

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Fakultät für Physik

der

Universität Bielefeld



vorgelegt von

Diplom-Physiker Ralf Brune

aus Bielefeld

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 2009

Inauguraldissertation

**Grenzen und Möglichkeiten
des Förster
Resonanz-Energietransfer**

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopische
Untersuchung an starren Systemen

Ralf Brune

Bielefeld, 29. Juni 2009

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer
Prof. Dr. Andreas Hütten

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach ISO 9706

Beiden

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Absorption und Emission	5
2.1.1	Lambert-Beer Gesetz	6
2.1.2	Franck-Condon-Prinzip	7
2.1.3	Interne Konversion	10
2.1.4	Interkombination	12
2.1.5	Stokes-Verschiebung und Spiegelbildregel	12
2.1.6	Anisotropie	13
2.1.7	Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute . .	14
2.1.8	Fluoreszenzlöschung	17
2.2	Chromophore	28
2.3	Mikroskopie	33
2.3.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	36
3	Material und Methoden	41
3.1	Proben	41
3.1.1	Oligo- und Polyprolin	41
3.1.2	Oligo(<i>para</i> -phenylenethinylen)	47
3.2	Messmethoden	50
3.2.1	Stationäre und zeitaufgelöste Spektroskopie	50
3.2.2	Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie mit alternierender Anregung	53
3.3	Datenaufnahme und Datenauswertung	57
3.3.1	Ensemblespektroskopie	57
3.3.2	Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie	59
4	Ergebnisse und Diskussion	63
4.1	Oligo- und Polyprolin	63
4.1.1	Intramolekulare Farbstoff-Farbstoff Wechselwirkungen . . .	78
4.2	Oligo(<i>para</i> -phenylenethinylen)	89
5	Zusammenfassung und Ausblick	101
	Literaturverzeichnis	105

Abbildungsverzeichnis

2.1	Elektronische Übergänge nach dem FRANCK-CONDON-Prinzip.	8
2.2	JABŁOŃSKI-Diagramm.	11
2.3	Dynamische Löschung eines Moleküls.	18
2.4	Statische Löschung eines Moleküls.	19
2.5	Verschiedene mögliche Orientierungen von Donor und Akzeptor. . .	23
2.6	Bestimmung des Überlappungsintegrals aus Donoremission und Akzeptorabsorption.	25
2.7	Abhängigkeit der Energietransfereffizienz vom Abstand.	27
2.8	Natürliche Chromophore β -Carotin und Chlorophyll b.	29
2.9	Darstellung der sp^2 -Hybridisierung der C-Atome in einem Benzolring. . .	30
2.10	Ausgedehnte π -Elektronensysteme mit Absorbtionsmaxima im sichtbaren Wellenlängenbereich.	32
2.11	Intensitätsverteilung der AIRY-Scheibe.	34
2.12	Intensitätsverteilung im Beugungsbild in der Umgebung des Fokus. . .	35
2.13	Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips.	37
3.1	Geometrie der Peptidbindung.	41
3.2	Strukturformel der Oligo- und Polyprolin Proben.	42
3.3	Reaktionsschema zur Farbstoffmarkierung von Biomolekülen.	44
3.4	OligoPPE Proben mit PMI und PMI(OAr) ₃	48
3.5	Längen und Winkel zur Berechnung der interchromophoren Distanz für die OligoPPE.	49
3.6	Abklingen der Fluoreszenz einer PMI Probe in Toluol.	52
3.7	Experimenteller Aufbau	55
4.1	Absorptionsspektren der Atto565-Pro _n -Atto488 Proben.	64
4.2	Absorptionsspektren der Atto647N-Pro _n -Atto565 Proben.	65
4.3	Fluoreszenzemissionsspektren der Atto565-Pro _n -Atto488 Proben. . .	67
4.4	Fluoreszenzanregungsspektren der Atto565-Pro _n -Atto488 Proben. . .	68
4.5	Fluoreszenzemissionsspektren der Atto647N-Pro _n -Atto565 Proben. . .	69
4.6	Fluoreszenzanregungsspektren der Atto647N-Pro _n -Atto565 Proben. . .	70
4.7	Zeitspur der für die Auswertung genutzten Photonenströme	72
4.8	<i>E-S</i> -Histogramme der Atto565-Pro _n -Atto488 Proben.	73
4.9	<i>E-S</i> -Histogramme der Atto647N-Pro _n -Atto565 Proben.	75
4.10	FRET-Effizienzen der Oligo- und Polyprolin Proben.	78

4.11	Absorptions- und Anregungsspektren von Cystein Proben in Ethanol und Wasser.	79
4.12	Anregungsspektren von Cystein Proben in Ethanol und Wasser bei 610 nm	81
4.13	Emissionsspektren von Cystein Proben in Ethanol und Wasser.	82
4.14	E_{PR} -S Histogramme von Cystein-Proben.	86
4.15	Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften von Atto647N und Cys durch Wechselwirkung mit der Thiolgruppe eines Cystein.	88
4.16	Absorptionsspektren von OligoPPE Proben.	90
4.17	Fluoreszenzemissionsspektren der gestreckten OligoPPE Proben.	91
4.18	Fluoreszenzemissionsspektren der geknickten OligoPPE Proben.	92
4.19	Bestimmung des Überlappungsintegrals aus den Spektren der PMI-Emission und der PMI(OAr) ₃ -Absorption	93
4.20	E -S-Histogramme der PMI-PPE _n ^s -PMI(OAr) ₃ Proben.	96
4.21	E -S-Histogramme der PMI-PPE _m ^k -PMI(OAr) ₃ Proben.	97
4.22	FRET-Effizienzen der OligoPPE Proben.	99
5.1	FRET-Effizienzen der OligoPPE, Oligo- und Polyprolin Proben.	103

Tabellenverzeichnis

2.1	Charakteristische Zeiten elektronischer Übergänge.	10
3.1	Fluoreszenzeigenschaften verschiedener kommerzieller Farbstoffe. . . .	43
3.2	Interchromophore Abstände und Dipolorientierungen der OligoPPE.	50
3.3	NanoLED Spezifikationen.	51
4.1	Lebensdauermessungen für Oligo- und Polyprolin Proben.	71
4.2	Transfereffizienz der Atto565-Pro _n -Atto488 Proben.	76
4.3	Transfereffizienz der Atto647N-Pro _n -Atto565 Proben.	77
4.4	Lebensdauermessungen für Cys-Proben in Wasser und Ethanol. . . .	84
4.5	Lebensdauermessungen für OligoPPE Proben.	94
4.6	Transfereffizienz der PMI-PPE-PMI(OAr) ₃ Proben.	98

Abkürzungsverzeichnis

ALEX	Alternierende Laser Anregung (engl. alternating laser excitation)
AOTF	Akustooptisch stimbbares Filter (engl. acoustooptical tunable filter)
APD	Lawinenphotodiode (engl. avalanche photodiode)
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine ($[(\text{CH}_3)_2\text{CH}]_2\text{NC}_2\text{H}_5$)
DMF	Dimethylformamid ($\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$)
EPR	Elektronenspinresonanz (engl. electron paramagnetic resonance)
EtOH	Ethanol, pro analysis ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)
FRET	FÖRSTER Resonanz-Energietransfer (engl. FÖRSTER resonance energy transfer)
H ₂ O	Wasser, zweifach destilliert (H_2O)
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (engl. highest occupied molecular orbital)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (engl. high performance liquid chromatography)
IC	Interne Konversion (engl. internal conversion)
ISC	Interkombination (engl. intersystem crossing)
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (engl. lowest unoccupied molecular orbital)
MeCN	Acetonitril, HPLC grade (CH_3CN)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid ($\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$)
NP	Normalphase (engl. normal phase)
ODS	Octadecylsilan ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SiH}_3$)
PBS	Salzlösung mit Phosphatpuffer, pH 7,4 (engl. phosphate buffered saline, enthält 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 10 mM Gesamtposphat)
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer (engl. photoinduced electron transfer)

PMI	Perylenmonoimid
PMI(OAr) ₃	tris(Aryloxy)perylene monoimid
PMT	Sekundärelektronenvervielfacher (engl. photomultiplier tube)
PPE	<i>para</i> -Phenylenethinylen
PSF	Punktabbildungsfunktion (engl. point spread function)
RP	Umkehrphase (engl. reversed phase)
TCSPC	zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (engl. time correlated single photon counting)
TEAA	Triethylammoniumacetat ($\text{CH}_3\text{COOH}\cdot\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$)
UV	Ultraviolett (engl. ultra violett)
VIS	Sichtbar (engl. visible)
VR	Vibrationsrelaxation (engl. vibrational relaxation)

1 Einleitung

Mikroskope ermöglichen Einblicke in, dem Menschen ohne Hilfsmittel, verborgene Bereiche. Gerade diese kleinen Strukturen faszinieren die Menschen jedoch schon seit Jahrtausenden. Der wahre Siegeszug der Lichtmikroskopie seit ihrer Entstehung zu Beginn des 17. Jahrhunderts, der bis heute vorangetrieben wird durch die Entwicklung immer neuer, höher auflösender Techniken, kann mit dem menschlichen Bedürfnis nach visueller Bestätigung erklärt werden. Das Lichtmikroskop erzeugt ein Bild des beobachteten Gegenstands, das das menschliche Auge so abbildet, wie einen realen Gegenstand. Dadurch entsteht beim Betrachter das Gefühl von Begreifen.

Prinzipiell werden mit einem Lichtmikroskop Strukturen aufgelöst, die nicht kleiner als etwa 200 nm sind. Dies folgt aus den Berechnungen von Abbe (1873), nach denen zwei Strukturen im Mikroskop gerade noch aufgelöst werden können, wenn sie einen Abstand haben, der dem Verhältnis aus Lichtwellenlänge und doppelter Brechzahl des Mediums mal Sinus des halben Öffnungswinkels des Objektivs entspricht.

In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie werden fluoreszierende Sonden eingesetzt, um Strukturen auflösen zu können. Die Auflösung wird dadurch erhöht, dass durch eine Lochblende im Strahlengang nur Licht aus dem Fokus zum Detektor gelangt. Üblicherweise werden Laser als Anregungslichtquelle eingesetzt. Der Laserstrahl wird mit einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur, also großem Öffnungswinkel, auf ein Volumen von etwa einem Femtoliter fokussiert. Die aus diesem kleinen Detektionsvolumen emittierten Photonen werden dann meist mit Lawinenphotodioden detektiert, die Einzelphotonenergienisse aufzeichnen können. Das Bild der Probe entsteht hierbei nicht direkt, sondern muss durch Rastern der Probe aus einzelnen Punkten zusammengesetzt werden.

Mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie können einzelne, fluoreszierende Moleküle in Lösung bis zu picomolaren Konzentrationen

nachgewiesen werden. Dazu muss gewährleistet sein, dass der Hintergrund keinen zu starken Beitrag leistet und zudem müssen geeignete Fluorophore verwendet werden.

Werden Messungen an einem Ensemble von Molekülen durchgeführt, wird der Mittelwert der gemessenen Größe bestimmt. Einzelmolekülmessungen hingegen zeichnen direkt die Veränderungen auf, die durch statische oder dynamische Prozesse hervorgerufen werden. Biologische Systeme weisen häufig statische oder dynamische Inhomogenitäten auf, und oft sind gerade diese Inhomogenitäten der Schlüssel zum Verständnis ihrer Funktion. Unterscheiden sich die Veränderungen von Molekül zu Molekül kann die Messung eines Ensembles die Veränderung nicht auflösen. Daher werden Einzelmolekültechniken verwendet, um die Inhomogenität der Proben zu diskriminieren.

Zur weiteren Erhöhung der Auflösung wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, die Abbildungen unterhalb der Beugungsgrenze ermöglichen. Dazu zählen sowohl die STED-Mikroskopie (engl. stimulated emission depletion) als auch STORM (engl. stochastic optical reconstruction microscopy). Bei der STED-Mikroskopie wird das Detektionsvolumen durch stimulierte Emission eingeschränkt. Die Auflösungserhöhung bei STORM wird durch stochastisches Ein- und Ausschalten der Fluorophore erreicht. Im Gegensatz zu diesen Techniken zählt der FÖRSTER Resonanz-Energietransfer (FRET) nicht zu den bildgebenden Verfahren. FRET beruht auf einer strahlungslosen Dipol-Dipol Wechselwirkung durch die die Energie eines elektronisch angeregten Donorfarbstoffs auf einen spektral passenden Akzeptorfarbstoff übertragen wird und kann genutzt werden, um Abstände im Bereich von 2 nm bis 10 nm zu bestimmen.^[14;18;45] Die FRET-Effizienz ist abhängig von:

- der spektralen Überlappung von Donoremissionsspektrum und Akzeptorabsorptionsspektrum,
- der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors,
- dem Absorptionskoeffizienten des Akzeptors,
- dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor,
- der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente der Fluorophore

und kann aus spektroskopischen Messungen bestimmt werden. Aufgrund der Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der inversen sechsten

Potenz des Abstands können aus den FRET-Effizienzen die Abstände der Fluorophore mit hoher Sensitivität berechnet werden. So wird FRET vielfach zur Abstandsmessung in biologisch relevanten Molekülen eingesetzt. Dazu werden diese mit einem Donor- und einem Akzeptorfluorophor markiert.

Viele Informationen, über die Funktion von Biomolekülen, können bereits aus relativen Abstandsmessungen gewonnen werden. Dennoch ist die Bestimmung von exakten Abständen im Bereich einiger Nanometer mittels FRET wünschenswert. Die Grundlage für exakte Abstandsmessungen auf Nanometerskalen sind stäbchenförmige Moleküle, die an beiden Enden geeignete Fluorophore tragen. Die Starrheit der Moleküle ist dabei, ebenso wie die definierte Ausrichtung der Dipolmomente der Fluorophore, entscheidend für die Präzision der Abstandsbestimmung. Zur Validierung der von Stryer und Haugland (1967) als „spektroskopisches Lineal“ (engl. spectroscopic ruler) bezeichneten Technik werden molekulare Lineale benötigt.^[49]

Stryer und Haugland nutzten Oligoprolin Moleküle mit ein bis zwölf Prolineinheiten als molekulare Lineale und konnten damit die Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der inversen sechsten Potenz des Abstands nachweisen. Eine exakte absolute Abstandsmessung erfolgte jedoch nicht.^[49]

Die Nutzung von Fluorophoren mit großem Absorptionskoeffizienten und hoher Fluoreszenzquantenausbeute ermöglicht auch die FRET-Messung an einzelnen Molekülen.^[2;19;54] Insbesondere können so dynamische Prozesse wie Faltungskinetiken dargestellt werden.^[41]

In dieser Arbeit soll FRET durch Ensemble- und Einzelmolekülmessungen vollständig charakterisiert werden. Dazu werden FRET-Messungen an Oligo- und Polyprolinen und an formtreuen Oligo(*para*-phenylenethinylen) (OligoPPE) Molekülen verglichen. OligoPPE sind extrem starre, organische Stäbchenmoleküle, bei denen eine definierte Orientierung der Übergangsdipolmomente der endständig gekoppelten Fluorophore erreicht werden kann. Durch einen Vergleich der FRET Effizienz, bestimmt aus Fluoreszenzspektroskopie, zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie und Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie mit alternierender Anregung (ALEX), werden die Grenzen der Zuverlässigkeit von FRET-Messungen ausgelotet und Konkurrenzprozesse wie fluo-

reszenzlöschende Dimerbildung identifiziert. Zudem wird der Einfluss der Orientierung der Übergangsdipolmomente auf FRET aufgezeigt.

2 Grundlagen

2.1 Absorption und Emission

Elektromagnetische Strahlung, die mit Materie wechselwirkt, kann transmittiert, elastisch oder inelastisch gestreut oder absorbiert werden.

Ist die Energie des eingestrahnten Photons zu klein, um die Materie anzuregen, wird das Photon elastisch gestreut (RAYLEIGH-Streuung). Die Energie des gestreuten Photons ändert sich dabei nicht.

Inelastische Streuung (RAMAN-Streuung) bezeichnet die Wechselwirkung, bei der Energie zwischen dem Photon und der Materie ausgetauscht wird, so dass sich die Energie des gestreuten Photons ändert. Wird Energie des Photons auf die Materie übertragen, heißt dieser Vorgang STOKES-RAMAN-Streuung. Bei Anti-STOKES-RAMAN-Streuung erfolgt ein Energieübertrag von angeregter Materie auf das Photon. Da die Wellenlänge des Lichts von der Energie abhängt, bewirkt der Energieübertrag eine Verschiebung der Wellenlänge des gestreuten Lichtes gegenüber dem eingestrahnten Licht.

Die Absorption läßt sich als resonante Kopplung zwischen dem einfallenden Lichtquant und dem elektronischen System beschreiben. Entspricht die Energie eines Photons der Energiedifferenz ΔE zwischen zwei Energieniveaus kann es zu Absorption kommen (Abbildung 2.2). Neben Auswahlregeln, die bestimmen, ob ein Übergang erlaubt ist (Spin-erhaltung), muß die Resonanzbedingung

$$\Delta E = h\nu \quad (2.1)$$

erfüllt sein, wobei ΔE die übertragene Energie, ν die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung und h die PLANCK-Konstante ist. Die Energie des Photons ergibt sich aus der Frequenz ν bzw. der Wellenlänge $\lambda = c/\nu$ der elektromagnetischen Welle und der PLANCK-Konstante. Quantenmechanisch kann ein Elektron bei der Absorption von Licht der Wellenlänge

λ unter Aufnahme der Energie $\Delta E = hc/\lambda$ aus dem elektronischen Singulettzustand S_0 auf einen energetisch höher gelegenen elektronischen Singulettzustand S_n übergehen, wenn der elektrische Feldstärkevektor des Anregungslichts parallel zum Übergangsdipolmoment des Moleküls orientiert ist.^[55]

Absorptionsprozesse im ultravioletten und sichtbaren Bereich beruhen auf elektronischen Übergängen. Ein Elektron wird durch Absorption eines Photons aus dem HOMO¹ in das LUMO² eines Fluorophors überführt und erreicht so einen elektronisch angeregten Zustand. Der erste angeregte Zustand S_1 ist bei Raumtemperatur $T = 293,15$ K aufgrund der BOLTZMANN-Verteilung

$$\frac{N(S_1)}{N(S_0)} = e^{\frac{-E}{k_B T}}, \quad (2.2)$$

mit der Teilchenzahl $N(S_n)$ des Zustands S_n und der BOLTZMANN-Konstante k_B bei einer Energiedifferenz $E = 2,5$ eV³, nahezu unbesetzt ($N_1/N_0 = 1 \cdot 10^{-43}$). Daher entspricht das HOMO dem Singulett-Grundzustand S_0 , und das LUMO dem ersten angeregten Singulettzustand S_1 .

Neben elektronischen Übergängen sind bei Molekülen auch Rotations- und Vibrationsübergänge möglich. Dadurch werden die bei Atomen scharfen Absorptionslinien zu Banden verbreitert, da vor allem bei größeren Molekülen eine Vielzahl von Übergängen eng beieinander liegen. Durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel ergeben sich die beobachtbaren kontinuierlichen Absorptionsspektren.

Die Abgabe der Energie bei der Rückkehr in den Grundzustand kann durch Aussenden eines Photons (Fluoreszenz oder Phosphoreszenz) oder strahlungslos durch Wärmeabgabe erfolgen (Abbildung 2.2).

2.1.1 Lambert-Beer Gesetz

Die Effizienz der Lichtabsorption, also das Absorptionsvermögen $A(\lambda)$ oder der Transmissionsgrad $T(\lambda)$ bei einer Wellenlänge λ durch ein

¹höchstes besetztes Molekülorbital (engl. highest occupied molecular orbital)

²niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (engl. lowest unoccupied molecular orbital)

³Die Energiedifferenz $E = 2,5$ eV entspricht einer Wellenlänge $\lambda = 496$ nm, also beispielsweise dem Absorptionsmaximum von Fluorescein in Methanol^[35]

absorbierendes Medium, läßt sich nach

$$A(\lambda) = -\lg T(\lambda) = \lg \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} \quad (2.3)$$

experimentell aus den Lichtintensitäten $I_0(\lambda)$ und $I(\lambda)$ vor und hinter dem zu untersuchenden Medium ermitteln.

Den linearen Zusammenhang zwischen Absorptionsvermögen und Konzentration beschreibt das LAMBERT-BEER-Gesetz

$$A(\lambda) = \lg \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \epsilon(\lambda)lc, \quad (2.4)$$

wobei $\epsilon(\lambda)$ der molare dekadische Absorptionskoeffizient, l die Weglänge im absorbierenden Medium und c die Konzentration des Absorbers ist. Der molare dekadische Absorptionskoeffizient $\epsilon(\lambda)$, als Maß für die Lichtabsorption durch ein Medium, ist dabei eine wellenlängenabhängige Materialkonstante. Daher läßt sich, bei bekanntem molarem Absorptionskoeffizienten, die Konzentration einer Probe spektroskopisch bestimmen.^[16]

Das LAMBERT-BEER-Gesetz gilt nur für monochromatisches Licht und verdünnte Lösungen ($c \leq 10^{-2}$ M), bei denen die gelösten Moleküle nicht wechselwirken. Abweichungen von der Linearität können durch Streuprozesse an Partikeln in der Probe oder durch Änderung des Brechungsindex bei hohen Konzentrationen hervorgerufen werden. Fluoreszenz und Phosphoreszenz können die Messung ebenfalls beeinträchtigen, haben aber aufgrund der Abstrahlung in alle Raumrichtungen nur einen geringen Anteil.

2.1.2 Franck-Condon-Prinzip

Erfolgt ein elektronischer Übergang in einem Molekül, wirkt durch die Umverteilung der elektrischen Ladung eine COULOMB-Kraft auf die Kerne. Die Änderung der Potentialflächen durch den Wechsel des elektronischen Zustands während des Übergangs führt zu einer Kernbewegung.

Nach der BORN-OPPENHEIMER-Näherung ist die Trägheit der Kerne viel größer als die der Elektronen. Der Anregungsprozess eines Elektrons erfolgt, im Vergleich zu molekularen Schwingungen (10^{-12} s bis

10^{-10} s), sehr schnell (10^{-15} s). Die Anregung überführt das Molekül in einen Rotations-Vibrations-Zustand eines höheren Singulettzustandes (S_n mit $n \geq 1$). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass ein elektronischer Übergang ohne Veränderung der Kernpositionen stattfindet. Dies stellt die Grundlage des FRANCK-CONDON-Prinzips dar. Der Übergang ist deshalb im Energiediagramm in Abbildung 2.1, in dem die potentielle Energie in Abhängigkeit von der Kernkonfiguration durch ein MORSE-Potential repräsentiert wird, als vertikaler Übergang dargestellt.

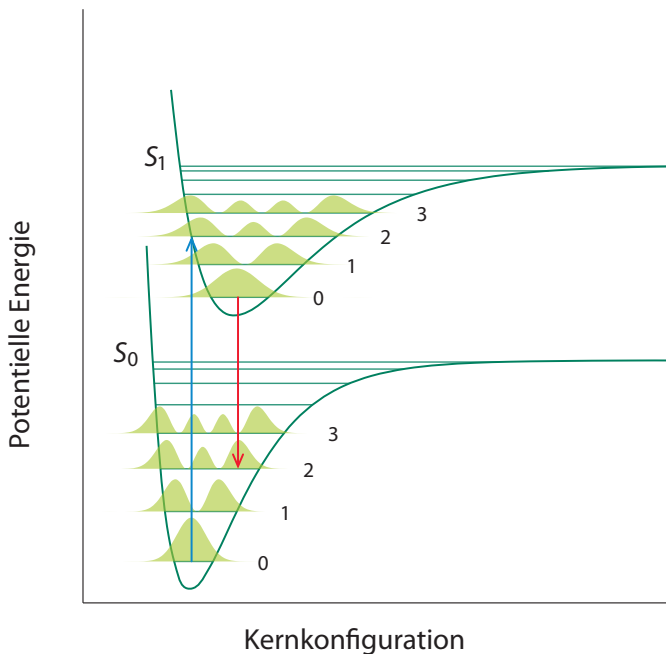


Abbildung 2.1: Elektronische Übergänge nach dem FRANCK-CONDON-Prinzip. Dargestellt sind jeweils die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für den Vibrationsgrundzustand und die ersten drei vibronisch angeregten Zustände des elektronischen Grundzustands S_0 und des ersten angeregten elektronischen Zustands S_1 . Die vertikalen Übergänge erfolgen aus dem Vibrationsgrundzustand vorwiegend in den Vibrationszustand mit der größten Aufenthaltswahrscheinlichkeit für diese Kernkonfiguration.

Klassisch tritt der Übergang auf, wenn die Abstände zwischen den Ker-

nen gleich der Gleichgewichtsbindungslänge des Moleküls im Grundzustand sind. Während des Übergangs bleibt die Position der Kerne unverändert. Folglich endet der Übergang, wenn die vertikale Linie, die diesen in Abbildung 2.1 repräsentiert, die Kurve der potentiellen Energie des niedrigsten angeregten Zustands schneidet. Elektronische Anregung erzeugt im allgemeinen einen stärkeren antibindenden Charakter der Molekülorbitale und erhöht damit die Gleichgewichtsbindungslänge. Daher ist die Potentialkurve des angeregten Zustands in Abbildung 2.1 gegenüber der des Grundzustands nach rechts verschoben. Der vertikale Übergang erfolgt nicht zwischen den Gleichgewichtsbindungsängen von Grundzustand und angeregtem Zustand, sondern endet in einem Wendepunkt einer Vibration, an dem die Kerne stationär die gleichen Bindungsängen haben wie der Ausgangszustand. Sobald der elektronische Übergang abgeschlossen ist, beginnt das angeregte Molekül mit der Energie des jeweiligen Vibrationszustands zu schwingen.

Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten der Moleküle im untersten Schwingungszustand des Grundzustands (nach der BOLTZMANN-Verteilung, Gleichung (2.2)). Zusätzlich zum reinen elektronischen Übergang gibt es mehrere vibronische Übergänge, deren Intensität von der relativen Position und Form der Potentialkurven abhängt (Abbildung 2.1).

Für viele Molekülzustände läßt sich die Gesamtwellenfunktion Ψ eines Zustands, im Rahmen der BORN-OPPENHEIMER-Näherung, als Produkt

$$\Psi = \Psi^{\text{el}} \Psi^{\text{vib}} \Psi^{\text{rot}} \quad (2.5)$$

aus elektronischer Wellenfunktion Ψ^{el} , Vibrations- Ψ^{vib} und Rotationswellenfunktion Ψ^{rot} schreiben. Der Beitrag der Rotation kann vernachlässigt werden und die Wahrscheinlichkeit des Übergangs zwischen dem Ausgangszustand (Index i) und dem Endzustand (Index f) ist proportional zum Übergangsdipolmoment $M_{fi} = |\langle \Psi_f | M | \Psi_i \rangle|^2$. Da der Dipolmomentoperator $M = \sum_j e r_j$ nur von den Koordinaten der Elektronen r_j relativ zum Ladungsmittelpunkt abhängt, kann die Übergangswahrscheinlichkeit als das Produkt

$$|\langle \Psi_f^{\text{el}} | M | \Psi_i^{\text{el}} \rangle|^2 |\langle \Psi_f^{\text{vib}} | \Psi_i^{\text{vib}} \rangle|^2 \quad (2.6)$$

geschrieben werden, wobei der zweite Teil der FRANCK-CONDON-Faktor ist. Qualitativ erfolgt der Übergang aus dem untersten Vibrationszustand

des Grundzustands in den Vibrationszustand des angeregten Zustands mit der größten Ähnlichkeit der Wellenfunktionen.

2.1.3 Interne Konversion

Die Energielücke zwischen aufeinander folgenden Singulettzuständen ($S_0, S_1, S_2, \dots, S_n$) nimmt mit zunehmender Energie des Elektrons ab. Die Rate der strahlungslosen Übergänge von einem Zustand in einen anderen ist im Allgemeinen umgekehrt proportional zur Energiedifferenz. Strahlungslose Übergänge zwischen höheren Zuständen (S_n nach S_{n-1}) erfolgen daher schnell (10^{-11} s bis 10^{-9} s) und bevölkern den niedrigsten angeregten Zustand S_1 . Dies gilt analog auch für Triplettzustände T_n . Die Übergänge werden als interne Konversion (IC, engl. internal conversion) bezeichnet, da sie zwischen Zuständen gleicher Spin-Multiplizität erfolgen. Die zugehörige Rate der Internen Konversion ist k_{IC} .

Die Vibrationsrelaxation (VR, engl. vibrational relaxation, 10^{-12} s bis 10^{-10} s) durch Stöße mit der Umgebung (z. B. Lösungsmittelmoleküle) erfolgt im Vergleich zu elektronischer Relaxation schnell. Daher wird das Molekül zunächst strahlungslos mit der Rate k_{VR} aus den angeregten Schwingungsniveaus in den Vibrationsgrundzustand des elektronischen Niveaus übergehen.

Tabelle 2.1: Charakteristische Zeiten der im JABŁOŃSKI-Diagramm (Abbildung 2.2) dargestellten elektronischen Übergänge.

Übergang	Beschreibung	Zeit (s)
$S_0 + h\nu \rightarrow S_n$	Absorption	10^{-15}
$S'_n \rightarrow S_n + k_B T$	Vibrationsrelaxation (VR)	$10^{-12} - 10^{-10}$
$T'_n \rightarrow T_n + k_B T$	Vibrationsrelaxation (VR)	$10^{-12} - 10^{-10}$
$S_n \rightarrow S_{n-1} + k_B T$	Interne Konversion (IC)	$10^{-11} - 10^{-9}$
$T_n \rightarrow T_{n-1} + k_B T$	Interne Konversion (IC)	$10^{-11} - 10^{-9}$
$S \leftrightarrow T$	Interkombination (ISC)	$10^{-10} - 10^{-8}$
$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu'$	Fluoreszenz	$10^{-10} - 10^{-7}$
$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu''$	Phosphoreszenz	$10^{-6} - 10^0$

Ein Molekül, das durch Absorption von höherenergetischen Photonen beispielsweise direkt in den S_3 Zustand angeregt wird, relaxiert durch interne Konversion in den S_1 Zustand, bevor ein Photon emittiert werden kann. Die Relaxation unter Aussendung eines Photons aus dem niedrigsten angeregten Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 wird als Fluoreszenz bezeichnet.

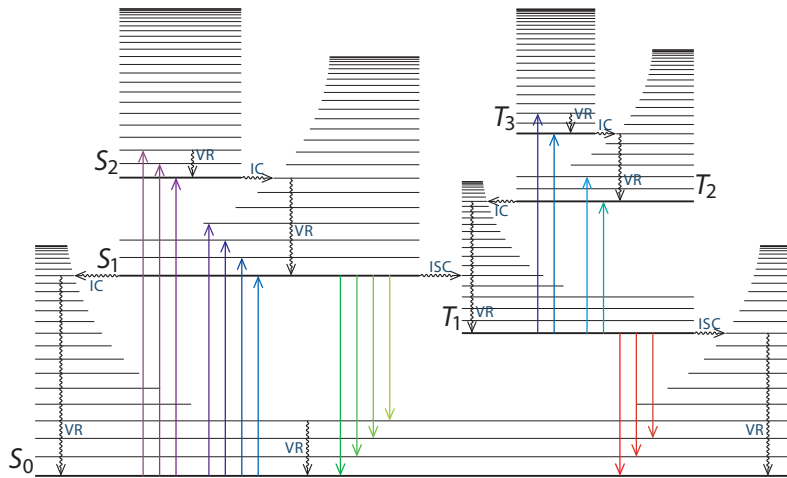


Abbildung 2.2: JABŁOŃSKI-Diagramm. Schematisch dargestellt sind die Vibrationsniveaus der ersten drei Singulettzustände und der ersten drei Tripletzustände. Die violetten und blauen Pfeile symbolisieren Absorptionsvorgänge, die grünen Fluoreszenz und die roten Phosphoreszenz. Strahlungslose Übergänge (IC, ISC, VR, siehe Tabelle 2.1) sind durch geschwungene Pfeile dargestellt.

Die KASHA-Regel besagt, dass radiative Prozesse oder Reaktionen im angeregten Zustand aus den niedrigsten elektronisch angeregten Zuständen (S_1 oder T_1) erfolgen. Daher ist das Fluoreszenzemissionsspektrum in der Regel unabhängig von der Anregungswellenlänge.

Die Energielücke zwischen S_0 und S_1 ist deutlich größer als zwischen anderen benachbarten Zuständen. Daher ist die Lebensdauer des S_1 Zustands wesentlich länger als die höher angeregten Singulettzustände. Radiative Übergänge aus dem S_1 Zustand in den Grundzustand können

dadurch effektiv mit nichtradiativen Prozessen konkurrieren. Eine Ausnahme von dieser Regel kann bei atypischen Molekülen wie Azulen, das aus dem S_2 Zustand fluoresziert^[53], beobachtet und durch eine große Energielücke zwischen S_2 und S_1 erklärt werden.

2.1.4 Interkombination

Interkombination (ISC, engl. intersystem crossing) ist definiert als ein nichtradiativer Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität und erfolgt unter Spinumkehr des angeregten Elektrons. Übergänge zwischen Zuständen gleicher Spin-Multiplizität (z. B. Singulett-Singulett) sind erlaubt und erfolgen mit größerer Wahrscheinlichkeit als Übergänge zwischen Zuständen unterschiedlicher Multiplizität (z. B. Singulett-Triplett). Die Interkombinationsrate wird mit k_{ISC} bezeichnet. Obwohl diese Übergänge formell verboten sind, können sie erfolgen, da die Auswahlregeln durch Spin-Bahn-Kopplung oder vibronische Kopplung teilweise aufgehoben werden können. Aufgrund der geringeren Wahrscheinlichkeit erfolgen diese Übergänge langsam (10^{-10} s bis 10^{-8} s).

Direkte Absorption in einen Triplettzustand T_n aus dem Grundzustand S_0 ist ebenfalls spinverboten und die Besetzung der Triplettzustände erfolgt vorwiegend durch ISC zwischen S_1 und T_1 . Anregung aus dem T_1 Zustand in höhere Triplettzustände kann durch Absorption von Photonen erfolgen. Die absorbierten Wellenlängen gleichen dabei denen der Singulettabsorption. Da der Übergang vom T_1 Zustand in den S_0 Grundzustand ebenfalls nicht erlaubt ist erfolgt er langsam (10^{-6} s bis 10^0 s). Die Relaxation unter Aussendung eines Photons aus dem Triplettzustand T_1 in den Grundzustand S_0 wird als Phosphoreszenz bezeichnet.

2.1.5 Stokes-Verschiebung und Spiegelbildregel

Das Emissionsspektrum ist, gegenüber dem Absorptionsspektrum, zu niedrigeren Energien verschoben, da nach der KASHA-Regel die Emission nach vibronischer Relaxation aus dem S_1 Zustand in die Rotations-Vibrations-Zustände des S_0 Grundzustands erfolgt (Abbildung 2.2). Die Absorption hingegen erfolgt in höhere Vibrationszustände der angeregten Singulettzustände und benötigt daher mehr Energie. Die emittierten

Photonen haben durch diese so genannte STOKES-Verschiebung eine geringere Energie als die absorbierten.^[29]

Eine spektrale Verschiebung zu größeren Wellenlängen wird als bathochrom bezeichnet, eine solche zu kleineren Wellenlängen als hypsochrom. Erhöht sich der molare Absorptionskoeffizient nennt man dies hyperchrom, das Gegenteil ist hypochrom.^[16]

Das Emissionsspektrum entspricht in vielen Fällen nahezu einem Spiegelbild des Absorptionsspektrums (Spiegelbild-Regel). Da sich die Potentiale des Grundzustands und des ersten angeregten Zustands gleichen (Abbildung 2.1) weisen die Vibrationszustände eine ähnliche Verteilung auf. Daraus resultiert eine ähnliche Verteilung der möglichen Übergänge und die erzeugten Spektren ähneln sich. Wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, erfolgt die Absorption in die Vibrationszustände mit dem größten Überlapp der Wellenfunktionen. Für die Emission ist ebenfalls ein Überlapp der Wellenfunktionen notwendig. Die Spiegelbild-Regel gilt für Moleküle deren Absorptionsspektrum durch die Absorption in die Vibrationszustände des S_1 Zustands bestimmt ist und bei denen kaum Anregung höherer elektronischer Zustände erfolgt.^[29]

2.1.6 Anisotropie

Fluorophore absorbieren bevorzugt Photonen, deren elektrische Vektoren parallel zu den Übergangsmomenten der Moleküle ausgerichtet sind. Die Momente der Übergänge, die bei Absorption und Emission in Molekülen erfolgen, könne als schwingende Dipole aufgefasst werden und haben damit eine definierte Orientierung. Die Orientierung der Dipolmomente für die Absorption und die Emission ist bezüglich der molekularen Achse festgelegt. Die Fluoreszenzanisotropie r_a ist definiert als:

$$r_a = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + 2F_{\perp}}. \quad (2.7)$$

Dabei werden die anteiligen Fluoreszenzintensitäten parallel F_{\parallel} und senkrecht F_{\perp} zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts betrachtet.

In einer isotropen Lösung sind die Fluorophore zufällig orientiert und es werden bei Anregung mit polarisiertem Licht vorwiegend solche

Fluorophore angeregt, deren Übergangsdipolmoment für die Absorption parallel zum elektrischen Feld des Anregungslichts ausgerichtet ist. Da die Orientierung der Dipolmomente für Absorption und Emission relativ zueinander konstant ist, ergibt sich eine polarisierte Fluoreszenzemission. Der Grad der Depolarisation wird durch den von Anregungsdipolmoment und Emissionsdipolmoment eingeschlossenen Winkel, die Zeitkonstante der Fluoreszenzemission und die Zeitkonstante der Rotationsdiffusion bestimmt.

2.1.7 Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzlebensdauer repräsentiert die mittlere Verweildauer eines fluoreszierenden Moleküls im angeregten Zustand bevor es in den Grundzustand zurück fällt.

Die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ läßt sich als Maß für die Fluoreszenz auffassen. Sie ist als das Verhältnis der von einem Molekül emittierten zu den absorbierten Photonen definiert:

$$\phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}}. \quad (2.8)$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute läßt sich auch über die Übergangsraten aller Desaktivierungsprozesse beschreiben. Hierbei ist zwischen radiativen k_r und nichtradiativen k_{nr} Prozessen zu unterscheiden. Unter radiativen Prozessen versteht man solche, die die Anregungsenergie unter Aussendung eines Photons abgeben.

Die Rate der nichtradiativen Prozesse setzt sich aus den Raten der strahlungslosen Deaktivierung aus Tabelle 2.1 zusammen:

$$k_{nr} = k_{VR} + k_{IC} + k_{ISC} + k_q. \quad (2.9)$$

Der letzte Summand k_q beschreibt darin alle weiteren nichtradiativen Prozesse, wie z. B. Fluoreszenzlöschung oder chemische Reaktionen (Abschnitt 2.1.8).

Befinden sich $N(t)$ Moleküle im angeregten Zustand, so ergibt sich für die Kinetik des Desaktivierungsprozesses:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr})N(t) \quad (2.10)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung mit der Bedingung $N(t = 0) = N_0$ ergibt einen exponentiellen Abfall für die Deaktivierung:

$$N(t) = N_0 e^{-(k_r+k_{nr})t} . \quad (2.11)$$

Die Fluoreszenzintensität $F(t)$ ist proportional zur Anzahl der angeregten Moleküle $N(t)$, so dass sich folgende Ersetzung ergibt:

$$F(t) = F_0 e^{-(k_r+k_{nr})t} . \quad (2.12)$$

Die Lebensdauer τ eines angeregten Zustands wird durch jeden Prozess, der diesen mit einer Rate k entvölkert, beeinflusst. Sie ist definiert als mittlere Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand verbleibt, bevor es in den Grundzustand zurück fällt. Eine anhand emittierter Photonen ermittelte Fluoreszenzlebensdauer τ_f , gegeben aus:

$$F(t) = F_0 e^{-t/\tau_f} , \quad (2.13)$$

hängt wie folgt von den radiativen und nichtradiativen Raten ab:

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} . \quad (2.14)$$

Mit diesen Definitionen kann die Fluoreszenzquantenausbeute als

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \frac{\tau_f}{\tau_r} \quad (2.15)$$

ausgedrückt werden, wobei $\tau_r = 1/k_r$ die radiative Lebensdauer bezeichnet.

Experimentell lässt sich die Fluoreszenzquantenausbeute absolut oder relativ bestimmen. Zur Bestimmung von absoluten Fluoreszenzquantenausbeuten kann der thermische Linseneffekt (engl. thermal lensing oder engl. thermal blooming) verwendet werden. Hierbei wird die durch nichtradiative Prozesse freiwerdende Wärme, über eine Brechungsindexänderung im Medium, gemessen. ^[21;22]

Das in einer Probe absorbierte Licht erzeugt eine räumlich inhomogene Temperaturverteilung. Da der Brechungsindex von der Temperatur

abhängt, ergibt sich so eine ortsabhängige Verteilung des Brechungsindex. Diese Verteilung wirkt als thermische Linse und beeinflusst die Ausbreitung des einfallenden Strahls und verzerrt die Wellenfront. Die Größe dieser Verzerrung wird durch die Messung der Transmission hinter einer kleinen Blende im Fernfeld bestimmt.

Für die relative Messung wird die Fluoreszenzemission einer Probe mit der eines Fluorophors bekannter Fluoreszenzquantenausbeute verglichen. Dazu existieren tabellierte Standards der Fluoreszenzquantenausbeute. Die über den Wellenlängenbereich der Emission integrierten Fluoreszenzintensitäten der Probe F und der Referenz F_r werden dabei verglichen. Die Fluoreszenzquantenausbeute der Probe kann nach:

$$\phi = \phi_r \frac{F A_r(\lambda_{\text{exc}}) n^2}{F_r A(\lambda_{\text{exc}}) n_r^2} \quad (2.16)$$

berechnet werden. Darin ist ϕ die Fluoreszenzquantenausbeute, $A(\lambda_{\text{exc}})$ die Absorption bei der Anregungswellenlänge λ_{exc} und n der jeweilige Brechungsindex. Der Index r verweist auf die Referenz mit der bekannten Fluoreszenzquantenausbeute.^[29]

Häufig lässt sich das Fluoreszenzabklingverhalten nur durch die Summe mehrerer Exponentialfunktionen:

$$F(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i}, \quad (2.17)$$

mit der Normierung $\sum_i a_i = 1$, beschreiben. Die Faktoren a_i bezeichnen dabei die den Lebensdauern τ_i zugeordneten Amplituden.

Für den nicht allgemein gültigen Fall, dass die Beiträge zu dem multiexponentiellen Abfall durch unterschiedliche, nicht wechselwirkende fluoreszierende Moleküle mit Lebensdauern τ_i hervorgerufen werden, kann aus den Faktoren a_i der relative Anteil A_i der einzelnen Populationen bestimmt werden:

$$A_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_i a_i \tau_i}. \quad (2.18)$$

Zur experimentellen Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer eines Moleküls können zwei unterschiedliche Prinzipien verwendet werden. Zum einen die Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen

(TCSPC, engl. time correlated single photon counting), zum andern die Phasenmodulationsmethode.

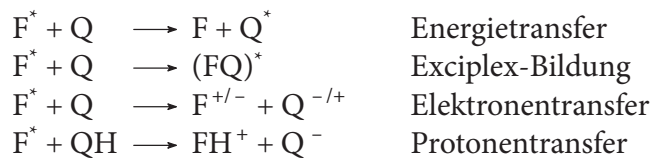
Bei der TCSPC-Methode wird ein möglichst kurzer Lichtpuls (viel kürzer als die zu messende Lebensdauer) zur Anregung der Probe verwendet. die Fluoreszenzlebensdauer lässt sich aus dem zeitabhängigen Intensitätsverlauf nach der Anregung ermitteln (Abschnitt 3.2.1).

Bei der Phasenmodulationsmethode erfolgt die Anregung der Probe intensitätsmoduliert. Die Intensität des Anregungslichts wird dabei sinusförmig mit einer Frequenz von typischerweise 100 MHz verändert.^[29] Das emittierte Fluoreszenzlicht ist unter diesen Bedingungen mit der gleichen Frequenz moduliert. Aufgrund der Verweildauer im angeregten Zustand kommt es jedoch zu einer Phasenverschiebung gegenüber der Anregung aus der die Lebensdauer bestimmt werden kann.

Die Fluoreszenzlebensdauer folgt einem exponentiellen Abfall und nicht alle im Anregungsmaximum angeregten Moleküle emittieren zum Zeitpunkt der maximalen Emission. Daher verschmiert die Intensitätsdifferenz der modulierten Anregung. Aus dieser Verminderung der Maximum zu Minimum Differenz kann die Fluoreszenzlebensdauer ebenfalls bestimmt werden.

2.1.8 Fluoreszenzlöschung

Als Fluoreszenzlöschung (engl. quenching) bezeichnet man die strahlungslose Rekombination eines angeregten Moleküls durch Wechselwirkung mit einem anderen Molekül. Fluoreszenzlöschung kann durch eine Vielzahl von Mechanismen erfolgen. Folgende bimolekulare Prozesse können zur Fluoreszenzlöschung beitragen:



Der Energietransfer ist in Abschnitt 2.1.8 ausführlich beschrieben. Dabei überträgt ein angeregtes Molekül (Donor D) seine Anregungsenergie strahlungslos, mittels Dipol-Dipol-Wechselwirkung, auf ein anderes Mo-

lekül (Akzeptor A).

Als photoinduzierten Elektronentransfer bezeichnet man die Übertragung eines Elektrons zwischen einem angeregten Molekül und einem geeigneten Molekül im Grundzustand. Dabei hängen sowohl die Transferichtung, als auch die Effizienz und die Geschwindigkeit von Faktoren wie den Redoxpotentialen, der relativen Orientierung der Moleküle und dem Abstand ab.

Bei der Exciplexbildung kommt es zu einer Molekülverbindung, die nur im angeregten Zustand stabilisiert ist. Der Komplex zerfällt dann strahlungslos oder unter Aussendung eines Photons in die entsprechenden Grundzustände der Einzelmoleküle.

Der Protonentransfer ist eine Säure-Base-Reaktion die auf Veränderung der Säurekonstanten der Moleküle im angeregten Zustand basiert. Voraussetzung dafür ist die Existenz von aciden Protonen oder basischen Gruppen.

Prinzipiell kann zwischen zwei Arten der Fluoreszenzlöschung unterschieden werden, der dynamischen und der statischen Fluoreszenzlöschung.

Bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung (Abbildung 2.3) kommt es während der Lebensdauer des angeregten Zustands eines Moleküls zu einem Stoß mit dem Löschmolekül. Die Desaktivierung erfolgt strahlungslos, die Energie wird dabei in Wärme umgewandelt. Im folgenden Reaktionsschema wird die Verbindung F^* im ersten angeregten Zustand S_1 durch Wechselwirkung mit der Löschsubstanz (engl. Quencher) Q deaktiviert:

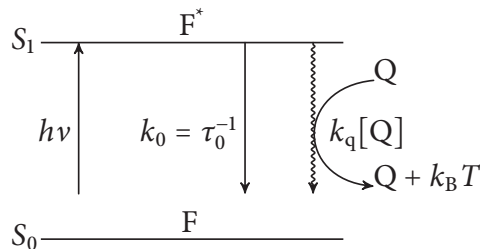
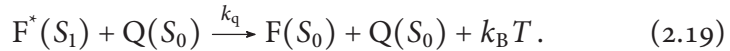


Abbildung 2.3: Dynamische Löschung eines Moleküls F^* im ersten angeregten Zustand S_1 durch Löschmoleküle Q .



Unter diesen Bedingungen wird die Fluoreszenzintensität F mit steigender Konzentration der Löschesubstanz vermindert. Der Einfluss der Löschesubstanz kann durch die STERN-VOLMER-Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{k_0 + k_q[Q]}{k_0} = 1 + \frac{k_q[Q]}{k_0} = 1 + K_d[Q], \quad (2.20)$$

dabei ist F_0 die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit der Löschesubstanz (nur abhängig von der Rate k_0) und $[Q]$ die Konzentration der Löschesubstanz. Es ergibt sich eine Gerade, wenn das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten mit und ohne Löschesubstanz gegen die Konzentration der Löschesubstanz aufgetragen wird. Aus der Steigung der Geraden lässt sich die STERN-VOLMER-Konstante $K_d = k_q \tau_0$ bestimmen. Wenn die Fluoreszenzlebensdauer τ_0 der ungelöschten Verbindung bekannt ist, kann die Löschrates k_q errechnet werden. Diese Art der Fluoreszenzlöschung wird als dynamische Fluoreszenzlöschung bezeichnet, da dynamisch, durch Stöße mit Löschemolekülen, die Lebensdauer des angeregten Zustandes reduziert wird.

Im Gegensatz dazu ändert sich die Lebensdauer des angeregten Zustands bei der statischen Fluoreszenzlöschung (Abbildung 2.4) nicht. Hierbei bildet sich aus der fluoreszierenden Verbindung und der Löschesubstanz ein Komplex, der nicht oder nur schwach fluoresziert. Die Anzahl der anregbaren Fluorophore wird dadurch reduziert.

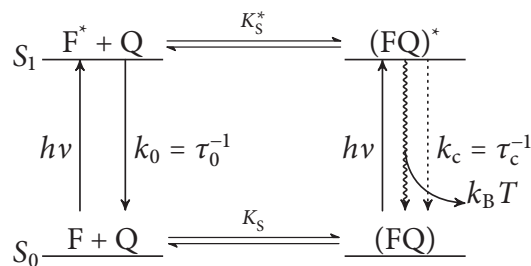


Abbildung 2.4: Statische Löschung eines Moleküls F durch Komplexbildung mit dem Löschemolekül Q .

Für die statische Löschung mit Bildung eines nichtfluoreszierenden Komplexes ergibt sich die STERN-VOLMER-Gleichung:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q] = 1 + \frac{[(FQ)][Q]}{[F][Q]}. \quad (2.21)$$

Die statische STERN-VOLMER-Konstante ist dann gleich der Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung:

$$K_s = \frac{[(FQ)]}{[F][Q]}. \quad (2.22)$$

Für eine rein dynamischen Löschung gilt $F_0/F = \tau_0/\tau$, während bei rein statischer Löschung unter Bildung nicht fluoreszierender Komplexe $\tau_0/\tau = 1$ gilt, die Fluoreszenzlebensdauer also nicht beeinflusst wird. Die Art der Löschung läßt sich daher experimentell, durch stationäre und zeitaufgelöste Löschemperimente, unterscheiden.

Meistens treten sowohl dynamische als auch statische Löschung auf. Die STERN-VOLMER-Gleichungen können dann kombiniert werden und es ergibt sich:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_d[Q]) (1 + K_s[Q]). \quad (2.23)$$

Förster Resonanz-Energietransfer

Befinden sich zwei fluoreszierende Moleküle (Donor D im angeregten Zustand und Akzeptor A im Grundzustand) in unmittelbarer Nähe zueinander, besteht eine Wahrscheinlichkeit für einen Energieübertrag vom Donor zum Akzeptor. Entspricht die Energiedifferenz des Absorptionsübergangs des benachbarten Akzeptors der des Fluoreszenzübergangs des Donors, können diese, bei ausreichender Kopplung zwischen Donor und Akzeptor, zeitgleich stattfinden. Die Spektren mehratomiger Moleküle sind meist stark verbreitert, so dass die spektrale Überlappung (Abbildung 2.6) oftmals ausreicht, damit ein solcher Energietransfer erfolgt.

Bei quantenmechanischer Betrachtung der Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen und unter der Annahme, dass nur ein Elektron des Donors (1) und ein Elektron des Akzeptors (2) an der Wechselwirkung

beteiligt sind, können die Wellenfunktionen des Ausgangszustands Ψ_i und Endzustands Ψ_f folgendermaßen geschrieben werden^[52]:

$$\begin{aligned}\Psi_i &= \frac{1}{\sqrt{2}} (\Psi_{D^*}(1) \Psi_A(2) - \Psi_{D^*}(2) \Psi_A(1)) \\ \Psi_f &= \frac{1}{\sqrt{2}} (\Psi_D(1) \Psi_{A^*}(2) - \Psi_D(2) \Psi_{A^*}(1)),\end{aligned}\quad (2.24)$$

wobei die Wellenfunktionen der Elektronen des Donors mit D und die des Akzeptor mit A bezeichnet sind und das Sternchen den angeregten Zustand signalisiert. Das Austauschmatrixelement, das die Kopplung zwischen dem Ausgangs- und Endzustand beschreibt, kann wie folgt geschrieben werden:

$$U = \langle \Psi_i | V | \Psi_f \rangle, \quad (2.25)$$

wobei V der Störanteil des Hamilton-Operators $\hat{H} = \hat{H}_D + \hat{H}_A + V$ des Gesamtsystems ist. Die Wechselwirkung U kann als Summe von zwei Komponenten U_C und U_{ex} geschrieben werden:

$$\begin{aligned}U &= \underbrace{\langle \Psi_{D^*}(1) \Psi_A(2) | V | \Psi_D(1) \Psi_{A^*}(2) \rangle}_{U_C} \\ &\quad - \underbrace{\langle \Psi_{D^*}(1) \Psi_A(2) | V | \Psi_D(2) \Psi_{A^*}(1) \rangle}_{U_{ex}}.\end{aligned}\quad (2.26)$$

Der erste Anteil U_C charakterisiert dabei die COULOMB-Wechselwirkung zwischen den Multipolen, die zu einem Übergang des Elektrons des Donors in den Grundzustand bei gleichzeitigem Übergang des Elektrons des Akzeptors in den angeregten Zustand führt. Der zweite Anteil U_{ex} beschreibt einen Elektronenaustausch zwischen Donor und Akzeptor.

Die Austauschwechselwirkung U_{ex} ist ein quantenmechanischer Effekt der aus der Antisymmetrisierung der Wellenfunktionen der Elektronen resultiert.^[9] Der Elektronenaustausch ist nur möglich, wenn die Orbitale überlappen, die Moleküle also in direktem Kontakt stehen. Daher ist die Austauschwechselwirkung kurzreichweitig (< 1 nm) und fällt exponentiell ab.^[31] Diese Art der Wechselwirkung wird als DEXTER-Energietransfer bezeichnet.

Der COULOMB Term U_C kann als Multipolentwicklung geschrieben werden:

$$U_C = U^{\text{dd}} + \underbrace{U^{\text{dq}} + \dots}_{\text{höhere Ordnungen}} \quad (2.27)$$

Die Monopolterme verschwinden, da die Moleküle neutral sind, und die elektrische Dipol-Dipol Wechselwirkung U^{dd} tritt als niedrigste Ordnung auf. Die höheren Ordnungen, wie die elektrische Dipol-Quadrupol Wechselwirkung U^{dq} und andere Kombinationen von elektrischen und magnetischen Multipolmomenten, können gegenüber der dominanten Dipol-Dipol Wechselwirkung vernachlässigt werden.^[9;15;52] Diese Dipol-Dipol Wechselwirkung wird als FÖRSTER Resonanz-Energietransfer (FRET) bezeichnet.

Die Wechselwirkung zwischen dem Übergangsdipolmoment \mathbf{M}_D der Donoremission und dem Übergangsdipolmoment \mathbf{M}_A der Akzeptoranregung kann durch

$$U^{\text{dd}} = \frac{\mathbf{M}_D \cdot \mathbf{M}_A}{r^3} - 3 \frac{(\mathbf{M}_D \cdot \mathbf{r})(\mathbf{M}_A \cdot \mathbf{r})}{r^5} \quad (2.28)$$

beschrieben werden, wobei \mathbf{r} der Vektor zwischen den Zentren der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor ist. Bezieht man die Winkel zwischen den Vektoren (Abbildung 2.5) mit ein erhält man:

$$U^{\text{dd}} = a \frac{|\mathbf{M}_D||\mathbf{M}_A|}{r^3} (\cos \theta_{\text{DA}} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A), \quad (2.29)$$

dabei bezeichnet θ_{DA} den Winkel zwischen den Dipolmomenten von Donor und Akzeptor und θ_D und θ_A den Winkel zwischen dem jeweiligen Dipolmoment und dem Verbindungsvektor \mathbf{r} . Der Faktor a ist von der Wahl des Maßsystems abhängig und beträgt $a = 5,04$, wenn die Wechselwirkung U^{dd} in cm^{-1} , der Abstand r in nm und die Übergangsdipolmomente in Debye ($1\text{D} = 3,335\,64 \cdot 10^{-30}\text{ C}\cdot\text{m}$) angegeben sind.^[52] Die Winkelabhängigkeit der Dipol-Dipol Wechselwirkung U^{dd} wird mit

$$\kappa^2 = (\cos \theta_{\text{DA}} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (2.30)$$

bezeichnet und kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Wie in Abbildung 2.5 dargestellt, ergibt sich $\kappa^2 = 4$ für kollineare, $\kappa^2 = 1$ für parallele

und $\kappa^2 = 0$ für senkrecht zueinander angeordnete Dipolmomente.^[7;52] ein Durchschnittswert von $\kappa^2 = 2/3$ ^[15] ergibt sich für Moleküle, die viel schneller als die Zerfallsrate des Donors rotieren (dynamisch isotrope Mittelwertbildung). In einem starren Medium, in dem die Moleküle statistisch zufällig verteilt und fixiert sind, folgt ein Durchschnittswert von $\kappa^2 = 0,476$ (statisch isotrope Mittelwertbildung).^[34;47]

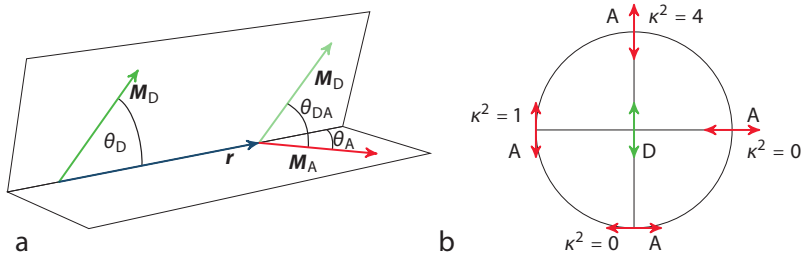


Abbildung 2.5: (a) Winkelbeziehungen zwischen den Übergangsdipolmomenten von Donor und Akzeptor. (b) Verschiedene mögliche Orientierungen von Donor und Akzeptor mit den zugehörigen Werten von κ^2 .

Die Dipolnäherung ist für Punktdipole gültig, also für Abstände r der Dipolmomente viel größer als die Ausdehnung der konjugierten Systeme (Abschnitt 2.2). Die Theorie bezieht sich auf den Abstandsbereich von $r = 1$ nm bis 10 nm.^[36]

Die Energietransferrate k_t ergibt sich durch Einsetzen der Bestandteile von Gleichung (2.26) in FERMIS Goldene Regel:

$$k_t = \frac{2\pi}{\hbar} U^2 \rho. \quad (2.31)$$

Hier bezeichnet ρ ein, durch die FRANCK-CONDON-Faktoren, bestimmtes Maß für die Dichte der wechselwirkenden Ausgangs- und Endzustände.^[52]

Im Fall der Dipol-Dipol Wechselwirkung U^{dd} ergibt sich die Transfertrate k_t^{dd} durch Einsetzen von Gleichung (2.29) zu:

$$k_t^{\text{dd}} = k_D \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6. \quad (2.32)$$

Hierbei wird vorausgesetzt, dass der Abstand r sich während der Lebensdauer τ_D des Donors nicht ändert. Der FÖRSTER Radius R_0 bezeichnet den Abstand, bei dem die Wahrscheinlichkeit die Anregungsenergie auf den Akzeptor zu Übertragen gerade 0,5 beträgt, die Transferrate k_t^{dd} also gleich der Donoremissionsrate k_D ist. Der FÖRSTER Radius kann aus dem spektralen Verlauf von Donoremission $F_D(\lambda)$ und Akzeptorabsorption $\epsilon_A(\lambda)$ und der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_D des Donors gemäß

$$R_0 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2}{128 \pi^5 N_A n^4} \int_0^\infty \phi_D F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.33)$$

bestimmt werden. Darin ist $N_A = 6,022\,141\,79(30) \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ die AVOGADRO Konstante und n der Brechungsindex des umgebenden Mediums.^[27]

Das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ beschreibt den Grad der spektralen Überlappung der Donoremission und Akzeptorabsorption (Abbildung 2.6)

$$J(\lambda) = \int_0^\infty \phi_D F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda = \frac{\int_0^\infty \phi_D F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda}. \quad (2.34)$$

Die Donoremission $F_D(\lambda)$ ist darin so normiert, dass $\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda = 1$ und die Akzeptorabsorption $\epsilon_A(\lambda)$ ist in $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ gegeben.

Für die in Abbildung 2.6 beispielhaft dargestellten Spektren der Farbstoffe Atto488 (Donor, Emissionsspektrum) und Atto565 (Akzeptor, Absorptionsspektrum) kann das Überlappungsintegral

$$J(\lambda) = 3,694\,495 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{nm}^4 \quad (2.35)$$

berechnet werden.

Durch Zusammenfassen der Konstanten in Gleichung (2.33) ergibt sich durch die Wahl des Maßsystems (Wellenlänge in nm und Überlappungsintegral in $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{nm}^4$) der FÖRSTER Radius in nm zu:

$$R_0 = 2,108 \left(\kappa^2 n^{-4} J(\lambda) \right)^{1/6}. \quad (2.36)$$

Hieraus lässt sich für beliebige Farbstoffe mit bekannten spektralen Eigenschaften direkt der jeweilige FÖRSTER Radius bestimmen.

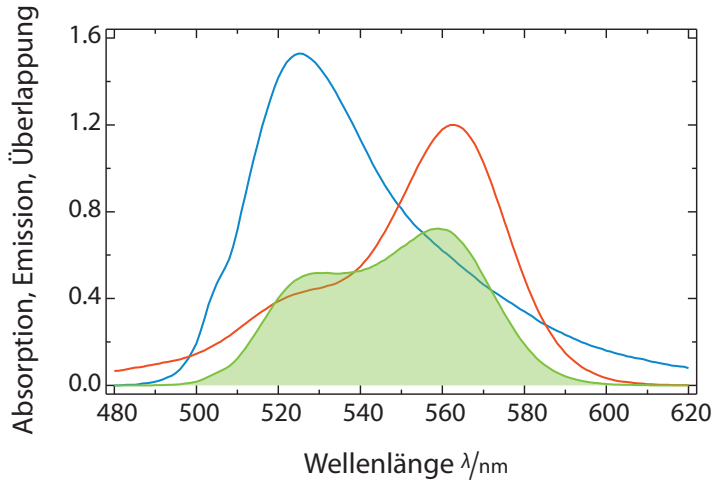


Abbildung 2.6: Bestimmung des Überlappungsintegrals (grün) aus dem Emissionsspektrum des Donors (blau) und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (rot) für die Farbstoffe Atto488 und Atto565. Die Fläche des Emissionsspektrums des Donors ist mit der Fluoreszenzquantenausbeute und das Absorptionsspektrum des Akzeptors auf den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten normiert. Die Größenordnung der Spektren ist zur gleichzeitigen Darstellung angepasst ($\phi_D^{FD}(\lambda)/10^{-2}$, $\epsilon_A(\lambda)/10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $J(\lambda)/10^{14} \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{nm}^4$).

Für die Farbstoffe Atto488 und Atto565 in Wasser ($n = 1,34$) ergibt sich damit, unter der Annahme dynamisch isotroper Mittelung der Orientierung ($\kappa^2 = 2/3$), ein FÖRSTER Radius $R_0 = 6,4 \text{ nm}$ (Abbildung 2.6).

Die Effizienz E_t des Energietransfers ist der Anteil der Photonen, der vom Donor absorbiert und auf den Akzeptor übertragen wird. Die Energietransfereffizienz beschreibt die mittlere Wahrscheinlichkeit eines Energietransfers vom Donor zum Akzeptor. Der Energietransfereffizienz ist hoch, wenn der Energietransfer schneller erfolgt als die Donoremission ($1/k_t \ll \tau_D$). Ist die Transferrate kleiner als die Rate der Donordesaktivierung, erfolgt nur ein geringer Transfer während der Lebensdauer des angeregten Zustands und die Energietransfereffizienz ist gering.

Die Energietransfereffizienz kann in der Praxis aus unterschiedlichen

spektroskopischen Messungen ermittelt werden. ^[36] Die Desaktivierungsrate, also die reziproke Lebensdauer, eines angeregten Moleküls D kann nach Gleichung (2.14) wie folgt geschrieben werden:

$$k_D = \tau_D^{-1} = k_{nr} + k_r = k_{VR} + k_{IC} + k_{ISC} + k_q + k_f. \quad (2.37)$$

In Anwesenheit eines Akzeptormoleküls A ergibt sich eine weitere Desaktivierungsrate durch den Energietransfer (k_t):

$$k_{DA} = \tau_{DA}^{-1} = k_{VR} + k_{IC} + k_{ISC} + k_q + k_f + k_t. \quad (2.38)$$

Analog zur Fluoreszenzquantenausbeute lässt sich die Energietransfereffizienz durch das Verhältnis der Transferrate k_t zur Desaktivierungsrate k_{DA} des Donors in Anwesenheit des Akzeptors definieren:

$$E_t = \frac{k_t}{k_{DA}} = k_t \tau_{DA}. \quad (2.39)$$

Durch Umformen der Gleichungen (2.37) und (2.38) ergibt sich für die Energietransferrate $k_t = \tau_{DA}^{-1} - \tau_D^{-1}$. Einsetzen in Gleichung (2.39) ergibt:

$$E_t = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}, \quad (2.40)$$

wodurch sich die Energietransfereffizienz aus der Donorlebensdauer in Anwesenheit und Abwesenheit des Akzeptors experimentell bestimmen lässt. ^[13]

Bei analoger Betrachtung der Fluoreszenzquantenausbeute nach Gleichung (2.15) in Abwesenheit $\phi_D = k_f/k_D$ und Anwesenheit $\phi_{DA} = k_f/k_{DA}$ des Akzeptors ergibt sich:

$$E_t = 1 - \frac{\phi_{DA}}{\phi_D}. \quad (2.41)$$

Auch aus der erhöhten Akzeptorfluoreszenz lässt sich die Transfereffizienz ableiten. Dazu vergleicht man die Fluoreszenzintensität des Akzeptors bei Donoranregung in Abwesenheit des Donors $F_{ex^D}^{DA}(\lambda^A)$ mit der in Anwesenheit des Donors $F_{ex^D}^A(\lambda^A)$:

$$E_t = \frac{A_A(\lambda_D)}{A_D(\lambda_D)} \left[\frac{F_{ex^D}^{DA}(\lambda^A)}{F_{ex^D}^A(\lambda^A)} - 1 \right]. \quad (2.42)$$

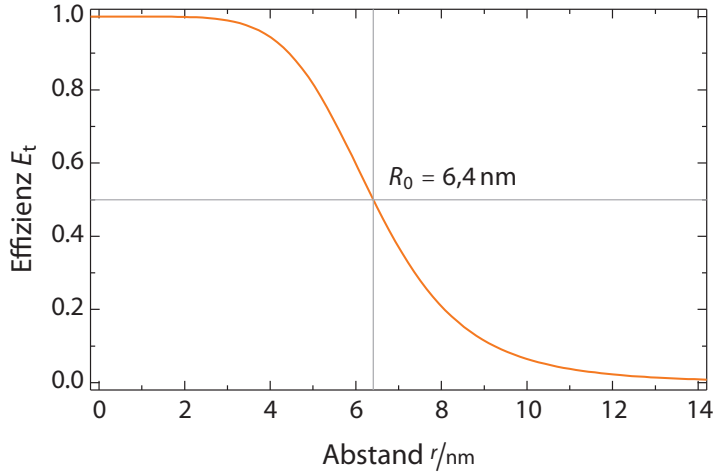


Abbildung 2.7: Abhängigkeit der Energietransfereffizienz E_t vom Abstand r . Der FÖRSTER Radius $R_0 = 6,4$ nm wurde für frei rotierende ($\kappa^2 = 2/3$) Farbstoffe Atto488 und Atto565 in Wasser ($n = 1,34$) berechnet und bezeichnet den Abstand, bei dem 50 % Energietransfer erfolgt.

Eine weitere Methode die Energietransfereffizienz zu bestimmen, basiert auf der Detektion von Anregungsspektren.^[48] Das Anregungsspektrum $F_{\text{em}^A}^{\text{DA}}(\lambda)$ der D-A-Probe mit der Anregungswellenlänge λ und der Detektion der Fluoreszenzemission des Akzeptors kann wie folgt beschrieben werden:

$$F_{\text{em}^A}^{\text{DA}}(\lambda) = \zeta (A^A(\lambda) + A^D(\lambda)E), \quad (2.43)$$

dabei ist ζ von experimentellen Faktoren wie der optischen Weglänge im Medium, der Anregungsleistung und der Fluoreszenzquantenausbeute abhängig. Der direkt vom Akzeptor absorbierte Anteil der Energie wird mit $A^A(\lambda)$ bezeichnet und der über den Donor absorbierte Anteil mit $A^D(\lambda)$.

Wertet man das Anregungsspektrum einer Probe bei zwei Wellenlängen, die den Absorptionsmaxima des Donors λ^D und des Akzeptors λ^A entsprechen, aus, läßt sich nach Gleichung (2.43) ein Gleichungssystem

aufstellen, so dass die Energietransfereffizienz bestimmt werden kann:

$$\begin{aligned} F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^D) &= \zeta \left(c(A)\epsilon^A(\lambda^D) + c(D)\epsilon^D(\lambda^D)E \right) \\ F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^A) &= \zeta \left(c(A)\epsilon^A(\lambda^A) + c(D)\epsilon^D(\lambda^A)E \right). \end{aligned} \quad (2.44)$$

Die Absorption $A(\lambda)$ ist dabei durch die Produkte aus den jeweiligen Absorptionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ und den zugehörigen Konzentrationen c ersetzt. Die Energietransfereffizienz lässt sich daher nach:

$$E = \frac{c(A) \frac{F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^D)\epsilon^A(\lambda^A) - F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^A)\epsilon^A(\lambda^D)}{c(D) \frac{F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^A)\epsilon^D(\lambda^D) - F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^D)\epsilon^D(\lambda^A)}}}{c(D) \frac{F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^A)\epsilon^D(\lambda^D) - F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^D)\epsilon^D(\lambda^A)}}{c(D) \frac{F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^A)\epsilon^D(\lambda^D) - F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^D)\epsilon^D(\lambda^A)}}}} \quad (2.45)$$

berechnen. Der Absorptionskoeffizient $\epsilon^D(\lambda^A)$ des Donors bei der Wellenlänge λ^A des Absorptionsmaximums des Akzeptors ist in realen Systemen häufig gleich null und Gleichung (2.45) vereinfacht sich entsprechend:

$$E = \frac{c(A)}{c(D)} \left[\frac{F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^D)}{F_{\text{ex}^A}^{\text{DA}}(\lambda^A)} - \frac{\epsilon^A(\lambda^D)}{\epsilon^A(\lambda^A)} \right] \frac{\epsilon^A(\lambda^A)}{\epsilon^D(\lambda^D)}. \quad (2.46)$$

Nach Gleichung (2.32) kann die Energietransfereffizienz auf das Verhältnis von Förster Radius R_0 und Abstand r bezogen werden:

$$E_t = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}. \quad (2.47)$$

Die Gleichung zeigt die starke Abstandsabhängigkeit der Energietransfereffizienz bei Donor-Akzeptor Abständen nahe bei R_0 (Abbildung 2.7). Für Abstände $r = 1/2R_0$ ergibt sich bereits eine Effizienz $E = 98,5\%$ und für $r = 2R_0$ fällt die Effizienz auf $E = 1,5\%$. Eine vergleichende Messung der Energietransfereffizienz zur Abstandsbestimmung lässt sich daher nur im Bereich von $1/2R_0 \leq r \leq 2R_0$ auswerten.^[29]

2.2 Chromophore

Chromophore (gr. chromos: farbig) sind Moleküle (bzw. funktionelle Gruppen in Molekülen), die in der Lage sind, Licht im Wellenlängenbereich von 180 nm bis 900 nm zu absorbieren. Dabei gehen Elektronen

in höhere elektronische Zustände über. Dies sind meist π -Elektronen ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) oder freie Elektronenpaare ($n \rightarrow \sigma^*$ - und $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge). In organischen Farbstoffen werden vorwiegend Elektronen aus konjugierten Doppelbindungen angeregt. Auch die Chromophore natürlicher Farbstoffe (Carotin, Chlorophyll) kann man als ausgedehntes π -Elektronensystem konjugierter Doppelbindungen auffassen (Abbildung 2.8).

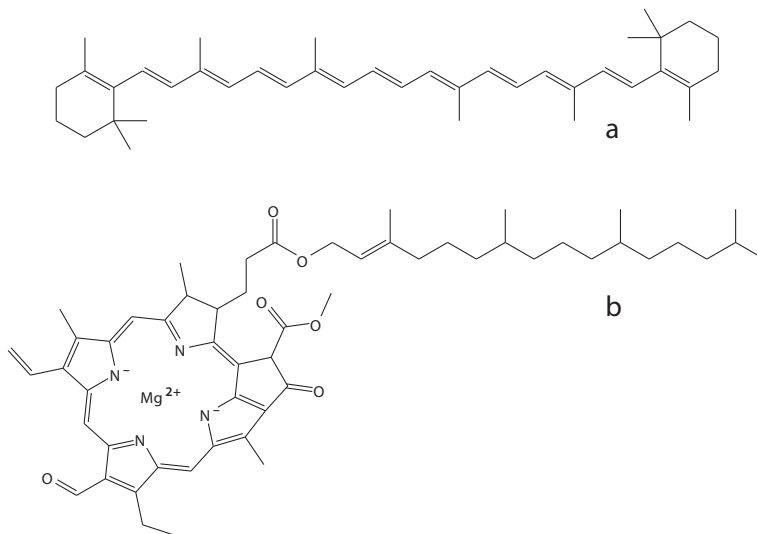


Abbildung 2.8: Natürliche Chromophore β -Carotin (a) und Chlorophyll b (b). Die alternierenden Einfach- und Doppelbindungen der Moleküle bilden konjugierte π -Elektronensysteme.

Analog wird ein Molekül (bzw. eine funktionelle Gruppe in einem Molekül) als Fluorophor bezeichnet, wenn es die absorbierte Energie als Fluoreszenz emittiert. Die Fluoreszenzquantenausbeute und die Wellenlänge der abgestrahlten Energie ist dabei abhängig vom Fluorophor und der chemischen Umgebung des Fluorophors.

Die in den meisten organischen Chromophoren vorkommenden aromatischen Ringe lassen sich auf den einfachsten aromatischen Ring, den Benzolring, zurückführen. Das Benzol-Molekül C_6H_6 (Abbildung 2.9) hat im elektronischen Grundzustand eine planare Struktur, wobei die

sechs C-Atome ein regelmäßiges Sechseck bilden. Der Bindungswinkel $\alpha = 120^\circ$ zwischen den C–C-Bindungen entspricht einer sp^2 -Hybridisierung der Atom-Orbitale der C-Atome.

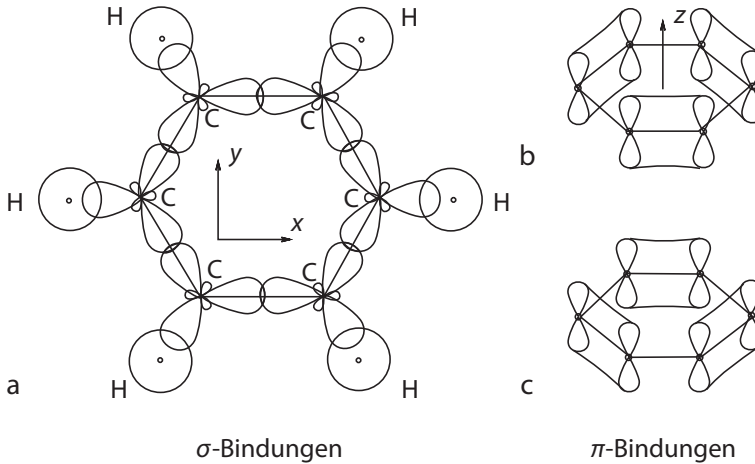


Abbildung 2.9: Darstellung der sp^2 -Hybridisierung der C-Atome in einem Benzolring mit (a) σ -Bindungen und (b, c) möglichen π -Bindungen.^[8]

Zwischen benachbarten C-Atomen ebenso wie zwischen den C- und H-Atomen lokalisierte σ -Bindungen, wobei diese von je einem Valenzelektron der C-Atome gebildet wird (Abbildung 2.9 a). Pro C-Atom verbleibt ein Valenzelektron im p_z -Orbital. Also insgesamt sechs Elektronen, die nicht an der sp^2 -Hybridisierung beteiligt sind. Diese p_z -Orbitale sind senkrecht zur xy -Ebene des Moleküls ausgerichtet und können eine nicht lokalisierte Bindung bilden. Hierzu gibt es zwei nicht-unterscheidbare Möglichkeiten wie zwei Elektronen aus benachbarten p_z -Orbitalen mit entgegengesetzten Spins dazu beitragen (Abbildung 2.9 b, c). Die elektronische Gesamtwellenfunktion Φ für die p_z -Elektronen ergibt sich aus der Linearkombination der p_z -Orbitale der sechs C-Atome zu einem molekularen π -Orbital.

Die Wellenfunktion, die durch diese Linearkombination über alle C-Atome im Sechsring verteilt wird, heißt delokalisiert. Die delokalisierten Elektronen stabilisieren dabei die planare Struktur des Moleküls.

In einem vereinfachten Modell können Elektronen, die mit gleichen Wahrscheinlichkeiten auf einem Intervall L (Umfang des Sechsrings) zu finden sind, wie Elektronen in einem Potentialtopf betrachtet werden. Dabei gilt, wegen der Stetigkeit der Wellenfunktion, für die DE BROGLIE Wellenlänge λ :

$$\lambda = \frac{L}{n}, \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (2.48)$$

Setzt man $\lambda = h/p$ mit der PLANCK Konstante h und dem Impuls p der Elektronen, ergibt sich $p = n h/L$. Daraus ergeben sich mit $E_{\text{kin}} = p^2/2m_e$ für die Elektronen diskrete Energieniveaus:

$$E_n = \frac{n^2 h^2}{2m_e L^2}. \quad (2.49)$$

Die Energiedifferenz zwischen zwei benachbarten Niveaus (Übergänge n nach $n + 1$) beträgt:

$$\Delta E = \frac{(n+1)^2 h^2}{2m_e L^2} - \frac{n^2 h^2}{2m_e L^2} = \frac{h^2(2n+1)}{2m_e L^2}. \quad (2.50)$$

Durch einsetzen der Zahlenwerte erhält man mit einer Bindungslänge der C–C-Bindungen im Benzol von 0,14 nm für den Umfang des Sechsrings $L = 0,84$ nm. Daraus ergibt sich die Energiedifferenz zwischen $n = 1$ und $n = 2$ zu $\Delta E = 1,0 \cdot 10^{-18}$ J und damit die Anregungswellenlänge

$$\lambda = \frac{hc}{\Delta E} = 199 \text{ nm}. \quad (2.51)$$

Benzolmoleküle können also im UV-Bereich elektronisch angeregt werden.

Die spektralen Eigenschaften eines Chromophores sind abhängig von der Molekülstruktur. Die Lichtabsorption organischer Verbindungen wird im wesentlichen durch die Eigenschaften des dem Molekül zugrundeliegenden π -Elektronensystems bestimmt. Damit die Absorption eines Moleküls im sichtbaren Wellenlängenbereich (400 nm bis 700 nm) liegt, muss die Energiedifferenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand hinreichend niedrig sein.

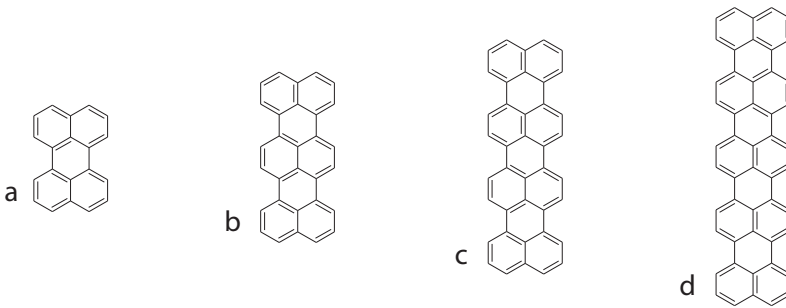


Abbildung 2.10: Ausgedehnte π -Elektronensysteme mit Absorptionsmaxima λ_{\max} im sichtbaren Wellenlängenbereich. (a) Perylen $\lambda_{\max} = 436$ nm, (b) Terrylen $\lambda_{\max} = 557$ nm, (c) Quaterrylen $\lambda_{\max} = 660$ nm und (d) Pentarylen $\lambda_{\max} = 748$ nm.

Da die Energie des ersten Übergangs umso niedriger ist je größer die Ausdehnung des konjugierten π -Elektronensystems ist, werden Farbstoffe mit ausgedehnteren π -Elektronensystemen verwendet (Abbildung 2.10). Die Absorptionsbanden solcher Farbstoffe lassen sich gezielt einstellen. Bei dem in Abbildung 2.10 dargestellten Perylen beispielsweise liegt das Absorptionsmaximum bei 436 nm, beim Terrylen bei 557 nm, beim Quaterrylen bei 660 nm und beim Pentarylen bei 748 nm.

Die Verschiebung zu größeren Wellenlängen wird als Bathochromie, zu kleineren Wellenlängen als Hypsochromie bezeichnet. Hyperchromie bedeutet eine Verstärkung und Hypochromie entspricht einer Verringerung der Absorption.

Bei $n \rightarrow \pi^*$ -Übergängen treten mit steigender Lösungsmittelpolarität hypsochrome und bei fallender Lösungsmittelpolarität bathochrome Verschiebungen auf. Eine weitere Möglichkeit das Absorptionsverhalten eines Chromophors zu beeinflussen ist die gezielte Modifikation mit Elektronendonoren oder Elektronenakzeptoren. Elektronendonoren stellen dem π -Elektronensystem Elektronen zur Verfügung (z. B. $-\text{O}^-$, $-\text{NR}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}$, ...), Elektronenakzeptoren entziehen dem System Elektronen (z. B. $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COOR}$, ...) dadurch wird die Elektronendichte im System und damit das optische Spektrum verschoben.

2.3 Mikroskopie

Details, die mit dem bloßen Auge nicht aufgelöst werden können, lassen sich mit Hilfe eines Lichtmikroskops sichtbar machen. Dabei wird vom Objekt kommendes Licht durch geeignete Kombination von Linsen (Objektiv und Okular) optisch so abgebildet, dass durch das Okular ein durch das Objektiv erzeugtes reelles Zwischenbild vergrößert dargestellt wird. Das Produkt aus Objektivvergrößerung und Okularvergrößerung ergibt den Vergrößerungsfaktor des Mikroskops.

Strukturen in kleinen Objekten können nur dann aufgelöst werden, wenn nicht nur die Vergrößerung, sondern auch das Auflösungsvermögen des Mikroskops dies zulassen. Lassen sich zwei Punkte mit dem Mikroskop gerade noch voneinander unterscheidbar abbilden, beschreibt ihr Abstand das Auflösungsvermögen des Mikroskops.

Das Bild eines idealen Punktes, betrachtet durch eine kreisförmige Blende, erscheint verschwommen. Das an der Blende gebeugte Bild wird als Beugungsscheibe oder AIRY-Scheibe bezeichnet. Ein Objektiv wirkt aufgrund der endlichen Ausdehnung der Linsen wie eine kreisförmige Blende und es zeigen sich daher auch im Zwischenbild Beugungseffekte.

Nach dem Prinzip von HUYGENS kann jeder Punkt der beleuchteten Öffnung als Quelle einer Kugelwelle betrachtet werden. Die Intensität in jedem Punkt der Bildebene ergibt sich durch Integration der Beiträge aller Kugelwellen über die gesamte Öffnungsfläche. Damit folgt für die rotationssymmetrische Intensitätsverteilung $I(r)$ das AIRY-Muster (Abbildung 2.11):

$$I(r) = I_0 \left(\frac{n\pi a^2}{f\lambda} \right)^2 \left(\frac{2J_1 \left(\frac{2\pi a n r f^{-1} \lambda^{-1}}{\frac{2\pi a n r}{f\lambda}} \right)}{\frac{2\pi a n r}{f\lambda}} \right)^2. \quad (2.52)$$

Darin ist λ die Wellenlänge, a der Öffnungsradius des Objektivs und r der Abstand von der optischen Achse. Die Intensitätsverteilung einer Punktquelle in der Fokalebene wird auch als Punktabbildungsfunktion (PSF, engl. point spread function) bezeichnet.^[51]

Die ersten drei Nullstellen der Besselfunktion erster Art und erster Ordnung $J_1(x)$ liegen bei $x_0 = 0$, $x_1 = 3,8317$ und $x_2 = 7,0156$. Der Radius

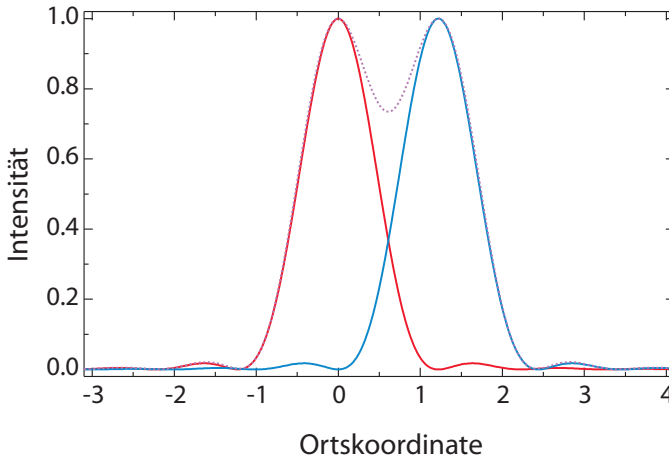


Abbildung 2.11: Intensitätsverteilung der AIRY-Scheibe. Dargestellt ist die Funktion $(2J_1(\pi r))/(\pi r)^2$ für $r = x$ (rot) und $r = x - 1,22$ (blau). Die Summe der Funktionen (violett) verdeutlicht die Intensitätsverteilung zweier Punktlichtquellen die nach dem RAYLEIGH-Kriterium noch unterschieden werden können.

r_1 des ersten Minimums der PSF ergibt sich dann zu:

$$r_1 = 3,8317 \frac{\lambda f}{2\pi a n} = 0,6098 \frac{\lambda}{n \frac{a}{f}} \quad (2.53)$$

Die Breite der AIRY-Scheibe ist daher von der Wellenlänge der Lichtquelle sowie dem Quotienten aus Aperturradius a und Brennweite f also der numerischen Apertur $NA = n \sin \alpha = n a/f$ des Objektivs abhängig. Dabei bezeichnet n den Brechungsindex des Mediums und α den Winkel zwischen optischer Achse und Strahlenkegel. Der Faktor 0,61 gilt für inkohärente Punktlichtquellen und kreisförmige Apertur. Für kohärente Lichtquellen ergibt sich ein Faktor von 0,82. ^[4;51]

Der Abstand zwischen Hauptmaximum und erster Nullstelle wird zur Definition des Auflösungsvermögens verwendet. Nach dem RAYLEIGH-Kriterium können zwei Lichtpunkte aufgelöst werden, wenn der Abstand

der beiden Hauptmaxima größer ist, als der Abstand zwischen einem der Maxima und dem zugehörigen ersten Minimum. Liegt das Maximum der zweiten Punktlichtquelle gerade im Minimum der ersten, trennt die resultierenden Maxima ein Minimum mit einer Intensität von 73,5 %.^[4]

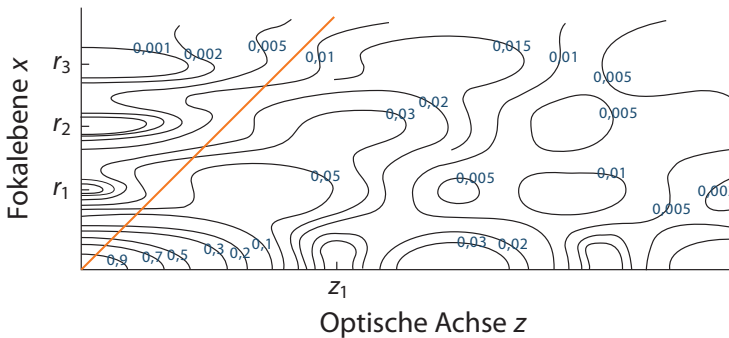


Abbildung 2.12: Intensitätsverteilung im Beugungsbild in der Umgebung des Fokus. Die Intensität des Fokus ist auf eins normiert. Der Fokus liegt im Ursprung und die Verteilung ist rotationssymmetrisch um beide Achsen. Die eingezeichnete orange Linie beschreibt die Grenze des geometrischen Strahlenkegels.^[33]

Die dreidimensionale Intensitätsverteilung eines aberrationsfreien Beugungsbilds einer monochromatischen Punktlichtquelle in Fokalnähe zeigt Abbildung 2.12. Die Konturlinien beschreiben konstante Lichtintensität (Isophotendarstellung). Deutlich erkennbar sind die Minima der AIRY-Scheibe bei r_1 , r_2 und r_3 und die gestreckte Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse. Diese zeigt sich auch in der Lage des ersten Minimums bei:

$$z_1 = \frac{2f^2\lambda}{a^2} = \frac{2n\lambda}{NA^2}. \quad (2.54)$$

Im Gegensatz zur lateralen Auflösung skaliert die axiale Auflösung mit dem Quadrat der Numerischen Apertur.

2.3.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Bildentstehung in einem konfokalen Mikroskop unterscheidet sich grundsätzlich von der in einem konventionellen Weitfeldmikroskop. In einem konventionellen Mikroskop wird die gesamte Probe beleuchtet und das Bild kann direkt betrachtet werden. Im Gegensatz dazu erfolgt die Beleuchtung im konfokalen Mikroskop durch Rastern der Probe mit einem fokussierten Lichtstrahl und das Bild wird aus den einzelnen Rasterpunkten zusammengesetzt. Dabei sind Anregungsvolumen und Detektionsvolumen gleich, da die Probe so auf eine Lochblende abgebildet wird, dass nur Licht aus dem Fokus detektiert werden kann.

Ein konfokales Mikroskop wurde von M. MINSKY erstmals verwirklicht und 1957 zum Patent angemeldet.^[37] Der Aufbau ist in Abbildung 2.13 schematisch dargestellt. Das Anregungslicht, meist paralleles Laserlicht, gelangt über einen dichroitischen Strahlteiler in das Objektiv und wird auf die Probe fokussiert. Dichroitische Strahlteiler reflektieren bestimmte Wellenlängenbereiche und transmittieren die anderen.

Fluoreszenzlicht aus der Probe wird vom Objektiv aufgesammelt und passiert als paralleler Strahl, wegen der STOKES-Verschiebung mit größerer Wellenlänge (Abschnitt 2.1.5), den dichroitischen Strahlteiler. Mit einer weiteren Linse wird das Fluoreszenzlicht auf eine Lochblende abgebildet. Fluoreszenzlicht aus dem Fokus wird auf die Blendenöffnung abgebildet, wohingegen Licht aus Bereichen außerhalb des Fokus entweder neben, vor oder hinter der Blendenöffnung fokussiert wird. Die Lochblende wirkt so als räumlicher Filter, da unerwünschtes Licht aus Bereichen außerhalb des Fokus stark abgeschwächt wird.

Die Lochblende in einem konfokalen Mikroskop verhindert, dass Licht auf den Detektor fällt, das nicht aus dem Fokalvolumen sondern einem anderen Bereich der Probe stammt. Die Lochblende wird in eine Bildebene eingebaut und kann, wenn sie nicht gut justiert oder kleiner als die beugungsbegrenzte Abbildung ist, dazu führen, dass weniger Photonen detektiert werden. Wird eine zu große Lochblende verwendet, können mehr Photonen detektiert werden aber auch Photonen die nicht aus dem Fokalvolumen stammen werden detektiert. Der geeignete Lochblendendurchmesser lässt sich aus dem Durchmesser der AIRY-Scheibe berechnen und liegt zwischen 50 % und 100 % des Durchmessers des

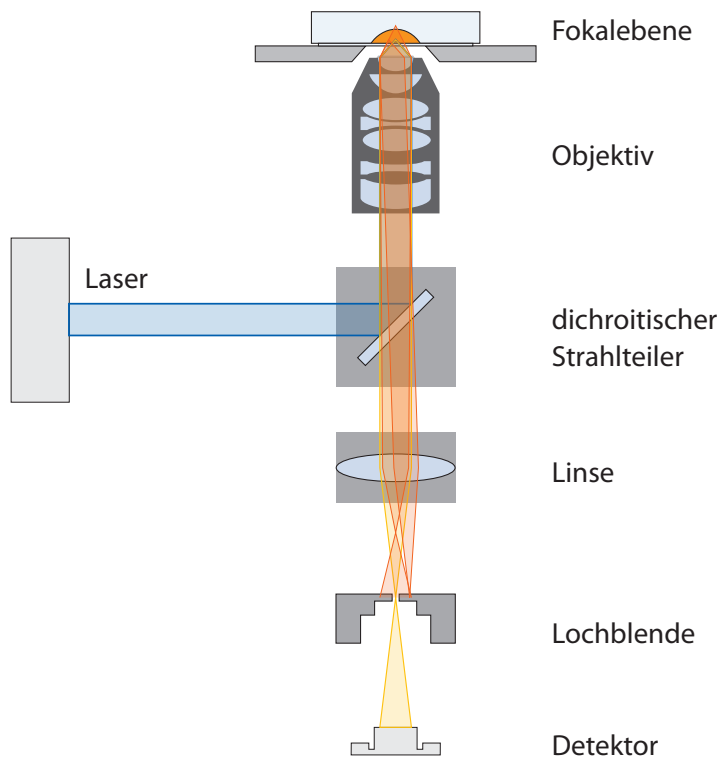


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips. Das Fluoreszenzlicht aus dem Fokalvolumen gelangt auf den Detektor, wohingegen der Großteil des Lichts aus Bereichen außerhalb des Fokalvolumens ausgeblendet wird.

ersten Minimums. Dabei erhält man für kleinere Lochblendendurchmesser eine höhere Auflösung aber auch ein schlechteres Signal zu Rausch Verhältnis.

Durch den konfokalen Aufbau kann im Vergleich zu der klassischen Auflösungsgrenze (Gleichungen (2.53) und (2.54)) eine höhere Auflösung erreicht werden, da die PSF des Systems als Produkt der PSF der Anregung und der Detektion betrachtet werden kann. Dabei ist die PSF der Anregung gegeben aus der Feldverteilung des fokussierten Anre-

gungslichts und die PSF der Detektion aus der optischen Filterung durch die Lochblende in der Bildebene.^[39] Die axiale und laterale Auflösung wird um einen Faktor $\sqrt{2}$ erhöht:

$$r_1 = 0,4 \frac{\lambda}{NA} \text{ und } z_1 = 1,4 \frac{n\lambda}{NA^2}. \quad (2.55)$$

In Abbildung 2.13 ist ein epiaxialer Aufbau dargestellt der für Anregung und Detektion dieselbe Optik verwendet. Es ist aber auch möglich einen Aufbau mit zwei Objektiven zu realisieren und die Transmission zu detektieren.

Die Probe wird beim konfokalen Mikroskop punktweise gerastert, das heißt, das Bild entsteht nicht gleichzeitig für alle Objekte in der Probe (parallel) sondern nacheinander (seriell). Daher werden zur Bildrekonstruktion Computer verwendet. Da Licht, das nicht aus der Bildebene des Mikroskops stammt, vor dem Detektor ausgeblendet wird, ist es möglich „optische Schnitte“ durch die Probe zu legen. Diese können zur dreidimensionalen Darstellung digital übereinandergelegt werden.

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Messungen an einem Ensemble von Molekülen ergeben nur gemittelte Informationen über die Eigenschaften des Gesamtsystems. Messungen an einzelnen Molekülen hingegen können Informationen liefern, die bei einer Mittelung verborgen bleiben. So können statische und dynamische Heterogenitäten aufgedeckt werden. Es kann also beobachtet werden ob einzelne Moleküle leicht unterschiedliche Eigenschaften haben oder ob sich ihre Eigenschaften mit der Zeit ändern.

Die ersten einzelmolekülsensitiven, fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden 1976 an farbstoffmarkierten Antikörpern durchgeführt.^[20] Diese trugen bis zu hundert Fluoresceinmoleküle. Durch die Einschränkung auf ein konfokales Volumen gelingt es die Sensitivität soweit zu erhöhen, dass auch einzelne Fluorophore detektiert werden können.

Das Beobachtungsvolumen eines konfokalen Aufbaus beträgt etwa einen Femtoliter. Bei einer Konzentration von etwa 10^{-10} M befindet sich statistisch stets nur ein Molekül im Fokalvolumen. die Diffusionszeit

eines Moleküls durch den Fokus liegt typischer Weise im Bereich von Millisekunden.^[29]

Zur einzelmolekülfluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von FRET-Prozessen kann die Fluoreszenz zweier Farbstoffe ausgenutzt werden. Hierzu ist es möglich bei Donoranregung die Emission der beiden Farbstoffe spektral getrennt zu detektieren. Hierbei ist die Unterscheidung von Subpopulationen in der Probe schwierig. Solche Heterogenitäten können aufgelöst werden, wenn auch der Akzeptor bei einer geeigneten Wellenlänge angeregt wird und die Anregungswellenlänge innerhalb der Diffusionszeit eines Moleküls durch das Fokalvolumen mehrfach zwischen Donoranregung und Akzeptoranregung wechselt. Dieses Prinzip der alternierenden Anregung wird als ALEX (engl. alternating laser excitation) bezeichnet.^[25;30]

3 Material und Methoden

3.1 Proben

3.1.1 Oligo- und Polyprolin

Die untersuchten Oligo- und Polypeptide sind aus α -Aminosäuren, die über eine Peptidbindung miteinander verbunden sind, aufgebaut. Aminosäuren sind organische Moleküle, die aus mindestens einer Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$) und einer Aminogruppe ($-\text{NH}_2$) bestehen. Die Aminosäuren, aus denen die Proteine von Lebewesen aufgebaut sind, werden als proteinogen bezeichnet und sind genetisch kodiert.

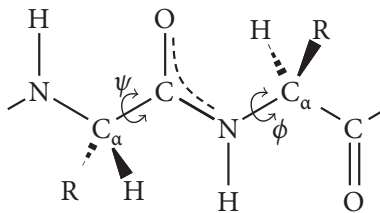


Abbildung 3.1: Geometrie der Peptidbindung. Dargestellt ist der mesomere Doppelbindungscharakter der $\text{C}=\text{O}$ - und $\text{C}=\text{N}$ -Bindung. Freie Drehbarkeit besteht um die mit Pfeilen bezeichneten $\text{C}_\alpha\text{-C}$ - und N-C_α -Bindungen. Die Seitenketten sind mit R bezeichnet.

Die Polymerkette in Peptiden setzt sich aus sich wiederholenden N-C-CO Einheiten mit Seitengruppen am zentralen α -Kohlenstoff Atom zusammen. Durch die Peptidbindung ergibt sich sowohl für die $\text{C}=\text{O}$ - als auch für die $\text{C}=\text{N}$ -Bindung partieller Doppelbindungscharakter, so dass die freie Drehbarkeit der Peptidbindung eingeschränkt wird. Abbildung 3.1 zeigt die $\text{C}_\alpha\text{-C}$ - und N-C_α -Bindungen mit freier Drehbarkeit um die Winkel ψ und ϕ .^[5]

Die eingeschränkte Drehbarkeit der $\text{C}=\text{N}$ -Bindung ergibt sich aus einem Überlapp der p_z -Orbitale der drei beteiligten Atome ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$).

Ein energetisch günstiger Zustand ergibt sich für parallel ausgerichtete p_z -Orbitale, d. h. es können zwei stabile Konformationen eingenommen werden. Wenn beide C_α -Atome auf der gleichen Seite liegen, spricht man von einem (*Z*)-Isomer (zusammen, auch *cis*). Liegen die beiden C_α -Atome auf entgegengesetzten Seiten der $C=N$ -Bindung wird die Verbindung als (*E*)-Isomer (entgegen, auch *trans*) bezeichnet.^[23]

Die proteinogene Aminosäure Prolin (Pro) besitzt als einzige keine primäre, sondern eine sekundäre Aminogruppe am zentralen C_α -Atom und wird daher auch als sekundäre Aminosäure bezeichnet. Die freie Drehbarkeit der $N-C_\alpha$ -Bindung wird durch einen Ringschluss zwischen der Seitenkette und der Aminogruppe stark eingeschränkt. Peptide liegen, aufgrund von sterischer Hinderung in der *Z*-Stellung, vorwiegend als *E*-Isomere vor. Für eine Peptidbindung mit einem Prolin ist das *E*-Isomer energetisch nicht so stark begünstigt, da in beiden Stellungen ein C-Atom in direkter Nachbarschaft zum C_α -Atom vorliegt.^[12;42]

Polyproline bilden helikale Strukturen aus, wenn auch, aufgrund des Ringschlusses mit der Seitenkette der Aminosäure, zur Stabilisierung keine Wasserstoffbrückenbindung beitragen. Helices, die nur aus (*Z*)-Isomeren aufgebaut sind bilden eine eng gewundene rechtshändige Helix, die als Polyprolin Typ I Helix bezeichnet wird. Jede weitere Prolineinheit führt, nach kristallographischen Untersuchungen, bei der Typ I Helix zu einem Anwachsen der Helix um 0,19 nm. Als Polyprolin II Helix wird die linkshändige Form bezeichnet, die nur aus *E*-Isomeren besteht und um 0,312 nm je Prolineinheit wächst.^[6]

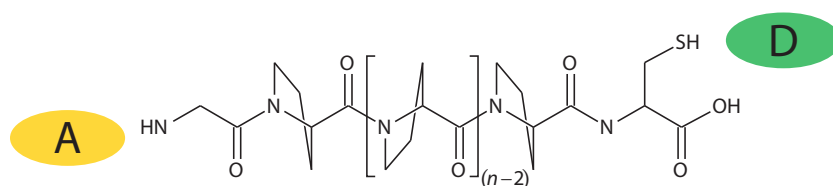


Abbildung 3.2: Strukturformel der Oligo- und Polyprolin Proben mit N-terminalem Glycin (links) und C-terminalem Cystein (rechts). Die Länge des Peptids ist abhängig von der Anzahl n der Prolin Einheiten

Die verwendeten Oligo- und Polyprolin Proben bestehen, wie in Ab-

bildung 3.2 dargestellt, aus einer Abfolge von Gly-(Pro)_n-Cys. Es werden Proben mit $n = 4, 6, 8, 12$ und 20 Prolineinheiten (Biosyntan, D) verwendet.

Die Oligo- und Polyprolin Proben werden jeweils am Glycin (Gly) und am Cystein (Cys) mit Fluoreszenzfarbstoffen (Tabelle 3.1) markiert. Durch ihre helikale Struktur bilden sie einen stäbchenförmigen Abstandhalter zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen. In Abhängigkeit von der Distanz kann so der Energieübertrag zwischen den Farbstoffen untersucht werden.

Tabelle 3.1: Fluoreszenzeigenschaften verschiedener kommerzieller Farbstoffe.

Angegeben sind jeweils Absorptionsmaximum λ_{abs} , Emissionsmaximum λ_{em} , Fluoreszenzlebensdauer τ , Fluoreszenzquantenausbeute ϕ und Absorptionskoeffizient im Maximum ϵ_{max} nach Herstellerangabe.

Farbstoff	Bezugsquelle	$\frac{\lambda_{\text{abs}}}{\text{nm}}$	$\frac{\lambda_{\text{em}}}{\text{nm}}$	$\frac{\tau}{\text{ns}}$	$\frac{\phi}{\%}$	$\frac{\epsilon_{\text{max}}}{\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}}$
Atto488	ATTO-TEC, D	501	523	3,2	80	90 000
TMRIA	Invitrogen, D	543	567	–	–	99 000
Cy3B	GE Healthcare, UK	558	572	2,8	70	130 000
Atto565	ATTO-TEC, D	563	592	3,4	90	120 000
Atto647N	ATTO-TEC, D	644	669	3,4	65	150 000
Cy5	GE Healthcare, UK	646	664	1,0	27	250 000

Zur Markierung von Biomolekülen mit Fluoreszenzfarbstoffen stehen verschiedene reaktive Farbstoffe zur Verfügung. Zum einen N-Hydroxysuccinimid (NHS) funktionalisierte Farbstoffe zur Kopplung an den Amino-Terminus (N-Terminus), also die freie Aminogruppe ($-\text{NH}_2$) am einen Ende von Proteinen und Peptiden. Zum Anderen können Maleimid-funktionalisierte Farbstoffe zur Kopplung an Thiolgruppen ($-\text{SH}$) wie z. B. in Cystein verwendet werden.

Die NHS-Ester reagieren mit der Aminogruppe und bilden stabile Amidbindungen zwischen dem Biomolekül und dem Farbstoff. Die Kopplungsreaktion (Abbildung 3.3) erfolgt in leicht basischem Milieu (pH 8,5), da die Reaktion der NHS-Ester mit den Biomolekülen in Kon-

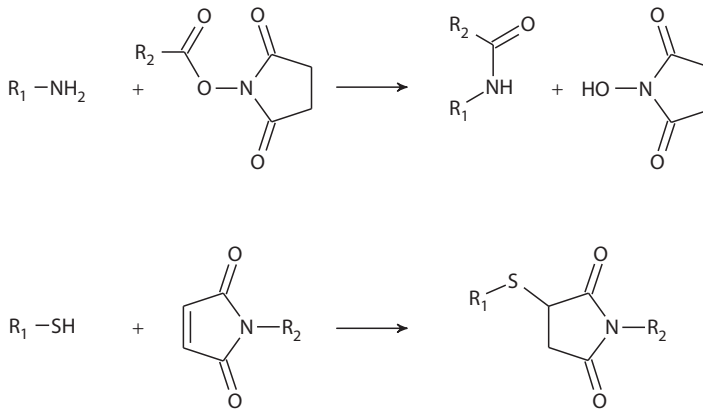


Abbildung 3.3: Reaktionsschema zur Farbstoffmarkierung von Biomolekülen. Farbstoffe (a) mit NHS-Funktionalität reagieren mit Aminogruppen (oben) und (b) mit Maleimid-Funktionalität reagieren mit Thiolgruppen (unten). Die Farbstoffe werden durch R_2 repräsentiert, die Biomoleküle durch R_1 .

kurenz zu einer möglichen Reaktion mit Hydroxonium Ionen (H_3O^+) steht.

Die kovalente Kopplung an Thiolgruppen erfolgt mit Maleimid-funktionalisierten Farbstoffen. Das Thiol greift dabei an der Doppelbindung des Azolrings an.

Die Kopplungsreaktionen werden, nach den im Folgenden dargestellten Protokollen, durchgeführt. Aufgrund der Tendenz der Cysteinreste, Disulfide zu bilden, erfolgt jeweils zuerst die Thiolkopplung. Dabei wird bei den FRET-Proben jeweils der Donor als Maleimid und der Akzeptor NHS-funktionalisiert verwendet.

Liegt das Cystein reaktiv, also nicht als Disulfid oder oxidiert vor, kann die Kopplung in 0,1 M Phosphat-Puffer (pH 7,0) durchgeführt werden. Dazu werden 0,5 mg bis 1,0 mg Peptid in 50 μ l Phosphat-Puffer gelöst. Zur Herstellung von 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,0 werden 4,08 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und 3,29 g Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) in 500 ml H_2O gelöst. Nach Hinzufügen von 5 μ l einer Lösung mit 0,05 mg Farbstoff (Maleimid-funktionalisiert) in Dimethylformamid (DMF) benötigt die Reaktion eine Inkubationszeit von

2 h bei Raumtemperatur (20 °C).

Für die N-terminale Konjugation der Oligoprolin Proben (Pro₂ und Pro₈ mit Atto647N) wird das getrocknete Peptid in 50 µl DMF aufgenommen. Die Kopplungsreaktion erfolgt dann in einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur (20 °C) nach Hinzugabe von 5 µl einer Lösung mit 0,05 mg Farbstoff (NHS-funktionalisiert) in DMF und 1 µl Diisopropylethylamine (DIPEA).

Aufgrund von Löslichkeitsproblemen mit den längeren Polyprolin Proben wird für die Kopplung der anderen Proben (Pro₁₂ und Pro₂₀ mit Atto647N, Pro_n, $n = 4, 6, 8, 12$ und 20 mit Atto565 und Cys mit Atto647N und Cy5) eine andere Vorschrift verwendet. Dabei wird das Peptid in 50 µl Carbonat-Puffer (0,1 M) aufgenommen. Zur Herstellung von 0,1 M Carbonat-Puffer pH 8,0 bis pH 8,5 werden 4,20 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) in H₂O gelöst. Die Kopplungsreaktion erfolgt dann in einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur (20 °C) nach Hinzugabe von 0,05 mg Farbstoff in 5 µl DMF. Die Hinzugabe von DIPEA kann wegen des bereits basischen Puffers entfallen.

Es wird jeweils parallel eine Referenzprobe, unter Verringerung des Volumens und ohne Zugabe des Peptids, erzeugt. Die Aufreinigung der Farbstoff-markierten Peptide erfolgt mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie.

Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC, engl. high performance liquid chromatography) stellt ein Trennverfahren dar, bei dem mittels einer flüssigen Phase die Probe unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Mit dieser Methode können, sehr schnell und mit hoher Trennleistung, chromatographische Trennungen von Substanzmengen im Bereich von $1 \cdot 10^{-9}$ g bis $1 \cdot 10^{-12}$ g durchgeführt werden. Bei der HPLC können verschiedene Wechselwirkung (z. B. Dipol-Dipol oder hydrophil-hydrophob) zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und Probe zur Auftrennung genutzt werden.^[16]

In einem Chromatogramm wird die Intensität eines Signals (z. B. Absorption oder Fluoreszenzemission) gegen die Zeit aufgetragen. Durch

die Wechselwirkungen mit der stationären Phase werden unterschiedliche Substanzen in einer Trennsäule zeitlich verzögert und erscheinen nach den jeweiligen charakteristischen Retentionszeiten im Chromatogramm.

Grundsätzlich können zwei Methoden unterschieden werden: Normalphase (NP, engl. normal phase) und Umkehrphase (RP, engl. reversed phase). In der NP-Chromatographie ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, in der RP-Chromatographie wird eine unpolare stationäre Phase verwendet.

Zur Aufreinigung von Biomolekülen wird vorwiegend die RP-Chromatographie verwendet. Hierbei hängt der Trennmechanismus von der hydrophoben Bindungswechselwirkung zwischen der in der mobilen Phase gelösten Substanz und der stationären Phase ab. Als stationäre Phase wird zur Trennung von Biomolekülen vielfach mit Octadecylsilan (ODS) modifiziertes Silicagel (C18-Phase) verwendet.

In wässrigen Lösungen sind sowohl die hydrophilen Anteile der stationäre Phase als auch die Biomoleküle von Hydrathüllen umgeben. In den hydrophoben Bereichen der Biomoleküle wird die Hydrathülle abgestoßen. Die hydrophobe stationäre Phase und die nicht von einer Hydrathülle abgeschirmten Bereiche der Biomoleküle assoziieren. Das System nimmt so einen energetisch günstigeren Zustand ein, da weniger hydrophobe Bereiche mit dem Wasser in Berührung kommen.^[16] Durch eine kontinuierliche Veränderung der Polarität des Lösungsmittels wird der Energiegewinn kontinuierlich verringert und so eine Auftrennung nach Hydrophobizität der Biomoleküle erreicht.

Zur Aufreinigung der Oligopeptide wird eine HPLC-Anlage Serie 1100 (Agilent Technologies, D) verwendet. Sie besteht aus Entgaser (G1379A), binarer Pumpe (G1312A), Diodenarraydetektor (G1315B) sowie Fluoreszenzdetektor (G1321A).

Die Trennung erfolgt auf einer RP-Trennsäule (00G-0152-Eo, Phenomenex, D) mit einer Länge von 250 mm und einem Durchmesser von 4,60 mm. Als Säulenmaterial dient ODS-Hypersil der Korngröße 5 µm.

Als Laufmittel werden gepufferte Gemische aus zweifach destilliertem Wasser (H₂O) und Acetonitril (MeCN) mit einer Pufferkonzentration von 0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) bei pH 7 verwendet. Laufmittel A ist eine rein wässrige Pufferlösung, Laufmittel B enthält einen

Volumenanteil von 75 % Acetonitril. Das Verhältnis Acetonitril zu Wasser wird in der HPLC-Anlage durch Mischung der Laufmittel A und B eingestellt und mit der Zeit variiert. In dieser Arbeit werden lineare Gradienten von 0 % bis 75 % Acetonitril in 20 min oder in 40 min verwendet.

Die Detektion der markierten Biomoleküle erfolgt durch Messung der Absorption und der Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe. Dazu werden Detektionswellenlängen im Bereich des Maximums des jeweiligen Farbstoffs ausgewertet.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Biomoleküle zeigen keine charakteristische Absorption oder Fluoreszenz und können daher nicht direkt beobachtet werden. Die Unterscheidung zwischen freiem Farbstoff und markiertem Peptid erfolgt hier anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten im Vergleich zu der Referenzprobe (Farbstoff im Kopplungspuffer).

3.1.2 Oligo(*para*-phenylenethinylen)

Grundlage für exakte Abstandsmessungen in FRET-Experimenten sind stäbchenförmige Moleküle in verschiedenen, definierten Längen, die an beiden Stäbchenenden geeignete Chromophore mit definiert ausgerichteten Dipolmomenten tragen. Durch intrinsische Flexibilität und die Bildung von Isomeren kann die Bestimmung der FRET-Effizienz stäbchenförmiger FRET-Proben beeinflusst werden.

Die aus *para*-Phenylen und Ethinylen erzeugten stäbchenförmigen Oligo(*p*-phenylenethinylen)e (OligoPPE) werden als starre Stäbchen angesehen, deren intrinsische Flexibilität in den meisten Fällen vernachlässigbar ist.^[44] Daher werden FRET-Proben entwickelt, die aus OligoPPE mit endständig konformativ starr angebondenen Fluoreszenzfarbstoffen bestehen (Abbildung 3.4).

Zudem kann der Akzeptorfarbstoff (PMI(OAr)₃), wie in Abbildung 3.4 dargestellt, in einem Winkel von 120° angebonden werden. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Orientierungen der Übergangsdipolmomente, die sich jedoch nicht dynamisch verändern.

Die Länge der OligoPPE-Kette kann durch Einfügen von PPE-Einheiten variiert werden. Es werden gerade (Index *s*) OligoPPE mit $n = 2, 5,$

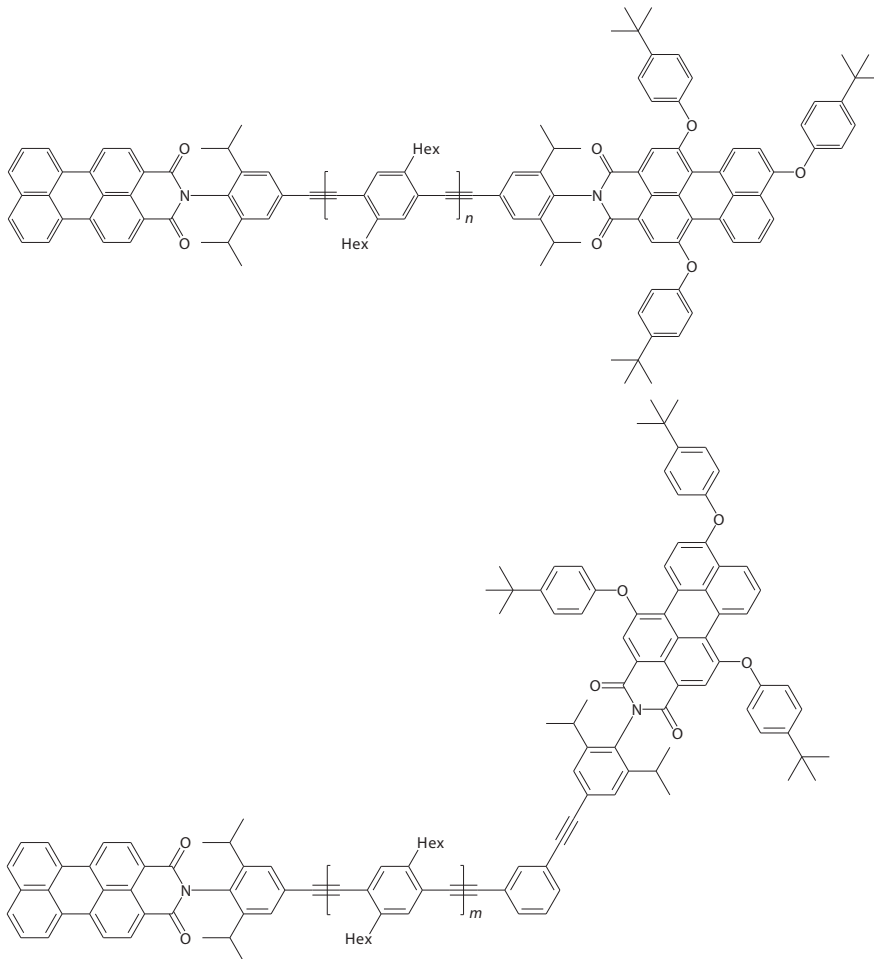


Abbildung 3.4: Oligo(*para*-PhenyleneEthyne) Proben mit PMI und PMI(OAr)₃. Die Länge des Abstandshalters kann durch Einfügen von PPE-Einheiten variiert werden. Es standen OligoPPE mit $n = 2, 5, 7, 9$ und $m = 5, 7, 9$ zur Verfügung.

7, 9 und geknickte (Index k) OligoPPE mit $m = 5, 7, 9$ synthetisiert und vermessen.

Berechnung der interchromophoren Distanz

Zur Berechnung des Abstands zwischen den Übergangsdipolmomenten der Farbstoffe werden die einzelnen PPE-Bausteine addiert. Die Berechnung erfolgt mit den Gleichgewichtsbindungslängen und Winkeln der Moleküle.^[32]

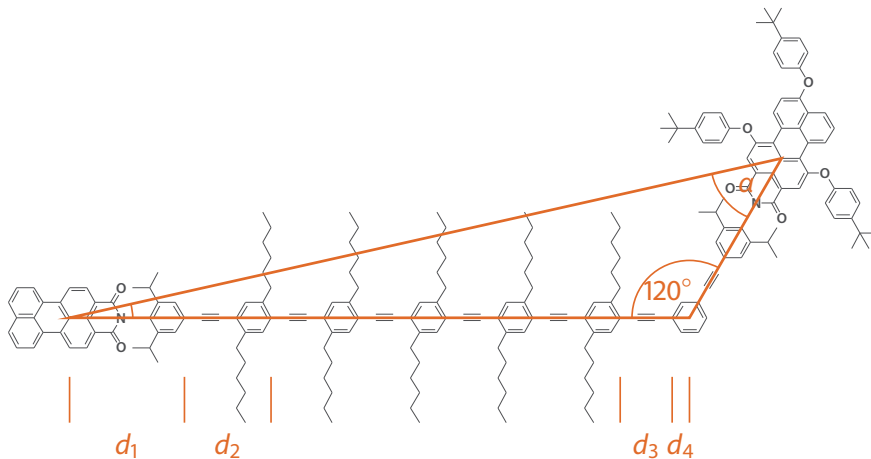


Abbildung 3.5: Längen und Winkel zur Berechnung der interchromophoren Distanz für die OligoPPE. Dargestellt ist ein geknicktes Molekül mit 5 PPE-Einheiten.

Mit den Bezeichnungen aus Abbildung 3.5 lässt sich der Abstand d der Zentren der Fluorophore berechnen:

$$\begin{aligned}
 d^s &= d_1 + nd_2 + d_3 + d_4 \\
 d^k &= (d_1 + d_3 + d_4)^2 + (d_1 + nd_2 + d_3 + d_4)^2 \\
 &\quad - 2(d_1 + d_3 + d_4)(d_1 + nd_2 + d_3 + d_4) \cos(\alpha). \quad (3.1)
 \end{aligned}$$

Es ergeben sich die in Tabelle 3.2 dargestellten Abstände.

Abbildung 3.5 verdeutlicht, dass sich durch Hinzufügen weiterer PPE-Einheiten nicht nur der Abstand, sondern auch die Orientierung der Farbstoffe ändert. Für die gestreckten $\text{PMI-PPE}_n^s\text{-PMI(OAr)}_3$ Moleküle wird $\kappa^2 = 4$ angenommen, also die Orientierung der Übergangsdipolmomente entlang der langen Achsen des PMI und PMI(OAr)_3 . Die mit

den gleichen Annahmen für die geknickten $\text{PMI-PPE}_n^k - \text{PMI(OAr)}_3$ Moleküle berechneten Werte von κ^2 sind in Tabelle 3.2 zusammen mit den Abständen angegeben.

Tabelle 3.2: Interchromophore Abstände d und Dipolorientierungen κ^2 der OligoPPE.

Probe	κ^2	$\frac{d}{\text{nm}}$
$\text{PMI-PPE}_2^s - \text{PMI(OAr)}_3$	4	3.47
$\text{PMI-PPE}_5^s - \text{PMI(OAr)}_3$	4	5.53
$\text{PMI-PPE}_5^k - \text{PMI(OAr)}_3$	2.17	5.65
$\text{PMI-PPE}_7^s - \text{PMI(OAr)}_3$	4	6.90
$\text{PMI-PPE}_7^k - \text{PMI(OAr)}_3$	1.95	6.99
$\text{PMI-PPE}_9^s - \text{PMI(OAr)}_3$	4	8.27
$\text{PMI-PPE}_9^k - \text{PMI(OAr)}_3$	1.80	8.35

3.2 Messmethoden

3.2.1 Stationäre und zeitaufgelöste Spektroskopie

Die Ensemble Messungen werden in Präzisions Küvetten aus Quarzglas Suprasil (Hellma, D) durchgeführt. Die Schichtdicke der Probe beträgt darin 4 mm bei einer Breite von 4 mm. Um intermolekulare Wechselwirkungen und Reabsorptionseffekte zu vermeiden, werden die Konzentration der Proben unter 10^{-6} M gehalten.

Zur Messung der Absorptionsspektren im ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Wellenlängenbereich wird ein Lambda25 UV/VIS Spektrometer (Perkin Elmer, USA) verwendet. Darin wird das von einer Deuteriumlampe (UV) und einer Wolframlampe (VIS) ausgehende polychromatische Licht mit einem SEYA-NAMIOKA-Monochromator (konkaves holografisches Gitter mit 1053 Linien/mm) spektral in einzelne Wellenlängen zerlegt. Die Selektion der Wellenlänge erfolgt an einer

Spaltblende mit einer Spaltbreite von 1 nm. So kann der Wellenlängenbereich von 190 nm bis 1100 nm mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ nm genutzt werden.

Zur Messung der Transmission wird ein Photodiodendetektor eingesetzt. Die Transmission einer Küvette mit der gelösten Probe wird im Vergleich zu einer Küvette mit dem Lösungsmittel gemessen. Aus der Verminderung des Signals kann nach dem LAMBERT-BEER-Gesetz (Abschnitt 2.4) bei bekanntem molaren Absorptionskoeffizienten die Konzentration der Probenlösung bestimmt werden.

Die Fluoreszenzmessungen werden an einem Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse Spectrophotometer mit Cary Temperature Controller (Varian, D) durchgeführt. Das Spektrometer nutzt eine Xenon Blitzlampe als Anregungslichtquelle. Die Probe wird also nicht kontinuierlich beleuchtet, sondern mit kurzen Lichtblitzen für jeden Messpunkt. Anregungswellenlängen von 290 nm bis 1100 nm sind möglich. Als Detektor kommt ein Sekundärelektronenvervielfacher (PMT, engl. photomultiplier tube) zum Einsatz.

Die Fluoreszenzlebensdauern werden an einem IBH Modell 5000MC Spektrometer (IBH, GB) mittels zeitkorreliertem Einzelphotonenzählen (TCSPC) bestimmt. Als Anregungsquelle werden NanoLED (IBH, GB) Dioden mit Repetitionsraten von 1 MHz und Pulsbreiten im ns-Bereich verwendet (Tabelle 3.2.1). Um Polarisierungseffekte auszuschließen wird die Fluoreszenz unter einem Winkel von $54,7^\circ$ gemessen.

Die Photonen werden mit einem auf Einzelphotonen sensitiven PMT-Detektor nachgewiesen. Die Auswahl von Anregungs- und Emissionswellenlänge erfolgt mit Monochromatoren.

Tabelle 3.3: NanoLED Spezifikationen. Angegeben ist die Wellenlänge maximaler Emission λ_{\max} , die Repetitionsrate f und die Pulsbreite Δt .

Modell	Lichtquelle	$\frac{\lambda_{\max}}{\text{nm}}$	$\frac{f}{\text{MHz}}$	$\frac{\Delta t}{\text{ns}}$
NanoLED-05	Leuchtdiode	450	1.0	1.0
NanoLED-01	Leuchtdiode	495	1.0	1.5
NanoLED-02B	Laserdiode	635	1.0	0.2

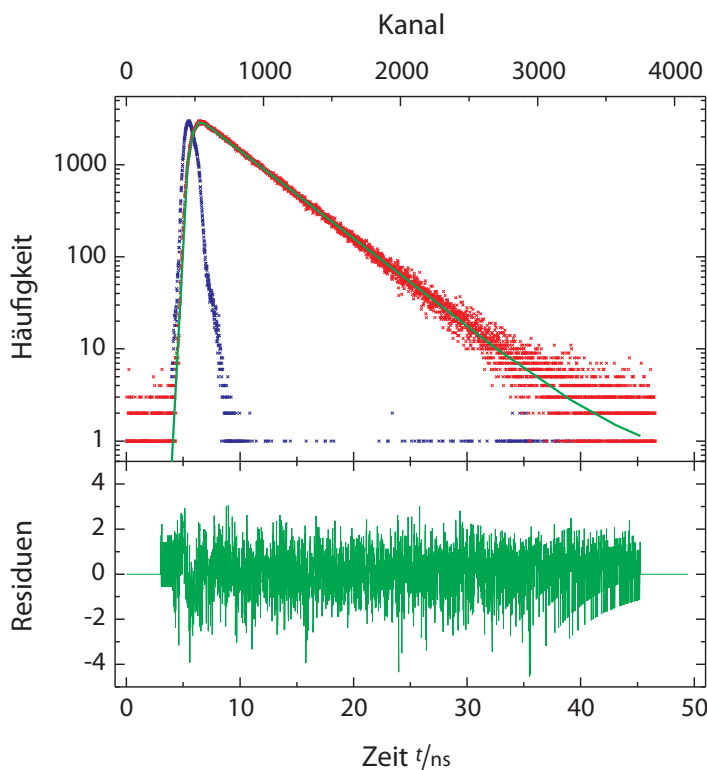


Abbildung 3.6: Abklingen der Fluoreszenz einer PMI Probe in Toluol (rot). Dargestellt ist die für die Auswertung notwendige Antwortfunktion (blau) der NanoLED-05 (450 nm, Tabelle 3.2.1) und das Ergebnis der Anpassung (grün, oben: Abklingkurve, unten: Residuen). Die Fluoreszenzlebensdauer beträgt $\tau = 4,50 \text{ ns}$, $\chi^2 = 1,054$.

Die Histogramme werden mit 4096 Kanälen aufgenommen, die jeweils einer Breite von etwa 12 ps entsprechen. Es werden, abhängig von der Probenkonzentration, Histogramme mit 1000 bis 3000 Photonenergebnissen im Maximum aufgenommen. Die untere Schranke der Fluoreszenzlebensdauerdetektion von etwa 100 ps ergibt sich aus den Antwortfunktionen der Lichtquelle und des PMT-Detektors.

Abbildung 3.6 zeigt ein Beispiel für eine Messung des Abklingverhaltens einer PMI Probe in Toluol. Das dargestellte Profil der Diode (blau) wird benötigt, da die gemessene Kurve (rot) der Faltung aus diesem Pro-

fil mit dem tatsächlichen Abklingverhalten des Fluorophors entspricht. Das Diodenprofil kann gemessen werden, indem die Probe durch eine Streuprobe¹ ersetzt wird und der Emissionsmonochromator auf die Anregungswellenlänge eingestellt wird.

3.2.2 Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie mit alternierender Anregung

Der experimentelle Aufbau zur Detektion einzelner Moleküle besteht im wesentlichen aus einem inversen konfokalen Mikroskop mit Laseranregung (Abbildung 3.7). Der Aufbau erlaubt, über einen dichroitischen Strahlteiler, die spektral aufgelöste Detektion mit zwei Lawienenphotodioden (APD, engl. avalanche photodiode).

Alternierende Anregung mit zwei unterschiedlichen Laserwellenlängen wird durch den Einsatz von zwei Lasern oder durch abwechselnde Selektion von zwei Laserwellenlängen eines Lasers erreicht. Dazu wird ein akustooptisch stimmbares Filter verwendet.

Die Anregung erfolgt entsprechend den spektralen Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe. Zur Anregung der Oligo- und Polyprolin Proben mit dem FRET-Paar Atto565/Atto647N und der Cystein Proben (FRET-Paare TMR/Atto647N, Cy3B/Atto647N und Cy3B/Cy5) wird die 531 nm Linie eines Argon/Krypton Mischgaslasers 2018-RM (Spectra Physics, D) und ein 638 nm Cube Diodenlaser (Coherent, D) genutzt. Die 457 nm und 568 nm Linien eines Innova 70C Spectrum (Coherent, USA) Argon/Krypton Mischgaslasers wird zur Anregung des FRET-Paares Atto488/Atto565, an den Oligo- und Polyprolin Proben, und der Perylenderivate PMI und PMI(OAr)₃, an den OligoPPE Proben, verwendet.

Der Cube Diodenlaser kann im ms-Bereich direkt mit einem TTL-Signal geschaltet werden. Das Alternieren der Gaslaserlinien kann durch ein akustooptisch stimmbares Filter (AOTF, engl. acoustooptical tunable filter) erreicht werden. Dazu wird mit einem Piezokristall eine Ultraschallwelle in einen optisch anisotropen Kristall induziert. Diese führt dazu, dass sich innerhalb des anisotropen Kristalls ein Brechungsindex-

¹Als Streuprobe eignet sich z. B. ein Tropfen Milch in Wasser.

gitter ausbildet, an dem die einfallende Laserstrahlung wellenlängenspezifisch gebeugt wird. In dem, in Abbildung 3.7 dargestellten, experimentellen Aufbau wird ein AOTF (AA Opto-Electronic, F) zur alternierenden Wellenlängenselektion verwendet.

Ein Einmoden-Lichtwellenleiter (engl. single mode optical fiber) wird als räumliches Filter eingesetzt, um ein sauberes Strahlprofil zu erhalten. Ein dichroitischer Strahlteiler reflektiert das einfallende Laserlicht in das Mikroskopobjektiv und transmittiert das mit dem Objektiv aufgesammelte Fluoreszenzlicht. Die Mikroskopoptik fokussiert das Fluoreszenzlicht auf eine Lochblende (100 μm).

Die Detektion erfolgt mit zwei SPCM-AQR14 APD (Perkin Elmer, D), die über einen weiteren dichroitischen Strahlteiler spektral getrennt sind. In APD werden durch einfallende Photonen Elektron-Loch Paare erzeugt, die zu einem Photostrom führen. Eine zusätzlich angelegte Sperrspannung führt dazu, dass die, durch das Photon erzeugten Ladungsträger im elektrischen Feld beschleunigt werden und dabei weitere Ladungsträger erzeugen können. So können Einzelphotonenereignisse detektiert werden. Die verwendeten APD haben eine Detektionseffizienz von bis zu 65 %, eine Totzeit von 32 ns und eine Dunkelzählrate von 100 Hz.

Die Bestimmung der FRET-Effizienz im Einzelmolekülexperiment erfolgt mittels alternierender Laser Anregung (ALEX, engl. alternating laser excitation). Zur Bestimmung der FRET-Effizienz bei kontinuierlicher Anregung des Donors werden bei Einzelmolekülmessungen zwei Photonenströme F^D und F^A von zwei spektral getrennten APD aufgenommen. Dabei bedeutet der Index jeweils den Kanal mit vorwiegend Donor- (D) bzw. Akzeptor-Emission (A). Daraus kann die FRET-Effizienz nach:

$$E = \frac{F^A}{F^D + F^A} \quad (3.2)$$

berechnet werden.

Bei Anwendung der ALEX-Technik werden vier unterschiedliche Photonenströme (F_D^D , F_D^A , F_A^D , F_A^A) aufgenommen. Die Unterscheidung erfolgt zum einen anhand des Detektionskanals (oberer Index) mit vorwiegend Donor- (D) bzw. Akzeptor-Emission (A). Zum anderen zusätzlich

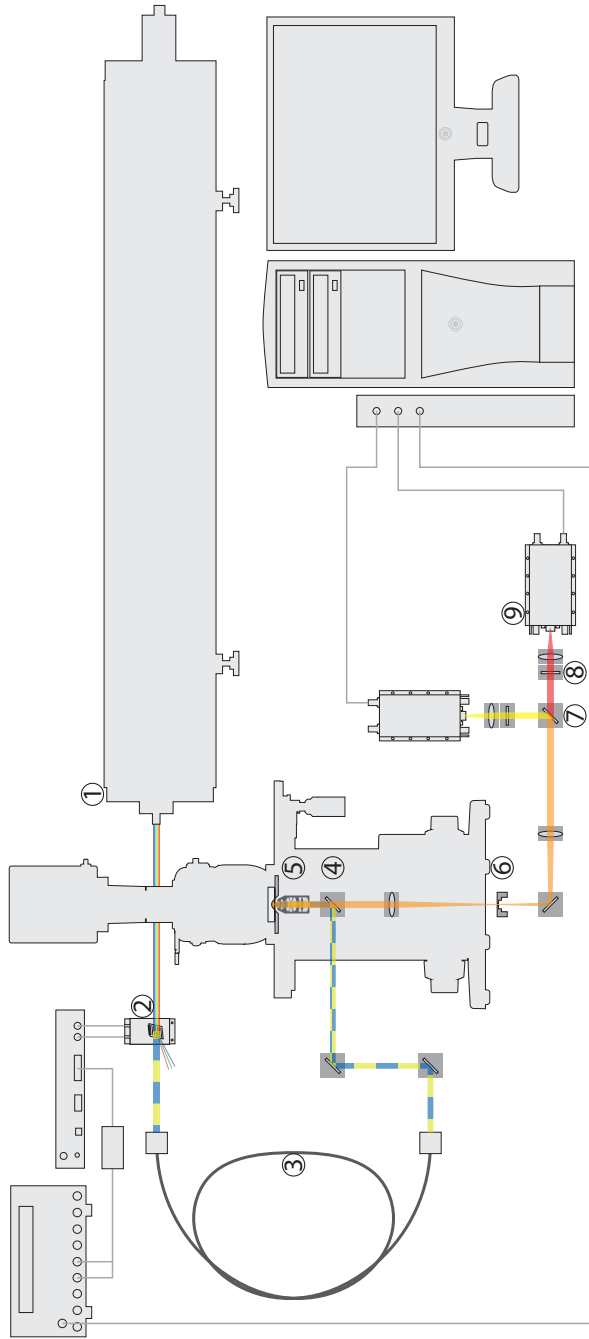


Abbildung 3.7: Experimenteller Aufbau zur Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie mit ALEX. (1) Laser, (2) AOTF, (3) Einmoden-Lichtwellenleiter, (4) dichroitischer Strahlteiler, (5) Mikroskopobjektiv, (6) Lochblende, (7) dichroitischer Strahlteiler, (8) Filter und (9) APD.

nach der Wellenlänge des Anregungslichts (unterer Index) mit vorwiegend Donor- (D) bzw. Akzeptor-Anregung (A).

Daraus kann, analog zu Gleichung (3.2), die FRET-Effizienz berechnet werden:

$$E = \frac{F_D^A}{F_D^D + F_D^A} \quad (3.3)$$

Zusätzlich wird ein stöchiometrischer Index S definiert:

$$S = \frac{F_D^D + F_D^A}{F_D^D + F_D^A + F_A^A}, \quad (3.4)$$

der eine Unterscheidung nach der Stöchiometrie des Moleküls ermöglicht.

Um FRET-Effizienzen genau ermitteln zu können, müssen einige Korrekturen eingeführt werden.^[30] Die Emission des Donors erfolgt im allgemeinen nicht nur in den Donorkanal, sondern auch in den Akzeptorkanal. Dies wird als Durchsickern (engl. leakage) bezeichnet. Der Koeffizient $l = \eta_A^D / \eta_D^D$, mit den Detektionseffizienzen der Donoremission auf dem Akzeptorkanal η_A^D und dem Donorkanal η_D^D , kann mit einer Donor-Probe aus dem Verhältnis der Photonenströme bei Donoranregung ermittelt werden:

$$l = F_D^A / F_D^D \quad (3.5)$$

Zudem kann der Akzeptor in vielen Fällen mit Licht der Anregungswellenlänge des Donors direkt angeregt werden. Die Direktanregung (engl. direct excitation) ist abhängig von den Intensitäten I der Anregungslaser und den Absorptionsquerschnitten σ^A des Akzeptors bei den verwendeten Wellenlängen. Der Direktanregungskoeffizient kann nach:

$$d = \frac{I_D \sigma_D^A}{I_A \sigma_A^A} = \frac{F_D^A}{F_D^D} \quad (3.6)$$

aus den Photonenströmen bei der Messung einer Akzeptorprobe bestimmt werden.

Eine weitere Korrektur ergibt sich aus der Detektionseffizienz für die jeweiligen Farbstoffe. Der Korrekturfaktor für die Detektion γ ist definiert als:

$$\gamma = \frac{\phi_A \eta_A^A}{\phi_D \eta_D^D}. \quad (3.7)$$

Mit diesen Korrekturen können die Energietransfereffizienz E und der stöchiometrische Index S aus den Photonenströmen berechnet werden:

$$E = \frac{F_D^A - lF_D^D - dF_A^A}{\gamma F_D^D + F_D^A - lF_D^D - dF_A^A}$$
$$S = \frac{\gamma F_D^D + F_D^A - lF_D^D - dF_A^A}{\gamma F_D^D + F_D^A - lF_D^D - dF_A^A + F_A^A}. \quad (3.8)$$

Mit Hilfe der ALEX-Spektroskopie können unterschiedliche Populationen in Proben, in Abhängigkeit ihrer relativen Anregbarkeit mit den verwendeten Laserlinien und ihrer Emissionscharakteristik, unterschieden werden. Bei Betrachtung der E - S Histogramme von FRET-Paaren, können unterschiedliche Subpopulationen aufgelöst werden:

- nur Fluoreszenzemission des Donors (kleine E Werte und große S Werte),
- nur Fluoreszenzemission des Akzeptors (unterschiedliche E Werte und kleine S Werte),
- Fluoreszenzemission des Donors und des Akzeptors (E Werte entsprechend der FRET-Effizienz und mittlere S Werte).

Auf diese Weise können Heterogenitäten in der Probe, die in Ensembleexperimenten aufgrund der Mittelung nicht sichtbar sind, aufgelöst werden.

3.3 Datenaufnahme und Datenauswertung

Zur Aufnahme der Daten des Absorptions- und des Fluoreszenzspektrometers existiert proprietäre Software der Hersteller. Die weitere Auswertung erfolgt nach Export in ASCII-kodierte Dateien unter Verwendung von OriginPro 8G (OriginLab, USA) und gnuplot 4.2 (freie Software, www.gnuplot.info).

3.3.1 Ensemblespektroskopie

Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren werden zunächst, durch Subtrahieren des Spektrums des jeweiligen Lösungsmittels, von Hintergrund bereinigt.

Aus den so erhaltenen Spektren wird, nach dem LAMBERT-BEER-Gesetz (Gleichung (2.4)), die Konzentration der Proben bestimmt. Dazu werden die molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ der Farbstoffe, soweit nicht anders vermerkt, nach Herstellerangabe verwendet.

Zur übersichtlicheren Darstellung werden die Absorptionsspektren auf das Maximum normiert und mit den Absorptionskoeffizienten skaliert (Normierung auf 1 M). Dadurch sind die Spektren der unterschiedlichen Farbstoffe und Farbstoff-Konstrukte vergleichbar.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Emissionsspektren werden ebenfalls mit den Spektren der jeweiligen Lösungsmittel korrigiert, um Streueffekte zu eliminieren. Die bereinigten Spektren werden dann entweder auf die Absorption bei der Anregungswellenlänge oder, wenn die Absorptionsspektren von Probe und freiem Farbstoff in guter Übereinstimmung sind, auf die Absorption im Maximum normiert.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Für ein, der δ -Funktion entsprechendes Profil, wäre das Abklingverhalten direkt beobachtbar. Bei realen Lichtpulsen muss jedoch eine Entfaltung durchgeführt werden. Eine Entfaltung stellt allerdings ein unterbestimmtes mathematisches Problem dar, da die Faltung zu einem Verwaschen der Funktionen und damit zu einem Informationsverlust führt. Die Entfaltung, mit anschließender Anpassung an das exponentielle Modell, wird daher durch eine Faltung des Modells mit der Antwortfunktion und anschließenden Vergleich mit den Messdaten ersetzt.

Die Auswertungssoftware des Spektrometers (DAS6, Fluorescence Decay Analysis Software) verwendet diese Methode und bestimmt die Qualität der Anpassung über einen χ^2 Wert, für den ein Minimum gesucht wird. Der Wert für χ^2 wird aus dem Verhältnis der Abweichung des Modells zu der erwarteten Abweichung (Poisson Statistik) in jedem Messpunkt berechnet. Für eine gute Übereinstimmung sollte $\chi^2 = 1$ gelten. Eine weitere Möglichkeit die Anpassungsqualität zu bewerten ist die Betrachtung der Residuen. Zeigen diese ausschließlich statistische

Schwankungen, stimmen das Modell und die erhaltenen Parameter mit den Messungen überein.

3.3.2 Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Die Datenaufnahme und -verarbeitung bei den ALEX-Messungen erfolgt mit einer in LabVIEW (National Instruments, USA) geschriebenen Software. Dabei werden die einzelnen Photonenergebnisse, sortiert nach Detektionskanal und mit einem Zeitstempel versehen, abgespeichert. Auf diese Daten greift ein Programmteil zu mit dem es möglich ist, mit Hilfe von wählbaren Parametern, Häufungen von Photonenergebnissen zu finden. Eine solche Häufung wird als Photonenschauer (engl. photon burst) bezeichnet. Das Vorliegen eines Photonenschauers ist gekennzeichnet durch die Detektion von L Photonen, die M benachbarte Photonen innerhalb eines Zeitintervalls von T Mikrosekunden aufweisen. Die detektierten Photonen, der so bestimmten Einzelmolekülereignisse, können, nach Photonenstrom getrennt, abgespeichert werden.

Die Auswertung der aus diesen Daten erzeugten E - S -Histogramme kann in OriginPro erfolgen. Dabei werden die implementierten Anpassungsalgorithmen (LEVENBERG-MARQUARDT) verwendet, um die Korrekturen und die Werte für E und S zu bestimmen. Die Auswertung erfolgt dabei in mehreren Schritten.

Durchsickern und Direktanregung

Zur Bestimmung der Korrekturkoeffizienten l und d werden ALEX-Messungen an Molekülen, die nur Donor- bzw. nur Akzeptorfarbstoff tragen, ausgewertet. Dabei werden für jeden detektierten Photonenschauer die Quotienten für l und d aus den Photonenströmen bestimmt. Das Maximum der Verteilungen von l und d ergibt die Korrekturfaktoren.

Detektionseffizienz

Zur Bestimmung der Detektionseffizienz γ werden vereinfachte Ausdrücke für E und S definiert:

$$E_{\text{PR}} = \frac{F_{\text{D}}^{\text{A}} - lF_{\text{D}}^{\text{D}} - dF_{\text{A}}^{\text{A}}}{F_{\text{D}}^{\text{D}} + F_{\text{D}}^{\text{A}} - lF_{\text{D}}^{\text{D}} - dF_{\text{A}}^{\text{A}}}$$

$$S_{\text{raw}} = \frac{F_{\text{D}}^{\text{D}} + F_{\text{D}}^{\text{A}} - lF_{\text{D}}^{\text{D}} - dF_{\text{A}}^{\text{A}}}{F_{\text{D}}^{\text{D}} + F_{\text{D}}^{\text{A}} - lF_{\text{D}}^{\text{D}} - dF_{\text{A}}^{\text{A}} + F_{\text{A}}^{\text{A}}}. \quad (3.9)$$

Diese lassen sich, mit den Korrekturkoeffizienten l und d , für jeden Photonenschauer aus den Photonenströmen berechnen. Die so erhaltenen Verteilungen können in zweidimensionalen $E_{\text{PR}}-S_{\text{raw}}$ -Histogrammen dargestellt werden, aus denen die Lage und Breite der Verteilungen der Subpopulationen bestimmt werden kann. Dazu werden Anpassungen von zweidimensionalen Normalverteilungen verwendet.

Da die Verteilungen, für die Subpopulationen von nur donor- und nur akzeptortragenden Molekülen, aus den Einzelmessungen bestimmt werden kann, werden diese bei der Bestimmung der Verteilung der FRET-Population, mit freier Amplitude, vorgegeben. Dabei muss beachtet werden, dass FRET-Population, die im E - S -Histogramm nah bei den Verteilungen des Donors oder des Akzeptors liegen, leicht als solche missinterpretiert werden können. Dadurch kann es zu großen Amplituden für die Donor bzw. Akzeptoranteile und einer inkorrekten Bestimmung der Lage und Breite der FRET-Verteilung kommen.

Zwischen E_{PR} und $1/S_{\text{raw}}$ besteht ein linearer Zusammenhang, aus dem sich die Detektionseffizienz γ ergibt:^[30]

$$\frac{1}{S_{\text{raw}}} = 1 + \gamma\beta + \beta(1 - \gamma)E_{\text{PR}} = \Omega + \Sigma E_{\text{PR}}$$

$$\gamma = \frac{\Omega - 1}{\Omega + \Sigma - 1}. \quad (3.10)$$

Bestimmung von Transfereffizienz und Stöchiometrie

Mit den Korrekturen l , d und γ können aus den Photonenströmen der Photonenschauer die genauen E und S Werte bestimmt werden (Glei-

chung (3.2.2)). Die Bestimmung der Lage und Breite der Verteilungen erfolgt wie zur Bestimmung der vereinfachten Werte.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Oligo- und Polyprolin

Die Untersuchung der Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz kann anhand von Oligoprolin-Molekülen erfolgen, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die, als Abstandshalter wirkenden Oligo- und Polyproline werden dazu mit den für Einzelmolekülexperimente geeigneten Farbstoffen Atto647N, Atto565 und Atto488 markiert.

Die Messungen werden in PBS (isotonische Salzlösung mit Phosphatpuffer, engl. phosphate buffered saline) durchgeführt.

Absorptionsspektroskopie

Abbildung 4.1 zeigt die Absorptionsspektren der, mit den Farbstoffen Atto488 und Atto565 markierten Oligo- und Polyprolin Proben. Die gemittelten Spektren der Proben mit nur einem Donor und nur einem Akzeptor sind auf das Maximum normiert und mit den Absorptionskoeffizienten der Farbstoffe skaliert. Dadurch lassen sich die Spektren konzentrationsunabhängig vergleichen. Die Spektren, der mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markierten Oligo- und Polyprolin Proben, sind auf die Absorption bei 450 nm (Anregungswellenlänge für die Messungen der Fluoreszenzemission, Abbildung 4.3) normiert. Die Skalierung erfolgt mit dem Wert der Summe aus Donor- und Akzeptorspektrum bei dieser Wellenlänge.

Die Absorptionsspektren der Atto565-Pro_n-Atto488 Proben zeigen teils deutliche Abweichungen von der Summe aus Donor- und Akzeptorspektrum. Die kurzen Oligoprolin Proben, mit 4 und 6 Prolin Einheiten, weisen eine erhöhte Absorption im Bereich der Donorabsorption und eine verminderte Absorption im Bereich der Akzeptorabsorption auf. Das Spektrum der Probe mit 8 Prolin Einheiten liegt in beiden Spektralbereichen oberhalb der Summe der Donor- und Akzep-

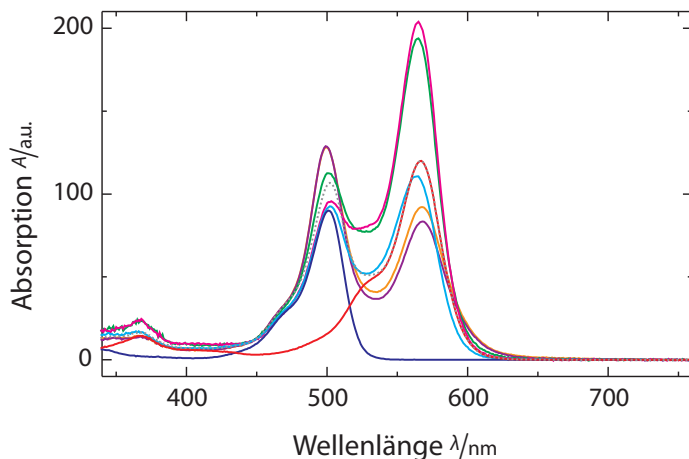


Abbildung 4.1: Absorptionsspektren der Atto565–Pro_n–Atto488 Proben. Die Kurven entsprechen $n = 4$ (orange), $n = 6$ (violett), $n = 8$ (grün), $n = 12$ (magenta), $n = 20$ (cyan) und den gemittelten Spektren von Pro_n–Atto488 (blau) und Atto565–Pro_n (rot). Zum Vergleich ist die Summe aus dem Donor- und Akzeptorspektrum dargestellt (grau gepunktet). Die Kurven sind auf die Absorption bei 450 nm normiert und mit dem gewichteten Absorptionskoeffizienten skaliert (siehe Text).

torspektren. Die Spektren der Polyprolin Proben mit 12 und 20 Prolin Einheiten liegen im Bereich der Donorabsorption unterhalb der Summe der Spektren von Donor und Akzeptor. Im Bereich der Akzeptorabsorption liegt die Atto565–Pro₁₂–Atto488 Probe oberhalb und die Atto565–Pro₂₀–Atto488 Probe unterhalb des Spektrums der Summe.

Durch lineares Anpassen der Spektren der Donorprobe und der Akzeptorprobe an das Spektrum der Atto565–Pro_n–Atto488 Proben kann das Verhältnis $c^{(A)}/c^{(D)}$ der Konzentrationen von Donor $c^{(D)}$ und Akzeptor $c^{(A)}$ bestimmt werden. Es ergeben sich, mit aufsteigender Anzahl von Prolin Einheiten, die Konzentrationsverhältnisse 0,64, 0,57, 1,65, 2,27 und 1,07.

Abbildung 4.2 zeigt die Absorptionsspektren der Oligo- und Polyprolin Proben, die mit den Farbstoffen Atto565 und Atto647N markiert sind.

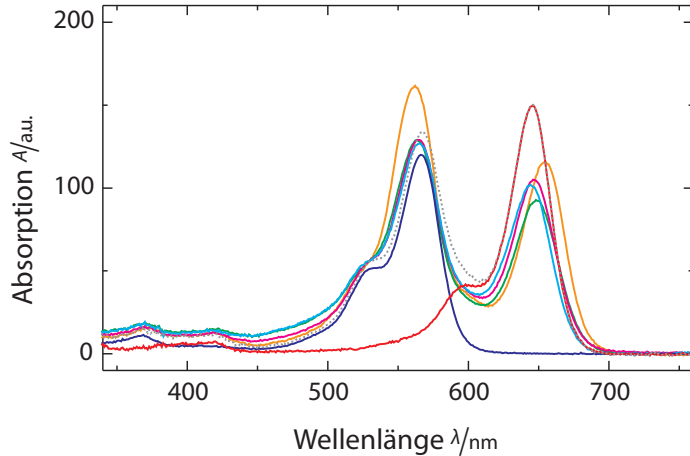


Abbildung 4.2: Absorptionsspektren der Atto647N – Pro_n – Atto565 Proben. Die Kurven entsprechen $n = 4$ (orange), $n = 8$ (grün), $n = 12$ (magenta), $n = 20$ (cyan) und den gemittelten Spektren von Pro_n–Atto565 (blau) und Atto647N–Pro_n (rot). Zum Vergleich ist die Summe aus dem Donor- und Akzeptorspektrum dargestellt (grau gepunktet). Die Kurven sind auf die Absorption bei 530 nm normiert und mit dem gewichteten Absorptionskoeffizienten skaliert (siehe Text).

Die Spektren sind auf die Absorption bei 530 nm (Anregungswellenlänge für die Messungen der Fluoreszenzemission, Abbildung 4.5) normiert und, wie die Spektren der Atto565 – Pro_n – Atto488 Proben, mit der berechneten Absorption der Summe aus Donor- und Akzeptorspektrum bei 530 nm skaliert.

Im Vergleich zu den Spektren in Abbildung 4.1 ergibt sich für die Spektren der Atto647N – Pro_n – Atto565 Proben ein einheitlicheres Bild. Die Kurven liegen nahezu aufeinander, nur das Spektrum der kurzen Oligoprolin Probe mit 4 Prolin Einheiten weicht deutlich ab. Der Kurvenverlauf unterscheidet sich dennoch von dem der Summe aus Donor- und Akzeptorspektrum. Die mit beiden Farbstoffen markierten Oligo- und Polyprolin Proben zeigen im Bereich des Akzeptors deutlich verminderte Absorption. Bei der kurzen Oligoprolin Probe mit 4 Einheiten

wird eine bathochrome und hypochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums im Bereich des Akzeptors und eine hypsochrome und hyperchrome Verschiebung im Bereich des Donors beobachtet.

Das Maximum der Donorabsorption ist, für die Oligoprolin Probe mit 4 Prolin Einheiten, um 5 nm hypsochrom und das Maximum der Akzeptorabsorption um 9 nm bathochrom verschoben. Bei genauerer Betrachtung der Absorptionsmaxima der längeren Prolin Proben lässt sich feststellen, dass auch diese eine Verschiebung zeigen. Die Verschiebung vermindert sich mit zunehmender Länge der Oligo- bzw. Polyprolin Moleküle. Die hypsochrome Verschiebung des Donormaximums beträgt für die Oligoprolin Probe mit 8 Prolin Einheiten 4 nm, für die mit 12 Einheiten 2 nm und für 20 Einheiten 1 nm. Die bathochrome Verschiebung des Akzeptormaximums beträgt für die Probe mit 8 Einheiten 3 nm und für 12 Einheiten 1 nm. Die Probe mit 20 Prolin Einheiten zeigt keine bathochrome Verschiebung.

Eine Interpretation dieser Verschiebungen ist die Bildung von H-Dimeren, die zu dem Auftreten von zwei neuen Absorptionsmaxima, die zu denen der Farbstoffe verschoben sind, führen. Charakteristisch für H-Dimere ist, dass die Energiezustände aufspalten. Dabei entstehen schwache Übergänge geringerer Energie und starke Übergänge mit höherer Energie.^[26]

Hydrophobe organische Substanzen neigen bekanntermaßen zu Dimerbildung in wässrigen Lösungen.^[46] Die hydrophobe Wechselwirkung kann dazu führen, dass die planaren aromatischen Ringsysteme von Fluorophoren aufeinander gestapelt werden. Die Bindungsenergie eines solchen gestapelten Systems kann einige $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ betragen.^[11,11]

Fluoreszenzspektroskopie

Anhand der in Abbildung 4.3 dargestellten Fluoreszenzemissionsspektren wird deutlich, dass die vollständige Fluoreszenzquantenausbeute (Verhältnis von absorbierten Photonen zu der Anzahl aller emittierten Photonen sowohl im Bereich der Donoremission als auch im Bereich der Akzeptoremission) herabgesetzt ist. Zur Quantifizierung kann eine relative Fluoreszenzquantenausbeute eingeführt werden, die das Verhältnis der auftretenden Fluoreszenzquantenausbeute der FRET-Probe mit

der erwarteten Summe der Fluoreszenzquantenausbeuten von Donor und Akzeptor ins Verhältnis setzt.

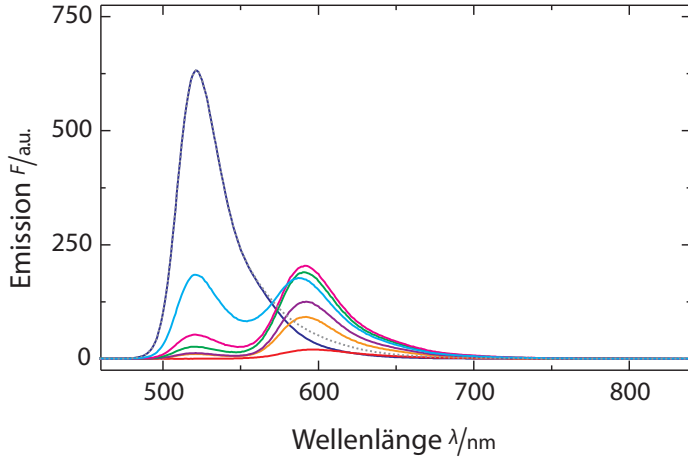


Abbildung 4.3: Fluoreszenzemissionsspektren der Atto565 – Pro_n – Atto488 Proben. Die Kurven entsprechen $n = 4$ (orange), $n = 6$ (violett), $n = 8$ (grün), $n = 12$ (magenta), $n = 20$ (cyan) und den gemittelten Spektren von Pro_n–Atto488 (blau) und Atto565–Pro_n (rot). Zum Vergleich ist die Summe aus dem Donor- und Akzeptorspektrum dargestellt (grau gepunktet). Die Kurven sind auf die Absorption bei der Anregungswellenlänge 450 nm normiert und mit dem gewichteten Absorptionskoeffizienten skaliert (siehe Text).

Die relative Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_r der FRET-Probe kann über die Fluoreszenzemission $F(\lambda)$ und die Absorption $A(\lambda_{\text{ex}})$ bei der Anregungswellenlänge λ_{ex} wie folgt definiert werden:

$$\phi_r = \frac{\frac{\int F_{\text{DA}}(\lambda) d\lambda}{A_{\text{DA}}(\lambda_{\text{ex}})}}{\frac{\int F_{\text{D}}(\lambda) d\lambda}{A_{\text{D}}(\lambda_{\text{ex}})} + \frac{\int F_{\text{A}}(\lambda) d\lambda}{A_{\text{A}}(\lambda_{\text{ex}})}}. \quad (4.1)$$

Die Integrale werden dabei über dem gesamten Wellenlängenbereich von Donor- und Akzeptoremission ausgewertet. Die so erhaltene relative

Fluoreszenzquantenausbeute kann mit der erwarteten FRET-Effizienz E und der Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors ϕ_A gewichtet werden:

$$[1 - E(1 + \phi_A)] \phi_r. \quad (4.2)$$

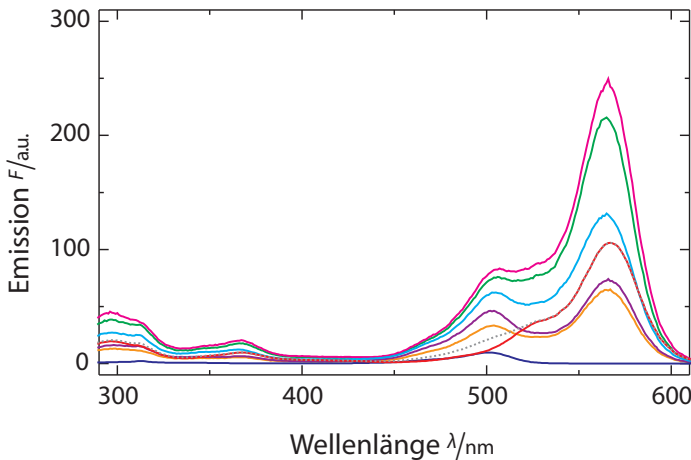


Abbildung 4.4: Fluoreszenzanregungsspektren der Atto565 – Pro_n – Atto488 Proben. Die Kurven entsprechen $n = 4$ (orange), $n = 6$ (violett), $n = 8$ (grün), $n = 12$ (magenta), $n = 20$ (cyan) und den gemittelten Spektren von Pro_n – Atto488 (blau) und Atto565 – Pro_n (rot). Zum Vergleich ist die Summe aus dem Donor- und Akzeptorspektrum dargestellt (grau gepunktet). Die Kurven sind auf die Absorption bei 450 nm normiert und mit dem gewichteten Absorptionskoeffizienten skaliert (siehe Text).

Betrachtet man die erwarteten FRET-Effizienzen¹ $E(n=4) = 1$, $E(n=6) = 1$, $E(n=8) = 1$, $E(n=12) = 0,96$ und $E(n=20) = 0,51$ und die Fluoreszenzquantenausbeute von Atto565 von etwa 90 %² ergeben sich gewichtete Ausbeuten von 17 %, 23 %, 37 %, 42 % und 59 % für die Moleküle mit 4, 6, 8, 12 und 20 Prolin Einheiten. Insgesamt wird also bei

¹berechnet mit einer Länge von 0,312 nm je Prolin einheit und einem FÖRSTER Radius von $R_0 = 6,3$ nm für das Farbstoffpaar nach Herstellerangabe

²nach Herstellerangabe

allen Proben eine deutlich zu geringe Photonenzahl detektiert, wobei die Löschung mit zunehmender Länge der Oligo- bzw. Polyprolinkette abnimmt.

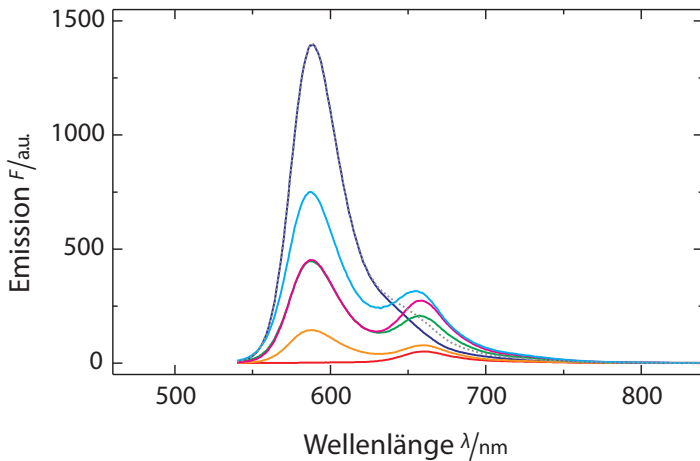


Abbildung 4.5: Fluoreszenzemissionsspektren der Atto647N-Pro_n-Atto565 Proben.

Die Fluoreszenzanregungsspektren (Abbildung 4.4) der Atto565-Pro_n-Atto488 Proben zeigen, ebenso wie die Absorptionsspektren in Abbildung 4.1, kein einheitliches Bild. Die kurzen Proben mit 4 und 6 Prolin Einheiten zeigen zu geringe Emission bei Anregung im Bereich der Akzeptorabsorption, die Proben mit 8 und 12 Prolin Einheiten erhöhte Emission und die Probe mit 20 Prolin Einheiten leicht erhöhte Emission. Dies stimmt gut mit den aus den Absorptionsspektren erhaltenen Konzentrationsverhältnissen überein.

Bei Betrachtung der in Abbildung 4.5 dargestellten Spektren der Fluoreszenzemission der Atto647N-Pro_n-Atto565 Proben fällt auf, dass, wie schon bei den Atto565-Pro_n-Atto488 Proben, die Gesamtfluoreszenz teilweise gelöscht ist. Zur Quantifizierung dieses Sachverhalts können die relativen Fluoreszenzquantenausbeuten bestimmt und mit den erwarteten FRET-Effizienzen ($E(n=4) = 1$, $E(n=8) = 1$, $E(n=12) = 0,97$ und

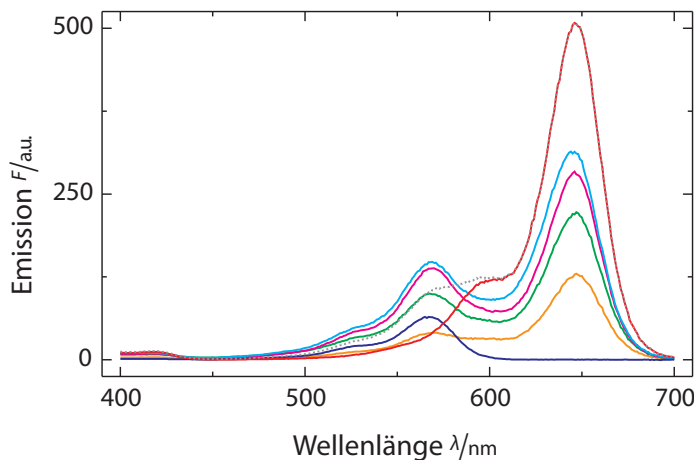


Abbildung 4.6: Fluoreszenzanregungsspektren der Atto647N–Pro_n–Atto565 Proben.

$E(n=20) = 0,63$) und der Fluoreszenzquantenausbeute von Atto647N ($\phi_A = 65\%³$) gewichtet werden.

Daraus ergeben sich gewichtete Ausbeuten von 9 %, 28 %, 31 % und 56 % für die Moleküle mit 4, 8, 12 und 20 Prolin Einheiten. Wie schon bei den Atto565–Pro_n–Atto488 Proben, sind auch bei den mit Atto647N und Atto565 markierten Proben die kurzen Oligoprolin Proben sehr stark gelöscht. Insbesondere eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz durch den erwarteten Energietransfer ist kaum zu erkennen.

Dies wird durch die in Abbildung 4.6 dargestellten Anregungsspektren bestätigt. Die Emission bei Anregung im Bereich der Akzeptorabsorption ist, insbesondere bei den kurzen Proben, deutlich geringer als bei der nur mit dem Akzeptor markierten Probe. Die Emission bei Anregung im Bereich der Donorabsorption ist bei der Atto647N–Pro₂–Atto565 Probe ebenfalls gelöscht. Dies gibt, wie schon die Betrachtung des Absorptionsspektrums, einen Hinweis auf das Vorkommen von nichtfluoreszierenden H-Dimeren, die zwar eine starke Absorption zeigen jedoch nicht zur

³nach Herstellerangabe

Emission beitragen.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzlebensdauer der Atto565 – Pro_n–Atto488 Proben können mit einer 450 nm Leuchtdiode (NanoLED-05) und einer Anregungswellenlänge von 450 nm mittels TCSPC durchgeführt werden. Die Fluoreszenzemission wird bei einer Wellenlänge von 525 nm detektiert. Die Konzentration der Proben wird auf etwa 10⁻⁶ M eingestellt, so dass die Messung nicht durch Reabsorptionseffekte beeinträchtigt wird.

Tabelle 4.1: Resultate der Lebensdauermessungen für Atto565 – Pro_n – Atto488. Es wird eine biexponentielle Anpassung mit Optimierung von χ^2 durchgeführt, um die Lebensdauern τ und die zugehörigen relativen Amplituden a zu ermitteln. Die Lebensdauer der jeweiligen Donorprobe wird dabei als τ_2 vorgegeben und festgehalten.

Probe	$\frac{t_1}{\text{ns}}$	$\frac{a_1}{\%}$	$\frac{t_2}{\text{ns}}$	$\frac{a_2}{\%}$	χ^2
Atto565 – Pro ₄ – Atto488	0.46	25	4.10	75	1.317
Atto565 – Pro ₆ – Atto488	0.37	60	4.12	40	1.151
Atto565 – Pro ₈ – Atto488	0.48	61	4.04	39	1.097
Atto565 – Pro ₁₂ – Atto488	0.84	80	4.13	20	1.165
Atto565 – Pro ₂₀ – Atto488	1.82	77	4.15	24	1.148

Die in Tabelle 4.1 aufgeführten Ergebnisse der TCSPC-Messungen zeigen, dass in den Proben Subpopulationen existieren, die nicht zum Energietransfer beitragen und deren Lebensdauer somit auch nicht verkürzt ist. Der Anteil dieser Subpopulation nimmt mit zunehmender Länge der Prolinkette ab. Für die Atto565 – Pro₄ – Atto488 Probe liegt der Anteil bei 75 %. Dieser große Anteil, und auch die im Vergleich lange Lebensdauer der gelöschten Komponente, kann mit dem sehr hohen Energietransfer und der damit verbunden kurzen Lebensdauer erklärt werden.

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Einzelmolekülempfindliche Untersuchungen können helfen, einen genaueren Einblick in die Beschaffenheit der Proben zu gewinnen und mögliche Heterogenitäten aufzudecken. ALEX-Fluoreszenzspektroskopie kann verwendet werden, um spektrale und stöchiometrische Unterschiede innerhalb eines Probenensembles aufzudecken.

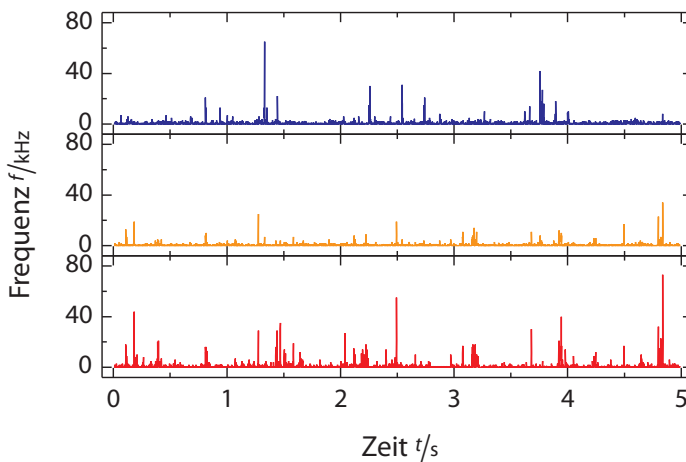


Abbildung 4.7: Zeitspur der für die Auswertung genutzten Photonenströme bei Donoranregung und Donordetektion (F_D^D , blau), bei Donoranregung und Akzeptordetektion (F_D^A , orange) und bei Akzeptoranregung und Akzeptordetektion (F_A^A , rot). Die dargestellten Einzelmolekülereignisse (Photonenschauer) stammen von Atto647N-Pro₁₂-Atto565 Molekülen.

In Abbildung 4.7 sind Zeitspuren einer ALEX-Messung an einer Lösung von Atto565-Pro₁₂-Atto488 dargestellt. Darin werden die in einzelnen Zeitschritten gesammelten Photonen gezeigt. Der Durchgang eines fluoreszierenden Moleküls durch den Fokus ist anhand eines sogenannten Photonenschauers (engl. photon burst) erkennbar.

Die in Abbildung 4.7 dargestellten Zeitspuren zeigen die detektierten Photonen in den drei für FRET-Messungen signifikanten Photonenströmen (F_D^D , F_D^A und F_A^A). Es sind einige Photonenschauer gleichzeitig in

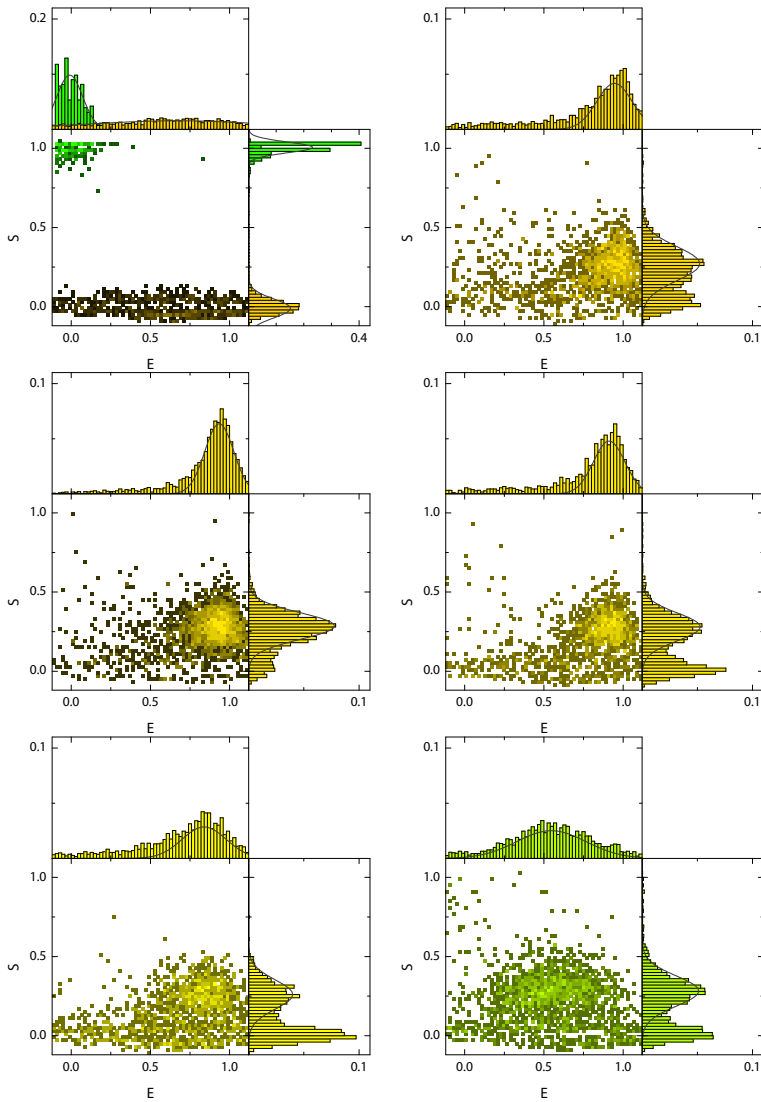


Abbildung 4.8: *E-S*-Histogramme der Atto565–Pro_n–Atto488 Proben. Dargestellt sind die Verteilungen für Pro_n–Atto488 und Atto565–Pro_n (oben links, grün und gelb) und die FRET-Proben mit aufsteigender Länge (von oben nach unten). Die in die eindimensionalen Projektionen der *E-S*-Histogramme eingezeichneten Verteilungen (dunkelgrau) entsprechen der zweidimensionalen Anpassung an die FRET Population.

mehreren Photonenströmen zu erkennen. Photonenschauer, die nur im Photonenstrom F_D^D bzw. F_A^A sichtbar sind, gehören zu Molekülen, die entweder nur ein Donormolekül bzw. Akzeptormolekül tragen oder bei denen der Akzeptor bzw. Donor nicht leuchtet. Gleichzeitig in den Photonenströmen F_D^A und F_A^A auftretende Photonenschauer bezeichnen FRET-Paare mit effektiver Donorlöschung. Ergibt sich zusätzlich ein Photonenschauer in dem Photonenstrom F_D^D , ist die FRET-Effizienz geringer.

Die einzelnen Photonenschauer können mit der zur Verfügung stehenden Software erkannt und ausgegeben werden. Dabei werden die, dem einzelnen Photonenschauer zugeordneten Photonen getrennt nach Photonenstrom abgespeichert. Daraus können, nach Anwendung der Korrekturen, die *E-S*-Histogramme erzeugt werden.

In Abbildung 4.8 sind *E-S*-Histogramme der Atto565-Pro_{*n*}-Atto488 Proben und die *E*- und *S*-Histogramme als eindimensionale Projektionen dargestellt. In den Histogrammen ist jeweils eine Hauptpopulation zu erkennen, deren Schwerpunkt sich mit zunehmender Länge der Oligo- bzw. Polyprolinkette zu kleineren Werten von *E* verschiebt. Diese Verteilung entspricht den Molekülen, in denen FRET stattfindet.

Zudem ist in den Histogrammen eine Subpopulation sichtbar, die nur kleine Werte von *S* annimmt, aber über den gesamten Bereich von *E* verteilt ist. Diese entspricht Molekülen, deren Donor weder über Energietransfer auf den Akzeptor noch direkt zur Fluoreszenz beiträgt. Eine solche Population stellt auch die oben links in gelb dargestellte Atto565-Pro_{*n*} Probe dar. Der Anteil dieser Population ist in den *S*-Histogrammen gut zu erkennen. Insbesondere für die Proben mit $n = 8$ und $n = 12$ ergibt sich, in guter Übereinstimmung mit den Absorptionmessungen im Ensemble aus denen sich für diese Proben auf eine erhöhte Akzeptorkonzentration schließen läßt, eine große Population.

Die *E-S*-Histogramme der Proben mit $n = 4$ und $n = 6$ zeigen eine weitere Subpopulation mit mittleren Werten von *S* und kleinen bis mittleren Werten von *E*. Diese läßt sich mit dynamischen Löschprozessen erklären, die zu unterschiedlichen Transferraten führen, jedoch Emission beider Fluorophore zulassen.

Für die in Abbildung 4.9 gezeigten *E-S*-Histogramme der Atto647N-Pro_{*n*}-Atto565 Proben gelten im Wesentlichen die gleichen Betrachtun-

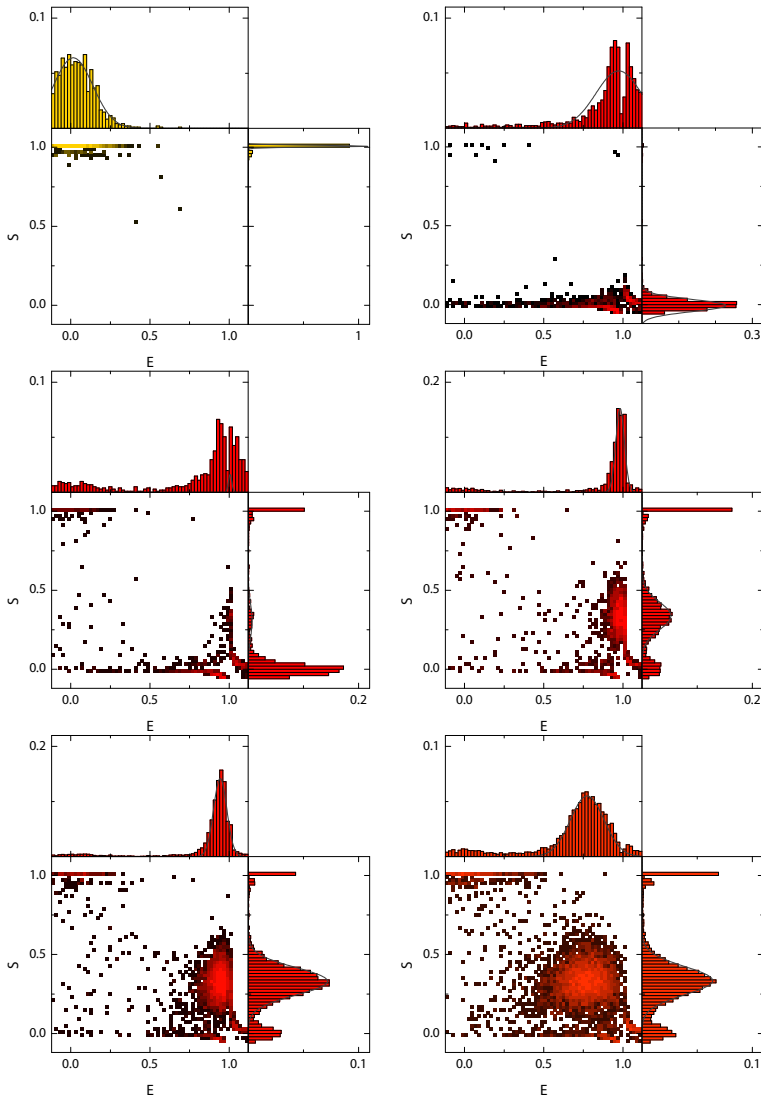


Abbildung 4.9: *E-S*-Histogramme der Atto647N-Pro_n-Atto565 Proben. Dargestellt sind die Verteilungen für Pro_n-Atto565 (oben links, gelb) und Atto647N-Pro_n (oben rechts, rot) und die FRET-Proben mit aufsteigender Länge (von oben nach unten). Die in die eindimensionalen Projektionen der *E-S*-Histogramme eingezeichneten Verteilungen (dunkelgrau) entsprechen der zweidimensionalen Anpassung an die FRET Population.

gen. Die Population mit mittleren Werten für S und mit zunehmender Länge abnehmenden Werten für E entspricht den Molekülen, in denen FRET stattfindet. Auffällig ist eine, im Vergleich zu den Messungen an den Atto565-Pro_n-Atto488 Proben vergrößerte Population, die nur Donoremission zeigt. Dies weist darauf hin, dass in der Probe Moleküle vorkommen, in denen der Akzeptor, entweder aufgrund schneller Photozerstörung oder aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Donor, nicht absorbiert. In Einzelmoleküluntersuchungen mit ALEX kann vielfach ein gewisser Anteil, in dem nur Donoremission auftritt, beobachtet werden.^[24;38]

FRET-Effizienzen

Aus den in den Ensemblemessungen gewonnenen Daten kann mit unterschiedlichen Methoden die FRET-Effizienz bestimmt werden. Prinzipiell können zwei Wege unterschieden werden. Die FRET-Effizienz kann zum einen aus der, durch den Energietransfer verminderten Donorfluoreszenz und zum anderen aus der erhöhten Akzeptorfluoreszenz ermittelt werden.

Tabelle 4.2: Transfereffizienz der Atto565-Pro_n-Atto488 Proben.

Probe	$\frac{r}{\text{nm}}$	E_{em^D}	E_{em^A}	E_{ex^A}	E_τ	E_{sm}
Atto565-Pro ₄ -Atto488	1.2	0.983	1.004	0.245	0.887	0.945
Atto565-Pro ₆ -Atto488	1.9	0.980	1.553	0.307	0.910	0.935
Atto565-Pro ₈ -Atto488	2.5	0.969	1.563	0.240	0.880	0.912
Atto565-Pro ₁₂ -Atto488	3.7	0.940	1.666	0.275	0.797	0.839
Atto565-Pro ₂₀ -Atto488	6.2	0.678	2.139	0.329	0.562	0.547

Die Verminderung der Donoremission lässt sich anhand der Quantenausbeute im Bereich der Donoremission (E_{em^D}) und aus der Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer (E_τ) quantifizieren (Gleichung (2.41) und (2.40)). Die erhöhte Akzeptorfluoreszenz kann anhand der Quantenausbeute im Bereich der Akzeptoremission bei Donoranregung (E_{em^A}) und

durch die Erhöhung der Donorabsorption in Anregungsspektren (E_{ex^A}) beobachtet werden (Gleichung (2.42) und (2.46)).

Die genaue Bestimmung der FRET-Effizienz aus den Ergebnissen der ALEX-Messungen erfolgt, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Daraus ergeben sich die Breite und Lage der Schwerpunkte der Verteilungen und damit die FRET-Effizienz (E_{sm}).

Tabelle 4.3: Transfereffizienz der Atto647N–Pro_n–Atto565 Proben.

Probe	$\frac{r}{nm}$	E_{em^D}	E_{em^A}	E_{ex^A}	E_{sm}
Atto647N–Pro ₄ –Atto565	1.2	0.899	0.023	0.115	1.006
Atto647N–Pro ₈ –Atto565	2.5	0.681	0.211	0.223	0.982
Atto647N–Pro ₁₂ –Atto565	3.7	0.683	0.335	0.288	0.943
Atto647N–Pro ₂₀ –Atto565	6.2	0.456	0.352	0.262	0.774

Die mit diesen Methoden ermittelten FRET-Effizienzen der Atto565–Pro_n–Atto488 Proben sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Dabei ist auffällig, dass insbesondere die Bestimmung aus der erhöhten Akzeptoremission zu unrealistisch großen (E_{em^A}) bzw. kleinen (E_{ex^A}) Werten für die FRET-Effizienz führt.

Da die aus den Anregungsspektren gewonnenen FRET-Effizienzen bereits auf das Konzentrationsverhältnis korrigiert sind, kann dies die Abweichung nicht erklären. Die zu kleinen Werte lassen sich mit den geringen gewichteten Quantenausbeuten erklären. Wenn die Akzeptorfluoreszenz effizient gelöscht ist, ergibt sich keine messbare Erhöhung der Fluoreszenz.

Die für die Atto647N–Pro_n–Atto565 Proben bestimmten FRET-Effizienzen sind in Tabelle 4.3 dargestellt. Auch für diese Farbstoffpaarung liegen die Werte, bei Bestimmung aus der erhöhten Akzeptorfluoreszenz, deutlich entfernt vom erwarteten Wert.

Abbildung 4.10 zeigt die FRET-Effizienzen der Oligo- und Polyprolin Proben. Die aus der Akzeptorfluoreszenz bestimmten Transfereffizienzen werden nicht dargestellt. Zur gleichzeitigen Darstellung der mit den unterschiedlichen Farbstoffpaaren markierten Proben ist der Abstand der Fluorophore ins Verhältnis zum Förster Radius gesetzt.

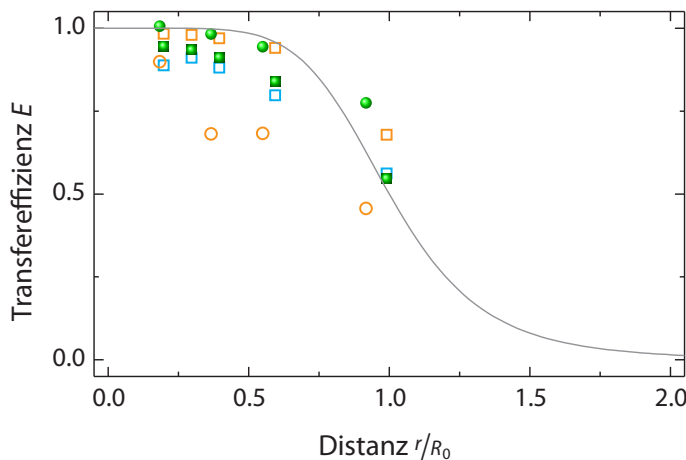


Abbildung 4.10: FRET-Effizienzen der Oligo- und Polyprolin Proben. Dargestellt sind die FRET-Effizienzen E_{emD} (orange), E_{τ} (cyan) und E_{sm} (grün) von Atto565–Pro_n–Atto488 (quadratisch) und Atto647N–Pro_n–Atto565 (kreisförmig). Der interchromophore Abstand ist in Einheiten von R_0 angegeben. Die Kurve veranschaulicht die theoretische Vorhersage (grau).

Die teils deutlichen Abweichungen von der theoretischen Vorhersage deuten auf kontaktinduzierte Lösprozesse. Insbesondere die kurzen Oligoprolin Moleküle zeigen erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Bestimmungsmethoden.

4.1.1 Intramolekulare Farbstoff-Farbstoff Wechselwirkungen

Anhand von farbstoffmarkierten Cystein (Cys) Molekülen können intramolekulare Farbstoff-Farbstoff Wechselwirkungen untersucht werden. Die Fluorophore sind dabei in VAN DER WAALS Kontakt, d. h. der Abstand beträgt nur wenige zehntel Nanometer. Es werden die Farbstoffpaare Atto647N/Cy3B, Atto647N/TMR und Cy5/Cy3B untersucht. Die Fluoreszenzquantenausbeuten der an Cystein gekoppelten Fluorophore werden relativ zu freiem, hydrolysiertem Farbstoff bestimmt.

Die Cys–Cy3B Probe zeigt relative Fluoreszenzquantenausbeuten von

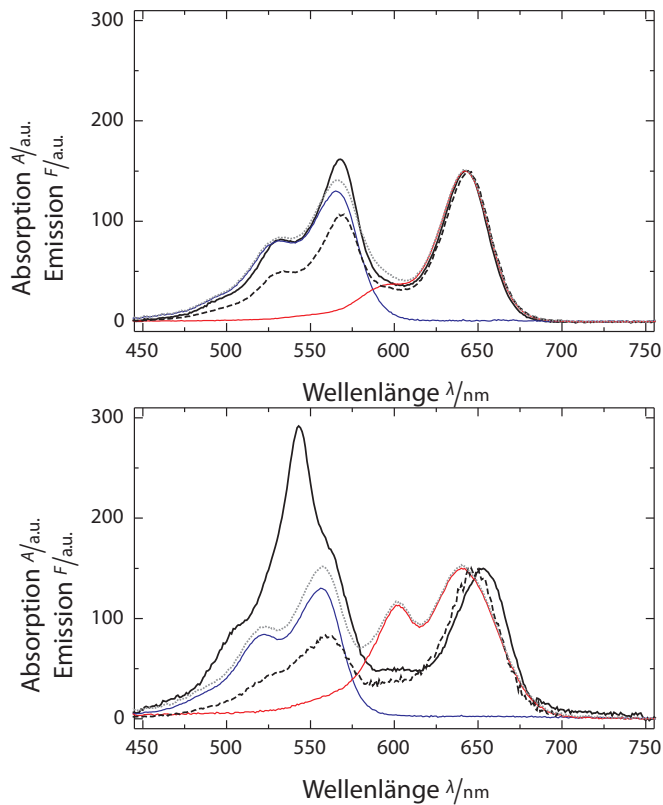


Abbildung 4.11: Absorptionsspektren von Atto647N-Cys-Cy3B (schwarz), Atto647N-Cys (rot) und Cys-Cy3B (blau) in Ethanol (oben) und Wasser (unten). Zum Vergleich ist die Summe der Absorptionsspektren von Atto647N-Cys und Cys-Cy3B dargestellt (grau gepunktet). Die Absorptionsspektren von Atto647N-Cys-Cy3B und Atto647N-Cys sind jeweils auf das Absorptionsmaximum von Atto647N (642 nm) normiert und mit dem Absorptionskoeffizienten von Atto647N skaliert. Das Absorptionsspektrum von Cys-Cy3B ist auf das Absorptionsmaximum von Cy3B (H₂O: 556 nm, EtOH: 565 nm) normiert und entsprechend skaliert. Das Anregungsspektrum von Atto647N-Cys-Cy3B (schwarz gestrichelt) ist bei einer Emissionswellenlänge von 710 nm aufgenommen.

62 % in Ethanol und 75 % in destilliertem Wasser. Für die Cy5 – Cys Probe ergeben sich in den gleichen Lösungsmitteln Fluoreszenzquantenausbeuten von 82 % und 62 % und für die Atto647N – Cys Probe Fluoreszenzquantenausbeuten von 83 % und 32 %.

Bei allen mit Donor und Akzeptor markierten Proben ist mit einer hohen FRET-Effizienz ($E > 99\%$) zu rechnen, da der Abstand, der konformativ flexibel an das Cystein gekoppelten Farbstoffe durchschnittlich nicht mehr als 1 nm beträgt. Der FÖRSTER Radius für das D-A-Paar Cy3B und Atto647N liegt bei 5,9 nm in Ethanol und 6,4 nm in Wasser. Für das D-A-Paar Cy3B und Cy5 ergeben sich 4,5 nm in Ethanol und 4,7 nm in Wasser. Die Berechnung erfolgt unter der Annahme dynamisch isotroper Verteilung der Orientierungen der Übergangsdipolmomente ($\kappa^2 = 2/3$).

Zur Beobachtung von FRET und konkurrierenden Löschprozessen wurden Messungen der Absorption, der Fluoreszenzemission und Fluoreszenzlebensdauer durchgeführt. Einzelmolekülspektroskopische Messungen mittels ALEX erfolgen, um die Heterogenität der Proben aufzudecken.

Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren von Atto647N–Cys–Cy3B, Atto647N–Cys und Cys–Cy3B in Ethanol und Wasser sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Spektren von Atto647N–Cys und Cys–Cy3B zeigen den für organische Fluorophore typischen Verlauf, ein Maximum mit ausgeprägter Schulter zu kürzeren Wellenlängen. Das Absorptionsspektrum von Atto647N–Cys – Cy3B hingegen zeigt in Wasser eine deutliche Abweichung im Vergleich zu der Summe der Einzelspektren. Es tritt ein zusätzliches Maximum bei 543 nm auf, relativ zu dem Maximum der Absorption von Cys–Cy3B um 13 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Zudem verschwindet die Schulter um 600 nm im Spektrum von Atto647N und das Maximum der Absorption von Atto647N wird um 10 nm zu längeren Wellenlängen verschoben.

Das Auftreten von zwei deutlichen, neuen Absorptionsmaxima bei Wellenlängen von 543 nm und 652 nm deutet auf die Bildung von H-Dimeren hin. Insbesondere das stark ausgeprägte Absorptionsmaximum bei 543 nm kann mit der Bildung eines H-Dimers erklärt werden. Die

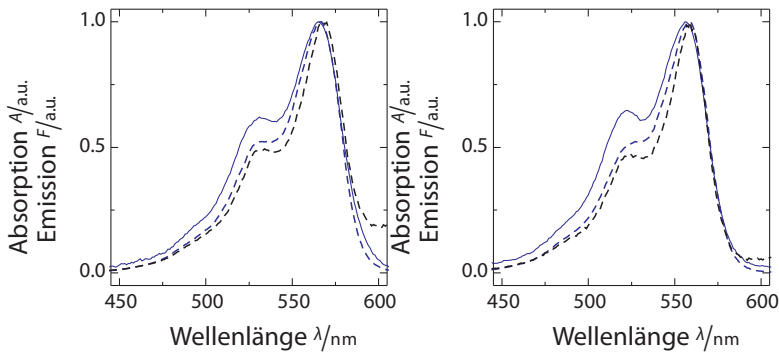


Abbildung 4.12: Anregungsspektren von Cys–Cy3B (blau gestrichelt) und Atto647N–Cys–Cy3B (schwarz gestrichelt) in Ethanol (links) und Wasser (rechts) bei einer Emissionswellenlänge von 610 nm. Zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum von Cys–Cy3B (blau) dargestellt. Die Kurven sind auf das Maximum bei 553 nm normiert.

leichte Verschiebung des zweiten Maximums zu längeren Wellenlängen könnte auch durch solvatochrome Effekte, die ebenfalls eine bathochrome Verschiebung bewirken können, hervorgerufen sein. Solvatochrome Effekte beruhen auf der Beeinflussung des elektronischen Systems durch die lokale Umgebung (z. B. Lösungsmittel).

Der auf der hydrophoben Wechselwirkung beruhende Effekt der Dimerbildung tritt insbesondere in wässrigen Lösungen auf. In weniger polaren Lösungsmitteln, wie Ethanol, kann die Dimerbildung deutlich vermindert sein.^[46] Das Absorptionsspektrum von Atto647N–Cys–Cy3B in Ethanol bestätigt diesen Sachverhalt.

Im Vergleich zu den Absorptionsspektren in Wasser ergibt sich eine deutliche bathochrome Verschiebung des Spektrums von Cy3B in Ethanol. Diese Verschiebung kann mit dem solvatochromen Effekt (Veränderung der Umgebung der Farbstoffmoleküle) erklärt werden. Das Absorptionsmaximum des Cy3B in der Summe der Spektren von Atto647N–Cys und Cys–Cy3B liegt, ebenso wie in dem Spektrum von Atto647N–Cys–Cy3B, in Ethanol bei 567 nm.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Anregungsspektren der Atto647N–Cys–Cy3B Probe in Ethanol und Wasser stimmen gut mit dem Verlauf der Summen der Absorptionsspektren von Atto647N–Cys und Cys–Cy3B überein (Abbildung 4.11). Es ist jedoch in Wasser ein deutlicher Unterschied zu dem Absorptionsspektrum festzustellen. Der Dimerübergang, im Absorptionsspektrum bei 543 nm, ist im Anregungsspektrum nicht sichtbar.

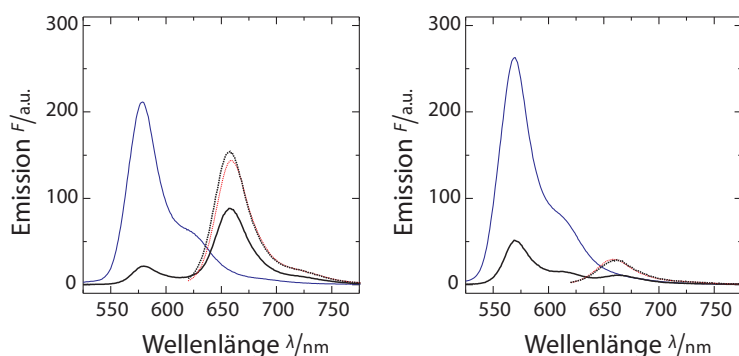


Abbildung 4.13: Emissionsspektren von Atto647N–Cys–Cy3B (schwarz), Cys–Cy3B (blau) und Atto647N–Cys (rot) in Ethanol (links) und Wasser (rechts). Die Emission wurde mit den Anregungswellenlängen 510 nm (durchgezogen) und 610 nm (gepunktet) aufgenommen. Die Spektren sind auf die Absorption bei der Anregungswellenlänge normiert. Die Gesamtquantenausbeute ist reduziert und es existiert eine Subpopulation die keinen FRET zeigen.

Die in Wasser gemessenen Anregungsspektren (Abbildung 4.11 und 4.12) zeigen, dass der Dimerübergang nicht zu der beobachteten Fluoreszenzemission beiträgt. Dies stimmt gut mit theoretischen Vorhersagen für H-Dimere überein.^[40]

Die in Ethanol gemessenen Anregungsspektren sind, wie auch die Absorptionsspektren, der Summe der Spektren von Cys–Cy3B und Atto647N–Cys sehr ähnlich. Dimerbildung ist also in wässrigen Lösungsmitteln, gegenüber weniger polaren Lösungsmitteln wie Ethanol, begünstigt.

Der Einfluss von kontaktinduzierten Lösprozessen auf die beobachtete FRET-Effizienz wird anhand der in Abbildung 4.13 dargestellten Fluoreszenzmissionsspektren deutlich. Die FRET-Effizienz ist geringer als für den geringen Abstand der Fluorophore erwartet. Zudem ist die Gesamtquantenausbeute, also das Verhältnis von absorbierten Photonen zu der Anzahl aller emittierten Photonen, im Vergleich zu der Cys–Cy3B Probe erheblich herabgesetzt. Für die relative Fluoreszenzquantenausbeute nach Gleichung (4.1) der Atto647N–Cys–Cy3B Probe ergibt sich in Wasser $\phi_r = 0,21$ und in Ethanol $\phi_r = 0,47$. Unter der Annahme einer FRET-Effizienz von 100 % und mit einer Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors von 65 %⁴ bedeutet dies, dass in Wasser nur maximal ein Drittel der erwarteten Photonen detektiert werden. In Ethanol können innerhalb dieser groben Abschätzung nahezu alle erwarteten Photonen gemessen werden.

Die Spektren in Abbildung 4.13 verdeutlichen, dass es in der Probe eine nicht zu vernachlässigende Subpopulation gibt, die keinen FRET zeigt. Die Fluoreszenzmission im Maximum von Cy3B wird nicht so stark wie erwartet verringert, sondern fällt auf 19,5 % in Wasser und 10,1 % in Ethanol. Zudem erhöht sich die Emission des Akzeptors nicht wie erwartet, sondern ist insbesondere in Wasser effektiv gelöscht.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Zur weiteren Analyse der Lösprozesse, die die FRET-Effizienz beeinflussen werden zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzlebensdauer durchgeführt. Mit zeitaufgelösten Messungen können Lösprozesse untersucht werden, da diese die Anzahl emittierter Photonen vermindern und so die Fluoreszenzlebensdauer verkürzen. Sehr effiziente Lösprozesse können dazu führen, dass die Anzahl emittierter Photonen zu gering ist, um die Photonen mit typischen TCSPC-Spektrometern detektieren zu können.

In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der TCSPC-Messungen in Wasser und Ethanol dargestellt. Die Anregung des Donors erfolgt bei 500 nm mit einer Leuchtdiode () und die Anregung des Akzeptors bei 635 nm

⁴nach Herstellerangabe

mit einer Laserdiode.

Tabelle 4.4: Resultate der Lebensdauermessungen für Atto647N–Cys–Cy3B, Atto647N–Cys und Cys–Cy3B in Wasser (H₂O) und Ethanol (EtOH). Es wurde eine biexponentielle Anpassung mit Optimierung von χ^2 durchgeführt, um die Lebensdauern τ und die zugehörigen relativen Amplituden a zu ermitteln.

Probe	Lösungs- mittel	λ_{ex} nm	t_1 ns	a_1 %	t_2 ns	a_2 %	χ^2
Cys–Cy3B	H ₂ O	500	0.31	12	2.45	88	1.13
Atto647N–Cys–Cy3B	H ₂ O	500	0.38	17	2.34	83	1.10
Atto647N–Cys	H ₂ O	635	0.25	5	3.60	95	1.12
Atto647N–Cys–Cy3B	H ₂ O	635	0.34	9	3.60	91	1.10
Cys–Cy3B	EtOH	500	0.50	15	2.52	85	1.12
Atto647N–Cys–Cy3B	EtOH	500	0.52	15	2.60	85	1.09
Atto647N–Cys	EtOH	635	0.48	5	3.68	95	0.99
Atto647N–Cys–Cy3B	EtOH	635	0.50	5	4.06	95	1.07

In den Messungen kann keine Komponente mit kurzer Fluoreszenzlebensdauer, die einem Löschprozess zugeordnet werden könnte, aufgelöst werden. Die Ergebnisse in Tabelle 4.4, zweifach exponentiell angepasst, zeigen nahezu identische Abfälle. Auch ein dritter Exponentialterm erbrachte keine Verbesserung der Anpassung. Es kann also keine gelöschte Subpopulation erkannt werden.

Eine allgemeine Verringerung der Photonen-Zählraten, in Übereinstimmung mit den Messungen der Fluoreszenzemission, kann jedoch beobachtet werden. Dies legt nahe, dass die Löschung so effektiv erfolgt, dass die Lebensdauer auf einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze der Messung fällt. Dies ist konsistent mit der erwarteten hohen FRET-Effizienz von über 99 %. Auch kontaktinduzierte Löschprozesse können sehr effektiv die Fluoreszenz löschen, da die Fluorophore sich in den untersuchten Proben sehr nahe kommen können. Beobachtbar sind die Löschprozesse mit der Methode des TCSPC nicht, es gibt keine Subpopulation die teilweise gelöscht ist, sondern nur nicht gelöschte und

vollständig gelöschte Subpopulationen.

Das Fehlen solcher teilweise gelöschter Subpopulationen weist auf die Bildung von stabilen Komplexen (statische Löschung) hin. Im Fall von dynamischer Löschung wäre die Löschrates durch die Diffusion der flexibel gekoppelten Fluorophore. In dem Fall käme es diffusionsgesteuert zu vorübergehenden Kontakten der Fluorophore und damit zu unterschiedlich starker Löschung. Wenn die Diffusionsbewegung langsamer als das Detektionsvermögen (100 ps) der Anlage erfolgt, würden Subpopulationen sichtbar.

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Statische und dynamische Heterogenität in der Probe kann, im Gegensatz zu Ensemblemessungen, in einzelmolekülspektroskopischen Untersuchungen aufgedeckt werden. Durch die geringen Konzentrationen in Einzelmolekülexperimenten sind zudem intermolekulare Wechselwirkungen äußerst unwahrscheinlich. In den Ensembleexperimenten konnte keine Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Löschrates festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass diese nicht auf intermolekulare Wechselwirkungen beruhen. Die Messung bei Einzelmolekülkonzentration (μM) vermindert den Effekt intermolekulare Wechselwirkungen zusätzlich.

Die Verteilung der Größen der Photonenschauer, also der mittleren Anzahl Photonen aus einem Molekül im fokalen Volumen, unterscheidet sich kaum zwischen den nur mit einem Farbstoff markierten Proben und der FRET-Probe. Die Fluoreszenzlöscherung der FRET-Probe erfolgt also, auf Zeitskalen die der Diffusion durch den Fokus entsprechen, nicht dynamisch. Auch gibt es keine teilweise Löscherung. Dies bestätigt die zuvor beschriebene Annahme vorwiegend statischer Löscherung durch die Bildung stabiler Komplexe.

Abbildung 4.14 zeigt E_{PR} -S Histogramme von Atto647N–Cys–Cy3B und Atto647N–Cys–TMR in Ethanol und Wasser. Darin können unterschiedliche Subpopulationen aufgelöst werden:

- (i) eine Subpopulation, die nur Fluoreszenzemission des Donors zeigt (kleine E_{PR} Werte und große S Werte),

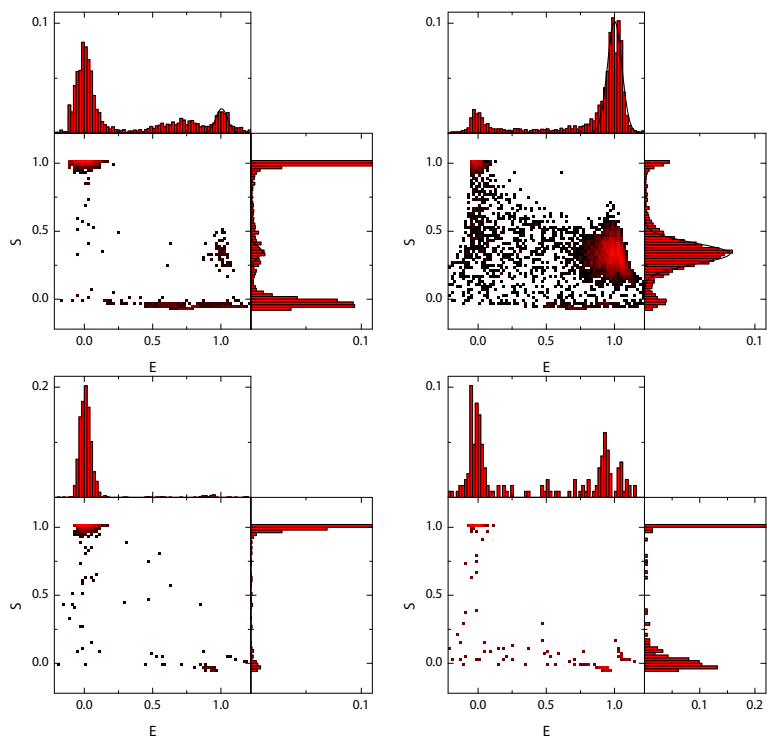


Abbildung 4.14: E_{PR} - S Histogramme von Atto647N-Cys-Cy3B (links) und Atto647N-Cys-TMR (rechts) in Ethanol (oben) und Wasser (unten). Deutlich erkennbar ist das Verschwinden der Subpopulation mit hoher FRET-Effizienz in Wasser.

- (ii) eine Subpopulation, die nur Fluoreszenzemission des Akzeptors zeigt (unterschiedliche E_{PR} Werte und kleine S Werte),
- (iii) eine Subpopulation mit hoher FRET-Effizienz, die Fluoreszenzemission bei Donor- und Akzeptoranregung zeigt (große E_{PR} Werte und mittlere S Werte),
- (iv) eine Subpopulation, die Fluoreszenzemission des Donors und des Akzeptors bei unterschiedlicher FRET-Effizienz zeigt (kleine bis mittlere E_{PR} Werte und mittlere S Werte).

Aufgrund der verminderten Anzahl der Photonenschauer pro Messung kann, insbesondere bei den Atto647N–Cys–Cy3B Proben, davon ausgegangen werden, dass eine weitere Subpopulation (v) existiert, die nicht fluoresziert.

Die Moleküle in Subpopulation (i) zeigen das Verhalten von Proben, die nur mit einem Donor markiert sind. Der Akzeptor ist also entweder photogeleicht oder emittiert, aufgrund einer Wechselwirkung mit dem Donor nicht.

Der Donor der Moleküle in Gruppe (ii) ist effektiv gelöscht, nur der Akzeptor emittiert. Photoinduzierter Elektronentransfer (PET, engl. photoinduced electron transfer) bei direktem Kontakt von Donor und Akzeptor kann dazu führen, dass zwar der Donor gelöscht ist, der Akzeptor jedoch nicht.

Die Subpopulation (iii) zeigt die erwartete, hohe FRET-Effizienz. Beide Fluorophore können angeregt werden und emittieren, wobei die Donoremission durch den Energietransfer zum Akzeptor verringert wird. Diese Subpopulation tritt vorwiegend in den in Ethanol gelösten Proben auf.

Die in allen Proben vorkommende Subpopulation (iv) zeigt Fluoreszenz von beiden Fluorophoren, jedoch keine oder nur eine geringe FRET-Effizienz. Dies deutet auf eine fixierte Orientierung der Übergangsdipolmomente der Fluorophore hin, die dafür sorgt, dass der Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 0$ und damit kein FRET möglich ist. Die Bildung von H-Dimeren bedeutet zwar eine Fixierung der relativen Dipolorientierung, da H-Dimere jedoch keine Fluoreszenz zeigen, kann sie nicht zur Erklärung herangezogen werden. Vielmehr gehören die Moleküle die H-Dimere bilden zu Subpopulation (v).

Wechselwirkungen von Farbstoffen und Thiolgruppen

In Abbildung 4.15 sind die Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren von Atto647N und Cy5 dargestellt. Es wird untersucht, inwiefern die spektralen Eigenschaften der Farbstoffe durch die N-terminale Kopplung an Cystein beeinflusst werden.

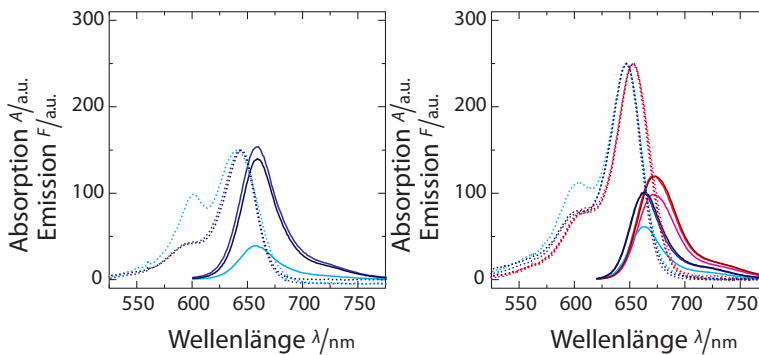


Abbildung 4.15: Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften von Atto647N (links) und Cy5 (rechts) durch Wechselwirkung mit der Thiolgruppe eines Cystein in Wasser (bläulich) und Ethanol (rötlich). Die Absorptionsspektren (gepunktet) sind jeweils auf das Maximum normiert und mit dem Absorptionskoeffizienten des Farbstoffs skaliert. Die Emissionsspektren sind auf die Absorption bei der Anregungswellenlänge normiert. Dargestellt sind jeweils die Spektren der hydrolysierten Farbstoffe (blau, rot), der farbstoffmarkierten Cysteine (cyan, magenta) und der farbstoffmarkierten Cysteine nach Maleimid-Kopplung (dunkelblau, dunkelrot).

Durch die N-terminale Kopplung an Cystein verändert sich das Absorptionsspektrum von Atto647N deutlich. Es entsteht ein Nebenmaximum in der blauverschobenen Schulter des Hauptmaximums. Die Fluoreszenzquantenausbeute sinkt dramatisch auf etwa 37 % ab.

Durch eine Kopplung von Maleimid an die Thiol-Gruppe des Cysteins wird dieser Effekt aufgehoben. Das Absorptionsspektrum ist in Übereinstimmung mit dem Spektrum des hydrolysierten Farbstoffs und es wird nahezu die Fluoreszenzquantenausbeute des freien Farbstoffs erreicht

(86 %).

Der gleiche Effekt kann bei an Cystein gekoppeltem Cy5 beobachtet werden. Das Nebenmaximum im Absorptionsspektrum ist in Wasser nicht so stark ausgeprägt wie bei Atto647N, in Ethanol ist keine Veränderung des Spektrums zu beobachten. Die Fluoreszenzquantenausbeute sinkt durch die Kopplung an das Cystein auf etwa 62 % in Wasser und 82 % in Ethanol. Zusätzliche Kopplung mit Maleimid führt zu vollständiger Rückgewinnung der Fluoreszenzquantenausbeute (H₂O: 103 %, EtOH: 101 %).

Die Wechselwirkung, die zu den beschriebenen Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe führt, lässt sich somit auf eine Wechselwirkung mit der Thiolgruppe des Cysteins zurückführen. Nach erfolgter Kopplung der Thiolgruppe mit Maleimid ist keine Wechselwirkung mehr festzustellen. Durch Bildung des Thioliations des Systems aus Farbstoff und Cystein kann sich die elektronische Mikroumgebung des Farbstoffs verändern und so das elektronische System des Farbstoffs beeinflussen.

4.2 Oligo(*para*-phenylenethinylene)

Durch die Beschaffenheit der OligoPPE Proben sollen die interchromophoren Wechselwirkungen auf den FÖRSTER Resonanz-Energietransfer beschränkt werden.

Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren der Proben mit fünf PPE-Einheiten zeigen deutlich, dass die Kopplung der PPE-Kette keinen nennenswerten Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe hat. Es tritt lediglich eine geringe hypochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums des PMI (blau) um 2 nm auf. Das Absorptionsspektrum des PMI(OAr)₃ (rot) wird nicht verändert.

Die Spektren der FRET-Proben (grün) können additiv aus den Spektren von Donor und Akzeptor gebildet werden. Eine direkte Addition der Spektren von Donor und Akzeptor ist nicht möglich, da der zur Normierung notwendige Absorptionskoeffizient des Akzeptors nicht

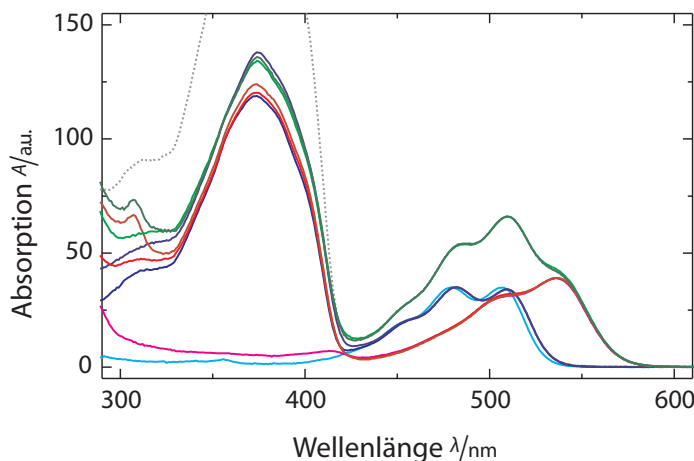


Abbildung 4.16: Absorptionsspektren von OligoPPE Proben. Dargestellt sind die Spektren von PMI (cyan), $\text{PMI}(\text{OAr})_3$ (magenta), $\text{PMI} - \text{PPE}_5^s$ (blau), $\text{PPE}_5^s - \text{PMI}(\text{OAr})_3$ (rot), $\text{PMI} - \text{PPE}_5^s - \text{PMI}(\text{OAr})_3$ (grün), $\text{PMI} - \text{PPE}_5^k$ (dunkelblau), $\text{PPE}_5^k - \text{PMI}(\text{OAr})_3$ (dunkelrot) und $\text{PMI} - \text{PPE}_5^k - \text{PMI}(\text{OAr})_3$ (dunkelgrün). Zum Vergleich ist die Summe der Spektren von PMI und $\text{PMI}(\text{OAr})_3$ eingezeichnet (grau).

genau bekannt ist. Lediglich der logarithmierte Wert $\log \epsilon_{\max} = 4.6$ ist angegeben.^[50]

Zur Bestimmung des unbekanntes Absorptionskoeffizienten des Akzeptorfarbstoffs $\text{PMI}(\text{OAr})_3$ werden Absorptionsmessungen am Donorfarbstoff PMI, am Akzeptorfarbstoff $\text{PMI}(\text{OAr})_3$ und an den FRET-Konstrukten durchgeführt. Der Absorptionskoeffizienten des Donorfarbstoffs PMI liegt bei $35\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.^[50] Damit lässt sich der Absorptionskoeffizient des Akzeptorfarbstoffs $\text{PMI}(\text{OAr})_3$ durch Anpassung der Spektren der einzelnen Farbstoffe an das Absorptionsspektrum der FRET-Probe ermitteln. Dabei wird angenommen, dass die Farbstoffe nicht wechselwirken. Es ergibt sich, bei einem angenommenen Markierungsgrad von 1, ein Absorptionskoeffizient von $39\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Dieser wird, ebenso wie der gleichzeitig bestimmte Absorptionskoeffizient der

FRET-Probe ($66\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), zur Skalierung der normierten Spektren verwendet.

Fluoreszenzspektroskopie

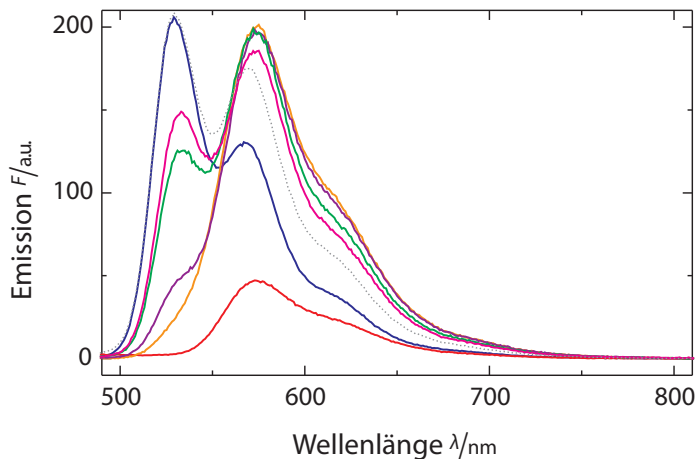


Abbildung 4.17: Fluoreszenzemissionsspektren der gestreckten OligoPPE Proben. Dargestellt sind die Spektren von PMI (blau), PMI(OAr)₃ (rot), PMI-PPE₂^s-PMI(OAr)₃ (orange), PMI-PPE₅^s-PMI(OAr)₃ (violett), PMI-PPE₇^s-PMI(OAr)₃ (grün) und PMI-PPE₉^s-PMI(OAr)₃ (magenta). Die Spektren sind, wie beschrieben, normiert und skaliert. Zum Vergleich ist die Summe der Spektren von PMI und PMI(OAr)₃ eingezeichnet (grau gepunktet).

Die Fluoreszenzemissionsspektren der gestreckten OligoPPE Proben (Abbildung 4.17) zeigen das erwartete Verhalten. Die Emission im Bereich der Donorfluoreszenz ist längenabhängig vermindert. Die PMI-PPE₂^s-PMI(OAr)₃ Probe zeigt nahezu keine Donorfluoreszenz. Wohingegen die PMI-PPE₉^s-PMI(OAr)₃ Probe schon ein deutlich erkennbares Maximum ausbildet.

Die Akzeptorfluoreszenz ist, im Vergleich zum Verlauf des Spektrums der Summe aus PMI und PMI(OAr)₃, erhöht. Dabei zeigen die kürzeren OligoPPE Proben einen größeren Effekt als die längeren Proben. Dies

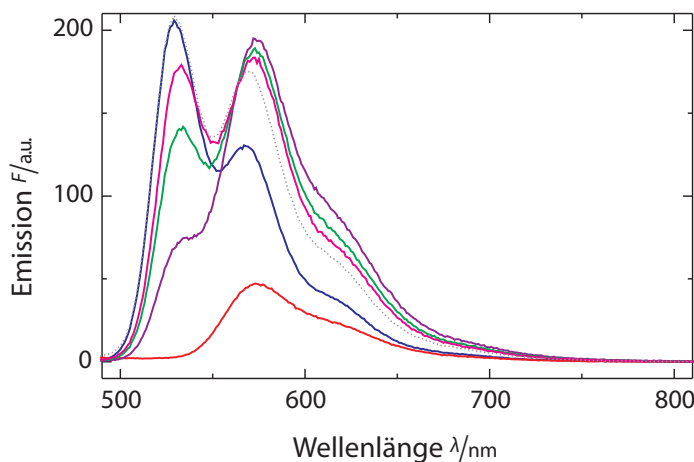


Abbildung 4.18: Fluoreszenzemissionsspektren der geknickten OligoPPE Proben. Dargestellt sind die Spektren von PMI (blau), $\text{PMI}(\text{OAr})_3$ (rot), $\text{PMI-PPE}_5^k\text{-PMI}(\text{OAr})_3$ (violett), $\text{PMI-PPE}_7^k\text{-PMI}(\text{OAr})_3$ (grün) und $\text{PMI-PPE}_9^k\text{-PMI}(\text{OAr})_3$ (magenta). Zum Vergleich ist die Summe der Spektren von PMI und $\text{PMI}(\text{OAr})_3$ eingezeichnet (grau gepunktet).

ist in Übereinstimmung mit den theoretischen Erwartungen. Eine objektive, quantitative Bestimmung der Transfereffizienz aus der Höhe der Maxima ist nicht möglich, da die Donor- und Akzeptorspektren sehr stark überlappen. Nur durch Anpassung dieser Spektren an das FRET-Spektrum können die Transfereffizienzen bestimmt werden.

Der gleiche Effekt wird bei Betrachtung der Abbildung 4.18 beobachtet. Die Donoremission der kurzen OligoPPE ist stark vermindert, wohingegen die Akzeptoremission erhöht ist. Die $\text{PMI-PPE}_9^k\text{-PMI}(\text{OAr})_3$ Probe zeigt nur eine geringe Verminderung der Donoremission und geringe Erhöhung der Akzeptoremission.

Zur Berechnung des Überlappungsintegrals aus den Spektren der PMI-Emission und der $\text{PMI}(\text{OAr})_3$ -Absorption werden die Spektren der verschiedenen PMI-PPE Proben flächennormiert und gemittelt. Die $\text{PPE-PMI}(\text{OAr})_3$ Absorptionsspektren werden auf das Maximum nor-

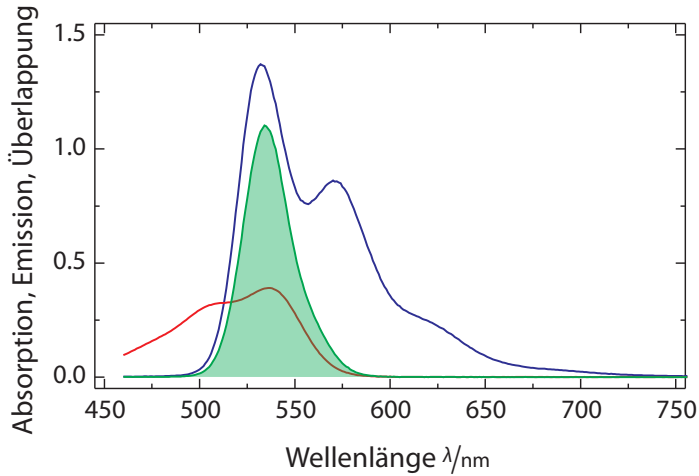


Abbildung 4.19: Bestimmung des Überlappungsintegrals J (grün) aus den Spektren der PMI-Emission (blau) und der PMI(OAr)₃-Absorption (rot). Die Größenordnung der Spektren ist zur gleichzeitigen Darstellung angepasst ($\phi_{\text{DFD}}(\lambda)/10^{-2}$, $\epsilon_{\text{A}}(\lambda)/10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $J(\lambda)/10^{14} \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{nm}^4$).

miert und ebenfalls gemittelt. Mit Gleichung (2.34) und Gleichung (2.36) kann eine Überlappung O der Spektren und damit der FÖRSTER Radius, in Abhängigkeit von κ^2 , bestimmt werden:

$$R_0^6 = \kappa^2 O = \kappa^2 \left[87,745 \frac{J(\lambda)}{n^4} \right], \quad (4.3)$$

wobei $n = 1,496$ der Brechungsindex des Lösungsmittels (Toluol) ist. Es ergibt sich die Überlappung $O = 25\,214$ und damit für die gestreckten Proben ein FÖRSTER Radius $R_0 = 6,82 \text{ nm}$. Für die geknickten Proben können die R_0 Werte für die verschiedenen Orientierungen nach Tabelle 3.2 berechnet werden. Damit können die FÖRSTER Radien $R_0(m=5) = 6,16 \text{ nm}$, $R_0(m=7) = 6,05 \text{ nm}$ und $R_0(m=9) = 5,97 \text{ nm}$ bestimmt werden.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern der OligoPPE Proben erfolgt mittels TCSPC. Bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm besteht ein gutes Verhältnis aus Donorabsorption (möglichst hoch) und Akzeptorabsorption (möglichst niedrig). Daher kann die 450 nm Leuchtdiode verwendet werden. Die Konzentration der Proben wird auf etwa 10^{-6} M eingestellt, um zu vermeiden, daß die Messung durch Reabsorptionseffekte beeinträchtigt wird.

Tabelle 4.5: Resultate der Lebensdauermessungen für PMI–PPE–PMI(OAr)₃. Es erfolgt eine triexponentielle Anpassung mit Optimierung von χ^2 , um die Lebensdauern τ und die zugehörigen relativen Amplituden a zu ermitteln. Die Lebensdauer der jeweiligen Akzeptorprobe wird als τ_3 vorgegeben und festgehalten.

Probe	$\frac{t_1}{\text{ns}}$	$\frac{a_1}{\%}$	$\frac{t_2}{\text{ns}}$	$\frac{a_2}{\%}$	$\frac{t_3}{\text{ns}}$	$\frac{a_3}{\%}$	χ^2
PMI–PPE ₂ ^s –PMI(OAr) ₃	0.02	-1.58	0.19	7.46	4.28	94.12	1.05
PMI–PPE ₅ ^s –PMI(OAr) ₃	0.12	-5.46	0.75	67.59	4.21	37.87	1.14
PMI–PPE ₅ ^k –PMI(OAr) ₃	0.11	-7.86	1.36	89.34	4.33	18.52	0.89
PMI–PPE ₇ ^s –PMI(OAr) ₃	0.12	-1.92	1.98	65.25	4.14	36.67	0.91
PMI–PPE ₇ ^k –PMI(OAr) ₃	0.12	-2.97	2.84	98.01	4.38	4.97	0.87
PMI–PPE ₉ ^s –PMI(OAr) ₃	0.12	-2.94	2.95	89.43	4.12	13.51	1.07
PMI–PPE ₉ ^k –PMI(OAr) ₃	0.12	-3.38	3.56	92.66	4.34	10.72	1.04

In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse einer dreifachen exponentiellen Anpassung dargestellt. Die kurze Abklingzeit τ_1 beschreibt darin, erkennbar an der negativen Amplitude, die Anstiegszeit (engl. rise time) der Akzeptoremision. Diese resultiert aus der Anregung des Akzeptors, die über den Donor und nicht direkt erfolgt. Die mittlere Abklingzeit τ_2 beschreibt die, durch FRET verminderte Fluoreszenzlebensdauer des Donors und die lange Abklingzeit τ_3 die Fluoreszenzlebensdauer des Akzeptors, die in der Anpassung vorgegeben wird.

Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer der PMI–PPE Proben kann zu 4,17(2) ns bestimmt werden, die der PPE–PMI(OAr)₃ Proben zu

4,26(4) ns. Der geringe Standardfehler belegt, dass die Fluorophore nicht durch die PPE-Kette beeinflusst werden.

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Die in Abbildung 4.20 dargestellten E - S -Histogramme der PMI-PPE_{*n*}^s-PMI(OAr)₃ Proben zeigen die Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz. Die Lage des scharfen Maximums der PMI-PPE-Verteilung und die breite Verteilung der PPE-PMI(OAr)₃ Ereignisse sind deutlich zu erkennen.

Die Verteilungen der FRET Proben liegen durch die eingesetzten Korrekturen bei gleichem stöchiometrischem Index S . Die in die S -Histogramme eingezeichneten Kurven entsprechen der zweidimensionalen Anpassung an die FRET Population im E - S -Histogramm. Die S -Histogramme weichen von der Form der Normalverteilung im Bereich kleinerer S Werte ab. Diese Abweichung kann mit dem Auftreten einer Population, die nur Akzeptoreigenschaften zeigt, erklärt werden. Es ist zu erkennen, dass es eine gute Übereinstimmung der angepassten Kurve mit den Verteilungen im Bereich größerer S Werte gibt. Daraus lässt sich schließen, dass die gewählte Methode, im E - S -Histogramm drei unabhängige, zweidimensionale Normalverteilungen anzupassen, geeignet ist, Subpopulationen, die nur Akzeptoreigenschaften zeigen, aufzulösen. Subpopulationen, die nur Donoreigenschaften zeigen, treten in sehr geringem Maße auf. Folglich kann nur angenommen werden, dass diese ebenfalls aufgelöst werden könnten und somit die Ermittlung der FRET-Effizienzen nicht beeinträchtigten.

Bei Betrachtung der Breiten der an die FRET Population angepassten Normalverteilungen, fällt auf, dass die Breite für das kurze und das lange OligoPPE geringer ist als für die mittleren. Dieses Verhalten ist theoretisch zu erwarten und bedingt durch die Berechnung der Transfereffizienz. Insbesondere bei langen Molekülen, mit kleinen Werten von E , ist jedoch, aufgrund der Flexibilität der Kette, mit einer Verbreiterung der Verteilung zu rechnen. Die OligoPPE zeigen also, wie erwartet, das Verhalten starrer Moleküle.

Die in Abbildung 4.21 dargestellten E - S -Histogramme der geknickten Proben zeigen ebenso wie die der gestreckten Proben kaum Hinweise

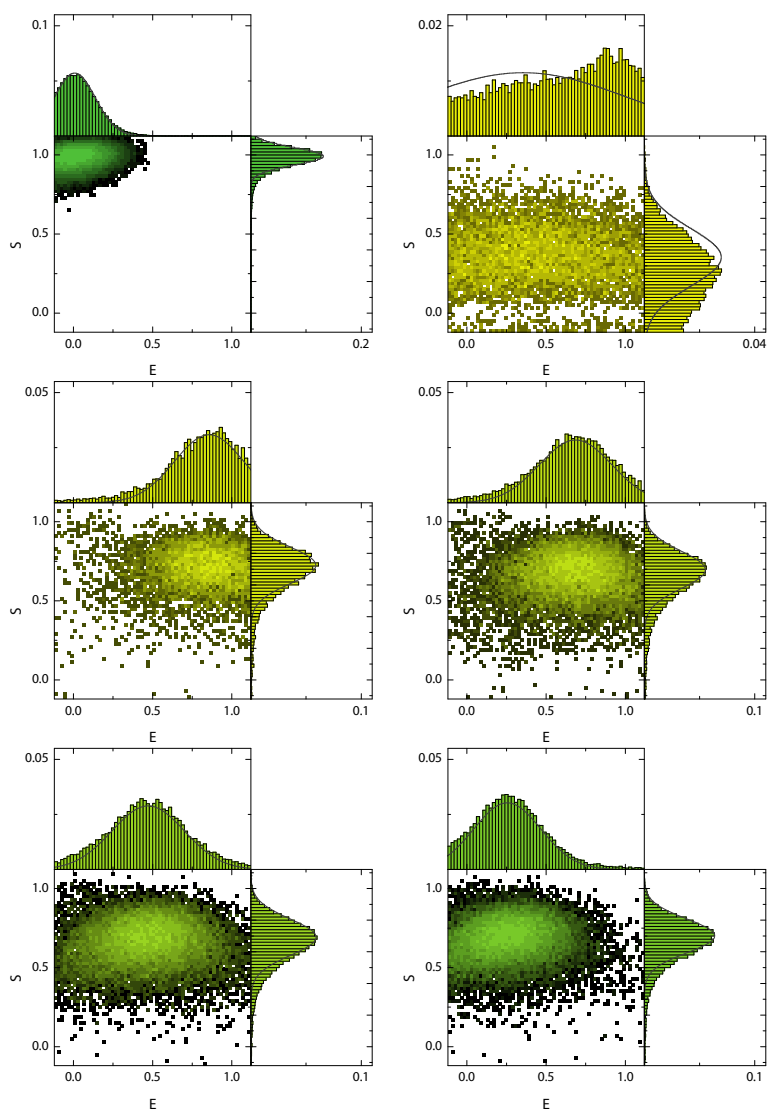


Abbildung 4.20: *E-S*-Histogramme der PMI-PPE_n^s-PMI(OAr)₃ Proben. Dargestellt sind die Verteilungen von PMI-PPE (oben links), PPE-PMI(OAr)₃ (oben rechts), PMI-PPE₂^s-PMI(OAr)₃ (mitte links), PMI-PPE₅^s-PMI(OAr)₃ (mitte rechts), PMI-PPE₇^s-PMI(OAr)₃ (unten links) und PMI-PPE₉^s-PMI(OAr)₃ (unten rechts).

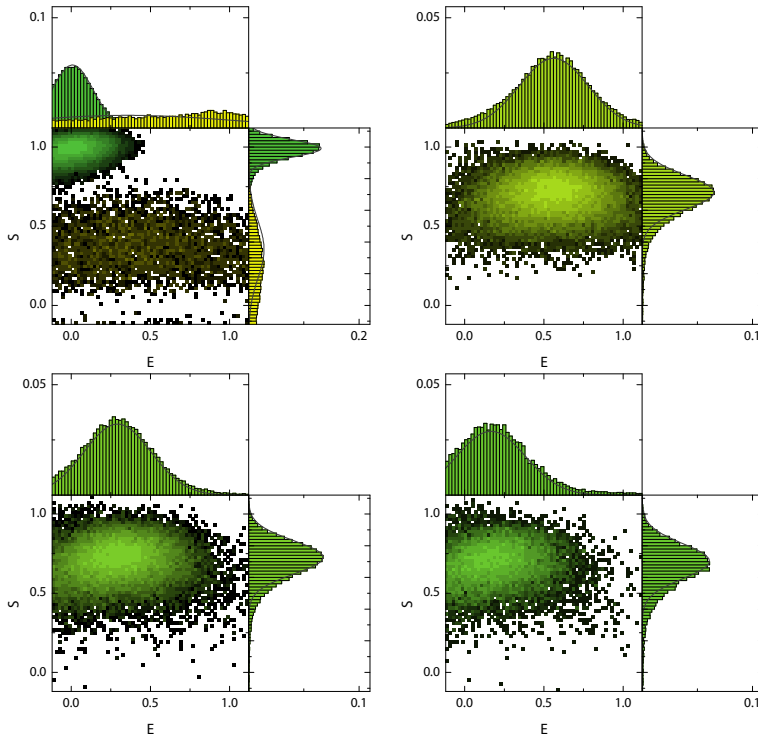


Abbildung 4.21: *E-S*-Histogramme der PMI-PPE_{*m*}^k-PMI(OAr)₃ Proben. Dargestellt sind die Verteilungen von PMI-PPE und PPE-PMI(OAr)₃ (oben links, grün und gelb), PMI-PPE₅^k-PMI(OAr)₃ (oben rechts), PMI-PPE₇^k-PMI(OAr)₃ (unten links) und PMI-PPE₉^k-PMI(OAr)₃ (unten rechts).

auf Subpopulationen. Einzig eine Verbreiterung des S-Histogramms zu kleinen Werten von S ist erkennbar. Dies lässt sich wiederum durch das Auftreten einer Population von Molekülen, die nur Akzeptoreigenschaften zeigen, erklären.

FRET-Effizienzen

Um die FRET-Effizienz zu bestimmen, können, wie bereits beschrieben, unterschiedliche Methoden verwendet werden. Zum einen kann die Verminderung der Donoremission ausgenutzt werden, um aus dem Vergleich der Emissionsspektren von nur donormarkierter Probe und FRET-Probe im Bereich der Donoremission die Effizienz zu bestimmen. Zum anderen ergibt sich, parallel zur Verminderung der Donorfluoreszenz, auch eine verkürzte Fluoreszenzlebensdauer des Donors, da die Donorfluoreszenz während dieser Lebensdauer durch den Energietransfer gelöscht wird. Desweiteren kann die Erhöhung der Akzeptorfluoreszenz aus den Emissionsspektren abgelesen werden.

Tabelle 4.6: Transfereffizienz der PMI-PPE-PMI(OAr)₃ Proben.

Probe	$\frac{r}{\text{nm}}$	E_{em^D}	E_{em^A}	E_τ	E_{sm}
PMI-PPE ₂ ^s -PMI(OAr) ₃	3.47	1.031	0.964	0.956	0.856
PMI-PPE ₅ ^s -PMI(OAr) ₃	5.53	0.827	0.782	0.821	0.686
PMI-PPE ₅ ^k -PMI(OAr) ₃	5.65	0.674	0.658	0.674	0.562
PMI-PPE ₇ ^s -PMI(OAr) ₃	6.90	0.552	0.542	0.536	0.472
PMI-PPE ₇ ^k -PMI(OAr) ₃	6.99	0.319	0.316	0.319	0.292
PMI-PPE ₉ ^s -PMI(OAr) ₃	8.27	0.272	0.292	0.290	0.255
PMI-PPE ₉ ^k -PMI(OAr) ₃	8.35	0.117	0.135	0.142	0.166

Um die Unterscheidung von Subpopulationen möglich zu machen, und so nur die Untermenge aller Moleküle betrachten zu können, bei denen FRET erfolgt, wird die ALEX-Spektroskopie eingesetzt. Dabei ergibt sich die FRET-Effizienz aus der korrigierten fraktionalen Intensität des Akzeptorkanals relativ zur Summe der Emissionskanäle von Donor und Akzeptor (Gleichung (3.3)).

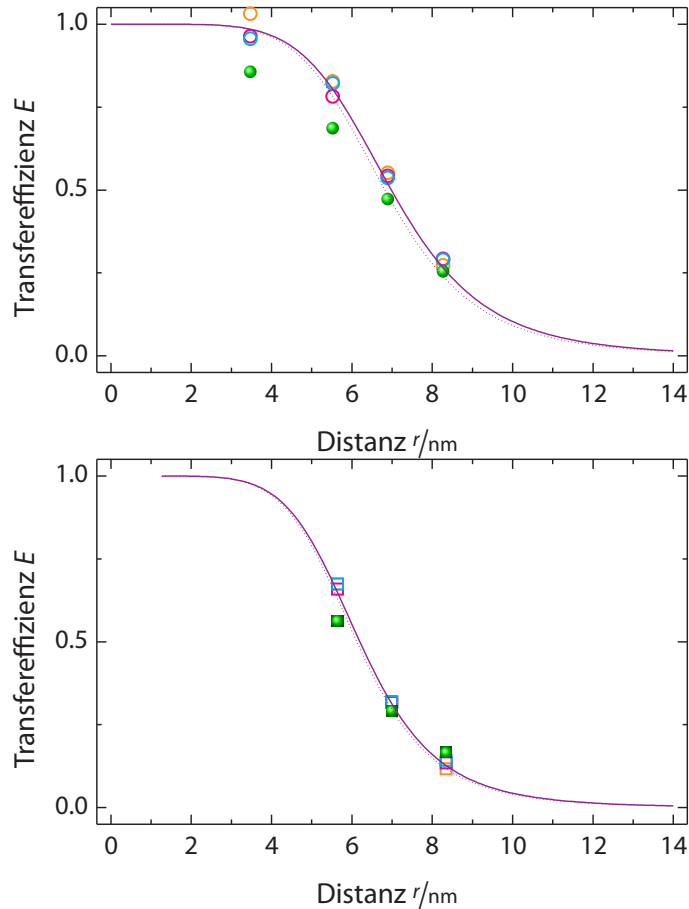


Abbildung 4.22: FRET-Effizienzen der OligoPPE Proben. Dargestellt sind die FRET-Effizienzen E_{emD} (orange), E_{emA} (magenta), E_{τ} (cyan) und E_{sm} (grün) von PMI-PPE_n^s-PMI(OAr)₃ (rund, oben) und PMI-PPE_m^k-PMI(OAr)₃ (quadratisch, unten). Die durchgezogenen Kurven geben die Anpassungen der theoretischen Funktionen an die Punkte wieder, die gepunkteten Kurven veranschaulichen die theoretische Vorhersage (violett).

Die mit den verschiedenen vorgestellten Methoden ermittelten FRET-Effizienzen der PMI-PPE-PMI(OAr)₃ Proben sind in Tabelle 4.6 darge-

stellt. Die Werte zeigen nur geringe Abweichungen und keine Ausreißer. Nur die FRET-Effizienzen der PMI – PPE₂^s – PMI(OAr)₃ Probe zeigen eine deutlichere Schwankung.

Abbildung 4.22 verdeutlicht die gute Übereinstimmung der ermittelten Daten mit den theoretischen Vorhersagen. Die dargestellten Messwerte liegen sehr gut auf den angepassten Kurven. Für die gestreckten OligoPPE kann R_0 durch Anpassen der Funktion $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$ bestimmt werden. Wohingegen die, an die Messwerte der geknickten OligoPPE anzupassende Funktion $E = (O\kappa^2) / (O\kappa^2 + r^6)$ der Distanzabhängigkeit der Orientierung der Übergangsdipolmomente Rechnung trägt:

$$\kappa^2 = (\cos 120^\circ - 3 \cos(120^\circ + \arcsin(\frac{d}{r} \sin 120^\circ)) \cos(\arcsin(\frac{d}{r} \sin 120^\circ)))^2. \quad (4.4)$$

Darin bezeichnet $d = 1,39$ nm den Abstand zwischen dem Knick in der Molekülkette und dem Zentrum des Akzeptors (Abbildung 3.5).

Die gestrichelt dargestellten Kurven geben den aus den spektralen Informationen der Fluorophore gewonnenen FÖRSTER Radius wieder. Sie liegen sehr dicht bei den angepassten Kurven, so dass die Abschätzungen bezüglich der Abstände der Fluorophore bestätigt werden. Der aus der Anpassung für die gestreckten Proben ermittelte Wert $R_0 = 6,98$ nm ist nur 0,16 nm größer als die aus spektralen Daten gewonnene Referenz ($R_0 = 6,82$ nm). Für die geknickten Proben ergibt sich, mit einen Wert $\kappa^2 = 2$, sogar nur ein Unterschied von 0,08 nm.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass einzelmolekülempfindliche Messungen an stäbchenförmigen Molekülen Informationen über Längenskalen im Bereich von einigen Nanometern liefern können. Solche stäbchenförmigen Moleküle zeichnen sich durch intrinsische Steifigkeit und Formstabilität aus.

Mit der Aminosäure Prolin gibt es ein natürliches Molekül, dass durch Polymerisation starre Polymere ausbilden kann. Aus kristallographischen Untersuchungen sind zwei mögliche helikale Strukturen bekannt, die aus Prolin Einheiten aufgebaut sind.^[6] Diese beruhen auf dem Auftreten von zwei energetisch favorisierten Orientierungen der Monomere zueinander und werden als Typ I und Typ II Helix bezeichnet. In wässrigen Lösungen kommt überwiegend die Typ II Helix vor, wobei jedoch etwa 30 % der Peptidbindungen in (Z)-Stellung vorliegen.^[3]

Für FRET-Messungen an solchen Oligo- und Polyprolin Molekülen wurden, konformativ flexibel, an die Enden der Peptidkette Fluorophore gekoppelt. Die aus den spektroskopischen Messungen im Ensemble berechneten FRET-Effizienzen zeigen ein uneinheitliches Bild, die erwartete Steigerung der Akzeptorfluoreszenz bleibt aus. Die Verminderung der Donorfluoreszenz kann jedoch ausgewertet werden und ergibt FRET-Effizienzen nahe den erwarteten Werten. Insbesondere die Spektren der kurzen Oligoprolin Moleküle, mit 2, 4 und 6 Prolineinheiten, zeigen Hinweise auf die Bildung von nicht fluoreszierenden H-Dimeren. Diese sind dadurch charakterisiert, dass die Absorption gegenüber dem Monomer erhöht und hypsochrom verschoben ist und keine Fluoreszenz auftritt.

ALEX-Messungen zeigen, insbesondere für das Farbstoffpaar Atto488 und Atto565, für die kurzen Oligoprolin Moleküle zu geringe Transfereffizienzen. Dies kann damit erklärt werden, dass für relativ zur Ausdehnung der Chromophore kurze Abstände die Punkt-Dipol-Näherung, die zu den einfachen Formeln der FÖRSTER Theorie führt (Abschnitt 2.1.8),

nicht mehr gilt.^[43] Zudem können Löschprozesse, die die Gesamtquantenausbeute vermindern, dazu führen, dass die Transfereffizienz verringert wird. Für das Molekül aus 20 Prolin Einheiten ergibt sich eine, relativ zur Vergleichskurve, höhere FRET-Effizienz. Diese läßt sich mit dem Auftreten von Knicken in der helikalen Struktur, durch Peptidbindungen in (Z)-Stellung, und der damit verbundenen Verminderung des interchromophoren Abstands, erklären.^[3;10;54] Um den Einfluss dieser Knicke zu untersuchen, könnten Messungen in z. B. Trifluorethanol durchgeführt werden, da in diesem Lösungsmittel die Peptidbindungen nicht in (Z)-Stellung vorliegen und damit eine gestreckte Typ II Helix zu erwarten ist.^[3] Durch Hinzugabe von Lithiumchlorid (LiCl) kann der Anteil Peptidbindungen in (Z)-Stellung auf 40 % bis 70 % angehoben werden.^[28]

Zur Untersuchung der interchromophoren Wechselwirkung wurde das Molekülsystem bis auf eine einzelne Aminosäure (Cystein) verkürzt, die mit unterschiedlichen Fluorophorpaaren gekoppelt wurde. Die Farbstoffe sind dabei in VAN DER WAALS Kontakt. Es zeigt sich eine deutlich verstärkte Wechselwirkung der Chromophore, mit dem Resultat einer ausgeprägten Dimerbildung in Wasser, die in dem weniger polaren Ethanol nicht auftritt. Die Wechselwirkung konnte für unterschiedliche Farbstoffklassen nachgewiesen werden.

Die festgestellte Fluoreszenzlöschung durch kontaktinduzierte Prozesse kann die Beobachtung von dynamischen Prozessen in Biomolekülen beeinflussen. Besonders, wenn die Wechselwirkung, aufgrund schneller Konformationsdynamik, weniger statisch ist, können beobachtete FRET-Effizienzen verfälscht werden.

Die N-terminale Kopplung von Farbstoffen an Cystein zeigt den möglichen Einfluß der Zielmoleküle der Kopplung auf die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs. Bei der Kopplung an Cystein kann es zu einer elektronischen Wechselwirkung zwischen dem elektronischen System des Chromophors und dem in Wasser auftretenden Thiolation kommen. In dem unpolaren Lösungsmittel Ethanol ist die Bildung des Thiolations vermindert und die Fluoreszenzlöschung tritt nicht auf. Zur genauen Aufklärung des Mechanismus könnten pH-abhängige Untersuchungen beitragen, da so die Bildung des Thiolations beeinflusst werden kann.

Um die in den Oligo- und Polyprolin Molekülen auftretenden Hetero-

genitäten zu vermeiden, und die Orientierung der Übergangsdipolmomente der Chromophore zu fixieren, wurden FRET-Proben entwickelt, die eine hohe Starrheit aufweisen.^[17] Zudem konnten die verwendeten Chromophore mit unterschiedlicher Orientierung endständig fixiert werden.

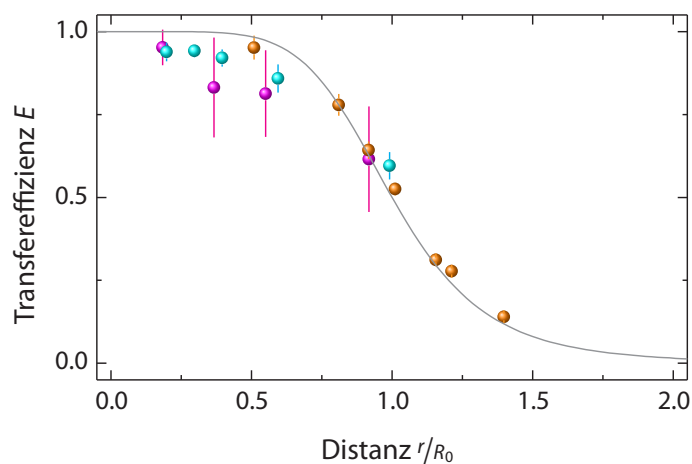


Abbildung 5.1: FRET-Effizienzen der OligoPPE, Oligo- und Polyprolin Proben. Dargestellt sind die jeweils gemittelten FRET-Effizienzen aus den Abbildungen 4.10 und 4.22 und die Standardfehler der Mittelung für die Atto565 – Pro – Atto488 (cyan), Atto647N – Pro – Atto565 (magenta) und PMI – PPE – PMI(OAr)₃ (orange) Proben.

Die spektroskopische Untersuchung der FRET-Effizienz dieser OligoPPE Proben ergab eine hohe Übereinstimmung mit der theoretischen Vorhersage aus einem einfachen Modell¹. Zudem kommt es in diesem System nicht zu starken Wechselwirkungen zwischen den Chromophoren, die zur Verringerung der Gesamtfluoreszenzquantenausbeute führen. So konnte die FRET-Effizienz übereinstimmend sowohl aus der verminderten Donorfluoreszenz als auch aus der erhöhten Akzeptorfluoreszenz ermittelt werden. Auch die Abhängigkeit von der Orientierung

¹Abstand der Chromophore additiv aus Gleichgewichtsbindungsängen

der Übergangsdipolmomente konnte bestätigt werden.

In Abbildung 5.1 sind die zusammengefassten Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchung der Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz dargestellt. Die Mittelwerte der Messungen für die OligoPPE zeigen, bei geringer Schwankung, eine gute Übereinstimmung mit der theoretischen Kurve. Die Abweichungen können mit der eingeschränkten Gültigkeit der Punkt-Dipol-Näherung (kürzestes OligoPPE) und einer restlichen Flexibilität der Kette (lange OligoPPE) erklärt werden. Zur genauen Untersuchung der Restflexibilität sollen die Ergebnisse mit EPR-Messungen an mit Spinsonden markierten OligoPPE und Simulationen verglichen werden.

Die Ergebnisse der Oligo- und Polyprolin Proben zeigen bei größerer Schwankung der Mittelwerte, den, durch die Verringerung der Abstände erzeugten, abgeflachten Verlauf der Transfereffizienzkurve.^[43]

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, bei Verwendung geeigneter starrer Systeme, die Näherungen der Förster Theorie mit den Messergebnissen übereinstimmen. Die auftretenden Abweichungen können mit dem Auftreten von Knicken in der Helix (Oligo- und Polyprolin) oder der Restflexibilität der Kette (OligoPPE) erklärt werden, da diese zu einem geringeren interchromophoren Abstand führen.

Literaturverzeichnis

- 1 AJTAI, K.; ILICH, P. J. K.; RINGLER, A.; SEDAROUS, S. S.; TOFT, D. J.; BURGHARDT, T. P.: Stereospecific reaction of muscle fiber proteins with the 5' or 6' isomer of (iodoacetamido)tetramethylrhodamine. In: *Biochemistry* 31 (1992), Dezember, Nr. 49, S. 12431–12440. – DOI: 10.1021/bio0164a019
- 2 ANTONIK, M.; FELEKYAN, S.; GAIDUK, A.; SEIDEL, C. A. M.: Separating structural heterogeneities from stochastic variations in fluorescence resonance energy transfer distributions via photon distribution analysis. In: *Journal of Physical Chemistry B* 110 (2006), April, Nr. 13, S. 6970–6978. – DOI: 10.1021/jp057257+
- 3 BEST, R. B.; MERCHANT, K. A.; GOPICH, I. V.; SCHULER, B.; BAX, A.; EATON, W. A.: Effect of flexibility and cis residues in single-molecule FRET studies of polyproline. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007), November, Nr. 48, S. 18964–18969. – DOI: 10.1073/pnas.0709567104
- 4 BORN, M.; WOLF, E.: *Principles of optics*. 6. (corr.) ed., repr. with corr. Oxford : Pergamon Pr., 1986. – XXVIII, 808 S. – ISBN 0-08-026481-6
- 5 CHRISTEN, P.; JAUSSE, R.: *Biochemie*. Berlin [u.a.] : Springer, 2005. – XIV, 633 S. : Ill., graph. Darst. S. – DOI: 10.1007/b137457. – ISBN 978-3-540-26347-0
- 6 COWAN, P. M.; MCGAVIN, S.: Structure of Poly-L-Proline. In: *Nature* 176 (1955), September, Nr. 4480, S. 501–503. – DOI: 10.1038/176501a0
- 7 DALE, R.; EISINGER, J.; BLUMBERG, W.: The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. In: *Biophysical Journal* 26 (1979), Mai, Nr. 2, S. 161–193. – DOI: 10.1016/S0006-3495(79)85243-1
- 8 DEMTRÖDER, W.: *Atoms, Molecules and Photons*. Berlin [u.a.] : Springer, 2006. – XV, 571 S. : Ill., graph. Darst. S. – DOI: 10.1007/3-540-32346-5. – ISBN 978-3-540-20631-6
- 9 DEXTER, D. L.: A Theory of Sensitized Luminescence in Solids. In: *Journal of Chemical Physics* 21 (1953), Nr. 5, S. 836–850. – DOI: 10.1063/1.1699044
- 10 DOOSE, S.; NEUWEILER, H.; BARSCH, H.; SAUER, M.: Probing polyproline structure and dynamics by photoinduced electron transfer provides evidence for deviations from a regular polyproline type II helix. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007), Oct, Nr. 44, S. 17400–17405. – DOI: 10.1073/pnas.0705605104

- 11 DOOSE, S.; NEUWEILER, H.; SAUER, M.: A Close Look at Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan. In: *ChemPhysChem* 6 (2005), November, Nr. 11, S. 2277–2285. – DOI: 10.1002/cphc.200500191
- 12 DUGAVE, C.; DEMANGE, L.: Cis-trans isomerization of organic molecules and biomolecules: implications and applications. In: *Chemical Reviews* 103 (2003), Juli, Nr. 7, S. 2475–2532. – DOI: 10.1021/cr0104375
- 13 FAIRCLOUGH, R. H.; CANTOR, C. R.: The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies. In: *Methods in Enzymology* 48 (1978), S. 347–379. – DOI: 10.1016/S0076-6879(78)48019-X
- 14 FÖRSTER, T.: Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Naturwissenschaften* 33 (1946), Juni, Nr. 6, S. 166–175. – DOI: 10.1007/BF00585226
- 15 FÖRSTER, T.: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Annalen der Physik* 437 (1948), Nr. 1-2, S. 55–75. – DOI: 10.1002/andp.19484370105
- 16 GEY, M. H.: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2008. – XXXIII, 470 S. : Ill., graph. Darst. S. – DOI: 10.1007/978-3-540-73804-6. – ISBN 978-3-540-73804-6
- 17 GODT, A.; SCHULTE, M.; ZIMMERMANN, H.; JESCHKE, G.: How Flexible Are Poly(para-phenyleneethynylene)s? In: *Angewandte Chemie International Edition* 45 (2006), November, Nr. 45, S. 7560–7564. – DOI: 10.1002/anie.200602807
- 18 HA, T.: Single-molecule fluorescence resonance energy transfer. In: *Methods* 25 (2001), September, Nr. 1, S. 78–86. – DOI: 10.1006/meth.2001.1217
- 19 HA, T.; ENDERLE, T.; OGLETREE, D. F.; CHEMLA, D. S.; SELVIN, P. R.; WEISS, S.: Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), Juni, Nr. 13, S. 6264–6268
- 20 HIRSCHFELD, T.: Optical microscopic observation of single small molecules. In: *Applied Optics* 15 (1976), Dezember, Nr. 12, S. 2965–2966. – DOI: 10.1364/AO.15.002965
- 21 HU, C.; WHINNERY, J. R.: New Thermo-optical Measurement Method and a Comparison with Other Methods. In: *Appl. Opt.* 12 (1973), Januar, Nr. 1, S. 72–79. – DOI: 10.1364/AO.12.000072

- 22 HUNG, J.; MARCANO O, A.; CASTILLO, J.; GONZÁLEZ, J.; PISCITELLI, V.; REYES, A.; FERNÁNDEZ, A.: Thermal lensing and absorbance spectra of a fluorescent dye solution. In: *Chemical Physics Letters* 386 (2004), März, Nr. 1-3, S. 206–210. – DOI: 10.1016/j.cplett.2004.01.058
- 23 IUPAC ; McNAUGHT, A. D. (Hrsg.); WILKINSON, A. (Hrsg.): *Compendium of Chemical Terminology*. 2nd ed. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1997 (the "Gold Book"). – DOI: 10.1351/goldbook. – XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. – ISBN 0-9678550-9-8
- 24 KAPANIDIS, A. N.; LAURENCE, T. A.; LEE, N. K.; MARGEAT, E.; KONG, X.; WEISS, S.: Alternating-laser excitation of single molecules. In: *Accounts of Chemical Research* 38 (2005), Juli, Nr. 7, S. 523–533. – DOI: 10.1021/aro401348
- 25 KAPANIDIS, A. N.; LEE, N. K.; LAURENCE, T. A.; DOOSE, S.; MARGEAT, E.; WEISS, S.: Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), Juni, Nr. 24, S. 8936–8941. – DOI: 10.1073/pnas.0401690101
- 26 KASHA, M.; RAWLS, H. R.; ASHRAF EL-BAYOUMI, M.: The Exciton Model in Molecular Spectroscopy. In: *Pure and Applied Chemistry* 11 (1965), August, Nr. 3-4, S. 371–392. – DOI: 10.1351/pac196511030371
- 27 KNOX, R. S.; AMERONGEN, H. van: Refractive Index Dependence of the Förster Resonance Excitation Transfer Rate. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002), Mai, Nr. 20, S. 5289–5293. – DOI: 10.1021/jp013927+
- 28 KOFRON, J. L.; KUZMIC, P.; KISHORE, V.; COLÓN-BONILLA, E.; RICH, D. H.: Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. In: *Biochemistry* 30 (1991), Juni, Nr. 25, S. 6127–6134. – DOI: 10.1021/bio0239a007
- 29 LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. New York, NY : Springer, 2006. – XXVI, 954 S. – DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4. – ISBN 0387312781
- 30 LEE, N. K.; KAPANIDIS, A. N.; WANG, Y.; MICHALET, X.; MUKHOPADHYAY, J.; EBRIGHT, R. H.; WEISS, S.: Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. In: *Biophysical Journal* 88 (2005), April, Nr. 4, S. 2939–2953. – DOI: 10.1529/biophysj.104.054114

- 31 LEVY, S.-T.; RUBIN, M. B.; SPEISER, S.: Orientational effects in intramolecular electronic energy transfer in bichromophoric molecules. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 66 (1992), Juni, Nr. 2, S. 159–169. – DOI: 10.1016/1010-6030(92)85210-L
- 32 LIDE, D. R. (Hrsg.): *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 87th Edition. Boca Raton, FL : Taylor and Francis, 2007. – Internet Version 2007
- 33 LINFOOT, E. H.; WOLF, E.: Phase Distribution near Focus in an Aberration-free Diffraction Image. In: *Proceedings of the Physical Society. Section B* 69 (1956), Nr. 8, S. 823–832. – DOI: 10.1088/0370-1301/69/8/307
- 34 MAKSIMOV, M. Z.; ROZMAN, I. M.: On Energy Transfer in Solid Solutions. In: *Optics and spectroscopy* 12 (1962), S. 337–338
- 35 MARTIN, M. M.: Hydrogen bond effects on radiationless electronic transitions in xanthene dyes. In: *Chemical Physics Letters* 35 (1975), August, Nr. 1, S. 105–111. – DOI: 10.1016/0009-2614(75)85598-9
- 36 MEER, B. W. van der; COKER, G.; CHEN, S.-Y. S.: *Resonance energy transfer : theory and data*. 1. print. New York : VCH, 1994. – X, 177 S. : graph. Darst. S. – ISBN 1-56081-643-0
- 37 MINSKY, M.: *Microscopy apparatus*. US Patent 3,013,467 : Eingereicht: 07. November 1957. Erteilt: 19. Dezember 1961
- 38 MÜLLER, B. K.; ZAYCHIKOV, E.; BRÄUCHLE, C.; LAMB, D. C.: Pulsed Interleaved Excitation. In: *Biophysical Journal* 89 (2005), November, Nr. 5, S. 3508–3522. – DOI: 10.1529/biophysj.105.064766
- 39 NOVOTNY, L.; HECHT, B.: *Principles of nano-optics*. Cambridge [u.a.] : Cambridge Univ. Press, 2006. – XVII, 539 S. : Ill., graph. Darst. S. – ISBN 978-0-521-83224-3
- 40 PACKARD, B. Z.; TOPTYGIN, D. D.; KOMORIYA, A.; BRAND, L.: Profluorescent protease substrates: Intramolecular dimers described by the exciton model. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), Oktober, Nr. 21, S. 11640–11645
- 41 RHOADES, E.; COHEN, M.; SCHULER, B.; HARAN, G.: Two-State Folding Observed in Individual Protein Molecules. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Oktober, Nr. 45, S. 14686–14687. – DOI: 10.1021/jao46209k
- 42 SCHIMMEL, P. R.; FLORY, P. J.: Conformational energy and configurational statistics of poly-L-proline. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58 (1967), Juli, Nr. 1, S. 52–59

- 43 SCHULER, B.; LIPMAN, E. A.; STEINBACH, P. J.; KUMKE, M.; EATON, W. A.: Polyproline and the "spectroscopic ruler" revisited with single-molecule fluorescence. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005), Februar, Nr. 8, S. 2754–2759. – DOI: 10.1073/pnas.0408164102
- 44 SCHWAB, P. F. H.; LEVIN, M. D.; MICHL, J.: Molecular Rods. 1. Simple Axial Rods. In: *Chemical Reviews* 99 (1999), Juli, Nr. 7, S. 1863–1934. – DOI: 10.1021/cr970070x
- 45 SELVIN, P. R.: The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. In: *Nature Structural Biology* 7 (2000), September, Nr. 9, S. 730–734. – DOI: 10.1038/78948
- 46 SELWYN, J. E.; STEINFELD, J. I.: Aggregation of equilibriums of xanthene dyes. In: *Journal of Physical Chemistry A* 76 (1972), März, Nr. 5, S. 762–774. – DOI: 10.1021/j100649a026
- 47 STEINBERG, I. Z.: Nonradiative Energy Transfer in Systems in which Rotatory Brownian Motion is Frozen. In: *Journal of Chemical Physics* 48 (1968), März, Nr. 6, S. 2411–2413. – DOI: 10.1063/1.1669461
- 48 STRYER, L.: Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. In: *Annual Review of Biochemistry* 47 (1978), Juli, Nr. 1, S. 819–846. – DOI: 10.1146/annurev.bi.47.070178.004131
- 49 STRYER, L.; HAUGLAND, R. P.: Energy transfer: A spectroscopic ruler. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58 (1967), August, Nr. 2, S. 719–726
- 50 TOMIZAKI, K.-Y.; LOEWE, R. S.; KIRMAIER, C.; SCHWARTZ, J. K.; RETSEK, J. L.; BOCIAN, D. F.; HOLTEN, D.; LINDSEY, J. S.: Synthesis and photophysical properties of light-harvesting arrays comprised of a porphyrin bearing multiple perylene-monoimide accessory pigments. In: *Journal of Organic Chemistry* 67 (2002), September, Nr. 18, S. 6519–6534. – DOI: 10.1021/jo0258002
- 51 TRÄGER, F. (Hrsg.): *Springer Handbook of Lasers and Optics*. New York : Springer, 2007. – DOI: 10.1007/978-0-387-30420-5. – 978-0-387-30420-5
- 52 VALEUR, B.: *Molecular Fluorescence*. 1. Weinheim : Wiley-VCH, 2002. – XIV, 387 S. – ISBN 3-527-29919-X
- 53 VISWANATH, G.; KASHA, M.: Confirmation of the Anomalous Fluorescence of Azulene. In: *Journal of Chemical Physics* 24 (1956), März, Nr. 3, S. 574–577. – DOI: 10.1063/1.1742548
- 54 WATKINS, L. P.; CHANG, H.; YANG, H.: Quantitative Single-Molecule Conformational Distributions: A Case Study with Poly-(L-proline). In: *Journal of Physical Chemistry A* 110 (2006), April, Nr. 15, S. 5191–5203. – DOI: 10.1021/jp055886d

- 55 WEBER, R.: *Physik*. Wiesbaden : B. G. Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, 2007. – DOI: 10.1007/978-3-8351-9205-8. – ISBN 9783835192058

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Markus Sauer für die interessante Themenstellung, sowie für die mir gewährten Freiräume und für seine fortwährende Diskussionsbereitschaft. Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Andreas Hütten, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu erstellen.

Herrn Dr. Sören Doose möchte ich danken, für seine ständige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen, seine guten Ideen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Hannes Neuweiler gilt mein Dank für die Einführung in die Kopplungschemie und seine Bereitschaft zur Hilfe bei allen Problemen bei der Aufreinigung der Peptide, insbesondere in der Anfangsphase dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Philip Tinnefeld, der mich in die konfokale Mikroskopie und die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie eingeführt hat, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Adelheid Godt, in deren Arbeitsgruppe die Darstellung der OligoPPE entwickelt und durchgeführt wurde. Herrn Dhananjaya Sahoo möchte ich für die Herstellung der OligoPPE Proben und für die gute Zusammenarbeit danken.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie gilt mein Dank für die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Herrn Dr. Gerd Wiebusch für die fortwährende Hilfe bei allen auftretenden Problemen mit Lasern und Optiken und Herrn Mark Löllmann und Herrn Idir Yahiathe für die anregenden Diskussionen und das angenehme Arbeiten im Büro.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, Karen und Yola, ihr seid mir Motivation und Stärke.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und dabei keine weiteren als die ausdrücklich bezeichneten Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, 29. Juni 2009