

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

Fakultät für Physik
der
Universität Bielefeld

vorgelegt von

Robert Kasper

geboren am 11.06.1978 in Cochem

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2009

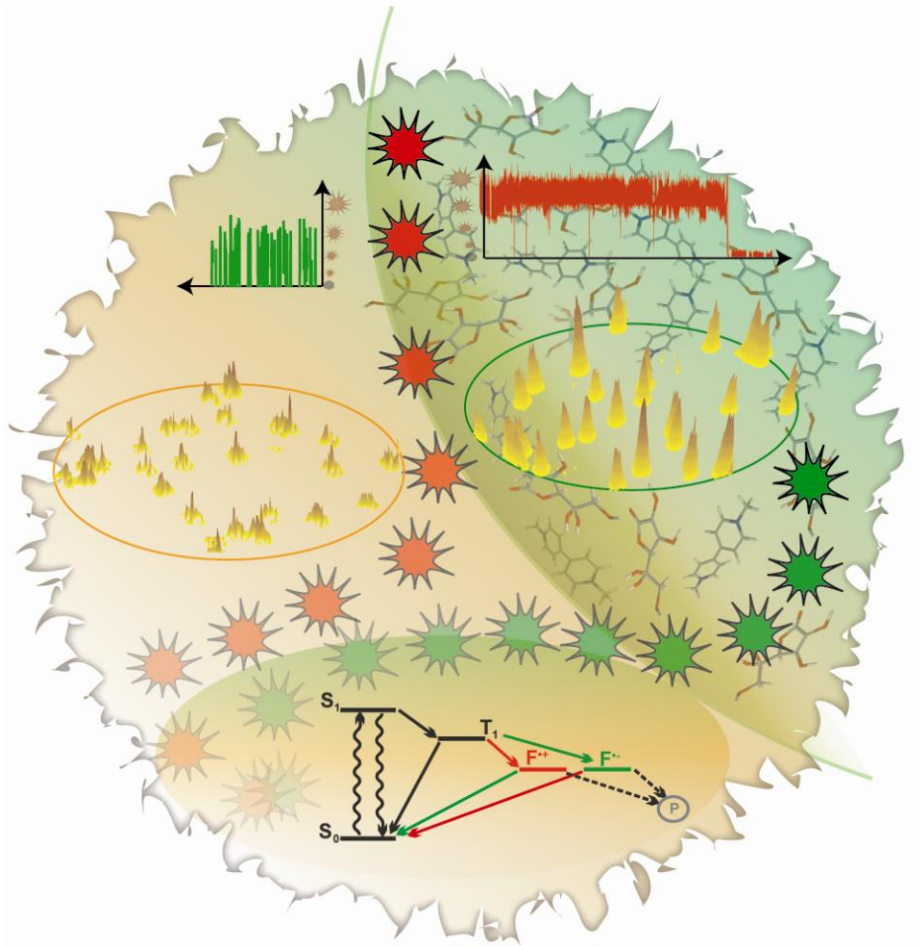
Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach DIN ISO 9706

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Bielefeld, 02.06.09

Robert Kasper

Optimierung von photophysikalischen Eigenschaften organischer Farbstoffe zur Auflösungserhöhung



Gutachter:

Prof. Dr. Markus Sauer

Prof. Dr. Andreas Hütten

Zusammenfassung

Die Zahl experimenteller Methoden für die hochauflösende optische Mikroskopie steigt stetig an. Als Fluoreszenzsonden werden häufig organische Farbstoffe verwendet. Je nach verwendeter Methode werden unterschiedliche Anforderungen an die Photostabilität und das Blinkverhalten der Farbstoffe gestellt. Beide Effekte limitieren in vielen Experimenten die Aussagekraft der Messungen. Die photophysikalischen Eigenschaften verschiedener Farbstoffe aus unterschiedlichen Strukturklassen müssen in unterschiedlicher chemischer Umgebung bekannt sein, um eine geeignete Auswahl treffen zu können. Deshalb wird in dieser Arbeit eine systematische Charakterisierung der Photophysik organischer Farbstoffe aus unterschiedlichen Strukturklassen gegeben.

Aufbauend auf diese Untersuchungen wird eine Methode vorgestellt, mit der es möglich ist für alle Strukturklassen die Fluoreszenzemission im Bezug auf Stabilität und Fluoreszenzunterbrechungen (so genanntes Blinking) zu optimieren. Das universell einsetzbare Prinzip beruht auf der simultanen Rekombination der Farbstoffe aus dem langlebigen Tripletzustand zurück in den Grundzustand, um eine schnelle Wiederanregung zu ermöglichen. Die Rekombination erfolgt über einen radikalischen Zwischenzustand, entweder über Oxidation oder Reduktion des Farbstoffmoleküls. Mit Hilfe der STED Mikroskopie kann gezeigt werden, dass über die Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften die Beugungsgrenze gebrochen werden kann und Auflösungen im Bereich von 25 nm an einzelnen Farbstoffmolekülen möglich sind.

Im letzten Kapitel liegt der Fokus der Arbeiten auf den Carbocyaninen. Einige Farbstoffe dieser Klasse können reversibel zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht-fluoreszierenden Zustand photoinduziert geschaltet werden. Die Bedingungen für das Schalten werden vorgestellt und die photoinduzierte Reaktion und diskutiert. Die Optimierung der Schalteigenschaften kann für die hochauflösende Mikroskopie ausgenutzt werden. Eine hochauflösende Methode, die

auf der Lokalisation einzelner Farbstoffmolekülen beruht, wird vorgestellt. Diese ermöglicht Aufnahmen weit unterhalb der Abbeschen Beugungsgrenze. Hierbei können einzelne Farbstoffe mit einer Genauigkeit von ca. 20 nm lokalisiert werden und Fluoreszenzbilder mit einer optischen Auflösung weit unterhalb der Beugungsgrenze rekonstruiert werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
1 Einleitung und Motivation	1
2 Theorie und Grundlagen	9
2.1 Absorption und Fluoreszenz	9
Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute.....	15
Fluoreszenzlöschung.....	18
Photoinduzierter Elektronentransfer	24
2.2 Konfokale Mikroskopie	26
2.3 Weitfeld-Mikroskopie	30
2.4 Detektion einzelner Moleküle	32
2.5 Möglichkeiten zur Auflösungserhöhung.....	35
Lokalisation der Farbstoffe	35
Prinzip der stimulierten Emission	37
Optische Bildrekonstruktion mit dSTORM.....	40
3 Material und Methoden	43
3.1 Einzelmolekülspektroskopie	43
Konfokale Mikroskopie	43
STED-Mikroskopie.....	47
dSTORM: kamerabasierte Weitfeldmikroskopie	48
3.2 Spektroskopie im Ensemble.....	50
Absorptionsspektrometer.....	50
Fluoreszenzspektrometer	51
Lebensdauermessungen	52
3.3 Farbstoffe und Proben	52
Oberflächenpräparation	52
Verwendete Farbstoffe und Oligonucleotide	54
Chemische Manipulation der Pufferumgebung	57

Pufferbestandteile.....	57
4 Ergebnisse und Diskussion	61
4.1 Charakterisierung der Farbstofffluoreszenz	61
Diskussion der Unterschiede in der Photophysik	67
4.2 Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz	72
ROXS-systematischer Aufbau am Beispiel von Cy5.....	78
ROXS am Beispiel von ATTO647N	84
Austausch des Reduktionsmittels	87
ROXS mit MR121	88
ROXS als generelles Prinzip	90
ROXS in der hochauflösenden Mikroskopie.....	97
Aufnahmen an fixierten Zellen.....	103
4.3 Photoinduziertes Schalten von Cyaninfarbstoffen	108
Schalten im Ensemble	109
Bildung der Differenzspektren	112
Mechanistische Studien zum Schalten von Cy5.....	117
Abhängigkeit des Schaltens von der Wellenlänge	124
Photoschalter in der hochauflösenden Mikroskopie	129
5 Fazit und Ausblick.....	135
6 Literaturverzeichnis.....	141
7 Publikationen.....	151
8 Konferenzbeiträge	152
9 Danksagung	153
10 Abbildungsverzeichnis.....	155

1 Einleitung und Motivation

Seit das erste optische Mikroskop Ende des 16. Jahrhunderts von den Brüdern Jansen in Holland entwickelt wurde, gewinnt die optische Mikroskopie immer mehr Einfluss in Anwendungen aus allen Bereichen der Naturwissenschaft. Schon Ende des 19. Jahrhunderts hat Ernst Abbe eine Definition des Auflösungsvermögens gegeben. Allerdings ist erst seit der Entwicklung des Lasers und der Weiterentwicklung der optischen Mikroskopie hin zur der konfokalen Mikroskopie (Minsky, 1955) möglich nach Kombination der beiden Entwicklungen, Objekte im Nanometerbereich aufzulösen. Obwohl die Auflösung anderer bildgebender mikroskopischer Verfahren wie der Raster-Elektronen-Mikroskopie höher ist, besitzt die optische Mikroskopie einen entscheidenden Vorteil. Insbesondere zeichnet sich die Lichtmikroskopie und vor allem die Fluoreszenzmikroskopie dadurch aus, dass sie nicht invasiv ist, d.h. es können Proben wie z.B. lebende Zellen bei minimaler Störung durch die Meßmethode untersucht werden. Die Fluoreszenzmikroskopie deckt einen großen Bereich an zeitlicher Dynamik und spektraler Breite ab, die mit hoher Auflösung gezielt untersucht werden können. Insbesondere die Fluoreszenzspektroskopie erlaubt Untersuchungen mit einer hohen Sensitivität. Es können einzelne Moleküle sichtbar und für spektroskopische Untersuchungen zugänglich gemacht werden. Nach den ersten erfolgreichen Einzelmolekülexperimenten in den Gruppen um M. Orrit, W. E. Moerner sowie R. A. Keller wurden Anfang der 90er Jahre frei diffundierende einzelne Moleküle in Lösung erstmals mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie detektiert [1-4]. In den folgenden Jahren zeigte sich, dass die nichtinvasive optische Mikroskopie aufgrund der unkomplizierten Messverfahren bei vielen Einzelmoleküluntersuchungen die Methode der Wahl ist [5-7].

Mit Hilfe von Ensemble-Experimenten können viele charakteristische Eigenschaften eines Farbstoffes direkt bestimmt werden, wie z.B. Absorptions- und Emissionsspektren, Quantenausbeute oder

Lebensdauer. Aber bei diesen Messungen verschwinden Informationen über das Zeitverhalten eines einzelnen Farbstoffmoleküls. Die Entwicklung der Fluoreszenzspektroskopie an einzelnen Molekülen eröffnet die Möglichkeit, diese einzelnen Systeme und dessen Eigenschaften zu beobachten und Informationen über Heterogenität zugänglich zu machen, wie z.B. Subpopulationen aufzudecken. Ein einzelner Farbstoff kann als Reporter seiner unmittelbaren Umgebung dienen und z.B. Änderungen der chemischen Umgebung, wie pH-Wert, Redoxpotential oder Sauerstoffgehalt des Lösungsmittels, mit einer Auflösung im Nanometerbereich übermitteln [8, 9].

Speziell bei bildgebenden Verfahren ist ein großer technischer Fortschritt im Bezug auf die Mikroskopiemethoden sowie auf die verwendeten biologischen Proben zu verzeichnen und es existieren bereits einige Verfahren, mit denen es möglich ist, die Beugungsgrenze zu brechen [10, 11]. Viele experimentelle Ansätze schaffen eine Verbesserung der Auflösung in allen drei Raumrichtungen, z.B. die 4Pi Mikroskopie, das Weitfeldmikroskopieverfahren I⁵M oder die Mikroskopie mit Hilfe von strukturierter Beleuchtung (structured illumination microscopy). Diese Methoden besitzen dennoch in der optischen Auflösung nur ca. 100 nm [12-14].

Um die Auflösungsgrenze weiter zu verbessern werden Methoden eingesetzt, die auf zwei unterschiedlichen Konzepten basieren. In der STED Mikroskopie (eng: Stimulated Emission Depletion Microscopy) wird der Bereich, aus der die Emission detektiert wird, räumlich eingeschränkt [15]. Im Experiment gelingt dies durch Einstrahlung eines zweiten Lasers, der gegenüber der Anregungswellenlänge rot verschoben und mit dem Anregungslaser überlagert ist. Der Farbstoff wird über das Prinzip der stimulierten Emission in den Grundzustand überführt und trägt nicht zum Fluoreszenzsignal bei. Die Auflösung wird bestimmt von der Größe der lokalen Nullstelle des als Doughnut abgebildeten Intensitätsprofils des STED-Lasers. Der Wirkungsquerschnitt der stimulierten Emission ist von der Intensität des Lasers

abhängig. Typischerweise sind Leistungen im Bereich von MW/cm^2 notwendig, um die Auflösung z.B. in lebenden Zellen auf 62 nm zu senken [16]. Das zweite Konzept beruht auf der Lokalisierung einzelner Farbstoffe, die stochastisch zwischen einem An- und Aus-Zustand reversibel geschaltet werden können. Für jeden An-Zustand wird die genaue Position des Farbstoffs über eine 2D-Gauss-Näherung der Punktabbildungsfunktion bestimmt. Die Präzision der Lokalisation hängt von der Anzahl der detektierten Photonen ab [17, 18]. Es existieren eine Vielzahl an experimentellen Methoden, die sich dieses Konzept der Lokalisation der genauen Molekülposition zu Nutze machen. An dieser Stelle sollen nur einige genannt werden: FIONA (fluorescence imaging with one nanometer accuracy), PALM (fluorescence photoactivation localisation microscopy), STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) oder auch dSTORM (direct stochastic optical reconstruction microscopy [19-27]).

Die Aussagekraft vieler Einzelmolekülexperimente ist nicht nur von der verwendeten Messtechnik abhängig sondern auch von den benutzten Fluoreszenzsonden. Insbesondere werden viele Untersuchungen durch die eingeschränkte Photostabilität der Farbstoffe limitiert. Die Photozerstörung ist eine intrinsische Eigenschaft aller Farbstoffe und erfolgt für typische Einzelmolekülfarbstoffe nach ca. 10^5 bis 10^7 Anregungszyklen. Zudem verhindert das sogenannte Blinken, d.h. vorübergehende Unterbrechung der Fluoreszenz, bei einzelnen Molekülen häufig eine genaue Quantifizierung von Prozessen. Die Entwicklung von Halbleiter-Nanokristallen mit einzigartigen spektroskopischen Eigenschaften ergänzt die breite Palette der organischen Farbstoffe. Nanokristalle zeichnen sich unter anderem über ein kontinuierliches Absorptionsspektrum, ein größenabhängiges Emissionsspektrum und eine ausgezeichnete Photostabilität aus [28]. Diese Kristalle können aufgrund des starken Blinkens auf verschiedenen Zeitskalen und ihrer räumlichen Ausdehnung in vielen Anwendungen herkömmliche organische Fluorophore, z.B. beim Einsatz des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET), nicht ersetzen. Daher ist ein besseres Verständnis der Photophysik einzelner Farbstoffmoleküle, sowohl bei

der Auswahl von Farbstoffen für ein bestimmtes Experiment, als auch für die Entwicklung neuer Farbstoffe, von besonderer Bedeutung. Besonders wichtig bei der Auswahl der Farbstoffe für ein Experiment sind ihre spektralen Eigenschaften, die Quantenausbeute sowie die Photostabilität.

Im Laufe der Zeit wurden immer mehr Farbstoffe von unterschiedlicher chemischer Struktur für den Einsatz in zahlreichen Anwendungen in allen Wellenlängenbereichen vom ultraviolethen über den sichtbaren bis in den infraroten Spektralbereich entwickelt. Umso wichtiger ist es die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe zu erforschen und zu verstehen. In den Fluoreszenzspuren von Farbstoffen sind unter verschiedenen chemischen Bedingungen Auszeiten zu erkennen. Diese Auszeiten können der Ausgangspunkt für die endgültige Photozerstörung sein. Farbstoffmoleküle können aber auch durch die Anwesenheit anderer Stoffe irreversibel zerstört werden, z.B. durch Sauerstoff. Dabei spricht man von einem Ausbleichen (engl.: bleaching) der Fluoreszenz [29, 30].

Eine bekannte Ursache für das Blinken ist der Übergang zum ersten angeregten Triplettniveau durch Intersystem crossing. Die Lebensdauer dieses Zustands liegt typischerweise im Bereich von mehreren Mikrosekunden bis hin zu mehreren Sekunden. Das Molekül kann während der Zeit im Triplettzustand nicht zum Fluoreszenzsignal beitragen. Ob einem bestimmten Aus-Zustand ein Übergang ins Triplett zugrunde liegt, lässt sich z.B. über die Sauerstoffabhängigkeit des Prozesses entscheiden, da dieser selbst dafür sorgt, dass die Triplettlebensdauer reduziert wird (Triplettquenching oder Triplettlöschung). Neben diesen Übergängen gelten radikalische Zustände als weitere Ursache für Auszeiten verschiedener Längen und Häufigkeiten in der Fluoreszenzemission. Diese können sowohl als Folge von Reduktion oder Oxidation des Farbstoffs aber auch weiterer reversibler Reaktionen und Elektronentransferprozesse auftreten, hervorgerufen z.B. durch den Einfluss von Sauerstoff [31]. Mit Hilfe der Autokorrelation können die Auszeiten für diese Prozesse berechnet

und den verschiedenen Übergängen bzw. Reaktionen zugeordnet werden [30].

Für viele Experimente können einzelne Moleküle in einer Matrix (z.B. Polymer) eingebettet oder auf einer Glasoberfläche immobilisiert werden. Ein Problem bei vielen photophysikalischen Untersuchungen auf Einzelmolekülebene ist, dass die leicht unterschiedliche Umgebung der einzelnen Moleküle zu einer inhomogenen Verbreiterung der Messergebnisse führen kann [32, 33].

Ziel dieser Arbeit ist es, die Photophysik einzelner Fluorophore so zu untersuchen, dass möglichst alle Moleküle einer homogenen chemischen Umgebung ausgesetzt sind, um die Eigenschaften genauer charakterisieren zu können. Um die Farbstoffe im weiteren Verlauf der Arbeit gezielt auf ihre photophysikalischen Eigenschaften hin untersuchen zu können, muss eine Möglichkeit gefunden werden, die Farbstoffe für die Messungen an Oberflächen zu verankern. Nur so ist eine Beobachtung eines Moleküls über ein Zeitintervall möglich, in dem die chemische Umgebung gezielt modifiziert werden kann. Um dies zu erreichen, muss gewährleistet sein, dass sich das Molekül in einer homogenen Umgebung befindet. Der Farbstoff wird mit Hilfe einer DNA mit einer Länge von 60 Basenpaaren, dies entspricht einer Länge von 20.4 nm, über der Oberfläche des Deckglases verankert, um das Molekül in Lösung beobachten zu können. Die Immobilisierung der Farbstoffe ermöglicht eine gezielte Modifizierung der chemischen Umgebung, wodurch eine direkte Zuordnung von Zuständen und Übergängen möglich wird [34].

Als Farbstoffklassen werden Oxazine, Rhodamine, Carbocyanine und Carborhodamine verwendet, da deren Vertreter wie beispielsweise MR121, ATTO655, RhG, Cy5 oder ATTO647N in vielen Experimenten verwendet werden [5, 10, 35-38]. Es wird gezeigt, dass sich die Farbstoffe in den photophysikalischen Eigenschaften unterscheiden und in verschiedener Weise auf die Änderung der chemischen Umgebung reagieren [39]. Neben der Charakterisierung der Photophysik wird die Optimierung der photophysikalischen

Eigenschaften im Vordergrund stehen. Dieses Wissen wird im zweiten Teil der Arbeit benutzt, um ein generelles Prinzip zur Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz und Reduzierung des Blinkens einzuführen [40]. Das Prinzip beruht auf der schnellen Rückführung des Farbstoffs aus dem Triplet in den Grundzustand. Mit Hilfe einer Kombination von Reduktions- und Oxidationsreaktionen kann die gewünschte Rekombination durchgeführt werden, die zudem unabhängig von der verwendeten Farbstoffklasse ist. Die Anwendung in der hochauflösenden STED Mikroskopie, die zu Auflösungen im Bereich von 25 nm für einzelne Farbstoffmoleküle führt, wird gezeigt [41]. Für diese Methode ist es von entscheidender Bedeutung, dass der Farbstoff eine gute Photostabilität besitzt und die Fluoreszenz nicht von Auszeiten durch Blinken unterbrochen wird.

Im letzten Kapitel steht die Farbstoffklasse der Carbocyanine, wie z.B. die häufig verwendeten Farbstoffe Cy5 und Alexa647 im Vordergrund. Diese zeichnen sich durch eine besonders komplexe Photophysik aus. Neben erwarteten Prozessen wie Triplet-Blinken und Cis-Trans Isomerisierung konnten für diese Farbstoffe weitere Auszustände und zusätzlich ein komplexes Photobleichverhalten festgestellt werden [42]. Außerdem lassen sich diese Farbstoffe mit zwei verschiedenen Anregungswellenlängen zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen gezielt und reversibel schalten [43, 44]. Dabei handelt es sich um einen fluoreszierenden und einen nicht-fluoreszierenden Zustand. Die Grundbedingungen, unter denen ein Cy5-Molekül reversibel an- und ausgeschaltet werden kann, sollen vorgestellt und diskutiert werden. Außerdem wird der Schaltvorgang in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Mechanismus eingehend überprüft. Die Anwendung in der hochauflösenden Mikroskopie wird erläutert [26]. Die für diese Methode notwendigen Photoschalter stellen im Gegensatz zur STED Mikroskopie unterschiedliche Bedingungen an die verwendeten Farbstoffe. Ein kontrollierbarer Aus-Zustand des verwendeten Farbstoffs mit einer Lebensdauer im Millisekundenbereich ist ausdrücklich erwünscht. Außerdem soll der Farbstoff reversibel zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht-fluoreszierenden Zustand wechseln. Dies kann sowohl photoinduziert, als auch über

Einleitung

Manipulation der Photophysik mit Hilfe spezieller Reagenzien geschehen [27]. Die dafür notwendigen experimentellen Eigenschaften sowie die verwendeten Farbstoffe und Pufferzusätze werden erläutert.

2 Theorie und Grundlagen

Im folgenden Abschnitt werden die zugrundeliegenden Theorien zu dieser Arbeit eingeführt. Neben der Theorie zur Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie, hier insbesondere die Wechselwirkung von Laserstrahlung mit den verwendeten organischen Farbstoffen, wird besonderer Wert auf die verwendeten mikroskopischen Verfahren gelegt. Um verstehen zu können, warum es möglich ist, einzelne Moleküle zu beobachten, werden die dafür notwendigen Techniken beschrieben und erklärt.

2.1 Absorption und Fluoreszenz

Bei einem einzelnen Atom ist die Energie der Zustände überwiegend in elektronischen Niveaus gespeichert, wohingegen bei Molekülen - mindestens zwei kovalent gebundenen Atomen - weitere Freiheitsgrade hinzukommen, sogenannte Rotations- und Schwingungsniveaus. Wie der Name schon sagt, handelt es sich dabei entweder um Rotationen um Bindungen und den Schwerpunkt des Moleküls oder Schwingungen der atomaren Bindungen [45]. Im Verlauf der Arbeit wird nur über die Anregung von Molekülen gesprochen, da es sich bei den verwendeten Farbstoffen um Moleküle aus mehreren kovalent gebundenen Atomen handelt.

Für den Prozess der Absorption spielt die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischen Wellen mit Molekülen eine entscheidende Rolle. Die für die Absorption benötigte Energie wird von einem Photon bereitgestellt. Die Energie kann nach Max Planck wie folgt berechnet werden kann [46]:

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda}$$

wobei als h das Plancksche Wirkungsquantum definiert ist, c ist die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und ν die Frequenz der elektromagnetischen Welle, bzw. λ deren Wellenlänge. Diese Energie muss ausreichend groß sein, typischerweise $E = 1-10$ eV, um den Übergang des Elektrons aus dem energetisch niedrigsten Zustand S_0 zu einem energetisch höheren Zustand S_1 oder allgemein S_n anzuheben [47]. Die verschiedenen Anregungen lassen sich über die dafür notwendige Energie und damit über das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung trennen. Energien von Rotationsübergängen liegen im Bereich von $E = 0.001$ eV, dies entspricht einer Strahlung im fernen Infrarot bzw. von Mikrowellen mit einer Wellenlänge von ca. $\lambda = 10^{-4}$ m. Die Energie von Schwingungsübergängen liegt bei $E = 0.1$ eV im Infraroten mit $\lambda = 10^{-7}$ m und die Energie elektronischer Übergänge liegt bei $E = 1-10$ eV, im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich mit $\lambda = 10^{-9}$ m.

Die Besetzung der Energieniveaus im thermodynamischen Gleichgewicht folgt der sogenannten Boltzmann-Verteilung:

$$\frac{N_i}{N_j} = e^{-(E_i - E_j)/kT}$$

N_i und N_j stehen für die Besetzungszahlen und E_i und E_j für die Energien der jeweiligen Niveaus, für die gilt $E_i < E_j$. T ist die Temperatur und k die fundamentale Boltzmannkonstante ($k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K). Mit Hilfe dieser Verteilung kann man berechnen, dass sowohl höhere Rotationsniveaus als auch höhere Schwingungsniveaus bei Raumtemperatur besetzt sein können, wohingegen für die elektronische Anregung zusätzliche Energie bereitgestellt werden muss.

Im folgenden Diagramm, einem sogenannten Jablonski-Diagramm, wird ein Überblick über eine Auswahl von Übergängen gegeben. Die möglichen Übergangsarten sind aufgezeichnet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die möglichen Rotationsniveaus und deren Übergänge nicht dargestellt.

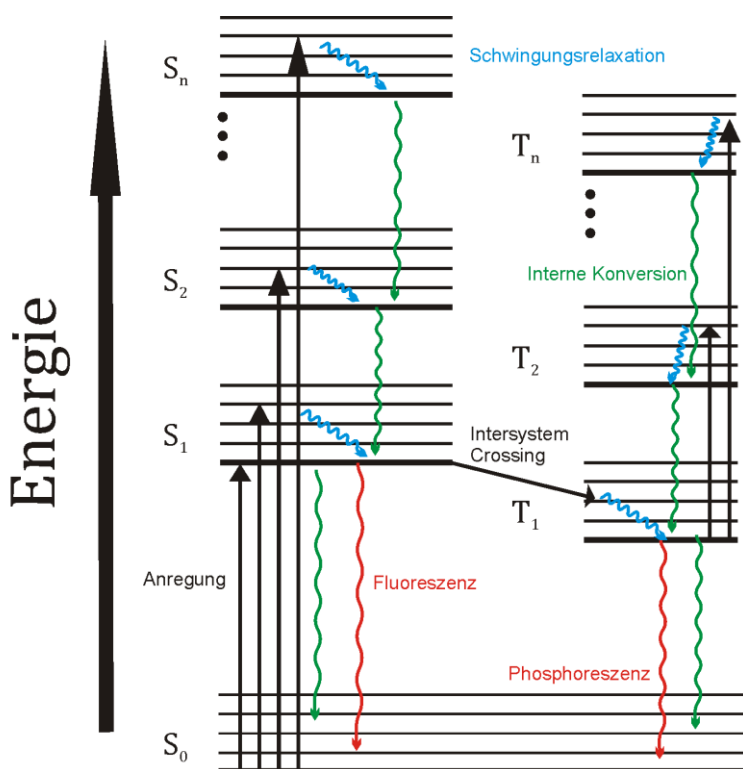


Abbildung 2.1.1: Schematisches Jablonski-Diagramm der möglichen Übergänge in einem Molekül. Farblich gekennzeichnet sind die Übergänge dargestellt.

Eine Unterscheidung der Singulett- oder Triplet-Zustände erfolgt aus der Quantenmechanik über den Spin der Elektronen. In Singulett-zuständen sind die Spins der Elektronen antiparallel und in Tripletzuständen haben die Elektronen einen parallelen Spin [48]. Aus diesen beiden Zustandsarten kann ein Elektron in weitere Zustände wechseln, wobei hier reduzierte als auch oxidierte Zustände sowie intermediäre Zwischenzustände von Folgereaktionen zusammen-

gefasst werden. Für die grundlegende Beschreibung von Absorption und Emission spielen diese Zustände zunächst keine besondere Rolle, werden aber im weiteren Verlauf dieser Arbeit diskutiert.

Die einzelnen elektronischen Niveaus ($S_0, S_1 \dots S_n, T_1, T_2 \dots T_n$) spalten sich in eine Vielzahl von Rotations- und Schwingungsniveaus auf. Um über eine Absorption eine Anhebung eines Elektrons aus dem Grundzustand S_0 in einen energetisch höher gelegenen Zustand S_1 oder S_n zu ermöglichen, muss das absorbierte Photon die minimale Energie $E_{S_1} - E_{S_0}$ aufbringen. Nur in seltenen Fällen entspricht diese Energie exakt der Differenz der beiden Niveaus, deshalb ist eine Anregung in ein Rotations- oder Schwingungsniveau des nächsten elektronischen Zustands wahrscheinlich. Nach der Regel von Kasha erfolgt die Rekombination des elektronischen Niveaus aus dem jeweilig niedrigsten Rotations- und Schwingungszustand des betroffenen Niveaus [49]. Nach der Absorption eines Photons folgt der Prozess der Rotations- bzw. Schwingungsrelaxation in dieses Niveau. Für den direkten elektronischen Übergang von S_1 nach S_0 existieren zwei konkurrierende Prozesse: radiativ unter Aussendung eines Photons, dann spricht man von Fluoreszenz, oder nichtradiativ, d.h. strahlungslos durch interne Konversion. Bei der Emission entspricht die Energiedifferenz der beteiligten Niveaus der Wellenlänge des Fluoreszenzlichts:

$$\Delta E = E_{S_1} - E_{S_0} = h * \frac{c}{\lambda}$$

Das Elektron kann über einen Übergang in den Triplettzustand in den Grundzustand zurückkehren, dann spricht man vom Intersystem Crossing. Wie bereits erwähnt, ist dieser Übergang aufgrund des Pauliprinzipis eigentlich verboten. Die Übergangswahrscheinlichkeit ist klein und besitzt als Folge eine relativ lange Lebensdauer (siehe Tabelle 2.1) [48]. Diese Übergangswahrscheinlichkeit wird dabei vornehmlich von den Moleküleigenschaften, der chemischen Umgebung und von der verwendeten Anregungsleistung bestimmt. Aus dem Triplettzustand kann ein Übergang zurück zum Grundzustand

entweder unter Aussendung eines Photons (Phosphoreszenz) oder strahlungslos erfolgen. Außerdem kann ein Übergang in einen weiteren Zwischenzustand, z.B. durch eine Oxidation des Moleküls erfolgen. Aus der erwähnten Regel von Kasha ergibt sich ein weiterer wichtiger Effekt, die sogenannte Stokes-Verschiebung. Sie besagt, dass die Emissionswellenlänge zu längeren Wellenlängen mit niedrigeren Frequenzen als die Anregungswellenlänge verschoben ist. Die „Energieverluste“ können dabei durch die interne Konversion der Schwingungs- oder Rotationsniveaus erklärt werden. Die Breite der Stokes-Verschiebung ist abhängig vom angeregten Molekül. Sie beträgt in der Regel aber zwischen 20 und 40 nm, wie am Beispiel von Cy5 in Abb. 2.1.2 gezeigt wird.

Eine Übersicht über die möglichen Übergänge, ihre Raten und die typischen Relaxationszeiten sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Darstellung der Übergangsarten, Übergangsraten und typischen Relaxationszeiten [47].

Beschreibung	Typische Zeit [s]	Reaktionsrate [1/s]
Absorption ($S_0 \rightarrow S_1 \dots S_n$)	$\sim 10^{-15}$	k_{anr}
Interne Konversion ($S_n \rightarrow S_1$)	$> 10^{-12}$	k_{ik}
Schwingungsrelaxation ($S_1 \rightarrow S_1$)	$> 10^{-11}$	K_{sr}
Fluoreszenz ($S_1 \rightarrow S_0$)	$10^{-9} - 10^{-6}$	k_{fl}
Strahlungsloser Übergang ($S_1 \rightarrow S_0$)	$10^{-7} - 10^{-6}$	$k_{\text{süs}}$
Intersystem Crossing ($S_1 \rightarrow T_1$)	$10^{-11} - 10^{-6}$	k_{isc}
Phosphoreszenz ($T_1 \rightarrow S_0$)	$10^{-3} - 10^2$	K_{ph}
Strahlungsloser Übergang ($T_1 \rightarrow S_0$)	$10^{-3} - 10^4$	$k_{\text{süt}}$

Häufig werden die Raten für die einzelnen Übergänge, anstatt der typischen Lebensdauern, zur Beschreibung benutzt. Dabei besteht folgender Zusammenhang zu den Relaxationszeiten:

$$k = \frac{1}{\tau}$$

Hierbei steht k für die Rate des jeweiligen Übergangs und τ für die Lebensdauer des Zustands. Die Raten geben an, wie sich ein Zustand über die Zeit verändert. Viele Übergänge sind aus mehreren Einzelreaktionen zusammengesetzt, die in die jeweiligen Raten mit einfließen.

Die Gesamtheit aller Übergänge und die auf die Absorption folgenden Reaktionen bezeichnet man als die Photophysik des jeweiligen Moleküls. Neben der Photophysik existiert für jedes Farbstoffmolekül ein typisches Spektrum der Absorption und Emission, das über die räumliche Struktur des Moleküls und die dazu beitragenden Atome bestimmt wird.

In Abbildung 2.1.2 ist die bereits erwähnte Stokes-Verschiebung zwischen dem Maximum der Absorption (blau) und der Emission (rot) deutlich zu erkennen. Für das Beispiel des Cyanin-Farbstoffes Cy5 beträgt die gemessene Verschiebung 20 nm.

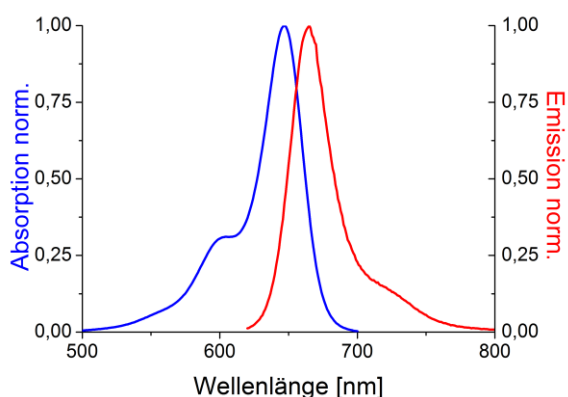


Abbildung 2.1.2: Absorption und Emission eines Cy5-Farbstoffs, gemessen in PBS (engl.: phosphate buffered saline, pH 7.4) bei Anregung mit 633 nm (HeNe-Laser).

Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute

Um einen Farbstoff hinreichend beschreiben zu können, benötigt man weitere experimentelle Parameter. Die wichtigsten Parameter werden im folgenden Abschnitt erklärt; es handelt sich dabei um die Fluoreszenzlebensdauer und die Quantenausbeute. Beide Eigenschaften sind für den jeweiligen Farbstoff charakteristisch und sind besonders von der Molekülstruktur und der chemischen Umgebung, z.B. der Polarität des Lösungsmittels, abhängig.

Die Quantenausbeute ist definiert, als die Energiebilanz der Fluoreszenz, dem Verhältnis der emittierten Photonen zu absorbierten Photonen. Damit ist die Quantenausbeute ein direktes Maß für die Effizienz, mit der ein Farbstoff die absorbierte Energie in Fluoreszenzlicht umwandelt. Im Jablonski-Diagramm (siehe Abb. 2.1.1) kann man erkennen, wie sich dieser Parameter zusammensetzt. Dafür teilt man die einzelnen Prozesse, die den ersten angeregten Zustand entvölkern, in zwei Kategorien: strahlende Übergänge (radiativ; k_r) und nichtstrahlende Relaxationen (nicht radiativ; k_{nr}). Damit wird die Quantenausbeute definiert als:

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Als radiativen Prozess bezeichnet man die Fluoreszenz ($k_r = k_f$). Die Gesamtheit aller nichtradiativen Prozesse setzt sich zusammen aus der Übergangsrate für die interne Konversion k_{ik} , der Übergangsrate in den Triplettzustand k_{isc} und einer weiteren Rate k_Q , in der alle weiteren nichtradiativen Prozesse, die den ersten angeregten Zustand depopulieren, wie z.B. Photozerstörung, zusammengefasst werden:

$$k_{nr} = k_{ic} + k_{isc} + k_Q$$

Die radiative Rate wird über die Lebensdauer des ersten angeregten Zustands bestimmt, der Fluoreszenzlebensdauer. Typischerweise folgt diese Lebensdauer einer exponentiellen Kinetik, weil das System

bestrebt ist, den energetisch günstigsten Zustand anzunehmen. In diesem Fall ist dies der nicht angeregte Grundzustand. Die Kinetik kann über den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität bestimmt werden:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

Dabei beschreibt $I(t)$ die Intensität in Abhängigkeit von der Zeit t , mit I_0 als Intensität zum Zeitpunkt $t=0$ und τ als der mittleren Lebensdauer eines Elektrons im ersten angeregten Zustands, bevor es unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand zurückkehrt. Man spricht dann von der Fluoreszenzlebensdauer, der Zeit in der die Gesamtintensität auf $1/e$ der Anfangsintensität abgefallen ist. Falls ein mono-exponentieller Abfall nicht ausreicht, um die Daten hinreichend zu beschreiben, kann man die Gleichung für multi-exponentielle Abfälle erweitern:

$$I(t) = I_0 * \sum_n A_n e^{-t/\tau_n}$$

A_n repräsentiert hierbei die relative Amplitude der jeweiligen Funktion zum Gesamtanteil, I_0 die Anfangsintensität der Fluoreszenz und τ_n die Lebensdauer der jeweiligen exponentiellen Komponente.

Die experimentelle Erfassung der Fluoreszenzlebensdauer erfolgt über das sogenannte zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen (engl: time correlated single photon counting) nach der Start-Stopp Methode.

Dabei verwendet man eine gepulste Anregungslichtquelle - in den meisten Fällen einen Laser mit geeigneter Wellenlänge - die das Start-Signal für die Messung liefert. Das auftreffende Photon definiert das Stopp-Signal, die Zeit zwischen Start und Stopp wird gemessen. Nach mehrmaligem Wiederholen der Messung erhält man ein Histogramm über die Verteilung der Ankunftszeiten eines Photons (siehe Abb. 2.1.3).

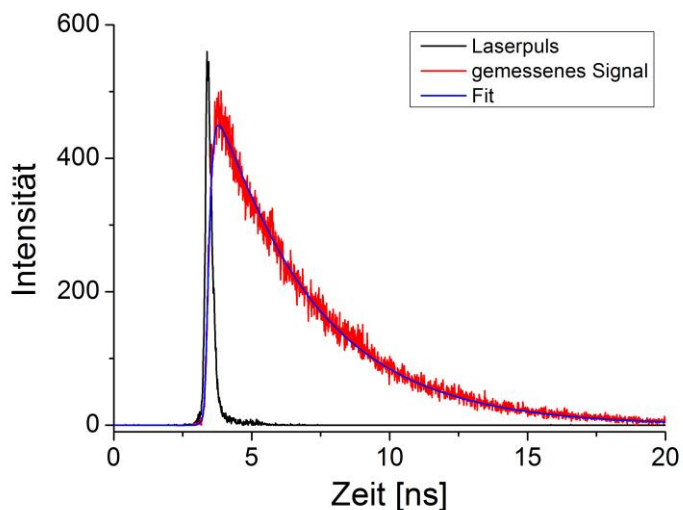


Abbildung 2.1.3: Verteilung über die Ankunftszeiten einzelner Photonen in einem Experiment zur Lebensdauerbestimmung des Farbstoffes ATTO647N.

Mit Hilfe einer exponentiellen Näherung über die vorhandenen Messdaten kann man die Fluoreszenzlebensdauer bestimmen. Dabei ist zu beachten, dass der Laserpuls eine bestimmte Breite besitzt. Diese ist im Allgemeinen eine Größenordnung niedriger als die Fluoreszenzlebensdauer, aber dennoch lang genug, um Moleküle anzuregen, nachdem ein Teil der Moleküle schon in den Grundzustand zurückgekehrt ist. Dies führt zu einer Verschiebung der Abklingkurve $R(t)$ zu längeren Zeiten. Die eigentliche Fluoreszenzabklingkurve $F(t)$ ist mit den Impulsantworten von Laser und Detektor $L(t)$ vermischt. Diese Verschiebung kann nachträglich aus dem Signal korrigiert werden. Dafür betrachtet man das gemessene Signal $R(t)$ und teilt dieses in zwei mögliche Anteile auf: das Zeitprofil des Lasers inklusive Detektors $L(t)$ und das tatsächliche Fluoreszenzsignal des Farbstoffes $F(t)$. Das Zeitprofil der Impulsantwort von Laser und Detektor wird mit einer Streulösung ohne fluoreszierende Farbstoffe bestimmt. Die beiden Signalanteile sind über eine Faltung miteinander verknüpft [49].

$$R(t) = L(t) \otimes F(t)$$

$$R(t) = \int_0^t L(t^*)F(t - t^*)dt^*$$

Die Entfaltung der beiden Funktionen folgt einem nicht differenziell lösbaeren mathematischen Modell. Deshalb muss es numerisch gelöst werden und man führt als Näherungsverfahren die Methode der geringsten Abweichung (engl.: least-squares-fit) ein. Dabei wird ein Messsignal $R_g(t)$ generiert bzw. abgeschätzt. Anschließend wird dieses Signal mit dem gemessenen Signal verglichen und die Abweichung zwischen beiden wird bestimmt. Der Vergleich findet über folgende Vorschrift statt:

$$X^2 = \sum_{i=1}^n g_i (R(t) - R_g(t))^2$$

X^2 ist dabei das Maß für die Güte der Abschätzung und g_i ein Gewichtungsfaktor für die Qualität der Näherung $1/R_i(t)$. Der Vorgang wird sooft wiederholt, bis X^2 in einem Intervall zwischen 0,9 bis 1,2 liegt.

Zusammen mit dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Spektrum des Farbstoffmoleküls und den Parametern Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer kann man einen Farbstoff hinreichend charakterisieren.

Fluoreszenzlöschung

Als Fluoreszenzlöschung (engl.: quenching) bezeichnet man die Gesamtheit von Wechselwirkung der Farbstoffe mit Molekülen, sowohl Farbstoffmoleküle als auch Moleküle aus der umgebenden Lösung, die stattfinden, während sich der Farbstoff im ersten

elektronisch angeregten Zustand befindet. Dadurch wird dem angeregten Molekül ein Elektron zur Verfügung gestellt. Es findet eine strahlungslose Rekombination in das Grundniveau S_0 statt. Die wichtigsten bimolekularen Löschprozesse sind in der folgenden Tabelle angeführt.

Tabelle 2.1.2: Überblick über die wichtigsten bimolekularen Löschprozesse zur Depopulierung eines Farbstoffs aus dem ersten angeregten elektronischen Zustand.

Energietransfer	$F_D^* + F_A \rightarrow F_D + F_A^*$
Elektronentransfer	$F^* + Q \rightarrow F^\pm + Q^\pm$
Protonentransfer	$F^* + Q-H \rightarrow F-H^+ + Q^-$
Exiplexbildung	$F^* + F \rightarrow (FF)^*$
Dimerbildung	$F + F \rightarrow (FF) \rightarrow (FF)^*$

Den Energietransfer kann man als Übertragung der Anregungsenergie beschreiben, dabei gibt der angeregte Farbstoff, der Donor, seine Energie an einen zweiten Farbstoff, den Akzeptor, weiter. Man unterscheidet grundsätzlich zwei Arten von Energietransfer, die sich über den Abstand der beiden Moleküle definieren. Bei dem sogenannten Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) für Molekülabstände zwischen 2 und 10nm und den Dexter Mechanismus bei Abständen im Sub-Nanometerbereich [50]. Bei beiden Transferarten findet über die Dipol-Dipol Wechselwirkung der beiden beteiligten Moleküle eine Energieübertragung statt. FRET stellt hierbei den prominenteren und in Einzelmolekülexperimenten häufig verwendeten Mechanismus dar, mit dessen Hilfe sich Abstände in Molekülen über die Effizienz der Energieübertragung bestimmen lassen. Mit Hilfe der abstandsabhängigen Rate des Energietransfer k_T ,

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

kann man die Energieeffizienz der Übertragung bestimmen:

$$E = \frac{k_T}{\tau_D^{-1} + k_T} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

R_0 steht hierbei für den Abstand der beiden Moleküle, bei dem die Energieeffizienz genau 50% beträgt, r ist der eigentliche Molekülabstand und τ_D ist die Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors.

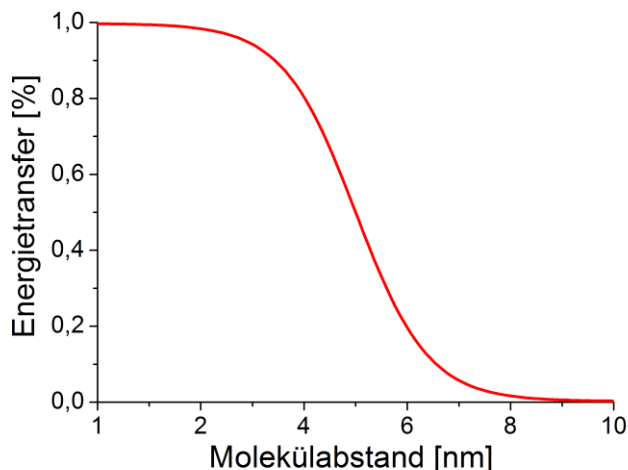


Abbildung 2.1.4: Schematische Darstellung der Energietransfereffizienz in Abhängigkeit vom Molekülabstand r .

Für die Messungen bedeutet dieser Zusammenhang, dass man mit der Einzelmolekülspektroskopie Molekülabstände unter 10 nm bestimmen kann. Dafür benutzt man die weitaus praktischeren Beziehungen:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D}$$

I_{DA} repräsentiert die Intensität der Fluoreszenz und τ_{DA} die Lebensdauer, wenn Donor und Akzeptor vorhanden sind, I_D die Fluoreszenzintensität und τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors.

Ein weiterer wichtiger Löschmechanismus ist der sogenannte Elektronentransfer. Damit ein Elektron ausgetauscht werden kann, müssen die Moleküle bzw. die Molekülorbitale in direkten Kontakt treten. Der Löschmechanismus ist abhängig von der Konzentration des Löschmoleküls und ist diffusionskontrolliert. Man teilt die Löschung in zwei übergeordnete Modelle ein, die dynamische oder die statische Fluoreszenzlöschung [49].

Bei der dynamischen Löschung findet ein Stoß zwischen Löschmolekül – auch Quencher genannt - und Farbstoff statt. Der Elektronenübertrag erfolgt simultan. Bei der statischen Fluoreszenzlöschung bilden Löschmolekül und Farbstoffmolekül einen Grundzustandskomplex mit einer bestimmten Lebensdauer. Während dieser Komplexbildung erfolgt der Elektronenaustausch. Beide Prozesse sind linear abhängig von der Konzentration des Löschmoleküls und somit abhängig von der Diffusion.

Für die dynamische Löschung muss, während der Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffs im ersten angeregten Zustand, ein Stoß mit einem Löschmolekül erfolgen. Es gilt die Stern-Vollmer Gleichung:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_L \tau_0 [L]$$

wobei I_0 die Fluoreszenzintensität und τ_0 die Fluoreszenzlebensdauer ohne Löschmoleküle und I bzw. τ Intensität und Zeitkonstante in Anwesenheit des Löschmoleküls in der Konzentration $[L]$ ist. Die Rate der Löschung wird repräsentiert durch k_L .

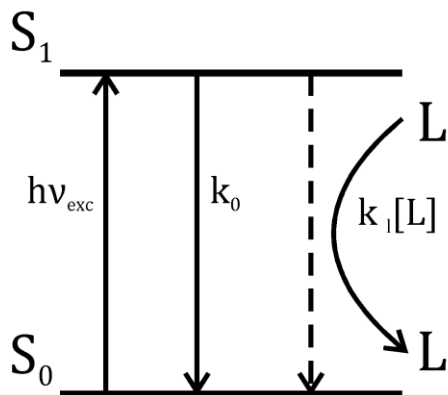


Abbildung 2.1.5: Dynamische Löschung der Fluoreszenz eines Farbstoffs durch Stoß mit den Löschmoleküle der Konzentration [L].

Der Farbstoff vollzieht einen strahlungslosen Übergang zurück in den Grundzustand. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Löschmolekülkonzentration [L] und der Rate der Fluoreszenzlöschung k_L .

Der zweite wichtige Löschmechanismus ist die statische Fluoreszenzlöschung, bei der Fluoreszenzfarbstoff und das Löschmolekül einen Komplex im Grundzustand bilden. Wird dieser Komplex angeregt, fluoresziert er nicht, sondern fällt durch Elektronenaustausch zwischen beiden Reaktionspartnern simultan zurück in das Grundniveau S_0 . Deshalb ändert sich die gemessene Fluoreszenzlebensdauer während der Messung nicht und der nicht gelöschte Farbstoff fluoresziert weiterhin mit der Lebensdauer τ_0 . Die Konzentration der fluoreszierenden Farbstoffe wird wegen der Komplexbildung verringert. Die Fluoreszenzintensität ist abhängig von der vorhandenen Löschmolekülkonzentration [L]. Für die Komplexbildungsrate K_S besteht folgender Zusammenhang zur Konzentration [L]:

$$K_S = \frac{[FQ]}{[F] + [Q]}$$

Die Rate für die Bildung des Grundzustandskomplexes ist direkt mit den Konzentrationen von Quencher und Fluorophor verknüpft.

Aus diesem Zusammenhang wird ersichtlich, dass weiterhin die Stern-Vollmer Gleichung für die Abhängigkeit der Intensität der Fluoreszenz von der Konzentration der Löschmoleküle gilt:

$$\frac{F_0}{F} = 1 - K_S[L]$$

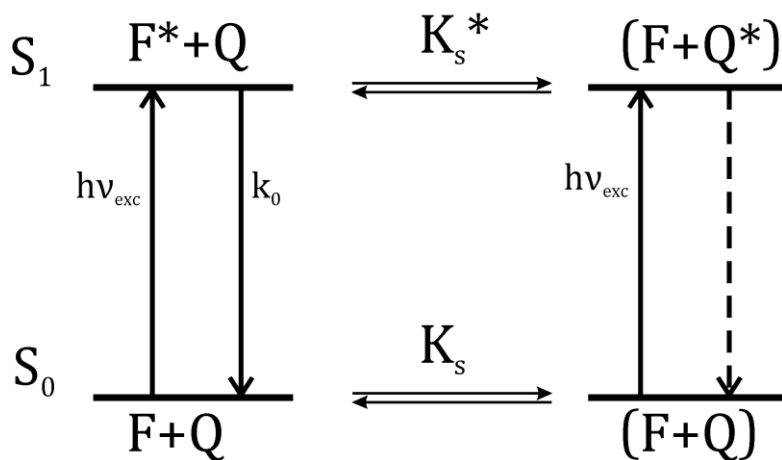


Abbildung 2.1.6: Statische Löschung der Farbstofffluoreszenz durch Bildung eines Grundzustandskomplexes zwischen Farbstoff und Löschmolekül.

Für viele Löschexperimente kann man aufgrund von Lebensdauermessungen zwischen dynamischer und statischer Löschung unterscheiden. Es existieren Ausnahmen, bei denen es zu einer Überlagerung der Löschprozesse kommt. Diese lassen sich in verschiedenen Methoden unterscheiden, auf die hier nicht weiter eingegangen wird [49].

Photoinduzierter Elektronentransfer

Im folgenden Kapitel wird ein Spezialfall des Elektronentransfers, der photoinduzierte Elektronentransfer, diskutiert. Er ist nicht nur wichtig für die Photosynthese in Pflanzen, die Energiegewinnung aus Sonnenlicht, sondern spielt in den folgenden Kapiteln eine wichtige Rolle [51].

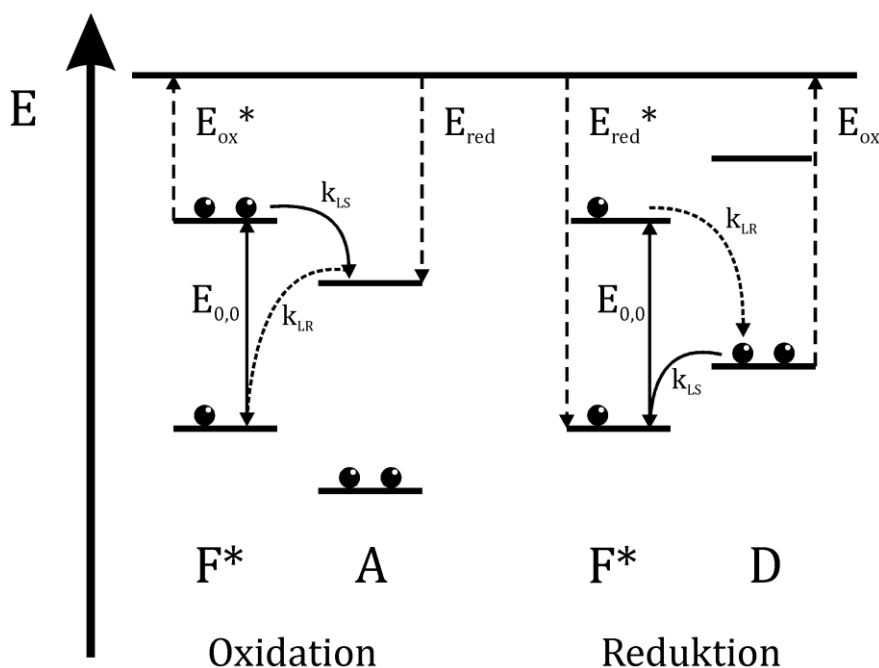


Abbildung 2.1.7: Energieschema des photoinduzierten Elektronentransfers zwischen einem Farbstoff im angeregten Zustand und eines Elektronendonors bzw. Elektronenakzeptors, inklusive den Raten für Ladungsseparation k_{LS} und Ladungsrekombination k_{LR} .

Ausgehend von der Anregung des Farbstoffs ändern sich die elektronischen Moleküleigenschaften im S_1 Zustand und ermöglichen, je nach Reaktionspartner, eine Oxidation oder Reduktion des Farbstoffs. Nach der Absorption eines Photons, fehlt im höchsten

besetzten Molekülorbital (engl.: highest occupied molecular orbital, HOMO) ein Elektron, dass in das energiereichere niedrigste unbesetzte Molekülorbital übergeht (engl.: lowest unoccupied molecular orbital, LUMO); es entsteht ein „Elektronenloch“. Dadurch wird das Ionisierungspotential des Moleküls herabgesetzt, wodurch dieses leichter oxidiert bzw. reduziert werden kann.

Die Übergangsenergie $E_{0,0}$ ist hierbei die Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand S_0 und dem ersten angeregten Zustand S_1 . Bei der Oxidation erfolgt der Ladungsaustausch in das erste elektronische Niveau des Elektronenakzeptors mit anschließender Ladungsrekombination in das Grundniveau. Bei der Reduktion erfolgt der Ladungsaustausch aus dem Grundniveau des Elektronendonors in das Grundniveau des Farbstoffmoleküls, die Rekombination erfolgt aus dem angeregten Zustand. Ob es sich bei der Reaktion um eine Oxidation oder Reduktion des Farbstoffes handelt, ist abhängig vom Reaktionspartner bzw. von der Lage der Energieniveaus (siehe Abb. 2.1.7). Die Energiebilanz der Reaktion hängt von der freien Reaktionsenthalpie für die Ladungsseparation ab. Sie kann mit Hilfe der klassischen Rehm-Weller Gleichung bestimmt werden, die um den Coulomb-Term ergänzt wird:

$$\Delta G_{LS}^0 = E_{Ox} - E_{Red} - E_{0,0} + \Delta G_{Coul}^0$$

mit

$$\Delta G_{Coul}^0 = \frac{-e^2}{\epsilon_r r}$$

wobei der Coulomb-Term die abstandsabhängige Anziehung der beiden Reaktionspartner beinhaltet. Sie muss in die Enthalpieberechnung miteinbezogen werden, wobei r den Abstand der Moleküle untereinander und ϵ_r die relative Permittivität beschreibt. E_{Ox} ist das erste Einelektronen-Oxidationspotential des Donors, E_{Red} das Einelektronen-Reduktionspotenzial des Akzeptors und $E_{0,0}$ die

bereits erwähnte Energiedifferenz von S_0 und S_1 . Mit der Rehm-Weller Gleichung gelangt man zu einer ersten Abschätzung darüber, ob die Reaktion überhaupt stattfinden kann.

2.2 Konfokale Mikroskopie

In der heutigen Mikroskopie unterscheidet man Nahfeld- und Fernfeldmethoden. In der Nahfeldmikroskopie wird zur Anregung der Probe ein evaneszentes Feld benutzt, z.B. bei der Raster-Nahfeld-Mikroskopie (eng.: scanning nearfield optical microscopy; SNOM), bei der eine Spitze mit kleinerem Durchmesser als die benutzte Wellenlänge dieses Feld erzeugt [52]. Ein weiterer wichtiger Vertreter dieser Mikroskopieklasse ist die Weitfeld-Mikroskopie mit Totalreflexion die in den nächsten Kapiteln erläutert wird. Bei Fernfeld-Methoden wird ein fokussierter Laserstrahl oder ein Strahlbündel für die Anregung benutzt, dies ist z.B. bei der konfokalen Mikroskopie der Fall. Zunächst wird das prinzipielle Konzept der Mikroskopie erläutert, bevor eine genauere Unterscheidung eingeführt wird.

Mit Hilfe der herkömmlichen Lichtmikroskopie lassen sich durch die starke Vergrößerung über ein Linsensystem - bestehend aus Objektiv und Okular - Größen im Submikrometerbereich für das menschliche Auge sichtbar darstellen. Die Vergrößerung hängt dabei von den verwendeten Linsen ab. Über das Objektiv wird ein Bild in der Zwischenbildebene erzeugt, das wiederum über ein Okular in der Bildebene abgebildet wird. Ein herkömmliches Lichtmikroskop erreicht eine laterale Auflösung von ca. 500nm und axial ca. 800nm [53]. Als Auflösung definiert man den Abstand zweier Punkte, die über das Mikroskop gerade noch voneinander unterscheidbar abgebildet werden können. Das sogenannte Rayleigh-Kriterium beschreibt diesen Vorgang:

„Zwei Punktobjekte können gerade noch getrennt werden, wenn das Maximum des einen Beugungsmusters mit dem ersten Minimum des anderen zusammenfällt.“ [54]

Die sogenannte Airy-Scheibe, das zweidimensionale Beugungsmuster einer Punktlichtquelle, hilft bei der Berechnung des tatsächlichen Abstands zweier noch zu trennender Punkte:

$$r_{Airy} = 1,22 * \frac{\lambda}{2 * NA}$$

NA ist die Numerische Apertur des Objektivs, λ die Laserwellenlänge. Man verwendet Laser als Lichtquellen, weil sie sich durch monochromatisches Licht auszeichnen.

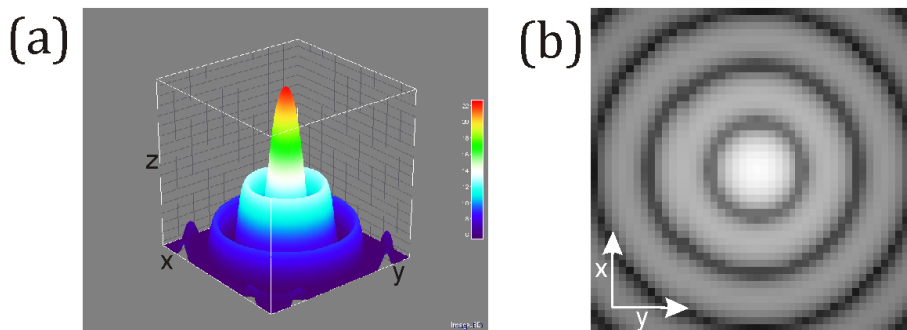


Abbildung 2.2.1: Darstellung der Intensitätsverteilung des verwendeten Lasers im Fokus (a:3-D, b:2-D→Airy-Scheibe), Wellenlänge 633nm, Apertur des Objektivs 1,45 und Brechungsindex des Öl 1,5.

In Abbildung 2.2.1 ist das Intensitätsprofil einer Punktlichtquelle als Airy-Scheibe abgebildet. Man kann die Interferenzen sowohl konstruktiv - helle Bereiche - als auch destruktiv - dunkle Bereiche – eindeutig erkennen. Im Idealfall ist nur im Zentrum des Fokus die Energiedichte groß genug für eine Anregung des Farbstoffs.

Die konfokale Mikroskopie ist eine technische Weiterentwicklung der herkömmlichen Lichtmikroskopie. Dabei wird das Objektiv nicht nur zur Anregung der Probe, sondern auch zum Abbilden der

entstehenden Fluoreszenz genutzt. Die beiden Foki fallen in der Objektebene zusammen. Dadurch gelingt es, das gesamte Anregungsvolumen auf den verwendeten Detektoren abzubilden. Das Bild wird nicht in der Zwischenbildebene erzeugt und vergrößert, sondern 1:1 auf dem Detektor abgebildet. Das punktförmige Anregungsvolumen des Laserfokus kann axial durch eine Lochblende von störenden Rauschsignalen befreit werden. Das typische Beobachtungsvolumen liegt bei einem konfokalen Mikroskop im Bereich von wenigen Femtolitern und wird über die Qualität des Laserfokus bestimmt. Ein paralleler Laserstrahl wird über einen dichroitischen Strahlteiler in das Objektiv abgelenkt. Dieser Strahlteiler ermöglicht es, das Laserlicht zu reflektieren und gleichzeitig die Fluoreszenz zu transmittieren. Im Detektionsarm, der Teil des Mikroskops unterhalb des Strahlteilers, wird das Anregungsvolumen über eine Lochblende räumlich gefiltert und mit Hilfe einer Tubuslinse auf die Detektoren fokussiert. Je nach Anwendung können mehrere Detektoren gleichzeitig eingesetzt werden. Die Fluoreszenz kann dann über weitere dichroitische Strahlteiler und Bandpassfilter für jeden Detektor spektral eingegrenzt werden.

Durch den definierten Fokus ist es nun möglich, mit Hilfe eines XYZ-Verschiebetischs, der gleichzeitig als Probenhalter dient, die Probe über dem Laserfokus zu bewegen, so dass eine punktgenaue Abbildung erreicht werden kann. Weitere Einzelheiten über die Abbildung einzelner Moleküle und die Auflösungsgrenze des Mikroskops werden in Abschnitt 2.4 detaillierter diskutiert. Um das zeitliche Verhalten des Farbstoffs untersuchen zu können, wählt man aus der Abbildung ein einzelnes Farbstoffmolekül aus, fährt den Laserfokus an die bekannte Position und sammelt das Fluoreszenzlicht aus diesem Molekül auf. Mit dieser Funktion kann man die Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls über die Zeit detektieren und sichtbar machen. Um daraus die zeitlichen Informationen, wie z.B. die charakteristische An- oder Auszeit des Farbstoffs zu bestimmen, bedarf es dem Mittel der Autokorrelation. Das erstmalige Anwenden der Autokorrelationsfunktion auf ein Intensitätssignal eines Moleküls,

fand in Experimenten zur Laserstreuung und wenig später an frei durch den Laserfokus diffundierenden Moleküle statt [55]. Die dabei entwickelte Methode wurde Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl.: fluorescence correlation spectroscopy, FCS) genannt [56, 57]. Mit Hilfe der Korrelation der Intensitätssignale lassen sich sowohl die mittlere Diffusionszeit durch den Laserfokus, als auch die charakteristischen Zeiten weiterer Löschprozesse bestimmen, wie z.B. Triplettübergänge oder Wechselwirkung zwischen Guanosin und Tryptophan mit Oxazinen sowie verschiedene photophysikalische Prozesse des Cyaninfarbstoff Cy5 [35, 58, 59]. Bei immobilisierten Molekülen existiert keine Diffusionskomponente in den Intensitätsfluktuationen. Jeder Wechsel zwischen fluoreszierendem und nichtfluoreszierendem Zustand ist einem Ereignis in der Photophysik des Moleküls zuzuordnen. Mit Hilfe der Autokorrelation können die Veränderungen der Fluoreszenzintensität in zeitlichen Zusammenhang gebracht werden.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Jede Schwankung wird einem photophysikalischen Prozess zugeordnet. Die Kinetik dieser Prozesse kann aus der Darstellung der Autokorrelationsfunktion über die charakteristischen Korrelationszeiten gewonnen werden. Durch Anwendung der normierten Autokorrelationsfunktion zweiter Ordnung können die Intensitätsschwankungen analysiert werden.

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle N(t)N(t + \tau) \rangle}{\langle N(t) \rangle^2}$$

I steht hierbei für die Intensität und N für die Anzahl der gemessenen Photonen. Beim Nenner handelt es sich jeweils um das Quadrat des Mittelwerts über die Intensität bzw. die Anzahl der Photonen. Im Fall einer Überlagerung von exponentiellen Kinetiken wird die erhaltene Autokorrelationsfunktion als Summe mehrerer exponentieller Funktionen beschrieben und es kann jedem Prozess eine für ihn charakteristische Zeit zugeordnet werden.

$$g^2(\tau) = 1 + \sum_{i=1}^n A_i e^{-(\tau/\tau_{char;i})}$$

Aus den charakteristischen Zeiten können die An- und Auszeiten der einzelnen Prozesse bestimmt werden. Die Zuordnung der An- und Auszeiten in einem 2-Zustands System erfolgt folgendermaßen.

$$\frac{1}{\tau_{char}} = \frac{1}{\tau_{Aus}} + \frac{1}{\tau_{An}} ; A \cong \frac{\tau_{Aus}}{\tau_{An}}$$

Die Zeit τ_{Aus} ist die mittlere Zeitdauer, die das Molekül benötigt um aus dem S_1 -Zustand in einen anderen Zustand, z.B. Triplet, überzugehen, entspricht der Lebensdauer des fluoreszierenden Zustands. Diese Komponente ist leistungsabhängig. Die zweite Zeitkomponente τ_{An} entspricht der mittleren Zeitdauer, bis das Molekül wieder in den Grundzustand zurückgekehrt ist und für eine Wiederanregung zur Verfügung steht. Da diese Zeitkonstante leistungsunabhängig ist, eignet sie sich für Vergleiche eines Farbstoffs unter verschiedenen chemischen Umgebungen und wird somit für den weiteren Verlauf der Arbeit eine wichtige Rolle spielen.

2.3 Weitfeld-Mikroskopie

Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie, bei der sich die gesamte Anregungsenergie im Fokus bündelt, wird bei der Weitfeld-Mikroskopie eine parallele gleichmäßige Ausleuchtung der Probe erreicht. Dafür fokussiert man den Laserstrahl in die Zwischenbildebene des Objektivs und erhält durch das Linsensystem im Objektiv einen parallelen Anregungsstrahl mit einer homogen ausgeleuchteten Fläche. Im Gegensatz zur Punktabbildung der Probe kann hier in einem einzelnen Anregungsschritt eine große Fläche der Probe beleuchtet und somit auf einem Detektor abgebildet werden.

Für die Abbildung der Probe benutzt man eine digitale Kamera mit einem CCD-Chip. Eine Kamera, auf dem heutigen Stand der Technik, besitzt eine ähnlich hohe Quantenausbeute, wie die bei der konfokalen Methode benutzten Lawinenphotodioden. Aufgrund des Auslesevorgangs des Chips kann man alle 2 ms ein Bild aufnehmen und muss Verluste der zeitlichen Information in Kauf nehmen. Ein großer Nachteil dieser Technik ist, die Anregung der Probe im gesamten Strahlenbündel, man erreicht keine z-Einschränkung der Anregung. Außerdem gelangt mehr Streulicht in den Detektionsstrahlengang und dies führt zu einer weiteren Verschlechterung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses.

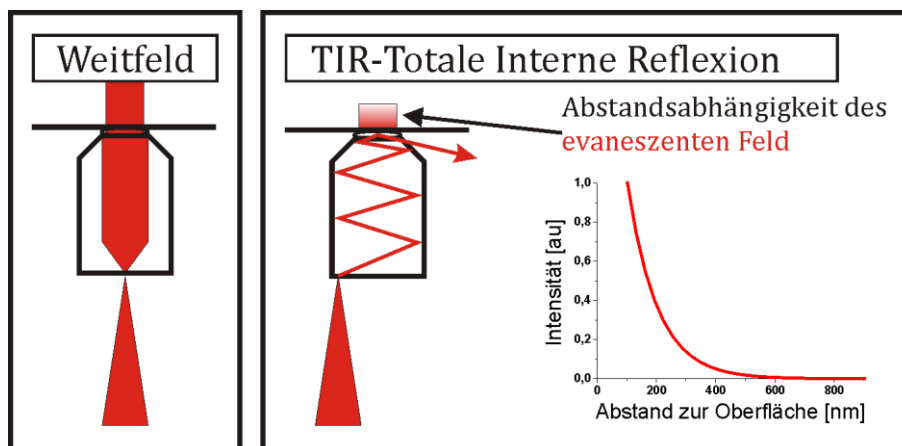


Abbildung 2.3.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Methoden der Weitfeldmikroskopie. Links ist der Weitfeldansatz abgebildet und im rechten Bild die Anregung mit einem evaneszenten Feld durch totale interne Reflexion (engl.: TIR-Total Internal Reflection).

Um dieses Verhältnis entscheidend zu verbessern, benutzt man das Phänomen der Totalreflexion, siehe Abb. 2.3.1. Der auftreffende Lichtstrahl wird nicht transmittiert, sondern durch den Brechungsindexsprung an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe vollständig reflektiert. Aus dem Gesetz von Snellius lässt sich die Bedingung für eine Totalreflexion bestimmen [54].

$$\sin\theta = \frac{n_2}{n_1}$$

Der Winkel für die Totalreflexion ist nur von dem Quotienten der beiden Brechungsindizes abhängig. Für die Grenzfläche Glas-H₂O, dem erwähnten Übergang vom Deckglas zur Probe, beträgt der Winkel für die Totalreflexion 58°. Der Winkel variiert, je nach Zusammensetzung des verwendeten Puffers.

Durch die Totalreflexion an der Grenzfläche wird ein evaneszentes Feld erzeugt, das exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche absinkt. Die Möglichkeit Moleküle anzuregen, besteht nur für geringe Abstände zum Deckglas. Dadurch lässt sich der Streulichtanteil deutlich verringern und man erhält ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis. Es wird nicht nur die Streuung der Laserstrahlung unterdrückt, auch zusätzliche Fluoreszenz oberhalb der beobachteten Ebene wird nur über ungefähr hundert Nanometer effizient angeregt, vergleiche dazu in Abb.2.3.1 die Abstandsabhängigkeit des evaneszenten Feldes.

2.4 Detektion einzelner Moleküle

Für die Detektion einzelner Moleküle werden besondere Anforderungen an den experimentellen Aufbau gestellt. Es gilt ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis herzustellen. Dies gelingt durch die Kombination verschiedener Elemente [60]. Das Reduzieren des Anregungsvolumens ist ein wichtiger Schritt um einzelne Moleküle zu detektieren. Durch diesen Schritt kann man störende Hintergrundstrahlung effizient unterdrücken. Dazu gehört sowohl die Rayleigh- als auch die Raman-Streuung, die beide proportional zur Molekülanzahl im Beobachtungsvolumen sind. Durch die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung kann bei Molekülen ein Dipolmoment

induziert werden. Dieses Moment schwingt mit der Lichtfrequenz und sendet elektromagnetische Strahlung ohne Energieverlust mit der gleichen Frequenz aus. Diese Strahlung ist kohärent zur Anregung. Dabei handelt es sich um die sogenannte elastische Rayleigh-Streuung. Raman beobachtete 1928, ein von der Anregung unabhängiges für jedes Molekül charakteristisches, Linienspektrum, die sogenannte Raman-Streuung. Diese wird durch Anregung von Schwingungs- bzw. Rotationsniveaus verursacht, die bei der Relaxation diese Strahlung aussenden. Durch jedes Molekül wird eine nichtkohärente Lichtwelle erzeugt, die unabhängig von der Anregungswellenlänge ist. Man kann durch das reduzierte Anregungsvolumen nicht nur die Rayleigh-, sondern auch die Raman-Streuung reduzieren [61].

Sowohl die konfokale Mikroskopie sowie die Weitfeld-Mikroskopie mit TIR-Anregung, erzeugen eine Reduktion des Anregungsvolumens. Bei der konfokalen Mikroskopie liegt die Größe des Anregungsvolumens bei wenigen Femtolitern und wird begrenzt durch die Größe des Laserfokus. Da die Intensität bei der TIR-Anregung exponentiell mit dem Abstand zum Deckglas abfällt, kann hier das Anregungsvolumen deutlich reduziert und somit die störende Hintergrundstrahlung merklich reduziert werden.

Eine weitere wichtige Störgröße, zumindest bei biologischen Proben oder den verwendeten Proteinoberflächen zur Immobilisierung der Farbstoffe, ist die Autofluoreszenz von organischen und anorganischen Verbindungen. Nicht immer kann die Anregungswellenlänge über 600nm gewählt werden, aber durch eine geschickte Auswahl von Filtern, kann die Autofluoreszenz hinreichend unterdrückt werden [62].

Abhängig von der experimentellen Methode verwendet man zwei verschiedene Arten von Detektoren für die Detektion der einzelnen Moleküle. Bei der zeitaufgelösten Einzelmolekülfluoreszenz werden sogenannte Lawinenphotodioden (engl. avalanche photodiode; APD) eingesetzt. Das sind Detektoren für eine punktförmige Abbildung des Probenvolumens. Als Basis dient ein Halbleiter, in dessen

Verarmungszone die auftreffenden Photonen Elektronen erzeugen. Über die angelegte Spannung werden die Elektronen in Richtung positiven Pols beschleunigt. Dabei entstehen durch Stoßionisation weitere Elektronen, es folgt ein sogenannter Lawineneffekt, der zu einer exponentiellen Steigerung des erzeugten Photostroms führt. Allerdings wird nicht, wie bei einer herkömmlichen Photodiode, dieser Strom gemessen, sondern der Spannungsdurchschlag wird als Auftreffen eines Photons gewertet. Die Auftreffzeit kann in Abhängigkeit von der Verstärkung gemessen werden und die erreichbare Zeitauflösung liegt bei etwa 300 ps. Für die Weitfeldmikroskopie wird eine elektronenvervielfachende CCD-Kamera (engl.: electron multiplied charge coupled device; EM-CCD) verwendet. Sie ermöglicht die Abbildung einer großen Probenfläche, aber mit einer geringeren zeitlichen Auflösung als der APD. Die Fluoreszenz wird für typische Belichtungszeiten von 2-100 ms auf dem Chip gesammelt und für jedes Bild ausgelesen.

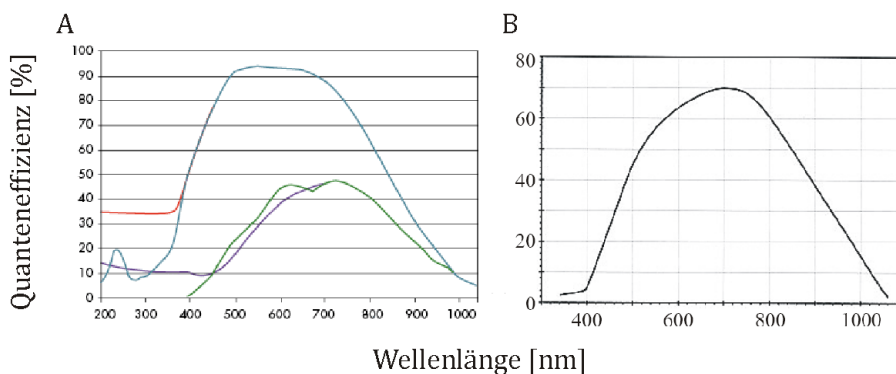


Abbildung 2.4.1: Quanteneffizienzen der verwendeten Detektoren, (A) EMCCD und (B) APD der AQR-1x Serie.

In Abb. 2.4.1 sind die Quanteneffizienzen der beiden verwendeten Detektorarten in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen. Für beide Arten liegt das Maximum im sichtbaren Bereich zwischen 500 und 800 nm. Beide Detektoren zeichnen sich durch ein niedriges Elektronenrauschen aus, dies ermöglicht es, einzelne Photonen zu detektieren.

Ein weiteres Kriterium für das Beobachten einzelner Moleküle ist das Auftreten von Fluoreszenzauszeiten, welche durch Übergänge des Moleküls in nicht-fluoreszierende Zustände auftreten. Wenn in den gemessenen Fluoreszenzspuren für ein Molekül genau zwei Zustände existieren, An- und Aus-Zustand, ist das ein eindeutiger Hinweis dafür, dass man nur ein einziges Molekül beobachtet, Ausnahmen bilden multichromophore Systeme [63]. Kann man zwei oder mehrere Stufen innerhalb des Signals erkennen, handelt es sich vermutlich um mehr als ein Farbstoffmolekül.

Unter Beachtung dieser Probleme und die Anwendung der beschriebenen Techniken, ist es möglich, einzelne Moleküle zu detektieren.

2.5 Möglichkeiten zur Auflösungserhöhung

Lokalisation der Farbstoffe

Die Auflösung eines Mikroskops ist nach dem Raleigh-Kriterium nur abhängig von der verwendeten Anregungswellenlänge und der Apertur, in diesem Fall der Apertur des verwendeten Objektivs. Bei einer Anregungswellenlänge von 647nm und einer Objektivapertur von 1.45 erreicht man eine maximale laterale Auflösung von 192 nm für das Anregungsvolumen. Mit Hilfe dieser Berechnung lässt sich erklären, warum ein einzelnes Farbstoffmolekül, dessen Größe im Bereich weniger Nanometer liegt, nicht direkt sichtbar gemacht werden kann. Man erhält vielmehr eine Punktabbildungsfunktion (engl.: Point Spread Function, PSF), da man die einzelnen Farbstoffe als unendlich entfernte Punktlichtquellen betrachten kann. Das Intensitätsprofil der Punktabbildungsfunktion kann mit einer Gauss-Funktion (2D) genähert werden.

$$I(x, y) = I_0 * A * \exp\left(\frac{-(x - x_s)^2}{2\sigma^2}\right) * \exp\left(\frac{-(y - y_s)^2}{2\sigma^2}\right)$$

Die Breite der Darstellung des Fluorophors entspricht, bei dieser Näherung, der Halbwertsbreite (engl.: Full Width Half Maximum, FWHM).

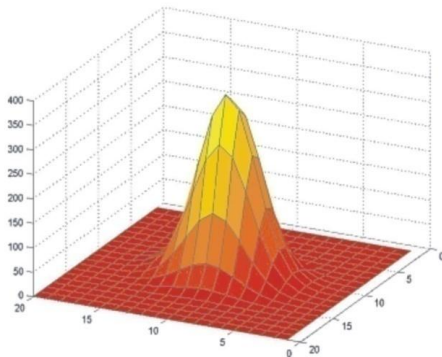


Abbildung 2.5.1: *Intensitätsverteilung der Punktabbildungsfunktion eines einzelnen Farbstoffmoleküls [nm]; im rechten Bild sind einzelne Cy5-Moleküle, immobilisiert auf einer Glasoberfläche zu erkennen (Anregung mit 633nm, 14 W/cm²). Das Bild zeigt einen Ausschnitt von 10*10µm.*

Den Mittelpunkt der PSF, die tatsächliche Position auf dem rechten Bild in Abbildung 2.5.1, kann mit Hilfe der angegebenen Formel bestimmt werden. Dabei ist die Genauigkeit des Zentrums nur von der Anzahl der Photonen im Intensitätssignal der Fluoreszenz abhängig [64].

$$\langle \Delta x \rangle = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

Dabei ist $\langle \Delta x \rangle$ der Erwartungswert der Abweichung von der Ortskoordinate x , σ die Standardabweichung der Gauss-Näherung der PSF und N ist die Anzahl der detektierten Photonen des Fluorophors. Für ein einzelnes Farbstoffmolekül in Abbildung 2.4.1 kann man das

Zentrum der PSF in Abhängigkeit der Photonenzahl mit einer Genauigkeit von ~ 10 nm bestimmen. Die Bestimmung des Mittelpunkts der PSF ist nur zulässig, unter der Annahme, dass es sich um ein einzelnes, von anderen Molekülen sichtbar getrenntes, Molekül handelt.

Im Folgenden werden zwei Ansätze zur Erhöhung der Auflösung in der optischen, konfokalen Fluoreszenzmikroskopie erklärt und beschrieben, da diese Techniken für diese Arbeit verwendet wurden. Zum einen handelt es sich dabei um die STED Mikroskopie (engl.: Stimulated Emission Depletion; STED), eine Methode, bei der das Anregungsprofil des Lasers verkleinert wird und dadurch der Ort eingeschränkt wird, aus dem die Fluoreszenz detektiert wird [15]. Die zweite in dieser Arbeit verwendete Möglichkeit zur Erhöhung der Auflösung basiert auf der STORM Methode (engl.: direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, dSTORM) und beruht auf der oben beschriebene Methode zur Bestimmung des Mittelpunkt eines einzelnen leuchtenden Farbstoffmoleküls [23, 65].

Prinzip der stimulierten Emission

Die STED-Mikroskopie beruht auf dem Effekt der stimulierten Emission. Das bedeutet, ein Farbstoff wird, nach der Anregung in das S_1 -Niveau durch einen zur längeren Wellenlänge verschobenen Laserpuls, in den Grundzustand überführt. Die Effizienz der stimulierten Emission ist direkt abhängig von der verwendeten Laserleistung. Dabei ist die Wellenlänge des STED-Strahls von dem eingesetzten Farbstoff abhängig. Man benötigt einen Überlapp der STED Wellenlänge mit dem Emissionsspektrum des Farbstoffs. Das bei der stimulierten Emission erzeugte Photon trägt dabei nicht zum Fluoreszenzsignal bei, da die Emissionswellenlänge weit ins Rote verschoben ist. Aufgrund der kurzen Anregungspulse des Lasers im

Picosekundenbereich kann der Farbstoff nach der stimulierten Emission nicht mit demselben Laserpuls nochmals angeregt werden. Der STED-Puls muss unmittelbar nach der Anregung den Farbstoff treffen, bevor dieser durch Fluoreszenz aus dem angeregten Niveau relaxieren kann. Es ist eine präzise zeitliche Synchronisation zwischen den beiden Lasern notwendig; außerdem ist eine Positionssynchronisation der beiden Foki notwendig. Wenn man das Profil des zweiten Laserstrahls verändert, z.B. mit einer Phasenplatte, kann man die Region für die stimulierte Emission bestimmen und festlegen. Mit Hilfe von solchen Phasenplatte erzeugt man ein Laserprofil mit einer Nullstelle im Mittelpunkt (siehe Abb. 2.5.2). Der Bereich für die stimulierte Emission ist hier rot eingefärbt. Man kann deutlich die Nullstelle in der Mitte des Strahls erkennen.

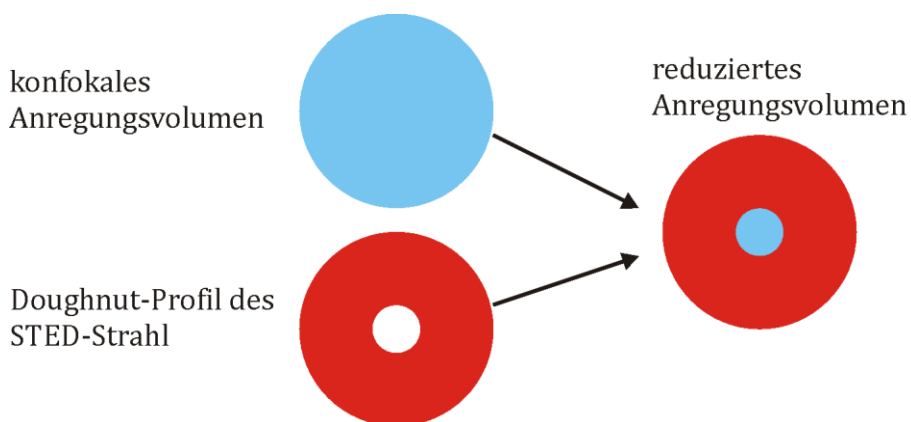


Abbildung 2.5.2: Schematische Darstellung des STED-Prinzips, die Reduzierung des Anregungsvolumens durch das Übereinanderlegen von konfokaler Anregung mit dem Doughnut-Profil des STED-Strahls.

Über die Leistung des STED-Strahls verändert man den Wirkungsquerschnitt der stimulierten Emission im inneren des Doughnut. Wegen der Überlagerung der beiden Laser erreicht man eine direkte Einschränkung des Anregungsvolumens, mit aktuellen Aufbauten kann das FWHM der Anregung auf bis zu 16nm reduziert

werden [10]. Um die Auflösung zu berechnen, folgt man nichtmehr der Abbeschen Formel, vielmehr kann man diese erweitern und erhält:

$$d = \frac{d_k}{\sqrt{1 + d_k^2 a^2 \zeta}}$$

mit der bisher berechneten konfokalen Auflösung d_k , a als Faktor für die Form des STED-Strahls und ζ als Faktor für die Saturierung, abhängig von der Effizienz der stimulierten Emission in Abhängigkeit von der Leistung des STED-Strahls [66]. Daraus ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der erreichbaren Auflösung d und der Intensität des STED-Strahls über folgende Beziehung:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I/I_{sat}}}$$

mit

$$I_{sat} = (\sigma \tau)^{-1}$$

wobei I_{sat} die Intensität beschreibt, wenn die Population des angeregten Zustands auf $1/e$ abgefallen ist. σ repräsentiert den Wirkungsquerschnitt der stimulierten Emission und τ ist die Lebensdauer des angeregten Zustands [10]. Für Farbstoffe aus dem sichtbaren Spektralbereich liegt I_{sat} im Bereich von 30 MW/cm^2 .

Es handelt sich bei dieser Methode um eine reale Verkleinerung des Anregungsvolumens. Die Fluoreszenz des Farbstoffes kann nur aus dem eingeschränkten Fokus stammen. Für die STED-Mikroskopie sind besondere Anforderungen an die Farbstoffe zu stellen. Hohe Quantenausbeute, gute Photostabilität und eine hohe Effizienz der stimulierten Emission sind besonders wichtige Kriterien.

Optische Bildrekonstruktion mit dSTORM

Die zweite in dieser Arbeit genutzte Methode zur Erhöhung der Auflösung beruht auf der Bestimmung der Mittelpunkte der Punktabbildungsfunktionen.

Wenn man Fluorophore als Marker an fixierten Proben einsetzt, wird die Auflösung über die PSF der Fluoreszenzemission bestimmt, obwohl die Farbstoffe selbst nur wenige Nanometer groß sind. Wenn man die Methode zur Bestimmung des Mittelpunkts für die tatsächliche Positionsbestimmung des Farbstoffs benutzt, erreicht man eine Auflösung, die theoretisch nur noch von der Anzahl der detektierten Photonen abhängig ist. Zusätzlich benutzt man besondere Farbstoffe, die zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht-fluoreszierenden Zustand reversibel geschaltet werden können [26, 27].

Für die Anwendung der Methode markiert man eine Struktur mit fluoreszierenden Markern. Diese schaltet man reversibel zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht-fluoreszierenden Zustand. Am Beispiel des Cyaninfarbstoffes Cy5 geschieht dies mit 635 oder 647nm zum Auslesen der Fluoreszenz, bei gleichzeitiger Erzeugung des Dunkelzustands. Die zweite Wellenlänge für die photoinduzierte Reaktion liegt im sichtbaren Spektralbereich (300nm, 488nm, 532nm). Bei der ersten Aufnahme kann man die Struktur nicht erkennen, da sich die PSF der einzelnen Farbstoffe überschneiden und eine verschmierte, unscharfe Abbildung ergeben (siehe Abbildung 2.5.3). Wenn man die Mehrzahl der Farbstoffe durch die Bestrahlung mit roter Laseranregung in den Aus-Zustand überführt und dann eine weitere Aufnahme macht, kann man die Position der wenigen fluoreszierenden Moleküle über die PSF genau bestimmen.

Über die Leistung der beiden Laserwellenlängen kann man das Verhältnis zwischen leuchtenden und nichtleuchtenden Farbstoffen einstellen. Nach Aufnahme von Bildreihen - typische Integrationszeit

pro Bild sind 100 ms – können diese Bild für Bild ausgewertet werden. Die Positionen der Moleküle werden bestimmt und hinterher zu einem hochauflösenden Bild zusammengesetzt. Mit Hilfe dieser Methode können Strukturen weit unterhalb der eigentlichen Auflösungsgrenze abgebildet und dargestellt werden.

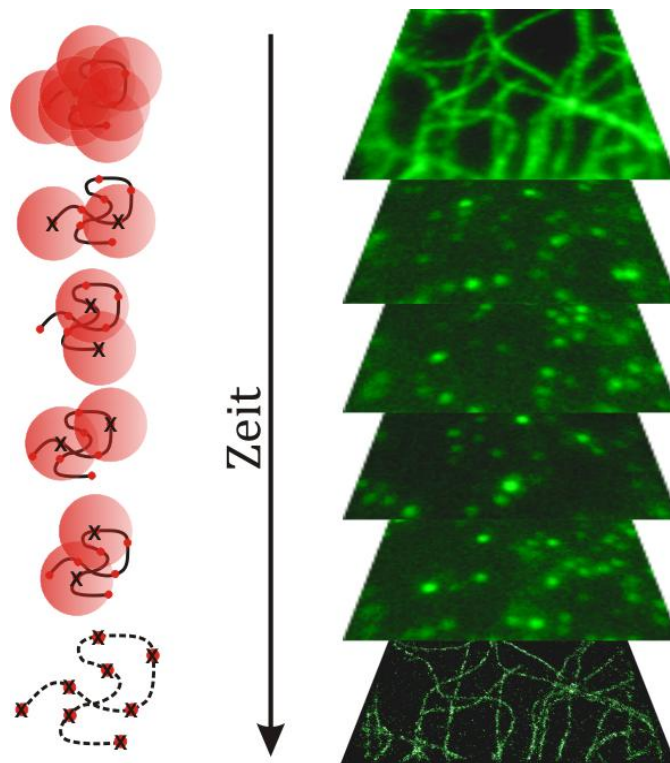


Abbildung 2.5.3: Schematische Darstellung des STORM Prinzips. Eine zunächst nicht auflösende Struktur wird Bild für Bild über die Methode der Lokalisation des Farbstoffmittelpunkts rekonstruiert, bis man ein hochauflöstes Bild erhält [11].

Die Genauigkeit der Abbildung hängt von der Zahl der emittierten Photonen pro Bild ab. Man muss besondere Anforderungen an die verwendeten Farbstoffe stellen. Zunächst müssen die Moleküle zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht-fluoreszierenden Zustand reversibel schaltbar sein. Des Weiteren müssen die Farbstoffe

einen hinreichend langen An-Zustand besitzen bzw. pro Integrationszeit genügend Photonen aussenden, um eine gute Statistik zu gewährleisten. Außerdem sollten die Moleküle mehrmals diesen Schaltzyklus durchlaufen können, bevor sie endgültig photozerstört werden. Diese Technik wurde in der Arbeitsgruppe um M. Sauer entwickelt und nennt sich dSTORM (engl.: direct stochastic optical reconstruction microscopy) [26]. Im Gegensatz zur STORM Technik wird der Farbstoff direkt über eine zweite Wellenlänge zwischen An- und Aus-Zustand geschaltet. Bei der STORM Technik wird der Farbstoff über einen Aktivator aus dem Aus-Zustand in den An-Zustand überführt. Man benötigt zwei Moleküle, Aktivator und Akzeptor, die in einem definierten Abstand zueinander an der Probe angebracht werden müssen. Der Vorteil der dSTORM Methode ist das direkte Schalten, die Probe wird mit nur einem Farbstoff markiert.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Konzepten eine Auflösungserhöhung erreicht werden kann. Bei der STED-Technik ist die Auflösung abhängig von der Qualität des verwendeten Doughnuts, der Breite der Nullstelle im Mittelpunkt. Außerdem muss die Photophysik der Farbstoffe kontrollierbar werden, man benötigt stabile Farbstoffe, die man relativ hohen Leistungen aussetzen kann.

Bei der dSTORM-Technik wiederum benötigt man keine besonderen experimentellen Anforderungen, mit der verfügbaren Technik kann das Experiment durchgeführt werden. Spezielle Farbstoffe sind für solche Messungen nötig: die Auszeit muss hinreichend lang sein, die Anzahl der ausgesendeten Photonen muss groß genug sein und man benötigt eine spezielle Auswertesoftware, um jedes Bild eines Films einzeln analysieren zu können.

Die speziellen experimentellen Anforderungen werden in Kapitel 3 genauer diskutiert.

3 Material und Methoden

Im folgenden Teil der Arbeit werden die experimentellen Methoden, als auch die verwendeten Farbstoffe und Materialien, die für diese Arbeit benötigt wurden, vorgestellt und genauer beschrieben. Zunächst werden die drei verschiedenen Aufbauten und ihre Funktionsweisen erklärt, um im zweiten Teil die Probenpräparation und die verwendeten Chemikalien zu erläutern.

3.1 Einzelmolekülspektroskopie

Die Beobachtung von einzelnen Farbstoffmolekülen stellt gewisse Anforderungen an den jeweils verwendeten experimentellen Aufbau, wie z.B. hohe Quanteneffizienzen der Detektoren. Die Merkmale sowie die Unterschiede der verschiedenen Aufbauten werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

Konfokale Mikroskopie

Das Setup mit dem die Messungen zur Charakterisierung der Farbstoffeigenschaften und deren Verhalten in unterschiedlichen chemischen Milieus durchgeführt worden sind, ist ein invertierter konfokaler Mikroskop-Aufbau. Die Anregung erfolgt mit einem kollimierten Laserstrahl, der in den hinteren Eingang eines Zeiss-Mikroskops (Axiovert 200M, Zeiss, Deutschland) eingekoppelt wird. Die Wellenlänge ist abhängig von dem verwendeten Farbstoff (siehe Tabelle 3.1). Zum Abrastern der Probe dient ein x,y,z-Verschiebetisch (PI-509; Physik Instrumente, Deutschland), mit dessen Hilfe die Probe in x- und y-Richtung jeweils um 100 μ m und in z-Richtung um 20 μ m verschoben werden kann. Dies ermöglicht eine punktgenaue

Abbildung der Probe im nm-Bereich. Die Ansteuerung des Tisches erfolgt computergestützt mit einer Analog-Output Karte (PCI-6713, National Instruments, USA), die die Signale aus jedem Punkt der Probe sammelt, speichert und wieder zusammensetzt. Mit einem Öl-Immersions-Objektiv (100fach, PlanFluar, NA=1,45, Zeiss, Deutschland) erfolgt sowohl die Fokussierung des Lasers, als auch das Aufsammeln des Fluoreszenzlichtes. Die Trennung wird über Reflektion des Anregungslicht und Transmission der Fluoreszenz erreicht und mit einem dichroitischen Strahlteiler durchgeführt. Die Wahl der dichroitischen Spiegel und Filter ist abhängig von der Wahl des Fluorophors. Die Kombination der Filter und Spiegel zusammen mit den Farbstoffen und der Anregungswellenlänge ist in Tabelle 3.2 am Ende dieses Abschnitts aufgeführt. Mit Hilfe der Tubuslinse des Mikroskops wird das Fluoreszenzlicht auf eine Lochblende (100µm) fokussiert, um störendes Hintergrundlicht zu unterdrücken und das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu verbessern. Um eine 1:1 Abbildung des Laserfokus auf die Detektoren zu gewährleisten, ist eine weitere Linse im Abstand ihrer doppelten Brennweite in den Detektionsarm integriert.

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{g} + \frac{1}{b} \rightarrow g = b = 2f$$

Diese Linse fokussiert die aufgefangene Emission des Farbstoffs auf die Lawinenphotodioden (APD AQR-15, Perkin Elmer, USA). Insgesamt werden für die Messungen drei spektral getrennte Detektoren verwendet. Die Trennung der Signale erfolgt über dichroitische Strahlteiler. Der komplette Aufbau wird über eine speziell programmierte Analysesoftware in LabVIEW (National Instruments, USA) gesteuert und kontrolliert.

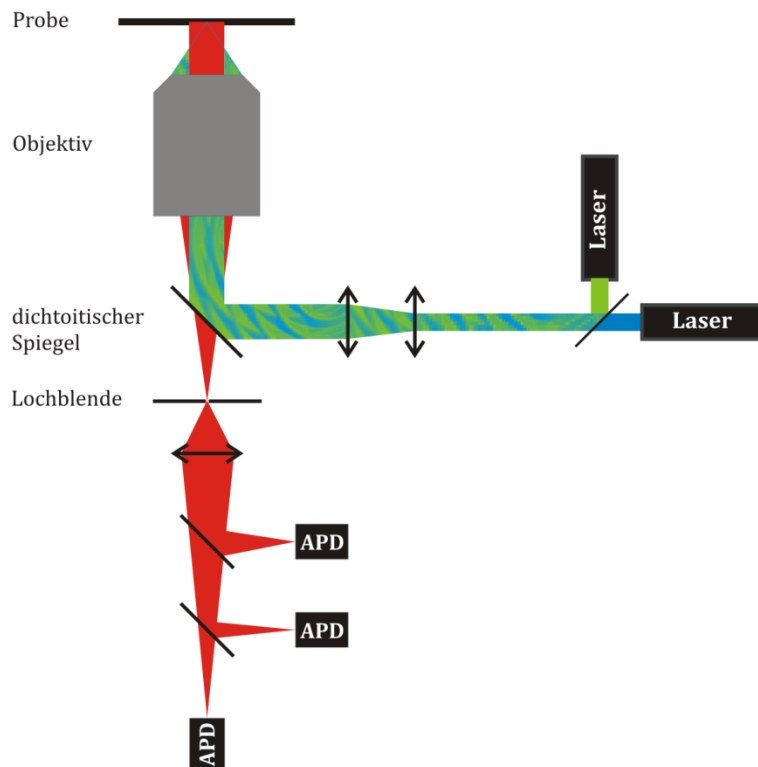


Abbildung 3.1.1: Schematische Abbildung des konfokalen Mikroskopbaus. Zwei Laser werden über einen dichroitischen Spiegel überlagert und in das Objektiv eingekoppelt. Die Abbildung des Anregungsvolumens erfolgt über eine Fokussierung auf die Lawinenphotodioden.

Mit Hilfe der vielen zur Verfügung stehenden Laserwellenlängen konnte das Setup für die grundlegende Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften der verwendeten Farbstoffe aus verschiedenen Spektralbereichen benutzt werden. Mit Hilfe der aufgenommenen Bilder erhält man die Informationen über die genaue Position der immobilisierten Moleküle und kann die Intensität der Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls abhängig von der Zeit beobachten. Dafür werden zunächst in einer Aufnahme die Molekülpositionen ausgelesen, um dann mit dem Laserfokus diese Position anzufahren und gezielt nur noch ein einzelnes Molekül anzuregen sowie die Fluoreszenzsignale als Intensitätsspur über die

Zeit zu verfolgen. Dies ermöglicht eine exakte Darstellung des Emissionsverhaltens der verschiedenen Fluorophore unter unterschiedlichen chemischen Umgebungen.

Anbei eine Tabelle mit den verwendeten Lasern an diesem Setup und den genauen Spezifikationen.

Tabelle 3.1: Verwendete Laser mit zugehörigen Wellenlängen, Herstellern und Repetitionsraten.

Typ	Name	Wellenlänge	Repetitionsrate
Argon-Ionen Laser	95 SHG-6W, Lexel Laser Inc., USA	514, 5nm; 488nm; 476, 5nm	Dauerstrich Betrieb (continuous wave;cw)
Dioden-Laser	LDH-635, Picoquant, Deutschland	635nm	5-80 MHz

Um das Laserlicht einzukoppeln und das Fluoreszenzlicht spektral aufzuteilen, werden dichroitische Strahlteiler als Langpassfilter (AHF, Deutschland) verwendet, die je nach Spezifikation kurzwelliges Licht reflektieren und ab einer bestimmten Grenzwellenlänge transmittieren. Um weitere Störlichteinflüsse zu vermindern und die Signalqualität zu verbessern, werden zusätzlich vor den Photodioden Bandpass oder Langpassfilter (AHF, Deutschland) eingesetzt.

Tabelle 3.2: Verwendete Farbstoffe und für die Anregung notwendige Wellenlänge und Strahlteiler.

Anregungswellenlänge	Dichroitische Strahlteiler	Farbstoff
514 nm	520 DRLP	RhG, Alexa532, Cy3B
576 nm	580 DRLP	ATTO565
635 nm	647 DRLP	MR121, ATTO647N, Cy5,
647 nm	660 DRLP	Cy5.5, Alexa680, Alexa700, Cy7

STED-Mikroskopie

Die Aufnahmen am STED-Setup für den Farbstoff ATTO647N wurden in Göttingen am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in der Abteilung NanoBiophotonics durchgeführt. Der experimentelle Aufbau, auf der Basis eines konfokalen Mikroskopbaus, wurde zusätzlich mit einem zweiten Laser für den STED-Strahl ausgestattet (Ti:Sa, MIRA900, Coherent, USA). Die ursprüngliche Pulslänge von 100fs wird auf ca. 300ps gestreckt, indem man den Laser in einen 100 m Lichtwellenleiter einkoppelt. Durch das Verbreitern der Pulse steigert man die Effizienz der stimulierten Emission, weil man die Leistungsdichte im Fokus erhöht. Der Anregungslaser ist eine herkömmliche Laserdiode mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{Anr}}=635\text{nm}$ und einer Pulsbreite von 70ps. Als Objektiv wird ein kommerziell erhältliches Öl-Immersions-Objektiv verwendet (100fach, plan apo, Leica Microsystems, Deutschland).

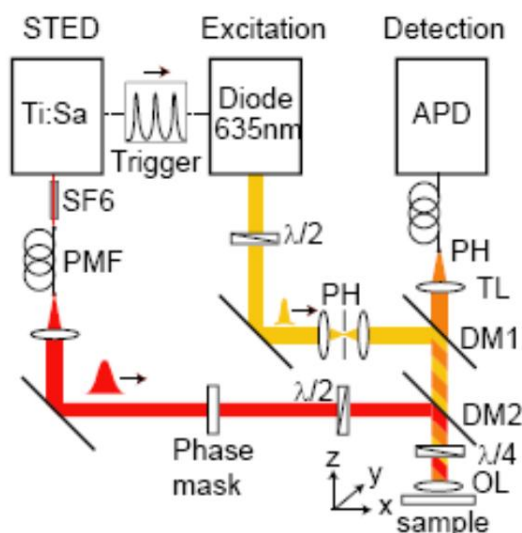


Abbildung 3.1.2: Schematische Darstellung des STED-Aufbaus in Göttingen, übernommen aus der Dissertation von Benjamin Harke.

Die Einkopplung der Laser und das Auskoppeln der Fluoreszenz erfolgt über einen dichroitischen Strahlteiler. Für die Detektion wird eine Lawinenphotodiode verwendet (ARQ-14, Perkin Elmer, USA). Das Fluoreszenzlicht wird über die entsprechenden Filter auf ein spektrales Fenster zwischen 650 und 740 nm begrenzt.

Das zusätzliche Einführen der $\lambda/2$ -Platten in Kombination mit der $\lambda/4$ -Platte in jedem der beiden Strahlengänge gewährleistet, dass beide Laser zirkular polarisiert sind. Die Phasenmaske im STED-Strahlengang erzeugt das gewünschte Strahlprofil, den Donut. Bei diesem Setup kann die Probe über einen x,y,z-Verschiebetisch über den Laserfokus bewegt werden. Die Auswertung erfolgt computergestützt über ein speziell für das Max-Planck Institut entwickeltes Programm (Inspector).

Die Aufnahmen mit dem Farbstoff Cy5 wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Leica Microsystems in Mannheim an einem kommerziell erhältlichen System, LEICA TCS STED, durchgeführt.

dSTORM: kamerabasierte Weitfeldmikroskopie

Für die hochauflösende dSTORM Technik wird ein konventioneller Weitfeldaufbau verwendet. Der Ar-Laser wird im Multiline Betrieb verwendet. Alle zur Verfügung stehenden Wellenlängen schwingen gleichzeitig an und werden emittiert. Die Selektion, der für die Farbstoffanregung verwendeten Wellenlängen, erfolgt mit Hilfe eines Akkusto-Optischen-Filters (AA.AOTF.nC, AA.Optics, Frankreich), dessen Funktionsprinzip auf dem elektrooptischen Effekt beruht. Dadurch ist es möglich, bis zu sieben Laserwellenlängen gleichzeitig zu verwenden; in der Regel werden nicht mehr als zwei benötigt. Um die Laserfoki möglichst exakt zu überlagern, werden sie anschließend über einen Lichtwellenleiter zum Mikroskop geführt. Die Fokussierung in die Zwischenbildebene des Objektivs (60fach, Öl, 1,4 Olympus, Deutschland) erfolgt über ein Linsensystem. Wie bei den anderen

verwendeten Mikroskopsystemen, erfolgt die Einkopplung über einen dichroitischen Strahlteiler. Als Detektor kommt an diesem Aufbau eine EMCCD zum Einsatz (IXON, Andor, Deutschland).

Für Messungen im roten Spektralbereich werden als Filter, vor der Kamera, ein 647 Langpass (647 razoredge, Semrock, USA) und ein Bandpassfilter (700DF75, AHF, Deutschland) verwendet. Bei Messungen in anderen Spektralbereichen werden die Filter entsprechend angepasst. Diese Filterkombinationen gewährleisten eine hinreichende Unterdrückung des Streulichts der Laseranregung und somit ein gutes Signal zu Rausch Verhältnis. Die Kamera verfügt über einen Aufnahmebereich von 512*512 Pixel, wobei jedes Pixel $16\mu\text{m}^2$ groß ist.

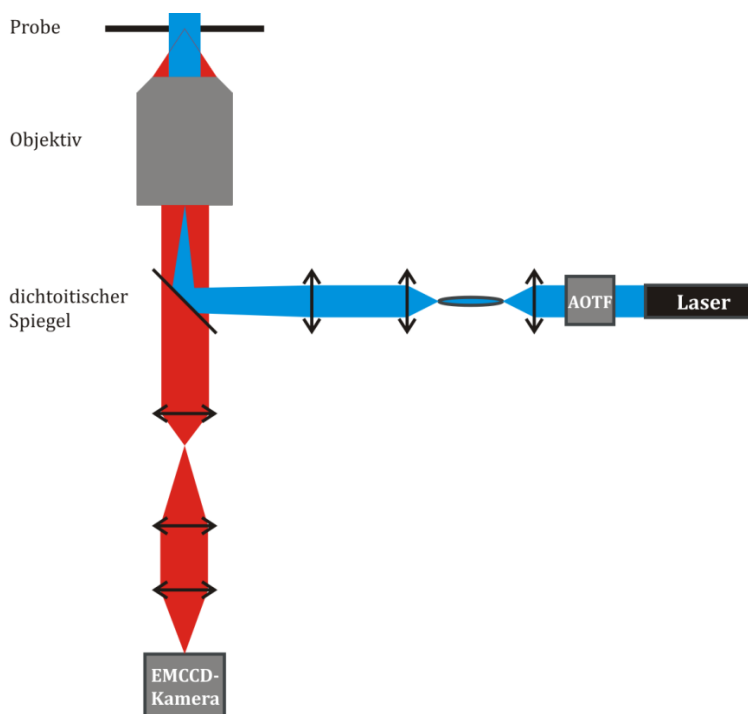


Abbildung 3.1.3: Schematische Darstellung des Weitfeldaufbaus mit einem AOTF zur Wellenlängenselektion und einer EMCCD-Kamera als Detektor.

Für die Anregung mit der Methode der Totalreflexion, kann der Fokus des Anregungslichts an den Rand der Apertur des Objektivs bewegt werden. Dadurch passiert der Strahl das Linsensystem nichtmehr senkrecht, in der Mitte der Apertur, sondern wird im Objektiv reflektiert und verlässt dessen Öffnung unter einem bestimmten Winkel. Über die genaue Position beim Eintritt in das Objektiv kann man den Austrittswinkel so verändern, dass es zur Totalreflexion kommt. Somit schafft man ein evaneszentes Feld, das exponentiell mit dem Abstand zum Deckglas abklingt. Dieses Prinzip und der Abfall des evaneszenten Feldes ist in Abbildung 2.3.1 dargestellt. Dadurch erfolgt die Anregung der Farbstoffe nur noch in einem kleinen Abstand zur Deckglasoberfläche.

3.2 Spektroskopie im Ensemble

Absorptionsspektrometer

Die für diese Arbeit benötigten Absorptionsmessungen wurden an einem UV/VIS-Spektrometer durchgeführt (Lambda25, Perkin Elmer, USA). Dieses Spektrometer kann über einen Wellenlängenbereich von 190 nm bis 1100 nm genutzt werden. Für die Messungen wurden Küvetten aus Quarzglas (Hellma, Deutschland) mit verschiedenen Volumen eingesetzt.

Die Absorption folgt dabei dem Lambert-Beerschen Gesetz [49],

$$\ln \frac{I_0}{I} = \varepsilon dc = A$$

wobei der Logarithmus des Verhältnisses zwischen der ursprünglich eingestrahlten Intensität und der Intensität nach Durchqueren der Probe angibt und die Absorption A widerspiegelt. Weiterhin ist c die Konzentration der Probe und ϵ die Extinktion des Farbstoffs in Abhängigkeit der Wellenlänge. Die typische Konzentration der Messlösung liegt im μM Bereich, zum einen für ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis genügend Lichtintensität nach der Probe zu detektieren sowie die Fluoreszenzanregung der Probe im Spektrometer zu minimieren.

Fluoreszenzspektrometer

Fluoreszenz- und Anregungsspektren wurden in einem Fluoreszenzspektrometer aufgenommen (Cary Eclipse, Varian, Deutschland). Der Wellenlängenbereich dieses Geräts reicht von 200 nm bis 1100 nm. Es ist zusätzlich mit einer Temperatursteuerung von 4°C bis 90°C versehen die in dieser Arbeit aber nicht benötigt wurde. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Anregungsintensität sowie die Fluoreszenz kann durch Auswahl von Blenden eingestellt werden. Um Streulicht zu vermeiden, erfolgt die Detektion über eine Photodiode, die im 90° Winkel zu Anregung angeordnet ist. Hier liegt die typische Konzentration der Probe im μM Bereich, um Sekundäreffekte, wie z.B. Reabsorption der Fluoreszenz in der Probe, zu verhindern.

Lebensdauermessungen

Die Messung der Lebensdauer der Farbstoffe erfolgte in einem Fluoreszenzspektrometer mit gepulster Anregung (IBH, USA). Die Funktionsweise wurde bereits in Kapitel 2.1 erläutert. Je nach Farbstoff kann man zwischen verschiedenen Anregungswellenlängen wählen. Der Detektor ist eine Photodiode, die nach dem Modus des beschriebenen zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen verwendet wird. Die Signale werden über einen Computer aufgenommen und ausgewertet.

3.3 Farbstoffe und Proben

Oberflächenpräparation

Um Farbstoffe als einzelne Moleküle scannen und sichtbar machen zu können, müssen diese an oder auf der Oberfläche eines Deckglases fixiert werden. Einzelne Moleküle können in Lösung untersucht werden, aber bei frei diffundierenden Molekülen beträgt die Zeit im Laserfokus nur wenige Millisekunden. Für die Fixierung der Moleküle ist in dieser Arbeit die folgende Technik angewendet worden.

Wenn man die Farbstoffe in Lösung beobachten will, um den Einfluss der chemischen Umgebung besser kontrollieren zu können, müssen die Moleküle auf der Oberfläche verankert werden, während sie einem Lösungsmittel ausgesetzt sind [67].

Bei dieser Präparationstechnik werden die Moleküle über chemische Verbindungen auf dem Objektträger verankert. Im ersten Schritt wird die Glasoberfläche mit Flusssäure ($c=0.5\%$) behandelt. Das garantiert

eine saubere Oberfläche, an der das Protein Albumin (engl.: albumin, bovine serum; BSA) als unterste Schicht abgelegt wird. Im Verhältnis 1:10 werden modifizierte BSA-Moleküle hinzugegeben; diese tragen ein kovalent gebundenes Biotin-Molekül. An dieses Biotin kann im nächsten Präparationsschritt ein Streptavidin binden. Streptavidin kann insgesamt vier Biotin-Moleküle an sich binden. Über eine zweite Biotin-Verbindung wird der Farbstoff über einen 60 Basenpaar langen Doppelstrang DNA an der Oberfläche verankert. Die kurzen DNA-Stücke haben den Vorteil, dass sie starr sind und somit eine relativ starre Immobilisierung der Farbstoffe bewirken. Auf diese Weise können unspezifische Wechselwirkungen zwischen Protein und Farbstoff, die zur Löschung der Fluoreszenz führen können, vermieden werden.

Mit Hilfe von Einzelmolekülexperimenten mit rotierender Polarisierung der Anregungsleistung konnte gezeigt werden, dass die Moleküle frei drehbar sind [68]. Mit dieser Technik hat man zwei Ziele erreicht: zum einen sind die Fluorophore fixiert, damit man sie mit dem Mikroskop sichtbar machen kann, und zum anderen befinden sich die Moleküle in Lösung, so dass man den Einfluss von unterschiedlichen chemischen Umgebungen testen kann.

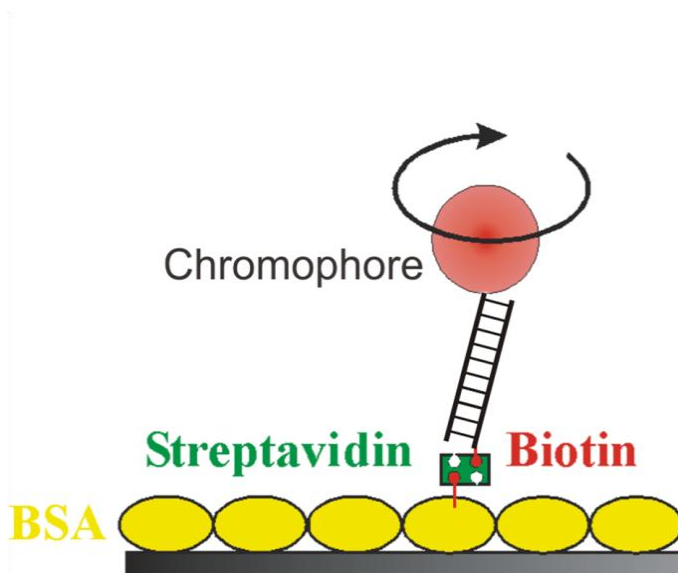


Abbildung 3.2.1: Schematische Abbildung der Immobilisierungstechnik über Biotin-Streptavidin-Bindungen. Die Dichte der Oberfläche kann über das Verhältnis BSA zu BSA-Biotin festgelegt werden. Als Abstandshalter zwischen Oberfläche und Farbstoff dient eine doppelsträngige DNA (60bp).

Verwendete Farbstoffe und Oligonucleotide

Um eine generelle Methode zur Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz zu entwickeln, wurde aus vier Farbstoffklassen jeweils mindestens ein Vertreter für die Messungen benutzt. Ein möglichst vollständiger Überblick wird durch die Auswahl der Farbstoffklassen der Cyanine, Oxazine, Carborhodamine und Rhodamine gewährleistet.

Die Cyaninfarbstoffe wurden von Amersham Bioscience, USA, bezogen, Rhodamin green von der Firma Invitrogen, USA, und die beiden ATTO Farbstoffe ATTO647N und ATTO655 von der Firma ATTO-Tec, Deutschland.

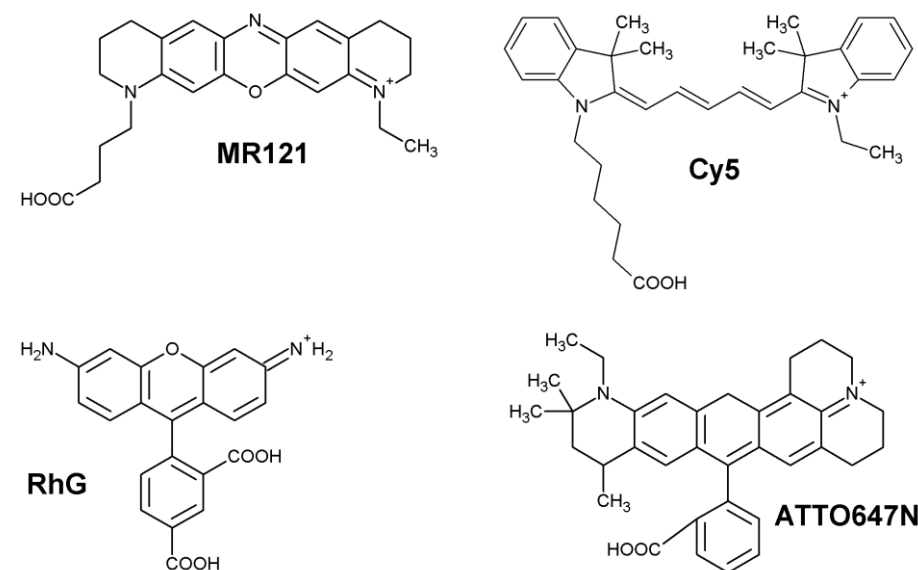


Abbildung 3.2.2: Beispielhaft für die verwendeten Farbstoffklassen sind jeweils die prominentesten Vertreter abgebildet. MR121, dessen Struktur der von ATTO655 ähnlich ist, für die Klasse der Oxazine, Cy5 für die Farbstoffklasse der Cyanine, RhG für die Rhodamine und ATTO647N aus der Farbstoffklasse der Carborhodamine [38, 43, 69, 70].

Über die Anwendung der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Immobilisierungsmethode kann man durch einen Abstandhalter zwischen Proteinoberfläche und Farbstoffmolekülen gewährleisten, dass die Fluorophore vom verwendeten Puffersystem gleichmäßig umspült werden. Als Abstandhalter empfiehlt es sich doppelsträngige DNA zu verwenden. Diese ist bis zu einer Persistenzlänge von etwa 150 Basenpaaren ein starrer Linker und Modifikationen, wie kovalente Bindung des Farbstoffs an der einen und Biotin an der anderen Seite,

lassen sich problemlos durchführen. Außerdem kann man die gewünschte DNA kommerziell nahezu in jeder beliebigen Sequenz, Farbstoffmarkierung und Länge zusammenstellen.

Tabelle 3.2.1. Liste mit den verwendeten Farbstoffen und ihrer zugehörigen Farbstoffklassen. Lebensdauer und maximale Absorptions- und Fluoreszenzwellenlänge in H₂O sind angegeben.

Farbstoffe	Farbstoffklasse	Anregung; (λ_{\max})	Emission; (λ_{\max})	Lebensdauer
Cy3b	Cyanin	558 nm	572 nm	2.8 ns
Cy5	Cyanin	649 nm	670 nm	1,0 ns
Cy5.5	Cyanin	675 nm	694 nm	1,0 ns
Cy7	Cyanin	743 nm	767 nm	0,3 ns
Alexa647	Cyanin	650 nm	665 nm	1,0 ns
Alexa680	Cyanin	679 nm	702 nm	1.17 ns
Alexa700	Cyanin	702 nm	723 nm	1 ns
ATTO647N	Carborhodamin	645 nm	669 nm	3,4 ns
ATTO655	Oxazin	655 nm	680 nm	1,9 ns
MR121	Oxazin	655 nm	680 nm	1.9 ns
ATTO680	Oxazin	680 nm	700 nm	1.8 ns
ATTO700	Oxazin	700 nm	719 nm	1.5 ns
Rhodamin green	Rhodamin	504 nm	532 nm	1,0 ns
Alexa532	Rhodamin	532 nm	554 nm	2.6 ns
ATTO565	Rhodamin	563 nm	592 nm	3.4 ns

Für diese Arbeit wurde immer dieselbe DNA Sequenz benutzt, um die möglichen Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und DNA für alle Proben gleich zu halten. Die Sequenz ist insgesamt 60 Basenpaare lang und ist an einem Ende mit einem Biotin versehen: 5`Amino-ATC GTT ACC AAA GCA TCG TAA ATC GCA TAA TAG CAC GTT AAT TTA GCA CGG ACG ATC GCC-3`-Biotin. Die entsprechende Gegensequenz wurde vor den Experimenten, zusammen mit der jeweiligen Farbstoff-DNA Probe, in PBS Puffer hybridisiert, um eine doppelsträngige Probe zu gewährleisten.

Falls benötigt, wurde für das nachträgliche Markieren der DNA-Sequenz mit einem Farbstoff, die mit einer Aminogruppe modifizierte DNA, über klassische NHS-Ester-Chemie mit Standardlösungsmitteln (Merck, Deutschland) durchgeführt. Dabei wird die DNA in einem 0.1 M Carbonatpuffer (pH9.4) gelöst und zusammen mit einem entsprechenden 5fachen Überschuss an reaktivem NHS-Ester des jeweiligen Farbstoffes über 6 Stunden im Dunklen gelagert. Über eine HPLC (Hewlett-Packard, Deutschland) können die Produkte von den Edukten getrennt werden.

Die Immobilisierung fand in sogenannten LabTek`s (Nunc, Deutschland) statt. Dabei handelt es sich um Probenkammern mit einem Volumen von etwa 1ml die auf Deckgläsern aufgebaut wurden und sich leicht mit Silikonplatten (Sigma, Deutschland) luftdicht verschließen lassen. Die Vorbehandlung der Probenkammern erfolgt über Nacht im Kühlschrank. Die eigentliche Farbstoffbelegung kann auf dem Mikroskop verfolgt werden, so dass man die Dichte kontrollieren und beliebig einstellen kann. Dadurch ist es möglich, ein einzelnes Molekül zu detektieren und die charakteristischen Eigenschaften der Fluoreszenz unter verschiedenen Pufferbedingungen zu untersuchen.

Chemische Manipulation der Pufferumgebung

Pufferbestandteile

Alle Messungen für diese Arbeit wurden in wässrigem Milieu durchgeführt. Die Belegung der Oberfläche fand immer in einem Phosphatpuffer statt (phosphate buffered saline, PBS). Dieser Puffer

ist ein 10 mM Phosphatpuffer mit 2.7 μ M KCl und 137 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7.4. Die Pufferumgebung ließ sich auf Basis des PBS Stamm-puffers leicht verändern. Es wurden die Reagenzien, entweder Oxidations- oder Reduktionsmittel in PBS gelöst und in gewünschter Konzentration zugesetzt.

Die eingesetzten Reduktions- und Oxidationsmittel sind in der Tabelle 3.2.3 aufgeführt.

Tabelle 3.2.3: Namen und Hersteller der verwendeten Reagenzien und deren Verwendungszweck. Außerdem sind die im Text benutzten Namen in die Tabelle integriert.

Trivialname	Hersteller	Art der Wirkung
Trolox; 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethyl- chroman-2-Carboxylsäure	Sigma, Deutschland	Reduktionsmittel
Ascorbinsäure	Sigma, Deutschland	Reduktionsmittel
N-Propylgallat	Sigma, Deutschland	Reduktionsmittel
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deutschland	Reduktionsmittel
β -Mercaptoethylamin (MEA)	Sigma, Deutschland	Reduktionsmittel
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deutschland	Reduktionsmittel
Glutathion	Sigma, Deutschland	Reduktionsmittel
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (TCEP)	Sigma, Deutschland	Reduktionsmittel
NaBH ₃ CN	Sigma, Deutschland	Reduktionsmittel
Methylviologen (MV); 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium- dichloridhydrat	Sigma, Deutschland	Oxidationsmittel
H ₂ O ₂ , Wasserstoffperoxid	Sigma, Deutschland	Oxidationsmittel
TCBQ	Sigma, Deutschland	Oxidationsmittel

Häufig wurde für die Messungen dem Puffer der Sauerstoff entzogen, um dessen Einfluss sichtbar zu machen. Dies konnte auf zwei verschiedene Arten erfolgen: entweder über eine enzymatische Sauerstoffentfernung oder über Ersetzen des Sauerstoffs mit Argon oder Stickstoff durch Spülen der Lösung mit dem jeweiligen Gas über einige Minuten. Bei der enzymatischen Methode werden dem Puffer Glukoseoxidase und Katalase hinzugefügt. Die Glukoseoxidase verbraucht unter Zusatz von Glukose Sauerstoff und bildet daraus H_2O_2 , das wiederum über die Katalase in Wasser umgewandelt wird [71]. Dabei werden dem PBS Puffer 10 % (wt/vol) Glukose, 12,5 % (vol/vol) Glycerol, 50-100 $\mu\text{g/ml}$ Glukoseoxidase, 100-200 $\mu\text{g/ml}$ Katalase und 0.1 mM Tris (2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorid (TCEP) zugesetzt. Anschließend wird die Messkammer luftdicht verschlossen [72].

Mit beiden Methoden wird die Sauerstoffkonzentration in der Lösung auf unter $1\ \mu\text{M}$ gesenkt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung der Farbstofffluoreszenz

In diesem Abschnitt sollen zunächst die Unterschiede der photophysikalischen Eigenschaften zwischen den einzelnen Farbstoffklassen beschrieben werden. Es werden systematisch verschiedene Pufferumgebungen verwendet und die Ergebnisse nach den Kriterien Photostabilität und Blinkverhalten ausgewertet. Außerdem kann der Einfluss der chemischen Umgebung auf die Lebensdauer der Farbstoffe gemessen und dargelegt werden. Dafür wurden die Fluoreszenzsignale der Fluorophore nicht nur in Bildern von einzelnen immobilisierten Molekülen ausgewertet, sondern auch Intensitätssignale über die Zeit aufgenommen und auf die gesamte Lebensdauer eines Moleküls, als auch auf die An- und Auszeiten hin untersucht. Mit der gepulsten Laseranregung ist es außerdem möglich die Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen.

Die Photophysik des Cyaninfarbstoffes Cy5 bzw. Alexa647 ist aufgrund des häufigen Einsatzes in der Einzelmolekülspektroskopie schon Teil von zahlreichen Untersuchungen gewesen. So sind die Zeitkonstanten für die Cis-Trans-Isomerisierung, die Generierung von Auszuständen aus dem Triplett sowie die optische Schaltbarkeit zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht-fluoreszierenden Zustand mittels einer zweiten Laserwellenlänge bekannt [29, 35, 42-44, 73, 74]. Die Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz und die gesteigerte Photostabilität, durch den Sauerstoffentzug der Lösung bei gleichzeitiger Zugabe von Triplettquenchern, wie z.B. β -Mercaptoethylamin (MEA) oder Trolox, erhöht die Einsetzbarkeit dieses Farbstoffes zusätzlich [36, 75-77]. Anhand der Charakterisierung der Photophysik von Farbstoffen unterschiedlicher Klassen soll diskutiert werden, ob diese Bedingungen, die die Cy5 Fluoreszenz positiv beeinflussen, auch für Farbstoffe anderer Klassen anwendbar sind. Ziel war es, die chemische Umgebung so zu

beeinflussen, dass man für die vier verschiedenen Farbstoffklassen eine Erhöhung der Photostabilität erreichen kann, um daraus ein allgemeingültiges Prinzip abzuleiten.

Eine erste Klassifizierung der Fluoreszenzcharakteristika fand unter vier verschiedenen, physiologischen Bedingungen statt: nur in PBS, in PBS mit zusätzlich MEA, wie in bisherigen Publikationen in 100 mM Konzentration eingesetzt, in PBS aber ohne Sauerstoff in der Lösung durch Anwendung der enzymatischen Entzugsmethode und schließlich ohne Sauerstoff in der Lösung unter Zugabe von 100mM MEA. Abbildung 4.1.1 zeigt typische Intensitätsspurten der Farbstoffe unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen.

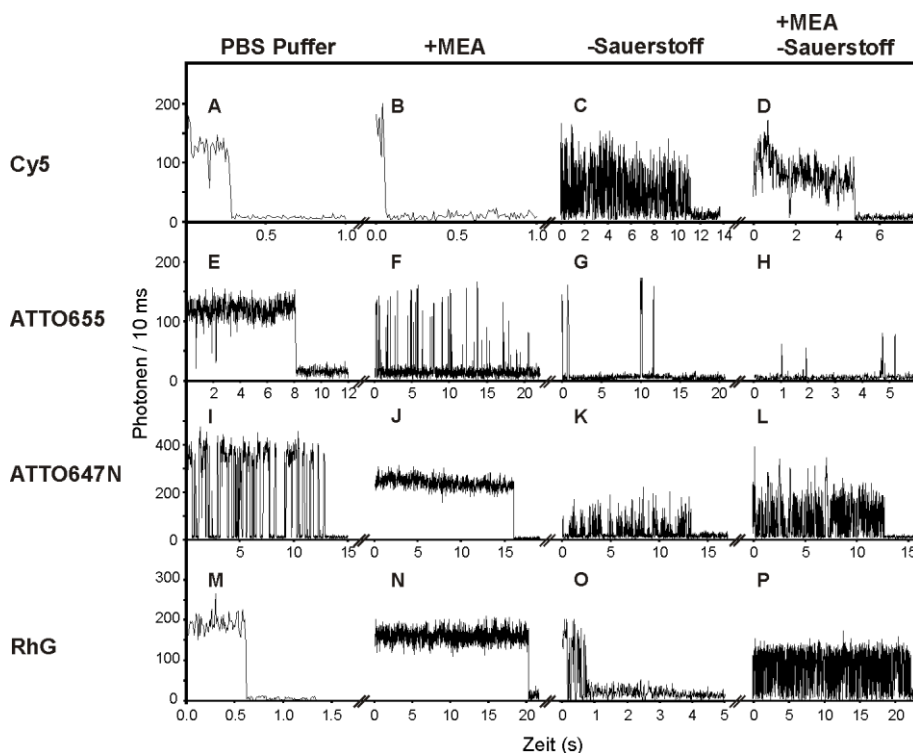


Abbildung 4.1.1: Fluoreszenzsignale, aufgetragen über die Zeit, von immobilisierter, farbstoffmarkierter 60bp DNA. Markiert wurde mit Cy5 (A-D), ATTO655 (E-H), ATTO647N (I-L) und Rhodamin Green (M-P). Die Pufferbedingungen sind über den jeweiligen Spalten aufgeführt [39].

In der Abbildung 4.1.1. (A-D) kann man den schon beschriebenen Stabilisierungseffekt für Cy5 nach Sauerstoffentzug und Zugabe von MEA erkennen. In purem PBS (Abb.4.1.1 A) emittiert der Farbstoff im Durchschnitt 3400 Photonen vor der endgültigen Photozerstörung. Nach Zugabe von MEA (Abb. 4.1.1 B) wird die Photostabilität nicht entscheidend erhöht, aber entzieht man der PBS Lösung den Sauerstoff, kann man im Durchschnitt 85000 Photonen pro Cy5 Molekül detektieren. Da Sauerstoff eine triplettquenched Wirkung aufweist, ist die Intensitätsspur von zahlreichen Auszuständen unterbrochen; immer wenn der Farbstoff im Tripletzustand verweilt (Abb. 4.1.1 C) oder eine Ladungstrennung über Elektronentransfer stattfindet [78]. Wenn man zusätzlich zum Sauerstoffentzug noch MEA in 100mM Konzentration zugibt (Abb. 4.1.1 D), kann die Gesamtzahl von Photonen nicht mehr gesteigert werden, aber man erreicht eine kontinuierliche Aussendung der Fluoreszenz, ohne Unterbrechung durch Blinken. Es werden im Durchschnitt 45000 Photonen detektiert, bevor der Farbstoff bleicht. Alexa647 und Cy5.5 verhalten sich unter den vier Bedingungen ähnlich wie Cy5. Dies spricht für ein einheitliches Verhalten der Klasse der Carbocyanine unter diesen Bedingungen. Auch für diese Farbstoffe sind Sauerstoffentzug des Puffers und Zugabe von 100mM MEA die optimalen Bedingungen. Die Verringerung der Gesamtphotonen wird wahrscheinlich durch die Tendenz des Farbstoffes, in einen langlebigen, schaltbaren Auszustand zu wechseln, verursacht. Dieser kann mit Hilfe einer zweiten Laserwellenlänge zwischen 300 und 532 nm in den fluoreszierenden Zustand überführt werden [43]. Die speziellen photophysikalischen Eigenschaften der Cyaninfarbstoffe werden, wegen ihrer Wichtigkeit und dem Potential für die Einzelmolekülspektroskopie, im Kapitel 4.3 ausführlich behandelt.

Wenn man den zentralen Kohlenstoff eines Xanthenfarbstoffs gegen ein Stickstoffatom austauscht, erhält man die Strukturklasse der Oxazine, siehe Abbildung 3.2.2. Der mit einer größeren Elektronegativität versehene Stickstoff führt zu einer Verschiebung der maximalen Absorption der Oxazine von etwa 100 nm gegenüber

vergleichbaren Rhodaminen. Wegen der veränderten Reduktions- und Oxidationseigenschaften finden sie ihren Einsatz als Elektronentransferproben im roten Spektralbereich [79, 80]. Hier wird nicht explizit zwischen ATTO655 und MR121 unterschieden, da diese ähnliche spektroskopische Eigenschaften besitzen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die chemischen Strukturen ebenfalls ähnlich sind [37]. Unter reinen PBS Bedingungen ist die Fluoreszenz von ATTO655 stabil und es werden im Durchschnitt 48000 Photonen pro Molekül emittiert, ohne dass die Intensitätsspur von Blinken unterbrochen wird. Es treten vereinzelt Auszeiten auf, die nicht korrelierbar sind. In früheren Arbeiten konnten bei dem strukturähnlichen Farbstoff MR121 Intensitätssprünge auf einer Millisekunderskala festgestellt werden. Außerdem wurde ein blauverschobener Zustand, hervorgerufen durch partielle Oxidation des Fluorophors, und ein nicht-fluoreszierender Zwischenzustand detektiert [81]. Die Photostabilität dieser Farbstoffe kann durch das Anbinden an DNA um das 20 fache, im Gegensatz zu freiem Farbstoff, gesteigert werden, was den Schluss nahelegt, dass die Nähe oder vielmehr die Wechselwirkung mit DNA die Photostabilität positiv beeinflusst [82]. Wenn man MEA in 100mM Konzentration zu der PBS-Lösung zugibt oder der Lösung den Sauerstoff entzieht, ändert sich das Bild, im Gegensatz zum Verhalten von Cy5, vollständig. Die Zugabe von MEA erzeugt ein Blinken mit typischen Auszeiten von 130ms (Abb. 4.1.1 F). Entfernt man den Sauerstoff (Abb. 4.1.1.G) findet man noch längere Auszustände, bis zu einer Länge im Sekundenbereich, unterbrochen von kurzen Anzeiten, die sich als Photonenschauer in den Intensitätsspuren widerspiegeln. Die Kombination von Sauerstoffentzug und Zugabe von 100 mM MEA, (Abb. 4.1.1.H), ändert das Verhalten der Fluoreszenz von ATTO655 nicht zu dem bei Zugabe von MEA ohne Sauerstoffentzug. Während die Photostabilität nicht vermindert wird, ist die Intensitätsspur von häufigem Blinken unterbrochen und eignet sich nicht für eine Beobachtung über die Zeit. Erstaunlicherweise sind die Bedingungen, unter denen Oxazine die höchste Photostabilität und die wenigsten Unterbrechungen der Fluoreszenzintensität durch Blinken zeigen, Anwesenheit von

Sauerstoff ohne Zugabe von MEA und unterscheiden sich zu denen der Cyaninfarbstoffe.

Xanthere und Oxazine können als Diphenylmethan Derivate angesehen werden, die über eine Sauerstoffbrücke stabilisiert werden. Wie bei Carborhodaminen wird durch ein Kohlenstoffatom die Absorption zum roten Spektralbereich verschoben [83]. Die Fluoreszenz von ATTO647N unter PBS-Puffer Bedingungen ist, im Gegensatz zu den Oxazinen und Cyaninen unter diesen Bedingungen, am stabilsten und die Fluoreszenzintensität bei gleicher Anregungsleistung ist die Höchste der genannten Farbstoffklassen (Abb. 4.1.1 I). Bevor das Molekül photozerstört wird, werden durchschnittlich 165000 Photonen ausgesendet bzw. können detektiert werden. Die typischen Auszeiten liegen bei 164 ms. Interessanterweise verschwindet das Blinken nach der Zugabe von 100 mM MEA (Abb. 4.1.1 J). Der Farbstoff fluoresziert ohne Unterbrechung und die Photostabilität reicht bis zu einer Länge von mehr als einer Minute. Die Anzahl der im Mittel ausgesendeten Photonen erhöht sich unter diesen Bedingungen auf 270000 pro Molekül. Im Gegensatz dazu steht das Verhalten unter Sauerstoffentzug; es ist ein stark ausgeprägtes Blinken mit einer Auszeit von 12 ms zu beobachten (Abb. 4.1.1 K). Wenn man zusätzlich zum Sauerstoffentzug MEA in 100 mM Konzentration hinzugibt, wird das Bild komplexer (Abb. 4.1.1 L). Man findet typische Auszeiten über verschiedene Zeitskalen, die nicht mehr korrelierbar sind.

Rhodamine-Derivate sind die am häufigsten benutzten Fluoreszenzfarbstoffe, da sie über eine hohe Leuchtkraft pro Molekül und eine gute Photostabilität verfügen. Über Modifikationen an der Grundstruktur lassen sich die Übergangsenergien soweit verändern, dass man Rhodamine mit Absorptions- und Fluoreszenzspektren über einen Wellenlängenbereich von ca. 500 nm (RhG) bis zu 650 nm (LCR) herstellen kann. RhG wurde als typisches Rhodamin ausgewählt und die Fluoreszenzspuren sind in Abbildung 4.1.1 M-P abgebildet. Unter PBS-Puffer Bedingungen ist die Photostabilität nicht ausreichend und es werden pro Molekül im Durchschnitt nur etwa 20000 Photonen

detektiert. Die Zahl der Photonen erhöht sich nach Zugabe von 100 mM MEA auf etwa 225000 Photonen pro Molekül (Abb. 4.1.1 N). Das Fluoreszenzsignal ist kontinuierlich und nicht von Blinken unterbrochen; die Photostabilität steigt an. Über Sauerstoffentzug kann die Stabilität der Fluoreszenzemission nicht weiter erhöht werden, eher im Gegenteil, es werden nur noch 95000 Photonen im Durchschnitt pro Molekül detektiert (Abb. 4.1.1 O). Unter diesen Bedingungen blinkt der Farbstoff auf einer Zeitskala von Millisekunden. Unter Sauerstoffentzug und Zugabe von MEA (Abb. 4.1.1 P) ist die Emission wieder stabil und die Photonenanzahl pro Molekül kann auf etwa 200000 Photonen gesteigert werden. Im Gegensatz zu den Cyaninen ist das Blinken nicht unterdrückt, die typischen Auszeiten liegen bei 11ms. Ähnliches Verhalten zeigen die übrigen Rhodamine, wie TMR, ATTO590 und LCR. Zusammenfassend kann man sagen, dass die optimalen Bedingungen für Rhodamine gegeben sind, wenn man den Sauerstoff aus dem Puffer nicht entfernt und 100 mM MEA hinzugibt.

Die Auswertung der Intensitätsspuren bezüglich der An- und Auszeiten, mit den Möglichkeiten der in 2.3 beschriebenen Autokorrelation, für alle vier Farbstoffe unter den genannten Bedingungen, sind in Tabelle 4.1.1 dargestellt.

Tabelle 4.1.1: Darstellung der mit Hilfe der Autokorrelation berechneten Auszeiten τ_{Aus} für die unterschiedlichen Farbstoffe unter verschiedenen Bedingungen [39].

		PBS	PBS+MEA	PBS; ohne Sauerstoff	PBS+MEA; ohne Sauerstoff
Cy5	τ_{Aus} (ms)	0.01 / 12.8	0.11	0.08 / 2.7 / 23	0.05 / 11
ATTO655	τ_{Aus} (ms)	- ^a	132	- ^b	299
ATTO647N	τ_{Aus} (ms)	164	0.04	12	- ^b
Rhodamin Green	τ_{Aus} (ms)	- ^a	- ^a	0.2 / 24	11

^a Autokorrelation mit $1\mu\text{s}$ Zeitauflösung ergibt keine statistisch relevanten Zeitkomponenten;

^b Multi-exponentielle Korrelationen in variierenden Zeitskalen

Diskussion der Unterschiede in der Photophysik

Die Messungen zum Fluoreszenzverhalten der verschiedenen Farbstoffklassen unter unterschiedlichen Bedingungen führen zu bestimmten empirischen Auswahlregeln, um für die jeweiligen Messbedingungen den bestmöglichen Farbstoff auszuwählen. Dabei muss man unterscheiden, welche Anforderungen an den Farbstoff zu stellen sind, wie etwa hohe Photostabilität oder wenige Unterbrechungen der Emission durch Blinken.

Hier sollen die Gründe für die Unterschiede in der Emission genauer diskutiert und die Ursprünge dargestellt werden. Blinken mit typischen Auszeiten im Bereich von Millisekunden wird oftmals mit Übergängen in einen langlebigen Triplettzustand erklärt. Diese Erklärung scheitert,

wenn man den Sauerstoff nicht aus der Lösung entfernt, da Sauerstoff als effizienter Quencher für diesen Zustand gilt. Ohne Sauerstoffentzug sind Konzentrationen von etwa 250 μM in der Lösung zu erwarten [84].

Nach Entfernen des Sauerstoffs, fällt dieser als Triplettquencher aus und die Ursache für das Blinken sind Übergänge ins Triplett bzw. andere radikalische Zwischenzustände aus dem Triplettzustand [78]. Neben diesen eher einfachen Erklärungsversuchen müssen aber noch andere Lösungsvorschläge in Betracht gezogen werden. Beispielsweise reichen diese Erklärungen nicht aus, um die komplizierte Photophysik der Cyanine - am Beispiel von Cy5 und Alexa647 - hinreichend zu beschreiben [29, 43, 44, 74, 85-87]. Wenn man den großen Einfluss der Zugabe des Triplettquenchers und Reduktionsmittels MEA mit in die Erklärung einfließen lässt, kann man das Blinken auf die Redoxpotentiale der einzelnen Farbstoffe zurückführen. Deshalb sind in Tabelle 4.1.2 die Potentiale für Oxidation und Reduktion einzelner Farbstoffe abgebildet.

Tabelle 4.1.2: Gemessene Oxidations- und Reduktionspotentiale der angegebenen Farbstoffe, repräsentativ für die verwendeten Farbstoffklassen. Angegeben sind die entsprechenden Übergangsenergien $E_{0,0}$. Die Redoxpotentiale wurden mit Hilfe der zyklischen Voltametrie in Acetonitril bestimmt. Anstelle von RhG ist hier R6G angegeben, die chemischen Strukturen sind ähnlich [39].

Farbstoff	E_{ox} (V/SCE)	E_{red} (V/SCE)	$E_{0,0}$ (eV)
Cy5	0.97	-0.84	1.88
MR121 bzw. ATTO655	1.31	-0.42	1.86
ATTO647N	1.11	-0.64	1.9
R6G	1.39	-0.95	2.27

Die Effizienz der Ladungstrennung kann über die Rehm-Weller Gleichung aus Abschnitt 3.1.1 bestimmt werden. Daraus lässt sich die

Energiedifferenz für die Ladungstrennung, sowohl durch Oxidation, als auch Reduktion über einen Reaktionspartner, ablesen:

$$\Delta G_{LS} = E_{ox} + E_{red} + E_{0,0} + C$$

mit dem Oxidationspotential E_{ox} des Farbstoffs, dem Reduktionspotential E_{red} des Reaktionspartners, oder umgekehrt. $E_{0,0}$ ist die Energie des S_0 - S_1 Übergangs und C die lösungsmittelabhängige Couloumbenergie [88, 89]. In Lösungsmitteln mit relativ geringer Polarität, wie z.B. PBS kann die Couloumbenergie vernachlässigt werden. Daraus folgt, dass Farbstoffe mit niedrigem Oxidationspotential bzw. solche mit hohem Reduktionspotential leicht photoinduziert oxidiert bzw. reduziert werden können.

Die hier untersuchten Farbstoffe MR121 und der strukturverwandte ATTO655, sind am zugänglichsten für photoinduzierte Elektronentransferprozesse. Diese Aussage spiegelt sich in den Spuren der Fluoreszenzintensität wieder: der Farbstoff zeigt unter PBS-Bedingungen die stabilste Fluoreszenz, nach Zugabe des Reduktionsmittel MEA ist ein ausgeprägtes Blinken zu beobachten, wahrscheinlich verursacht von einer photoinduzierten Reduktion des Moleküls. Entzieht man der Lösung den Sauerstoff werden die Auszeiten des Blinkens noch länger. Die radikalischen Zwischenzustände scheinen eine noch längere Lebensdauer zu besitzen, als unter Zugabe von MEA.

Der Cyaninfarbstoff Cy5 zeigt unter reduktiven Bedingungen und gleichzeitigem Sauerstoffentzug das stabilste Emissionsverhalten. Dies spiegelt sich in einem geringen Reduktionspotential wieder.

Rhodamine hingegen neigen, durch die hier verwendeten Reagenzien, weder zur Reduktion noch zur Oxidation. Die Auszeiten des Blinkens können als Übergänge ins Triplett bzw. photoinduzierte Prozesse von höher angeregten Zuständen beschrieben werden. Dies gilt zumindest für die rotverschobenen Rhodamin-Derivate. Im Vergleich dazu tritt ein photoinduzierter Elektronentransfer bei blau-verschobenen Rhodaminen aufgrund der höheren $E_{0,0}$ Energie häufiger auf.

Der Farbstoff ATTO647N zeigt eine höhere Tendenz zur Oxidation bzw. Reduktion als Rhodamine, aber die Wahrscheinlichkeit solcher photoinduzierter Reaktionen ist immer noch deutlich geringer, als bei den Oxazinen ATTO655 oder MR121. Speziell das Blinken in purem PBS ist überraschend und kann durch die Oxidations- bzw. Reduktionspotentiale an dieser Stelle nicht erklärt werden. Im nächsten Abschnitt wird bei der Beschreibung der Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz mit einem System aus Reduktions- bzw. Oxidationsmittel versucht, diesen Effekt genauer darzustellen, um zu einer Erklärung zu gelangen.

Zunächst lässt sich aufgrund dieser Messungen feststellen, dass Farbstoffe aller Klassen sensitiv auf die jeweilige chemische Umgebung reagieren. Die Auszeiten der Fluoreszenzintensität können nicht ausschließlich durch Übergänge in den langlebigen Tripletzustand erklärt werden. Des Weiteren reagieren die verschiedenen Klassen unterschiedlich auf die Umgebung und die optimalen Bedingungen für den jeweiligen Farbstoff variieren. Carborhodamine und Rhodamine reagieren ähnlich und zeigen nahezu die gleiche Photophysik: die optimalen Bedingungen im Bezug auf Photostabilität, Blinken und Leuchtkraft pro Molekül sind PBS-Puffer bei pH7.4 in Anwesenheit von Sauerstoff und der Zugabe von 100 mM MEA. Die Wirkung der Reduktionsmittel als Tripletquencher kann durch den Einsatz von β -Mercaptoethanol oder Trolox bestätigt werden. Für Cyaninfarbstoffe sind die optimalen Bedingungen unter PBS, Sauerstoffentzug und Zugabe von 100 mM MEA. Die Klasse der Oxazine hingegen zeigt die stabilste Fluoreszenz in PBS bei pH7.4 ohne Sauerstoffentzug und ohne Zugabe eines Reagenz.

Eine ähnliche Photophysik innerhalb einer Farbstoffklasse ist besonders wichtig, für den Einsatz von Farbstoffen für FRET Proben [90]. Dabei kann unterschiedliches Fluoreszenzverhalten die Analyse des Energietransfers und somit die Aussagen über die Ergebnisse der Experimente erschweren. Des Weiteren sollten insbesondere bei Mehrfarben-Einzelmolekülexperimenten Farbstoffe aus derselben

Klasse ausgewählt werden, z.B. nur Cyanine oder Rhodamine bzw. Carborhodamine.

Einige Fragen, die wegen dieser Messungen aufgeworfen werden, können an dieser Stelle nicht geklärt werden:

Könnte man ein generelles Prinzip entwickeln, um die Fluoreszenzstabilität von verschiedenen Farbstoffklassen gleichermaßen zu erhöhen?

Warum kann man das Reduktionsmittel MEA zum Schalten von Cy5 benutzen, mit Trolox ist aber kein Schalten möglich?

Diese Fragen werden Bestandteil der nächsten beiden Kapitel sein.

4.2 Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz

In diesem Kapitel wird eine Möglichkeit erörtert, die sich als generelles Konzept zur Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz eignet. Aufbauend auf den Studien aus Kapitel 4.1 wird gezeigt, dass man über das Verständnis der Photophysik und die Anwendung von Reaktionen, beruhend auf der Reduktion oder Oxidation des Farbstoffes, eine schnelle Rekombination ermöglichen kann. Aus dem langlebigen Triplett kann der nicht-fluoreszierende Farbstoff über eine Redox-Reaktion simultan in den Grundzustand überführt werden. Man kann die chemischen Eigenschaften des Puffersystems, im Bezug auf die Redox-Potentiale, so verändern, dass man ein generelles Prinzip entwickeln kann, das für die meisten Farbstoffklassen anwendbar ist. Im folgenden Kapitel wird der Aufbau und die Wirkungsweise dieses Systems systematisch erklärt und analysiert. Dafür werden Intensitätspuren von zunächst drei verschiedenen Farbstoffen, die für das Kapitel 4.1 untersucht wurden, in Bezug auf Stabilität und Kinetik des Blinkens analysiert.

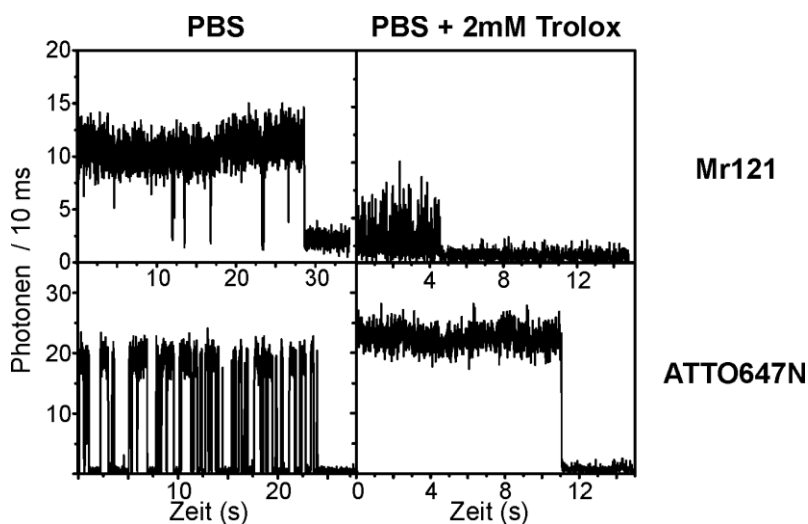


Abbildung 4.2.1: Einzelmolekül-Fluoreszenzspuren der Farbstoffe MR121 und ATTO647N, an immobilisierter DNA, jeweils gemessen in PBS und PBS nach Zugabe von 2mM Trolox [40].

Ein entscheidendes Problem bei der Entwicklung eines generellen Konzepts zur Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz ist das unterschiedliche Verhalten der Farbstoffe bei gleichen chemischen Bedingungen, siehe Abb. 4.2.1. In reinem PBS-Puffer zeigt der Farbstoff MR121 eine für fast 30 Sekunden stabile Fluoreszenz mit seltenen Aus-Zuständen. Die Fluoreszenzintensität wird nur an einigen Stellen von Blinken des Farbstoffs unterbrochen. Die Zugabe von Trolox verringert die Photostabilität auf weniger als 5 Sekunden und die Spur wird immer wieder von Blinken unterbrochen. Der Farbstoff ATTO647N zeigt ein gegensätzliches Verhalten, unter PBS-Bedingungen ist die Fluoreszenz ähnlich stabil, weist aber häufige Aus-Zustände im Bereich von einigen hundert Millisekunden auf. Wenn man Trolox zu der Lösung in 2mM Konzentration hinzugibt, verschwinden die Aus-Zustände komplett, das Fluoreszenzsignal ist stabil.

Um dieses ambivalente Verhalten zu erklären und dann in einem weiteren Schritt beseitigen zu können, ist es notwendig die Photophysik der Fluorophore genauer zu betrachten. Die Photophysik von Farbstoffen wird üblicherweise in einem Dreizustandsmodell beschrieben, dem Grundzustand S_0 , dem ersten angeregten Zustand S_1 und dem Triplettzustand T_1 . Dieses Modell wurde bereits im vorherigen Kapitel um weitere Zustände erweitert. Es kann sich sowohl um intermediäre Zwischenzustände oder auch ladungsseparierte, radikalische Zustände handeln. Dabei kommt dem Triplettzustand eine ganz besondere Rolle zu, sowohl wegen der Unterbrechung des Fluoreszenzsignals durch Verweilen des Farbstoffs in diesem Zustand, als auch als Ausgangspunkt für weitere Reaktionen, die zur endgültigen Photozerstörung oder in weitere Zwischenzuständen führen können. Dieser Zustand soll möglichst schnell und effizient entvölkert werden. In PBS-Puffer entvölkert molekularer Sauerstoff das Triplett über dynamische Löschung sehr effizient. Dabei entstehen hochreaktive, radikalische Sauerstoffreste die mit dem Triplettzustand ebenfalls angeregter Farbstoffe reagieren können. Diese Reaktionen sind als Hauptursache für die Photozerstörung

bekannt [91]. Dabei bilden sich, aus dem Triplett durch die Reaktion mit Sauerstoffradikalen, irreversible Produkte und das Molekül steht für die weitere Anregung nicht mehr zur Verfügung. Wenn man den Sauerstoff aus der Lösung entfernt, werden die Verweilzeiten im Triplettzustand verlängert. Dies hat zur Folge, dass das Molekül über erneute Absorption eines Photons in höher angeregte Triplettzustände angehoben werden kann. Auch diese Zustände führen zu einer irreversiblen Photozerstörung.

Die Herausforderung bestand nun darin, den hochreaktiven Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen und einen Weg zu finden, den langlebigen Triplettzustand effizient zu entvölkern, um eine Wiederanregung des Farbstoffes zu ermöglichen. Zustände können besonders effizient mit Hilfe von Elektronentransferprozessen auf Basis des dynamischen Quenching entvölkert werden. Die Entwicklung des Konzepts zur Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz wird folgendermaßen durchgeführt: der Sauerstoff wird aus der Lösung entfernt, um die Störeinflüsse durch hochreaktive Sauerstoffradikale zu unterbinden. Alternativ wird der Triplett über Elektronentransferreaktionen gelöscht. Entweder wird das Molekül aus dem Triplett reduziert oder oxidiert. Als Produkte entstehen Radikalanionen oder Radikalkationen des Farbstoffs. Die einzelnen Reaktionswege werden in der folgenden Abbildung dargestellt und im nächsten Abschnitt genauer erläutert.

In schwarz ist das allgemeingültige Dreizustandssystem mit dem Singulett-Grundzustand S_0 , dem ersten angeregten Zustand S_1 und dem Triplettzustand T_1 , sowie den beteiligten Raten, abgebildet.

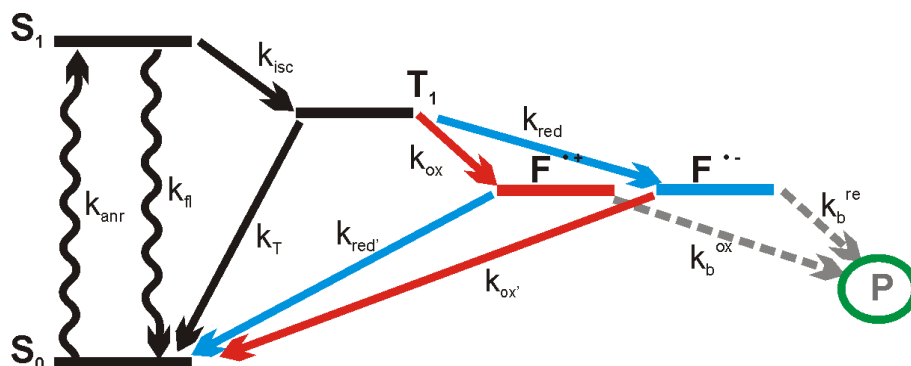
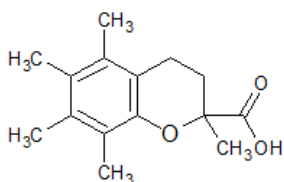


Abbildung 4.2.2: Schematische Darstellung der Zustände eines Farbstoffmoleküls inklusive Erweiterung von reduzierten als auch oxidierten Zuständen. Die blaue Farbe steht für eine Reduktion des Moleküls und in rot ist die Oxidation abgebildet.

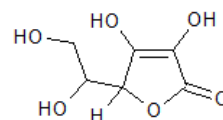
Für das Depopulieren des Triplets bestehen durch Elektronentransfer zwei verschiedene Möglichkeiten, entweder gibt der Farbstoff ein Elektron weiter an den Quencher oder der Quencher überträgt ein Elektron auf das Farbstoffmolekül. Im ersten Fall spricht man von der Oxidation des Farbstoffs, es entsteht ein Radikalkation; dieser Reaktionsweg ist in rot abgebildet. Als Stoßpartner für den Farbstoff muss ein Oxidationsmittel eingesetzt werden, das das Elektron aufnehmen kann. Die schnelle Rekombination in den Singulett-Grundzustand ist bei diesem radikalischen Zwischenzustand besonders wichtig, da dieser hochreaktiv ist und als Ausgangspunkt für Folgereaktionen dienen kann, die zur endgültigen Photozerstörung des Farbstoffs führen. Die Folgereaktionen sowohl für das Kation, als auch das Anion sind in grau angedeutet. Für die Rekombination des Kations in den Grundzustand wird ein Reduktionsmittel benötigt. Nach Abgabe eines Elektrons an den Farbstoff, kann das Molekül in den Grundzustand überführt werden und steht für eine Wiederanregung bereit. Die Reduktion aus dem Zustand des Radikalkations ist in blau dargestellt. Eine Folge von Oxidation bei anschließender Reduktion überführt das Molekül aus dem Triplettzustand über den radikalischen Zwischenzustand zurück in den Grundzustand. Diese Reaktionen

können auch in umgekehrter Reihenfolge ablaufen. Zuerst wird ein Elektron auf den Farbstoff übertragen, über eine Reduktion wird das Anion gebildet. Dieses Anion wird anschließend oxidiert, es überträgt ein Elektron auf den Reaktionspartner und wird in den Grundzustand überführt. Es ist in beiden Fällen eine Redox-Reaktion, die den Farbstoff aus dem langlebigen Triplett, über einen radikalischen Zwischenzustand, in den Grundzustand überführt. Als Abkürzung für diese Pufferumgebung wurde das Synonym ROXS eingeführt, **re**duzierendes und **o**xidierendes **S**ystem zur Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz. Der Ansatz Oxidations- und Reduktionsmittel gleichzeitig in einem Puffer einzusetzen, wird im folgenden Teil der Arbeit diskutiert und als generelle Methode zur Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz angewendet. Durch Messung der Reduktions- sowie Oxidationspotentiale der verwendeten Farbstoffe und den Vergleich mit den Potentialen der verwendeten Reagenzien, kann mit Hilfe der Rehm-Weller Gleichung das Prinzip dieses Systems überprüft und bestätigt werden.

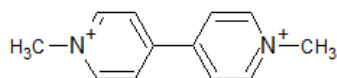
Die jeweiligen Startreaktionen für die Rekombination aus dem Triplett in den Grundzustand, werden durch Farbstoffeigenschaften bestimmt und hängen von den Energien des Radikalanions und Radikalkations ab. Für den Aufbau des ROXS-Puffers wurde als Reduktionsmittel Trolox und Ascorbinsäure verwendet und als Oxidationsmittel Methylviologen benutzt. In Abbildung 4.2.3 sind die chemischen Strukturen der verwendeten Reagenzien und die ursprünglichen Strukturbezeichnungen abgebildet.



6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure



Ascorbinsäure



1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichlorid-hydrat

Abbildung 4.2.3: Schematische Darstellung der Strukturen der verwendeten Reagenzien und die jeweiligen Strukturbezeichnungen. Im Text werden die Trivialnamen Trolox für die 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure und Methylviologen für das 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-dichlorid-hydrat verwendet.

Im folgenden Abschnitt wird die Wirkung des Puffersystems systematisch erklärt. Dies geschieht anhand des Beispiels des Cyaninfarbstoffs Cy5 und dem Carborhodamin ATTO647N. Am Ende des Kapitels kann das ROXS-Prinzip auf andere Farbstoffe und Farbstoffklassen übertragen werden, um die generelle Anwendung dieses Prinzips zu verdeutlichen.

ROXS-systematischer Aufbau am Beispiel von Cy5

Vor den Messungen wird der Sauerstoff aus der Lösung entfernt. Die Auswirkungen dieses Schrittes wurden schon in Kapitel 4.1 ausführlich erläutert und sollen in diesem Abschnitt nicht mehr explizit diskutiert werden. Im Folgenden werden deshalb die Auswirkungen der Zugabe der Reduktions- bzw. Oxidationsmittel auf die Fluoreszenzstabilität in Bezug auf Blinken und Dauer der Fluoreszenzemission aufgezeigt.

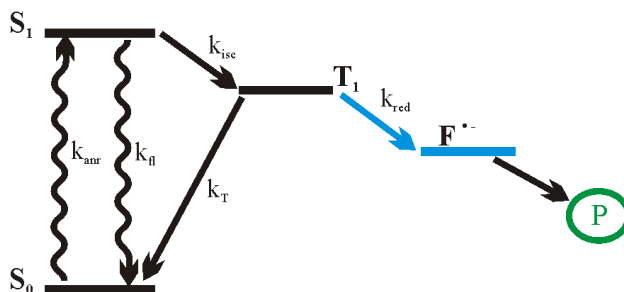
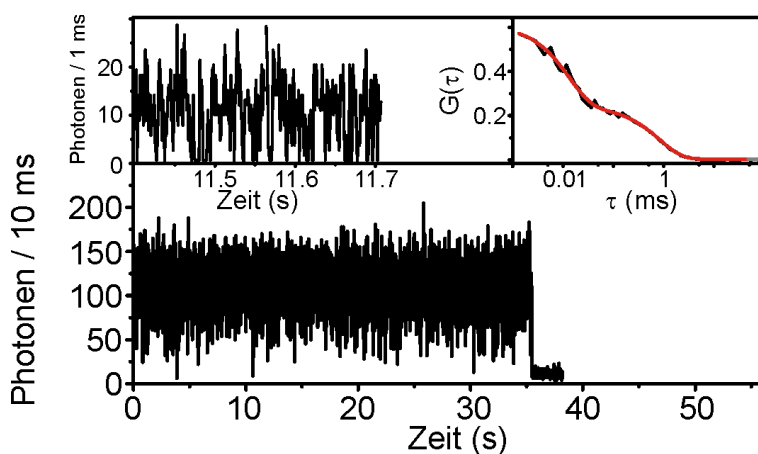


Abbildung 4.2.4: Darstellung des Fluoreszenzsignals des Farbstoffs Cy5 an immobilisierter DNA, nach enzymatischer Sauerstoffentfernung und Zugabe von 1mM Trolox. Die Spur links oben zeigt eine Vergrößerung des Fluoreszenzsignals mit 1 ms Zeitauflösung und oben rechts die Autokorrelation zweiter Ordnung mit bi-exponentieller Anpassung. Unten ist das Zustandsdiagramm mit dem Reaktionsweg der Reduktion aufgezeigt.

Die Fluoreszenzemission von Cy5 wird, im Gegensatz zur Emission in reinem PBS oder in PBS nach Sauerstoffentzug, deutlich stabiler. Der Farbstoff emittiert in der Fluoreszenzspur über 35 Sekunden. Wenn man die Spur vergrößert und mit einer Zeitauflösung von 1 ms abbildet (oben rechts), kann man erkennen, dass die Spur immer wieder durch Auszeiten unterbrochen wird. Die Autokorrelation liefert zwei charakteristische Zeiten. Die kurze Zeitkomponente von 33 μ s deckt sich mit bisher veröffentlichten Ergebnissen [35, 92]. Als Ursache gilt die Cis-Trans Isomerisierung des Farbstoffs aufgrund struktureller Eigenschaften der Polymethinbrücke des Moleküls. Diese Kinetik ist eine intrinsische Eigenschaft des Farbstoffs und kann mit keinem Reduktions- oder Oxidationsmittel beseitigt werden. Die zweite Zeitkomponente liegt bei 2 ms, sie entspricht der Lebensdauer des Radikalanions; im Zustandsdiagramm in Abb. 4.2.4 in blau dargestellt. Durch Elektronentransfer, zwischen dem Farbstoff aus dem Triplett und Trolox aus der umgebenden Lösung, wird dieser Zustand erreicht. Die, aus Kapitel 4.1 bekannte, Lebensdauer des Triplettzustands von 3 ms wird durch die Reduktion verkürzt. Die Lebensdauer dieses Zwischenzustands reicht aus, um Ausgangspunkt für die endgültige Photozerstörung zu sein. Das Blinken kann durch die Zugabe von Trolox nicht vollständig unterdrückt werden, die Stabilität der Fluoreszenzemission kann deutlich erhöht werden.

Wenn man anstatt Trolox Methylviologen in 1 mM Konzentration zu der Pufferlösung hinzugibt, zeigt sich ein ähnliches Bild. Auch in Abb. 4.2.5 sind in der Autokorrelation zwei Zeitkomponenten zu erkennen, die kurze Zeitkomponente der Cis-Trans Isomerisierung bei etwa 30 μ s und eine längere charakteristische Zeit bei 1.7 ms. Diese Zeit entspricht der charakteristischen Lebensdauer des oxidierten Farbstoffs, dem Radikalkation. Auch dieser Radikalzustand wird aus dem Triplett gebildet, aber diesmal durch Oxidation mit Hilfe von Methylviologen in 1 mM Konzentration.

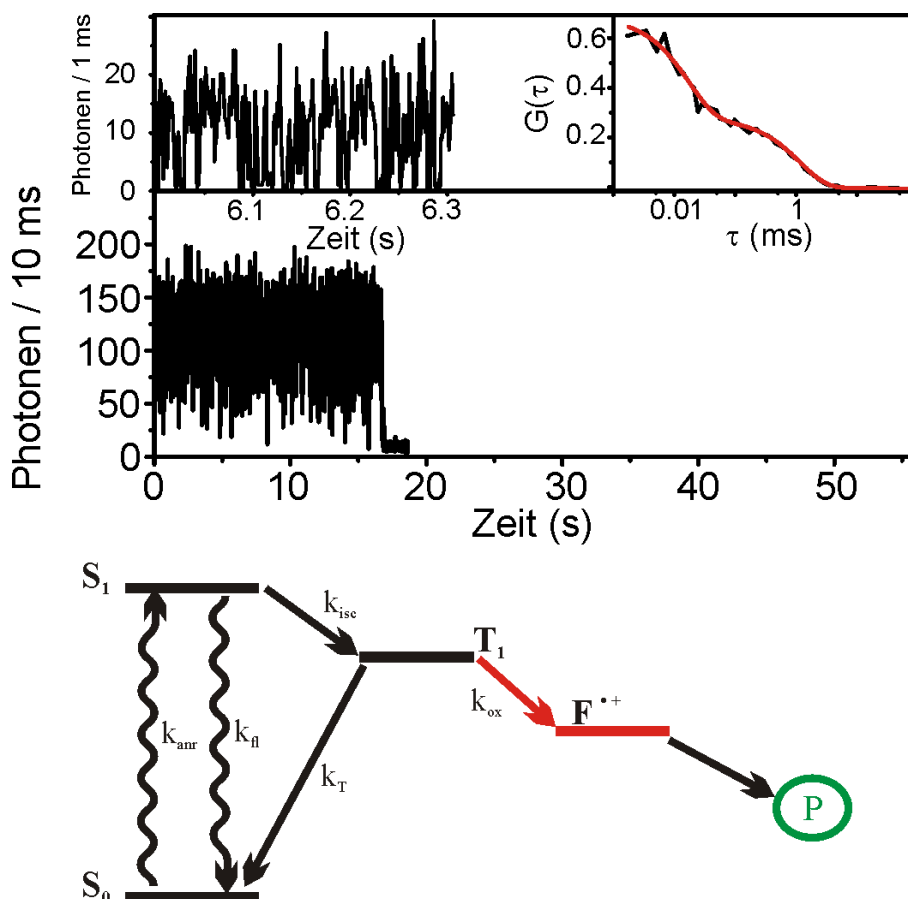


Abbildung 4.2.5: Darstellung der Fluoreszenz von Cy5 in sauerstofffreiem PBS-Puffer nach Zugabe von 1 mM Methylviologen. Oben links ist das Signal mit 1 ms Zeitauflösung dargestellt, oben rechts die Autokorrelation und unten das Zustandsdiagramm abgebildet.

Die Fluoreszenzemission ist, verglichen mit der Emission unter Zugabe von Trolox, weniger stabil, aber liegt immer noch über der Stabilität bei reinem PBS oder in sauerstofffreiem PBS-Puffer. Wenn beide Reagenzien getrennt zugegeben werden, wird das Blinken nicht komplett unterdrückt. Dies ändert sich, wenn beide Reagenzien in ähnlicher Konzentration zugegeben werden.

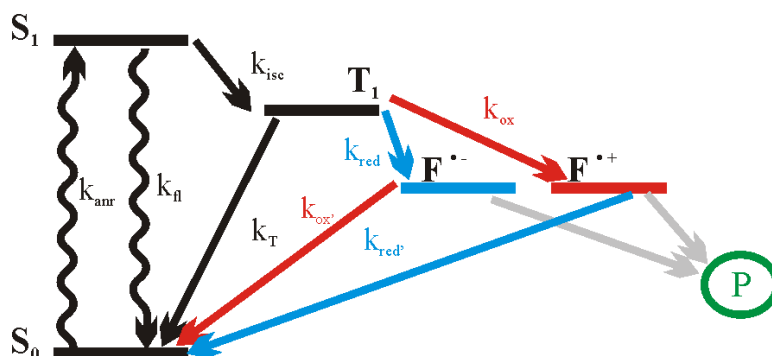
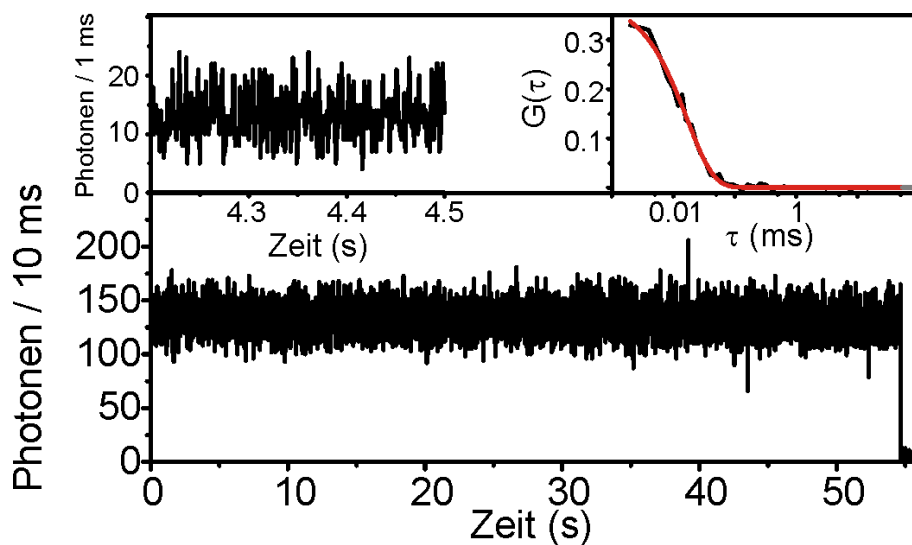


Abbildung 4.2.6: Darstellung der Fluoreszenzemission von an DNA immobilisiertem Cy5 in sauerstofffreiem Puffer nach Zugabe von Methylviologen und Trolox, beide in 1 mM Konzentration. Oben links ist ein Auszug der Fluoreszenzspur mit 1 ms Zeitauflösung abgebildet, oben rechts die Autokorrelation und unten das Zustandsdiagramm, sowohl Oxidation als auch Reduktion sind aufgetragen.

Aus der Autokorrelation kann man erkennen, dass nur noch die kurze Zeitkomponente der Cis-Trans Isomerisierung in der Korrelation sichtbar wird. Das Blinken ist vollständig unterdrückt, dies ist in der Vergrößerung der Fluoreszenzspur oben links zu erkennen. Es treten

keine Auszeiten durch Blinken auf. Die Stabilität der Fluoreszenzintensität nimmt zu. In Abb. 4.2.6 liegt die zeitliche Länge der Aussendung des Fluoreszenzsignals bei über 55 Sekunden. Dies entspricht dem Durchschnitt der Länge der Fluoreszenzemission der Farbstoffe vor endgültiger Photozerstörung. Sowohl die Stabilitätserhöhung als auch das Unterdrücken des Blinkens kann mit diesem Ansatz erreicht werden.

Im Folgenden soll die nicht-intuitive, gleichzeitige Verwendung von Oxidations- sowie Reduktionsmittel über die Energie der verschiedenen Zustände, anhand thermodynamischer Prinzipien, diskutiert werden. Eine wichtige Voraussetzung von ROXS und den verwendeten Reagenzien ist, dass trotz der Tendenz von Reduktions- und Oxidationsmittel Elektronen abzugeben oder aufzunehmen, die Energie des absorbierten Photons für den photoinduzierten Elektronentransfer zwingend notwendig ist. Aufgrund ihrer Redoxpotentiale reagieren Reduktions- und Oxidationsmittel nicht in einer Grundzustandselektronentransferreaktion. Aus Sicht der Thermodynamik muss die Energie aus der Photonenabsorption groß genug sein, um den Reaktionszyklus aus dem Triplettzustand in einen ladungsseparierten Zustand und zurück in den Grundzustand zu bewältigen. Die Absorption liefert die Null-Null-Übergangsenergie $E_{0,0}$, im Fall von Cy5 liegt diese bei ungefähr 1.88 eV. Ungefähr 280 meV gehen beim Übergang in den Triplettzustand verloren, der für Cy5 bei 1.6 eV liegt [85]. Mit Hilfe der Rehm-Weller Gleichung lässt sich die Änderung der freien Enthalpie für die Ladungstrennung abschätzen [89]:

$$\Delta G_{LS} = E_{Ox} - E_{Red} - E_{0,0} + C$$

wobei E_{Ox} das erste Ein-Elektronen-Oxidationspotential des Donors und E_{Red} das Ein-Elektronen-Reduktionspotential des Akzeptors ist, die für die jeweiligen Farbstoffe cyclovoltammetrisch bestimmt wurden [39]. Wegen der hohen Polarität von Wasser, kann die lösungsmittelabhängige Coulomb-Wechselwirkung C vernachlässigt werden. Im Fall einer Reduktion des Triplets von Cy5 durch Trolox E_{Red} (Cy5

gegen SCE) = -0.84 eV und $E_{\text{Ox}}(\text{Trolox}) = 0.4 \text{ eV}$ [51] liegt der Wert für die Änderung der freien Enthalpie bei $\Delta G_{\text{LS}} = -0.36 \text{ eV}$. Dies bedeutet, dass die Reaktion exergonisch ist und freiwillig abläuft. Für die Oxidation aus dem Triplett von Cy5 durch Methylviologen mit $E_{\text{Ox}}(\text{Cy5 gegen SCE}) = 0.97 \text{ eV}$ und $E_{\text{Red}}(\text{Methylviologen}) = -0.45 \text{ eV}$ [51] liegt der Wert bei $\Delta G_{\text{LS}} = -0.18 \text{ eV}$. Der Wert ist ebenfalls negativ und die Reaktion ist exergonisch. Diese beiden Abschätzungen unterstützen die Annahme, dass der Triplettzustand von Cy5 durch Reduktion mit Hilfe von Trolox, als auch durch Oxidation mit Hilfe von Methylviologen über eine photoinduzierte Elektronentransferreaktion gelöscht wird. Es bilden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit jeweils das Radikalanion und das Radikalkation, nach Anregung des Farbstoffes in das S_1 Niveau mit anschließendem Übergang in den Triplettzustand.

Um das System komplett zu betrachten muss auch die Rückreaktion aus den ladungsseparierten Zuständen in den Grundzustand in die Energiebilanz mit einbezogen werden. Hierfür kann die Rehm-Weller Gleichung als Abschätzung benutzt werden. Dafür vergleicht man das Reduktionspotential von Cy5 mit dem Reduktionspotential von Methylviologen und erhält so die freie Enthalpie der Ladungsrekombination $\Delta G_{\text{LS}} = -0.39 \text{ eV}$ für das Cy5-Radikalanion. Für die Ladungsrekombination kann man analog vorgehen, man vergleicht die Oxidationspotentiale von Cy5 und Trolox und erhält die freie Enthalpie für die Rekombination $\Delta G_{\text{LK}} = -0.57 \text{ eV}$. Die Tatsache, dass alle berechneten Reaktionsschritte sowohl für die Ladungstrennung, als auch für die Ladungsrekombination exergonisch sind, bestätigen die Ergebnisse aus den Experimenten mit dem Farbstoff Cy5. Die Wirkungsweise von ROXS, die in Abb. 4.2.2 anhand des Zustandsdiagramms vorgestellt wurde, kann durch die zugrundeliegende thermodynamische Abschätzung aus der Theorie gestützt werden.

ROXS am Beispiel von ATTO647N

Weitere Messungen mit dem Farbstoff ATTO647N sollen zeigen, dass ROXS als generelles Prinzip auch für andere Farbstoffklassen angewendet werden kann. In Abb. 4.2.7 sind die Messungen am Beispiel des Farbstoffes ATTO647N gezeigt. Für diese Messungen wurde der ROXS-Puffer systematisch aufgebaut. Im ersten Bild wurde der Lösung der Sauerstoff enzymatisch entzogen und das Oxidationsmittel Methylviologen in 1 mM Konzentration zugegeben (Abb. 4.2.7 a). Die Stabilität der Emission ist nicht mehr gegeben, nach ca. 20 Sekunden wird der Farbstoff endgültig irreversibel gebleicht. In der Autokorrelation ist das Blinken deutlich zu erkennen. Die charakteristischen Aus-Zeiten liegen bei 1.2 ms und sind oben links, in der Vergrößerung der Spur mit einer Zeitauflösung von 1ms, abgebildet. Nach der Zugabe des Reduktionsmittels Trolox zu dem sauerstofffreien Puffer, steigt die Photostabilität auf über 60 Sekunden an (Abb. 4.2.7 b), aber das Blinken wird nicht vollständig unterdrückt. Auch hier ist die Vergrößerung mit 1 ms Zeitauflösung abgebildet, die charakteristische Aus-Zeit von 0.2 ms lässt sich aus der Autokorrelation bestimmen. Nach Zugabe von Oxidations- und Reduktionsmittel in jeweils 1 mM Konzentration, nachdem der Sauerstoff aus der Lösung entfernt wurde, wird der stabilisierende Effekt von ROXS auf die Farbstoffemission deutlich (Abb. 4.2.7 c). Die Zeit bis zur endgültigen Photozerstörung steigt bis auf fast 20 Minuten an. Sowohl in der Autokorrelation oben rechts, als auch in der Vergrößerung oben links, ist nahezu kein Blinken mehr erkennbar. Durch spektral aufgelöste Messungen wurden die beiden Zustände, mit leicht unterschiedlicher Fluoreszenzintensität, seltenen Übergängen zwischen zwei spektral verschiedenen, aber photophysikalisch ähnlichen, Zuständen des Fluorophors zugeordnet. Die Lebensdauer des Farbstoffs während den beiden Zuständen ist nahezu identisch.

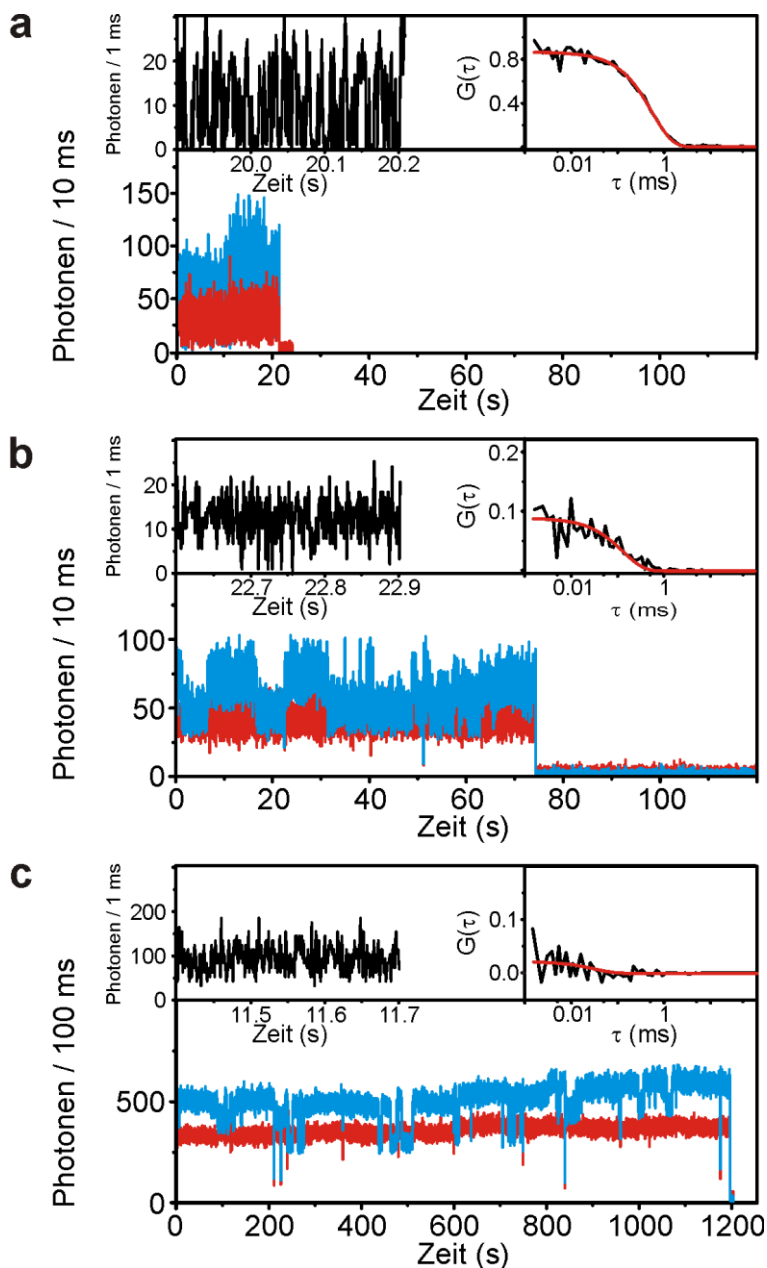


Abbildung 4.2.7: Darstellung der Fluoreszenzsignale von ATTO647N, an immobilisierter DNA und in sauerstofffreiem Puffer, a) nach Zugabe von 1 mM Methylviologen, b) mit 1 mM Trolox und c) mit Trolox und Methylviologen jeweils in 1 mM Konzentration. Die Fluoreszenz wurde zusätzlich spektral getrennt aufgenommen (blau <math><680\text{ nm}</math>; rot >680 nm).

Die Ursache für die spektralen Sprünge sind bis jetzt noch nicht geklärt, sie können beispielsweise in der unregelmäßigen, nicht symmetrischen Struktur des Farbstoffes liegen (vergleiche dazu Abb. 3.2.2). Der Eindruck, dass über das Hintergrundrauschen hinaus keine weiteren Intensitätsfluktuationen auftreten, wird, sowohl durch die vergrößerte Fluoreszenzspur, als auch die Autokorrelationsfunktion der Intensität, gestützt. Diese weist bis zu 1 μs keine charakteristische Zeitkonstante auf. Zusätzlich zu reduziertem Blinken, wechselt das Molekül effizient zwischen dem ersten angeregten Zustand und dem Grundzustand hin und her, was sich in einer höheren Fluoreszenzhelligkeit einzelner ATTO647N-Moleküle widerspiegelt. Die gesteigerte Photostabilität und die Unterdrückung des Blinkens, durch das Anwenden von ROXS, bestätigt die Annahme, dass die Auszustände der Farbstoffe, eng mit der Photozerstörung verbunden sind [93].

Auch bei diesem Farbstoff kann man Abschätzungen, anhand der Rehm-Weller Gleichung, zu den Werten der freien Enthalpie für die verschiedenen Reaktionsschritte, Ladungsseparation und Ladungsrekombination, durchführen. Die Werte für das Oxidations- sowie das Reduktionspotentials wurden, wie in Kapitel 4.1 erwähnt, cyclovoltammetrisch bestimmt. Mit dem Oxidationspotential $E_{\text{Ox}} = 1.11 \text{ eV}$, dem Reduktionspotential $E_{\text{Red}} = -0,64 \text{ eV}$, $E_{0,0} = 1.0 \text{ eV}$ und dem angenommenen Potential des ersten angeregten Triplettzustand $E_{\text{T1}} = 1.6\text{-}1.7 \text{ eV}$, gelangt man für ATTO647N zu negativen Werten, sowohl für den Übergang in das Radikalanion und Radikalkation, als auch für die Rekombination in den Grundzustand. Bei diesem Farbstoff kann die experimentelle Beobachtung durch die Theorie bestätigt werden, ROXS ist bei dem Carborhodamin ATTO647N anwendbar und führt zu beeindruckenden Ergebnissen.

Austausch des Reduktionsmittels

Eine weitere Bestätigung für den theoretischen Ansatz zur Erzeugung der Radikalzustände, ist die Verwendung eines weiteren Reduktionsmittels, das Ersetzten von Trolox durch Ascorbinsäure. Im Gegensatz zu Trolox, dessen Oxidationspotential bei $E_{\text{Ox}} = 0.40$ eV liegt, ist Ascorbinsäure, ebenfalls ein Vitaminderivat, ein stärkeres Reduktionsmittel mit einem Oxidationspotential $E_{\text{Ox}} = 0.06$ eV. Nach den Abschätzungen durch die Rehm-Weller Gleichung sollte dieses Reduktionsmittel bei Einsatz im Puffer funktionieren und die Stabilität erhöhen und dabei das Blinken unterdrücken.

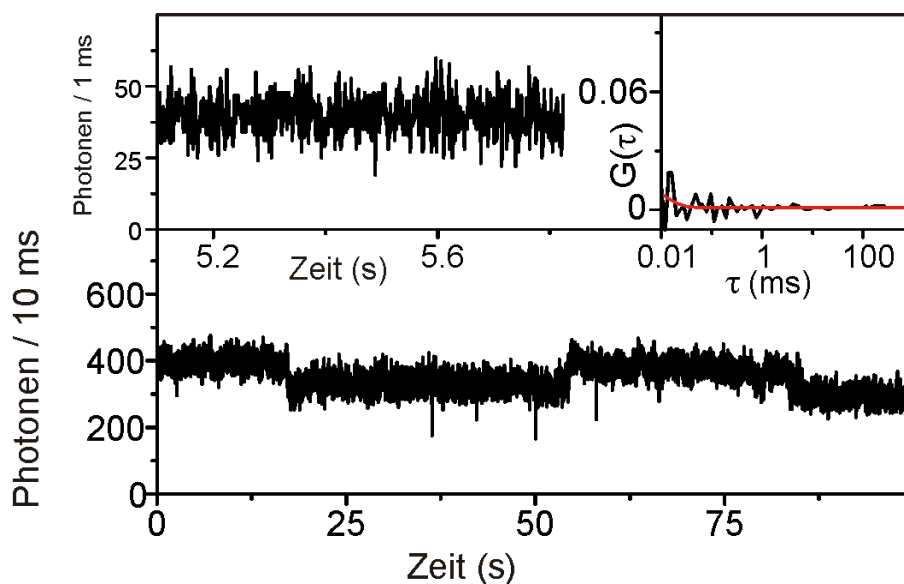


Abbildung 4.2.8: Ausschnitt aus der Fluoreszenzspur von ATTO647N an immobilisierter DNA unter ROXS Bedingungen, mit 1 mM Methylviologen und 1 mM Ascorbinsäure. Oben links ist die Vergrößerung der Spur mit einer Zeitauflösung von 1 ms und oben rechts die Autokorrelation abgebildet [40].

In der Abb. 4.2.8 kann man erkennen, dass mit dem Reduktionsmittel Ascorbinsäure, die Photostabilität von ATTO647N erhöht werden kann. Außerdem ist, wie bei der Verwendung von Trolox, die Helligkeit pro Molekül gestiegen. Anhand der Vergrößerung der Spur und bei der Auswertung, bezüglich charakteristischer Zeiten über die Autokorrelation, erkennt man, dass das Blinken nahezu komplett unterdrückt werden kann. Die Theorie liefert für diese Reduktionsmittel negative Werte für die freie Enthalpie, sowohl für die Reduktion aus dem Triplet in den Radikalzustand als auch für die anschließende Rekombination in den Grundzustand über Oxidation. Die Reaktionen für die Ladungsseparation in das Radikalanion sowie für die Ladungsrekombination in den Grundzustand laufen exergonisch ab.

ROXS mit MR121

Bei der Betrachtung des Oxazins MR121 erhält man durch diese Berechnungen einen positiven Wert für die freie Enthalpie. Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Farbstoffen, besitzt MR121 ein relativ hohes Reduktionspotential, $E_{\text{Red}} = 0.61$ eV. Die Rekombination aus dem reduzierten Zustand ist nicht länger exergonisch. Der Farbstoff wird nicht simultan zurück in den Grundzustand überführt. Dies ist in der Fluoreszenzemission, als Unterbrechung des Fluoreszenzsignals, durch starkes Blinken auch unter ROXS-Bedingungen zu erkennen. In Abb. 4.2.9 ist dieser Effekt sowohl in der Fluoreszenzspur, als auch in der Autokorrelation abgebildet.

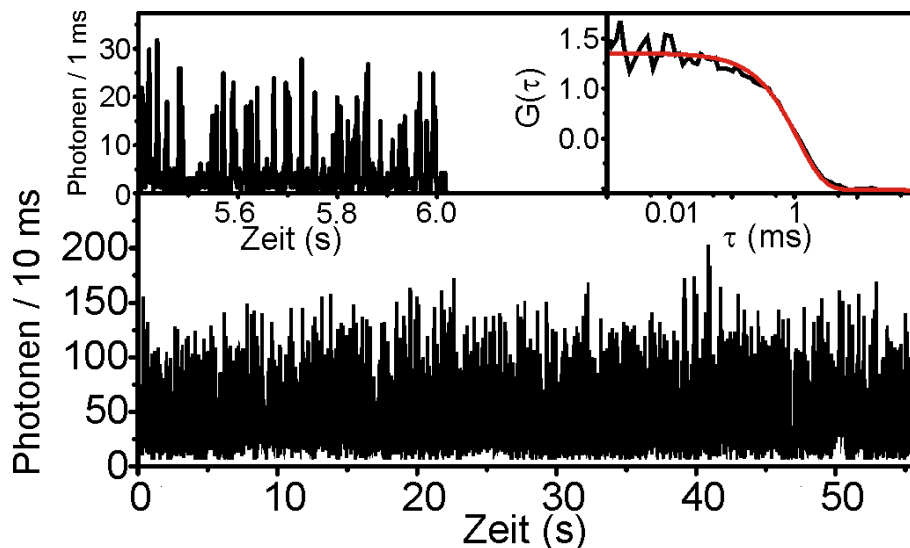


Abbildung 4.2.9: Fluoreszenzspur von immobilisierten MR121-Molekülen gemessen unter ROXS-Bedingungen mit 1mM Methylviologen und 2 mM Trolox in sauerstofffreier Umgebung [40].

Bei den Messungen ist eine Stabilisierung der Fluoreszenz zu erkennen, aber die Fluoreszenzemission wird häufig durch Blinken mit typischen Auszeiten im Millisekundenbereich unterbrochen. In der Abb. 4.2.9 ist dies, in der oberen, linken Vergrößerung der Spur mit einer Zeitauflösung von 1 ms, deutlich zu erkennen. Die Autokorrelation oben rechts zeigt die charakteristische Auszeit. Der Farbstoff ist in dem relativ langlebigen, reduzierten Zustand gefangen. Die Auszeiten in der Fluoreszenzspur haben ihren Ursprung in der Verweilzeit im Radikalanion, die Oxidation des reduzierten Zustands erfolgt nicht länger effizient. Im Zustandsmodell (vergleiche Abb.4.2.10) für den Farbstoff MR121 wird das Problem durch die Lage der Zustandsenergien verdeutlicht.

Der Reaktionsweg über Oxidation in das Radikalkation mit anschließender Rekombination in den Grundzustand, erfolgt unter ROXS weiterhin so effizient, wie bei den anderen verwendeten Farbstoffen. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, wird die

Rekombination in den Grundzustand energetisch nicht zwingend notwendig, die Niveaus liegen zu dicht beieinander. Das Radikalkation wird von Methylviologen nicht mehr effizient in den Grundzustand überführt. Trotz des Blinkens ist die Photostabilität von MR121 unter ROXS-Bedingungen deutlich gesteigert worden. Hier wird die Photozerstörung aus dem Triplettzustand ebenfalls durch Reduktion oder Oxidation unterbunden.

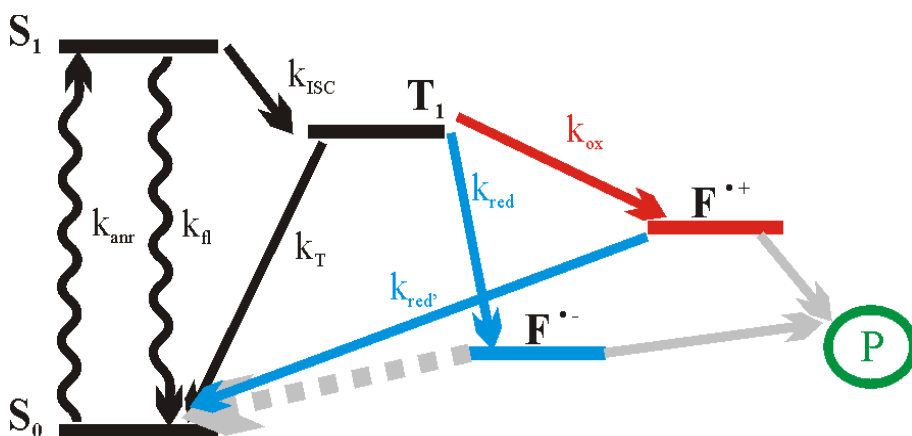


Abbildung 4.2.10: Zustandsmodell für den Farbstoff MR121, zusätzlich sind der Radikalkation- und Radikalanion-Zustand gezeigt.

ROXS als generelles Prinzip

In diesem Teil der Arbeit wird gezeigt, dass das ROXS Konzept auf weitere Farbstoffe aus anderen Strukturklassen übertragen werden kann. Außerdem wird der Effekt der verbesserten Photostabilität, mit Hilfe der Photonenstatistik und damit quantitativ über die Anzahl der ausgesendeten Photonen, bestätigt. Zu diesem Zweck wurden die Farbstoffe auf einer BSA/BSA-Biotin Oberfläche, gebunden an DNA,

immobilisiert, aber nicht mit einem konfokalen Aufbau, sondern mit Hilfe einer Weitfeld-Versuchsanordnung untersucht. Dies ermöglicht die gleichzeitige Anregung einer größeren Fläche und somit die Darstellung von einem Durchschnitt von ca. 100 einzelnen Molekülen. In diesem Experiment wurden die Moleküle über die Zeit beobachtet, Filme mit typischen Integrationszeiten von 50 oder 100 ms aufgenommen und anschließend mit Hilfe eines LabVIEW-Programms in Fluoreszenzspuren umgewandelt. Aus diesen Spuren lassen sich die Photonenanzahlen pro Molekül während der Emission bestimmen [30]. Die Auswertung über die Photonenstatistik wurde für insgesamt 6 verschiedene Bedingungen durchgeführt, um die stabilisierende Wirkung von ROXS sichtbar machen zu können. Die Messungen wurden durchgeführt in:

- purem PBS
- sauerstofffreiem PBS mit 1 mM Ascorbinsäure
- sauerstofffreiem Puffer mit 1 mM Methylviologen
- sauerstofffreiem Puffer mit 2 mM Trolox
- sauerstofffreiem Puffer nach Zugabe von 1 mM Methylviologen und 1 mM Ascorbinsäure
- sauerstofffreiem Puffer nach Zugabe von 1 mM Methylviologen und 2 mM Trolox

Die mittleren, emittierten Photonenzahlen pro Molekül konnten für sieben verschiedene Farbstoffe aus insgesamt vier unterschiedlichen Farbstoffklassen berechnet werden. Die Photonenzahl wurde für mindestens 200 Moleküle berechnet und daraus die mittlere Photonenzahl ermittelt [40].

Für alle getesteten Farbstoffe, außer dem schon diskutierten Oxazin Derivat MR121, konnte die Photonenzahl durch ROXS im Vergleich zu purem PBS gesteigert werden. Darüber hinaus verbesserte sich die Photonenstatistik aller Farbstoffe bei der gleichzeitigen Verwendung von Oxidations- und Reduktionsmittel im Gegensatz zur Verwendung von entweder Oxidations- oder Reduktionsmittel. Am Beispiel von ATTO647N ist dieser deutlich Effekt zu erkennen. In purem PBS

werden von diesem Farbstoff ungefähr 1000 Photonen pro Molekül emittiert. Diese Zahl sinkt auf unter 1000 Photonen nach Entfernung des Sauerstoffs aus der Lösung, sowohl nach der Zugabe von 1 mM Methylviologen sowie bei Zugabe von 1 mM Ascorbinsäure. Erst wenn Methylviologen und Ascorbinsäure gleichzeitig hinzugegeben wird, steigt die Photonenzahl auf einen Wert von 840000 Photonen an. Diese Steigerung belegt, dass durch die gleichzeitige Zugabe von Oxidations- und Reduktionsmittel, die Photostabilität entscheidend gesteigert werden kann. Einen ähnlichen Effekt beobachtet man nicht nur für weitere Farbstoffe aus dem roten Spektralbereich, sondern auch für Fluorophore im kürzeren Wellenlängenbereich. Der Effekt ist nicht so ausgeprägt wie im roten Spektralbereich, zumindest für die getesteten Farbstoffe ATTO565 und Alexa 532. Für diese Farbstoffe kann das Blinken stark reduziert werden, wie in der Abb. 4.2.12 zu erkennen ist.

Bevor auf das Blinken in Abhängigkeit von der Konzentration der Oxidations- oder Reduktionsmittel eingegangen wird, soll hier die Steigerung der Photostabilität durch die Zugabe von Trolox diskutiert werden.

Bei Messungen mit dem ROXS-Puffer musste besonders darauf geachtet werden, dass alle Komponenten frisch in PBS gelöst und erst in der Probenkammer zusammengemischt werden. Immer wenn die Trolox-Lösung mehr als einen Tag alt wurde, zeigte Trolox ohne Zusatz eines Oxidationsmittels, den gewünschten reduzierenden und oxidierenden Effekt. Nach detaillierten Untersuchungen der Arbeitsgruppe um P. Tinnefeld, LMU München, konnte eine Lösung für diese Beobachtung vorgeschlagen werden [94].

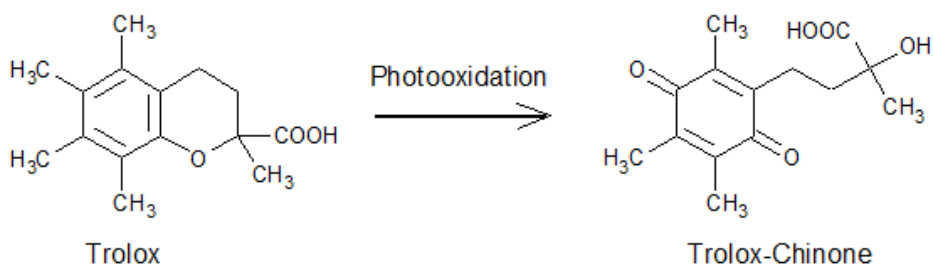


Abbildung 4.2.11: Darstellung der chemischen Strukturen von Trolox und des über eine Photooxidation entstehende Trolox-Chinone.

Aufgrund der Wechselwirkung mit Umgebungslicht und molekularem Sauerstoff in der Trolox-Lösung, kommt es zu einer Umwandlung von Trolox zu Trolox-Chinone (Abb.4.2.11). Für diese Reaktion stellt sich ein Gleichgewicht nach circa 18 Stunden ein. Aus den Abschätzungen wird deutlich, dass in einer 1 mM Trolox Lösung, ein Anteil von etwa 25 μM Trolox-Chinone entsteht. Dieses Chinone wirkt nicht mehr reduzierend, sondern oxidierend. In dem ursprünglichen Puffer mit Reduktionsmittel ist, ohne Zugabe des Oxidationsmittels Methylviologen, nach der Photooxidation von Trolox, ein ROXS-Puffer entstanden. Dieser geringe Anteil an Oxidationsmittel reicht aus, um das Blinken in Spuren, im Gegensatz zu frischem Trolox-Puffer, merklich zu unterdrücken. Nach wie vor bleibt das ROXS-Konzept bestehen Ein kleiner Anteil Oxidationsmittel, das erwähnten Trolox-Chinone, ist in der Lösung enthalten. Dieser geringe Anteil kann die Photostabilität merklich steigern, aber das Blinken wird nicht vollständig unterdrückt. Die vollständige Unterdrückung des Blinkens funktioniert nur bei der richtigen Kombination der Konzentrationen von Oxidations- bzw. Reduktionsmittel. Die Messergebnisse, nach Ersetzen von Trolox durch Ascorbinsäure, unterstützen diese These.

Neben der Photostabilität und der Wirkung, sowohl der Einzelbestandteile, als auch des kompletten ROXS-Puffers, auf die Anzahl der emittierten Photonen zu untersuchen, ist es von entscheidender Bedeutung die Auswirkungen auf die Aus-Zeiten detaillierter zu diskutieren. Dafür wurden konzentrationsabhängige Messungen zum

Blinkverhalten unter verschiedenen chemischen Bedingungen durchgeführt. Die Fluoreszenzspuren der einzelnen Moleküle wurden mit Hilfe der Autokorrelation in Bezug auf die Aus-Zeiten ausgewertet. Diese Messungen konnten in Abhängigkeit von den Konzentrationen der jeweiligen Oxidations- oder Reduktionsmittel ausgewertet werden. Die Messungen fanden in sauerstofffreier Lösung jeweils mit Ascorbinsäure, Methylviologen und Trolox statt. Zusätzlich wurden die beiden ROXS-Ansätzen, Ascorbinsäure und Methylviologen oder Trolox und Methylviologen, getestet. Um eine Wechselwirkung zwischen Aus-Zeiten, die durch die Zugabe der Reagenzien verursacht werden und den molekülspezifischen Auszeiten der Cis-Trans Isomerisierung bei Cy5 zu vermeiden, wurde das Carborhodamin ATTO647N für die Messungen verwendet. In der folgenden Abbildung sind die Auszeiten, unter den jeweiligen Bedingungen, in Abhängigkeit der verwendeten Konzentrationen der Oxidations- oder Reduktionsmittel aufgetragen. Bei den Experimenten mit zwei Reagenzien waren die Konzentrationen aus Gründen der Übersichtlichkeit jeweils gleich.

Zu erkennen ist, dass die Zugabe von Ascorbinsäure oder Methylviologen keinen Einfluss auf die Entwicklung der Aus-Zeiten hat. Dieser Effekt war nach dem ROXS-Prinzip, vergleiche Abb. 4.2.2, zu erwarten. Mit ROXS hingegen, sinken die Aus-Zeiten bereits ab einer Konzentration von 10 μM deutlich ab.

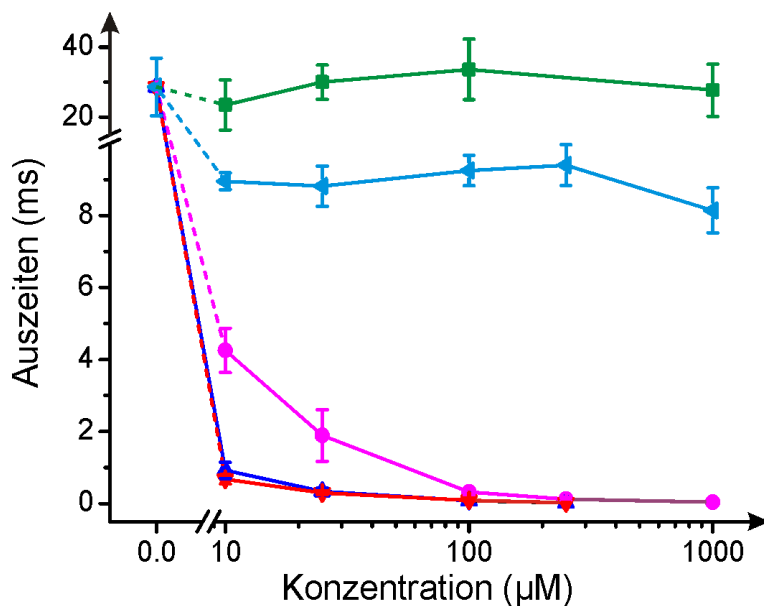


Abbildung 4.2.12: Konzentrationsabhängigkeit der Auszeiten für ATTO647N bei fünf verschiedenen Pufferbedingungen in sauerstofffreier Lösung. Nach Zugabe von Ascorbinsäure (grün), Methylviologen (hellblau), Trolox (magenta), Ascorbinsäure plus Methylviologen (dunkelblau) und Trolox plus Methylviologen (rot) [40].

Bei den für die Photonenstatistik verwendeten Konzentrationen lässt sich bis auf einer Zeitskala von $1 \mu\text{s}$ keine Aus-Zeit detektieren. Dies unterstützt den beschriebenen Mechanismus von ROXS, dass der Triplett, unter Bildung von radikalischen Farbstoffionen mit anschließender Rekombination in den Grundzustand, effizient durch die gleichzeitige Zugabe von Oxidations- und Reduktionsmittel gelöscht wird. Die Wirkung von Trolox kann durch zwei verschiedene Überlegungen beschrieben werden. Zum einen kann sich aus dem Reduktionsmittel Trolox durch Photooxidation, wie bereits erwähnt, ein Gemisch aus Reduktions- und Oxidationsmittel bilden. Dies kann zu einer Reduzierung der Aus-Zeiten führen, aber nicht in dem Maße, wie unter ROXS-Bedingungen, dafür reicht die Konzentration des gebildeten Oxidationsmittels nicht aus. Da der Effekt dennoch so deutlich ist, kann zum anderen auf die triplettlöschende Wirkung von

Trolox über Elektronentransfer zurückgeführt werden. Dieser Effekt ist allgemein akzeptiert und bekannt [77, 95]. Unter Berücksichtigung beider Effekte lässt sich die Verkürzung der Aus-Zeiten, nach der Zugabe von Trolox, erklären und in der Theorie bestätigen. Die Wirkung ist um den Faktor 4 bis 6 geringer, als bei Anwendung des ROXS-Prinzips. Die gezeigten konzentrationsabhängigen Aus-Zeiten für den Farbstoff ATTO647N können als repräsentativ für das ROXS-Konzept angesehen werden. Dabei ist eine Photostabilisierung schon durch die Zugabe von Trolox möglich, wohingegen das Reduzieren des Blinkens die Zugabe eines weiteren Reagenz, des Oxidationsmittels, erfordert. Für die Anwendung des Konzepts könnte es nützlich sein, Trolox, wie gezeigt, durch Ascorbinsäure zu ersetzen. Der stabilisierende Effekt kann, im Gegensatz zu Trolox, weiter gesteigert werden und die zu verwendenden Konzentrationen sind geringer. Der Einfluss der Zusätze auf die zu untersuchenden Proben muss immer durch die geeigneten Kontrollexperimente gesichert werden, dies gilt vor allem für das giftige Oxidationsmittel Methylviologen gilt.

Die Photozerstörung schränkt die Anwendbarkeit moderner Fluoreszenzspektroskopie und bildgebenden Verfahren immer noch stark ein. Um der Photozerstörung entgegenzuwirken, kann das ROXS-Konzept in vielen Experimenten eingesetzt werden. Die Photostabilität von organischen Farbstoffen, unabhängig von der Strukturklasse, kann in wässriger Lösung gesteigert werden. Außerdem kann das Blinken deutlich reduziert werden. Beides kann helfen, sowohl bildgebende Verfahren, als auch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen über lange Zeiten zu ermöglichen, um z.B. die Kinetik von Prozessen darzustellen. Der zugrundeliegende Ansatz ist nicht nur empirisch gestützt, sondern wird durch thermodynamische Überlegungen bestätigt. Das Modell der Entvölkerung des Triplets in Radikalzustände und anschließende Rekombination in den Grundzustand des Moleküls unterbindet, eine Reihe von unterschiedlichen Wegen der Photozerstörung und ist eine allgemein anwendbare Methode mit großem Potential. Der Einsatz des ROXS-Konzepts in der STED-Mikroskopie ist Thema des nächsten Abschnitts. Dabei wird

gezeigt, dass die Auflösung an einzelnen organischen Farbstoffmolekülen deutlich erhöht werden kann.

ROXS in der hochauflösenden Mikroskopie

Wie bereits im Kapitel Theorie und Grundlagen erklärt, beruht die STED-Mikroskopie auf dem Prinzip der stimulierten Emission und der damit einhergehenden Depopulierung des ersten angeregten Singulettzustandes. Der angeregte Farbstoff wird mit einem zweiten Laserpuls bestrahlt, der quasi simultan nach dem Anregungspuls auf die Probe treffen muss, da die Lebensdauer der meisten organischen Farbstoffe im Bereich von einigen Nanosekunden liegt. Dieser STED-Puls ist im Gegensatz zur Anregungswellenlänge rot verschoben und wird durch die Wahl geeigneter Filter vom eigentlichen Fluoreszenzsignal abgeschnitten. Über die Form des STED-Pulses, dem sogenannten Doughnut, lässt sich das effektive Anregungsvolumen deutlich verkleinern; nach dem heutigen Stand der Technik auf bis zu 20 nm im Durchmesser [10]. Anhand der Bilder von einzelnen an DNA fixierten und anschließend über eine Proteinoberfläche immobilisierten Farbstoffen, soll das auflösungserhöhende Prinzip verdeutlicht werden.

Dabei wurde als Farbstoff das Carborhodamin ATTO647N ausgewählt, da dieses als typischer Farbstoff in Einzelmolekül-STED Messungen eingesetzt wird [16, 70].

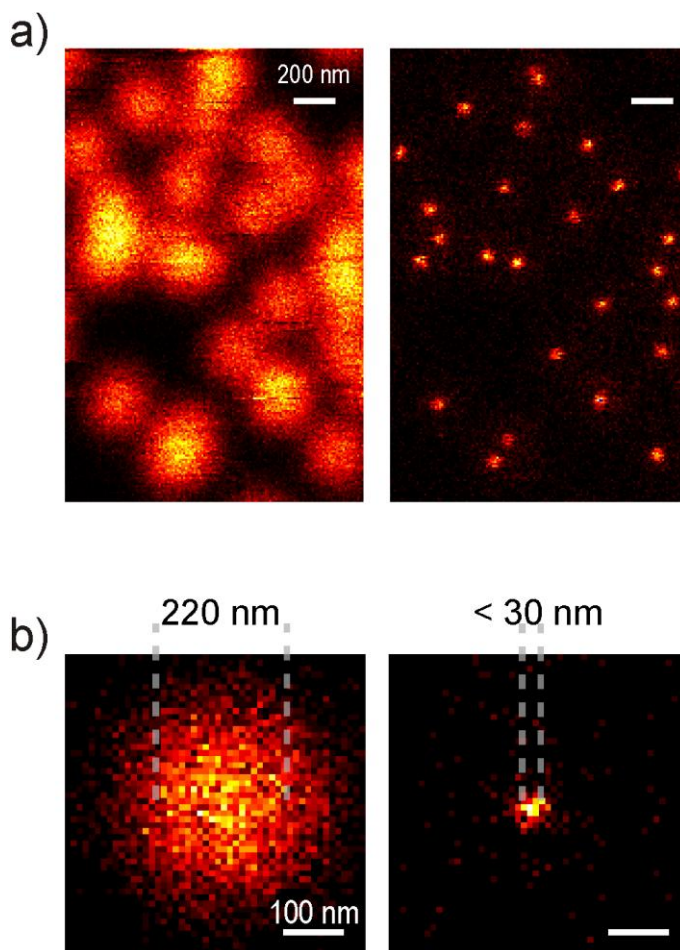


Abbildung 4.2.13: Darstellung der Auflösungserhöhung mittels Anwendung der STED-Mikroskopie an einzelnen ATTO647N-Molekülen, immobilisiert an DNA und in ROXS-Puffer. In a) und b) sind jeweils die konfokalen Aufnahmen im rechten Bild und die Aufnahmen mit einem STED-Mikroskop im linken Bild abgebildet. a) zeigt die Rasterung über eine Fläche von $2 \times 4 \mu\text{m}$ und b) die Vergrößerung eines einzelnen Spots [41].

Wenn man Oberflächen von immobilisierten Farbstoffen mit einem konfokalen Mikroskop abrastert und Bilder aufnimmt, muss gewährleistet sein, dass sich die Halbwertsbreiten der Punktabbildungsfunktionen der einzelnen Moleküle nicht überschneiden. Ansonsten ist eine Unterscheidung zwischen einem Cluster aus

Molekülen und einzelnen Molekülen nicht mehr möglich (Abb. 4.2.13 a), linkes Bild). Mit Hilfe der STED-Mikroskopie erreicht man eine Verkleinerung der Halbwertsbreiten von 220 nm auf unter 30 nm. Dadurch ist es möglich, die einzelnen Moleküle aufzulösen und als solche zu identifizieren (Abb. 4.2.13 a), rechtes Bild), die in der konfokalen Aufnahme nicht getrennt werden können. Um das Potential dieser Technik zu veranschaulichen, wurde in Abb. 4.2.13 b) die Vergrößerung eines einzelnen Spots hervorgehoben. Die Auflösungserhöhung ist im Bild deutlich zu erkennen. In der Abbildung 4.2.14 sind jeweils die Halbwertsbreiten der Punktabbildungsfunktionen dargestellt, die mit einem konfokalen und einem STED-Mikroskop aufgenommen worden sind.

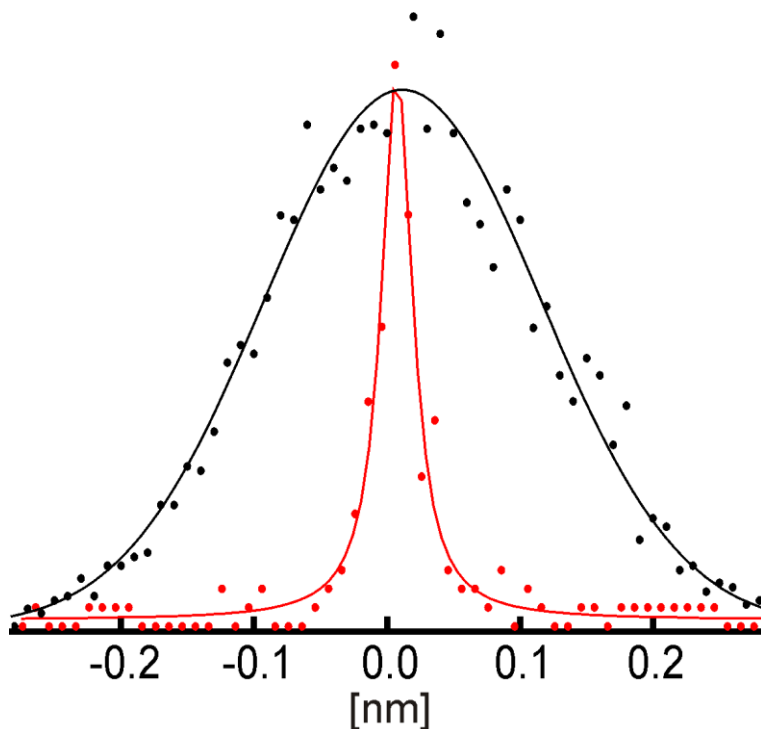


Abbildung 4.2.14: Darstellung der gemessenen Halbwertsbreiten von einzelnen ATTO647N Molekülen. Die schwarze Kurve repräsentiert die Werte aus konfokalen und die rote Kurve Werte aus STED-Aufnahmen.

Die beiden Kurven veranschaulichen noch einmal den beschriebenen Effekt. Durch den Einsatz von ROXS gelingt es die Breite der Punktabbildungsfunktion für den Farbstoff ATTO647N, immobilisiert an einer 60 Basenpaar langen doppelsträngigen DNA, bis auf 35 ± 4 nm zu reduzieren. Wenn man die DNA direkt über Biotin ohne den 20.4 nm langen DNA-Linker an der Oberfläche immobilisiert, kann man die Halbwertsbreite nochmal auf 25 ± 1.3 nm herabsetzen. Die Verringerung der Halbwertsbreite kann über die Bewegung des mobilen DNA-Linker erklärt und berechnet werden [41].

Die STED-Mikroskopie stellt hinsichtlich der Photostabilität besondere Anforderungen an den verwendeten Farbstoff, da die relativ hohen STED-Leistungen leicht zur Photozerstörung des Farbstoffs führen können. Abbildung 4.2.15 zeigt die Photozerstörung durch STED, am Beispiel eines mit Cy5 markierten Mikrotubulinnetzwerkes einer Zelle.

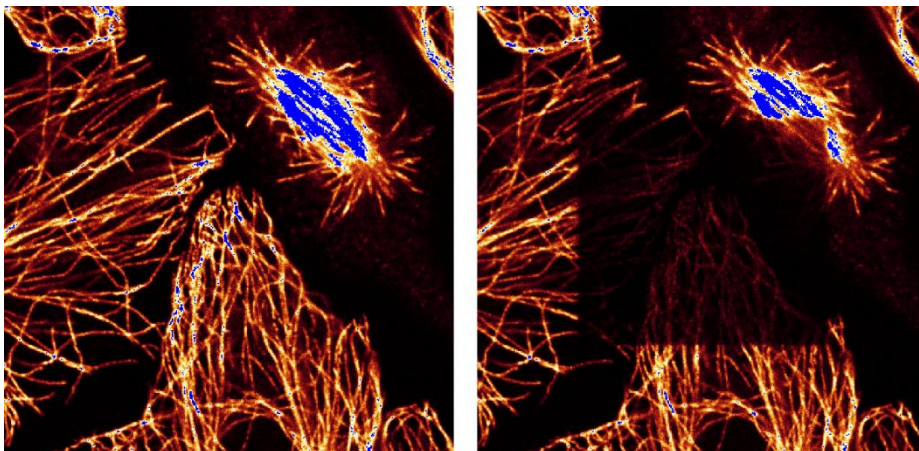


Abbildung 4.2.15: *Darstellung eines Mikrotubulinnetzwerkes mit Cy5 markierten Antikörpern in PBS-Puffer. Das linke Bild zeigt das konfokale Übersichtsbild von $8 \times 8 \mu\text{m}$, aufgenommen mit einem Leica-TCS-STED-Mikroskop. Im rechten Bild ist das gleiche Netzwerk dargestellt, nach einer STED-Aufnahme eines $4 \times 4 \mu\text{m}$ großen Bereichs, der deutlich an der verringerten Intensität zu erkennen ist.*

Die Photostabilität der Farbstoffe, hier in Abb.4.2.15 am Beispiel von Cy5 gezeigt, führt unter normalen PBS-Pufferbedingungen zum Ausbleichen des Farbstoffs, wenn man mit Hilfe eines STED-Mikroskops hochauflösende Aufnahmen erhalten will.

Bei den Messungen für diese Arbeit wurde mit einer Leistung, am Objektiv gemessen, von bis zu 150 mW bei einer Wellenlänge von 675 nm gearbeitet. Dies entspricht einer Leistungsdichte im Fokus von einigen Gigawatt. Wie aus der Theorie ersichtlich wird, beeinflusst die Leistung des STED-Strahls Effektivität der stimulierten Emission. Nur bei hohen Leistungswerten ist der Wirkungsquerschnitt der stimulierten Emission groß genug, um eine Auflösungserhöhung im Bereich von 20 nm zu erreichen [66]. Die daraus resultierende Leistungsdichte im Laserfokus verringert die Stabilität des Farbstoffs. Durch Messungen in PBS konnte bestätigt werden, dass die Leistung, die das Molekül nicht umgehend in die Photozerstörung befördert, nur für eine Auflösung von etwa 100 nm ausreichend ist. Dies entspricht gerade mal einer Drittelung der theoretisch erreichbaren Auflösung nach Abbe. Wenn man ROXS als Pufferlösung verwendet, kann man die Auflösung an einem einzelnen Molekül bis auf 25 ± 1.3 nm steigern. Um den Effekt der gesteigerten Stabilität messen zu können, wurde eine Scanreihe durchgeführt. Mit Hilfe dieser Scanreihe wurden die Anzahl der Moleküle vor und nach dem Abrastern durch die STED Mikroskopie bestimmt und eine Vorher-Nachher Bilanz konnte erstellt werden.

Zunächst wurde in einem konfokalen Scan die Molekülanzahl auf der Oberfläche ermittelt. Danach wurde ein STED-Scan und im letzten Schritt, zur Bestimmung der verbliebenen Moleküle, ein erneuter konfokaler Scan der Oberfläche durchgeführt.

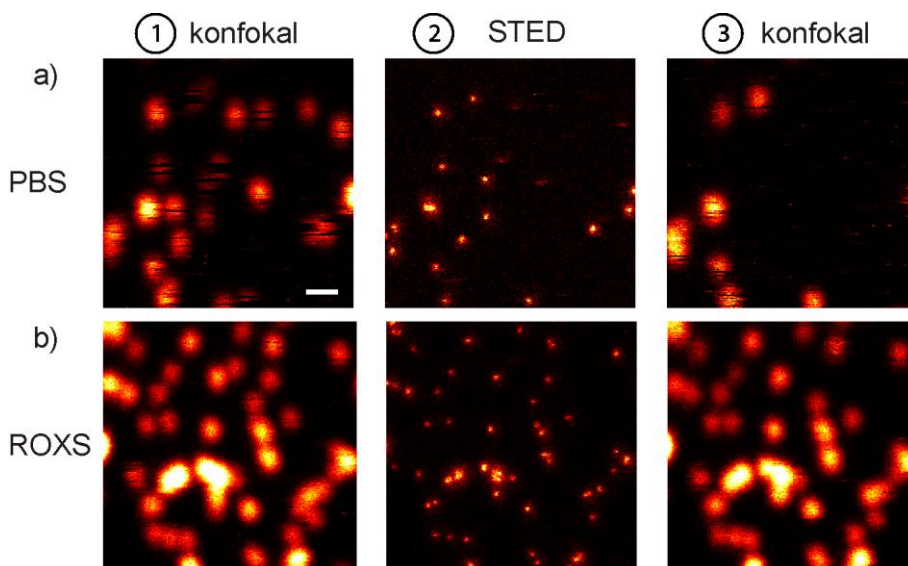


Abbildung 4.2.16: Darstellung der Scanreihe bestehend aus einem konfokalen Bild (1), einem STED-Bild (2) und einem konfokalen Bild (3) der gerasterten Oberfläche, mit an DNA immobilisiertem ATTO647N. Die Scanreihen wurden für jeweils zwei Bedingungen durchgeführt: in reinem PBS und unter ROXS Bedingungen. Als Anregungsleistung wurden $14 \mu\text{W}$ bei 633 nm verwendet, die Leistung des STED-Strahls lag bei 100 mW bei 675 nm , jeweils vor dem Objektiv gemessen [41].

Unter PBS-Bedingungen wird die Mehrheit der Moleküle durch den STED-Strahl endgültig photozerstört. Von anfangs 23 Molekülen sind im zweiten konfokalen Scan nur noch 8 Moleküle zu erkennen. Dies entspricht gerade einmal einem Drittel der Molekülanzahl, die den STED Scan überleben. Unter ROXS Bedingungen verringert sich der Anteil der photozerstörten Farbstoffe. Im ersten konfokalen Bild sind insgesamt 52 Moleküle zu erkennen und nach der STED Aufnahme sind immer noch 49 Farbstoffmoleküle zu erkennen, über 90 % der Moleküle bleiben erhalten. Die gesteigerte Photostabilität ist, nach

den schon vorgestellten Ergebnissen am Anfang dieses Kapitels, zu erwarten. Aber es kann dennoch gezeigt werden, dass das Potential von ROXS besonders bei der STED-Mikroskopie zu beeindruckenden Ergebnissen führt. Hier ist es - wegen der verwendeten hohen Laserleistungen - besonders wichtig, die Photostabilität des Farbstoffes zu gewährleisten.

Aufnahmen an fixierten Zellen

Um die Anwendbarkeit des ROXS-Konzepts an biologisch relevanten Proben zu bestätigen, wurden Messungen an fixierten Zellen durchgeführt. Dafür wurden PTK2 Zellen nach einem Standardprotokoll fixiert und anschließend mit einem Antikörper gegen Mikrotubuli, ein Bestandteil des Cytoskeletts der Zelle, markiert [23, 96]. Ein weiterer, sekundärer, Antikörper, der gegen den primären Antikörper bindet, wurde mit ATTO647N markiert, um damit die Mikrotubuli sichtbar zu machen. Ein sekundärer Antikörper trägt 4-6 ATTO647N Moleküle. Nach der Fixierung der Zellen und Markierung der Mikrotubuli konnten diese in wässriger Lösung mit Hilfe des ROXS-Puffers gemessen werden.

Als Referenz dazu, wurde die gleiche Probe in Mowiol eingebettet, das sich als Standard für die STED Messungen an fixierten Zellen durchgesetzt hat [97, 98]. Mowiol ist ein kommerziell erhältliches Polymer, das in den Zellen Wasser ersetzt und so für eine dauerhafte Fixierung der Zelle sorgt. Statt von wässrigem Milieu umgeben ist die Zelle in ein Polymer eingebettet. Im ersten Schritt wurden konfokale Bilder und anschließend STED Bilder aufgenommen. Diese Aufnahme-sequenz wurde mehrmals an derselben Stelle wiederholt, um die Stabilität der Farbstoffe in beiden verschiedenen Umgebungen zu testen.

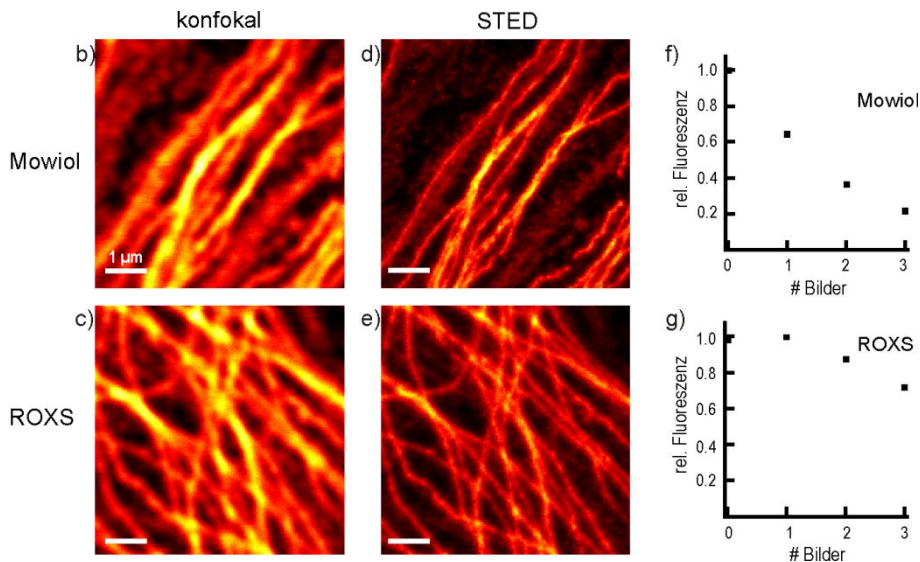


Abbildung 4.2.17: Aufnahmen von Mikrotubuli in fixierten Zellen(b), c) konfokal, d) und e) STED) jeweils in zwei unterschiedlichen Bedingungen. Um die Stabilität zu bestimmen wurden die Ausschnitte jeweils 4-mal abgerastert und die rel. Fluoreszenz ist in f) und g) aufgetragen. Die stabilisierende Wirkung von ROXS ist in den Graphen f) und g) deutlich zu erkennen [41].

Sowohl in Mowiol, als auch unter ROXS Bedingungen, ist die Verbesserung der Auflösung deutlich zu erkennen. In den jeweiligen STED-Bildern können einzelne Strukturen aufgelöst werden, die in den beiden konfokalen Bildern zu einer breiten verschwommenen Struktur verschmelzen. Aber es war nicht nur Ziel dieser Messung, die Anwendbarkeit in der STED-Mikroskopie zu zeigen, sondern auch, dass die Stabilität der einzelnen Farbstoffmoleküle eindeutig verbessert werden kann. In Abb. 4.2.17 ist die relative Fluoreszenz des gesamten Bildes gegen die Anzahl der Messungen aufgetragen. Die Fluoreszenz wird dabei auf die erste Messung normiert, um den Verlauf bzw. die Stabilität der Farbstofffluoreszenz sichtbar zu machen. Aus den beiden Graphen kann man erkennen, dass die Stabilität unter Mowiol von Scan zu Scan stark absinkt; es ist ein exponentieller Verlauf der Emission zu erkennen. Nach vier Aufnahmen - jeweils konfokal gefolgt

von einer STED-Aufnahme - sinkt die Fluoreszenz auf 20% des Anfangswertes ab. Weil die Farbstoffe ausbleichen, sind die Strukturen kaum noch erkennbar. Unter ROXS-Bedingungen bleibt die Stärke der Emission für 2 Aufnahmesequenzen konstant und ist nach vier Aufnahmen auf 75% der Anfangsfluoreszenz abgesunken. Die Stabilität der Farbstoffemission ist viermal so hoch wie unter Mowiol. Es ist somit eindeutig, dass die Fluoreszenz unter ROXS-Bedingungen viel stabiler ist, als unter der herkömmlichen Mowiol Einbettung der fixierten Zellen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Messungen in wässriger Umgebung unter nahezu physiologischen Bedingungen stattfinden. Es ist keine langwierige Einbettung mit Mowiol nötig, die zudem den Brechungsindex und die Viskosität der Probe verändert. Ein Effekt der höheren Viskosität ist, dass es beim Ersetzen des Wassers zu Stauchungen der Zelle kommt. Das Wasser wird schneller verdrängt, als das Mowiol nachfließen kann. Es ist von Vorteil die ROXS-Methode zu verwenden.

Durch das Verständnis der Photophysik ist es möglich, die Fluoreszenz der einzelnen Moleküle über einen bisher nie erreichten zeitlichen Bereich auszudehnen. Es existieren unzählige experimentelle Methoden, die Naturwissenschaftlern beonders auf dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie, zur Verfügung stehen. Der limitierende Faktor ist deshalb nicht mehr durch die Instrumente, sondern vielmehr durch die Stabilität der verwendeten Farbstoffe gegeben. Durch die Entwicklung der hochauflösenden Mikroskopie und den verbesserten Detektor- und Mikroskopsystemen ist ein nahezu unbegrenzter Pool an Methoden zur Verfügung gestellt worden. Es existieren nur wenige Konzepte, die die Photophysik von Farbstoffen, in Bezug auf Unterdrückung des Blinkens und Ausdehnung der Stabilität soweit verbessern, dass Aufnahmen bis hin zu mehreren Minuten an einem einzelnen Molekül möglich sind. Es handelt sich dabei um Konzepte, deren Verbesserungen speziell auf eine Farbstoffklasse zugeschnitten sind. Die Anwendung von Elektronentransferprozessen für die Depopulierung des Triplets wurde schon vielfach veröffentlicht, aber nicht als generelles Konzept vorgestellt [39, 43, 95].

Das hier erstmals eingeführte Konzept zur Stabilisierung der Fluoreszenzemission von Farbstoffen verschiedener Klassen beruht auf bekannten thermodynamischen und physikalischen Gesetzmäßigkeiten. Das theoretische Modell stützt die experimentellen Ergebnisse und liefert für den Fall des Oxazin MR121 eine schlüssige Erklärung, warum dieses Konzept nicht funktionieren kann.

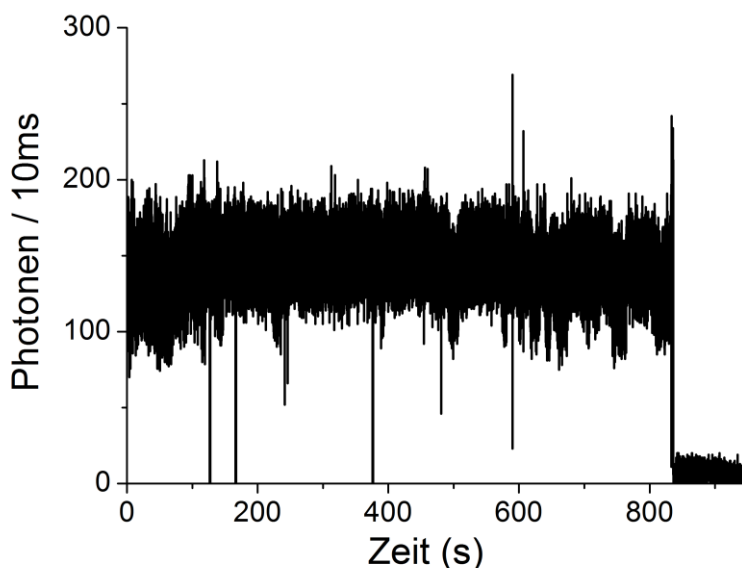


Abbildung 4.2.18: Darstellung der Fluoreszenzemission von einem einzelnen immobilisierten ATTO647N Molekül unter ROXS-Bedingungen.

Die Anwendung von Elektronentransferreaktionen, sowohl für die Depopulierung der ungewollten Auszustände durch den Übergang in den Triplettzustand, sowie der anschließenden Rekombination zurück in den Grundzustand, ist möglich. Die dafür verwendeten Redox-Reaktionen können thermodynamisch berechnet werden. Die Auszeiten können nahezu vollständig unterdrückt und die Stabilität der Farbstoffe kann erheblich gesteigert werden. Am Beispiel von ATTO647N kann die Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls über 14 Minuten aufrecht erhalten werden (Abb.4.2.18).

Das Potential des ROXS-Konzepts konnte nicht nur durch Einzelmolekülspuren bestätigt werden, auch die quantitative Statistik zur Bestätigung des theoretischen Modells, konnte in diesem Kapitel hinreichend aufgezeigt werden. Das Potential des Konzepts ist vielversprechend und sollte breite Anwendung in der modernen Fluoreszenzspektroskopie und den bildgebenden Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie finden.

4.3 Photoinduziertes Schalten von Cyaninfarbstoffen

Aufgrund der Charakterisierung der Photophysik von Farbstoffen verschiedenster Klassen, ist ein weiterer interessanter Aspekt des Cyaninfarbstoffes Cy5 entdeckt worden. Dieses Molekül lässt sich durch Einstrahlung von Licht zwischen einem nicht-fluoreszierenden und einem fluoreszierenden Zustand reversibel schalten [43]. Der Prozess des Schaltens basiert auf einer photoinduzierten Reaktion des Farbstoffs unter Einbeziehung einer Schwefelgruppe. Im folgenden Kapitel sollen die Bedingungen für diese Reaktion diskutiert werden. Außerdem wird der dafür notwendige Mechanismus beschrieben und Einsatzmöglichkeiten in der hochauflösenden Mikroskopie werden aufgezeigt.

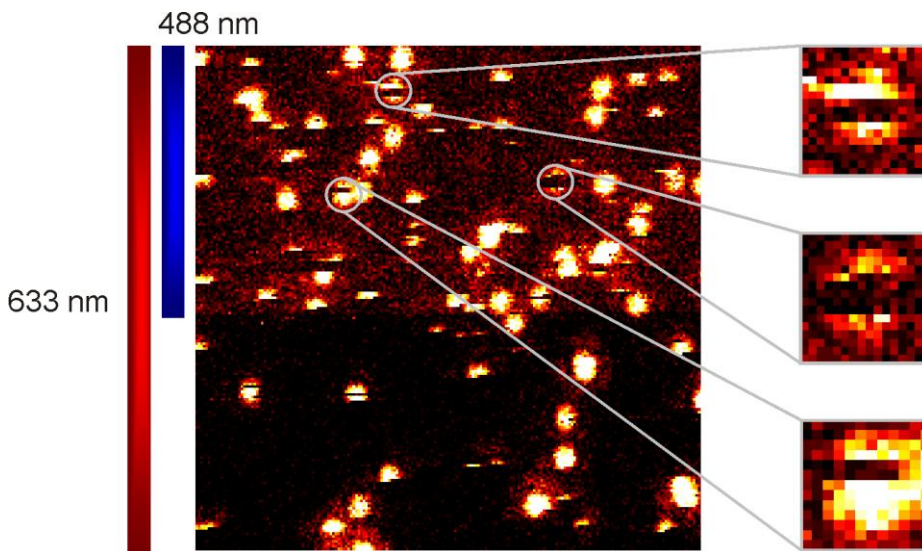


Abbildung 4.3.1: Darstellung einer Oberfläche von $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, nach Scan mit 633 nm. Die erste Hälfte des Bildes wurde mit zusätzlicher Beleuchtung von 488 nm durchgeführt. Die Vergrößerungen zeigen Moleküle, die nach dem scheinbaren Photobleichen durch die Beleuchtung mit 488 nm in den fluoreszierenden Zustand zurückkehren.

Um das Schaltverhalten von Cy5 zu demonstrieren, sind in Abb. 4.3.1 drei einzelne Moleküle vergrößert dargestellt. Die Farbstoffe wurden durch einen HeNe-Laser mit 633 nm angeregt und beginnen mit der Emission des Fluoreszenzlichts. Nach dem Übergang in den Triplettzustand werden diese Moleküle in einen Dunkelzustand überführt und die Emission bricht ab. Durch simultane Beleuchtung mit 488 nm, kann der Farbstoff zurück in den fluoreszierenden Zustand überführt werden und erneut Fluoreszenz emittieren. Dieses Verhalten ist unter bestimmten Bedingungen typisch für den Cyaninfarbstoff Cy5. In einem ersten Schritt muss der Sauerstoff aus der Lösung entfernt werden. Dies kann durch das bereits beschriebene enzymatische Puffersystem erreicht werden, oder durch Ersetzen des molekularen Sauerstoffs mit einem anderen Gas, wie z.B. Argon oder Stickstoff, durch Spülen der Lösung mit dem jeweiligen Gas. Des Weiteren muss eine Thiolverbindung in ausreichender Konzentration, z.B. 100 mM, zur Verfügung gestellt werden, z.B. Mercaptoethylamin, β -Mercaptoethanol oder Cystein. Ohne diese beiden Bedingungen ist ein reversibles Schalten zwischen An- und Aus-Zustand nicht möglich. Das reversible Schalten funktioniert sowohl im Ensemble als auch auf Einzelmolekülebene und lässt sich auf weitere Cyaninfarbstoffe erweitern.

Schalten im Ensemble

Unter den oben genannten Bedingungen lässt sich Cy5 im Ensemble als Farbstofflösung in einer Küvette reversibel schalten. Durch Bestrahlung mit 647 nm sinkt die Extinktion, wie im Absorptionsspektrum sichtbar, kann aber durch Bestrahlung einer weiteren Wellenlänge, z.B. 514 nm, wiederhergestellt werden. Da der Prozess des Schaltens ein konkurrierender Prozess zur

Photozerstörung ist, kann die ursprüngliche Extinktion wiederhergestellt werden.

Der Anteil der Photozerstörung hängt vor allem von der verwendeten Laserleistung ab. Das photoinduzierte reversible An- und Ausschalten ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

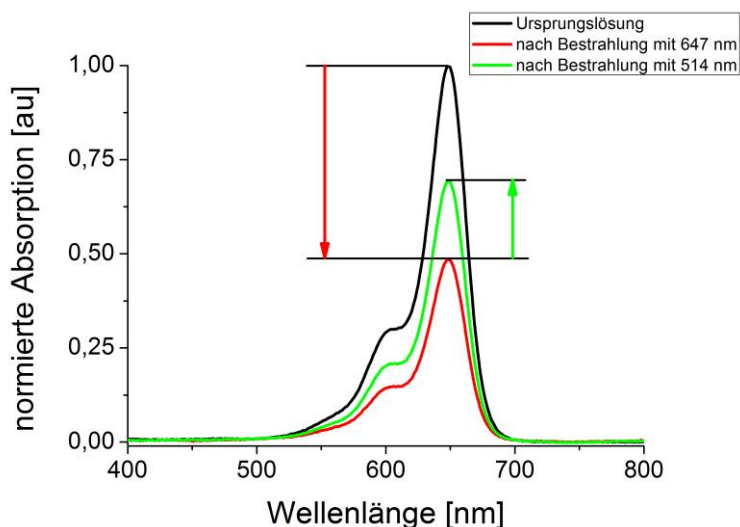


Abbildung 4.3.2: Darstellung der Absorptionsspektren einer Cy5 Lösung. In der schwarzen Kurve ist die Absorption einer etwa 1 μ M Cy5 Lösung abgebildet. Die rote Kurve stellt die Absorption der Lösung nach 55 Minuten Bestrahlung mit 647 nm dar und für die Messung der grünen Kurve wurde die Lösung 10 Minuten mit 514 nm bestrahlt.

Über die Bestrahlung der Probe mit 647 nm gelangt der Farbstoff in einen nicht-fluoreszierenden Zwischenzustand. Die Extinktion der Probe sinkt ab, das bedeutet, dieser Zwischenzustand absorbiert nicht. Die Verkleinerung der Extinktion kann man deutlich, am Maximum der Absorption bei 649 nm, erkennen. Es existiert ein reversibler Prozess, durch den der Farbstoff photoinduziert aus dem intermediären Zustand in den Grundzustand zurückgeschaltet werden kann. Die Extinktion steigt im Absorptionsspektrum an.

Um den Schaltvorgang detaillierter zu diskutieren, soll zunächst das Absorptionsverhalten von Cy5 im Ensemble systematisch beschrieben werden.

Dafür wird sowohl das Ausschalt-, als auch das Anschaltverhalten in verschiedenen Pufferumgebungen analysiert. Als Pufferumgebungen werden a) pures PBS, b) sauerstofffreies PBS und c) sauerstofffreies PBS nach Zugabe von 100 mM MEA gewählt. Dadurch ist es möglich, die genauen Schaltbedingungen zu rekonstruieren und vor allem sowohl den Übergang in den Dunkelzustand, als auch den Übergang zurück in den fluoreszierenden Zustand zeitlich zu analysieren. Der Auszustand wird zusätzlich auf thermische Stabilität überprüft. Aus Gründen der Übersicht wird nicht das vollständige Absorptionsspektrum, sondern nur der Wert für das Absorptionsmaximum von Cy5 bei 649 nm über die Zeit, aufgetragen.

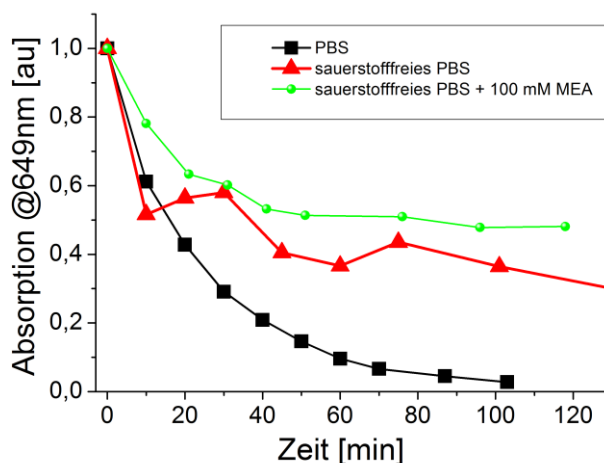


Abbildung 4.3.3: Darstellung der Absorption von Cy5 bei 649 nm, während der Bestrahlung mit 657 nm und 100 mW in drei verschiedenen Pufferbedingungen.

Die schwarze Kurve ist in reinem PBS aufgenommen. Eine exponentielle Abnahme der Absorption mit einer Abklingdauer von $\tau = 23 \pm 1$ min ist zu erkennen. Nach einer Stunde ist die Absorption schon

um 90 Prozent eingebrochen. Nach mehr als 100 Minuten ist die Absorption in der Küvette nahezu komplett verschwunden. Da keine Bedingungen gefunden werden konnten, die Absorption wiederherzustellen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um irreversible Photozerstörung handelt.

Wenn man den Sauerstoff aus der Lösung entfernt, erkennt man ein anderes zeitliches Verhalten. Die Absorption ist deutlich stabiler und kann nicht mehr mit einem einfachen exponentiellen Verlauf beschrieben werden. Das Ausschalten scheint in eine exponentielle Kinetik und eine lineare Kinetik aufgespalten zu sein. Auch unter diesen Bedingungen ist der Farbstoff irreversibel zerstört und kann nicht wieder angeschaltet werden. Der zeitliche Verlauf nach der Zugabe von MEA zeigt ein ähnliches Verhalten. Die exponentielle Kinetik in der grünen Kurve besitzt mit $\tau = 18 \pm 3$ min eine ähnliche Abklingzeit, wie in PBS. Der zusätzliche, lineare Verlauf ist deutlich zu erkennen. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, die Absorption durch Bestrahlung wiederherzustellen (siehe Abb. 4.3.2). Die Vermutung liegt nahe, dass die irreversible Zerstörung des Farbstoffs weiterhin mit einer exponentiellen Kinetik beschrieben werden kann. Diese wird überlagert von der reversiblen Bildung des Schaltprodukts mit einem linearen Zeitverlauf. Die Absorption ist deutlich stabiler, als in sauerstofffreiem PBS. Eine mikromolare Lösung mit Cy5 lässt sich innerhalb von 2 Stunden Bestrahlungszeit mit 100 mW Leistung nur zu 50 Prozent ausschalten.

Bildung der Differenzspektren

Die Unterschiede im zeitlichen Verhalten der Absorption werden bestätigt, wenn man ein Differenzspektrum zwischen dem ursprünglichen Farbstoffspektrum, vor der Bestrahlung, und dem

jeweiligen gemessenen Spektrum, nach den verschiedenen Messzeitpunkten, bildet.

Dafür wird jedes dieser gemessenen Spektren auf die verbliebene Cy5-Absorption im Absorptionsmaximum des Farbstoffs bei 649 nm normiert und anschließend voneinander subtrahiert. Daraus kann man die Veränderung der Spektren erkennen, ohne dass diese in der Cy5 Absorption verschwinden. Für die Bestrahlung in PBS sind drei spektrale Maxima bei 270, 350 und 550 nm zu erkennen.

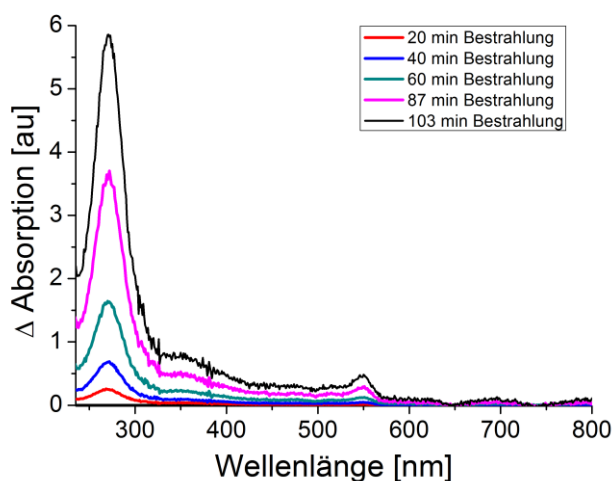


Abbildung 4.3.4: Darstellung der Differenzspektren einer etwa 1 μM Cy5 Lösung in PBS. Die Differenzspektren sind nach verschiedenen Zeitpunkten der Bestrahlung mit 657 nm gebildet worden. Die Bildung der Maxima bei 270, 350 und 550 nm kann über die Zeit verfolgt werden.

Während der Bestrahlung mit einer zweiten Wellenlänge, ändern sich die Werte für die Absorption nicht. Der Farbstoff scheint durch die Bestrahlung endgültig zerstört worden zu sein.

Bei Bestrahlung der sauerstofffreien Probe entstehen andere Maxima in den Differenzspektren, die bei 310, 360 und 625 nm liegen. Die Differenzspektren sind unter beiden Bedingungen unterschiedlich.

Dies war aus der Betrachtung der Zeitentwicklung der Cy5-Absorption zu erwarten (vergleiche Abb.4.3.3).

Durch die Bildung der Differenzspektren, zu unterschiedlichen Zeiten der Bestrahlung mit 657 nm, kann die Bildung der drei Peaks über die Zeit verfolgt werden.

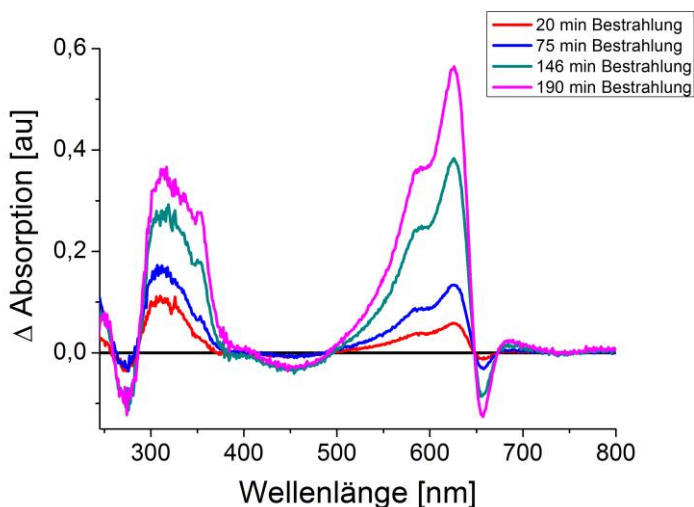


Abbildung 4.3.5: Differenzspektren der Cy5 Probe in sauerstofffreier Lösung und deren zeitliche Entwicklung bei Bestrahlung mit 657 nm. Die Bildung der Maxima bei 310, 360 und 625 nm über die Zeit ist zu erkennen.

Die negativen Anteile im Differenzspektrum resultiert aus der Normierung auf die Restabsorption von Cy5 im Maximum bei 649 nm. Diese Werte werden durch den gebildeten Peak bei 625 nm beeinflusst und sorgen für den negativen Anteil in den Spektren. Die eindeutige Bildung der Peaks bei 310, 360 und 625 nm, bleibt dennoch sichtbar. Der Versuch, den Farbstoff aus dem Auszustand zurückzuführen, ändert bei dieser Probe nichts an den Werten für die Absorption. In sauerstofffreiem Puffer wird der Farbstoff durch die Bestrahlung mit dem roten Laser zerstört.

Nach der Zugabe von MEA ändert sich dieses Bild, zu den beiden bisher betrachteten Bedingungen. Wie in der Vergrößerung der Abb. 4.3.6 zu sehen ist, kann man eine sich ausbildende Bande zwischen 450 und 600 nm erkennen, auch wenn der Unterschied in der Absorption klein ist. Trotz Normierung der Spektren und der damit verbundenen Vergrößerung des Effekts, liegen die Werte für die Änderung nur im Bereich von 0.005 in den Differenzspektren.

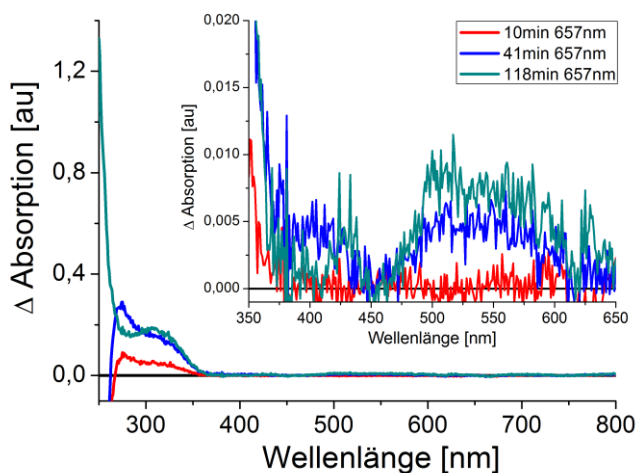


Abbildung 4.3.6: Darstellung des Differenzspektrums der normierten Cy5 Absorption zu verschiedenen Bestrahlungszeitpunkten mit 657 nm (100 mW). Die Vergrößerung zeigt den Wellenlängenbereich zwischen 350 und 650 nm.

Die Bande zwischen 280 und 350 nm zeigt dagegen eine deutliche Zunahme der Absorption und der Unterschied ist klar zu erkennen.

Außerdem kann aus den Spektren eine weitere Bande identifiziert werden, die sich nach etwa 60 Minuten ausbildet und deren Maximum bei 275 nm liegt. Diese beiden Banden sind auch noch nach Normierung der Spektren zu erkennen. Die Bande im grünen Wellenlängenbereich wird erst nach dem Bilden der Differenzspektren sichtbar und dann nur nach starker Vergrößerung.

Nach der in Abb. 4.3.2 gezeigten Veränderungen der Absorption, durch Bestrahlung der Cy5 Moleküle bei 514 nm, und den Einzelmolekülexperimenten aus Abb. 4.3.1 liegt die Vermutung nahe, dass das Schaltprodukt im Auszustand in diesem Wellenlängenbereich absorbieren sollte. Als Resultat sollte eine gut sichtbare Absorptionsbande zu erkennen sein. Die Änderungen sind gegenüber dem ursprünglichen Cy5-Spektrum gering.

Die Deutung der Bande wird zudem schwieriger, wenn man die Differenzspektren während des Zurückschaltens ebenfalls zeitaufgelöst darstellt und auf ähnliche Weise analysiert.

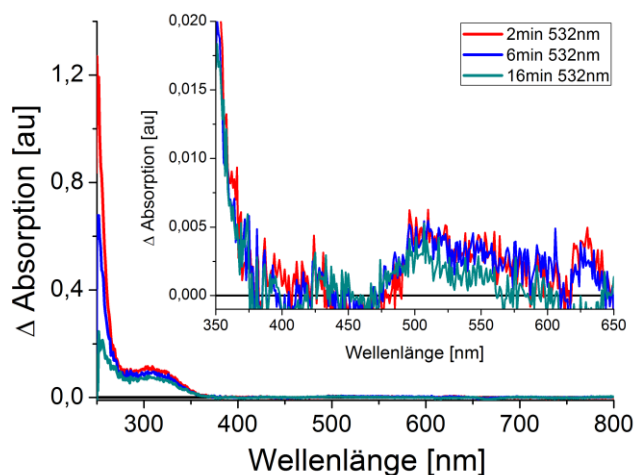


Abbildung 4.3.7: Darstellung des Differenzspektrums der normierten Cy5 Absorption zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung der Probe mit 532 nm. Die Vergrößerung zeigt den Wellenlängenbereich zwischen 350 und 650 nm.

Die ausgebildete Bande im grünen Wellenlängenbereich kann dem reversiblen Dunkelzustand nicht zugeordnet werden, denn in der Vergrößerung des Spektrums ist keine Änderung der Absorption zu erkennen. Im Gegensatz dazu kann die Absorption bei 649 nm wiederhergestellt werden (Abb. 4.3.2). Wenn eine reversible

Änderung stattfindet, geht sie im Rauschen des Spektrometers verloren. Im Gegenteil dazu verhalten sich die beiden Maxima im ultravioletten Spektralbereich. Diese bilden sich sowohl thermisch, als auch durch die Bestrahlung mit einer zweiten Wellenlänge, zurück. Dies bedeutet, dass die Cy5 Moleküle im ausgeschalteten Zustand in dem Bereich zwischen 270 und 350 nm absorbieren. Die beiden Banden können eindeutig dem Schaltprodukt zugeordnet werden.

Mechanistische Studien zum Schalten von Cy5

Um den Anschaltvorgang am Beispiel von Cy5 zu diskutieren, ist in der folgenden Abbildung, die Absorption bei 649 nm für die im vorherigen Abschnitt untersuchten Bedingungen zeitabhängig aufgetragen.

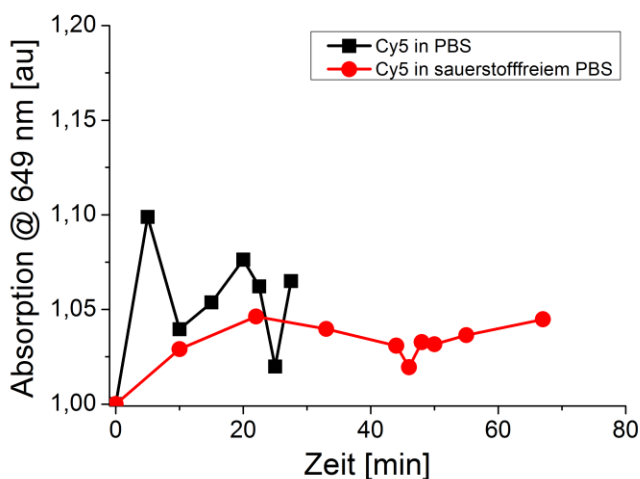


Abbildung 4.3.8: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Absorption bei 649 nm ausgeschalteten Cy5 Lösung unter zwei unterschiedlichen Pufferbedingungen. Die Absorption kann durch Bestrahlung nicht wiederhergestellt werden.

Bei Bestrahlung der ausgeschalteten Cy5-Lösung mit 514 nm, verändert sich die Extinktion nicht. Sowohl die Proben, gemessen in purem PBS, als auch in sauerstofffreiem PBS, zeigen keine Veränderung der Absorption. Der Farbstoff ist in beiden Proben irreversibel zerstört.

Unter den zuvor bereits erwähnten Schaltbedingungen, sauerstofffreien Pufferbedingungen nach Zugabe von 100 mM MEA oder einer anderen Schwefelverbindung in gleicher Konzentration, ändert sich dieses Verhalten. Einen Überblick über die getesteten Schwefelverbindungen sind in Tabelle 4.3.1 zu finden.

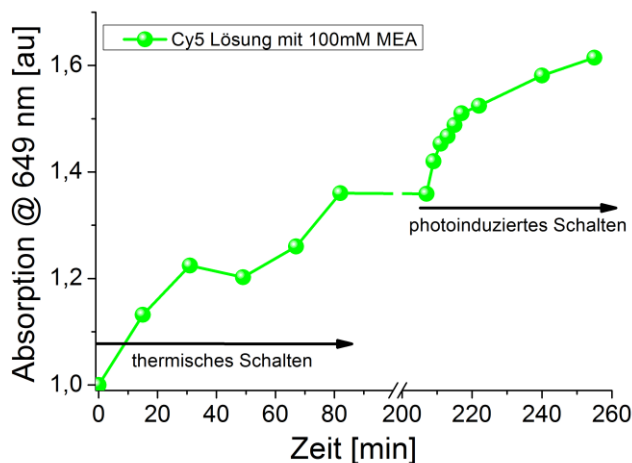


Abbildung 4.3.9: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Cy5 Absorption bei 649 nm. Bis 200 min ist die thermische Stabilität aufgetragen, danach wurde zwischen den Messpunkten jeweils zwei, fünf oder zehn Minuten mit 532 nm (30 mW) belichtet.

Die grüne Kurve in Abb.4.3.9 ist in zwei Bereiche unterteilt. Bis 200 Minuten nach der Messung wurde die Küvette in einer dunklen Umgebung aufbewahrt. Die Relaxation kann nur durch thermische Rekombination der Farbstoffmoleküle herbeigeführt worden sein. Nach dem Erreichen eines Plateaus, das nach 80 Minuten erreicht war,

wurde die Küvette mit einem Laser mit der Wellenlänge 532 nm bestrahlt. Es ist ein weiterer Anstieg der Absorption zu erkennen. Der Prozess der Rekombination kann in einen thermisch induzierten und einen photoinduzierten Anteil aufgeteilt werden. Beide Prozesse folgen einer exponentiellen Dynamik mit asymptotischen Charakter: die thermodynamische Relaxation besitzt eine Zeitkonstante von $\tau = 38 \pm 5$ min, die photoinduzierte Relaxation ist mit einer Zeitkonstante $\tau = 6 \pm 1$ min deutlich schneller. Die beiden Prozesse sind eindeutig über die zeitliche Kinetik trennbar.

Tabelle 4.3.1: Überblick über getestete Reagenzien und die Möglichkeit Cy5 photoinduziert zu schalten.

Schalten möglich	Schalten nicht möglich
β -Mercaptoethanol	Glutathion
β -Mercaptoethylamin	Trolox,
Cystein	TCBQ
Dithiothreitol	NaBH ₃ CN
	Phosphin
	Ascorbinsäure

Die Übersicht über die getesteten Reagenzien bestätigt die Vermutung, dass die Thiolgruppe für das photoinduzierte Schalten von Bedeutung ist. Glutathion stellt für die getesteten Reagenzien einen Sonderfall dar, es enthält eine Schwefelgruppe, kann aber nicht zum Anschalten von Cy5 benutzt werden. Eine endgültige Erklärung kann dafür an dieser Stelle nicht gegeben werden, aber durch die komplizierte räumliche Struktur des Moleküls, liegt die Vermutung nahe, dass die Schwefelgruppen nicht frei zugänglich sind. Deshalb können diese nicht mit dem Cy5 Molekül in Interaktion treten.

Die Bedeutung der Thiolgruppe bei der photoinduzierten Reaktion des Schaltens und deren Mechanismus, werden am Ende dieses Kapitels nochmals diskutiert.

Um das Anschalten von Cy5 weitergehend analysieren zu können, wurden Experimente an einzelnen Molekülen durchgeführt. Dadurch ist es möglich, die Zeitdynamik des Anschaltens näher zu beleuchten und die Reproduzierbarkeit des Schaltvorgangs an immobilisierter mit Cy5 markierter DNA zu bestimmen.

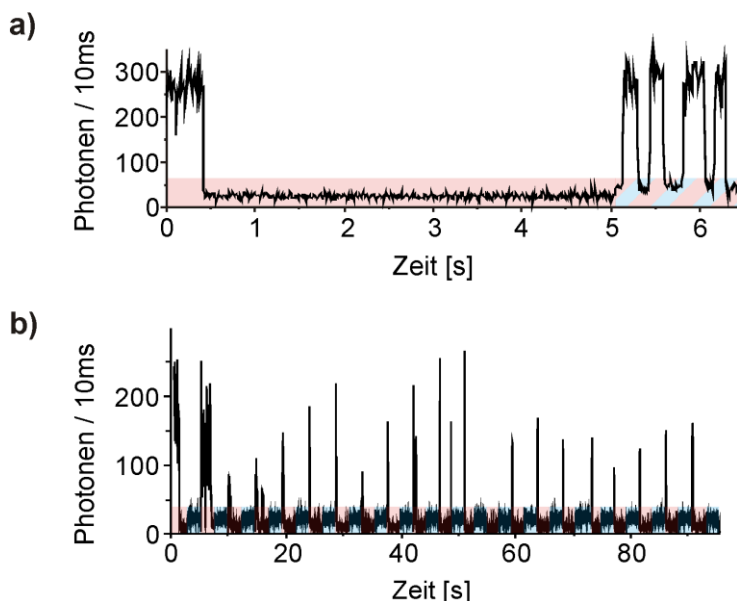


Abbildung 4.3.10: Fluoreszenzspuren von Cy5 an immobilisierter DNA. In a) ist in rot die Anregung mit nur einer Wellenlänge eingefärbt (633 nm, 14 kW/cm²) und in rot und blau ist die Anregung mit zwei Farben gekennzeichnet (633 nm und 488 nm, jeweils 14 kW/cm²). In b) ist in rot jeweils das Ausschalten mit 633 nm dargestellt. In den blauen Bereichen wird mit 488 nm belichtet, um den Farbstoff in den fluoreszierenden Zustand zu überführen. Die Leistungen entsprechen denen in Bild a).

Im Teil a) der Abb. 4.3.10 ist im ersten Teil der Fluoreszenzspur zu erkennen, wie der Farbstoff durch die Beleuchtung mit 633 nm in den Auszustand überführt werden kann. Die Anregung wurde noch für einige Sekunden aufrecht erhalten, um sicher zu gehen, dass keine Fluoreszenz mehr ausgesendet wird. Sobald die zweite Wellenlänge

dazu geschaltet wird, in diesem Fall 488 nm (dargestellt in dem rot und blau schraffierten Bereich), dauert es nur wenige hundert ms bis der Farbstoff wieder mit der Emission beginnt. In Abb. 4.3.10 b) wurde die Reproduzierbarkeit des Schaltvorgangs getestet, abgebildet ist eine repräsentative Spur für die Cy5-Emission. Nach Ausschalten der Cy5 Fluoreszenz durch Anregung mit 633 nm (rot schraffierter Bereich), wurde für 2.5 Sekunden mit der blauen Laserwellenlänge belichtet. Das Molekül wird in den fluoreszierenden Zustand überführt. Um dies zu überprüfen wurde die Probe wieder mit 633 nm bestrahlt. Dadurch konnte nicht nur die Fluoreszenz angeregt, sondern der Auszustand wieder erzeugt werden. Dieser Vorgang konnte 20-mal wiederholt werden, bevor der Farbstoff endgültig zerstört wurde. In nur einem Fall scheiterte das Anschalten, entweder war die Leistung des 488 nm Lasers nicht ausreichend, oder die Fluoreszenzemission war zu kurz, um detektiert zu werden.

Unter den oben dargestellten Bedingungen konnten die Cy5 Moleküle, in über 50% der Fälle, bis zu 100-mal zwischen An- und Aus-Zustand und einer Verlässlichkeit von über 90% geschaltet werden.

Um die Auszeiten unter den Schaltbedingungen genauer zu analysieren, wurden diese mit Hilfe der Autokorrelation aus den Spuren berechnet und anschließend histogrammiert.

Aus den Histogrammen werden zwei verschiedene Auszeiten für die Cy5 Moleküle ersichtlich. Die kurze Auszeit liegt im unteren Millisekundenbereich, zwischen 2 und 20 ms. Diese Auszeit zeigt sich in sauerstofffreiem Puffer ohne Zugabe von MEA und ist in der Literatur bekannt als molekülspezifische Auszeit für einzelne Cy5 Moleküle [35, 39].

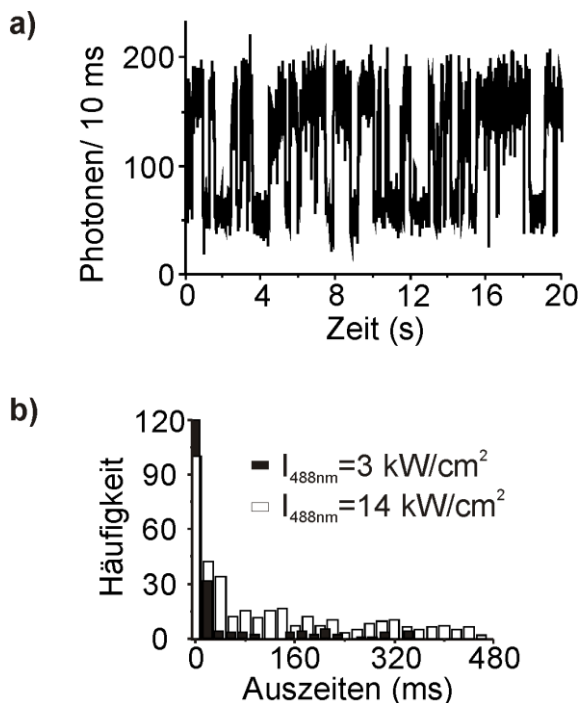


Abbildung 4.3.11: a) Darstellung der Fluoreszenz von immobilisierten Cy5 Molekülen bei Beleuchtung mit 488 und 633 nm. In b) sind die aus den Spuren erhaltenen Auszeiten für zwei verschiedene Leistungen des 488 nm Lasers histogrammiert.

Aus den Histogrammen kann die zweite Auszeit nicht mit einem eindeutigen Wert bestimmt werden. Diese breite Verteilung (siehe Abb.4.3.11 b)) tritt aber nur bei gleichzeitiger Beleuchtung mit 633 und 488 nm auf. Daraus lässt sich schließen, dass durch die Bildung des Aus-Zustands diese Auszeit verursacht wird und direkt mit dem Schaltvorgang verbunden ist. Diese Auszeit zeigt nur eine schwache Abhängigkeit von der Leistung der 488 nm Anregung.

Um die Bildung des Aus-Zustandes besser zu verstehen, wurden FRET Messungen an immobilisierter DNA durchgeführt. Die DNA wurde mit Cy5 als Akzeptor und Tetramethylrhodamin (TMR) als Donor im Abstand von 10 Basenpaaren markiert, woraus ungefähr 3,4 nm resultieren.

Am Anfang der Fluoreszenzspur wurde das FRET-Konstrukt mit 633 nm angeregt, um den Akzeptor-Farbstoff in den Dunkelzustand zu überführen, dargestellt im rot schraffierten Bereich in Abb. 4.3.12 a). Erst nach etwa 2.5 Sekunden wurde die Probe dann mit 514 nm angeregt und der Donor begann simultan mit der Fluoreszenzemission.

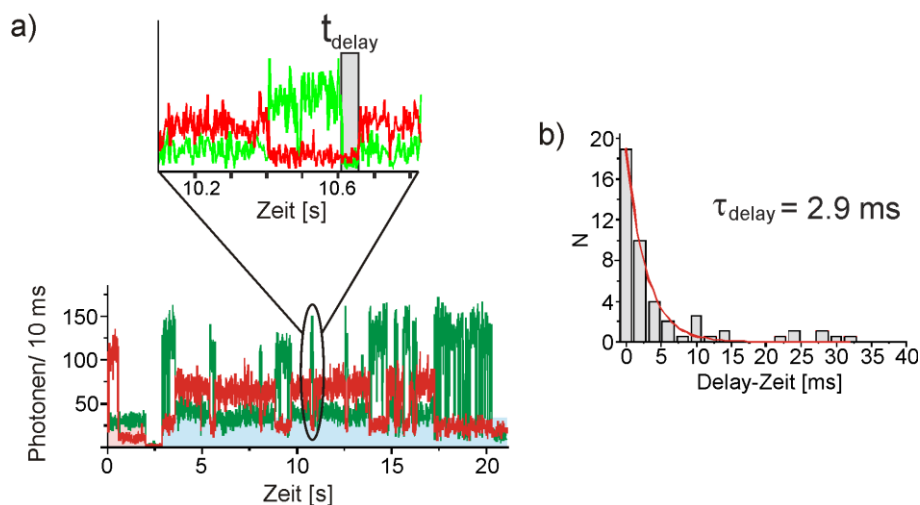


Abbildung 4.3.12: a) Darstellung der Fluoreszenzspur der FRET Probe an immobilisierter DNA. Die ersten 2 Sekunden wurden mit 633 nm und danach mit 514 nm angeregt, jeweils 14 kW/cm^2 . Die Vergrößerung zeigt, dass die TMR Emission auf das Niveau des Hintergrunds abfällt, bevor die Cy5 Emission startet. In b) sind diese Verzögerungen histogrammiert und eine typische Zeitkonstante von 2.9 ms kann daraus bestimmt werden.

Da sich der Akzeptor Cy5 noch im nicht absorbierenden Dunkelzustand befindet, kann kein Energietransfer stattfinden. Nach etwa 3.5 Sekunden reicht die Energie aus, um Cy5 in den fluoreszierenden Zustand zurückzuführen und die Akzeptor-Emission zu starten. Nach etwa 6 Sekunden wird der nicht-fluoreszierende Zustand erneut gebildet und der vorhin beschriebene Vorgang beginnt von neuem. Wenn man die Fluoreszenzspur vergrößert darstellt, fällt auf, dass vor jeder Rückkehr von Cy5 in den fluoreszierenden Zustand, die TMR

Emission komplett zusammenbricht und auf das Niveau des Hintergrunds absinkt. Trotz Anregung mit 488 nm, fluoresziert der Donor TMR nichtmehr, sondern überträgt die Energie komplett auf den Akzeptor Cy5, ohne dass dieser fluoresziert. Die Vermutung liegt nahe, dass die Energie, die während dieser Zeit auf das Cy5 Molekül übertragen wird, notwendig ist, um den Farbstoff aus dem nicht-fluoreszierenden in den fluoreszierenden Zustand zu überführen. In einem Histogramm über diese Verzögerung, die sogenannte Delay-Zeit, wird eine charakteristische Zeit von ca. 2.9 ms gefunden, siehe Abb. 4.3.12 b). Diese Zeit entspricht der Lebensdauer des Triplettzustands unter diesen Bedingungen, gemessen bei roter Anregung, die für Cy5 schon im vorherigen Kapitel bestimmt werden konnte. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Absorptionsmaximum des Cy5 Triplettzustands bei etwa 600 nm liegt. Es ist wahrscheinlich, dass die Rückkehr aus dem nicht-fluoreszierenden Zustand über den Triplettzustand stattfindet [86]. Durch frühere Untersuchungen der Gruppe um X. Zhuang, konnte als Ausgangspunkt für die Reaktion zur Bildung des reversiblen Aus-Zustands, das Triplett bestimmt werden. Der Triplettzustand ist nicht nur an der Bildung des Aus-Zustands, sondern auch an der Rückführung aus dem nicht-fluoreszierenden Zustand beteiligt [44].

Abhängigkeit des Schaltens von der Wellenlänge

Da der Anschaltvorgang photoinduziert stattfindet, aber kein Absorptionsspektrum für diesen Zustand zu erkennen ist, wurde eine wellenlängenabhängige Versuchsreihe für das Anschalten der Cy5-Moleküle durchgeführt. In Einzelmolekülexperimenten konnten verschiedene Laserwellenlängen erfolgreich eingesetzt werden. Die Rückführung in den An-Zustand funktioniert mit 475, 488, 514 und 532 nm, Linien eines Argon-Krypton Lasers. Außerdem konnte eine

Halogen-Lampe, aus der ein Wellenlängenbereich von 300-350 nm herausgefiltert wurde, eingesetzt werden. Um das Anschalten zeitabhängig untersuchen zu können, wurde ein Fluoreszenzspektrometer benutzt. In der folgenden Darstellung sind die Ergebnisse dieses Versuchs abgebildet.

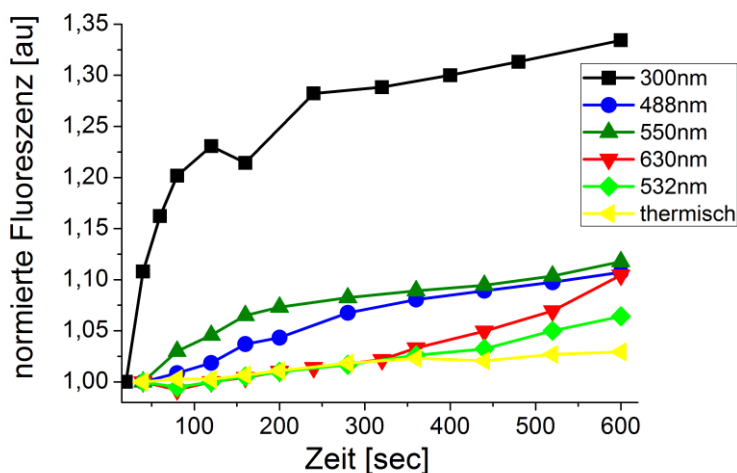


Abbildung 4.3.13: Darstellung des Anschaltvorgangs im Fluoreszenzspektrometer mit verschiedenen Wellenlängen. Jeder Datenpunkt spiegelt die gemessene Fluoreszenz zu dem jeweiligen Zeitpunkt wieder, die Anregung erfolgte dann mit 650 nm. In der Zwischenzeit wurde mit der angegebenen Wellenlänge bestrahlt. In gelb ist die Kontrolle für den thermischen Anschaltvorgang abgebildet.

Die Probe ist zwischen jedem Messpunkt, bei dem die Fluoreszenz durch Anregung des Farbstoffs bei 650 nm überprüft wurde, mit der angegebenen Wellenlänge belichtet worden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit ist das Spektrometer mit denselben Einstellungen betrieben worden. Dies beinhaltet, dass die Anregungsleistung der jeweiligen Wellenlängen korrigiert wurde.

Die Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Differenzspektren aus den Versuchen zur Bestimmung der Absorption des nicht fluoreszierenden Zustands. Mit 300 nm ist der Schaltvorgang im Ensemble am effektivsten und für diesen Bereich existiert eine reversible Absorptionsbande. Die Wellenlängen, die in Einzelmolekül-experimenten benutzt worden sind, können zum Schalten in der Küvette benutzt werden. Erstaunlich ist, dass das Anschalten mit der eigentlichen Anregungswellenlänge (630 nm) für den Farbstoff funktioniert. Auch in Weitfeld-Experimenten kann dieser Effekt beobachtet werden: nicht alle Moleküle können ausgeschaltet werden und in Abhängigkeit von der Anregungsleistung ist in den Aufnahmen ein gewisser Anteil von blinkenden Cy5 Molekülen zu erkennen. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass das Absorptionsspektrum des ausgeschalteten Zustands über einen großen Wellenlängenbereich ausgedehnt sein muss aber gleichzeitig ist die Extinktion dieses Zustands klein.

Die Frage, ob das Schalten des Cyaninfarbstoffes ein generelles Merkmal der gesamten Klasse ist, sollte in weiteren Versuchen mit anderen Vertretern der Cyanine geklärt werden.

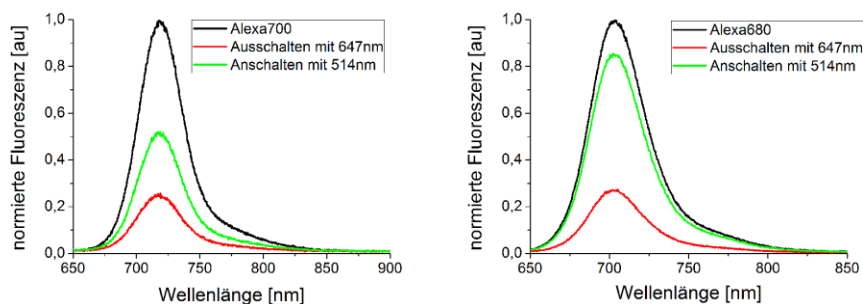


Abbildung 4.3.14: Darstellung der Fluoreszenz von a) Alexa680 und b) Alexa700 in Lösung. Die roten Kurven zeigen die verbleibende Fluoreszenz nach dem Ausschalten mit 657 nm. Die grünen Kurven zeigen die wiederhergestellte Fluoreszenz nach Anschalten eines grünen Lasers.

Neben den in Abb. 4.3.14 gezeigten Farbstoffen, Alexa700 und Alexa680, die in einer Küvette im Ensemble geschaltet worden sind, konnten sowohl Alexa647, Cy5.5, als auch Cy7 auf Einzelmolekülebene erfolgreich geschaltet werden.

Die Bedingungen für das Schalten sind für alle Farbstoffe gleich:

- Entfernung des Sauerstoffs aus der Lösung
- Zugabe einer Schwefelverbindung
- Einstrahlung einer zweiten Wellenlänge im grünen Spektralbereich.

In den Experimenten konnte kein Unterschied zwischen freiem Farbstoff und an DNA gekoppeltem Farbstoff festgestellt werden. Außerdem scheint es ein generelles Merkmal der Cyaninfarbstoffe mit einer Polymethinbrücke von 5 oder mehr Kohlenstoffatomen zu sein. Die oben genannten Cyanine mit dieser Brückenlänge lassen sich photoinduziert zwischen fluoreszierendem und nicht-fluoreszierendem Zustand schalten.

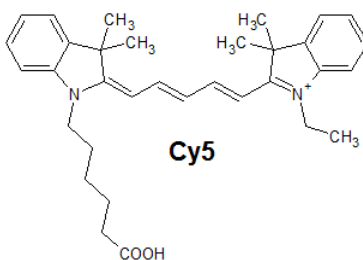


Abbildung 4.3.15: Struktur des Carbocyanin Cy5. Über die funktionelle Carboxylgruppe kann der Farbstoff an Proben gekoppelt werden. Die Polymethinbrücke in der Mitte der Struktur ist 5 Kohlenstoffatome lang.

Bei Betrachtung der Cy5-Struktur und unter Einbeziehung der Veränderungen im Spektrum liegt die Vermutung nahe, dass die Thiolverbindung an der Polymethinbrücke angreift. Wahrscheinlich ist die Bildung einer reversiblen, kovalenten Bindung. Dieser Mechanismus ist von dem sogenannten PhotLOV1-Protein bekannt.

Dort bildet sich nach Aufbrechen einer C-C Doppelbindung eine reversible Bindung zwischen einem Schwefel und einem Kohlenstoffatom, diese Reaktion ist photoinduziert [99]. Die reversiblen Absorptionsbanden im ultravioletten Spektralbereich können von Indolresten hervorgerufen werden, die bei der Anlagerung des Thiols entstehen. Noch ist unklar, wie genau und vor allem wo der Ansatzpunkt in der Polymethinbrücke für eine solche Reaktion zu finden ist. Aufgrund der pH Abhängigkeit bei der Bildung des Schaltprodukts ist es wahrscheinlich, dass das Radikalanion der Schwefelverbindung der Ausgangspunkt für eine solche Reaktion ist. Die Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich, fördert die Bildung des Radikalanions. In Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit des Verhaltens der Auszeiten von Oxazin- und Rhodaminfarbstoffen konnte dieser Effekt bestätigt werden [100].

Photoschalter in der hochauflösenden Mikroskopie

In der hochauflösenden Mikroskopie existiert, neben der STED-Mikroskopie und anderen Ansätzen, eine weitere wichtige technische Realisierung, die auf dem STORM Prinzip aufbaut, die sogenannte dSTORM Technik [26, 65]. Diese Methode basiert auf dem direkten Schalten von einzelnen Farbstoffmolekülen. Es ist nicht, wie bei der STORM Technik, notwendig, einen sogenannten Aktivator-Farbstoff in unmittelbarer Nähe zu dem zu schaltenden Farbstoff anzubringen. Der Farbstoff kann über eine zweite Wellenlänge zwischen An- und Aus-Zustand geschaltet werden. Dieses direkte Schalten des Farbstoffmoleküls hat den Vorteil, dass kommerziell zu erhaltende Proben eingesetzt werden können. Darüber hinaus werden Moleküle mit einer geringen räumlichen Ausdehnung, so wie Phalloidin zur Markierung von Actin, für die Beobachtung zugänglich [26, 27]. Eine Markierung mit zwei Farbstoffen kann bei diesen Molekülen, ohne Störung der Funktion, nicht durchgeführt werden.

Die dSTORM Technik basiert auf der Methode der Lokalisation einzelner Moleküle, mit einer Genauigkeit von ungefähr 10 nm. Um einen Farbstoff nicht nur einmal zu lokalisieren, sondern mehrmals die Information über die Position zu erhalten, werden Photoschalter benötigt. Dadurch ist es möglich, nur einen Teil der Moleküle in den An-Zustand zu befördern und die Positionen mehrmals zu bestimmen. Der Farbstoff Cy5 hat sich für solche Experimente als geeignet erwiesen, nicht nur wegen der Schalteigenschaften, sondern vor allem, weil man über die Anregungsleistung der beiden Laser, die Populationen der An- und Aus-Zustände steuern kann. In der Abb. 4.3.16 a) ist das Experiment schematisch dargestellt. Die Messungen wurden an einem Weitfeld-Mikroskop im TIRF Betrieb aufgenommen, als Probe diente immobilisierte, mit Cy5 markierte DNA. Die Experimente wurden in zwei Konfigurationen durchgeführt: mit ausschließlich roter Anregung, zur Bestimmung der Ausschalttrate k_{Aus}

und mit beiden Laserwellenlängen gleichzeitig, um die Anschaltrate k_{An} zu bestimmen.

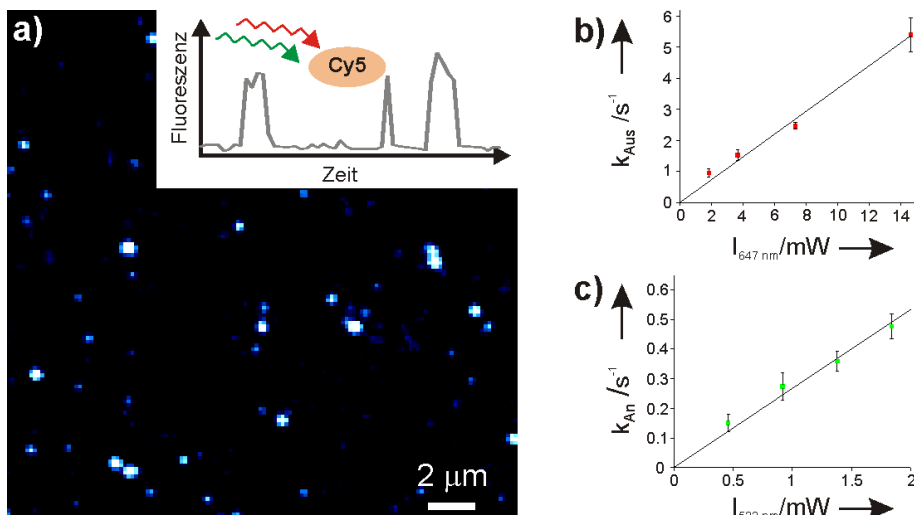


Abbildung 4.3.16: a) Darstellung des Messprinzips für die Leistungsabhängigkeit des a) Ausschaltens mit roter Laseranregung und b) Anschaltens mit grüner Laseranregung an immobilisierter DNA, markiert mit Cy5. Die Daten wurden mit einem Weitfeld-Mikroskop aufgenommen, das im TIRF-Modus betrieben worden ist. Die Leistungsabhängigkeit ist in beiden Fällen linear [26].

In beiden Fällen ist eine lineare Leistungsabhängigkeit, sowohl für das Ausschalten, als auch für das Anschalten der Cy5 Moleküle, zu erkennen. Mit dieser Leistungsabhängigkeit ist es möglich, die Oberflächendichte der Moleküle so einzustellen, dass sich immer der gewünschte Anteil der Farbstoffe im An-Zustand befindet.

Zur Bestimmung der Auflösungsgrenze an einem einzelnen Molekül wurde das Cy5 Molekül mehrmals zwischen dem fluoreszierenden und dem nicht-fluoreszierenden Zustand hin und her geschaltet. Für jeden An-Zustand wurde die genaue Position der Moleküle über die Bestimmung der Maxima der Punktabbildungsfunktion aus den Aufnahmen (Abb. 4.3.17 a) berechnet. Zu diesem Zweck wird die

Funktion über eine 2D Gauß-Funktion angenähert und daraus die Position des Maximums extrahiert. Die Positionen werden dann histogrammiert und dargestellt (Abb. 4.3.17 b).

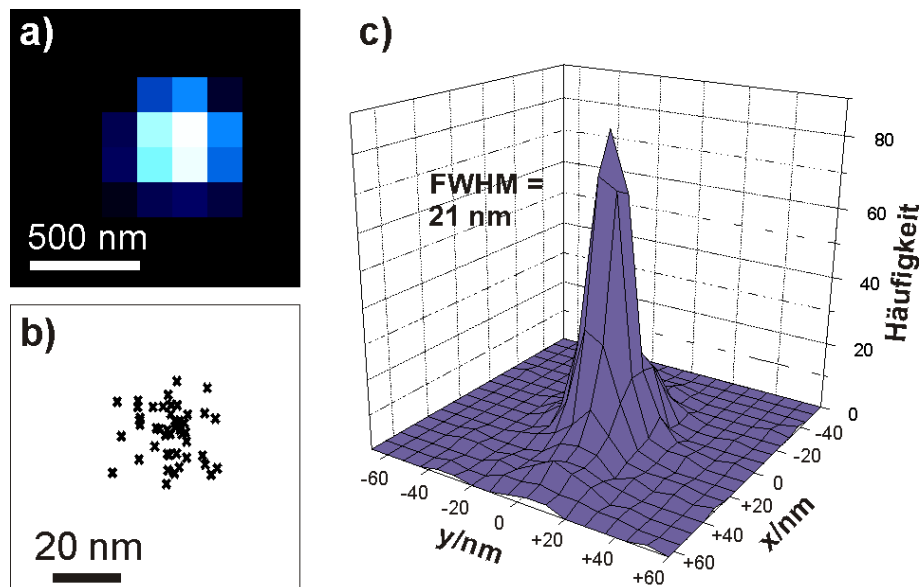


Abbildung 4.3.17: a) zeigt die gemessene Punktabbildungsfunktion eines einzelnen Cy5 Moleküls. Aus diesen Bildern wurden jeweils die Maxima bestimmt und in Bild b) aufgetragen. Aus Mittelung über 50 einzelne Moleküle (Bild c)) kann die Position bis auf 21 nm genau bestimmt werden [26].

Wenn man den oben beschriebenen Vorgang für 50 Moleküle durchführt, kann man die Genauigkeit der Positionsbestimmung eines einzelnen Cy5 Moleküls von 21 ± 1 nm bestimmen.

Als Anwendungsbeispiel für die hochauflösende Mikroskopie wird hier, wie im Abschnitt mit der STED Mikroskopie, eine Messung an Mikrotubuli in fixierten Zellen gezeigt. Die Mikrotubuli in COS-7-Zellen wurden zunächst mit einem primären Antikörper markiert, bevor Alexa647 markierte Fab-Fragmente an diese Antikörper binden.

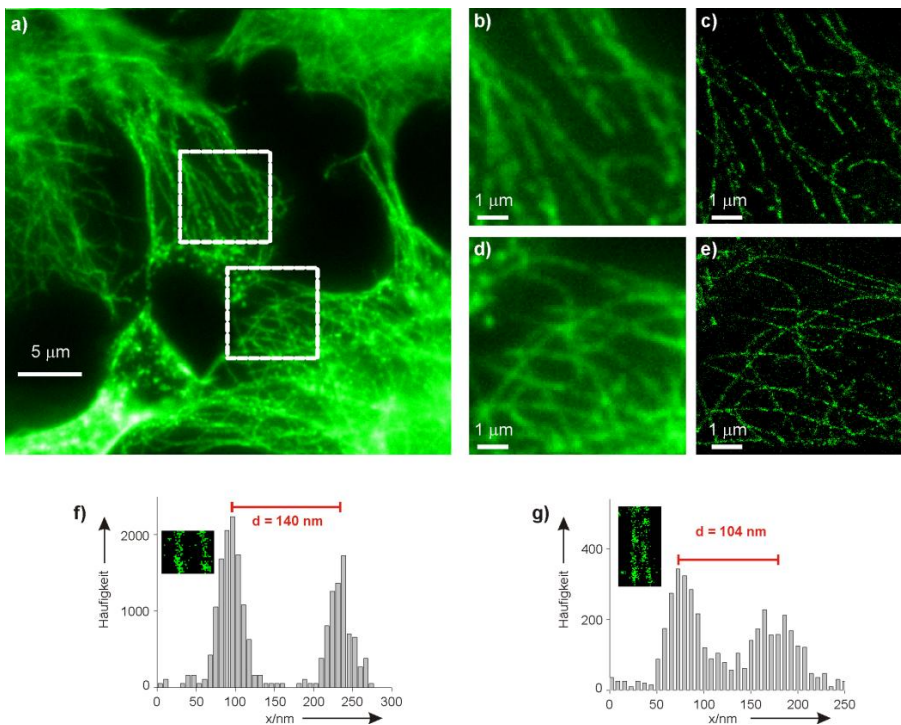


Abbildung 4.3.18: Aufnahmen mit der dSTORM Technik an Mikrotubuli in COS-7-Zellen. a) Übersichtsbild der Immunfluoreszenz der mit einem primären Antikörper und Alexa647-FAB-Fragmente markierten Strukturen. b), d) konventionelle Fluoreszenzbilder und c), e) dSTORM-Bilder der vergrößerten Bereiche. In f) und g) sind Profilschnitte von benachbarten Mikrotubuli im Abstand unter der Auflösungsgrenze abgebildet. Abstände von 140 und 104 nm können problemlos aufgelöst werden [26].

Nach der Probenpräparation können mit der dSTORM Technik hochaufgelöste Bilder der Mikrotubulinnetzwerke der Zellen aufgenommen werden. Aus einer Sequenz von typischerweise 5000-40000 Einzelaufnahmen und einer Integrationszeit zwischen 25 und 100 ms pro Bild, können die hochaufgelösten Bilder rekonstruiert werden.

Wie in der Abb. 4.3.18 zu erkennen ist, kann die Auflösung mit Hilfe der dSTORM-Methode, im Vergleich zu den herkömmlichen Weitfeld-

Methoden, erheblich gesteigert werden (vergleiche Abb. 4.3.18 b) zu c) und d) zu e)). Einzelne Mikrotubuli können mit einer Breite von 35 bis 50 nm aufgelöst werden. Dieser Wert liegt in guter Näherung an der tatsächlich angenommenen Breite von etwa 25 nm [101]. Benachbarte Mikrotubuli können bis zu einem Abstand von 104 nm (Abb. 4.3.18 g)) problemlos getrennt und einzeln dargestellt werden.

Es wurde gezeigt, dass die Auflösung mit Hilfe der photoschaltbaren Cyanine Cy5 und Alexa647 deutlich gesteigert werden kann. Mit einfachen, technischen Mitteln, einem konventionellen Weitfeld-Mikroskop, das im TIRF-Modus verwendet werden kann und den kommerziell erhältlichen Photoschaltern, kann die Auflösungsgrenze deutlich unterschritten werden.

5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Auswahl des Farbstoffs für Experimente in der Einzelmolekülspektroskopie von entscheidender Bedeutung ist. Unter verschiedenen chemischen Bedingungen unterscheiden sich die Farbstoffe in der Charakteristik der Fluoreszenzemission. Jede der verwendeten Strukturklassen zeigt unterschiedliche Reaktionen auf den Wechsel des chemischen Milieus und die Stabilität der Farbstofffluoreszenz ist von der Umgebung abhängig.

Aufgrund systematischer Untersuchungen an einzelnen Molekülen konnten die charakteristischen Eigenschaften der Photophysik für die Farbstoffklassen der Carbocyanine, Rhodamine, Oxazine und Carborhodamine an jeweils mindestens einem Vertreter der Strukturklasse studiert werden. Der Einfluss der chemischen Umgebung wurde an den Merkmalen Photostabilität und Blinkkinetik demonstriert. Das Carbocyanin Cy5 zeigt das stabilste Fluoreszenzverhalten in sauerstofffreiem Puffer nach Zugabe eines Triplettquenchers wie z.B. MEA. Unter äquivalenten Bedingungen unterscheiden sich Farbstoffe der Klasse der Oxazine, Rhodamine und Carborhodamine in der Emission. Die Fluoreszenzspuren werden von Blinken unterbrochen und bei ATTO655 sind lange Auszeiten bis hin zu mehreren Sekunden zu beobachten. Die Bedeutung der Klassifizierung des Fluoreszenzverhaltens unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen konnte mit Hilfe dieser Untersuchungen aufgezeigt werden. Die Photophysik des verwendeten Farbstoffs muss für eine korrekte Analyse des Experiments und eine Interpretation der Ergebnisse in die Überlegungen mit einbezogen werden. Außerdem kann eine adäquate Wahl des Farbstoffs an den Anforderungen des Experiments ausgerichtet werden.

Eine Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften konnte anhand dieser Charakterisierung erfolgen. Im Kapitel 4.2 war die

Optimierung auf eine lange und stabile Fluoreszenzemission ausgerichtet, die nicht durch Blinken unterbrochen wird. Als Ausgangspunkt dient die simultane Rückführung der Farbstoffe aus einem solchen Aus-Zustand, dessen Ursache häufig der Übergang des Moleküls in den langlebigen Triplettzustand darstellt. Die Lebensdauer bewegt sich im Bereich von einigen Mikrosekunden bis hin zu mehreren Sekunden. Weil während dieser Lebensdauer keine Fluoreszenzphotonen ausgesendet werden können ist es von entscheidender Bedeutung, den Farbstoff in den Grundzustand zu überführen, um eine Wiederanregung zu ermöglichen. Auf Basis der Erzeugung eines Farbstoffradikals konnte die Entvölkerung des Triplettzustands gezeigt werden. Die Entvölkerung des Triplett- und Repopulation des Singulett-Grundzustandes konnte anhand einer Zugabe von einem Reduktions- und einem Oxidationsmittel erreicht werden. Als Reduktionsmittel wurde Trolox oder Ascorbinsäure verwendet und als Oxidationsmittel kam Methylviologen zum Einsatz. Eine Ladungstrennung ist die Folge der Stoßionisation mit den verwendeten Reagenzien und es entsteht entweder das Radikalkation des Farbstoffs, über eine Oxidation, oder das Radikalanion, über eine Reduktion. Die anschließende Rekombination in den Grundzustand erfolgt über die Reduzierung des Kations und für das Anion entsprechend über eine Oxidation. Mit einer Folge von Redox-Reaktionen ist es möglich den Farbstoff aus dem Triplett in den Grundzustand zu überführen. Aufbauend auf diese Reaktionen wurde ein System entwickelt, das einen universellen Einsatz, unabhängig von der Strukturklasse des Farbstoffs möglich macht. Für den Begriff **reduzierendes** und **oxidierendes** System zur Stabilisierung der Farbstofffluoreszenz wurde das Kürzel ROXS eingeführt. Anhand der Farbstoffe Cy5 und ATTO647N konnte die Wirkung von ROXS demonstriert werden. Thermodynamische Berechnung der Reaktionsenthalpie mittels der Rhem-Weller Gleichung stützen die experimentellen Ergebnisse. Die universelle Einsetzbarkeit von ROXS konnte an Farbstoffen aus den Strukturklassen der Carbocyanine, Carborhodamine, Oxazine und Rhodamine aus dem grünen und roten Spektralbereich demonstriert werden. Am Beispiel von ATTO647N

konnte die Fluoreszenz über 18 Minuten an einem einzelnen Molekül aufrecht erhalten werden.

Die Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften führte im weiteren Verlauf der Arbeit zu neuen Einsatzgebieten der hochauflösenden Mikroskopie. Von diesen Eigenschaften profitiert besonders die STED Mikroskopie. Der Einsatz in der STED Mikroskopie, die aufgrund der hohen Leistungsdichten im Laserfokus besonders hohe Anforderungen an die Photostabilität der verwendeten Farbstoffe stellt, konnte gezeigt werden. Bei Leistungsdichten von 30 MW/cm^2 zeigen einzelne ATTO647N Moleküle eine ausreichend hohe Photostabilität, die weit über die bisher erreichte Stabilität hinausgeht. Eine Auflösung von $25 \pm 1.3 \text{ nm}$ an einem einzelnen ATTO647N-Farbstoffmolekül wurde erreicht. Messungen an fixierten Zellen, zur Rekonstruktion von Mikrotubulinnetzwerken demonstrieren die Anwendung in der hochauflösenden Mikroskopie. Bisher wurden fixierte Zellen für STED-Messungen häufig in ein Polymer (Mowiol) eingebettet. Vor der Einbettung wird die Struktur über ein System, bestehend aus zwei Antikörpern, markiert. Diese Standardmethode in Mowiol wurde als Vergleichsmessung für die Fluoreszenzstabilität herangezogen. Die ROXS-Methode bietet deutliche Vorteile gegenüber dieser Methode. Eine langwierige Einbettung ist nicht mehr nötig, sondern vielmehr wird eine Messung unter physiologischen Bedingungen möglich. Unter ROXS-Bedingungen kann die Farbstofffluoreszenz über mehrere Aufnahmen an derselben Stelle aufrecht erhalten werden. Mikrotubulinnetzwerke weit unterhalb der Auflösungsgrenze konnten rekonstruiert werden.

Außerdem können weitere interessante Einsatzgebiete in der Fluoreszenzmikroskopie über das Verständnis der Photophysik erschlossen werden. Die Farbstoffe können als Sonden für unterschiedliche chemische Umgebungen genutzt werden [102]. Eine Kontrolle der Blinkkinetik ist möglich und kann in der hochauflösenden Einzelmolekül-Lokalisations-Mikroskopie erfolgreich eingesetzt werden [103]. Diese Methode ist keine neue Mikroskopietechnik, sondern vielmehr beruht sie auf der Erweiterung der hochauflösenden

Mikroskopie basierend auf der Lokalisation einzelner Farbstoffmoleküle. Eine Steuerung der Auszeiten der Farbstoffe ist über die Konzentrationen von Reduktions- und Oxidationsmittel möglich. Es werden keine Photoschalter als Sonden mehr eingesetzt und mit einer Anregungswellenlänge nach der Manipulation der Pufferumgebung können hochauflösende Bilder erzielt werden. Der Nachteil des ROXS Prinzips ist der Einsatz der Farbstoffe in einer künstlichen erzeugten Pufferumgebung. So sind hochauflösende Aufnahmen in fixierten Zellen möglich, aber die experimentellen Bedingungen erlauben keinen Einsatz in lebenden Zellen. Bei einem Test mit diesem System trat der Zelltod nach etwa 5 Minuten ein wodurch keine Experimente durchgeführt werden konnten. Die Optimierung der photophysikalischen Eigenschaften von Farbstoffen führt zu einem besseren Verständnis der Photophysik, wodurch es möglich ist, Farbstoffe auszuwählen, die unter zellulären Bedingungen ein ausgeprägtes Blinkverhalten zeigen. Dieses Blinken kann für die hochauflösende Mikroskopie benutzt werden [27]. Es konnten unter zellulären Bedingungen Farbstoffen aus der Klasse der Oxazine mit Hilfe von nur einer Laserwellenlänge hochauflösende Bilder rekonstruiert werden. Diese Messungen weisen darauf hin, dass ein Einsatz in lebenden Zellen möglich ist. In vivo Experimente mit schaltbaren Proteinen konnten bereits in verschiedene Gruppen durchgeführt werden und sind sicherlich ein Forschungsgebiet der Zukunft [14, 16, 22, 69, 70, 104-106].

Im letzten Kapitel der Arbeit wurde das photoinduzierte Schalten der Carbocyaninfarbstoffe mit Absorptionsmaxima über 650 nm diskutiert. Dabei wurden die Bedingungen für die chemische Umgebung und Wellenlängen, die das Schalten ermöglichen, erläutert. Photoinduziertes Schalten ist in sauerstofffreiem Puffer nach Zugabe einer Thiolverbindung in geeigneter Konzentration möglich. In Experimenten auf Einzelmolekülebene und im Ensemble konnten die Wellenlängen 300, 476, 488, 514, 532 und 630 nm zur Rückführung des Farbstoffs aus dem nicht-fluoreszierenden Zustand benutzt werden. Obwohl das photoinduzierte Schalten mit den oben genannten Wellenlängen im

sichtbaren Bereich des Spektrums möglich war, wurde kein reversibles Absorptionsspektrum des nicht-fluoreszierenden Zustands in den Messungen gefunden. In mechanistischen Studien konnte der Einfluss des Triplettzustandes sowohl für die Bildung, als auch für Rückführung festgestellt werden. Das Triplett ist zum einen der Ausgangspunkt für die Reaktion zur Bildung des reversiblen nicht-fluoreszierenden Zustands und aus Messungen an einer FRET-Probe mit Cy5 als Akzeptor konnte die Beteiligung der Triplets auch auf dem Rückweg in den fluoreszierenden Zustand demonstriert werden. Mit dem strukturverwandten Alexa647-Farbstoffs, sowie den Farbstoffen Cy5.5, Cy7, Alexa680 und Alexa700 war das photoinduzierte Schalten möglich und scheint ein generelles Merkmal für Carbocyanine mit mindestens fünf Kohlenstoffatomen in der Polymethinbrücke der Farbstoffstruktur zu sein. Alle genannten Farbstoffe konnten unter denselben Bedingungen reversibel zwischen An- und Aus-Zustand geschaltet werden. Die Anwendung dieser Photoschalter in der hochauflösenden Mikroskopie wurde im letzten Abschnitt der Arbeit diskutiert. Die dSTORM Methode wurde entwickelt und vorgestellt. Diese Methode benutzt das Schaltverhalten der Cyanine, um über mehrfache Lokalisation eines einzelnen Farbstoffs die Auflösung zu erhöhen. Hierbei konnte eine Auflösung von ca. 20 nm erreicht werden. Die Anwendung der Methode konnte am Beispiel von fixierten Zellen gezeigt werden. Einzelne Mikrotubuli mit einem Abstand von ca. 100 nm konnten voneinander getrennt und ganze Netzwerke in hochauflösenden Aufnahmen abgebildet werden. Das direkte Schalten von Cy5-Molekülen erlaubt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Markern. Proben, die mit der STORM-Technik nicht zugänglich sind, können abgebildet werden. STORM benötigt zwei Moleküle - Aktivator und Akzeptor - in definiertem Abstand von < 10 nm, um photoinduziertes Schalten zu ermöglichen. Relativ kleine Moleküle, wie z.B. Phalloidin zur Markierung von Aktinstrukturen, können für dSTORM eingesetzt werden. Obwohl die Bedingungen für das Schalten geklärt werden konnten, ist der exakte Schaltmechanismus bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig bekannt. Fest steht, dass für reversibles Schalten eine Thiolverbindung in der Pufferlösung benötigt

wird und der Lösung der Sauerstoff entzogen werden muss. In pH-abhängigen Studien konnte die Effizienz der photoinduzierten Reaktion gesteigert werden, wenn der pH-Wert zu Werten über pH7.4 verschoben wird. Die Untersuchungen stützen die Vermutung der Bildung einer reversiblen Bindung zwischen dem Farbstoff und einer ionisierten Schwefelverbindung. Das Radikalanion könnte eine Kohlenstoff Doppelbindung angreifen. Eine reversible kovalente Bindung könnte sich ausbilden. Ein solcher Mechanismus - die Ausbildung einer reversiblen Schwefel-Kohlenstoff Bindung - wurde schon im Zusammenhang mit dem PhotLov1-Proteinen vorgestellt [99]. Die endgültige Klärung des Schaltmechanismus bleibt noch offen, aber die Hinweise in dieser Arbeit geben die Richtung der folgenden Forschungsarbeiten an diesem System vor.

6 Literaturverzeichnis

1. Orrit, M., D. Mobius, U. Lehmann, and H. Meyer, *Reflection and Transmission of Light by Dye Monolayers*. Journal of Chemical Physics, 1986. **85**(9): p. 4966-4979.
2. Moerner, W.E. and L. Kador, *Optical-Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid*. Physical Review Letters, 1989. **62**(21): p. 2535-2538.
3. Shera, E.B., N.K. Seitzinger, L.M. Davis, R.A. Keller, and S.A. Soper, *Detection of Single Fluorescent Molecules*. Chemical Physics Letters, 1990. **174**(6): p. 553-557.
4. Rigler, R., U. Mets, J. Widengren, and P. Kask, *Fluorescence Correlation Spectroscopy with High Count Rate and Low-Background - Analysis of Translational Diffusion*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 1993. **22**(3): p. 169-175.
5. Weiss, S., *Fluorescence spectroscopy of single biomolecules*. Science, 1999. **283**(5408): p. 1676-1683.
6. Bohmer, M. and J. Enderlein, *Fluorescence spectroscopy of single molecules under ambient conditions: Methodology and technology*. Chemphyschem, 2003. **4**(8): p. 793-808.
7. Michalet, X., A.N. Kapanidis, T. Laurence, F. Pinaud, S. Doose, M. Pflughoefft, and S. Weiss, *The power and prospects of fluorescence microscopies and spectroscopies*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2003. **32**: p. 161-182.
8. Stephens, D.J. and V.J. Allan, *Light microscopy techniques for live cell Imaging*. Science, 2003. **300**(5616): p. 82-86.
9. Zhuang, X.W., T. Ha, H.D. Kim, T. Centner, S. Labeit, and S. Chu, *Fluorescence quenching: A tool for single-molecule protein-folding study*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(26): p. 14241-14244.
10. Hell, S.W., *Far-field optical nanoscopy*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1153-1158.
11. M. Heilemann, P.D.J.H.M.S., *Photoswitches: Key molecules for subdiffraction-resolution fluorescence imaging and molecular quantification*. Laser & Photonics Review, 2009. **3**(1-2): p. 180-202.

12. Gustafsson, M.G.L., D.A. Agard, and J.W. Sedat, *(IM)-M-5: 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution*. Journal of Microscopy-Oxford, 1999. **195**: p. 10-16.
13. Hell, S. and E.H.K. Stelzer, *Fundamental Improvement of Resolution with a 4Pi-Confocal Fluorescence Microscope using 2-Photon Excitation*. Optics Communications, 1992. **93**(5-6): p. 277-282.
14. Schermelleh, L., P.M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M.C. Cardoso, D.A. Agard, M.G.L. Gustafsson, H. Leonhardt, and J.W. Sedat, *Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy*. Science, 2008. **320**(5881): p. 1332-1336.
15. Hell, S.W. and J. Wichmann, *Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated-Emission - Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy*. Optics Letters, 1994. **19**(11): p. 780-782.
16. Westphal, V., S.O. Rizzoli, M.A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, and S.W. Hell, *Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement*. Science, 2008. **320**(5873): p. 246-249.
17. Thompson, R.E., D.R. Larson, and W.W. Webb, *Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes*. Biophysical Journal, 2002. **82**(5): p. 2775-2783.
18. Cheezum, M.K., W.F. Walker, and W.H. Guilford, *Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles*. Biophysical Journal, 2001. **81**(4): p. 2378-2388.
19. Yildiz, A., J.N. Forkey, S.A. McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman, and P.R. Selvin, *Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization*. Science (Washington, DC, United States), 2003. **300**(5628): p. 2061-2065.
20. Yildiz, A. and P.R. Selvin, *Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: Application to molecular motors*. Accounts of Chemical Research, 2005. **38**(7): p. 574-582.
21. Betzig, E., G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H.F. Hess, *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1642-1645.

22. Shroff, H., C.G. Galbraith, J.A. Galbraith, and E. Betzig, *Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics*. *Nature Methods*, 2008. **5**(5): p. 417-423.
23. Bates, M., B. Huang, G.T. Dempsey, and X.W. Zhuang, *Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes*. *Science*, 2007. **317**(5845): p. 1749-1753.
24. Huang, B., S.A. Jones, B. Brandenburg, and X.W. Zhuang, *Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution*. *Nature Methods*, 2008. **5**(12): p. 1047-1052.
25. Huang, B., W.Q. Wang, M. Bates, and X.W. Zhuang, *Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy*. *Science*, 2008. **319**(5864): p. 810-813.
26. Heilemann, M., S. van de Linde, M. Schuttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, and M. Sauer, *Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008. **47**(33): p. 6172-6176.
27. van de Linde, S., R. Kasper, M. Heilemann, and M. Sauer, *Photoswitching microscopy with standard fluorophores*. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 2008. **93**(4): p. 725-731.
28. Michalet, X., F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, and S. Weiss, *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. *Science*, 2005. **307**(5709): p. 538-544.
29. Tinnefeld, P., V. Buschmann, K.D. Weston, and M. Sauer, *Direct observation of collective blinking and energy transfer in a bichromophoric system*. *Journal of Physical Chemistry a*, 2003. **107**(3): p. 323-327.
30. Yip, W.T., D.H. Hu, J. Yu, D.A. Vanden Bout, and P.F. Barbara, *Classifying the photophysical dynamics of single- and multiple- chromophoric molecules by single molecule spectroscopy*. *Journal of Physical Chemistry a*, 1998. **102**(39): p. 7564-7575.
31. Vosch, T., M. Cotlet, J. Hofkens, K. Van der Biest, M. Lor, K. Weston, P. Tinnefeld, M. Sauer, L. Latterini, K. Mullen, and F.C. De Schryver, *Probing Forster type energy pathways in a first generation rigid dendrimer bearing two perylene imide chromophores*. *Journal of Physical Chemistry A*, 2003. **107**(36): p. 6920-6931.

32. Weston, K.D. and S.K. Buratto, *Millisecond intensity fluctuations of single molecules at room temperature*. Journal of Physical Chemistry A, 1998. **102**(21): p. 3635-3638.
33. Weston, K.D., P.J. Carson, H. Metiu, and S.K. Buratto, *Room-temperature fluorescence characteristics of single dye molecules adsorbed on a glass surface*. Journal of Chemical Physics, 1998. **109**(17): p. 7474-7485.
34. Anzai, J., T. Hoshi, and T. Osa, *Avidin-Biotin Complexation for Enzyme Sensor Applications*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 1994. **13**(5): p. 205-210.
35. Widengren, J. and P. Schwille, *Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry a, 2000. **104**(27): p. 6416-6428.
36. Ha, T., *Single-molecule fluorescence resonance energy transfer*. Methods, 2001. **25**(1): p. 78-86.
37. Buschmann, V., K.D. Weston, and M. Sauer, *Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes*. Bioconjug Chem, 2003. **14**(1): p. 195-204.
38. Doose S., H. Neuweiler, M. Sauer, *Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer: A Reporter for Conformational Dynamics of Macromolecules*. ChemPhysChem, 2009. **9999**(9999): p. NA.
39. Kasper, R., M. Heilemann, P. Tinnefeld, and M. Sauer. *Toward ultra-stable fluorescent dyes for single-molecule spectroscopy*. in *Biophotonics 2007: Optics in Life Science*. 2007. Munich, Germany: SPIE.
40. Vogelsang, J., R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, and P. Tinnefeld, *A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes*. Angewandte Chemie-International Edition, 2008. **47**(29): p. 5465-5469.
41. Kasper, R., B. Harke, C. Forthmann, P. Tinnefeld, S.W. Hell, and M. Sauer, *STED of Stable Single Fluorophores under close to physiological conditions*. in preparation, 2009.
42. Ha, T. and J. Xu, *Photodestruction Intermediates Probed by an Adjacent Reporter Molecule*. Physical Review Letters, 2003. **90**(22): p. 223002/1-223002/4.
43. Heilemann, M., E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, and P. Tinnefeld, *Carbocyanine dyes as efficient reversible single-*

- molecule optical switch*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(11): p. 3801-6.
44. Bates, M., T.R. Blosser, and X. Zhuang, *Short-Range Spectroscopic Ruler Based on a Single-Molecule Optical Switch*. Physical Review Letters, 2005. **94**(10): p. 108101/1-108101/4.
45. Condon, E.U., *Nuclear Motions Associated with Electron Transitions in Diatomic Molecules*. Physical Review, 1928. **32**(6): p. 858.
46. Haken, H. and H.C. Wolf, *Atom- und Quantenphysik*. 8., aktualisierte und erw. Aufl. ed. Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen ; mit 32 Tabellen, 177 Aufgaben und vollständigen Lösungen. 2004, Berlin [u.a.]: Springer. XX, 531 S. : Ill., graph. Darst.
47. Atkins, P.W., C.A. Trapp, and J. De Paula, eds. *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH: Weinheim [u.a.].
48. Cohen-Tannoudji, C., B. Diu, and F. Laloë, *Quantenmechanik*, Berlin [u.a.]: de Gruyter.
49. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. ed. ed. 978-0387-31278-1. 2006, New York, NY: Springer. XXVI, 954 S. : zahlr. Ill. und graph. Darst.
50. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **2**: p. 55-75.
51. Kavarnos, G.J., *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*. Vol. 1. 1993.
52. Pohl, D.W., W. Denk, and M. Lanz, *Optical Stethoscopy - Image Recording With Resolution $\lambda/20$* . Applied Physics Letters, 1984. **44**(7): p. 651-653.
53. Pawley, J.B., ed. *Handbook of biological confocal microscopy*. 3. ed. ed. 2006, Springer: New York, NY. XXVIII, 985 S. : Ill., graph. Darst.
54. Tipler, P.A., ed. *Physik*. 2., korrigierter Nachdr. der 1. Aufl. ed. Spektrum-Lehrbuch. 1998, Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg [u.a.]. XVIII, 1522 S. : Ill., graph. Darst.
55. Chu, B. and F.L. Lin, *Laser Light-Scattering Study of a Ternary Liquid-Mixture - Ethanol Water Chlorophorm*. Journal of Chemical Physics, 1974. **61**(12): p. 5132-5146.
56. Elson, E.L. and D. Magde, *Fluorescence Correlation Spectroscopy .1. Conceptual Basis And Theory*. Biopolymers, 1974. **13**(1): p. 1-27.

57. Magde, D., E.L. Elson, and W.W. Webb, *Fluorescence Correlation Spectroscopy. 2. Experimental Realization*. Biopolymers, 1974. **13**(1): p. 29-61.
58. Neuweiler, H. and M. Sauer, *Using photoinduced charge transfer reactions to study conformational dynamics of biopolymers at the single-molecule level*. Curr Pharm Biotechnol, 2004. **5**(3): p. 285-98.
59. Neuweiler, H., A. Schulz, M. Bohmer, J. Enderlein, and M. Sauer, *Measurement of submicrosecond intramolecular contact formation in peptides at the single-molecule level*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(18): p. 5324-30.
60. Selvin, P.R., ed. *Single-molecule techniques. a laboratory manual*. 2008, CSHL Press: Cold Spring Harbor, NY. VII, 507 S. : Ill., graph. Darst.
61. Haken, H. and H.C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie*. 5., völlig Neubearb. und erw. Aufl. ed. Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen ; mit 43 Tabellen und 133 Aufgaben ; vollständige Lösungen im Internet. 2006, Berlin [u.a.]: Springer. XXII, 530 S. : graph. Darst.
62. Mortelmaier, M., E.J. Kogler, J. Hesse, M. Sonnleitner, L.A. Huber, and G.J. Schutz. *Single molecule microscopy in living cells: Subtraction of autofluorescence based on two color recording*. 2002: Wiley-VCH Verlag GmbH.
63. Hofkens, J., M. Maus, T. Gensch, T. Vosch, M. Cotlet, F. Kohn, A. Herrmann, K. Mullen, and F. De Schryver, *Probing photophysical processes in individual multichromophoric dendrimers by single-molecule spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(38): p. 9278-9288.
64. Larson, D.R., R. Thompson, and W.W. Webb, *Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes*. Biophysical Journal, 2002. **82**(1): p. 221.
65. Rust, M.J., M. Bates, and X.W. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nature Methods, 2006. **3**(10): p. 793-795.
66. Harke, B., J. Keller, C.K. Ullal, V. Westphal, A. Schoenle, and S.W. Hell, *Resolution scaling in STED microscopy*. Optics Express, 2008. **16**(6): p. 4154-4162.
67. Dontha, N., *Generation of Biotin/Avidin'/Enzyme Nanostructures with Maskless Photolithography*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(14).

68. Piestert, O., H. Barsch, V. Buschmann, T. Heinlein, J.-P. Knemeyer, K.D. Weston, and M. Sauer, *A single-molecule sensitive DNA hairpin system based on intramolecular electron transfer*. *Nano Letters*, 2003. **3**(7): p. 979-982.
69. Longmire, M.R., M. Ogawa, Y. Hama, N. Kosaka, C.A.S. Regino, P.L. Choyke, and H. Kobayashi, *Determination of Optimal Rhodamine Fluorophore for in Vivo Optical Imaging*. *Bioconjugate Chemistry*, 2008. **19**(8): p. 1735-1742.
70. Eggeling, C., C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V.N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schonle, and S.W. Hell, *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell*. *Nature*, 2009. **457**(7233): p. 1159-U121.
71. Harada, Y., K. Sakurada, T. Aoki, D.D. Thomas, and T. Yanagida, *Mechanochemical Coupling in Actomyosin Energy Transduction Studied by Invitro Movement Assay*. *Journal of Molecular Biology*, 1990. **216**(1): p. 49-68.
72. Ha, T., I. Rasnik, W. Cheng, H.P. Babcock, G.H. Gauss, T.M. Lohman, and S. Chu, *Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the Escherichia coli Rep helicase*. *Nature*, 2002. **419**(6907): p. 638-641.
73. Ha, T.J., A.Y. Ting, J. Liang, A.A. Deniz, D.S. Chemla, P.G. Schultz, and S. Weiss, *Temporal fluctuations of fluorescence resonance energy transfer between two dyes conjugated to a single protein*. *Chemical Physics*, 1999. **247**(1): p. 107-118.
74. Sabanayagam, C.R., J.S. Eid, and A. Meller, *Long time scale blinking kinetics of cyanine fluorophores conjugated to DNA and its effect on Forster resonance energy transfer*. *Journal of Chemical Physics*, 2005. **123**(22): p. 224708/1-224708/7.
75. Funatsu, T., Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, and T. Yanagida, *Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual Atp Turnovers By Single Myosin Molecules in Aqueous-Solution*. *Nature*, 1995. **374**(6522): p. 555-559.
76. Tan, E., J. Wilson Timothy, K. Nahas Michelle, M. Clegg Robert, M.J. Lilley David, and T. Ha, *A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(16): p. 9308-13.
77. Rasnik, I., S.A. McKinney, and T. Ha, *Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging*. *Nat Methods*, 2006. **3**(11): p. 891-3.

78. Zondervan, R., F. Kulzer, S.B. Orlinskii, and M. Orrit, *Photoblinking of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet*. Journal of Physical Chemistry a, 2003. **107**(35): p. 6770-6776.
79. Doose, S., H. Neuweiler, and M. Sauer, *A close look at fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan*. Chemphyschem, 2005. **6**(11): p. 2277-85.
80. Neuweiler, H., S. Doose, and M. Sauer, *A microscopic view of miniprotein folding: enhanced folding efficiency through formation of an intermediate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16650-5.
81. Tinnefeld, P., V. Buschmann, K.D. Weston, A. Biebricher, D.-P. Herten, O. Piester, T. Heinlein, M. Heilemann, and M. Sauer, *How single molecule photophysical studies complement ensemble methods for a better understanding of chromophores and chromophore interactions*. Recent Research Developments in Physical Chemistry, 2004. **7**(Pt. 1): p. 95-125.
82. Buschmann, V., *Measurements on Single Anchored Molecules under Aqueous Conditions with Rotating Polarization, Spectrally Resolved, Fluorescence Lifetime Imaging (SFLIM)*, in *Physikalisch-Chemisches Institut*. 2002, Ruprecht-Karls-Universität: Heidelberg.
83. Drexhage, K.H., *Structure and properties of laser dyes*, in *Topics in applied physics*, F.P. Schäfer, Editor. 1973, Springer Verlag: Berlin. p. 144-178.
84. Weast, R.C., *Handbook of data on organic compounds*. Vol. 1. 1979: Chemical Rubber Company.
85. Huang, Z., D. Ji, A. Xia, F. Koberling, M. Patting, and R. Erdmann, *Direct Observation of Delayed Fluorescence from a Remarkable Back-Isomerization in Cy5*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(22): p. 8064-8066.
86. Huang, Z., D. Ji, S. Wang, A. Xia, F. Koberling, M. Patting, and R. Erdmann, *Spectral Identification of Specific Photophysics of Cy5 by Means of Ensemble and Single Molecule Measurements*. Journal of Physical Chemistry a, 2006. **110**(1): p. 45-50.
87. Heinlein, T., A. Biebricher, P. Schluter, C.M. Roth, D.P. Herten, J. Wolfrum, M. Heilemann, C. Muller, P. Tinnefeld, and M. Sauer, *High-resolution colocalization of single molecules within the resolution gap of far-field microscopy*. Chemphyschem, 2005. **6**(5): p. 949-55.

88. Weller, A., *Mechanism and Spin-Dynamics of Photoinduced Electron-Transfer Reactions*. Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-Wiesbaden, 1982. **130**(2): p. 129-138.
89. Rehm, D. and A. Weller, *Kinetics of fluorescence quenching by electron and hydrogen-atom transfer*. Israel Journal of Chemistry, 1970. **8**(2): p. 259-71.
90. Heilemann, M., R. Kasper, P. Tinnefeld, and M. Sauer, *Dissecting and reducing the heterogeneity of excited-state energy transport in DNA-based photonic wires*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(51): p. 16864-75.
91. Christ, T., F. Kulzer, P. Bordat, and T. Basche, *Watching the photo-oxidation of a single aromatic hydrocarbon molecule*. Angewandte Chemie-International Edition, 2001. **40**(22): p. 4192-4195.
92. Tinnefeld, P., D.P. Herten, and M. Sauer, *Photophysical dynamics of single molecules studied by spectrally-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy (SFLIM)*. Journal of Physical Chemistry a, 2001. **105**(34): p. 7989-8003.
93. Hoogenboom, J.P., E.M.H.P. van Dijk, J. Hernando, N.F. van Hulst, and M.F. Garcia-Parajo, *Power-Law-Distributed Dark States are the Main Pathway for Photobleaching of Single Organic Molecules*. Physical Review Letters, 2005. **95**(9): p. 097401/1-097401/4.
94. Cordes, T., J. Vogelsang, and P. Tinnefeld, *On the Mechanism of Trolox as Antiblinking and Antibleaching Reagent*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(14): p. 5018-5019.
95. Lambert, C.R. and I.E. Kochevar, *Electron transfer quenching of the rose Bengal triplet state*. Photochemistry and Photobiology, 1997. **66**(1): p. 15-25.
96. Willig, K.I., B. Harke, R. Medda, and S.W. Hell, *STED microscopy with continuous wave beams*. Nature Methods, 2007. **4**: p. 915-918.
97. Willig, K.I., R.R. Kellner, R. Medda, B. Hein, S. Jakobs, and S.W. Hell, *Nanoscale resolution in GFP-based microscopy*. Nature Methods, 2006. **3**(9): p. 721-723.
98. Wildanger, D., E. Rittweger, L. Kastrup, and S.W. Hell, *STED microscopy with a supercontinuum laser source*. Optics Express, 2008. **16**(13): p. 9614-9621.
99. Kottke, T., J. Heberle, D. Hehn, B. Dick, and P. Hegemann, *Phot-LOV1: Photocycle of a blue-light receptor domain from*

- the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Biophysical Journal, 2003. **84**(2): p. 1192-1201.
100. Heilemann, M., S. van de Linde, A. Mukherjee, and M. Sauer, *Super-resolution imaging with small organic fluorophores*. in preparation, 2009.
101. Weber, K., P.C. Rathke, and M. Osborn, *Cytoplasmic Microtubular Images in Glutaraldehyde-Fixed Tissue-Culture Cells by Electron-Microscopy and by Immunofluorescence Microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978. **75**(4): p. 1820-1824.
102. Vogelsang, J., T. Cordes, and P. Tinnefeld, *Single-molecule photophysics of oxazines on DNA and its application in a FRET switch*. Photochemical & Photobiological Sciences, 2009. **8**(4): p. 486-496.
103. Steinhauer, C., C. Forthmann, J. Vogelsang, and P. Tinnefeld, *Superresolution Microscopy on the Basis of Engineered Dark States*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(50): p. 16840-+.
104. Hein, B., K.I. Willig, and S.W. Hell, *Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(38): p. 14271-14276.
105. Nagerl, U.V., K.I. Willig, B. Hein, S.W. Hell, and T. Bonhoeffer, *Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(48): p. 18982-18987.
106. Shtengel, G., J.A. Galbraith, C.G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J.M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C.M. Waterman, P. Kanchanawong, M.W. Davidson, R.D. Fetter, and H.F. Hess, *Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(9): p. 3125-3130.

7 Publikationen

1. Heilemann, M., E. Margeat, **R. Kasper**, M. Sauer, and P. Tinnefeld, *Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch*. J Am Chem Soc, 2005. 127(11): p. 3801-6.
2. Heilemann, M., **R. Kasper**, P. Tinnefeld, and M. Sauer, *Dissecting and reducing the heterogeneity of excited-state energy transport in DNA-based photonic wires*. J Am Chem Soc, 2006. 128(51): p. 16864-75.
3. Fetting, D., **R. Kasper**, and P. Tinnefeld. *Multicolor single-molecule spectroscopy for the study of complex interactions and dynamics*. Biophotonics 2007: Optics in Life Science. 2007.
4. **Kasper, R.**, M. Heilemann, P. Tinnefeld, and M. Sauer. *Toward ultra-stable fluorescent dyes for single-molecule spectroscopy*. Biophotonics 2007: Optics in Life Science. 2007.
5. Seefeldt, B., **R. Kasper**, T. Seidel, P. Tinnefeld, K.J. Dietz, M. Heilemann, and M. Sauer, *Fluorescent proteins for single-molecule fluorescence applications*. Journal of Biophotonics, 2008. 1(1): p. 74-82.
6. Vogelsang, J., **R. Kasper**, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, and P. Tinnefeld, *A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes*. Angewandte Chemie-International Edition, 2008. 47(29): p. 5465-5469.
7. Heilemann, M., S. van de Linde, M. Schuttpelz, **R. Kasper**, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, and M. Sauer, *Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes*. Angewandte Chemie-International Edition, 2008. 47(33): p. 6172-6176.
8. van de Linde, S., **R. Kasper**, M. Heilemann, and M. Sauer, *Photoswitching microscopy with standard fluorophores*. Applied Physics B-Lasers and Optics, 2008. 93(4): p. 725-731.
9. **Kasper, R.**, B. Harke, C. Forthmann, P. Tinnefeld, S.W. Hell, and M. Sauer, *STED of Stable Single Fluorophores under close to physiological conditions*. in preparation, 2009.

8 Konferenzbeiträge

„Towards ultra-stable fluorescent dyes for single-molecule spectroscopy“ (poster); European Conference on Biomedical Optics 2007, 18.06.-20.06.2007, München

“Towards in planta-visualisation of a transcription factor complex with multistep FRET” (poster); SFB613 workshop, 08.10-09.10.2007, Bielefeld

“A reducing and oxidizing sytem for unprecedented stabilizatuion of fluorescent dyes” (poster); 52th Annual Meeting of the biophysical society, 02.02-06.02.2008, Long Beach, Kalifornien, USA

“Reversible Photoswitching of Carbocyanine Dyes” (talk); 14th International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in Life Science, 17.09-19.09.08, Picoquant Berlin

“Mechanistic Studies of Reversible Photoswitching of Carbocyanine Dyes” (poster); 21th Lecture Conference of the GDCh-division Photochemistry, 06.10-08.10.08, Universität Bielefeld

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, mit deren Hilfe diese Arbeit erst möglich geworden ist und die zum Erfolg der Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Markus Sauer für das Ermöglichen der Dissertation, ohne seine Unterstützung wäre ich nie soweit gekommen.

Besonderer Erwähnung bedarf es Philip Tinnefeld, Mike Heilemann und Sören Doose, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind und mir tiefe Einsichten in die Welt der einzelnen Moleküle, Photophysik und Hochauflösung gegeben haben. Außerdem haben sie, während der Durchführung dieser Arbeit, unglaubliche Geduld in Diskussionen und mit mir bewiesen.

Für die wissenschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich bei Jan Vogelsang, Sebastian van de Linde und Britta Seefeldt bedanken.

Danken möchte ich Benjamin Harke vom Max-Planck Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen für eine sehr gute Zusammenarbeit und die Einarbeitung in die STED Mikroskopie.

Dem Arbeitskreis D3 Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie an der Universität Bielefeld möchte ich für die tatkräftige Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima während meiner Zeit in Bielefeld danken.

Nochmals möchte ich meinen Dank an Sören Doose richten, der mir nicht nur mit der Korrektur des Manuskripts geholfen hat. Die Prüfungen für die Zulassung der Dissertation wären ohne ihn nicht möglich gewesen. Außerdem freue ich mich in ihm einen guten Freund gefunden zu haben.

Danke Ann Catrin und Bjarne für die vielen kleinen Lichtblicke.

Nochmals Danken möchte ich Britta Seefeld, Heiko Neuweger und Sebastian van de Linde für ihre Unterstützung, auch wenn diese weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausgeht.

Außerdem möchte ich allen meinen Freunden danken!

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich immer aus voller Kraft unterstützt haben. Ohne Eure Ausdauer und den langen Atem wäre all das nicht möglich gewesen.

Einen nicht unerheblichen Beitrag am Gelingen dieser Arbeit hat meine Verlobte Sabine Anna Esch, die während der ganzen Zeit hinter mir gestanden ist. Ohne ihre Unterstützung und Geduld wäre all das nicht möglich gewesen.

10 Abbildungsverzeichnis

2.1.1	Jablonski Diagramm	10
2.1.2	Cy5 Absorption und Emissionsspektrum	13
2.1.3	Lebensdaueremessung von ATTO647N	16
2.1.4	Abstandsabhängigkeit von FRET	19
2.1.5	Dynamische Löschung	21
2.1.6	Statische Löschung	22
2.1.7	Photoinduzierter Elektronentransfer	23
2.2.1	Airy-Disk 2D und 3D	26
2.3.1	Weitfeld- und TIRF-Prinzip	30
2.4.1	Quanteneffizienzen der Detektoren	33
2.5.1	PSF eines einzelnen Moleküls	35
2.5.2	STED-Prinzip	37
2.5.3	dSTORM-Prinzip	40
3.1.1	konfokaler Mikroskopaufbau	44
3.1.2	STED-Mikroskopaufbau	46
3.1.3	Weitfeld-Mikroskopaufbau	48
3.2.1	Immobilisierung der Farbstoffe	53
3.2.2	Farbstoffstrukturen	54
4.1.1	Fluoreszenzspuren in drei unterschiedlichen Puffern	60
4.2.1	Spur von MR121 und ATTO647N in PBS \pm O ₂	70
4.2.2	Zustandsdiagamm für ROXS	73
4.2.3	Strukturen von Oxidations- und Reduktionsmittel	75

4.2.4	Spur von Cy5 + Trolox mit Zustandsdiagramm	76
4.2.5	Spur von Cy5 + Methylviologen mit Zustandsdiagramm	78
4.2.6	Spur von Cy5 + ROXS mit Zustandsdiagramm	79
4.2.7	Spur von ATTO647N + ROXS	83
4.2.8	Spur von ATTO647N + ROXS mit Ascorbinsäure	85
4.2.9	Spur von MR121 + ROXS	87
4.2.10	Zustandsdiagramm für MR121 und ROXS	88
4.2.11	Photooxidation von Trolox	91
4.2.12	Abhängigkeit der Auszeiten von der Konzentration	93
4.2.13	STED Aufnahmen von einzelnen ATTO647N-Molekülen	96
4.2.14	gemessene Halbwertsbreiten der PSF	97
4.2.15	STED-Aufnahmen von Mikrotubuli	98
4.2.16	Stabilität von einzelnen ATTO647N-Molekülen	100
4.2.17	Stabilität von ATTO647N an Antikörpern	102
4.2.18	Spur von ATTO647N + ROXS	104
4.3.1	Schalten von Cy5 an einzelnen Molekülen	106
4.3.2	Schalten von Cy5 im Ensemble	108
4.3.3	Absorption von Cy5 beim Ausschalten	109
4.3.4	Differenzspektren von Cy5 in PBS	111
4.3.5	Differenzspektren von Cy5 in PBS – O ₂	112
4.3.6	Differenzspektren von Cy5 in PBS – O ₂ + MEA	113
4.3.7	Differenzspektren von Cy5 in PBS – O ₂ + MEA	114
4.3.8	Absorption Cy5 beim Anschalten in PBS – O ₂ + MEA	115
4.3.9	Absorption Cy5 beim Anschalten in PBS und PBS – O ₂	116

4.3.10	Schalten von einzelnen Cy5 als Fluoreszenzspur	118
4.3.11	Zeitanalyse von Cy5	120
4.2.12	FRET-Probe unter Schaltbedingungen	121
4.2.13	Wellenlängenabhängigkeit des Anschaltens	123
4.3.14	Schalten von Alexa680 und 700	124
4.3.15	Struktur von Cy5	125
4.3.16	Leistungsabhängigkeit des Schaltens von Cy5	128
4.3.17	rekonstruierte PSF	129
4.3.18	dSTORM-Aufnahmen von Mikrotubuli	130