



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Physik
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Christian G. Hübner

**Einzelmoleküluntersuchungen des Leuchtverhaltens
organischer Farbstoffmoleküle**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Jan Pavlita

aus Hamburg

Lübeck, 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian G. Hübner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gereon Hüttmann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26. Oktober 2020

Zusammenfassung

Die Fluoreszenzmikroskopie und die Einzelmolekülspektroskopie sowie die suprauflösende Mikroskopie sind insbesondere in den Lebenswissenschaften beliebte und heutzutage weit verbreitete Methoden. Sie ermöglichen die Abbildung biologischer Materialien mit beispielloser Auflösung und die Untersuchung komplexer Wechselwirkungen und Dynamiken bis auf die Ebene einzelner Moleküle, um verschiedene biologische, chemische und physikalische Prozesse zu entschlüsseln. Da diese Methoden hohe Anforderungen an die eingesetzten Fluorophore wie auch Instrumente stellen, ist es von entscheidender Bedeutung, deren photophysikalischen Eigenschaften zu verstehen. Ein Ziel dieser Arbeit ist daher, den Einfluss der Zugabe von Glycerin, Sauerstoff und Additiven auf das photophysikalische Verhalten verschiedener organischer Fluorophore bei optischer Sättigung zu untersuchen. Dies geschieht durch eine umfassende Analyse der Diffusions- und Blinkdynamik von sechs Rhodamin- und Cyaninfarbstoffen mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS). Darüber hinaus zeigt eine selbst entwickelte Monte-Carlo-Simulation, dass nichtlineare Abweichungen der positionsabhängigen Fluoreszenzantwort im beobachteten Fokusbereich bei hohen Intensitäten von einigen 100 kW cm^{-2} zu einer fehlerhaften Interpretation der Intensitäts-Autokorrelation und einem der Photozerstörung ähnlichen Abfall der molekularen Helligkeit führen können. Daher wird eine neu entwickelte Anpassungsfunktion aus einem empirischen Modell der Molekül-Detektions-Funktion (MDF) hergeleitet, die eine gute Approximation des beobachteten Verhaltens liefert. Darüber hinaus wird eine einfache Methode vorgeschlagen, die auf den in dieser Arbeit hergeleiteten photophysikalischen Zusammenhängen basiert, um die Anregungs- und Detektionseigenschaften eines konfokalen Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskops getrennt voneinander zu beurteilen und die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Instrumenten durch die FCS-Sättigungsreihe einer einfach zu handhabenden Farbstoffprobe zu ermöglichen.

Abstract

Fluorescence microscopy and single molecule spectroscopy as well as superresolution microscopy are popular and nowadays widely used methods, in particular in the life sciences. They enable the imaging of biological materials with unprecedented resolution and the investigation of complex interactions and dynamics down to the level of individual molecules in order to decipher different biological, chemical and physical processes. As these methods pose high demands on the employed fluorophores, as well as on the used instruments, it is of crucial importance to understand their photophysical properties. Thus one aim of this thesis is to examine the influence of specific environmental effects imposed by glycerol, oxygen and other additives on the photophysical behaviour of different organic fluorophores under optical saturation. This is done by an extensive analysis of the diffusion and blinking dynamics of six rhodamine and cyanine dyes by fluorescence correlation spectroscopy (FCS). Furthermore, a home written monte-carlo-simulation shows that nonlinear deviations of the position-dependent fluorescence response in the observed focal volume at high irradiances above a few 100 kW cm^{-2} can lead to an erroneous interpretation of the intensity autocorrelation and a decrease of the molecular brightness similar to photobleaching. Therefore, a new fitting function is derived, using an empirical model of the molecule detection function (MDF), which was suitable to describe the observed data. Additionally, a simple method based on the photophysical mechanisms treated in this thesis has been derived, which allows for a separate evaluation of the excitation and detection properties of a confocal single molecule fluorescence microscope and should facilitate the comparability of different instruments by an FCS saturation series of a standard dye sample.

Inhaltsverzeichnis

Symbol- und Variablenverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
2 Mathematische und physikalische Grundlagen	5
2.1 Licht als elektromagnetische Welle	5
2.1.1 Wellengleichung und elektromagnetische Wellen	6
2.1.1.1 Die Wellengleichung und Differentialoperatoren	6
2.1.1.2 Die Maxwell-Gleichungen und elektromagnetische Felder	8
2.1.2 Fokus elektrischer Dipolwellen	11
2.1.3 Dipolorientierung und Polarisierung	13
2.2 Photolumineszenz	14
2.2.1 Zustände von Elektronensystemen	14
2.2.2 Stokes-Verschiebung und Franck-Condon-Faktoren	15
2.2.3 Energieniveaumockup	17
2.2.4 Lösungsprozesse	21
2.2.4.1 Energie- und Elektronentransfer	22
2.2.4.2 Molekularer Sauerstoff	24
2.2.5 Photozerstörung	27
2.3 Konfokale Mikroskopie	29
2.3.1 Auflösungsvermögen	31
2.3.2 Punktspreizfunktion und konfokale Lochblende	32
2.3.3 Signal und Rauschen	34
2.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	36
2.4.1 Diffusions-Korrelations-Funktion	36
2.4.2 Schnelle Fluktuationsprozesse	38
3 Material und Methoden	43
3.1 Konfokales Laserscanningmikroskop	44
3.1.1 Messkammer zur Desoxygenierung der Proben	47
3.1.2 Datenerfassung und Datenverarbeitung	48
3.1.3 Niedrige Temperaturen und TIRF-Mikroskopie	49

3.2	Proben	51
3.2.1	Alexa Fluor® 488 und Alexa Fluor® 647	52
3.2.2	PromoFluor 488 Premium und CF®488A	54
3.2.3	Sulfo-Cyanin 3 und Sulfo-Cyanin 5	55
3.2.4	Photoprotektive Additive	57
3.2.5	Immobilisierung von thiol-reaktiven Farbstoffen	58
3.3	Monte-Carlo-Simulation	60
3.3.1	Diffusion	61
3.3.2	Anregungs- und Detektionsfunktionen	61
3.3.2.1	Gaußnäherung	62
3.3.2.2	Beschreibung durch elektrische Feldkomponenten	64
4	Photophysikalische Modelle	69
4.1	Anpassungsfunktion des Drei-Zustand-Modells	70
4.1.1	Sub-Poisson-Statistik – Antibunching	73
4.2	Anpassungsfunktionen erweiterter Zustands-Modelle	76
4.2.1	Simulation höherer elektronischer Zustände	82
4.2.2	Sättigung der AKF bei Mehr-Photonen-Prozessen	86
4.3	Zusammenfassung und Diskussion	97
5	Immobilisierte Moleküle	99
5.1	Simulation und Analyse eines Drei-Niveau-Systems	99
5.2	Simulation und Analyse von Mehr-Niveau-Systemen	105
5.2.1	Beschleunigte Rück-Interkombination	105
5.2.2	Drei-, Vier- und Fünf-Niveau-Systeme im Vergleich	110
5.2.3	Zusammenfassung und Diskussion	115
5.3	Immobilisiertes Alexa Fluor® 488	116
5.3.1	Niedrige Temperaturen	117
5.3.2	Zusammenfassung und Diskussion	119
6	Photophysik frei diffundierender Fluorophore	121
6.1	Bestimmung des lateralen und axialen Fokusparameters	121
6.2	Glycerineinfluss auf Diffusion und Sauerstoffgehalt	124
6.2.1	Diffusionszeit und molekulare Helligkeit	124
6.2.2	Triplettparameter und Löschraten	131
6.2.3	Zusammenfassung und Diskussion	144
6.3	Sauerstoffarme Umgebung	146
6.3.1	Diffusion- und Triplettdynamik	146
6.3.2	Molekulare Helligkeit	152
6.3.3	Zusammenfassung und Diskussion	154
6.4	Isomerisierung und photoprotektive Additive	157
6.4.1	Beschreibung des photophysikalischen Modelldiagramms	157

6.4.2	Einfluss photoprotektiver Additive	168
6.4.3	Zusammenfassung und Diskussion	178
7	Benchmarking durch Sättigungsmessungen	181
7.1	Anregungsprofil	182
7.2	Detektionsprofil	187
7.3	Zusammenfassung und Diskussion	190
8	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	191
A	Mathematische Ergänzungen	I
A.1	Autokorrelationsfunktion für gaußsche Volumina	I
A.2	Gaußstrahlen	V
A.3	Fokusfunktionen	VII
B	Herleitungen photophysikalischer Zusammenhänge	IX
B.1	Stationäres, geschlossenes Singulettssystem	IX
B.2	Anpassungsfunktionen für die molekulare Helligkeit	XI
B.3	Zeitabhängige Lösung des Drei-Niveau-Systems	XIV
B.4	Molekulare Helligkeit bei der Isomerisierung	XIX
C	Ergänzungen	XXI
C.1	Photophysikalische Modelle	XXI
C.2	Lebensdauermessungen	XXVI
C.3	Immobilisierte Moleküle	XXVII
C.4	Photophysik frei diffundierender Fluorophore	XXIX
C.4.1	Alternative Formulierung für χ	XXXV
C.4.2	Isomerisierung und photoprotektive Additive	XXXVI
C.5	Benchmarking durch Sättigungsmessungen	XXXIX
D	Protokolle und Code	XLI
D.1	ROXS aus Trolox und Trolox-Chinon	XLI
D.2	Thiol-reaktive Oberflächenimmobilisierung auf Deckglas	XLII
D.3	SensL HRM-TDC	XLIV
	Literaturverzeichnis	LI
	Abbildungsverzeichnis	LXXXIX
	Tabellenverzeichnis	XCIII
	Curriculum Vitae	XCV

Symbol- und Variablenverzeichnis

$\vec{B}$	$\text{T} = \text{kg A}^{-1} \text{s}^{-2}$	magnetische Flussdichte
c	mol m^{-3}	Stoffmengenkonzentration
	$\text{M} = \text{mol dm}^{-3}$	Molarität
c	m s^{-1}	Lichtgeschwindigkeit
c_0	$299\,792\,458 \text{ m s}^{-1}$	Vakuumlichtgeschwindigkeit
E	$\text{J} = \text{kg m}^2 \text{s}^{-2}$	Energie
	$1 \text{ eV} = 1,602\,176\,634 \cdot 10^{-19} \text{ J}$	Elektronvolt
$\vec{E}$	V m^{-1}	elektrische Feldstärke
e	$1,602\,176\,634 \cdot 10^{-19} \text{ C}$	Elementarladung
F	$\text{N} = \text{kg m s}^{-2}$	Kraft
f, ν	$\text{Hz} = \text{s}^{-1}$	Frequenz
$\vec{H}$	A m^{-1}	magnetische Feldstärke
h	$6,626\,070\,15 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$	Plancksche Wirkungsquantum
I	A	elektrische Stromstärke
I	W m^{-2}	Intensität, Flächenleistungsdichte
$\vec{j}$	A m^{-2}	elektrische Stromdichte
$\vec{k}$	m^{-1}	Wellenzahlvektor
k_{B}	$1,380\,649 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$	Boltzmann-Konstante
l	m	Länge
m	kg	Masse

n	mol	Stoffmenge
N_A	$6,022\,140\,76 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$	Avogadro-Konstante
P	$\text{W} = \text{kg m}^2 \text{ s}^{-3}$	Leistung
p	$\text{Pa} = \text{kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$	Druck
Q	$\text{C} = \text{A s}$	elektrische Ladung
T	K	Temperatur
t	s	Zeit
U	$\text{V} = \text{kg m}^2 \text{ A}^{-1} \text{ s}^{-3}$	elektrische Spannung
ε	$\text{A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$	Permittivität
ε_0	$8,854\,187\,812\,8(13) \cdot 10^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$	Permittivität des Vakuums
λ	m	Wellenlänge
μ	N A^{-2}	magnetische Permeabilität
μ_0	$1,256\,637\,062\,12(19) \cdot 10^{-6} \text{ N A}^{-2}$	magnetische Feldkonstante
ρ	A s m^{-3}	elektrische Ladungsdichte
σ	m^{-2}	Wirkungsquerschnitt
ϕ	$\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Photonenflussdichte
ϕ	rad	Phasenwinkel
ω	s^{-1}	Kreisfrequenz

Abkürzungsverzeichnis

AA	Ascorbinsäure – <i>ascorbic acid</i> , auch Vitamin C
AE	Airy-Einheit – <i>Airy unit</i> , auch AU
AF-488	Alexa Fluor [®] 488
AF-546	Alexa Fluor [®] 546
AF-555	Alexa Fluor [®] 555
AF-594	Alexa Fluor [®] 594
AF-647	Alexa Fluor [®] 647
AKF	Autokorrelationsfunktion
Ag/AgCl	Silber-Silberchlorid-Elektrode
APD	Avalanche-Photodiode – <i>avalanche photodiode</i> , auch Lawinenphotodiode
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
CEF	Detektionstransferfunktion – <i>collection-efficiency function</i>
CF-488A	CF [®] 488A
COT	Cyclooctatetraen
CW	zeitlich konstante Abstrahlung – <i>continuous wave</i> , auch Dauerstrich
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure – <i>deoxyribonucleic acid</i> , auch DNS

Dy-488	DyLight™ 488
Dy-550	DyLight™ 550
Dy-650	DyLight™ 650
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie – <i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPALM	photoaktivierte Fluoreszenz-Lokalisationsmikroskopie – <i>fluorescence photoactivated localization microscopy</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer – <i>Förster resonance energy transfer</i>
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital – <i>highest occupied molecular orbital</i>
HWB	Halbwertsbreite – <i>full width at half maximum</i> , auch FWHM
IC	innere Umwandlung – <i>internal conversion</i>
IR	Infrarotstrahlung – etwa 0,78 µm bis 1000 µm
ISC	Interkombination – <i>intersystem crossing</i>
JSON	JavaScript Object Notation
LASER	Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung – <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LabVIEW	Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital – <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
LVTTTL	Low-Voltage-TTL – siehe TTL
MASER	Mikrowellenverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung – <i>microwave amplification by stimulated emission of radiation</i>
MB	molekulare Helligkeit – <i>molecular brightness</i>
MDF	Molekül-Detektions-Funktion – <i>molecule detection function</i>
ME	Paraquat, 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium, auch Methylviologen
MEA	Mercaptoethylamin
MFD	Modenfelddurchmesser – <i>mode field diameter</i>

MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NHE	Normal-Wasserstoffelektrode – <i>normal hydrogen electrode</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimidester – auch Succinimidylester
NA	numerische Apertur – <i>numerical aperture</i>
OCT	optische Kohärenztomografie – <i>optical coherence tomography</i>
PALM	photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie – <i>photoactivated localization microscopy</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung – <i>phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyethylenglycol
PET	photoinduzierter Elektronentransfer – <i>photoinduced electron transfer</i>
PF-488P	PromoFluor 488 Premium
PMT	Photoelektronenvervielfacher – <i>photomultiplier tube</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPD	<i>p</i> -Phenylendiamin
PSF	Punktspreizfunktion – <i>point spread function</i>
Rh-123	Rhodamin 123
Rh-630	Rhodamin 630
Rh-6G	Rhodamin 6G
rISC	Rück-Interkombination – <i>reverse intersystem crossing</i>
ROXS	reduzierendes und oxidierendes System – <i>reducing and oxidizing system</i>
SCE	Kalomelektrode – <i>saturated calomel electrode</i> , auch GKE
sCy3	Sulfo-Cyanin 3
sCy5	Sulfo-Cyanin 5
SH	Thiolgruppe – auch Mercaptogruppe
smFRET	Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energie-Transfer – <i>single molecule förster resonance energy transfer</i>

SNR	Signal-Rausch-Verhältnis – <i>signal-to-noise ratio</i>
SR	Schwingungsrelaxation – auch vibronische Relaxation
STED	Desaktivierung durch stimulierte Emission – <i>stimulated emission depletion</i>
STORM	stochastische, optische Rekonstruktionsmikroskopie – <i>stochastic optical reconstruction microscopy</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TCP	Transmission Control Protocol
TCSPC	zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung – <i>time-correlated single photon counting</i>
TDC	Time-to-Digital-Converter
TEDA	Triethylendiamin, 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan, auch DABCO (Markenname)
TEM	transversalelektromagnetische Welle – <i>transverse electromagnetic mode</i>
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i> – siehe TIRFM
TIRFM	interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie – <i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
TTL	Transistor-Transistor-Logik
TTTR	Time-Tagged Time-Resolved
UV	Ultraviolettstrahlung – etwa 100 nm bis 380 nm
2fFCS	Zwei-Fokus-FCS – <i>dual-focus fluorescence correlation spectroscopy</i>

Kapitel 1

Einleitung

Die Geschichte der Lichtmikroskopie reicht weit hinter die ersten Vergrößerungslinsen im 16. Jahrhundert zurück. Bereits im 1. Jahrhundert wurde unter anderem von Lucius Annaeus Seneca von der Nutzung wassergefüllter Glaskugeln zur Vergrößerung berichtet¹. Das erste zusammengesetzte Mikroskop wird Hans Janssen und seinem Sohn Zacharias Janssen gegen Ende des 16. bzw. Anfang des 17. Jahrhunderts, kurz vor Galileo Galileis *Occhiolino* im Jahr 1609 [1], zugeschrieben. Neben einer Vielzahl anderer Entdeckungen entwickelte Christiaan Huygens im späten 17. Jahrhundert die Wellentheorie des Lichtes, und Robert Hooke sowie Antoni van Leeuwenhoek konstruierten leistungsfähigere zusammengesetzte Mikroskope. Diese waren erstmals in der Lage, eine Beschreibung roter Blutkörperchen, der Facettenaugen einer Fliege, von Bakterien und vieler weiterer bis dahin unbekannter Elemente des Mikrokosmos zu liefern [2–4].

Die heutigen physikalischen Grundlagen der modernen Optik beruhen zu großen Teilen auf Ernst Karl Abbe, der im 19. Jahrhundert die Theorie der Bildentstehung und die physikalische Auflösungsgrenze optischer Mikroskope beschrieb [5] und zusammen mit Carl Zeiß, Otto Schott und mit Beginn des 20. Jahrhunderts auch August Köhler optische Instrumente entwickelte. August Köhler entdeckte 1904, dass der von Sir George Gabriel Stokes bereits 1852 beschriebene Effekt der Fluoreszenz [6] in den mit Ultraviolettstrahlung (UV) arbeitenden Mikroskopen auftrat [7]. Das erste Mikroskop, das bewusst mit Fluoreszenz arbeitete, entwickelte daraufhin Oskar Heimstädt im Jahr 1911 [8], womit ein Jahrhundert der Erforschung und Entwicklung neuer Techniken, Farbstoffe und Filtersysteme begann, die bis heute in der Fluoreszenzmikroskopie genutzt werden.

Erst die 1964 mit dem Nobelpreis für Physik geehrte Entwicklung des MASER-Prinzips² durch Charles Hard Townes, Nikolai Gennadijewitsch Bassow und Alexander Michailowitsch

¹ Seneca, *Naturalium quaestionum* I, 6, 5; *Litterae, quamvis minutae et obscurae, per vitream pilam aqua plenam maiores clarioresque cernuntur*. (Briefe, so klein und dunkel sie auch sein mögen, erscheinen durch eine mit Wasser gefüllte Glaskugel klarer.)

² MASER – Mikrowellenverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung (*microwave amplification by stimulated emission of radiation*)

Prochorow und die darauf folgende Übertragung des Prinzips auf kürzere Wellenlängen, die zur heutigen LASER-Technik³ geführt hat, ermöglichte die Beobachtung einzelner Moleküle [9–11] und die supraauflösende Mikroskopie (STED⁴ [12], PALM⁵ [13], FPALM⁶ [14], STORM⁷ [15] etc.) jenseits der von Abbe formulierten Auflösungsgrenze. Für diese faszinierende Entwicklung wurde der Nobelpreis für Chemie im Jahr 2014 an Eric Betzig, Stefan Hell und William Esco Moerner verliehen. Mithilfe der konfokalen Abbildungsgeometrie nach Minsky [16] vermied die in den 90er Jahren aufkommende Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie den Informationsverlust statischer oder dynamischer Heterogenitäten, der bei der Beobachtung eines Molekülensembles auftritt, und ermöglichte deren Untersuchung [17, 18]. Auch die Betrachtung komplexer Konformationsdynamiken bei der Proteinfaltung oder bei der Materialforschung an Polymeren und Oberflächen wurde auf einer weiten Zeitskala von Nanosekunden bis zu Sekunden möglich [10, 19–22].

In Kombination mit der 1972 von Magde, Elson und Webb [23] entwickelten Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) bietet die konfokale Fluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit, über die zeitabhängige Dynamik der Intensitätsfluktuationen der Fluoreszenz, die Kinetik chemischer Reaktionen und das Diffusionsverhalten einzelner fluoreszenzmarkierter Moleküle in Lösung zu untersuchen [24–26]. Die damit gewonnenen Informationen finden in der Diagnostik und in der evolutionären Biotechnologie, der Polymerphysik, der Untersuchung unterschiedlicher Prozesse in Zellen und der Photophysik breite Anwendung [27–31] und haben zu einer Vielzahl unterschiedlicher Korrelations-, Raster-, Abbildungs- und Datenauswertungsverfahren geführt [32].

Alle gängigen Verfahren der supraauflösenden Mikroskopie nutzen zur Abbildung der markierten Strukturen das Blink- bzw. Schaltverhalten der Fluorophore. Aber auch andere Methoden der intensitätsbasierten Fluoreszenzmikro- und Spektroskopie, wie die Messung inter- und intramolekularer Abstände mithilfe des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) [33], oder die genaue räumliche Bestimmung des Diffusionsverhaltens durch die Multi-Fokus-FCS [34] basieren auf der genauen Kenntnis der dem Leuchtverhalten zugrundeliegenden Eigenschaften der verwendeten Fluorophore. So sind zum Beispiel hohe Photonenraten oder Beobachtungszeiten vor dem Wechsel in Dunkelzustände wünschenswert [35] und werden durch entsprechend der photophysikalischen Zusammenhänge gewählte Anregungsraten und Verfahren erzielt [36, 37]. Auch die aktive Beeinflussung der Dunkelzeiten durch spezielle LASER [38, 39] oder Additive [40–44] findet breite Anwendung.

Die genutzten Leistungsdichten der Anregung liegen je nach Experiment in einem weiten

³ LASER – Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung (*light amplification by stimulated emission of radiation*)

⁴ STED – Desaktivierung durch stimulierte Emission (*stimulated emission depletion*)

⁵ PALM – photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (*photoactivated localization microscopy*)

⁶ FPALM – photoaktivierte Fluoreszenz-Lokalisationsmikroskopie (*fluorescence photoactivated localization microscopy*)

⁷ STORM – stochastische, optische Rekonstruktionsmikroskopie (*stochastic optical reconstruction microscopy*)

Bereich von wenigen Kilowatt bis zu einigen Megawatt je Quadratzentimeter [45–47]. Im beleuchteten Volumen können die fluoreszierenden Moleküle mehr als einmal angeregt werden und chemische oder photophysikalische Prozesse durchlaufen, die ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern. Da FCS-Experimente diese zeitliche Abhängigkeit der Signalschwankung messen und bei einer dem Fluorophor innewohnenden Zeitabhängigkeit diese Schwankung auch in den aufgezeichneten Daten vorhanden ist, sollte das Fluktuationsverhalten des betrachteten Fluorophors bekannt sein. Folglich beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem photophysikalischen Verhalten einzelner organischer Fluorophore in einem großen Bereich von Anregungsraten. Dazu wird im zweiten Kapitel die Definition und die Erläuterung einiger essentieller mathematischer und physikalischer Zusammenhänge und eine grundlegende Einführung in die konfokale Fluoreszenzmikroskopie und FCS gegeben.

Eine Beschreibung des entwickelten konfokalen Laserscanningmikroskops mit der zur Datenerfassung und Verarbeitung nötigen Hard- und Software, sowie der verwendeten Fluorophore, Protokolle zur Probenpräparation und der Beschreibung der entwickelten Monte-Carlo-Simulation mitsamt der implementierten Anregungs- und Detektionsfunktionen findet im dritten Kapitel statt. Dabei wird auch die in der Arbeit verwendete Messkammer zur Desoxygenierung der Farbstofflösungen mittels eines inerten Gases, die Konstruktion eines Erweiterungsmoduls für Tieftemperaturexperimente am konfokalen Mikroskop mit einem System zur Probenpräparation und der Aufbau eines TIRF-Mikroskops zur Betrachtung großer Bereiche mit einzelnen immobilisierten Molekülen vorgestellt.

Im vierten Kapitel wird das Verhalten von Einzelmolekülen im Rahmen einer FCS-Analyse bestimmt und ein Modell zur Korrektur der dabei auftretenden Effekte vorgeschlagen. Dazu wird die bei hohen Leistungsdichten auftretende Mehr-Photonen-Absorption im geometrischen Zentrum des konfokalen Fokusvolumens mit einer empirischen Gauß-Differenz-Funktion approximiert und eine entsprechende Anpassungsfunktion für die Autokorrelationsfunktion (AKF) der transienten Intensitäten bestimmt.

Das theoretische Modell des Sättigungsverhaltens wird im fünften Kapitel auf simulierte Intensitätsfluktuationen immobilisierter Moleküle angewandt und bezüglich seiner Gültigkeit und der Unterscheidbarkeit verschiedener intramolekularer Übergangswahrscheinlichkeiten untersucht. Es werden zwei unterschiedliche Ansätze der Immobilisierung realisiert, sowie auf Einschränkungen der Bestimmung der internen Dynamik im Vergleich zur einfachen Messung in Lösung diskutiert.

Das sechste Kapitel beschäftigt sich mit der FCS-Messung in Lösung und dem Einfluss der unmittelbaren Umgebung des betrachteten Fluorophors. Im Besonderen wird auf das Diffusionsverhalten von Alexa Fluor[®] 488 (AF-488) bei der Zugabe von Glycerin und die Interaktion mit gelöstem Sauerstoff eingegangen. Eine detaillierte Analyse der Photo-physik unter Normalatmosphäre und ohne Sauerstoff findet für die Fluorophore AF-488, PromoFluor 488 Premium (PF-488P) und CF[®]488A (CF-488A) statt. Anschließend werden Strategien zur Manipulation des Leuchtverhaltens präsentiert und im Hinblick auf ihre

Anwendung bei unterschiedlichen Fluorophoren untersucht. Dazu wird unter anderem die Isomerisierung von Carbocyaninfarbstoffen am Beispiel von Alexa Fluor[®] 647 (AF-647) diskutiert und mit dem Verhalten von AF-488, Sulfo-Cyanin 5 (sCy5) und Sulfo-Cyanin 3 (sCy3) verglichen.

Die bis dahin betrachteten photophysikalischen Zusammenhänge werden im siebten Kapitel zur Evaluation des Anregungs- und Detektionsstrahlengangs eines konfokalen Einzelmolekülmikroskops anhand einer einfachen Sättigungsmessung verwendet. Der Messvorgang und die Auswertung kann auch ohne die genaue Kenntnis des individuellen Aufbaus und lediglich anhand relativer Anregungs- und Detektionsraten auf vergleichbare konfokale Fluoreszenzmikroskope übertragen und als Vergleichsmaßstab genutzt werden.

Eine Zusammenfassung und Einordnung der grundlegenden Erkenntnisse der Arbeit findet im achten Kapitel statt.

Kapitel 2

Mathematische und physikalische Grundlagen

2.1 Licht als elektromagnetische Welle

In der Geschichte der modernen Naturwissenschaften wurde die physikalische Natur des Lichtes abwechselnd mit dem Modell der Teilchen oder der Wellen beschrieben. Im letzten Jahrhundert setzte sich in der modernen Physik die Ansicht durch, dass das Licht sowohl Teilchen- als auch Welleneigenschaften besitzt und somit keinem der beiden komplementären Modelle vollständig zuzuschreiben ist. Das hierdurch herbeigeführte Dilemma des *Welle-Teilchen-Dualismus* konnte erst durch die Theorie der Quantenelektrodynamik zufriedenstellend gelöst werden. Der Übersichtlichkeit halber wird die dieser Arbeit zugrunde liegende Betrachtung im Folgenden das Licht als elektromagnetische Welle auffassen. Obgleich dadurch die relevanten optischen Phänomene zur Genüge beschrieben werden, sei auf die Unvollständigkeit dieses Modells hingewiesen.

Das sichtbare Licht macht nur einen kleinen Bereich des in Abbildung 2.1 dargestellten elektromagnetischen Spektrums aus. Mithilfe elektronischer Geräte lassen sich niederfrequente Wellen im Radio- und Mikrowellenbereich erzeugen und dienen so zum Beispiel als Informationsträger für Fernseh-, Radio- und Funktelefonübertragungen. Elektromagnetische Wellen höherer Frequenzen können unter anderem durch beschleunigte Ladungsträger entstehen und uns als Infrarotlicht wärmen, oder in Form von Röntgen- oder Gammastrahlung einer Vielzahl verschiedenster Zwecke dienen. Daher wird im Folgenden eine mathematische Beschreibung physikalischer Wellen aus einfachen Grundlagen hergeleitet und in eine Form gebracht, die ein Verständnis optischer Phänomene bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie zulässt.

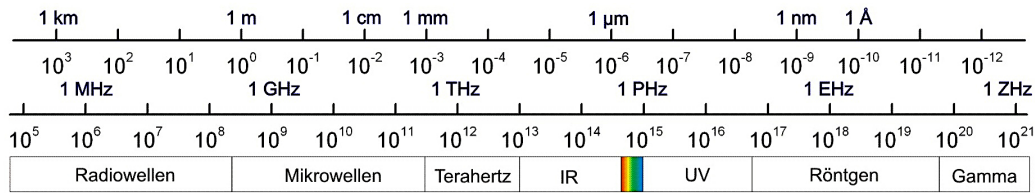


Abbildung 2.1: Elektromagnetisches Spektrum

Werden die Wellen nach ihrer Frequenz oder der Wellenlänge geordnet, wird das elektromagnetische Spektrum erhalten. Das dabei für den Menschen sichtbare optische Spektrum stellt nur einen geringen Ausschnitt aus dem gesamten elektromagnetischen Spektrum dar.

2.1.1 Wellengleichung und elektromagnetische Wellen

Während Licht in der geometrischen Optik als Strahl approximiert wird, ist diese Vereinfachung nur ein bedingt physikalisch korrekter Grenzfall der Wellenoptik. Tatsächlich lassen sich viele Phänomene wie Farbe, Interferenzfähigkeit, Beugung und Polarisierung erst mithilfe der Wellenoptik hinreichend erklären. Im Folgenden wird eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten wellenoptischen Gleichungen gegeben und die elektromagnetische Natur des Lichtes aus den Maxwell-Gleichungen hergeleitet.

2.1.1.1 Die Wellengleichung und Differentialoperatoren

Eine beliebige eindimensional betrachtete, dispersionsfrei laufende Welle lässt sich durch die Funktion $s = f(x')$ darstellen. Wobei s die Auslenkung und x' die Position der beliebigen Wellenfunktion f beschreibt. Bewegt sich diese Welle mit der Geschwindigkeit c relativ zu einem ruhenden System, kann sie aus diesem wie folgt beschrieben werden:

$$s = f(x') = f(x \pm ct) \quad \text{mit} \quad x' = x \pm ct \quad . \quad (2.1)$$

Diese allgemeine Form einer laufenden Welle lässt sich auch durch eine partielle Differentialgleichung ausdrücken. Hierzu betrachten wir Gleichung (2.1) so, dass bei partieller Differentiation $\frac{\delta x'}{\delta x} = 1$ und $\frac{\delta x'}{\delta t} = \pm c$ gilt. Daraus ergibt sich für die erste und zweite Ableitung nach der Zeit t :

$$\frac{\delta s}{\delta t} = \frac{\delta f}{\delta x'} \frac{\delta x'}{\delta t} = \pm c \frac{\delta f}{\delta x'} \quad , \quad (2.2a)$$

$$\frac{\delta^2 s}{\delta t^2} = \frac{\delta}{\delta t} \left(\frac{\delta s}{\delta t} \right) = \frac{\delta}{\delta x'} \left(\frac{\delta s}{\delta t} \right) \frac{\delta x'}{\delta t} = \frac{\delta}{\delta x'} \left(\pm c \frac{\delta f}{\delta t} \right) (\pm c) = c^2 \frac{\delta^2 f}{\delta x'^2} \quad , \quad (2.2b)$$

und für die 2. Ableitung nach dem Ort:

$$\frac{\delta^2 s}{\delta x^2} = \frac{\delta^2 f}{\delta x'^2} \quad . \quad (2.3)$$

Gleichsetzen liefert die eindimensionale Differential- bzw. Wellengleichung:

$$\frac{\delta^2 s}{\delta x^2} = \frac{1}{c^2} \frac{\delta^2 s}{\delta t^2} \quad . \quad (2.4)$$

Eine beliebige Funktion von x und t , die dieser Gleichung genügt, stellt also eine laufende Welle dar. So erfüllen Sinus- und Kosinusfunktionen die Wellengleichung in der Art, dass sich durch eine Linearkombination von

$$s = A \cdot \begin{cases} \sin(\omega t \pm kx + \varphi_0) \\ \cos(\omega t \pm kx + \varphi_0) \end{cases} \quad (2.5)$$

eine beliebige periodische Wellenform beschreiben lässt. Dabei wird die Amplitude durch A , die Kreisfrequenz durch $\omega = 2\pi f$, die Kreiswellenzahl durch $k = 2\pi/\lambda$ und die Nullphase durch φ_0 beschrieben. Mit $f = c/\lambda$ sehen wir, dass die Kreiswellenzahl auch als $\omega = kc$ geschrieben werden kann und somit mehrere Schreibweisen möglich sind. In komplexer Darstellung lässt sich eine eindimensionale homogene Welle somit wie folgt schreiben:

$$s = Ae^{i(\omega t \pm kx + \varphi_0)} = Ae^{i\varphi_0} \cdot e^{i(\omega t \pm kx)} \quad . \quad (2.6)$$

Für eine beliebige Ausbreitungsrichtung $\vec{k}$, die senkrecht auf der Wellenfront steht, ändert sich Gleichung (2.6) zu einer in $\vec{k}$ -Richtung fortschreitenden ebenen Welle:

$$s = Ae^{i(\omega t \pm \vec{k} \cdot \vec{r} + \varphi_0)} = Ae^{i\varphi_0} \cdot e^{i(\omega t \pm \vec{k} \cdot \vec{r})} \quad . \quad (2.7)$$

Wobei $\vec{r}$ einen beliebigen Raumpunkt beschreibt, sodass $\vec{k} \cdot \vec{r} = k_x x + k_y y + k_z z$. Dabei bezeichnet der Betrag des Wellenvektors $\vec{k}$ die Kreiswellenzahl:

$$|\vec{k}| = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2} = k = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda} \quad . \quad (2.8)$$

Entsprechend stellt sich die dreidimensionale Wellengleichung wie folgt dar [48]:

$$\Delta s = \frac{1}{c^2} \frac{\delta^2 s}{\delta t^2} \quad . \quad (2.9)$$

Dabei stellt Δ den Laplace-Operator dar, der sich wiederum durch den Nabla-Operator $\vec{\nabla}$ in der Form

$$\Delta f = \operatorname{div}(\operatorname{grad} f) = \vec{\nabla} \cdot (\vec{\nabla} f) = \nabla^2 f$$

$$\text{mit } \vec{\nabla} = \left(\frac{\delta}{\delta x_1}, \dots, \frac{\delta}{\delta x_n} \right)$$
(2.10)

ausdrücken lässt. Der Nabla-Operator bezeichnet die drei Differentialoperatoren Gradient, Divergenz und Rotation. Dabei ergibt das Produkt mit einer Funktion f den Gradienten

$$\vec{\nabla} f = \operatorname{grad} f = \left(\frac{\delta f}{\delta x_1}, \dots, \frac{\delta f}{\delta x_n} \right)^T, \quad (2.11)$$

und somit ein Vektorfeld, das die Richtung der Steigung anzeigt. Das Skalarprodukt mit einem Vektorfeld $\vec{V} = (V_1, \dots, V_n)^T$ ergibt dessen Divergenz:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{V} = \operatorname{div} \vec{V} = \sum_{i=1}^n \frac{\delta V_i}{\delta x_i}. \quad (2.12)$$

Das Ergebnis stellt ein Skalarfeld dar, das Quellen oder Senken des Vektorfeldes angibt. Das Kreuzprodukt mit einem Vektorfeld berechnet dessen Rotation:

$$\vec{\nabla} \times \vec{V} = \operatorname{rot} \vec{V} = \sum_{i,j,k=1}^n \varepsilon_{ijk} \nabla_i V_j \vec{e}_k. \quad (2.13)$$

Dies ist wiederum ein Vektorfeld, das die Wirbeldichte des Vektorfeldes $\vec{V}$ angibt. Im dreidimensionalen Raum gibt das Kreuzprodukt zweier Vektoren einen zu diesen orthogonal gerichteten Vektor an.

2.1.1.2 Die Maxwell-Gleichungen und elektromagnetische Felder

Die vier Maxwell-Gleichungen

$$\text{Gaußsches Gesetz: } \vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\varepsilon_0}, \quad (2.14a)$$

$$\text{Gaußsches Gesetz für Magnetfelder: } \vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0, \quad (2.14b)$$

$$\text{Induktionsgesetz: } \vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\delta \vec{B}}{\delta t}, \quad (2.14c)$$

$$\text{Erweitertes Durchflutungsgesetz: } \vec{\nabla} \times \vec{B} = \mu_0 \vec{j} + \varepsilon_0 \mu_0 \frac{\delta \vec{E}}{\delta t} \quad (2.14d)$$

beschreiben den Zusammenhang zwischen den Theorien des Magnetismus und der Elektrostatik. Sie liefern somit die physikalische Grundlage für den Elektromagnetismus. Dabei

verknüpfen sie die elektrische Feldstärke $\vec{E}$ und die magnetische Flussdichte $\vec{B}$ mit der Ladungsdichte ρ und der Stromdichte $\vec{j}$ unter Zuhilfenahme der Materialkonstanten der Permittivität ε und Permeabilität μ^1 . Die physikalischen Grundaussagen sind, dass Ladungen elektrische Felder erzeugen (Gleichung (2.14a)), Magnetfelder quellenfrei sind (Gleichung (2.14b)), Magnetfeldänderungen zu elektrischen Wirbelfeldern führen (Gleichung (2.14c)) und elektrische Ströme (einschließlich des Verschiebungsstroms) magnetische Wirbelfelder erzeugen (Gleichung (2.14d)). Unter der Betrachtung dieser Gleichungen im freien Raum, gibt es keine freien Ströme und Ladungen und es folgt:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 \quad , \quad (2.15a)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad , \quad (2.15b)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\delta \vec{B}}{\delta t} \quad , \quad (2.15c)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{B} = \varepsilon_0 \mu_0 \frac{\delta \vec{E}}{\delta t} \quad . \quad (2.15d)$$

Anwenden der Rotation auf Gleichung (2.15c) und einsetzen von Gleichung (2.15d) führt zu:

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) = \vec{\nabla} \times \left(-\frac{\delta \vec{B}}{\delta t} \right) = -\mu_0 \varepsilon_0 \frac{\delta^2 \vec{E}}{\delta t^2} \quad . \quad (2.16)$$

Für ein zweifaches Anwenden der Rotation auf ein Vektorfeld $\vec{V}$ gilt

$$\text{rot}(\text{rot } \vec{V}) = \text{grad}(\text{div } \vec{V}) - \Delta \vec{V} \quad , \quad (2.17)$$

sodass Gleichung (2.16) als

$$\begin{aligned} \vec{\nabla} \cdot \underbrace{(\vec{\nabla} \cdot \vec{E})}_{=0} - \Delta \vec{E} &= -\mu_0 \varepsilon_0 \frac{\delta^2 \vec{E}}{\delta t^2} \\ \Rightarrow \nabla^2 \vec{E} &= \mu_0 \varepsilon_0 \frac{\delta^2 \vec{E}}{\delta t^2} \end{aligned} \quad (2.18)$$

geschrieben werden kann. Mit $c_0^2 = 1/(\mu_0 \varepsilon_0)$ ergibt sich die elektromagnetische Wellengleichung für $\vec{E}$:

¹ Diese beschreiben die dielektrische und magnetische Leitfähigkeit des betrachteten Materials. Die Permittivität des Vakuums ε_0 ist dabei durch die Vakuumlichtgeschwindigkeit c_0 und die magnetische Feldkonstante μ_0 in der Form $\varepsilon_0 = 1/(\mu_0 c_0^2)$ gegeben.

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{c_0^2} \frac{\delta^2}{\delta t^2} \right) \vec{E} = 0 \quad . \quad (2.19)$$

Bei analoger Anwendung der Schritte und Vertauschen von Gleichung (2.15c) und Gleichung (2.15d) gilt für $\vec{B}$:

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{c_0^2} \frac{\delta^2}{\delta t^2} \right) \vec{B} = 0 \quad . \quad (2.20)$$

Wird für das elektrische Feld, eine beliebige komplexe Welle der Form $\vec{E} = \vec{E}_0 e^{i(\omega t \pm \vec{k} \vec{r})}$ (siehe Gleichung (2.7)) betrachtet, so erfüllt diese die elektromagnetische Wellengleichung, muss aber auch den übrigen Maxwell-Gleichungen genügen. Durch Einsetzen der komplexen Welle in Gleichung (2.15a) ergibt sich:

$$\begin{aligned} \vec{\nabla} \cdot \vec{E} &= \vec{k} \cdot \vec{E}_0 e^{i(\omega t \pm \vec{k} \vec{r})} \\ \Rightarrow \quad \vec{k} \cdot \vec{E} &= 0 \quad . \end{aligned} \quad (2.21)$$

Die Propagationsrichtung der Welle verläuft also orthogonal zum elektrischen Feld. Wird diese Welle in Gleichung (2.15c) eingesetzt, ergibt sich:

$$\begin{aligned} \vec{\nabla} \times \vec{E} &= i\vec{k} \times \vec{E}_0 e^{i(\omega t \pm \vec{k} \vec{r})} = -\frac{\delta \vec{B}}{\delta t} = i\omega \vec{B}_0 e^{i(\omega t \pm \vec{k} \vec{r})} \\ \Rightarrow \quad \vec{B} &= \frac{1}{\omega} \vec{k} \times \vec{E} \quad . \end{aligned} \quad (2.22)$$

Die magnetische Flussdichte steht also senkrecht zum elektrischen Feld und zur Propagationsrichtung der Welle, die somit eine Transversalwelle darstellt. Des weiteren sind $\vec{E}$ -Feld und $\vec{B}$ -Feld proportional zueinander. Die Energiestromdichte $\vec{S}$ (Poynting-Vektor) der transversalelektromagnetischen Welle wird dabei durch

$$\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H} = \frac{1}{\mu} (\vec{E} \times \vec{B}) \quad (2.23)$$

beschrieben, wobei $\vec{H}$ die magnetische Feldstärke der Form $\vec{H} = \vec{B}/\mu$ angibt und die Permeabilität μ die magnetische Leitfähigkeit des betrachteten Raumpunktes ausdrückt.

2.1.2 Fokus elektrischer Dipolwellen

Die durch eine elektromagnetische Welle übertragene Feldenergie stammt zu gleichen Teilen aus dem magnetischen Feld und dem elektrischen Feld, sodass die gesamte Energiedichte w durch

$$w = \varepsilon E^2 = \mu H^2 = \varepsilon c E B = \frac{EH}{c} \quad (2.24)$$

berechnet wird [48]. Dabei ist ε die Dielektrizitätskonstante und $c = (\varepsilon\mu)^{-1/2}$ die Ausbreitungsgeschwindigkeit. Die transportierte Leistung bei einer Fläche A ist $P = wcA$, womit die zeitabhängige Intensität $S = P/A$ sich zu

$$S = wc = EH = \varepsilon c E^2 \quad (2.25)$$

ergibt. Die Mittelung der Intensität über eine oder mehrere Perioden führt zu der mittleren Intensität I , die wie folgt gegeben ist [48]:

$$I = \frac{1}{2} E_0 H_0 = \frac{1}{2} \varepsilon c E_0^2 = \frac{1}{2} \mu c H_0^2 = \frac{1}{2} c \frac{B_0^2}{\mu} \quad (2.26)$$

In komplexer Schreibweise ergibt sich I zu:

$$I = \frac{1}{2} E_0 \cdot H_0^* = \frac{1}{2} \varepsilon c E_0 \cdot E_0^* \quad (2.27)$$

Aufgrund der Proportionalität des $\vec{E}$ - und $\vec{B}$ -Feldes zueinander (siehe Gleichung (2.22)) und des proportionalen Zusammenhangs zwischen Energiestromdichte und Intensität (siehe Gleichungen (2.26) und (2.27)), genügt bei der Beschreibung fluoreszenter Moleküle, im Bereich sichtbarer Frequenzen, die Betrachtung des elektrischen Feldanteils der elektromagnetischen Welle [49, 50]. Deshalb wird im Folgenden auf die Wirkung und Beschaffenheit des elektrischen Feldes im Fokus einer elektromagnetischen Welle eingegangen. Nach Richards und Wolf [51] lässt sich das elektromagnetische Feld in zylindrischen Polarkoordinaten r_p , θ_p , ϕ_p im Punkt p wie folgt beschreiben:

$$\begin{aligned} E_x(p) &= -iA(I_0 + I_2 \cos(2\phi_p)) & H_x(p) &= -iAI_2 \sin(2\phi_p) \quad , \\ E_y(p) &= -iAI_2 \sin(2\phi_p) & H_y(p) &= -iA(I_0 - I_2 \cos(2\phi_p)) \quad , \\ E_z(p) &= -2AI_1 \cos(\phi_p) & H_z(p) &= -2AI_1 \sin(\phi_p) \quad . \end{aligned} \quad (2.28)$$

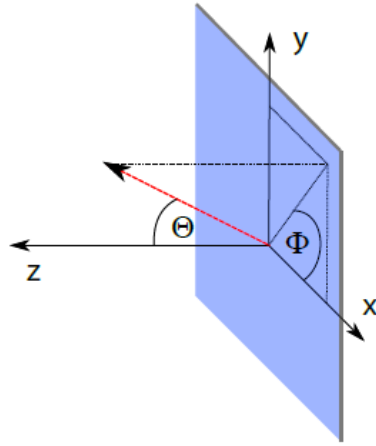


Abbildung 2.2: Definition des Koordinatensystems

Die blaue x,y-Ebene stellt die konfokale Ebene, in der der azimutale Winkel Φ die Lage der Projektion des Dipols auf die konfokale x,y-Ebene darstellt, dar. Der rote Pfeil repräsentiert die Orientierung des Dipolmoments im Winkel Θ von der optischen Achse (z) aus. Abbildung adaptiert von [52].

Die Integrale I_1 , I_2 und I_3 sind dabei durch

$$I_0 = \int_0^\alpha A(\theta) \sin \theta (1 + \cos \theta) J_0(kr_p \sin \theta \sin \theta_p) e^{ikr_p \cos \theta \cos \theta_p} d\theta, \quad (2.29a)$$

$$I_1 = \int_0^\alpha A(\theta) \sin^2 \theta J_1(kr_p \sin \theta \sin \theta_p) e^{ikr_p \cos \theta \cos \theta_p} d\theta, \quad (2.29b)$$

$$I_2 = \int_0^\alpha A(\theta) \sin \theta (1 - \cos \theta) J_2(kr_p \sin \theta \sin \theta_p) e^{ikr_p \cos \theta \cos \theta_p} d\theta \quad (2.29c)$$

gegeben. Dabei gibt $J_n(\rho)$ die Besselfunktion erster Gattung n -ter Ordnung an², α beschreibt den halben Öffnungswinkel und $A(\theta)$ ist die Apodisationsfunktion, welche im Falle eines aplanatischen Systems durch

$$A(\theta) = \cos^{\frac{1}{2}} \theta \quad (2.30)$$

gegeben ist [49].

Befindet sich ein beliebig orientiertes Einzelmolekül als Dipolempfänger im Fokus, steht das von diesem Dipol wahrnehmbare Feld in Abhängigkeit von seiner Orientierung. Die im Folgenden benutzten Orientierungsparameter beziehen sich auf das in Abbildung 2.2

² Diese lautet für ganzzahlige n in der Integraldarstellung $2\pi i^n J_n(\rho) = \int_0^{2\pi} \exp(n\phi + \rho \cos \phi) d\phi$.

dargestellte Koordinatensystem. Dabei beschreibt der Winkel Θ die Neigung des Strahlers von der optischen Achse aus (Polarwinkel). Der azimutale Winkel Φ hingegen beschreibt die Lage der Projektion des Dipols auf die konfokale x,y -Ebene.

2.1.3 Dipolorientierung und Polarisation

Werden Farbstoffmoleküle mit Licht bestrahlt, wechselwirken sie mit dem einfallenden Licht. Diese Wechselwirkung der Dipolempfänger³ wird bei einer parallelen Ausrichtung von ihrem Absorptionsdipolmoment $\vec{p}_{\text{abs}}$ zu dem elektrischen Feldvektor des einfallenden Lichtes maximal. Somit ist durch

$$\left| \vec{p}_{\text{abs}} \cdot \vec{E}_0 \right|^2 \propto \cos^2 \Phi_{\text{abs}} \quad (2.31)$$

die Wahrscheinlichkeit für die Anregung eines Dipolempfängers gegeben [52]. Φ_{abs} beschreibt dabei den Winkel zwischen einfallendem Feldvektor $\vec{E}_0$ des Lichtes und der Richtung des Absorptionsdipolmoments $\vec{p}_{\text{abs}}$.

Handelt es sich beim Empfänger um ein Fluorophor, so ist das anschließend vom Fluorophor emittierte Licht in Richtung seines Dipolmoments polarisiert. Im Allgemeinen kann die Polarisationsrichtung von Licht durch die Oszillation des $\vec{E}$ -Feldes definiert werden. Sie kann linear entlang der y -Achse (s-polarisiert), oder x -Achse (p-polarisiert), alternierend zwischen x - und y -Achse mit fester Periode und konstanter Amplitude (zirkular polarisiert), oder nicht konstanter Amplitude (elliptisch polarisiert) gegeben sein.

³ Die meisten Farbstoffe absorbieren Licht in Abhängigkeit ihres elektronischen Zustandes entlang einer bevorzugten Richtung, die mithilfe des Dipolmoments des Farbstoffes charakterisiert werden kann.

2.2 Photolumineszenz

Die Photolumineszenz ist ein Spezialfall der Lumineszenz, die die optische Strahlung eines Systems durch strahlende Desaktivierung beschreibt. Wird die nötige Energie zum Anregen bzw. Aktivieren des beobachteten physikalischen Systems (Atom oder Molekül) durch elektromagnetische Strahlung zugeführt, so wird von Photolumineszenz gesprochen. Dabei hat eine Vielzahl von Parametern Einfluss auf die Art der Photolumineszenz.

Zwischen der Absorption und der Emission eines Photons können verschiedene strahlungslose Prozesse auftreten, nach welchen die Art der Photolumineszenz in Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterschieden wird. Phosphoreszierende Stoffe werden auch als Luminophore bezeichnet und zeigen ein langandauerndes Nachleuchten im Bereich von Sekundenbruchteilen bis Stunden. Im Gegensatz dazu leuchten fluoreszente Stoffe (Fluorophore) im Bereich von Nano- bis Mikrosekunden nach und zeigen somit in einem kurzen Zeitbereich nach der Anregung ein Leuchten.

2.2.1 Zustände von Elektronensystemen

Bei organischen Molekülen basieren die Absorptionsbanden typischerweise auf dem Elektronenübergang aus einem nichtbindenden n - oder bindenden π -Orbital in ein antibindendes π^* -Orbital⁴. Unter der Annahme einer vernachlässigbaren Wechselwirkung zwischen den Elektronen, kann die potentielle Energie der Elektronen entlang des Moleküls, wie in Abbildung 2.3 exemplarisch dargestellt, als konstant betrachtet werden (Kastenpotential). Die Energiedifferenz zwischen dem höchsten besetzten (HOMO - *highest occupied molecular orbital*) und dem niedrigsten unbesetzten Energiezustand (LUMO - *lowest unoccupied molecular orbital*) sinkt dabei mit der Kastenlänge und Anzahl der π -Elektronen.

Die nach der Anregung angenommene Elektronenkonfiguration kann bei der Betrachtung von zwei bzw. einer geraden Anzahl von Elektronen zu einer Gesamtspinquantenzahl von $S = 0$ oder $S = 1$ führen. Der Fall $S = 0$ bezeichnet antiparallel orientierte Spins und wird Singulettzustand genannt. Tritt der Zustand mit ungepaartem Spin ein, sodass $S = 1$ gilt, wird von einem Triplettzustand gesprochen. Die Begriffe Singulett und Triplett bezeichnen dabei die Entartung des Gesamtspins in der Form, dass sie die Anzahl der möglichen Eigenwerte $m_S = -S, -S + 1, \dots, S - 1, S$ angeben.

Im Grundzustand, wenn beide Elektronen im Zustand $n = 1$ sind und die gleiche Nebenquantenzahl sowie magnetische Drehimpulsquantenzahl besitzen, müssen sie sich nach dem Pauli-Prinzip in der Spinquantenzahl m_S unterscheiden und entsprechend im Singulettzustand vorliegen. Werden diese Zustände in Form von Energieniveaus beschrieben, resultiert aus jeder durch Absorption aus dem Grundzustand hervorgehenden Elektronenkonfiguration ein entsprechender Triplett- und Singulett-Energiezustand. Die Triplettzustände haben

⁴ Prinzipiell sind auch Übergänge aus σ -Orbitalen bzw. in σ^* -Orbitale möglich. Diese werden hier aufgrund ihrer hohen Übergangsenergien aber nicht explizit betrachtet.

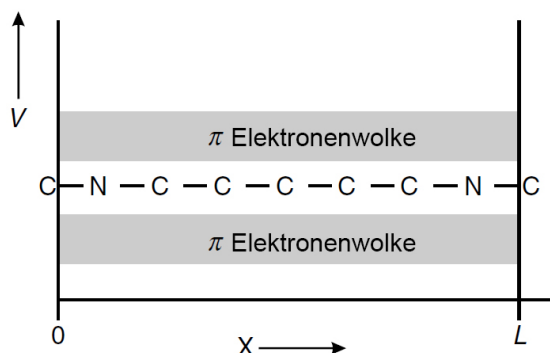


Abbildung 2.3: Elektronenwolken eines planaren Moleküls

Zu sehen ist die vereinfachte Darstellung der potentiellen Energie V eines planaren Moleküls als eindimensionaler Kasten von der Seite. Die Elektronen sind über die Kastenlänge L auf die senkrecht stehenden p-Orbitale verteilt und liegen somit delokalisiert vor. Die Anregungsenergie ist durch die Differenz zwischen dem höchsten von einem π -Elektron besetzten und dem niedrigsten unbesetzten Energieniveau gegeben. Abbildung entnommen und verändert aus [53].

dabei primär aufgrund ihrer abweichenden Ortsfunktionen und den daraus veränderten Coulomb-Energien und Kernabschirmungen niedrigere Energien als die dazugehörigen Singulettzustände. Dabei gilt für die Änderung der Quantenzahlen des angeregten Elektrons nach Trennung der Orts- und Spinwellenfunktion, dass eine Änderung der Gesamtspinquantenzahl vom Ausgangs- zum angeregten Zustand nicht möglich ist. Die Gültigkeit dieser Auswahlregel sinkt mit steigender Kernladungszahl, da die Entkopplung der Wellenfunktionen zunehmend verschwindet. Anders ausgedrückt kann auch von einer zunehmenden Spin-Bahn-Kopplung und einer daraus möglichen Mischung von Singulett- und Triplettzuständen gesprochen werden. Schweratome können durch ihre Anwesenheit im Molekül (innerer/intramolekularer Schweratomeffekt) oder in der Umgebung des Moleküls (äußerer/intermolekularer Schweratomeffekt) diese Kopplung beeinflussen und so zur Manipulation der Wahrscheinlichkeiten der Singulett- und Triplettübergänge genutzt werden [54, 55]. Quantenmechanisch führt dies zu einem Störungsterm im Hamiltonoperator, der zu einer, bei organischen Molekülen typischerweise sehr kleinen, Übergangswahrscheinlichkeit vom Singulettzustand in den Triplettzustand und umgekehrt führt.

2.2.2 Stokes-Verschiebung und Franck-Condon-Faktoren

Zumeist ist bei lumineszenten Stoffen in Lösung die Energie der emittierten Photonen geringer als die der Anregung. Dass das Emissionsspektrum somit zum Absorptionsspektrum rot verschoben ist, wurde erstmals von Stokes [6] detailliert beobachtet, und wird auch als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Dabei ist zum einen die Relaxation des angeregten fluoreszenten Moleküls in den niedrigsten Schwingungszustand und der damit verbundene Energieverlust in Form von Wärme und zum anderen die Reorganisation des das Molekül umgebenden Lösungsmittels verantwortlich⁵.

⁵ Andere Effekte, wie z. B. Energietransferreaktionen oder Komplexbildungen, können zu zusätzlichen Verschiebungen führen, sollen an dieser Stelle aber nicht betrachtet werden.

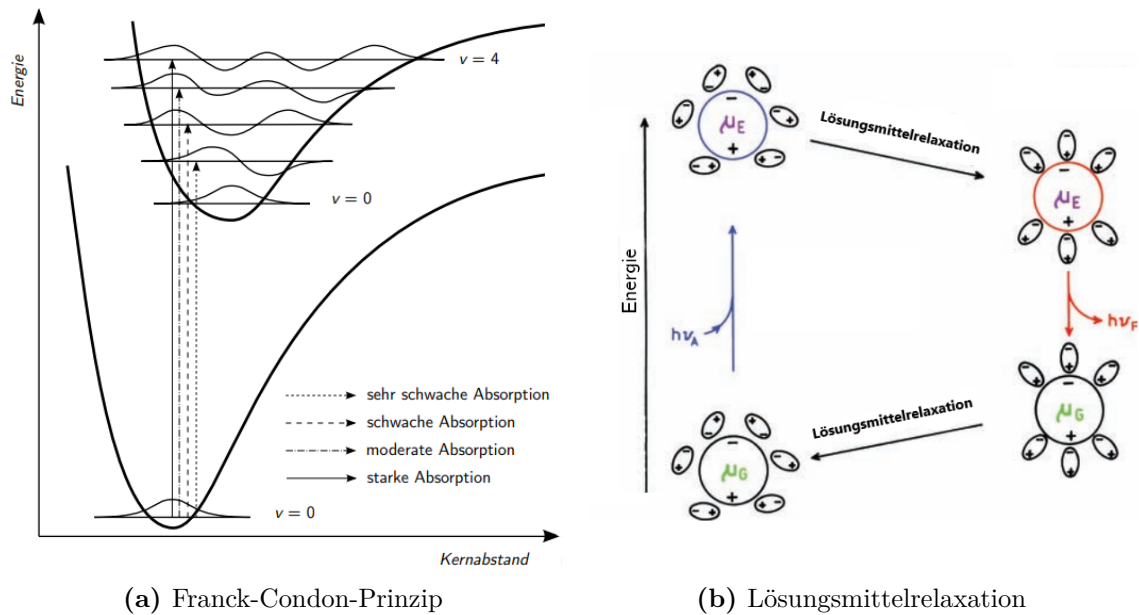


Abbildung 2.4: Franck-Condon-Prinzip und Lösungsmittelrelaxation

(a) Die wahrscheinlichsten elektronischen Übergänge finden zwischen Zuständen mit ähnlicher Kernkonfiguration und ähnlichem Schwingungsverhalten statt. Quantenmechanisch ist die Größe des Überlappungsintegrals der Schwingungs-Wellenfunktionen in den beiden elektronischen Zuständen die entscheidende Größe für die Wahrscheinlichkeit des elektronischen Übergangs. Abbildung entnommen und verändert aus [56]. (b) Vor der Absorption sind die Lösungsmittelmoleküle mit ihren Dipolmomenten (kleine Ellipsen) energetisch günstig in Bezug auf das Dipolmoment des Grundzustandes μ_G angeordnet. Während des Absorptionsprozesses ordnen sich die Elektronen des Moleküls im angeregten Zustand um. Die Lösungsmittelmoleküle reorientieren sich entsprechend dem geänderten Dipolmoment μ_E , was zu einer Energieabsenkung des angeregten Zustandes führt. Gleiches gilt für den Emissionsprozess. Abbildung entnommen und verändert aus [57].

Energetische Übergänge in einem Molekül können in eine Vielzahl von Schwingungszuständen stattfinden. Die Wahrscheinlichkeit das Molekül in einen bestimmten Schwingungszustand anzuregen, wird dabei durch das Franck-Condon-Prinzip und die damit verbundenen Franck-Condon-Faktoren bestimmt. Die Franck-Condon-Faktoren bezeichnen die durch das elektronische Übergangsdipolmoment gegebene Übergangswahrscheinlichkeit in bestimmte Schwingungszustände des elektronischen Zielzustandes unter Erhaltung des Kernabstandes. Sie sind durch das Überlappungsintegral der Schwingungswellenfunktionen nach Separation der Elektronen- und Schwingungsanteile⁶ gegeben und können für große Moleküle mathematisch komplex werden. Nach der Anregung durch ein Photon entsprechender Energie führt die Änderung der Elektronenkonfiguration zu einer Verschiebung der Gleichgewichtslage der Kernschwingungen, wie in Abbildung 2.4a schematisch dargestellt. Je größer diese Verschiebung ist, desto höher sind die angeregten Schwingungszustände. Bleibt in Lösung den Lösungsmittelmolekülen keine Zeit, sich während eines Absorptionsvorgangs dem gegebenen Zielzustand anzupassen, findet die Reorientierung zum Dipolmoment des angeregten Zustandes entsprechend Abbildung 2.4b erst nach der Anregung statt.

⁶ Im Rahmen der Born-Oppenheimer-Näherung können die Wellenfunktionen als Produkt von Elektronen- und Schwingungswellenfunktionen dargestellt werden.

Der Ablauf dieser Prozesse wird bei der Betrachtung der involvierten Zeiten der Übergänge deutlich. So findet die Absorption eines Photons im Bereich von Femtosekunden statt, typische Schwingungsdauern eines Moleküls bewegen sich aber im Bereich von Picosekunden. Anschließend können die Lösungsmittelmoleküle sich im Bereich von Nanosekunden reorientieren, was zu einer weiteren Energieabsenkung führt. Der selbige Ablauf gilt auch für den Fluoreszenzprozess, sodass je nach Polarität des Lösungsmittels eine zusätzliche Verschiebung der energetischen Niveaus stattfindet.

2.2.3 Energieniveautermschema

Das in Abbildung 2.5 dargestellte Energieniveautermschema, das nach seinen Erfindern auch Perrin-Jabłoński- oder nur Jabłoński-Diagramm genannt wird [58, 59], veranschaulicht strahlende und strahlungslose intramolekulare Prozesse und liefert somit eine anschauliche Darstellung der physikalischen Zusammenhänge bei der Anregung eines Fluoreszenzsystems. Dabei kennzeichnen die dicken Linien S_0 und S_1 die Singulettzustände und T_1 den ersten Triplettzustand. Die verschiedenen Vibrationszustände sind durch die dünnen Linien dargestellt. Wird Strahlungsenergie der Intensität I gemäß

$$k_{\text{ex}} = \frac{I}{h\nu} \sigma \quad (2.32)$$

absorbiert, kann ein Elektron in einen Vibrationszustand von S_1 , oder ein höheres Niveau S_n (nicht dargestellt) angeregt werden. Die Absorptionsrate k_{ex} beschreibt dabei die Anzahl der Anregungen in Photonen der Energie $h\nu$ entsprechend dem Absorptionswirkungsquer-

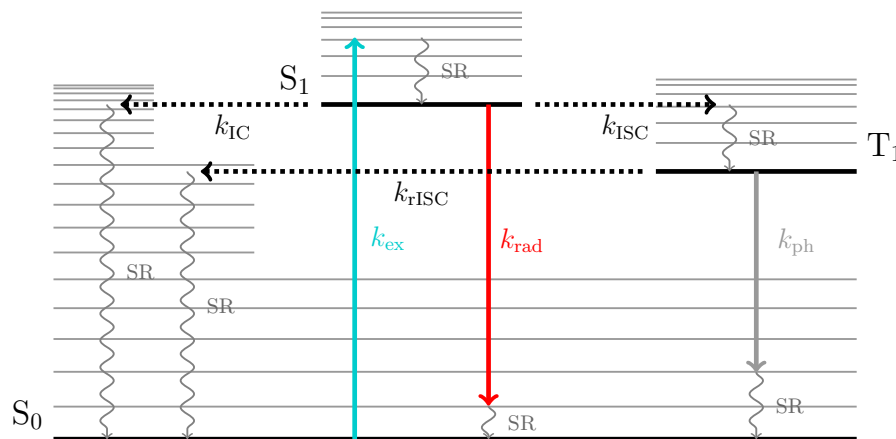


Abbildung 2.5: Perrin-Jabłoński-Diagramm

Das Energieniveautermschema stellt die wichtigsten photoinduzierten intramolekularen Übergänge für drei elektronische Niveaus inklusive ihrer Ratenkonstanten dar. Die durchgezogenen Linien kennzeichnen strahlende und direkt photonisch angeregte Vorgänge. Waagerechte gepunktete Linien stehen für iso-energetische Konversion und die geschwungenen Linien zeigen strahlungslose Desaktivierung mittels vibronischer Relaxation. Die Übergänge sind mit den zugehörigen Raten und die elektronischen Niveaus gemäß ihrer Multiplizität mit S_n (S für Singulett - Multiplizität 1), oder T_n (T für Triplett - Multiplizität 3) beschriftet. Dabei bezeichnet der Index n die energetische Höhe des jeweiligen elektronischen Zustandes.

schnitt σ des Übergangs $S_0 \rightarrow S_1$, S_n pro Sekunde. Gemäß der Boltzmann-Verteilung wird bei Raumtemperatur hauptsächlich der niedrigste vibronische Zustand im elektronischen Grundzustand besetzt. Daher erfolgt die Anregung aus diesem Zustand in genau das vibronische Niveau bei dem der Überlapp der Wellenfunktionen des Moleküls am größten ist (siehe Abschnitt 2.2.2). Das Elektron relaxiert durch Schwingungsrelaxation (SR) innerhalb von 10^{-10} s bis 10^{-12} s Sekunden in den niedrigsten Vibrationszustand. Durch innere Umwandlung (IC – *internal conversion*) kann das Elektron anschließend in einen höheren Vibrationszustand des niedrigeren Singulettzustandes wechseln. Dieser Prozess kann sich entsprechend des angeregten Startzustandes wiederholen und resultiert in einer jeweiligen Energieabgabe durch strahlungslose IC mit anschließender SR in Form von Schwingungs- und Rotationsquanten.

Abhängig von der Besetzungsdichte des S_1 -Zustandes und der Molekularstruktur kann auch ein strahlender Übergang in einen Vibrationszustand von S_0 stattfinden. Relaxiert das Elektron durch Emission von Licht aus dem S_1 in den S_0 , so wird von Fluoreszenz (10^{-7} s bis 10^{-9} s) gesprochen. Möglich ist auch eine Interkombination (ISC – *intersystem crossing*) in einen angeregten Triplettzustand. Geschieht dort die Relaxation durch Lichtemission, so ist von Phosphoreszenz (10^2 s bis 10^{-3} s) die Rede. Allerdings ist die Aufenthaltsdauer im angeregten Triplettzustand relativ lang, weshalb es oft wahrscheinlicher ist, dass das Elektron mittels Rück-Interkombination (rISC – *reverse intersystem crossing*) strahlungslos in einen Schwingungszustand von S_0 übergeht. Somit sind die Anregungsintensität und die Emissionsrate des Farbstoffmoleküls die die Fluoreszenzemission F begrenzenden Parameter, sodass

$$F = \sigma \cdot Q \cdot \phi \quad (2.33)$$

gilt. Die eigentliche Fluoreszenzemission hängt somit vom molekularen Wirkungsquerschnitt σ , der Fluoreszenzquantenausbeute Q und der anregungsseitigen Photonenflussdichte ϕ ab. Der molekulare Wirkungsquerschnitt σ kann dabei über das Lambert-Beersche Gesetz und somit durch den molaren Extinktionskoeffizienten ε und die Avogadro-Konstante⁷ (N_A) in der Form

$$\sigma = \ln(10) \cdot \frac{\varepsilon}{N_A} \quad (2.34)$$

ausgedrückt werden. Die Fluoreszenzquantenausbeute Q ist durch das Verhältnis der radiativen Rate zur Summe aller den angeregten Zustand depopulierenden Raten gegeben. Dabei wird die inverse Summe der depopulierenden Raten als Lebenszeit τ_0 des fluoreszenten Zustandes beschrieben und kann zum Beispiel mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC – *time correlated single photon counting*) bestimmt werden [57, 60, 61]. Wird die

⁷ Die N_A bezeichnet die Teilchenzahl je Stoffmenge und beträgt $6,022\,140\,76 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

strahlende Rate entsprechend Abbildung 2.5 in dieser Form beschrieben, so gilt:

$$\tau_0 = (k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}})^{-1} \quad , \quad (2.35a)$$

$$Q = \frac{k_{\text{rad}}}{k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}} = \frac{\tau_0}{\tau_n} \quad . \quad (2.35b)$$

Dabei bezeichnet τ_n die Lebensdauer unter Abwesenheit nichtstrahlender Vorgänge und wird auch als natürliche Lebensdauer bezeichnet. Der Umstand, dass die Fluoreszenz aufgrund der um mehrere Größenordnungen schnelleren SR stets aus dem untersten Vibrationszustand von S_1 ausgeht, wird nach Kasha [62] auch Kasha-Regel genannt und ist der Grund für die Unabhängigkeit des Emissionsspektrums von der Anregungswellenlänge. Ein Charakteristikum organischer Fluorophore ist dabei die Spiegelsymmetrie des Emissions- zum Absorptionsspektrum. Dies resultiert aus der Ähnlichkeit der in der Absorption und Emission involvierten Übergänge (siehe Abschnitt 2.2.2).

Zur genaueren Beschreibung des im Verlauf der Arbeit beobachteten Verhaltens der Fluorophore, wird das Energieniveautermschema aus Abbildung 2.5 in Form eines zeitabhängigen Raten-Gleichungssystems formuliert. Obgleich der Phosphoreszenzübergang k_{ph} in verschiedenen Analysen Anwendung finden kann [63–65], ist er für die in dieser Arbeit beobachteten Fluorophore vernachlässigbar klein. Auch die SR in die entsprechenden elektronischen Grundzustände spielt aufgrund ihrer geringen Lebensdauer im Bereich von Picosekunden [66] eine vernachlässigbare Rolle. Daher werden beim Aufstellen des Raten-Gleichungssystems weder der Phosphoreszenzübergang noch die SR mit einbezogen, sodass die sich ergebenden Differentialgleichungen wie folgt lauten:

$$\dot{S}_0 = -k_{\text{ex}}S_0 + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})S_1 + k_{\text{rISC}}T_1 \quad , \quad (2.36a)$$

$$\dot{S}_1 = k_{\text{ex}}S_0 - (k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}})S_1 \quad , \quad (2.36b)$$

$$\dot{T}_1 = k_{\text{ISC}}S_1 - k_{\text{rISC}}T_1 \quad . \quad (2.36c)$$

Sind die Interkombinationsraten k_{ISC} und k_{rISC} um Größenordnungen kleiner als die innere Umwandlungsrate k_{IC} und die Fluoreszenzrate k_{rad} , kann das Singulett-System (S_0 , S_1) im Vergleich zum Triplett-System als stationär angesehen werden, sodass mit

$$-k_{\text{ex}}S_0 + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})S_1 = 0 \quad , \quad (2.37a)$$

$$k_{\text{ex}}S_0 - (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})S_1 = 0 \quad (2.37b)$$

die Lösungsmenge für die Singulett-Besetzungen

$$S_1 = \frac{k_{\text{ex}}}{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} S_0 \quad (2.38)$$

lautet. Aus den Gleichungen (2.36a), (2.36b) und (2.38) folgt für den gesamten Singulett:

$$\begin{aligned} \dot{S} &= \dot{S}_0 + \dot{S}_1 \\ &= -k_{\text{ISC}} S_1 + k_{\text{rISC}} T_1 \\ &= -\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} S_0 + k_{\text{rISC}} T_1 \quad . \end{aligned} \quad (2.39)$$

Die Ratengleichungen aus den Gleichungen (2.36a) bis (2.36c) lassen sich somit als

$$\dot{S} = -\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} S_0 + k_{\text{rISC}} T_1 \quad , \quad (2.40a)$$

$$\dot{T}_1 = \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} S_0 - k_{\text{rISC}} T_1 \quad (2.40b)$$

schreiben. Die zeitabhängige Lösung des Differentialgleichungssystems (2.40) ist für die Anpassungsfunktion von experimentellen Daten von Bedeutung und wird in Abschnitt 2.4 genauer behandelt. Für die einfache Beschreibung des Sättigungsverhaltens ist an dieser Stelle die homogene Lösung des stationären Systems

$$S = \frac{k_{\text{rISC}}}{\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}}} \quad , \quad (2.41a)$$

$$T_1 = \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \quad (2.41b)$$

ausreichend. Somit nimmt die mittleren Besetzungsdichte des Singulett gemäß

$$S(\phi) = \left(1 + \frac{\phi \sigma}{(k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) \frac{k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ISC}}}} \right)^{-1} \quad (2.42)$$

ab. Der Verlauf der Besetzungsdichte des Singulett- und Triplettzustandes ist in Abbil-

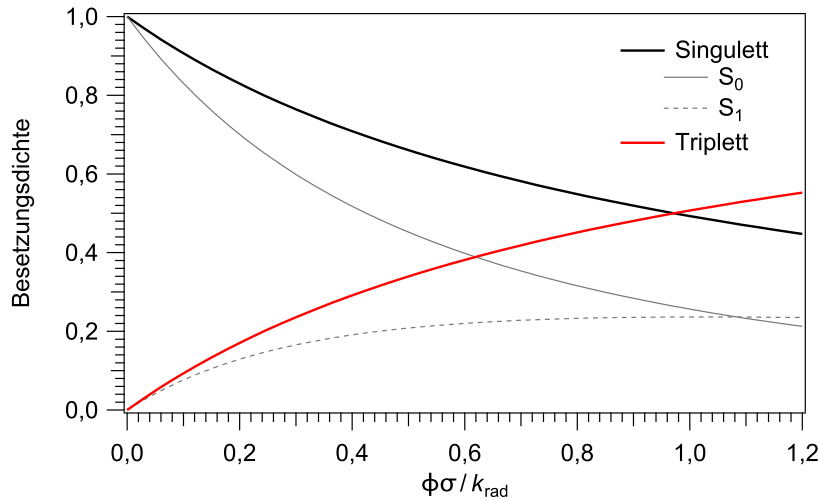


Abbildung 2.6: Besetzungsdichten der Zustände

Die Besetzungsdichte des Singulett (schwarz) nimmt gemäß Gleichung (2.42) mit steigender Photonenflussdichte ab und die Besetzungsdichte des Triplett (rot) entsprechend zu. Zusätzlich ist der Singulettanteil im Grundzustand (grau) und im angeregten Zustand (grau gestrichelt) gemäß der Gleichungen (B.3a) und (B.3b) (siehe Seite IX) dargestellt.

Abbildung 2.6 gegen die entsprechend der radiativen Rate k_{rad} normierte Photonenflussdichte ϕ abgebildet. Die Lösung des Differentialgleichungssystems aus Gleichung (2.36) für den Singulett ist in Anhang B.1 (ab Seite IX) gegeben und ebenfalls in Abbildung 2.6 in Abhängigkeit von der jeweiligen Besetzungsdichte des gesamten Singulett dargestellt. Der Anteil des stationären, angeregten Singulett kann zur Bestimmung der Parameter der Korrelationsfunktion in Abschnitt 2.4 genutzt werden und wird an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt.

2.2.4 Lösungsprozesse

Eine Vielzahl von Prozessen kann zu einer Reduzierung der beobachtbaren Emissionsrate eines Fluorophors führen. Die in Abschnitt 2.2.3 bereits erwähnten, intramolekularen Prozesse führen zwar zu einer Reduktion der Fluoreszenz, doch experimentell zugänglich sind häufig lediglich Wechselwirkungsprozesse mit der Umgebung beziehungsweise anderen Molekülen. Unterschieden werden zumeist Prozesse, die statisch die Fluoreszenzrate erniedrigen⁸, zum Beispiel durch die Komplexbildung mit anderen Molekülen, und dynamische Verminderungen wie etwa die zufällige Kollision des angeregten Fluorophors mit einem Lösch-Molekül. Im Folgenden werden die wichtigsten intermolekularen Prozesse, die zur nichtstrahlenden Desaktivierung eines Fluorophors aus dem angeregten Zustand führen können, beschrieben.

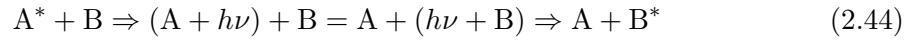
⁸ Statisch auch deshalb, da die Fluoreszenzlöschung aus dem Grundzustand und ohne diffusive oder andere dynamische Einflüsse stattfindet.

2.2.4.1 Energie- und Elektronentransfer

Beim Energietransfer wird die Anregungsenergie (durch ein * gekennzeichnet) eines Moleküls A auf ein anderes Molekül B übertragen:



Hierbei kann zwischen strahlendem und strahlungslosem Energietransfer unterschieden werden. Der strahlende, also über Photonen medierte, Transfer tritt bei Distanzen auf, die über der Emissionswellenlänge des angeregten Moleküls liegen. Er hängt maßgeblich von der Konzentration der betrachteten Moleküle und der Überlagerung ihrer jeweiligen Emissions- und Absorptionsspektren ab. Entsprechend Gleichung (2.43) kann dies als



geschrieben werden. Molekül A emittiert also ein Photon, das von B aufgenommen werden kann.

Im Falle des strahlungsfreien Energietransfers erfolgt die Übertragung der Energie über Distanzen kleiner der Emissionswellenlänge des angeregten Moleküls. Dabei sind im niedrigen Nanometerbereich⁹ von typischerweise $< 10 \text{ \AA}$ Elektronenaustauschmechanismen von einem angeregten Molekül im Singulett $^1A^*$ oder Triplett $^3A^*$ nach dem Dexter-Prinzip [67]



möglich. Es werden ein angeregtes und ein nicht angeregtes Elektron übertragen. Dabei führt eine Triplett-Triplett-Wechselwirkung zu einer Spinänderung der beteiligten Moleküle, wobei Singulett-Singulett-Wechselwirkungen ohne Spinänderung ebenso möglich sind [68, 69]. Die Transferrate k_{dex} des Dexter-Übergangs kann folgendermaßen geschrieben werden [70]:

$$k_{\text{dex}} = K J(\lambda) e^{-\frac{2r}{L}} \quad . \quad (2.46)$$

Die Konstante K bezeichnet dabei die spezifische Orbitalwechselwirkung, $J(\lambda)$ das Überlappungsintegral vom Donoremissionsspektrum und Akzeptorabsorptionsspektrum, r den Abstand der Moleküle und L die van der Waals Radien. Als Sonderfall ist die Triplett-Triplett-Annihilation zu nennen, die eine Photonen-Hochkonversion verursacht, welche aktuell in einem weiten Feld technische und biotechnologische Anwendung findet [71–74].

⁹ Im Nahbereich der Moleküle bei der eine Überlagerung der Orbitale stattfindet.

Dabei führt die Wechselwirkung zweier angeregter Moleküle im Triplett zu einem Molekül im Singulett-Grundzustand und einem Molekül im angeregten Singulett gemäß:



Das Molekül im angeregten Singulettzustand kann anschließend ein Fluoreszenzphoton emittieren. Von einer Hochkonversion wird gesprochen, da die Triplettbesetzungen durch die Anregung mittels niedrig energetischer Strahlung erzeugt werden können¹⁰, die anschließend nach dem Prinzip einer klassischen Anti-Stokes-Verschiebung zu einem energiereichen Fluoreszenzphoton führen. Unter Einbeziehung der Solvathüllen der Moleküle lassen sich weitere Zwischenstufen für Elektronentransferreaktionen definieren, sodass verschiedene Stufen zwischen kontakt- und solvatgetrennten Ionenpaaren unterschieden werden können. Unpolare Lösungsmittel können zusätzlich die Bildung von Kontaktionenpaaren und somit metastabilen angeregten Komplexen, sogenannte Exciplexe oder Excimere, begünstigen [75, 76]. Zerfallen diese, kommt es zur Dissoziation der entstandenen Radikationenpaare oder zur direkten Rekombination in den elektronischen Grundzustand. Das primär angeregte Molekül kann in den genannten Reaktionen einen oxidativen oder reduktiven Elektronentransfer durchlaufen. Kommt es zu einem dauerhaften Transfer von Ladungen, handelt es sich um eine Redoxreaktion. Die Redoxpotentiale der beteiligten Stoffe beschreiben dabei die jeweilige Affinität die Ladung aufzunehmen bzw. abzugeben. Wird die Redoxreaktion durch eine photonische Anregung induziert, wird von photoinduziertem Elektronentransfer (PET) gesprochen.

Erfolgt ein Singulett-Singulett-Energieübertrag über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, wird aufgrund der erstmaligen detaillierten Beschreibung dieses Prozesses im Jahr 1948 von Theodor Förster, vom Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) gesprochen [33]. Dabei ist die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Ladungsverteilungen entscheidend. Im Rahmen der zeitabhängigen Störungstheorie kann die Transferrate k_{FRET} als dynamische Störung des Hamiltonoperators in der Form $\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_{\text{Störung}}$ aufgefasst und mithilfe Fermis Goldener Regel [77] für den Übergang aus dem Eigenzustand Ψ_i in den Zielzustand Ψ_f als

$$k_{\text{FRET}} \propto \left| \left\langle \Psi_f \left| \hat{H}_{\text{Störung}} \right| \Psi_i \right\rangle \right|^2 \quad (2.48)$$

geschrieben werden. Der Störungsterm $\hat{H}_{\text{Störung}}$ beschreibt somit die Kopplung der Zustände Ψ_i und Ψ_f in Form einer Multipolentwicklung der Coulombterme und führt genähert zur Proportionalität der Störung zu den Übergangsdipolmomenten des angeregten Donor-

¹⁰ Häufig werden zusätzliche Photosensibilisierer eingesetzt, die die primäre (niedrige) Photonenenergie aufnehmen und eine hohe Wahrscheinlichkeit der ISC in den Triplettzustand aufweisen. Durch eine Triplett-Triplett-Wechselwirkung führen diese zu einer Anregung der eigentlichen Emittermoleküle in den Triplettzustand.

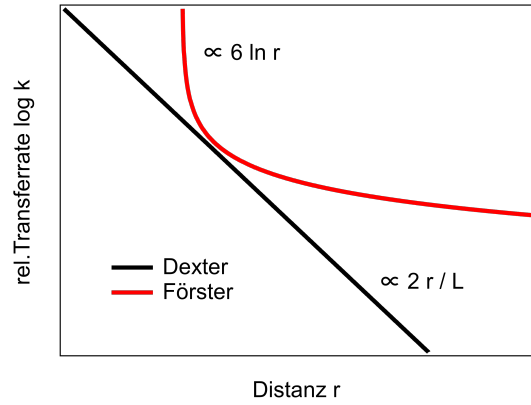


Abbildung 2.7: Abstandsabhängigkeit des Energie- und Elektronentransfers

Die Transferrate nach Dexter (schwarz, Gleichung (2.46)) ist durch ihre exponentielle Abstandsabhängigkeit bei niedrigen Distanzen bis etwa 10 Å von Bedeutung. Die Transferrate nach Förster (rot, Gleichung (2.49)) ist im Vergleich langreichweitig und spielt bei Distanzen bis etwa 100 Å eine Rolle.

moleküls μ_D und des den Energieübertrag vom Donor aufnehmenden Akzeptormoleküls μ_A mit einer kubischen Abstandsabhängigkeit der Form $\hat{H}_{\text{Störung}} \propto \mu_D \mu_A / r^3$ [33, 67]. Die Transferrate berechnet sich demnach zu [57]

$$k_{\text{FRET}} = \frac{\Phi_D \kappa^2 J(\lambda) K}{\tau_D n^4} \cdot \frac{1}{r^6} \quad (2.49)$$

und unterscheidet sich somit in ihrer Abstandsabhängigkeit, wie in Abbildung 2.7 dargestellt ist, deutlich von der Transferrate nach Dexter. Dabei gibt Φ_D die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, κ den Orientierungsfaktor, $J(\lambda)$ das Überlappungsintegral vom Donoremissionsspektrum und Akzeptorabsorptionsspektrum, τ_D die Lebensdauer des angeregten Zustandes des Donors, r den Abstand der Moleküle, n die Brechzahl des Mediums und K eine Konstante¹¹ an.

2.2.4.2 Molekularer Sauerstoff

Sauerstoff nimmt, aufgrund seiner Präsenz in vielen biologischen Systemen, für die in der Einzelmolekülspektroskopie verwendeten Lösungsmittel und der normalen Umgebungsluft eine besondere Rolle als Singulett- und Triplett-Löcher ein [78, 79]. Die Sauerstoffkonzentration in luftgesättigter, wässriger Lösung beträgt 0,29 mM bei 20 °C und 1 bar Luftdruck [80], mit einem Diffusionskoeffizienten von 2,5 cm² s⁻¹ bei 25 °C [57]. Abhängig von der Lebensdauer τ des beobachteten, angeregten Zustandes lässt sich über die Einstein-Smoluchowski-Gleichung, $\Delta x^2 = 2D\tau$, die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens von Fluoreszenz- und Sauerstoffmolekül abschätzen. Molekularer Sauerstoff tritt unter Normalbedingungen als Disauerstoff O₂, also als Verbindung zweier Sauerstoffatome

¹¹ $K = 9000 \cdot \ln(10) / (128\pi^5 N_A)$

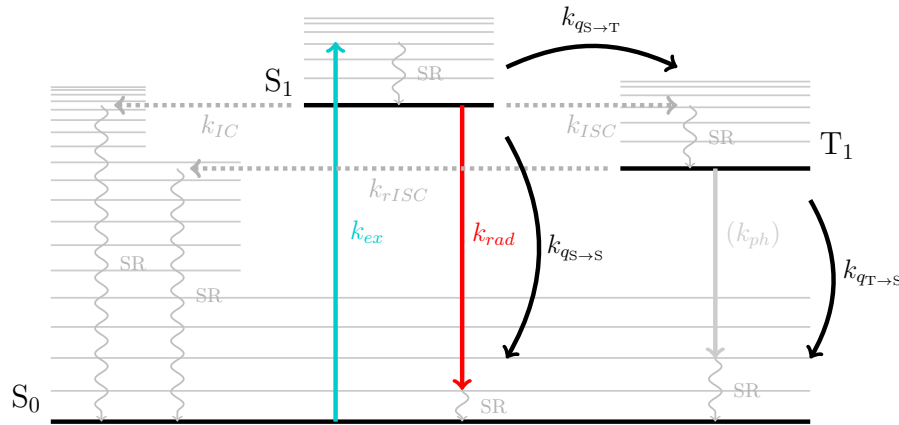


Abbildung 2.8: Energieniveautermschema mit Singulett- und Triplettlöschung

Die Wechselwirkung mit einem Lösch-Molekül kann zu einem strahlungsfreien Energieverlust des Fluorophors führen und dieses in ein niedrigeres Energieniveau bringen. Wird der Zustand aus dem die Fluoreszenz stattfindet gelöscht, vermindert dies die mittlere Fluoreszenzemission des Moleküls. Das Löschen des Dunkelzustandes hingegen kann durch die Verkürzung der Aufenthaltsdauer in diesem und somit zu einer höheren Fluoreszenzemission führen.

auf. Disauerstoff befindet sich im Grundzustand aufgrund seiner zwei parallel, in zwei antibindenden π^* -Orbitalen, angeordneten Valenzelektronen im Triplettzustand $^3\text{O}_2$ und zeigt somit Paramagnetismus. Die Wirkung des Sauerstoffs als Lösch-Molekül kann, wie in Abbildung 2.8 dargestellt ist, angeregte Triplett- und Singulettzustände strahlungsfrei desaktivieren, wobei eine Vielzahl von Prozessen dafür verantwortlich ist [81–85]. Im Folgenden sollen die in der Einzelmolekülspektroskopie bedeutendsten Vorgänge kurz erläutert werden.

Kommt es zu einer Kollision von einem angeregten Fluoreszenzmolekül und einem Disauerstoff im Grundzustand, kann es zu einem Elektronenaustausch nach dem Dexter-Mechanismus (siehe Abschnitt 2.2.4.1) kommen. Die Stern-Volmer-Gleichung beschreibt dabei die Kollisions-Löschung eines angeregten Zustandes über das Verhältnis der Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluorophors ohne anwesendes Lösch-Molekül F_0 zu der Fluoreszenzintensität unter Anwesenheit des Lösch-Moleküls F in der Form [86]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad . \quad (2.50)$$

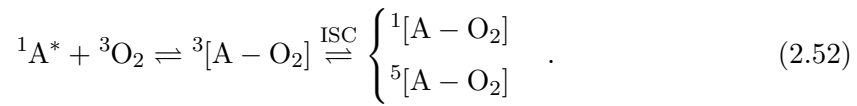
Die Stern-Volmer Konstante K gibt die Sensitivität des betrachteten Fluorophors bezüglich des Löschvorgangs an und kann auch als Produkt aus der Löschrage k_q und der Fluoreszenzlebensdauer ohne Anwesenheit eines Löschers τ_0 , sowie der Konzentration des Löschers Q geschrieben werden. Bei rein diffusiver Fluoreszenzlöschung durch Disauerstoff in wässriger Lösung kann die Löschrage k_q mithilfe der Löschrage-Effizienz f_Q ¹² auf die mittlere Kollisionsrate der betrachteten Moleküle k_k bezogen werden, sodass $k_q = f_Q k_k$ gilt. Die

¹² Die Löschrage-Effizienz gibt die mittlere Anzahl der Löschrage-Vorgänge pro Kollisionsvorgang mit dem Löschrage-Molekül an und nimmt Werte von 0 bis 1 an.

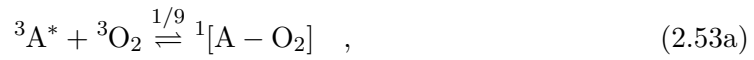
Kollisionsrate kann nach der Smoluchowski-Gleichung [87]

$$k_k = 4\pi N_A (D_q + D_f) (R_q + R_f) \quad (2.51)$$

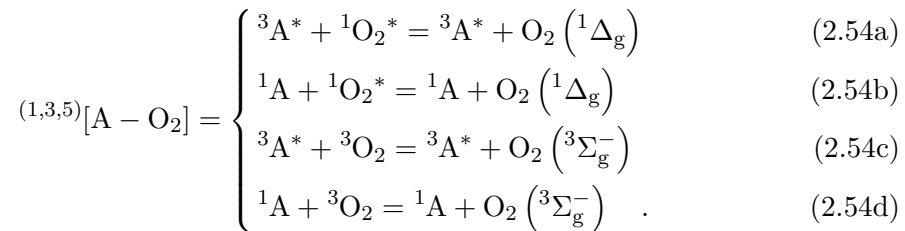
unter Angabe der Diffusionskoeffizienten von Löscher D_q und Fluorophor D_f und den molekularen Radien R_q und R_f bestimmt werden. Die maximale diffusive Löschrates ($f_Q = 1$) des Disauerstoffs in wässriger Lösung beträgt somit nach Gleichung (2.50) und Gleichung (2.51) $k_q \approx 1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [57, 88]. Die Löschung eines Fluorophors A aus dem angeregten Singulett durch Triplett-Disauerstoff kann dabei prinzipiell zu drei unterschiedlichen Gleichgewichtskomplexen führen [89, 90]:



Die Löschung eines Fluorophors A aus dem Triplett führt ebenfalls zu diesen drei möglichen Komplexen, allerdings ist die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen Komplexbildung, gekennzeichnet durch den Bruch über dem Gleichgewichtspfeil, durch



gegeben [89–91]. Da der Quintett-Komplex aus Gleichung (2.53c) lediglich wieder in seine Edukte redissoziieren kann, verringert sich die maximal mögliche Rate der diffusiven Löschung des Moleküls aus dem angeregten Triplett um 5/9 [91]. Die aus den in Gleichung (2.52) und Gleichung (2.53) gegebenen, metastabilen Komplexen, mögliche Produkte sind:



Nicht dargestellt ist der Fall, dass der zweite angeregte Singulettzustand $\text{O}_2 \left(^1\Sigma_g^+ \right)$ erzeugt

wird. Da dieser aufgrund seiner kurzen Lebenszeit und der damit verbundenen schnellen Relaxation in den ersten angeregten Singulettzustand $O_2(^1\Delta_g)$, von der Betrachtung ausgeschlossen werden kann [68]. Die energetische Differenz des ersten angeregten Singulettzustandes $O_2(^1\Delta_g)$ zum Triplett-Grundzustand $O_2(^3\Sigma_g^-)$ beträgt dabei 7882 cm^{-1} ($0,977\text{ eV}$) und die energetische Differenz des zweiten angeregten Singulettzustandes $O_2(^1\Sigma_g^+)$ beträgt $13\,121\text{ cm}^{-1}$ ($1,627\text{ eV}$) [89, 92, 93].

2.2.5 Photozerstörung

Unter der Photozerstörung (auch Photobleichen) wird ein irreversibler, photochemischer Prozess verstanden, der die Anregungsenergie zur Umsetzung des betrachteten Stoffes in ein nicht-fluoreszierendes Produkt nutzt [94, 95]. Dabei werden auch indirekt von der Anregungsenergie beeinflusste Prozesse zur Photozerstörung gezählt. Vor allem Oxidationsreaktionen aus angeregten Zuständen sind in Lösungsexperimenten dabei von Bedeutung und führen in wässriger Lösung bei Raumtemperatur zu einem Bleichen des Farbstoffes nach einer mittleren Ausbeute von etwa 10^3 bis 10^6 Photonen [96, 97]. Die in Abbildung 2.9 durch die k_b -Raten beschriebene, beobachtbare Bleichrate ist somit vom Sauerstoffgehalt, sowie der mittleren Aufenthaltsdauer in den angeregten Zuständen abhängig [98, 99]. Bezogen auf das in Abschnitt 2.2.3 beschriebene Ratensystem, kann für die gesamte Bleichrate k_b mithilfe der stationären Lösung der angeregten Singulett- und Triplettbesetzung

$$k_b = S_1 k_{bS_1} + T_1 k_{bT_1} + R^{+, -} k_{bR} \quad (2.55)$$

geschrieben werden. Wobei $R^{+, -}$ für einen radikal-anionischen Zustand R^- bzw. radikal-kationischen Zustand R^+ steht, der durch die Aufnahme oder Abgabe eines Elektrons aus einem der angeregten Zustände S_1 und T_1 , oder durch Photoionisation aus einem höheren angeregten Singulett- oder Triplettzustand (nicht dargestellt) entstehen kann [90, 100–103]. Die Lebensdauer der radikalionischen Zustände bewegt sich bei organischen Molekülen in Lösung im Bereich von Mikro- bis Millisekunden und hängt deutlich von der Konzentration möglicher Lösch-Moleküle (wie z. B. Sauerstoff) ab [101, 104–106]. Unter der Annahme einer homogenen Anregung im beobachteten Volumen zeigt entsprechend Gleichung (2.55) die mittlere Besetzungsdichte der angeregten bzw. radikalionischen Zustände einen proportionalen Zusammenhang zur Photozerstörung, sodass die Korrelationsfunktion in Gleichung (2.78) um einen exponentiellen Term mit der Bleichrate k_b zu

$$G(\tau) = 1 + G_D D(\tau) \cdot G_T(\tau) \cdot e^{-k_b \tau} \quad (2.56)$$

erweitert werden kann [107].

In nicht entgasten Lösungen kann der Sauerstoff durch die in Abschnitt 2.2.4.2 dargestellten Prozesse die effektive Dauer der angeregten Zustände beeinflussen, womit er sich sowohl

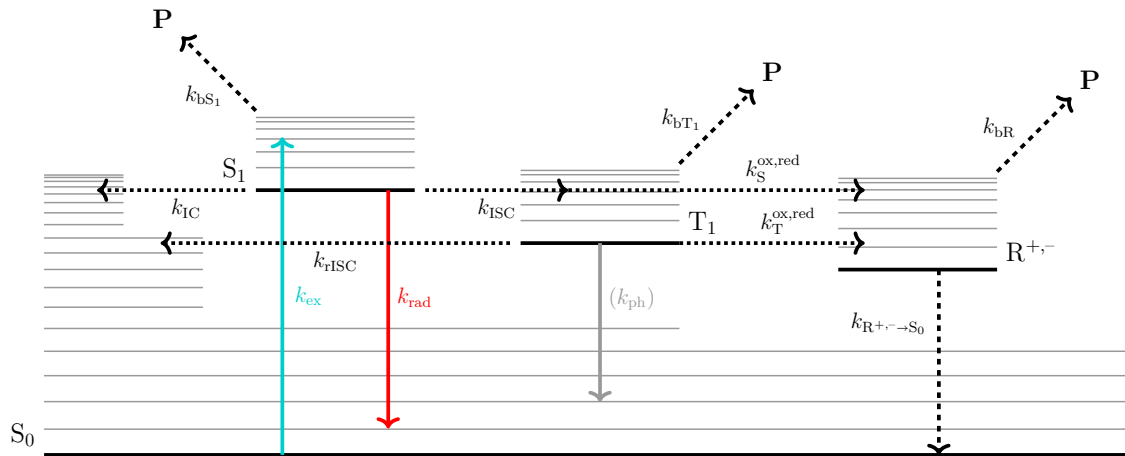


Abbildung 2.9: Energieniveaustermschema mit Bleichprozessen

Die Photozerstörung findet aus dem angeregten Singulett- oder Triplettzustand statt und führt zu einem irreversiblen Verlust der Fluoreszenzfähigkeit des betrachteten Moleküls. Die Bildung von radikal-anionischen- und radikalkationischen Zuständen kann dabei ebenfalls zu einer Erhöhung der Bleichrate führen und ist von der chemischen Umgebung und der eingestrahnten Leistung abhängig.

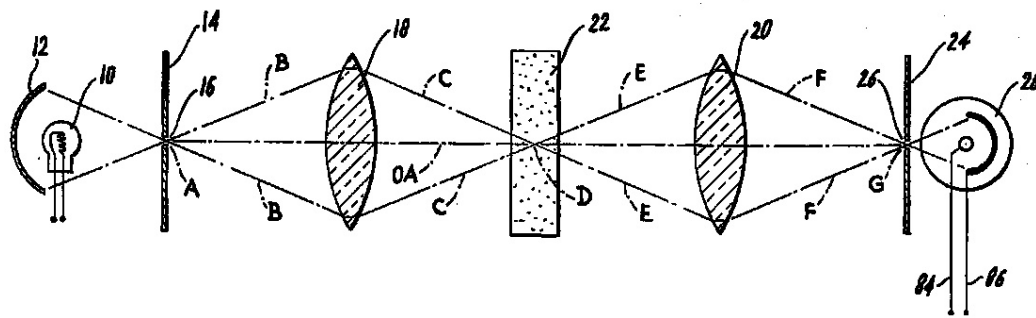
positiv als auch negativ auf die beobachtete Photostabilität auswirken kann [108, 109]. Besonders die Erzeugung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff als Folge der vorhergehenden Löschung durch Sauerstoff kann zu einer erhöhten Bleichrate und phototoxischen Reaktionen mit der biologischen Umgebung führen [110–113]. Wenn das primär von der Löschung betroffene Molekül nicht durch den eventuell entstandenen Singulett-Sauerstoff gebleicht wird, kann dieser entsprechend Gleichung (2.51) aufgrund seiner langen Lebenszeit von etwa $3,45 \mu s$ (in H_2O bei $25^\circ C$) [114] eine mittlere Distanz von $\sqrt{\Delta x^2} \approx 131,34 \text{ nm}$ zurücklegen und beim Kontakt mit anderen Molekülen diese bleichen. Hohe Triplettanteile beschleunigen diesen Prozess zusätzlich, indem sie die Wahrscheinlichkeit der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff erhöhen und den Farbstoff in einem reaktiven Zustand halten, der mit dem Grundzustand des Sauerstoffes reagieren kann. Die typischen Ansätze, um die sauerstoffabhängigen Bleicheffekte zu minimieren, sind dabei die Verdrängung des Sauerstoffes durch ein inertes Gas [115], die chemische Manipulation durch Sauerstofffängersysteme [116, 117], oder die Beobachtung in Gasphase bzw. im Vakuum [118].

2.3 Konfokale Mikroskopie

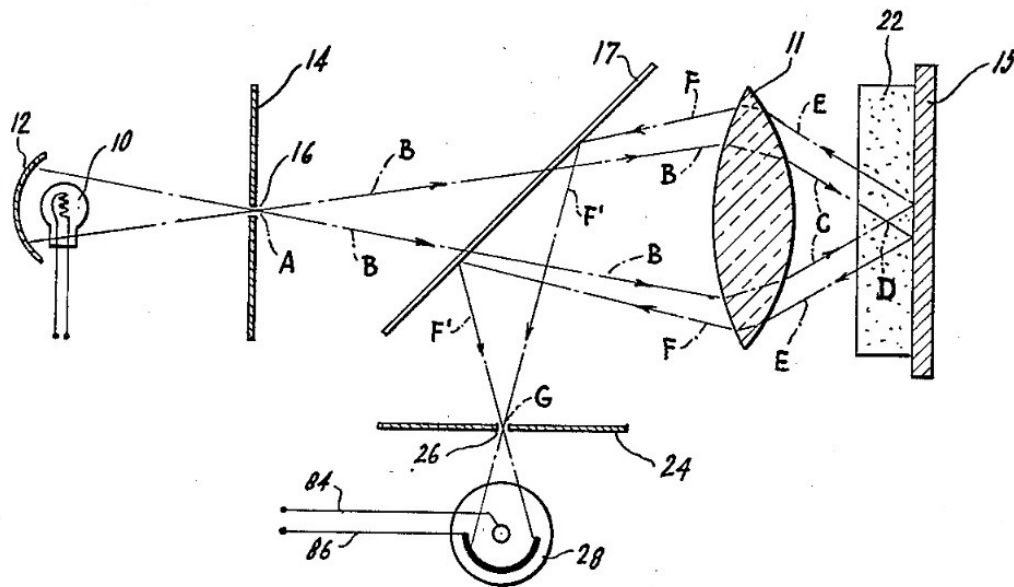
Der Vorteil der 1957 von Marvin Minsky entwickelten [16, 119] konfokalen Mikroskopie gegenüber der üblichen Weitfeldmikroskopie ist die Auslöschung von unerwünschtem Streulicht aus dem Hintergrund der Probe. Realisiert wird dies durch die Fokussierung des Anregungslichtes mithilfe einer Lochblende und eines Objektivs oder entsprechenden Linsensystems auf ein möglichst kleines Volumen. Das vom Objekt reflektierte, transmittierte oder ausgesandte Licht wird aus demselben Brennpunkt gesammelt und durch eine mit der ersten Lochblende konfokal überlagerte, zweite Lochblende fokussiert. Da die Brennpunkte der Anregung und Detektion damit, wie in Abbildung 2.10a dargestellt, zusammenfallen, wird von einem konfokalen Aufbau gesprochen. Eine Lochblende in der konfokalen Ebene vor dem Detektor trägt dazu bei, dass nur Licht aus der konfokalen Ebene detektiert wird, und wirkt somit tiefendiskriminierend. Fluoreszenzmikroskope sind zumeist gemäß Abbildung 2.10b als konfokale Auflichtmikroskope konstruiert und trennen das Anregungs- vom Detektionslicht mittels eines dichroitischen Spiegels. Bei der konfokalen Mikroskopie wird die zur Anregung kohärente Rayleigh-Streuung und die Raman-Streuung, welche nicht kohärentes, von der Anregungswellenlänge unabhängiges Licht erzeugt, durch die Reduzierung des Anregungsvolumens auf wenige Femtoliter und somit auch der Streumöglichkeiten, minimiert. Des Weiteren führt die Überlagerung des Anregungs- und Detektionsfokus in einem Punkt zu einer erhöhten lateralen Auflösung, was in Abschnitt 2.3.2 genauer ausgeführt wird. Als Auflösungsvermögen wird dabei der kleinste auflösbare Abstand zweier Objektpunkte in der Bildebene verstanden. In der Mikroskopie wird dies üblicherweise nach dem Rayleigh-Kriterium bestimmt. Das Rayleigh-Kriterium besagt, dass zwei Punktlichtquellen gerade noch unterschieden werden können, wenn das Zentrum des Airy-Scheibchens der einen Quelle mit dem ersten Minimum der anderen zusammenfällt.

Ein Nachteil der konfokalen Mikroskopie ist, dass Probenbereiche außerhalb des konfokalen Volumens zwar beleuchtet, aber nicht abgebildet werden. Dies kann zum Bleichen, oder zu phototoxischen Reaktionen außerhalb des betrachteten Volumens führen. Außerdem muss aufgrund der Punktdetektion die Probe für eine Bildaufnahme abgerastert werden, da nur ein Volumenelement in der Größe des Laserfokus zur gleichen Zeit beobachtet werden kann. Aus diesen Gründen dauert die Aufnahme eines Bildes mithilfe eines konfokalen Aufbaus ungleich länger als die eines konventionellen Mikroskops.

Scanverfahren, die diesen Nachteil teilweise, oder gar vollständig negieren, sind unter anderem durch konfokale Linienscanner- und Nipkow-Systeme gegeben [120–122]. Bei Linienscanner-Systemen wird die Probe mit einer Linie statt mit einem Punkt beleuchtet, und das Fluoreszenzlicht durch eine Schlitzblende anstelle der Lochblende geführt. Während dies die Bildaufnahme deutlich beschleunigt, steigt gleichzeitig die optische Schnittdicke bei sinkender Penetrationstiefe. Nipkow-Systeme hingegen beleuchten über ein Mikrolinsen-Array ein dem nachgeschaltetes Lochblenden-Array, welches somit viele konfokale Punktbilder



(a) Durchlichtmikroskop



(b) Auflichtmikroskop

Abbildung 2.10: Optische Pfade konfokaler Mikroskope

Zu sehen sind Abbildungen aus der Patentschrift von Minsky [16]. (a) Optischer Pfad eines konfokalen Durchlichtmikroskops. Die Kondensorlinse 18 bildet den Punkt A von der Lochblende 14 in die Probe 22, in Punkt D, ab. Die Objektivlinse 20 bildet das Bild D in der Lochblende 24, die in G konfokal zu D und A steht, ab. Punkte, die nicht konfokal mit A, D und G sind, können den Detektor 28 somit nicht erreichen. (b) Optischer Pfad eines konfokalen Auflichtmikroskops. Die Punkte A, G und D sind in gleicher Weise wie in (a) konfokal überlagert. Anstelle einer Kondensor- und Objektivlinse, ist nur noch eine Linse 11 nötig. Ein teilweise durchlässiger, halbdurchlässiger, oder dichroitischer Spiegel 17 lässt das Licht B der Lichtquelle 10 durch und reflektiert das vom Spiegel 15 reflektierte, oder aus Punkt D fluoreszierte Licht über die Lochblende 24 auf den Detektor 28.

in einem Schritt generiert. Die Bild-Akquisitionsgeschwindigkeit eines solchen Systems ist dabei, analog zur Weitfeldmikroskopie, vom Detektor limitiert. Ein Nachteil dieses Systems ist allerdings, dass dicke bzw. stark streuende Proben zu einer Überlagerung (*crosstalk*) der benachbarten Abbildungen der Lochblenden führen können, was starkes Hintergrundrauschen generiert. Darüber hinaus ist die Lochblendengröße fix gewählt und nicht veränderbar. Dies führt dazu, dass nur bestimmte Kombinationen aus Objektiv und

Anregungswellenlänge verlustfrei genutzt werden können. Eine Gegenüberstellung und detaillierte Erläuterung verschiedener konfokaler Mikroskop-Varianten und Methoden ist zum Beispiel bei Pawley [123] zu finden.

Den folgenden Ausführungen zur Beschreibung der Abbildungsleistung liegen allesamt homogen ausgeleuchtete optische Elemente zugrunde. Der Ausleuchtungs- bzw. Überstrahlungsfaktor T ist dabei durch das Verhältnis vom $1/e^2$ -Laserstrahldurchmesser zum Durchmesser der effektiven Eingangsapertur des verwendeten Objektivs gegeben. In grober Näherung kann bei einem Überstrahlungsfaktor von über 1,3 von einer homogenen Ausleuchtung gesprochen werden.

Die folgenden Formeln beziehen sich auf reine Airy-Verteilungen (siehe Abschnitt 2.3.2) und nehmen eine Überstrahlung von mindestens $T = 5,2$ an. Daher treten bei in Hinblick auf die Auflösung optimierten Systemen häufig hohe Verluste der eingestrahnten Lichtleistung auf. Bei niedrigeren Überstrahlungen ($T < 1$) wird die Intensitätsverteilung gaußförmig und breiter, wodurch die folgenden prinzipiellen Zusammenhänge zwar nach wie vor gelten, aber von einer Unterschätzung der Fokusparameter auszugehen ist.

2.3.1 Auflösungsvermögen

Die Auflösung eines Mikroskops wird qualitativ über die axiale und laterale Ausdehnung des abtastenden und detektierenden Lichtfokus bzw. dessen, in Abschnitt 2.3.2 genauer behandelte, Punktspreizfunktion (PSF) bestimmt. Die minimale Größe des erreichbaren Fokusvolumens ist dabei beugungsbegrenzt. Wird ein Laserstrahl fokussiert, ist das Minimum der Strahltaile von der Wellenlänge des Lichtes, vom Brechungsindex n des Mediums und vom halben Öffnungswinkel α des Lichtkegels abhängig. Die radiale Intensitätsverteilung im Fokus bei einem Laserstrahl ohne transversale Nullstellen (TEM_{00} ¹³) ist näherungsweise gaußförmig. Dabei hängt der Öffnungswinkel mit der Strahltaile w , dem Brechungsindex n und der Wellenlänge λ wie folgt zusammen:

$$\text{NA} = n \cdot \sin \alpha = \frac{\lambda}{\pi w} \quad . \quad (2.57)$$

Die numerische Apertur (NA) beschreibt somit das Fokussiervermögen des optischen Elements und kann in Luft maximal 1 (Öffnungswinkel $2\alpha = 180^\circ$) werden. In anderen Medien können professionelle Objektive typischerweise Werte von etwa 1,2 unter der Nutzung von Wasserimmersion (spezielle Objektive für die supraauflösende Mikroskopie auch 1,27) oder 1,4 bei Ölimmersion (spezielle Objektive für supraauflösende Mikroskopie und die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie¹⁴ auch 1,49) erreichen. So kann mittels der Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung im Fokus das Auflösungsvermögen

¹³ Die Bezeichnung TEM_{xy} steht für transversale elektromagnetische Moden und gibt an, wie viele Nullstellen das elektrische Feld in x - und y -Richtung aufweist.

¹⁴ Siehe auch Abschnitt 3.1.3.

des optischen Elements bestimmt werden. Die Halbwertsbreite (HWB) einer Funktion bezeichnet den Punkt, an dem die Funktion auf 50 % ihres Maximums abgesunken ist. Dabei sind die laterale und axiale Auflösung durch

$$\text{lateral} \quad C_1 \cdot \frac{\lambda}{\text{NA}} \quad , \quad (2.58a)$$

$$\text{axial} \quad C_2 \cdot \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}} \quad (2.58b)$$

gegeben [124]. Die Faktoren C_1 und C_2 hängen dabei von der Konfokalität des Systems ab (siehe Kapitel 2.3.2) und liegen für C_1 und C_2 bei etwa 0,37 und 0,64 bei wellenoptischer und 0,51 und 0,88 bei geometrisch-optischer Konfokalität. Außerdem sollte bei wellenoptischer Konfokalität die durch

$$\bar{\lambda} \approx \sqrt{2} \frac{\lambda_{\text{anr}} \cdot \lambda_{\text{emi}}}{\sqrt{\lambda_{\text{anr}}^2 + \lambda_{\text{emi}}^2}} \quad (2.59)$$

gegebene mittlere Wellenlänge $\bar{\lambda}$ aus der Anregungswellenlänge λ_{anr} und der Emissionswellenlänge λ_{emi} zur Berechnung verwendet werden [125].

2.3.2 Punktspreizfunktion und konfokale Lochblende

Selbst ein vollständig korrigiertes optisches System kann ein exakt punktförmiges Objekt nicht als Punkt abbilden. So entsteht bei der Abbildung eines Punktes ein unscharfer, beugungsbegrenzter Fleck mit einem zentralen Maximum, umgeben von Ringen abnehmender Intensität. Der zentrale Fleck wird nach George Bidell Airy auch Airy-Scheibchen genannt. Die Größe und genaue Form des Beugungsmusters ist dabei abhängig von der Apertur der abbildenden Linse und der Wellenlänge des Lichtes. Quantitativ ist das Punktbild über die Punktspreizfunktion (PSF) beschreibbar, die die zugehörige Intensitätsverteilung im Bildraum widerspiegelt und für ein konventionelles Mikroskop mit zirkularsymmetrischer Apertur durch

$$P_1(x', y') = |h(x', y')|^2 \quad (2.60)$$

beschrieben werden kann [126]. Dabei sind x' , und y' optische Koordinaten¹⁵ und $h(x', y')$ gibt die Feldverteilung im Fokus des Objektivs an. Sie wird auch als Amplituden-PSF bezeichnet und führt bei der Betrachtung eines Punktobjekts in der Fokusebene zu folgenden Ausdrücken für die Intensität entlang der optischen Achse $v = 0$ ($x' = y' = 0$) und

¹⁵ Für eine bessere Vergleichbarkeit der Größen sind die Wellenlänge λ und die NA (vgl. Gleichung (2.57)) in den Koordinaten in der Form $x' = 2\pi \cdot x \cdot \text{NA} / \lambda$ enthalten.

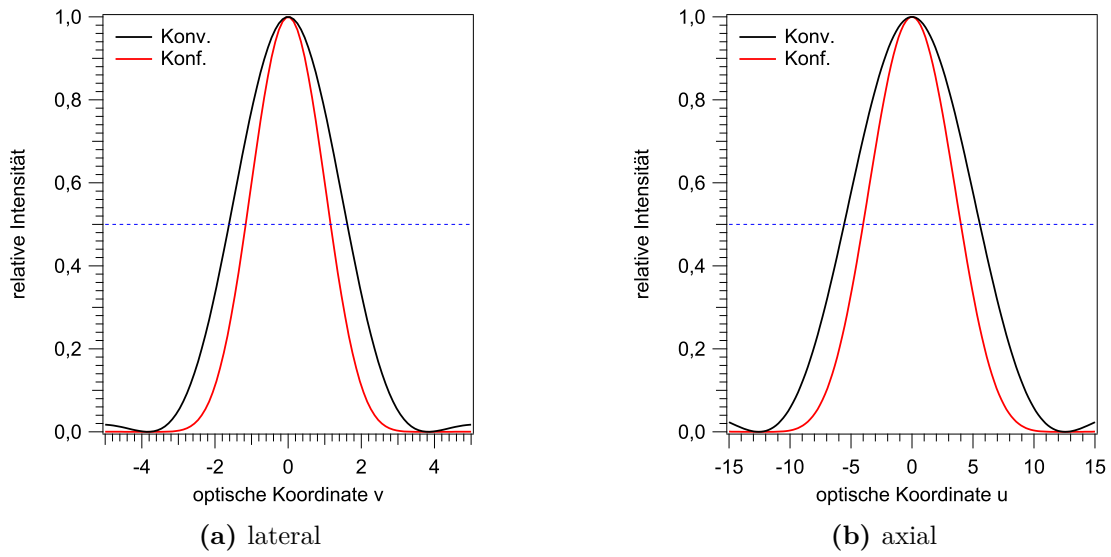


Abbildung 2.11: Intensitäts-Punktspreizfunktion

Dargestellt sind die Intensitäts-PSF eines konventionellen (schwarz) und konfokalen (rot) Mikroskops in der Fokusebene (a) und entlang der optischen Achse (b). Die gepunktete Linie kennzeichnet die relative Intensität bei halber Höhe. Die HWB fällt beim konfokalen Mikroskop lateral von 3,26 auf 2,34 und axial von 11,22 auf 8,08 ab. Die Angaben entsprechen optischen Koordinaten nach Gleichung (2.62).

Fokusebene $u = 0$ ($z = 0$) [124]:

$$I(u,0) = \left(\frac{\sin u/4}{u/4} \right)^2, \quad I(0,v) = \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^2. \quad (2.61)$$

Dabei gibt J_1 die Besselfunktion erster Gattung und Ordnung an (vgl. Gleichung (2.29)) und u und v bezeichnen die optischen Koordinaten der Form:

$$u = z \frac{8\pi}{\lambda} \sin^2(\alpha/2) \quad \text{und} \quad v = \sqrt{x'^2 + y'^2}. \quad (2.62)$$

Unter Annahme der Vereinfachungen einer unendlich kleinen Blende, gleicher Wellenlänge für Anregung und Detektion, sowie des Durchgangs durch das gleiche Objektiv, lässt sich die Intensitäts-PSF für den konfokalen Fall als

$$P_{I, \text{konfokal}}(x',y') = P_I(x',y')^2 = |h(x',y')|^4 \quad (2.63)$$

schreiben [25, 127]. In Abbildung 2.11 ist dieser Zusammenhang für ein Punktobjekt in der Fokusebene entsprechend der Gleichungen (2.61) und (2.63) dargestellt. Es entstehen im konfokalen Fluoreszenzmikroskop also zwei Bilder. Zum einen durch die Abbildung der Lichtquelle in den Objektraum und zum anderen durch die Abbildung des Punktobjektes in den Bildraum. Im realen Experiment treffen die gemachten Annahmen (Blende, Wel-

lenlänge) im Allgemeinen nicht zu, weshalb die Abbildungseigenschaften eines konfokalen Mikroskops durch die Wechselwirkung zwischen der unterschiedlichen Anregungs- und Detektionsfunktion bestimmt werden. Die Anregungsfunktion PSF_{anr} hängt primär von der Wellenlänge des Lichtes, der NA des Objektivs und dem Überstrahlungsfaktor ab. Die Detektionsfunktion PSF_{det} ist zusätzlich von der Blendengröße (bzw. Detektorfläche) abhängig, sodass die PSF des Gesamtsystems durch

$$\text{PSF}_{\text{ges}} = \text{PSF}_{\text{anr}} \cdot \text{PSF}_{\text{det}} \quad (2.64)$$

gegeben ist. Das Verhältnis der Signalbreiten bei einem relativem Abfall der Intensitäten auf die Hälfte der Spitzenintensität kann als Maß für das Auflösungsvermögen verwendet werden und beträgt in lateraler (Abbildung 2.11a) und axialer Richtung (Abbildung 2.11b) etwa 1,4 bzw. $\sqrt{2}$.

Neben Faktoren wie der numerischen Apertur des Objektivs, der Wellenlänge des Lichtes, dem Brechungsindex der Probe und anderen im System präsenten Aberrationen, wird die PSF maßgeblich von der Größe der konfokalen Blende beeinflusst. Die Größe der Blende wird häufig in Vielfachen des in die Blendenebene projizierten Airy-Scheibchendurchmessers¹⁶ ausgedrückt. Ist der Durchmesser der Blende größer als ein Airy, beruhen die zu beobachtenden Eigenschaften im wesentlichen auf den Gesetzen der geometrischen Optik, bei kleineren Blenden treten wellenoptische Gesetze in den Vordergrund. Dabei ist insbesondere die erreichbare Tiefendiskriminierung vom Blendendurchmesser abhängig und kann für in Airy-Einheiten gegebene Blendendurchmesser d durch

$$w_{\text{opt. Schnitt}} = 0,67 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}} \sqrt{\frac{1 + d^2}{2 \ln 2}} \quad (2.65)$$

genähert werden [128]. Wobei n das Immersionsmedium und $w_{\text{opt. Schnitt}}$ den Radius beim $1/e^2$ -Abfall bezeichnet. Für Blendengrößen unter einem Airy entspricht die erreichbare Tiefendiskriminierung dem Auflösungsvermögen und wird daher auch durch die in Abschnitt 2.3.1 gegebenen Gleichungen beschrieben.

2.3.3 Signal und Rauschen

Das Signal bzw. die durch die Gesamt-Detektionsempfindlichkeit gegebene Anzahl an detektierbaren Photonen eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops bei zählender Detektion, ist maßgeblich von der Objektivapertur, den Transmissions- und Reflexionseigenschaften der optischen Komponenten und der Quanteneffizienz des Detektors abhängig. Das Rauschen wird hauptsächlich durch das Laser-, Schrot- und Dunkelrauschen bestimmt. Das Laser- und Dunkelrauschen resultiert dabei aus einer zufälligen Schwankung der Besetzung der angeregten

¹⁶ Eine Airy-Einheit (AE) entspricht $1\text{AE} = 1,22 \cdot \lambda/\text{NA}$

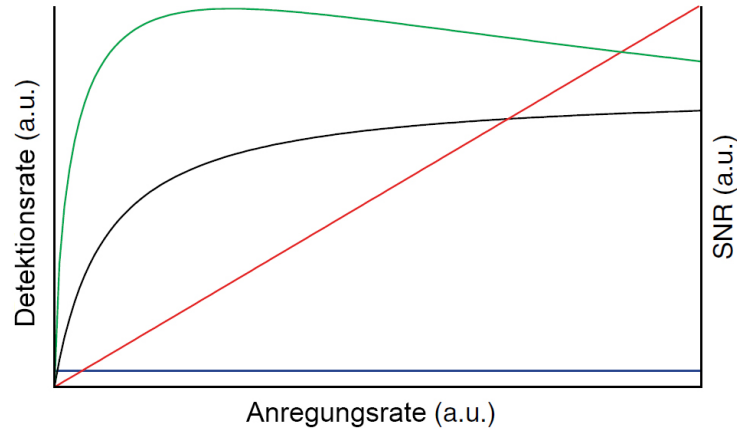


Abbildung 2.12: Signal-Rausch-Verhältnis als Funktion der Anregungsleistung

Dargestellt sind das Signal-Rausch-Verhältnis nach Gleichung (2.66) (grün), die Fluoreszenzintensität eines Einzelmoleküls (schwarz), das Dunkelrauschen (blau) und der laserinduzierte Hintergrund (rot). Abbildung entnommen und verändert aus [129].

Zustände im Lasermedium. Zusätzlich führt das Laserlicht zu einem Hintergrundsignal, das durch elastische Rayleigh- und inelastische Ramanstreuung des Lichtes erzeugt wird und sich somit linear zur eingestrahlichten Laserleistung verhält. Das Schrotrauschen ist durch die Poissonverteilung der zufällig am Detektor eintreffenden Photonen gegeben. Das Dunkelrauschen entsteht durch thermische Dunkelektronen und ist somit unabhängig von der Sensorbeleuchtung. Abhängig von der Elektronik und den Einstellungen des Detektors können weitere Rauschfaktoren durch die Ladungsträgermultiplikation bzw. Verstärkung auftreten.

Diese Signal und Rauschanteile bei einem Einzelmolekül-FCS-Experiment sind in Abbildung 2.12 dargestellt, wobei das Maß für die Qualität eines, von einem Rausch- und Hintergrundsignal überlagerten, Nutzsignals als Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) angegeben wird. Es beschreibt das Verhältnis der mittleren Leistung des Nutzsignals zum Hintergrund und zur mittleren Rauschleistung des Störsignals. Dabei kann das SNR durch

$$\begin{aligned}
 \text{SNR} &= \frac{\text{Nutzsignalleistung}}{\text{Rauschleistung}} \\
 &= \frac{\eta_{\text{det}} k_{\text{ex}} T_{\text{int}}}{\sqrt{\eta_{\text{det}} k_{\text{ex}} T_{\text{int}} + C_{\text{b}} I_{\text{L}} T_{\text{int}} + N_{\text{d}} T_{\text{int}}}} \\
 &= \frac{\eta_{\text{det}} k_{\text{ex}}}{\sqrt{\eta_{\text{det}} k_{\text{ex}} + C_{\text{b}} I_{\text{L}} + N_{\text{d}}}} \sqrt{T_{\text{int}}}
 \end{aligned} \tag{2.66}$$

beschrieben werden [130]. Dabei gibt η_{det} die Detektionseffizienz, k_{ex} die Emissionsrate des Fluorophors, T_{int} die Integrationszeit, C_{b} das Verhältnis von Laserleistung I_{L} zu laserinduziertem Hintergrund und N_{d} das Dunkelrauschen des Detektors an.

2.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

In der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) werden Intensitätsfluktuationen mittels einer Korrelationsanalyse mit den ihnen zugrunde liegenden physikalischen Prozessen und Parametern verknüpft. Die ersten Anwendungen der FCS waren die Analyse des Diffusions- und Interaktionsverhaltens niedrig konzentrierter fluoreszenter Teilchen in Lösungsexperimenten [23, 26, 131]. Dabei werden die Intensitätsschwankungen im einfachsten Fall durch lokale Konzentrationsänderungen der fluoreszenten Teilchen aufgrund der Brownschen Molekularbewegung verursacht.

2.4.1 Diffusions-Korrelations-Funktion

Die grundlegende Theorie basiert dabei auf der Poisson-Verteilung, nach der die mittlere Anzahl der beobachteten, voneinander unabhängigen Ereignisse n in einem festen Zeitintervall T über den beobachteten Raum V der Verteilung

$$P_N(n) = \frac{N^n}{n!} e^{-N} \quad (2.67)$$

gehorchen [57]. N gibt dabei den Erwartungswert der Verteilung, also in diesem Fall die mittlere Anzahl fluoreszenter Teilchen

$$N = V \cdot c \quad (2.68)$$

bei einer Gesamtkonzentration c an. Damit hängt die beobachtete Fluoreszenzintensität F zum Zeitpunkt t über die Diffusionsgeschwindigkeit, sowie die Poisson-Verteilung aus Gleichung (2.67) und deren Erwartungswert (siehe Gleichung (2.68)) mit der beobachteten Fluoreszenzintensität zu einem späteren Zeitpunkt $t + \tau$ zusammen. Mathematisch entspricht dies der Berechnung der Autokorrelationsfunktion (AKF) $G(\tau)$ der aufgenommenen transienten Intensitäten der Form:

$$G(\tau) = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) F(t + \tau) dt = \langle F(t) F(t + \tau) \rangle_t \quad (2.69)$$

Da physikalisch unkorrelierte Ereignisse unabhängig von der Verschiebezeit τ auftreten, führen sie zu einem konstanten Signalteil in der Korrelation. Beobachtet werden somit die Fluktuationen δF zum Zeitpunkt t um einen konstanten Mittelwert $\langle F \rangle$ sodass mit

$$\delta F(t) = \langle F \rangle - F(t) \quad (2.70)$$

die normierte AKF der Fluktuationen als

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle_t}{\langle F(t) \rangle_t^2} + 1 \quad (2.71)$$

geschrieben werden kann [132]. Die beobachtbare Fluoreszenz hängt dabei von der ortsabhängigen Anregungstransferfunktion $I(x, y, z)$ mit der Amplitude I_0 und der Detektionstransferfunktion $CEF(x, y, z)$ ab. Die dimensionslosen Größen der Transferfunktionen der Anregung und Detektion können nun in Form der Molekül-Detektions-Funktion (MDF) zusammengefasst werden. Liegen den Fluktuationen rein diffusive Vorgänge zugrunde, kann Gleichung (2.70) als

$$\delta F(t) = \eta \int_V I_0 \cdot \text{MDF}(x, y, z) \cdot \delta(\sigma \cdot Q \cdot C(x, y, z, t)) \, dV \quad (2.72)$$

formuliert werden¹⁷. Wobei η die Gesamtdetektionseffizienz, $\delta\sigma$ die Fluktuation des Absorptionswirkungsquerschnittes und δQ die Fluktuation der Quanteneffizienz beschreibt. Der Wert der MDF ist dabei proportional zu der Wahrscheinlichkeit, ein Emissionsereignis am Ort (x, y, z) zu detektieren, und C beschreibt die lokale Konzentration am Ort (x, y, z) zum Zeitpunkt t . Die Diffusions-Korrelationsfunktion Fickscher Diffusion und einer Verschiebezeit τ am Ort r_1 relativ zu einem Zeitpunkt $t = 0$ und Ort r_0 lautet dann [53, 133, 134]:

$$\langle \delta C(r_0, 0) \delta C(r_1, \tau) \rangle = \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} e^{-\frac{|r_0 - r_1|^2}{4D\tau}} \quad (2.73)$$

Häufig wird die PSF mikroskopischer Systeme zwecks einer einfacheren mathematischen Behandlung in guter Näherung durch eine Gaußfunktion beschrieben [135]¹⁸. Für eine dreidimensionale gaußförmige MDF

$$\text{MDF}(x, y, z) = e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{w_{xy}^2} + \frac{z^2}{w_z^2}\right)} \quad (2.74)$$

kann durch Einsetzen von Gleichung (2.73) in Gleichung (2.71) die Korrelationsfunktion

$$G_D(\tau) = G_D(0) \left(1 + \frac{4D\tau}{w_{xy}^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_z^2}\right)^{-1/2} \quad (2.75)$$

erhalten werden [57, 136]. Die explizite Lösung der Autokorrelationsgleichung ist in Anhang A.1 aufgeführt. Häufig wird anstelle des Diffusionskoeffizienten D die Diffusionszeit

¹⁷ Entsprechend gilt $F(t) = \eta \int_V I_0 \text{MDF}(x, y, z) \cdot \sigma Q C(x, y, z, t) \, dV$

¹⁸ Die sich daraus ergebende Annahme eines 3D-Gaußvolumens ist im Großteil der Literatur zur konfokalen Einzelmolekül-FCS üblich und wird daher auch an dieser Stelle betrachtet.

$\tau_D \approx w_{xy}^2/4D$ und für die Volumenparameter ein Strukturfaktor der Form $S = w_{xy}/w_z$ verwendet. Außerdem kann unter der Annahme, dass die beobachtete Fluoreszenzintensität proportional zur mittleren Konzentration ist, also $N \propto \langle c \rangle$ gilt, und da die lokale Konzentrationsfluktuation δC in den Gleichungen (2.71) und (2.73) sich gemäß der Poisson-Verteilung proportional zu $\sqrt{N}$ verhält, die Korrelationsamplitude durch

$$G_D(0) = \frac{\sqrt{N}^2}{N^2} = \frac{1}{N} \quad (2.76)$$

ausgedrückt werden. Die gesamte Diffusions-Korrelationsfunktion lautet somit:

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2}. \quad (2.77)$$

Für Formen der MDF, die vom in Gleichung (2.74) beschriebenen Gauß abweichen, ergeben sich entsprechend andere Amplituden. Auch ein abweichendes Diffusionsverhalten oder die Beobachtung verschiedener Spezies kann mithilfe unterschiedlicher Parameter bzw. Umformungen realisiert werden. In Anhang A.1 (Seite I) ist die Bestimmung der Amplitude $G(0)$ entsprechend der MDF nach Gleichung (2.74) dargestellt und der Zusammenhang zwischen der geometrischen Form des Fokus und einer zusätzlichen Parametrisierung der Amplitude der Form $G(0) = \gamma/N$ wird besprochen. Dabei dient γ als geometrischer Faktor, der zum Beispiel $\gamma \approx 0,354$ bei einem gaußförmigen Volumen und $\gamma \approx 0,076$ bei einem lorentzförmigen Volumen¹⁹ lautet. In der folgenden Verwendung der AKF wird auf das γ verzichtet, wodurch sich die Messgrößen auf das effektiv beobachtete Volumen V_{eff} beziehen. Diese Definition hat den Vorteil, dass bei einer gegebenen Probenkonzentration die Größe des effektiven Volumens durch die mittlere Molekülzahl N , also direkt durch die Amplitude der Korrelationsfunktion nach Gleichung (2.76), gegeben ist (vgl. Gleichung (2.68)).

Die bisher betrachtete AKF dient der Analyse physikalischer Vorgänge, die auf einer Zeitskala von Millisekunden bis zu wenigen Sekunden die Fluoreszenzrate beeinflussen. Daher wird die FCS auch abseits einfacher Konzentrationsmessungen in der Analyse von diffusionsgetriebenen Bindungsreaktionen und Interaktionen zwischen verschiedenen Partnern (wie zum Beispiel Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteinen), sowie bei anomaler Diffusion in Zellen oder in/an Membranen verwendet [137–144].

2.4.2 Schnelle Fluktuationsprozesse

Bei kleineren Verschiebezeiten τ im Bereich von wenigen Micro- bis zu mehreren Nanosekunden, können zusätzliche Fluktuationsprozesse sichtbar sein. Diese werden zumeist durch chemische Reaktionen, Konformationsänderungen, oder andere kinetische Prozesse verursacht [30, 145–148]. Unter der Annahme, dass die bisher betrachteten, zumeist

¹⁹ Entsprechend der Standard-Lorentz-Verteilung $f(x) = \pi^{-1}s/(s^2 + x^2)$ mit dem Breitenparameter s .

diffusiven, Prozesse in diesem Zeitbereich stationär sind und somit keinen Einfluss auf das Fluktuationsverhalten haben²⁰, kann die Korrelationsfunktion als Produkt zweier Funktionen geschrieben werden [57, 132]:

$$G(\tau) = 1 + G_D(\tau) \cdot G_T(\tau) \quad . \quad (2.78)$$

Der Fluktuationsterm $G_T(\tau)$ wird im Folgenden für die in Abschnitt 2.2.3 erläuterten Prozesse genauer beschrieben. Die zeitabhängige Lösung der mit Gleichung (2.40) eingeführten Trennung des Singulett- und Triplett-Systems führt mithilfe Gleichung (B.4) zu den Eigenwerten:

$$\lambda_1 = 0 \quad , \quad \lambda_2 = -\frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} - k_{\text{rISC}} \quad . \quad (2.79)$$

Die dazugehörigen Eigenvektoren lauten:

$$\vec{\eta}_1 = \begin{pmatrix} \frac{(k_{\text{ex}}+k_{\text{IC}}+k_{\text{rad}})k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}} \\ 1 \end{pmatrix} \quad , \quad \vec{\eta}_2 = \begin{pmatrix} -1 \\ 1 \end{pmatrix} \quad . \quad (2.80)$$

Mithilfe der Randbedingungen, dass das betrachtete System im Singulettzustand startet, also $S(t=0) = 1$ und $T_1(t=0) = 0$, ergeben sich die Konstanten:

$$c_1 = \frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \quad , \quad (2.81a)$$

$$c_2 = -\frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \quad . \quad (2.81b)$$

Womit die Lösungen für die zeitabhängige Besetzung des Singulettzustandes

$$S(t) = \frac{e^{t\lambda_2} k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} + e^{t\lambda_1} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \quad , \quad (2.82)$$

und des Triplettzustandes

$$T_1(t) = \frac{(e^{t\lambda_1} - e^{t\lambda_2}) k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \quad (2.83)$$

²⁰ Entsprechend werden auch Bindungsreaktionen, welche den Diffusionskoeffizienten beeinflussen, ausgeschlossen. Die Annahme des stationären Verhaltens der molekularen Diffusion wird dabei auf die Größenskala deutlicher Änderungen im Detektionsvolumen bezogen.

lauten. Die zeitabhängigen Besetzungen beinhalten einen durch den ersten Eigenwert $\lambda_1 = 0$ gegebenen stationären Zustand. Das heißt, dass die Besetzungsdichten der Zustände für $t \rightarrow \infty$ konstant werden, womit die Gleichungen (2.82) und (2.83) auch als

$$S(t) = \bar{S} + \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} \cdot e^{-t \left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \right)}}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \quad (2.84)$$

mit $\bar{S} = \frac{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}}$

für den Singulett, und

$$T_1(t) = \bar{T} \left(1 - e^{-t \left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \right)} \right) \quad (2.85)$$

mit $\bar{T} = \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}}$

für den Triplett formuliert werden können. Nun wird Gleichung (2.82) mithilfe der stationären Lösungsanteile $\bar{S}$ und $\bar{T}$ aus den Gleichungen (2.84) und (2.85) zu:

$$S(t) = \bar{S} \underbrace{\left(\frac{\bar{T}}{1 - \bar{T}} e^{-t \left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \right)} + 1 \right)}_{G_{\text{T}}(\tau)} \quad (2.86)$$

Der geklammerte Ausdruck beschreibt das Betreten und das Verlassen eines Dunkelzustandes und die damit verbundene Intensitätsänderung. Das Leuchtverhalten zu kurzen ($\sim \mu\text{s}$) und langen ($\sim \text{ms}$) Zeiten wird durch Einsetzen der Gleichungen (2.77) und (2.86) in Gleichung (2.78) erhalten, sodass die gesamte Korrelationsfunktion

$$G(\tau) = 1 + A \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{D}}} \right)^{-1} \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_{\text{D}}} \right)^{-1/2} \left(1 + A_{\text{T}} \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{T}}}} \right) \quad (2.87)$$

lautet. Bei der Anpassung experimenteller Daten mit der Korrelationsfunktion nach Gleichung (2.87) werden die Parameter A , S , A_{T} und τ_{T} bestimmt.

chung (2.87) werden typischerweise die folgenden fünf Parameter variiert:

$$\text{Amplitude} \quad A = N^{-1} \quad , \quad (2.88a)$$

$$\text{Diffusionszeit} \quad \tau_D \approx \frac{w_{xy}^2}{4D} \quad , \quad (2.88b)$$

$$\text{Strukturfaktor} \quad S = \frac{w_{xy}}{w_z} \quad , \quad (2.88c)$$

$$\text{Triplet-Amplitude} \quad A_T = \frac{\bar{T}}{1 - \bar{T}} = \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \quad , \quad (2.88d)$$

$$\text{Tripletzeit} \quad \tau_T = \left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \right)^{-1} . \quad (2.88e)$$

Der Strukturfaktor S beschreibt die Geometrie des betrachteten Volumens und kann auch durch Kalibriermessungen bestimmt und entsprechend konstant gewählt werden. Die erhaltenen Werte können anschließend zur Berechnung der Interkombinationsraten gemäß

$$\text{Interkombination} \quad \frac{k_{\text{ex}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} k_{\text{ISC}} = \left(\tau_T \left(1 + \frac{1}{A_T} \right) \right)^{-1} \quad , \quad (2.89a)$$

$$\text{Rück-Interkombination} \quad k_{\text{rISC}} = (\tau_T (1 + A_T))^{-1} \quad (2.89b)$$

genutzt werden. Der Bruch vor der k_{ISC} -Rate charakterisiert dabei die Abhängigkeit von der Anregungsleistung und wird in Abschnitt 4.1 genauer behandelt.

Kapitel 3

Material und Methoden

Dieses Kapitel soll dazu dienen, die benutzten Geräte, Materialien und untersuchten Fluorophore vorzustellen. Im ersten Unterkapitel wird der prinzipielle Aufbau der Einzelmolekülmikroskope und die zur Desoxygenierung der Probenlösungen genutzte Messkammer vorgestellt. Dabei wird am Beispiel des in dieser Arbeit entwickelten Aufbaus die Funktion aller in der Arbeit genutzten Mikroskope beschrieben. Danach wird die zum Teil selbst entwickelte und zur Datenverarbeitung eingesetzte Hard- und Software besprochen. Anschließend wird die mit Duda [149] im Rahmen ihrer Masterarbeit entwickelte Erweiterung des Messaufbaus um ein Kryostatsystem und die Optimierung der Spincoating-Einfriermethode für die Herstellung von amorphen Einzelmolekülproben bei niedrigen Temperaturen und der Aufbau eines TIRF-Mikroskops¹ mit zwei Farbkanälen präsentiert.

Das zweite Unterkapitel bespricht die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und geht auf ihre essentiellen spektralen Eigenschaften ein. Dabei werden kurz die strukturellen Unterschiede besprochen und die Spektren dargestellt. Die Vorbereitung und Zugabe von unterschiedlichen photoprotektiven Additiven wird erläutert und in Bezug auf ihre erwartete Funktion beschrieben. Daraufhin wird ein Protokoll zur Immobilisierung von thiol-reaktiven Farbstoffen am Deckglas vorgestellt.

Das dritte Unterkapitel beschäftigt sich mit der in Zusammenarbeit mit Zickmantel entwickelten Simulation von Einzelmolekülexperimenten. Dabei werden insbesondere die der Simulation zugrundeliegenden mathematisch-physikalischen Zusammenhänge vorgestellt. Die in der Arbeit genutzten Anregungs- und Detektionsfunktionen werden definiert und der grundlegende Ablauf einer Simulation beschrieben. Abschließend wird die entwickelte LabVIEW-Benutzeroberfläche² präsentiert.

¹ Ein Fluoreszenzmikroskop das ein evaneszentes Anregungsfeld durch Totalreflexion an der Grenzfläche zum Präparat erzeugt.

² LabVIEW – Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench

3.1 Konfokales Laserscanningmikroskop

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Einzelmolekülmessungen wurden an von der Arbeitsgruppe selbstgebaute Mikroskopen durchgeführt. Der in Abbildung 3.1 dargestellte Aufbau wurde im Rahmen dieser Arbeit entworfen und aufgebaut. Die Auswahl und Bewertung der Komponenten kann in der Bachelorarbeit von Kühne [150] nachvollzogen werden. Da die prinzipielle Funktionsweise der genutzten Mikroskope ähnlich ist, wird dieser hier beispielhaft präsentiert. Änderungen an optischen Komponenten (wie z. B. der Wechsel der Rastermethode von der Strahlrasterung über Galvanometerspiegel und ein telezentrisches Linsensystem zur Probenverschiebung mittels piezoelektrischer Aktuatoren) werden im Verlauf der Arbeit erwähnt, soweit sie für die betrachteten Daten von Bedeutung sind.

Abbildung 3.2 zeigt schematisch die grundlegenden Komponenten des Mikroskops. Die Anregung erfolgt durch verschiedene Dauerstrichlaser. Die in der Arbeit verwendeten Laser emittieren bei einer Wellenlänge von 488 nm, 532 nm und 632 nm. Zur Erzeugung einer punktförmigen Lichtquelle wird das Laserlicht über einen Laserstrahl-Koppler (60 SMS-RGBV, Schäfter & Kirchhoff) in eine nicht polarisationserhaltende Einzelmodenfaser (SMC-400Si, NA = 0,12, Schäfter & Kirchhoff) eingekoppelt.

Die Polarisation und Intensität des Anregungslichtes wird mittels der vor der Einzelmodenfaser angebrachten $\lambda/2$ - und $\lambda/4$ -Verzögerungsplättchen (Melles Griot) eingestellt. Die

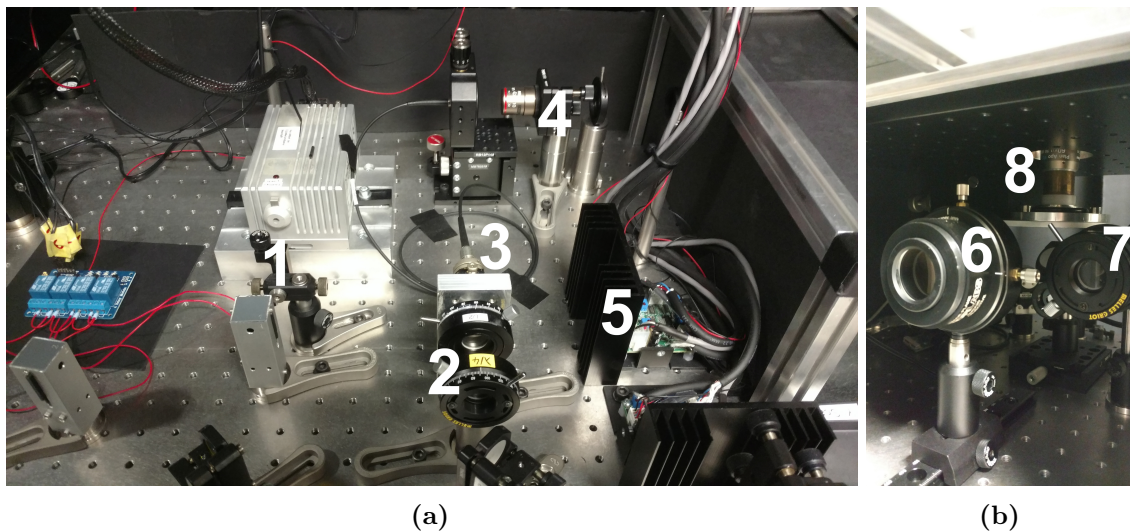


Abbildung 3.1: Anregungs- und Detektionsstrahlengang des Mikroskops

(a) Im Anregungsstrahlengang sind ein Laser (1) mit einer Wellenlänge von 488 nm und die Verzögerungsplättchen (2) vor der Fasereinkopplung (3) zu sehen. Das ausgekoppelte Licht wird mit einem Objektiv (4) kollimiert. Vorne rechts ist die Steuerelektronik (5) der Galvanometerspiegel zu sehen. (b) Hinter der telezentrischen Linse (6) sind das Verzögerungsplättchen und der Analysator (7) zu erkennen. Ein 45° -Spiegel leitet das Licht in das Wasserimmersionsobjektiv (8). Die Objektivhalterung ist auf die in Abschnitt 3.1.3 aufgeführten Kryostatmessungen ausgelegt und wurde hier zur besseren Sichtbarkeit vom zusätzlichen Aufbau (z. B. Vakuumbälge) befreit.

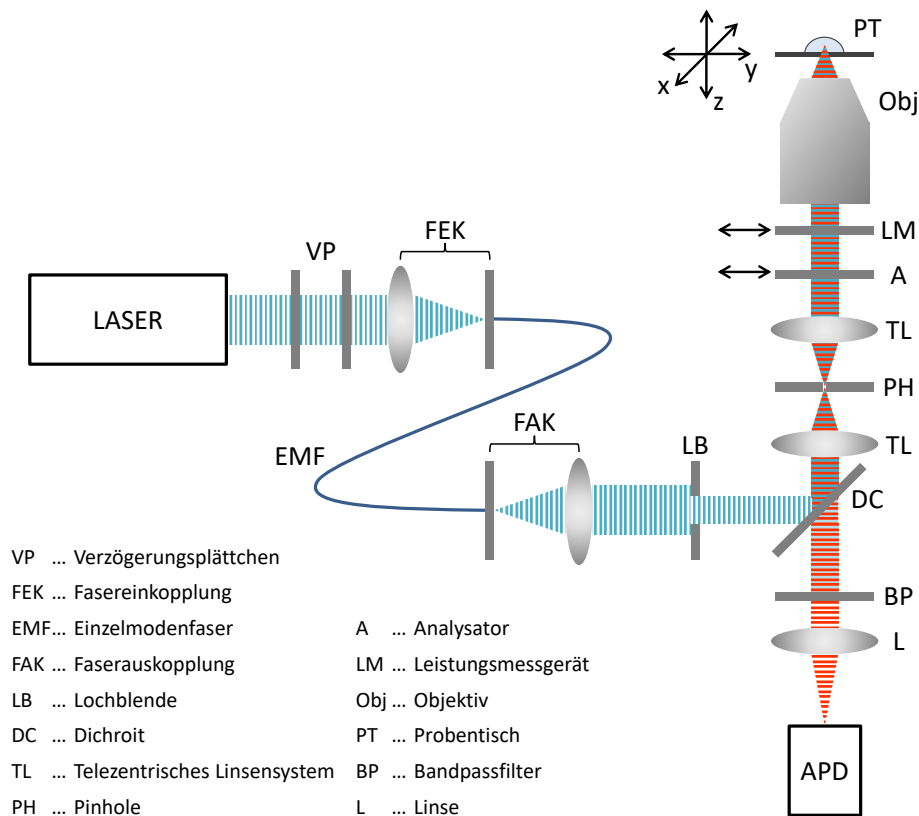


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der verwendeten Mikroskope

Das Laserlicht wird in eine optische Faser eingekoppelt (FEK) und kann durch zwei Verzögerungsplättchen (VP) in seiner Polarisation eingestellt werden. Das aus der Faser austretende Licht wird kollimiert (FAK) und von einer Lochblende (LB) in seinem Durchmesser beschränkt. Hiernach wird das Anregungslicht durch einen Dichroit (DC) und ein telezentrisches Linsensystem (TL) gelenkt. Ein zwischengeschaltetes Pinhole (PH) bestimmt dabei das Auflösungsvermögen gemäß Abschnitt 2.3.2. Das Objektiv (Obj) fokussiert das Laserlicht auf die Probe und sammelt das emittierte Fluoreszenzlicht, das den Dichroit passiert und auf die Detektoreinheit (APD) gelenkt wird. Dazu wird das Licht erst durch einen Bandpassfilter (BP) zum Blocken des gestreuten Anregungslichtes und danach auf eine achromatische Linse (L) gelenkt. Die Kontrolle der Polarisation und Laserleistung vor dem Objektiv kann durch ein einfahrbares Leistungsmessgerät (LM) und einen Analysator (A) vorgenommen werden. Das Rastern bzw. Anfahren bestimmter Positionen in der Probe wird entweder durch ein Verschieben des Probenstisches (PT) mittels piezoelektrischer Aktuatoren (*sample scanning*), oder zwei vor dem telezentrischen Linsensystem platzierten Galvanometerspiegeln (*beam scanning*, nicht dargestellt) realisiert.

Überprüfung der Polarisation und Intensität kann durch ein vor dem Objektiv angebrachten Analysator (Melles Griot) und ein Leistungsmessgerät (OP-2VIS, Coherent) vorgenommen werden.

Die aus der Faser divergent austretende TEM_{00} -Mode des Lichtes wird mittels eines Objektivs (4× CFI Plan Achromat, NA = 0,1, Nikon) zu einem Parallelstrahl kollimiert. Der zum optimalen Füllen des Messobjektivs nötige Durchmesser des parallelen Gaußstrahls kann über eine Lochblende eingestellt werden. Ein wechselbarer, dichroitischer Strahlteiler (bei 488 nm und 632 nm: z405/470/633, bei 532 nm: z532/633, beide Chroma) reflektiert

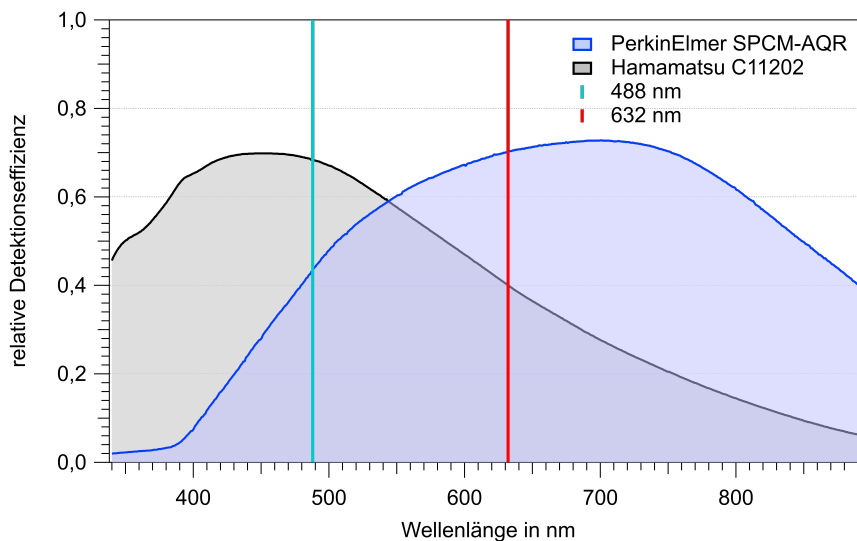


Abbildung 3.3: Detektionseffizienzen der genutzten Detektoren

Die Detektionseffizienzen unterscheiden sich je nach betrachteter Wellenlänge deutlich voneinander. Die maximale Detektionseffizienz der Hamamatsu C11202 (schwarz) liegt bei 70 % bei einer Wellenlänge von 445 nm. Die maximale Detektionseffizienz der PerkinElmer SPCM-AQR-14 (blau) liegt bei 73 % bei einer Wellenlänge von 700 nm. Die über den dargestellten Bereich gemittelte Detektionseffizienz beträgt für den C11202 41 % und für den SPCM-AQR-14 43 %.

das Anregungslicht über ein telezentrisches Linsensystem (Tubuslinse mit der Brennweite 20 cm, Nikon) in die rückseitige Apertur des Messobjektivs (Wasserimmersionsobjektiv, 60× CFI Plan Apochromat VC, NA = 1,2, Nikon). Im Brennpunkt des telezentrischen Linsensystems kann ein Pinhole zur Manipulation des Auflösungsvermögens (siehe Abschnitt 2.3.2) angebracht werden. Um den Fokus lateral in der Probe zu positionieren, kann der Laserstrahl vor der Telezentrik mittels eines Galvanometerscanners (GVS212/M, Thorlabs) in der xy -Ebene bewegt werden. Die laterale und axiale Positionierung der Probe geschieht durch eine Verschiebung des Objektivs mittels einer Flexure Stage (MAX303/M, Thorlabs), die mit einem Schrittmotor in axialer Richtung (DRV208, Thorlabs) ausgestattet ist.

Das aus dem Fokus stammende Fluoreszenzlicht der Probe wird von demselben Objektiv gesammelt und läuft entgegengesetzt zum Anregungslicht bis zum Dichroiten, wo es aufgrund der Rotverschiebung zum Anregungslicht (siehe Abschnitt 2.2.3) transmittiert wird. Ein Bandpassfilter (bei 488 nm: ET525/50, Chroma) dient zum Blockieren des Streulichtes der Anregung und zur Unterdrückung der Ramanstreuung des Wassers. Eine achromatische Sammellinse fokussiert das Strahlenbündel auf die Detektoren. Dabei ist eine Avalanche-Photodiode (APD) des Typs SPCM-AQG-14 von Perkin Elmer, die sich durch ihre in Abbildung 3.3 (lila) dargestellte hohe Quanteneffizienz (50 % bis 70 %) sowie eine niedrige Totzeit (etwa 60 ns) und maximale Dunkelzählrate von 100 cps auszeichnet, verbaut. Die aktive Detektorfläche der APD hat einen Durchmesser von 175 μm und dient als weitere konfokale Lochblende.

Als zweiter Detektor ist ein Einzelphotonenzählmodul von Hamamatsu (C11202-050) verbaut. Es besitzt eine aktive Fläche von $50\text{ }\mu\text{m}$ mit einer Dunkelzählrate von im Mittel 7 cps (max. 25 cps). Die Detektionseffizienz ist besonders bei niedrigen Wellenlängen hoch und sinkt im roten Bereich deutlich ab. Mittels eines Strahlteilers kann das Licht auf die beiden Detektoren aufgeteilt werden, um die Durchführung von Zweifarb-Experimenten oder Kreuzkorrelationen des gleichen Signals zur Beseitigung unkorrelierter Signalteile, wie zum Beispiel Afterpulsingartefakten zu ermöglichen. Um Abweichungen bei der Kreuzkorrelationsanalyse aufgrund der verschiedenen Detektionseffizienzen zu vermindern, wurde für diese Experimente der Hamamatsu C11202-050 Detektor mit einem zweiten Perkin-Elmer SPCM-AQG-14 ersetzt.

3.1.1 Messkammer zur Desoxygenierung der Proben

Zur Desoxygenierung der Farbstofflösungen wurde in dieser Arbeit eine Messkammer verwendet, die mit inertem Gas geflutet werden kann und dadurch nach Henry und Banks [151] zu einer Verdrängung des Sauerstoffes aus dem Probenvolumen führt. Eine andere, in der Literatur weit verbreitete Variante ist die Zugabe eines enzymatischen Sauerstofffänger-Systems [152]. Die Messkammer ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt und kann mithilfe von Vakuumfett und Magneten auf einem Deckglas angebracht werden.

Das gemäß Abbildung 3.4b durch ein Wasserbad befeuchtete, inerte Gas strömt über den Probentropfen und führt so zu einer Verdrängung des Sauerstoffes in der Probe aufgrund des hohen Konzentrationsgradienten zwischen Lösungsmittel und umgebender

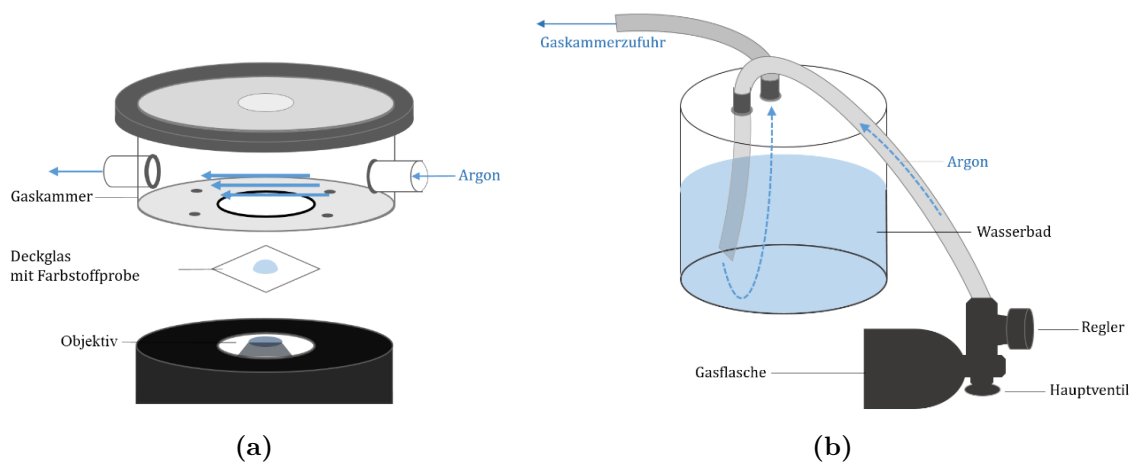


Abbildung 3.4: Kammer für Messungen unter Gasatmosphäre

(a) Die gasdichte Kammer wird mithilfe von Magneten und Vakuumfett über dem Deckglas platziert. Von einer Seite kann nun ein inertes Gas (hier: Argon) über die Probe geführt und die Probe somit desoxygeniert werden. Durch einen konstanten Gasfluss wird sichergestellt, dass stets eine maximale Inertgas- und minimale Sauerstoffatmosphäre in der Probenkammer herrscht. (b) Das zugeführte Gas wird über einen Druckminderer in ein Wasserbad geleitet. Der Wasserbehälter ist dicht verschlossen, sodass überschüssiges, befeuchtetes Gas von der Kammerdecke der Probenkammer zugeführt wird. Abbildungen entnommen aus [153].

Atmosphäre. Da das Probenvolumen aufgrund des kleinen Beobachtungsvolumens des konfokalen Mikroskops (siehe Abschnitt 2.3) wenige Mikroliter beträgt, führt das große Oberfläche zu Volumen Verhältnis zu einer raschen Abnahme des Sauerstoffgehaltes in der Probe.

Um Schwankungen im Sauerstoffgehalt zu vermeiden, wird nach der Befestigung der in Abbildung 3.4a dargestellten Probenkammer mindestens für 15 min Gas über die Probe geströmt, um das System in einen Gleichgewichtszustand zu bringen und mögliche undichte Stellen zu schließen. Des Weiteren wird während der Messung regelmäßig der Gasfluss bzw. -druck am Druckminderer geprüft und gegebenenfalls nachgestellt.

3.1.2 Datenerfassung und Datenverarbeitung

Ein großer Teil, der in dieser Arbeit präsentierten Messungen ist an einem Aufbau mit einem ADwin Datenerfassungssystem (ADwin Light 16, Jäger Computergesteuerte Messtechnik) und einer TCSPC-Messkarte (TimeHarp200, Picoquant) entstanden [154]. Dabei wird die Kanalnummer des Detektors (4096 Kanäle) und die Zeitspanne zwischen dem Beginn der Messung und der Detektion eines Photons mit einer globalen Zeitauflösung von 120 ns bis 4500 ns (Mikrozeit für TCSPC-Messungen < 35 ps) im Time-Tagged Time-Resolved (TTTR)-Modus gespeichert. Allerdings führt die Totzeit von 350 ns dazu, dass die Korrelationskurven nicht über diesen Bereich hinweg ausgewertet werden können.

Die in Abbildung 3.5 dargestellte und im Rahmen der Arbeit entwickelte LabVIEW-Bedienoberfläche steuert ereignisgetrieben alle Komponenten des Mikroskops. Hier werden die

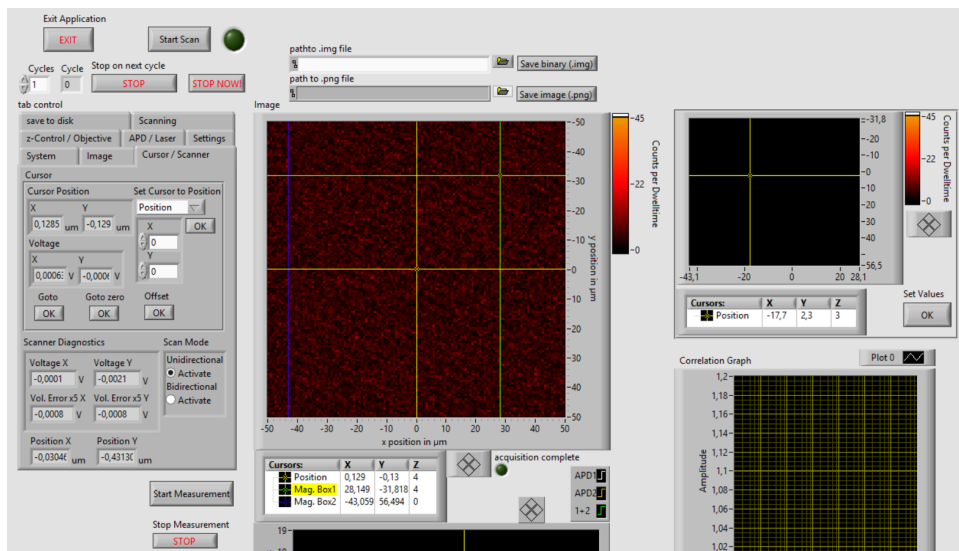


Abbildung 3.5: LabVIEW-Bedienoberfläche des konfokalen Einzelmolekülmikroskops Links sind Felder zur Auswahl verschiedener Einstellungen des Galvanometers, der Detektoren, der Laser, sowie anderer Bauteile und zur Anzeige aktueller Daten (wie Position, Spannung, geladene Treiber usw.) zu sehen. In der Mitte ist die Bildanzeige mit einer optionalen vergrößerten Ansicht eines gewählten Ausschnittes (rechts) positioniert. Rechts unten ist eine Korrelationsanzeige zur Kontrolle der Korrelation während einer Messung zu sehen.

Daten mittels einer selbst geschriebene Routine (siehe Anhang D.3) durch ein TDC-Modul³ (SensL HRM-TDC) ausgelesen. Die Auflösung der Mikrozeit beträgt 27 ps, die der Makrozeit 5 ns, bei einer Totzeit von 190 ns je Kanal. Das TDC-Modul unterstützt vier Kanäle (je ein Start- und Stop-Eingang, LVTTL⁴) und einen programmierbaren Takt-Ausgang (LVTTL, 50 Ω).

3.1.3 Niedrige Temperaturen und TIRF-Mikroskopie

Vorbereitungen zu Kryostatmessungen bei niedrigen Temperaturen (Flüssigstickstoff, etwa 77 K) wurden mit Duda [149] im Rahmen ihrer Masterarbeit, aufbauend auf der Arbeit von Hirschfeld [155] durchgeführt. Zusätzlich wurde ein System für die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) mit zwei Farbkanälen realisiert. Der schematische Aufbau für Kryostatmessungen ist in Abbildung 3.6a dargestellt und zeigt die Befestigung des Kryostaten am Mikroskop. Der grundlegende Aufbau entspricht dem Schema in Abbildung 3.2, wobei hier explizit die Laserlinien bei 488 nm und 640 nm und die Auftrennung in zwei Detektorkanäle dargestellt sind. Das obere Kryostatgefäß wird evakuiert, um die Häufigkeit des Nachfüllens von flüssigem Stickstoff zu reduzieren und Reifbildung am Deckglas zu verhindern. Um die auf die Objektivhalterung wirkende Kraft auszugleichen und die Fokussierung entlang der Strahlrichtung zu stabilisieren, wird auf der dem Objektiv gegenüberliegenden Seite ebenfalls ein Vakuum angelegt.

Die Präparation der Proben für Tieftemperaturmessungen ist in Abbildung 3.6b dargestellt. Dabei wird ein hohler Aluminiumzylinder auf eine Antriebswelle aufgesetzt. Der Zylinder ist so geformt, dass der untere Teil in ein die Antriebswelle umgebendes Stickstoffbad eintauchen kann. Auf der Oberseite des Zylinders befindet sich eine Vertiefung für quadratische Deckgläser, die konzentrische Vertiefungen/Ringe zur Abdichtung besitzt. Nachdem das Deckglas mit Zylinder auf der Antriebswelle angebracht ist, wird es mit etwa 9000 Umdrehungen pro Minute in Rotation versetzt. Auf das rotierende, kalte Deckglas wird nun ein Tropfen mit wenigen μl Probenlösung pipettiert. Dieser breitet sich nach dem Auftreffen auf dem Glas aus und gefriert. Aufgrund der wirkenden Radialbeschleunigung wird der überschüssige, nicht angefrorene Teil des Tropfens zu den Seiten des Aufbaus geschleudert. Abhängig von der Temperatur der Glasoberfläche, Winkelgeschwindigkeit der Rotation und Pippetierung bzw. Tropfengröße⁵ kann so eine dünne, amorph gefrorene Schicht auf dem Glas erzeugt werden. Anschließend kann das stickstoffgefüllte Gefäß mitsamt des Zylinders und Deckglases von der Welle gehoben und in den am Mikroskop angebrachten Kryostaten überführt werden. Detaillierte Erklärungen, Beispiele und Messungen hierzu sind bei Duda [149] und Hirschfeld [155] zu finden.

³ TDC – Time-to-Digital-Converter. Elektronische Baugruppen, die kurze Zeitintervalle messen und in eine digitale Ausgabe umwandeln.

⁴ LVTTL – Low-Voltage-TTL. Transistor-Transistor-Logik (TTL) mit einer reduzierten Versorgungsspannung von 3,3 V.

⁵ Wobei auch die Kräfte innerhalb der Probenlösung und die Beschaffenheit der Glasoberfläche eine Rolle spielen.

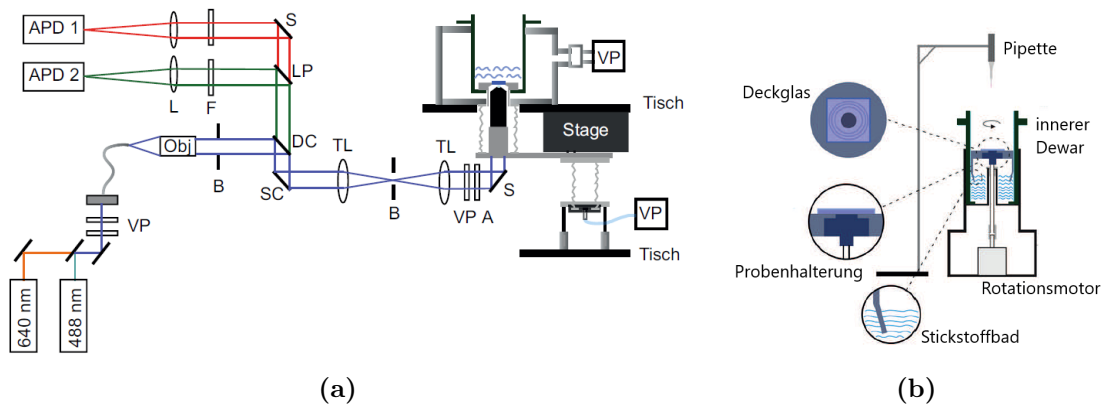


Abbildung 3.6: Schematischer Kryostat-Mikroskop-Aufbau und Einfrierprozess

(a) Der prinzipielle Aufbau entspricht dem in Abschnitt 3.1 vorgestellten Mikroskop. Hier wird zusätzlich ein Kryostat auf den invertierten Objektiv Aufbau aufgesetzt. Die Kraft, die durch das Evakuieren des Isolierbehälters auf die Stage wirkt, wird durch ein entgegengesetztes Vakuum ausgeglichen. (b) Optimierter Aufbau des Einfriervorgangs für die Präparation amorpher Einzelmolekülproben mittels Rotationsbeschichtung. Eine genauere Beschreibung ist im Text zu finden. Abbildungen entnommen und verändert aus [149].

Die TIRFM, die die Betrachtung von großen Probenbereichen mit gleichzeitiger Unterdrückung ungewollter Hintergrundfluoreszenz ermöglicht, eignet sich vor allem zur Beobachtung deckglasnaher Prozesse. Zuerst im Jahr 1956 von Ambrose [156] als grundlegendes Konzept zur Beleuchtung publiziert und 1981 zur Betrachtung von Zell-Substrat- und Membraninteraktionen [157] weiterentwickelt, wurden bereits 1995 einzelne Myosinmoleküle mit der TIRFM dargestellt [158]. Das Prinzip der TIRFM besteht in der Beleuchtung oberflächennaher Fluoreszenzfarbstoffe durch ein evaneszentes Wellenfeld, welches durch die totale Reflexion eines Laserstrahls an der Grenzschicht vom Glas zum Probenlösungsmittel resultiert. Dabei verläuft die Energiestromdichte der transversalelektromagnetischen Welle (vergleiche Gleichung (2.23)) am Ort der Reflexion⁶ entlang des Glases, sodass in Abhängigkeit der Brechungsindizes, der Lichtwellenlänge und des Reflexionswinkels eine Tiefe von etwa der Größenordnung der Wellenlänge des Lichtes oder geringer (also etwa 30 nm bis 300 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Die Feldstärke im beleuchteten Medium fällt exponentiell ab, was zu einer geringen Hintergrundanregung führt.

Zur Betrachtung der in dieser Arbeit vorgestellten immobilisierten Farbstoffe und für die Durchführung von FRET-Experimenten in anderen Projekten, wurde ein Aufbau für TIRFM in ein bestehendes Konfokalmikroskop integriert, sodass zwischen konfokaler Punktdetektion für Lösungsmittelmessungen und kamerabasierter (hier: EMCCD, C9100-02, Hamamatsu Photonics) TIRFM in wenigen Schritten gewechselt werden kann. Eine genaue Beschreibung des Aufbaus ist bei Duda [149] und Heinrich [159] zu finden.

⁶ Für eine genauere Beschreibung der Reflexion muss die Polarisation und somit der Imbert-Fedorov- und Goos-Hänchen-Effekt betrachtet werden.

3.2 Proben

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 ausgeführt, sind organische Farbstoffe Verbindungen, bei denen sich die Konjugation des planaren oder zyklischen π -Elektronensystems über mehrere Bindungen erstreckt. Bis auf wenige Ausnahmen können organische Farbstoffe in Aromate, die nach dem Hückel-Molekülorbital-Modell mindestens ein stabiles zyklisch-konjugiertes Ringsystem beinhalten, Polyene, die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen enthalten, und Polymethine eingeteilt werden. Dabei sind Polymethine Polyene, die funktionelle Endgruppen aus Heteroatomen besitzen und freie Elektronenpaare (Donorgruppen wie R_1-NR_2 , positiver M-Effekt) oder Doppelbindungen (Akzeptorgruppen wie $R_1=NR_2$, negativer M-Effekt) enthalten. Polymethine mit stickstoffhaltigen Endgruppen bilden die Gruppe der Cyanine.

Eine Erweiterung der konjugierten Systeme führt zumeist zu einer bathochromen Verschiebung des Spektrums, sowie bei Cyaninen pro zusätzlicher Doppelbindung zu einer Erhöhung der maximalen Absorptionswellenlänge um etwa 100 nm [161, 162]. Daher werden die Cyanine anhand der Anzahl der Methineinheiten ($-C=$) klassifiziert. In Tabelle 3.1 sind

Tabelle 3.1: Parameter der verwendeten Fluorophore

Die vom Hersteller gegebenen Extinktionskoeffizienten (siehe Text) sind anhand der Spektren gemäß der Abbildungen 3.8b, 3.8d, 3.9b, 3.9c, 3.10b und 3.10d und der jeweiligen Anregungswellenlänge korrigiert und mit den zugehörigen Absorptionseffizienzfaktoren und vom Hersteller gegebenen Quanteneffizienzen aufgetragen. Die Fluoreszenzlebensdauern sind sofern nicht anders angegeben am FluoroHub (Horiba Jobin Yvon GmbH) in PBS gemessen. Die Lebensdauer-Messungen sind in Abbildung C.6 (Seite XXVI) dargestellt.

Fluorophor	Quanteneffizienz Q	Extinktionskoeffizient ε in $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$	Abs.-Wirkungsquerschnitt σ in 10^{-20}m^2
AF-488	0,92	67 680 bei 488 nm	2,59
CF-488A	—	69 300 bei 488 nm	2,65
PF-488P	0,896	71 540 bei 488 nm	2,74
sCy3	0,10	84 340 bei 532 nm	3,22
AF-647	0,33	223 540 bei 640 nm	8,55
sCy5	0,28	255 870 bei 640 nm	9,78

	Fluoreszenzlebensdauer		rel. Amplitude	
	τ_1 in ns	τ_2 in ns	a_1	a_2
AF-488	$2,221 \pm 0,068$	$4,166 \pm 0,005$	10,80	89,20
CF-488A	$2,104 \pm 0,014$	$4,136 \pm 0,003$	7,01	92,99
PF-488P	$2,136 \pm 0,008$	$4,346 \pm 0,003$	13,65	86,35
sCy3 ^a	$0,17 \pm 0,01$	—	—	—
AF-647	$0,587 \pm 0,027$	$1,050 \pm 0,001$	4,85	95,15
sCy5 ^a	$0,36 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,01$ ^b	—

^a In H_2O mit 50 mM K^+ , 10 mM Mg^{2+} , pH 7,5 bei 25 °C nach Steffen, Sigel und Börner [160].

^b Amplitudenverhältnis der Lebenszeiten.



Abbildung 3.7: Maleimid- und NHS-Ester-Funktionalisierung

(a) Maleimide sind Imide der Maleinsäure, die am Stickstoffatom mit einer Alkylgruppe oder Arylgruppe substituiert sind. Sie weisen eine hohe Affinität für Thiole auf und eignen sich daher z. B. für die Markierung von Cysteinresten an Proteinen und Peptiden. Die meisten Maleimide zeigen eine geringe Wasserlöslichkeit, weshalb häufig organischen Hilfslösungsmittels, wie beispielsweise DMSO oder DMF, eingesetzt werden. (b) NHS-Ester sind die am weitesten verbreitete Art von aktivierten Estern und dienen unter anderem als aminreaktive Fluoreszenzlabel. Allerdings ist die Reaktion mit Aminen stark pH-abhängig. Bei einem niedrigen pH-Wert ist die Aminogruppe protoniert, wodurch keine Modifizierung stattfinden kann. Bei zu hohen pH-Werten kann es zur Hydrolyse des NHS-Ester kommen. Üblicher Weise liegt der optimale pH-Bereich zwischen 8,3 und 8,5.

die für die in der Arbeit verwendeten Laserlinien bestimmten Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe, sowie die molekularen Absorptionsquerschnitte, Quanteneffizienzen und Fluoreszenzlebensdauern aufgetragen. Die im Rahmen der Arbeit mithilfe des FluoroHub (Horiba Jobin Yvon GmbH) bestimmten und in der Literatur vorhandenen farbstoffspezifischen Werte sind in den folgenden Unterkapiteln aufgeführt.

Das Markieren von Biomolekülen mit Fluoreszenzfarbstoffen kann zum Beispiel durch die Reaktionen der nukleophilen Gruppen der Moleküle mit Isothiocyanaten oder Succinimidylestern geschehen. In Abbildung 3.7 sind die Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten, weitverbreiteten Funktionalisierungen mit einem Maleimid oder einem N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester), die für die thiol- ($-\text{SH}$) bzw. aminreaktive ($-\text{NH}_2$) Markierung von Molekülen genutzt werden können, dargestellt.

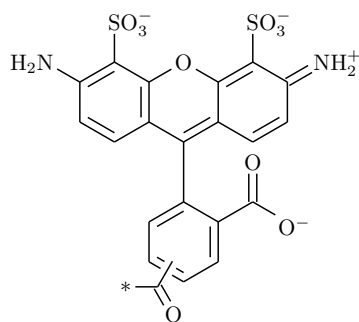
3.2.1 Alexa Fluor[®] 488 und Alexa Fluor[®] 647

Alexa Fluor[®] bezeichnet eine Familie an Farbstoffen des Konzerns Thermo Fisher Scientific⁷, die aus unterschiedlichen Farbstoffgruppen synthetisiert werden. Alexa Fluor[®] 488 (AF-488) basiert chemisch auf Fluorescein, das zur Gruppe der Xanthenfarbstoffe und somit der Aromate gehört und mit Maleimidfunktionalisierung die Summenformel

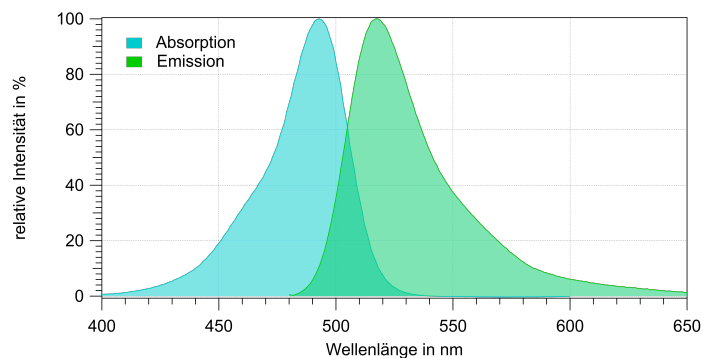


besitzt. In Abbildung 3.8a ist die Struktur von AF-488 dargestellt. Das Absorptions- und

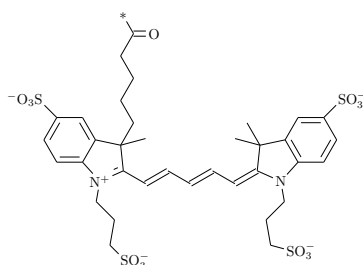
⁷ Die Alexa Fluor[®] Farbstofffamilie wurde ursprünglich vom Unternehmen Molecular Probes entwickelt, welches 2003 von Invitrogen gekauft wurde. Obwohl Invitrogen 2008 mit Applied Biosystems zu Life Technologies fusionierte und 2014 von Thermo Fisher Scientific übernommen wurde, wird die Alexa Fluor[®] Farbstofffamilie unter der unregistrierten Warenmarke Invitrogen weitergeführt.



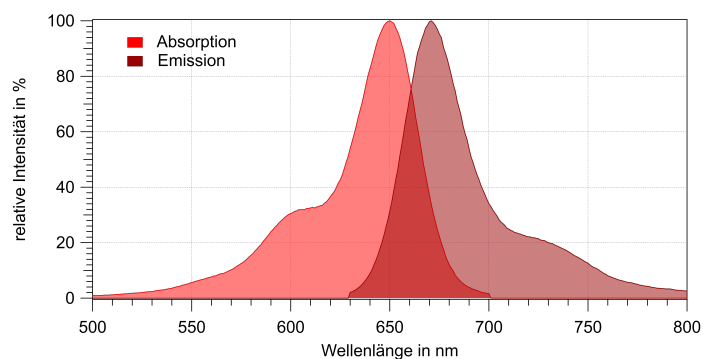
(a) Strukturformel AF-488



(b) Spektrum AF-488



(c) Strukturformel AF-647



(d) Spektrum AF-647

Abbildung 3.8: Strukturformeln und Spektren der Alexa-Farbstoffe

(a) Struktur von AF-488 mit dem aromatischen Ringsystem, das zur Fluoreszenzfähigkeit führt. (b) Das Absorptionsspektrum besitzt ein Maximum bei 493 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 516 nm. Die Rotverschiebung des Emissions- zum Absorptionsmaximum beträgt somit 23 nm. (c) Die Struktur von AF-647 zeigt die Methinkette mit stickstoffhaltigen Endgruppen, wie sie für Cyanine typisch ist. Die Kette besteht aus fünf Kohlenstoffen und ist somit dem Cy5® (siehe Abbildung 3.10c) ähnlich. (d) Das Absorptionsspektrum liegt im roten Bereich und besitzt ein Maximum bei 651 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 671 nm. Die Rotverschiebung des Emissions- zum Absorptionsmaximum beträgt 20 nm.

Emissionsspektrum von in Wasser gelöstem AF-488 ist in Abbildung 3.8b zu sehen. Die gemessene Fluoreszenzlebensdauer des Maleimid-Derivats beträgt in phosphatgepufferter Salzlösung PBS ($4,166 \pm 0,005$) ns, und die Quantenausbeute liegt laut Hersteller bei $Q = 0,92$. Der Extinktionskoeffizient beträgt $72\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, wobei das Absorptionsmaximum bei 493 nm liegt und das Emissionsmaximum eine Wellenlänge von 516 nm hat.

Das in dieser Arbeit verwendete AF-488 ist für die Reaktion mit Thiolen mit einer Maleimid-Gruppe versehen und hat ein Molekulargewicht von $720,66\text{ g mol}^{-1}$. Die übliche Anregungslinie liegt bei 488 nm, womit es sich als Alternative für zum Beispiel Fluorescein, Fluoresceinisothiocyanat (FITC), DyLight™ 488 (Dy-488) oder Cy2® eignet.

Alexa Fluor® 647 (AF-647) ist ein Cyanin-Derivat, das somit zur Gruppe der Polymethin-Farbstoffe gehört. Die Atome der Methingruppenkette bilden das konjugierte Bindungssystem und bestimmen maßgeblich die Lage des Absorptionsmaximums. In Abbildung 3.8c ist

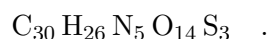
die Struktur von AF-647 dargestellt, deren Aufbau der mesomeren Struktur



folgt. Dabei bildet der Stickstoff mit der Methinkette einen Teil des heterozyklischen Systems. Der Extinktionskoeffizient des Maleimid-Derivats liegt bei $265\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, wobei das Absorptionsmaximum 651 nm beträgt und mit dem Emissionsmaximum von 671 nm im Spektrum in Abbildung 3.8d dargestellt ist. Die übliche Anregungslinien liegen bei 594 nm und 633 nm , womit es sich mit seiner Quantenausbeute von $Q = 0,33$ als Ersatz für zum Beispiel Cy5[®] und DyLight[™] 650 (Dy-650) eignet. Die Fluoreszenzlebensdauer beträgt $(1,050 \pm 0,001)\text{ ns}$.

3.2.2 PromoFluor 488 Premium und CF[®]488A

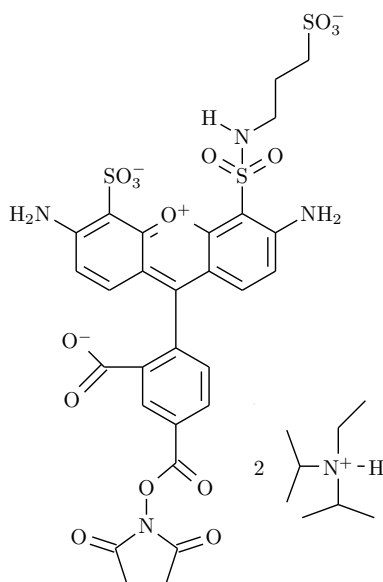
PromoFluor 488 Premium (PF-488P) ist ein Farbstoff der Firma PromoCell. Er ist, wie an der Struktur in Abbildung 3.9a zu sehen, ein Xanthenderivat und kann aufgrund seiner spektralen Ähnlichkeit als Substitut für AF-488 eingesetzt werden. Die Fluoreszenzlebensdauer beträgt $(4,346 \pm 0,003)\text{ ns}$ und die Summenformel lautet:



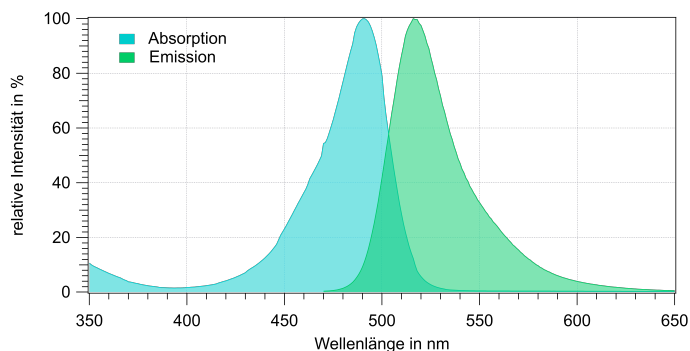
Das Molekulargewicht des maleimidmodifizierten Farbstoffs beträgt $799,74\text{ g mol}^{-1}$ bei einem Extinktionskoeffizienten von $73\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Die in Abbildung 3.9b dargestellten Spektren in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) zeigen ein Absorptionsmaximum bei 490 nm . Das Emissionsmaximum liegt bei 516 nm und weist somit eine Rotverschiebung von 26 nm auf. Die Löslichkeit in Wasser oder Methanol beträgt bis zu 10 mg ml^{-1} , wobei die Quanteneffizienz in PBS bei $0,896$ liegt.

CF[®]488A (CF-488A)⁸ ist ein grüner Fluoreszenzfarbstoff für die 488 nm Laserlinie. Der Hersteller wirbt mit einer Helligkeit, die mindestens der des AF-488 entsprechen soll. Gleichzeitig weicht die Gesamtladung des CF-488A mit -3 vom AF-488 mit einer Ladung von $-3,94$ bei einem pH von $7,4$ ab [163]. Das Spektrum ist in Abbildung 3.9c dargestellt und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 490 nm und ein Emissionsmaximum bei 515 nm . Der Extinktionskoeffizient beträgt $70\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bei einem Molekulargewicht von etwa 1036 g mol^{-1} und einer Fluoreszenzlebensdauer von $(4,136 \pm 0,003)\text{ ns}$. Die Struktur von CF-488A wird vom Hersteller nicht freigegeben, weshalb diese in Abbildung 3.9 nicht zu finden ist.

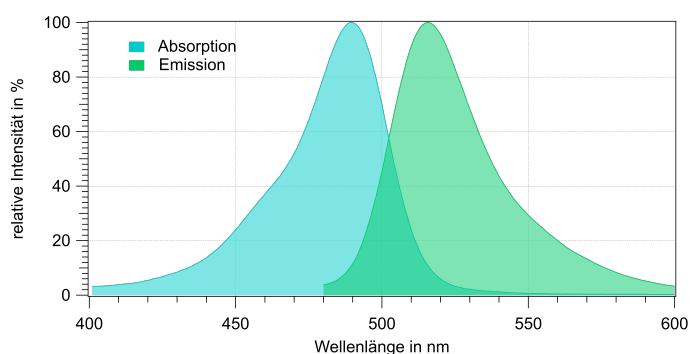
⁸ Im ursprünglichen Patent sind alle Farbstoffe der CF[®]-Familie cyaninbasiert (CF – *cyanine-based fluorescent dyes*). Allerdings sind seitdem auch Farbstoffe die nicht cyaninbasiert sind in die Familie der CF[®]-Farbstoffe aufgenommen worden, weshalb die ursprüngliche Bezeichnung irreführend ist und nur noch in ihrer Kurzform genutzt wird.



(a) Strukturformel PF-488P



(b) Spektrum PF-488P



(c) Spektrum CF-488A

Abbildung 3.9: Strukturformel und Spektren der PF- und CF-Farbstoffe

(a) PF-488P zeigt eine aromatische Ringstruktur ähnlich zum AF-488 und ist hier als NHS-Ester-Derivat dargestellt. (b) Das Absorptionsspektrum liegt im cyanen Bereich und besitzt ein Maximum bei 490 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 516 nm. Die Rotverschiebung des Emissions- zum Absorptionsmaximum beträgt 26 nm. (c) Das Absorptionsspektrum von CF-488A liegt im cyanen Bereich und besitzt ein Maximum bei 490 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 515 nm. Die Rotverschiebung des Emissions- zum Absorptionsmaximum beträgt 25 nm.

3.2.3 Sulfo-Cyanin 3 und Sulfo-Cyanin 5

Die Cy[®]-Farbstoffe der Firma GE Healthcare Bio-Sciences Ltd. gehören zu der Gruppe der Cyanine. Wie die Namen Cy3[®] und Cy5[®] bereits vermuten lassen, wird beim Blick auf die Strukturen in Abbildung 3.10a und Abbildung 3.10c deutlich, dass es sich bei den Farbstoffen um ein Trimethincyanin (drei Methineinheiten) bzw. ein Pentamethincyanin (fünf Methineinheiten) handelt. Cyanine zeichnen sich häufig durch relativ schmale Absorptionsbanden und einen hohen molekularen Extinktionskoeffizienten aus, wobei die Quanteneffizienz von der Anzahl der Methineinheiten und dem Lösungsmittel (insbesondere auch dessen Viskosität) abhängt [164, 165]. Die in dieser Arbeit verwendeten Cyaninfarbstoffe sind zwecks einer besseren Wasserlöslichkeit ohne Hilfslösungsmittel sulfoniert und mit einer NHS-Ester-Gruppe funktionalisiert, welche nach längerer Lagerung in wässriger Lösung keine Reaktivität mehr aufweisen sollte.

Die Struktur des in der Arbeit verwendeten Sulfo-Cyanin 3 (sCy3) ist in Abbildung 3.10e dargestellt. Es hat ein Molekulargewicht von 735,80 g mol⁻¹ und ist ein Analogon zum

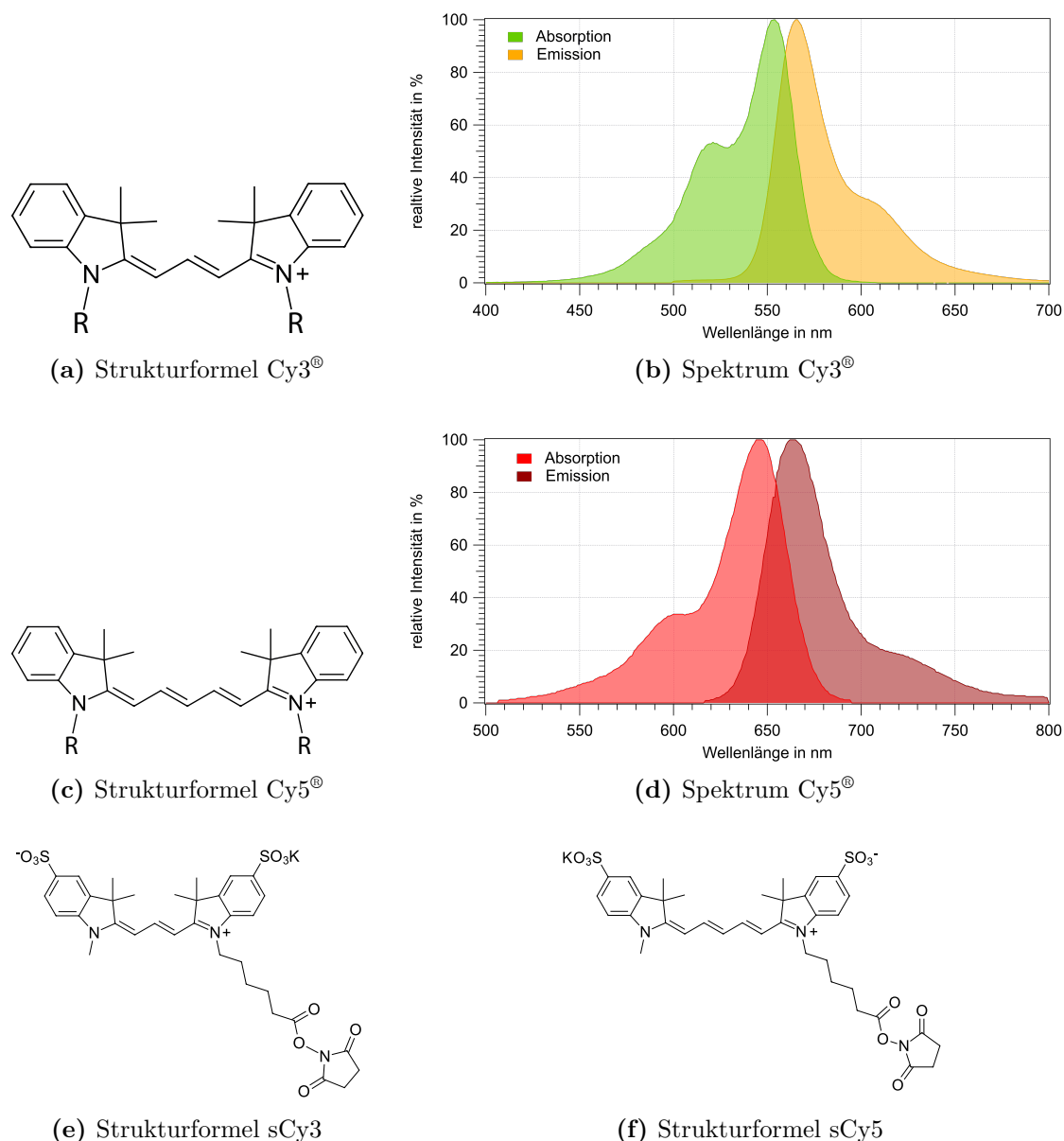
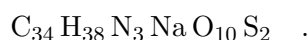


Abbildung 3.10: Strukturformeln und Spektren der Cyaninfarbstoffe

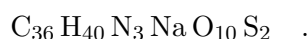
(a) Die Struktur von Cy3 mit drei Methineinheiten ohne Sulfogruppe. (b) Das Absorptionsspektrum von Cy3 liegt im grünen Bereich und besitzt ein Maximum bei 555 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 565 nm. Die Rotverschiebung des Emissions- zum Absorptionsmaximum beträgt 10 nm. (c) Struktur von Cy5 mit fünf Methineinheiten ohne Sulfogruppe. (d) Das Absorptionsspektrum von Cy5 liegt im roten Bereich und besitzt ein Maximum bei 649 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 665 nm. Die Rotverschiebung des Emissions- zum Absorptionsmaximum beträgt 16 nm. (e) Struktur von sCy3. (f) Struktur von sCy5.

Cy3[®] NHS-Ester, wobei der Extinktionskoeffizienten $162\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bei 548 nm beträgt. Das Emissionsmaximum liegt bei 563 nm und die Quanteneffizienz ist mit $Q = 0,1$ relativ niedrig. Die Fluoreszenzlebensdauer beträgt $(0,17 \pm 0,01)\text{ ns}$. Die üblichen Anregungslaserwellenlängen liegen bei 488 nm und 532 nm, womit es sich als Alternative für zum Beispiel Alexa Fluor[®] 546 (AF-546), Alexa Fluor[®] 555 (AF-555), Tetramethylrhodamine (TRITC)

und DyLight™ 550 (Dy-550) eignet. Die Summenformel lautet:



Das um zwei Methineinheiten größere sCy5 ist ein Analogon zum Cy5® NHS-Ester und hat bei 646 nm einen Extinktionskoeffizienten von $271\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Quanteneffizienz beträgt $Q = 0,28$ bei einer Fluoreszenzlebensdauer von $(0,86 \pm 0,03) \text{ ns}$ und einem Emissionsmaximum bei 662 nm. Das Molekulargewicht des in Abbildung 3.10f dargestellten Farbstoffes beträgt etwa $777,95 \text{ g mol}^{-1}$ und die üblichen Anregungslaserwellenlängen liegen bei 633 nm und 647 nm, womit es sich als Ersatz für zum Beispiel AF-647 und Dy-650 eignet. Die Summenformel lautet:



3.2.4 Photoprotektive Additive

Die Erhöhung der Photostabilität eines Fluoreszenzmarkers, kombiniert mit einem hohen Photonenfluss, ist in vielen Anwendungen wünschenswert. Ein typischer Ansatz ist die Zugabe von Additiven, die als Löscher unerwünschter photophysikalischer Prozesse fungieren. Dabei können diese protektiven Gruppen entweder kovalent an den Fluorophor gebunden in das zu untersuchende System eingebracht werden, obgleich hier auf unerwünschte Singulett-Löschung geachtet werden muss [166, 167]. Oder sie werden dem Lösungsmittel zugegeben, womit aufgrund der konzentrationsabhängigen mittleren Entfernung der Stoffe Elektronentransferübergänge unwahrscheinlicher werden, aber alle in der Lösung vorhandenen Farbstoffe betroffen sind bzw. die zu untersuchende Umgebung bezüglich des Additiv-Einflusses verändert sein kann. Dabei gibt es viele Untersuchungen der Wirkung unterschiedlicher Additive auf das Leucht- und Blinkverhalten von Fluorophoren in Einzelmolekülexperimenten [41, 42, 116].

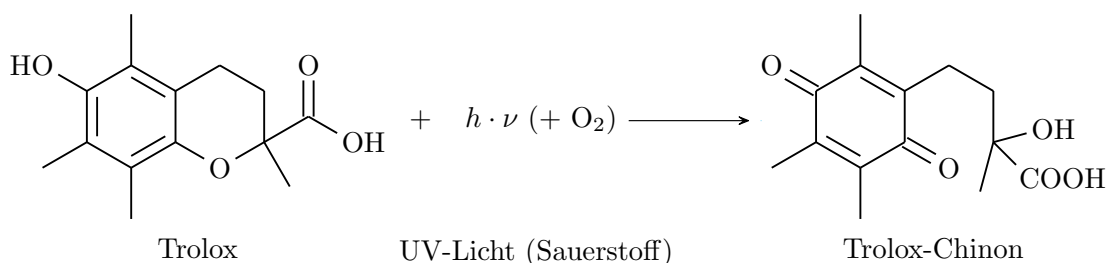
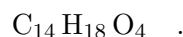


Abbildung 3.11: Umwandlung von Trolox zu Trolox-Chinon

Die Oxidation mittels ultravioletten Lichtes (und Sauerstoff), führt zu einer Umwandlung von Trolox zu Trolox-Chinon [168]. Die Umwandlung kann durch gezielte Photooxidation über einige Minuten, oder durch die Wechselwirkung mit Umgebungslicht und molekularem Sauerstoff in der Lösung über mehrere Stunden stattfinden.

Das in dieser Arbeit verwendete Vitamin E-Derivat 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox) wurde zusammen mit einem enzymatischen Sauerstofffänger-System [152] erstmals von Rasnik, McKinney und Ha [41] als effektives Additiv zur Verringerung der Blinkrate und Erhöhung der Photostabilität des Fluorophors Cy5 beschrieben. Trolox ist wasserlöslich und ein starkes Antioxidans mit einem Molekulargewicht von $250,29 \text{ g mol}^{-1}$ und der Summenformel:

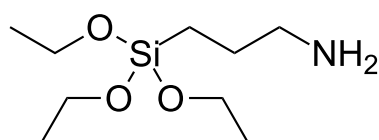


Es führt durch einen Elektronenaustauschmechanismus (siehe Abschnitt 2.2.4.1) zu einer Reduktion und somit effektiven Löschung von Triplettzuständen [41, 169, 170]. Die (Photo-) Oxidation von Trolox kann, wie in Abbildung 3.11 dargestellt ist, unter anderem abhängig von der Polarität des Lösungsmittels zur Formung eines Trolox-Chinons führen [41, 43, 168, 171–173].

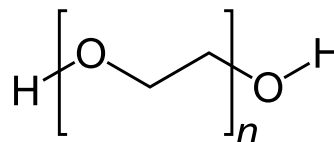
Gemäß Abbildung 2.9 führt dies zu einer Oxidation reduzierter Zustände des Farbstoffes ($k_{\text{R} \rightarrow \text{S}_0}$), die zum Beispiel durch vorhergehende Elektronentransferreaktionen aus dem Triplett ($k_{\text{T}}^{\text{red}}$), oder Photoionisation entstanden sein können. Dabei spielt der in Abschnitt 2.2.4.2 besprochene molekulare Sauerstoff eine wichtige Rolle. Er kann zu einer Löschung der Triplettzustände führen, dadurch aber auch in den hochreaktiven Singulettzustand $\text{O}_2 (^1\Delta_{\text{g}})$ übergehen und so zu irreversiblen Bleichreaktionen führen. Daher führt die Desoxygenierung der Lösung bei einer gleichzeitigen Zugabe einer Kombination aus reduzierendem und oxidierendem System (ROXS, wie z. B. Trolox und Trolox-Chinon) zu einem deutlich verminderten Blinken und Photobleichen der meisten organischen Farbstoffe [41, 43, 172, 174].

3.2.5 Immobilisierung von thiol-reaktiven Farbstoffen

Bei der Immobilisierung auf einem Deckglas (High Precision, $(170 \pm 5) \mu\text{m}$, Carl Roth) ist aufgrund des geringen Intensitätssignals der einzelnen Moleküle, das Hintergrundsignal des Glases aufgrund von Verunreinigungen oder die Autofluoreszenz der genutzten Puffer und



(a) Strukturformel von APTES



(b) Strukturformel von PEG

Abbildung 3.12: Strukturformeln von APTES und PEG

(a) APTES ist eine farblose Flüssigkeit mit aminartigem Geruch und wird zur Herstellung einer positiv geladenen, reaktiven Oberfläche der Deckgläser genutzt. (b) PEG ist ein Polymer mit variabler Kettenlänge und dient der Verbindung der NHS- und SH-Gruppen. Es wird zur Funktionalisierung des silanisierten Deckglases eingesetzt.

anderer eingesetzter Chemikalien von besonderer Bedeutung. Typische Wege die Deckgläser zu reinigen, sind entweder die Behandlung mit Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid oder die Reinigung durch Kaliumhydroxid und Ultraschall [175, 176]. In dieser Arbeit wurde aufbauend auf der Masterarbeit von Rönna [177] vorgegangen und eine alternative Reinigungsmethode durch mehrstündiges Brennen der Deckgläser (min. 3 h) bei hohen Temperaturen (450 °C bis 500 °C) genutzt [178].

Die Oberflächenaktivierung wurde durch eine Silanisierung mittels des in Abbildung 3.12a dargestellten (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) zur anschließenden Kopplung von NHS modifizierten Verbindungen durchgeführt und ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Da die Qualität der Silanschicht, aber auch der folgenden Passivierung der Oberfläche und Kopplung von Farbstoffen von vielen Parametern abhängt [179–184], wurde in Zusammenarbeit mit Rönna ein Protokoll anhand seiner Masterarbeit erarbeitet, das in Anhang D.2 (Seite XLII) detailliert nachzulesen ist.

Die Oberfläche wird mittels einer NHS-Polyethylenglycol (NHS-PEG) und NHS-PEG-SH Lösung in 50 mM 3-(N-Morpholino)propane sulfonsäure (MOPS) mit einem pH von 7,5 behandelt, mit hochreinem Wasser gespült und anschließend in einer Vakuumkammer getrocknet. Die Farbstoffkopplung erfolgt nach kurzer Inkubation mit 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) und Spülen mittels PBS (bzw. dem genutzten Farbstoffpuffer). Dazu wird die Farbstofflösung (50 pM bis 100 pM) für mindestens eine Stunde inkubiert und das Deckglas anschließend mit PBS gewaschen.

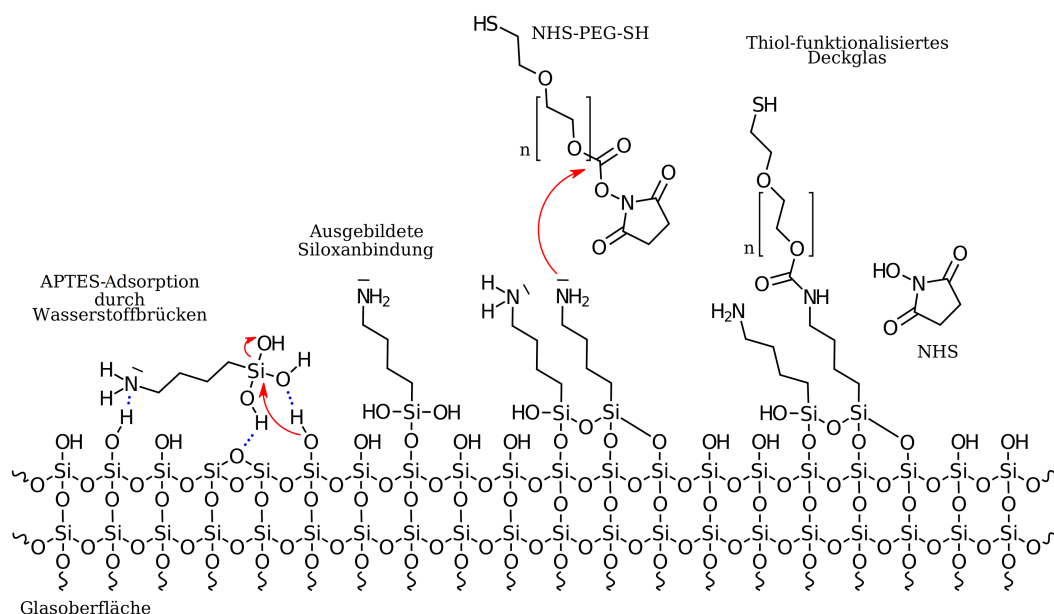


Abbildung 3.13: Immobilisierung von Farbstoffen am Deckglas

Die durch Wasserkontakt hydrolysierten APTES-Moleküle werden zuerst durch Wasserstoffbrückenbindungen am Glas gehalten und durch darauf folgende nukleophile Angriffe auf die Silanolgruppe über Siloxanbindungen gebunden. Das NHS-PEG-SH kann nun unter Abspaltung der NHS-Gruppe eine Amidbindung eingehen und somit das Deckglas mit Thiolgruppen funktionalisieren [177].

3.3 Monte-Carlo-Simulation

Die in Zusammenarbeit mit Zickmantel entwickelte Monte-Carlo-Simulation bildet Energieniveaudiagramme in der Form eines gerichteten Multigraphen ab. So kann zum Beispiel das in Abbildung 2.5 und Gleichung (2.36) dargestellte Drei-Niveau-System mit drei Knoten für die elektronischen Zustände (S_0 , S_1 , T_1) und fünf bzw. sechs (unter Einbezug der Phosphoreszenz) Kanten für die ratenbehafteten Übergänge eines Moleküls abgebildet werden. Die Schwingungsrelaxationen werden dabei in den Simulationen im Rahmen dieser Arbeit vernachlässigt und nicht simuliert. Da im Verlauf dieser Arbeit kein besonderer Fokus auf die Anisotropie und entsprechende Korrelationsanteile gelegt wird, wird die Rotation der Dipolemitter ebenso vernachlässigt. Ein anschließendes Traversieren des Graphen führt zu Einzelphotonensignalen des simulierten Moleküls.

Die Simulation besteht aus einzelnen Modulen, die entweder physikalische Probleme in Form einer Gleichung bearbeiten, oder informationstechnische Aufgaben (zum Beispiel das Speichern eines Fluoreszenzphotons) übernehmen. Die Simulation wird über das JavaScript Object Notation (JSON)-Datenformat angesprochen, was eine simple Kommunikation über eine Vielzahl von Wegen ermöglicht.

In Abbildung 3.14 ist exemplarisch die für LabVIEW entwickelte Benutzeroberfläche zu sehen, die über eine Transmission Control Protocol (TCP)-Verbindung mit dem Simulations-Server kommuniziert. Eine direkte Steuerung über die Kommandozeile oder Jupyter Notebooks kann ebenso stattfinden. Im Folgenden werden einige physikalische Zusammenhänge, die in der Simulation mit Hinblick auf die vorliegende Arbeit eine Rolle spielen, vorgestellt.

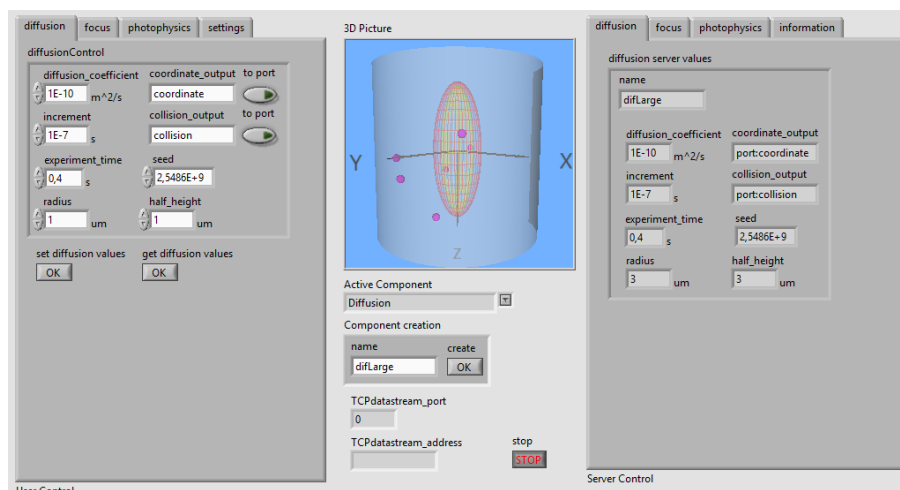


Abbildung 3.14: Bedienoberfläche des Simulators in LabVIEW

Das Programm kommuniziert über eine TCP-Verbindung mit dem Server. In der Mitte ist eine schematische Darstellung der gewählten Fokusparameter, des Simulationsvolumens und der Molekülzahl zu sehen. Links können neue Einstellungen vorgenommen und an den Server gesendet werden, wobei rechts die aktuellen Serverparameter angezeigt werden.

3.3.1 Diffusion

Nach dem zweiten Fick'schen Gesetz lässt sich die Selbstdiffusion eines Teilchens anhand seiner zeitlichen und räumlichen Wahrscheinlichkeitsverteilung P , die durch einen konstanten Diffusionskoeffizienten D verknüpft sind, als

$$\frac{\delta P}{\delta t} = D \vec{\nabla}^2 P \quad (3.2)$$

schreiben. Die Lösung von Gleichung (3.2) liefert unter der Randbedingung, dass sich das betrachtete Teilchen zum Zeitpunkt $t = 0$ am Ort r befindet, also

$$\lim_{r \rightarrow \infty} P(r, t) = 0 \quad , \quad (3.3a)$$

$$P(r, t = 0) = \delta(r) \quad (3.3b)$$

gilt, die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion zum Zeitpunkt t in der Form:

$$P(r, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{r^2}{2\sigma^2}\right) \quad , \quad (3.4)$$

mit $\sigma = \sqrt{2Dt}$. Die Diffusion folgt also einer Gaußschen Normalverteilung, sodass die mittlere quadratische Verschiebung in drei Raumdimensionen

$$\langle r^2 \rangle = \langle x^2 + y^2 + z^2 \rangle = 6Dt \quad (3.5)$$

beträgt. In der Simulation wird entsprechend die Verteilungsfunktion für die eingestellte Diffusionszeit ausgewertet und eine darauf basierende Positionsänderung in x , y und z bestimmt.

3.3.2 Anregungs- und Detektionsfunktionen

Die hier vorgestellten Funktionen können als Anregungs- oder Detektionsfunktion genutzt werden. Sie dienen zur Beschreibung einer Anregungs- oder Detektionskante und sind beispielhaft in Abbildung 3.15 dargestellt. Abhängig von vorgegebenen Parametern wie der Wellenlänge des betrachteten Lichtes oder Fokusparametern wie dem $1/e^2$ -Intensitätsabfall in axialer und lateraler Richtung wird für die Position des betrachteten Moleküls die Anregungsfunktion ausgewertet. Sie ergibt mithilfe des molekularen Absorptionswirkungsquerschnittes σ nach Gleichung (2.32) die Anregungsrate der entsprechenden Kante. Im Fall der Detektion kann die Funktion als normierte Wahrscheinlichkeitsfunktion ausgewertet werden und gibt so direkt die Wahrscheinlichkeit der Detektion eines Photons

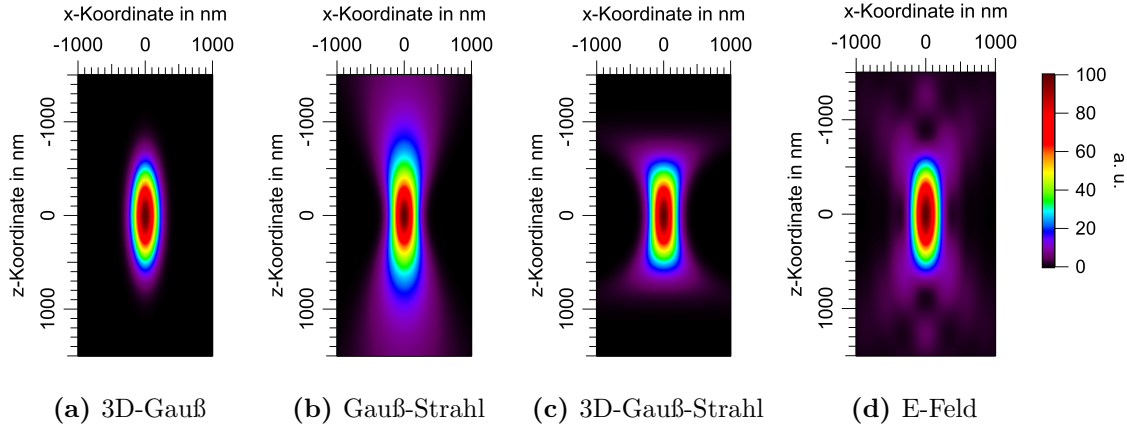


Abbildung 3.15: Vergleich der Anregungs- und Detektionsfunktionen

Die Intensität des elektrischen Feldes^a nach Gleichung (3.18) bei einer Fokussierung durch ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer NA von 1,2 ($\theta_{\max} \approx 64,5^\circ$) bei 488 nm ist in (d) dargestellt. Die Strahltaile beträgt $w_{xy} = 249$ nm und $w_z = 637$ nm. Das Einsetzen dieser Größen in die Gleichungen (3.6), (3.7) und (3.12) führt zu den Intensitätsverteilungen für den (a) 3D-Gauß f_G , (b) Gauß-Strahl f_{GS} und (c) 3D-Gauß-Strahl f_{GG} .

^a Betragsquadrat der Feldkomponenten $|E|^2 = E^* \cdot E$. Siehe auch Gleichung (2.27).

an einem bestimmten Ort an. Die Simulationskomponenten sind in der Form modular gehalten, sodass eine zusätzliche Funktion implementiert werden kann, oder eine beliebige Nach- und Vorbearbeitung der Daten möglich ist. So ist zum Beispiel das Speichern vorberechneter Anregungs- und Detektionsfunktionen möglich, sodass für Simulationen bei gleichen Anregungs- und Detektionsparametern die entsprechenden Funktionen nicht erneut berechnet werden müssen.

3.3.2.1 Gaußnäherung

Die einfachste, in Abbildung 3.15a dargestellte, Beschreibung des betrachteten Volumens ist durch ein einfaches dreidimensional gaußförmiges Volumen der Form

$$f_G(x, y, z) = \frac{2}{\pi w_x w_y} \cdot e^{-2\left(\frac{x^2}{w_x^2} + \frac{y^2}{w_y^2} + \frac{z^2}{w_z^2}\right)} \quad (3.6)$$

gegeben. Wie bereits in Abschnitt 2.4 erwähnt, basiert die grundlegende Diffusionsanalyse auf einer Moleküldetektionsfunktion, die einem dreidimensionalen Gauß entspricht. Im realen Experiment kann die tatsächliche Form allerdings aufgrund photophysikalischer Zusammenhänge (zum Beispiel durch Sättigung) und optischer Aberrationen (zum Beispiel durch unterschiedliche Brechungsindizes oder Astigmatismus) abweichen [53].

Im allgemeinen ist die Beschreibung der Anregung mit einem parallelen Strahl, dessen Intensität gaußverteilt und achsensymmetrisch ist und bei dem die paraxiale Näherung⁹

⁹ Linearisierung der Tangens-Winkelbeziehung zur optischen Achse, woraus eine Einschränkung auf Systeme mit geringer Divergenz folgt.

gilt, durch die in Abbildung 3.15b dargestellte Funktion

$$f_{\text{GS}}(x, y, z) = \left(\frac{w_{xy}}{w(z)} \right)^2 e^{-2 \frac{x^2 + y^2}{w(z)^2}} \quad (3.7)$$

gegeben. Eine genauere Herleitung dieser Beziehung ist in Anhang A.2 (ab Seite V) zu finden. Das transversale Profil $w(z)$ ist mithilfe der Rayleighlänge $z_{\text{R}} = \pi w_{xy}^2 n / \lambda_{\text{ex}}$ als

$$w(z) = w_{xy} \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_{\text{R}}} \right)^2} \quad (3.8)$$

bestimmt. Zusätzlich kann der Einfluss einer sphärischen Blende mit dem Radius r_{ph} durch

$$R_{\text{ph}}(z) = 1 - e^{-2 \left(\frac{r_{\text{ph}}}{w_{\text{ph}}(z)} \right)^2} \quad (3.9)$$

betrachtet werden [185, 186]. Dabei gibt w_{ph} den Radius des Strahls an der Blendenposition, analog zu Gleichung (3.8), durch

$$w_{\text{ph}}(z) = w'_{xy} \sqrt{1 + \left(\frac{z'}{z'_{\text{R}}} \right)^2} \quad (3.10)$$

an. Die gestrichenen Variablen bezeichnen die bildseitigen Koordinaten¹⁰ und führen zu einer Amplitude von:

$$\frac{R_{\text{ph}}(z)}{w(z)^2} = \frac{1 - \exp \left(-2 \frac{r_{\text{ph}}^2}{w_{xy}'^2 + \left(\frac{\lambda_{\text{em}} z'}{\pi n w'_{xy}} \right)^2} \right)}{w_{xy}^2 + \left(\frac{\lambda_{\text{ex}} z}{\pi n w_{xy}} \right)^2} . \quad (3.11)$$

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der fokalen Volumina kann auch durch eine entlang der optischen Achse projizierte gaußförmige Amplitude geschehen. Dabei fällt die in Abbildung 3.15c dargestellte Funktion

$$f_{\text{GG}}(x, y, z) = \frac{2}{\pi w_{xy}^2} \cdot \exp \left\{ -2 \left(\left(\frac{z}{w_z} \right)^2 + (x^2 + y^2) \cdot \frac{\exp \left(-2 \left(\frac{z}{w_z} \right)^2 \right)}{w_{xy}^2} \right) \right\} \quad (3.12)$$

¹⁰ In Luft (Brechungsindex $n' = 1$) bezeichnet z'_{R} die Rayleighlänge mit dem bildseitigen Radius w'_{xy} und die axiale Koordinate z' lautet $nM^2 (L + L_u) z / (L + L_u - (nM^2 + M) z)$, mit der Tubuslänge $L + L_u$, dem Immersionsmedium n und der Vergrößerung M . Der bildseitige Radius w'_{xy} ist dabei durch $w_{xy} M (L + L_u) / (L + L_u - (nM^2 + M) z)$ gegeben.

in allen drei Raumrichtungen gaußförmig ab und ist auf einen konstanten Energiestrom in der x,y -Ebene normiert. Der $1/e^2$ -Abfall in x,y ist dabei durch w_{xy} und in z durch w_z gegeben.

3.3.2.2 Beschreibung durch elektrische Feldkomponenten

Zur Bestimmung des elektrischen Feldes im Fokus eines optischen Systems können die in Abschnitt 2.1.2 gemachten Beobachtung genutzt werden. Dabei soll hier darauf hingewiesen werden, dass die folgende Definition der Achsen und Richtungen in der Literatur unterschiedlich wiederzufinden ist. Zwar führt eine Änderung wie zum Beispiel die Drehung des Koordinatensystems um 90° im Bezug auf das qualitative Ergebnis keine Rolle. Doch die Bezugspunkte der verwendeten Begrifflichkeiten (wie parallel und orthogonal) und die Winkelfunktionen ändern sich. Für eine bessere Lesbarkeit der folgenden Gleichungen, und da in großen Teilen der betreffenden Literatur diese Konvention vorzufinden ist, wird anstelle eines Pfeils über dem Vektor $\vec{a}$ der Fettdruck $\mathbf{a}$ als Vektordarstellung gewählt.

Die unter Gleichung (2.28) zusammengefassten elektrischen Feldkomponenten können mithilfe der expliziten Angabe des Polarwinkelintegrals bei der Betrachtung des vollen Azimuts als

$$E(\mathbf{r}) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\theta_{\max}} d\theta \sin \theta \, \hat{\mathbf{e}}(\theta, \phi) E_0 \sqrt{\cos \theta} \exp \left(ik \begin{pmatrix} -\sin \theta \cos \phi \\ -\sin \theta \sin \phi \\ \cos \theta \end{pmatrix} \cdot \mathbf{r} \right) \quad (3.13)$$

geschrieben werden. Wobei $\theta_{\max}$ durch die numerische Apertur des Objektivs (siehe Gleichung (2.57)) gegeben ist und $\hat{\mathbf{e}}(\theta, \phi)$ den gesamten Polarisationsvektor in Abhängigkeit des Radial- und Azimutalwinkels in der Form

$$\hat{\mathbf{e}}(\theta, \phi) = \hat{\mathbf{e}}_{\parallel} (\hat{\mathbf{e}}_{\parallel} \cdot \hat{\mathbf{e}}_0) + \hat{\mathbf{e}}_{\perp} (\hat{\mathbf{e}}_{\perp} \cdot \hat{\mathbf{e}}_0) \quad (3.14)$$

beschreibt. Dabei gibt $\hat{\mathbf{e}}_0$ den Vektor der orthogonal zu z (optische Achse, vergleiche Abbildung 2.2) einfallenden Polarisation an. Die azimutalen und radialen Vektoren sind daher durch

$$\hat{\mathbf{e}}_{\parallel} = \begin{pmatrix} -\sin \phi \\ \cos \phi \\ 0 \end{pmatrix}, \quad \hat{\mathbf{e}}_{\perp} = \begin{pmatrix} \cos \phi \\ \sin \phi \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.15)$$

gegeben. Unter Betrachtung des Polarwinkels wird der Radialanteil $\hat{\mathbf{e}}_{\perp}$ (im Gegensatz zum Parallelanteil $\hat{\mathbf{e}}_{\parallel}$) in der Form

$$\hat{\mathbf{e}}_{\perp, \text{proj.}} = \begin{pmatrix} \cos \theta \cos \phi \\ \cos \theta \sin \phi \\ \sin \theta \end{pmatrix} \quad (3.16)$$

auf die Gesamtpolarisation projiziert. Das führt nach Gleichung (3.14) zu einem Polarisationsvektor $\hat{\mathbf{e}}(\theta, \phi)$, der aus den orthogonalen und parallelen Anteilen gemäß

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{e}}(\theta, \phi) &= \hat{\mathbf{e}}_{\parallel} (\hat{\mathbf{e}}_{\parallel} \cdot \hat{\mathbf{e}}_0) + \hat{\mathbf{e}}_{\perp, \text{proj.}} (\hat{\mathbf{e}}_{\perp} \cdot \hat{\mathbf{e}}_0) \\ &= \begin{pmatrix} -\sin \phi \\ \cos \phi \\ 0 \end{pmatrix} (-\sin(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \cos(\phi)\hat{\mathbf{y}}) + \begin{pmatrix} \cos \theta \cos \phi \\ \cos \theta \sin \phi \\ \sin \theta \end{pmatrix} (\cos(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \sin(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \end{aligned} \quad (3.17)$$

besteht. Einsetzen in Gleichung (3.13) führt zu:

$$\begin{aligned} E(\mathbf{r}) &= \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\theta_{\max}} d\theta \left\{ \begin{pmatrix} -\sin \phi (-\sin(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \cos(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \\ \cos \phi (-\sin(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \cos(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \\ 0 \end{pmatrix} \right. \\ &\quad \left. + \begin{pmatrix} \cos \theta \cos \phi (\cos(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \sin(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \\ \cos \theta \sin \phi (\cos(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \sin(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \\ \sin \theta (\cos(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \sin(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \end{pmatrix} \right\} \\ &\quad \cdot \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \cdot E_0 \cdot \exp \left(ik \begin{pmatrix} -\sin \theta \cos \phi \\ -\sin \theta \sin \phi \\ \cos \theta \end{pmatrix} \cdot \mathbf{r} \right) . \end{aligned} \quad (3.18)$$

Die Lösungen dieser Gleichung unter Betrachtung des gesamten Integrals ϕ sind bereits in Abschnitt 2.1.2 in den Gleichungen (2.28) und (2.29) gegeben.

An dieser Stelle soll unter Beibehaltung der Formulierung von Gleichung (3.18) eine zusätzliche Grenzfläche¹¹ an der Position $z = z_0$ betrachtet werden. Diese führt zu einer Brechung um einen Winkel ψ in der Form:

$$\psi = \arcsin \left(\frac{n_1}{n_2} \sin \theta \right) . \quad (3.19)$$

Mit den fresnelschen Formeln, die die Reflexion und Transmission einer ebenen Welle an einer Grenzfläche beschreiben, kann der Reflexions- und Transmissionsgrad polarisations-

¹¹ Bei unterschiedlichen Brechungsindizes ($n_2 \neq n_1$) der zu durchlaufenden Medien. Wie z.B. bei einem Deckglas aus Quarzglas $n_2 = 1,46$ und Wasser als Immersionsmedium $n_1 = 1,33$.

abhängig bestimmt werden. Für s- und p-polarisierte Wellen in Dielektrika verschwindet der komplexe Anteil des Brechungsindex, sodass die Transmissionsfaktoren

$$\begin{aligned} t_s = t_{\parallel} &= \frac{2n_1 \cos \theta}{n_1 \cos \theta + n_2 \cos \psi} \\ &= \frac{2 \sin \psi \cos \theta}{\sin (\theta + \psi)} \end{aligned} \quad (3.20)$$

und

$$\begin{aligned} t_p = t_{\perp} &= \frac{2n_1 \cos \theta}{n_2 \cos \theta + n_1 \cos \psi} \\ &= \frac{2 \sin \psi \cos \theta}{\sin (\theta + \psi) \cos (\theta - \psi)} \end{aligned} \quad (3.21)$$

lauten. Nun wird die Wellenzahl k und der Radialanteil $\hat{\mathbf{e}}_{\perp}$ in Abhängigkeit vom Brechungswinkel ψ geschrieben, sodass

$$k_{\psi} = k \frac{n_2}{n_1} \quad (3.22)$$

und

$$\hat{\mathbf{e}}_{\perp, \text{proj}, \psi} = \begin{pmatrix} \cos \psi \cos \phi \\ \cos \psi \sin \phi \\ \sin \psi \end{pmatrix} \quad (3.23)$$

gilt. Gleichung (3.18) kann nun um die Betrachtung einer Grenzfläche zu

$$\begin{aligned} E(\mathbf{r}) &= \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\theta_{\max}} d\theta \sin \theta \sqrt{\cos \theta} \left(\hat{\mathbf{e}}_{\parallel} t_{\parallel} (\hat{\mathbf{e}}_{\parallel} \cdot \hat{\mathbf{e}}_0) + \hat{\mathbf{e}}_{\perp, \text{proj}, \psi} t_{\perp} (\hat{\mathbf{e}}_{\perp} \cdot \hat{\mathbf{e}}_0) \right) \\ &\quad \cdot E_0 \exp \left(ik_{\psi} \begin{pmatrix} -\sin \psi \cos \phi \\ -\sin \psi \sin \phi \\ \cos \psi \end{pmatrix} \cdot \mathbf{r} - \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \cos \psi - \cos \theta \end{pmatrix} z_0 \right) , \end{aligned} \quad (3.24)$$

bzw. ausgeschrieben zu

$$\begin{aligned}
 E(\mathbf{r}) = & \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\theta_{\max}} d\theta \left(t_{\parallel} \begin{pmatrix} -\sin\phi (-\sin(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \cos(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \\ \cos\phi (-\sin(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \cos(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \\ 0 \end{pmatrix} \right. \\
 & \left. + t_{\perp} \begin{pmatrix} \cos\psi \cos\phi (\cos(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \sin(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \\ \cos\psi \sin\phi (\cos(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \sin(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \\ \sin\psi (\cos(\phi)\hat{\mathbf{x}} + \sin(\phi)\hat{\mathbf{y}}) \end{pmatrix} \right) \\
 & \cdot \sin\theta \sqrt{\cos\theta} E_0 \exp \left(ik_{\psi} \begin{pmatrix} -\sin\psi \cos\phi \\ -\sin\psi \sin\phi \\ \cos\psi \end{pmatrix} \cdot \mathbf{r} - ik_{\psi} \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \cos\psi - \cos\theta \end{pmatrix} z_0 \right)
 \end{aligned} \tag{3.25}$$

erweitert werden und ist in Abbildung 3.15d dargestellt. Da zur Auswertung der elektrischen Feldkomponenten gemäß Gleichung (3.18) bzw. Gleichung (3.25) das numerische Lösen des Azimut- und Polarwinkelintegrals nötig ist¹², steigt die Rechenzeit der Simulationen entsprechend an. Im direkten Vergleich der Anregungs- und Detektionsfunktionen in Abbildung 3.15 ist zu erkennen, dass die geometrischen Zentren aller Funktionen gut übereinstimmen und die größten Unterschiede in den Randbereichen auftreten.

¹² Mithilfe der analytischen Lösung bei vollem Azimut nach Abschnitt 2.1.2 nur das numerische Lösen des Polarwinkelintegrals.

Kapitel 4

Photophysikalische Modelle

Die quantenmechanische Beschreibung der Interaktion des in Abschnitt 2.2.3 eingeführten Drei-Niveau-Systems mit einem Laserfeld einer bestimmten Frequenz, führt zu einem Hamilton-Operator der Wechselwirkung für Frequenzen in der Nähe der molekularen Dipolübergänge. Unter Vernachlässigung schnell oszillierender Terme (Drehwellennäherung [187]) kann das System mithilfe optischer Bloch-Gleichungen in Form einer Dichtematrix geschrieben werden [188–191]:

$$\dot{\varrho}_{11} = (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) \varrho_{22} + k_{\text{rISC}} \varrho_{33} + i\Omega_{\text{R}} (\varrho_{21} - \varrho_{12}) \quad , \quad (4.1a)$$

$$\dot{\varrho}_{22} = -(k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}) \varrho_{22} - i\Omega_{\text{R}} (\varrho_{21} - \varrho_{12}) \quad , \quad (4.1b)$$

$$\dot{\varrho}_{12} = \left[i\Delta\omega - \frac{1}{T_2} \right] \varrho_{12} + i\Omega_{\text{R}} (\varrho_{22} - \varrho_{11}) \quad , \quad (4.1c)$$

$$\dot{\varrho}_{33} = k_{\text{ISC}} \varrho_{22} - k_{\text{rISC}} \varrho_{33} \quad . \quad (4.1d)$$

Wobei die diagonalen Matrixelemente ϱ_{ii} die Populationen und die Nicht-Diagonalelemente ϱ_{ij} mit $i \neq j$ die kohärenten Überlagerungen der Zustände beschreiben. Die Rabi-Frequenz $\Omega_{\text{R}} \equiv \vec{d} \cdot \vec{E} / \hbar$ gibt die Stärke der Wechselwirkung des eingestrahnten Laserfeldes $\vec{E}$ mit dem Molekül bezüglich des Übergangsdipolmoments $\vec{d}$ vom Grundzustand S_0 in den angeregten Zustand S_1 an. Die Verstimmung $\Delta\omega$ ist durch die Differenz der Winkelfrequenz des Lasers und des Moleküls gegeben und T_2 gibt die Dephasierungszeit des Übergangs ϱ_{12} an. Bei Raumtemperatur in Lösung werden in Näherung¹ nur die Diagonalelemente der Dichtematrix ohne stimulierte Emission betrachtet, womit das System ausreichend gut durch die Besetzungswahrscheinlichkeiten der elektronischen Zustände $S_i(t)$, $T_i(t)$ beschrieben wird [192]. Diese vereinfachte Beschreibung wird im Folgenden genutzt, um

¹ Aufgrund schneller elastischer Kollisionen mit Lösungsmittelmolekülen (~ 10 fs), die zu einem raschen Abfall der Kohärenz führen.

das Verhalten der betrachteten Systeme im Rahmen der Korrelationsanalyse zu bestimmen. Dafür werden Anpassungsfunktionen und Ratenzusammenhänge aus dem bereits erwähnten Drei-Niveau-System und aus komplexeren Modellen hergeleitet und analysiert.

4.1 Anpassungsfunktion des Drei-Zustand-Modells

Das in Abbildung 2.5 dargestellte und mittels der Dichtematrixelemente in Gleichung (4.1) beschriebene Gleichungssystem unter Vernachlässigung der nicht-diagonal Elemente lautet:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \varrho_{11} \hat{=} S_0(t) \\ \varrho_{22} \hat{=} S_1(t) \\ \varrho_{33} \hat{=} T_1(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{\text{ex}}S_0(t) + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})S_1(t) + k_{\text{rISC}}T_1(t) \\ k_{\text{ex}}S_0(t) - (k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}})S_1(t) \\ k_{\text{ISC}}S_1(t) - k_{\text{rISC}}T_1(t) \end{pmatrix} . \quad (4.2)$$

Die stationäre Lösung für dieses Differentialgleichungssystem ist in Abbildung 4.1a dargestellt und lautet unter der Annahme, dass die Gesamtpopulation der Niveaus S_0 , S_1 und T_1 der Menge aller möglichen Molekülzustände entspricht und zum Fluoreszenzzeitpunkt $t = 0$ für die Besetzung des Grundzustandes $S_0 = 1$ gilt:

$$S_0 = \frac{(k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} , \quad (4.3a)$$

$$S_1 = \frac{k_{\text{ex}}k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} , \quad (4.3b)$$

$$T_1 = \frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} . \quad (4.3c)$$

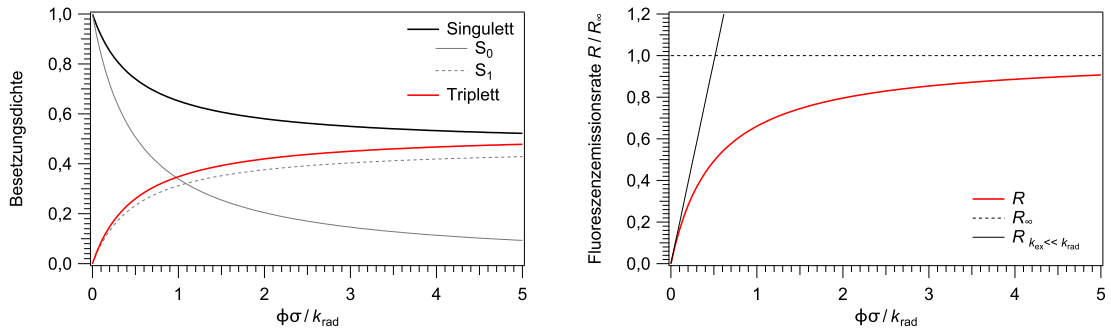
Gemäß Hübner und Basché [192] lässt sich anhand der stationären Lösung für die S_1 -Besetzung aus Gleichung (4.3b) die mittlere molekulare Fluoreszenzemissionsrate R des Systems unter niedriger und hoher Anregung beschreiben und liefert mithilfe der Quanteneffizienz Φ_F (siehe Gleichung (2.35b)) und $R = S_1 \cdot k_{\text{rad}}$:

$$R = \Phi_F \frac{k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}}{1 + \frac{k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}}{k_{\text{ex}}} + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}}} , \quad (4.4a)$$

$$\text{mit } \lim_{k_{\text{ex}} \rightarrow \infty} R_{\infty} = \Phi_F \frac{k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}}{1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}}} , \quad (4.4b)$$

$$\text{mit } k_{\text{ex}} \ll k_{\text{rad}} \quad R_{k_{\text{ex}} \ll k_{\text{rad}}} = \Phi_F \cdot k_{\text{ex}} . \quad (4.4c)$$

Der von der Anregungsrate abhängige Verlauf der Fluoreszenzemissionsrate lautet unter



(a) Besetzungsdichten nach Gleichung (4.3) (b) Fluoreszenzemissionsrate entsprechend der Gleichungen (4.4) und (4.5)

Abbildung 4.1: Mittlere Besetzungsdichten und Fluoreszenzemissionsrate

(a) Die Besetzungsdichten des gesamten Singulett (schwarz) nimmt entsprechend der Summe des Singulett-Grundzustands S_0 (grau, Gleichung (4.3a)) und angeregten Singulettzustands S_1 (grau gestrichelt, Gleichung (4.3b)) mit steigender Photonenflussdichte bzw. Anregungsrate ab und die Besetzungsdichte des Triplett (rot) entsprechend Gleichung (4.3c) zu. (b) Dargestellt ist die mittlere molekulare Fluoreszenzemissionsrate R (rot, Gleichung (4.4a) bzw. Gleichung (4.5)) mit der oberen Grenze bei hohen Anregungsraten (schwarz) gemäß Gleichung (4.4b) und dem linearen Verhalten bei niedrigen Anregungsraten (schwarz gestrichelt) entsprechend Gleichung (4.4c). Die Raten der Darstellungen in (a) und (b) lauten: $k_{\text{rad}} = 224 \text{ MHz}$, $k_{\text{IC}} = 19 \text{ MHz}$, $k_{\text{ISC}} = 0,29 \text{ MHz}$, sowie $k_{\text{rISC}} = 0,26 \text{ MHz}$.

Angabe einer farbstoffabhängigen Sättigungsrate, die den Anstieg des Sättigungsverlaufes charakterisiert, wie folgt:

$$R = R_\infty \frac{1}{1 + \frac{k_{\text{sat}}}{k_{\text{ex}}}} \quad (4.5)$$

mit $k_{\text{sat}} = \frac{(k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}}$.

Dabei steigt die Fluoreszenzemissionsrate, wie in Abbildung 4.1b dargestellt, bei niedrigen Anregungsraten linear nach Gleichung (4.4c) und sättigt bei hohen Anregungsraten gegen ein Maximum gemäß Gleichung (4.4b) (vgl. auch Abbildung 2.12). Das erreichbare Maximum sowie der Verlauf der Sättigungskurve hängen von unterschiedlichen Faktoren ab. So zeigen sich zum Beispiel Unterschiede im Sättigungsverhalten zwischen der Anregung mittels eines Dauerstrichlasers zu einer gepulsten Anregung, und sogar Abweichungen in der Rotationsdiffusionszeit können einen Einfluss haben [193, 194].

Bei der Betrachtung einzelner Moleküle kann nach Gleichung (2.76) aus der Amplitude der Korrelationskurve auf die mittlere Anzahl der Teilchen N im beobachteten Volumen geschlossen werden. Üblicherweise sollte für ein Einzelmolekülexperiment die Wahrscheinlichkeit, mehr als ein Molekül im Fokus anzutreffen, möglichst minimiert, N also sehr klein gewählt werden. Ein kleines N von zum Beispiel 0,2 führt nach Gleichung (2.67) jedoch zu einem zu 82 % der Beobachtungsdauer leeren Beobachtungsvolumen und einer

somit erhöhten Messzeit. Andererseits beträgt die Wahrscheinlichkeit, zwei Moleküle im Beobachtungsvolumen anzutreffen, bei einem N von 1 bereits 18 % (drei Moleküle noch 6 %), womit die der Messinformation zugrundeliegende Heterogenität durch Überlagerungen der Einzelsignale eingeschränkt wird. Dieses führt zu einer vom Experiment abhängigen Wahl der optimalen mittleren Molekülzahl im Beobachtungsvolumen² und dazu, dass die gemessene Fluoreszenzrate um diesen Betrag korrigiert werden muss. Diese korrigierte, mittlere Fluoreszenzemissionsrate je Molekül wird im folgenden molekulare Helligkeit (MB – *molecular brightness*) genannt. Sie lässt sich analog zu Gleichung (4.4a) als

$$\text{MB} = \eta \Phi_F \cdot \frac{\phi \cdot \sigma_{S_0 \rightarrow 1}}{1 + \frac{\phi}{\phi_{\text{sat}}}} \quad (4.6)$$

schreiben (siehe Anhang B.2 ab Seite XI für eine ausführliche Herleitung). Dabei gibt σ den molekularen Wirkungsquerschnitt gemäß Gleichung (2.34) und ϕ die anregungsseitige Photonenflussdichte entsprechend Gleichung (2.33) an. Wobei η die Detektionseffizienz des Mikroskops charakterisiert und abhängig vom Objektiv, den gewählten Filtern, Linsen und Detektorelementen einen Wert zwischen 0 und 1 annimmt.

Die bereits in Abschnitt 2.4 eingeführte, von der Triplettbesetzung bestimmte Überlagerung des Leuchtverhaltens durch zusätzlichen Fluktuationen bei kurzen Zeiten (μs), führt zu einem zusätzlichen Term in der Korrelation. Die entsprechende Triplett-Anpassungsfunktion $G_T(\tau)$ lautet mit Hilfe der stationären Lösung in Gleichung (4.3c), gemäß Gleichung (2.86) und mit $k_0 = k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}$:

$$G_T(\tau) = \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{(k_{\text{ex}} + k_0) k_{\text{rISC}}} e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} + 1 \quad (4.7)$$

Die Triplettzeit ergibt sich aus einer längeren Rechnung, auf die an dieser Stelle verzichtet werden soll. Der explizite Lösungsweg für das zeitabhängige System und somit auch den zeitlichen Verlauf der Triplettfluktuationen ist in Anhang B.3 (ab Seite XIV) aufgeführt. Die Triplettzeit ist dabei durch Gleichung (B.24c) durch

$$\tau_T = \left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \right)^{-1} \quad (4.8)$$

gegeben. Um die Abhängigkeit der beobachteten Interkombinationsvorgänge von der Anregungsintensität bzw. der sich daraus ergebenden Anregungsrate k_{ex} darzustellen, können die Gleichungen (4.7) und (4.8) über eine apparente Interkombinationsrate $k_{\text{ISC}}^{\text{app}}$ mittels

² So ist z. B. bei smFRET-Messungen gerade die Heterogenität der Probe von Bedeutung, wohingegen bei Bleichexperimenten die mittlere Abnahme der Fluoreszenzintensität von Interesse ist.

$$G_T(\tau) = \frac{k_{ISC}^{app}}{k_{rISC}} e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} + 1 \quad (4.9)$$

mit $\tau_T = (k_{ISC}^{app} + k_{rISC})^{-1}$

ausgedrückt werden. Die apparente Interkombinationsrate k_{ISC}^{app} ist dabei durch

$$k_{ISC}^{app} = k_{ISC} \left(1 + \frac{k_{sat}}{k_{ex}} \right)^{-1} \quad (4.10)$$

gegeben. Die Sättigungsrate k_{sat} stimmt für Gleichung (4.8) durch die in der Herleitung vollzogenen Näherungen (siehe Anhang B.3) nicht vollständig mit der in Gleichung (4.7) dargestellten Form überein, kann aber durch die Lebensdauer $\tau_0 = 1/k_0$, welche in folgendem Zusammenhang mit der Triplett-Quantenausbeute

$$\Phi_T = \frac{k_{ISC}}{k_{IC} + k_{ISC} + k_{rad}} = \frac{k_{ISC}}{k_0} \quad (4.11)$$

in Verbindung steht, approximiert werden. Daher wird unter der Voraussetzung, dass $k_{IC} + k_{rad} \gg k_{ISC}$ gilt, in den nachfolgenden Gleichungen das Rundungszeichen ($\approx$) an den entsprechenden Stellen genutzt. Die Triplett-Anpassungsparameter nehmen somit folgende veränderte Form im Vergleich zu Gleichung (2.88) an:

$$\text{Triplett-Amplitude} \quad A_T = \frac{\bar{T}}{1 - \bar{T}} = \frac{k_{ISC}}{k_{rISC}} \left(1 + \frac{1}{\tau_0 \phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1}} \right)^{-1}, \quad (4.12a)$$

$$\text{Triplettzeit} \quad \tau_T \approx \left(k_{rISC} + k_{ISC} \left(1 + \frac{1}{\tau_0 \phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1}} \right)^{-1} \right)^{-1}. \quad (4.12b)$$

Entsprechend ist der Triplettanteil $\bar{T}$ durch

$$\bar{T} = \frac{k_{ISC}}{k_{ISC} + k_{rISC} \left(1 + \frac{1}{\tau_0 \phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1}} \right)} \quad (4.13)$$

gegeben.

4.1.1 Sub-Poisson-Statistik – Antibunching

Zusätzlich zum bisher betrachteten Triplett-Blinken treten bei kurzen Zeiten, typischerweise im Bereich von Nanosekunden, zusätzliche Fluktuationen der Fluoreszenzintensität auf. Diese Fluktuationen werden im Gegensatz zum Bunching (von englisch *bunch* – Anhäufung),

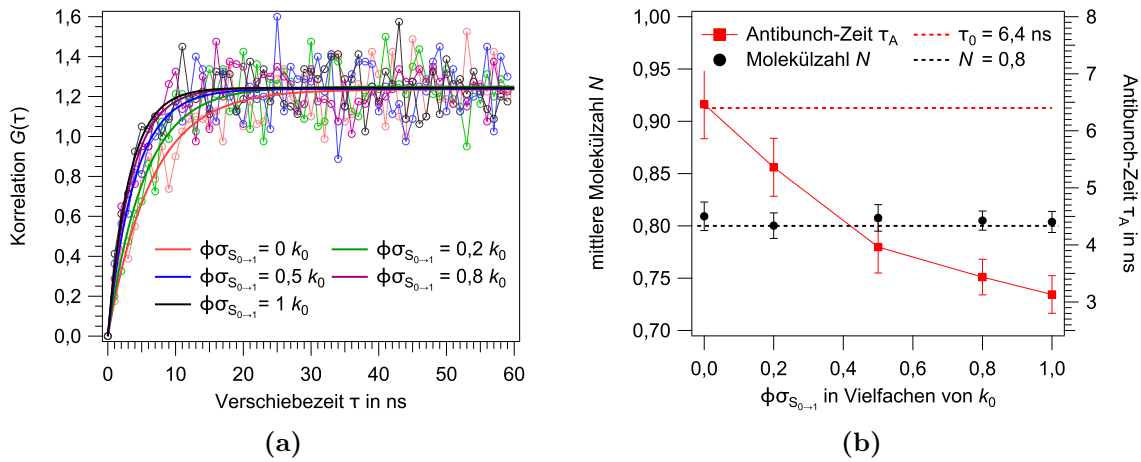


Abbildung 4.2: Antibunching in der Korrelationsfunktion

Die zeitlichen Lücken zwischen den Emissionsereignissen eines Moleküls führen zu einem Abfall der Korrelationsfunktion bei kleinen Zeiten. Nach Gleichung (4.15b) setzt sich die beobachtete Abfallzeit unter Abwesenheit von Triplettzuständen lediglich aus der Fluoreszenzlebensdauer $\tau_0 = 1/k_0$ (vgl. Gleichung (2.35a)) und der Anregungsrate $\phi\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}$ zusammen. In (a) sind simulierte Korrelationsfunktionen mit einer Lebensdauer von 6,4 ns bei fünf unterschiedlichen Anregungsleistungen mit der jeweiligen Anpassung (dicke Linien) nach Gleichung (4.16) dargestellt. (b) zeigt die Werte der Anpassungsfunktion in Abhängigkeit von der Anregungsleistung. Dabei sinkt die Antibunch-Zeit τ_A (rote Rechtecke) mit steigender Anregungsleistung. Die dünnen Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

welches die Korrelation von Photonenergebnissen einer thermischen Lichtquelle gemäß der Bose-Einstein-Verteilung beschreibt, als Antibunching bezeichnet und entstehen durch die „Wartezeiten“ zwischen einzelnen Emissionsereignissen eines Moleküls [130, 195–200]. Es sollte erwähnt werden, dass die Interkombinationsvorgänge in der Einzelmolekülbetrachtung ebenfalls zu einem Bunching führen, das mit der Abfallrate $k_T = 1/\tau_T$ mit τ_T gemäß Gleichung (4.8) charakterisiert werden kann.

Die zeitlichen Lücken des Antibunchings werden durch die in Gleichung (2.35) definierten Lebenszeiten beschrieben und führen zu einer Abweichung der gemäß Gleichung (2.67) eingeführten Poissonverteilung. Dabei wird bei der Betrachtung des Antibunchings auch von einer Sub-Poisson-Verteilung und beim Bunching von einer Super-Poisson-Verteilung gesprochen, was verdeutlichen soll, dass die auftretende Varianz beim Antibunching kleiner und beim Bunching größer als bei einer reinen Poisson-Verteilung ist [201]. Der Umstand, dass der zeitliche Abstand zweier Photonen eines Moleküls zur Abnahme der erwarteten Varianz des Fluktuationssignals bei kurzen Zeiten führt, ist in Abbildung 4.2 dargestellt und verursacht in der FCS-Analyse eine Abnahme der Autokorrelationsfunktion (AKF) gemäß:

$$G_A(\tau) = A_A e^{-\frac{\tau}{\tau_A}} \quad . \quad (4.14)$$

Analog zur Bestimmung der Triplettparameter ist die explizite Herleitung dieser Zusammen-

hänge in Anhang B.3 (ab Seite XIV) zu finden. Die Amplitude A_A und die charakteristische Abfallzeit des Antibunchings τ_A sind entsprechend der Gleichungen (B.24b) und (B.28) mit $k_0 = k_{IC} + k_{ISC} + k_{rad}$ durch

$$\text{Antibunch-Amplitude} \quad A_A = \left(1 - \bar{T}\right)^{-1} = 1 + \frac{k_{ISC}}{k_{rISC}} \left(1 + \frac{1}{\tau_0 \phi \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}}\right)^{-1}, \quad (4.15a)$$

$$\text{Antibunch-Zeit} \quad \tau_A \approx \left(k_0 + \phi \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} - k_{ISC} \left(1 + \frac{1}{\tau_0 \phi \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}}\right)^{-1}\right)^{-1} \quad (4.15b)$$

bestimmt. Die in Gleichung (2.87) aufgestellte Korrelationsfunktion kann nun im Zeitbereich der Fluoreszenzlebensdauer unter Einbezug der Antibunching-Anpassungsfunktion $G_A(\tau)$ nach Gleichung (4.14) in der Form

$$\begin{aligned} G(\tau) &= 1 + G_D(\tau) (G_T(\tau) - G_A(\tau)) \\ &= 1 + A \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \left(1 + A_T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} - A_A e^{-\frac{\tau}{\tau_A}}\right) \end{aligned} \quad (4.16)$$

geschrieben werden.

4.2 Anpassungsfunktionen erweiterter Zustands-Modelle

Wie anhand der Gleichungen (4.13) und (4.15) erkennbar ist, zeigt die eingestrahelte Photonenflussdichte ϕ einen direkten Einfluss auf die in der FCS-Analyse bestimmten Parameter. So kann eine Messreihe von niedrigen Anregungsleistungen im Bereich weniger μW bis zu Anregungsleistungen von einem oder mehr mW zur Bestimmung der photophysikalischen Parameter genutzt werden, indem die aus der jeweiligen Messung extrahierten Werte mithilfe der vorgestellten Gleichungen angepasst werden [202, 203]. Bei diesen hohen Anregungsleistungen können Intensitäten im Fokus des konfokalen Mikroskops im Bereich von mehreren hundert kW cm^{-2} entstehen, wodurch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die konsekutive Absorption eines Photons in einem bereits angeregten elektronischen Zustand, wie in Abbildung 4.3 dargestellt ist, resultiert [204, 205].

Obgleich Effekte wie die induzierte Emission von Photonen aufgrund der schnellen Schwingungsrelaxation in den S_1 -Grundzustand vernachlässigt werden [206], können diese höher angeregten Zustände zum einen zu erhöhten Bleichraten in polaren Lösungsmitteln [207–210], und zum anderen zu einer Änderung der beobachteten Fluoreszenzintensität und den damit verbundenen, aus der FCS-Analyse bestimmten, abweichenden photophysikalischen Parametern führen [211].

Das in Abbildung 4.3 dargestellte Energieniveaumodellschema beinhaltet entsprechend höher angeregte Singulettzustände S_n und höher angeregte Triplettzustände T_n . Die Anregung erfolgt aus dem jeweils energetisch niedriger liegenden angeregten Zustand über die Raten

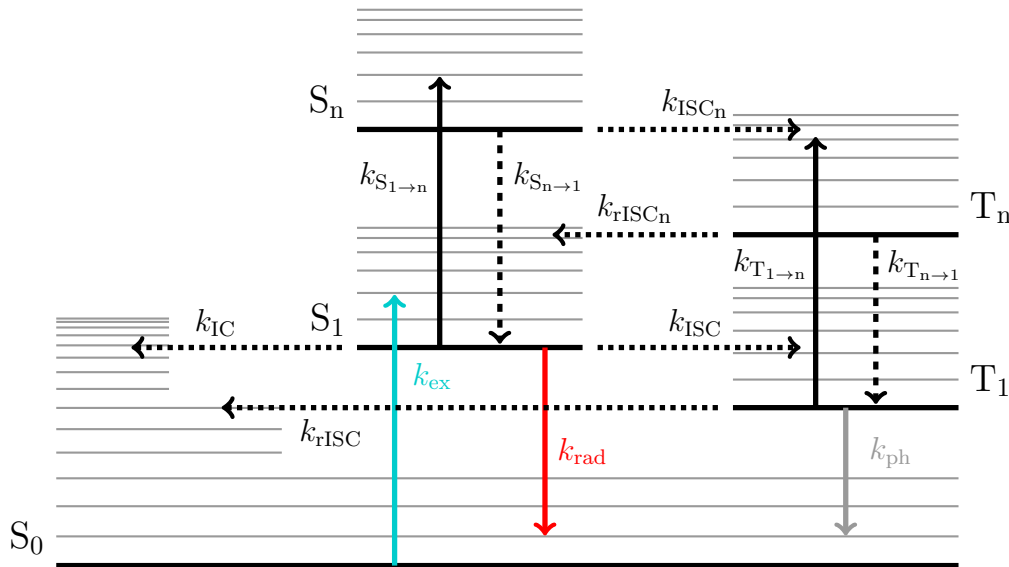


Abbildung 4.3: Energieniveaumodellschema mit höher angeregten Zuständen

Die konsekutive Absorption eines Photons aus einem bereits angeregten Zustand S_1 bzw. T_1 führt zu einem höher angeregten elektronischen Zustand S_n bzw. T_n . Die durchgezogenen Linien kennzeichnen strahlende und direkt photonisch angeregte Vorgänge. Waagerechte gepunktete Linien stehen für iso-energetische Konversion. Die Desaktivierung mittels vibronischer Relaxation ist der Übersicht halber nicht dargestellt.

$k_{S_1 \rightarrow n}$ bzw. $k_{T_1 \rightarrow n}$ und kann analog zum Drei-Zustand-Modell (siehe Abschnitt 2.2.3) über eine Interkombination mit der Rate k_{ISC_n} bzw. k_{rISC_n} oder interne Konversion $k_{S_n \rightarrow 1}$ bzw. $k_{T_n \rightarrow 1}$ in den niedrigsten angeregten Zustand relaxieren. Dabei sind direkte Anregungsraten in höher angeregte Zustände aus dem Grundzustand und direkte Emissionsraten aus höher angeregten Zuständen in den Grundzustand im Rahmen dieser Betrachtung vernachlässigbar klein und daher nicht dargestellt: Zum einen werden keine Anregungsenergien verwendet, die eine direkte Anregung höherer Zustände verursacht. Zum anderen verhalten sich die meisten fluoreszenten organischen Molekülen gemäß Kashas Regel (siehe Abschnitt 2.2.3) und emittieren lediglich aus dem ersten angeregten Singulettzustand S_1 [57].

Abweichungen von diesem Verhalten sollen in der vorliegenden Arbeit nicht explizit betrachtet werden. Es soll aber an dieser Stelle auf das Vorhandensein solcher Abweichungen und im Zusammenhang damit auf das Review von Demchenko, Tomin und Chou [212] und dabei insbesondere die Betrachtung anomaler Emission und Emission aus höher angeregten Zuständen, die zum Beispiel in dem Review von Itoh [213] zusammengefasst werden, verwiesen sein.

Das in Abbildung 4.3 dargestellte Energieniveaumterschema kann in Form eines Differentialgleichungssystems notiert werden, wobei die Phosphoreszenzrate k_{ph} vernachlässigt wird, und lautet:

$$\dot{S}_0 = -k_{ex}S_0 + (k_{IC} + k_{rad})S_1 + k_{rISC}T_1 \quad , \quad (4.17a)$$

$$\dot{S}_1 = k_{ex}S_0 + (-k_{IC} - k_{ISC} - k_{rad} - k_{S_1 \rightarrow n})S_1 + k_{S_n \rightarrow 1}S_n + k_{rISC_n}T_n \quad , \quad (4.17b)$$

$$\dot{T}_1 = k_{ISC}S_1 + (-k_{rISC} - k_{T_1 \rightarrow n})T_1 + k_{T_n \rightarrow 1}T_n \quad , \quad (4.17c)$$

$$\dot{S}_n = k_{S_1 \rightarrow n}S_1 + (-k_{ISC_n} - k_{S_n \rightarrow 1})S_n \quad , \quad (4.17d)$$

$$\dot{T}_n = k_{ISC_n}S_n + k_{T_1 \rightarrow n}T_1 + (-k_{rISC_n} - k_{T_n \rightarrow 1})T_n \quad . \quad (4.17e)$$

Unter der Annahme, dass die interne Konversion aus einem höher angeregten Zustand S_n , T_n in den jeweiligen darunterliegenden angeregten Zustand S_{n-1} , T_{n-1} den gegenüber der Interkombination zwischen den elektronischen Zuständen k_{ISC_n} und k_{rISC_n} dominierenden Prozess ausmacht [214–217], also $k_{S_n \rightarrow 1}$, $k_{T_n \rightarrow 1} \gg k_{ISC_n}$, k_{rISC_n} gilt, kann das Differentialgleichungssystem aus Gleichung (4.17) vereinfacht ohne die Interkombination zwischen höheren elektronischen Zuständen als

$$\dot{S}_0 = -k_{ex}S_0 + (k_{IC} + k_{rad})S_1 + k_{rISC}T_1 \quad , \quad (4.18a)$$

$$\dot{S}_1 = k_{ex}S_0 + (-k_{IC} - k_{ISC} - k_{rad} - k_{S_1 \rightarrow n})S_1 + k_{S_n \rightarrow 1}S_n \quad , \quad (4.18b)$$

$$\dot{T}_1 = k_{ISC}S_1 + (-k_{rISC} - k_{T_1 \rightarrow n})T_1 + k_{T_n \rightarrow 1}T_n \quad , \quad (4.18c)$$

$$\dot{S}_n = k_{S_1 \rightarrow n} S_1 - k_{S_n \rightarrow 1} S_n \quad , \quad (4.18d)$$

$$\dot{T}_n = k_{T_1 \rightarrow n} T_1 - k_{T_n \rightarrow 1} T_n \quad (4.18e)$$

geschrieben werden. Die Betrachtung der Besetzungen ohne diese Vereinfachung ist aufgrund ihrer unhandlichen Länge hier nicht aufgeführt und findet sich für den radiativen Singulett in Anhang B.2. Die sich daraus ergebenden Zusammenhänge und Gleichungen werden im weiteren Verlauf mit dargestellt und können in Analogie zu der Betrachtung ohne die Interkombination zwischen höheren elektronischen Zuständen nachvollzogen werden.

Für das Gleichungssystem aus Gleichung (4.18) gilt mit der den angeregten Singulett depopulierenden Rate $k_0 = k_{IC} + k_{ISC} + k_{rad}$ (vgl. Gleichung (2.35a)) und unter der Annahme eines geschlossenen, stationären Systems

$$[S_0(t) + S_1(t) + T_1(t) + S_n(t) + T_n(t)] = 1 \quad \wedge \quad \frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ T_1 \\ S_n \\ T_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (4.19)$$

für die Besetzung der jeweiligen Zustände:

$$S_0 = \left(1 + \frac{k_{ex} (k_{rISC} (k_{S_1 \rightarrow n} + k_{S_n \rightarrow 1}) k_{T_{n \rightarrow 1}} + k_{ISC} k_{S_{n \rightarrow 1}} (k_{T_1 \rightarrow n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))}{k_0 k_{rISC} k_{S_{n \rightarrow 1}} k_{T_{n \rightarrow 1}}} \right)^{-1} \quad , \quad (4.20a)$$

$$S_1 = \left(\frac{k_0}{k_{ex}} + \frac{k_{rISC} (k_{S_1 \rightarrow n} + k_{S_n \rightarrow 1}) k_{T_{n \rightarrow 1}} + k_{ISC} k_{S_{n \rightarrow 1}} (k_{T_1 \rightarrow n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{k_{rISC} k_{S_{n \rightarrow 1}} k_{T_{n \rightarrow 1}}} \right)^{-1} \quad , \quad (4.20b)$$

$$T_1 = \left(\frac{k_0 k_{rISC}}{k_{ex} k_{ISC}} + \frac{k_{rISC} (k_{S_1 \rightarrow n} + k_{S_n \rightarrow 1}) k_{T_{n \rightarrow 1}} + k_{ISC} k_{S_{n \rightarrow 1}} (k_{T_1 \rightarrow n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{k_{ISC} k_{S_{n \rightarrow 1}} k_{T_{n \rightarrow 1}}} \right)^{-1} \quad , \quad (4.20c)$$

$$S_n = \left(\frac{k_0 k_{S_{n \rightarrow 1}}}{k_{ex} k_{S_1 \rightarrow n}} + \frac{k_{rISC} (k_{S_1 \rightarrow n} + k_{S_n \rightarrow 1}) k_{T_{n \rightarrow 1}} + k_{ISC} k_{S_{n \rightarrow 1}} (k_{T_1 \rightarrow n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{k_{rISC} k_{S_1 \rightarrow n} k_{T_{n \rightarrow 1}}} \right)^{-1} \quad , \quad (4.20d)$$

$$T_n = \left(\frac{k_0 k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}}}{k_{ex} k_{ISC} k_{T_1 \rightarrow n}} + \frac{k_{rISC} (k_{S_1 \rightarrow n} + k_{S_n \rightarrow 1}) k_{T_{n \rightarrow 1}} + k_{ISC} k_{S_{n \rightarrow 1}} (k_{T_1 \rightarrow n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{k_{ISC} k_{S_{n \rightarrow 1}} k_{T_1 \rightarrow n}} \right)^{-1} \quad . \quad (4.20e)$$

Die Modellfunktion für die molekulare Helligkeit lautet damit im Vergleich zum Drei-Niveau-System (siehe Gleichung (4.6)):

$$\begin{aligned}
 \text{MB}(\phi) &= \eta\Phi_F \left(\frac{1}{\phi\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}} + \tau_0 \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} \right) + \phi\tau_0 \left(\frac{\sigma_{S_{1 \rightarrow n}}}{k_{S_{n \rightarrow 1}}} + \frac{\sigma_{T_{1 \rightarrow n}}k_{\text{ISC}}}{k_{T_{n \rightarrow 1}}k_{\text{rISC}}} \right) \right)^{-1} \\
 &= \eta\Phi_F \cdot \frac{\phi \cdot \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}}{1 + \frac{\phi}{\phi_{\text{sat}}} + \phi^2\tau_0\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left(\frac{\sigma_{S_{1 \rightarrow n}}}{k_{S_{n \rightarrow 1}}} + \frac{\sigma_{T_{1 \rightarrow n}}k_{\text{ISC}}}{k_{T_{n \rightarrow 1}}k_{\text{rISC}}} \right)} .
 \end{aligned} \tag{4.21}$$

Die Herleitung und genaue Bezeichnung der Sättigungsterme ist in Anhang B.2 unter Gleichung (B.11) zu finden. In Abbildung 4.4 ist das Verhalten der MB gegen die Anregungsrate in Form einer Photonenflussdichte ϕ für den Fall eines Drei-Niveau-Systems und eines Fünf-Niveau-Systems mit und ohne Interkombination aufgetragen. Es fällt auf, dass die MB bei Systemen mit höheren elektronischen Niveaus S_n , T_n ein Maximum der Form

$$\begin{aligned}
 \text{MB}(\phi_{\text{max}}) &= \eta\Phi_F\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \frac{\phi_{\text{sat1}}\sqrt{\phi_{\text{sat2}}}}{2\phi_{\text{sat1}} + \sqrt{\phi_{\text{sat2}}}} \\
 &= \eta\Phi_F k_0 \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} + 2\sqrt{\frac{k_0\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}}{\frac{\sigma_{S_{1 \rightarrow n}}}{k_{S_{n \rightarrow 1}}} + \frac{\sigma_{T_{1 \rightarrow n}}k_{\text{ISC}}}{k_{T_{n \rightarrow 1}}k_{\text{rISC}}}}} \right)^{-1} ,
 \end{aligned} \tag{4.22}$$

bei einer Photonenflussdichte von

$$\phi_{\text{max}} = \sqrt{\phi_{\text{sat2}}} = \sqrt{k_0} \left(\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left(\frac{\sigma_{S_{1 \rightarrow n}}}{k_{S_{n \rightarrow 1}}} + \frac{\sigma_{T_{1 \rightarrow n}}k_{\text{ISC}}}{k_{T_{n \rightarrow 1}}k_{\text{rISC}}} \right) \right)^{-1/2} \tag{4.23}$$

besitzt³. Dagegen nähert sich das Drei-Niveau-System asymptotisch dem Maximum

$$\lim_{\phi \rightarrow \infty} \text{MB}(\phi) = \eta\Phi_F\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}\phi_{\text{sat1}} = \eta\Phi_F k_0 \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} \right)^{-1} . \tag{4.24}$$

Somit ist bei hohen Leistungsdichten im Fokus, ohne die Betrachtung zusätzlicher Prozesse, wie zum Beispiel Diffusion, Rauschen, optischer Verzeichnungen oder Fluoreszenzlöschung und Photozerstörung (vgl. die Abschnitte 2.2.4, 2.3.1 und 2.3.3), ab einem Grenzwert ϕ_{max} , von einem Abfall der Emissionsrate allein aufgrund der Besetzung höher angeregter Zustände auszugehen. Auch der Maximalwert der MB sinkt in Übereinstimmung mit Nikogosyan [208] aufgrund der verminderten Besetzungsdichte des S_1 -Zustandes.

Wird im Differentialgleichungssystem in Gleichung (4.17) die Interkombinationsrate aus höheren Singulettzuständen in den Triplett über k_{ISC_n} , aufgrund der kurzen Aufenthaltsdauern im S_n und einer dominanten Relaxationsrate aus dem höher angeregten Singulett S_n

³ Unter der Bedingung, dass $\phi_{\text{sat1}} > \eta\Phi_F\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} > 0 \wedge ((\phi_{\text{sat2}} \geq 4\phi_{\text{sat1}}^2 \wedge 4\phi_{\text{sat1}} > 1) \vee (\phi_{\text{sat2}} < 4\phi_{\text{sat1}}^2 \wedge \phi_{\text{sat1}} < \phi_{\text{sat2}}))$ gilt.

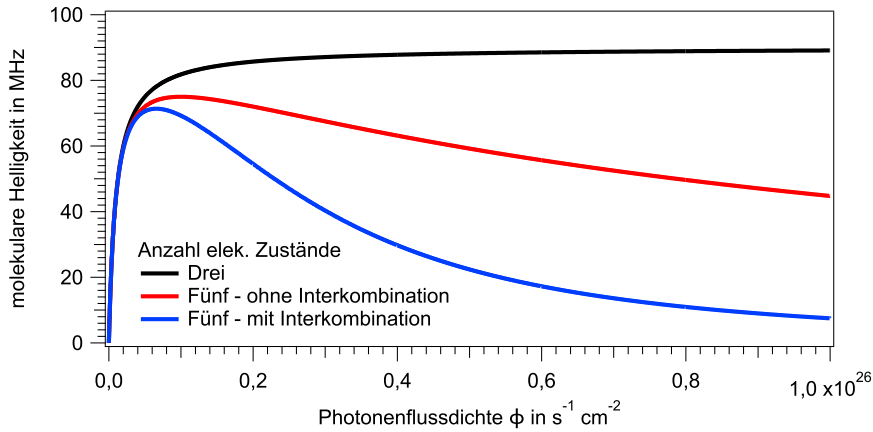


Abbildung 4.4: Verlauf der MB als Funktion der Photonenflussdichte

In schwarz ist der Verlauf der MB des Drei-Niveau-Systems nach Gleichung (4.6), in rot der Verlauf des Fünf-Niveau-Systems ohne Interkombination höher angeregter Zustände nach Gleichung (4.21) und in blau der Verlauf des Fünf-Niveau-Systems mit Interkombination höher angeregter Zustände nach Gleichung (B.8) dargestellt. Die abgebildeten Parameter lauten $\eta = 1$, $\Phi_F = 0,9$, $\sigma_{S_0 \rightarrow 1} = 1 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$, $\phi_{\text{sat}_1} = 1 \cdot 10^{24} \text{ s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, $\phi_{\text{sat}_2} = 1 \cdot 10^{50} \text{ s}^{-2} \text{ cm}^{-4}$ und $\phi_{\text{sat}_3} = 1 \cdot 10^{75} \text{ s}^{-3} \text{ cm}^{-6}$. Entsprechend liegt das Maximum des Fünf-Niveau-Systems ohne Interkombination (rot) gemäß Gleichung (4.23) bei einer Photonenflussdichte von $\phi_{\text{max}} = 1 \cdot 10^{25} \text{ s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ und beträgt nach Gleichung (4.22) $MB(\phi_{\text{max}}) = 75 \text{ MHz}$. Das Drei-Niveau-System (schwarz) hingegen nähert sich nach Gleichung (4.24) einem Maximum von 90 MHz.

in den S_1 über $k_{S_{n \rightarrow 1}}$, vernachlässigt, ergibt sich für die Besetzung des radiativen Singulettts nach Gleichung (B.6)

$$S_1 = \phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1} \left[\frac{k_0 k_{\text{rISC}} (k_{\text{rISC}_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{\phi \sigma_{T_1 \rightarrow n} k_{\text{rISC}_n} + k_{\text{rISC}} (k_{\text{rISC}_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})} + \phi \left(\frac{\sigma_{S_0 \rightarrow 1} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}) (k_{\text{rISC}_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}) + \sigma_{T_1 \rightarrow n} k_{\text{rISC}_n} (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})}{k_{\text{rISC}} (k_{\text{rISC}_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}) + \phi \sigma_{T_1 \rightarrow n} k_{\text{rISC}_n}} \right) + \phi^2 \left(\frac{\sigma_{S_0 \rightarrow 1} \sigma_{T_1 \rightarrow n} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}_n})}{k_{\text{rISC}} (k_{\text{rISC}_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}) + \phi \sigma_{T_1 \rightarrow n} k_{\text{rISC}_n}} \right) \right]^{-1}, \quad (4.25)$$

was sich zu

$$S_1 = \phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1} \left(1 + \frac{\phi \sigma_{T_1 \rightarrow n}}{k_{\text{rISC}} \left(1 + \frac{k_{T_{n \rightarrow 1}}}{k_{\text{rISC}_n}} \right)} \right) \left[k_0 + \phi \left\{ \sigma_{S_0 \rightarrow 1} \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} \right) + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) \frac{\sigma_{T_1 \rightarrow n}}{k_{\text{rISC}} \left(1 + \frac{k_{T_{n \rightarrow 1}}}{k_{\text{rISC}_n}} \right)} \right\} + \phi^2 \left\{ \sigma_{S_0 \rightarrow 1} \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}_n}} \right) \frac{\sigma_{T_1 \rightarrow n}}{k_{\text{rISC}} \left(1 + \frac{k_{T_{n \rightarrow 1}}}{k_{\text{rISC}_n}} \right)} \right\} \right]^{-1} \quad (4.26)$$

umformulieren lässt. Mithilfe der radiativen Rate k_{rad} lautet die MB unter der Annahme einer relevanten Rück-Interkombination aus höheren Triplettzuständen k_{rISC_n} entsprechend

$$\text{MB}(\phi) \propto \frac{k_{\text{rad}}}{k_0} \cdot \frac{\phi \sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}} (1 + \phi \kappa)}{1 + \frac{\phi}{\phi_{\text{sat}_1}} + \frac{\phi^2}{\phi_{\text{sat}_2}}} \quad (4.27)$$

mit

$$\kappa = \frac{\sigma_{\text{T}_{1 \rightarrow n}}}{k_{\text{rISC}} \left(1 + \frac{k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}}{k_{\text{rISC}_n}} \right)} \quad (4.28)$$

Die Sättigungsschwellen sind dabei durch

$$\phi_{\text{sat}_1} = k_0 \left(\sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}} \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} \right) + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) \kappa \right)^{-1}, \quad (4.29a)$$

$$\phi_{\text{sat}_2} = k_0 \left(\sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}} \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}_n}} \right) \kappa \right)^{-1} \quad (4.29b)$$

gegeben. Die Anpassungsfunktion kann somit auch als

$$\begin{aligned} \text{MB}(\phi) = \eta \Phi_{\text{F}} (1 + \phi \kappa) & \left(\frac{1}{\phi \sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}}} + \tau_0 \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} + \frac{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}}{\sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}}} \kappa \right) \right. \\ & \left. + \phi \tau_0 \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}_n}} \right) \kappa \right)^{-1} \end{aligned} \quad (4.30)$$

geschrieben werden. Durch $\phi \kappa$ wird die Wahrscheinlichkeit beschrieben, nach der Anregung in einen höheren Triplettzustand diesen durch eine Rück-Interkombination in den angeregten Singulett zu verlassen, und somit zu einer niedrigeren Triplettbesetzung und erhöhten Fluoreszenzwahrscheinlichkeit zu führen. Dieses Verhalten wird in Abschnitt 5.2 genauer besprochen.

4.2.1 Simulation höherer elektronischer Zustände

Die bisher betrachteten Zusammenhänge gehen von einer zeitlich und räumlich konstanten anregungsseitigen Photonenflussdichte ϕ gemäß Widengren, Rigler und Mets [202] aus. Diffundieren die betrachteten Moleküle in Lösung durch das konfokale Volumen (siehe Abschnitt 2.4), ist die beobachtbare Fluoreszenz von der Position des Moleküls abhängig. Verhält sich die Fluoreszenzrate nicht gemäß Gleichung (2.33) linear proportional zur Photonenflussdichte, weicht das effektive Beobachtungsvolumen von den Annahmen in Abschnitt 2.4 ab und führt zu einer fehlerhaften Anpassung der Korrelation durch Gleichung (2.87). Wie bereits in Abschnitt 2.3 und Abschnitt 3.3.2 dargestellt, folgt die Fluoreszenz im Fokus eines Mikroskopobjektives mit hoher NA einem nichtlinearen Verlauf. Moleküle, die den Fokus passieren, zeigen ein, besonders bei hohen Leistungen, nichtlineares Leuchtverhalten entsprechend der lokalen Photonenflussdichte gemäß der bisher aufgeführten Zusammenhänge.

Dieses Verhalten kann mit der in Abschnitt 3.3 beschriebenen, im Rahmen der Arbeit entwickelten Monte-Carlo-Simulationssoftware nachgestellt werden. In Abbildung 4.5 sind die Fluoreszenzereignisse je Voxel (mit einem Volumen von 375 yl) und Sekunde entlang der Fokusebene ($z = 0$, Abbildung 4.5 links) und entlang der optischen Achse ($x = 0$, Abbildung 4.5 rechts) aufgetragen. Die Simulationsparameter sind in Tabelle 4.1 dargestellt, und die Fokusform ist durch Gleichung (3.12) gegeben und beträgt für die Anregung

Tabelle 4.1: Simulationsparameter verschiedener Energieniveaudiagramme

Die Moleküle diffundieren mit einem Diffusionskoeffizienten von $435 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ durch ein zylinderförmiges Volumen. Die Anregungsfunktion ist durch eine, entsprechend der Energieflussdichte normierte, gaußförmige Verteilungsfunktion bestimmt (siehe Abschnitt 3.3.2, Gleichung (3.12)). Die Fokusparameter lauten transversal $w_{xy} = 176 \text{ nm}$ und axial $w_z = 655 \text{ nm}$ bei einer Wellenlänge von 488 nm . Die Detektion ist durch die Parameter $w_{xy} = 417 \text{ nm}$ und $w_z = 1222 \text{ nm}$ gegeben.

	$\varepsilon_{S_{0 \rightarrow 1}}$ in $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$	k_{rad} in MHz	k_{IC}	k_{ISC} in MHz	k_{rISC}
3-, 4-, 5-Niveau	55 800	224,388	19,040	0,290	0,260

	$\varepsilon_{S_{1 \rightarrow n}}$ in $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$	$\varepsilon_{T_{1 \rightarrow n}}$	$k_{S_{n \rightarrow 1}}$ in MHz	$k_{T_{n \rightarrow 1}}$	k_{ISC_n} in MHz	k_{rISC_n}
3-Niveau	—	—	—	—	—	—
4-Niveau mit T_n	—	55 800	—	1000	—	0,260
5-Niveau ohne $\text{ISC}_n/\text{rISC}_n$	55 800	55 800	1000	1000	—	—
5-Niveau	55 800	55 800	1000	1000	0,290	0,260
5-Niveau höhere $k_{S_{n \rightarrow 1}}/k_{T_{n \rightarrow 1}}$	55 800	55 800	4000	4000	0,290	0,260

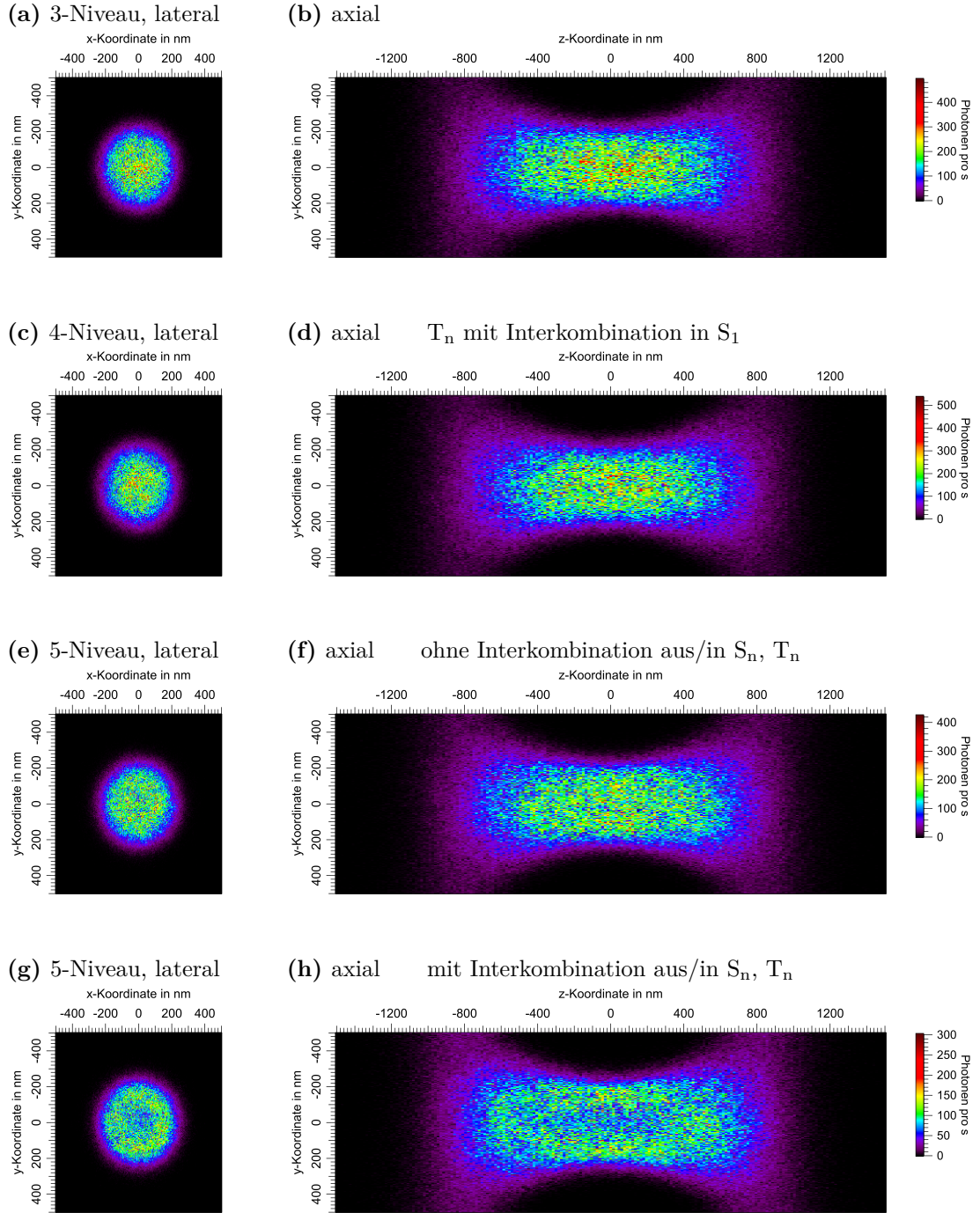


Abbildung 4.5: Simulierte Fluoreszenzereignisse im konfokalen Volumen

Links ist die Fokusebene (lateraler Schnitt) in $z = 0$ dargestellt. Rechts sind die entsprechenden Schnitte entlang der optischen Achse (axialer Schnitt) in $x = 0$ zu sehen. Die simulierten Parameter sind in Tabelle 4.1 dargestellt und bilden ein (a,b) Drei-Niveau-System, (c,d) Vier-Niveau-System mit höheren Triplettzuständen, (e,f) Fünf-Niveau-System ohne Interkombination höherer Zustände und (g,h) Fünf-Niveau-System mit Interkombination höherer Zustände ab. Die dargestellten Abbildungen zeigen die positionsabhängigen Fluoreszenzereignisse bei einer simulierten Anregungsleistung von 2 mW.

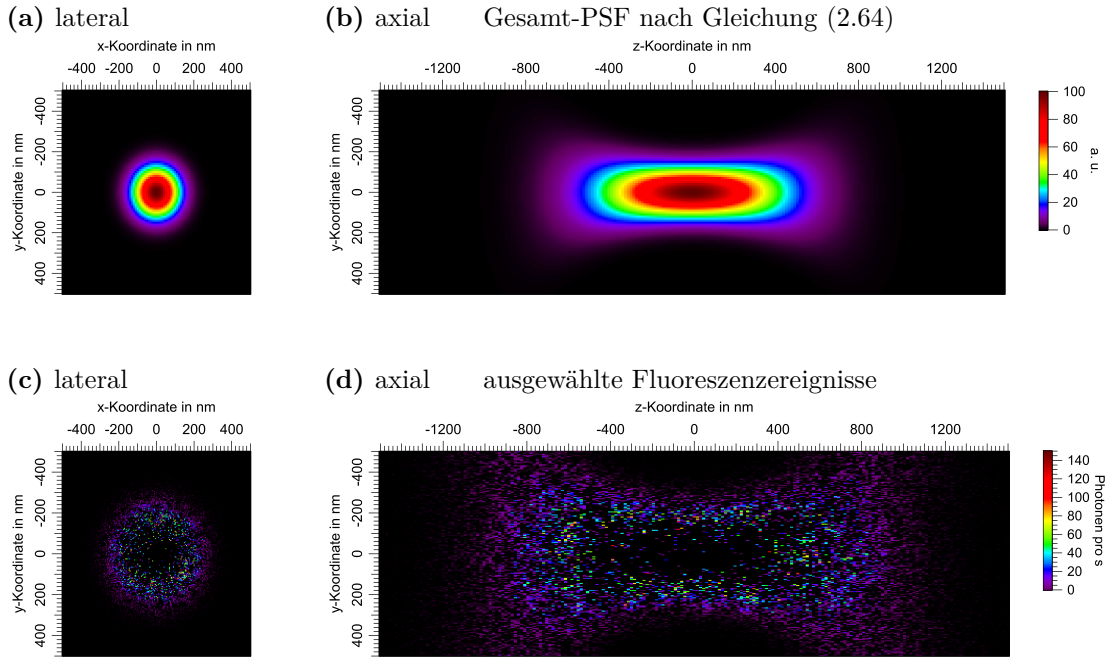


Abbildung 4.6: Erhöhte Intensitäten im Fünf-Niveau-System

Die PSF im lateralen (a) und axialen (b) Schnitt. Die Anregungs- und Detektionsfunktion ist gemäß Gleichung (3.12) bestimmt und in Anhang A.3 aufgeführt. Werden nur die Ereignisse der Voxel des Fünf-Niveau-Systems betrachtet, die eine höhere Photonenzahl pro Sekunde im Vergleich zum Drei-Niveau-System aufweisen, so fällt auf, dass diese besonders im Randbereich auftreten.

$w_{xy} = 176 \text{ nm}$, $w_z = 655 \text{ nm}$, $\lambda = 488 \text{ nm}$ und für die Detektion $w_{xy} = 417 \text{ nm}$, $w_z = 1222 \text{ nm}$. In den Abbildungen 4.5a und 4.5b ist die Simulation eines Drei-Niveau-Systems (siehe Gleichung (4.6)), in 4.5c und 4.5d die eines Vier-Niveau-Systems mit höheren Triplettzuständen (siehe Gleichung (4.30)), in 4.5e und 4.5f die eines Fünf-Niveau-Systems ohne Interkombination höherer Zustände (siehe Gleichung (4.21)) und in 4.5g und 4.5h die eines Fünf-Niveau-Systems mit Interkombination höherer Zustände (siehe Gleichung (B.8)) zu sehen.

Wie entsprechend Abbildung 4.4 und gemäß der Gleichungen (4.6), (4.21), (4.30) und (B.8) erwartet, sinkt die mittlere Photonenzahl je Sekunde und Voxel in den Simulationen in Abbildung 4.5 von im Mittel 15,9 (Maximal 495) beim Drei-Niveau-System auf 15,0 (Maximal 425) beim Fünf-Niveau-System ohne Interkombination und 13,2 (Maximal 302) beim Fünf-Niveau-System mit Interkombination. Auffällig ist ein Absinken der Fluoreszenzereignisse im mittleren Bereich des Fokus beim Fünf-Niveau-System, wo die höchsten Anregungsphotonenflüsse auftreten. Die Multiplikation der Anregungsfunktion mit der Detektionsfunktion ist in den Abbildungen 4.6a und 4.6b dargestellt (siehe Anhang A.3 für die separaten Funktionen). Bei einer zum Anregungsfluss proportionalen Fluoreszenzantwort wäre ein solcher Verlauf der Fluoreszenzereignisse zu erwarten. Das ist insbesondere bei der Betrachtung der Fünf-Niveau-Systeme nicht der Fall. Die Abbildungen 4.6c und 4.6d zeigen

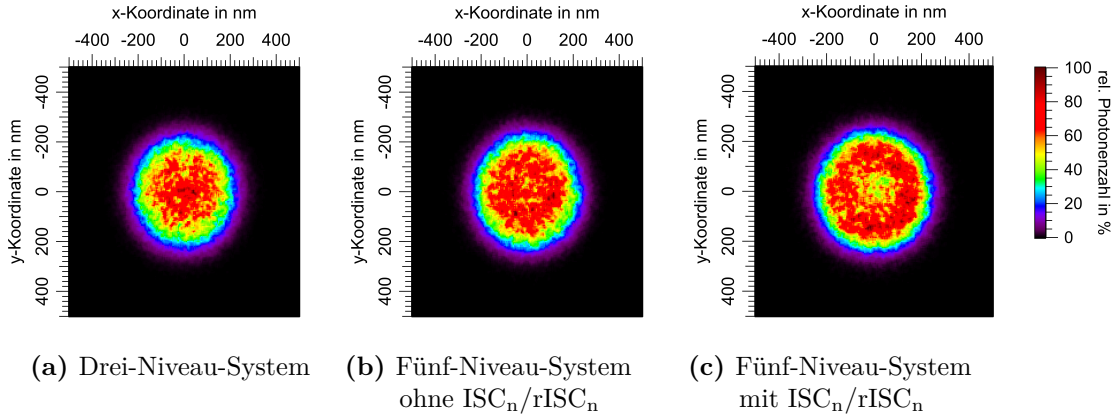


Abbildung 4.7: Relative Fluoreszenzintensität in der Fokusebene

Dargestellt ist die Fokusebene (lateral, $z = 0$) des (a) Drei-Niveau-Systems, (b) Fünf-Niveau-Systems ohne Interkombination höherer Zustände und des (c) Fünf-Niveau-Systems mit Interkombination höherer Zustände. Die Photonenzahlen je Pixel sind über ein 3×3 -Feld gemittelt und normiert. Die Fluoreszenzphotonen des Drei-Niveau-Systems stammen primär aus dem Zentrum. Beim Fünf-Niveau-System (b) stammen sie teilweise und in (c) hauptsächlich aus dem Randbereich der Fokusebene.

einen lateralen und axialen Schnitt durch die simulierten Volumina. Es sind lediglich die Voxel dargestellt, in denen mehr Fluoreszenzereignisse pro Sekunde im Fünf-Niveau-System (siehe Abbildungen 4.5g und 4.5h) als im Drei-Niveau-System (siehe Abbildungen 4.5a und 4.5b) auftreten. Es fällt auf, dass Moleküle, die weiter entfernt vom Fokussmittelpunkt diffundieren zu mehr Fluoreszenzereignissen führen, als Moleküle im geometrischen Zentrum. Das ist auf eine geringere statistische Wahrscheinlichkeit, in einem nichtstrahlenden Zustand zu sein (gleichbedeutend mit einer höheren S_1 -Besetzungsdichte), zurückzuführen. Somit bedingt das Vorhandensein höherer Zustände eine Verminderung der Fluoreszenz bei steigender Anregungsleistung. Im Gegensatz dazu ist beim Vier-Niveau-System durch die Wahrscheinlichkeit, bei hohen Leistungen den nichtstrahlenden Triplett über den strahlenden Singulett zu verlassen, die mittlere Photonenzahl je Sekunde und Voxel mit 16,2 (Maximal 537) erhöht. Dieses Verhalten wird detailliert in Abschnitt 5.2.1 besprochen.

Die beobachtete mittlere Fluktuation an einem Ort im beobachteten Volumen ist von der durch die systembedingte PSF gegebene Verteilung der Anregungsflussdichte, die ortsabhängige Detektionswahrscheinlichkeit und die durch die lokale Molekülkonzentration und das Sättigungsverhalten gegebene Fluoreszenz bestimmt (siehe die Beschreibung der zeitlichen Fluktuationen zu Gleichung (2.72) in Abschnitt 2.4). Dabei spielen unterschiedliche Parameter wie zum Beispiel der Unter- bzw. Überstrahlungsfaktor (siehe Abschnitt 2.3) und die konfokale Lochblendengröße und Position (siehe Abschnitt 2.3.2) eine Rolle und werden in der Literatur ausgiebig besprochen [218–223]. Der Einfluss der Helligkeitsfunktion auf das Beobachtungsvolumen ist in Abbildung 4.7 anhand der gemittelten relativen Photonverteilung in der Fokusebene (lateralen Schnitt) der unterschiedlichen Niveau-Systeme bei gleicher Anregungsleistung dargestellt. Zu sehen ist, dass das Maximum im Zentrum der Ebene beim Drei-Niveau-System (Abbildung 4.7a) verbreitert ist und im Fall des

Fünf-Niveau-Systems in Abbildung 4.7c zu einem kreisringförmigen Maximum wird. Eine detaillierte Gegenüberstellung der relativen Unterschiede des Leuchtverhaltens findet in Abbildung C.1 (Seite XXII) statt.

4.2.2 Sättigung der AKF bei Mehr-Photonen-Prozessen

Zusätzlich zur Änderung der MDF durch die Sättigung des angeregten Zustandes (Anregungsrate $\geq$ Fluoreszenzlebensdauer) und des Triplettzustandes (Dunkelzeiten durch Interkombinationsvorgänge), die zu einer effektiven Verbreiterung der Funktion führen [53, 221, 224–226], ist bei hohen Anregungsintensitäten gemäß Abschnitt 4.2.1 im geometrischen Zentrum ein weiterer Abfall vorhanden. Die Absorption zusätzlicher Photonen im bereits angeregten Singulett- oder Triplettzustand verlängert die effektive Dunkelzeit der Moleküle, was zu einer Abweichung der MDF von der einfachen 3D-Gaußfunktion (nach Gleichung (2.74)) führt [211, 227]. Obgleich in den betrachteten Daten kein Photobleichen einbezogen wurde, ist im Experiment von einer zusätzlichen Verstärkung der Abweichung von der Gaußform auszugehen, da nach Abschnitt 2.2.5 insbesondere die höher angeregten Moleküle im Zentrum der Fokusebene wahrscheinlicher Bleichprozesse durchlaufen. Die Änderung der ortsspezifischen Fluoreszenzantwort kann in die MDF und somit die über die AKF vollzogene Mittelung einbezogen werden. Dazu wird die sättigungsabhängige MDF in empirischer Näherung des in Abschnitt 4.2.1 beobachteten Verhaltens, als einfache Differenz zweier achsensymmetrischer ($w_x = w_y$) Gaußfunktionen

$$I_0 \cdot e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{w_{xy}^2} + \frac{z^2}{w_z^2}\right)} - I_1 \cdot e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{w_{xy}^{\text{sat}2}} + \frac{z^2}{w_z^{\text{sat}2}}\right)} \quad (4.31)$$

formuliert. Im Vergleich zum 3D-Gauß kann die Differenz-Funktion als

$$\text{MDF}_G^{\sigma,f}(x,y,z) = e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{w_{xy}^2} + \frac{z^2}{w_z^2}\right)} - c \cdot e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{\sigma_{xy}^2 w_{xy}^2} + \frac{z^2}{\sigma_z^2 w_z^2}\right)} \quad (4.32)$$

geschrieben werden. Dabei gibt c das Amplitudenverhältnis I_1/I_0 und σ_{xy} , sowie σ_z das Verhältnis der jeweiligen Breite $w_{xy}^{\text{sat}}/w_{xy}$ und w_z^{sat}/w_z der Gaußfunktionen in lateraler und axialer Richtung an. In Analogie zu Gleichung (2.74) wird die Differenzfunktion in Gleichung (4.32) ohne vorangestelltes I_0 geschrieben, sodass die Darstellung auf eine maximale Amplitude von Eins normiert ist. Wie in Abbildung 4.8 dargestellt ist, können so unterschiedliche, von einer Gaußfunktion abweichende Verläufe der Gesamtfunktion modelliert werden. Über c kann die reduzierte Amplitude A im Punkt $x = y = z = 0$ gemäß $A = 1 - c$ bestimmt werden, und die Breiten σ_{xy} und σ_z geben die relative Größe des reduzierten Bereiches an.

Da lediglich die Form bei der Bestimmung der Korrelationsfunktionen von Bedeutung ist (vgl. Anhang A.1 und Abschnitt 2.4), muss die Funktion nicht explizit auf die Fokusebene

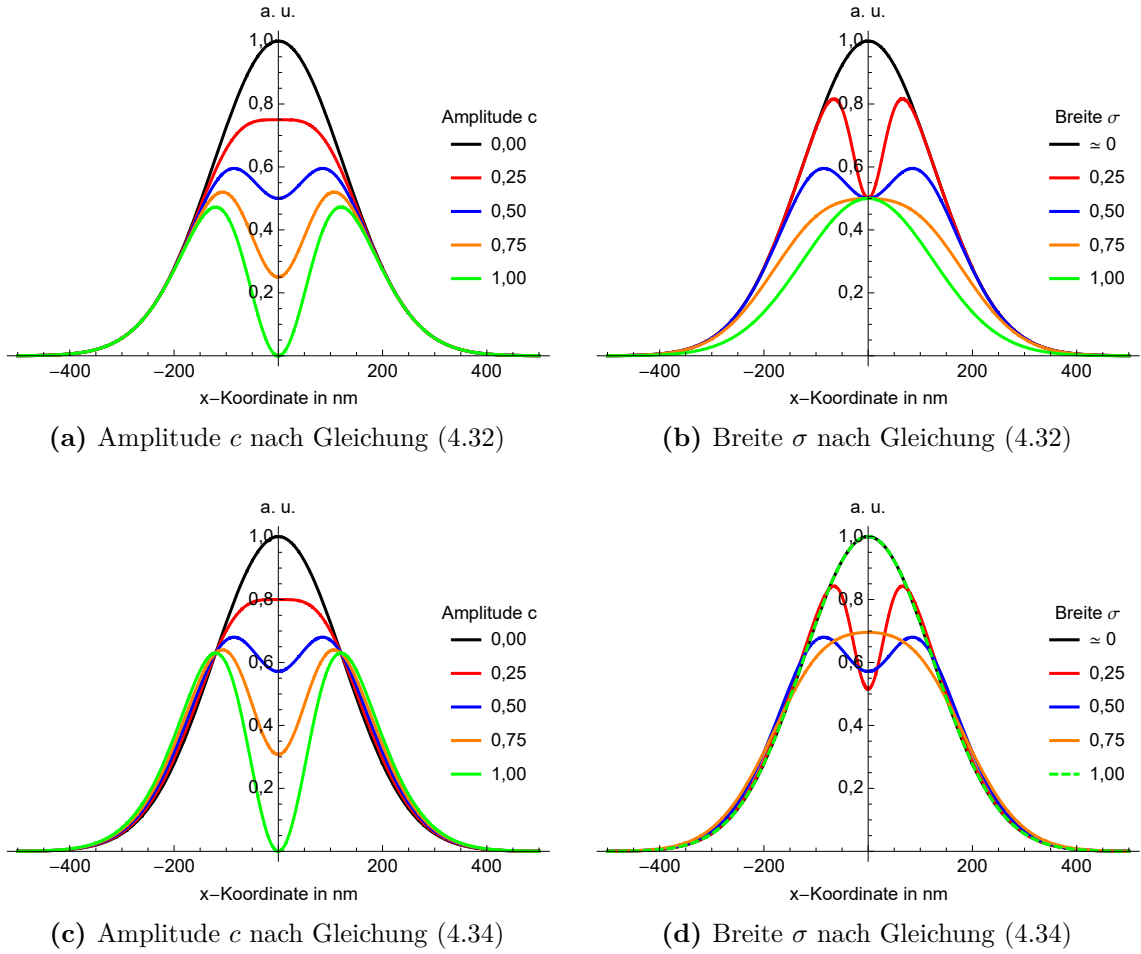


Abbildung 4.8: Differenz von Gaußfunktionen

Dargestellt sind Schnitte entlang der x -Koordinate durch die Fokustaille ($y = z = 0$) nach den Gleichungen (4.32) und (4.34) mit $w_{xy} = 250$ nm, $w_z = 1000$ nm bei (a,c) unterschiedlicher Amplitude c und konstanter Breite $\sigma_{xy} = 0,5$, $\sigma_z = 0,5$ und (b,d) unterschiedlicher Breite σ_{xy} , σ_z und konstanter Amplitude $c = 0,5$.

normiert werden. Für die Berechnung von Intensitätsprofilen ist ein Normierungsfaktor für die Fokustaille allerdings nötig, und kann als Amplitude analog zu den Gleichungen (3.6), (3.7) und (3.12) in der Form

$$A = \frac{2}{\pi w_{xy}^2 (1 - \sigma_{xy}^2 \cdot c)} \quad (4.33)$$

geschrieben werden⁴. Die relative Abweichung vom 3D-Gaußprofil (siehe Gleichung (2.74)) kann daher durch

$$\frac{1}{1 - \sigma_{xy}^2 \cdot c} \left(e^{-2 \left(\frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2} + \frac{z^2}{w_z^2} \right)} - c \cdot e^{-2 \left(\frac{x^2 + y^2}{\sigma_{xy}^2 w_{xy}^2} + \frac{z^2}{\sigma_z^2 w_z^2} \right)} \right) \quad (4.34)$$

⁴ Der Übersicht halber wird der Faktor I_0 unterschlagen. Die gesamte Funktion lautet $A \cdot I_0^{-1} \cdot I_0 \cdot \text{MDF}_G^{\sigma,f}$.

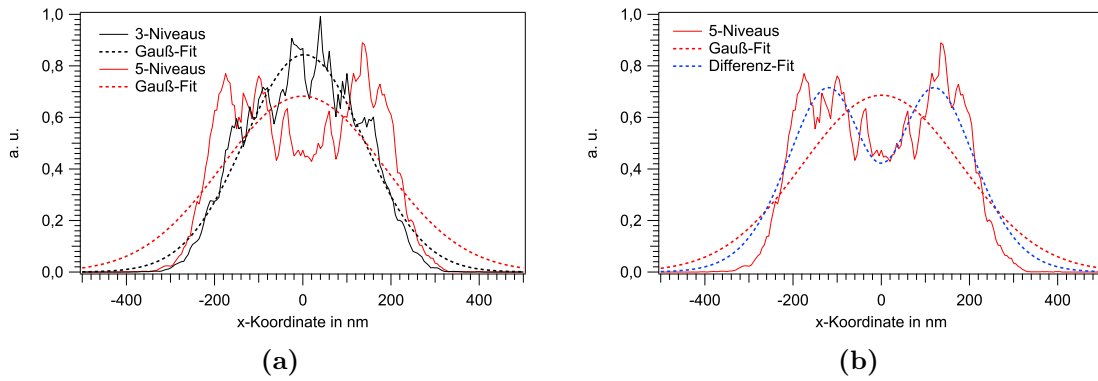
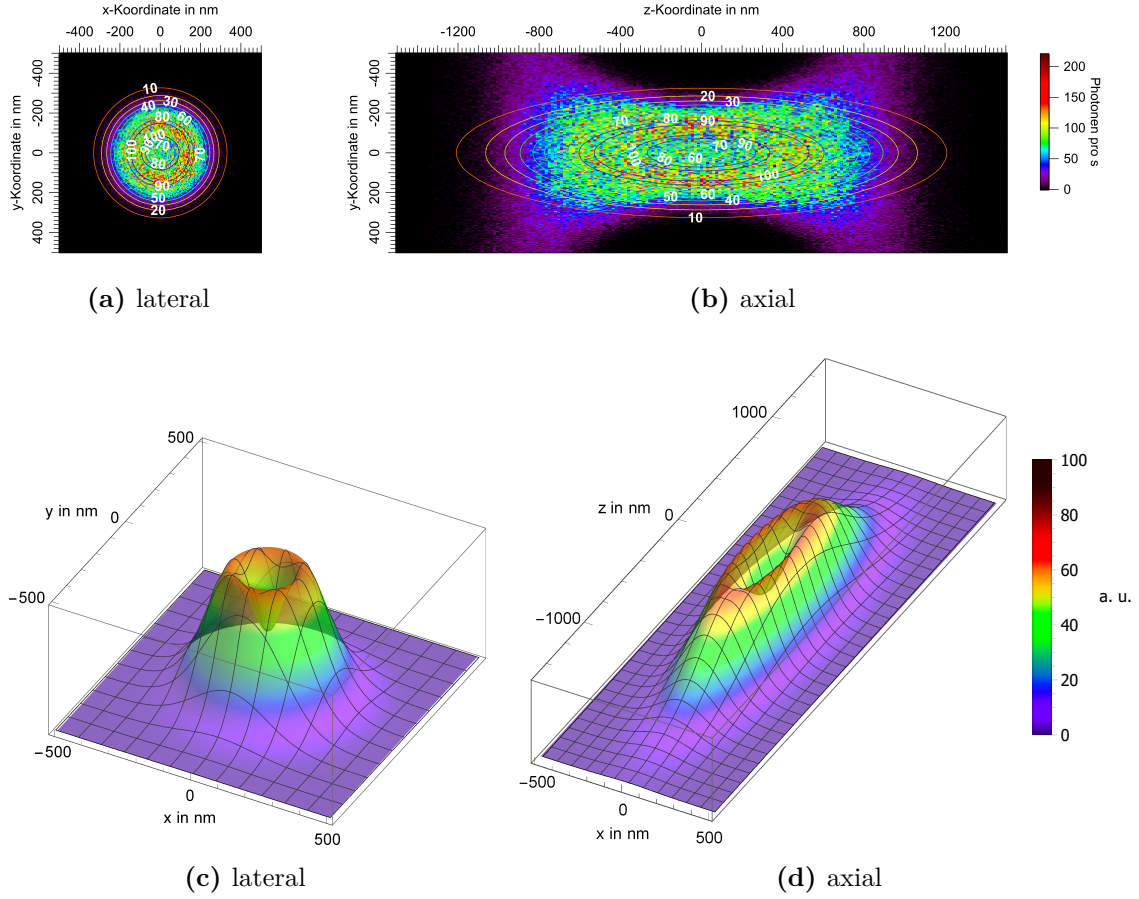


Abbildung 4.9: Anpassung mit Gauß- und Gauß-Differenz-Funktion

In (a) sind die lateralen Schnitte durch den Fokus ($y = z = 0$) aus den Abbildungen 4.7a und 4.7c dargestellt. Die Anpassung mit einer Gaußfunktion nach Gleichung (2.74) mit einer Amplitude A , führt beim Drei-Niveau-System (schwarz) zu einer guten Approximation des Profils, und zu den Anpassungswerten von $A = 0,84 \pm 0,01$ und einer Breite von $w_{xy} = (271 \pm 4)$ nm. Beim Fünf-Niveau-System (rot) hingegen sind deutliche Abweichungen zu erkennen und die Anpassungswerte lauten für die Amplitude $A = 0,68 \pm 0,02$ und für die Breite $w_{xy} = (365 \pm 14)$ nm. (b) zeigt den lateralen Schnitt des Fünf-Niveau-Systems mit dem Gaußfit (rot) im Vergleich zur Anpassung mit der Gauß-Differenz-Funktion (blau) nach Gleichung (4.34), die den Verlauf genauer anpasst und mit einer aus dem Drei-Niveau-System vorgegebenen Breite von $w_{xy} = 271$ nm zu einer Amplitude von $A = 1,20 \pm 0,02$, $c = 0,73 \pm 0,01$ und dem Breitenparameter $\sigma = 0,57 \pm 0,02$ führt.

beschrieben werden. Wie in den Abbildungen 4.8c und 4.8d dargestellt ist, führt das dazu, dass bei einer Amplitude $c = 0$ und/oder den Breitenparametern $\sigma = 0$ und $\sigma = 1$ keine Abweichungen von der 3D-Gaußform vorhanden sind. Dabei ist interessant festzustellen, dass die hier gewählte Formulierung bei geeigneter Parameterwahl ebenso die Beschreibung eines nur in x, y doughnutförmigen Maximums, wie er bei der STED-Mikroskopie⁵ üblich ist, oder durch ein Quadrieren der Formbeschreibung auch Sättigungsverläufe der Zwei-Photonen-Mikroskopie abbilden kann [228, 229]. Werden nun die lateralen Schnitte des Drei- und Fünf-Niveau-Systems aus den Abbildungen 4.7a und 4.7c mit einer einfachen Gaußfunktion nach Gleichung (2.74) und der in Gleichung (4.34) beschriebenen Gauß-Differenz-Funktion angepasst, ergeben sich die in Abbildung 4.9 dargestellten Werte. In Abbildung 4.9a sind die einfachen Gaußanpassungen dargestellt, die beim Drei-Niveau-System (schwarz) gut mit dem experimentellen Profil übereinstimmen und beim Fünf-Niveau-System (rot) dieses nur unzureichend abbilden können. In Abbildung 4.9b ist dem die Anpassung mittels der Gauß-Differenz-Funktion gegenübergestellt. Diese gibt die Form des Leuchtverhaltens wesentlich besser wieder und bildet den zentralen Bereich genauer ab. Abbildung 4.10 zeigt die Konturlinien der Anpassungsfunktion über dem lateralen und axialen Schnitt durch die Fluoreszenzereignisse aus den Abbildungen 4.5g und 4.5h und die 3D-Darstellungen der sich daraus ergebenden MDF. Obgleich auffällt, dass die Anpassung entlang z die Daten im Außenbereich unzureichend anpasst, gibt sie das Leuchtverhalten im Zentrum gut wieder. Zum Vergleich ist die Darstellung des Drei-Niveau-Systems mit einer einfachen Gaußanpassung in Abbildung C.2 (Seite XXIII) dargestellt.

⁵ STED – Desaktivierung durch stimulierte Emission (*stimulated emission depletion*) [12]


Abbildung 4.10: Gauß-Differenz-Anpassung

Die Anpassung des (a) lateralen und (b) axialen Schnittes des Fünf-Niveau-Systems mit Interkombination mit der Gauß-Differenz-Funktion nach Gleichung (4.34) führt zu der Breite $w_{xy} = (260,3 \pm 3,4) \text{ nm}$ und $w_z = (969,4 \pm 2,8) \text{ nm}$, der lateralen Amplitude $A_{\text{lat}} = 172,6 \pm 0,4$ und axialen Amplitude $A_{\text{ax}} = 176,3 \pm 0,4$, der Differenz-Amplitude $c = 0,763 \pm 0,003$ und den Breitenparametern $\sigma_{xy} = \sigma_z = 0,55 \pm 0,01$. In der 3D-Darstellung in (c) und (d) ist zu erkennen, dass das zu einer Absenkung des Maximums und einer doughnutförmigen Intensitätsverteilung führt.

Da die bisherige Definition der Anpassungsfunktion für die Korrelationsfunktion von einem gaußförmigen Volumen ausgeht (vgl. Abschnitt 2.4 und Anhang A.1), führt die Abweichung der Form zu einer fehlerhaften Anpassung der Korrelationsergebnisse. Die Berechnung der um die Differenzfunktion nach Gleichung (4.32) korrigierten Diffusionskorrelationsfunktion folgt Abschnitt 2.4, und kann mit dem nicht stationären Term aus Gleichung (A.3) als

$$\frac{\iint \text{MDF}(\mathbf{r}) \text{MDF}(\mathbf{r}') e^{-\frac{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|^2}{4D\tau}} dV dV'}{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2}, \quad (4.35)$$

mit der Diffusionskonstanten D und der Korrelationszeit τ formuliert werden. Dabei ist im Zähler die integrierte Konzentrationsfluktuation über alle Orte im beobachteten Volumen, also die proportionale Signaländerung bei der Bewegung des Moleküls von einem Ort $\mathbf{r}$ zu

einem Ort $\mathbf{r}'$ gegeben. Dies führt zu:

$$\begin{aligned}
 & \iint \text{MDF}_G^{\sigma,f}(\mathbf{r}) \cdot \text{MDF}_G^{\sigma,f}(\mathbf{r}') \cdot e^{-\frac{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|^2}{4D\tau}} dV dV' \\
 &= \iint \left(e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{w_{xy}^2} + \frac{z^2}{w_z^2}\right)} - c \cdot e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{\sigma_{xy}^2 w_{xy}^2} + \frac{z^2}{\sigma_z^2 w_z^2}\right)} \right) \\
 & \quad \cdot \left(e^{-2\left(\frac{x'^2+y'^2}{w_{xy}^2} + \frac{z'^2}{w_z^2}\right)} - c \cdot e^{-2\left(\frac{x'^2+y'^2}{\sigma_{xy}^2 w_{xy}^2} + \frac{z'^2}{\sigma_z^2 w_z^2}\right)} \right) \\
 & \quad \cdot e^{-\frac{|x-x'|^2+|y-y'|^2+|z-z'|^2}{4D\tau}} dV dV' \\
 &= D\tau \pi^3 w_{xy}^4 w_z^2 \left[\frac{\sqrt{\frac{D\tau}{4D\tau+w_z^2}}}{4D\tau+w_z^2} + \sigma_{xy}^2 \sigma_z c \right. \\
 & \quad \cdot \left(\frac{\sigma_{xy}^2 \sigma_z c \sqrt{\frac{D\tau}{4D\tau+\sigma_z^2 w_z^2}}}{4D\tau+\sigma_{xy}^2 w_{xy}^2} - \frac{4\sqrt{2} \sqrt{\frac{D\tau}{8D\tau+w_z^2(1+\sigma_z^2)}}}{8D\tau+w_{xy}^2(1+\sigma_{xy}^2)} \right) \Big] .
 \end{aligned} \tag{4.36}$$

Der Nenner in Gleichung (4.35) gibt das über das Volumen integrierte, im Mittel beobachtete Signal in der Form

$$\iiint \text{MDF}_G^{\sigma,f}(x,y,z) dx dy dz = \frac{1 - \sigma_{xy}^2 \sigma_z c}{2\sqrt{2}} \pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z \tag{4.37}$$

wieder. Die Diffusions-AKF für die MDF aus Gleichung (4.32) lautet somit:

$$\begin{aligned}
 G_D^{\sigma,c}(\tau) &= \frac{1}{\langle C \rangle \pi^{3/2} (\sigma_{xy}^2 \sigma_z c - 1)^2} \left[\frac{(4D\tau + w_z^2)^{-1/2}}{4D\tau + w_{xy}^2} + \sigma_{xy}^2 \sigma_z c \right. \\
 & \quad \cdot \left(\frac{\sigma_{xy}^2 \sigma_z c (4D\tau + \sigma_z^2 w_z^2)^{-1/2}}{4D\tau + \sigma_{xy}^2 w_{xy}^2} - \frac{4\sqrt{2} (8D\tau + w_z^2 (1 + \sigma_z^2))^{-1/2}}{8D\tau + w_{xy}^2 (1 + \sigma_{xy}^2)} \right) \Big] \\
 &= \frac{1}{\langle C \rangle \pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z (\sigma_{xy}^2 \sigma_z c - 1)^2} \left[\left(1 + \frac{4D\tau}{w_{x,y}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \right. \\
 & \quad + \sigma_{xy}^2 \sigma_z c \left(c \left(1 + \frac{4D\tau}{\sigma_{xy}^2 w_{x,y}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{\sigma_z^2 w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \right. \\
 & \quad \left. \left. - 4\sqrt{2} \left(1 + \sigma_{xy}^2 + \frac{8D\tau}{w_{x,y}^2} \right)^{-1} \left(1 + \sigma_z^2 + \frac{8D\tau}{w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \right) \right] .
 \end{aligned} \tag{4.38}$$

Die Änderung in der AKF kann nun in Form einer Multiplikation der reinen 3D-Gauß-

Diffusions-AKF $G_D(\tau)$ (vgl. Gleichung (2.75)) mit einem durch die Sättigungseffekte gegebenen Korrekturterm $G^{\sigma,c}(\tau)$ formuliert werden:

$$\begin{aligned}
 G_D^{\sigma,c}(\tau) &= G_D(\tau) \cdot G^{\sigma,f}(\tau) \\
 &= G_D(\tau) \cdot \frac{1}{(\sigma_{xy}^2 \sigma_z c - 1)^2} \left[1 + \sigma_{xy}^2 \sigma_z c \left(1 + \frac{4D\tau}{w_{xy}^2} \right) \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{w_z^2}} \right. \\
 &\quad \cdot \left(c \left(1 + \frac{4D\tau}{\sigma_{xy}^2 w_{xy}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{\sigma_z^2 w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \right. \\
 &\quad \left. \left. - 4\sqrt{2} \left(1 + \sigma_{xy}^2 + \frac{8D\tau}{w_{xy}^2} \right)^{-1} \left(1 + \sigma_z^2 + \frac{8D\tau}{w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \right) \right] . \tag{4.39}
 \end{aligned}$$

Die Sättigung des Leuchtverhaltens führt somit zu der in Abbildung 4.11 dargestellten Abnahme der Korrelationsamplitude. Diese entsteht durch einen apparenten Anstieg der mittleren Molekülzahl durch eine Vergrößerung des effektiven Volumens. In den Abbildungen 4.11c und 4.11d ist der Korrekturterm $G^{\sigma,c}(\tau)$ dargestellt. Dieser beschreibt die relative Abweichung von der AKF mit steigender Amplitude c und Breite σ und kann zu einer Abnahme der Amplitude von über 20 % führen, da der negative Term ($4\sqrt{2} \dots$ in Gleichung (4.39)) der bestimmende ist (siehe Abbildung C.3). Wird das autokorrelierte Signal mit der Modellfunktion aus Gleichung (2.77) (3D-Gaußvolumen) angepasst, ergeben sich die in den Abbildungen 4.11e und 4.11f dargestellten Werte. Es fällt auf, dass neben der Amplitude der AKF auch der durch die Diffusionszeit nach Gleichung (2.88b) charakterisierte Anstieg der Korrelationskurve eine Verschiebung zu höheren Werten aufweist. Wie aus den Anpassungsergebnissen und der Betrachtung in Gleichung (4.37) ersichtlich ist, nimmt das Volumen im Vergleich zum einfachen 3D-Gauß-Modell $V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z$ (vgl. die Gleichungen (A.11) und (A.13a)) zu. Es folgt für das effektive Volumen unter Sättigungsbedingungen $V_{\text{eff}}^{\sigma,c}$ dem in Abbildung 4.12 dargestellten Zusammenhang

$$V_{\text{eff}}^{\sigma,c} = \frac{(\sigma_{xy}^2 \sigma_z c - 1)^2}{1 + \sigma_{xy}^2 \sigma_z c \left(-4\sqrt{2} \left(1 + \sigma_{xy}^2 \right)^{-1} \left(1 + \sigma_z^2 \right)^{-1/2} + c \right)} V_{\text{eff}} . \tag{4.40}$$

Der Term vor V_{eff} nimmt Werte von 1 bis 2,5 an und wird im Folgenden als Volumenfaktor bezeichnet, da er zu einer entsprechenden Vergrößerung des effektiven Volumens in der FCS-Analyse führt. Bei gleichen Breitenverhältnissen $\sigma = \sigma_{xy} = \sigma_z$ wird Gleichung (4.40) zu:

$$V_{\text{eff}}^{\sigma,c} = \frac{(\sigma^3 c - 1)^2}{1 + \sigma^3 c \left(-4\sqrt{2} (1 + \sigma^2)^{-3/2} + c \right)} V_{\text{eff}} . \tag{4.41}$$

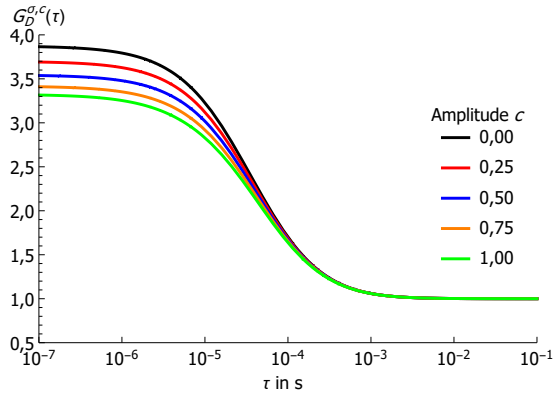
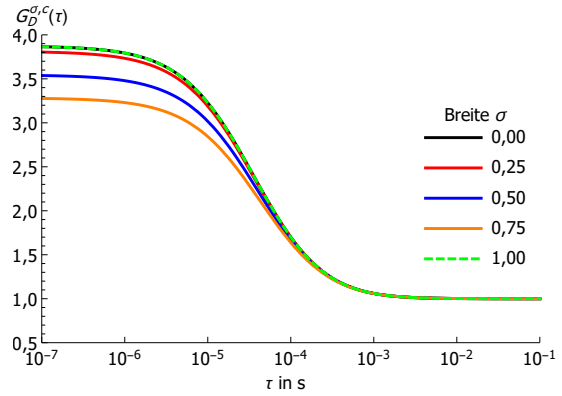
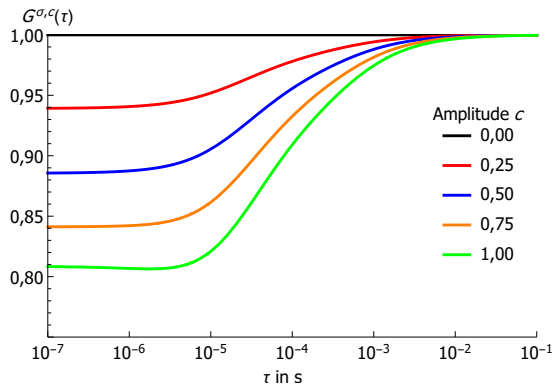
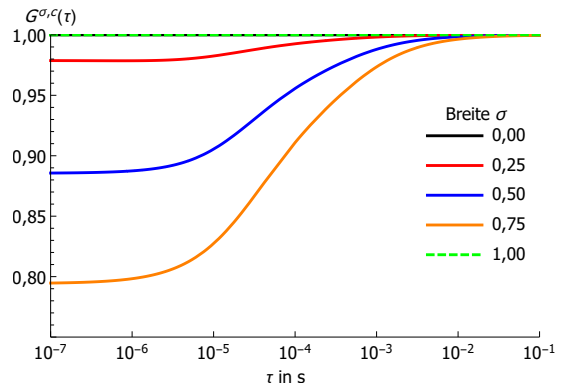
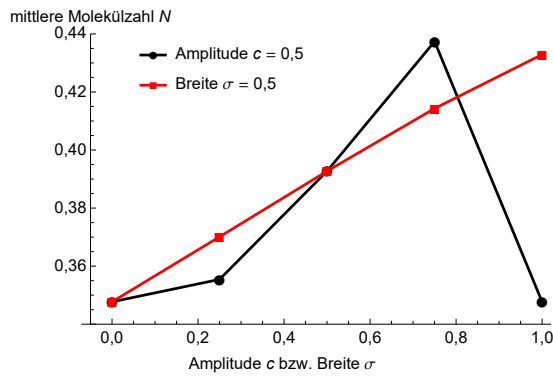
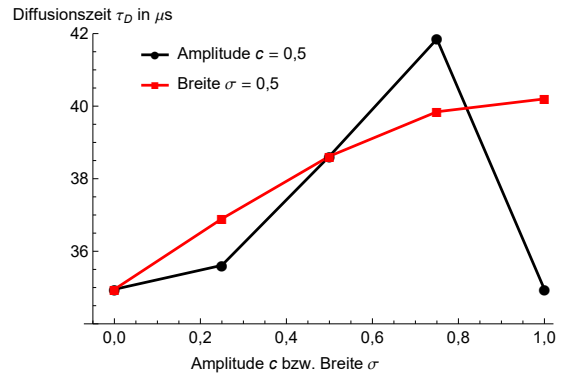

 (a) Gesamt-AKF $G_D^{\sigma,c}(\tau)$ bei unterschiedlichen Amplituden c

 (b) Gesamt-AKF $G_D^{\sigma,c}(\tau)$ bei unterschiedlichen Breiten σ

 (c) Korrekturterm $G^{\sigma,c}(\tau)$ bei unterschiedlichen Amplituden c

 (d) Korrekturterm $G^{\sigma,c}(\tau)$ bei unterschiedlichen Breiten σ

 (e) Einfluss auf die Anpassung der mittleren Molekülzahl N

 (f) Einfluss auf die Anpassung der Diffusionszeit τ_D

Abbildung 4.11: Autokorrelationsfunktion der Diffusion

Die gesamte AKF gemäß der Gleichungen (4.38) und (4.39) ist in (a) bei unterschiedlichen Amplituden c und konstanten Breiten σ_{xy} und σ_z und in (b) bei unterschiedlichen Breiten und konstanter Amplitude c dargestellt. Die Abweichungen zur AKF bei einem 3D-Gaußvolumen $G^{\sigma,f}(\tau)$ sind in (c) und (d) gemäß Gleichung (4.39) abgebildet. Die mit der Amplitude c und Breite σ sinkende Korrelationsamplitude führt nach Gleichung (2.77) zu (e) einem apparenten Anstieg der Molekülzahl und die Verschiebung der Anstiegszeit der Korrelation zu (f) einem Anstieg der Diffusionszeit. Die Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

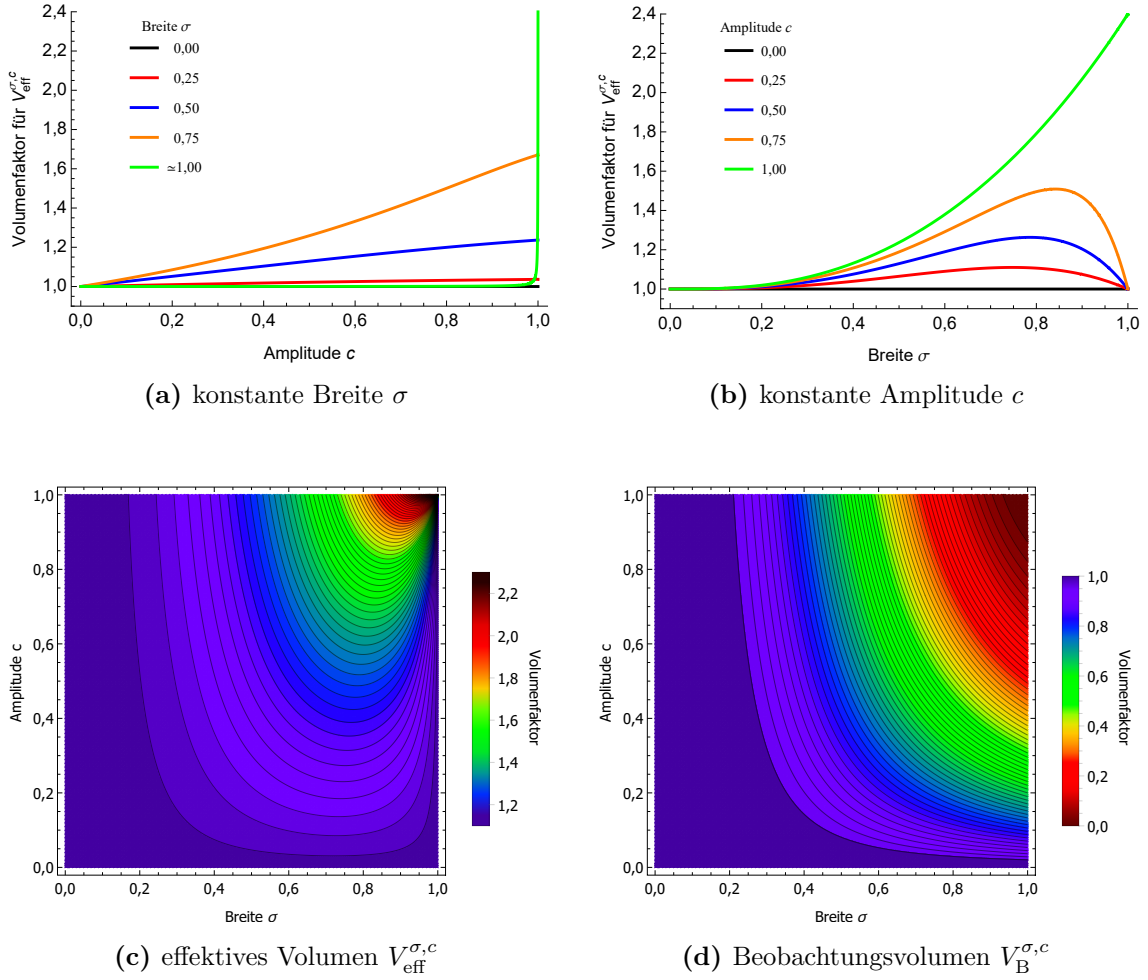


Abbildung 4.12: Effektives Volumen $V_{\text{eff}}^{\sigma,c}$ und Beobachtungsvolumen $V_B^{\sigma,c}$

Nach Gleichung (4.40) führt die Abweichung der MDF von der Gaußform, abhängig vom (a) Amplitudenverhältnis c und (b) Breitenverhältnis σ , zu einem Anstieg des effektiv beobachteten Volumens. Dabei sinkt dieser Anstieg bei hohen Breiten σ ab, da die MDF sich wieder einer Gaußform annähert, was im Konturdiagramm in (c) anhand der Isolinien gut zu erkennen ist. Außerdem fällt auf, dass eine Amplitudenänderung im Vergleich zur Breite einen geringeren Einfluss auf den Volumenfaktor hat. Das nach Gleichung (4.43) in (d) dargestellte Beobachtungsvolumen $V_B^{\sigma,c}$ hingegen sinkt mit steigender Sättigung bzw. Amplitude c und Breite σ .

In Abbildung 4.12b ist zu erkennen, dass bei einem konstanten Amplitudenverhältnis das effektive Volumen ein Maximum anstrebt, welches bei niedrigen Werten c gegen 0 bei einer Breite σ von etwa 0,718 liegt und bei hohen Werten c gegen 1 bei Breiten σ von etwa 1 zu finden ist. Der genaue Zusammenhang ist im Anhang C.1 (Seite XXI) in Abbildung C.4 dargestellt. Für das Beobachtungsvolumen V_B ist der Vergrößerungsfaktor nun im Vergleich zur einfachen Gaußfunktion, die nach Gleichung (2.74)

$$V_B^{3\text{DG}} = \int e^{-4\left(\frac{x^2+y^2}{w_{xy}^2} + \frac{z^2}{w_z^2}\right)} dV = \frac{\pi^{3/2}}{8} w_{xy}^2 w_z \quad (4.42)$$

lautet, durch

$$V_B^{\sigma,c} = \int \left(\text{MDF}_G^{\sigma,f} \right)^2 dV = V_B^{\text{3DG}} \cdot \left(1 + \sigma^3 c \left(-\frac{4\sqrt{2}}{(1+\sigma^2)^{3/2}} + c \right) \right) \quad , \quad (4.43)$$

gegeben⁶. Dies führt mit ausgeschriebenem Amplitudenverhältnis $c = I_1/I_0$, bei dem I_0 für die Amplitude der Anregung und I_1 die Amplitude der Differenzfunktion, die in Abhängigkeit von der Sättigungsleistung I_S durch $I_1 = I_0 - I_S$ gegeben ist, zu:

$$V_B^{\sigma,c} = V_B^{\text{3DG}} \cdot \left(1 + \frac{\sigma^3 (I_0 - I_S) \left(\left(1 - \frac{4\sqrt{2}}{(1+\sigma^2)^{3/2}} \right) I_0 - I_S \right)}{I_0^2} \right) \quad . \quad (4.44)$$

Es fällt auf, dass für $\sigma = 0$ und $I_S = I_0$ keine Änderung des Volumens auftritt ($V_B^{\sigma,c} = V_B^{\text{3DG}}$), wohingegen im Grenzfalle von $\sigma = 1$ das Beobachtungsvolumen eine Änderung um den Faktor I_S^2/I_0^2 erfährt.

Die gesamte Anpassungsfunktion kann nun mithilfe Gleichung (2.88) und unter der Annahme gleicher Breitenverhältnisse σ , sodass $\sigma_{xy} = \sigma_z$ gilt, gemäß der Gleichungen (4.15) und (4.16) als

$$\begin{aligned} G(\tau) &= 1 + G_D^{\sigma,c}(\tau) (G_T(\tau) - G_A(\tau)) \\ &= 1 + \frac{1}{N(\sigma^3 c - 1)^2} \left[\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} + \sigma^3 c \left(c \left(1 + \frac{\tau}{\sigma^2 \tau_D} \right)^{-1} \right. \right. \\ &\quad \cdot \left. \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\sigma^2 \tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} - 4\sqrt{2} \left(1 + \sigma^2 + \frac{2\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left(1 + \sigma^2 + S^2 \frac{2\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \right] \\ &\quad \cdot \left(1 + \frac{\bar{T}}{1 - \bar{T}} \exp \left(-\frac{\tau}{\tau_T} \right) - \frac{1}{1 - \bar{T}} \exp \left(-\frac{\tau}{\tau_A} \right) \right) \end{aligned} \quad (4.45)$$

geschrieben werden. In Abbildung 4.13 sind die leistungsabhängigen Autokorrelationen der Simulation eines 5-Niveau-Systems (letzte Zeile in Tabelle 4.1) dargestellt. Dabei sind die detektierten Emissionsereignisse in den lateralen Fokusschnitten ($z = 0$) der jeweiligen Korrelationskurve in Abbildung 4.13a zu sehen. Das Verhalten ähnelt dem in Abbildung 4.7 dargestellten Wechsel vom gaußförmigen Profil zu einer breiteren und letztlich kreisringförmigen Verteilung. Werden die Korrelationen mit der einfachen Korrelationsfunktion nach Gleichung (4.16) global angepasst, ergeben sich die in Abbildung 4.13a gezeigten Kurven mit den in den Abbildungen 4.13c und 4.13d in schwarz dargestellten Werten für die mittlere Molekülzahl N und die Diffusionszeit τ_D . Die Anpassungsfunktion nach Gleichung (4.45) beinhaltet dabei auch die Anpassungsterme der schnellen Fluktuationen

⁶ Wobei die allgemeine Lösung $V_B^{\sigma,c} = V_B^{\text{3DG}} \cdot \left(1 + \sigma_{xy}^2 \sigma_z c \left(-4\sqrt{2} (1 + \sigma_{xy}^2)^{-1} (1 + \sigma_z^2)^{-1/2} + c \right) \right)$ lautet.

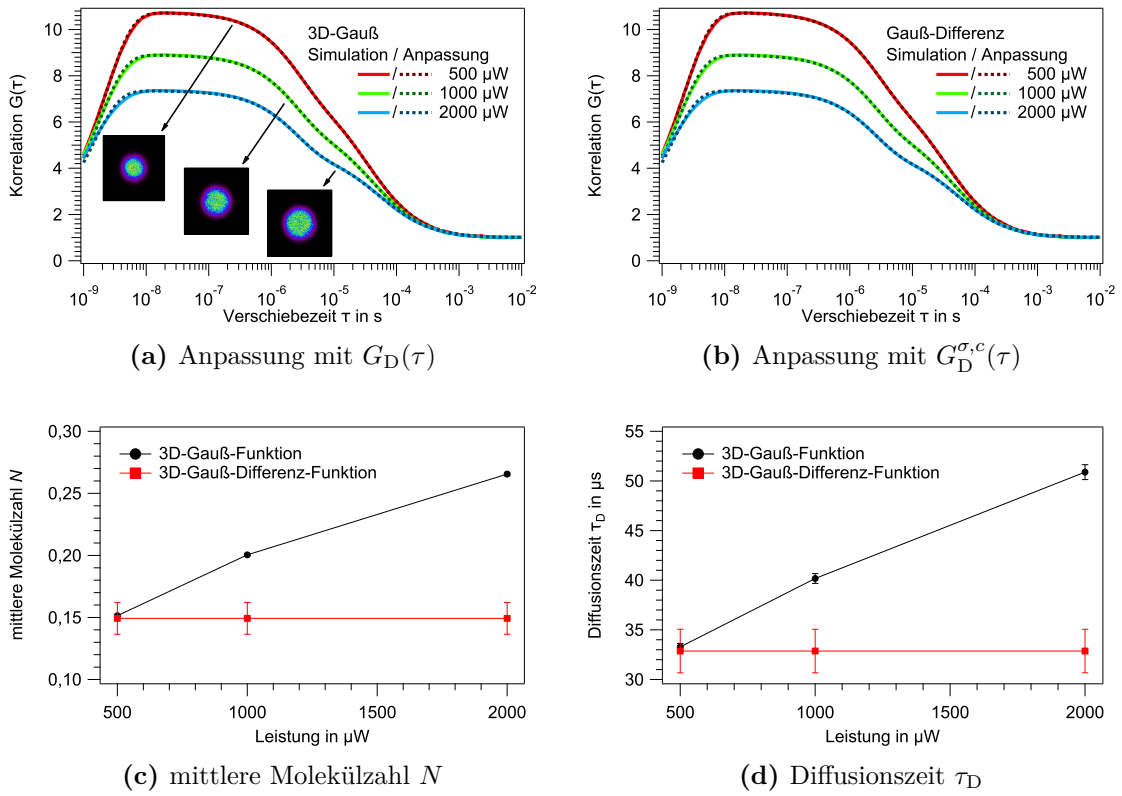


Abbildung 4.13: Vergleich der Anpassungsfunktionen

Die Anpassung der Korrelationskurven eines 5-Niveau-Systems mit Simulationen nach Tabelle 4.1 (höhere $k_{S_{n \rightarrow 1}} / k_{T_{n \rightarrow 1}}$) nach dem Standard-3D-Gauß-Modell entsprechend Gleichung (4.45) führt zu den Kurven in (a) und der mittleren Molekülzahl in (c) und Diffusionszeit in (d) (beide schwarz). In (b) ist die Anpassung nach dem Gauß-Differenz-Modell dargestellt, die in (c) und (d) rot dargestellt ist. Die übrigen Korrelationswerte sind in Abbildung C.5 zu finden. Zusätzlich sind die lateralen Fokusschnitte ($z = 0$) der detektierten Fluoreszenzereignisse in (a) dargestellt. Die Verbindungslinien der Punkte in (c) und (d) dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

(Tripletverhalten und Antibunching gemäß Abschnitt 4.1). Die entsprechenden Parameter sind im Anhang C.1 in Abbildung C.5 dargestellt.

Die mittlere Molekülzahl und Diffusionszeit steigen wie erwartet aufgrund der mit der Anregungsleistung größer werdenden Abweichung der MDF von der 3D-Gaußform (vgl. die Abbildungen 4.11 und 4.12). Die globale Anpassung der Korrelation nach Gleichung (4.45) führt zu den in Abbildung 4.13b dargestellten Kurven, die die simulierten Messwerte ebenso gut abbilden wie die 3D-Gauß-Anpassung in Abbildung 4.13a. Allerdings ist in den Abbildungen 4.13c und 4.13d in rot zu erkennen, dass unter Berücksichtigung der nach Gleichung (4.32) abweichenden MDF keine Änderung der mittleren Molekülzahl und der Diffusionszeit mit steigender Anregungsintensität stattfindet. Das entspricht der intuitiven Erwartung, dass die mittlere Anzahl der Moleküle lediglich von der Konzentration der Fluorophore, sowie deren Diffusionsgeschwindigkeit vom Diffusionskoeffizienten und nicht von der Anregungsleistung abhängen sollte. Die übrigen Korrelationswerte (wie die Sätti-

gungsparameter c und σ , sowie die Triplett- und Antibunching-Anpassungswerte) sind in Abbildung C.5 zu finden und den Ergebnissen der Korrelationsanalyse nach Gleichung (4.16) gegenübergestellt.

4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Aus der Betrachtung der Übergangsmatrix der intramolekularen Zustände entsprechend Gleichung (4.1), konnte das in der Fluktuationsspektroskopie beobachtete zeitabhängige Leuchtverhalten für Drei-Niveau-Systeme übereinstimmend mit der Literatur bestimmt werden [192, 200, 202, 203, 230]. Höhere Singulett- und Triplettzustände führen analog zum von Winckler und Jaffiol [211] bestimmten Verlauf der MB zu nichtlinearen Abweichungen der Fluoreszenzantwort in Abhängigkeit vom Ort des betrachteten Fluorophors. Bei hohen Anregungsleistungen ($> 100 \text{ kW cm}^{-2}$) resultieren Mehr-Photonen-Absorptionszyklen so in einem Abfall der MB. Darüber hinaus wurde das Fluktuationsverhalten in Hinblick auf die schnelle Photophysik hergeleitet und in der Form von Anpassungsfunktionen formuliert. Dabei ist hervorzuheben, dass die Änderungen des Blinkverhaltens und des Abfalls der MB ohne Photobleichreaktionen beobachtbar sind, die unabhängig vom bekannten und ausführlich untersuchten Bleichverhalten unter Sättigungsbedingungen [40, 204, 231] auftreten.

Mithilfe einer in Zusammenarbeit mit Till Zickmantel entwickelten Monte-Carlo-Simulation konnte das Fluktuationsverhalten von Fluorophoren auf Grundlage einer modularen Trennung der physikalischen Prozesse betrachtet werden. Im Vergleich zu früheren Simulationen [232–234] werden hier keine festen Zeitschritte und vordefinierten Wahrscheinlichkeitsmaße wie z. B. vorgegebene Quanteneffizienzen oder analytische Lösungen des Leuchtverhaltens benötigt, womit eine einfache Manipulation der Anregungs- und Detektionsfunktion (siehe Abschnitt 3.3), sowie des photophysikalischen Verhaltens des Fluorophors im Rahmen des in dieser Arbeit verwendeten Energieniveauschema-Modells, ermöglicht wird. Die variable Betrachtung des komplexen Leuchtverhaltens konnte so auf einer äußerst weiten Zeitskala von der Diffusion ($\sim \text{ms}$) bis zum Antibunching ($\leq \text{ns}$) stattfinden. Die Simulation höherer Singulett- und Triplettzustände resultiert bei der Betrachtung der ortsspezifischen Fluoreszenzantwort in einer fehlerhaften Mittelung über das effektive Volumen bei der FCS-Analyse unter Sättigungsbedingungen und führt so zu einer falschen Einschätzung der Diffusionszeit und der mittleren Molekülzahl.

Zur Korrektur der beschriebenen Effekte wird eine empirische Näherung der Sättigungs-MDF in Form einer Gauß-Differenz-Funktion entwickelt, die bei entsprechender Wahl der Parameter bzw. durch einfache Umformungen ebenfalls zur Beschreibung der Sättigungsfunktion bei der STED- und Zwei-Photonen-Mikroskopie genutzt werden kann [228, 229]. Die bereits explizit untersuchten Sättigungseffekte der FCS in Bezug auf die Diffusion gemäß Enderlein et al. [235] bzw. bezüglich des Triplettverhaltens entsprechend Widengren, Mets und Rigler [203] und Schönle et al. [236] können so im Bereich hoher Anregungsraten erweitert werden. Dazu wurde aus der empirisch basierten MDF eine modifizierte Anpassungsfunktion für die Autokorrelationsanalyse unter Sättigungsbedingungen hergeleitet und bezüglich ihres Verhaltens bei unterschiedlicher Parameterwahl charakterisiert sowie erfolgreich auf die simulierten Daten angewandt.

Kapitel 5

Immobilisierte Moleküle

Entgegen der Messung einzelner, diffundierender Moleküle, bietet die Betrachtung immobilisierter Farbstoffe einige Vorteile. So limitiert das Verhältnis von Diffusion zu konfokalem Volumen die effektive Beobachtungszeit nicht, was zu theoretisch beliebig langen Intensitätszeitspuren einzelner Moleküle führt und somit Einblick in die grundlegende Heterogenität des Verhaltens bietet. Es ist möglich, die Photophysik auf der Grundlage der Statistik eines Moleküls und nicht wie in Diffusionsexperimenten der Mittelung der Statistik vieler einzelner Moleküle zu untersuchen. Außerdem findet keine Überlagerung von möglichen kinetischen Prozessen im Diffusionsbereich der AKF statt, wodurch auch langsame Prozesse (im ms-Bereich) sichtbar werden. Zusätzlich ist die Betrachtung der in Abschnitt 4.2 aufgeführten Volumenmittlungen im Idealfall nicht nötig, da direkt die der Anregung entsprechende Signalantwort (ohne eine relevante Verschiebung des Ortes und der damit verbundenen Helligkeitsfluktuation) beobachtet werden kann.

5.1 Simulation und Analyse eines Drei-Niveau-Systems

Da bei der Analyse immobilisierter Moleküle der diffusive Signalanteil (vgl. Abschnitt 2.4) verschwindet, kann das erhaltene Signal vollständig durch das in Abschnitt 2.2.3 definierte Energieniveauschema beschrieben werden. Dies führt zu Korrelationskurven, wie sie in Abbildung 5.1 dargestellt sind. Zu sehen sind die Simulationen eines immobilisierten Moleküls mit drei elektronischen Zuständen im Laserfokus und der im Inset dargestellten, entsprechenden MB¹ bei unterschiedlichen Leistungen. Der dargestellte Datensatz besteht aus fünfzig einzelnen Simulationen bei äquidistanten Anregungsleistungen von 1 μW bis 2 mW bzw. Anregungsintensitäten von 1,6 kW cm^{-2} bis 3,2 MW cm^{-2} bei einer Wellenlänge von 488 nm und einem lateralen Fokusparameter von $w_{xy} = 200 \text{ nm}$. Das jeweils betrachtete Molekül befindet sich im geometrischen Zentrum ($x = y = z = 0$) der Anregungs- und Detektionsfunktion.

¹ Bei der Betrachtung eines einzelnen immobilisierten Moleküls entspricht das korrigierte Intensitätssignal direkt der MB (siehe Abschnitt 2.2).

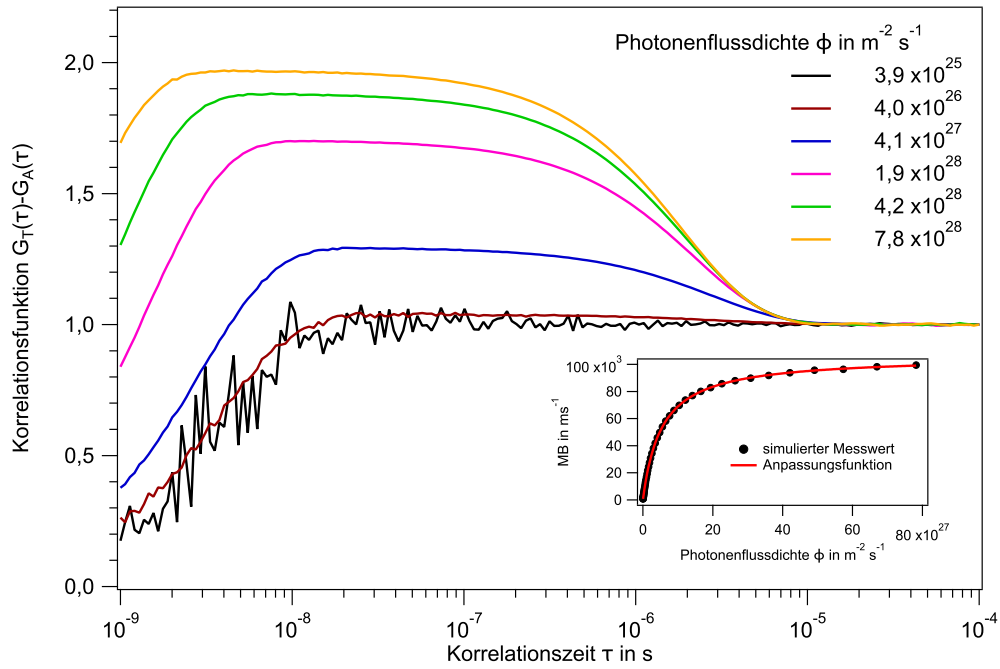


Abbildung 5.1: Simulierte Korrelationsfunktion immobilisierter Moleküle

Sechs beispielhaft ausgewählte, angepasste Autokorrelationsfunktionen der Simulation eines immobilisierten Moleküls mit einem molekularen Absorptionswirkungsquerschnitt von $\sigma_{S_0 \rightarrow 1} = 2,1 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$, einer radiativen Rate von $k_{\text{rad}} = 224,4 \text{ MHz}$, der inneren Umwandlungsrate $k_{\text{IC}} = 19 \text{ MHz}$, der Interkombinationsrate $k_{\text{ISC}} = 290 \text{ kHz}$ und der Rück-Interkombinationsrate $k_{\text{rISC}} = 260 \text{ kHz}$. Mit steigendem Photonenfluss werden die Dunkelzeiten zwischen einzelnen Photonen kürzer (siehe Abschnitt 4.1.1, Antibunching) und führen zu einem Abfall der Korrelationskurve im Bereich von wenigen Nanosekunden. Gleichzeitig steigt der Triplettanteil und führt zu einer erhöhten Blinkrate und Amplitude der Korrelationsfunktion im Mikrosekundenbereich. Die im Inset dargestellte MB steigt mit der Anregungsleistung gemäß Gleichung (5.1) (Anpassung in rot) und nähert sich einem Maximalwert von 106 Photonen je Millisekunde. Jeder schwarze Punkt entspricht hier einer Simulation bzw. Korrelationskurve, die nach Gleichung (4.9) und Gleichung (4.14) angepasst und ausgewertet ist (siehe Text).

Die Bestimmung der anregungsseitigen Photonenflussdichte aus diesen, dem realen Experiment zugänglichen Größen, ist bei Gleichung (6.3) (Seite 128) zu finden. Die Simulation findet auf Basis der Photonenflussdichten statt, die daher im Folgenden angegeben werden. Dabei ist in Abbildung 5.1 klar ein Ansteigen der Korrelationsamplitude (und somit auch des Triplettanteils), sowie eine Verschiebung des Abfalls der Korrelationsfunktion zu kürzeren Zeiten mit steigender Anregungsleistung bzw. Photonenflussdichte zu sehen. Die MB steigt anfangs linear und sättigt bei höherer Anregung gegen einen Maximalwert ab.

Die molekulare Helligkeit in Abhängigkeit von der anregenden Photonenflussdichte kann nach Gleichung (4.6) mittels der Anpassungsfunktion

$$\text{MB}(\phi) = \eta \cdot \Phi_F \left(\frac{1}{\phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1}} + \tau_0 \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} \right) \right)^{-1} \quad (5.1)$$

beschrieben werden. In der halblogarithmischen Darstellung in Abbildung 5.2 ist die globale

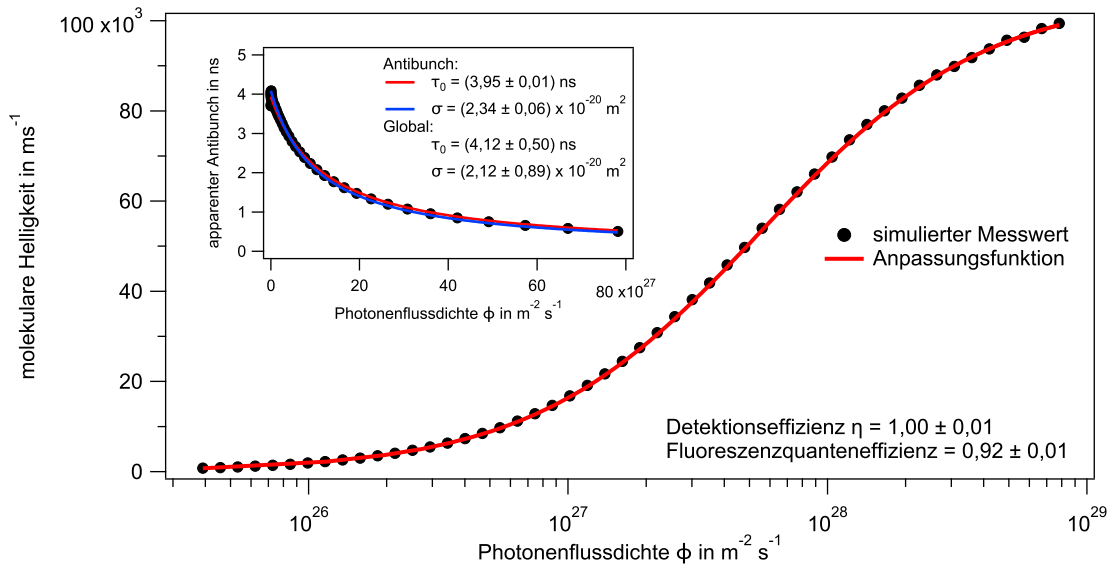


Abbildung 5.2: Molekulare Helligkeit eines Drei-Niveau-Systems

Dargestellt ist der Anstieg der MB bei einem Drei-Niveau-System im immobilisierten Zustand mit einer globalen Anpassungsfunktion in rot nach Gleichung (5.1). Die anregungsseitigen Photonenflussdichten entsprechen Anregungsleistungen von $1 \mu\text{W}$ bis $2000 \mu\text{W}$ bzw. Anregungsintensitäten von $1,6 \text{ kW cm}^{-2}$ bis $3,2 \text{ MW cm}^{-2}$. Die Messwerte (schwarze Punkte) der simulierten transienten Intensität nähern sich dem durch Gleichung (5.2) bestimmten Maximalwert von 106 MHz . Die Quanten- und Detektionseffizienzen stimmen mit den simulierten Werten überein und zeigen lediglich Abweichungen im unteren Prozentbereich. Der im Inset dargestellte Verlauf der Antibunching-Zeit für einen vorgegebenen molekularen Absorptionswirkungsquerschnitt (rot - Anpassung der Fluoreszenzlebensdauer) und eine vorgegebene Fluoreszenzlebensdauer (blau - Anpassung des molekularen Wirkungsquerschnitts) stimmt mit dem nach Gleichung (5.3) erwarteten Verlauf überein und führt mit einer Lebensdauer / einem molekularen Absorptionswirkungsquerschnitt von $(3,95 \pm 0,01) \text{ ns} / (2,34 \pm 0,06) \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$ zu einer Abweichung von $0,15 \text{ ns} / 0,24 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$ zum simulierten Wert von $4,10 \text{ ns} / 2,10 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$. Die globale Anpassung resultiert bei analog vorgegebenen Parametern in einer Lebensdauer von $(4,12 \pm 0,50) \text{ ns}$ und einem molekularen Wirkungsquerschnitt von $(2,12 \pm 0,89) \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$.

Anpassung der Simulationsdaten mit drei Zuständen dargestellt. Die simulierte radiative Rate beträgt $k_{\text{rad}} = 224,4 \text{ MHz}$ und die nicht radiativen Raten der inneren Konversion $k_{\text{IC}} = 19 \text{ MHz}$ und der Interkombination $k_{\text{ISC}} = 290 \text{ kHz}$. Die Anpassungsfunktion liefert für eine Fluoreszenzquanteneffizienz von $Q = 0,92$ bei einem simulierten molekularen Absorptionswirkungsquerschnitt für den $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang von $\sigma = 2,1 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$ eine Detektionseffizienz von $\eta = 1$, was aufgrund der nicht betrachteten Raumwinkelabdeckung der Detektionsoptik sowie der nicht beachteten Verluste an optischen Elementen wie Bandpassfiltern, Strahlteilern und Detektoren exakt den simulierten Werten entspricht. Es ist zu bemerken, dass die MB nach Gleichung (5.1) einen Maximalwert anstrebt, der

$$\text{MB}_{\text{max}} = \eta \frac{k_{\text{rad}}}{1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}}} \quad (5.2)$$

entspricht (vgl. Gleichung (4.4b)) und in diesem Fall 106 MHz beträgt. Im Inset von

Abbildung 5.2 ist der Abfall der Antibunchzeit zu sehen. Diese wird als apparentes Antibunching bezeichnet, da die beobachtete Größe im Gegensatz zu anderen Messmethoden (siehe Abschnitt 2.2.3) in der FCS direkt von der Anregungsrate abhängig ist. Die aus der entsprechend Gleichung (4.14), unter der Bedingung, dass $k_{\text{ex}}, k_{\text{rad}}, k_{\text{IC}} \gg k_{\text{ISC}}, k_{\text{rISC}}$ gilt, aufgestellten Anpassungsfunktion

$$\tau_A = \left(\phi \sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}} + \tau_0^{-1} \right)^{-1} \quad (5.3)$$

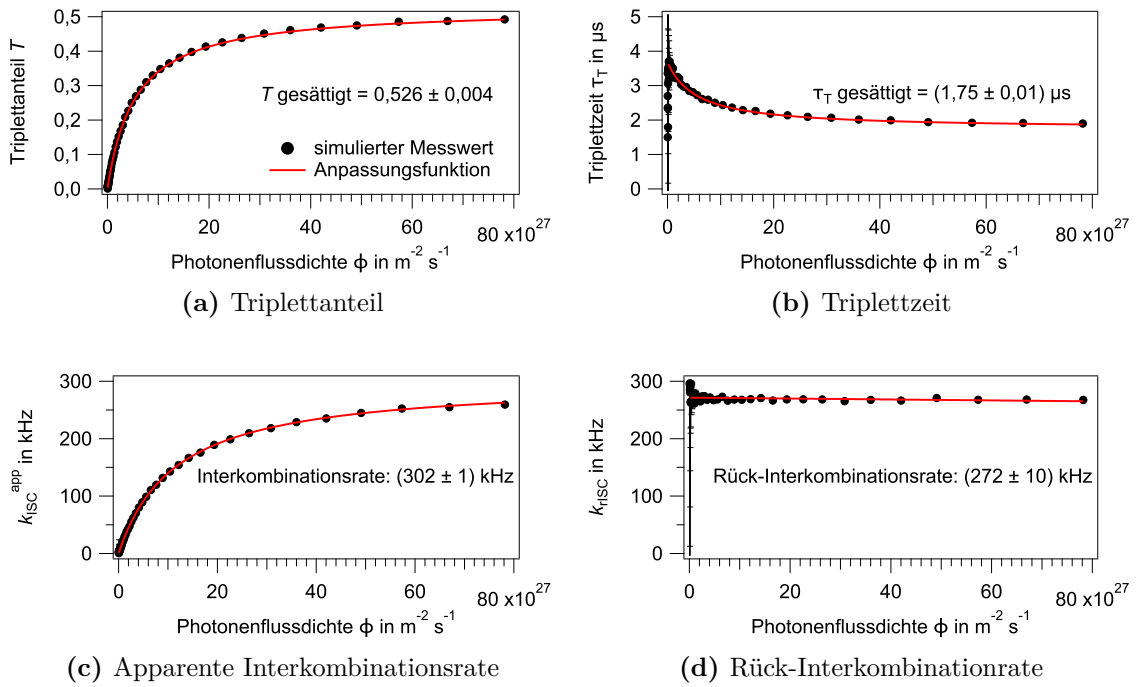
erhaltene Lebensdauer beträgt $(3,95 \pm 0,01) \text{ ns}$ und weicht somit von der simulierten Lebensdauer $4,10 \text{ ns}$ (mit einer natürlichen Lebensdauer von $\tau_n = 4,46 \text{ ns}$) um etwa $0,15 \text{ ns}$ ab. Obwohl das nur einer Abweichung von vier Prozentpunkten entspricht, verhindert dies eine genaue Bestimmung der nach Gleichung (2.35) in der Lebensdauer τ_0 enthaltenen Raten aus einer globalen Anpassung der Korrelationsergebnisse. Das liegt primär an der unterschiedlichen Größenordnung der simulierten Raten, welche zum Teil um einen Faktor von $1 \cdot 10^3$ voneinander abweichen. Zusätzlich führen die Näherungen im Rahmen der Herleitung zu geringen Abweichungen der Anpassung gemäß Gleichung (5.3) von der in Gleichung (B.14b) und Gleichung (B.23b) bestimmten Form.

Umgekehrt kann bei hohen Leistungen der molare Absorptionswirkungsquerschnitt σ über den Anstieg $k_{\text{ex}}/\phi = \sigma$ mit einer entsprechenden Ungenauigkeit bestimmt werden [237]. Mit bekannter Fluoreszenzlebensdauer τ_0 und einer entsprechenden Zeitauflösung und Statistik ist die Bestimmung des molaren Absorptionswirkungsquerschnitts über Gleichung (5.3) zudem auch bei niedrigeren Leistungen möglich, wodurch der Einfluss der Sättigung und des Photobleichens verringert werden kann.

In Abbildung 5.3 sind die aus den mittels der Gleichungen (4.9) und (4.14) angepassten Autokorrelationsfunktionen bestimmten Werte für die Triplettparameter dargestellt. Die Anpassungsfunktionen wurden dabei global auf die Triplettwerte und molekularen Helligkeitswerte (aus Abbildung 5.2 bzw. im Inset in Abbildung 5.1) angepasst. Es fällt auf, dass alle Anpassungsfunktionen den simulierten Werten sehr nahe kommen, diese jedoch nicht genau reproduzieren. Eine hohe Übereinstimmung mit den Simulationsparametern kann beim Tripletanteil (siehe Abbildung 5.3a) beobachtet werden. Der nach Gleichung (4.13) erwartete maximale Tripletanteil ist durch

$$T_{\text{max}} = \left(1 + \frac{k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ISC}}} \right)^{-1} \quad (5.4)$$

gegeben und beträgt unter der simulierten Rück-Interkombinationsrate $k_{\text{rISC}} = 260 \text{ kHz}$ einem Tripletanteil von $T_{\text{max}} = 0,527$, was nahezu genau mit dem Wert aus der Anpassungsfunktion von $0,526 \pm 0,004$ übereinstimmt. Die in Abbildung 5.3b dargestellte Tripletzeit charakterisiert die mittlere Dauer der durch Interkombinationsvorgänge hervorgerufenen Dunkelzustände. Die minimale Tripletzeit bei hoher eingestrahelter Leistung


Abbildung 5.3: Triplettparameter und Interkombinationsraten

Zu sehen ist die globale Anpassung der Simulation eines im Fokus immobilisierten Moleküls mit drei Zuständen. Die anregungsseitigen Photonenflussdichten entsprechen Anregungsleistungen von $1 \mu\text{W}$ bis $2000 \mu\text{W}$ bzw. Anregungsintensitäten von $1,6 \text{ kW cm}^{-2}$ bis $3,2 \text{ MW cm}^{-2}$. Jeder schwarze Punkt entspricht der Auswertung einer Anpassungsfunktion der Korrelation des simulierten Moleküls im Laserfokus. Die roten Linien stellen den Verlauf der Anpassungsfunktionen dar. Die Simulationsparameter sind im Text gegeben. Die Anpassung der Korrelation der simulierten Intensitätsfluktuationen führt zu einer deutlichen Übereinstimmung mit den simulierten Werten. Dabei sättigt (a) der Tripletanteil bei einem Maximum von $T = 0,526 \pm 0,004$. Der simulierte Wert beträgt nach Gleichung (5.4) $T_{\text{max}} = 0,527$. (b) Der simulierte Grenzwert der Tripletzeit beträgt nach Gleichung (5.5) $1,82 \mu\text{s}$. Die Anpassungsfunktion führt zu einem Wert von $(1,75 \pm 0,01) \mu\text{s}$. (c) Die Anpassung nach Gleichung (4.10) liefert eine Interkombinationsrate von $k_{\text{ISC}} = (302 \pm 1) \text{ kHz}$ bei einer simulierten Rate von $k_{\text{ISC}} = 290 \text{ kHz}$. (d) Die entsprechend Gleichung (2.89b) bestimmte Rück-Interkombinationsrate beträgt $k_{\text{rISC}} = (272 \pm 10) \text{ kHz}$ bei einem simulierten Wert von $k_{\text{rISC}} = 260 \text{ kHz}$.

entspricht nach Gleichung (4.12b):

$$\tau_{T, \text{max}} = (k_{\text{rISC}} + k_{\text{ISC}})^{-1} \quad . \quad (5.5)$$

Dies führt zu einem erwarteten Wert von $\tau_{T, \text{max}} = 1,82 \mu\text{s}$. Analog zur Abweichung beim apparenten Antibunching, weicht die angepasste Tripletzeit mit $(1,75 \pm 0,01) \mu\text{s}$ um 4 % vom simulierten Wert ab. Unter der gleichen Argumentation wie bei der Anpassungsfunktion für das apparente Antibunching (siehe Gleichung (5.3)), treten diese Abweichungen größtenteils durch Näherungen der Gleichungen (B.14c) und (B.23c) im Rahmen der Herleitung der Anpassungsfunktion für τ_T auf. Die nach Gleichung (2.89) berechneten Interkombinationsraten sind in den Abbildungen 5.3c und 5.3d aufgetragen und weichen für die Interkombinationsrate mit $k_{\text{ISC}} = (302 \pm 1) \text{ kHz}$ um 4 % und für die

Tabelle 5.1: Simulierte und durch die Anpassung bestimmte Werte

Die Gegenüberstellung der simulierten und aus der FCS-Analyse gewonnenen Werte zeigt eine gute Übereinstimmung der Triplettparameter. Die Werte für den molekularen Wirkungsquerschnitt und die Fluoreszenzlebensdauer sind dabei aus dem Antibunching bestimmt. Die Werte für die Bestimmung aus der globalen Anpassungsfunktion sind im Text und in Abbildung 5.2 zu finden.

	k_{ISC} in kHz	k_{rISC} in kHz	$\tau_{\text{T, max}}$ in μs	T_{max} in %	σ in 10^{-20} m^2	τ_0 in ns
Simulation	290	260	1,82	52,7	2,10	4,10
Anpassung	302 ± 1	272 ± 10	$1,75 \pm 0,01$	$52,6 \pm 0,4$	$2,34 \pm 0,06$	$3,95 \pm 0,01$

Rück-Interkombinationsrate mit $k_{\text{rISC}} = (272 \pm 1) \text{ kHz}$ um 5 % vom jeweils simulierten Wert ab. Dabei ist die in rot dargestellte Anpassung der Interkombination durch Gleichung (4.10) gegeben. Die Anpassungsfunktion für die Rück-Interkombination folgt einer einfachen Geradengleichung, wobei die geringe Steigung (hier: $(-8 \pm 3) \cdot 10^{-26} \text{ m}^2$) in die Fehlerangabe einberechnet ist. Im Idealfall sollte keine Steigung auftreten bzw. diese Null sein, sodass die Rück-Interkombinationsrate leistungsunabhängig einen konstanten Wert liefert.

Die Bestimmung des molekularen Wirkungsquerschnittes aus dem Antibunching ist mit einer Abweichung von über 10 % zum simulierten Wert ungenau im Vergleich zu den Bestimmten Triplettraten. Die Bestimmung aus der globalen Anpassungsfunktion liefert zwar einen genaueren Wert, der aber einen sehr großen Anpassungsfehler von 42 % des eigentlichen Wertes aufweist. Obgleich die Triplettraten tendenziell zu hoch bestimmt sind, zeigen sie insgesamt eine gute Übereinstimmung von etwa 96 % mit den simulierten Ratenwerten. In Tabelle 5.1 sind diese simulierten und aus der Simulation über die FCS-Analyse bestimmten Parameter zusammengefasst.

5.2 Simulation und Analyse von Mehr-Niveau-Systemen

Wie bereits in Abschnitt 4.2 erläutert, können gerade unter hoher Anregungsleistung Mehr-Photonen-Prozesse auftreten. Im Folgenden wird die beschleunigte Rück-Interkombination über höhere Triplettzustände und anschließend das Verhalten der aus der Korrelationsanalyse zugänglichen Parameter für unterschiedliche elektronische Zustände und Übergangsraten dargestellt.

5.2.1 Beschleunigte Rück-Interkombination

Im Gegensatz zu der bisher mittels der FCS-Analyse erhaltenen konstanten Depopulation des Triplettzustandes des Drei-Niveau-Systems, kann bei manchen Farbstoffen eine leistungsabhängige Erhöhung der Rück-Interkombinationsrate beobachtet werden (wie es unter anderem in Abbildung C.24a auf Seite XXXIX zu sehen ist). Dieses vom betrachteten Farbstoff abhängige Verhalten kann durch einen zusätzlichen rotverschobenen Anregungslaser verstärkt und zum Beispiel zur Signaloptimierung genutzt werden [39]. Das durch die beschleunigte Rück-Interkombination modulierte Leuchtverhalten bzw. Blinken der Farbstoffe kann auch zur Manipulation und im Rahmen der Erstellung organischer Leuchtstoffe für unterschiedliche Anwendungsfelder genutzt werden [238, 239]. Einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen nehmen eine Erhöhung der Rück-Interkombination aufgrund einer relevanten Besetzung höherer Triplettzustände mit anschließender Interkombination in den radiativen Singulett an [201].

Analog zum Vorgehen in Abschnitt 2.4 ist es hilfreich, das zugrunde liegende Ratensystem mit der in Abschnitt 2.2.3 formulierten Lösung des Drei-Niveau-Systems und der

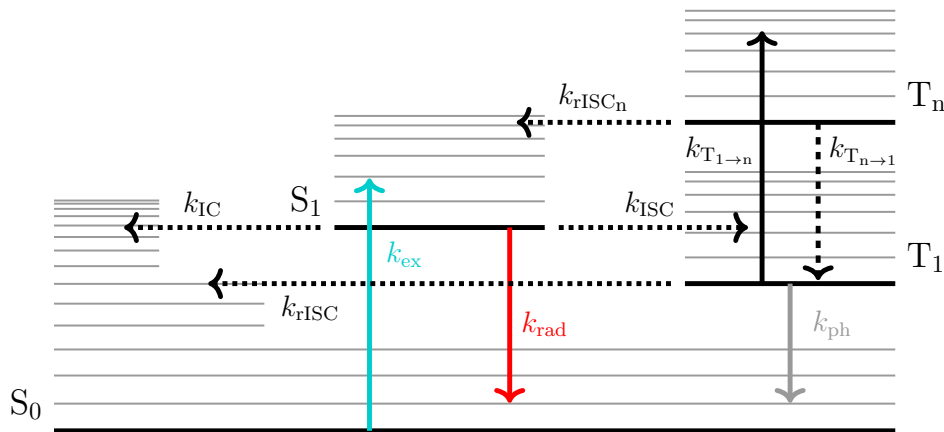


Abbildung 5.4: Beschleunigte Rück-Interkombination

Das Modell der beschleunigten Rück-Interkombination beschreibt, dass die Anregung höherer Triplettzustände und anschließende Rück-Interkombination mittels der Rate k_{rISCn} zu einer zusätzlichen leistungsabhängigen Population des elektronischen S₁-Zustandes führt. Im Rahmen der Anpassung der Korrelationskurven würde dies zu einem Anstieg des Anpassungsparameters der Rück-Interkombinationsrate k_{rISC} führen, da bei steigender Photonenflussdichte die Depopulation des Triplett-Grundzustandes zunähme.

Approximation, dass die Interkombinationsvorgänge langsam gegen die Anregungs- und Relaxationsraten sind, als

$$\dot{S}_0 = -k_{\text{ex}}S_0 + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})S_1 + \left(k_{\text{rISC}} - \frac{k_{\text{rISC}}k_{\text{T}_{1 \rightarrow n}}}{k_{\text{rISC}} + k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}}\right)T \quad , \quad (5.6a)$$

$$\dot{S}_1 = k_{\text{ex}}S_0 - (k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}})S_1 + \frac{k_{\text{rISC}_n}k_{\text{T}_{1 \rightarrow n}}}{k_{\text{rISC}} + k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}}T \quad , \quad (5.6b)$$

$$\dot{T} = k_{\text{ISC}}S_1 - \left(k_{\text{rISC}} - \frac{k_{\text{rISC}}k_{\text{T}_{1 \rightarrow n}}}{k_{\text{rISC}} + k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}} + \frac{k_{\text{rISC}_n}k_{\text{T}_{1 \rightarrow n}}}{k_{\text{rISC}} + k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}}\right)T \quad . \quad (5.6c)$$

zu schreiben. Diese Ratengleichungen entsprechen dem in Abbildung 5.4 dargestellten Modell und führen durch Lösen der Eigenwertgleichung und mit wiederholter Anwendung der Approximation, dass die Interkombinationsvorgänge langsam gegen die Anregungs- und Relaxationsraten sind, zu der Triplettzeit τ_T^{acc} :

$$\tau_T^{\text{acc}} \approx \left(\frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \left(1 - \frac{k_{\text{T}_{1 \rightarrow n}} \left(1 + \frac{k_{\text{rISC}_n}}{k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}} \right)}{k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}} \right) - \frac{k_{\text{rISC}_n}k_{\text{T}_{1 \rightarrow n}}}{k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}} \right)^{-1} \quad . \quad (5.7)$$

Im Vergleich zur Triplettzeit τ_T des Drei-Niveau-Systems (siehe Gleichung (4.8)) wird die beobachtete Triplettzeit um einen Faktor der Form

$$\tau_T^{\text{acc}} = \tau_T \left(1 - \frac{k_{\text{T}_{1 \rightarrow n}} (k_{\text{rISC}}k_{\text{rISC}_n} - (k_{\text{rISC}} + k_{\text{rISC}_n})k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}})}{(k_{\text{ISC}}^{\text{app}} + k_{\text{rISC}})k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}^2} \right)^{-1} \quad (5.8)$$

verringert. In Abbildung 5.5b ist diese Abnahme für die Simulation eines immobilisierten Moleküls mit den Simulationsparametern aus Abschnitt 5.1 und einem entsprechend inkludierten Triplett-niveau T_n für vier verschieden hohe Rück-Interkombinationsraten in den angeregten Singulettzustand zu sehen. Der molekulare Absorptionswirkungsquerschnitt der Anregung eines höheren Triplett-niveaus $\sigma_{\text{T}_{1 \rightarrow n}}$ entspricht dem des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs. Die Depopulationsrate $k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}}$ beträgt in allen simulierten Fällen 4 GHz, und die Rück-Interkombination aus dem T_n -Zustand in den angeregten Singulett ist für vier verschiedene Werte dargestellt. Dabei resultiert durch die Rückkehrate aus dem höheren Triplettzustand in den Singulettzustand eine leistungsabhängige Verringerung der Triplettamplitude A_T gemäß

$$A_T = \frac{k_{\text{ISC}}^{\text{app}}}{k_{\text{rISC}}} (1 - k_{\text{T}_{1 \rightarrow n}}\xi) \quad , \quad (5.9)$$

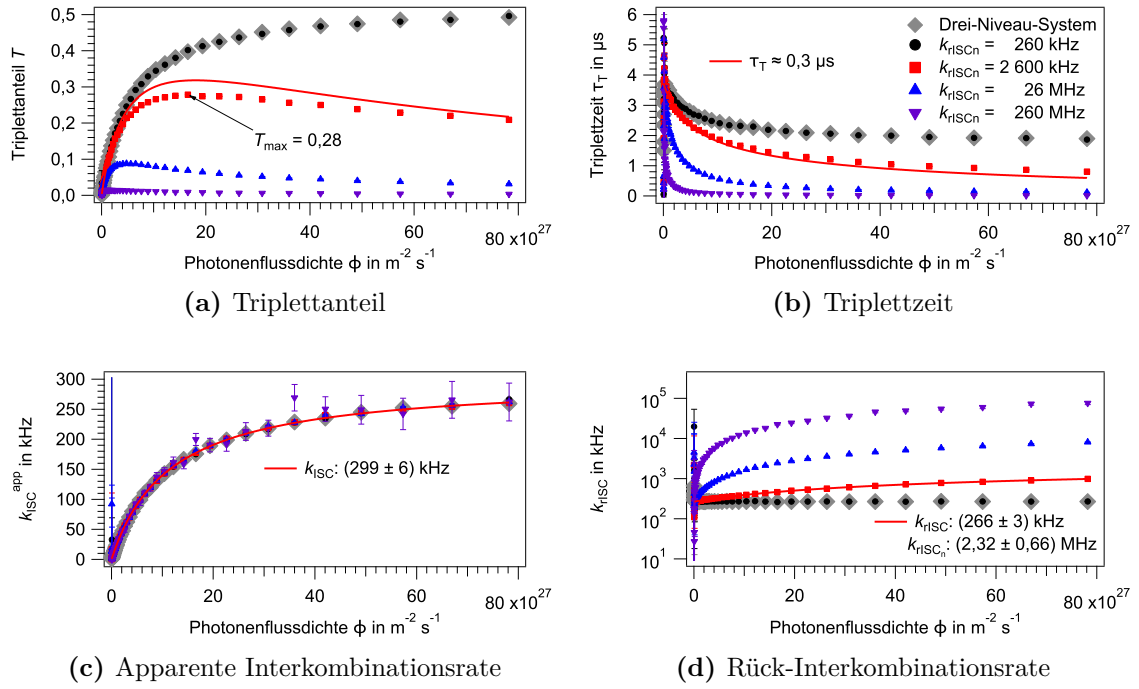


Abbildung 5.5: Triplettparameter bei beschleunigter Rück-Interkombination

Dargestellt sind die Simulationen eines im Fokus immobilisierten Moleküls mit drei Zuständen (grau) und mit einem zusätzlichen höheren Tripletzustand gemäß Abbildung 5.4. Die anregungsseitigen Photonenflussdichten entsprechen Anregungsleistungen von $1 \mu\text{W}$ bis $2000 \mu\text{W}$ bzw. Anregungsintensitäten von $1,6 \text{ kW cm}^{-2}$ bis $3,2 \text{ MW cm}^{-2}$. Es wurden unterschiedliche Rück-Interkombinationsraten k_{rISC_n} mit den Werten 260 kHz (schwarz), 2600 kHz (rot), 26 MHz (blau) und 260 MHz (violett) simuliert. Die übrigen Simulationsparameter gleichen den Werten aus Abschnitt 5.1 (siehe auch Abbildung 5.1). Die globale Anpassungsfunktion der Simulation bei $k_{\text{rISC}_n} = 2600 \text{ kHz}$ ist in rot eingetragen und liefert mit den Gleichungen (5.7) bis (5.15) die in Tabelle 5.2 dargestellten Werte. Die aus der FCS bestimmten Werte des Tripletanteils sind in (a), der Tripletzeit in (b), der apparenten Interkombinationsrate in (c) und der Rück-Interkombinationsrate in (d) dargestellt.

mit

$$\xi = \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}_n}}{(k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}_n} k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_0 k_{\text{rISC}} (k_{\text{rISC}_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}) + k_{\text{ex}} ((k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}_n}) k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{\text{rISC}} (k_{\text{rISC}_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))} \quad (5.10)$$

Bei niedrigen Anregungsleistungen kann dieses in Näherung in der Form

$$A_T \approx \frac{k_{\text{ISC}}^{\text{app}}}{k_{\text{rISC}}} \left(1 - k_{T_{1 \rightarrow n}} \frac{(k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}_n}}{k_0 k_{\text{rISC}} (k_{\text{rISC}_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})} \right) \quad (5.11)$$

geschrieben werden. Die mittlere Besetzungsdichte des höher angeregten Tripletzustandes hängt dabei mit der Besetzung des Triplet-Grundzustandes über

$$\bar{T}_n = \frac{k_{T_{1 \rightarrow n}}}{k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}} \bar{T}_1 \quad (5.12)$$

zusammen. Die Besetzungsdichte des angeregten Triplets kann also zu einer relevanten Rück-Interkombination in den angeregten Singulett mittels k_{rISC_n} führen. In der Korrelationsanalyse wird diese Änderung der Amplitude entsprechend der Gleichungen (4.12a) und (4.13) durch eine Abnahme des mittleren Triplettanteils T_{acc} sichtbar, was in Abhängigkeit vom erwarteten Triplettanteil des Drei-Niveau-Systems T geschrieben, zu

$$T_{acc} \approx T + \frac{T(k_0 + k_{ex})(k_{rISC} - k_{rISC_n})k_{T_{1 \rightarrow n}}}{k_{ex}(k_{rISC}^2 + k_{rISC_n}k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC}(k_{rISC} + k_{T_{n \rightarrow 1}}) + k_{rISC}(k_{T_{n \rightarrow 1}} - k_{T_{1 \rightarrow n}})) + k_0(k_{rISC}^2 + k_{rISC_n}k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC}(k_{T_{n \rightarrow 1}} - k_{T_{1 \rightarrow n}}))} \quad (5.13)$$

wird. Bei niedrigen Leistungen führt dies in Näherung zu einem zusätzlichen Abfall des Triplettanteils der Anpassungsfunktion gemäß:

$$T_{acc} \approx T - \frac{k_{ISC}^{app}k_{T_{1 \rightarrow n}}(k_{rISC_n} - k_{rISC})}{k_{rISC}(k_{rISC}^2 + k_{rISC_n}k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC}(k_{T_{n \rightarrow 1}} - k_{T_{1 \rightarrow n}}))} \quad (5.14)$$

Dieses Verhalten ist in Abbildung 5.5a deutlich zu erkennen. Obwohl die Anpassungsfunktion den Triplettanteil überbewertet, passt der grundlegende Verlauf zu den Messwerten. Die aus der Anpassungsfunktion bestimmte, apparente Rück-Interkombinationsrate k_{rISC}^{app} kann durch die Gleichungen (5.8) und (5.9) bestimmt werden. In Näherung lässt sie sich durch einen konstanten Term für das Triplett-Grundniveau und einen leistungsabhängigen Term für die Rück-Interkombination aus höheren Zuständen gemäß

$$k_{rISC}^{app} \approx k_{rISC} + \frac{k_{rISC_n}}{1 + \frac{k_{T_{n \rightarrow 1}}}{\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}}}} \quad (5.15)$$

schreiben und ist in Abbildung 5.5d dargestellt. Die Anpassung über die AKF führt entsprechend zu einem leistungsabhängigen Anstieg bzw. einer Beschleunigung der effektiven

Tabelle 5.2: Parameter bei beschleunigter Rück-Interkombination

Bei der Gegenüberstellung der simulierten Parameter (Sim) und der aus der globalen Anpassung erhaltenen Parameter (Fit), fällt auf, dass diese für den angeregten Triplettzustand große Anpassungsfehler aufweisen.

	k_{ISC} in kHz	k_{rISC}	k_{rISC_n} in MHz	$k_{T_{n \rightarrow 1}}$ in GHz	$\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}$ in 10^{-20}	$\sigma_{T_{1 \rightarrow n}}$ m^2	Φ_F
Sim	290	260	2,60	4,0	2,1	2,1	0,92
Fit	299 ± 6	266 ± 3	$2,32 \pm 0,66$	$3,7 \pm 2,0$	$2,1 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,7$	$0,93 \pm 0,03$

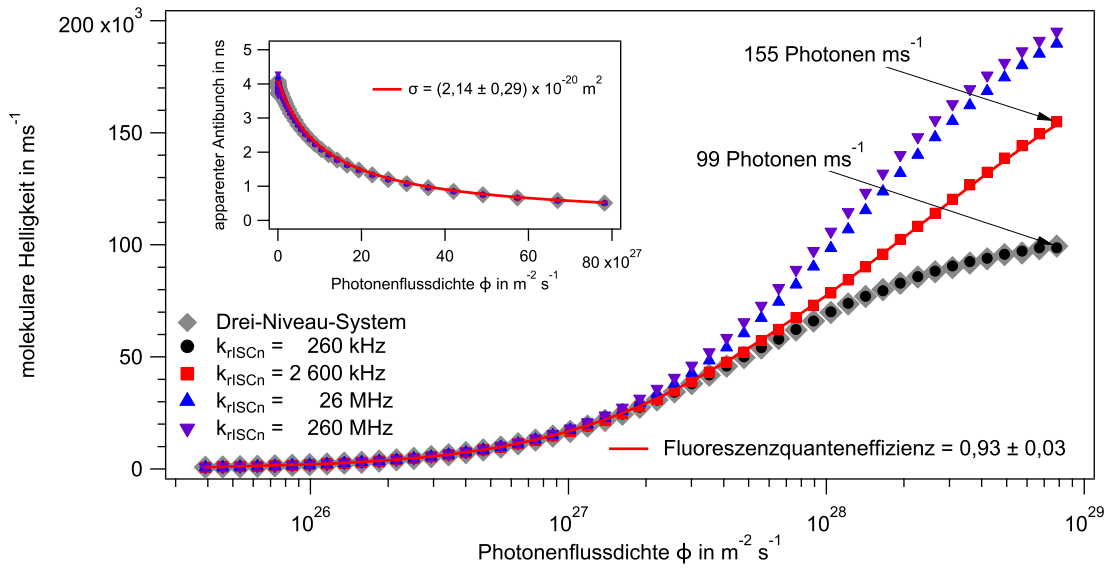


Abbildung 5.6: Molekulare Helligkeit bei unterschiedlichen Raten k_{rISCn}

Dargestellt ist die MB eines immobilisierten Moleküls nach einem Drei-Zustands-Modell und mit einem höheren Triplettzustand unter verschiedenen Rück-Interkombinationsraten in den Singulett. Die anregungsseitigen Photonenflussdichten entsprechen Anregungsleistungen von 1 μW bis 2000 μW bzw. Anregungsintensitäten von 1,6 kW cm^{-2} bis 3,2 MW cm^{-2} . In grau sind dabei die in Abschnitt 5.1 simulierten Werte zum Vergleich dargestellt. Die rote Linie zeigt die globale Anpassungsfunktion für die MB nach Gleichung (4.30). Im Inset ist das Antibunching mit einer Anpassung gemäß Gleichung (4.15) (rote Linie) dargestellt.

Rück-Interkombination in den Singulett. Wie in Abbildung 5.5c zu erkennen ist, hat die beschleunigte Rück-Interkombination keinen Einfluss auf die Interkombination aus dem angeregten Singulett in den Triplett-Grundzustand, weshalb der Gesamtanteil der im Dunkelizustand verbrachten Zeit nur durch die beschleunigte Rück-Interkombination verkürzt wird.

Die Verringerung der mittleren Besetzungsdichte des Triplets führt daher zu dem in Abbildung 5.6 dargestellten Anstieg der MB unter hohen Photonenflussdichten. Die globale Anpassung nach Gleichung (4.30) zeigt eine Übereinstimmung mit dem beobachteten Verhalten und es ist zu erkennen, dass die Sättigung zu höheren Werten verschoben wird. Das Antibunching (Inset in Abbildung 5.6, Anpassung nach Gleichung (4.15)) zeigt keine Änderung bei Variationen der Rück-Interkombination, sodass der Anstieg der Helligkeit nicht auf ein verändertes Singulett-Sättigungsverhalten, sondern lediglich auf die erhöhte Besetzungsdichte des radiativen Zustandes durch die beschleunigte Rück-Interkombination zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Konversionsrate $k_{T_{n-1}}$ nicht genau bestimmt werden kann. Dennoch bilden die in den Abbildungen 5.5 und 5.6 dargestellten Anpassungen die beobachteten Sättigungsverläufe gut ab und führen zu einer hohen Übereinstimmung mit den simulierten Werten der Ein-Photonen-Prozesse und der Quanteneffizienz. Die Genauigkeit der Anpassung der Daten kann zudem durch zusätzliche Information wie

zum Beispiel aus TCSPC-Messungen (Lebensdauern zur Bestimmung des Antibunchings), Herstellerangaben (wie Absorptionswirkungsquerschnitte und Quanteneffizienzen), oder FCS-Analysen bei niedrigen Leistungen erhöht werden.

5.2.2 Drei-, Vier- und Fünf-Niveau-Systeme im Vergleich

Die in Abschnitt 4.2 dargestellten Mehr-Niveau-Systeme wurden im Folgenden für die Fälle eines Drei-Niveau-Systems, Vier-Niveau-Systems und Fünf-Niveau-Systems simuliert und mittels der Korrelationsanalyse gemäß Kapitel 4 ausgewertet. Jedes dargestellte Modell besteht aus 50 separaten Simulationen bei unterschiedlichen Photonenflussdichten. Die Simulationsparameter sind in Tabelle 5.3 aufgetragen und stimmen zum Teil mit den betrachteten Werten der Abschnitte 4.2.1 und 5.1 überein.

Dabei ergeben sich die in Abbildung 5.7 dargestellten Werte. Die MB in Abbildung 5.7a steigt wie bereits in Abschnitt 4.2 besprochen, im Vergleich zum einfachen Drei-Niveau-System (schwarz) für das Vier-Niveau-System mit T_n und k_{rISC_n} (violett) an. Die durchgezogenen Linien kennzeichnen dabei Anpassungen gemäß der Gleichungen (4.6), (4.21) und (4.30). Ohne die Möglichkeit der Rück-Interkombination aus dem T_n in den radiativen Singulett mittels k_{rISC_n} (grün), fällt die MB im Vergleich zum Drei-Niveau-System ab. Befindet sich das Molekül im Triplettzustand, kann die sukzessive Anregung zu einem Wechsel zwischen dem ersten angeregten Triplettzustand und einem höheren Triplettzustand mit einer anschließenden Rück-Konversion in den ersten angeregten Triplettzustand führen. Das

Tabelle 5.3: Simulationsparameter der immobilisierten Moleküle

Das Vier-Niveau-System mit T_n und rISC_n entspricht dem global angepassten System aus Abschnitt 5.2.1 (dort in rot dargestellt). Nicht aufgeführte Simulationsparameter gleichen den Werten der Abschnitte 4.2.1 und 5.1 (siehe auch Tabelle 4.1 auf Seite 82).

	$\varepsilon_{S_0 \rightarrow 1}$ in $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$	k_{rad} in MHz	k_{IC}	k_{ISC} in MHz	k_{rISC}
3-, 4-, 5-Niveau	55 800	224,388	19,040	0,290	0,260

	$\varepsilon_{S_1 \rightarrow n}$ in $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$	$\varepsilon_{T_1 \rightarrow n}$	$k_{S_n \rightarrow 1}$ in MHz	$k_{T_n \rightarrow 1}$	k_{ISC_n} in MHz	k_{rISC_n}
3-Niveau	—	—	—	—	—	—
4-Niveau mit S_n	55 800	—	4000	—	—	—
4-Niveau mit T_n	—	55 800	—	4000	—	—
4-Niveau mit T_n und rISC_n	—	55 800	—	4000	—	2,60
5-Niveau mit S_n und T_n	55 800	55 800	4000	4000	0,290	0,260

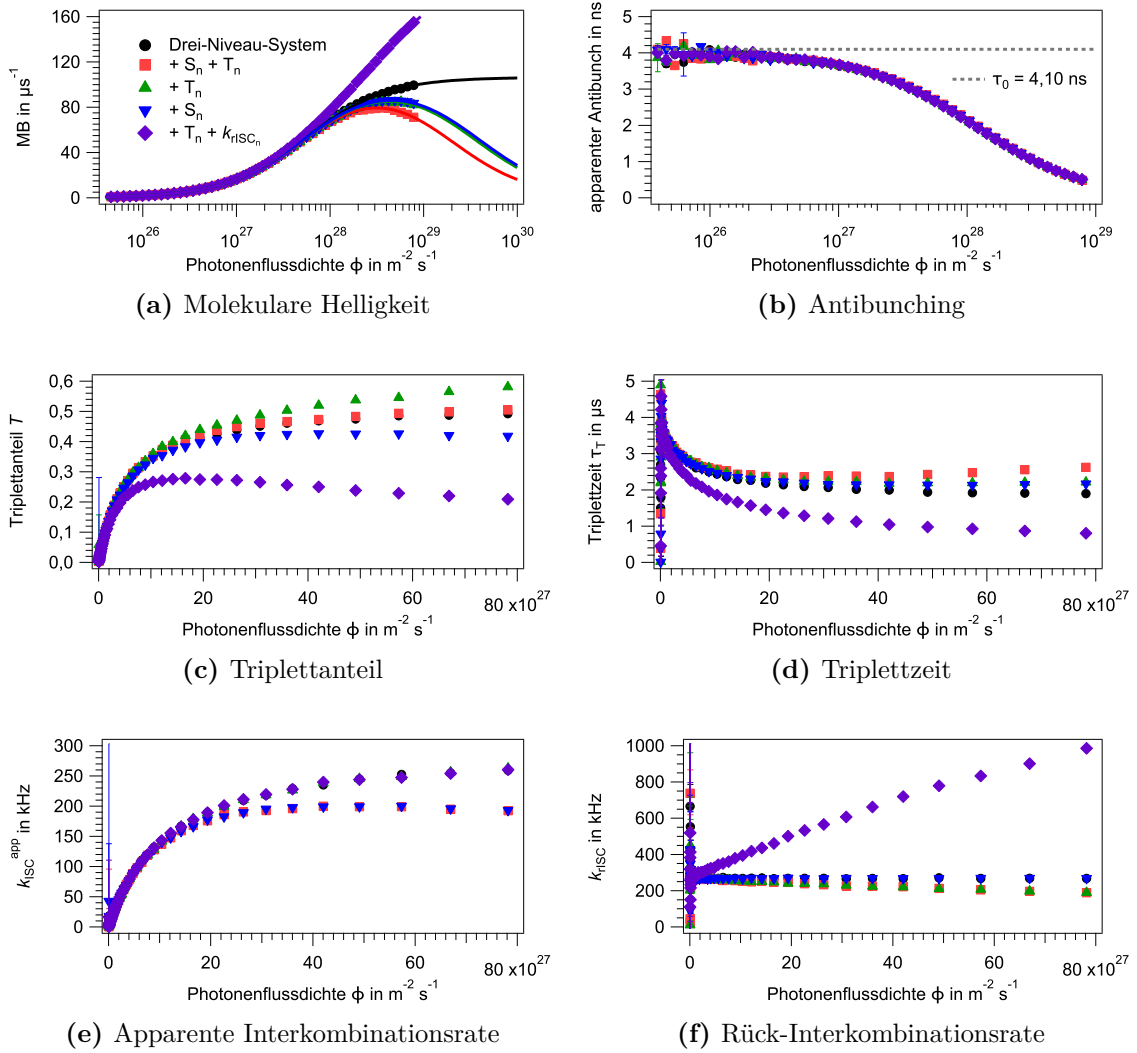


Abbildung 5.7: Anpassungswerte unterschiedlicher Niveaudiagramme

Dargestellt sind die Simulationen eines im Fokus immobilisierten Moleküls mit drei Zuständen (schwarz), einem höheren Triplett- und Singulettzustand (rot), lediglich einem höheren Triplett- (grün) oder Singulettzustand (blau) und einem höheren Triplettzustand mit einer erhöhten Rück-Interkombinationsrate k_{rISC_n} in den radiativen Singulett (violett, entspricht der in rot dargestellten Simulation in Abschnitt 5.2.1). Die anregungsseitigen Photonenflussdichten entsprechen Anregungsleistungen von $1 \mu\text{W}$ bis $2000 \mu\text{W}$ bzw. Anregungsintensitäten von $1,6 \text{ kW cm}^{-2}$ bis $3,2 \text{ MW cm}^{-2}$. Jeder Punkt entspricht dem Parameter einer angepassten Autokorrelationsfunktion nach den Gleichungen (4.9) und (4.14). Dabei ist das Verhalten (a) der MB mit Anpassungen gemäß der Gleichungen (4.6), (4.21) und (4.30) und Werten entsprechend Tabelle 5.4, (b) des Antibunchings mit der simulierten Lebensdauer $\tau_0 = 4,10 \text{ ns}$ (grau gestrichelt) nach Gleichung (2.35a), (c) des Triplettanteils, (d) der Triplettzeit, (e) der Interkombination in den Triplett und (f) der Rück-Interkombination in den Singulett abgebildet. In Abbildung C.7 (Seite XXVII) ist die Rück-Interkombination in den Singulett für die konstanten und sinkenden Messwerte zur Übersicht vergrößert dargestellt.

resultiert in einer effektiven Verringerung der Rück-Interkombinations-Wahrscheinlichkeit in den radiativen Singulettzustand. Dabei führt ein höheres Singulett-Niveau S_n anstelle des Triplets T_n zu einem nahezu identischen Abfall der MB (blau).

Ist ein höherer Singulett S_n und Triplett T_n vorhanden (rot), fällt die MB besonders

Tabelle 5.4: Simulations- und Anpassungswerte der Sättigungsparameter ϕ_{sat} der MB
Oben sind die aus den Simulationsdaten (siehe Text und Tabelle 5.3) nach den Gleichungen (4.21), (4.27), (4.29) und (B.11) bestimmten, erwarteten Sättigungswerte des Verlaufes der MB für die unterschiedlichen Systeme zu sehen. Die in Abbildung 5.7a dargestellten Anpassungen (ebenfalls gemäß der Gleichungen (4.21), (4.27), (4.29) und (B.11)) der MB, führen zu den unten aufgetragenen Anpassungswerten. Diese stimmen gut mit den simulierten Werten überein (Abweichungen unter 5 %) und zeigen, dass die Parameter der Mehr-Photonen-Prozesse zuverlässig aus der Korrelationsanalyse extrahiert werden können. Die Fehler der Einzelwerte resultieren aus der Ungenauigkeit der Anpassung und haben keine physikalische Bedeutung.

	S_0, S_1, T_1	$+S_n$	$+T_n$	$+T_n$ mit $rISC_n$	$+S_n + T_n$
<u>Simulation</u>					
$\phi_{\text{sat}1}$ in 10^{27} s m^2	5,49	5,49	5,49	4,26	5,49
$\sqrt{\phi_{\text{sat}2}}$ in 10^{28} s m^2	—	4,70	4,45	1,41	3,23
<u>Anpassung</u>					
$\phi_{\text{sat}1}$ in 10^{27} s m^2	$5,51 \pm 0,01$	$5,56 \pm 0,01$	$5,54 \pm 0,01$	$4,32 \pm 0,01$	$5,56 \pm 0,01$
$\sqrt{\phi_{\text{sat}2}}$ in 10^{28} s m^2	—	$4,50 \pm 0,03$	$4,29 \pm 0,03$	$1,41 \pm 0,06$	$3,14 \pm 0,01$

stark ab (vgl. auch Abbildung 4.4). Obgleich in der Simulation nicht betrachtet, ist im Experiment entsprechend der Abschnitte 2.2.4.2, 2.2.5, 3.2.4 und 6.4.2 von einer zusätzlichen Erhöhung der Lösch- und Bleich-Wahrscheinlichkeit durch die erhöhte mittlere Aufenthaltsdauer in potentiell reaktiven Zuständen auszugehen, was zu einer zusätzlichen Verringerung der MB bzw. zu einem Ausbleichen des Fluorophors führt. Bei niedrigen Photonenflussdichten im Bereich einer linearen Fluoreszenzantwort (siehe Gleichung (4.4c)) und geringen Wahrscheinlichkeit der sukzessiven Absorption aus angeregten Zuständen (ϕ klein gegen $\sqrt{\phi_{\text{sat}2}}$, siehe Gleichung (4.23)) sind hingegen keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Systemen zu erkennen.

Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, führen höhere elektronische Zustände zu einem Maximum der MB (siehe Gleichungen (4.22) und (4.23)) und damit dem in Abschnitt 4.2.2 besprochenen Sättigungsverhalten. Wenn keine beschleunigte Rück-Interkombination, also kein Anstieg der Rück-Interkombinationsrate (siehe Abbildung 5.7f) bei Photonenflussdichten im Bereich des Helligkeitsabfalls erkennbar ist, kann das Abfallen der MB vollständig durch Mehr-Photonen-Absorptionszyklen des Moleküls erklärt werden. Das heißt, dass ein Helligkeitsabfall bei hohen Photonenflussdichten auch hier nicht durch eine erhöhte Photozerstörung (siehe Abschnitt 2.2.5) getrieben ist².

In Tabelle 5.4 sind die Sättigungsparameter der Anpassungen dargestellt. Dabei stimmen die mittels der Gleichungen (4.21), (4.27), (4.29) und (B.11) angepassten Werte gut

² Bleichvorgänge bei immobilisierten Molekülen würden zu einem sprunghaften Abfall der Fluoreszenz führen.

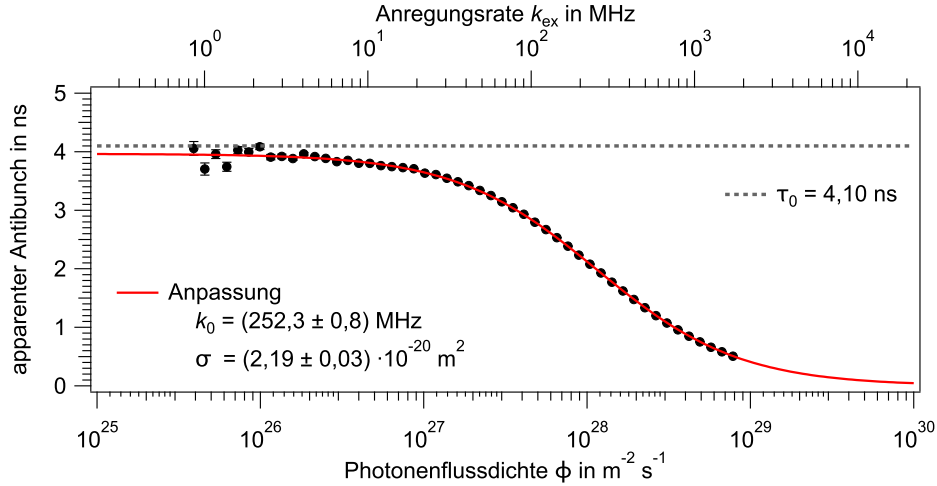


Abbildung 5.8: Anpassung des Antibunchings des Drei-Niveau-Systems

Die Anpassung mittels Gleichung (5.18) führt zu einem k_0 von $(252,3 \pm 0,8)$ MHz (Lebensdauer $\tau_0 = k_0^{-1}$) und einem molekularen Wirkungsquerschnitt von $\sigma = (2,19 \pm 0,03) \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$.

mit den simulierten Werten überein (Abweichungen unter 5 %). Es fällt auf, dass die Sättigungsparameter für das System mit relevanter Rück-Interkombination ($+T_n$ mit $rISC_n$) von den übrigen Systemen (insbesondere von $+T_n$ ohne $rISC_n$) abweichen, da die Abhängigkeit von k_{rISC_n} unter der Annahme $k_{T_{n \rightarrow 1}} \gg k_{rISC}$, k_{rISC_n} für ϕ_{sat_1} zu einem zusätzlichen Summanden

$$\frac{k_{IC} + k_{rad}}{k_{T_{n \rightarrow 1}}} \cdot \frac{k_{rISC_n}}{k_{rISC}} \quad (5.16)$$

und für ϕ_{sat_2} zu einem Faktor von

$$1 + \frac{k_{rISC_n}}{k_{rISC}} \quad (5.17)$$

führt. Die Konversionsrate $k_{T_{n \rightarrow 1}}$ resultiert in einer Depopulation der angeregten Zustände im Bereich von 250 ps. Somit ist der erste Term in Gleichung (5.16) relativ klein, was ein leichtes Sinken von ϕ_{sat_1} zur Folge hat. Der Faktor in Gleichung (5.17) hingegen hängt nur vom Verhältnis der Interkombinationsraten ab, und führt so zu einer deutlich stärkeren Änderung von ϕ_{sat_2} .

Das Antibunching in Abbildung 5.7b verhält sich für alle Simulationen erwartungsgemäß gleich, da die nach Abschnitt 4.1.1 (insbesondere Gleichung (4.15b)) entscheidenden Ratengrößen der radiativen Singulettzyklen in allen Fällen identisch gewählt sind (gleiche radiative Rate, innere Konversionsrate, Interkombinationsrate und ein gleicher Absorptionswirkungsquerschnitt des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs). Dabei ist gut zu erkennen, dass das Antibunching bei niedrigen Photonenflussdichten in guter Näherung der Lebensdauer τ_0 (grau gestrichelt) entspricht und mit steigender Photonenflussdichte deutlich absinkt. In

Tabelle 5.5: Änderung der Parameter im Vergleich zum Drei-Niveau-System

Aufgetragen ist das Verhalten der aus der FCS-Untersuchung gewonnenen Parameter bei hohen Photonenflussdichten (der Anregung) im Vergleich zum Drei-Niveau-System. Dabei kennzeichnen die Pfeile einen Anstieg ($\uparrow$), keine signifikante Änderung ($\rightarrow$), oder einen Abfall ($\downarrow$) des entsprechenden Anpassungswertes. Doppelpfeile ($\uparrow\uparrow$ oder $\downarrow\downarrow$) geben eine stärkere Änderung als Einzelpfeile an. Die Angaben beziehen sich auf die Ergebnisse im Text und Abbildung 5.7.

Zustände	MB	T	τ_T	k_{ISC}	k_{rISC}
$+S_n$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	$\rightarrow$
$+T_n$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\rightarrow$	$\downarrow$
$+T_n$ mit k_{rISC_n}	$\uparrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow$	$\rightarrow$	$\uparrow$
$+S_n + T_n$	$\downarrow\downarrow$	$\rightarrow$	$\uparrow\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$

Abbildung 5.8 ist die Anpassung des apparenten Antibunchings τ_A unter Vernachlässigung des k_{ISC} -Terms (da $k_{ic} + k_{rad} \gg k_{ISC}$, vgl. Gleichung (4.15b)) gemäß

$$\tau_A(\phi) = (k_0 + \phi\sigma_{S_0 \rightarrow 1})^{-1} \quad (5.18)$$

dargestellt. Aus der Anpassung kann nun der molekulare Wirkungsquerschnitt σ und somit die Anregungsrate k_{ex} bestimmt werden. Eine lineare Darstellung der Antibunching-Rate ist in Abbildung C.8 auf Seite XXVII zu finden.

Der Triplettanteil in Abbildung 5.7c hingegen zeigt deutliche Abweichungen vom Drei-Niveau-System. So führen die beschleunigte Rück-Interkombination und der zusätzliche höhere Singulettzustand S_n zu einer Abnahme des Triplettanteils bei hohen Photonenflussdichten, was auf die entweder erhöhte Entvölkerung des Triplettzustandes (violett) oder die niedrigere mittlere Besetzungsdichte des radiativen Singulettzustandes (blau) zurückzuführen ist. Dies ist insbesondere anhand der geringeren Interkombinationsrate in Abbildung 5.7e zu erkennen. Die Systeme mit einem höheren Singulettzustand (rot und blau) zeigen eine niedrigere Übergangsrate in den Triplett, wohingegen höhere Triplettzustände hier keinen Einfluss haben. Allerdings führen höhere Triplettzustände zu einer verminderten Rück-Interkombinationsrate aufgrund der erniedrigten mittleren Besetzungsdichte des Triplett-Grundzustandes (siehe Abbildung 5.7f, rot und grün). Daher zeigt das System mit einem höheren Triplettzustand (grün) in Abbildung 5.7c einen Anstieg im Triplettanteil.

In Tabelle 5.5 sind die prinzipiellen Abweichungen der FCS-Parameter der simulierten Systeme im Vergleich zum Drei-Niveau-System zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass zusätzliche elektronische Zustände zu einem Abfall der MB und einem Anstieg der Triplettzeit τ_T führen. Je nachdem, ob der höhere Zustand im Singulett oder Triplett hinzugefügt wird, kommt es zu einem Absinken der dieses Zustandssystem verlassenden Interkombinationsrate (bei T_n sinkt k_{rISC} , bei S_n sinkt k_{ISC}) und einem entsprechenden Anstieg bzw. Abfall des Triplettanteils T . Sind beide Zustände S_n und T_n vorhanden,

kombinieren sich die genannten Effekte, wobei aufgrund der hier gleich gewählten Übergangsrate (siehe Tabelle 5.3) keine Änderung des Triplettanteils mehr zu beobachten ist. Ein Anstieg der MB und Rück-Interkombinationsrate k_{rISC} ist nur unter einer zusätzlichen Rück-Interkombination k_{rISC_n} aus erhöhten Triplettzuständen T_n vorhanden und führt zu einem deutlichen Abfall des Triplettanteils.

5.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Eine hohe Übereinstimmung der hergeleiteten FCS-Anpassungsfunktionen mit dem Fluktuationsverhalten immobilisierter Einzelmoleküle im Rahmen eines Drei-Zustand-Modells gemäß [203, 225, 236] konnte anhand der Anpassung simulierter Daten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde das Verhalten bei beschleunigter Rück-Interkombination über höhere elektronische Triplettzustände untersucht. Im Gegensatz zu einer Vielzahl bisheriger Publikationen [39, 40, 201, 204, 231] wurde nicht das Bleichverhalten sondern der direkte Einfluss auf das Triplettverhalten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bereits bei Leistungsdichten unter 800 kW cm^{-2} selbst bei hohen Relaxationsraten (über eine Größenordnung über der radiativen Rate aus dem S_1) der höher angeregten Zustände S_n und T_n deutliche Änderungen der Triplettparameter auftreten können. So wurde zum Beispiel im Vergleich zu Untersuchungen in Lösung von Ringemann et al. [39] und Eggeling, Volkmer und Seidel [231] ein analoger Abfall der MB zu hohen Photonenflussdichten wie bei der Annahme von Bleicheffekten lediglich durch die Betrachtung der Besetzungsdichten höher angeregter Zustände (ohne Bleicheffekte) ersichtlich.

Für unterschiedliche Raten der Hin- und Rück-Interkombination konnte die entsprechende Abweichung in der FCS-Analyse mit dem Verhalten bei höheren Singulett- und/oder Triplettzuständen charakterisiert werden. Anhand des betrachteten Sättigungsverhaltens konnten somit Rückschlüsse auf das Vorhandensein höherer elektronischer Zustände gezogen und die hergeleiteten Anpassungsfunktionen verifiziert werden.

5.3 Immobilisiertes Alexa Fluor® 488

Die Nähe fluoreszenter Moleküle zu einer Oberfläche kann einen Einfluss auf photophysikalische Größen wie die Lebensdauer und die Fluoreszenzintensität haben, und zu einer Verschiebung sowie Verbreiterung der Absorptions- und Emissionsspektren und einer Änderung der detektierten Fluoreszenz führen [240–242]. Die in Abbildung 5.9 dargestellten konfokalen Rasteraufnahmen zeigen entsprechend Abschnitt 3.2.5 auf einem Deckglas immobilisierte AF-488-Moleküle. In Abbildung 5.9a ist eine Kontrollmessung des silanisierten Deckglases ohne TCEP-Behandlung und inkubierte Farbstofflösung in einem $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ großen Bereich zu sehen. Die Abbildungen 5.9b und 5.9c zeigen Aufnahmen des gleichen Bereichs des Deckglases nach der TCEP-Behandlung und Inkubation mit etwa 100 pM Farbstofflösung. Die Anregungsintensität (Gesamteingangsleistung in der Objektivapertur) beträgt $1\text{ }\mu\text{W}$ bei einer Wellenlänge von 488 nm und einer Integrationszeit von 2 ms je Pixel bei 128×128 Pixeln. Dies führt bereits zu Bleichprozessen während der Beobachtungs- bzw. Bildaufnahmezeit, welche zum Beispiel in Abbildung 5.9b an den Positionen $(x,y) = (1,6)\text{ }\mu\text{m}$ oder $(9,3)\text{ }\mu\text{m}$ zu erkennen sind. Entsprechend sind in der zweiten Rasteraufnahme des gleichen Bereichs in Abbildung 5.9c weniger Moleküle zu sehen.

In Abbildung C.9 (siehe Seite XXVIII) sind exemplarisch die transienten Intensitäten zweier Einzelmoleküle bis zum Bleichvorgang dargestellt. Dabei ist gut zu erkennen, dass es sich um einzelne Moleküle handelt, da der Abfall in einem Schritt zu einem Zeitpunkt stattfindet (kein Helligkeitsverlauf bzw. langsames dunkler werden). Die Emissionsdauer bis zum Photobleichen beträgt bei direkter Anregung $1,4\text{ s}$ bzw. $0,4\text{ s}$ bei einer Anregungsleistung (100 nW in der Eingangsapertur), die ein SNR von etwa $3,4$ bis $7,1$ erzeugt. An den in Abbildung C.10 dargestellten Korrelationskurven der Moleküle wird ersichtlich, dass die

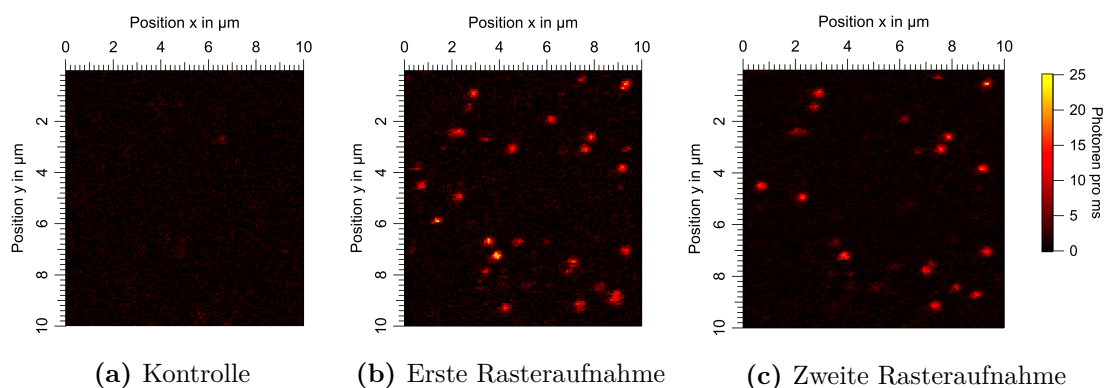


Abbildung 5.9: Auf einem Deckglas immobilisierte AF-488-Moleküle

(a) Kontrollmessung des Deckglases ohne Farbstoff und ohne TCEP. (b) Rasteraufnahme eines $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ großen Bereichs bei einer Integrationszeit von 2 ms je Pixel bei 128×128 Pixeln nach der TCEP-Behandlung und Markierung mit AF-488-Molekülen. (c) Direkt nach (b) durchgeführte zweite Fluoreszenzaufnahme des gleichen Ausschnittes. Es fällt auf, dass viele der in (b) vorhandenen Moleküle in (c) bereits geblichen sind. Die Anregungsleistung beträgt in allen drei Fällen $1\text{ }\mu\text{W}$ bei 488 nm .

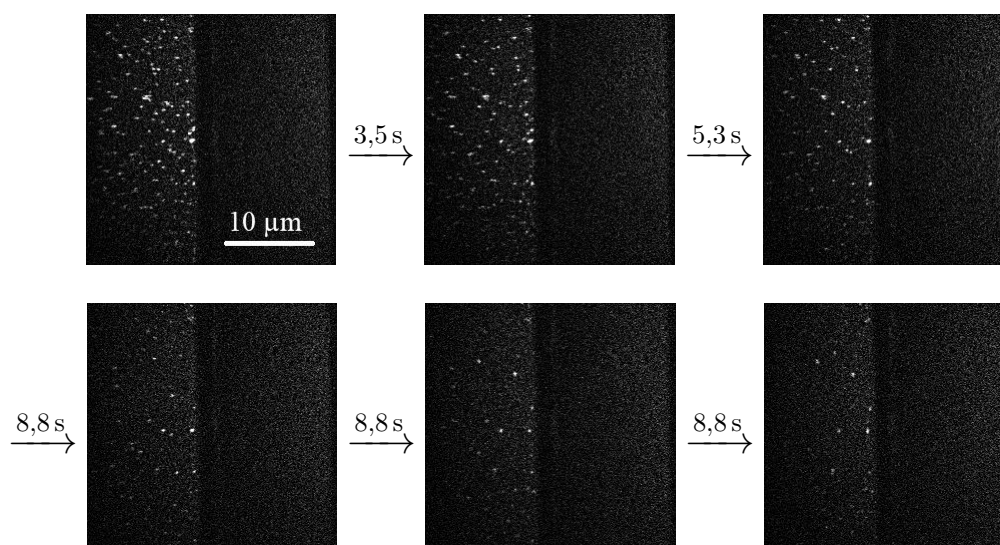


Abbildung 5.10: TIRFM immobilisierter AF-488-Moleküle

Zu sehen sind über jeweils vier Aufnahmen mit einer Integrationszeit von 220 ms gemittelte Bilder immobilisierter AF-488-Moleküle, die mit dem in Abschnitt 3.1.3 vorgestellten TIRF-Mikroskop aufgenommen wurden. Dabei ist die senkrechte Trennung der Farbkanäle in einen grünen Kanal, der spektral zwischen 500 nm und 570 nm, und einen roten Kanal, der zwischen 650 nm und 720 nm liegt, gut zu erkennen. Das AF-488 emittiert lediglich im grünen Kanal (siehe Abschnitt 3.2, Abbildung 3.8b) und beginnt bereits nach wenigen Sekunden deutlich zu bleichen.

Beobachtungsdauer für eine belastbare Anpassung nicht ausreicht.

In Abbildung 5.10 ist das Bleichverhalten mit dem in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen TIRF-Mikroskop über einen Zeitraum von 35,2 s zu sehen. Obgleich einige Moleküle über den gesamten Zeitraum ein konstantes Leuchten bzw. Blinken zeigen, kann aufgrund der langen Integrationszeiten (ms-Bereich) der verwendeten Kamera keine Analyse des Dynamikbereichs, in dem die photophysikalischen Prozesse ablaufen, durchgeführt werden.

5.3.1 Niedrige Temperaturen

Eine alternative Methode der Immobilisierung stellt die Vitrifizierung der zu untersuchenden Moleküle (in wässriger Lösung) dar. Dabei sind je nach Anforderung der Probe unterschiedliche Methoden zum Erzeugen amorpher Strukturen möglich [243–246]. So kann das Vitrifizieren zum Beispiel der Lagerung ohne den Verlust der (biologischen) Aktivität der Probe [247, 248], oder zur Fixation und Vorbereitung für die Untersuchung mittels unterschiedlicher Mikroskopie- und Analysemethoden dienen [249–253].

Fluoreszenzmikroskopische Einzelmoleküluntersuchungen bei Raumtemperatur sind, wie anhand der Abbildungen 5.9 und 5.10 dargestellt, zumeist durch das Photobleichen der Moleküle in ihrer maximalen Beobachtungszeit limitiert [254]. Bei niedrigen Temperaturen werden hingegen sterische (siehe Abschnitt 6.4) und diffusive (z. B. durch O₂, siehe Abschnitt 2.2.4.2) Prozesse, die zum Bleichen der Fluorophore führen, unterdrückt [255,

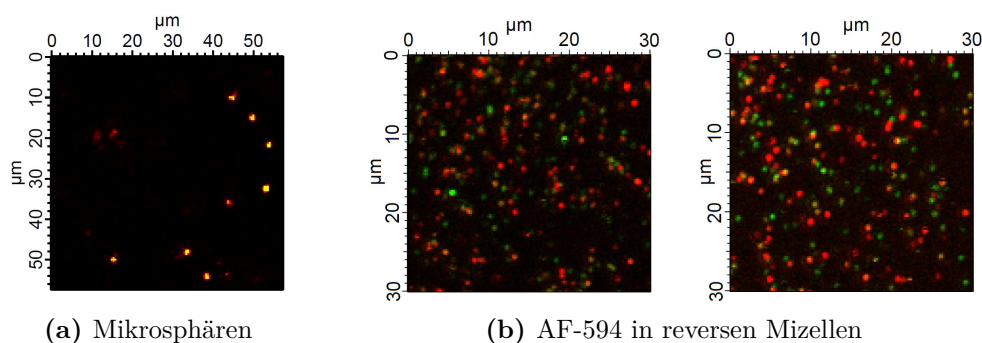


Abbildung 5.11: Aufnahmen bei niedrigen Temperaturen (77 K)

(a) 20 nM FluoSpheres®-Mikrosphären mit einer Größe von 100 nm in flüssigem Stickstoff bei einer Anregungsleistung von 10 μ W. Abbildung entnommen aus [264]. (b) Polarisationsabhängige Aufnahme von 10 nM AF-594 in reversen Mizellen bei Anregungsleistungen von 30 μ W (links) und 60 μ W (rechts). Horizontal polarisiertes Fluoreszenzlicht ist in grün und vertikal polarisiertes Fluoreszenzlicht in rot dargestellt. Abbildung entnommen aus [265].

256]. Das resultiert in deutlich größeren Anzahlen an detektierbaren Photonen bei der Untersuchung von Fluorophoren wie z. B. Rhodamin 6G (Rh-6G) [254] oder fluoreszenten Proteinen in vitrifizierten Zellen [257]. Gleichzeitig wird neben dem Photobleichen und der Fluoreszenzlöschung auch das spontane und photoinduzierte Schaltverhalten aufgrund geänderter spektraler und photophysikalischer Eigenschaften beeinflusst, was zumeist zu längeren Beobachtungsdauern führt und Erkenntnisse über diverse physikalische Prozesse liefert [256–263].

Gerade die supraauflösende Mikroskopie, die auf dem Schaltverhalten der einzelnen Moleküle basiert, kann von der höheren Photostabilität und dem geänderten photophysikalischen Verhalten profitieren. So erlauben niedrige Temperaturen von etwa 76 K höhere Wirkungsquerschnitte für die stimulierte Emission bei der STED-Mikroskopie, was zu einer relativen Auflösungserhöhung um den Faktor 1,6 führen kann [266]. Die Auflösung und die Anwendbarkeit von stochastischen Methoden zur Lokalisierung einzelner Moleküle wie PALM, FPALM und STORM ist ebenfalls durch die Anzahl der detektierten Photonen je Molekül und das Verhältnis der Lebensdauern der Hell- und Dunkelzustände begrenzt [267]. So zeigten Kaufmann et al. [268], dass die supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie bei Temperaturen von etwa 80 K einzelne Moleküle mit einer Genauigkeit von 10 nm bis 50 nm auflösen kann. Bei Temperaturen von 4,4 K gelang es Weisenburger et al. [269] sogar, trotz der Verwendung von Luftobjektiven mit einer niedrigen NA von 0,75, deutlich längere Beobachtungszeiten durch eine optimierte Photostabilität der Fluorophore und somit Lokalisierungsgenauigkeiten unter 3 Å zu erreichen. Weitere Ausführungen und Zusammenfassungen der Anforderungen und Möglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie bei niedrigen Temperaturen sind unter anderem bei Kozankiewicz und Orrit [270] und Kaufmann, Hagen und Grünewald [271] zu finden.

Für eine erfolgreiche Vitrifizierung ist die Abkühlungsrate und die damit verbundene Zunahme der Viskosität entscheidend [272, 273]. Grundsätzlich führt das Abkühlen einer

wässrigen Lösung zu einer Viskositätsänderung gemäß der Arrhenius-Gleichung [274–276]. Dabei können in der Nähe der Übergangstemperatur zum amorph gefrorenen Zustand Abweichungen von der Arrhenius-Gleichung auftreten [277–281], die hier nicht weiter ausgeführt werden sollen. Das von Hirschfeld [155] eingeführte und mit Duda [149] entsprechend Abschnitt 3.1.3 verbesserte Einfrier- und Kühlverfahren ist im Rahmen verschiedener Bachelorarbeiten detailliert untersucht und verbessert worden und kann zur Beobachtung vitrifizierter Proben genutzt werden [264, 265, 282]. In Abbildung 5.11a ist die Messung von FluoSpheres®-Mikrosphären (Invitrogen™), die mit einer Größe von 100 nm unter der beugungsbegrenzten Fokusgröße des Mikroskops liegen, in flüssigem Stickstoff bei 77 K dargestellt. Abbildung 5.11b zeigt die Aufnahme von mit Alexa Fluor® 594 (AF-594) gefüllter reverser Mizellen in zwei unterschiedlichen Polarisationskanälen bei 77 K.

5.3.2 Zusammenfassung und Diskussion

Die Immobilisierung einzelner Moleküle [178–184] konnte in Zusammenarbeit mit und anhand der Masterarbeit von Rönnau [177] (siehe auch Abschnitt 3.2.5) am Beispiel des Fluorophors AF-488 erfolgreich durchgeführt werden. Allerdings konnten aufgrund der kurzen Beobachtungsdauer, die durch Bleichprozesse beschränkt war, weder mit dem konfokalen Einzelmolekülmikroskop, noch mit dem TIRF-Mikroskop belastbare Autokorrelationsanalysen der schnellen Fluktuationsdynamik gemessen werden.

Ogleich detaillierte Untersuchungen der thermischen und mechanischen Stabilität des Kryostataufbaus, sowie der optischen Komponenten anhand weiterführender Messungen im Rahmen der Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten, wurde die Vitrifizierungsmethode der von Hirschfeld [155] eingeführten Fluoreszenz-Kryo-Mikroskopie bei niedrigen Temperaturen optimiert und ein Beispiel immobilisierter mit Fluorophoren gefüllter reverser Mizellen bei 77 K präsentiert. Die weiteren Schritte zur festen Etablierung des entwickelten Aufbaus beinhalten eine Überprüfung der Dichtigkeit und Positionierungsgenauigkeit der Komponenten über längere Zeiträume zur Identifizierung thermischer Verluste und eventueller Instabilitäten während der Messung. Des weiteren ist die Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften der genutzten Fluorophore zur Optimierung der verwendeten spektralen Komponenten und Einstellungen, sowie der Lösungsmittel und Protokolle zur Präparation der Proben für niedrige Temperaturen essentiell.

Kapitel 6

Photophysik frei diffundierender Fluorophore

Die Untersuchung von Einzelmolekülen durch die FCS-Analyse in Lösung bietet viele Vorteile gegenüber immobilisierten Messungen. Da die Beobachtungszeit eines Moleküls durch die Größe des Beobachtungsvolumens und die Diffusionsgeschwindigkeit in der Lösung begrenzt ist, spielt das Photobleichen eine geringere Rolle. Die Präparation der Proben erfordert einen geringeren Aufwand, und die benötigten Farbstoffkonzentrationen und Volumina bewegen sich im Bereich von picomolaren Konzentrationen in wenigen Mikrolitern Gesamtvolumen.

Auch dynamische Interaktionen können aufgrund der Korrelation von Beobachtungszeit und verschiedenen molekülspezifischen Parametern wie Volumen und Masse untersucht werden. Dabei kann das Bindungs- und Aggregationsverhalten in sehr kleinen Volumina oder auch die Komplexbildung von Molekülen sehr unterschiedlicher Größe untersucht werden [283, 284]. Die Schwierigkeit bei der Bestimmung und Trennung von verschiedenen, das Leuchtverhalten modulierenden Vorgängen in kurzen Zeitbereichen (einige μs bis wenige ms) ist das Verhältnis der Signalstärken der jeweiligen Prozesse sowie die korrekte Annahme der photophysikalischen Parameter, die die Analyse beeinflussen [285].

6.1 Bestimmung des lateralen und axialen Fokusparameters

Zur Kontrolle der in den folgenden Kapiteln aus den Diffusionszeiten gewonnenen Größen des Beobachtungsvolumens wurden Messungen an immobilisierten fluoreszenten Mikrosphären durchgeführt und mit den Werten aus Lösungsmessungen verglichen. Die Justage mit einer in Wasser gelösten AF-488-Probe führt unter der Annahme eines Diffusionskoeffizienten bei $(22,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ von $435 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ [286] nach Gleichung (2.88b) zu einem lateralen Fokusparameter w_{xy} bei einem Abfall der Intensität auf $1/e^2$ von $(254,4 \pm 4,1) \text{ nm}$. Zum Vergleich wurden 500 nm, 200 nm und 100 nm große fluoreszente Mikrosphären zur Bestimmung der

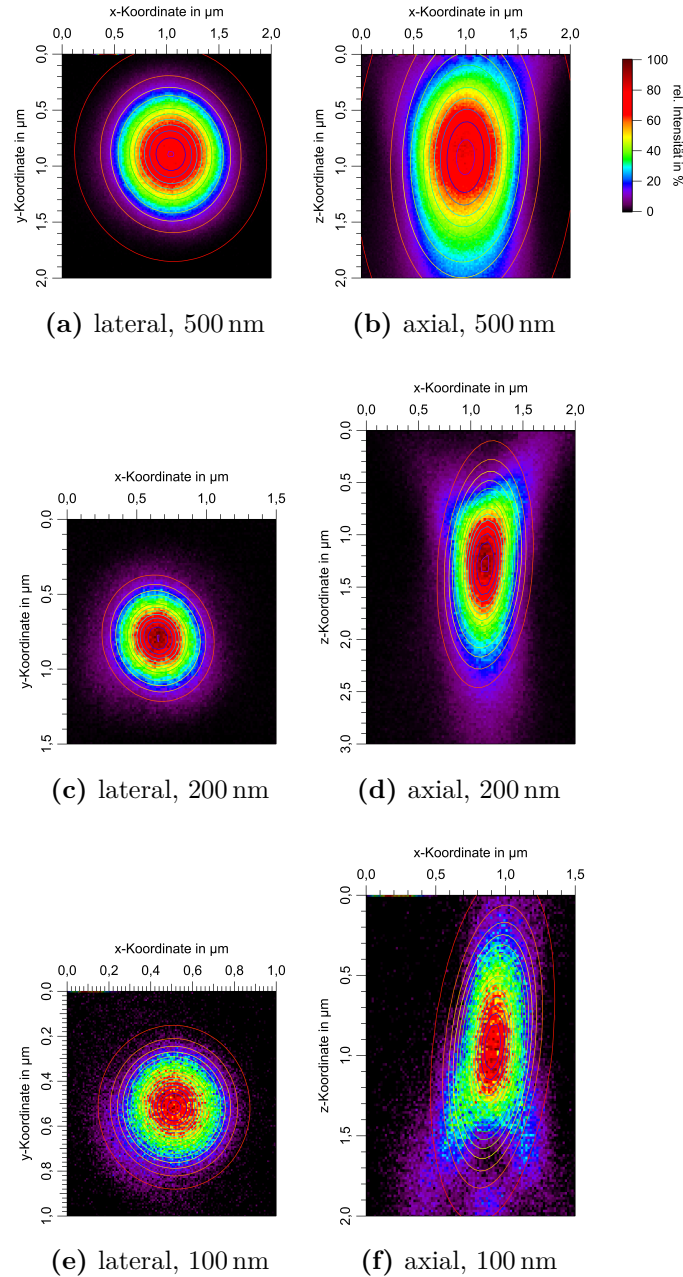


Abbildung 6.1: Bestimmung der Abbildungsfunktion des Mikroskops

Rasteraufnahmen von TetraSpeck[®]- und FluoSpheres[®]-Mikrosphären (InvitrogenTM) mit einer Größe von 500 nm, 200 nm (beide TetraSpeck[®]) und 100 nm (FluoSpheres[®]) bei einer Laser-Wellenlänge von 488 nm und Leistung von 50 nW und 100 nW. Die Messungen wurden mit einem 50 μ m-Pinhole und einer Probenverschiebung mittels piezoelektrischer Aktuatoren durchgeführt. Bei der Anpassung mit einer 2D-Gaußfunktion lauten die erhaltenen Werte für die TetraSpeck[®]-Mikrosphären: (a) Lateraler $1/e^2$ -Abfall von $(632,0 \pm 1,1)$ nm für x und $(658,3 \pm 1,2)$ nm für y , mit einem Korrelationskoeffizient von $0,028 \pm 0,002$. (b) Axialer $1/e^2$ -Abfall von $(1197,7 \pm 2,6)$ nm für z . (c) Lateraler $1/e^2$ -Abfall von $(351,5 \pm 0,4)$ nm für x und $(368,4 \pm 0,4)$ nm für y , wobei der Korrelationskoeffizient $0,068 \pm 0,002$ beträgt. (d) Axialer $1/e^2$ -Abfall von $(990,2 \pm 2,2)$ nm für z . Die Werte der 100 nm FluoSpheres[®]-Mikrosphären lauten: (e) Lateraler $1/e^2$ -Abfall von $(283,7 \pm 0,9)$ nm für x und $(284,0 \pm 1,0)$ nm für y mit einem Korrelationskoeffizienten von $0,010 \pm 0,004$. (f) Axialer $1/e^2$ -Abfall von $(801,8 \pm 3,4)$ nm.

Abbildungsfunktion bzw. der Intensitätsabfallfunktion in Rasteraufnahmen abgebildet [287]. Die kommerziell erhältlichen TetraSpeck[®]- und FluoSpheres[®]-Mikrosphären (Invitrogen[™]) sind entweder bereits in einer Matrix eingebettet oder werden in Agarose-Gel ($n = 1,3355$ bei 0,5 % [288]) präpariert.

In Abbildung 6.1 sind die radialen (links) sowie axialen (rechts) Aufnahmen der Mikrosphären dargestellt. In Abbildung 6.1d ist zu erkennen, dass der axiale Intensitätsverlauf nicht optimal durch die angepasste 2D-Gaußfunktion beschrieben wird. Die Anpassung des radialen Verlaufs der jeweiligen Mikrosphären mit einer Größe von 500 nm, 200 nm und 100 nm liefert hingegen niedrige Korrelationskoeffizienten von $0,028 \pm 0,002$, $0,068 \pm 0,002$ und $0,010 \pm 0,004$. Die 500 nm- und 200 nm-Mikrosphären besitzen eine Größe, die über der Auflösung des Mikroskops (siehe Abschnitt 2.3.1) liegt und somit nicht zu einer Faltung der Abbildungsfunktion mit einer Punktfunktion führt. Das resultiert in den dargestellten Bildern zu einer Verbreiterung um das entsprechende Faltungsprodukt der abbildbaren Kreisfunktion der Sphäre und somit zu größeren Radien als bei den 100 nm-Mikrosphären.

Die Radien der Abbildungsfunktion werden entsprechend an der 100 nm-Mikrosphäre bestimmt und betragen für die in den Abbildungen 6.1e und 6.1f dargestellten Messungen radial $(283,9 \pm 1,9)$ nm und axial $(801,8 \pm 3,4)$ nm. Da die Mikrosphären in Agarose eingebettet sind, die Bestimmung des lateralen Radius w über den Diffusionskoeffizienten aber in destilliertem Wasser erfolgt, ist von einer Abweichung der Radien im Bereich von 5 % auszugehen [289].

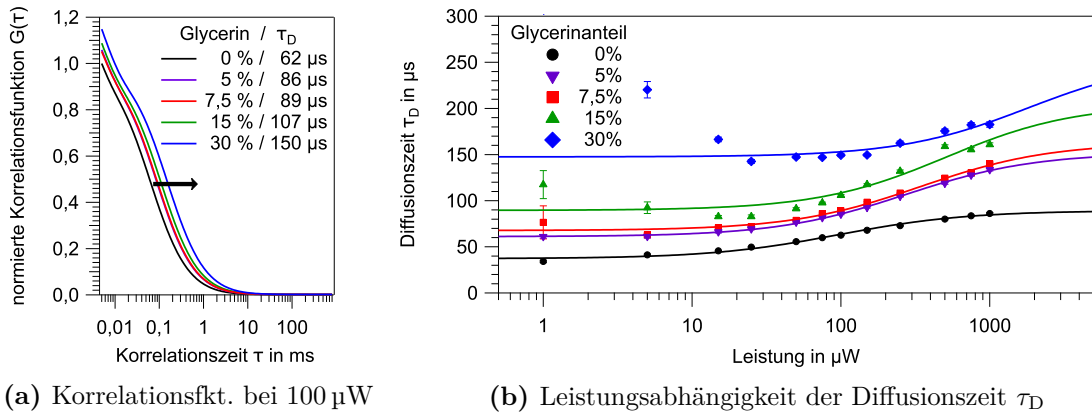
6.2 Glycerineinfluss auf Diffusion und Sauerstoffgehalt

Findet eine Überlagerung verschiedener Prozesse in einem ähnlichen Zeitbereich statt, wird die Trennung bzw. die Bestimmung dieser abhängig vom Rauschniveau, dem Abstand der entsprechend zugrundeliegenden Verteilungsfunktionen und der Qualität des Anpassungsmodells maßgeblich beeinflusst. Obgleich die mathematische Behandlung dieser Problematik gut untersucht ist, bleibt vor allem bei dynamischen Prozessen, die nicht vollständig reproduzierbar sind, diese Schwierigkeit bestehen [290]. Somit ist für eine genaue Bestimmung von Ratenprozessen im Bereich der Diffusionszeit der betrachteten Moleküle eine genaue Identifikation des diffusiven Anteils hilfreich. Zum Vergleich der aus der FCS gewonnen photophysikalischen Parameter eines Moleküls bei verschiedenen Diffusionsgeschwindigkeiten wird die Viskosität der Farbstofflösung mittels der Zugabe von Glycerin erhöht und somit der Diffusionsteil in der FCS zu längeren Zeiten verschoben.

6.2.1 Diffusionszeit und molekulare Helligkeit

Die Proben wurden wie in Abschnitt 3.2 beschrieben vorbereitet und anschließend in einer Sättigungsreihe gemessen. Die Anregungsleistung beträgt 1 μ W bis 1 mW bei einer Messdauer von 60 min bei geringen und mindestens 3 min bei hohen Leistungen. Aufgrund der insgesamt mehrere Stunden dauernden Messreihe für einen Farbstoff wurde das Immersionswasser nach jeder vollen Stunde kontrolliert und gegebenenfalls erneuert. Dabei wurde aufgrund der Empfindlichkeit der Messung auf äußere Einflüsse jede Messreihe geschlossen an einem Tag aufgenommen. Darauf folgende Messungen wurden jeweils erst bei alter Konzentration mit der vorangegangenen Messreihe verglichen und anschließend auf die benötigte neue Konzentration gebracht, um systematische Einflüsse wie Änderungen der Ausgangskonzentration durch Anlagerung der Farbstoffe an den Gefäßwänden oder Bleichen zu korrigieren. Exemplarisch ist in Abbildung 6.2a die Verschiebung der Anpassungsfunktionen im Diffusionsbereich der Korrelationskurve für eine Anregungsleistung von 100 μ W dargestellt. Zur besseren visuellen Vergleichbarkeit sind die Kurven auf ihre Amplitude normiert. Die Diffusionszeit wird nach Gleichung (2.77) angepasst und steigt bei einem Glycerinanteil von 30 % auf das 2,4-fache der Ausgangszeit.

In Abbildung 6.2b sind die aus der Korrelationsfunktion mittels der Anpassungsfunktion gemäß Gleichung (2.87) erhaltenen Diffusionszeiten von AF-488 für fünf unterschiedliche Glycerin-Konzentrationen gegen die Anregungsleistung aufgetragen. Diffusionsmessungen werden in der FCS häufig durch die Messung einer Probe mit bekanntem Diffusionskoeffizienten kalibriert, sodass bei einer festgelegten Anregungsleistung relative Änderungen des Diffusionsverhaltens genau bestimmt werden können. Eine solche Kalibrierung ist hier nur eingeschränkt möglich, da in Hinblick auf die Analyse des photophysikalischen Verhaltens Messwerte unter verschiedenen Leistungen aufgenommen werden. Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten aus den FCS-Daten kann bei hohen Anregungsleistungen durch das Auftreten von Photobleichen zu einer Verminderung der lokalen Konzentration und somit

(a) Korrelationsfkt. bei 100 μ W(b) Leistungsabhängigkeit der Diffusionszeit τ_D **Abbildung 6.2: Glycerineinfluss auf die Diffusionszeit von AF-488**

Unter Zugabe von Glycerin steigt die mittlere Diffusionszeit der beobachteten Moleküle durch das konfokale Volumen an. (a) Die normierten Anpassungen der Korrelationsfunktionen bei einer Leistung von 100 μ W in der Eingangsapertur zeigen eine Verschiebung des diffusiven Anteils zu längeren Zeiten bei steigendem Glycerinanteil. (b) Die gemessenen Diffusionszeiten bei unterschiedlichen Glycerinanteilen steigen mit der Anregungsleistung. Die durch Gleichung (6.1) extrapolierten Diffusionszeiten geben beim Ordinatenschnittpunkt die Diffusionszeit τ_{D_0} ohne Sättigungseffekte an.

einer Fehlinterpretation der (niedrigeren) Diffusionszeiten führen [40].

Entspricht die mittlere Bleichzeit der mittleren Aufenthaltsdauer der Moleküle im Fokus (oder kürzer), kann dies anhand einer leistungsabhängigen Abnahme der mittleren Molekülanzahl bzw. der Amplitude der Korrelationsfunktion beobachtet werden. Bei der Beobachtung von Farbstoffen, bei denen kein nennenswertes Photobleichen auftritt, ist ein Anstieg der mittleren Molekülanzahl und Diffusionszeit mit steigender Leistung aufgrund von Sättigungseffekten beobachtbar [291]. Der Einfluss von Sättigungseffekten auf die Korrelationsamplitude und die Zeitkonstante des Diffusionsverhaltens wurde bereits von Enderlein et al. [235] untersucht, dennoch bleiben einige Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit und Parametrisierung der Werte bei hohen Laserleistungen [292]. Daher wird im Folgenden zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten die Diffusionszeit zur minimalen Laserleistung $\lim_{P \rightarrow 0} \tau_D(P)$ durch

$$\tau_D(P) = \tau_{D_0} + \frac{\alpha P}{1 + \frac{P}{P_{\text{sat}}}} \quad (6.1)$$

bestimmt [211]. Die Funktion beschreibt einen einfachen Sättigungsverlauf, wobei der Parameter α frei angepasst wird und die Normierung auf die betrachtete Abhängigkeitsgröße herstellt. Durch P_{sat} ist der Sättigungsverlauf bestimmt, und τ_{D_0} beschreibt das asymptotische Minimum der Diffusionszeit. Wird dieses Minimum mit einer Probe mit bekanntem Diffusionskoeffizienten bestimmt, können anschließende Sättigungsmessungen relativ zu dieser Messung ausgewertet werden. Die für die Bestimmung von τ_{D_0} genutzte Anpassungsfunktion ist in Abbildung 6.2b als durchgezogene Linie dargestellt. Der jeweilige

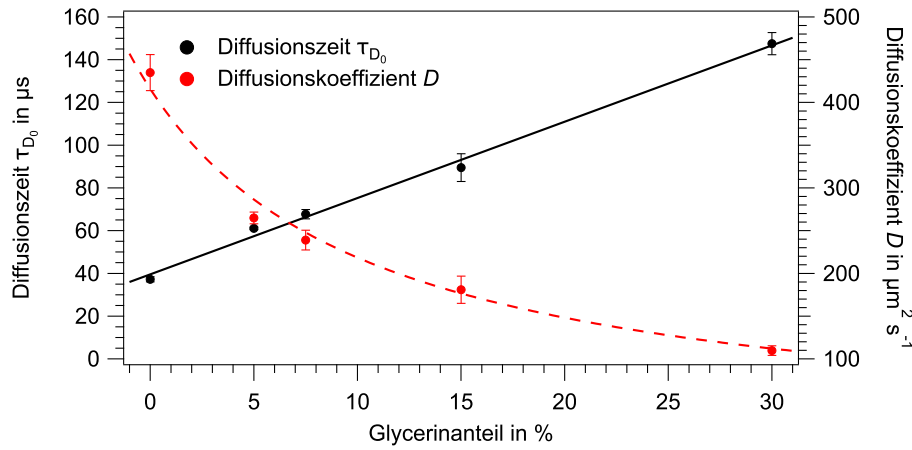


Abbildung 6.3: Diffusionszeit und Diffusionskoeffizient von AF-488

Die aus den FCS Messungen bestimmte Diffusionszeit τ_{D_0} (schwarz) steigt linear (schwarze Bestgerade) mit dem Glycerinanteil. Die nach Gleichung (2.88b) berechneten Diffusionskoeffizienten (rot) sinken indirekt proportional dazu (rot gestrichelte Linie).

Schnittpunkt mit der Ordinate gibt dabei den Wert für das zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten verwendete τ_{D_0} an. Es ist klar zu erkennen, dass die Diffusionszeit wie erwartet mit einer Erhöhung des Glycerinanteils ansteigt.

Auffällig ist, dass bei steigender Glycerinkonzentration die Diffusionszeit zu niedrigen Leistungen wieder ansteigt. Eine generelle Erhöhung der Diffusionszeit ist aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes von Glycerin mit einem Brechungsindex von $n = 1,4784$ und Wasser mit einem Brechungsindex von $n = 1,3372$ bei 486 nm (Fraunhofer F-Linie bzw. H β -Linie der Balmer-Serie bei 20 °C relativ zu Luft unter Normalbedingung) erwartbar [293]. Die Abweichung führt bei der Verwendung des genutzten Wasserimmersionsobjektivs zu Aberrationen und somit einer Vergrößerung des konfokalen Volumens von bis zu 10 % [289]. Dieser Effekt kann durch die Anpassung des verwendeten Deckglases und des Objektivs (z. B. Einstellung des Korrekturringes) korrigiert werden, wobei der Effekt auf die Aussagekraft der FCS-Messungen keinen entscheidenden Einfluss haben sollte [294]. Obgleich die glycerinabhängige Änderung des Beobachtungsvolumens also zu Verschiebungseffekten der Diffusionszeit führen kann, wird das Absinken der Zeiten zu einem Minimum bei etwa 20 μW mit anschließendem sigmoidalen Verlauf dadurch nur unzureichend erklärt.

Abbildung 6.3 zeigt die mit der Glycerinkonzentration linear ansteigende minimale Diffusionszeit τ_{D_0} . Der Diffusionskoeffizient kann anhand der Kalibrationsmessung (siehe Abschnitt 6.1) nach Gleichung (2.88b) berechnet werden und fällt indirekt proportional zur Diffusionszeit. Mit Hilfe der in Abbildung 6.4a dargestellten Viskosität des Glycerin-Wasser-Gemisches, kann über die Stokes-Einstein-Gleichung

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_0} \quad (6.2)$$

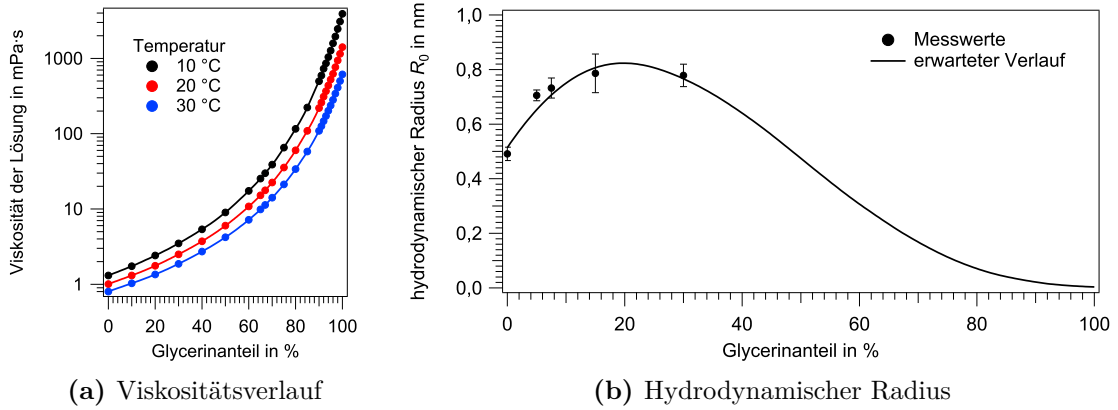


Abbildung 6.4: Viskosität und hydrodynamischer Radius von AF-488

(a) Verlauf der Viskosität des Glycerin-Wasser-Gemisches nach Segur und Oberstar [298]. (b) Der hydrodynamische Radius (schwarze Kreise) ergibt sich aus der Stokes-Einstein-Gleichung (siehe Gleichung (6.2)) bei $(20,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ und steigt von $(4,9 \pm 0,2) \text{ \AA}$ auf $(7,8 \pm 0,4) \text{ \AA}$. Die durchgezogene Linie kennzeichnet den aus der genäherten Diffusionszeit in Abbildung 6.3 (rot gestrichelte Linie) und der Viskosität bei 20°C in (a) erwarteten Verlauf.

den entsprechenden Diffusionskoeffizienten ein hydrodynamischer Radius R_0 zugewiesen werden. In Abbildung 6.4b ist der entsprechende hydrodynamische Radius (auch Stokesradius) gegen den Glycerinanteil und in Abbildung C.11 zusätzlich die zugehörige Viskosität des Lösungsmittels gegen die gemessene Diffusionszeit aufgetragen. Da der Einfluss von Temperaturänderungen auf die Viskosität ebenfalls zu einer linearen Verschiebung der Diffusionszeiten führen kann, die hier nicht unterscheidbar mit der Änderung durch die Glycerinkonzentration ist, ist von einem zusätzlichen Fehler von etwa 2 % je abweichendem Grad Celsius auszugehen [286, 295]. Der hydrodynamische Radius von AF-488 in Wasser ohne Glycerin beträgt dabei $R_0 = (4,91 \pm 0,25) \text{ \AA}$ und steigt auf einen Wert von $R_0 = (7,8 \pm 0,4) \text{ \AA}$ bei 30 % Glycerin. Er bewegt sich damit im Bereich der aus der Literatur erwarteten Größenordnung [296] und entspricht etwa der zwei- bis dreifachen Größe des effektiven hydrodynamischen Radius des Glycerins von $R_{0,\text{Gly}} = 2,6 \text{ \AA}$ [297]. Die Änderung des hydrodynamischen Radius kennzeichnet Abweichungen im Diffusionsverhalten der Moleküle bei unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen und ist anhand des Diffusionskoeffizienten gemäß Abbildung 6.3 und der Viskosität entsprechend Abbildung 6.4a als durchgezogene Linie in Abbildung 6.4b dargestellt. Zusätzlich führen, wie bereits in Bezug auf Abbildung 6.2b erläutert, hohe Glycerinkonzentrationen zu Problemen in der Bestimmung der minimalen Diffusionszeit τ_{D_0} . Da bereits bei einem Glycerinanteil von 15 % die Diffusionszeit mehr als verdoppelt wird und bei geringen Leistungen die Genauigkeit der Anpassungsfunktion 6.1 zu höheren Glycerinkonzentrationen abnimmt und Änderungen des Diffusionsverhaltens auftreten, wurden die folgenden Messungen in 5 % Schritten bis zu einem maximalen Glycerinanteil von 20 % durchgeführt.

Da die Farbstoffkonzentration der jeweiligen Probe die messbare Gesamtintensität bestimmt, aber keinen Einfluss auf das Fluktuationsverhalten der transienten Intensität hat, konnten

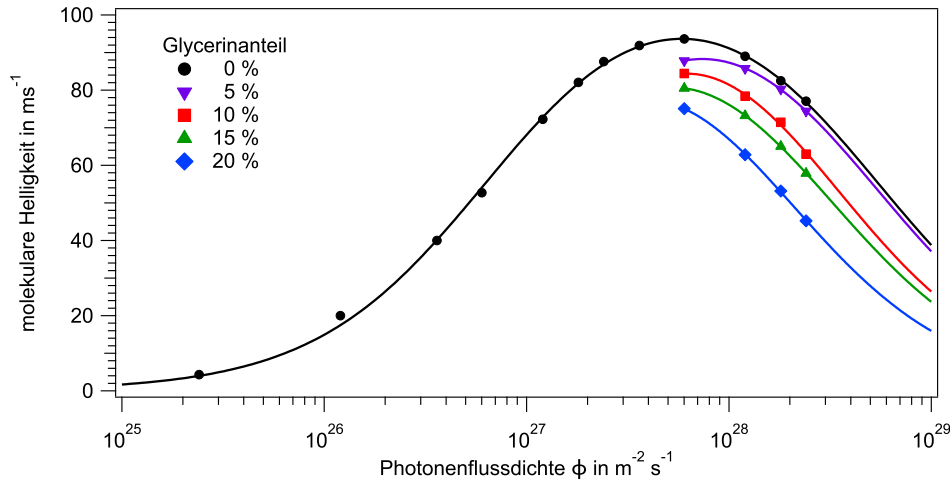


Abbildung 6.5: Molekulare Helligkeit von AF-488 unter Glycerinzugabe

Die MB von AF-488 erreicht ein Maximum bei einer Photonenflussdichte von etwa $\phi = 6 \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und sinkt mit weiter steigender Anregungsleistung wieder ab. Dies spricht für eine zusätzliche Sättigung des Systems durch höhere Singulett und/oder Triplettzustände. Die Linien zeigen daher die Anpassung der Messwerte durch Gleichung (4.21), die allerdings keine Interkombinationsvorgänge in höher angeregten elektronischen Zuständen beachtet. Die Zugabe von Glycerin zum Lösungsmittel führt zu einem zusätzlichen Absinken der MB.

unterschiedliche Farbstoffkonzentrationen verwendet werden. Dies bringt den Vorteil, den relativen Unterschied im Glycerinanteil der Proben zuverlässig einstellen zu können, da von einer hohen Ausgangskonzentration ausgehend verdünnt werden kann. Da dies zu unterschiedlichen Zählraten und mittleren Molekülzahlen (siehe Abbildung 6.7) führt, wird nachfolgend die mittlere Zählrate je Molekül in Form der molekularen Helligkeit (MB, siehe Abschnitt 4.1 und Anhang B.2) angegeben. Der Verlauf der MB sollte dabei unabhängig vom Diffusionsverhalten sein und ist in Abbildung 6.5 dargestellt. Die Messungen unter Glycerinzugabe sind nur für hohe Anregungsleistungen über $200 \mu\text{W}$ durchgeführt worden und entsprechend aufgetragen. Es fällt auf, dass die MB ein Maximum bei $\phi = 6 \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erreicht und bei weiter steigender Photonenflussdichte abnimmt. Die Photonenflussdichte gibt dabei die entsprechend der am Objektiv eingestrahlten Leistung P und bezüglich der Querschnittsfläche des Fokus herrschende Energieflussdichte an. Sie führt mit dem molekularen Wirkungsquerschnitt des betrachteten Fluorophors zur Anregungsrate im Laserfokus. Für einen gaußförmigen Laserstrahl ist die Photonenflussdichte durch

$$\phi(P) = \frac{2P}{h\nu \cdot \pi w^2} \quad (6.3)$$

gegeben. Die Photonenenergie ist über die Planck–Einstein-Relation durch die Frequenz des Lichtes ν und das Plancksche Wirkungsquantum h bestimmt. Die Querschnittsfläche wird mit dem radialen Fokusparameter ($1/e^2$ -Abfall) der auch für die Diffusionsbestimmungen verwendet wurde, berechnet.

Unabhängig von der Photonenflussdichte führt die Erhöhung des Glycerinanteils zu einer

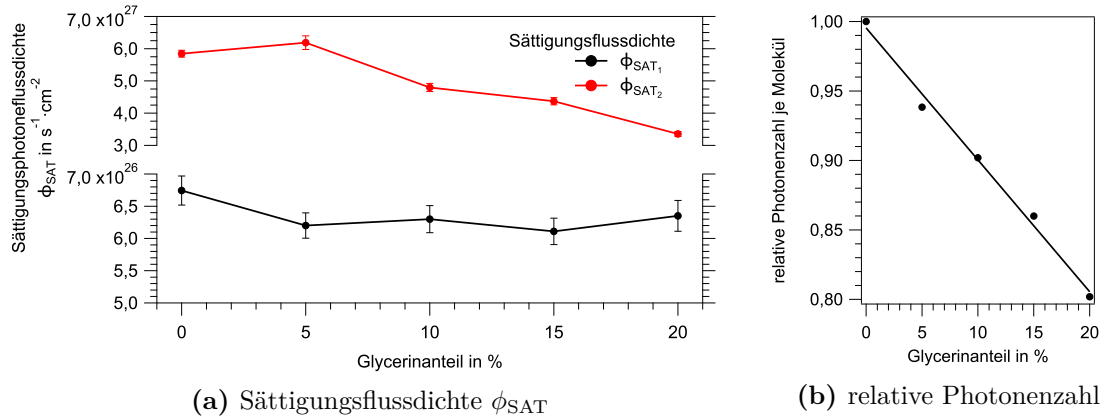


Abbildung 6.6: Sättigung des Leuchtverhaltens von AF-488

(a) Die Sättigungswerte nach Gleichung (6.4) geben den Verlauf der MB gemäß der Besetzung von einfachen und höheren angeregten elektronischen Zuständen an. Die Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung. (b) Die maximale MB sinkt annähernd linear mit steigendem Glycerinanteil und beträgt bei 20 % Glycerinanteil noch 80 % der Ausgangsintensität. Die Linie kennzeichnet eine lineare Anpassung der Messwerte.

Verminderung der molekularen Helligkeit insgesamt. Die in Abbildung 6.5 dargestellten farbigen Linien sind globale Anpassungen nach Gleichung (4.21) unter der Annahme, dass die Abnahme der Helligkeit durch die Besetzung höherer Triplett- bzw. Singulettzustände bedingt ist und die Wahrscheinlichkeit von Wechseln der Multiplizität aus höheren elektronischen Zuständen vernachlässigbar klein ist. Dabei sind die Sättigungsflussdichten durch

$$\begin{aligned} \phi_{\text{sat}_1} &= k_0 \left(\sigma_{S_0 \rightarrow 1} \frac{k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}}{k_{\text{rISC}}} \right)^{-1}, \\ \phi_{\text{sat}_2} &= k_0 \left(\sigma_{S_0 \rightarrow 1} \left(\frac{\sigma_{S_1 \rightarrow n}}{k_{S_{n \rightarrow 1}}} + \frac{\sigma_{T_1 \rightarrow n} k_{\text{ISC}}}{k_{T_{n \rightarrow 1}} k_{\text{rISC}}} \right) \right)^{-1} \end{aligned} \quad (6.4)$$

gegeben und in Abbildung 6.6a gegen den Glycerinanteil aufgetragen. Die Sättigungsflussdichten dienen hier als Indikatoren für das Absorptionsverhalten des Farbstoffes. Dabei gibt ϕ_{sat_1} die Sättigung gemäß eines einfachen Drei-Niveau-Systems an und führt zu einer asymptotischen Stagnation der MB. Die sukzessive Absorption weiterer Photonen aus einem bereits elektronisch angeregten Zustand wird durch ϕ_{sat_2} beschrieben und führt zu einer Verminderung der Besetzungsdichte des einfach angeregten Zustandes und somit zu einem zusätzlichen Helligkeitsverlust. Der Sättigungswert ϕ_{sat_1} bleibt bei unterschiedlichen Glyceringehalten relativ konstant und ϕ_{sat_2} sinkt leicht. Dies führt zu einer rascheren Abnahme der maximalen MB bei höherem Glycerinanteil und kann unter anderem durch den längeren Aufenthalt einzelner Moleküle im konfokalen Volumen und der damit steigenden Wahrscheinlichkeit für eine sukzessive Photonenabsorption erklärt werden. In Abbildung 6.6b ist die relative Abnahme des Maximums der MB dargestellt. Es fällt auf, dass

die relative Photonenzahl im Mittel um einen Prozentpunkt je Prozentpunkt Glycerinanteil sinkt, wobei durch die erhöhte Viskosität des Lösungsmittels eine erhöhte Quantenausbeute aufgrund der unwahrscheinlicheren Wechselwirkung mit anderen Molekülen zu erwarten wäre [299].

An den Anpassungswerten für die mittlere Molekülzahl und die Zählrate der Detektoren, die in Abbildung 6.7 dargestellt sind, ist zu erkennen, dass die Verminderung der MB während der Transitzeit durch den Fokus nicht primär auf erhöhtes Photobleichen zurückgeführt werden kann. Bei Bleichprozessen im Bereich der Diffusionszeit wäre unter hohen Anregungsleistungen ein Absinken der apparenten Diffusionszeit, eine Abnahme der mittleren Molekülzahl aufgrund der verminderten lokalen Konzentration, oder eine Abnahme des Fluoreszenzsignals zu erwarten [46, 107, 204, 231]. Bei den in Abbildung 6.2b dargestellten apparenten Diffusionszeiten ist kein durch Photobleichen induzierter Abfall bei hohen Anregungsleistungen zu sehen. Die mittlere Molekülzahl in Abbildung 6.7a zeigt sogar ein tendenziell Gegenteiliges Verhalten und steigt unter Glycerinzugabe stärker an. Dabei wurde eine Hintergrundkorrektur mittels der Messung des Lösungsmittels ohne Farbstoffe durchgeführt, da das Fluoreszenzintensitätssignal F der k beobachteten Moleküle um ein unkorreliertes Hintergrundsignal H der Form

$$F(t) = H(t) + \sum_k F_k(t) \quad (6.5)$$

verstärkt wird. Somit lautet Gleichung (2.71) bei unkorreliertem Hintergrundsignal, das nicht vernachlässigbar klein ist und insbesondere bei stark streuenden Lösungsmitteln auftreten kann [57, 300, 301]:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle_t}{\langle F(t) \rangle_t^2} \frac{\langle F(t) \rangle_t^2}{\langle F(t) + H(t) \rangle_t^2} \quad (6.6)$$

Dies führt zu einer geringeren Amplitude bzw. zum Trugschluss einer höheren Konzentration und folglich einer geringeren MB. Eine Korrektur dieses Effektes kann basierend auf der Arbeit von Koppel [302] und den Formulierungen nach [221, 303] als

$$\frac{1}{N} = \frac{N_{\text{kor}}}{(N_{\text{kor}} + N_H)^2} \quad (6.7)$$

mit

$$N_H = \frac{\text{Hintergrundzählrate}}{\text{Signalzählrate}} = \frac{\langle F_H \rangle}{\langle F \rangle - \langle F_H \rangle} N_{\text{kor}} \quad (6.8)$$

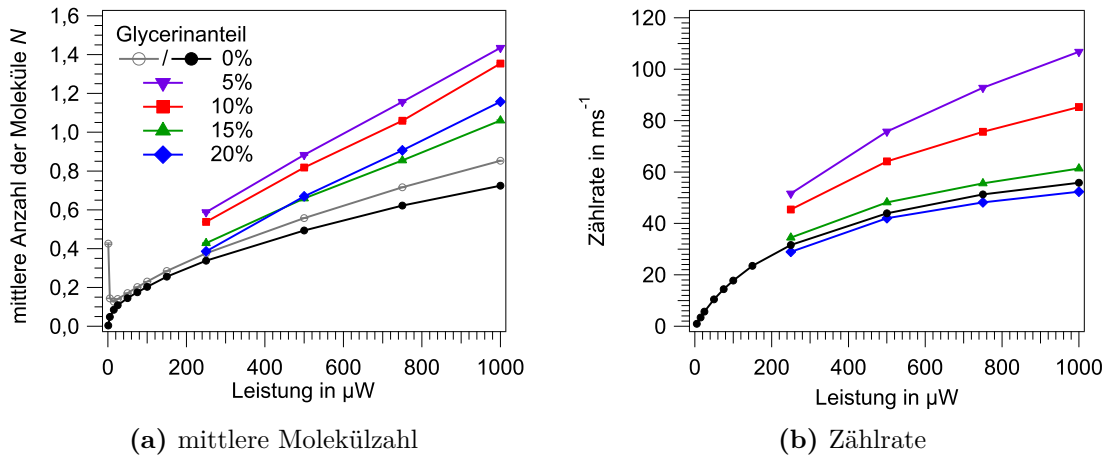


Abbildung 6.7: Mittlere Molekülzahl und Zählrate von AF-488

(a) Die Steigung der mittleren Molekülzahl N zeigt unter der Zugabe von Glycerin keinen zusätzlichen Abfall. Abweichende Werte für N resultieren aus unterschiedlichen Fluorophorkonzentrationen zwischen den Proben. Die grauen leeren Symbole zeigen exemplarisch die nicht nach Gleichung (6.9) hintergrundkorrigierten Werte für die Messung ohne Glycerin. (b) Die Zählraten sättigen bei hohen Anregungsleistungen leicht. Es ist kein systematisch anderer Verlauf unter Glycerinzugabe zu erkennen. Die Verbindungslinien der Punkte in (a) und (b) dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

geschrieben werden¹. Die Korrektur kann nun mithilfe der Gleichungen (6.7) und (6.8) und der Messung der Hintergrundfluoreszenz F_H gemäß der Gleichung

$$N_{\text{korrt}} = N \left(1 + \frac{\langle F_H \rangle}{\langle F \rangle - \langle F_H \rangle} \right)^{-2} \quad (6.9)$$

vorgenommen und in die dargestellte mittlere Molekülzahl einbezogen werden. Die Abweichung ist zusätzlich in Abbildung 6.7a für die Messung ohne Glycerinzugabe mit dargestellt (grau, leere Kreise). Die unterschiedlichen absoluten Werte bzw. mittleren Anzahlen an Molekülen im Beobachtungsvolumen resultieren, wie bereits erwähnt, aus Unterschieden der Farbstoffkonzentration aufgrund der Präparation der Proben. Dies sollte keinen Einfluss auf die in Abbildung 6.5 gezeigte MB haben, da sie sich aus dem Verhältnis der Molekülzahl zur Zählrate (siehe Abbildung 6.7b) ergibt und, solange die Probenkonzentration nicht zu einer hohen Mehr-Molekül-Wahrscheinlichkeit im Beobachtungsvolumen führt, die Emissionsrate eines einzelnen Moleküls beschreibt. Selbiges gilt für die photophysikalischen Parameter, die im Folgenden genauer betrachtet werden.

6.2.2 Triplettparameter und Löschraten

Unter Betrachtung der in Abbildung 6.8 dargestellten Triplettzeiten und des Triplettanteils fällt auf, dass die mittlere Zahl an Molekülen im Triplett und die Aufenthaltsdauer in diesem mit steigender Glycerinkonzentration zunimmt. Die durchgezogenen Linien

¹ Die gemessene Fluoreszenz F ist durch die Signalzählrate und die Hintergrundfluoreszenz F_H gegeben.

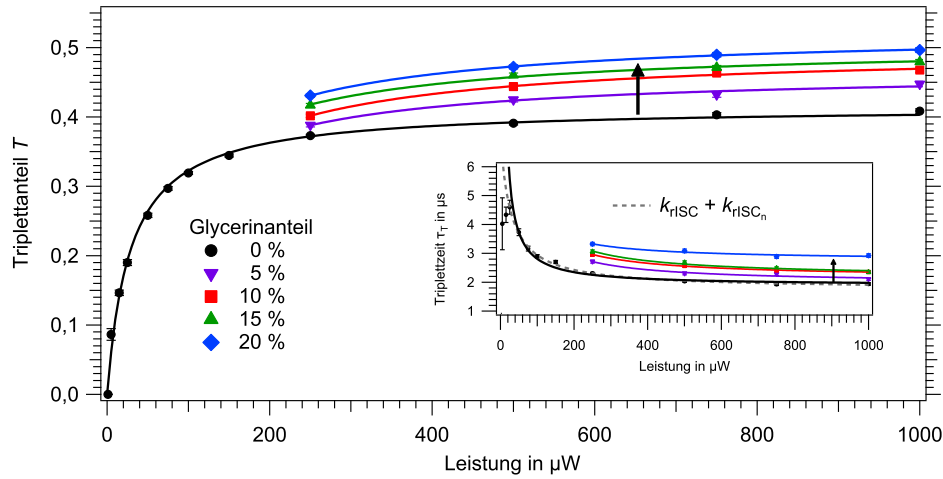


Abbildung 6.8: Triplettparameter von AF-488 unter Glycerinzugabe

Der Tripletanteil und die Tripletzeit steigen mit steigendem Glycerinanteil. Die Linien sind globale Anpassungen nach Gleichung (6.10) und Gleichung (4.12b). Der Tripletanteil / die Tripletzeit steigt von 0,41 / 1,94 μs ohne Glycerin auf 0,50 / 2,92 μs mit 20 % Glycerin bei 1 mW eingestrahelter Leistung. Die grau gestrichelte Anpassungsgerade für den Tripletzeitverlauf ohne Glycerin ist durch Gleichung (6.11) gegeben.

sind dabei Anpassungen nach Gleichung (4.13), wobei der von der anregungsseitigen Photonenflussdichte und der Lebensdauer sowie dem molekularen Wirkungsquerschnitt des Farbstoffes abhängige Tripletanteil T in vereinfachter Weise formuliert wird, so dass

$$T(P) = \left(1 + \frac{k_{rISC}}{k_{ISC}} \left(1 + \frac{P_{\text{sat}}}{P} \right) \right)^{-1} \quad (6.10)$$

mit $P_{\text{sat}} = \frac{h\nu \cdot \pi w^2}{2\tau_0 \sigma_{S_0 \rightarrow 1}}$

gilt. Dabei wurde Gleichung (6.3) genutzt, um den Tripletanteil in direkter Abhängigkeit von der ins Objektiv eingestrahlten Anregungsleistung angeben zu können. Die Sättigungsschwelle P_{sat} gibt damit die halbe Höhe der mit der Anregungsleistung P steigenden Besetzungsdichte des angeregten Singulettzustandes aus dem Singulett-Grundzustand an. In analoger Formulierung kann die Tripletzeit τ_T gemäß Gleichung (4.12b) formuliert werden, wobei unter der zusätzlichen Annahme, dass die Rück-Interkombination eine Leistungsabhängigkeit nach Gleichung (5.15) aufweist und somit die Tripletzeiten bei geringer Anregung weiter verlängert. Die Anpassungsfunktion lautet:

$$\tau_T(P) = \left(k_{ISC} \left(1 + \frac{P_{\text{sat}}}{P} \right)^{-1} + k_{rISC} + k_{rISC_n} \left(1 + \frac{P_{\text{sat}_T}}{P} \right)^{-1} \right)^{-1} \quad (6.11)$$

mit $P_{\text{sat}} = \frac{h\nu \cdot \pi w^2}{2\tau_0 \sigma_{S_0 \rightarrow 1}}$ und $P_{\text{sat}_T} = \frac{h\nu \cdot \pi w^2 \cdot k_{T_{n \rightarrow 1}}}{2\sigma_{T_1 \rightarrow n}}$.

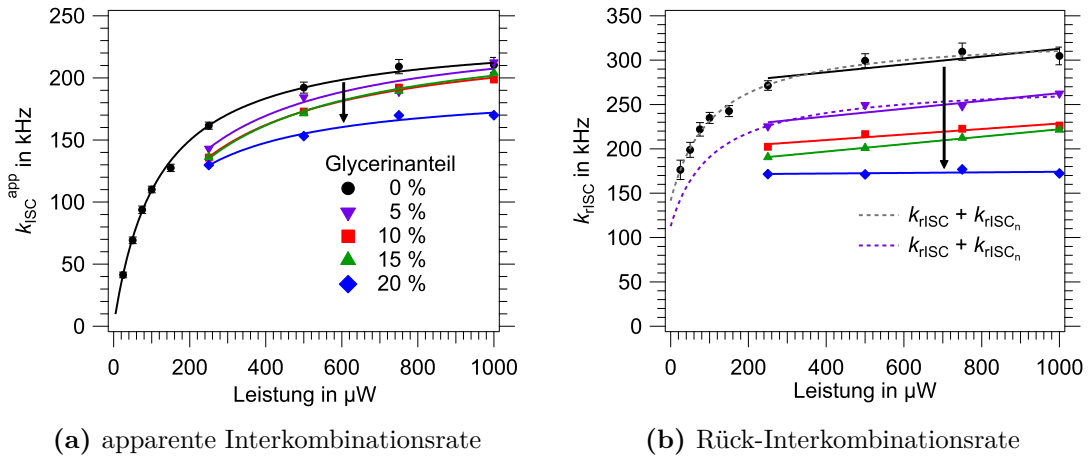


Abbildung 6.9: Interkombinationsraten von AF-488 unter Glycerinzugabe

(a) Die Interkombinationsrate nimmt bei steigendem Glyceringehalt ab und führt so zu einem verringerten Übergang in den Dunkelzustand. Die durchgezogenen Linien kennzeichnen dabei die globale Anpassung entsprechend Gleichung (2.89a). (b) Die Rück-Interkombinationsrate nimmt ebenfalls bei steigendem Glyceringehalt ab. Die durchgezogenen Linien zeigen die globalen Anpassungen der Messwerte nach Gleichung (6.12). Die grau und lila gestrichelten Linien geben dabei zusätzlich die Anpassung unter Beachtung einer beschleunigten Rück-Interkombination gemäß Gleichung (5.15) an, die im Text genauer erklärt wird und bei 0 % Glycerin zu $k_{rISC} = (142 \pm 10)$ kHz und $k_{rISC_n} = (187 \pm 9)$ kHz und bei 5 % zu $k_{rISC} = (113 \pm 30)$ kHz und $k_{rISC_n} = (162 \pm 36)$ kHz führt.

Die durchgezogenen Linien bei der Tripletzeit in Abbildung 6.8 zeigen dabei die Anpassung nach Gleichung (4.12b). Grau gestrichelt ist die Anpassung nach Gleichung (6.11) mit zwei unterschiedlichen Rück-Interkombinationsraten zu sehen. Die Berechnung der Interkombinationsraten nach Gleichung (2.89) führt zu Abbildung 6.9, in der bei der Interkombinationsrate k_{ISC} und der Rück-Interkombinationsrate k_{rISC} ein leistungsabhängiger Abfall zu sehen ist. Dabei sinkt die Rück-Interkombination aus dem Triplet deutlich stärker ab als die Interkombination in den Dunkelzustand. Somit steigen die Aufenthaltszeiten und der mittlere Anteil von Molekülen im Triplet wie bereits beschrieben an (siehe Abbildung 6.8). Die Rück-Interkombinationsrate in Abbildung 6.9b kann bei hohen Leistungen durch die einfache lineare Gleichung

$$k_{rISC}^{app}(P) = k_{rISC} + \alpha P \quad (6.12)$$

approximiert werden, führt aber zu keiner sinnvollen Abschätzung der Grenzwerte $P \rightarrow \infty$ und $P \rightarrow 0$ der beobachteten Rück-Interkombination. So führt die Anpassung der Datenpunkte ohne Glycerin zu einem Wert von $k_{rISC} = (269 \pm 4)$ kHz und bei einem Glycerinanteil von 5 % zu $k_{rISC} = (219 \pm 4)$ kHz, was einer Abnahme um 18,6 % entspricht. Bei der Betrachtung der Messwerte bei geringen Leistungen ist ersichtlich, dass diese Werte deutlich zu hoch sind und die Messwerte bei niedriger Anregung nur unzureichend charakterisieren.

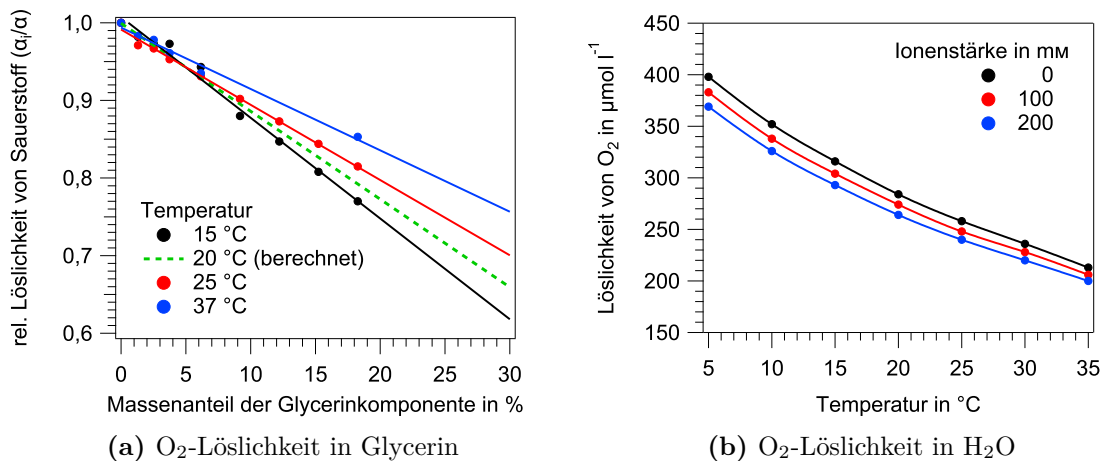


Abbildung 6.10: Temperaturabhängige O₂-Löslichkeit in Glycerin-Wasser-Gemischen

(a) Relative Löslichkeit von Sauerstoff in Glycerin in Abhängigkeit des relativen Massenanteils von Glycerin bei verschiedenen Temperaturen nach [304]. Bei steigendem Glycerinanteil wurde in erster Näherung ein linearer Verlauf zur Bestimmung der Werte bei 20 °C angenommen (grün gestrichelte Linie). (b) Temperaturabhängige Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser. Dabei ist die Löslichkeit mit steigendem Chloridgehalt bzw. steigender Ionenstärke niedriger und sinkt mit der Temperatur [305].

Eine genauere Analyse ist mit Gleichung (5.15) möglich und führt in Abbildung 6.9b zu dem grau gestrichelten Verlauf mit den Werten $k_{\text{rISC}} = (142 \pm 10) \text{ kHz}$ und $k_{\text{rISC}_n} = (187 \pm 9) \text{ kHz}$ und dem Sättigungswert $P_{\text{sat}_T} = (108,3 \pm 20,7) \mu\text{W}$. Der Sättigungswert hängt nach Gleichung (6.10) vom Verhältnis des molekularen Wirkungsquerschnitts des Triplettzustandes zur inneren Konversionsrate aus dem höher angeregten Triplettzustand ab. Unter der Annahme, dass die Glycerinzugabe einen Einfluss auf die Reproduktionswahrscheinlichkeiten hat, kann P_{sat_T} als farbstoff- und mikroskopabhängige Konstante zur Bestimmung der Abnahme der Rück-Interkombination genutzt werden. So führt die Anpassung der Rück-Interkombinationsraten bei 5 % Glycerin zu den Werten $k_{\text{rISC}} = (113 \pm 30) \text{ kHz}$ und $k_{\text{rISC}_n} = (162 \pm 36) \text{ kHz}$. Die Abnahme der einzelnen Raten entspricht somit 20,4 % für k_{rISC} und 13,4 % für k_{rISC_n} . Die relativen Anpassungsfehler sind dabei mit 19 % und 27 % sehr hoch, was den fehlenden Messpunkten bei niedrigen Leistungen zuzuschreiben ist.

Weitere mögliche Erklärungen für den Einfluss des Glycerins auf das Triplettblinking des Farbstoffes sind neben der Viskositätsänderung die unterschiedliche Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser und Glycerin. So ist zum Beispiel für strukturell ähnliche Farbstoffe wie Rh-6G die Wirkung des Sauerstoffes als Triplettlöcher bekannt [95, 108, 203, 306]. In Abbildung 6.10a ist die relative Sauerstofflöslichkeit in einem Glycerin-Wasser-Gemisch nach Kutsche et al. [304] dargestellt. Die grün gestrichelte Linie gibt dabei eine lineare Näherung für eine Temperatur von 20 °C an. Dabei fällt die Löslichkeit auf etwa 77 % des Ausgangswerts. Mithilfe der in Abbildung 6.10b dargestellten Löslichkeitswerte von Sauerstoff in Wasser, können die in Tabelle 6.1 aufgeführten Sauerstofflöslichkeiten für die betrachteten Glycerinkonzentrationen berechnet werden.

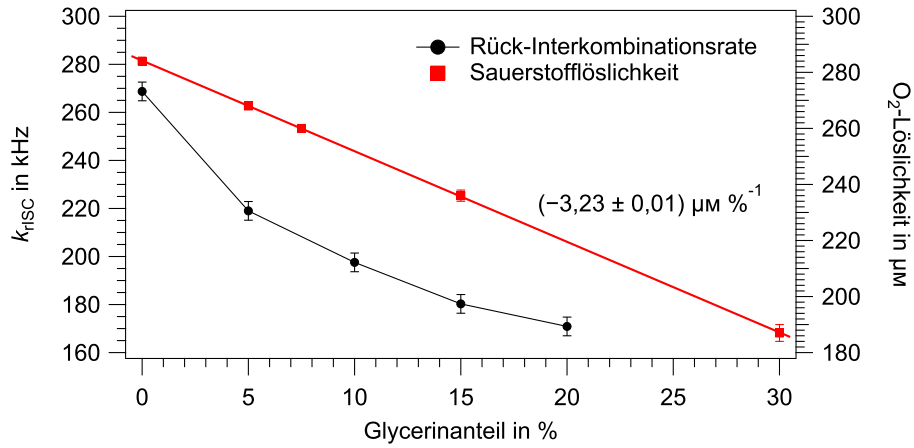
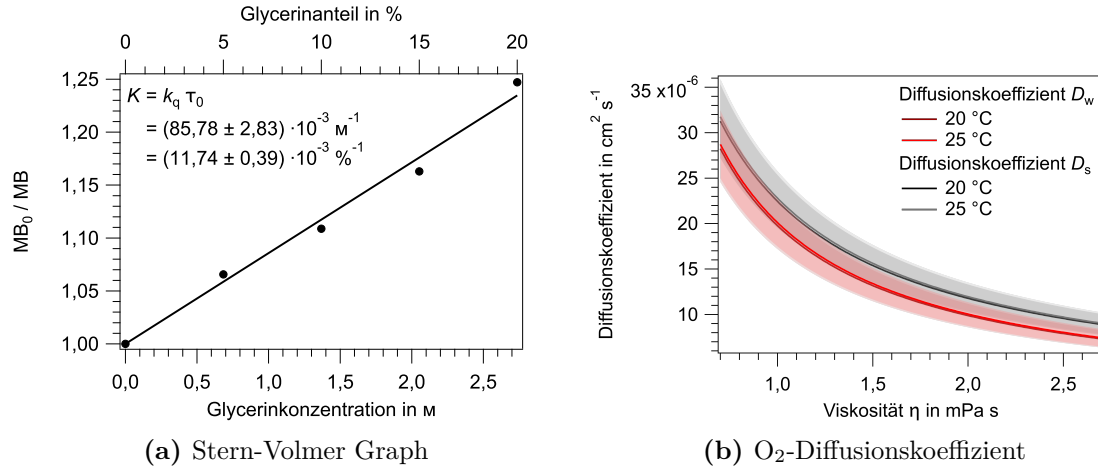


Abbildung 6.11: O₂-Löslichkeit und Rück-Interkombinationsrate von AF-488

Die sinkende Sauerstofflöslichkeit lässt sich linear anpassen (rote Linie) und sinkt um $(3,23 \pm 0,01) \mu\text{M}$ je Prozent Glycerinanteil. Zusätzlich ist ein deutlichen Abfall der Rück-Interkombinationsrate (schwarze Kreise) zu sehen. Die dünnen schwarzen Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

In Abbildung 6.11 ist der Abfall der Sauerstofflöslichkeit und der aus der globalen Anpassung der Rück-Interkombination gewonnene Wert für k_{ISC} aufgetragen. Der aus den Abbildungen 6.10a und 6.10b bestimmte, sinkende Sauerstoffanteil im Lösungsmittel führt zu einem deutlichen Abfall der Rück-Interkombinationsrate, die letztlich zu einer verringerten Besetzungsdichte des angeregten Zustandes und somit auch der molekularen Helligkeit führt. Dabei sinkt die Rück-Interkombinationsrate bei geringen Änderungen stark und nähert sich anschließend asymptotisch einem Minimum. Auch ein vermindert auftretender Schweratomeffekt durch eine geringere Konzentration gelöster Sauerstoffmoleküle (siehe Abschnitt 2.2.1) kann die Wahrscheinlichkeit für Prozesse, die mit einem Wechsel der Multiplizität verbunden sind, absenken. In Übereinstimmung mit Stracke, Heupel und Thiel [307] sind die Übergänge aus dem Triplett stärker betroffen als die Prozesse in den Triplett, wodurch die in Abbildung 6.5 beobachtete Abnahme der molekularen Helligkeit und der in Abbildung 6.8 gezeigte steigende Triplettanteil entstehen.

Die bereits in Abbildung 6.6b aufgetragene Verringerung der molekularen Helligkeit, kann nach Abschnitt 2.2.4.2 mit Hilfe der Stern-Volmer-Gleichung (siehe Gleichung (2.50), Seite 25) zur Bestimmung der Stern-Volmer Konstante K und der bimolekulare Löschrates k_q genutzt werden. In Abbildung 6.12a ist der lineare Anstieg des Verhältnisses der maximalen molekularen Helligkeit MB_0 bei einer Photonenflussdichte von $6 \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ zur maximalen molekularen Helligkeit MB bei zunehmendem Glycerinanteil entsprechend der Stern-Volmer-Gleichung aufgetragen (vgl. auch Abbildung 6.5). Der Anstieg und somit die Stern-Volmer Konstante beträgt $(85,78 \pm 2,83) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} / (11,74 \pm 0,39) \cdot 10^{-3}$ je Prozentpunkt Glycerin, was im Bezug zur Lebensdauer von $\tau_0 = 4,1 \text{ ns}$ zu einer Löschrates von $k_q = (20,92 \pm 0,69) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} / k_q = (2,89 \pm 0,10) \text{ MHz}$ je Prozentpunkt Glycerin führt. Das entspricht einer Abnahme der MB auf 50 % der maximalen MB (ohne Glycerin-


Abbildung 6.12: Stern-Volmer Graph und Sauerstoffdiffusivität

(a) Der Stern-Volmer Graph zeigt einen linearen Verlauf mit einem Anstieg bzw. einer Stern-Volmer Konstanten von $(85,78 \pm 2,83) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ / $(11,74 \pm 0,39) \cdot 10^{-3}$ je Prozentpunkt Glycerin. (b) Verlauf des Diffusionskoeffizienten von Sauerstoff in Wasser bei verschiedenen Temperaturen (20 °C dunkel, 25 °C hell) nach Gleichung (6.13) (rot) und Gleichung (6.14) (schwarz). Die halbtransparenten Bereiche kennzeichnen einen Fehler von $\pm 13\%$.

zugabe) bei $(11,66 \pm 0,38) \text{ M}$ bzw. einem Anteil von 85 % Glycerin. Die Reduktion diffusiver Lösungsprozesse durch die Viskositätsänderung und Verminderung der Sauerstofflöslichkeit führt also zu einer Reduktion der MB. Basierend auf der Stokes-Einstein-Gleichung kann der Diffusionskoeffizient des Sauerstoffes in der Lösung nach Wilke und Chang [308] empirisch durch

$$D_w = 7,4 \cdot 10^{-8} \cdot \frac{T \sqrt{xM}}{\eta \sqrt[5]{V^3}} \quad (6.13)$$

abgeschätzt werden. Dabei bezeichnet T die Temperatur, x einen Assoziationsparameter, der das molekulare Gewicht des Lösungsmittels M in Bezug zum betrachteten Diffusionsprozess korrigiert, η die Viskosität der Lösung und V das molare Volumen der gelösten Substanz. In der Literatur sind einige Modifikationen der Gleichung für bestimmte Lösungsmittel und gelöste Substanzen zu finden [309]. So kann der Assoziationsparameter x in Form eines latenten Wärmefaktors² ausgedrückt werden, wodurch die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten gemäß Gleichung (6.13) mit weiteren empirischen Korrekturen auch als [310]

$$D_s = 5,4 \cdot 10^{-8} \left(\frac{T \sqrt{M}^3 \sqrt{\Delta H_{\text{Lös}}}}{\eta \sqrt{V} (\Delta H_{\text{Sub}})^{0,3}} \right)^{0,93} \quad (6.14)$$

geschrieben werden kann. Hier gibt $\Delta H_{\text{Lös}}$ die Verdampfungsenthalpie des Lösungsmittels

² Unter der Betrachtung, dass der Zusammenhalt über intermolekulare Kräfte über die spezifische Verdampfungswärme charakterisiert ist.

Tabelle 6.1: Parameter unterschiedlicher Glycerin-Wasser-Gemische

Nach Gleichung (6.1) aus Abbildung 6.2b extrapolierte Diffusionszeit τ_{D_0} und entsprechend Gleichung (6.2) bestimmter Diffusionskoeffizient D . Zusätzlich ist die maximale Sauerstofflöslichkeit der Lösung entsprechend Abbildung 6.11 aufgetragen. Der laterale Fokusparameter beträgt $w = (254,4 \pm 4,1)$ nm.

Glycerinanteil in %	τ_{D_0} in μ s	Viskosität ^a in mPa s	D in $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	O ₂ -Löslichkeit ^{a,b} in $\mu\text{mol l}^{-1}$
0,0	$37,2 \pm 1,2$	$1,01 \pm 0,03$	$434,9 \pm 21,0$	284 ± 1
5,0	$61,1 \pm 0,6$	$1,15 \pm 0,01$	$264,8 \pm 6,9$	268 ± 1
7,5	$67,7 \pm 2,2$	$1,23 \pm 0,04$	$239,0 \pm 11,6$	260 ± 1
15,0	$89,5 \pm 6,5$	$1,51 \pm 0,11$	$180,8 \pm 16,0$	236 ± 2
30,0	$147,5 \pm 5,2^c$	$2,51 \pm 0,09$	$109,7 \pm 5,6$	187 ± 3

^a Bei einer Temperatur von 20 °C nach Segur und Oberstar [298]. Der Fehler folgt aus dem Fehler der Diffusionszeit.

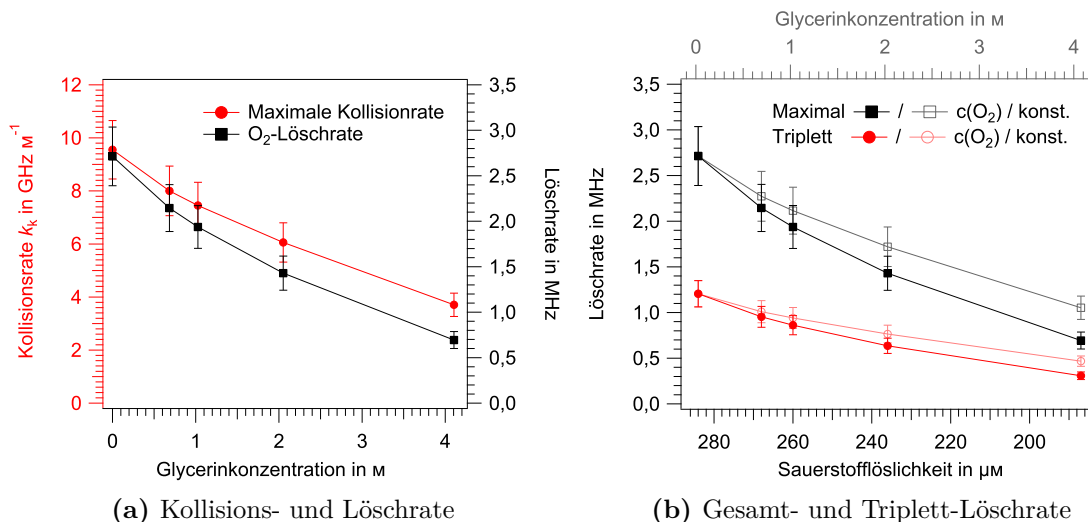
^b Bei einem Druck von 101,3 kPa und einem Atmosphären-Sauerstoffanteil von 20,94 % bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit nach Kutsche et al. [304] und Koppenol und Butler [305].

^c Aufgrund der starken Abweichung der Diffusionszeiten vom theoretisch erwarteten Verlauf (vgl. Abschnitt 2.2.3) bis zu einer Leistung von etwa 10 μ W wurden diese Messwerte nicht in die Anpassung einbezogen.

und ΔH_{Sub} die der gelösten Substanz an. Der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in Wasser bei 25 °C und Normaldruck kann nun mittels der Gleichungen (6.13) und (6.14) zu $D_w = (2,26 \pm 0,29) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bzw. $D_s = (2,54 \pm 0,33) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ berechnet werden³ und stimmt gut mit den experimentellen Werten von $2,19 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bis $2,60 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ überein [57, 309, 316–318].

In Abbildung 6.12b ist der Verlauf der Diffusionskoeffizienten D_w und D_s in Abhängigkeit von der Viskosität des Lösungsmittels für 20 °C und 25 °C aufgetragen. Es fällt auf, dass der Fehler der Bestimmung (± 13 %) die temperaturabhängigen Abweichungen ($\Delta T = 5$ °C) der Diffusionskoeffizienten weit übersteigt. Nach der Stokes-Einstein-Gleichung (siehe Gleichung (6.2)) entspricht ein mittlerer Diffusionskoeffizient von $2,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ einem hydrodynamischen Radius von etwa 91 pm. Die Literaturwerte für den kovalenten Atomradius von Sauerstoff betragen (66 ± 2) pm [319] und für den Van-der-Waals-Radius 155 pm bis 171 pm [320], wobei die Bindungslänge im Sauerstoffmolekül etwa 120 pm [321] beträgt. Diese Abweichungen in der Bestimmung über die Stokes-Einstein Gleichung für kleine Moleküle sind auch in der Literatur zu finden [78, 297, 322]. Zur Bestimmung der mittleren Kollisionsrate nach der Smoluchowski-Gleichung (siehe Abschnitt 2.2.4.2, Gleichung (2.51)) werden die aus der Stokes-Einstein Beziehung gewonnenen Radien verwendet, welche im Vergleich zum betrachteten Farbstoff ($(4,9 \pm 0,2)$ Å bis $(7,8 \pm 0,4)$ Å, vergleiche Abbildung C.11) klein sind und somit nur zu geringen Abweichungen der Interaktionsdistanz führen. Für eine grobe Abschätzung des Interaktionsradius kann auch die Ausdehnung des

³ Assoziationsparameter $x = 2,26$ [308, 309], molare Masse $M = 18,0 \text{ g mol}^{-1}$ [311], Viskosität $\eta = 0,890 \text{ mPa s}$ bei 25 °C [312, 313], molares Volumen $V = 25,6 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ [308, 314], Verdampfungsenthalpie $\Delta H_{\text{H}_2\text{O}} = 40,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta H_{\text{O}_2} = 5,58 \text{ kJ mol}^{-1}$ [311, 315]


Abbildung 6.13: Kollisions- und Löschraten von AF-488

(a) Die Kollisionsrate k_k (rot) gibt die konzentrationsabhängige Frequenz des Zusammentreffens der Farbstoff- und Sauerstoffmoleküle entsprechend der Smoluchowski Gleichung (siehe Gleichung (2.51)) an. Die effektiv beobachtbare Löschraten k_{O_2} (schwarz) hängt von der Sauerstoffkonzentration in der Lösung ab und ist hier für eine Löschraten-Effizienz von 100 % und einen Interaktionsradius von 5 Å aufgetragen. (b) Die Löschraten der Tripletzustände $k_{\text{O}_2, \text{qT} \rightarrow \text{S}}$ (rot) beträgt aufgrund der Redissoziation des Quintett-Komplexes in seine Edukte lediglich 4/9 der möglichen Löschraten (schwarz, siehe Abschnitt 2.2.4.2). Wird die verringerte Sauerstofflöslichkeit des Glycerin-Wasser-Gemisches außer acht gelassen, steigen die Löschraten (hellgrau und hellrot) entsprechend. Die durch die Sauerstofflöslichkeit verursachte Ratenänderung ist in Abbildung C.12 aufgetragen. Die Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

delokalisierten Elektronensystems des Fluorophors (siehe Abbildung 3.8a) entsprechend der Kohlenstoff-Bindungsabstände⁴ mit einem Radius von etwa 4 Å angenommen werden, was zusammen mit dem Sauerstoffradius von etwa 1 Å zu einem Interaktionsradius von 5 Å führt. Mit den in Tabelle 6.1 aufgetragenen Diffusionskoeffizienten des Fluorophors und den entsprechenden Viskositäten der Glycerin-Wasser-Mischung, können die in Tabelle 6.2 aufgetragenen Kollisionsraten k_k der Fluorophor- und Sauerstoffmoleküle nach Gleichung (2.51) zu $(3,71 \pm 0,44) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bis $(9,55 \pm 1,10) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.

In Abbildung 6.13a ist der Verlauf der diffusionsbestimmten Kollisionsrate k_k und der maximalen Löschraten $k_{\text{O}_2, \text{q}}$ bei entsprechend Tabelle 6.1 gegebener Sauerstofflöslichkeit dargestellt. Die Abweichung durch die Betrachtung der Sauerstofflöslichkeit ist für die maximale und Triplet-Löschraten auch in Abbildung C.12 (siehe Seite XXX) zu finden. Die Effizienz des Löschratenvorgangs bestimmt den Zusammenhang der Kollisionsrate mit der bimolekularen Löschraten⁵ und ist in den dargestellten Werten als $f_Q = 1$ gewählt. Dies entspricht der Situation, dass jeder Kollisionsvorgang zu einer Löschraten führt. Obgleich die Fehler der Bestimmung groß sind ($\pm 13\%$), ist ein deutlicher Abfall der Löschraten zu höheren Glycerinkonzentrationen zu erkennen. Bezüglich der Möglichkeiten, nach denen

⁴ Etwa 150 pm bei Einfach- und 140 pm bei Doppelbindungen und einer Wasserstoff-Kohlenstoff-Bindungs-länge von etwa 110 pm.

⁵ Bimolekulare Löschraten $k_q = f_Q k_k$, siehe Abschnitt 2.2.4.2

Tabelle 6.2: Zusammenfassung der Raten und Koeffizienten

Der Diffusionskoeffizient der gelösten Sauerstoffmoleküle D_{O_2} sinkt mit steigender Glycerinkonzentration. Das führt mit dem ebenfalls sinkenden Diffusionskoeffizienten des Fluorophors (siehe Tabelle 6.1) zu einer abnehmenden Kollisionsrate zwischen den Sauerstoff- und Fluorophormolekülen k_k . Die mit der O_2 -Löslichkeitsänderung bestimmte, maximale Löschrates $k_{O_2,q}$ ist für eine Löscheffizienz von $f_Q = 1$ dargestellt. Bei der Betrachtung der Löschung von Triplett-niveaus ist entsprechend Abschnitt 2.2.4.2 von einer verminderten Löschrates auszugehen, die als $k_{O_2,q_{T \rightarrow S}}$ aufgetragen ist. Zusätzlich ist die durch die O_2 -Löslichkeitsänderung verursachte Verminderung der Löschrates in Prozent dargestellt.

c(Glycerin) in M	D_{O_2} in $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$	k_k in $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{O_2,q}$ in MHz	$k_{O_2,q_{T \rightarrow S}}$ in MHz	O_2 -Anteil in %
0,00	$2,09 \pm 0,27$	$9,55 \pm 1,10$	$2,71 \pm 0,32$	$1,21 \pm 0,14$	0
0,68	$1,85 \pm 0,24$	$8,00 \pm 0,93$	$2,14 \pm 0,26$	$0,95 \pm 0,11$	$5,6 \pm 1,5$
1,03	$1,73 \pm 0,22$	$7,45 \pm 0,88$	$1,94 \pm 0,24$	$0,86 \pm 0,10$	$8,5 \pm 2,6$
2,05	$1,42 \pm 0,18$	$6,06 \pm 0,74$	$1,43 \pm 0,19$	$0,64 \pm 0,08$	$16,9 \pm 6,6$
4,10	$0,87 \pm 0,11$	$3,71 \pm 0,44$	$0,69 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,04$	$34,2 \pm 11,0$

die Fluoreszenzlöschung durch den molekularen Sauerstoff ablaufen kann, ist die Wahl einer Löscheffizienz von $f_Q = 1$ lediglich für die Löschung von Singulettzuständen möglich. Bei der Löschung von Triplettzuständen ist die Wahrscheinlichkeit auf 4/9 der Kollisionsrate begrenzt (siehe Abschnitt 2.2.4.2), womit die mögliche Triplett-Löschrates $k_{q_{T \rightarrow S}}$ Werte von $(1,65 \pm 0,20) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bis $(4,24 \pm 0,49) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ annimmt. Wird diese Löschrates ebenfalls auf die gelöste Sauerstoffmenge bezogen, ergeben sich die in Tabelle 6.2 und Abbildung 6.13b dargestellten Werte für $k_{O_2,q_{T \rightarrow S}}$ ⁶. In Tabelle C.1 und Abbildung C.13 (Seite XXIX) sind zum Vergleich die Raten und Koeffizienten bei einem Interaktionsradius, der auf dem in Abbildung C.11 dargestellten Stokesradius basiert, aufgetragen.

Die in Abbildung 6.13b dargestellte Abhängigkeit der Löschrates von der Sauerstofflöslichkeit zeigt den Zusammenhang zwischen der Konzentration der Lösch-Moleküle und der erwarteten diffusionsvermittelten Löschung. Der Anteil der Ratenänderung, der durch die verminderte Sauerstofflöslichkeit in der Glycerin-Wasser-Mischung zu erwarten ist, führt zu einer zusätzlichen Verminderung der Rate um etwa 34 %. Die berechneten Diffusionskoeffizienten und Raten sind in Tabelle 6.2 aufgeführt. Dabei sollte die Änderung der Triplett-Löschrates $k_{O_2,q_{T \rightarrow S}}$ anhand der Rück-Interkombinationsrate k_{rISC} aus der FCS-Analyse erkennbar sein, da diese die Lebensdauer des Triplettzustandes $\tau_{0,T}$ gemäß

$$\tau_{0,T} = \underbrace{k_{rISC}^{\text{intrinsisch}} + k_{O_2,q_{T \rightarrow S}}}_{k_{rISC}^{\text{Messung}}} \quad (6.15)$$

charakterisiert bzw. verkürzt. Die Triplett-Löschrates nimmt dabei von 0 M Glycerin zu 0,68 M Glycerin um 21 % ($(26 \pm 25) \text{ kHz}$) ab, was überaus genau mit den Rück-Interkombinationsraten entsprechend Abbildung 6.9b (0 M Glycerin: $k_{rISC} = (142 \pm 10) \text{ kHz}$, 0,68 M

⁶ Gemäß $k_{O_2,q_{T \rightarrow S}} = k_{q_{T \rightarrow S}} \cdot c(O_2)$.

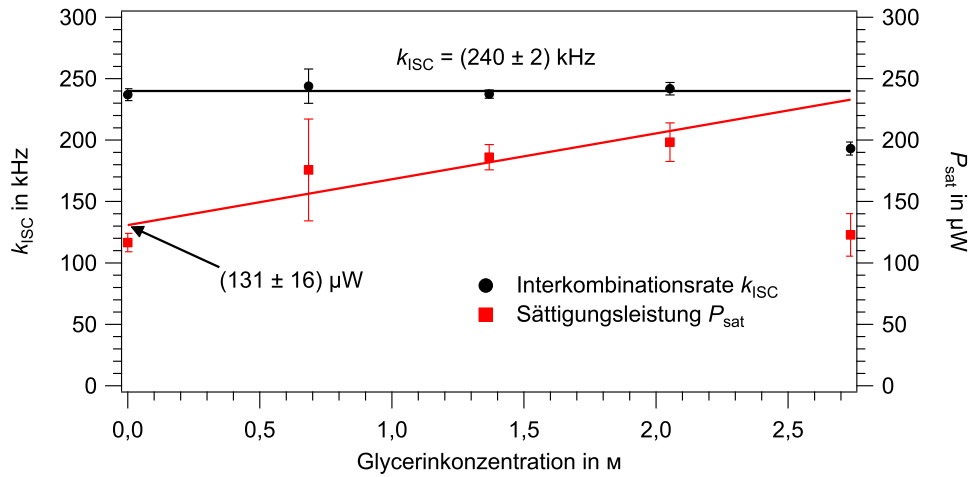


Abbildung 6.14: Globale Anpassung der Interkombination von AF-488

Zu sehen sind die Werte der Interkombinationsrate in den Triplett k_{ISC} (schwarz) und die Sättigungsleistung P_{sat} (rot) der globalen Anpassung aus Abbildung 6.9a. Es fällt auf, dass die Interkombinationsrate konstant bei einem Wert von (240 ± 2) kHz bleibt und lediglich die Sättigungsleistung mit einer Zunahme von (37 ± 12) $\mu W M^{-1}$ bezüglich der Glycerinkonzentration steigt. Der letzte Messwert weicht deutlich von diesem Verhalten ab und ist nicht mit in die Anpassungen einbezogen.

Glycerin: $k_{rISC} = (113 \pm 30)$ kHz), mit einer Abnahme von 20 % $((29 \pm 40)$ kHz) bzw. einer Erhöhung der Lebensdauer des Triplettzustandes um etwa 1,81 μs übereinstimmt. Anhand der großen Fehler und der ungenauen Bestimmung der Rück-Interkombinationsraten bei niedrigen Leistungen (unter Glycerinzugabe) müssen die absoluten Werte mit Vorsicht betrachten werden. Dennoch zeigen die dargestellten Werte, dass die Änderung der Löschungsprozesse durch die Manipulation der Umgebung in der FCS-Analyse mit hoher Übereinstimmung zur Theorie bestimmt werden kann.

Die in Abbildung 6.9a dargestellte Abnahme der Interkombination in den Triplett zeigt bei globaler Anpassung mit Gleichung (2.89a) das in Abbildung 6.14 aufgetragene Verhalten. Durch die Zunahme der Sättigungsleistung P_{sat} (rot) der Interkombination in den Triplett k_{ISC} kann die mittlere Besetzungsdichte des Singulets und die Verschiebung der Triplett-Quantenausbeute mithilfe der Gleichungen (4.7), (4.10) und (4.11) bestimmt werden. Das führt mit den in Abbildung 6.14 dargestellten Werten $((131 \pm 16)$ μW und (37 ± 12) μW) zu einem Anstieg der Sättigungsleistung P_{sat} von (28 ± 13) % M^{-1} . Die Interkombinationsrate k_{ISC} bleibt konstant bei (240 ± 2) kHz, womit keine Interaktion des radiativen Zustandes mit den gelösten Sauerstoffmolekülen, die einen Triplettübergang induziert, zu erkennen ist. Die Sättigungsleistung hängt gemäß

$$P_{sat} = \frac{h\nu \cdot \pi w^2}{2\tau_0 \sigma_{S_0 \rightarrow 1}} \quad (6.16)$$

lediglich von der Photonenflussdichte im Zähler, dem molekularen Absorptionsquerschnitt $\sigma_{S_0 \rightarrow 1}$ und der Fluoreszenzlebensdauer τ_0 ab. Aufbauend auf den frequenzabhängigen

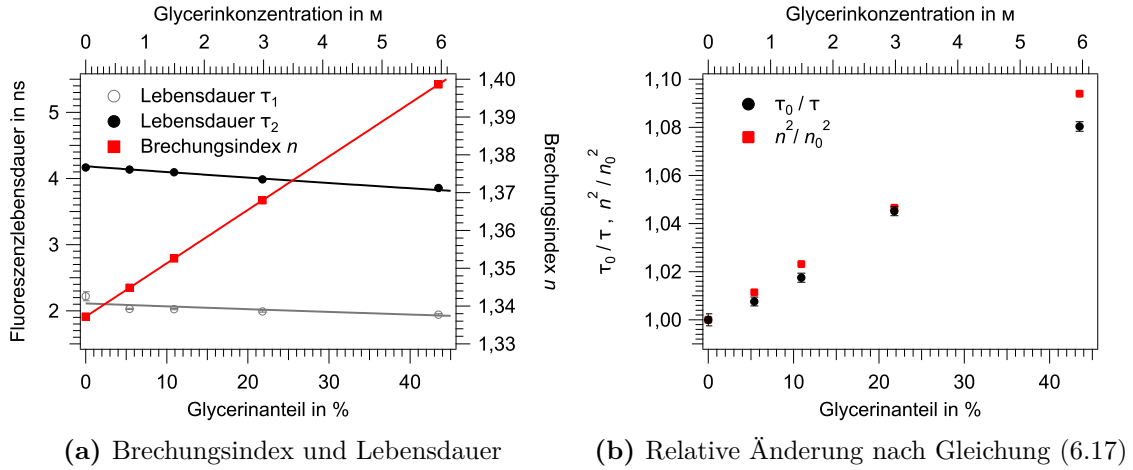


Abbildung 6.15: AF-488-Lebensdauer und Brechungsindex bei Glycerinzugabe

(a) Mit steigender Glycerinkonzentration erhöht sich der Brechungsindex der Lösung (rot) und die Fluoreszenzlebensdauer sinkt (grau, schwarz). Die grau und schwarze Linie zeigen Anpassungen der Lebensdauern nach Gleichung (6.17). (b) Die relative Änderung der Fluoreszenzlebensdauer entspricht der inversen quadratischen Änderung des Brechungsindizes.

Übergangswahrscheinlichkeiten der photonischen Absorption und Emission nach Einstein [323] und mithilfe einiger Umformungen und einer Brechungsindexkorrektur für Systeme in Lösung [324–327] führt gemäß Strickler und Berg [328] bei organischen Molekülen die Änderung des Brechungsindizes n des Lösungsmittels zu einer Verschiebung der natürlichen Fluoreszenzlebensdauer τ_n ($1/k_{\text{rad}}$ bzw. τ_0/Q , siehe Gleichung (2.35)) entsprechend der Gleichung:

$$\frac{1}{\tau_n} = 8 \cdot 2303\pi \frac{n^2}{N_A} c_0 \left\langle \tilde{\nu}_f^{-3} \right\rangle_{A\nu}^{-1} \frac{g_l}{g_u} \int \varepsilon d \ln \tilde{\nu} \quad (6.17a)$$

$$= 2,880 \cdot 10^{-9} n^2 \left\langle \tilde{\nu}_f^{-3} \right\rangle_{A\nu}^{-1} \frac{g_l}{g_u} \int \varepsilon d \ln \tilde{\nu} \quad (6.17b)$$

Dabei gibt g_l die Multiplizität des unteren Zustandes, g_u die Multiplizität des oberen Zustandes, ε den molaren Extinktionskoeffizienten, N_A die Avogadro-Konstante, c_0 die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und $\tilde{\nu}$ die Wellenzahl der Übergänge in cm^{-1} (in Gleichung (6.17a) in s^{-1}) an. Durch $\left\langle \tilde{\nu}_f^{-3} \right\rangle_{A\nu}^{-1}$ wird die Rate der Emission aus dem untersten elektronischen Niveau von u in die vibronischen Zustände des Grundzustandes l entsprechend Kashas Regel (siehe Abschnitt 2.2.3) mithilfe des Fluoreszenzspektrums $I(\tilde{\nu})$ gemäß

$$\frac{\int I(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int \tilde{\nu}^{-3} I(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}} = \left\langle \tilde{\nu}_f^{-3} \right\rangle_{A\nu}^{-1} \quad (6.18)$$

bezeichnet. Nach Gleichung (6.17) führt das Quadrat der Änderung des Brechungsindex

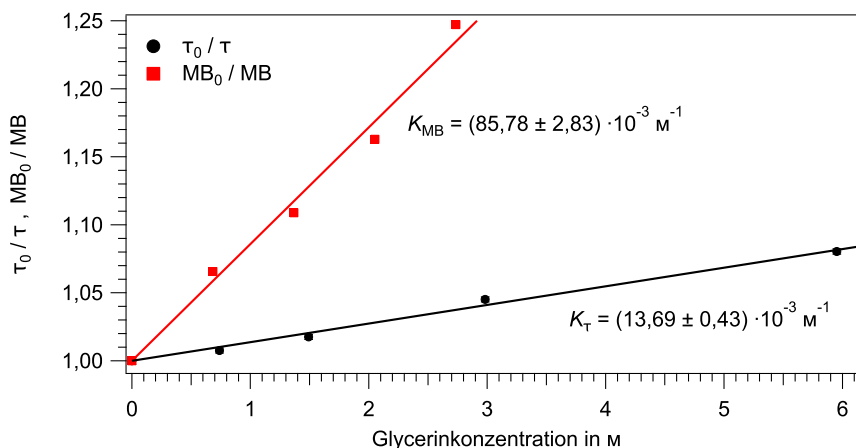


Abbildung 6.16: Stern-Volmer Graph für die MB und die Lebensdauer von AF-488

Die Stern-Volmer Graphen der MB (rot) und der Fluoreszenzlebensdauer (schwarz) zeigen unterschiedliche Steigungen.

zu einer invers proportionalen Änderung der natürlichen Fluoreszenzlebensdauer. In Abbildung 6.15a sind die Brechungsindizes der AF-488-PBS-Lösung bei unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen mit den entsprechenden Fluoreszenzlebensdauern aus gesonderten TCSPC-Messungen (siehe Abbildung C.14) aufgetragen. Aus den relativen Amplituden der Lebensdauern (hier nicht dargestellt, siehe Tabelle C.2) ist ersichtlich, dass die zweite Komponente der Anpassung (τ_2) die primäre Lebensdauer der Fluoreszenz angibt. Dabei steigt der Brechungsindex der Lösung mit steigender Glycerinkonzentration und die Lebensdauern τ_2 sinken.

Abbildung 6.15b zeigt die relative Änderung der Fluoreszenzlebensdauer τ_2 und die invers quadratische Änderung des Brechungsindex des Lösungsmittels⁷, wobei eine exzellente Übereinstimmung des nach Gleichung (6.17) erwarteten Verhaltens zu erkennen ist. Die Erhöhung der radiativen Rate k_{rad} aus dem angeregten Singulettzustand S_1 resultiert demzufolge aus der Brechungsindexänderung des Lösungsmittels und zeigt keine Einflüsse durch kollisionsvermittelte Löschungen des radiativen Zustandes. Diese führt somit zu einer niedrigeren Triplett-Quantenausbeute (vgl. Gleichung (4.11)), die als Abnahme der apparenten Interkombinationsrate beobachtbar ist. Im in Abbildung 6.16 dargestellten Vergleich der Fluoreszenzlebensdauer zum Stern-Volmer Graphen aus Abbildung 6.12a ist entsprechend ein deutlicher Unterschied der Koeffizienten K_{MB} und K_τ zu erkennen.

Da der Einfluss der Änderung der Viskosität, und somit des Diffusionskoeffizienten, lediglich zu einer linearen Erhöhung der dynamischen Löschrates in der Lösung führt [329], kann die von der Sauerstoffkonzentration abhängende Änderung der Löschrates als zusätzlich stattfindender Prozess betrachtet werden. Der entsprechende Stern-Volmer Graph ist bereits in Abbildung 6.12a (und in den Abbildungen 6.16 und 6.17) dargestellt und verläuft

⁷ Bestimmt aus den Brechungsindizes von Wasser $n = 1,3372$ und Glycerin $n = 1,4784$, siehe Abschnitt 6.2.1, Seite 126

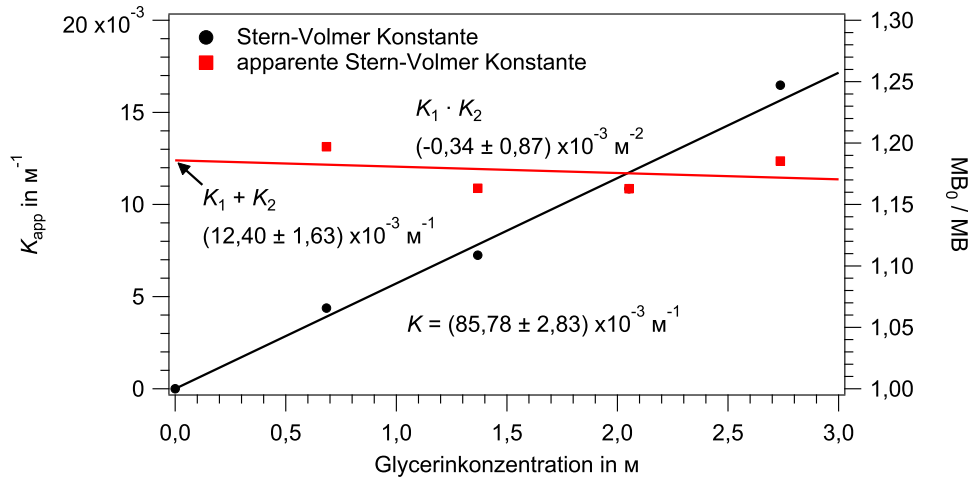


Abbildung 6.17: Stern-Volmer-Graph von AF-488 in Abhängigkeit von zwei Prozessen
 Steigende Werte von MB_0/MB kennzeichnen eine sinkende MB. Die Stern-Volmer Gleichung (schwarz) ist in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration aufgetragen. K_{app} (rot) gibt den Verlauf unter der Annahme von zwei involvierten Raten an und wird durch Gleichung (6.20) bestimmt.

linear, was für eine Fluoreszenzlöschung durch Kollisionen mit Lösch-Molekülen und gegen statische Effekte spricht. Es ist zu beachten, dass diese Darstellung die Sauerstofflöslichkeit und Diffusionsänderung mit einschließt und nur als Angabe der kombinierten Löschung interpretiert werden kann. Zur Untersuchung der involvierten Raten wird die Stern-Volmer Gleichung in Abhängigkeit von zwei Prozessen K_1 und K_2 geschrieben

$$\frac{MB_0}{MB} = (1 + K_1[O_2]) (1 + K_2[O_2]) \quad . \quad (6.19)$$

Umformuliert zu einer apparenten Lösch-Konstanten K_{app} können anhand des Ordinatenschrittpunktes und der Steigung des Verlaufs gegen die Löcher-Konzentration die bimolekularen Löschraten der beiden Prozesse voneinander getrennt werden. Die apparente Rate ist mit den entsprechenden Werten in Abbildung 6.17 rot eingetragen und berechnet sich zu [57]

$$K_{app} = \left(\frac{MB_0}{MB} - 1 \right) \frac{1}{[O_2]} = (K_1 + K_2) + K_1 K_2 [O_2] \quad . \quad (6.20)$$

Somit ergibt sich mithilfe des interpolierten Wertes bei einer Sauerstoff-Konzentrationsänderung von 0 (Normaldruck, Raumtemperatur, Wasser) und der Steigung der Geraden für die beiden Stern-Volmer Konstanten $K_1 = (-13,25 \pm 16,56) \cdot 10^{-3} M^{-1}$ und $K_2 = (25,65 \pm 16,85) \cdot 10^{-3} M^{-1}$.

Die Erhöhung der Glycerinkonzentration führt also durch zwei Effekte zu einer Änderung der MB der beobachteten Moleküle. Zum einen steigt die Viskosität der Lösung an und führt zusammen mit der geringeren Sauerstofflöslichkeit zu einer Verminderung der kollisi-

onsvermittelten Löschung von Triplettzuständen. Das führt zu längeren Aufenthaltszeiten im Triplett und dadurch zu einer Verminderung der molekularen Helligkeit (K_2).

Zum anderen sinkt aber auch die Wahrscheinlichkeit, dass angeregte Singulettzustände gelöscht werden und hochreaktiver Singulett-Sauerstoff entsteht, der zur Photozerstörung führen kann. Obgleich die Messungen der Lebensdauer und der Interkombination in den Triplett keine Hinweise auf Singulettlöschungen liefern, woraus eine Erhöhung der molekularen Helligkeit lediglich aus der Erhöhung der radiativen Rate durch die Variation des Brechungsindizes folgt (K_1). Erwähnenswert ist, dass der durch K_1 beschriebene Effekt in ähnlicher Form in der Literatur bei Oxazin-, Rhodamin- und Cyaninfarbstoffen durch eine Verringerung der nicht-radiativen Raten beobachtet werden kann, wenn z. B. anstelle von Wasser (H_2O) Deuteriumoxid (D_2O) als Lösungsmittel eingesetzt wird [330–332]. Der Effekt wird hier dem abgeschwächten Wasserstoffbrücken-Bindungsnetzwerk [333, 334] zugerechnet, das zu einer nicht radiativen Desaktivierung durch resonante Überlagerungen der Schwingungsstrukturen führt. Allerdings weicht die Viskosität und der Sauerstoff-Diffusionskoeffizient von Deuteriumoxid ebenfalls vom Wasser ab [335], sodass kollisionsvermittelte Effekte gemäß Abschnitt 2.2.4 nicht gänzlich auszuschließen sind. Zusätzlich ist in Abbildung C.15 (Seite XXXII) die Betrachtung des Systems unter der Annahme einer zugänglichen (Triplett-Löschung) und einer nicht zugänglichen bzw. schwach zugänglichen (Singulett-Löschung) Population dargestellt.

6.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Trennung des Diffusionsverhaltens von der Triplettodynamik mithilfe einer Viskositätsänderung des Lösungsmittels durch die Zugabe von Glycerin führt zu einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse. Änderungen des Brechungsindex konnten in Übereinstimmung mit Enderlein et al. [235, 336] festgestellt und unter Berücksichtigung und Messung der Fluoreszenzlebensdauer gemäß Strickler und Berg [328] in die Betrachtung einbezogen werden. Die sauerstoffinduzierte Interkombination vom Singulett S_1 in den Triplett T_1 entsprechend Potashnik, Goldschmidt und Ottolenghi [82] konnte anhand der Interkombinationsrate k_{ISC} nicht beobachtet werden. Die glycerinabhängige Verschiebung der Sättigungsleistung $((37 \pm 12) \mu W M^{-1})$ führte lediglich zu einer apparenten Erhöhung von k_{ISC} bei niedrigen und mittleren Photonenflussdichten $(< 2,4 \cdot 10^{28} m^{-2} s^{-1})$. Wie unter anderem von Hübner et al. [79] an in Polymethylmethacrylat (PMMA) immobilisierten DiI-Molekülen⁸ gezeigt, führt der Sauerstoff ebenfalls zu einer Abnahme der Triplettzeit durch eine erhöhte Rück-Interkombination k_{TISC} . Daraus resultierte eine Erhöhung der MB ($K_{MB} = (86 \pm 3) \cdot 10^{-3} M^{-1}$) in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration, wobei gleichzeitig auch Photobleichreaktionen durch entstehenden Singulett-Sauerstoff nicht gänzlich ausgeschlossen werden können [40, 337]. Die maximalen Kollisions- und Löschraten (siehe Tabelle 6.2) liegen mit $k_k = 9,55 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$ und $k_{O_2, qT \rightarrow S} = 1,21 MHz$ in Übereinstimmung mit Lakowicz [57] und Eggeling et al. [96] unter den möglichen Grenz-

⁸ DiI – 1,1'-diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin

werten diffusionsvermittelter Prozesse von $k_k = 1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{O}_2, \text{qT} \rightarrow \text{S}} = 1,3 \text{ MHz}$ in wässriger Lösung. Eine Änderung des schnellen Fluktuationsverhaltens durch eine Abnahme der Sauerstofflöslichkeit und Erhöhung der Viskosität, sowie eine damit verbundene Verminderung der mittleren Kollisionsrate k_k konnte somit aus der Verschiebung der Triplettparameter und der Anpassung der MB unter Sättigungsbedingungen beobachtet werden.

6.3 Sauerstoffarme Umgebung

Für die Untersuchungen zum Einfluss des molekularen Sauerstoffes auf die mittels der FCS beobachteten Photophysik, wurden drei Farbstoffe untersucht. Dabei wurde das Fluoresceinderivat AF-488 als ein gut untersuchter und in der Literatur weit verbreiteter Farbstoff ausgewählt [338–343]. Zum Vergleich wurden mit PF-488P und CF-488A zwei spektral analoge Farbstoffe mit laut Hersteller ähnlichen Eigenschaften untersucht. Eine Zusammenfassung der grundlegenden Parameter, wie der vom Hersteller angegebenen Quantenausbeute und dem Spektrum, sind in Abschnitt 3.2 angegeben. Alle Farbstoffe wurden in PBS gelöst und in der in Abschnitt 3.1.1 vorgestellten Probenkammer am Mikroskop befestigt. Wie bereits in Abschnitt 2.2.4.2 und Abschnitt 6.2 besprochen, kann gelöster Sauerstoff zu kollisionsvermittelten Löschungsprozessen und konsekutiver Photozerstörung führen.

6.3.1 Diffusion- und Triplettdynamik

In Abbildung 6.18 ist die Diffusionszeit der drei Fluorophore in PBS für Anregungsleistungen von $1\mu\text{W}$ bis $800\mu\text{W}$ aufgetragen. Die hellen, nicht gefüllten Symbole bezeichnen die Messwerte unter einer vollständigen Argonatmosphäre und somit ohne Sauerstoff. Mittels der Anpassungsfunktion aus Gleichung (6.1) wird die asymptotische Diffusionszeit τ_{D_0} und der Sättigungsparameter P_{sat} bestimmt. Bei normaler Umgebungsatmosphäre lauten die angepassten Werte der Diffusionszeit τ_{D_0} für AF-488 ($54,2 \pm 0,7$) μs , für PF-488P ($49,3 \pm 0,6$) μs und für CF-488A ($49,8 \pm 1,0$) μs . Die Sättigungsparameter P_{sat} , die mit (165 ± 17) μW für AF-488, (176 ± 14) μW für PF-488P und (162 ± 15) μW für CF-488A nur geringe Abweichungen voneinander zeigen, beschreiben den Anstieg des Verlaufes

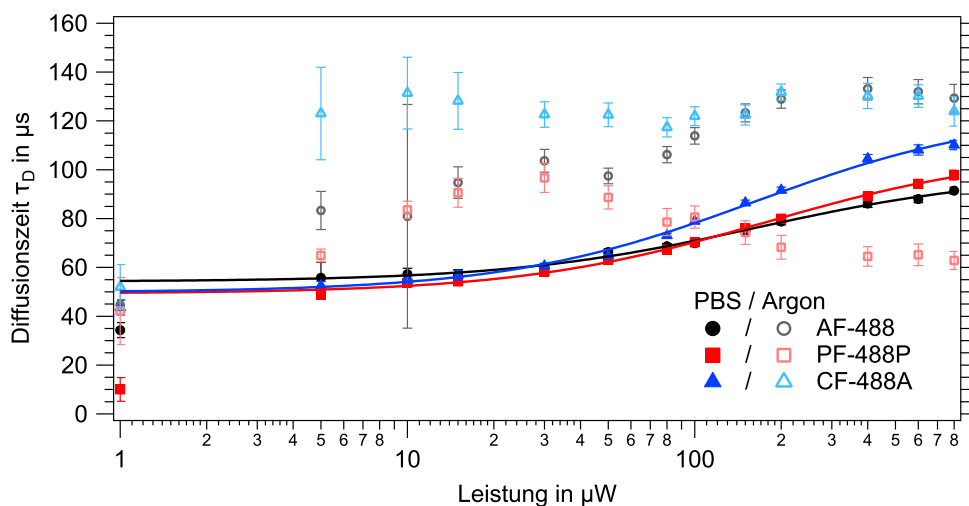


Abbildung 6.18: Diffusionszeiten unter Normal- und Argonatmosphäre

Zu sehen ist der leistungsabhängige Verlauf der Diffusionszeiten in PBS unter normaler Raum-atmosphäre (dunkle, gefüllte Symbole) und in PBS unter Argon (helle, leere Symbole). Die Anpassungen nach Gleichung (6.1) sind für die Lösungen in PBS unter normaler Raum-atmosphäre aufgetragen.

Tabelle 6.3: Zusammenfassung der Messparameter des Diffusionsanteils

Zu sehen sind die Diffusionszeiten τ_{D_0} und die entsprechenden Diffusionskoeffizienten D nach Gleichung (2.88b) bei gleichem lateralen Fokusparameter w , der aus der AF-488-Messung zu $w = (307 \pm 8) \text{ nm}$ unter normaler Raumatmosphäre (in PBS) bestimmt ist. Zusätzlich ist die nach Gleichung (6.1) maximal erwartete Diffusionszeit $\tau_{D_{\max}}$ bei hoher Leistung mit der daraus bestimmten Vergrößerung der effektiv beobachteten Fokustaille eingetragen.

PBS ^a	τ_{D_0} in μs	D in $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	$\tau_{D_{\max}}$ in μs	Tailenfaktor $w_{D_{\max}}/w_{D_0}$
AF-488 ^b	$54,2 \pm 0,7$	435 ± 4	$98,6 \pm 9,1$	$1,35 \pm 0,14$
PF-488P	$49,3 \pm 0,6$	478 ± 19	$107,6 \pm 13,3$	$1,48 \pm 0,20$
CF-488A	$49,8 \pm 1,0$	473 ± 22	$124,2 \pm 13,8$	$1,58 \pm 0,21$
PBS & Argon ^c				
AF-488	$44,6 \pm 1,8$	529 ± 35	$129,3 \pm 0,6$	$1,70 \pm 0,08$
PF-488P	$42,1 \pm 13,7$	560 ± 197	$62,9 \pm 0,4$	$1,22 \pm 0,40$
CF-488A	$52,0 \pm 9,2$	453 ± 92	$123,9 \pm 0,6$	$1,54 \pm 0,28$

^a Die Werte und die Fehler der Diffusionszeiten resultieren aus der Anpassungsfunktion der Messreihe.

^b Diffusionskoeffizient D nach Petrášek und Schwille [286].

^c Die Werte und die Fehler der Diffusionszeiten resultieren aus der Korrelationsfunktion der Einzelmessung.

der Diffusionszeiten. Die relative Änderung der effektiven Diffusionszeit findet somit bei vergleichbaren Leistungen statt. Dabei sind die Messwerte bei $1 \mu\text{W}$ aufgrund ihrer großen Abweichung nicht mit in die Anpassungsfunktion einbezogen. Es fällt auf, dass die Diffusionszeiten bei $1 \mu\text{W}$ unter den angepassten Minima durch Gleichung (6.1) liegen und besonders die Messwerte unter Argon eine sehr große Abweichung von den Werten bei $5 \mu\text{W}$ zeigen. Nach Gleichung (2.88b) führen, bei der Annahme des gleichen konfokalen Volumens und somit auch lateralen Fokusparameters w für die betrachteten Messung⁹, die Diffusionszeiten zu den in Tabelle 6.3 aufgetragenen Diffusionskoeffizienten. Die Angaben für PF-488P und CF-488A sind in Relation zum Literaturwert des Diffusionskoeffizienten von AF-488 gegeben. Die drei Farbstoffe zeigen ein ähnliches Diffusionsverhalten (Abweichung $< 10\%$), wie es aufgrund der vergleichbaren Molekulargewichte und der Struktur der Moleküle (siehe Abschnitt 3.2) zu erwarten ist. Die maximale Diffusionszeit $\tau_{D_{\max}}$ hingegen zeigt Abweichungen von bis zu 20% zwischen den Farbstoffen, was auf unterschiedliche photophysikalische Sättigungsprozesse zurückzuführen ist.

Zur Analyse dieser Änderungen, kann aus dem Verhältnis der maximalen Diffusionszeit und der Diffusionszeit bei niedriger Leistung die relative Vergrößerung der effektiven Fokustaille bestimmt werden. Bezogen auf ein durch Gleichung (2.74) (3D-Gauß) beschriebenes effektives Beobachtungsvolumen V_{eff} , führen die in Tabelle 6.3 aufgetragenen Tailenfaktoren von im Mittel 1,47 zu mehr als einer Verdoppelung des effektiven Volumens¹⁰. Der Anstieg der

⁹ Bei niedriger Leistung ($< 10 \mu\text{W}$) und ähnlichen spektralen Eigenschaften der Farbstoffe.

¹⁰ Da das effektive Volumen gemäß $V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z$ (siehe Anhang A.1, Gleichung (A.11)) quadratisch von der Fokustaille abhängt, entspricht ein Tailenfaktor von 1,47 einem Anstieg des Volumens um den Faktor 2,16.

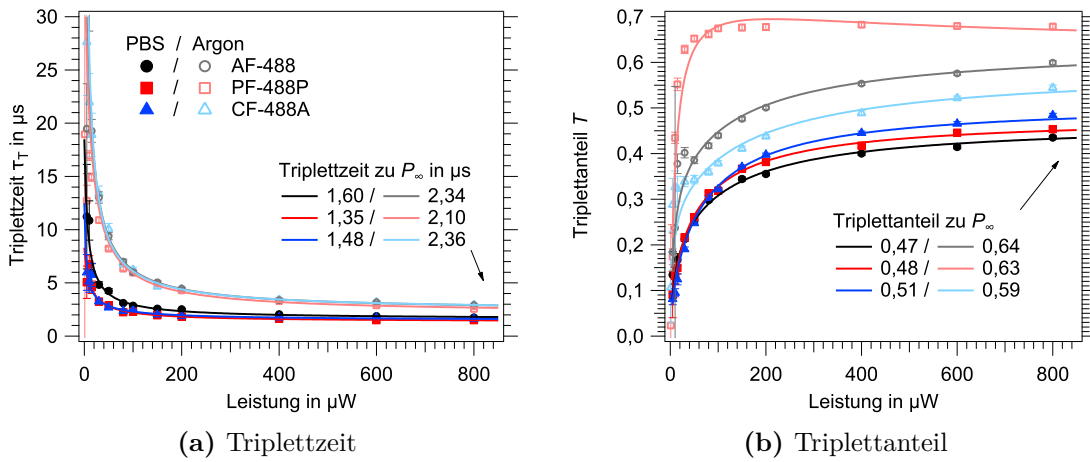


Abbildung 6.19: Triplettparameter unter Normal- und Argonatmosphäre

(a) Die Tripletzeit unter normaler Atmosphäre (dunkle Symbole) des AF-488 (schwarz) ist etwas höher als die des PF-488P (rot) und des CF-488A (blau). Unter Argon (helle Symbole) steigen die Tripletzeiten deutlich an und sättigen bei ähnlichen Werten. Als Vergleichswert sind die Zeiten gegen die maximale Anregungsleistung, also eine minimale Triplet-Zyklusdauer, angegeben. Die durchgezogenen Linien zeigen globale Anpassungen nach Gleichung (6.11). (b) Der Tripletanteil zeigt ebenfalls einen klaren Anstieg unter Argon. Auffällig ist, dass das PF-488P abweichend vom AF-488 und CF-488A bereits bei niedrigen Anregungsleistungen unter 100 μW einen hohen Tripletanteil von etwa 67 % erreicht. Die durchgezogenen Linien zeigen globale Anpassungen nach Gleichung (6.21).

Diffusionszeiten zu hohen Leistungen resultiert aus der steigenden mittleren Anregungsrate im beobachteten Volumen, woraus eine Verlängerung der effektiven Beobachtungszeit der fluoreszenten Moleküle folgt. Dass die Abweichungen in der maximalen Diffusionszeit $\tau_{D_{max}}$ deutliche Unterschiede zeigen, ist auf das unterschiedliche Sättigungsverhalten der jeweiligen Fluorophore zurückzuführen, was zu einer zusätzlichen Änderung der Detektionsfunktion (siehe Abschnitt 2.4) und somit der effektiven Beobachtungsdauer führt [344]. Unter Sauerstoffentzug zeigen die Diffusionszeiten einen nicht ausreichend durch Gleichung (6.1) beschreibbaren Verlauf. Es ist davon auszugehen, dass eine Verschiebung der Tripletzeiten zu Anpassungsfehlern der Diffusionszeit führt, oder zusätzliche Prozesse wie radikalionische Zustände (siehe Abschnitt 2.2.5) eine zusätzliche Amplitude im Bereich der Diffusion bewirken. Wie in Tabelle 6.3 dargestellt ist, stimmen die Diffusionszeiten der Messungen unter Argon bei geringer Leistung mit den Anpassungswerten τ_{D_0} unter Normalatmosphäre überein. Daher werden bei den Messungen unter Argon lediglich die Diffusionszeiten bei niedrigen Leistungen für die Abschätzung der asymptotischen Diffusionszeit τ_{D_0} und damit auch der Fokustaille gemäß Gleichung (2.88b) genutzt.

Da bei niedrigen Leistungen von einem vernachlässigbaren Einfluss des Tripletblinkens und sättigender Effekte auszugehen ist, kann das konfokale Volumen durch diese Messwerte abgeschätzt werden. Die Übereinstimmung im τ_{D_0} spricht somit für vergleichbare Beobachtungsvolumina bei den Messungen mit und ohne Sauerstoff. Bei höheren Leistungen treten deutliche Abweichungen auf, wobei die Werte über den sauerstoffhaltigen Messwerten

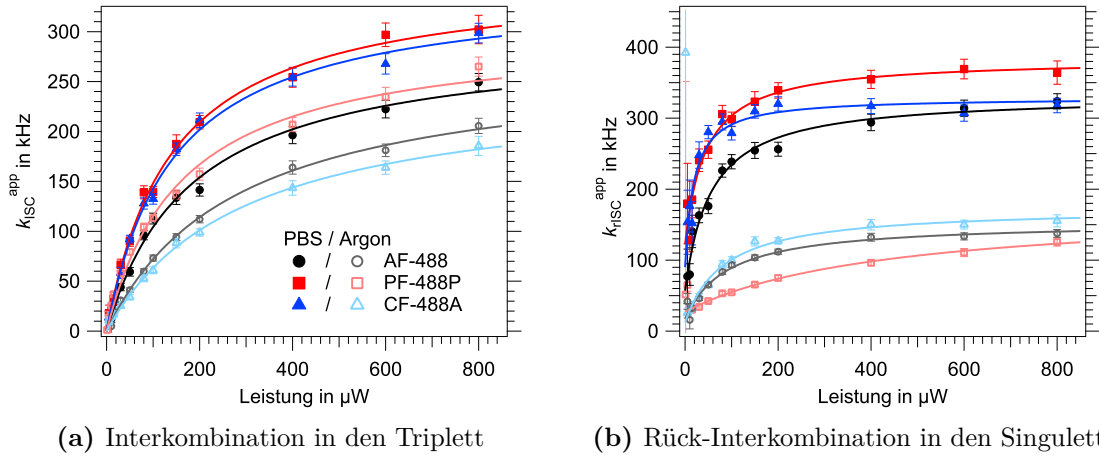


Abbildung 6.20: Interkombinationsraten unter Normal- und Argonatmosphäre

(a) Dargestellt sind die Interkombinationsraten in den Triplet. Die durchgezogenen Linien geben die Anpassungen nach Gleichung (6.22) an. Die daraus erhaltenen Werte für die Interkombinationsrate k_{ISC} und Sättigungsleistung P_{sat} in PBS und unter Argon sind für das AF-488 (schwarz/grau), PF-488P (rot/hellrot) und CF-488A (blau/hellblau) in Tabelle 6.4 aufgetragen. Dabei fällt auf, dass ohne Sauerstoff die Interkombinationsrate aller untersuchter Farbstoffe sinkt. (b) Die Linien stellen die Anpassungsfunktion nach Gleichung (5.15) dar. Unter Argon sinken die Rück-Interkombinationsraten deutlich. Die genauen Werte der globalen Anpassung sind in Tabelle 6.4 zu finden.

liegen. Daher werden die Diffusionszeiten unter Argon bei 0,8 mW als Schätzung für $\tau_{D_{max}}$ verwendet. Die daraus bestimmten Tailenfaktoren $w_{D_{max}}/w_{D_0}$ weichen stark von den Messungen mit Sauerstoff ab.

In Abbildung 6.19a sind die Tripletzeiten τ_T der Messreihen mit der Anpassungsfunktion 6.11 dargestellt. Es fällt auf, dass die Tripletzeiten unter Argon deutlich ansteigen. Besonders bei niedrigen Leistungen betragen sie über das Doppelte des Wertes in normaler Atmosphäre. Der Grenzwert zu hohen Leistungen (P_∞) gibt die minimale Tripletzeit bei vollständiger Sättigung der Ratensysteme an und kann daher als Vergleichsmaß der sauerstoffinduzierten Verkürzung der Tripletzyklen betrachtet werden. Dabei zeigt das CF-488A mit einer um 0,88 μs (37 %) kürzeren Tripletzeit in Normalatmosphäre die stärkste Verschiebung. Mit 0,75 μs (36 %) folgt das PF-488P und die geringste Abweichung zeigt das AF-488 mit 0,74 μs (32 %). Analog zur Tripletzeit (siehe Gleichung (6.11)) kann mit der Leistungsabhängigkeit gemäß Gleichung (5.15) der Tripletanteil aus Gleichung (6.10) als

$$T = \left(1 + \frac{P + P_{sat}}{k_{ISC}} \left(\frac{k_{rISC}}{P} + \frac{k_{rISC_n}}{P + P_{sat_T}} \right) \right)^{-1} \quad (6.21)$$

mit $P_{sat} = \frac{h\nu \cdot \pi w^2}{2\tau_0 \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}}$ und $P_{sat_T} = \frac{h\nu \cdot \pi w^2 \cdot k_{T_{n \rightarrow 1}}}{2\sigma_{T_{1 \rightarrow n}}}$

Tabelle 6.4: Parameter der globalen Anpassung der Tripletttraten

Dargestellt sind die Werte der globalen Anpassung gemäß der Gleichungen (5.15), (6.11), (6.21) und (6.22) der in den Abbildungen 6.19 und 6.20 dargestellten Messwerte der FCS-Analyse. Obgleich die Fehler der bestimmten Werte groß sind (bis zu 47 %), ist zu erkennen, dass die Raten der Interkombination und Rück-Interkombination k_{ISC} , k_{rISC} und k_{rISC_n} bei allen drei Fluorophoren unter Argon deutlich sinken.

PBS	k_{ISC} in kHz	P_{sat} in μW	k_{rISC} in kHz	k_{rISC_n} in kHz	P_{sat_T} in μW
AF-488	294 ± 22	182 ± 35	57 ± 14	275 ± 14	55 ± 12
PF-488P	345 ± 19	142 ± 22	122 ± 22	261 ± 20	44 ± 15
CF-488A	356 ± 17	141 ± 18	90 ± 38	239 ± 34	19 ± 9
PBS & Argon					
AF-488	273 ± 17	278 ± 39	17 ± 7	137 ± 8	90 ± 24
PF-488P	303 ± 25	161 ± 35	27 ± 2	148 ± 8	439 ± 62
CF-488A	249 ± 18	292 ± 49	12 ± 5	162 ± 5	83 ± 12

geschrieben werden. Die globale Anpassung der Triplettanteile mit Gleichung (6.21) ist in Abbildung 6.19b dargestellt. Dabei ist unter Argon ein Anstieg des Triplettanteils zu erkennen. Besonders das PF-488P zeigt bereits bei niedrigen Leistungen ($<100 \mu\text{W}$) eine deutliche Sättigung des Triplettanteils bei etwa 67 %, die bei den anderen Farbstoffen nicht zu erkennen ist. Bezogen auf die Sättigung bei hohen Leistungen ist ein genau umgekehrtes Verhalten im Vergleich zur Triplettzeit zu erkennen. So ist beim AF-488 unter Argon eine absolute Erhöhung des Triplets um 17 % (relativ 36 %), beim PF-488P um 15 % (relativ 31 %) und beim CF-488A um 8 % (relativ 16 %) zu sehen.

Werden die Interkombinationsraten entsprechend Gleichung (2.89) bestimmt, ergeben sich die in Abbildung 6.20 dargestellten Werte. Dabei zeigen die Interkombinationsraten in Abbildung 6.20a das bereits in Abschnitt 4.1 besprochene Sättigungsverhalten. Die globale Anpassungsfunktion nach Gleichung (4.10) kann dabei als

$$k_{\text{ISC}}^{\text{app}} = k_{\text{ISC}} \left(1 + \frac{P_{\text{sat}}}{P} \right)^{-1} \quad (6.22)$$

mit $P_{\text{sat}} = \frac{h\nu \cdot \pi w^2}{2\tau_0 \sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}}}$

geschrieben werden und ist in Form der durchgezogenen Linien zu erkennen. Die verminderte Interkombination aus dem Singulett- in den Triplettzustand unter Argon deutet auf Lösungsprozesse des Sauerstoffes mit dem angeregten Singulettzustand der Farbstoffe hin. Die induzierte Interkombination führt damit, wie in Tabelle 6.4 zu sehen ist, unter sauerstoffhaltiger Atmosphäre zu einer höheren Rate k_{ISC} und somit niedrigeren Triplettzeit. Die Abnahme entspricht dabei beim AF-488 (21 ± 39) kHz (7 %), beim PF-488P (42 ± 44) kHz (12 %) und beim CF-488A (107 ± 35) kHz (30 %). Ausgehend von einer linearen Abhän-

Tabelle 6.5: Aus der Triplettanalyse bestimmte Ratenkonstanten der Löschung

Aufgetragen sind die aus dem Triplettverhalten unter normaler Atmosphäre und Argon bestimmten Ratenkonstanten K_{ISC} , K_{rISC} , K_{rISC_n} und die Summe der Ratenkonstanten der Rück-Interkombination $K_{Triplett}$. Die Werte zur Bestimmung der Raten sind in Abbildung C.16 (Seite XXXII) mit einer linearen Anpassung zu finden. Die sauerstoffinduzierte Interkombination in den Triplett ist dabei um einen Faktor 1,4 bis 8,5 niedriger als die der gesamten Rück-Interkombination $K_{Triplett}$.

Fluorophor	K_{ISC} in $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	K_{rISC}	K_{rISC_n} in $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$K_{Triplett}$
AF-488	$0,74 \pm 1,37$	$1,41 \pm 0,74$	$4,86 \pm 0,77$	$6,27 \pm 1,51$
PF-488P	$1,48 \pm 1,76$	$3,35 \pm 0,85$	$3,98 \pm 0,99$	$7,33 \pm 1,84$
CF-488A	$3,77 \pm 1,23$	$2,75 \pm 1,51$	$2,71 \pm 1,37$	$5,46 \pm 2,88$

gigkeit der Interkombinationsrate von der Sauerstoffkonzentration [203], können die in Tabelle 6.5 dargestellte Ratenkonstanten der sauerstoffinduzierten Interkombination K_{ISC} bestimmt werden. Es fällt auf, dass diese Bestimmung mit großen Fehlern behaftet ist. So ist zum Beispiel beim AF-488 der Fehler der Bestimmung größer als der Ratenwert selbst ($(0,74 \pm 1,37) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Letztlich deutet dies auf einen geringen Einfluss der Löschung über sauerstoffinduzierte Interkombination beim AF-488 hin. In Relation zu der in Abschnitt 6.2.2 bestimmten Kollisionsrate $k_k = (9,55 \pm 1,10) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, kann nun die Wahrscheinlichkeit einer entsprechenden Löschung bei Kontakt des Fluorophors mit dem Sauerstoffmolekül für das AF-488 zu $(1 \pm 2) \%$ bestimmt werden. Beim CF-488A ist mit $(3,77 \pm 1,23) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eine deutliche sauerstoffinduzierte Erhöhung der Übergangsrate in den Triplett beobachtbar, die zu einer Löschwahrscheinlichkeit bei einer Kollision von $(4 \pm 2) \%$ führt. Für das PF-488P liegt der Wert bei $(2 \pm 2) \%$. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung aus Abschnitt 6.2.2, dass geringe Änderungen der Sauerstofflöslichkeit kaum einen Einfluss auf die in der FCS beobachtete Interkombinationsrate¹¹ zeigen und erst bei Abweichungen von über 20 % deutlich auftreten (siehe Tabelle 6.1).

In Abbildung 6.20b sind die mit Gleichung (5.15) angepassten Rück-Interkombinationen zu sehen. Unter Argon kann eine verminderte Rück-Interkombination aufgrund der ausbleibenden Triplett-Löschung durch Sauerstoffmoleküle beobachtet werden. Das führt zu einer erhöhten Triplettzeit τ_T und zum anderen aufgrund der großen absoluten Änderung der Rate gemäß Gleichung (6.21) zu einem Anstieg des Triplettanteils. In Tabelle 6.4 sind die global angepassten Triplettparameter zusammengefasst. Analog zur Bestimmung der Ratenkonstanten der sauerstoffinduzierten Interkombination können die Ratenkonstanten der jeweiligen sauerstoffinduzierten Rück-Interkombination K_{rISC} und K_{rISC_n} , sowie die aus diesen beiden Ratenkonstanten bestehende Konstante der gesamten sauerstoffinduzierten Rück-Interkombination $K_{Triplett}$ bestimmt werden. Sie sind in Tabelle 6.5 aufgetragen und führen in Relation zur nach Abschnitt 6.2.2 maximal erwarteten Löschrates $k_{q_{T \rightarrow S}} = (4,24 \pm 0,49) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ zu einer gesamten Löscheffizienz des Triplets

¹¹ Hier ist nicht die apparente Interkombination k_{ISC}^{app} gemeint.

von $(15 \pm 5) \%$ beim AF-488, $(17 \pm 6) \%$ beim PF-488P und $(13 \pm 8) \%$ beim CF-488A. Zusätzlich ist auffällig, dass die Sättigungsleistungen P_{sat} und $P_{\text{sat,T}}$ unter Argon ansteigen. Das weist auf eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer τ_0 und eine Erhöhung der inneren Konversionsrate des Triplets $k_{\text{T} \rightarrow \text{T}_1}$ hin. Da keine Fluoreszenzlebensdauermessungen unter Argon durchgeführt wurden, kann eine solche Verschiebung der Lebensdauer nicht genauer betrachtet werden. Allerdings kann der Einfluss einer verminderten Lebensdauer und erhöhten inneren Triplett-Konversion anhand des Verhaltens der MB indirekt über die Sättigungsraten abgeschätzt werden.

6.3.2 Molekulare Helligkeit

In Abbildung 6.21 ist der Verlauf der MB für die drei Farbstoffe in PBS unter normaler Raumatmosphäre und unter Argon zu sehen. Die MB ist gegen den eingestrahlichten Photonenflussdichte gemäß Gleichung (6.3) aufgetragen, der mit dem farbstoffabhängigen molekularen Wirkungsquerschnitt die Anregungsrate bestimmt. Es fällt auf, dass die MB in der sauerstoffarmen Umgebung bei allen beobachteten Farbstoffen deutlich sinkt. Die maximale MB je Molekül fällt dabei beim PF-488P am stärksten und beträgt 29,8 % der MB unter Sauerstoff. Ein ähnlicher Abfall ist beim CF-488A mit 31,6 % zu beobachten. Das AF-488 hingegen ist unter Sauerstoff bei niedrigen Leistungen das dunkelste, zeigt aber mit einem Helligkeitsabfall auf 50,4 % des Maximums die geringste Sauerstoffabhängigkeit.

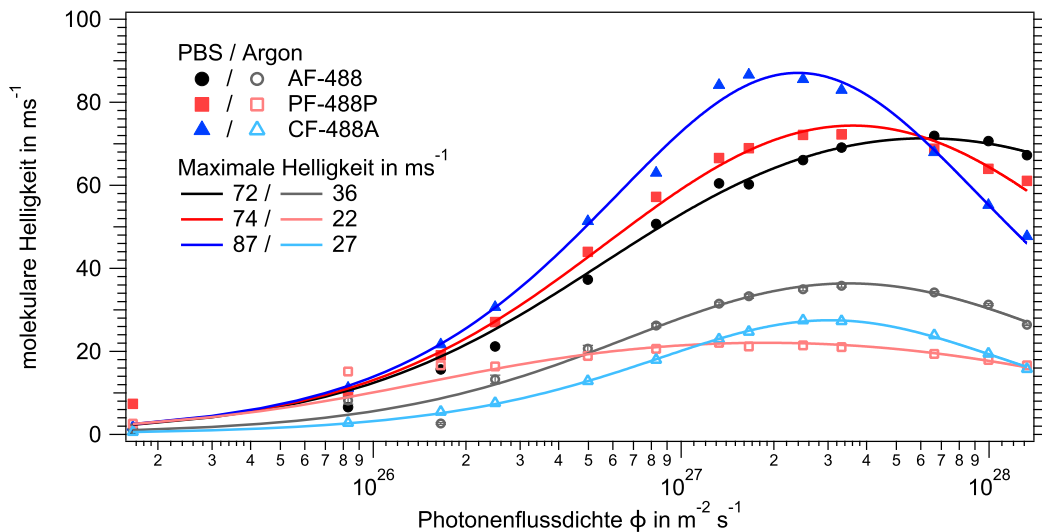


Abbildung 6.21: Molekulare Helligkeit unter Normal- und Argonatmosphäre

Die dunklen, vollen Symbole geben die Messwerte der molekularen Helligkeit bei Standard-Atmosphäre gegen den Photonenfluss ϕ von AF-488 (schwarz), PF-488P (rot) und CF-488A (blau) wieder. Unter dem Entzug von Sauerstoff (helle, leere Symbole) sinkt die MB bei allen beobachteten Farbstoffen deutlich. Auffällig ist, dass AF-488 mit Sauerstoff die geringste Helligkeit besitzt, unter Sauerstoffentzug jedoch der hellste Farbstoff mit einem Emissionsverlust von etwa 50 % ist. PF-488P sowie CF-488A verlieren etwa 70 % ihrer Helligkeit. Eine globale Anpassung der Werte nach Gleichung (6.23) liefert die in Tabelle 6.6 angegebenen Parameter und ist als durchgezogene Linie der entsprechenden Farbe dargestellt.

Für die globale Anpassung der Messwerte wurde Gleichung (4.21) in der Form

$$\text{MB}(\phi) = \eta \Phi_F \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left(\frac{1}{\phi} + \phi_{\text{sat}_1} + \phi \cdot \phi_{\text{sat}_2} \right)^{-1}, \quad (6.23)$$

mit den Sättigungsschwellen

$$\phi_{\text{sat}_1} = \tau_0 \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} \right), \quad (6.24a)$$

$$\phi_{\text{sat}_2} = \tau_0 \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left(\frac{\sigma_{S_{1 \rightarrow n}}}{k_{S_{n \rightarrow 1}}} + \frac{\sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{\text{ISC}}}{k_{T_{n \rightarrow 1}} k_{\text{rISC}}} \right) \quad (6.24b)$$

verwendet. ϕ_{sat_1} beschreibt die Sättigung der Helligkeit durch eine erhöhte Besetzung des Triplets und ϕ_{sat_2} beschreibt die Sättigung durch höher angeregte Singulett- und Triplett-Niveaus. Die Sättigungsparameter wurden als jeweils unabhängige Anpassungsvariablen verwendet. Wird die Gesamteffizienz der Detektion η über alle Messungen hinweg als konstanter mikroskopabhängiger Wert betrachtet, lassen sich mithilfe der Extinktionskoeffizienten und damit zusammenhängender Wirkungsquerschnitte der Farbstoffe nach Tabelle 3.1 (siehe Seite 51) Aussagen über den Einfluss der Sättigung auf die Quanteneffizienz treffen.

In Tabelle 6.6 sind die aus den globalen Anpassungen erhaltenen Daten zu sehen. Die Quantenausbeuten des AF-488 und des CF-488A sinken unter Argon deutlich und führen beim AF-488 zu einer Absenkung um $(58 \pm 7) \%$ und beim CF-488A um $(78 \pm 20) \%$. Da das PF-488P eine deutliche Abweichung von der erwarteten Form zeigt, resultiert die Anpassung in einer maximalen Quantenausbeute unter Argon von $\Phi_F = 1,00 \pm 0,19$ (Anstieg um $(12 \pm 2) \%$). Der Verlauf zeigt insbesondere bei niedrigen Leistungen insofern

Tabelle 6.6: Parameter der globalen Anpassung der MB

Die globale Anpassung der molekularen Helligkeiten aus Abbildung 6.21 durch Gleichung (6.23) führt zu den aufgetragenen Werten der Quanteneffizienz Φ_F und der Sättigungswerte ϕ_{sat_1} und ϕ_{sat_2} . Die Wirkungsquerschnitte wurden entsprechend Tabelle 3.1 gewählt und die Detektionseffizienz beträgt $\eta = (6,11 \pm 0,27) \cdot 10^{-3}$.

	O ₂ -Umgebung / PBS			O ₂ -Entzug / Argon		
	Φ_F	ϕ_{sat_1} in $10^{26} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\sqrt{\phi_{\text{sat}_2}}$	Φ_F	ϕ_{sat_1} in $10^{26} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\sqrt{\phi_{\text{sat}_2}}$
AF-488	0,92 ^a	$5,8 \pm 0,4$	$62,0 \pm 7,5$	$0,39 \pm 0,05$	$8,7 \pm 1,9$	$35,0 \pm 2,7$
PF-488P	0,896 ^b	$6,9 \pm 0,5$	$36,1 \pm 1,6$	$1,00 \pm 0,19$	$1,5 \pm 0,4$	$18,8 \pm 3,0$
CF-488A	$0,94 \pm 0,06$	$11,0 \pm 1,2$	$23,9 \pm 0,6$	$0,21 \pm 0,04$	$17,4 \pm 7,0$	$30,4 \pm 2,4$

^a Laut Herstellerangabe in PBS bei 22 °C als Relativmessung zu Fluorescein ($\Phi_F = 0,92$).

^b Laut Herstellerangabe in PBS oder ddH₂O.

nicht erwartete Änderungen, als dass die MB bei $8,29 \cdot 10^{25} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ($10 \mu\text{W}$) mit 15 ms^{-1} über der MB der Messung unter Normalatmosphäre (10 ms^{-1}) liegt und im Vergleich zum AF-488 und CF-488A eine geringe Leistungsabhängigkeit zeigt. Dabei sollte erwähnt werden, dass die Bestimmung der absoluten Quanteneffizienz nicht trivial ist und mindestens einem Fehler im Bereich von 5 % unterliegt [345]. Da dieser Fehler in den Herstellerangaben nicht berücksichtigt ist, ist bei der Angabe der über die globale Anpassung bestimmten Quanteneffizienzen von einer zusätzlichen Ungenauigkeit im selben Bereich auszugehen.

Der abgeflachte Verlauf der MB des PF-488P unter Argon führt in der Anpassung zu einem deutlichen Absinken der Sättigungsparameter und resultiert aus dem hohen Triplettanteil bei niedrigen Leistungen (siehe Abbildung 6.19b). Da das Verhalten des PF-488P im Rahmen der in Abbildung 6.20 dargestellten Interkombinationsraten ähnlich zum Verhalten des AF-488 und des CF-488A ist, kann das Absinken des Sättigungsparameters ϕ_{sat_1} von $(6,9 \pm 0,5) \cdot 10^{26} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf $(1,5 \pm 0,4) \cdot 10^{26} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Verringerung um $(78 \pm 26) \%$) nicht durch den Triplett-Term $k_{\text{ISC}}/k_{\text{rISC}}$ erklärt werden und weist auf eine verkürzte Fluoreszenzlebensdauer τ_0 hin. Die beiden Fluorophore AF-488 und CF-488A zeigen einen Anstieg im Sättigungsparameter ϕ_{sat_1} (um $(50 \pm 14) \%$ und $(58 \pm 30) \%$), der einen geringeren Anstieg der Helligkeitskurve bei niedrigen Photonenflussdichten impliziert. Das Verhalten beim Sättigungsparameter ϕ_{sat_2} weicht entgegengesetzt voneinander ab. Das AF-488 zeigt eine Verminderung um $(56 \pm 11) \%$ aufgrund eines früheren Einsetzens von Mehr-Photonen-Prozessen. Der Sättigungsparameter ϕ_{sat_2} des CF-488A hingegen steigt um $(27 \pm 3) \%$ an und begründet den geringeren Abfall der MB bei hohen Photonenflussdichten.

Die absoluten Werte der Photonenflussdichten und somit auch der Sättigungsparameter unterliegen in der Bestimmung der effektiv angeregten Fläche im Fokus (w_{xy} , siehe Gleichung (6.3)), die über die Diffusionsanpassung in Abbildung 6.18 bestimmt wurde. Diese Anpassung kann von der Beschreibung der Fokustaille über eine Beadmessung (siehe Abbildung 6.1) bzw. der real am System vorliegenden Strahlquerschnittsfläche abweichen und zu einer Verschiebung der Abszisse und somit der Werte in den Anpassungen der MB führen. Die in den vorangegangenen Absätzen gemachten, relativen Aussagen sind von einer solchen Abweichung entsprechend unbeeinflusst. Eine Abschätzung der Photonenflussdichte kann ebenfalls aus den photophysikalischen Parametern des Triplettblinkens gemacht werden, da zumindest der Sättigungsparameter ϕ_{sat_1} direkt von den Grenzwerten der Interkombinationsraten abhängt.

6.3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die detaillierte Bestimmung des Triplettverhaltens unter Normal- und Argonatmosphäre der drei spektral ähnlichen Farbstoffe AF-488, PF-488P und CF-488A mittels der in dieser Arbeit hergeleiteten photophysikalischen Zusammenhänge führte zu klaren Unterschieden des Einflusses des molekularen Sauerstoffes auf das Leuchtverhalten der Fluorophore. Insgesamt konnte eine Verminderung der MB durch eine verminderte Löschung von Triplettzustän-

den unter Argon in Übereinstimmung mit Untersuchungen an anderen Fluorophoren [79, 337, 346] beobachtet werden. Die Triplettparameter des AF-488 unter Normalatmosphäre wurden von Kahra [347] und Seidel [348] bis zu einer Anregungsleistung von 200 μW bzw. 1500 μW (entspricht etwa 190 kW cm^{-2} bzw. 1400 kW cm^{-2}) aufgenommen und stimmen mit den hier gezeigten Werten überein. Lediglich bei Winckler und Jaffiol [211] ist eine Sättigungsreihe von AF-488 in Wasser¹² unter Normalatmosphäre mitsamt einer Auswertung des Tripletterhaltens zu finden. Diese weicht mit einer Interkombinationsrate von $k_{\text{ISC}} = (1000 \pm 100) \text{ kHz}$ und Rück-Interkombinationsrate $k_{\text{rISC}} = (210 \pm 10) \text{ kHz}$ deutlich von den in dieser Arbeit bestimmten Werten von $k_{\text{ISC}} = (294 \pm 22) \text{ kHz}$ und $k_{\text{rISC}} = (57 \pm 14) \text{ kHz}$ ($k_{\text{rISC}_n} = (275 \pm 14) \text{ kHz}$) ab.

Das liegt zum einen an Abweichungen der Anpassungsfunktion, die in dieser Arbeit nicht gemäß Widengren, Rigler und Mets [202] und Widengren, Mets und Rigler [203] an einem Drei-Zustands-Modell orientiert ist, aber auch an abweichenden absoluten Messwerten. So sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestimmten Triplettparameter der FCS-Anpassungskurve bezüglich des maximalen Tripletanteils von $T_{\text{max}} = 0,47$ niedriger und mit einer minimalen Tripletzeit (bei maximaler Anregungsleistung, siehe z. B. Abbildung 6.19a) von $\tau_{\text{T,min}} = 1,6 \mu\text{s}$ länger als die von Winckler und Jaffiol [211] dargestellten Werte von etwa $T_{\text{max}} = 0,67$ und $\tau_{\text{T,min}} = 1,4 \mu\text{s}$. Eine Ursache dieser Abweichung könnte zum einen die höhere maximale Photonenflussdichte von $\phi \approx 14,9 \cdot 10^{28} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (entspricht einer fokussierten Gesamtleistung von 3,9 mW) im Vergleich zur in dieser Arbeit verwendeten maximalen Photonenflussdichte von $\phi \approx 2,5 \cdot 10^{28} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (entspricht etwa 1,0 mW) und somit einer genaueren Anpassung bei hohen Leistungsdichten sein. Zum anderen weichen die Abbildungsfunktionen der verwendeten Instrumente ab, was nach Schönle et al. [236] zu unterschiedlichen systematischen Fehlern in der Bestimmung der Triplettparameter bei hohen Leistungen (im Bereich der Sättigung des radiativen Zustandes) führen kann und tendenziell kleinen detektionsbestimmten konfokalen Volumina höhere Tripletanteile und niedrigere Tripletzeiten zuordnet. Ein Unterschied der Funktionalisierung des AF-488 (in der vorliegenden Arbeit Maleimid und in [211] NHS-Ester) und die Verwendung einer Küvette mit nicht näher genannten Volumen in [211] (kein bzw. verminderter Gasaustausch mit der Umgebung) könnten ebenfalls zu Unterschieden bzgl. des photophysikalischen Verhaltens führen.

Vergleichbare Untersuchungen in desoxygenierter Umgebung in Lösung sind lediglich für strukturell ähnliche Fluorophore wie zum Beispiel Rh-6G (vgl. die Abbildungen 3.8a und C.18b) vorhanden. So gibt es einige Publikationen zur Löschung des Tripletzustandes von Rh-6G durch Sauerstoff [95, 108, 203, 306, 349, 350]. Die für das AF-488 bestimmten sauerstoffabhängigen Raten $K_{\text{ISC}} = (0,74 \pm 1,37) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, und $K_{\text{rISC}} = (1,41 \pm 0,74) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (sowie $K_{\text{rISC}_n} = (0,49 \pm 0,08) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) sind deutlich klei-

¹² Unterschiede des Einflusses des Lösungsmittels bzgl. Wasser und PBS wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Hutfilz [153] untersucht und konnten für das AF-488 keine systematischen Abweichungen des Tripletterhaltens über 10 % feststellen.

ner als die Raten des Rh-6G, die nach Korobov und Chibisov [108] und Widengren, Mets und Rigler [203] etwa $K_{\text{ISC}} = 1,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $K_{\text{rISC}} = 0,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bis $K_{\text{rISC}} = 2,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ betragen. So konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal das Leuchtverhalten und das schnelle Fluktuationsverhalten von AF-488, PF-488P und CF-488A in Normal- und Argonatmosphäre auf Basis einer Mehr-Photonen-Absorption in einem erweiterten Energieniveaudiagramm untersucht werden.

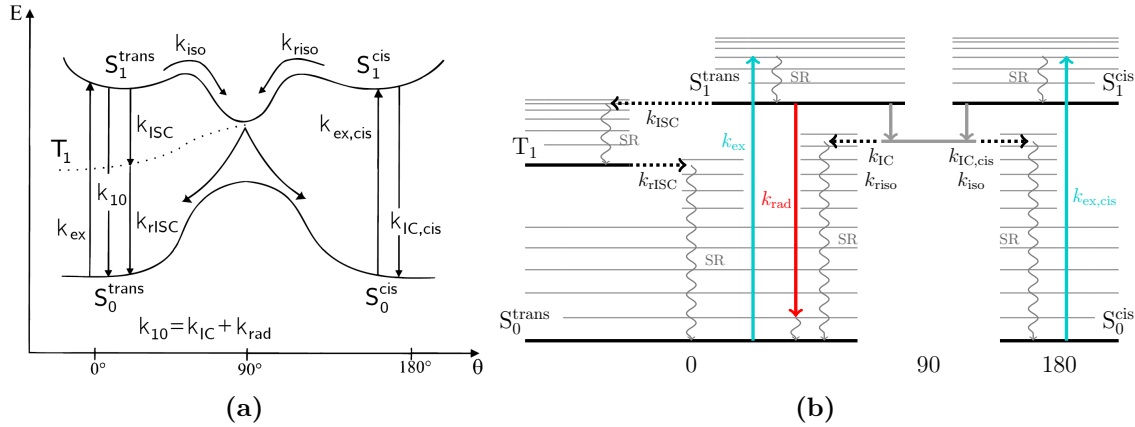
6.4 Isomerisierung und photoprotektive Additive

Ein bei Cyaninfarbstoffen häufig beobachtetes Phänomen ist eine anregungsabhängige Fluktuation der Fluoreszenzintensität, die der photoinduzierten Isomerisierung der Farbstoffmoleküle zugerechnet wird. Dabei findet an einer der Doppelbindungen der Kohlenwasserstoffkette, die die beiden Kopfgruppen des Farbstoffes verbindet (vgl. die Strukturen in den Abbildungen 3.8c, 3.10a und 3.10c), eine Rotation statt [351, 352]. Diese Umformung führt zu einer so starken Erniedrigung der Quanteneffizienz des Fluorophors, dass in der Literatur von einem Dunkelzustand gesprochen wird [353–355]. Die Isomerisierung ist nur in geringem Maße von der Lösungsmittelpolarität abhängig [356, 357] und kann durch sterische Effekte und die Viskosität des Lösungsmittels deutlich beeinflusst werden [145, 146, 352, 358–360]. So weist zum Beispiel in Glycerin gelöstes Cy3 bei 8 °C eine etwa zehnfach größere Quanteneffizienz im Vergleich zu in Wasser gelöstem Cy3 bei Raumtemperatur auf [164]. Auch die Kopplung an Biomoleküle kann zu einer deutlichen Verminderung der Isomerisierungsrate und somit Erhöhung der Quanteneffizienz und der Fluoreszenzlebensdauer führen [361–366].

Ähnliche Effekte lassen sich unter sterischen Einschränkungen auch in Bezug auf die Fluoreszenzlebensdauer von sCy3 und sCy5 beobachten [160]. FCS-Untersuchungen an Cy5 zeigen, dass bereits bei niedrigen Anregungsintensitäten ($< 10 \text{ kW cm}^{-2}$) die Hälfte der Moleküle in einem nichtfluoreszenten photoisomeren Zustand vorliegt, und die Rück-Isomerisierung in den fluoreszenten Zustand ebenfalls photoinduziert stattfindet [145, 146]. Die nachfolgenden Daten basieren zu großen Teilen auf Messungen, die zusammen mit Gerant [367] im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt wurden. Eine detaillierte Beschreibung des Messaufbaus und der Simulation (siehe Abschnitt 3.3) der nachfolgenden Zusammenhänge ist in der entsprechenden Arbeit nachzulesen.

6.4.1 Beschreibung des photophysikalischen Modelldiagramms

Ein vereinfachtes photophysikalisches Modelldiagramm der potentiellen Energie eines Carbocyaninfarbstoffes nach Rullière [368] ist in Abbildung 6.22a gegeben. Die Energie der Zustände (dicke Linien) ist dabei in Abhängigkeit vom Torsionswinkel θ entlang der Methinkette angegeben. Der in der Grundform des Moleküls vorliegende *trans*-Zustand ($\theta = 0^\circ$) [351, 369] kann aus seinem angeregten Singulett S_1^{trans} über einen teilweise verdrehten Zwischenzustand ($\theta = 90^\circ$) entweder in den *trans*-Grundzustand S_0^{trans} zurückkehren, und so zur Rate der inneren Umwandlung k_{IC} beitragen. Oder, durch die Isomerisierungsrate k_{iso} beschrieben, zum Übergang in den nicht fluoreszenten *cis*-Grundzustand S_0^{cis} ($\theta = 180^\circ$) führen. Die Rück-Isomerisierung k_{riso} findet aus dem angeregten *cis*-Singulett S_1^{trans} statt und führt in den *trans*-Grundzustand S_0^{trans} . Mittels thermischer Relaxation kann die Rück-Isomerisierung auch direkt aus dem S_0^{cis} stattfinden (nicht dargestellt). Die gepunktete Linie bezeichnet den Triplett des *trans*-Zustandes T_1 , der durch die Interkombinationsrate k_{ISC} betreten und über die Rück-Interkombinationsrate k_{rISC} verlassen


Abbildung 6.22: Einfaches Modell der Isomerisierung eines Carbocyaninfarbstoffes

(a) Photophysikalisches Modelldiagramm der potentiellen Energie. Die dicken Linien kennzeichnen die Energie der Zustände in Abhängigkeit vom Torsionswinkel θ einer konjugierten Doppelbindung der Kohlenwasserstoffkette. Die *trans*-Konformation bei $\theta = 0^\circ$ bildet im Normalfall den thermodynamisch stabilen Zustand. Nach der Photoisomerisierung über einen Zwischenzustand bei $\theta = 90^\circ$ liegt das Molekül in der *cis*-Konformation mit einem Torsionswinkel von $\theta = 180^\circ$ vor. Über die Interkombinationsrate k_{ISC} und die Rück-Interkombinationsrate k_{rISC} wird der Wechsel zwischen dem Singulett- und Triplettssystem im *trans*-Zustand beschrieben. Im *cis*-Zustand wird von einem vernachlässigbaren Triplett ausgegangen, der daher nicht dargestellt ist. Die Übergänge von der *trans*- in die *cis*-Konformation und zurück finden über die Isomerisierungsrate k_{iso} und die Rück-Isomerisierungsrate k_{riso} statt. Eine detaillierte Beschreibung der Raten ist im Text zu finden. Abbildung entnommen und verändert aus [145]. (b) Energieniveaumerschema der Isomerisierung. Die grauen senkrechten Linien kennzeichnen zum einen iso-energetische Konversionen durch innere Umwandlung (IC) innerhalb des *trans*- bzw. *cis*-Zustandes, und zum anderen die Übergänge von der *trans*- in die *cis*-Konformation über einen Zwischenzustand (graue waagerechte Linie) und zurück über k_{iso} und k_{riso} . Die übrigen senkrechten Linien kennzeichnen strahlende und direkt photonisch angeregte Vorgänge. Waagerechte gepunktete Linien stehen für iso-energetische Konversion. Das Differentialgleichungssystem unter Vernachlässigung der strahlungslosen Desaktivierung mittels vibronischer Relaxation (geschwungene Linien), ist in Gleichung (6.25) dargestellt.

wird. Wobei die Quanteneffizienz der Interkombination bei Raumtemperatur sehr klein ist [370]. Der mögliche Triplett des *cis*-Zustandes T_1^{cis} ist hier nicht mit dargestellt. Dieser kann unter Anwesenheit von Schweratomen und bei niedrigen Temperaturen aufgrund seines geringen energetischen Abstandes zum S_1^{trans} zu einer Rück-Interkombination in den radiativen Zustand führen [371]. Die Raten k_{ex} und $k_{ex,cis}$ bezeichnen die Anregung vom *trans*- und *cis*-Grundzustand in den jeweils höheren Singulettzustand. Durch k_{10} und $k_{IC,cis}$ werden die den angeregten *trans*- und *cis*-Zustand, durch innere Umwandlung und im Falle von k_{10} auch durch die radiative Relaxation k_{rad} , desaktivierenden Raten beschrieben. Das Differentialgleichungssystem

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0^{trans}(t) \\ S_1^{trans}(t) \\ T_1(t) \\ S_0^{cis}(t) \\ S_1^{cis}(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{ex}S_0^{trans} + (k_{IC} + k_{rad})S_1^{trans} + k_{rISC}T_1 + k_{riso}S_1^{cis} \\ k_{ex}S_0^{trans} - (k_{IC} + k_{ISC} + k_{iso} + k_{rad})S_1^{trans} \\ k_{ISC}S_1^{trans} - k_{rISC}T_1 \\ k_{iso}S_1^{trans} - k_{ex,cis}S_0^{cis} + k_{IC,cis}S_1^{cis} \\ k_{ex,cis}S_0^{cis} - (k_{IC,cis} + k_{riso})S_1^{cis} \end{pmatrix} \quad (6.25)$$

beschreibt das in Abbildung 6.22b gegebene Energieniveaudiagramm. Da die Lösung dieses Gleichungssystems zu länglichen, unhandlichen Ausdrücken führt, wird an dieser Stelle, unter der Annahme eines geschlossenen, stationären Systems

$$\left[S_0^{\text{trans}}(t) + S_1^{\text{trans}}(t) + T_1(t) + S_0^{\text{cis}}(t) + S_1^{\text{cis}}(t) \right] = 1 \quad \wedge \quad \frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0^{\text{trans}}(t) \\ S_1^{\text{trans}}(t) \\ T_1(t) \\ S_0^{\text{cis}}(t) \\ S_1^{\text{cis}}(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (6.26)$$

lediglich die zur Bestimmung der Gleichgewichtszustände nötige, homogene Lösung dargestellt. Mit $k_0 = k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}$, sowie

$$\alpha = [k_{\text{ex,cis}} (k_0 + k_{\text{iso}}) k_{\text{rISC}} k_{\text{riso}} + k_{\text{ex}} \{k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}} (k_{\text{IC,cis}} + k_{\text{riso}}) + k_{\text{ex,cis}} (k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}} + (k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}) k_{\text{riso}})\}]^{-1} \quad (6.27)$$

folgt für die Zustände:

$$S_0^{\text{trans}} = k_{\text{ex,cis}} (k_0 + k_{\text{iso}}) k_{\text{rISC}} k_{\text{riso}} \cdot \alpha \quad , \quad (6.28a)$$

$$S_1^{\text{trans}} = k_{\text{ex}} k_{\text{ex,cis}} k_{\text{rISC}} k_{\text{riso}} \cdot \alpha \quad , \quad (6.28b)$$

$$T_1 = k_{\text{ex}} k_{\text{ex,cis}} k_{\text{ISC}} k_{\text{riso}} \cdot \alpha \quad , \quad (6.28c)$$

$$S_0^{\text{cis}} = k_{\text{ex}} k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}} (k_{\text{IC,cis}} + k_{\text{riso}}) \cdot \alpha \quad , \quad (6.28d)$$

$$S_1^{\text{cis}} = k_{\text{ex}} k_{\text{ex,cis}} k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}} \cdot \alpha \quad . \quad (6.28e)$$

Auffällig ist, dass alle Zustände eine Abhängigkeit von den Übergangsraten zwischen *trans*-Zustand und *cis*-Zustand zeigen. Die Anpassung der MB kann nun anhand des radiativen *trans*-Zustandes bestimmt werden und ist in Anhang B.4 aufgeführt. Die Gleichungen (6.28a) bis (6.28e) führen zu

$$S_1^{\text{cis}} = \frac{k_{\text{iso}}}{k_{\text{riso}}} S_1^{\text{trans}} \quad \text{und} \quad T_1 = \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} S_1^{\text{trans}} \quad , \quad (6.29)$$

womit der Anteil der nicht radiativen Zustände vom Verhältnis der Rate in den entsprechend Zustand hinein und aus dem Zustand heraus sowie der Besetzung des radiativen Zustandes S_1^{trans} selbst abhängt. Die Triplettamplitude des *trans*-Zustandes A_T^{trans} lautet dabei:

$$\begin{aligned}
 A_T^{\text{trans}} &= \frac{T}{1-T} \\
 &= \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ex,cis}} k_{\text{ISC}} k_{\text{riso}}}{k_{\text{rISC}} \{ (k_{\text{ex,cis}} (k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{riso}} + k_{\text{ex}} (k_{\text{iso}} (k_{\text{IC,cis}} + k_{\text{riso}}) + k_{\text{ex,cis}} (k_{\text{iso}} + k_{\text{riso}}))) \}} .
 \end{aligned} \tag{6.30}$$

Das resultiert somit in einer Änderung der Triplettamplitude des Systems ohne Isomerisierung A_T um einen Term in der Form

$$A_T^{\text{trans}} = \frac{k_0 + k_{\text{ex}}}{k_0 + k_{\text{iso}} + \frac{k_{\text{ex}} (k_{\text{iso}} (k_{\text{IC,cis}} + k_{\text{riso}}) + k_{\text{ex,cis}} (k_{\text{iso}} + k_{\text{riso}}))}{k_{\text{ex,cis}} k_{\text{riso}}}} A_T . \tag{6.31}$$

Für die Betrachtung der Anpassungsfunktion ist es an dieser Stelle ausreichend, das in Gleichung (6.25) beschriebene lineare Differentialgleichungssystem in vereinfachter Form entsprechend Widengren und Schwille [145] als

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S^{\text{trans}} \\ T_1 \\ S^{\text{cis}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\frac{k_{\text{ex}}(k_{\text{ISC}}+k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}}+k_{\text{IC}}+k_{\text{rad}}} S^{\text{trans}} + k_{\text{rISC}} T_1 + \frac{k_{\text{ex,cis}} k_{\text{riso}}}{k_{\text{ex,cis}}+k_{\text{IC,cis}}} S^{\text{cis}} \\ \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}}+k_{\text{IC}}+k_{\text{rad}}} S^{\text{trans}} - k_{\text{rISC}} T_1 \\ \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{iso}}}{k_{\text{ex}}+k_{\text{IC}}+k_{\text{rad}}} S^{\text{trans}} - \frac{k_{\text{ex,cis}} k_{\text{riso}}}{k_{\text{ex,cis}}+k_{\text{IC,cis}}} S^{\text{cis}} \end{pmatrix} . \tag{6.32}$$

zu formulieren. Dabei sind die Zyklen im Singulettssystem $S_0^{\text{trans}} \rightleftharpoons S_1^{\text{trans}}$ sowie $S_0^{\text{cis}} \rightleftharpoons S_1^{\text{cis}}$ in jeweils einem Zustand S^{trans} und S^{cis} zusammengefasst. Die Lösung kann analog zu Abschnitt 4.2 und Anhang B.3 bestimmt werden. Dabei lauten die Eigenwerte mit

$$\begin{aligned}
 \chi &= \left[\left(\frac{k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} + \frac{k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)^2 \right. \\
 &\quad \left. - 4 \left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + \frac{\left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \right) k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right) \right]^{1/2}
 \end{aligned} \tag{6.33}$$

wie folgt:

$$\lambda_1 = 0 , \tag{6.34a}$$

$$\lambda_2 = -\frac{1}{2} \left(\frac{k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} + \frac{k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} + \chi \right) , \tag{6.34b}$$

$$\lambda_3 = -\frac{1}{2} \left(\frac{k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} + \frac{k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} - \chi \right) . \tag{6.34c}$$

χ ist gemäß Anhang C.4.1 umformuliert als positiver Term erkennbar und führt so zu einem niedrigeren und einem größeren Eigenwert. Entsprechend dem ersten Eigenwert λ_1 hat das System einen stationären Anteil, der später zur Normierung verwendet werden kann. Die dazugehörigen Eigenvektoren lauten:

$$\vec{\eta}_1 = \begin{pmatrix} \frac{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex}} k_{\text{iso}} (k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}})} \\ \frac{k_{\text{ISC}} k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}} (k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}})} \\ 1 \end{pmatrix}, \quad (6.35a)$$

$$\vec{\eta}_2 = \begin{pmatrix} -\frac{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) \left(\chi + \frac{k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} - \frac{k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)}{2 k_{\text{ex}} k_{\text{iso}}} \\ \frac{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) \left(\chi + \frac{k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} - k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} - \frac{k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)}{2 k_{\text{ex}} k_{\text{iso}}} \\ 1 \end{pmatrix}, \quad (6.35b)$$

$$\vec{\eta}_3 = \begin{pmatrix} \frac{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) \left(\chi - \frac{k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} - k_{\text{rISC}} + \frac{k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)}{2 k_{\text{ex}} k_{\text{iso}}} \\ -\frac{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) \left(\chi + \frac{k_{\text{ex}} (-k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} - k_{\text{rISC}} + \frac{k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)}{2 k_{\text{ex}} k_{\text{iso}}} \\ 1 \end{pmatrix}. \quad (6.35c)$$

Mit

$$\alpha = (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}} k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{ex}} \{ (k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}) k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}} (k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}) \} \quad (6.36)$$

können die Konstanten zu

$$c_1 = \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}} (k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}})}{\alpha}, \quad (6.37a)$$

$$c_2 = -\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{iso}} (k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}})}{2\alpha\chi} \left(-\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{rISC}} \left(k_{\text{rISC}} - \frac{2k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{iso}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} - k_{\text{rISC}} + \frac{k_{\text{riso}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} + \chi \right) \right), \quad (6.37b)$$

$$c_3 = \frac{k_{\text{ex}}k_{\text{iso}}(k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}})}{2\alpha\chi} \left(-\frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} \left(k_{\text{rISC}} - \frac{2k_{\text{rISO}}k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right. \\ \left. - k_{\text{rISC}} \left(-\frac{k_{\text{ex}}k_{\text{iso}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} - \frac{k_{\text{rISO}}k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} + \chi \right) \right) \quad (6.37c)$$

bestimmt werden. Die Besetzungsdichte des fluoreszenten Singulettts S^{trans} lautet nun mithilfe der Normierung um den stationären Anteil, der

$$c_1\vec{\eta}_1(1) = \frac{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}} k_{\text{rISO}} k_{\text{ex,cis}}}{\alpha} \quad (6.38)$$

lautet, wie folgt:

$$S_{\text{norm}}^{\text{trans}} = 1 + \frac{c_2\vec{\eta}_2(1)e^{t\lambda_2} + c_3\vec{\eta}_3(1)e^{t\lambda_3}}{c_1\vec{\eta}_1(1)} = 1 + A_2e^{t\lambda_2} + A_3e^{t\lambda_3} \quad (6.39)$$

Dabei sind die Amplituden A_2 und A_3 durch die Terme

$$A_2 = \frac{(k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}})}{4\chi k_{\text{rISC}} k_{\text{rISO}} k_{\text{ex,cis}}} \left(\chi + \frac{k_{\text{ex}}(k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} - \frac{k_{\text{rISO}}k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right) \\ \cdot \left\{ -\frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} \left(k_{\text{rISC}} - \frac{2k_{\text{rISO}}k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \left(\chi + \frac{k_{\text{ex}}k_{\text{iso}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right. \right. \\ \left. \left. - k_{\text{rISC}} + \frac{k_{\text{rISO}}k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right) \right\} \quad (6.40a)$$

$$A_3 = -\frac{(k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}})}{4\chi k_{\text{rISC}} k_{\text{rISO}} k_{\text{ex,cis}}} \left(\chi - \frac{k_{\text{ex}}(k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} - k_{\text{rISC}} + \frac{k_{\text{rISO}}k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right) \\ \cdot \left\{ \frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} \left(k_{\text{rISC}} - \frac{2k_{\text{rISO}}k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \left(\chi - \frac{k_{\text{ex}}k_{\text{iso}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right. \right. \\ \left. \left. + k_{\text{rISC}} - \frac{k_{\text{rISO}}k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right) \right\} \quad (6.40b)$$

gegeben. In Analogie zu Gleichung (B.28) gibt Gleichung (6.39) die Fluktuation durch Übergänge in Form der *cis-trans*-Isomerisierung und der Singulett-Triplett-Übergänge an. Allerdings fällt auf, dass die Raten der Interkombination und Isomerisierung in den beiden Amplituden A_2 und A_3 und den beiden Eigenwerten λ_2 und λ_3 vorkommen. Damit ist die Zuordnung der Terme $A_2e^{t\lambda_2}$ und $A_3e^{t\lambda_3}$ zur Isomerisierung oder zum Triplettblinken ohne weitere Vereinfachung nicht offensichtlich. Unter der Annahme einer ausreichend großen Trennung der Zeiten (bzw. Eigenwerte) der Isomerisierung und Triplettodynamik kann die

gesamte Anpassungsfunktion der AKF (ohne Antibunching) als

$$G(\tau) = 1 + A \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \left(1 + A_T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} + A_I e^{-\frac{\tau}{\tau_I}}\right) \quad (6.41)$$

geschrieben werden. A_I gibt die Amplitude der Isomerisierung und τ_I die charakteristische Zeit der Isomerisierung an. Mit Gleichung (6.29) und der Formulierung der apparenten Übergangsraten gemäß Gleichung (6.32), also

$$k_{ISC}^{app} = \frac{k_{ex}}{k_{rad} + k_{IC} + k_{ex}} k_{ISC} \quad , \quad (6.42a)$$

$$k_{iso}^{app} = \frac{k_{ex}}{k_{rad} + k_{IC} + k_{ex}} k_{iso} \quad , \quad (6.42b)$$

$$k_{riso}^{app} = \frac{k_{ex,cis}}{k_{IC,cis} + k_{ex,cis}} k_{riso} \quad , \quad (6.42c)$$

können A_I und τ_I analog zum Triplett in der Form

$$\text{Triplett-Amplitude} \quad A_T = \frac{\bar{T}}{1 - \bar{T}} = \frac{k_{ISC}^{app}}{k_{TISC}} \quad , \quad (6.43a)$$

$$\text{Triplettzeit} \quad \tau_T \approx (k_{TISC} + k_{ISC}^{app})^{-1} \quad , \quad (6.43b)$$

$$\text{Isomerisierungs-Amplitude} \quad A_I = \frac{\bar{A}_I}{1 - \bar{A}_I} = \frac{k_{iso}^{app}}{k_{riso}^{app}} \quad , \quad (6.43c)$$

$$\text{Isomerisierungs-Zeit} \quad \tau_I \approx (k_{riso}^{app} + k_{iso}^{app})^{-1} \quad (6.43d)$$

geschrieben werden. Dabei ist der Anteil der Isomerisierung $\bar{A}_I$ für eine bessere Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Amplitudenanteile analog zum Triplett formuliert.

Die Abszisse der folgenden Abbildungen ist jeweils mit der vor dem Objektiv gemessenen Leistung beschriftet. Zur Bestimmung einer Leistungsdichte kann die Mittelung aus drei Mikrosphären-Messungen entsprechend Abschnitt 6.2.1 genutzt werden. Diese führt zu einem mittleren lateralen Fokusparameter von etwa 287 nm, was somit zu Leistungsdichten von 23 kW cm⁻² bis 1,2 MW cm⁻² führt. In Abbildung 6.23 ist die Auswertung der Triplett- und Isomerisierungsanteile einer nach Gleichung (6.41) angepassten Leistungsreihe von AF-647 in PBS dargestellt¹³. Die Anpassung mit der einfachen AKF eines Drei-Niveau-Systems (vgl. Gleichung (2.87)) ist dem in grau gegenübergestellt. Es fällt auf, dass bei Leistungen unter 200 µW der Anteil der Isomerisierung kaum vom Anteil der Triplett-dynamik unterschieden werden kann. Bei niedrigeren Leistungen (< 30 µW, nicht dargestellt)

¹³ Anstelle der TimeHarp200 (Picoquant) wurde hier die USB2.0-TDC SC von Surface Concept mit einer kanalweisen Zeitauflösung von 82 ps verwendet.

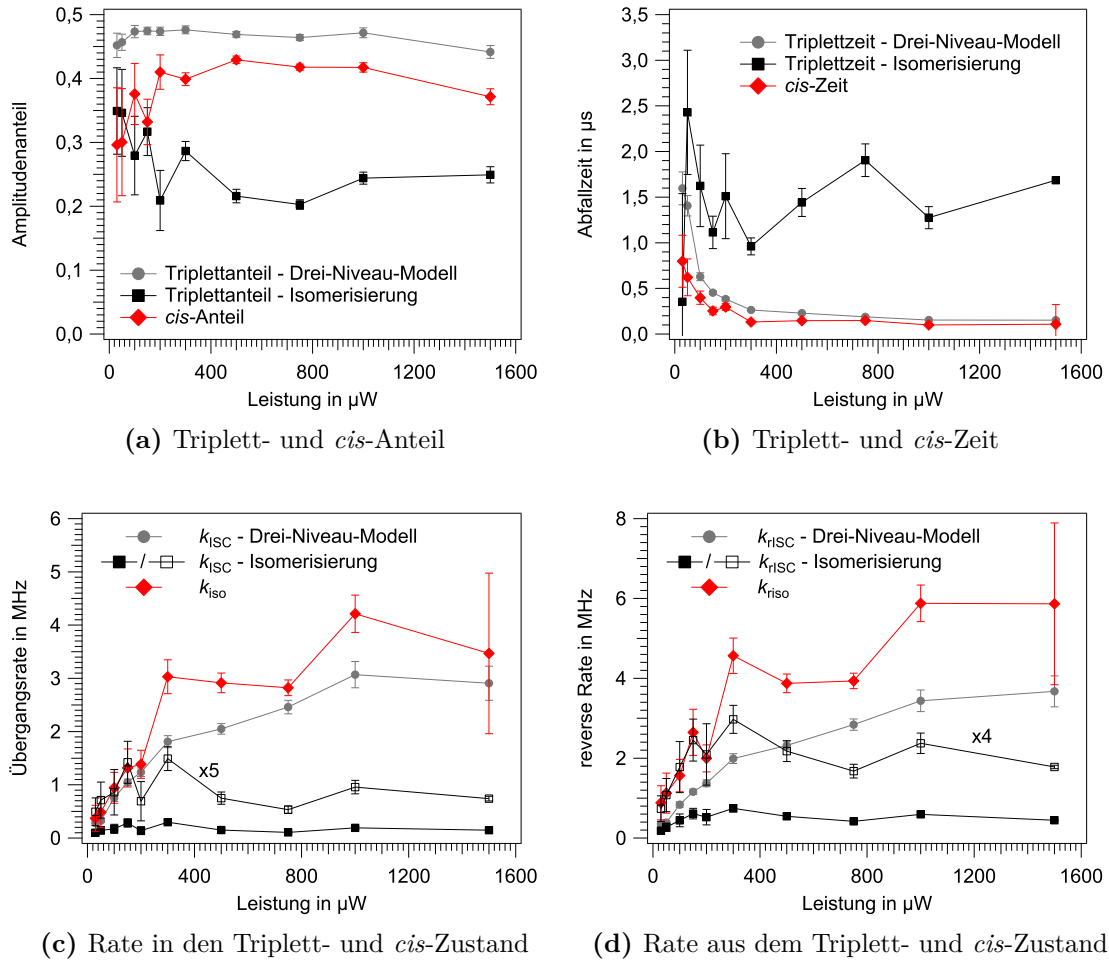


Abbildung 6.23: Anpassung der schnellen Dynamik von AF-647

Zu sehen sind die Werte der Anpassung mit einem Term für die Isomerisierung gemäß Gleichung (6.41) (schwarze Rechtecke und rote Rauten) und ohne den zusätzlichen Term gemäß Gleichung (2.87) (graue Kreise). In (a) ist der aus der Amplitude bestimmte Anteil $\bar{T}$ und $\bar{A}_I$ gemäß der Gleichungen (6.43a) und (6.43c) dargestellt. Dabei fällt der Triplettanteil (schwarze Rechtecke) zu Beginn leicht und steigt bei höheren Leistungen wieder an, während der *cis*-Anteil (rote Rauten) ein genau entgegengesetztes Verhalten zeigt. (b) zeigt die entsprechenden Abfallzeiten τ_T und τ_I . Die Triplettzeit (schwarze Rechtecke) schwankt über den gesamten Bereich stark zwischen etwa 1 µs und 2,5 µs. Die *cis*-Zeit (rote Rauten) fällt mit steigender Anregungsleistung ab und liegt bei einer Leistung von 1,5 mW bei 107 ns im Vergleich zu 797 ns bei 30 µW. In (c) sind die Übergangsrate aus dem radiativen *trans*-Zustand in den Triplett über k_{ISC} (schwarze Rechtecke) und in den *cis*-Zustand über k_{iso} (rote Rauten) dargestellt. Die Interkombinationsrate k_{ISC} beträgt bis 150 µW ein fünftel der Übergangsrate in den *cis*-Zustand (schwarze, leere Rechtecke) und schwankt bei höheren Leistungen um einen Wert von etwa 170 kHz. Die Rate k_{iso} hingegen zeigt einen deutlichen Anstieg bei steigender Anregungsleistung und erreicht Werte von etwa 4,2 MHz. In (d) sind die Rück-Übergangsrate in den *trans*-Zustand aus dem Triplett über k_{rISC} (schwarze Rechtecke) und *cis*-Zustand über k_{riso} (rote Rauten) dargestellt. Die Rück-Interkombinationsrate k_{rISC} beträgt dabei bis zu einer Leistung von 200 µW ein Viertel der Rück-Rate aus dem *cis*-Zustand (schwarze, leere Rechtecke). Bei höheren Leistungen schwankt die Rate um Werte von etwa 540 kHz. Die Rück-Rate aus dem *cis*-Zustand steigt mit der Anregungsleistung deutlich an und erreicht Werte von etwa 5,9 MHz. Die Verbindungslien der Punkte in (a), (b), (c) und (d) dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

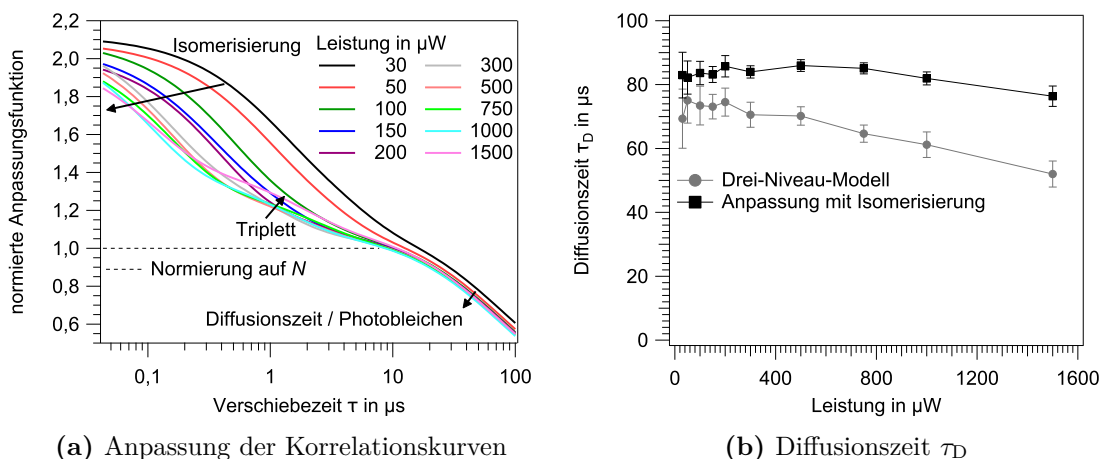


Abbildung 6.24: Normierte Anpassungen und Diffusionszeit von AF-647

(a) zeigt die auf die mittlere Anzahl der beobachteten Teilchen N normierte Anpassung der Autokorrelation gemäß Gleichung (6.41). Der Anteil der Isomerisierung der FCS-Kurve verschiebt sich mit höheren Anregungsleistungen deutlich zu kürzeren Zeiten τ . Ab einer Leistung von etwa $300 \mu\text{W}$ ist der Tripletanteil bei im Mittel $1,5 \mu\text{s}$ zu erkennen. Zusätzlich fällt ein leichter Abfall der Diffusionszeit mit steigender Leistung auf. Die Korrelationsfunktionen (ohne Normierung) mit der entsprechenden Anpassung sind in Abbildung C.20 dargestellt. (b) Die sinkende Diffusionszeit ist ein Indiz für Bleichprozesse, die während des Transits der Moleküle durch das beleuchtete Volumen auftreten. Allerdings können auch andere Prozesse (wie z. B. radikalionische Zustände bei hohen Leistungsdichten gemäß Abschnitt 2.2.5) zu einer effektiven Verkürzung der möglichen Beobachtungsdauer führen. Die Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

überlagern zudem in Übereinstimmung mit Widengren und Schwille [145] die Abfallzeiten des Triplets und der Isomerisierung und lassen keine einfache Unterscheidung der Prozesse zu.

Obgleich die in Abbildung 6.23a dargestellte Anpassung mit dem einfachen Drei-Niveau-Modell (graue Kreise) eine relativ hohe Übereinstimmung mit den Anpassungen des *cis*-Anteils (rote Rauten) zeigt, wird bei der Betrachtung der Korrelationskurve in Abbildung C.19 (siehe Seite XXXVI) deutlich, dass das Drei-Niveau-Modell diese nur sehr unzureichend abbildet. Die Abfallzeiten der beiden Komponenten in Abbildung 6.23b zeigen ein Absinken der *cis*-Zeit τ_I zu hohen Leistungen. Die Tripletzeit kann bei niedrigen Leistungen ($< 300 \mu\text{W}$) nur mit großen Fehlern angepasst werden und steigt im Bereich von $300 \mu\text{W}$ bis $750 \mu\text{W}$ auf Tripletzeiten τ_T von $1 \mu\text{s}$ bis $2,5 \mu\text{s}$ an. Die *cis*-Zeit hingegen zeigt mit steigender Anregungsleistung einen deutlichen Abfall. Sie sinkt von $\tau_I = 797 \text{ ns}$ bei $30 \mu\text{W}$ zu $\tau_I = 107 \text{ ns}$ bei einer Leistung von $1,5 \text{ mW}$ ab. Die Darstellungen der analog zu den Triplettparametern gewonnenen *trans-cis*- bzw. *cis-trans*-Übergangsraten sind in den Abbildungen 6.23c und 6.23d zu sehen. Dabei steigt die Rate in den *cis*-Zustand k_{iso} und auch die Rück-Rate aus dem *cis*- in den *trans*-Zustand k_{triso} deutlich mit der Anregungsleistung. Die Triplettraten sind dabei um eine Faktor vier bis fünf geringer und sättigen ab etwa $300 \mu\text{W}$.

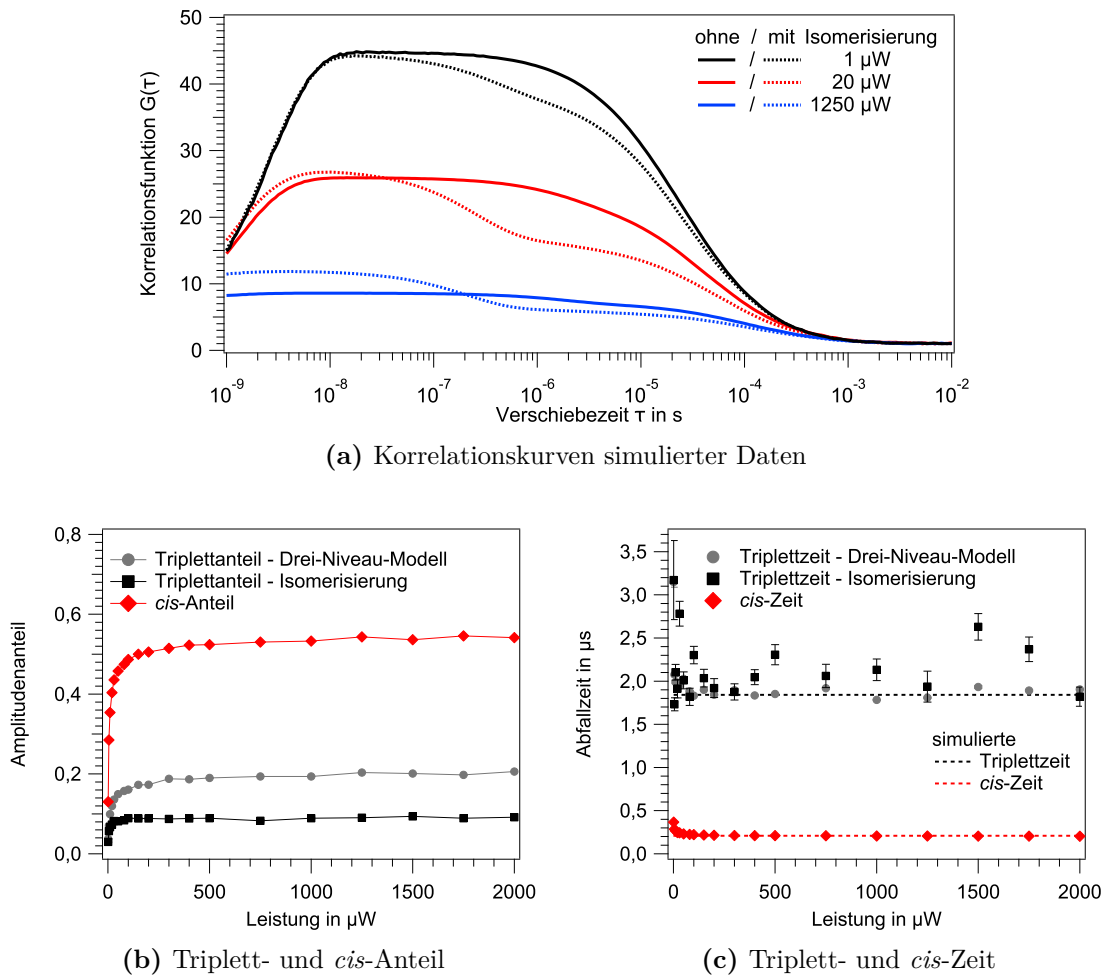
Tabelle 6.7: Simulationsparameter mit Isomerisierung

Der simulierte Diffusionskoeffizient lautet $D = 3,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bei einem zylindrischen Simulationsvolumen mit einer Höhe von $11,0 \mu\text{m}$ und einem Radius von $2,2 \mu\text{m}$ (Volumen von $167,3 \text{ fl}$). Die Fokusfunktionen in Anregung und Detektion folgen der 3D-Gauß-Strahl-Funktion gemäß Abschnitt 3.3.2 und die Breiten- und Längenparameter lauten $w_{xy} = 170 \text{ nm}$ und $w_z = 570 \text{ nm}$ in der Anregung, sowie $w_{xy} = 417 \text{ nm}$ und $w_z = 1200 \text{ nm}$ in der Detektion. Die simulierten Leistungen liegen im Bereich von $1 \mu\text{W}$ bis $2000 \mu\text{W}$. Jeweils drei exemplarische FCS-Kurven der Simulation mit und ohne Isomerisierung sind mit der Auswertung der gesamten Simulation gemäß Gleichung (6.32) in Abbildung 6.25 dargestellt.

Extinktionskoeffizient in $\text{cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$	k_{rad} in kHz	k_{ISC} in kHz	k_{rISC} in kHz	τ_{T} in μs	k_{iso} in kHz	k_{riso} in kHz	τ_{I} in μs
217 567	330 000	113	430	1,84	2500	2280	0,21

Diese Leistungsabhängigkeit kann auch direkt an den normierten Anpassungen der Korrelationskurven in Abbildung 6.24a beobachtet werden. Dabei sind die Kurven auf die mittlere Anzahl der beobachteten Teilchen, also das N des Diffusionsanteils der Korrelationsfunktion (siehe Abschnitt 2.4.1), normiert. Mit steigender Anregungsleistung findet eine Verschiebung der Isomerisierungsamplitude zu kürzeren Zeiten τ statt. Durch die größer werdende Trennung der Zeiten der Isomerisierung und der Triplettedynamik, kann der Triplett ab Leistungen von etwa $200 \mu\text{W}$ deutlich in den FCS-Kurven erkannt werden. Zusätzlich fällt eine Verschiebung der Diffusionszeit τ_{D} zu niedrigeren Zeiten auf. Unter Betrachtung des in Abbildung 6.24b dargestellten Verlaufes der Diffusionszeit, ist zu erkennen, dass die Anpassung mit Isomerisierungsanteil (siehe Gleichung (6.41)) zu längeren Diffusionszeiten führt. Diese sind bei geringen Leistungen (bis $350 \mu\text{W}$) um 10 % bis 19 % und bei höheren Leistungen um 22 % bis 47 % länger als aus der Anpassung des Drei-Niveau-Modells. Der Abfall bei steigender Anregungsleistung ist in beiden Anpassungen gleich stark ausgeprägt und gut zu erkennen. Entgegen des Verhaltens entsprechend der Abschnitte 6.2 und 6.3 ist somit eine Verringerung der mittleren Beobachtungsdauer bei hohen Leistungen erkennbar. Das kann zum Beispiel aus Bleicheffekten während der Transitzeit durch das effektiv beobachtete Volumen resultieren [40, 107]. Allerdings können auch andere Prozesse zu Dunkelzeiten im Bereich der Diffusionszeit führen (wie z. B. radikalionische Zustände nach Abschnitt 2.2.5), sodass hier weitere Untersuchungen des Bleich- bzw. Leuchtverhaltens nötig sind.

Die Simulation des verwendeten Modells nach Gleichung (6.32) ist in Abbildung 6.25 dargestellt und wurde im Rahmen der Masterarbeit von Gerant [367] durchgeführt. Die Parameter der Simulation sind in Tabelle 6.7 aufgetragen. Abbildung 6.25a zeigt je drei exemplarische Korrelationskurven der Simulation bei niedriger ($1 \mu\text{W}$ und $20 \mu\text{W}$) und hoher ($1250 \mu\text{W}$) Leistung mit und ohne Isomerisierung. Die zusätzliche Amplitude der Isomerisierung bei kurzen Zeiten ($< \mu\text{s}$) ist gut zu erkennen. Die Anpassung der Simulationskurven gemäß Gleichung (6.32) führt zu den in Abbildung 6.25b und Abbildung 6.25c dargestellten Werten. Die Isomerisierung führt dabei zu einer Verminderung des Triplettanteils und erschwert die Anpassung der Triplettzeiten, obwohl diese um etwa eine Größenordnung

**Abbildung 6.25: Simulation der Isomerisierung**

(a) Drei exemplarisch ausgewählte Korrelationskurven der Simulation bei niedriger (1 μW und 20 μW , schwarz und rot) und hoher (1250 μW , blau) Leistung mit (gepunktete Linien) und ohne (durchgezogene Linien) Isomerisierung gemäß Tabelle 6.7. (b) Die Isomerisierung (rote Rauten) führt zu einer Verminderung des Tripletanteils (schwarze Rechtecke) im Vergleich zum Drei-Niveau-Modell (graue Kreise). Die Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung. (c) Die Abfallzeiten des Triplets und der Isomerisierung zeigen beim Drei-Niveau-Modell (graue Kreise) und für die *cis*-Zeit (rote Rauten) eine genaue Übereinstimmung mit den vorgegebenen Werten (schwarz und rot gestrichelte Linie). Die Bestimmung der Tripletzeiten bei vorhandener Isomerisierung (schwarze Rechtecke) weicht in der Auswertung trotz der deutlich getrennten Zeitbereiche der Simulation (Tripletzeit von 1,84 μs und *cis*-Zeit von 0,21 μs , gestrichelte schwarze und rote Linie) teilweise deutlich (bis zu 43 %) vom in der Simulation vorgegebenen Wert ab.

voneinander abweichen (1,84 μs zu 0,21 μs , siehe Tabelle 6.7 und gestrichelte Linien in Abbildung 6.25c). Bei niedrigen Leistungen im Bereich von 1 μW liegen die Triplet- und Isomerisierungsamplituden nah beieinander. Die Trennung des Triplet- und Isomerisierungsterms der Korrelation ist lediglich aufgrund der unterschiedlichen Abfallzeiten τ_T und τ_I möglich. Das in den Abbildungen 6.23 und 6.24 beobachtete, grundlegende Verhalten der Isomerisierung stimmt bei hohen Leistungen bzw. bei Sättigung des angeregten *trans*-Zustandes mit den Simulationen überein.

6.4.2 Einfluss photoprotektiver Additive

Photoprotektive Additive führen zumeist zu einer Löschung höherer elektronischer Zustände durch Energie- bzw. Elektronentransfer-Prozesse (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Dabei existiert eine Vielzahl von eingesetzten Radikalfängern wie Ascorbinsäure (AA) [40, 42, 43], Trolox [41, 43, 172], *p*-Phenylendiamin (PPD) [174], Triethylendiamin (TEDA) [372] und Triplett-Löschern wie Mercaptoethylamin (MEA) [42] und Cyclooctatetraen (COT) [42, 373] sowie Oxidantien wie z.B. Methylviologen (ME) [374–376]. Findet die Löschung eines Zustandes durch einen Elektronentransfer statt, können wie bei der Photoionisation radikalkationische Zustände R^+ oder auch radikalanionische Zustände R^- auftreten (vgl. Abschnitt 2.2.5), die zu zusätzlichen Dunkelzeiten und Bleichvorgängen führen. In Abbildung 6.26 sind die Radikalzustände, die mittels der Oxidation oder Reduktion aus den angeregten Zuständen des Farbstoffes entstehen können, aufgetragen.

Gemäß Abschnitt 3.2.4 ist die grundlegende Idee des reduzierenden und oxidierenden Systems (ROXS) dabei, die Besetzung der Triplettzustände durch ein Oxidations- oder Reduktionsmittel mittels $k_{\text{Tox,red}}$ in die Radikalzustände $R^{+,-}$ zu überführen und diese anschließend durch ein Reduktions- oder Oxidationsmittel in den Singulett-Grundzustand S_0 zu bringen. Passiert dies auf einer kürzeren Zeitskala als der der Lebensdauer der Radikal- und Triplettzustände, führt dies zu einer Verkürzung der Dunkelzeiten, durch die Löschung der Dunkelzustände, und zum anderen zu einer Abnahme der Bleich-Wahrscheinlichkeit aufgrund der verminderten Besetzungsdichte bzw. Besetzungsdauer möglicher Zwischenzustände auf dem Photozerstörungsweg.

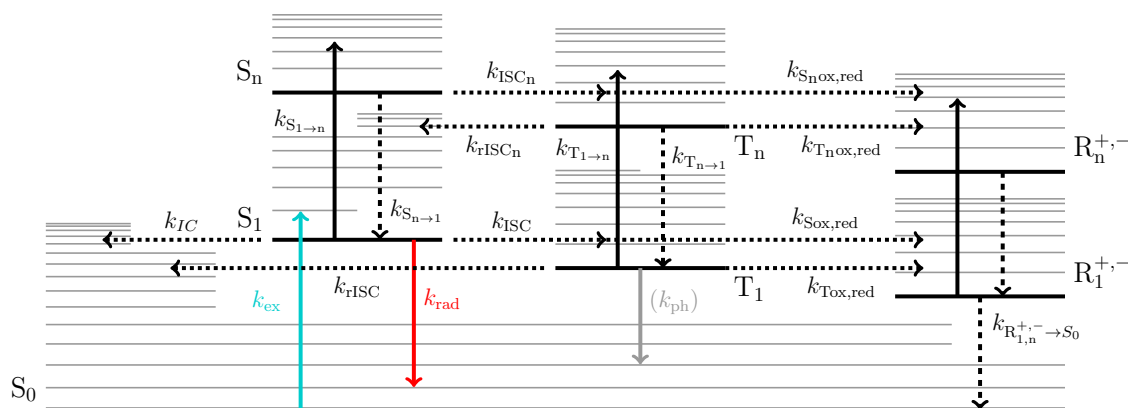


Abbildung 6.26: Löschung angeregter Zustände durch Redoxreaktionen

Die angeregten Zustände S_1 und T_1 des betrachteten Fluorophors können durch die konsequente Absorption von Photonen in höher angeregten elektronische Zustände S_n bzw. T_n gebracht werden. Die einfach und höher angeregten Zustände können anschließend durch einen photoinduzierten Ladungstransfer (Photoionisation, Oxidation des Fluorophors) oder Reaktionen mit anderen Molekülen bzw. Additiven in einen Radikalzustand $R_{1,n}^{+,-}$ gebracht werden. Anschließend kann der Fluorophor über einen erneuten Elektronentransfer in den Grundzustand relaxieren. Die durchgezogenen Linien kennzeichnen strahlende und direkt photonisch angeregte Vorgänge. Gepunktete Linien stehen für iso-energetische Konversion mit anschließender Schwingungsrelaxation (SR). Die Desaktivierung mittels SR ist der Übersicht halber nicht dargestellt.

Die Löschung des radiativen Singulettzustandes S_1 ist dabei nicht gewollt, obwohl dies in einer Verringerung der Quantenausbeute der Bleichprozesse und somit einer längeren Beobachtungsdauer resultiert, da zugleich (im gleichen Verhältnis) die mittlere Helligkeit des Fluorophors vermindert wird [96]. Im Idealfall sind demnach Triplett-Triplett-Löschungen energetisch begünstigt und Singulett-Singulett-Löschungen energetisch verboten. Thermodynamisch lässt sich die freie Enthalpie des Elektronentransfers ΔG mithilfe der Rehm-Weller-Gleichung [57, 377, 378]

$$\Delta G = e(E_{\text{ox}} - E_{\text{red}}) - \Delta G_{00} - \frac{e^2}{\epsilon d} \quad (6.44)$$

bestimmen. Wobei E_{ox} das Oxidationspotential des Elektronendonors D



und E_{red} das Reduktionspotential des Elektronenakzeptors A



angibt¹⁴. ΔG_{00} gibt die Energie des Null-Null-Übergangs vom Grundzustand zum angeregten Zustand ($S_0 \rightarrow S_1$) des Moleküls an und $e^2/(\epsilon d)$ beschreibt die Coulomb-Wechselwirkung des gebildeten Ionenpaares in Abhängigkeit des Abstandes der Ladungen d , der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels ϵ ¹⁵ und der Elementarladung e . Wobei der Coulomb-Term in Medien mit einer hohen Dielektrizitätskonstanten, wie z. B. in Wasser ($\epsilon_r = 78,30$ bei 25 °C [379]), vernachlässigt werden kann [380].

In Tabelle 6.8 sind die elektrochemischen Potentiale und Übergangsenergien einiger Fluorophore und Additive aufgetragen. Es fällt auf, dass das Trolox-Chinon und der Sauerstoff besonders niedrige Reduktionspotentiale (bezüglich des Betrags) besitzen und damit effiziente Oxidationsmittel darstellen. Im Fall des Sauerstoffes kann die Betrachtung der Lösungsprozesse in Abschnitt 2.2.4.2 bzw. die Analyse der Messungen in Abschnitt 6.3 um eine Abschätzung der Entstehung von reaktivem Sauerstoff im Singulettzustand erweitert werden. So kann nach den Gleichungen (2.52) und (2.54a) die Löschung des Fluorophors F im angeregten Singulett gemäß



¹⁴ Die Oxidations- und Reduktionspotentiale werden zumeist über zyklische Voltammetrie bestimmt und entsprechend der verwendeten Referenzelektrode angegeben. Die in dieser Arbeit angegebenen Potentiale beziehen sich auf eine Kalomelektrode (SCE).

¹⁵ Wobei ϵ über $4\pi\epsilon_0\epsilon_r$ mit der relativen Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels ϵ_r und der Permittivität des Vakuums ϵ_0 zusammenhängt.

Tabelle 6.8: Elektrochemische Potentiale und Übergangsenergien

Strukturen der nicht in Abschnitt 3.2 dargestellten Fluorophore sind in Abbildung C.18 zu finden. Bei Cyaninfarbstoffen sind die Energien der radiativen Systeme im *trans*-Zustand aufgetragen. Das Oxidationspotential von AF-488 kann aufgrund der ähnlichen Struktur anhand der Rhodamine (vgl. die Abbildungen 3.8a und C.18a bis C.18c) abgeschätzt werden und sollte etwa $E_{\text{ox}} = (1,39 \pm 0,42) \text{ V}$ vs SCE betragen. Analog dazu beträgt der Abstand des angeregten Triplets zum Grundzustand $\Delta G_{00}(\text{T}_1) = 1,95 \text{ eV}$. Der energetische Abstand der Triplett-Triplett-Absorptionsbande ($\text{T}_1 \rightarrow \text{T}_n$) des Cy5 beträgt nach Jia et al. [381] $1,98 \text{ eV}$ für den *trans*-Zustand und $1,80 \text{ eV}$ für den *cis*-Zustand. Nicht aufgetragen ist das AF-647, das eine große Ähnlichkeit zum Cy5 besitzt (vgl. die Abbildungen 3.8c und 3.10c) und daher vergleichbare Werte aufweisen sollte. Es fällt auf, dass der Sauerstoff und das Trolox-Chinon effiziente Oxidationsmittel darstellen (großes E_{red}) und Trolox ein starkes Reduktionsmittel ist (kleines E_{ox}).

Fluorophor / Additiv	E_{ox} in V vs SCE	E_{red} in V vs SCE	$\Delta G_{00}(\text{S}_1)$ in eV	$\Delta G_{00}(\text{T}_1)$ in eV
AF-488	—	$-0,64^a$	$2,45(6)^b$	—
Rh-6G	$1,39^{c,d}$	$-0,95^{c,d,e}$	$2,28(1)^{c,d,e}$	—
Rh-123	$0,97^f$	$-0,85^f$	$2,42^f$	$1,92^f$
Rh-630	$1,03^e$	$-0,82^e$	$2,16^e$	—
Cy3	$1,09^g$	$-1,24^h$	$2,21(2)^b$	$1,72^i$
Cy5	$0,90(8)^{c,d}$	$-0,86(2)^{c,d,j}$	$1,86(2)^{c,d,k}$	$1,60^k$
Atto 647N	$1,11^j$	$-0,64^j$	$1,90^j$	—
AA	0,06 bis $0,66^{l,m}$	$-2,28^l$	—	—
TEDA	$0,67(10)^{l,n}$	$-2,15^l$	—	$>3,90^n$
Trolox	$0,16(8)^{d,l,o,p}$	$-1,06^{l,o}$	$4,20^o$	—
Sauerstoff	—	$-0,33^q$	$0,98^{n,r,s}$	—
Trolox-Chinon	—	$-0,08$ bis $-0,50^t$	—	—
ME	—	$-0,45^u$	—	$3,10^n$

^a berechnet aus Angaben in V vs Ag/AgCl nach Chen et al. [380]

^b Abschätzung aus den Spektren in Abschnitt 3.2

^c nach Dietrich et al. [382]

^d nach Kasper [173]

^e nach Sauer et al. [383]

^f nach Piffi et al. [384], berechnet aus Angaben in V vs NHE

^g nach Lenhard [385]

^h keine Reduktion über $-1,0 \text{ V}$ vs NHE nach Torimura et al. [386]

ⁱ nach Jia et al. [381]

^j nach Vogelsang et al. [43]

^k nach Huang et al. [371], $\Delta G_{00}(\text{T}_1)$ bestimmt aus dem Phosphoreszenzspektrum bei 77 K

^l berechnet aus Angaben in V vs NHE nach Piffi [387]

^m nach Lambert und Kochevar [170]

ⁿ nach Kavarnos und Turro [89] aus Daten nach Muto, Nakato und Tsubomura [388], Ledwith [389], Turro [390] und Hub et al. [391]

^o berechnet aus Angaben in V vs NHE nach Dörr [392]

^p nach Steenken und Neta [393]

^q bei 1 atm ($101,325 \text{ kPa}$, bei 1 M : -155 mV) nach Wardman [394] und Sawyer und Williams [395]

^r nach Schweitzer und Schmidt [92]

^s nach Atkins und Paula [93]

^t nach Cordes, Vogelsang und Tinnefeld [172]

^u nach Kavarnos [396]

Tabelle 6.9: Freie Enthalpie der Elektronentransferreaktionen

Dargestellt sind die nach Gleichung (6.44) (unter Vernachlässigung des Coulomb-Terms) bestimmten freien Reaktionsenthalpien für den Fall der Oxidation (ΔG_{ox}) und Reduktion (ΔG_{red}) der vier angeregten Fluorophore AF-488, Rh-6G, Cy3 und Cy5 mit Trolox und Trolox-Chinon nach Tabelle 6.8. Dabei wurde für das Trolox-Chinon ein mittleres Reduktionspotential mit einem Wert von $E_{\text{red}} = -0,29 \text{ V}$ vs SCE angenommen. Es ist zu sehen, dass eine exergonische Energieübertragung ($\Delta G < 0$) in Form der Reduktion angeregter Singulett- und Triplett-Zustände durch Trolox stattfinden kann. Gleichzeitig ist die freie Enthalpie der oxidativen Reaktionen mit Trolox endergonisch ($\Delta G > 0$) oder nahe $\Delta G = 0$. Das Trolox-Chinon hingegen zeigt eine negative freie Enthalpie der oxidativen Reaktionen aus den angeregten Zuständen. Da Sauerstoff ein ähnliches Reduktionspotential ($E_{\text{red}} = -0,33 \text{ V}$ vs SCE) wie das hier aufgeführte Trolox-Chinon besitzt, sind die aufgeführten oxidativen Reaktionen auch für den Sauerstoff exergonisch.

Trolox mit	$\Delta G_{\text{ox}}(\text{S}_1)$ in eV	$\Delta G_{\text{ox}}(\text{T}_1)$ in eV	$\Delta G_{\text{red}}(\text{S}_1)$ in eV	$\Delta G_{\text{red}}(\text{T}_1)$ in eV
AF-488	0,00 ^a	0,50 ^a	-1,65	-1,15 ^a
Rh-6G	0,17	—	-1,17	—
Cy3	-0,06	0,43	-0,81	-0,32
Cy5	0,10	0,36	-0,84	-0,58
Trolox-Chinon mit				
AF-488	-0,77 ^a	-0,27 ^a	—	—
Rh-6G	-0,60	—	—	—
Cy3	-0,83	-0,34	—	—
Cy5	-0,67	-0,41	—	—

^a geschätzt aus den Werten strukturell ähnlicher Fluorophore gemäß Tabelle 6.8

nur stattfinden, wenn die energetische Differenz zwischen dem angeregten Singulettzustand und Triplett-Zustand des Fluorophors $\Delta E_{\text{S}_1, \text{T}_1}$ die energetische Differenz des ersten angeregten Singulettzustandes des Sauerstoffes O_2 ($^1\Delta_{\text{g}}$) zum Triplett-Grundzustand des Sauerstoffes O_2 ($^3\Sigma_{\text{g}}^-$) von $\Delta G_{00}(\text{S}_1) = 0,98 \text{ eV}$ erreicht bzw. übersteigt. Das ist beim Rhodamin 123 (Rh-123) ($\Delta E_{\text{S}_1, \text{T}_1} = 0,51 \text{ eV}$) und Cy5 ($\Delta E_{\text{S}_1, \text{T}_1} = 0,26 \text{ eV}$) nicht der Fall und lässt den Schluss zu, dass auch strukturell ähnliche Fluorophore wie das AF-488 und AF-647 nicht auf diesem Weg zu Singulett-Sauerstoff führen bzw. gelöscht werden. Über Löschungen des Triplettzustandes gemäß der Gleichungen (2.53a) und (2.54a)



kann hingegen Singulett-Sauerstoff entstehen, wenn die Triplettenergie des Fluorophors größer als die energetische Differenz $\Delta G_{00}(\text{S}_1)$ des Sauerstoffes ist. Das ist für die Fluorophore Rh-123 ($\Delta G_{00}(\text{T}_1) = 1,9 \text{ eV}$) und Cy5 ($\Delta G_{00}(\text{T}_1) = 1,6 \text{ eV}$) und somit wahrscheinlich auch für AF-488 und AF-647 gegeben. Zusätzlich fällt auf, dass der zweite angeregte Singulett-Zustand des Sauerstoffes O_2 ($^1\Sigma_{\text{g}}^+$) mit einer energetischen Differenz von $\Delta G_{00}(\text{S}_2) = 1,6 \text{ eV}$ (siehe Abschnitt 2.2.4.2) im Bereich der Triplettenergien liegt und somit ebenfalls zu möglichen Übergängen führt.

Tabelle 6.10: Freie Enthalpie der Ladungsrekombination

Die Abschätzung der freien Enthalpie der Ladungsrekombination ergibt sich aus dem Reduktions- und Oxidationspotential der Fluorophore und Additive. Die freie Enthalpie der Ladungsrekombination der Radikalanionen $\Delta G_{\text{ox}}(\text{R}_1^-)$ ist durch die Reduktionspotentiale der Fluorophore AF-488, Rh-6G, Cy3 und Cy5 sowie des entsprechenden Additivs gegeben. Die freie Enthalpie der Ladungsrekombination der Radikalkationen $\Delta G_{\text{red}}(\text{R}_1^+)$ durch die entsprechenden Oxidationspotentiale der Fluorophore und Additive. Die Ladungsrekombination der Radikalanionen $\Delta G_{\text{ox}}(\text{R}_1^-)$ mit Trolox ist dabei endergonisch bzw. im Fall von Cy3 nur schwach exergonisch. In allen anderen Fällen ist die freie Enthalpie der Ladungsrekombinationen negativ und somit exergonisch.

	Trolox		Trolox-Chinon	Sauerstoff
	$\Delta G_{\text{ox}}(\text{R}_1^-)$	$\Delta G_{\text{red}}(\text{R}_1^+)$	$\Delta G_{\text{ox}}(\text{R}_1^-)$	$\Delta G_{\text{ox}}(\text{R}_1^-)$
	in eV		in eV	in eV
AF-488	0,42	−1,23 ^a	−0,35	−0,31
Rh-6G	0,11	−1,23	−0,66	−0,62
Cy3	−0,18	−0,93	−0,95	−0,91
Cy5	0,20	−0,74	−0,57	−0,53

^a geschätzt aus den Werten strukturell ähnlicher Fluorophore gemäß Tabelle 6.8

Die freien Reaktionsenthalpien nach Gleichung (6.44) sind für die Fluorophore AF-488, Rh-6G, Cy3 und Cy5 mit den Additiven Trolox und Trolox-Chinon in Tabelle 6.9 eingetragen. Die Reduktion angeregter Singulett- und Triplett-Zustände der Fluorophore durch Trolox ist exergonisch ($\Delta G < 0$). Die Oxidation hingegen endergonisch ($\Delta G > 0$) oder nahe $\Delta G = 0$. Trolox-Chinon und Sauerstoff zeigen eine negative freie Reaktionsenthalpie der oxidativen Reaktionen aus den angeregten Zuständen. So können die Additive Trolox und Trolox-Chinon die betrachteten Fluorophore in einen nichtfluoreszenten radikalanionischen bzw. radikalkationischen Zustand bringen.

Die freie Enthalpie der Ladungsrekombination aus dem oxidierten bzw. reduzierten Zustand kann jeweils anhand der Reduktions- und Oxidationspotentiale der beteiligten Moleküle abgeschätzt werden [43, 376]. Das führt über die Reduktionspotentiale der Fluorophore AF-488, Rh-6G, Cy3 und Cy5 sowie der Additive Trolox, Trolox-Chinon und Sauerstoff gemäß Tabelle 6.8 zur freien Enthalpie der Ladungsrekombination der Radikalanionen $\Delta G_{\text{ox}}(\text{R}_1^-)$ und über die entsprechenden Oxidationspotentiale der Fluorophore und des Additivs Trolox zur freien Enthalpie der Ladungsrekombination der Radikalkationen $\Delta G_{\text{red}}(\text{R}_1^+)$ in Tabelle 6.10. Der Sauerstoff zeigt ebenso wie das Trolox-Chinon exergonische oxidative Eigenschaften, wohingegen Trolox bezüglich der Reduktion exergonisch ist.

Die in Abbildung 6.27a dargestellten Messungen zeigen den leistungsabhängigen Verlauf der MB der Fluorophore AF-488, sCy5 und AF-647 in PBS ohne Additive und in PBS mit Trolox bei einer Sättigungskonzentration von 2 mM [397]. Bis zu einer Leistung von etwa 100 μW (Photonenflussdichte von $2,05 \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ist bei keinem der untersuchten Farbstoffe ein deutlicher Unterschied zwischen den molekularen Helligkeiten mit oder ohne Trolox festzustellen. Oberhalb dieser Grenze führt das Trolox bei den Cyaninfarbstoffen

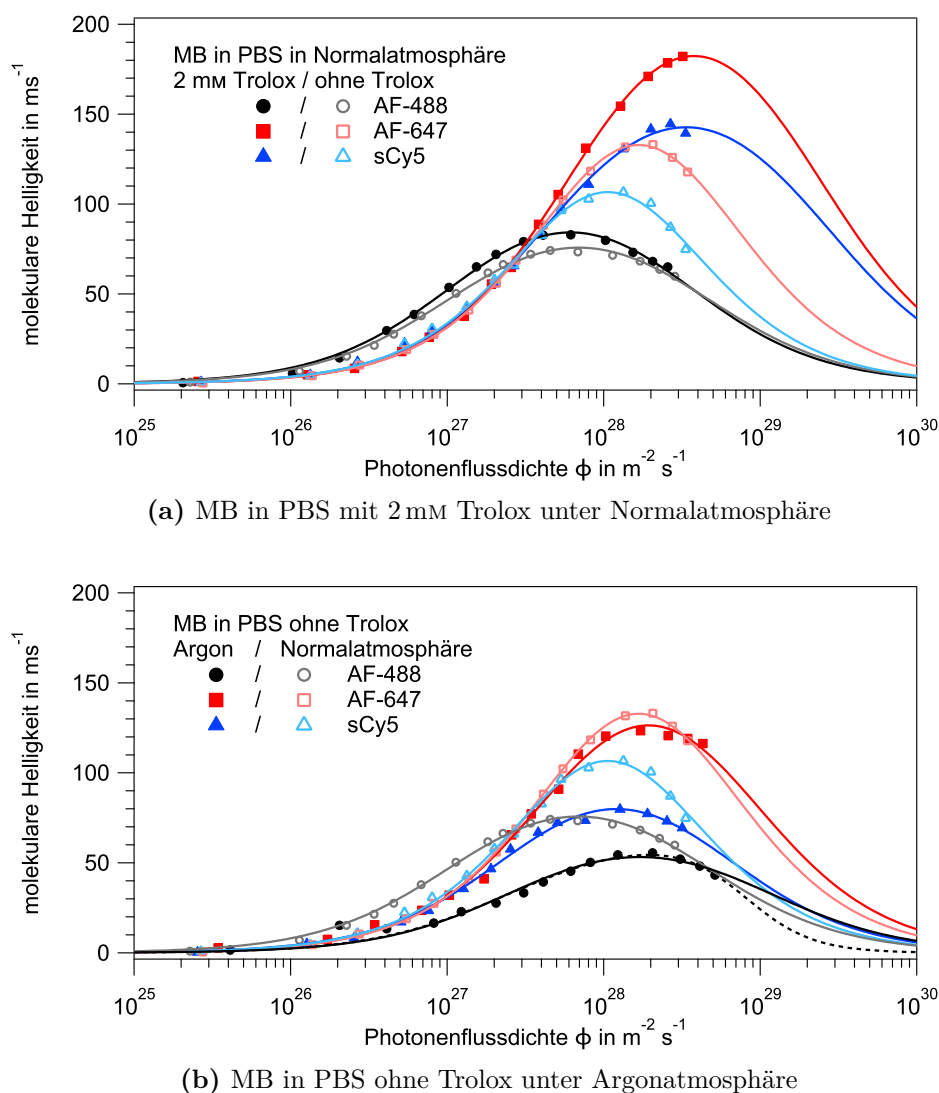


Abbildung 6.27: MB bei der Zugabe von Trolox und unter Argonatmosphäre

Dargestellt ist die MB der Cyaninfarbstoffe sCy5 (blaue Dreiecke) und AF-647 (rote Rechtecke), sowie des Xanthenderivats AF-488 (schwarze Kreise) in PBS (helle, leere Symbole) und in PBS mit (a) 2 mM Trolox sowie (b) unter Argonatmosphäre (beides dunkle, volle Symbole). Die durchgezogenen Linien kennzeichnen Anpassungen nach den Gleichungen (4.21) und (B.32), deren Werte in Abbildung 6.28 und Tabelle C.3 aufgetragen sind. In (a) ist bei den Cyaninfarbstoffen ein deutlicher Anstieg der maximalen MB um bis zu 82 % zu erkennen. Die maximale MB des AF-488 hingegen steigt nur leicht (12 %). In (b) unter Argon zeigen alle betrachteten Fluorophore einen Abfall der maximalen MB. Auffällig ist, dass die maximale MB des AF-647 nur leicht sinkt (8 %) wohingegen das strukturell ähnliche sCy5 einen Abfall von 25 % zeigt. Die schwarz gepunktete Linie kennzeichnet die Anpassung des AF-488 mit einem zusätzlichen kubischen Sättigungsterm gemäß Gleichung (B.8).

sCy5 und AF-647 zu einer deutlichen Erhöhung der MB. So steigt die maximale MB beim sCy5 von 107 ms^{-1} auf 145 ms^{-1} (136 %) und beim AF-647 von 133 ms^{-1} auf 182 ms^{-1} (137 %). Das Xanthenderivat AF-488 hingegen zeigt im Vergleich eine sehr geringe Steigerung der maximalen MB von 74 ms^{-1} auf 83 ms^{-1} (112 %). Die Cyanine zeigen einen leicht sinkenden Tripletanteil bei der Zugabe von Trolox ohne Veränderungen der Tripletzeit,

während das AF-488 eine niedrigere Triplettzeit bei nur geringeren Veränderungen des Triplettanteils zeigt (siehe Abbildung C.21). Die Interaktion des Trolox mit dem angeregten Triplett führt also primär bei den Cyaninen zu einer Erhöhung der MB gemäß Tabelle 6.9. Die Anpassung der MB mit den Gleichungen (4.21) und (B.32) (Fünf-Niveau-System ohne Interkombination höherer Zustände und Drei-Niveau-System mit Isomerisierung gemäß Abschnitt 6.4.1) zeigt in Übereinstimmung mit den Triplettparametern unter der Betrachtung der Anpassungsparameter der MB in Abbildung 6.28 keine Änderung des linearen Sättigungsterms $\phi_{\text{sat}1}$. Der quadratische Term $\phi_{\text{sat}2}$ hingegen steigt für die Cyanine deutlich, was auf einen verringerten Einfluss der isomerisierten Zustände und des Triplettts hindeutet und zu einer Verbreiterung der Kurven zu hohen Photonenflussdichten führt. Dabei ist der Einfluss des Additivs nach Abschnitt 6.2.2 abhängig von der mittleren Kollisionsrate und kann schnellere Prozesse nicht effizient manipulieren. Es sollte erwähnt sein, dass die Sulfonierung der Cy-Fluorophore spektroskopische und photophysikalische Abweichungen zu den nicht sulfonierten Cy-Fluorophoren bedingen kann [364].

Zusätzlich kann aus dem Sättigungsterm $\phi_{\text{sat}2}$ eine Abschätzung der inneren Konversionsrate der höher angeregten Singulett- und Triplettzustände getroffen werden. Unter der Annahme einer vernachlässigbaren Interkombination der höheren Zustände, und einer ähnlichen Größenordnung der molekularen Wirkungsquerschnitte, sodass $\sigma_{S_0 \rightarrow 1} \approx \sigma_{S_1 \rightarrow n} \approx \sigma_{T_1 \rightarrow n}$ bei Werten von 10^{-20} m^2 bis 10^{-21} m^2 [398, 399] gilt, liegen die Raten $k_{T_{n \rightarrow 1}}$ und $k_{S_{n \rightarrow 1}}$ in der Größenordnung von 10^8 Hz bis 10^{11} Hz , was wenigen Nano- bis einigen Picosekunden entspricht. Das stimmt nur teilweise mit der Annahme von Eggeling, Brand und Seidel [46] und Schäfer [215] überein, nach der die Lebensdauer der höher Angeregten Zustände im Bereich von Pico- bzw. Sub-Picosekunden liegt.

Wie von Steinhauer et al. [44] für Cy5 und AF-647 in desoxygenierter Umgebung unter der Zugabe von AA gezeigt, treten durch entsprechenden Reduktionsmittel radikal-anionische Zustände der Fluorophore auf. Hier werden die radikal-anionische Zustände R_1^- durch das Trolox hervorgerufen und können durch eine sukzessive Reaktion mit dem Sauerstoff gemäß Tabelle 6.10 in Übereinstimmung mit Linde et al. [103] in den Grundzustand zurückgeführt werden. Trolox geht primär durch Wechselwirkung mit gelöstem Sauerstoff in den oxidierten Zustand über und kann somit auch als Oxidationsmittel wirken [41, 43, 172]. Die in Abbildung C.22 dargestellte Verlängerung der aus der FCS gewonnen Diffusionszeit aller betrachteten Fluorophore bei hohen Leistungen ($> 100 \mu\text{W}$), deutet auf eine verlängerte Beobachtungsdauer aufgrund der Verminderung photoionisierter Zustände die in Bleichprozessen münden (siehe Abschnitt 2.2.5) bzw. einer Verkürzung radikalkationischer Zustände R_1^+ durch das Trolox hin.

In Abbildung 6.27b sind die Messungen in Argonatmosphäre dargestellt, bei denen ein gegenteiliger Effekt zu sehen ist. Die maximale MB des AF-488 sinkt von 74 ms^{-1} in Normalatmosphäre auf 56 ms^{-1} unter Argon (76 %) und die maximale MB des sCy5 von 107 ms^{-1} auf 80 ms^{-1} (75 %). Auffällig ist das abweichende Verhalten des AF-647, welches

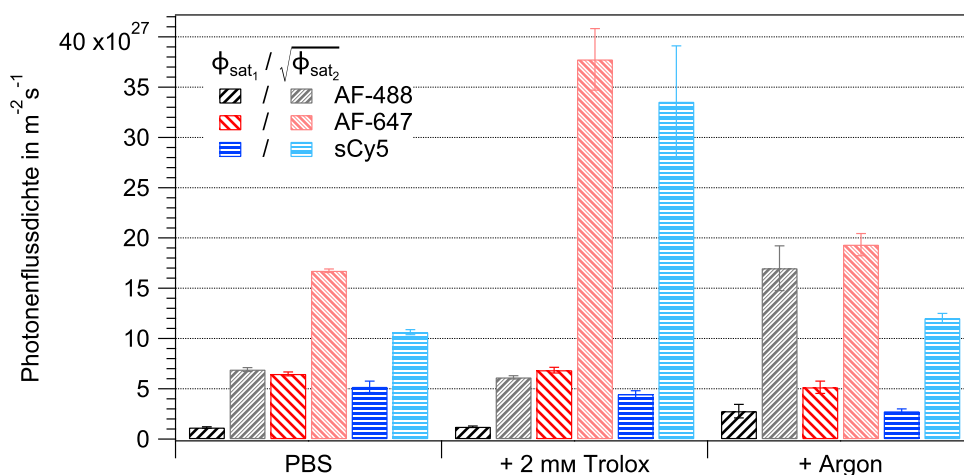


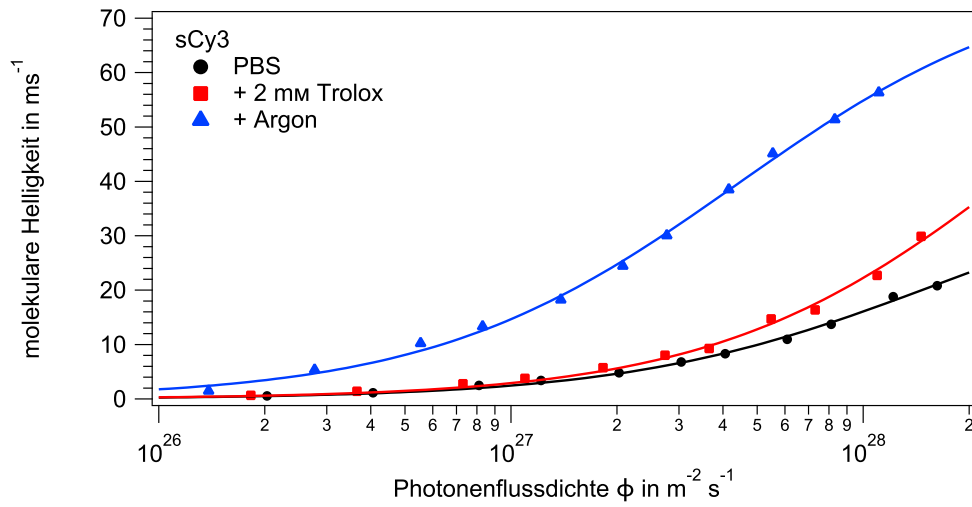
Abbildung 6.28: Parameter der Anpassung der MB mit Trolox und unter Argon

Dargestellt sind die Sättigungsparameter ϕ_{sat_1} und ϕ_{sat_2} der Anpassung der MB in Abbildung 6.27 nach den Gleichungen (4.21) und (B.32) von in PBS, in PBS mit 2 mM Trolox und in PBS unter einer Argonatmosphäre gelöstem AF-488 (schwarz), AF-647 (rot) und sCy5 (blau). Die Zahlenwerte sind in Tabelle C.3 (Seite XXXIV) aufgetragen.

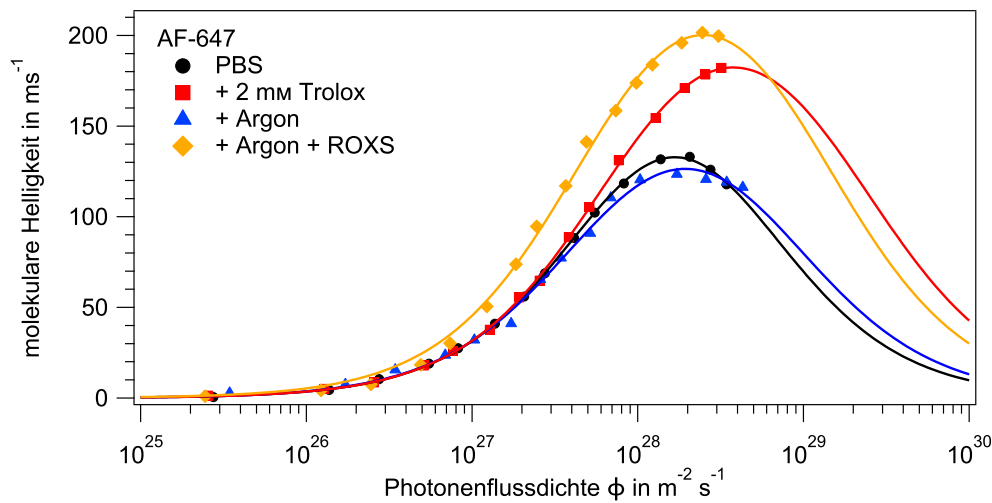
lediglich von 133 ms^{-1} auf 123 ms^{-1} (92 %) abfällt. Unter Betrachtung der Sättigungsparameter der Anpassungen in Abbildung 6.28 ist für alle drei Fluorophore eine Änderung in beiden Anpassungswerten zu sehen. Beim AF-488 steigt der lineare und quadratische Sättigungswert, was in Abbildung 6.27b als Verschiebung des Anstiegs und Abfalls zu höheren Photonenflussdichten erkennbar ist. Schwarz gepunktet ist die Anpassung mit einem weiteren Sättigungsterm gemäß Gleichung (B.8) dargestellt. Dieser führt zu einem steileren Abfall der MB bei hohen Photonenflussdichten und einer größeren Übereinstimmung mit den Messwerten. Allerdings beinhalten die Modelle der verwendeten Anpassungsfunktionen kein Photobleichen (vgl. die Abschnitte 2.2.5 und 4.2 und Anhang B.2), welches aufgrund der längeren Aufenthaltsdauer im Triplett-Zustand und dessen erhöhter mittlerer Besetzungsdichte (siehe Abbildung 6.19) von Relevanz sein und ebenso zu einem steileren Abfall führen kann.

Bei den Cyaninfarbstoffen sinkt ϕ_{sat_1} und ϕ_{sat_2} steigt. Bei hohen Leistungen findet beim Cy5 nach Huang et al. [371, 400] zum einen eine beschleunigte Rück-Interkombination über den Triplett im *trans*-Zustand (siehe Abschnitt 4.2) und zum anderen eine Rück-Isomerisierung über den *cis*-Triplett¹⁶ statt. Daher kann die Manipulation der Sauerstoffkonzentration zu Verschiebungen der mittleren Triplett- und *cis*-Zustands-Besetzungsdichte führen, was wiederum in einer Abnahme der MB resultiert. Auffällig ist im Vergleich dazu das Verhalten des sCy3, das in Abbildung 6.29a dargestellt ist. Obgleich nach Jia et al. [381] Sauerstoff den *trans*-Triplett-Zustand von Cy3 effizient löscht und keinen deutlichen Einfluss auf die Rück-Isomerisierung hat, führt die Messung unter Argon zu einer deutlichen Erhöhung der MB. Bei der Anpassung nach Gleichung (B.32) ist aufgrund der zu geringen Anregungs-

¹⁶ Im Rahmen des Modells nach Abschnitt 6.4.1 ist dieser Zustand nicht mit dargestellt.



(a) sCy3



(b) AF-647

Abbildung 6.29: MB von sCy3 und AF-647 mit Additiven

(a) Zu sehen ist die leistungsabhängige MB von sCy3 (schwarze Kreise). Die Zugabe von 2 mM Trolox (rote Rechtecke) führt zu einem leichten Anstieg bei höheren Photonenflussdichten, in Übereinstimmung zum Verhalten der anderen betrachteten Cyaninfarbstoffe AF-647 und sCy5 in Abbildung 6.27a. Unter Argonatmosphäre (blaue Dreiecke) steigt die MB im Gegensatz zu dem in Abbildung 6.27b betrachteten Verhalten deutlich an. Die durchgezogenen Linien kennzeichnen eine globale Anpassung nach Gleichung (B.32) ohne ϕ_{sat_2} . Eine Angabe der Diffusionszeit und der Triplettparameter ist in Abbildung C.23 zu finden. (b) Die leistungsabhängige MB von AF-647 steigt bei der Zugabe von Trolox (rote Rechtecke) und sinkt unter Argon (blaue Dreiecke) im Vergleich zur Probe in PBS ohne Additive und in normaler Atmosphäre (schwarze Kreise). Wird eine 2 mM Mischung aus Trolox und Trolox-Chinon nach dem ROXS-Prinzip (siehe Abschnitt 3.2.4) zugegeben (orangene Rauten), steigt die MB weiter an und zeigt eine Verschiebung zu niedrigeren Photonenflussdichten. Die durchgezogenen Linien kennzeichnen eine globale Anpassung nach Gleichung (B.32). Die Parameter der globalen Anpassungen von (a) und (b) sind in Tabelle 6.11 aufgetragen.

Photonenflussdichten und dem entsprechend nicht erreichten Plateau der maximalen MB, lediglich der lineare Term ϕ_{sat_1} bestimmbar. Die globale Anpassung führt dabei zu den in Tabelle 6.11 dargestellten Werten. Werden Änderungen der Detektionseffizienz des Mikroskops zwischen den unterschiedlichen Messreihen vernachlässigt¹⁷, kann die Quanteneffizienz Φ_F der Form

$$\Phi_F = \frac{k_{\text{rad}}}{k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{iso}}} \quad (6.49)$$

unter den verschiedenen Bedingungen aus den Anpassungen bestimmt werden (vgl. Gleichung (2.35b)). Dazu wird angenommen, dass die Angaben nach Tabelle 3.1 für die Messung in PBS zutreffend sind. Die Zugabe von 2 mM Trolox führt zu keiner deutlichen Abweichung von Φ_F und kann vollständig durch eine Erhöhung des Sättigungsparameters ϕ_{sat_1} beschrieben werden. Unter Argon hingegen sättigt das Fluoreszenzverhalten früher (niedrigeres ϕ_{sat_1}) und die Quanteneffizienz nimmt stark von 0,10 auf $0,69 \pm 0,05$ zu. Eine markante Änderung des in Abbildung C.23 aufgetragenen Triplettverhaltens ist nicht zu erkennen. Die abnehmende Diffusionszeit (siehe Abbildung C.23a) hingegen deutet auf langanhaltende Dunkelzeiten im Bereich der Diffusion oder Bleichprozesse hin. Obwohl die Interaktion von Cy3 und die Abhängigkeit des Leuchtverhaltens an DNA, bei FRET-Messungen und unter der Zugabe unterschiedlicher Sauerstofffängersysteme gut untersucht ist [116, 117, 364, 386, 401, 402], wird dieses Verhalten in der Literatur nicht beschrieben. Entsprechend Gleichung (6.49) ist von einer Erhöhung der geringen Aktivierungsenergie von $(19 \pm 1) \text{ kJ mol}^{-1}$ [363] und somit Verringerung der Isomerisierungsrate k_{iso} bei sinkendem Sauerstoffgehalt auszugehen.

Abbildung 6.29b zeigt die bereits in Abbildung 6.27 dargestellten Daten des AF-647 mit einer zusätzlichen Leistungsreihe unter Argonatmosphäre mit zugegebenen ROXS bestehend aus einer Mischung von Trolox und Trolox-Chinon (siehe Abschnitt 3.2.4 und Anhang D.1). Das ROXS führt zu einem weiteren Anstieg der maximalen MB von 133 ms^{-1} mit PBS ohne Additiv bzw. 182 ms^{-1} mit PBS und Trolox auf 202 ms^{-1} (152 % bzw. 111 %) und einer Verschiebung zu niedrigeren Photonendichten. In Tabelle 6.11 sind die erhaltenen Anpassungsparameter dargestellt. Eine Erhöhung der Quanteneffizienz von 0,33 auf $0,49 \pm 0,03$ durch eine effektive Verminderung der Isomerisierung kann bei der Zugabe des ROXS unter Argon beobachtet werden. Dabei führt das ROXS über PET zur Löschung angeregter Zustände gemäß Tabelle 6.9 und führt die entstandenen Radikationen über eine Redoxreaktion gemäß Tabelle 6.10 zurück in den Grundzustand. Da die Eigenschaft des Sauerstoffes als Triplettlöcher nun vom ROXS übernommen wird, kann dieser aus der Lösung entfernt werden, was zusätzlich zu einer Verringerung der Bleichwahrscheinlichkeit (aufgrund des fehlenden Singulett-Sauerstoffes) führt.

¹⁷ Diese können z. B. durch eine Verschiebung des Emissionsspektrums oder geringfügige Abweichungen in der Justage der in Abschnitt 3.1 beschriebenen optischen Elemente auftreten.

Tabelle 6.11: Globale Anpassungswerte der MB von AF-488, sCy3, sCy5 und AF-647

Die in den Abbildungen 6.27 und 6.29 dargestellten Anpassungen wurden unter der Annahme mit Gleichung (B.32) angepasst, dass keine Änderungen der Detektionseffizienz des Mikroskops zwischen den unterschiedlichen Messreihen auftritt. Da beim sCy3 die (im Verhältnis zu den anderen Messungen) geringe Photonenflussdichten von maximal etwa $1,6 \cdot 10^{28} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (entspricht etwa 400 pW) nicht zu einer ausreichenden Sättigung der MB (Plateau mit anschließendem Abfall) führt, beinhaltet die Anpassung keinen quadratischen Sättigungsparameter ϕ_{sat_2} .

AF-488	PBS ^a	2 mM Trolox	Argon	Argon + ROXS
Quanteneffizienz Φ_F	0,92	$1,00 \pm 0,07$	$0,27 \pm 0,03$	—
in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,4$	—
in $10^{28} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$0,69 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,02$	$1,69 \pm 0,12$	—
sCy3				
Quanteneffizienz Φ_F	0,10	$0,12 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,15$	—
in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$16,1 \pm 8,2$	$28,4 \pm 15,7$	$4,4 \pm 0,6$	—
sCy5				
Quanteneffizienz Φ_F	0,28	$0,28 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	—
in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$5,2 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,3$	—
in $10^{28} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$1,06 \pm 0,02$	$3,35 \pm 0,50$	$1,20 \pm 0,06$	—
AF-647				
Quanteneffizienz Φ_F	0,33	$0,33 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,03$
in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$6,5 \pm 0,7$	$6,9 \pm 0,6$	$5,1 \pm 0,5$	$5,3 \pm 0,3$
in $10^{28} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$1,67 \pm 0,07$	$3,78 \pm 0,65$	$1,93 \pm 0,09$	$2,49 \pm 0,18$

^a Quanteneffizienz Φ_F konstant gewählt gemäß Tabelle 3.1

6.4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Besonderheit der untersuchten Cyaninfarbstoffe sCy3, sCy5 und AF-647 ist die Photoisomerisierung, bei der durch photonische Anregung eine primär durch sterische Effekte manipulierbare Rotation des Fluorophors um eine Doppelbindung der Kohlenwasserstoffkette stattfinden kann, die zum Übergang in einen Dunkelzustand, die sogenannte *cis*-Form, führt [145, 146, 351–360]. Da bei Cyaninfarbstoffen zumeist das Absorptionsspektrum in der *cis*-Form teilweise mit dem Absorptionsspektrum der radiativen *trans*-Form überlappt, kann auch im Dunkelzustand die eingestrahlte Energie absorbiert werden und zu einer Rück-Rotation führen [351, 353, 355, 360, 369, 370]. Ein entsprechendes photophysikalisches Modelldiagramm nach Rullière [368] wurde in der Form eines Differentialgleichungssystems formuliert und bezüglich der Anpassungsfunktion für die MB stationär gelöst (siehe

Gleichung (6.28) und Anhang B.4).

Mithilfe einer vereinfachten Formulierung des Energieniveaudiagramms gemäß Widengren und Schwille [145] konnte eine allgemeine Formulierung für das zeitabhängige Verhalten der *trans-cis*-Isomerisierung in der Fluktuationsanalyse aufgestellt werden. Eine direkte Zuordnung bzw. Trennung der Triplet- und *trans-cis*-Raten anhand der erhaltenen Terme war nicht möglich, sodass für eine reliable Anpassung des Fluktuationsverhaltens eine ausreichende Trennung der charakteristischen Dunkelzeiten der Prozesse vonnöten ist. Die Anpassung einer Sättigungsreihe des Fluorophors AF-647 bei Intensitäten von 23 kW cm^{-2} bis 1159 kW cm^{-2} zeigte eine starke Leistungsabhängigkeit der *trans-cis*-Isomerisierung, die bei hohen Intensitäten zu *cis*-Zeiten bis hinunter zum Zeitbereich von 100 ns führt. Zusätzlich deutet ein Abfall der Diffusionszeit auf das Vorhandensein langer Dunkelzustände oder Photobleichreaktionen hin. Im Gegensatz zur Annahme, dass eine Verminderung des *cis*-Anteils bei hohen Anregungsleistungen einsetzt [145], konnte ein vergleichbarer Anstieg der Hin- und Rück-Raten aus dem *trans* in den *cis*-Zustand und umgekehrt um etwa eine Größenordnung beobachtet werden. Eine tendenzielle Abnahme des *cis*-Anteils ist somit nicht zu beobachten gewesen. Die bestimmte Isomerisierungsrate k_{iso} liegt im Maximum mit etwa 6 MHz etwas höher als die Isomerisierungsrate von Cy5 von 5 MHz [403], welche aufgrund der großen strukturellen und spektroskopischen Übereinstimmung des AF-647 mit dem Cy5 [404, 405] ebenfalls ähnlich sein sollte. Im Vergleich mit Monte-Carlo-Simulationen wurde ersichtlich, dass die gleichzeitige Anpassung der Isomerisierung und des Triplets selbst bei einer Trennung der charakteristischen Zeiten um etwa eine Größenordnung (Triplet 1,84 μs zu Isomerisierung 0,21 μs) zu großen Abweichungen (bis zu 43 %) der Anpassung vom simulierten Wert führt. Trotz dieser großen Fehler stimmen die in dieser Arbeit bestimmten Werte für die Interkombination und Rück-Interkombination bei hohen Leistungen mit etwa $k_{\text{ISC}} = 0,2 \text{ MHz}$ und $k_{\text{rISC}} = 0,5 \text{ MHz}$ teilweise mit den Beobachtungen von Widengren et al. [403] von $k_{\text{ISC}} = 0,8 \text{ MHz}$ und $k_{\text{rISC}} = 0,5 \text{ MHz}$ für freies Cy5 überein.

Anschließend wurde das zum Beispiel in FRET-Untersuchungen häufig verwendete Farbstoffpaar sCy3 und sCy5 und das bereits betrachtete AF-647, sowie das Rhodaminderivat AF-488 im Hinblick auf den Einfluss photoprotektiver Additive und einer sauerstofffreien Umgebung auf die MB untersucht. So hat das Farbstoffpaar sCy3 und sCy5 mit 0,10 und 0,28 eine sehr geringe Quanteneffizienz, die aus einem hohen Anteil von *trans-cis*-Dunkelzuständen resultiert [370, 406]. Eine deutliche Erhöhung der Quanteneffizienz der Fluorophore kann stattfinden, wenn diese mit DNA oder Proteinen gekoppelt werden [361–366]. Zusätzlich kann der Einsatz von Radikalfängern zu einer Löschung höherer elektronischer Zustände und somit einer verminderten Bleichwahrscheinlichkeit führen [40–43, 172, 174, 372]. Dies wurde ausführlich anhand der freien Enthalpie des photoinduzierten Elektronentransfers mithilfe der Rehm-Weller-Gleichung (siehe Gleichung (6.44)) für unterschiedliche Fluorophore und Oxidations- sowie Reduktionsmittel untersucht. Dabei konnte bei der Zugabe von Trolox bei den Cyninfarbstoffen ein Anstieg der MB von über 35 % beobachtet werden. Der Anstieg der MB beim Rhodaminderivat AF-488 betrug hingegen

lediglich 12 %, was sich mit Beobachtungen von Cordes et al. [174] deckt, die einen leichten Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität von ca. 10 % bei der Zugabe von Trolox und Trolox-Chinon beobachten konnten.

Der geringe Einfluss des Trolox auf die beobachtete Triplettedynamik weist auf eine vernachlässigbare Reaktion mit den angeregten Singulett- und Triplettzuständen hin. Die Erhöhung der MB passt mit dem Anstieg der Diffusionszeit zusammen und deutet auf eine Verminderung der Bleichwahrscheinlichkeit aufgrund der schnellen Löschung photoionisierter Zustände hin, die einen reaktiven Zwischenzustand auf dem Photozerstörungsweg darstellen [42, 99]. Langanhaltende radikalionische Zustände im Bereich der Diffusionszeit¹⁸ (40 µs oder kürzer) konnten ebenfalls nicht beobachtet werden, da die durch das Trolox entstehenden radikalionischen Zustände durch einen komplementären Redoxprozess mit dem vorhandenen, gelösten Sauerstoff in den Singulett-Grundzustand zurückgebracht werden können. Dieser Prozess wurde erstmals von Vogelsang et al. [43] anhand der Additive AA und ME und der Zugabe eines sauerstoffverbrauchenden Enzyms gemäß Harada et al. [408] präsentiert. Für das AF-647 konnte unter Sauerstoffentzug und durch die Zugabe von Trolox und Trolox-Chinon wie von Rasnik, McKinney und Ha [41] und Cordes, Vogelsang und Tinnefeld [172] vorgeschlagen, eine erhöhte Quanteneffizienz von $0,49 \pm 0,03$ erreicht werden.

Auffallend war das Verhalten des sCy3 unter Sauerstoffentzug, das in dieser Form nicht in der Literatur zu finden ist. So erfährt die MB einen deutlichen Anstieg, der in einer Verringerung der Sättigungsschwelle von $\phi_{\text{sat}_1} = (16,1 \pm 2,8) \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ auf $\phi_{\text{sat}_1} = (4,4 \pm 0,2) \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und einem beträchtlichen Anstieg der Quanteneffizienz von 0,10 auf $0,69 \pm 0,05$ ersichtlich wird. Obgleich nach Jia et al. [381] von einer effizienten Löschung des *trans*-Triplettzustandes auszugehen ist, konnte dies hier nicht direkt beobachtet werden. Die abfallende Diffusionszeit deutet hingegen auf eine weitere langanhaltende Dunkelzeit bzw. ein verstärktes Photobleichen hin.

¹⁸ So beträgt z. B. die Rück-Oxidationsrate des Radikalanionzustandes von Rhodamine GreenTM nach Chmyrov, Sandén und Widengren [407] $1,8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$.

Kapitel 7

Benchmarking durch Sättigungsmessungen

Die Fluoreszenzmikroskopie ist heutzutage durch die stetige Weiterentwicklung der Laser-, Farbstoff-, Detektor- und Analysetechnologie zu einem Standardinstrument in der Industrie und Wissenschaft geworden. Obwohl die Anzahl der Publikationen, wie in Abbildung 7.1 zu sehen ist, zum Thema Fluoreszenzmikroskopie und auch der fluoreszenzbasierten Einzelmolekülmethoden in den letzten zwanzig Jahren stetig gestiegen ist, existiert keine weit verbreitete, einheitliche Methode, die verschiedenen, häufig selbst entwickelten Instrumente in ihren Eigenschaften zu vergleichen. Die in der Literatur anzutreffenden Untersuchungen und Beschreibungen [410–421] basieren zumeist auf der Abbildung fluoreszenter Mikrosphären (siehe Abschnitt 6.1), reflektiver Strukturen und fluoreszenter Schichten, sowie dem systematischen Variieren unterschiedlicher Parameter der Beleuchtung, Detektion und Positionierung der Elemente des Mikroskops.

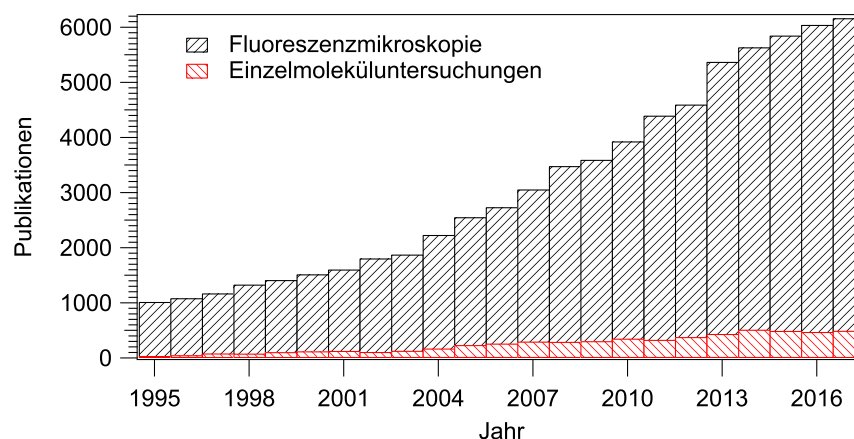


Abbildung 7.1: Publikationen im Bereich der Einzelmoleküluntersuchungen

Anzahl der Publikationen mit dem Thema Fluoreszenzmikroskopie (schwarz) und davon mit einem Schwerpunkt auf Einzelmoleküluntersuchungen (rot). Daten nach [409].

Im Folgenden wird ein Ansatz zur Bewertung der Leistungsfähigkeit eines konfokalen Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskops mittels einer FCS-Sättigungs-Untersuchung an einer einfach zu handhabenden Probe vorgestellt. Dabei kann die Effizienz der Anregung und der Detektion des Mikroskops anhand einer Sättigungsreihe getrennt voneinander bestimmt und mit anderen Mikroskopen verglichen werden. Im täglichen Einsatz kann mit einer Kalibriermessung die Justage des Mikroskops überprüft und bei Abweichungen der verstellte Bereich eingegrenzt werden. Die Analyse basiert auf FCS-Messungen, die durch bereits in der Literatur beschriebene Effekte, wie unter anderem bei Enderlein et al. [235], Schönle et al. [236], Enderlein et al. [336] und Visscher, Brakenhoff und Visser [344], und den in dieser Arbeit präsentierten theoretischen Zusammenhängen zu einem Vergleichsmaßstab für selbst entwickelte und kommerzielle Systeme führt.

Als Probe wird AF-488 eingesetzt, da dieses keine Isomerisierung zeigt und unter anderem häufig als Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energie-Transfer (smFRET)-Donor [20, 422–424] oder FCS-Markierung [286, 425–427] genutzt wird. Das AF-488 ist bei einer Konzentration von etwa 0,6 nM in Wasser gelöst. Wie bereits in Abschnitt 6.2.1 erläutert, sind die betrachteten photophysikalischen Parameter nicht von der Konzentration der Probe abhängig, solange Einzelmolekülbedingungen herrschen (siehe auch Abschnitt 4.1). Die Konzentration hat lediglich auf die effektive mittlere Teilchenzahl im Volumen sowie die Zählrate und somit die Messdauer Einfluss.

7.1 Anregungsprofil

Nach Abschnitt 2.4.1 und Anhang A.1 setzt sich die MDF aus der Anregungstransferfunktion und der Detektionstransferfunktion (CEF) zusammen und bestimmt das effektive Volumen bzw. Beobachtungsvolumen in der Korrelationsanalyse. Abweichungen in der Anregung und Detektion zeigen somit einen direkten Einfluss auf die aus der FCS gewonnen Parameter. So ist in Abbildung 7.2 die leistungsabhängige Diffusionszeit von AF-488 unter drei unterschiedlichen Bedingungen aufgetragen. In schwarz ist das Verhalten bei normaler Justage und Einstellung des Mikroskops abgebildet. Die rote Kurve zeigt die gemessenen Diffusionszeiten nach dem Einbringen einer leicht dejustierten Relaisoptik. Die aus zwei asphärischen Achromaten mit einer Brennweite von 50 mm (#49-665, Edmund Optics) bestehende Relaisoptik wird durch die Verstellung der z -Position einer der Relaislinsen leicht verstellt. Der Grad der Dejustage wird mithilfe eines Shearing-Interferometers überprüft und die Relaisoptik in der Anregung nach der Faserauskopplung und vor dem Dichroiten positioniert (siehe Abschnitt 3.1 und Abbildung 3.2). In blau ist die Messung bei gleicher Dejustage in der Detektion nach dem Dichroiten vor den Bandpassfiltern dargestellt. Die gemessenen Diffusionszeiten im Fall der Dejustage der Anregung und der Detektion steigen teils deutlich an. Besonders die verstellte Anregung hat einen großen Einfluss auf die Diffusionszeit und führt nach Anpassung mit Gleichung (6.1) zu einer minimalen Diffusionszeit τ_{D_0} von $(47,5 \pm 1,0) \mu\text{s}$. Das entspricht im Vergleich zur minimalen Diffusionszeit ohne

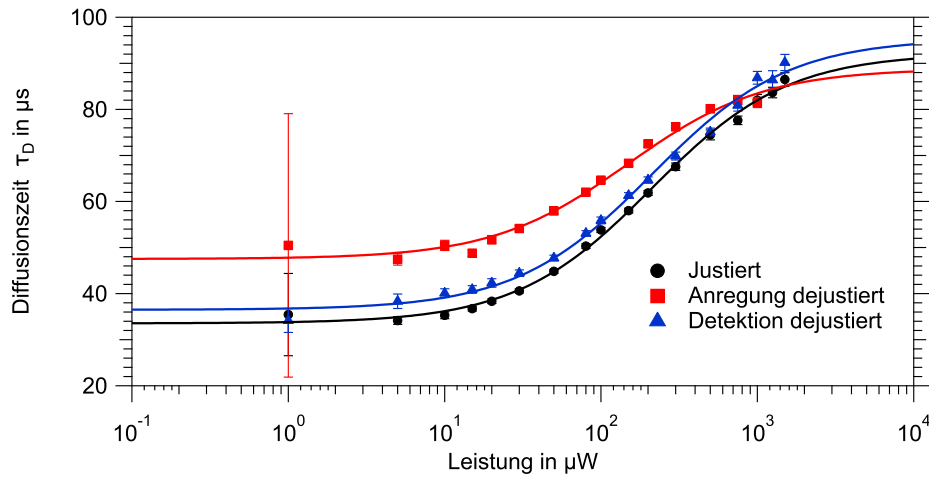


Abbildung 7.2: Diffusionszeit bei Dejustage der Anregung und der Detektion

Die Linien zeigen die Anpassung mit Gleichung (6.1), die zu einer minimalen Diffusionszeit $\tau_{d0} = (33,6 \pm 0,6) \mu\text{s}$ und Sättigungsleistung $P_{\text{sat}} = (211 \pm 6) \mu\text{W}$ führt (schwarze Kreise). Wird die Anregungsfunktion durch das Einbringen einer leicht dejustierten Relaisoptik (siehe Text) manipuliert, steigt τ_{d0} auf $(47,5 \pm 1,0) \mu\text{s}$ und P_{sat} sinkt deutlich auf $P_{\text{sat}} = (149 \pm 11) \mu\text{W}$ (rote Rechtecke). In der Detektion führt die Dejustage zu einem leichten Anstieg der minimalen Diffusionszeit auf $(36,5 \pm 1,0) \mu\text{s}$ und keiner relevanten Änderung der Sättigungsleistung, die $(212 \pm 9) \mu\text{W}$ beträgt (blaue Dreiecke). In Tabelle 7.1 sind die Anpassungswerte und die daraus bestimmten lateralen Fokusparameter $w_{x,y}$ und effektiven Volumina V_{eff} zusammengefasst.

Dejustage, die $(33,6 \pm 0,6) \mu\text{s}$ beträgt, einem Anstieg von 41 %. Im Gegensatz dazu führt die verstellte Detektion lediglich zu einem kleinen Anstieg auf $(36,5 \pm 1,0) \mu\text{s}$ (9 %).

Entsprechend der Gleichungen (2.88b) und (A.11) kann aus der minimalen Diffusionszeit mithilfe des bekannten Diffusionskoeffizienten von AF-488 in Wasser der laterale Fokusparameter w_{xy} und das effektive Volumen V_{eff} bestimmt werden. In Tabelle 7.1 sind diese Werte mit der Sättigungsleistung P_{sat} aufgetragen, wobei für die Bestimmung des effektiven Volumens ein Strukturfaktor von 0,2 (siehe Gleichung (2.88c)) angenommen wird. Die Vergrößerung des effektiven Volumens um 15 % von $(0,39 \pm 0,02) \text{ fl}$ auf $(0,45 \pm 0,04) \text{ fl}$ bei der Detektion und um 72 % auf $(0,67 \pm 0,04) \text{ fl}$ bei der Anregung zeigt, dass besonders optische Fehler des Anregungsstrahlengangs einen deutlichen Einfluss auf das bei der FCS betrachtete effektive Volumen haben. Das Detektionsvolumen entspricht, mit einer großen aktiven Detektoroberfläche der verwendeten APDs von $175 \mu\text{m}$, über die Brennweite der Fokussierlinse vor den Detektoren mit $f = 500 \text{ mm}$, den Tubuslinsen mit $f = 200 \text{ mm}$ und dem genutzten Wasserimmersionsobjektiv ($60\times$, $\text{NA} = 1,2$, Nikon) einem abgebildeten Durchmesser von etwa $1,17 \mu\text{m}$ in der Probe (bei einem $50 \mu\text{m}$ Pinhole etwa $0,83 \mu\text{m}$, siehe auch Abschnitt 3.1). Das Anregungsvolumen beträgt hingegen unter der Annahme eines maximalen Modenfelddurchmessers (MFD) der Faser (SMC-400Si, Schäfter+Kichhoff) von ca. $8,8 \mu\text{m}$ und über ein Luftobjektiv ($4\times$, $\text{NA} = 0,1$, Nikon) mit dem gleichen Wasserimmersionsobjektiv wie in der Detektion abgebildet, einem Durchmesser von etwa $0,59 \mu\text{m}$. Gemäß Abschnitt 2.3.2 entspricht das in Bezug zur mittleren Wellenlänge

Tabelle 7.1: Aus der Diffusionszeit bestimmte Parameter

Aufgetragen ist die minimale Diffusionszeit τ_{D_0} und Sättigungsleistung P_{sat} der in Abbildung 7.2 dargestellten Messungen. Zusätzlich ist der laterale Fokusparameter w_{xy} nach Gleichung (2.88b) mithilfe des Diffusionskoeffizienten des AF-488, der $D = (435 \pm 4) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ [286] lautet, und das daraus gemäß Gleichung (A.11) bestimmte effektive Volumen V_{eff} unter der Annahme eines Strukturfaktors von 0,2 (siehe Gleichung (2.88c)) dargestellt.

	min. Diffusionszeit τ_{D_0} in μs	Sättigungsleistung P_{sat} in μW	Fokusparameter w_{xy} in nm	eff. Volumen V_{eff} in fl
Justiert	$33,6 \pm 0,6$	211 ± 6	242 ± 5	$0,39 \pm 0,02$
Anregung	$47,5 \pm 1,0$	149 ± 11	288 ± 6	$0,67 \pm 0,04$
Detektion	$36,5 \pm 1,0$	212 ± 9	252 ± 7	$0,45 \pm 0,04$

nach Gleichung (2.59)¹ von 501 nm auf die Anregung bezogen 1,16 AE. Die abgebildeten Detektoroberflächen entsprechen 2,30 AE (mit Pinhole 1,63 AE). Damit wirken sich Änderungen der Anregungsfunktion im Randbereich stärker auf das effektiv abgebildete Volumen aus, als vergleichbare Änderungen der Detektion. Wenn bei einer konfokalen Blende im Bereich von etwa 1 AE bis 3 AE für die Anregungs- und Detektions-PSF gilt, dass $\text{PSF}_{\text{det}} > \text{PSF}_{\text{anr}}$ (siehe Abschnitt 2.3.2), kann eine Überprüfung der Justage des Anregungsstrahlengangs durch die Betrachtung der Diffusionszeit τ_D bei niedrigen Anregungsintensitäten ($\leq 50 \text{ kW cm}^{-2}$, Abhängig von der Sättigungsschwelle des betrachteten Farbstoffs) geschehen. Höhere Diffusionszeiten gehen dabei primär auf einen dejustierten Anregungsstrahlengang zurück.

Eine von der Abbildungsgeometrie unabhängige Beschreibung liefert die schnellen Fluktuationsdynamik. Unter Betrachtung des Triplettanteils und der Triplettzeit in Abbildung 7.3 ist ein leichter Abfall des Triplettanteils lediglich bei der Positionierung der Relaisoptik in der Anregung zu erkennen. Die Triplettzeit hingegen zeigt in Übereinstimmung mit Widengren, Mets und Rigler [203] keine auffallende Änderung beim Dejustieren des Anregungs- oder Detektionspfades. Der Abfall im Triplett deutet entweder auf eine verringerte Interkombinationsrate aus dem Triplett- in den Singulett-, oder eine Erhöhung der Rate aus dem Singulett- in den Triplett-Zustand hin. Da kaum Abweichungen der Triplettzeit auftreten, sollte diese Veränderungen klein im Verhältnis zur Triplettzeit sein.

In Abbildung 7.4 ist dieser Zusammenhang anhand der nach Gleichung (2.89a) bestimmten Interkombinationsrate k_{ISC} in den Triplett dargestellt. Die Rück-Interkombinationsrate k_{rISC} gemäß Gleichung (2.89b) zeigt keine Änderung und ist in Abbildung C.24 (Seite XX-XIX) dargestellt. Die globale Anpassung der Interkombination nach Gleichung (6.22) führt in Abbildung 7.4a zu einer Rate von $k_{\text{ISC}} = (276 \pm 3) \text{ kHz}$ und den Sättigungswerten $P_{\text{sat}} = (113 \pm 6) \mu\text{W}$ (8 % der maximal eingestrahnten Leistung), $P_{\text{sat,exi}} = (164 \pm 8) \mu\text{W}$ (11 %) und $P_{\text{sat,det}} = (129 \pm 7) \mu\text{W}$ (9 %). Bei gleicher eingestrahelter Leistung in der Eingangspupille des abbildenden Objektivs, führt die Relaisoptik in der Anregung somit zu

¹ Aus der Anregungswellenlänge von 488 nm und dem Emissionsmaximum bei 516 nm entsprechend Abschnitt 3.2

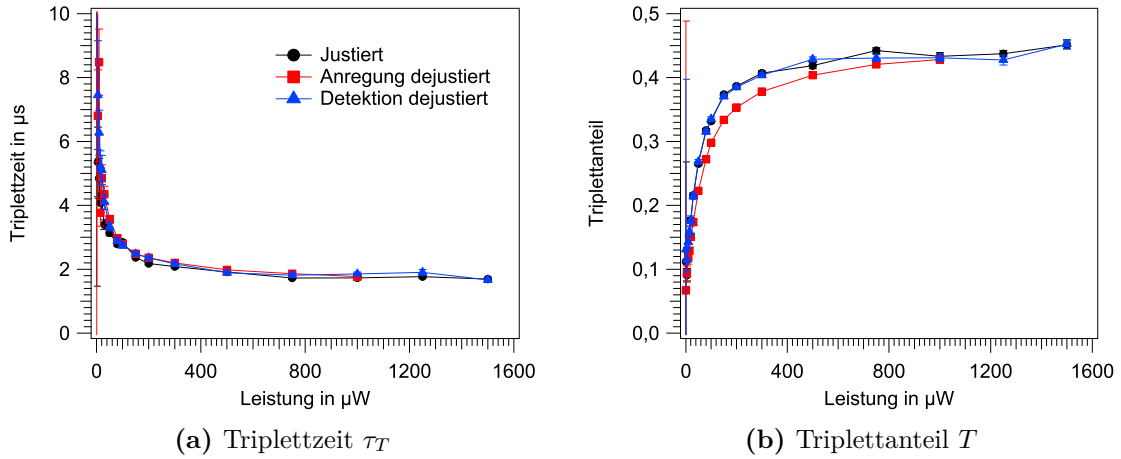


Abbildung 7.3: Tripletanteil und Zeit bei Dejustage der Anregung und der Detektion
 (a) Die Tripletzeit zeigt keine deutlichen Unterschiede zwischen den Messreihen. (b) Der Tripletanteil sinkt bei der Positionierung der Relaisoptik in der Anregung leicht. Mögliche Ursachen dieses Verhaltens werden im Text besprochen. Die Verbindungslinien der Punkte in (a) und (b) dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

einem Anstieg der Sättigungsleistung um $(45 \pm 5) \%$. Entsprechend kann die Sättigung der Interkombination in den Triplet als Maß für die Effizienz der Anregung verwendet werden. Prinzipiell hängt die Steilheit des Anstiegs der apparenten Interkombination und somit P_{sat} von der mittleren Besetzungsdichte des radiativen Singulettzustandes ab (siehe Abschnitt 4.1). Die Besetzungsdichte ist nicht von der Detektionsfunktion, sondern primär von der eingestrahlten Energie im Sinne der Photonenflussdichte, also der Anregungsfunktion, abhängig. Zur Überprüfung kann die Interkombinationsrate in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte aufgetragen werden. Ein Vergleich unterschiedlicher Systeme unter der Angabe relativer Anregungsleistungen ist über den Umrechnungsfaktor der eingestrahlten Leistung zur Photonenflussdichte möglich. Größere Werte geben eine höhere Fokussierung und somit größere Photonenflussdichte bei gleicher Anregungsleistung in der Objektivaperur an. Die Bestimmung der jeweiligen Photonenflussdichte ϕ gemäß Gleichung (6.3) der hier dargestellten Messungen, führt zu den Photonenflussdichten

$$\phi(P) = P \cdot (2,68 \pm 0,05) \cdot 10^{31} \text{ J}^{-1} \text{ m}^{-2} \quad , \quad (7.1a)$$

$$\phi_{\text{exi}}(P) = P \cdot (1,89 \pm 0,04) \cdot 10^{31} \text{ J}^{-1} \text{ m}^{-2} \quad , \quad (7.1b)$$

$$\phi_{\text{det}}(P) = P \cdot (2,46 \pm 0,07) \cdot 10^{31} \text{ J}^{-1} \text{ m}^{-2} \quad , \quad (7.1c)$$

gegen die die Interkombinationsrate in Abbildung 7.4b aufgetragen ist. Die globale Anpassung mit Gleichung (6.22) resultiert in der gleichen Interkombinationsrate wie in Abbildung 7.4a ($k_{\text{ISC}} = (276 \pm 3) \text{ kHz}$) und nahezu identischen Sättigungsflussdichten von $\phi_{\text{sat}} = (2,99 \pm 0,16) \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\phi_{\text{sat,exi}} = (3,14 \pm 0,16) \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $\phi_{\text{sat,det}} = (3,14 \pm 0,16) \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Bei gleicher Photonenflussdichte ist also bei allen drei Messrei-

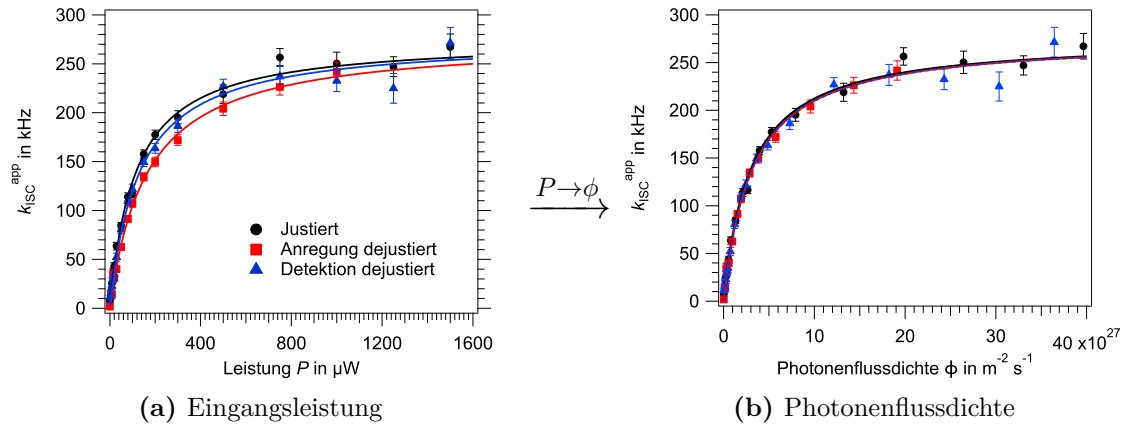


Abbildung 7.4: Interkombinationsrate bei Dejustage der Anregung und der Detektion
 (a) Die Abweichungen in der Verteilung der Anregungsenergie im betrachteten Volumen führen zu Unterschieden in der mittleren Besetzungsdichte des radiativen Zustandes. Höhere Leistungsdichten resultieren in einem früheren Sättigen der apparenten Interkombinationsrate in den Triplett und somit einem kleineren Sättigungsparameter P_{sat} (siehe Abschnitt 4.1 und Gleichung (6.22)).
 (b) Wird die apparenten Interkombinationsrate gegen die, entsprechend Gleichung (7.1) aus der Diffusionszeit bestimmte, Photonenflussdichte aufgetragen, sind entsprechend keine Unterschiede im Sättigungsverhalten erkennbar.

hen das gleiche Sättigungsverhalten zu sehen.

Die Bestimmung der Interkombinationsrate k_{ISC} kann demzufolge als Parameter zur Bewertung des Anregungsprofils genutzt werden. Der Vergleich der eingestrahlt Leistung (bzw. relativen Intensität), um die Hälfte der zuvor bestimmten maximalen Interkombinationsrate (beim hier betrachteten AF-488 $(276 \pm 3) \text{ kHz} \cdot 1/2 = (138 \pm 3) \text{ kHz}$) zu erreichen, mit der Sättigungsleistung bei optimaler Justage (hier $(113 \pm 6) \mu\text{W}$), kann als Parameter der Effizienz der Anregung genutzt werden. Die Anregungsleistung des betrachteten Instruments ist somit durch die minimale Diffusionszeit bzw. die Diffusionszeit bei niedriger Leistung und den Sättigungsverlauf der Interkombinationsrate in den Triplettzustand bzw. den dieses Sättigungsverhalten charakterisierenden Parameter der Sättigungsleistung gegeben. Ein Anstieg der Diffusionszeit τ_D und der Sättigungsleistung P_{sat} kennzeichnet somit eine Dejustage der Anregung. Der gemäß Gleichung (7.1) benötigte Faktor, um zwei abweichende Messungen (auch von unterschiedlichen Instrumenten) bezüglich der Photonenflussdichte und somit einer gleichen Sättigungsschwelle ϕ_{sat} zu überlagern, gibt das Maß der Abweichung der Effizienz der Anregung an.

7.2 Detektionsprofil

Mithilfe des Absorptionswirkungsquerschnitts σ des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs entsprechend Tabelle 3.1 kann die leistungsabhängige Anregungsrate vom Grundzustand S_0 in den angeregten Zustand S_1 gemäß der Photonenflussdichten aus Gleichung (7.1) zu

$$k_{\text{ex}}(P) = P \cdot (6,94 \pm 0,13) \cdot 10^{11} \text{ J}^{-1} \quad (7.2a)$$

$$k_{\text{ex,exi}}(P) = P \cdot (4,90 \pm 0,10) \cdot 10^{11} \text{ J}^{-1} \quad (7.2b)$$

$$k_{\text{ex,det}}(P) = P \cdot (6,37 \pm 0,18) \cdot 10^{11} \text{ J}^{-1} \quad (7.2c)$$

bestimmt werden. Die Betrachtung der in Abbildung 7.5 dargestellten MB bildet eben diesen Zusammenhang ab, da entsprechend der Anpassungsfunktion nach Gleichung (4.21) die Photonenflussdichte mit dem jeweiligen Absorptionswirkungsquerschnitt des betrachteten Überganges multipliziert wird. Die Darstellung der MB gegen die Anregungsleistung ist in Abbildung C.26 (Seite XL) zu finden. Die Parameter der Anpassungsfunktion sind also bezüglich der Anregungsrate normiert, weshalb Unterschiede in der MB bei gleicher

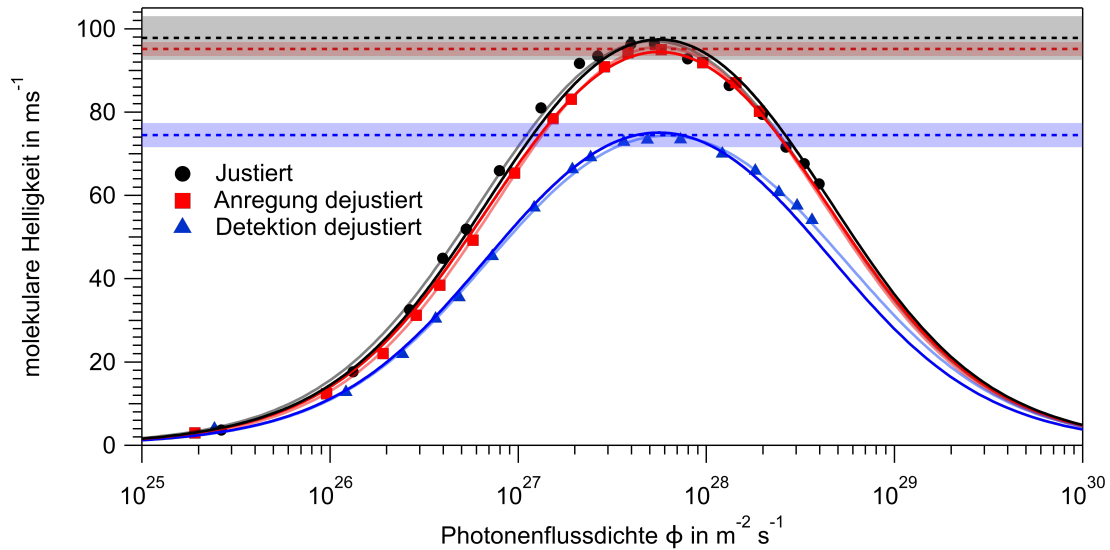


Abbildung 7.5: MB bei Dejustage der Anregung und der Detektion

Wird die MB gegen die Photonenflussdichte gemäß Gleichung (7.1) dargestellt, haben Abweichungen in der Anregungsfunktion keinen Einfluss auf die Sättigungsparameter und Werte der MB. So hat die maximale MB (gestrichelte Linien) unter dejustierter Anregung (rote Rechtecke) mit $(95 \pm 2) \text{ ms}^{-1}$ nahezu den gleichen Wert wie ohne Relaisoptik $(98 \pm 5) \text{ ms}^{-1}$ (schwarze Kreise). Wird die Relaisoptik im Detektionspfad positioniert, sinkt die maximale MB deutlich auf $(75 \pm 3) \text{ ms}^{-1}$ (blaue Dreiecke). Die dunklen durchgezogenen Linien geben die globale Anpassung der Daten nach Gleichung (4.21) bzw. Gleichung (B.11) an und führen zu den Sättigungsparametern $\phi_{\text{sat}_1} = (0,75 \pm 0,02) \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $\sqrt{\phi_{\text{sat}_2}} = (5,59 \pm 0,09) \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Zum Vergleich sind auch die Anpassungen der einzelnen Messreihen dargestellt (helle durchgezogene Linien). In Abbildung C.26 ist die Darstellung der MB gegen die Anregungsleistung zu finden.

Photonenflussdichte aus Änderungen der Detektionsfunktion resultieren. Zum Vergleich sind in Abbildung C.25 (Seite XXXIX) die mittlere Anzahl an Molekülen und die entsprechende Zählrate dargestellt.

Die hellen durchgezogenen Linien in Abbildung 7.5 geben die Anpassung der einzelnen Messreihen, die dunklen durchgezogenen Linien die globale Anpassung der Daten nach Gleichung (4.21) bzw. Gleichung (B.11) an. Die maximale MB ist durch gestrichelte Linien dargestellt. Ohne Relaisoptik liegt die maximale MB bei $(98 \pm 5) \text{ ms}^{-1}$ und zeigt bei dejustierter Anregung mit $(95 \pm 2) \text{ ms}^{-1}$ nahezu keine Änderung. Wird der Detektionspfad gestört, sinkt die maximale MB um $(23 \pm 2) \%$ auf $(75 \pm 3) \text{ ms}^{-1}$ ab. Die Sättigungsparameter betragen $\phi_{\text{sat}_1} = (0,75 \pm 0,02) \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $\sqrt{\phi_{\text{sat}_2}} = (5,59 \pm 0,09) \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Die Differenzen der gemessenen MB mit und ohne Relaisoptik sind gegen eine lineare Abszisse in Abbildung C.27 (Seite XL) aufgetragen. Die maximale Abweichung bei manipulierter Detektion von etwa 22 ms^{-1} wird bei einer Photonенflussdichte von $5,5 \cdot 10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erreicht. Das entspricht einer Leistung in der Apertur des Objektivs von etwa $223 \mu\text{W}$ (bei manipulierter Anregung $290 \mu\text{W}$). Steht nicht viel Eingangsleistung zur Verfügung, sollte zuerst die Anregung anhand der in Abschnitt 7.1 besprochenen Diffusionszeit und den Triplettparametern überprüft werden, um die benötigte Leistung für die Bewertung der Detektion zu minimieren.

Die Messung zum Vergleich der Detektionsleistung des Instruments bzw. der Instrumente sollte im Maximum der MB gemäß Gleichung (4.23) ($\phi_{\text{max}} = \sqrt{\phi_{\text{sat}_2}}$) bestimmt werden. Das entspricht bei dem hier gewählten Beispiel entsprechend der Anpassung in Abbildung 7.5,

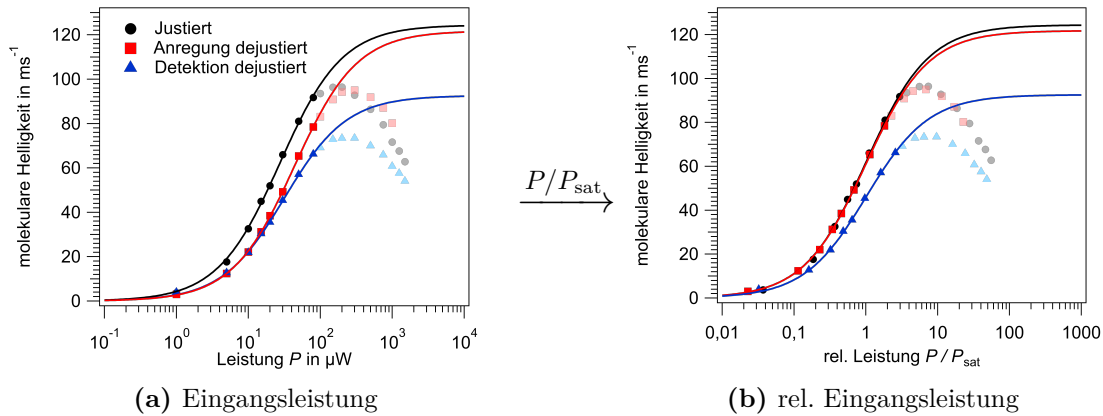


Abbildung 7.6: Detektionseffizienz ohne maximale MB

(a) Dargestellt ist die MB aus Abbildung 7.5 gegen die Anregungsleistung in der Apertur des Objektivs. Die durchgezogenen Linien kennzeichnen die Anpassung gemäß Gleichung (7.3) ohne Einbezug der halbtransparenten Werte und entsprechen dem Fall, dass keine maximale MB aufgrund einer zu niedrigen Anregungsleistung bzw. Photonенflussdichte gemessen werden kann. Das führt zu den Sättigungsleistungen $P_{\text{sat}} = (27 \pm 1) \mu\text{W}$, $P_{\text{sat,exi}} = (44 \pm 1) \mu\text{W}$ und $P_{\text{sat,det}} = (31 \pm 1) \mu\text{W}$. (b) Die Normierung über die in (a) bestimmte Sättigungsleistung führt zu einer Darstellung analog zu Abbildung 7.5, bei der die Unterschiede der Detektionseffizienz über den gesamten Messbereich sichtbar sind.

bei einer Vakuumwellenlänge der Anregung von 488 nm entsprechend Gleichung (6.3), einer Anregungsintensität von 227 kW cm^{-2} . Da die Höhe der maximal erreichbaren MB lediglich von den photophysikalischen Parametern des Fluorophors abhängt (bei gleicher Umgebung bzgl. des Lösungsmittels, der Temperatur, der Sauerstoffsättigung, etc.), ist die gemessene maximale MB gemäß Kapitel 4 und Anhang B direkt proportional zur Detektionseffizienz des betrachteten Instruments.

Wird aufgrund zu niedriger Anregungsintensitäten keine maximale MB erreicht, oder ein System mit einer linearen Sättigung und einer maximalen MB gemäß Gleichung (5.2) betrachtet, sollte die Messung bei der maximal möglichen Anregungsintensität bzw. Anregungsrate stattfinden. In Abbildung 7.6a ist die MB aus Abbildung 7.5 gegen die Anregungsleistung in der Apertur des Objektivs dargestellt. Die durchgezogenen Linien kennzeichnen die Anpassung der dunklen Messwerte ohne einen quadratischen Sättigungsterm, bis zu einer maximalen Anregungsleistung von $80 \mu\text{W}$ mit der aus Gleichung (4.6) abgeleiteten Anpassungsfunktion

$$\text{MB} = \alpha \cdot \Phi_{\text{F}} \cdot \frac{P}{1 + \frac{P}{P_{\text{sat}}}} \quad . \quad (7.3)$$

Die durch den linearen Sättigungsterm beschränkte maximale MB bei maximal möglicher Anregungsleistung $P \rightarrow \infty$ wird durch $\alpha \cdot \Phi_{\text{F}} \cdot P_{\text{sat}}$ beschrieben, und führt zu den maximalen molekularen Helligkeiten $\text{MB}_{\infty} = (122 \pm 8) \text{ ms}^{-1}$, $\text{MB}_{\text{exi},\infty} = (121 \pm 4) \text{ ms}^{-1}$ und $\text{MB}_{\text{det},\infty} = (91 \pm 4) \text{ ms}^{-1}$. Das entspricht einer um 25 % niedrigeren MB im Fall der dejustierten Detektion im Vergleich zu den beiden anderen Messungen und stimmt gut mit dem relativen Abfall der maximalen MB unter Betrachtung und Messung des quadratischen Sättigungsfaktors überein. Wird die MB auf die Sättigungsleistung P_{sat} normiert (vgl. Abschnitt 7.1), ist die Abweichung der gemessenen MB aufgrund der verringerten Detektionseffizienz durch die Relaisoptik in der Detektion analog zu Abbildung 7.5 bei allen Werten zu sehen.

7.3 Zusammenfassung und Diskussion

Obgleich die hier präsentierte Evaluation keine Charakterisierung der Detektor- und Abbildungseigenschaften für die konfokale Abbildung größerer Probenbereiche oder bestimmter Kamera- bzw. Detektionssysteme auf Grundlage einer genauen Überprüfung der Leistung aller am Abbildungsprozess beteiligten Komponenten gemäß Zucker [428] darstellt, bietet sie eine einfache Methode, die Anregungs- und Detektionseigenschaften eines konfokalen Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskops getrennt voneinander zu bewerten. Sie basiert auf der Aufnahme einer FCS-Sättigungsreihe, bzw. beim Kalibrieren eines bekannten Systems der Aufnahme einer FCS-Messung, einer auf Einzelmolekülkonzentrationen verdünnten Farbstofflösung.

Die Anforderungen an den eingesetzten Fluorophor sind dabei eine ausreichend niedrige Bleichrate und ein nicht mit anderen Prozessen überlagernder Triplett. Im Vergleich zur Kalibrierung mithilfe immobilisierter Proben bzw. Schichten, wie unter anderem bei Brakenhoff et al. [414], Hibbs, MacDonald und Garsha [416], Kedziora et al. [429] und Zwier et al. [430], sind keine aufwendigen Probenpräparationen oder zusätzliche (mathematische) Methoden zur Auswertung der Daten nötig. Zur Bestimmung der Anregungsfunktion wird nicht wie zum Beispiel bei Zwier et al. [413] direkt das Photobleichen nahe einer Oberfläche beobachtet, sondern lediglich das Triplettblinden des Fluorophors. Zum einen werden so Messfehler durch die Nähe anderer Moleküle bzw. der Oberfläche verhindert [109, 242, 431–433], zum anderen kann das Mikroskop direkt in der später genutzten Umgebung der Probe charakterisiert werden. Eine Bewertung über die Analyse des Bleichverhaltens gemäß Dittrich und Schwille [40] und Delon et al. [434] kann bei entsprechender Farbstoffwahl und Fokusgröße auch erfolgen.

Die Diffusionszeiten bei niedrigen Intensitäten (etwa 10 kW cm^{-2}) können zur Bestimmung des Anregungsvolumens genutzt werden. Dabei sind im bereits justierten System auch Rückschlüsse auf andere Parameter wie die Deckglasdicke oder den Brechungsindex möglich [235]. Die Besetzungsdichte des radiativen Zustandes kann über die Sättigungsparameter des Triplettverhaltens bestimmt werden und gibt so Aufschluss über die erreichte Leistungsdichte im Beobachtungsvolumen unabhängig von eventuell vorhandenen Aberrationen des Systems [203]. Die MB hingegen liefert über eine Normierung durch den linearen Sättigungsparameter ϕ_{sat_1} bzw. die Auswertung des Maximums beim nichtlinearen Parameter $\sqrt{\phi_{\text{sat}_2}}$ ein Maß für die Detektionseffizienz.

Kapitel 8

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die bei der Einzelmolekülspektroskopie auftretenden Leistungsdichten können in der Anregung in einem weiten Bereich von wenigen Kilowatt bis zu einigen Megawatt je Quadratzentimeter liegen. Eine Erhöhung der Signalstärke ist, bei der Betrachtung einzelner Moleküle, nicht durch eine Erhöhung der Fluorophorkonzentration möglich. Bei Messungen in Lösung führt zum Beispiel eine Erhöhung der Konzentration bis zu einem sinnvollen Grenzwert entsprechend Abschnitt 4.1 lediglich zu einem Anstieg der mittleren Zählrate durch häufiger auftretende Ereignisse und somit zwar zu einer verkürzten Messzeit, aber keiner Verbesserung des SNRs der beobachteten Einzelereignisse. Der naheliegendste Weg, die Photonenrate der Detektion und somit das SNR der Einzelmolekülereignisse zu verbessern, ist die Optimierung der Anregungsrate im beobachteten Bereich. Das kann jedoch abhängig vom Fluorophor zu unterschiedlichen energetischen Übergängen, langanhaltenden Dunkelzuständen, oder sogar zur Photozerstörung führen.

Im vierten Kapitel wurde, ausgehend von einer vereinfachten Übergangsmatrix der intramolekularen Zustände eines Fluorophors, dessen Leuchtverhalten im Zeitbereich der Diffusion ($\sim \text{ms}$) bis hin zum Antibunching ($\leq \text{ns}$) hergeleitet. Mithilfe der in Zusammenarbeit mit Till Zickmantel entwickelten und im dritten Kapitel vorgestellten Monte-Carlo-Simulation konnte gezeigt werden, dass bei Leistungsdichten ab wenigen 100 kW cm^{-2} (abhängig von den jeweiligen photophysikalischen Parametern) die Besetzung höher angeregter Zustände maßgeblich das Leuchtverhalten der Fluorophore beeinflussen kann [211]. Höhere Singulett- und Triplett-Zustände führen dabei zu nichtlinearen Abweichungen der ortsspezifischen Fluoreszenzantwort und somit einer inkorrekten Mittelung über das effektiv beobachtete Volumen in der FCS-Analyse. Das führt zu einem Abfall der MB bei hohen Leistungen, was (fälschlicherweise) mit photoinduzierten Bleichprozessen verwechselt werden kann. Zum anderen konnte ein Anstieg der Diffusionszeiten und der mittleren Molekülzahl beobachtet werden. Zur Korrektur wurde eine empirische Näherung der Sättigungs-MDF

in Form einer Gauß-Differenz-Funktion vorgeschlagen und gezeigt, dass diese die beobachtete Fluoreszenzantwort gut abbildet. Die entsprechend um die Gauß-Differenz-Funktion korrigierte Anpassung der Korrelationsfunktion wurde hergeleitet und bezüglich ihres Verhaltens bei unterschiedlichen Sättigungsformen (Volumina, sowie Amplituden und Breiten in x, y, z) charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die modifizierte Anpassungsfunktion (mit Diffusions-, Triplet- und Antibunch-Anteil) die Korrelationskurven bei hohen Leistungsdichten gut approximiert und im Gegensatz zur üblichen Korrelationsanalyse keine sättigungsabhängige Abweichung der mittleren Molekülzahl und Diffusionszeit zeigt. Damit wird einer leistungsunabhängigen Bestimmung der Diffusionskonstanten möglich.

Im Rahmen der Simulation immobilisierter Fluorophore im fünften Kapitel konnte die genaue Bestimmbarkeit der schnellen ($< \text{ms}$) photophysikalischen Parameter aus der FCS-Analyse nachgewiesen und eine Formulierung für die Approximation des Tripletanteils und der Tripletzeit bei beschleunigter Rück-Interkombination bestimmt werden. Auch die im vierten Kapitel hergeleiteten Anpassungsfunktionen der MB für unterschiedliche Besetzungs- und Übergangswahrscheinlichkeiten höherer Zustände zeigten in der Anpassung eine große Übereinstimmung mit den simulierten Werten und erlaubten eine Unterscheidung der auftretenden Mehr-Photonen-Prozesse anhand des Sättigungsverhaltens. Für Vergleichsmessungen wurden zwei Varianten der Immobilisierung einzelner Farbstoffmoleküle untersucht. Zum einen wurde die Optimierung der von Hirschfeld [155] eingeführten Vitrifizierungsmethode in Kombination mit einem Kryostat-Mikroskop-Adapter für die Messung bei tiefen Temperaturen (77 K, Flüssigstickstoff) vorgestellt. Zum anderen konnten einzelne AF-488-Moleküle über Maleimid-Thiol-Reaktionen erfolgreich an einem oberflächenaktivierten Deckglas gebunden und mittels konfokaler Raster- und TIRFM-Aufnahmen im Gegensatz zu anderen Immobilisierungsmethoden [241, 435] in ihrer normalen Lösungsumgebung betrachtet werden. Die detaillierten Analysen der Photonenstatistik und des Bleichverhaltens dieser immobilisierten Moleküle hätten den Rahmen der Arbeit gesprengt und müssen Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

Überlagern sich bei der FCS die photophysikalischen Prozesse mit dem Diffusionsverhalten in Lösung, kann, wie im sechsten Kapitel gezeigt, mithilfe von Glycerin durch eine Erhöhung der Viskosität des Lösungsmittels eine Verschiebung der Diffusionszeit und somit eine zeitliche Trennung der betrachteten Prozesse vorgenommen werden. Die detaillierte Analyse der kollisionsvermittelten Lösungsprozesse bei unterschiedlichen Viskositäten, Sauerstoffkonzentrationen und Brechungsindizes zeigt allerdings einen deutlichen Einfluss des Glycerins auf die beobachteten photophysikalischen Größen bei einer gleichzeitig sinkenden MB. Diese Ergebnisse sind besonders bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen im Bereich des *molecular crowding*¹, aber auch in Hinblick auf ein allgemeines Verständnis der in Lösung ablaufenden Wechselwirkungsprozesse von Bedeutung und erweitern den bisherigen theoretischen Rahmen des Diffusions- und Tripletmodells der FCS-Analyse [235,

¹ Bei der Anwesenheit von hohen Makromolekülkonzentrationen in der Umgebung eines betrachteten Moleküls wird von *molecular crowding* gesprochen.

236]. Der Vergleich der drei spektral und strukturell ähnlichen Farbstoffe AF-488, PF-488P und CF-488A in PBS und unter Sauerstoffentzug, konnte große Unterschiede im Leucht- und Blinkverhalten nachweisen. So zeigte besonders das CF-488A eine starke Sauerstoffabhängigkeit der Interkombination in den Triplett. Beim PF-488P konnte eine ungewöhnlich frühe Sättigung des Triplettanteils beobachtet werden, die zu einer im Vergleich mit den anderen Fluorophoren niedrigen, aber bis hin zu hohen Leistungsdichten der Anregung konstanten MB führte. Unter desoxygenierter Umgebung zeigten alle Farbstoffe ähnliche Triplettzeiten, wobei das AF-488 die größte maximale MB und höchste Sättigungsschwelle für Mehr-Photonen-Prozesse aufwies. Bei normaler Raumatmosphäre zeigte das AF-488 ebenfalls eine hohe Sättigungsschwelle für Mehr-Photonen-Prozesse, war im Vergleich zum PF-488P und CF-488A aber dunkler (niedrigere maximale MB). Letztlich eignet sich das CF-488A aufgrund seiner hohen MB und kurzen Triplettzeit am besten für Messungen unter Normalatmosphäre bei moderaten Leistungsdichten der Anregung bis etwa 2 kW cm^{-2} . Bei höheren Leistungsdichten führt das AF-488, aber auch das PF-488P zu besseren Ergebnissen und unter Sauerstoffentzug resultieren die Verschiebungen der Triplett-Übergangsraten besonders beim AF-488 in einem verhältnismäßig geringen Verlust der MB von 50 %.

In Abschnitt 6.4 konnte anhand des Farbstoffes AF-647 die Leistungsabhängigkeit der *cis-trans*-Isomerisierung von Cyaninen bestimmt werden. Dabei wurde in Übereinstimmung mit Widengren und Schwille [145] gezeigt, dass die Zuordnung der Isomerisierungs- und Triplettterme zum Blinkverhalten nur bei einer ausreichenden zeitlichen Trennung der charakteristischen Dunkel- bzw. Übergangszeiten möglich ist. Die Raten des Übergangs in den *cis*-Zustand und zurück in den fluoreszenten *trans*-Zustand steigen in den durchgeführten Experimenten und Simulationen bei höherer Anregungsleistung an und resultieren damit in kürzer werdenden Dunkelzeiten ($\leq \mu\text{s}$), höheren Amplitudenanteilen und einer Reduktion der MB. Zusätzlich zu diesen Dunkelzeiten führen auch Radikalzustände (z. B. durch Photoionisation oder die Wechselwirkung mit Sauerstoff) gerade bei hohen Leistungsdichten zu einer weiteren Limitierung der MB. Die Zugabe des photoprotektiven Additivs Trolox konnte die MB der Farbstoffe AF-647 und sCy5 durch Energie- und Elektronentransfermechanismen unter Normalatmosphäre deutlich erhöhen [172]. Bei den Farbstoffen AF-488 und sCy3 war hingegen nur eine geringe Erhöhung der MB zu beobachten. Die Korrelationsanalyse der vier Farbstoffe unter Sauerstoffentzug zeigte überraschend große Abweichungen des Verhaltens zwischen den strukturell nahezu identischen Fluorophoren AF-647 und sCy5. Während die MB des sCy5 um 25 % absank, war die Abnahme der MB beim AF-647 mit 8 % geringer. Eine deutlich ansteigende MB unter Sauerstoffentzug konnte beim sCy3 beobachtet werden. Gleichzeitig trat keine entsprechende Änderung des Triplettverhaltens auf. Die Erhöhung der MB kann daher auf die sauerstoffabhängigen Änderungen der *cis-trans*-Isomerisierung zurückgeführt werden.

Im siebten Kapitel wurde eine einfache Methode vorgestellt, anhand einer FCS-Sättigungsreihe die Anregungs- und Detektionseigenschaften eines konfokalen Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskops getrennt voneinander zu bewerten und mit anderen Instrumenten zu

vergleichen. Mit einer einfachen Farbstoffprobe in Einzelmolekülkonzentration in wässriger Lösung (hier AF-488 bei 0,6 nM in destilliertem Wasser), konnte durch die Bestimmung der Diffusionszeiten bei geringen Intensitäten bis etwa 10 kW cm^{-2} das effektive Volumen und damit primär die Fokussierung des Anregungsstrahlengangs überprüft werden. Die Triplett-dynamik lässt über die Interkombinationsrate aus dem Singulett- in den Triplett-zustand einen Rückschluss auf die mittlere Besetzungsdichte des radiativen Zustandes zu und kann über den Sättigungsparameter P_{sat} die Effizienz der Anregung charakterisieren. Zur Bewertung der Detektion wurde eine einfache Messung der maximalen MB beim Sättigungsparameter $\sqrt{\phi_{\text{sat}_2}}$, oder bei nicht ausreichender Anregungsleistung über eine Normierung mit dem linearen Sättigungsparameter bei einer beliebigen Anregungsleistung eingeführt.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit die Bedeutung höher angeregter elektronischer Zustände bei der Betrachtung des Leucht- und Fluktuationsverhaltens einzelner Moleküle in der Fluoreszenzspektroskopie. Es wurde ein Modell aufgestellt, das eine Korrektur der Sättigungseffekte in der FCS mittels einer einfach zu handhabenden empirischen Korrekturfunktion ermöglicht. Außerdem konnten die Auswirkungen der Anzahl und Beschaffenheit unterschiedlicher elektronischer Niveaus im Energieniveaudiagrammmodell eines Fluorophors anhand der im Rahmen der Arbeit hergeleiteten Anpassungskurven und durchgeführten Simulationen für immobilisierte und frei in Lösung diffundierende Moleküle nachvollzogen werden. Der Einfluss von Viskositätsänderungen, Lösungsprozessen und Redoxreaktionen konnte durch die Zugabe bzw. Entnahme von gelöstem Sauerstoff, photoprotektiven Additiven und Glycerin bei unterschiedlichen Rhodamin- und Cyaninfarbstoffen bezüglich der auftretenden Photophysik untersucht und charakterisiert werden. Insbesondere konnten deutliche Unterschiede im Sättigungsverhalten der verschiedenen, als Alternative angebotenen Farbstoffe aufgezeigt werden, die von großer Wichtigkeit bei der Auswahl des geeigneten Farbstoffs für die jeweilige Anwendung sind.

Abschließend wurde eine Methode skizziert, die die Evaluation der Anregungs- und Detektionseffizienz eines konfokalen Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskops über einfache Sättigungsmessungen bestimmt und mittels weniger Parameter einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Mikroskopen bzw. die Bewertung der Justage eines Mikroskops ermöglicht. Eine solche Methode ist von großer Bedeutung, da sie die Grundlage für den korrekten Vergleich von Ergebnissen von Einzelmolekülexperimenten unterschiedlicher Labore ist [436].

Anhang A

Mathematische Ergänzungen

A.1 Autokorrelationsfunktion für gaußsche Volumina

Wird Gleichung (2.72) in Gleichung (2.71) eingesetzt, so lautet die AKF für die Intensitätsfluktuation mit $\mathbf{r} = (x, y, z)$ bzw. $\mathbf{r}' = (x', y', z')$

$$G(\tau) = \frac{\iint \text{MDF}(\mathbf{r}) \text{MDF}(\mathbf{r}') \langle \delta(\text{MB} \cdot C(\mathbf{r}, t)) \delta(\text{MB} \cdot C(\mathbf{r}', t + \tau)) \rangle dV dV'}{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) \langle \text{MB} \cdot C(\mathbf{r}, t) \rangle dV)^2} + 1 \quad , \quad (\text{A.1})$$

wobei MB die detektierte Zählrate von Photonen je Molekül und Sekunde in der Form $\text{MB} = \eta \cdot I_0 \cdot \sigma \cdot Q$ (vgl. Gleichung (2.33)) ausdrückt. Mit Gleichung (2.73) und der Annahme, dass die MB während der Beobachtungszeit statisch (bzw. linear abhängig von der lokalen Anregungsflussdichte) ist und die Quanteneffizienz Q nicht von der Position im Fokus abhängt¹, lässt sich Gleichung (A.1) als

$$G(\tau) = \frac{\text{MB}^2 \iint \text{MDF}(\mathbf{r}) \text{MDF}(\mathbf{r}') \langle C \rangle (4\pi D\tau)^{-\frac{3}{2}} e^{-\frac{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|^2}{4D\tau}} dV dV'}{(\text{MB} \langle C \rangle \int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2} + 1 \quad (\text{A.2})$$

schreiben. Somit ist die AKF der Helligkeitsfluktuation unabhängig von der MB und lautet im allgemeinen Fall bei dreidimensionaler Diffusion:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle (4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \frac{\iint \text{MDF}(\mathbf{r}) \text{MDF}(\mathbf{r}') e^{-\frac{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|^2}{4D\tau}} dV dV'}{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2} + 1 \quad . \quad (\text{A.3})$$

Wird nun die Annahme einer dreidimensionalen Gaußfunktion für die MDF aus Gleichung (2.74) eingesetzt, lauten die Integrale aus Gleichung (A.3) für den Zähler

¹ Die intrinsische molekulare Helligkeit hängt nicht vom Ort ab.

$$\begin{aligned}
 & \iiint \exp \left(-2 \frac{x^2 + x'^2}{w_{xy}^2} - \frac{|x - x'|^2}{4D\tau} \right) \exp \left(-2 \frac{y^2 + y'^2}{w_{xy}^2} - \frac{|y - y'|^2}{4D\tau} \right) dx dx' dy dy' \\
 & \cdot \iint \exp \left(-2 \frac{z^2 + z'^2}{w_z^2} - \frac{|z - z'|^2}{4D\tau} \right) dz dz' \\
 & = \frac{\pi^2 D\tau w_{xy}^2}{1 + \frac{4D\tau}{w_{xy}^2}} \cdot \frac{\pi w_z^2 \sqrt{D\tau}}{\sqrt{4D\tau + w_z^2}} = \pi^3 (D\tau)^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z \left(1 + \frac{4D\tau}{w_{xy}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}}
 \end{aligned} \tag{A.4}$$

und den Nenner

$$\iiint \exp \left(-2 \frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2} \right) \exp \left(-2 \frac{z^2}{w_z^2} \right) dx dy dz = \frac{\pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z}{2\sqrt{2}} \quad , \tag{A.5}$$

womit die Korrelationsfunktion wie folgt lautet:

$$\begin{aligned}
 G(\tau) &= \frac{1}{\langle C \rangle (4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \frac{\pi^3 (D\tau)^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z \left(1 + \frac{4D\tau}{w_{xy}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}}}{\frac{1}{8} \pi^3 w_{xy}^4 w_z^2} + 1 \\
 &= \frac{1}{\langle C \rangle \pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_{xy}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}} + 1 \quad .
 \end{aligned} \tag{A.6}$$

Da für $G(\tau = 0)$ lediglich der erste, von τ unabhängige, Term (plus eins) stehen bleibt, wird dieser häufig als $G(0)$ bezeichnet (vergleiche Gleichung (2.75)). Allgemein kann also mit der Autokovarianzfunktion nach Gleichung (2.73) und bereits gekürzter MB die Funktion nach Gleichung (A.1) in $\tau = 0$ als

$$G(\tau = 0) = \frac{\iint \text{MDF}(\mathbf{r}) \text{MDF}(\mathbf{r}') \langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', 0) \rangle dV dV'}{(\langle C \rangle \int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2} \tag{A.7}$$

geschrieben werden. Mit

$$\langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', 0) \rangle = \langle C \rangle \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') \tag{A.8}$$

vereinfacht sich der Ausdruck zu

$$\begin{aligned}
G(0) &= \frac{\iint \text{MDF}(\mathbf{r}) \text{MDF}(\mathbf{r}') \langle C \rangle \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}') dV dV'}{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) \langle C \rangle dV)^2} \\
&= \frac{1}{\langle C \rangle} \cdot \frac{\int (\text{MDF}(\mathbf{r}))^2 dV}{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2} ,
\end{aligned} \tag{A.9}$$

wobei die Integrale sich zu

$$\frac{\int (\text{MDF}(\mathbf{r}))^2 dV}{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2} = \frac{\frac{1}{8} \pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z}{\left(\frac{\pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z}{2\sqrt{2}} \right)^2} = \frac{1}{\pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z} \tag{A.10}$$

berechnen. Dies führt zu der in der Literatur oft anzutreffenden Definition des *effektiven Volumens* V_{eff} als

$$V_{\text{eff}} = \frac{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2}{\int (\text{MDF}(\mathbf{r}))^2 dV} = \pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z , \tag{A.11}$$

womit die Anzahl der im Mittel beobachteten Moleküle N in der FCS im effektiven Volumen nach

$$G(0) = \frac{1}{\langle C \rangle \cdot V_{\text{eff}}} = \frac{1}{N} \tag{A.12}$$

gegeben ist. Zum Vergleich der Volumendefinition sind im Folgenden drei ausgewählte Integrale für den gesamten Raum (a), den $1/e^2$ -Abfall (b) und den Abfall auf halbe Höhe der MDF (c, hier im Fall der 3D-Gaußfunktion nach Abschnitt 3.3.2.1) dargestellt²:

$$\iiint_{-\infty}^{\infty} \frac{\text{MDF}(\mathbf{r})}{\text{MDF}(0)} dz dy dx = \frac{\pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z}{2\sqrt{2}} \approx 0,3536 \cdot \pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z \tag{A.13a}$$

$$\iiint_{-w_{xy}}^{w_{xy}} \int_{-w_z}^{w_z} \frac{\text{MDF}(\mathbf{r})}{\text{MDF}(0)} dz dy dx = \frac{\pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z}{2\sqrt{2}} (\text{erf } \sqrt{2})^3 \approx 0,3075 \cdot \pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z \tag{A.13b}$$

$$\iiint_{-a}^a \int_{-b}^b \frac{\text{MDF}(\mathbf{r})}{\text{MDF}(0)} dz dy dx = \frac{\pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z}{2\sqrt{2}} (\text{erf } \sqrt{\ln 2})^3 \approx 0,1558 \cdot \pi^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z \tag{A.13c}$$

$$\text{mit } a = \frac{1}{2} \sqrt{2 \ln 2} \cdot w_{xy} , b = \frac{1}{2} \sqrt{2 \ln 2} \cdot w_z$$

² Obgleich die hier gewählte Definition der MDF keine Normierung durch $\text{MDF}(0)$ benötigt, wird sie an dieser Stelle der Vollständigkeit halber mitgeschrieben.

Dabei gibt erf die gaußsche Fehlerfunktion, die durch das Integral

$$\operatorname{erf} x = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt \quad (\text{A.14})$$

gegeben ist, an. Zur Darstellung des Zusammenhangs der mittleren Molekülzahl zum geometrischen Volumen der MDF (siehe Gleichung (A.5)) kann ein Faktor γ eingeführt werden, sodass

$$G(0) = \frac{\gamma}{N} = \frac{1}{\langle C \rangle} \cdot \frac{\int (\text{MDF}(\mathbf{r}))^2 dV}{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2} \quad , \quad (\text{A.15})$$

gilt und somit γ wie folgt definiert ist und zum Beispiel für das Volumenintegral der Gaußfunktion

$$\begin{aligned} \gamma &= \frac{N}{\langle C \rangle} \cdot \frac{\int (\text{MDF}(\mathbf{r}))^2 dV}{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2} \\ &= \frac{N \int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV}{N} \cdot \frac{\int (\text{MDF}(\mathbf{r}))^2 dV}{(\int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV)^2} \\ &= \frac{\int (\text{MDF}(\mathbf{r}))^2 dV}{\int \text{MDF}(\mathbf{r}) dV} = \frac{1}{2\sqrt{2}} \end{aligned} \quad (\text{A.16})$$

lautet (vgl. Gleichung (A.13a)).

A.2 Gaußstrahlen

Auf Grundlage der in Abschnitt 2.1.1.2 aufgestellten Wellengleichungen, kann mithilfe einer Trennung der Variablen in

$$\vec{E}(\mathbf{r}, t) = \vec{E}(\mathbf{r}) e^{i\omega t} \quad (\text{A.17})$$

und Einsetzen in die Wellengleichung (2.19), mit einer Konstanten k , die Helmholtz-Gleichung

$$(\nabla^2 + k^2) \vec{E}(\mathbf{r}) = 0 \quad (\text{A.18})$$

aufgestellt werden. Unter der paraxialen Näherung bewegt sich die Welle lediglich in Richtung der optischen Achse z , sodass

$$\vec{E}(\mathbf{r}) = \vec{A}(\mathbf{r}) e^{ikz} \quad (\text{A.19})$$

gilt und $\mathbf{r}$ den Abstand zur z -Achse und z den Tailenabstand bezeichnet. Außerdem muss die Änderung von $\vec{A}$ entlang der optischen Achse klein sein (geringe Divergenz)

$$\left| \frac{\delta^2 \vec{A}(\mathbf{r})}{\delta z^2} \right| \ll \left| k \frac{\delta \vec{A}(\mathbf{r})}{\delta z} \right| \quad . \quad (\text{A.20})$$

Einsetzen der Welle aus Gleichung (A.19) in die Helmholtz-Gleichung (A.18) führt zur paraxialen Wellengleichung:

$$\left(\frac{\delta^2}{\delta x^2} + \frac{\delta^2}{\delta y^2} \right) \vec{A}(\mathbf{r}) e^{ikz} + 2 \left(\frac{\delta}{\delta z} \vec{A}(\mathbf{r}) \right) i e^{ikz} = 0 \quad . \quad (\text{A.21})$$

Das Lösen dieser Gleichung nach dem Rück-Substituieren von $\vec{E}(\mathbf{r})$ aus Gleichung (A.19), führt zu:

$$\vec{E}(\mathbf{r}) = A_0 \frac{w_0}{w(z)} \exp \left(-\frac{\mathbf{r}^2}{w(z)^2} \right) \exp \left(-ikz - ik \frac{\mathbf{r}^2}{2R(z)} + i\zeta(z) \right). \quad (\text{A.22})$$

Dabei gibt A_0 die Feldstärke im Ursprung ($|E(0)|$), $w(z)$ den $1/e$ -Abfall entlang der optischen Achse, w_0 die Strahltaile, k die Wellenzahl ($2\pi/\lambda$), $R(z)$ den Krümmungsradius und $\zeta(z)$ die Gouy-Phase an. Der Krümmungsradius beschreibt wie eben die Wellenfronten sind und ist durch

$$R(z) = z \left(1 + \left(\frac{z_R}{z} \right)^2 \right) \quad (\text{A.23})$$

gegeben. Wobei z_R die Rayleigh-Länge beschreibt, die

$$z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (\text{A.24})$$

lautet. Die Gouy-Phase ist durch

$$\zeta(z) = \arctan \left(\frac{z}{z_R} \right) \quad (\text{A.25})$$

bestimmt und beschreibt eine zusätzliche Phasenverschiebung des Gaußstrahls im Vergleich zu einer einfachen planen Welle. Mit der aus der Energiestromdichte bestimmten komplexen Intensität aus Gleichung (2.27) kann dann für die Intensität I

$$I(\mathbf{r}) = \frac{1}{2} \varepsilon c |E(\mathbf{r})|^2 = I_0 \left(\frac{w_0}{w(z)} \right)^2 \exp \left(-2 \frac{\mathbf{r}^2}{w(z)^2} \right) \quad (\text{A.26})$$

geschrieben werden.

A.3 Fokusfunktionen

Die Multiplikation der Anregungs- und Detektionsfunktion aus Abbildung A.1 führt mit der Anpassung einer allgemeinen 2D-Gaußfunktion der Form

$$f(x,y,z) = A_0 + A \cdot e^{-2\left(\frac{(x-x_0)^2}{w_x^2} + \frac{(y-y_0)^2}{w_y^2} + \frac{(z-z_0)^2}{w_z^2}\right)} \quad (\text{A.27})$$

im lateralen Schnitt (siehe Abbildungen A.1a und A.1c) zu einem Tailenparameter der Gesamt-PSF von $w_{xy} = 162 \text{ nm}$ und im axialen Schnitt (siehe Abbildungen A.1b und A.1d) zu den Tailenparametern der Gesamt-PSF von $w_{xy} = 178 \text{ nm}$ und $w_z = 620 \text{ nm}$.

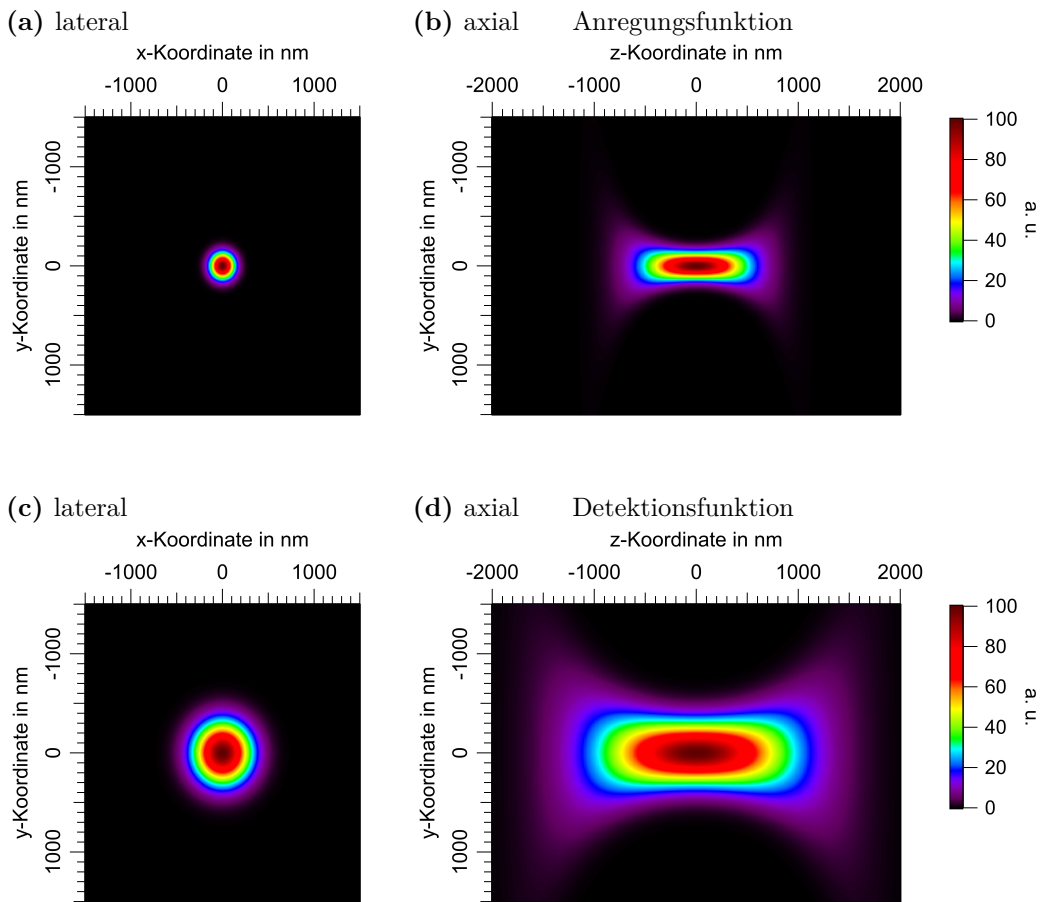


Abbildung A.1: Simulierte Anregungs- und Detektionsfunktion

Dargestellt sind die lateralen und axialen Schnitte in der Fokusebene der (a),(b) Anregung und (c),(d) Detektion. Die Anpassung der lateralen und axialen Schnitte mit einer 2D-Gaußfunktion führt zu den Tailenparametern (a) $w_{xy} = 176 \text{ nm}$, (b) $w_{xy} = 202 \text{ nm}$ und $w_z = 721 \text{ nm}$, (c) $w_{xy} = 417 \text{ nm}$, sowie (d) $w_{xy} = 465 \text{ nm}$ und $w_z = 1310 \text{ nm}$

Anhang B

Herleitungen photophysikalischer Zusammenhänge

B.1 Stationäres, geschlossenes Singulettssystem

Die Betrachtung des Singulettsystems

$$\dot{S}_0 = -k_{\text{ex}}S_0 + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})S_1 \quad (\text{B.1a})$$

$$\dot{S}_1 = k_{\text{ex}}S_0 - (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})S_1 \quad (\text{B.1b})$$

mit den Anfangsbedingungen $S_0 = 1$ (im Grundzustand ist S_0 besetzt) und $S_1 = 0$ folgt:

$$S_0(t) = \frac{e^{-t(k_{\text{ex}}+k_{\text{IC}}+k_{\text{rad}})}k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \quad (\text{B.2a})$$

$$S_1(t) = \frac{\left(1 - e^{-t(k_{\text{ex}}+k_{\text{IC}}+k_{\text{rad}})}\right)k_{\text{ex}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \quad (\text{B.2b})$$

Zum einen ist hier der charakteristische Antibunching des Singulett bei niedrigen Zeiten in Form der Abfallzeit des Exponenten $\tau_A = (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^{-1}$ (siehe Abschnitt 4.1) zu sehen, zum anderen kann die stationäre Lösung des geschlossenen Systems ($S_0 + S_1 = 1$) zu

$$S_0 = \frac{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \quad (\text{B.3a})$$

$$\begin{aligned}
 S_1 &= \frac{k_{\text{ex}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \\
 &= 1 - \frac{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}}
 \end{aligned}
 \tag{B.3b}$$

bestimmt werden. Die Änderung des Ratengleichungssystems aus Gleichung (2.40) wird damit bezogen auf die Besetzung des gesamten Singulettts zu:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S \\ T_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}}+k_{\text{IC}}+k_{\text{rad}}}S + k_{\text{rISC}}T_1 \\ \frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}}+k_{\text{IC}}+k_{\text{rad}}}S - k_{\text{rISC}}T_1 \end{pmatrix} .
 \tag{B.4}$$

B.2 Anpassungsfunktionen für die molekulare Helligkeit

Die Lösung für die Anpassungsfunktion aus dem Fünf-Niveau-Modell entsprechend Gleichung (4.17) mit $k_0 = k_{IC} + k_{ISC} + k_{rad}$ lautet für den radiativen Singulett-Zustand S_1

$$\begin{aligned}
 S_1 = k_{ex} & \left[\frac{(k_{IC} + k_{rad}) k_{rISC_n} k_{T_{1 \rightarrow n}}}{k_{rISC_n} k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})} \right. \\
 & + \frac{k_{ISC_n} k_{rISC} k_{S_{1 \rightarrow n}} k_{T_{n \rightarrow 1}}}{(k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}) (k_{rISC_n} k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))} \\
 & + \frac{k_0 k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{k_{rISC_n} k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})} \\
 & + k_{ex} \left(\frac{(k_{ISC_n} (k_{rISC_n} + k_{S_{1 \rightarrow n}}) + k_{rISC_n} (k_{S_{1 \rightarrow n}} + k_{S_{n \rightarrow 1}})) (k_{rISC} + k_{T_{1 \rightarrow n}})}{(k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}) (k_{rISC_n} k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))} \right. \\
 & + \frac{(k_{ISC_n} (k_{rISC} + k_{S_{1 \rightarrow n}}) + k_{rISC} (k_{S_{1 \rightarrow n}} + k_{S_{n \rightarrow 1}})) k_{T_{n \rightarrow 1}}}{(k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}) (k_{rISC_n} k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))} \\
 & \left. \left. + \frac{k_{ISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{k_{rISC_n} k_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})} \right) \right]^{-1}. \tag{B.5}
 \end{aligned}$$

Das führt mit den molekularen Absorptionswirkungsquerschnitten σ und Photonenflussdichten ϕ für die anregenden Raten $k_{ex} = \phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1}$, $k_{S_{1 \rightarrow n}} = \phi \sigma_{S_{1 \rightarrow n}}$ und $k_{T_{1 \rightarrow n}} = \phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}}$, zu:

$$\begin{aligned}
 S_1 = \phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1} & \left[\frac{k_0 k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{rISC_n} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})} \right. \\
 & + \phi \left\{ \frac{\sigma_{S_0 \rightarrow 1} k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}) (k_{S_{n \rightarrow 1}} + \phi \sigma_{S_{1 \rightarrow n}})}{(k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}) (\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{rISC_n} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))} \right. \\
 & + \frac{\sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{rISC_n} (\phi^2 \sigma_{S_0 \rightarrow 1} \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} + k_{S_{n \rightarrow 1}} (k_{IC} + k_{rad} + \phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1}))}{(k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}) (\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{rISC_n} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))} \\
 & + \frac{\sigma_{S_0 \rightarrow 1} k_{ISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}} + \phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}})}{\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{rISC_n} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}})} \\
 & + k_{ISC_n} \left(\frac{k_{rISC} (\sigma_{S_0 \rightarrow 1} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}) + \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} (\phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))}{(k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}) (\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{rISC_n} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))} \right. \\
 & + \frac{\sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{rISC_n} (k_{IC} + k_{rad})}{(k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}) (\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{rISC_n} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))} \\
 & \left. \left. + \frac{\phi \sigma_{S_0 \rightarrow 1} (\sigma_{S_{1 \rightarrow n}} k_{T_{n \rightarrow 1}} + \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} (\phi \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} + k_{rISC_n}))}{(k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}) (\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{rISC_n} + k_{rISC} (k_{rISC_n} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))} \right) \right]^{-1}. \tag{B.6}
 \end{aligned}$$

Dieser Zusammenhang kann unter der Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit des Wechsels der Multiplizität aus einem angeregten Triplett-Zustand vernachlässigbar gering ist, zu

$$\begin{aligned}
 S_1 &= \phi \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left[k_0 + \phi \cdot \left\{ \frac{\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} (\phi \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} + k_{S_{n \rightarrow 1}})}{k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}} + \frac{\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} k_{ISC} (\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}}} \right. \right. \\
 &\quad + k_{ISC_n} \left(\frac{\phi \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} + k_{T_{n \rightarrow 1}} (\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} + \sigma_{S_{1 \rightarrow n}})}{k_{T_{n \rightarrow 1}} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})} \right) \\
 &\quad \left. \left. + \frac{\phi \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} (\phi \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} + k_{T_{n \rightarrow 1}})}{k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})} \right\} \right]^{-1} \\
 &= \phi \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left[k_0 + \phi \left(\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left(1 + \frac{k_{ISC}}{k_{rISC}} \right) + \frac{\sigma_{S_{1 \rightarrow n}} k_{ISC_n}}{k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}} \right) \right. \\
 &\quad + \phi^2 \left(\frac{\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} (k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}} + k_{ISC_n} (k_{rISC} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))}{k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})} \right) \\
 &\quad + \frac{\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{ISC} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})}{k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})} \left. \right]^{-1} \\
 &\quad + \phi^3 \frac{\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{ISC_n}}{k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})} \left. \right]^{-1}
 \end{aligned} \tag{B.7}$$

vereinfacht werden. Da der experimentelle Zugang über die Emissionsrate erfolgt, ist es nützlich, Gleichung (B.7) mittels $MB(\phi) \propto k_{rad} S_1$ zu

$$MB(\phi) \propto \frac{k_{rad}}{k_0} \cdot \frac{\phi \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}}{1 + \frac{\phi}{\phi_{sat_1}} + \frac{\phi^2}{\phi_{sat_2}} + \frac{\phi^3}{\phi_{sat_3}}} \tag{B.8}$$

umzuformulieren. Dabei sind ϕ_{sat_1} , ϕ_{sat_2} und ϕ_{sat_3} durch

$$\phi_{sat_1} = k_0 \left(\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left(1 + \frac{k_{ISC}}{k_{rISC}} \right) + \frac{\sigma_{S_{1 \rightarrow n}} k_{ISC_n}}{k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}}} \right)^{-1} \tag{B.9a}$$

$$\begin{aligned}
 \phi_{sat_2} &= k_0 \left(\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \frac{\sigma_{S_{1 \rightarrow n}} (k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}} + k_{ISC_n} (k_{rISC} + k_{T_{n \rightarrow 1}}))}{k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})} \right. \\
 &\quad \left. + \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \frac{\sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{ISC} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})}{k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})} \right)^{-1}
 \end{aligned} \tag{B.9b}$$

$$\phi_{sat_3} = k_0 \left(\frac{\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} k_{ISC_n}}{k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}} (k_{ISC_n} + k_{S_{n \rightarrow 1}})} \right)^{-1} \tag{B.9c}$$

bestimmt. Wird zusätzlich die Interkombination in angeregte Triplettzustände vernachlässigt, lässt sich S_1 als

$$S_1 = \frac{1}{k_0} \cdot \frac{\phi \sigma_{S_{0 \rightarrow 1}}}{1 + \frac{\phi}{\frac{\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \left(1 + \frac{k_{ISC}}{k_{rISC}} \right)}{k_0}} + \frac{\phi^2}{\frac{\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \sigma_{S_{1 \rightarrow n}} \left(\frac{1}{k_{S_{n \rightarrow 1}}} \right)}{k_0}} + \frac{\phi^2}{\frac{\sigma_{S_{0 \rightarrow 1}} \sigma_{T_{1 \rightarrow n}} \left(\frac{k_{ISC}}{k_{rISC} k_{T_{n \rightarrow 1}}} \right)}{k_0}}} \tag{B.10}$$

schreiben. Womit der kubische Term entfällt und die MB durch

$$\begin{aligned} \text{MB}(\phi) &\propto \frac{k_{\text{rad}}}{k_0} \cdot \frac{\phi \sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}}}{1 + \frac{\phi}{\phi_{\text{sat}_1}} + \frac{\phi^2}{\phi_{\text{sat}_2}}} \\ \text{mit } \phi_{\text{sat}_1} &= k_0 \left(\sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}} \frac{k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}}{k_{\text{rISC}}} \right)^{-1} \\ \phi_{\text{sat}_2} &= k_0 \left(\sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}} \left(\frac{\sigma_{\text{S}_{1 \rightarrow n}}}{k_{\text{S}_{n \rightarrow 1}}} + \frac{\sigma_{\text{T}_{1 \rightarrow n}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{T}_{n \rightarrow 1}} k_{\text{rISC}}} \right) \right)^{-1} \end{aligned} \quad (\text{B.11})$$

gegeben ist. Dabei ist auffällig, dass die Anwesenheit eines höheren Singulett- oder Triplettzustandes bereits zu einem quadratischen Term führt. Wenn hingegen keine höheren Singulett- und Triplettzustände gegeben sind, wird aus Gleichung (B.11)

$$\begin{aligned} \text{MB}(\phi) &\propto \frac{k_{\text{rad}}}{k_0} \cdot \frac{\phi \sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}}}{1 + \frac{\phi}{\phi_{\text{sat}}}} \\ \text{mit } \phi_{\text{sat}} &= k_0 \left(\sigma_{\text{S}_{0 \rightarrow 1}} \frac{k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}}{k_{\text{rISC}}} \right)^{-1} . \end{aligned} \quad (\text{B.12})$$

B.3 Zeitabhängige Lösung des Drei-Niveau-Systems

Für das lineare Differentialgleichungssystem mit drei Zuständen aus Gleichung (2.36) lautet die Lösung mit

$$\chi = \sqrt{k_{\text{ex}}^2 + 2k_{\text{ex}}(k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}}) + (k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}})^2} \quad (\text{B.13})$$

für die Eigenwerte

$$\lambda_1 = 0 \quad , \quad (\text{B.14a})$$

$$\lambda_2 = \frac{1}{2}(-k_{\text{ex}} - k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} - k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}} - \chi) \quad , \quad (\text{B.14b})$$

$$\lambda_3 = \frac{1}{2}(-k_{\text{ex}} - k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} - k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}} + \chi) \quad , \quad (\text{B.14c})$$

sowie die Eigenvektoren

$$\vec{\eta}_1 = \begin{pmatrix} \frac{(k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}})k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}} \\ \frac{k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ISC}}} \\ 1 \end{pmatrix} \quad , \quad (\text{B.15a})$$

$$\vec{\eta}_2 = \begin{pmatrix} \frac{1}{2k_{\text{ISC}}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}} + \chi) \\ -\frac{1}{2k_{\text{ISC}}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}} + \chi) \\ 1 \end{pmatrix} \quad , \quad (\text{B.15b})$$

$$\vec{\eta}_3 = \begin{pmatrix} \frac{1}{2k_{\text{ISC}}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}} - \chi) \\ -\frac{1}{2k_{\text{ISC}}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}} - \chi) \\ 1 \end{pmatrix} \quad (\text{B.15c})$$

und die entsprechenden Konstanten

$$c_1 = \frac{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}}k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}})k_{\text{rISC}}} \quad , \quad (\text{B.16a})$$

$$c_2 = \frac{1}{2} \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{rISC}} - \chi)}{\chi (k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}})} , \quad (\text{B.16b})$$

$$c_3 = -\frac{1}{2} \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{rISC}} + \chi)}{\chi (k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}})} . \quad (\text{B.16c})$$

Womit mit $k_0 = k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}$ für die zeitabhängige Besetzung der Zustände

$$\begin{aligned} S_0(t) = & \frac{k_0 k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_0 + k_{\text{ex}}) k_{\text{rISC}}} \\ & + \frac{e^{t\lambda_2} k_{\text{ex}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}} + \chi) (k_0 + k_{\text{ex}} + k_{\text{rISC}} - \chi)}{4\chi (k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_0 + k_{\text{ex}}) k_{\text{rISC}})} \\ & + \frac{e^{t\lambda_3} k_{\text{ex}} (k_0 + k_{\text{ex}} + k_{\text{rISC}} + \chi) (-k_{\text{ex}} - k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} - k_{\text{rad}} + k_{\text{rISC}} + \chi)}{4\chi (k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_0 + k_{\text{ex}}) k_{\text{rISC}})} , \end{aligned} \quad (\text{B.17})$$

$$\begin{aligned} S_1(t) = & \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_0 + k_{\text{ex}}) k_{\text{rISC}}} \\ & - \frac{e^{t\lambda_2} k_{\text{ex}} (k_0 + k_{\text{ex}} - k_{\text{rISC}} + \chi) (k_0 + k_{\text{ex}} + k_{\text{rISC}} - \chi)}{4\chi (k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_0 + k_{\text{ex}}) k_{\text{rISC}})} \\ & + \frac{e^{t\lambda_3} k_{\text{ex}} (k_0 + k_{\text{ex}} - k_{\text{rISC}} - \chi) (k_0 + k_{\text{ex}} + k_{\text{rISC}} + \chi)}{4\chi (k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_0 + k_{\text{ex}}) k_{\text{rISC}})} , \end{aligned} \quad (\text{B.18})$$

$$\begin{aligned} T_1(t) = & \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_0 + k_{\text{ex}}) k_{\text{rISC}}} + \frac{e^{t\lambda_2} k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} (k_0 + k_{\text{ex}} + k_{\text{rISC}} - \chi)}{2\chi (k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_0 + k_{\text{ex}}) k_{\text{rISC}})} \\ & - \frac{e^{t\lambda_3} k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} (k_0 + k_{\text{ex}} + k_{\text{rISC}} + \chi)}{2\chi (k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} + (k_0 + k_{\text{ex}}) k_{\text{rISC}})} \end{aligned} \quad (\text{B.19})$$

gilt. Eine Näherung für χ , kann mit Hilfe von $k_{\text{ex}}, k_{\text{rad}}, k_{\text{IC}} \gg k_{\text{ISC}}, k_{\text{rISC}}$ als

$$\begin{aligned} \chi = & k_{\text{ex}} \sqrt{1 + \left(\frac{k_{\text{ISC}} - k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}}} + \frac{k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}}{k_{\text{ex}}} \right)^2 - 2 \frac{k_{\text{ISC}} - k_{\text{rad}} - k_{\text{IC}} + k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}}}} \\ \approx & k_{\text{ex}} \left[1 + \left(\frac{k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}}{k_{\text{ex}}} \right)^2 \right. \\ & \left. + 2 \left(\frac{(k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}) (k_{\text{ISC}} - k_{\text{rISC}})}{k_{\text{ex}}^2} - \frac{k_{\text{ISC}} - k_{\text{rad}} - k_{\text{IC}} + k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}}} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \\ = & (k_{\text{ex}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}) \\ & \cdot \sqrt{1 + \frac{2}{\left(1 + \frac{k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}}{k_{\text{ex}}} \right)^2} \left(\frac{k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}}{k_{\text{ex}}^2} (k_{\text{ISC}} - k_{\text{rISC}}) - \frac{k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}}} \right)} \end{aligned} \quad (\text{B.20})$$

und weiter

$$\begin{aligned}
 \chi &\approx (k_{\text{ex}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}) \\
 &\cdot \left(1 + \frac{k_{\text{ex}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}})^2} \left(\frac{k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}}{k_{\text{ex}}} (k_{\text{ISC}} - k_{\text{rISC}}) - (k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}) \right) \right) \\
 &= k_{\text{ex}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}} + \frac{(k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}) (k_{\text{ISC}} - k_{\text{rISC}}) - k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{IC}}} \\
 &= k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{2k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) - k_{\text{rISC}} \quad ,
 \end{aligned} \tag{B.21}$$

oder über eine Potenzreihendarstellung unter Betrachtung der linearen Glieder in der Form

$$\begin{aligned}
 \chi &\approx \frac{k_{\text{ex}}^3 + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2 (k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}})}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2} \\
 &+ \frac{k_{\text{ex}}^2 (3k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} + 3k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}})}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2} \\
 &+ \frac{k_{\text{ex}} (3(k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2 - 2(k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}})}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2} \quad .
 \end{aligned} \tag{B.22}$$

geschrieben werden. Die Eigenwerte lauten entsprechend unter der Näherung gemäß Gleichung (B.22):

$$\lambda_1 = 0 \tag{B.23a}$$

$$\lambda_2 \approx -k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} - k_{\text{rad}} - k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) + \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} k_{\text{rISC}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2} \tag{B.23b}$$

$$\begin{aligned}
 \lambda_3 &\approx -\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \\
 &- \frac{\left(k_{\text{ex}}^2 + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2 + k_{\text{ex}} (2k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + 2k_{\text{rad}}) \right) k_{\text{rISC}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2} \quad .
 \end{aligned} \tag{B.23c}$$

Durch ein abermaliges Näheren der letzten Terme von Gleichung (B.23) oder direkt über

Gleichung (B.21) lauten die Eigenwerte:

$$\lambda_1 = 0 \quad (\text{B.24a})$$

$$\lambda_2 \approx -k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} - k_{\text{rad}} - k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) \quad (\text{B.24b})$$

$$\lambda_3 \approx -\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} - k_{\text{rISC}} \quad (\text{B.24c})$$

Somit können die zeitabhängigen Besetzungsdichten der elektronischen Niveaus mit $k_{\text{ISC}}^{\text{app}}$ entsprechend Gleichung (4.10) auf den stationären Zustand normiert wie folgt geschrieben werden. Für den Grundzustand $S_0(t)$ gilt

$$\begin{aligned} S_0(t) &= 1 + \frac{k_{\text{ex}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}} + \chi) (k_{\text{ex}} + k_0 + k_{\text{rISC}} - \chi)}{4k_0 \chi k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_2} \\ &\quad + \frac{k_{\text{ex}} (-k_{\text{ex}} - k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} - k_{\text{rad}} + k_{\text{rISC}} + \chi) (k_{\text{ex}} + k_0 + k_{\text{rISC}} + \chi)}{4k_0 \chi k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_3} \\ &\approx 1 + e^{t\lambda_2} \frac{k_{\text{ex}} \left(k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) - k_{\text{rISC}} \right)}{k_0 \left(k_0 + k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{2k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) - k_{\text{rISC}} \right) k_{\text{rISC}}} \\ &\quad \cdot \left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \right) + e^{t\lambda_3} \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})}{k_0 k_{\text{rISC}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})} \\ &\quad \cdot \frac{k_{\text{ex}}^2 + k_0 (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) + 2k_{\text{ex}} (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})}{k_{\text{ex}}^2 + (k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) (k_0 - k_{\text{rISC}}) + k_{\text{ex}} (2k_{\text{IC}} - k_{\text{ISC}} + 2k_{\text{rad}} - k_{\text{rISC}})} \end{aligned} \quad (\text{B.25})$$

was zu

$$\begin{aligned} S_0(t) &\approx 1 + e^{t\lambda_2} k_{\text{ex}} \left(\frac{1}{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} - k_{\text{rISC}} \left(\frac{1}{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}^2} + \frac{1}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}^2} \right. \right. \\ &\quad \left. \left. - \frac{k_{\text{ex}}}{(k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} + \frac{k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}^3} \right) \right) \\ &\quad + e^{t\lambda_3} k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} \left(\frac{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}^3} + \frac{1}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \right) \\ &\approx 1 + \frac{k_{\text{ex}}}{k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \frac{k_{\text{rISC}} + k_{\text{ISC}}^{\text{app}}}{k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_2} + \frac{k_{\text{ISC}}^{\text{app}}}{k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_3} \end{aligned} \quad (\text{B.26})$$

führt. Für den radiativen Singulettzustand $S_1(t)$ gilt

$$\begin{aligned}
 S_1(t) &= 1 - \frac{(k_0 - k_{\text{rISC}} + \chi) k_{\text{rISC}} + k_{\text{ex}} (2k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}})}{2\chi k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_2} \\
 &\quad + \frac{(k_0 - k_{\text{rISC}} - \chi) k_{\text{rISC}} + k_{\text{ex}} (2k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}})}{2\chi k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_3} \\
 &\approx 1 - \frac{(k_0 + k_{\text{rISC}}) k_{\text{rISC}} + k_{\text{ex}} \left(k_{\text{rISC}} + k_{\text{ISC}} \left(1 - \frac{k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) \right)}{\left(k_0 + k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{2k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) - k_{\text{rISC}} \right) k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_2} \\
 &\quad + \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}} + k_{\text{rISC}}) e^{t\lambda_3}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) \left(k_0 + k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{2k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) - k_{\text{rISC}} \right) k_{\text{rISC}}}
 \end{aligned} \tag{B.27}$$

und somit

$$\begin{aligned}
 S_1(t) &\approx 1 - e^{t\lambda_2} \left[1 + \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right. \\
 &\quad \cdot \left(\frac{2}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + \frac{1}{k_{\text{rISC}}} + \frac{2k_{\text{rISC}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2} \right) \Bigg] \\
 &\quad + \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} e^{t\lambda_3}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \left(\frac{2}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + \frac{1}{k_{\text{rISC}}} + \frac{2k_{\text{rISC}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2} \right) \\
 &\approx 1 - e^{t\lambda_2} \left(1 + \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \right) + e^{t\lambda_3} \frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}} \\
 &\approx 1 - \frac{k_{\text{rISC}} + k_{\text{ISC}}^{\text{app}}}{k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_2} + \frac{k_{\text{ISC}}^{\text{app}}}{k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_3} .
 \end{aligned} \tag{B.28}$$

Der Triplettzustand $T_1(t)$ lautet:

$$\begin{aligned}
 T_1(t) &= 1 + \frac{k_{\text{ex}} + k_0 + k_{\text{rISC}} - \chi}{2k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} \chi} e^{t\lambda_2} - \frac{k_{\text{ex}} + k_0 + k_{\text{rISC}} + \chi}{2k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} \chi} e^{t\lambda_3} \\
 &\approx 1 + \frac{\frac{1}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + \frac{k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}}{k_0 + k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{2k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) - k_{\text{rISC}}} e^{t\lambda_2} \\
 &\quad - \frac{k_0 + k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right)}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}} \left(k_0 + k_{\text{ex}} \left(1 - \frac{2k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right) - k_{\text{rISC}} \right)} e^{t\lambda_3} \\
 &\approx 1 - \frac{1}{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}} e^{t\lambda_3} .
 \end{aligned} \tag{B.29}$$

B.4 Molekulare Helligkeit bei der Isomerisierung

Für die MB kann mit $k_0 = k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{rad}}$ und $k_{\text{ex}} = \phi\sigma_{\text{trans}}$, $k_{\text{ex,cis}} = \phi\sigma_{\text{cis}}$ nach Gleichung (6.28b) für den radiativen Zustand

$$S_1^{\text{trans}} = \frac{\phi k_{\text{rISC}} k_{\text{riso}} \sigma_{\text{cis}} \sigma_{\text{trans}}}{(k_0 + k_{\text{iso}}) k_{\text{rISC}} k_{\text{riso}} \sigma_{\text{cis}} + \sigma_{\text{trans}} \{k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}} (k_{\text{IC,cis}} + k_{\text{riso}}) + \phi \sigma_{\text{cis}} (k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}} + (k_{\text{ISC}} + k_{\text{rISC}}) k_{\text{riso}})\}} \quad (\text{B.30})$$

geschrieben werden. Das führt analog zur Formulierung in Gleichung (B.7) zu

$$S_1^{\text{trans}} = \phi \sigma_{\text{trans}} \left[k_0 + k_{\text{iso}} + \frac{k_{\text{iso}} \sigma_{\text{trans}}}{\sigma_{\text{cis}}} \left(1 + \frac{k_{\text{IC,cis}}}{k_{\text{riso}}} \right) + \phi \sigma_{\text{trans}} \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} + \frac{k_{\text{iso}}}{k_{\text{riso}}} \right) \right]^{-1} . \quad (\text{B.31})$$

Für die MB gilt somit

$$\begin{aligned} \text{MB}(\phi) &\propto \frac{k_{\text{rad}}}{k_0 + k_{\text{iso}}} \cdot \frac{\phi \sigma_{\text{trans}}}{\phi_{\text{sat}_1} + \frac{\phi}{\phi_{\text{sat}_2}}} \\ \text{mit } \phi_{\text{sat}_1} &= (k_0 + k_{\text{iso}}) \left(\frac{\sigma_{\text{trans}}}{\sigma_{\text{cis}}} k_{\text{iso}} \left(1 + \frac{k_{\text{IC,cis}}}{k_{\text{riso}}} \right) \right)^{-1}, \\ \phi_{\text{sat}_2} &= (k_0 + k_{\text{iso}}) \left(\sigma_{\text{trans}} \left(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_{\text{rISC}}} + \frac{k_{\text{iso}}}{k_{\text{riso}}} \right) \right)^{-1}. \end{aligned} \quad (\text{B.32})$$

Anhang C

Ergänzungen

C.1 Photophysikalische Modelle

In Abbildung C.1 sind die Differenzen der lateralen Schnitte eines Drei- und eines Fünf-Niveau-Systems (entsprechend der Abbildungen 4.7a und 4.7c) dargestellt. Dabei findet der Großteil der Fluoreszenzereignisse des Drei-Niveau-Systems im geometrischen Zentrum der Verteilung statt, wohingegen beim Fünf-Niveau-System die Ereignisse bevorzugt im Randbereich auftreten. Die Anpassung der Fokusebenen des Drei-Niveau-Systems in Abbildung C.2 mit einer 2D-Gauß-Funktion führt zu einer guten Approximation des beobachteten Verhaltens. Dabei fällt auf, dass die Gaußfunktion entlang der z -Koordinate nur eine unzureichende Anpassung im Außenbereich bietet.

Die Modellfunktion nach Gleichung (4.38) führt zu zwei zusätzlichen Termen bei der Bestimmung der Korrelationsfunktion im Diffusionsbereich und somit auch der Amplitude. Diese haben einen gemeinsamen Faktor $\sigma_{xy}^2 \sigma_z c$ und teilen sich in einen positiven Term

$$c \left(1 + \frac{4D\tau}{\sigma_{xy}^2 w_{xy}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{\sigma_z^2 w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (\text{C.1})$$

der zu einem Anstieg der Korrelationsfunktion führt, und einen negativen Term

$$4\sqrt{2} \left(1 + \sigma_{xy}^2 + \frac{8D\tau}{w_{xy}^2} \right)^{-1} \left(1 + \sigma_z^2 + \frac{8D\tau}{w_z^2} \right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (\text{C.2})$$

der zu einem Absinken der Korrelationsfunktion führt. In Abbildung C.3 sind diese für verschiedene Werte c und σ ohne den gemeinsamen Faktor dargestellt. Der negative Term überwiegt dabei den positiven für alle Wertepaare, womit die Abweichung der betrachteten Modellfunktion von der Standard-Gauß-Funktion zu einem Sinken der Korrelationsfunktion führt.

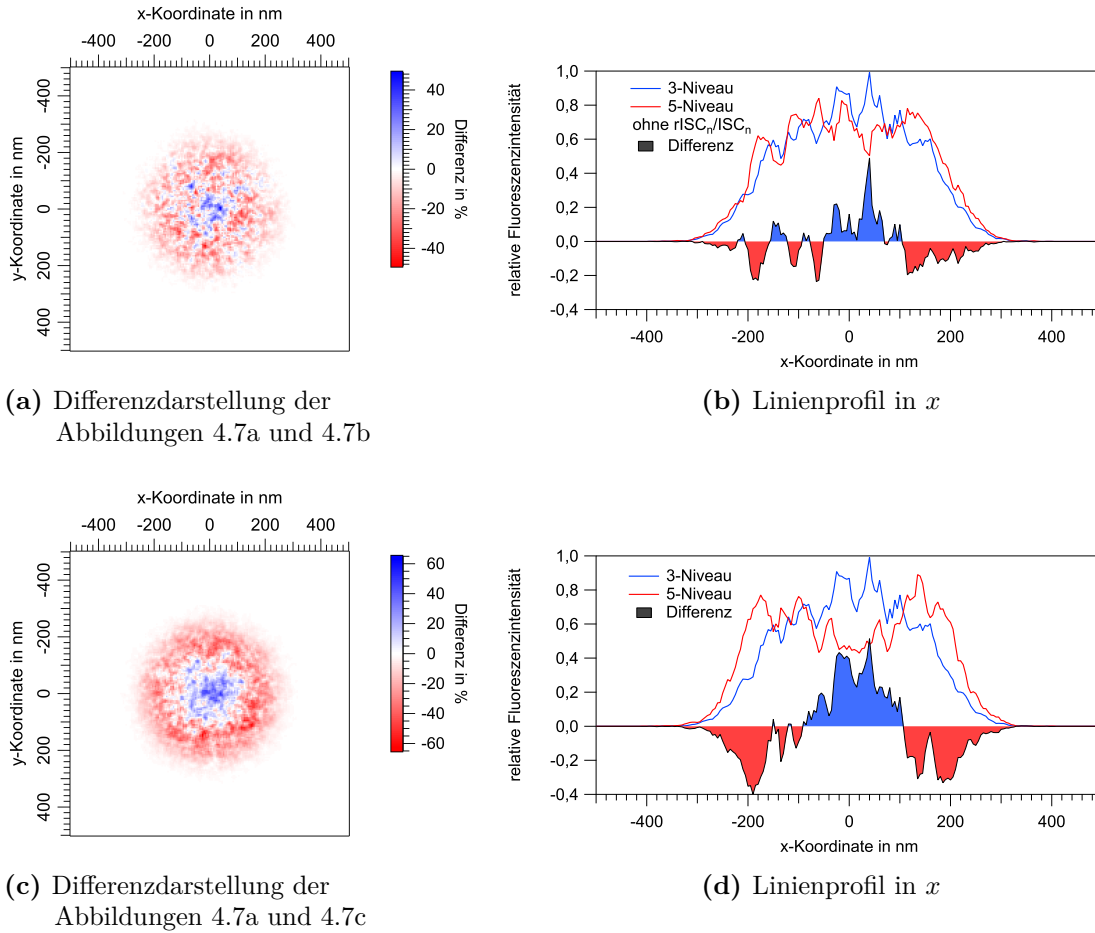
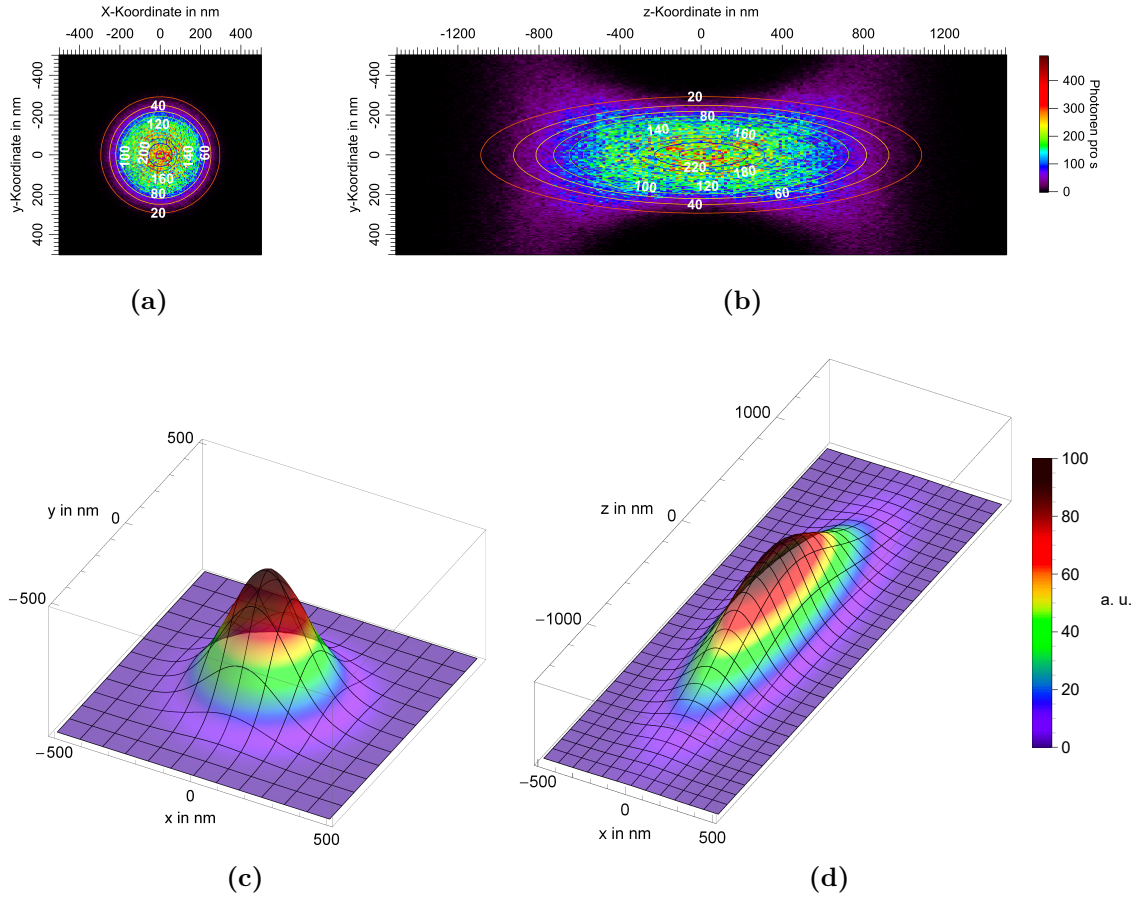
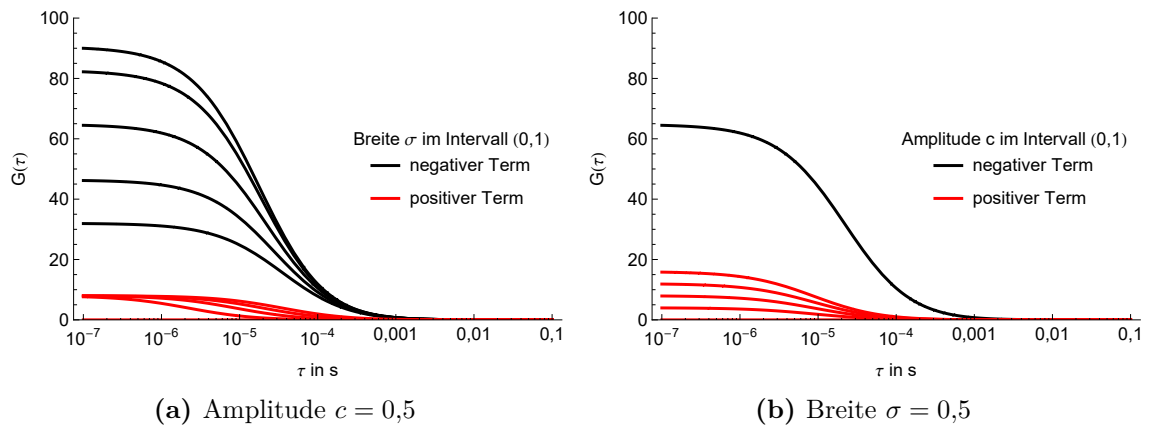


Abbildung C.1: Differenzen der relativen Fluoreszenzintensität

Die Differenzen der lateralen Schnitte des Drei- und Fünf-Niveau-Systems ohne Interkombination (a) und mit Interkombination (c) zeigen, dass der Großteil der Fluoreszenzphotonen der Fünf-Niveau-Systeme (rot) aus den Außenbereichen des Fokus kommen. Während die Fluoreszenzphotonen des Drei-Niveau-Systems (blau) primär aus dem geometrischen Zentrum des Fokus stammen. In (b) und (d) sind die Linienprofile aus Abbildung 4.7 (siehe Seite 85) und die der entsprechenden Differenzen (a) und (c) entlang x ($y = 0$) dargestellt.

**Abbildung C.2: 3D-Gauß-Anpassung**

Zu sehen sind die Konturlinien der 3D-Gauß-Anpassung der (a) lateralen Fokusebene ($z = 0$) und (b) axialen Fokusebene ($x = 0$) des Drei-Niveau-Systems. Die Anpassung führt zu den in (c) und (d) dargestellten gaußförmigen Emissionsverteilungen.

**Abbildung C.3: Zusätzliche Terme des Gauß-Differenz-Modells**

Dargestellt sind die zusätzlichen Terme nach Gleichung (C.1) in rot und nach Gleichung (C.2) in schwarz. Für variierende (a) Breiten und (b) Amplituden bleibt der negative Term dominierend, was zu einem Abfall der Gesamtamplitude der Korrelationsfunktion führt.

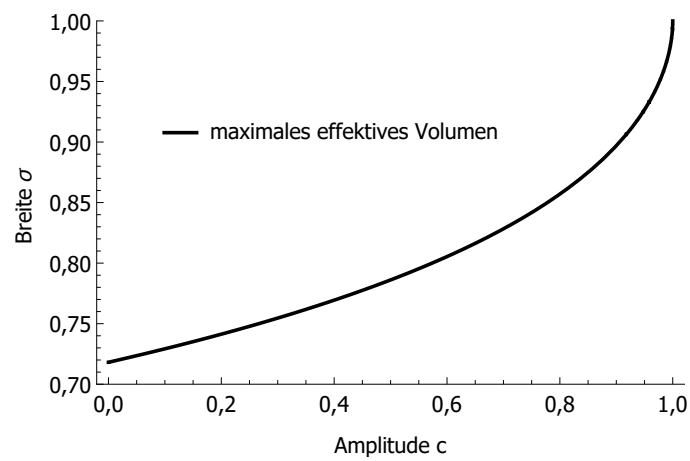


Abbildung C.4: Maximaler Volumenfaktor für das effektive Volumen $V_{\text{eff}}^{\sigma,c}$
 Die Bestimmung des maximalen effektiven Volumens bei einer gegebenen Amplitude c führt zu der dargestellten Kurve.

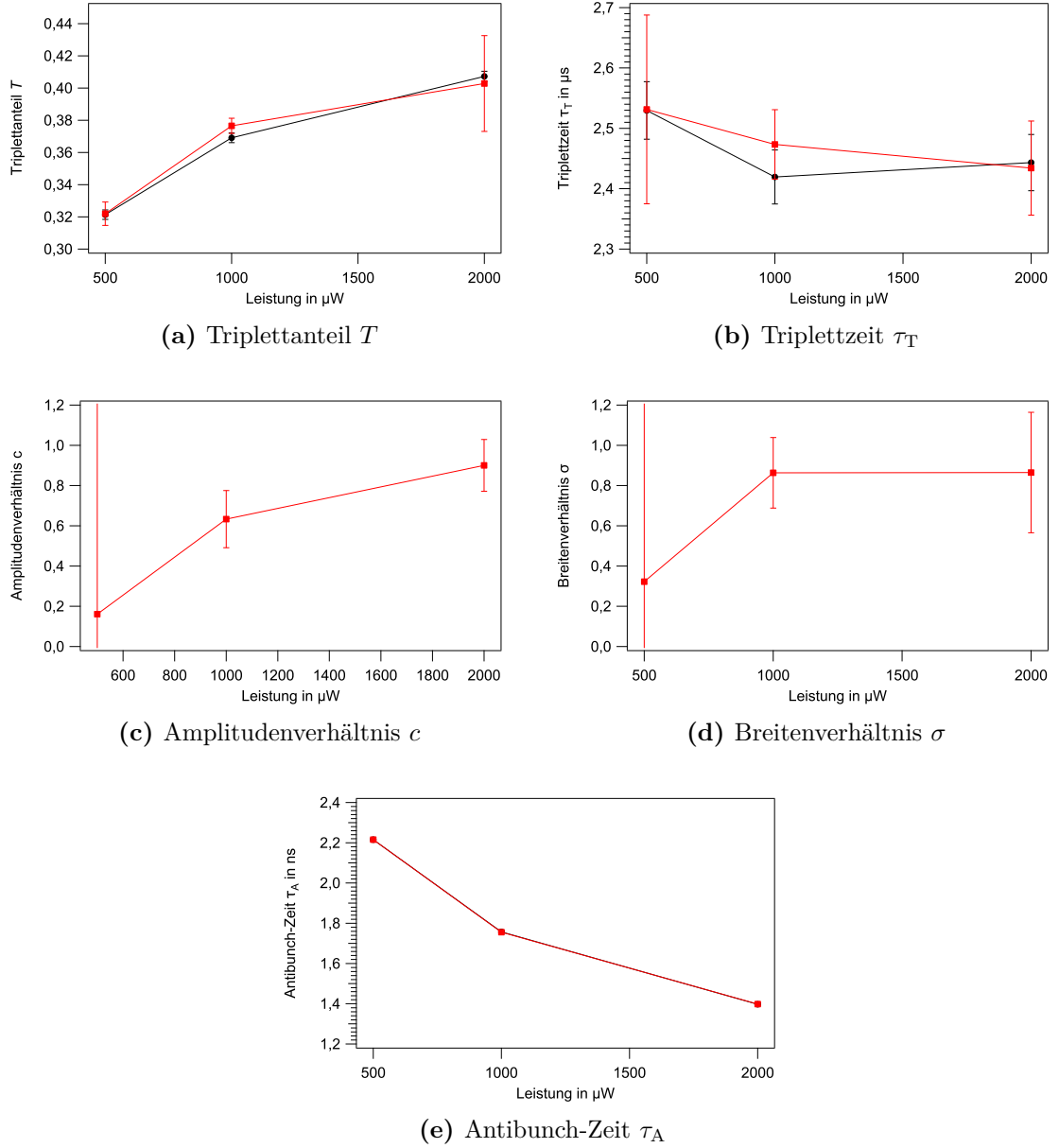


Abbildung C.5: 3D-Gauß- und Gauß-Differenz-Anpassungsfunktionen

Die angepassten Werte des (a) Tripletanteils, (b) der Tripletzeit und (e) der Antibunch-Zeit stimmen bei beiden Anpassungsmodellen im Rahmen der Fehler überein. Das steigende (c) Amplitudenverhältnis und (d) Breitenverhältnis resultiert aus der mit der Anregungsleistung größer werdenden Abweichung der MDF vom einfachen Gaußvolumen und führt zu den in den Abbildungen 4.13c und 4.13d dargestellten konstanten Werten für die mittlere Molekülzahl und Diffusionszeit. Die Verbindungslinien der Punkte der Abbildungen dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

C.2 Lebensdauermessungen

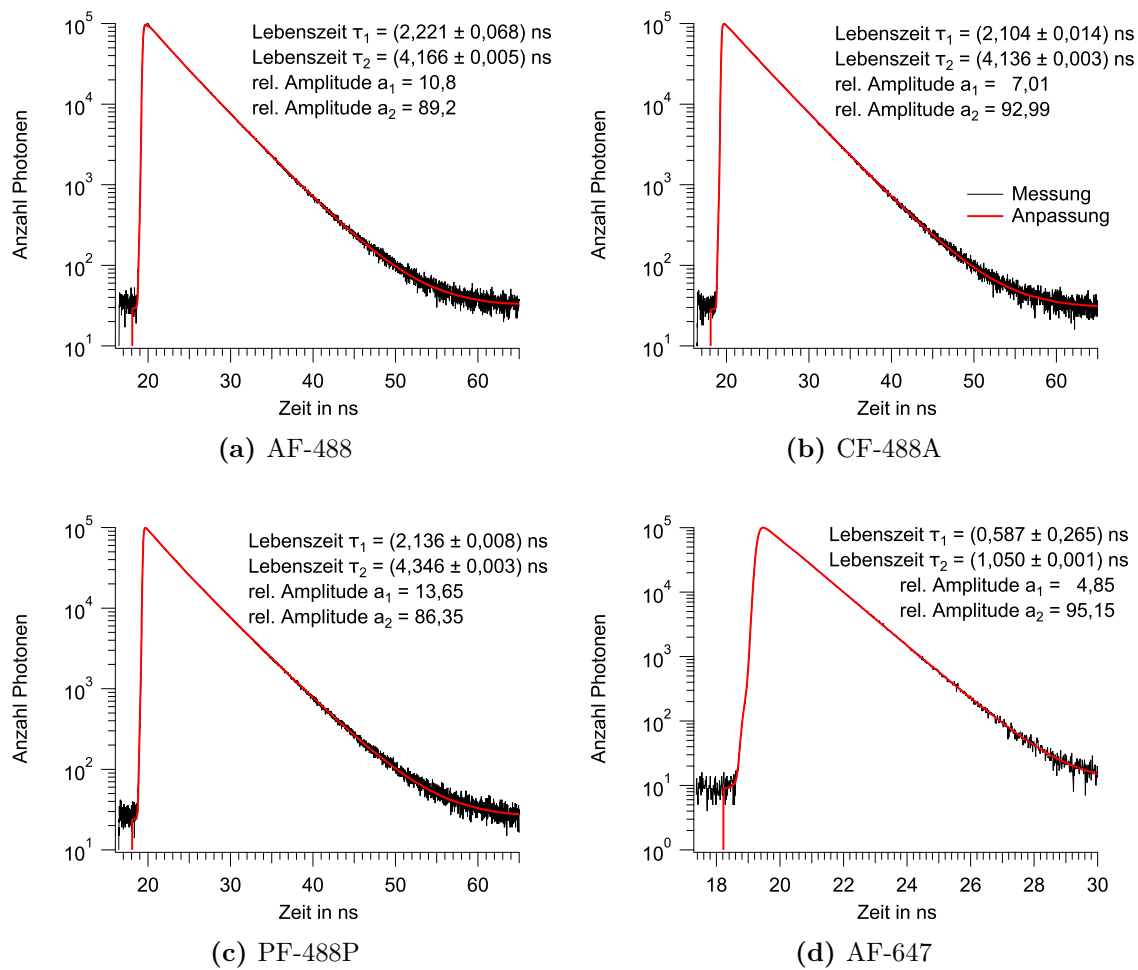


Abbildung C.6: Fluoreszenzlebensdauer unterschiedlicher Fluorophore in PBS

Dargestellt sind die in PBS durchgeführten TCSPC-Lebenszeitmessungen der Fluorophore (a) AF-488, (b) CF-488A, (c) PF-488P und (d) AF-647.

C.3 Immobilisierte Moleküle

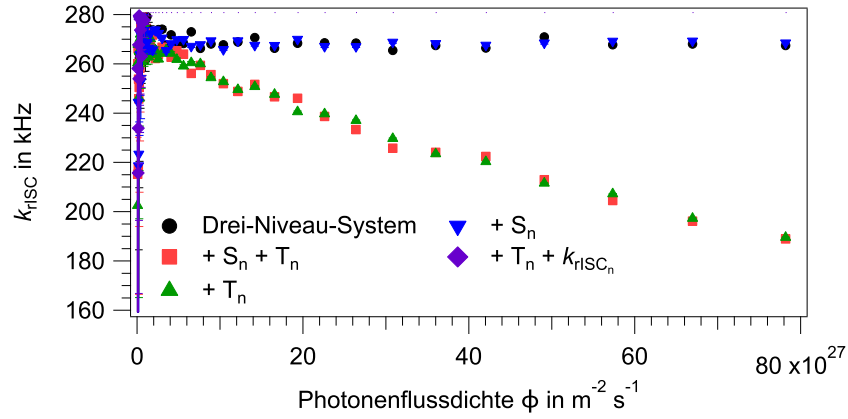


Abbildung C.7: Rück-Interkombination unterschiedlicher Niveaudiagramme

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Simulationen der Rück-Interkombination in den Singulett. Dabei ist die Ordinate nicht für die hohen Ratenwerte der beschleunigten Rück-Interkombination (Vier-Niveau-System mit k_{rISC_n} , violett) skaliert, sodass das Absinken der Rück-Interkombination beim Vier-Niveau-System mit höherem Triplettzustand (grün) und Fünf-Niveau-System mit höherem Triplett- und Singulettzustand (rot) besser zu erkennen ist.

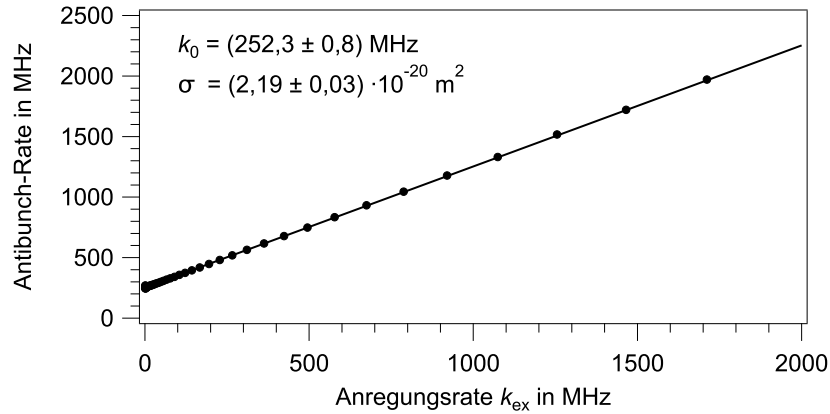


Abbildung C.8: Antibunching des Dreier-Niveau-Systems

Der Anstieg der Antibunch-Rate der Messung entspricht der Anregungsrate. Das führt bei hohen Anregungsraten zu einem deutlichen Abfall des apparenten Antibunches in der Korrelationsanalyse.

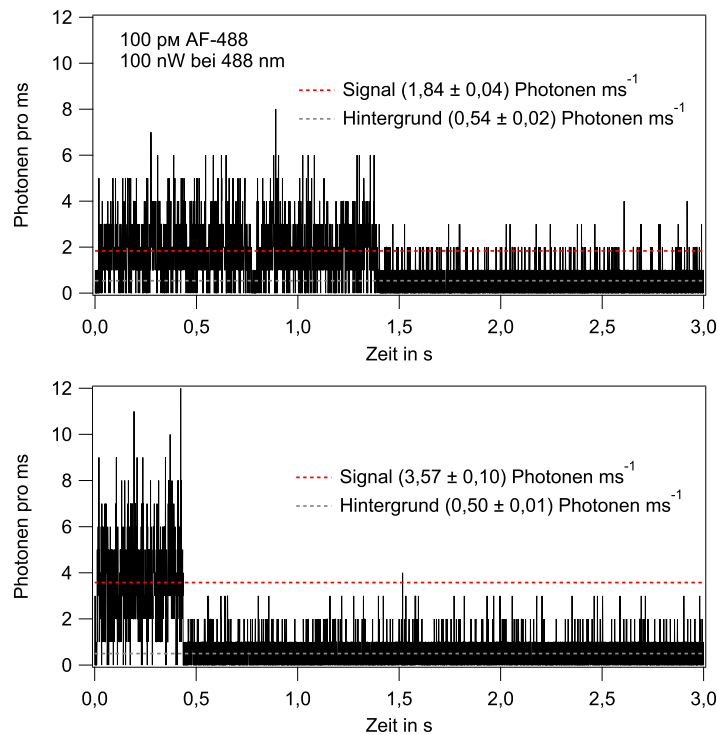


Abbildung C.9: Transiente Intensität einzelner AF-488-Moleküle

Dargestellt ist jeweils die transiente Intensität eines exemplarisch ausgewählten, auf dem Deckglas immobilisierten Moleküls im Laserfokus. Die geringe Anregungsleistung (100 nW in der Objektivapertur) führt zu einem Signal (rot gestrichelt), das nur schwach über dem Hintergrund (grau gestrichelt) liegt. Dennoch fällt auf, dass es bereits im Bereich einer Sekunde zur Photozerstörung kommt.

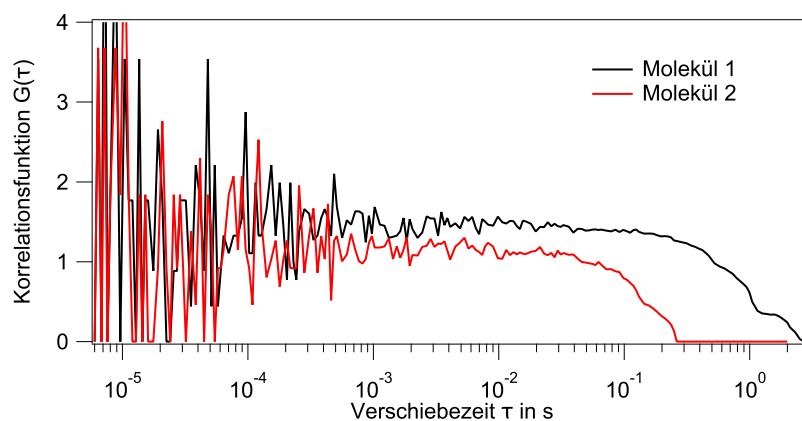


Abbildung C.10: Korrelationsfunktion der AF-488-Moleküle

Dargestellt ist die Autokorrelation der in Abbildung C.9 dargestellten transienten Intensitäten. Aufgrund des frühen Bleichens der Moleküle und der damit verbundenen geringen Anzahl an Signalphotonen, ist die Korrelationsfunktion in beiden Fällen bei kurzen Zeiten (< ms) nicht auswertbar.

C.4 Photophysik frei diffundierender Fluorophore

Abbildung C.15 zeigt einen Stern-Volmer Graphen unter der Annahme, dass lediglich ein Teil der Fluorophore für Lösungsreaktionen zugänglich ist. Damit lautet nach Lakowicz [57] die Fluoreszenz F unter einer konzentrationsabhängigen Löschung der zugänglichen Fluorophore a und nicht zugänglichen Fluorophore b :

$$F = \frac{F_a}{1 + K [Q]} + F_b \quad . \quad (\text{C.3})$$

Damit kann die Stern-Volmer Gleichung mit der Fluoreszenzdifferenz ΔF der ungelöschten Fluoreszenz F_0 und gelöschten Fluoreszenz nach Gleichung (C.3) gemäß [57]

$$\Delta F = F_0 = \frac{F_a}{1 + K [Q]} + F_b \quad (\text{C.4})$$

geschrieben werden. Analog zu Gleichung (2.50) lautete damit die modifizierte Stern-Volmer Gleichung [57]

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad , \quad (\text{C.5})$$

mit einem Anteil zugänglicher Moleküle f_a der Form

$$f_a = \frac{F_a}{F_b + F_a} \quad . \quad (\text{C.6})$$

Tabelle C.1: Zusammenfassung der Raten und Koeffizienten

Dargestellt sind die Raten und Koeffizienten der Lösungsvorgänge, wenn der Interaktionsradius jeweils über die Stokesradien bestimmt wird. Der Diffusionskoeffizient der gelösten Sauerstoffmoleküle D_{O_2} und der durch die O_2 -Löslichkeitsänderung verursachte Anteil der Löschraten erfährt keine Änderung.

c(Glycerin) in M	D_{O_2} in $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$	k_k in $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{qS} \rightarrow \text{S}, \text{T}}$ in MHz	$k_{\text{qT} \rightarrow \text{S}}$ in MHz	O_2 -Anteil in %
0	$2,09 \pm 0,27$	$1,13 \pm 0,17$	$3,21 \pm 0,49$	$1,43 \pm 0,22$	0
0,68	$1,85 \pm 0,24$	$1,29 \pm 0,16$	$3,45 \pm 0,45$	$1,53 \pm 0,20$	$5,6 \pm 1,5$
1,03	$1,73 \pm 0,22$	$1,24 \pm 0,19$	$3,23 \pm 0,50$	$1,43 \pm 0,22$	$8,5 \pm 2,6$
2,05	$1,42 \pm 0,18$	$1,07 \pm 0,20$	$2,53 \pm 0,50$	$1,13 \pm 0,22$	$16,9 \pm 6,6$
4,10	$0,87 \pm 0,11$	$0,65 \pm 0,10$	$1,21 \pm 0,20$	$0,54 \pm 0,09$	$34,2 \pm 11,0$

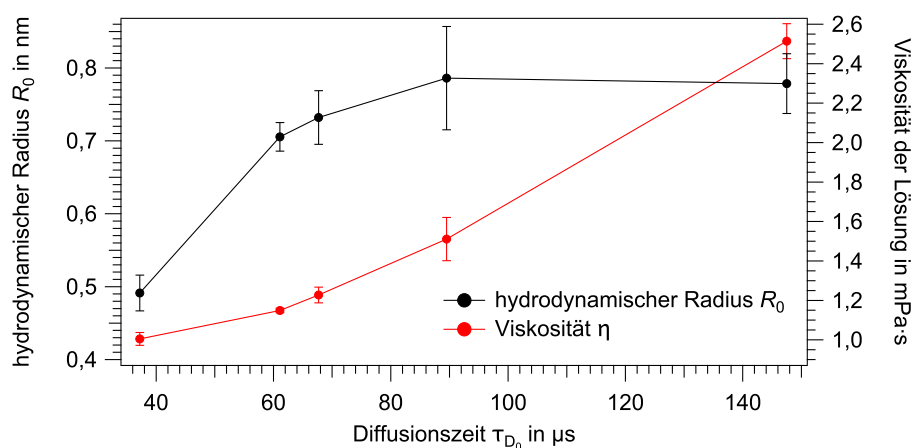


Abbildung C.11: Stokesradius und Viskosität bei unterschiedlichen τ_{D0}

Der hydrodynamische Radius (schwarz) ergibt sich aus der Stokes-Einstein-Gleichung (siehe Gleichung (6.2)) bei $(20,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ und steigt von $(4,9 \pm 0,2) \text{ \AA}$ auf $(7,8 \pm 0,4) \text{ \AA}$. Die Viskosität (rot) steigt in dem beobachteten Bereich ebenfalls und beträgt bei 30 % Glycerinanteil das 2,5fache des Wertes in Wasser. Die Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

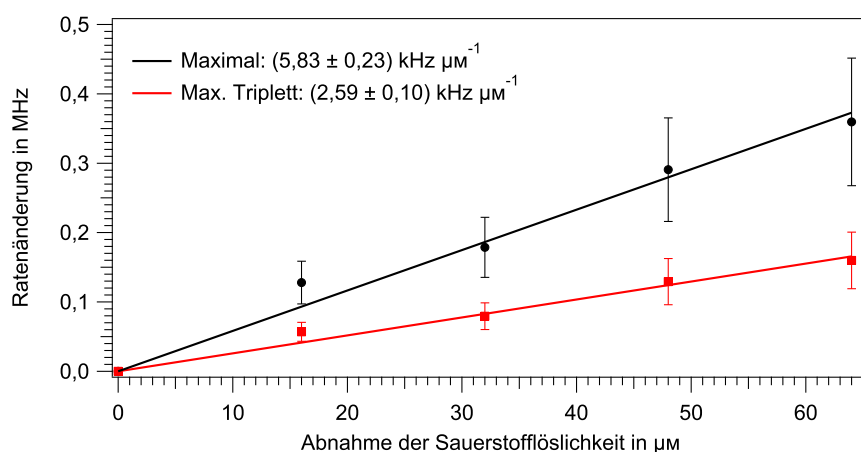


Abbildung C.12: Einfluss der Sauerstofflöslichkeit

Dargestellt ist die Differenz der Löschrates bei steigender Viskosität und unter einem zusätzlichen Einbezug der geringeren Sauerstofflöslichkeit in Glycerin. Dabei ist die maximale Löschrates (schwarz) und die verringerte Löschrates der möglichen Triplett-Löschungen (rot) zu sehen.

Tabelle C.2: Fluoreszenzlebensdaueremessung von AF-488 bei Glycerinzugabe

Die Fluoreszenzlebensdauern wurden am FluoroHub (Horiba Jobin Yvon GmbH) gemessen.

Glycerinkonzentration in M	Fluoreszenzlebensdauer		rel. Amplitude	
	τ_1 in ns	τ_2 in ns	a_1	a_2
0,7	$2,029 \pm 0,009$	$4,134 \pm 0,002$	10,59	89,41
1,5	$2,025 \pm 0,009$	$4,094 \pm 0,003$	10,23	89,77
3,0	$1,990 \pm 0,011$	$3,986 \pm 0,002$	8,21	91,79
6,0	$1,942 \pm 0,014$	$3,856 \pm 0,002$	6,32	93,68

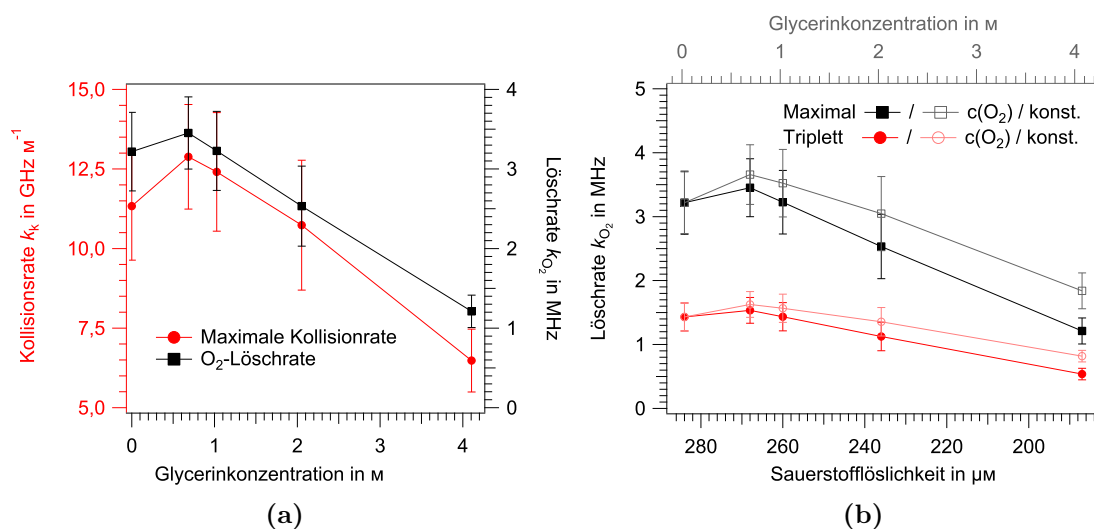


Abbildung C.13: Kollisions- und Löschraten nach Tabelle C.1

(a) Die Kollisionsrate k_k (rot) gibt die konzentrationsabhängige Frequenz des Zusammentreffens der Farbstoff- und Sauerstoffmoleküle an. Die effektiv beobachtbare Löschrates k_{O_2} (schwarz) ist für eine Löschrates-Effizienz von 100 % aufgetragen. (b) Die Löschrates der Tripletts (rot) beträgt aufgrund der Redissoziation des Quintett-Komplexes in seine Edukte lediglich 4/9 der möglichen Löschrates (schwarz). Wird die verringerte Sauerstofflöslichkeit in der Glycerin-Wasser Probe außer Acht gelassen, steigen die Löschrates (hellgrau und -rot) entsprechend. Die Verbindungslinien der Punkte in (a) und (b) dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

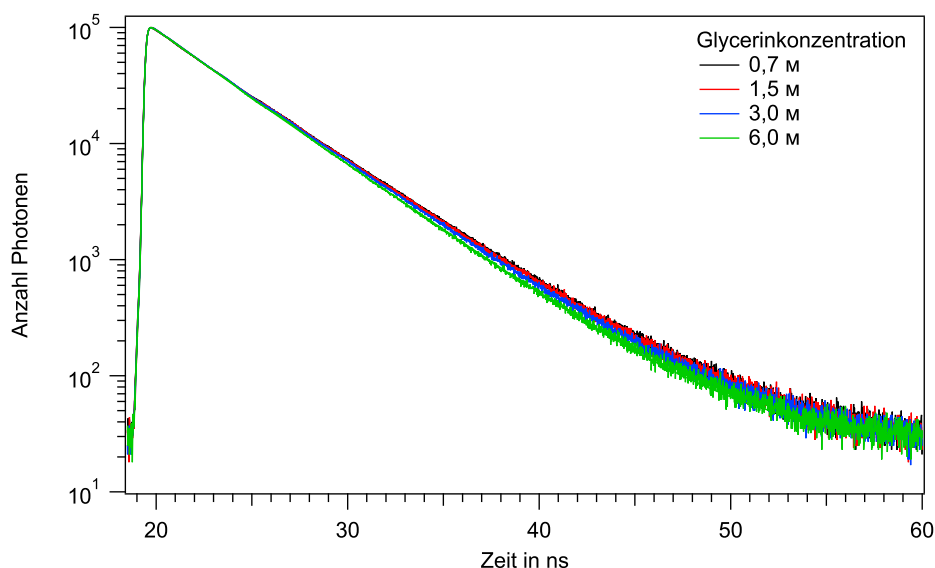


Abbildung C.14: Fluoreszenzlebensdauer messung von AF-488 bei Glycerinzugabe

Dargestellt sind die Lebensdauer messungen des Fluorophors AF-488 in PBS unter unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen. Dabei ist ein klarer Abfall der Fluoreszenzlebensdauer zu erkennen. Die Anpassung mit einer Zwei-Komponenten-Funktion führt zu den in Tabelle C.2 dargestellten Lebensdauern und Amplituden.

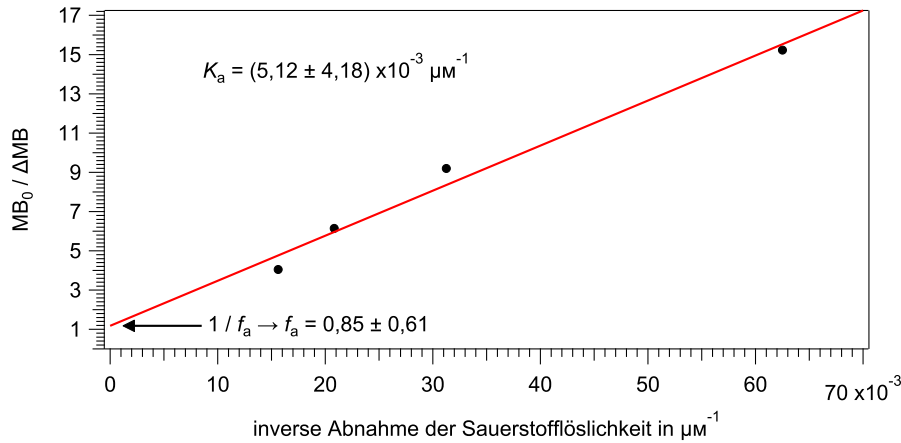


Abbildung C.15: Stern-Volmer Graph für teilweise zugängliche Löschung

Dargestellt ist der Stern-Volmer Graph nach Gleichung (C.5) für die Annahme, dass der betrachtete Lösungsprozess von zwei Populationen in der Probe abhängt. Dabei ist die Population F_a zugänglich für die Lösungsreaktion und F_b nicht. Das Verhältnis dieser Populationen wird durch f_a (Anteil der zugänglichen Moleküle) bestimmt und beträgt $0,85 \pm 0,61$. Die Stern-Volmer Konstante K_a für die zugängliche Population lautet entsprechend $(5,12 \pm 4,18) \cdot 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$.

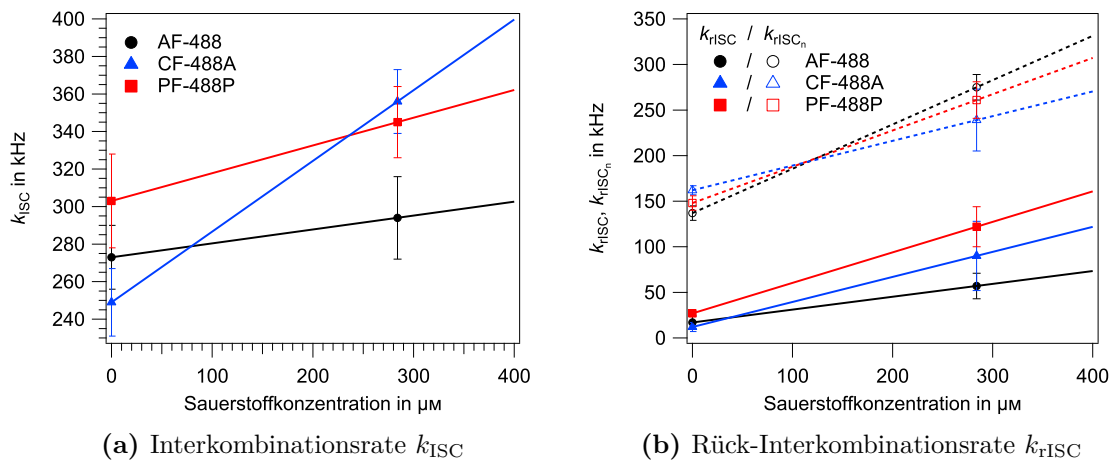


Abbildung C.16: Interkombinationsraten unter normaler Atmosphäre und in Argon

Da lediglich zwei Messwerte je Fluorophor ($0 \mu\text{M}$ Sauerstoff und $284 \mu\text{M}$ Sauerstoff) zur Bestimmung der jeweiligen Ratenkonstante vorhanden sind, haben die erhaltenen Ratenkonstanten große Fehler und geben eher den tendenziellen Sauerstoffeinfluss denn eine genaue Ratengröße an. (a) Die Raten der linearen Anpassung für die Interkombination K_{ISC} lauten für das AF-488 $(0,74 \pm 1,37) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (schwarz), für das CF-488A $(1,48 \pm 1,76) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (blau) und PF-488P $(3,77 \pm 1,23) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (rot). (b) Die Gesamtraten der linearen Anpassung für die Rück-Interkombination K_{Triplet} lauten für das AF-488 $(6,27 \pm 1,51) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (schwarz), für das CF-488A $(7,33 \pm 1,84) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (blau) und PF-488P $(5,46 \pm 2,88) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (rot). Die Ratenkonstanten der Rück-Interkombination aus dem Grundzustand (durchgezogene Linie, volle Symbole) und den höheren Zuständen (gestrichelte Linie, leere Symbole) sind in Tabelle 6.5 dargestellt.

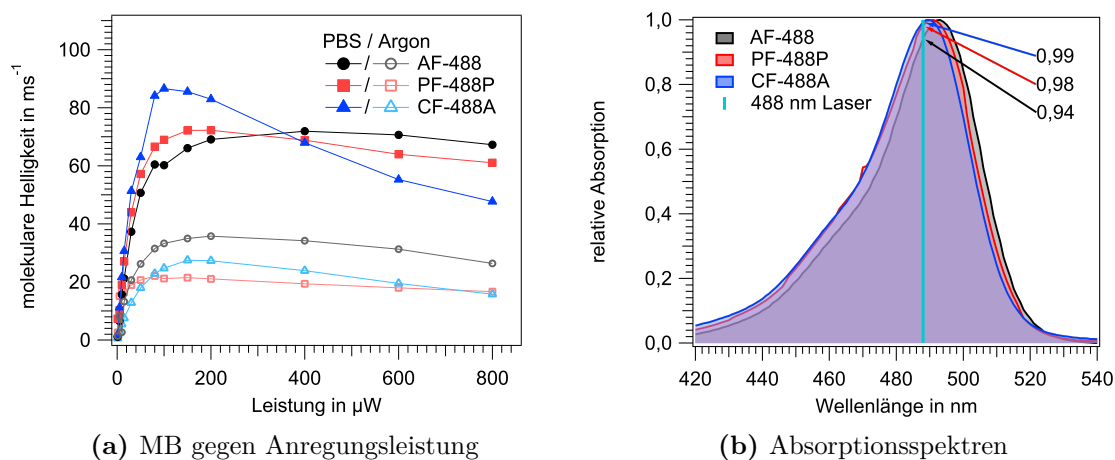
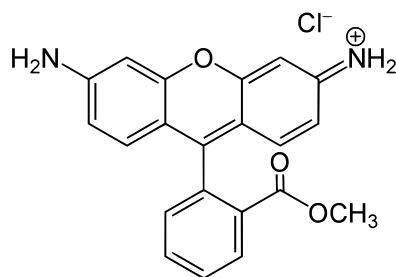
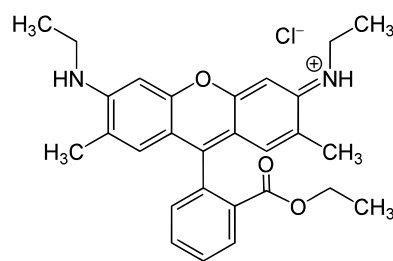


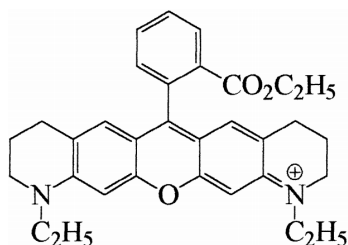
Abbildung C.17: Molekulare Helligkeit und wellenlängenabhängige Absorption
 (a) Es ist deutlich zu erkennen, dass die MB unter Argon sinkt. Dabei reagiert das CF-488A mit einem besonders starken Abfall. Die Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung. (b) Die Absorptionsspektren der betrachteten Fluorophore sind spektral nahezu identisch, was entsprechend der ebenfalls ähnlichen Extinktionskoeffizienten (siehe Tabelle 3.1) zu vergleichbaren Photonenflussdichten der Anregung bei 488 nm führt.



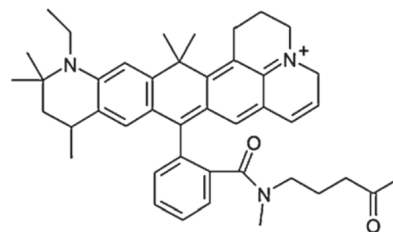
(a) Rh-123



(b) Rh-6G



(c) Rh-630



(d) Atto 647N

Abbildung C.18: Strukturformeln der Rhodamine und von Atto 647N
 Die Strukturformeln sind gemäß (a) Hersteller (Thermo Fisher, Invitrogen™), (b) PubChem [437], (c) Sauer et al. [383] und (d) Eggeling et al. [438] dargestellt.

Tabelle C.3: Parameter der Anpassung der MB mit Trolox und unter Argon

Aufgetragen sind die Werte der Anpassungen nach Gleichung (4.21) der in den Abbildungen 6.27 und 6.28 dargestellten Messungen. Abweichungen zu den in Tabelle 6.11 dargestellten Werten des AF-647 resultieren aus der hier nicht mit betrachteten Messreihe unter Argon mit ROXS. Die übrigen Werte weichen aufgrund der Unterschiede der globalen und der nicht globalen Anpassung ab. Die Abweichungen liegen im Bereich weniger Prozentpunkte.

	PBS		Trolox		Argon	
	ϕ_{sat_1} in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\sqrt{\phi_{\text{sat}_2}}$ in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	ϕ_{sat_1} in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\sqrt{\phi_{\text{sat}_2}}$ in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	ϕ_{sat_1} in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$\sqrt{\phi_{\text{sat}_2}}$ in $10^{27} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
AF-488	$1,2 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,7$	$17,0 \pm 2,2$
AF-647	$6,5 \pm 0,2$	$16,7 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,3$	$37,8 \pm 3,1$	$5,1 \pm 0,6$	$19,3 \pm 1,1$
sCy5	$5,2 \pm 0,6$	$10,6 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,3$	$33,6 \pm 5,6$	$2,8 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,5$

C.4.1 Alternative Formulierung für χ

Für

$$\begin{aligned}
 \chi &= \left[\left(\frac{k_{\text{rISO}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} + \frac{(k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}} + k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}} + k_{\text{rISC}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} \right)^2 \right. \\
 &\quad \left. - 4 \left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{iso}} k_{\text{rISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + \frac{\left(\frac{k_{\text{ex}} k_{\text{ISC}}}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} \right) k_{\text{rISO}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right) \right]^{1/2} \\
 &= \left(\frac{((k_{\text{ic}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}} + k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}} + k_{\text{rISC}}))^2}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{ic}} + k_{\text{rad}})^2} + \frac{k_{\text{rISO}}^2 k_{\text{ex,cis}}^2}{(k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{ic,cis}})^2} \right. \\
 &\quad - \frac{2((k_{\text{ic}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}} + k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} - k_{\text{iso}} + k_{\text{rISC}})) k_{\text{rISO}} k_{\text{ex,cis}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{ic}} + k_{\text{rad}}) (k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{ic,cis}})} \\
 &\quad \left. + \frac{-4k_{\text{ex}} k_{\text{iso}} (k_{\text{ex}} + k_{\text{ic}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{ic}} + k_{\text{rad}})^2} \right)^{1/2} \tag{C.7}
 \end{aligned}$$

mit

$$k_{\text{ex}}^2 (k_{\text{ISC}} + k_{\text{iso}})^2 = k_{\text{ex}}^2 (k_{\text{ISC}} - k_{\text{iso}})^2 + 4k_{\text{ISC}} k_{\text{iso}} k_{\text{ex}}^2 \tag{C.8}$$

folgt

$$\begin{aligned}
 \chi &= \left[\left(\frac{(k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}) k_{\text{rISC}} + k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} - k_{\text{iso}} + k_{\text{rISC}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} - \frac{k_{\text{rISO}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)^2 \right. \\
 &\quad \left. + \frac{4k_{\text{ex}}^2 k_{\text{ISC}} k_{\text{iso}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2} \right]^{1/2} \\
 &= \left[\left(\frac{k_{\text{ex}} (k_{\text{ISC}} - k_{\text{iso}})}{k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}}} + k_{\text{rISC}} - \frac{k_{\text{rISO}} k_{\text{ex,cis}}}{k_{\text{ex,cis}} + k_{\text{IC,cis}}} \right)^2 + \frac{4k_{\text{ex}}^2 k_{\text{ISC}} k_{\text{iso}}}{(k_{\text{ex}} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}})^2} \right]^{1/2} . \tag{C.9}
 \end{aligned}$$

C.4.2 Isomerisierung und photoprotektive Additive

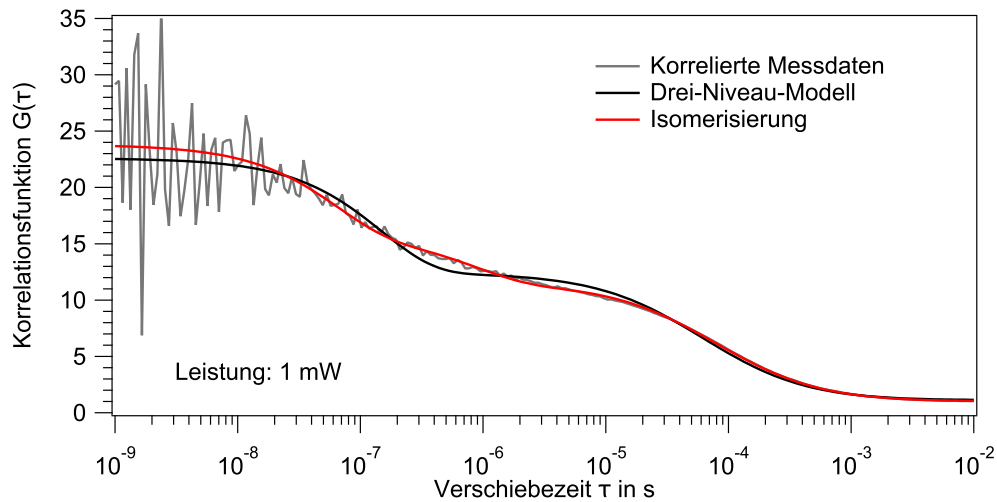


Abbildung C.19: Korrelationskurve von AF-647 mit Anpassungen bei 1 mW

In grau dargestellt ist die Autokorrelation von AF-647 bei einer Leistung von 1 mW. Die Anpassung des Drei-Niveau-Systems nach Gleichung (2.87) ist in schwarz zu sehen und gibt den Verlauf der Kurve nur unzureichend wieder. Die in rot dargestellte Anpassung nach Gleichung (6.41) hingegen stimmt gut mit dem Verlauf überein.

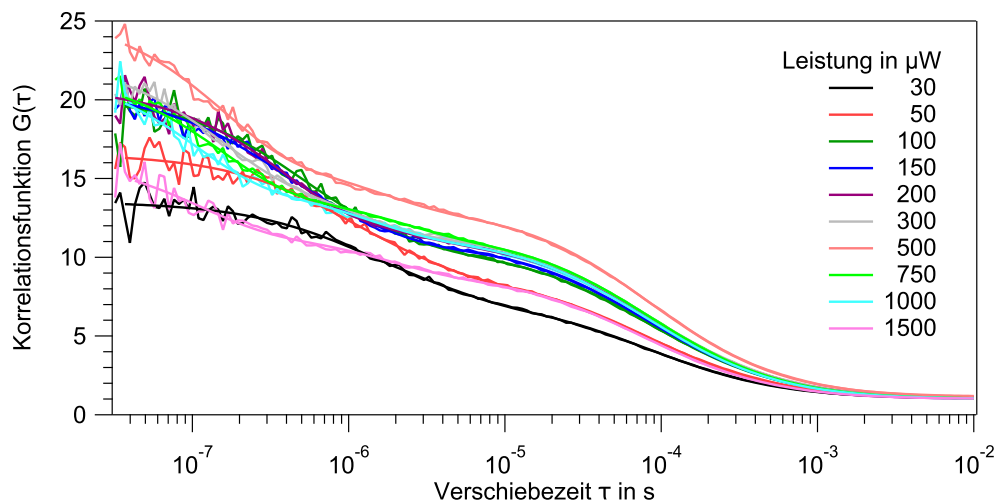


Abbildung C.20: Autokorrelationen und Anpassungen von AF-647

Dargestellt sind die Autokorrelationen und Anpassungen (gemäß Gleichung (6.41)) des AF-647 bei Leistungen von 30 μW bis 1500 μW .

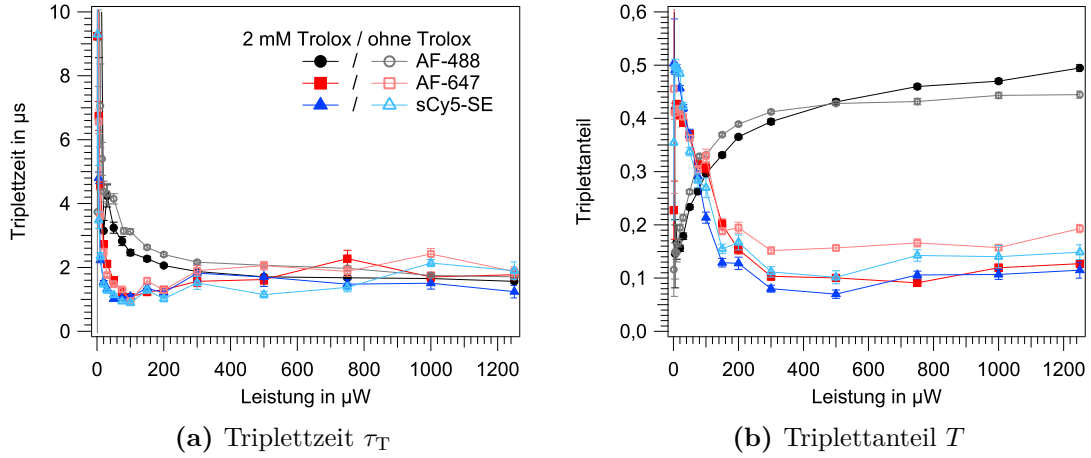


Abbildung C.21: Tripletzeit und Tripletanteil bei der Zugabe von Trolox in PBS

Dargestellt ist (a) die Tripletzeit und (b) der Tripletanteil der Cyaninfarbstoffe sCy5 (blaue Dreiecke) und AF-647 (rote Rechtecke), sowie des Xanthenderivats AF-488 (schwarze Kreise) in PBS (helle, leere Symbole) und in PBS mit 2 mM Trolox (dunkle, volle Symbole). Die Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

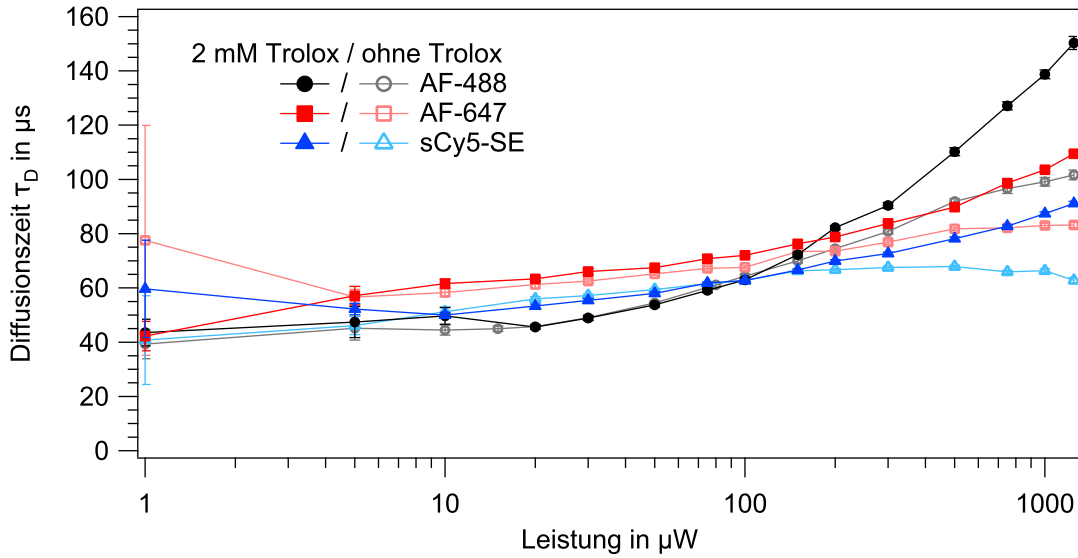


Abbildung C.22: Diffusionszeit unter der Zugabe von Trolox in PBS

Bei hohen Leistungen steigt die Diffusionszeit τ_D mit 2 mM Trolox (dunkle, volle Symbole) deutlich stärker an als in PBS ohne Additiv (helle, leere Symbole). Die Diffusionskoeffizienten der Fluorophore liegen bei $\tau_{D,AF-488} = 435 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ [286], $\tau_{D,AF-647} = 250 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ [439] und $\tau_{D,Cy5} = 250 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ [145]. Nach Loman [440] lauten die Diffusionskoeffizienten von AF-647 und Cy5 abweichend bei 25 °C durch 2fFCS bestimmt $\tau_{D,AF-647} = (325 \pm 10) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $\tau_{D,Cy5} = (369 \pm 9) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

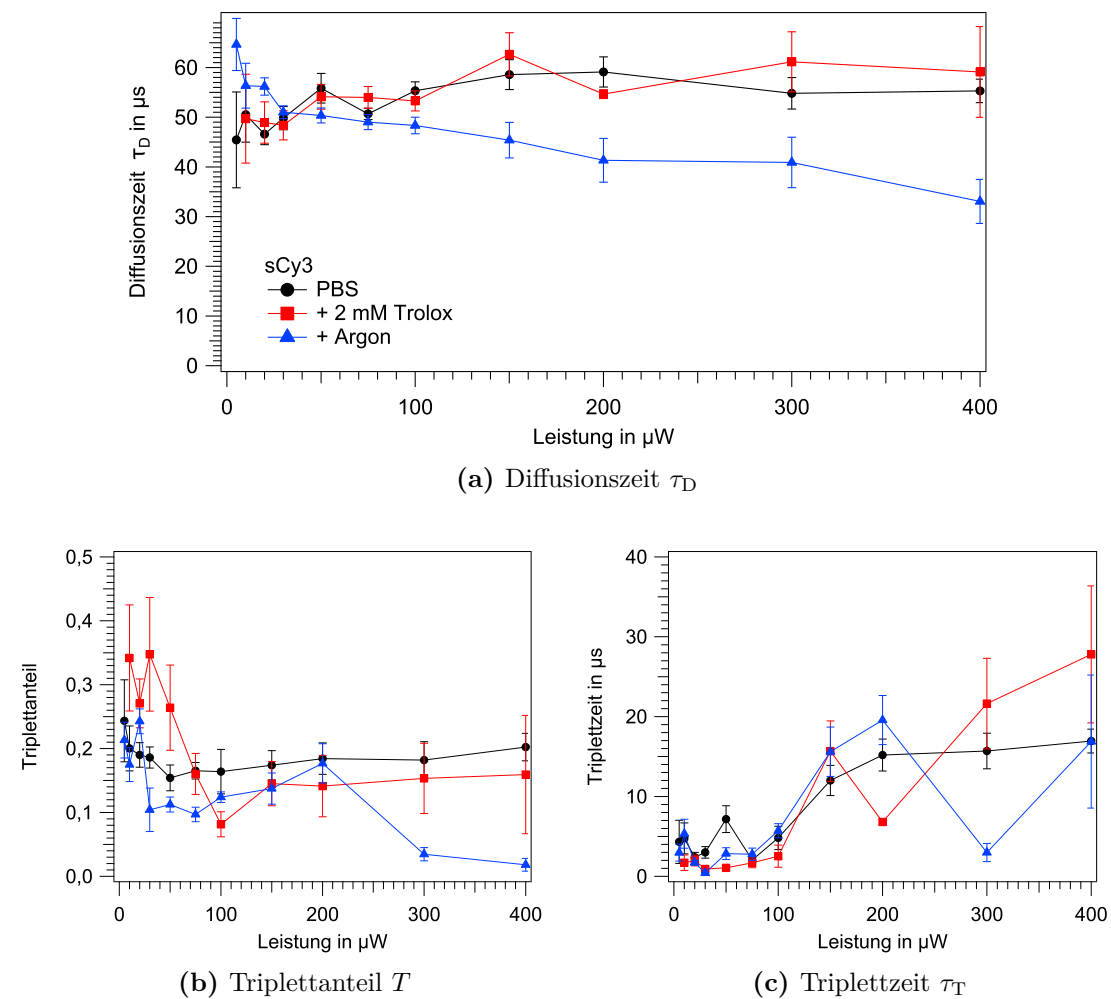


Abbildung C.23: Diffusionszeit und Triplettparameter von sCy3

Dargestellt ist (a) die Diffusionszeit (b) der Triplettanteil und (c) die Triplettzeit des Cyaninfarbstoffes sCy3 in PBS (schwarze Kreise), in PBS mit 2 mM Trolox (rote Rechtecke) und in PBS mit Argon (blaue Dreiecke). Die Verbindungslinien der Punkte dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

C.5 Benchmarking durch Sättigungsmessungen

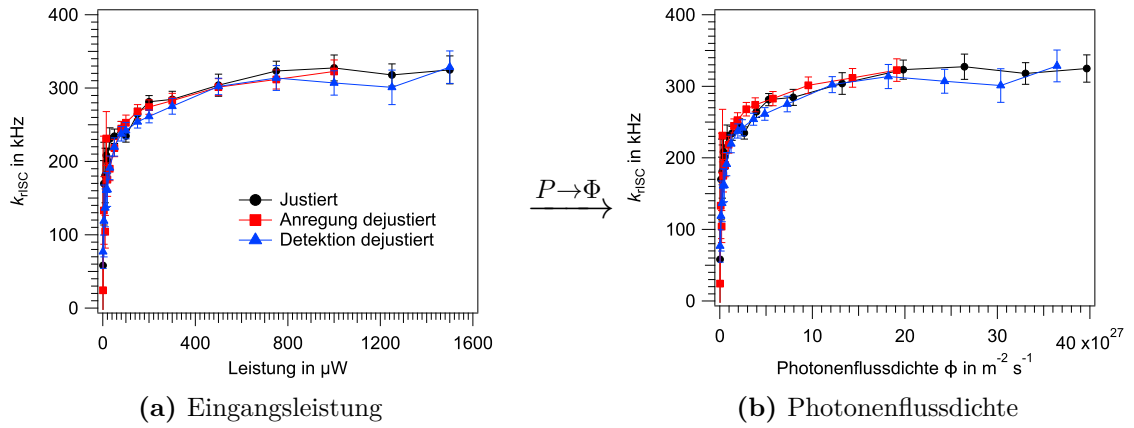


Abbildung C.24: Rück-Interkombinationsrate bei Dejustage

(a) Es sind keine systematischen Änderungen der Rück-Interkombinationsrate zwischen den Messreihen erkennbar. (b) Die Darstellung gegen die Photonenflussdichte gemäß Gleichung (7.1) führt ebenfalls zu keinen deutlichen Abweichungen. Die Verbindungslinien der Punkte in (a) und (b) dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

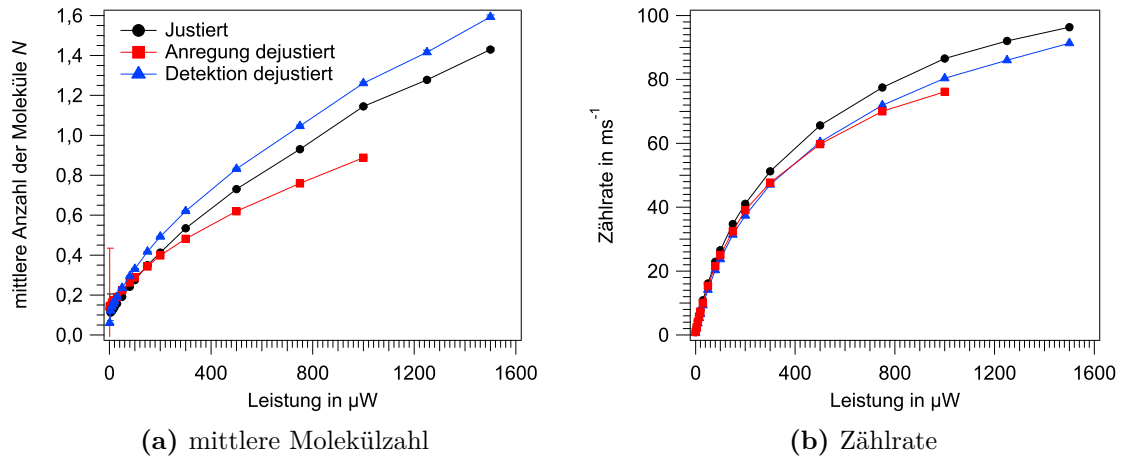


Abbildung C.25: Molekülzahl und Zählrate bei Dejustage

(a) Die mittlere Anzahl der Moleküle N steigt entsprechend Abschnitt 6.2.1 mit steigender Leistung (vgl. auch Abbildung 7.2). Unterschiede ergeben sich aus Abweichungen der Probenkonzentration (z. B. durch Pipettierfehler kleiner Volumina) und Unterschiede des effektiven Volumens (siehe Abschnitt 7.1). (b) Die Zählrate steigt mit der Anregungsleistung und sättigt durch die in Kapitel 4 besprochen Effekte. Die Verbindungslinien der Punkte in (a) und (b) dienen der Übersicht und haben keine physikalische Bedeutung.

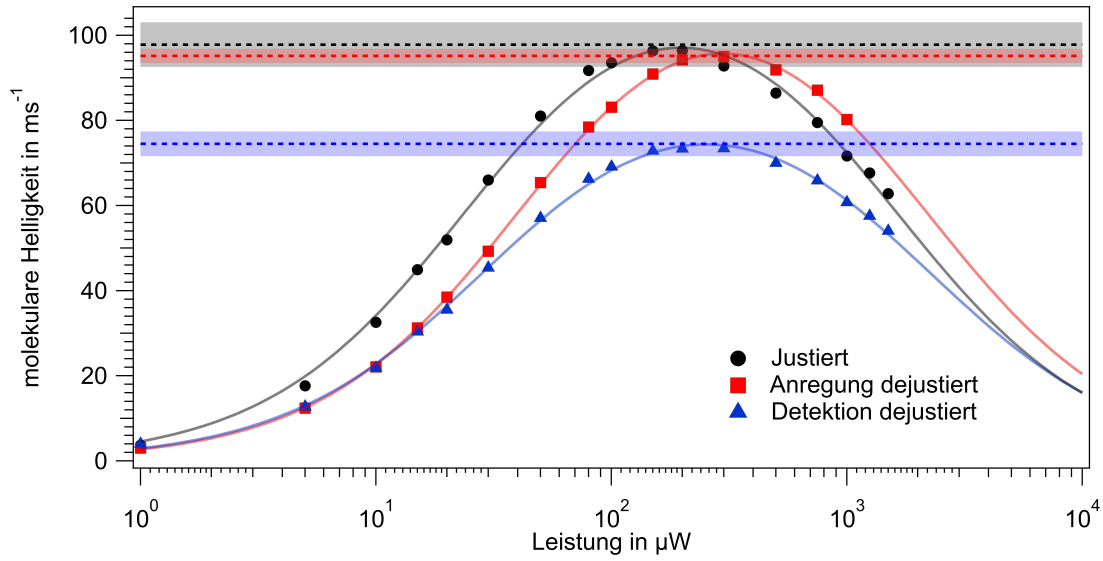


Abbildung C.26: MB bei Dejustage der Anregung und der Detektion

Zu sehen ist die gegen die Anregungsleistung dargestellte MB. Die maximale MB (gestrichelte Linien) unter dejustierter Anregung (rote Rechtecke) liegt mit $(95 \pm 2) \text{ ms}^{-1}$ nahezu bei den gleichen Wert wie ohne Relaisoptik $(98 \pm 5) \text{ ms}^{-1}$ (schwarze Kreise). Wird die Relaisoptik im Detektionspfad positioniert, sinkt die maximale MB deutlich auf $(75 \pm 3) \text{ ms}^{-1}$ (blaue Dreiecke). Die hellen durchgezogenen Linien geben die Anpassung der Daten nach Gleichung (4.21) bzw. Gleichung (B.11) an.

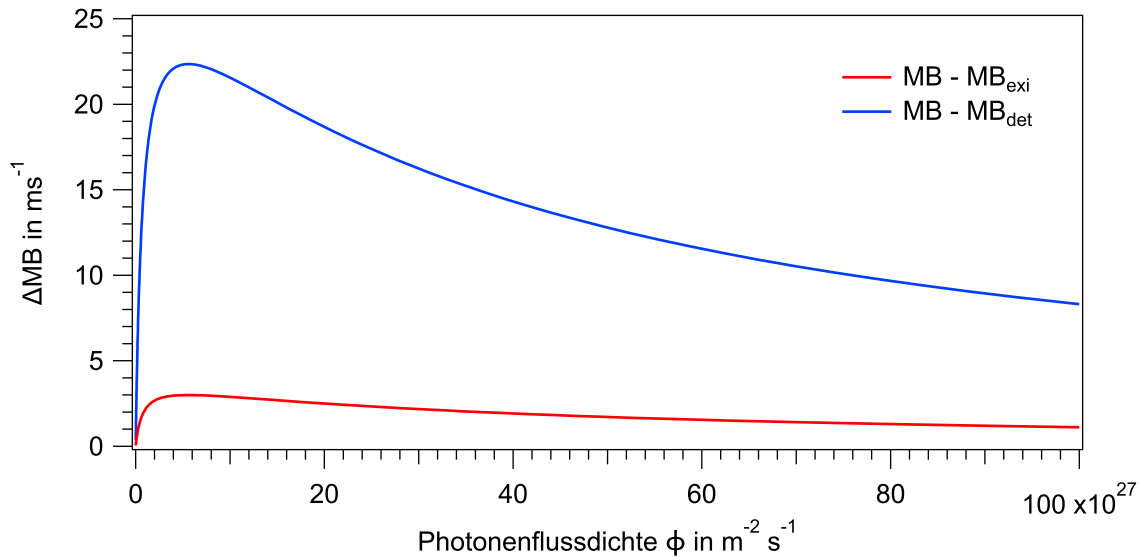


Abbildung C.27: Differenz der MB bei Dejustage der Anregung und Detektion

Dargestellt ist die Differenz der MB ohne Relaisoptik und mit Relaisoptik in der Anregung (rot) und Detektion (blau).

Anhang D

Protokolle und Code

D.1 ROXS aus Trolox und Trolox-Chinon

Verwendete Chemikalien:

- phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (0,01 M entspricht 0,0027 M KCl und 0,137 M NaCl mit einem pH-Wert von 7,4 bei 25 °C)
- 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)
- Farbstoff:

AF-488, AF-647, sCy3, sCy5

Das in Methanol gelagerte Trolox (100 mM) wird in PBS gelöst und auf eine Konzentration von 4 mM gebracht. Anschließend wird die Trolox-Lösung 10 min mit UV-Licht (Herolab, NU-4, 254 nm+365 nm, 4 W-Tube) zur Erzeugung des Trolox-Chinons bestrahlt.

D.2 Thiol-reaktive Oberflächenimmobilisierung auf Deckglas

Reinigung der Deckgläser:

- Im Ofen für mindestens 3 h bei 450 °C bis 500 °C backen
- Gebrannte Deckgläser in der Deckglasbox aufbewahren

Silanisierung mithilfe von Aceton¹:

- Inkubieren der Deckgläser in Aceton (in den Deckglashaltern) – 10 min (die ersten 2 min unter Ultraschall)
- Ein Becherglas mit 3 % APTES² (mit einer Spritze mit Nadel entnehmen) in Aceton vorbereiten
- Die Deckgläser direkt aus dem Aceton in die APTES-Lösung transferieren
- Mindestens für 5 min, aber nicht länger als 10 min inkubieren (eine längere Inkubation erhöht die Dicke und Heterogenität der Silanschicht)
- Die letzten 2 min unter Ultraschall inkubieren
- Etwa 1 min mit Aceton spülen
- Die Deckgläser (mit Halter) 3 mal für etwa 10 s in jeweils frisches Reinstwasser (z. B. Millipore) tauchen
- In einer Vakuumkammer (Unterdruck durch eine Wasserstrahlpumpe ist ausreichend) für 1 h bis 3 h (oder über Nacht) aushärten
- Direkt im Anschluss die PEGilierung durchführen. Die Deckgläser nicht über längere Zeiträume aufbewahren!

PEGilierung:

- Vorbereitung einer NHS-PEG/NHS-PEG-SH-Lösung mit 50 mM MOPS-Puffer bei pH 7,5
 - Lösen von 12 mg NHS-PEG³ (die Aliquots auf Raumtemperatur kommen lassen) in 70 µl Puffer
 - Lösen von 0,5 mg NHS-PEG-SH⁴ (die Aliquots auf Raumtemperatur kommen lassen) in der bereits gelösten PEG-Lösung
 - Für 1 min vortexen, dann für 1 min bis 2 min schallen

¹ ROTISOLV® ≥ 99,9 %, UV/IR-Grade, Roth

² (3-Aminopropyl)triethoxysilane 99 %, Sigma

³ O-[(N-Succinimidyl)succinyl-aminoethyl]-O'-methylpolyethylene glycol, Sigma

⁴ PG2-NSTH-3k, NANOCS (Tebu-bio)

- Bei voller Geschwindigkeit für 1,5 min herunter zentrifugieren
- Die Deckgläser für etwa 3 h in dunkler und feuchter Umgebung ruhen lassen
- Mit 72 ml PBS (pH 7,2) spülen
- 3 mal mit Reinstwasser spülen
- In einer Vakuumkammer trocknen lassen (siehe oben)

Immobilisierung thiol-reaktiver Moleküle:

- Silikondichtungen anbringen
- Für eine Maximierung der SH-Gruppen mit 1 mM TCEP supplementiertem PBS für 10 min inkubieren
- 3 mal mit PBS (Markierungspuffer) spülen
- 20 µl einer 50 pM bis 100 pM thiol-reaktiven (maleimid) Reagenz hinzugeben. Markierung für 1 h bei Raumtemperatur durchführen (abdecken um Lichteinstrahlung und Austrocknung zu vermindern)
- 5 mal mit etwa 50 µl PBS (Messpuffer) spülen

D.3 SensL HRM-TDC

```
typedef unsigned char    Ubyte;
typedef char            Sbyte;
typedef unsigned short   Uword;
typedef unsigned int     Ulong;
typedef double           Sdoub;
```

Listing D.1: Typedefs.h

```
Ulong ResyncRawToText(Sbyte *fraw, Sbyte *ftxt);
```

Listing D.2: InternFunctions.h

```
Ulong startModule(HANDLE *mHandle, Uword FSR);
void startFIFOTimeTagging(HANDLE *mHandle, Uword ESR, Ulong *Msize, Uword mode
    , Ulong *startTime);
void readFIFOtoBuffer(HANDLE *mHandle, Ulong Msize, Uword mode, Ulong *
    startTime, Ulong *buffer, Ulong memsize, Ulong stopTime, Ulong *FFc, Ulong *
    total);
void safeBuffToFile(Ulong *buffer, Ulong total, Sbyte *fname, Uword convert);
```

Listing D.3: ExternFunctions.h

```
startModule(*mHandle, FSR)
{
    //Connect module.
    RefreshConnectedModuleList();
    moduleCount = GetConnectedModuleCount();
    if (moduleCount)
        GetConnectedModuleList(handleArr);
    else
        error = "module not found";
    *mHandle = handleArr[0];
    SetFrequencySelectionRegister(*mHandle, FSR);
}

startFIFOTimeTagging(*mHandle, ESR, *Msize, mode, *startTime)
{
    //Get memory size.
    GetMemorySize(*mHandle, Msize);
    *Msize = (Ulong)(*Msize / 4);

    //Start FIFO TimeTagging.
    RunFifoTimeTagging(*mHandle, ESR, 0, mode);
    *startTime = GetTickCount();
}

readFIFOtoBuffer(*mHandle, Msize, mode, *startTime, *buffer, memsize,
    stopTime, *FFc, *total)
{
```

```

static Ulong   c_tmp1, c_tmp2, count, done, wrp, j, k, bufferPos;
static Uword   i;

for (done = 0, count = *total, bufferPos = 0; !done; i++)
{
    // Do not use GetFIFOdata(). The HI and LO MEMORY WRITE registers
    // are not protected. To avoid an error:

    // 1. Read the register twice.
    GetWriteCountRegister(*mHandle, &c_tmp1)
    GetWriteCountRegister(*mHandle, &c_tmp2)

    // 2. If the LSB of the HI register is the same for both, use it.
    if ((c_tmp1 & 0x10000) != (c_tmp2 & 0x10000)) {

        // 2.1. If the LSBs are different, read again and use
        // this value.
        GetWriteCountRegister(*mHandle, &c_tmp1);
    }

    // 3. Check that wrap-round is real. Eventually read again.
    wrap = (Ulong)(c_tmp1 / 4);
    if (wrap < count) {
        GetWriteCountRegister(*mHandle, &c_tmp1);
    }

    // Convert the memory count into 32-bit words.
    count = (Ulong)(c_tmp1 / 4);

    // Check for a FIFO buffer wrap-round. If the memory counter is
    // less than the FIFO pointer, use 'Msize' to determine the
    // event counts. Otherwise the number of events is the count
    // minus FFc.
    if (*FFc > count)
    {
        j = Msize - *FFc;
        j = j + count;
    }
    else {
        j = count - *FFc;
    }

    // Only read events if more than 256 exist. If more than 256
    // events are available, read a multiple of 256 events
    // from the FIFO (leave rest in FIFO) and fix the buffer.
    if (j > 256)
    {
        k = (Ulong)(floor(j / 256));
        k = (Ulong)(k * 256);
        ReadFIFOmemory(*mHandle, (Uword)0x8032, 0, (Ulong)k, (

```

```

        Ubyte *)&buffer[bufferPos]));
    FixTimeTags(mode, k, (Ubyte *)&buffer[bufferPos]);
    *FFc += k;
    *FFc &= (Msize - 1);
    *total = count;
    bufferPos = bufferPos + k;
}

// Get the current time and if it is expired or the
// allocated buffer is full set the 'done' flag.
if ((GetTickCount() - *startTime) >= stopTime) {
    done = 1;
}
else
    if ((memsize - bufferPos) < Msize) {
        done = 1;
    }
}
*startTime = GetTickCount();
}

```

Listing D.4: Main.c

```

safeBufftoFile(*buffer, total, *fname, convert)
{
    static FILE      *fl;
    static Ulong     count;
    static Uword     length, i;

    for (i = 0; fname[i] && fname[i] != '.'; i++)
        length = i + 4;

    Sbyte* csv = (Sbyte*)malloc(length + 1);

    fopen_s(&fl, fname, "w+b");
    if (fl == NO_PTR)
        error;
    for (count = 0; count != total; count++)
    {
        fwrite(&buffer[count], 4, 1, fl);
    }
    fclose(fl);

    for (i = 0; fname[i] && fname[i] != '.'; i++)
        csv[i] = fname[i];
    csv[i++] = '.';
    csv[i++] = 'c';
    csv[i++] = 's';
    csv[i++] = 'v';
    csv[i++] = 0;
}

```

```

if (convert == 1)
{
    ResyncRawToText(fname, csv)
    {
        static Ulong    error;
        static Ulong    values[3], cnt, dMAC, dDIF, uMIC, uMAC;
        static Uword    Read2, chan, flag;
        static FILE     *fr, *ft;
        static Sdoub     s1, s2, pMIC[4], pMAC[4], micro, macro;
        static Sbyte     k;

        //Initialse the previous values.
        for (\mathbf{r}ead2 = 0, error = 0; Read2 != 4; Read2++)
        {
            pMIC[Read2] = 0;
            pMAC[Read2] = 0;
        }

        // Open the files.
        fopen_s(&fr, fraw, "r+b");
        if (fr == NULL)
            error = 2;
        if (!error)
            fopen_s(&ft, ftxt, "w+t");
        if (ft == NULL)
            error = 2;
        values[0] = 0;
        values[1] = 0;

        // Main loop to read in long pairs to determine time-tags.
        for (cnt = 1, Read2 = 2; Read2 == 2 && !error; cnt++)
        {

            // Read in the PAIR and create CHANNEL, MACRO and MICRO
            values .
            Read2 = (Uword)fread(values, 4, 2, fr);
            chan = (Uword)(values[0] & 3);
            macro = (Sdoub)values[1];
            micro = (Sdoub)(values[0] >> 2);
            uMIC = (Ulong)micro;
            uMAC = (Ulong)macro;

            // Fix channel in case end of file.
            if (\mathbf{r}ead2 != 2)
                chan = 0;

            // Get DELTA MACRO accounting for wrap-round.
            if (macro < pMAC[chan])
                s1 = (Sdoub)((4294967296 - pMAC[chan]) + macro);
            else

```

```

        s1 = (Sdoub)(macro - pMAC[chan]);
// Get rough MICRO value based on previous MICRO plus
// DELAT MACRO. 926.437 = 25ns / 26.9851ps. dDIFF is
// ULONG version of estimated new MICRO value. dMAC is
// the 4us frame count.
s1 = (Sdoub)(s1 * 926.437);
s1 = (Sdoub)(s1 + pMIC[chan]);
s1 = (Sdoub)(s1 / 148229.95);
dMAC = (Ulong)s1;
s2 = (Sdoub)dMAC;
s2 = (Sdoub)(s1 - s2);
s2 = (Sdoub)(s2 * 148229.95);
dDIF = (Ulong)s2;

// Set the flag for process 1 or more 4us frames.
k = ' ';
flag = 1;

// If no FRAME count then just calculte the delta time
// accounting for MICRO wrap-round and clear the flag.
if (dMAC == 0)
{
    flag = 0;
    if (micro > pMIC[chan])
        s1 = (Sdoub)((micro - pMIC[chan]) * 26.9851);
    else
        s1 = (Sdoub)((((148229.95 - pMIC[chan]) +
            micro) * 26.9851));
}

// If estimated MICRO is much larger than real MICRO
// then frame boundary is crossed so increment frame
// count.
else
{
    if (dDIF > uMIC)
    {
        dDIF = (Ulong)(dDIF - uMIC);
        if (dDIF > 90000)
        {
            dMAC++;
            k = '+';
        }
    }

// If MICRO is much larger than estimated MICRO then
// frame boundary not crossed so decrement frame count
// . If decrement causes no frame count then calculate
// detal time here and clear the flag.
else

```



```

{
    dDIF = (Ulong)(uMIC - dDIF);
    if (dDIF > 90000)
    {
        dMAC--;
        k = '-';
        if (dMAC == 0)
        {
            s1 = (Sdoub)((micro - pMIC[chan]) *
                26.9851);
            flag = 0;
        }
    }
}

// If there are frames then calculate total delta time
// here.
if (flag)
{
    dMAC--;
    s1 = (Sdoub)((148229.95 - pMIC[chan]) * 26.9851);
    s2 = (Sdoub)dMAC;
    s2 = (Sdoub)(s2 * 4000000);
    s2 = (Sdoub)(s2 + (micro * 26.9851));
    s1 = (Sdoub)(s1 + s2);
}

// Copy current MACRO and MICRO times to previous
// values.
pMIC[chan] = micro;
pMAC[chan] = macro;

//If not end of file save the time-tag.
if (\mathbf{r}ead2 == 2)
    fprintf(ft, "%t%-20d\t%-20d\t%-20d\t%-20.0f\t%
        c\n", cnt, chan, uMAC, uMIC, s1, k);
}

// Close the files.
if (fr)
    fclose(fr);
if (ft)
    fclose(ft);

return (error);
}
}

```

Listing D.5: SafeBuffer.c

Literaturverzeichnis

- [1] Wolfgang W. Osterhage. *Galileo Galilei: At the Threshold of the Scientific Age*. Springer-Verlag GmbH, Juni 2018. ISBN: 9783319917795.
- [2] Robert Hooke. *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon*. The Royal Society, 1665.
- [3] „A specimen of some observations made by a microscope, contrived by M. Leewenhoeck in Holland, lately communicated by Dr. Regnerus de Graaf.“ In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* Jg. 8, Nr. 94 (Jan. 1673), S. 6037–6038. DOI: 10.1098/rstl.1673.0017.
- [4] „Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, de nativae semine genitali animalculis“. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* Jg. 12, Nr. 142 (März 1677), S. 1040–1046. DOI: 10.1098/rstl.1677.0068.
- [5] E. Abbe. „Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung“. In: *Archiv für Mikroskopische Anatomie* Jg. 9, Nr. 1 (Dez. 1873), S. 413–468. DOI: 10.1007/bf02956173, 10.1007/bf02956174, 10.1007/bf02956175, 10.1007/bf02956176.
- [6] Sir George Gabriel Stokes. „On the Change of Refrangibility of Light“. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* Jg. 142 (1852), S. 463–562.
- [7] August Köhler. „Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht.“ In: *Zeitschrift für Wissenschaftliche Mikroskopie* Jg. 21 (1904).
- [8] Oskar Heimstädt. „Das Fluoreszenzmikroskop“. In: *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie* Jg. 28 (1911), S. 330–337.
- [9] T. Hirschfeld. „Optical microscopic observation of single small molecules“. In: *Applied Optics* Jg. 15, Nr. 12 (Dez. 1976), S. 2965. DOI: 10.1364/ao.15.002965.
- [10] E. Brooks Shera et al. „Detection of single fluorescent molecules“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 174, Nr. 6 (Nov. 1990), S. 553–557. DOI: 10.1016/0009-2614(90)85485-u.

- [11] W. Patrick Ambrose et al. „Single Molecule Fluorescence Spectroscopy at Ambient Temperature“. In: *Chemical Reviews* Jg. 99, Nr. 10 (Okt. 1999), S. 2929–2956. DOI: 10.1021/cr980132z.
- [12] Stefan W. Hell und Jan Wichmann. „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy“. In: *Optics Letters* Jg. 19, Nr. 11 (Juni 1994), S. 780. DOI: 10.1364/ol.19.000780.
- [13] E. Betzig et al. „Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution“. In: *Science* Jg. 313, Nr. 5793 (Sep. 2006), S. 1642–1645. DOI: 10.1126/science.1127344.
- [14] Samuel T. Hess, Thanu P.K. Girirajan und Michael D. Mason. „Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy“. In: *Biophysical Journal* Jg. 91, Nr. 11 (Dez. 2006), S. 4258–4272. DOI: 10.1529/biophysj.106.091116.
- [15] Michael J Rust, Mark Bates und Xiaowei Zhuang. „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)“. In: *Nature Methods* Jg. 3, Nr. 10 (Aug. 2006), S. 793–796. DOI: 10.1038/nmeth929.
- [16] Marvin Minsky. „Microscopy apparatus“. US-Pat. US3013467A. 19. Dez. 1961.
- [17] Dirk-Peter Herten und Markus Sauer. „Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie – Analytik an der ultimativen Grenze der Empfindlichkeit“. In: *Bunsen-Magazin* Jg. 101, Nr. 1 (2003), S. 5–16.
- [18] Philip Tinnefeld und Markus Sauer. „Neue Wege in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie: Herausforderungen für die Chemie und Einfluss auf die Biologie“. In: *Angewandte Chemie* Jg. 117, Nr. 18 (Apr. 2005), S. 2698–2728. DOI: 10.1002/ange.200300647.
- [19] M. Orrit und J. Bernard. „Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in ap-terphenyl crystal“. In: *Physical Review Letters* Jg. 65, Nr. 21 (Nov. 1990), S. 2716–2719. DOI: 10.1103/physrevlett.65.2716.
- [20] Benjamin Schuler, Everett A. Lipman und William A. Eaton. „Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy“. In: *Nature* Jg. 419, Nr. 6908 (Okt. 2002), S. 743–747. DOI: 10.1038/nature01060.
- [21] Hannes Neuweiler et al. „Measurement of Submicrosecond Intramolecular Contact Formation in Peptides at the Single-Molecule Level“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 125, Nr. 18 (Mai 2003), S. 5324–5330. DOI: 10.1021/ja034040p.
- [22] Maarten B. J. Roelfaers et al. „Spatially resolved observation of crystal-face-dependent catalysis by single turnover counting“. In: *Nature* Jg. 439, Nr. 7076 (Feb. 2006), S. 572–575. DOI: 10.1038/nature04502.

-
- [23] Douglas Magde, Elliot Elson und W. W. Webb. „Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *Physical Review Letters* Jg. 29, Nr. 11 (Sep. 1972), S. 705–708. DOI: 10.1103/physrevlett.29.705.
- [24] R. Rigler et al. „Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion“. In: *European Biophysics Journal* Jg. 22, Nr. 3 (Aug. 1993). DOI: 10.1007/bf00185777.
- [25] Robert H. Webb. „Confocal optical microscopy“. In: *Reports on Progress in Physics* Jg. 59, Nr. 3 (März 1996), S. 427–471. DOI: 10.1088/0034-4885/59/3/003.
- [26] Douglas Magde, Elliot L. Elson und Watt W. Webb. „Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization“. In: *Biopolymers* Jg. 13, Nr. 1 (Jan. 1974), S. 29–61. DOI: 10.1002/bip.1974.360130103.
- [27] M. Eigen und R. Rigler. „Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 91, Nr. 13 (Juni 1994), S. 5740–5747. DOI: 10.1073/pnas.91.13.5740.
- [28] W. E. Moerner. „Those Blinking Single Molecules“. In: *Science* Jg. 277, Nr. 5329 (Aug. 1997), S. 1059–1060. DOI: 10.1126/science.277.5329.1059.
- [29] P. Schwille et al. „Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 97, Nr. 1 (Jan. 2000), S. 151–156. DOI: 10.1073/pnas.97.1.151.
- [30] D. Lumma et al. „Dynamics of Large Semiflexible Chains Probed by Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *Physical Review Letters* Jg. 90, Nr. 21 (Mai 2003). DOI: 10.1103/physrevlett.90.218301.
- [31] Sally A Kim, Katrin G Heinze und Petra Schwille. „Fluorescence correlation spectroscopy in living cells“. In: *Nature Methods* Jg. 4, Nr. 11 (Okt. 2007), S. 963–973. DOI: 10.1038/nmeth1104.
- [32] Elliot L. Elson. „40 Years of FCS“. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier, 2013, S. 1–10. DOI: 10.1016/b978-0-12-388422-0.00001-7.
- [33] Th. Förster. „Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz“. In: *Annalen der Physik* Jg. 437, Nr. 1-2 (1948), S. 55–75. DOI: 10.1002/andp.19484370105.
- [34] Vit Doležal. „Multifocus fuorescence correlation spectroscopy“. Dissertation. Universität zu Lübeck, 2016.
- [35] Jonas Fölling et al. „Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return“. In: *Nature Methods* Jg. 5, Nr. 11 (Sep. 2008), S. 943–945. DOI: 10.1038/nmeth.1257.

- [36] G. Donnert et al. „Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 103, Nr. 31 (Juli 2006), S. 11440–11445. DOI: 10.1073/pnas.0604965103.
- [37] Gerald Donnert, Christian Eggeling und Stefan W Hell. „Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation“. In: *Nature Methods* Jg. 4, Nr. 1 (Dez. 2006), S. 81–86. DOI: 10.1038/nmeth986.
- [38] S. Reindl und A. Penzkofer. „Higher excited-state triplet-singlet intersystem crossing of some organic dyes“. In: *Chemical Physics* Jg. 211, Nr. 1-3 (Nov. 1996), S. 431–439. DOI: 10.1016/0301-0104(96)00191-7.
- [39] Christian Ringemann et al. „Enhancing Fluorescence Brightness: Effect of Reverse Intersystem Crossing Studied by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy“. In: *Chem-PhysChem* Jg. 9, Nr. 4 (März 2008), S. 612–624. DOI: 10.1002/cphc.200700596.
- [40] P. S. Dittrich und P. Schwill. „Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis. with one- and two-photon excitation“. In: *Applied Physics B* Jg. 73, Nr. 8 (Dez. 2001), S. 829–837. DOI: 10.1007/s003400100737.
- [41] Ivan Rasnik, Sean A. McKinney und Taekjip Ha. „Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging“. In: *Nature Methods* Jg. 3, Nr. 11 (Okt. 2006), S. 891–893. DOI: 10.1038/nmeth934.
- [42] Jerker Widengren et al. „Strategies to Improve Photostabilities in Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 111, Nr. 3 (Jan. 2007), S. 429–440. DOI: 10.1021/jp0646325.
- [43] Jan Vogelsang et al. „A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes“. In: *Angewandte Chemie International Edition* Jg. 47, Nr. 29 (Juli 2008), S. 5465–5469. DOI: 10.1002/anie.200801518.
- [44] Christian Steinhauer et al. „Superresolution Microscopy on the Basis of Engineered Dark States“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 130, Nr. 50 (Dez. 2008), S. 16840–16841. DOI: 10.1021/ja806590m.
- [45] Roger Y. Tsien und Alan Waggoner. „Fluorophores for Confocal Microscopy“. In: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer US, 1995, S. 267–279. DOI: 10.1007/978-1-4757-5348-6_16.
- [46] C. Eggeling, L. Brand und C. A. M. Seidel. „Laser-induced fluorescence of coumarin derivatives in aqueous solution: Photochemical aspects for single molecule detection“. In: *Bioimaging* Jg. 5, Nr. 3 (Sep. 1997), S. 105–115. DOI: 10.1002/1361-6374(199709)5:3<105::aid-bio4>3.3.co;2-h.
- [47] M. Hofmann et al. „Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 102, Nr. 49 (Nov. 2005), S. 17565–17569. DOI: 10.1073/pnas.0506010102.

-
- [48] Frank L. Pedrotti, Hartmut Schmidt und Werner Bausch. *Optik für Ingenieure*. Springer-Verlag GmbH, Sep. 2007. ISBN: 3540734716.
- [49] C. J. R. Sheppard und P. Török. „Electromagnetic field in the focal region of an electric dipole wave“. In: *Optik* Jg. 4 (1997), S. 175–176. ISSN: 0030-4026.
- [50] M. A. Lieb und A. J. Meixner. „A high numerical aperture parabolic mirror as imaging device for confocal microscopy“. In: *Optics Express* Jg. 8, Nr. 7 (März 2001), S. 458. DOI: 10.1364/oe.8.000458.
- [51] B. Richards und E. Wolf. „Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. II. Structure of the Image Field in an Aplanatic System“. In: *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* Jg. 253, Nr. 1274 (Dez. 1959), S. 358–379. DOI: 10.1098/rspa.1959.0200.
- [52] Richard Börner. „3D Orientierung und Multi-Parameter-Analyse einzelner Moleküle mithilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie“. Dissertation. Universität zu Lübeck, 2012.
- [53] Markus Sauer, Johan Hofkens und Jörg Enderlein. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Jan. 2011. ISBN: 9783527316694. DOI: 10.1002/9783527633500.
- [54] Isadore B. Berlman. „Empirical study of heavy-atom collisional quenching of the fluorescence state of aromatic compounds in solution“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 77, Nr. 4 (Feb. 1973), S. 562–567. DOI: 10.1021/j100623a028.
- [55] M. Rae et al. „Intra- and Intermolecular Heavy-Atom Effects on the Fluorescence Properties of Brominated C60Polyads“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* Jg. 110, Nr. 25 (Juni 2006), S. 12809–12814. DOI: 10.1021/jp061010a.
- [56] Nicholas J. Turro, V. Ramamurthy und J. C. Scaiano. *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*. University Science Books, U.S., 30. Juli 2009. 1110 S. ISBN: 1891389254.
- [57] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Hrsg. von Joseph R. Lakowicz. Springer US, Dez. 2007. ISBN: 978-0-387-46312-4. DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4.
- [58] A. Jabłoński. „Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren“. In: *Zeitschrift für Physik* Jg. 94, Nr. 1-2 (Jan. 1935), S. 38–46. DOI: 10.1007/bf01330795.
- [59] Bernard Valeur und Jean-Claude Brochon, Hrsg. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*. Springer Berlin Heidelberg, 2001. DOI: 10.1007/978-3-642-56853-4.
- [60] D. V. O’Connor, W. R. Ware und J. C. Andre. „Deconvolution of fluorescence decay curves. A critical comparison of techniques“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 83, Nr. 10 (Mai 1979), S. 1333–1343. DOI: 10.1021/j100473a019.

- [61] Desmond O'Connor. *Time-correlated single photon counting*. Elsevier Science, 2. Dez. 2012. 298 S. ISBN: 9780323141444.
- [62] Michael Kasha. „Characterization of electronic transitions in complex molecules“. In: *Discussions of the Faraday Society* Jg. 9 (Juli 1950), S. 14. DOI: 10.1039/df9500900014.
- [63] Caterin Salas Redondo et al. „Interplay of Fluorescence and Phosphorescence in Organic Biluminescent Emitters“. In: *The Journal of Physical Chemistry C* Jg. 121, Nr. 27 (Juli 2017), S. 14946–14953. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b04529.
- [64] Karolina Jahn, Volker Buschmann und Carsten Hille. „Simultaneous Fluorescence and Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy in Living Cells“. In: *Scientific Reports* Jg. 5, Nr. 1 (Sep. 2015). DOI: 10.1038/srep14334.
- [65] Qijun Li et al. „Induction of long-lived room temperature phosphorescence of carbon dots by water in hydrogen-bonded matrices“. In: *Nature Communications* Jg. 9, Nr. 1 (Feb. 2018). DOI: 10.1038/s41467-018-03144-9.
- [66] A. Penzkofer, W. Falkenstein und W. Kaiser. „Vibronic relaxation in the S1 state of rhodamine dye solutions“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 44, Nr. 1 (Nov. 1976), S. 82–87. DOI: 10.1016/0009-2614(76)80414-9.
- [67] D. L. Dexter. „A Theory of Sensitized Luminescence in Solids“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 21, Nr. 5 (Mai 1953), S. 836–850. DOI: 10.1063/1.1699044.
- [68] Petr Klan und Jakob Wirz. *Photochemistry of Organic Compounds*. John Wiley & Sons, Ltd, Feb. 2009. DOI: 10.1002/9781444300017.
- [69] Luis-Manuel Frutos, Obis Castaño und Manuela Merchán. „Theoretical Determination of the Singlet-Singlet and Singlet-Triplet Electronic Spectra, Lowest Ionization Potentials, and Electron Affinity of Cyclooctatetraene“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 107, Nr. 28 (Juli 2003), S. 5472–5478. DOI: 10.1021/jp030193n.
- [70] Norman S. Allen, Hrsg. *Photochemistry and Photophysics of Polymeric Materials*. John Wiley & Sons, Inc, 11. März 2010. 689 S. ISBN: 0470137967.
- [71] Nobuhiro Yanai und Nobuo Kimizuka. „Recent emergence of photon upconversion based on triplet energy migration in molecular assemblies“. In: *Chemical Communications* Jg. 52, Nr. 31 (2016), S. 5354–5370. DOI: 10.1039/c6cc00089d.
- [72] Damir Dzebo, Kasper Moth-Poulsen und Bo Albinsson. „Robust triplet–triplet annihilation photon upconversion by efficient oxygen scavenging“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* Jg. 16, Nr. 8 (2017), S. 1327–1334. DOI: 10.1039/c7pp00201g.
- [73] Manoj K. Manna et al. „New perspectives for triplet–triplet annihilation based photon upconversion using all-organic energy donor & acceptor chromophores“. In: *Chemical Communications* Jg. 54, Nr. 46 (2018), S. 5809–5818. DOI: 10.1039/c8cc01553h.

- [74] Jiajia Zhou und Dayong Jin. „Triplet state brightens upconversion“. In: *Nature Photonics* Jg. 12, Nr. 7 (Juni 2018), S. 378–379. DOI: 10.1038/s41566-018-0188-2.
- [75] Richard A. Caldwell, David Creed und Hiroyuki Ohta. „Exciplex quenching. Geometric and electronic requirements“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 97, Nr. 11 (Mai 1975), S. 3246–3247. DOI: 10.1021/ja00844a069.
- [76] Michael G. Kuzmin et al. „Exciplex mechanism of fluorescence quenching in polar media“. In: *Journal of Chemical Sciences* Jg. 105, Nr. 6 (Okt. 1993), S. 637–649. DOI: 10.1007/bf03040836.
- [77] Enrico Fermi. *Nuclear Physics*. University of Chicago Press, 1950. 258 S. ISBN: 0226243656.
- [78] William R. Ware. „Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 66, Nr. 3 (März 1962), S. 455–458. DOI: 10.1021/j100809a020.
- [79] Christian G. Hübner et al. „Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 115, Nr. 21 (Dez. 2001), S. 9619–9622. DOI: 10.1063/1.1421382.
- [80] Steven L. Murov, Ian Carmichael und Gordon L. Hug. *Handbook of Photochemistry, Second Edition*. CRC Press, 1993. ISBN: 0824779118.
- [81] A. Morikawa und R. J. Cvetanović. „Quenching of Benzene Fluorescence by Oxygen“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 52, Nr. 6 (März 1970), S. 3237–3239. DOI: 10.1063/1.1673464.
- [82] R. Potashnik, C.R. Goldschmidt und M. Ottolenghi. „Triplet state formation in the quenching of fluorescence by molecular oxygen“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 9, Nr. 5 (Juni 1971), S. 424–425. DOI: 10.1016/0009-2614(71)80258-0.
- [83] S. V. Camyshin et al. „Quenching of the luminescence of organic compounds by oxygen in glassy matrices“. In: *Chemical Physics* Jg. 142, Nr. 1 (März 1990), S. 59–68. DOI: 10.1016/0301-0104(90)89068-2.
- [84] Koichi Kikuchi et al. „New aspects of fluorescence quenching by molecular oxygen“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 115, Nr. 12 (Juni 1993), S. 5180–5184. DOI: 10.1021/ja00065a033.
- [85] C. S. Parmenter und J. D. Rau. „Fluorescence Quenching in Aromatic Hydrocarbons by Oxygen“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 51, Nr. 5 (Sep. 1969), S. 2242–2246. DOI: 10.1063/1.1672322.
- [86] Horst Schmidt-Böcking et al. „S10“. In: *Otto Sterns Veröffentlichungen – Band 2*. Springer Berlin Heidelberg, Nov. 2015, S. 79–85. DOI: 10.1007/978-3-662-46962-0_5.

- [87] M. von Smoluchowski. „Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen“. In: *Annalen der Physik* Jg. 326, Nr. 14 (1906), S. 756–780. DOI: 10.1002/andp.19063261405.
- [88] W. M. Vaughn und Gregorio Weber. „Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water. Dynamic probe of the microenvironment“. In: *Biochemistry* Jg. 9, Nr. 3 (Feb. 1970), S. 464–473. DOI: 10.1021/bi00805a003.
- [89] George J. Kavarnos und Nicholas J. Turro. „Photosensitization by reversible electron transfer: theories, experimental evidence, and examples“. In: *Chemical Reviews* Jg. 86, Nr. 2 (Apr. 1986), S. 401–449. DOI: 10.1021/cr00072a005.
- [90] Wolfgang Rettig et al. *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, 1999. DOI: 10.1007/978-3-642-59903-3.
- [91] Rachel C. Evans, Peter Douglas und Hugh D. Burrow. *Applied Photochemistry*. Hrsg. von Rachel C. Evans, Peter Douglas und Hugh D. Burrow. Springer-Verlag GmbH, 8. Juli 2014. ISBN: 978-90-481-3829-6. DOI: 10.1007/978-90-481-3830-2.
- [92] Claude Schweitzer und Reinhard Schmidt. „Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen“. In: *Chemical Reviews* Jg. 103, Nr. 5 (Mai 2003), S. 1685–1758. DOI: 10.1021/cr010371d.
- [93] Peter Atkins und Julio de Paula. *Physical Chemistry*. W. H. Freeman, 2006. ISBN: 0-7167-8759-8.
- [94] B. Stevens, R. R. Sharpe und W. S. W. Bingham. „pH-dependence of rhodamine b semiquinone dismutation rate in aqueous alcoholic solution“. In: *Photochemistry and Photobiology* Jg. 6, Nr. 1 (Jan. 1967), S. 83–89. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1967.tb08792.x.
- [95] D. N. Dempster, T. Morrow und M. F. Quinn. „The photochemical characteristics of rhodamine 6G-ethanol solutions“. In: *Journal of Photochemistry* Jg. 2, Nr. 5 (Jan. 1973), S. 343–359. DOI: 10.1016/0047-2670(73)80032-2.
- [96] C. Eggeling et al. „Photostability of Fluorescent Dyes for Single-Molecule Spectroscopy: Mechanisms and Experimental Methods for Estimating Photobleaching in Aqueous Solution“. In: *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, 1999, S. 193–240. DOI: 10.1007/978-3-642-59903-3_10.
- [97] W. E. Moerner und David P. Fromm. „Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy“. In: *Review of Scientific Instruments* Jg. 74, Nr. 8 (Aug. 2003), S. 3597–3619. DOI: 10.1063/1.1589587.
- [98] Thomas Christ et al. „Watching the Photo-Oxidation of a Single Aromatic Hydrocarbon Molecule“. In: *Angewandte Chemie International Edition* Jg. 40, Nr. 22 (Nov. 2001), S. 4192–4195. DOI: 10.1002/1521-3773(20011119)40:22<4192::aid-anie4192>3.0.co;2-d.

- [99] Jacob P. Hoogenboom et al. „Power-Law-Distributed Dark States are the Main Pathway for Photobleaching of Single Organic Molecules“. In: *Physical Review Letters* Jg. 95, Nr. 9 (Aug. 2005). DOI: 10.1103/physrevlett.95.097401.
- [100] Albert Weller. „Photoinduced Electron Transfer in Solution: Exciplex and Radical Ion Pair Formation Free Enthalpies and their Solvent Dependence“. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* Jg. 133, Nr. 1 (Jan. 1982), S. 93–98. DOI: 10.1524/zpch.1982.133.1.093.
- [101] Paul C. Beaumont, David G. Johnson und Barry J. Parsons. „Excited state and free radical properties of rhodamine dyes in aqueous solution: A laser flash photolysis and pulse radiolysis study“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* Jg. 107, Nr. 1-3 (Juli 1997), S. 175–183. DOI: 10.1016/s1010-6030(96)04591-1.
- [102] M. W. Ferguson et al. „Excited state and free radical properties of Rhodamine 123: a laser flash photolysis and radiolysis study“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* Jg. 1, Nr. 2 (1999), S. 261–268. DOI: 10.1039/a807013j.
- [103] Sebastian van de Linde et al. „Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging“. In: *Photochem. Photobiol. Sci.* Jg. 10, Nr. 4 (2011), S. 499–506. DOI: 10.1039/c0pp00317d.
- [104] Elena Klimtchuk, M. A. J. Rodgers und D. C. Neckers. „Laser flash photolysis studies of novel xanthene dye derivatives“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 96, Nr. 24 (Nov. 1992), S. 9817–9820. DOI: 10.1021/j100203a044.
- [105] Helmut Görner. „Oxygen uptake induced by electron transfer from donors to the triplet state of methylene blue and xanthene dyes in air-saturated aqueous solution“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* Jg. 7, Nr. 3 (2008), S. 371. DOI: 10.1039/b712496a.
- [106] Jan Vogelsang et al. „Make them Blink: Probes for Super-Resolution Microscopy“. In: *ChemPhysChem* Jg. 11, Nr. 12 (Juli 2010), S. 2475–2490. DOI: 10.1002/cphc.201000189.
- [107] Jerker Widengren und Rudolf Rigler. „Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Bioimaging* Jg. 4 (3 Sep. 1996), S. 149–157. DOI: 10.1002/1361-6374(199609)4:3<149::AID-BI05>3.0.CO;2-D.
- [108] V. E. Korobov und A. K. Chibisov. „Primary processes in the photochemistry of rhodamine dyes“. In: *Journal of Photochemistry* Jg. 9, Nr. 4 (Jan. 1978), S. 411–424. DOI: 10.1016/0047-2670(78)85008-4.
- [109] L. Song et al. „Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy“. In: *Biophysical Journal* Jg. 68, Nr. 6 (Juni 1995), S. 2588–2600. DOI: 10.1016/s0006-3495(95)80442-x.

- [110] Helmut Sies und Carlos F.M. Menck. „Singlet oxygen induced DNA damage“. In: *Mutation Research/DNAging* Jg. 275, Nr. 3-6 (Sep. 1992), S. 367–375. DOI: 10.1016/0921-8734(92)90039-r.
- [111] Michael J. Davies. „Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* Jg. 3, Nr. 1 (2004), S. 17. DOI: 10.1039/b307576c.
- [112] Han-Chun DeFedericis et al. „Singlet Oxygen-Induced DNA Damage“. In: *Radiation Research* Jg. 165, Nr. 4 (Apr. 2006), S. 445–451. DOI: 10.1667/rr3533.1.
- [113] Jeffrey R. Kanofsky und Paul D. Sima. „Structural and Environmental Requirements for Quenching of Singlet Oxygen by Cyanine Dyes †“. In: *Photochemistry and Photobiology* Jg. 71, Nr. 4 (Mai 2007), S. 361–368. DOI: 10.1562/0031-8655(2000)0710361saerfq2.0.co2.
- [114] Mikkel Bregnhøj et al. „Solvent-dependent singlet oxygen lifetimes: temperature effects implicate tunneling and charge-transfer interactions“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* Jg. 18, Nr. 33 (2016), S. 22946–22961. DOI: 10.1039/c6cp01635a.
- [115] Y. Lill und B. Hecht. „Single dye molecules in an oxygen-depleted environment as photostable organic triggered single-photon sources“. In: *Applied Physics Letters* Jg. 84, Nr. 10 (März 2004), S. 1665–1667. DOI: 10.1063/1.1667591.
- [116] Colin Echeverri’a Aitken, R. Andrew Marshall und Joseph D. Puglisi. „An Oxygen Scavenging System for Improvement of Dye Stability in Single-Molecule Fluorescence Experiments“. In: *Biophysical Journal* Jg. 94, Nr. 5 (März 2008), S. 1826–1835. DOI: 10.1529/biophysj.107.117689.
- [117] Marko Swoboda et al. „Enzymatic Oxygen Scavenging for Photostability without pH Drop in Single-Molecule Experiments“. In: *ACS Nano* Jg. 6, Nr. 7 (Juni 2012), S. 6364–6369. DOI: 10.1021/nn301895c.
- [118] Kenneth D. Weston et al. „Single-molecule detection fluorescence of surface-bound species in vacuum“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 308, Nr. 1-2 (Juli 1999), S. 58–64. DOI: 10.1016/s0009-2614(99)00553-9.
- [119] M. Minsky. „Memoir on inventing the confocal scanning microscope“. In: *Scanning* Jg. 10, Nr. 4 (1988), S. 128–138. DOI: 10.1002/sca.4950100403.
- [120] Paul Nipkow. „Elektrisches Teleskop“. Dt. Pat. 30105. 15. Jan. 1885.
- [121] Akira Ichihara et al. „High-Speed Confocal Fluorescence Microscopy Using a Nipkow Scanner with Microlenses for 3-D Imaging of Single Fluorescent Molecule in Real Time“. In: *Bioimaging* Jg. 4, Nr. 2 (Juni 1996), S. 57–62.
- [122] A. Egner, V. Andresen und S. W. Hell. „Comparison of the axial resolution of practical Nipkow-disk confocal fluorescence microscopy with that of multifocal multiphoton microscopy: theory and experiment“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 206, Nr. 1 (Apr. 2002), S. 24–32. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2002.01001.x.

- [123] James B. Pawley, Hrsg. *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. Springer US, 2006. DOI: 10.1007/978-0-387-45524-2.
- [124] T. WILSON. „Resolution and optical sectioning in the confocal microscope“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 244, Nr. 2 (Okt. 2011), S. 113–121. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2011.03549.x.
- [125] Ulrich Kubitscheck, Hrsg. *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*. Wiley-Blackwell, März 2013. ISBN: 9783527329229. DOI: 10.1002/9783527671595.
- [126] Jerome Mertz. *Introduction to Optical Microscopy*. Roberts und Company Publishers, 2009. ISBN: 0981519482.
- [127] Colin Sheppard Tony Wilson. *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*. Academic Press, 1984. ISBN: 0-12-757760-2.
- [128] B. Amos, G. McConnell und T. Wilson. „2.2 Confocal Microscopy“. In: *Comprehensive Biophysics*. Elsevier, 2012, S. 3–23. DOI: 10.1016/b978-0-12-374920-8.00203-4.
- [129] Michael Prummer und Christian Hübner. „Single-Molecule Fluorescence: Biophysics“. In: *Encyclopedia of Applied Physics*. American Cancer Society, 2009. Kap. 17, S. 627–653. ISBN: 9783527600434. DOI: 10.1002/3527600434.eap687.
- [130] Th. Basché, W. P. Ambrose und W. E. Moerner. „Optical spectra and kinetics of single impurity molecules in a polymer: spectral diffusion and persistent spectral hole burning“. In: *Journal of the Optical Society of America B* Jg. 9, Nr. 5 (Mai 1992), S. 829. DOI: 10.1364/josab.9.000829.
- [131] Elliot L. Elson und Douglas Magde. „Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory“. In: *Biopolymers* Jg. 13, Nr. 1 (Jan. 1974), S. 1–27. DOI: 10.1002/bip.1974.360130102.
- [132] Jerker Widengren und Ülo Mets. „Conceptual Basis of Fluorescence Correlation Spectroscopy and Related Techniques as Tools in Bioscience“. In: *Single Molecule Detection in Solution*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Jan. 2003. Kap. 3, S. 69–120. DOI: 10.1002/3527600809.ch3.
- [133] W. R. Schneider und W. Wyss. „Fractional diffusion and wave equations“. In: *Journal of Mathematical Physics* Jg. 30, Nr. 1 (Jan. 1989), S. 134–144. DOI: 10.1063/1.528578.
- [134] Andreas Mandelis. *Diffusion-Wave Fields*. Springer New York, 9. März 2013. 741 S. ISBN: 978-0-387-95149-2. DOI: 10.1007/978-1-4757-3548-2.
- [135] Bo Zhang, Josiane Zerubia und Jean-Christophe Olivo-Marin. „Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models“. In: *Applied Optics* Jg. 46, Nr. 10 (März 2007), S. 1819. DOI: 10.1364/ao.46.001819.

- [136] Petra Schwille und Elke Haustein. „Fluorescence Correlation Spectroscopy An Introduction to its Concepts and Applications“. In: *Biophysics Textbook Online*. 2002.
- [137] T. Wohland et al. „Study of Ligand-Receptor Interactions by Fluorescence Correlation Spectroscopy with Different Fluorophores: Evidence That the Homopentameric 5-Hydroxytryptamine Type 3A Receptor Binds Only One Ligand†“. In: *Biochemistry* Jg. 38, Nr. 27 (Juli 1999), S. 8671–8681. DOI: 10.1021/bi990366s.
- [138] Daniel R. Larson et al. „Direct measurement of Gag–Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy“. In: *The Journal of Cell Biology* Jg. 162, Nr. 7 (Sep. 2003), S. 1233–1244. DOI: 10.1083/jcb.200303200.
- [139] Petra Schwille, Frank Oehlenschläger und Nils G. Walter. „Quantitative Hybridization Kinetics of DNA Probes to RNA in Solution Followed by Diffusional Fluorescence Correlation Analysis“. In: *Biochemistry* Jg. 35, Nr. 31 (Jan. 1996), S. 10182–10193. DOI: 10.1021/bi960517g.
- [140] Rudolf Rigler et al. „Fluorescence cross-correlation: A new concept for polymerase chain reaction“. In: *Journal of Biotechnology* Jg. 63, Nr. 2 (Aug. 1998), S. 97–109. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00079-0.
- [141] Frank Schubert et al. „Comparative Thermodynamic Analysis of DNA-Protein Interactions Using Surface Plasmon Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy†“. In: *Biochemistry* Jg. 42, Nr. 34 (Sep. 2003), S. 10288–10294. DOI: 10.1021/bi034033d.
- [142] Hacène Boukari, Ralph Nossal und Dan L. Sackett. „Stability of Drug-Induced Tubulin Rings by Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *Biochemistry* Jg. 42, Nr. 5 (Feb. 2003), S. 1292–1300. DOI: 10.1021/bi026751q.
- [143] Nicoletta Kahya et al. „Probing Lipid Mobility of Raft-exhibiting Model Membranes by Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *Journal of Biological Chemistry* Jg. 278, Nr. 30 (Mai 2003), S. 28109–28115. DOI: 10.1074/jbc.M302969200.
- [144] Felix Höfling, Karl-Ulrich Bamberg und Thomas Franosch. „Anomalous transport resolved in space and time by fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Soft Matter* Jg. 7, Nr. 4 (2011), S. 1358–1363. DOI: 10.1039/c0sm00718h.
- [145] Jerker Widengren und Petra Schwille. „Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 104, Nr. 27 (Juli 2000), S. 6416–6428. DOI: 10.1021/jp000059s.
- [146] Jerker Widengren und Claus A. M. Seidel. „Manipulation and characterization of photo-induced transient states of Merocyanine 540 by fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* Jg. 2, Nr. 15 (2000), S. 3435–3441. DOI: 10.1039/b003268i.

-
- [147] Flaminia Malvezzi-Campeggi et al. „Light-Induced Flickering of DsRed Provides Evidence for Distinct and Interconvertible Fluorescent States“. In: *Biophysical Journal* Jg. 81, Nr. 3 (Sep. 2001), S. 1776–1785. DOI: 10.1016/s0006-3495(01)75828-6.
- [148] Rudolf Rigler und Jerker Widengren. „Fluorescence-based monitoring of electronic state and ion exchange kinetics with FCS and related techniques: from T-jump measurements to fluorescence fluctuations“. In: *European Biophysics Journal* Jg. 47, Nr. 4 (Dez. 2017), S. 479–492. DOI: 10.1007/s00249-017-1271-1.
- [149] Katharina Duda. „Konstruktion eines Stickstoff-Bad-Kryostaten für Einzelmolekülmessungen an dünnen Schichten“. Masterarbeit. Universität zu Lübeck, 2017.
- [150] Jonas Kühne. „Aufbau und Theorie eines Konfokalmikroskops“. Bachelorarbeit. Universität zu Lübeck, 2015.
- [151] William Henry und Joseph Banks. „III. Experiments on the quantity of gases absorbed by water, at different temperatures, and under different pressures“. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* Jg. 93 (Jan. 1803), S. 29–274. DOI: 10.1098/rstl.1803.0004.
- [152] R. E. Benesch und R. Benesch. „Enzymatic Removal of Oxygen for Polarography and Related Methods“. In: *Science* Jg. 118, Nr. 3068 (Okt. 1953), S. 447–448. DOI: 10.1126/science.118.3068.447.
- [153] Alessa Hutfliz. „Photophysikalische Untersuchung von Xanthenderivaten durch Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS)“. Bachelorarbeit. Universität zu Lübeck, 2016.
- [154] Aleš Benda et al. „TCSPC upgrade of a confocal FCS microscope“. In: *Review of Scientific Instruments* Jg. 76, Nr. 3 (März 2005), S. 033106. DOI: 10.1063/1.1866814.
- [155] Verena Hirschfeld. „Förster-Energietransfer an einzelnen Molekülen bei tiefen Temperaturen“. Dissertation. Universität zu Lübeck, 2011.
- [156] E. J. Ambrose. „A Surface Contact Microscope for the study of Cell Movements“. In: *Nature* Jg. 178, Nr. 4543 (Nov. 1956), S. 1194–1194. DOI: 10.1038/1781194a0.
- [157] D. Axelrod. „Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence“. In: *The Journal of Cell Biology* Jg. 89, Nr. 1 (Apr. 1981), S. 141–145. DOI: 10.1083/jcb.89.1.141.
- [158] Takashi Funatsu et al. „Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution“. In: *Nature* Jg. 374, Nr. 6522 (Apr. 1995), S. 555–559. DOI: 10.1038/374555a0.
- [159] Devin Heinrich. „Entwicklung eines dichroit-freien TIRF-Mikroskops“. Masterarbeit. Universität zu Lübeck, 2018.

- [160] Fabio D. Steffen, Roland K. O. Sigel und Richard Börner. „An atomistic view on carbocyanine photophysics in the realm of RNA“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* Jg. 18, Nr. 42 (2016), S. 29045–29055. DOI: 10.1039/c6cp04277e.
- [161] N. Tyutyulkov. *Polymethine dyes: structure and properties*. St. Kliment Ohridski University Press, 1991. ISBN: 9540706262.
- [162] Bernd Schmidt Joachim Buddrus. *Grundlagen der Organischen Chemie*. Gruyter, Walter de GmbH, 1. Jan. 2015. ISBN: 3110305593.
- [163] Laura C. Zanetti-Domingues et al. „Hydrophobic Fluorescent Probes Introduce Artifacts into Single Molecule Tracking Experiments Due to Non-Specific Binding“. In: *PLoS One* Jg. 8, Nr. 9 (Sep. 2013). Hrsg. von Paul A. Randazzo, e74200. DOI: 10.1371/journal.pone.0074200.
- [164] Ratnakar B. Mujumdar et al. „Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters“. In: *Bioconjugate Chemistry* Jg. 4, Nr. 2 (März 1993), S. 105–111. DOI: 10.1021/bc00020a001.
- [165] E. J. Wood. „Molecular probes: Handbook of fluorescent probes and research chemicals“. In: *Biochemical Education* Jg. 22, Nr. 2 (Apr. 1994), S. 83. DOI: 10.1016/0307-4412(94)90083-3.
- [166] Tasuku Ueno et al. „Rational Principles for Modulating Fluorescence Properties of Fluorescein“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 126, Nr. 43 (Nov. 2004), S. 14079–14085. DOI: 10.1021/ja048241k.
- [167] B. Albinsson und J. Martensson. „Long-range electron and excitation energy transfer in donor–bridge–acceptor systems“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* Jg. 9, Nr. 3 (Sep. 2008), S. 138–155. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2008.01.002.
- [168] Estrella Núñez Delicado, Alvaro Sánchez Ferrer und Francisco García Carmona. „A kinetic study of the one-electron oxidation of Trolox C by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* Jg. 1335, Nr. 1-2 (Apr. 1997), S. 127–134. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/s0304-4165(96)00130-4.
- [169] John W. Scott et al. „6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: Novel antioxidants“. In: *Journal of the American Oil Chemists Society* Jg. 51, Nr. 5 (Mai 1974), S. 200–203. DOI: 10.1007/bf02632894.
- [170] Christopher R. Lambert und Irene E. Kochevar. „Electron Transfer Quenching of the Rose Bengal Triplet State“. In: *Photochemistry and Photobiology* Jg. 66, Nr. 1 (Juli 1997), S. 15–25. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb03133.x.

- [171] Maria Eugenia Carlotti et al. „Photostability of Trolox in Water/Ethanol, Water, and Oramix CG 110 in the Absence and in the Presence of TiO₂“. In: *Journal of Dispersion Science and Technology* Jg. 25, Nr. 2 (Dez. 2004), S. 193–207. DOI: 10.1081/dis-120030666.
- [172] Thorben Cordes, Jan Vogelsang und Philip Tinnefeld. „On the Mechanism of Trolox as Antiblinking and Antibleaching Reagent“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 131, Nr. 14 (Apr. 2009), S. 5018–5019. DOI: 10.1021/ja809117z.
- [173] Robert Kasper. „Optimierung von photophysikalischen Eigenschaften organischer Farbstoffe zur Auflösungserhöhung“. Dissertation. Universität Bielefeld, 2009.
- [174] Thorben Cordes et al. „Mechanisms and advancement of antifading agents for fluorescence microscopy and single-molecule spectroscopy“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* Jg. 13, Nr. 14 (2011), S. 6699. DOI: 10.1039/c0cp01919d.
- [175] Zhengjian Zhang et al. „Single-molecule tracking of the transcription cycle by sub-second RNA detection“. In: *eLife* Jg. 3 (Jan. 2014). DOI: 10.7554/elife.01775.
- [176] Hai Pan et al. „A simple procedure to improve the surface passivation for single molecule fluorescence studies“. In: *Physical Biology* Jg. 12, Nr. 4 (Juni 2015), S. 045006. DOI: 10.1088/1478-3975/12/4/045006.
- [177] Christian Rönna. „Experimental Assessments of Sample Preparation for Studying the Argonaute Protein Using TIRF Microscopy“. Masterarbeit. Universität zu Lübeck, 2018.
- [178] Paul S. Cremer und Steven G. Boxer. „Formation and Spreading of Lipid Bilayers on Planar Glass Supports“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* Jg. 103, Nr. 13 (Apr. 1999), S. 2554–2559. DOI: 10.1021/jp983996x.
- [179] Susan J. Sofia, V. Premnath und Edward W. Merrill. „Poly(ethylene oxide) Grafted to Silicon Surfaces: Grafting Density and Protein Adsorption“. In: *Macromolecules* Jg. 31, Nr. 15 (Juli 1998), S. 5059–5070. DOI: 10.1021/ma971016l.
- [180] Joonyeong Kim et al. „Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates“. In: *Journal of Colloid and Interface Science* Jg. 329, Nr. 1 (Jan. 2009), S. 114–119. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.09.031.
- [181] John A. Howarter und Jeffrey P. Youngblood. „Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane“. In: *Langmuir* Jg. 22, Nr. 26 (Dez. 2006), S. 11142–11147. DOI: 10.1021/la061240g.
- [182] Nesrine Aissaoui et al. „Silane Layers on Silicon Surfaces: Mechanism of Interaction, Stability, and Influence on Protein Adsorption“. In: *Langmuir* Jg. 28, Nr. 1 (Dez. 2011), S. 656–665. DOI: 10.1021/la2036778.
- [183] Stanley D. Chandradoss et al. „Surface Passivation for Single-molecule Protein Studies“. In: *Journal of Visualized Experiments*, Nr. 86 (Apr. 2014). DOI: 10.3791/50549.

- [184] Haogang Cai und Shalom J. Wind. „Improved Glass Surface Passivation for Single-Molecule Nanoarrays“. In: *Langmuir* Jg. 32, Nr. 39 (Sep. 2016), S. 10034–10041. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02444.
- [185] C. J. de Grauw et al. „Axial resolution of confocal Raman microscopes: Gaussian beam theory and practice“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 188, Nr. 03 (Dez. 1997), S. 273–279. DOI: 10.1046/j.1365-2818.1997.2620818.x.
- [186] Anastasia Loman et al. „Comparison of optical saturation effects in conventional and dual-focus fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 459, Nr. 1-6 (Juni 2008), S. 18–21. DOI: 10.1016/j.cplett.2008.05.018.
- [187] Marlan O. Scully. *Quantum Optics*. Cambridge University Press, 1997. 656 S. ISBN: 978-0524235959.
- [188] Harmen de Vries und Douwe A. Wiersma. „Photophysical and photochemical molecular hole burning theory“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 72, Nr. 3 (Feb. 1980), S. 1851–1863. DOI: 10.1063/1.439330.
- [189] J. Bernard et al. „Photon bunching in the fluorescence from single molecules: A probe for intersystem crossing“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 98, Nr. 2 (Jan. 1993), S. 850–859. DOI: 10.1063/1.464249.
- [190] Taras Plakhotnik, Elizabeth A. Donley und Urs P. Wild. „Single-molecule Spectroscopy“. In: *Annual Review of Physical Chemistry* Jg. 48, Nr. 1 (Okt. 1997), S. 181–212. DOI: 10.1146/annurev.physchem.48.1.181.
- [191] T. Basché, S. Kummer und C. Bräuchle. „Excitation and Emission Spectroscopy and Quantum Optical Measurements“. In: *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Dez. 2007, S. 31–67. DOI: 10.1002/9783527614714.ch2.
- [192] Christian Hübner und Thomas Basché. „Optical Microscopy and Spectroscopy of Single Molecules“. In: *Photophysics of Molecular Materials*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Apr. 2006, S. 5–47. DOI: 10.1002/3527607323.ch2.
- [193] Ingo Gregor, Digambara Patra und Jörg Enderlein. „Optical Saturation in Fluorescence Correlation Spectroscopy under Continuous-Wave and Pulsed Excitation“. In: *ChemPhysChem* Jg. 6, Nr. 1 (Jan. 2005), S. 164–170. DOI: 10.1002/cphc.200400319.
- [194] Jörg Enderlein. „Dependence of the optical saturation of fluorescence on rotational diffusion“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 410, Nr. 4-6 (Juli 2005), S. 452–456. DOI: 10.1016/j.cplett.2005.05.113.
- [195] M. Ehrenberg und R. Rigler. „Rotational brownian motion and fluorescence intensify fluctuations“. In: *Chemical Physics* Jg. 4, Nr. 3 (Juni 1974), S. 390–401. DOI: 10.1016/0301-0104(74)85005-6.

-
- [196] R. Short und L. Mandel. „Observation of Sub-Poissonian Photon Statistics“. In: *Physical Review Letters* Jg. 51, Nr. 5 (Aug. 1983), S. 384–387. DOI: 10.1103/physrevlett.51.384.
- [197] P. Kask, P. Piksarv und Ü. Mets. „Fluorescence correlation spectroscopy in the nanosecond time range: Photon antibunching in dye fluorescence“. In: *European Biophysics Journal* Jg. 12, Nr. 3 (Aug. 1985). DOI: 10.1007/bf00254074.
- [198] Malvin C. Teich und Bahaa E. A. Saleh. „I Photon Bunching and Antibunching“. In: *Progress in Optics*. Elsevier, 1988, S. 1–104. DOI: 10.1016/s0079-6638(08)70174-4.
- [199] Reeta Vyas und Surendra Singh. „Antibunching and photoemission waiting times“. In: *Journal of the Optical Society of America B* Jg. 17, Nr. 4 (Apr. 2000), S. 634. DOI: 10.1364/josab.17.000634.
- [200] Ülo Mets. „Antibunching and Rotational Diffusion in FCS“. In: *Springer Series in Chemical Physics*. Springer Berlin Heidelberg, 2001, S. 346–359. DOI: 10.1007/978-3-642-59542-4_16.
- [201] L. Fleury et al. „Nonclassical Photon Statistics in Single-Molecule Fluorescence at Room Temperature“. In: *Physical Review Letters* Jg. 84, Nr. 6 (Feb. 2000), S. 1148–1151. DOI: 10.1103/physrevlett.84.1148.
- [202] Jerker Widengren, Rudolf Rigler und Ülo Mets. „Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Journal of Fluorescence* Jg. 4, Nr. 3 (Sep. 1994), S. 255–258. DOI: 10.1007/bf01878460.
- [203] Jerker Widengren, Uelo Mets und Rudolf Rigler. „Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 99, Nr. 36 (Sep. 1995), S. 13368–13379. DOI: 10.1021/j100036a009.
- [204] C. Eggeling et al. „Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis“. In: *Analytical Chemistry* Jg. 70, Nr. 13 (Juli 1998), S. 2651–2659. DOI: 10.1021/ac980027p.
- [205] C. Julien et al. „Single Molecule Study of Perylene Orange Photobleaching in Thin Sol-Gel Films“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* Jg. 109, Nr. 49 (Dez. 2005), S. 23145–23153. DOI: 10.1021/jp052398x.
- [206] A. Laubereau und W. Kaiser. „Vibrational dynamics of liquids and solids investigated by picosecond light pulses“. In: *Reviews of Modern Physics* Jg. 50, Nr. 3 (Juli 1978), S. 607–665. DOI: 10.1103/revmodphys.50.607.
- [207] M. Anbar und Edwin J. Hart. „The Reactivity of Aromatic Compounds toward Hydrated Electrons“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 86, Nr. 24 (Dez. 1964), S. 5633–5637. DOI: 10.1021/ja01078a046.

- [208] David N. Nikogosyan. „Definition of Photoreaction Quantum Yield at Two-quantum Excitation of Molecules in Solution“. In: *Laser Chemistry* Jg. 7, Nr. 1 (1987), S. 29–34. DOI: 10.1155/1c.7.29.
- [209] Eugenia V. Khoroshilova und David N. Nikogosyan. „Photochemistry of uridine on high intensity laser UV irradiation“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* Jg. 5, Nr. 3-4 (Mai 1990), S. 413–427. DOI: 10.1016/1011-1344(90)85055-2.
- [210] A. Reuther, A. Laubereau und D. N. Nikogosyan. „Primary Photochemical Processes in Water“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 100, Nr. 42 (Jan. 1996), S. 16794–16800. DOI: 10.1021/jp961462v.
- [211] Pascale Winckler und Rodolphe Jaffiol. „Multiphoton Cascade Absorption in Single Molecule Fluorescence Saturation Spectroscopy“. In: *Analytical Chemistry* Jg. 85, Nr. 9 (Apr. 2013), S. 4735–4744. DOI: 10.1021/ac400454f.
- [212] Alexander P. Demchenko, Vladimir I. Tomin und Pi-Tai Chou. „Breaking the Kasha Rule for More Efficient Photochemistry“. In: *Chemical Reviews* Jg. 117, Nr. 21 (Okt. 2017), S. 13353–13381. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00110.
- [213] Takao Itoh. „Fluorescence and Phosphorescence from Higher Excited States of Organic Molecules“. In: *Chemical Reviews* Jg. 112, Nr. 8 (Mai 2012), S. 4541–4568. DOI: 10.1021/cr200166m.
- [214] Robert Englman und Joshua Jortner. „The energy gap law for radiationless transitions in large molecules“. In: *Molecular Physics* Jg. 18, Nr. 2 (Feb. 1970), S. 145–164. DOI: 10.1080/00268977000100171.
- [215] Fritz Peter Schäfer, Hrsg. *Dye Lasers (Topics in Applied Physics)*. Springer Berlin Heidelberg, 1973. DOI: 10.1007/978-3-662-11579-4.
- [216] Phaedon. Avouris, William M. Gelbart und M. A. El-Sayed. „Nonradiative electronic relaxation under collision-free conditions“. In: *Chemical Reviews* Jg. 77, Nr. 6 (Dez. 1977), S. 793–833. DOI: 10.1021/cr60310a002.
- [217] Karl F. Freed. „Radiationless transitions in molecules“. In: *Accounts of Chemical Research* Jg. 11, Nr. 2 (Feb. 1978), S. 74–80. DOI: 10.1021/ar50122a004.
- [218] Taco D. Visser und Sjoerd H. Wiersma. „Spherical aberration and the electromagnetic field in high-aperture systems“. In: *Journal of the Optical Society of America A* Jg. 8, Nr. 9 (Sep. 1991), S. 1404. DOI: 10.1364/josaa.8.001404.
- [219] Taco D. Visser und Sjoerd H. Wiersma. „Electromagnetic description of image formation in confocal fluorescence microscopy“. In: *Journal of the Optical Society of America A* Jg. 11, Nr. 2 (Feb. 1994), S. 599. DOI: 10.1364/josaa.11.000599.
- [220] Jörg Enderlein. „Theoretical study of detection of a dipole emitter through an objective with high numerical aperture“. In: *Optics Letters* Jg. 25, Nr. 9 (Mai 2000), S. 634. DOI: 10.1364/ol.25.000634.

-
- [221] Samuel T. Hess und Watt W. Webb. „Focal Volume Optics and Experimental Artifacts in Confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *Biophysical Journal* Jg. 83, Nr. 4 (Okt. 2002), S. 2300–2317. DOI: 10.1016/s0006-3495(02)73990-8.
- [222] Ingo Gregor und Jörg Enderlein. „Focusing astigmatic Gaussian beams through optical systems with a high numerical aperture“. In: *Optics Letters* Jg. 30, Nr. 19 (Okt. 2005), S. 2527. DOI: 10.1364/ol.30.002527.
- [223] Rodolphe Jaffiol et al. „Spatial fluorescence cross-correlation spectroscopy“. In: *Applied Optics* Jg. 45, Nr. 6 (Feb. 2006), S. 1225. DOI: 10.1364/ao.45.001225.
- [224] Gianguido C. Cianci, Jianrong Wu und Keith M. Berland. „Saturation modified point spread functions in two-photon microscopy“. In: *Microscopy Research and Technique* Jg. 64, Nr. 2 (2004), S. 135–141. DOI: 10.1002/jemt.20071.
- [225] Lloyd Davis und Guoqing Shen. „Accounting for Triplet and Saturation Effects in FCS Measurements“. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology* Jg. 7, Nr. 4 (Aug. 2006), S. 287–301. DOI: 10.2174/138920106777950843.
- [226] Jianrong Wu und Keith Berland. „Fluorescence intensity is a poor predictor of saturation effects in two-photon microscopy: Artifacts in fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Microscopy Research and Technique* Jg. 70, Nr. 8 (2007), S. 682–686. DOI: 10.1002/jemt.20454.
- [227] Rodolphe Jaffiol und Pascale Winckler. „Single molecule fluorescence saturation spectroscopy“. In: *Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging VII*. Hrsg. von Jörg Enderlein et al. SPIE, März 2014. DOI: 10.1117/12.2037029.
- [228] Keith Berland und Guoqing Shen. „Excitation saturation in two-photon fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Applied Optics* Jg. 42, Nr. 27 (Sep. 2003), S. 5566. DOI: 10.1364/ao.42.005566.
- [229] Charmaine Tressler, Michael Stolle und Cécile Fradin. „Fluorescence correlation spectroscopy with a doughnut-shaped excitation profile as a characterization tool in STED microscopy“. In: *Optics Express* Jg. 22, Nr. 25 (Dez. 2014), S. 31154. DOI: 10.1364/oe.22.031154.
- [230] Jörg Enderlein. „Maximum-likelihood criterion and single-molecule detection“. In: *Applied Optics* Jg. 34, Nr. 3 (Jan. 1995), S. 514. DOI: 10.1364/ao.34.000514.
- [231] Christian Eggeling, Andreas Volkmer und Claus A. M. Seidel. „Molecular Photobleaching Kinetics of Rhodamine 6G by One- and Two-Photon Induced Confocal Fluorescence Microscopy“. In: *ChemPhysChem* Jg. 6, Nr. 5 (Mai 2005), S. 791–804. DOI: 10.1002/cphc.200400509.
- [232] Thorsten Wohland, Rudolf Rigler und Horst Vogel. „The Standard Deviation in Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *Biophysical Journal* Jg. 80, Nr. 6 (Juni 2001), S. 2987–2999. DOI: 10.1016/s0006-3495(01)76264-9.

- [233] Marisa Huertas de la Torre, Riccardo Forni und Giuseppe Chirico. „Brownian dynamics simulations of fluorescence fluctuation spectroscopy“. In: *European Biophysics Journal* Jg. 30, Nr. 2 (Mai 2001), S. 129–139. DOI: 10.1007/s002490000117.
- [234] Antonino Ingargiola, Shimon Weiss und Eitan Lerner. „Monte Carlo Diffusion-Enhanced Photon Inference: Distance Distributions and Conformational Dynamics in Single-Molecule FRET“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* Jg. 122, Nr. 49 (Sep. 2018), S. 11598–11615. DOI: 10.1021/acs.jpcb.8b07608.
- [235] Jörg Enderlein et al. „Performance of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Measuring Diffusion and Concentration“. In: *ChemPhysChem* Jg. 6, Nr. 11 (Nov. 2005), S. 2324–2336. DOI: 10.1002/cphc.200500414.
- [236] Andreas Schönle et al. „Monitoring triplet state dynamics with fluorescence correlation spectroscopy: Bias and correction“. In: *Microscopy Research and Technique* Jg. 77, Nr. 7 (Apr. 2014), S. 528–536. DOI: 10.1002/jemt.22368.
- [237] Ülo Mets, Jerker Widengren und Rudolf Rigler. „Application of the antibunching in dye fluorescence: measuring the excitation rates in solution“. In: *Chemical Physics* Jg. 218, Nr. 1-2 (Mai 1997), S. 191–198. DOI: 10.1016/s0301-0104(97)00040-2.
- [238] Rongjuan Huang et al. „The contributions of molecular vibrations and higher triplet levels to the intersystem crossing mechanism in metal-free organic emitters“. In: *Journal of Materials Chemistry C* Jg. 5, Nr. 25 (2017), S. 6269–6280. DOI: 10.1039/c7tc01958k.
- [239] Hiroki Noda, Hajime Nakanotani und Chihaya Adachi. „Excited state engineering for efficient reverse intersystem crossing“. In: *Science Advances* Jg. 4, Nr. 6 (Juni 2018), eaao6910. DOI: 10.1126/sciadv.aao6910.
- [240] J. J. Macklin et al. „Imaging and Time-Resolved Spectroscopy of Single Molecules at an Interface“. In: *Science* Jg. 272, Nr. 5259 (Apr. 1996), S. 255–258. DOI: 10.1126/science.272.5259.255.
- [241] Lili Wang, Adolfas K. Gaigalas und Vytas Reipa. „Optical properties of AlexaTM 488 and CyTM5 immobilized on a glass surface“. In: *BioTechniques* Jg. 38, Nr. 1 (Jan. 2005), S. 127–132. DOI: 10.2144/05381mt03.
- [242] Jörg Enderlein. „Fluorescence detection of single molecules near a solution/glass interface – an electrodynamic analysis“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 308, Nr. 3-4 (Juli 1999), S. 263–266. DOI: 10.1016/s0009-2614(99)00595-3.
- [243] Peter Brüggeller und Erwin Mayer. „Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions“. In: *Nature* Jg. 288, Nr. 5791 (Dez. 1980), S. 569–571. DOI: 10.1038/288569a0.
- [244] J. Dubochet und A.W. McDowell. „Vitrification of pure water for electron microscopy“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 124, Nr. 3 (Dez. 1981), S. 3–4. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1981.tb02483.x.

- [245] Erwin Mayer und Rudolf Pletzer. „Polymorphism in vapor deposited amorphous solid water“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 80, Nr. 6 (März 1984), S. 2939–2952. DOI: 10.1063/1.447044.
- [246] O. Mishima, L. D. Calvert und E. Whalley. „‘Melting ice’ I at 77 K and 10 kbar: a new method of making amorphous solids“. In: *Nature* Jg. 310, Nr. 5976 (Aug. 1984), S. 393–395. DOI: 10.1038/310393a0.
- [247] Jonathan Daly et al. „Successful cryopreservation of coral larvae using vitrification and laser warming“. In: *Scientific Reports* Jg. 8, Nr. 1 (Okt. 2018). DOI: 10.1038/s41598-018-34035-0.
- [248] Mayako Fujihara, Takehito Kaneko und Miho Inoue-Murayama. „Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles“. In: *Scientific Reports* Jg. 9, Nr. 1 (März 2019). DOI: 10.1038/s41598-019-40711-6.
- [249] Ashraf Al-Amoudi et al. „Cryo-electron microscopy of vitreous sections“. In: *The EMBO Journal* Jg. 23, Nr. 18 (Aug. 2004), S. 3583–3588. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600366.
- [250] Shigeki Watanabe et al. „Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy“. In: *Nature Methods* Jg. 8, Nr. 1 (Nov. 2010), S. 80–84. DOI: 10.1038/nmeth.1537.
- [251] Ilse Hurbain und Martin Sachse. „The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells“. In: *Biology of the Cell* Jg. 103, Nr. 9 (Sep. 2011), S. 405–420. DOI: 10.1042/bc20110015.
- [252] Gerd Schneider et al. „Cryo X-ray microscope with flat sample geometry for correlative fluorescence and nanoscale tomographic imaging“. In: *Journal of Structural Biology* Jg. 177, Nr. 2 (Feb. 2012), S. 212–223. DOI: 10.1016/j.jsb.2011.12.023.
- [253] Bei Liu et al. „Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context“. In: *Scientific Reports* Jg. 5, Nr. 1 (Okt. 2015). DOI: 10.1038/srep13017.
- [254] Rob Zondervan et al. „Photobleaching of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol) at the Ensemble and Single-Molecule Levels“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 108, Nr. 10 (März 2004), S. 1657–1665. DOI: 10.1021/jp037222e.
- [255] B. Mao et al. „Flash photolysis and low temperature photochemistry of bovine rhodopsin with a fixed 11-ene“. In: *Biophysical Journal* Jg. 35, Nr. 2 (Aug. 1981), S. 543–546. DOI: 10.1016/s0006-3495(81)84809-6.
- [256] W. E. Moerner und Michel Orrit. „Illuminating Single Molecules in Condensed Matter“. In: *Science* Jg. 283, Nr. 5408 (März 1999), S. 1670–1676. DOI: 10.1126/science.283.5408.1670.

- [257] Cindi L. Schwartz et al. „Cryo-fluorescence microscopy facilitates correlations between light and cryo-electron microscopy and reduces the rate of photobleaching“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 227, Nr. 2 (Aug. 2007), S. 98–109. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2007.01794.x.
- [258] T. M. H. Creemers et al. „Photophysics and optical switching in green fluorescent protein mutants“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 97, Nr. 7 (März 2000), S. 2974–2978. DOI: 10.1073/pnas.97.7.2974.
- [259] Aline Regis Faro et al. „Low-temperature switching by photoinduced protonation in photochromic fluorescent proteins“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* Jg. 9, Nr. 2 (2010), S. 254. DOI: 10.1039/b9pp00121b.
- [260] Rob Zondervan et al. „Photoblinking of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 107, Nr. 35 (Sep. 2003), S. 6770–6776. DOI: 10.1021/jp034723r.
- [261] Rob Zondervan et al. „Laser-Driven Microsecond Temperature Cycles Analyzed by Fluorescence Polarization Microscopy“. In: *Biophysical Journal* Jg. 90, Nr. 8 (Apr. 2006), S. 2958–2969. DOI: 10.1529/biophysj.105.075168.
- [262] R. Zondervan et al. „Local viscosity of supercooled glycerol near T_g probed by rotational diffusion of ensembles and single dye molecules“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 104, Nr. 31 (Mai 2007), S. 12628–12633. DOI: 10.1073/pnas.0610521104.
- [263] M.A. Le Gros et al. „High-aperture cryogenic light microscopy“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 235, Nr. 1 (Juli 2009), S. 1–8. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2009.03184.x.
- [264] Lucas Schnelle. „Konstruktion einer Objektivhalterung eines Stickstoffbad Kryostaten und Entwicklung eines Probentransferverfahrens für Einzelmolekülmessungen an dünnen Schichten“. Bachelorarbeit. Universität zu Lübeck, 2018.
- [265] Silke Olschewski. „Einzelmolekülspektroskopie an reversen Mizellen bei niedrigen Temperaturen“. Bachelorarbeit. Universität zu Lübeck, 2013.
- [266] Arnold Giske. „CryoSTED microscopy - a new spectroscopic approach for improving the resolution of STED microscopy using low temperature“. Dissertation. Universität Heidelberg, 2008. DOI: 10.11588/heidok.00007969.
- [267] Sean A McKinney et al. „A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein“. In: *Nature Methods* Jg. 6, Nr. 2 (Jan. 2009), S. 131–133. DOI: 10.1038/nmeth.1296.
- [268] Rainer Kaufmann et al. „Super-Resolution Microscopy Using Standard Fluorescent Proteins in Intact Cells under Cryo-Conditions“. In: *Nano Letters* Jg. 14, Nr. 7 (Juni 2014), S. 4171–4175. DOI: 10.1021/nl501870p.

- [269] Siegfried Weisenburger et al. „Cryogenic localization of single molecules with angstrom precision“. In: *Nanoimaging and Nanospectroscopy*. Hrsg. von Prabhat Verma und Alexander Egner. SPIE, Sep. 2013. DOI: 10.1117/12.2025373.
- [270] Bolesław Kozankiewicz und Michel Orrit. „Single-molecule photophysics, from cryogenic to ambient conditions“. In: *Chem. Soc. Rev.* Jg. 43, Nr. 4 (2014), S. 1029–1043. DOI: 10.1039/c3cs60165j.
- [271] Rainer Kaufmann, Christoph Hagen und Kay Grünewald. „Fluorescence cryo microscopy: current challenges and prospects“. In: *Current Opinion in Chemical Biology* Jg. 20 (Juni 2014), S. 86–91. DOI: 10.1016/j.cbpa.2014.05.007.
- [272] Amir Arav et al. „New trends in gametes cryopreservation“. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* Jg. 187, Nr. 1-2 (Feb. 2002), S. 77–81. DOI: 10.1016/s0303-7207(01)00700-6.
- [273] Pablo G. Debenedetti und H. Eugene Stanley. „Supercooled and Glassy Water“. In: *Physics Today* Jg. 56, Nr. 6 (Juni 2003), S. 40–46. DOI: 10.1063/1.1595053.
- [274] Svante Arrhenius. „Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren“. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* Jg. 4U, Nr. 1 (Jan. 1889). DOI: 10.1515/zpch-1889-0416.
- [275] C. V. Raman. „A Theory of the Viscosity of Liquids“. In: *Nature* Jg. 111, Nr. 2790 (Apr. 1923), S. 532–533. DOI: 10.1038/111532b0.
- [276] E.N. da C. Andrade. „XLI. A theory of the viscosity of liquids.—Part I“. In: *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* Jg. 17, Nr. 112 (Feb. 1934), S. 497–511. DOI: 10.1080/14786443409462409.
- [277] Malcolm L. Williams, Robert F. Landel und John D. Ferry. „The Temperature Dependence of Relaxation Mechanisms in Amorphous Polymers and Other Glass-forming Liquids“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 77, Nr. 14 (Juli 1955), S. 3701–3707. DOI: 10.1021/ja01619a008.
- [278] C.A. Angell et al. „Liquid fragility and the glass transition in water and aqueous solutions“. In: *Journal of Food Engineering* Jg. 22, Nr. 1-4 (Jan. 1994), S. 115–142. DOI: 10.1016/0260-8774(94)90028-0.
- [279] C. A. Angell. „Formation of Glasses from Liquids and Biopolymers“. In: *Science* Jg. 267, Nr. 5206 (März 1995), S. 1924–1935. DOI: 10.1126/science.267.5206.1924.
- [280] Pablo G. Debenedetti und Frank H. Stillinger. „Supercooled liquids and the glass transition“. In: *Nature* Jg. 410, Nr. 6825 (März 2001), S. 259–267. DOI: 10.1038/35065704.
- [281] Julio Cesar Martinez-Garcia et al. „Fragility and basic process energies in vitrifying systems“. In: *Scientific Reports* Jg. 5, Nr. 1 (Feb. 2015). DOI: 10.1038/srep08314.

- [282] Lina Sophie Schlaeger. „Einzelmolekülspektroskopie an mit Fluoreszenzfarbstoff gefüllten reversen Mizellen“. Bachelorarbeit. Universität zu Lübeck, 2018.
- [283] J. Klingler und T. Friedrich. „Site-specific interaction of thrombin and inhibitors observed by fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Biophysical Journal* Jg. 73, Nr. 4 (Okt. 1997), S. 2195–2200. DOI: 10.1016/s0006-3495(97)78251-1.
- [284] Chan-Gi Pack et al. „Analysis of interaction between chaperonin GroEL and its substrate using fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Cytometry* Jg. 36, Nr. 3 (Juli 1999), S. 247–253. DOI: 10.1002/(sici)1097-0320(19990701)36:3<247::aid-cyto15>3.3.co;2-r.
- [285] Ulrich Meseth et al. „Resolution of Fluorescence Correlation Measurements“. In: *Biophysical Journal* Jg. 76, Nr. 3 (März 1999), S. 1619–1631. DOI: 10.1016/s0006-3495(99)77321-2.
- [286] Zdeněk Petrášek und Petra Schwill. „Precise Measurement of Diffusion Coefficients using Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *Biophysical Journal* Jg. 94, Nr. 4 (Feb. 2008), S. 1437–1448. DOI: 10.1529/biophysj.107.108811.
- [287] Yu-Zhong Zhang und David Carter. „Multicolor Fluorescent Microspheres as Calibration Standards for Confocal Laser Scanning Microscopy“. In: *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* Jg. 7, Nr. 2 (Juni 1999), S. 156–163. DOI: 10.1097/00129039-199906000-00009.
- [288] Barbara Pierscionek. „Refractive Index of the Human Lens Surface Measured with an Optic Fibre Sensor“. In: *Ophthalmic Research* Jg. 26, Nr. 1 (1994), S. 32–35. DOI: 10.1159/000267371.
- [289] Eilon Sherman et al. „Using Fluorescence Correlation Spectroscopy to Study Conformational Changes in Denatured Proteins“. In: *Biophysical Journal* Jg. 94, Nr. 12 (Juni 2008), S. 4819–4827. DOI: 10.1529/biophysj.107.120220.
- [290] Guobin Bao und Detlev Schild. „Fast and Accurate Fitting and Filtering of Noisy Exponentials in Legendre Space“. In: *PLoS ONE* Jg. 9, Nr. 3 (März 2014). Hrsg. von James P. Brody. DOI: 10.1371/journal.pone.0090500.
- [291] Goro Nishimura und Masataka Kinjo. „Systematic Error in Fluorescence Correlation Measurements Identified by a Simple Saturation Model of Fluorescence“. In: *Analytical Chemistry* Jg. 76, Nr. 7 (Apr. 2004), S. 1963–1970. DOI: 10.1021/ac034690b.
- [292] Attila Nagy, Jianrong Wu und Keith M. Berland. „Observation Volumes and γ -Factors in Two-Photon Fluorescence Fluctuation Spectroscopy“. In: *Biophysical Journal* Jg. 89, Nr. 3 (Sep. 2005), S. 2077–2090. DOI: 10.1529/biophysj.104.052779.
- [293] Bruce H. Billings und Dwight E. Gray. *American Institute of Physics Handbook*. Hrsg. von Dwight E. Gray. 3. Aufl. McGraw Hill Higher Education, 1982. ISBN: 007001485X.

- [294] Ewa Banachowicz et al. „Successful FCS Experiment in Nonstandard Conditions“. In: *Langmuir* Jg. 30, Nr. 29 (Juli 2014), S. 8945–8955. DOI: 10.1021/la5015708.
- [295] Bankanidhi Sahoo et al. „A fluorescence correlation spectrometer for measurements in cuvettes“. In: *Biophysical Journal* (März 2018). DOI: 10.1101/275230.
- [296] Nathanael S. Heyman und Janis M. Burt. „Hindered Diffusion through an Aqueous Pore Describes Invariant Dye Selectivity of Cx43 Junctions“. In: *Biophysical Journal* Jg. 94, Nr. 3 (Feb. 2008), S. 840–854. DOI: 10.1529/biophysj.107.115634.
- [297] S. G. Schultz und A. K. Solomon. „Determination of the Effective Hydrodynamic Radii of Small Molecules by Viscometry“. In: *The Journal of General Physiology* Jg. 44, Nr. 6 (Juli 1961), S. 1189–1199. DOI: 10.1085/jgp.44.6.1189.
- [298] J. B. Segur und Helen E. Oberstar. „Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions“. In: *Industrial & Engineering Chemistry* Jg. 43, Nr. 9 (Sep. 1951), S. 2117–2120. DOI: 10.1021/ie50501a040.
- [299] Tomomichi Iwaki et al. „Antibodies for fluorescent molecular rotors“. In: *Biochemistry* Jg. 32, Nr. 29 (Juli 1993), S. 7589–7592. DOI: 10.1021/bi00080a034.
- [300] R. D. Icenogle und E. L. Elson. „Fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery of multiple binding reactions. II. FPR and FCS measurements at low and high DNA concentrations“. In: *Biopolymers* Jg. 22, Nr. 8 (Aug. 1983), S. 1949–1966. DOI: 10.1002/bip.360220809.
- [301] A. G. Palmer und N. L. Thompson. „Molecular aggregation characterized by high order autocorrelation in fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Biophysical Journal* Jg. 52, Nr. 2 (Aug. 1987), S. 257–270. DOI: 10.1016/s0006-3495(87)83213-7.
- [302] Dennis E. Koppel. „Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Physical Review A* Jg. 10, Nr. 6 (Dez. 1974), S. 1938–1945. DOI: 10.1103/physreva.10.1938.
- [303] S. Milon et al. „Factors influencing fluorescence correlation spectroscopy measurements on membranes: simulations and experiments“. In: *Chemical Physics* Jg. 288, Nr. 2-3 (März 2003), S. 171–186. DOI: 10.1016/s0301-0104(03)00018-1.
- [304] Ilona Kutsche et al. „Oxygen solubilities in aqueous alcohol solutions“. In: *Journal of Chemical & Engineering Data* Jg. 29, Nr. 3 (Juli 1984), S. 286–287. DOI: 10.1021/je00037a018.
- [305] W. H. Koppenol und J. Butler. „Energetics of interconversion reactions of oxyradicals“. In: *Advances in Free Radical Biology & Medicine* Jg. 1, Nr. 1 (Jan. 1985), S. 91–131. DOI: 10.1016/8755-9668(85)90005-5.
- [306] J. P. Webb et al. „Intersystem Crossing Rate and Triplet State Lifetime for a Lasing Dye“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 53, Nr. 11 (Dez. 1970), S. 4227–4229. DOI: 10.1063/1.1673926.

- [307] F Stracke, Ma Heupel und E Thiel. „Singlet molecular oxygen photosensitized by Rhodamine dyes: correlation with photophysical properties of the sensitizers“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* Jg. 126, Nr. 1-3 (Sep. 1999), S. 51–58. DOI: 10.1016/s1010-6030(99)00123-9.
- [308] C. R. Wilke und Pin Chang. „Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions“. In: *AIChE Journal* Jg. 1, Nr. 2 (Juni 1955), S. 264–270. DOI: 10.1002/aic.690010222.
- [309] Bruce E. Poling, John M. Prausnitz und John P. O’Connell. *The Properties of Gases and Liquids*. McGraw-Hill Education, 2000. ISBN: 0070116822.
- [310] Ramalingam Sitaraman, S. H. Ibrahim und N. R. Kuloor. „A Generalized Equation for Diffusion in Liquids.“ In: *Journal of Chemical & Engineering Data* Jg. 8, Nr. 2 (Apr. 1963), S. 198–201. DOI: 10.1021/je60017a017.
- [311] International Association for the Properties of Water und Steam. *Revised Release on the IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Properties of Ordinary Water Substance for General and Scientific Use*. IAPWS R6-95(2016). Sep. 2016.
- [312] John C. Crittenden et al. *MWH’s Water Treatment*. John Wiley und Sons Ltd, März 2012. 1920 S. ISBN: 0470405392.
- [313] A. H. Johnstone. „CRC Handbook of Chemistry and Physics-69th Edition Editor in Chief R. C. Weast, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988, pp. 2400, price 57.50. ISBN 0-8493-0369-5“. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* Jg. 50, Nr. 2 (Apr. 2007), S. 294–295. DOI: 10.1002/jctb.280500215.
- [314] James Welty et al. *Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer*. Wiley, 2007. ISBN: 9780470128688.
- [315] Yiming Zhang, Julian R. G. Evans und Shoufeng Yang. „Corrected Values for Boiling Points and Enthalpies of Vaporization of Elements in Handbooks“. In: *Journal of Chemical & Engineering Data* Jg. 56, Nr. 2 (Feb. 2011), S. 328–337. DOI: 10.1021/je1011086.
- [316] Ralph T. Ferrell und David M. Himmelblau. „Diffusion coefficients of nitrogen and oxygen in water“. In: *Journal of Chemical & Engineering Data* Jg. 12, Nr. 1 (Jan. 1967), S. 111–115. DOI: 10.1021/je60032a036.
- [317] Frederick C. TSE und Orville C. Sandall. „Diffusion coefficients for oxygen and carbon dioxide in water at 25C by unsteady state desorption from a quiescent liquid“. In: *Chemical Engineering Communications* Jg. 3, Nr. 3 (Mai 1979), S. 147–153. DOI: 10.1080/00986447908935860.
- [318] Kenneth R. Harris und Lawrence A. Woolf. „Pressure and temperature dependence of the self diffusion coefficient of water and oxygen-18 water“. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* Jg. 76, Nr. 0 (1980), S. 377. DOI: 10.1039/f19807600377.

- [319] Colin R. Groom et al. „The Cambridge Structural Database“. In: *Acta Crystallographica Section B Structural Science, Crystal Engineering and Materials* Jg. 72, Nr. 2 (Apr. 2016), S. 171–179. DOI: 10.1107/s2052520616003954.
- [320] S. S. Batsanov. „Van der Waals Radii of Elements“. In: *Inorganic Materials* Jg. 37, Nr. 9 (2001), S. 871–885. DOI: 10.1023/a:1011625728803.
- [321] Sutton L.E., Hrsg. *Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions: Supplement 1956-1959*. The Chemical Society, 1965.
- [322] Robert Evans et al. „Improving the Interpretation of Small Molecule Diffusion Coefficients“. In: *Analytical Chemistry* Jg. 90, Nr. 6 (Feb. 2018), S. 3987–3994. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b05032.
- [323] Albert Einstein. „Zur Quantentheorie der Strahlung“. In: *Physikalische Zeitschrift* Jg. 18 (1917), S. 121–128.
- [324] R. Ladenburg. „Die quantentheoretische Deutung der Zahl der Dispersionselektronen“. In: *Zeitschrift für Physik* Jg. 4, Nr. 4 (Dez. 1921), S. 451–468.
- [325] Richard C. Tolman. „Duration of Molecules in Upper Quantum States“. In: *Physical Review* Jg. 23, Nr. 6 (Juni 1924), S. 693–709. DOI: 10.1103/physrev.23.693.
- [326] Francis Perrin. „Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans letat excité“. In: *Journal de Physique et le Radium* Jg. 7, Nr. 12 (1926), S. 390–401. DOI: 10.1051/jphysrad:01926007012039000.
- [327] Gilbert N. Lewis und M. Kasha. „Phosphorescence in Fluid Media and the Reverse Process of Singlet-Triplet Absorption“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 67, Nr. 6 (Juni 1945), S. 994–1003. DOI: 10.1021/ja01222a032.
- [328] S. J. Strickler und Robert A. Berg. „Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 37, Nr. 4 (Aug. 1962), S. 814–822. DOI: 10.1063/1.1733166.
- [329] Mustafa Arik, Neslihan Çelebi und Yavuz Onganer. „Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* Jg. 170, Nr. 2 (März 2005), S. 105–111. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2004.07.004.
- [330] Douglas Magde, Roger Wong und Paul G. Seybold. „Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields“. In: *Photochemistry and Photobiology* Jg. 75, Nr. 4 (Mai 2007), S. 327–334. DOI: 10.1562/0031-8655(2002)0750327fqyatr2.0.co2.
- [331] Steven F. Lee, Quentin Vérolet und Alexandre Fürstenberg. „Improved Super-Resolution Microscopy with Oxazine Fluorophores in Heavy Water“. In: *Angewandte Chemie International Edition* Jg. 52, Nr. 34 (Juli 2013), S. 8948–8951. DOI: 10.1002/anie.201302341.

- [332] Kathrin Klehs et al. „Increasing the Brightness of Cyanine Fluorophores for Single-Molecule and Superresolution Imaging“. In: *ChemPhysChem* Jg. 15, Nr. 4 (Dez. 2013), S. 637–641. DOI: 10.1002/cphc.201300874.
- [333] Hans Schott. „Direct comparison of the strength of hydrogen bonds formed by H₂O and D₂O“. In: *Journal of Macromolecular Science, Part B* Jg. 27, Nr. 1 (Apr. 1988), S. 119–123. DOI: 10.1080/00222348808212315.
- [334] W. Wallace Cleland. „Enzyme Mechanisms from Isotope Effects“. In: *Isotope Effects In Chemistry and Biology*. CRC Press, Nov. 2005, S. 915–930. DOI: 10.1201/9781420028027.ch37.
- [335] Ping Han und David M. Bartels. „Temperature Dependence of Oxygen Diffusion in H₂O and D₂O⁺“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 100, Nr. 13 (Jan. 1996), S. 5597–5602. DOI: 10.1021/jp952903y.
- [336] Jörg Enderlein et al. „Art and Artefacts of Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology* Jg. 5, Nr. 2 (Apr. 2004), S. 155–161. DOI: 10.2174/1389201043377020.
- [337] Alois Renn, Johannes Seelig und Vahid Sandoghdar. „Oxygen-dependent photochemistry of fluorescent dyes studied at the single molecule level“. In: *Molecular Physics* Jg. 104, Nr. 3 (Feb. 2006), S. 409–414. DOI: 10.1080/00268970500361861.
- [338] Nataliya Panchuk-Voloshina et al. „Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates“. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* Jg. 47, Nr. 9 (Sep. 1999), S. 1179–1188. DOI: 10.1177/002215549904700910.
- [339] P. C. Peters, C. Thoni und E. J. Harry. „Unexpected photobleaching of Alexa 488 in a fixed bacterial sample during 2-photon excitation“. In: *Biotechnic & Histochemistry* Jg. 81, Nr. 2-3 (Jan. 2006), S. 105–106. DOI: 10.1080/10520290600869355.
- [340] Younggyu Kim et al. „Efficient Site-Specific Labeling of Proteins via Cysteines“. In: *Bioconjugate Chemistry* Jg. 19, Nr. 3 (März 2008), S. 786–791. DOI: 10.1021/bc7002499.
- [341] Timothy Ragan et al. „Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging“. In: *Nature Methods* Jg. 9, Nr. 3 (Jan. 2012), S. 255–258. DOI: 10.1038/nmeth.1854.
- [342] Dasom Lee et al. „Ocular Drug Delivery through pHEMA-Hydrogel Contact Lenses Co-Loaded with Lipophilic Vitamins“. In: *Scientific Reports* Jg. 6, Nr. 1 (Sep. 2016). DOI: 10.1038/srep34194.
- [343] Yubing Han et al. „Cell-permeable organic fluorescent probes for live-cell long-term super-resolution imaging reveal lysosome-mitochondrion interactions“. In: *Nature Communications* Jg. 8, Nr. 1 (Nov. 2017). DOI: 10.1038/s41467-017-01503-6.

- [344] K. Visscher, G. J. Brakenhoff und T. D. Visser. „Fluorescence saturation in confocal microscopy“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 175, Nr. 2 (Aug. 1994), S. 162–165. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1994.tb03479.x.
- [345] G.A. Crosby, J.N. Demas und J.B. Callis. „Absolute quantum efficiencies“. In: *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry* Jg. 76A, Nr. 6 (Nov. 1972), S. 561. DOI: 10.6028/jres.076a.050.
- [346] H. Piwoński et al. „Optimal oxygen concentration for the detection of single indocarbocyanine molecules in a polymeric matrix“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 405, Nr. 4-6 (Apr. 2005), S. 352–356. DOI: 10.1016/j.cplett.2005.02.033.
- [347] Dana Kahra. „Die Energielandschaft von Proteinen: Von der Faltung zur Katalyse - Einzelmolekül-FRET-Studien an einem Zwei-Domänen-Protein“. Dissertation. Universität zu Lübeck, 2012.
- [348] Henning Seidel. „Einzelmoleküluntersuchungen zur Proteinkomplexbildung an den Modellsystemen ESAT-6/CFP-10 des *Mycobacterium tuberculosis* und NSP7/NSP8 des Felinen Coronavirus“. Dissertation. Universität zu Lübeck, 2013.
- [349] M.M. Asimov, V.N. Gavrilenko und A.N. Rubinov. „Laser photolysis of laser dyes and the influence of triplet quenchers“. In: *Journal of Luminescence* Jg. 46, Nr. 4 (Mai 1990), S. 243–249. DOI: 10.1016/0022-2313(90)90020-c.
- [350] E. Thiel und K.H. Drexhage. „New method to investigate weakly populated transient states“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 199, Nr. 3-4 (Nov. 1992), S. 329–334. DOI: 10.1016/0009-2614(92)80127-w.
- [351] William West, Sandra Pearce und F. Grum. „Stereoisomerism in cyanine dyes–meso-substituted thiacyanines“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 71, Nr. 5 (Apr. 1967), S. 1316–1326. DOI: 10.1021/j100864a021.
- [352] Marcia Levitus und Suman Ranjit. „Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments“. In: *Quarterly Reviews of Biophysics* Jg. 44, Nr. 01 (Nov. 2010), S. 123–151. DOI: 10.1017/s0033583510000247.
- [353] V.A. Kuzmin und A.P. Darmanyan. „Study of sterically hindered short-lived isomers of polymethine dyes by laser photolysis“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 54, Nr. 1 (Feb. 1978), S. 159–163. DOI: 10.1016/0009-2614(78)85688-7.
- [354] Ricardo Duchowicz, Lucia Scaffardi und Jorge O. Tocho. „Relaxation processes of singlet excited state of 3,3'-diethyloxadicarbocyanine iodide (DODCI) photoisomer“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 170, Nr. 5-6 (Juli 1990), S. 497–501. DOI: 10.1016/s0009-2614(90)87091-5.
- [355] Roberto E. Di Paolo et al. „Photoisomerization Dynamics and Spectroscopy of the Polymethine Dye DTCl“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 99, Nr. 38 (Sep. 1995), S. 13796–13799. DOI: 10.1021/j100038a008.

- [356] Glauco Ponterini und Fabio Momicchioli. „Trans-cis photoisomerization mechanism of carbocyanines: experimental check of theoretical models“. In: *Chemical Physics* Jg. 151, Nr. 1 (März 1991), S. 111–126. DOI: 10.1016/0301-0104(91)80011-6.
- [357] Javier Rodríguez et al. „AM1 Study of the Ground and Excited State Potential Energy Surfaces of Symmetric Carbocyanines“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 101, Nr. 37 (Sep. 1997), S. 6998–7006. DOI: 10.1021/jp9713569.
- [358] D. N. Dempster et al. „Photochemical characteristics of cyanine dyes. Part 1.—3,3′-diethyloxadicarbocyanine iodide and 3,3′-diethylthiadibocarbocyanine iodide“. In: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* Jg. 68, Nr. 0 (1972), S. 1479–1496. DOI: 10.1039/f29726801479.
- [359] V. A. Kuzmin, A. P. Darmanyan und M. M. Kulchitskii. „Laser photolysis of fluoro-substituted polymethine dyes“. In: *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science* Jg. 25, Nr. 10 (Okt. 1976), S. 2236–2238. DOI: 10.1007/bf02659566.
- [360] V. E. Korobov und Aleksandr K. Chibisov. „Primary Photoprocesses in Colorant Molecules“. In: *Russian Chemical Reviews* Jg. 52, Nr. 1 (Jan. 1983), S. 27–42. DOI: 10.1070/rc1983v052n01abeh002795.
- [361] Tom Brismar. „Physiology of transformed glial cells“. In: *Glia* Jg. 15, Nr. 3 (Nov. 1995), S. 231–243. DOI: 10.1002/glia.440150305.
- [362] R. Yasuda et al. „The ATP-waiting conformation of rotating F1-ATPase revealed by single-pair fluorescence resonance energy transfer“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 100, Nr. 16 (Juli 2003), S. 9314–9318. DOI: 10.1073/pnas.1637860100.
- [363] Matthew E. Sanborn et al. „Fluorescence Properties and Photophysics of the Sulfoindocyanine Cy3 Linked Covalently to DNA“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* Jg. 111, Nr. 37 (Sep. 2007), S. 11064–11074. DOI: 10.1021/jp072912u.
- [364] Billie J. Harvey und Marcia Levitus. „Nucleobase-Specific Enhancement of Cy3 Fluorescence“. In: *Journal of Fluorescence* Jg. 19, Nr. 3 (Okt. 2008), S. 443–448. DOI: 10.1007/s10895-008-0431-1.
- [365] Maria Sorokina et al. „Fluorescent Lifetime Trajectories of a Single Fluorophore Reveal Reaction Intermediates During Transcription Initiation“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 131, Nr. 28 (Juli 2009), S. 9630–9631. DOI: 10.1021/ja902861f.
- [366] H. Hwang, H. Kim und S. Myong. „Protein induced fluorescence enhancement as a single molecule assay with short distance sensitivity“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 108, Nr. 18 (Apr. 2011), S. 7414–7418. DOI: 10.1073/pnas.1017672108.

- [367] Victoria-Marie Gerant. „Charakterisierung des photophysikalischen Verhaltens von Rhodamin- und Cyaninderivaten mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie“. Masterarbeit. Universität zu Lübeck, 2018.
- [368] C. Rullière. „Laser action and photoisomerisation of 3,3'-diethyl oxadiazocyanine iodide (DODCI): Influence of temperature and concentration“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 43, Nr. 2 (Okt. 1976), S. 303–308. DOI: 10.1016/0009-2614(76)85308-0.
- [369] Ivan Baraldi et al. „Electronic spectra and trans—cis photoisomerism of carbocyanines. A theoretical (CS INDO CI) and experimental study“. In: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* Jg. 49, Nr. 4 (Apr. 1993), S. 471–495. DOI: 10.1016/0584-8539(93)80190-1.
- [370] Alexander K. Chibisov, Galina V. Zakharova und Helmut Görner. „Effects of substituents in the polymethine chain on the photoprocesses in indodicarbocyanine dyes“. In: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. Jg. 92, Nr. 24 (1996)*, S. 4917–4925. DOI: 10.1039/ft9969204917.
- [371] Zhengxi Huang et al. „Direct Observation of Delayed Fluorescence from a Remarkable Back-Isomerization in Cy5“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 127, Nr. 22 (2005). PMID: 15926831, S. 8064–8066. DOI: 10.1021/ja050050+.
- [372] A. N. Fletcher und M. E. Pietrak. „Laser dye stability, part 10. Effects of DABCO on flashlamp pumping of coumarin dyes“. In: *Applied Physics B Photophysics and Laser Chemistry* Jg. 37, Nr. 3 (Juli 1985), S. 151–157. DOI: 10.1007/bf00692078.
- [373] Richa Dave et al. „Mitigating Unwanted Photophysical Processes for Improved Single-Molecule Fluorescence Imaging“. In: *Biophysical Journal* Jg. 96, Nr. 6 (März 2009), S. 2371–2381. DOI: 10.1016/j.bpj.2008.11.061.
- [374] L. Michaelis. „The Viologen Indicators“. In: *The Journal of General Physiology* Jg. 16, Nr. 6 (Juli 1933), S. 859–873. DOI: 10.1085/jgp.16.6.859.
- [375] Norishige Kakegawa und Makoto Ogawa. „Effective Luminescence Quenching of Tris(2,2-bipyridine)ruthenium(II) by Methylviologen on Clay by the Aid of Poly(vinylpyrrolidone)“. In: *Langmuir* Jg. 20, Nr. 17 (Aug. 2004), S. 7004–7009. DOI: 10.1021/la036213u.
- [376] J. Vogelsang et al. „Controlling the fluorescence of ordinary oxazine dyes for single-molecule switching and superresolution microscopy“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 106, Nr. 20 (Mai 2009), S. 8107–8112. DOI: 10.1073/pnas.0811875106.
- [377] Dieter Rehm und Albert Weller. „Kinetik und Mechanismus der Elektronübertragung bei der Fluoreszenzlöschung in Acetonitril“. In: *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* Jg. 73 (8-9 1969), S. 834–839.

- [378] Dieter Rehm und Albert Weller. „Kinetics of Fluorescence Quenching by Electron and H-Atom Transfer“. In: *Israel Journal of Chemistry* Jg. 8, Nr. 2 (1970), S. 259–271. DOI: 10.1002/ijch.197000029.
- [379] C.G. Malmberg und A.A. Maryott. „Dielectric constant of water from 0 to 100 C“. In: *Journal of Research of the National Bureau of Standards* Jg. 56, Nr. 1 (Jan. 1956), S. 1. DOI: 10.6028/jres.056.001.
- [380] Huimin Chen et al. „Mechanisms of Quenching of Alexa Fluorophores by Natural Amino Acids“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 132, Nr. 21 (Juni 2010), S. 7244–7245. DOI: 10.1021/ja100500k.
- [381] Ke Jia et al. „Characterization of Photoinduced Isomerization and Intersystem Crossing of the Cyanine Dye Cy3“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 111, Nr. 9 (März 2007), S. 1593–1597. DOI: 10.1021/jp067843i.
- [382] Anja Dietrich et al. „Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and competing processes in donor–acceptor substituted DNA strands: a comparative study of ensemble and single-molecule data“. In: *Reviews in Molecular Biotechnology* Jg. 82, Nr. 3 (Jan. 2002), S. 211–231. DOI: 10.1016/s1389-0352(01)00039-3.
- [383] M. Sauer et al. „New fluorescent dyes in the red region for biodiagnostics“. In: *Journal of Fluorescence* Jg. 5, Nr. 3 (Sep. 1995), S. 247–261. DOI: 10.1007/bf00723896.
- [384] Daniela Pfiffi et al. „Diphenylhexatrienes as Photoprotective Agents for Ultrasensitive Fluorescence Detection“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 114, Nr. 12 (Apr. 2010), S. 4099–4108. DOI: 10.1021/jp909033x.
- [385] J. Lenhard. „Measurement of reversible electrode potentials for cyanine dyes by the use of phase-selective second-harmonic AC voltammetry“. In: *Journal of Imaging Science* Jg. 30 (1 1986), S. 27–35.
- [386] Masaki Torimura et al. „Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base“. In: *Analytical Sciences* Jg. 17, Nr. 1 (2001), S. 155–160. DOI: 10.2116/analsci.17.155.
- [387] Daniela Pfiffi. „Steigerung der Signalstärke und der Photostabilität von Fluorophoren in der Einzelmolekülspektroskopie“. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2010.
- [388] Y. Muto, Y. Nakato und H. Tsubomura. „Solvent effects on the fluorescence spectra of some aliphatic amines in solutions“. In: *Chemical Physics Letters* Jg. 9, Nr. 6 (Juni 1971), S. 597–599. DOI: 10.1016/0009-2614(71)85137-0.
- [389] Anthony Ledwith. „Cation radicals in electron transfer reactions“. In: *Accounts of Chemical Research* Jg. 5, Nr. 4 (Apr. 1972), S. 133–139. DOI: 10.1021/ar50052a003.
- [390] Nicholas J. Turro. *Modern Molecular Photochemistry*. Benjamin/Cummings Publishing Company, 1978, S. 628.

- [391] Walter Hub et al. „trans-Stilbene-amine exciplexes. Stereoelectronic control of amine dimer cation radical formation“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 106, Nr. 3 (Feb. 1984), S. 701–708. DOI: 10.1021/ja00315a040.
- [392] Denis Dörr. „Untersuchung des Einflusses der Matrix und photoprotektiver Additive auf die Eigenschaften von Fluorophoren mittels Einzelmolekülspektroskopie“. Dissertation. Universität Düsseldorf, 2014.
- [393] S. Steenken und P. Neta. „One-electron redox potentials of phenols. Hydroxy- and aminophenols and related compounds of biological interest“. In: *The Journal of Physical Chemistry* Jg. 86, Nr. 18 (Sep. 1982), S. 3661–3667. DOI: 10.1021/j100215a033.
- [394] Peter Wardman. „Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free Radicals in Aqueous Solution“. In: *Journal of Physical and Chemical Reference Data* Jg. 18, Nr. 4 (Okt. 1989), S. 1637–1755. DOI: 10.1063/1.555843.
- [395] Donald T. Sawyer und R.J.P. Williams. *Oxygen Chemistry*. International Series of Monographs on Chemistry. Oxford University Press, 19. Sep. 1991. ISBN: 0195363329.
- [396] George J. Kavarnos. *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*. Titles Supplied by John Wiley & Sons Australia, 1993. ISBN: 0895737515.
- [397] Maria Ott. „Konformationsänderung und enzymatische Aktivität am einzelnen Molekül“. Dissertation. Universität zu Lübeck, 2008.
- [398] J. Barroso et al. „Wavelength dependence of the nonlinear absorption properties of laser dyes in solid and liquid solutions“. In: *Chemical Physics* Jg. 238, Nr. 2 (Nov. 1998), S. 257–272. DOI: 10.1016/s0301-0104(98)00334-6.
- [399] Danilo Dini et al. „Nonlinear optical effects related to saturable and reverse saturable absorption by subphthalocyanines at 532 nm“. In: *Chemical Communications*, Nr. 30 (2005), S. 3796. DOI: 10.1039/b502359a.
- [400] Zhengxi Huang et al. „Spectral Identification of Specific Photophysics of Cy5 by Means of Ensemble and Single Molecule Measurements“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 110, Nr. 1 (Jan. 2006), S. 45–50. DOI: 10.1021/jp0562936.
- [401] David Cooper et al. „Photobleaching Lifetimes of Cyanine Fluorophores Used for Single-Molecule Förster Resonance Energy Transfer in the Presence of Various Photoprotection Systems“. In: *ChemBioChem* Jg. 14, Nr. 9 (Juni 2013), S. 1075–1080. DOI: 10.1002/cbic.201300030.
- [402] Nicole Kretschy, Matej Sack und Mark M. Somoza. „Sequence-Dependent Fluorescence of Cy3- and Cy5-Labeled Double-Stranded DNA“. In: *Bioconjugate Chemistry* Jg. 27, Nr. 3 (Feb. 2016), S. 840–848. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00053.

- [403] Jerker Widengren et al. „Two New Concepts to Measure Fluorescence Resonance Energy Transfer via Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Experimental Realizations“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* Jg. 105, Nr. 28 (Juli 2001), S. 6851–6866. DOI: 10.1021/jp010301a.
- [404] Volker Buschmann, Kenneth D. Weston und Markus Sauer. „Spectroscopic Study and Evaluation of Red-Absorbing Fluorescent Dyes“. In: *Bioconjugate Chemistry* Jg. 14, Nr. 1 (Jan. 2003), S. 195–204. DOI: 10.1021/bc025600x.
- [405] Samuel S. White et al. „Characterization of a Single Molecule DNA Switch in Free Solution“. In: *Journal of the American Chemical Society* Jg. 128, Nr. 35 (Sep. 2006), S. 11423–11432. DOI: 10.1021/ja0614870.
- [406] A. K. Chibisov et al. „Photoprocesses in dimers of polymethine dyes“. In: *Journal of Applied Spectroscopy* Jg. 62, Nr. 2 (März 1995), S. 229–235. DOI: 10.1007/bf02606475.
- [407] Andriy Chmyrov, Tor Sandén und Jerker Widengren. „Iodide as a Fluorescence Quencher and Promoter-Mechanisms and Possible Implications“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* Jg. 114, Nr. 34 (Sep. 2010), S. 11282–11291. DOI: 10.1021/jp103837f.
- [408] Yoshie Harada et al. „Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay“. In: *Journal of Molecular Biology* Jg. 216, Nr. 1 (Nov. 1990), S. 49–68. DOI: 10.1016/s0022-2836(05)80060-9.
- [409] Clarivate Analytics. *Publication topic records*. 2018.
- [410] Yu-Zhong Zhang und David Carter. „Multicolor Fluorescent Microspheres as Calibration Standards for Confocal Laser Scanning Microscopy“. In: *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* Jg. 7, Nr. 2 (1999), S. 156–163. DOI: 10.1097/00022744-199906000-00009.
- [411] Kenneth W. Dunn und Exing Wang. „Optical Aberrations and Objective Choice in Multicolor Confocal Microscopy“. In: *BioTechniques* Jg. 28, Nr. 3 (März 2000), S. 542–550. DOI: 10.2144/00283rr03.
- [412] Robert M. Zucker und Owen Price. „Evaluation of confocal microscopy system performance“. In: *Cytometry* Jg. 44, Nr. 4 (2001), S. 273–294. DOI: 10.1002/1097-0320(20010801)44:4<273::aid-cyto1120>3.0.co;2-n.
- [413] J. M. Zwier et al. „Image calibration in fluorescence microscopy“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 216, Nr. 1 (Okt. 2004), S. 15–24. DOI: 10.1111/j.0022-2720.2004.01390.x.
- [414] G. J. Brakenhoff et al. „Characterization of sectioning fluorescence microscopy with thin uniform fluorescent layers: Sectioned Imaging Property or SIPcharts“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 219, Nr. 3 (Sep. 2005), S. 122–132. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2005.01504.x.

- [415] L. C. Kuypers, J. J. J. Dirckx und W. F. Decraemer. „A simple method for checking the illumination profile in a laser scanning microscope and the dependence of resolution on this profile“. In: *Scanning* Jg. 26, Nr. 5 (Dez. 2006), S. 256–258. DOI: 10.1002/sca.4950260507.
- [416] Alan R. Hibbs, Glen MacDonald und Karl Garsha. „Practical Confocal Microscopy“. In: *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. Springer US, 2006, S. 650–671. DOI: 10.1007/978-0-387-45524-2_36.
- [417] E. H. Cho und S. J. Lockett. „Calibration and standardization of the emission light path of confocal microscopes“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 223, Nr. 1 (Juli 2006), S. 15–25. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2006.01598.x.
- [418] Rimas Juškaitis. „Measuring the Real Point Spread Function of High Numerical Aperture Microscope Objective Lenses“. In: *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. Springer US, 2006, S. 239–250. DOI: 10.1007/978-0-387-45524-2_11.
- [419] Jennifer C. Waters. „Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy“. In: *The Journal of Cell Biology* Jg. 185, Nr. 7 (Juni 2009), S. 1135–1148. DOI: 10.1083/jcb.200903097.
- [420] Michael A Model und James L Blank. „Intensity calibration of a laser scanning confocal microscope based on concentrated dyes.“ In: *Analytical and quantitative cytology and histology* Jg. 28 (5 Okt. 2006), S. 253–261.
- [421] David Grünwald et al. „Calibrating excitation light fluxes for quantitative light microscopy in cell biology“. In: *Nature Protocols* Jg. 3, Nr. 11 (Okt. 2008), S. 1809–1814. DOI: 10.1038/nprot.2008.180.
- [422] E. Rhoades, E. Gussakovsky und G. Haran. „Watching proteins fold one molecule at a time“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 100, Nr. 6 (Feb. 2003), S. 3197–3202. DOI: 10.1073/pnas.2628068100.
- [423] R. D. Smiley et al. „Single-molecule measurements of the opening and closing of the DNA gate by eukaryotic topoisomerase II“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jg. 104, Nr. 12 (März 2007), S. 4840–4845. DOI: 10.1073/pnas.0700342104.
- [424] Dominik Haenni et al. „Intramolecular Distances and Dynamics from the Combined Photon Statistics of Single-Molecule FRET and Photoinduced Electron Transfer“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* Jg. 117, Nr. 42 (Mai 2013), S. 13015–13028. DOI: 10.1021/jp402352s.
- [425] Jeong Lee et al. „Measurement of diffusion in articular cartilage using fluorescence correlation spectroscopy“. In: *BMC Biotechnology* Jg. 11, Nr. 1 (2011), S. 19. DOI: 10.1186/1472-6750-11-19.

- [426] Kirsten Bacia, Zdeněk Petrášek und Petra Schwill. „Correcting for Spectral Cross-Talk in Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy“. In: *ChemPhysChem* Jg. 13, Nr. 5 (Feb. 2012), S. 1221–1231. DOI: 10.1002/cphc.201100801.
- [427] Mario Schneider et al. „Fluorescence correlation spectroscopy reveals a cooperative unfolding of monomeric amyloid-42 with a low Gibbs free energy“. In: *Scientific Reports* Jg. 7, Nr. 1 (Mai 2017). DOI: 10.1038/s41598-017-02410-y.
- [428] Robert M. Zucker. „Evaluation of Confocal Microscopy System Performance“. In: *Cell Imaging Techniques*. Humana Press, 2006, S. 77–135. DOI: 10.1007/978-1-59259-993-6_5.
- [429] Katarzyna M. Kedziora et al. „Method of calibration of a fluorescence microscope for quantitative studies“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 244, Nr. 1 (Juli 2011), S. 101–111. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2011.03514.x.
- [430] J.M. Zwier et al. „Quantitative image correction and calibration for confocal fluorescence microscopy using thin reference layers and SIPchart-based calibration procedures“. In: *Journal of Microscopy* Jg. 231, Nr. 1 (Juli 2008), S. 59–69. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2008.02017.x.
- [431] Marcia Levitus et al. „Novel Kinetic Model in Amorphous Polymers. Spiropyran-Merocyanine System Revisited“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* Jg. 101, Nr. 39 (Sep. 1997), S. 7680–7686. DOI: 10.1021/jp963132g.
- [432] M. Kreiter et al. „Orientation dependence of fluorescence lifetimes near an interface“. In: *The Journal of Chemical Physics* Jg. 117, Nr. 20 (Nov. 2002), S. 9430–9433. DOI: 10.1063/1.1515732.
- [433] Taekjip Ha und Jian Xu. „Photodestruction Intermediates Probed by an Adjacent Reporter Molecule“. In: *Physical Review Letters* Jg. 90, Nr. 22 (Juni 2003). DOI: 10.1103/physrevlett.90.223002.
- [434] A. Delon et al. „Photobleaching, Mobility, and Compartmentalisation: Inferences in Fluorescence Correlation Spectroscopy“. In: *Journal of Fluorescence* Jg. 14, Nr. 3 (Mai 2004), S. 255–267. DOI: 10.1023/b:jofl.0000024557.73246.f9.
- [435] Zhengxi Huang, Dongmei Ji und Andong Xia. „Fluorescence intensity and lifetime fluctuations of single Cy5 molecules immobilized on the glass surface“. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* Jg. 257–258 (Mai 2005), S. 203–209. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2004.10.108.
- [436] Björn Hellenkamp et al. „Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements – a multi-laboratory benchmark study“. In: *Nature Methods* Jg. 15, Nr. 9 (Aug. 2018), S. 669–676. DOI: 10.1038/s41592-018-0085-0.
- [437] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. *C.I. Basic Red 1*, CID=13806, 10. Mai 2019. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13806>.

- [438] Christian Eggeling et al. „Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell“. In: *Nature* Jg. 457, Nr. 7233 (Dez. 2008), S. 1159–1162. DOI: 10.1038/nature07596.
- [439] D. Yin et al. „Microphotonic control of single molecule fluorescence correlation spectroscopy using planar optofluidics“. In: *Optics Express* Jg. 15, Nr. 12 (2007), S. 7290. DOI: 10.1364/oe.15.007290.
- [440] Anastasia Loman. „Molecular Sizing using Fluorescence Correlation Spectroscopy“. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen, 2010.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Elektromagnetisches Spektrum	6
2.2	Definition des Koordinatensystems	12
2.3	Elektronenwolken eines planaren Moleküls	15
2.4	Franck-Condon-Prinzip und Lösungsmittelrelaxation	16
2.5	Perrin-Jabłoński-Diagramm	17
2.6	Besetzungsdichten der Zustände	21
2.7	Abstandsabhängigkeit des Energie- und Elektronentransfers	24
2.8	Energieniveautermschema mit Singulett- und Triplettlöschung	25
2.9	Energieniveautermschema mit Bleichprozessen	28
2.10	Optische Pfade konfokaler Mikroskope	30
2.11	Intensitäts-Punktspreizfunktion	33
2.12	Signal-Rausch-Verhältnis als Funktion der Anregungsleistung	35
3.1	Anregungs- und Detektionsstrahlengang des Mikroskops	44
3.2	Schematische Darstellung der verwendeten Mikroskope	45
3.3	Detektionseffizienzen der genutzten Detektoren	46
3.4	Kammer für Messungen unter Gasatmosphäre	47
3.5	LabVIEW-Bedienoberfläche des konfokalen Einzelmolekülmikroskops	48
3.6	Schematischer Kryostat-Mikroskop-Aufbau und Einfrierprozess	50
3.7	Maleimid- und NHS-Ester-Funktionalisierung	52
3.8	Strukturformeln und Spektren der Alexa-Farbstoffe	53
3.9	Strukturformel und Spektren der PF- und CF-Farbstoffe	55
3.10	Strukturformeln und Spektren der Cyaninfarbstoffe	56
3.11	Umwandlung von Trolox zu Trolox-Chinon	57
3.12	Strukturformeln von APTES und PEG	58
3.13	Immobilisierung von Farbstoffen am Deckglas	59
3.14	Bedienoberfläche des Simulators in LabVIEW	60
3.15	Vergleich der Anregungs- und Detektionsfunktionen	62
4.1	Mittlere Besetzungsdichte und Fluoreszenzemissionsrate	71
4.2	Antibunching in der Korrelationsfunktion	74
4.3	Energieniveautermschema mit höher angeregten Zuständen	76
4.4	Verlauf der MB als Funktion der Photonenflussdichte	80
4.5	Simulierte Fluoreszenzereignisse im konfokalen Volumen	83

4.6	Erhöhte Intensitäten im Fünf-Niveau-System	84
4.7	Relative Fluoreszenzintensität in der Fokusebene	85
4.8	Differenz von Gaußfunktionen	87
4.9	Anpassung mit Gauß- und Gauß-Differenz-Funktion	88
4.10	Gauß-Differenz-Anpassung	89
4.11	Autokorrelationsfunktion der Diffusion	92
4.12	Effektives Volumen $V_{\text{eff}}^{\sigma,c}$ und Beobachtungsvolumen $V_{\text{B}}^{\sigma,c}$	93
4.13	Vergleich der Anpassungsfunktionen	95
5.1	Simulierte Korrelationsfunktion immobilisierter Moleküle	100
5.2	Molekulare Helligkeit eines Drei-Niveau-Systems	101
5.3	Triplettparameter und Interkombinationsraten	103
5.4	Beschleunigte Rück-Interkombination	105
5.5	Triplettparameter bei beschleunigter Rück-Interkombination	107
5.6	Molekulare Helligkeit bei unterschiedlichen Raten k_{rISC_n}	109
5.7	Anpassungswerte unterschiedlicher Niveaudiagramme	111
5.8	Anpassung des Antibunchings des Drei-Niveau-Systems	113
5.9	Auf einem Deckglas immobilisierte AF-488-Moleküle	116
5.10	TIRFM immobilisierter AF-488-Moleküle	117
5.11	Aufnahmen bei niedrigen Temperaturen (77 K)	118
6.1	Bestimmung der Abbildungsfunktion des Mikroskops	122
6.2	Glycerineinfluss auf die Diffusionszeit von AF-488	125
6.3	Diffusionszeit und Diffusionskoeffizient von AF-488	126
6.4	Viskosität und hydrodynamischer Radius von AF-488	127
6.5	Molekulare Helligkeit von AF-488 unter Glycerinzugabe	128
6.6	Sättigung des Leuchtverhaltens von AF-488	129
6.7	Mittlere Molekülzahl und Zählrate von AF-488	131
6.8	Triplettparameter von AF-488 unter Glycerinzugabe	132
6.9	Interkombinationsraten von AF-488 unter Glycerinzugabe	133
6.10	Temperaturabhängige O ₂ -Löslichkeit in Glycerin-Wasser-Gemischen	134
6.11	O ₂ -Löslichkeit und Rück-Interkombinationsrate von AF-488	135
6.12	Stern-Volmer Graph und Sauerstoffdiffusivität	136
6.13	Kollisions- und Löschraten von AF-488	138
6.14	Globale Anpassung der Interkombination von AF-488	140
6.15	AF-488-Lebensdauer und Brechungsindex bei Glycerinzugabe	141
6.16	Stern-Volmer Graph für die MB und die Lebensdauer von AF-488	142
6.17	Stern-Volmer-Graph von AF-488 in Abhängigkeit von zwei Prozessen	143
6.18	Diffusionszeiten unter Normal- und Argonatmosphäre	146
6.19	Triplettparameter unter Normal- und Argonatmosphäre	148
6.20	Interkombinationsraten unter Normal- und Argonatmosphäre	149

6.21	Molekulare Helligkeit unter Normal- und Argonatmosphäre	152
6.22	Einfaches Modell der Isomerisierung eines Carbocyaninfarbstoffes	158
6.23	Anpassung der schnellen Dynamik von AF-647	164
6.24	Normierte Anpassungen und Diffusionszeit von AF-647	165
6.25	Simulation der Isomerisierung	167
6.26	Löschung angeregter Zustände durch Redoxreaktionen	168
6.27	MB bei der Zugabe von Trolox und unter Argonatmosphäre	173
6.28	Parameter der Anpassung der MB mit Trolox und unter Argon	175
6.29	MB von sCy3 und AF-647 mit Additiven	176
7.1	Publikationen im Bereich der Einzelmoleküluntersuchungen	181
7.2	Diffusionszeit bei Dejustage der Anregung und der Detektion	183
7.3	Tripletanteil und Zeit bei Dejustage der Anregung und der Detektion . . .	185
7.4	Interkombinationsrate bei Dejustage der Anregung und der Detektion . . .	186
7.5	MB bei Dejustage der Anregung und der Detektion	187
7.6	Detektionseffizienz ohne maximale MB	188
A.1	Simulierte Anregungs- und Detektionsfunktion	VII
C.1	Differenzen der relativen Fluoreszenzintensität	XXII
C.2	3D-Gauß-Anpassung	XXIII
C.3	Zusätzliche Terme des Gauß-Differenz-Modells	XXIII
C.4	Maximaler Volumenfaktor für das effektive Volumen $V_{\text{eff}}^{\sigma,c}$	XXIV
C.5	3D-Gauß- und Gauß-Differenz-Anpassungsfunktionen	XXV
C.6	Fluoreszenzlebensdauer unterschiedlicher Fluorophore in PBS	XXVI
C.7	Rück-Interkombinationsrate unterschiedlicher Niveaudiagramme	XXVII
C.8	Antibunching des Drei-Niveau-Systems	XXVII
C.9	Transiente Intensität einzelner AF-488-Moleküle	XXVIII
C.10	Korrelationsfunktion der AF-488-Moleküle	XXVIII
C.11	Stokesradius und Viskosität bei unterschiedlichen τ_{D_0}	XXX
C.12	Einfluss der Sauerstofflöslichkeit	XXX
C.13	Kollisions- und Löschraten nach Tabelle C.1	XXXI
C.14	Fluoreszenzlebensdaueremessung von AF-488 bei Glycerinzugabe	XXXI
C.15	Stern-Volmer Graph für teilweise zugängliche Löschung	XXXII
C.16	Interkombinationsraten unter normaler Atmosphäre und in Argon . . .	XXXII
C.17	Molekulare Helligkeit und wellenlängenabhängige Absorption	XXXIII
C.18	Strukturformeln der Rhodamine und von Atto 647N	XXXIII
C.19	Korrelationskurve von AF-647 mit Anpassungen bei 1 mW	XXXVI
C.20	Autokorrelationen und Anpassungen von AF-647	XXXVI
C.21	Tripletzeit und Tripletanteil bei der Zugabe von Trolox in PBS . . .	XXXVII
C.22	Diffusionszeit unter der Zugabe von Trolox in PBS	XXXVII
C.23	Diffusionszeit und Tripletparameter von sCy3	XXXVIII

C.24 Rück-Interkombinationsrate bei Dejustage	XXXIX
C.25 Molekülzahl und Zählrate bei Dejustage	XXXIX
C.26 MB bei Dejustage der Anregung und der Detektion	XL
C.27 Differenz der MB bei Dejustage der Anregung und Detektion	XL

Tabellenverzeichnis

3.1	Parameter der verwendeten Fluorophore	51
4.1	Simulationsparameter verschiedener Energieniveaudiagramme	82
5.1	Simulierte und durch die Anpassung bestimmte Werte	104
5.2	Parameter bei beschleunigter Rück-Interkombination	108
5.3	Simulationsparameter der immobilisierten Moleküle	110
5.4	Simulations- und Anpassungswerte der Sättigungsparameter ϕ_{sat} der MB .	112
5.5	Änderung der Parameter im Vergleich zum Drei-Niveau-System	114
6.1	Parameter unterschiedlicher Glycerin-Wasser-Gemische	137
6.2	Zusammenfassung der Raten und Koeffizienten	139
6.3	Zusammenfassung der Messparameter des Diffusionsanteils	147
6.4	Parameter der globalen Anpassung der Tripletttraten	150
6.5	Aus der Triplettanalyse bestimmte Ratenkonstanten der Löschung	151
6.6	Parameter der globalen Anpassung der MB	153
6.7	Simulationsparameter mit Isomerisierung	166
6.8	Elektrochemische Potentiale und Übergangsenergien	170
6.9	Freie Enthalpie der Elektronentransferreaktionen	171
6.10	Freie Enthalpie der Ladungsrekombination	172
6.11	Globale Anpassungswerte der MB von AF-488, sCy3, sCy5 und AF-647 . .	178
7.1	Aus der Diffusionszeit bestimmte Parameter	184
C.1	Zusammenfassung der Raten und Koeffizienten	XXIX
C.2	Fluoreszenzlebensdauermessung von AF-488 bei Glycerinzugabe	XXX
C.3	Parameter der Anpassung der MB mit Trolox und unter Argon	XXXIV

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Jan Pavlita
Virchowstraße 2a
23562 Lübeck

E-Mail: jan@pavlita.de

Geboren am 22. Juni 1989 in Hamburg
Ledig, Tschechisch



Studium & Promotion

- seit 01/2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter - Doktorand am Institut für Physik der Universität zu Lübeck
- 04/2012–01/2014 Masterstudium der Medizinischen Ingenieurwissenschaft an der Universität zu Lübeck mit der Gesamtnote 1,2 (Titel der Masterarbeit: *Dichroic-free confocal fluorescence microscopy*, Note: 1,0)
- 05/2011–07/2013 Studentische und wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physik der Universität zu Lübeck
- 08/2008–03/2012 Bachelorstudium der Medizinischen Ingenieurwissenschaft an der Universität zu Lübeck mit der Gesamtnote 2,2 (Titel der Bachelorarbeit: *Single-Molecule Fluorescence Benchmark*, Note: 1,0)

Qualifikationen & Forschungspraktika

- seit 11/2014 Sachkunde für Laserschutzbeauftragte gem. Anhang 3 der Unfallverhütungsvorschrift „Laserstrahlung“ BGV B2. Besteller Laserschutzbeauftragter am Institut für Physik.
- 09/2012–03/2013 Entwicklung eines Spektral-Domänen-OCT auf Basis einer Superkontinuum-Lichtquelle bei Thorlabs in Lübeck

Schulbildung

- 09/1995–06/2008 Grundschule und Gymnasium in Hamburg (Abiturnote: 1,7)

Lübeck, 2019

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

Jan Pavlita, Till Zickmantel and Christian G. Hübner

An Easy to Handle Open Source Simulator: From Diffusion to Single Photon Events and FRET

in Vorbereitung

Jan Pavlita, Verena Hirschfeld and Christian G. Hübner

Evaluating the Detection and Excitation Properties of Single Molecule Microscopes via Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

in Vorbereitung

Jan Pavlita, Victoria Gerant, Fiona Allerding and Christian G. Hübner

Photophysical Properties of Rhodamin and Cyanin Dye Molecules under Strong Excitation Conditions

in Vorbereitung

Vorträge & Poster

Jan Pavlita, Till Zickmantel and Christian G. Hübner

A Single Molecule Fluorescence Simulator Toolkit

Biennial Meeting of the German Biophysical Society (DGfB), Düsseldorf, 16-18 September 2018, Poster

Jan Pavlita, Fiona Allerding and Christian G. Hübner

Observing Photo Physical Properties of Fluorescent Dyes by Single Molecule Fluorescence Methods

11th North German Biophysics Meeting, Research Center Borstel, 12 Januar 2018, Poster

Jan Pavlita, Fiona Allering and Christian G. Hübner

Observing Photo Physical Properties of Fluorescent Dyes by Single Molecule Fluorescence Methods

23. International Workshop on “Single Molecule Spectroscopy and Super-resolution Microscopy in the Life Sciences”, Berlin, 13-15 September 2017, Poster

Jan Pavlita, Fiona Allering and Christian G. Hübner

Observing Photo Physical Properties of Fluorescent Dyes by Single Molecule Fluorescence Methods

10th North German Biophysics Meeting, Research Center Borstel, 13 Januar 2017, Poster

Jan Pavlita and Christian G. Hübner

Eiweißmoleküle bei der Arbeit

Uni im Dialog, Lübeck, 8 Juni 2016, Posterpreis der Baltic Schule, Poster

Katharina Duda, Verena Hirschfeld, Jan Pavlita, and Christian G. Hübner

Construction of a Cryo Microscope for Single Molecule Measurements

Studierendentagung des BioMedTec Wissenschaftscampus, Lübeck, 09-11 März 2016, Poster

Jan Pavlita, Verena Hirschfeld and Christian G. Hübner

Benchmarking Single Molecule Fluorescence Instruments: Detection in Solution

9th North German Biophysics Meeting, Research Center Borstel, 135 Januar 2016, Poster

Jan Pavlita, Verena Hirschfeld and Christian G. Hübner

Benchmarking Single Molecule Fluorescence Instruments: Detection in Solution

21. International Workshop on “Single Molecule Spectroscopy and Super-resolution Microscopy in the Life Sciences”, Berlin, 02-04 September 2015, Poster

Jan Pavlita, Verena Hirschfeld and Christian G. Hübner

Benchmarking Single Molecule Fluorescence Instruments: Detection in Solution

10th European Biophysics Congress, Dresden, 18-22 Juli 2015, Poster

Jan Pavlita and Christian Winter

Broadband Spectral Domain Optical Coherence Tomography

*Studierendentagung des BioMedTec Wissenschaftscampus, Lübeck, 13-14 März 2013, Talk
& Poster*

Betreute wissenschaftliche Arbeiten

- 12/2018 **Masterarbeit**
 von Victoria-Marie Gerant
Titel der Arbeit: *„Charakterisierung des photophysikalischen Verhaltens von Rhodamin- und Cyaninderivaten mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie“*
- 12/2017 **Bachelorarbeit**
 von Claudio Kirchholtes
Titel der Arbeit: *„Entwicklung und Evaluation einer FCS-Simulation anhand von Diffusion und photophysikalischen Eigenschaften“*
Zusätzliche Unterstützung durch: Lars Kreutzburg und Till Zickmantel
- 09/2017 **Masterarbeit**
 von Katharina Duda
Titel der Arbeit: *„Konstruktion eines Stickstoff-Bad-Kryostaten für Einzelmolekülmessungen an dünnen Schichten“*
- 09/2017 **Bachelorarbeit**
 von Fiona Allerdin
Titel der Arbeit: *„Einfluss von Diffusionskoeffizient und Afterpulse auf die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) am Beispiel der Farbstoffe Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 647“*
- 10/2016 **Bachelorarbeit**
 von Alessa Hutfilz
Titel der Arbeit: *„Photophysikalische Untersuchung von Xanthenderivaten durch Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS)“*

- 10/2015 **Bachelorarbeit**
 von Niclas Ludolph
 Titel der Arbeit: „*Aufbau eines Laser Scanning Konfokalmikroskops*“
- 09/2015 **Bachelorarbeit**
 von Christian Borchert
 Titel der Arbeit: „*Implementierung einer Kommunikationsschnittstelle auf einem netzwerkbasierten FPGA für die Konfokalmikroskopie*“
 Zusätzliche Unterstützung durch: Christopher Blochwitz
- 01/2015 **Bachelorarbeit**
 von Jonas Kühne
 Titel der Arbeit: „*Aufbau und Theorie eines Konfokalmikroskops*“

Lehre & Übungen

- | | | |
|---------|---|-----------------------|
| WS | Physikalisches Praktikum
für Naturwissenschaftler

Betreuung und Ausarbeitung des Grundpraktikums Physik für Naturwissenschaftler im Rahmen der Versuche Wärmelehre, Strömungsmechanik, Diffusion und Spektralphotometer. | Universität zu Lübeck |
| SoSe | Physikalisches Praktikum
für Mediziner

Betreuung und Ausarbeitung des Grundpraktikums Physik für Mediziner im Rahmen der Versuche Wärmelehre / Energieumsatz und Strömungsmechanik / Blutkreislauf. | Universität zu Lübeck |
| SoSe/WS | Biophysikalisches Praktikum
für Naturwissenschaftler

Betreuung und Ausarbeitung des Biophysikalischen Praktikums für Naturwissenschaftler im Rahmen der Versuche Elektronenspinresonanz (EPR) und Rastertunnelmikroskopie (RTM). | Universität zu Lübeck |

SoSe/WS

Einzelmolekülmethoden - Übung
für Naturwissenschaftler

Universität zu Lübeck

Vertretung des Dozenten und Betreuung der Vorträge im Rahmen der Masterübung zur Vorlesung.

