

Entwicklung und Charakterisierung neuartiger Fluoreszenzsonden für fortgeschrittene Mikroskopiemethoden

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften an der Fakultät für Physik der
Universität Bielefeld vorgelegte Dissertation

von

Britta Seefeldt

17. Februar 2011



Britta Seefeldt
Ellerstraße 33
33615 Bielefeld
seefeldt@physik.uni-bielefeld.de

Betreuer: Prof. Dr. Markus Sauer
Prof. Dr. Jochen Mattay

Zusammenfassung

Die optische Mikroskopie unterliegt aufgrund der Beugung des Lichts einer Begrenzung ihres Auflösungsvermögens. In jüngster Vergangenheit wurden Methoden entwickelt, diese Begrenzung zu umgehen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Bewertung von Fluoreszenzsonden für derartige Mikroskopiemethoden. Viele Methoden der hochauflösenden Bildgebung basieren auf der Verwendung von Photoschaltern, die zwischen einem fluoreszierenden An- und einem nicht fluoreszierenden Aus-Zustand geschaltet werden können. Es gibt verschiedene Ansätze der Realisation solcher Photoschalter. In dieser Arbeit werden Photoschalter, die aus synthetischen Konjugaten aus Fluorophoren und photochromen Schalteinheiten bestehen, tiefgehend auf der Ensemble- und der Einzelmolekülebene charakterisiert und ihr Potential für die RESOLFT (Reversible Saturable Optical Fluorescent Transitions)-Mikroskopie beleuchtet. Als photochrome Einheiten wurden Spiropyrane und Diarylethene eingesetzt, die in jeweils einer ihrer Formen als effiziente Energie-Transfer-Akzeptoren der Fluorophore dienen und somit deren Fluoreszenz determiniert modulieren können. Eine besondere Berücksichtigung erfährt der Aspekt der Schaltkinetiken der Konjugate zwischen dem An- und dem Aus-Zustand, da hierüber das Verhältnis der Fluorophore im An- zu denen im Aus-Zustand gesteuert werden kann. Dies ermöglicht eine Optimierung des Bildgebungsprozesses. Besonders die Diarylethen-basierten Konjugate erwiesen sich aufgrund ihrer passenden Schaltraten und ihrer hohen Stabilität im jeweiligen Zustand als vielversprechend für einen Einsatz nach dem RESOLFT-Konzept. Ein großer Fortschritt wurde durch den Einsatz von Diarylethenen mit einem verlängerten konjugierten π -System erzielt, da so ein Schalten durch UV-Licht vermieden werden konnte. Weiterhin wurde der organische Farbstoff Cy5, der unter bestimmten chemischen Bedingungen ein reversibles Schalten zwischen einem An- und einem Aus-Zustand aufweist, in der *d*STORM-Methode eingesetzt, um hochauflösende Fluoreszenzbilder zu realisieren. Auch hier wurde der Fokus auf die Beeinflussung

der Schaltraten des Farbstoffs Cy5 zwischen dem An- und dem Aus-Zustand gesetzt. Im zweiten Teil der Arbeit werden Einzelmoleküldaten von den fluoreszierenden Proteinen eGFP, eYFP, DsRed, mOrange und mCherry präsentiert. Die Daten der Einzelmolekül- und der Ensemblemessungen stellen mCherry durch seine hohe Photostabilität und geringen Fluktuationen der Fluoreszenz bezüglich der Intensität und der spektralen Verteilung als ideal geeigneten Fluorophor für Einzelmolekülanwendungen heraus. Durch seine spektralen Charakteristika und seine kurze Fluoreszenzlebensdauer ergänzt mCherry die Palette der fluoreszierenden Proteine und empfiehlt sich für das Tracking und die Lokalisation von Zielmolekülen mit hoher Genauigkeit. Ebenso bietet es sich für den Einsatz in Fluoreszenz Resonanten Energie Transfer (FRET)-Methoden, Fluoreszenz-Lebensdauer-Bildgebung (FLIM) und Mehrfarbanwendungen an. Im letzten Teil der Arbeit wird die Photochemie des für die Einzelmolekülspektroskopie tauglichen fluoreszierenden Proteins eGFP durch seine chemische Umgebung beeinflusst. Ziel ist es dabei, reversible Dunkelzustände zu generieren, um das eGFP für hochauflösende Mikroskopiemethoden, die auf der Lokalisation einzelner, zeitlich separierter Fluorophore basieren, zugänglich zu machen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xiii
1 Einleitung und Motivation	1
1.1 Aufbau der Arbeit	8
1.2 Danksagung	8
2 Theorie und Grundlagen	11
2.1 Absorption und Emission	11
2.1.1 Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute	16
2.1.2 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer	17
2.2 Konfokale Mikroskopie	20
2.3 Die Spektroskopie von einzelnen Molekülen	23
2.4 Weitfeld-Mikroskopie	26
2.4.1 Totale Interne Reflektions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie	26
2.5 Möglichkeiten der Auflösungserhöhung	28
2.5.1 Auflösungsbegrenzung in der Lichtmikroskopie	28
2.5.2 Determiniertes Schalten zur Auflösungserhöhung - das RESOLFT-Konzept	31
2.5.3 Lokalisation einzelner Moleküle und Bildrekonstruktion - Stochastisches Schalten zur Auflösungserhöhung	35
2.6 Photochrome Systeme	37
2.6.1 Die Farbigkeit eines Moleküls	40
2.6.2 Photochromie der Diarylethene	43
2.6.3 Photochromie der Spiropyrane	45
2.7 Fluoreszierende Proteine	47

2.7.1	Fluoreszierende Proteine in der hochauflösenden Mikroskopie	48
3	Material und Methoden	51
3.1	Ensemble-Messungen	51
3.1.1	Absorptionsspektrometer	51
3.1.2	Fluoreszenzspektrometer	51
3.1.3	Real-time-Schallexperimente	52
3.1.4	Lebensdauer-messungen	52
3.2	Einzelmolekülspektroskopie	54
3.2.1	Konfokale Mikroskopie	54
3.2.2	Weitfeld-Mikroskopie	56
3.3	Photochrome Moleküle, Farbstoffe und fluoreszierende Proteine . .	61
3.3.1	Spiropyrane und Spiropyrankonjugate	61
3.3.2	Diarylethene und Diarylethenkonjugate	64
3.3.3	Fluoreszierende Proteine	66
3.4	Probenpräparation	67
3.4.1	Oberflächenpräparation mit Cy5	67
3.5	Chemikalien und Puffer	70
3.6	Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten	70
3.7	Datenauswertung	72
3.7.1	Berechnung von FRET-Effizienzen	72
3.7.2	Bestimmung von Kennziffern der Schalter	73
3.7.3	Bestimmung der Schaltraten von Cy5	74
3.7.4	Auswertung der Weitfeld- und TIRF-Aufnahmen	75
4	Ergebnisse und Diskussion	77
4.1	Spiropyrane	77
4.1.1	Schaltperformance von Spiropyranen	77
4.1.2	Spiropyrankonjugate	78
4.2	Diarylethene	90
4.2.1	Freie Diarylethene	90
4.2.2	Diarylethen-Konjugate	93
4.3	Schaltraten von Cy5 für optimierte <i>d</i> STORM-Mikroskopie	102
4.4	Fluoreszierende Proteine	106
4.4.1	Manipulation der Photophysik von eGFP zur Generierung reversibler Dunkelzustände	119
5	Fazit und Ausblick	129

Abbildungsverzeichnis

1.1	Photochromes Molekül	2
1.2	Übersicht Photoschalter	5
1.3	Funktionsweise Konjugate	7
2.1	Franck-Condon-Prinzip	12
2.2	Jablonski-Diagramm	14
2.3	Stokes-Verschiebung	15
2.4	Fluoreszenzabklingkurve	17
2.5	FRET-Prozess	18
2.6	FRET-Effizienz	19
2.7	FRET Dipolorientierung	19
2.8	Konfokale Mikroskopie	22
2.9	Punktabbildungsfunktion eines Einzelmoleküls	23
2.10	Einzelne Cy5-Moleküle	24
2.11	Zeitabhängige Fluoreszenzspuren	25
2.12	Weitfeld	27
2.13	TIRF	29
2.14	Airy-Scheibchen	30
2.15	Rayleighkriterium	30
2.16	Stimulierte Emission	32
2.17	STED Prinzip	33
2.18	STED Intensität	34
2.19	Zweidimensionale Gauss-Näherung einer Punktabbildungsfunktion	36
2.20	STORM Prinzip	38
2.21	Photochromes Molekül	39
2.22	Chemische Struktur von Cy5	40
2.23	Energieniveauschema der Molekülorbitale	42

2.24	Schaltmechanismus des Stilben	43
2.25	Schaltmechanismus der Diarylethene	44
2.26	Absorptionsspektren der offenen und der geschlossenen Form eines Diarylethens	45
2.27	Schaltmechanismus der Spiropyrane	46
2.28	Absorptionsspektren von Spiropyran und Merocyanin	46
2.29	Struktur GFP	47
2.30	Absorptions- und Emissionsspektrum von GFP	48
3.1	Aufbau zur Real-Time-Fluoreszenz-Messung	53
3.2	Konfokales Setup	57
3.3	Intensitätsfarbskala	57
3.4	Weitfeld-Mikroskop	59
3.5	Spiropyrane	62
3.6	Spiropyrankonjugate	63
3.7	Diarylethene	64
3.8	OT577	65
3.9	Diarylethenkonjugate	65
3.10	Oberflächenpräparation	68
3.11	Fluoreszenzsignal	73
4.1	Absorptionsspektren MB131, MB216 und MB23	79
4.2	Reversibilität des Schaltprozesses der Spiropyrane	80
4.3	Absorptionsspektren vom MB231	81
4.4	Absorptionsspektren von JA484	82
4.5	Schaltexperiment mit JA476	83
4.6	Maximale Fluoreszenzlöschung der Spiropyrankonjugate	85
4.7	k_{an} -Raten der Spiropyrankonjugate	86
4.8	Einzelmolekülexperiment mit JA484	87
4.9	Einzelmolekülexperimente mit ATTO488 und MB231	89
4.10	Absorptionsspektren von KA123	91
4.11	Reversibilität des Schaltprozesses des Diarylethens KA123	92
4.12	Absorptions- und Fluoreszenzspektren des Diarylethens OT557	94
4.13	k_{an} -Schaltraten und k_{aus} -Schaltraten des Diarylethens OT557	94
4.14	Thermische Stabilität des Diarylethens OT557	95
4.15	Schaltzyklen von OT557	95
4.16	Schaltzyklen von KA298 und KA304	99
4.17	Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Konjugate KA298 und KA304	100
4.18	k_{an} -Schaltraten und k_{aus} -Schaltraten der Konjugate KA298 und KA304	101
4.19	Thermische Stabilität der Konjugate KA298 und KA304	103
4.20	Fluoreszenzspur Cy5	104
4.21	Lokalisation eines Cy5-Moleküls	105

4.22	Schaltraten von Cy5	107
4.23	<i>d</i> STORM-Aufnahme von Microtubuli in Säugerzellen.	108
4.24	Spektren von eGFP und eYFP	110
4.25	Spektren von DsRed, mCherry und mOrange	111
4.26	Einzelmolekülbilder von eGFP und eYFP	113
4.27	Einzelmolekülbilder von DsRed, mCherry und mOrange	114
4.28	F_2 -Wert von einzelnen DsRed- und mCherry-Proteinen	115
4.29	Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spuren von eGFP und eYFP	116
4.30	Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spuren von DsRed und mCherry	117
4.31	Generierung von Aus-Zuständen von eGFP	119
4.32	Ausschaltprozess von eGFP und Zurückkommen	121
4.33	Abhängigkeit Methylviologen-Konzentration	122
4.34	Leistungsabhängigkeit der Generierung von eGFP-Aus-Zuständen	123
4.35	Abhängigkeit des Ausschaltprozesses von der Mercaptoethylamin-Konzentration	124
4.36	Abhängigkeit des Prozesses des Zurückkommens von der Mercaptoethylamin-Konzentration	125
4.37	Emission von eGFP bei Zugabe von 10 mM Methylviologen oder 100 mM Mercaptoethylamin	126
4.38	Rekonstruiertes Bild von mit eGFP markierten <i>E.coli</i> mit Hilfe von forcierten Fluoreszenz-Aus-Zuständen	127

Tabellenverzeichnis

2.1	Mechanismen der Photochromie und Beispiel-Verbindungen	39
2.2	Photoaktivierbare Proteine	49
2.3	Photokonvertierbare Proteine	50
2.4	Photoschaltbare Proteine	50
3.1	Verwendete Filter und Strahlteiler konfokales Setup	56
3.2	Verwendete Filter und Strahlteiler Weitfeld-Setup	60
3.3	Spiropyrankonjugate	62
3.4	Farbstoffe	66
3.5	Polymere	69
3.6	Chemikalien	71
4.1	Fluoreszenzquantenausbeuten der Spiropyrankonjugate relativ zu den freien Farbstoffen	83
4.2	Quantenausbeuten von KA298, KA304 und OT557	97
4.3	Fluoreszenzlebensdauern fluoreszierender Proteine	110
4.4	Lösungsmittel und Emission am Maximum	127
5.1	Schaltraten der verschiedenen Photoschalter	131

Einleitung und Motivation

Optische Mikroskopie, die in ihrer ersten Form von den Brüdern Jansen in Holland bereits am Ende des 16. Jahrhunderts entwickelt wurde, hat eine sehr hohe Bedeutung in allen Bereichen der Naturwissenschaften erlangt. Sie war bis vor kurzem durch die so genannte Auflösungsbegrenzung, die von Abbe im Jahr 1873 (Abbe1873) für linsenbasierte Weitfeld-Mikroskopie definiert wurde, beschränkt. Hiernach können Objekte, die eine geringere Distanz zueinander aufweisen als etwa die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts, aufgrund des Phänomens der Beugung von Licht nicht mehr aufgelöst werden. Dieses entspricht bei sichtbarem Licht einer Größenordnung von einigen hundert Nanometern. Auch wenn diese Beschränkung durch die Entwicklung der konfokalen, lasergestützten Mikroskopie leicht gesenkt wurde [1](vgl. 2.2), blieb das generelle Problem der Auflösungsbegrenzung bestehen. In vielen Anwendungen und besonders im Bereich der Zellbiologie finden sich Strukturen unterhalb dieser Grenze. Die Auflösung kann durch die Verwendung von elektromagnetischer Strahlung einer kürzeren Wellenlänge, wie in der Röntgenmikroskopie oder der Elektronenmikroskopie, verbessert werden. Doch bringen diese Methoden andere Nachteile mit sich, die gerade bei der Mikroskopie von biologischen Proben ins Gewicht fallen. Weiterhin hat gerade die meist mit sichtbarem Licht durchgeführte Fluoreszenzmikroskopie eine weite Verbreitung besonders bei der Mikroskopie von biologischen Proben. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, diese Auflösungsbegrenzung auch bei Verwendung von sichtbarem Licht wenn nicht zu brechen, so doch geschickt zu umgehen [2–15]. Die Gesamtheit dieser Methoden wird als *Super-resolution-fluorescence-microscopy* bezeichnet. Auch wenn diese Methoden in ihrer technischen Ausführung divers sind, so basiert doch ein Großteil auf der Verwendung von so genannten Photoschaltern, die zwischen einem fluoreszierenden An- und einem nicht fluoreszieren-

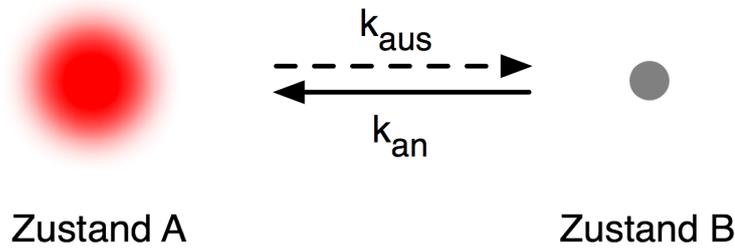


Abbildung 1.1: Ein Photoschalter kann zwischen einem fluoreszierenden An- und einem nicht fluoreszierenden Aus-Zustand mit einer bestimmten Ausschalttrate k_{aus} (gestrichelter Pfeil) und einer bestimmten Anschalttrate k_{an} (durchgezogener Pfeil) reversibel geschaltet werden. Optional ist auch ein irreversibler Anschaltprozess mit einer bestimmten Anschalttrate k_{an} (durchgezogener Pfeil) möglich.

den Aus-Zustand reversibel geschaltet werden können oder irreversibel aus einem nicht fluoreszierenden Zustand in einen fluoreszierenden Zustand überführt werden können. Abb. 1.1 zeigt abstrahiert einen solchen Photoschalter und die beiden möglichen Mechanismen.

Weiterhin können die auf Photoschaltern basierten Methoden in die determinierten Methoden, die unter dem Namen RESOLFT (*REversible Saturable Optical (Fluorescence) Transitions*) zusammengefasst werden [16] und den Methoden, die auf der stochastischen, zeitlichen Separation der Fluoreszenz von einzelnen Emitttern und deren Lokalisation mit einer im Nanometer-Bereich liegenden Genauigkeit basieren [4–6, 11–13], unterschieden werden. Der wichtigste Vertreter des RESOLFT-Konzepts ist die *Stimulated Emission Depletion* (STED)-Mikroskopie [17]. Hier wird die optische Auflösung durch die stimulierte Emission angeregter Fluorophore durch einen langwelligen Laser-Strahl verbessert, der eine Intensitätsnullstelle im Fokus aufweist. Mit diesem wird ein beugungsbegrenzter Anregungsfokus eines konfokalen Laserrastermikroskops überlagert und somit eingeschnürt (vgl. Kapitel 2.5.2). Dieses kann prinzipiell nicht nur durch stimulierte Emission eines Fluorophors, sondern auch durch stimuliertes Ausschalten eines determiniert photoschaltbaren Fluoreszenz-Emitters durch eine zweite Laser-Wellenlänge erfolgen. Während für die Sättigung der stimulierten Emission aufgrund der sehr kurzen Lebensdauern der angeregten Zustände sehr hohe Bestrahlungsleistungen im GW-Bereich benötigt werden, ist bei determiniert photoschaltbaren Emitttern eine geringere Leistung nötig, um den Aus-Zustand zu sättigen. Daher nehmen derartige determiniert photoschaltbare Fluorophore den Großteil der vorliegenden Arbeit ein. Bei den Methoden, die auf der zeitlichen Separation und Lokalisation einzelner Fluorophore basieren, findet sich keine determinierte, sondern eine stochastische Verteilung von Fluoreszenz-Emittern im An- und Aus-Zustand. Die Methoden nach dem *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* (STORM)-Prinzip [6, 11] basieren auf einem reversiblen Photoschalten von Fluoro-

phoren, während bei den *PhotoActivated Localization Microscopy* (PALM)-artigen Methoden [5] einzelne fluoreszierende Proteine durch Photoaktivierung oder Photokonversion aus einem Aus-Zustand in einen An-Zustand überführt und einmalig lokalisiert werden. Je nach Methode wird der für *Super-resolution-fluorescence-microscopy* ideale Photoschalter durch verschiedene Eigenschaften charakterisiert:

- ein reversibler Schaltprozess ist unumgänglich bei RESOLFT-Anwendungen, da ein Fluorophor mehrere Schaltzyklen durchlaufen muss, während ein Rasterbild aufgenommen wird. In den STORM-ähnlichen Methoden gewährleistet ein reversibler Schaltprozess eine mehrmalige Lokalisation eines Emitters, was die Genauigkeit der Methode erhöht.
- das Photoschalten unter Verwendung von sichtbarem Licht führt dazu, dass standardmäßige optische Bauteile problemlos zum Einsatz kommen können. Weiterhin reagieren viele biologische Proben negativ auf die Bestrahlung mit UV-Licht.
- eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute ist besonders für die STORM-artigen Methoden essentiell, da die Genauigkeit der Methode von der Zahl der gesammelten Photonen abhängt (vgl. 2.5.3).
- besonders im Fall der determiniert schaltbaren Fluorophore gilt es, Photoschalter mit kurzer Antwortzeit auf den Schaltimpuls bei hoher thermischer Stabilität der beiden Zustände zu finden.
- für biologische Anwendungen ist es notwendig, dass die Photoschalter mit verschiedenen biologischen Targets verknüpft werden können.
- die Photoschalter müssen für Messungen an lebenden Zellen in wässriger Umgebung schaltbar sein.

In jüngster Zeit stellte sich heraus, dass besonders die Lebensdauern der Photoschalter in den jeweiligen Zuständen von essentieller Bedeutung für ein optimales Funktionieren von *super-resolution-microscopy*-Methoden sind. Cordes [18] und van de Linde [19] konnten experimentell und in Modellierungen zeigen, dass sich die Genauigkeit der Methoden, die auf der zeitlichen Separation und Lokalisation von einzelnen Fluorophoren basieren, erhöht, wenn die Photoschalter eine längere Aus-Zustands-Lebensdauer als An-Zustands-Lebensdauer besitzen. Hierdurch kann die Markierungsdichte erhöht werden. Dies führt letztendlich dazu, dass sich das Auflösungsvermögen dieser Methoden bei längerer Lebensdauer des Aus-Zustands im Vergleich zu der des An-Zustands verbessert. Die Lebensdauern des jeweiligen Zustands werden über die Schaltraten vom An-Zustand in den Aus-Zustand und denen des umgekehrten Prozesses kontrolliert. Um die geeigneten Lebensdauern zu erhalten, muss also die Schaltrate des Ausschaltprozesses k_{aus} signifikant höher sein als die des umgekehrten Prozesses k_{an} . Zusätzlich führen hohe Ausschalttraten k_{aus} zu einer schnelleren Sättigung des Aus-Zustands und damit zu

einer stärker reduzierten Punktabbildungsfunktion im RESOLFT-Konzept. Alternativ kann das RESOLFT-Konzept in diesem Fall mit niedrigeren Ausschaltleistungen genutzt werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde außerdem festgestellt, dass niedrige k_{aus} -Schaltraten in hohen benötigten Ausschaltleistungen resultieren und somit zu einer schnellen Photozerstörung führen [20]. Dieses ist ungünstig, da die Genauigkeit von *Super-resolution-fluorescence-microscopy*-Methoden, wie bereits beschrieben, auf einer hohen Zyklenzahl des Schaltprozesses der Fluorophore basiert, was einen hohen Widerstand gegenüber Ermüdungserscheinungen und eine hohe Verlässlichkeit des Schaltprozesses voraussetzt. Aufgrund dieser Ergebnisse und Erwägungen wurde der Fokus der Charakterisierung der determiniert und stochastisch schaltbaren Photoschalter auf die Kinetiken der Schaltprozesse und die Beeinflussbarkeit der Schaltraten des Ausschalt- sowie des Anschaltprozesses gelegt.

Prinzipiell können drei verschiedene Arten von Photoschaltern für *super-resolution-fluorescence-microscopy*-Techniken eingesetzt werden.

- Photoaktivierbare oder photoschaltbare fluoreszierende Proteine wie das photoaktivierbare *Green Fluorescent Protein* (PA)-GFP [21, 22] oder Dronpa [23–25]
- Organische Fluorophore, die unter bestimmten Bedingungen [6, 11–15, 26], zum Beispiel bei Anwesenheit von Reduktions- oder Oxidationsmittel, ein reversibles Schalt-Verhalten zeigen
- Synthetische Konjugate aus einem Fluorophor und einer photoschaltbaren Einheit, die die Emission des Fluorophors kontrolliert

Eine graphische Übersicht über die drei möglichen Typen von Photoschaltern gibt Abb. 1.2 Im Rahmen meiner Arbeit beschäftigte ich mich mit Vertretern aller drei Typen. So wurde die Beeinflussbarkeit der Schaltraten von Cy5, einem organischen Farbstoff, der aufgrund seines reversiblen Photoschaltens unter bestimmten Bedingungen für *dSTORM*-Anwendungen eingesetzt wird, untersucht und sein Einsatz in der *dSTORM*-Methode demonstriert. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf den synthetischen Konjugaten, in denen eine photoschaltbare photochrome Einheit mit einem passenden organischen Fluorophor verknüpft ist. Einer der Zustände des Photoschalters löscht die Fluoreszenz des Fluorophors durch intramolekulare Prozesse, der andere beeinflusst die Fluoreszenz nicht [27]. Dieses führt zu einer Modulation der Fluoreszenz zwischen einer hohen und einer niedrigen Intensität. Abb. 1.3 stellt beispielhaft ein mögliches photochromes Konjugat vor. Hier basiert der intramolekulare Löschprozess auf resonantem Energietransfer (FRET, vgl. Kapitel 2.1.2 vom Fluorophor zu nur einem Zustand der photochromen Einheit. Die Absorption dieses Zustands muss signifikant mit der Emission des Fluorophors überlappen, während die Absorption des anderen Zustands keine Überlappung mit der Emission besitzt. Wenn die Auslewellenlänge der Fluoreszenz des Fluorophors eine Wellenlänge ist, die den Schaltzustand der photochromen Einheit nicht beeinflusst, so liegt eine Entkopplung der Auslewellenlänge von den Schaltwellenlängen vor. Von Bedeutung ist der Linker zwischen dem Fluorophor und der photochromen Einheit. Dieser

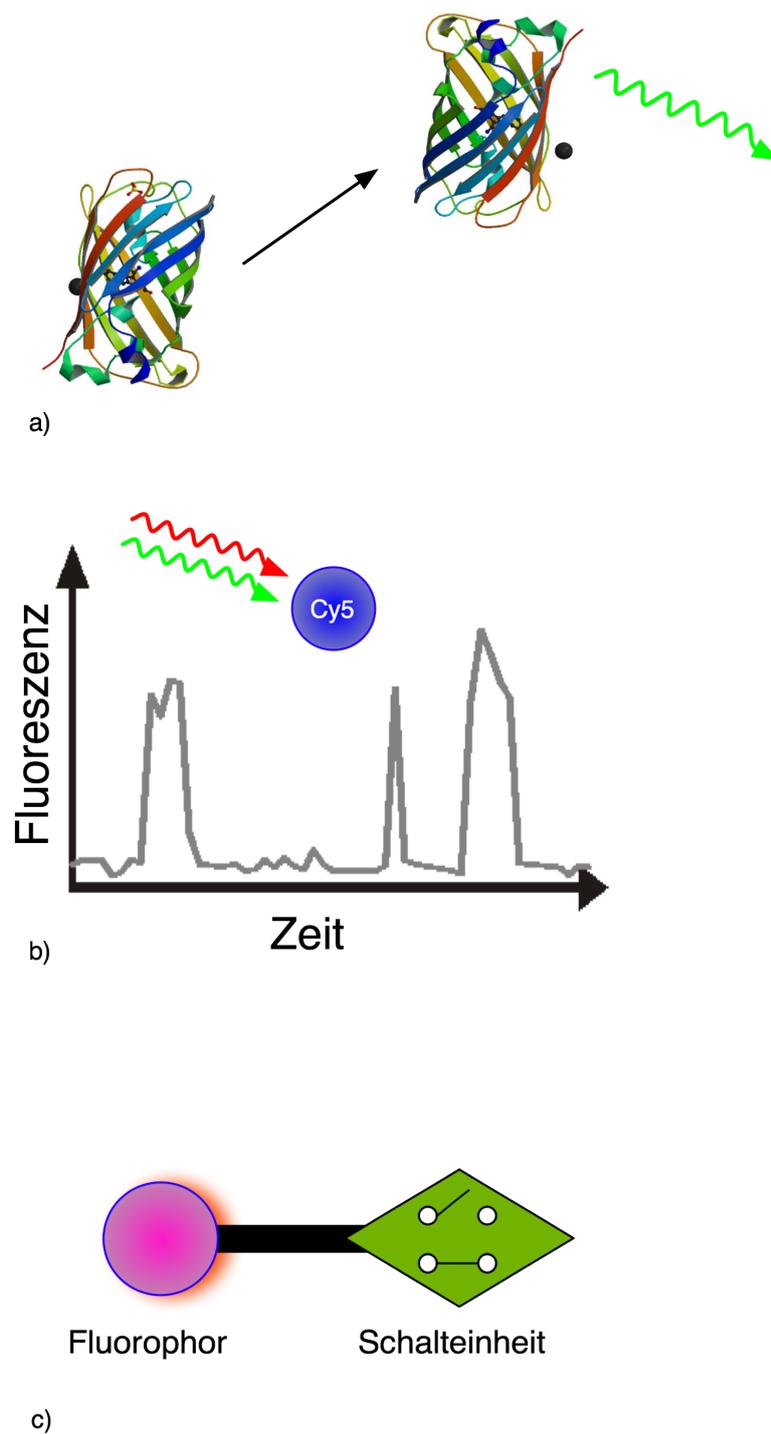


Abbildung 1.2: Übersicht über die in *super-resolution-fluorescence-microscopy* verwendbaren Photoschalterttypen: a) Photoaktivierbare oder photoschaltbare fluoreszierende Proteine, b) organische Farbstoffe, die unter bestimmten Bedingungen ein reversibles Schalt-Verhalten zeigen, c) photoschaltbare Konjugate aus einem Fluorophor und einer Schalteinheit, die die Fluoreszenz des Fluorophors kontrolliert

sollte starr sein, um eine direkte elektronische Wechselwirkung zwischen beiden zu unterbinden, aber gleichzeitig kurz genug, um einen effizienten Energietransfer zu garantieren.

Es wurden in den letzten Jahren verschiedene photochrome Moleküle als Schalteinheiten in photochromen Konjugaten eingesetzt, z.B. Diarylethene [28–30], Spiropyrane [27, 31] oder Fulgide [32]. In der vorliegenden Arbeit beschäftige ich mich mit Konjugaten, in denen Spiropyrane oder Diarylethene als Schalteinheiten an für Einzelmolekülspektroskopie tauglichen Fluorophoren angebracht wurden. Besonders Diarylethene sind in diesem Zusammenhang Erfolg versprechend, da sie herausragende Eigenschaften wie P-Typ-Photochromie (vgl. Kapitel 2.6 und Kapitel 2.6.2), hohe thermische Stabilität, hohen Widerstand gegenüber Ermüdung, hohe Reversibilität des Schaltprozesses und schnelle Antwortzeiten zeigen.

Einem technisch vollständig anderen Ansatz, der die Messung von kurzen Distanzen im Nanometer-Bereich erlaubt, ohne auf Abbildungen angewiesen und somit beugungsbegrenzt zu sein, widmet sich der zweite Teil der vorliegenden Arbeit. In Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-Anwendungen können sehr kurze Distanzen und deren Änderung durch Messung verschiedener Parameter indirekt bestimmt werden. In FRET-Prozessen wird Anregungsenergie strahlungslos von einem Donor-Molekül auf ein Akzeptor-Molekül übertragen. Die Effizienz dieses Prozesses ist abhängig vom Abstand der beiden Moleküle. Einhergehend mit Änderungen der Effizienz des FRET-Prozesses ändern sich Parameter wie die Intensität der Donor- sowie der Akzeptoremision und die Fluoreszenzlebensdauer des Donors. Aus den relativen Werten dieser Parameter lässt sich folglich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor bestimmen. In dieser Arbeit wurden verschiedene fluoreszierende Proteine untersucht, die gegenüber organischen Farbstoffen den Vorteil haben, dass sie durch genetische Kodierung an das Zielmolekül gebunden werden. Diese wurden hinsichtlich ihrer Eignung in Bezug auf Einzelmolekülspektroskopie-Anwendungen wie Einzelmolekültracking oder Lokalisation in Zellen und für Mehrfarbanwendungen und FRET-Techniken charakterisiert. Methodisch konnte besonders in diesem Teil der Arbeit auf die Vorteile der Einzelmolekülspektroskopie zurückgegriffen werden. Die in jüngerer Zeit stattgefundenene Entwicklung der Spektroskopie einzelner Moleküle, beginnend mit [33], erlaubt die Betrachtung individueller Parameter, die nur auf der Einzelmolekülebene sichtbar werden, während sie auf der Ensembleebene durch die Mittelwertbildung nicht zu detektieren sind. Es sind dies besonders Fluktuationen in der Intensität der Emission (Blinken) und spektrale Fluktuationen. Zudem kann die Photostabilität, das heißt die Lebensdauer einzelner Moleküle, bestimmt werden. Den Bogen von den Messungen an fluoreszierenden Proteinen zurück zu den Photoschaltern für hochauflösende Mikroskopie schlagen die Versuche, die Photophysik von normalem eGFP so zu beeinflussen, dass es ebenfalls ein reversibles Photoschalten zeigt. So könnte auch normales eGFP in einer Methode, die auf der Lokalisation einzelner Fluorophore basiert, für die hochauflösende Mikroskopie eingesetzt werden. Dieser Ansatz besitzt durch die weite Verbreitung von eGFP als Fluoreszenzlabel biologischer Proben ein besonderes Potential.

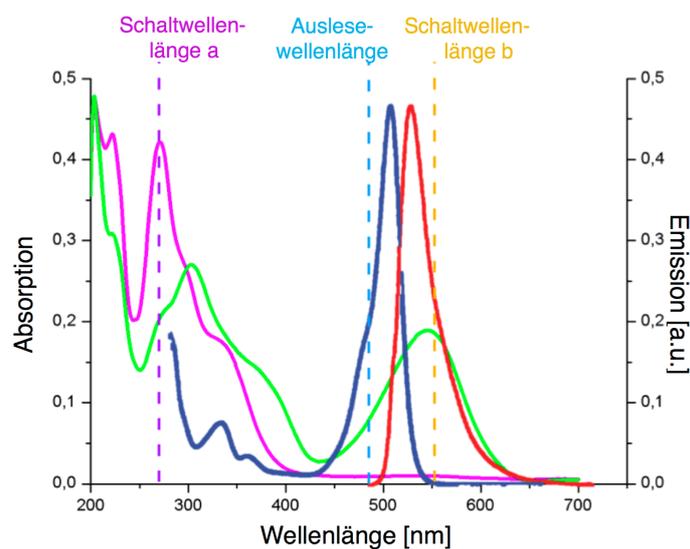
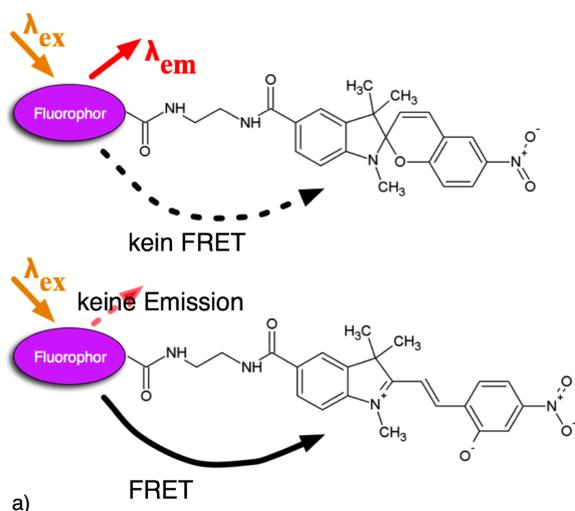


Abbildung 1.3: Die Funktionsweise von Konjugaten aus einem Fluorophor und einer photochromen Schalteinheit. Die photochrome Einheit kann in zwei unterschiedlichen chemischen Formen vorliegen. Die untere Form aus a) zeigt eine Absorption im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums (grüne Kurve in b)), die obere Form aus a) nicht (rosafarbenes Absorptionsspektrum in b)). Die Absorption der unteren Form überlappt signifikant mit dem Emissionsspektrum (rot) des Fluorophors, so dass dieses durch Energietransfer gelöscht wird. Die Absorption der oberen Form überlappt nicht mit der Emission des Fluorophors, so dass dieser Fluoreszenz emittiert. Die photochrome Einheit kann durch Anregung mit Licht der Schaltwellenlängen a bzw. b von der oberen in die untere Form bzw. zurück überführt werden. Hat die Auslesewellenlänge des Fluorophors, die im Bereich der Absorption des Fluorophors (blau) liegt, keinen Einfluss auf den Schaltstatus der photochromen Einheit, liegt eine Entkopplung des Auslesevorgangs vom Schaltstatus vor.

1.1 Aufbau der Arbeit

Zunächst werden die wichtigsten Grundlagen eingeführt, die für das Verständnis der folgenden Kapitel benötigt werden (Kapitel 2). Diese Grundlagen unterteilen sich in 5 Bereiche. In den "Optischen Grundlagen" werden die Fluoreszenz, wichtige, die Fluoreszenz charakterisierende, Parameter und der Resonante Energie Transfer (FRET) vorgestellt. Es folgt ein technischer Teil, in dem die Grundlagen der in dieser Arbeit vielfach eingesetzten Methoden, die konfokale Mikroskopie, die Weitfeldmikroskopie und die Spektroskopie von Einzelmolekülen besprochen werden. Das Kapitel "Möglichkeiten der Auflösungserhöhung" erläutert die grundlegenden Konzepte der RESOLFT-Mikroskopie und der Methoden, die auf der Lokalisation von einzelnen Fluorophoren basieren, und motiviert die Beschäftigung mit Photoschaltern. Im folgenden Kapitel wird Photochromismus erklärt und die photochromen Substanzklassen der Spiropyrane und der Diarylethene vorgestellt. Der theoretische Teil der Arbeit endet mit einer Beschreibung von fluoreszierenden Proteinen unter besonderer Berücksichtigung von fluoreszierenden Proteinen, die in der hochauflösenden Mikroskopie eingesetzt werden können. Im Kapitel drei ("Material und Methoden") werden die untersuchten Photoschalter vorgestellt und die verwendeten Farbstoffe benannt. Die verwendeten Apparaturen, die Methoden der Datenaufnahme und die Vorgehensweise bei der Auswertung der Daten werden beschrieben. Das Kapitel vier ("Ergebnisse und Diskussion") stellt zunächst die Ergebnisse der Messungen mit freien Spiropyranen und Spiropyrankonjugaten als auch mit verschiedenen Diarylethenen und Diarylethenkonjugaten vor. Es folgen die Ergebnisse der Untersuchung der Schaltkinetiken von Cy5 und des Einsatzes von Cy5 bei der hochauflösenden Mikroskopie nach der *d*STORM- Methode. Abschließend folgen die Ergebnisse der Charakterisierung von fluoreszierenden Proteinen auf der Einzelmolekülebene und der Beeinflussung der Photophysik von eGFP zur Generierung reversibler Dunkelzustände. In diesem Kapitel erfolgen ebenfalls eine erste Diskussion und Bewertung der Ergebnisse. Die Arbeit schließt mit einem Resümee der Ergebnisse und einer zusammenfassenden und vergleichenden Bewertung, die mögliche Optimierungsmethoden aufzeigt.

1.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, durch die diese Arbeit erst möglich geworden ist und die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Meinem Betreuer Markus Sauer danke ich für das Ermöglichen der Dissertation, die ständige Unterstützung und Gesprächsbereitschaft. Jochen Mattay danke ich für die hervorragende Kooperation zwischen den beiden Arbeitskreisen und die Betreuung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt dem gesamten Arbeitskreis D3 Angewandte Laserphysik und Laserspektroskopie an der Uni Bielefeld für seine Unterstützung. Besonderer Erwähnung bedarf es Mike Heilemann, der ebenfalls große Teile dieser Arbeit be-

treut hat, Gerd Wiebusch, ohne den die praktische Durchführung nicht möglich gewesen wäre, und Reinhild Pätzmann, die jederzeit hilfsbereit war und alle organisatorischen Aspekte perfekt im Griff hatte.

Ebenso gilt mein Dank dem Arbeitskreis Organische Chemie I der Universität Bielefeld, besonders Oliver Tasic, Kai Altenhöner, Florian May, Mirco Beining und Frank Strübe, die mich nicht nur mit vielfältigen Proben versorgt haben, sondern mir auch stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danke an Thorsten Seidel, der Unmengen von fluoreszierenden Proteinen für mich exprimiert hat.

Danke an Robert Kasper und Sebastian van de Linde für die anhaltende Unterstützung, nicht nur auf fachlicher Ebene. Die Zeit mit Euch auf D3 wird unvergessen bleiben!

Danke an Magga, Jan, Bine, Bernd, Dan, Ramin, Nina, Alu, Linda, Damian, Svenja, Carina, Thorsten, Hannah, Thonie, Daniel, Julia und Idir für permanente Unterstützung und die notwendige Ablenkung. Und für das Versorgen mit leckerstem Essen besonders in den letzten Wochen.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich immer aus voller Kraft unterstützen. Ich danke außerdem Vikingur und Fálki, die mir für die Zeit der Doktorarbeit ihre Flügel liehen.

Heiko, Danke für Alles, besonders für's immer Da-Sein!

Theorie und Grundlagen

2.1 Absorption und Emission

Als Fluoreszenz bezeichnet man ein Phänomen, bei dem von Molekülen absorbiertes Licht nach einem bestimmten Zeitraum wieder als elektromagnetische Strahlung abgegeben wird anstatt in Wärme umgewandelt zu werden [34, 35]. Dieses tritt auf bei Molekülen, die aufgrund ihrer Struktur daran gehindert werden, die Energie des Lichts in Schwingungs- oder Rotationsenergie umzuwandeln. Man spricht in diesem Fall von einem Fluoreszenzfarbstoff oder Fluorophor. Bei einem solchen wird durch Absorption eines Photons von ausreichender Energie ein Elektron des energiereichsten besetzten Molekülorbitals (HOMO - highest occupied molecular orbital) eines Atoms oder Moleküls aus seinem elektronischen Grundzustand S_0 angehoben in ein Schwingungs- oder Rotationsniveau eines energetisch höheren Zustands S_n , wobei gilt $n > 0$. Der Übergang eines Elektrons aus einem Zustand S_n in einen anderen Zustand S_m mit m ungleich n erfolgt nach dem nach James Franck und Edward U. Condon benannten Franck-Condon-Prinzip (siehe Abb. 2.1). Dieses besagt, dass die Änderung der Lage der Kerne zueinander während des Elektronensprungs vernachlässigt werden kann. Der Kernabstand bleibt gleich, da ein Elektronensprung mit ca. 10^{-15} s sehr viel schneller erfolgt als eine molekulare Schwingung mit 10^{-12} s.

Daher erfolgen die Elektronenübergänge in der Abbildung 2.1, in der auf der x-Achse der Kernabstand aufgetragen ist, vertikal [36]. Zusätzlich zeigt diese Abbildung die zwei Potentialkurven des Moleküls für den Normalzustand und den angeregten Zustand. Wellenförmig sind die verschiedenen Schwingungsniveaus der Zustände, benannt durch die Schwingungsquantenzahl v , eingetragen. Je kompatibler die Wellenfunktionen aus dem Grund- und dem angeregten Zustand sind,

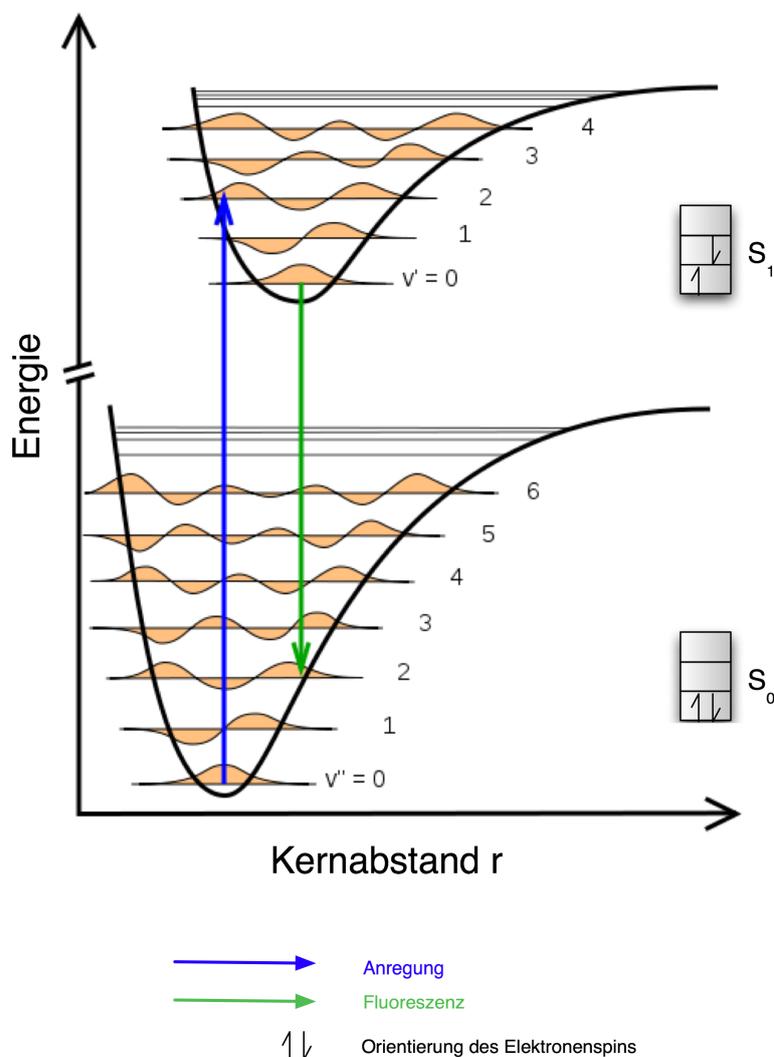


Abbildung 2.1: Nach dem Franck-Condon-Prinzip erfolgen Elektronenübergänge vertikal zwischen den verschiedenen elektronischen Zuständen eines Moleküls. ν'' 1 bis 6 und ν' 1 bis 4 stellen hierbei verschiedene vibronische Wellenfunktionen des Grundzustands S_0 bzw. des ersten angeregten Zustands S_1 dar. Der Übergang erfolgt je wahrscheinlicher, je kompatibler die Wellenfunktionen zueinander sind.

desto wahrscheinlicher ist ein Übergang zwischen beiden.

Die möglichen Übergänge eines Elektrons zwischen den Energieniveaus eines Moleküls sind in Abb. 2.2 dargestellt. Der Übergang eines Elektrons aus dem Normalzustand in den angeregten Zustand ist als blauer Pfeil dargestellt. Aufgrund des Satzes der Energieerhaltung muss gelten, dass die Energiedifferenz des angeregten Zustands und des Grundzustands E gerade der Energie des absorbierten Photons entspricht. Nach Max Planck gilt für die Energie eines Photons:

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda}, \quad (2.1)$$

wobei

- h das Planck'sche Wirkungsquantum,
- ν die Frequenz des absorbierten Lichts,
- c die Vakuumlichtgeschwindigkeit und
- λ die Wellenlänge des absorbierten Lichts ist.

Es muss beim Elektronensprung folgende Bedingung erfüllt sein:

$$\Delta E = h\frac{c}{\lambda} \quad (2.2)$$

Wie oben erläutert erfolgt der Übergang des Elektrons normalerweise nicht in das unterste Schwingungsniveau des angeregten Zustands, sondern in ein höheres Schwingungsniveau. Aus diesem relaxiert es strahlungslos durch einen als Schwingungsrelaxation bezeichneten Vorgang in das unterste Niveau des angeregten Zustands S_n (schwarze Wellenlinien in Abbildung 2.2). Der Zustand des angeregten Moleküls besitzt eine endliche Lebensdauer. Nach dieser geht das Elektron wieder in den Grundzustand über, wobei ein Photon mit der Energiedifferenz entsprechender Wellenlänge emittiert wird (in Abbildung 2.2 als grüner Pfeil zu erkennen). Dieses Phänomen wird als Fluoreszenz bezeichnet. Nur wenn ein Elektron in den Zustand angeregt wurde, aus dem es unter Fluoreszenz wieder in den Grundzustand S_0 übergeht, entspricht die Wellenlänge des emittierten Photons der des absorbierten. In diesem Fall spricht man von Resonanzfluoreszenz. Da in den meisten Fällen ein Elektron in ein höheres Schwingungs- oder Rotationsniveau eines S_n -Zustands angeregt wird, von diesem durch Schwingungsrelaxation erst in den niedrigsten S_n -Zustand übergeht und von hier unter Abgabe eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand zurückkehrt, ist die Energie des emittierten Photons geringer als die des absorbierten Photons und seine Wellenlänge größer. Diese Differenz der Wellenlänge von absorbiertem und emittiertem Licht bezeichnet man als Stokes-Verschiebung. Es gilt:

$$\lambda_S = |\lambda_{in} - \lambda_{out}| \quad (2.3)$$

- λ_S ist die Stokes-Verschiebung,

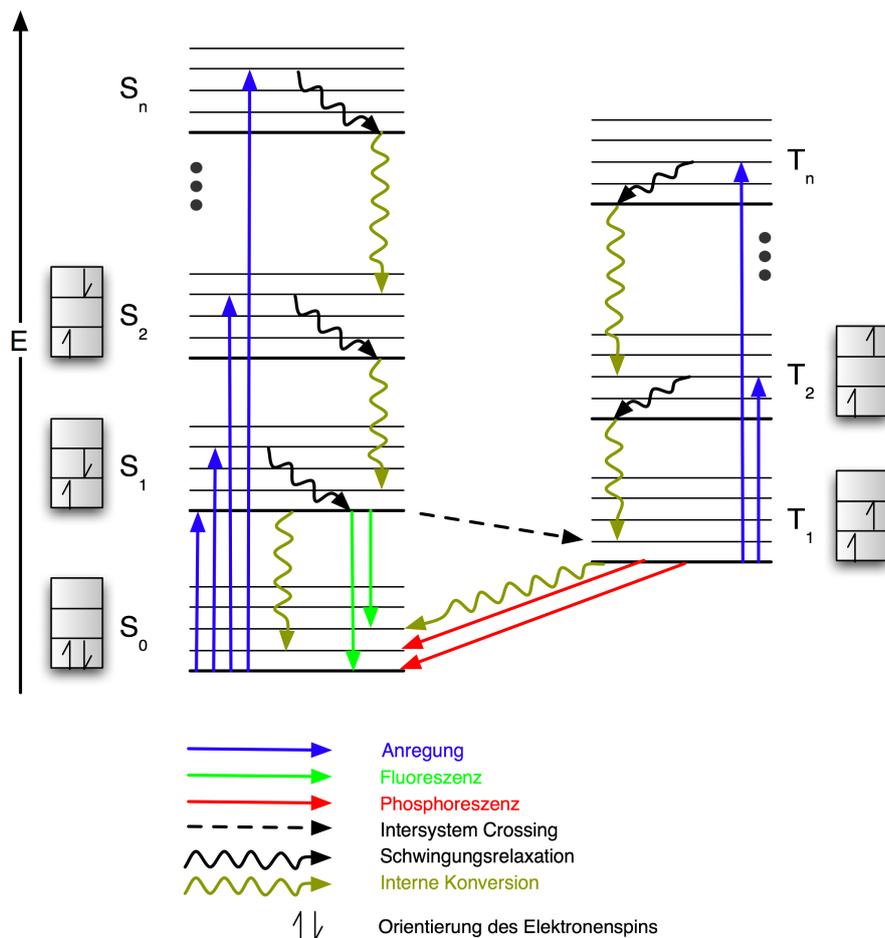


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der möglichen elektronischen Übergänge innerhalb eines Moleküls in einem Jablonski-Diagramm (Elektronenanregung: blau, Fluoreszenz: grün, Phosphoreszenz: rot, Schwingungsrelaxation: gelb gewellt, intersystem crossing: schwarz gestrichelt) S_0 bis S_n sind der Grundzustand bzw. angeregte Singulettzustände, während T_1 bis T_n angeregte Triplettzustände darstellen.

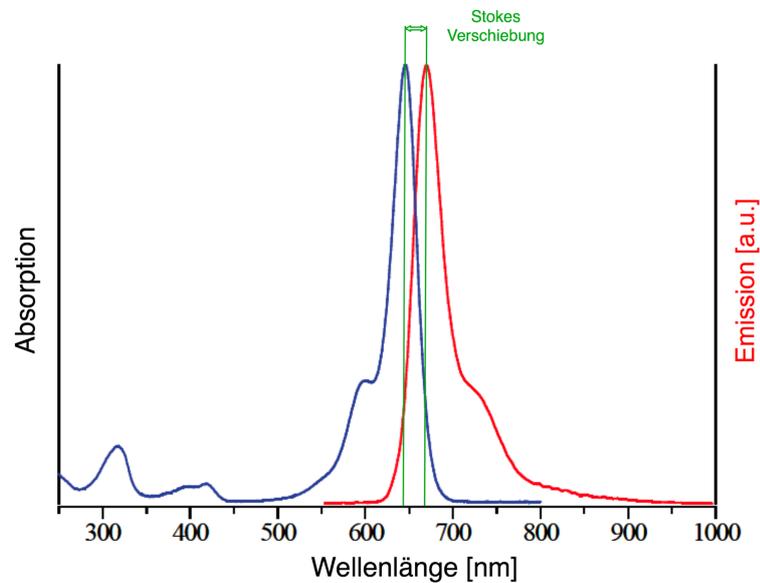


Abbildung 2.3: Stokes-Verschiebung des Emissionsspektrums (rot) zum Absorptionsspektrum (blau) von ATTO647N

- λ_{in} die Wellenlänge des absorbierten Lichts und
- λ_{out} die Wellenlänge des emittierten Lichts.

Die Stokes-Verschiebung zeigt Abbildung 2.3, in der das Absorptions- und das Emissionsspektrum von ATTO647N dargestellt werden. Sie bestimmt sich aus der Wellenlänge der maximalen Emission abzüglich der Wellenlänge der maximalen Absorption. Die Stokes Verschiebung ist eine charakteristische Größe eines Fluoreszenzfarbstoffs.

In Abbildung 2.2 sind neben der Fluoreszenz weitere Möglichkeiten des Elektrons in den Grundzustand zurückzukehren gezeigt, die mit dem Prozess der Fluoreszenz konkurrieren. Es tritt zum einen ein als interne Konversion bezeichneter Übergang auf, bei dem die elektronische Energie isoenergetisch in vibratorische Energie des Grundzustands umgewandelt wird, als auch intersystem crossing (ISC) aus dem ersten angeregten Zustand S_1 in den Triplettzustand T_1 . Im Triplettzustand zeigen die beiden Elektronen, die aus dem höchsten Energieniveau stammen, nicht, wie im Singulettzustand antiparallelen Spin, sondern parallelen. Der Drehimpuls eines Elektrons kann die Werte $+1/2$ und $-1/2$ annehmen. Daher ist der Gesamtspin S eines Systems bei Parallelstellung der Elektronen 1, im entgegengesetzten Fall 0. Damit ist die Multiplizität des Systems, die sich nach der Formel

$$M = 2S + 1, \quad (2.4)$$

wobei

- M die Multiplizität des Systems
- und S der Gesamtspin des Systems ist,

bestimmen lässt, im Triplettzustand 3 und im Singulettzustand 1. Da sich bei einem Übergang aus dem Singulettzustand in den Triplettzustand oder umgekehrt der Gesamtspin des Systems ändert ($\Delta S \neq 0$) bezeichnet man einen solchen Übergang als "verboten". Er läuft entsprechend unwahrscheinlich bzw. langsam ab. Die Rückkehr aus dem T_1 -Zustand in den S_1 -Zustand wird als Phosphoreszenz [37] bezeichnet (Darstellung in der Abbildung als rote Linie). Diese Rückkehr erfolgt aus oben genannten Gründen langsam, in Zeiträumen von Sekunden bis Stunden. Die Gesamtheit aller Übergänge ergeben ein molekülspezifisches Spektrum sowohl der Absorption als auch der Emission.

2.1.1 Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute

Eine weitere spezifische Kenngröße eines Fluorophors ist die Fluoreszenzlebensdauer, die die mittlere Zeit angibt, die das Molekül im angeregten Zustand verbleibt, bevor es unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand zurückkehrt. Die Fluoreszenzquantenausbeute beschreibt das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen. Da absorbierte Photonen bei Vernachlässigung der Phosphoreszenz zwei Möglichkeiten haben, in den Grundzustand zurückzukehren, nämlich die Fluoreszenz, mit der Photonenemissionsrate Γ und die strahlungslosen Übergänge, deren Rate mit k_{nr} bezeichnet wird, lässt sich die Quantenausbeute Φ folgendermaßen berechnen:

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.5)$$

Die Zeit bis zur Aussendung des Fluoreszenzphotons, die Fluoreszenzlebensdauer τ , berechnet sich nach

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.6)$$

Wenn die Fluoreszenzlebensdauer einer monoexponentiellen Kinetik folgt, so kann der zeitliche Verlauf der Intensität des Fluoreszenzlichts in der Form

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.7)$$

dargestellt werden. Hier ist $I(t)$ die Intensität des Fluoreszenzlichts zum Zeitpunkt t , I_0 ist die Intensität zum Zeitpunkt $t = 0$ und τ die mittlere Verweilzeit eines Elektrons im angeregten Zustand. Nach der Zeit $t = \tau$ ist die Intensität des Fluoreszenzlichts auf $1/e$ der Ausgangsintensität abgefallen. Eine experimentell gemessene Fluoreszenzabklingkurve ist in Abbildung 2.4 gezeigt.

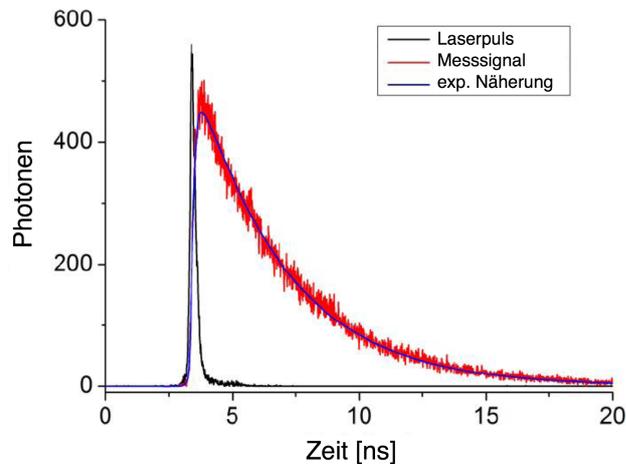


Abbildung 2.4: Exponentiell abfallende Verteilung der Ankunftszeiten von Fluoreszenzphotonen in einem Ensembleexperiment.

2.1.2 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer

Eine Möglichkeit der Modulation der Fluoreszenz eines Fluorophors über eine Schalteinheit besteht über den Förster Resonanz Energie Transfer (FRET). Ebenso ist es durch Ausnutzen des FRET-Phänomens möglich, sehr kurze Abstände (im nm Bereich) zu messen.

Als FRET bezeichnet man eine Wechselwirkung der Dipole zweier Chromophore, bei der strahlungslos Anregungsenergie von einem Donor- auf ein Akzeptor-Molekül übertragen wird. Das Emissions-Übergangsdipolmoment des Donors ist mit dem Absorptions-übergangsdipolmoment des Akzeptors über ein Resonanzphänomen gekoppelt. Normalerweise bleibt der Elektronenspin beider Chromophore beim FRET-Prozess erhalten, was einen Singulett-Singulett-übergang bedeutet (Abb. 2.5). FRET führt sowohl zu einer Abnahme der Strahlungsintensität als auch der Fluoreszenzlebensdauer des Donors und, falls der Akzeptor ebenfalls strahlungsfähig ist, zu einer Zunahme der Strahlungsintensität des Akzeptors.

Die Effizienz des FRET-Prozesses berechnet sich aus dem Verhältnis der Transferrate k_T zu der Rate der insgesamt absorbierten Photonen, bzw. zu der Summe aus Transferrate und Photonenemissionsrate Γ_D :

$$E = \frac{k_T}{\Gamma_D + k_T} \quad (2.8)$$

Die Höhe der Transferrate ist abhängig von:

- dem Überlappintegral J des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrum des Akzeptors:

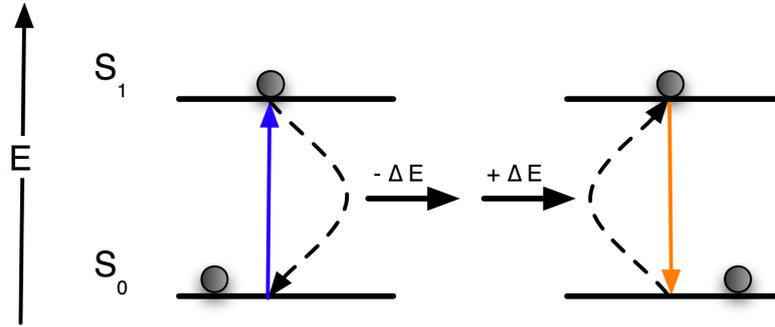


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des FRET-Prozesses. Es wird strahlungslos Energie von einem angeregten (blauer Pfeil) Donor auf einen Akzeptor übertragen, wobei der Donor in seinen Grundzustand zurückkehrt und der Akzeptor angeregt wird. Dieser kann diese Energie über verschiedene Prozesse abgeben (gelber Pfeil).

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_d(\lambda)\epsilon_a(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (2.9)$$

$F_d(\lambda)$ beschreibt das Emissionsspektrum des Donors, $\epsilon_a(\lambda)$ das Absorptionsspektrum des Akzeptors in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

- dem Abstand r von Donor und Akzeptor zueinander. Die Effizienz des FRET-Prozesses sinkt nach

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.10)$$

mit der 6. Potenz des Abstands r zwischen Donor und Akzeptor (siehe Abb. 2.6).

R_0 ist der sogenannte Försterradius. Das ist der Abstand, bei dem die Übertragungseffizienz bei einem bestimmten Donor-Akzeptor-Paar gerade 50% beträgt (siehe Abb. 2.6). Er lässt sich über

$$R_0 = \sqrt[6]{8,7910^{-5}Q_D n^{-4}\kappa^2 J(\lambda)} \quad (\text{in } \text{Å}) \quad (2.11)$$

berechnen, wobei das Überlappungsintegral in $(M^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm})$ eingefügt wird [38].

Hierbei ist Q_D die Quantenausbeute des Donors und n der Brechungsindex des Mediums. Der Försterradius liegt typischerweise bei Werten zwischen 2 und 8 nm.

κ^2 beschreibt einen geometrischen Faktor, der mit der Orientierung der Dipolmomente beider Chromophore zueinander zusammenhängt. Je nach Orientierung kann

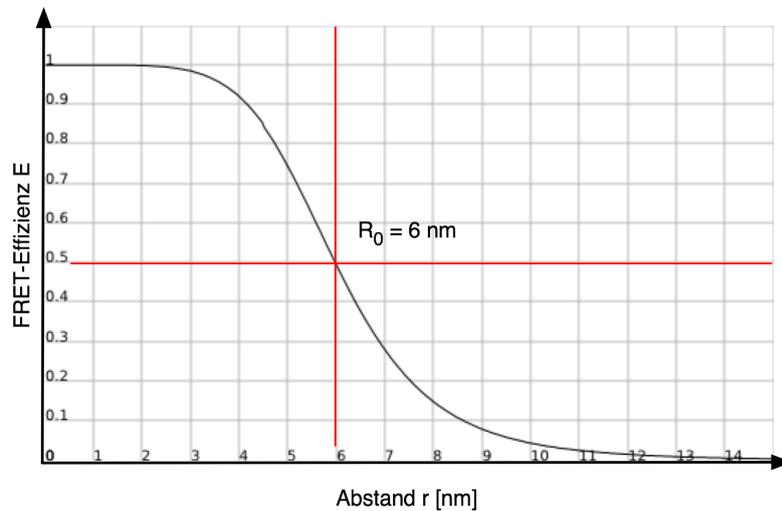


Abbildung 2.6: Die Effizienz eines FRET-Prozesses sinkt mit der 6. Potenz des Abstands zwischen Donor und Akzeptor. Entspricht der Abstand gerade dem Försterradius R_0 , so ist die Effizienz 50%.

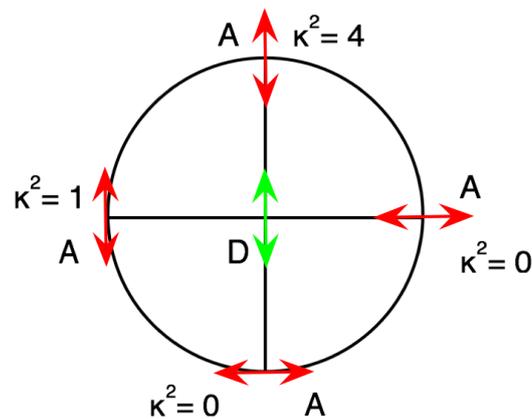


Abbildung 2.7: Verschiedene Orientierungen der Dipole von Donor und Akzeptor zueinander. Da der FRET-Prozess auf einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung beruht, führen diese zu unterschiedlichen Werten des Parameters κ^2 , welcher in die Berechnung der Effizienz des FRET-Prozesses einfließt.

κ^2 Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Abb. 2.7 zeigt verschiedene mögliche Orientierungen und die dazugehörigen Werte von κ^2 . Bei Farbstoffen, die frei zueinander beweglich sind, nimmt man als Wert von $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ an.

Die Übertragungsrate des FRET-Prozesses wird beschrieben über

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.12)$$

Hierbei ist τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors. In unserem Zusammenhang besonders relevant ist die Reduktion der Donor-Strahlungsintensität. Diese Abnahme und die FRET-Effizienz hängen wie folgt zusammen:

$$F_{DA} = F_D(1 - E) \quad (2.13)$$

wobei F_D die Fluoreszenz des Donors in Abwesenheit des Akzeptors und F_{DA} die Fluoreszenz des Donors in Anwesenheit des Akzeptors ist.

Ebenso kann die Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer des Donors im Zusammenhang mit der FRET-Effizienz beschrieben werden.

$$\tau_{DA} = \tau_D(1 - E) \quad (2.14)$$

τ_D ist die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, τ_{DA} in Anwesenheit des Akzeptors.

Wie man in Abb. 2.6 sieht, ändert sich die Effizienz des FRET-Prozesses im Bereich des Förster-Radius sehr stark und damit einhergehend die Intensität der Emission und die Lebensdauer des Donors sowie die Intensität der Emission der Akzeptors. Daher eignen sich Messungen dieser Parameter in FRET-Anwendungen, um kurze Abstände zwischen einem Donor-Akzeptor-Paar genau zu bestimmen.

2.2 Konfokale Mikroskopie

Mikroskopie ist die vergrößerte Abbildung von Objekten über ein Linsensystem. Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie besteht darin, dass der als Anregungslicht verwendete Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)-Strahl fokussiert wird, die Probe also nur in einem einzigen Punkt angeregt wird [39]. Ebenso wird nur Licht aus einem Anregungsfokus detektiert. Die Foki des Anregungslichts und des bildgebenden Lichts liegen übereinander. Die Abbildung wird mit den unscharfen Signalen der Bereiche vor und hinter der Fokalebene überlagert, was die Auflösung besonders bei Ausdehnung der Probe in der z-Ebene verringert. Diese unerwünschten Signale werden bei der konfokalen Mikroskopie zweifach unterdrückt: Zum einen werden diese Bereiche der Probe durch die punktförmige Anregung wenig angeregt, zum anderen fällt jedes von einem Punkt außerhalb der Fokalebene ausgesandte Licht auf Höhe der Lochblende im Detektionsarm nicht in einem Punkt zusammen, sondern bildet ein Scheibchen, so dass der Großteil

von ihm geblockt wird. Dieser Fall ist in der Abbildung 2.8 beispielhaft anhand der blauen und grünen Strahlengänge dargestellt. Hinzu kommt bei der konfokalen Mikroskopie, dass nicht nur das Licht aus Bereichen außerhalb der Fokusebene unterdrückt wird, sondern auch Licht, das in x- oder y-Richtung vom Anregungsfokus verschoben ausgesandt wird (rosafarbene Linie in Abbildung 2.8).

Als Anregungslichtquelle dient bei der konfokalen Mikroskopie meist ein Laser, da hohe Intensitäten benötigt werden, um die Beobachtungszeiten zu verkürzen. Das Anregungslicht fällt auf einen dichroitischen Strahlteiler, dessen Eigenschaften so gewählt sind, dass er das Anregungslicht in Richtung des Objektivs reflektiert, während das zurückgeworfene Fluoreszenzlicht, das aufgrund der Stokes-Verschiebung längerwellig ist, transmittiert wird.

Nach der Reflektion durch den Strahlteiler wird das Licht durch das Objektiv des Mikroskops auf einen Punkt der Probe fokussiert. Das von diesem Punkt ausgehende rot verschobene Fluoreszenzlicht wird von dem gleichen Objektiv gesammelt und fällt nach Passage des Strahlteilers und der Lochblende im Detektionsarm auf den Detektor. Da immer auch ein kleiner Teil des Anregungslichts durch den Strahlteiler gelangt, wird dieses im Bereich des Detektionsarmes durch geeignete Filterkombinationen unterdrückt. Für das Auflösungsvermögen gilt das Rayleigh Kriterium [35]: Zwei Punkte werden getrennt dargestellt, wenn das Maximum des Signals des einen Punktes in das Beugungsminimum des anderen fällt, wie in Abbildung 2.15 gezeigt. Es gilt für die transversale Auflösung:

$$\delta x = 0,61 \frac{\lambda}{NA}, \quad (2.15)$$

wobei λ die Wellenlänge des Anregungslichts und NA die numerische Apertur des Mikroskopobjektivs ist.

Da ein nicht aus dem Anregungs- und Detektionsfokus stammendes Signal, wie oben erläutert, zweifach unterdrückt wird, wird die optische Auflösung bei der konfokalen Mikroskopie erhöht. Aus diesem Grund wird die Auflösung eines konfokalen Mikroskops mit dem Korrekturfaktor $\frac{1}{\sqrt{2}}$ multipliziert [39]. Das Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops in z-Richtung ergibt sich aus:

$$\delta x_{axial} = 1,77 \frac{\lambda}{(NA)^2}. \quad (2.16)$$

Insgesamt ergibt sich nach [40] ein sphäroidales Anregungs- und Detektionsvolumen von 0,5 - 1,0 Femtolitern. Bei der Fluoreszenzspektroskopie sorgen zwei Streuungsphänomene für ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis: die Rayleigh- und die Ramanstreuung [35]. Trifft ein Photon auf ein Atom oder Molekül und führt dies nicht zu einer elektronischen Anregung, so kann es elastisch gestreut werden, wobei sich seine Energie und Frequenz nicht ändern. Diesen Effekt bezeichnet man als Rayleigh Streuung. Im Gegensatz dazu ist die Ramanstreuung eine inelastische Streuung eines Photons an einem Atom oder Molekül, wobei Rotations- oder Schwingungszustände angeregt werden oder solche angeregten Zustände vernichtet

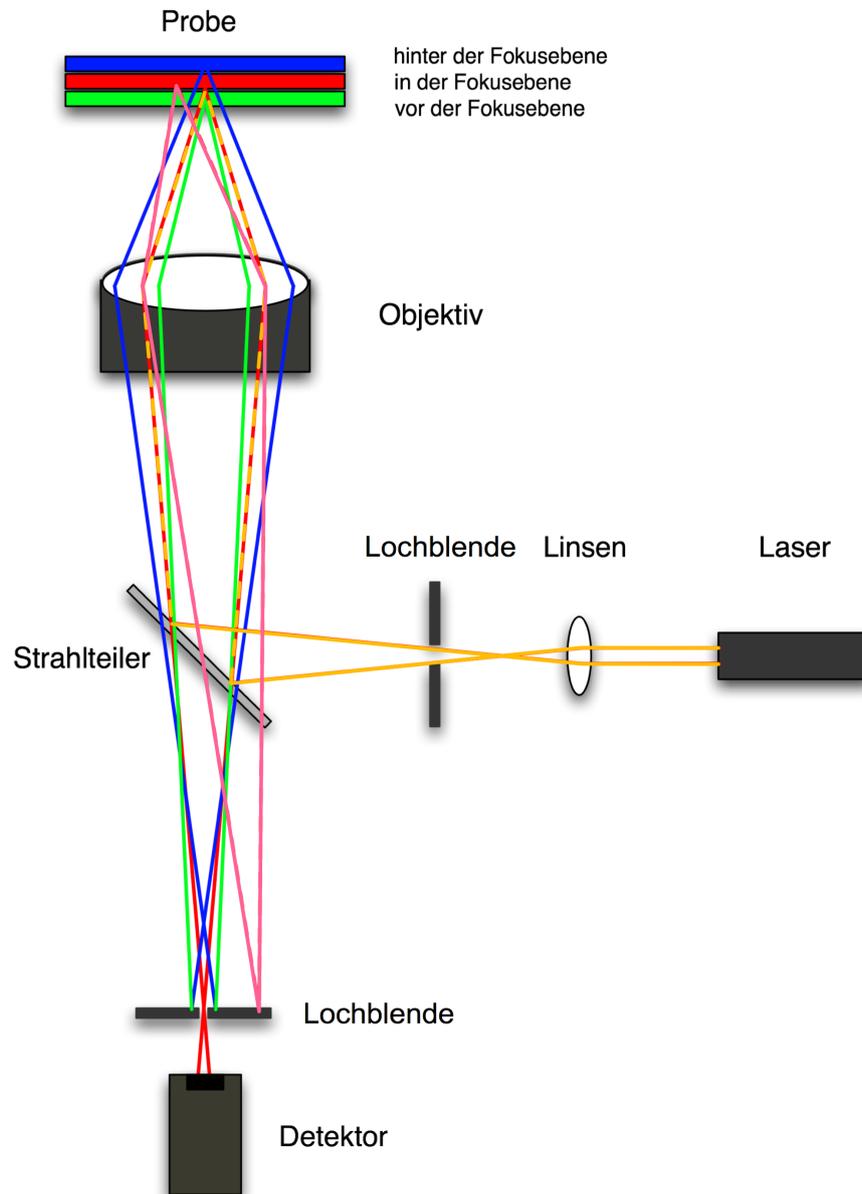


Abbildung 2.8: Prinzip der konfokalen Mikroskopie. Hierbei wird der Anregungslaser in einem parallelen Strahl in das Objektiv eingekoppelt und dadurch im Brennpunkt des Objektivs fokussiert. Dies führt zu einer geringen räumlichen Ausdehnung des Anregungsvolumens, je nach Wellenlänge 200-300nm lateral und 600-800 nm axial. Dargestellt sind die Begrenzungsstrahlen des Anregungslasers (gelb) und der Emission (rot). Rosa, grün und blau sind Begrenzungsstrahlen des Streulichts, das von seitlich, unterhalb oder oberhalb des Detektionsvolumens stammt. Dieses wird besonders durch die Verwendung von Lochblenden unterdrückt.

werden. Die Energie des gestreuten Photons beträgt somit die Energie des einfallenden Photons abzüglich der Anregungsenergie bzw. zuzüglich der Abregungsenergie.

$$h\nu' = h\nu - \delta E \quad (2.17)$$

Die Ramanstreuung ist für jedes Molekül charakteristisch und unabhängig von der Anregungswellenlänge. Bei der Einzelmolekülspektroskopie ist die Ramanstreuung der untersuchten Einzelmoleküle aufgrund des geringen Streuquerschnitts zu vernachlässigen, aber nicht die der umgebenden Moleküle, beispielsweise des Lösungsmittels. Die Rayleighstreuung kann über Wahl geeigneter Filter im Detektionsarm unterdrückt werden, da sich ihre Frequenz von der Frequenz des interessierenden Fluoreszenzlichts unterscheidet. Im Gegensatz dazu kann mit der Ramanstreuung nicht auf gleiche Weise verfahren werden, da sie ebenso wie die Fluoreszenz rot verschoben sein kann. Beide Streuungen sind proportional zum Anregungsvolumen.

Da immer nur ein Punkt der Probe angeregt und detektiert wird, muss die Probe, um ein 2- oder 3-dimensionales Bild zu erhalten, abgerastert werden, was entweder über ein Verschieben der Probe oder des Anregungsfokus erreicht werden kann. Die detektierten Signale der einzelnen Punkte werden durch einen Computer zu einem Bild zusammengesetzt.

2.3 Die Spektroskopie von einzelnen Molekülen

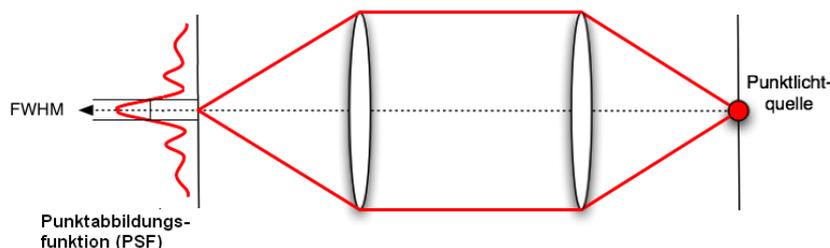


Abbildung 2.9: Durch ein Linsensystem erzeugte Punktabbildungsfunktion eines Einzelmoleküls, FWHM ist die Halbwertsbreite der Punktabbildungsfunktion.

Mit den oben beschriebenen Mikroskopiemethoden lassen sich einzelne Farbstoffmoleküle abbilden. Einzelne fluoreszierende Moleküle können ihrer geringen Größe nach als punktförmige Lichtquellen angesehen werden. Aufgrund des Phänomens der Beugung des Lichts am bildgebenden System erfolgt die Abbildung in der Beobachtungsebene nicht in einem Punkt, sondern in einer Punktabbildungsfunktion (PSF) (Abb. 2.9) mit einer bestimmten Ausdehnung. Die Breite bei halber Intensitätshöhe der PSF wird als Halbwertsbreite (*Full width at half maximum* - FWHM) bezeichnet.

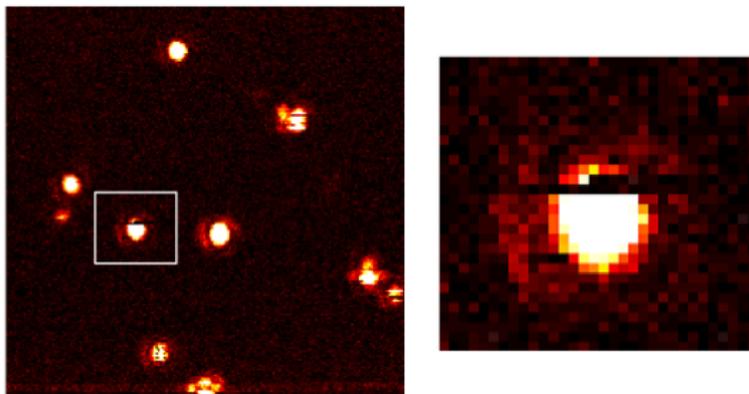


Abbildung 2.10: Abbildungen von einzelnen Cy5-Molekülen.

Für Einzelmoleküle gelten die in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Phänomene ebenso wie für ein Ensemble von Farbstoffen. Andere Phänomene sind auf der Ensembleebene durch die Mittelwertbildung nicht sichtbar, können daher nur auf der Einzelmolekülebene beobachtet werden und dienen so unter anderem als Kriterium für die tatsächliche Beobachtung einzelner Moleküle. Zunächst ist hier das Auftreten von Fluoreszenzauszeiten zu nennen, sei es durch den reversiblen Übergang in einen nichtfluoreszierenden Zustand oder sei es durch irreversible Photozerstörung. Abbildung 2.10 zeigt die Punktabbildungsfunktionen eines Cy5 Moleküls, das im hervorgehobenen Fall reversibel blinkt.

Bei der spektral- und zeitaufgelösten Mikroskopie (SFLIM) [40] fällt das Fluoreszenzlicht im Detektionsarm auf einen dichroitischen Strahlteiler, der es je nach Wellenlänge entweder reflektiert oder transmittiert. So fällt das Fluoreszenzphoton entweder auf Detektor 1 oder Detektor 2. Die Detektoren bestehen aus hochempfindlichen Avalanche-Photo-Dioden (APDs). Hier erzeugt jedes auftreffende Photon ein Ausgangssignal. Das Ausgangssignal der APDs wird in eine spezielle Messkarte für das zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen (TCSPC) eingespeist. Jedes eintreffende Photon erhält eine Information, wann nach Beginn des Experiments es detektiert wurde (makroskopische Zeit) und auf welchem Detektor es auftraf. Ferner kann, wenn für das Experiment ein gepulster Laser verwendet wird, die mikroskopische Zeit des Zeitabstands zwischen vorangegangenem Laserpuls und Detektion gespeichert werden. Die erste Information ermöglicht eine zeitabhängige Darstellung in einer Fluoreszenzspur (Abb. 2.11).

Befindet sich nur ein Molekül im Anregungs- und Detektionsfokus, so zeigt diese Spur genau zwei charakteristische Zustände der Fluoreszenz (einen An- und einen Aus-Zustand), wie in Abbildung 2.11a zu sehen ist. Bei diesem Molekül spricht man von "Blinken". Finden sich mehrere Intensitätsstufen innerhalb der Fluoreszenzspur, so spricht dies für ein Vorhandensein mehrerer Moleküle im Fokus, die durch unterschiedliche Kombinationen ihrer An- und Aus-Zustände diese Stufen er-

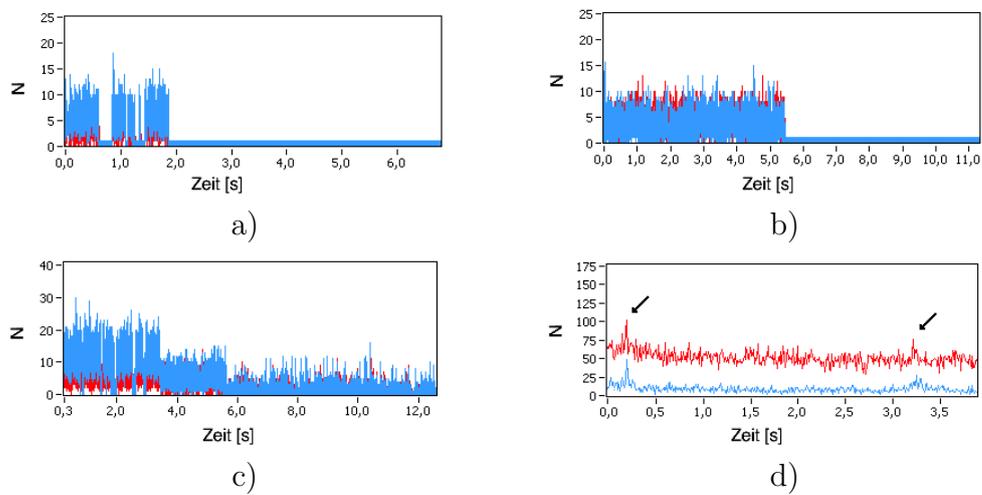


Abbildung 2.11: Zeitabhängige Fluoreszenzspuren (Intensität des langwelligen Kanals in rot, die des kurzwelligen in blau): a) zeigt das Fluoreszenzsignal eines einzelnen Moleküls, welches zwischen An- und Aus-Zustand wechselt; b) zeigt die irreversible Photozerstörung eines Einzelmoleküls; c) zeigt die irreversible Photozerstörung zweier Moleküle; d) zeigt Fluoreszenzbursts (markiert mit schwarzen Pfeilen), ausgelöst von durch den Fokus diffundierenden Molekülen.

zeugen (Abb. 2.11c). Hier werden zwei Moleküle nacheinander photozerstört. Abb. 2.11b zeigt die irreversible Photozerstörung eines einzelnen Moleküls. Ist ein einzelnes angeregtes Molekül nicht ortsfest, sondern diffundiert es durch den Laserfokus, so erzeugt es eine Fluoreszenzburst, wie in Abb. 2.11d zu sehen ist. Durch ein Verschieben der Probe mittels einer Scanbühne kann mit der Information der Makrozeit ein zweidimensionales Bild (Abb. 2.10) der Probe erstellt werden. In beiden Darstellungen können unter anderem Intensitätsgradienten beobachtet werden. Aus den mikroskopischen Ankunftszeiten lässt sich eine Fluoreszenzabklingkurve rekonstruieren, aus der sich ein mittlerer Wert für die Fluoreszenzlebensdauer bestimmen lässt. Anhand der Information, auf welchem Detektor das Photon auftraf, kann das Signal spektral aufgelöst und in einer Spur dargestellt werden. Für jeden Punkt eines Bildes wird der F_2 -Wert gebildet, der eine Aussage über die spektrale Verteilung macht und bestimmt wird über

$$F_2 = \frac{I_{det2}}{I_{det2} + I_{det1}}, \quad (2.18)$$

wobei I_{det1} die Fluoreszenzintensität auf dem ersten Detektor und I_{det2} die auf dem zweiten ist. In Abbildung 2.11 ist die Intensität auf dem langwelligen Kanal rot, die auf dem kurzwelligen blau dargestellt.

2.4 Weitfeld-Mikroskopie

Während im Fall der konfokalen Mikroskopie der Laserstrahl parallel in das Objektiv eingekoppelt wird und so auf ein Anregungsvolumen von wenigen Femtolitern fokussiert wird, wird bei der Weitfeld-Mikroskopie eine parallele Ausleuchtung eines größeren Probenvolumens erreicht. Hierfür wird der Laserstrahl auf die Zwischenbildebene des Objektivs fokussiert (siehe Abbildung 2.12) und verlässt dieses in einem parallelen Strahl. Der so ausgeleuchtete Bereich wird auf einen Detektor abgebildet. Als Detektor wird eine digitale Kamera mit einem CCD-Chip verwendet. Aufgrund der hohen Quantenausbeute der aktuellen CCD-Kameras ist eine Abbildung von einzelnen, fluoreszierenden Molekülen möglich. Ein Nachteil der Weitfeld-Mikroskopie ist, dass keinerlei Einschränkung der Anregung der Probe in z-Richtung erreicht wird. Dies verschlechtert das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Abbildung im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie. Eine Methode, die Anregung in z-Richtung einzuschränken, ist die Totale Interne Reflektions (Fluoreszenz)-Mikroskopie (TIRF).

2.4.1 Totale Interne Reflektions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie

Totale Interne Reflektions Fluoreszenz-Mikroskopie beruht auf dem Effekt, dass ein Lichtstrahl, der auf eine Grenze zwischen einem optisch dichteren und einem optisch dünneren Medium trifft, nicht nur gebrochen, sondern auch reflektiert wird.

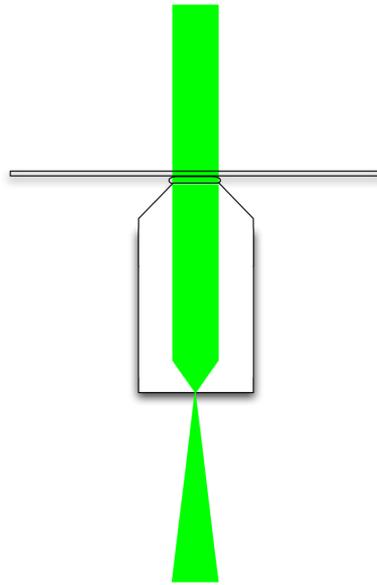


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Ausleuchtung einer Probe im Weitfeld-Modus. Der Laserstrahl wird auf die Zwischenbildebene des Objektivs fokussiert und verlässt dieses als parallelen Strahl mit einem bestimmten Durchmesser.

Überschreitet der Einfallswinkel des Lichtstrahls einen bestimmten Wert, so wird dieser totalreflektiert. Die Bedingung für diesen Winkel findet sich in dem 1621 von Snellius beschriebenen Snelliusschen Brechungsgesetz.

$$n_1 \sin \Phi_1 = n_2 \sin \Phi_2 \quad (2.19)$$

Hier ist n_1 der Brechungsindex des Austrittsmediums, n_2 der Brechungsindex des Eintrittsmediums, Φ_1 der Einfallswinkel und Φ_2 der Brechungswinkel. Bei einem Brechungswinkel von $\Phi_2 = 90^\circ$ als Grenzbedingung und $n_1 > n_2$ ergibt sich für den kritischen Einfallswinkel

$$\Phi_1 = \arcsin \left(\frac{n_2}{n_1} \right) \quad (2.20)$$

Ein zweiter, für die TIRF-Mikroskopie unabdingbarer Effekt besteht darin, dass trotz Totalreflektion ein sehr geringer Teil der Lichtenergie die Grenzfläche passiert (siehe Abb. 2.13). Jenseits dieser bildet sich ein evaneszentes Feld aus, dessen Intensität exponentiell mit dem Abstand zu der Grenzfläche abnimmt. Die Eindringtiefe d der evaneszenten Welle in das optisch dünnere Medium ist definiert als der Abstand zwischen Grenzfläche und dem Punkt, an dem die Intensität auf $1/e$ abgeklungen ist. Sie ist abhängig von der Wellenlänge λ_0 des verwendeten Lichts und dem Einfallswinkel.

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi \sqrt{(\sin \Phi_1 / \sin \Phi_2) - 1}} \quad (2.21)$$

Nur in einem Bereich nahe der Grenzfläche (ca. bis 100 nm) reicht die Intensität der evaneszenten Welle aus, um Fluorophore anzuregen. So wird nicht nur Streulicht aus anderen Teilen der Probe vermieden, sondern auch Fluoreszenzlicht aus tieferen Ebenen unterdrückt. Dieses führt zu einer starken Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses.

2.5 Möglichkeiten der Auflösungserhöhung

2.5.1 Auflösungsbegrenzung in der Lichtmikroskopie

Wie bereits von Abbe (Abbe1873) beschrieben, ist die Auflösung von optischen Instrumenten durch das Phänomen der Beugung begrenzt. Beugung führt dazu, dass das über ein Linsensystem erzeugte Bild einer Punktlichtquelle nicht punktförmig ist, sondern sich in Form eines Airy-Scheibchens mit einer gewissen Ausdehnung darstellt (siehe Abb. 2.14). Erfolgt die Abbildung mit einer Linse der Brennweite f und mit dem Durchmesser D , so bestimmt sich der Radius des zentralen Airy-Scheibchens r über

$$r = 1,22\lambda \frac{f}{D} \quad (2.22)$$

wobei λ die Wellenlänge des Lichts ist. Das Rayleigh-Kriterium 2.15 besagt, dass zwei Punktlichtquellen genau dann noch voneinander unterschieden werden können, wenn das Intensitätsmaximum der ersten Punktlichtquelle in das erste Intensitätsminimum der zweiten Punktlichtquelle fällt. Somit ergibt sich der minimale Abstand Δd , den zwei Punkte haben müssen, damit sie noch als zwei Objekte erkannt werden können, aus

$$\Delta d = 1,22 \frac{\lambda}{2n \sin \Phi} \quad (2.23)$$

wobei die λ Wellenlänge des abbildenden Lichts, n der Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Probe und Φ der halbe Öffnungswinkel des Objektivs ist. Der Term $n \sin \Phi$ wird als die numerische Apertur (NA) des Objektivs bezeichnet. Bei einer numerischen Apertur von z.B. 1,45 und einer Wellenlänge von 450 nm, beträgt Δd 190 nm, das heißt, zwei Punkte oder Strukturen müssen lateral mindestens 190 nm voneinander entfernt sein, damit sie getrennt wahrgenommen werden können. Die theoretische axiale Auflösung wird beschrieben durch

$$\Delta z = 0,88 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad (2.24)$$

wobei n wiederum der Brechungsindex des Immersionsmediums und NA die numerische Apertur des Objektivs ist. In jüngster Vergangenheit wurden eine Vielzahl

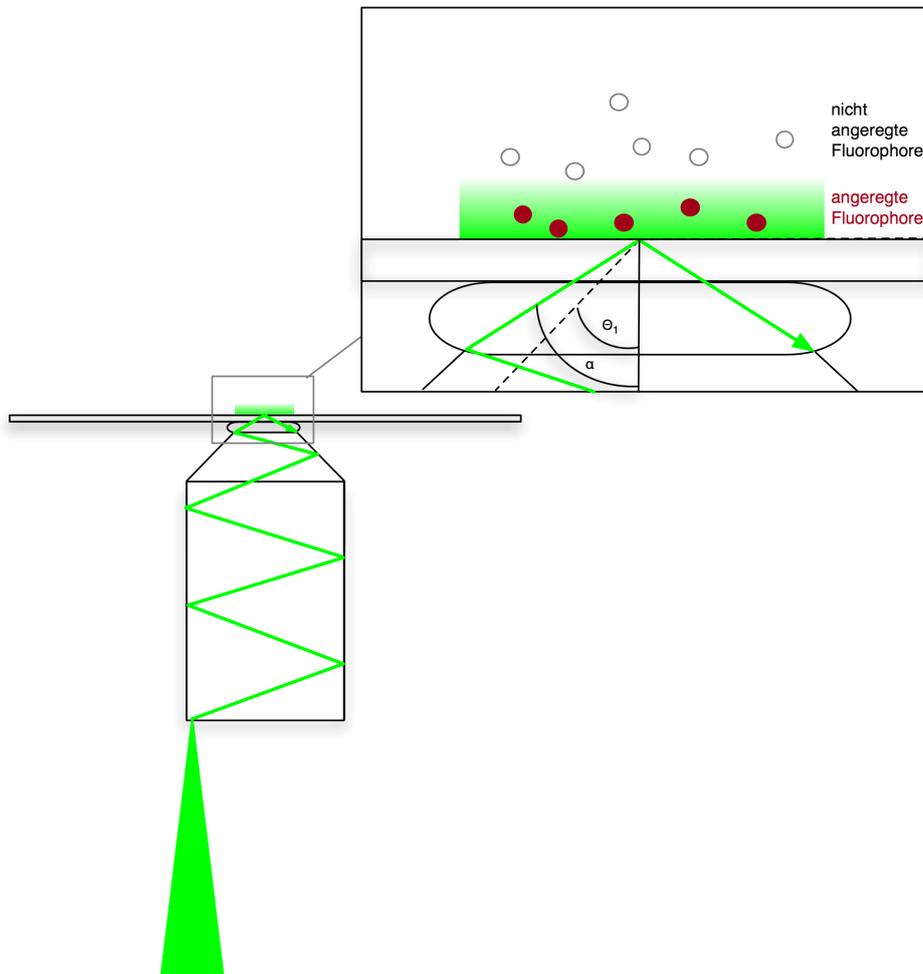


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung der Ausleuchtung einer Probe im TIRF-Modus. Der Fokus des Anregungslasers wird an den Rand der Zwischenbildebene des Objektivs verschoben. Hierdurch wird das Anregungslicht mehrmals im Objektiv reflektiert und trifft unter einem Winkel α auf die Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe. Wenn dieser größer ist als der kritische Einfallswinkel Θ_1 nach dem Snellius'schen Brechungsgesetz, wird der Anregungslichtstrahl totalreflektiert. Hierbei entsteht ein evaneszentes Feld, das nur ca. 100 nm in die Probe eindringt, so dass nur in diesem Bereich Fluorophore angeregt werden.

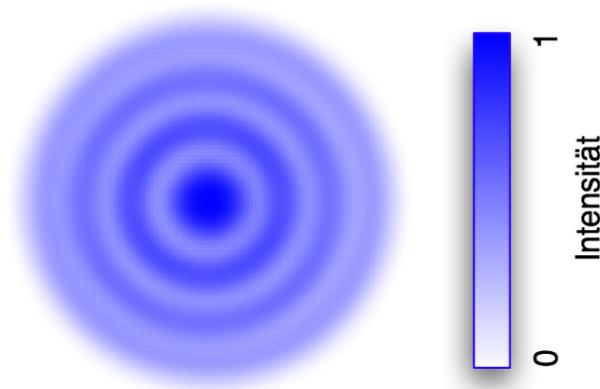


Abbildung 2.14: Zweidimensionale Darstellung der Intensitätsverteilung der Punktabbildungsfunktion eines einzelnen Moleküls mit Maxima und Minima. Dieses Muster wird als Airy-Scheibchen bezeichnet.

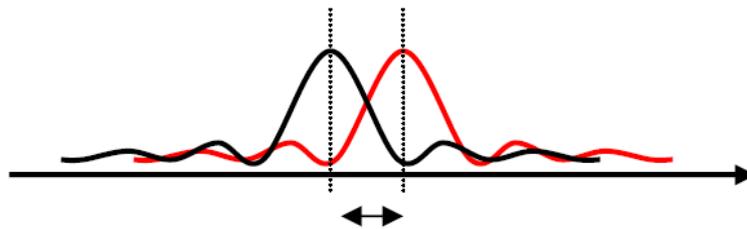


Abbildung 2.15: Eindimensionale Darstellung der Intensitätsverteilung der Punktabbildungsfunktionen zweier Moleküle. Der kleinste Abstand, bei dem die Punktabbildungsfunktionen noch zwei verschiedenen Lichtquellen zugeordnet werden können, ist gegeben, wenn das Hauptmaximum der einen Punktabbildungsfunktion in das erste Minimum der zweiten Punktabbildungsfunktion fällt. Dieses Kriterium wird als Rayleighkriterium bezeichnet. (nach [1])

von Methoden entwickelt, diese Auflösungsbegrenzung der Lichtmikroskopie zu umgehen. Ein Großteil von ihnen basiert auf dem Schalten von Fluorophoren zwischen einem fluoreszierenden An- und einem nicht fluoreszierenden Aus-Zustand.

2.5.2 Determiniertes Schalten zur Auflösungserhöhung - das RESOLFT-Konzept

Im RESOLFT (Reversible Saturable Optical Fluorescent Transitions)-Konzept [41] werden optisch sättigbare Übergänge eines Fluorophores in einen nicht fluoreszierenden Zustand genutzt, um die Auflösung von konfokalen Laserrastermikroskopen zu erhöhen, indem diese Übergänge im Randbereich des Anregungsfokuses induziert werden und dieser dadurch praktisch verkleinert wird. Der einzige bisher realisierte Vertreter des RESOLFT-Konzepts ist die STED (Stimulated Emission Depletion) Mikroskopie [17]. Im Fall der STED-Mikroskopie wird ausgenutzt, dass Fluorophore nicht nur aus ihrem Grundzustand in einen höheren energetischen Zustand angeregt werden können, sondern auch durch stimulierte Emission aus diesem höheren Zustand abgeregt werden können. Für die stimulierte Emission (Abb. 2.16) wird das Fluorophor mit rotverschobenem Licht bestrahlt. Die Anregungsenergie des Fluorophores wird in Form eines Photons des Abregungslichts abgegeben, das spektral gut von der Fluoreszenz zu unterscheiden ist. Das Aussenden eines Fluoreszenzphotons wird so unterdrückt. Aus dem abgeregten Zustand können die Fluorophore anschließend wieder angeregt werden, so dass die Forderung der reversiblen Übergänge erfüllt ist.

Das rotverschobene Abregungslicht wird in der praktischen Anwendung durch eine Null-Moden-Phasenmaske zu einem Doughnut-förmigen Laserstrahl mit einer Nullstelle im zentralen Bereich geformt. Dieser wird dann dem, in seinem Ausmaß beugungsbegrenzten, Anregungsfokus des konfokalen Laserrastermikroskops überlagert (siehe Abb. 2.17). So wird Fluoreszenz im Randbereich des Spots unterdrückt, während sie in der Nullstelle erhalten bleibt. Wird die Intensität des Abregungslichts erhöht, so wird der Bereich, in dem Fluoreszenz möglich ist, weiter eingeschnürt. Wird mit diesen kombinierten Laserstrahlen eine Probe abgerastert, zeigt das entstehende Bild eine bessere Auflösung als es mit einem standardmäßigen konfokalen Anregungsfokus der Fall wäre. Die Beziehung über den minimalen Abstand, den zwei Punkte voneinander haben müssen, um noch getrennt dargestellt werden zu können, kann damit zu

$$\Delta d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I/I_{sat}}} \quad (2.25)$$

erweitert werden, wobei λ die Wellenlänge des abbildenden Lichts, n der Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Probe und α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs ist. I ist die Intensität des verwendeten Abregungslichts und I_{sat} die Sättigungsintensität, die definiert ist als die Intensität bei der die Fluoreszenz eines Fluorophores mit einer Wahrscheinlichkeit von 63% unter-

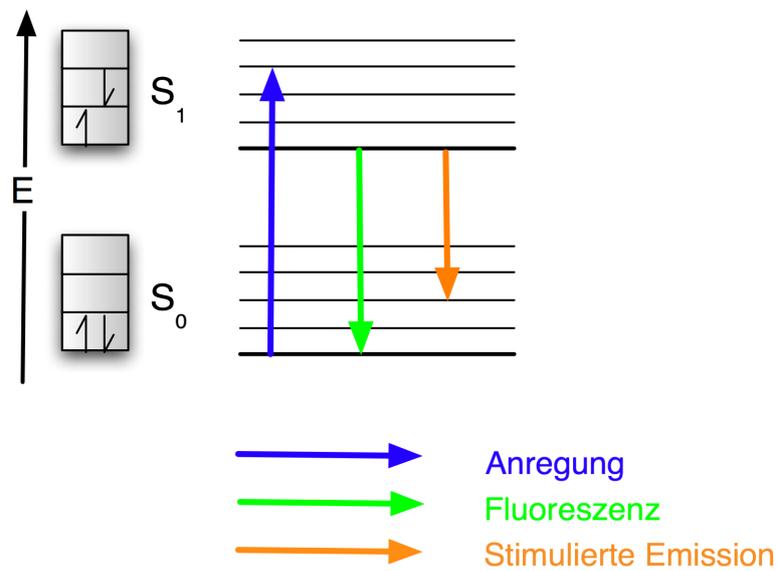


Abbildung 2.16: Das Prinzip der stimulierten Emission. Ein angeregtes (blau) Fluorophor kann aus diesem Zustand durch stimulierte Emission abregert werden. Wird das angeregte System mit Licht einer im Vergleich zur Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge rot verschobenen Wellenlänge bestrahlt, so emittiert es ein Photon derselben Wellenlänge und kehrt so in den Grundzustand zurück (orange). Dadurch wird die Abregung durch Aussenden eines Fluoreszenzphotons (grün) unterdrückt.

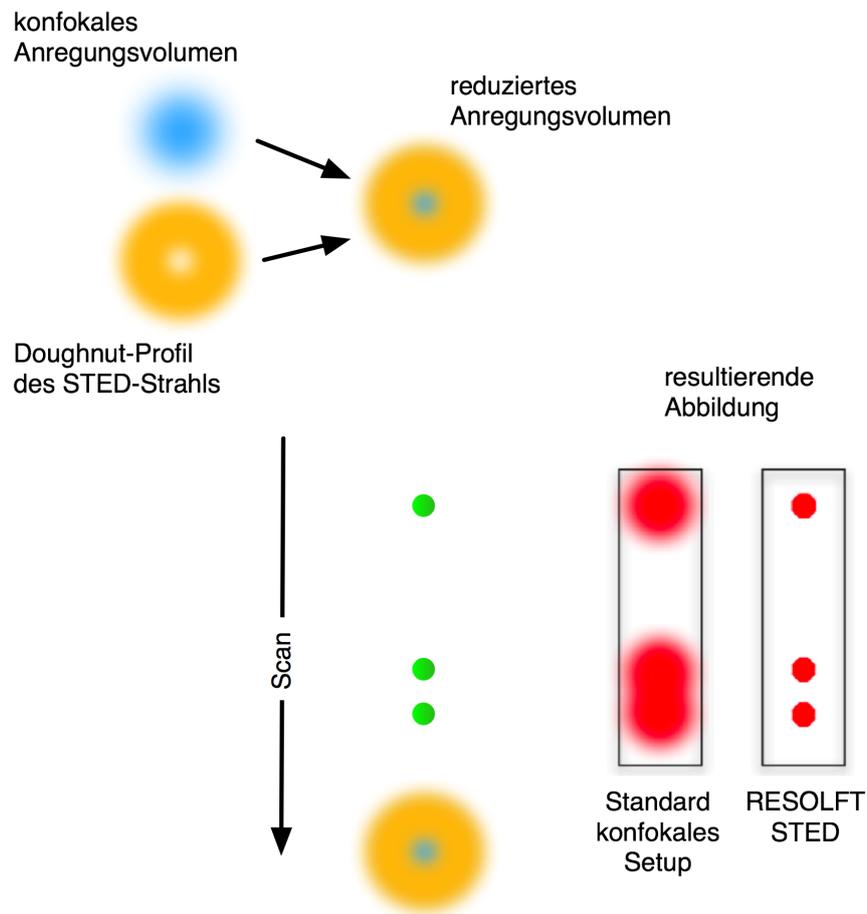


Abbildung 2.17: Das STED Prinzip: Einem Anregungsfokus (blau) eines konfokalen Mikroskopaufbaus wird ein ringförmiger Laserstrahl der Abregungswellenlänge (gelb) überlagert. Hierdurch wird der Bereich des Anregungsfokuses, mit dem tatsächlich Fluoreszenz detektiert werden kann, eingeschnürt. Werden nun Fluorophore mit diesem Konstrukt abgerastert, so resultiert ein Bild mit deutlich verkleinerten Punktabbildungsfunktionen der Moleküle und folglich einer erhöhten Auflösung.

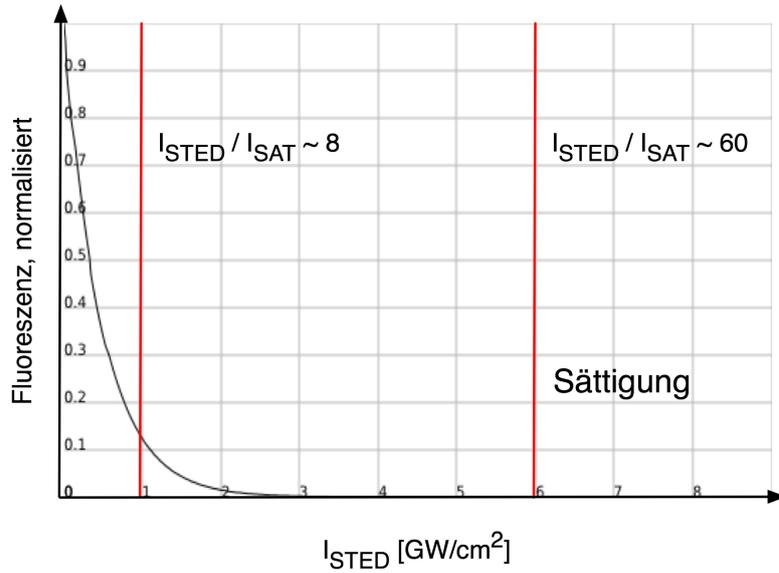


Abbildung 2.18: Die Fluoreszenz sinkt exponentiell mit der Höhe der verwendeten STED-Intensität I_{STED} . Ist die im STED-Verfahren verwendete Intensität I_{STED} um ein Vielfaches größer als die Sättigungsintensität I_{sat} der stimulierten Emission (zweiter Schwellenwert), so wird die Fluoreszenz nahezu vollständig unterdrückt.

drückt wird. Die Sättigungsintensität ist abhängig von dem Wirkungsquerschnitt der stimulierten Emission σ und der Lebensdauer τ der Fluorophore im angeregten Zustand [42]:

$$I_{sat} = (\sigma\tau)^{-1} \quad (2.26)$$

Standardmäßige Fluorophore haben Wirkungsquerschnitte der stimulierten Emission von $\sim 10^{-17}\text{cm}^2$ und Lebensdauern von ~ 1 ns. Es ergibt sich hieraus eine ungefähre Sättigungsintensität von 10^{26} Photonen $(s\text{ cm}^2)^{-1}$, was ca. $30\text{ MW}(\text{cm}^2)^{-1}$ im sichtbaren Bereich des Spektrums entspricht. Wird eine Abregungsintensität I verwendet, die deutlich größer ist als I_{sat} , erhöht sich der Sättigungsgrad von der stimulierten Emission und die Fluoreszenz der Fluorophore wird nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 2.18). Für eine deutliche Auflösungserhöhung bedarf es einer Übersättigung dieses Wertes innerhalb der Einschnürung des Anregungsfokuses. Daher sind Ausgangsintensitäten des STED-Lichts über $1\text{GW}(\text{cm}^2)^{-1}$ nötig. Diese hohe Intensität führt zu einer schnellen Photozerstörung der Fluorophore und zu einem starken Einfluss auf die abgebildete Probe. Eine Stabilisierung der Fluorophore gegen Photozerstörung kann durch den Einsatz verschiedener Anti-Photozerstörungs-Reagenzien erreicht werden. So konnte Kasper [43] auflösungserhöhte Bilder einzelner Moleküle aufnehmen, die durch den

ROXS-Puffer [44] stabilisiert wurden. Photoschalter, die zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht fluoreszierenden Zustand geschaltet werden können, können prinzipiell auf gleiche Weise im Rahmen des RESOLFT-Konzepts für die Auflösungserhöhung eingesetzt werden. Photoschalter, die auf photochromen Molekülen als Schalteinheiten basieren, zeigen eine hohe Stabilität in beiden Zuständen und somit eine lange Lebensdauer. Daraus ergibt sich, dass die Sättigungsintensität des Übergangs in den nicht fluoreszierenden Zustand in diesem Fall wesentlich niedriger ist als im Fall der STED-Mikroskopie. Dieses führt zu einer geringeren Photozerstörung der Fluorophore und einem geringeren Einfluss auf die abgebildete Probe.

2.5.3 Lokalisation einzelner Moleküle und Bildrekonstruktion - Stochastisches Schalten zur Auflösungserhöhung

Die Auflösungserhöhung der stochastischen Methoden wird durch eine zeitliche Trennung der Signale einzelner Emittter und deren präzisen Lokalisation [4–6, 11–13] erreicht. Die zeitliche Separation der Signale wird dadurch hervorgerufen, dass sich, statistisch verteilt, nur ein Teil der Fluorophore in einem fluoreszierenden An-Zustand befindet, während sich der Großteil in einem nicht fluoreszierenden Aus-Zustand befindet. Die Fluorophore können durch bestimmte Beeinflussung (meist durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge und Leistung) zwischen diesen beiden Zuständen geschaltet werden. So kann zwar nicht determiniert beeinflusst werden, welcher Fluorophor sich in welchem Zustand befindet, doch es kann das Verhältnis von Fluorophoren im An- zu den Fluorophoren im Aus-Zustand bestimmt werden. Dies ist möglich, da die Prozesse des Schaltens zwischen den einzelnen Zuständen linear von der Leistung des zum Schalten benötigten Lichts abhängig sind. Wird dieses Verhältnis so eingestellt, dass die Dichte der Fluorophore im An-Zustand sehr niedrig ist, können die Punktabbildungsfunktionen einzelner Emittter ohne zu überlappen abgebildet werden. Wenn gesichert ist, dass man das Signal eines einzelnen Emittters detektiert hat, so ist es erlaubt, das Intensitätsprofil der Punktabbildungsfunktion (siehe Abb. 2.19) mit einer 2-dimensionalen Gaussverteilung anzunähern. Die Intensität der Punktabbildungsfunktion am Punkt x, y wird beschrieben über

$$I(x, y) = I_0 \times \exp\left(\frac{-(x - x_0)^2}{2\sigma^2}\right) \times \exp\left(\frac{-(y - y_0)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (2.27)$$

wobei σ die Standardabweichung der Gaussfunktion ist und x_0 und y_0 die Koordinaten des Mittelpunkts sind. Diese Koordinaten stellen die Position des Emitters da. Die Genauigkeit, mit der diese Position bestimmt werden kann, ist abhängig von der Anzahl der emittierten Photonen N im Intensitätssignal [3].

$$\Delta x, \Delta y = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (2.28)$$

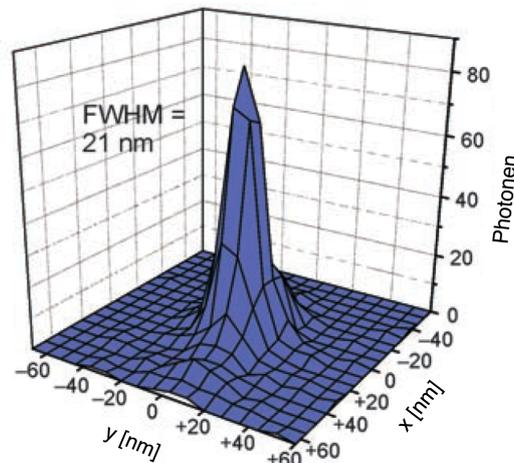


Abbildung 2.19: Zweidimensionale Gauss-Näherung einer Punktabbildungsfunktion einer Punktlichtquelle. Über die Näherung ist es möglich, die Position der Punktlichtquelle zu bestimmen.

Das Hintergrundsignal beeinflusst durch Autofluoreszenz oder benachbarte Sonden im Aus-Zustand die Genauigkeit der Lokalisation.

Es konnte von van de Linde [19] und Cordes [18] außerdem gezeigt werden, dass das Auflösungsvermögen abhängig von dem Verhältnis der Lebensdauern des Aus- und des An-Zustands ist. Sie beschrieben eine verbesserte Auflösung, wenn die Lebensdauer des Aus-Zustands deutlich länger ist als die des An-Zustands.

Innerhalb des Abbildungsprozesses werden mehrere Aufnahmen von Signalen einzelner Emittter gemacht, deren Position lokalisiert und gespeichert. Das stochastische Schalten der Fluorophore führt dazu, dass in jedem Bild eine andere Untergruppe von Emitttern Fluoreszenz emittiert und lokalisiert werden kann. Nach der Aufnahme einer endlichen Anzahl von Bildern wird aus den lokalisierten Positionen ein neues Bild rekonstruiert, dessen Auflösung nur noch von der Genauigkeit abhängig ist, mit der die Lokalisationen durchgeführt werden können. Es ist somit deutlich höher aufgelöst als ein mit herkömmlicher Fluoreszenz-Mikroskopie aufgenommenes Fluoreszenzbild.

Der Prozess der Rekonstruktion eines hochaufgelösten Bildes mit Hilfe von stochastischem Schalten ist in Abb. 2.20 dargestellt. Die Methoden des stochastischen Schaltens zur Auflösungserhöhung können danach unterschieden werden, ob das Schalten zwischen einem fluoreszierenden An-Zustand und einem nicht-fluoreszierenden Aus-Zustand reversibel oder irreversibel ist. Im Fall des nicht reversiblen Schaltens werden photoaktivierbaren oder photokonvertierbaren fluoreszierende Proteinen als Fluoreszenzsonden verwendet. Hier wird jeder einzelne Emittter nur einmal lokalisiert, nachdem er aus einem nicht fluoreszierenden Zustand photo-

aktiviert oder aus einem spektral anders gelegenen Zustand photokonvertiert wird. Nach der einmaligen Lokalisation wird der Emitter irreversibel photozerstört. Dies führt einerseits zu einer geringeren Verlässlichkeit der Lokalisation, andererseits zu einer erhöhten Genauigkeit der Quantifizierung der Zahl der Emitter. Auf die Methoden der Mikroskopie zur Auflösungserhöhung mit fluoreszierenden Proteinen wird im weiteren in Kapitel 2.7.1 eingegangen.

2.6 Photochrome Systeme

Photochromie ist definiert als eine durch elektromagnetische Strahlung angeregte reversible Transformation zweier chemischer Spezies ineinander, wobei die Spezies sich hinsichtlich ihrer Absorption unterscheiden. [45]. Die Transformation von Zustand A in Zustand B (Abb. 2.21) erfolgt durch Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge, die Rückreaktion von B zu A kann wiederum durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge geschehen. In diesem Fall spricht man von P-Typ-Photochromie. Die Rückreaktion kann auch thermisch (T-Typ-Photochromie) oder durch chemische Einflüsse induziert sein. Normalerweise findet die Bildung des Produkts B von einem angeregten Zustand des Edukts A aus statt. Dieses ist sowohl aus einem angeregten Singulett-Zustand, in den das Molekül durch Absorption eines Photons gelangt, als auch aus einem angeregten Triplett-Zustand möglich. Eine Eigenschaft, die die Qualität eines photochromen Systems definiert, ist die Widerstandsfähigkeit gegen Ermüdungserscheinungen, also gegen Degradation zu Nebenprodukten während der photochromen Reaktionen. Auch wenn Photochromie per Definition ein nicht-destruktiver Prozess ist, können Verluste von photochromem Material besonders durch Oxidation auftreten [46]. Eng mit der Widerstandsfähigkeit gegenüber Degradation hängt die Zahl der möglichen Schaltzyklen (Von A nach B und wieder zurück nach A) zusammen. Wenn x die Fraktion der Moleküle ist, die während eines Schaltzyklus degradieren, und n die Anzahl der Schaltzyklen, so gilt für die Menge der unzerstörten Fraktion y nach n Zyklen:

$$y = (1 - x)^n \quad (2.29)$$

Es gibt eine Vielzahl photochromer Verbindungen mit verschiedenen dem Schaltverhalten zugrunde liegenden Mechanismen, die in den letzten Jahren intensiv untersucht und weiterentwickelt wurden. Über diese wird in Tabelle 2.1 [45, 47] ein kurzer Überblick gegeben. In der vorliegenden Arbeit beschäftigte ich mich mit Verbindungen der Klassen Diarylethene und Spiropyrane, weshalb diese jeweils in eigenen Kapiteln beschrieben werden.

Um die Photochromie von Diarylethenen und von Spiropyranen zu verstehen, werden im folgenden Kapitel zunächst die Farbigkeit von organischen Molekülen und der Einfluss der Länge des konjugierten π -Systems auf die Absorption besprochen.

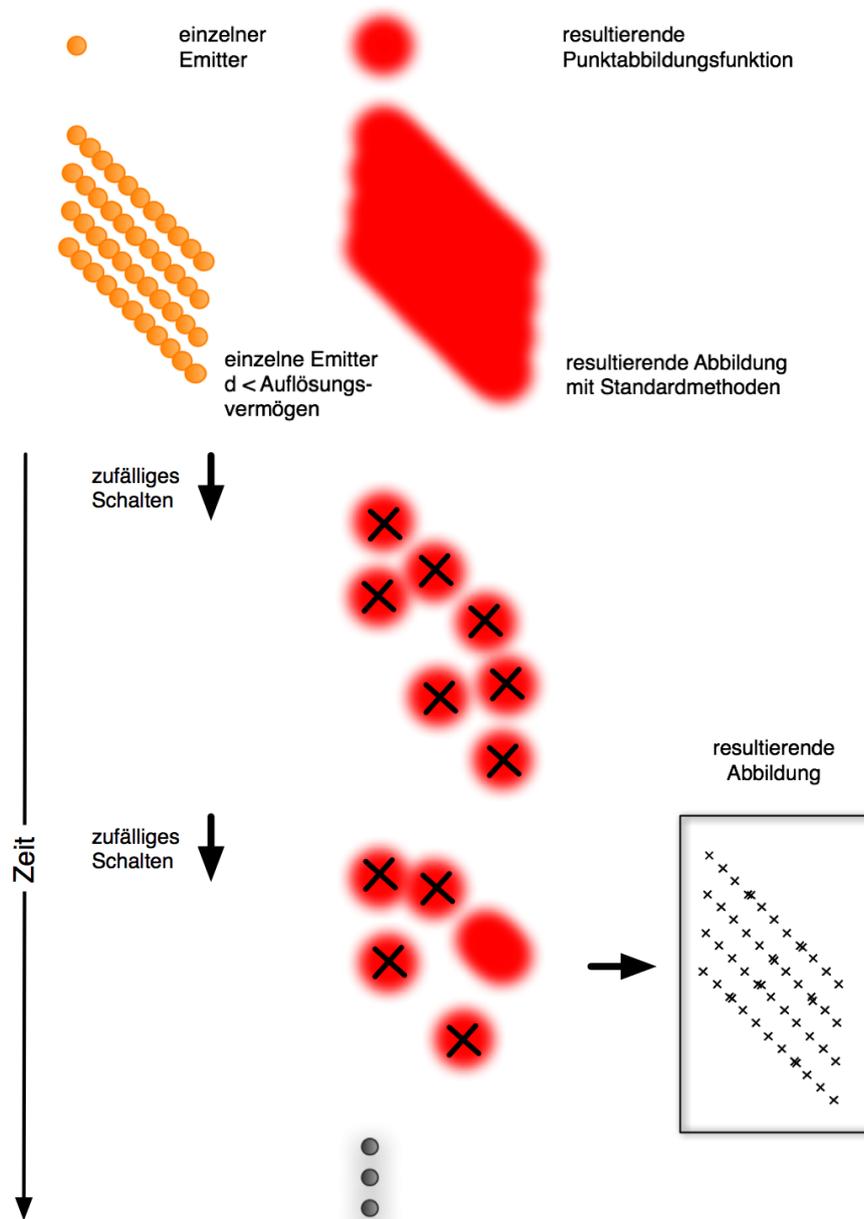


Abbildung 2.20: Das STORM-Prinzip: Fluorophore, die mit herkömmlichen Mikroskopiemethoden nicht gegeneinander aufgelöst werden können, werden so manipuliert, dass sich jeweils nur eine Teilmenge im An-Zustand befindet. Liegt die Punktabbildungsfunktion eines einzelnen Moleküls vor, so kann seine Position lokalisiert werden. Dies wird mehrmals wiederholt, wobei die Moleküle statistisch zwischen den An- und dem Aus-Zustand wechseln. Die gespeicherten Positionen aller lokalisierten Moleküle werden zu einem Bild rekonstruiert, in dem die Strukturen unterhalb der Auflösungsgrenze zu erkennen sind. Aufgrund des stochastischen Schaltprozesses kann es zu einer mehrfachen Lokalisation einzelner Moleküle kommen.

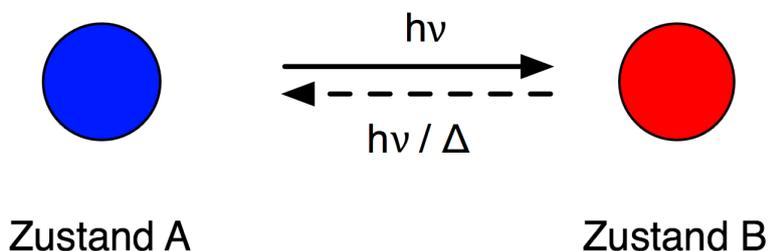


Abbildung 2.21: Ein photochromes Molekül kann durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge von einem Zustand A in einen Zustand B überführt werden. Aus dem Zustand B kann das Molekül durch Bestrahlung mit einer anderen Wellenlänge, thermisch oder durch chemische Beeinflussung in den Zustand A zurückkehren. Die beiden Zustände unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Absorption.

Tabelle 2.1: Mechanismen der Photochromie und Beispiel-Verbindungen, die diesem Mechanismus folgen

Mechanismus	Beispiel-Verbindung
<i>E</i> zu <i>Z</i> -Isomerisierung von Kohlenstoff-Doppelbindungen	Stilbene [48], Azobenzene [49], Retinale [50]
Pericyclische Reaktionen: Elektrocyclische Reaktionen	Oxirane, Spirodihydroindolizine [51], Diarylethene [28–30], Fulgide [32], Spirooxazine, Spiropyrane [27, 31], Azulene [52], Arylolefine [53]
Pericyclische Reaktionen: Cycloadditionen und Cycloreversionen	Norbornadiene [45]
Tautomerisierung (Protonen-Transfer)	Salicylidenanilinen [51]
Redox-Photochromie	Silberchlorid [54]
Sonstige Photochrome Reaktionen (z.B. Dissoziationsreaktionen, Triplet-Triplett-Anregungen etc.)	

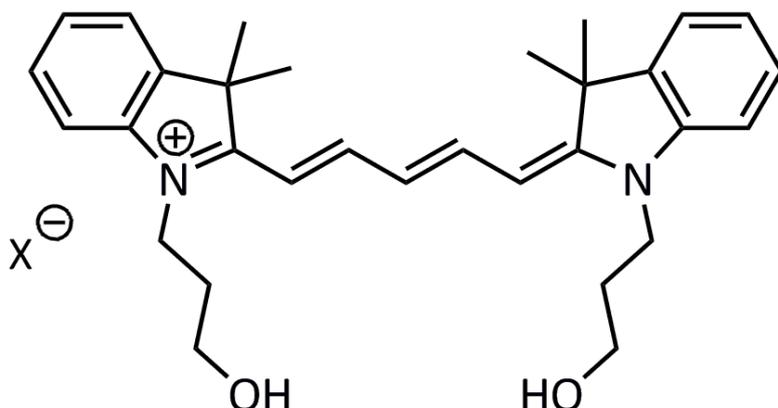


Abbildung 2.22: Chemische Struktur eines Cy5 Moleküls als Beispiel für ein Molekül mit einem ausgedehnten konjugierten π -System

2.6.1 Die Farbigkeit eines Moleküls

Die Farbigkeit organischer Farbstoffe beruht im Allgemeinen auf einem System konjugierter Doppelbindungen [55]. So wird ein molekulares System bezeichnet, in dem man abwechselnd Einzel- und Doppelbindungen findet (siehe beispielsweise Abb. 2.22). Dieses abwechselnde Auftreten ist eine vereinfachte Darstellung. Tatsächlich sind die Elektronen aus den bindenden π -Molekülorbitalen über die gesamte Länge des Systems delokalisiert. Durch Absorption von Licht kann eines der Elektronen aus dem bindenden π -Molekülorbital in das antibindende π^* -Molekülorbital angeregt werden. Bei Systemen mit mehr als einer Doppelbindung springt das Elektron von dem highest occupied molecular orbital (HOMO), dem höchsten bindenden Molekülorbital, in das lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), dem niedrigsten antibindenden Molekülorbital.

Um den Einfluss der Länge des konjugierten π -Bindungssystem auf die Absorptionsbanden und damit die Farbigkeit des Moleküls zu verstehen, wird an dieser Stelle das Modell des "Elektrons im Kasten" genutzt. Das hier in einen Kasten eingesperrte Elektron sei dasjenige, das bei Absorption aus dem Grundzustand in einen energetisch höherliegenden Zustand angeregt wird.

Ein Elektron kann sowohl Teilchen- als auch Wellencharakter zeigen (Welle-Teilchen-Dualismus). Nach de Broglie kann der Zusammenhang zwischen den Teilchen- und den Welleneigenschaften über die Beziehung:

$$m \cdot v = h/\lambda \quad (2.30)$$

- m Masse
- v Geschwindigkeit
- h Plank'sches Wirkungsquantum
- λ (De Broglie) Wellenlänge

beschrieben werden. Hieraus und aus

$$W_{kin} = m \cdot v^2 / 2 \quad (2.31)$$

resultiert als kinetische Energie W_{kin} eines Elektrons:

$$W_{kin} = h^2 / 2m\lambda^2 \quad (2.32)$$

Die Bewegungsmöglichkeiten des Elektrons seien nun auf einen eindimensionalen Kasten atomarer Größe beschränkt. Das Elektron kann als stehende Welle innerhalb dieses Kastens beschrieben werden. Damit die Ausbildung einer stehenden Welle mit Nullstellen an den Kastenwänden möglich ist, muss gelten, dass die Kastenlänge L ein Vielfaches der halben Wellenlänge des Elektrons ist.

$$\lambda = 2L/n \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (2.33)$$

Diese Beziehung wird als Quantenbedingung bezeichnet. Durch Einsetzen dieser Bedingung in 2.32 ergibt sich als kinetische Energie des Elektrons im Schwingungszustand n

$$W_{kin}(n) = (h^2 / 8mL^2) \cdot n^2 \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (2.34)$$

Zur Vereinfachung wird angenommen, dass die potentielle Energie des Elektrons innerhalb des Kastens konstant sei und an den Kastenwänden unmittelbar unendlich ansteigt.

Als Gesamtenergie des Elektrons ergibt sich somit:

$$W_{ges}n = W_{kin}n + W_{pot} = (h^2 / 8mL^2) \cdot n^2 + b \quad n = 1, 2, 3, \dots, b = \text{konstant} \quad (2.35)$$

Wird angenommen, dass in einem Molekül einer bestimmten Länge L die Bewegungsmöglichkeiten aller Elektronen aus π -Molekülorbitalen auf diese Länge beschränkt sind. Bei N Doppelbindungen finden wir N bindende π -Molekülorbitale und N antibindende π^* -Molekülorbitale. Diesen $2N$ Molekülorbitalen können die Schwingungszustände 1 bis $2N$ zugeordnet werden (siehe Abb. 2.23). Die Elektronen werden im Grundzustand auf die niedrigsten Energieniveaus (bindende π -Molekülorbitale) verteilt, wobei ein bestimmtes Energieniveau mit nur jeweils zwei Elektronen besetzt werden darf.

Bei einer Anregung springe ein Elektron aus dem Energieniveau N (HOMO) in das Energieniveau $N + 1$ (LUMO). Für die hierfür benötigte Anregungsenergie gilt:

$$W_{anr} = W(N + 1) - W(N) \quad (2.36)$$

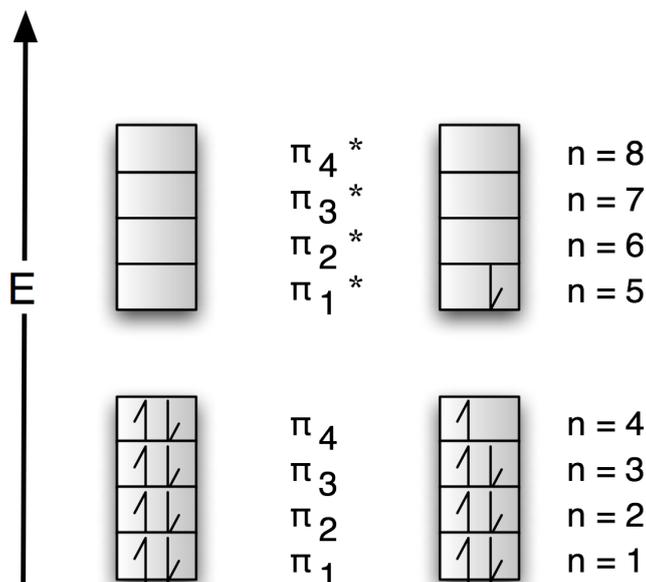


Abbildung 2.23: Verteilung der bindenden Elektronen eines Moleküls in die bindenden und antibindenden (*) π -Orbitalen, die 1 - n Schwingungszuständen zugeordnet werden können. Im linken Fall befindet sich das Molekül im Grundzustand, im rechten im angeregten Zustand.

$$\begin{aligned}
 W_{\text{anr}} &= \left[\frac{h^2}{8mL^2} (N+1)^2 + \text{konst.} \right] - \left[\frac{h^2}{8mL^2} N^2 + \text{konst.} \right] \\
 &= \frac{h^2}{8mL^2} [(N+1)^2 - (N^2)] \\
 &= \frac{h^2}{8mL^2} (2N+1)
 \end{aligned} \tag{2.37}$$

Hieraus ist ersichtlich, dass die Anregungsenergie umgekehrt proportional zum Quadrat der Kastenlänge, das bedeutet der Länge des konjugierten π -Systems, ist. Je länger das konjugierte π -System ist, desto geringer ist die nötige Anregungsenergie. Wegen des Zusammenhangs zwischen Energie und Wellenlänge eines Photons kann die Anregung mit Photonen immer längerer Wellenlänge erfolgen.

Die oben gemachten Bemerkungen zur Abhängigkeit der benötigten Anregungsenergie zur Ausdehnung des konjugierten π -Systems beziehen sich auf planare konjugierte Systeme. Stehen zwei Molekülteile mit konjugierten Doppelbindungen in einem bestimmten Winkel zueinander, ist das delokalisierte π -System unterbrochen. Die Elektronen dieser nun kürzeren π -Systeme werden einzeln mit entsprechenden höheren Energien angeregt.

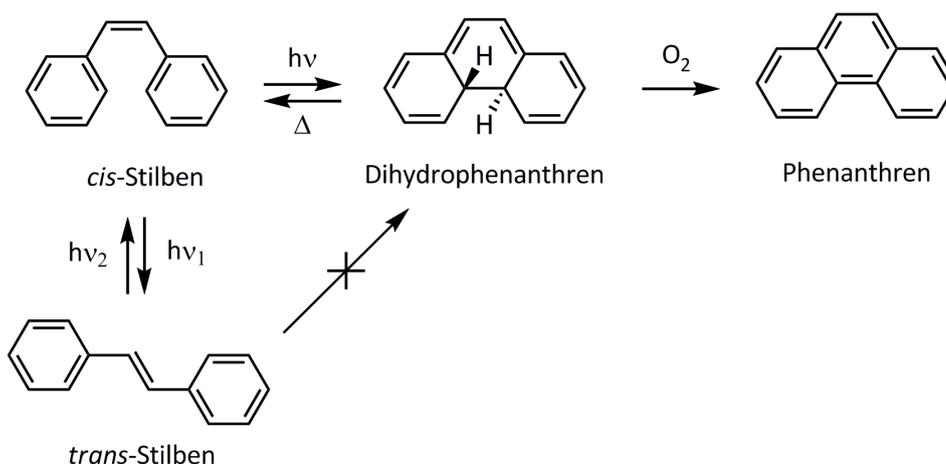


Abbildung 2.24: Das einfachste Diarylethen Stilben kann unter dem Einfluss von Licht sowohl eine *cis-trans*-Isomerisierung als auch eine Elektrocyclisierung in die geschlossene Form durchlaufen. Aus der geschlossenen Form kann es thermisch in die offene Form zurückkehren oder zum irreversiblen Endprodukt Phenanthren oxidiert werden.

2.6.2 Photochromie der Diarylethene

Als photochrome Diarylethene werden Verbindungen bezeichnet, die an 1- und 2-Position einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung (Ethenbindung) aromatische Gruppen besitzen [28]. Das Diarylethen mit der einfachsten Struktur ist das Stilben [56, 57] (Abb. 2.24). Dieses Molekül kann unter dem Einfluss von Licht zwei verschiedene Isomerisierungen erfahren: Eine *cis-trans*-Isomerisierung und eine Elektrocyclisierung, die auch für die Photochromie der komplizierteren Diarylethene verantwortlich ist.

Die Elektrocyclisierung geht von der *cis*-Form des Diarylethens aus. Im Rahmen dieses Prozesses kommt es zu einer Umverteilung von 6 π -Elektronen. Die Umverteilung der Elektronen resultiert in einer Einfachbindung zwischen den beiden aromatischen Funktionalitäten. Das so entstandene Isomer bezeichnet man als geschlossene Form, während die Ausgangsform als offene Form bezeichnet wird. Die Umverteilung der Elektronen führt zu einer geometrischen Strukturveränderung des Moleküls. Irie [58] beschreibt für das Molekül 1,2-bis(2,5-dimethyl-3-thienyl)perfluorocyclopentene eine Verringerung der Breite der Basis von 1,01 auf 0,9 nm und eine Vergrößerung der Höhe von 0,49 auf 0,56 nm. Aufgrund der geometrischen Strukturveränderung wird das Molekül signifikant flacher, also planar. In der offenen Form konzentrieren sich zwei konjugierte π -Systeme auf die beiden aromatischen Ringe des Diarylethens. Da innerhalb des Moleküls die Ringstrukturen gegeneinander verdreht sind (Abb. 2.25), haben die aromatischen π -Systeme eine geringe Konjugation miteinander und das Molekül absorbiert im kurzwelligen Bereich. Nach Anregung mit passendem kurzwelligem Licht kann das Molekül nicht

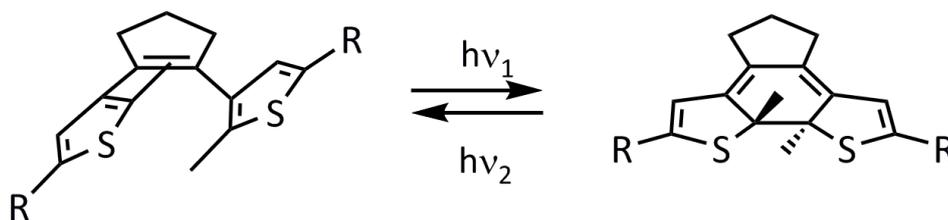


Abbildung 2.25: Schaltmechanismus der Diarylethene: In der offenen Form sind die Bestandteile des Moleküls gegeneinander verdreht. Der Ringschluss führt zu einem ausgedehnten konjugierten π -System.

nur in seinen Ausgangszustand zurückkehren, sondern es kann mit hoher Wahrscheinlichkeit die Elektrocyclisierung zur geschlossenen Form durchlaufen. Hiernach liegt das Molekül planar vor und das konjugierte π -System ist über das gesamte Molekül delokalisiert. Durch das verlängerte π -System kommen Absorptionsbanden im langwelligen Bereich zustande. Durch Anregung mit passendem, langwelligen Licht kann das Molekül wiederum mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit in seine offene Form zurück überführt werden. Abb. 2.25 zeigt die offene Form und die geschlossene Form eines Diarylethens in einer dreidimensionalen Darstellung und Abb. 2.26 die korrespondierenden Absorptionsspektren.

Um die Eigenschaften der Diarylethene im Hinblick auf eine mögliche Anwendbarkeit z.B. für optische Datenspeicherung zu verbessern, wurden in der Vergangenheit vielfache Modifikationen an Diarylethensystemen vorgenommen und die entstehenden Verbindungen untersucht. Vielversprechende Abwandlungen der Diarylethene finden sich in der Klasse der Dithienylethene [59]. Hier werden die beiden aromatischen Ringe durch Thiophenringe ersetzt (siehe Abb. 2.25), was die thermische Stabilität der geschlossenen Form erhöht. Die 2- und die 5-Position der Thiophenringe ist mit einer Methylgruppe substituiert, was die Oxidation der geschlossenen Form, welche zu einem irreversiblen Endprodukt führen würde (vgl. Abb. 2.24), verhindert. An weiteren Positionen der Thiophenringe können zusätzliche Funktionalitäten eingeführt werden. Um die *cis-trans*-Isomerisierung der Doppelbindung zu verhindern, werden die beiden Kohlenstoffatome der Ethengruppe in eine Ringstruktur, bestehend aus 5 oder 6 Atomen verschiedener Elemente, eingeschlossen (Abb. 2.25). So kann nur noch die Isomerisierung zwischen der offenen und der geschlossenen Form stattfinden.

In verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten wurde festgestellt, dass Dithienylethene über einige Eigenschaften verfügen, die sie auch im Kontext der Photoschalter für hochauflösende Mikroskopie interessant machen [28]:

- Beide Isomere weisen eine hohe thermische Stabilität auf.
- Der Schaltprozess weist eine hohe Reversibilität auf. Das Schalten von der offenen in die geschlossene Form und zurück kann bis zu 10^5 mal wiederholt werden, ohne dass mehr als 20 % der Moleküle degradieren.

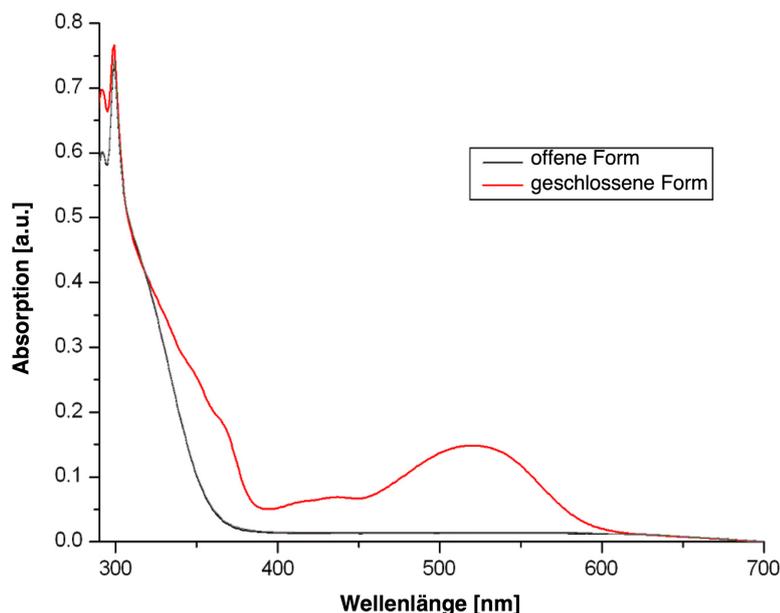


Abbildung 2.26: Absorptionsspektren der offenen (schwarz) und der geschlossenen (rot) Form eines Diarylethens

- Die Quantenausbeute des Schaltprozesses von der offenen in die geschlossene Form ist relativ hoch. Sie liegt bei einigen Diarylethenen zwischen 0,5 und 1.
- Die Antwortzeiten auf einen Anregung des Schaltprozesses in Richtung von offener in die geschlossene Form und für den umgekehrten Prozess sind für einige Diarylethene sehr kurz, nämlich kürzer als 10 ps.

2.6.3 Photochromie der Spiropyrane

Spiropyrane sind Moleküle, in denen ein *2H*-Pyran über das gesättigte Kohlenstoffatom in 2-Position in einer Spiroverbindung mit einer weiteren Ringstruktur verbunden ist. Im Kontext mit Photoschaltern wird der Begriff zusätzlich für Moleküle verwendet, in denen ein Benzospyran über dieses Kohlenstoffatom mit einer weiteren Ringstruktur verbunden ist [60].

Die Photochromie von Spiropyranen resultiert aus einer heterolytischen Bindungsspaltung zwischen Spirokohlenstoff und Sauerstoff des Pyrans bzw. der Bildung dieser Bindung in der umgekehrten Reaktion bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Abb. 2.27). Dieses geschieht in Form einer [4 + 2]-Elektrocyclisierung. In der Spiroform liegen die beiden Teile des Moleküls, die über den Spirokohlenstoff miteinander verbunden sind, gegeneinander im 90°-Winkel verdreht vor. Man findet folglich nur kurze konjugierte π -Systeme und Absorption im

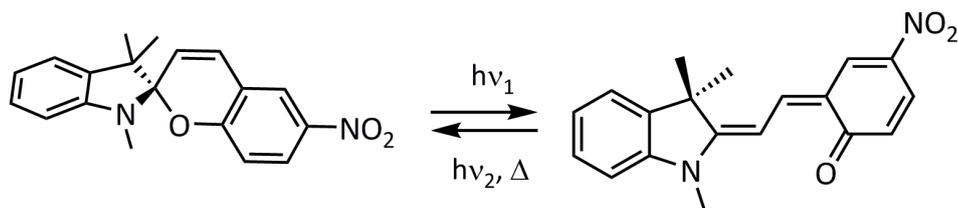


Abbildung 2.27: Schaltmechanismus der Spiropyrane: In der geschlossenen Form sind die Bestandteile des Moleküls gegeneinander verdreht. Die Ringöffnung führt zu einem ausgedehnten konjugierten π -System.

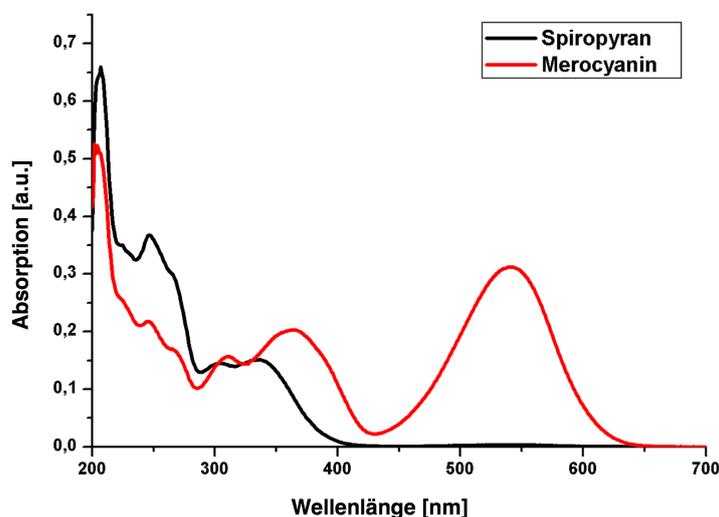


Abbildung 2.28: Absorptionsspektren von Spiropyran (schwarz) und Merocyanin (rot)

UV-Bereich. Durch die Absorption von UV-Licht findet die angesprochene elektrocyclische Reaktion statt. Das geöffnete Molekül liegt planar in seiner so genannten Merocyanin-Form vor. Diese zeigt durch das verlängerte konjugierte π -System auch Absorption von Licht im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Die Merocyaninform kann thermisch, aber auch durch Absorption von sichtbarem Licht wieder in die Spiropyran-Form zurückkehren. Abb. 2.27 zeigt ein Spiropyran, das durch Absorption von UV-Licht in seine Merocyanin-Form überführt werden kann und Abbildung 2.28 die korrespondierenden Absorptionsspektren. Beide Formen sind dreidimensional dargestellt.

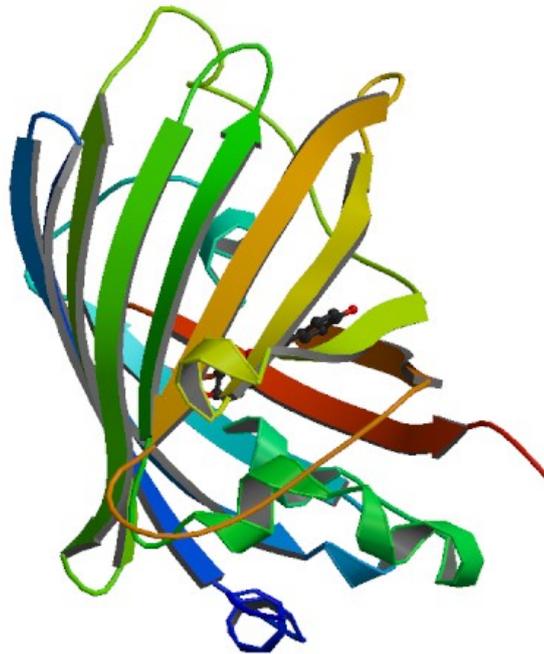


Abbildung 2.29: Kristallstruktur eines *Green Fluorescent Proteins* (Quelle: RCSB Protein Data Bank)

2.7 Fluoreszierende Proteine

Fluoreszierende Proteine haben gegenüber organischen Farbstoffen den großen Vorteil, dass sie direkt über genetische Kodierung an das interessierende Protein gebunden werden können. Der genetische Code des fluoreszierenden Proteins wird zwischen dem Code des interessierenden Proteins und dem Stopp-Kodon eingefügt. So werden beide Codes zusammen zu einem mit einem fluoreszierenden Protein markierten Protein transkribiert und translatiert. Farbstoffmarkierungen, die auf einer chemischen Kopplung beruhen, benötigen im Gegensatz dazu teilweise sehr invasive Färbeprozesse. Auch entstehen hierbei Probleme mit der Sensibilität und Sensitivität der Markierung, da zum einen nicht alle Targets markiert werden und zum anderen auch Falsch-Markierungen erfolgen. Dies ist bei genetischer Markierung durch fluoreszierende Proteine ausgeschlossen. Das erste entdeckte, natürlich von der Qualle *Aequorea victoria* produzierte fluoreszierende Protein ist das *Green Fluorescent Protein* (GFP) [61, 62]. Dieses wird seitdem vielfach als Markerprotein verwendet. Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren, von denen sich die Tripeptidsequenz Serin-Tyrosin-Glycin autokatalytisch in den Fluorophor umwandelt. Dieser liegt innerhalb einer von dem Rest der Polypeptidkette gebildeten, tonnenförmigen Struktur (siehe Abb. 2.29). Abb. 2.30 zeigt das Absorptions und Emissionsspektrum von GFP.

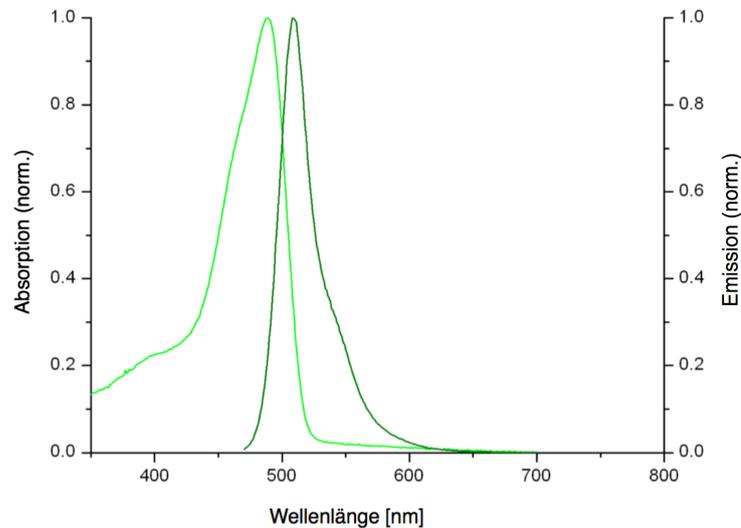


Abbildung 2.30: Absorptions- (hellgrün) und Emissionsspektrum (dunkelgrün) von GFP

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl weiterer fluoreszierender Proteine entdeckt oder entwickelt. Sie sind oft Derivate des GFP oder ähneln diesem bezüglich ihrer Struktur. Besonders Proteine, deren Absorption und Emission hin zu längeren Wellenlängen verschoben sind, haben den Vorteil, dass sie sich spektral von der Autofluoreszenz vieler biologischer Proben unterscheiden. Ferner hat man eine große Auswahl über einen weiten spektralen Bereich für Mehrfarbanwendungen oder für Untersuchungen auf Basis von FRET-Prozessen [63].

2.7.1 Fluoreszierende Proteine in der hochauflösenden Mikroskopie

Wie bereits beschrieben (1), sind schaltbare Fluorophore der Schlüssel zu einer Vielzahl von hochauflösenden Mikroskopiemethoden. Dies gilt auch für fluoreszierende Proteine, die von einem nicht fluoreszierenden in einen fluoreszierenden Zustand übergehen können. Dies gilt sowohl für reversibel als auch für irreversibel schaltbare Proteine. Weiterhin können Proteine verwendet werden, die photoinduziert zwischen Zuständen mit unterschiedlicher Absorption schalten. Eine Veränderung der Fluoreszenzwellenlänge ist die Folge. Ein Beispiel einer hochauflösenden Mikroskopiemethode mit Hilfe eines fluoreszierenden Proteins ist die PhotoActivated Localization Microscopy (PALM) [5, 7]. Im Fall der PALM wird mit photoaktivierbarem GFP (PA-GFP) [21] ein stochastischer Ansatz verwendet. Das PA-GFP, das sich zunächst in einem nicht fluoreszierenden Zustand befindetet, wird sukzessiv durch Bestrahlung mit Licht von 400 nm bei geringer Anregungsleistung in

Tabelle 2.2: Photoaktivierbare fluoreszierende Proteine

	Emissions- maximum nach Photoaktivierung [nm]	Aktivierungs- wellenlänge [nm]	Form
PA-GFP [21]	517	→ 400	Monomer
PS-CFP [65]	511	→ 400	Monomer
PA-mRFP1-1 [66]	605	→ 400	Monomer
PA-mCherry1 [67]	595	→ 400	Monomer

eine Form umgewandelt, in der es Fluoreszenz ($\Phi = 0,79$) bei einer zentralen Wellenlänge von 517 nm emittiert. Dadurch, dass die Rate der Umwandlung abhängig von der verwendeten Leistung bei 400 nm ist, kann sicher gestellt werden, dass die Dichte der aktivierten PA-GFP-Moleküle so niedrig ist, dass Signale von einzelnen Molekülen detektiert und deren Positionen mit hoher Genauigkeit lokalisiert werden können. Die photoaktivierten Fluorophore werden laufend irreversibel photozerstört, so dass die benötigte Fluorophor-Dichte erhalten bleibt. Auf diese Art konnten Strukturen unterhalb der Auflösungsgrenze dargestellt werden. In letzter Zeit wurde eine Vielzahl von ähnlichen Ansätzen mit einer ebensolchen Vielzahl verschiedener geeigneter fluoreszierender Proteine vorgestellt. Es konnte ebenfalls ein RESOLFT-artiger Ansatz mit dem reversibel schaltbaren Protein asFP595 vorgestellt werden [64]. Die für Anwendungen der Hochauflösung nutzbaren Proteine können unterschieden werden in:

- **Photoaktivierbare Proteine:** Diese zeigen vor ihrer Aktivierung keine oder nur geringe Fluoreszenz.
- **Photokonvertierbare Proteine:** Diese können von einem fluoreszierenden Zustand in einen zweiten fluoreszierenden Zustand, der spektral gut vom ersten zu trennen ist, verschoben werden.
- **Photoschaltbare Proteine:** Diese können reversibel zwischen zwei Zuständen geschaltet werden.

Die Tabellen 2.2, 2.3 und 2.4 zeigen einen Übersicht über die derzeit verfügbaren fluoreszierenden Proteine dieser drei Kategorien.

Tabelle 2.3: Photokonvertierbare fluoreszierende Proteine

	Emissionsmaximum vor und nach Pho- toaktivierung [nm]	Konvertierungs- wellenlänge [nm]	Form
Dendra [68]	505 / 575	→ 405 / 488	Monomer
Kaede [69]	518 / 582	→ 400	Tetramer
KikGR [70]	517 / 593	→ 400	Tertamer
mKikGR [71]	515 / 591	→ 405	Monomer
EosFP [22]	516 / 582	→ 390	Tetramer
mEosFP [22]	519 / 584	→ 405	Monomer
mEos2 [72]	516 / 582	→ 405	Monomer
dEosFP [22]	516 / 581	→ 390	Dimer

Tabelle 2.4: Photoschaltbare fluoreszierende Proteine

	Emissionsmaximum vor und nach Photoschalten [nm]	Schaltwellen- längen [nm]	Form
Dronpa [23, 24]	- / 518	→ 400 / ← 490	Monomer
rsFastLime [73]	- / 518	→ 480 / ← 405	Monomer
Padron [74]	- / 522	→ 530 / ← thermisch	Tetramer
KFP1 [75]	- / 600	→ 530 / ← thermisch ← 490 (irreversibel)	Tetramer
rsCherry [76]	- / 610	→ 550 / ← 450	Monomer
rsCherryREV [76]	- / 610	→ 450 / ← 550	Monomer
E ² GFP [77]	- / 523	→ 720 / ← 780	Monomer
nTFP0.7 [74]	- / 488	→ 380 / ← 453	Monomer

Material und Methoden

3.1 Ensemble-Messungen

3.1.1 Absorptionsspektrometer

Für die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten Absorptionsmessungen wurde ein UV/VIS-Spektrometer Lambda25 der Firma Perkin Elmer, USA, eingesetzt. Dieses deckt einen Wellenlängenbereich von 190 nm bis 1100 nm ab. Die Messungen wurden in Küvetten aus Quarzglas (Hellma, Deutschland) mit verschiedenen Volumina (1 ml, 500 μ l und 50 μ l) durchgeführt. Die Absorption A wird als natürlicher Logarithmus des Quotienten der Anfangsintensität I_0 zur Ausgangsintensität I beschrieben und hängt von dem Extinktionskoeffizienten ε der absorbierenden Spezies, derer Konzentration c und der Schichtdicke d ab. Sie folgt dem Lambert-Beerschen-Gesetz [34].

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon dc = A \quad (3.1)$$

Die Messungen wurden im μ M-Konzentrationsbereich durchgeführt, um ein Signal in einer für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis nötige Höhe zu erhalten, zum anderen um die Fluoreszenzanregung innerhalb der Probe möglichst gering zu halten. Die Messungen wurden ausschließlich bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.1.2 Fluoreszenzspektrometer

Die Aufnahme von Emissionsspektren sowie Emissionskinetiken erfolgte mit einem Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse der Firma Varian, Deutschland. Dieses deckt

einen Wellenlängenbereich von 200 nm bis 1100 nm ab. Mit diesem können im Scan-Modus sowohl ein gesamtes Spektrum bei einer bestimmten Anregungswellenlänge als auch im Kinetik-Modus das Emissionssignal bei verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen über die Zeit aufgenommen werden. Die Proben befanden sich bei diesen Messungen ebenfalls in Küvetten aus Quarzglas (Hellma, Deutschland) mit verschiedenen Volumina (1 ml, 500 μ l und 50 μ l). Die Messungen wurden bei Konzentrationen im μ M Bereich durchgeführt, um Artefakte durch Reabsorption zu vermeiden. Um Streulichteefekte zu verringern, erfolgten die Messungen über eine Photodiode, die im 90° Winkel zur Anregungslichtquelle angeordnet ist.

3.1.3 Real-time-Schallexperimente

Die Fluoreszenzkinetiken innerhalb der Schallexperimente wurden in einer Küvette auf einer selbst gebauten Anregungsbühne durchgeführt und mit einem Fluoreszenzspektrometer der Firma Ocean Optics, USA, aufgezeichnet. Abb. 3.1 zeigt dieses Setup. Zur Anregung bzw zum Schalten konnte Licht verschiedener Wellenlängen (488 nm, 514 nm und 568 nm) eines Argon-Krypton-Lasers (Innova 70C, Coherent, USA), das durch einen AOTF ausgewählt werden konnte, genutzt werden. Des weiteren standen die Wellenlängen 405 nm einer Laserdiode (Cube, Coherent, USA), 365 nm einer Nichia Diode oder UV-Licht einer Quecksilber-Lampe, die mit einem 337/75 Bandpass Anregungsfilter (AHF Analystechnik, Deutschland) verwendet wurde, zur Verfügung.

3.1.4 Lebensdauermessungen

Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer wurde ein 5000 MC Spektrometer (IBH, UK) mit gepulster Anregungslichtquelle verwendet. Die Datenaufnahme erfolgte über das so genannte zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen (TCSPC). Hierbei signalisiert der Puls einer als Anregungslichtquelle verwendeten Photodiode das Stoppsignal der Messung. Das eintreffende, detektierte Photon markiert den Startzeitpunkt der Messung. Die Zeit zwischen Start und Stoppzeitpunkt wird gemessen. Über den Abstand der Laserpulse kann man die Ankunftszeit des eintreffenden Fluoreszenzphotons berechnen. Die Bedingungen bezüglich der Konzentration und Anregungsleistung sind bei derartigen Messungen so gewählt, dass weniger als ein Photon pro Anregungspuls angeregt wird. Durch mehrmaliges Wiederholen der Messung wird ein Histogramm über die Verteilung der Ankunftszeiten der Photonen erhalten. Dieses weist einen exponentiellen Abfall auf und kann mit einem exponentiellen Zusammenhang (einfacher oder multipler Ordnung) angenähert werden. Aus dieser Annäherung ergibt sich die Fluoreszenzlebensdauer τ der untersuchten Probe. Es ist hierbei zu beachten, dass der Laserpuls selbst eine bestimmte Breite auf der Zeitskala besitzt. Dieser ist zwar etwa eine Größenordnung kürzer als die Fluoreszenzlebensdauer. Dennoch können durch den Laserpuls auch Moleküle angeregt werden, die bereits in den Grundzustand zurückgekehrt sind. Dies führt zu einer Verschiebung der Fluoreszenzabklingkurve zu längeren Zeiten. Zusätzlich

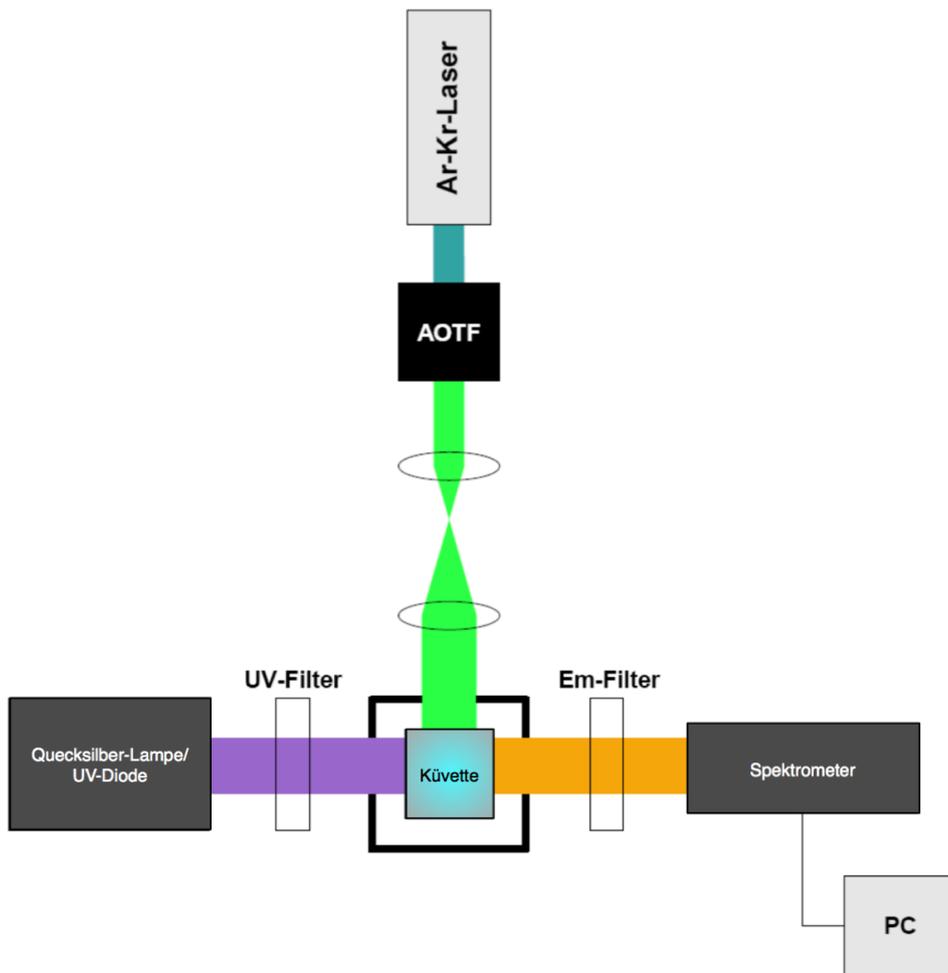


Abbildung 3.1: Aufbau der Messapparatur für die Real-Time-Fluoreszenz-Messungen. Die in der Küvette befindliche Probe wird durch farbiges Licht eines Argon-Krypton-Ionen-Lasers und zusätzlich mit UV-Licht bestrahlt. Das Fluoreszenzlicht wird mit einem Spektrometer detektiert.

ist die Fluoreszenzabklingkurve $N(t)$ mit den Impulsantworten von Laser und Detektor vermischt $L(t)$. Diese wird als Instrument-Antwort-Funktion bezeichnet. Sie wird vor Beginn des Experiments über eine Messung des Streulichts mit einer stark verdünnten Streususpension ohne fluoreszierende Farbstoffe und bei Detektion bei der Anregungswellenlänge bestimmt. Dieser Aspekt muss bei der Annäherung des Abfalls berücksichtigt werden. Dafür teilt man das gemessene Signal $R(t)$ in diese beiden Anteile auf, die über eine Faltung miteinander verknüpft sind [34].

$$R(t) = L(t) \otimes F(t) \quad (3.2)$$

$$R(t) = \sum_0^t L(t') \times F(t - t') dt' \quad (3.3)$$

Dieser Zusammenhang wird numerisch gelöst. Hierfür wird die Methode der geringsten Abweichungen als Näherungsverfahren verwendet. Ein Wert $R_{g(t)}$ wird geschätzt, dieser mit dem gemessenen Signal verglichen und die Abweichung beider bestimmt. Das Maß für die Güte der Abschätzung χ^2 ergibt sich aus

$$\chi^2 = \sum_{t=1}^n g_i (R(t) - R_g(t))^2 \quad (3.4)$$

wobei g_i ein Gewichtungsfaktor für die Qualität der Näherung ist. Der Annäherungsvorgang wird sooft wiederholt, bis χ^2 in einem Intervall zwischen 0,9 und 1,2 liegt. Je nach Absorptionseigenschaften der zu untersuchenden Probe stehen Photodioden mit verschiedenen Wellenlängen zur Verfügung. Für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern der fluoreszierenden Proteine wurde eine Diode mit einer zentralen Wellenlänge von 495 nm mit einer Repetitionsrate von 1 MHz und einer Pulslänge von ~ 1 ns (FWHM) verwendet. Typischerweise wurden 3000 Photonen im maximalen Kanal gesammelt, wobei 2048 Kanäle genutzt wurden.

3.2 Einzelmolekülspektroskopie

Die Detektion von einzelnen fluoreszierenden Molekülen stellt besondere Anforderungen an den verwendeten experimentellen Aufbau. Im Folgenden sollen die Eigenschaften und Komponenten zweier für diesen Zweck verwendeten Aufbauten (eines konfokalen und eines Weitfeld-Aufbaus) vorgestellt werden.

3.2.1 Konfokale Mikroskopie

Der Laser und der Anregungsarm

Als Anregungslichtquelle wurden bestimmte Wellenlängen eines Argon-Krypton-Lasers (Innova 70C, Coherent, USA) durch einen Akusto-Optischen-Filter

(AA.AOTF.nC, AA.Optics, Frankreich) ausgewählt. Hierdurch ist es möglich, innerhalb von $\sim 2 \mu\text{s}$ zwischen den Anregungswellenlängen zu schalten. Es wurden die Wellenlängen 488 nm oder 568 nm verwendet. Über den Akusto-Optischen Filter (AOTF) kann die Anregungsintensität gesteuert werden. Um geringe Abweichungen der verschiedenen Laserlinien, die aus einer unvollständigen Kompensation der Streuung durch den AOTF resultieren, auszugleichen, wurden die Anregungsstrahlen mit Hilfe einer Singlemode-Faser (460 HP, Nufern, USA) gereinigt und übereinandergelegt.

Das Mikroskop

In den Versuchsaufbau integriert ist ein konfokales Mikroskop vom Typ Olympus IX70 (Olympus, Deutschland). Das Anregungslicht wird über einen Akusto-Optischen Strahlteiler (AOBS, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Deutschland) in das Mikroskop eingekoppelt. Der AOBS ist außerhalb des Mikroskops positioniert, während sich im Filter-Würfel an dem Platz, der ursprünglich für einen Strahlteiler reserviert war, ein hochreflektierender Spiegel befindet. Zusätzlich befindet sich ein Teleskop zwischen dem AOBS und dem Objektiv, um die unterschiedlichen Aperturen beider anzupassen. Hier wird ein Ölimmersionsobjektiv der Firma Olympus mit einer 100-fachen Vergrößerung und hohen numerischen Apertur von 1,45 verwendet. Dieses fokussiert das Anregungslicht und sammelt das Fluoreszenzlicht. Die Emission wird durch den AOBS vom Anregungslicht separiert. Auf dem Mikroskop befindet sich ein 3D-Piezoscantisch, der das Scannen der Probe ermöglicht. Der Piezoscantisch ist vom Typ P-517.3CL von der Firma Physikinstrumente, Göttingen, Deutschland. Mit dessen Hilfe kann die Probe in x- und y-Richtung jeweils um $100 \mu\text{m}$ verschoben werden. Die Ansteuerung des Tisches erfolgt computergestützt mit einer Analog-Output-Karte (PXI 6602, National Instruments, USA).

Der Detektionsarm

Auf den AOBS folgend finden sich ein weiterer Strahlteiler, mit Hilfe dessen das Emissionslicht spektral aufgetrennt wird. Im Detektionsarm wird das Signal von Streueinflüssen durch Einbau eines Bandpass-Filters (AHF Analysentechnik, Deutschland) mit passenden spektralen Eigenschaften in den Strahlengang gereinigt. Ein System aus Linsen in jedem Detektionskanal reinigt den Emissionsstrahl mit Hilfe von Lochblenden auf und fokussiert das Licht auf die aktiven Bereiche der Detektoren. Hier werden Avalanche Photodioden (AQR-15, Perkin Elmer Optoelectronics, USA) als Detektoren verwendet. Avalanche Photodioden sind für die Detektion einzelner Photonen geeignet, da sie durch den Avalancheeffekt eine innere Verstärkung und zudem eine sehr geringe Totzeit besitzen. Für jeden durch ein Photon ausgelösten Puls wird das Signal im FIFO-Modus unter Speicherung der Makrozeit, der Mikrozeit und des Detektionskanals durch eine time-correlated single photon counting-Karte (TCSPC, SPC-830, Becker&Hickl, Berlin) aufgenom-

Tabelle 3.1: Verwendete Filter und Strahlteiler im Aufbau des konfokalen Mikroskops bei der Charakterisierung der fluoreszierenden Proteine.

Fluoreszierendes Protein	Anregungswellenlänge	Anregungsbandpass	Strahlteiler im Detektionsarm
eGFP, eYFP,	488 nm	HQ520/40M*	
DsRED, mCherry, mOrange	488, 568 nm	HQ520/40M* HQ600/40M*	DC560LP**

* Chroma Technology, USA

** Omega, USA

men. Die Abbildung 3.2 zeigt den Aufbau der Messapparatur.

Die Software zur Ansteuerung des gesamten Setups und zur Aufnahme der Fluoreszenzsignale, DaqLineScan, wurde mit LabView 6.1. erstellt [78].

Die Auswertung der Daten

Die Software zur Auswertung der Fluoreszenzsignale aus dem konfokalen Laser-aufbau, AnnaLineScan und FifoScreenBurst, wurde mit LabView 6.1. erstellt. Die Farbskala eines Bildes, auf dem die Photonenzahl (Counts) der einzelnen Pixel des Bildes dargestellt werden, kann manuell festgelegt werden, um einen hohen Informationsgehalt zu gewährleisten. Abbildung 3.3 zeigt eine solche Farbskala. Pixel mit Photonenzahlen unter dem minimalen Intensitätsthreshold werden schwarz dargestellt, Pixel mit Photonenzahlen über dem maximalen Intensitätsthreshold weiß. Der Bereich zwischen diesen Werten wird über den Farbverlauf von schwarz über rot und gelb zu weiß dargestellt. Der F_2 -Wert wird über einen Farbverlauf von rot zu blau wiedergegeben.

3.2.2 Weitfeld-Mikroskopie

Für die Schaltexperimente der Schalter in Konjugaten und in intermolekularen Experimenten sowie für die Bestimmung der Schaltraten von Cy5 und die Versuche einer hochauflösenden Mikroskopie mit eGFP wurde ein konventioneller Weitfeld-aufbau verwendet.

Der Laser und der Anregungsarm

Als Anregungslichtquelle wurde ein Argon-Krypton-Laser (Innova 70C, Coherent, USA) im Multiline-Betrieb verwendet. Die gewünschte Anregungswellenlänge wurde durch einen Akusto-Optischen-Filter (AOTFnC-VIS-TN 1001,

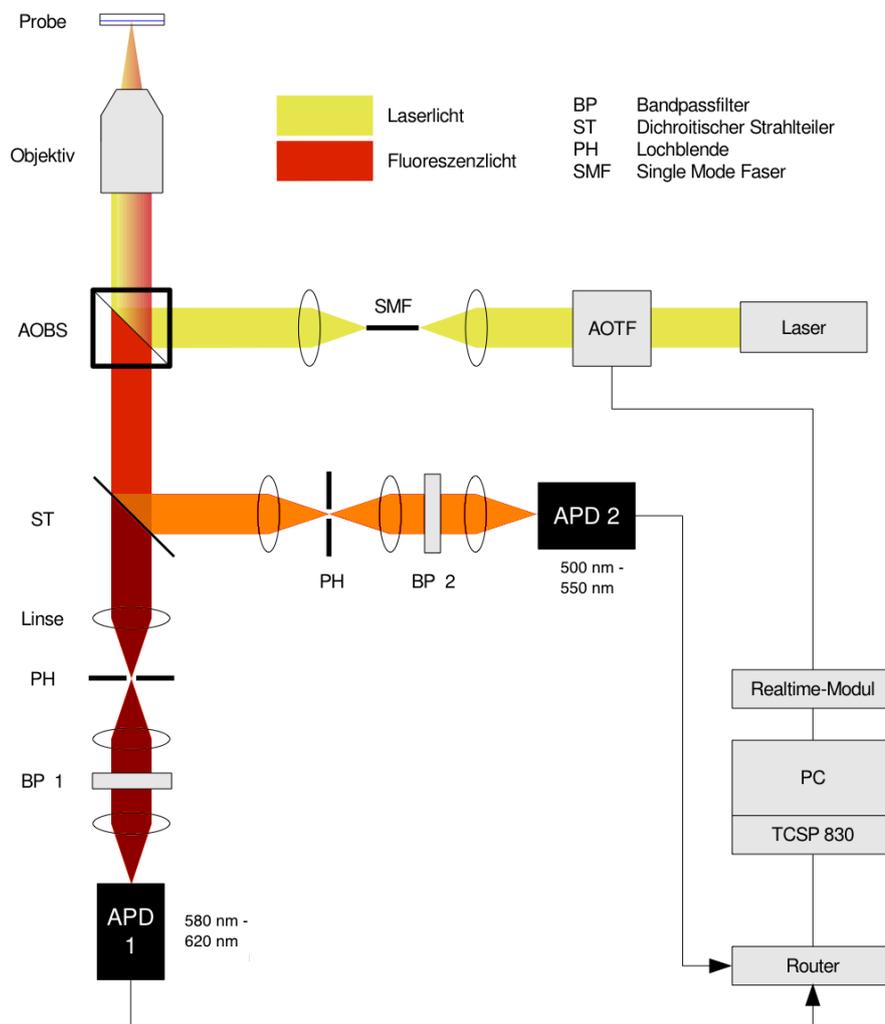


Abbildung 3.2: Aufbau des konfokalen Mikroskops. In gelb ist der Anregungsstrahlengang dargestellt. Der Emissionsstrahlengang, der durch einen Strahlteiler auf zwei APDs aufgeteilt wird, ist in rot dargestellt.

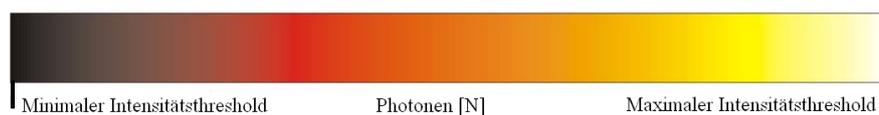


Abbildung 3.3: Farbskala eines Bildes, auf dem die Intensität dargestellt wird. Die Thresholds sind frei wählbar.

Opto-Electronics, Frankreich) ausgewählt. Hier wurden die Wellenlängen 488 nm, 514 nm oder 568 nm verwendet. Über den Akusto-Optischen-Filter (AOTF) kann die Anregungs-Intensität gesteuert werden. Eine exakte Überlagerung der Laserstrahlengänge wurde erreicht, in dem die Anregungsstrahlen durch eine Singlemode-Faser geleitet wurden. Die Fokussierung in die Zwischenbildebene des Objektivs erfolgt über ein Linsensystem. Mit Hilfe eines Spiegels kann der Fokus des Anregungslichts für die Methode der Totalen Internen Reflektions (Fluoreszenz) (TIRF)-Mikroskopie an den Rand des Objektivs bewegt werden. Dadurch passiert der Anregungsstrahl das Linsensystem nicht mehr senkrecht in der Mitte der Apertur, sondern wird im Objektiv reflektiert und verlässt dessen Öffnung unter einem bestimmten Winkel. Über die Position bei Eintritt in das Objektiv kann der Austrittswinkel beeinflusst werden. Dieser wird im TIRF-Modus so gewählt, dass es zur Totalreflexion am Übergang zum Deckglas kommt. Das Prinzip der TIRF wird detailliert in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Mikroskop sowohl im TIRF-Modus als auch im Weitfeld-Modus betrieben.

Das Mikroskop

Das innerhalb des Weitfeldaufbaus verwendete Mikroskop ist ein Olympus IX70 (Olympus, Deutschland). Das Anregungslicht wird über einen Strahlteiler mit passenden spektralen Eigenschaften (siehe Tabelle 3.2) in das Mikroskop eingekoppelt. Es wird ein Ölimmersionsobjektiv der Firma Olympus (PlanApo 60X, NA 1.45) genutzt, um die Probe in einem parallelen Anregungsstrahl oder einem durch TIRF erzeugten evaneszenten Feld anzuregen. Dieses sammelt das Fluoreszenzlicht. Die Emission wird durch den dichroitischen Strahlteiler vom Anregungslicht separiert.

Der Detektionsarm

Als Detektor kommt in diesem Aufbau eine EMCCD-Kamera (DV897DCS-BV Ixon, Andor, Deutschland) zum Einsatz. Aufgrund der hohen Quantenausbeute dieser Kamera ist eine Abbildung von einzelnen, fluoreszierenden Molekülen möglich. Aufgrund der zeitlichen Ausdehnung des Auslesevorgangs ist die zeitliche Auflösung der Kamera begrenzt. Die Kamera verfügt über einen Aufnahmebereich von 512×512 Pixel. Um Artefakte durch Streulicht zu unterdrücken wurden verschiedene Bandpass- und Langpass-Filter (AHF Analysentechnik, Deutschland) vor dem Detektor eingefügt. Die genauen Bezeichnungen der für das jeweilige Experiment verwendeten Filter finden sich in Tabelle 3.2. Optional konnte ein weiteres Linsensystem eingebaut werden, das zu einer Vergrößerung des Abbildes auf der Kamera von 100x auf 225x führt, was einer Reduzierung der Pixelgröße von 160 nm auf 70 nm entspricht. Eine schematische Darstellung des Aufbaus findet sich in Abb.3.4.

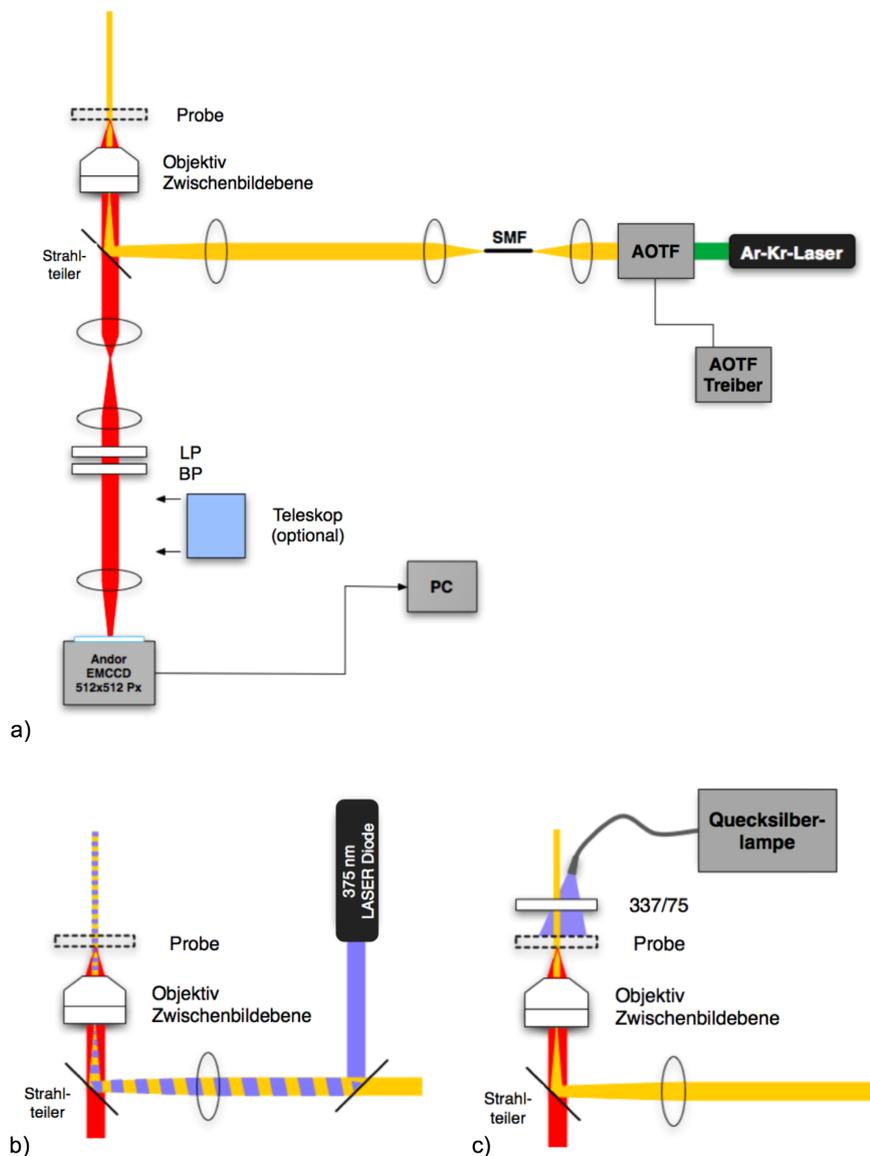


Abbildung 3.4: a) Aufbau des Weitfeld-Mikroskops. In gelb ist der Anregungsstrahlengang dargestellt. Der Emissionsstrahlengang ist in rot dargestellt. Optional kann die auf dem Rastertisch befindliche Probe mit UV-Licht einer 375 nm-Laserdiode (b)) oder einer UV-Lampe (c)) bestrahlt werden.

Tabelle 3.2: Verwendete Filter und Strahlteiler im Aufbau des Weitfeld-Mikroskops bei verschiedenen Experimenten

Experiment	Anregungs- wellenlängen	Strahlteiler	Detektionsfilter Bandpass Langpass
Schaltraten von Cy5	647 nm 514 nm	532/647* HQ542LP*	700DF75*
Schaltextperimente Spiropyrankonjugate Schaltextperimente Spiropyran / ATTO488 intermolekular eGFP Schaltextperimente, Zell-Imaging	568 nm 488 nm 488 nm	LF405/488/561/635-A* DC488* LF405/488/561/635-A*	647 razoredge** HQ585LP* 600DF40* 525DF40 * HQ500LP* 525DF40 * HQ500LP*

* AHF Analysetechnik, Deutschland

** Semrock, USA

Weitere Wellenlängen für Schaltexperimente

Um die Bildung von Merocyaninen aus Spiropyranen bzw. die Bildung der geschlossenen Form der Diarylethene anzuregen, konnte die Probe auf dem Weitfeldsetup von oben mit dem Licht einer Quecksilberlampe unter Verwendung eines 337DF75 Bandpassfilters bestrahlt werden (siehe Abb. 3.4c). Für weitere Experimente wurde eine Laserdiode (Cube, Coherent, USA), die bei 375 nm emittiert, über einen dichroitischen Strahlteiler (570DCXR, AHF Analystechnik) in den Anregungsstrahlengang eingekoppelt (siehe Abb. 3.4b).

3.3 Photochrome Moleküle, Farbstoffe und fluoreszierende Proteine

3.3.1 Spiropyrane und Spiropyrankonjugate

Spiropyrane

Die in dieser Arbeit verwendeten und charakterisierten Spiropyrane wurden von Mirco Beining aus der Arbeitsgruppe Organische Chemie I der Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, synthetisiert. Bei der Synthese wurde der Fokus auf das Vorhandensein funktioneller Gruppen für eine einfache, kovalente Kopplung an Aminofunktionen, die Löslichkeit in Wasser und die Schaltbarkeit mit sichtbarem Licht gerichtet. Abb. 3.5 stellt die chemischen Strukturen der untersuchten Spiropyrane dar. Die Spiropyrane wurden je nach Löslichkeit in Ethanol oder in Wasser gelöst aufbewahrt. Ensemble Messungen wurden entweder in Ethanol oder Wasser bei Konzentrationen von 10^{-6} M durchgeführt.

Spiropyrankonjugate

Die Kopplung der Spiropyrane an Fluorophore erfolgte über ein standardmäßiges Vorgehen. Dieses wurde von Mitarbeitern der Firma Atto-tec, Siegen, Deutschland, durchgeführt. Die Kopplung erfolgte über den aktivierten Ester der Carboxylgruppe der Spiropyrane mit der Aminofunktion des jeweiligen Farbstoffs. Um direkte elektronische Wechselwirkungen zu vermeiden, war es notwendig, den Linker zwischen beiden Komponenten so kurz wie möglich zu halten. Nachdem die Schutzgruppe von MB216 entfernt worden war ($\text{TFA}_c/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), konnte die Aminogruppe mit den aktivierten Estern von ATTO565 und ATTO590 gekoppelt werden. Alle Produkte wurden über eine HPLC aufgereinigt. Bei den Konjugaten mit dem Spiropyran MB131 wurde ein zusätzlicher Linker unter Verwendung von Farbstoff-Ethyl-Diaminen eingefügt. Insgesamt wurden 5 Spiropyran-Farbstoff-Konjugate synthetisiert und untersucht. Abb. 3.6 zeigt die Strukturformeln dieser Konjugate und Tabelle 3.3 gibt die Zusammensetzung aus jeweiligem Spiropyran und Farbstoff wieder.

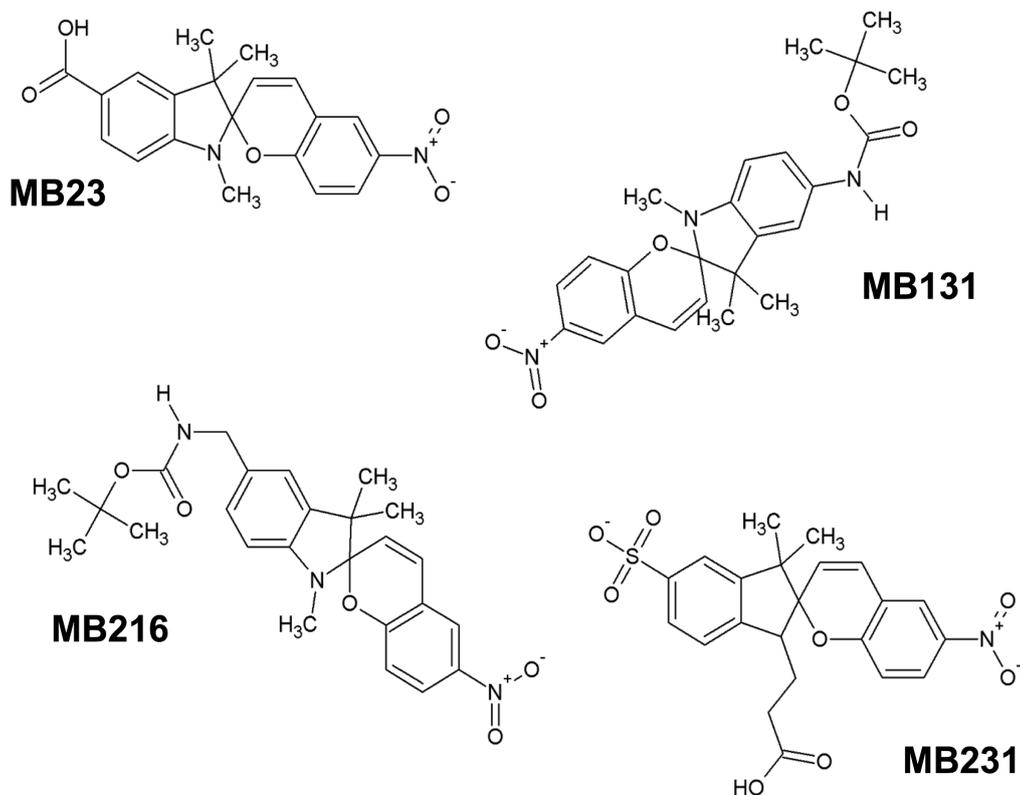


Abbildung 3.5: Chemische Strukturen der charakterisierten und in weiteren Experimenten verwendeten Spiropyran

Tabelle 3.3: Spiropyrankonjugate

	Spiropyran	Fluorophor
JA484	MB131	ATTO594
JA476	MB131	ATTO590
JA481	MB131	ATTO565
JA497	MB216	ATTO590
JA496	MB216	ATTO565

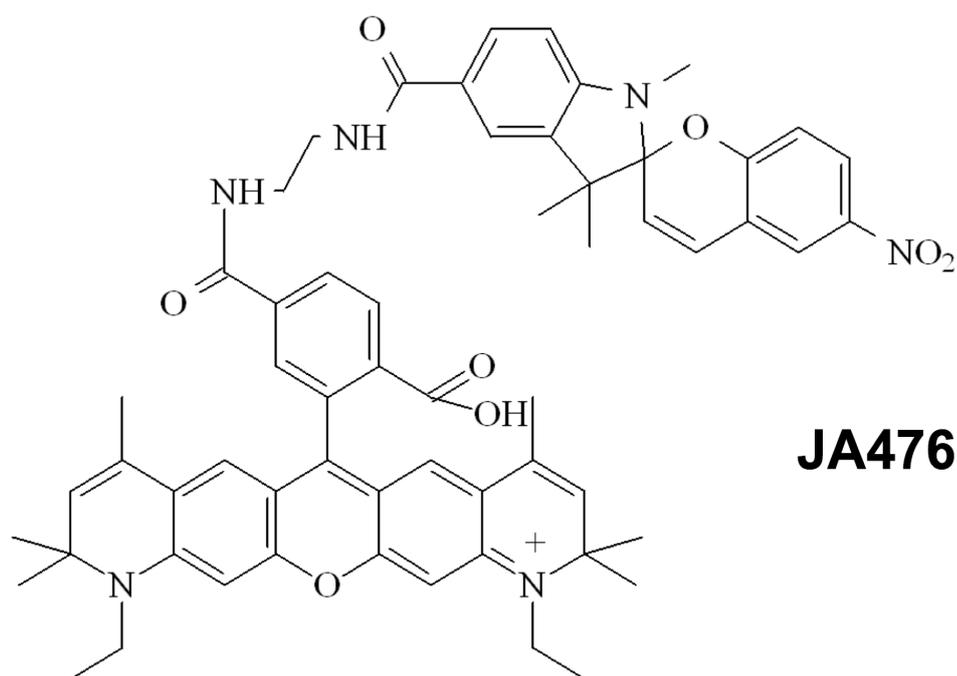
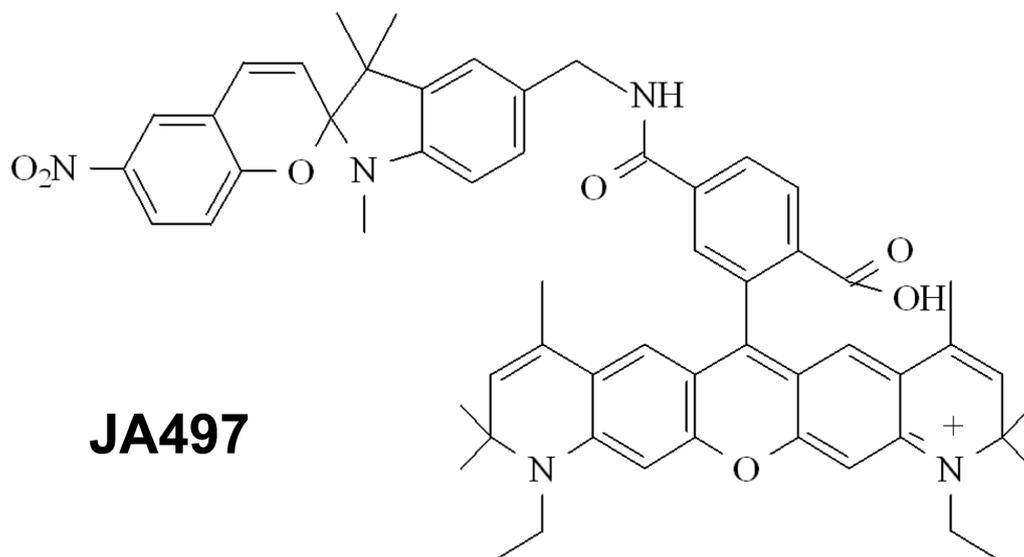


Abbildung 3.6: Chemische Strukturen der charakterisierten Spiropyranconjugate

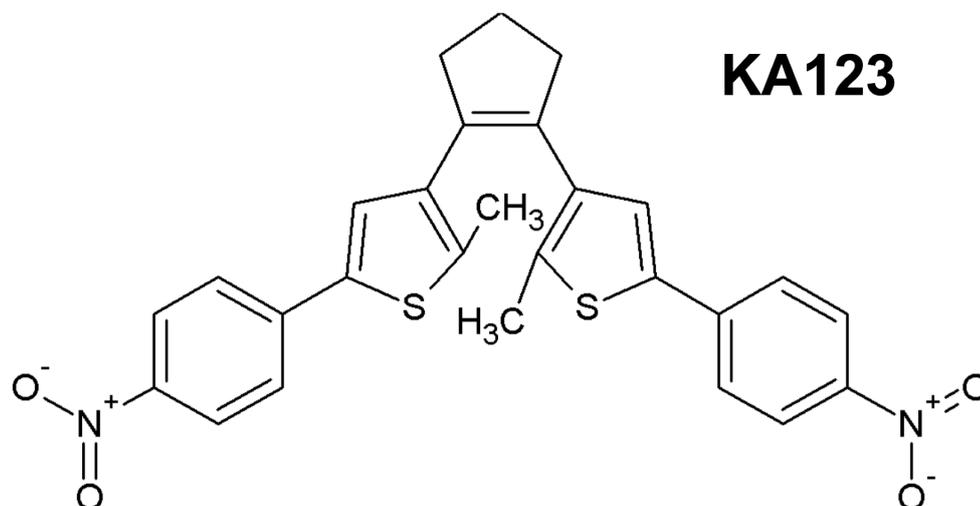


Abbildung 3.7: Chemische Struktur des charakterisierten Diarylethens KA123

Vorratslösungen der Fluorophor-Spiropyran-Konjugate wurden in Dimethylformamide (DMF, Sigma) vorgehalten. Ensemble-Messungen wurden in Ethanol bei Konzentrationen von 10^{-6} M durchgeführt.

3.3.2 Diarylethene und Diarylethenkonjugate

Diarylethene

Die in dieser Arbeit verwendeten und charakterisierten Diarylethene wurden von Kai Altenhöner und Oliver Tosic aus der Arbeitsgruppe Organische Chemie I der Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, synthetisiert. Der Synthese von mit sichtbarem Licht photoschaltbaren Diarylethenen wurde hierbei besondere Beachtung geschenkt. Abb. 3.7 und Abb. 3.8 stellen die chemischen Strukturen der auf der Ensembleebene charakterisierten und in intermolekularen Schaltexperimenten verwendeten Diarylethenen dar. Die Diarylethene wurden in Ethanol gelöst aufbewahrt. Ensemble-Messungen wurden ebenfalls in Ethanol bei Konzentrationen von 10^{-6} M durchgeführt.

Diarylethenkonjugate

Die charakterisierten Rhodamin B-Diarylethen-Konjugate wurden von Kai Altenhöner aus der Arbeitsgruppe Organische Chemie I der Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld, synthetisiert. Die hierfür verwendete Synthese findet sich in [79]. Abb. 3.9 zeigt die Strukturen der Fluorophor-Diarylethenkonjugate.

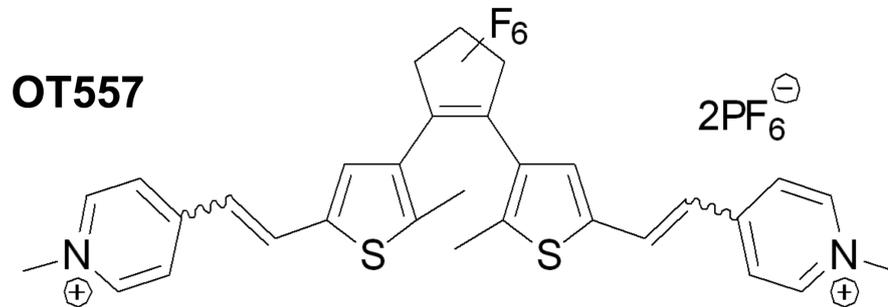


Abbildung 3.8: Chemische Struktur des Diarylethens OT557

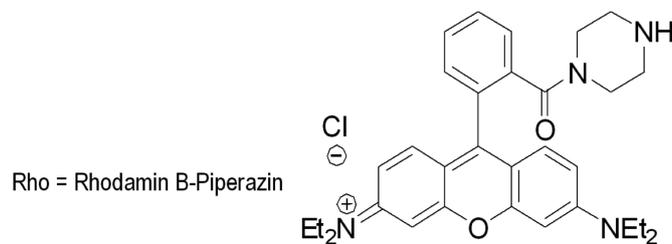
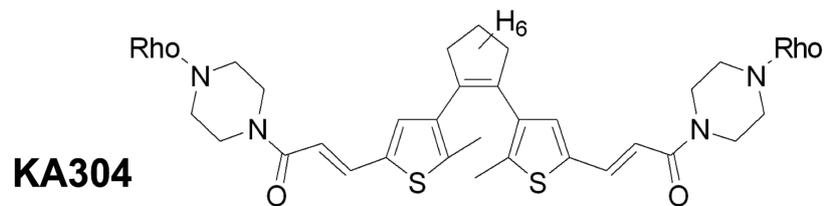
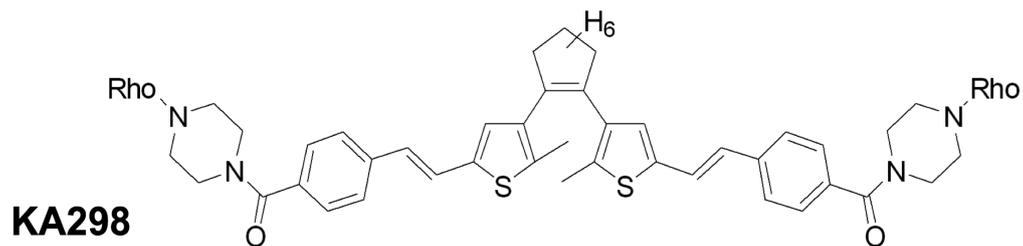


Abbildung 3.9: Chemische Strukturen der charakterisierten Diarylethenkonjugate

Tabelle 3.4: Verwendete Farbstoffe und deren Eigenschaften

Farbstoff	Farbstoff- klasse	Anregung (λ_{max})	Emission (λ_{max})	Bezug
Cy5	Cyanin	649 nm	670 nm	GE Healthcare, UK
ATTO488		501 nm	523 nm	Atto-Tec GmbH, Siegen
ATTO565 (in Konjugaten)	Rhodamin	563 nm	592 nm	Atto-Tec GmbH, Siegen
ATTO590 (in Konjugaten)	Rhodamin	594 nm	624 nm	Atto-Tec GmbH, Siegen
ATTO594 (in Konjugaten)	Rhodamin	601 nm	627 nm	Atto-Tec GmbH, Siegen
Rhodamin B (in Konjugaten)	Rhodamin	540 nm	625 nm	Carl Roth, Deutschland

Farbstoffe

Der Farbstoff Cy5 wurden in den Experimenten zur Bestimmung der Schaltraten an das 5'-Ende einer 60 Basenpaar langen DNA gekoppelt, die an ihrem 3'-Ende zusätzlich ein Biotin trägt. Die Sequenz der DNA lautet: 5'Amino-ATC GTT ACC AAA GCA TCG TAA ATC GCA TAA TAG CAC GTT AAT TTA GCA CGG ACG ATC GCC-3'-Biotin. Diese wurde von der Firma IBA, Deutschland, bezogen. An die Aminogruppe kann eine NHS-Ester-Cy5 in einem 0.1 M Hydrogencarbonatpuffer (pH 8.5) gekoppelt werden. Dazu wird die DNA in diesem gelöst, der reaktive Ester des Farbstoffs in 5-fachem Überschuss hinzugegeben und 6 Stunden im Dunkeln gelagert. Die Aufreinigung erfolgt über eine HPLC (Hewlett-Packard, Deutschland). Die DNA wird in PBS mit ihrer Gegensequenz hybridisiert, um eine doppelsträngige Probe zu erhalten.

Der freie Farbstoff ATTO488 wurde in intermolekularen Schaltversuchen verwendet. Die Farbstoffe ATTO565, ATTO590, ATTO594 und Rhodamin B wurden in Farbstoff-Schalter-Konjugaten eingebunden. Eine Zusammenfassung der Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe findet sich in Tabelle 3.4.

3.3.3 Fluoreszierende Proteine

Die fluoreszierenden Proteine eGFP, eYFP, DsRED und mCherry wurden von Thorsten Seidel in der Arbeitsgruppe Biochemie und Physiologie der Pflanzen der Universität Bielefeld hergestellt. Sie wurden in *E. coli*, Expressionsstamm BL21, unter Kontrolle des T7-Promoters exprimiert. Eine Kultur von 500 ml Volumen wurde

bei 37° C unter kontinuierlichem Schwenken bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm inkubiert. Die Expression wurde durch die Zugabe von 1 mM Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Außer im Fall von DsRed wurden alle Kulturen für weitere 4 Stunden inkubiert. Die DsRed-Kulturen wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden die 6-fach mit einem His-Tag versehenen Proteine durch metall-immobilisierte Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose-Matrix aufgereinigt. Abschließend wurden die Proteine gegen 40 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7 dialysiert.

3.4 Probenpräparation

3.4.1 Oberflächenpräparation mit Cy5

Um das Verhalten von Cy5 in unterschiedlicher chemischer Umgebung auf Einzelmolekülebene über die Zeit beobachten zu können, müssen einzelne Farbstoffmoleküle auf einer Oberfläche fixiert werden. Hierbei ist es notwendig, dass sie einerseits einem Lösungsmittel ausgesetzt sind und andererseits keinen Kontakt zur Glasoberfläche haben.

Hierfür verwendet man die folgende Präparationstechnik. Die Experimente finden in einem Lab-Tek der Firma Nunc, Deutschland, statt. Zunächst wird die Glasoberfläche in den Kammern des Lab-Teks mit Flußsäure ($c=0,5\%$) behandelt. Danach wird die Oberfläche dreimal mit PBS gespült. Dieses führt zu einer saubereren Oberfläche, an die sich das Protein Albumin (albumin, bovine serum, BSA) anlagert. Man gibt eine Lösung von BSA und mit Biotin modifiziertem BSA in einem Verhältnis von 7:1 bis 10:1 bei absoluten Konzentrationen von 7 mg ml^{-1} und 1 mg ml^{-1} über Nacht auf die Oberfläche. Nach dieser Zeit kann davon ausgegangen werden, dass sich ausreichend viele Proteine in diesem Verhältnis auf der Oberfläche angelagert haben. Nachdem die Lösung entfernt worden ist, wäscht man die Oberfläche dreimal mit einem Phosphatpuffer (phosphate buffered saline, PBS). Darauf folgend gibt man eine Streptavidin-Lösung der Konzentration 0.1 mg ml^{-1} auf die Oberfläche und belässt diese dort für fünf bis zehn Minuten. Streptavidin besitzt Bindungstaschen für insgesamt vier Biotinmoleküle. Daher bindet es sich an das auf der Oberfläche verteilte BSA-Biotin. Nach Entfernen dieser Lösung wird dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt folgt die Zugabe des Cy5, das an das 5'-Ende einer 60 Basenpaar (60 BP DNA) langen doppelsträngigen DNA gebunden ist. An das 3'-Ende der DNA ist ein Biotin gebunden, das eine weitere Bindungstasche des Streptavidins besetzen kann. Durch dieses Konstrukt und die relativ starre DNA sind die Cy5-Moleküle mit einem Abstand von ca. 20 nm über der Oberfläche fixiert. Die starre DNA verhindert eine direkte Wechselwirkung des Farbstoffs mit den Proteinen, was zu einer ungewollten Löschung führen könnte. Abb. 3.10 zeigt schematisch das beschriebene Konstrukt der Immobilisierung der Farbstoffe.

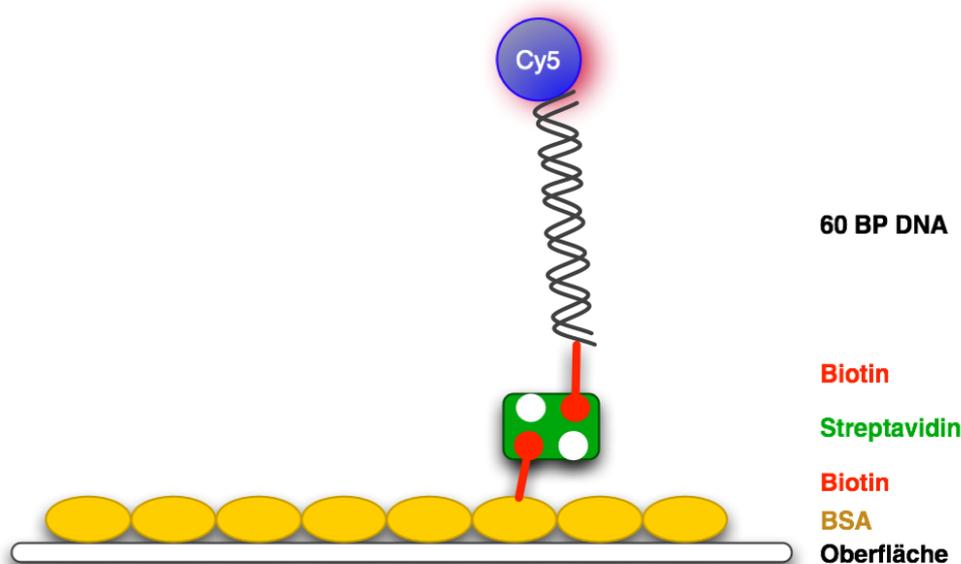


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Oberflächenpräparation zur Immobilisierung von einzelnen Farbstoffmolekülen in Lösung mit Hilfe von Biotin-Streptavidin-Bindungen. Die Dichte der Farbstoffmoleküle kann über das Verhältnis von BSA zu BSA-Biotin bei der Herstellung der Oberfläche eingestellt werden.

Es konnte in Einzelmolekülexperimenten mit rotierender Polarisation an derartig fixierten Molekülen gezeigt werden, dass die Moleküle frei drehbar sind [80].

Mit dieser Technik wird also eine Fixierung von einzelnen Farbstoffmolekülen mit einer bestmöglichen Imitation der Verhältnisse eines freien Farbstoffs kombiniert.

Immobilisierung in Polymeren

Sowohl die fluoreszierenden Proteine, als auch die Spiropyran-Fluorophor-Konjugate wurden zur Fixierung in Polymere eingebettet. Die Wahl des Polymeren wurde nach der jeweiligen Polarität der zu untersuchenden Probe getroffen. Auch die intermolekularen Schaltexperimente mit Fluorophoren und photochromen Schaltern wurden in solchen Polymeren durchgeführt. Es wurde jeweils der Polymergrundstoff in einem passenden Lösungsmittel gelöst (Polyvinylalkohol, PVA, gesättigte Lösung in H_2O bidest. und das Cycloolefin Zeonor der Firma Zeon Chemicals L.P., USA, gesättigte Lösung in Chloroform) und die zu untersuchende Probe in einer Konzentration von 10^{-8} M - 10^{-9} M hinzugegeben. Die photochromen Schalter im Rahmen der intermolekularen Schaltexperimente wurden in einem 10^4 fachen Überschuss hinzugegeben. 20 μl dieser Gemische wurden jeweils durch Rotationsbeschichtung auf einem Deckglas aufgebracht. Dieses Verfahren garantiert sehr dünne Polymerschichten, in denen die Fluorophore eine sehr enge Verteilung in z-Richtung aufweisen. Die in den unterschiedlichen Experimenten verwendeten

Tabelle 3.5: In den Experimenten verwendete Polymere.

Experiment	verwendetes Polymer
Einzelmolekülspektroskopie an fluoreszierenden Proteinen	PVA
Schallexperimente an Spiropyran-konjugaten	Zeonor
Intermolekulare Schallexperimente mit ATTO488 und MB231	PVA

Polymere sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Fixierung von *E.coli* mit eGFP markierten mRNA-Polymerasen

Eine Kultur von *E.coli* mit eGFP markierten mRNA-Polymerasen wurde über Nacht bei 37° C unter kontinuierlichem Schwenken in einem LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm inkubiert. Die anschließende Fixierung und Immobilisierung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Fixierung

- Durchmischen des Kultur-Aliquots auf einem Vortex-Gerät (verhindert ein Verklumpen der Bakterien)
- Hinzufügen von:
 - 2,4% Formaldehyd
 - 0,04% Gluteraldehyd
 - 30 mM Na-PO₄ Puffer, pH 7,5
- Durchmischen und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur und 50 min auf Eis
- 3maliges Waschen mit 1 ml PBS bei Raumtemperatur und anschließendes Zentrifugieren mit 6000 rpm für 5 min
- Lösen der Bakterien in 80 - 100 µl GTE (50 mM Glukose, 20 mM Tris-HCL pH 7,5, 10 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid))

Immobilisierung auf der Glasoberfläche von Lab-Teks

- Ätzen der Oberflächen für wenige Sekunden mit Flusssäure (HF) 0,5%
- 3maliges waschen mit H₂O bidest.

- Inkubation jeder Kammer für 5 min mit 100 μ l Poly-L-Lysin, 0,01% (wt/vl)
- Entfernen des Poly-L-Lysin und bei Raumluft trocknen lassen
- Zugabe von 2 mg/ml Lysozym zur der Bakterien-Suspension
- Zugabe von mindestens 25 μ l Bakterien-Suspension in jede Kammer und Inkubation für 5 min
- Entfernen der Suspension und bei Raumluft trocknen lassen
- Inkubieren der Oberfläche mit -20° kaltem Methanol für 5 min
- Inkubieren der Oberfläche mit -20° kaltem Aceton für 1 min
- Inkubieren der Oberfläche mit 100 μ l BSA (5% in PBS) für 30 - 60 min

3.5 Chemikalien und Puffer

Die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden entweder in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, in H_2O bidest. oder in einem Phosphatpuffer (phosphate buffered saline, PBS) durchgeführt. Dieser Puffer ist ein 10 mM Phosphatpuffer mit 2,7 μ M KCl und 137 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7,4. Diesem Puffer wurden verschiedene Chemikalien wie Oxidations- oder Reduktionsmittel in bestimmten Konzentrationen zugesetzt.

Für die Bestimmung der Schaltraten von Cy5 wurde dem Puffer der Sauerstoff entzogen. Dieses erfolgte über eine enzymatische Sauerstoffentfernung. Bei dieser Methode werden dem Puffer Glukoseoxidase und Katalase sowie Glukose hinzugefügt. Die Glukoseoxidase setzt, unter Verbrauch der Glukose, Sauerstoff um und bildet H_2O_2 , das durch die Katalase in Wasser umgewandelt wird [81]. Dabei werden dem PBS Puffer 0,5 mg/ml Glukoseoxidase, 10% (wt/vol) Glukose und 40 μ g/ml Katalase und zugesetzt. Anschließend wird die Messkammer luftdicht verschlossen [82]. Diese Methode senkt den Sauerstoffgehalt in der Lösung auf unter 1 μ M. Zusätzlich werden dem Puffer 50 mM *beta*-Mercaptoethylamine (MEA) als Reduktionsmittel zugefügt.

Die Messungen an mit eGFP markierten *E.coli* wurden in PBS unter Zugabe von 10 mM Methylviologen (MV) und 100 mM β -Mercaptoethylamine (MEA) durchgeführt.

Tabelle 3.6 listet die verwendeten Chemikalien und deren Hersteller bzw. Vertreter auf.

3.6 Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Fluoreszenzquantenausbeute des Diarylethens OT557, das eine immanente Fluoreszenz im offenen Zustand zeigt, wurde relativ zum Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, Roche) als Standard bestimmt. Die

Tabelle 3.6: Chemikalien und Bezugsquellen

Chemikalie	Hersteller
H ₂ O bidest.	eigene Herstellung aus doppeltdeionisiertem Wasser
Ethanol	Sigma, Deutschland
Chloroform	Sigma, Deutschland
Methanol	Sigma, Deutschland
Aceton	Sigma, Deutschland
Flusssäure	Carl Roth, Deutschland
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma, Deutschland
Zeonor®	Zeon Chemicals L.P., USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma, Deutschland
β -Mercaptoethylamine (MEA)	Sigma, Deutschland
Methylviologen (MV)	Sigma, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma, Deutschland
Glukoseoxidase	Sigma, Deutschland
Glukose	Sigma, Deutschland
Katalase	Roche Applied Science
Formaldehyd	Sigma, Deutschland
Gluteraldehyd	Sigma, Deutschland
LB-Medium	Invitrogen, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma, Deutschland
Lysozym	Sigma, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma, Deutschland
Chlorwasserstoffsäure	Sigma, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Sigma, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Sigma, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma, Deutschland

Messungen wurden in standardmäßigen Küvetten aus Quarzglas (Hellma, Deutschland) mit einer Pfadlänge von 10 mm durchgeführt. Um Reabsorptionseffekte zu vermeiden, wurden die Konzentrationen von DAPI und OT557 so gewählt, dass die Absorption jeweils unter 0,1 a.u. lag. Nachdem eine Nullabgleichung mit dem Lösungsmittel vorgenommen worden war, wurden für 5 verschiedene Konzentrationen des Farbstoffs DAPI und des Diarylethens OT557 jeweils die Absorption bei der Anregungswellenlänge und das Integral des korrigierten Emissionsspektrums aufgenommen. Hiernach wurden sowohl für den Farbstoff als auch für das Diarylethen die Integrale des Emissionsspektrums gegen die Absorption aufgetragen. Die Graphen wurden mit einer linearen Beschreibung angenähert. Aus diesen Näherungen ergeben sich die Steigungen der linearen Zusammenhänge m_{DAPI} und m_{OT557} , welche in

$$\Phi_{OT557} = \Phi_{DAPI} \left(\frac{m_{OT557}}{m_{DAPI}} \right) \left(\frac{\eta_{OT557}^2}{\eta_{DAPI}^2} \right) \quad (3.5)$$

einfließen. Hierbei ist η_{DAPI} der Brechungsindex des Lösungsmittels, in dem DAPI gelöst wurde (Dimethylsulfoxide, DMSO) und η_{OT557} der Brechungsindex des Lösungsmittels, in dem OT557 gelöst wurde (Ethanol). Daraus ergibt sich relativ zur Quantenausbeute von DAPI in DMSO $\Phi_{DAPI} = 0,58$ [83] eine Quantenausbeute Φ_{OT557} des OT557. Die Quantenausbeuten sowohl der Fluorophor-Spiropyranals auch der Fluorophor-Diarylethen-Konjugate wurden jeweils relativ zu denen der freien Farbstoffe bestimmt.

3.7 Datenauswertung

3.7.1 Berechnung von FRET-Effizienzen

Die für die Fluorophor-Farbstoff-Konjugate erwarteten FRET-Effizienzen $E_{Konjugat}$ wurden aus

$$E_{Konjugat} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + d_{F-PhE}^6} \quad (3.6)$$

berechnet, wobei d_{F-PhE} der Abstand zwischen Fluorophor und photochromer Einheit ist und R_0 der Försterradius des Fluorophor-Photoschalter-Paars. R_0 lässt sich nach Formel 2.11 bestimmen. Das hierfür benötigte Überlappungsintegral $J(\lambda)$ des Emissionsspektrums des Donorfluorophors und des Absorptionsspektrums des Akzeptormoleküls wird berechnet nach

$$J(\lambda) = \sum_0^{\infty} F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.7)$$

Hierbei ist F_d das auf die Fläche normierte Emissionsspektrum des Donors und ε_a das auf das Maximum normierte, mit dem Extinktionskoeffizienten ε des Akzeptors

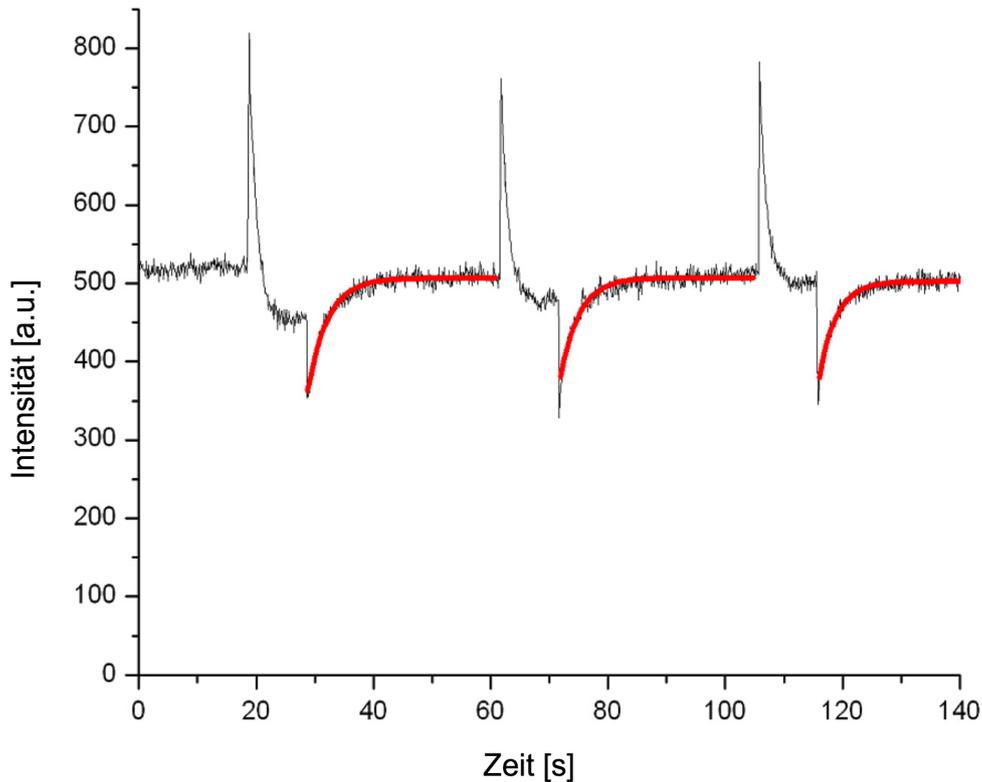


Abbildung 3.11: Fluoreszenzsignal des Spiropyran-Fluorophor-Konjugats über die Zeit bei Anregung mit 568 nm und zusätzlicher Bestrahlung mit 337 nm. In rot sind die Annäherungsfunktionen an den Anschaltprozess dargestellt.

multiplizierte Absorptionsspektrum von diesem. Da die geometrische Stellung der Dipole der Donorfluorophore und der Photoschalter nicht bekannt war, ging κ^2 mit dem Wert $2/3$ in Formel 2.11 ein.

3.7.2 Bestimmung von Kennziffern der Schalter

Die Datenauswertung und Berechnungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Origin 7.0 bzw. 8.0 durchgeführt. Eine beispielhafte Messung, wie sie im Fall der Spiropyrankonjugate ausgewertet wurde ist in Abb. 3.11 abgebildet.

Bestimmung von maximaler Fluoreszenzlöschung

Die maximale Fluoreszenzlöschung q_{max} wurde im Fall der Spiropyrankonjugate bestimmt aus

$$q_{max} = 100 \frac{(I_1 - I_2)}{I_1} \quad (3.8)$$

wobei I_1 die Emissionsintensität vor und I_2 die nach Anregung mit UV-Licht

repräsentiert. Die maximale Fluoreszenzlöschung im Fall der Diarylethenkonjugate wurde aus

$$q_{max} = 100 \frac{(F(\lambda)_1 - F(\lambda)_2)}{F(\lambda)_1} \quad (3.9)$$

wobei $F(\lambda)_1$ das Integral des Emissionsspektrums des Fluorophors vor und $F(\lambda)_2$ dasjenige nach Anregung mit Licht der geeigneten Ausschaltwellenlänge repräsentiert.

Bestimmung von Schaltraten

Die Anschaltraten k_{an} wurden sowohl im Fall der Spiropyranconjugate als auch im Fall der Diarylethenkonjugate durch eine exponentielle Anpassung des Anschaltprozesses bestimmt. Es wurde ein monomolekulares Wachstumsmodell verwendet:

$$I(t) = I_1 - \exp(-k_{an}t) \quad (3.10)$$

wobei $I(t)$ die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit t und I_1 die Intensität des Sättigungswertes darstellen.

Im Fall der Diarylethenkonjugate wurden die Ausschaltraten k_{aus} durch eine exponentielle Näherung an den Ausschaltprozess bestimmt. Hierbei wurde ein exponentielles Abfall-Modell erster Ordnung verwendet:

$$I(t) = I_1 \exp(-tk_{aus}) + y_0 \quad (3.11)$$

wobei $I(t)$ die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit t , I_1 die Ausgangsintensität und y_0 die Intensität des Sättigungswertes darstellen. Eine derartige Näherung war im Fall der Spiropyranconjugate nicht möglich, da der Einfluss der Auslesewellenlänge auf den Schaltzustand als nicht zu vernachlässigen angenommen wurde. Daher wurden die Ausschaltraten k_{aus} in diesem Fall über

$$k_{aus} = \frac{(I_0 - I_E) k_{an}}{I_E} \quad (3.12)$$

bestimmt, wobei I_0 die Ausgangsintensität und I_E die Fluoreszenzintensität im Gleichgewichtszustand darstellt.

3.7.3 Bestimmung der Schaltraten von Cy5

Da die Schaltraten von Cy5 nicht auf der Ensembleebene, sondern auf der Einzelmolekülebene bestimmt wurden, sind die Parameter, die in die Berechnung einfließen, nicht eine Fluoreszenzintensität, sondern die Zahl der Moleküle im An-Zustand. Die Ausschaltraten von Cy5 wurden über eine exponentielle Näherung an den Ausschaltprozess bestimmt. Es wurde die Beziehung

$$N(t) = N_0 \exp(-tk_{aus}) \quad (3.13)$$

verwendet, wobei $N(t)$ die Zahl der Moleküle in Abhängigkeit von der Zeit t und N_0 die Zahl der Moleküle zu Beginn der Messung repräsentiert. Die Raten des Anschaltprozess k_{an} konnten nicht aus einer mathematischen Annäherung bestimmt werden, da sich bei diesem Prozess die Einflüsse der Anschaltwellenlänge (514 nm) und die der Auslese-/Ausschaltwellenlänge (647 nm) überlagern. Sie wurden deshalb aus der Zahl der angeschalteten Moleküle im Gleichgewichtszustand N_E nach

$$k_{an} = \frac{N_E k_{aus}}{(N_0 - N_E)} \quad (3.14)$$

bestimmt.

3.7.4 Auswertung der Weitfeld- und TIRF-Aufnahmen

Die Weitfeld- und TIRF-Aufnahmen von einzelnen Emitttern wurden mit der Andor iXon Software Version 1.3.1.2, Andor Solis Software Version 4.8.30003.0 aufgenommen. Eine weitere Analyse fand mit einer Matlab-basierten Software statt, die das Fluoreszenzsignal einzelner Emittter in jedem Bild eines aufgenommenen Filmes identifiziert und zählt. Fluoreszenz-Spots, die zu dunkel, zu breit oder zu elliptisch waren, wurden durch Filteralgorithmen verworfen. Die Rekonstruktion von Bildern aus im *dSTORM*-Modus aufgenommenen Filmen von eGFP-markierten *E. coli* erfolgte mit der C++ basierten Software *rapidstorm* [84].

Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der Messungen mit freien Spiropyranen und Spiropyrankonjugaten als auch mit verschiedenen Diarylethenen und Diarylethenkonjugaten vorgestellt. Es folgen die Ergebnisse der Untersuchung der Schaltkinetiken von Cy5 und des Einsatzes von Cy5 bei der hochauflösenden *d*STORM-Methode. Das Kapitel schließt mit den Ergebnisse der Charakterisierung von fluoreszierende Proteinen auf der Einzelmolekülebene und der Beeinflussung der Photophysik von eGFP zur Generierung reversibler Dunkelzustände. Es erfolgt eine erste Diskussion und Bewertung der Ergebnisse

4.1 Spiropyrane

4.1.1 Schaltperformance von Spiropyranen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden eine Vielzahl verschiedener Spiropyrane hinsichtlich ihrer Eignung als Schalteinheiten in photoschaltbaren Konjugaten untersucht [20]. Eine Übersicht über die Strukturen der untersuchten Spiropyrane gibt Abb. 3.5 im Kapitel Material und Methoden. Die Spiropyrane MB23, MB131 und MB216 wurden in Ethanol gelöst untersucht. Abbildung 4.1 zeigt die Absorptionsspektren der drei Spiropyrane und der zugehörigen Merocyaninformen bei einer Konzentration von 10^{-5} M. Sowohl MB131 als auch MB216, die in weiteren Experimenten als photochrome Schalteinheiten an Fluorophore gekoppelt werden, weisen in ihrer Spiropyranform keine Absorption im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums auf. Im Fall von MB131 sind die Spektren von zwei Schaltzyklen jeweils nach jedem Schaltschritt und nach 5 min im Dunkeln nach dem Schalten in die Merocyanin-Form gezeigt. Wie man erkennen kann, kehrt MB131 auch ther-

misch aus der Merocyaninform zurück. Im UV-Bereich des Spektrums von MB131 zeigt sich die unvollkommene Reversibilität des Schaltprozesses, da die Spektren vor und nach dem Schaltprozess nicht zur Deckung kommen. MB23 weist eine Absorptionsbande auf, die geringfügig in den Bereich des sichtbaren Lichts hineinreicht. Durch Bestrahlung mit Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm bzw. 337 nm mit Leistungen von ~ 70 bzw. 200 mW wird die Spiropyranform in einem Zeitrahmen von Minuten in die Merocyaninform umgewandelt. Diese zeigt eine breite Absorptionsbande im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums (siehe Abb. 4.1) und eine reduzierte Absorption im UV-Bereich. Wird die Probe anschließend für einige Minuten mit sichtbarem Licht (532 nm, 100 mW) bestrahlt, so verschwindet die Absorption im sichtbaren Bereich vollständig und die Absorption im UV-Bereich kehrt zurück. Dieses zeigt an, dass die Spiropyranform der untersuchten Moleküle gebildet wird. Dieses photoinduzierte Schalten zwischen der farblosen Spiropyran- und der farbigen Merocyaninform ist hoch reversibel und kann mehr als zehnmal durchgeführt werden, wobei nur ein geringer Verlust von Molekülen oder deren Aktivität zu beobachten ist. So gehen im Fall des MB23 nur etwa 0,4% der Moleküle pro Schaltzyklus durch Photozerstörung verloren (siehe Abb. 4.2a).

Das Schaltverhalten des wasserlöslichen MB231 wurde in einer wässrigen Lösung bei Konzentrationen von 10^{-4} - 10^{-5} M untersucht. Bereits unter Tageslichtbedingungen wird teilweise die Merocyaninform des Moleküls gebildet, die durch eine breite Absorptionsbande zwischen 500 und 600 nm gekennzeichnet ist. Nach 60-sekündiger Bestrahlung bei 280 nm mit 80 mW steigt diese Absorptionsbande an, während die Absorptionsbande zwischen 250 und 300 nm sinkt. Durch eine 40-minütige Bestrahlung bei 532 nm mit einer durchschnittlichen Leistung von 25 mW verschwindet die Absorption der Merocyaninform vollständig und die Absorption im UV-Bereich steigt an (siehe Abb. 4.3). Auch im Fall des MB231 ist der Prozess des Photoschaltens reversibel, allerdings nicht vollständig. Wie in Abb. 4.2b zu sehen ist, gehen bei jedem Schaltzyklus etwa 2% der Moleküle durch Photozerstörung verloren.

Während die Moleküle MB131 und MB216 sehr schnell und mit geringen Anregungsleistungen von der Merocyanin- in die Spiropyranform geschaltet werden können, besitzt das MB231 eine stabile Merocyaninform. Diese muss in wässriger Lösung über einen längeren Zeitraum mit relativ hohen Leistungen mit Licht der adäquaten Wellenlänge bestrahlt werden, um vollständig in die Spiropyranform geschaltet zu werden. Durch die vergleichbare Stabilität der Merocyaninform zur Spiropyranform existiert MB231 in beiden Formen unter Tageslichtbedingungen. Alle untersuchten Spiropyrane zeigen in ihrer Merocyaninform eine sehr geringe Fluoreszenzquantenausbeute um 1 % (gemessen relativ zu Rhodamin 6G).

4.1.2 Spiropyrankonjugate

Die Spiropyrane MB131 und MB216 wurden kovalent an verschiedene organische Fluorophore gekoppelt. Ihre Eigenschaft der reversiblen Photoschaltbarkeit sollte so genutzt werden, um die Fluoreszenz der Farbstoffe zu modulieren. Hierfür wurden

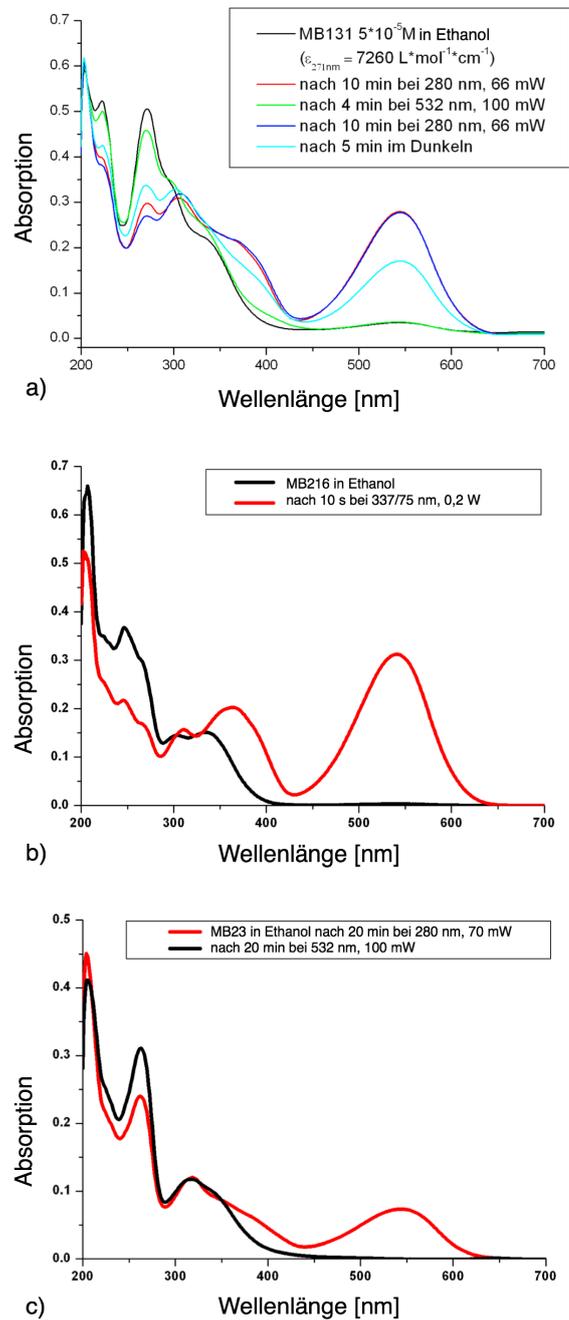


Abbildung 4.1: Absorptionsspektren der Spiropyrane a) MB131, b) MB216 und c) MB23 in ihrer Spiropyran- und ihrer Merocyaninform. Im Fall von MB131 sind die Spektren von zwei Schaltzyklen sowie die Änderung nach 5 min im Dunkeln, nachdem die Probe in die Merocyaninform geschaltet wurde, gezeigt. MB131 kehrt thermisch aus der Merocyaninform zurück. Im UV-Bereich erkennt man die unvollkommene Reversibilität des Schaltprozesses.

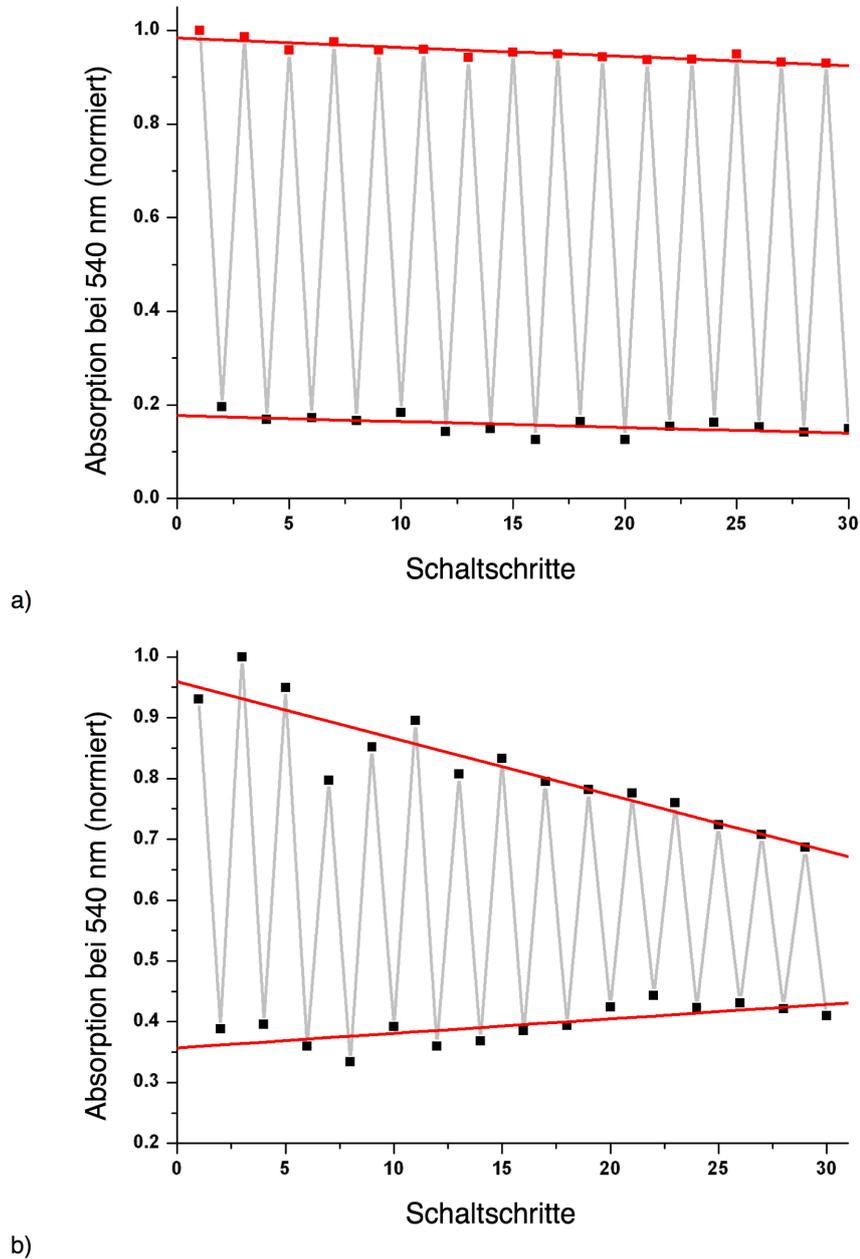


Abbildung 4.2: Messungen zur Reversibilität des Schaltprozesses von a) MB23 und b) MB231. Gemessen wurde jeweils die Absorption bei 540 nm, nachdem die Probe mit passendem Licht bestrahlt wurde, um es von der Spiropyranform (jeweils untere Datenpunkte) in die Merocyaninform (jeweils obere Datenpunkte) oder von der Merocyaninform in die Spiropyranform zu überführen.

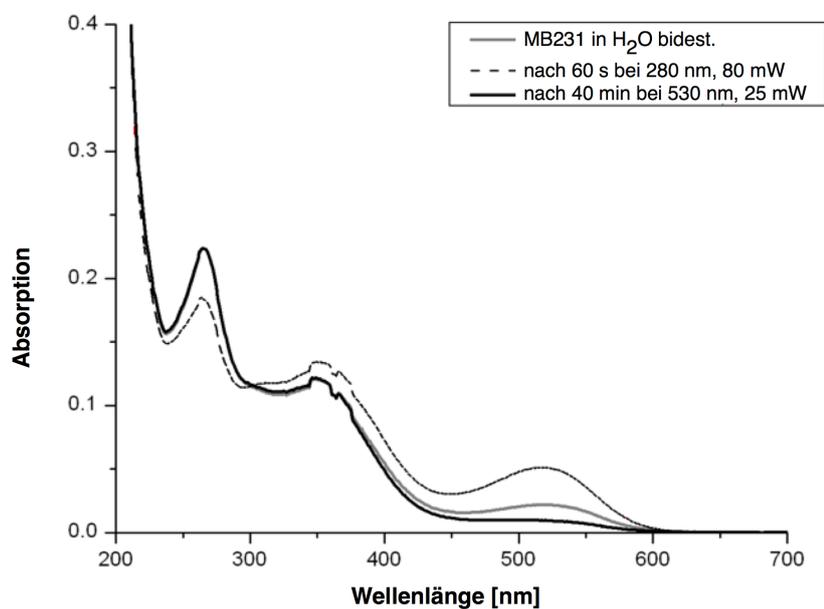


Abbildung 4.3: Absorptionsspektrum von MB231, gelöst in Wasser, im Gleichgewichtszustand (grau), in der Merocyaninform (gestrichelte Linie), in der Spiropyranform (schwarz).

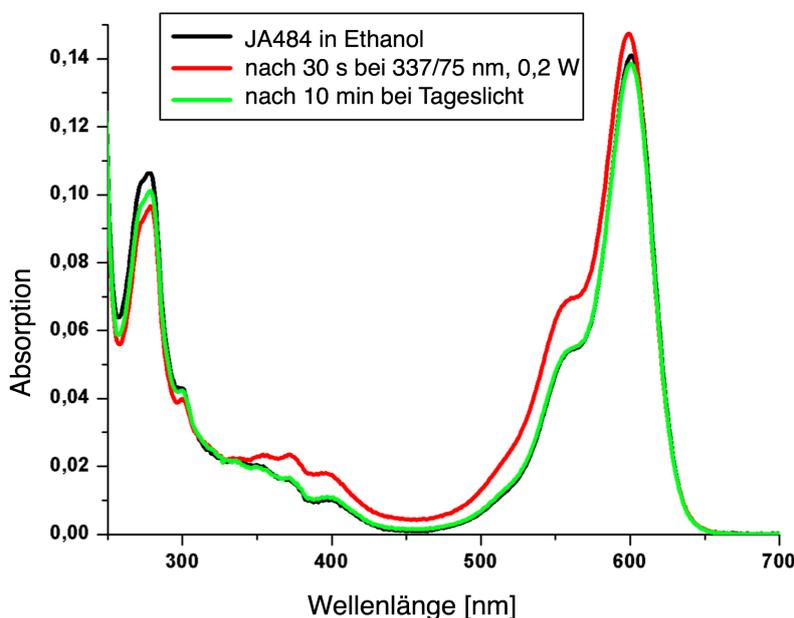


Abbildung 4.4: Absorptionsspektrum von JA484 (eine Superposition der Absorption des Farbstoffs und der Spiropyranereinheit bzw. der Merocyanineinheit nach Bestrahlung mit UV-Licht (rot). Auch im Konjugat kann die Schalteinheit reversibel zwischen ihrer Spiropyran- (schwarz und grün) und ihrer Merocyaninform (rot) geschaltet werden.

Farbstoffe der Firma Attotec ausgewählt. Abb. 3.6 zeigt die Strukturformeln der untersuchten Spiropyran-Fluorophor-Konjugate. Es zeigte sich, dass das Absorptionsspektrum und die Fluoreszenzquantenausbeute der gekoppelten Farbstoffe im Vergleich zu freien Farbstoffen nahezu unverändert waren (siehe Tabelle 4.1). Dies weist darauf hin, dass die direkten elektronischen Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen und den Spiropyranformen zu vernachlässigen sind.

Abb. 4.4 zeigt beispielhaft das Absorptionsspektrum des Konjugats JA484 in Ethanol vor und nach Bestrahlung mit UV-Licht, sowie nach Bestrahlung mit Tageslicht. Zu Beginn des Experiments ist im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums lediglich die Absorptionsbande des Farbstoffs ATTO594 zu erkennen. Nach Bestrahlung mit UV-Licht wird diese mit der Absorptionsbande des Merocyanins im sichtbaren Bereich überlagert. Nach Bestrahlung mit Tageslicht ist wiederum lediglich die Bande des Fluorophors zu erkennen. Tabelle 4.1 zeigt die Fluoreszenzquantenausbeuten der in den Konjugaten gekoppelten Fluorophore gemessen relativ zu den freien Fluorophoren. Es zeigt sich, dass die Fluoreszenzquantenausbeute der Fluorophore in den Konjugaten in keinem Fall niedriger als 75% der der freien Fluorophore war.

Tabelle 4.1: Fluoreszenzquantenausbeuten der Spiropyrankonjugate relativ zu den freien Farbstoffen

Konjugat	Fluorophor-Spiropyran-Paar	rel. Φ
JA476	ATTO590-ED - MB131	87%
JA481	ATTO565-ED - MB131	99%
JA484	ATTO594-ED - MB131	75%
JA496	ATTO565 - MB216	95%
JA497	ATTO590 - MB216	91%

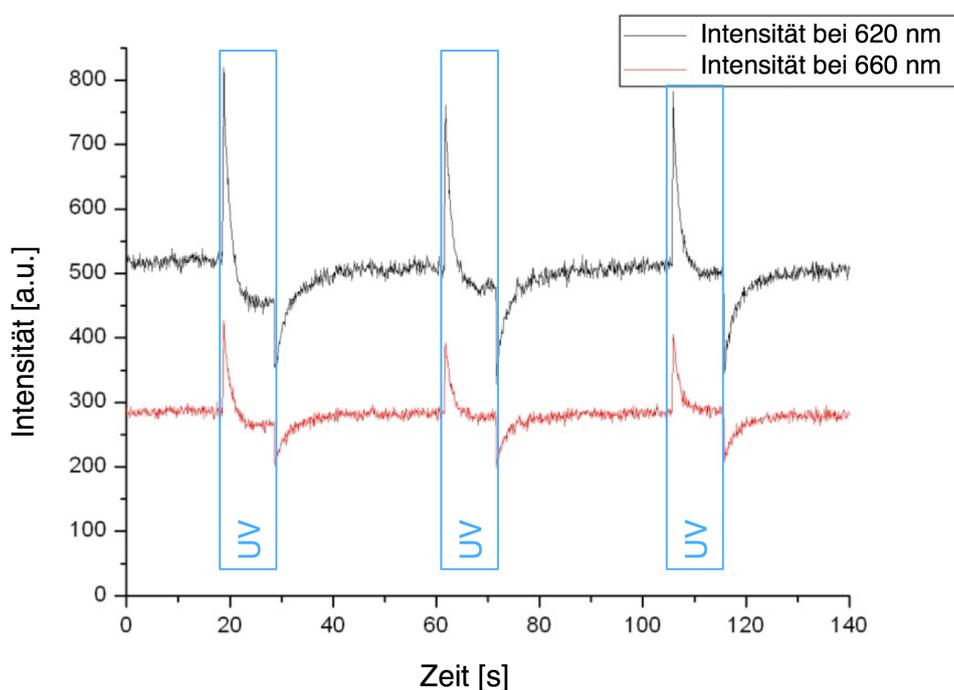


Abbildung 4.5: Reversibles Photoschalten des Konjugats JA476 auf der Ensembleebene in Ethanol (10^{-6} M). Der Fluorophor ATTO590 wird bei 514 nm mit einer durchschnittlichen Leistung von 20 mW angeregt. Die Fluoreszenz wurde bei 620 und 660 nm aufgenommen. Innerhalb der blau markierten Bereiche (10 s) wurde zusätzlich mit UV-Licht einer Quecksilberlampe bei einer zentralen Wellenlänge von 337 nm und 200 mW bestrahlt, um das Spiropyran in seine Merocyaninform zu schalten. Während dieser Bestrahlung mit UV-Licht steigt die Emission durch die höhere Anregungsleistung zunächst an. Danach sinkt sie durch den Energietransfer vom Fluorophor zum Merocyanin.

Die Konjugate wurden in einer Konzentration von $\sim 10^{-6}$ M in Ethanol gelöst und die Fluoreszenz der Fluorophore bei Anregung mit 488, 514 oder 568 nm beobachtet. Um den Einfluss des Schaltens des gekoppelten Spiropyrans in seine Merocyaninform zu untersuchen, wurden die Konjugate zusätzlich mit UV-Licht von 337 ± 37.5 nm bei einer Leistung von ~ 200 mW bestrahlt.

Abb. 4.5 zeigt das typische Verhalten der Intensität der Fluoreszenz eines Fluorophor-Spiropyran-Konjugats unter Anregung mit zusätzlichem UV-Licht. Der Fluorophor wird zunächst mit sichtbarem Licht (hier 514 nm) angeregt und emittiert eine konstante Fluoreszenz. Wird zusätzlich mit UV-Licht bestrahlt, steigt die Fluoreszenzintensität zunächst sprunghaft an. Dies ist durch Direktanregung des Fluorophors durch das UV-Licht zu erklären. Der Fluorophor zeigt eine Absorption bei 337 ± 37.5 nm und die Gesamt-Anregungsintensität ist deutlich höher als zuvor. Diesem sprunghaften Anstieg folgt eine exponentielle Abnahme der Fluoreszenz innerhalb von Sekunden. Diese Abnahme wird durch einen Energietransfer von dem angeregten Fluorophor zum Merocyanin, das unter UV-Licht-Bestrahlung kontinuierlich gebildet wird, erzeugt. Wie man in Abb. 4.5 sehen kann, nimmt die Intensität der Fluoreszenz nicht vollständig, sondern nur bis zu einem mittleren Gleichgewichtszustand ab. Dies liegt daran, dass das Merocyanin im Bereich der Anregung und der Emission des Fluorophors absorbiert und durch dieses Anregungslicht im sichtbaren Bereich permanent sehr effizient zurück in die Spiropyranform überführt wird. Der Gleichgewichtszustand zwischen Spiropyran- und Merocyaninform ist abhängig von den eingestrahlten Leistungen der zwei Lichtquellen für die Anregung und das Schalten sowie den Schaltraten.

Wird das UV-Licht ausgeschaltet, erscheint der *wahre* Wert des Gleichgewichtszustands ohne Beeinflussung durch den Effekt der Direktanregung. Die Intensität steigt unmittelbar anschließend exponentiell auf den Ausgangszustand an. Auch hier lässt sich erkennen, dass die sichtbare Auslesewellenlänge des Fluoreszenzsignals simultan die Photocyclisierung von der Merocyanin- in die Spiropyranform induziert. Für alle untersuchten Konjugate wurde bei Anregung mit verschiedenen Wellenlängen aus den Fluoreszenzintensitäten vor Anregung mit der Schaltwellenlänge und im Gleichgewichtszustand die Modulationstiefe bzw. die Fluoreszenzlöschung bestimmt (Abb. 4.6). Der Anstieg der Fluoreszenz im durch sichtbares Licht induzierten Anschaltprozess kann mit einer exponentiellen Beziehung angenähert werden und so die k_{an} -Raten dieses Prozesses in Abhängigkeit von benutzter Leistung bestimmt werden. Aus den k_{an} -Raten und den Werten der Fluoreszenzintensität vor dem Ausschaltprozess und im Gleichgewichtszustand bei gleichzeitiger Anregung mit UV- und sichtbarem Licht, kann die Ausschalttrate k_{aus} des Ausschaltprozesses determiniert werden. Das Konjugat JA476 (MB131-ATTO590) zeigt die deutlichste Modulation der Intensität mit einer Fluoreszenzlöschung von ~ 50 % bei Anregung mit 568 nm. Wie man in Abb. 4.7 sehen kann, steigt die Anschalttrate bei allen untersuchten Konjugaten linear mit der benutzten Anregungsleistung und liegt zwischen $0,1$ und $0,7$ s^{-1} unter den verwendeten experimentellen Bedingungen. Im Gegensatz dazu sind die Raten k_{aus} des Ausschaltprozesses, das heißt der Bildung der Merocyaninform in Übereinstimmung mit der

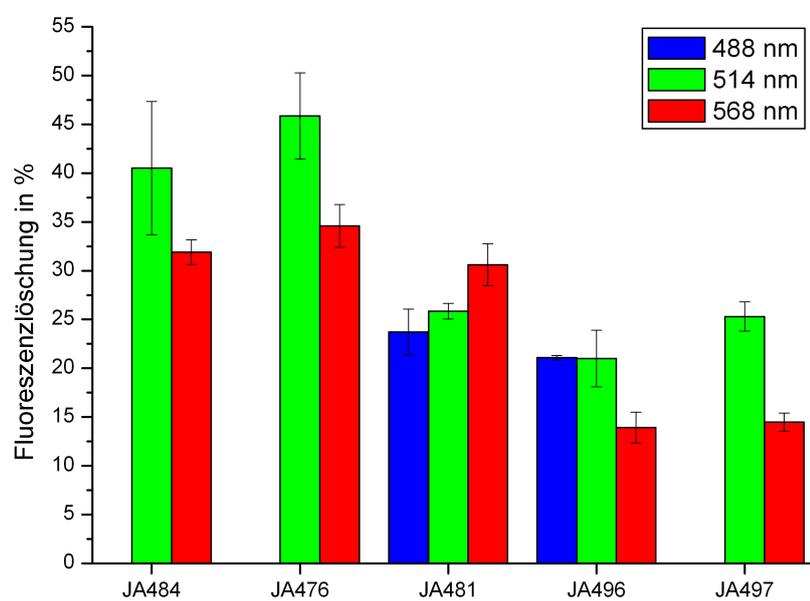


Abbildung 4.6: Maximale Fluoreszenzlöschung der Spiropyrankonjugate bei Anregung mit 488, 514 oder 568 nm und zusätzlicher Bestrahlung mit UV-Licht.

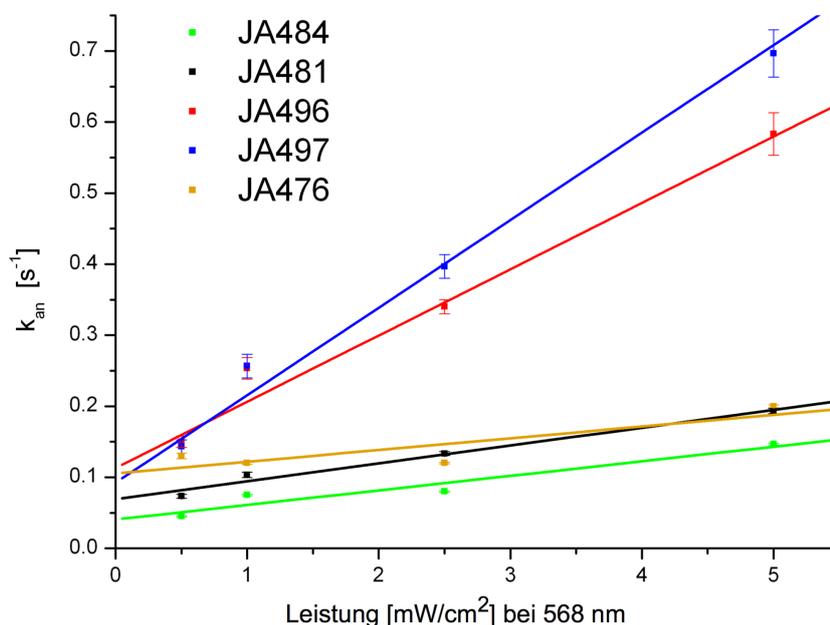


Abbildung 4.7: k_{an} -Raten der Spiropyran-Konjugate für die lichtinduzierte Bildung der Spiropyranform der verschiedenen Konjugate als eine lineare Funktion der Anregungsleistung bei 568 nm.

Literatur [85], um ~ 1 Größenordnung langsamer. Sie liegen typischerweise bei den untersuchten Konjugaten zwischen $0,04$ und $0,06 \text{ s}^{-1}$ bei einer Anregungsleistung von 200 mW bei $337 \pm 37.5 \text{ nm}$.

Die Messergebnisse zeigen, dass der Ausleseprozess des Zustands der Konjugate mit hoher Rate die Photocyclisierung von der Merocyanin- in die Spiropyranform, also in den An-Zustand der Konjugate, induziert. Hier finden wir folglich keine Entkopplung der Auslesewellenlänge von den Schaltwellenlängen. An dieser Stelle muss noch einmal darauf hingewiesen werden, dass hochauflösende Mikroskopie, die auf stochastischem Schalten basiert, abhängig von der isolierten Detektion und Lokalisation von individuellen Photoschaltern in ihrem fluoreszierenden An-Zustand ist. Um dies zu gewährleisten, sollte der Aus-Zustand deutlich länger als die Lebensdauer des An-Zustands sein. Andernfalls ist es unmöglich, die Mehrheit der Photoschalter in den Aus-Zustand zu bringen. Um die zeitliche Abgrenzung und das isolierte Auslesen einzelner Fluorophore sicherzustellen, muss der nicht fluoreszierende Aus-Zustand eine gewisse Stabilität bzw. Lebensdauer aufweisen. Diese Bedingung erschwert die Verwendung von Spiropyranen in photochromen Konjugaten für die hochauflösende Mikroskopie. Andererseits kann die Lebensdauer der Merocyaninform signifikant verlängert werden, indem man sie in Polymeren wie Polyhydroxyethyl Methacrylat einschließt oder die Temperatur senkt [27, 86, 87].

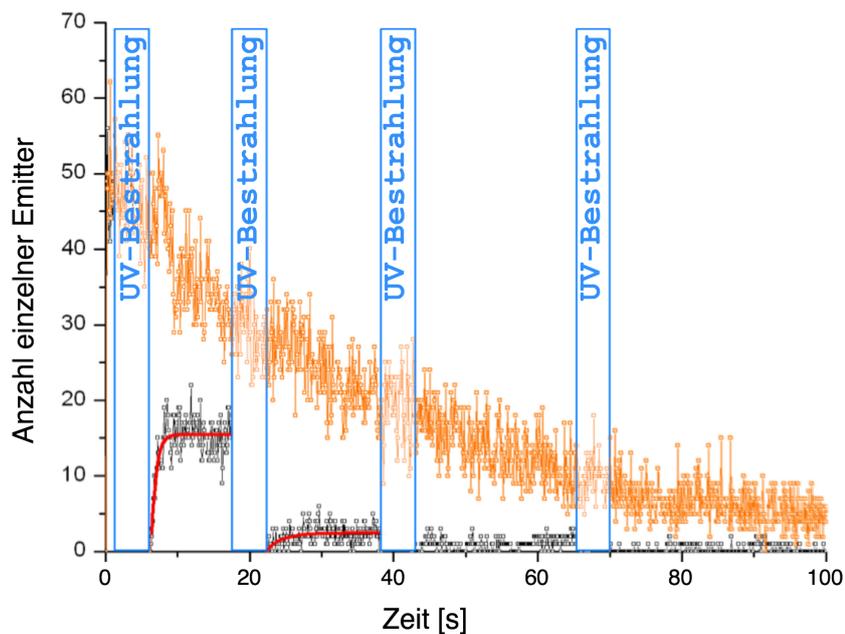


Abbildung 4.8: Anzahl einzelner Fluoreszenzspots, die pro Bild erkannt wurden. Innerhalb der blau markierten Bereiche wurde zusätzlich mit UV-Licht von 375 nm bei einer Leistung von $1,5 \text{ kW cm}^{-2}$ angeregt. Unter dieser zusätzlichen Anregung verschwindet die Fluoreszenz der einzelnen ATTO594-Fluorophore vollständig durch den effizienten Energietransfer zur Merocyaninform. Sobald das UV-Licht ausgeschaltet wird, kehren nur $\sim 30 \%$ der Fluorophore zurück in den fluoreszierenden Zustand, während die Mehrheit irreversibel photozerstört wurde. Die orangenen Datenpunkte zeigen eine Messung, die in Abwesenheit von UV-Licht durchgeführt wurde. Diese Referenzmessung zeigt, dass der Einsatz von UV-Licht die Photozerstörung der organischen Fluorophore forciert.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden Einzelmolekülexperimente mit dem Konjugat JA484, das die niedrigste Anschaltrate k_{an} aufweist (siehe Abb. 4.8), durchgeführt. Das Konjugat wurde in einer Konzentration von 10^{-8} M in einem Cycloolefin Polymer (Zeonex) auf einem Deckglas immobilisiert. Um das Fluoreszenzsignal von ATTO594 (dem Donor-Fluorophor in JA484) durch Totale Interne Reflektions (Fluoreszenz)-Mikroskopie (TIRF) zu detektieren, wurde die Probe mit 568 nm mit einer Anregungsleistung von $0,4 \text{ kW cm}^{-2}$ angeregt. In diesen Experimenten wurde die Probe zusätzlich mit Licht einer Laserdiode, die bei 375 nm emittiert, angeregt, um die Ringöffnung von der Spiropyran- in die Merocyaninform zu induzieren. Die gewählte Wellenlänge von 375 nm repräsentiert einen Kompromiss, der eine hinreichend effiziente Anregung des Spiropyrans durch ein Mikroskop-Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur erlaubt. Die Fluoreszenz-Emission wurde zwischen 600 und 640 nm aufgenommen. Bei zusätzlicher Anregung mit 375 nm mit einer Anregungsleistung von $1,5 \text{ kW cm}^{-2}$, wird das Spiropyran effizient in die Merocyaninform überführt, wodurch alle Fluoreszenzabbilder einzelner ATTO594-Moleküle innerhalb von 5 s verschwinden. Dies liegt an dem effizienten Energietransfer vom Donor-Fluorophor zum Merocyanin als Akzeptor. In diesem Experiment wird der Gleichgewichtszustand zwischen den beiden Zuständen der photochromen Verbindung hin zum Aus-Zustand verschoben, da das Merocyanin eine höhere Stabilität im Polymer aufweist. Interessanterweise wird die Fluoreszenz der einzelnen ATTO594-Fluorophoren mit einer Emission um 625 nm durch Energietransfer zum Merocyanin als Akzeptor, das bei deutlich kürzeren Wellenlängen (zwischen 500 und 600 nm) absorbiert, effizient gelöscht. Die geringe spektrale Überlappung zwischen der Emission von ATTO594 und der Absorption der Merocyaninform des MB131 im JA484 resultiert in einem kleinen Försterradius R_0 von 3,4 nm. Dennoch wird diese ungünstige spektrale Überlappung durch die sehr kurze Distanz zwischen Donor und Akzeptor von $\sim 1,5$ nm leicht kompensiert, was einen effizienten Energietransfer garantiert.

Wenige hundert Millisekunden, nachdem das UV-Licht ausgeschaltet wurde, kehrt die Fluoreszenz der ATTO594-Fluorophore zurück. Allerdings überstehen nur etwa 30 % aller ATTO594-Fluorophore den ersten Schaltzyklus. Abb. 4.8 zeigt, dass die Zahl der Fluorophore, die das UV induzierte Photoschalten überstehen, dramatisch sinkt. Schon nach nur drei Schaltzyklen sind nahezu alle Fluorophore photozerstört. Im Vergleich dazu wird ebenfalls in Abb. 4.8 die Abnahmekurve der Fluorophore über die Zeit dargestellt, die nur mit sichtbarem Licht angeregt werden (orange Kurve). Es wird deutlich, dass Anregung mit UV-Licht das Photobleichen deutlich erhöht. Betrachtet man das Absorptionsspektrum des ATTO594 (siehe www.atto-tec.com), stellt man fest, dass das Fluorophor eine deutliche Absorption im UV-Bereich aufweist, die die Anregung und anschließende Photozerstörung begünstigt.

Auch ungekoppelte Fluorophore und photochrome Spiropyrane können zusammen in einem Polymer immobilisiert werden, was die Durchführung von intramolekularen Schaltexperimenten ermöglicht. Hier wurde eine Mischung aus ATTO488-Molekülen (10^{-8} M) und MB231-Spiropyranen (10^{-4} M) in einem PVA-Film auf

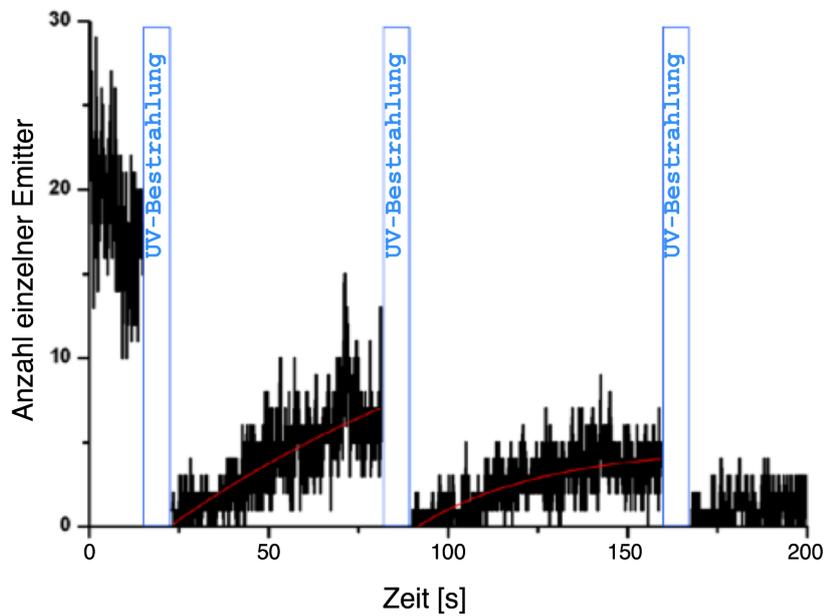


Abbildung 4.9: Anzahl einzelner Fluoreszenzspots, die bei Anregung mit 488 nm mit einer Anregungsleistung von $0,4 \text{ kW cm}^{-2}$ pro Bild erkannt wurden. Bei zusätzlicher Bestrahlung mit UV-Licht (375 nm bei einer Leistung von $1,5 \text{ kW cm}^{-2}$) verschwindet die Fluoreszenz der einzelnen ATTO488-Fluorophore vollständig durch effizienten intermolekularen Energietransfer zur Merocyaninform. Sobald das UV-Licht ausgeschaltet wird, kehren wiederum nur $\sim 30 \%$ der Fluorophore zurück in den fluoreszierenden Zustand, was die photozerstörende Wirkung des UV-Lichts unterstreicht.

einem Deckglas immobilisiert. Um ein Bild einzelner ATTO488-Moleküle mit TIRF-Mikroskopie aufzunehmen, wurde die Probe mit Licht von 488 nm mit einer Anregungsleistung von 0.4 kW cm^{-2} angeregt. Zusätzlich wurde die Probe mit Licht von 375 nm für ca. 5 s bestrahlt, um die Bildung der Merocyaninform zu induzieren. Wie man in Abb. 4.9 sehen kann, ist der durchschnittliche Abstand zwischen ATTO488-Molekülen und Merocyaninen kurz genug, um effizienten Energietransfer zu garantieren, was zu einer Löschung der Fluoreszenz der meisten ATTO488-Fluorophore führt. Wie auch im Fall der intramolekularen Schaltung, kann das Photoschalten nur wenige Male wiederholt werden, bevor alle Fluorophore irreversibel photozerstört werden. Dennoch beweisen sowohl die intra- als auch die intermolekularen Schaltexperimente, dass Spiropyrane genutzt werden können, um die Fluoreszenz von geeigneten Donor-Fluorophoren reversibel zwischen einem An- und einem Aus-Zustand zu schalten, wenn die Merocyaninform stabilisiert wird, indem man sie zum Beispiel in einem Polymer immobilisiert.

4.2 Diarylethene

4.2.1 Freie Diarylethene

KA123

Das auf der Ensembleebene untersuchte Diarylethen KA123 [79] zeigt ein verlängertes, konjugiertes π -System durch zwei zusätzliche Benzolringe, denen sich jeweils zwei Nitrogruppen mit elektronenziehender Funktionalität anschließen. Dies führt dazu, dass das Diarylethen KA123 bei Anregung mit sichtbarem Licht (hier 405 nm) von seiner offenen in seine geschlossene Form überführt werden kann, da es in diesem Bereich eine Absorption zeigt (siehe Abb. 4.10). Ebenso ist die Absorptionsbande im sichtbaren Wellenlängenbereich des elektromagnetischen Spektrums im Vergleich zu unsubstituierten Dithienylethenen zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Abb. 4.11 zeigt die Absorptionsbande der offenen (schwarz) und der geschlossenen (blau) Form des Diarylethens KA123. In diesem Experiment wurde zur Bildung der offenen Form für 5 min bei 405 nm und einer Leistung von 40 mW bestrahlt, während für die Rückreaktion für 15 min bei 620 nm und 120 mW bestrahlt wurde. Bereits beim Betrachten der verwendeten Leistungen und Zeitdauern fällt auf, dass die Schaltrate des Prozesses offene zu geschlossene Form $k_{\text{offen} \rightarrow \text{geschlossen}}$ deutlich höher ist als die des umgekehrten Prozesses ($k_{\text{geschlossen} \rightarrow \text{offen}}$). Bei mehrmaliger Wiederholung dieses Experiments (Abb. 4.11) zeigt sich, dass KA123 eine sehr hohe Stabilität gegenüber Degradationsprozessen aufweist. Der Verlust von photochromen Material liegt um 0,2% pro Schaltzyklus. Zudem zeigt KA123 eine sehr hohe Stabilität in beiden Zuständen, das heißt, es zeigt keine thermische Relaxation.

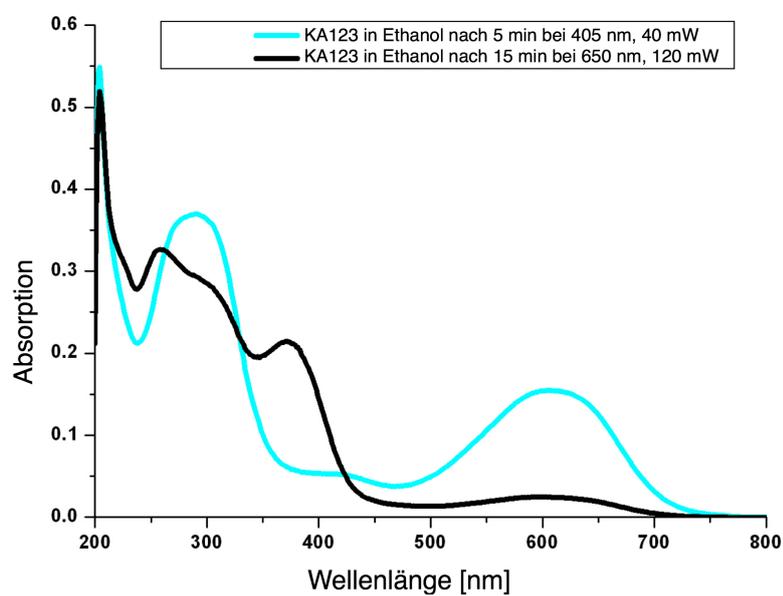


Abbildung 4.10: Absorptionsspektrum der offenen (schwarz) und der geschlossenen (blau) Form des KA123. Die Absorption der offenen Form reicht in den sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums hinein. Die geschlossene Form zeigt eine breite und intensive Absorptionsbande im sichtbaren Bereich.

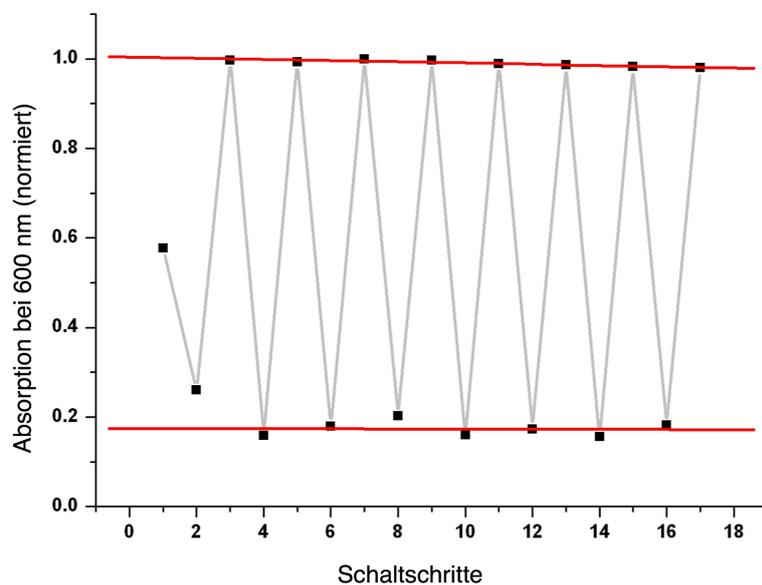


Abbildung 4.11: Messungen zur Reversibilität des Schaltprozesses von KA123. Gemessen wurde jeweils die Absorption bei 600 nm, nachdem die Probe mit passendem Licht bestrahlt wurde, um es von der offenen Form (jeweils untere Datenpunkte) in die geschlossene Form (jeweils obere Datenpunkte) oder von der geschlossenen in die offene Form zu überführen.

OT557

Weiterhin wurde ebenfalls das Diarylethen OT557 auf der Ensembleebene charakterisiert, das eine schwache, immanente Fluoreszenz in seiner offenen Form besitzt. Die chemische Struktur des OT557 in seiner offenen und seiner geschlossenen Form wird in Abb. 3.8 dargestellt. Die Fluoreszenz kann bei 405 nm angeregt werden und besitzt eine Quantenausbeute von 0,17%, gemessen relativ zu DAPI. In der geschlossenen Form sinkt die Fluoreszenzintensität auf weniger als 10% des Wertes der offenen Form. Dies liegt möglicherweise an einem Verlust der Aromazität der Thiophen-Untereinheit des Stilbazolium-ähnlichen Fluorophors im Rahmen der Ring-Schluss-Reaktion des Diarylethens. In Verbindung mit der Ring-Schluss-Reaktion sinkt die Absorption des Moleküls bei 405 nm, so dass eine Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute von 65% bestimmt werden konnte (siehe Tabelle 4.2). Abb. 4.12 zeigt die Absorptionsspektren der offenen und der geschlossenen Form des Diarylethens sowie die zugehörigen Emissionsspektren. In diesem Fall liegen umgekehrte Verhältnisse im Vergleich zu den Schaltern, die aus Konjugaten aus Diarylethen und Fluorophor bestehen, vor: Die Auslesewellenlänge (hier 405 nm) schaltet die Fluoreszenz in den Aus-Zustand, während eine zweite, längere Wellenlänge sie zurück in den An-Zustand schaltet. Es könnte eine lineare Abhängigkeit der Rate des Ausschaltprozesses k_{aus} von der verwendeten Leistung bei 405 nm sowie eine lineare Abhängigkeit der Schaltrate des Anschaltprozesses k_{an} von der verwendeten Leistung bei 568 nm festgestellt werden. Diese Abhängigkeit zeigt Abb. 4.13. Zudem sind die Schaltraten des Ausschaltprozesses k_{aus} um eine Größenordnung höher als die des Anschaltprozesses k_{an} . Das Diarylethen zeigt in beiden Zuständen in nicht entgastem Lösungsmittel eine sehr hohe Stabilität auf der Zeitskala von Stunden wie in Abb. 4.14 gezeigt wird. Der Schaltprozess des OT557 erweist sich als hoch reversibel, wie in Abb. 4.15 zu sehen ist. Hier sind ein vollständiger Schaltzyklus und jeweils die Sättigungswerte der folgenden Schaltschritte dargestellt. Im Fall des OT557 hat die Auslesewellenlänge einen hohen Effekt auf den Schaltstatus des Moleküls. Wegen der hohen k_{aus} -Raten kann die Fluoreszenzintensität nur zu wenigen Zeitpunkten während des Anschaltprozesses gemessen werden, um eine Beeinflussung des Systems gering zu halten. Auf Rückschlüsse, die man aus der hohen Reversibilität des Schaltprozesses, besonders im Vergleich zu der schlechteren der Diarylethen-Fluorophor-Konjugate, ziehen kann, wird in Abschnitt 4.2.2 näher eingegangen. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass das Diarylethen OT557 ein photoschaltbares Fluorophor, wenn auch mit geringer Fluoreszenzquantenausbeute, mit einer Modulationstiefe der Fluoreszenzintensität von über 90% ist. Zudem weist es das gewünschte Verhältnis der Schaltraten ($k_{aus} > k_{an}$) auf.

4.2.2 Diarylethen-Konjugate

Zwei Diarylethen-Fluorophor-Konjugate wurden untersucht und charakterisiert. In beiden Fällen wurde ein Derivat von Rhodamin B kovalent an ein Diarylethen gekoppelt. Es wurden jeweils zwei Moleküle des Fluorophors an eine photochro-

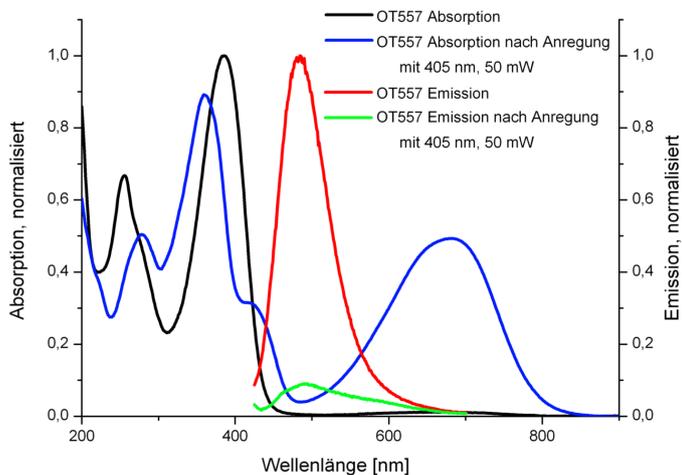


Abbildung 4.12: Absorptions- und Emissionsspektren von OT557 in Methanol. Die Spektren wurden, bevor und nachdem die Probe mit Licht der adäquaten Schaltwellenlänge und -leistung bestrahlt wurde, aufgenommen.

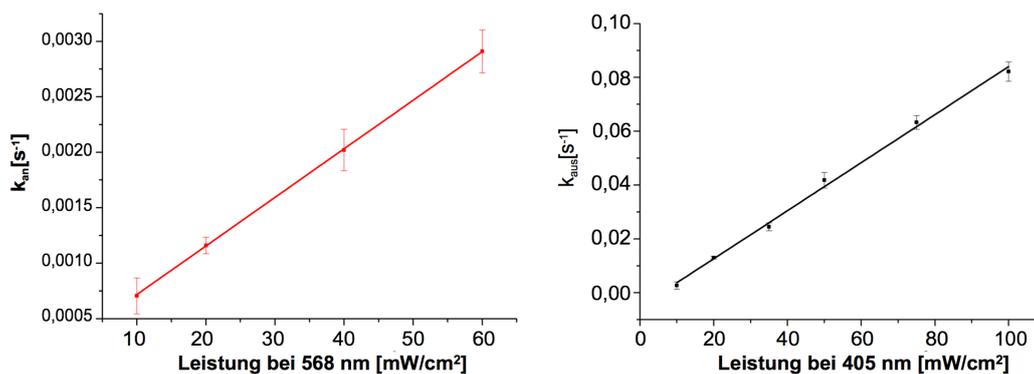


Abbildung 4.13: Leistungsabhängigkeit der Photozyklisationsraten für die lichtinduzierte Bildung der geschlossenen bzw. der offenen Form des Diarylethens OT557: In rot: k_{an} -Raten von OT557 als eine Funktion der Anregungsleistung bei 568 nm. In schwarz: k_{aus} -Raten von OT557 als eine Funktion der Anregungsleistung bei 405 nm.

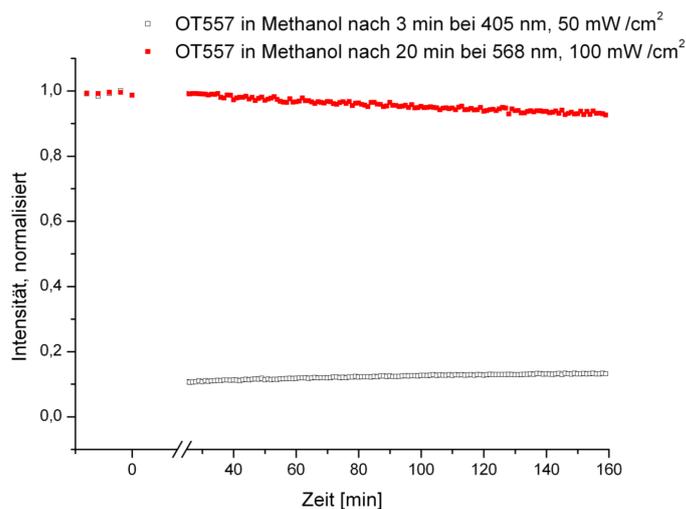


Abbildung 4.14: Thermische Stabilität des Aus-Zustands (grau) und des An-Zustands (rot) von OT557 auf der Ensembleebene auf einer Zeitskala von Minuten. Die Datenpunkte wurden einmal pro Minute bei der Auslesewellenlänge (405 nm) aufgenommen.

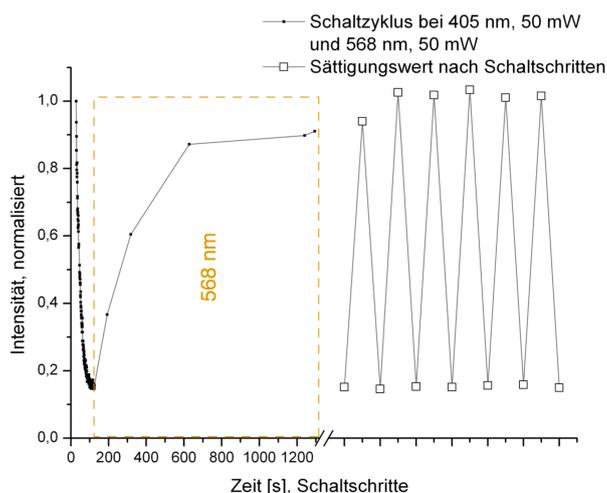


Abbildung 4.15: Reversibles Ensemble-Photoschalten von OT557 in Methanol. Das Diarylethen wurde bei 405 nm mit einer durchschnittlichen Leistung von 50 mW cm^{-2} angeregt. Die Fluoreszenz wurde bei 490 nm aufgenommen. Unter Bestrahlung mit 405 nm sinkt die Intensität der Fluoreszenz exponentiell durch die Bildung der geschlossenen Form des Diarylethens. Im gelb markierten Bereich wurde die Probe mit VIS-Licht (568 nm , 50 mW cm^{-2}) bestrahlt, um das Diarylethen aus der geschlossenen Form in die offene Form zu überführen. Zu bestimmten Zeitpunkten innerhalb des Anschaltprozesses wurde die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 405 nm aufgenommen. Es sind ein kompletter Schaltzyklus und die Sättigungswerte nach mehreren Schaltschritten dargestellt.

me Einheit gekoppelt. Die molekularen Strukturen dieser Konjugate sind Abb. 3.9 zu entnehmen. Sie sind jeweils in der offenen Form der photochromen Einheit als auch in deren geschlossenen Form abgebildet. Im Konjugat KA298 [79] wurde ein Diarylethen mit einem signifikant verlängerten konjugierten π -System verwendet. Daher ist es möglich, dieses Konjugat ausschließlich unter Verwendung von sichtbarem Licht (405 nm für den Ausschaltprozess) zwischen seinen beiden Zuständen zu schalten. Im Fall des Konjugats KA304 wurde ein Diarylethen mit einem kürzeren konjugierten π -System eingesetzt, weshalb das Schalten von der offenen in die geschlossene Form durch Bestrahlung mit UV-Licht (337 nm oder 365 nm) erreicht wird. Die beiden photochromen Einheiten fungieren hier als photoschaltbare Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)-Akzeptoren, über die die Fluoreszenz der verbundenen Fluorophore moduliert werden kann. Um derart verwendet werden zu können, ist es notwendig, dass das Emissionsspektrum des Fluorophors signifikant mit dem Absorptionsspektrum von nur einer der beiden Formen der photochromen Einheit überlappt. Die Absorptionsspektren der offenen Formen beider Konjugate (siehe Abb. 4.17 a und b) sind Superpositionen der der Absorptionsspektren des Rhodamin B Derivats und der Carboxyl-Säure des jeweiligen Diarylethens. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine direkte elektronische Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten besteht. Es findet sich ebenso keine spektrale Überlappung der Spektren des Rhodamin B-Derivats und der offenen Form des jeweiligen Diarylethens. In der geschlossenen Form der Diarylethene besitzen diese eine deutliche Absorptionsbande zwischen 550 nm und 650 nm, die eine signifikante Überlappung mit der Emissionsbande des Rhodamin B-Derivats aufweist. In Tabelle 4.2 sind die Überlappungsintegrale der Emissionsbande des Rhodamin B-Derivats mit den Absorptionsbanden des jeweiligen Diarylethens dargestellt. Eine signifikante Überlappung führt zu einem großen Försterradius. Vergleicht man diesen mit den kalkulierten Distanzen zwischen Fluorophor und photochromer Einheit in den jeweiligen Konjugaten, können die erwarteten FRET-Effizienzen bestimmt werden. Man erwartet für die Konjugate KA298 und KA304 FRET-Effizienzen nahe 100% in der geschlossenen Form des jeweiligen Diarylethens.

Tabelle 4.2: Quantenausbeuten der offenen sowie der geschlossenen Formen der Verbindungen KA298, KA304 und OT557, bestimmt aus dem Integral des Emissionsspektrums und der Absorption bei Anregungswellenlänge, maximale Abnahme der Quantenausbeuten kalkuliert aus dem Vergleich der beiden Quantenausbeuten, für Verbindung KA298 und KA304 sind die kalkulierten Überlappungsintegrale des Emissionsspektrum des Rhodamin B-Derivats und der Absorption der geschlossenen Form der jeweiligen photochromen Komponente angegeben sowie die hieraus kalkulierten FRET-Effizienzen zwischen dem Fluorophor und der geschlossenen Form der photochromen Einheit.

	Φ Zustand	An- Φ Zustand	Aus- Φ Zustand	Abnahme max	Überlappungsintegral (geschl. Form)	kalkulierte FRET-Effizienz (geschl. Form)
KA298	19 % *	5 %	5 %	74 %	2,06 E15	99 %
KA304	29 % *	5,5 %	5,5 %	81 %	1,56 E15	100 %
OT557	0,17 % **	0,06 %	0,06 %	65 %		

* bestimmt relativ zu Rhodamine B

** bestimmt relativ zu DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol)

Abb. 4.16a und 4.16b zeigen das typische Verhalten der Verbindungen KA298 und KA304 auf der Ensembleebene bei Anregung mit der Auslesewellenlänge (514 nm bzw. 568 nm) und zusätzlicher Anregung mit 405 nm bzw. $337 \pm 37,5$ nm. Ein kompletter Schaltzyklus und die Sättigungswerte nach mehreren Schaltschritten sind dargestellt. Das Rhodamin emittiert Fluoreszenz bei einer mittleren Wellenlänge von 590 nm mit einer konstanten Intensität. Bei zusätzlicher Anregung mit 405 nm (Konjugat KA298) bzw. UV-Licht (Konjugat KA304) sinkt die Fluoreszenz-Intensität in einem exponentiellen Abfall auf einen Gleichgewichtszustand bei ca. 20% der Eingangsintensität. Dieses Verhalten findet sich bei beiden Konjugaten durch zunehmenden FRET vom Fluorophor zur geschlossenen Form der photochromen Einheit. Es stellt sich hierbei ein Unterschied zwischen der maximalen Abnahme der Fluoreszenzintensität, die bestimmt wurde aus der Abnahme der Integrale der Emissionsspektren unter idealen Schaltbedingungen, und dem erwarteten Effekt heraus. Dieser sollte nach den kalkulierten FRET-Effizienzen nahe 100% sein (Tabelle 4.2). Möglicherweise kommt diese Abweichung durch das Einstellen eines chemischen Gleichgewichts auf der Ensembleebene zwischen Konjugaten, die sich in der geschlossenen Form, und Konjugaten, die sich in der offenen Form befinden, zu stande. Nach Beenden des Bestrahleins mit der Ausschaltwellenlänge (405 nm bzw. UV-Licht), steigt die Intensität der Fluoreszenz wieder mit einer langsamen Kinetik auf den Eingangswert an, da die Auslesewellenlänge nicht nur den Fluorophor anregt, sondern auch die photochrome Einheit aus der geschlossenen in die offene Form schaltet. Die maximal erreichbare Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute wurde aus einem Vergleich der Emissionsintegrale vor und nach Anwenden von idealen Schaltbedingungen auf die beiden Konjugate bestimmt.

Die entsprechenden Absorptions- und Emissionsspektren finden sich in Abb. 4.17a und 4.17b. KA298 weist die mit 81% höchste Abnahme auf (Tabelle 3.9). In Abb. 4.16a und 4.16b kann beobachtet werden, dass beide Konjugate kein perfektes Verhalten hinsichtlich der Reversibilität des Schaltprozesses besitzen. KA298 weist ansteigende Sättigungswerte der Fluoreszenzintensität im An- und im Aus-Zustand nach jedem Schaltzyklus auf. Dies kann möglicherweise durch die teilweise Zerstörung der Bindung zwischen Fluorophor und Schalteinheit unter Schaltbedingungen erklärt werden. Konjugat KA304 zeigt dagegen ansteigende Werte im Aus-Zustand und fallende Werte im An-Zustand. Ein derartiges Verhalten wurde bereits für Diarylethen-basierte photochrome Fluorophore beschrieben [88]. Die fallenden Werte des An-Zustands können dadurch erklärt werden, dass UV-Licht zur Induzierung des Aus-Zustands verwendet werden muss, das außerdem zu einer Photozerstörung des Fluorophors führen kann. Besonders der Vergleich mit den Verbindungen OT557 und KA123, die eine sehr hohe Reversibilität des Schaltprozesses zeigen, legt den Verdacht nahe, dass die Ermüdungserscheinungen der Konjugate KA298 und KA304 während des Schaltzyklus durch Einflüsse auf die chemische Bindung zwischen Fluorophor und photochromer Einheit zu erklären und nicht der photochromen Einheit selbst zuzuschreiben sind.

Die Schaltraten der Aus- und Anschaltprozesse wurden aus den exponentiellen Abfällen und Anstiegen der Emissionsintensität bei Bestrahlung mit Licht ver-

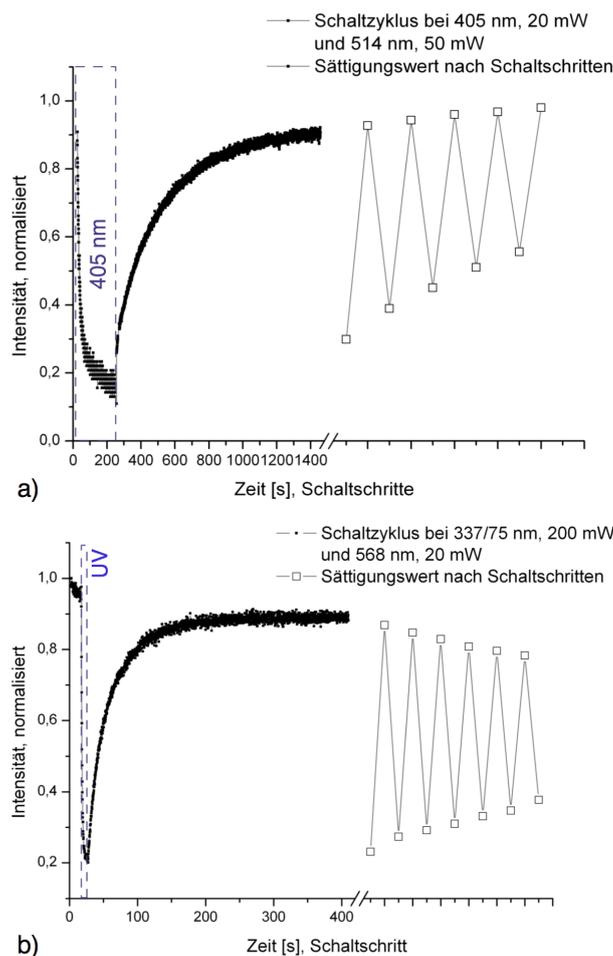


Abbildung 4.16: a) Reversibles Ensemble-Photoschalten von KA298 in Ethanol/Methanol (90 % / 10 %). Der Fluorophor wurde bei 514 nm mit einer durchschnittlichen Leistung von 50 mW cm^{-2} angeregt. Die Fluoreszenz wurde bei 590 nm aufgenommen. Innerhalb des blau markierten Bereichs wurde die Probe zusätzlich mit Licht von 405 nm (20 mW cm^{-2}) bestrahlt, um das Diarylethen in seine geschlossene Form zu überführen. Während dieser Bestrahlung sinkt die Intensität der Fluoreszenz durch Energietransfer vom Fluorophor zur geschlossenen Form des Diarylethens exponentiell. Nach Ausschalten des 405 nm-Lichts steigt die Fluoreszenz langsam wieder an, da durch die andauernde Bestrahlung mit 514 nm die offene Form des Diarylethens gebildet wird. Es sind für beide Verbindungen ein kompletter Schaltzyklus und die Sättigungswerte nach mehreren Schaltschritten dargestellt. b) Reversibles Ensemble-Photoschalten von KA304 in Methanol. Der Fluorophor wurde bei 568 nm mit einer durchschnittlichen Leistung von 20 mW cm^{-2} angeregt. Die Fluoreszenz wurde bei 590 nm aufgenommen. Innerhalb des blau markierten Bereichs (10 s) wurde die Probe zusätzlich mit UV-Licht von 337 nm (200 mW cm^{-2}) bestrahlt.

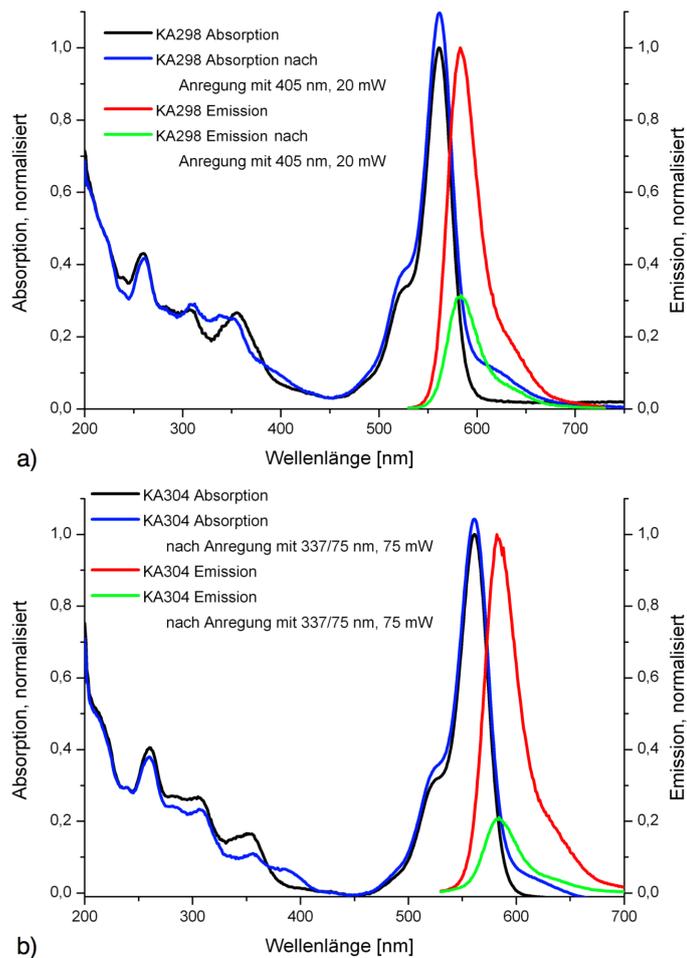


Abbildung 4.17: Absorptions- und Emissionsspektren von (a) KA298 in Ethanol und (b) KA304 in Methanol. Die Spektren wurden, bevor und nachdem die Proben mit Licht der adäquaten Schaltwellenlänge und -leistung bestrahlt wurden, aufgenommen.

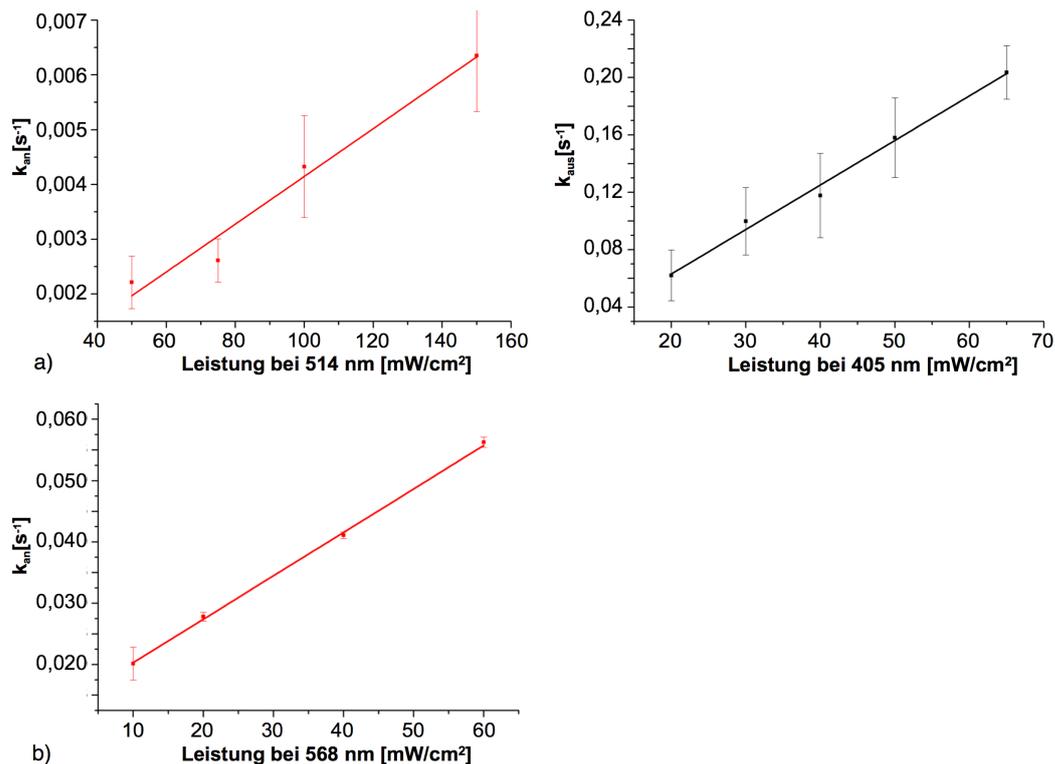


Abbildung 4.18: Leistungsabhängigkeit der Photozyklisationsraten für die lichtinduzierte Bildung der geschlossenen bzw. der offenen Form der Diarylethenkonjugate KA298 und KA304: In rot: k_{an} -Raten von (a) KA298 und (b) KA304 als eine Funktion der Anregungsleistung bei 514 nm bzw. 568 nm. In schwarz: k_{aus} -Raten von (a) KA298 als eine Funktion der Anregungsleistung bei 405 nm. Die k_{aus} -Schaltraten des UV-schaltbaren KA304 sind $0,9 \text{ s}^{-1} \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$ bei $337 \pm 37,5 \text{ nm}$, 200 mW cm^{-2} und $0,1 \text{ s}^{-1} \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ bei 365 nm , 27 mW cm^{-2} .

schiedener Anregungsleistungen bestimmt. Hierbei wurde angenommen, dass der Einfluss der Auslesewellenlänge gering gegenüber dem Einfluss der Ausschaltwellenlänge ist, so dass er im Fall des Fluoreszenz-Abfalls vernachlässigt werden kann. Wie in Abb. 4.18 zu sehen ist, zeigen sowohl die Anschaltrate k_{an} als auch die Ausschalttrate k_{aus} des Schaltprozesses eine signifikante lineare Abhängigkeit von der verwendeten Anregungsleistung. Im Fall des Konjugats KA304 konnte die Ausschalttrate k_{aus} nur für zwei Leistungen bei unterschiedlichen Wellenlängen bestimmt werden, nämlich $0,9 \text{ s}^{-1} \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$ bei $337 \pm 37,5 \text{ nm}$, 200 mW cm^{-2} und $0,1 \text{ s}^{-1} \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ bei 365 nm , 27 mW cm^{-2} . Dies impliziert, dass das Verhältnis von Photoschaltern im Aus-Zustand zu denen im An-Zustand über das Anlegen geeigneter Schaltleistungen gesteuert werden kann. Des weiteren zeigt sich, dass die Raten des Ausschaltprozesses k_{aus} im Fall des Konjugats KA298 zwei Größenordnungen und im Fall des Konjugats KA304 eine Größenordnung höher sind als die des Anschaltprozesses k_{an} . Dies führt zu einem hohen Quotienten von Photoschaltern im Aus-Zustand zu denen im An-Zustand bei Anlegen von vergleichbaren Schaltleistungen. Wie im Abschnitt 2.5.3 beschrieben, ist dies eine Voraussetzung für eine Erhöhung der räumlichen Auflösung in hochauflösenden Mikroskopiemethoden. Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass Diarylethene durch ihre geeigneten Schaltraten und daraus resultierenden Lebensdauern im jeweiligen Zustand ideal für den Einsatz als photochrome Einheiten in photoschaltbaren Konjugaten im Kontext der hochauflösenden Mikroskopie sind. Weiterhin weisen die Konjugate eine sehr hohe thermische Stabilität sowohl in der offenen als auch in der geschlossenen Form über einen Zeitrahmen von Stunden auf, wie Abb. 4.19a und Abb. 4.19b zeigen. Hier wurden Aliquots der Konjugate, die mit idealen Ausschalt- bzw. Anschaltbedingungen behandelt worden waren, im Dunkeln gehalten. Die Fluoreszenzintensität wurde minütlich aufgenommen, um einen vernachlässigbaren Einfluss auf den Schaltstatus zu haben.

4.3 Schaltraten von Cy5 für optimierte dSTORM-Mikroskopie

dSTORM ist eine Methode zur Auflösungserhöhung in der Fluoreszenzmikroskopie, die zu den stochastischen Methoden zu zählen ist (siehe Kapitel 2.5.3) [11]. Im ersten veröffentlichten Ansatz von dSTORM wurde Cy5 als Markierung verwendet. Cy5 kann, auch ohne die Verwendung eines Aktivators [6], unter bestimmten Bedingungen durch Anregung mit Licht verschiedener Wellenlängen zwischen einem fluoreszierenden An- und einem nicht fluoreszierenden Aus-Zustand reversibel geschaltet werden. Dieses direkte Schalten hat den Vorteil, dass kommerziell erhältliche Markierungen, beispielsweise zur Zellfärbung, verwendet werden können. Das bei dSTORM ausgenutzte Schalten des Fluorophors erfolgt ausschließlich unter Bedingungen der Sauerstofffreiheit. Diese kann durch den Einsatz eines enzymatischen Puffersystems oder durch das Spülen der Lösung mit einem Gas, das den

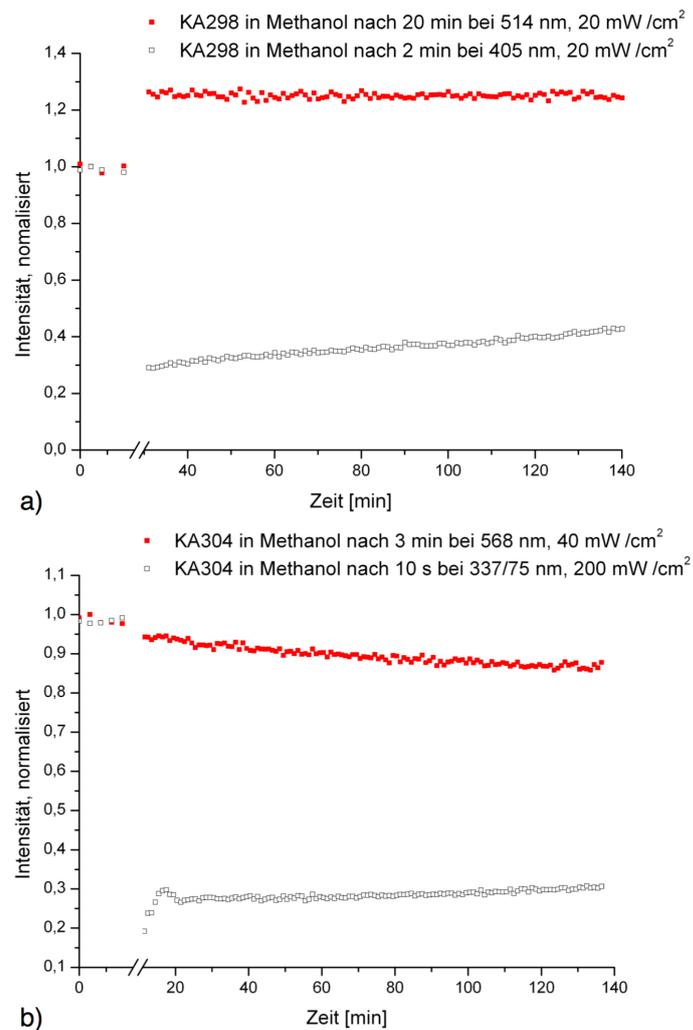


Abbildung 4.19: Thermische Stabilität des Aus-Zustands (grau) und des An-Zustands (rot) von a) KA298 und b) KA304 auf der Ensembleebene auf einer Zeitskala von Minuten. Die Datenpunkte wurde einmal pro Minute bei der Auslesewellenlänge (514 nm im Fall von KA298 und 568 nm im Fall von KA304) aufgenommen.

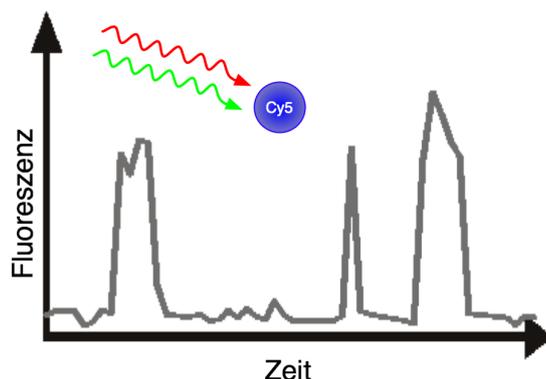


Abbildung 4.20: Zeitaufgelöste Fluoreszenzspur eines einzelnen Cy5-Moleküls unter *d*STORM-Bedingungen. Dieses wird gleichzeitig mit Licht von 647 nm und 514 nm bestrahlt, so dass es statistisch zwischen einem An- und einem Aus-Zustand wechselt.

gelösten Sauerstoff verdrängt, erreicht werden. Zusätzlich muss eine Thiolverbindung in ausreichender Konzentration (etwa 100 mM) zur Verfügung gestellt werden. Hierfür werden standardmäßig Mercaptoethylamin, β -Mercaptoethanol oder Cystein eingesetzt. Das Ausschalten des Cy5 erfolgt mit derselben Wellenlänge, mit der auch die Fluoreszenz des Farbstoffs angeregt wird. Nach einer gewissen Zeitdauer, innerhalb derer Cy5 Fluoreszenz emittiert, geht der Farbstoff über in einen Dunkelzustand. Aus diesem kann er durch Bestrahlung mit einer geeigneten, kürzeren Wellenlänge wieder zurück in den fluoreszierenden Zustand überführt werden. Als kürzere Wellenlänge werden standardmäßig 514 nm verwendet, doch konnte gezeigt werden [43], dass das Zurückschalten auch mit verschiedenen anderen Wellenlängen möglich ist. Werden nun beide Wellenlängen gleichzeitig eingestrahlt, so schaltet der Fluorophor stochastisch zwischen den beiden Zuständen. Abb. 4.20 zeigt die Fluoreszenzspur eines einzelnen Cy5-Moleküls, dass zugleich mit 647 als auch mit 514 nm bestrahlt wird. Abb. 4.21 zeigt ein typisches Fluoreszenzmuster eines einzelnen Cy5-Moleküls, das mit Weitfeldmikroskopie aufgenommen wurde. Wird dieses mehrmals zwischen seinem fluoreszierenden und seinem nicht fluoreszierenden Zustand geschaltet und jeweils die genaue Position determiniert, ergibt sich eine Verteilung der einzelnen Lokalisationen, deren Halbwertsbreite die Genauigkeit der Lokalisation und somit das Auflösungsvermögen repräsentiert.

Dieses Schaltverhalten kann, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, zur Auflösungserhöhung eingesetzt werden. Unter anderem war es mit der *d*STORM-Methode möglich, Cy5-markierte Mikrotubuli mit einem Abstand von weniger als 200 nm gegeneinander aufzulösen [11].

Wie bereits in der Einleitung und im Theorieteil der Arbeit beschrieben, ist das Verhältnis von Molekülen, die sich im An-, zu denen, die sich im Aus-Zustand befinden von entscheidender Bedeutung für die Anwendung von stochastischen Methoden für die Auflösungserhöhung. Nur wenn sich die Mehrzahl der Moleküle

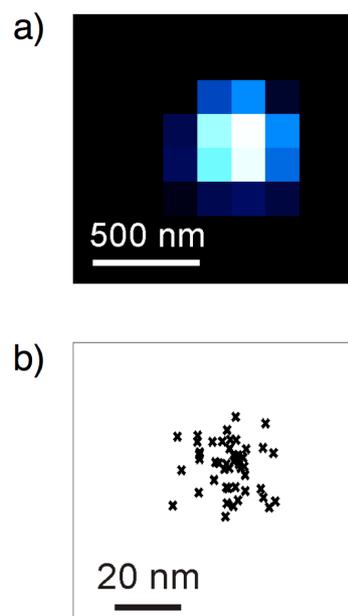


Abbildung 4.21: Lokalisation eines Cy5-Moleküls a) typisches Fluoreszenz-Muster eines einzelnen mit Cy5 markierten DNA-Moleküls. Die Punktabbildungsfunktion des Fluorophors wurde mit einer zweidimensionalen Gaussfunktion angenähert, um die Position genau zu bestimmen. b) Lokalisationsmuster eines einzelnen mit Cy5 markierten DNA-Moleküls. Der Fluorophor wurde mehrmals zwischen seinem fluoreszierenden und seinem nicht fluoreszierenden Zustand geschaltet.

im Aus-Zustand befindet, kann trotz einer hinreichend hohen Markierungsdichte gewährleistet werden, dass die Punktabbildungsfunktionen von einzelnen Molekülen detektiert und lokalisiert werden. Ist die Markierungsdichte zu gering, können keine durchgehend markierten Strukturen dargestellt werden. Zudem zeigte Cordes [18] kürzlich einen direkten, positiven Zusammenhang von Auflösungsvermögen und der Lebensdauer der zur Markierung verwendeten Fluorophore im Dunkelzustand. Aus diesem Grund wurde die Beeinflussungsmöglichkeiten der Schaltraten des Cy5 zwischen den beiden Zuständen und damit der Lebensdauern in den jeweiligen Zuständen untersucht, um einen hohen Quotienten von Molekülen im Aus- zu Molekülen im An-Zustand erreichen zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass die Schaltraten des Cy5 zwischen den beiden Zuständen linear abhängig von der Anregungsleistung der jeweiligen zum Schalten verwendeten Wellenlänge ist. Diese Zusammenhänge sind in Abb. 4.22 dargestellt, die die Ausschaltraten in Abhängigkeit von der verwendeten Leistung bei 647 nm (Abb. 4.22a), bzw. die Anschaltraten in Abhängigkeit von der verwendeten Leistung bei 514 nm (Abb. 4.22b) zeigt.

In Kenntnis der linearen Zusammenhänge zwischen zum Schalten verwendeter Leistung und Schaltraten ist es nun unkompliziert möglich, über die benutzten Leistungen, das Verhältnis von Molekülen im Aus- zu denen im An-Zustand so einzustellen, dass eine Detektion von einzelnen Punktabbildungsfunktionen auch bei hoher Markierungsdichte gewährleistet ist. Ein problemloser Ablauf eines Bildgebungsprozesses mit der *d*STORM-Methode ist somit garantiert. Abb. 4.23 zeigt ein mit der *d*STORM-Methode aufgenommenes Bild von mit Cy5-markierten Mikrotubuli in Cos7-Zellen mit einer Auflösung unterhalb der Auflösungsgrenze.

4.4 Fluoreszierende Proteine

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen, um herauszufinden, ob diese für Einzelmolekülexperimente und FRET-Anwendungen verwendet werden können [89]. Hierfür wurden diese sowohl auf der Ensemble- als auch auf der Einzelmolekülebene charakterisiert. Es wurden drei bekannte fluoreszierende Proteine, nämlich das Green Fluorescent Protein (GFP), dessen gelb verschobenes Derivat Yellow Fluorescent Protein (YFP) und das rot emittierende Protein DsRed untersucht. Weiterhin wurde ein erst kürzlich beschriebenes fluoreszierendes Protein charakterisiert. Dies ist ein als Monomer vorliegendes Derivat des DsRed, mCherry. Dieses wird außerdem mit einem weiteren monomeren DsRED-Derivat, dem mOrange, verglichen. Der Fokus der Charakterisierung der Proteine lag auf den Gesichtspunkten der Photostabilität, Fluktuationen der Fluoreszenzemission hinsichtlich der Intensität und der spektralen Verteilung und der Zeitdauer, über die ein einzelnes fluoreszierendes Protein beobachtet werden kann. Weiterhin wurden Fluoreszenzlebensdauern der Proteine bestimmt. Obwohl die Eigenschaften von eGFP, eYFP und DsRed bereits auf der Einzelmolekülebene untersucht wurden [23, 62, 90], wurde hier der direkte Ver-

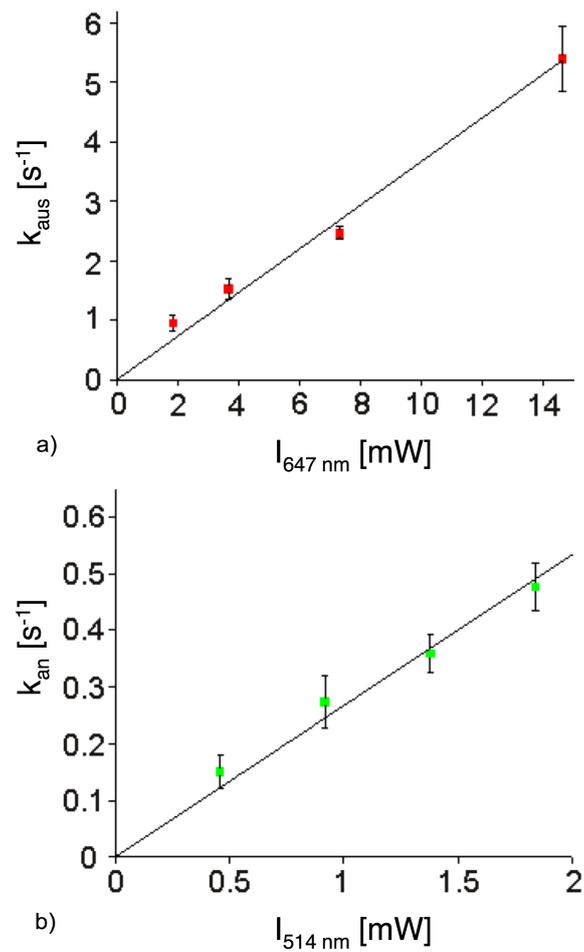


Abbildung 4.22: Lineare Leistungsabhängigkeit der k_{aus} -Schaltraten a) und k_{an} -Schaltraten b) von Cy5 bei Bestrahlung mit 647 nm bzw. 514 nm.

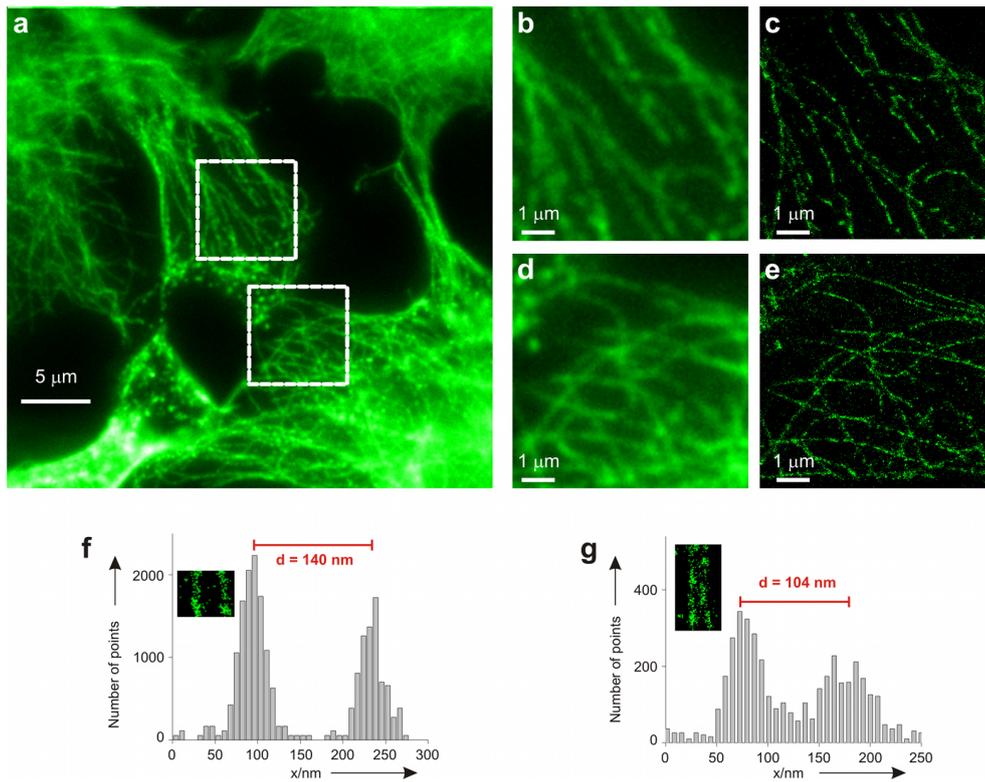


Abbildung 4.23: *d*STORM-Aufnahme von Microtubuli in Säugerzellen. (a) Immunofluoreszenz Bild von Microtubuli in COS-7 Zellen markiert mit einem primären Antikörper und Alexa 647 F(ab')₂ Fragmenten. (b, d) Konventionelle Fluoreszenz und (c, e) *d*STORMAufnahmen der markierten Regionen in (a). (f, g) Querschnittsprofile von benachbarten Microtubuli mit 140 und 104 nm Abstand innerhalb der Zelle. Die Ausschnitte zeigen die zugehörigen durch *d*STORM aufgelösten Filamente.

gleich mit mCherry in den Vordergrund gestellt. Sowohl das eYFP als auch das mCherry sind Mutanten, die zum einen vom GFP und zum anderen vom als Monomer vorliegenden DsRed Derivat mRFP derivatisiert wurden. Sie liegen somit beide ebenfalls als Monomere vor. Das Protein DsRed liegt als Tetramer vor und weist verschiedene fluoreszierende Zustände auf. Diese sind abhängig vom aktuellen Status hinsichtlich des Reifungsprozesses und der Oligomerisation des Proteins. Das vollständig ausgereifte Tetramer zeigt rote Fluoreszenz, während die unreifen Proteine auch Fluoreszenz im kürzeren Wellenlängenbereich zeigen [91]. Hier wurde das vollständig ausgereifte Protein verwendet. Daten der Absorption und der Emission der Proteine eGFP, eYFP, DsRed, mCherry und mOrange auf der Ensembleebene findet man in Abb. 4.24 und Abb. 4.25. Die auf der Ensembleebene gemessene Fluoreszenzlebensdauern finden sich in Tabelle 4.3. Die Fluoreszenzabfallkurve kann für alle Proteine hinreichend genau durch einen monoexponentiellen Abfall beschrieben werden. Die Fluoreszenzlebensdauern der Proteine liegen zwischen 1,46 und 3,04 ns. Allerdings muss beachtet werden, dass die Fluoreszenzabfallkurven für viele GFP- und DsRed- Derivate nicht streng monoexponentiell sind, besonders, wenn sie mit hoher Auflösung untersucht werden [92]. Beispielsweise konnte Cotlet [93] multiexponentielle Abfallkurven für das Protein DsRed in einem wässrigen Puffer zeigen, wobei die Amplituden der verschiedenen Lebensdauern stark von den Anregungs- und Detektionswellenlängen abhängig waren. Im Detail konnte gezeigt werden, dass der Fluoreszenzabfall von DsRed bei Anregung bei 460 nm und Detektion bei 500 nm von sehr kurzen Lebensdauer-Komponenten von einigen zehn bis mehreren hundert Pikosekunden dominiert wird. Dagegen kann der Fluoreszenzabfall bei Detektion über 650 nm nahezu vollständig mit einer 3,6 ns-Lebensdauer-Komponente beschrieben werden. Die Anwendung eines multiexponentiellen Modells auf die Fluoreszenzabfallkurve in den Daten bei Detektion am Emissionsmaximum und Anregung bei 495 nm enthüllt ebenfalls einen geringen Anteil von kürzeren Fluoreszenzlebensdauern im Bereich von 100 ps mit einer Amplitude von $\sim 15\%$. Zusätzlich gibt es eine entsprechend längeren Komponente, die den Abfall dominiert. Ein weiterer Vergleich zwischen Literaturwerten und diesen Ergebnissen ist durch die geringe Zeitauflösung innerhalb des Time correlated single photon counting (TCSPC)- Experiments, bei dem eine gepulste LED als Anregungslichtquelle mit einer Pulslänge von 1 ns (FWHM) verwendet wurde, limitiert.

Unter den untersuchten Proteinen zeigt mCherry die am weitesten rotverschobenen Absorption und Emission (Abb. 4.25). Wie von der geringen Fluoreszenzquantenausbeute ($\Phi = 0,22$) [91] ausgehend zu erwarten war, zeigt mCherry die kürzeste Fluoreszenzlebensdauer mit 1,46 ns. Dieses Merkmale machen mCherry sowohl für FRET- als auch für *Fluorescence Lifetime Imaging* (FLIM)-Anwendungen interessant. Um Einzelmolekülmessungen durchzuführen, wurden die Proteine in eine Polymermatrix aus Polyvinylalkohol eingebettet. Hierfür wurde eine PVA-Protein-Mischung auf einem Deckglas durch Rotationsbeschichtung aufgebracht. Die Proteine wiesen eine Dichte von < 1 Molekül / μm^2 auf. Hierdurch konnte garantiert werden, dass sich jeweils nur ein einziges Molekül im Laserfokus befand und

Tabelle 4.3: Fluoreszenzlebensdauern der fluoreszierenden Proteine

Protein	Fluoreszenzlebensdauer [ns]
eGFP	2,6
eYFP	3,0
DsRed	1,0 und 4,2 (zweiexponentiell)
mCherry	1,3
mOrange	3,0

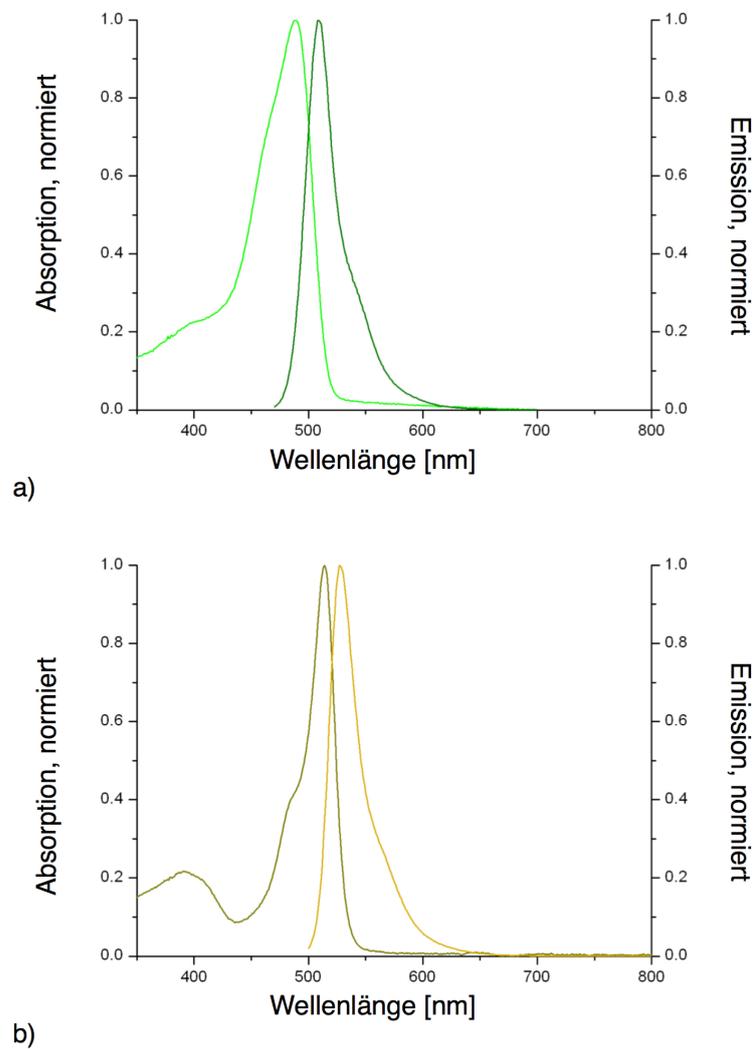


Abbildung 4.24: Absorptions- und Emissionsspektrum von a) eGFP Absorptionsspektrum: hellgrün, Emissionsspektrum: dunkelgrün, b) eYFP Absorptionsspektrum: braun, Emissionsspektrum: gelb, jeweils gemessen in PBS, pH 7,4

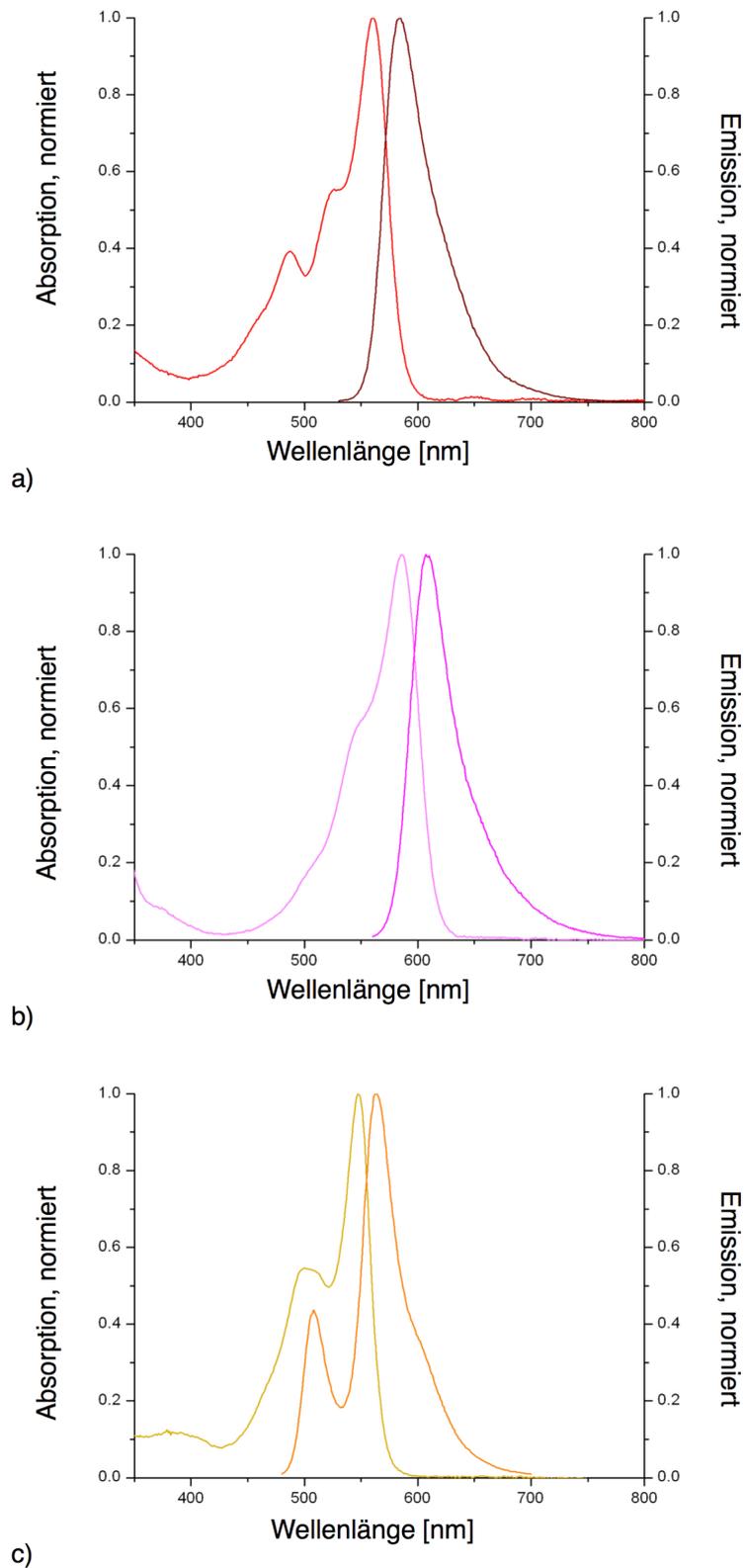


Abbildung 4.25: Absorptions- und Emissionsspektrum von a) DsRed Absorptionsspektrum: hellrot, Emissionsspektrum: dunkelrot, b) mCherry Absorptionsspektrum: hellrosa, Emissionsspektrum: dunkelrosa, c) mOrange Absorptionsspektrum: hellgelb, Emissionsspektrum: dunkelgelb, jeweils gemessen in PBS, pH 7,4.

dass das Signal dieses Moleküls wesentlich höher war, als das des Hintergrunds. Um Bilder von einzelnen Proteinen aufzunehmen, wurde ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 488 bzw. 568 nm und einer Anregungsleistung von wenigen kW cm^{-2} verwendet. Abb. 4.26 und 4.27 zeigen $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ große Raster-Bilder von derartigen Oberflächen.

Einzelne eGFP-Moleküle zeigen eine moderate Helligkeit (Abb. 4.26a) und einige Unterbrechungen der Emission von verschiedenen Zeitdauern. Zusätzlich werden einige Moleküle bereits nach kurzer Bestrahlung photozerstört. Ein ähnliches Bild ergibt sich sowohl für einzelne eYFP- (Abb. 4.26b) als auch für einzelne DsRed-Moleküle (Abb. 4.27a). Im Gegensatz dazu weisen die Abbildungen einzelner mCherry-Moleküle (Abb. 4.27b) eine sehr homogene Emission bezüglich der Intensität auf. Alle Punktabbildungsfunktionen, die einzelne mCherry-Moleküle repräsentieren, sind von vergleichbarer Helligkeit. Sie zeigen nur selten Unterbrechungen der Emission über die Zeit und sind relativ stabil gegenüber Photobleichen, wenn sie mit moderater Leistung angeregt werden. Auch der Vergleich von DsRed und mCherry bezüglich des F_2 -Wertes (Abb. 4.28 zeigt für mCherry eine sehr konstante spektrale Verteilung, während der F_2 -Wert von DsRed stark fluktuiert. Zum Vergleich wurden außerdem Bilder von einzelnen mOrange-Molekülen, einem weiteren fluoreszierenden Protein, mit einem Absorptionsmaximum bei 548 nm und einem Emissionsmaximum bei 562 nm, aufgenommen. Doch obwohl mOrange eine relativ hohe Fluoreszenzquantenausbeute von 0,69 [91] besitzt, war es durch schnelles Photobleichen kaum möglich, Bilder von einzelnen Molekülen aufzunehmen (Abb. 4.27c).

Um die fluoreszierenden Proteine weiter zu charakterisieren und sie hinsichtlich ihrer Benutzbarkeit für z.B. Einzel-Paar-FRET-Experimente zu vergleichen, wurde die Fluoreszenz-Emission einzelner Proteine über die Zeit aufgezeichnet (Abb. 4.29 und 4.30). Das Fluoreszenzsignal über die Zeit ist für die drei bekannten Proteine eGFP, eYFP (Abb. 4.29 a) und b) und DsRed (Abb. 4.30 a) dargestellt. Sie zeigen eine annehmbare Photostabilität, wenn sie mit moderaten Anregungsleistungen von $15 - 150 \text{ kW cm}^{-2}$ angeregt werden. Jedoch fluktuiert die Intensität der Emission der Proteine eGFP, eYFP und DsRed auf einer breiten Skala mit Auszeiten von wenigen ms bis zu einigen Sekunden. Dieses so genannte Blinken resultiert aus Übergängen zwischen mindestens zwei Zuständen des Chromophors des fluoreszierenden Proteins. Von diesen kann nur einer mit der Anregungswellenlänge angeregt werden und emittiert Fluoreszenz. Dieser Wechsel zwischen zwei Zuständen kann einer Kombination von Protonierung und Ladungs-Austausch-Ereignissen oder strukturellen Veränderungen wie Isomerisierung zugeschrieben werden [94]. In den meisten Fällen blieb die Anfangsintensität einzelner eGFP-, eYFP- oder DsRed-Moleküle für einige hundert ms stabil und emittierte in diesem Zeitraum Photonen mit einer Rate von einigen kHz bei einer Anregungsleistung von $50 - 65 \text{ kW cm}^{-2}$ bevor Dunkelzustände von verschiedenen Zeitdauern erreicht wurden.

Die statistische Auswertung wurde durch die breite Verteilung der Lebensdauern der Dunkelzustände und das schnelle Photobleichen erschwert. Es ließ sich jedoch beobachten, dass die zur Anregung genutzte Laserintensität keinen signifikanten

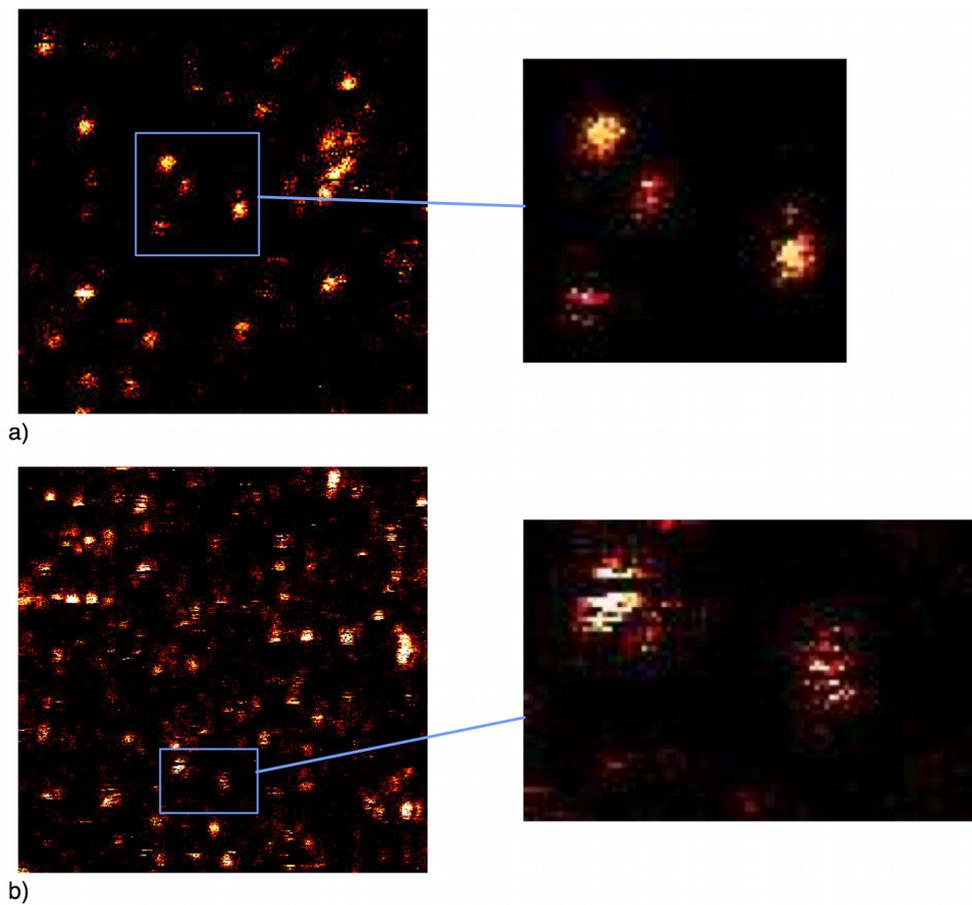


Abbildung 4.26: Konfokal aufgenommene Einzelmolekülbilder ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$ von in PVA eingebetteten a) eGFP und b) eYFP. Es wurde eine mittlere Anregungsleistung von ca. 150 kW cm^{-2} (eGFP) bzw. 65 kW cm^{-2} (eYFP) verwendet. Die Anregung erfolgte bei 488 nm. Die Pixelgröße betrug 50 nm und es wurde eine Integrationszeit von 2 ms verwendet. Es sind zusätzliche vergrößerte Bilder von einzelnen Proteinen gezeigt. (Grenzwerte der Darstellung: a) 12 - 33 Photonen / ms, b) 2 - 20 Photonen / ms)

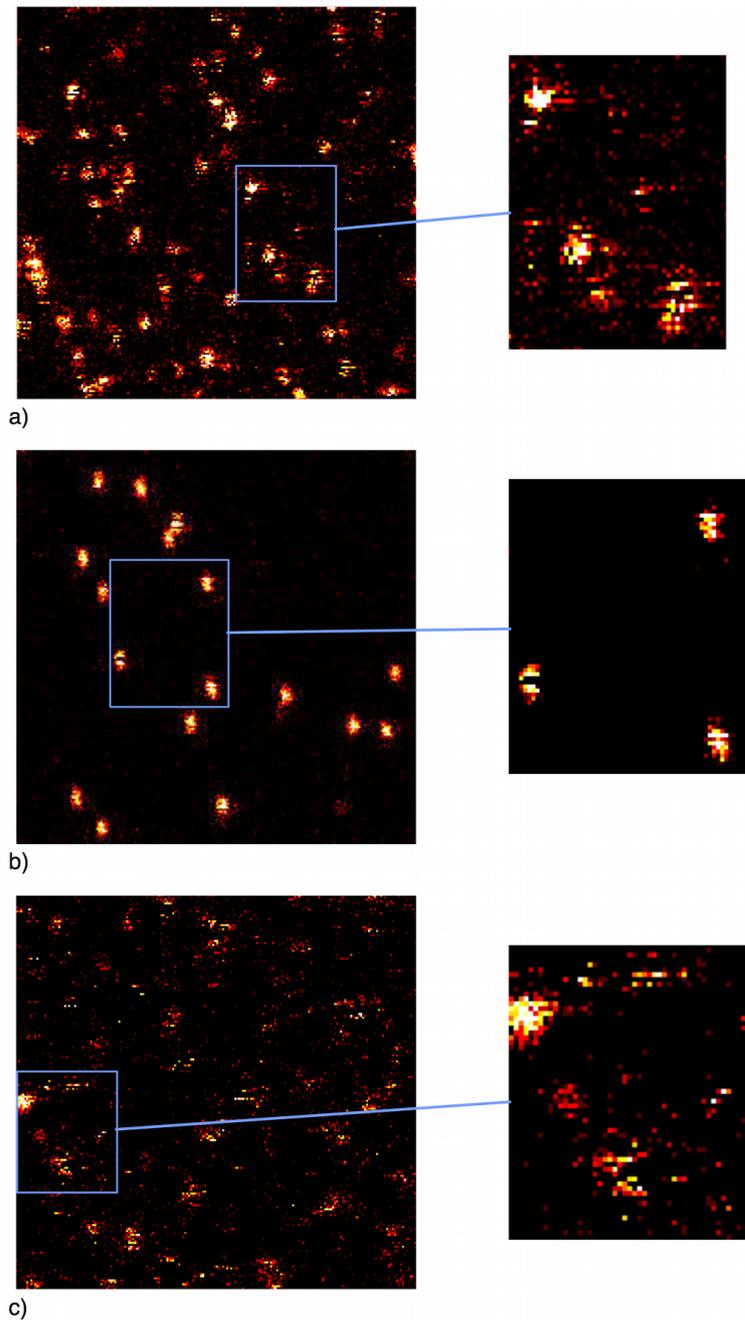
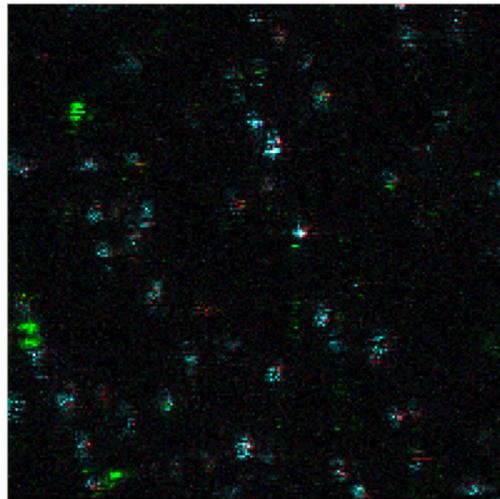
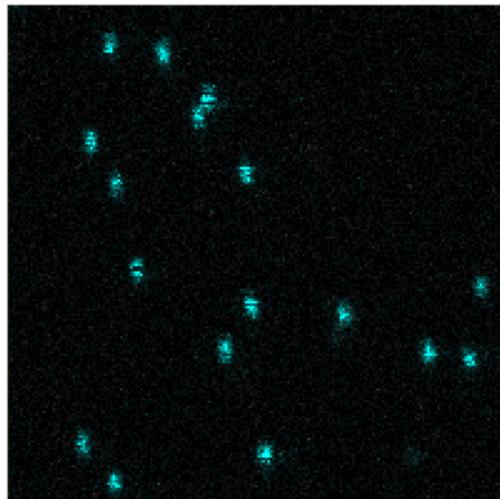


Abbildung 4.27: Konfokal aufgenommene Einzelmolekülbilder ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$ von in PVA eingebetteten a) DsRed, b) mCherry und c) mOrange. Es wurde eine mittlere Anregungsleistung von 15 kW cm^{-2} (DsRed und mCherry) und 60 kW cm^{-2} (mOrange) verwendet. Die Anregung erfolgte bei 568 nm a) und b) und bei 488 nm c). Die Pixelgröße betrug 50 nm , 25 nm im Fall von mCherry) und es wurde eine Integrationszeit von 2 ms verwendet. Es sind zusätzliche vergrößerte Bilder von einzelne Proteinen gezeigt. (Grenzwerte der Darstellung: a) $4 - 22 \text{ Photonen / ms}$, b) $2 - 20 \text{ Photonen / ms}$, c) $2 - 10 \text{ Photonen / ms}$)



a)



b)

Abbildung 4.28: Farblich dargestellt ist der F_2 -Wert von einzelnen DsRed- und mCherry-Proteinen (niedriger F_2 -Wert rot, hoher F_2 -Wert blau)

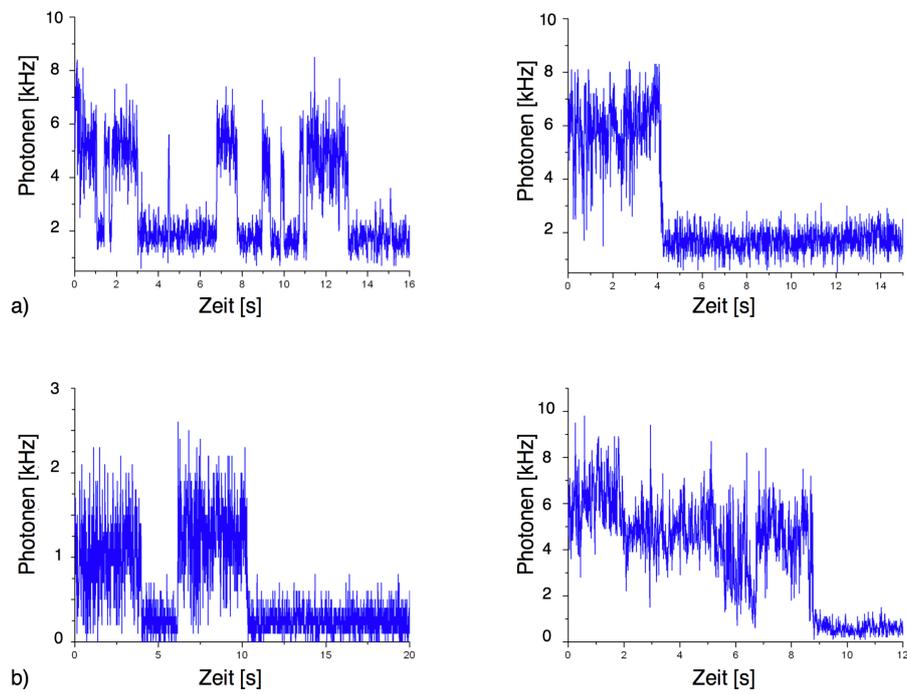


Abbildung 4.29: Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spuren von a) eGFP und b) eYFP. Die Anregung erfolgte bei 488 nm bei einer durchschnittlichen Anregungsleistung von 65 - 85 kW cm⁻². Die Integrationszeit betrug 10 ms.

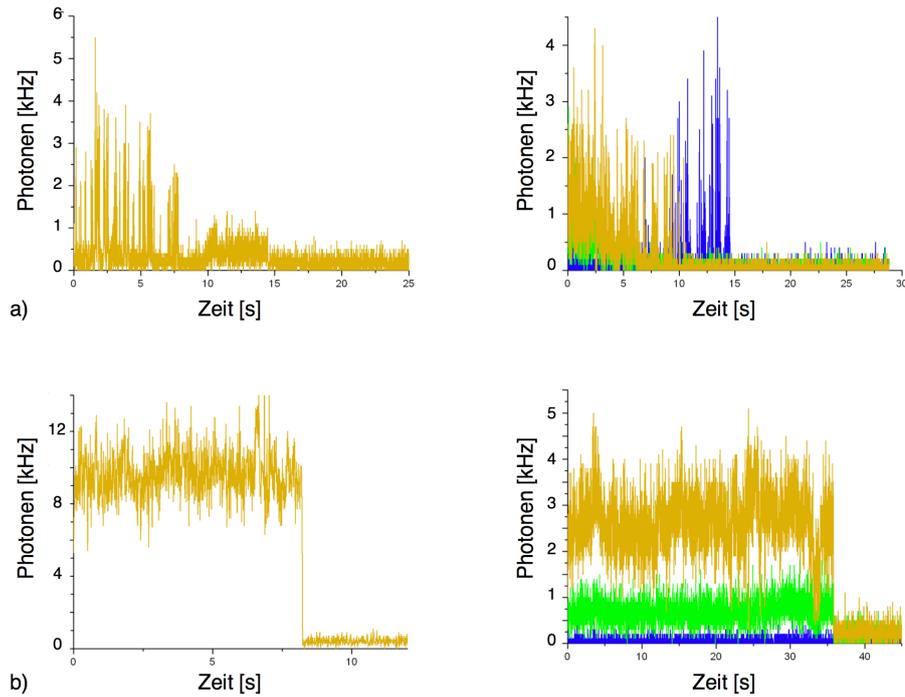


Abbildung 4.30: Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spuren von a) DsRed und b) mCherry. Die Anregung erfolgte bei 568 nm bzw. bei 568 nm und 488 nm abwechselnd (rechte Hand) bei einer durchschnittlichen Anreizungsleistung von $50 - 65 \text{ kW cm}^{-2}$. Die Integrationszeit betrug 10 ms. Durch die Struktur des DsRed als Tetramer zeigt dieses Protein verschiedene Intensitätslevel. Rechter Hand ist die spektrale Variabilität der Proteine über die verschiedenen Kanäle dargestellt (gelb: Anregung auf dem gelben Kanal, Detektion auf dem gelben Kanal, grün: Anregung auf dem blauen Kanal, Detektion auf dem gelben Kanal, blau: Anregung auf dem blauen Kanal, Detektion auf dem blauen Kanal)

Einfluss auf die Dauer der Dunkelzustände hatte. Andererseits nimmt die Dauer des An-Zustands, das heißt des Zustand, in dem das Molekül Photonen emittiert, bei allen untersuchten Proteinen bei steigender Anregungsintensität deutlich ab. Zusätzlich steigt die Wahrscheinlichkeit des Photobleichens signifikant bei steigender Laser-Leistung an. Dies verhindert die Beobachtung der Fluoreszenz der Proteine bei höheren Anregungsleistungen. Im Fall von DsRed tritt eine spektrale Veränderung der Emission, also des F_2 -Wertes, im Verlauf der Zeit auf, was durch nacheinander erfolgendem Photobleichen verschiedener Einheiten mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften des Tetramers zu erklären ist.

Das vierte Protein, mCherry, weist eine vergleichsweise höhere Photostabilität auf der Einzelmolekülebene auf, wie die Fluoreszenzspur in Abb. 4.30b demonstriert. Typischerweise konnten Photonennraten von 5-10 kHz bei einer Anregungsleistung von 50 - 65 kW cm⁻² über mehrere Sekunden von einzelnen mCherry-Molekülen, die in eine PVA-Matrix eingebettet waren, detektiert werden. Dies ist in Anbetracht der niedrigen Fluoreszenzquantenausbeute von mCherry besonders interessant. Die experimentellen Daten zeigen, dass bis zu 10⁵ Photonen von einem einzelnen mCherry-Molekül bei moderater Anregungsintensität detektiert werden können. Auch zeigt mCherry eine hohe Stabilität der spektralen Verteilung der Emission (Abb. 4.30a, rechte Seite). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die relativ hohen Anregungsleistungen, die in Einzel-Molekül-Experimenten verwendet werden, neue Pfade der Photozerstörung und für interne Konversion öffnen. Dies reduziert möglicherweise die gemessenen Fluoreszenzintensitäten von einigen fluoreszierenden Proteinen, die normalerweise hohe Fluoreszenzquantenausbeuten bei relativ hoher Stabilität besitzen.

Andererseits verringert die Immobilisierung in PVA die konformative Flexibilität und sollte daher strukturspezifische strahlungsfreie Deaktivierungsprozesse verhindern oder reduzieren.

Wie von den relativ homogenen Fluoreszenz-Punktabbildungsfunktionen einzelner mCherry-Moleküle zu erwarten war (Abb. 4.27b), zeigt das Protein nur geringe Fluktuationen der Fluoreszenz-Intensität auf der Millisekunden-Zeitskala. Diese herausragenden Eigenschaften machen mCherry daher zu einer idealen Fluoreszenzsonde für Einzelmolekül-Experimente. Die hohe Photonenausbeute, die langen Beobachtungszeiten und die spektralen Eigenschaften sollten Einzel-Molekül-Tracking und Lokalisation mit hoher Genauigkeit ermöglichen. Ebenso sollte die Anwendung in Einzel-Paar-FRET-Experimenten sogar in zellulärer Umgebung oder Mehrfarben-Experimenten durchführbar sein. Zusätzlich unterscheidet sich die kurze Fluoreszenzlebensdauer von 1,46 ns signifikant von der anderer fluoreszierender Proteine, was mCherry zu einem Kandidaten für hochsensitive FLIM-Anwendungen macht.

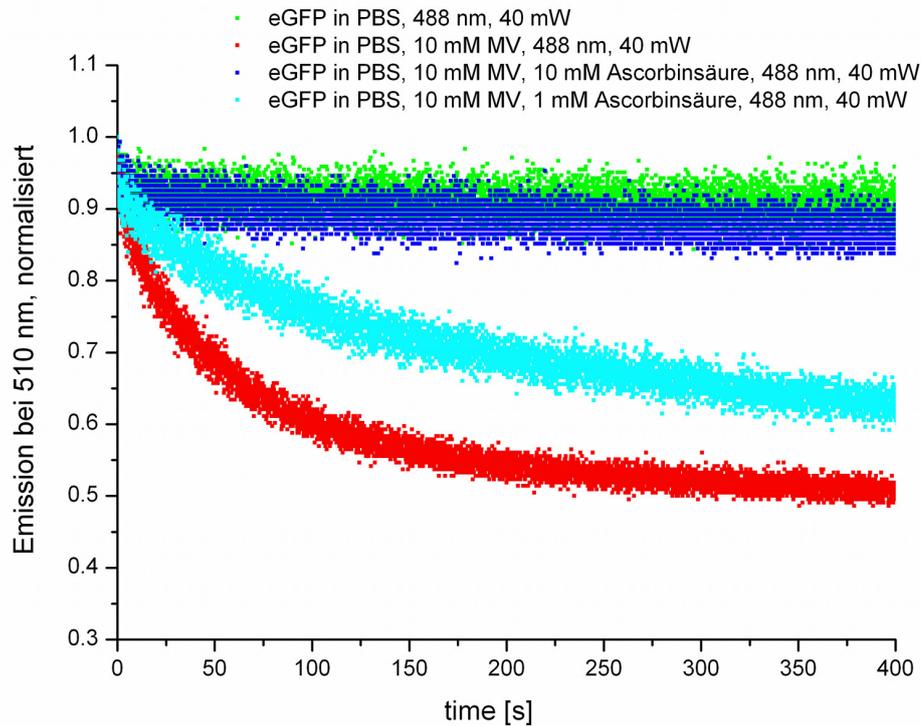


Abbildung 4.31: Generierung von Aus-Zuständen von eGFP durch Bestrahlung bei 488 nm unter Zugabe von Oxidations- oder bzw. und Reduktionsmitteln

4.4.1 Manipulation der Photophysik von eGFP zur Generierung reversibler Dunkelzustände

Das eGFP ist ein Derivat des GFP, das zuerst 1962 von [95] beschrieben wurde. Bis heute gibt es mehr als 30000 Publikationen, die sich mit dem GFP oder eGFP befassen. Das eGFP ist mit einer Vielzahl verschiedener Targets durch genetische Kodierung verknüpft. Aus diesem Grund ist es wünschenswert, hochauflösende Mikroskopie auch mit eGFP markierten Zielen durchführen zu können. eGFP zeigt von sich aus kein Verhalten der Photoaktivierung, der Photokonvertierung oder des Photoschaltens. Etliche Derivate des GFPs oder anderer fluoreszierender Proteine zeigen ein solches Verhalten (siehe Kapitel 2.7.1). Dennoch liegen diese nicht in einer derartigen Vielzahl von genetisch markierten Zielen vor.

Die den Versuchen zu Grunde liegende Idee war, die Photophysik des eGFPs so zu beeinflussen, dass es durch Anregung mit Licht in einen reversiblen Dunkelzustand überführt werden kann, was eine Anwendbarkeit in der hochauflösenden Mikroskopie bedeuten würde. Aus den Ergebnissen des vorigen Kapitels (Kapitel 4.4) ist ersichtlich, dass die Abbildung von individuellen eGFP-Molekülen möglich ist. eGFP besitzt daher das Potential in Methoden der hochauflösenden Mikro-

skopie, die auf der Lokalisation von einzelnen Fluorophoren basieren, eingesetzt zu werden. Es wurde untersucht, ob die Photostabilität des eGFPs beeinflussbar ist, wenn oxidierende oder reduzierende Reagenzien dem Medium, in dem sich das eGFP befindet, hinzugefügt werden. Abb. 4.31 zeigt die Photostabilität von eGFP in einer Ensemblemessung. Hierfür wurde das in PBS gelöste eGFP in einer Küvette bei 488 nm bestrahlt und die Emissionsintensität detektiert. Abb. 4.31 verdeutlicht, dass die Photostabilität von eGFP abnimmt, wenn ein Oxidationsmittel, in diesem Fall Methyl-Viologen, beigelegt wird. Es kommt zu einem exponentiellen Abfall der Intensität der Fluoreszenz innerhalb weniger Minuten. Im Gegensatz dazu zeigt das in PBS gelöste eGFP ohne Zugabe weiterer Reagenzien unter den verwendeten Bedingungen eine relativ hohe Photostabilität. Das Hinzugeben verschiedener Konzentrationen eines Reduktionsmittels, in diesem Fall Ascorbinsäure, verringert die Abnahme der Photostabilität in Abhängigkeit von der Konzentration. Hierbei konnte nicht geklärt werden, ob dieser Effekt auf eine Beeinflussung des Photosystems der eGFPs durch das Reduktionsmittel basiert, oder ob aus einer direkten Reaktion des Reduktionsmittels mit dem Oxidationsmittel eine geringere effektive Konzentration des Oxidationsmittels resultiert. Wird im Anschluss an diesen Ausschaltprozess die Anregungslichtquelle ausgeschaltet und nur in bestimmten Zeitintervallen die Höhe der Fluoreszenz-Intensität bestimmt, lässt sich ein Zurückkommen der Emission beobachten (Abb. 4.32). Dieses Zurückkommen zeigt eine sehr langsame Kinetik. Dennoch weist es darauf hin, dass der Dunkelzustand, den das eGFP bei Bestrahlung und Zugabe eines Oxidationsmittels erreicht, reversibel ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das eGFP so beeinflusst, dass sich jeweils die Mehrheit der Moleküle im Aus-Zustand befindet, so dass das eGFP für eine stochastische Methode der Auflösungserhöhung benutzt werden kann. Das Verhältnis der Aus- zu Anschaltrate scheint eine solche Anwendung zu begünstigen. Daher wurde sich im weiteren Verlauf der Arbeit auf die Beeinflussbarkeit der Aus- sowie der Anschaltraten durch Zugabe verschiedener Konzentrationen von Oxidations- und Reduktionsmitteln sowie der Verwendung verschiedener Anregungsleistungen konzentriert.

Die effektive Konzentration des Oxidationsmittels zeigt einen signifikanten, linearen Einfluss auf die Rate der Fluoreszenzabnahme. Dieser Zusammenhang wird in Abb. 4.33 dargestellt. Die Rate der Fluoreszenzabnahme ist linear abhängig von der verwendeten Leistung bei 488 nm, die sowohl zur Anregung der Fluoreszenz, als auch zum Überführen des eGFPs in den Dunkelzustand verwendet wird. Diese Abhängigkeit der Ausschaltrate von der verwendeten Anregungsleistung ist in Abb. 4.34 dargestellt. Die Höhe der Ausschaltrate kann, wie bereits erwähnt, durch die Zugabe eines Reduktionsmittels beeinflusst werden. Abb. 4.35 zeigt den Verlauf des Ausschaltprozesses bei der Zugabe von 10 mM Methylviologen und variierender Konzentration von Mercaptoethylamin (MEA). Wie man sieht, nimmt bei steigender MEA-Konzentration die Ausschaltrate ab und die Höhe des Gleichgewichtszustands steigt. Um ausschließen zu können, dass dieser Effekt auf einer direkten Reaktion zwischen Reduktions- und Oxidationsmittel beruht, wurde

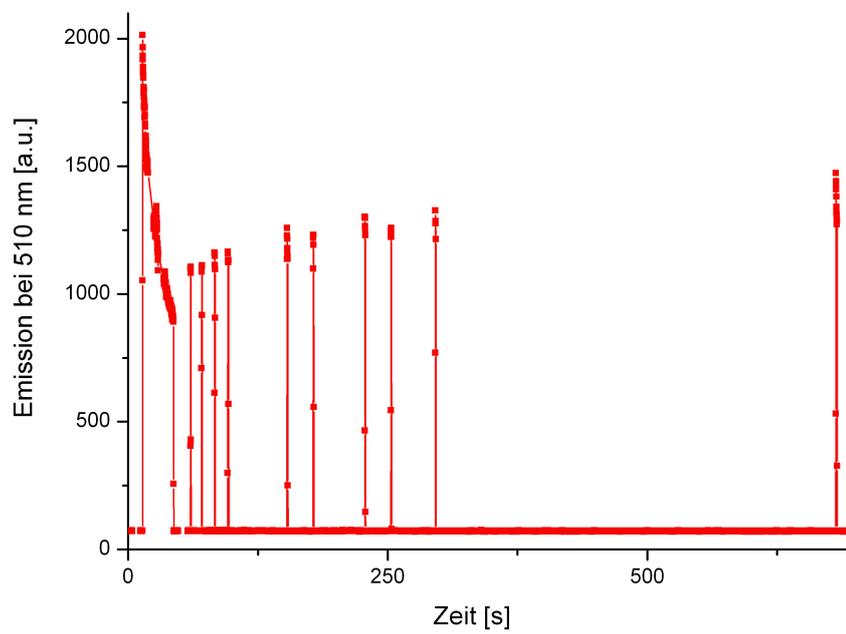


Abbildung 4.32: Wird eGFP bei Zugabe von 10 mM Methylviologen mit 488 nm bestrahlt, so sinkt die Intensität der bei 510 nm detektierten Fluoreszenz exponentiell. Nach Beenden der Bestrahlung kommt die Fluoreszenz langsam zurück.

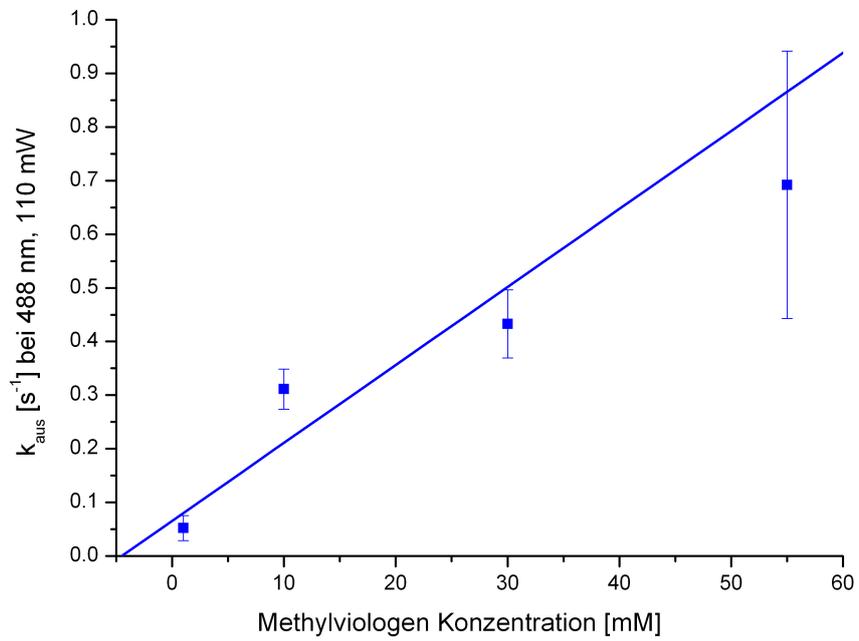


Abbildung 4.33: Lineare Abhängigkeit der k_{aus} -Schaltrate von eGFP von der verwendeten Methylviologen-Konzentration

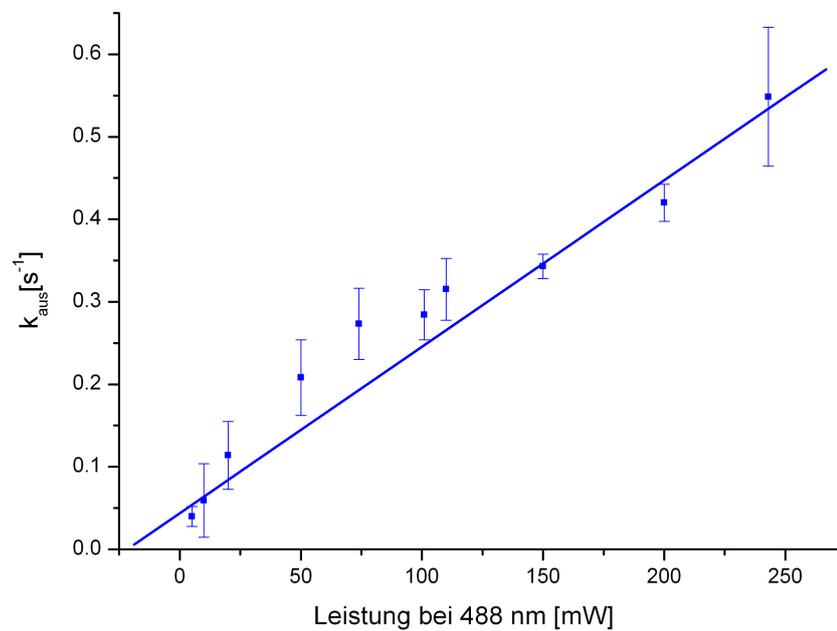


Abbildung 4.34: Lineare Abhängigkeit der k_{aus} -Schaltrate von eGFP von der Anregungsleistung bei 488 nm

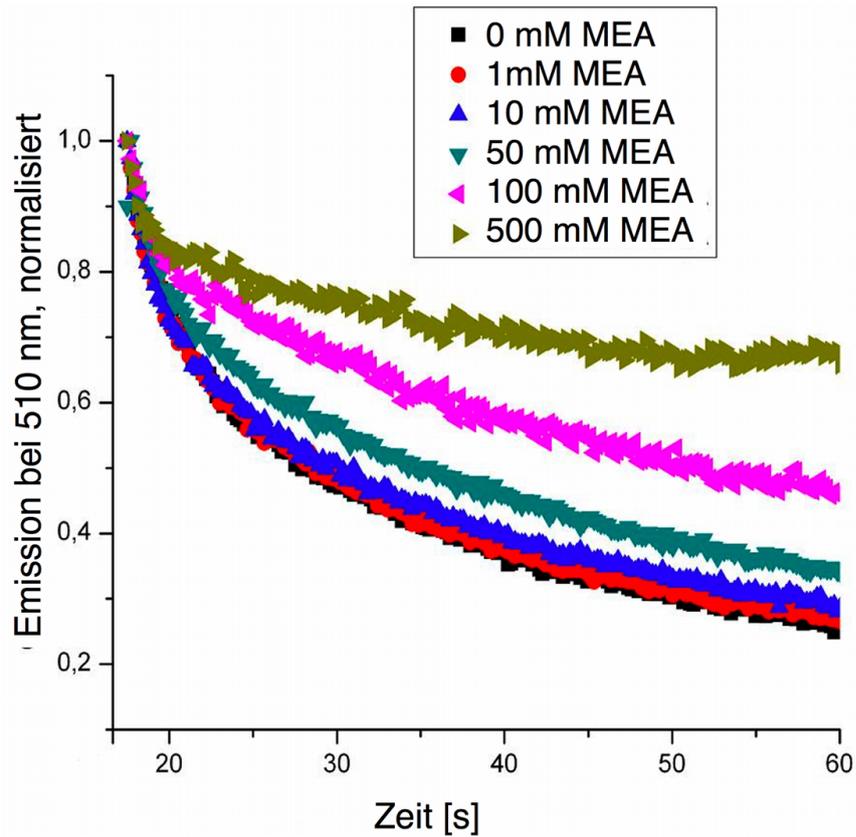


Abbildung 4.35: Von der Mercaptoethylamin-Konzentration abhängige Tiefe des Gleichgewichtszustands bei Generierung von Aus-Zuständen von eGFP. Die Messungen wurden jeweils bei Bestrahlung mit 488 nm, einer Methylviologen-Konzentration von 10 mM und variierender Mercaptoethylamin-Konzentration durchgeführt.

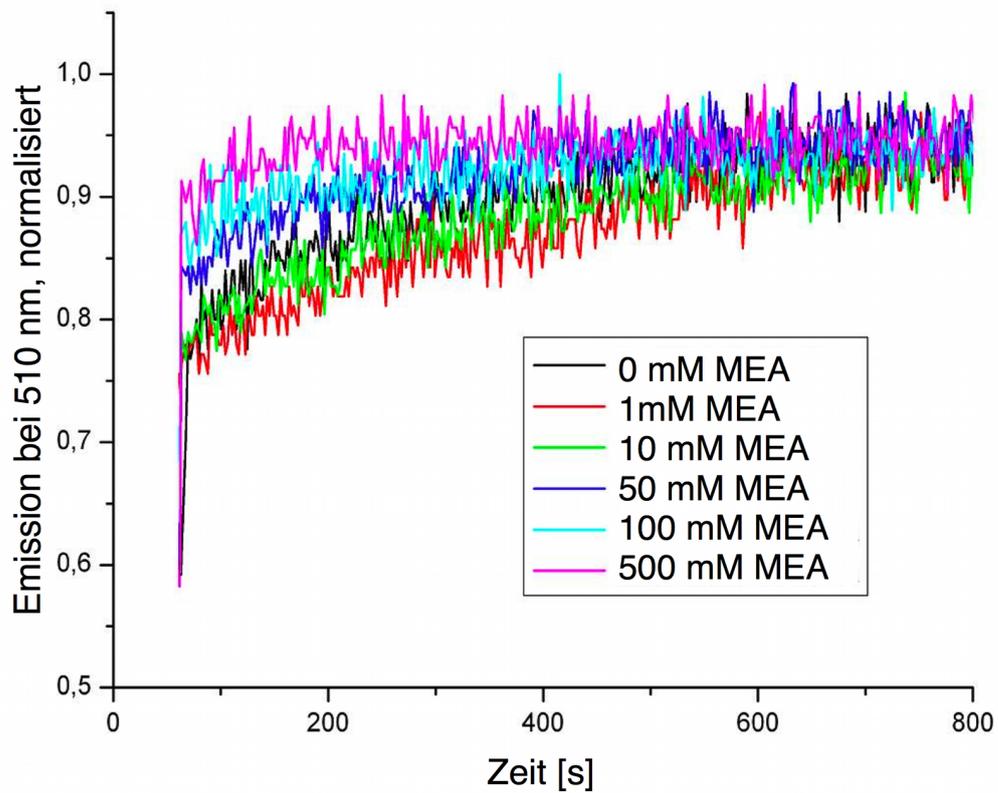


Abbildung 4.36: Von der Mercaptoethylamin-Konzentration abhängige Geschwindigkeit des Prozesses des Zurückkommens von eGFP aus dem Dunkelzustand. Die Messungen wurden jeweils nach Bestrahlung mit 488 nm, einer Methylviologen-Konzentration von 10 mM und variierender Mercaptoethylamin-Konzentration durchgeführt.

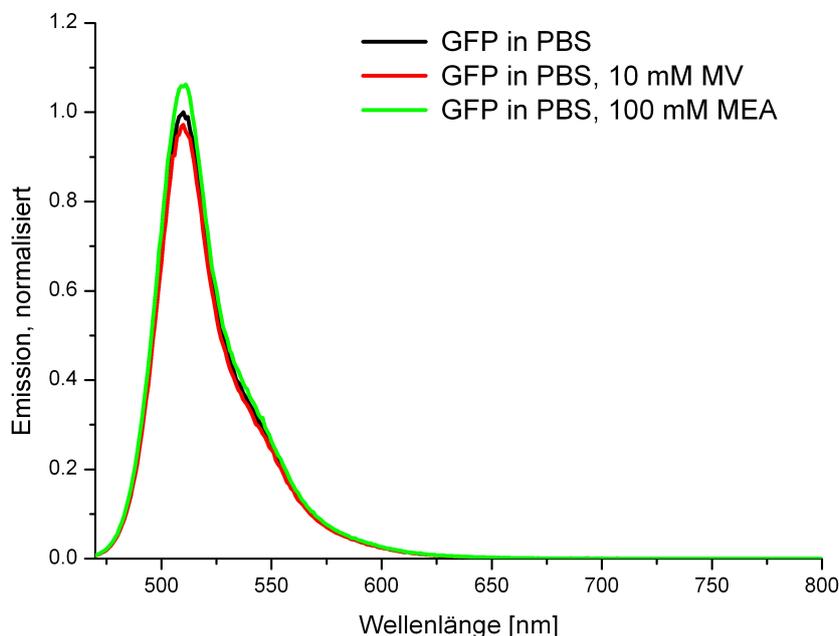


Abbildung 4.37: Die Zugabe von 10 mM Methylviologen (rotes Spektrum) bzw. 100 mM Mercaptoethylamin (grünes Spektrum) führen zu keiner signifikanten Veränderung des Spektrums im Vergleich zum in PBS aufgenommenen Spektrum (schwarz), wenn nicht vorher mit Licht von 488 nm bestrahlt wurde.

der Einfluss verschiedener MEA-Konzentrationen auf die Kinetik des Prozesses des Zurückkommens betrachtet. Abb. 4.36 stellt den Prozess des Zurückkommens der Fluoreszenzintensität bei verschiedenen MEA-Konzentrationen dar. Es lässt sich ein positiver Einfluss der Höhe der MEA-Konzentration auf die Geschwindigkeit dieses Prozesses erkennen.

Um sicherzustellen, dass der Einfluss des Oxidations- sowie Reduktionsmittels tatsächlich zur Generierung bzw. dem Abbau eines wie auch immer gearteten Dunkelzustands führt und der beobachtete Effekt nicht nur auf einem Löschen des ersten angeregten Zustands S_1 des Fluorophors basiert, wurde die Emission von eGFP in PBS, PBS mit 10 mM Methyl-Viologen und PBS mit 100 mM Mercaptoethylamin ohne vorherige Bestrahlung bestimmt. Abb. 4.37 zeigt die unter diesen Bedingungen erhaltenen Emissionsspektren und Tabelle 4.4 die Höhe der Emission am Maximum sowie die Abweichung zum in reinem PBS gemessenen Wert. Es zeigt sich sowohl bei Zugabe von Methyl-Viologen als auch bei Zugabe von Mercaptoethylamin nur eine geringe Abweichung der Fluoreszenzintensität vom in PBS gemessenen Wert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass durch Zugabe des Oxidations- und des Reduktionsmittels keine Beeinflussung des S_1 -Zustands stattfindet.

Tabelle 4.4: Lösungsmittel und Emission am Maximum

Lösungsmittel	Emission am Maximum (510 nm) [a.u.]	Abweichung zu PBS [%]
PBS	1	
PBS + 10 mM MV	0,97	-2,8
PBS + 100 mM MEA	1,058	+5,8

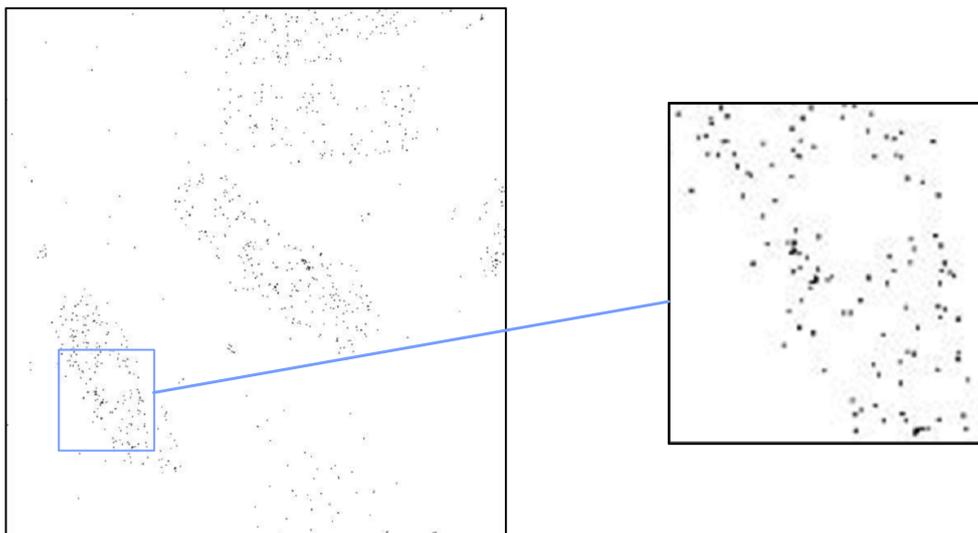


Abbildung 4.38: Rekonstruiertes Bild von mit eGFP markierten *E. coli* mit Hilfe von forcierten Fluoreszenz-Aus-Zuständen unter Zugabe von 10 mM Methylviologen und 100 mM Mercaptoethylamin. Rechter Hand findet sich die Vergrößerung eines Ausschnitts aus diesem Bild, auf der zu erkennen ist, dass die Mehrzahl der Proteine lediglich einmal lokalisiert wurde.

Anschließend an diese Vorversuche wurde *d*STORM-Messungen an Zellen (*E. coli*), deren mRNA-Polymerase mit eGFP markiert war, unter Zugabe von 10 mM Methylviologen und 100 mM Mercaptoethylamin durchgeführt. Es wurden Filme bei $\sim 3,5 \text{ kW cm}^{-2}$ Anregungsleistung bei 488 nm über mehrere Minuten aufgenommen. In den Bildern aus diesen Filmen konnten Fluoreszenzspots erkannt werden. Diese konnten als Punktabbildungsfunktionen einzelner Proteine identifiziert werden.

Aus den Lokalisationen dieser einzelnen Spots konnte ein Bild mit einer Verteilung der mRNA-Polymerase in einer Zelle mit hoher räumlicher Auflösung rekonstruiert werden (siehe Abb. 4.38). Die Vergrößerung zeigt, dass jedes Protein lediglich einmal lokalisiert wurde, was darauf hinweist, dass der Großteil der eGFP-Moleküle unter den gewählten Bedingungen nicht aus dem Aus-Zustand zurückkehrt. Ebenso war es bisher nicht möglich, eine Auflösungserhöhung an Zellen, in denen eine Struktur mit eGFP markiert war, zu zeigen. Dies wurde an HEK-Zellen sowie an U373-Zellen, deren Aktingerüst mit eGFP markiert war, versucht. In beiden Fällen konnten nur einzelne lokalisierte Spots auf den rekonstruierten Bildern gefunden werden und keine durchgängige Struktur. Dies weist darauf hin, dass der Großteil der eGFP-Moleküle eben nicht aus dem Dunkelzustand zurückkehrt und nur eine Minorität reversibel geschaltet werden kann. In jedem Fall bleibt ein endgültiger Beweis der Verwendbarkeit von eGFP unter den benutzten Bedingungen bisher aus.

Fazit und Ausblick

Im Rahmen meiner Arbeit beschäftigte ich mich mit der Entwicklung und Charakterisierung von Fluoreszenzsonden für verschiedene fortgeschrittene Fluoreszenzmikroskopiemethoden. Diese Methoden waren vornehmlich Methoden der *Super-resolution-fluorescence-microscopy*, die eine Auflösung von Objekten unterhalb der Auflösungsgrenze ermöglichen. Diese Methoden basieren größtenteils auf der Verwendung von Photoschaltern als Fluoreszenzsonden, die zwischen einem fluoreszierenden An- und einem nicht fluoreszierenden Aus-Zustand geschaltet werden können. Es wurden verschiedene Photoschalter charakterisiert, die auf der Basis von photochromen Molekülen wie Diarylethenen oder Spiropyranen beruhen. An diese photochromen Moleküle wurden organische Fluorophore, die sich für die Einzelmolekülspektroskopie eignen, gekoppelt. Die Konjugate wurden sowohl auf der Ensembleebene als auch, im Fall der Spiropyrankonjugate, auf der Einzelmolekülebene untersucht. Die Ergebnisse ermöglichen es, die Charakteristika dieser Photoschalter im Kontext ihrer Verwendbarkeit für *Super-resolution-fluorescence-microscopy* zu bewerten. Es konnte sowohl im Fall der Spiropyran- als auch der Diarylethenkonjugate gezeigt werden, dass diese photochromen Moleküle in einem ihrer beiden Zustände als effiziente Energie-Transfer-Akzeptoren fungieren und so die Fluoreszenz der gekoppelten Fluorophore löschen. Die photochromen Moleküle wurden so ausgewählt, dass ihre Absorption in ihrem jeweils anderen Zustand nicht mit der Emission der Fluorophore überlappt und so kein resonanter Energietransfer stattfinden kann. Die beiden Einheiten der Konjugate wurden im Fall der Spiropyrankonjugate über einen starren Linker verbunden, der eine direkte elektronische Wechselwirkung der beiden Komponenten unterband, wobei ihr Abstand in der Größenordnung effizienten resonanten Energietransfers lag. Die Effektivität der Linker erkennt man daran, dass die Fluoreszenzquantenausbeuten der gekoppelten

Fluorophore im An-Zustand des Konjugats nahezu denen der freien Fluorophore entsprachen. Im Fall der Diarylethenkonjugate war die Fluoreszenzquantenausbeute des An-Zustands der Konjugate gegenüber der des Referenzfarbstoffs deutlich reduziert. Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass der Schaltprozess der Diarylethenkonjugate nur teilweise reversibel ist (vgl. 4.2.2, legen den Verdacht nahe, dass zwischen den beiden Komponenten der Konjugate auch eine elektronische Wechselwirkung besteht und dass die Kopplung zwischen beiden während der Schaltprozesse teilweise zerstört wird. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass das Schaltverhalten des Diarylethen KA123, das über seine Absorption beobachtet werden konnte, und des Diarylethen OT557, das eine schwache immanente Fluoreszenz zeigt, besonders durch seine hohe Reversibilität hervorsteht. Auch das Schaltverhalten der Spiropyrankonjugate zeigte auf der Ensembleebene eine relativ hohe Reversibilität, obwohl freie Spiropyrane für gewöhnlich eine schlechtere Reversibilität des Schaltprozesses zeigten als die freien Diarylethene. Im Verlauf meiner Arbeit und auch in Veröffentlichungen, die im Zeitrahmen meiner Arbeit erschienen [18, 19] stellte sich heraus, dass die Lebensdauern der Photoschalter in ihren An- bzw. Aus-Zuständen und folglich die Schaltraten zwischen diesen beiden Zuständen von entscheidender Bedeutung für den Einsatz in hochauflösenden Mikroskopiemethoden ist. Beste Voraussetzungen sind erfüllt, wenn die Ausschalttraten größer sind als die Anschalttraten. Deswegen wurde auf diesen Aspekt besondere Beachtung gelegt und die Kinetiken der Photoschalterkonjugate bei verschiedenen Anregungsleistungen betrachtet. Tabelle 5.1 stellt die Größenordnungen der Schaltraten der Konjugate und das Verhältnis von An- zu Ausschalttraten zusammen.

Wie man sieht, sind im Fall der Spiropyrankonjugate die Ausschalttraten bei vergleichbarer Leistung deutlich niedriger als die Anschalttraten. Dies führt dazu, dass ein Ausschalten der Fluoreszenz der Konjugate auf der Ensembleebene nur bis zu einem gewissen Gleichgewichtszustand möglich ist, da die Konjugate bereits durch die Auslesewellenlänge effizient wieder zurück in den An-Zustand geschaltet werden. Um die Merocyaninform der Spiropyrane zu stabilisieren und so eine Verschiebung der Schaltraten zu erreichen, wurden die Konjugate in Polymere eingebettet, was gleichzeitig die Durchführung von Einzelmolekülexperimenten ermöglichte. Bei diesen Experimenten mit den Spiropyrankonjugaten auf der Einzelmolekülebene stellte sich heraus, dass es durch die Stabilisierung der Merocyaninform zwar möglich war, das chemische Gleichgewicht so zu verschieben, dass alle Fluorophore in einem Beobachtungsvolumen ausgeschaltet werden konnten, doch führte die für den Ausschaltprozess benötigte hohe Leistung im UV-Bereich zu einer schnellen Photozerstörung der gekoppelten Fluorophore nach maximal vier Schaltzyklen. Diese Ergebnisse stellen die Einsatzmöglichkeit von Spiropyrankonjugaten als Fluoreszenzsonden in hochauflösenden Mikroskopiemethoden in Frage und unterstreichen die Notwendigkeit von hohen Ausschalttraten. Dennoch konnte an diesen Konjugaten gezeigt werden, dass ein determiniertes Photoschalten eines Fluorophors über ein gekoppeltes photochromes Molekül, das in einer seiner Formen als effizienter Energie-Transfer-Akzeptor fungiert, prinzipiell möglich ist. Andererseits findet sich in dem Molekül MB231 ein Spiropyran, das sowohl

Tabelle 5.1: Schaltraten der verschiedenen Photoschalter

Photoschalter	Größen- ordnung Ausschaltrate	Größen- ordnung Anschaltrate	Verhältnis von Ausschalt- Anschaltrate bei vergleichbaren Schaltleistungen
MB131-Konjugate	0,04-0,06 s ⁻¹ (200 mW/cm ²)	0,1-0,2 s ⁻¹ (5 mW/cm ²)	<< 1
MB216-Konjugate	0,04-0,06 s ⁻¹ (200 mW/cm ²)	0,5-0,7 s ⁻¹ (5 mW/cm ²)	<< 1
KA289	~0,15 s ⁻¹ (50 mW/cm ²)	~0,002 s ⁻¹ (50 mW/cm ²)	~ 100
KA304	0,9 s ⁻¹ (200 mW/cm ²)	~0,05 s ⁻¹ (50 mW/cm ²)	~ 5
OT557	~ 0,04 s ⁻¹ (50 mW/cm ²)	~ 0,0025 (50 mW/cm ²)	~ 10
Cy5*	~ 2,5 s ⁻¹ (0,18 kW/cm ²)	~ 0,4 s ⁻¹ (0,04 kW/cm ²)	~ 1
eGFP*	~ 0,3 s ⁻¹ (150 mW/cm ²)	wesentlich niedriger	>> 1

* unter passenden chemischen Bedingungen

wasserlöslich ist, als auch eine hohe Stabilität in seiner offenen Form aufweist, da diese durch das polare Lösungsmittel stabilisiert wird. Es ist daher vielversprechend, dieses Spiropyran zukünftig in Fluorophor-MB231-Konjugaten einzusetzen. Die Diarylethen-basierten Konjugate weisen ein inverses Verhältnis der Aus- zu Anschaltraten im Vergleich zu den Spiropyran-Konjugaten auf. Hier sind die Ausschaltraten um 1 - 2 Größenordnungen höher als im Fall der Spiropyran-Konjugate, was dazu führt, dass moderate Ausschaltleistungen verwendet werden können. Konsequenterweise kann bei Wahl von passenden Schaltleistungen das Verhältnis von Fluorophoren im An- zu denen im Aus-Zustand so eingestellt werden, dass sich der Großteil der Fluorophore im Aus-Zustand befindet, wie es für ein optimales Funktionieren von hochauflösenden Mikroskopiemethoden nötig ist. Dieses Verhältnis kann schon in Ensembleexperimenten eingestellt werden, in denen es möglich war, die Fluoreszenz auf bis zu 20% zu senken. Aus den Kalkulationen der Schaltraten und der berechneten Energietransfereffizienz von $\sim 100\%$ wäre eine noch effektivere Löschung unter den gewählten Bedingungen auf Ensembleebene zu erwarten gewesen. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sich Diarylethen-basierte Konjugate determiniert schalten lassen. So stellen sich aufgrund der Ergebnisse die Diarylethene als besonders geeignet heraus, um als Schalteinheit in derartigen photoschaltbaren Konjugaten eingesetzt zu werden. Ein weiterer Vorteil der Diarylethene ist die hohe Stabilität der Diarylethen-basierten Konjugate sowohl im Aus- als auch im An-Zustand über Stunden, was in dem P-Typ-Photochromismus der Diarylethene begründet liegt. Ebenso lassen sich die Konjugate mit relativ geringen Anregungsleistungen schnell und effizient schalten, was eine Sättigung des Übergangs in den Aus-Zustand in einem RESOLFT-artigen Ansatz erleichtert. Freie Diarylethene zeigen zusätzlich eine hohe Reversibilität des Schaltprozesses. Diese Reversibilität konnte für die von mir untersuchten Diarylethen-Fluorophor-Konjugate nicht in dem Maße bestätigt werden, doch sollte sich diesem Problem durch eine veränderte Ankopplung der Fluorophore entgegen wirken lassen. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass es durch den Einsatz von Diarylethenen mit einem verlängerten konjugierten π -System gelang, das Schalten in beide Richtungen mit Licht im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums zu induzieren. Eine Benutzung von UV-Licht wird so umgangen. Sowohl im Fall der Spiropyran- als auch der Diarylethen-basierten Konjugate beeinflusst die Auslesewellenlänge den Schaltzustand der Photoschalter. Im Fall der Konjugate induziert die Auslesewellenlänge gleichzeitig ein Anschalten der Konjugate. Nur im Fall des Diarylethen OT557 mit schwacher immanenter Fluoreszenz induziert die Auslesewellenlänge ein Ausschalten des Photoschalters. Hier liegt also keine Entkopplung der Auslese- von den Schaltwellenlängen vor. Dieses schränkt einen Einsatz in den hochauflösenden Mikroskopiemethoden nicht ein, da die *d*STORM-artigen Methoden ohnehin auf einer Lokalisation von stochastisch in den beiden Zuständen verteilten Fluorophoren basieren. Daher ist es nicht nötig, dass der Photoschalter von der Auslesewellenlänge nicht beeinflusst wird. Es ist im Gegenteil sogar von Vorteil, dass nicht noch eine dritte Wellenlänge benötigt wird, um den Schaltprozess zu induzieren. Dies trifft ebenso zu bei einer determinierten Methode nach dem

RESOLFT-Konzept. Hier ist der Bereich, in dem die Fluoreszenz ausgelesen wird, auch der Bereich, in dem die Photoschalter im An-Zustand vorliegen sollen. Dieser Bereich wird durch die Sättigung des Übergangs in den Aus-Zustand ringförmig eingeschnürt. Auch hier ist es vorteilhaft, auf eine dritte Wellenlänge verzichten zu können. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass sich die determiniert schaltbaren Diarylethen-basierten Konjugate aufgrund verschiedener Charakteristika besonders für einen Einsatz in einem RESOLFT-artigen Ansatz anbieten. Ein photoschaltbarer Fluorophor eines anderen Typus ist das Cy5. Dieses kann unter bestimmten chemischen Bedingungen und Bestrahlung bei der Auslesewellenlänge 674 nm und einer weiteren kürzeren Wellenlänge reversibel zwischen einem An- und einem Aus-Zustand geschaltet werden, bzw. kann dem Fluorophor ein Blinkverhalten aufgezwungen werden. Dieses Verhalten ermöglicht einen Einsatz dieses Fluorophors in der *d*STORM-Mikroskopie [11]. Inzwischen ist dieses Verfahren an einer Vielzahl von Targets verwendet worden. Auch im Fall des Cy5 wurde ein Fokus auf dessen Schaltkinetiken gelegt. Es stellte sich heraus, dass die Raten des Schaltprozesses linear von der verwendeten Schaltleistung abhängen (vgl. Tabelle 5.1). Durch das Ausnutzen der linearen Zusammenhänge zwischen Schaltleistungen und -raten kann bei einer gegebenen Markierungsdichte über die Schaltleistungen das ideale Verhältnis von Fluorophoren im An- zu Fluorophoren im Aus-Zustand eingestellt werden, um einen schnellen und störungsfreien Bildgebungsprozess mit der *d*STORM-Methode zu gewährleisten und eine Auflösung von bis zu 20 nm in der Bildebene zu erreichen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden verschiedene fluoreszierende Proteine auf der Einzelmolekülebene betrachtet. So konnte ihr Potential für die Einzelmolekül-Mikroskopie und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Anwendungen bewertet werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass das fluoreszierende Protein mCherry, ein Derivat des DsRed, sich besonders für derartige Anwendungen eignet. mCherry zeigt eine besonders hohe Photostabilität auf der Einzelmolekülebene. Weiterhin weist es ein stabiles Fluoreszenzsignal auf, das nur selten von Fluoreszenzauszeiten auf der Millisekunden-Zeitskala unterbrochen wird. Zudem ist auch die spektrale Verteilung der Fluoreszenz stabil, besonders im Vergleich zu DsRed, was eine Voraussetzung für FRET-Anwendungen ist. mCherry sticht durch seine rot verschobene Absorption und Emission hervor, da in diesem Bereich nur wenig Autofluoreszenz in biologischen Proben zu erwarten ist. Das mCherry zeigt sich auch im Vergleich zu konventionell genutzten fluoreszierenden Proteinen wie eGFP, eYFP oder DsRed als ideal für Mehrfarben-Experimente, *Fluoreszenz Lifetime Imaging* (FLIM) oder Einzelmolekültechniken. Nachdem sich das eGFP als für die Einzelmolekülspektroskopie geeignet erwies, wurde die Photophysik des fluoreszierenden Proteins eGFP durch seine chemische Umgebung beeinflusst. Ziel war es dabei, reversible Dunkelzustände zu generieren, um das eGFP für hochauflösende Mikroskopiemethoden, die auf der Lokalisation einzelner, zeitlich separierter Fluorophore basieren, zugänglich zu machen. Auch wenn die Arbeit an der Beeinflussbarkeit der Photophysik von eGFP und der Generierung reversibler Dunkelzustände noch nicht zu einem Einsatz dieses fluoreszierenden Proteins in einer

Hochauflösungsanwendung geführt haben, so sind die Ergebnisse doch vielversprechend und sollten zukünftig weiter verfolgt werden.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit Photoschalter der drei in Kapitel 1 vorgestellten Typen charakterisiert. Das größte Potential zeigte der organische Farbstoff Cy5, der in einer hochauflösenden Mikroskopiemethode zur Anwendung kommt. Bisher konnten keine Anwendungen zur Hochauflösung mit den synthetischen Konjugaten realisiert werden. Dennoch konnte ihr Potential für Anwendungen, in denen determiniertes Photoschalten nötig ist, klar herausgestellt werden. Besonders die Diarylethen-basierten Photoschalter profilierten sich während meiner Arbeit aufgrund ihrer Charakteristika als erfolgsversprechende Kandidaten für Hochauflösungs-Mikroskopie nach dem RESOLFT-Konzept. Hierfür muss zukünftig an einer Verbesserung der Kopplung zwischen Fluorophor und photochromer Einheit, die nicht anfällig für Ermüdungserscheinungen ist, gearbeitet werden. Wenn zusätzlich eine Möglichkeit geschaffen wird, bestimmte Targets mit den Konjugaten zu markieren, sollte einem Einsatz in der hochauflösenden Mikroskopie nichts widersprechen.

Literaturverzeichnis

- [1] M Minsky. Microscopy apparatus. *US Patent*, 3.013.467, Nov 1957.
- [2] M. G Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc*, 198(2):82–7, May 2000.
- [3] R. E Thompson, D. R Larson und W. W Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J*, 82(5):2775–83, May 2002.
- [4] A Yildiz, J. N Forkey, S. A McKinney, T Ha, Y. E Goldman und P. R Selvin. Myosin v walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 300(5628):2061–5, Jun 2003.
- [5] E Betzig, G. H Patterson, R Sougrat, O. W Lindwasser, S Olenych, J. S Bonifacino, M. W Davidson, J Lippincott-Schwartz und H. F Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–5, Sep 2006.
- [6] M. J Rust, M Bates und X Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nat Methods*, 3(10):793–5, Oct 2006.
- [7] S. T Hess, T. P. K Girirajan und M. D Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J*, 91(11):4258–72, Dec 2006.
- [8] P Dedecker, J.-I Hotta, C Flors, M Sliwa, H Ujii, M. B. J Roeffaers, R Ando, H Mizuno, A Miyawaki und J Hofkens. Subdiffraction imaging through the selective donut-mode depletion of thermally stable photoswitchable fluorophores: numerical analysis and application to the fluorescent protein dronpa. *J Am Chem Soc*, 129(51):16132–41, Dec 2007.

- [9] S. W Hell. Far-field optical nanoscopy. *Science*, 316(5828):1153–8, May 2007.
- [10] M Bates, B Huang und X Zhuang. Super-resolution microscopy by nanoscale localization of photo-switchable fluorescent probes. *Curr Opin Chem Biol*, 12(5):505–14, Oct 2008.
- [11] M Heilemann, S v. d Linde, M Schüttpelz, R Kasper, B Seefeldt, A Mukherjee, P Tinnefeld und M Sauer. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(33):6172–6, Jan 2008.
- [12] C Steinhauer, C Forthmann, J Vogelsang und P Tinnefeld. Superresolution microscopy on the basis of engineered dark states. *J Am Chem Soc*, 130(50):16840–1, Dec 2008.
- [13] M Heilemann, S v. d Linde, A Mukherjee und M Sauer. Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(37):6903–8, Jan 2009.
- [14] R Wombacher, M Heidbreder, S v. d Linde, M. P Sheetz, M Heilemann, V. W Cornish und M Sauer. Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nat Methods*, 7(9):717–9, Sep 2010.
- [15] T Klein, A Löscherger, S Proppert, S Wolter, S v. d Linde und M Sauer. Live-cell dstorm with snap-tag fusion proteins. *Nat Methods*, 8(1):7–9, Jan 2011.
- [16] T. A Klar, S Jakobs, M Dyba, A Egner und S. W Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(15):8206–10, Jul 2000.
- [17] S. W Hell und J Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 19(11):780–2, Jun 1994.
- [18] T Cordes, M Strackharn, S. W Stahl, W Summerer, C Steinhauer, C Forthmann, E. M Puchner, J Vogelsang, H. E Gaub und P Tinnefeld. Resolving single-molecule assembled patterns with superresolution blink-microscopy. *Nano Lett*, 10(2):645–51, Feb 2010.
- [19] S v. d Linde, S Wolter, M Heilemann und M Sauer. The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging. *J Biotechnol*, 149(4):260–6, Sep 2010.
- [20] B Seefeldt, R Kasper, M Beining, J Mattay, J Arden-Jacob, N Kemnitzer, K. H Drexhage, M Heilemann und M Sauer. Spiropyran as molecular optical switches. *Photochem Photobiol Sci*, 9(2):213–20, Feb 2010.

- [21] G. H Patterson und J Lippincott-Schwartz. A photoactivatable gfp for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 297(5588):1873–7, Sep 2002.
- [22] J Wiedenmann, S Ivanchenko, F Oswald, F Schmitt, C Röcker, A Salih, K.-D Spindler und G. U Nienhaus. Eosfp, a fluorescent marker protein with uv-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proceedings of the National Academy of Science*, 101:15905, Nov 2004.
- [23] R Ando, H Mizuno und A Miyawaki. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science*, 306(5700):1370–3, Nov 2004.
- [24] S Habuchi, R Ando, P Dedecker, W Verheijen, H Mizuno, A Miyawaki und J Hofkens. Reversible single-molecule photoswitching in the gfp-like fluorescent protein dronpa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(27):9511–6, Jul 2005.
- [25] C Flors, J i Hotta, H Uji-i, P Dedecker, R Ando, H Mizuno, A Miyawaki und J Hofkens. A stroboscopic approach for fast photoactivation-localization microscopy with dronpa mutants. *J Am Chem Soc*, 129(45):13970–7, Nov 2007.
- [26] J Vogelsang, C Steinhauer, C Forthmann, I. H Stein, B Person-Skegro, T Cordes und P Tinnefeld. Make them blink: probes for super-resolution microscopy. *Chemphyschem*, 11(12):2475–90, Aug 2010.
- [27] X Sheng, A Peng, H Fu, Y Liu, Y Zhao, Y Ma und J Yao. Modulation of a fluorescence switch based on photochromic spirooxazine in composite organic nanoparticles. *Nanotechnology*, 18:5707, Apr 2007.
- [28] M Irie. Diarylethenes for memories and switches. *Chem Rev*, 100(5):1685–1716, May 2000.
- [29] M Irie, T Fukaminato, T Sasaki, N Tamai und T Kawai. Organic chemistry: A digital fluorescent molecular photoswitch. *Nature*, 420:759, Dec 2002.
- [30] T Fukaminato, T Sasaki, T Kawai, N Tamai und M Irie. Digital photoswitching of fluorescence based on the photochromism of diarylethene derivatives at a single-molecule level. *J Am Chem Soc*, 126(45):14843–9, Nov 2004.
- [31] G Berkovic, V Krongauz und V Weiss. Spiropyran and spirooxazines for memories and switches. *Chem Rev*, 100(5):1741–1754, May 2000.
- [32] Y Yokoyama. Fulgides for memories and switches. *Chem Rev*, 100(5):1717–1740, May 2000.
- [33] W Moerner und L Kador. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys Rev Lett*, 62(21):2535–2538, May 1989.

- [34] J. M Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Number 2. Auflage. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Norwell, MA 02061 USA, 1999.
- [35] P. A Tipler. *Physik*. Spektrum, Heidelberg, 2006.
- [36] E. U Condon. Recent developments in quantum mechanics. *Science*, 68(1757): 193–5, Aug 1928.
- [37] J. B Birks. *Organic molecular photophysics*. John Wiley and Sons Ltd, London, 1973.
- [38] P. R Selvin. Fluorescence resonance energy transfer. *Methods in Enzymology*, 246:300–34, Jan 1995.
- [39] C Sheppard und D Shotton. *Confocal Laser Scanning Microscopy*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK, 1997.
- [40] P Tinnefeld und M Sauer. Branching out of single-molecule fluorescence spectroscopy: challenges for chemistry and influence on biology. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(18):2642–71, Apr 2005.
- [41] S. W Hell, K. I Willig und V Westphal. Fluoreszenzmikroskopie ohne beugungsgrenze. *Biospektrum*, 12(5):492–494, 2006.
- [42] M Bossi, J Fölling, M Dyba, V Westphal und S. W Hell. Breaking the diffraction resolution barrier in far-field microscopy by molecular optical bistability. *New Journal of Physics*, 8:275, Nov 2006.
- [43] R Kasper, B Harke, C Forthmann, P Tinnefeld, S. W Hell und M Sauer. Single-molecule sted microscopy with photostable organic fluorophores. *Small*, 6(13): 1379–84, Jul 2010.
- [44] J Vogelsang, R Kasper, C Steinhauer, B Person, M Heilemann, M Sauer und P Tinnefeld. A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(29):5465–9, Jan 2008.
- [45] H Dürr und H Bouas-Laurent. *Photochromism: Molecules and Systems*. Elsevier B. V., Amsterdam, The Netherlands, Jan 2003.
- [46] V Malatesta, J. C Crano und R Guglielmetti. Organic photochromic and thermochromic compounds. *Plenum New York*, 2, 1999.
- [47] A. T Bens. *Photochrome Dithienylethenfarbstoffe als molekulare Modellsysteme für die optische Informationsspeicherung*. Dissertation, Universität Düsseldorf, 2001.
- [48] G Likhtenshtein. *Stilbenes: Applications in Chemistry, Life Sciences and Materials Science*. Wiley-VCH, Weinheim, Jan 2009.

- [49] T Iyoda, T Saika und K Honda. . . . A multi-mode chemical transducer 1 new conjugated function of photochromism and electrochromism of azo-quinone compound. *Tetrahedron Letters*, 30(40), Jan 1989.
- [50] J Lanyi. Photochromism of halorhodopsin. cis/trans isomerization of the retinal around the 13-14 double bond. *Journal of Biological Chemistry*, 261(30): 14025–30, Jan 1986.
- [51] H Dürr. Perspectives in photochromism: A novel system based on the 1,5electrocyclization of heteroanalogous pentadienyl anions. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 28(4):413–431, Jan 1989.
- [52] H Spreitze und J Daub. Functional dyes for molecular switching. dihydroazulene/vinylheptafulvene photochromism: Effect of π -arylenes on the switching behavior. *Liebigs Annalen*, 9:1637–1641, Jan 1995.
- [53] W Laarhoven. Photochemical cyclizations and intramolecular cycloadditions of conjugated arylolefins. part i: Photocyclization with dehydrogenation. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 102(4):185204, Jan 1983.
- [54] A. F Perveyev und A. F Mikhaylov. Agcl-cucl photochromic coatings. *Soviet Journal of Optical Technology*, 39:117–118, 1972.
- [55] R Dickerson und I Geis. *Chemie - eine lebendige und anschauliche Einführung*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Jan 1990.
- [56] D Waldeck. Photoisomerization dynamics of stilbenes. *Chem Rev*, 91(3): 415436, Jan 1991.
- [57] F. B Mallory und C. W Mallory. *Organic Reactions*, volume 30. Wiley VCH, New York, 1984.
- [58] M Irie. Photochromism of diarylethene molecules and crystals. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci*, 86(5):472–83, Jan 2010.
- [59] S Nakamura und M Irie. Thermally irreversible photochromic systems. a theoretical study. *The Journal of Organic Chemistry*, 53(26):6136–6138, Jan 1988.
- [60] R Bertelson. Spiropyrans. *Organic Photochromic and Thermochromic Compounds*, 1(11):11–83, Jan 1999.
- [61] R. Y Tsien. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67:509–44, Jan 1998.
- [62] G Jung und A Zumbusch. Improving autofluorescent proteins: comparative studies of the effective brightness of green fluorescent protein (gfp) mutants. *Microsc Res Tech*, 69(3):175–85, Mar 2006.

- [63] C. L Takanishi, E. A Bykova, W Cheng und J Zheng. Gfp-based fret analysis in live cells. *Brain Res*, 1091(1):132–9, May 2006.
- [64] M Hofmann, C Eggeling, S Jakobs und S. W Hell. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(49):17565–9, Dec 2005.
- [65] D Chudakov, V Verkhusha, D Staroverov, E Souslova, S Lukyanov und K Lukyanov. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. *Nature Biotechnology*, 22(11):1435–9, Jan 2004.
- [66] V Verkhusha und A Sorkin. Conversion of the monomeric red fluorescent protein into a photoactivatable probe. *Chemistry & biology*, 12(3):279–85, Jan 2005.
- [67] F. V Subach, V. N Malashkevich, W. D Zencheck, H Xiao, G. S Filonov, S. C Almo und V. V Verkhusha. Photoactivation mechanism of pamcherry based on crystal structures of the protein in the dark and fluorescent states. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(50):21097–102, Dec 2009.
- [68] N. G Gurskaya, V. V Verkhusha, A. S Shcheglov, D. B Staroverov, T. V Cherpurnykh, A. F Fradkov, S Lukyanov und K. A Lukyanov. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat Biotechnol*, 24(4):461–5, Apr 2006.
- [69] R Ando, H Hama, M. K Hino, H Mizuno und A Miyawaki. An optical marker based on the uv-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(20):12651–6, 2002.
- [70] H Tsutsui, S Karasawa, H Shimizu, N Nukina und A Miyawaki. Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO reports*, 6(3):233–8, Mar 2005.
- [71] S Habuchi, H Tsutsui, A Kochaniak, A Miyawaki und A. M v Oijen. mkikgr, a monomeric photoswitchable fluorescent protein. *PLoS ONE*, 3(12):1–9, Jan 2008.
- [72] S McKinney, C Murphy und K Hazelwood. . . . A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat Methods*, 6:131–133, Jan 2009.
- [73] A. C Stiel, S Trowitzsch, G Weber, M Andresen, C Eggeling, S. W Hell, S Jakobs und M. C Wahl. 1.8 a bright-state structure of the reversibly switchable fluorescent protein dronpa guides the generation of fast switching variants. *Biochem J*, 402(1):35–42, Feb 2007.
- [74] M Andresen, A. C Stiel, J Fölling, D Wenzel, A Schönle, A Egner, C Eggeling, S. W Hell und S Jakobs. Photoswitchable fluorescent proteins enable

- monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol*, 26(9):1035–40, Sep 2008.
- [75] D. M Chudakov und K. A Lukyanov. Use of green fluorescent protein (gfp) and its homologs for in vivo protein motility studies. *Biochemistry Mosc*, 68(9):952–7, Sep 2003.
- [76] A. C Stiel, M Andresen, H Bock, M Hilbert, J Schilde, A Schönle, C Eggeling, A Egner, S. W Hell und S Jakobs. Generation of monomeric reversibly switchable red fluorescent proteins for far-field fluorescence nanoscopy. *Biophys J*, 95(6):2989–97, Sep 2008.
- [77] G Chirico, A Diaspro, F Cannone, M Collini, S Bologna, V Pellegrini und F Beltram. Selective fluorescence recovery after bleaching of single e2gfp proteins induced by two-photon excitation. *Chemphyschem*, 6(2):328–35, Feb 2005.
- [78] J Ross, P Buschkamp, D Fetting, A Donnermeyer, C. M Roth und P Tinnefeld. Multicolor single-molecule spectroscopy with alternating laser excitation for the investigation of interactions and dynamics. *J Phys Chem B*, 111(2):321–6, Jan 2007.
- [79] K Altenhöner. *Synthese π -erweiterter Diarylethene: Zugangswege zu Photoschaltbarer Fluoreszenz*. Dissertation, Universität Bielefeld, 2010.
- [80] O Piestert, H Barsch, V Buschmann, T Heinlein, J. P Knemeyer, K. D Weston und M Sauer. A single-molecule sensitive dna hairpin system based on intramolecular electron transfer. *Nano Lett*, 3(7):979–982, Jan 2003.
- [81] Y Harada, K Sakurada, T Aoki, D. D Thomas und T Yanagida. Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay. *J Mol Biol*, 216(1):49–68, Nov 1990.
- [82] T Ha, I Rasnik, W Cheng, H. P Babcock, G. H Gauss, T. M Lohman und S Chu. Initiation and re-initiation of dna unwinding by the escherichia coli rep helicase. *Nature*, 419(6907):638–41, Oct 2002.
- [83] T Härd, P Fan und D. R Kearns. A fluorescence study of the binding of hoechst 33258 and dapi to halogenated dnas. *Photochem Photobiol*, 51(1):77–86, Jan 1990.
- [84] S Wolter, M Schüttpelz, M Tscherepanow, S. V. D Linde, M Heilemann und M Sauer. Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. *J Microsc*, 237(1):12–22, Jan 2010.
- [85] V. I Minkin. Photo-, thermo-, solvato-, and electrochromic spiroheterocyclic compounds. *Chem Rev*, 104(5):2751–76, May 2004.

- [86] Z Tian, W Wu und A. D Li. Photoswitchable fluorescent nanoparticles: preparation, properties and applications. *Chemphyschem*, 10(15):2577–91, Oct 2009.
- [87] A Dvornikov, J Malkin und P. M Rentzepis. Spectroscopy and kinetics of photochromic materials for 3d optical memory devices. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(27):6746 – 6752, Jan 1994.
- [88] H Zheng, W Zhou, M Yuan, X Yin, Z Zuo, C Ouyanga, H Liua, Y Li und D Zhu. Optic and proton dual-control of the fluorescence of rhodamine based on photochromic diarylethene: mimicking the performance of an integrated logic gate. *Tetrahedron Letters*, 50(14):1588–1592, Jan 2009.
- [89] B Seefeldt, R Kasper, T Seidel, P Tinnefeld, K.-J Dietz, M Heilemann und M Sauer. Fluorescent proteins for single-molecule fluorescence applications. *J Biophotonics*, 1(1):74–82, Mar 2008.
- [90] R Steinmeyer, A Noskov, C Krasel, I Weber, C Dees und G. S Harms. Improved fluorescent proteins for single-molecule research in molecular tracking and colocalization. *J Fluoresc*, 15(5):707–21, Sep 2005.
- [91] N. C Shaner, R. E Campbell, P. A Steinbach, B. N. G Giepmans, A. E Palmer und R. Y Tsien. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 22(12):1567–72, Dec 2004.
- [92] M Cotlet, J Hofkens, M Maus, T Gensch, J Michielis, G Dirix, M Guyse, J Vanderleyden, A. J. W. G Visser und F Schryver. Excited state dynamics in the enhanced green fluorescent protein mutant probed by picosecond time-resolved single photon counting spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.*, 79(9):4999 – 5006, 2001.
- [93] M Cotlet, J Hofkens, S Habuchi, G Dirix, M. V Guyse, J Michiels, J Vanderleyden und F. C. D Schryver. Identification of different emitting species in the red fluorescent protein dsred by means of ensemble and single-molecule spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(25):14398–403, Dec 2001.
- [94] W Moerner, A Grunnet-Jepsen, D. A Wright und B. R Smith. Recent advances in high-gain photorefractive polymers. In *Lasers and Electro-Optics*, pages 31–32, Jan 2002.
- [95] O Shimomura, F Johnson und Y Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan aequorea. *J Cell Comp Physiol*, 59(3):223–39, Jun 1962.

ERKLÄRUNG

Ich, Britta Seefeldt, erkläre hiermit, dass ich die Dissertation selbständig erarbeitet und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Bielefeld, den 17. Februar 2011

Britta Seefeldt