

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

Förster-Energietransfer an einzelnen Molekülen bei tiefen Temperaturen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Verena Hirschfeld
aus Stralsund

Lübeck, 2011

-
1. Berichtstatter: Prof. C. G. Hübner
 2. Berichtstatter: Prof. T. Gutsmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.08.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Photophysikalische Grundlagen	5
2.1.1	Fluoreszenz und Phosphoreszenz	5
2.1.2	Stokes -Verschiebung	6
2.1.3	Fluoreszenzlebensdauer τ und Quantenausbeute Φ_F	7
2.1.4	Fluoreszenzlöschung („Quenching“)	9
2.1.5	Photobleichen	9
2.1.6	Anisotropie	10
2.1.7	Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	12
2.1.8	Theoretische Betrachtung des Orientierungsfaktors κ^2	17
2.2	Grundlagen der Konfokalmikroskopie	19
2.2.1	Konfokales Prinzip	20
2.2.2	Punkt-Abbildungs-Funktion und Auflösung	21
2.2.3	Konfokales Volumen	23
2.3	Einzelmolekülspektroskopie	23
2.3.1	Signal und Hintergrund	24
2.3.2	Einzelmolekülspektroskopie bei Raumtemperatur	25
2.3.3	Einzelmolekül-FRET (spFRET)	26
2.3.4	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	28
2.3.5	Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen	31
2.4	Kryofixation - Immobilisierung in einer amorphen Eisschicht	33
3	Experimentelles	35
3.1	Konfokales Laser-Raster-Mikroskop	35
3.1.1	Anisotropiemessungen	38
3.1.2	Aufnahme von Spektren	39
3.2	Kalt-Rotationsbeschichter und Kryostataufsatz	40
3.2.1	Aufbau	41
3.2.2	Probenpräparation im Kalt-Rotationsbeschichter	43
3.3	Aufnahme und Bearbeitung der Daten	45
3.4	Die Farbstoffe Alexa Fluor 488/594 und Polyprolinpeptide	47
3.4.1	Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594	47

3.4.2	Polyprolinpeptide	48
3.5	Perylenmonoimide	49
4	Entwicklung, Optimierung und Qualität der Experimente bei 77 K	51
4.1	Entwicklung und Optimierung der Experimente	51
4.2	Evaluation der Methode	54
5	Photophysikalische Eigenschaften der Farbstoffe	59
5.1	Donor- und Akzeptorspektren	60
5.1.1	Absorptionsspektren	60
5.1.2	Fluoreszenzspektren	61
5.2	Triplettdynamik	68
5.3	Anisotropie	72
5.3.1	Messparameter für die Anisotropiemessung	72
5.3.2	Anisotropie von freiem und gebundenem Alexa Fluor 488	74
5.3.3	Anisotropie von Alexa Fluor 488 an doppelt markierten Polypeptidketten	75
5.3.4	Diskussion der Anisotropie der markierten Peptidketten	76
5.4	Fluoreszenzlebensdauer	78
5.4.1	Messparameter	78
5.4.2	Fluoreszenzlebensdauer des freien und des gebundenen Farbstoffs Alexa Fluor 488	80
5.4.3	Fluoreszenzlebensdauer des Donors an den doppelt markierten Peptidketten	81
5.4.4	Diskussion der Fluoreszenzlebenszeiten	82
5.5	Zusammenfassung der photophysikalischen Eigenschaften	84
6	Energietransfer bei 300 K und 77 K	87
6.1	Parameter für FRET-Experimente	87
6.1.1	Detektionseffizienzen und Quantenausbeuten	87
6.1.2	Bestimmung des Förster-Radius' in verschiedenen Lösungsmitteln	89
6.1.3	Flexibilität und Konformationen der Polyproline	90
6.1.4	Theoretische Transfereffizienz bei 300 K und bei 77 K	94
6.2	FRET bei Raumtemperatur in Lösung	95
6.2.1	Tetra-Speck-Kugeln und „Shotnoise“-Verteilung	96
6.2.2	Simulation einer Messung in Lösung	98
6.2.3	Transfereffizienz-Histogramme der Polyproline	99
6.2.4	Diskussion des Energietransfers in Lösung	104
6.3	FRET bei tiefen Temperaturen (77 K)	109
6.3.1	Dicke der Eisschicht	109
6.3.2	Bildaufnahme mit abwechselnder Laseranregung (ALEX)	110
6.3.3	Transfereffizienz-Histogramme der Polyproline bei 77 K	112

6.3.4	Vergleich der Fluorophorabstände bei 300 K und bei 77 K	118
7	Photophysik und -chemie bei 77 K	121
7.1	Aufnahme transienter Intensitäten	122
7.2	Analyse der transienten Intensitäten	123
7.2.1	An-Aus-Verhalten des Fluoreszenzsignals	125
7.2.2	Überlebenszeit der Fluorophore	127
7.2.3	Korrelation der transienten Intensitäten	130
7.3	Diskussion der Photophysik und -chemie	136
8	Zusammenfassung	141
	Literaturverzeichnis	145
	Abbildungsverzeichnis	159
	Danksagung	i
	Publikationen	iii

1 Einleitung

Die letzten zwei Jahrzehnte sind durch eine Renaissance der Fluoreszenzspektroskopie geprägt. Fluoreszenzspektroskopie an einem Ensemble sehr vieler Teilchen erlaubt eine Charakterisierung des Systems über die Mittelwerte der spektroskopischen Größen. Unter der Annahme der Ergodizität, die in einem Ensemble die Übereinstimmung von Schar- und Zeitmittel voraussetzt, können aus makroskopischen Beobachtungen Rückschlüsse auf mikroskopische Eigenschaften gezogen werden. Durch die Mittelung kann dabei jedoch die Information über eine statische oder eine dynamische Heterogenität des Ensembles verloren gehen. Statische Heterogenität tritt z. B. in Form verschiedener Populationen auf, während die zeitliche Änderung spezifischer Eigenschaften eine dynamische Heterogenität ausmacht. Erst durch die Beobachtung der Fluoreszenz *einzelner* Moleküle können eben diese Heterogenitäten näher untersucht werden.

1948 entwickelte Theodor Förster eine Theorie, die den strahlungslosen Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren beschreibt [39]. Die Energie eines angeregten Fluorophors, dem sogenannten Donor, wird dabei auf einen anderen Fluorophor, den Akzeptor, mittels Dipol-Dipol-Wechselwirkung übertragen. Der Abstand der beiden Fluorophore bestimmt im Wesentlichen die Übertragungsrate und damit die Transfereffizienz, die den spektroskopisch zugänglichen Parameter des Prozesses darstellt. Umso näher sich die Fluorophore kommen, desto größer ist der Energieübertrag auf den Akzeptor. Aufgrund dieser Abstandsabhängigkeit wird der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) oft als spektroskopisches Lineal bezeichnet, mit dem inter- und intramolekulare Abstände zwischen 1 nm und 10 nm untersucht werden können [124, 114]. Die Anwendung auf Biomoleküle ermöglicht die Analyse von sowohl statischen Eigenschaften, z. B. der Konformation, als auch dynamischen Eigenschaften. Wird der Energietransfer an einem einzelnen Fluorophoren-paar verfolgt, so wird diese Methode als single-pair-FRET (spFRET) bezeichnet.

In einem typischen spFRET-Experiment diffundieren Makromoleküle, die mit einem Fluorophoren-paar markiert sind, frei in einer Lösung. Beim Durchqueren des winzigen Beobachtungsvolumens, das durch ein konfokales Mikroskop realisiert wird, werden die Farbstoffe angeregt und liefern über ihre Emission Informationen über ihre Diffusionseigenschaften oder ihren Konformationszustand. Nachteilig ist dabei die durch die Diffusion limitierte, kurze Beobachtungszeit von in der Regel weniger als eine Millisekunde. Auf der einen Seite ist durch die geringe Photonenzahl und das damit verbundene Rauschen die Messgenauigkeit eingeschränkt. Andererseits ist die Analyse von Moleküldynamiken, die ähnlich

lang oder länger als die Beobachtungszeit sind, erschwert bzw. nicht möglich.

Es gibt bereits verschiedene Methoden, die eine Verlängerung der Beobachtungszeit ermöglichen. Neben einer Immobilisierung der Moleküle, z. B. über Linkerstrukturen oder in Gelen [76, 31], ist auch eine Vergrößerung des Anregungsvolumens durch künstliches Aufblähen des Laserfokus' [139, 54] oder eine langsamere Diffusion durch Einschluss in große Lipidstrukturen denkbar. Dennoch bleibt die Beobachtungszeit durch die Überlebenszeit der Fluorophore, welche hauptsächlich durch Umgebungsparameter bzw. -wechselwirkungen bestimmt ist, begrenzt.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt in einer verlängerten und damit präziseren Beobachtung von spFRET, realisiert durch das Einfrieren von markierten Makromolekülen in einer dünnen Schicht ihres Lösungsmittels. Eine reduzierte Wechselwirkung der Fluorophore mit der festen, amorphen Umgebung verspricht verlängerte Überlebenszeiten, sodass ausreichend Photonen zur Analyse eines Zustandes gesammelt werden können.

Um Fluoreszenzspektroskopie an einzelnen Molekülen bei tiefen Temperaturen anzuwenden, musste eine adäquate Probenpräparation und eine am Mikroskop integrierbare Kühleinheit, ein Kryostat, entwickelt werden.

Die Einbettung der Makromoleküle erfolgt in amorphem Eis, da sie so in einem möglichst natürlichen/physiologischen Zustand eingefroren werden. Die Vitrifizierung von Wasser erfordert jedoch eine hohe Abkühlrate sowie kleine Volumina. Deshalb wurde ein Kalt-Rotationsbeschichter mit einem integrierten Kryostat zur Präparation dünner Eisschichten entwickelt. Der gleichzeitig als Probenträger konzipierte Kryostat ermöglicht sowohl einen einfachen Probentransfer als auch die Adaption an das Stativ eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops. Dieses System erfüllt die Anforderungen einer effektiven Probenkühlung, sowie einen kurzen Arbeitsabstand des Objektivs. Durch einen kurzen Arbeitsabstand ist eine hohe Sammeleffizienz gesichert.

Als Modellsystem werden zwei unterschiedlich lange Polyprolinketten untersucht. Polyproline, allgemein für ihre steife Struktur bekannt, bieten eine Referenz, mit deren Hilfe der Energietransfer zunächst für distinkte (bekannte) Abstände näher charakterisiert werden kann. Somit wird die Voraussetzung geschaffen, unbekannt Konformationen bzw. Zustände von Biomolekülen anhand ihres Abstandes zu identifizieren. Auch die Detektion kurzlebiger Übergangszustände im Gleichgewicht wird möglich, da durch den Einfrierprozess *Schnappschüsse* zu beliebiger Zeit entstehen.

Die vorliegende Arbeit ist wie folgt gegliedert. Nach der Einleitung erfolgt im zweiten Kapitel zunächst eine Einführung in photophysikalische Grundlagen. Dabei wird insbesondere auf den resonanten Energietransfer eingegangen. Nach der Erläuterung des konfokalen Prinzips des Messaufbaus werden Charakteristika von Einzelmolekülexperimenten näher betrachtet.

Das dritte Kapitel beschäftigt sich mit dem experimentellen Aufbau. Die entwickelte Kryostateinheit, die Probenpräparation und die Experimente zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit des Aufbaus werden im Detail beschrieben. Das Modellsystem, fluoreszenzmarkierte Polyproline, wird kurz vorgestellt.

Im vierten Kapitel wird der Entwicklungsprozess der Probenpräparation skizziert und die Methode evaluiert.

Die photophysikalischen Eigenschaften der genutzten Fluorophore sind für eine korrekte Interpretation des Energietransfers notwendig und sind ausführlich im fünften Kapitel beschrieben.

Das sechste Kapitel beschäftigt sich mit dem Energietransfer am Modellsystem bei Raumtemperatur in Lösung und bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff (77 K) in einer amorphen Eisschicht.

Im letzten Kapitel wird schließlich die Photophysik und -chemie bei tiefen Temperaturen charakterisiert.

2 Grundlagen

Dieses Kapitel gibt zuerst einen Überblick über photophysikalische Grundlagen. Dabei wird hauptsächlich auf die Eigenschaften von Fluoreszenz eingegangen, die in der Einzelmolekülspektroskopie Anwendung finden. Insbesondere wird der resonanten Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren und der Einfluss des Orientierungsfaktors näher erläutert.

Die folgende Einführung in die Konfokalmikroskopie erläutert das konfokale Prinzip, den Einfluss einer Punkt-Abbildungs-Funktion auf die Auflösung und schließlich die Geometrie des konfokalen Volumens.

Abschließend werden die Methoden der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie bei Raumtemperatur und bei kryogenen Temperaturen vorgestellt. Dabei wird auch auf die Photonstatistik und ihre Auswirkung auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei Einzelmolekülmessungen eingegangen.

2.1 Photophysikalische Grundlagen

2.1.1 Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Die Untersuchung von Molekülen und ihren Energieniveaus kann über die Absorption und Emission von elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren, infraroten und ultravioletten Spektralbereich erfolgen. Energie, die von einem Molekül absorbiert wurde, kann über verschiedene Prozesse wieder abgegeben werden. Neben strahlungslosen Prozessen sind vor allem die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz von Bedeutung. Des weiteren können photochemische Prozesse das Molekül ändern bzw. zerstören. Die wichtigsten Übergänge zwischen den Energieniveaus eines Moleküls können in einem Jablonski-Diagramm (siehe Abbildung 2.1) veranschaulicht werden. Dies zeigt neben den elektronischen Singulett- und Triplettzuständen auch deren Schwingungszustände.

Bei der Absorption von Licht erfolgt die Anregung eines Elektrons von seinem Grundzustand S_0 in einen vibronischen Zustand von S_1 oder von höheren elektronischen Zuständen. Durch die Schwingungsrelaxation wird ein Teil der Anregungsenergie innerhalb weniger Pikosekunden in Form von Schwingungs- und Rotationsquanten an die Umgebung abgegeben, sodass sich das Elektron nun in dem energetisch niedrigsten Zustand von S_1 befindet. Da das Elektron in S_1 zum Elektron im Grundzustand einen entgegengesetzten Spin besitzt, ist der Übergang in einen vibronischen Zustand von S_0 erlaubt. Dieser strahlende Übergang wird Fluoreszenz genannt und erfolgt innerhalb weniger Nanosekunden. Durch die sogenannte innere Umwandlung (IC - Inner Conversion) kann die elektronische

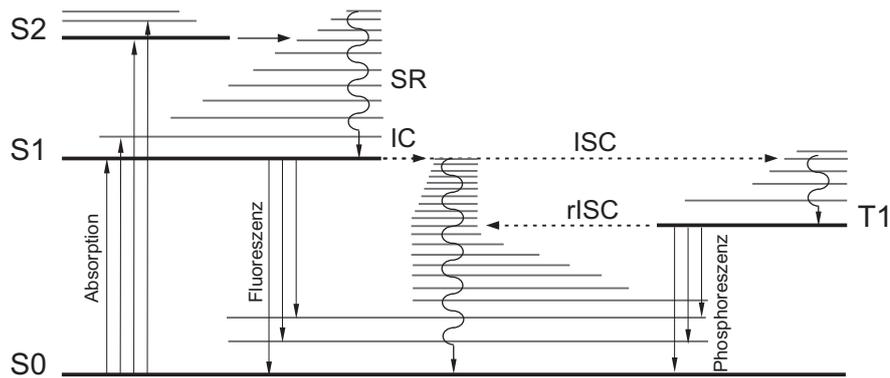


Abbildung 2.1: Jablonski-Diagramm

Die Anregung eines Moleküls und die darauf folgenden strahlenden und nicht-strahlenden Prozesse werden schematisch in einem Jablonski-Diagramm verdeutlicht. Die Singulettzustände S_0 , S_1 und S_2 sowie der erste Triplettzustand T_1 (dicke Linien) und ihre vibronischen Zustände (dünne Linien) sind dargestellt. Nach der Anregung eines Elektrons in einen vibronischen Zustand von S_1 relaxiert das Elektron durch Schwingungsrelaxation (SR) in den niedrigsten Zustand von S_1 . Erfolgt die Relaxation durch Emission von Licht innerhalb von ca. 10^{-8} s direkt in einen vibronischen Zustand von S_0 , so spricht man von Fluoreszenz. Durch innere Umwandlung (IC - Inner Conversion) kann die elektronische Energie in Schwingungsenergie umgewandelt werden; die Relaxation in den Grundzustand erfolgt dann strahlungslos durch Schwingungsrelaxation. Geht das Elektron durch Interkombination (ISC) in den Triplettzustand T_1 über und relaxiert erst dann durch Emission von Licht, so handelt es sich um Phosphoreszenz. Der Übergang aus dem Triplettzustand in ein Schwingungsniveau des Grundzustandes S_0 wird reverse ISC (rISC) genannt. (Bild adaptiert von [45])

Energie auch in Schwingungsenergie umgewandelt werden, sodass sich dann das Elektron in einem hohen Schwingungszustand von S_0 befindet. Der Übergang in den energetisch niedrigsten Grundzustand erfolgt dann strahlungslos über Schwingungsrelaxation. Streng quantenmechanisch nicht erlaubt hingegen ist die Interkombination (ISC - Inter System Crossing), der Übergang in einen Triplettzustand T_0 , T_1 Da die Spins der Elektronen im angeregten Zustand und im Triplettzustand parallel sind, muss der Spin beim Übergang umklappen, was bei optischen Übergängen verboten ist. Möglich ist der Übergang dennoch durch die Spin-Bahn-Kopplung, d. h. durch die Wechselwirkung des Bahndrehimpulses eines Elektrons mit seinem Spin, die einen Übergang wahrscheinlicher macht. Durch Wechselwirkungen mit der Umgebung wird diese Kopplung begünstigt und damit auch die Interkombination. Die Emission eines Photons durch den Übergang in den Grundzustand aus dem Triplettzustand ist aufgrund des Verbotes eher langsam (einige Mikrosekunden bis mehrere Sekunden) und wird Phosphoreszenz genannt. Schließlich kann das Elektron auch über eine Interkombination zurück (reverse ISC, rISC) in einen Schwingungszustand von S_0 und dann über Schwingungsrelaxation in den Grundzustand übergehen.

2.1.2 Stokes -Verschiebung

In Abbildung 2.2 sind schematisch ein Absorptions- und ein Fluoreszenzspektrum gezeigt. Das Absorptionsspektrum weist mehrere Banden auf, die der Anregung in verschiedene elektronische Zustände S_n entsprechen. Die Breite einer Bande gibt die Schwingungszu-

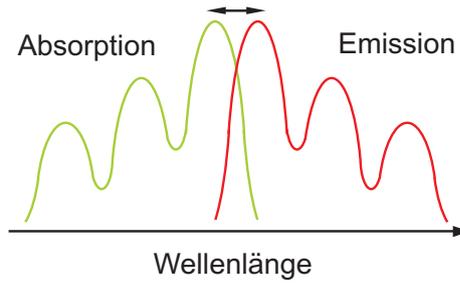


Abbildung 2.2: Stokes -Verschiebung

Das Absorptions- und das Fluoreszenzspektrum eines Fluorophors sind spiegelsymmetrisch. Die einzelnen Banden entsprechen Übergängen in verschiedene elektronische Zustände. Durch Übergänge in die verschiedenen vibronischen Niveaus ist eine Bande nicht schmal (diskret), sondern verbreitert. Das Fluoreszenzspektrum ist durch Wechselwirkungen mit der Umgebung und damit verbundenen Energieverlusten zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Der Abstand der Spektren (Pfeil) wird als Stokes -Verschiebung bezeichnet.

stände eines elektronischen Zustands wieder. Typisch für das Fluoreszenzspektrum ist die Spiegelsymmetrie zum Absorptionsspektrum, die aus der Relaxation in vibronische Zustände des Grundzustandes resultiert, welche denen der angeregten Zustände ähneln. Wichtig für die Einzelmolekülspektroskopie ist jedoch die Stokes -Verschiebung, die die Verschiebung der Emission zu längeren Wellenlängen hin beschreibt. Durch die Wechselwirkung des angeregten Moleküls mit dem umgebenden Medium geht Energie verloren, sodass die daraufhin folgende Emission langwelliger ist. In Abhängigkeit von z. B. der Polarität vergrößert oder verkleinert sich die Stokes-Verschiebung. Durch sie ist es erst möglich, in den Spektroskopieexperimenten das Fluoreszenzlicht spektral von dem Anregungslicht zu trennen.

2.1.3 Fluoreszenzlebensdauer τ und Quantenausbeute Φ_F

Für die Fluoreszenzspektroskopie entscheidende molekulare Parameter eines Fluorophors sind die Fluoreszenzlebensdauer τ , die Quantenausbeute Φ_F und der Absorptionsquerschnitt σ . Sie bestimmen die Fluoreszenzintensität und entscheiden, ob Fluorophore für die Spektroskopie geeignet sind. Ist die gesamte Fluoreszenzintensität eines Farbstoffes zu klein, so sind Experimente damit nicht sinnvoll und in der *Einzelmolekülspektroskopie* nicht möglich. Ein großer Absorptionsquerschnitt spricht, bei gleicher Laserleistung, für eine höhere Anregungswahrscheinlichkeit des Fluorophors (siehe Abschnitt 2.3.1). Verbunden mit einer hohen Quantenausbeute kann die Emissionsrate maximiert werden. Die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt die Zeit, in der das Fluorophor Informationen über Wechselwirkungen mit seiner Umgebung geben kann.

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F gibt an, wie viel absorbierte Photonen wieder in Form von Fluoreszenzphotonen abgegeben werden:

$$\Phi_F = \frac{k_e}{k_a} = \frac{k_e}{k_e + k_{NS}} \quad (2.1)$$

- k_e ... Rate der emittierten Photonen
- k_a ... Rate der absorbierten Photonen
- k_{NS} ... Rate der nicht-strahlenden Übergänge von S_1 zu S_0

Die Depopulation des angeregten Zustandes erfolgt somit über strahlende und nicht strahlende Prozesse. Die Rate der nicht strahlenden Übergänge fasst die Raten der inneren Konversion, der Interkombination (ISC) (siehe Abschnitt 2.1.1) und die der Fluoreszenzlöschung (siehe Abschnitt 2.1.4), auch „Quenching“ genannt, zusammen:

$$k_{NS} = k_{IC} + k_{ISC} + k_Q \quad (2.2)$$

- k_{IC} ... innere Konversion
- k_{ISC} ... Interkombination
- k_Q ... Fluoreszenzlöschung

Die Fluoreszenzlebensdauer τ_0 ist die mittlere Zeit, die ein Elektron im angeregten Zustand verbringt und kann durch die strahlende und die nicht-strahlende Rate ausgedrückt werden:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_e + k_{NS}} \quad (2.3)$$

Die natürliche Lebensdauer τ_n eines Fluorophors, bei der nicht-strahlende Prozesse ausgeschlossen sind,

$$\tau_n = \frac{1}{k_e}, \quad (2.4)$$

kann theoretisch aus dem Extinktionskoeffizienten ε und den Emissions- und Absorptionsspektren berechnet werden [71]. Da diese Berechnung jedoch sehr fehlerhaft ist, sollte τ_n mittels Quantenausbeute und Lebensdauer bestimmt werden:

$$\tau_n = \frac{\tau_0}{\Phi_F}. \quad (2.5)$$

Für Fluoreszenz liegt die Lebensdauer im Bereich weniger Nanosekunden (10^{-9} s). Rhodamin 6G, ein beliebter Farbstoff aufgrund seiner Photostabilität und hohen Quantenausbeute von 0,95 (in Ethanol) [38], hat eine mittlere Lebenszeit von ca. 4 ns. In einer Sekunde können von Rhodamin 6G also, bei optimaler Anregung, ca. $2,5 \cdot 10^8$ Photonen emittiert werden.

Diese hohe Emissionsrate wird jedoch durch verschiedene Faktoren begrenzt. Neben der optischen Sättigung und der Triplett-Sättigung reduziert auch Photobleichen die maximale Photonenzahl. Zunächst steigt die Emission des Fluorophors mit steigender Laserleistung. Der Absorptions-Emissions-Kreislauf ist jedoch durch die Lebensdauer des angeregten Zustandes zeitlich begrenzt, sodass die Emissionsrate bis zur optischen Sättigung konvergiert. Zusätzlich wächst mit steigender Laserintensität die Wahrscheinlichkeit für das Fluorophor,

in einen Triplettzustand überzugehen. Es ist dann nicht mehr anregbar, d. h., die Emissionsrate wird vermindert.

Im Experiment muss somit die optimale Anregungsintensität gefunden werden, um maximale Quantenausbeute zu erreichen und dabei den Hintergrund, der linear mit der Laserintensität wächst, niedrig zu halten (siehe auch Abschnitt 2.3.1).

2.1.4 Fluoreszenzlöschung („Quenching“)

Quenching ist ein allgemeiner Begriff für die Reduktion der Emissionsrate eines Fluorophors. Meistens handelt es sich dabei um den Energieverlust des angeregten Zustandes über nicht strahlende Prozesse.

Auf der einen Seite sind Molekülwechselwirkungen sowohl mit der Umgebung als auch mit anderen Probemolekülen für Fluoreszenzlöschung verantwortlich. Befindet sich ein anderes Fluorophor in der Nähe, kann über resonanten Energie-Transfer (FRET) (siehe Abschnitt 2.1.7) oder photoinduzierten Elektronentransfer (PET) [94] die Energie an diesen strahlungslos übergeben werden. Die Wahrscheinlichkeit für diese Übergänge ist u. a. vom Abstand der Farbstoffe zueinander abhängig. Des weiteren können sich im Lösungsmittel sogenannte Kollisionsquencher befinden, die durch einen kurzen Kontakt die Anregungsenergie des Fluorophors löschen. Sauerstoff, Halogene oder elektronegative Moleküle wie Acrylamid [71] sind nur einige von ihnen. Kollisionsquencher sowie FRET und PET zählen zu den dynamischen Quenchprozessen, bei denen die Energie dem angeregten Fluorophor entzogen wird.

Auf der anderen Seite kann es zu Molekülumformungen kommen, bei denen der Fluorophor nicht-fluoreszierende Verbindungen eingeht. Da der Fluorophor zwar weiterhin durch Absorption von Licht angeregt werden kann, jedoch nicht mehr emittiert, wird von statischem Quenchen gesprochen.

Experimentell kann die Art des Quenchens durch die unterschiedliche Temperatur- oder Viskositätsabhängigkeit der beiden Prozesse unterschieden werden. Temperatur und Viskosität beeinflussen beide die Diffusion der Quenchmoleküle. Wird diese schneller, ist die Wahrscheinlichkeit eines Quenchprozesses durch Kollision größer. Die Wahrscheinlichkeit für statisches Quenchen sinkt dagegen, da leicht gebundene Komplexe von Fluorophor und Quencher bei höheren Temperaturen dissoziieren.

2.1.5 Photobleichen

Photobleichen ist ein photochemischer Prozess, bei dem sich das fluoreszierende Molekül chemisch so verändert, dass Absorption und Emission von Licht dann nicht mehr möglich ist. Ein Fluorophor in Lösung unterliegt meist nach der Emission von ca. 10^6 Photonen einer Strukturänderung, die ihn zum völligen Erlöschen bringen [87]. Oft ist eine erhöhte Reaktivität des Farbstoffes im angeregten Zustand für das Photobleichen verantwortlich.



Abbildung 2.3: Struktur des Farbstoffes Fluorescein

Die Lage des Übergangsdipolmomentes am Beispiel von Fluorescein ist als Pfeil gekennzeichnet. Quelle: [93]

Neben einer Photooxidation, meist aus einem angeregten Triplettzustand, kann es auch zu einer Photoionisierung, und der damit verbundenen Bildung eines hochreaktiven, radikalischen Zustandes, kommen [138].

Hinauszögern lässt sich Photobleichen z. B. durch die Reduktion der Konzentration des molekularen Sauerstoffs im Lösungsmittel [67] sowie durch Anpassen der Anregungsintensität, da diese, zu hoch gewählt, den Prozess beschleunigt.

2.1.6 Anisotropie

Die Anisotropie r ist ein Maß für die Änderung der Orientierung des Übergangsdipols zwischen Absorption und Emission. Die Orientierung der Übergangsdipole, im Folgenden kurz Emissions- bzw. Absorptionsdipol genannt, ist durch die Fluorophorstruktur gegeben (siehe Abbildung 2.3). Die Anregung eines Fluorophors ist optimal, sobald sein Absorptionsdipol parallel zur Polarisation des anregenden Lichtes ist. Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Fluorophor angeregt wird, ist somit vom elektrischen Feld \vec{E} und seinem Absorptionsdipol $\vec{\mu}$ abhängig [71]:

$$P \sim |\mu \cdot E|^2 \sim \cos^2 \varphi \quad (2.6)$$

φ beschreibt dabei den Winkel zwischen Übergangsdipol und elektrischem Feld.

Werden Fluorophore, deren Absorptionsdipole in einer homogenen Lösung zufällig verteilt sind, mit polarisiertem Licht angeregt, so führt das aufgrund der selektiven Anregung auch zu einer polarisierten Emission. Unterscheidet sich jedoch der Emissionsdipol vom Absorptionsdipol, so ist die Emission relativ zur Anregung depolarisiert. Der Grad dieser Depolarisation wird mit der Anisotropie beschrieben. Eine Depolarisation erfolgt hauptsächlich durch zwei verschiedene Prozesse. Zum Einen durch Rotationsdiffusion, d. h., dass sich während der Lebensdauer des angeregten Zustandes die Lage des Dipols durch eine Drehung des Fluorophors ändert. Zum Anderen besitzen manche Fluorophore einen vom Absorptionsdipol verschiedenen Emissionsdipol.

Für die Messung der Anisotropie wird eine Probe mit polarisiertem Licht angeregt, und deren Fluoreszenz polarisationsabhängig, d.h. einmal parallel und einmal senkrecht zur

Anregung, mithilfe eines Polarisators detektiert. Die statische Anisotropie r ist dann wie folgt definiert:

$$r = \frac{I_p - I_s}{I_p + 2I_s} \quad (2.7)$$

mit

- I_p ... Fluoreszenzintensität parallel zur Anregung polarisiert
 I_s ... Fluoreszenzintensität senkrecht zur Anregung polarisiert.

Durch die Normierung auf die Gesamtintensität ($I_p + 2I_s$) ist die Anisotropie einheitenlos und unabhängig von der Konzentration der Farbstoffe. Erfolgt die Anregung gepulst, so kann die Anisotropie in Abhängigkeit von der Zeit gemessen und die Rotationskorrelationszeit τ_r bestimmt werden [71]:

$$r(t) = r_0 e^{-t/\tau_r} \quad (2.8)$$

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (2.9)$$

mit β als Winkel zwischen Emissions- und Absorptionsdipol.

Die fundamentale Anisotropie r_0 wird beobachtet, wenn es keine Depolarisationseffekte durch Rotationsdiffusion oder Energietransfer gibt, und setzt sich aus dem Faktor für die Photos Selektion bei der Anregung (2/5) und der Depolarisation durch verschieden orientierte Emissions- und Absorptionsdipole zusammen. Sind Emissions- und Absorptionsdipol des Fluorophors parallel ($\beta = 0$), so ergibt sich aus Gleichung 2.9 die maximale Anisotropie von 0,4. Die fundamentale Anisotropie eines Fluorophors wird meist in Propylenglykol bestimmt. Es bildet bei tiefen Temperaturen ein homogenes Glas [71] und verhindert somit eine Rotation des Moleküls.

Mithilfe der Formel von Perrin [150] wird ein Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzlebensdauer τ , der Rotationskorrelationszeit sowie der statischen Anisotropie r hergestellt:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_r} \right) \quad (2.10)$$

Anwendung Bei Ensemblemessungen in der Biochemie wird die Anisotropie seit langem genutzt, um Aussagen über Form, Größe oder Beweglichkeit von Biomolekülen treffen zu können [71]. Zudem können auch Wechselwirkungen zwischen Proteinen, die mit einer Änderung der Rotationsdiffusion einhergehen, untersucht werden. Für die Einzelmolekülspektroskopie interessant ist die Möglichkeit, Bindungseigenschaften, insbesondere die Beweglichkeit der Fluorophore am Molekül, näher zu charakterisieren.

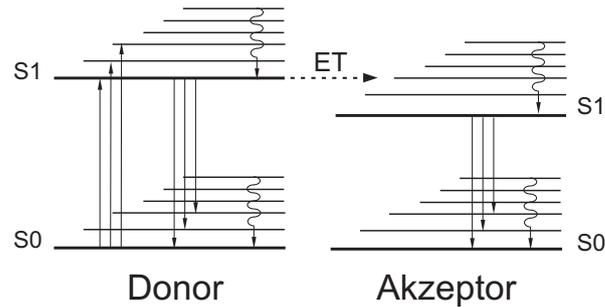


Abbildung 2.4: Jablonski-Diagramm mit resonantem Energietransfer

Die elektronischen Zustände S_0 und S_1 (dicke Linien) und ihre Schwingungszustände (dünne Linien) von Donor und Akzeptor sowie die möglichen Übergänge sind dargestellt. Nach der Anregung des Donors in einen vibronischen Zustand von S_1 relaxiert er durch innere Konversion (gewellter Pfeil) in den Grundzustand von S_1 . Von dort aus geht er entweder durch Abgabe eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand über oder überträgt strahlungslos seine Energie auf den Akzeptor, welcher danach z. B. über Fluoreszenz relaxiert. Dieser Energietransfer (ET) ist von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem stark vom Abstand beider Fluorophore.

2.1.7 Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Der strahlungslose Energieübertrag von einem angeregten Fluorophor auf einen anderen Fluorophor wurde 1948 von Theodor Förster theoretisch beschrieben [39]. Stryer und Haugland [124] zeigten 1967, dass sich die starke Abstandsabhängigkeit des Energietransfers für Abstandsmessungen im Bereich weniger Nanometer nutzen lässt. Durch das Markieren unterschiedlich langer Polyproline mit fluoreszenten Farbstoffen konnte die von Förster vorhergesagte Abhängigkeit der Transferrate k_T vom Abstand r der Farbstoffe, $k_T \sim 1/r^6$, im wesentlichen bestätigt werden.

Das Prinzip des Energietransfers ist schematisch in einem vereinfachten Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.4 gezeigt. Ein Fluorophor, der Donor, wird durch Licht passender Wellenlänge in den ersten angeregten, elektronischen Zustand gebracht. Befindet sich in dessen Nähe ein anderer Fluorophor, der Akzeptor, so wird die Anregungsenergie mittels Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf diesen übertragen. Obwohl dieser Energietransfer oft Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer genannt wird, spielt Fluoreszenz während der Übertragung keine Rolle. Die Wechselwirkung der Übergangsdipolmomente des Donors und des Akzeptors ist strahlungslos.

Theodor Förster berechnete mithilfe Fermis Goldener Regel die Transferrate $k_T(r)$:

$$k_T(r) = \frac{\Phi_D \kappa^2 J(\lambda) K}{\tau_D n^4} \frac{1}{r^6} \quad (2.11)$$

Φ_D ... Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

κ^2 ... Orientierungsfaktor

$J(\lambda)$... Überlappungsintegral

τ_D ... Lebensdauer des angeregten Zustandes

r ... Abstand zwischen Donor und Akzeptor

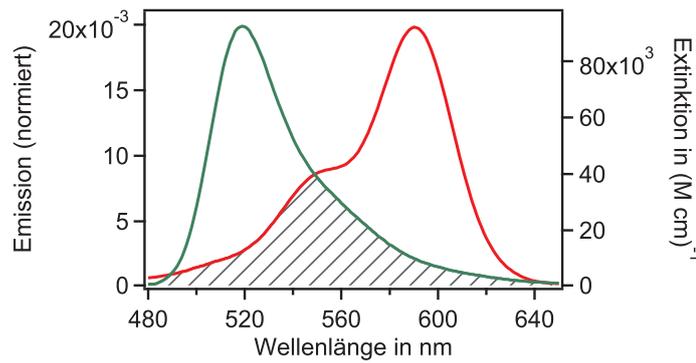


Abbildung 2.5: Überlappungsintegral

Aus dem Emissionsspektrum des Donors (grün) und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (rot) wird das Überlappungsintegral berechnet. Der Überlappungsbereich ist grau schraffiert.

n ... Brechzahl des Lösungsmittels

K ... Konstante ($K = 9000 (\ln 10) / 128 \pi^5 N = 8.7 \cdot 10^{-25} \text{ mol}$)

Sie gibt an, wie viele Übergänge vom Donor auf den Akzeptor in einer bestimmten Zeit stattfinden. Neben dem Abstand r , der die für Konformationen von Biomolekülen interessante Größe darstellt, spielen auch das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ und der Orientierungsfaktor κ^2 eine wichtige Rolle.

Überlappungsintegral $J(\lambda)$ Damit ein Energieübertrag stattfinden kann, müssen die beiden Übergangsdipolmomente der Fluorophore miteinander resonant sein, d. h. das Emissionsspektrum des Donors muss sich mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. In Abbildung 2.5 ist das auf Eins normierte Emissionsspektrum eines Donors und das Absorptionsspektrum eines Akzeptors gezeigt. Der schraffierte Bereich von 490 nm bis 650 nm zeigt den spektralen Überlapp.

Das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ beschreibt den Grad der spektralen Überlappung von Donor und Akzeptor:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.12)$$

λ ... Wellenlänge

$F_D(\lambda)$... Fluoreszenzintensität des Donors (normiert)

$\epsilon_A(\lambda)$... Extinktionskoeffizient des Akzeptors (bei λ)

Je größer der Überlapp ist, umso effizienter ist der Energietransfer. Optimal für FRET ist, wenn die langwelligste Emissionsbande des Donors mit der Absorption des Akzeptors überlappt.

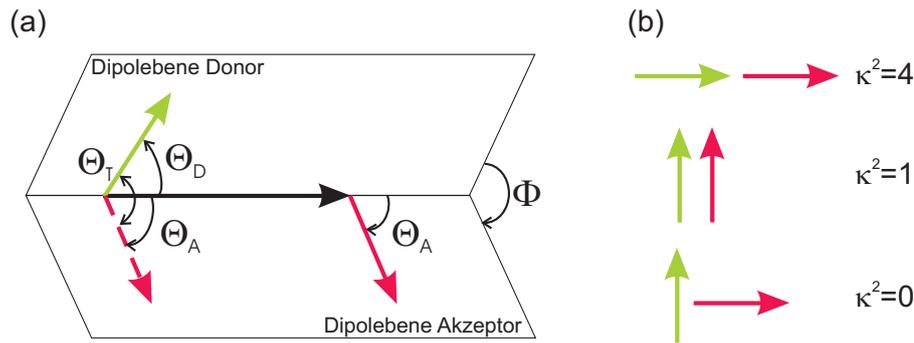


Abbildung 2.6: Orientierung der Übergangsdipolmomente

Übergangsdipolmoment des Donors (grün) und des Akzeptors (rot). (a) Θ_D und Θ_A sind die Winkel zwischen Donor- bzw. Akzeptordipolmoment und ihrer Verbindungsline (schwarzer Pfeil). Θ_T ist der Winkel zwischen Donor- und Akzeptordipolmoment und Φ ist der Winkel zwischen den Ebenen der Dipolmomente. (b) Der Wert von κ^2 ergibt sich aus der Lage der Dipolmomente zueinander nach Gleichung 2.13.

Orientierungsfaktor κ^2 Ein weiterer Parameter, der die Transferrate wesentlich beeinflusst, ist der geometrische Orientierungsfaktor κ^2 . Er beschreibt, wie stark die Wechselwirkung zweier Übergangsdipolmomente in Abhängigkeit ihrer Orientierung zueinander ist, und wird wie folgt definiert [27]:

$$\kappa^2 = (\cos\Theta_T - \cos\Theta_D \cos\Theta_A)^2 \quad (2.13)$$

$$\kappa^2 = (\sin\Theta_D \sin\Theta_A \cos\Phi - 2\cos\Theta_D \cos\Theta_A)^2 \quad (2.14)$$

- Θ_T ... Winkel zwischen Donordipolmoment und dem Akzeptordipolmoment
- Θ_D ... Winkel zwischen Donordipolmoment und dem Verbindungsvektor
- Θ_A ... Winkel zwischen Akzeptordipolmoment und dem Verbindungsvektor
- Φ ... Winkel zwischen den Ebenen

Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 2.6a die Übergangsdipolmomente beider Fluorophore und ihre Winkel zueinander sowie der Verbindungsvektor dargestellt. Der Orientierungsfaktor kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Die Wechselwirkung beider ist am effektivsten, wenn die Dipole hintereinander kollinear angeordnet sind, d. h. $\kappa^2 = 4$ (siehe Abbildung 2.6b). Sind sie senkrecht zueinander ausgerichtet, so ist $\kappa^2 = 0$, und es findet kein Energietransfer statt.

Für die meisten FRET-Experimente in Lösung wird für den Orientierungsfaktor ein Mittelwert von $2/3$ angenommen [27, 10]. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die Farbstoffe sich komplett neu orientieren können, bevor der Energietransfer stattfindet. In Lösung können sich die Farbstoffe meist so frei bewegen, dass dieser dynamische Mittelwert des Orientierungsfaktors gerechtfertigt ist. Wird jedoch ein statisches, zufällig orientiertes Ensemble betrachtet, so ergibt sich ein Mittelwert von 0,476 [10]. Eine genauere Betrachtung

des Orientierungsfaktors und seiner statischen Verteilung erfolgt in Abschnitt 2.1.8, da ein Mittelwert bei der Beobachtung von einzelnen Molekülen nicht angewandt werden kann.

Förster-Radius R_0 Der Abstand, bei dem genau die Hälfte aller Anregungen des Donors auf den Akzeptor übertragen werden, wird als Förster-Radius bezeichnet. Da in diesem Fall die Übertragungsrate k_T gleich der inversen Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors τ_D ist, kann er mithilfe der Gleichung 2.11 wie folgt berechnet werden:

$$R_0^6 = \frac{\kappa^2 J(\lambda) \Phi_D K}{n^4} \quad (2.15)$$

Der Förster-Radius ist für jedes Fluorophorenpaar eine Konstante, solange die Fluorophore frei rotieren können und ein mittleres κ^2 angenommen werden kann.

Die Transferrate kann nun mithilfe des Förster-Radius vereinfacht angegeben werden:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.16)$$

In dieser Gleichung wird die Abhängigkeit der Transferrate vom Abstand der Fluorophore besonders deutlich. Vergrößert sich der Abstand, so sinkt die Transferrate.

Transfereffizienz E Im Experiment ist oft die sogenannte Transfereffizienz E zugänglich. Sie ist als Anteil transferierter Anregungen definiert:

$$E = \frac{k_T}{(\tau_D)^{-1} + k_T} \quad (2.17)$$

Der Einfluss des Abstandes spiegelt sich natürlich auch in der Transfereffizienz, die von k_T abhängt, wider. Durch Einsetzen der Gleichung 2.16 in Gleichung 2.17 ergibt sich:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.18)$$

In Abbildung 2.7 wird deutlich, was Gleichung 2.18 aussagt: ist der Abstand der Fluorophore klein gegenüber dem Förster-Radius, ist die Transfereffizienz fast Eins. Ist er jedoch mehr als doppelt so groß, findet kaum Energietransfer mehr statt. Für Abstandsmessungen in einem FRET-Experiment ist nur der Bereich von $0,5 R_0$ bis $1,5 R_0$ geeignet, da hier bereits eine geringe Abstandsänderung die Transfereffizienz beeinflusst. Durch unterschiedliche Förster-Radien verschiedener Fluorophorpaare können damit Abstände zwischen 1 nm und 10 nm untersucht werden.

Eine relativ einfache Bestimmung der Transfereffizienz wird durch das separate Messen von Donor- und Akzeptorfluoreszenz möglich. Danach ergibt sich die Effizienz wie folgt:

$$E = \frac{N_A}{N_A + N_D} \quad (2.19)$$

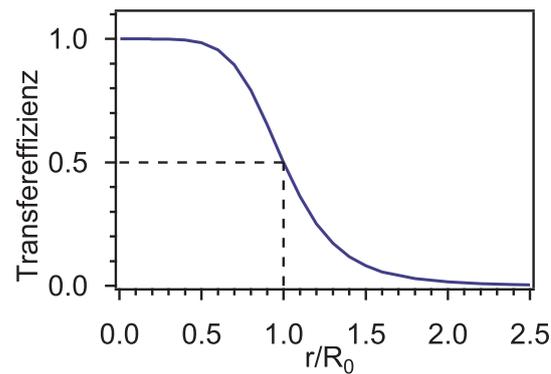


Abbildung 2.7: Transfereffizienz in Abhängigkeit von R_0

Gezeigt wird die Transfereffizienz in Abhängigkeit vom Abstand r der Fluorophore im Verhältnis zum Förster-Radius R_0 . Genau die Hälfte der Energie wird übertragen, wenn der Abstand dem Förster-Radius entspricht. Ist der Abstand mehr als doppelt so groß, wird fast keine Energie mehr übertragen.

N_D ... Photonen des Donors pro Zeiteinheit

N_A ... Photonen des Akzeptors pro Zeiteinheit

In dieser Gleichung ist noch nicht das spektrale Verhalten der im Aufbau vorkommenden Filter und Strahlteiler sowie die unterschiedliche Quanteneffizienz der Detektoren berücksichtigt. Zudem muss die Quanteneffizienz der Farbstoffe beachtet werden. Dafür wird in Abschnitt 6.1 ein Korrekturfaktor eingeführt.

Eine weitere Möglichkeit, die Transfereffizienz experimentell zu bestimmen, ergibt sich aus der Fluoreszenzlebenszeit des Donors ohne Akzeptor (τ_D) und in Anwesenheit des Akzeptors (τ_{DA}):

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2.20)$$

Um nun aus der gemessenen Transfereffizienz einen mittleren Abstand zu berechnen, ist die Kenntnis des Förster-Radius (Gl. 2.15) wichtig. Die Quantenausbeuten werden bestimmt, indem sie mit der von Standardfluorophoren verglichen wird. Für den Brechungsindex wird für Lösungsexperimente in der Regel der von Wasser angenommen (1,33). Eine genaue Bestimmung in der unmittelbaren Umgebung des Fluorophors ist nicht möglich. Das Überlappungsintegral wird mithilfe der Emissions- und Absorptionsspektren berechnet. Die größte Unsicherheit stellt in der Regel der Orientierungsfaktor dar. Nur wenn die Farbstoffe frei beweglich sind, was z. B. bei einer Bindung an ein Protein stark eingeschränkt sein kann, ist eine Mittelung gerechtfertigt.

Eigenschaften der Fluorophore Werden die beschriebenen Bedingungen für den resonanten Energietransfer zusammengefasst, so ergeben sich für Farbstoffe bestimmte Kriterien, damit Abstandsmessungen mit diesen überhaupt möglich sind [113]:

- Die Farbstoffe sollten geeignete photophysikalische und -chemische Eigenschaften aufweisen. Eine hohe Quantenausbeute, ein großer Absorptionskoeffizient und eine geringe Triplettdynamik sowie hohe Photostabilität ermöglichen eine hohe Signalintensität.
- Der Förster-Radius sollte entsprechend des untersuchten Abstandes gewählt werden. Die Änderungen der Transfereffizienz sind im Bereich von $0,5 R_0$ bis $1,5 R_0$ am effektivsten.
- Donor- und Akzeptoremission müssen gut spektral voneinander trennbar sein, um den Crosstalk¹ niedrig zu halten.
- Die Absorption und die Emission des Fluorophorenpaars sollten im sichtbaren Bereich liegen. Beide Farbstoffe sollten bei gängigen Laserlinien optimal anregbar sein.
- Der Farbstoff darf das Molekül, an das er gebunden ist, nicht bei Strukturänderungen und Bewegungsabläufen beeinflussen. Zudem ist es von Vorteil, wenn er hydrophil ist, um besser im Puffer lösbar zu sein und nicht mit dem Molekül zu wechselwirken.

Anwendungen FRET wird primär als „spektroskopisches Lineal“ genutzt, d. h. strukturelle Veränderungen, die mit Abstandsänderungen innerhalb des Biomoleküls verbunden sind, können erkannt und zeitaufgelöst untersucht werden [114, 116, 42]. In Verbindung mit der Einzelmolekülspektroskopie können zum Beispiel verschiedene Konformationen des entfaltenen Zustandes eines Proteins, also Subpopulationen, gefunden werden [29]. Eine hohe Zeitauflösung erlaubt es auch, Dynamiken zu untersuchen, die z. B. bei katalytischen Prozessen von Enzymen eine Rolle spielen [53].

Des Weiteren können Farbstoffpaare an zwei verschiedenen Biomolekülen angebracht und so deren Wechselwirkung näher untersucht werden. So können z. B. Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* in einer Zelle betrachtet werden [144, 121], oder deren Wechselwirkungen mit der Zellmembran [82].

2.1.8 Theoretische Betrachtung des Orientierungsfaktors κ^2

Für quantitative Aussagen bei FRET-Experimenten ist die Kenntnis des Förster-Radius für eine Abstandsbestimmung unerlässlich. In Abschnitt 2.1.7 wurde gezeigt, dass der Förster-Radius mit dem Orientierungsfaktor eines Fluorophorenpaars variiert,

$$R_0^6 = C\kappa^2, \quad (2.21)$$

¹Crosstalk ist z. B. Donorfluoreszenz, die im Akzeptorkanal detektiert wird und somit dem falschen Kanal zugeordnet ist.

während die anderen Parameter im Allgemeinen als Konstante zusammengefasst werden können. Bei den meisten Messungen im Ensemble wird davon ausgegangen, dass die Dipolmomente statistisch gleichverteilt sind. Ist außerdem gegeben, dass die Dipole bzw. die Fluorophore sich während der Anregungszeit komplett orientieren können, so kann für κ^2 ein Mittelwert von $2/3$ angenommen werden [27, 10]. Die Annahme eines konstanten Mittelwertes ist jedoch nicht gerechtfertigt, wenn die Bewegung der Fluorophore langsam im Vergleich zur ihrer Lebenszeit ist oder wenn die Orientierung bzw. die Bewegung der Fluorophore räumlich eingeschränkt ist. Die eingeschränkte Bewegung wird hier nicht weiter betrachtet, sondern auf Literatur verwiesen [27].

Die Dynamik eines Systems bestimmt also den Mittelwert des Orientierungsfaktors. Entscheidend dabei ist das Verhältnis der Rotationskorrelationszeit τ_r zur Dauer des angeregten Zustandes τ_a des Fluorophors. Die Fluorophore, genauer gesagt deren Dipolmomente, ändern stetig ihre Orientierung, und so kann für Donor und Akzeptor eine Rotationskorrelationszeit definiert werden, die die Geschwindigkeit einer solchen Rotation charakterisiert. Um nun Rückschlüsse auf den Orientierungsfaktor durch Betrachten der Dynamik ziehen zu können, wird der Ensemble-Mittelwert von κ^2 , $\langle(\bar{\kappa}^2)^{1/2}\rangle$, näher betrachtet [10]:

$$\langle(\bar{\kappa}^2)^{1/2}\rangle = \int_0^4 F(\bar{\kappa}^2) (\bar{\kappa}^2)^{1/2} d\bar{\kappa}^2 \quad (2.22)$$

mit

$$\bar{\kappa}^2 = \frac{1}{t} \int_0^t \kappa^2(t') dt'. \quad (2.23)$$

$F(\bar{\kappa}^2)$ beschreibt die Verteilung der κ^2 -Werte in einem Ensemble. $\bar{\kappa}^2$ ist der endliche, zeitliche Mittelwert für ein Donor-Akzeptor-Paar. Die Zeitabhängigkeit des Mittelwertes ergibt sich aus der sich ständig ändernden Verteilung der Dipole $F(\bar{\kappa}^2, t)$.

Wird der dynamische Grenzfall für $\langle(\bar{\kappa}^2)^{1/2}\rangle$ betrachtet, d. h. die Rotationskorrelationszeit ist viel kürzer als die Lebensdauer, so können sich während der Anregung alle möglichen Orientierungen der Dipole einstellen. Das zeitliche Mittel entspricht dann dem Ensemble-Mittel; $\bar{\kappa}^2 = \langle\kappa^2\rangle$. In diesem Fall ist der Mittelwert $2/3$.

Beim statischen Grenzfall ist die Anregungsdauer des Fluorophors viel kürzer als die Rotationszeit. Die Dipole werden als starr angesehen, und der zeitliche Mittelwert ist somit gleich κ^2 . Mit Gleichung 2.22 ergibt sich dann ein Mittelwert von 0.476 [10].

Wird die Rotationskorrelationszeit, vom statischen Grenzfall ausgehend, im Vergleich zur Anregungsdauer immer kleiner, d. h. das System wird dynamischer, so steigt $\langle\bar{\kappa}^2\rangle$ an, bis es den dynamischen Grenzwert von $2/3$ erreicht. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 2.8a dargestellt. Zusätzlich ist die Entwicklung des Mittelwertes gezeigt, wenn nur ein Fluorophor frei rotieren kann und das andere starr ist. Der Mittelwert strebt hier zu einem kleineren Mittelwert von 0,63 [10].

Wird ein System mit starren Dipolen betrachtet, so bleibt $\langle\bar{\kappa}^2\rangle$, unabhängig von der Lebensdauer, konstant, da eine Orientierung der Dipole nach der Anregung ausgeschlossen ist.

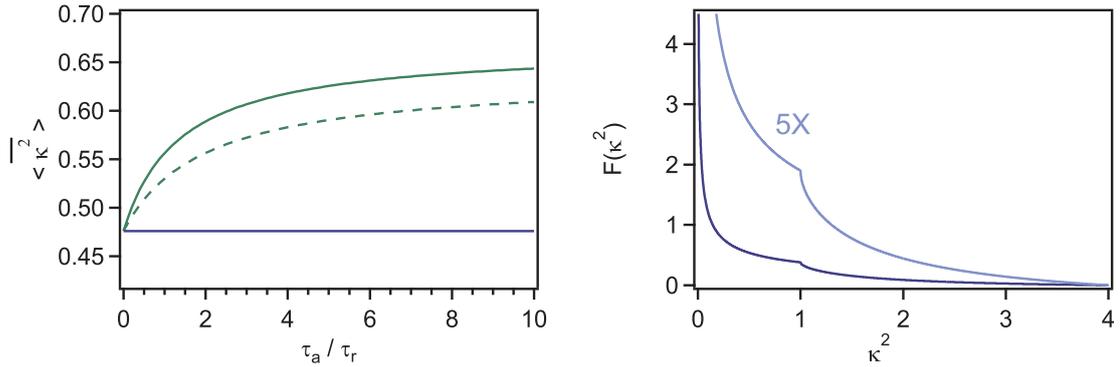


Abbildung 2.8: Mittelwert und statische Verteilung des Orientierungsfaktors κ^2

(a) Das Verhältnis der Anregungsdauer τ_a zur Rotationskorrelationszeit τ_r bestimmt den Wert von κ^2 für das jeweilige Experiment. Handelt es sich um bewegliche Moleküle (grüne Linie), wächst der Mittelwert von κ^2 von 0.476, bei dem keine Orientierung der Dipole während der Anregung vorausgesetzt wird, auf $2/3$, bei dem sich die Dipole sehr schnell im Vergleich zu ihrer Anregungsdauer orientieren. Ist nur ein Molekül frei beweglich (grün gestrichelte Linie) ist der Mittelwert im dynamischen Grenzfall etwas kleiner. Sind die Dipole gar nicht oder kaum beweglich, ist auch bei unterschiedlichen Lebensdauern κ^2 konstant (blau). (b) Im starren Grenzfall ist die Verteilung von κ^2 durch die Gleichung 2.24 gegeben. Deutlich ist, dass statistisch die κ^2 -Werte meist kleiner als Eins sind (dunkelblaue Linie). Große κ^2 -Werte, die eine höhere Transfereffizienz ermöglichen, sind eher unwahrscheinlich. Die hellblaue Linie zeigt zur genaueren Darstellung die Verteilung $F(\kappa^2)$ fünfmal vergrößert.

Vorausgesetzt, dass Donor und Akzeptor das gleiche Rotationsverhalten haben, konnte die Verteilung $F(\kappa^2)$ im statischen Grenzfall mithilfe des isotropen Diffusionsmodells [96] bestimmt werden. Sie ist gegeben durch [27]:

$$F(\kappa^2) = \frac{1}{2\sqrt{3}\kappa^2} \left[\ln(2 + \sqrt{3}) - H(\kappa^2 - 1) \ln(\sqrt{\kappa^2} + \sqrt{\kappa^2 - 1}) \right] \quad (2.24)$$

$H(\kappa^2 - 1)$... Heavy-Side-Funktion,

mit $H = 0$, für $0 < \kappa^2 < 1$, und $H = 1$, für $1 < \kappa^2 < 4$.

In Abbildung 2.8b ist die statische Verteilung von κ^2 zu sehen. Theoretisch spiegelt sie die Verteilung des Orientierungsfaktors einzelner Fluorophore im eingefrorenen Zustand wider. Der Schwerpunkt der Verteilung liegt deutlich bei Werten unter Eins. Große κ^2 -Werte, bei denen der Energietransfer effizienter ist, sind eher unwahrscheinlich. Zur besseren Veranschaulichung ist die Verteilung noch einmal vergrößert dargestellt.

2.2 Grundlagen der Konfokalmikroskopie

Mitte der Fünfziger entwickelte Marvin Minsky [84] ein erstes Konfokalmikroskop, um neuronale Netze direkt im Hirngewebe beobachten und somit biologische Vorgänge *in vivo* untersuchen zu können [24]. Durch zu schwache Lichtquellen und fehlende Rechnerkapazitäten war die Anwendbarkeit des ersten Mikroskops jedoch eher eingeschränkt. Erst Ende

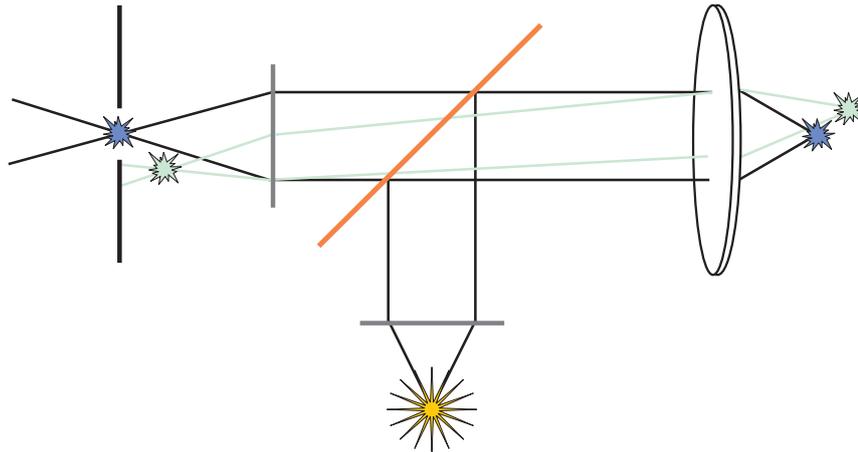


Abbildung 2.9: Konfokales Prinzip

Eine Punktlichtquelle (gelb) wird über einen halbdurchlässigen Spiegel oder Dichroit (orange) mithilfe einer Linse in der Objektelebene abgebildet. Das Objekt (blau) wird über dieselbe Linse in der Mitte einer kleinen Lochblende abgebildet. Ein Objekt (grün), das nicht in der Objektelebene liegt, wird nicht in der Lochblende abgebildet und somit nicht detektiert.

der Sechziger gelang es Egger und Petran [35] Gehirnzellen mithilfe eines konfokalen Mikroskops, das eine Nipkowscheibe zum Rastern nutzte, darzustellen.

Der große Vorteil von Konfokalmikroskopie ist die Möglichkeit, unerwünschten Hintergrund der Probe, meist Streulicht, auf ein Minimum zu reduzieren, da durch eine kleine Blende nur Licht aus der konfokalen Ebene detektiert wird. Somit ist die axiale Auflösung im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie verbessert. Durch das Überlagern des Anregungs- und des Detektionsfokus wird auch die laterale Auflösung erhöht. Die Punktdetektion ist aber auch gleichzeitig ein Nachteil, da für die Aufnahme eines Bildes die Probe abgerastert werden muss.

Das Rastern erfolgt prinzipiell über zwei verschiedene Ansätze. Entweder wird die Probe selbst über einen festen Laserfokus bewegt, oder die Probe ist fixiert und die Anregung bewegt sich auf dieser. Das Rastern der Anregung wird dabei z. B. mithilfe eines auslenkbaren Lasers oder über eine Nipkow-Scheibe realisiert [103].

2.2.1 Konfokales Prinzip

In Abbildung 2.9 ist das Prinzip eines Konfokalmikroskops gezeigt. Licht einer Punktlichtquelle wird über einen halbdurchlässigen Spiegel oder einen Dichroit auf eine Linse gelenkt und von dieser in der Objektelebene fokussiert. Vom Objekt reflektiertes oder ausgesandtes Licht wird von derselben Linse gesammelt und auf das kleine Loch der konfokalen Blende fokussiert. Licht, das nicht aus dem Fokus stammt, wird nicht detektiert, da es von der Blende zurückgehalten wird. Da die Beleuchtung und die Detektion in einem Punkt erfolgen, wird der Aufbau konfokal genannt.

2.2.2 Punkt-Abbildungs-Funktion und Auflösung

Obwohl die Auflösung eines konfokalen Mikroskops besser ist als die eines konventionellen, ist sie dennoch aufgrund von Beugung begrenzt. Wird ein punktförmiges Objekt durch ein optisches System abgebildet, so entsteht beugungsbedingt ein „verwaschener“ Punkt. Die Intensitätsverteilung in diesem Bild wird durch die Punkt-Abbildungs-Funktion (PSF - engl. point spread function) beschrieben. Unter der Annahme, dass es sich um ein paraxiales System handelt, d. h. um ein System mit kleiner numerischer Apertur, kann die PSF mithilfe der Besselfunktion J_1 beschrieben werden [136].

Die numerische Apertur NA eines Objektivs ist wie folgt definiert:

$$NA = n \sin \alpha. \quad (2.25)$$

Der Winkel α ist der halbe Öffnungswinkel des Objektivs und n der Brechungsindex des Mediums. Unter Verwendung der NA können die reduzierten Variablen ζ und ρ zur Beschreibung der PSF entlang der optischen Achse z bzw. in radialer Richtung r eingeführt werden [136]. λ ist dabei die Wellenlänge des Lichts.

$$\rho(r) = \frac{2\pi}{\lambda} NA r \quad (2.26)$$

$$\zeta(z) = \frac{2\pi}{n\lambda} (NA)^2 z \quad (2.27)$$

In der Fokalebene, d. h. bei $\zeta = 0$, ist die PSF rotationssymmetrisch und entspricht einer Airy-Scheibe [51]:

$$PSF(0, \rho) = 2J_1^2(\rho)/\rho^2 \quad (2.28)$$

Eine Airy-Scheibe ist eine helle, kreisförmige Scheibe in der Mitte, umgeben von konzentrisch angeordneten, nach außen schwächer werdenden, hellen und dunklen Ringen. Entlang der optischen Achse ($\rho = 0$) kann die PSF durch

$$PSF(\zeta, 0) = \left(\frac{\sin(\zeta/4)}{\zeta/4} \right)^2 \quad (2.29)$$

beschrieben werden. Auf der linken Seite in Abbildung 2.10 ist $PSF(\zeta, \rho)$ für die paraxiale Näherung dargestellt.

Interessant ist nun die PSF bei konfokaler Beleuchtung, d. h. bei Anregung und Detektion in einem Punkt. Da beide durch die oben eingeführte PSF beschrieben werden können, ist die konfokale PSF, PSF_{konf} , durch ihr Produkt gegeben:

$$PSF_{konf}(\zeta, \rho) = PSF_{Anr}(\zeta, \rho) \times PSF_{Det}(\zeta, \rho) \quad (2.30)$$

Zum Vergleich ist die konfokale PSF_{konf} rechts in Abbildung 2.10 dargestellt. Auffällig

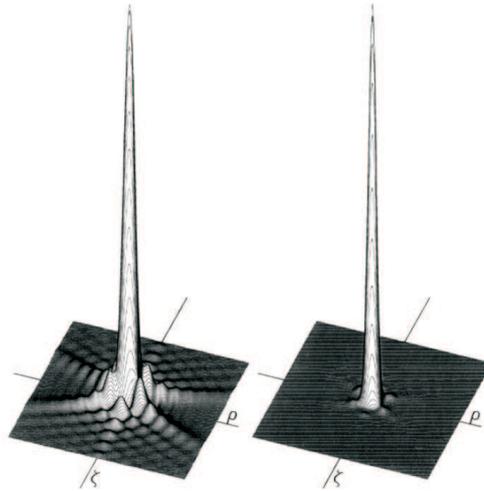


Abbildung 2.10: Punkt-Abbildungs-Funktion

Links: PSF in Abhängigkeit der reduzierten Variablen ρ (radial) und ζ (entlang optischer Achse). Rechts: Produkt zweier identischer PSF im konfokalen Fall. Bild aus: [136]

ist, dass unter konfokalen Bedingungen die PSF schmäler und somit die Auflösung besser als bei Weitfeldmikroskopie ist. Zudem sind die Nebenmaxima minimiert.

Um das Auflösungsvermögen eines Mikroskops zu beschreiben, wird oft das Rayleighkriterium genutzt. Demnach sind zwei Punkte noch voneinander trennbar, wenn die Mitte der Airy-Scheibe des einen in den ersten dunklen Streifen des anderen Airy-Musters fällt [51]. Der Radius einer Airy-Scheibe, und somit die laterale Auflösungsgrenze eines konventionellen Mikroskops, ist [103]:

$$r_{Airy} = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.31)$$

Für ein Konfokalmikroskop verbessert sich die Auflösung um den Faktor $\sqrt{2}$:

$$r_{Konf} = \frac{0,61}{\sqrt{2}} \frac{\lambda}{NA} \quad (2.32)$$

Entlang der optischen Achse verbessert sich die Auflösung von $2\lambda n/(NA)^2$ für ein konventionelles Mikroskop auf $1,5\lambda n/(NA)^2$ bei einem Konfokalmikroskop.

Es sei noch bemerkt, dass die Größe der konfokalen Lochblende die Auflösung entlang der Achse stark beeinflusst. Je kleiner das Loch ist, umso besser wird die axiale Auflösung, da mehr und mehr Streulicht gefiltert wird. Das geht jedoch auf Kosten des Probensignals, da immer weniger Photonen die Lochblende passieren können. Als optimale Größe für die Lochblende wird meist die Größe der Airy-Scheibe angegeben, da eine kleinere Lochblende die Auflösung nicht merklich verbessert und kaum Signal verloren geht [103, 117].

2.2.3 Konfokales Volumen

Die erfolgten Ausführungen zur PSF setzen voraus, dass das Objektiv gleichmäßig ausgeleuchtet wird und nur die Apertur des Objektivs das Licht einschränkt. Diese Annahme gilt jedoch nicht für das Beleuchten mit einem Laser, da die Intensitätsverteilung $I(\rho)$ im Querschnitt einem Gauß-Profil entspricht:

$$I(\rho) = I_0 e^{-2\rho^2/w^2}. \quad (2.33)$$

w definiert den Strahlradius, bei dem die maximale Intensität I_0 auf $1/e^2$ abgefallen ist. Wird die Apertur des Objektivs mit Laserlicht unterfüllt, d. h. der Strahldurchmesser ($2w$) ist kleiner als die Objektivapertur, wird auch die Intensitätsverteilung im Fokus einem Gauß-Profil entsprechen. Obwohl so ein großer Teil der Laserintensität genutzt werden kann, geht es auf Kosten der Auflösung, da der Durchmesser der Airy-Scheibe größer wird. Optimal ist ein Strahldurchmesser, der der Apertur entspricht. Die Auflösung wird kaum verändert im Vergleich zur gleichmäßigen Ausleuchtung und nur 14% der Laserleistung gehen verloren [136].

Vereinfacht kann das durch einen Gauß-Strahl entstehende konfokale Volumen radial mit einer Gauß-Verteilung und axial mit einer Lorentz-Verteilung angenähert werden [107]:

$$I(r, z) = \frac{2P}{\pi w^2(z)} e^{-2r^2/w^2(z)} \quad (2.34)$$

mit

$$w^2(z) = w_0^2 + z^2 \tan^2 \delta. \quad (2.35)$$

$w(z)$ beschreibt den Radius entlang der optischen Achse z , P die Laserleistung und δ den Winkel des fokussierten Laserstrahls.

2.3 Einzelmolekülspektroskopie

Die Heterogenität von biologischen Makromolekülen macht die Einzelmolekülspektroskopie für die Wissenschaft erst interessant. Proteine z. B. können verschiedene Faltungszustände und Konfigurationen oder unterschiedliche Dynamik bei enzymatischen Prozessen aufweisen [47]. In einem Ensembleexperiment werden all diese Eigenschaften gemittelt, und die Information eines einzelnen Moleküls geht verloren.

Fluoreszenzspektroskopie bietet die Möglichkeit, einzelne Moleküle mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung zu betrachten. Neben der Information über den Zustand eines Moleküls, z. B. seine Konformation, kann auch die zeitliche Entwicklung dieses Zustandes, z. B. bei der Bindung an ein Targetmolekül, genau untersucht werden. Nicht nur Aussagen über das Makromolekül selbst, sondern auch über seine unmittelbare Umgebung sind möglich, sobald diese die spektralen Eigenschaften, z. B. das Emissionsspektrum des

Moleküls, beeinflusst. Fluoreszenz dient somit auf der einen Seite als Sonde für Konformationen/Zustände und auf der anderen Seite als Sonde für Umgebungsbedingungen.

Die nächsten Abschnitte geben einen Überblick über die Methoden der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie bei Raum- und bei Tieftemperatur sowie eine kurze Einführung in die Photonenstatistik. Während das erste Einzelmolekülexperiment bei kryogenen Temperaturen stattfand [88], gibt es heutzutage zahlreiche Methoden bei Raumtemperatur [87, 83, 47]. Die Vorteile der Raumtemperaturexperimente liegen auf der Hand:

- ungemittelte Informationen über einzelne Moleküle mit keinem oder minimalem Kontakt des Systems, d. h. physiologische Bedingungen sind möglich;
- neben statischen Strukturinformationen sind dynamische Prozesse und Wechselwirkungen in Echtzeit zugänglich.

Dennoch bietet die Kryospektroskopie ein großes Potential, um weiter verfolgt zu werden [98]. Durch das Einfrieren kann die Struktur eines Biomoleküls exakter bestimmt werden, da Bewegungen, die das Bild verschmieren, verringert bzw. verhindert werden. Das Beobachten verschiedener Konformationszustände, die im Gleichgewicht vielleicht nur sehr kurz existieren, ist möglich. Interessant ist auch der Ansatz, durch stufenweises Erhöhen der Temperatur einem System immer mehr Freiheiten in seiner Energielandschaft zu geben und z. B. die Faltung eines Proteins in verschiedenen Stadien zu untersuchen [98, 150]. Des Weiteren sind Raumtemperaturexperimente durch Photobleichen limitiert. Da Wechselwirkungen mit der Umgebung, speziell mit Sauerstoff, verringert werden, wird erwartet, dass die Fluorophore bei tiefen Temperaturen stabiler sind und lange Beobachtungszeiten ermöglicht werden.

2.3.1 Signal und Hintergrund

Die Emission eines Photons ist ein zufälliges Ereignis, das mit einer geringen Wahrscheinlichkeit eintritt. Diese voneinander unabhängigen Ereignisse, die in einem bestimmten Zeitintervall eintreten, werden durch die Poisson-Statistik beschrieben. Mit einer mittleren Anzahl von N Photonen pro Zeitintervall ergibt sich folgende Wahrscheinlichkeit für n Photonen in diesem Intervall:

$$P_N(n) = \frac{N^n}{n!} e^{-N} \quad (2.36)$$

Die Standardabweichung dieser Verteilung beträgt:

$$\Delta N = \sqrt{N} \quad (2.37)$$

Für die Fluoreszenzmikroskopie bedeutet das, dass jedes Signal S mit einem statistischen Rauschen \sqrt{S} , auch Schrotrauschen genannt, gemessen wird. Gerade für die Einzelmolekül-

spektroskopie ist es wichtig, das Signal vom Schrotrauschen trennen zu können. Zusätzlich wird das Signal auch noch von Hintergrund, z. B. Streu- oder Ramanlicht, oder Licht anderer Quellen überlagert. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis SRV ergibt sich damit zu [48]:

$$SRV = \frac{\eta_{Det} R t_{int}}{\sqrt{(\eta_{Det} R + C_H P + N_D) t_{int}}}. \quad (2.38)$$

Das Signal S setzt sich aus der Detektionseffizienz η_{Det} und der Emissionsrate R in einem bestimmten Zeitintervall t_{int} zusammen. Der Hintergrund ergibt sich aus Hintergrundphotonen C_H , der Laserleistung P und der Dunkelzählrate N_D der Detektoren. Ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis resultiert somit aus einer hohen Emissionsrate und einer hohen Detektionseffizienz bei niedrigem Hintergrund und kleiner Dunkelzählrate. Da die Emission bei hohen Laserleistungen in die Sättigung übergeht (siehe 2.1), der Hintergrund aber proportional zur Leistung wächst, gibt es eine optimale Anregungsintensität, bei der das Signal-zu-Rausch-Verhältnis maximal ist. Die Dunkelzählrate der Detektoren dagegen ist konstant.

2.3.2 Einzelmolekülspektroskopie bei Raumtemperatur

Die Beobachtung eines einzelnen Moleküls mit einem Konfokalmikroskop kann prinzipiell auf zwei Arten erfolgen, frei diffundierend in Lösung oder immobilisiert an einer Oberfläche. In Lösungsexperimenten diffundieren die zu beobachtenden Moleküle aufgrund von Brownscher Molekularbewegung durch das Anregungsvolumen und können anhand ihrer spektroskopischen Eigenschaften identifiziert und dann klassifiziert werden. Ein Beispiel dafür ist ein FRET-Experiment, bei dem die Faltung/Entfaltung im Gleichgewicht untersucht wird. Werden die Moleküle dagegen auf einer Oberfläche immobilisiert, entweder durch Linker oder durch Einbetten in eine Matrix, so ist eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum möglich. Die Dynamik eines Enzyms oder die Photophysik des einzelnen Farbstoffs können dann verfolgt werden.

Fluoreszenz bietet mehrere charakteristische Eigenschaften, anhand derer ein Molekül identifiziert werden kann: Emissionsspektrum, Fluoreszenzlebensdauer, -anisotropie und -intensität, sowie in Lösung den Diffusionskoeffizienten. Durch das Beobachten zweier Farbstoffe, die sich sehr nah sind, kommt als weiterer Parameter die Transfereffizienz dazu. Die simultane Messung mehrerer Fluoreszenzparameter erlaubt in der Regel detailliertere Rückschlüsse auf das System [69, 115].

Im Folgenden werden die Methoden des Einzelmolekül-FRET (engl. single-pair FRET, spFRET) und der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie vorgestellt. An einzelnen Molekülen können außerdem Lebenszeit-, Anisotropie- oder Orientierungsexperimente durchgeführt werden. Da diese Methoden hier nur am Ensemble angewandt werden (siehe Kapitel 2.1), wird auf weiterführende Literatur verwiesen [71].

2.3.3 Einzelmolekül-FRET (spFRET)

Datenaufnahme und Auswertung Die Transfereffizienz einzelner Moleküle kann entweder in Lösung oder immobilisiert gemessen werden. In einem Lösungsexperiment ist die Konzentration der fluoreszenzmarkierten Moleküle so klein (50 pM - 200 pM), dass sich im Beobachtungsvolumen im Mittel weniger als ein Teilchen befindet. Befänden sich mehrere Moleküle gleichzeitig im Fokus, entspräche das gemessene Verhältnis von Akzeptor- zu Gesamtintensität nicht der Transfereffizienz eines einzelnen Teilchens, sondern einem Mittelwert. Die Fluoreszenzintensität wird zeitabhängig aufgenommen (siehe Abschnitt 3.3) und für FRET-Experimente in Zeitintervallen von z. B. einer Millisekunde dargestellt. In Abbildung 2.11a ist ein kurzer Ausschnitt von Intensitäten in Abhängigkeit von der Zeit zu sehen. Aus der Donor- und der Akzeptorintensität wird nach Gleichung 2.19 für jedes Zeitintervall die Transfereffizienz berechnet, sobald die Summenintensität einen bestimmten Schwellwert übersteigt. Durch die Summenschwelle wird Hintergrund aus der Statistik herausgefiltert. Die Transfereffizienzen werden dann in ein Histogramm übertragen (Abbildung 2.11b). In diesem Beispiel ist eine hohe Transfereffizienz bei 0,9 zu sehen, sowie ein geringer Anteil mit einer Transfereffizienz von Null.

Ist ein Molekül immobilisiert, kann der Laserfokus direkt auf diesem platziert und die zeitabhängige Intensität dieses einen Moleküls gemessen werden. Die Beobachtungszeit ist jetzt nicht mehr durch die Aufenthaltszeit im Fokus begrenzt, sondern durch die Überlebenszeit des Fluorophors. In Abbildung 2.11c ist die transiente Intensität eines doppeltmarkierten Moleküls dargestellt. Die Zeitintervalle, in denen die Photonen zusammengefasst wurden, betragen hier 10 ms. Zur Analyse der Zeitspur wird auch hier ein Transfereffizienz-Histogramm erstellt (Abbildung 2.11d). Im Vergleich zur der Messung in Lösung tragen weniger Ereignisse zu dem Histogramm bei, dennoch sind deutlich drei Zustände des Moleküls zu erkennen.

Die in Abbildung 2.11b und d gezeigten Histogramme vermitteln recht deutlich die Möglichkeiten der Einzelmolekülspektroskopie. Während das Histogramm über sehr viele Moleküle (b) eine Ensembleverteilung zeigt, ist in dem Histogramm in (d) eine Zeitverteilung eines einzigen Moleküls zu sehen. Zusätzlich kann durch eine Analyse der Zeitdauern der Zustände die Dynamik des Systems charakterisiert werden.

Charakterisierung eines Transfereffizienz-Histogramms Ein Transfereffizienz - Histogramm kann über die mittlere Transfereffizienz E und ihre Breite ΔE Auskunft über Abstände, Subpopulationen und Dynamiken geben [29, 111]. Dabei sollte beachtet werden, dass zur Breite der Verteilung nicht nur Photophysik oder Abstandsänderungen der Fluorophore beitragen, sondern vor allem das Schrotrauschen, d. h. die Statistik des Fluoreszenzsignals. Die Signale des Donors (N_D) und des Akzeptors (N_A) unterliegen, wie in den Grundlagen erläutert (s. Abschnitt 2.3.1), der Poisson-Statistik. Ihre Mittelwerte n_D und n_A sind von photophysikalischen Eigenschaften wie Triplettzuständen oder Sättigung

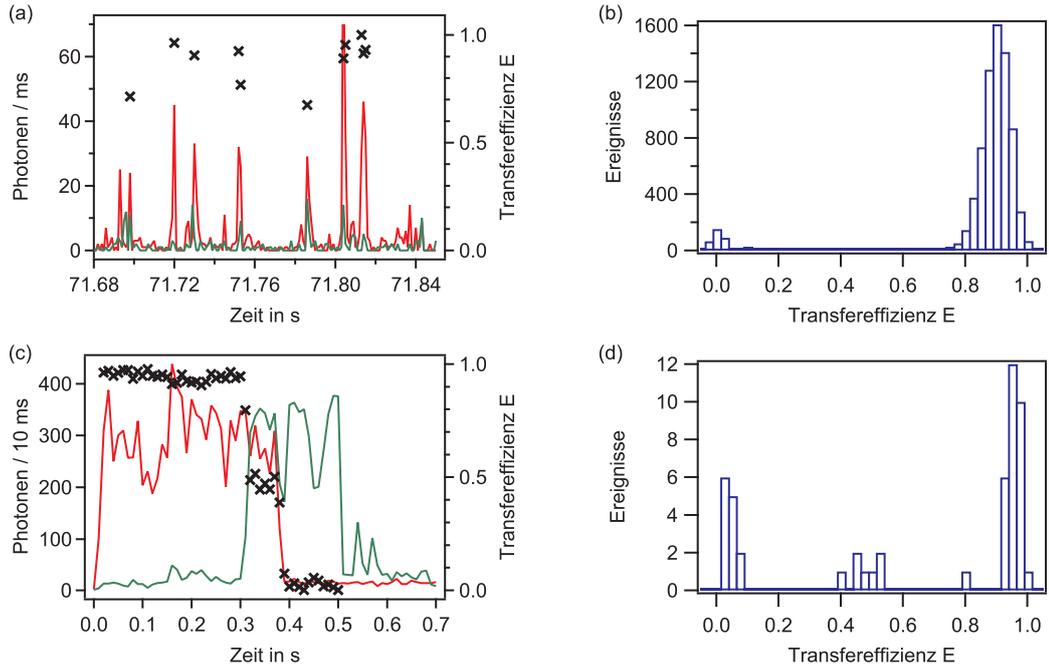


Abbildung 2.11: Beispiele für spFRET-Experimente

(a) Ausschnitt der zeitabhängigen Intensität im Donorkanal (grün) und im Akzeptorkanal (rot) in einem Lösungsexperiment. Diffundiert ein fluoreszenzmarkiertes Molekül durch das konfokale Volumen wird ein Photonenschwall (- burst) detektiert. Die Anzahl der Photonen je Millisekunde wird dargestellt. Für jeden Punkt der transienten Intensität, bei dem die Summe von Donor und Akzeptor 30 Photonen/ms übersteigt, wird die Transfereffizienz berechnet (Kreuze) und in einem Transfereffizienz-Histogramm (b) dargestellt. (c) Zeitabhängige Intensität eines immobilisierten Moleküls mit Donor- (grün) und Akzeptorfluoreszenz (rot). Zunächst emittiert der durch FRET angeregte Akzeptor und bleicht nach 0,4 s. Nach ca. 0,6 s bleicht auch der Donor, oder er geht in einen Dunkelzustand über. Die berechnete Transfereffizienz für die 10 ms-Intervalle ist in schwarz dargestellt und ist in (d) in ein Histogramm übertragen.

sowie von der Laserleistung abhängig. Sind die Signale, d. h. die Mittelwerte, sehr niedrig, so spielen die statistischen Schwankungen eine große Rolle in der Transfereffizienz-Verteilung. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 2.12a simulierte Histogramme (durchgezogene Linien) dargestellt, deren Breite nur durch Schrotrauschen bestimmt ist. Die Simulation ist eine einfache Monte-Carlo-Simulation, bei der zwei zeitabhängige Intensitäten mit einer mittleren Intensität n_D bzw. n_A und Poisson-Rauschen erzeugt werden. Die mittlere Summenintensität ($n_D + n_A$) beträgt 60 Photonen pro Zeiteinheit. Es ist deutlich, dass die Verteilung bei Transfereffizienzen um 0,5 am breitesten ist, da hier das Schrotrauschen auf beide Intensitäten den größten Einfluss hat. Neben der mittleren Transfereffizienz hat die Höhe des Summensignals S , bestimmt durch die Laserintensität, Einfluss auf die Breite des Histogramms. Das wird deutlich, wenn die Varianz der Transfereffizienz betrachtet wird. Sie kann wie folgt abgeschätzt werden [29]:

$$(\Delta E)^2 = \frac{E(1-E)}{S} \quad (2.39)$$

In Abbildung 2.12b ist die Breite ΔE für verschieden große Summensignale dargestellt.

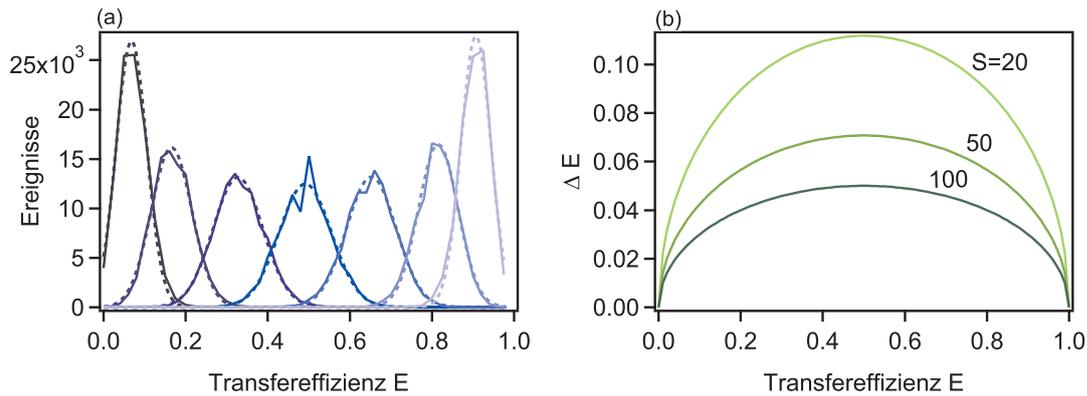


Abbildung 2.12: Simulation von FRET-Verteilungen und deren Breite

(a) Die simulierten FRET-Verteilungen (durchgezogene Linien) wurden mit Gauß-Funktionen angepasst (gepunktete Linien). Die mittlere Summenintensität beträgt 60 Photonen je Zeiteinheit. (b) Die Breite der Transfereffizienz in Abhängigkeit von der mittleren Transfereffizienz und der Summenintensität zeigt den starken Einfluss des Schrotrauschens bei geringer Summenintensität ($S = 20$). Umso höher das Summensignal ist, desto schmaler wird die FRET-Verteilung ($S = 100$).

Bei einer Summenintensität von 20 Photonen pro Zeiteinheit kann die Verteilung eine Breite von 0,1 erreichen; bei 100 Photonen reduziert sich die Breite schon auf 0,05. Es sei erwähnt, dass die Verteilungen in einem Experiment meist breiter sind, da in diesem Modell der Hintergrund sowie die Diffusion der Moleküle vernachlässigt wurde. Der zusätzliche Beitrag macht jedoch nicht mehr als 10 % aus [26].

Zur Bestimmung der mittleren Transfereffizienz E und ihrer Breite ΔE werden alle Histogramme mit einer Gauß-Funktion angepasst (Abb. 2.12a). Auch unsymmetrische Verteilungen, die in der Nähe einer Transfereffizienz von 0 und 1 liegen, können mit einer Gauß-Funktion angenähert werden. Eine Anpassung mit einer β -Funktion liegt nahe; die Ergebnisse unterscheiden sich jedoch nur wenig von der Gauß-Verteilung [26].

2.3.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die theoretischen Grundlagen für die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurden bereits vor vier Jahrzehnten in den 1970ern von Elson und Magde veröffentlicht [36]. Sie beschreiben die statistische Analyse von Fluktuationen des Fluoreszenzsignals einzelner Moleküle, die Aussagen über die Dynamik dieser Moleküle ermöglicht. Die Fluktuationen resultieren dabei zum Einen aus der Diffusion der Teilchen durch das Beobachtungsvolumen (siehe Abschnitt 2.3.2) und zum Anderen aus photophysikalischen Prozessen, z. B. aus Tripletzuständen oder Energietransfer.

Die zeitliche Korrelation der Fluktuationen stellt die Grundlage der Analyse dar und wird mathematisch mithilfe einer normierten Autokorrelationsfunktion (AKF) $G(\tau)$ charakterisiert [54]:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2.40)$$

Dabei sind die Intensitätsfluktuationen $\delta F(t)$ des Fluoreszenzsignals $F(t)$ und der Mittelwert $\langle F(t) \rangle$ wie folgt definiert:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad \text{mit} \quad (2.41)$$

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt. \quad (2.42)$$

(Der Mittelwert $\langle F(t) \rangle$ ist eigentlich für unendlich lange Messungen, d. h. $T \rightarrow \infty$, definiert.) Die Autokorrelationsfunktion zeigt die Ähnlichkeit eines Signals zum Zeitpunkt t verglichen mit dem Zeitpunkt $t + \tau$. Im Fall von frei diffundierenden Molekülen in einer Lösung entspricht sie also der Wahrscheinlichkeit, ein Molekül, das zum Zeitpunkt t detektiert wurde, auch noch zum Zeitpunkt $t + \tau$ detektieren zu können. Ein Beispiel für eine Autokorrelationsfunktion, in der nur Diffusion Ursache der Fluktuationen ist, wird in Abbildung 2.13 gezeigt.

Aus dieser Form der AKF lassen sich zwei wesentliche Charakteristika entnehmen, die Amplitude $G(0)$ und die Zeitkonstante τ_D , die Informationen über die Konzentration und die Beweglichkeit der untersuchten Moleküle geben.

- $G(0)$ entspricht der relativen Stärke der Fluktuationen im zeitlichen Mittel und ist somit ein Maß für die mittlere Konzentration der Fluorophore. Da die Fluktuationen, die hier durch die variierende Teilchenanzahl im Volumen entstehen, der Poisson-Statistik unterliegen (siehe Abschnitt 2.2), ist die Amplitude der Autokorrelationsfunktion:

$$G(0) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle}. \quad (2.43)$$

Aus ihr kann somit die Molekülanzahl im Fokus bestimmt werden und somit auch, mithilfe der bekannten Größe des Beobachtungsvolumens, die Konzentration der Probe.

- Die Zeitkonstante τ_D ist die charakteristische Zerfalls- oder Relaxationszeit und gibt Auskunft über die Dynamik des Systems. Sie entspricht der Diffusionszeit, wenn sie nur aus der Aufenthaltsdauer der Teilchen im Volumen bestimmt wird. Ist das Messvolumen bekannt, lässt sich der Diffusionskoeffizient D berechnen.

Für eine Diffusion, die nur auf der Brownschen Molekularbewegung basiert, kann die aus den Messungen erhaltene AKF mit der folgenden Funktion angepasst werden [107]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[1 + \left(\frac{w_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1/2} \quad (2.44)$$

N ... mittlere Anzahl der Moleküle im Fokus

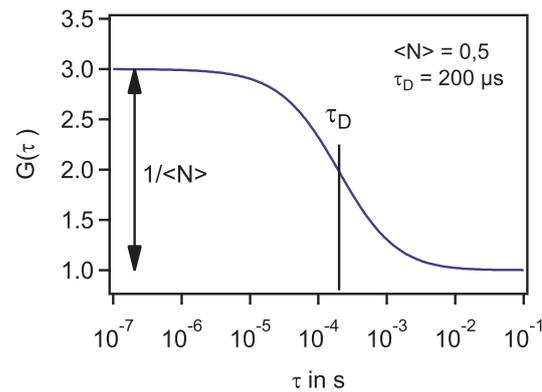


Abbildung 2.13: Beispiel einer Autokorrelationsfunktion

Die Abbildung zeigt eine simulierte Autokorrelationsfunktion mit einer mittleren Teilchenanzahl von 0,5 und einer mittleren Aufenthaltsdauer von 200 μs im Fokus. Der Strukturparameter beträgt 0,2.

- w_0 ... Radius der kleinen Halbachse
- z_0 ... Radius der großen Halbachse
- τ_D ... mittlere Diffusionszeit

Diese Form ermöglicht die Bestimmung der Amplitude $G(0)$ sowie der dazugehörigen Diffusionszeit τ_D . w_0/z_0 stellt dabei den Strukturparameter S dar, durch den die Geometrie des Anregungsvolumens (siehe Abschnitt 2.2) in die Gleichung mit einbezogen wird. Mithilfe eines bekannten Fokusradius', kann aus der Diffusionszeit der Diffusionskoeffizient D berechnet werden:

$$D = \frac{w_0^2}{4\tau_D}. \quad (2.45)$$

Neben den Intensitätsfluktuationen, die auf Diffusion beruhen, zeigen sich auch photophysikalische und -chemische Prozesse charakteristisch in der AKF. Geht ein Fluorophor in einen Triplettzustand über (siehe Abschnitt 2.1.1), so ist er für eine gewisse Zeit dunkel, bevor er wieder emittiert. Diese An-Aus-Dynamik ist in der Regel viel schneller als die Diffusion der Moleküle durch das Beobachtungsvolumen und ist dadurch als zusätzlicher Abfall in der AKF bei kurzen Zeiten zu sehen. In Abbildung 2.14 ist eine AKF eines Experiments mit verschieden starker Triplettedynamik dargestellt. Der Anteil der Moleküle, die im Beobachtungsvolumen in einen Triplettzustand übergehen, variiert z. B. mit der Anregungsintensität und äußert sich in einer höheren Amplitude. Die Anpassungsfunktion für die AKF wird in diesem Fall um einen exponentiellen Triplettterm erweitert:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[1 + \frac{T}{1-T} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T}\right) \right] \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\omega_0^2}{z_0^2} \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1/2} \quad (2.46)$$

T ist der mittlere Anteil der Teilchen im Triplettzustand bzw. der Zeitanteil eines Moleküls im Triplettzustand und τ_T die Zeitkonstante des exponentiellen Abfalls.

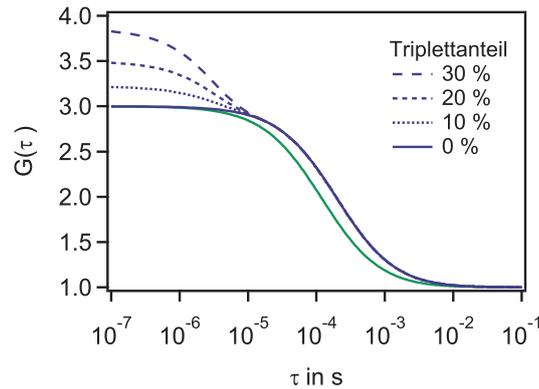


Abbildung 2.14: Autokorrelationsfunktion mit Triplettodynamik und Photobleichen

Die blauen AKF haben alle die gleiche Diffusionszeit von $200 \mu\text{s}$ und 0,5 Moleküle im Fokus, jedoch verschiedene Anteile an Molekülen, die sich im Fokus in einem Triplettzustand befinden. Mit steigender Triplettodynamik steigt auch die Amplitude im Bereich sehr kurzer Zeiten an. Die grüne AKF zeigt eine Verkürzung der Diffusionszeit aufgrund von Photobleichen.

Bei einer zu hohen Anregungsintensität kann es auch zum Photobleichen des Farbstoffs innerhalb des Beobachtungsvolumens kommen (siehe 2.1.5). Ist der Anteil der gebleichten Moleküle hoch, so verkürzt sich scheinbar die Diffusionszeit durch den Fokus (siehe Abb. 2.14). Ein Hinweis in der AKF auf Photobleichen ist also eine Reduktion der Diffusionszeit mit steigender Anregungsintensität.

Anwendung der FCS Mithilfe von FCS kann direkt die Mobilität von fluoreszierenden Molekülen in verschiedenen Umgebungen untersucht werden. Ein Vorteil stellt dabei die „noninvasive“ Anregung durch den Laser dar, sodass die Methode auch *in vivo* Experimente an Zellen erlaubt. Durch Mobilitätsänderungen, also Änderungen der Diffusionszeit von z. B. farbstoffmarkierten Proteinen, können Aggregation, Konformationsheterogenität oder Wechselwirkungen mit anderen Proteinen nachgewiesen werden. Aber auch die photophysikalische Dynamik kann Auskunft über Änderungen der Umgebung geben.

Die zahlreichen Experimentmöglichkeiten sind nur durch den gegebenen Zeitrahmen eingeschränkt. Das Zeitfenster, das durch FCS erfasst werden kann, ist nach unten begrenzt durch die Zeitauflösung der Detektoren und der Auswertelektronik (ps-ns) sowie nach oben durch die mittlere Aufenthaltsdauer der Moleküle im Beobachtungsvolumen ($< 500 \mu\text{s}$).

2.3.5 Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen

Die Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen erfolgt prinzipiell vor dem Hintergrund zweier verschiedener Fragestellungen.

Auf der einen Seite können einzelne Moleküle über ihre spektrale Selektivität beobachtet werden. D. h., im Beobachtungsvolumen, welches ca. zwei bis vier Größenordnungen größer als bei Raumtemperatur ist [98], können sich viele Moleküle befinden. Die Unter-

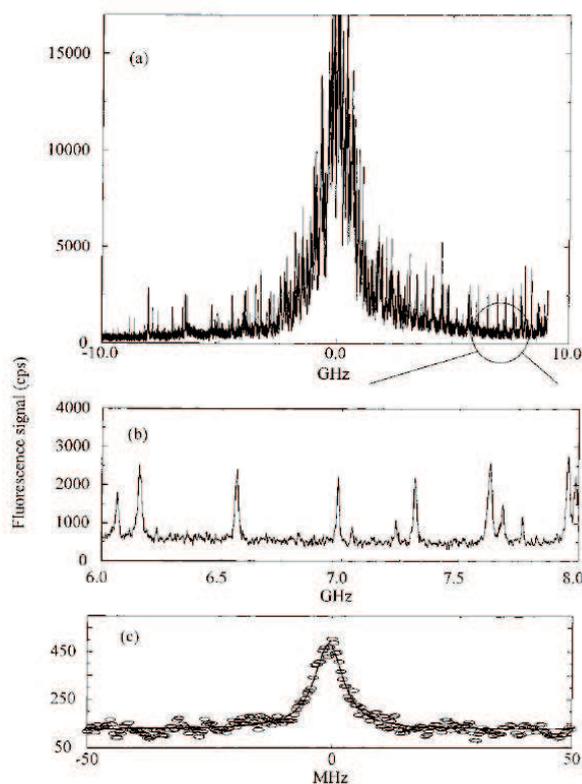


Abbildung 2.15: Fluoreszenz-Anregungsspektrum von Pentacen in p-Terphenyl bei 1,5 K.

Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungsfrequenz. Die Anregung erfolgte mit einem abstimmbaren Laser mit einer Bandweite von ca. 3 MHz. (a) Breite Anregung um 592,321 nm, sodass mehrere Moleküle angeregt werden. (b) Ausschnitt aus einem 2 GHz-Bereich, der Spektren einzelner Moleküle zeigt. (c) Anregungsspektrum eines einzelnen Moleküls. Es zeigt die Lebenszeit-begrenzte Weite des Spektrums von 7,8 MHz (Punkte) und eine Lorentz-Anpassung (durchgezogene Linie). Übernommen aus: [86].

drückung des Hintergrundes, für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis, erfolgt nur durch die sehr schmale Anregung mit einer Frequenz, der Null-Phononen-Linie. Zunächst bot diese Technik eine Möglichkeit überhaupt optische Spektroskopie an einzelnen Molekülen zu betreiben, in dem die Sensitivität der Null-Phononen-Absorption auf die lokale Umgebung genutzt wurde. Nachdem die ersten einzelnen Moleküle durch eine Linienabsorption eines Pentacens in p-Terphenyl nachgewiesen werden konnten [88], zeigte sich später, dass Fluoreszenz ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht [100]. Als Beispiel für diese Null-Phononen-Linien sind in Abbildung 2.15 mehrere Linien einzelner Pentacene in p-Terphenyl gezeigt [86]. Diese Linien sind sehr sensitiv auf Änderungen in der Umgebung, z. B. Punktdefekte oder Versetzungen sowie äußere Einwirkungen wie Druck [48]. Nachteilig bei dieser Art von Kryospektroskopie ist die geringe Zahl an Molekülarten, die Null-Phononen-Linien in verschiedenen Gastsystemen zeigen.

Auf der anderen Seite wird Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen genutzt, um generell Dynamik der untersuchten Moleküle oder der Umgebung zu reduzieren. In diesem Fall werden die einzelnen Moleküle wie bei Raumtemperaturmessungen räumlich

selektiert. Erste Experimente an biologischen Systemen machten van Oijen und Mitarbeiter an Lichtsammelkomplexen eines Bakteriums bei 1,2 K. Hintergrund dieser Messungen war vor allem die Beobachtung der elektronischen Kopplung und der Energieübertragung in diesen Lichtsammelkomplexen [131, 132]. Deren Beobachtung war durch die inhomogene Verbreiterung der Spektren durch verschiedene Umgebungen bei Raumtemperatur nicht möglich. Neben diesem „Einfrieren“ von Umgebungen können tiefe Temperaturen auch genutzt werden, um Photodynamik zu reduzieren und damit die Beobachtungszeit einzelner Moleküle zu verlängern [150, 148]. Untersucht wurden bisher z. B. synthetische Farbstoffe wie Perylenmonoimide oder Rhodamine in Polymerschichten oder Glycerol [150, 18]. Neben Photophysik [149] und Anisotropie [150] war auch der Energietransfer Gegenstand der Experimente bei niedrigen Temperaturen [90, 92].

An das Einfrieren von Dynamiken, um einzelne Zustände zu untersuchen, und an die Verlängerung der Beobachtungszeit soll diese Arbeit anknüpfen. Ziel ist es nun, biologische Makromoleküle in einem wässrigen Puffer einzufrieren, um möglichst eine natürliche Umgebung zu erhalten. Auf die Schwierigkeiten und Methoden wird im nächsten Kapitel eingegangen.

2.4 Kryofixation - Immobilisierung in einer amorphen Eisschicht

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Betrachtung von einzelnen, fluoreszenzmarkierten Polypeptiden, die in einer dünnen Schicht ihrer Lösung eingefroren sind. Durch die Immobilisierung ist es möglich, die Beobachtungszeit des Moleküls, von wenigen hundert Mikrosekunden in Lösungsexperimenten, auf mehrere Sekunden, zu erhöhen. Sie ist somit nur noch von der Überlebenszeit des Farbstoffmoleküls begrenzt, welche jedoch, aufgrund reduzierter Photobleichprozesse, theoretisch länger ist als in Lösung.

Vorangetrieben wurde die sogenannte Kryofixation, „das gekonnte Einfrieren der Proben“, durch die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie, bei der hauchdünne Schichten als Probe benötigt werden. Ziel dabei ist es, biologische Systeme oder Moleküle so zu fixieren, dass sie sich nicht von ihrer Struktur bei Raumtemperatur unterscheiden. Dies gelingt nur, wenn das Wasser beim Einfrieren vitrifiziert, d. h. in einen festen amorphen Zustand übergeht und keine Kristallstrukturen ausbildet [77]. Interessant ist, dass amorph eingefrorenes Wasser wahrscheinlich am häufigsten im Universum vorkommt, seine Herstellung jedoch schwierig ist und spezielle Techniken benötigt [28].

Eine der ersten Methoden, Wasser zu vitrifizieren, war das Aufsprühen sehr kleiner, mit n-Heptan gemischter Wassertröpfchen auf flüssiges Ethan bei 90 K [14]. Später erfolgte die Vitrifizierung durch Wasserdampf auf stark gekühlten Metallplatten (unter 77 K) [80], oder durch hohen Druck auf kristallines Eis [85].

Ob Wasser amorph oder kristallin einfriert, hängt von drei Faktoren ab: der Abkühlungsrate, der Viskosität und dem Volumen [2]. Eine hohe Abkühlrate, eine hohe Viskosität sowie

ein kleines Volumen sind Voraussetzungen für die Vitrifizierung. Wird Wasser langsam abgekühlt, bildet sich ein hexagonales Gitter aus, das zwischen 72 K und 273 K stabil ist. Erst bei einer Abkühlrate von ca. 10^6 K/s wird die Bildung von Kristallen verhindert, und es entsteht amorphes Eis [28]. Der amorphe Zustand ist jedoch nur bei sehr tiefen Temperaturen stabil. Ab einer Temperatur von 150 K geht die glasartige in die kristalline, hexagonale Struktur über [63, 28].

Nicht nur in der Kristallographie und der Elektronen-Mikroskopie, sondern auch in der Biologie ist das Interesse an der Vitrifizierung von Wasser groß. Durch die Kryokonservierung von Zellen kann ihre Vitalität, z. B. bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff, über sehr lange Zeit erhalten bleiben. Kristallines Eis würde Zellstrukturen schon beim Einfrierprozess zerstören. So entdeckten Polge und Mitarbeiter [104], dass Glycerin im Wasser als Kryoprotektor fungiert und somit auch langsamere Einfrierprozesse erlaubt. Kryoprotektoren, u. a. Trehalose, Saccharose oder Propylenglykol, erhöhen die Viskosität von Wasser, d. h. die molekulare Mobilität sinkt und die Bildung von Eiskristallen wird unwahrscheinlicher [2].

Die wahrscheinlich einfachste Methode, amorphes Eis herzustellen, ist, die Probe in flüssigen Stickstoff zu tauchen [2, 119]. Durch das Leidenfrost-Phänomen, bei dem sich eine Gasschicht um die Probe bildet, wird jedoch der Wärmeaustausch zwischen flüssigem Stickstoff und Probe stark reduziert, sodass die Abkühlrate gesenkt wird und für größere Probenvolumina nicht genügt. Song und Mitarbeiter [119] zeigten, dass ein $20\ \mu\text{m}$ großer Wassertropfen noch vollständig vitrifiziert, sich aber in einem $200\ \mu\text{m}$ großen bereits Eiskristalle ausbilden. Stickstoff eignet sich nicht unbedingt als direktes Kühlmittel, jedoch als primäres Kühlmittel, das entweder andere Gase (z. B. Propan) oder feste Substrate kühlt. Die gängigste Methode in der Elektronen-Mikroskopie ist das Eintauchen der Probe in flüssiges Propan bzw. flüssiges Ethan [32].

In dieser Arbeit wird flüssiger Stickstoff für den Einfrierprozess als Kühlmittel für den Probenhalter, ein Deckglas, genutzt; sowie um die Probe konstant auf 77 K zu kühlen.

3 Experimentelles

In diesem Kapitel werden der experimentelle Aufbau sowie die verwendeten Peptide beschrieben. Basierend auf dem Prinzip der konfokalen Rastermikroskopie kann der Aufbau für Experimente in Lösung und im eingefrorenen Zustand genutzt werden. Besonderes Augenmerk wird dabei auf den für tiefe Temperaturen speziell entwickelten Kryostat sowie die dazugehörige Probenpräparation gelegt. Die Erweiterung des Aufbaus mit einem Gitter und einer CCD-Kamera ermöglicht die Aufnahme von Fluoreszenzspektren.

Zwei unterschiedlich lange Polyprolinpeptide wurden ausgewählt, um den Energietransfer näher zu charakterisieren. Auf die Besonderheiten ihrer Struktur sowie auf die zur Markierung genutzten Farbstoffe Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594 wird im dritten Abschnitt näher eingegangen.

Der Farbstoff Perylenmonoimid, eingebettet in einer Polymerschicht, wurde genutzt, um die Güte des Aufbaus zu charakterisieren, und wird im vierten Abschnitt vorgestellt.

3.1 Konfokales Laser-Raster-Mikroskop

Das Besondere an einem Konfokalmikroskop ist, im Gegensatz zur konventionellen Weitfeldmikroskopie, die Anregung und Detektion in einem Punkt. Dieser Punkt ist ein beugungsbegrenzter Fokus, der ein sehr kleines Volumen im Femtoliterbereich bildet. Bei Molekülkonzentrationen im nanomolaren Bereich befindet sich somit im Mittel weniger als ein Teilchen in diesem Volumen. Da auch der Hintergrund in solch einem kleinen Volumen stark reduziert ist, wird das Betrachten einzelner Moleküle möglich (siehe Abschnitt 2.2). Der prinzipielle Aufbau des Konfokalmikroskops ist in Abbildung 3.1 gezeigt. Passend zu den gewählten Farbstoffen stehen zwei Laserlinien der Wellenlängen 488 nm und 594 nm für die Anregung zur Verfügung. Der 488 nm Laser ist ein frequenzverdoppelter Diodenlaser (Sapphire488-20, Coherent, Dieburg, D) mit einer Ausgangsleistung von 20 mW. Der Laser mit 594 nm ist ein Helium-Neon-Laser (1677P, JDSU, Milpitas, USA) mit einer Ausgangsleistung von 5 mW. Dieser wird mithilfe eines Langpassfilters (570DCXR, Chroma, Bellows Falls, USA) genau auf den Strahlengang des 488 nm Lasers ausgerichtet, sodass beide Strahlen gleichzeitig in eine Lichtleitfaser (Schäfter + Kirchhoff, Hamburg, D) eingekoppelt werden können. Die Polarisation des Laserlichtes wird durch ein $\lambda/2$ - und ein $\lambda/4$ -Verzögerungsplättchen (Melles Griot, Bensheim, D), die vor der Faser stehen, sowie durch die Faser selbst bestimmt, und wird nach der Faser mithilfe eines $\lambda/4$ -Plättchens und eines Analysators justiert.

Die Ausbreitung des Lichts in der Faser erfolgt mit nur einer Mode, und da der Glaskern nur einen Durchmesser von wenigen Mikrometern aufweist, wird das Ende der Faser als eine ideale Punktquelle angenommen. Das aus dem Faserende austretende, divergente Licht wird durch eine achromatische Linse (Brennweite 50 mm) kollimiert und auf einen Dichroit (z488-594, Chroma) gelenkt. Der Dichroit ist ein Dualbandpassfilter, der nur die beiden Laserlinien reflektiert und Licht anderer Wellenlängen transmittiert (siehe Abb. 6.1, blau). Das reflektierte Laserlicht trifft nun auf eine Rastereinheit, die aus zwei mit Galvanometerantrieb verstellbaren Spiegeln besteht (Squirrel 11, ARGES, Wackersdorf, D). Durch ihre räumliche Nähe können diese Spiegel als ein Drehpunkt für den Laser angesehen werden. Dieser gedachte, mittlere Drehpunkt muss in die Hauptebene des Objektivs abgebildet werden, damit durch horizontale und vertikale Auslenkungen des Lasers der Fokus des Objektivs eine Fläche abrastert. Da der parallele Strahlengang nach den Spiegeln erhalten bleiben soll, wird ein telezentrisches Linsensystem mit zwei Linsen benötigt. Diese Linsen (2. Tubuslinse, Nikon, Kingston, UK) haben eine Brennweite von 200 mm, und der Abstand ihrer Hauptebenen beträgt 400 mm (doppelte Brennweite). Damit der Drehpunkt im Objektiv abgebildet wird, muss sich der Brennpunkt der ersten Linse im Drehpunkt und der Brennpunkt der zweiten Linse in der Hauptebene des Objektivs befinden.

Nach dem telezentrischen Linsensystem wird das Licht durch den Epifluoreszenzeingang des Mikroskopstativs (TS100, Nikon) rückwärtig in das Objektiv geleitet. Das Objektiv fokussiert letztlich das Laserlicht in die Probe. Je nach Art des Experimentes wird das Objektiv gewählt. Für Messungen in Lösung wird ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer hohen numerischen Apertur (Nikon, 60X, NA 1,2) und einem Arbeitsabstand von 0,31 mm bis 0,28 mm eingesetzt. Für Tieftemperaturexperimente hingegen wird ein Luftobjektiv mit einer kleineren numerischen Apertur (Nikon, 60X, NA 0,8) und einem Arbeitsabstand von 0,30 mm genutzt. Für Messungen auf der Deckglasoberfläche bei Raumtemperatur steht ein Ölimmisionsobjektiv (Nikon, 100X) mit einer numerischen Apertur von 1,4 und einem Arbeitsabstand von 0,13 mm zur Verfügung.

Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird vom selben Objektiv eingesammelt, passiert die Tubuslinsen und die Rasterspiegel und trifft auf den Dichroit. Da das Fluoreszenzlicht aufgrund der Stokes-Verschiebung langwelliger als das Anregungslicht ist (siehe Abschnitt 2.1.2), wird es vom Dichroit transmittiert. Danach erfolgt eine experimentenspezifische Auftrennung des Lichts durch zum Beispiel Langpassfilter (alle von Chroma) oder 50/50-Strahlteiler (Melles Griot). Da die optischen Eigenschaften eines Dichroits nicht genügen, um Anregungs- bzw. Streulicht ausreichend zu blockieren, werden zusätzlich Bandpass- bzw. Langpassfilter nach oder vor der Auftrennung in den Strahlengang gestellt.

Für FRET-Messungen wird das Licht entsprechend seiner Wellenlänge in ein Donor- und ein Akzeptorsignal durch einen Strahlteiler (ST595) getrennt. Ein Bandpassfilter im Donorkanal (HQ532/70) blockiert nicht nur Streulicht, sondern auch das ramanverschobene Streulicht von Wasser nach einer Anregung mit 488 nm. Der Bandpassfilter im Akzeptorkanal (HQ650/100) dient hauptsächlich dem Filtern des Streulichts des 594 nm Lasers.

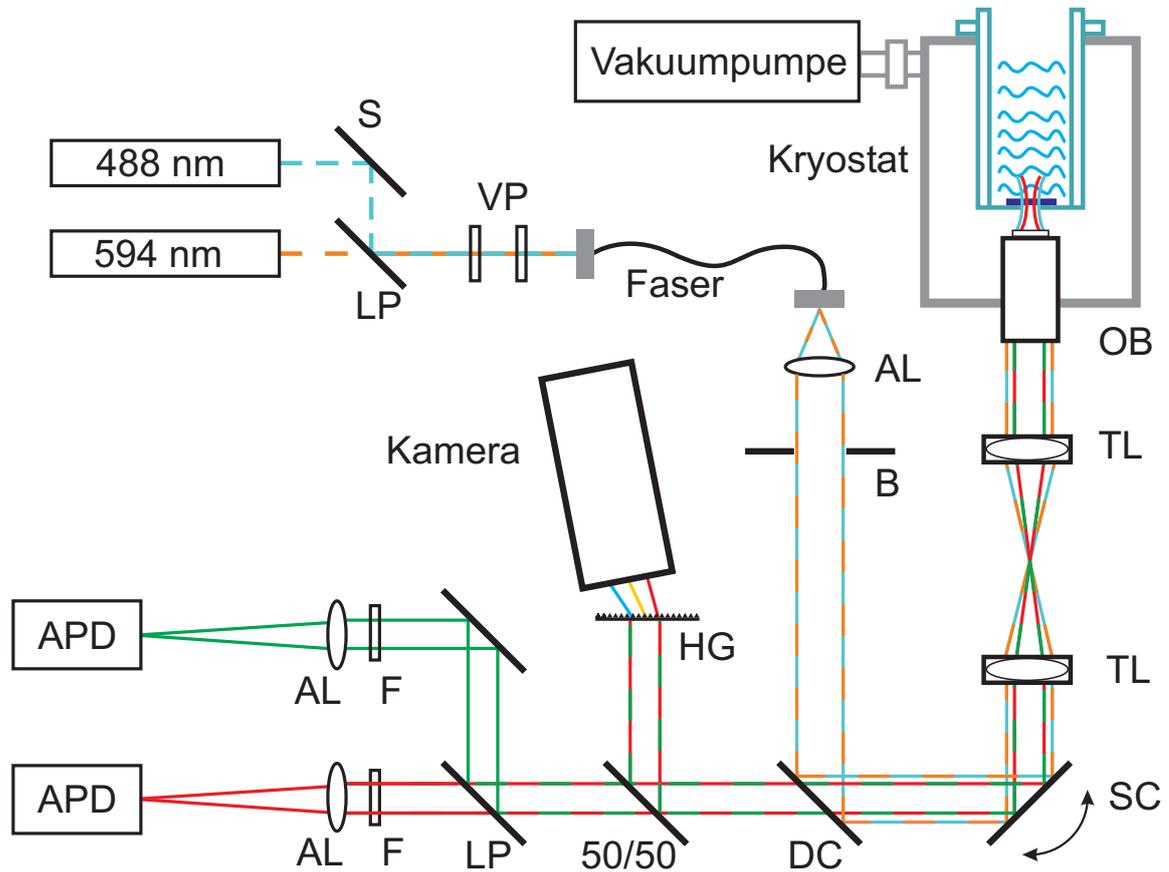


Abbildung 3.1: Konfokaler Aufbau

Das Laserlicht wird über einen Spiegel (S) und einen Langpassfilter (LP) in eine Faser eingekoppelt. Die Polarisation des Lichtes wird mit Verzögerungsplättchen (VP) eingestellt. Das aus der Faser austretende, divergente Licht wird von einer achromatischen Linse (AL) kollimiert und durch einen Dichroit (DC) über eine Raster-Einheit (SC) und ein telezentrisches Linsensystem (TL) gelenkt. Mit der Blende (B) kann die Breite des Laserstrahls variiert werden. Das Objektiv (OB) fokussiert das Licht und sammelt das emittierte Licht, welches dann den Dichroit passiert, und entweder auf das holografische Gitter (HG) und die Kamera gelenkt wird, oder auf die APD. Vor den APD erfolgt durch einen Strahlteiler (LP) eine spektrale Aufteilung des Fluoreszenzlichtes, bevor es von achromatischen Linsen (AL) auf die APD fokussiert wird. Gestreutes Anregungslicht wird durch zusätzliche Filter (F) abgeblockt. Für Messungen bei 77 K ragt das Objektiv in einen Kryostat, der während der Messung durch eine Vakuumpumpe evakuiert wird.

Bei Anisotropiemessungen wird das Licht zunächst von einem Bandpass (HQ532/70 bzw. 650/100) gefiltert und dann seiner Polarisation entsprechend mit einem Polarisationsstrahlteiler (Melles Griot) aufgeteilt.

Die Punktdetektion wird nun durch Linsen ($f = 500 \text{ mm}$) realisiert, die das Fluoreszenzlicht genau auf die aktive Fläche der Detektoren fokussieren. Als Detektoren werden Lawinendurchbruchdioden (APD - Avalanche Photo Diode, SPCM-AQR-14, Perkin Elmer, Waltham, USA) genutzt. Diese zeichnen sich durch eine gute Quanteneffizienz sowie eine geringe Totzeit (60 ns) aus. Da die aktive Fläche der APD nur einen Durchmesser von $180 \mu\text{m}$ hat, gelangt Licht, das nicht aus der Fokusebene in der Probe stammt, nicht auf die APD. Abgebildet in die Fokusebene hat die Detektorfläche mit dem Luft- oder dem Wasserobjektiv einen Durchmesser von ca. $1,2 \mu\text{m}$. Das entspricht $1,6 \text{ AU}$ bei Messungen mit dem Luftobjektiv und $2,4 \text{ AU}$ mit dem Wasserobjektiv bei einer Anregung mit 488 nm^1 . Damit fungiert die Detektorfläche als Lochblende, die die axiale Auflösung in der konfokalen Mikroskopie verbessert. Eine bessere Anregungs- und Detektionsoptik sowie eine bessere axiale Auflösung wird mit einer Lochblende mit einem Durchmesser von z. B. $50 \mu\text{m}$ erreicht, die fest im Brennpunkt zwischen den beiden Tubuslinsen platziert wird. Um eine optimale Verbesserung der Auflösung zu erhalten, sollte dabei die abgebildete Lochblende ungefähr die Größe der Airy-Scheibe (1 AU) besitzen (siehe Abschnitt 2.2.2, [103, 117]). Die Größe der Abbildung der Lochblende in der Fokusebene beträgt ca. $1,1 \text{ AU}$ beim Luftobjektiv und $1,7 \text{ AU}$ beim Wasserobjektiv. Da ein Abrastern der Probe mit einer Lochblende nicht mehr möglich ist, kann sie nur bei Lösungsexperimenten eingesetzt werden.

3.1.1 Anisotropiemessungen

Für Anisotropie- sowie Fluoreszenzlebensdauerexperimente muss der experimentelle Aufbau erweitert werden. Um den sehr schnellen zeitlichen Abfall der Fluoreszenz zu betrachten, muss das Fluoreszenzlicht durch eine gepulste Anregung zeitlich synchronisiert detektiert werden. Dafür wird ein gepulster Laser der Wellenlänge 470 nm (Picoquant) und einer variablen Pulsfrequenz zwischen 40 MHz und $2,5 \text{ MHz}$ integriert. Die Datenaufnahme wird durch die Zählereinheit TimeHarp (Picoquant), die zusätzlich zur Detektionszeit eines Photons die Zeit relativ zum Laserpuls speichert, realisiert. Die Datenauswertung erfolgt mit IGOR Pro.

Die zeitabhängigen Anisotropie- sowie Lebensdauerexperimente erfordern immer zwei Messungen. Um den Einfluss optischer Elemente, die polarisationsabhängig transmittieren, auf das Messergebnis zu minimieren, wird jede Probe nacheinander mit horizontal und mit vertikal linear polarisiertem Licht angeregt. In der Detektion befindet sich ein Strahlteiler, der horizontal polarisiertes Licht transmittiert und vertikal polarisiertes reflektiert. Zur Berech-

¹ 1 AU entspricht einer Airy-Einheit und bezeichnet den Durchmesser der Airy-Scheibe nach Gleichung 2.32.

nung der Anisotropie nach Gleichung 2.7 werden jeweils die parallelen bzw. senkrechten Fluoreszenzintensitäten beider Anregungen addiert:

$$I_p = APD1_H + APD2_V \quad (3.1)$$

$$I_s = APD2_H + APD1_V \quad (3.2)$$

I_p	...Fluoreszenzintensität parallel zur Anregungspolarisation
I_s	...Fluoreszenzintensität senkrecht zur Anregungspolarisation
$APD1_H, APD2_H$...detektierte Fluoreszenzintens. bei horiz. Anregungspolarisation
$APD1_V, APD2_V$...detektierte Fluoreszenzintens. bei vertikal. Anregungspolarisation

Für die Experimente wurde das Luftobjektiv verwendet, um Messungen bei Raumtemperatur und bei 77 K vergleichen zu können.

3.1.2 Aufnahme von Spektren

Die Aufnahme der Spektren erfolgt, wie bei der Anisotropie, mit dem Luftobjektiv. Durch einen 50/50-Strahlteiler (Melles Griot) im Detektionskanal (siehe Abb. 3.1) wird die Emission zum Teil durch ein Transmissionsgitter auf die Kamera und zum Anderen Teil auf die APD gelenkt. Dadurch ist es möglich, mit der APD Bilder der eingefrorenen Proben zu erhalten und deren Qualität (Strukturen etc.) zu untersuchen und gleichzeitig Spektren aufzunehmen. Die Spektren werden, mit Ausnahme des notwendigen Dichroits, ohne zusätzliche Filter aufgenommen, um sie so wenig wie möglich zu verfälschen. Nachteilig ist dabei, dass das Anregungslicht im Spektrum erscheint und es teilweise überlagert. Vor den APD werden zusätzlich der Donor- bzw. der Akzeptorfilter eingesetzt.

Durch Interferenz am Gitter wird das Fluoreszenzlicht spektral aufgetrennt (siehe Abb. 3.2) und auf die Kamera abgebildet. Um die räumliche Aufteilung des Lichtes nutzen zu können, muss die Beleuchtung der Probe in einem Punkt erfolgen, was durch den konfokalen Aufbau gegeben ist. Das Licht trifft kollimiert auf das Transmissionsgitter und wird dann durch das Objektiv der Kamera wieder fokussiert.

Das Gitter ist ein holografisches Volumen-Phasen-Gitter (Volume-Phase Holographic Grating, EdmundOptics). Im Gegensatz zu konventionellen Reflexions- bzw. Transmissionsgittern, deren Beugungseigenschaften auf periodischen Strukturen auf der Gitteroberfläche beruhen, werden bei diesem Gitter periodisch wechselnde Brechungsindizes (Volumen-Phase) in einer optisch dichten Schicht genutzt. Diese Schicht besteht meist aus einem weichen, dichromatischen Material und wird von einer Glas- oder Quarzglasschicht umschlossen. Diese Glasummantelung ist ein großer Vorteil, da die Gitter somit unempfindlich gegen äußere Einflüsse, lange haltbar und gut zu säubern sind. Die Herstellung des periodisch wechselnden Brechungsindex erfolgt mithilfe eines holografischen Musters, welches durch zwei kollimierte, interferierende Strahlen einer Quelle erzeugt wird. Die Eigenschaften des

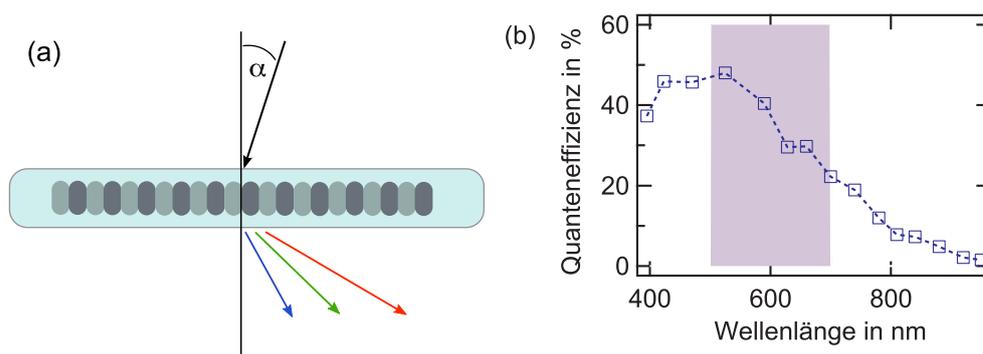


Abbildung 3.2: Transmissionsgitter und Quanteneffizienz der Kamera

(a) Prinzip des holografischen Volumen-Phasen-Transmissionsgitters. Polychromatisches Licht trifft unter dem Winkel α auf das Gitter auf. Durch verschiedene Brechungsindizes tritt das Licht wellenlängenabhängig unter verschiedenen Winkel aus. (b) Dargestellt ist die Quanteneffizienz der Kamera in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Im Messbereich zwischen 500 nm und 700 nm (violett) fällt die Effizienz von 50 % auf 20 % ab.

Gitters werden durch die Anzahl der Brechungsindexwechsel sowie deren Breite bestimmt, ähnlich dem konventionellen Gitter. Auch hier gibt es einen Glanzwinkel, unter dem ein Intensitätsmaximum auftritt. Dieses Gitter zeichnet sich durch die intensiven Beugungsmaxima und damit geringen Verluste aus. Zudem ist die spektrale Auftrennung im betrachteten Bereich linear. Es hat 600 Linien pro Millimeter, einen Einfalls- bzw. Glanzwinkel α von $10,37^\circ$ (siehe Abb. 3.2) und ist für den Wellenlängenbereich von 500 nm - 700 nm konzipiert.

Die Spektren werden mit einer hoch sensitiven CCD-Kamera (PCO sensicam qe, PCO AG, Kelheim) aufgenommen. Diese Kamera zeichnet sich durch ein geringes Rauschen aus, realisiert durch eine interne, thermoelektrische Kühlung des Sensors, und verfügt im sichtbaren Bereich über eine gute Quanteneffizienz. Die Wellenlängenabhängigkeit der Quanteneffizienz ist in Abbildung 3.2b dargestellt und muss bei der Aufnahme der Spektren beachtet werden. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit IGOR Pro 6.

3.2 Kalt-Rotationsbeschichter und Kryostataufsatz

Um eine Spektroskopie zu ermöglichen, mit der einzelne Fluorophore im eingefrorenen Zustand beobachtet werden können, war die Entwicklung eines geeigneten Aufbaus sowie einer Probenpräparation notwendig. Ziel war es, diese Methode in den bestehenden Aufbau des Konfokalmikroskops zu integrieren und dabei die Vorteile der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie zu nutzen. Zum Einen sollte ein kurzer Abstand der Probe zum Objektiv gewährleistet sein. Das ermöglicht die Verwendung eines Objektivs mit einer hohen numerischen Apertur, die mit kurzen Arbeitsabständen verbunden ist. Dadurch wird eine hohe Sammeleffizienz erreicht. Zum Anderen soll die Probenpräparation an die Beobachtung gekoppelt sein. Erfolgt das Einfrieren der Probe direkt im Kryostat, so sind aufwendige

Proben Transporte und ungünstige Kryogenwechsel nicht mehr nötig.

Zuerst wurde ein Kryostat entwickelt, der den oben genannten Anforderungen entspricht und im nächsten Abschnitt näher erläutert wird. Bei der Probenpräparation und -handhabung wurden verschiedene Ideen umgesetzt und weiterentwickelt. Gerade in Bezug auf eine an die Beobachtung gekoppelte Probenpräparation wurde ein Kalt-Rotationsbeschichter entwickelt, der die Präparation der dünnen Eisschicht direkt in dem Dewar-Gefäß ermöglicht, in dem auch gemessen wird. Diese Methode wird im Abschnitt 3.2.2 genauer beschrieben.

3.2.1 Aufbau

Für die Tieftemperaturexperimente wird der in Abschnitt 3.1 beschriebene Aufbau genutzt. Dafür wird auf das invertierte Mikroskopstativ, welches das Objektiv und den Probenhalter trägt, ein spezieller Kryoaufbau gesetzt, der in Abbildung 3.3b zu sehen ist. Er dient dazu, die Proben mit flüssigem Stickstoff möglichst lange und effizient zu kühlen. Um dies zu ermöglichen, ist die Wärmeleitung sowie -konvektion im Probenraum zu minimieren.

Der Kryoaufbau besteht aus zwei Einheiten, die ineinander gesetzt werden. Die äußere ist eine Art Edelstahltopf, der fest mit dem Stativ und einer Vakuumpumpe verbunden ist. In diesen ragt von unten, luftdicht von einem O-Ring umschlossen, das Luftobjektiv. Der innere Teil ist ein Dewar-Gefäß (siehe auch Foto in 3.4a), d. h. ein doppelwandiger, bereits evakuierter Edelstahltopf, der mit dem unteren Topf luftdicht verschraubt werden kann und während der Messung mit flüssigem Stickstoff gefüllt ist. Im Boden dieses Gefäßes befindet sich direkt über dem Objektiv ein kleines Loch, das mit einem Deckglas abgedeckt wird. Somit ist das Deckglas sowohl das optische Fenster als auch der Probenhalter.

Diese zwei Einheiten bilden gemeinsam einen Doppel-Dewar, der durch den abnehmbaren inneren Topf eine externe Probenpräparation in diesem ermöglicht. Zudem garantiert diese Art der Konstruktion mit zwei separat evakuierten Zwischenräumen eine gute Wärmeisolierung. Das Vakuum im äußeren Topf ist nicht nur aus thermischen Gründen notwendig, sondern verhindert auch die Reifbildung auf der unteren Deckglasseite.

Da durch das Vakuum im äußeren Topf das Objektiv in diesen hineingedrückt wird, wurde außen auf den Objektivrevolver eine Stange gelegt, die von beiden Seiten durch je eine Feder angepasster Federkraft (5 N/cm) nach unten gezogen wird. Damit kann sicher gestellt werden, dass das Objektiv während einer Messung nicht langsam nach oben wandert und sich damit der Fokus nicht mehr auf der Deckglasoberfläche befindet. Durch thermische Bewegungen kann jedoch eine Defokussierung nicht ganz ausgeschlossen werden. Die Integration eines Auto-Fokusses ist bedingt möglich, da das Objektiv durch die Reibung an der Dichtung sehr träge ist.

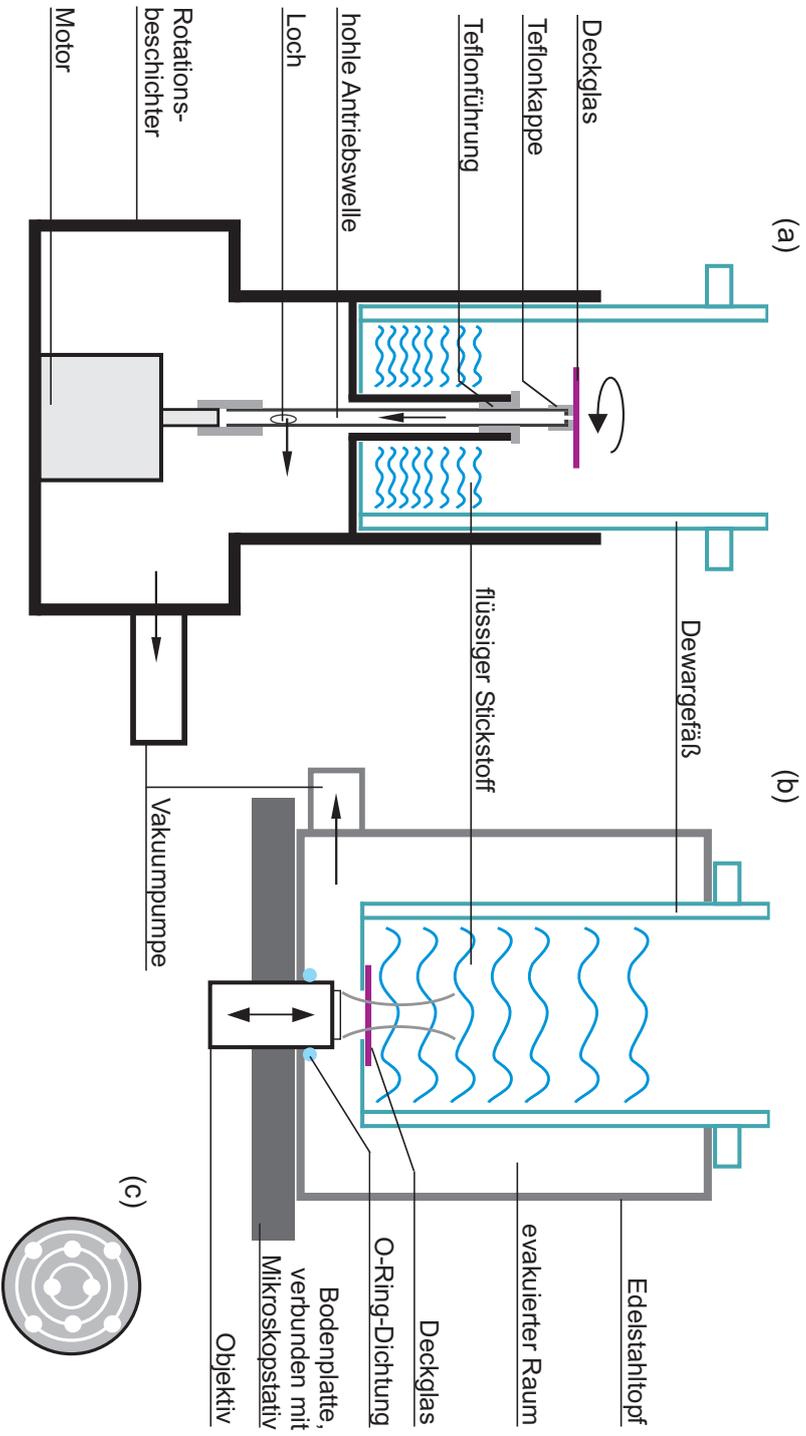


Abbildung 3.3: Kalt-Rotationsbeschichter und Kryostat

(a) Das Deckglas wird durch einen Unterdruck im Rotationsbeschichter auf der Teflonkappe fixiert und auf 9000 Umdrehungen pro Minute beschleunigt. Flüssiger Stickstoff, der in den unteren Teil des Dewar-Gefäßes eingefüllt wurde, kühlt das Deckglas. Ein Tropfen mit wenigen Mikrolitern Probe wird dann auf das Deckglas fallen gelassen und friert augenblicklich fest. Das Dewar-Gefäß wird direkt auf den Kryostat (b), der sich auf dem Mikroskopstativ befindet, gesetzt. Die Evakuierung des Kryostats während der Messung verhindert Reifbildung am Deckglas und isoliert das innere Dewar-Gefäß. (c) Aufsicht der Teflonkappe. Die Ringe verbinden die Löcher und optimieren somit das Ansaugen des Deckglases.

3.2.2 Probenpräparation im Kalt-Rotationsbeschichter

Die Probenpräparation erfolgt direkt im inneren Dewar-Gefäß. Die Probe selbst sollte eine sehr dünne (wenige Mikrometer), auf einem Deckglas amorph eingefrorene Wasserschicht sein, in der sich die fluoreszenzmarkierten Moleküle befinden. Um eine Kristallisation des Wassers zu verhindern, wird zu dem wässrigen Puffer 7,5% Trehalose hinzugefügt, wie bereits in den Grundlagen 2.4 erläutert.

Eine bekannte Methode, dünne, gleichmäßige Schichten auf verschiedenste Oberflächen aufzutragen, ist die Rotationsbeschichtung (Spin-Coating). Dabei liegt das zu beschichtende Material auf einem Drehteller und wird meist durch ein Vakuum an der Unterseite fixiert. Das aufzutragende Material, z. B. ein Polymer, wird in gelöster Form von oben auf das sich drehende Substrat getropft und durch die wirkenden Zentrifugalkräfte gleichmäßig von innen nach außen verteilt. Überschüssige Lösung wird entweder während des Auftragens abgeschleudert, verdunstet augenblicklich oder wird durch nachträgliches Aufheizen der Probe entfernt. Die Dicke der Schicht ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben der Rotationsgeschwindigkeit, typischerweise einige tausend Umdrehungen pro Minute, hat unter anderem die Viskosität der Lösung, der Anteil der Feststoffe in der Lösung, die molare Masse des Polymers und die Beschaffenheit der zu beschichtenden Oberfläche Einfluss auf die Schicht [112].

Dieses Prinzip wurde nun auf die Präparation der Eisschicht auf dem Deckglas übertragen. Im Gegensatz zur üblichen Rotationsbeschichtung soll nicht nur der gelöste Stoff haften bleiben und eine Schicht bilden, sondern auch das Lösungsmittel. Dazu wird ein schnell rotierendes Deckglas so stark abgekühlt, dass auftreffendes Wasser sofort an der Oberfläche gefriert und überschüssiges Wasser weggeschleudert wird. Durch diese Methode kann sowohl eine hohe Abkühlrate als auch ein sehr kleines zu kühlendes Volumen ermöglicht werden, was, wie oben beschrieben, Voraussetzungen für amorphes Einfrieren sind (siehe auch Abschnitt 2.4). Inwiefern die gewünschte amorphe Eisschicht entsteht, und ob sie nachweisbar sowie reproduzierbar ist, wird nach der Beschreibung des Kalt-Rotationsbeschichters diskutiert.

Der Aufbau des Kalt-Rotationsbeschichters ist schematisch in Abbildung 3.3a zu sehen. Zwei fest verbundene Edelstahlzylinder umschließen einen Motor (Faulhaber), auf dem eine, oben nach außen ragende, von einer Teflonummantelung geführte Antriebswelle befestigt ist. Diese Antriebswelle ist hohl, besitzt kurz über dem Motor ein kleines Loch und ist außen von einer gelöcherten Teflonkappe bedeckt. Der Innenraum des unteren Zylinders ist nahezu luftdicht und wird mithilfe einer angeschlossenen Wasserstrahlpumpe evakuiert, sodass durch das Loch in der Antriebswelle an der Teflonkappe ein Unterdruck entsteht und ein Deckglas fest angedrückt wird. Um die Fixierung des Deckglases zu optimieren, sind in die Oberfläche der Teflonkappe konzentrische Ringe gefräst, die die Luftlöcher noch miteinander verbinden (siehe Abb. 3.3c). Ein Deckglas mit einer Dicke von $150\ \mu\text{m}$ kann bis zu 9000 Umdrehungen pro Minute gedreht werden.

Der obere Zylinder des Rotationsbeschichters ist offen und hat in der Mitte eine Hülse, die

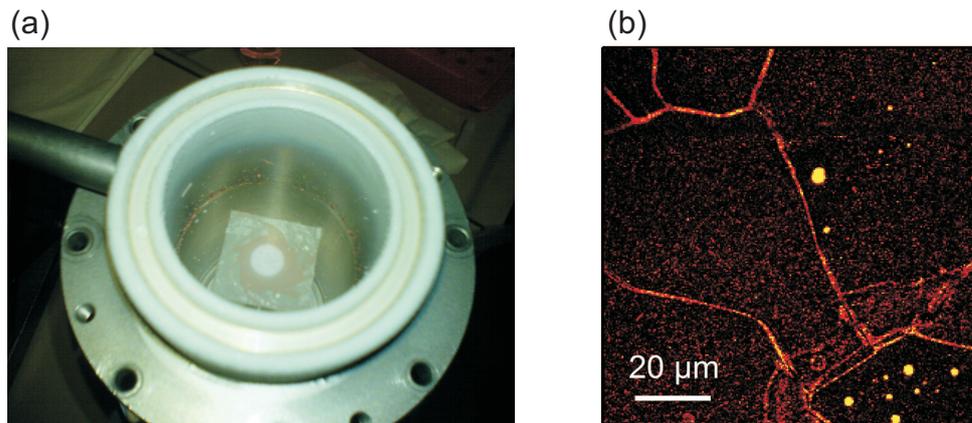


Abbildung 3.4: Inneres Dewar-Gefäß und Strukturen in der Eisschicht

(a) Das Bild zeigt das innere Dewar-Gefäß auf dem Kalt-Rotationsbeschichter. Ein Deckglas liegt auf der mit einer Teflonkappe bedeckten Antriebswelle. Auf dem Deckglas ist eine eingefrorene Schicht zu sehen, die aufgrund einer hohen Farbstoffkonzentration rot erscheint. (b) Konfokales Raster-Bild, das Strukturen in einer Eisschicht aus Trehalose-Puffer mit Prolin 6 (25 nM) zeigt. Sie deuten entweder auf kristallines Eis oder Deckglasunebenheiten hin.

die Antriebswelle führt. In diesen Zylinder wird zur Probenpräparation das innere Dewar-Gefäß gestellt. Die Antriebswelle sowie die Teflonkappe passen genau durch das Loch am Boden des Dewar-Gefäßes und ragen ca. 5 cm in dieses hinein.

Um eine Probe zu präparieren, wird zuerst ein Deckglas mittig auf die Teflonkappe gelegt und durch die Wasserstrahlpumpe angesaugt. Um das Deckglas von Unreinheiten zu befreien, wurde es zuvor für zwei Stunden in einem Ofen bei 505 °C gebrannt [49]. Dann wird das Deckglas auf ca. 9000 Umdrehungen pro Minute beschleunigt. Nun wird flüssiger Stickstoff vorsichtig auf und neben das rotierende Deckglas gegossen, bis der Topf ca. ein Viertel gefüllt ist. Auf das kalte Deckglas wird mittig mithilfe einer Pipette ein kleiner Tropfen von wenigen Mikrolitern fallen gelassen. Durch die Rotation wird Wasser, das nicht instantan am Deckglas festfriert nach außen getragen, und es entsteht eine sehr dünne Wasser- bzw. Pufferschicht. In Abbildung 3.4a ist ein Beispiel einer solchen Eisschicht zu sehen. Um sie besser sichtbar zu machen, wurde eine Lösung mit sehr hoher Farbstoffkonzentration (Rhodamin6G) aufgetragen.

Für eine Messung muss nun das Dewar-Gefäß mit dem Deckglas unverzüglich vom Rotationsbeschichter auf den unteren Teil des Kryostaten gesetzt werden. Nachdem das Deckglas angehalten und die Wasserstrahlpumpe abgeschaltet wurde, kann der flüssige Stickstoff, der sich noch im Dewar-Gefäß befindet, langsam durch Anheben des Dewar-Gefäßes durch das Loch am Boden abfließen, während das Deckglas weiterhin auf der Teflonkappe liegt. Durch die gute Wärmeisolierung des Dewar-Gefäßes bleibt die Temperatur am Deckglas bei ca. -50°C, sodass auch ohne flüssigen Stickstoff die Probe gefroren bleibt². Das Dewar-Gefäß

²Die Temperatur im Dewar-Gefäß in der Nähe des Deckglases wurde mithilfe eines Thermoelements gemessen. Unmittelbar nach dem Einfrierprozess betrug die Temperatur unter dem Deckglas ca. -110 °C. Ohne Stickstoff, also beim Transport in den Kryostat, wurde eine Temperatur von ca. -50 °C bestimmt.

wird nun weiter angehoben, sodass sich das Deckglas mittig auf dem Loch des Bodens befindet, dann schnell auf den Kryostaten gesetzt und durch die zugeschaltete Vakuumpumpe gleich fest angesaugt. Sofort wird flüssiger Stickstoff in das Dewar-Gefäß gefüllt, sodass die Probe jetzt wieder auf genau 77 K gekühlt wird. Der Stickstoff muss während der Messung von Zeit zu Zeit nachgefüllt werden.

Die Probenpräparation selbst ist ein kritischer Prozess. Vor allem eine hohe Luftfeuchtigkeit im Raum erschwert die Präparation einer guten Probe. Ist sie zu hoch, beschlägt das Deckglas zu stark während des Transports in den äußeren Kryostat. Der Laser wird an der Reifschicht stark gestreut, und eine Messung ist nicht mehr möglich.

Eine Überprüfung, ob es sich bei der dünnen Eisschicht wirklich um amorph eingefrorenes Wasser handelt, ist nicht möglich. Strukturen, die oft bei hohen Konzentrationen gesehen wurden (siehe Abb. 3.4b) können ein Hinweis auf kristallines Eis sein, jedoch auch Unebenheiten auf der Oberfläche des Deckglases aufweisen. Da jedoch zu jeder Probe 7,5% Trehalose hinzugefügt wurde (siehe Abschnitt 2.4) und dies bei bekannten Kryofixationsprozessen zu amorphem Eis führt, wird davon ausgegangen, dass es sich um amorphes Eis handelt.

3.3 Aufnahme und Bearbeitung der Daten

Die Steuerung des gesamten Aufbaus erfolgt mithilfe des Echtzeit-Datenerfassungs- und Verarbeitungssystems ADwin (ADwin Light 16, Jäger Computergesteuerte Messtechnik, Lorsch, D), welches über LABVIEW (National Instruments, Austin, USA), einer grafischen Programmierumgebung, bedient wird. Die Aufnahme der Daten erfolgt sowohl über ADwin als auch über zwei weitere PC-Messkarten (PCI6602, National Instruments (NI), Austin, USA; TimeHarp200, Picoquant, Berlin). Die Auswertung der Daten erfolgt mit IGOR Pro 6 (Wavemetrics, Portland, USA).

Die Art der Datenaufnahme ist experimentspezifisch. Zeitspuren und Bilder für FRET- oder FCS-Experimente werden mit den Messkarten von ADwin und NI aufgenommen. Die Datenaufnahme für Anisotropie- bzw. Fluoreszenzlebenszeitmessungen erfolgt mit der Messkarte TimeHarp.

Die Messkarte von ADwin zählt die ankommenden Photonen in zuvor festgelegten Zeitintervallen und speichert diese „gebinnten“ Daten. Das Zeitintervall kann zwischen 20 μs und mehreren Millisekunden oder Sekunden variiert werden. Aufgrund der geringen Zeitauflösung werden diese Daten nur für Bilder, die durch das Abrastern einer Probe entstehen, genutzt. In der Regel erfolgt die Bildaufnahme mit 128 x 128 Pixel² und einer Millisekunde Integrationszeit. Der maximale Rasterbereich beträgt 160 x 160 μm^2 für das Luftobjektiv.

Mit der Messkarte von NI kann eine Zeitauflösung von 12,5 ps erreicht werden. Diese Karte speichert jedes Photon mit seiner globalen Ankunftszeit. Für FRET-Experimente werden die Ankunftszeiten histogrammiert, d.h. in Zeitintervallen von einer Millisekunde

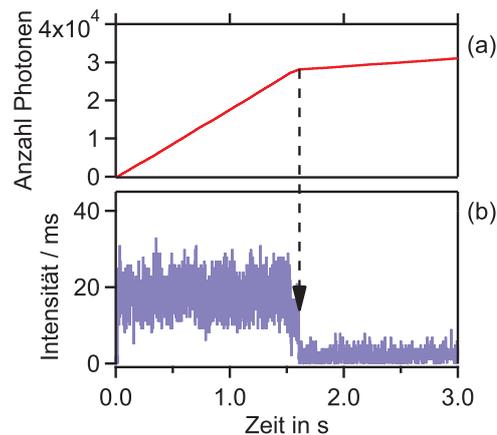


Abbildung 3.5: NI-Daten

(a) Für die NI-Daten wird zu jedem Photon eine Ankunftszeit gespeichert. (b) Durch Histogrammieren wird die detektierte Fluoreszenzintensität pro Millisekunde in Abhängigkeit von der Zeit erhalten. Der Pfeil markiert einen Übergang von hoher zu niedriger Fluoreszenzintensität.

zusammengefasst. In Abbildung 3.5 ist ein Beispiel für die Ankunftszeiten (a) und eine daraus resultierende transiente Intensität (b) dargestellt. Der Pfeil zeigt den Übergang von einer hohen zu einer niedrigen Fluoreszenzintensität.

Die Messkarte TimeHarp speichert neben einer globalen Ankunftszeit auch eine Ankunftszeit in Bezug zu dem Triggersignal des gepulsten Lasers (siehe Abbildung 3.6), die TCSPC-Zeit (Time Correlated Single Photon Counting) genannt wird. Die Auflösung der globalen Zeit beträgt 100 ns und die der TCSPC-Zeit 35 ps [9]. Aus den globalen Ankunftszeiten kann die transiente Intensität erhalten werden. Erfolgt eine Histogrammierung der Zeiten in Bezug auf das Triggersignal des Lasers, so kann die Fluoreszenzlebenszeit dargestellt und charakterisiert werden (siehe Abbildung 5.9).

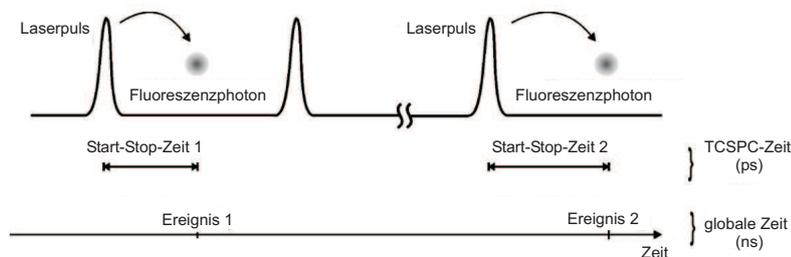


Abbildung 3.6: Datenformat der TimeHarp-Karte

Zu jedem Photon wird eine globale Zeit und eine TCSPC-Zeit in Bezug zum Triggersignal des Lasers gespeichert. Darstellung aus [9].

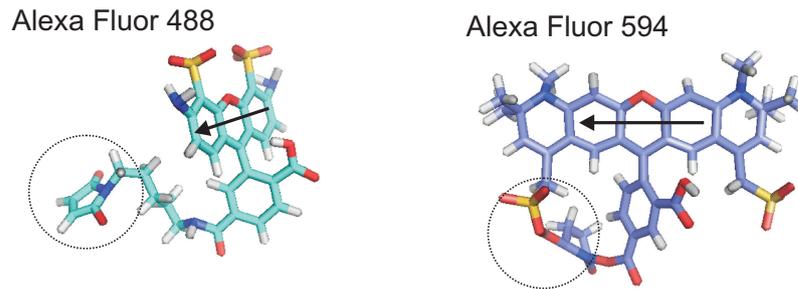


Abbildung 3.7: Chemische Struktur von AF488 und AF594

Darstellung der Kohlenstoffe in türkis (AF488) und blau (AF594), der Wasserstoffe in weiß, der Sauerstoffe in rot, Stickstoffe in blau und Schwefel in gelb. Der schwarze Pfeil zeigt das Übergangsdipolmoment. Der Kreis kennzeichnet die funktionelle Gruppe des jeweiligen Farbstoffs. Bilder aus [40].

3.4 Die Farbstoffe Alexa Fluor 488/594 und Polyprolinpeptide

Um den Energietransfer bei Raum- und Kryotemperatur genauer zu untersuchen, wurden zwei Polyprolinketten unterschiedlicher Länge mit einem geeigneten Farbstoffpaar markiert. Diese Polyproline waren bereits mehrfach Gegenstand der aktuellen Forschung. Zunächst wurden sie aufgrund ihrer Steifheit als „Referenzstäbe“ genutzt, mit deren Hilfe der Energietransfer unabhängig von Denaturierungsmitteln oder proteininternen Dynamiken charakterisiert werden konnte [114]. Weitere Experimente zeigten jedoch Abweichungen von einer starren Struktur, sodass mithilfe des Energietransfers auch Konformationsuntersuchungen am Polyprolin erfolgten [135, 11]. Auch der Einfluss der Bindung des Farbstoffs, flexibel oder eher sterisch gehindert, wurde bereits bei Raumtemperatur näher untersucht [11, 33].

3.4.1 Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594

Unter dem Markennamen Alexa bietet Molecular Probes (Invitrogen, Darmstadt) eine Familie von Fluoreszenzfarbstoffen an, die vom ultravioletten über den sichtbaren bis hin zum infraroten Bereich absorbieren und folglich auch emittieren [102]. Sie zeichnen sich durch eine hohe Quantenausbeute sowie eine hohe Photostabilität aus. Von Vorteil für die Markierung von Biomolekülen ist ihre gute Wasserlöslichkeit. Außerdem ist ihre Fluoreszenz weitgehend pH-Wert-unabhängig.

Alexa Fluor 488 (AF488), dessen maximale Absorption in der Nähe der 488 nm Laserlinie liegt, dient als Donorfarbstoff. Als Akzeptor wird Alexa Fluor 594 (AF594) verwendet. In Abbildung 3.7 ist die Struktur der beiden Farbstoffe dargestellt und ihre funktionellen Gruppen sind markiert [102]. Der Donor trägt als Kopplungsgruppe ein Maleimid und der Akzeptor über einen NHS-Ester. Die Anregung, und somit auch die Fluoreszenz, entsteht in den konjugierten π -Elektronen im aromatischen Ringsystem. Die Lage des Übergangs-

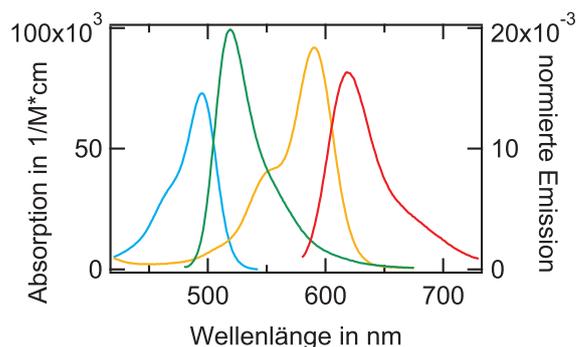


Abbildung 3.8: Spektren von AF488 und AF594

Dargestellt sind die Absorptionsspektren von AF488 (blau) und von AF594 (orange) sowie die normierten Emissionsspektren von AF488 (grün) und AF594 (rot).

dipols ist als Pfeil angedeutet [93].

Die Absorptions- und Emissionsspektren (von Invitrogen) des Donors und des Akzeptors sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Der Donor wird maximal bei 495 nm angeregt, ist somit z. B. für die Anregung mit einem Argon-Laser geeignet, und hat sein Emissionsmaximum bei 519 nm. Der Akzeptor, bestimmt für eine Helium-Neon-Laserlinie, hat seine maximale Absorption bei 590 nm und emittiert maximal bei 618 nm. Die vom Hersteller angegebene Fluoreszenzlebensdauer für den Donor beträgt 4,1 ns und für den Akzeptor 3,9 ns.

3.4.2 Polyprolinpeptide

Die Struktur eines Polyprolinpeptids wurde 1955 erstmals durch Röntgenkristallographie bestimmt [25]. Prolin, eine Iminosäure mit einem unpolaren, aliphatischen Aminosäurerest (siehe Abb.3.9a), ordnet sich danach in einer linksgängigen Helix (Abb. 3.9b) an. Tatsächlich bildet sich diese Helix, die sogenannte Polyprolin-II-Helix, nur in wässriger Umgebung aus. Die Peptidbindungen befinden sich alle in *trans*-Konformation. Die Steighöhe beträgt 0,93 nm pro Windung und entspricht ca. drei Aminosäureresten [3]. Befindet sich eine Polyprolinkette in apolaren, anorganischen Lösungsmitteln, z. B. Propanol, so bildet sich eine kompaktere Polyprolin-I-Helix aus, die rechtsgängig ist. Nun befinden sich alle Peptidbindungen in *cis*-Konformation. Beide Helixstrukturen lassen sich reversibel durch Tausch des Lösungsmittels ineinander überführen.

Prolin ist die einzige Aminosäure, deren Aminosäurerest sich wieder mit dem Peptidrückgrat verbindet (Abb. 3.9a). Die dadurch entstehende Einschränkung des Diederwinkels ϕ auf -75° gibt einer Polyprolinkette eine außergewöhnliche Rigidität und einen eingeschränkten Konformationsraum [89]. Durch diese, vermeintlich starre Struktur wurde Polyprolin lange als „molekulares Lineal“ bei FRET-Experimenten genutzt [124, 114, 135]. Abweichungen von der theoretischen Transfereffizienz konnten jedoch nicht gänzlich erklärt werden. Nähere Untersuchungen, unter anderem mit NMR-Spektroskopie [11] und photon-induziertem Elektronen-Transfer (PET) [33], zeigten, dass in der all-*trans*-Konformation

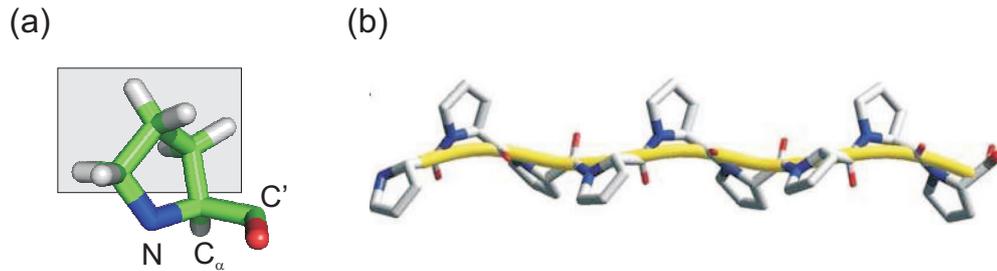


Abbildung 3.9: Struktur eines Prolins und eines Polyprolinpeptids

(a) Struktur der Aminosäure Prolin (Pymol). Grau unterlegt ist der Aminosäurerest, der wieder an das Stickstoffatom (blau) des Peptidrückgrates bindet und somit mögliche Konformationen einschränkt. (b) Dargestellt ist eine Polyprolinkette mit neun Prolinen in der Polyprolin-II-Konformation. Diese Konformation bildet sich in wässrigen Medien aus. Bild aus [3].

der Polyprolin-II-Helix ein bestimmter Anteil der Peptidbindungen in *cis*-Konformation vorliegt. Dieser Anteil wird zu 2 % der Peptidbindungen bestimmt [11]. Demnach kann es in den starren Helices durch eine *cis*-Konformation Knickstellen geben, die den Abstand der Enden verkürzen und somit den Energietransfer beeinflussen.

Für die Experimente dieser Arbeit wurde eine Peptidkette mit sechs Prolinen (Prolin 6) und eine mit 20 Prolinen (Prolin 20) verwendet.

Synthese und Markierung der Polypeptide

Die Synthese der Peptide mit der Sequenz Gly-(Pro)_n-Cys erfolgte mit einer Standard FastMoc Chemie in einem Syro-Peptide-Synthetizer (MultiSynTech). Nach einer präparativen Aufreinigung mit einer Umkehrphasen-Chromatographie (Macherey Nagel) wurde AF488-Maleimid (Invitrogen), der Donorfarbstoff, an das Cystein gekoppelt. Die Trennung markierter von unmarkierten Peptiden erfolgte über eine Umkehrphasen-Chromatographie. Anschließend wurde AF594 über ein Succinimidylester an die Aminogruppe des Glyzins gekoppelt. Das doppelt markierte Peptid wurde wiederholt mit einer Umkehrphasen-Chromatographie gereinigt. Die Masse wurde mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie überprüft (Waters Micromass MSQ).

3.5 Perylenmonoimide

Um die Güte des konfokalen Aufbaus ohne und mit Kryostataufsatz charakterisieren zu können, wurde Perylenmonoimid (PMI) untersucht. PMI gehört zu der Gruppe der Rylenfarbstoffe, ist also ein synthetischer Farbstoff, der aus polycyclischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen besteht. Rylenfarbstoffe sind Oligomere, deren Wiederholungseinheit Naphthalin ist. In Abbildung 3.10 ist die Struktur von PMI dargestellt. Im Perylen, bestehend aus zwei Naphthalinen, bildet sich das konjugierte π -Elektronensystem. Um eine Stapelung der π -Systeme zu verhindern und somit auch die Löslichkeit zu Verbessern, wurde 2,6-Diisopropylphenyl substituiert [97].

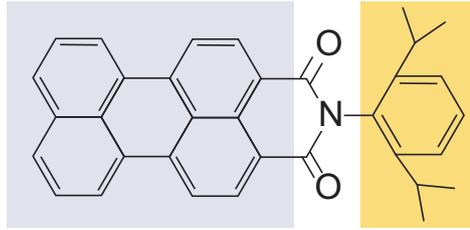


Abbildung 3.10: Struktur des Perylenmonoimids

Das aus zwei Naphthalinen aufgebaute Perylen ist grau unterlegt. Durch den Wechsel von Einfach-Bindung und Doppel-Bindung der C-Atome bildet sich das für Fluoreszenz verantwortlich konjugierte π -Elektronensystem aus. Um ein Stapeln der π -Systeme zu vermeiden, wurde eine 2,6-Diisopropylphenyl-Gruppe ergänzt, die gelb unterlegt ist.

PMI wird in Toluol gelöst, das bereits mit 5 g/l Polymethylmetacrylat (PMMA) versetzt ist. Durch Rotationsbeschichtung (siehe Abschnitt 3.2.2) erfolgt das Auftragen einer dünnen PMMA-Schicht auf ein Deckglas. Die Konzentration der PMI-Moleküle im PMMA wird so gewählt, dass sich mit hoher Wahrscheinlichkeit immer nur *ein* Molekül im konfokalen Fokus befindet.

Durch die Immobilisierung im PMMA kann die Detektionseffizienz des Aufbaus direkt an einzelnen Farbstoffen bei Raumtemperatur und bei 77 K verglichen werden.

4 Entwicklung, Optimierung und Qualität der Experimente bei 77 K

4.1 Entwicklung und Optimierung der Experimente

Für die ersten Experimente mit flüssigem Stickstoff stand der in Abschnitt 3.2 beschriebene Kryostat und ein Weitfeldmikroskop mit einer hochsensitiven Kamera zur Verfügung. Erste Tests, ob mit der Weitfeldkonfiguration einzelne Moleküle sichtbar waren, wurden an Perylenmonoimid (PMI) in Polymethylmethacrylat (PMMA) durchgeführt (siehe 3.4). Die Immobilisierung der Fluorophore in einer dünnen PMMA-Schicht erfolgte über ein Rotationsbeschichtungsverfahren und ermöglicht Experimente bei 300 K und bei 77 K. Die Dicke der PMMA-Schicht wurde nicht exakt bestimmt, kann aber, mithilfe der konfokalen Messungen (nächster Abschnitt), abgeschätzt werden. Die Länge z des konfokalen Volumens kann mit $z = 2\lambda n / (NA)^2$ berechnet werden und ergibt ca. $2\ \mu\text{m}$ [103]. Eine Schicht, die dicker als zwei Mikrometer ist, würde zu defokussierten Molekülen in einem Bild führen. Da in den Bildern keine defokussierten Moleküle zu sehen sind, wird auf eine Schicht kleiner als zwei Mikrometer geschlossen. Aus der Literatur kann entnommen werden, dass diese PMMA-Schichten viel dünner als diese Abschätzung sind. Ähnliche Experimente zeigten Schichten zwischen 10 nm und 30 nm [50, 49, 37].

Die in Abbildung 4.1 dargestellte Weitfeldmessung zeigt PMI-Moleküle in PMMA bei Raumtemperatur und bei 77 K. Die Anregungsleistung betrug 1,5 mW und die Integrationszeit der Kamera 1 s. In beiden Bildern ist der Hintergrund sehr stark, sodass die PMI-Moleküle nur schwach erkennbar sind. Ob die hellen Punkte einzelne Moleküle oder Molekülaggregate sind, konnte nicht genau geklärt werden. Es zeigte sich schnell, dass dieser Aufbau nicht für Einzelmolekülexperimente geeignet war. Aus diesem Grund folgte der Aufbau des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (siehe Abschnitt 3.1).

Parallel zur Optimierung des Aufbaus wurde die Probenpräparation entwickelt. Die in Abschnitt 2.4 genannten Bedingungen, die ein amorphes Gefrieren von Wasser sichern, erschwerten die Präparation einer Eisschicht auf einem Deckglas. Demnach wurden zu Beginn der Experimente mehrere Ansätze bzw. Methoden verfolgt, die im Folgenden kurz aufgezeigt werden.

Bei den ersten Versuchen sollte die Eisschicht aus einer dünnen, sich zwischen zwei Deckgläsern befindenden, Wasserschicht entstehen. Die beiden übereinanderliegenden Deckgläser wurden dafür einfach in flüssigen Stickstoff getaucht. Da die Wärmeleitung von Glas je-

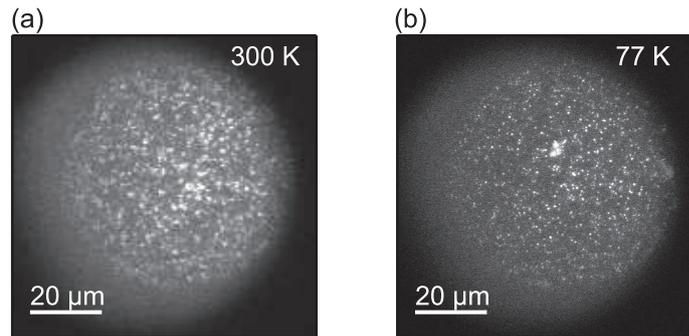


Abbildung 4.1: PMI in PMMA bei Weitfeldanregung

Der hohe Hintergrund sowohl bei Raumtemperatur (a) als auch bei 77 K (b) erschwert die Detektion der Fluoreszenz einzelner Moleküle bei Weitfeldanregung.

doch nicht sehr gut ist, reichte die Abkühlrate, die für die Entstehung von amorphem Eis erforderlich ist, nicht aus. Die eingefrorenen Schichten zeigten stets Strukturen, die auf kristallines Eis hinwiesen. Zudem waren die zwei übereinandergelegten Deckgläser im Kryostat bei 77 K bruchanfällig. Um sowohl die Wärmeleitung zu verbessern als auch die Bruchanfälligkeit zu mindern, wurden anschließend Schichten zwischen einem Deckglas und PMMA-Folie ($50\ \mu\text{m}$ dick) oder Aluminiumfolie eingefroren (siehe Abbildung 4.2). Die PMMA-Folie stellte sich als ungeeignet heraus, da sie Autofluoreszenz im Akzeptorkanal zeigte. Mit Aluminiumfolie konnte FRET bei einer hohen Konzentration an Prolin 6 zwar bei 77 K gemessen werden, jedoch zeigten sich auch hier noch zu oft Strukturen.

Eine andere Idee war, die Probenpräparation der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie zu nutzen. Dort werden dünne Schichten von Wasser zwischen den Stegen feiner Netze (sogenannte Grids) erzeugt. Die Einfrierversuche in flüssigem Stickstoff zeigten jedoch keine Farbstoffe zwischen, sondern auf den Stegen (siehe Abbildung 4.3b). Oft bildete sich auch eine Eisschicht auf dem Grid, die die Detektion der fluoreszenten Moleküle verhinderte (Abbildung 4.3a). Um das Leidenfrost-Phänomen (siehe Abschnitt 2.4) bei flüssigem Stickstoff zu umgehen und somit den Einfrierschritt zu optimieren, wurden die Grids auch in flüssigem Propan eingefroren. Aber auch mit dieser Methode konnten keine besseren Ergebnisse erzielt werden. Daraufhin wurde der Kalt-Rotationsbeschichter entwickelt (siehe Abschnitt 3.2). Um die optimalen Messbedingungen zu finden, die reproduzierbar amorphe Eisschichten versprechen, wurden verschiedene Parameter getestet. Neben der Änderung der Rotationsgeschwindigkeit des Deckglases zwischen 5000 und 9000 Runden pro Minute erfolgte auch eine Variation der Tropfengröße, die auf das Deckglas fiel. Es wurde auch getestet, ob das Auftragen mit einer Pipette (Tropfen) oder einer Spritze (gespritzt) günstiger ist. Bei einer hohen Rotationsgeschwindigkeit von 9000 Runden pro Minute und einer durch eine Pipette aufgetragener Tropfengröße von $4 - 8\ \mu\text{l}$ wurden die besten Ergebnisse erzielt.

Des Weiteren wurde nach einem geeigneten Kryoprotektor gesucht. Zum Einen erhöht der Kryoprotektor die Viskosität des Puffers und somit die Wahrscheinlichkeit, eine amorph ge-

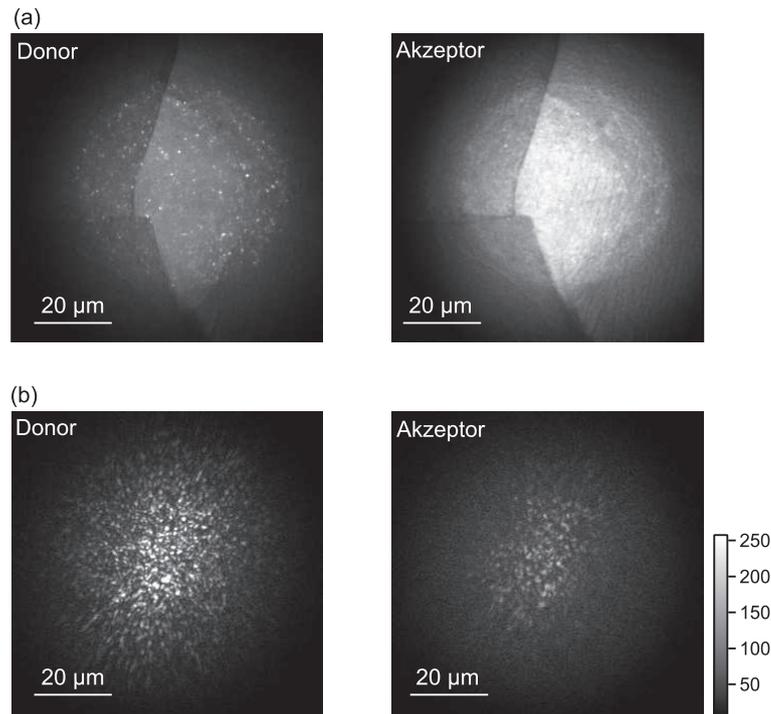


Abbildung 4.2: Prolin 6 zwischen Deckglas u. PMMA- oder Aluminiumfolie bei 77 K
 Prolin 6 zwischen Deckglas und (a) PMMA-Folie oder (b) Aluminiumfolie. (a) Die Summenbilder aus Filmsequenzen mit Donor- und Akzeptorfilter vor der Kamera zeigen besonders im Akzeptorkanal hohen Hintergrund. Im Donorkanal sind einzelne Moleküle bzw. Aggregate von Prolin 6 zu erkennen. (100 pM, in 7,5% Trehalose in Bidest, Anregungsleistung 1,2 mW). (b) Die Bilder im Donor und Akzeptorkanal sind hintereinander mit den jeweiligen Filtern aufgenommen worden. Vereinzelte Moleküle/Aggregate von Prolin 6 zeigen auch im Akzeptorkanal Intensität. (1 nM, in 7,5% Trehalose in Bidest, Anregungsleistung 1,0 mW). Der Intensitätsbalken gilt für alle Bilder und zeigt die Intensität pro Pixel und Sekunde.

frone Eisschicht zu erhalten (siehe Abschnitt 2.4). Zum Anderen ist amorphes Eis nur bei sehr tiefen Temperaturen stabil. Wird es wärmer als 150 K, so geht es in einen kristallinen Zustand über. Da sich das Deckglas mit der amorphen Eisschicht während des Transports in den Kryostat bis auf ca. $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmen kann, hilft der Kryoprotektor, den amorphen Zustand zu erhalten (siehe Abschnitt 3.2.2). Als Kryoprotektoren wurden Glycerin und Trehalose in verschiedenen Konzentrationen mit einer hohen Farbstoffkonzentration getestet. Dabei zeigten die eingefrorenen Schichten, die eine Konzentration von 7,5% (w/v) Trehalose im Puffer enthielten, meist nur wenige oder gar keine Strukturen. Diese Trehalosekonzentration sichert bereits das amorphe Einfrieren einer Trehalose-Wasser-Lösung [17].

Während der Experimente zeigte sich oft, dass die Luftfeuchtigkeit im Labor auch einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Probe hat. Bei einer sehr hohen Luftfeuchte kann das Deckglas, sobald es auf dem Boden des Kryostats liegt, von unten schnell beschla-

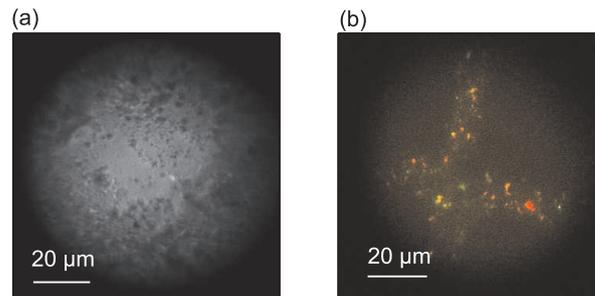


Abbildung 4.3: Experimente mit Grids

(a) Die Eisschicht, die sich auf einem Grid gebildet hat, verhindert die Abbildung der Moleküle. (b) Prolin 6 (10 nM, in destilliertem Wasser, Anregungsleistung 1,3 mW) wurde auf einem Grid in flüssigem Propan eingefroren. Anstatt in einer dünnen Wasserschicht zwischen den Stegen, sammelten sich die Moleküle auf den Stegen des Grids. Die Bilder mit Donor- (grün) und Akzeptorfilter (rot) vor der Kamera sind übereinandergelegt. Gelb erscheinen Moleküle, die in beiden Kanälen fluoreszieren.

gen. Es hat sich herausgestellt, dass während des Transports vom Rotationsbeschichter zum äußeren Kryostat die Deckglastemperatur nicht so niedrig ist, dass es augenblicklich beschlägt. Erst wenn der innere Kryostat (mit Deckglas) auf dem äußeren Kryostat sitzt und wieder mit flüssigem Stickstoff gefüllt wird, resublimiert Wasser sofort am nun sehr kalten Deckglas und bildet eine dicke Eisschicht, die das Laserlicht stark streut. Um das zu verhindern, sollte der Evakuierung des Raumes zwischen dem inneren und dem äußeren Kryostat ca. 10 s Zeit gegeben werden, bevor Stickstoff eingefüllt wird.

4.2 Evaluation der Methode

In diesem Abschnitt wird geprüft, ob das Konfokalmikroskop mit dem Luftobjektiv für Experimente sowohl bei Raumtemperatur als auch mit flüssigem Stickstoff gekühlt bis auf Einzelmolekülniveau anwendbar ist.

In der Einzelmolekülspektroskopie ist eine hohe Detektionseffizienz in Verbindung mit geringem Rauschen unerlässlich, um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Die Detektionseffizienz ist das Produkt aus der räumlichen Sammeleffizienz, der Transmission der optischen Elemente und der Quanteneffizienz der Detektoren. Die räumliche Sammeleffizienz Y ist das Verhältnis des Öffnungskegels (Steradians) des Mikroskopobjektivs zum vollen Raumwinkel (4π) und ist eine spezifische Größe des Objektivs. Die Sammeleffizienz ist mit dem Öffnungswinkel α des Objektivs über folgende Gleichung verknüpft:

$$Y = (1 - \cos \alpha)/2. \quad (4.1)$$

Der Öffnungswinkel α und der Brechungsindex n des Immersionsmediums wiederum definieren die numerische Apertur NA (siehe auch 2.2):

$$NA = n \sin(\alpha), \quad (4.2)$$

die für ein Mikroskopobjektiv spezifiziert ist. Ein großer Öffnungswinkel (bzw. eine große numerische Apertur) ermöglicht somit eine hohe Sammeleffizienz.

Um nun die Anwendbarkeit des Luftobjektivs für Einzelmolekülmessungen zu zeigen, wird seine Detektionseffizienz mit der eines häufig genutzten Öobjektivs verglichen. Die Verwendung von Immersionsobjektiven ist bei den Tieftemperaturexperimenten nicht möglich, da über das Immersionsmedium Wärme vom Objektiv zum Deckglas transportiert werden kann, und folglich das Objektiv abkühlt und die Probe erwärmt wird. Das Immersionsmedium könnte zusätzlich einfrieren oder seinen Brechungsindex verändern. Das Luftobjektiv, das aufgrund seiner numerischen Apertur von 0,8 einen Öffnungswinkel von $53,1^\circ$ hat, besitzt eine Sammeleffizienz von 20 %. Das Ölimmersionsobjektiv hingegen, mit einer numerischen Apertur von 1,4 und einem Öffnungswinkel von $67,5^\circ$, sammelt 31 % einer isotropen Emission. An dieser Stelle sei erwähnt, dass hier die Farbstoffe in der Nähe einer Grenzschicht mit zwei unterschiedlichen Brechungsindizes (PMMA und Luft) betrachtet werden. Durch diese Grenzschicht wird die Abstrahlcharakteristik eines emittierenden Dipols stark verändert [6]. Anstatt der charakteristischen, senkrecht zur Dipolachse gleichmäßig ringförmigen Abstrahlung, wird die Emission in Richtung des höheren Brechungsindex verstärkt [37]. Da dieser Effekt noch zusätzlich von der Orientierung des Emissionsdipols zur Grenzfläche abhängt, was diese Betrachtung weiter kompliziert, soll im weiteren die Näherung eines isotropen Emitters verwendet werden.

Als Referenzfluorophor wurde, wie bei den ersten Testmessungen (siehe oben) PMI in PMMA untersucht. Abbildung 4.4a zeigt ein Bild von PMI in PMMA, aufgenommen mit dem Ölimmersionsobjektiv bei Raumtemperatur und einer Laserleistung von $7 \mu\text{W}$. Die Fluoreszenz wurde durch einen polarisierenden Strahlteiler in vertikal linear und horizontal linear polarisiertes Licht aufgeteilt. Die Abbildung zeigt übereinandergelegt und farblich getrennt die gemessenen Intensitäten in beiden Detektoren. Die grünen Punkte bzw. Moleküle zeigen vertikal polarisiertes Licht und die roten horizontal polarisiertes. Diese verschiedenen Polarisierungen machen deutlich, dass es sich bei den Punkten um alleinstehende, emittierende Dipole handelt und somit nur einzelne Moleküle betrachtet werden. Des Weiteren ist das typische Blinken der Fluoreszenz, zu erkennen als dunkle Flecken im Molekül, und das Bleichen der Fluorophore ein Indiz für die Darstellung/Untersuchung einzelner Moleküle. In Abbildung 4.4b und c sind im Vergleich zum Öobjektiv die Bilder zu sehen, die mit dem Luftobjektiv bei 300 K (b) und bei 77 K (c) aufgenommen worden sind. Die Laserleistung wurde bei diesen Messungen auf $20 \mu\text{W}$ erhöht, um die gleiche Anregungsintensität wie für das Ölimmersionsobjektiv zu erhalten (nähere Erläuterung siehe unten).

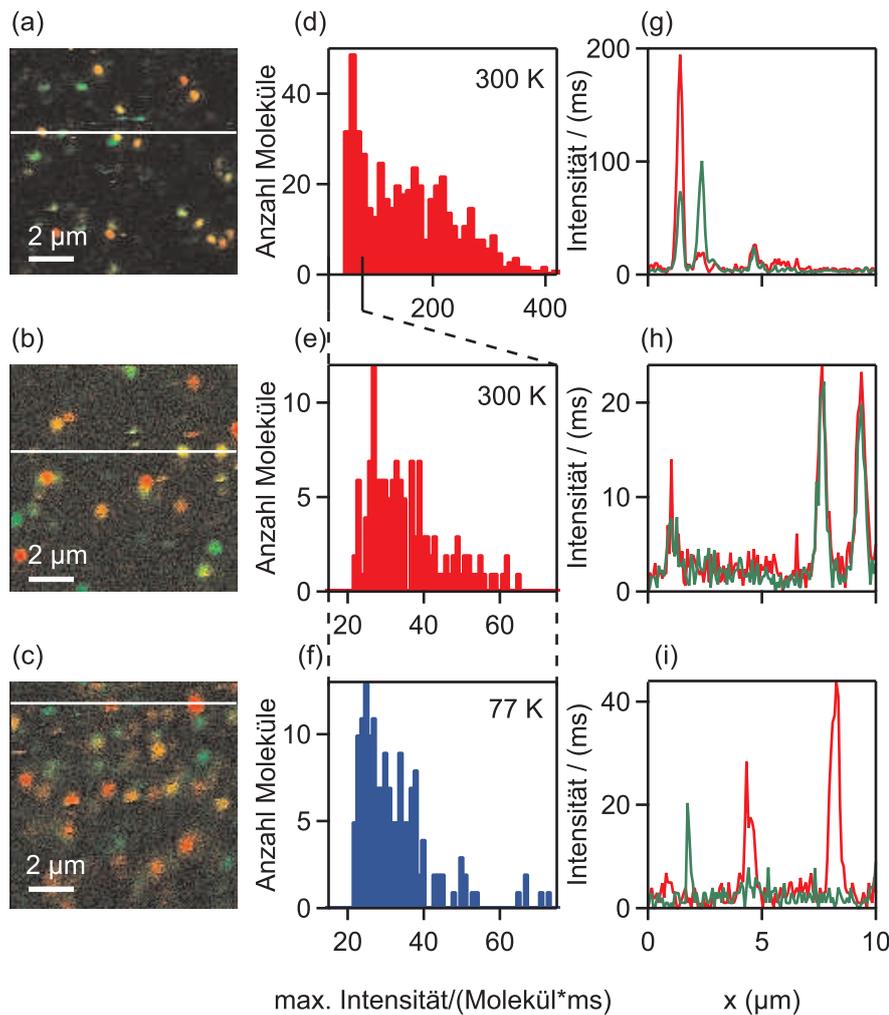


Abbildung 4.4: Gütemessungen mit PMI in PMMA

Detektionseffizienz des Ölimmersionsobjektivs bei 300 K verglichen mit der des Luftobjektivs bei 300 K und bei 77 K. (a)-(c) Übereinandergelegte Bilder der beiden Kanäle, die horizontal linear polarisiertes (rot) bzw. vertikal linear polarisiertes (grün) Licht detektierten. (d)-(f) Histogramme der maximalen Intensität in beiden Kanälen pro Molekül und Millisekunde. (g)-(i) Linienprofile, die die zu den weißen Linien in (a)-(c) gehörende Intensität pro Millisekunde darstellen. Obere Reihe: aufgenommen mit dem Ölimmersionsobjektiv (NA 1,4) bei 300 K, Anregungsintensität $7 \mu\text{W}$. Mittlere Reihe: Luftobjektiv (NA 0,8) bei 300 K, Anregungsintensität von $20 \mu\text{W}$. Untere Reihe: Luftobjektiv (NA 0,8) bei 77 K, Anregungsintensität von $20 \mu\text{W}$.

Bei einem genaueren Blick auf diese drei Bilder fällt auf, dass die Bilder der Moleküle unterschiedlich groß sind. Die Abbildungen der einzelnen Moleküle (Spots) stellen nicht die Größe des Moleküls selbst dar, sondern die Größe des illuminierenden Strahls, d. h. die Punkt-Abbildungs-Funktion (PSF) (siehe Abschnitt 2.2.2). Deswegen werden die Spots mit größer werdender numerischer Apertur kleiner. Die Breite, bei der die Laserintensität auf $1/e^2$ ihres Maximums abgefallen ist, wird häufig als Strahldurchmesser d_0 angegeben. Dieser Strahldurchmesser kann experimentell aus den Bildern bestimmt werden. Dafür wurde

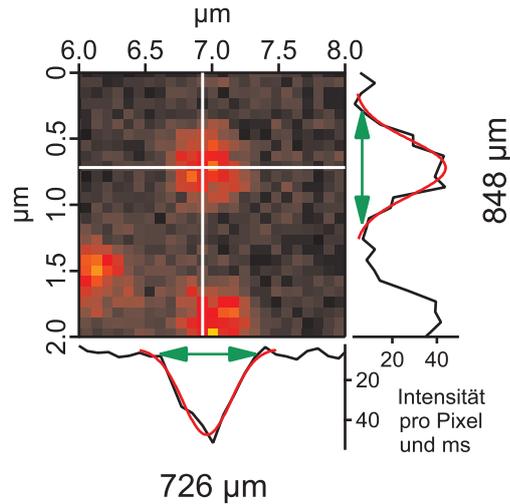


Abbildung 4.5: Beispiel für die Bestimmung der Spotgröße

Ausschnitt eines Bildes von PMI in PMMA, aufgenommen mit dem Luftobjektiv bei Raumtemperatur mit $20 \mu\text{W}$ Anregungsintensität. Um die Größe des Spots zu ermitteln, wird die Intensitätsverteilung mittig horizontal und vertikal (weiße Linien) mit einer Gauß-Funktion angepasst. Die Breite, an der die maximale Intensität auf $1/e^2$ gesunken ist, wird als Spotgröße angenommen (grüne Pfeile).

jeder Punkt mit einer Gauß-Funktion angepasst [127, 146] und die Breite des Punktes bei $1/e^2$ des Maximums ermittelt (siehe Abbildung 4.5). Unabhängig von der Laserintensität wurde der Strahldurchmesser für das Öobjektiv zu $d_0 = (436 \pm 6) \text{ nm}$ und für das Luftobjektiv zu $d_0 = (737 \pm 13) \text{ nm}$ bestimmt. Beim Öobjektiv wurden ca. 50 Spots vermessen, beim Luftobjektiv ca. 20. Der angegebene Fehler ist der mittlere Fehler der Mittelwertes mehrerer Messungen.

Theoretisch kann der Strahldurchmesser durch die Größe einer Airy-Scheibe abgeschätzt werden [103],

$$d_{\text{Airy}} = 1,22 \cdot \lambda / (NA), \quad (4.3)$$

die durch die Wellenlänge λ und die numerische Apertur des Objektivs bestimmt ist. Für den genutzten Aufbau ist diese Näherung der PSF ausreichend. Die Detektionsfläche der APD, die in diesem Aufbau als konfokale Blende fungiert, ist ca. $180 \mu\text{m}$ groß. Wird diese Fläche auf der Probenebene abgebildet, so ist sie bei dem Ölimmersionsobjektiv $0,7 \mu\text{m}$ und bei dem Luftobjektiv $1,2 \mu\text{m}$ groß, und damit ungefähr zweimal größer als der Durchmesser der Airy-Scheibe. Aufgrund dieser großen konfokalen Blende dominiert die PSF der Anregung die gesamte Instrument-PSF [146, 54]. Die aus Gleichung 4.3 resultierenden, theoretischen Werte für d_0 , 426 nm für das Öobjektiv und 744 nm für das Luftobjektiv, stimmen innerhalb der Fehler sehr gut mit den experimentell erhaltenen überein.

Die kleinere numerische Apertur des Luftobjektivs führt neben einer geringeren Sammeleffizienz auch zu einer geringen Anregungsrate, da die Laserleistung über eine größere Fläche verteilt ist. Durch das Anpassen der Laserleistung an die entsprechende Größe des

Strahldurchmessers kann die gleiche Anregungsintensität für beide Objektive eingestellt werden. Somit ergibt eine Laserleistung von $7 \mu\text{W}$ bei dem Öobjektiv und $20 \mu\text{W}$ bei dem Luftobjektiv die gleiche Anregungsintensität von $13,5 \text{ kW}/\text{cm}^2$. Bei dem Luftobjektiv kann die Anregungsintensität zudem durch Reflexionen an der Grenzschicht beim Übergang von Luft zu Glas vermindert werden. Dieser Effekt wurde jedoch hier nicht betrachtet.

In Abbildung 4.4d-f sind, für gleiche Anregungsintensitäten, die detektierten Fluoreszenzintensitäten von PMI-Molekülen dargestellt. Die Anzahl der Teilchen im Histogramm entspricht ungefähr der Anzahl, die in der rasterbaren Fläche einer Probe vorkommen. Beim Öobjektiv beträgt diese Fläche $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ und beim Luftobjektiv $160 \times 160 \mu\text{m}^2$. Für die Analyse wurden die Bilder zunächst mit einem Gauß-Filter geglättet, um den Einfluss von Schrotrauschen zu minimieren. Dann wurden die maximalen Intensitäten der einzelnen Moleküle, die, um Hintergrund auszuschließen, größer sind als eine bestimmte Schwelle, in das Histogramm übertragen. Bei der Messung mit dem Öobjektiv (4.4d) sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei Raumtemperatur ungefähr fünfmal größer als mit dem Luftobjektiv (4.4e). Dieser große Unterschied ist sowohl auf die Reflexion am Deckglas als auch auf die geringere Detektionseffizienz und geringere Transmission des Luftobjektives zurückzuführen. Die Abkühlung der Probe auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff (4.4f) bedingt jedoch keine weitere Änderung der Fluoreszenzintensität. Die breite Verteilung der Einzelmolekülintensitäten kann durch die Abhängigkeit der Anregungs- bzw. Detektionsrate von dem Winkel zwischen Übergangsdipol und optischer Achse begründet werden [57].

Werden die Bilder links in Abbildung 4.4 genauer betrachtet, wird deutlich, dass neben einem kleineren Signal auch das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis für das Luftobjektiv schlechter wird. Die Intensitätsprofile auf der rechten Seite in Abbildung 4.4, die die Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linien in den Bildern links für beide APD zeigen, erlauben nähere Aussagen über das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Dieses Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis wurde durch den Quotienten aus mittlerer Intensität der Moleküle und dem Mittelwert des Hintergrundsignals, welches durch eine Schwelle definiert ist, bestimmt. Für das Öobjektiv bei Raumtemperatur kann damit ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von $20/1$ abgeschätzt werden. Dieses reduziert sich bei dem Luftobjektiv zwar auf $8/1$, wird aber bei Messungen in flüssigem Stickstoff nicht noch kleiner und ist, was entscheidend für Einzelmolekülmessungen ist, weiterhin ausreichend, um das Signal klar vom Hintergrund zu unterscheiden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass, trotz der geringeren Sammeleffizienz und des reduzierten Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses, mit dem entwickelten Kryostat Fluoreszenzmessungen auf Einzelmolekülniveau möglich sind.

5 Photophysikalische Eigenschaften der Farbstoffe

In diesem Abschnitt werden die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe, die an den Polyprolinen gebunden sind, näher untersucht, und mit denen der freien Farbstoffe verglichen.

Neben den doppelt markierten Polyprolinen werden auch einfach markierte betrachtet, um den Einfluss des Energietransfers auszuschließen. Das Peptid, das nur einen Donor am C-Terminus trägt, besteht aus sechs Prolinen (Prolin 6), während das nur Akzeptor markierte Peptid aus 20 Prolinen (Prolin 20) aufgebaut ist.

Die Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften ist für eine genaue Analyse des Energietransfers zwischen zwei Farbstoffen unerlässlich. Um aus der apparenten Transfereffizienz die tatsächliche Transfereffizienz zu berechnen, wird neben der Detektionseffizienz auch die Quantenausbeute beider Farbstoffe benötigt (siehe Abschnitt 6.1).

Aus der tatsächlichen Transfereffizienz können mithilfe des Förster-Radius' Aussagen über Abstände getroffen werden. Für eine möglichst genaue Berechnung des Förster-Radius' werden sowohl die Emissions- und Absorptionsspektren der Farbstoffe als auch die Quantenausbeute des Donors benötigt. Da die Bestimmung der Quantenausbeute nicht möglich war (insbesondere bei 77 K), wird aus den Lebenszeitmessungen auf Veränderungen der Quantenausbeute geschlossen.

Die Anisotropiemessungen geben einen Einblick in die Beweglichkeit der Farbstoffe bzw. der Peptide. Somit können Rückschlüsse auf die Orientierungsmöglichkeiten der Farbstoffe gezogen und der ebenfalls den Förster-Radius beeinflussende Orientierungsfaktor κ^2 ermittelt werden.

Messbedingungen

Die Durchführung der Experimente erfolgte jeweils in vier verschiedenen Pufferlösungen. Der Standardpuffer ist Natrium-Phosphat-Puffer (NaP-Puffer, 50 mM, pH 7,0). Als Kryoprotektor wird Trehalose genutzt, sodass dem NaP-Puffer 7,5 % (w/v) Trehalose (Trehalose-Puffer) hinzugefügt wurde (siehe Abschnitt 2.4). Des Weiteren wurde in Propylenglykol und Trifluoroethanol (TFE) gemessen.

Propylenglykol wird zum Einen oft genutzt, um die fundamentale Anisotropie (s. 2.1.6) zu bestimmen, da es bei tiefen Temperaturen ein amorphes Glas bildet [71]. Zum Anderen ist es bekannt für die Änderung der Persistenzlänge von Polyprolinen [109] und bietet somit

einen zusätzlichen Parameter für die FRET-Messungen (siehe auch Abschnitt 5.3 und 6.2). Mit den Messungen in TFE kann die Konformation der Polyproline näher untersucht werden. Während in Wasser auch *cis*-Bindungen möglich sind, liegen in TFE nur *trans*-Bindungen vor (siehe Abschnitt 3.4) [11].

5.1 Donor- und Akzeptorspektren

5.1.1 Absorptionsspektren

Die Absorption der Farbstoffe in den verschiedenen Medien wurde an einem Standardspektrometer (JASCO) mit einer Scan-Geschwindigkeit von 2000 nm/min und einer Auflösung von 2 nm gemessen. Die Konzentration der Farbstoffe betrug 300 nM für AF488 und 500 nM für AF594. In Abbildung 5.1 sind die Absorptionsspektren des Donors (a) und des Akzeptors (b), normiert auf ihr Maximum, zu sehen.

Das Absorptionsspektrum des freien Donors in 5.1a ändert sich durch Zugabe von Trehalose in den NaP-Puffer kaum. In TFE verschiebt sich das Maximum um 5 nm zu kürzeren und in Propylenglykol um 5 nm zu längeren Wellenlängen. Der gebundene Farbstoff verhält sich ähnlich, nur in den Flanken sind leichte Unterschiede erkennbar.

Auch beim freien Akzeptorfarbstoff in Abb. 5.1b ist zwischen NaP-Puffer und Trehalose-Puffer kein Unterschied sichtbar. In TFE verschiebt sich die Absorption ebenfalls zu kürzeren Wellenlängen (um 8 nm). Propylenglykol dagegen hat einen anderen Einfluss auf den Akzeptor als auf den Donor. Hier verschiebt sich das Spektrum um ca. 2 nm auch zu kürzeren Wellenlängen. Durch die Bindung des Akzeptors an die Peptidkette verschieben sich die Maxima in den Puffern und in Propylenglykol um wenige Nanometer zu kleineren Wellenlängen. In TFE ist keine Verschiebung erkennbar. Um diese Änderungen deutlicher darzustellen, wurde in Abbildung 5.1b ein vergrößerter Ausschnitt der Maxima hinzugefügt. Der größte Unterschied zwischen gebundenem und freiem Farbstoff ist in Propylenglykol zu sehen.

Diskussion der Absorptionsspektren

Obwohl in der Literatur meist davon ausgegangen wird, dass die Absorptionsspektren im Vergleich zu den Emissionsspektren weniger lösungsmittelabhängig sind [71], besitzen der Donor und der Akzeptor in Propylenglykol und in TFE unterschiedliche Absorptionsmaxima. Hierbei spielt die Polarität des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle. Es gibt Fluorophore, deren Dipolmomente im Grundzustand sowie beim Übergang in den Franck-Condon-Zustand von der Polarität des Lösungsmittels abhängig sind. Somit variiert das Absorptionsmaximum mit der Polarität [16]. Bei schwach- oder unpolaren Lösungsmitteln stellten Bublitz und Mitarbeiter [16] fest, dass mit sinkender Temperatur die Polarität des Lösungsmittels aufgrund intensiverer Wechselwirkung mit dem Farbstoffdipol steigt. Außerdem zeigten sie, dass die Verschiebung des Absorptionsmaximums zwischen Raumtem-

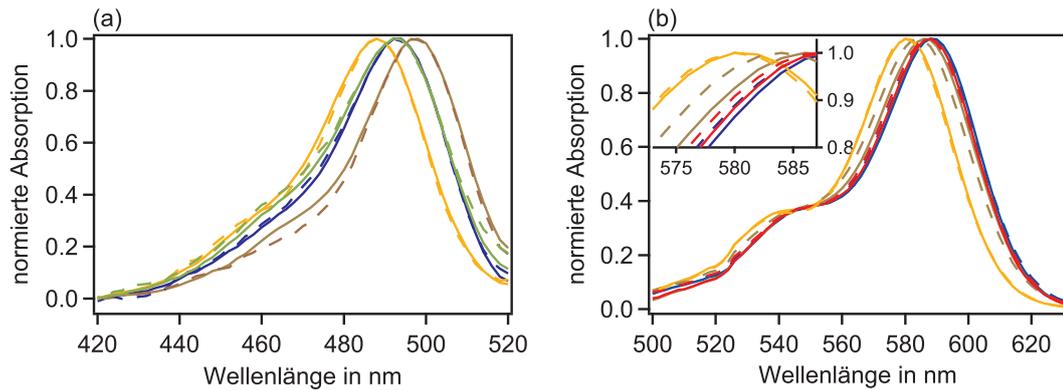


Abbildung 5.1: Absorptionsspektren bei Raumtemperatur von AF488 und AF594

(a) Spektren des freien (durchgezogene Linie) und des gebundenen (gestrichelte Linie) AF488 in NaP-Puffer (grün), Trehalose-Puffer (blau), Propylenglykol (braun) und TFE (gelb) bei 300 K. (b) Spektren des freien (durchgezogene Linie) und des gebundenen (gestrichelte Linie) AF594 in NaP-Puffer (rot), Trehalose-Puffer (blau), Propylenglykol (braun) und TFE (gelb) bei 300 K. Einfügung links oben: vergrößerter Ausschnitt der Maxima mit gleicher Legende wie in (b)

peratur und 77 K in unpolaren Lösungsmitteln am größten ist. In stark polaren hingegen ist die Verschiebung nahe Null.

Wasser sowie Propylenglykol und TFE sind polare Lösungsmittel. Da sie jedoch unterschiedlich stark polar sind, verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbstoffe bei Raumtemperatur entsprechend. Mit dem derzeitigen experimentellen Aufbau (sowie mit dem Standardspektrometer) konnten bei 77 K weder Absorptionsspektren noch mit ihnen vergleichbare Anregungsspektren aufgenommen werden. Durch die hohe Polarität von Wasser wird für weitere Betrachtungen jedoch davon ausgegangen, dass sich das Absorptionsspektrum im Vergleich zur Raumtemperaturmessung bei 77 K nicht verschiebt.

5.1.2 Fluoreszenzspektren

Vor den Messungen erfolgte zunächst eine Kalibrierung des im Konfokalmikroskop integrierten Spektrometers. Zum Einen wurde damit einer bestimmten Wellenlänge eine Position auf dem Sensor der Kamera zugeordnet und zum Anderen wurde so die Linearität der spektralen Auftrennung überprüft. Dazu wurden die drei Laserlinien 488 nm, 594 nm und 633 nm mithilfe des Rückreflexes auf dem Deckglas auf der Kamera abgebildet. Somit gab es zwei fixe Punkte (488 nm und 633 nm), mit denen die Spektren skaliert wurden. Durch die Lage des dritten Punktes konnte die Linearität überprüft und auch bestätigt werden. Die Fluoreszenzspektren (bei Raumtemperatur) wurden zusätzlich in einem Fluorometer (LS 50 B, Perkin Elmer) aufgenommen. Um eine Vergleichbarkeit der Spektren bei Raumtemperatur und bei 77 K zu gewährleisten, werden jedoch nur am Konfokalmikroskop gemessene Spektren gezeigt. Die Raumtemperaturspektren stimmen bei beiden Methoden überein.

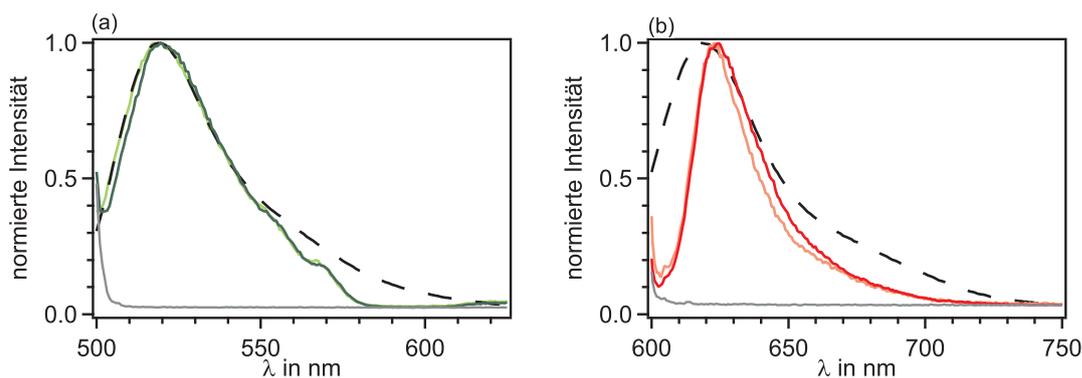


Abbildung 5.2: Raumtemperaturfluoreszenzspektren von AF488 und AF594, frei und gebunden

(a) Spektren des freien (hellgrün) und des gebundenen (dunkelgrün) AF488 in Trehalose-Puffer bei 300 K. Schwarz gestrichelt ist das vom Hersteller angegebene Spektrum und in grau der Hintergrund des Trehalose-Puffers. (b) Spektren des freien (hellrot) und des gebundenen (dunkelrot) AF594 in Trehalose-Puffer bei 300 K. Schwarz gestrichelt ist das vom Hersteller angegebene Spektrum und in grau der Hintergrund des Trehalose-Puffers.

Die Messungen bei Raumtemperatur erfolgten mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ und einer Laserleistung von $5 \mu\text{W}$. Die Integrationszeit der Kamera betrug 100 ms. Die Konzentration sowie die Laserleistung wurden für die Tieftemperaturexperimente auf $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{W}$ erhöht. Die Integrationszeit der Kamera wurde auf 1 s erhöht. Um die Spektren bei Raumtemperatur miteinander vergleichen zu können, wurde ihr Intensitätsmaximum auf Eins normiert. Auf die Normierung der Tieftemperaturspektren wird im entsprechenden Abschnitt näher eingegangen.

Spektren der freien und der gebundenen Farbstoffe bei 300 K

Zunächst wurde der Einfluss der Bindung des Farbstoffes an ein Polyprolin auf die Emissionsspektren untersucht. In Abbildung 5.2 sind die Spektren des Donors und des Akzeptors im gebundenen und im freien Zustand in Trehalose-Puffer zu sehen. Da sich die Spektren mit und ohne Trehalose nicht unterscheiden, sind nur die für die Tieftemperaturmessungen interessanten mit Trehalose aufgeführt. Als Beispiel ist der Hintergrund einer Messung nur mit Trehalose-Puffer gezeigt. Der Bereich der kurzen Wellenlängen ist in beiden Graphen nicht dargestellt, da hier, zu sehen durch die hohen Intensitäten zu Beginn der Spektren, das gestreute Anregungslicht das Fluoreszenzspektrum überdeckt. Zum Vergleich sind jeweils die vom Hersteller angegebenen Emissionsspektren beider Farbstoffe zu sehen. In Abbildung 5.2a ist eine gute Übereinstimmung des freien AF488 mit dem Referenzspektrum erkennbar. Die Abweichungen ab 560 nm entstehen durch den Dichroit (siehe unten), der bei 594 nm kein Licht transmittiert. Durch die Bindung des Farbstoffs an das Peptid verschmälert sich das Spektrum nur geringfügig. Bei den Spektren des AF594 in Abbildung 5.2b ist der Einfluss des Dichroits und der der Kamera deutlicher zu erkennen. Bei 600 nm schneidet der Dichroit einen Teil des Spektrums ab und bestimmt dadurch die linke

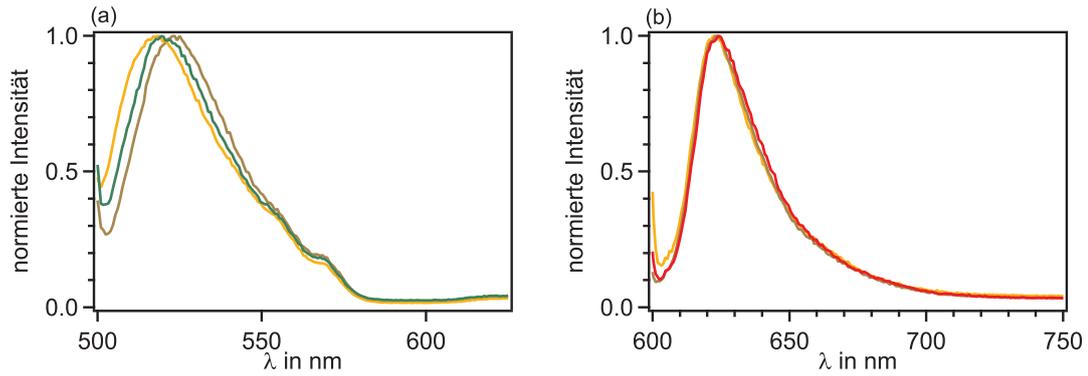


Abbildung 5.3: Raumtemperaturfluoreszenzspektren in verschiedenen Lösungen

(a) Spektren des gebundenen AF488 in NaP-Puffer mit Trehalose (grün), in Propylenglykol (braun) und in TFE (gelb). (b) Spektren des gebundenen AF594 in Trehalose (rot), in Propylenglykol (braun) und in TFE (gelb). Verschiedene Umgebungen verschieben das Fluoreszenzspektrum des Donors, jedoch nicht das des Akzeptors.

Flanke. Ab 650 nm nimmt die Detektionseffizienz der Kamera ab, sodass der langwellige Bereich abgeflacht ist. Trotzdem ist ein kleiner Unterschied zwischen dem Spektrum des freien Farbstoffs und des gebundenen zu sehen. Durch die Bindung verschiebt sich das Spektrum minimal zu längeren Wellenlängen.

Spektren der gebundenen Farbstoffe in verschiedenen Lösungen bei 300 K

In Abbildung 5.3 sind die Spektren der gebundenen Farbstoffe in den verschiedenen Medien dargestellt. Die Stokes-Verschiebung (siehe Kapitel 2.1.2) eines Farbstoffes ist von der Lösungsmittelrelaxation und damit von der Polarität des Lösungsmittels abhängig. In Abbildung 5.3a ist zu sehen, dass das Spektrum des gebundenen Donors im Vergleich zum Trehalose-Puffer in TFE um wenige Nanometer zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben ist. In Propylenglykol ist es zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Diese, schon beim Donor sehr kleine Veränderungen, sind beim Spektrum des Akzeptorfarbstoffes in Abbildung 5.3b nicht zu finden. Die rechte, von Filtern und Kamera unbeeinflusste Flanke des Spektrums im Trehalose-Puffer liegt genau über der in TFE und über der in Propylenglykol.

Spektren der gebundenen Farbstoffe bei 77 K

Interessant ist nun die Veränderung der Fluoreszenzspektren, wenn sich die Farbstoffe bei 77 K in amorphem Eis und damit in einer starren Umgebung befinden. Da Propylenglykol aufgrund seiner hohen Viskosität amorph gefriert und deswegen oft zur Messung von Spektren bei tiefen Temperaturen genutzt wird, erfolgt ein Vergleich mit den Spektren in Trehalose-Puffer bei 77 K. Messungen in TFE bei 77 K sind für die weiteren (FRET-) Experimente nicht relevant und sind deswegen nicht gezeigt.

Da sich die Spektren beider Farbstoffe viel weiter zu kürzeren Wellenlängen hin verschieben als in den anderen Umgebungen, muss hier der Einfluss des Dichroits genauer betrachtet

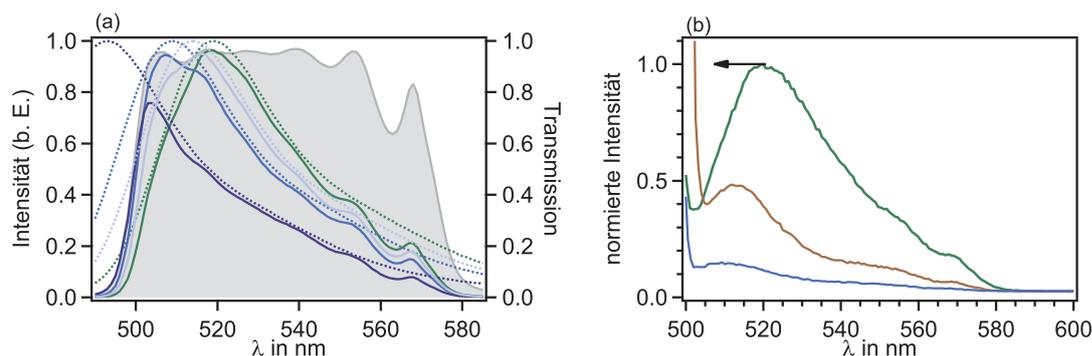


Abbildung 5.4: Tieftemperaturspektren des Donors

a) Dargestellt ist die Transmissionseigenschaft des Dichroits (grau, rechte Ordinate), das Herstellerspektrum bei Raumtemperatur (grün gepunktet) und um 5 nm, 10 nm und 26 nm verschobene, theoretische Spektren (hellblau bis dunkelblau gepunktet, linke Ordinate). Wird die Transmission des Dichroits beachtet, entstehen die jeweiligen durchgezogenen Spektren. b) Raumtemperaturspektrum in Trehalose-Puffer (grün) sowie Tieftemperaturspektren in Trehalose-Puffer (blau) und Propylenglykol (braun) von Pro6 AF488.

werden. Zudem kann die Normierung der Spektren nicht mithilfe des Intensitätsmaximums erfolgen, da dieses (höchstwahrscheinlich) nicht vom Dichroit transmittiert wird. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 5.4a die Transmissionseigenschaft des Dichroits und daraus resultierende, theoretische Spektren gezeigt. Das Herstellerspektrum des Donors sowie die, zur Veranschaulichung um 5 nm, 10 nm und 26 nm verschobenen Spektren sind gepunktet dargestellt. (Eine Verschiebung von 26 nm entspricht der Stokes-Verschiebung und damit der maximal möglichen.) Durch die Multiplikation dieser verschobenen Spektren mit dem Transmissionsspektrum des Dichroits werden Spektren erhalten, die der eigentlichen Messung entsprechen (durchgezogen). Diese theoretisch ermittelten Spektren in 5.4a zeigen, dass bis zu einer Verschiebung von ca. 10 nm das gemessene Maximum auch dem wirklichen Emissionsmaximum entspricht. Bei größeren Verschiebungen kann das Maximum und damit das Ausmaß der Verschiebung nicht bestimmt werden.

Das unverschobene Spektrum in Abbildung 5.4a steht für die Raumtemperaturmessung und wird nur wenig beeinflusst. Das gemessene Spektrum des gebundenen Donors in 5.4b ähnelt diesem sehr, deutlich vor allem durch die Wellenform bei 560 nm.

Des Weiteren sind in Abbildung 5.4b die Spektren des gebundenen Donors in Trehalose-Puffer und in Propylenglykol bei 77 K zu sehen. Da eine korrekte Normierung der Spektren nicht möglich ist, erfolgt die Darstellung entsprechend der gemessenen Intensitäten. Zur Vereinfachung ist die maximale Intensität bei Raumtemperatur auf Eins normiert. In Trehalose-Puffer wird von einer Verschiebung von über 10 nm ausgegangen, da das Maximum sehr nah an der Flanke des Dichroits liegt. In Propylenglykol ist das Maximum nicht mehr als 10 nm verschoben und wird deswegen auch als dieses angenommen. Die geringe Intensität der Spektren kann auf eine reduzierte Quantenausbeute bei 77 K (siehe Abschnitt 5.4) zurückgeführt werden.

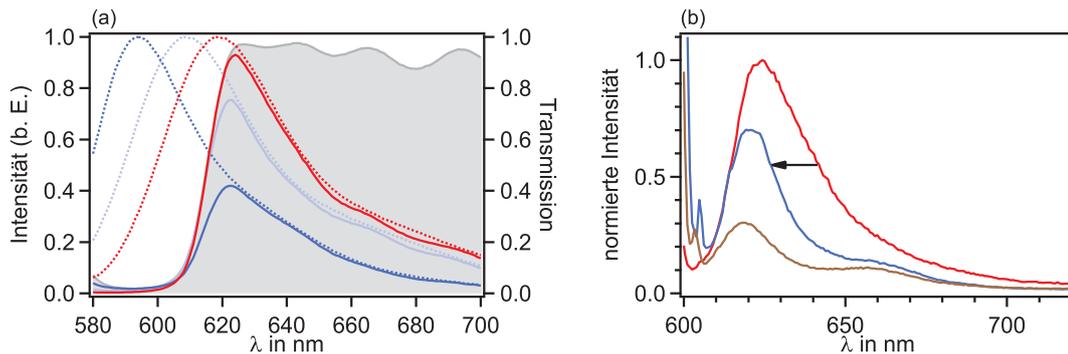


Abbildung 5.5: Tieftemperaturspektren des Akzeptors

a) Dargestellt ist die Transmissionseigenschaft des Dichroits (grau, rechte Ordinate), das Herstellerspektrum bei Raumtemperatur (rot gepunktet) und um 10 nm und 28 nm verschobene, theoretische Spektren (hellblau und blau gepunktet, linke Ordinate). Wird die Transmission des Dichroits beachtet, entstehen die jeweiligen durchgezogenen Spektren. b) Raumtemperaturspektrum in Trehalose-Puffer (rot) sowie Tieftemperaturspektren in Trehalose-Puffer (blau) und Propylenglykol (braun) von Pro20 AF594.

Die Spektren des Akzeptors werden schon bei Raumtemperatur stark durch den Dichroit bestimmt. In Abbildung 5.5a ist das Herstellerspektrum ohne und mit Dichroittransmission dargestellt. Fast die Hälfte des Spektrums wird abgeschnitten, sodass die linke Flanke nur durch den Dichroit bestimmt wird. Auch bei den um 10 nm und 28 nm verschobenen Spektren wird nur ein kleiner Teil des Spektrums detektiert. Um die Spektren des gebundenen Akzeptors bei Raum- und Tieftemperatur vergleichen zu können, wurde in Abbildung 5.5b die linke Flanke der Messung in Trehalose-Puffer der bei Raumtemperatur angepasst. Da die Messung in Propylenglykol unter den gleichen Bedingungen der Trehalose-Messung ablief, wurde ihre Intensität relativ zu dieser normiert. Die Verschiebung des Emissionsmaximums bei AF594 gebunden an Prolin 20 wurde an der rechten Flanke des Spektrums bestimmt und auf 15 nm abgeschätzt. Die Verschiebung bei 77 K in Propylenglykol beträgt mehr als 15 nm, kann jedoch nicht genauer abgeschätzt werden.

Die vier bei 77 K aufgenommenen Spektren in 5.4b und 5.5b zeigen zudem noch die typische Form von Spektren bei tiefen Temperaturen. Durch die geringe Temperatur verschmälern sich die Spektren und die verschiedenen Schwingungsniveaus werden im Spektrum deutlich.

Diskussion der Fluoreszenzspektren

Die Emissionseigenschaften von Farbstoffen werden stark durch deren lokale Umgebung beeinflusst. Vor allem die Polarität des Lösungsmittels bzw. der unmittelbaren Umgebung, die hauptsächlich für die Stokes-Verschiebung verantwortlich ist, kann die Emissionsspektren der Farbstoffe und deren Quantenausbeute ändern (siehe Abschnitt 2.1.2). Diese Änderungen werden genutzt, um z. B. Bindungsstellen an einem Protein, einer Membran oder einem Liganden zu charakterisieren.

Die Aufnahme der Donor- und Akzeptorspektren erfolgte somit zum Einen, um die Bindung am Peptid zu untersuchen, zum Anderen, um den Einfluss von Trehalose, Propylenglykol und TFE auf die Spektren und damit auf den Förster-Radius näher zu spezifizieren. Da das Hauptaugenmerk auf dem Energietransfer bei 77 K liegt, spielt die Verschiebung der Spektren eine wesentliche Rolle, um die Transfereffizienz genauer charakterisieren und, wenn möglich, quantifizieren zu können.

Die Bindung des Donors (AF488) an das C-terminale Cystein der Peptidkette hat weder Einfluss auf das Absorptions- noch auf das Fluoreszenzspektrum, d. h. die Wechselwirkung mit der Peptidkette ist sehr schwach. Beim Akzeptor hingegen verschiebt sich das Spektrum durch die Bindung an das N-terminale Glyzin um ca. drei Nanometer zu längeren Wellenlängen. Die unmittelbare Umgebung des Farbstoffs ist wahrscheinlich durch die Bindung polarer geworden und resultiert, in Verbindung mit dem verschobenen Absorptionsspektrum, in einer größeren Stokes-Verschiebung.

Der Zusatz von 7,5% Trehalose im NaP-Puffer zeigt keine Veränderung im Spektrum. Deutlich sind die Veränderungen der Spektren des gebundenen Donors in Propylenglykol und TFE zu sehen. TFE verschiebt die Emission um ca. 3 nm zu kürzeren Wellenlängen. Diese Blauverschiebung ist bei Lösungsmitteln, die Wasserstoffbrücken bilden können, bekannt [105]. Zudem kann sie auch mit einer geringeren Polarität begründet werden [71]. Propylenglykol, im Vergleich zu Wasser auch weniger polar, verschiebt das Spektrum hingegen um ca. 3 nm zu längeren Wellenlängen. Der gebundene Akzeptor wird durch die verschiedenen Medien nicht beeinflusst.

Bei den Tieftemperaturmessungen zeigen alle Spektren eine starke Blauverschiebung. Diese kann durch eine verzögerte Lösungsmittelrelaxation begründet werden und ist in Abbildung 5.6 schematisch veranschaulicht. Das Jablonski-Diagramm zeigt die Anregung des Fluorophors in den Franck-Condon-Zustand, d. h. in einen vom Lösungsmittel unbeeinflussten Zustand. Daraufhin richten sich die Lösungsmittelmoleküle entsprechend des Dipols des angeregten Fluorophors aus, d. h. sie relaxieren, der angeregte Zustand verliert Energie und folglich ist die Emission langwelliger. Die Geschwindigkeit des Prozesses wird mit der Lösungsmittelrelaxationsrate k_L beschrieben und ist von der Viskosität des Mediums abhängig. Relaxiert das Lösungsmittel komplett während der Dauer des angeregten Zustandes, so erfolgt die Emission aus dem energetisch niedrigen Zustand R (Abb. 5.6) und es resultiert ein stark rotverschobenes Spektrum. Kann die Relaxation nicht stattfinden, so erfolgt die Emission aus dem unrelaxierten Zustand F. Sind die Fluoreszenzlebensdauer τ und $1/k_L$ ungefähr gleich groß, so kann ein sehr breites Spektrum entstehen.

Diese Art der Spektrenverschiebung kann bei sinkender Lösungsmitteltemperatur beobachtet werden. Bei niedrigen Temperaturen erhöht sich die Viskosität des Lösungsmittels und die Relaxation verlangsamt sich. Bei 77 K ist die Viskosität des Lösungsmittels so groß, dass praktisch keine Relaxation mehr stattfindet und die Emission aus dem Franck-Condon-Zustand F erfolgt [65]. Dass dennoch ein Energieverlust und damit eine Rotverschiebung der Emission nach der Anregung erfolgt, kann nicht ganz ausgeschlossen werden.

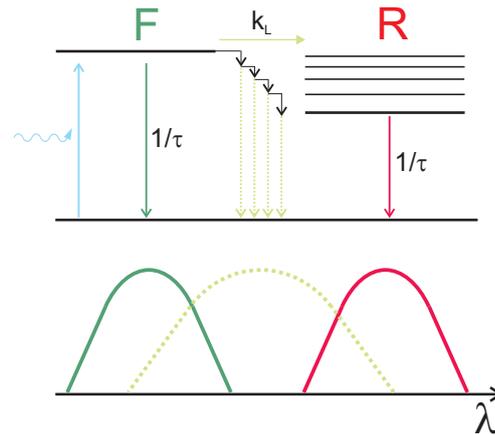


Abbildung 5.6: Jablonski-Diagramm

Dargestellt ist der Einfluss der Lösungsmittelrelaxation (k_L) auf die Lage des Emissionsspektrums. Ist die Lösungsmittelrelaxation langsamer als die Fluoreszenzlebensdauer, so erfolgt die Emission aus dem Franck-Condon-Zustand (F); ist sie schneller, aus dem relaxierten Zustand (R). Überschneiden sich beide Zeiten, so kann ein sehr breites Spektrum entstehen.

Trotz der geringen Temperatur kann ein Fluorophor in höhere Schwingungszustände von S_1 oder in Phononenzustände des umgebenden Mediums angeregt werden [90, 18]. Bei der Schwingungsrelaxation in den vibronischen Grundzustand von S_1 wird Energie direkt an die Umgebung abgegeben. Die anschließende Emission erfolgt in einen Schwingungszustand von S_0 , dessen Relaxation auch mit Energieabgabe an die Umgebung verbunden ist. Diese Energieverluste, die nicht durch eine Reorientierung der Lösungsmittelmoleküle entstehen, konnten bereits bei Temperaturen bis 1,4 K gezeigt werden [18, 91, 92].

Wie bereits oben erwähnt, sind in den bei 77 K aufgenommenen Spektren die Schwingungszustände deutlicher zu erkennen. Die Breite eines Spektrums entsteht durch bei Raumtemperatur zahlreich vorhandene Schwingungszustände des Farbstoffmoleküls. Bei sinkender Temperatur werden manche Schwingungszustände eingefroren, sodass die Übergänge „diskreter“ und die Spektren schmäler werden [45, 147, 128, 98]. Bei sehr tiefen Temperaturen (wenige Kelvin) besteht sowohl das Absorptions- als auch das Emissionsspektrum eines Moleküls neben Phononenseitenbändern aus nur einer schmalen Linie, welche aus dem rein elektronischen Übergang ohne Schwingungen resultiert (Null-Phononen-Linie) [90, 91]. Die für diese Arbeit gemessenen Spektren bei 77 K sind noch relativ breit, da es zum Einen Ensemble-Spektren sind und sie somit die Heterogenität der Moleküle und ihrer Umgebung darstellen. Zum Anderen kann angenommen werden, dass, im Gegensatz zu 1,4 K, bei 77 K noch viele Schwingungszustände existieren. Prinzipiell lässt sich aus diesen Spektren das Überlappungsintegral für den Energietransfer berechnen. Ob diese aber eine gute Näherung für die Spektren von *einzelnen* Farbstoffpaaren bei 77 K sind, kann nicht beantwortet werden.

Um den Energietransfer genauer charakterisieren zu können, sind zwei Spektren von Bedeutung. Aus dem Emissionsspektrum des gebundenen Donors und dem Absorptionsspektrum

des gebundenen Akzeptors wird das Überlappungsintegral berechnet. Da das gemessene Fluoreszenzspektrum des Donors vom Dichroit beeinflusst wird, jedoch keine Verschiebung aufweist, wird für Messungen in Trehalose-Puffer das unverschobene Herstellerspektrum bei Raumtemperatur genommen. Für den Energietransfer bei 77 K wird ein um 10 nm verschobenes Herstellerspektrum verwendet. Als Absorptionsspektrum für den gebundenen Akzeptor wird für 300 K sowie für 77 K in Trehalose-Puffer das unverschobene Herstellerspektrum genutzt.

Eine Übersicht für die Raumtemperaturexperimente in Propylenglykol und TFE ist in Tabelle 6.1.2 gegeben.

5.2 Triplettdynamik

Die Triplettdynamik der Farbstoffe wurde mithilfe von FCS untersucht (siehe Abschnitt 2.3.4). Um den Nachimpuls¹ (Afterpulse) der APD zu eliminieren, wird das Signal mit einem 50/50-Strahlteiler auf zwei APD aufgeteilt und gekreuzkorreliert. In dieser „Pseudo-Autokorrelation“ erscheint der Nachimpuls der APD nicht, da die virtuellen Photonen nicht miteinander korrelieren. In Abbildung 5.7 sind die Pseudo-AKF für den Donor (a) und für den Akzeptor (b) bei verschiedenen Anregungsleistungen zu sehen. Gemessen wurde in NaP-Puffer, und die Konzentration des freien und des gebundenen Farbstoffes betrug 500 pM.

Die AKF des freien Donors in Abbildung 5.7a zeigen mit steigender Anregungsleistung des 488 nm Lasers einen steigenden Tripletanteil. Die Normierung erfolgte durch die Amplitude der reinen Diffusions-AKF, welche auf Eins gesetzt wurde. Im Mikrosekundenbereich ist schon bei 13 μW ein zusätzlicher Anstieg zu erkennen, der deutlich bis zu einer Leistung von 70 μW ansteigt. Der gebundene Farbstoff zeigt das gleiche Tripletverhalten wie der freie Farbstoff. Die Diffusionszeit wird durch das gebundene Prolin 6 kaum beeinflusst.

Beim Akzeptorfarbstoff in Abbildung 5.7b wurde die Leistung des 594 nm Lasers von 20 μW auf 50 μW erhöht. Die Triplettdynamik des freien Farbstoffs ist gelb unterlegt, die des gebundenen rot. Deutlich ist, dass durch die Bindung des Akzeptors an Prolin 20 die Diffusionszeit steigt. Auch die Triplettdynamik scheint durch die Bindung an die Peptidkette ausgeprägter zu sein.

In Abbildung 5.8a sind für eine genauere Analyse die Tripletzeit τ_T und der Tripletanteil T in Abhängigkeit von der Anregungsintensität dargestellt. Die Anpassung der Pseudo-AKF erfolgte nach Gleichung 2.46. Der eingezeichnete Fehler resultiert aus der Anpassung. Der Donorfarbstoff zeigt im freien und im gebundenen Zustand gleiche Tripletzeiten und -anteile. Während die Tripletzeit von ca. 7 μs bei 13 μW auf 3 μs bei 70 μW fällt, erhöht sich gleichzeitig der Tripletanteil von 14 % auf 34 %. Dass die Bindung des Akzeptors

¹Auf der Detektorfläche der APD wird oft nach einem reellen Photon noch ein virtuelles detektiert. Diese virtuellen Photonen überlagern im kurzen Zeitbereich die AKF, sodass die Analyse von Photodynamik erschwert ist.

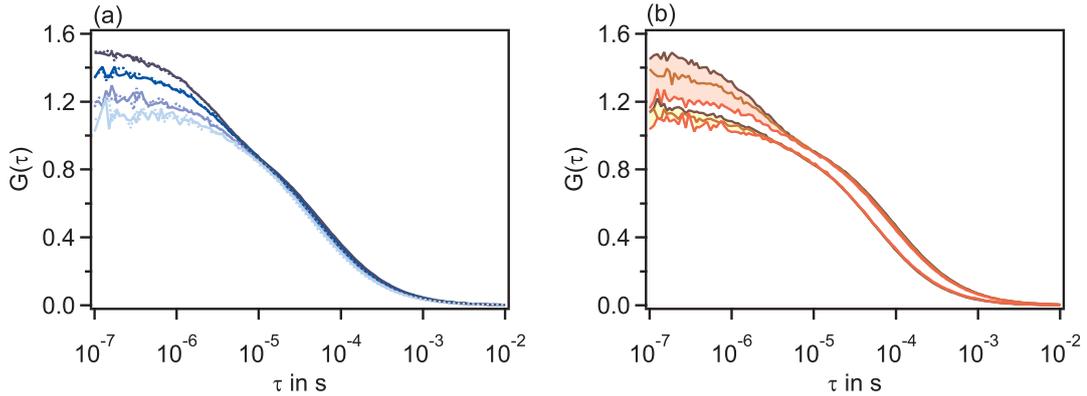


Abbildung 5.7: Triplett der freien und der gebundenen Farbstoffe

(a) AKF des freien (durchgezogen) und des gebundenen AF488 (gepunktet) bei verschiedenen Anregungsleistungen bei 488 nm, von $70 \mu\text{W}$ (dunkelblau), über $50 \mu\text{W}$, $25 \mu\text{W}$ bis $13 \mu\text{W}$ (hellblau). (b) AKF des freien (gelb unterlegt) und des gebundenen AF594 (rot unterlegt) bei verschiedenen Anregungsleistungen bei 594 nm, von $50 \mu\text{W}$ (dunkelrot) über $35 \mu\text{W}$ (rot) bis $20 \mu\text{W}$ (hellrot).

an das Peptid einen Einfluss auf die Triplettodynamik hat, wird bei der genaueren Analyse bestätigt. Der freie AF594 zeigt bei einer Anregungsleistung bis $50 \mu\text{W}$ eine konstante Triplettzeit bei einem leichten Anstieg des Triplettanteils von 8 % auf 15 %. Gebunden verkürzt sich die Triplettzeit dagegen von ca. $4 \mu\text{s}$ auf $2 \mu\text{s}$, und der Anteil steigt von 12 % auf 33 %.

Bei einem genaueren Blick auf die Triplettanteile des freien Akzeptors fällt auf, dass nur sie bei einer Anregung von $0 \mu\text{W}$ nicht gegen Null extrapolieren. Dieser Verlauf ist ungewöhnlich und weist wahrscheinlich auf die ungenaue Bestimmung des Triplett beim freien Akzeptor hin. Obwohl die Anpassung keinen großen Fehler bei den Triplettanteilen zeigt, so sind aber die Triplettzeiten mit einem großen Fehler behaftet. Ein Grund dafür kann die schwach ausgeprägte Triplettodynamik in Verbindung mit einem sehr kurzen Aufenthalt im konfokalen Fokus sein. Durch wenige Tripletttereignisse im Fokus ist deren Bestimmung erschwert. Der gebundene Akzeptor hingegen verweilt durch die Bindung an Prolin 20 viel länger im Fokus, und erlaubt so eine genauere Analyse.

Mithilfe der Triplettzeiten und -anteile lassen sich die Raten für Interkombination k_{ISC} und Interkombination zurück in den S_0 , k_{rISC} , bestimmen (siehe Abschnitt 2.1.1). Die zusätzliche Amplitude A_T in der Pseudo-Autokorrelation, gegeben durch $T/(1-T)$, bestimmt das Verhältnis zwischen der apparenten Interkombinationsrate k_{ISC}^{app} und der Interkombination zurück in S_0 :

$$A_T = \frac{k_{ISC}^{app}}{k_{rISC}} \quad (5.1)$$

Die Summe beider Raten ist die Tripletttrate, d. h. das Inverse der Triplettzeit:

$$k_{ISC}^{app} + k_{rISC} = 1/\tau_T \quad (5.2)$$

Die apparente Interkombinationsrate k_{ISC} ist wiederum von der Besetzungsdichte des S_1 -Zustandes, N_{S_1} , abhängig:

$$k_{ISC}^{app} = \langle N_{S_1} \rangle k_{ISC}. \quad (5.3)$$

Aus den Gleichungen 5.1 und 5.2 folgt die direkte Berechnung der Raten:

$$k_{ISC}^{app} = \frac{T}{\tau_T} \quad \text{und} \quad k_{rISC} = \frac{1}{\tau_T(1 + T/(1 - T))}. \quad (5.4)$$

Die berechneten Raten k_{ISC}^{app} und k_{rISC} des Donors und des Akzeptors sind in Abbildung 5.8b in Abhängigkeit von der Anregungsleistung dargestellt.

Wie erwartet, steigt die apparente Interkombinationsrate für alle Proben mit steigender Leistung an, da bei höherer Anregung der angeregte Zustand öfter besetzt wird. Da eine exakte Bestimmung der Besetzungsdichte nicht möglich ist, wird k_{ISC} aus dieser Leistungsabhängigkeit der apparenten Rate bestimmt. Ist die Anregung in Sättigung, das heißt, der angeregte Zustand ist maximal besetzt, entspricht die apparente der maximalen Rate k_{ISC} . Durch folgende Gleichung kann die Leistungsabhängigkeit mithilfe der Parameter k_{ISC} und der Sättigungsleistung P_{sat} angepasst werden [48]:

$$k_{ISC}^{app}(P) = \frac{k_{ISC}}{1 + P_{sat}/P}. \quad (5.5)$$

Daraus ergeben sich folgende Werte:

	k_{ISC} in $\cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$	P_{sat} in μW
AF488	$6,8 \pm 4,8$	370 ± 340
Pro6AF488	$16,5 \pm 10,8$	978 ± 680
AF594	$(1,1 \pm 0,4)$	(26 ± 20)
Pro20AF594	$15,4 \pm 1,9$	495 ± 65

Wie in Abbildung 5.8b (oben) zu sehen, liegen die Messpunkte des Donors und des gebundenen Akzeptors im linearen Anstieg, d. h. eine Sättigung der Rate ist noch nicht erkennbar. Dass die Sättigung erst bei viel höherer Anregung erfolgt, spiegelt sich auch in den Werten der Sättigungsintensität wider (Tabelle 5.2). Der große Fehler, der aus der Anpassung resultiert, ist mit der geringen Anzahl an Messpunkten, welche zudem nur im Bereich geringer Anregungsintensitäten liegen, begründet. Der freie Akzeptor dagegen zeigt schon bei diesen Anregungsintensitäten eine Sättigung. Dieser Verlauf bestätigt die bereits in Abbildung 5.7b sichtbare, schwach ausgeprägte Triplettedynamik des freien Akzeptors. Dennoch sollte gerade diese Anpassung mit Vorsicht betrachtet werden, da die geringere Sättigungsintensität vielleicht nur aus der Bedingung $k_{ISC}^{app} = 0$ bei einer Anregung von $0 \mu\text{W}$ resultiert.

Die Raten der beiden Farbstoffe zeigen zusätzlich, dass durch die Bindung an ein Peptid die Wahrscheinlichkeit für eine Interkombination steigt.

Die Raten für die Interkombination zurück in S_0 sind in Abbildung 5.8b (unten) dargestellt.

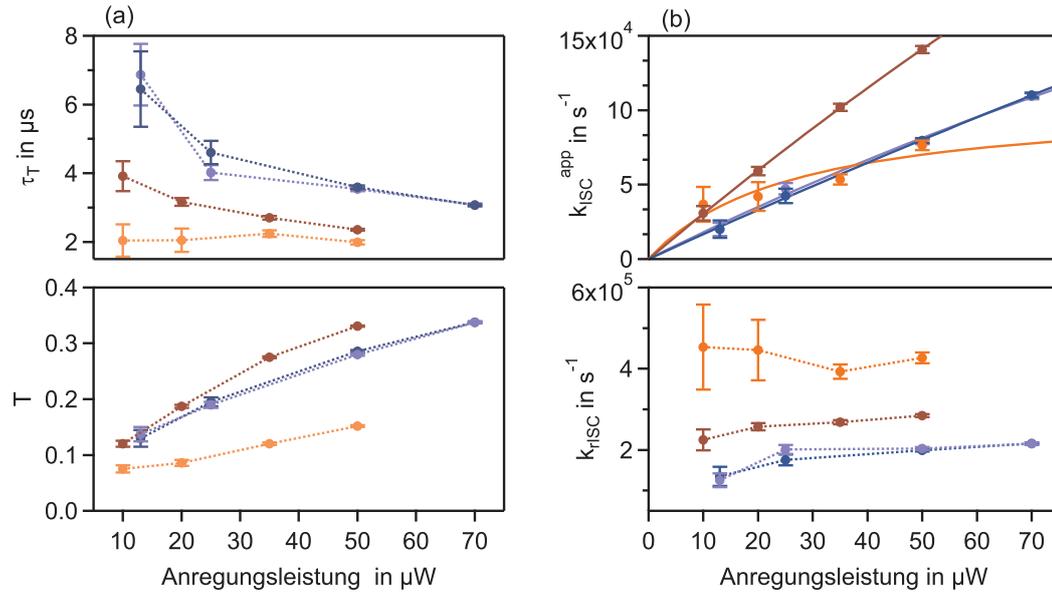


Abbildung 5.8: Triplettparameter und -raten in Abhängigkeit von der Anregung

(a) Die Tripletzeit τ_T (oben) nimmt mit steigender Anregungsleistung sowohl für den freien (hellblau) und den gebundenen (dunkelblau) AF488 als auch für den gebundenen AF594 (rot) ab. Für den freien AF594 bleibt sie hingegen konstant. Der Tripletanteil (unten) steigt im gleichen Maße für den freien (hellblau) und den gebundenen (dunkelblau) AF488 mit steigender Anregungsleistung. Beim freien Akzeptorfarbstoff (orange) steigt der Tripletanteil geringer als beim gebundenen (rot). (b) Die Raten für die apparente Interkombination (oben) steigen bei dem freien (hellblaue Punkte) und dem gebundenen AF488 (dunkelblaue Punkte), und bei dem freien (orange Punkte) und gebundenen AF594 (rote Punkte) mit steigender Laserleistung. Die Linien zeigen die Anpassung nach Gleichung 5.4. Die Rückinterkombination (unten) steigt leicht in Abhängigkeit von der Laserleistung für den freien (hellblau) und den gebundenen AF488 (dunkelblau). Dieser leichte Anstieg ist auch bei dem gebundenen Akzeptor (rot) zu erkennen. Beim freien Akzeptor scheint die Rate zu sinken, ist jedoch bei kleiner Anregung mit einem großen Fehler behaftet. Für (a) und (b): Die gestrichelten Linien dienen nur der Verbesserung der Visualisierung. Die Fehler resultieren aus einer Größtfehlerabschätzung.

Während sowohl der freie und der gebundene Donor als auch der gebundene Akzeptor einen leichten Anstieg aufweisen, zeigt der freie Akzeptor eine sinkende Rate. Die großen Fehler bei geringer Anregungsleistung gestalten eine genaue Interpretation der Raten des freien Akzeptors jedoch schwierig.

Diskussion der Triplettdynamik Die Tripletzeit des Donors variiert zwischen drei und sieben Mikrosekunden, die des Akzeptors zwischen zwei und vier Mikrosekunden. Damit sind sie ca. 1/10 kürzer als die mittlere Aufenthaltsdauer eines Moleküls im konfokalen Fokus mit $\tau_{\text{ungebunden}} \sim 50 \mu\text{s}$ und $\tau_{\text{gebunden}} \sim 90 \mu\text{s}$, und sie beeinflussen nicht die gemessene Diffusionszeit der Farbstoffe/Peptide. Für die Experimente in Lösung stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss die Triplettdynamik auf den Energietransfer und somit auf die Transfereffizienz-Verteilung hat. Triplet und andere „blinkende“ Prozesse wie Quenchen oder Bleichen (siehe Abschnitte 2.1.4 und 2.1.5) beeinflussen erst dann die Breite der Ver-

teilung, wenn die Auszeiten ungefähr gleich groß oder größer sind als der mittlere, zeitliche Abstand zwischen zwei detektierten Photonen [81, 1]. In den FRET-Lösungsexperimenten beträgt der mittlere Abstand zwischen zwei Photonen ca. $10 \mu\text{s}$ (bei einer Zählrate von 100 kHz). Da die Tripletzeiten bei einer Anregung von $50 \mu\text{W}$ kleiner als $4 \mu\text{s}$ sind, sollte diese Dynamik keinen Einfluss auf die Breite der Transfereffizienz-Verteilung haben.

Obwohl die Bestimmung der Interkombinationsraten k_{ISC} mit einem großen Fehler behaftet ist, zeigt sie einen signifikanten Unterschied zwischen freiem und gebundenem Farbstoff. Durch die Bindung des Farbstoffes an ein Peptid kann durch Wechselwirkungen mit der Umgebung die Spin-Bahn-Kopplung erhöht werden und somit ist ein Übergang in den Tripletzustand wahrscheinlicher. Besonders deutlich ist der Einfluss der Bindung beim Akzeptor, da die Rate hier ca. 14 mal größer ist als beim freien Farbstoff.

Die leicht mit der Anregungsintensität ansteigenden Raten k_{rISC} weisen auf eine beschleunigte Rückinterkombination (accelerated rISC) hin [50]. Durch eine höhere Anregungsleistung werden öfter höhere Tripletzustände T_n besetzt, aus denen die Relaxation in den Grundzustand wahrscheinlicher ist. Somit steigt die Rate des reversen ISC.

5.3 Anisotropie

5.3.1 Messparameter für die Anisotropiemessung

Die Anisotropiemessungen wurden mithilfe eines zusätzlich integrierten, gepulsten Lasers (470 nm, 20 MHz) und einer speziellen Zählleinheit durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.1). Die Konzentration der Proben war so hoch gewählt, dass der Hintergrund keinen bzw. kaum Einfluss auf das Ergebnis hat. Die Laserleistung wurde zwischen $1 \mu\text{W}$ und $4 \mu\text{W}$ eingestellt. Um den sogenannten „Pile-Up“-Effekt² zu verhindern, durfte die Zählrate nicht mehr als 100000 Photonen pro Sekunde betragen.

In Abbildung 5.9 ist ein Histogramm einer Anisotropiemessung am Beispiel von AF488 ($1 \mu\text{M}$) in Propylenglykol gezeigt. Der grüne Graph stellt die Summe des Fluoreszenzabfalls der zur Anregung parallel polarisierten Signale I_p dar, der gelbe dementsprechend die Summe der senkrecht orientierten Signale I_s . Da die Ankunftszeiten der Signale aufgrund unterschiedlich langer Wege zu den Detektoren verschieden sind, wurde der Anstieg der Kurven zunächst übereinandergelegt. Dann wurde nach Gleichung 2.7 der Anisotropieabfall berechnet. Die Rotationskorrelationszeit τ_r wird aus einer Anpassung des Anisotropieabfalls $r(t)$ mit einer monoexponentiellen Funktion bestimmt:

$$r(t) = r_0 \cdot \exp(-t/\tau_r). \quad (5.6)$$

Um die statische Anisotropie r_0 (Abschnitt 2.1.6) zu berechnen, wird in Gleichung 2.7 nicht die zeitabhängige, sondern die mittlere Intensität der Kanäle eingesetzt. Eine Bestimmung

²Bei einer TCSPC-Messung (s. 3.3) kann zwischen den Triggersignalen nur ein Photon gemessen werden. Ein zweites, späteres Photon würde verloren gehen. Um diese Bevorzugung früher Photonen zu unterbinden, sollten im Mittel pro Laserpuls nur 0,1 bis 0,01 Photonen detektiert werden.

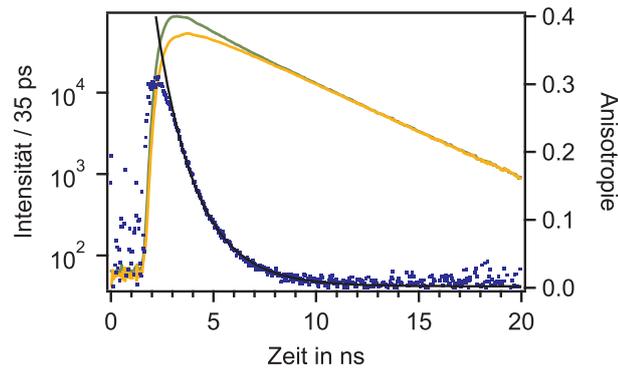


Abbildung 5.9: Beispiel einer Anisotropiemessung

Gezeigt ist eine Messung an dem freien Donorfarbstoff AF88 in Propylenglykol. Aus den Summen des Fluoreszenzabfalls der zur Anregung parallelen (grün) und senkrechten (gelb) Signale wird der Anisotropieabfall (blau) berechnet. Die Anpassung der Anisotropie erfolgt mit einer monoexponentiellen Funktion (schwarz). Die Rotationskorrelationszeit beträgt in diesem Beispiel 1,9 ns.

von r_0 aus Gleichung 5.6 ist ungenau, da der Zeitpunkt Null nicht exakt bekannt ist. Die Fehler aus der Anpassung der Rotationskorrelationszeit sind meist nicht signifikant und werden deswegen nicht angezeigt. Die Fehler der statischen Anisotropie können über eine Gaußsche Fehlerfortpflanzung mit einer Standardabweichung des Messsignals I von \sqrt{I} abgeschätzt werden (siehe Abschnitt 2.3.1). Daraus resultiert ein Fehler von ca. $\pm 0,05$ für Messungen in NaP-Puffer und TFE sowie $\pm 0,07$ in Propylenglykol.

Die Anisotropie gibt Aufschluss über die Depolarisation der Emission bezogen auf die Polarisation der Anregung (siehe Kapitel 2.1.6). Somit können depolarisierende Effekte des Aufbaus das Ergebnis verfälschen. Der Einfluss von Filtern und Strahlteilern wird, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, durch zweifache Anregung minimiert.

Im Allgemeinen wird zur Messung der Anisotropie ein Spektrometer mit einer Küvettenanordnung genutzt. Dabei erfolgt die Anregung sowie die Detektion mit linear polarisiertem, parallelem Licht. In dem genutzten konfokalen Aufbau wird das Licht jedoch durch ein Objektiv hoher numerischer Apertur fokussiert. Dadurch wird das linear polarisierte Licht teilweise depolarisiert, und die gemessene Anisotropie wäre kleiner als die wahre. Diese Depolarisationseffekte können mithilfe des Öffnungswinkels des Objektivs theoretisch korrigiert werden [43]. Für das Luftobjektiv mit einem Öffnungswinkel von $53,1^\circ$ reduziert sich demnach die Gesamtintensität in Gleichung 2.7, und die Anisotropie r wird wie folgt berechnet:

$$r = \frac{I_p - I_s}{I_p + 1,48I_s} \quad (5.7)$$

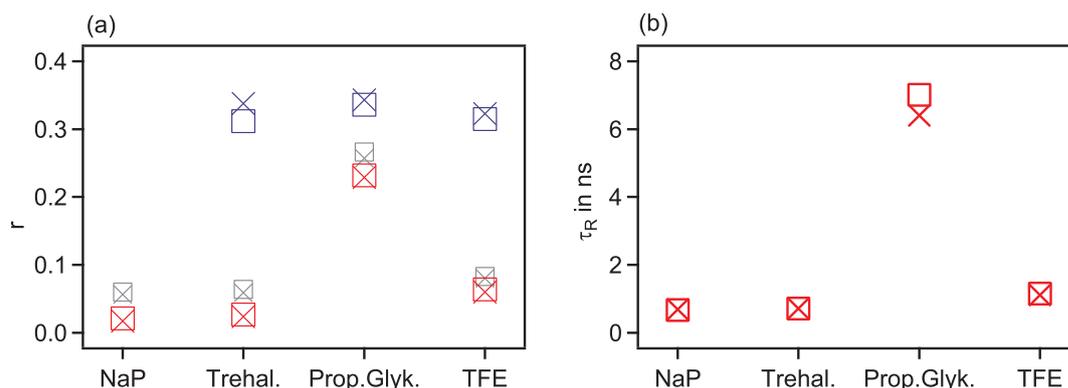


Abbildung 5.10: Anisotropie und Rotationskorrelationszeit von AF488

(a) Anisotropie des freien (Quadrat) und des an Prolin 6 gebundenen (Kreuz) Farbstoffs bei Raumtemperatur (rot) und bei 77 K (blau). Anisotropie bei Raumtemperatur ermittelt aus der Perrin-Gleichung (grau). (b) Rotationskorrelationszeit des freien (Quadrat) und des an Prolin 6 gebundenen (Kreuz) Farbstoffs bei Raumtemperatur (rot). Die hohe Viskosität von Propylenglykol ist für hohe Anisotropie- und Rotationskorrelationswerte verantwortlich. Bei 77 K ist die Rotation so stark eingeschränkt, dass eine Bestimmung von τ_r nicht möglich ist.

5.3.2 Anisotropie von freiem und gebundenem Alexa Fluor 488

Mithilfe des gepulsten Lasers konnte die Anisotropie und die Rotationskorrelationszeit des Donorfarbstoffes, AF488, unter verschiedenen Pufferbedingungen sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 77 K untersucht werden. Da kein gepulster Laser der Wellenlänge 594 nm zur Verfügung stand, konnten diese Messungen nicht für den Akzeptorfarbstoff, AF594, durchgeführt werden. Bei den Tieftemperaturmessungen wurde zur Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten eine Fläche abgerastert, da aufgrund von Bleichprozessen die emittierte Fluoreszenz aus einem Punkt nicht ausreichte, um ungefähr zehn Millionen Photonen zu sammeln.

In Abbildung 5.10a ist die statische Anisotropie des freien und des an Prolin 6 gebundenen Farbstoffs AF488 in den verschiedenen Pufferlösungen zu sehen. Die Konzentration des Farbstoffes betrug 200 nM bei Raumtemperatur und 1 μ M bei 77 K. Die Quadrate zeigen die Ergebnisse für den freien AF488 bei Raumtemperatur und bei 77 K. Die Kreuze stehen für den gebundenen Farbstoff, gemessen bei Raumtemperatur und bei 77 K.

Die Anisotropie bei Raumtemperatur in NaP-Puffer ist mit 0,02 sowohl für den freien als auch für den gebundenen Farbstoff klein, d. h. während der Anregungsdauer können sich beide komplett neu orientieren. Durch den Trehaloseanteil im NaP-Puffer vergrößert sich die Anisotropie nur minimal. Die Änderung der Viskosität des Puffers durch Trehalose spielt somit für so kleine Moleküle wie den freien Farbstoff sowie für die kurze Peptidkette kaum eine Rolle. In Propylenglykol hingegen ist die Änderung der Viskosität deutlich durch eine erhöhte Anisotropie zu erkennen. In TFE ist für beide Proben die Anisotropie nur geringfügig höher.

Im eingefrorenen Zustand wird aufgrund der hohen Anisotropiewerte auf einen unbewegli-

chen Zustand der Moleküle geschlossen. Dennoch wird die maximale Anisotropie von 0,4, die aus der Photoselektion resultiert (siehe Abschnitt 2.1.6), nicht erreicht. Auch im eingefrorenen Zustand gibt es zwischen freiem und gebundenem Farbstoff in Propylenglykol und in TFE kaum Unterschiede. Nur mit Trehalose ist die statische Anisotropie leicht verschieden.

Die Rotationskorrelationszeiten bei Raumtemperatur, gezeigt in Abbildung 5.10b, spiegeln die statischen Anisotropiewerte wider. In NaP-Puffer, mit und ohne Trehalose, sowie in TFE ist τ_r sehr kurz (≈ 1 ns). Im zähflüssigen Propylenglykol dagegen rotieren sowohl der freie als auch der gebundene Farbstoff sehr viel langsamer ($\tau_r \approx 7$ ns). Auffällig ist, dass in den wässrigen Lösungen kein Unterschied zwischen freiem und gebundenem Farbstoff auftritt. In Propylenglykol rotiert jedoch der an Prolin 6 gebundene Farbstoff trotz größerem Volumen etwas schneller. Begründet werden kann das durch eine eingeschränkte Beweglichkeit des gebundenen Farbstoffs. D. h., die Reorientierung in einem Raum weniger Freiheitsgrade erfolgt schneller als in einem Raum, in dem alle Freiheitsgrade gegeben sind [55]. Dieser Unterschied ist jedoch nur im viskosen Propylenglykol messbar.

Im eingefrorenen Zustand konnte die Rotationskorrelationszeit nicht bestimmt werden. In Abbildung 5.11 ist als Beispiel der Anisotropieabfall von AF488 an Prolin 6 in zwei Pufferlösungen bei Raumtemperatur und bei 77 K zu sehen. Durch die halblogarithmische Auftragung der Anisotropie ist der monoexponentielle Abfall linear dargestellt. Die Messung bei Raumtemperatur in Trehalose-Puffer zeigt im Vergleich zur Messung in Propylenglykol einen sehr schnellen Abfall der Anisotropie. Bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff befindet sich der Farbstoff in einer starren Umgebung, d. h. jegliche Rotation ist unterbunden, und somit bleibt die Anisotropie konstant. Sollte der Farbstoff bzw. die Peptidkette noch geringe Bewegungsfreiheiten besitzen, so sind diese, aufgrund der kurzen Fluoreszenzlebensdauer, zu langsam, um detektiert werden zu können.

Mithilfe der Rotationskorrelationszeit und der in Abschnitt 5.4 bestimmten Fluoreszenzlebensdauer kann die statische Anisotropie auch aus der Perrin-Gleichung (siehe Gleichung 2.10) berechnet und mit der oben ermittelten (nach Gleichung 2.7) verglichen werden. Als fundamentale Anisotropie r_0 wird 0,4 angenommen (siehe Abschnitt 2.1.6). In Abbildung 5.10a sind die so erhaltenen statischen Anisotropien für die Raumtemperaturmessungen mit eingezeichnet. Diese sind nur minimal höher als die zuvor bestimmten. Die geringe Abweichung kann ein Hinweis auf eine kleinere fundamentale Anisotropie oder auf Ungenauigkeiten bei der Bestimmung von τ_r und der Lebensdauer τ sein, soll hier aber nicht weiter betrachtet werden.

5.3.3 Anisotropie von Alexa Fluor 488 an doppelt markierten Polypeptidketten

Nach den Messungen am einfach markierten Peptid erfolgten Messungen an den Donor-Akzeptor gelabelten Peptiden. Neben einer veränderten Rotationsdiffusion aufgrund größerer Moleküle hat jetzt auch der Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor Einfluss

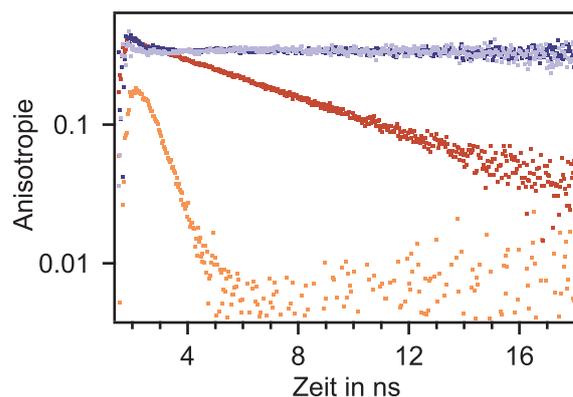


Abbildung 5.11: Anisotropie bei Raumtemperatur und bei 77 K

Anisotropieabfall (halblogarithmisch aufgetragen) von AF488 gebunden an Prolin 6 bei Raumtemperatur in Trehalose-Puffer (orange) und in Propylenglykol (rot), sowie bei 77 K in Trehalose-Puffer (hellblau) und in Propylenglykol (dunkelblau). Die Messungen bei Raumtemperatur zeigen einen sehr schnellen (in Trehalose) und einen durch höhere Viskosität bedingten (in Propylenglykol) langsameren Abfall der Anisotropie mit der Zeit. Bei 77 K bleibt die Anisotropie dagegen konstant, d. h. alle Bewegungen sind eingefroren.

auf die Anisotropie. Da durch den Energietransfer die im Donorkanal detektierte Intensität sinkt, insbesondere bei Prolin 6, wurden die Konzentrationen für die Anisotropiemessung auf $1 \mu\text{M}$ (Prolin 6) und auf 500 nM (Prolin 20) erhöht. Die Anregungsleistung betrug $2 \mu\text{W}$.

In Abbildung 5.12 ist sowohl die statische Anisotropie (a) als auch die Rotationskorrelationszeit (b) für Prolin 6 und Prolin 20 bei Raumtemperatur gezeigt. Die Quadrate stehen für Prolin 6 und die Kreise für Prolin 20. Wie bereits beim einfach markierten Prolin 6 ist die statische Anisotropie in NaP-Puffer mit und ohne Trehalose am kleinsten, in Propylenglykol am größten, und die Messung in TFE ordnet sich mittig ein. Insgesamt sind die Werte größer als am einfach markierten Peptid. Für Prolin 20 sind die Änderungen der Anisotropie analog; die Werte liegen jedoch alle unter denen von Prolin 6.

Die Rotationskorrelationszeiten des Donorfarbstoffs in Abbildung 5.12b zeigen, wie erwartet, das gleiche Verhalten wie am einfach markierten Peptid. Durch den Einfluss des Energietransfers sind diese Zeiten, insbesondere bei Prolin 6, etwas langsamer.

Auch hier erfolgte die Bestimmung der statischen Anisotropie zum Vergleich zusätzlich mit der Perrin-Gleichung (siehe Abbildung 5.12a). Während die so ermittelte Anisotropie bei Prolin 6 etwas kleiner ist, stimmt sie bei Prolin 20 recht gut mit den anderen Werten überein.

5.3.4 Diskussion der Anisotropie der markierten Peptidketten

Die Anisotropie, die ein Maß für die Änderung der Orientierung des Absorptions- zum Emissionsdipol darstellt, gibt Auskunft über die Beweglichkeit eines Farbstoffes in seiner Umgebung (siehe Abschnitt 2.1.6). Ist er frei, können Rückschlüsse auf die (lokale) Viskosität seiner Umgebung gezogen werden [150]. Ist der Farbstoff an einem Makromolekül, z. B.

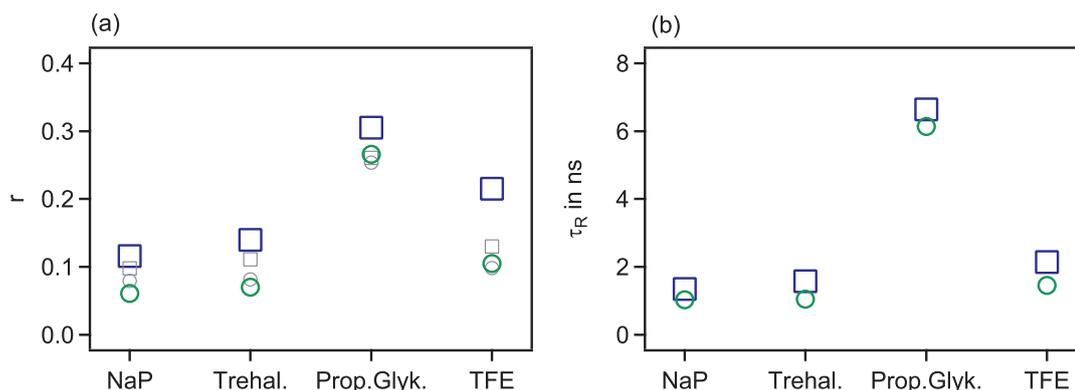


Abbildung 5.12: Anisotropie und Rotationskorrelationszeit an Prolin 6 und Prolin 20

(a) Anisotropie von Prolin 6 (blaue Quadrate) und von Prolin 20 (grüne Kreise) in verschiedenen Lösungen. Durch die hohe Transferrate bei Prolin 6 ist der angeregte Zustand des Donors kürzer. Der Donor kann sich nicht mehr vollständig reorientieren und die Anisotropie steigt. Durch den geringeren Energietransfer bei Prolin 20 ist, trotz gleicher Bindungsart des Donors, seine Anisotropie kleiner. Die aus der Perrin-Gleichung ermittelte Anisotropie ist in grau dargestellt. (b) Rotationskorrelationszeit von Prolin 6 (blaue Quadrate) und von Prolin 20 (grüne Kreise) in verschiedenen Lösungen. Auch hier suggeriert die hohe Transfereffizienz eine langsamere Rotationskorrelationszeit des kürzeren Peptids.

einem Protein, gebunden, charakterisiert die Anisotropie auch die Bindungseigenschaften. Neben der Depolarisation durch die Rotationsdiffusion des Makromoleküls kann erkannt werden, ob der Farbstoff frei am Molekül rotiert oder eher starr gebunden ist. Wenn die Farbstoffe ohne Orientierungsmöglichkeit am Molekül gebunden sind, kann das Einfluss auf die Transfereffizienz haben, da ein mittlerer Orientierungsfaktor von $2/3$ nicht mehr gerechtfertigt ist [10, 130, 93] (siehe 2.1.7).

Um die Bindung des Donors, der über ein Maleimid mit dem C-terminalen Cystein verbunden ist, zu charakterisieren, wurde die Anisotropie am freien und am gebundenen Farbstoff bestimmt. Bei Raumtemperatur zeigen die Anisotropie und die Rotationskorrelationszeiten keinen Unterschied zwischen gebundenem und ungebundenen Farbstoff. Da die Ausdehnung von Prolin 6 jedoch mit ca. 2 nm Länge ungefähr der des Farbstoffs entspricht, kann es sowohl in wässriger Lösung als auch in Propylenglykol ähnlich schnell rotieren wie der Farbstoff. Dadurch kann nicht direkt eine Aussage über die Bindung getroffen werden. Durch molekular dynamische Studien ist jedoch bekannt, dass die fünffache Kohlenstoffbindung des Donors sehr flexibel ist [11]. Die Bindung des Akzeptors, die hier nicht untersucht werden konnte, ist hingegen, mit einer zweifachen Kohlenstoffbindung am N-terminalen Glyzin, weniger flexibel. Dennoch ist ein Orientierungsfaktor von $2/3$ gerechtfertigt, da er sich selbst bei nur einem flexiblen Linker maximal auf 0,63 reduzieren würde [10].

Interessant sind die Ergebnisse der Messung bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff. Bei dieser Temperatur sollte jegliche Bewegung des Fluorophors und des Peptids in seiner Umgebung ausgeschlossen sein. Dennoch erreicht die Anisotropie nicht den maximalen Wert von 0,4. Die Depolarisation der Anregung durch das Objektiv hoher numerischer

Apertur wurde korrigiert. Sehr wahrscheinlich wird die Anisotropie durch Photoblinken (siehe Abschnitt 2.1) reduziert [150, 148]. Durch Elektronentransport vom umgebenden Medium kann der Farbstoff in einen radikal-ionischen Zustand übergehen; d. h. er geht in einen Dunkelzustand über. Da dieser Übergang bei einer hohen Anregungsrate wahrscheinlicher ist, gehen hauptsächlich Moleküle, deren Absorptionsdipol parallel zur Anregung ist, in diesen über. Dadurch sinkt das Verhältnis I_p/I_s , und somit auch die nach Gleichung 5.7 berechnete Anisotropie. Dieses Blinken ist durch die hohe Anzahl an Fluorophoren in dieser Ensemblemessung nicht sichtbar, wird jedoch bei den Einzelmolekülmessungen deutlich. Eine maximale Anisotropie von 0,4 setzt auch voraus, dass die Übergangsdipolmomente der Absorption und der Emission parallel sind. Bei AF488 ist kein Unterschied bekannt. Die Anregung des Farbstoffs bei 470 nm erfolgt außerdem in den ersten elektronischen Zustand, und da nach Kashas Regel die Emission auch immer aus diesem erfolgt, sind die Momente parallel zueinander. Ein Winkelunterschied der beiden Momente, der z. B. bei einer Anisotropie von 0,33 schon ca. 20° (nach 2.9) betragen würde, kann die geringe Anisotropie im eingefrorenen Zustand nicht erklären. Weitere Gründe für eine Depolarisation können Streulicht, Reabsorption, Energietransfer sowie Ungenauigkeiten der polarisierenden Optiken sein. Durch die sehr dünne Schicht und die relativ geringe Konzentration wird Reabsorption sowie Energietransfer zwischen zwei Farbstoffen, der erst bei Konzentrationen im millimolaren Bereich auftritt [71], ausgeschlossen. Inwieweit die amorphe Schicht sowie der sich darüber befindende Stickstoff streuen, könnte anhand einer Messung nur mit Trehalose-Puffer untersucht werden. Diese Messung wurde jedoch nicht durchgeführt.

Die Messungen der Anisotropie an den doppelt markierten Peptidketten zeigen, dass der Energietransfer bei der Interpretation der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden kann. In allen Lösungen zeigt sich, dass, im Vergleich zum einfach markierten Polyprolin, die Anisotropie steigt, insbesondere bei der kürzeren Kette Prolin 6. Das ist bei diesen kleinen Peptiden (um 1-2 kDa) nicht auf eine veränderte Beweglichkeit des Moleküls durch einen weiteren, gebundenen Farbstoff zurückzuführen. Durch die hohe Transfereffizienz bei Prolin 6 emittiert hauptsächlich der Akzeptor. Umso länger sich der Donor im angeregten Zustand befindet, desto wahrscheinlicher ist ein Energietransfer. Photonen, die der Donor emittiert, besitzen somit eine sehr kurze Lebensdauer, in der der Donor sich nicht vollständig drehen kann, d. h. die Anisotropie steigt. Dieser Effekt ist bei Prolin 20 aufgrund einer geringeren Transferrate weniger stark ausgeprägt.

5.4 Fluoreszenzlebensdauer

5.4.1 Messparameter

Die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffs unter verschiedenen Bedingungen wurde aus den Daten der Anisotropiemessungen (siehe Abschnitt 5.3) bestimmt. In Abbildung 5.13 ist eine Messung der Lebensdauer am Beispiel von AF488 in Propylenglykol gezeigt.

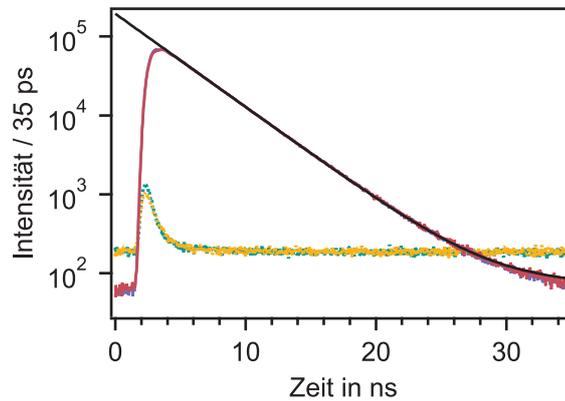


Abbildung 5.13: Messung der Fluoreszenzlebensdauer

Beispiel einer Fluoreszenzlebensdauerermessung an AF488 in Propylenglykol bei horizontal linear (rot) und vertikal linear (blau) polarisierter Anregung. Die Anpassung der Daten erfolgte mit einer monoexponentiellen Funktion (schwarz). Die Instrument-Antwort-Funktion, bei horizontaler Anregung in gelb und in vertikaler grün, wurde in Wasser gemessen. Durch die lange Messzeit ist der Hintergrund über den ganzen Zeitbereich sehr hoch.

Die gemessenen Intensitäten beider APD wurden je für die horizontal linear und für die vertikal linear polarisierte Anregung addiert, um den Einfluss des polarisierenden Strahlteilers zu entfernen. Der Laufzeitunterschied zwischen beiden APD wurde bereits vor der Addition korrigiert. Wie erwartet ist kein Unterschied zwischen beiden Anregungen zu sehen. Zur weiteren Auswertung wurden die Daten der horizontalen Anregung verwendet. Der Fluoreszenzabfall $I(t)$, in Abbildung 5.13 halb-logarithmisch dargestellt, wurde mit einer monoexponentiellen (5.8) oder doppeltexponentiellen (5.9) Funktion mithilfe von IGOR Pro angepasst, um die Fluoreszenzlebensdauer τ_F zu bestimmen:

$$I(t) = I_0 + I_1 \cdot \exp(-t/\tau_{F1}) \quad (5.8)$$

bzw.

$$I(t) = I_0 + I_1 \cdot \exp(-t/\tau_{F1}) + I_2 \cdot \exp(-t/\tau_{F2}). \quad (5.9)$$

I_0	... Hintergrundintensität
I_1	... Intensität Spezies 1
I_2	... Intensität Spezies 2
τ_{F1}	... Lebensdauer Spezies 1
τ_{F2}	... Lebensdauer Spezies 2

Der Hintergrund der Messung, der verhindert, dass die Intensität auf Null abfällt, wird mit I_0 korrigiert.

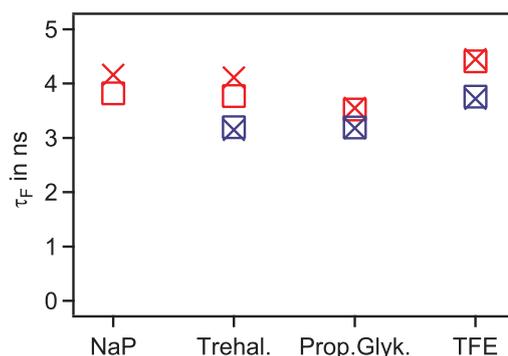


Abbildung 5.14: Fluoreszenzlebensdauer des freien und des gebundenen AF488

Fluoreszenzlebensdauer von freiem (Quadrate) und an Prolin 6 gebundenen (Kreuze) AF488 bei Raumtemperatur (rot) und bei 77 K (blau). Deutlich ist, dass die Fluoreszenzlebensdauer bei 77 K in allen Medien kleiner ist als bei Raumtemperatur.

Die Instrument-Antwort-Funktion³ (IRF) wurde unter den gleichen Bedingungen der anderen Messungen für 40 Minuten in Wasser gemessen und ist in Abbildung 5.13 für horizontale und vertikale Anregung zu sehen. Durch die lange Messzeit ist der Hintergrund außerhalb des Laserpulses höher als bei einer normalen Messung.

Der gemessene Fluoreszenzabfall ist eine Faltung aus der IRF und dem wahren Fluoreszenzabfall. Da der Einfluss der IRF auf alle Messungen gleich ist, und für diese Arbeit nur relative Änderungen von Bedeutung sind, erfolgt die Anpassung der Kurven ohne Faltung. Die Fehler der Lebenszeiten, die aus der Anpassung resultieren, sind sehr klein und werden deswegen nicht mit aufgeführt.

5.4.2 Fluoreszenzlebensdauer des freien und des gebundenen Farbstoffs Alexa Fluor 488

Die Fluoreszenzlebensdauer von freiem AF488 beträgt in Puffer laut Hersteller (Molecular Probes) 4,1 ns bei Raumtemperatur. Die Ergebnisse der Messungen bei Raumtemperatur sowie bei 77 K sind in Abbildung 5.14 für den freien und für den an Prolin 6 gebundenen Farbstoff dargestellt. In NaP-Puffer sowie in Trehalose-Puffer weicht die gemessene Lebensdauer des freien Donors mit 3,8 ns nur gering ab, was wahrscheinlich auf die fehlende Faltung der Instrument-Antwort-Funktion zurückzuführen ist. Durch die Bindung des Farbstoffes an die Peptidkette erhöht sich die Lebensdauer mit und ohne Trehalose auf 4,1 ns. In Propylenglykol verringert sich die Lebensdauer des freien und des gebundenen Farbstoffs auf 3,6 ns, während sie sich in TFE auf 4,5 ns erhöht.

Ist der Donor bei 77 K eingefroren, reduziert sich die Fluoreszenzlebensdauer in Trehalose und Propylenglykol auf 3,2 ns und in TFE auf 3,8 ns (keine Messung in NaP-Puffer).

³Die Instrument-Antwort-Funktion entspricht der Kurve, die ohne eine fluoreszierende Probe gemessen wird. Der entstehende Abfall gibt das kürzeste Zeitprofil, das gemessen werden kann, wieder, und seine Breite wird durch Detektoreigenschaften und der Messelektronik bestimmt [71].

Tabelle 5.1: Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute AF488

		NaP-Puffer	Treha-Puffer	TFE	Propylenglykol
AF488	τ_0 in ns	3,8	3,8	4,4	3,5
300 K	Q	0,84	0,84	0,98	0,78
Pro6AF488	τ_0 in ns	4,2	4,1	4,5	3,6
300 K	Q	0,93	0,91	1,00	0,80
AF488	τ_0 in ns	-	3,2	3,8	3,2
77 K	Q	-	0,71	0,84	0,71
Pro6AF488	τ_0 in ns	-	3,2	3,7	3,2
77 K	Q	-	0,71	0,82	0,71

Fluoreszenzquantenausbeute Mithilfe der bestimmten Fluoreszenzlebenszeiten des freien und des gebundenen Donors können Rückschlüsse auf seine Quantenausbeute gezogen werden. Da eine genaue Bestimmung der Quantenausbeute nicht durchgeführt wurde, erfolgt sie so indirekt über Gleichung 2.5, $\tau_n = \tau_0/\Phi_F$. Dabei wird die natürliche Lebensdauer τ_n zunächst aus den Herstellerdaten berechnet. Dieser gibt bei einer Lebensdauer von 4,1 ns (pH 7,4, 20 °C) eine Quantenausbeute von 0,92 (pH 7,2, 22 °C, 50 mM KaliumPhosphat, 100 mM NaCl) an. Daraus folgt eine natürliche Lebensdauer von 4,5 ns. Unter der Annahme, dass die strahlende Rate konstant bleibt, ergeben sich die in Tabelle 5.1 zusammengefassten Quantenausbeuten des Donors in den verschiedenen Lösungsmitteln.

5.4.3 Fluoreszenzlebensdauer des Donors an den doppelt markierten Peptidketten

Durch die Anwesenheit des Akzeptors und die dadurch entstehende, zusätzliche Möglichkeit des Donors, über Energietransfer in den Grundzustand zurückzukehren, verkürzt sich dessen Fluoreszenzlebenszeit. In Abbildung 5.15a ist am Beispiel von Prolin 6 der Unterschied der Lebenszeiten des Donors mit und ohne Akzeptor zu sehen. Der Fluoreszenzabfall des Donorfarbstoffs an Prolin 6 ohne Akzeptor zeigt einen monoexponentiellen Verlauf. Deutlich dagegen ist der doppeltexponentielle Abfall des Peptids mit Akzeptor zu sehen. Der schnelle Abfall bei den kurzen Zeiten entspricht der Lebenszeit des Donors mit Akzeptor in der Nähe. Moleküle, die keinen Akzeptor tragen oder deren Akzeptor gebleicht ist, sind für den anschließenden, langsameren Abfall verantwortlich.

Die ermittelten Lebenszeiten in verschiedenen Puffern sind in Abbildung 5.15b für Prolin 6 und Prolin 20 gezeigt. Die längere Lebenszeit, die der an den einzeln markierten Peptiden bestimmten Lebenszeit entspricht, wurde während der Anpassung an einen doppeltexponentiellen Verlauf für beide Peptide fest gehalten. Bei Prolin 6 verkürzt sich die Donorlebensdauer bei Anwesenheit des Akzeptors sowohl in Puffer mit und ohne Trehalose sowie in TFE auf 0,8 ns. In Propylenglykol ist sie mit 1,1 ns etwas länger. Bei Prolin 20 verkürzt sich die Lebensdauer auch, jedoch durch eine geringere Transfereffizienz weniger stark, auf 2 ns bis 3 ns.

Mithilfe der Fluoreszenzlebenszeiten des Donors kann die Transfereffizienz der beiden Pep-

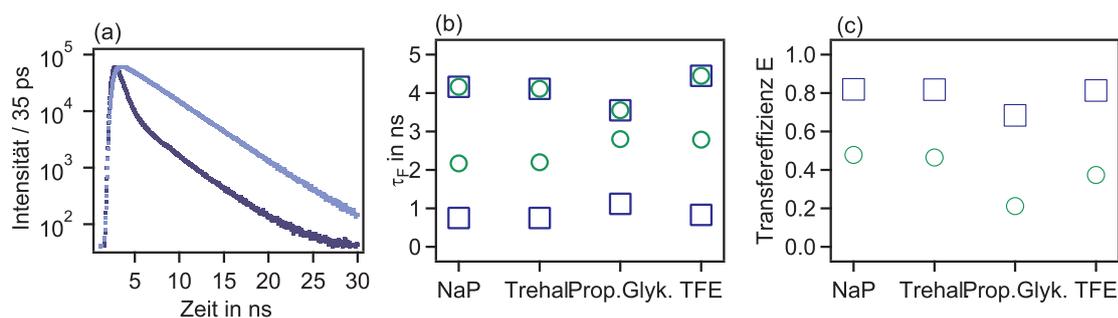


Abbildung 5.15: Fluoreszenzlebensdauer des Donors an Prolin 6 und Prolin 20

(a) Monoexponentielle Abklingkurve von Pro6 AF488 (hellblau) im Vergleich zur doppelt-exponentiellen von Prolin 6 (dunkelblau). Die schnelle Lebenszeit entsteht durch den Energietransfer zum Akzeptor; die langsame entspricht der ohne aktiven Akzeptor. (b) Dargestellt ist die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffs an doppelt markiertem Prolin 6 (blaues Quadrat) und Prolin 20 (grüne Kreise) bei Raumtemperatur. Zu sehen sind immer zwei Lebenszeiten; die lange entspricht der ohne Energietransfer (Moleküle ohne aktiven Akzeptor) und die kurze Lebenszeit der des Donors mit Energietransfer. (c) Die aus den Lebenszeiten bestimmten Transfereffizienzen von Prolin 6 (blaues Quadrat) und Prolin 20 (grüner Kreis).

tide nach Gleichung 2.20, $E = 1 - \tau_{DA}/\tau_D$, bestimmt werden. In Abbildung 5.15c sind die berechneten Transfereffizienzen dargestellt. Wie bereits anhand der Lebenszeiten sichtbar wurde, zeigt Prolin 6 in allen Lösungsmitteln eine hohe Transfereffizienz von 0,8. In Propylenglykol ist sie etwas geringer. Bei Prolin 20 wird in wässriger Lösung eine Transfereffizienz von 0,5 erhalten. Während in TFE die Effizienz auf 0,37 sinkt, zeigt sich in Propylenglykol eine weitere Abnahme auf 0,21.

5.4.4 Diskussion der Fluoreszenzlebenszeiten

Zunächst wurde untersucht, ob die Bindung des Donorfarbstoffes an das Peptid einen Einfluss auf dessen Fluoreszenzlebensdauer und damit auf seine Quantenausbeute hat. Bei Raumtemperatur in wässriger Lösung mit und ohne Trehalose zeigt sich, dass die Lebensdauer am Peptid leicht erhöht ist. Folglich ist somit, unter der Annahme, dass die strahlende Rate konstant bleibt, auch die Quantenausbeute nach Gleichung 2.5 im gebundenen Zustand größer als im freien. Durch die Nähe des Peptids ändert sich die unmittelbare Umgebung des Farbstoffs, sodass die Wahrscheinlichkeit für einen strahlungslosen Übergang in den Grundzustand sinkt und die Lebensdauer steigt [123, 71]. In Propylenglykol und in TFE scheint der Einfluss des Lösungsmittels auf die Lebensdauer des Fluorophors größer zu sein als dessen Bindung an ein Peptid, sodass sich die Lebensdauer durch die Bindung nicht ändert. Die kürzere Lebensdauer in Propylenglykol ist wahrscheinlich auf den größeren Brechungsindex (1,43) im Vergleich zu Wasser (1,33) zurückzuführen. Es ist bekannt, dass die Fluoreszenzlebensdauer mit steigendem Brechungsindex sinkt [71]. Die höhere Lebensdauer des Donors in TFE kann somit mit dem geringeren Brechungsindex (1,29) erklärt werden.

Bei den Tieftemperaturexperimenten zeigt sich für die Lebensdauer in allen Lösungen kein Unterschied zwischen dem gebundenen und dem freien Farbstoff. Auffällig ist jedoch, dass die Lebensdauer im Vergleich zu den Raumtemperaturexperimenten in allen Medien kürzer wird. Im Allgemeinen sind die radiativen und die nicht-radiativen Raten von der Schwingungsenergie des angeregten Zustands und dem Ausmaß der Lösungsmittelrelaxation abhängig [118]. Daraus folgt, dass die Lebensdauer sowie die Quantenausbeute temperatur- und lösungsmittelabhängig sind. Ungewöhnlich ist jedoch eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer bei tiefen Temperaturen. Zum Einen wird argumentiert, dass sich in einer stabilen Matrix die Photostabilität erhöht, da Wechselwirkungen und somit strahlungslose Prozesse reduziert werden, und die Lebensdauer steigt [74, 128]. Zum Anderen werden dynamische Lösungsmittelleffekte aufgeführt [118]. Eine mögliche Erklärung für kürzere Lebenszeiten ist die Bildung von Aggregaten bei tiefen Temperaturen, die gegenseitig die Fluoreszenz löschen und somit die Lebenszeit verkürzen [74]. Da sich aber die Emissionsspektren bis auf eine Blauverschiebung nicht verändert haben (siehe Abschnitt 5.1) und auch die Konzentration der Lösung relativ gering war, ist Aggregation als Ursache unwahrscheinlich.

Die kürzeren Fluoreszenzlebenszeiten bei 77 K lassen sich nur erklären, indem die nähere Umgebung der Farbstoffe betrachtet wird. Im Vergleich zu Messungen in Lösung bei Raumtemperatur befinden sich die Moleküle nicht mehr in einem homogenen Medium, sondern in der Nähe zweier Grenzschichten. Diese Grenzschichten entstehen durch die unterschiedlichen Brechungsindizes von Glas, amorphem Eis und flüssigem Stickstoff. Die Farbstoffe sind in amorphem Eis eingebettet ($n = 1,31$), welches zum Einen von Glas mit einer höheren optischen Dichte ($n = 1,5$) und zum Anderen von flüssigem Stickstoff niedriger optischer Dichte ($n = 1,21$) begrenzt wird. Die Änderung der Fluoreszenzabklingraten in Abhängigkeit vom Abstand zu diesen Grenzschichten wurde von Kreiter [68] untersucht und ist in Abbildung 5.16 dargestellt. Befindet sich der emittierende Dipol im optisch dünneren Medium, so steigt seine Abklingrate, umso näher er der Grenzschicht kommt. Da die Fluoreszenzabklingrate invers proportional zur Fluoreszenzlebensdauer ist, sinkt die Lebensdauer in der Nähe der Grenzschicht [68]. Somit wird angenommen, dass die Verkürzung der Lebenszeiten bei 77 K durch die Nähe der Grenzschicht zwischen Glas und Eis verursacht wird. Der Brechungsindexunterschied zum flüssigen Stickstoff ist kleiner, sodass nur von einem geringen Einfluss ausgegangen wird.

Die Messungen der Fluoreszenzlebenszeiten an den doppeltmarkierten Polyprolinen zeigen, welchen Einfluss die unterschiedlichen Medien auf den Energietransfer haben, sodass erste Rückschlüsse auf die Struktur der Polyproline gezogen werden können. In den wässrigen Lösungen sinkt die Fluoreszenzlebensdauer des Donors aufgrund der hohen Transfereffizienz; bei Prolin 6 durch den kurzen Abstand der Fluorophore viel stärker als bei Prolin 20. Trehalose hat dabei keinen Einfluss auf die Farbstoffe oder auf ihre Abstände. In Propylen glykol hingegen sinkt die Lebensdauer für beide Peptide weniger, d. h. die Transfereffizienz ist kleiner. Diese geringere Transfereffizienz weist auf eine geweitete Konformation beider

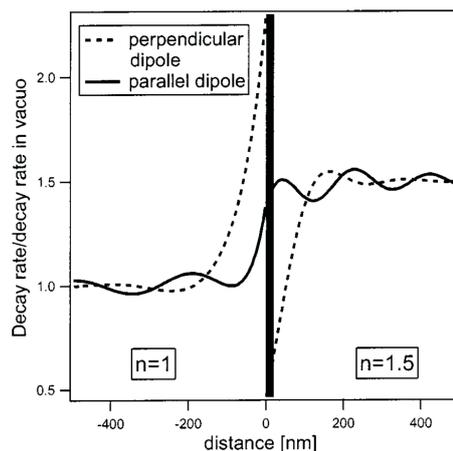


Abbildung 5.16: Fluoreszenzabklingraten an einer Grenzschicht

In der Nähe einer Grenzschicht (schwarzer, vertikaler Balken) zwischen zwei Medien unterschiedlicher Brechungsindizes ($n_1 = 1$, $n_2 = 1,5$) ändern sich die Fluoreszenzabklingraten (decay rate) eines emittierenden Dipols in Abhängigkeit vom Abstand (distance). Der Verlauf ist für zur Grenzschicht parallel orientierte (durchgezogene Linien) und für senkrecht orientierte (gestrichelte Linien) Dipole dargestellt. Nähert sich ein Dipol vom optisch dünneren Medium der Grenzschicht, so steigt seine radiative Rate für beide Dipolorientierungen an; die Fluoreszenzlebenszeit sinkt. Grafik entnommen aus [68].

Peptide hin. In TFE zeigt sich diese Aufweitung nur bei Prolin 20 und ist ein Indiz für eine konformationelle Änderung, die bei längeren Peptiden wahrscheinlicher ist. Es ist bekannt, dass Polyprolin in TFE ausschließlich in *trans*-Konformation vorliegt [23, 11] (siehe 3.4). Durch fehlende *cis*-Konformationen liegt Prolin 20 somit nur in gestreckter Form vor, und damit sinkt der Anteil mit hoher Transfereffizienz.

Weitere Schlussfolgerungen zu den Transfereffizienzen, die aus der Lebensdauer bestimmt wurden, erfolgen in Kapitel 6.2. Dort werden sie mit den mittleren Transfereffizienzen aus Einzelmolekülmessungen verglichen.

5.5 Zusammenfassung der photophysikalischen Eigenschaften

Die Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe unter verschiedenen Bedingungen ist für eine korrekte Analyse der FRET-Experimente wichtig. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf dem Energietransfer in amorphem Eis liegt, ist vor allem der Einfluss des Kryogens Trehalose im Messpuffer interessant. Die Messungen zeigen, dass 7,5% Trehalose bei Raumtemperatur weder die Spektren noch die Fluoreszenzlebensdauer der Farbstoffe verändert. Die Anisotropie-Messungen belegen, dass eine Mittelung des Orientierungsfaktors κ^2 mit und ohne Trehalose gerechtfertigt ist, da die Rotationskorrelationszeit (1 ns) kürzer als der angeregte Zustand (4 ns) ist.

Mithilfe der Quantenausbeuten, bestimmt aus den Fluoreszenzlebensdauern, und der Spektren können die Förster-Radien für die entsprechenden Lösungsmittel bei Raumtemperatur

berechnet werden. Da die Anisotropie in Propylenglykol aufgrund der hohen Viskosität sehr hoch ist, sollte berücksichtigt werden, dass eine Mittelung von κ^2 die Ergebnisse verfälschen könnte.

Beide Farbstoffe weisen bei Raumtemperatur eine ausgeprägte Triplettcharakteristik auf. Der Aufenthalt eines Farbstoffes im Triplettzustand ist jedoch so kurz, dass ein Einfluss auf Transfereffizienz-Verteilungen ausgeschlossen werden kann.

Bei den Tieftemperaturexperimenten muss die Blauverschiebung des Emissionsspektrums des Donors bei der Berechnung des Förster-Radius im Überlappungsintegral berücksichtigt werden. Aus der geringeren Fluoreszenzlebensdauer wird auf eine kleinere Quantenausbeute bei 77 K geschlossen. Für den Orientierungsfaktor wird aufgrund der hohen Anisotropie die statische Verteilung angenommen.

6 Energietransfer bei 300 K und 77 K

6.1 Parameter für FRET-Experimente

6.1.1 Detektionseffizienzen und Quantenausbeuten

In dieser Arbeit wird die Transfereffizienz aus dem Verhältnis von Akzeptorsignal zum Gesamtsignal nach Gleichung 2.19 bestimmt. Die detektierten Fluoreszenzintensitäten entsprechen jedoch nicht den emittierten, da auf dem Weg vom Emittor zum Detektor zahlreiche Photonen absorbiert bzw. gestreut werden. Neben den Transmissionseigenschaften des Dichroits und der Bandpassfilter trägt auch die Detektion mit einer APD zu Verlusten bei. Die daraus resultierenden Detektionseffizienzen des Donor- und des Akzeptorkanals, sowie die Quantenausbeuten der Farbstoffe, werden durch den Korrekturterm γ bei der Berechnung der Transfereffizienz beachtet:

$$E = \frac{N_A}{N_A + \gamma N_D} \quad (6.1)$$

$$\gamma = \frac{\eta_A \Phi_A}{\eta_D \Phi_D} \quad (6.2)$$

N_A, N_D ... Anzahl der Photonen im Akzeptor- bzw. Donorkanal

γ ... Korrekturfaktor

η_A, η_D ... Detektionseffizienz des Akzeptor- bzw. Donorkanals

Φ_A, Φ_D ... Quantenausbeute des Akzeptors bzw. des Donors

In Abbildung 6.1a sind zur Veranschaulichung die Transmissionseigenschaften der im Aufbau integrierten Filter sowie die Quanteneffizienz der APD dargestellt. Deutlich ist, dass ca. 40% der Donoremission und ca. 30% der Akzeptoremission durch die Detektionseigenschaften der APD verloren gehen. Werden zusätzlich, wie in Abbildung 6.1b zu sehen, die Filtereigenschaften auf die Emissionsspektren angewendet, so werden reduzierte „Emissionsspektren“ erhalten, die den Anteil der detektierten von der gesamten Emission darstellen. Bei Raumtemperaturmessungen werden danach im Donorkanal nur noch 40,9% aller Donorphotonen und im Akzeptorkanal 41,0% aller Akzeptorphotonen detektiert. Damit sind die Korrekturfaktoren $\eta_A = 0,410$ und $\eta_D = 0,409$. Bei Messungen in flüssigem Stickstoff muss die Blauverschiebung der Emissionsspektren beachtet werden. Diese sind in Abbildung 6.1b in hellblau für die jeweiligen Farbstoffe dargestellt. Der Anteil, der noch von der Emission detektiert wird, ist jetzt noch geringer. Die Korrekturfaktoren bei 77 K

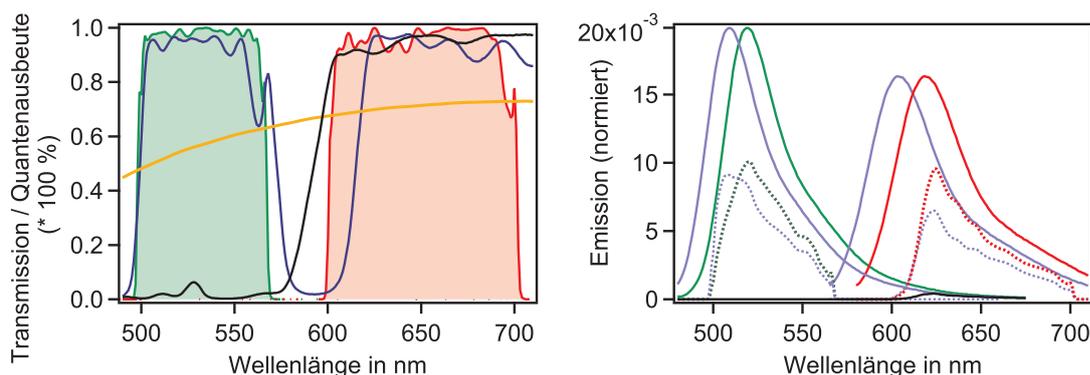


Abbildung 6.1: Transmission der Filter und Detektionseffizienzen

(a) Transmissionseigenschaften des Donorfilters HQ532/70 (grün), des Akzeptorfilters HQ650/100 (rot), des Dichroits Z488-594 (blau) und des Langpassfilters ST595 (schwarz) sowie die Quanteneffizienz der APD (gelb). (b) Die Emissionsspektren des Donors (grün) und des Akzeptors (rot), mit einer Normierung der Flächen auf Eins, sind durchgezogen gezeigt. Durch die Transmissionseigenschaften der Filter und die Quanteneffizienz der APD wird jedoch nur ein Teil der Emission (gepunktet) detektiert. Der Cross-Talk des Donors im Akzeptorkanal ist schwarz dargestellt. Bei 77 K sind die Emissionsspektren blau verschoben (durchgezogene, hellblaue Linien). Der Anteil der detektierten Emission ist geringer als bei 300 K (gepunktet hellblau).

betragen damit $\eta_A = 0,288$ und $\eta_D = 0,371$.

Die Quantenausbeuten der Farbstoffe in den verschiedenen Medien bei Raumtemperatur und bei 77 K wurden mithilfe der Fluoreszenzlebensdauern in Abschnitt 5.4, Tabelle 5.1, bestimmt.

Des weiteren muss bei jeder Messung der Hintergrund sowie der Anteil von Photonen im „falschen“ Kanal, der sogenannte Cross-Talk, beachtet werden. Durch eine Messung des nur donor- bzw. nur akzeptormarkierten Peptids wurde der Anteil der Donorphotonen im Akzeptorkanal auf 3,6% bestimmt, während der Anteil von Akzeptorphotonen im Donorkanal vernachlässigbar klein ist. Diese 3,6% werden dem Donorsignal hinzugefügt und dem Akzeptorsignal abgezogen. Der Hintergrund, für das jeweilige Lösungsmittel separat gemessen, wird von den Signalen abgezogen. Die vollständig korrigierte Transfereffizienz ergibt sich zu:

$$E = \frac{(N_A - HG_A - 0,036 \cdot N_D)}{(N_A - HG_A - 0,036 \cdot N_D) + \gamma (N_D - HG_D + 0,036 \cdot N_D)} \quad (6.3)$$

N_A, N_D	... Anzahl der Photonen im Akzeptor- bzw. Donorkanal
HG_A, HG_D	... Hintergrund im Akzeptor- bzw. Donorkanal
γ	... Korrekturfaktor
$0,036 \cdot N_D$... Anteil der Donorphotonen im Akzeptorkanal

Die Transfereffizienz wird für jeden Datenpunkt einer transienten Fluoreszenzintensität, die die detektierten Photonen einer Millisekunde zusammenfasst (s. Abschnitt 3.3), berechnet

Tabelle 6.1: Ergebnisse der Spektrenverschiebung

Emissionsspektren des Donors				
Temperatur	NaP-Puffer	Treha-Puffer	TFE	Propylenglykol
300 K	unverschoben	unverschoben	+ 3 nm	- 3 nm
77 K	–	- 10 nm	–	–
Absorptionsspektren des Akzeptors				
Temperatur	NaP-Puffer	Treha-Puffer	TFE	Propylenglykol
300 K	unverschoben	unverschoben	- 8 nm	- 2 nm
77 K	–	unverschoben	–	–

und in einem Histogramm dargestellt. Um Hintergrund in diesem Histogramm auszuschließen, werden nur Datenpunkte übernommen, deren Summensignal ($S = N_A + N_D$) einen bestimmten Schwellwert übersteigt [26].

6.1.2 Bestimmung des Förster-Radius' in verschiedenen Lösungsmitteln

Um bei einer Messung des Energietransfers zwischen zwei Fluorophoren auf deren Abstände schließen zu können, ist die Kenntnis des Förster-Radius' unabdingbar. Die Berechnung des Förster-Radius' erfolgt nach Gleichung 2.15.

Das Überlappungsintegral wurde mithilfe der Herstellerspektren berechnet. Dabei wurden jedoch die Ergebnisse der Messungen aus Kapitel 5.1 beachtet. Das Maximum des Emissionsspektrums des Donors ist sowohl in TFE und in Propylenglykol als auch bei einer Temperatur von 77 K verschoben. Auch die Absorptionsspektren des Akzeptors sind in den Lösungsmitteln verschoben. Die Tabelle 6.1.2 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse. Die Donorquantenausbeute, bestimmt aus den Fluoreszenzlebenszeitmessungen, wird der Tabelle 5.1 entnommen.

Der Brechungsindex für NaP-Puffer und für Trehalose-Puffer beträgt 1,33 bei Raumtemperatur und 1,31 für 77 K. Für TFE wird der Wert 1,29 und für Propylenglykol 1,43 bei Raumtemperatur angenommen. In diesen Medien fanden keine FRET-Messungen bei 77 K statt (siehe Abschnitt 6.3).

Entscheidenden Einfluss auf den Förster-Radius hat der Orientierungsfaktor κ^2 . In Kapitel 2.1.8 wird näher erläutert, dass für Messungen in Lösung ein mittlerer Wert von $2/3$ gerechtfertigt ist. In Tabelle 6.2 sind die daraus resultierenden Förster-Radien für die verschiedenen Pufferbedingungen bei Raumtemperatur zusammengefasst. Für die Messungen in Trehalose-Puffer bei 77 K muss für κ^2 die statische Verteilung (siehe Abb. 2.8), d. h. für jedes Prolin ein anderes κ^2 , angenommen werden. Die daraus entstehende theoretische Verteilung der Förster-Radien in einer Einzelmolekülmessungen ist in Abbildung 6.2 zusehen. Diese Verteilung wurde mithilfe einer Monte-Carlo-Simulation (MC-Simulation) erhalten, in der die Orientierung zweier Übergangsdipolmomente zueinander zufällig gewürfelt und daraus je ein Orientierungsfaktor und ein Förster-Radius berechnet wurde. Am häufigsten tritt ein Förster-Radius zwischen 5,6 nm und 5,8 nm auf, was einem κ^2 nahe Eins entspricht. Sehr wahrscheinlich sind jedoch auch kleinere Radien bis 2,0 nm. Größere

Tabelle 6.2: Förster-Radien

Temperatur	NaP-Puffer	Treha-Puffer	TFE	Propylenglykol
300 K	5,9 nm	5,9 nm	6,3 nm	5,5 nm
77 K	–	5,2 nm	–	–

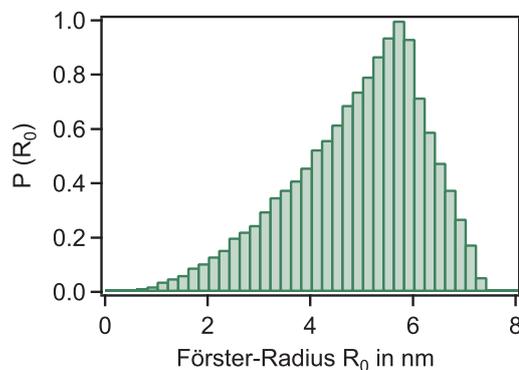


Abbildung 6.2: Verteilung der Förster-Radien bei 77 K

Bei 77 K findet keine Orientierung der Übergangsdipolmomente während der Zeit im angeregten Zustand statt. Daraus folgt für jedes FRET-Paar ein bestimmtes κ^2 und damit ein anderer Förster-Radius. Die Wahrscheinlichkeit für einen Förster-Radius von 5,7 nm ist am größten; er variiert jedoch zwischen 0,6 nm und 7,4 nm.

Förster-Radien, bei denen κ^2 größer als Eins ist, sind seltener.

Wird ein Ensemble von Molekülen bei 77 K betrachtet, so kann für κ^2 der statische Mittelwert von 0,467 angenommen und der mittlere Förster-Radius auf 5,2 nm abgeschätzt werden.

6.1.3 Flexibilität und Konformationen der Polyproline

Der Abstand der Farbstoffe wird über den Abstand der Peptidtermini bestimmt. In der Polyprolin-II-Konformation, die sich in Wasser ausbildet und nur *trans*-Bindungen aufweist (siehe Kap. 3.4), nimmt ein Prolin eine Länge von 0,312 nm in der helikalen Struktur ein [25]. Für das Glyzin am N-Terminus und für das Cystein am C-Terminus wird von der Ausdehnung in einer α -Helix ausgegangen, die pro Aminosäure 0,15 nm entspricht. Die maximale Länge der Prolinpeptide, auch Konturlänge l_K genannt, beträgt somit für Prolin 6 2,17 nm und für Prolin 20 6,54 nm.

Aufgrund ihrer als recht starr angenommenen Struktur wurden Polyprolinpeptide oft als Referenz für FRET-Experimente genutzt [124, 114]. Abweichungen von der Theorie zeigen jedoch, dass dynamische Flexibilität sowie Konformationsheterogenität, die zu einer Verteilung von Abständen führt, nicht ausgeschlossen werden können [11, 33, 89]. Eine gute Näherung für die dynamische Flexibilität der *all-trans*-Konformation bietet das WLC-Modell (Worm-like-Chain-Modell) [126]:

$$P(L) = \frac{4 \pi N L^2}{l_K^2 (1 - L^2/l_K^2)^{9/2}} \exp\left(-\frac{3 l_K}{4 l_P (1 - L^2/l_K^2)}\right) \quad (6.4)$$

$P(L)$... Wahrscheinlichkeit für den Terminiabstand L

N ... Normierungskonstante

L ... Abstand der Termini

l_K ... Konturlänge

l_P ... Persistenzlänge

Dabei bezeichnet l_K die oben angegebene Konturlänge, L den Terminiabstand und l_P die Persistenzlänge. Die Persistenzlänge gibt an, über welche Länge eine Kette ihre ursprüngliche Orientierung beibehält. Für Polyprolinpeptide ergab eine Anpassung des WLC-Modells an molekulardynamische Simulationen längenabhängige Persistenzlängen [11]. Danach wächst die Persistenzlänge mit der Anzahl der Monomere von ca. 7 nm bei zehn Prolinen bis maximal 13 nm für unendlich lange Ketten. Für Prolin 6, das in [11] nicht betrachtet wurde, wird eine Persistenzlänge von 7 nm angenommen und für Prolin 20 die dort ermittelte Persistenzlänge von 9 nm. Die Normierungskonstante N ist durch das Verhältnis α von Kontur- zu Persistenzlänge bestimmt:

$$N = \frac{4 \alpha^{3/2} e^\alpha}{\pi^{3/2} (4 + 12 \alpha^{-1} + 15 \alpha^{-2})} \quad (6.5)$$

$$\alpha = \frac{3 l_c}{4 l_p} \quad (6.6)$$

Die aus diesem Modell erhaltenen Abstandsverteilungen für Prolin 6 und Prolin 20 in *all-trans*-Konformation sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Zum Vergleich ist für beide Peptide die Konturlänge schwarz gestrichelt eingezeichnet. Die Termini von Prolin 6, welches aufgrund seiner Kürze eher steif ist, nehmen nur Abstände zwischen 1,9 nm und 2,1 nm ein. Am wahrscheinlichsten ist jedoch ein Abstand von ca. 2,1 nm. Prolin 20 ist dagegen viel flexibler, sodass Abstände zwischen 4 nm und 6,4 nm auftreten können. Dem Modell nach ist ein Abstand von 6,1 nm am wahrscheinlichsten.

Allein durch die Flexibilität der Polyproline konnten die Ergebnisse der FRET-Messungen jedoch noch nicht erklärt werden. NMR-Messungen ergaben, dass ca. 2 % der Peptidbindungen in *cis*-Konformation vorliegen [11]. D. h., in einem Ensemble von Prolin20-Peptiden besitzen ca. 30 % eine *cis*-Bindung. Der dadurch entstehende Knick im Peptid kann je nach Position zu einer starken Verkürzung des Terminiabstandes führen.

Da diese Konformationsheterogenität nicht durch das WLC-Modell beschrieben werden kann, wurde zusätzlich eine MC-Simulation zur Bestimmung der Terminiabstände durchgeführt. Das Rückgrat der gestreckten Polyprolin-II-Konformation wurde mit den entsprechenden Diederwinkeln $\Phi = -75^\circ$, $\Psi = 145^\circ$ sowie $\omega = 180^\circ$ (*trans*) oder, mit einem Anteil

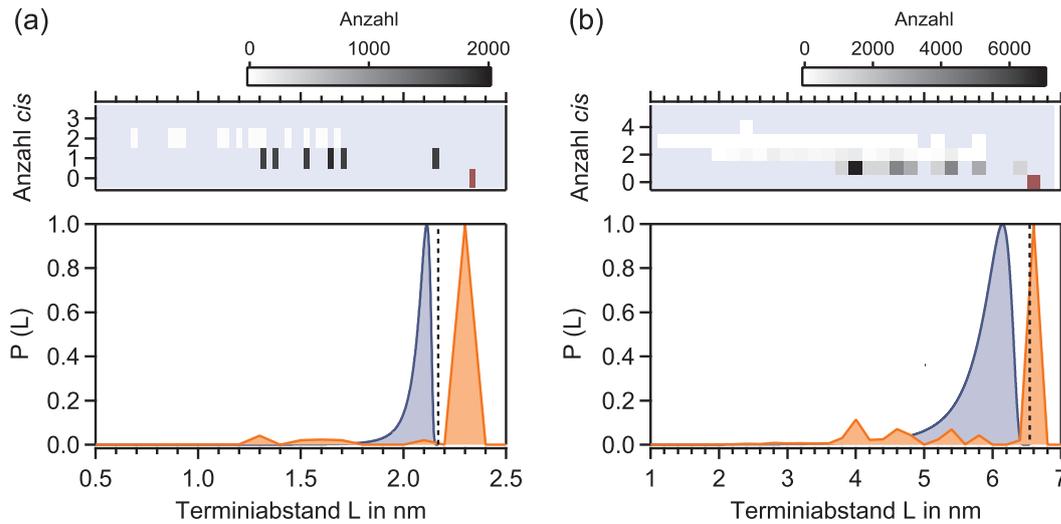


Abbildung 6.3: Theoretische Abstände der Peptidtermini

Unten: Die Abstandsverteilungen der *all-trans*-Konformation von Prolin 6 (a) und von Prolin 20 (b) berechnet nach dem WLC-Modell sind in blau dargestellt. Sie spiegeln die Flexibilität der Peptidketten wider. Die Konturlänge beider Peptide ist schwarz gestrichelt eingezeichnet. Eine MC-Simulation, die einen *cis*-Anteil aller Peptidbindungen von 2 % berücksichtigt, ist in orange zu sehen. Deutlich wird der Anteil verkürzter Abstände durch *cis*-Bindungen. Oben: Die Anzahl der *cis*-Bindungen in einem Peptid in Abhängigkeit vom Terminiabstand für 10^5 Moleküle. Nur der Bereich zwischen (a) 5 und 2000 Ereignissen und (b) 5 und 7000 Ereignissen ist grau skaliert. Ereignisse unter 5 sind hellblau dargestellt und über 2000 bzw. 7000 in rot.

von 2 % $\omega = 0^\circ$ (*cis*), simuliert. Die Abstände des N-Atoms im Glyzin zum C'-Atom im Cystein wurden für 10^5 Proline bestimmt. Ihre Verteilung ist in Abbildung 6.3 im Vergleich zum WLC-Modell dargestellt. Bei dieser Simulation fand keine Energieminimierung statt, sodass die erhaltenen Abstände die maximale Rückgratausdehnung widerspiegeln. Des weiteren enthält die Simulation keine Beweglichkeit der Ketten, sondern soll Auskunft über mögliche Konformationen geben. Demnach befinden sich ca. 89 % der Prolin6-Peptide in einer *all-trans*-Konformation mit einer Länge von ca. 2,3 nm. Der Rest besitzt eine *cis*-Bindung, sodass kleinere Terminiabstände möglich sind. Die Wahrscheinlichkeit für zwei *cis*-Bindungen ist deutlich kleiner [11]. Bei Prolin 20 ist der Anteil geknickter Konformationen größer. Während ca. 67 % in gestreckter *all-trans*-Konformation vorliegen, besitzt der Rest ein (27 %) oder zwei (5 %) *cis*-Bindungen. Ein Abstand von ca. 4 nm ist sehr wahrscheinlich auf einen Knick mittig der Peptidkette zurückzuführen [33]. Um zu veranschaulichen, welche Abstände aus möglichen *cis*-Bindungen entstehen können, ist der Abbildung 6.3 die Anzahl der *cis*-Bindungen für die verschiedenen möglichen Abstände in einem 2D-Histogramm hinzugefügt. Es sei bemerkt, dass die Grauskala nur einen Teil der insgesamt 10^5 Moleküle abdeckt. Allein bei Prolin 6 haben bereits 89 % aller Moleküle keine *cis*-Bindung. Deutlich wird jedoch, dass, wenn auch eher unwahrscheinlich, sehr kleine Abstände durch mehrere *cis*-Bindungen selbst bei Prolin 20 möglich werden.

Die Konformationsänderungen, die auf der *cis-trans*-Isomerie beruhen, sind so langsam, dass sie nicht während des Aufenthalts im konfokalen Fokus beobachtet werden können.

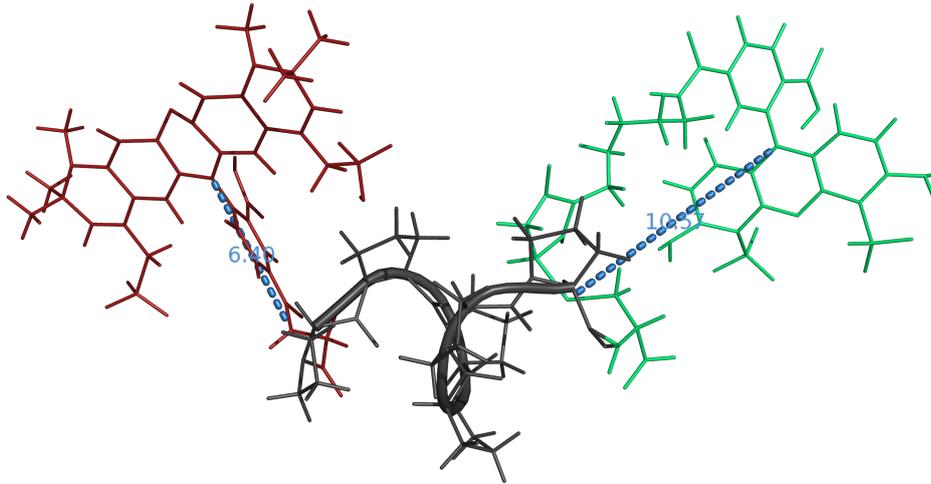


Abbildung 6.4: Prolin 6 mit AF488 und AF594

Der Akzeptor AF594 (rot) ist über ein Succinimidylester und der Donor AF488 (blau) über ein Maleimid an Gly-(Pro)₆-Cys gebunden. Die graue Helix stellt nur die sechs Proline dar. Die eingezeichneten Abstände (blau) geben einen möglichen Abstand des Akzeptordipols (vom N des Glyzins) und des Donordipols (vom S des Cysteins) von den Peptidenden an. Struktur von M. Glanert, [40].

Für die FRET-Messungen kann somit von einer statischen Heterogenität ausgegangen werden [33, 135].

Einfluss der gebundenen Fluorophore Gerade bei sehr kurzen Peptidketten muss die Länge der Verbindung und die Größe der Farbstoffe berücksichtigt werden. Um die Größe besser abschätzen zu können, wurde die Struktur von AF594-Gly-(Pro)₆-Cys-AF488 mithilfe des Programms PyMOL¹ (DeLano Scientific LLC, Schrödinger) erstellt und anschließend mit GROMACS² energieminimiert [40]. In Abbildung 6.4 ist die so erhaltene Struktur von Prolin 6 mit den Farbstoffen gezeigt. Die eingezeichneten Abstände geben einen von vielen möglichen Abständen der Farbstoffdipole von den Peptidenden an. Der Abstand des Akzeptordipols vom Stickstoffatom des Glyzins beträgt ca. 0,7 nm. Von der Disulfidbrücke des Cysteins hat der Donordipol einen Abstand von ca. 1,0 nm (siehe auch [145]). Da die Farbstoffe flexibel am Peptid angebracht sind, insbesondere der Donor durch die Bindung über fünf Kohlenstoffe, kann je nach Orientierung der Abstand beider sehr unterschiedlich sein [11]. Aufgrund der MD-Simulation in [40] wird auf einen zusätzlichen Abstand von maximal 1,7 nm geschlossen.

Es wird angenommen, dass die Flexibilität und die Konformation der Proline nicht durch die Farbstoffe beeinflusst werden, obwohl sie im Verhältnis zum Peptid mit einer Ausdehnung von ca. 0,7 nm (Donor) und 1,2 nm (Akzeptor) relativ groß sind [114].

¹PyMOL - Freie Software, mit der Moleküle erstellt, bearbeitet und dargestellt werden können.

²GROMACS - GRoningen MACHine for Chemical Simulations, freie Software der Universität Groningen, NL, für Moleküldynamik-Simulationen.

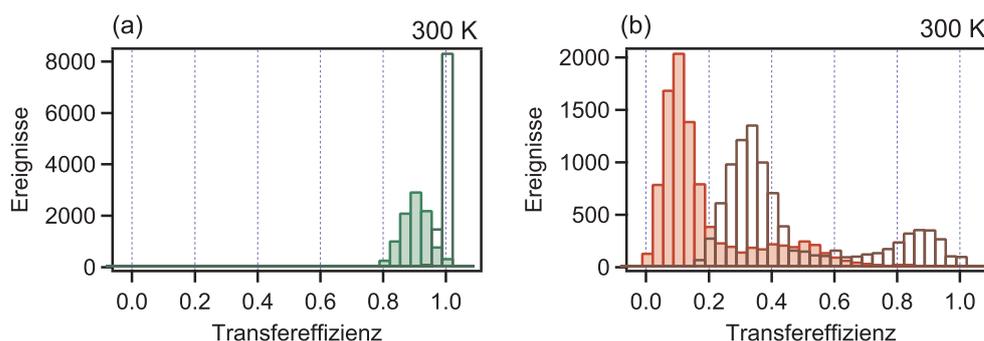


Abbildung 6.5: Theoretische Transfereffizienz bei Raumtemperatur in NaP-Puffer

Theoretisches Transfereffizienz-Histogramm für Prolin 6 (a) und Prolin 20 (b) in NaP-Puffer bei 300 K. Als Orientierungsfaktor wird der dynamische Mittelwert von $2/3$ angenommen, und die Farbstoffabstände entsprechen denen der MC-Simulation, addiert mit 1,7 nm, bedingt durch die Farbstoffverknüpfungen (farbige Balken). Den Verteilungen wurde Poisson-Rauschen hinzugefügt. Während Prolin 6 durch die kurzen Fluorophorabstände nur eine Transfereffizienz bei 0,9 zeigt, sind bei Prolin 20 zwei Populationen zu erkennen. Diese zeigen die Konformationsheterogenität und weisen auf Peptidketten mit und ohne *cis*-Bindung hin. Die transparenten Histogramme zeigen die Transfereffizienz ohne den zusätzlichen Abstand durch die Farbstoffverknüpfungen. Die Transfereffizienz verschiebt sich dadurch zu höheren Werten.

6.1.4 Theoretische Transfereffizienz bei 300 K und bei 77 K

Mithilfe der bestimmten Förster-Radien und der Fluorophorabstände kann nach Gleichung 2.19 die Transfereffizienz bei Prolin 6 und Prolin 20 abgeschätzt werden. Für ein Ensemble von 10^4 Molekülen, deren Terminiabstände aus der MC-Simulation bekannt sind, wurde für jedes einzelne eine Transfereffizienz berechnet. Da in Lösung (hier NaP-Puffer) von einem dynamischen Ensemble ausgegangen werden kann, ist $\kappa^2 = 2/3$, und somit beträgt der Förster-Radius 5,9 nm. Für die erhaltenen Transfereffizienzen wurden aus einer Summenintensität von 50 Photonen pro Binzeit die theoretischen Donor- und Akzeptoranteile berechnet und ihnen Poisson-Rauschen hinzugefügt. Die aus den verrauchten Intensitäten berechneten Transfereffizienz-Histogramme sind in Abbildung 6.5 für Prolin 6 (a) und Prolin 20 (b) gezeigt. Bei Prolin 6 ist der Abstand so gering, dass eine hohe Transfereffizienz bei 0,9 ($\pm 0,06$) erwartet wird. Würde die Transfereffizienz nur für den Abstand der Peptidtermini bestimmt (ohne die 1,7 nm), so läge die Transfereffizienz genau bei 1,0 (siehe Abbildung 6.5a). Prolin 20 dagegen zeigt zwei breite Verteilungen. Die geringe Transfereffizienz bei 0,1 ist auf die gestreckte Konformation ohne *cis*-Bindung zurückzuführen, während die höhere Transfereffizienz bei 0,5 durch Konformationen mit *cis*-Anteilen entsteht. Auch hier ist ein Histogramm ergänzt, bei dem nur der Transfer zwischen den Peptidenden betrachtet wurde. Die zwei Verteilungen verschieben sich dadurch zu höheren Transfereffizienzen.

Die Simulationen der FRET-Verteilungen im eingefrorenen Zustand erfolgten wie bei Raumtemperatur, jedoch nicht mehr mit einem gemittelten Orientierungsfaktor. Nun wurde für jedes Molekül auch ein κ^2 entsprechend der statischen Verteilung in Abschnitt 2.1.8 berech-

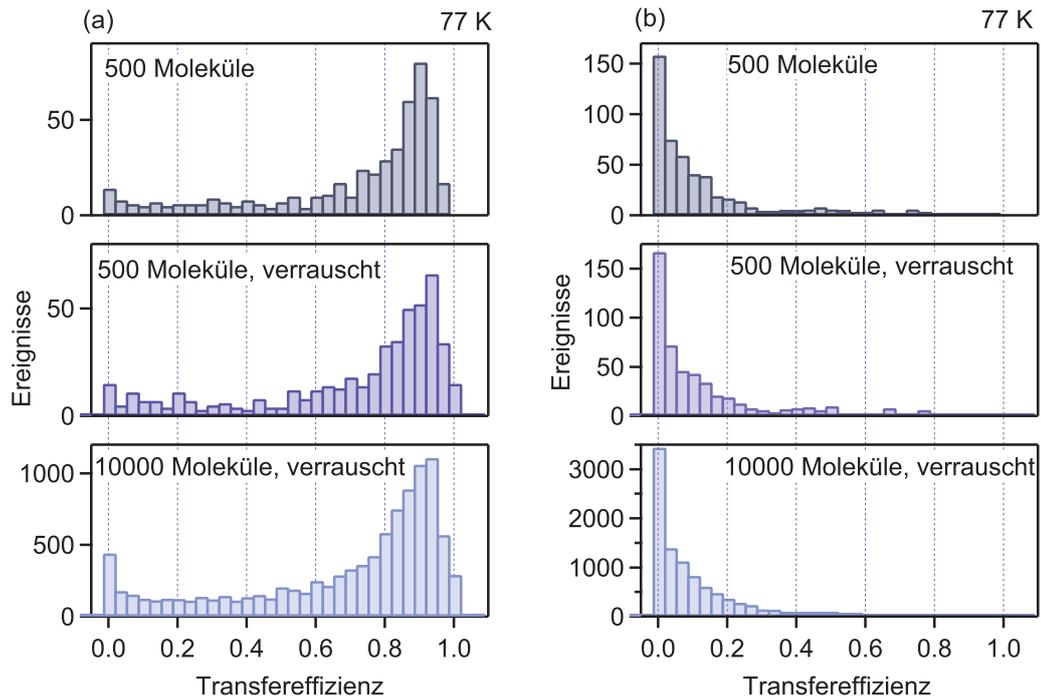


Abbildung 6.6: Theoretische Transfereffizienz bei 77 K

Theoretische Transfereffizienz-Histogramme (blau) für Prolin 6 (a) und Prolin 20 (b) in Trehalose-Puffer bei 77 K. Für jedes Molekül wurde ein Abstand r , entsprechend der MC-Simulation und Farbstoffabstand (1,7 nm), und ein κ^2 gewürfelt. Oben ist die Transfereffizienz-Verteilung für 500 Peptide dargestellt. In der Mitte ist der Verteilung mit 500 Teilchen Poisson-Rauschen hinzugefügt. Unten ist die theoretische Verteilung mit Poisson-Rauschen für 10000 Moleküle gezeigt. Bei Prolin 6 (a) wird auch im eingefrorenen Zustand von einer Transfereffizienz bei 0,9 ausgegangen, jedoch mit einer breiteren Verteilung. Bei Prolin 20 (b) wird eine geringe Transfereffizienz bei 77 K erwartet.

net. Die daraus ermittelten Transfereffizienz-Verteilungen sind in Abbildung 6.6 für Prolin 6 (a) und Prolin 20 (b) dargestellt. Um den Einfluss des Poisson-Rauschens zu zeigen, wurde für beide Peptide eine Verteilung mit 500 Molekülen mit und ohne Rauschen simuliert. Bei Prolin 6 ähnelt die Verteilung der bei Raumtemperatur, jedoch gibt es jetzt auch Ereignisse mit geringen Transfereffizienzen, die auf die statische Verteilung von κ^2 zurückzuführen sind. Bei einer Anzahl von 10^4 Molekülen ändert sich die Verteilung kaum. Wird Prolin 20 im statischen Zustand betrachtet, so ist aufgrund der κ^2 -Verteilung und des recht großen Abstandes nur geringe Transfereffizienz zu erwarten.

6.2 FRET bei Raumtemperatur in Lösung

Die FRET-Messungen in Lösung wurden mit zirkular polarisiertem Licht, dem Wasserimmersionsobjektiv und einer $50 \mu\text{m}$ Lochblende zwischen den telezentrischen Linsen durchgeführt. Die Anregungsleistung betrug 300 nW bei den Tetra-Speck-Kugeln und $50 \mu\text{W}$ bei den Prolinen.

6.2.1 Tetra-Speck-Kugeln und „Shotnoise“-Verteilung

Transfereffizienz von immobilisierten Tetra-Speck-Kugeln In Kapitel 6.1 ist der Einfluss der Poisson-Statistik auf die Einzelmolekülspektroskopie erklärt. Würde in einem Experiment der Energietransfer zweier Farbstoffe betrachtet, die einen festen Abstand besitzen, so wird nicht nur eine bestimmte Transfereffizienz gemessen, sondern aufgrund der Poisson-Statistik eine breite Verteilung. Erst bei Verteilungen, deren Breite über diese sogenannte „Shotnoise“-Verteilung hinausgehen, kann über verschiedene Abstände der Fluorophore und damit über verschiedene Konformationen nachgedacht werden (siehe auch Abschnitt 2.3.3).

Mithilfe von Tetra-Speck-Kugeln (TS-Beads, Invitrogen), die mit vielen verschiedenen Farbstoffen gefüllt sind und somit eine definierte Transfereffizienz besitzen, kann die Shotnoise-Verteilung gemessen und für den genutzten Aufbau überprüft werden. Die Tetra-Speck-Kugeln bestehen aus Latex, haben einen Durchmesser von 100 nm und emittieren bei 430 nm, 515 nm, 580 nm und 680 nm. Um sie zu immobilisieren, wurde ein Tropfen mit den in destilliertem Wasser gelösten Kugeln auf ein Deckglas gegeben und anschließend das Wasser entfernt. Die durch Adhäsion am Deckglas verbliebenen TS-Kugeln wurden dann mit dem Laser der Wellenlänge 488 nm bei 1 nW angeregt.

Als Beispiel sind in Abbildung 6.7a die transienten Intensitäten zweier TS-Kugeln im Donor- und im Akzeptorkanal dargestellt. Die unterschiedliche Helligkeit beider Kugeln ist wahrscheinlich auf von 100 nm abweichende Größen oder auf eine variierende Anzahl von Farbstoffen in einer Kugel zurückzuführen. Aus den Intensitäten wurde dann die Transfereffizienz pro Zeiteinheit (1 ms) berechnet und in Abbildung 6.7b in einem Histogramm dargestellt. Die Transfereffizienz beider Kugeln beträgt ca. 0,2. Die Breiten der Verteilungen weichen dagegen mit 0,05 und 0,09 voneinander ab. Ob diese Verteilungen „shotnoise“-limitiert sind, kann anhand einer einfachen Simulation überprüft werden (siehe auch Abschnitt 2.3.3). In dieser Simulation wird die im Experiment ermittelte mittlere Intensität in Donor- und Akzeptorkanal pro Zeiteinheit mit einer Poisson-Verteilung vertauscht. Die daraus erhaltene Transfereffizienz-Verteilung ist auch in Abbildung 6.7b dargestellt. Bis auf eine geringe Abweichung der mittleren Transfereffizienz, stimmen die Breiten der simulierten Verteilungen genau mit den gemessenen überein. Außerdem wird wiederholt deutlich (siehe Abschnitt 2.3.3), dass die Breite der Verteilung von der Anzahl der Photonen abhängt. Damit ist gezeigt, dass mit dem genutzten Aufbau shotnoise-limitiert Energietransfer gemessen werden kann. (Da in der Simulation der Mittelwert und nicht der wahrscheinlichste Wert der Intensität vertauscht wurde, kommt es zu der geringen Abweichung der simulierten von der gemessenen Transfereffizienz.)

Durch die Experimente an den immobilisierten TS-Kugeln wurde festgestellt, dass sie unterschiedlich groß und damit unterschiedlich hell sind, und, dass sie leicht voneinander abweichende Transfereffizienzen haben (zwischen 0,17 und 0,21). Bei einer Messung in Lö-

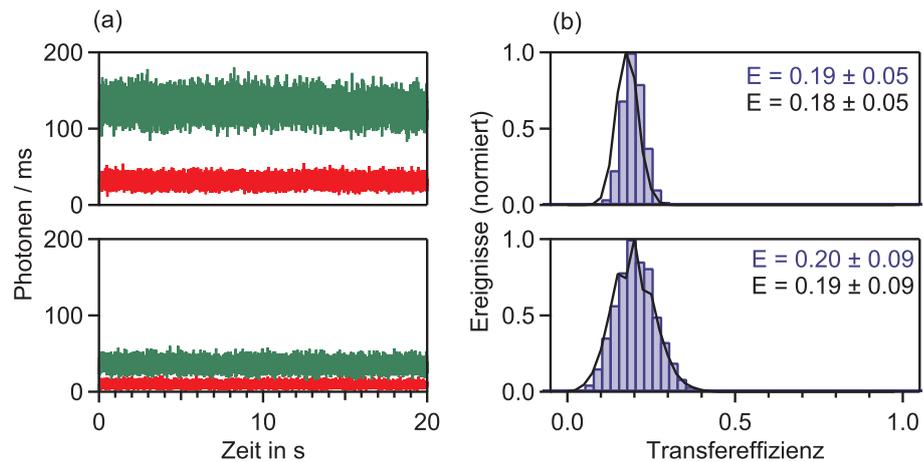


Abbildung 6.7: Energietransfer von immobilisierten Tetra-Speck-Kugeln

(a) Transiente Intensität zweier immobilisierter TS-Kugeln im Donor- (grün) und im Akzeptorkanal (rot). (b) Die aus den Zeitspuren resultierenden Transfereffizienz-Histogramme (blaue Balken) zeigen eine mittlere Transfereffizienz von ca. 0,2 und durch eine Simulation (schwarz) bestätigte, shotnoise-limitierte Breiten von 0,05 und 0,09.

sung (dest. Wasser) wird zwar immer eine reproduzierbare Transfereffizienz von $0,19 \pm 0,06$ erhalten, diese ist jedoch aufgrund der Unterschiede in der Zusammensetzung der Kugeln nicht shotnoise-limitiert.

Einfluss der Lösungsmittel auf die Histogramme Das konfokale Volumen ist bei gegebener numerischer Apertur des Objektivs sowohl von der Anregungswellenlänge als auch vom Brechungsindex des Lösungsmittels abhängig (siehe Abschnitt 2.2). Aus diesem Grund wird der Einfluss von TFE und Propylenglykol auf die *gemessene* Transfereffizienz im Vergleich zu Messungen in wässriger Lösung untersucht. Da die Fluorophore in den Tetra-Speck-Kugeln aufgrund der Latexumhüllung nicht mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommen bzw. bei Kontakt völlig von diesen gequollen werden, kann in allen Medien von der gleichen mittleren Transfereffizienz (0,19) ausgegangen werden. Sollten sich die Anregungs- und Detektionsfoki für Donor- und Akzeptorkanal in TFE und Propylenglykol stark ändern, kann das das Verhältnis von Donor und Akzeptor, und somit die gemessene Transfereffizienz, verfälschen.

In Abbildung 6.8 sind die Transfereffizienz-Histogramme von Tetra-Speck-Kugeln in den verschiedenen Medien dargestellt. In Propylenglykol verschiebt sich das Histogramm kaum merklich zu einer höheren Transfereffizienz hin und wird schmaler. Durch die hohe Viskosität von Propylenglykol ist der Aufenthalt der Kugeln im Fokus sehr lang, sodass viele Photonen gesammelt werden können und die Verteilung schmaler wird. In TFE wird eine verbreiterte Verteilung gemessen, die zudem leicht zu höheren Transfereffizienzen verschoben ist.

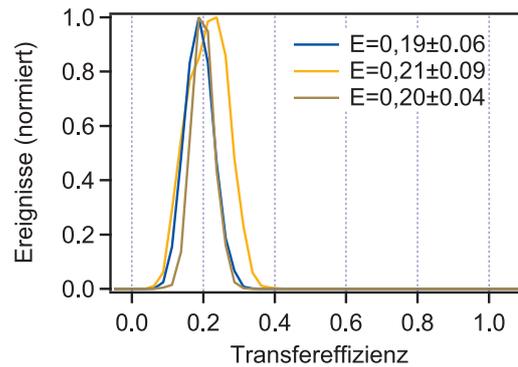


Abbildung 6.8: Tetra-Speck-Kugeln in verschiedenen Lösungen

Tetra-Speck-Kugeln in destilliertem Wasser (blau Linie), TFE (gelb) und Propylenglykol (braun). Die gemessene Transfereffizienz verschiebt sich in Propylenglykol nur minimal und wird schmaler im Vergleich zur Messung in destilliertem Wasser. In TFE wird eine stärker verschobene und breitere Verteilung gemessen.

Für die in Abschnitt 6.2.3 folgenden FRET-Messungen werden die Transfereffizienzen sowohl mit den in Abschnitt 6.1 eingeführten Korrekturen für die Detektionseffizienz und die Quantenausbeute als auch mit den hier ermittelten Verschiebungen korrigiert. Der Einfluss auf die Breite der Verteilung wird nicht korrigiert, jedoch in die Diskussion einbezogen.

6.2.2 Simulation einer Messung in Lösung

Für die FRET-Messungen in Lösung ist eine Simulation für die Interpretation der Transfereffizienz-Verteilung nötig, bei der zusätzlich zur Simulation in 2.3.3 auch die Diffusion der Moleküle durch das konfokale Anregungsvolumen berücksichtigt wird. Die Simulation ist eine Monte-Carlo-Simulation, bei der mehrere Moleküle in einer Box diffundieren. In dieser Box befindet sich ein konfokales Beobachtungsvolumen (siehe 2.2.3). Passiert ein Teilchen das Volumen, wird Fluoreszenz entsprechend der Anregungsintensität im Volumen berechnet, und dieses Mittel wird als Grundlage für Poisson-Rauschen verwendet.

Zum Vergleich mit einer Messung in Lösung wird die Summenintensität im Maximum des Volumens gleich der molekularen Helligkeit des Donors und des Akzeptors im Experiment gesetzt. Die molekulare Helligkeit wird aus der mittleren Intensität einer Zeitspur geteilt durch die mittlere Anzahl von Molekülen im Volumen berechnet. Da in TFE und Propylenglykol der hohe Hintergrund zu einer höheren mittleren Anzahl der Teilchen führt, und somit die Bestimmung der molekularen Helligkeit erschwert, wird für alle Simulationen die molekulare Helligkeit der Messung in NaP-Puffer angenommen. Diese beträgt für Prolin 6 ca. 80 und für Prolin 20 ca. 90 Photonen pro Millisekunde und Teilchen.

6.2.3 Transfereffizienz-Histogramme der Polyproline

Die Konzentration der Polyproline betrug bei jeder Messung 100 pM. Den Pufferlösungen wurde je 0,001 % Tween 20 (Carl Roth) hinzugefügt, um Adhäsion der Proline am Deckglas zu vermeiden. Der Hintergrund für die verschiedenen Messungen wurde mit den Tween-Pufferlösungen unter gleichen Messbedingungen bestimmt und von den gebinteten Zeitspuren subtrahiert (s. Abschnitt 6.1). Die Summenschwelle wurde auf 70 Photonen pro Millisekunde gesetzt.

In Abbildung 6.9 sind die Transfereffizienz-Histogramme von Prolin 6 und Prolin 20 in den verschiedenen Pufferlösungen zu sehen. Wie erwartet, zeigt Prolin 6 aufgrund des kurzen Farbstoffabstandes in NaP-Puffer, in Trehalose-Puffer und in TFE eine hohe Transfereffizienz. Die mittlere Transfereffizienz, bestimmt durch eine Anpassung mit einer Gauß-Funktion, beträgt 0,92 in NaP-Puffer, 0,90 in Trehalose-Puffer und 0,89 in TFE. Die Breite der Verteilung ist 0,05 in NaP-Puffer, 0,05 in Trehalose-Puffer und 0,06 in TFE. In Propylenglykol verschiebt sich die Verteilung zu niedrigeren Werten (0,77) und wird deutlich breiter (0,10). Zum Vergleich ist allen Histogrammen eine simulierte Shotnoise-Verteilung gezeigt (siehe 6.2.2), deren Breite gut mit der Messung übereinstimmt. Nur in Propylenglykol ist die gemessene Verteilung etwas breiter als die simulierte. In den Histogrammen erscheinen zusätzlich zu der hohen Transfereffizienzen Werte mit geringer Transfereffizienz. Diese sind auf Proline, die keinen aktiven Akzeptor besitzen, zurückzuführen. Während dieser Anteil in NaP-Puffer, Trehalose-Puffer und TFE relativ klein bleibt, ist er in Propylenglykol stärker ausgeprägt. Daraus wird auf ein verstärktes Bleichen des Akzeptors in Propylenglykol geschlossen (siehe unten).

In Abbildung 6.9b sind die Histogramme von Prolin 20 dargestellt. Für eine erste Analyse erfolgte die Anpassung der Histogramme mit nur einer Gauß-Kurve, um die verschiedenen Lösungsbedingungen miteinander vergleichen zu können. In NaP-Puffer und in Trehalose-Puffer zeigt sich ein sehr breites Histogramm mit einer mittleren Transfereffizienz von 0,41 bzw. 0,39. Die Breite der Verteilung reduziert sich in TFE von 0,15 (NaP-Puffer und Trehalose-Puffer) auf 0,11. Auch die mittlere Transfereffizienz verschiebt sich auf 0,35. In Propylenglykol wird die Transfereffizienz noch geringer (0,25). Die Breite der Verteilung ist mit 0,09 im Vergleich zu den anderen Medien am schmalsten. Transfereffizienzen nahe Null sind auch hier wieder auf Proline ohne bzw. mit inaktiven Akzeptor zurückzuführen. Die simulierten Verteilungen, die über den Histogrammen eingezeichnet sind und die die Breite einer reinen Shotnoise-Verteilung darstellen, zeigen deutlich, dass es, aufgrund der breiteren Verteilungen, eine Art Abstandsverteilung für die Fluorophore bei Prolin 20 geben muss. Um Rückschlüsse auf verschiedene Konformationen der Proline ziehen zu können, werden die Histogramme im Folgenden näher analysiert.

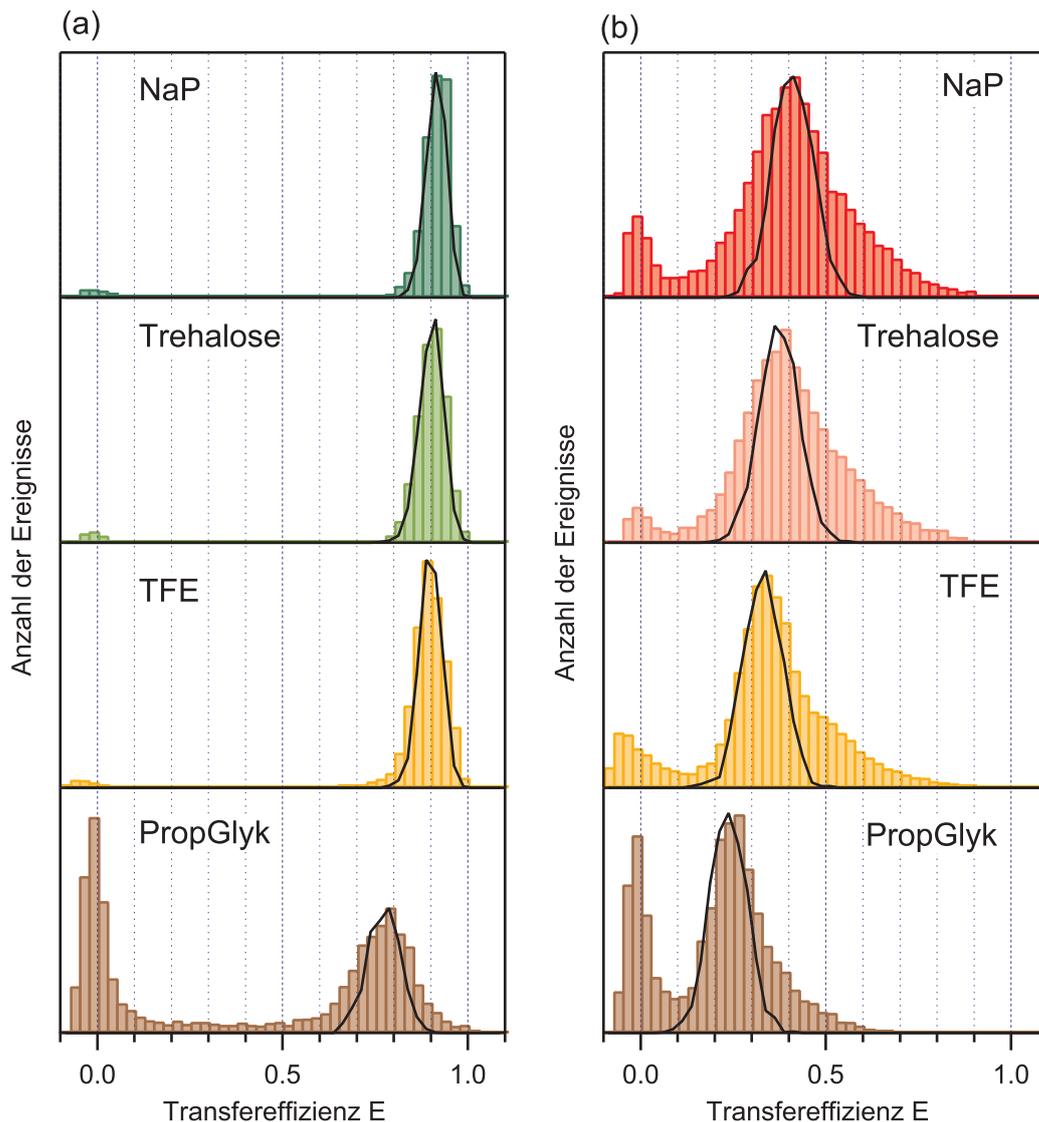


Abbildung 6.9: Transfereffizienz in Lösung

Gezeigt sind die Transfereffizienz-Histogramme von Prolin 6 (a) und Prolin 20 (b) in NaP-Puffer, in Trehalose-Puffer, in TFE und in Propylenglykol. (a) Prolin 6 zeigt in NaP-Puffer, Trehalose-Puffer und TFE eine hohe Transfereffizienz bei 0,9. In Propylenglykol verschiebt sich der Transfereffizienz zu 0,77. Die Verteilung bei geringen Transfereffizienzen ist in allen Lösungen auf Proline zurückzuführen, die keinen Akzeptor tragen bzw. deren Akzeptor bereits gebleicht ist. Über den Histogrammen ist jeweils eine simulierte Shotnoise-Verteilung dargestellt (schwarz). (b) In NaP-Puffer und Trehalose-Puffer liegt die Transfereffizienz von Prolin 20 bei 0,41 bzw. 0,39 und ist mit einer Breite von 0,16 viel breiter als eine Shotnoise-Verteilung. In TFE und in Propylenglykol verschiebt sich die Verteilung zu geringeren Transfereffizienzen und wird schmaler. Auch hier entspricht die Population bei einer Transfereffizienz von Null Proline ohne aktiven Akzeptor. Die simulierten, shotnoise-limitierten Verteilungen (schwarz) sind schmaler als die gemessenen.

Einfluss von Photophysik und -chemie Die Verbreiterung der Transfereffizienz-Histogramme kann neben verschiedenen großen Fluorophorabständen auch photophysikalische

bzw. -chemische Ursachen haben. Um auf mögliche Abstandsverteilungen schließen zu können, müssen diese Ursachen zunächst ausgeschlossen bzw. (quantitativ) berücksichtigt werden. Bei Prolin 6 sind die Verteilungen in NaP-Puffer, Trehalose-Puffer und TFE nicht breiter als eine Shotnoise-Verteilung (siehe Abbildung 6.9a), sodass hier zunächst auf einen einzigen Fluorophorabstand geschlossen werden kann. Nur in Propylenglykol ist die Verteilung breiter und sollte näher analysiert werden. Bei Prolin 20 sind dagegen alle Verteilungen breiter als eine reine Shotnoise-Verteilung.

Heterogenität, die durch verschiedene Positionen der Fluorophore an der Peptidkette auftreten könnte, ist ausgeschlossen, da durch die unterschiedliche Bindungschemie der Farbstoffe jeder nur an einer Position binden kann (siehe auch Abschnitt 3.4).

Des Weiteren können Triplettzustände, die ein Blinken des Farbstoffes im Fokus verursachen, die Verteilung verbreitern. In Abschnitt 5.2 wurde die Triplettedynamik beider Farbstoffe untersucht und aufgrund der sehr kurzen Triplettzeit geschlussfolgert, dass diese Dynamik keinen Einfluss auf die Histogramme hat. Auch konnte bereits durch die Anisotropiemessungen (siehe Abschnitt 5.3) gezeigt werden, dass die Farbstoffe durch ihre flexible Bindung am Peptid nicht in ihrer Bewegung eingeschränkt sind. Die Annahme des gemittelten Orientierungsfaktors von $2/3$ ist somit gerechtfertigt.

Letztlich kann auch ein Bleichen des Akzeptors im Fokus zu einer Verbreiterung führen. Bleicht der Donor zuerst (was bei einem FRET-Paar meist jedoch unwahrscheinlich ist), hätte das keine Auswirkungen auf das Histogramm. Das Bleichen des Akzeptors würde das Histogramm zum Teil zu geringeren Effizienzen verschieben, und es somit verbreitern. Um zu überprüfen, ob Akzeptoren häufig in einer Messung bleichen, werden zwei Histogramme erstellt: eines mit den Intensitäten aus der ersten Hälfte eines Photonenschwalls³ und eines mit der zweiten Hälfte. Liegen beide übereinander, so ist das Akzeptorbleichen im Fokus sehr unwahrscheinlich. In Abbildung 6.10 sind diese Histogramme für beide Peptide in NaP-Puffer und in Propylenglykol im Vergleich zu den nicht getrennten Histogrammen dargestellt. Während in NaP-Puffer bei Prolin 6 kein Unterschied zu erkennen ist, zeigt das Histogramm der zweiten Hälfte in Propylenglykol einen höheren Anteil in der Population ohne Energietransfer und einen kleineren Anteil bei der hohen Transfereffizienz, d. h. ein Teil der Akzeptoren ist im Fokus gebleicht. Bei Prolin 20 ist sowohl in NaP-Puffer als auch in Propylenglykol kaum ein Unterschied beider Histogramme auszumachen.

Dass der Akzeptor trotz gleicher Anregungsintensität nur bei Prolin 6 in Propylenglykol bleicht, kann gut erklärt werden. Zum Einen diffundieren die Peptide aufgrund der hohen Viskosität von Propylenglykol sehr lange durch den Fokus. Zum Anderen ist bei Prolin 6 die Transfereffizienz so hoch, dass fast ausschließlich der Akzeptor fluoresziert und somit schneller bleicht als bei Prolin 20, da er hier nur ca. 20% – 40% der Energie aufnimmt. In Trehalose-Puffer und TFE (nicht gezeigt) liegen beide Histogramme übereinander, sodass Akzeptorbleichen auch in diesen Lösungsmitteln ausgeschlossen werden kann.

³Diffundiert ein Molekül durch den Fokus wird die resultierende Anhäufung von Photonen, die sich oft über mehrere „Bins“ in der transienten Intensität erstreckt, Photonenschwall bzw. -burst genannt.

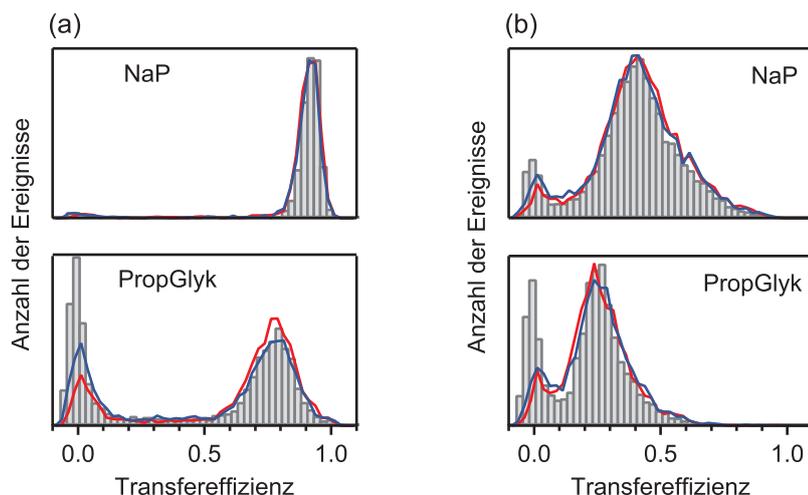


Abbildung 6.10: Einfluss von Akzeptorbleichen

Über die Transfereffizienz-Histogramme (grau) von (a) Prolin 6 und (b) Prolin 20 sind die Histogramme der ersten Hälfte (rot) und der zweiten Hälfte (blau) eines Photonenschwells gezeigt. Kein Unterschied ist in NaP-Puffer (oben) bei beiden Peptiden und in Propylenglykol (unten) bei Prolin 20 zu erkennen, sodass das Bleichen des Akzeptors im Fokus ausgeschlossen werden kann. In Propylenglykol bei Prolin 6 weist der Unterschied der beiden selektierten Histogramme auf Akzeptorbleichen hin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Photophysik und -chemie bei Prolin 20 nicht für die Verbreiterung der Transfereffizienz-Histogramme verantwortlich ist und tatsächlich eine Abstandsverteilung vorliegen muss. Das breite Histogramm von Prolin 6 in Propylenglykol ist wahrscheinlich auf ein vermehrtes Bleichen des Akzeptors zurückzuführen.

Konformationsanalyse bei Prolin 20 Es ist bekannt, dass Polyproline in wässrigen Lösungen eine linksgängigen Helix bilden, in der alle Peptidbindungen in *trans*-Konformation vorliegen (siehe auch Abschnitt 3.4). Genauere Strukturanalysen mit NMR-Spektroskopie [11], photoinduziertem Elektronentransfer (PET) [33] und FRET [11] deckten jedoch auf, dass ein kleiner Anteil der Bindungen von ca. 2% in Wasser eine *cis*-Konformation einnimmt. In TFE hingegen, einem organischen Alkohol, das an die Carbonylgruppe der Peptidketten bindet, liegen alle Bindungen in *trans* vor, da die Binderate bei der *trans*-Konformation fünfmal größer ist als bei der *cis*-Konformation [23]. Nur an der Bindung zum C-terminalen Cystein der markierten Peptide können *cis*-Bindungen auftreten [11]. Mit dem Wissen, dass Prolin 20 in TFE nur in zwei verschiedenen Konformationen vorliegt, wird das Transfereffizienz-Histogramm mit zwei verschiedenen Gauß-Kurven angepasst. In Abbildung 6.11 ist das Histogramm in TFE mit der Anpassung gezeigt. Die mittleren Transfereffizienzen beider Verteilungen liegen bei $0,33 \pm 0,09$ und $0,50 \pm 0,13$. Mit einem Förster-Radius in TFE von 6,3 nm ergeben sich daraus mittlere Abstände von 7,1 nm und 6,3 nm. Dabei wird es sich bei 7,1 nm um die gestreckte Konformation und bei 6,3 nm um die Konformation mit einem C-terminalen *cis* handeln. Wird der relative Anteil des

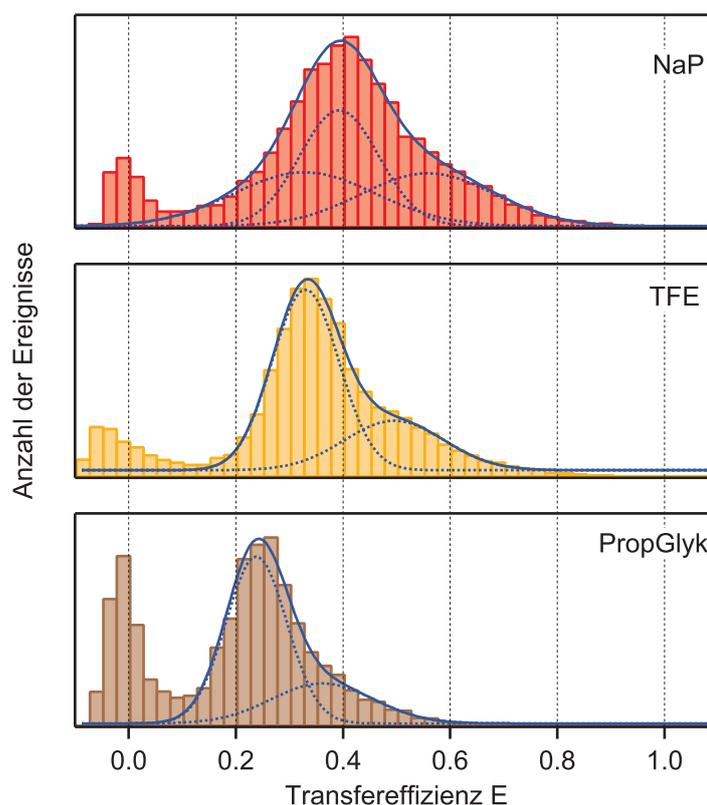


Abbildung 6.11: Konformationsanalyse von Prolin 20 in Lösung

Die Transfereffizienz-Histogramme von Prolin 20 in NaP-Puffer, TFE und Propylenglykol sind mit zwei bzw. drei Gauß-Funktionen (gepunktete Linie) angepasst. Die gesamte Anpassungsfunktion ist als durchgezogene Linie gezeigt.

C-terminalen *cis* betrachtet, so ist er mit 36% höher als die in der Literatur angegebenen. Mithilfe von NMR-Messungen wurde ein Anteil von 12,5% bestimmt, und mit FRET-Messungen ein Anteil von 19% [11].

Die Transfereffizienzen im NaP-Puffer zeigen eine sehr breite Verteilung, die sich nur ungenau mit zwei Gauß-Kurven anpassen lässt. Erst ab drei Kurven wird eine vernünftige Anpassung erhalten. Aus den mittleren Transfereffizienzen von 0,33, 0,39 und 0,56 ergeben sich Abstände von 6,6 nm, 6,4 nm und 5,7 nm. Aus den Breiten der einzelnen Verteilungen (0,19, 0,10 und 0,18), die z. T. deutlich breiter als eine Shotnoise-Verteilung sind, kann jedoch geschlussfolgert werden, dass in Prolin 20 in wässrigem Puffer mehr als drei Konformationen vorliegen müssen. Das bestätigt die in Abbildung 6.3 dargestellte Verteilung der Terminiabstände von Prolin 20, die viele verschiedene Konformationen mit *cis*-Bindungen enthält.

Das Histogramm in Propylenglykol in Abbildung 6.11 zeigt, ähnlich der Messung in TFE, an der rechten Seite eine weitere Verteilung. Die daraus folgende Anpassung mit zwei Gauß-Funktionen ergibt mittlere Transfereffizienzen von $0,24 \pm 0,08$ und $0,36 \pm 0,13$. Durch den kleineren Förster-Radius in Propylenglykol von 5,5 nm entspricht das mittleren Abständen von 6,8 nm und 6,1 nm. Diese Abstände könnten wie in TFE einer gestreckten Konforma-

Tabelle 6.3: Mittlere Transfereffizienzen und Abstände bei Prolin 20

NaP-Puffer	$E \pm \Delta E$	$0,33 \pm 0,19$	$0,39 \pm 0,10$	$0,56 \pm 0,18$
	r	6,6 nm	6,4 nm	5,7 nm
TFE	$E \pm \Delta E$	$0,33 \pm 0,09$	$0,50 \pm 0,13$	-
	r	7,1 nm	6,3 nm	-
PropGlyk	$E \pm \Delta E$	$0,24 \pm 0,08$	$0,36 \pm 0,13$	-
	r	6,8 nm	6,1 nm	-

tion und einer Konformation mit einer terminalen *cis*-Bindung zugeordnet werden. Zur besseren Übersicht sind die angepassten mittleren Transfereffizienzen, deren Breite und die daraus resultierenden Fluorophorabstände in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

Vergleich mit den Transfereffizienzen aus den Lebenszeitmessungen In Abschnitt 5.4 wurden die Transfereffizienzen bereits mithilfe der Gleichung 2.20 aus den Fluoreszenzlebenszeiten berechnet. In Abbildung 6.12 sind diese im Vergleich zu den oben ermittelten, mittleren Transfereffizienzen dargestellt. Dabei ist deutlich, dass bei Prolin 6 eine geringere und bei Prolin 20 eine höhere Transfereffizienz aus den Fluoreszenzlebenszeiten erhalten wird.

In der Literatur wird dieser Unterschied auf einen statisch gequenchten Anteil zurückgeführt [110, 109]. D. h., bei Farbstoffen, die im direkten Kontakt stehen, findet der Energietransfer augenblicklich statt, sodass diese dann nicht in die Donorlebenszeitmessungen eingehen. Somit werden bei Prolin 6 eher Konformationen detektiert, die kein Quenchen ermöglichen und deren Transfereffizienz etwas kleiner ist. Bei Prolin 20 ist diese Art von Quenchen sehr unwahrscheinlich (siehe Diskussion in 6.2.4). Die geringen Abweichungen sowohl zu höheren (in wässriger Lösung und in TFE) als auch zu kleineren Transfereffizienzen (in Propylenglykol) weisen auf eine gemittelte Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors hin. Durch die schon beschriebene Konformationsheterogenität bei Prolin 20 variiert die Donorlebenszeit je nach Fluorophorabstand, d. h. je nach Transfereffizienz, und lässt somit Abweichungen zu.

6.2.4 Diskussion des Energietransfers in Lösung

Prolin 6 Die Messungen von Prolin 6 in wässriger Lösung und TFE zeigen, wie erwartet, einen hohen Energietransfer mit einer Transfereffizienz bei 0,9. Der daraus resultierende mittlere Abstand der Farbstoffe von 4,1 nm, stimmt gut mit dem theoretisch bestimmten, größten Abstand, der die Farbstoffverbindungen berücksichtigt, überein ($2,3 \text{ nm} + 1,7 \text{ nm}$). Die Breite der Verteilung (0,05) lässt nicht auf verschiedene Abstände schließen, sodass unklar ist, warum die durch eine *cis*-Bindung auftretenden kürzeren Abstände nicht zu sehen sind (siehe Abbildung 6.3). Auch in der theoretischen Verteilung in Abbildung 6.5 sind diese nur schwer durch eine leicht breitere Verteilung (0,06) zu erkennen. Dabei sollte jedoch bemerkt werden, dass hier nur der maximal mögliche Abstand der Farbstoffdipole

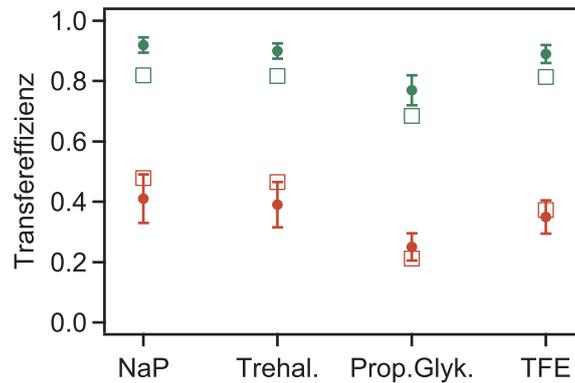


Abbildung 6.12: Mittlere Transfereffizienzen im Vergleich

Die Transfereffizienzen bestimmt aus den Einzelmolekülexperimenten (Kreise) und aus den Lebenszeitmessungen (Quadrate) sind für Prolin 6 (grün) und Prolin 20 (rot) dargestellt. Während die geringere Transfereffizienz aus der Lebenszeitmessung bei Prolin 6 auf statisches Quenchen zurückgeführt wird, lässt sich die Abweichung bei Prolin 20 durch eine gemittelte Lebensdauer mehrerer Konformationen erklären.

und eine steife Peptidkette betrachtet wurden. Durch die sehr flexiblen Verbindungen der Farbstoffe, sowie durch *cis*-Bindungen, sind durchaus Abstände unter 2 nm möglich [11], die eine Transfereffizienz von 1,0 aufweisen müssten. Diese kurzen Abstände können einen van-der-Waals-Kontakt⁴ beider Farbstoffe ermöglichen, der zu einem Quenchen der Fluoreszenz über photoinduzierten Elektronen-Transfer (PET) führen kann [33]. Deswegen wird angenommen, dass dieses Quenchen die Detektion von Populationen mit einer Transfereffizienz bei 1,0 verhindert. Das Quenchen selbst kann statisch, über Komplexbildung der Farbstoffe, oder dynamisch, durch kurzzeitige Kollision, erfolgen.

In TFE zeigt Prolin 6 das gleiche Transfereffizienz-Histogramm wie in wässriger Lösung. Rückschlüsse auf die Konformation in TFE können somit bei Prolin 6 nicht gezogen werden.

Obwohl ein Teil der Fluoreszenz bei Prolin 6 gequencht wird, zeigt sich das gewählte Farbstoffpaar für Messungen an Prolin 6 als (bedingt) geeignet. In der Literatur wurde oft aus den FRET-Experimenten an Prolin 6, die ungefähr die gleiche Transfereffizienz von 0,9 zeigten, durch ungenaue Abstandsbestimmungen auf eine zu gering gemessene Transfereffizienz geschlossen [114](mit anderen Alexa-Farbstoffen auch [135, 108]). Begründet wurde die Abweichung zum Einen durch die Punkt-Dipol-Approximation in der Förster-Theorie [39], die bei diesen kurzen Abständen nicht mehr gilt [93, 4] und zum Anderen durch fehlende Reorientierung des Donors während der kurzen Zeit im angeregten Zustand [62]. Durch die genaue Darstellung der Farbstoffe gebunden an Prolin 6 (siehe Abschnitt 6.1.3) konnte hier jedoch gezeigt werden, dass die Verbindung der Farbstoffe und ihre

⁴Sind die Abstände der Fluorophore so gering, dass sich deren Molekülorbitale überlappen, so spricht man von einem van-der-Waals-Kontakt.

Ausdehnung selbst einen entscheidenden Einfluss auf die Fluorophorabstände hat. Für die gestreckte Konformation, in der immerhin ca. 89 % der Prolin 6-Peptide vorliegen, liefert das Fluorophorenpaar korrekte Abstände. Die Annahme, dass die Farbstoffe immer einen zusätzlichen Abstand von 1,7 nm liefern, ist jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da sie sehr flexibel gebunden sind und damit kürzere Abstände sehr wahrscheinlich sind. Das dennoch nicht höhere Transfereffizienzen detektiert werden, liegt wahrscheinlich an dem bereits oben erwähnten Quenchen der Farbstoffe, sobald sie in van-der-Waals-Kontakt kommen.

Bedingt geeignet ist es, weil es keine genauere Strukturanalyse von Prolin 6 zulässt. Um kürzere Abstände im FRET-Histogramm darstellen zu können, ist der Förster-Radius mit 5,9 nm viel zu groß. Optimal wäre ein Förster-Radius ähnlich des untersuchten Abstandes, um mit kleinen Änderungen des Abstandes signifikante Änderungen in der Transfereffizienz zu erhalten (siehe Abbildung 2.7). In der Literatur sind dafür bereits Beispiele aufgeführt [72, 110, 135].

In Propylenglykol verringert sich die Transfereffizienz auf 0,77, und die Verteilung wird deutlich breiter. Trotz des kleineren Förster-Radius' (5,5 nm) ergibt sich ein größerer mittlerer Farbstoffabstand von 4,5 nm. Propylenglykol besitzt eine ca. 40 mal höhere Viskosität als Wasser. Bei einer Donorlebenszeit von 1,1 ns bei Anwesenheit des Akzeptors und einer Rotationskorrelationszeit von 6,4 ns kann hier nicht mehr von einer vollständigen Reorientierung des Donors während seiner Zeit im angeregten Zustand ausgegangen werden. Der mittlere Orientierungsfaktor wäre damit kleiner (siehe Abschnitt 2.1.8) und somit auch der Förster-Radius, d. h., der Energietransfer ist weniger effizient. Allein durch die (maximal mögliche) Änderung des Orientierungsfaktors auf 0,476 ließe sich die geringe Transfereffizienz jedoch nicht ganz erklären, denn auch mit dem daraus resultierenden Förster-Radius von 5,2 nm beträgt die Transfereffizienz bei einem theoretischen Abstand von 4,0 nm noch 0,83. Sehr wahrscheinlich kommt es auch zu einer strukturellen Änderung. Es ist bekannt, dass Polyprolin in organischen Lösungsmitteln weniger kompakt vorliegt als in wässriger Lösung [79]. Auch die Persistenzlänge von Polyprolin ist in Propylenglykol mit 22 nm [109, 135] deutlich größer als in Wasser (max. 13 nm)[11]. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Helix stabilisiert wird und in einer gestreckteren Konformation vorliegt, sodass die Farbstoffe einen größeren Abstand voneinander haben.

Auffällig ist auch die Breite der Verteilung. In den anderen Medien zeigte Prolin 6 shotnoise-limitierte Verteilungen, jedoch nicht in Propylenglykol. Ein Einfluss von Propylenglykol auf die optischen Bedingungen des Konfokalmikroskops konnte mit der Messung von Tetra-Speck-Kugeln ausgeschlossen werden. Die Analyse von photochemischen Prozessen im konfokalen Fokus konnte aber zeigen, dass die Verbreiterung des Histogramms zum Teil durch Akzeptorbleichen im Fokus entsteht. Auch die bereits oben erwähnte unvollständige Reorientierung des Donors kann zur Verbreiterung beitragen, da dadurch jedes Fluorophorenpaar einen anderen Orientierungsfaktor tragen kann. Diese κ^2 -Heterogenität spiegelt sich dann auch in der Transfereffizienz wider.

Prolin 20 Die FRET-Messungen an Prolin 20 zeigen in allen Medien Verteilungen, die breiter als eine shotnoise-limitierte Verteilung sind. Sowohl experimentelle als auch photo-physikalische/-chemische Ursachen können ausgeschlossen werden, sodass eine Abstandsverteilung bzw. Konformationsheterogenität vorliegen muss. Schon in der theoretischen Betrachtung der Transfereffizienz in Abbildung 6.5 sind zwei Verteilungen sichtbar, die zudem etwas breiter sind als es mit reiner Photostatistik erklärbar wäre. Die gemessenen Histogramme zeigen anstatt einer zweiteiligen Verteilung eine breite mit einer Transfereffizienz zwischen 0,1 und 0,8.

Im Folgenden wird zunächst auf die ermittelte Konformationsheterogenität eingegangen. Anschließend werden die resultierenden Fluorophorabstände mit denen der Simulation verglichen und die Unterschiede diskutiert.

Die Histogramme in TFE und Propylenglykol lassen sich mithilfe zweier Gauß-Kurven gut beschreiben. Die größeren Populationen in beiden, die den größeren Abstand aufweisen (7,1 nm und 6,8 nm), lassen auf eine gestreckte Peptidkonformation ohne *cis*-Bindungen schließen. TFE besitzt die Eigenschaft, *trans*-Bindungen in einer Polyprolinkette zu begünstigen [23]; das Isomerieverhalten in Propylenglykol ist jedoch nicht bekannt. Die zweite, kleinere Population mit den kleineren Abständen (6,3 nm und 6,1 nm) wird auf eine Verkürzung des Abstandes durch ein terminales *cis* zurückgeführt. In TFE konnten mithilfe von NMR-Spektroskopie *cis*-Bindungen am C-Terminus nachgewiesen werden [11]. Wo sich die (vermutete) terminale *cis*-Bindung in Propylenglykol befindet, kann nicht genau gesagt werden. In der Literatur wurde in Propylenglykol mit zirkularem Dichroismus (CD) eine *cis*-Population von ca. 25 % am N-Terminus gemessen, dabei handelte es sich jedoch um eine Tryptophan-Prolin-Bindung [109]. In wässriger Lösung war die Population etwas höher und betrug ca. 30 %. Eine andere Untersuchung N-terminaler *cis/trans*-Isomerie bei Prolinen zeigte auch für ein N-terminales Glyzin, also vergleichbar mit dem hier untersuchten Prolin, 13,7 % *cis* in Wasser [106]. Der Anteil der in dieser Arbeit ermittelten kompakteren Population beträgt 30 %, sodass möglicherweise an beiden Enden *cis*-Bindungen vorliegen. Das Histogramm in wässriger Lösung lässt sich erst mit drei Gauß-Kurven zufriedenstellend anpassen. Sowohl die resultierenden mittleren Abstände (6,6 nm, 6,4 nm, 5,7 nm) als auch die breiten Verteilungen der Transfereffizienzen lassen auf eine sehr flexible Peptidkette mit mehreren Konformationen schließen. Im Vergleich zu TFE und Propylenglykol sind die Abstände zudem kürzer. Das bestätigt zum Einen die Aussage, dass Polyproline in den organischen Lösungsmitteln ausgedehnter/gestreckter sind [79] und zum Anderen, dass, zumindest in Propylenglykol, die Persistenzlänge viel größer und die Kette somit steifer ist [11, 135]. Des Weiteren macht die Breite der Verteilung, die Transfereffizienzen bis 0,8 zulässt, deutlich, dass viele Konformationen, d. h. Peptide mit *cis*-Bindungen, vorliegen müssen. Eine Transfereffizienz von 0,8 bringt die Farbstoffe auf einen Abstand von ca. 4,7 nm. Allein durch Peptidflexibilität ist dieser Abstand nicht zu erklären. Erst eine oder mehrere *cis*-Bindungen, die eine Art Knick in der Peptidhelix verursachen, bringen die Peptidenden so nah zueinander.

Die experimentell erhaltene mittlere Transfereffizienz in NaP-Puffer ist mit 0,41 viel höher als die theoretisch erwartete von 0,1. Diese große Abweichung kann zwei Ursachen haben. Zum Einen hat der Korrekturfaktor γ Einfluss auf die Position der mittleren Transfereffizienz. Die den Korrekturfaktor beeinflussende Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors konnte nicht bestimmt werden, sodass ein Literaturwert herangezogen wurde. Da sich γ jedoch bei der Analyse der Transfereffizienz von Prolin 6 bereits als geeignet herausstellte und eine so große Abweichung nicht allein durch die Akzeptorquantenausbeute erklärbar ist, wird γ als Ursache ausgeschlossen. Viel wahrscheinlicher als Ursache ist die Unzulänglichkeit der Monte-Carlo-Simulation, die nur die Länge einer steifen Prolinkette ermittelt und keine Flexibilität dieser zulässt. Ein Vergleich der MC-Simulation mit dem WLC-Model zeigt (Abbildung 6.3), dass sich die Peptidkette aufgrund von Flexibilität um 1 nm bis 2 nm verkürzen kann. Das entspricht in etwa dem zusätzlichen Abstand der Farbstoffe durch die Linker von der Peptidkette von 1,7 nm. Bei der theoretischen Betrachtung wurde auch ein Histogramm erstellt, in dem nur der Abstand der Peptidenden bei der Berechnung der Transfereffizienz berücksichtigt wurde. Die somit erhaltene mittlere Transfereffizienz von 0,33 ist dem Experiment schon näher. Es scheint, dass aufgrund der fehlenden Flexibilität der langen Prolinkette die MC-Simulation zu große Abstände liefert, sie bei kurzen Peptidketten, wie Prolin 6, aber eine gute Näherung gibt.

Ob sich die Farbstoffe an den Enden der Prolinkette wirklich auf 5,7 nm bis 6,6 nm nähern (siehe Tabelle 6.3), entsprechend einer Transfereffizienz von 0,41, kann nicht genau gesagt werden. Bedingt durch die Flexibilität von Prolin 20, kann es auch zu einer Erhöhung der Transfereffizienz durch die Diffusion der Peptidenden kommen („diffusion enhanced FRET“) [78, 120]. Nähern sich die Peptidenden mit den gebundenen Farbstoffen, während der Donor sich im angeregten Zustand befindet, so steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Energietransfer stattfindet. Bei sehr flexiblen Ketten kann somit eine höhere Transfereffizienz gemessen werden. Für eine (beliebige) Peptidkette mit 20 Aminosäuren und einer Donorlebenszeit von 1 ns bis 3 ns kann die gemessene Transfereffizienz sogar bis zu 30 % abweichen [78].

Abschließend ist zu klären, warum die zweite Population der theoretischen Verteilung bei höheren Transfereffizienzen nicht im Experiment zu sehen ist. Auch dies wird wiederum mit der fehlenden Flexibilität in der Simulation begründet. In der Simulation sind die Populationen ohne und mit *cis*-Bindung, die einen Knick in der Peptidkette und damit einen kürzeren Abstand hervorrufen, klar voneinander getrennt. Im Experiment ist nur eine sehr breite Verteilung zu sehen, die eher eine Verschmelzung beider Populationen darstellt. Dies zeigt, dass ein Knick in einer flexiblen Kette nicht notwendigerweise zu einer Verkürzung des Terminiabstandes führen muss, und somit die Abstandsunterschiede verschiedener Konformationen geringer als in der Simulation ausfallen.

Dass die Farbstoffe sich gegenseitig durch Kontakt quenchen, kann bei Prolin 20 ausgeschlossen werden. Ein Abstand von 1 nm, bei dem PET wahrscheinlich ist, ist bei Prolin 20 auch für mehrere *cis*-Bindungen sehr unwahrscheinlich [33].

Zusammenfassend kann man feststellen, dass FRET-Messungen in Lösung zur Charakterisierung von Konformationen gut geeignet sind. Dabei ist eine gründliche Analyse der photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe Voraussetzung für eine richtige Interpretation der Daten. Die markierten Polyprolinketten, die aufgrund ihrer starren Struktur als Referenzlineal dienen sollten, zeigten eine ausgeprägte Konformationsheterogenität.

6.3 FRET bei tiefen Temperaturen (77 K)

Für die Messungen bei 77 K wurden die Polypeptide in 50 mM NaP-Puffer, pH 7,0, der 7,5% (w/w) Trehalose enthält, auf Konzentrationen im Nanomolarenbereich (500 pM - 5 nM) verdünnt. Nach der Probenpräparation im Kalt-Rotationsbeschichter (siehe Abschnitt 3.2.2) und dem Probentransfer auf das Mikroskop erfolgten sowohl Bildaufnahmen als auch Messungen von transienten Intensitäten einzelner Moleküle (siehe Kapitel 7). Die Bildaufnahme ist durch die Raster Spiegel und das 60fach vergrößernde Luftobjektiv auf eine Gesamtfläche von $160 \times 160 \mu\text{m}^2$ beschränkt. Für die Energietransfer-Experimente wurde eine Bildgröße von $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ mit $128 \times 128 \text{ Pixel}^2$ und eine Integrationszeit von 1 ms pro Pixel gewählt. Die Anregungsleistung wurde je nach Experiment für den 488 nm Laser zwischen $5 \mu\text{W}$ und $60 \mu\text{W}$ eingestellt; für den 594 nm Laser auf $20 \mu\text{W}$. Das Licht beider Laser war zirkular polarisiert.

Die Messungen erfolgten nur in NaP-Puffer mit Trehalosezusatz. Einzelmolekülexperimente in Propylenglykol und in TFE zeigten sich problematisch.

In Propylenglykol konnten keine einzelnen Peptide gefunden werden, was auf Quenchprozesse und eine damit verbunden geringe Fluoreszenzintensität zurückgeführt wird. In Abbildung 6.13a ist zur Veranschaulichung Prolin 6 in Propylenglykol bei 77 K gezeigt. Trotz einer sehr hohen Konzentration von 100 nM und einer Anregungsleistung von $30 \mu\text{W}$ wurden im Mittel nur ca. 40 Photonen pro Millisekunde und Pixel in beiden Kanälen detektiert.

Bei den Experimenten in TFE bildeten sich wiederholt Strukturen, zu sehen in Abbildung 6.13b. Aus diesem Grund erfolgten keine Messungen auf Einzelmolekülniveau in TFE.

6.3.1 Dicke der Eisschicht

Die Dicke der Eisschicht kann mithilfe der Flächendichte detektierter Moleküle und der Konzentration der markierten Proline abgeschätzt werden. Eine Peptidkonzentration von 500 pM, bestimmt durch die Donorabsorption, und eine Flächendichte von ungefähr 30 Molekülen auf einer Fläche von $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ergibt eine Schichtdicke, die dünner als ein Mikrometer ist. Die Molekülanzahl wurde aus der Summe von Donor- und Akzeptorkanal

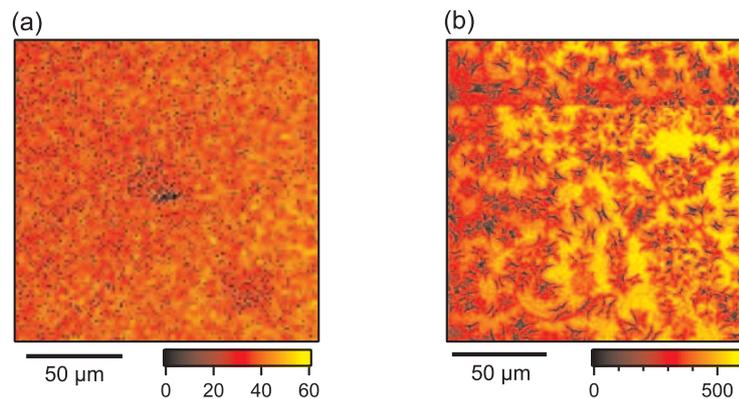


Abbildung 6.13: Prolin 6 in Propylenglykol und AF488 in TFE bei 77 K

(a) Summenbild des Donor- und des Akzeptorkanals von Prolin 6, eingefroren in Propylenglykol. Der Intensitätsbalken gibt die Photonen pro Millisekunde und Pixel an. Aufgrund der niedrigen Fluoreszenzintensität, trotz einer hohen Konzentration von 100 nM und einer Anregungsleistung von $30 \mu\text{W}$, wird auf ein Quenchen der Fluoreszenz in Propylenglykol geschlossen. Die mittige, dunkle Stelle wurde bereits durch die Anregung geblichen. Das bestätigt, dass es sich bei dem Signal um Fluoreszenz und nicht um Hintergrund handelt. (b) Der freie Farbstoff AF488 ($1 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{W}$) in TFE während einer Lebenszeitmessung. Das Summenbild der Kanäle unterschiedlicher Polarisation (siehe Abschnitt 5.4) zeigt deutliche Strukturen.

bestimmt. Proline, die nur einen Akzeptor tragen, werden weder in der Konzentrationsbestimmung noch in der Statistik beachtet. Moleküle, die sich während der gesamten Bildaufnahme in einem Dunkelzustand befinden und somit in der Statistik fehlen, können ausgeschlossen werden. Wie die Photophysikanalyse in Abschnitt 7 zeigt, sind die Dunkelzustände zu kurz, um Moleküle zu verbergen.

6.3.2 Bildaufnahme mit abwechselnder Laseranregung (ALEX)

Durch die unterschiedliche Bindungschemie der Fluorophore sollte jedes Polyprolin je einen Donor und einen Akzeptor tragen. Polyproline mit zwei Donoren oder Akzeptoren sind nicht möglich. Es kann jedoch sein, dass nur ein Farbstoff gebunden ist, oder, dass ein Farbstoff photoinaktiv ist. Während ein Prolin, das nur einen Akzeptor trägt, bei der für FRET entscheidenden Donoranregung nicht sichtbar ist, kann ein Molekül mit nur einem Donor fälschlich auf eine geringe Transfereffizienz schließen lassen. Um diese Moleküle zu unterscheiden, erfolgt die Bildaufnahme bei einer Probe mit abwechselnder Laseranregung (Alternating Laser Excitation - ALEX).

Dafür wird jede Zeile zweimal gerastert. Erst erfolgt die Anregung der Probe mit dem 488 nm Laser, der den Donorfluorophor direkt anregt. Detektiert wird dabei die Fluoreszenz des Donors und die durch FRET vermittelte Fluoreszenz des Akzeptors. Um die Anwesenheit eines intakten Akzeptors zu überprüfen, wird jede Zeile dann mit dem 594 nm Laser gerastert. Dabei werden im Akzeptorkanal alle Moleküle, die ein Akzeptorfluorophor tragen, detektiert. Die resultierenden vier Bilder einer Probenfläche sind in Abbildung 6.14 dargestellt.

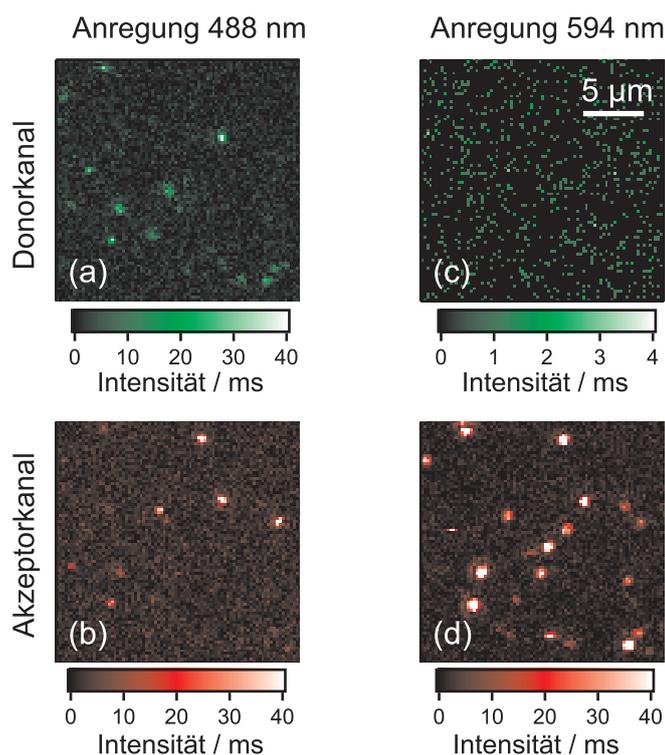


Abbildung 6.14: Bildaufnahme mit ALEX

In den FRET-Experimenten bei 77 K erfolgt das Abrastern einer Zeile immer doppelt. Erst wird der Donor mit 488 nm direkt angeregt (a,b), dann der Akzeptor mit 594 nm (c,d). Detektiert wird jeweils im Donorkanal (a,c) und im Akzeptorkanal (b,d), sodass pro Aufnahme vier Bilder entstehen.

Mithilfe dieser Bilder ist nun sowohl eine Stöchiometrie- als auch eine FRET-Analyse der Probe möglich. In Abbildung 6.15 ist ein Beispiel für die Auswertung der Bilder anhand einer Messung mit Prolin 20 gezeigt. Zunächst wird ein Summenbild aus dem Donor- und dem Akzeptorkanal bei 488 nm Anregung erstellt und Moleküle, deren Summenintensität über einer bestimmten Schwelle liegt, markiert. Um hier zwischen Molekülen mit einem oder zwei Fluorophoren zu unterscheiden, wird zunächst ein Stöchiometriebild, zu sehen in Abbildung 6.15b, erstellt. Dafür werden die Bilder des Donor- und des Akzeptorkanals, die einmal während der Donor- und einmal während der Akzeptoranregung entstanden, addiert und anschließend übereinandergelegt. Moleküle, die während der Donoranregung fluoreszierten (unabhängig in welchem Kanal), tragen auf alle Fälle einen Donor und erscheinen grün im Stöchiometriebild. Moleküle, die einen Akzeptor tragen, erscheinen rot. Befinden sich zwei Fluorophore an einem Prolin, so emittieren sie bei beiden Anregungen und sind somit gelb im Stöchiometriebild.

Zur Berechnung der Transfereffizienz werden nur diese gelben Moleküle herangezogen. Die nach Gleichung 6.1 berechnete Transfereffizienz ist farblich kodiert in Abbildung 6.15 zu

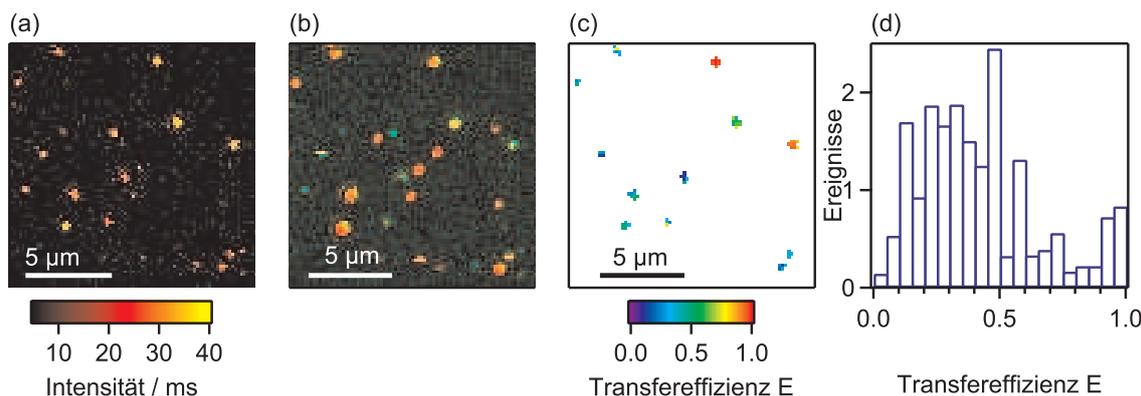


Abbildung 6.15: Analyse der FRET-Experimente bei 77 K

(a) Summenbild aus Donor- und Akzeptorkanal während der Donoranregung (488 nm). Zu sehen sind direkt angeregte Donormoleküle oder durch Energietransfer angeregte Akzeptormoleküle. (b) Durch das Stöchiometriebild kann zwischen Molekülen, die ein FRET-Paar oder nur ein Fluorophor tragen, unterschieden werden. Grüne Punkte zeigen die gesamte Emission bei Donoranregung und rote die bei Akzeptoranregung. Besitzt ein Molekül beide Farbstoffe und emittiert folglich bei beiden Anregungen, so erscheint der Punkt gelb. (c) Zur Berechnung der Transfereffizienz werden nur die gelben Moleküle genommen. Der Hintergrund wird durch eine Schwelle für das Summensignal bei Donoranregung entfernt. Die Transfereffizienz, farblich kodiert, zeigt hohen Energietransfer in rot und niedrigen in blau. (d) Die Transfereffizienzen aus (c) werden in ein Histogramm übertragen.

sehen. Hohe Transfereffizienz ist demnach in rot gezeigt, niedrige in blau. Der gesamte Hintergrund ist durch das Anlegen der Summenschwelle entfernt und somit weiß.

Zur genaueren Analyse werden dann die Transfereffizienzen der einzelnen Moleküle in ein Histogramm übertragen. Das Histogramm der Beispielmessung ist in Abbildung 6.15d gezeigt. Zunächst wird für jedes Molekül, da es aus mehreren Pixeln besteht, ein Histogramm erstellt. Dieses Histogramm wird auf Eins normiert, d. h. durch die Anzahl der Pixel geteilt, um im Gesamthistogramm nicht nur Aussagen über die Verteilung, sondern auch über die Anzahl der Moleküle treffen zu können.

6.3.3 Transfereffizienz-Histogramme der Polyproline bei 77 K

Für die Erstellung der Histogramme wurden folgende Parameter bzw. Schwellen genutzt. Der Hintergrund wurde aus Bildausschnitten, die keine fluoreszierende Moleküle enthielten, entnommen und über viele Messungen gemittelt. Danach wurde im Akzeptorkanal ein Hintergrund von vier Photonen pro Millisekunde und Pixel, und im Donorkanal zwei Photonen pro Millisekunde und Pixel abgezogen. Die Summenschwelle, d. h. die Summe der Signale beider Kanäle während der Donoranregung, wurde auf 20 Photonen pro Millisekunde und Pixel festgesetzt. Die Schwelle für das Akzeptorsignal während der Akzeptoranregung, die bestimmt, ob ein Prolin einen Akzeptor trägt, wurde ebenfalls auf 20 Photonen pro Millisekunde und Pixel festgelegt.

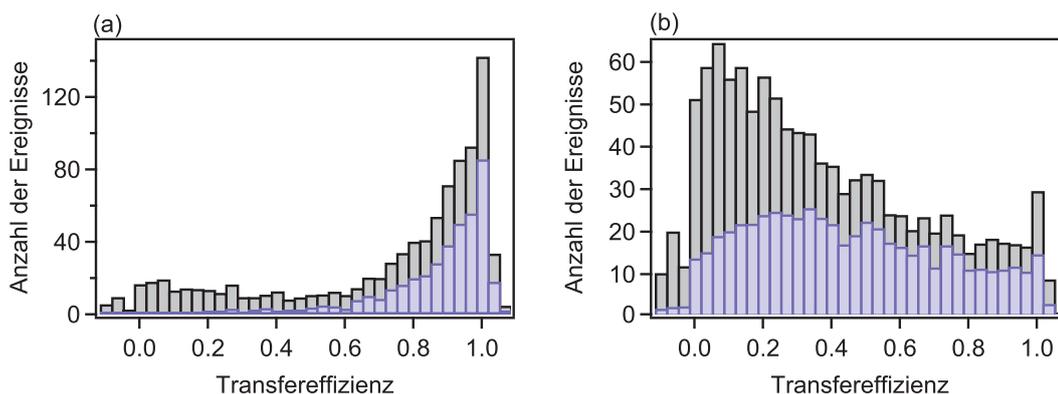


Abbildung 6.16: Transfereffizienz-Verteilung ohne und mit Akzeptorschwelle
 Transfereffizienz von Prolin 6 (a) und von Prolin 20 (b) ohne (schwarz) und mit (blau) Akzeptorschwelle. Durch die Photos Selektion bei der Anregung werden nicht nur einfach-donor markierte Proteine aussortiert, sondern auch die, deren Akzeptor kaum oder nur schwach angeregt wird.

Einfluss der Akzeptorschwelle In Abbildung 6.16 sind die Transfereffizienz-Verteilungen von Prolin 6 und Prolin 20 ohne und mit Akzeptorschwelle dargestellt. Durch die Akzeptorschwelle reduziert sich die Anzahl der detektierten Moleküle bei Prolin 6 von 944 auf 421, bei Prolin 20 von 1116 auf 558. Deutlich ist, dass die Anzahl der Ereignisse in beiden Histogrammen nicht nur bei kleinen Transfereffizienzen verringert ist, sondern über das gesamte Histogramm verteilt. Insbesondere bei Prolin 6 ist keine bestimmte Population auszumachen, die auf Moleküle ohne aktive Akzeptor zurückzuführen ist. Durch die Akzeptorschwelle werden hier Moleküle mit allen möglichen Transfereffizienzen aussortiert. Bei Prolin 20 hingegen befindet sich der größte Anteil der aussortierten Population bei geringen Transfereffizienzen, und wird damit auf Moleküle, die nur einen Donor tragen, zurückgeführt. Dass dieser Anteil bei Prolin 20 größer ist, bestätigt die Verteilung von einfach (-donor) und doppelt markierten Peptiden, die schon aus den Lösungsexperimenten ersichtlich war. In Abbildung 6.9 zeigt sich sowohl in NaP-Puffer als auch in Trehalose-Puffer bei Prolin 20 ein größere Population von Molekülen, die nur einen Donor tragen.

Trotz zirkular polarisierter Anregung werden nicht alle Fluorophordipole gleichwahrscheinlich angeregt (siehe auch Abschnitt 2.1.6). D. h., ein Akzeptormolekül könnte z. B. durch den Donor über FRET angeregt werden, aber nicht direkt oder nur schwach durch den Akzeptorlaser selbst. Somit würde zwar FRET während der Donoranregung detektiert werden, das Akzeptorsignal bei direkter Anregung ist jedoch zu schwach, um in die Statistik aufgenommen zu werden. Aus diesem Grund werden Ereignisse mit allen Transfereffizienzen durch die Akzeptorschwelle aussortiert.

Prolin 6 Abbildung 6.17a zeigt die Transfereffizienz-Verteilung von Prolin 6 bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff. Ähnlich der Messung in Lösung zeichnet sich Prolin 6 durch eine sehr hohe Transfereffizienz aus. Bei der Verteilung, bestehend aus 421 Teilchen, gibt es nur wenige mit geringer Transfereffizienz.

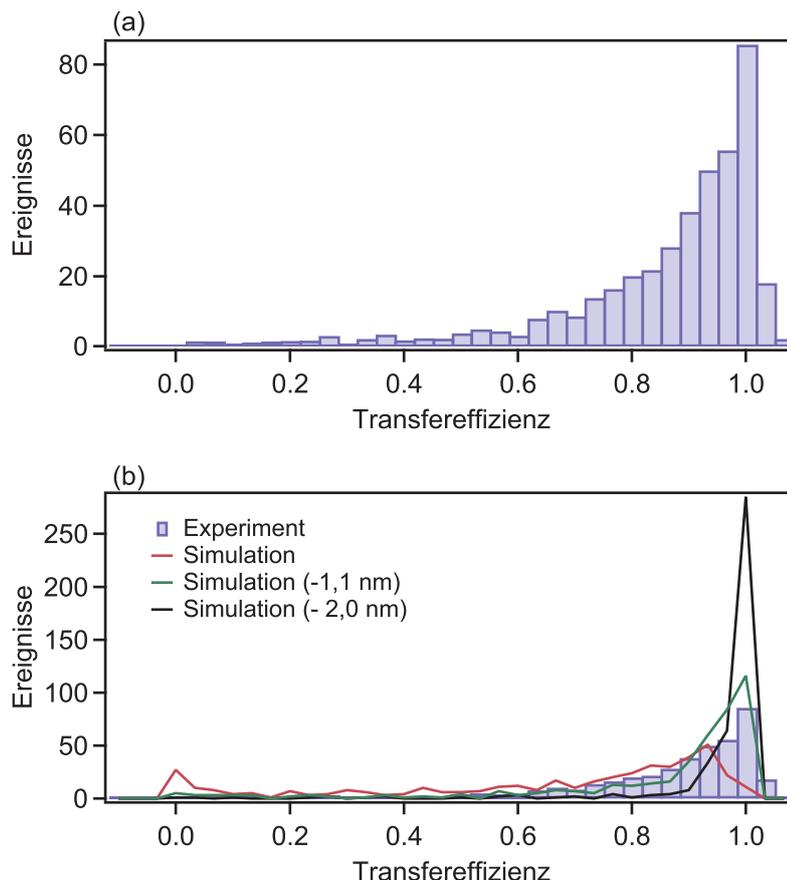


Abbildung 6.17: Transfereffizienz-Verteilung bei Prolin 6

(a) Die Transfereffizienz-Verteilung von 421 Prolin 6 - Molekülen zeigt eine hohe Transfereffizienz zwischen 0,8 und 1,0. (b) Über die experimentelle Verteilung (blau) ist die Simulation mit den Fluorophorabständen entsprechend der MC-Simulation (rot) gelegt, sowie die Simulationen mit um 1,1 nm (grün) und um 2 nm (schwarz) gekürzten Abständen. Dabei gibt die mit um 1,1 nm gekürzten Abständen die gemessene Verteilung sehr gut wieder.

Mithilfe der in Abschnitt 6.1 bestimmten Fluorophorabstände und der bekannten Verteilung des Orientierungsfaktors in einem statischen Ensemble konnte bereits die erwartete Transfereffizienz-Verteilung eingefrorener Polyproline simuliert werden (siehe Abbildung 6.6). In Abbildung 6.17b ist die gleiche Simulation für 421 Moleküle im Vergleich mit dem Experiment dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Simulation die Transfereffizienz unterschätzt. Während der Schwerpunkt der Verteilung in der Simulation bei einer Transfereffizienz von 0,9 liegt, ist er im Experiment bei einer Transfereffizienz von 1,0. Zudem zeigt die Simulation einen geringen Anteil ohne Energietransfer, der im Experiment fehlt. Für die Abweichung sind zwei Erklärungen denkbar. Auf der einen Seite kann die angenommene Akzeptorquantenausbeute von 0,66, die den Korrekturfaktor γ beeinflusst, zu klein sein. Um das Maximum der experimentellen Verteilung auf eine Transfereffizienz von 0,9 zu bringen, ist jedoch die maximal mögliche Akzeptorquantenausbeute nicht ausreichend. Die Änderungen im experimentellen Histogramm sind dabei nur minimal (nicht gezeigt). Auf der anderen Seite können die aus der MC-Simulation ermittelten Terminiabstände der

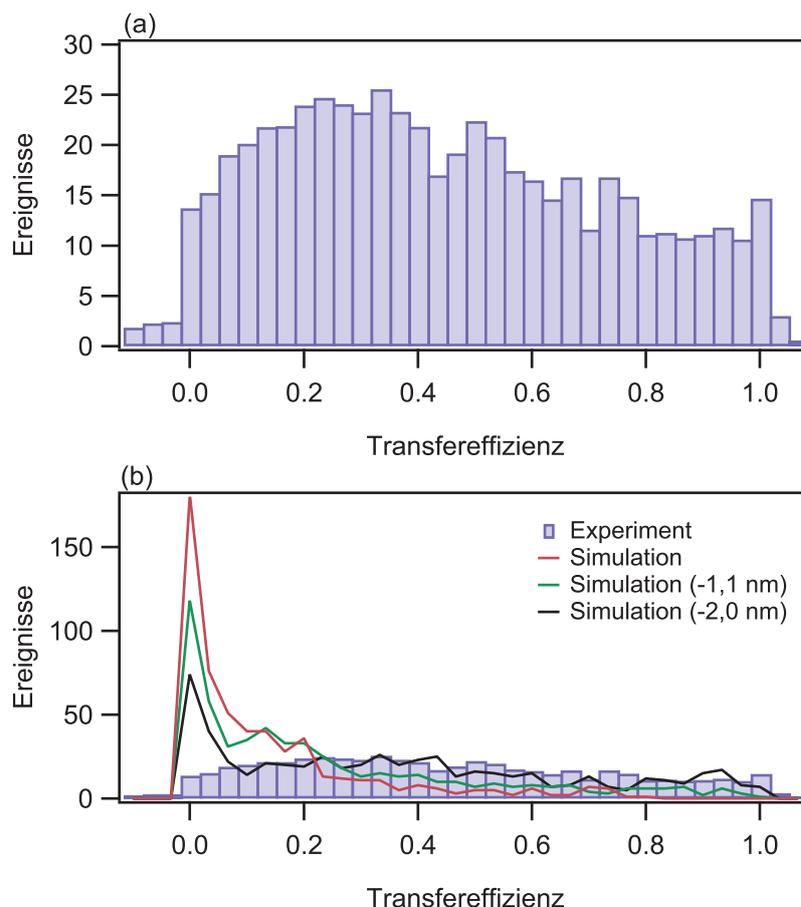


Abbildung 6.18: Transfereffizienz-Verteilung bei Prolin 20

(a) In dem Histogramm ist die über den ganzen Bereich ausgedehnte Transfereffizienz-Verteilung von 558 Prolin 20 - Molekülen zu sehen. (b) Über der experimentellen Verteilung (blau) liegen die simulierten Verteilungen, deren Grundlage die Abstände der MC-Simulation (rot) und um 1,1 nm (grün) bzw. 2 nm (schwarz) gekürzte Abstände sind. Ein Kürzung der Abstände um 2 nm passt die experimentellen Daten gut an, mit Ausnahme auf die Population ohne Energietransfer.

Proline zu groß sein, da sie die Flexibilität einer Peptidkette nicht berücksichtigt. Um diese Flexibilität versuchsweise zu berücksichtigen, wurden die Fluorophorabstände, die in die Simulation eingehen, systematisch um wenige Ångström gekürzt. Der Abbildung 6.17b sind zwei dieser Versuche hinzugefügt. Während eine Kürzung des Abstandes um 2 nm bereits eine zu hohe Transfereffizienz zeigt, passt die Verteilung bei einer Kürzung um 1,1 nm sehr gut.

Prolin 20 Das Transfereffizienz-Histogramm von Prolin 20 in Abbildung 6.18a zeigt eine sehr breite Verteilung. Die Simulation der Transfereffizienz, entsprechend dem Experiment mit 558 Molekülen, unterschätzt, ähnlich Prolin 6, die gemessene Transfereffizienz (6.18b). Auch hier wurden daraufhin die Fluorophorabstände aus der MC-Simulation systematisch gekürzt und die resultierenden Verteilungen mit der des Experiments verglichen. Bei einer Kürzung um 2 nm stimmen die gemessene und die theoretische Verteilung sehr gut überein.

Der einzige Unterschied zur Simulation ist die fehlende Population ohne Energietransfer, d. h. bei einer Transfereffizienz von 0.

Diskussion Die Effizienz des Energietransfers an einzelnen, eingefrorenen Polyprolinen unterscheidet sich deutlich von der in Lösungsexperimenten. Prolin 6 zeigt, begründet durch den sehr kurzen Abstand der Fluorophore, eine sehr hohe Transfereffizienz nahe Eins. Die Verteilung ist aber dennoch breiter als in Lösung, da sie Transfereffizienzen bis 0,6 zulässt. Die Verteilung von Prolin 20 ist, verglichen mit dem Lösungsexperiment, gänzlich verschieden. Die Transfereffizienzen sind fast gleichmäßig zwischen 0,0 und 1,0 verteilt; mit einer Tendenz zu Effizienzen unter 0,6.

In einem ersten Versuch, diese Verteilungen zu simulieren und erklären zu können, wurde die statische Verteilung des Orientierungsfaktors und, mithilfe einer MC-Simulation, die *cis-trans*-Isomerie der Polyproline berücksichtigt. Die so erhaltenen Transfereffizienzen eines statischen Ensembles waren jedoch geringer als die experimentell ermittelten. Ähnlich der Messungen in Lösung wurde dies auf die fehlende Flexibilität der Polyproline in der MC-Simulation zurückgeführt. Durch systematisches Kürzen der Fluorophorabstände, um der Flexibilität versuchsweise Rechnung zu tragen, konnten die Transfereffizienz-Verteilungen von Prolin 6 und Prolin 20 sehr gut mit der Simulation beschrieben werden. Für Prolin 6 zeigte eine Kürzung um 1,1 nm die entsprechende Verteilung. Bei Prolin 20, der längeren und somit flexibleren Kette, passte die Simulation mit 2 nm kürzeren Fluorophorabständen. Die relativen Kürzungen beider, bei Prolin 6 sind es 28% und bei Prolin 20 24%, stimmen gut überein. Zusätzlich zu berücksichtigen ist hier, dass zur Berechnung der Fluorophorabstände den Terminiabständen der Peptide aus der MC-Simulation ein konstanter Abstand von 1,7 nm hinzugefügt wurde, welcher jedoch den maximal möglichen Abstand darstellt. Das heißt, aufgrund der sehr flexiblen Farbstofflinker ist ein kürzerer Fluorophorabstand recht wahrscheinlich. Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass sich die Verteilung der Transfereffizienzen im eingefrorenen Zustand mithilfe der statischen κ^2 -Verteilung, der *cis-trans*-Isomerie⁵ der Polyproline und der Flexibilität von Peptidketten gut erklären lässt.

Als signifikanter Unterschied zwischen Simulation und Experiment wurden die in den Messungen fehlenden Ereignisse bei kleinen Transfereffizienzen um Null festgestellt. In der Simulation sind diese Ereignisse auf zueinander senkrecht orientierte Fluorophore, deren Orientierungsfaktor einen Wert nahe Null ergibt (siehe Abschnitt 2.1.7), zurückzuführen. Eine Studie zeigte, dass trotz zueinander senkrecht orientierter Farbstoffe Energietransfer stattfindet [73]. Als Begründung wurden mögliche räumliche Fluktuationen der Moleküle angegeben, die jedoch in der eingefrorenen Umgebung bei 77 K ausgeschlossen werden können. Es scheint, dass die Dipolnäherung der Fluorophore zur Erklärung des Energie-

⁵Ohne die *cis-trans*-Isomerie, d. h. nur mit den Fluorophorabständen der gestreckten Konformation, fehlen in der theoretischen Verteilung (Abb. 6.18), die das Experiment gut wiedergibt (schwarz), die Transfereffizienzen zwischen 0,8 und 1,0.

transfers nicht genügt und höhere Momente (z. B. Quadrupole) existieren und beachtet werden müssen [129].

Dennoch ist dieses Ergebnis aufgrund der vielen Parameter, die den Energietransfer bei 77 K beeinflussen und die zum Teil nur abgeschätzt sind, erstaunlich. Aufgrund des statischen Zustandes bei 77 K besitzt jedes Fluorophorenpaar einen anderen κ^2 -Wert, unterschiedliche Emissions- und Absorptionsspektren, wahrscheinlich, je nach lokaler Umgebung, verschiedene Quantenausbeuten, und somit einen anderen Förster-Radius. Folglich kann die Transfereffizienz trotz gleichem Fluorophorabstand erheblich variieren. Die Trennung verschiedener Konformationen eines Proteins, die mit nur recht kleinen Abstandsänderungen gebundener Farbstoffe einhergehen, ist dadurch kaum möglich. Zwar könnte z. B. bei einer Mischung von Prolin 6 und Prolin 20 auf zwei verschiedene Konformationen geschlossen werden, Aussagen über weitere Konformationen wären aber eher spekulativ.

Es ist eine weitere Studie bekannt, die den Energietransfer von Prolin 6 und Prolin 20 im eingefrorenen Zustand behandelt [145]. Die Peptide sind mit den gleichen Farbstoffen markiert, jedoch in einer dünnen Schicht Glycerol bei 170 K eingefroren. Die Transfereffizienz-Histogramme, erstellt aus transienten Intensitäten einzelner Moleküle, zeigen für Prolin 6 zwei sehr breite Verteilungen bei Transfereffizienzen von 0,2 und 0,75, und für Prolin 20 eine breite Verteilung bei einer Effizienz von 0,15, sowie einige Ereignisse bis zu Effizienzen von 0,8. Diese Verteilungen unterscheiden sich somit signifikant von denen in dieser Arbeit. Einerseits gibt es Proline mit Transfereffizienzen nahe Null, die hier nicht detektiert wurden. Zudem gibt es keine Erklärung für die breiten Verteilungen bei Prolin 6. Schlussfolgernd wurde jedoch auch festgehalten, dass sowohl der Einfluss der (Re)-Orientierung der Moleküle als auch der des Orientierungsfaktors κ^2 bei Messungen in eingefrorenen Umgebungen beachtet werden.

Der Orientierungsfaktor spielt bei dieser Art von Experimenten die wohl wichtigste Rolle. Um dieses Problem zu umgehen, sind zwei Ansätze denkbar. Entweder muss κ^2 für jedes einzelne Fluorophorenpaar bei der Messung mitbestimmt werden, oder κ^2 ist für jedes Paar gleich groß.

Um den Orientierungsfaktor direkt zu bestimmen, ist eine 3D-Orientierungsmessung, die die Orientierung der Fluorophordipole im Raum ermittelt, möglich [57, 58]. Um damit κ^2 zu berechnen, ist jedoch auch die Kenntnis des Verbindungsvektors nötig (siehe Abschnitt 2.1.7). Durch die 2D-Abbildung der Proline kann jedoch nur eine Projektion des Verbindungsvektors, d. h. nur seine ungefähre Richtung, bestimmt werden. Mit FIONA (fluorescence imaging with one-nanometer accuracy, [143, 142]) sind Fluoreszenzmessungen mit einer Auflösung von bis zu einem 1 nm möglich. Die Genauigkeit δx , mit der die Position eines fluoreszierendes Molekül angegeben wird, kann über die Gleichung $\delta x = \sqrt{\sigma^2/N}$ abgeschätzt werden. Dabei ist σ die Standardabweichung der mit einem Gauß-Profil angepassten Punkt-Abbildungs-Funktion (siehe Abschnitt 2.2.2) und N die Anzahl der detektierten Photonen eines Moleküls [127]. Eine Genauigkeit von ungefähr 0,8 nm kann somit

mit 100000 Photonen erreicht werden, was zur Bestimmung der Richtung des Verbindungsvektors genügen sollte [56].

Um die Transfereffizienz weniger von κ^2 abhängig zu machen, ist die Nutzung von Quantenpunkten (Quantum dots - QD) als Fluorophor [30, 22] denkbar. Da sie über einen sehr großen Absorptionsbereich und einen schmalen Emissionsbereich verfügen, eignen sie sich als Donor in einem FRET-Experiment. Anstatt eines Liniendipols, wie die meisten organischen Fluorophore, besitzt z. B. ein Cadmiumselenid-QD einen zweifach-entarteten (2D) Dipol [19]. Der Energietransfer auf einen Akzeptor ist damit weniger abhängig von der Orientierung des Donors, sodass κ^2 für jedes (einzelne) Fluorophorenpaar gleich groß ist. Meist wird sogar aufgrund der teilweise zufälligen Orientierung des Donordipols der Mittelwert von $2/3$ angenommen [22]. Nachteilig an QD ist jedoch ihre Größe, die, je nach Emissionswellenlänge, einige Nanometer betragen kann [21]. Des weiteren müssen QD, z. B. über eine Beschichtung, funktionalisiert werden, um mit Makromolekülen wechselwirken oder an ihnen binden zu können.

Auch Porphyrine, organisch-chemische Farbstoffe mit vier Pyrrol-Ringen [140], besitzen nicht nur einen Dipol und könnten die FRET-Experimente bei 77 K unabhängiger vom Orientierungsfaktor machen.

6.3.4 Vergleich der Fluorophorabstände bei 300 K und bei 77 K

Für eine bessere Übersicht sollen im Folgenden nochmal kurz die experimentell bestimmten Fluorophorabstände bei 300 K und bei 77 K mit den theoretischen verglichen werden. Bei den Messungen in Lösung wurden aus den Transfereffizienz-Histogrammen mithilfe einer (Prolin 6) oder mehrerer (Prolin 20) Gauß-Anpassungen mittlere Fluorophorabstände bestimmt. Im eingefrorenen Zustand wurden durch eine Anpassung der MC-Simulation Abstandsverteilungen erhalten. In Abbildung 6.19 sind diese im Vergleich mit den Fluorophor- und mit den Terminiabständen aus der MC-Simulation gezeigt.

Bei Prolin 6 unterscheiden sich die gemessenen Abstände bei 300 K und bei 77 K um etwas mehr als 1 nm. Dabei passt der in Lösung bestimmte Abstand gut zur Theorie. Bei Prolin 20 zeigen sowohl die Petide in Lösung als auch in der amorphen Eisschicht einen ca. 2 nm kürzeren Fluorophorabstand als die Theorie. Dieser Unterschied ist aber, wie schon bei der Diskussion der Transfereffizienzen erfolgt, gut erklärbar. Neben flexiblen Fluorophorlinkern trägt auch die Flexibilität der Peptidkette zu kürzeren Abständen bei. Die Messungen an Prolin 20 sind also in sich stimmig und erlauben eine quantitative Abstandsbestimmung. Die große Unsicherheit bei der Abstandsbestimmung bei Prolin 6, die auch oft in der Literatur zu finden ist (siehe auch Abschnitt 6.2.3), liegt wahrscheinlich in der Punktdipol-Approximation oder in einem ungünstigen Förster-Radius begründet.

Es wird diskutiert, dass bei diesen kurzen Abständen und den im Vergleich dazu relativ großen Fluorophoren die Punktdipol-Approximation der Förster-Theorie nicht mehr gegeben ist [114]. Handelt es sich nicht um Punktdipole, sondern um ausgedehnte Dipole, so

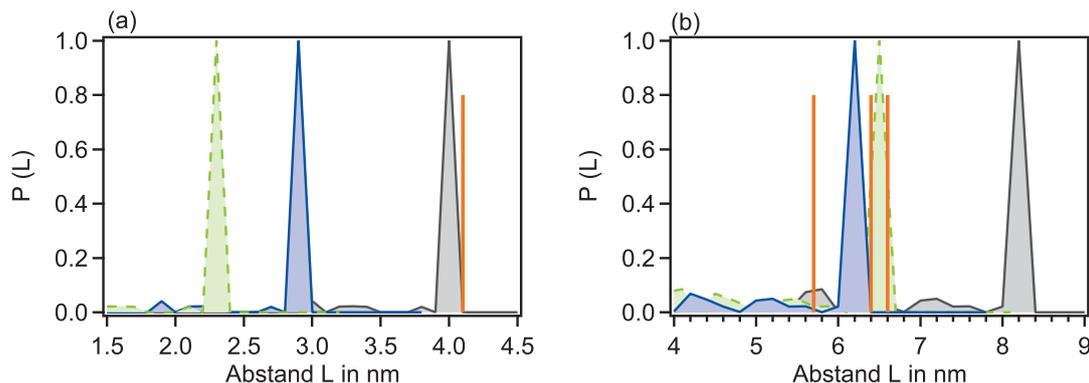


Abbildung 6.19: Vergleich der Fluorophorabstände in Theorie und Experiment

Für (a) Prolin 6 und (b) Prolin 20 sind die theoretischen Fluorophorabstände (grau) im Vergleich zu den gemessenen Fluorophorabständen bei Raumtemperatur (mittlere Abstände aus der Gauß-Anpassung, orange) und bei 77 K (Abstandsverteilung, die Effizienzhistogramm erklärt, blau) gezeigt. In grün ist der Terminiabstand der Proline ergänzt, um den Einfluss der Fluorophorlinker zu verdeutlichen. Bei Prolin 6 stimmt der theoretische Farbstoffabstand gut mit der Messung bei Raumtemperatur überein, bei 77 K wurden kürzere Abstände ermittelt. Bei Prolin 20 hingegen sind unter beiden Bedingungen die experimentell bestimmten Abstände kürzer als die theoretischen.

unterschätzt die Approximation die Stärke der Kopplung [93]. Somit würde der Abstand, der aus der Förster-Theorie ermittelt wird, kleiner als der eigentliche Abstand der Fluorophore sein. Dieser Fehler beträgt bei dem hier genutzten Fluorophorenpaar bei 2 nm Abstand ca. 5 % und steigt bei 1,5 nm auf 10% an [93]. Dies könnte eine Erklärung für die kürzeren Abstände bei 77 K sein. Eine andere Erweiterung der Förster-Theorie geht von Liniendipolen aus [4]. Ist die Ausdehnung der Dipole (L_D) in der Größenordnung ihres Abstandes (R), kann der Dipol als Liniendipol angesehen werden. Für den Energietransfer zwischen zwei Liniendipolen reduziert sich die Transferrate ($k_{td} \sim (RL)^{-2}$) im Vergleich zur Punktdipol-Approximation ($k_{pd} \sim L^2 R^{-6}$) [4], d. h. bei Prolin 6 kann es zu einer geringeren Transfereffizienz kommen. Mit dieser Theorie wäre es möglich, dass die aus den FRET-Experimenten erhaltenen Abstände in Lösung zu groß sind, und eigentlich, begründet durch Flexibilität der Linker und der Peptidkette, kürzer sein müssten.

Oft wird außerdem diskutiert, dass der Förster-Radius von 5,2 nm bis 6,3 nm (je nach Lösungsmittel, Temperatur) für solch kurze Abstände ungeeignet ist. In der Regel sollten die vermessenen Abstände zwischen $0,5 R_0$ bis $2 R_0$ groß sein, um mit Abstandsänderungen auch signifikante Transfereffizienzänderungen zu erhalten [109] (siehe auch Abschnitt 2.1.7). Ein Abstand von 2,0 nm bis 2,5 nm wie bei Prolin 6 ist somit schon an der unteren Grenze.

Letzteres zeigt noch einmal deutlich, dass quantitative Abstandsbestimmungen mit FRET kompliziert sind und von vielen Faktoren beeinflusst werden.

7 Photophysik und -chemie bei 77 K

Durch die Immobilisierung der Polyproline in einer amorphen Eisschicht und die Möglichkeit, den auslenkbaren Laser direkt auf diese zu fokussieren, kann die Photophysik und die Photochemie einzelner Farbstoffpaare über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Dabei ist die Beobachtungszeit durch die Überlebenszeit beider Fluorophore begrenzt. Aus transienten Intensitäten können Rückschlüsse auf Triplet- oder radikal-ionische Zustände und deren Abhängigkeit von der Anregungsleistung gezogen werden. Des Weiteren kann die Fluoreszenzrate und die Gesamtemission beider Farbstoffe näher untersucht werden.

Ein Vergleich der Photophysik bei 77 K mit der bei Raumtemperatur ist nur begrenzt möglich. In Lösung konnte aus den Autokorrelationsfunktionen die Tripletzeit und der Tripletanteil sowie daraus resultierende Raten bestimmt werden (Abschnitt 5.2). Eine Immobilisierung der Proline bei Raumtemperatur für weiterführende Untersuchungen könnte einen direkten Vergleich der Überlebenszeiten ermöglichen, und somit vielleicht die erwartete Verlängerung dieser bestätigen oder revidieren. Für eine Immobilisierung über eine Linkerstruktur (z. B. Biotin, Avidin, Histidin, siehe in [135]) besitzen die hier genutzten Proline nicht die notwendige Sequenz. Recht einfach realisierbar ist das Immobilisieren durch Antrocknen der Peptide auf einem Deckglas. Dabei befinden sich die Peptide jedoch nicht in physiologischer/wässriger Umgebung und können mit der Oberfläche wechselwirken [46]. Insbesondere die Emissionscharakteristik von Dipolen in der Nähe einer Grenzschicht führt dabei zu weiteren Schwierigkeiten [6, 68]. Letztlich bleibt die Möglichkeit, die Peptide in Poren von Gelen [76] oder in immobilisierten Lipidvesikeln einzuschließen [13]. Die Umsetzung der letzten Methode erfolgte jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit, sodass keine Messungen transienter Intensitäten bei Raumtemperatur vorliegen.

Die Analyse der transienten Intensitäten erfolgt einerseits über eine An-Aus-Statistik und andererseits sowohl über die Korrelationsfunktionen der einzelnen Trajektorien als auch über die Korrelation aller gemeinsam. Dabei gibt jede Methode Aufschluss über andere Zeitbereiche. Photophysik, deren Dynamik sich über einen Bereich von wenigen Millisekunden bis Sekunden ausdehnt, wird direkt mithilfe der An-Aus-Statistik untersucht und mit der Korrelation aller Zeitspuren verglichen. Photophysik im Sub-Millisekundenbereich ist nur über die Auto- bzw. Kreuzkorrelation der einzelnen Trajektorien zugänglich.

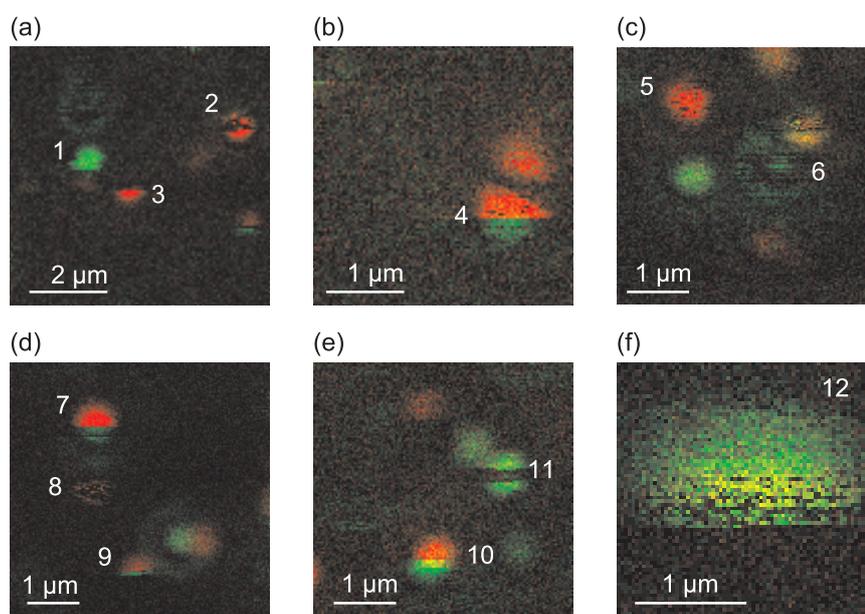


Abbildung 7.1: Photophysik an einzelnen Prolin 6 - Molekülen

In den Bildausschnitten sind die Intensitäten aus dem Donor- (grün) und dem Akzeptorkanal (rot) übereinandergelegt. Die Moleküle zeigen sowohl kürzere (4,5,12) und längere (2,6,8,11) Dunkelzustände als auch Bleichen (1,9,12) der Fluorophore. Bleicht der Akzeptor, so leuchtet meist der Donor danach auf (4,7,10). Ob die Moleküle irreversibel bleichen oder ob sie in einen langen Dunkelzustand übergehen, kann anhand der Bilder nicht genau gesagt werden. Das Molekül in (f) wurde defokussiert aufgenommen und erscheint deswegen viel größer als die anderen Moleküle.

7.1 Aufnahme transientser Intensitäten

Um eine transiente Intensität zu erhalten, wird zunächst ein Bild von ca. $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ aufgenommen (Integrationszeit 1 ms/Pixel), der Laser dann direkt auf ein Molekül positioniert und die Emission zeitabhängig detektiert. Die Anregung erfolgte nur mit dem 488 nm Laser. Eine Überprüfung, ob ein intakter Akzeptor vorhanden ist, wurde nicht durchgeführt, um frühzeitiges Bleichen des Akzeptors zu vermeiden. Die Anregungsleistung wurde zwischen $10 \mu\text{W}$ und $60 \mu\text{W}$ variiert.

In Abbildung 7.1 ist eine Auswahl an Bildausschnitten dargestellt, in denen die Fluorophore an Prolin 6 auffällige Photophysik bzw. -chemie zeigen. Die Intensitäten aus Donor- und Akzeptorkanal sind in diesen Bildern übereinander gelegt, sodass direkt erkannt werden kann, welcher Fluorophor emittiert. Besonders auffällig sind in diesen Bildern Dunkelzustände, zu sehen durch dunkle Pixel, die die Abbildung eines Moleküls unterbrechen. Dabei kann sowohl der Donor als auch der Akzeptor in einen photoinaktiven Zustand übergehen. Neben sehr kurzen Dunkel- oder Auszeiten (wenige Pixel, wenige ms) sind auch Auszeiten mehrerer hundert Millisekunden zu sehen. Bleicht der Akzeptor, oder geht er in einen Zustand über, in dem er keine Energie mehr vom Donor aufnehmen kann, so wechselt in den

Bildern die Farbe des Moleküls, d. h. der Akzeptor wird dunkel und der Donor beginnt zu emittieren.

Auch wenn die Bildausschnitte schon einen Einblick in die photophysikalischen Eigenschaften der Fluorophorenpaare zulassen, eignen sie sich nicht für nähere Analysen. Aus diesem Grund wurden transiente Intensitäten vieler Moleküle bei variierender Anregungsleistung aufgenommen.

In Abbildung 7.2 sind verschiedene Beispiele von Prolin 6 und von Prolin 20 zu sehen. Schon diese zehn ausgesuchten Trajektorien veranschaulichen deutlich die Verschiedenheit der photophysikalischen Eigenschaften einzelner Fluorophore.

Neben unterschiedlich langen Überlebenszeiten zeigt jede Trajektorie verschieden starke Fluktuationen in der Intensität sowie unregelmäßig korreliertes oder antikorreliertes Verhalten beider Fluorophore. Gehen beide Fluorophore gleichzeitig in einen Dunkelzustand, so verhalten sie sich korreliert. Dabei kann entweder der Donor in einen Dunkelzustand übergehen oder bleichen, oder der Akzeptor geht in einen Zustand über, der zwar Energie vom Donor weiterhin aufnimmt, jedoch selbst die Energie nicht in Form von Photonen abgeben kann. Geht der Akzeptor in einen Zustand über, bei dem kein Energieübertrag mehr möglich ist, so steigt in der Dunkelzeit des Akzeptors die Emission des Donors und beide verhalten sich antikorreliert.

Auffällig sind auch die unterschiedlich hohen Intensitäten trotz gleicher Anregungsleistung. Das ist durch die Dipolcharakteristik der Fluorophore und ihre zufällige Orientierung im Raum begründet. Sowohl die Anregungsrate als auch die Detektionseffizienz hängt vom Winkel zwischen Übergangsdipol und optischer Achse ab [57] (siehe auch 2.1.6).

Bei Prolin 6 dominiert oft der Akzeptorfluorophor. In den vier gezeigten Trajektorien bleicht dieser zuerst, und dann emittiert der Donor. Bei Prolin 20 hingegen sind sehr unterschiedliche Verhältnisse beider Fluorophorintensitäten zu erkennen. Auch innerhalb einer Zeitspur kann das Verhältnis wechseln.

7.2 Analyse der transienten Intensitäten

Für eine systematische Analyse der transienten Intensitäten wurden zunächst die Intensitäten beider Kanälen addiert, sodass im Folgenden immer das photophysikalische Verhalten beider Fluorophore näher betrachtet wird. Inwiefern sich die Photophysik des Donors und die Photophysik des Akzeptors beeinflussen können, wird in der Diskussion aufgezeigt.

Für Prolin 6 wurden insgesamt 91 Trajektorien untersucht, sieben bei $60 \mu\text{W}$, 31 bei $40 \mu\text{W}$, 22 bei $20 \mu\text{W}$ und 31 bei $10 \mu\text{W}$. Bei Prolin 20 erfolgte die Analyse für insgesamt 197 Moleküle, 67 bei $40 \mu\text{W}$, 26 bei $30 \mu\text{W}$, 74 bei $20 \mu\text{W}$ und 30 bei $10 \mu\text{W}$.

In Abbildung 7.3 ist die Summe der Donor- und der Akzeptorintensität eines Prolin 20 - Moleküls zu sehen. Für die Analyse wurde eine Binzeit (siehe Abschnitt 3.3) von 10 ms gewählt. Eine kleinere Binzeit würde die Analyse bei intensitätsschwachen Trajektorien erschweren, da eine klare Trennung von Signal und Hintergrund nicht immer machbar wäre.

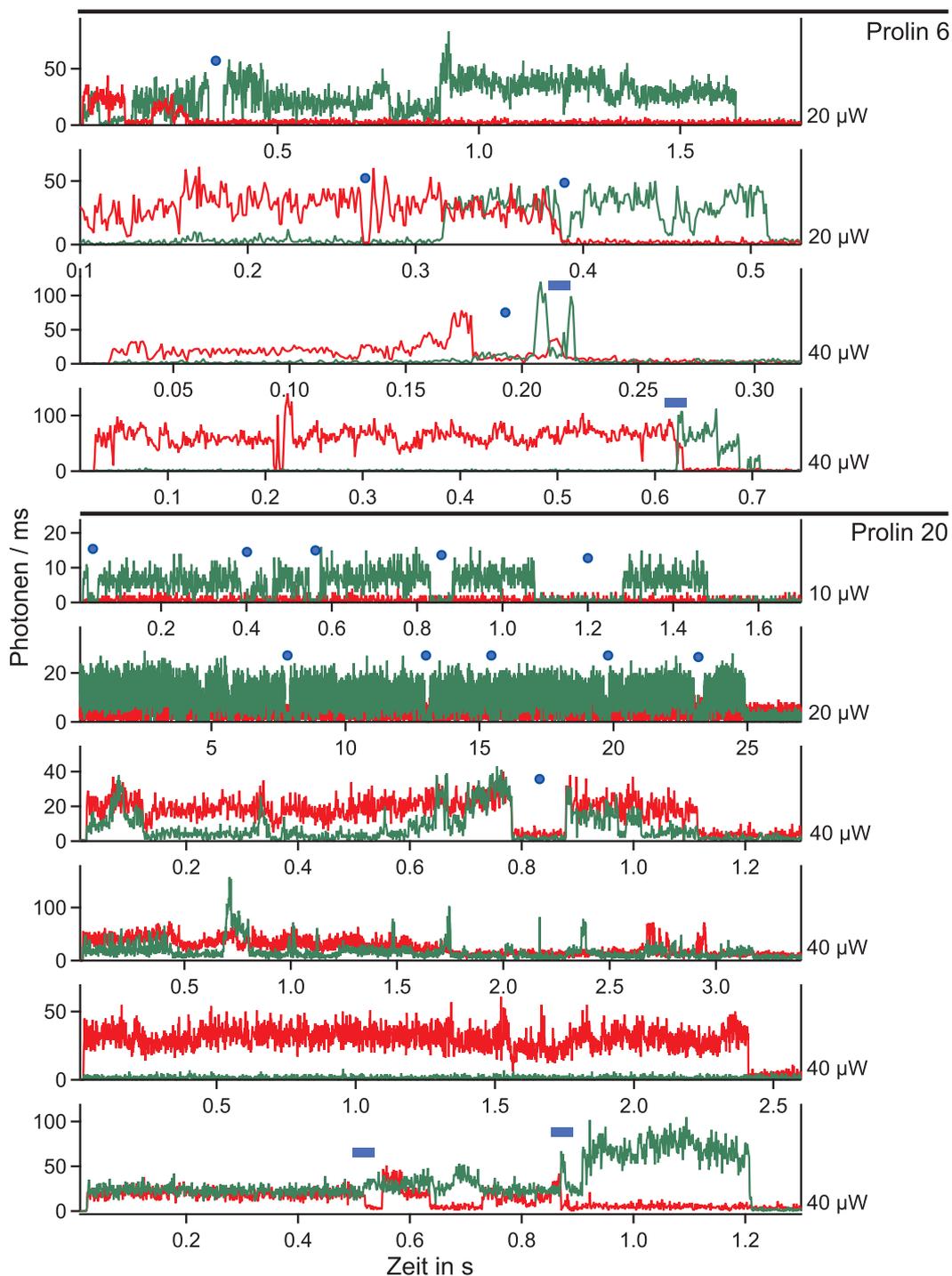


Abbildung 7.2: Transiente Intensitäten einzelner Proline bei 77 K

Die Fluoreszenzintensität im Donor- (grün) und im Akzeptorkanal (rot) ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Charakteristisch für einzelne Moleküle sind abrupte Intensitätsänderungen, bei denen der Donor und der Akzeptor in einen Dunkelzustand übergehen (blaue Punkte), und antikorreliertes Verhalten, bei dem ein Fluorophor dunkel wird während der andere Fluorophor eine erhöhte Emission zeigt (blaue Balken).

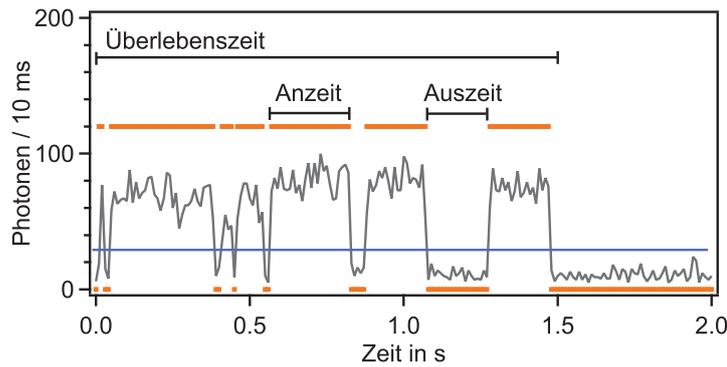


Abbildung 7.3: Beispiel für An- und Auszeiten einer transienten Intensität

Die Summe der Intensitäten aus Donor- und Akzeptorkanal ist in grau dargestellt. Der Schwellwert (blau), bestimmt aus dem maximalen Hintergrund der letzten drei Sekunden (Ende der Trajektorie nicht gezeigt), trennt An- und Auszeiten. Die Gesamtlänge, bestehend aus allen An- und Auszeiten, wird Überlebenszeit genannt.

Zudem können Dynamiken, die schneller als 10 ms sind, mithilfe der Auto- bzw. Kreuzkorrelation der transienten Intensitäten untersucht werden (siehe Abschnitt 7.2.3).

Um die Länge von An-, Aus- oder Überlebenszeiten zu bestimmen, muss zunächst Signal und Hintergrund in einer Trajektorie definiert, d. h. ein Schwellwert, der beides voneinander trennt, bekannt sein. Dieser Schwellwert wurde für jede Trajektorie aus dem maximalen Hintergrund der letzten drei Sekunden, addiert mit fünf Photonen pro Bin, bestimmt. In Abbildung 7.3 macht diese Schwelle deutlich, wann ein Fluorophor emittiert und wann es in einem Dunkelzustand ist.

Im nächsten Abschnitt werden zuerst diese An- und Auszeiten näher analysiert. Im folgenden Abschnitt wird dann auf die Anzahl aller Photonen eines Fluorophors und auf seine Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Anregungsleistung eingegangen.

7.2.1 An-Aus-Verhalten des Fluoreszenzsignals

Die Abbildung 7.3 zeigt ein charakteristisches Beispiel für das photophysikalische Verhalten einzelner Fluorophore. Dabei ist der Zustand, in dem Photonen emittiert werden, immer wieder von Zuständen ohne Fluoreszenz unterbrochen. Die Länge und die Häufigkeiten dieser An- bzw. Auszeiten können über Zustände des Fluorophors und Übergänge in diese Aufschluss geben [70].

In einem ersten Schritt der Analyse wurden die Längen der An- bzw. Auszeiten, zusammengefasst in Zeitintervallen von 100 ms, in einem Histogramm dargestellt. Angenommen, das An-Aus-Verhalten der Fluorophore würde durch nur eine Ratenkonstante, z. B. den Übergang in den Triplett, k_{ISC} , dominiert werden, so müssten sich die Häufigkeiten für eine bestimmte Auszeit t_{aus} durch einen einfach exponentiellen Abfall beschreiben lassen [70]. D. h. in einer halblogarithmischen Darstellung müssten die Anzahl der Ereignisse für eine Auszeit linear abnehmen. In Abbildung 7.1a, die beispielhaft bei einer Anregungslei-

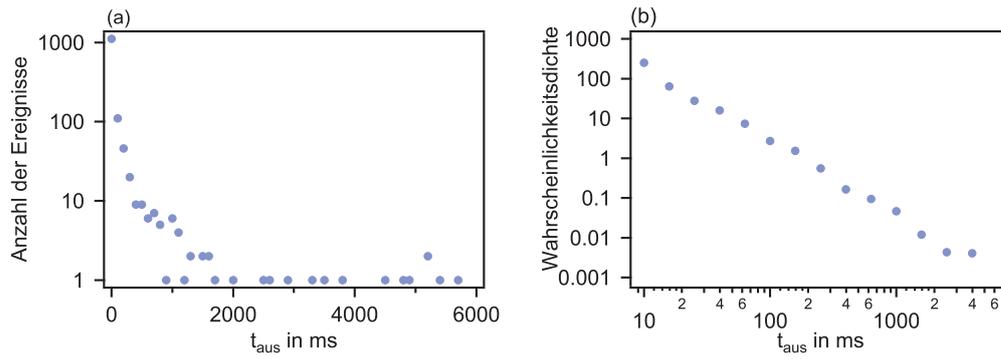


Abbildung 7.4: halb- und doppelt-logarithmische Darstellung der Auszeiten von Prolin 6 bei $10 \mu\text{W}$

(a) Die Auszeiten von Prolin 6, zusammengefasst in Zeitintervallen von 100 ms, zeigen in der halb-logarithmischen Darstellung keinen mono-exponentiellen Abfall. (b) Der lineare Abfall der Auszeiten in einem doppelt-logarithmischen Histogramm zeigt, dass sich die Statistik der Auszeiten mit einem Potenzgesetz beschreiben lässt.

stung von $10 \mu\text{W}$ die Auszeiten von Prolin 6 zeigt, wird deutlich, dass die Auszeiten einer anderen Statistik folgen. Anstatt einer linearen Abhängigkeit ist eine Kurve zu sehen. Es gibt also Auszeiten, die deutlich länger sind, als dass sie mit einem exponentiellen Abfall erklärbar wären.

Diese große Zeitspanne der Auszeiten lässt sich sehr gut über ein Potenzgesetz beschreiben [70, 64, 44]. Da die Längen der Auszeiten jedoch durch die experimentellen Bedingungen begrenzt sind (10 ms bis Sekunden), wird angenommen, dass die Auszeiten nur in diesem Zeitbereich dem Potenzgesetz folgen [134]. Für die Wahrscheinlichkeit P_{aus} , dass ein Auszustand der Länge t auftritt, gilt demnach für $t_{min} \ll t_{max}$ und $t_{min} < t < t_{max}$ [134]:

$$P(t_{aus}) = At^{-m_{aus}}, \quad (7.1)$$

mit dem Normierungsfaktor

$$A = (m - 1)(t_{min})^{m-1}, \quad \text{für } m > 1. \quad (7.2)$$

m_{aus} beschreibt den Anstieg der Auszeiten in einem doppelt-logarithmischen Histogramm. Ein Prozess, der auf einer einfachen Zufallsbewegung basiert, würde z. B. zu einem Anstieg von 1,5 führen [64].

In Abbildung 7.4b sind nun die Auszeiten aus 7.4a in einem doppelt-logarithmischen Histogramm aufgetragen. Dafür wurden die Auszeiten in logarithmische Intervalle aufgeteilt. Die erhaltene Anzahl der Auszeiten eines Intervalls wurden durch die Breite des Intervalls geteilt, sodass Wahrscheinlichkeitsdichten der verschiedenen Auszeiten/Zustände entstehen. In diesem Histogramm wird nun deutlich, dass nicht nur die Zeiten über einen großen Bereich verteilt sind, sondern auch deren Wahrscheinlichkeitsdichten. Die Verteilung zeigt einen linearen Abfall, sodass sie mit einem Potenzgesetz nach Gleichung 7.1 angepasst werden kann.

Die hier für die Auszeiten diskutierte Statistik zeigt sich auch bei den Anzeiten der transienten Intensitäten. Aus diesem Grund werden die Anzeiten auch mithilfe der doppelt-logarithmischen Darstellung näher analysiert.

In Abbildung 7.5 sind die zeitlichen Verteilungen der An- und Auszeiten von Prolin 6 und Prolin 20 für verschiedenen Anregungsleistungen gezeigt. Sowohl die An- als auch die Auszeiten lassen sich durch ein Potenzgesetz beschreiben. Zu sehen sind bei Prolin 6 An- bzw. Auszeiten von 10 ms bis 4 s, bei Prolin 20 sogar Auszeiten bis 10 s. Die Wahrscheinlichkeitsdichte, mit der diese Ereignisse eintreten, umfasst dabei mehr als eine Größenordnung. Kürzere Ereignisse werden aufgrund der gewählten Binzeit von 10 ms hier nicht erfasst, werden aber mithilfe von Autokorrelationen in Abschnitt 7.2.3 näher untersucht. Längere An- bzw. Auszeiten sind sehr wahrscheinlich auch möglich. Diese treten jedoch sehr selten auf. Des Weiteren ist deren Detektion durch die begrenzte Überlebenszeit oder durch die experimentell begrenzte Messzeit erschwert.

Auf den ersten Blick ist keine deutliche Abhängigkeit der Wahrscheinlichkeitsdichten von der Anregungsleistung auszumachen. Einzig die Verteilungen bei Prolin 6 bei einer Anregungsleistung von $60 \mu\text{W}$ weicht von den anderen ab. Die größere Streuung der Werte um die Anpassung liegt sehr wahrscheinlich an der geringen Statistik, da hier nur sieben Trajektorien gemessen wurden.

Für eine genauere Analyse sind die aus den Anpassungen erhaltenen Potenzen, die die Anstiege in den Histogrammen darstellen und damit die Verteilung der An- und Auszeiten beschreiben, in Abbildung 7.6 in Abhängigkeit von der Anregungsleistung gezeigt. Bei Prolin 6 ist mit steigender Anregungsleistung sowohl bei den An- als auch bei den Auszeiten eine leichte Tendenz zu kleineren Anstiegen zu erkennen. Dabei sei jedoch nochmal erwähnt, dass der Anstieg bei einer Anregungsleistung von $60 \mu\text{W}$ aus wenigen Ereignissen ermittelt wurde und damit mit einem größeren Fehler behaftet sein kann. Ohne diesen Wert ist die Tendenz zu kleineren Anstiegen, vor allem bei den Auszeiten, nicht mehr so eindeutig. Bei Prolin 20 ist keine Abhängigkeit von der Anregungsleistung erkennbar. Während die Anstiege der Anzeiten noch ein wenig streuen, sind die Anstiege der Auszeiten innerhalb des Fehlers aus der Anpassung konstant.

Ein Vergleich der aus der An-Aus-Statistik gewonnenen Potenzen mit denen aus der Korrelation aller Trajektorien erfolgt in Abschnitt 7.2.3.

7.2.2 Überlebenszeit der Fluorophore

Für die Einzelmolekülspektroskopie ist sowohl eine hohe Fluoreszenzintensität, die ein gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ermöglicht, als auch eine hohe Gesamtanzahl an emittierten Photonen sehr wichtig [56]. D. h. neben der Immobilisierung der Fluorophore, die eine längere Beobachtungszeit ermöglicht, ist auch eine Verlängerung der Überlebenszeit nötig,

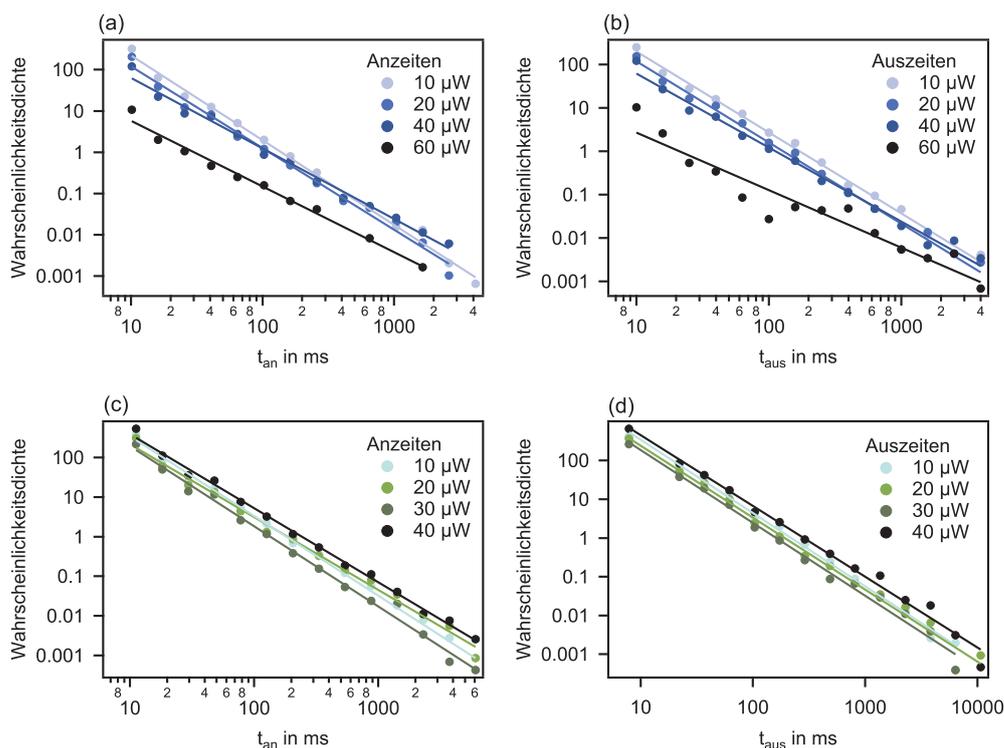


Abbildung 7.5: An- und Auszeiten der Fluorophore an Prolin 6 und Prolin 20

Doppelt-logarithmische Darstellung der Anzeiten (a),(c) und der Auszeiten (b),(d) des Donor-Akzeptor-Paars an Prolin 6 (oben) und an Prolin 20 (unten). Die Anregungsleistung variiert bei Prolin 6 von 10 μ W (hellblau) bis 60 μ W (dunkelblau) und bei Prolin 20 von 10 μ W (hellgrün) bis 40 μ W (dunkelgrün). Die Linien zeigen die Anpassung der Verteilungen nach dem Potenzgesetz. Die großen Abweichungen bei Prolin 6 bei einer Anregungsleistung von 60 μ W sind auf die geringe Anzahl der Trajektorien (7) zurückzuführen.

sodass genügend Photonen gesammelt werden können.

In Abbildung 7.7a ist die mittlere Anzahl der Photonen in Abhängigkeit von der Anregungsleistung zu sehen. Die mittlere Anzahl entspricht der Summe der Photonen beider Kanäle pro Millisekunde während einer Anzeit. Bei beiden Peptiden zeigt sich, dass die niedrigste, detektierte Photonenzahl pro Zeit mit der Anregungsleistung steigt. Auffällig ist auch die breite Streuung der Photonenzahl, die z. B. bei 40 μ W Werte zwischen 100 und 500 Photonen pro Millisekunde zulässt. Dabei wird, ähnlich der Bilder (siehe Abb. 7.1), wieder die Abhängigkeit der Anregung und der Detektionseffizienz von der Orientierung des Fluorophordipols deutlich.

Interessant ist nun, ob es durch die erhöhte Anregung, und dem damit erhöhten Photonfluss, auch zu einer höheren Gesamtanzahl der Photonen in einer Trajektorie kommt. Abbildung 7.7b zeigt die Gesamtanzahl der emittierten Photonen von Donor und Akzeptor aller transienten Intensitäten in Abhängigkeit von der Anregungsleistung. Bereits die logarithmische Achse der Gesamtanzahl, gewählt für eine übersichtlichere Darstellung, weist auf große Unterschiede zwischen einzelnen Fluorophorpaaren hin. Eine Tendenz zu

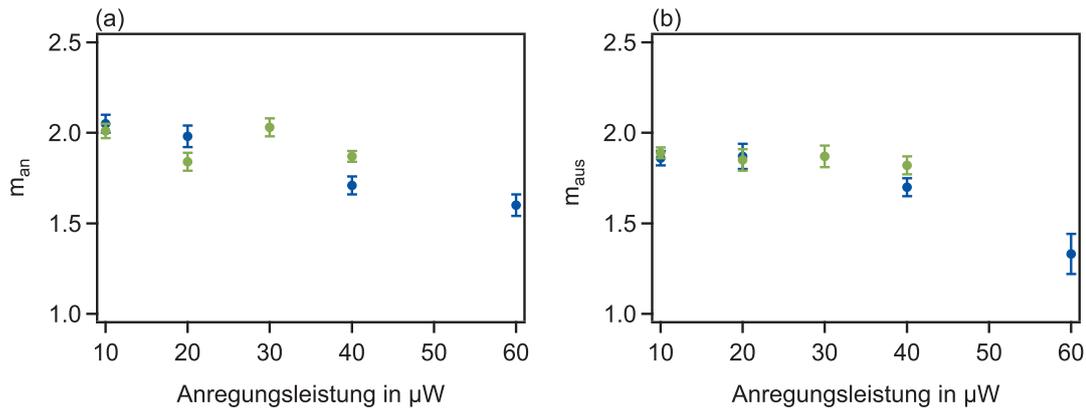


Abbildung 7.6: Anstieg der Wahrscheinlichkeitsdichten der An- und Auszeiten

Die Anstiege der (a) An- und (b) Auszeiten aus den doppelt-logarithmischen Histogrammen von Prolin 6 (blau) und Prolin 20 (grün) sind in Abhängigkeit von der Anregungsleistung dargestellt. Während bei Prolin 6 eine Tendenz zu kleineren Anstiegen mit steigender Leistung auszumachen ist, sind die Anstiege bei Prolin 20 konstant. Der eingezeichnete Fehler resultiert aus der Anpassung nach dem Potenzgesetz.

einer höheren Gesamtphotonenanzahl bei steigender Anregungsleistung ist nur bei Prolin 20 zu erkennen, da die geringste Gesamtanzahl mit der Anregung steigt. Ansonsten ist die Gesamtanzahl, unabhängig von der Anregungsintensität, bei beiden Peptiden relativ gleichmäßig über mehr als eine Größenordnung verteilt (100 bis 500000).

Ausschlaggebend für die Gesamtanzahl an Photonen, die aus einem Fluorophor gewonnen werden kann, ist schließlich dessen Überlebenszeit. Neben reversiblen Dunkelzuständen, kann ein Fluorophor einer photochemischen Veränderung unterliegen, sodass er danach weder Photoenergie absorbieren noch emittieren kann. Die vorherige Analyse der transienten Intensitäten machte deutlich, dass neben kurzen Dunkelzeiten auch sehr lange, bis zu mehreren Sekunden, möglich sind. Die Detektion sehr langer Auszeiten ist jedoch durch die zeitlich limitierte Aufnahme einer Trajektorie eher selten. Ob ein Fluorophor während der Messung photobleicht oder in einen sehr langen Dunkelzustand übergeht, kann somit nicht eindeutig festgestellt werden. In der Regel wurde die Aufnahme einer Trajektorie ca. 10 s nach der letzten Anzeit abgebrochen.

In Abbildung 7.8 sind für beiden Peptide die Überlebenszeiten von Donor und Akzeptor für die verschiedenen Anregungsleistungen gezeigt. Auch die Überlebenszeiten überspannen einen großen Zeitbereich, sodass eine halblogarithmische Darstellung gewählt wurde. Die maximale (gemessene) Überlebenszeit sinkt mit steigender Anregungsleistung bei Prolin 6 recht deutlich. Auch bei Prolin 20 befindet sich die längste Überlebenszeit bei der geringsten Anregung, jedoch sinkt sie nicht so eindeutig bis zu einer Anregungsleistung von $40 \mu W$. Auch scheinen die Überlebenszeiten der Fluorophore an Prolin 20 allgemein länger zu sein als an Prolin 6. Dies kann bereits auf eine geringere Photostabilität des Akzeptors hinweisen, da sein Emissionsanteil bei Prolin 6 aufgrund der hohen Transfereffizienz höher als bei Prolin 20 ist.

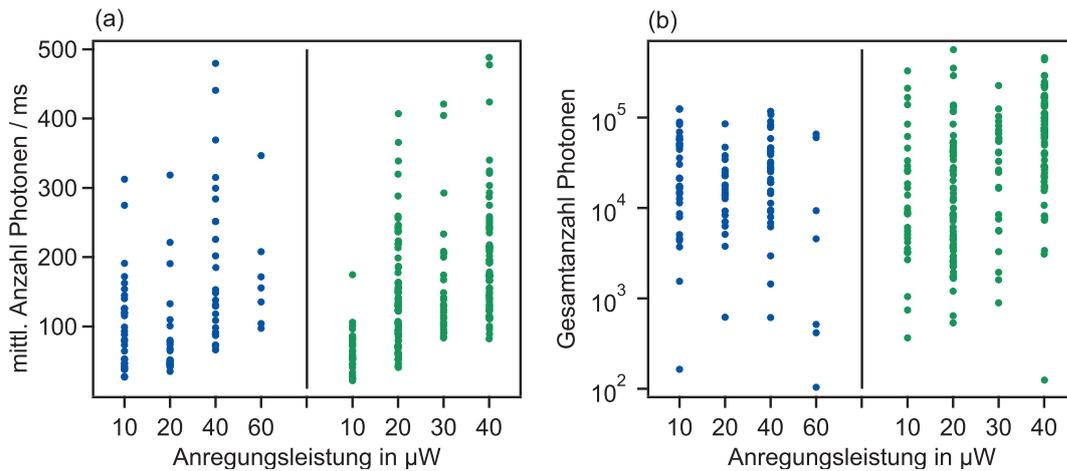


Abbildung 7.7: Photonenzahl pro Zeit und Gesamtanzahl der Photonen

(a) Für jede transiente Intensität ist die mittlere Photonenzahl pro Millisekunde während der Anzeiten aus dem Summensignal für Prolin 6 (blau) und für Prolin 20 (grün) gezeigt. Deutlich ist die steigende Anzahl an Photonen mit steigender Anregungsleistung. (b) Die Gesamtanzahl aller Photonen aus dem Summensignal während der Anzeiten jeder Trajektorie ist für Prolin 6 (blau) und Prolin 20 (grün) dargestellt. Bei Prolin 6 ist keine Abhängigkeit von der Anregungsleistung zu erkennen. Bei Prolin 20 steigt die Gesamtanzahl der Photonen mit steigender Anregungsleistung.

7.2.3 Korrelation der transienten Intensitäten

Aufgrund der oft geringen Fluoreszenzintensität der Fluorophorpaare bei den hier gewählten Anregungsleistungen (maximal 60 µW) sind Triplettzustände, d. h. Auszeiten im Mikrosekundenbereich, nicht über die transiente Intensität analysierbar. Eine klare Trennung von Signal und Hintergrund ist dabei nicht möglich.

In der Autokorrelation des Donor- bzw. des Akzeptorsignals ist das An-Aus-Verhalten beider Fluorophore in einem bestimmten Zeitbereich durch einen Abfall der Korrelationsfunktion in eben diesem Zeitbereich zu sehen (siehe Abschnitt 2.3.4). In der Kreuzkorrelation beider Signale wird deutlich, ob die beiden Farbstoffe sich korreliert oder unkorreliert verhalten. Geht z. B. der Donor wiederholt in einen Dunkelzustand über, in dem er keine Energie aufnehmen kann, so ist auch der Akzeptor gleichzeitig dunkel und beide emittieren korreliert. Wird ein Fluorophor dunkel während der andere aufleuchtet, so verhalten sie sich antikorreliert.

In Abbildung 7.9a ist ein Beispiel für die Auto- und die Kreuzkorrelationen (Akzeptor mit Donor und Donor mit Akzeptor) eines Prolin 20 - Moleküls dargestellt. Die An-Aus-Dynamik, hervorgerufen durch Triplettzustände, führt in der Korrelationsfunktion zu einem zusätzlichen Abfall, der mit einer exponentiellen Funktion $G_T(\tau)$ angepasst werden kann:

$$G_T(\tau) = A_T e^{-\tau/\tau_T} \quad (7.3)$$

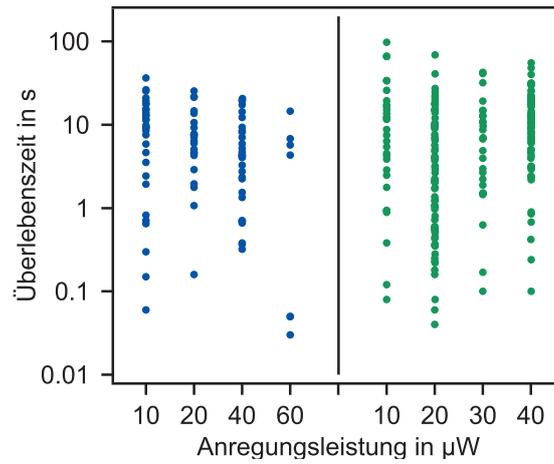


Abbildung 7.8: Überlebenszeit der Fluorophore

Die Überlebenszeit, d. h. die Länge aller An- und Auszeiten einer Trajektorie einschließlich der letzten, gemessenen Anzeit, ist für Prolin 6 (blau) und Prolin 20 (grün) in Abhängigkeit von der Anregungsleistung gezeigt. Die längsten Überlebenszeiten treten bei beiden bei der niedrigsten Anregungsleistung auf.

A_T ist die durch Tripletzustände hervorgerufene Amplitude und τ_T die mittlere Zeit vom Beginn eines Tripletzustandes bis zum Beginn des nächsten.

In den Korrelationsfunktionen des Beispiels in Abbildung 7.9a ist nach dem Abfall, der aus der Triplettdynamik resultiert, ein weiterer Abfall zu erkennen, der auf zeitlich längeren An-Aus-Prozessen beruht und meist bei der Zeit des Photobleichens endet. Da diese Ereignisse aufgrund ihrer Länge eher selten in einer Trajektorie auftreten, wird zu ihrer Analyse über die Korrelationsfunktionen aller Trajektorien gemittelt. In diesen gemittelten Autokorrelationen (siehe Abbildung 7.9b) zeigen sich nun, die bereits in Abschnitt 7.2.1 mithilfe des Potenzgesetzes beschriebenen, langen An- und Auszeiten in einem Bereich von einigen Millisekunden bis zu mehreren Sekunden. Dieser Bereich der Korrelationsfunktion lässt sich durch eine gestreckte Exponentialfunktion anpassen [125]:

$$G_L(\tau) = A_L e^{-(\tau/\tau_L)^{\beta/2}} \quad (7.4)$$

A_L ist die Amplitude, τ_L eine Zeitkonstante, die den zeitlichen Abfall beschreibt, und $\beta/2$ der zusätzliche, streckende Parameter im Exponenten, der die Anpassung über einen so großen Zeitraum mit einer exponentiellen Funktion erst möglich macht. Der Parameter β ist mit den Anstiegen m aus der doppelt-logarithmischen Darstellung wie folgt verknüpft [125]:

$$\beta/2 = 2 - m \quad (7.5)$$

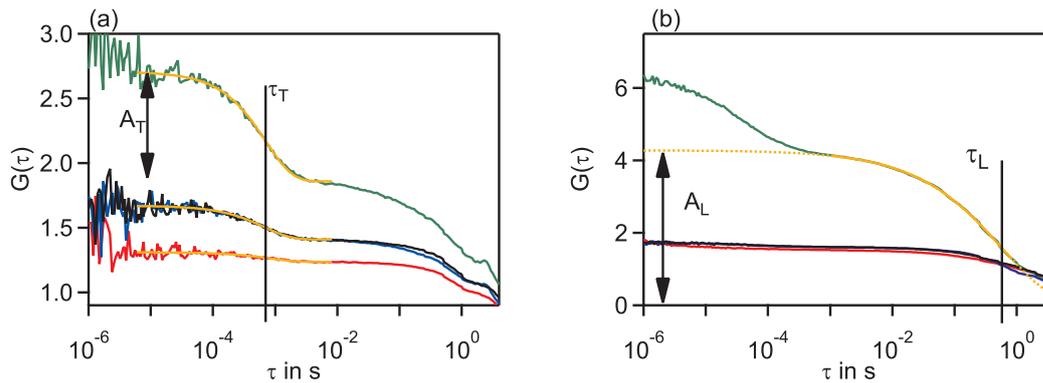


Abbildung 7.9: Analyse der Korrelationsfunktionen

(a) Die aus der transienten Intensität eines Prolin 20 - Moleküls ($30 \mu\text{W}$) erhaltenen Autokorrelations des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) sowie die Kreuzkorrelation des Akzeptorsignals mit dem des Donors (blau) und des Donorsignals mit dem des Akzeptors (schwarz) sind dargestellt. Die Donorautokorrelationsfunktion zeigt eine ausgeprägte Triplettscharakteristik, die mithilfe einer exponentiellen Funktion angepasst ist (gelb); die des Akzeptors ist weniger stark. In der Kreuzkorrelation ist ein korreliertes Verhalten der Emission beider Fluorophore zu sehen (Anpassung in gelb nur bei der Kreuzkorrelation Akzeptor mit Donor). (b) Gemittelte Auto- und Kreuzkorrelationen aller Trajektorien von Prolin 20 bei einer Anregung von $40 \mu\text{W}$ (Farben entspr. (a)). Der durch längere Aus- und Anzeiten verursachte Abfall ist mit einer gestreckten Exponentialfunktion angepasst.

Photophysik im Submillisekunden-Bereich In Abbildung 7.10 sind transiente Intensitäten verschiedener Peptide und ihre Korrelationsfunktionen dargestellt. Ähnlich der vielen diversen transienten Intensitäten (Abb. 7.2) zeigen auch die Korrelationsfunktionen der einzelnen Trajektorien unterschiedliche, photophysikalische Charakteristika. In manchen Autokorrelationen des Donors (d,f,h,j) und eher selten in denen des Akzeptors (h,j) ist Triplettdynamik zu sehen. Ob der Akzeptor dabei selbst in Triplettszustände übergeht oder die Dynamik des Donors zeigt, ist fraglich. Ein Indiz, dass der vermutete Akzeptortriplett, genauer die Dunkelzeit des Akzeptors, hauptsächlich durch den Donor verursacht wird, ist in der Kreuzkorrelation zu sehen. Zeigen Donor und Akzeptor das gleiche Blinkverhalten, gehen also gemeinsam an und aus, so ist dies auch in der Kreuzkorrelation zu erkennen (h,j). In der Regel stimmen die beiden Kreuzkorrelationen, Akzeptor-Donor und Donor-Akzeptor, überein. In einigen ist jedoch bei größeren Zeiten ein Unterschied auszumachen (b,h). Die deutliche Antikorrelation entsteht durch das zeitgleiche Bleichen des Akzeptors und Aufleuchten des Donors. Geht der Akzeptor in einen Dunkelzustand über, ohne dass der Donor danach mehr emittiert, so fällt der Unterschied beider Kreuzkorrelationen geringer aus.

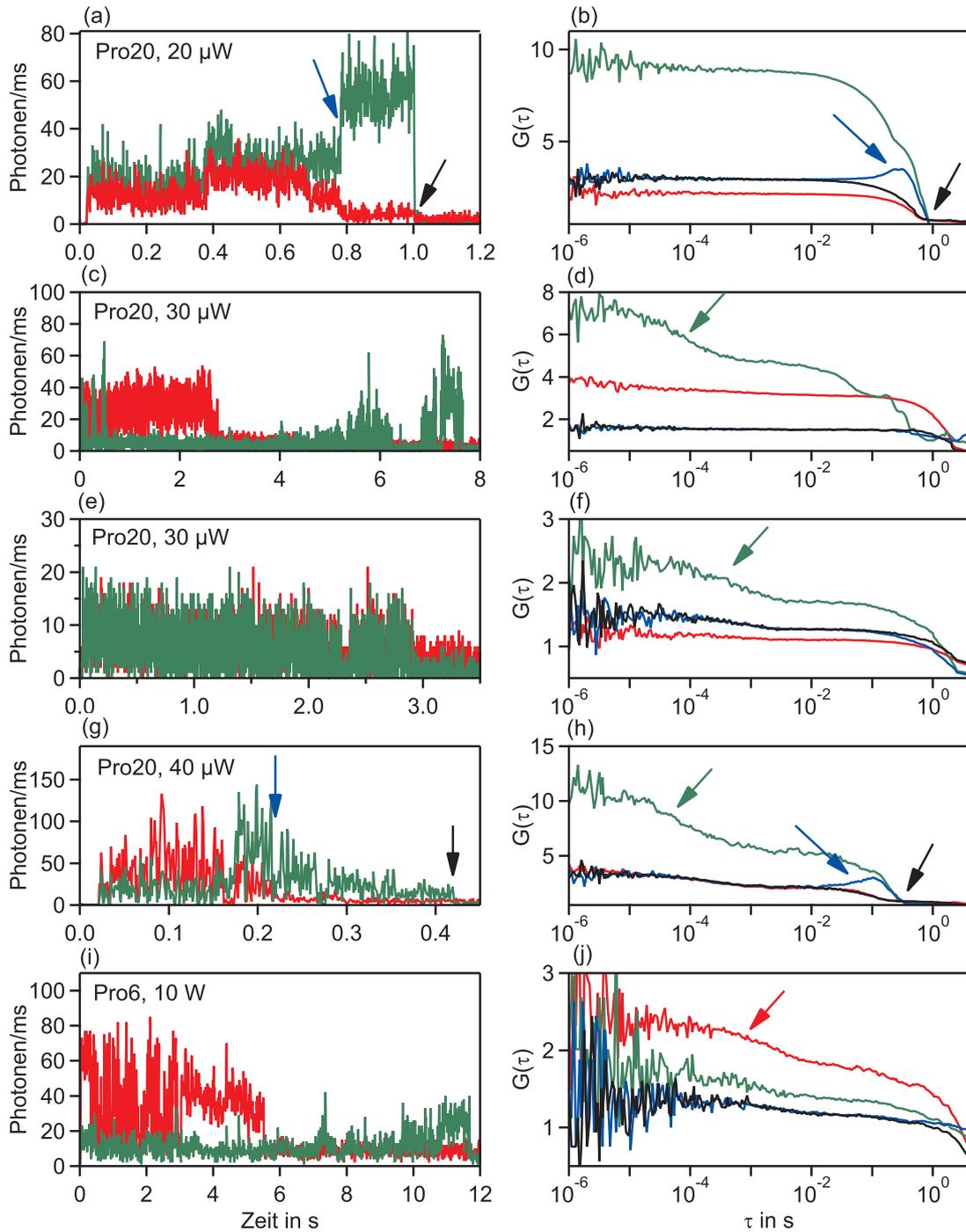


Abbildung 7.10: Beispiele transienter Intensitäten und ihrer Korrelationen

Links: Transiente Intensitäten im Donor- (grün) und im Akzeptorkanal (rot) für verschiedene Peptide und Anregungsleistungen. Rechts: Die dazugehörigen Autokorrelationen des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) sowie die Kreuzkorrelationen Akzeptor-Donor (blau) und Donor-Akzeptor (schwarz). Die grünen Pfeile weisen auf Triplettdynamik des Donors, die roten auf Triplettdynamik des Akzeptors hin. Das Bleichen des Akzeptors mit anschließendem Aufleuchten des Donors resultiert in verschiedene Kreuzkorrelationen (blauer Pfeil). Das Bleichen beider Farbstoffe ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

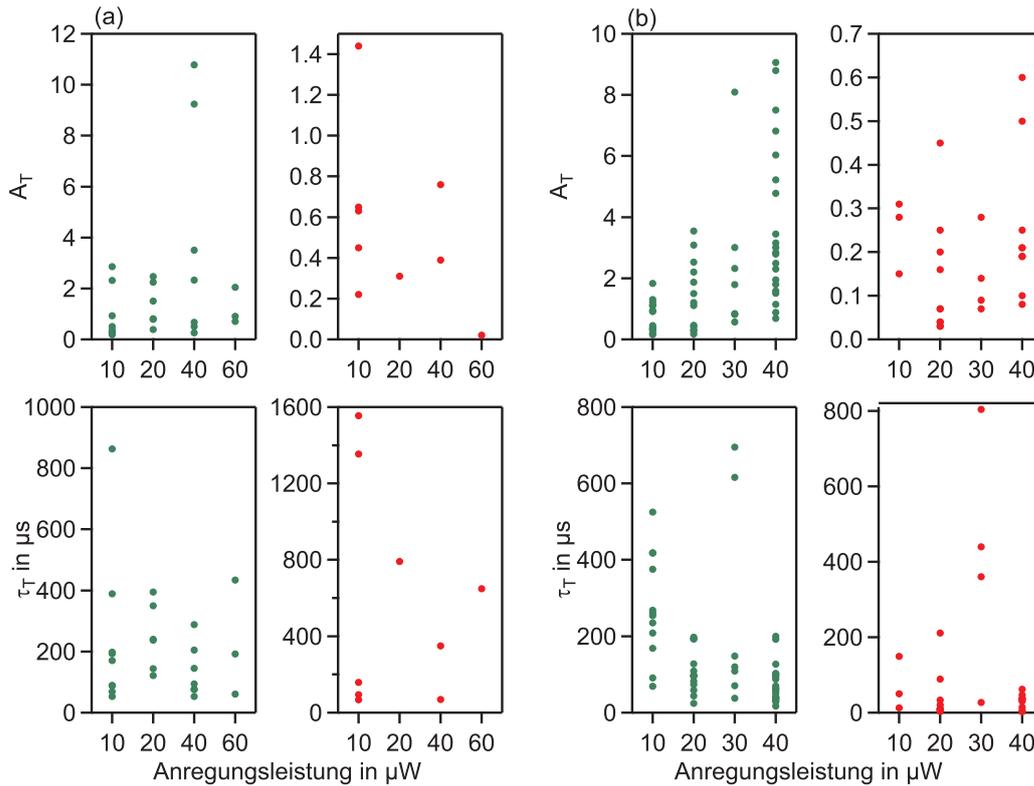


Abbildung 7.11: Triplettdynamik bei 77 K

Die Triplettdynamik A_T und -zeiten τ_T des Donors (grün) und des Akzeptors (rot) für Prolin 6 (a) und Prolin 20 (b) sind gezeigt. Die Donorkorrelation hat meist eine viel höhere Amplitude als Prolin 20, d. h., er geht öfter in einen Tripletzzustand über. Die Tripletzeiten sind im Vergleich zur Raumtemperaturmessung mit wenigen hundert Mikrosekunden sehr lang und breit gestreut.

Die mithilfe der exponentiellen Funktion (Gleichung 7.4) ermittelten Tripletzeiten τ_T und -amplituden A_T sind in Abbildung 7.11 für Prolin 6 und Prolin 20 dargestellt. Es sei bemerkt, dass nur etwa 30 % aller Peptide Triplettdynamik beim Donor zeigten (siehe z. B. 7.10b), und sogar nur ca. 10 % beim Akzeptor.

Bei Prolin 6 lässt sich aufgrund der geringen Statistik keine Änderung der Triplettdynamik mit der Laserintensität erkennen. Deutlich ist nur, dass die Amplitude beim Donor oft größer ist als beim Akzeptor, d. h. der Donor geht viel öfter in den Triplet über. Die Tripletzeit liegt bei beiden zwischen 50 und 800 μs .

Der Donor bei Prolin 20 hingegen zeigt mit steigender Anregungsleistung kürzere Tripletzeiten mit stark variierenden, und auch wachsenden, Amplituden. Die Tripletzeiten des Akzeptors sind meist kürzer als die des Donors und auch die Amplitude ist viel kleiner als die des Donors. Der Donor zeigt also an beiden Peptiden eine ausgeprägtere Triplettdynamik.

Auffällig bei beiden Fluorophoren ist die deutlich verlängerte Tripletzeit im Vergleich zu den Messungen bei Raumtemperatur. In Lösung variierte die Tripletzeit bei einer Anregung von 10 μW bis 60 μW nur zwischen 7 μs und 2 μs (siehe Abschnitt 5.2).

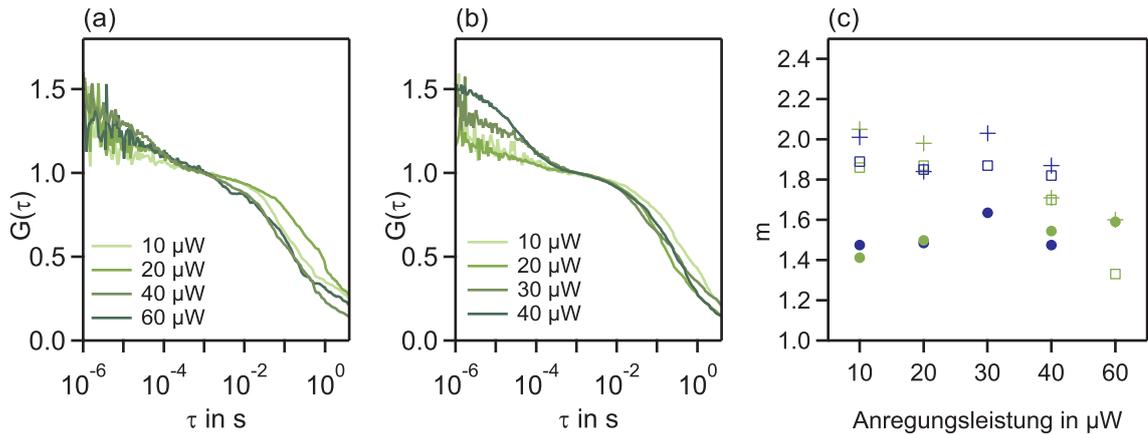


Abbildung 7.12: Gemittelte Donor-AKF aller transienten Intensitäten

Für Prolin 6 (a) und Prolin 20 (b) sind die AKF, gemittelt über alle Donortrajektorien, in Abhängigkeit von der Anregungsleistung dargestellt. Die Amplitude jeder AKF ist bei 1 ms auf Eins normiert. Bei beiden Peptiden ist die Tripletdynamik und die langsamere An-Aus-Dynamik gut erkennbar. An Prolin 20 (b) zeigt sich mit steigender Leistung ein höherer Triplettanteil. Die langsame An-Aus-Dynamik zeigt keine Abhängigkeit von der Anregung. (c) Die Potenzen m_{aus} (Quadrat) und m_{an} (Kreuz) für Prolin 6 (grün) und Prolin 20 (blau) im Vergleich zum Parameter m (Kreis) bestimmt aus den AKF aller Trajektorien.

Weitere Erkenntnisse über das Triplettverhalten der Farbstoffe lassen sich aus der Korrelation aller Trajektorien ziehen. Die Abbildungen 7.12a und b zeigen für die verschiedenen Anregungsleistungen die gemittelten AKF des Donorsignals. Zum Vergleich sind die AKF bei einer Millisekunde auf eine Amplitude von Eins normiert. Der Bereich um eine Zeit von einer Millisekunde trennt deutlich die schnelle Triplett- von der langsameren Dynamik. Die AKF des Akzeptors und die Kreuzkorrelationen aller Trajektorien weisen keine, oder nur sehr schwach, charakteristische Photophysik auf und werden aus diesem Grund nicht weiter betrachtet.

Der Donor, gebunden an Prolin 20, unterliegt bei höherer Anregung öfter einem Übergang in den Triplettzustand, zu sehen an der höheren Amplitude in der AKF bei kurzen Zeiten. Beim Donor, gebunden an Prolin 6, zeigt sich für 10 µW bis 40 µW das gleiche Verhalten, die AKF sind jedoch aufgrund der geringeren Anzahl an Trajektorien verrauschter. Deswegen sollte gerade die AKF bei 60 µW mit Vorsicht betrachtet werden.

Photophysik im Millisekunden- bis Sekundenbereich Die langen An- und Auszeiten des Donors spiegeln sich auch in den AKF, gezeigt in Abbildung 7.12a und b, wider, jedoch in einem Zeitbereich von 1 ms bis 4 s. Aus der Darstellung ist weder bei Prolin 6 noch bei Prolin 20 eine Abhängigkeit von der Anregungsleistung auszumachen. Um den zeitlichen Verlauf besser zu quantifizieren, wurden die AKF in diesem Bereich mit Gleichung 7.4 angepasst und aus dem Faktor b das m_{an}/m_{aus} -Äquivalent m bestimmt. In Abbildung 7.12c sind im Vergleich die aus dem Potenzgesetz ermittelten Anstiege m_{an} und m_{aus} und

der aus den Korrelationen bestimmte Parameter m dargestellt. Dabei ist der Parameter m immer kleiner als m_{an}/m_{aus} . Nur der (statistisch bedenkliche) Wert bei Prolin 6 bei $60 \mu\text{W}$ gleicht den anderen. Bei Prolin 6 steigt, im Gegensatz zur vorherigen Analyse, der Parameter m leicht mit der Anregungsleistung, während Prolin 20 erneut keine Abhängigkeit zeigt.

7.3 Diskussion der Photophysik und -chemie

Im letzten Kapitel dieser Arbeit wurde die Photophysik und -chemie des Farbstoffpaares AF488 und AF594, gebunden an Polyprolin, in einer amorphen Eisschicht untersucht. Die Kenntnis photophysikalischer und - chemischer Prozesse in einer bestimmten Umgebung unter verschiedenen Voraussetzungen, z. B. variierender Anregungsleistung, ist unerlässlich für die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie. Zum Einen kann eine häufige Unterbrechung der Fluoreszenz eine genaue Untersuchung eines Prozesses verhindern, da zu wenig Photonen gesammelt werden können. Zum Anderen können z. B. Dynamiken eines Proteins, die zeitlich ähnliche Fluktuationen wie die Photophysik aufzeigen, nicht von diesen getrennt und somit untersucht werden. Sind Prozesse, die Photoblinken und -bleichen verursachen, bekannt, so kann die Effizienz einer fluoreszenten Probe verbessert werden [141]. Neue Methoden in der Fluoreszenzspektroskopie nutzen sogar die Photophysik, um gezielt Moleküle an- bzw. auszuschalten und so eine höhere Auflösung zu erreichen [52, 66].

Photoblinken Als ein möglicher reversibler Prozess, der zu Dunkelzuständen des Fluorophors führt, war zunächst der Triplettzustand bekannt [75, 137, 41]. Genauere Photophysikanalysen, sowohl an Quantenpunkten [70, 134, 64] als auch an organischen Fluorophoren [44, 149, 60], zeigten jedoch die Existenz sehr viel langsamerer Prozesse. Als mögliche Ursache werden verschiedene Modelle aufgeführt [44, 141]:

- Konformationsänderungen, die zu einer spektralen Verschiebung der Absorption oder zur Änderung der Quantenausbeute führen können
- molekulare Reorientierung, die die Anregungs- und die Detektionseffizienz ändert
- photochemische Prozesse, die zu ionisierten oder metastabilen oxidierten Zuständen führen
- Quenchen durch andere Moleküle in der unmittelbaren Umgebung

Um die verschiedenen Prozesse identifizieren zu können, sind meist zusätzliche Informationen notwendig, da sich die Zeitbereiche oft überlappen [44]. Durch die simultane Messung des Spektrums und der Orientierung des Moleküls kann z. B. spektrale Verschiebung oder Reorientierung des Moleküls ausgeschlossen werden [15]. Die Entstehung eines Anions kann z. B. mithilfe von Elektronen-Spin-Resonanz näher untersucht werden [149]. Durch den Zusatz oder die Reduktion quenchantiver Stoffe, z. B. Sauerstoff, kann Quenchen systematisch

untersucht werden [138].

Für das Verständnis dieser Prozesse ist nicht nur ihre Art von Interesse, sondern auch der Weg in den Dunkelzustand, z. B. über einen angeregten Singulett- oder Triplettzustand.

In den Korrelationsfunktionen der einzelnen transienten Intensitäten wurde zunächst die Triplettodynamik näher betrachtet. Wenn ein Prozess nur einer einzigen Rate unterliegt, so zeigt seine Korrelation einen monoexponentiellen Abfall [70]. Da die Anpassung der Korrelationsfunktionen mithilfe einer monoexponentiellen Funktion erfolgreich war und der Übergang in einen Triplettzustand von nur einer Rate (k_{ISC}) bestimmt wird, kann bei dieser Dynamik auf Triplett geschlossen werden.

Ein weiterer Prozess, der zu Intensitätsfluktuationen und zu einem monoexponentiellen Abfall in der Korrelationsfunktion führen soll, ist spektrale Diffusion [12, 99]. Unter spektraler Diffusion wird eine Verschiebung der Absorptionsfrequenz eines Moleküls verstanden, sodass sie dann nicht mehr zur Frequenz des anregenden Lasers passt und das Molekül folglich nicht mehr emittiert [75]. Gerade bei tiefen Temperaturen, bei denen die Absorptions- und Emissionsspektren schmaler werden (siehe Abschnitt 5.1), kommt es oft zu spektraler Diffusion. Inwiefern spektrale Diffusion hier eine Rolle spielt, kann nicht genau gesagt werden, da Spektren an einzelnen Molekülen nicht gemessen wurden.

Im Vergleich zu den Messungen bei Raumtemperatur in Lösung (siehe Abschnitt 5.2) sind die Triplettzeiten in amorphen Eis sehr viel länger. Sie steigen von wenigen Mikrosekunden in Lösung auf einige hundert Mikrosekunden in der Eisschicht. Generell werden in festen Medien (z. B. PMMA, Polyvinylalkohol), unabhängig von der Temperatur, aufgrund eingeschränkter Dynamik [133], längere Triplettzeiten gemessen (tiefe Temperaturen: [100, 8], Raumtemperatur: [44, 49]). Zudem variieren auch da die Triplettzeiten und -raten, je nach Molekül und der Umgebung, in dem es eingebettet ist, sehr stark. Zum Beispiel zeigte sich an Pentazen in einem p-Terphenyl-Kristall, dass die Triplettzeiten k_{ISC} von dem Grad der Fehlstellungen im Kristall abhängen [7]. D. h. die starke Streuung der Triplettzeiten im amorphen Eis ist ein Hinweis auf eine inhomogene, lokale Umgebung, entweder bereits durch die amorphe Struktur von Wasser gegeben, oder erst durch die Anwesenheit von Trehalose bzw. Verunreinigungen verursacht.

Eine klare Abhängigkeit der Triplettodynamik von der Laserleistung war, aus den Einzelkorrelationen, weder für den Donor noch für den Akzeptor zu finden. Nur für den Donor, gebunden an Prolin 20, nahm die Triplettzeit, das heißt, die Zeit von Beginn eines Triplettzustandes zum Beginn des nächsten, ab. Die Mittelung aller Korrelationen zeigte jedoch recht deutlich, dass der Triplettanteil des Donors mit steigender Laserleistung zunimmt. Auch hier ist diese Tendenz für den Donor an Prolin 20 stärker ausgeprägt, höchstwahrscheinlich begründet durch den höheren Anteil an emittierten Photonen aufgrund der geringeren Transfereffizienz bei Prolin 20. Somit führt in amorphen Eis, wie auch in Lösung bei 300 K, eine höhere Anregungsleistung zu einem erhöhten Triplettanteil (trotz gleicher Übergangswahrscheinlichkeit), da der Anregungs-Relaxations-Zyklus des Fluorophors öfter durchlaufen wird.

Schließlich ist noch zu bemerken, dass nicht jedes Fluorophor bzw. Fluorophorpaar in der amorphen Schicht Triplettodynamik zeigte. Der Übergang in den Triplettzustand, welcher durch Wechselwirkungen mit der Umgebung aufgrund verstärkter Spin-Bahn-Kopplung begünstigt wird (siehe Abschnitt 2.1.1), ist wahrscheinlich aufgrund der starren, jedoch heterogenen Umgebung bei 77 K, von Fluorophor zu Fluorophor verschieden wahrscheinlich bzw. sogar ausgeschlossen.

Schon bei der Betrachtung der Abbildungen einzelner Fluorophore zeigten sich sehr lange Dunkelzeiten, die nicht nur auf Triplettzustände beruhen konnten. Die Analyse der transienten Intensitäten bestätigte dann diese Vermutung. Durch das Histogrammieren der An- und Auszeiten aller Fluorophore wurde sowohl der große zeitliche Bereich als auch der große Bereich der Wahrscheinlichkeiten für bestimmte An-/Auszeiten deutlich. Die Abhängigkeit der An-/Auszeiten von einem Potenzgesetz kann nur durch sehr viele Übergangsraten in andere Zustände erklärt werden [70].

In der starren, amorphen Eisschicht bei 77 K können, von den bereits oben aufgeführten Ursachen, die Konformationsänderung und die molekulare Reorientierung als Ursache ausgeschlossen werden. Spektrale Diffusion führt laut [99] zu einem monoexponentiellen Abfall. Die wahrscheinlichste Ursache für die langen Auszeiten ist die Bildung eines radikalischen Zustandes [44, 70]. Dabei wird nach einer photoinduzierten Ladungstrennung ein Elektron oder ein Loch in der Umgebung des Fluorophors eingefangen [149]. Die Abhängigkeit der An-/Aus-Fluktuationen von einem Potenzgesetz wurde zunächst nur an Quantenpunkten beobachtet und näher untersucht, da sie die benötigte Photostabilität aufwiesen [70]. Aber auch organische Fluorophore in festen Medien wie PMMA zeigten ähnliche Charakteristika [44, 60].

Zur Beschreibung dieser Prozesse wurden verschiedene Modelle entwickelt, von denen die zwei gängigsten hier kurz erläutert werden sollen (ausführlich in [20]). Da das An-/Ausverhalten der Fluorophore fast immer temperaturunabhängig ist, und somit thermische Aktivierung ausgeschlossen werden kann, wird zum Einen Tunneln der Ladungen angenommen. Die Tunnelrate einer Ladung sinkt exponentiell mit dem Abstand der Elektronen-/Lochfalle. Wird von einer statischen Verteilung der Fallen ausgegangen, so kann damit das Potenzgesetzverhalten der Auszeiten erklärt werden, jedoch nicht das der Anzeiten, da diese wieder exponentiell verteilt wären [70]. Wird jedoch angenommen, dass die Barrieren, die die Wahrscheinlichkeit für das Tunneln bestimmen, fluktuieren, so lassen sich auch die nach dem Potenzgesetz verteilten Anzeiten erklären. Dennoch ist dieses Modell umstritten, da es für fluktuierende Barrieren in einem Festkörper keinen physikalischen Hintergrund gibt [64]. Eine andere Erklärung ergibt sich aus der oft wiederkehrenden Potenz $m_{an,aus}$ von 1,5. Beträgt der Anstieg 1,5, so kann die Rekombination der Ladungen (also das Ende der Auszeit) mit einer Zufallsbewegung, d. h. mit einem reinen Diffusionsprozess, beschrieben werden [20]. Die Zeit, die z. B. ein Elektron braucht, um durch Diffusion wieder an den Ausgangspunkt zurückzukehren, ist nach einem Potenzgesetz verteilt. Da jedoch nicht jedes Elektron an seinen Ausgangspunkt zurückkehren würde, müsste die Diffusion auf ein

oder zwei Dimensionen beschränkt werden. Als Lösung dieses Problems wurde u. a. vorgeschlagen, dass die Rekombination zusätzlich von Coulomb-Kräften beeinflusst wird [59]. Auch wurde vorgeschlagen, dass der Prozess nicht durch Diffusion, sondern durch Super-Diffusion, die auf einem Lévy-Flug¹ beruht, beschrieben werden kann [64]. Aber auch hier fehlt dem mathematischen Gerüst die physikalische Erklärung [20].

Um nun die hier beobachteten An-/Auszeiten in amorphen Eis zu erklären, wird auf das Tunneln in Fallen zurückgegriffen. Es ist bekannt, dass Elektronenfallen in amorphem Eis existieren [5]. Aufgrund der Unordnung in solch einer Schicht, existiert eine große Vielfalt von Fallen unterschiedlicher Energie. Zunächst wird das Elektron gefangen, und durch Reorientierung der Umgebung, also der polaren Wassermoleküle, wird der Zustand weiter stabilisiert [122]. Diese Art „Vorfälle“ für Elektronen, die dann erst stabilisiert wird, wurde auch für Fluorophore in anderen Kristallen/Festkörpern entdeckt. In Kristallen hoher Ordnung existieren diese Vorfälle nicht, und folglich wurden auch keine langen Auszeiten detektiert [99, 20]. Das Auftreten sehr langen Auszeiten wird somit auf die Bildung von Radikationen zurückgeführt, bei der das Elektron des Fluorophors durch einen Tunnelprozess im Eis eingefangen wird.

Die Bildung eines Radikalions kann auch über die Abgabe eines Loches, d. h. die Aufnahme eines Elektrons, erfolgen. Die Ionisierungsenergie von amorphen Eis liegt bei 8,5 eV [95]. Licht der Wellenlänge 488 nm hat jedoch nur eine Energie von 2,5 eV, sodass das Eis in der Nähe eines Fluorophors nicht photoinduziert ionisiert und die Abgabe eines Loches ausgeschlossen werden kann.

Bei den Anstiegen $m_{an,aus}$ und dem Parameter m aus der Korrelation konnte keine signifikante Abhängigkeit von der Laserleistung festgestellt werden. Das ermöglicht erste Schlussfolgerungen über den Weg in den Dunkelzustand. Würden die Dunkelzustände nur aus dem Triplettzustand entstehen, so müsste es aufgrund steigender Triplett-dynamik mit steigender Laseranregung zu kürzeren Anzeiten und somit zu einem größeren (negativen) Anstieg m_{an} kommen. Auch wenn dieser Weg sehr wahrscheinlich wäre, da die Lebensdauer des Triplettzustandes länger als die des ersten angeregten Zustandes ist, würde er auch nicht das Potenzgesetz der Anzeiten erklären. Bildete sich der Dunkelzustand nur aus dem Triplettzustand, unterläge er nur einer Rate und wäre somit monoexponentiell. D. h. das Tunneln des Elektrons kann aus dem ersten angeregten Zustand oder aus dem Triplettzustand erfolgen [141]. Die Unabhängigkeit der Auszeiten von der Laserleistung bestätigt, dass der Tunnelprozess zurück eher durch die lokale Umgebung bzw. die Barrierenhöhe bestimmt ist als durch einen photoinduzierten Prozess.

Photobleichen Unterliegt ein Fluorophor einer chemischen Änderung, sodass er danach keine Photoenergie mehr absorbieren kann, so spricht man von einem gebleichten Fluorophor.

¹Bei einer zufälligen Fortbewegung nach Lévy gibt es keine mittlere Schrittweite, d. h. sehr große Schrittweiten sind auch möglich. Die Schrittweiten sind nach einem Potenzgesetz verteilt.

rophor. Es ist bekannt, dass Photobleichen von der Anregungsrate und von den Umgebungsbedingungen abhängig ist und über viele verschiedene Prozesse erfolgen kann [138]. Im Zusammenhang mit der Umgebung werden hauptsächlich zwei Prozesse, die Photoionisierung und die Photooxidation, diskutiert. Photoionisierung erfolgt meist aufgrund eines gesteigerten Reaktionsvermögens eines Fluorophors in einem angeregten Zustand und verursacht oft, wie bereits erwähnt, Photoblinken. Bei der Photooxidation hingegen wird aus einem Sauerstoff im Triplettzustand über den Triplettzustand des Fluorophors ein chemisch aktiver Singulett-Sauerstoff erzeugt [138]. Durch das Einfrieren der Fluorophore in eine amorphe Eisschicht sollte eine Verlängerung der Überlebenszeit aufgrund reduzierter Wechselwirkungen mit der Umgebung erreicht werden. Insbesondere der Ausschluss von Sauerstoff sollte die Photooxidation der Fluorophore verhindern.

Die Analyse der Überlebenszeiten ergab eine breite Verteilung, die sowohl sehr kurze als auch sehr lange Überlebenszeiten von fast einhundert Sekunden zeigte. Deutlich ist die Abhängigkeit von der Anregungsleistung zu sehen. Durch eine erhöhte Anregungsleistung stieg zwar die mittlere Anzahl an Photonen pro Zeiteinheit; die Gesamtanzahl an Photonen konnte jedoch nicht deutlich erhöht werden, da sich die Überlebensdauer meist verkürzte. Da die Fluorophore, die an Prolin 20 gebunden waren, insgesamt bei gleicher Anregung länger lebten, wird auf eine allgemein längere Überlebenszeit des Donors geschlossen. Der Akzeptor unterliegt in FRET-Experimenten meist zuerst Photobleichen, oft aus einem höheren angeregten Singulettzustand [34]. Wird bei Donoranregung die Energie durch FRET auf den Akzeptor übertragen, so befindet sich dieser im ersten angeregten Singulettzustand. Die Anregung in höhere, und damit in reaktivere, Singulettzustände ist dann direkt über die Donoranregung möglich [138].

Da ein Vergleich mit Messungen bei Raumtemperatur in Lösung nicht vorliegt, kann nicht genau gesagt werden, ob die Überlebenszeit von Fluorophoren prinzipiell bei 77 K länger ist. Andere Arbeiten zeigen jedoch deutlich kürzere Überlebenszeiten bei Raumtemperatur [101]. Offensichtlich unterliegen die Fluorophore jedoch weiterhin Photobleichprozessen oder Auszeiten, die die Länge des Experiments überschreiten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Sauerstoff, der in dem flüssigen Stickstoff direkt über der Probe gelöst ist, in die Eisschicht diffundieren und mit den Fluorophoren reagieren kann. Dass Sauerstoff in kristallinem Eis diffundiert, ist bekannt [61]. Der Einfluss von diffundierendem Sauerstoff in Polymeren wurde bereits untersucht und zeigte z. B. die Verkürzung der Triplettzeiten, jedoch keine Änderung der Tripletttraten [49]. Ein Experiment, bei dem der flüssige Stickstoff zusätzlich mit Sauerstoff angereichert wäre, könnte somit vielleicht Auskunft über eine mögliche Sauerstoffdiffusion und ihre Auswirkung auf photophysikalische bzw. -chemische Eigenschaften der Fluorophore geben.

8 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Evaluierung einer Methode, die Untersuchungen von Einzelmolekül-FRET an eingefrorenen Proteinkonformationen erlaubt. Einzelmolekül-FRET, bei Raumtemperatur angewendet, bietet bereits vielfältige Möglichkeiten, Struktur und Dynamik von Biomolekülen spektroskopisch zu verfolgen. Dabei können jedoch nur Zustände charakterisiert werden, die so stabil sind, dass sie ein für die Analyse ausreichendes Signal aussenden. Aus diesem Grund wurde die Idee verfolgt, die Zustände einzufrieren, um auch kurzlebige Zustände beliebig lange beobachten und somit charakterisieren zu können.

Das Einfrieren der Moleküle erfolgte in einer dünnen amorphen Eisschicht. Für die Präparation dieser Schicht wurde ein Kalt-Rotationsbeschichter entwickelt. Der Kryostat, der als Probenträger und -kühler fungiert, ist in diesen Kalt-Rotationsbeschichter integriert, sodass ein sicherer Probentransport auf die Kryostateinheit des Mikroskopstativs gewährleistet ist.

Für die Charakterisierung des Energietransfers bei tiefen Temperaturen wurden Polypropylene verschiedener Längen als Modellsystem gewählt, da sie aufgrund ihrer steifen Struktur oft als Referenz für FRET-Experimente genutzt werden. Um aus den ermittelten Transfereffizienzen Rückschlüsse auf Fluorophorabstände ziehen zu können, muss der Förster-Radius des Farbstoffpaars für alle Messbedingungen bekannt sein. Die Berechnung des Förster-Radius' setzt die Kenntnis der photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe, wie Spektren und Fluoreszenzquantenausbeuten, voraus. Insbesondere wurde der Einfluss von Trehalose im Puffer untersucht, da diese bei den Tieftemperaturexperimenten die Kristallisation der Eisschicht verhindern soll. Zum Vergleich wurden Experimente bei Raumtemperatur und bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff durchgeführt.

Die Messungen der Absorptions- und Emissionsspektren bei Raumtemperatur zeigten leichte Verschiebungen der Maxima in TFE und Propylenglykol im Vergleich zu den wässrigen Lösungen. Viel deutlicher dagegen war die Verschiebung der Emissionsspektren beider Farbstoffe bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff. Die Lösungsmittelrelaxation, die zu Energieverlusten im angeregten Zustand führt und damit die Stokes-Verschiebung verursacht, ist in der amorphen, festen Umgebung bei 77 K sehr viel kleiner. Die Maxima der Emissionsspektren sind dadurch zu niedrigeren Wellenlängen verschoben. Die Messung der Spektren erfolgte nur am Ensemble. Gerade bei tiefen Temperaturen können jedoch die Spektren von Molekül zu Molekül variieren, sodass zukünftig auch die Messung von

Spektren einzelner Moleküle erfolgen soll.

Anhand von FCS-Messungen wurde die Triplettedynamik der Farbstoffe untersucht. Geht ein angeregter Farbstoff in den Triplettzustand über, so ist er für gewisse Zeit dunkel. Da diese Dunkelzeiten nur wenige Mikrosekunden betragen, konnte ein Einfluss auf Transfereffizienzen ausgeschlossen werden. Durch die Bestimmung der Tripletttraten wurde deutlich, dass die Bindung der Farbstoffe an das Polypeptid den Übergang in einen Triplettzustand begünstigt.

Des weiteren war von Interesse, ob die Flexibilität der Fluorophorbindungen einen Mittelwert des Orientierungsfaktors κ^2 von $2/3$ bei Lösungsexperimenten rechtfertigt. Die Anisotropie, die Auskunft über die Reorientierung der Farbstoffe während ihrer Zeit im angeregten Zustand gibt, konnte nur für den Donor bestimmt werden. Dieser zeigte eine sehr kleine Anisotropie, und lässt damit den Mittelwert für κ^2 zu. Die Anisotropie bei tiefen Temperaturen war, wie erwartet, sehr hoch. Durch die gefrorene Umgebung ist keine Orientierung der Farbstoffe möglich und für κ^2 muss die statische, heterogene Verteilung des Orientierungsfaktors beachtet werden.

Bereits in Lösung zeigte die längere der Prolinketten, Prolin 20, eine komplexe Transfer-effizienz-Verteilung. Anstatt einer schmalen Verteilung, deren Breite nur durch Schrotrauschen bestimmt ist, wurde eine sehr breite Verteilung gemessen. Diese ließ sich jedoch durch die Konformationsheterogenität, hervorgerufen durch die *cis-trans*-Isomerie von Prolinen, gut erklären. Die Isomerie konnte durch eine Messung in TFE bestätigt werden, da die Unterdrückung von *cis*-Bindungen in TFE in einer schmaleren Transfereffizienz-Verteilung resultierte. Die Transfereffizienz von Prolin 6, der kurzen Peptidkette, lag nahe Eins und ließ keine Schlussfolgerungen über verschiedene Fluorophorabstände zu. Einerseits ist der Förster-Radius des Farbstoffpaares nicht geeignet, um solch kurze Abstände aufzulösen, und andererseits können sich die Farbstoffe aufgrund ihrer flexiblen Bindung so nahe kommen, dass die Fluoreszenz gequenchet wird. Die Messungen bei Raumtemperatur machten deutlich, dass sich Polyproline, trotz ihrer vergleichsweise starren Struktur, nicht unbedingt als gute Referenz für FRET-Experimente eignen, sondern selbst ein komplexes System darstellen.

Die Transfereffizienz-Verteilungen der Proline in der amorphen Eisschicht unterscheiden sich deutlich von denen in Lösung. Das Histogramm von Prolin 6 hat die meisten Ereignisse bei einer Transfereffizienz von 1,0, zeigt aber auch Ereignisse bei einer Effizienz von 0,5. Die Transfereffizienzen bei Prolin 20 sind über den gesamten Bereich nahezu gleich verteilt. Die Hauptursache der breiteren Verteilungen als in Lösung ist die statische κ^2 -Verteilung. Die Rotation der Farbstoffe ist bei 77 K ganz unterbunden, sodass jedes Farbstoffpaar einen eigenen Orientierungsfaktor und damit einen eigenen Förster-Radius besitzt. Durch MC-Simulationen wurde deutlich, dass die κ^2 -Heterogenität jedoch zur Erklärung der Verteilungen nicht ausreichte. Erst mit der zusätzlichen Beachtung der *cis-trans*-Isomerie und der Flexibilität der Polyprolinketten konnten die Histogramme beschrieben werden. Als

einzigster Unterschied blieb der in der Messung fehlende Anteil an Ereignissen mit Transfereffizienzen nahe Null, die die Simulation insbesondere bei Prolin 20 zeigt. Wahrscheinlich ist dies auf die nicht vollständig zutreffende Vereinfachung der Farbstoffe als Dipol zurückzuführen. Zusammenfassend kann für die FRET-Messungen bei tiefen Temperaturen festgestellt werden, dass Aussagen über Abstände bzw. Abstandsverteilungen durch die statische Verteilung von κ^2 erschwert sind. Konformationsheterogenität, die mit großen Abstandsänderungen einhergeht, könnte jedoch gut detektiert werden. Um kleinere Abstände auflösen zu können, wäre in Zukunft die Verwendung von Fluorophoren ohne ausgeprägte Liniendipole, z. B. Quantenpunkte, denkbar, um die Abhängigkeit der Transfereffizienz vom Orientierungsfaktor zu minimieren.

Abschließend wurden transiente Intensitäten einzelner Polyproline näher betrachtet, um einen Einblick in die Photophysik bzw. -chemie bei tiefen Temperaturen zu erhalten, da ein Ziel des Einfrierens war, die Transfereffizienz mit großer Photonenzahl präzise zu messen.

Besonders auffällig waren Dunkelzeiten unterschiedlicher Länge, deren Verteilung mithilfe eines Potenzgesetzes beschrieben werden konnten. Durch diese Abhängigkeit konnten die Dunkelzeiten auf radikalische Zustände zurückgeführt werden. Die Ionisierung der Farbstoffe erfolgt sehr wahrscheinlich durch das Tunneln des angeregten Elektrons in eine Elektronen Falle im amorphen Eis.

Durch die Korrelation der transienten Intensitäten wurden auch Tripletzustände bei tiefen Temperaturen entdeckt. Diese sind mit einigen hundert Mikrosekunden sehr viel länger als bei den Messungen in Lösung.

Beide Eigenschaften, sowohl die radikalischen als auch die Tripletzustände, haben die gemessenen Transfereffizienzen jedoch nicht sichtlich beeinflusst.

Schließlich wurde geklärt, ob die Immobilisierung der Farbstoffe in amorphem Eis die Überlebenszeit und damit die mögliche Beobachtungszeit deutlich verlängert. Die Polyproline zeigten neben sehr kurzen Überlebenszeiten auch sehr lange von bis zu 100 s. Im Vergleich mit Literaturwerten von Überlebenszeiten in Lösung ist die Beobachtungszeit erhöht. Um einen direkten Vergleich für das gleiche Fluorophorenpaar zu ermöglichen, sollten diese in einem zukünftigen Experiment z. B. in immobilisierten Vesikeln und bei Raumtemperatur in Lösung untersucht werden.

Diese Arbeit zusammenfassend kann festgestellt werden, dass FRET-Messungen in einem eingefrorenen System ermöglicht und verstanden wurden. Damit wurde eine neue Methode entwickelt, die weitere Einblicke in biologische Systeme erlaubt. Beliebige Zustände oder Konformationen können anhand eines Abstandes in einer Art *Foto* festgehalten werden. Dies stellt einen erfolgreichen ersten Schritt auf dem Weg zur Untersuchung von Proteindynamik durch Auftau-Gefrier-Zyklen dar. In einem zukünftigen Projekt sollen diese durch kurzzeitiges Erhitzen der Probe mit einem Laserpuls realisiert werden.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Antonik, S. Felekyan, A. Gaiduk, und C. A. M. Seidel. Separating structural heterogeneities from stochastic variations in fluorescence resonance energy transfer distributions via photon distribution analysis. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(13), 6970–6978, 2006.
- [2] A. Arav, S. Yavin, Y. Zeron, D. Natan, I. Dekel, und H. Gacitua. New trends in gamete’s cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1-2), 77–81, February 2002.
- [3] T. Aumüller. *Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung des Prolin-induzierten Polymorphismus in Peptiden und Proteinen*. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle, 2008.
- [4] W. Barford. Beyond Förster resonance energy transfer in linear nanoscale systems. *Journal of Physical Chemistry A*, 114(43), 11842–11843, 2010.
- [5] W. M. Bartczak, M. Hilczer, und J. Kroh. A statistical-model of the hydrated electron. *Journal of Physical Chemistry*, 91(14), 3834–3840, 1987.
- [6] A. P. Bartko und R. M. Dickson. Imaging three-dimensional single molecule orientations. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(51), 11237–11241, 1999.
- [7] T. Basché, S. Kummer, und C. Bräuchle. Optical spectroscopy of single pentacene molecules in an ordered and a disordered p-terphenyl crystal. *Chemical Physics Letters*, 225(1-3), 116–123, 1994.
- [8] T. Basché, S. Kummer, und C. Bräuchle. Direct spectroscopic observation of quantum jumps of a single molecule. *Nature*, 373(6510), 132–134, 1995.
- [9] A. Benda, M. Hof, M. Wahl, M. Patting, R. Erdmann, und P. Kapusta. TCSPC upgrade of a confocal FCS microscope. *Review of Scientific Instruments*, 76(3), 033106, 2005.
- [10] M. Berberan-Santos und M. J. E. Prieto. Monte carlo simulation of orientational effects on direct energy transfer. *Journal of Chemical Physics*, 88(10), 6341–6349, 1988.
- [11] R. B. Best, K. A. Merchant, I. V. Gopich, B. Schuler, A. Bax, und W. A. Eaton. Effect of flexibility and cis residues in single-molecule FRET studies of polyproline.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(48), 18964–18969, 2007.
- [12] A.-M. Boiron, Ph. Tamarat, B. Lounis, R. Brown, und M. Orrit. Are the spectral trails of single molecules consistent with the standard two-level system model of glasses at low temperatures? *Chemical Physics*, 247(1), 119–132, 1999.
- [13] E. Boukobza, A. Sonnenfeld, und G. Haran. Immobilization in surface-tethered lipid vesicles as a new tool for single biomolecule spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(48), 12165–12170, 2001.
- [14] P. Brüggeller und E. Mayer. Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions. *Nature*, 288, 569–571, 1980.
- [15] R. Börner, D. Kowerko, C. von Borczyskowski, und C. G. Hübner. Time resolved 3D orientation spectroscopy: experimental realization and simulation. *SPIE*, 7905, 2011.
- [16] G. U. Bublitz und S. G. Boxer. Effective polarity of frozen solvent glasses in the vicinity of dipolar solutes. *Journal of the American Chemical Society*, 120(16), 3988–3992, 1998.
- [17] T. N. Chen, A. Fowler, und M. Toner. Literature review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology*, 40(3), 277–282, 2000.
- [18] T. Christ, F. Kulzer, T. Weil, K. Müllen, und Th. Basché. Frequency selective excitation of single chromophores within shape-persistent multichromophoric dendrimers. *Chemical Physics Letters*, 372(5-6), 878–885, 2003.
- [19] I. Chung, K. T. Shimizu, und M. G. Bawendi. Room temperature measurements of the 3D orientation of single cdse quantum dots using polarization microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), 405–408, 2003.
- [20] F. Cichos, C. von Borczyskowski, und M. Orrit. Power-law intermittency of single emitters. *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, 12(6), 272–284, 2007.
- [21] A. R. Clapp, I. L. Medintz, und H. Mattoussi. Förster resonance energy transfer investigations using quantum-dot fluorophores. *ChemPhysChem*, 7, 47–57, 2006.
- [22] A. R. Clapp, I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi, und H. Mattoussi. Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors. *Journal of the American Chemical Society*, 126(1), 301–310, 2004.

-
- [23] D. S. Clark, J. J. Dechter, und L. Mandelkern. Conformational properties of poly(L-proline) and poly(γ -hydroxy-L-proline). 1. Cis imide bonds and evidence for two trans conformers. *Macromolecules*, 12(4), 626–633, 1979.
- [24] N. S. Claxton, T. J. Fellers, und M. W. Davidson. *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, Kapitel: Laser scanning confocal microscopy, Seiten 1–37. John Wiley & Sons, 2006.
- [25] P. Cowan und S. McGavin. Structure of poly-L-proline. *Nature*, 176, 501–503, 1955.
- [26] M. Dahan, A. A. Deniz, T. J. Ha, D. S. Chemla, P. G. Schultz, und S. Weiss. Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules. *Journal of Chemical Physics*, 247(1), 85–106, 1999.
- [27] R. E. Dale, J. Eisinger, und W. E. Blumberg. The orientational freedom of molecular probes. *Biophysical Journal*, 26, 161–194, 1979.
- [28] P. G. Debenedetti und H. E. Stanley. Supercooled and glassy water. *Physics Today*, 56(6), 40–46, 2003.
- [29] A. A. Deniz, T. A. Laurence, M. Dahan, D. S. Chemla, P. G. Schultz, und S. Weiss. Ratiometric single-molecule studies of freely diffusing biomolecules. *Annual Review of Physical Chemistry*, 52, 233–253, 2001.
- [30] A. M. Dennis und G. Bao. Quantum dot-fluorescent protein pairs as novel fluorescence resonance energy transfer probes. *Nano Letters*, 8(5), 1439–1445, 2008.
- [31] R. M. Dickson, D. J. Norris, Y.-L. Tzeng, und W. E. Moerner. Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly(acrylamide) gels. *Science*, 274(5289), 966–968, November 1996.
- [32] M. J. Dobro, L. A. Melanson, G. J. Jensen, und A. W. McDowall. Plunge freezing for electron cryomicroscopy. In Grant J. Jensen, editor, *Cryo-EM Part A Sample Preparation and Data Collection*, volume Volume 481, Seiten 63–82. Academic Press, 2010.
- [33] S. Doose, H. Neuweiler, H. Barsch, und M. Sauer. Probing polyproline structure and dynamics by photoinduced electron transfer provides evidence for deviations from a regular polyproline type II helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), 17400–17405, 2007.
- [34] C. Eggeling, J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, und C. A. M. Seidel. Analysis of photobleaching in single-molecule multicolor excitation and Förster resonance energy transfer measurements. *J. Phys. Chem. A*, 110(9), 2979–2995, 2006.
- [35] M. D. Egger und M. Petran. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. *Science*, 157(3786), 305–307, 1967.

- [36] E. L. Elson und D. Magde. Fluorescence correlation spectroscopy. 1. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13(1), 1–27, 1974.
- [37] J. Enderlein, T. Ruckstuhl, und S. Seeger. Highly efficient optical detection of surface-generated fluorescence. *Applied Optics*, 38(4), 724–732, 1999.
- [38] M. Fischer und J. Georges. Fluorescence quantum yield of rhodamine 6g in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry. *Chemical Physics Letters*, 260(1-2), 115–118, 1996.
- [39] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 2(6), 55–75, 1948.
- [40] M. Glanert. Moleküldynamikrechnung an farbstoffmarkierten Proteinen. Bachelorarbeit, Universität zu Lübeck, 2010.
- [41] T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin, und S. Weiss. Quantum jumps of single molecules at room temperature. *Chemical Physics Letters*, 271(1-3), 1–5, 1997.
- [42] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, und S. Weiss. Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6264–6268, 1996.
- [43] T. Ha, T. A. Laurence, D. S. Chemla, und S. Weiss. Polarization spectroscopy of single fluorescent molecules. *Journal of Physical Chemistry B*, 103, 6839–6850, 1999.
- [44] M. Haase, C. G. Hübner, E. Reuther, A. Herrmann, K. Müllen, und T. Basché. Exponential and power-law kinetics in single-molecule fluorescence intermittency. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(29), 10445–10450, 2004.
- [45] H. Haken und H. C. Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer-Verlag Berlin, 1994.
- [46] G. Haran. Single-molecule fluorescence spectroscopy of biomolecular folding. *Journal of Physics - Condensed Matter*, 15(32), R1291–R1317, 2003.
- [47] E. Haustein und P. Schwille. Single-molecule spectroscopic methods. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(5), 531–540, 2004.
- [48] C. Hübner und T. Basché. *Photophysics of molecular materials*, Kapitel: Optical microscopy and spectroscopy of single molecules, Seiten 5–41. Wiley-VCH, 2006.
- [49] C. G. Hübner, A. Renn, I. Renge, und U. P. Wild. Direct observation of the triplet lifetime quenching of single dye molecules by molecular oxygen. *Journal of Chemical Physics*, 115(21), 9619–9622, 2001.

-
- [50] C. G. Hübner, G. Zumofen, A. Renn, A. Herrmann, K. Müllen, und T. Basché. Photon antibunching and collective effects in the fluorescence of single bichromophoric molecules. *Physical Review Letters*, 91, 093903, 2003.
- [51] E. Hecht. *Optik*. Oldenbourg Verlag München, 2009.
- [52] S. W. Hell und J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19(11), 780–782, June 1994.
- [53] K. A. Henzler-Wildman, V. Thai, M. Lei, M. Ott, M. Wolf-Watz, T. Fenn, E. Pozharski, M. A. Wilson, G. A. Petsko, M. Karplus, C. G. Hübner, und D. Kern. Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature*, 450, 838–844, 2007.
- [54] S. T. Hess und W. W. Webb. Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 83, 2300–2317, 2002.
- [55] F. Hillger, D. Hänni, D. Nettels, S. Geister, M. Grandin, M. Textor, und B. Schuler. Probing protein-chaperone interactions with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(33), 6184–6188, 2008.
- [56] V. Hirschfeld und C. Hübner. A sensitive and versatile laser scanning confocal optical microscope for single-molecule fluorescence at 77 K. *Review of Scientific Instruments*, 81, 113705, 2010.
- [57] J. Hohlbein und C. G. Hübner. Simple scheme for rapid three-dimensional orientation determination of the emission dipole of single molecules. *Applied Physical Letters*, 86, 121104, 2005.
- [58] J. Hohlbein und C. G. Hübner. Three-dimensional orientation determination of the emission dipoles of single molecules: The shot-noise limit. *The Journal of Chemical Physics*, 129(9), 094703, 2008.
- [59] K. M. Hong, J. Noolandi, und R. A. Street. Theory of radiative recombination by diffusion and tunneling in amorphous Si-h. *Physical Review B*, 23(6), 2967–2976, 1981.
- [60] J. P. Hoogenboom, E. M. H. P. van Dijk, J. Hernando, N. F. van Hulst, und M. F. Garcia-Parajo. Power-law-distributed dark states are the main pathway for photobleaching of single organic molecules. *Physical Review Letters*, 95(9), 097401, 2005. Phys. Rev. Lett.
- [61] T. Ikeda-Fukazawa, K. Kawamura, und T. Hondoh. Mechanism of molecular diffusion in ice crystals. *Molecular Simulation*, 30(13-15), 973–979, 2004.

- [62] V. Ivanov, M. Li, und K. Mizuuchi. Impact of emission anisotropy on fluorescence spectroscopy and FRET distance measurements. *Biophysical Journal*, 97(3), 922–929, 2009.
- [63] G. P. Johari, A. Hallbrucker, und E. Mayer. The glass-liquid transition of hyperquenched water. *Nature*, 330, 552–553, 1987.
- [64] Y. Jung, E. Barkai, und R. J. Silbey. Lineshape theory and photon counting statistics for blinking quantum dots: A Levy walk process. *Chemical Physics*, 284(1-2), 181–194, 2002.
- [65] S. Kinoshita, N. Nishi, und T. Kushida. Stochastic behaviour of the dynamic Stokes shift in rhodamine 6g. *Chemical Physics Letters*, 134(6), 605–609, 1987.
- [66] T. A. Klar und S. W. Hell. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 24(14), 954–956, July 1999.
- [67] X. X. Kong, E. Nir, K. Hamadani, und S. Weiss. Photobleaching pathways in single-molecule FRET experiments. *Journal of the American Chemical Society*, 129(15), 4643–4654, 2007.
- [68] M. Kreiter, M. Prummer, B. Hecht, und U. P. Wild. Orientation dependence of fluorescence lifetimes near an interface. *Journal of Chemical Physics*, 117(20), 9430–9433, 2002.
- [69] R. Kuhnemuth und C. A. M. Seidel. Principles of single molecule multiparameter fluorescence spectroscopy. *Single Molecules*, 2(4), 251–254, 2001.
- [70] M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, und D. J. Nesbitt. “On”/“Off” fluorescence intermittency of single semiconductor quantum dots. *The Journal of Chemical Physics*, 115(2), 1028–1040, 2001.
- [71] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 2006.
- [72] J. R. Lakowicz, W. Wiczak, I. Gryczynski, und M. L. Johnson. Influence of oligopeptide flexibility on donor-acceptor distance distribution by frequency-domain fluorescence spectroscopy. *SPIE*, 1204, 192–205, 1990.
- [73] H. Langhals, A. J. Esterbauer, A. Walter, E. Riedle, und I. Pugliesi. Förster resonant energy transfer in orthogonally arranged chromophores. *Journal of the American Chemical Society*, 132(47), 16777–16782, 2010.
- [74] C. T. Lin, A. M. Mahloudji, L. Li, und M. W. Hsiao. Molecular aggregation of rhodamine 6g probed by optical and electrochemical techniques. *Chemical Physics Letters*, 193(1-3), 8–16, 1992.
- [75] H. P. Lu und X. S. Xie. Single-molecule spectral fluctuations at room temperature. *Nature*, 385(6612), 143–146, 1997.

-
- [76] H. P. Lu, L. Y. Xun, und X. S. Xie. Single-molecule enzymatic dynamics. *Science*, 282(5395), 1877–1882, 1998.
- [77] B. J. Luyet und R. Hodapp. Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology*, 39, 433–434, 1938.
- [78] D. E. Makarov und K. W. Plaxco. Measuring distances within unfolded biopolymers using fluorescence resonance energy transfer: The effect of polymer chain dynamics on the observed fluorescence resonance energy transfer efficiency. *Journal of Chemical Physics*, 131(8), 085105, 2009.
- [79] L. Mandelkern und W. L. Mattice. Conformational properties of poly-L-proline form II in dilute solution. *Journal of the American Chemical Society*, 93(7), 1769–1777, 1971.
- [80] E. Mayer und R. Pletzer. Polymorphism in vapor-deposited amorphous solid water. *Journal of Chemical Physics*, 80(6), 2939–2952, 1984.
- [81] K. A. Merchant, R. B. Best, J. M. Louis, I. V. Gopich, und W. A. Eaton. Characterizing the unfolded states of proteins using single-molecule fret spectroscopy and molecular simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(5), 1528–1533, 2007.
- [82] B. H. Meyer, J.-M. Segura, K. L. Martinez, R. Hovius, N. George, K. Johnsson, und H. Vogel. FRET imaging reveals that functional neurokinin-1 receptors are monomeric and reside in membrane microdomains of live cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2138–2143, 2006.
- [83] X. Michalet, A. N. Kapanidis, T. Laurence, F. Pinaud, S. Doose, M. Pflughoeft, und S. Weiss. The power and prospects of fluorescence microscopies and spectroscopies. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32, 161–182, 2003.
- [84] M. Minsky. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4), 128–138, 1988.
- [85] O. Mishima, L. D. Calvert, und E. Whalley. Melting ice I at 77 k and 10 kbar - a new method of making amorphous solids. *Nature*, 310(5976), 393–395, 1984.
- [86] W. E. Moerner. A dozen years of single-molecule spectroscopy in physics, chemistry, and biophysics. *Journal of Physical Chemistry B*, 106(5), 910–927, 2002.
- [87] W. E. Moerner und D. P. Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 74(8), 3597–3619, 2003.
- [88] W. E. Moerner und L. Kador. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Physical Review Letters*, 62(21), 2535–2538, 1989.

- [89] M. Moradi, V. Babin, C. Roland, T. A. Darden, und C. Sagui. Conformations and free energy landscapes of polyproline peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), 20746–20751, 2009.
- [90] R. Métivier, T. Christ, F. Kulzer, T. Weil, K. Müllen, und T. Basché. Single-molecule spectroscopy of molecular aggregates at low temperature. *Journal of Luminescence*, 110(4), 217–224, 2004.
- [91] R. Métivier, F. Kulzer, T. Weil, K. Müllen, und T. Basché. Energy transfer rates and pathways of single donor chromophores in a multichromophoric dendrimer built around a central acceptor core. *Journal of the American Chemical Society*, 126(44), 14364–14365, 2004.
- [92] R. Métivier, F. Nolde, K. Müllen, und T. Basché. Electronic excitation energy transfer between two single molecules embedded in a polymer host. *Physical Review Letters*, 98(4), 047802, 2007.
- [93] A. Munoz-Losa, C. Curutchet, B. P. Krueger, L. R. Hartsell, und B. Mennucci. Fretting about FRET: Failure of the ideal dipole approximation. *Biophysical Journal*, 96(12), 4779–4788, 2009.
- [94] H. Neuweiler, C. M. Johnson, und A. R. Fersht. Direct observation of ultrafast folding and denatured state dynamics in single protein molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18569–18574, 2009.
- [95] Y. V. Novakovskaya. Theoretical estimation of the ionization potential of water in condensed phase. I. Amorphous ice. *Protection of Metals*, 42(6), 542–548, 2006.
- [96] J. O’Dell und B. J. Berne. Molecular-dynamics of rough sphere fluid. 1. Rotational relaxation. *Journal of Chemical Physics*, 63(6), 2376–2394, 1975.
- [97] I. Oesterling. *Multichromophore Systeme auf Basis von Rylencarbonsäureimiden*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität, 2007.
- [98] M. Orrit. Single-molecule spectroscopy: The road ahead. *Journal of Chemical Physics*, 117(24), 10938–10946, 2002.
- [99] M. Orrit. Chemical and physical aspects of charge transfer in the fluorescence intermittency of single molecules and quantum dots. *Photochemical and Photobiological Science*, 9(5), 637–642, 2010.
- [100] M. Orrit und J. Bernard. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal. *Physical Review Letters*, 65(21), 2716–2719, 1990.
- [101] M. Ott. *Konformationsänderungen und enzymatische Aktivität am einzelnen Molekül*. PhD thesis, Universität zu Lübeck, 2008.

-
- [102] N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhargat, P. J. Millard, F. Mao, W.-Y. Leung, und R. P. Haugland. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(9), 1179–1188, 1999.
- [103] J. B. Pawley. *Biological confocal microscopy*. Springer, 2006.
- [104] C. Polge, A. U. Smith, und A. S. Parkes. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172), 666, 1949.
- [105] C. Reichardt. *Solvents and Solvent Effects in organic chemistry*. VCH, Weinheim, 1988.
- [106] U. Reimer, G. Scherer, M. Drewello, S. Kruber, M. Schutkowski, und G. Fischer. Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *Journal of Molecular Biology*, 279(2), 449–460, 1998.
- [107] R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, und P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low-background - analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*, 22(3), 169–175, 1993.
- [108] S. Rüttinger, R. Macdonald, B. Krämer, F. Koberling, M. Roos, und E. Hildt. Accurate single-pair Förster resonant energy transfer through combination of pulsed interleaved excitation, time correlated single-photon counting, and fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 11(2), 024012, 2006.
- [109] H. Sahoo, D. Roccatano, A. Hennig, und W. M. Nau. A 10-angstrom spectroscopic ruler applied to short polyprolines. *Journal of the American Chemical Society*, 129(31), 9762–9772, 2007.
- [110] H. Sahoo, D. Roccatano, M. Zacharias, und W. M. Nau. Distance distributions of short polypeptides recovered by fluorescence resonance energy transfer in the 10 angstrom domain. *Journal of the American Chemical Society*, 128(25), 8118–8119, 2006.
- [111] Y. Santoso, C. M. Joyce, O. Potapova, L. Le Reste, J. Hohlbein, J. P. Torella, N. D. F. Grindley, und A. N. Kapanidis. Conformational transitions in DNA polymerase I revealed by single-molecule FRET. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), 715–720, 2010.
- [112] D. W. Schubert und T. Dunkel. Spin coating from a molecular point of view: its concentration regimes, influence of molar mass and distribution. *Materials Research Innovations*, 7(5), 314–321, 2003.
- [113] B. Schuler. *Methods in Molecular Biology - Protein folding protocols*, Kapitel: Application of single molecule Förster resonance energy transfer to protein folding, Seiten 115–138. Humana Press Inc., 2007.

- [114] B. Schuler, E. A. Lipman, P. J. Steinbach, M. Kumke, und W. A. Eaton. Polyproline and the 'spectroscopic ruler' revisited with single-molecule fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(102), 2754–2759, 2005.
- [115] C. A. M. Seidel. Analysis of molecular conformations with high time resolution by multi-parameter single-molecule fluorescence spectroscopy. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 228, U306, 2004.
- [116] P. R. Selvin. New fluorescent tools for watching nanometer-scale conformational changes of single molecules. *Biophysical Journal*, 86(1), 342A, 2004.
- [117] D. Semwogerere und E. R. Weeks. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Kapitel: Confocal Microscopy, Seiten 1–10. Informa Healthcare, 2005.
- [118] L. C. T. Shoute, V. J. MacKenzie, K. J. Falk, H. K. Sinha, A. Warsylewicz, und R. P. Steer. Spectroscopy and photophysics of tropolone in condensed media. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2, 1–9, 1999.
- [119] Y. S. Song, D. Adler, F. Xu, E. Kayaalp, A. Nureddin, R. M. Anchan, R. L. Maas, und U. Demirci. Vitrification and levitation of a liquid droplet on liquid nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(10), 4596–4600, 2010.
- [120] A. Soranno, R. Longhi, T. Bellini, und M. Buscaglia. Kinetics of contact formation and end-to-end distance distributions of swollen disordered peptides. *Biophysical Journal*, 96(4), 1515–1528, 2009.
- [121] V. Sourjik und H. C. Berg. Binding of the Escherichia coli response regulator CheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 12669–12674, 2002.
- [122] J. Stähler, U. Bovensiepen, M. Meyer, und M. Wolf. A surface science approach to ultrafast electron transfer and solvation dynamics at interfaces. *Chemical Society Reviews*, 37(10), 2180–2190, 2008.
- [123] S. J. Strickler und Robert A. Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *J. Chem. Phys.*, 37(4), 814–822, 1962.
- [124] L. Stryer und R. P. Haugland. Energy transfer: A spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58, 719–726, 1967.
- [125] J. Tang, D. H. Lee, Y. C. Yeh, und C. T. Yuan. Short-time power-law blinking statistics of single quantum dots and a test of the diffusion-controlled electron transfer model. *Journal of Chemical Physics*, 131(6), 064506, 2009.

-
- [126] D. Thirumalai und B. Y. Ha. *Theoretical and mathematical models in polymer research*. Academic, NY, 1988.
- [127] R. E. Thompson, D. R. Larson, und W. W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 82(5), 2775–2783, 2002.
- [128] C. Tietz, O. Chekhlov, A. Drabnestedt, J. Schuster, und J. Wrachtrup. Spectroscopy on single light-harvesting complexes at low temperature. *Journal of Physical Chemistry*, 103(30), 6328–6333, 1999.
- [129] K. Tonooka, K. Yamada, N. Kamata, und F. Maruyama. Role of the dipole-quadrupole interaction in fluorescence of RE glasses estimated by Monte Carlo simulation. *Journal of Luminescence*, 60-61, 864–866, April 1994.
- [130] B. W. van der Meer. Kappa-squared: from nuisance to new sense. *Molecular Biotechnology*, 82, 181–196, 2002.
- [131] A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Kohler, T. J. Aartsma, und J. Schmidt. Spectroscopy of single light-harvesting complexes from purple photosynthetic bacteria at 1.2 k. *Journal of Physical Chemistry B*, 102(47), 9363–9366, 1998.
- [132] A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Kohler, T. J. Aartsma, und J. Schmidt. Spectroscopy of individual LH2 complexes of *Rhodospseudomonas acidophila*: Localized excitations in the B800 band. *Chemical Physics*, 247(1), 53–60, 1999.
- [133] J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajo, L. Kuipers, und N. F. van Hulst. Time-varying triplet state lifetimes of single molecules. *Physical Review Letters*, 83(11), 2155–2158, 1999.
- [134] R. Verberk und M. Orrit. Photon statistics in the fluorescence of single molecules and nanocrystals: Correlation functions versus distributions of on- and off-times. *Journal of Chemical Physics*, 119(4), 2214–2222, 2003.
- [135] L. P. Watkins, H. Chang, und H. Yang. Quantitative single-molecule conformational distributions: A case study with poly-(L-proline). *Journal of Physical Chemistry*, 110, 5191–5203, 2006.
- [136] R. H. Webb. Confocal optical microscopy. *Reports On Progress In Physics*, 59(3), 427–471, 1996.
- [137] K. D. Weston, P. J. Carson, H. Metiu, und S. K. Buratto. Room-temperature fluorescence characteristics of single dye molecules adsorbed on a glass surface. *Journal of Chemical Physics*, 109(17), 7474–7485, 1998.

- [138] J. Widengren, A. Chmyrov, C. Eggeling, P. A. Lofdahl, und C. A. M. Seidel. Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A*, 111(3), 429–440, 2007.
- [139] J. Widengren und R. Rigler. Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Bioimaging*, 4(3), 149–57, 1996.
- [140] J. Yang und D. Kim. Single molecule spectroscopic investigation on various multiporphyrin systems as molecular photonic devices. *J. Mater. Chem.*, 19(8), 1057–1062, 2009.
- [141] E. K. L. Yeow, S. M. Melnikov, T. D. M. Bell, F. C. De Schryver, und J. Hofkens. Characterizing the fluorescence intermittency and photobleaching kinetics of dye molecules immobilized on a glass surface. *Journal of Physical Chemistry A*, 110(5), 1726–1734, 2006.
- [142] A. Yildiz und P. R. Selvin. Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: Application to molecular motors. *Accounts of Chemical Research*, 38(7), 574–582, 2005.
- [143] Ahmet Yildiz, Joseph N. Forkey, Sean A. McKinney, Taekjip Ha, Yale E. Goldman, und Paul R. Selvin. Myosin V walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 300(5628), 2061–2065, 2003.
- [144] X. You, A. W. Nguyen, A. Jabaiah, M. A. Sheff, K. S. Thorn, und P. S. Daugherty. Intracellular protein interaction mapping with FRET hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18458–18463, December 2006.
- [145] H. Yuan, T. Xia, B. Schuler, und M. Orrit. Temperature-cycle single-molecule FRET microscopy on polyprolines. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 1762–1769, 2011.
- [146] B. Zhang, J. Zerubia, und J. C. Olivo-Marin. Gaussian approximations of fluorescence microscope point-spread function models. *Applied Optics*, 46(10), 1819–1829, 2007.
- [147] L. Zhang, S. Aite, und Z. Yu. Unique laser-scanning optical microscope for low-temperature imaging and spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*, 78(8), 083701, 2007.
- [148] R. Zondervan, F. Kulzer, G. C. G. Berkhout, und M. Orrit. Local viscosity of supercooled glycerol near T_g probed by rotational diffusion of ensembles and single dye molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), 12628–12633, 2007.
- [149] R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii, und M. Orrit. Photoblinking of rhodamine 6g in poly(vinyl alcohol): Radical dark state formed through the triplet. *Journal of Physical Chemistry A*, 107(35), 6770–6776, 2003.

- [150] R. Zondervan, F. Kulzer, H. van der Meer, J. A. J. M. Disselhorst, und M. Orrit. Laser-driven microsecond temperature cycles analyzed by fluorescence polarization microscopy. *Biophysical Journal*, 90(8), 2958–2969, 2006.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Jablonski-Diagramm	6
2.2	Stokes -Verschiebung	7
2.3	Struktur des Farbstoffes Fluorescein	10
2.4	Jablonski-Diagramm mit resonantem Energietransfer	12
2.5	Überlappungsintegral	13
2.6	Orientierung der Übergangsdipolmomente	14
2.7	Transfereffizienz in Abhängigkeit von R_0	16
2.8	Mittelwert und statische Verteilung des Orientierungsfaktors κ^2	19
2.9	Konfokales Prinzip	20
2.10	Punkt-Abbildungs-Funktion	22
2.11	Beispiele für spFRET-Experimente	27
2.12	Simulation von FRET-Verteilungen und deren Breite	28
2.13	Beispiel einer Autokorrelationsfunktion	30
2.14	Autokorrelationsfunktion mit Triplettdynamik und Photobleichen	31
2.15	Fluoreszenz-Anregungsspektrum von Pentacen in p-Terphenyl bei 1,5 K.	32
3.1	Konfokaler Aufbau	37
3.2	Transmissionsgitter und Quanteneffizienz der Kamera	40
3.3	Kalt-Rotationsbeschichter und Kryostat	42
3.4	Inneres Dewar-Gefäß und Strukturen in der Eisschicht	44
3.5	NI-Daten	46
3.6	Datenformat der TimeHarp-Karte	46
3.7	Chemische Struktur von AF488 und AF594	47
3.8	Spektren von AF488 und AF594	48
3.9	Struktur eines Prolins und eines Polyprolinpeptids	49
3.10	Struktur des Perylenmonoimids	50
4.1	PMI in PMMA bei Weitfeldanregung	52
4.2	Prolin 6 zwischen Deckglas u. PMMA- oder Aluminiumfolie bei 77 K	53
4.3	Experimente mit Grids	54
4.4	Gütemessungen mit PMI in PMMA	56
4.5	Beispiel für die Bestimmung der Spotgröße	57
5.1	Absorptionsspektren bei Raumtemperatur von AF488 und AF594	61

5.2	Raumtemperaturfluoreszenzspektren von AF488 und AF594, frei und gebunden	62
5.3	Raumtemperaturfluoreszenzspektren in verschiedenen Lösungen	63
5.4	Tieftemperaturspektren des Donors	64
5.5	Tieftemperaturspektren des Akzeptors	65
5.6	Jablonski-Diagramm	67
5.7	Triplet der freien und der gebundenen Farbstoffe	69
5.8	Tripletparameter und -raten in Abhängigkeit von der Anregung	71
5.9	Beispiel einer Anisotropiemessung	73
5.10	Anisotropie und Rotationskorrelationszeit von AF488	74
5.11	Anisotropie bei Raumtemperatur und bei 77 K	76
5.12	Anisotropie und Rotationskorrelationszeit an Prolin 6 und Prolin 20	77
5.13	Messung der Fluoreszenzlebensdauer	79
5.14	Fluoreszenzlebensdauer des freien und des gebundenen AF488	80
5.15	Fluoreszenzlebensdauer des Donors an Prolin 6 und Prolin 20	82
5.16	Fluoreszenzabklingraten an einer Grenzschicht	84
6.1	Transmission der Filter und Detektionseffizienzen	88
6.2	Verteilung der Förster-Radien bei 77 K	90
6.3	Theoretische Abstände der Peptidtermini	92
6.4	Prolin 6 mit AF488 und AF594	93
6.5	Theoretische Transfereffizienz bei Raumtemperatur in NaP-Puffer	94
6.6	Theoretische Transfereffizienz bei 77 K	95
6.7	Energietransfer von immobilisierten Tetra-Speck-Kugeln	97
6.8	Tetra-Speck-Kugeln in verschiedenen Lösungen	98
6.9	Transfereffizienz in Lösung	100
6.10	Einfluss von Akzeptorbleichen	102
6.11	Konformationsanalyse von Prolin 20 in Lösung	103
6.12	Mittlere Transfereffizienzen im Vergleich	105
6.13	Prolin 6 in Propylenglykol und AF488 in TFE bei 77 K	110
6.14	Bildaufnahme mit ALEX	111
6.15	Analyse der FRET-Experimente bei 77 K	112
6.16	Transfereffizienz-Verteilung ohne und mit Akzeptorschwelle	113
6.17	Transfereffizienz-Verteilung bei Prolin 6	114
6.18	Transfereffizienz-Verteilung bei Prolin 20	115
6.19	Vergleich der Fluorophorabstände in Theorie und Experiment	119
7.1	Photophysik an einzelnen Prolin 6 - Molekülen	122
7.2	Transiente Intensitäten einzelner Proline bei 77 K	124
7.3	Beispiel für An- und Auszeiten einer transienten Intensität	125

7.4	halb- und doppelt-logarithmische Darstellung der Auszeiten von Prolin 6 bei $10 \mu W$	126
7.5	An- und Auszeiten der Fluorophore an Prolin 6 und Prolin 20	128
7.6	Anstieg der Wahrscheinlichkeitsdichten der An- und Auszeiten	129
7.7	Photonenanzahl pro Zeit und Gesamtanzahl der Photonen	130
7.8	Überlebenszeit der Fluorophore	131
7.9	Analyse der Korrelationsfunktionen	132
7.10	Beispiele transienter Intensitäten und ihrer Korrelationen	133
7.11	Triplettdynamik bei 77 K	134
7.12	Gemittelte Donor-AKF aller transienten Intensitäten	135

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. C. G. Hübner. Er hat die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation übernommen und deren Entstehung mit kritischen und inspirierenden Diskussionen bereichert. Auch im Hinblick auf meine fachliche, berufliche und persönliche Weiterentwicklung hat er mich stets gefördert.

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. T. Gutschmann.

Besonderer Dank gilt auch PD Dr. H. Paulsen und M. Glanert für Ihre Unterstützung bei den Simulationen.

Dr. T. Aumüller hat mir freundlicherweise Proline für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Dafür danke ich ihm.

Prof. B. Schuler danke ich sehr für die Ermöglichung meines halbjährigen Forschungsaufenthaltes an seinem Institut in Zürich. Dort habe ich unter der Betreuung und in Zusammenarbeit mit Frau S. Müller-Späth, der ich auch herzlich danke, Grundlegendes über die Biochemie gelernt. Dieses Wissen konnte ich erfolgreich für diese Arbeit nutzen.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die stets freundliche, familiäre und motivierende Arbeitsatmosphäre am Institut und für jegliche Art von Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ich danke hier insbesondere Dana Kahra für die vielen Diskussionen, Anmerkungen und Korrekturen zu meiner Arbeit.

Den Werkstätten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der Universität zu Lübeck sowie Herrn M. Mischok danke ich für die technische Umsetzung unserer Ideen und die Konstruktion des Kryostats und des Kalt-Rotationsbeschichters.

Mein größter Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets unterstützt und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mir somit die notwendige Ruhe und Sicherheit für die Erstellung dieser Arbeit gaben.

Mein liebster Dank gilt meinem Frank.

Publikationen

Kahra, D.; Kovermann, M.; Löw, C.; Hirschfeld, V.; Haupt, C.; Balbach, J. und Hübner, C. G.; Conformational plasticity and dynamics in the generic protein folding catalyst SlyD unraveled by single-molecule FRET. *Journal of Molecular Biology*, 2011, im Druck

Hirschfeld, V. und Hübner, C. G.; A sensitive and versatile laser scanning confocal microscope for single-molecule fluorescence at 77 K. *Review of Scientific Instruments* 81(11), 113705, 2010

Müller-Späth, S.; Soranno, A.; Hirschfeld, V.; Hofmann, H.; Rügger, S.; Reymond, L.; Nettels, D. und Schuler, B.; Charge interactions can dominate the dimensions of intrinsically disordered proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 107(33),14609-14614, 2010