbstoffe gemeinsam auf die Oberfläche bindet, kann man diese sehr gut anhand ihrer unterschiedlichen Lebensdauern unterscheiden. Das folgende Bild zeigt nicht den erreichten Optimalfall, sondern ein typisches Beispiel für die Überlappungen der *Gauß*-Kurven der Lebensdauern beider Farbstoffe und die viel höhere Ankopplungstendenz von Cy5 an die aminomodifizierte Glasoberfläche gegenüber MR121, ausgedrückt durch die Fläche unter den Kurven.



Abbildung 4.1-4: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für gemeinsam gebundene Cy5 (links) und MR121 (rechts) auf trockener Glasoberfläche.

Die Maxima der Lebensdauer-Histogramme von  $(2,2 \pm 0,5)$  ns und  $(3,6 \pm 1,0)$  ns liegen um durchschnittlich 1,5 ns voneinander entfernt.

In den ausgewerteten Experimenten wurden für die Farbstoffe Zuordnungssicherheiten von 90,4% für Cy5 bezüglich MR121 und 92,9% für MR121 bezüglich Cy5 bzw. 92,0% insgesamt für beide Spezies erreicht.

Die folgende Tabelle fasst diese Lebensdauer-Daten für die Farbstoffe, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gebunden, zusammen.

Seite 98	
----------	--

Lebensdauer-	172-	172-	172-	172-	188-
Verteilungen	С92М9	C92M9_1	C92M9_2	C92M9_3	M9C10-
					5μW_1
Integral 1 <sup>1)</sup>	83,99	10,67	37,55	33,26	10,40
Integral Überlappg.	24,03	0,21	0,00	3,94	0,57
von $1^{1}$					
Integral 2 <sup>2)</sup>	67,47	4,92	4,62	17,85	3,79
Integral Überlappg.	3,77	0,48	0,00	0,56	0,64
von $2^{2}$					
Summe Integrale	151,45	15,59	42,17	51,12	14,20
Summe Überlappungen	27,80	0,69	0,00	4,49	1,21
Identunsicher	28,6	2,0	0,0	11,8	5,5
heit 1 [%] <sup>1)</sup>					
Identunsicher	5,6	9,7	0,0	3,1	16,8
heit 2 $[\%]^{2}$					
GesIdentunsicher	18,4	4,4	0,0	8,8	8,5
heit [%]					
Identsicherh. 1 [%] <sup>1)</sup>	71,4	98,0	100,0	88,2	94,5
Identsicherh. 2 $[\%]^{2)}$	94,4	90,3	100,0	96,9	83,2
GesIdentsicher	81,6	95,6	100,0	91,2	91,5
heit [%]					
Ø Identsicher	90,4				
heit 1 [%] <sup>1)</sup>					
Ø Identsicher	92,9				
heit 2 $[\%]^{2)}$					
Ø GesIdentsicher	92,0				
heit [%]					

Tabelle 4.1-1: Werte representativer Messungen zu Gauß-Integralen der Lebensdauer-Verteilungen und resultierende Zuordnungssicherheiten bzw. –unsicherheiten für Cy5 und MR121 auf trockener Glasoberfläche.

(<sup>1)</sup> Cy5; <sup>2)</sup> MR121; Ø: Mittelwert; Die "Null-Werte" unterscheiden sich erst ab der 3. Nachkommastelle.)

Die beiden Cy5- und MR121-markierten Modellpeptide ergaben die folgenden Werte:

40

35

30

Mean

SD





Abbildung 4.1-5: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für Uni370-Cy5 (links) und Uni371-Cy5 (rechts) auf trockener Glasoberfläche.

Kovalent auf Glas gekoppeltes Uni370-Cy5 besitzt eine mittlere Lebensdauer von  $(2,0 \pm 0,2)$  ns und Uni371-Cy5  $(2,0 \pm 0,1)$  ns. Bei Ensemble-Messungen in Acetonitril findet man 1,1 ns und 1,2 ns in Wasser/Acetonitril (1:1) für Uni371-Cy5 sowie 1,1 ns in Acetonitril wie auch in Wasser/Acetonitril (1 : 1) für Uni370-Cy5.



Abbildung 4.1-6: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für Uni370-MR121 (links) und Uni371-MR121 (rechts) auf trockener Glasoberfläche.

Kovalent auf Glas gekoppeltes Uni370-MR121 besitzt eine mittlere Lebensdauer von  $(3,2 \pm 0,3)$  ns und Uni371-MR121  $(4,0 \pm 0,4)$  ns. Bei Ensemble-Messungen in Acetonitril findet man 3,6 ns und 2,6 ns in Wasser/Acetonitril (1 : 1) für Uni370-MR121 sowie 3,9 ns in Acetonitril und 3,0 ns in Wasser/Acetonitril (1 : 1) für Uni371-MR121.

Gemeinsam auf modifizierte Glasoberflächen kovalent gekoppelte Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 bzw. Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 lassen sich leicht über ihre Lebensdauern unterscheiden wie die folgenden beiden Bilder veranschaulichen.



Abbildung 4.1-7: Beispiel einer Lebensdauer-Verteilungen für gemeinsam auf Glasoberfläche gekoppelte Modellpeptide Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 (linkes Bild) sowie Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 (rechtes Bild).

Die Lebensdauern der beiden Farbstoff-Spezies liegen bei  $(2,7 \pm 0,9)$  ns und  $(4,8 \pm 1,1)$  ns für das markierte Modellpeptid Uni370 und bei  $(3,0 \pm 0,8)$  ns und  $(4,8 \pm 0,7)$  ns für das markierte Modellpeptid Uni371.

In den ausgewerteten Experimenten wurden für das markierte Modellpeptid Uni370 Zuordnungssicherheiten von 99,1% für Uni370-Cy5 bezüglich Uni370-MR121 und 98,0% für Uni370-MR121 bezüglich Uni370-Cy5 bzw. 98,9% insgesamt für beide Spezies erreicht.

Für das Modellpeptid Uni371 wurden Zuordnungssicherheiten von 98,5% für Uni371-Cy5 bezüglich Uni371-MR121 und 95,0% für Uni371-MR121 bezüglich Uni371-Cy5 bzw. 98,1% für beide Spezies insgesamt erreicht.

Die folgende Tabelle fasst diese Lebensdauer-Daten für die Farbstoffmarkierten Modellpeptide, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gebunden, zusammen.

Seite	101

Lebensdauer-	190-	190-	190-	190-	190-
Verteilungen	370М92С9Н-	371М92С9Н-	371M92C9H-	371M92C9H-	371М92С9Н-
	4µW_1	4μW	4μW_3	4μW_5	5µW_4
Integral 1 <sup>1)</sup>	6,54	9,20	14,73	6,33	24,53
Integral Über-	0,06	0,33	0,10	0,02	0,38
lappg. von 1 <sup>1)</sup>					
Integral 2 <sup>2)</sup>	1,37	5,50	6,75	4,57	1,95
Integral Über-	0,03	0,22	0,07	0,03	0,28
lappg. von $2^{2}$					
Summe	7,91	14,70	21,48	10,90	26,47
Integrale					
Summe Über-	0,09	0,55	0,17	0,05	0,66
lappungen					
Identunsicher	0,9	3,6	0,7	0,4	1,5
heit 1 [%] <sup>1)</sup>					
Identunsicher	2,0	4,0	1,1	0,7	14,5
heit 2 $[\%]^{2}$					
GesIdentun-	1,1	3,7	0,8	0,5	2,5
sicherheit [%]					
Identsicher-	99,1	96,4	99,3	99,6	98,5
heit 1 [%] <sup>1)</sup>					
Identsicher-	98,0	96,0	98,9	99,3	85,5
heit 2 [%] <sup>2</sup>				-	
GesIdent	98,9	96,3	99,2	99,5	97,5
sicherheit [%]					
Ø Identsicher	99,1	98,5			
heit 1 [%] <sup>1</sup>					
Ø Identsicher	98,0	95,0			
heit 2 [%] <sup>2</sup>					
Ø GesIdent	98,9	98,1			
sicherheit [%]					

Tabelle 4.1-2: Werte representativer Messungen zu Gauß-Integralen der Lebensdauer-Verteilungen und resultierende Zuordnungssicherheiten bzw. –unsicherheiten für Cy5 und MR121 auf trockener Glasoberfläche.

(<sup>1)</sup> Cy5; <sup>2)</sup> MR121; Ø: Mittelwert; Die hier berücksichtigten Farbstoff-Peptide wurden nach der HBTU/HOBt-Methode an die Glasoberfläche gekoppelt.)

Am besten veranschaulichen Werte-Diagramme von Lebensdauer ( $\tau_{ges}$ ) und *anteiliger Intensität* (F<sub>2</sub>) die Unterschiede zwischen den Farbstoffen. Die folgenden "Scatter-Plots" zeigen die Messwerte der jeweils gemeinsam auf die Glasoberfläche gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffe bzw. deren Peptidkonjugate mit den Modellpeptiden Uni370 und Uni371. Es ist zu erkennen, dass die Messwerte der Lebensdauern für die getrennt gemessenen Spezies in der Regel etwas geringer sind als die Werte für die gemischtgebundenen Spezies.



Abbildung 4.1-8: Beispiel eines Lebensdauer- $F_2$ -Diagramms für die gemeinsam, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gekoppelten Farbstoffe Cy5 und MR121 (oberes Diagramm, linker Bereich um 2 ns: Cy5; rechter Bereich um 4 ns: MR121). Darunter zum Vergleich: Beispiele von Lebensdauer- $F_2$ -Diagrammen der puren, gebundenen Farbstoffe Cy5 (links) und MR121 (rechts).

Man sieht im Diagramm der gemischt gekoppelten Farbstoff-Spezies, dass sich der Cy5-Bereich in etwa von 1,3 ns bis 3,3 ns erstreckt, der MR121-Bereich von 3,3 ns bis 5,0 ns.



Abbildung 4.1-9: Beispiel eines Lebensdauer- $F_2$ -Diagramms für die gemeinsam, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gekoppelten Farbstoff-Peptid-Konjugate Uni370-Cy5 und Uni370-MR121 (oberes Diagramm, linker Bereich um 2,5 ns: Uni370-Cy5; rechter Bereich um 4,5 ns: Uni370-MR121). Darunter zum Vergleich: Beispiele von Lebensdauer- $F_2$ -Diagrammen der einzelnen, gebundenen Konjugate Uni370-Cy5 (links) und Uni370-MR121 (rechts).

Man sieht im Diagramm der gemischt gekoppelten Konjugat-Spezies, dass sich der Cy5-Bereich in etwa von 2,1 ns bis 3,4 ns erstreckt, der MR121-Bereich von 4,0 ns bis 5,1 ns.



Abbildung 4.1-10: Beispiel eines Lebensdauer- $F_2$ -Diagramms für die gemeinsam, kovalent auf modifizierte Glasoberflächen gekoppelten Farbstoff-Peptid-Konjugate Uni371-Cy5 und Uni371-MR121 (oberes Diagramm, linker Bereich um 3 ns: Uni371-Cy5; rechter Bereich um 5 ns: Uni371-MR121). Darunter zum Vergleich: Beispiele von Lebensdauer- $F_2$ -Diagrammen der einzelnen, gebundenen Konjugate Uni371-Cy5 (links) und Uni371-MR121 (rechts).

Man sieht im Diagramm der gemischt gekoppelten Konjugat-Spezies, dass sich der Cy5-Bereich in etwa von 2,1 ns bis 4,0 ns erstreckt, der MR121-Bereich von 4,2 ns bis 6,0 ns.

Sowohl die Darstellung als "Scatter-Plot" mit Lebensdauer  $\tau_{(ges.)}$  und *anteiliger Intensität* F<sub>2</sub> als auch die Darstellung als Histogramm der Lebensdauerverteilung  $\tau_{(ges.)}$  eignen sich zur bildlichen Darstellung und Unterscheidung verschiedener, gemeinsam gemessener Spezies. Nur anhand der Histogramme mit *Gauβ*-Kurven sind jedoch die mathematisch berechneten Zuordnungssicherheiten möglich.

Zusätzliche Flüssigkeitsüberschichtung mit FTP erschwerte die Messungen so stark, dass kaum verwertbare Abbildungen durch SFLIM möglich waren und im weiteren Verlauf der Messungen auf diese Möglichkeit der Einflussnahme auf die spektroskopischen Parameter verzichtet werden musste. Da sich die Modellpeptide Uni370 und Uni371 darin unterscheiden, dass erstere als vierte Aminosäure Tryptophan (Trp) und letztere an dieser Position Phenylalanin (Phe) enthält, sollte der Einfluss des Tryptophans auf die spektroskopischen Eigenschaften der Fluoreszenz-Farbstoffe erkennbar sein.



Abbildung 4.1-11: Strukturen der Modellpeptide Uni370 (oben) und Uni371 (unten), mit Tryptophan bzw. mit Phenylalanin.

Tryptophan kann durch seine Wirkung als Fluoreszenz-Löscher auf den an Lysin in direkt benachbarter 5-Position gebundenen Farbstoff Cy5 bzw. MR121 Einfluss nehmen. In einzelnen, separierten Molekülen, wie sie in den hier untersuchten, an Glasoberflächen gekoppelten Farbstoff-Peptiden vorliegen, kann durch statische Löschung sowohl die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt, als auch die Intensität geschwächt werden.

τ (MW) [ns]	Lösung/Ensemble		Ober	fläche
	H <sub>2</sub> O/MeCN (1:1)	MeCN	trocken	FTP
Cy5	1,0	1,0	2,0 (5)	2,2 (7)
Uni371-Cy5	1,2	1,1	2,0 (1)	-
Uni370-Cy5	1,1	1,1	2,0 (2)	-
MR121	2,9	4,4	3,7 (10)	3,1 (3)
Uni371-MR121	3,0	3,9	4,0 (5)	-
Uni370-MR121	2,6	3,6	3,2 (3)	-
Cy5/MR121	-	-	3,0 (7)	-
Uni371-MR121/Uni371-Cy5	-	-	3,9 (5)	-
Uni370-MR121/Uni370-Cy5	-	_	3,3 (1)	-

Tabelle 4.1-3: Übersicht zu durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauern von Cy5 und MR121 sowie ihrer Peptidkonjugate unter verschiedenen Bedingungen. (Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der verwendeten Messungen an.)

Für Cy5 ist aus Tabelle 4.1-3 ersichtlich, dass seine Fluoreszenzlebensdauer praktisch unabhängig von unterschiedlicher Polarität der Umgebung ist. Cy5 besitzt sowohl im unpolaren Acetonitril, als auch im polaren Wasser/Acetonitril-Gemisch eine Lebensdauer von 1,0 ns, auf trockener oder FTP-überschichteter Glasoberfläche eine Lebensdauer von 2,0...2,2 ns. Cy5 in seinen Peptidkonjugaten wird nicht durch Tryptophan beeinflusst, da Cyanin-Farbstoffe aufgrund ihrer Struktur keinen Elektronentransfer eingehen können, und zeigen eine mittlere Lebensdauer von 2,0 ns. In Lösung liegt die Lebensdauer für Uni370 und Uni371 bei 1,1...1,2 ns sowohl im unpolaren, als auch im polaren Lösemittel, wobei die Obergrenze polaren Medien zuzurechnen ist.

Der Oxazin-Farbstoff MR121 zeigt bereits in Lösung große Unterschiede in seiner jeweiligen Lebensdauer. So besitzt er im relativ unpolaren Wasser/Acetonitril-Gemisch eine mittlere Lebensdauer von 2,9 ns, im unpolaren Acetonitril 4,4 ns. Kovalent auf Glasoberflächen gebunden, besitzt er eine mittlere Lebensdauer von 3,7 ns auf trockener Oberfläche und 3,1 ns unter FTP. Die um 0,6 ns kürzere Lebensdauer unter Flüssigkeit ist auf die höhere Anzahl an Freiheitsgraden, die eine schnellere Entvölkerung der angeregten Zustände ermöglichen, zurückzuführen. Sehr deutlich sieht man hier, dass der Farbstoff nicht mehr an der Oberfläche haftet, da man sonst die gleiche Lebensdauer wie auf trockener Oberfläche finden würde. Seine Peptidkonjugate weisen in Lösung jeweils Unterschiede von 1 ns zwischen polarer und unpolarer Umgebung auf. Im Tryptophan-haltigen Konjugat liegen die Lebensdauern um 0,4 ns (13,5% in polarer, 10,2% in unpolarer Lösung) niedriger als in der Phenylalanin-haltigen Spezies. Auf trockener Oberfläche lag die Lebensdauer

der Tryptophan-haltigen Spezies um 0,8 ns (20%) unter der der Phenylalaninhaltigen.



Abbildung 4.1-12: Schema zur Ablösung der Farbstoffmarkierten Peptide von der Glasoberfläche nach Zugabe von FTP.

Die Messungen der gemischt gekoppelten, puren Farbstoffe Cy5 und MR121 auf trockener Glasoberfläche zeigten den erwarteten Mittelwert der beiden Spezies (3,0 ns).

Die beiden Modellpeptide Uni370 mit Phe und Uni371 mit Trp eignen sich sehr gut, den Fluoreszenz-löschenden Einfluss von Tryptophan auf Rhodamin- bzw. Oxazin-Farbstoffe sowohl in Lösung, als auch gebunden auf Glasoberflächen zu studieren.

Zusammenfassend kann hier somit gesagt werden, dass der Fluoreszenz-Farbstoff MR121 sowohl selbst in seinen verschiedenen Umgebungen, als auch vom Fluoreszenz-Farbstoff Cy5 in den entsprechenden Umgebungen aufgrund der unterschiedlichen Lebensdauern sicher unterschieden werden kann. MR121 besitzt in polarer Lösung eine Lebensdauer von 2,9 ns, in unpolarer Lösung 4,4 ns, auf trockener Oberfläche 3,7 ns und 3,1 ns unter FTP. Cy5 hingegen besitzt eine Lebensdauer um 1,0 ns in Lösung und 2,0...2,2 ns auf Glasoberflächen, ohne und mit FTP. Die Cy5-Peptide zeigen in Lösung Lebensdauern um 1,1 ns, die MR121-Peptide liegen im Bereich 2,6...3,9 ns. Auf trockener Oberfläche zeigen die beiden Cy5-Peptide Lebensdauern von 2,0 ns, die MR121-Peptide 4,0 ns (Phe) bzw. 3,2 ns (Trp).

Weiterhin kann hervorgehoben werden, dass der Fluoreszenz-löschende Einfluss von Tryptophan auf Oxazin-Farbstoffe wie MR121 bewiesen wurde, Carbocyanin-Farbstoffe wie Cy5 aber keine spektroskopischen Unterschiede durch die Nähe zu Tryptophan zeigen. Allerdings muss sich Tryptophan in unmittelbarer Nachbarschaft zum Farbstoff befinden. Schon eine Aminosäure (wie Glycin) mehr zwischen Trp (4-Position) und Lys-MR121 (5-Position) verringert die gegenseitige Wechselwirkung so stark, dass praktisch kein Unterschied mehr in den Lebensdauern mit und ohne Trp erkennbar ist. Entsprechende Vorversuche wurden mit den Modellpeptiden Uni355 mit Trp in 3-, Phe in in 4- und Lys-MR121 in 5-Position sowie Uni356 mit Trp in 3-, Arg in in 4- und Lys-MR121 in 5-Position und Uni357 mit Pro in 3-, Arg in in 4- und Lys-MR121 in 5-Position durchgeführt.



Ac-Gly-Pro-Pro-Arg-Lys-Pro-Asn-Ser-Gly-Gly-OH

Abbildung 4.1-13: Strukturen der Modellpeptide Uni355 (oben) mit Tryptophan ( $C_{51}H_{69}N_{13}O_{14}$ , M = 1088,173) und Uni356 (Mitte) mit Tryptophan ( $C_{48}H_{72}N_{16}O_{14}$ , M = 1097,185) sowie Uni357 (unten) mit Phenylalanin ( $C_{42}H_{69}N_{15}O_{14}$ , M = 1008,090).

Ensemble-Messungen in Wasser/Acetonitril (1 : 1) am Fluoreszenz-Spektrometer IBH ergaben Lebensdauern von 3,0 ns für Uni357-MR121 (mit Pro-Arg), 2,8 ns für Uni356-MR121 (mit Trp-Arg) und 2,5 ns für Uni355-MR121 (mit Trp-Phe). Ein leichter Trend ist dahingehend zu sehen, dass das Peptid ohne löschfähige Aminosäure die längste Lebensdauer aufweist, mit Tryptophan (Trp) niedriger und mit der zusätzlichen, leicht löschenden Aminosäure Phenylalanin (Phe) am niedrigsten ist. Die entsprechenden drei Cy5-Derivate zeigten Lebensdauern im Bereich 1,2...1,6 ns. Durch die fehlende deutliche Signifikanz im Bezug auf Tryptophan-Löschung wurden hierzu keine weiteren Versuche durchgeführt.

Für die Modellpeptide Uni370-MR121 (mit Phe) und Uni371-MR121 (mit Trp) jedoch war ein markanter Abfall der Lebensdauer um 0,8 ns, von 4,0 ns auf 3,2 ns durch die Wechselwirkung mit Tryptophan zu beobachten.

In einer der sehr wenigen Veröffentlichungen zur Fluoreszenz-Löschung von Fluoreszenz-Farbstoffen durch Tryptophan beschreiben Emans et al. [Emans 1995] eine pH-unabhängige BODIPY-Avidin-Fluoreszenz-Verstärkung durch BODIPY-Trp-Wechselwirkung. Die BODIPY-Avidin-Fluoreszenz-Verstärkung um das 10-fache beobachteten sie nach Bindung an Biotin. Die relativ geringe Änderung in der Lebensdauer von BODIPY, verglichen mit hoher Fluoreszenz-Verstärkung, kommt durch die Biotin-Bindung, die eine Konformationsänderung im Avidin induziert, was wiederum zu einer Änderung der BODIPY-Umgebung führt. Sie führten Messungen der intrinsischen Fluoreszenz von Tryptophan in BODIPY-Avidin und Avidin durch. Die Biotin-Bindung führt zu einer Blau-Verschiebung und Erhöhung der Tryptophan-Fluoreszenz in BODIPY-Avidin, aber auch zu einer Reduzierung der Tryptophan-Fluoreszenz in Avidin. Es handelt sich also um eine Wechselwirkung zwischen Tryptophan und BODIPY.

Auch Karolin et al. beschreiben, dass Biotin in eine tiefe Tasche mit zwei von vier Tryptophanresten bindet. Nach der Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, und das Tryptophan bewegt sich in eine abgeschirmte, nichtpolare Umgebung, was zu einer Blau-Verschiebung der Fluoreszenz von Tryptophan in Avidin und BODIPY-Avidin führt. Ausserdem verringert sich die Fluoreszenz von Avidin, die Fluoreszenz von BODIPY-Avidin erhöht sich. Es muss sich um eine statische Wechselwirkung zwischen Tryptophan und BODIPY in Abwesenheit von Biotin handeln, die eine Fluoreszenz-Löschung beider Chromophore bewirkt. Nach der Biotin-Bindung reduzieren sich die Wechselwirkungen, wodurch die Fluoreszenz von Tryptophan und BODIPY ansteigen [Karolin 1994].

Watt und Voss Jr. unternahmen *Stern-Volmer*-Analysen für Löschversuche mit Indol-Strukturen, die ergaben, dass dynamische und statische Löschung bei Tryptophan vorhanden ist, und bestätigten frühere Experimente von Vaughan et al. [Vaughan 1970] [Watt 1977]. Versuche zur Fluorescein-Löschung durch Indol-Strukturen ergaben folgende Effizienzreihe: Trp-amid<sup>+</sup> (70,6%, pH 8) > L-Trp (62,5%) > 5-Indol-CS (51,3%) > 2-Indol-CS (43,8%) > Phenol (33,8) > L-Met (18,2%) > L-Phe, L-His (5,0%) > L-Ser (1,3%)

Der Vergleich der *anteiligen Intensitäten*  $F_2$  zeigt, dass alle Werte für trockene Oberflächen im gleichen Bereich von 0,4...0,5 liegen, unabhängig vom Farbstoff Cy5 oder MR121. Außerdem ist keine Korrelation zu Löschung oder Gemischtkopplung sichtbar. Die Werte der Messungen mit FTP sind deutlich höher, über 10% für Cy5 und 20% für MR121; eine Farbstoff-Spezifität lässt sich dadurch aber nicht ableiten. Durch diese Erkenntnisse konnte der  $F_2$ -Wert allein nicht als Identifizierungskriterium herangezogen werden.

<b>F</b> <sub>2</sub> ( <b>MW</b> )	Ober fläche		
	trocken	FTP	
Cy5	0,51 (5)	0,58 (7)	
Uni371-Cy5	0,41 (1)	-	
Uni370-Cy5	0,49 (2)	-	
MR121	0,51 (10)	0,64 (3)	
Uni371-MR121	0,48 (5)	-	
Uni370-MR121	0,50 (3)	-	
Cy5/MR121	0,52 (7)	-	
Uni371-MR121/Uni371-Cy5	0,47 (5)	-	
Uni370-MR121/Uni370-Cy5	0,47 (1)	-	

Tabelle 4.1-4: Übersicht zu durchschnittlichen  $F_2$ -Werten von Cy5 und MR121 sowie ihrer Peptidkonjugate unter verschiedenen Bedingungen. (Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der verwendeten Messungen an.)

Einige bemerkenswerte Beobachtungen und spektroskopische Effekte mit und ohne Zusatz von FTP sind im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

## 4.2 Spektroskopische Effekte in abgebildeten Einzelmolekülen

Schon auf den ersten Blick fallen bekannte Phänomene der Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie auf den Scann-Bildern wie Blinken und Fluoreszenz-Zerstörung ins Auge.



Abbildung 4.2-1: MultiFluorImage-Bilderder Einzelmolekül-Fluoreszenz-Abbildung von kovalent auf Glas gekoppeltem Cy5 ohne (links) und mit Femtotip-Puffer (FTP) (rechts).

Neben der viel schlechteren Bildqualität sind auf dem Fluoreszenzbild von Cy5 mit Femtotip-Puffer (FTP) rechts auch sich bewegende, "hin und her rollende" Moleküle zu erkennen (z.B. ganz unten).



Abbildung 4.2-2: MultiFluorImage-Bilder der Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie von kovalent auf Glas gekoppeltem MR121 ohne (links) und mit Femtotip-Puffer (FTP) (rechts).

Bei MR121 sind neben der etwas schlechteren Bildqualität kaum Unterschiede im Aussehen der abgebildeten Fluoreszenzmoleküle zu sehen.

Für alle getätigten Messungen wurden die folgenden Beobachtungen zu Blinken und Fluoreszenz-Zerstörung gemacht und in Tabelle 4.2-1 zusammengefasst. Nicht alle Bilder der Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie konnten hierzu verwendet werden. Für erfolgreiche Messungen mit FTP-Zugabe werden die Beobachtungen ebenfalls angegeben.

Spezies (Oberflächenzustand)	Anzahl berück-	Anzahl	Anzahl Photo-	Anteil an Ges
	sichtigter Messgn.	Blinken	Zerstörung	Molekülen [%]
Cy5 (trocken)	2	11	8	51,3
Cy5 (FTP)	2	7	25	59,0
MR121 (trocken)	6	8	2	10,9
MR121 (FTP)	1	10	13	38,3
Cy5/MR121 (trocken)	4	21	8	21,3
Cy5/MR121 (FTP)	0	-	-	-
Uni370-Cy5 (trocken)	1	6	2	18,6
Uni370-Cy5 (FTP)	0	-	-	_
Uni370-MR121 (trocken)	0	-	-	-
Uni370-MR121 (FTP)	0	-	-	-
Uni370-Cy5/Uni370-MR121 (trock.)	0	-	-	-
Uni370-Cy5/Uni370-MR121 (FTP)	0	-	-	-
Uni371-Cy5 (trocken)	1	4	1	14,7
Uni371-Cy5 (FTP)	0	-	-	-
Uni371-MR121 (trocken)	0	-	-	-
Uni371-MR121 (FTP)	0	-	-	-
Uni371-Cy5/Uni371-MR121 (trock.)	2	4	3	16,9
Uni371-Cy5/Uni371-MR121 (FTP)	0	-	-	_

Tabelle 4.2-1: Übersicht zu Anzahl blinkender und photozerstörter Moleküle in ausgewählten Messungen.

Aus Tabelle 4.2-1 ist ersichtlich, dass Cy5 sowohl auf trockener Oberfläche (51%), als auch unter FTP (59%) viel mehr photophysikalische Effekte zeigt als MR121 (trocken: 11%; FTP: 38%). Bemerkenswert ist die starke Erhöhung dieser Zahl nach Zugabe von FTP auf gekoppeltes MR121. Gut zu erkennen ist, dass die Zahl dieser photophysikalischen Ereignisse bei den Farbstoff-Peptiden von Cy5 und MR121 stark reduziert ist. Offensichtlich wirken beide Modellpeptide als wirksame Triplett-Löscher.

Einige typische, visuelle Effekte zeigen die folgenden Ausschnitte von Einzelmolekül-Fluoreszenz-Abbildungen aus MultiFluorImage.

langes Blinken ("off"-Zustand)	-	Cy5
mehrfaches Blinken	1990 - Carlo Ca	Cy5
mehrfaches, kurzes Blinken	1	Cy5
mehrfaches, relativ kurzes Blinken und Fluoreszenz-Zerstörung	<u>8</u>	Cy5
langes Blinken ("dim"-Zustand) und Fluoreszenz-Zerstörung	-	Cy5
Fluoreszenz-Zerstörung	*	Cy5
Blinken		MR121
Molekülbewegung ("Hin-und-her-Rollen")	*	MR121
Fluoreszenz-Zerstörung	-	MR121
Molekülbewegung ("Hin-und-her-Rollen")	Ŧ	MR121
einmaliges, relativ kurzes Blinken	-	Uni371-Cy5

mehrfaches, langes Blinken



Uni371-MR121

Nur mithilfe einer Bildauswertungssoftware wie DaVis können sehr eng bei einander liegende, unterschiedliche Moleküle identifiziert werden, wie die folgenden Beispiele zeigen.

4	τ <sub>ges</sub> :	F <sub>2</sub> :	
oben:	$\tau_{ges} = 5,0$ ns	$F_2 = 0,45$	MR121
unten:	$\tau_{ges} = 1,7 \text{ ns}$	$F_2 = 0,45$	Cy5
2	$\tau_{ges}$ :	F <sub>2</sub> :	
oben, rechts:	$\tau_{ges} = 2,0 \text{ ns}$	$F_2 = 0,95$	Cy5
unten, links:	$\tau_{ges} = 4,0 \text{ ns}$	$F_2 = 0,45$	MR121
2	τ <sub>ges</sub> :	F <sub>2</sub> :	
oben:	$\tau_{ges} = 5,0 \text{ ns}$	$F_2 = 0,50$	MR121
unten:	$\tau_{ges} = 2,0$ ns	$F_2 = 0,50$	Cy5
	τ <sub>ges</sub> :	F <sub>2</sub> :	
oben:	$\tau_{ges} = 2,0 \text{ ns}$	$F_2 = 0,90$	Cy5
unten:	$\tau_{ges} = 3.8 \text{ ns}$	$F_2 = 0,55$	MR121

Zahlreiche Autoren beschäftigten sich mit plötzlichen Intensitätsänderungen und schwankungen (Fluktuationen) fluoreszierender Farbstoff-Einzelmoleküle und ihrer Konjugate mit Biomolekülen.



Abbildung 4.2-3: Beispiel für den "dim"-Zustand in einem Ausschnitt eines Fluoreszenz-Bildes mit einem Cy5-Molekül auf einer Glasoberfläche.

Wie im gezeigten Beispiel eines langen Aufenthaltes im "dim"-Zustand, beschreiben Weston und Buratto die Emission von Einzelmolekülen auf Glasoberflächen mit Wechsel zwischen "on"- und "dim"-Zustand. Dieser korreliert mit der Dynamik im Millisekunden- bis Zehntelsekunden-Bereich Eine Anderung in Kernkoordinaten wird hervorgerufen durch den Übergang zwischen Minima der Energiepotentialfläche. Das führt zu Änderungen der Emissionsausbeute und des Emissions-Spektrums. Plötzliche Sprünge in der Emissions-Intensität wurden beobachtet, wie auch häufige schnelle Wechsel. Eine andere Erklärung für schnelle Intensitätsänderungen ist zufällige spektrale Diffusion: Jedes Emissions-Spektrum kommt aus einem Molekül, das verschiedene Potentialminima der Energiefläche besetzt. Die Übergänge zwischen den Potentialminima werden intramolekularen Bewegungen (Konformationsänderungen der Seitenketten) oder intermolekularen Bewegungen (kleine Bewegungen der Matrix) angerechnet. Intensitätsänderungen, die mit spektralen Verschiebungen einhergehen, resultieren aus Änderungen des Absorptionsquerschnitts bei der neuen Resonanzenergie. Eine spezifische Molekülbewegung, die in einer Änderung der Emissionshäufigkeit und Emissionsausbeute resultiert, ist die Drehung (twist) um die konjugierte C-Brücke durch Delokalisierung von Elektronendichte und verbessertem Zugang zu nicht-strahlenden Deaktivierungskanälen [Weston 1998].

Konformations-Fluktuationen von TMR-DNS-Molekülen auf Streptavidinbeschichteten Oberflächen erklärten Weston et al. mit dem Übergang zwischen 2 Konformationszuständen [Weston 1998].

Außerdem untersuchten Weston et al. den Carbocyanin-Farbstoff DiIC<sub>12</sub> auf Glasoberflächen und beobachteten diskrete Intensitätsschwankungen mit Korrelationszeiten von 1 ms bis 10 s. Diese Fluktuation erfolgte zwischen "on"- (hohe Intensität) und "dim"-Zustand (niedrige Intensität), also anders als "on/off"-Effekte. Die beschriebenen Schwankungen erfolgten durch kleine Änderungen in den Kernkoordinaten im Chromophor-Gerüst, wie die Drehung um die Konjugationsbrücke, wohl aber nicht durch Reorganisation des Moleküls, da die Behinderung durch die Glasoberfläche zu groß ist. Sie zogen ein 4-Niveau-Modell zur Erklärung heran:

Das 4-Niveau-2-Konfigurationen-Modell geht von zwei gering unterschiedlichen Konfigurationen des elektronischen Grundzustands mit jeweils erstem angeregtem

Zustand aus. Grund- und angeregter Zustand (1 und 2) beschreiben "on", Grund- und angeregter Zustand (3 und 4) charakterisieren "dim". Die Trennung besteht durch eine Energiebarriere, deren Überwindung zur plötzlichen Änderung der Emissionseigenschaften führt [Weston 1998 a].



Abbildung 4.2-4: Schema des 4-Niveau-Modells mit Grund- (1) und angeregtem Zustand (2) der "on"-Konfiguration auf der linken Seite sowie Grund- (3) und angeregtem Zustand (4) der "dim"-Konfiguration auf der rechten Seite.  $k_{12}$  und  $k_{21}$  bezeichnen die Anregungs- bzw. Emissions-Geschwindigkeiten für "on",  $k_{34}$  und  $k_{43}$  für "dim". Die Geschwindigkeiten  $k_{13}$  und  $k_{31}$  repräsentieren den Übergang zwischen den Grund-,  $k_{24}$  und  $k_{42}$  zwischen den angeregten Zuständen.

Versuche mit DiIC<sub>12</sub> auf Oberflächen im Vakuum (10<sup>-4</sup> Torr) durch Weston et al. zeigten Erhöhungen der Triplett-Lebensdauer  $\tau_T$  und eine Reduzierung der Photozerstörungsgeschwindigkeit. Fluktuationen in der ISC-Geschwindigkeit und Triplett-Lebensdauer bei konstanter Leistung resultierten offensichtlich aus dem Wechsel zwischen zwei oder mehr Konfigurationen des Farbstoffs. Da kaum Intensitätsabhängigkeit in den Übergangsgeschwindigkeiten zu sehen war, lag wohl eher spontaner als photoinduzierter Übergang vor [Weston 1999].

Später berichten Weston et al. über die Dynamik von Einzelmolekülen in dünnen Polymerfilmen verschiedener Dicke auf Glas. Es gab jeweils eine signifikante Fraktion, die sich durch Rotationsbewegung auszeichnete. Sie fanden einige Beweise, dass die Bewegung photoinduziert sein könnte, aber nicht strikt. Es bestand aber fast keine Abhängigkeit von der Laser-Leistung. Eventuell lag thermische Induzierung vor [Weston 2001].

Ambrose et al. schreiben über plötzliche Photozerstörung von Einzelmolekülen nach Sekunden konstanter Anregung. Zuvor erfolgt oft eine Reorientierung der Moleküle, sichtbar durch reversible Änderungen (Anstieg und Absinken) der Fluoreszenz. Die zufällige Orientierung der Übergangs-Dipole in der Ebene führt zu verschiedenen Anregungsgeschwindigkeiten. [Ambrose 1994].

Ha et al. beschreiben längere Dunkelzustände (ms...s) mit sehr niedrigen Übergangseffizienzen ( $< 10^{-5}$ ) von Rhodamin-Einzelmolekülen, die eventuell durch verdrehte Konformationen (twisted) erklärbar sind, wobei einige davon nicht fluoreszieren. Tritt wieder Fluoreszenz auf, dann oft zusammen mit spektralen Änderungen in der Fluoreszenzemission, wohl durch Polaritätsänderung oder O<sub>2</sub>-Bewegung [Ha 1997]. Später koppelten Ha et al. TMR über eine C-Kette mit einem DNS-Fragment (Oligo) und adsorbierten dieses Konjugat auf eine Glasoberfläche. Im Gegensatz zur trockenen Oberfläche löste es sich unter Puffer wiederholt von der Oberfläche ab und rotierte schnell um die C-Kette. Diese Spezies waren aufgrund ihrer Rotationssprünge (rotational jumps) sowie ihre Rückkehr (Readsorption) zu bestimmter Bindungsanordnung erkennbar. Auch lange Dunkelzustände (> 10 ms) durch Blinken (blinking) oder eventuell durch photoinduzierte, nichtfluoreszierende, verdrehte Konformationen wurden beobachtet. Die Rotationssprung- und die Blink-Geschwindigkeit seien abhängig von der Laser-Leistung, da es zu Photoaktivierung kommen kann. Doch auch spontane Rotationssprünge wurden bei der Leistung gleich Spontane Sprünge kommen durch thermisch Null registriert. aktivierte Konformationsänderungen vor. Diese ist wohl auch verantwortlich für die schnelle Rotation in Lösung. [Ha 1998].

Xie berichtet von unterschiedliche Intensitäten beim Farbstoff Oxazin 720 durch unterschiedliche Orientierungen. Beim Carbocyanin-Farbstoff dil sind plötzliche Sprünge charakteristisch für Einzelmolekül-Verhalten. Ein möglicher Mechanismus für Intensitätssprünge ist die molekulare Reorientierung auf der Oberfläche, was zu einer Änderung im Absorptionsquerschnitt bei der Absorptionswellenlänge führt. [Xie 1996].

Später schreiben Lu und Xie über Intensitätsschwankungen, die mit blauverschobener Emission und Absorption einher ging. Die spektralen Schwankungen kommen wohl durch Änderungen in den Kernkoordinaten, intermolekular oder intramolekular [Lu 1997].

Spektrale und Rotationssprünge, Photon(anti)bunching und individuelle Photozerstörung sind normalerweise unsichtbar durch den Ensembledurchschnitt. Veerman et al. studierten diese Phänomene an DiIC<sub>18</sub> in einer Polymermatrix (PMMA, PS). Sie berichten von pötzlicher Änderung von  $\tau_T$  und Y<sub>ISC</sub> in einem Molekül mit plötzlicher Änderung in den Emissionsintensitäten (Intensitätssprünge). Sie schlossen Bewegung aus und vermuteten spektrale Sprünge, wohl durch die Änderung der lokalen Polarität der Umgebung oder die plötzliche Änderung der Fluoreszenz-Quantenausbeute, vermutlich durch Drehung der konjugierten C-Brücke im Molekül [Veerman 1999].

Tinnefeld et al. beobachteten unter anderem unterschiedliche Lebensdauern von Cy5, die wohl durch Konformationsänderungen, wie Verdrehungen der Konjugationsbrücke, hervorgerufen werden Ähnliche Effekte beim Rhodamin-Farbstoff JA242 sind vermutlich auf leichte Symmetrieverzerrungen zurückzuführen. Außerdem wurden zwei Moleküle gleichzeitig mit spontanen, spektralen Sprüngen des einen beobachtet, was eventuell durch FRET verursacht wurde [Tinnefeld 2000].

Die anteilige Intensität F<sub>2</sub> ergab unter Lösemittel für den Oxazin-Farbstoffs JF9 relativ homogene spektrale Eigenschaften, für den Rhodamin-Farbstoff JA242 eine breite spektrale Verteilung. Cy5 zeigte eine fast konstante Fluoreszenz-Lebensdauer von ca. 2 ns. Die Lebensdauer war etwas länger, wenn Cy5 auf trocker Oberfläche gemessen wurde, als in Lösung, möglicherweise durch reduzierte Flexibilität in seiner C-Brücke, was zur Erhöhung der S<sub>1</sub>-Lebensdauer führt. Schwache bis gar keine Emission zeigte cis-Cy5. JF9 verhielt sich auf trockener Oberfläche fast gleich wie in Lösung, JA242 zeigte längere Lebensdauern als in Wasser, ähnlich wie in Ethanol. Cy5 zeigte Konfigurationsänderungen in seiner C-Brücke (cis/trans-Isomerisierung) [Tinnefeld 2001 a].

Widengren und Schwille befassten sich mit der photoinduzierten Isomerisierung und Rück-Isomerization des Carbocyanin-Farbstoffs Cy5 [Widengren 2000].

Vámosi et al. berichten über eine TMR-DNS, die zwei Konformationen mit Fluoreszenz-Lebensdauern von 0,5...1 ns und 2,5...3 ns sowie eine nicht-fluoreszierende Konformation aufwies. Die Populationen sind abhängig von Temperatur und Lösemittel [Vámosi 1996].

Das Peptid-Konjugat TMR-S1 untersuchten Wazawa et al. Sie schreiben, dass TMR-Einzelmoleküle auf Glasoberflächen nur minimale Fluktuationen zeigen und die TMR-S1-Fluktuation wahrscheinlich durch spontane Konformationsänderung des Proteins hervorgerufen wird. Es war keine Änderung der Fluktuation bei 5-fach höherer Laser-Leistung zu beobachten. [Wazawa 2000]. Hin-und-her-Bewegung des Moleküls und Abfall von  $\tau$  (2,5 ns  $\rightarrow$  1,9 ns), konstantes F<sub>2</sub> (0,60) bei Cy5 (unter FTP):



Die Verringerung der Lebensdauer von Cy5, das über eine KohlenstoffKette an die Glasoberfläche gekoppelt ist, und die Bewegung des Moleküls lassen sich durch effektivere Deaktivierungsmöglichkeiten in der Flüssigkeit erklären.

Plötzlicher Anstieg von  $\tau$  (0,7 ns  $\rightarrow$  2,4 ns), konstantes F<sub>2</sub> (0,35) und Blinken bei Cy5:



Cy5 scheint seine Lage gegenüber seiner Umgebung geändert zu haben, so dass sich seine Flexibilität (der C-Brücke) und seine Möglichkeiten der effektiven Deaktivierung drastisch verringert haben.

Hin-und-her-Bewegung des Moleküls und Anstieg von  $\tau$  (3,9 ns  $\rightarrow$  6,5 ns), Abfall von F<sub>2</sub> (0,85  $\rightarrow$  0,55) bei MR121 (mit Cy5 gebunden):







Offenbar unterliegt hier MR121 einer Konformationsänderung, z.B. durch Verdrehung (twist).

Leichter Abfall von F<sub>2</sub> während Blinken (0,65  $\rightarrow$  0,55), konstantes  $\tau$  (2,0 ns) bei Uni371-Cy5 (mit Uni371-MR121 gebunden):







Hier liegt eine leichte spektrale Verschiebung (spectral jump) vor.

Anstieg von F<sub>2</sub> (0,40  $\rightarrow$  0,70), konstantes  $\tau$  (2,0 ns) bei Uni370-Cy5:



Diese Bilder sind ein Beispiel für einen spektralen Sprung (spectral jump), hervorgerufen durch Änderungen der lokalen Polarität oder durch Isomerisierung der C-Brücke. Wie man an den obigen Beispielen sieht, bieten Fluoreszenzbilder von Carbocyaninund Oxazin-Farbstoffen sowie deren Konjugate mit Peptiden eine Fülle interessanter, spektroskopischer Effekte.

## 4.3 Tetramethylrhodamin auf Goldoberfläche



Abbildung 4.3-1: Ausschnitt aus einem Intensitätsbild von TMR-gebundenen Regionen einer Goldoberfläche

Das Bild der Bindungsregionen von TMR auf der aromatischen Monoschicht auf Gold der zeitaufgelösten Einzelmolekül-Spektroskopie zeigt, dass chemische Lithographie Vorlagen zur Immobilisation von fluoreszenzierenden Molekülen erzeugen kann. Die Anzahl er gebundenen Moleküle wird durch die Größe der Regionen und der Moleküle bestimmt. Die Größe dieser Bindungsregionen kann Dimensionen von ca. 6 nm betragen, wodurch auch einzelne Moleküle gebunden werden könnten [Lercel 1996].