

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Das Monomer des Lichtsammelkomplexes
Phycoerythrocyanin:
Optische Experimente am Ensemble, an einzelnen
Molekülen und Modellierung des
Energietransferverhaltens

Peter Zehetmayer

aus
Erding

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. C. Bräuchle betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 06. Juni 2003



Peter Zehetmayer

Dissertation eingereicht am	06. Juni 2003
1. Gutachter:	Prof. Dr. C. Bräuchle
2. Gutachter:	Prof. Dr. H. Scheer
Mündliche Prüfung am	08. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen der Einzelmolekülspektroskopie	6
2.1	Photophysik einzelner Moleküle	6
2.1.1	Absorption	7
2.1.2	Relaxationsprozesse	8
2.1.3	Fluoreszenzlebenszeit	9
2.1.4	Fluoreszenzquantenausbeute	10
2.1.5	Sättigungsverhalten	10
2.1.6	Photonenstatistik	12
2.1.7	Photostabilität	17
2.2	Apparative Grundlagen zur Detektion einzelner Moleküle	19
2.2.1	Theoretische Begrenzungen der Detektionsoptik	20
2.2.2	Techniken zur räumliche Isolierung	24
2.2.3	Spektrale Selektion	28
3	Polarisationssensitive Experimente am Ensemble und an einzelnen Molekülen	31
3.1	Absorption	32
3.2	Emission	33
3.3	Anisotropie und Depolarisation	34

3.3.1	Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment	35
3.3.2	Energietransfer	36
3.3.3	Rotation	42
3.3.4	Anregungs- und Detektionscharakteristik	45
3.4	Apparative Charakteristik am Beispiel Terrylen - Definition des Laborkoordinatensystems	49
4	Experimentelle Durchführung	54
4.1	Einzelmolekülspektroskopie bei Raumtemperatur	54
4.1.1	Lasersysteme	54
4.1.2	Anregungsstrahlengang	56
4.1.3	Detektionsstrahlengang	58
4.2	Einzelmolekülexperimente bei tiefen Temperaturen	59
4.3	Automatisierte Steuerung der Einzelmolekülexperimente	61
4.4	Zeitaufgelöste optische Spektroskopie	61
4.4.1	Lasersystem	61
4.4.2	Anregungsstrahlengang	62
4.4.3	Detektionsstrahlengang	62
4.4.4	Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen	62
4.5	Fluoreszenz- und Absorptionsspektren	64
4.6	Probenpräparation	65
5	Photophysik des Biliproteins Phycoerythrocyanin (PEC)	67
5.1	Energietransferuntersuchungen an einzelnen PEC Monomeren	74
5.1.1	Polarisationssensitive Fluoreszenzdetektion am PEC Monomer	74
5.1.2	Energietransfer einzelner PEC Monomere	77
5.2	Parameter für den Energietransfer im PEC	83
5.2.1	Fluoreszenzzerfallskonstanten im PEC	83

5.2.2	Fluoreszenzquantenausbeuten der α - und β -Untereinheiten . . .	91
5.2.3	Berechnung des Überlappintegrals durch Modellierung der Spektren	93
5.3	Mittlerer Energietransfer im PEC Monomer	98
5.3.1	Energietransferraten und mittlerer Relaxationskanal	99
5.3.2	Gleichgewichtsverteilung der Anregungsenergie im PEC Mo- nomer	100
5.3.3	Monte Carlo Simulation des Energietransfers	101
5.3.4	Einflüsse auf den Energietransferkoeffizienten γ	103
5.4	Photostabilität und Dunkelzustände	107
5.4.1	Der Einfluss von Temperatur und Sauerstoff auf die Photosta- bilität	108
5.4.2	Dunkelzustände im Phycoerythrocyanin	111
5.4.3	Spektrale Untersuchungen zur Photostabilität	115
6	Zusammenfassung	118
A	Tabellen	121
B	Programme	123
B.1	Photonenstatistik	123
B.2	Programm zur Berechnung des Energietransferkoeffizienten γ	126
B.3	Berechnung der Energietransferraten	131
B.4	Monte Carlo Simulation	136
C	Abbildungen	140
	Literaturverzeichnis	141

Kapitel 1

Einleitung

Obwohl der Chemiker immer mit einer großen Anzahl an Molekülen experimentiert, ist seine Denkweise stark an die modellhafte Vorstellung einzelner Moleküle angelehnt. Das Ergebnis seiner Experimente wird auch heutzutage noch mit spektroskopischen Methoden verifiziert, bei denen eine Mittelung über eine große Anzahl an Teilchen erfolgt. In den letzten 20 Jahren wurden eine Reihe von Techniken entwickelt, um die individuellen Eigenschaften einzelner Moleküle experimentell zugänglich zu machen. Durch die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops [1] war es erstmals möglich, detaillierte Bilder von einzelnen Atomen und Molekülen auf Metalloberflächen [2] zu erhalten. Auf der Seite der optischen Spektroskopie galt die ganze Anstrengung dem Überwinden der inhomogenen Verbreiterung von Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum. Mit Techniken wie Fluoreszenzlinienverschmälerung [3], Lochbrennen [4] oder Photonen-Echo [5] konnten Einblicke in die, unter der breiten Absorptionsbande versteckten, Feinstruktur der Spektren gewonnen werden. Im Jahre 1989 gelang dann die Detektion des Absorptionssignals eines einzelnen, in einer festen Matrix immobilisierten, Moleküls bei kryogenen Temperaturen [6, 7]. Jedoch erforderte dieses Experiment eine anspruchsvolle Doppelmodulationstechnik. Wegen des hohen apparativen Aufwands setzte sich schnell die weit einfachere Technik der Fluoreszenzanregung und Detektion [8] einzelner Moleküle durch. Die anfängliche Detektion einzelner Moleküle über ihre Absorption, wie auch über deren Fluoreszenz, setzte schmale Absorptionslinien voraus, die man nur bei tiefen Temperaturen erhält. Die hohe spektrale Sensitivität der Absorptionslinie erlaubte den Einsatz eines einzelnen Moleküls als Sonde für seine lokale Umgebung [9, 10]. Als Sonde reagiert das einzelne Molekül durch spektrale Verschiebungen seiner Absorptionslinie, wie es am Beispiel des Stark Effekts gezeigt wurde [11, 12]. Neben der Rolle als Reporter für die lokale Umgebung beschäftigten sich andere Untersuchungen mit den photophysikalischen und quantenoptischen Eigenschaften einzelner Moleküle,

wie Bunching [13], Antibunching [14] oder den Fluoreszenzlebenszeiten [15].

Der Weg zur Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie bei tiefen Temperaturen war begleitet von den Anstrengungen die Konzentration für spektroskopische Untersuchungen bei Raumtemperatur immer weiter zu reduzieren. Im Gegensatz zu den starren Aromaten, die anfangs in den Experimenten bei tiefen Temperaturen Verwendung fanden, kamen in den Untersuchungen bei Raumtemperatur von Anfang an biologische Probensysteme zum Einsatz. Proteine, DNA oder Lipide zeigen jedoch selten genug Fluoreszenz, um sie detektieren zu können. Der Einsatz von Markierungstechniken durch fluoreszierende Farbstoffe erlaubte jedoch schon 1976 die Einzelteilchendetektion [16]. Während damals noch sehr viele Fluorophore pro Teilchen zum Einsatz kamen, möchte man heute möglichst minimalinvasiv in die Biologie des Probensystems eingreifen. Der ursprüngliche Weg zur Detektion einzelner Moleküle bei Raumtemperatur führte über den Einsatz von Durchflusskapillaren, bei denen durch verbesserte Detektions- und Anregungstechniken die Konzentration immer weiter gesenkt werden konnte. Ausgehend von anfangs 22000 Rhodamin 6G Molekülen [17] war der Schritt zur Detektion eines einzelnen Phycoerythrin Moleküls [18, 19] mit einer Fluoreszenzintensität von ca. 25 Rhodamin 6G Molekülen ein weiterer Meilenstein zur Detektion einzelner Fluorophore. Die Verwendung immer kleinere Anregungs- und Detektionsvolumina, wie auch die zeitlich verzögerte Detektion des Fluoreszenzsignals vom instantan auftretenden Ramansignal, erlaubte schließlich die Trennung des Untergrundsignals von der Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls [20, 21, 22]. Die erste mikroskopische Detektion eines einzelnen Moleküls bei Raumtemperatur fand 1993 statt [23, 24, 25, 26]. Im Gegensatz zur spektralen Isolierung einzelner Moleküle bei tiefen Temperaturen wird bei der mikroskopischen Abbildung die Fluoreszenz nun räumlich aufgelöst. Der Einsatz der bereits früher vorgestellten NSOM-Technik (Near-field Scanning Optical Microscope) führte dabei zu einer weiteren Reduktion des Anregungsvolumens und der untergrundarmen, nun mikroskopischen, Abbildung einzelner Moleküle. Die technisch anspruchsvolle Nahfeldmikroskopie durch NSOM wurde schon bald durch TIR (Total Internal Reflection) [27] und die Fernfeldmikroskopie einzelner Moleküle ergänzt. Bei den Fernfeldtechniken, kam neben der Weitfeldanregung [28, 29, 30, 31], auch die konfokale Mikroskopie zum Einsatz [32].

Der erleichterte Zugang zur Einzelmolekülspektroskopie bei Raumtemperatur kam vor allem biologisch motivierten Fragestellungen zugute. So spielen bei den Raumtemperaturuntersuchungen nicht nur die photophysikalischen Eigenschaften des fluoreszierenden Reportermoleküls eine Rolle. Ebenso versucht man aus dem Fluoreszenzverhalten auf Vorgänge des gelabelten Systems zu schließen. Durch Kollimation gelabelter ATP-Moleküle und gelabelter Motorproteine auf einer Proben-

oberfläche konnte so der Umsatz eines einzelnen ATP zu ADP nachgewiesen werden [27]. Selbst die Bewegungsschritte von Motorproteinen [33, 34] oder die Rotation einer gelabelten F_1 -ATPase [35, 36] bei der Synthese/Hydrolyse von ATP, konnte beobachtet werden. Die Einzelmolekülmikroskopie brachte auch erstmals Einblicke in die Kinetik eines einzelnen Enzyms. An der Cholesterin Oxidase [37], Lactat Dehydrogenase [38, 39] oder Staphylococcal Nuclease [40] konnten die für einzelne Moleküle typische Heterogenitäten in den Geschwindigkeitskonstanten gezeigt werden. Andere Experimente beschäftigten sich mit der Diffusion von einzelnen Teilchen in zellulären Medien. Durch das Markieren mit kleinen Farbstoffmolekülen kann, fast ungestört durch den Label, diese Diffusion untersucht werden. So stellt die Charakterisierung der Diffusion von fluoreszenzgelabelten Lipiden in einer Phospholipidmembran [41, 42] ein wichtiges Experiment zum Verständnis der Transportvorgänge in Zellmembranen dar. Die Beobachtung einzelner AAV Viren auf ihrem Infektionsweg durch die Zellmembran bis hinein in den Zellkern [43] ist ein weiteres schönes Beispiel für die biologische Relevanz der Einzelmolekülmikroskopie bei Raumtemperatur.

Diese hier aufgelisteten Experimente stellen nur einen sehr kleinen Auszug der in den vergangenen Jahren untersuchten Probleme dar. In allen Beispielen konnte die Einzelmolekülspektroskopie einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung leisten. Den meisten dieser Experimente ist jedoch gemeinsam, dass das zu untersuchende Target stets über einen Fluoreszenzmarker gelabelt werden musste. Es sind jedoch auch Proteine bekannt, die in ihrer nativen Form über eine chromophore Gruppe verfügen, die ausreichend Fluoreszenz zeigt, um im Einzelmolekülexperiment detektiert werden zu können. Das GFP (Green Fluorescent Protein) ist wohl der bekannteste Vertreter dieser Proteine. Seine Beliebtheit hat es seiner Fluoreszenz ohne externe Kofaktoren zu verdanken [44, 45]. Diese Eigenschaft ermöglicht den direkten Einsatz des GFPs als Label eines nicht zur Fluoreszenz befähigten Proteins [46, 47]. Auch Enzyme mit Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als prosthetische Gruppe sind der Einzelmolekülspektroskopie ohne externen Label zugänglich [37].

In dieser Arbeit kommt die Einzelmolekülspektroskopie für Untersuchungen an Protein-Pigment-Komplexen zum Einsatz, die für die Photosynthese eine wichtige Rolle spielen. Auch diese Proteine sind ohne zusätzliche Markierung mit einem Farbstoff der Einzelmolekülspektroskopie zugänglich. Sie bilden die zur Photosynthese notwendigen Lichtsammelkomplexe in Pflanzen und Bakterien. Lichtsammelkomplexe dienen als Antennen, um das eingestrahlte Sonnenlicht effektiv zu absorbieren und die so gewonnene Energie in das Reaktionszentrum des Photosystems zu leiten. Trennt man die Lichtsammelkomplexe vom Reaktionszentrum ab, dann muss die Anregungsenergie auf den chromophoren Gruppen, wie Chlorophyll oder Bak-

teriochlorophyll, über Fluoreszenz abgegeben werden. Über diese Fluoreszenz sind sie der Einzelmolekülspektroskopie zugänglich. Angespornt durch die Erfolge in der Nahfeldmikroskopie wurden sehr früh erste Untersuchungen an kompletten Thylakoidmembranstücken der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt [48]. Durch eine Mutation konnte in dieser Alge die Bildung des Photosystems I, II und der "core"-Antennen unterbunden werden und die membranverankerten Lichtsammelkomplexe ließen sich so über Fluoreszenz abbilden. Erst 1997 erfolgten Untersuchungen an einzelnen, isolierten, bacteriochlorophyllhaltigen Lichtsammelkomplexen des Typs LH II aus dem Purpurbakterium *Rhodospirillum rubrum* [49]. Detaillierte Untersuchungen bei tiefen Temperaturen zeigen an diesen Lichtsammelkomplexen strukturelle Unterschiede, die sich auf die spektroskopischen Eigenschaften des Systems auswirken [50, 51, 52].

Neben den membranverankerten Lichtsammelkomplexen des Photosystems I und II kommt in prokaryotischen Cyanobakterien und eukaryotischen Rotalgen ein weiteres Lichtsammelsystem, das Phycobilisom, vor. Das Phycobilisom ist ein Komplex aus unterschiedlichen Proteinen mit kovalent angebundenen Chromophoren, die Phycobiliproteine genannt werden. Das Phycobiliprotein Allophycocyanin konnte 1995 erstmals nahfeldmikroskopisch abgebildet werden [53]. Erste photophysikalische Untersuchungen fanden am Phycobiliprotein B-Phycoerythrin statt. Wu et al. [54] konnten in diesem Protein-Pigment-Komplex mit 34 Chromophoren durch "One-Step-Photobleaching" eine exzitonische Kopplung zwischen den Chromophoren nachweisen. Auch im trimeren Allophycocyanin mit seinen sechs Chromophoren kann eine starke Kopplung beobachtet werden [55]. Anders als im B-Phycoerythrin ist die Kopplung im Allophycocyanin nicht auf das ganze System ausgedehnt sondern beschränkt sich auf jeweils zwei, räumlich benachbarte Chromophore.

Ein weiteres Phycobiliprotein ist das Phycoerythrocyanin (PEC). Im Vergleich zu den bisher einzelmolekülspektroskopisch untersuchten Biliproteinen besitzt das PEC zwei chemisch verschiedene Chromophore mit unterschiedlichen photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften. In dieser Arbeit findet deshalb eine detaillierte photophysikalische Charakterisierung dieser Chromophore statt. Neben den spektroskopischen Untersuchungen mit konventionellen Techniken, geben Untersuchungen an einzelnen PEC-Einheiten erstmals einen Einblick in die Heterogenitäten des Systems. Diese können besonders eindrucksvoll am Energietransferverhalten einer monomeren PEC Einheit herausgestellt werden. Eine ausführliche Einführung zu diesem Pigment-Protein-Komplex findet sich zu Beginn des Kapitels 5. Alle anderen Kapitel stellen die Grundlagen zu den hier gemachten Untersuchungen heraus. Im Detail gliedert sich diese Arbeit wie folgt:

In Kapitel 2 werden die photophysikalischen und experimentellen Grundlagen zur

Detektion einzelner Moleküle vorgestellt. Neben den bereits in vielen Arbeiten behandelten Prozessen der Absorption und Relaxation wird ein Überblick über die Statistik der Emission und eine ausführliche Betrachtung der Photostabilität von fluoreszenten Farbstoffen gegeben. Bei der Beschreibung der experimentellen Grundlagen werden die theoretischen Limitierungen der mikroskopischen Abbildung einzelner Moleküle besprochen und die unterschiedlichen Techniken dazu vorgestellt. In Kapitel 3 wird der Polarisation von Licht besondere Bedeutung zugemessen. Sowohl einzelne Moleküle, als auch Ensemble von Molekülen zeigen eine starke Dynamik die zur Änderungen der Polarisation der Fluoreszenz führen. Ebenso führen die experimentellen Bedingungen zu einer Reihe interessanter Effekte, die bei der Interpretation der Messdaten berücksichtigt werden müssen. In Kapitel 4 wird die experimentelle Versuchsanordnung beschrieben. Neben den konfokalen Mikroskopen zur Untersuchung einzelner Moleküle bei Raum- und Tieftemperatur wird auch der Versuchsaufbau zur schnellen Spektroskopie am Phycoerythrocyanin beschrieben. Das darauf folgende Kapitel 5 gibt, wie bereits erwähnt, am Anfang eine Einführung in den Lichtsammelkomplex PEC. Im Anschluss werden die Ergebnisse der einzelnen Experimente dargestellt. Neben den photophysikalischen Parametern, wie Fluoreszenzquantenausbeute, Fluoreszenzlebenszeit, spektralen Eigenschaften und Photobleichverhalten wird an einzelnen PEC-Monomeren der intramolekulare Energietransfer untersucht. Dabei zeigt sich, dass der Energietransfer in monomerem PEC signifikant vom Energietransfer, der im Ensemble durch den Förstermechanismus beschrieben wird, abweicht. Durch Monte-Carlo Simulationen zum Energietransfer in monomerem PEC kann dabei gezeigt werden, dass sich diese Diskrepanz durch Heterogenitäten in den photophysikalischen Parametern von PEC erklären lässt.

Kapitel 2

Grundlagen der Einzelmolekülspektroskopie

Die Grundlagen der Einzelmolekülspektroskopie gliedern sich vornehmlich in zwei Teilbereiche auf. Da die Spektroskopie einzelner Moleküle über deren Fluoreszenz erfolgt, bilden die photophysikalischen Parameter eines einzelnen Moleküls die Grundlage zur Realisierung der Detektion. Die Detektionstechnik und die damit verbundene Optik mit ihren physikalischen Grenzen stellen den zweiten wichtigen Teilbereich dar. Auf beides wird in diesem Kapitel eingegangen.

2.1 Photophysik einzelner Moleküle

Optische Übergänge in Farbstoffmolekülen können durch das Jablonski Termschema dargestellt werden (siehe Abbildung 2.1a). Vielfach findet man dieses Termschema in einer vereinfachten Darstellung, in der es auf ein Drei-Niveau-System reduziert ist (siehe Abbildung 2.1b). Die Raten k für die einzelnen Übergänge stellen dabei die Geschwindigkeitskonstanten dar. Die einzelnen Prozesse können somit, in Abhängigkeit vom Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten, in Konkurrenz zueinander treten. Die einzelnen Teilschritte, die zur Absorption (k_{12}), Fluoreszenz (k_{rad}) und Phosphoreszenz (k_{32}) führen, werden in diesem Kapitel näher beschrieben. Auch auf die strahlungslosen Relaxationskanäle k_{vr} , k_{IC} und k_{32} wird eingegangen. Die Raten für die unterschiedlichen Prozesse, die zur Relaxation eines Moleküls führen, bestimmen weitere photophysikalische Parameter wie Fluoreszenzquantenausbeute und das Sättigungsverhalten der Fluoreszenz. In diesem Kapitel wird ebenfalls die Statistik der Fluoreszenz einzelner Moleküle beschrieben und die Hauptursache für das Photobleichen vorgestellt.

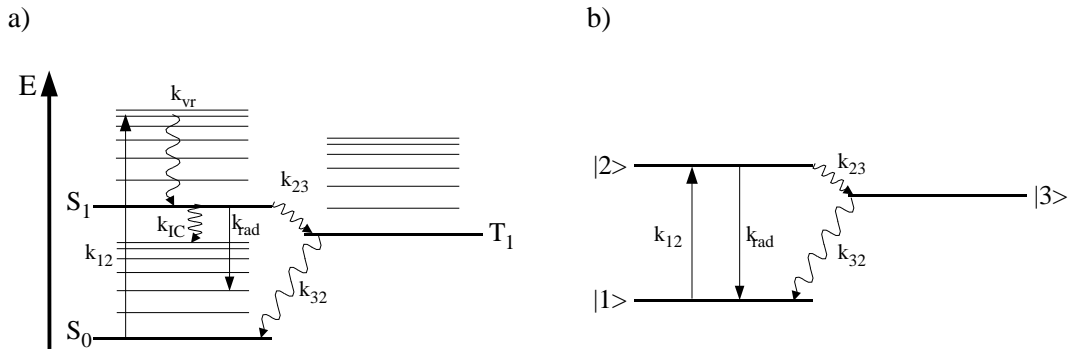


Abbildung 2.1: a) Jablonski Termschema mit allen für die Fluoreszenzspektroskopie wichtigen Populationsraten. Im Detail sind dies die Absorptionsrate k_{12} , die Schwingungsrelaxation k_{vr} , interne Konversion k_{IC} , der Übergang ins Triplettssystem k_{23} , die Phosphoreszenzrate k_{32} und die Fluoreszenzrate k_{rad} . b) Drei-Niveau-System des unter a) dargestellten Termschemas. Bei dieser Darstellung reduziert man das System allein auf die elektronischen Übergänge. Die Zustände $|1\rangle$, $|2\rangle$ und $|3\rangle$ entsprechen den Zuständen S_0 , S_1 und T_1 .

2.1.1 Absorption

Der Ausgangspunkt für die Beschreibung des Absorptionsprozesses sind Farbstoffmoleküle, die sich im thermischen Gleichgewicht befinden. Nach der Boltzmannverteilung ist bei allen Schwingungen der Grundzustand des elektronischen Grundzustands S_0 am höchsten populiert. Die Population höherer Schwingungszustände ist bei Raumtemperatur vernachlässigbar. Durch die Absorption eines Lichtquants wird das einzelne Molekül vom Grundzustand S_0 in den ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 gebracht. Die Rate $k_{12}[\text{s}^{-1}]$ für den Übergang von S_0 nach S_1 entspricht dabei dem Produkt aus der Photonenflussdichte $\rho(\nu)[\text{s}^{-1}\text{m}^{-2}]$ und dem Absorptionsquerschnitt des Moleküls $\sigma_{12}(\nu)[\text{m}^2]$:

$$k_{12}(\nu) = \sigma_{12}(\nu)\rho(\nu) \quad (2.1)$$

Die Frequenzabhängigkeit der Photonenflussdichte ist durch die spektrale Charakteristik der Anregungsquelle bedingt. Aus apparativer Sicht ist die Intensität I der Anregungsquelle ein leicht zugänglicher Parameter. Für monochromatisches Licht kann die Photonenflussdichte direkt aus $\rho = I/h\nu$ erhalten werden. Den Absorptionsquerschnitt kann man mit einer virtuellen aktiven Fläche des Moleküls vergleichen. Diese Fläche stellt ein Maß für die Fähigkeit eines Moleküls zur Absorption eines Photons dar. Man erhält den Absorptionsquerschnitt direkt aus dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\nu)[\text{m}^2/\text{mol}]$ [56]:

$$\sigma_{12}(\nu) = \frac{\log 10\epsilon(\nu)}{N_A}, \quad (2.2)$$

wobei N_A die Avogadrokonstante ist. Als Maß für die Absorptionswahrscheinlichkeit wird aus der quantenmechanischen Beschreibung die Oszillatorstärke f definiert [57]. Sie ist proportional dem aus der Quantenmechanik zugänglichen Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments $\langle \Psi_m | \hat{d} | \Psi_n \rangle$ (h : Plancksches Wirkungsquantum, m_e : Elektronenmasse, e : Elementarladung, ν : Absorptionsfrequenz):

$$f = \frac{8\pi^2 m_e \nu |\langle \Psi_m | \hat{d} | \Psi_n \rangle|^2}{3 h e^2} \quad (2.3)$$

Die Oszillatorstärke f stellt ein Maß für die Stärke des Übergangs vom Zustand n in den Zustand m dar. Mit den Wellenfunktionen des Anfangs- und Endzustands lässt sie sich direkt bestimmen. Eine direkte Verknüpfung zwischen dieser quantenmechanischen Definition und den experimentell zugänglichen Parametern ist über folgende Beziehung möglich:

$$f = \frac{4\pi\epsilon_0 c}{e^2} \int \sigma(\nu) d\nu \quad (2.4)$$

2.1.2 Relaxationsprozesse

Nach der elektronischen Anregung in einen Schwingungszustand des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 strebt das System wieder in Richtung des thermischen Gleichgewichts. Im Folgenden werden die in Abbildung 2.1a dargestellten Prozesse dazu näher erläutert.

Ein Vergleich des Absorptionsspektrums mit dem korrespondierenden Fluoreszenzspektrum eines Farbstoffmoleküls in kondensierter Phase zeigt, dass das Fluoreszenzspektrum zu niedrigeren Energien verschoben ist (Stokes Shift). Dies beruht darauf, dass zwischen der Absorption und der Emission der Energie, weitere Prozesse stattfinden, um den Übergang in den elektronischen Grundzustand zu erreichen. Durch den Übergang nach dem Franck-Condon-Prinzip befindet sich das Molekül nach der Anregung in einem Schwingungsniveau des ersten elektronisch angeregten Zustands. Durch Stöße mit der Umgebung (z.B. Lösemittel) gibt das Molekül seine Energie innerhalb von 10^{-12} s bis 10^{-9} s an diese ab. Bei diesem Vorgang spricht man von der Schwingungsrelaxation, die mit einer charakteristischen Rate k_{vr} erfolgt. Bei entsprechenden Stoßpartnern kann dieser Relaxationsprozess bis in den elektronischen Grundzustand führen (interne Konversion, k_{IC}). In Fluoreszenzfarbstoffen ist die Energiedifferenz von S_0 nach S_1 so groß, dass die Wahrscheinlichkeit einen entsprechenden Stoßpartner für den Prozess der internen Konversion zu finden sehr gering ist. Dies hat eine größere Verweildauer im Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten Zustands zur Folge.

Im Schwingungsgrundzustand von S_1 tritt als direkter Konkurrenzprozess zur internen Konversion die Relaxation unter Emission eines Photons mit der Geschwindigkeitskonstante k_{rad} (reziproke, natürliche Fluoreszenzlebenszeit) auf. Diese lässt sich aus experimentell leicht zugänglichen Parametern, wie Fluoreszenzspektrum $f(\nu)$ und Absorptionsspektrum $\epsilon(\nu)$, abschätzen [58] :

$$k_{\text{rad}} = \frac{8\pi n_0^2 l n 10}{c^2 N_A} \frac{\int f(\nu) d\nu}{\int \nu^{-3} f(\nu) d\nu} \int \epsilon(\nu) \nu^{-1} d\nu \quad (2.5)$$

Die Energie des Fluoreszenzphotons entspricht der Energiedifferenz zwischen Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands und dem, ebenfalls durch das Franck-Condon-Prinzip selektierten, Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustands S_0 .

Ein weiterer Kanal für die Depopulierung des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 ist der unter Spinumkehr stattfindende Übergang in den energetisch niedriger liegenden Triplettzustand T_1 des Farbstoffs (k_{23}). Unter Abgabe eines Phosphoreszenzphotons kann aus diesem Zustand, erneut unter Spinumkehr, in den Grundzustand S_0 gewechselt werden (k_{32}). Der Wechsel zwischen Singulett- und Triplettssystem wird Intersystem-Crossing (ISC) genannt.

2.1.3 Fluoreszenzlebenszeit

Die gesamte Depopulierung des Singulett S_1 -Zustands ist gegeben durch die Ratenkonstante k_{tot} :

$$k_{\text{tot}} = k_{23} + k_{\text{IC}} + k_{\text{rad}} \quad (2.6)$$

Bei der experimentellen Bestimmung der Ratenkonstanten k_{tot} (vgl. Kapitel 5.2) folgt die zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität der Depopulierung des S_1 -Zustands:

$$I(t) = I(0)e^{-\frac{t}{\tau}} \text{ mit } \tau = k_{\text{tot}}^{-1} \quad (2.7)$$

Für den in Gleichung 2.7 angenommenen Fall eines monoexponentiellen Zerfallsgesetzes entspricht die Zerfallskonstante τ der mittleren Fluoreszenzlebenszeit $\langle t \rangle$. Für komplexere Zerfälle kann die mittlerer Fluoreszenzlebenszeit $\langle t \rangle$ aus der mit dem Fluoreszenzabfall gewichteten Mittelung erhalten werden [59]:

$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (2.8)$$

Die mittlere Fluoreszenzlebenszeit $\langle t \rangle$ bewegt sich für gute Fluoreszenzfarbstoffe im Bereich von 1 ns bis 10 ns. Dies impliziert, dass solche Farbstoffe eine sehr kleine Intersystem-Crossing-Rate k_{23} und eine vernachlässigbare interne Konversion k_{IC} besitzen. Ein solcher Farbstoff ist dann in der Lage maximal zwischen 10^8 bis 10^9 Photonen pro Sekunde zu emittieren.

2.1.4 Fluoreszenzquantenausbeute

Wie aus Gleichung 2.6 ersichtlich, folgt die gesamte Depopulierung des angeregten Zustands S_1 der Ratenkonstanten k_{tot} . Um allein die strahlenden Beiträge der Fluoreszenz zu quantifizieren, definiert man die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ :

$$\phi = \frac{k_{rad}}{k_{tot}} \quad (2.9)$$

Mit der Beziehung aus Gleichung 2.5 und der experimentell ermittelten Fluoreszenzlebenszeit k_{tot}^{-1} lässt sich die Fluoreszenzquantenausbeute gut abschätzen. Die experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute erfolgt im einfachsten Fall durch den direkten Vergleich mit in der Literatur tabellierten Referenzfarbstoffen [60]. Dabei wird die Fläche des Fluoreszenzspektrums des unbekanntes Farbstoffs mit dem Fluoreszenzspektrum des Referenzfarbstoffs verglichen. Das genaue Vorgehen und die zu berücksichtigenden Parameter finden sich bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute der Untereinheiten des Phycoerythrocyans in Abschnitt 5.2.2. Neben einer hohen Photostabilität des Fluoreszenzfarbstoffs, ist für die Einzelmolekülspektroskopie auch eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute wünschenswert. Während die Photostabilität, durch den Vorgang des Photobleichens, den gesamten Beobachtungszeitraum des Moleküls limitiert, beeinflusst die Fluoreszenzquantenausbeute die Anzahl der Fluoreszenzphotonen pro Integrationsintervall. Nur bei einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute ist garantiert, dass die entsprechenden Anregungszyklen auch zum gewünschten Fluoreszenzphoton führen.

2.1.5 Sättigungsverhalten

Die Anzahl an Fluoreszenzphotonen, sowohl aus einem einzelnen Molekül, wie auch aus einer Ensembleprobe, lässt sich trotz zunehmender Anregungsintensität I nicht beliebig steigern. Die Raten der oben vorgestellten Relaxationskanäle, wie z.B. Fluoreszenz- und Phosphoreszenzrate, führen zu diesem Sättigungsverhalten. Die Fluoreszenzzählrate $R_f(I)$ lässt sich als Produkt aus der mittleren Besetzungszahl

\bar{N}_{S_1} des elektronisch angeregten Zustands, der experimentell zugänglichen Ratenkonstante k_{tot} für die Entvölkerung von S_1 (vgl. Gleichung 2.6) und der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ aus Gleichung 2.9 beschreiben:

$$R_f(I) = \bar{N}_{S_1}(I)k_{\text{tot}}\phi \quad (2.10)$$

Die mittlere Besetzungszahl $\bar{N}_{S_1}(I)$ des elektronisch angeregten Zustands S_1 ist aus der Lösung des Ratengleichungssystem erhältlich. Es beschreibt die Be- und Entvölkerung der einzelnen Zustände S_0 , S_1 und T_1 :

$$\begin{aligned} -\frac{dN_{S_0}}{dt} &= -k_{12}N_{S_0}(t) && + (k_{12} + k_{21})N_{S_1}(t) && + k_{31}N_{T_1}(t) \\ -\frac{dN_{S_1}}{dt} &= +k_{12}N_{S_0}(t) && - (k_{12}k_{21} + k_{32})N_{S_1}(t) && \\ -\frac{dN_{T_1}}{dt} &= && + k_{23}N_{S_1}(t) && - k_{31}N_{T_1}(t) \end{aligned}$$

Betrachtet man die Besetzungszahlen $N_i(t)$ als relative Größen und beachtet, dass die Summe der Besetzungszahlen konstant ist, dann kann man dafür schreiben: $N_{S_0}(t) + N_{S_1}(t) + N_{T_1}(t) = 1$. Die mittlere Besetzungszahl \bar{N}_{S_1} erhält man für den Gleichgewichtsfall (stationäre Lösung), d.h dass $\frac{dN_{S_0}}{dt} = \frac{dN_{S_1}}{dt} = \frac{dN_{T_1}}{dt} = 0$:

$$\bar{N}_{S_1}(I) = \frac{1}{2 + k_{23}k_{31}^{-1} + k_{21}k_{12}^{-1} + k_{23}k_{12}^{-1}} \quad (2.11)$$

Aus Gleichung 2.1 und Gleichung 2.11 erhält man nach Einsetzen in Gleichung 2.10:

$$R_f(I) = \frac{k_{21} + k_{23}}{2 + \frac{k_{23}}{k_{31}} + \frac{h\nu(k_{21} + k_{23})}{\sigma_{12}I}}\phi \quad (2.12)$$

Gleichung 2.12 wird oftmals in Abhängigkeit der maximal erreichbaren Fluoreszenzzählrate $R_f(\infty)$ und der Sättigungsintensität I_s ausgedrückt. Die Sättigungsintensität ist definiert als Anregungsintensität, bei der genau die Hälfte der maximalen Fluoreszenzrate erreicht wird. $R_f(\infty)$ und I_s sind direkt aus Gleichung 2.12 erhältlich:

$$\begin{aligned} I_s &= \frac{h\nu(k_{21} + k_{23})}{\sigma_{12}(2 + \frac{k_{23}}{k_{31}})} \\ R_f(\infty) &= \frac{k_{21} + k_{23}}{2 + k_{23}k_{31}^{-1}}\phi \end{aligned}$$

Die Fluoreszenzrate $R_f(I)$ lässt sich somit kompakt schreiben als:

$$R_f(I) = R_f(\infty) \frac{1}{1 + \frac{I_s}{I}} = R_f(\infty) \frac{\frac{I}{I_s}}{1 + \frac{I}{I_s}} \quad (2.13)$$

In Abbildung 2.2 ist ersichtlich, dass für Anregungsleistungen $I \ll I_s$ die Fluoreszenzzählrate $R_f(I)$ näherungsweise linear mit der Anregungsleistung I steigt. Für diesen Fall vereinfacht sich Gleichung 2.13 unter Verwendung von Gleichung 2.1 zu:

$$R_f(I) = \sigma_{12} I \frac{1}{h\nu} = k_{12} \quad (2.14)$$

Für höhere Anregungsleistungen I nähert sich die Fluoreszenzzählrate $R_f(I)$ der maximal erreichbaren Zählrate R_∞ asymptotisch an.

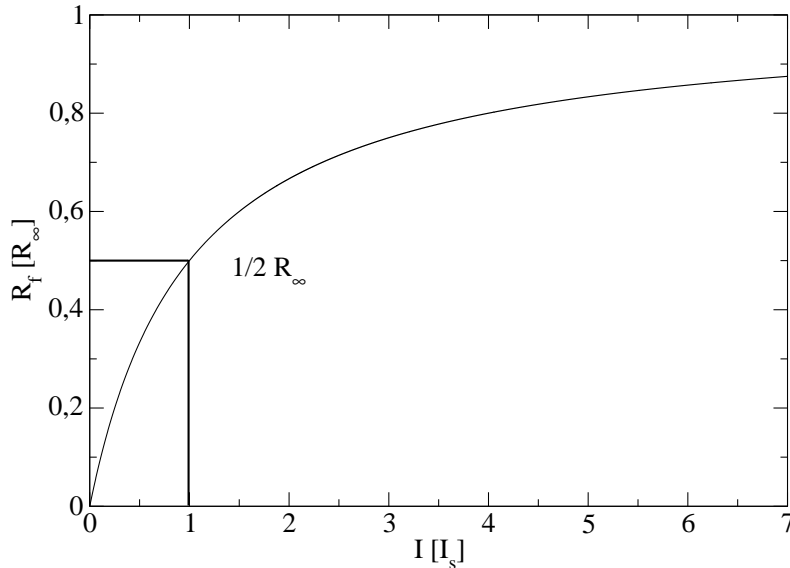


Abbildung 2.2: Intensitätsabhängigkeit der Fluoreszenzzählrate $R_f(I)$. Die Fluoreszenzrate nähert sich für hohe Anregungsleistungen der maximalen Fluoreszenzzählrate $R_f(\infty)$ an.

2.1.6 Photonenstatistik

Wie bereits oben erwähnt, erfolgt die Detektion einzelner Moleküle über deren Fluoreszenz. Aus der zeitlichen Verteilung dieses Fluoreszenzsignals kann man zusätzliche Informationen erhalten. Wie später im Kapitel 5.4.2 gezeigt, lassen sich damit direkt Aussagen über vorhandene Dunkelzustände des Systems machen. Grundlage dieser Analyse bildet die Histogrammbildung über die auftretenden Signalintensitäten. Die theoretische Beschreibung dieser Histogramme beruht auf der

Betrachtung der Photonenstatistik einzelner Moleküle, deren Schritte zur theoretische Beschreibung im Folgenden deshalb kurz dargestellt werden. Mit diesem Verfahren kann man, allein aus der Fluoreszenzzeitspur eines einzelnen Moleküls, Aussagen über Dunkelzustände in diesem System machen.

Allgemein untersucht man bei der Photonenstatistik die Intensitätsfluktuationen einer Lichtquelle. Bei der Einzelmolekülspektroskopie kommen dabei zwei Hauptlichtquellen in Frage, das Fluoreszenzsignal eines einzelnen Moleküls und detektiertes Streulicht der Anregungslichtquelle. In der Literatur findet man einen allgemeinen Ausdruck für die Wahrscheinlichkeit $P(T, i)$, i Photonen während der Integrationszeit T zu detektieren [61]:

$$P(T, i) = \left\langle \frac{\{\zeta \bar{I}(t, T) T\}^i}{i!} e^{-\zeta \bar{I}(t, T) T} \right\rangle \quad (2.15)$$

$\bar{I}(t, T)$ beschreibt dabei die mittlere Intensitätsentwicklung auf dem Detektor während der Integrationszeit T . t ist der Zeitnullpunkt der Integration. Die Mittelung $\langle \dots \rangle$ über unterschiedliche Integrationsstartpunkte t führt zu obigem Ausdruck, der nur noch von der Integrationszeit T abhängig ist. ζ ist ein Korrekturparameter, der die Quantenausbeute des Detektors berücksichtigt und den direkten Bezug zwischen detektierter Signalintensität und der Anzahl an Photonen pro Zeiteinheit herstellt.

Die übliche Anregungsquelle in der Einzelmolekülspektroskopie ist ein Laser. Laser zeichnen sich durch eine hohe Amplitudenstabilität aus. Der obige Ausdruck lässt sich deshalb bezüglich der Intensitätsfluktuationen vereinfachen. Eine Mittelung ist wegen der Intensitätsstabilisierung nicht mehr notwendig und $P(T, i)$ nimmt die bekannte Form einer Poissonverteilung an:

$$P(T, i) = \frac{\bar{m}^i}{i!} e^{-\bar{m}} \quad \text{mit } \bar{m} = \zeta \bar{I} T \quad (2.16)$$

\bar{m} ist dabei die mittlere Photonenzahl die im Integrationszeitraum T detektiert wird. Die Gaußfunktion der allgemeinen Form $y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2}}$ kann in Näherung zur Beschreibung der Verteilung, wie sich bei der Bildung eines Photonenhistogramms ergibt, herangezogen werden. Über die Standardabweichung der angepassten Verteilungsfunktion $\sigma = \sqrt{\bar{m}}$ kann man schnell entscheiden, ob die vorhandene Verteilung der Poissoncharakteristik folgt oder nicht (vgl. Abbildung 2.4 und Tabelle 2.1).

Für einzelne Moleküle, bei denen in der Regel Fluoreszenzfluktuationen auftreten, ist eine komplexere Verteilungsfunktion zu erwarten. Die Übergangswahrscheinlichkeiten in die einzelnen Niveaus des Moleküls (siehe Abschnitt 2.1.5) und das Photo bleichen (siehe Abschnitt 2.1.7) tragen zu den in Gleichung 2.15 eingehenden Intensitätsfluktuationen bei. Für ein Zweiniveausystem lässt sich die Verteilungsfunktion

noch durch die bekannte Poissonverteilung ausdrücken [62]. Die Summe aus Untergrundsignal I_b und Fluoreszenzsignal I_m liefert dabei erneut eine Poissonverteilung (Gleichung 2.16) mit $\bar{m} = \bar{I}_b + \bar{I}_m$ (durch Faltung der beiden individuellen Poissonverteilungen).

Der Übergang zum Dreiniveausystem liefert einen doppelt stochastischen Prozess [63]:

$$P(N_m = i) = \int e^{-(I_b + xI_m)T} \frac{[(I_b + xI_m)T]^i}{i!} p(x, T) dx \quad (2.17)$$

Dabei wird berücksichtigt, dass sich das einzelne Molekül nicht immer im fluoreszierenden Zustand befindet. x gibt den Anteil der Zeit an, in dem sich das Molekül im fluoreszierenden Zustand während der Integrationszeit T befindet und nimmt damit direkt Einfluss auf die mittlere Zählrate. Da x für unterschiedliche Integrationsintervalle nicht statisch ist, muss die Poissonverteilung mit der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p(x, T)$ gefaltet werden. Als Verteilungsfunktion $p(x, T)$ für das Dreiniveausystem eignet sich die von Berezhkovskii et al. [64] vorgestellte Wahrscheinlichkeitsverteilung :

$$p(x, T) = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}} + k_{\text{off}}} p_{\text{on}}(x, t) + \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{on}} + k_{\text{off}}} p_{\text{off}}(x, t) \quad \text{mit}$$

$$p_{\text{on}} = \delta(x - 1) e^{-k_{\text{on}}T} + k_{\text{on}}T \{I_0(y) + I_1(y) * \sqrt{k_{\text{off}}x/[k_{\text{on}}(1-x)]}\} e^{-[k_{\text{on}}x + k_{\text{off}}(1-x)]T} \quad ,$$

$$p_{\text{off}} = \delta(x) e^{-k_{\text{off}}T} + k_{\text{off}}T \{I_0(y) + I_1(y) * \sqrt{k_{\text{on}}(1-x)/[k_{\text{off}}x]}\} e^{-[k_{\text{on}}x + k_{\text{off}}(1-x)]T} \quad \text{und}$$

$$y = 2T \sqrt{k_{\text{on}}k_{\text{off}}x(1-x)}$$

Bei der Wahrscheinlichkeitsverteilung $p(x, T)$ sind I_0 und I_1 modifizierte Besselfunktionen erster bzw. zweiter Ordnung. Die Rate k_{on} beschreibt die Rate aus dem Singulettssystem in das Triplettssystem, während die Rate k_{off} die Repopulierung des Singulettsystems wiedergibt. $\delta(x)$ ist so definiert, dass das Integral im geschlossenen Intervall $[0, 1]$ normiert ist. Für ein experimentelles Photonenhistogramm [65], das aus der Fluoreszenzzeitspur eines einzelnen DiI-Moleküls gewonnen wurden, konnte Molski [63] zeigen, dass die Verteilungsfunktion $p(x, T)$ die dort vorgestellte Verteilung gut beschreibt.

Abbildung 2.3 zeigt den Einfluss der Integrationszeit T auf die Form der Verteilungsfunktion aus Gleichung 2.17 bei konstanten Populierungs- und Depopulierungsraten des Dunkelzustands. Zur Berechnung der Verteilung wurde ein Untergrundsignal $I_b = 10$ Zählereignisse/Integrationsintervall T und ein mittleres Fluoreszenzsignal $I_m = 50$ Zählereignisse/Integrationsintervall T angesetzt. Für sehr kurze Integrationszeiten T können Ereignisse registriert werden, in denen sich das Molekül nur im Dunkelzustand befindet. Es bildet sich im Histogramm um I_b eine Verteilung

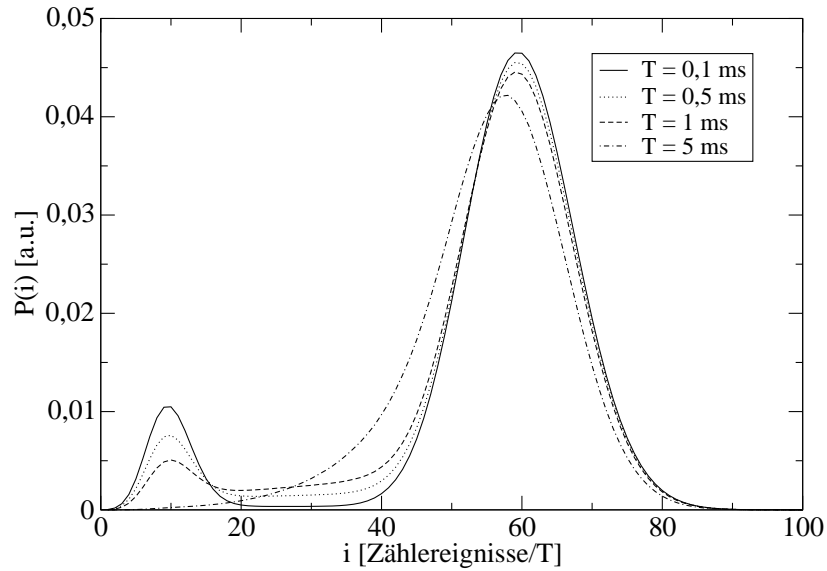


Abbildung 2.3: Verteilungsfunktionen für unterschiedliche Integrationszeiten bei konstanten Populations-/Depopulationsraten des Dunkelzustands k_{on} und k_{off} . Bei länger werdenden Integrationszeiten sinkt die Häufigkeit den reinen Untergrund I_b zu detektieren. Gleichzeitig führt die Detektion des Untergrunds parallel zum eigentlichem Fluoreszenzsignal zu einer im Mittel geringeren Zählrate.

aus, die der statistischen Verteilung des Untergrunds entspricht. Das zweite Maximum befindet sich bei $I_b + I_m$. Für längere Integrationsintervalle T findet während der Integrationszeit ein mehrmaliger Übergang zwischen dem Dunkelzustand und dem fluoreszierenden Zustand statt. Eine Abnahme der Amplitude der reinen Untergrundverteilung ist die Folge. Falls sich während der Integrationszeit T mehrere An- und Auszustände abwechseln, dann verschiebt sich auch das Signalmaximum zu geringeren Zählraten.

Mit Gleichung 2.17 kann man auch ohne Variation der Integrationszeit T entscheiden ob Dunkelzustände in einem System vorhanden sind. Für ein Verteilungsmaximum um ≈ 58 Zählereignisse/10 ms und einem konstanten Verhältnis von Fluoreszenzsignal/Untergrundsignal von 5/1 sind in Abbildung 2.4 Verteilungsfunktionen für unterschiedliche Dunkelzustandspopulationsraten k_{on} und konstanter Depopulationsrate $k_{\text{off}} = 1$ dargestellt. Der berechneten Verteilungsfunktionen kann man in Näherung mit einer Gaußfunktion anpassen. Über die Standardabweichung σ der Verteilung kann dann entschieden werden, ob sie der Poissonstatistik folgt, oder

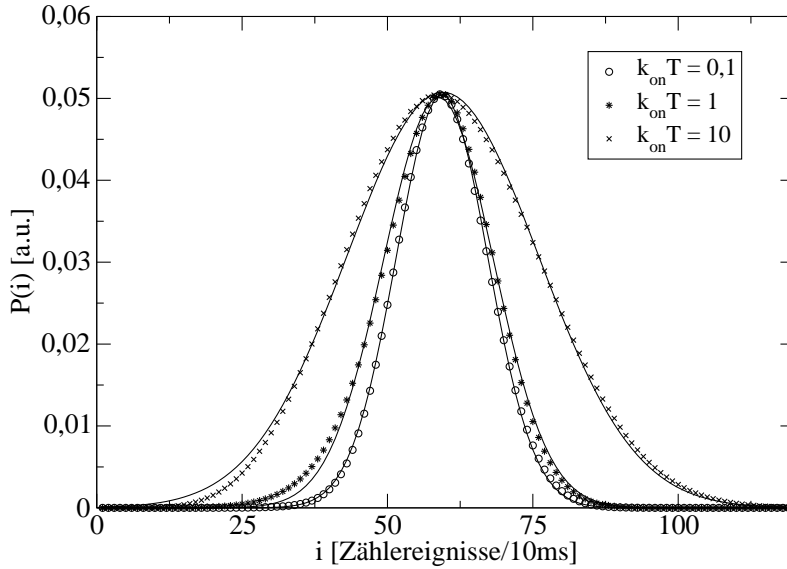


Abbildung 2.4: Diskrete Funktionswerte für unterschiedliche Dunkelzustandspopulationsraten k_{on} . Die durchgezogenen Linien entsprechen dem besten Gaußfit für die aus Gleichung 2.17 berechnete Verteilungswahrscheinlichkeit. Zunehmende Dunkelzustandspopulation führt zu einer Verbreiterung der Verteilungsfunktion.

ob eine anders geartete Verteilung vorliegt. Für sehr geringe Dunkelzustandspopulationen ($k_{\text{on}}T = 0.1$) lässt sich aus Tabelle 2.1 entnehmen, dass die Verteilungsfunktion noch die Form einer Poissonverteilung besitzt. Eine einmalige Besetzung des Dunkelzustands während der Integrationszeit ($k_{\text{on}}T = 1$) führt bereits zu einer merklichen Verbreiterung und kann mit einer Normalverteilung angenähert. Häufige Dunkelzustandspopulationen ($k_{\text{on}}T = 10$) führen zu einer deutlichen Verbreiterung.

Die notwendige Integration zur Berechnung der Verteilungsfunktionen gestaltete sich sehr zeitaufwendig. Sie konnte innerhalb angemessener Zeit nicht mit kommerziellen Programmen erfolgen. Die Berechnung erfolgte deshalb mit einem selbstgeschriebenen C-Programm. Für einen verwendeten Parametersatz k_{on} , k_{off} und T ist dieses exemplarisch im Anhang B.1 abgedruckt. Zur numerischen Integration wurden die Routinen zur *Monte Carlo Integration* der *GNU Scientific Library* [66] verwendet. Auch die Besselfunktionen entstammen dieser Bibliothek.

$k_{\text{on}}T$	σ	σ
	aus Gaußfit	aus Poissonstatistik
0,1	7,87	7,71
1	9,41	7,67
10	16,47	7,69

Tabelle 2.1: Entwicklung der Standardabweichungen/Verteilungsbreite σ mit zunehmender Dunkelzustandspopulation. Mit der Standardabweichung σ kann entschieden werden, ob eine vorliegende Verteilung der Poissonstatistik folgt. Bei sehr geringer Dunkelzustandspopulation ($k_{\text{on}}T = 0.1$) kann kaum zwischen Poissonstatistik und einer davon abweichenden Verteilung unterschieden werden. Die einmalige Besetzung eines Dunkelzustands während der Integrationszeit führt bereits zu einer merklichen Verbreiterung der Verteilungsfunktion.

2.1.7 Photostabilität

Neben den oben erwähnten Parametern wie der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ , der natürlichen Fluoreszenzlebenszeit $\tau = k_{\text{rad}}^{-1}$ oder den einzelnen Raten k_{23} und k_{1C} , die jeweils zur strahlungslosen Entvölkerung des angeregten Zustandes S_1 führen, limitieren auch die Prozesse die zum Photobleichen des Farbstoffmoleküls führen die Detektierbarkeit einzelner Moleküle. Vorsichtige Schätzungen gehen für Farbstoffe wie Cy-5 oder Rhodamine von 10^5 - 10^6 emittierten Photonen vor dem irreversiblen Photobleichen aus [67]. Die Photochemie, die hinter den Bleichprozessen steht, ist oftmals nur unvollständig aufgeklärt. Neben Isomerisierungsreaktionen und Fragmentierungen spielt die bimolekulare Reaktion mit Sauerstoff eine entscheidende Rolle für die Photolabilität von Farbstoffmolekülen. Auch in dieser Arbeit erfolgen Untersuchungen zum Einfluss von Sauerstoff auf die Photostabilität des Lichtsammelkomplexes Phycoerythrocyanin. Um die Bedeutung von Sauerstoff besser zu beurteilen zu können, wird im Folgenden auf die dabei relevanten Prozesse näher eingegangen.

Der initiale Schritt für die Photooxidation ist der Angriff von molekularem Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta$ -Sauerstoff) am Farbstoffmolekül im Grundzustand. Die Darstellung von $^1\Delta$ -Sauerstoff erfolgt über Photosensibilisierung durch hauptsächlich zwei Prozesse [68]:



Der Prozess 2.18 beschreibt die Triplett-Triplett-Annihilierung. Es wird ein Elektronenaustausch [68] mit dem Sauerstoff angenommen, der den Triplettzustand des Farbstoffmoleküls quencht und den Farbstoff wieder in sein Singulettssystem bringt.

Der Farbstoff steht anschließend dem Fluoreszenzzyklus erneut zur Verfügung. Hübner et al. [69] zeigten an einzelnen DiI_{18} Molekülen diese Repopulierung des S_0 -Zustands. Die schnelle Repopulierung des Singulettsystems ließ sich über den Fluoreszenzzuwachs nachweisen. Die Anwesenheit von $^1\Delta$ -Sauerstoff bedingt jedoch auch eine höhere Photobleichrate, die in diesen Experimenten ebenfalls anschaulich verdeutlicht werden konnte. Die molare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Triplett-Triplett-Annihilierung wird im Weiteren mit k_{tt} benannt.

Der Prozess 2.19 beschreibt das Quenchen des Singulettzustands des angeregten Farbstoffmoleküls. Der energetische Unterschied beim Übergang des Chromophors $S_1 \rightarrow T_1$ ist bei einfachen, aromatischen Verbindungen jedoch zu gering, um Sauerstoff in das energetisch höhere Singulettssystem zu bringen. Trotz dieser Diskrepanz konnte gezeigt werden, dass dieser Übergang mit hohen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_{st} stattfindet [70, 71]. Das Farbstoffmolekül befindet sich danach im Triplettzustand und kann über den Prozess 2.18 weiteren $^1\Delta$ -Sauerstoff erzeugen.

Um die Relevanz der beiden Prozesse zur Darstellung von $^1\Delta$ -Sauerstoff besser beurteilen zu können bedarf es der Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, der Sauerstoffkonzentration und der Ratenkonstanten der Konkurrenzprozesse. Vergleicht man die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Prozesse in 2.18 ($k_{tt} = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und 2.19 ($k_{st} = 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), so ist die Konstante für Singulett-Quenching etwa um eine Größenordnung schneller. Sauerstoff ist in den gängigsten Lösungsmitteln nur mäßig löslich. In luftgesättigtem Wasser beträgt die Sauerstoffkonzentration ca. 10^{-4} M . Als Ratenkonstanten k_{max} für die Darstellung von Singulett-Sauerstoff erhält man damit aus dem Produkt von Konzentration und molarer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Triplett-Triplett Annihilierung $k_{\text{max}} = 10^5 \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{\text{max}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$ als Raten der Singulett-Triplett Annihilierung.

Die Rate für die Depopulierung des Triplettzustands k_{32} liegt bei Abwesenheit von Sauerstoff im ms-Bereich [56]. Die Bildung von $^1\Delta$ -Sauerstoff aus dem Triplettzustand ist, wie der Vergleich der Depopulationsrate durch die Triplett-Triplett Annihilierung k_{max} und der Rate k_{32} für den Phosphoreszenzübergang zeigt, um den Faktor 100 bevorzugt. Bei Anwesenheit von Sauerstoff kann die Depopulierung des Triplettzustands durch den Phosphoreszenzprozess deshalb vernachlässigt werden. Für eine angenommene Anregungsrate $k_{12} \approx 10^9 \text{ s}^{-1}$, dies entspricht für einzelne Moleküle wie sie in der Einzelmolekülspektroskopie untersucht werden der Sättigung, erfolgt der Übergang in den Triplett bei einer typischen Übergangsrate $k_{23} \approx 10^6 \text{ s}^{-1}$ bei jedem tausendstem Photozyklus. Die Rate für die Singulett-Triplett Annihilierung $k_{\text{max}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$ führt ebenfalls bei jedem tausendstem Photozyklus zur Bildung von $^1\Delta$ -Sauerstoff. Das Farbstoffmolekül bleibt dabei im Triplettzustand zurück und kann über den Prozess 2.18 erneut $^1\Delta$ -Sauerstoff bilden. Der Prozess 2.18 tritt also

in Näherung doppelt so oft wie der Prozess 2.19 auf.

Durch Sättigung der wässrigen Lösung mit Stickstoff kann man die Sauerstoffkonzentration in Lösungen auf ca. 10^{-6} M senken. In diesem Konzentrationsbereich findet die Singulett-Triplett-Annihilierung kaum mehr statt. Die zusätzliche Besetzung des Triplettzustands verringert sich um den Faktor 100. Im Triplettssystem tritt der Phosphoreszenzprozess merklich in Konkurrenz zur Triplett-Triplett-Annihilierung. Für die oben angenommenen Raten reduziert sich die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von $^1\Delta$ -Sauerstoff um ca. $2/3$.

Die Anwesenheit von Sauerstoff im Probensystem führt zur Darstellung reaktiven $^1\Delta$ -Sauerstoffs. Dieser trägt zum Photobleichen von Farbstoffen bei. Entfernt man den Sauerstoff in der Fluoreszenzprobe, dann lässt eine gesteigerte Photostabilität erwarten. Dies kann sowohl durch Sättigung des Probensystems mit Stickstoff, als auch durch den Einsatz von stabilisierenden Agenzien erreicht werden. J. A. Bloom et al. [72] untersuchte den Einfluss einer Reihe dieser Substanzen auf die Photostabilität verschiedener Farbstoffe. Ein verbessertes Enzymsystem aus Glucoseoxidase und Katalase wurde von Bopp et al. [73] erfolgreich zur Stabilisierung bei Einzelmoleküluntersuchungen an Lichtsammelkomplexen des Typs LH2 eingesetzt. Dieses Enzymsystem kam auch in den Untersuchungen dieser Arbeit zum Einsatz. Für Details sei auf Kapitel 5.4.1 verwiesen. Obwohl $^1\Delta$ -Sauerstoff mit als Ursache für das Photobleichverhalten in Fluoreszenzfarbstoffen ausgemacht werden kann, bleibt die eigentliche Photochemie des Bleichprozesses weitgehend ungeklärt. Lediglich am System Terrylen in p-Terphenyl konnten Christ et al. [74] durch Einzelmoleküluntersuchungen und theoretischen Rechnungen zur mechanistischen Aufklärung des Photobleichens an diesem System beitragen.

2.2 Apparative Grundlagen zur Detektion einzelner Moleküle

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, haben die photophysikalischen Eigenschaften eines Moleküls direkten Einfluss auf dessen Einzelmolekültauglichkeit. Um das Fluoreszenzsignal auch detektieren zu können, bedarf es jedoch außerdem einer leistungsfähigen Optik. Im Folgenden werden, je nach Anwendungsgebiet verschiedene, mikroskopische und spektroskopische Techniken vorgestellt. Neben diesen Techniken wird ebenfalls auf jene optischen Grundlagen eingegangen, die die Grenzen für die Detektion einzelner Moleküle setzen.

2.2.1 Theoretische Begrenzungen der Detektionsoptik

Einsammeleffizienz einer Linse

Die Fluoreszenz, die von einem einzelnen Molekül stammt, kann im Rahmen der weiter unten beschriebenen Auflösung als Punktlichtquelle angesehen werden. Um von einer Punktlichtquelle möglichst viel Licht einzusammeln, muss der Raumwinkel, den die Abbildungsoptik erfasst, möglichst groß sein. Als Maß für den Raumwinkel wird die numerische Apertur (NA) definiert, die mit dem halben, maximalen Öffnungswinkel α_{\max} der Abbildungsoptik und dem Brechungsindex n_0 des an die Optik anschließenden Mediums in folgender Beziehung steht (vgl. Abbildung 2.5a):

$$NA := n_0 \sin \alpha_{\max} \quad (2.20)$$

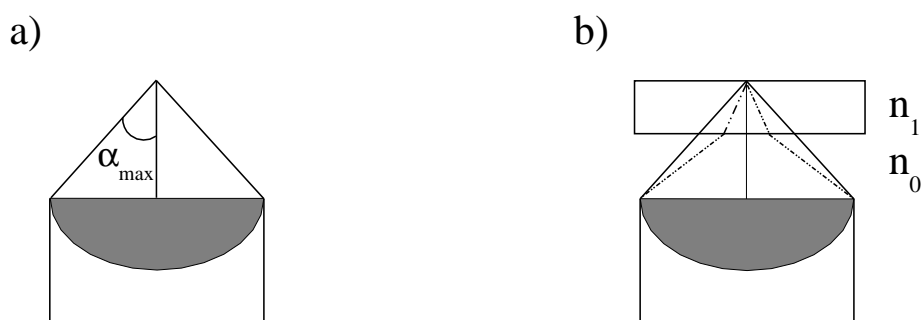


Abbildung 2.5: a) Definition des halben Öffnungswinkels α_{\max} . b) Skizzierung des Einflusses des Brechungsindex auf die NA einer Linse. Strahlen, die an der Grenzfläche aufgrund unterschiedlicher Brechungsindizes n_0 und n_1 weggebrochen werden, verringern die NA (gestrichelte Linie). Der effektive Öffnungswinkel der Optik reduziert sich entsprechend. Durch den Angleich des Brechungsindex n_0 , mit einem passenden Immersionsmedium, erfolgt keine Brechung an den Grenzflächen, und der volle Öffnungswinkel kommt zum Einsatz (durchgezogene Linie).

Wie aus Gleichung 2.20 ersichtlich, kann die numerische Apertur mit Luft als Immersionsmedium ($n_0 = 1,00028 \approx 1$) bei unendlicher Ausdehnung der Linse und einem Arbeitsabstand der gegen Null geht, maximal eins werden. Diese Anordnung ist aus praktischen Gründen nicht zu erreichen. Eine weitere Schwierigkeit den maximalen Öffnungswinkel einer Optik voll auszunutzen, besteht in der Brechung des Lichts. Wie in Abbildung 2.5b gezeigt, kommt es bei unterschiedlichen Brechungsindizes zweier benachbarter Medien an der Grenzfläche zur Brechung. Die Folge ist eine Verkleinerung des maximalen Öffnungswinkels α_{\max} und damit der effektiven

numerischen Apertur NA . Durch die Anpassung der Brechungsindizes zwischen Objektträger und der Abbildungsoptik ($n_{\text{Glas}} = 1,5$) kann man erreichen, dass Strahlen die Objektivöffnung erreichen, die ohne Anpassung nicht erfasst werden. Diese Anpassung erfolgt durch den Einsatz eines Immersionsmediums. In gängigen Lichtmikroskopen mit Ölimmersion kommen Mikroskopobjektive mit einer maximalen numerischen Apertur $NA = 1,4$ zum Einsatz. Wegen des kleineren Brechungsindex $n = 1,32$ von Wasser wird mit Wasserimmersionsobjektiven nur eine NA von 1,2 erreicht. Das Quadrat NA^2 stellt ein Maß für die Lichteinsammeleffizienz eines optischen Systems dar. Vergleicht man mit dieser Definition Wasser- und Ölimmersionsobjektiv, so ist die erreichte Einsammeleffizienz beim Wasserimmersionsobjektiv um ca. 26% geringer als bei der Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs.

Unter der Einsammeleffizienz η einer isotropen Punktlichtquelle versteht man den Anteil des gesamten Kugelvolumens, der mit dem halben Öffnungswinkel α des Mikroskopobjektivs abgedeckt werden kann. Bei dieser Definition wird der Brechungsindex des Immersionsmediums nicht berücksichtigt:

$$\eta = \frac{\int_{r=0}^{r_1} \int_{\phi=0}^{2\pi} \int_{\theta=0}^{\alpha} r^2 \sin \theta dr d\phi d\theta}{\int_{r=0}^{r_1} \int_{\phi=0}^{2\pi} \int_{\theta=0}^{\pi} r^2 \sin \theta dr d\phi d\theta} = \frac{1}{2}(1 - \cos \alpha) \quad (2.21)$$

Während die Definition der numerischen Apertur NA unabhängig von der Strahlungscharakteristik der Punktlichtquelle ist, ist die hier vorgestellte Einsammeleffizienz strenggenommen nur für eine isotrope Strahlungscharakteristik gültig. Ebenso bedarf es in der Herleitung Korrekturen, die aufgrund der hohen numerischen Apertur zum Einsatz kommen müssen. Beim Einsatz solcher Objektive ist für die Berechnung einer absoluten Einsammeleffizienz die paraxiale Näherung nicht mehr ausreichend. In Rechnungen von Enderlein [75] ist gezeigt, wie die Berechnung mit Wellenvektoren durchzuführen ist. Zur Berechnung der Einsammeleffizienz eines nicht isotropen Strahlers, wie es ein einzelnes Molekül darstellt, sei ebenfalls auf die Literatur verwiesen [76]. Trotz dieser Einschränkungen dienen die hier gemachten Ausführungen als guter Anhaltspunkt für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit der eingesetzten Optik geht.

Definition des Auflösungsvermögens

Der Wellencharakter des Lichtes und die damit auftretenden Erscheinungen, wie z.B. Beugung, limitieren die exakte Abbildung von Strukturen. Die Abbildung ei-

nes einzelnen Moleküls über dessen Fluoreszenz führt deshalb nicht zu einem Bild, das die Ausdehnung eines Moleküls hat, sondern im Idealfall zu einer wesentlich ausgedehnteren, als Airymuster bekannten Intensitätsverteilung, wie sie durch die Fraunhofer Beugung an einer kreisförmigen Apertur vorhergesagt wird [77]:

$$I(r) = I_0 \left(\frac{2J_1(\gamma r)}{\gamma r} \right)^2 \quad (2.22)$$

$J_1(x)$ in Gleichung 2.22 ist dabei die Besselfunktion erster Ordnung. r ist der Abstand zur optischen Achse in der Bildebene. γ ist direkt proportional zum Radius der Öffnung a , zum Wellenvektor $\vec{k} = 2\pi/\lambda$ und in Näherung indirekt proportional zur Brennweite f . Aus der räumlich ausgedehnten Abbildung eines ursprünglich sehr kleinen Objekts ergibt sich die Notwendigkeit eines Kriteriums, das bestimmt, wie nah sich zwei Objekte kommen dürfen, damit sie weiterhin getrennt voneinander beobachtet werden können. Je kleiner die Ausdehnung des Airymusters, desto näher können sich zwei Objekte kommen. In Abbildung 2.6 ist der Einfluss des Radius a der kreisförmigen Öffnung auf die räumliche Ausdehnung des Airymusters dargestellt.

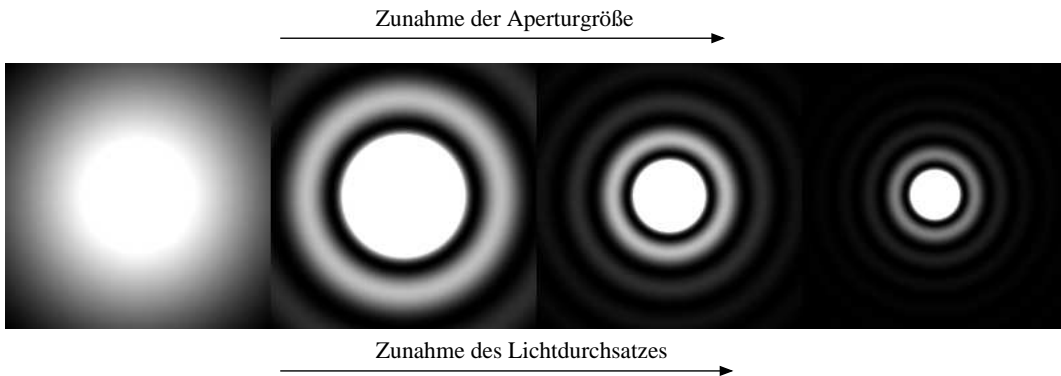


Abbildung 2.6: Berechnete Airymuster für unterschiedliche Radien a der kreisförmigen Öffnung. Mit zunehmendem Radius a nimmt die Größe des Airymusters ab. Gleichzeitig erhöht sich der Lichtdurchsatz, der in der Skalierung dieser Darstellung nicht berücksichtigt ist.

Mit größer werdendem Radius reduziert sich der Durchmesser des zentralen Maximums und der Lichtdurchsatz erhöht sich. Es ist deshalb leicht einzusehen, dass bei der Detektion einzelner Moleküle eine möglichst große Apertur eingesetzt werden soll, denn es gilt: $NA \approx a/f$. Wenn man den Abstand zweier Punktlichtquellen stetig reduziert, ist aus Abbildung 2.7 ersichtlich, dass beim Unterschreiten eines gewissen Abstandes Δx nicht mehr unterschieden werden kann, ob es sich um ein oder um zwei Objekte handelt. Das Rayleigh Kriterium ist ein Ansatz das Auflösungslimit Δx zu quantifizieren.

Nach Rayleigh gelten 2 Objekte als gerade noch aufgelöst, wenn das zentrale Maximum einer Airyscheibe in das erste Minimum einer anderen Airyscheibe fällt (siehe Abbildung 2.7). Als kleinsten auflösbaren Abstand zwischen zwei Objekten erhält man deshalb nach dem Rayleigh Kriterium:

$$\Delta x = \frac{1,22f\lambda}{2a} \approx \frac{0,61\lambda}{NA} \quad (2.23)$$

Der kleinste Abstand den zwei Punktobjekte nach Rayleigh zueinander einnehmen können, ist demnach nur durch die Wellenlänge λ und die numerische Apertur des Mikrosystems limitiert. Das Rayleigh Kriterium ist nur ein Ansatz um ein

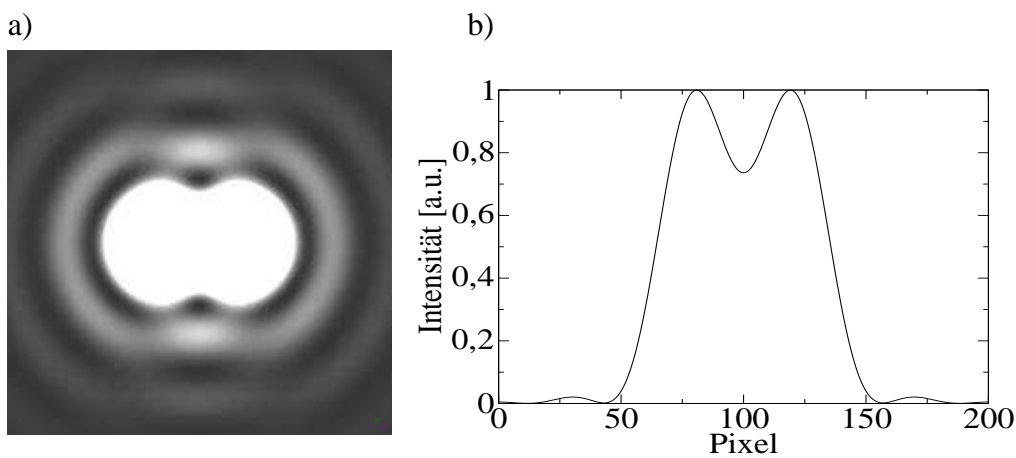


Abbildung 2.7: a) Berechnete Airymuster zweier Punktlichtquellen die nach dem Rayleigh-Kriterium gerade noch aufgelöst werden können. b) Schnitt durch das Airymuster.

unteres Limit für das Auflösungsvermögen eines optischen Systems anzugeben. In der Praxis wird die Airyscheibe bzw. der Fluoreszenzspot eines einzelnen Moleküls durch Gaußfunktionen beschrieben. Die aus der Gaußfunktion erhaltene Halbwertsbreite Δx_{FWHM} (FWHM= Full Width at Half Maximum) wird dabei als Maß für das Auflösungskriterium herangezogen:

$$\Delta x_{FWHM} = \frac{0,51\lambda}{NA} \quad (2.24)$$

Bei der unter Abschnitt 2.2.2 vorgestellten Technik der konfokalen Mikroskopie, wie sie in dieser Arbeit zum Einsatz kommt, sorgt eine modifizierte Anregungs- und Detektionsgeometrie für eine weitere Reduktion der Auflösungsgrenze. Für die Anregung wird dabei eine Punktlichtquelle verwendet, während in der Detektion eine Lochblende das axiale Auflösungsvermögen verbessert. Berücksichtigt man dies, dann erhält man für die laterale Auflösungsgrenze [78]:

$$\Delta x_{FWHM} \approx \frac{0,4\lambda}{NA} \quad (2.25)$$

Wie für das lateralen Auflösungsvermögen eines optischen Systems, findet man auch für das axiale Auflösungslimit mehrere Angaben in der Literatur. Im Gegensatz zur lateralen Auflösungsgrenze beschränken sich die folgenden Ausführungen lediglich auf das konfokale Mikroskop. Die axiale Auflösungsgrenze aus der paraxialen Näherung ist dabei gegeben durch [79]:

$$\Delta z_{FWHM} \approx \frac{0,45\lambda}{n(1 - \cos \alpha)} \quad (2.26)$$

In der Literatur findet man Ausdrücke für das axiale Auflösungslimit oftmals unter Verwendung der numerische Apertur. Dabei findet für kleine Öffnungswinkel α eine Reihenentwicklung statt, die nach dem zweiten Glied abgebrochen wird. Dies entspricht der Näherung zweiter Ordnung und Gleichung 2.26 vereinfacht sich zu:

$$\Delta z_{FWHM} \approx \frac{0,9n\lambda}{NA^2} \quad (2.27)$$

Obwohl in der Einzelmolekülspektroskopie meist Mikroskopobjektive mit hoher numerischer Apertur zum Einsatz kommen, findet man in Literaturangaben zur konfokalen Mikroskopie vielfach diese vereinfachte Angabe zum axialen Auflösungslimit. Für hohe numerische Aperturen stellt Gleichung 2.27 jedoch nur eine grobe Näherung dar. Bei einer NA von 1,4 beträgt der relative Fehler bereits 32% im Vergleich zur exakten Lösung aus der paraxialen Näherung (Gleichung 2.26). Tabelle 2.2 zeigt eine Gegenüberstellung der berechneten, axialen Auflösungslimits aus Gleichung 2.27, Gleichung 2.26 und einer nicht paraxialen, skalaren Theorie [78].

	Ref. [78]	Gleichung 2.26	Gleichung 2.27
Δz_{FWHM}	255 nm	240 nm	389 nm

Tabelle 2.2: Berechnete, axiale Auflösungsgrenzen für $\lambda=546$ nm, $NA=1,4$ und $n=1,47$.

2.2.2 Techniken zur räumliche Isolierung

Als denkbar einfachster Ansatz zur Detektion einzelner Moleküle gilt die räumliche Isolierung. Darunter versteht man eine hinreichend hohe Verdünnung der Probe unter Berücksichtigung des oben aufgeführten Auflösungslimits (vgl. Abschnitt 2.2.1). Ist die räumliche Distanz durch die entsprechend gewählte Verdünnung groß genug, dann lassen sich einzelne Moleküle mit mikroskopischen Methoden getrennt voneinander unterscheiden. Schätzt man diese Konzentration ab, dann sollte eine individuelle, räumliche Unterscheidbarkeit einzelner Moleküle ab einer Konzentration von $10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ möglich sein. Um in der Praxis sicherzustellen, dass das detektierte

Fluoreszenzsignal einzig und allein von einem bestimmten Molekül stammt, muss man den Abstand der einzelnen Moleküle zueinander größer wählen als zur ihrer reinen Unterscheidbarkeit notwendig wäre. Ein gewünschter Abstand der zentralen Maximas einzelner, fluoreszierender Moleküle von $2 \mu\text{m}$, führt zum üblicherweise verwendeten Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-10} M.

Imaging / Abbildende Techniken

Bei der Abbildung einzelner Moleküle erfolgt die Anregung bzw. Beleuchtung in einer Objektebene. Bei der Weitfeldanregung erfolgt diese in Epigeometrie (Abbildung 2.8a). In der Einzelmolekülspektroskopie wird dabei bisher ein konvergenter oder divergenter Laserstrahl verwendet. Dieser führt bei der Abbildung in die Objektebene zu einer räumlich ausgedehnten, gaußförmigen Intensitätsverteilung [42]. Unter geeigneten Bedingungen lässt sich diese Fläche als homogen beleuchtet auffassen [80]. Bei der Weitfeldtechnik wird nicht nur die Objektebene zur Fluoreszenz angeregt, sondern auch tiefere Schichten. Diese Tiefenunschärfe verringert das Signal/Rauschverhältnis und kann die Detektion einzelner Moleküle verhindern. In der Biologie hat sich die Weitfeldanregung deshalb bei der Abbildung dünner Schichten bewährt. Auch in der Einzelmolekülmikroskopie ist für diese Technik ein Präparat mit geringer axialer Ausdehnung zu bevorzugen. Die Anregung in tieferen Schichten lässt sich durch den Einsatz von TIR (totale interne Reflexion) verhindert (Abbildung 2.8b). Bei einem Brechungsindexunterschied zweier Medien kann durch die geeignete Wahl des Einstrahlwinkels Totalreflexion des Anregungslichts erreicht werden. An der totalreflektierenden Grenzfläche tritt ein evaneszentes Feld aus. Dieses Feld klingt typischerweise nach ca. 100 nm exponentiell ab und kann zur Anregung einzelner Moleküle verwendet werden. Störendes Fluoreszenz- und Streulicht aus tieferen Schichten wird auf diese Weise verhindert.

Sowohl bei der Weitfeldanregung, wie auch bei der Anregung durch TIR, wird das erzeugte Fluoreszenzbild anschließend über das Objektiv auf einen Flächendetektor abgebildet. Als Flächendetektoren kommen in der Einzelmolekülmikroskopie CCDs (charge coupled device) zum Einsatz. Gute CCDs zeichnen sich durch eine hohe Quantenausbeute, schneller Auslesegeschwindigkeit und geringem elektronischen Rauschen aus.

Das schnelle, simultane Abbilden eines Probenausschnitts hat sich bei der Verfolgung von Diffusionsvorgängen einzelner Moleküle in viskosen Medien [81], Lipidmembranen [42, 82] oder im Cytoplasma [83, 43] bewährt. Für langsamere Bewegungen und falls genauere Aussagen über das dreidimensionale Diffusionsverhalten erfolgen sollen, eignet sich wegen dem besseren Signal/Rauschverhältnis die im Folgenden

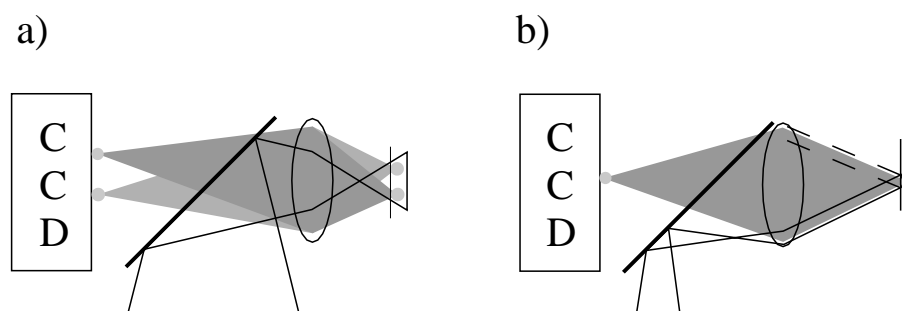


Abbildung 2.8: a) Schematische Darstellung der Weitfeldanregung. Die durchgezogene Linie entspricht dem Anregungsstrahlengang. Der konvergente Anregungsstrahl wird vor der eigentlichen Probenebene durch das Mikroskopobjektiv fokussiert. Dadurch erfolgt eine räumlich ausgedehnte Beleuchtung der Probenebene. Die Fluoreszenz von einzelnen Molekülen (grauer Strahlengang) wird auf eine CCD abgebildet. Streuung und Fluoreszenzanregung in tieferen Schichten tragen bei dieser Anregungsgeometrie zu einem schlechten Signal/Rauschverhältnis bei. b) TIR Anregungsgeometrie. Die durchgezogene Linie entspricht dem Anregungsstrahlengang. Trifft das Anregungslicht mit einem bestimmten Winkel auf die Probe, dann kommt es aufgrund unterschiedlicher Brechungsindizes zur Totalreflexion an der Grenzfläche. Das entstehende, evaneszente Feld fällt typischerweise nach ca. 100 nm ab. Die Anregung tieferer Schichten entfällt. Die Fluoreszenz von einzelnen Molekülen (grauer Strahlengang) wird auf eine CCD abgebildet.

vorgestellte Technik der konfokalen Mikroskopie.

Konfokale Techniken

Um das störende Hintergrundsignal aus den Außerfokalebene der herkömmlichen Mikroskopie zu reduzieren, erfand Minsky ein Mikroskop mit zwei Foki [84]. Der in diesem Patent beschriebene, gemeinsame Fokus von Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang, führte später zum Begriff der konfokalen Mikroskopie [85]. Dabei wird eine Punktlichtquelle oder ein kollimierter Strahl durch ein Objektiv in die Objektebene abgebildet (Abbildung 2.9). Wie in der konventionellen Mikroskopie, kommt es auch bei dieser Anregungsgeometrie zur störendem Fluoreszenz- und Streulicht aus Ebenen vor und hinter der Fokalebene. Das reflektierte, gestreute oder durch Fluoreszenz emittierte Licht wird durch das selbe Objektiv eingesammelt und auf eine Lochblende P abgebildet. Dies ist in Abbildung 2.10 dargestellt. Die Lochblende können nur Strahlen passieren, die aus dem Fokus F stammen. Alle anderen eingesammelten Beiträge, die in der konventionellen Mikroskopie zur Tiefenunschärfe und zu einem schlechten Signal/Rauschverhältnis führen, werden an der Lochblende abgeschnitten und erreichen nicht den Detektor. Diese Anordnung führt zur beugungslimitierten Abbildung eines Punktes. Durch Rastern der Probe in x,y und z

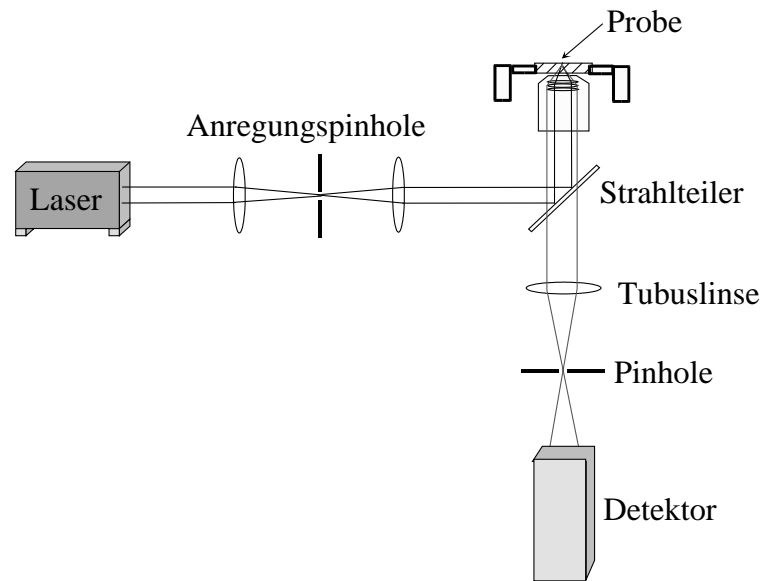


Abbildung 2.9: Typische Geometrie eines konfokalen Mikroskops, wie es auch in der Einzelmolekülspektroskopie zum Einsatz kommt. Zwischen dichroitischem Strahlteiler und dem Mikroskopobjektiv ist der Anregungs- und der Detektionsstrahlengang identisch. Im Detektionsstrahlengang wird gestreutes Anregungslicht an diesem Strahlteiler vom Signal abgetrennt. Die Tubuslinse bildet auf eine Lochblende ab, die nur Licht aus dem Anregungsfokus passieren lässt.

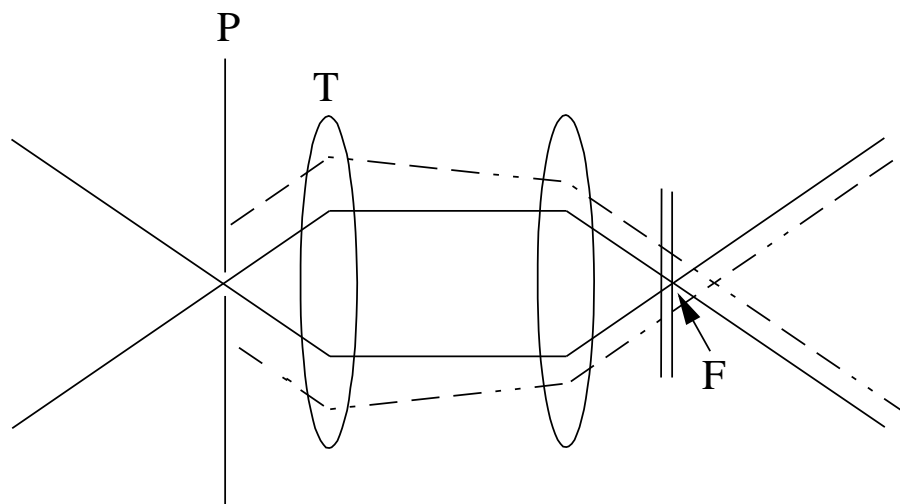


Abbildung 2.10: Einfluss des Detektionslochblende P. Strahlen die aus dem Fokus F stammen (durchgezogene Linie) werden durch die Tubuslinse T am Ort der Lochblende auf einen Punkt abgebildet und können die Lochblende damit passieren. Strahlen außerhalb des Fokus (gestrichelte Linie) werden durch die Tubuslinse T am Pinhole P nicht auf einen Punkt abgebildet. Sie können dieses deshalb nicht passieren. Damit erreicht man die Unterdrückung von Licht außerhalb des Fokus, was zur Reduktion von störendem Untergrundsignal führt.

kann ein dreidimensionales Bild erhalten werden. Piezoscanner bewegen dabei die Probe über den fixen Fokus. Eine andere, wesentlich schnellere Methode ist das Bewegen des Fokus über die Probe. Spiegel lenken dabei den Laserstrahl entsprechend aus und erlauben damit die Rasterung der räumlich fixen Probe. Das Laserscanning kommt vor allem in kommerziellen Geräten zum Einsatz. Moderne, rechnergestützte Verarbeitung der anfallenden Datenmengen machten die konfokale Mikroskopie praktikabel.

In der Einzelmolekülspektroskopie findet die konfokale Abbildung Anwendung, um durch das reduzierte, abgebildete Probenvolumen ein verbessertes Signal/Rauschverhältnis zu erhalten. Durch die starke Untergrundreduktion ist es gerade mit dieser Technik möglich, selbst in stark streuenden Proben einzelne Moleküle zu detektieren. Auch Moleküle mit geringer Fluoreszenzquantenausbeute lassen sich wegen des geringeren Untergrundes leichter detektieren. Im Unterschied zur Weitfeldtechnik wird bei der konfokalen Abbildung jeder einzelne Bildpunkt separat angefahren. Die Bilderzeugung ist somit deutlich langsamer als durch die simultane Aufnahme der ganzen Probenoberfläche mit einer CCD. Schnelle Diffusionsvorgänge lassen sich deshalb mit dieser Technik deshalb nicht verfolgen, langsame Diffusionsvorgänge, wie sie Farbstoffe z.B. in Molekularsieben zeigen, sind jedoch weiterhin zugänglich [86]. Neben der Abbildung eines Probenausschnitts hat sich die konfokale Anregungs- und Detektionsgeometrie auch in der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie durchgesetzt. Für die experimentelle Durchführung und den Anwendungsbereich dieser Methode der Einzelmolekülspektroskopie sei auf die Literatur verwiesen (z.B. [87]). Sie soll hier nur als weiteres Beispiel für den flexiblen Einsatz der konfokalen Technik aufgeführt werden.

2.2.3 Spektrale Selektion

Trotz des denkbar einfachen Ansatzes der räumlichen Isolierung einzelner Moleküle, gelang die individuelle Adressierung einzelner Moleküle zuerst aufgrund ihrer unterschiedlichen spektralen Eigenschaften [6, 8]. Grundlage dieser Technik ist die starke Temperaturabhängigkeit der Breite der Absorptionsbande Γ eines einzelnen Moleküls. Sie ist gegeben durch:

$$\Gamma = \frac{1}{\pi T_2} = \frac{1}{2\pi T_1} + \frac{1}{\pi T_2^*} \quad (2.28)$$

Während T_1 die natürliche Lebensdauer des angeregten Zustandes ist und in Näherung temperaturunabhängig ist, zeigt die Phasenrelaxationszeit T_2^* eine starke Temperaturabhängigkeit. Die Phasenrelaxationszeit T_2^* stellt ein Maß für die mittlere

Phononendynamik der Umgebung und der individuellen Ankopplung dieser Phononen an das Farbstoffsystem dar. Die Zahl der besetzten Phononenzustände sinkt mit abnehmender Temperatur, wodurch sich die Dynamik verringert. Die Breite der Absorptionsbande Γ des einzelnen Moleküls verschmälert sich entsprechend Gleichung 2.28. Bei ausreichend hoher Verdünnung kommen unter der inhomogen verbreiterten Absorptionsbande die einzelnen, sehr schmalen und fast nur noch durch die Lebensdauer des angeregten Zustandes T_1 bestimmten, homogenen Absorptionsbanden der einzelnen Moleküle zum Vorschein. Obwohl sich, im Gegensatz zur räumlichen Isolierung bei Raumtemperatur, immer noch mehrere hundert Moleküle im Anregungsvolumen befinden, gelingt durch den Einsatz schmalbandiger Laser die individuelle Anregung der spektral unterschiedlichen, einzelnen Moleküle.

Aus der individuellen Ankopplung der mittleren Phononendynamik an ein einzelnes Molekül resultiert, selbst bei tiefen Temperaturen, für viele Moleküle eine charakteristische Verteilung der homogenen Linienbreiten. Diese Verteilung ist charakteristisch für ein bestimmtes Farbstoff/Matrix-System. Die systemspezifische Elektron/Phononkopplung stellt auch den limitierenden Faktor für die Technik der spektralen Selektion dar. Bisher sind nur wenige Systeme bekannt, bei denen im üblicherweise verwendeten Temperaturbereich zwischen 1,2 K und 4 K eine spektrale Isolierung möglich ist. Hauptsächlich beschränken sich die Anwendungsmöglichkeiten der spektralen Selektion zur Zeit auf planare, aromatische Farbstoffsysteme in ausgewählten Matrizen [88]. Die meisten anderen Farbstoffsysteme zeigen auch bei tiefen Temperaturen eine starke Ankopplung an die Phononen der umgebenden Matrix. Die damit einhergehende, breite Absorptionsbande verhindert folglich die spektrale Unterscheidbarkeit mehrerer Moleküle die auf einem Probenort lokalisiert sind. Auch sehr schnelle spektrale Fluktuationen erschweren die Selektion einzelner Moleküle über ihre Absorptionsfrequenz [89].

Im Rahmen dieser Arbeit werden auch Tieftemperaturuntersuchungen am Lichtsammelkomplex Phycoerythrocyanin vorgestellt. Jedoch konnten für dieses System keine schmalen Absorptionslinien gefunden werden. Trotz dieses Umstands nimmt die Spektroskopie einzelner Proteine bei kryogenen Temperaturen eine bedeutende Stellung ein. Proteine werden bei tiefen Temperaturen, im Gegensatz zu Raumtemperatur, in einer bestimmten Konformation eingefroren. Die Spektroskopie einzelner Moleküle bietet unter diesen Bedingungen die Möglichkeit, die durch die Proteindynamik bei Raumtemperatur stattfindende Mittelung zu verhindern. Einzelmolekülexperimente bei tiefen Temperaturen ermöglichen somit einen Einblick in die unterschiedlichen Konformationen einzelner Proteine. Neben der Proteindynamik, ist auch die Dynamik der Umgebung stark reduziert. Bei Raumtemperatur finden für das Protein laufend Änderungen in seiner Umgebung statt und eine Vielzahl an

Phononen koppeln an das System. Diese dynamische Wechselwirkung mit dem umgebenden Lösungsmittel kann bei kryogenen Temperaturen verhindert werden. Dort ist der Einfluss nahezu statisch und kann im Detail charakterisiert werden. Wie in den hier vorgestellten Untersuchungen im Abschnitt 5.4.1 gezeigt, kann durch den Einsatz tiefer Temperaturen auch das Photobleichverhalten einzelner Moleküle reduziert werden.

Neben den Vorzügen, die die Spektroskopie einzelner Moleküle bei tiefen Temperaturen bietet, gibt es jedoch auch Einschränkungen für diese Experimente. Die Aufgabe von Chromophoren in biologischen Probensystemen ist in erster Linie nicht, Anregungsenergie über Fluoreszenz abzugeben. Deshalb ist die Fluoreszenzquantenausbeute in diesen Systemen deutlich geringer als in Farbstoffen, die für die Fluoreszenz optimiert wurden. Die Anforderungen an die Detektionsoptik sind deshalb besonders hoch. Wie bei der Vorstellung des Messapparats zur Detektion einzelner Moleküle bei tiefen Temperaturen in Abschnitt 4.2 gezeigt, stellt genau diese Optik zur Zeit die Limitierung dar. Anfängliche Experimente zur Photostabilität an monomerem Phycoerythrocyanin zeigten die in Abschnitt 4.2 diskutierten Probleme. Deshalb wurden der größere Teile dieser Arbeit an diesem Protein bei Raumtemperatur durchgeführt.

Kapitel 3

Polarisationssensitive Experimente am Ensemble und an einzelnen Molekülen

In Kapitel 2 wurden die wesentlichen Grundlagen zur Detektion einzelner Moleküle über deren Fluoreszenz vorgestellt. Auf einige Aspekte des Fluoreszenzlichts wurde dort bereits eingegangen. Aus den Eigenschaften des Fluoreszenzlichts kann man zusätzliche, interessante Einblicke in die Natur einzelner Moleküle gewinnen. Sowohl die spektralen Eigenschaften des Fluoreszenzlichts, die zeitliche Abfolge der Fluoreszenzphotonen, als auch die Polarisation des emittierten Lichts sind dabei wichtige Parameter. Eine Vielzahl an Experimenten an einzelnen Molekülen stützt sich auf diese Polarisation. So konnten über sie Vorgänge, wie zum Beispiel Rotationen [90, 91] oder Konformationsänderungen [40, 92] beobachtet werden. Auch in dieser Arbeit nimmt die Polarisation des Lichts eine besondere Stellung ein. Im Folgenden wird deshalb auf deren Bedeutung, bei der Absorption, der Emission oder der Detektion von Licht, eingegangen. Zwischen diesen Prozessen können viele weitere Vorgänge stattfinden, die zur Änderung der Polarisation des Lichts beitragen. Während für Änderungen zwischen der Absorption und der Emission molekulare Ursachen auszumachen sind, ist die Depolarisation zwischen Emission und Detektion der verwendeten Optik zuzuschreiben. Die nötigen Grundlagen zum Verständnis dieser Effekte, die sowohl für die später vorgestellten Ensemblemessungen als auch für die Spektroskopie einzelner Moleküle relevant sind, werden hier aufgezeigt. Ihr Verständnis ist sowohl für die schnelle Spektroskopie, wie auch für den Energietransfer zwischen zwei Chromophoren oder die Orientierungsbestimmung einzelner Moleküle unerlässlich.

3.1 Absorption

Der gängige Ansatz, der die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Molekülen beschreibt, ist die zeitabhängige Störungstheorie. Die Wellenfunktionen des gestörten Systems werden bei dieser Theorie als Linearkombination der stationären Wellenfunktionen dargestellt. Zur Lösung dieses Problems müssen die Entwicklungskoeffizienten b_k , die zur Darstellung der Linearkombination nötig sind, berechnet werden. Als Näherungslösung für die zeitliche Entwicklung des dominierenden Expansionskoeffizienten $b_m(t')$, dessen Betragsquadrat die Wahrscheinlichkeit für den Übergang von n nach m darstellt, erhält man [93] :

$$b_m(t') \approx \delta_{mn} - \frac{i}{\hbar} \int_0^{t'} e^{i(E_m^0 - E_n^0)t/\hbar} \langle \Psi_m^0 | \hat{H}' | \Psi_n^0 \rangle dt \quad (3.1)$$

δ_{mn} ist dabei die Dirac'sche Deltafunktion, Ψ_m^0 und Ψ_n^0 sind die Wellenfunktionen des End- bzw. Anfangszustands mit den Energien E_m^0 und E_n^0 . Der zeitabhängige Störoperator \hat{H}' wird bei der Wechselwirkung von Molekülen mit elektromagnetischer Strahlung klassisch angesetzt. Er beschreibt die Wechselwirkung des elektrischen Felds \vec{E} der elektromagnetischen Strahlung mit dem Dipolmoment \vec{d} des Moleküls:

$$\hat{H}' = \vec{d}\vec{E} \quad (3.2)$$

Bei der Beschreibung des elektrischen Felds kann die räumliche Ausbreitung der elektromagnetischen Welle, aufgrund der im Vergleich dazu kleinen Moleküldimensionen, vernachlässigt werden. Allein die zeitliche Entwicklung $\vec{E}' = \vec{\mathcal{E}}_0 \sin \omega t$ wird berücksichtigt. Da das Integral $\langle \Psi_m^0 | \hat{H}' | \Psi_n^0 \rangle$ nur ein Ortsintegral ist, kann die zeitliche Entwicklung der elektrischen Felds \vec{E}' von diesem separiert werden. Eingesetzt in Gleichung 3.1 und nach den dargestellten Vereinfachungen erhält man:

$$b_m(t') \approx \delta_{mn} - \frac{i}{\hbar} \langle \Psi_m^0 | \hat{d} | \Psi_n^0 \rangle \int_0^{t'} e^{i(E_m^0 - E_n^0)t/\hbar} \vec{E}' dt \quad (3.3)$$

Die Amplituden $\vec{\mathcal{E}}_0$ des elektromagnetischen Felds sind zeitunabhängig. Nach Integration erhält man:

$$b_m(t') \approx \delta_{mn} - \frac{i}{\hbar} \langle \Psi_m^0 | \hat{d} | \Psi_n^0 \rangle \vec{\mathcal{E}}_0 \left[\frac{e^{i(\omega_{mn} + \omega)t'} - 1}{\omega_{mn} + \omega} - \frac{e^{i(\omega_{mn} - \omega)t'} - 1}{\omega_{mn} - \omega} \right] \quad (3.4)$$

Für den Übergang vom stationären Zustand n in den gestörten Zustand m mit $m \neq n$ gilt $\delta_{mn} = 0$. Unter $\langle \Psi_m^0 | \hat{d} | \Psi_n^0 \rangle$ versteht man das Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}$ des Übergangs von n nach m . Der Amplitudenvektor $\vec{\mathcal{E}}_0$ beinhaltet den Richtungsvektor des

elektrischen Felds der elektromagnetischen Welle. Die Anregungswahrscheinlichkeit $|b_m(t')|^2$ ist folglich proportional dem Betragsquadrat des Skalarprodukts zwischen dem Richtungsvektor des elektrischen Felds der elektromagnetischen Strahlung und dem Richtungsvektor des Übergangsdipolmoments $\vec{\mu}$. Der Winkel ϕ des Skalarprodukts ist der Winkel zwischen dem Richtungsvektor des elektrischen Felds und dem Richtungsvektor des Übergangsdipolmoments:

$$|b_m(t')|^2 \propto |\vec{\mu}_{mn}\vec{\mathcal{E}}_0|^2 \propto \cos^2 \phi \quad (3.5)$$

Eine maximale Anregung kann nach Gleichung 3.5 erreicht werden, wenn der Winkel ϕ zwischen dem Richtungsvektor $\vec{\mu}$ und dem Richtungsvektor $\vec{\mathcal{E}}_0$ minimal wird. Stehen $\vec{\mu}$ und $\vec{\mathcal{E}}_0$ senkrecht aufeinander, dann erfolgt keine Anregung.

3.2 Emission

Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anregungswahrscheinlichkeit. Sie folgt deshalb der unter Gleichung 3.5 hergeleiteten Winkelabhängigkeit. Bei der kontinuierlichen Drehung der Polarisation des Anregungslichts in der Probenebene folgt die integrale Fluoreszenz dem \cos^2 -Verhalten der Anregung. Dieses Verhalten ist in Abbildung 3.1 am Beispiel eines einzelnen Terrylenmoleküls gezeigt. Im Ensemble liegt in der Regel eine statistische Verteilung der Übergangsdipolmomente vor. Unabhängig von der Polarisation des Anregungslichts werden deshalb immer Moleküle angeregt und die Mittelung über viele, individuelle \cos^2 -Signale führt zur völligen Auslöschung dieser Modulation. Nur das Fluoreszenzsignal eines einzelnen Moleküls kann deshalb dieses typische \cos^2 -Verhalten zeigen. Dieses einfache Experiment zeigt bereits sehr deutlich, dass die Mittelung über viele Moleküle stets mit einem Informationsverlust verbunden ist.

Analog des vorhergehenden Abschnitts 3.1 lässt sich auch für die Fluoreszenz ein Übergangsdipolmoment ableiten. Folglich ist auch die Emission eines einzelnen Moleküls polarisiert. Betrachtet man das einzelne Molekül als Hertz'schen Dipol, so liegt der Richtungsvektor des elektrischen Felds des emittierten Lichts parallel zum Übergangsdipolmoment der Fluoreszenz. Die Ausbreitungsrichtung der Emission ist dazu senkrecht. Der Richtungsvektor des Übergangsdipolmoments der Absorption kann in Näherung als parallel zum Richtungsvektor der Emission angesehen werden. Die Grundlage dieser Näherung ist, dass die Positionen der Atomkerne zwischen dem ersten elektronisch angeregten Zustand und dem Grundzustand ähnlich sind. Auch die Schwingungswellenfunktionen in beiden Zuständen müssen in Näherung gleich sein. Die Kolinearität gilt, im Rahmen dieser Annahmen, für alle aromati-

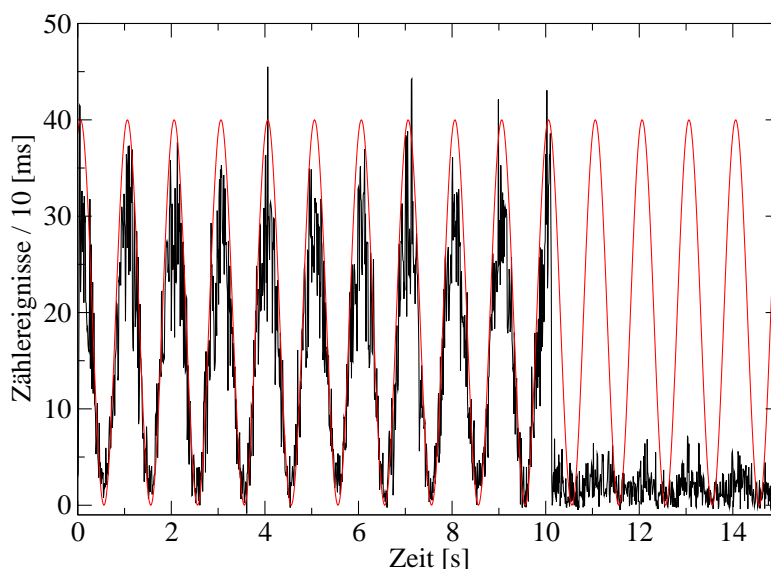


Abbildung 3.1: Die dunkle Kurve zeigt die detektierte Fluoreszenz eines einzelnen Terrylen Moleküls. Sie folgt der zwischen 0° und 180° rotierenden Anregungspolarisation. An den Stellen maximalen Fluoreszenzsignals sind der Richtungsvektor des elektrischen Felds der Anregung und das auf die Anregungsebene projizierte Übergangsdipolmoment parallel zueinander. Die helle, eingezeichnete Funktion hebt das \cos^2 -Verhalten der Fluoreszenzintensität bei durchmodulierter Anregungspolarisation hervor.

schen Kohlenwasserstoffe in kondensierter Phase [94]. Diese Näherung wird bei der Interpretation der in dieser Arbeit gewonnenen Daten ebenfalls gemacht.

3.3 Anisotropie und Depolarisation

Mit der oben dargestellten, stichpunktartigen Ableitung des Übergangsdipolmoments der Absorption und der Emission wurde gezeigt, dass man bei polarisierter Anregung polarisierte Fluoreszenz erwarten kann. Tatsächlich zeigen viele Farbstoffe dieses Verhalten. Für Änderungen zwischen der Polarisation des absorbierten Lichts und des emittierten Lichts finden sich aber viele Ursachen, die hier, im Rahmen der Relevanz für diese Arbeit, kurz dargestellt werden sollen.

Detektiert man das Fluoreszenzsignal, wie in Abbildung 4.4 gezeigt, in 90° -Geometrie, dann kann die integrale Fluoreszenzintensität angegeben werden

als [59]:

$$I_{\text{total}} = I_{\parallel} + 2I_{\perp}, \quad (3.6)$$

wobei die Polarisation der Fluoreszenzintensität I_{\parallel} als parallel zur Polarisation der Anregung definiert ist. Unter der Anisotropie r versteht man die relative Änderung der Polarisation der Gesamtintensität I_{total} bezüglich der Polarisation der Anregung [95]. Wie weiter unten gezeigt wird, ist diese Änderung selten statisch. Die Anisotropie r kann deshalb in der zeitabhängigen Form geschrieben werden:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (3.7)$$

Bei der Untersuchung der Anisotropie in einem isotropen Ensemble führt die Anregung mit polarisiertem Licht zur selektiven Anregung der einzelnen Emitter entsprechend dem unter Kapitel 3.1 dargestellten \cos^2 -Verhalten. Es findet also nicht nur die Anregung von Molekülen statt, die parallel zum Richtungsvektor des elektrischen Felds sind, sondern es resultiert eine entsprechende Verteilung der angeregten Übergangsdipolmomente. Diese PhotoSelektion führt bereits zu einem Verlust an Anisotropie, verglichen mit dem maximal erreichbaren Wert von 1. Bei $r = 1$ entspricht die Polarisation der Anregung der Polarisation der Emission und es tragen keine weiteren Prozesse zum Polarisationsverlust bei [96].

Diese PhotoSelektion findet im Einzelmolekülexperiment nicht statt. Bei der Anregung eines einzelnen Moleküls parallel zum Übergangsdipolmoment hat man den ganzen dynamischen Bereich der Anisotropie $r = -0,5 \dots 1$ für Untersuchungen zur Verfügung. Im Folgenden werden nun die typischen Gründe für die Depolarisation der Anregung besprochen, die nicht auf der PhotoSelektion eines Ensembleexperiments basieren.

3.3.1 Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment

Bisher wurde der Begriff der Anisotropie unter der Voraussetzung verwendet, dass das Übergangsdipolmoment der Anregung und der Emission parallel zueinander ist. Nur für diesen Fall kann ein einzelnes Molekül den maximalen Anisotropiewert $r = 1$ zeigen. Als Spezialfall soll hier nur kurz auf den intramolekularen Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment eingegangen werden. Analog können jedoch auch intermolekulare Winkel behandelt werden, die als vorgeschalteten Prozess den Energietransfer der Anregungsenergie voraussetzen. Dessen Grundlagen werden jedoch erst im folgenden Abschnitt 3.3.2 behandelt.

Existiert in einem Molekül ein Winkel β zwischen Anregungs- und Emissionsübergangsdipolmoment, dann reduziert sich die gemessene Anisotropie gemäß [59]:

$$r_{max} = r_0 \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (3.8)$$

r_0 entspricht dabei der anfänglichen Anisotropie, also jenem Wert den man erhält wenn man alle anderen Depolarisationseffekte berücksichtigt. Ausgenommen ist dabei der Winkel β zwischen Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment.

Betrachtet man die Anisotropie r in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge, dann findet man bei Untersuchungen zum Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der Absorption und Emission den höchsten Wert für die Anisotropie meist bei Anregung der langwelligsten Bande. Hier sind für den Absorptions- und Emissionsprozess die gleichen elektronischen Übergänge beteiligt und deren Übergangsmomente sind nahezu parallel [59].

3.3.2 Energietransfer

Auch bei der Energieübertragung von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül kommt es in der Regel zur Depolarisation der Anregung. Nur falls garantiert ist, dass das Übergangsdipolmoment des Akzeptors parallel zum Übergangsdipolmoment des Donors steht, unterbleibt diese. In einer Ensemblemessung mit isotroper Molekülverteilung findet man ebenfalls eine statistische Verteilung der Übergangsdipolmomente der Akzeptoren. Betrachtet man den Energietransfer als eine Emission des Donors und der Reabsorption eines Akzeptormoleküls, dann tritt beim Übergang der Anregung der bereits bekannte Prozess der Photoselektion ein. Für die später vorgestellten Energietransferuntersuchungen an einzelnen Molekülen spielt die Depolarisation der Anregung eine entscheidende Rolle. Bei bekannter Orientierung des Übergangsdipolmoments des Donormoleküls lässt sich z.B. aus der Polarisation des Fluoreszenzphotons das Übergangsdipolmoment des Akzeptors bestimmen. Sind zwei Akzeptoren mit bekannter Orientierung zum Donor vorhanden, dann kann man über die Polarisation des Fluoreszenzlichts entscheiden, welcher der beiden Akzeptoren die Anregungsenergie erhalten hat. Details zu diesen Untersuchungen finden sich im experimentellen Abschnitt 5.1.2 dieser Arbeit. Eine besondere Bedeutung kommt in diesem Kapitel die theoretische Behandlung des Förstermechanismus zu. Die Ergebnisse aus den Energietransfermessungen an einzelnen Molekülen können mit dem Energietransfer aus Ensemblemessungen verglichen werden. Die theoretische Herleitung findet im experimentellen Teil ihre Anwendung.

Besitzen Donor und Akzeptor einen ausreichend großen Abstand, dann entspricht der Energietransfer aus mechanistischer Sicht der Emission des Fluoreszenzphotons und seiner Reabsorption. Man bezeichnet diesen Vorgang, wegen der einfachen physikalischen Vorgänge die dabei beteiligt sind, als den trivialen Fall. Seine quantitative Untersuchung bereitet jedoch Schwierigkeiten, weil oftmals andere Transfermechanismen beteiligt sind, deren gleichzeitige Berücksichtigung nicht einfach sind. Die Wahrscheinlichkeit p_{abs} zur Aufnahme eines Fluoreszenzphotons ist für den trivialen Prozess proportional dem Überlappintegral des Fluoreszenzspektrums $f(\tilde{\nu})$ des Donors mit dem Absorptionsspektrum $\epsilon(\tilde{\nu})$ des Akzeptors [94]:

$$p_{abs} \propto \int_0^{\infty} f(\tilde{\nu})\epsilon(\tilde{\nu})d\tilde{\nu} \quad (3.9)$$

In verdünnten Lösungen stellt die Reabsorption den dominierenden Energietransferprozess dar. Bei höheren Konzentrationen tritt die strahlungslose Energieübertragung in den Vordergrund. Sie kann über zwei unterschiedliche Mechanismen stattfinden. Diese sind als Dexter- und Försterenergietransfer bekannt sind. Obwohl sich der Förstermechanismus klassisch herleiten lässt [97], wird im Folgenden kurz auf die quantenmechanische Herleitung eingegangen. Aus dieser ist nämlich ebenso die Herkunft des Dextermechanismus ersichtlich.

Für die quantenmechanische Behandlung des Energietransfers bedarf es der Wellenfunktionen für den Anfangs $|i\rangle$ - und den Endzustand $|f\rangle$ des Systems. Sie sind wegen des Pauli-Verbots antisymmetrisiert:

$$|i\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(\psi_D^*(1)\psi_A(2) - \psi_D^*(2)\psi_A(1)) \quad (3.10)$$

$$|f\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(\psi_D(1)\psi_A^*(2) - \psi_D(2)\psi_A^*(1)) \quad (3.11)$$

Aus der zeitabhängigen Störungsrechnung erhält man für den strahlungslosen Übergang von einem Zustand D in einen Zustand A die Rate k_{DA} [98]:

$$k_{DA} = \frac{2\pi}{\hbar}\beta^2\rho(E) \quad (3.12)$$

Diese Beziehung ist auch als *Fermis Goldene Regel* bekannt. $\rho(E)$ entspricht dabei der Zustandsdichte, β ist das elektronische Wechselwirkungselement der Störung, mit $\beta = \langle f|\hat{H}_{WW}|i\rangle$. Mit den Wellenfunktionen 3.10 und 3.11 lässt sich das Matrixelement β als Summe aus Coulombterm β_C und Austauschterm β_A schreiben:

$$\beta = \underbrace{\langle \psi_D^*(1)\psi_A(2)|\hat{H}_{WW}|\psi_D(1)\psi_A^*(2)\rangle}_{\text{Coulombterm } \beta_C} + \underbrace{\langle \psi_D^*(1)\psi_A(2)|\hat{H}_{WW}|\psi_D(2)\psi_A^*(1)\rangle}_{\text{Austauschterm } \beta_A} \quad (3.13)$$

Der Austauschterm resultiert aus den Symmetrieeigenschaften der Wellenfunktionen und führt im Weiteren zum Dextermechanismus des Energietransfers. Der Dextermechanismus erfordert einen Überlapp der Wellenfunktionen, seine Übergangsrates ist deshalb exponentiell vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängig [99]. Da ihm in dieser Arbeit keine Relevanz zukommt, wird im Folgenden nicht weiter auf ihn eingegangen. Der Coulombterm führt zum Förstermechanismus [97, 100].

Förstermechanismus

Der Förstermechanismus beschreibt den Energietransfer zwischen einem Donormolekül und einem Akzeptormolekül als eine dipolare Wechselwirkung zwischen diesen. Nach der Anregung des Donormoleküls kommt es üblicherweise zur Schwingungsrelaxation im ersten angeregten Singulettzustand S_1 . Im Schwingungsgrundzustand von S_1 steht neben den unter Kapitel 2.1.2 vorgestellten Relaxationsprozessen nun ein zusätzlicher Kanal mit der Ratenkonstanten k_{DA} für die Abregung bereit. Dieser Prozess führt dazu, dass der Donor im Anschluss wieder im elektronischen Grundzustand S_0 ist und sich nun der Akzeptor im elektronisch angeregten Zustand S_1 befindet. Aus diesem Zustand kann nun die endgültige Relaxation erfolgen, z.B. unter Abgabe eines Fluoreszenzphotons mit den photophysikalischen Eigenschaften des Akzeptors. Der beschriebene Vorgang findet sich in Abbildung 3.2 graphisch zusammengestellt.

Um die Ratenkonstante k_{DA} für den Energietransfer zwischen Donor- und Akzeptormolekül nach Gleichung 3.12 bestimmen zu können, benötigt man das Matrixelement der Störung β_C und die Zustandsdichte $\rho(E)$ für diesen Prozess. Das Matrixelement der Störung β_C beinhaltet den Störoperator \hat{H}_{WW} , der zur Beschreibung des Förstermechanismus nur die Coulombwechselwirkung enthält. Sie kann als Summe aller elektronischen Wechselwirkungen durch eine Multipolentwicklung beschrieben werden [101]. Da es sich bei Donor und Akzeptor um ungeladene Moleküle handelt, entfällt die Monopol-Monopol Wechselwirkung. Bei der Herleitung des Förstermechanismus wird die Summenentwicklung, wegen der starken Abstandsabhängigkeit höherer Terme, nach der Dipol-Dipol Wechselwirkung abgebrochen [99]. Deshalb kann man als Coulomboperator \hat{H}_{WW} für die klassische Dipol-Dipol Wechselwirkung schreiben [102]:

$$\hat{H}^{WW} = \frac{\vec{d}_D \vec{d}_A}{n^2 R^3} - \frac{3(\vec{d}_D \vec{R})(\vec{R} \vec{d}_A)}{n^2 R^5} = \frac{d_D d_A \cos \phi_{DA}}{n^2 R^3} - \frac{3d_D d_A R^2 \cos \phi_D \cos \phi_A}{n^2 R^5} \quad (3.14)$$

\vec{d}_D und \vec{d}_A entsprechen hier jeweils dem Dipol des Donors bzw. des Akzeptors. d_D

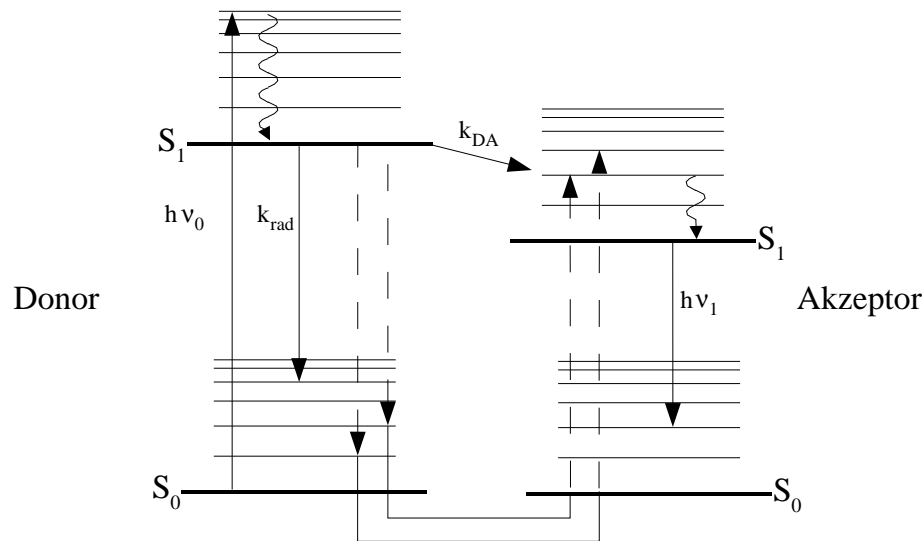


Abbildung 3.2: Termschema für den Energietransfer zwischen einem Donormolekül und einem Akzeptormolekül nach dem Förstermechanismus. Durch die Absorption eines Photons $h\nu_0$ befindet sich der Donor im ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 in einem Schwingungsniveau. Im Anschluss kommt es zur Schwingungsrelaxation. Aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes S_1 des Donors kann es mit der Rate k_{DA} zur Energieübertragung auf den Akzeptor kommen. Der Donor befindet sich im Anschluss im elektronischen Grundzustand und der Donor in seinem elektronisch angeregten Zustand S_1 -Zustand. Von dort kann er unter Abgabe eines Fluoreszenzphotons $h\nu_1$ in den Grundzustand zurückkehren.

und d_A verstehen sich als die Längen dieser Vektoren. n ist der Brechungsindex des Mediums in dem der Energietransfer stattfindet, R ist der Abstand der beiden Dipole zueinander und \vec{R} ist deren Richtungsvektor (vgl. Abbildung 3.3). Die orientierungsabhängigen Anteile des Wechselwirkungsoperators fasst man in der Regel in dem Orientierungsparameter $\kappa = \cos \phi_{DA} - 3 \cos \phi_D \cos \phi_A$ zusammen.

Als Matrixelement der Störung für die Coulombwechselwirkung β_C nach Gleichung 3.13 mit dem Wechselwirkungsoperator \hat{H}_{WW} aus Gleichung 3.14 erhält man folglich:

$$\beta_C = \frac{\kappa |\vec{\mu}_D|^2 |\vec{\mu}_A|^2}{n^2 R^3}, \quad (3.15)$$

mit $\vec{\mu}_D$ und $\vec{\mu}_A$ als Übergangsdipolmoment.

Die Zustandsdichte $\rho(E)$ für den Übergang erhält man aus der Faltung der quadrierten Überlappintegrale χ der beteiligten Schwingungswellenfunktionen [102]. Für den Donor erstrecken sich diese über das Energieintervall $[E_D; E_D - h\nu]$, für den Akzeptor über das Intervall $[E_A; E_A + h\nu]$. E_D bzw. E_A sind die Energien des Anfangszustands von Donor und Akzeptor. Damit lässt sich die Gesamtzustandsdichte $\rho(E)$ schreiben

als:

$$\rho(E) = \frac{1}{2\pi} \int \left[\int \chi_D^2(E_D, E_D - h\nu) dE_D \int \chi_A^2(E_A, E_A + h\nu) dE_A \right] d\tilde{\nu} \quad (3.16)$$

Mit Hilfe der Einsteinkoeffizienten für die Absorption und der spontanen Emission, lassen sich die Überlappintegrale der Schwingungswellenfunktionen χ_D^2 und χ_A^2 durch spektroskopische Größen des Donor- bzw. des Akzeptormoleküls ausdrücken [102]:

$$\int \chi_D^2(E_D, E_D - h\nu) dE_D = \frac{3\hbar\phi_D}{2^5\pi^3 n\tau_D \tilde{\nu}^3 |\vec{\mu}_D|^2} f(\tilde{\nu}) \quad (3.17)$$

$$\int \chi_A^2(E_A, E_A + h\nu) dE_A = \frac{3000n\hbar \ln 10}{2^2\pi^2 N_A \tilde{\nu} |\vec{\mu}_A|^2} \epsilon(\tilde{\nu}) \quad (3.18)$$

$\epsilon(\tilde{\nu})$ entspricht dabei dem wellenlängenabhängigen, molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten aus dem Lambert-Beerschen Gesetz und damit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. $f(\tilde{\nu})$ ist das auf die Fläche eins normierte Fluoreszenzspektrum des Donormoleküls. Setzt man Gleichung 3.17, 3.18 und Gleichung 3.15 in Gleichung 3.12 ein, dann erhält man den bekannten Ausdruck für die Übergangsrate k_{DA} nach dem Förstermechanismus:

$$k_{DA} = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 \phi_D}{128\pi^5 n^4 R^6 N_A \tau_D} \int_0^\infty f(\tilde{\nu}) \epsilon(\tilde{\nu}) \frac{d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^4} \quad (3.19)$$

Diese Gleichung gilt für die folgenden Einheiten: R [cm], N_A [mol⁻¹], τ_D [s], $\epsilon(\tilde{\nu})$ [M⁻¹cm⁻¹]. Alle anderen Parameter sind dimensionslos. Es ist ersichtlich, dass die Übergangsrate k_{DA} von mehreren experimentell zugänglichen Faktoren abhängig ist. Neben Brechungsindex n , der Fluoreszenzlebensdauer τ_D und der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_D des Donors, beeinflusst auch der Überlapp zwischen dem Fluoreszenzspektrum des Donor $f(\tilde{\nu})$ und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors $\epsilon(\tilde{\nu})$ die Übergangsrate. Auch der Orientierungsparameter κ^2 nimmt auf die Geschwindigkeit, mit der die Energieübertragung stattfindet, Einfluss. Er kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. In Abbildung 3.3b ist für verschiedene Dipolanordnungen gezeigt wie sich diese auf den Wert von κ^2 auswirken. Die exakte Bestimmung von κ^2 gelingt, wenn Donor und Akzeptor eine feste Geometrie zueinander besitzen. Bei Energietransfermessungen, bei denen durch eine ausreichend schnelle Rotationsdiffusion eine Mittelung der Orientierungen von Donor- und Akzeptordipol während der Energieübertragung auftritt, wird ein Orientierungsparameter $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ angesetzt. Für statistisch verteilte Orientierungen zwischen Donor und Akzeptor, bei denen jedoch keine weitere Mittelung durch Rotationsdiffusion auftritt, nimmt κ^2 den Wert 0,476 an [103]. Eine weitere Größe, die einen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante k_{DA} hat, ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptormolekül. In der Literatur findet häufig auch der Försterradius R_0 Verwendung. Er ist als der Abstand zwischen

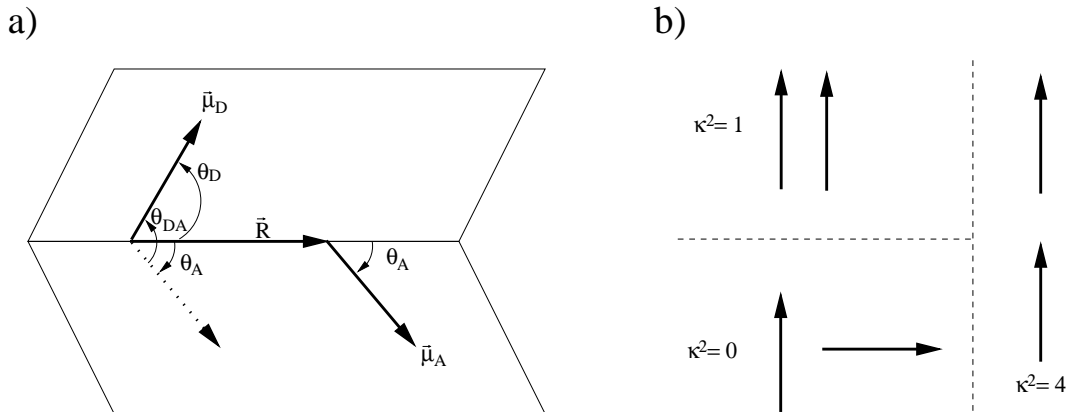


Abbildung 3.3: a) Anordnung zweier Übergangsdipolmomente $\vec{\mu}_D$ und $\vec{\mu}_A$. $\vec{\mu}_D$ liegt im Ursprung, \vec{R} ist der Richtungsvektor der beiden Dipole zueinander. Die Polarisation für Absorption und Emission entspricht der Richtung des entsprechenden Dipols. b) κ^2 für verschiedene Dipolanordnungen berechnet nach $\kappa^2 = (\cos \phi_{DA} - 3 \cos \phi_D \cos \phi_A)^2$.

Donor und Akzeptor definiert, bei dem 50 % der Anregungsenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen werden. Dies ist der Fall, wenn die Fluoreszenzlebenszeit τ_D des Donors gleich der inversen Energietransferrate k_{DA}^{-1} ist. Der Försterradius ist daher gegeben als:

$$R_0 = \left(\frac{9000 \ln 10 \kappa^2 \phi_D}{128 \pi^5 n^4 N_A} \int_0^\infty f(\tilde{\nu}) \epsilon(\tilde{\nu}) \right)^{-6} \quad (3.20)$$

Definiert man die Energietransfereffizienz E in Abhängigkeit vom Abstand R dann erhält man:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (3.21)$$

In Abbildung 3.4 ist sieht man die Energietransfereffizienz gegen den Abstand R von Donor und Akzeptor aufgetragen. Falls der Abstand R sehr viel geringer ist als der Försterradius R_0 , dann ist die Energietransfereffizienz relativ unempfindlich auf Änderungen. Dies beinhaltet sowohl Abstandsänderungen als auch Änderungen der anderen, oben aufgeführten Parameter. Ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor im Bereich des Försterradius R_0 , dann können kleine Änderungen in den Energietransferparametern große Änderungen im Energietransferverhalten hervorrufen.

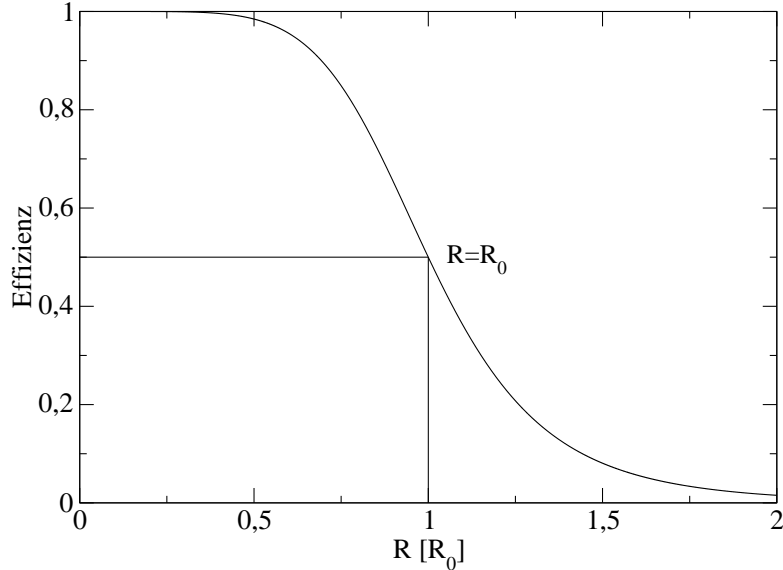


Abbildung 3.4: Energietransfereffizienz vom Donor zum Akzeptor in Abhängigkeit vom Abstand R in Einheiten von R_0 . Beim Försterradius R_0 ist die Energietransfereffizienz auf genau die Hälfte abgefallen. Für Abstände $R \ll R_0$ findet nahezu keine Änderung der Energietransfereffizienz statt.

3.3.3 Rotation

Auch die Rotation eines Moleküls während seiner Fluoreszenzlebenszeit führt zur Änderung der Polarisation der Emission. Die Rotation eines Moleküls kann durch das zweite Fick'sche Diffusionsgesetz beschrieben werden:

$$\frac{W(\theta, \phi, t)}{dt} = D_{rot} \nabla^2 W(\theta, \phi, t) \quad (3.22)$$

$W(\theta, \phi, t)$ ist dabei die Wahrscheinlichkeit das Übergangsdipolmoment eines Moleküls zum Zeitpunkt t in der Orientierung (θ, ϕ) anzutreffen. D_{rot} ist die Rotationsdiffusionskonstante. Man kann Gleichung 3.22 lösen und erhält [104]:

$$W(\theta(t_0), \phi(t_0), t) = e^{-6D_{rot}t} \quad (3.23)$$

t_0 entspricht dabei dem Rotationszeitnullpunkt. Analog der Wahrscheinlichkeit $W(\theta(t_0), \phi(t_0), t)$ lässt sich auch die zeitabhängige Anisotropie beschreiben:

$$r(t) = r_0 e^{-6D_{rot}t} \quad (3.24)$$

Um zur stationären Anisotropie zu gelangen, muss der Zerfall der angeregten Zustände berücksichtigt werden. Man erhält für einen monoexponentiellen Zerfall (vgl. Gleichung 2.7):

$$r = \frac{\int_0^{\infty} I(t)r(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt} = \frac{r_0}{1 + \tau/\gamma} \quad (3.25)$$

Dieser Ausdruck entspricht der Perringleichung [59] bei der die Rotationsdiffusionszeit D_{rot} durch die Diffusionskorrelationszeit γ ersetzt wurde ($D_{\text{rot}} = \gamma^{-1}$). Man findet die Perringleichung oftmals auch in folgender Form:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + 6D_{\text{rot}}\tau \quad (3.26)$$

Konsequenzen der zeitabhängigen Rotationsdepolarisation

Die Rotation von Molekülen während der Fluoreszenzlebenszeit führt zu einer Änderung der detektierten Fluoreszenzintensitäten von parallel und senkrecht polarisiertem Licht. Die Transmissionseigenschaften der optischen Komponenten sind jedoch in der Regel für die beiden Polarisationskomponenten unterschiedlich. Bei der Bestimmung der Fluoreszenzzerfallskonstanten kann die zeitabhängige Rotationsdepolarisation zu Fehlern führen, was im Folgenden gezeigt werden soll.

Aus den Gleichungen 3.7 und 3.6 erhält man allgemein für den zeitabhängigen Zerfall der beiden Polarisationskomponenten unter Berücksichtigung einer willkürlich eingeführten Transmissionscharakteristik ω_{\parallel} und ω_{\perp} :

$$\begin{aligned} I_{\parallel}(t) &= \omega_{\parallel} \frac{1}{3} I_{\text{tot}}(t)(1 + 2r(t)) \\ I_{\perp}(t) &= \omega_{\perp} \frac{1}{3} I_{\text{tot}}(t)(1 - r(t)) \end{aligned} \quad (3.27)$$

$r(t)$ in Gleichung 3.27 entspricht dabei dem zeitabhängigen Anisotropieverlust aus Gleichung 3.24. Zwei Fälle können dabei unterschieden werden, in denen der Einfluss von $r(t)$ vernachlässigt werden kann. Falls D_{rot} wesentlich größer ist als die Fluoreszenzzerfallsrate k_{tot} , führt dies zu einem sehr schnellen Verlust der Anisotropie, was einer Mittelung über alle unterschiedlichen Orientierungen gleichkommt. Dies hat lediglich einen Einfluss auf die Amplitude des gemessenen Fluoreszenzsignals. Der gemessene Fluoreszenzzerfall ist jedoch unabhängig von den Transmissionseigenschaften ω_{\parallel} und ω_{\perp} . Falls D_{rot} wesentlich kleiner als die Fluoreszenzzerfallsrate k_{tot} ist, kommt dies einem sehr langsamen Verlust der Anisotropie gleich. Dies führt

zu keiner zeitabhängigen Änderung der Gesamtintensität durch die Anisotropie. Der Beitrag $r(t)$ erscheint während dem Fluoreszenzzerfall statisch. Auch unter diesen Bedingungen erfolgt keine Bevorzugung oder Unterdrückung einer Polarisationsrichtung durch die Transmissionscharakteristiken ω_{\parallel} und ω_{\perp} des experimentellen Aufbaus.

Für den Fall, dass die Rotation des Moleküls auf der selben Zeitskala abläuft wie der Fluoreszenzzerfall, muss der Einfluss der Transmissionscharakteristik des Messapparats auf die bestimmten Fluoreszenzzerfallszeiten berücksichtigt werden. Normalerweise wird dieser Einfluss durch die Messung unter "Magic-Angle" Bedingungen unterdrückt. PEC ist als Probe ein vergleichsweise großes Molekül mit einer Fluoreszenzlebensdauer von etwa 1 ns. Im Folgenden wird gezeigt, dass in diesem Fall ohne größere Messfehler auf die "magic-angle" Bedingung verzichtet werden kann.

Die Rotationskorrelationszeit für ein kugelförmiges Molekül ist nach Debye [105] gegeben als $\gamma = \frac{V_h \eta}{RT}$, wobei V_h dem hydratisierten Molekülvolumen und η der Viskosität des umgebenden Mediums entspricht. Für globulare Proteine kann das Proteinvolumen über die molekulare Masse M angenähert werden [106]:

$$\gamma = \frac{\eta M}{RT}(\bar{v} + h) \quad (3.28)$$

\bar{v} ist dabei das spezifische Proteinvolumen und entspricht für typische Proteine ca. 0,73 ml/g. h ist das Volumen der umgebenden Solvathülle und wird bei Proteine mit 0,23 ml/g angesetzt. Ein Vergleich der berechneten Rotationskorrelationszeiten γ_{calc} für unhydratisierte Moleküle (nach Gleichung 3.28) mit gemessenen Rotationskorrelationszeiten γ_{exp} zeigt, dass typischerweise $\gamma_{\text{exp}}/\gamma_{\text{calc}} \approx 2$ gilt [107]. Diese Abweichung folgt aus der Annahme einer sphärischen Geometrie der Moleküle.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Untereinheiten des PEC mit einem Molekulargewicht von ca. 18 kDa berechnet sich, ohne Hydrathülle, eine Rotationskorrelationszeit von $\gamma_{\text{calc}} \approx 5$ ns. Mit $\gamma_{\text{exp}}/\gamma_{\text{calc}} \approx 2$ kann deshalb von einer realen Rotationskorrelationszeit $\gamma \approx 10$ ns ausgegangen werden ($\eta = 0,94$ cP, $T = 298$ K). Mit einer angenommenen Fluoreszenzlebensdauer $\tau = 2$ ns kann man für verschiedene Transmissionscharakteristiken ω_{\parallel} und ω_{\perp} mit den Gleichungen 3.27 und 3.24 bei der gegebenen Rotationskorrelationszeit von 10 ns den zu erwartenden, nicht mehr streng monoexponentiellen Fluoreszenzzerfall berechnen. Es zeigt sich, dass dieser Fluoreszenzzerfall, der auch noch den Einfluss der Rotation berücksichtigt, weiterhin gut mit einer monoexponentiellen Zerfallsfunktion angepasst werden. Ein Vergleich der Zerfallskonstanten, ohne und unter Berücksichtigung der Rotation, ergibt den Fehler den man erhält, wenn man die Transmissionscharakteristik in der Detektion vernachlässigt. Die Ergebnisse dieser Rechnung für verschiedene Transmissionscharakteristiken sind in Abbildung 3.5 zusammengestellt. Es ist ersichtlich, dass für

PEC unter Annahme realistischer Transmissionseigenschaften der Fehler nie größer als 10% wird. Bei den Experimenten zur Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit wird deshalb in dieser Arbeit auf die "Magic-Angle-Geometrie" verzichtet.

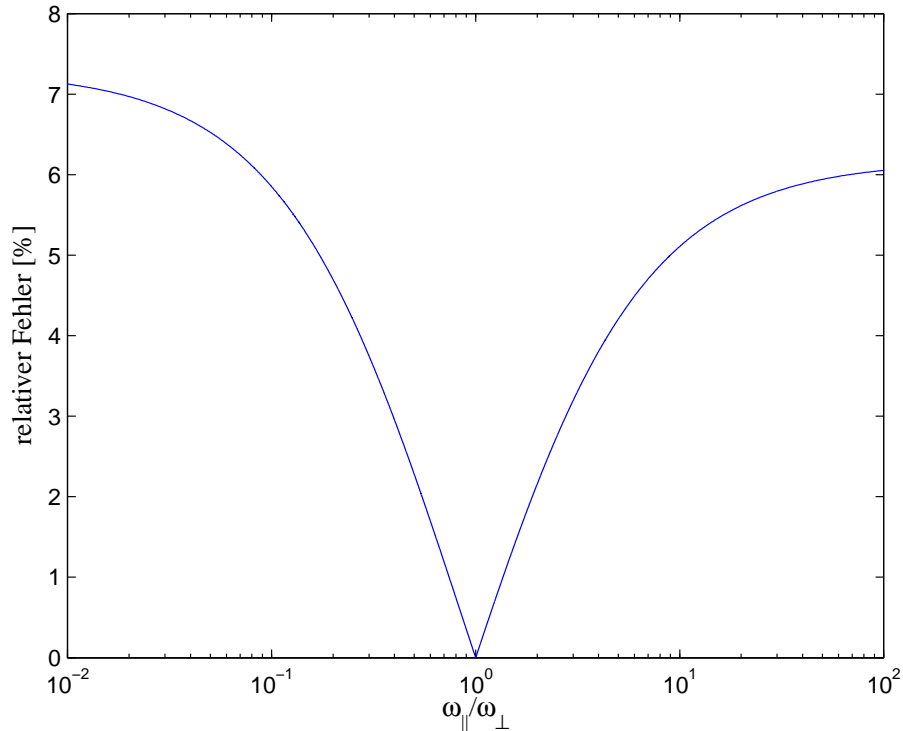


Abbildung 3.5: Relativer Fehler bei der Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit bei Vernachlässigung der "Magic-Angle-Bedingung" für beliebige Transmissionscharakteristiken $\omega_{||}/\omega_{\perp}$ ($\gamma = 10$ ns, $\tau = 2$ ns).

3.3.4 Anregungs- und Detektionscharakteristik

Die bisher vorgestellten Prozesse der Depolarisation sind alle auf molekulare Ursachen zurückzuführen. Wie bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel erwähnt, ändert auch die verwendete Optik die Polarisations-eigenschaften des Lichts. In diesem Abschnitt wird deshalb nun der Einfluss der Messapparatur auf die Polarisation von Anregungs- und Fluoreszenzlichts beschrieben.

Depolarisation im Anregungsstrahlengang

Für Objektive mit hoher numerischer Apertur NA lässt sich das elektromagnetische Feld im Fokus des Objektivs nicht hinreichend mit der skalaren Beugungstheorie

beschreiben. Bei der Anregung mit linear polarisiertem Licht kommt es zu einer Verteilung der Feldvektoren, die bei der polarisationssensitiven Anregung einzelner Moleküle zu berücksichtigen ist. In Rechnungen von Richards et al. [108] wurde dem vektoriellen Charakter des Anregungslichts Rechnung getragen und es konnte so die tatsächliche Feldverteilung in der Fokalebene erhalten werden.

Ha et al. [91] erarbeiteten einen für die Einzelmolekülspektroskopie handhabbaren, quantitativen Ausdruck für die Depolarisation beim Einsatz von Mikroskopobjektiven hoher numerischer Apertur. Dabei zeigt sich, dass bei nur 50 nm lateraler Entfernung vom Brennpunkt bereits 20% der ursprünglichen Anregungspolarisation der Fokalebene auf der optischen Achse liegt. Obwohl Ha et al. diesen Effekt am Einzelmolekülexperiment nicht nachweisen konnten und deshalb vernachlässigten, gelang es Bahlmann et al. [109], die durch die Theorie vorhergesagte Depolarisation von 1,6% der Ausgangspolarisation auf der senkrecht zur Anregungspolarisation stehenden transversalen Achse zu vermessen.

Um in den Experimenten dieser Arbeit eine Depolarisierung durch die hohe numerische Apertur des eingesetzten Objektivs auszuschließen, findet keine vollständige Ausleuchtung des Mikroskopobjektivs statt. Bei kleiner Apertur verschwindet der Effekt der Depolarisation der Anregung [91, 109]. Der Anregungsfokus ist nun jedoch nicht mehr beugungsbegrenzt und man erzeugt damit unnötiges Untergrundsignal durch das größere, beleuchtete Volumen. Dieser Effekt wird jedoch in Kauf genommen. In der Probenebene ließ sich auf diese Weise ein Polarisationskontrast von 1/30 erreichen. Effekte die auf die Depolarisation des Anregungslichts zurückzuführen sind, werden deshalb in der Folge vernachlässigt.

Depolarisation im Detektionsstrahlengang

Während man in der Anregung die Depolarisation des Lichts durch die Wahl einer geringeren Mikroskopapertur verhindern kann, macht man in der Detektion von der vollen numerischen Apertur Gebrauch. Die Reduktion der NA durch eine zusätzliche Blende im Detektionsstrahlengang will man bei der Detektion einzelner Moleküle vermeiden. Der Öffnungswinkel des Objektivs geht direkt in die Einsammeleffizienz aus Gleichung 2.21 ein. Je höher die numerische Apertur NA desto mehr Fluoreszenzsignal kann von einem einzelnen Molekül erhalten werden. Der Einsatz eines Mikroskopobjektivs hoher numerischer Apertur führt jedoch zur Depolarisation des detektierten Fluoreszenzlichts. Die Ursache dieser Depolarisation kann als Abbildungsphänomen betrachtet werden und spielt bei der polarisationssensitiven Detektion einzelner Moleküle eine große Rolle. Die Auswirkungen dieser Detektionscharakteristik sind im darauf folgenden Kapitel 3.4 dargestellt. Die erstmalige Ableitung

dieser Abbildungserscheinung geschah durch Axelrod [110]. Die Auswertung der polarisationssensitiven Experimente an einzelnen Molekülen in dieser Arbeit stützen sich jeweils auf genau dieses Phänomen, weshalb es hier, kurz zusammengefasst, dargestellt werden soll:

Die Abbildung eines Objekts der Objektebene in das Laborkoordinatensystem entspricht der Überführung des einen Koordinatensystems in das andere. Die eingesetzte Optik verknüpft beide Koordinatensysteme miteinander. Mathematisch gesehen kommt es dabei zu einer Achsentransformation. Diese überführt das Koordinatensystem der Objektebene \vec{x}^0 durch eine geeignete Rotationsmatrize in das Koordinatensystem \vec{x} des Mikroskops (Abbildung 3.6).

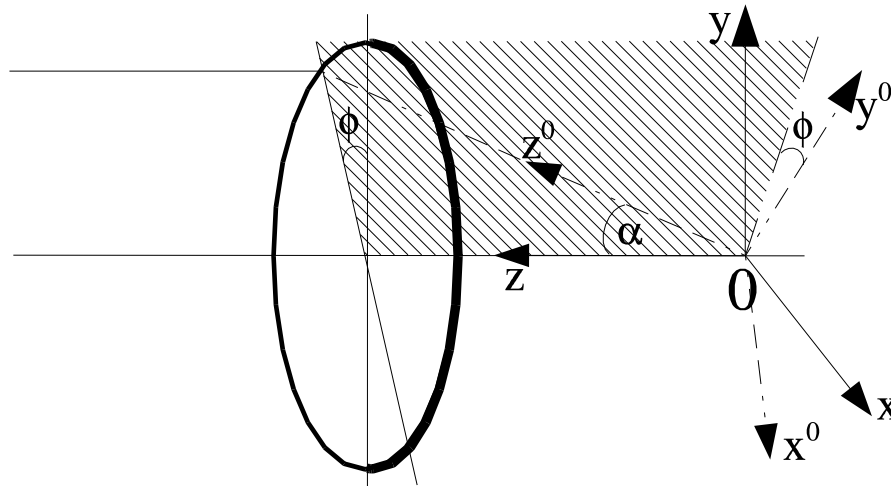


Abbildung 3.6: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Objektkoordinatensystem \vec{x}^0 (gestrichelte Linie) und Laborkoordinatensystem \vec{x} . Über den Winkel ϕ des Objektkoordinatensystem zur Meridionalebene und dem Öffnungswinkel des Objektivs α lassen sich beide Koordinatensysteme ineinander überführen.

Als abzubildendes Objekt wählt man einen emittierenden Dipol im Ursprung O, der in Richtung y^0 zeigt, d.h auch die emittierte Strahlung ist entlang dieser Richtung polarisiert. Die Strahlung des Dipols propagiert in Richtung des Objektivs entlang der z^0 -Achse. Diese Koordinaten sind so gewählt, dass die Abbildung den Dipol im Laborkoordinatensystem in Richtung y zeigen lässt. Die Ausbreitung erfolgt entlang z . Für die Abbildung des Dipols in das Laborkoordinatensystem kann man Polarkoordinaten definieren, die das Laborkoordinatensystem mit dem Koordinatensystem des Dipols (Objektkoordinatensystem) verknüpfen. Diese werden im Weiteren α und ϕ genannt. α ist dabei der Winkel zwischen der Ausbreitungsrichtung der Strahlung und der optischen Achse. Bei der Abbildung ist er deshalb durch

die numerische Apertur des Mikroskopobjektivs begrenzt (vgl. Abbildung 3.6). ϕ ist der Winkel zwischen der Polarisationsrichtung y^0 und der Meridionalebene. Wenn man annimmt, dass an den Grenzflächen nur wenig Brechung auftritt, dann ist der Winkel ϕ zwischen der Polarisationsrichtung und der Meridionalebene im Objekt- und im Laborkoordinatensystem identisch [111]. Das bedeutet, dass jede Strahlung mit der Richtung des elektrischen Feldvektors im Laborkoordinatensystem entlang y mit dem Winkel ϕ zur Meridionalebene diesen Winkel auch im Objektsystem besitzt. ϕ kann Winkel zwischen 0 und 2π annehmen. Mit beiden Winkeln lässt sich eine Rotationsmatrix aufstellen, die das Laborkoordinatensystem in das Objektkoordinatensystem überführt:

Die Rotation beginnt mit der Drehung des Laborkoordinatensystems um den Winkel ϕ um dessen z -Achse. Das so erhaltene Koordinatensystem wird um den Winkel $-\alpha$ um die neue x -Achse gedreht. Eine dritte Rotation um $-\phi$ um die aktuelle z -Achse führt die beiden Systeme endgültig ineinander über. Die einzelnen Teilschritte lassen sich in einer Gesamtrrotationsmatrix darstellen:

$$\begin{pmatrix} x^0 \\ y^0 \\ z^0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos^2 \phi + \sin^2 \phi \cos \alpha & & \\ -\cos \phi \sin \phi + \sin \phi \cos \alpha \cos \phi & & \\ \sin \phi \sin \alpha & & \\ -\cos \phi \sin \phi + \sin \phi \cos \alpha \cos \phi & -\sin \phi \sin \alpha & \\ \sin^2 \phi + \cos^2 \phi \cos \alpha & -\cos \phi \sin \alpha & \\ \cos \phi \sin \alpha & \cos \alpha & \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (3.29)$$

Bei der polarisationssensitiven Detektion des Fluoreszenzlichts sind die beiden Signalintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} von Interesse. Diese sind proportional zur Projektion des Dipols auf die Objektebene. Die Projektion entspricht dem Quadrat der vektoriellen Komponenten x^0 und y^0 des Dipols. Integriert man über den eingesammelten Raumwinkel α_{\max} , kann man dafür schreiben:

$$I_{\parallel, \perp} \propto \int_{\alpha=0}^{\alpha_{\max}} \int_{\phi=0}^{2\pi} (x^0, y^0)^2 \sin \alpha d\phi d\alpha \quad (3.30)$$

Führt man die Integration durch, dann erhält man die Signalintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} des detektierten Fluoreszenzlichts in Abhängigkeit von der Orientierung des Dipols:

$$I_{\parallel} \propto (k_1 x^2 + k_2 y^2 + k_3 z^2) \quad (3.31)$$

$$I_{\perp} \propto (k_2 x^2 + k_1 y^2 + k_3 z^2) \quad (3.32)$$

mit

$$k_1 = \frac{1}{4}\pi(5 - 3 \cos \alpha_{\max} - \cos^2 \alpha_{\max} - \cos^3 \alpha_{\max})$$

$$k_2 = \frac{1}{12}\pi(1 - 3 \cos \alpha_{\max} + 3 \cos^2 \alpha_{\max} - 3 \cos^3 \alpha_{\max})$$

$$k_3 = \frac{1}{3}\pi(2 - 3 \cos \alpha_{\max} + \cos^3 \alpha_{\max})$$

Ha et al. [91] normierte diese Ausdrücke entsprechend, so dass bei $\alpha_{\max} = \pi$ die Summe aus parallel und senkrecht polarisierter Signalintensität dem integralen Fluoreszenzsignal entspricht:

$$I_{\parallel} + I_{\perp} = I_{\text{total}}(x^2 + y^2 + z^2) = I_{\text{total}}$$

für

$$k_1 = \frac{3}{32}(5 - 3 \cos \alpha_{\max} - \cos^2 \alpha_{\max} - \cos^3 \alpha_{\max})$$

$$k_2 = \frac{1}{32}(1 - 3 \cos \alpha_{\max} + 3 \cos^2 \alpha_{\max} - \cos^3 \alpha_{\max}) \quad (3.33)$$

$$k_3 = \frac{1}{8}(2 - 3 \cos \alpha_{\max} + \cos^3 \alpha_{\max})$$

Die derart normierten Gleichungen werden in dieser Arbeit verwendet. Für ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von $NA = 1,2$ und einem Brechungsindex von $n_D = 1,333$ erhält man $k_1 = 0,3208$, $k_2 = 0,0056$ und $k_3 = 0,097$. Diese Korrekturparameter gingen in dieser Form in die polarisationssensitiven Messungen ein.

Man kennt nun den Zusammenhang zwischen der Orientierung des Dipols und den detektierten Signalintensitäten. Die Lage des Koordinatensystems ist auf diese Weise jedoch weiterhin nicht zugänglich. Wie im nächsten Kapitel gezeigt wird, kann man dessen Lage jedoch vermessen und mit experimentell zugänglichen Parametern in Beziehung setzen.

3.4 Apparative Charakteristik am Beispiel Terrylen - Definition des Laborkoordinatensystems

Bei der polarisationsselektiven Anregung einzelner Moleküle befindet sich im Anregungsstrahlengang ein elektrooptischer Modulator (EOM) über dessen Betriebsspannung man die Polarisation des Anregungslichts ändern kann. Diese Betriebsspannung ist der einzige Parameter, um das detektierte Fluoreszenzsignal mit der Orientierung des Übergangsdipolmoments in Zusammenhang zu bringen. Wie dies geschieht wird hier für ein Molekül gezeigt, dessen Übergangsdipolmoment der Absorption parallel zum Übergangsdipolmoment der Emission ist. Diese Übereinstimmung ist notwendig, da dann die Polarisation des Anregungslichts identisch mit der Polarisation des

Emissionslichts ist und die Interpretation der Daten somit erleichtert wird. In den hier vorgestellten Experimenten kam Terrylen in PMMA als Matrix zum Einsatz. Bei Terrylen handelt es sich dabei um einen planaren Kohlenwasserstoff der, wie in Abschnitt 3.2 dargestellt wurde, diese Forderung erfüllt. Der experimentelle Aufbau für diese Untersuchungen wird erst in Kapitel 4 besprochen.

Zur Lokalisierung einzelner Moleküle wird mit beliebiger Anregungspolarisation ein Bild des Probenausschnitts aufgenommen (siehe Abbildung 3.7). Mit dem Piezoscanner kann ein einzelnes Molekül genau in den Laserfokus gebracht werden. Mit einer Spannungsrampe am EOM und einer nachfolgenden $\lambda/4$ -Platte wird die Polarisation des Anregungslichts schrittweise von 0 bis π gedreht. Während dieser Polarisationsdrehung wird die integrale Signalintensität detektiert. Sie folgt der im Kapitel 3.2 beschriebenen \cos^2 -Abhängigkeit (siehe Abbildung 3.1). Aus dem Signalmaximum des Fluoreszenzsignals lässt sich die EOM-Spannung bestimmen, bei der die Polarisation der Anregung parallel zur Projektion des Übergangsdipolmoments auf die Fokusebene ist.

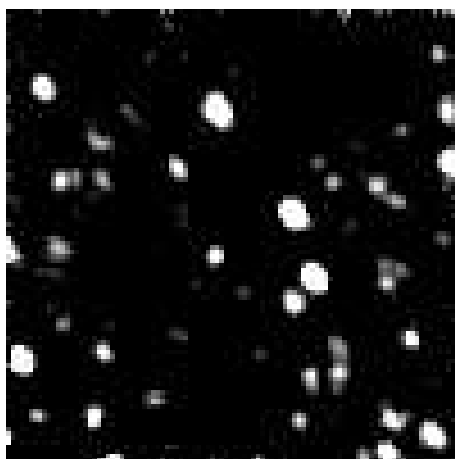


Abbildung 3.7: Konfokales Fluoreszenzbild einzelner Terrylen Moleküle in PMMA. Die hellen Flecken entsprechen der Fluoreszenzintensität. Je nach Lage des Übergangsdipolmoments zum elektrischen Feldvektor der Anregung erfolgt die Anregung mehr oder weniger gut. $\lambda_{exc} = 568$ nm, Integrationszeit $t = 10$ ms, $P = 10$ μ W, Probenausschnitt 10 μ m \times 10 μ m.

Für diese EOM-Spannung erfolgt die Anregung des Moleküls. Die Polarisation der Anregung ist nun also parallel zur Projektion des Übergangsdipolmoments. Die Fluoreszenzintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} werden separat detektiert. Man erhält zwei Fluoreszenzzeitspuren, die den Intensitätsverlauf der Fluoreszenz, getrennt in die beiden Polarisationskomponenten enthalten. Für beide Polarisationsrichtungen erfolgt eine zeitliche Mittelung über die Fluoreszenzintensitäten. Es wird das Verhältnis

$V = \bar{I}_{\parallel}/\bar{I}_{\perp}$ der beiden mittleren Signalintensitäten gehen die EOM-Spannung aufgetragen. Aus den Gleichungen 3.31 und 3.32 ist ersichtlich, dass je nach Lage des Übergangsdipolmoments das Verhältnis der Signalintensitäten folgender Bedingung folgt:

$$\begin{aligned} V &= \frac{\bar{I}_{\parallel}}{\bar{I}_{\perp}} = \frac{k_1 x^2 + k_2 y^2 + k_3 z^2}{k_2 x^2 + k_2 y^2 + k_3 z^2} = \\ &= \frac{k_1(\sin^2 \phi \sin^2 \theta) + k_2(\cos^2 \phi \sin^2 \theta) + k_3(\cos^2 \theta)}{k_2(\sin^2 \phi \sin^2 \theta) + k_1(\cos^2 \phi \sin^2 \theta) + k_3(\cos^2 \theta)} \end{aligned} \quad (3.34)$$

Der Winkel ϕ entspricht dabei dem Azimutalwinkel und der Winkel θ der Polhöhe des Übergangsdipolmoments im Laborkoordinatensystem. Abbildung 3.8 zeigt den Verlauf des Polarisationsverhältnisses V in Abhängigkeit des Azimutalwinkels ϕ für verschiedene Polhöhen θ . Für den Fall kleiner numerischer Apertur in der Detek-

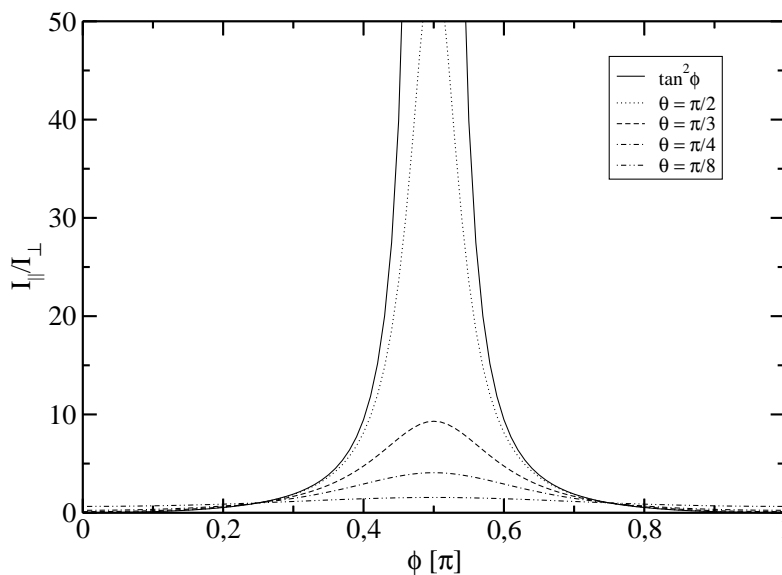


Abbildung 3.8: Polarisationsverhältnis $V = I_{\parallel}/I_{\perp}$ nach Gleichung 3.34 für verschiedene Polhöhen θ und Azimutalwinkel ϕ . Unabhängig von der Polhöhe θ besitzen alle Funktionen ihr globales Maximum bei $\phi = \frac{\pi}{2}$ und den Funktionswert 1 bei $\frac{\pi}{4}$ und $\frac{3}{4}\pi$.

tion oder falls Moleküle ausschließlich in der xy -Ebene ($\theta = 90^\circ$) liegen, kann mit den Darstellungen aus Abschnitt 3.3.4 gezeigt werden, dass Depolarisationseffekte kaum auftreten. Gleichung 3.34 lässt sich deshalb vereinfachen. Vernachlässigt man den sehr kleinen Beitrag des Parameters $k_2 = 0,0056$ dann erhält man für

die Intensitäten die bekannte Proportionalität, die lediglich von der Projektion des Übergangsdipolmoments auf die Detektionsebene abhängig ist:

$$V = \frac{\bar{I}_{\parallel}}{\bar{I}_{\perp}} = \frac{\sin^2 \phi}{\cos^2 \phi} = \tan^2 \phi \quad (3.35)$$

Diese vereinfachte Gleichung stellt in Abbildung 3.8 die Einhüllende aller möglichen Polarisationsverhältnisse im Bereich $[\frac{\pi}{4}, \frac{3\pi}{4}]$ dar.

Die Einschränkung, dass sich das Übergangsdipolmoment nur in der Ebene befinden darf, ist nur bei entsprechend präparierten Proben gegeben. Für das System Terrylen/PMMA kann dies nicht angenommen werden. Der Einsatz von Mikroskopobjektive mit hoher numerischer Apertur bringt deshalb die Depolarisationserscheinungen zum Vorschein, die in Kapitel 3.3.4 vorgestellt sind. Entsprechend ist in Abhängigkeit vom Azimutalwinkel ϕ kein einfaches \tan^2 -Verhalten für das Verhältnis $\bar{I}_{\parallel}/\bar{I}_{\perp}$ zu erwarten. Dies ist in Abbildung 3.9 ersichtlich. Es zeigt sich, dass Terrylen Moleküle in PMMA wie erwartet isotrop auf der Probe verteilt sind. Im Bereich $\phi = \frac{\pi}{2}$ finden sich Polarisationsverhältnisse, die man nach Abbildung 3.8 für eine Polhöhe $\theta = \frac{\pi}{3}$ erwartet.

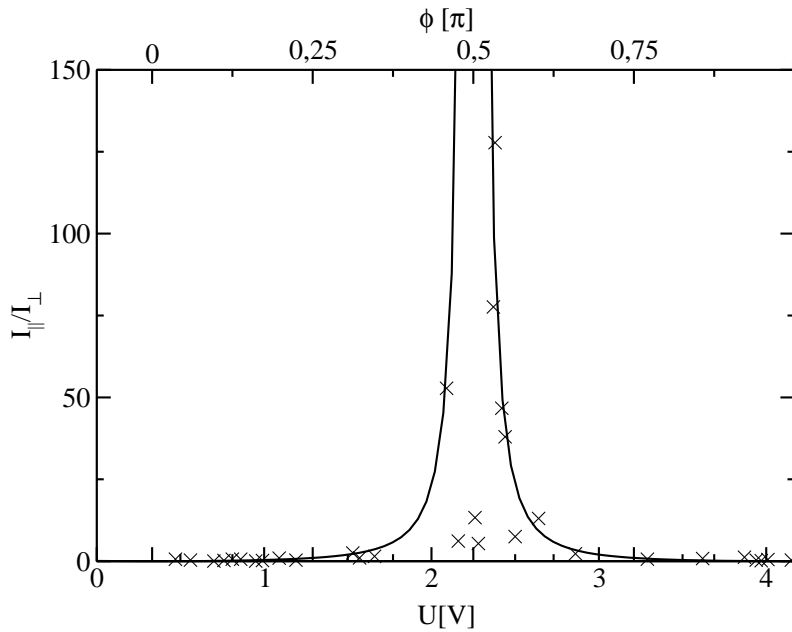


Abbildung 3.9: Verhältnisse der beiden Polarisationskanäle für verschiedene Terrylenmoleküle. Der \tan^2 -Fit bildet die Spannungsrampe des elektrooptischen Modulators auf den Azimutalwinkel ϕ ab (obere Achsenbeschriftung)

Unabhängig davon besitzen alle Funktionen aus Abbildung 3.8 im Bereich $[0, \pi]$ drei ausgezeichnete Punkte. Eine Singularität bzw. ein Maximum bei $\frac{\pi}{2}$ und den Funktionswert 1 bei $\frac{\pi}{4}$ und $\frac{3}{4}\pi$. Um, wie eingangs erwähnt, der Spannung des EOM einen Azimutalwinkel ϕ zuordnen zu können, wurde an die maximalen Funktionswerte im Bereich $[\frac{\pi}{4}, \frac{3}{4}\pi]$ die \tan^2 -Einhüllende angepasst. Die drei Fixpunkte die durch die Kurvenanpassung erhalten werden sind auch für alle Funktionen gültig deren Polhöhe $\theta \neq \frac{\pi}{2}$ ist. Durch die angepasste \tan^2 -Funktion erhält man direkt die Zuordnung der EOM-Spannung zum Winkel ϕ und hat damit die experimentell zugängliche Betriebsspannung des EOM mit der Projektion des Übergangsdipolmoments verknüpft. Für Moleküle deren Polarisationsverhältnis I_{\parallel}/I_{\perp} sich nicht auf der einhüllenden \tan^2 -Funktion befindet kann man durch Wahl der passenden Polhöhe θ auch diese Polarkoordinate ermitteln. Es muss lediglich ein θ -Wert gefunden werden, der das experimentell gemessene Polarisationsverhältnis widerspiegelt. Nur im Bereich um die ausgezeichneten Werte $\frac{\pi}{4}$ und $\frac{3}{4}\pi$ ist dies nicht möglich, denn dort besitzen alle Funktionswerte, unabhängig von der Polhöhe den Wert 1. Auch wenn sich die Funktionswerte Intervall $[0, \frac{\pi}{4}]$, sowie im Intervall $[\frac{3}{4}\pi, \pi]$ scheinbar kaum unterscheiden, so kann auch in diesem Bereich eine Polhöhe θ ermitteln. Dies geschieht indem man statt V den reziproken Wert V^{-1} aufträgt.

Kapitel 4

Experimentelle Durchführung

Die hier beschriebenen, experimentellen Aufbauten sind für eine Vielzahl unterschiedlicher Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben werden, verwendet worden. Die Abkürzungen im Text beziehen sich für die Einzelmolekülexperimente stets auf Abbildung 4.2, für die zeitaufgelösten Untersuchungen auf Abbildung 4.4. Finden sich bei den verwendeten Komponenten, speziell bei den eingesetzten Filtern, keine Herstellerangaben, dann sind diese bei den entsprechenden Experimenten in Kapitel 5 erwähnt.

4.1 Einzelmolekülspektroskopie bei Raumtemperatur

4.1.1 Lasersysteme

Als Anregungslichtquellen wurden für alle Experimente kommerzielle Lasersysteme verwendet. Ein Ar^+ -Ionen (*Coherent Sabre*, 15/3 R) diente als Pumplaser für einen mit Rhodamin 6G (*Lambda Physics*, LC 5900) betriebenen Farbstofflaser (*Coherent*, 699-21). Das Lasersystem ist auf einem aktiv gedämpften, optischen Tisch (*Newport*) montiert. Dies ermöglicht den störungsfreien Betrieb des Farbstofflasers. Für die Zweifarbenanregung kam ein weiterer Ar^+ -Ionenlaser (*Coherent*, Innova 90-6) zum Einsatz. Dieser befand sich auf einem weiteren optischen Tisch (*Melles Griot*), auf dem sich auch das Mikroskop und der Großteil der eingesetzten, optischen Komponenten befand. Der große Platzbedarf zweier Lasersysteme machte diese Aufteilung notwendig.

Argonionenlaser Der Sabre 15/3 R diente als Pumplaser für den nachgeschalteten Farbstofflaser, welcher weiter unten beschrieben wird. Er wurde bei 6 W im "Single-Line-Mode" betrieben. Seine Laserlinie bei 514,5 nm ist geeignet, den gewählten Farbstoff Rhodamin 6G optimal anzuregen. Der Sabre besitzt zwei interne Feedback-Schleifen zur Regulierung der Ausgangsleistung und Minimierung des Röhrenstroms. Die Option "PowerTrack" dient der automatischen Optimierung der Kavitätsjustage auf Ausgangsleistung, während die Option "Light Regulation" garantiert, dass die voreingestellte Ausgangsleistung stets durch Nachregelung des Röhrenstroms konstant gehalten wird. Beide Optionen sind für den optimalen, langzeitstabilen Betrieb des Lasers notwendig und wurden eingesetzt. Die verwendete 514 nm-Linie des Sabre 15/3 R hätte aus spektraler Sicht auch für das weiter unten beschriebene Experiment der simultanen Anregung mit zwei Anregungswellenlängen Verwendung finden können. Für dieses Experiment wurde versucht mit einem Glassubstrat ca. 4% der Pumpleistung auszukoppeln und es als zweite Anregungswellenlänge zu verwenden. Die mechanische Instabilität des Glassubstrats, bedingt durch den thermischen Einfluss der hohen Laserleistungen, machte aber keinen stabilen Betrieb des Farbstofflasersystems möglich. Zusätzlich verhinderte dies eine langzeitstabile Einkopplung in eine Glasfaser zur räumlichen Überlagerung beider Anregungslinien. Für die Zweifarbenanregungsexperimente kam deshalb ein zusätzlicher Ar^+ -Laser zum Einsatz. Er wurde ebenfalls im "Single-Line-Mode" betrieben. Diese zusätzliche Flexibilität bei der Wahl der Anregungswellenlänge erlaubte eine spektral besser angepasste Anregung bei 496 nm.

Farbstofflaser Das verwendete Farbstofflasersystem bietet die Option für den schmalbandigen, frequenzstabilisierten Betrieb. Sowohl für die hier vorgestellten Untersuchungen bei tiefen Temperaturen, als auch für die Untersuchungen bei Raumtemperatur war dies nicht notwendig. Als wellenlängenselektierende Elemente besitzt der Farbstofflaser in seiner Grundausstattung ein dünnes und ein dickes Etalon. Beide sind in einer Einheit, der so genannten ICA (Intercavity Assembly), zusammengefasst. Zum frequenzstabilisierten Betrieb besitzt er einen Referenzresonator. Die mitgelieferte Elektronik regelt eine drehbare, planparallele Platte (Scanning Brewster Plate), einen piezogetriebenen Resonatorspiegel (Tweeter) und die beiden Etalons. Die Anordnung erlaubt das Durchstimmen der Frequenz in einem 30 GHz großen Bereich, sowie die Stabilisierung der Frequenz mit einer Linienbreite um 1 MHz. Diese Elemente wurden aus dem verwendeten Lasersystem entfernt. Dies ermöglichte eine einfacher Handhabung des Lasers und bedingte gleichzeitig eine spektrale Verbreiterung des Anregungslichts. Abbildung 4.1 zeigt die Änderungen die im Vergleich zur Grundausstattung am Farbstofflaser vorgenommen wurden. In der in dieser Arbeit verwendeten Konfiguration werden, wie in der Dissertation von

Stefan Mais beschrieben, im Intervall von 2 GHz mehrere Moden verstärkt [76]. Eine detaillierte Beschreibung der Funktionsweise der einzelnen Elemente findet sich ebenfalls in dieser Arbeit. In den hier vorgestellten Untersuchungen bot der Ein-

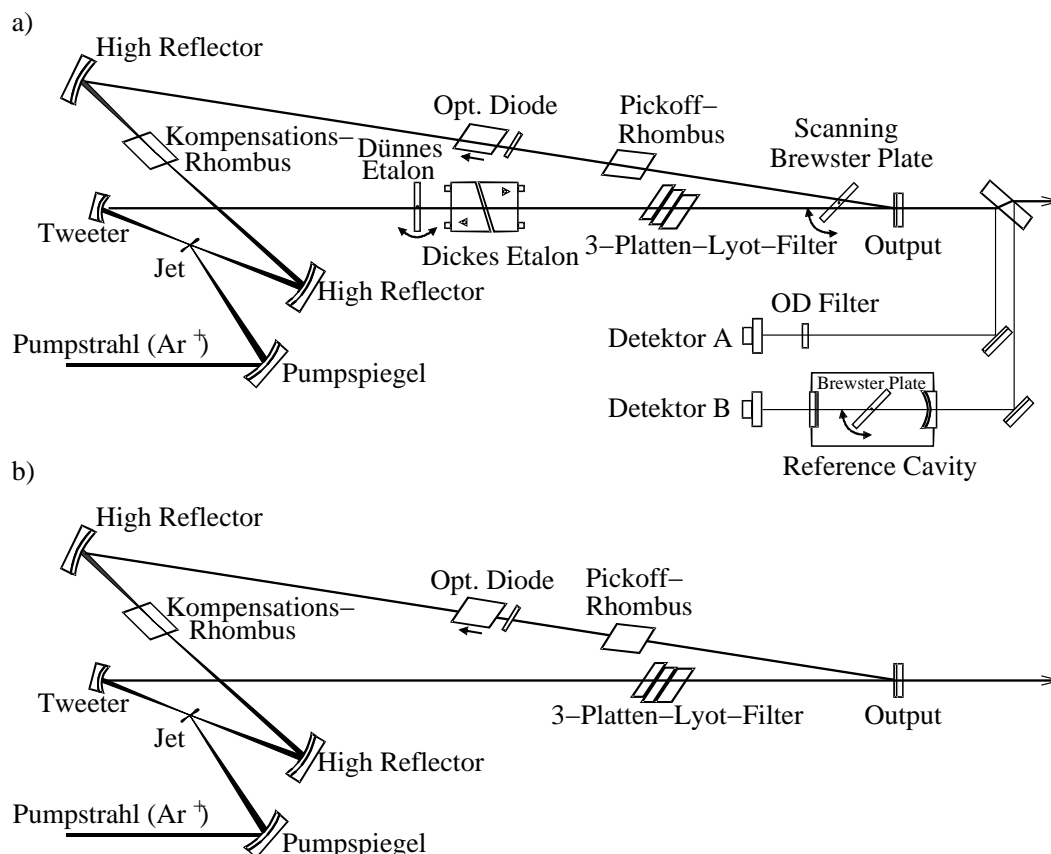


Abbildung 4.1: a) Frequenzstabilisierter, schmalbandiger Farbstofflaser mit allen aktiv regelnden Elementen im Resonator. b) Modifizierter Farbstofflaser. Nur der Tweeter ist als aktiv regelndes Element weiterhin vorhanden, jedoch nicht an die Elektronik angeschlossen. (modifizierte Zeichnung aus [112]).

satz des Farbstofflasers den Vorteil, die Anregungswellenlänge variabel wählen zu können. Der eingesetzte Farbstoff konnte den Spektralbereich von 560 nm - 620 nm durch Verstellen eines doppelbrechenden Kristalls (Lyot-Filter) ohne Strahlversatz abdecken.

4.1.2 Anregungsstrahlengang

Das Anregungslicht aus dem Farbstofflaser wird an einem 70/30 Strahlteiler BS1 geteilt. Die reflektierten 30% dienen zur externen Kontrolle der Wellenlänge mit einem Spektrometer WM (*Burleigh*, WA 10). Die restlichen 70% transmittieren den

Strahlteiler und werden in eine polarisationserhaltende Glasfaser GF (*Atos York*, HB 450) eingekoppelt. Sie stellt einen Filter zur Unterdrückung von räumlichen Schwankungen dar. Der ausgekoppelte Laserstrahl ist räumlich stabil und stellt die konfokale Lichtquelle dar, wie sie unter Kapitel 2.2.2 eingeführt wurde. Das Licht wird an einem Keilabschwächer AT1 (*Newport*, M-925B) auf die gewünschte Leistung gebracht. Ein Laserstabilisator ST (*Cambridge Research*, LS 100) dient der Amplitudenstabilisierung. Er kann Intensitätsschwankungen mit einer Frequenz von bis zu 300 kHz durch die Rückkopplung mit einer Photodiode mit einem elektrooptischen Modulator nachregeln. Der Einsatz dieser Amplitudenstabilisierung ist nach der Faser notwendig, weil die Enden der Glasfaser nicht die nötige mechanische Stabilität aufweisen, um stets die selbe Laserleistung ein- bzw. auszukoppeln. Der elektronische Shutter S1 (*Newport*, 846HP) erlaubt das computergesteuerte Zu- und Abschalten des Strahls. Der Bandpassfilter F1 (*Coherent Ealing*, 42-7328, 568,2/10) blockiert die roten Anteile des Anregungslichts.

Zur kontinuierlichen Polarisationsdrehung passiert das Anregungslicht eine von Stefan Mais und Gregor Jung entwickelte Anordnung aus elektrooptischem Modulator EOM (*Gsänger*, LM 0202) und der $\lambda/4$ -Platte WP1. Mit einem Verstärker (*Piezomechanik Pickelmann*, SQV1/500; $\times 100$; 0-500 V; für kapazitive Lasten) wird dabei eine Spannung zwischen 0 V-500 V an den doppelbrechenden Kristall des EOMs angelegt, der je nach Spannung für eine Phasenverschiebung der Polarisationsanteile des Eingangslichts sorgt. Zusammen mit der $\lambda/4$ -Platte kann die resultierende Gesamtpolarisation, Werte zwischen 0° und 180° annehmen. Eine detaillierte Beschreibung zur Funktionsweise findet sich in der Dissertation von Stefan Mais [76]. Zum kontinuierlichen Durchdrehen der Polarisation wird an den Kristall eine Spannungsrampe angelegt. Entsprechend der Verstärkung kann das Eingangssignal der Verstärkers einen Spannungswert zwischen 0-5 V annehmen. Diese Spannungsrampe wird mit einem Frequenzgenerator (*Wavetek*, Mod. 22) erzeugt.

Für die Steuerung des Experiments mit dem Computer wurde in unserer Elektronikwerkstatt ein Rampengenerator RG gebaut. Über zwei hexadezimale Schalter kann der Rampenstartwert U_0 festgelegt werden. Die Grobverstellung erlaubt dabei den Offset U_0 im Bereich 0 mV bis 300 mV um jeweils 20 mV zu verändern. Die Feinverstellung deckt den Bereich von 0 mV bis 4800 mV in Schritten von 320 mV ab. Beide Schalter wirken additiv. Die Kombination beider Schalter deckt den gesamten Bereich von 0 V - 5 V in 20 mV Schritten ab. Über ein Potentiometer und einen Schalter kann man die Frequenz der Rampe von 0,1 Hz - 10 Hz regeln. Ein Ausgang liefert ein der Frequenz proportionales Spannungssignal. Zur Steuerung des Rampengenerators stehen zwei digitale Eingangsleitungen zur Verfügung. Über die Signalkombinationen 00, 01, 10 und 11 (TTL-Signalpegel) kann der Rampengenera-

tor angehalten, die Spannungsrampe vorwärts oder rückwärts gefahren bzw. auf den Spannungsstartwert U_0 zurückgesetzt werden. Der Schaltplan des für diesen Zweck entworfenen Rampengenerators findet sich im Anhang (siehe Abbildung C.1).

Das Anregungslicht gewünschter Polarisation wird nach Transmission eines weiteren Strahlteilers BS3 (siehe unten) durch einen dichroitischen Strahlteiler BS4 in das Mikroskop (*Nikon*, TE 300) eingekoppelt. Ein Mikroskopobjektiv MO hoher numerischer Apertur (*Nikon*, NA=1,2, Plan Apochromat, Wasserimmersion 60x) fokussiert den Laserstrahl auf die Probe. Mit einem piezobetriebenen xy-Scanner (*Physik Instrumente*, P-731) kann die Probe verfahren werden.

Für die simultane Anregung eines Moleküls mit zwei Anregungswellenlängen stand ein weiterer Ar^+ -Laser bereit. Dieser wird an einem dichroitischen Strahlteiler BS6 (*Chroma*) reflektiert. Längerwellige Plasmalinen des Lasers werden von diesem Strahlteiler transmittiert und so abgetrennt. Der reflektierte Strahl ist anschließend frei von roten Anteilen der Plasmaröhre. Diese wären im Detektionsstrahlengang nicht abzutrennen gewesen, weil sich das detektierte Fluoreszenzlicht im gleichen Wellenlängenbereich befindet. Diese vorherige Abtrennung der Plasmalinen des Ar^+ -Lasers führt zu einer deutlichen Reduzierung des Untergrundsignals. Die $\lambda/4$ -Platte WP2 sorgt für eine zirkulare Polarisation dieses Anregungslichts. Eine langbrennweitige Linse L1 ($f=8000$ mm) bedingt eine geringe Konvergenz des Laserstrahls. Sie wurde so gewählt, dass am Probenort, im Fokus der ersten Anregungswellenlänge, der Anregungsstrahl des Ar^+ -Lasers ca. den doppelten Durchmesser des Fokus aufweist. Dies erleichtert das räumliche Überlagern beider Anregungsquellen. Ein elektronischer Shutter S2 (*Newport*, 846HP) ermöglicht das Zu- und Abschalten der zweiten Anregungsfarbe. Ein ND-Filterrad AT2 erlaubt die stufenlose Einstellung der Anregungsintensität. Über den dichroitischen Strahlteiler BS3 (*Chroma*, Q 535 LP) wird der Laser in den restlichen Strahlengang eingekoppelt.

4.1.3 Detektionsstrahlengang

Das erzeugte Fluoreszenz- und Streulicht wird über das oben beschriebene Mikroskopobjektiv eingesammelt und durch den Strahlteiler BS4 transmittiert. Die Tubulinse L2 des Mikroskops fokussiert auf die konfokale Lochblende P ($100 \mu\text{m}$). Transmittiertes Licht wird anschließend durch die Linse L3 ($f=100$ mm) kollimiert. Obwohl bereits der Strahlteiler BS4 individuell so angepasst wurde, dass das Anregungslicht reflektiert wird, ist die zusätzliche spektrale Filterung über einen weiteren Filter F2 essentiell. In Abhängigkeit vom gewählten Experiment kommt dabei ein Notchfilter, ein Bandpassfilter oder ein Farbglassfilter zum Einsatz. Der Strahlteiler BS5 ermöglicht die Auftrennung des Fluoreszenzsignals nach spektralen oder

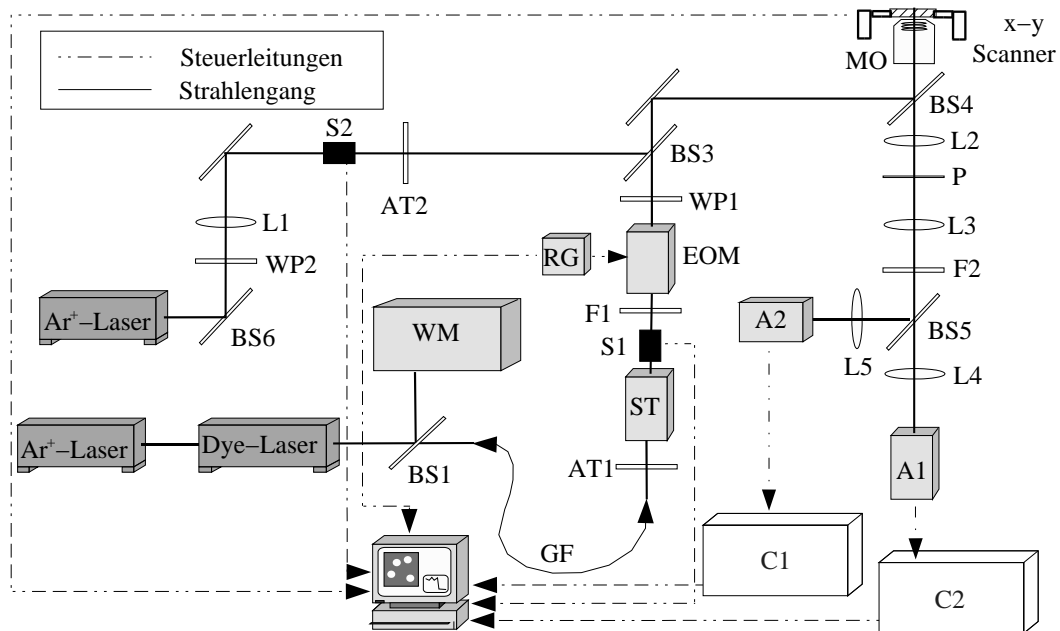


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Raumtemperaturexperiments. (Abkürzungen: AT1 & AT2 Abschwächer, BS1-BS6 div. Strahlteiler (siehe Text), C1 & C2 D/A-Wandler, EOM Elektrooptischer Modulator, F1 & F2 div. Filter, GF Glasfaser, L1-L5 Linse, P Lochblende, RG Rampengenerator, S1 & S2 elektronische Shutter, ST Stabilisator, WP1 & WP2 $\lambda/4$ -Platte, WM Spektrometer.

Polarisations-Eigenschaften. Die Linsen L4 und L5 (jeweils $f=100$ mm) fokussieren anschließend auf zwei Avalanche Photodioden (*EG&G*, SPCM-AQR-16). Diese geben ihr digitales Signal an zwei Photonenzählssysteme C1 und C2 (*Stanford Research*, SR400) weiter. Diese summieren die digitalen Signale und stellen sie als analoges Signal einer Computerkarte (*National Instruments*, AT-MIO 16XE-10) zu weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

4.2 Einzelmolekülexperimente bei tiefen Temperaturen

Die räumliche Isolierung einzelner Moleküle findet seit kurzem auch für die Untersuchung bei tiefen Temperaturen Anwendung. Ein entsprechendes Experiment wurde in unserem Arbeitskreis aufgebaut [76, 113]. Für die konfokale Mikroskopie bei tiefen Temperaturen wird für die räumliche Rasterung der Probe meist das Scannen des Laserstrahls auf der Probe eingesetzt. Zuverlässige, piezogetriebene Probenrasterung bei tiefen Temperaturen mit einer Scanrange von $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ in einem Bereich von

6 mm \times 6 mm ist erst seit kurzem möglich [114]. Die Aufnahme konfokaler Fluoreszenzbilder erfolgte deshalb auch in dieser Arbeit mit einer Spiegelscan-Vorrichtung (*General Scanning*, M2). Für die Untersuchung von Proben bei tiefen Temperaturen stand ein Kryostat der Firma *Janis Research* (SVT-200-4) bereit. Weil der für hohe numerische Aperturen nötige Arbeitsabstand von Mikroskopobjektiven sehr klein ist, musste das zur Anregung und Detektion benötigte Mikroskopobjektiv im Kryostaten platziert werden. Neben chromatischer Korrektur und hoher numerischer Apertur ist die primäre Forderung für die Untersuchung von einzelnen Molekülen bei tiefen Temperatur, dass die im Objektiv eingesetzten Linsen nicht, wie üblicherweise praktiziert, verklebt sind. Standardobjektive der Firma *Melles Griot* erfüllten diese Forderung, trotz ursprünglicher Zusage, nicht. Es zeigte sich nach 3-4 Abkühlzyklen der getesteten Objektive (60x, NA=0,85) eine starke Abnahme des detektierten Signals. Die Transmission des Objektivs nahm um 30% ab. Ein konfokales Bild (vgl. Abbildung 4.3) des Zwischenraums zwischen den Linsen des Mikroskopobjektivs zeigte rissartige Veränderungen. Vorhandener Kleber zwischen den Linsen bewirkte eine drastische Verschlechterung der optischen Eigenschaften des Objektivs, die eine Detektion einzelner Moleküle verhinderte.

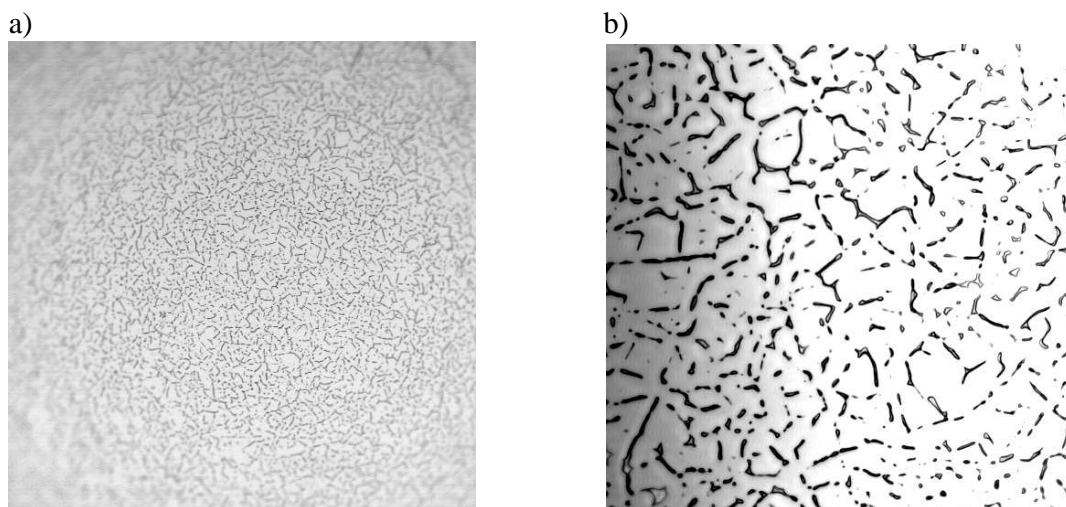


Abbildung 4.3: Konfokales Bild zwischen den Linsen eines Mikroskopobjektivs nach Abkühlen auf 1.4 K. Der Kleber zwischen den Linsen zeigt Risse. Dieses Bild wurde von Christian Seebacher mit einem kommerziellen konfokalen Mikroskop der Firma *Zeiss* (LSM 410) aufgenommen. a) 1280 μm \times 1280 μm . b) 320 μm \times 320 μm .

Als Alternativen zum kommerziellen Mikroskopobjektiv kommt der Einsatz einer einzelnen Linse [50] oder eine Spezialanfertigung in Frage. Während eine einzelne Linse wegen ihrer geringen numerischen Apertur nur für sehr gute Fluoreszenzfarbstoffe geeignet ist, ist die Spezialanfertigung eines Mikroskopobjektivs mit hoher

numerischer Apertur und Korrektur von chromatischen Aberrationen wünschenswert. Diese Spezialanfertigung ist inzwischen bestellt und steht in Kürze dem Arbeitskreis für detaillierte Einzelmoleküluntersuchungen bei tiefen Temperaturen an biologischen Proben zur Verfügung.

4.3 Automatisierte Steuerung der Einzelmolekülexperimente

Die Ansteuerung des Raum- und des Tieftemperaturperiments erfolgte durch einen Computer mit einer Einsteckkarte zur Datenerfassung und Steuerung (*National Instruments*, AT-MIO 16XE-10). Die Steuersoftware wurde in *Labview*[®] implementiert. Eine ältere Version dieses Programms zum Scannen von konfokalen Bildern und zur Aufnahme von Fluoreszenzzeitspuren wurde bereits früher vorgestellt [76, 113]. Für die in dieser Arbeit angestellten Untersuchung musste das Steuerprogramm entsprechend erweitert werden. Die eingesetzte Computerkarte besitzt zur analogen Steuerung von externen Geräten lediglich zwei analoge Ausgänge hoher Genauigkeit (0-10 V; 16 Bit). Diese dienen zur genauen Ansteuerung der Spiegel des konfokalen Tieftemperaturmikroskops oder zur Ansteuerung des Scannertischs für die Probenrasterung bei Raumtemperatur. Zwei analoge Eingänge dienen zur Aufzeichnung des zur Fluoreszenzzählrate proportionalen Spannungssignals. Die Ansteuerung weiterer Geräte erfolgt über die acht digitalen Ein- und Ausgabeleitungen. Für die polarisationssensitiven Experimente in der Anregung dienen zwei digitale Leitungen zur Ansteuerung des Rampengenerators RG. Über zwei weitere digitale Steuerleitungen werden die Shutter im Anregungsstrahlengang kontrolliert. Sie stellen sicher, dass die Probe nur bei der Aufnahme von Daten beleuchtet wird. Bei der synchronen Anregung einzelner Moleküle mit zwei Anregungswellenlängen ist durch die automatisierte Shuttersteuerung eine getrennt steuerbare Beleuchtung des Systems möglich.

4.4 Zeitaufgelöste optische Spektroskopie

4.4.1 Lasersystem

Ein frequenzverdoppelter, mit einem Diodenarray gepumpter Nd:YVO₄-Festkörperlaser (*Spectra Physics*, Millennia X) diente als Pumplichtquelle für einen Ti:Saphir-Oszillator TiSa (*Spectra Physics*, Tsunami 3960). Der Ti:Saphir-Oszillator stellt

den Spektralbereich von 700 - 1100 nm mit einer Repetitionsrate von 82 MHz zur Verfügung. Ein nachgeschalteter optisch-parametrischer Oszillator Opal (*Spectra Physics*, OPAL) erzeugt über einen LBO-Kristall eine durchstimmbare Signalwellenlänge von 1100 - 1600 nm. Aus diesem IR-Licht kann mit einem Frequenzverdoppler Strahlung im Wellenlängenbereich von 550 - 800 nm erzeugt werden. Das Lasersystem befand sich auf einem aktiv gedämpften Lasertisch (*Melles Griot*). Eine detaillierte Beschreibung des kommerziellen Lasersystems findet sich in den Dissertationen von Robert Baumann [115] und Jens-Peter Rau [116].

4.4.2 Anregungsstrahlengang

Über zwei gekreuzte Polarisatoren P1 und P2 konnte die Intensität des Anregungslichts eingestellt werden. Die Anregungsintensität wurde so gewählt, dass pro Anregungspuls immer nur ein Fluoreszenzphoton den Detektor erreichte. Auf die üblicherweise gewählte "Magic-Angle-Geometrie" wurde wegen des sehr kleinen zu erwartenden Fehlers verzichtet (siehe 3.3.3). Das Anregungslicht wird im Anschluss über eine Linse L1 auf die Probe S fokussiert.

4.4.3 Detektionsstrahlengang

Ein Mikroskopobjektiv MO (*Melles Griot*, NA=0,12, 4x) sammelt die Fluoreszenz ein und bildet sie auf den Eintrittsspalt eines Monochromators MC (*Jobin Yvon*, HD10-D-VIS) ab. Mit dem Monochromator wird das Fluoreszenzsignal vom Anregungslicht abgetrennt. Zusätzlich ist so die wellenlängenselektive Detektion des Fluoreszenzzerfalls möglich. Das transmittierte Signal wird im Anschluss von einem wassergekühlten Mircochannel-Plate Photomultiplier MCP (*Hamamatsu*, R3809U-51) detektiert.

4.4.4 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen

Die Fluoreszenzzerfallszeiten der individuellen Probensysteme wurde durch das Prinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (TCSPC, Time Correlated Single Photon Counting) ermittelt. Die Ankunftszeiten einzelner Fluoreszenzphotonen nach der Anregung durch einen Laserpuls werden dabei in ein Histogramm aufgetragen. Das Histogramm über alle Ankunftszeiten hat die Form eines exponentiellen Zerfalls. Durch eine Kurvenanpassung des Histogramms mit exponentiellen Zerfallsfunktionen können daraus die den Zerfall des angeregten Zustandes bestimmenden

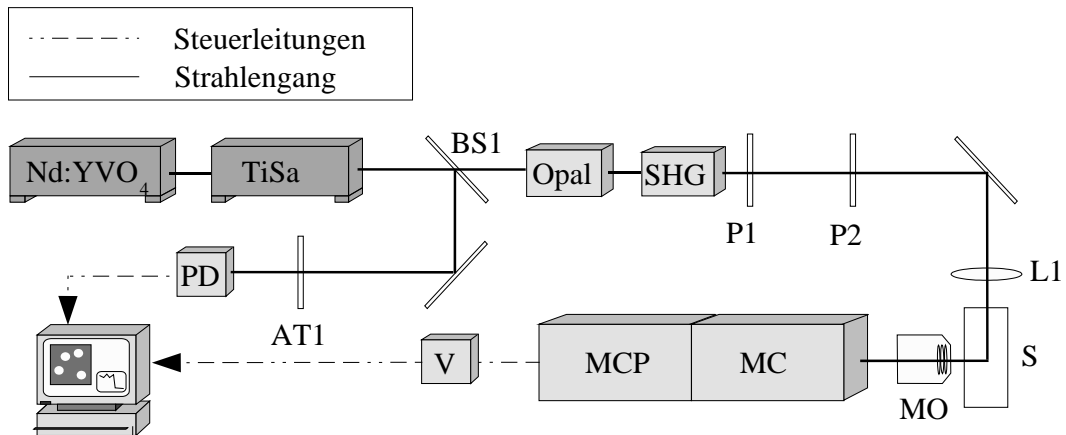


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des TCSPC-Experiments (Abkürzungen: TiSa: Ti:Saphir-Oszillator, Opal: optisch-parametrischer Oszillator, SHG: Frequenzverdoppler, AT1 Abschwächer, BS1 Strahlteiler, P1 & P2 Polarisatoren, L1 Linse, S Fluoreszenzprobe, MO Mikroskopobjektiv, MC Monochromator, MCP Multi Channel Plate, V elektronischer Verstärker, PD Photodiode)

Zeiten ermittelt werden. Um die Zeit zwischen Anregungszeitnullpunkt und dem Eintreffen des Fluoreszenzphotons bestimmen zu können, benötigt man zwei Signale. Diese Art der Signalfolge ist auch als Start-Stopp-Experiment bekannt.

Der Zeitnullpunkt wird durch den Anregungspuls festgelegt. Dazu wird ein Teil des Anregungslichts direkt nach dem Ti:Saphir-Oszillator an dem Strahlteiler BS1 ausgekoppelt und auf eine PIN-Photodiode (*Hamamatsu*, S5773-01) fokussiert. Variable ND-Filter AT1 erlauben das optimale Einstellen des Photostroms. Die Ankunft des Fluoreszenzphotons stoppt den Zähler und die ermittelte Zeit wird im Speicher des Computers hinterlegt. Das Start-, sowie das Stoppsignal werden von einer kommerziellen Computerkarte (*Becker & Hickl*, SPC 300) verarbeitet. Üblicherweise wird ein Prozess durch eine bestimmte Signalamplitude eines Signals getriggert. Amplitudenschwankungen in einem periodischen Signal führen durch das zeitversetzte Erreichen der prozessauslösenden Signalamplitude zu einem Zeitversatz (Jitter). Ein Constant Fraction Discriminator (CFD) entkoppelt die Amplitudenschwankungen der Eingangssignale von dem daraus resultierenden Jitter und ermöglicht damit eine exaktere Registrierung des Zeitnullpunktes. Das Startsignal für die Messung wird diesem CFD auf der Karte übergeben, der daraus einen passenden Triggerpuls zum Starten bzw. Stoppen des Zeit-Amplituden Konverters (TAC) generiert. Der TAC produziert ein stabile, zeitlich linear ansteigenden Spannungsrampe.

Das Stoppsignal für den TAC ist die Detektion eines Fluoreszenzphotons. Danach liegt am TAC eine Spannung an, die proportional der verstrichenen Zeit ist. Ein

auf der Karte nachgeschalteter AD-Wandler (ADC) ordnet dem Spannungssignal einen der 1024 Kanäle auf der Karte zu. Jeder Kanal zählt die Häufigkeit der Anknüpfungseignisse für die ihm zugeordnete Zeit. Tritt kein Stopp-Ereignis ein, wird das TAC nach dem Erreichen seiner maximal möglichen Spannung von der Elektronik gestoppt und wartet auf die erneute Auslösung durch den CFD.

Die hier vorgestellte Funktionsweise des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens basiert auf der Vorstellung, dass der Startpuls durch den Anregungspuls und der Stopp-puls durch das Fluoreszenzphoton erfolgt. In der Praxis wird die Fluoreszenzzählrate so niedrig gehalten, dass der TAC unnötig oft seinen maximalen Spannungspegel erreicht und zurück gesetzt wird. Um seine Belastung (es handelt sich dabei um einen präzisen Kondensator) möglichst gering zu halten, wird die Funktion von Start- und Stoppsignal vertauscht. Das Fluoreszenzphoton löst nun den TAC aus, während der Anregungspuls die Aufgabe des Stopppulses übernimmt. Das Experiment wurde mit diesem technischen Unterschied durchgeführt.

Die Computerkarte, die die Signale des TCSPC-Experiments verarbeitet, besitzt eine Vielzahl weiterer Einstellungsmöglichkeiten, die über die mitgelieferte Software zugänglich sind. Es ist u. a. möglich am CFD, am TAC und am ADC Schwellenwerte einzustellen, die regeln, welche Signallevele der einzelnen Signale tatsächlich zu Zählereignissen führen. Eine detaillierte Beschreibung der Karte findet sich in den Handbüchern von Becker & Hickl [117] und der Dissertation von Jens-Peter Rau [116].

4.5 Fluoreszenz- und Absorptionsspektren

Die Steady-State-Absorptionsspektren wurden mit einem kommerziellen Spektrometer aufgenommen (*Perkin Elmer*, Perkin Elmer 330). Die Steady-State-Fluoreszenzspektren wurden mit einem modularen System von *Edinburgh Analytical Instruments* aufgenommen (*Edinburgh Instruments*, FS 900).

Für die Berechnung des Energietransfers wurden die Spektren von der Wellenlängenskala in Wellenzahlen umgerechnet. Diese Umrechnung der Abszisse in Wellenzahlen geschieht durch den reziproken Wellenlängenwert. Übliche Absorptions- und Emissionsspektrometer liefern ihre Spektren in der Einheit der Wellenlänge λ . Sie sind so konstruiert, dass ihre Auflösung $\Delta\lambda$ über den ganzen Wellenlängenbereich konstant ist, besitzen also einen konstanten Bandpass. Mit einem Bandpass von 2 nm entspricht dies bei 400 nm einem Wellenzahlenbandpass von $\Delta\tilde{\nu} = 124 \text{ cm}^{-1}$. Bei 500 nm entspricht die Auflösung von 2 nm nur noch 80 cm^{-1} .

Die Umrechnung der Auflösung von der Einheit der Wellenlänge in die Einheit Wellenzahlen erfolgt über: $\Delta\tilde{\nu} = |\Delta\lambda|/\lambda^2$. Diese Korrektur muss auch die Ordinate des Spektrums bei der Umrechnung erfahren. Das Spektrometer liefert die Signalintensität pro Wellenlängenintervall $I(\lambda)/\Delta\lambda$. Beim Übergang zu Wellenzahlen erhält man deshalb [59]:

$$\frac{I(\tilde{\nu})}{\Delta\tilde{\nu}} = \lambda^2 \frac{I(\lambda)}{\Delta\lambda} \quad (4.1)$$

4.6 Probenpräparation

Das Biliprotein Phycoerythrocyanin (PEC) setzt sich aus α - und β -Untereinheiten zusammen. Im nativen Protein kommt es in hexameren $(\alpha\beta)_6$ und trimeren $(\alpha\beta)_3$ -Aggregaten vor. Linkerproteine unterstützen den Zusammenhalt dieser Aggregate. Eine detaillierte Einführung zum PEC findet sich zu Beginn des Kapitels 5. Die α -Untereinheit, die β -Untereinheit, trimeres PEC mit und ohne Linkerprotein wurden am Institut für Botanik der LMU München von A. Parbel und M. Kupka in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Scheer hergestellt. Alle Proben wurden als wässrige Lösungen, gepuffert mit 0,1 M Kaliumhydrogenphosphat, bereitgestellt. Verdünnt man trimeres PEC dann kommt es zur teilweisen Dissoziation in das Monomer. Anders als beim Allophycocyanin gibt es von PEC kein Trimer bei dem die Untereinheiten, durch Vernetzung untereinander zusammengehalten werden. Einzelmoleküluntersuchungen am Trimer sind deshalb zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Monomeres PEC wurde durch den Zusatz von 4 M Harnstoff (*Fluka*, *MicroSelect*) selbst präpariert. Dabei kommt es zur Denaturierung des trimeren Komplexes. Das Absorptionsspektrum des Monomers ist nahezu identisch mit der Summe der Absorptionsspektren von α - und β -Untereinheit [118]. Da Bilinfarbstoffe eine hohe spektrale Sensitivität auf strukturelle Änderungen zeigen, die Spektren sich aber mit der Denaturierung kaum ändern, werden diese ausgeschlossen.

Die konfokale Abbildung einzelner PEC Einheiten bei Raumtemperatur erfordert die Fixierung der Moleküle auf einer Probenfläche. Um die Denaturierung des Proteins zu verhindern, muss das umgebende Medium immer noch wässrig sein. Durch die Immobilisierung ist die Dauer der Fluoreszenzdetektion nicht mehr durch die Diffusion der Fluorophore durch den Anregungsfokus begrenzt, sondern ausschließlich durch das Bleichverhalten. Für biologische Probensysteme wurde diese Fixierung bisher durch Polyvinylalkohol [119], durch radikalische Polyacrylamidpolymerisation [120] oder durch Agarosegelmatrizen [37] vorgenommen. Diese Verfahren basieren auf der Ausbildung eines Netzwerks des Wirts. Die Poren der gebildeten Netzwerke sind klein genug, um die zu untersuchenden Moleküle an der Diffusion zu hindern.

Sowohl die Immobilisierung mit Agarosegelmatrizen als auch die Immobilisierung durch radikalische Polyacrylamidpolymerisation führte bei PEC nicht zur notwendigen Fixierung der Moleküle in den Poren des ausgebildeten Netzwerks. PEC befand sich bei der Untersuchung dieser Proben stets auf der Probenoberfläche. Deshalb wurde PEC allein durch die elektrostatische Wechselwirkung mit der Glasoberfläche immobilisiert. Dieses Verfahren war bereits am Biliprotein Allophycocyanin [55] erfolgreich und erlaubt auch die Immobilisierung von PEC. Dabei wurde die Proteinlösung mit einer Wasser/Glycerinmischung (2:3), die mit 0,1 M Kaliumhydrogenphosphat gepuffert war, verdünnt. Ca. 200 μl dieser Lösung wurden auf ein Deckglas (*Marienfeld*, No. 1) aufgebracht und mit der Pipettenspitze gleichmäßig auf diesem verteilt. Um die Austrocknung der Probe bei Raumtemperatur zu verhindern, wurde sie in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre aufbewahrt und mikroskopiert.

Für die Untersuchung bei tiefen Temperaturen entfällt die Notwendigkeit der aktiven Immobilisierung. Einzelne Moleküle werden beim Einfrieren des Lösungsmittels von diesem eingeschlossen. Beim Abkühlen muss jedoch sichergestellt sein, dass das einzubettende Molekül nicht aus der umgebenden Matrix auskristallisiert. Deshalb verwendet man für die Untersuchung bei tiefen Temperaturen Gläser als Matrixbildner. Als Glasbildner eignet sich die bei der Raumtemperaturpräparation vorgestellte Lösung aus Kaliumhydrogenphosphat in einer Wasser/Glycerinlösung. Ca. 50 μl dieser Lösung wurden auf ein Deckglas gegeben, um einen dünneren Film zu erhalten, mit einem weiteren Deckglas bedeckt und anschließend abgekühlt. Die identische Präparation einzelner Moleküle bei Raum- und Tieftemperatur, erlaubt den direkten Vergleich der Ergebnisse ohne einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels berücksichtigen zu müssen.

Kapitel 5

Photophysik des Biliproteins Phycoerythrocyanin (PEC)

Die Evolution hat für Pflanzen und einige Bakterien die Photosynthese als Strategie entwickelt, um den Energiebedarf zum Leben aus dem nahezu unerschöpflichen Sonnenlicht zu decken. Dabei wird die Lichtenergie über eine komplizierte Prozesskaskade in eine für Lebewesen direkt nutzbare Energieform gebracht. Der erste Schritt auf dem Weg dazu ist die Absorption eines Photons. Um dies möglichst effektiv zu bewerkstelligen, besitzen photosynthetisch aktive Organismen sogenannte Lichtsammelantennen. Unter Lichtsammelantennen versteht man geometrisch und energetisch aufeinander abgestimmte Aggregate von Protein-Farbstoff-Komplexen. Nach der Anregung eines Farbstoffmoleküls durch Lichtabsorption erfolgt eine schnelle Energieverteilung innerhalb des Lichtsammelkomplexes. Über nachgeschaltete Energietransferschritte zwischen den Antennen wird die Anregungsenergie in ein Reaktionszentrum transportiert in dem die Umwandlung in für Organismen verwertbare chemische Energie stattfindet. Sowohl für die schnelle Weiterleitung der Anregungsenergie innerhalb und zwischen Lichtsammelantennen, sowie auch aufgrund von deren räumlicher Trennung vom Reaktionszentrum, kommt dem Energietransfer eine entscheidende Rolle zu. Abhängig von der Anordnung der Lichtsammelantennen kommen aus mechanistischer Sicht zwei Arten von Energietransfer zwischen diesen Komplexen in Frage. Bei kleinen Abständen zwischen den Chromophoren kann es, wie in Kapitel 3.3.2 kurz dargestellt, zu einem Überlapp der Wellenfunktionen kommen. Daraus resultiert ein sehr schneller Energietransfer, dessen Zeitkonstante bis zu wenigen fs-Sekunden betragen kann. Bei größeren Abständen dominiert die Energieübertragung nach dem Förstermechanismus. Die Parameter, die die Geschwindigkeit für diesen Prozess bestimmen, wurden bei der theoretischen Beschreibung in Abschnitt 3.3.2 behandelt und sind hier noch einmal zusammengefasst:

- Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander
- Abstand von Donor und Akzeptor
- Fluoreszenzlebenszeit $k_X^{-1} = \tau_{\text{tot}}$ des Donors
- Quantenausbeute ϕ des Donors
- Brechungsindex des Mediums
- Spektren für das Überlappintegral $J(\tilde{\nu})$

Mit diesen Parametern ist eine detaillierte Aufklärung der Energietransfervorgänge, die nach dem Förstermechanismus ablaufen, möglich. Das Verständnis dieser fundamentalen Vorgänge ist zur vollständigen Beschreibung der Prozesse, die zur Photosynthese beitragen, unerlässlich. In dieser Arbeit werden deshalb detaillierte Untersuchungen zum Energietransferverhalten am Phycobiliprotein Phycoerythrocyanin vorgestellt.

Das Lichtsammelsystem bei dem Phycobiline als chromophore Gruppen zum Einsatz kommen, findet sich in prokaryotischen Cyanobakterien und eukaryotischen Rotalgen. Phycobiline bilden zusammen mit dem Apoprotein und den Linkerproteinen, die das System zusammenhalten, das Phycobilisom (PBS). Das Phycobilisom absorbiert im Bereich der Grünlücke des Chlorophylls, welches im Bereich von 450 nm - 670 nm nahezu keine Absorption besitzt. Es besteht aus einem Kern ("core") und daran angeordneten Stäbchen ("rods") (siehe Abbildung 5.1). Der "core" ist über spezielle Ankerproteine direkt in der Thylakoidmembran verankert. Wichtige Bestandteile des PBS sind die Phycobiliproteine, die sich in drei Klassen einteilen lassen: Phycoerythrin (PE), Phycocyanin (PC) und Allophycocyanin (APC). PE und PC werden an den "rods" ausgebildet. PE kann dabei in einigen Bakterien durch Phycoerythrocyanin (PEC) substituiert werden [121]. APC bildet im PBS den Kern.

Die Anordnung der Phycobiliproteine im PBS entspricht der energetischen Abfolge ihrer jeweiligen Absorptionsmaxima. Der zur Photosynthese nötige Energietransport der Anregungsenergie findet dabei vom äußeren Antennenrand zum in der Membran verankerten Kern statt. Dort wird die Energie dann auf chlorophyllhaltige Antennen des Photosystems I und II verteilt [122]. Im Gegensatz zu den Chlorophyllen, die als geschlossene Tetrapyrrole im blauen und roten Spektralbereich absorbieren, sind die Phycobiline offenkettige Tetrapyrrole ohne Metallzentrum. Die freien, nicht an das Apoprotein gebundenen Bilinchromophore bilden eine helikale, den Chlorophyllen ähnliche, Struktur. In dieser Konformation besitzen sie eine große Flexibilität und

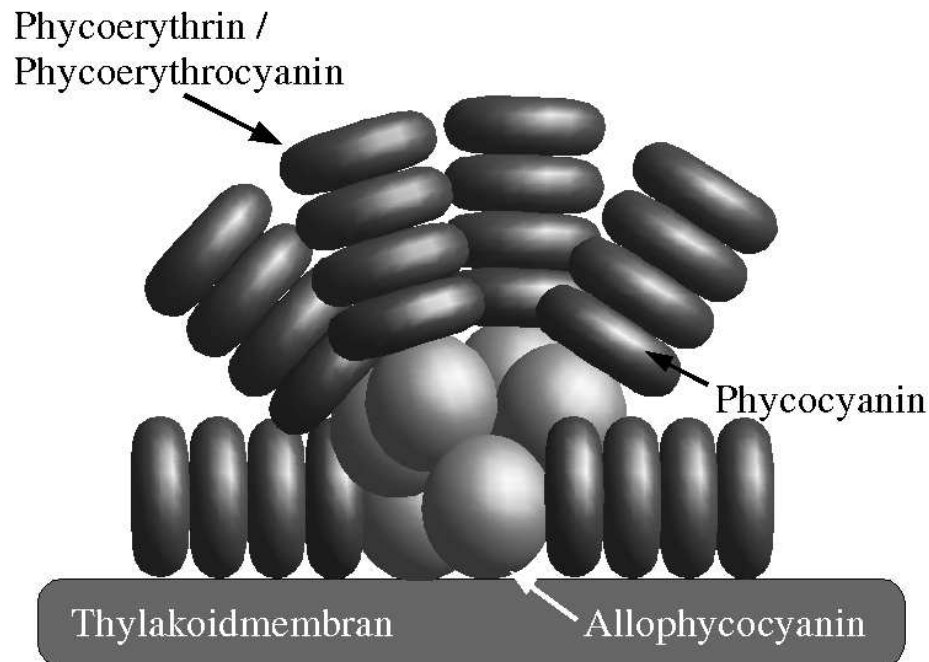


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Phycobilisoms. An den peripheren Stäbchen ("rods") befinden sich die für die Lichtabsorption im grünen Spektralbereich verantwortlichen Phycobiliproteine (Phycoerythrin und Phycoerythrocyanin). Sie geben ihre aufgenommene Energie an die inneren Antennen (Phycocyanin) weiter. Allophycocyanin, im Kern ("core") des PBS, leitet die Energie im Anschluss an die Antennen des Photosystems I und II.

sehr viele Freiheitsgrade. Sie verlieren daher die Anregungsenergie schnell durch interne Konversion [123]. Erst durch die Bindung an ein richtig gefaltetes Apoprotein werden die Phycobiline in eine lineare Struktur gebracht. Die dadurch reduzierte Zahl an Freiheitsgraden steigert die Lebensdauer des angeregten elektronischen Zustands und ermöglicht so den effizienten Einsatz der Chromophore als Energiedonatoren in Lichtsammelkomplexen.

Neben der Reduzierung der Freiheitsgrade nimmt das Apoprotein auch Einfluss auf die spektralen Eigenschaften der Bilinfarbstoffe. Chemisch identische Bilinfarbstoffe zeigen, je nach Fixierung durch das Apoprotein, eine spektrale Variabilität in den Absorptionsspektren von bis zu 50 nm [124]. Durch den Einsatz von nur wenigen Isomeren und durch hohe Sensibilität auf die Proteinumgebung lässt sich das Absorptionsverhalten perfekt an die äußeren Bedingungen anpassen. Als chromophore Gruppen finden sich in den Phycobiliproteinen das Phycourobilin (PUB), Phycoerythrobin (PEB), Phycoviolobin (PVB) und das Phycocyanobilin (PCB). Die Anzahl und der Typ der Bilinchromophore, die ein bestimmtes Phycobiliprotein trägt, sind in der Regel unveränderlich. Phycobiliproteine bestehen immer aus mindestens

zwei Untereinheiten in der Stöchiometrie 1:1 (α - und β -Untereinheit). Eine Ausnahme davon bilden zwei PE, bei denen eine dritte Untereinheit (γ -Untereinheit) gefunden wurde. Sie trägt ebenfalls chromophore Gruppen [124]. Allen Phycobiliproteinen ist gemeinsam, dass die $\alpha\beta$ -Heterodimeren, die als Monomer bezeichnet werden, im nativen Phycobilisom höhere Aggregate bilden. So treten bevorzugt Trimere $(\alpha\beta)_3$ oder Hexamere $(\alpha\beta)_6$ auf. Der Zusammenhalt der Aggregate wird durch strukturdirigierende Linkerproteine unterstützt [125, 126]. Durch diese Anordnung kann die Effizienz des zur Photosynthese notwendigen Energietransfers von den peripheren "rods" über den zentralen "core" hin zum Reaktionszentrum über 95 % betragen [127, 128, 129].

In einigen Organismen, wie dem Cyanobakterium *Mastigocladus laminosus*, kann unter speziellen Wachstumsbedingungen PE im PBS durch PEC substituiert werden. In diesen ist PEC das kurzwelligst absorbierende Pigment [130] und sitzt als Lichtsammelantenne am äussersten Antennerand. PEC besteht aus 2 Untereinheiten, die mit α und β bezeichnet werden. Die α -Untereinheit besitzt einen PVB-Chromophor, während die β -Untereinheit zwei PCB-Chromophore hat. Die grüne Absorption des PEC stammt vom PVB-Chromophor mit einem Absorptionsmaximum um 570 nm. Das Fluoreszenzmaximum dieses Chromophors liegt bei 590 nm. Verglichen mit dem PCB-Chromophor besitzt der PVB-Chromophor eine kürzerer Konjugation des π -Elektronensystems (vgl. Abbildung 5.2a/b). Der PVB-Chromophor ist in der α -Untereinheit an der Position Cys-84 mit dem Apoprotein verknüpft. In Abbildung 5.2a ist seine Struktur wiedergegeben. Die Verknüpfung mit dem Apoprotein findet

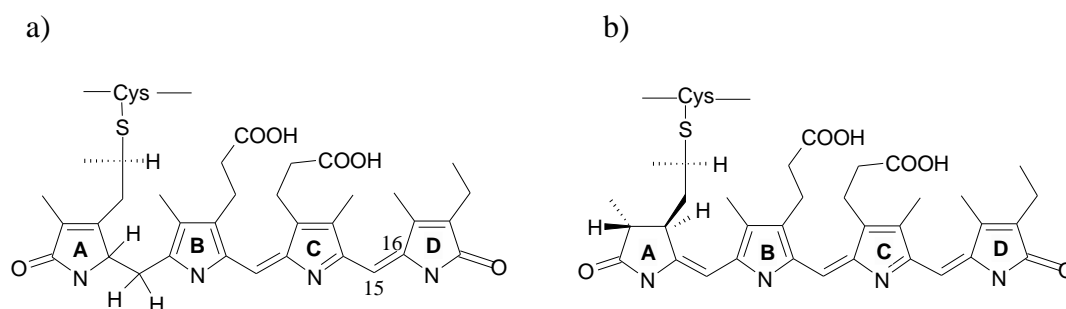


Abbildung 5.2: a) Struktur des Phycoviolobilin (PVB) Chromophors. Durch seine geringere Konjugation des π -Elektronensystems an der Methinbrücke zwischen den Ringen A und B ist seine Absorption gegenüber dem PCB zu höheren Energien verschoben. b) Struktur des Phycocyanobilin (PCB) Chromophors. PCB ist isomer zum PVB Chromophor mit einer weiteren Konjugation an der Methinbrücke zwischen den beiden Ringen A und B.

über den Ring A des Chromophors statt. Eine Besonderheit des PVB-Chromophors ist, dass an der C-15/C-16 Doppelbindung eine E/Z-Isomerisierung möglich ist [131]. Man unterscheidet dabei zwei Typen (Typ I und Typ II). Die Zuordnung erfolgt nach

dem Zustand der SH-Gruppen des Apoproteins. Im nativen PEC, mit reduzierten SH-Gruppen Cys-98 und Cys-99 spricht man bei der E/Z-Isomerisierung von Typ I, nach Oxidation der SH-Gruppen spricht man vom Typ II [132]. Während in der Z-Konformation zwischen oxidierten und reduzierten SH-Gruppen fast keine Änderung der spektralen Eigenschaften auftritt ($\lambda_{\max}(\text{Z}_I) = 566 \text{ nm}$, $\lambda_{\max}(\text{Z}_{II}) = 563 \text{ nm}$), ist der unterschiedliche Zustand der SH-Gruppen in der E-Konformation deutlich zu sehen ($\lambda_{\max}(\text{E}_I) = 507 \text{ nm}$, $\lambda_{\max}(\text{E}_{II}) = 552\text{-}555 \text{ nm}$) [132]. Die Quantenausbeute der E-Konformation ist sehr gering und trägt kaum zum Fluoreszenzspektrum bei [133]. Bei der Detektion der Fluoreszenz kann der große spektrale Unterschied der E-Konformation zwischen reduzierter und oxidiertes Form deshalb vernachlässigt werden. Die zunehmende strukturdirigierende Wirkung des Apoproteins in höher molekularen Komplexen reduziert für den PVB Chromophor die Wahrscheinlichkeit, seine Anregungsenergie über die E/Z-Isomerisierung zu verlieren.

Die β -Untereinheit trägt an den Positionen Cys-84 und Cys-155 jeweils einen PCB-Chromophor. Anders als in der α -Untereinheit ist von den PCB-Chromophoren keine E/Z-Isomerisierung bekannt. Das Absorptionsmaximum für den β_{84} -Chromophor liegt bei 610 nm und bei 590 nm für den β_{155} -Chromophor. Die Fluoreszenz aus dem β_{84} -Chromophor erfolgt bei 640 nm, sowie bei 620 nm für den β_{155} -Chromophor. In Abbildung 5.2b ist die Struktur des PCB-Chromophors wiedergegeben. Die Verknüpfung mit dem Apoprotein findet wie im Fall des PVB über den Ring A statt.

Wie alle Biliproteine kommt auch PEC in nativer Umgebung in höhermolekularen Komplexen vor. PEC bildet, im nativen Protein bevorzugt Trimere $(\alpha\beta)_3$ oder Hexamere $(\alpha\beta)_6$. Diese Aggregate erlauben einen effizienten Transfer der Anregungsenergie auf energetisch tieferliegende Antennen. Für den Energietransfer innerhalb des PEC resultiert im nativen Protein ein kompliziertes Zusammenspiel von 9 bzw. 18 Chromophoren. Um dieses komplexe System zu verstehen, ist zuerst fundiertes Wissen über das Monomer nötig. Das Monomer $\alpha\beta$ des PEC ist das einfachste höhermolekulare Aggregat des PEC, das beide Untereinheiten mit insgesamt drei Chromophoren besitzt. Die Struktur des Monomers ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Die Abstände der Chromophore im Monomer bewegen sich zwischen 35 Å und 50 Å [134]. Der Energietransfer zwischen den Chromophoren muss folglich nach dem Förstermechanismus erfolgen. Auch dass sich die spektralen Eigenschaften des Monomers additiv aus den spektralen Eigenschaften der Untereinheiten zusammensetzen, zeigt dass es keine exzitonische Wechselwirkung in diesem Komplex gibt.

Der PVB-Chromophor, der im nativen Protein für die Absorption im grünen Spektralbereich verantwortlich ist, spielt auch in den hier vorgestellten Untersuchungen zum Energietransfer eine zentrale Rolle. Nach der Absorption eines Lichtquants hat

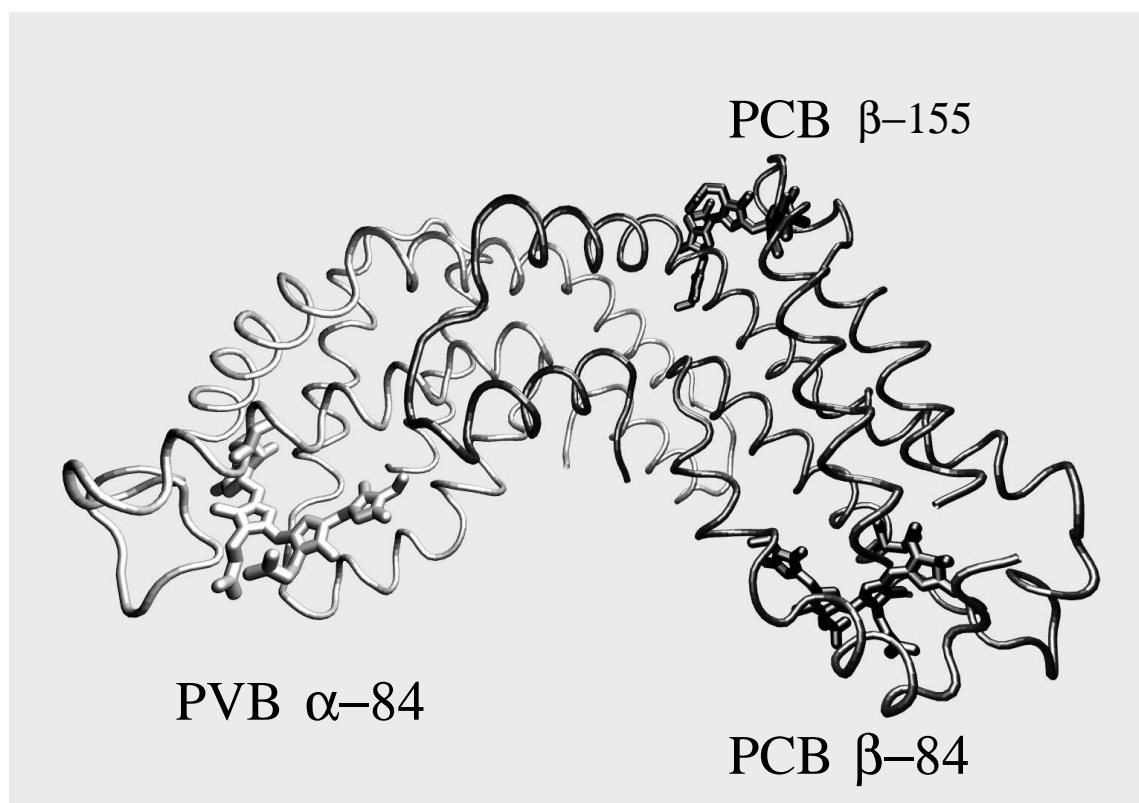


Abbildung 5.3: Monomeres PEC durch Aggregation einer α - und einer β -Untereinheit. Die Abstände $R(\alpha_{84} - \beta_{84}) = 48 \text{ \AA}$, $R(\alpha_{84} - \beta_{155}) = 47 \text{ \AA}$ und $R(\beta_{84} - \beta_{155}) = 35 \text{ \AA}$ zwischen den Chromophoren erlauben die Beschreibung des Energietransfers untereinander nach dem Förstermechanismus.

er im Monomer drei Relaxationskanäle zur Verfügung. Er kann seine Energie durch Fluoreszenz oder durch Energietransfer an einen der beiden PCB-Chromophore abgeben. Auch jeder der beiden PCB-Chromophore hat diese drei Relaxationskanäle zur Verfügung. Die komplexe Energietransfersituation im Monomer, mit bereits neun Raten, ist einem Ratenchema in Abbildung 5.4 zusammengefasst. Gegenstand dieser Arbeit ist die genaue Beschreibung des Energietransfer im Monomer des PEC mit Untersuchungen am Ensemble und an einzelnen Molekülen.

Zur Berechnung der Energietransferraten werden die notwendigen Parameter wie Fluoreszenzlebenszeit, Fluoreszenzquantenausbeute und die spektralen Eigenschaften der einzelnen Chromophore benötigt. Diese sind aus Ensemblemessungen zugänglich. Untersuchungen zum Energietransfer an einzelnen Molekülen liefern einen anderen, tiefen Einblick in das Energietransferverhalten von PEC. Mit ihnen kann gezeigt werden, dass die aus Ensemblemessungen gewonnenen Raten des Energietransfers lediglich eine Mittelung über das gesamte Energietransferverhalten

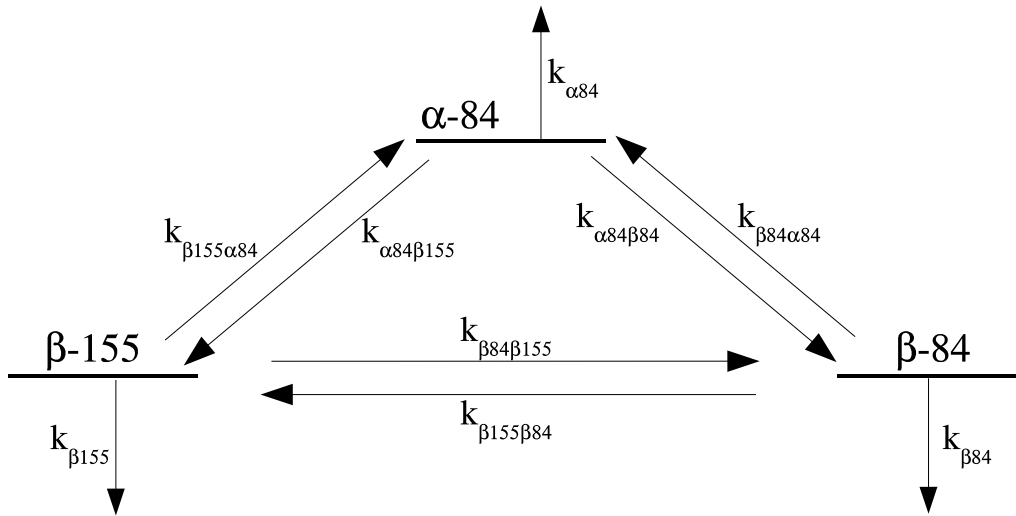


Abbildung 5.4: Schema des Energietransfers in monomerem PEC. Neben den intermolekularen Austauschraten, besitzt jeder Chromophor noch die Möglichkeit über Fluoreszenz die Energie der Anregung zu dissipieren.

darstellen, hinter der sich ein ausgeprägtes, individuell verschiedenes Verhalten einzelner Moleküle verbirgt. Zusätzlich wurden Untersuchungen zur Photostabilität und zu Dunkelzuständen im PEC angestellt. Während Photobleichen oftmals die gesamte Funktion des Komplexes beeinträchtigt, führen Dunkelzustände zu einer verminderten Effizienz der Antenne. Wieder liefern Einzelmoleküluntersuchungen die nötigen Einblicke. Mit ihnen kann gezeigt werden, um welche Art von Dunkelzuständen es sich handelt und welcher Chromophor hauptsächlich für das Photobleichen des Systems verantwortlich ist.

Mit den hier vorgestellten Experimenten ist die Grundlage geschaffen worden, den Energietransfer im PEC vollständig zu verstehen. Bisherige Untersuchungen am PEC stützten sich auf die photophysikalischen Parameter von PC [135]. Obwohl PC und PEC aufgrund ihrer hohen Homologie in den Aminosäuresequenzen sehr ähnliche Röntgenstrukturen aufweisen [136, 134], sind die energetischen Verhältnisse in beiden System vollkommen unterschiedlich. PC besitzt sowohl in der α - als auch in der β -Untereinheit lediglich PCB-Chromophore. Im Gegensatz zum PEC hat im PC der β_{155} -Chromophor die kurzwelligste Absorption. Die neu gewonnenen Daten machen erstmals einen direkten Vergleich der beiden Lichtsammelkomplexe möglich.

5.1 Energietransferuntersuchungen an einzelnen PEC Monomeren

Ziel der Untersuchung des Energietransfers in einzelnen Monomeren ist es, beurteilen zu können, in welchem Maße die Anregungsenergie des grün absorbierenden, PVB-Chromophors auf die beiden PCB-Chromophore verteilt wird. Ein möglicher Ansatz dies zu untersuchen, wäre die spektrale Trennung der Fluoreszenz der beiden PCB-Chromophore. Dies gelingt jedoch wegen der nahezu identischen Fluoreszenzspektren nicht (vgl. Abbildung 5.14b). Beim Blick auf die Kristallstruktur zeigt sich jedoch, dass die beiden PCB-Chromophore mit unterschiedlichen Orientierungen in das Apoprotein eingebaut sind. Folglich sind auch die Übergangsdipolmomente unterschiedlich orientiert. Dies ermöglicht die Unterscheidung der beiden Chromophore über die Polarisation der Fluoreszenz. Experimente, bei denen lediglich eine polarisationssensitive Detektion des Fluoreszenzlichts stattfindet, zeigen, dass einzelne Monomere diesen Experimenten prinzipiell zugänglich sind. Zusätzlich geben sie erste, interessante Einblicke in den stattfindenden Energietransfer. Erst durch die Erweiterung des Experiments um die polarisationsselektive Anregung ist eine detailliertere Untersuchung des Energietransfers einzelner Monomere möglich.

5.1.1 Polarisationssensitive Fluoreszenzdetektion am PEC Monomer

Wie in den Grundlagen zur polarisationselektiven Anregung und Detektion in Kapitel 3 gezeigt wurde, findet bei Experimenten am Ensemble durch die Mittelung über die isotrope Molekülverteilung eine Depolarisation des Emissionslichts statt. Informationen wie die über die Orientierung des Übergangsdipolmoments gehen dabei verloren. Untersucht man einzelne Moleküle, findet diese Mittelung nicht statt und man kann aus der Polarisation des Fluoreszenzlichts Rückschlüsse auf den emittierenden Dipol ziehen. Voraussetzung dafür ist, dass dabei die Rotation des Moleküls unterbleibt. Schnelle Rotationen führen, wie im Ensemble, zur vollständigen Depolarisation des Fluoreszenzlichts (vgl. Abschnitt 3.3.3). Untersucht man einzelne Moleküle, bei denen die Translation und die Rotation unterbleibt, dann hat die Polarisation des Emissionslichts die Eigenschaften, die ihm durch die Orientierung des Übergangsdipolmoments mitgegeben werden. Nicht rotierende, immobilisierte Moleküle lassen sich bei der Modulation der Anregungspolarisation über das bereits in Kapitel 3.1 beschriebene \cos^2 -Verhalten nachweisen. Abbildung 5.5 zeigt, dass einzelne PEC-Monomere diesem Verhalten folgen.

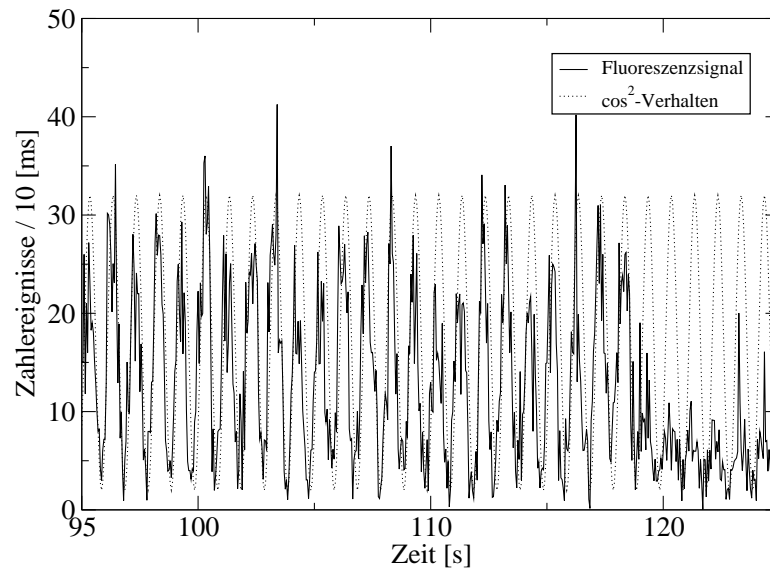


Abbildung 5.5: Fluoreszenzzeitspur eines PEC-Monomeren. Die Polarisation der Anregung wird dabei mit einer Frequenz von 1 Hz moduliert. Die Anregungsleistung beträgt $1,5 \mu\text{W}$. Die Fluoreszenzzeitspur zeigt die letzten 20 Sekunden der Fluoreszenzmodulation herausvergrößert. Die gestrichelte Linie verdeutlicht das \cos^2 -Verhalten.

Die Unterdrückung der Rotation des Monomeren ermöglicht die detaillierte Untersuchung der statischen Polarisation des Fluoreszenzlichts. Um bei alleiniger Anregung des PVB-Chromophors ($\lambda = 568 \text{ nm}$) nur die Fluoreszenz der β -Untereinheit zu detektieren, kommt als Strahlteiler BS4 der dichroitische Spiegel mit einer Kante bei 595 nm zum Einsatz. An die Stelle des Strahlteilers BS5 wird ein Polarisationsstrahlteiler in den Detektionsweg gebracht. Dieser trennt die Fluoreszenz in die P - und S -Anteile der Polarisation auf. Zur weiteren Unterdrückung des Anregungslichts kommt an der Stelle F2 ein Bandpassfilter (*Chroma*, HQ 620-60) zum Einsatz. Die Anregungsleistung beträgt stets $1 \mu\text{W}$.

Bei der Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens von monomeren PEC findet man alle denkbaren Verhaltensweisen des detektierten Signals (vgl. Abbildung 5.6):

- korreliertes An-/Aus-Verhalten des Fluoreszenzsignals auf beiden Detektionskanäle P und S
- anti-korreliertes An-/Aus-Verhalten des Fluoreszenzsignals auf beiden Detektionskanäle P und S

- nicht-korreliertes An-/Aus-Verhalten des Fluoreszenzsignals auf beiden Detektionskanälen P und S

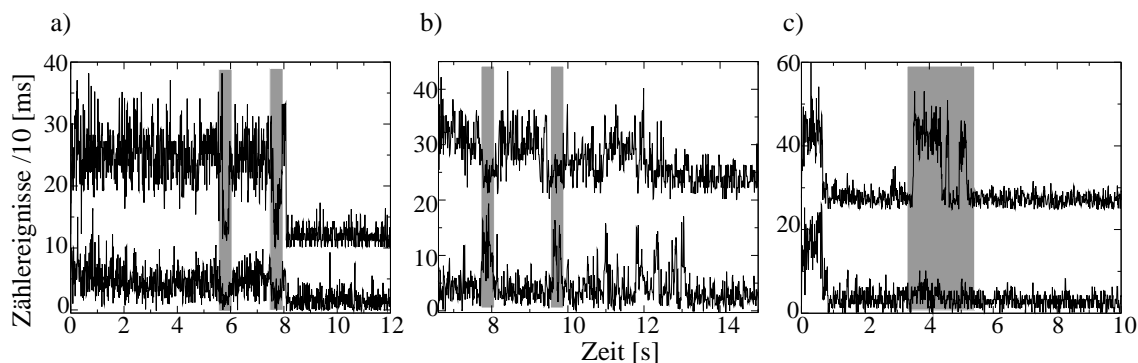


Abbildung 5.6: Fluoreszenztrajektorien einzelner Monomer, separiert in die beiden orthogonalen Polarisationsanteile. Grau hinterlegt sind jene Bereiche in denen sich das Fluoreszenzverhalten der untersuchten Moleküle ändert. a) Korreliertes An-/Aus-Verhalten der Fluoreszenzintensität auf beiden Detektionskanäle. b) Anti-Korreliertes An-/Aus-Verhalten der Fluoreszenzintensität auf beiden Detektionskanäle. c) nicht-korreliertes An-/Aus-Verhalten der Fluoreszenzintensität auf beiden Detektionskanäle.

Das in Abbildung 5.6a gezeigte, korrelierte An-/Aus-Verhalten der beiden Detektionskanäle entspricht dem Blinking des PVB-Chromophors. Ist dieser in einem Dunkelzustand, so kann er nicht mehr angeregt werden und die Emission auf beiden Kanälen verschwindet. Eine weitere Erklärung für dieses Verhalten ist, dass eine mögliche Anregung des PVB-Chromophors schnell über einen anderen Kanal relaxiert. Beide Fälle haben zur Konsequenz, dass die Fluoreszenz der PCB-Chromophore ausbleibt.

Beim anti-korrelierten An-/Aus-Verhalten findet eine Änderung der Austauschraten des Energietransfers statt, wie sie in Abbildung 5.4 dargestellt sind. Schnellere Energietransferraten und damit ein effektiverer Energietransfer auf einen der beiden PCB-Chromophore bedingen eine Änderung in den Raten $k_{\alpha 84\beta 155}$ bzw. $k_{\alpha 84\beta 84}$. Findet auf einem der beiden PCB-Chromophore eine Zunahme in seiner Populationsrate statt, dann bedeutet dies für den anderen PCB-Chromophor entsprechend weniger Anregungspopulation und damit Fluoreszenz. Dieses Verhalten ist in Abbildung 5.6b dargestellt. Durch die isotrope Verteilung der Moleküle ist dieses Verhalten nur selten zu beobachten. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass ein Molekül genau so auf der Probenoberfläche orientiert ist, dass die beiden PCB-Chromophore eindeutig über die Polarisation der Fluoreszenzemission unterschieden werden können.

Während eine Änderung der Energietransferraten zu einer Umverteilung der Energie führt, findet im Fall des unkorrelierten Verhaltens eine tatsächliche Signalreduktion

statt. Dies ist in Abbildung 5.6c dargestellt. Dieses Verhalten ist mit der Änderung der Quantenausbeute eines Chromophors zu erklären. Die Anregungsenergie aus dem PVB-Chromophor wird dabei weiterhin entsprechend der Energietransferraten auf die beiden PCB-Chromophore transferiert. Jedoch erfolgt die Relaxation auf einem Chromophor nun nicht mehr über die Fluoreszenz. Der entsprechende Kanal verliert entsprechend an Signal.

Die isotrope Orientierung der PEC-Monomere verhindert, dass statistische Aussagen über die Häufigkeit der beobachteten Änderungen in den Energietransferparametern gemacht werden können. Anti-korreliertes und nicht-korreliertes An/Aus-Verhalten ist nur dann sichtbar, wenn die Orientierung der Übergangsdipolmomente günstig in Bezug zur Detektion liegen. Nur dann kann der Signalverlauf der beiden PCB-Chromophore getrennt aufgezeichnet werden. Kennt man die genaue Orientierung der Monomeren auf der Probenebene, dann kann man die *P*- und *S*-Anteile des Fluoreszenzlichts den einzelnen Chromophoren zuschreiben und damit den Energietransfer einzelner Moleküle im Detail studieren. Hier wird im Folgenden ein Verfahren vorgeschlagen, mit dem die Orientierung des PVB-Chromophors ermittelt wird. Allein mit der Kenntnis der Orientierung eines Chromophors kann ein Einblick in den Energietransfer des monomeren PEC gewonnen werden.

5.1.2 Energietransfer einzelner PEC Monomere

Um entscheiden zu können, wie die Anregungsenergie des grün absorbierenden PVB-Chromophors verteilt wird, wurde im vorhergehenden Abschnitt das Fluoreszenzlicht der beiden PCB-Chromophore in die beiden Polarisationskomponenten aufgeteilt. Ohne die exakte Lage der PCB-Chromophore können die detektierten Fluoreszenzintensitäten jedoch nicht zugeordnet werden. Durch die polarisationsselektive Anregung kann man, wie in Abschnitt 3.4 gezeigt, die Orientierung des Übergangsdipolmoments des absorbierenden PVB-Chromophors bestimmen. Diese Information erlaubt dann die erweiterte Zuordnung des detektierten Fluoreszenzsignals.

Wie in Gleichung 3.34 gezeigt, lässt sich bei einem emittierenden Dipol das Verhältnis der Signalintensitäten I_{\parallel}/I_{\perp} direkt mit der Lage des Dipols korrelieren. Im Monomer des PEC findet nach der Absorption durch den PVB-Chromophor ein schneller Energietransfer auf einen der beiden PCB-Chromophore statt. Die Polarisation des absorbierten Lichts steht deshalb nicht im direkten Zusammenhang mit der Polarisation der Fluoreszenz. Die Intensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} beinhalten die Information der Orientierung beider PCB-Chromophore, sowie deren anteiligen Beitrag zur Fluoreszenz. Für den Fluoreszenzbeitrag lässt sich ein Energietransferkoeffizient

ent γ definieren. Dieser gibt an, wieviel der Gesamtintensität vom β_{155} -Chromophor stammt. Diese Erweiterungen müssen in Gleichung 3.34 berücksichtigt werden. Das Verhältnis der Intensitäten auf beiden Detektoren kann deshalb angegeben werden zu:

$$V = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = \frac{(1 - \gamma)I_{\parallel}(\vec{\beta}'_{84}) + \gamma I_{\parallel}(\vec{\beta}'_{155})}{(1 - \gamma)I_{\perp}(\vec{\beta}'_{84}) + \gamma I_{\perp}(\vec{\beta}'_{155})} \quad (5.1)$$

I_{\parallel} bzw. I_{\perp} ist nun die Summe der Intensitäten der parallelen bzw. senkrechten Polarisationsanteile der beiden β -Chromophore. $I_{\parallel}(\vec{\beta}'_{84})$, $I_{\parallel}(\vec{\beta}'_{155})$, $I_{\perp}(\vec{\beta}'_{84})$ und $I_{\perp}(\vec{\beta}'_{155})$ sind eine Funktion der Lage der Übergangsdipolmomente $\vec{\beta}'_{84}$ bzw. $\vec{\beta}'_{155}$ (vgl. Gleichung 3.31 und 3.32). Die integrale Fluoreszenzintensität verteilt sich entsprechend dem Energietransferkoeffizienten γ auf den β_{84} - bzw. β_{155} -Chromophor. Die Orientierungen der Chromophore α_{84} -PVB, β_{84} -PCB und β_{155} -PCB zueinander können aus der Kristallstruktur [134] entnommen werden. Die dort hinterlegten Richtungsvektoren der langen Achsen der Chromophore beschreiben diese (vgl. Abbildung 5.7). Sie werden, entsprechend einem durchkonjugiertem System, den Übergangsdipolmomenten zugeordnet. Für den PVB-Chromophor werden dabei nur die 3 konjugierten Ringe berücksichtigt.

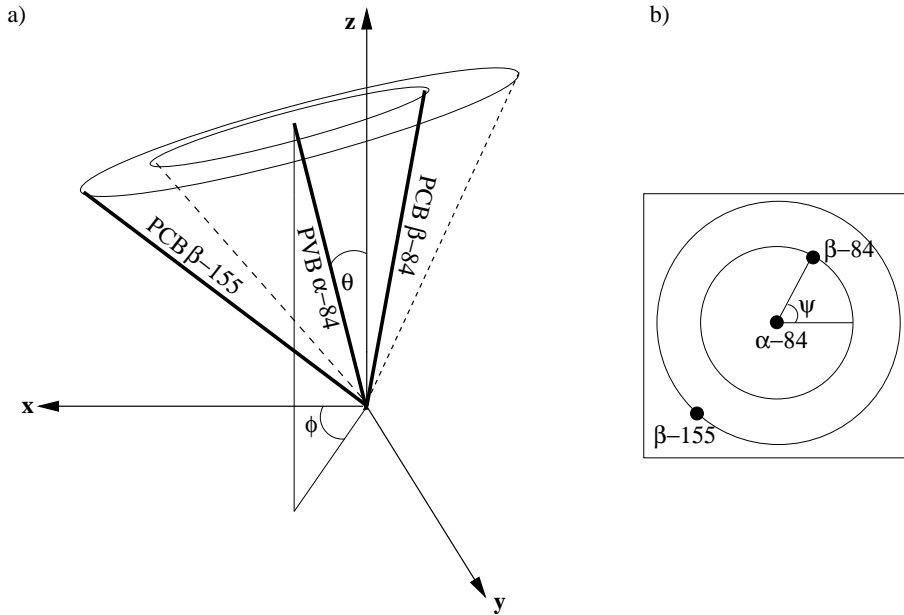


Abbildung 5.7: a) Schematische Darstellung eines monomeren PEC Moleküls, mit den experimentell bestimmbaren Winkeln θ und ϕ des α -Chromophors. Die relative Anordnung der Chromophore zueinander ist durch die Kristallstruktur festgeschrieben. b) Aufsicht auf a). Schematische Darstellung des experimentell nicht bestimmbaren Winkels ψ .

Für einzelne PEC Monomere kann eine isotrope Verteilung auf der Probe ange-

nommen werden. Durch die Bestimmung der Orientierung des PVB-Chromophors kann der Konfigurationsraum der beiden PVB-Chromophore jedoch stark eingeschränkt werden. Die Bestimmung des Azimutalwinkels ϕ des PVB-Chromophors gelingt nach der Charakterisierung des Detektionswegs wie es im Kapitel 3.4 beschrieben wurde. Eine definierte Anregungspolarisation führt dabei zu einem integralen Fluoreszenzmaximum. Aus der Korrelation zwischen der EOM-Spannung und dem Azimutalwinkel ϕ des Laborkoordinatensystems kann ϕ direkt ermittelt werden. Für die Bestimmung der Polhöhe θ wurden bereits verschiedene Verfahren vorgeschlagen [137, 138], die wegen der hohen Photolabilität monomerer PEC Moleküle jedoch nicht zum Einsatz kommen können. Der Winkel θ wird deshalb durch Skalierung der integralen Fluoreszenzintensität bestimmt. Dieses Vorgehen gründet auf die folgende Überlegung: Durch die ausreichend große Statistik, kann nach der Untersuchung von 101 Molekülen das maximal erreichte, integrale Fluoreszenzsignal I_{\max} einem Molekül zugeschrieben, dessen Übergangsdipolmoment in der xy -Ebene liegt. Alle anderen detektierten Fluoreszenzintensitäten folgen in Abhängigkeit von der Polhöhe θ dem bekannten \sin^2 -Verhalten. Die Polhöhe θ lässt sich demnach über

$$\theta = \arcsin \sqrt{I/I_{\max}} \quad (5.2)$$

bestimmen. Damit ist die absolute Orientierung des PCB-Chromophors bestimmt. Nun misst man die Fluoreszenzintensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} . Zur Bildung des Quotienten ist erforderlich, dass sich während der Aufnahme der Fluoreszenzzeit Spuren die Signalintensität nicht ändert. Signalfuktuationen wie sie in Abschnitt 5.1.1 beobachtet wurden, verfälschen die Berechnung eines individuellen Energietransferkoeffizienten γ . Das Verhältnis von I_{\parallel}/I_{\perp} aus den Fluoreszenzzeit Spuren wird deshalb nur für jene Bereiche gebildet, in denen ein statisches Verhältnis über die Zeit vorliegt.

Trotz der exakt bestimmten Lage des PVB-Chromophors im Laborkoordinatensystem bleibt den beiden PCB-Chromophoren ein weiterer Freiheitsgrad. Für einen gemessenen Azimutalwinkel ϕ und eine ermittelte Polhöhe θ können die Richtungsvektoren der beiden β -Chromophore, eingeschränkt durch die Kristallstruktur, eine beliebige Position auf einem fest definierten Kegelmantel um den PVB-Chromophor einnehmen. Jede dieser möglichen Positionen kann durch den Winkel ψ beschrieben werden (Abbildung 5.7b). ψ kann dabei Werte zwischen 0 und 2π einnehmen und ist experimentell nicht zugänglich. Für jedes Monomer erhält man deshalb, bedingt durch die Unsicherheit in ψ viele möglichen Orientierungen der beiden β -Chromophore. Unter diesen Randbedingungen, d.h gemessenem I_{\parallel} und I_{\perp} , der bekannten Lage des PVB-Chromophors und frei wählbarem ψ , können diese Orientierungen berechnet werden. Aus jeder dieser Geometrien wird nach Gleichung 5.1 ein Energietransferkoeffizient γ ermittelt. Man erhält für ein Monomer deshalb, in Abhängigkeit von der Orientierung, eine Verteilung dieser Koeffizienten. Defini-

tionsgemäß sind von den berechneten Koeffizienten γ nur Werte zwischen 0 und 1 physikalisch sinnvoll. Jeder berechnete Energietransferkoeffizient γ könnte die wahren Verhältnisse in diesem einzelnen Molekül widerspiegeln.

Diese Rechnungen erfolgen mit einem Programm, dessen C-Quelltext im Anhang B.2 abgedruckt ist. Die einzelnen Schritte sind im Folgendem zusammengefasst:

Wie bereits oben erwähnt können die Richtungsvektoren der einzelnen Chromophore aus der Kristallstruktur entnommen werden. Zusammengefasst in einer Koordinatenmatrix C erhält man:

$$C = (\vec{\alpha}_{84}, \vec{\beta}_{84}, \vec{\beta}_{155}) = \begin{pmatrix} -0,25 & 0,31 & -0,27 \\ -0,96 & 0,81 & -0,47 \\ 0,14 & -0,50 & -0,84 \end{pmatrix} \quad (5.3)$$

Die Orientierungen werden im Folgenden den Richtungsvektoren der Übergangsdipolmomente der Chromophore zugeschrieben (vgl. Abschnitt 3.2). Mit geeigneten Drehmatrizen legt man das Übergangsdipolmoment des PVB-Chromophors auf die z -Achse, während das Übergangsdipolmoment des β_{84} -Chromophors in die xz -Ebene gebracht wird. Die daraus resultierende Koordinatenmatrix ist die Startmatrix für alle durch den frei wählbaren Winkel ψ möglichen Orientierungen der Chromophore:

$$C_z = \begin{pmatrix} 0 & 0,39 & 0,66 \\ 0 & 0 & -0,56 \\ 1 & -0,92 & -0,50 \end{pmatrix} \quad (5.4)$$

Mit dieser Startmatrix ist eine anschauliche Beschreibung der Drehoperationen, die die Chromophore in die gewünschte Lage bringen, möglich. Aus dieser Lage wird der β_{84} -Chromophor um den Winkel ψ um den auf der z -Achse liegenden PVB-Chromophor gedreht ($D_{z,\psi}$). Der β_{155} -Chromophor folgt dabei der Bewegung des β_{84} -Chromophors. Im Anschluss wird der α_{84} -Chromophor auf seine experimentell bestimmten Azimutalwinkel ϕ und seine Polhöhe θ gebracht. Dazu wird er zuerst um die y -Achse um den Winkel θ gedreht ($D_{y,\theta}$), anschließend um den Winkel ϕ um die z -Achse ($D_{z,\phi}$). Für diese hier aufgezeigten Einzelschritte lässt sich eine Gesamtdrehmatrix D_{rot} erstellen:

$$D_{rot} = D_{z,\phi} D_{y,\theta} D_{z,\psi} = \begin{pmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos \theta & 0 & -\sin \theta \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin \theta & 0 & \cos \theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos \phi & \sin \phi & 0 \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5.5)$$

Aus $C' = D_{rot} C_z$ erhält man für alle möglichen Winkel ψ im Bereich von 0 bis 2π die Richtungsvektoren der drei Chromophore. Wie oben bereits erwähnt, wird über

Gleichung 5.1 und den Gleichungen 3.31 und 3.32 für jede Orientierung, die durch den Winkel ψ beschrieben wird, der erwartete Energietransferkoeffizient γ ermittelt. Die verschiedenen γ -Werte eines Monomeren lassen sich, wie in Abbildung 5.8 gezeigt in einem Histogramm auftragen.

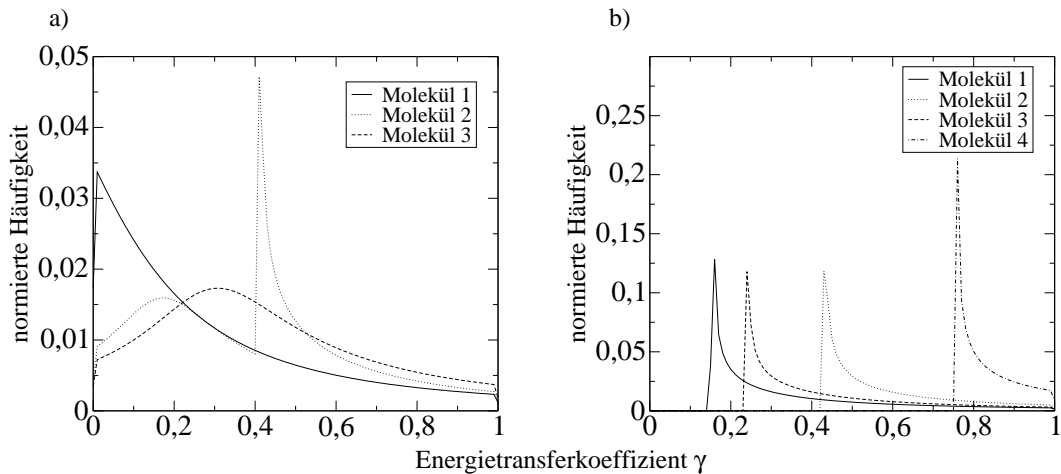


Abbildung 5.8: Histogramm über die Häufigkeit verschiedener Energietransferkoeffizienten γ , bedingt durch den Freiheitsgrad ψ . a) Ausgewählte Histogramme, bei denen der Energietransferkoeffizient alle Möglichkeiten von 0 bis 1 abdeckt. b) Ausgewählte Histogramme, bei denen der Energietransferkoeffizient nur einen Teil des möglichen Bereiches zwischen 0 und 1 abdeckt.

Für 51 der 101 Moleküle erstrecken sich die unter den jeweiligen Randbedingungen berechneten Energietransferkoeffizienten über den gesamten Bereich von 0 bis 1 (vgl. Abbildung 5.8a). Für jeden der experimentell zugänglichen Parameter, wie V , ϕ und θ , und den frei wählbaren Parameter ψ findet sich im gesamten, physikalisch sinnvollen Ergebnisraum ein γ , so dass Gleichung 5.1 erfüllt ist. Für diese Moleküle ist keine Aussage über den intramolekularen Energietransfer möglich. Die Maximalwerte in den Verteilungen sind Artefakte der Berechnung. Um alle Orientierungen zu berechnen, die sich aus dem experimentell nicht zugänglichen Winkel ψ zu ergeben, wurde der Wertebereich von 0 bis 2π linear abgetastet. Die zur Berechnung nötigen Winkelfunktionen besitzen im Bereich von 0 bis 2π jedoch keine konstante Steigung und es gibt Intervalle in denen Änderungen im Winkel zu fast keiner Orientierungsänderung führen. In diesen Bereichen häufen sich identische Energietransferkoeffizienten γ und führen somit zu einem Maximum in der Verteilung.

Für 50 Moleküle erstrecken sich die ermittelten Transferkoeffizienten nicht über den ganzen Bereich (vgl. Abbildung 5.8b). Es findet sich ein minimaler Transferkoeffizient γ_{\min} , der in der Berechnung nicht unterschritten werden kann, d.h. mit dem

frei wählbaren Parameter ψ (bei gegebenem ϕ und θ) findet sich keine Geometrie, die das experimentell bestimmte Intensitätsverhältnis I_{\parallel}/I_{\perp} mit einem Energietransferkoeffizienten kleiner γ_{\min} beschreiben kann. Für das PEC Molekül bedeutet dies, dass vom PVB-Chromophore mindestens dieser Anteil der Anregungsenergie auf den β -155 Chromophor fließen muss, um mit den experimentellen Daten in Einklang zu sein. Eine Häufigkeitsverteilung über die Energietransferkoeffizienten γ_{\min} ist in Abbildung 5.9 wiedergegeben. Es zeigt sich eine breite Verteilung an γ_{\min} -Werten.

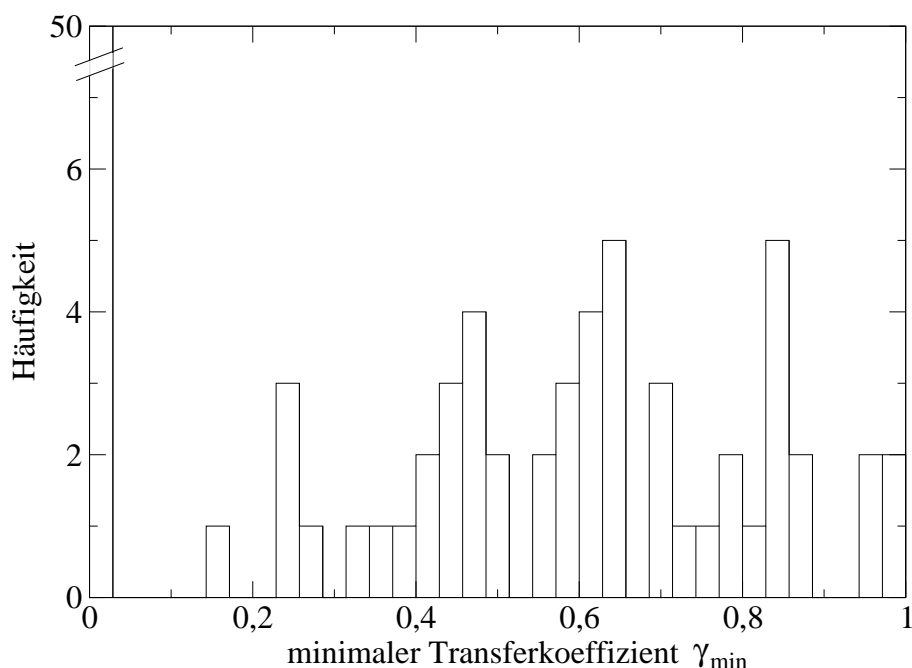


Abbildung 5.9: Histogramm über die Energietransferkoeffizienten γ_{\min} verschiedener Moleküle. Unter $\gamma = 0$ gruppieren sich die Moleküle für die Transferkoeffizienten von 0 bis 1 möglich sind und somit ihren minimalen Schnittpunkt bei 0 besitzen.

Den Ursprung dieser Heterogenitäten versteht man, wenn man den Energietransfer einzelner Monomere mit dem berechneten Energietransfer nach Förster vergleicht. Dazu werden im nun folgenden Abschnitt die in die Försterrechnung eingehenden, experimentell zugänglichen Parameter bestimmt. Im Anschluss kann man aus der Försterrechnung einen Wert ermitteln, der den Energietransfer auf den β_{155} -Chromophor widerspiegelt. Da für diese Rechnung jedoch Parameter aus Ensemblemessungen eingehen, stellt dieser Wert lediglich den Durchschnitt des Ensembles dar. Schreibt man einzelnen Monomeren individuelle Parameter zu, dann kann man über diese Simulation den Energietransfer individuell modellieren. Dies ermöglicht den Vergleich der hier gewonnenen Daten mit den Ergebnissen, die man aus Berechnung des Energietransfers nach Förster erhält.

5.2 Parameter für den Energietransfer im PEC

In Lichtsammelkomplexen findet die Aufnahme der Energie für die Photosynthese statt. Diese Energie wird über Energietransfermechanismen an das Reaktionszentrum weitergeleitet. In Messungen zum Fluoreszenzzerfall am Monomer und am Trimer ist dieser Energietransfer ersichtlich. Jedoch kann er wegen der Vielzahl an beteiligten Chromophoren nicht im Detail verstanden werden. Um ihn aufzuklären, zerlegt man den Energietransfer in seine einzelnen Teilschritte und kann darauf aufbauend den komplexen Gesamtvorgang erfassen. Mechanistisch läuft der Transfer der Anregungsenergie im monomeren PEC nach dem Förstermechanismus ab. Für seine mathematische Beschreibung benötigt man die aus Ensemblemessungen zugängliche Fluoreszenzlebenszeit und Fluoreszenzquantenausbeute des Energiedonors (vgl. Kapitel 3.3.2). Jeder Chromophor in einer Lichtsammelantenne kann dabei als Donor dienen. Deshalb ist für die Bestimmung der Energietransferraten die Fluoreszenzlebenszeit und Fluoreszenzquantenausbeute aller im System vorhandenen Chromophore nötig.

Als weitere Parameter zur Berechnung der Ratenkonstanten benötigt man die spektralen Überlappintegrale. Diese erhält man aus den Absorptions- und Fluoreszenzspektren der am Energietransfer beteiligten Chromophore. Das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum der α -Untereinheit kann dabei direkt dem PVB-Chromophor zugeordnet werden. Die individuellen Spektren der beiden PCB-Chromophore der β -Untereinheit sind auf diese Weise nicht zugänglich. Hier wird deshalb ein Verfahren vorgestellt um auch deren Spektren zu erhalten. Alle Spektren werden mit mathematischen Funktionen beschrieben, um im Weiteren den Einfluss von spektralen Verschiebungen auf die Energietransferraten untersuchen zu können.

5.2.1 Fluoreszenzzerfallskonstanten im PEC

Bereits im einfachen Monomer mit einem PVB- und zwei PCB-Chromophoren, findet ein komplexer Austausch der Anregungsenergie statt. Dieser muss mit bereits neun Raten beschrieben werden (vgl. Abbildung 5.4). Basis für die Berechnung dieser Raten bilden die Fluoreszenzzerfallszeiten der beteiligten Chromophore. Diese werden hier durch Messungen an der α - und β -Untereinheit bestimmt. Ebenfalls stand monomeres und trimeres PEC zur Verfügung. Deren wellenlängenabhängigen Fluoreszenzzerfallszeiten zeigen bereits den komplexen Energietransfer auf und verdeutlichen die Notwendigkeit, diesen zuerst für das im Vergleich dazu wesentlich einfacher gebaute Monomer im Detail zu verstehen.

Die Fluoreszenzzerfallszeiten wurden mit dem unter Abschnitt 4.4.4 beschriebenen,

experimentellen Aufbau gemessen. Sie wurden in Abhängigkeit von der Anregungs- und der Detektionswellenlänge ermittelt. Die Fluoreszenzzerfälle der einzelnen Proben folgen keinem monoexponentiellen Zerfallsgesetz. Zur Kurvenanpassung wurde jeweils eine Summe aus zwei oder drei Exponentialfunktionen verwendet. In Abbildung 5.10 ist ein typischer Fluoreszenzzerfall exemplarisch dargestellt. Die ermittelten, komplizierten Zerfallskinetiken erlauben oftmals keine direkte Zuordnung zu molekularen Prozessen. Sie bilden jedoch die Basis zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzlebenszeit $\langle t \rangle$ wie sie zur Berechnung des Energietransfers nach Förster notwendig ist. $\langle t \rangle$ wurde entsprechend Gleichung 2.8 berechnet.

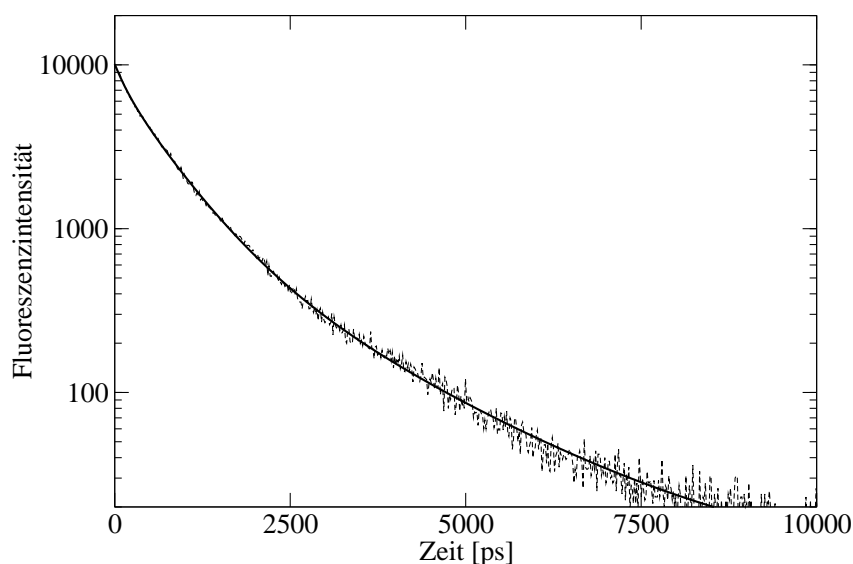


Abbildung 5.10: Beispiel für einen triexponentiellen Fluoreszenzzerfall der α -Untereinheit (gestrichelte Linie) mit angepasster Zerfallsfunktion (durchgezogene Linie). Anregungswellenlänge $\lambda = 580$ nm. Detektionswellenlänge $\lambda = 620$ nm.

α -Untereinheit

Obwohl die α -Untereinheit nur einen Chromophor trägt, muss der Fluoreszenzzerfall mit einem triexponentiellen Zerfallsgesetz beschrieben werden (vgl. Abbildung 5.10). Der Zerfall besitzt zwei Hauptkomponenten mit Zeitkonstanten von 200 ps und 600 ps. Die dritte, wesentlich langsamere Komponente hat eine weitaus

geringere Amplitude. Während die ermittelten Zeiten der beiden Hauptkomponenten unabhängig von der Detektionswellenlänge sind, findet sich in der langsamen Komponente eine klare Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Von 560 nm bis 580 nm findet eine Zunahme von 1153 ps auf 1885 ps statt. Die mittlere Fluoreszenzlebenszeit $\langle t \rangle$ für den PVB-Chromophor der α -Untereinheit variiert über diesen Bereich von 738 ps bis 1013 ps. In Tabelle 5.1 sind diese Zeiten zusammengetragen.

	Anregung					
	560,0 nm		570,0 nm		580,0 nm	
Emission	A	τ [ps]	A	τ [ps]	A	τ [ps]
580 nm	0,41	332	0,33	230		
	0,42	627	0,50	615		
	0,17	1174	0,18	1283		
$\langle t \rangle$		738		817		
600 nm	0,39	269	0,39	301	0,14	117
	0,43	573	0,44	616	0,74	635
	0,17	1243	0,17	1391	0,11	1885
$\langle t \rangle$		768		848		1013
620 nm	0,17	100	0,39	230	0,21	156
	0,61	426	0,48	613	0,68	633
	0,22	1153	0,13	1456	0,11	1840
$\langle t \rangle$		767		839		982

Tabelle 5.1: Fluoreszenzzerfallskonstanten der α -Untereinheit in Abhängigkeit von der Anregungs- und Detektionswellenlänge. $\langle t \rangle$ ist die mittlere Fluoreszenzlebenszeit nach Gleichung 2.8.

Ein direkter Vergleich der α -Untereinheit des PEC mit der α -Untereinheit von PC oder APC ist wegen des chemisch unterschiedlichen PVB-Chromophors schwierig. Im C-PC aus *Anabaena variabilis* finden sich für den PCB-Chromophor der α -Untereinheit zwei Zerfallszeiten mit 1480 ps und 450 ps, die unabhängig von der Detektionswellenlänge sind [139]. Heferle et al. [140] konnte die Existenz zweier Zerfallszeiten auch am C-PC aus *Mastigocladus laminosus* beobachten und ordneten diesen unterschiedliche Subpopulationen zu. Die zwei ähnlichen Zeitkonstanten des PVB-Chromophor des PEC deuten darauf hin, dass es auch für die α -Untereinheit diese Subpopulationen gibt. Beim PEC(X) aus *Westiellopsis prolifica* handelt es sich um ein der α -Untereinheit des PEC ähnliches Protein. Schneider et al. [141] fanden für dieses Protein ebenfalls drei Zeitkonstanten mit 200 ps, 700 - 1500 ps und 3000 ps - 6300 ps. Die sehr lange Fluoreszenzlebenszeit um 3000 ps - 6300 ps mit eine Amplitude bis zu 10% konnten in der α -Untereinheit des PEC nicht gefunden werden. Für die beiden anderen finden sich im Fluoreszenzzerfall der α -Untereinheit des

PEC entsprechende Übereinstimmungen. PEC(X) zeigt bei konstanter Anregungswellenlänge ($\lambda = 575$ nm) eine deutliche Zunahme der beiden langen Zerfallskonstanten mit längerwelliger Detektion [141]. Auch für die lange Fluoreszenzlebenszeit in der α -Untereinheit findet man bei Anregung mit 570 nm dieses Verhalten. Bei der Anregung mit 570 nm findet mit längerwelliger Detektion eine Zunahme von 1283 ps zu 1456 ps statt. Im PEC(X) erhöht sich im selben Wellenlängenbereich die mittlere Komponente von 700 ps auf 1500 ps. Schneider et al. ordneten diesen Effekt der Detektion unterschiedlicher Subpopulationen des PEC(X) zu. Populationen die längere Zerfallszeiten zeigen, emittieren längerwelliger. Verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum einer Spezies zur geringeren Energien, dann verschiebt sich, unter der Annahme, dass der Stokes Shift konstant bleibt, auch das Absorptionsmaximum entsprechend. Wenn in der α -Untereinheit des PEC ähnliche Effekte wie im PEC(X) auftreten, dann wäre dies eine mögliche Erklärung für die im PVB sehr deutliche Zunahme der langen Fluoreszenzkomponente mit längerwelliger Anregung. Die Ursache für die schnelle Komponente um 200 ps bleibt ungeklärt. Da auch Schneider et al. diese Komponente im PEC(X) beobachten konnte, kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um einen experimentellen Artefakt durch die Antwortfunktion des Messapparates handelt. Als mögliche Erklärung bleibt die Photochemie des PVB-Chromophors die vielleicht mit dieser Zerfallskomponente in Zusammenhang gebracht werden kann.

β -Untereinheit

Anders als beim PVB-Chromophor, dessen Fluoreszenzzerfall triexponentiell verläuft, gelingt die Beschreibung des Fluoreszenzzerfalls der β -Untereinheit trotz der Anwesenheit zweier Chromophore mit einem biexponentiellen Zerfallsgesetz. Die wellenlängenabhängigen Zerfallszeiten sind in Tabelle 5.2 zusammengetragen. Dort ist ersichtlich, dass die Zeitkonstanten sowohl von der Anregungs- als auch von der Detektionswellenlänge unabhängig sind. Auch das Verhältnis der Amplituden ist weitgehend konstant (2/3). Die kurze Zeit bewegt sich im Bereich von 308 ps bis 572 ps, während die lange Komponente im Bereich von 1344 ps bis 1492 ps liegt. Die mittlere Fluoreszenzlebenszeit variierte zwischen 1163 ps und 1296 ps.

Die Chromophore der β -Untereinheit des PEC sind mit den PCB-Chromophoren des PC identisch. Auch die Umgebungen der Chromophore in PEC und PC sind sich sehr ähnlich [136, 134]. Ein Vergleich der Zerfallskonstanten mit der β -Untereinheit aus C-PC (aus *Anabaena variabilis*) [139] zeigt, dass sich die beiden Untereinheiten auch hier kaum unterscheiden ($\tau_1 = 1300$ ps, $\tau_2 = 400$ ps). Ebenso ist das Verhältnis der Amplituden vergleichbar (5,5 /4,5). Für das Auftreten zwei-

Emission	Anregung							
	558,9 nm		579,3 nm		599,6 nm		620,0 nm	
	A	τ [ps]	A	τ [ps]	A	τ [ps]	A	τ [ps]
610 nm	0,36	332	0,37	344	0,35	400		
	0,64	1344	0,63	1291	0,65	1432		
$\langle t \rangle$		1222		1163		1296		
630 nm	0,41	470	0,40	468	0,42	518	0,44	326
	0,59	1437	0,60	1389	0,58	1492	0,56	1382
$\langle t \rangle$		1260		1219		1295		1219
650 nm	0,41	521	0,50	572	0,43	548	0,44	334
	0,59	1456	0,50	1473	0,57	1385	0,56	1380
$\langle t \rangle$		1264		1252		1282		1213
670 nm	0,41	486	0,42	496	0,46	550	0,42	308
	0,59	1426	0,58	1397	0,54	1475	0,58	1348
$\langle t \rangle$		1244		1211		1255		1200

Tabelle 5.2: Fluoreszenzzerfallskonstanten der β -Untereinheit in Abhängigkeit von der Anregungs- und Detektionswellenlänge. $\langle t \rangle$ ist die mittlere Fluoreszenzlebenszeit nach Gleichung 2.8.

er Zerfallszeiten können auch bei der β -Untereinheit strukturelle Subpopulationen angenommen werden. Anders als in der α -Untereinheit zeigen diese kein wellenlängenabhängiges Absorptions- und Fluoreszenzverhalten. Der direkte Zusammenhang, zwischen der schnellen Komponente um 400 ps und dem Energietransfer zwischen den beiden PCB-Chromophoren kann ausgeschlossen werden. Mit zunehmend längerwelliger Anregung, von 558 nm bis 620 nm, verliert der energetisch höher liegende β_{155} -Chromophor zunehmend an Absorption. Ein Energietransfer auf den β_{84} -Chromophor wird deshalb immer unwahrscheinlicher. Würden die beobachteten Zerfallszeiten mit dem Energietransfer in Zusammenhang stehen, dann würde man für diese Zeitkonstante bzw. deren Amplitude eine Wellenlängenabhängigkeit erwarten. Diese kann jedoch nicht beobachtet werden. Försterrechnungen zum PC zeigen, daß der Energietransfer zwischen den zwei Chromophoren mit Transferzeiten von ca. 40 ps - 100 ps abläuft [142, 143].

Fluoreszenzzerfallskonstanten des Monomers

Aus der Additivität der Absorptionsspektren der α - und β -Untereinheit folgt, dass das Monomer lediglich ein Aggregat der beiden Einheiten ist. Die Aggregation hat wegen der unveränderten Spektren keinen Einfluss auf die Chromophore, deren Spek-

tren sehr empfindlich auf strukturelle Änderungen reagieren. Der komplexe Fluoreszenzzerfall der α -Untereinheit, lässt deshalb auch für das Monomer ein ähnliches Verhalten erwarten. Tatsächlich zeigt sich, dass auch dessen Fluoreszenzzerfall in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge meistens mit einem triexponentiellen Zerfallsgesetz beschrieben werden muss. Alle Zeiten sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Es tritt eine schnelle Komponente im Bereich von 101 ps bis 308 ps auf, die

Emission	Anregung							
	558,9 nm		579,3 nm		599,6 nm		620,0 nm	
	A	τ [ps]	A	τ [ps]	A	τ [ps]	A	τ [ps]
610 nm	0,36	179	0,22	101	0,17	119		
	0,40	704	0,42	526	0,45	490		
	0,24	1782	0,35	1737	0,38	1528		
$\langle t \rangle$		1254		1379		1218		
630 nm	0,14	111	0,28	266	0,10	127	0,53	316
	0,48	574	0,43	900	0,46	513	0,47	1395
	0,38	1724	0,29	2067	0,44	1581		
$\langle t \rangle$		1361		1514		1290		1172
650 nm	0,28	257	0,26	259	0,08	107	0,53	313
	0,44	860	0,42	821	0,48	510	0,47	1388
	0,27	1941	0,33	1962	0,44	1588		
$\langle t \rangle$		1401		1484		1297		1164
670 nm	0,31	266	0,35	308	0,32	295	0,54	318
	0,48	901	0,41	989	0,44	891	0,46	1463
	0,21	2056	0,23	2049	0,24	1895		
$\langle t \rangle$		1374		1419		1316		1142

Tabelle 5.3: Fluoreszenzzerfallskonstanten des Monomers in Abhängigkeit von der Anregungs- und Detektionswellenlänge. $\langle t \rangle$ ist die mittlere Fluoreszenzlebenszeit nach Gleichung 2.8.

mit der bekannten 200 ps Komponente der reinen α -Untereinheit vergleichbar ist. Die mittlere Komponente bewegt sich im Bereich von 490 ps bis 989 ps. Die lange Zeitkonstante deckt den Bereich von 1300 ps bis 2056 ps ab.

Eine Ausnahme vom triexponentiellen Zerfallsgesetz stellt die Anregung bei 620 nm dar. Hier besitzt die α -Untereinheit nahezu keine Absorption mehr und es folgt die alleinige Anregung der β -Untereinheit. Es ist deshalb auch nicht überraschend, dass die beobachteten Zeitkonstanten von 315 ps und 1400 ps denen des Fluoreszenzzerfalls der reinen β -Untereinheit aus Tabelle 5.2 entsprechen. Bei kürzerwelliger Anregung besitzen beide Untereinheiten eine merkliche Absorption. Da-

durch erfolgt eine zusätzliche Anregung des PVB-Chromophors. Dieser tranferiert seine Anregungsenergie auf einen der beiden β -Chromophore. Die zusätzliche β -Anregungspopulation bewirkt, dass eine längere Fluoreszenzlebenszeit beobachtet werden kann [144]. Tatsächlich findet man mit abnehmender Anregungswellenlänge diese Zunahme in der langsamsten Zeitkonstante. Bei der Detektion um 670 nm ist dies am ausgeprägtesten. Die Zerfallskonstante steigt von 1463 ps auf 2056 ps an. Für die Fluoreszenzlebenszeit des PVB-Chromophors erwartet man wegen des Energietransfers auf einen der beiden PCB-Chromophore eine Verkürzung. Dies konnte nicht beobachtet werden, da alle Zerfallszeiten lediglich ein Gemisch aus dem komplexen PVB- und des PCB-Zerfall darstellen. Deshalb konnten auch die kurzen Zeiten des Fluoreszenzzerfalls des Monomers keine molekularen Vorgänge zugeordnet werden. Ähnlich wie in der α -Untereinheit findet man in der Detektion für die Komponente um 1400 ps eine Zunahme der Zerfallskonstanten bei der wellenlängenabhängigen Detektion von 610 nm bis 670 nm. Wie bereits beim Fluoreszenzzerfall der α -Untereinheit diskutiert, sind möglicherweise strukturelle Subpopulationen für dieses Verhalten verantwortlich.

Ein Vergleich mit dem Monomeren des C-PC aus *Anabaena variabilis* [139] oder aus *Synechococcus 6301* [145] zeigt deutliche Abweichungen. Die langsamste Komponente im Monomeren PEC ist um ca. 300 ps langsamer als im Monomeren des C-PC. In den Arbeiten von Zhang et al. [146], in denen Untersuchungen am PEC aus *Anabaena variabilis* erfolgten, konnten vier Zerfallskonstanten ermittelt werden. Auch im C-PC [145] lassen sich diese vier Zeiten finden. Diese vierte Zerfallskomponente ($\tau \approx 40$ ps) konnte wegen der nicht ausreichenden Zeitauflösung des hier verwendeten Experiments nicht gefunden werden.

Schneider et al. fand am Monomeren des PEC aus *Westiellopsis prolifica* ebenfalls vier Zerfallszeiten. Die längste Komponente mit 6 ns trägt jedoch nur zu 1% zur Amplitude des Fluoreszenzzerfalls bei. Auch die restlichen drei Zeiten sind nicht direkt vergleichbar. Bei der Präparation des monomeren PEC denaturierten Schneider et al. trimeres PEC mit KSCN. Von dieser Art der Probenpräparation ist bekannt, dass es dabei zu spektralen Veränderungen des Monomers kommt [118]. Dessen Spektrum lässt sich danach nicht mehr als Summe der Spektren der Untereinheiten beschreiben. Die Denaturierung mit KSCN scheint also einen strukturellen Einfluss auf das Protein zu haben. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass die dort ermittelten Zeiten nicht mit den hier vorgestellten verglichen werden können.

Fluoreszenzzerfallskonstanten des Trimers

Die Fluoreszenzzerfallskonstanten wurden sowohl für das trimere PEC ohne Linkerprotein (Tabelle 5.4) als auch für das trimere PEC mit Linkerprotein (Tabelle 5.5) bestimmt. Die Beschreibung der Zerfälle erfolgte mit einem triexponentiel-

Emission	Anregung							
	558.9 nm		579.3 nm		599.6 nm		620.0 nm	
	A	τ [ps]	A	τ [ps]	A	τ [ps]	A	τ [ps]
610 nm	0,17	198	0,13	83	0,12	79		
	0,52	1058	0,33	643	0,37	675		
	0,31	2131	0,53	1867	0,51	1895		
$\langle t \rangle$		1601		1636		1633		
630 nm	0,22	647	0,27	613	0,33	573	0,30	306
	0,36	1223	0,36	1450	0,67	1728	0,69	1672
	0,42	1956	0,37	1987				
$\langle t \rangle$		1597		1631		1567		1572
650 nm	0,25	837	0,27	743	0,26	570	0,31	349
	0,36	1258	0,36	1386	0,36	1200	0,35	1655
	0,38	2018	0,37	2051	0,38	1927	0,35	2633
$\langle t \rangle$		1602		1484		1532		1548
670 nm	0,34	713	0,34	678	0,25	508	0,31	307
	0,66	1728	0,65	1754	0,38	1161	0,69	1607
					0,37	1899		
$\langle t \rangle$		1548		1578		1506		1505

Tabelle 5.4: Fluoreszenzzerfallskonstanten des Trimers ohne Linker in Abhängigkeit von der Anregungs- und Detektionswellenlänge. $\langle t \rangle$ ist die mittlere Fluoreszenzlebenszeit nach Gleichung 2.8.

len Zerfallsgesetz. Für ausgewählte Anregungs- und Detektionsbedingungen genügt der Fluoreszenzzerfall auch einem biexponentiellen Zerfallsgesetz. Eine Abhängigkeit von Anregungswellenlänge bzw. Detektionswellenlänge ist dabei nicht zu erkennen. Aussagen über den Ursprung der verschiedenen Zerfallskomponenten sind deshalb nicht möglich. Durch die Aggregation dreier Monomere zum Trimer eröffnet sich durch den sehr geringen Abstand des α_{84} -Chromophors zum β_{84} -Chromophor eines benachbarten Monomers ein weiterer Relaxationskanal für den Fluoreszenzzerfall. Dieser ist mit ca. 20 ps [141] zu schnell um mit dem hier beschriebenen experimentellen Aufbau aufgelöst werden zu können. Ob es sich dabei um eine exzitonische Kopplung oder um einen schnellen Energietransfer nach Förster handelt ist nicht ge-

Emission	Anregung							
	558.9 nm		579.3 nm		599.6 nm		620.0 nm	
	A	τ [ps]	A	τ [ps]	A	τ [ps]	A	τ [ps]
610 nm	0,15	105	0,38	287	0,13	68		
	0,47	403	0,33	1316	0,40	385		
	0,50	1709	0,29	1926	0,47	1677		
$\langle t \rangle$		1497		1522		1452		
630 nm	0,39	360	0,35	379	0,42	347	0,46	85
	0,61	1645	0,65	1677	0,39	1547	0,25	519
					0,19	1701	0,29	1719
$\langle t \rangle$		1489		1536		1428		1396
650 nm	0,38	396	0,36	438	0,42	373	0,46	366
	0,62	1669	0,64	1725	0,39	1576	0,55	1567
					0,19	1669		
$\langle t \rangle$		1504		1560		1429		1368
670 nm	0,36	365	0,40	447	0,43	348	0,46	374
	0,64	1563	0,61	1738	0,38	1515	0,33	1429
					0,19	1658	0,22	1694
$\langle t \rangle$		1424		1551		1391		1346

Tabelle 5.5: Fluoreszenzzerfallskonstanten des Trimers mit Linker in Abhängigkeit von der Anregungs- und Detektionswellenlänge. $\langle t \rangle$ ist die mittlere Fluoreszenzlebenszeit nach Gleichung 2.8.

klärt. Die spektralen Änderungen bei der Aggregation von drei Monomeren zu einem Trimer lassen jedoch mindestens eine schwache Kopplung zwischen den Chromophoren möglich erscheinen. Generell ist die mittlere Fluoreszenzlebenszeit des Trimers länger als bei den Untereinheiten und dem Monomer. Vergleicht man die mittlere Fluoreszenzlebenszeit der beiden Trimere untereinander, so findet man, dass das Trimer mit Linker im Mittel deutlich schneller zerfällt als ohne diesen.

5.2.2 Fluoreszenzquantenausbeuten der α - und β -Untereinheiten

Der komplexe Energietransfer des monomeren PEC lässt sich über die photophysikalischen Parameter der beiden Untereinheiten nach dem Förstermechanismus beschreiben. Neben den Fluoreszenzlebenszeiten des PVB- und des PCB-Chromophors die im vorhergehenden Abschnitt ermittelt wurden, geht in die Berechnung der Ener-

gietransferraten auch die Fluoreszenzquantenausbeute ein. Diese sind ebenfalls experimentell zugänglich. Die Fluoreszenzquantenausbeuten der α - und β -Untereinheiten wurden durch den Vergleich mit Referenzfarbstoffen bekannter Quantenausbeuten ϕ_r ermittelt. Bei gleicher Extinktion der Untereinheit und des Referenzfarbstoffes an der Anregungswellenlänge ergibt sich die Fluoreszenzquantenausbeute direkt aus dem Vergleich des integralen Fluoreszenzspektrums F_r des Referenzfarbstoffes mit dem integralen Fluoreszenzspektrum F_u der Untereinheit [60]:

$$\phi_u = \frac{F_u n_u^2}{F_r n_r^2} \phi_r \quad (5.6)$$

n ist dabei der Brechungsindex des Solvens. Wegen der üblicherweise vorhandenen wellenlängenabhängigen Transmissionscharakteristik des Fluoreszenzspektrometers muss bei der Auswahl des Referenzfarbstoffes auf eine gute spektrale Übereinstimmung der Fluoreszenzspektren geachtet werden. Als Referenzfarbstoff für die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute des PVB-Chromophors kommt Rhodamin 101 (*Lambda Physik*, LC6400) zum Einsatz ($\phi = 1,0 \pm 0,02$) [147]. Die Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeute der PCB-Chromophore wurde mit Cresylviolet (*Lambda Physik*, LC 6700) [148] als Referenzfarbstoff durchgeführt ($\phi = 0,54 \pm 0,03$). Beide Referenzfarbstoffe wurden von Eaton [60] für den entsprechenden Wellenlängenbereich vorgeschlagen. In Abbildung 5.11 sind die Fluoreszenzspektren der Untereinheiten im Vergleich mit den Fluoreszenzspektren der verwendeten Referenzfarbstoffe abgebildet.

Die Fluoreszenzquantenausbeute der beiden Untereinheiten wurden für verschiedene Anregungswellenlängen bestimmt (siehe Abbildung 5.12 und Tabelle A.1). Bei der α -Untereinheit spielt bei kurzweiliger Anregung zusätzlich die Absorption des E-Isomers eine Rolle, von dem bisher noch keine Fluoreszenz beobachtet werden konnte [162]. Für die α -Untereinheit werden mit dem beschriebenen Verfahren und in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge, Fluoreszenzquantenausbeuten von 12 - 19 % ermittelt. Bei der β -Untereinheit liegt die Quantenausbeute im Bereich von 16 - 37 %. Man findet sowohl für die α - als auch für die β -Untereinheit eine Abhängigkeit der wellenlängenabhängigen Fluoreszenzquantenausbeute von der Extinktion des Absorptionsspektrums. In Bereichen in denen die Extinktion sehr gering ist oder in denen die Bandenform sehr steil ist, findet man in beiden Fällen geringe Fluoreszenzquantenausbeuten. Dies stellt die Grenzbereiche dar, innerhalb derer das von Eaton [60] vorgeschlagene Verfahren verlässliche Werte liefert. Aus den unterschiedlichen Werten wurde eine mittlere, von der Anregungswellenlänge unabhängige Fluoreszenzquantenausbeute $\bar{\phi}$ ermittelt ($\bar{\phi}_\alpha = 17\%$, $\bar{\phi}_\beta = 27\%$). Früher Untersuchungen zum Försterenergietransfer im PEC von Zhao et al. [135] stützten sich auf publizierte Fluoreszenzquantenausbeuten des PC von Sauer et al. [143]. Ein

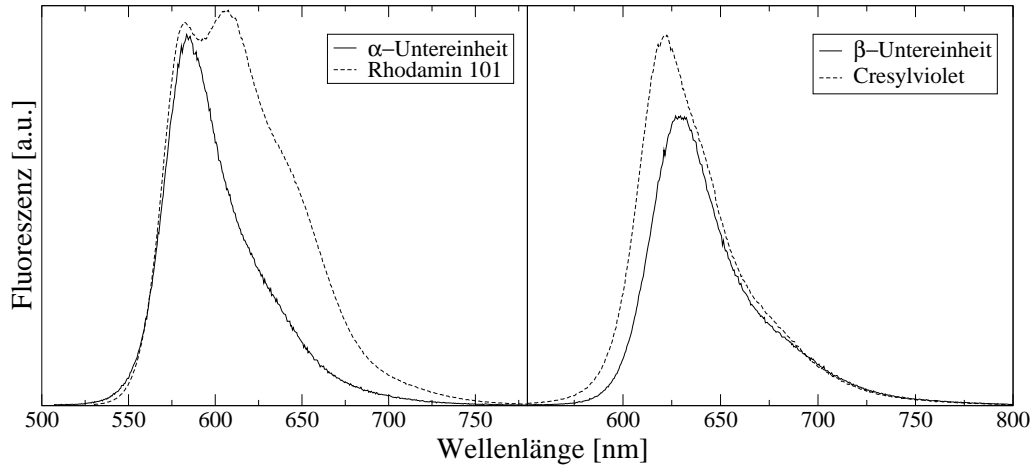


Abbildung 5.11: Fluoreszenzspektren der α -Untereinheit, der β -Untereinheit und der entsprechenden Referenzfarbstoffe Rhodamin 101 und Cresylviolet. Die gute spektrale Übereinstimmung des Referenzfarbstoffes mit dem Farbstoff unbekannter Fluoreszenzquantenausbeute erlaubt die Vernachlässigung der apparativen, wellenlängenabhängigen Charakteristik des Fluoreszenzspektrometers bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute.

Vergleich mit den nun experimentell zugänglichen Werten zeigt, dass diese um den Faktor 2 bis 3 zu hoch angesetzt wurden. Bei späteren Untersuchungen am C-PC wurde diese Werte nach unten korrigiert [142]. Ein Vergleich mit diesen Fluoreszenzquantenausbeute, mit $\phi_{\alpha 84} = 0,23$, $\phi_{\beta 84} = 0,25$ und $\phi_{\beta 155} = 0,19$, zeigt eine überraschende Ähnlichkeit beider Systeme. Erstaunlich dabei ist, dass die Quantenausbeute des β -155-Chromophors, der im C-PC der kurzwelligst absorbierende Chromophor ist, mit der Quantenausbeute des α_{84} -Chromophors im PEC vergleichbar ist. Der α_{84} -Chromophor im PEC übernimmt in diesem Biliprotein die Absorption im grünen Spektralbereich. Diese Analogie der beiden Chromophore im PEC und C-PC zeigt sich auch bei den weiter unten vorgestellten Energietransferrechnungen.

5.2.3 Berechnung des Überlappintegrals durch Modellierung der Spektren

In früheren Arbeiten zum Energietransfer im C-PC sind bereits ausführliche Vorschläge zur Modellierung einzelner Spektren der am Energietransfer beteiligten Chromophore ausgeführt [149, 150]. Probleme bei der Beschreibung individueller Chromophorspektren können dann auftreten, wenn die Spektren der Untereinheiten

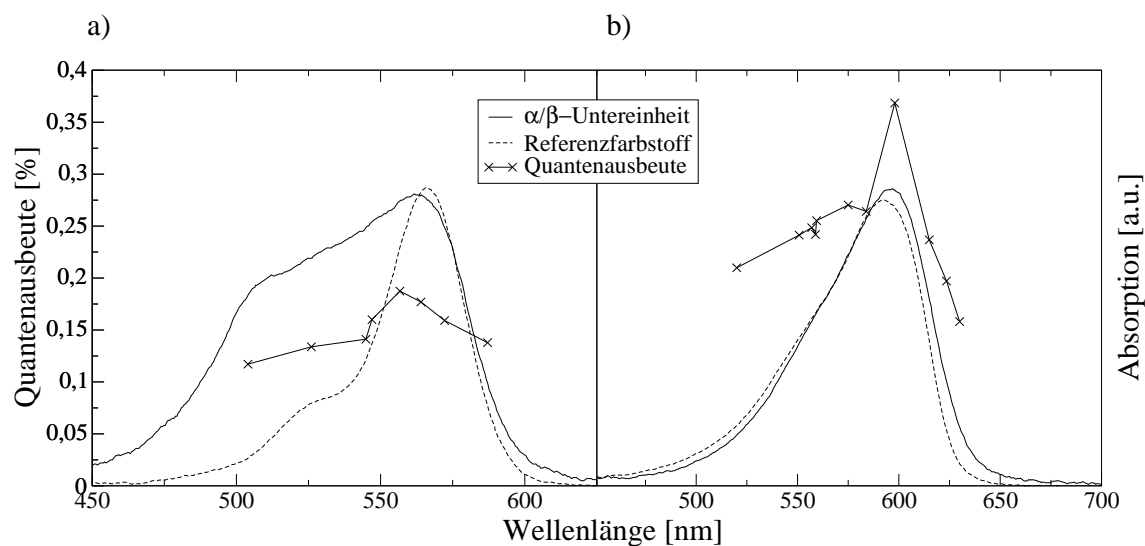


Abbildung 5.12: a): Wellenlängenabhängige Quantenausbeute der α -Untereinheit. Das Absorptionsspektrum der α -Untereinheit und des Referenzfarbstoffs Rhodamin 101 sind im Vergleich dazu dargestellt. b) Wellenlängenabhängige Quantenausbeute der β -Untereinheit. Das Absorptionsspektrum der β -Untereinheit und des Referenzfarbstoffs Cresylviolet sind im Vergleich dazu dargestellt.

sich aus mehreren einzelnen Farbstoffen zusammensetzen. Um das Gesamtspektrum in seine Teile zu zerlegen, können verschiedene Wege eingeschlagen werden. Für die Beschreibung des Energietransfers im C-PC nutzten Sauer et al. [149] für die Entfaltung des Spektrums der β -Untereinheit, in Spektren der beiden individuellen PCB Chromophore, die Bandenform des einzelnen PCB Chromophors in der α -Untereinheit. Für das integrale Fluoreszenzspektrum der β -Untereinheit wurde ein 80-85%-iger Beitrag des energetisch niedriger liegenden β -84 Chromophors angenommen und das Fluoreszenzspektrum damit fast vollständig diesem zugeschrieben. Debreczeny et al. [150] konnten im C-PC mit Hilfe einer mutierten β -Untereinheit die Ausbildung des β -155 Chromophors verhindern, wobei sich die Untereinheit nur im $\alpha\beta$ -Monomer korrekt faltete. Aus Differenzspektren war ihnen damit das Absorptionsspektrum des β -155 Chromophors zugänglich. Die Fluoreszenzspektren der beide Chromophore der β -Untereinheit wurden aus zeitaufgelösten Messungen ermittelt.

Die Spektren eines PEC Monomers setzen sich additiv aus den Spektren der beiden Untereinheiten zusammen. Die Analyse kann sich deshalb auf deren Spektren beschränken. Während die α -Untereinheit nur einen PVB Chromophor trägt und ihr Spektrum somit direkt diesem zugeschrieben werden kann, setzt sich das Spektrum der β -Untereinheit aus den individuellen Spektren beider PCB Chromophore

zusammen. Im PEC unterscheidet sich der α -Chromophor (PVB) von den beiden Chromophoren der β -Untereinheit (PCB). Ein direkter Rückschluss auf die spektralen Eigenschaften ist deshalb nicht möglich. Ebenso gibt es für die β -Untereinheit bisher keine Mutante die nur einen Chromophor aufweist, um damit Zugang zu den Spektren der einzelnen Chromophoren zu erhalten. Für PEC beschrieben Parbel et al. [151] die Absorptionsspektren der beiden β -Chromophore durch die Bilinlinienfunktion. Sie besteht aus einer Summe von vier Gaußfunktionen und einer aus der α -Untereinheit abgeleiteten Abhängigkeit der Parameter. Das Fluoreszenzspektrum der β -Untereinheit wurde vollständig dem langwellig emittierenden β -84 zugeschrieben. Das Fluoreszenzspektrum des β -155 Chromophors wurde aus dem Stokes Shift der α -Untereinheit abgeschätzt.

Um möglichst einfache arithmetische Ausdrücke für die Spektren der am Energietransfer beteiligten Chromophore zu bekommen, erfolgt in dieser Arbeit die Beschreibung der einzelnen Spektren lediglich aus der Summe zweier Gaußfunktionen pro Chromophor:

$$I(\tilde{\nu}) = A_1 e^{-\frac{-(\tilde{\nu}-x_1)^2}{b_1^2}} + A_2 e^{-\frac{-(\tilde{\nu}-x_2)^2}{b_2^2}} + U \quad (5.7)$$

Bei der Anpassung des Absorptionsspektrums des α -Chromophors wurde auf eine gute Beschreibung im Bereich niedriger Energie geachtet. Wegen der in der Einführung zum PEC (Abschnitt 5) vorgestellten Isomerisierung des PVB-Chromophors und der damit einhergehenden zusätzlichen Absorption bei hohen Energien gelingt die Beschreibung des Absorptionsspektrums in diesem Bereich nicht zufriedenstellend (siehe Abbildung 5.13a). Dies kann jedoch für die spätere Berechnung des Überlappintegrals mit den Fluoreszenzspektren der β -Chromophore vernachlässigt werden, da das Fluoreszenzspektrum der β -Untereinheit in diesem Bereich keinen Beitrag mehr liefert. Das Fluoreszenzspektrum der α -Untereinheit ist mit der gewählten Fitfunktion in guter Übereinstimmung (siehe Abbildung 5.13b).

Das Absorptionsspektrum der β -Untereinheit wurde wegen der Anwesenheit zweier Chromophore in Analogie zu Gleichung 5.7 mit einer Summe aus zweimal zwei Gaußfunktionen angepasst. Es wurde angenommen, dass beide PCB Chromophore zu gleichen Anteilen zum Spektrum beitragen, womit die Amplituden A_1 , A_2 der beiden individuellen Chromophorspektren also für beide Chromophore identisch sind. Auch die Breiten b_1 , b_2 wurden für beide Chromophorteilspektren konstant gehalten. Als dritte Einschränkung wurde die Differenz $\delta s = x_1 - x_2$ der beiden Maxima für beide Teilspektren als konstant angesehen. Mit diesen Annahmen bekommt man eine Fitfunktion mit acht freien Parametern ($A_1, A_2, x_1, x_2, \delta s, b_1, b_2, U$) die an das

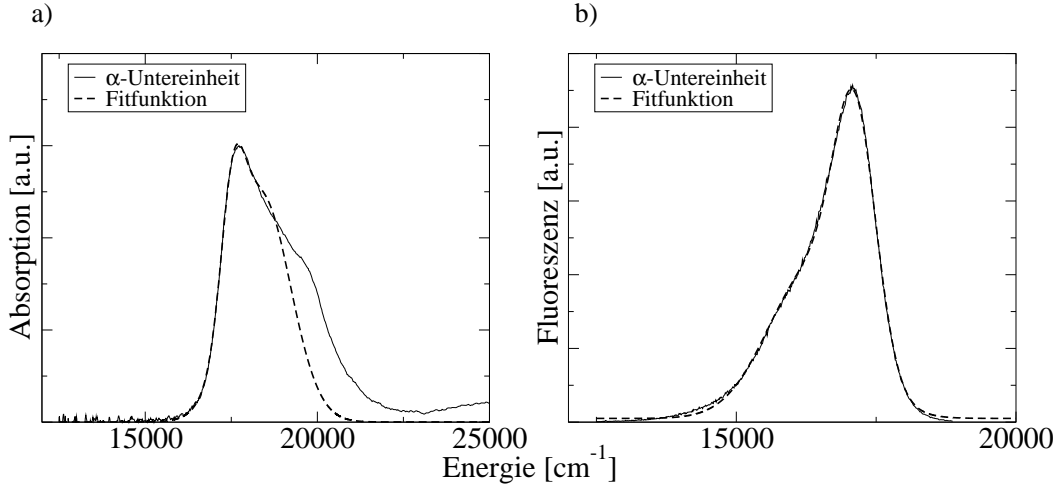


Abbildung 5.13: a) Absorptionsspektrum der α -Untereinheit und angepasste Fitfunktion (Erläuterung zu den Abweichungen siehe Text). b) Fluoreszenzspektrum der α -Untereinheit und angepasste Fitfunktion.

Absorptionsspektrum angepasst wurde:

$$\epsilon(\tilde{\nu}) = \underbrace{\left\{ A_1 e^{-\frac{-(\tilde{\nu}-x_1)^2}{b_1^2}} + A_2 e^{-\frac{-(\tilde{\nu}-(x_1+\delta s))^2}{b_2^2}} \right\}}_{\beta\text{-84 Absorption}} + \underbrace{\left\{ A_1 e^{-\frac{-(\tilde{\nu}-x_2)^2}{b_1^2}} + A_2 e^{-\frac{-(\tilde{\nu}-(x_2+\delta s))^2}{b_2^2}} \right\}}_{\beta\text{-155 Absorption}} + U \quad (5.8)$$

Die Fluoreszenz der β -Untereinheit ist durch den β -84 Chromophor dominiert. Aus dem individuellen β -84 Absorptionsspektrum und dem Fluoreszenzmaximum der β -Untereinheit kann man die Stokes Verschiebung ermitteln. Für die Stokes Verschiebung des β -155 Chromophors wurde der selbe Wert angenommen. Mit den Stokes Verschiebungen und der Spiegelsymmetrie von Absorptions- und Fluoreszenzspektrum [94] wurde aus den oben ermittelten β -84- und β -155-Absorptionsspektren die Fluoreszenzspektren modelliert. Fluoreszenz- und Absorptionsspektren, sowie die Teilspektren, die zur Beschreibung der gesamten Bande führen, sind in Abbildung 5.14a und 5.14b zusammengefasst.

Tabelle 5.6 zeigt zusammenfassend die ermittelten Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der einzelnen Chromophore. Zum Vergleich sind die Werte aus der von Parbel et al. [151] verwendeten Bilinienfunktion gegenübergestellt. Dabei zeigt sich eine gute Übereinstimmung. Der Vorteil der hier verwendeten Methode liegt in der einfacheren Handhabung der Funktion.

Für die Berechnung des Überlappintegrals der Försterrechnung sind die ermittelten Funktionen der Absorptions- und Fluoreszenzspektren auf den Extinktionsko-

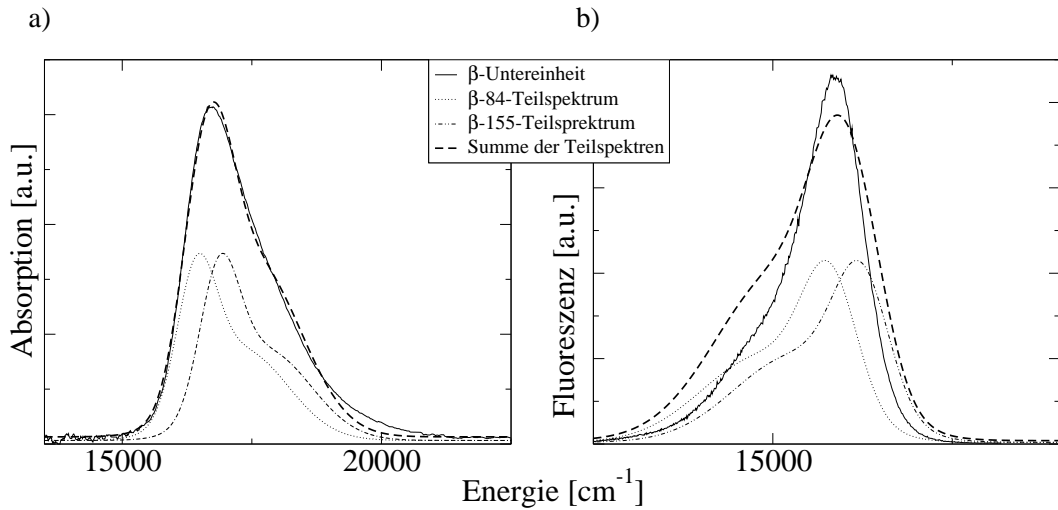


Abbildung 5.14: a) Absorptionsspektrum der β -Untereinheit, Teilspektren der beiden PCB-Chromophore und die Summe der Teilspektren. b) Fluoreszenzspektrum der β -Untereinheit, Teilspektren der beiden PCB-Chromophore, Summe der Teilspektren. Da das Fluoreszenzspektrum der β -Untereinheit vom β -84 Chromophor dominiert ist, entspricht die Summe der Teilspektren nicht dem Fluoreszenzspektrum.

Chromophor	Absorption	Fluoreszenz	Absorption [151]	Fluoreszenz [151]
α -84	564 nm	586 nm	566 nm	588 nm
β -84	606 nm	636 nm	604 nm	630 nm
β -155	590 nm	619 nm	593 nm	611-622 nm

Tabelle 5.6: Übersicht der ermittelten Absorptions- und Fluoreszenzmaxima im Vergleich zu bereits früher publizierten Werten [151] bei Verwendung der Bilinlinienfunktion.

effizienten zu skalieren bzw. auf die Fläche zu normieren (vgl. Abschnitt 3.3.2). Das Maximum des Absorptionsspektrums des PVB Chromophors wurde auf $\epsilon_{\max} = 1,1 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [132], das beiden PCB jeweils auf $\epsilon_{\max} = 1 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [151] skaliert. Die so angepassten Fitparameter und berechneten Überlappintegrale befinden sich tabellarisch im Anhang in Tabelle A.2 und Tabelle A.3.

5.3 Mittlerer Energietransfer im PEC Monomer

Der Energietransfer in monomerem PEC lässt sich beschreiben als Zusammenspiel von Austauschraten der Anregungsenergie. In Abbildung 5.4 ist dies graphisch dargestellt. Nach der elektronischen Anregung eines Chromophors X kann die Anregungsenergie mit der Ratenkonstante k_{XY} an einen der beiden anderen Chromophore (hier: Y) abgegeben werden. Alternativ kann der Chromophor X auch durch Fluoreszenz oder interne Konversion in den elektronischen Grundzustand zurückkehren (k_X). Die Berechnung der Ratenkonstanten k_{XY} erfolgt wegen der großen Abstände der einzelnen Chromophore zueinander nach Förster. Im Folgenden werden hier im Detail die nötigen Parameter zur Berechnung dieser Raten abgeleitet:

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, wird angenommen, dass das Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment parallel zueinander sind und deren Richtungsvektor entlang der langen Achse des Chromophors zeigt. Die Berechnung des Orientierungsparameter κ^2 kann deshalb aus den publizierten Richtungsvektoren der Kristallstruktur [134] erfolgen. Wie unter Kapitel 5.1.2, wird für den α -84 Chromophor nur das konjugierte Ringsystem berücksichtigt. Auch die Abstände der Chromophore zueinander wurden der Kristallstruktur entnommen. Die Orientierungsparameter und die Abstände sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

$\kappa_{\alpha 84 \beta 84}^2$	$R_{\alpha 84 \beta 84}$	$\kappa_{\alpha 84 \beta 155}^2$	$R_{\alpha 84 \beta 155}$	$\kappa_{\beta 84 \beta 155}^2$	$R_{\beta 84 \beta 155}$
2,82	48 Å	0,36	47 Å	0,68	35 Å

Tabelle 5.7: Zusammenstellung der verwendeten Orientierungsparameter κ^2 und der Abstände zwischen den Chromophoren.

Die Fluoreszenzlebensdauern wurden experimentell bestimmt (siehe Abschnitt 5.2.1). Für den PVB-Chromophor wurde die mittlerer Fluoreszenzlebensdauer von 800 ps für die Anregung bei 570 nm gewählt. Dies entspricht den experimentellen Bedingungen für die Untersuchung des Energietransfers einzelner Moleküle (siehe Kapitel 5.1.2). Die Fluoreszenzlebensdauer der β -Untereinheit ist wellenlängenunabhängig. Jedem einzelnen der beiden Chromophore wurde deshalb der experimentell ermittelte Mittelwert von 1200 ps zugeschrieben. Die Fluoreszenzquantenausbeute wurde wie unter Kapitel 5.2.2 beschrieben ermittelt. Für die α -Untereinheit wurde ein Mittelwert von 0,17 angesetzt. Jedem PCB-Chromophore wurde ein Mittelwert von 0,25 zugeschrieben. Der Brechungsindex unter Berücksichtigung der Proteinumgebung wurde auf 1,34 festgelegt [152]. Die Berechnung der spektralen Überlappintegrale erfolgte durch die Beschreibung der experimentellen Spektren mit mathematischen Funktionen in Abschnitt 5.2.3. Mit

diesen Funktionen ist eine genaue Untersuchung des Einflusses von spektralen Verschiebungen auf den Energietransfer und somit die Simulation von spektralen Heterogenitäten möglich.

5.3.1 Energietransferraten und mittlerer Relaxationskanal

Mit den gegebenen Parametern lassen sich über Gleichung 3.19 die Raten für den Energieaustausch im PEC Monomer berechnen. Das Programm, das diese Rechnung durchführte, findet sich im Anhang B.3 abgedruckt. Die so berechneten Raten sind in Tabelle 5.8 zusammengestellt.

$k_{\alpha 84\beta 84}$	$k_{\beta 84\alpha 84}$	$k_{\alpha 84\beta 155}$	$k_{\beta 155\alpha 84}$	$k_{\beta 84\beta 155}$	$k_{\beta 155\beta 84}$
10,45 ns ⁻¹	0,28 ns ⁻¹	1,44 ns ⁻¹	0,13 ns ⁻¹	2,56 ns ⁻¹	14,20 ns ⁻¹

Tabelle 5.8: Ratenkonstanten für den Energietransfer im PEC Monomer

Im PEC ist der PVB-Chromophor für die Absorption im grünen Spektralbereich (530 nm - 580 nm) verantwortlich. In den Raten findet ein mit 10,45 ns⁻¹ schneller Energietransfer auf den am energetisch tiefsten liegenden β_{84} -Chromophor statt. Mit 1,44 ns⁻¹ ist der Energietransfer vom PVB-Chromophor auf den β_{155} -Chromophor zehnmal langsamer. Anregungsenergie, die auf dem β_{155} -Chromophor lokalisiert ist, wird mit 14,2 ns⁻¹ ebenfalls sehr schnell auf den energetisch tiefer liegenden β_{84} -Chromophor transferiert. Alle entsprechenden Rückraten sind im Vergleich dazu klein.

Da nun der Energietransfer in monomerem PEC mit Raten beschrieben werden kann, die aus seinen eigenen photophysikalischen Eigenschaften abgeleitet sind, ist an dieser Stelle ein direkter Vergleich mit dem PC möglich. Beide Lichtsammelantennen besitzen sehr ähnliche Strukturen [136, 134]. Dies gilt sowohl für die Orientierungen der Chromophore zueinander, wie auch für die Abstände. Beide für den Energietransfer essentiellen Parameter sind für PC und PEC nahezu identisch. Im Wesentlichen unterscheidet sich PC und PEC nur durch den Chromophor in der α -Untereinheit. Während im PC an der Position Cys-84 ein PCB-Chromophor ($\lambda_{\max} = 624$ nm) [150] sitzt, hat PEC an dieser Stelle einen PVB-Chromophor ($\lambda_{\max} = 564$ nm). Die energetische Situation ist damit vollkommen anders geartet. Im PC stellt der β_{155} -Chromophor den kurzwelligst absorbierenden Chromophor dar. Dies verlagert sich im PEC auf die α -Untereinheit. Zusammenfassend ändert sich die energetische Reihenfolge vom PC aus *Synechococcus sp.* PCC 7002 mit $\beta_{155} > \alpha_{84} > \beta_{84}$ [142] zu $\alpha_{84} > \beta_{155} > \beta_{84}$ im PEC. Sowohl die Rechnungen zum Energietransfer im PC, als

auch die hier vorgestellten Rechnungen zum PEC zeigen, dass alle Raten zum energetisch niedrigst liegenden Chromophor sehr schnell sind. In beiden Fällen ist dies der β_{84} -Chromophor. Neben den geometrischen Parametern, wie der Orientierung und der Abstand zwischen den Chromophoren, sind trotz der energetischen Neuordnung auch die spektralen Überlappintegrale nahezu identisch. Betrachtet man den Orientierungsparameter des β_{155} -Chromophors zum β_{84} -Chromophor ($\kappa^2 = 0,68$), dann ist der Energietransfer zwischen den beiden Chromophoren eher ungünstig. Der sehr geringe Abstand von ca. 35 Å ist dafür verantwortlich, dass die Energieübertragung vom β_{155} - zum β_{84} -Chromophor mit der schnellen Rate von ca. 14 ns^{-1} erfolgt. Für die Energieübertragung vom α_{84} -Chromophor zum β_{84} -Chromophor ist die Situation vertauscht. Hier ist der Abstand zwischen den beiden Chromophoren mit 48 Å wesentlich grösser. Eine auf effizienten Energietransfer optimierte Ausrichtung der Chromophore zueinander ($\kappa^2 = 2,82$) bedingt eine schnelle Energietransferrate von ca. 10 ns^{-1} . Obwohl sich die energetischen Verhältnisse vom PC zum PEC drastisch geändert haben, bleibt dem β_{84} -Chromophor in beiden Antennen die Aufgabe des Trichters für die Anregungsenergie.

5.3.2 Gleichgewichtsverteilung der Anregungsenergie im PEC Monomer

Unter der Gleichgewichtsverteilung der Anregungsenergie versteht man die mittlere Population des angeregten Zustands. Diese Verteilung stellt sich ein, wenn die zur Relaxation führende Fluoreszenz mit einer, verglichen mit den Energieaustauschraten, sehr langsamen Ratenkonstanten k_{rad} erfolgt. Die zeitabhängige Entwicklung des angeregten Zustandes lässt durch ein differentielles Gleichungssystem beschreiben:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} N_{\alpha 84} \\ N_{\beta 84} \\ N_{\beta 155} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(k_{\alpha 84\beta 84} + k_{\alpha 84\beta 155}) & k_{\beta 84\alpha 84} & k_{\beta 155\alpha 84} \\ k_{\alpha 84\beta 84} & -(k_{\beta 84\alpha 84} + k_{\beta 84\beta 155}) & k_{\beta 155\beta 84} \\ k_{\alpha 84\beta 84} & k_{\beta 84\beta 155} & -(k_{\beta 155\alpha 84} + k_{\beta 155\beta 84}) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} N_{\alpha 84} \\ N_{\beta 84} \\ N_{\beta 155} \end{pmatrix} \quad (5.9)$$

Die Gleichgewichtsverteilung erhält man, wenn das System equilibriert ist, sich die Besetzung mit der Zeit also nicht mehr ändert ($\frac{dN_X}{dt} = 0$). Mit dieser Randbedingung und der Normierung der Besetzungszahlen N_X ($N_{\alpha 84} + N_{\beta 84} + N_{\beta 155} = 1$)

lässt sich das Gleichungssystem lösen. Man erhält die prozentuale Energieverteilung je Chromophor. Die Ergebnisse der stationären Lösung des Gleichungssystem sind in Tabelle 5.9 zusammengetragen. Unter Vernachlässigung des Fluoreszenzprozesses zeigt sich, dass sich im Gleichgewichtsfall 83% der Anregungsenergie auf dem β -84 Chromophor befinden. Dies ist in gutem Einklang mit der oben aufgeführten, qualitativen Analyse, die den β -84 Chromophor als Trichter der Anregungsenergie ausgemacht hat. Der PVB Chromophor, der die Absorption im grünen Spektralbereich abdecken soll, scheint nach der stationären Lösung kaum Energie zu behalten.

Die stationäre Lösung obiger Differentialgleichung wurde unter Vernachlässigung der Fluoreszenzraten der betroffenen Chromophore gewonnen. Für das Monomer liegen die ermittelten Energietransferraten jedoch in der selben Größenordnung wie die mittlere Fluoreszenzlebenszeiten. Das Gleichungssystem 5.9 kann deshalb nur eine sehr grobe Näherung darstellen. Um beurteilen zu können, aus welchem Chromophor nach Anregung die Fluoreszenz zu erwarten ist, muss berücksichtigt werden, dass bereits während der Einstellung des stationären Gleichgewichts Fluoreszenz oder interne Konversion erfolgen kann. Dafür wird in einer Monte Carlo Simulation die Anregung in jedem Teilschritt verfolgt und eine Statistik über die Herkunft der Relaxation angelegt.

5.3.3 Monte Carlo Simulation des Energietransfers

Für die allgemeine Beschreibung des Verfahrens werden die Chromophore im folgenden mit A, B und C bezeichnet. k_{XY} bezeichnet dabei die Ratenkonstante für den Energietransfer von X auf Y. Dies wird im folgenden als Ereignis XY beschrieben. Die inverse Fluoreszenzlebenszeit des Chromophors X wird k_X genannt. Die Fluoreszenz entspricht dem Ereignis X. Für die Simulation des Energietransfers wurde angenommen, dass in jedem Simulationsschritt entweder Energietransfer oder Relaxation eintritt, d.h. die normierte Summe aller Depopulationsraten entspricht der Wahrscheinlichkeit $P = 1$:

$$k_{\text{tot}} = k_{\text{AB}} + k_{\text{AC}} + k_{\text{A}} \quad (5.10)$$

$$P = \frac{k_{\text{AB}}}{k_{\text{tot}}} + \frac{k_{\text{AC}}}{k_{\text{tot}}} + \frac{k_{\text{A}}}{k_{\text{tot}}} = 1 \quad (5.11)$$

Der Ereignisraum wird in Intervalle eingeteilt. Die Größe des Intervall ist gegeben durch den Anteil, den die Rate für dieses Ereignis im Vergleich zur Summe der Raten einnimmt:

$$\left[0, \frac{k_{\text{AB}}}{k_{\text{tot}}} \right] \quad \text{Ereignis AB tritt ein}$$

$$\begin{aligned} \left[\frac{k_{AB}}{k_{\text{tot}}}, \frac{k_{AB} + k_{AC}}{k_{\text{tot}}} \right] & \quad \text{Ereignis AC tritt ein} \\ \left[\frac{k_{AB} + k_{AC}}{k_{\text{tot}}}, 1 \right] & \quad \text{Ereignis A tritt ein} \end{aligned} \quad (5.12)$$

Die Simulation beginnt mit einem angeregten Chromophor A. Es wird eine Pseudozufallszahl nach dem Mersenne-Twister Verfahren [153] im Intervall $[0, 1[$ ermittelt. Das entsprechende Teilintervall 5.12 entscheidet, welches der drei möglichen Ereignisse eingetreten ist. Befindet sich die Anregung nach diesem Simulationsschritt weiterhin auf einem der Chromophore (hier: B und C), wird die Simulation fortgesetzt, bis die Relaxation der Anregung erfolgt. Eine Statistik über maximal 10^7 Simulationsschritte gibt Aufschluss darüber an welchem Chromophor die Relaxation der Anregung erfolgt. Tabelle 5.9 zeigt eine Zusammenfassung dieser Simulationen. Im Anhang B.4 ist das zur Simulation verwendete *Fortran*-Programm abgedruckt.

Relaxationskanal	angeregter Chromophor			stationäre Lösung (siehe Gleichung 5.9)
	α -84	β -84	β -155	
α -84	12 %	3 %	3 %	2 %
β -84	75 %	83 %	78 %	83 %
β -155	13 %	14 %	19 %	15 %
β -84 normiert	85 %	86 %	80 %	85 %
β -155 normiert	15 %	14 %	20 %	15 %

Tabelle 5.9: Übersicht über die Relaxationskanäle unter verschiedenen Anregungsbedingungen. Die stationäre Lösung ist dem gegenübergestellt. Die auf die β -Fluoreszenz normierten Lösungen entsprechen dem Transferkoeffizienten γ der Einzelmolekülbedingung (Kapitel 5.1.2).

Für die Anregung des PVB-Chromophors tritt eine deutliche Abweichung im Vergleich zur stationären Lösung auf. Ca. 12% der Anregungsenergie führen direkt zur Fluoreszenz und werden nicht, wie aus der stationären Lösung erwartet, auf den β_{84} -Chromophor transferiert. Es ist ersichtlich, dass das System mit den Energietransferraten aus Tabelle 5.8 nicht schnell genug equilibrieren kann. Verantwortlich für dieses Verhalten ist die schnelle Fluoreszenzrelaxation des PVB-Chromophors. Diese tritt direkt in Konkurrenz zum Energietransfer. Bei der direkten Anregung des β_{84} -Chromophors erhält man aus der Simulation das gleiche Resultat wie aus der stationären Lösung. Die sehr langsamen Rückraten des Energietransfers sorgen dafür, dass die Anregungsenergie größtenteils auf dem β_{84} -Chromophor bleibt. Die Energieübertragung auf den PVB-Chromophor findet nahezu nicht statt. Man beobachtet lediglich einen schnellen Austausch zwischen den beiden PCB-Chromophoren.

Vergleichbares gilt bei der Anregung des β_{155} -Chromophors. Jedoch sind hier noch geringe Unterschiede im Vergleich zur stationären Lösung festzustellen.

In den Energietransferuntersuchungen einzelner PEC Monomere konnte lediglich die Fluoreszenz der beiden PCB-Chromophore beobachtet werden. Will man die hier ermittelte Energieverteilung mit den Ergebnissen des Einzelmolekülexperiments vergleichen, dann müssen die hier berechneten Verteilungen unter Vernachlässigung der α -Fluoreszenz normiert werden. Diese Normierung erfolgte in den Zeilen β_{84} normiert und β_{155} normiert. Nach Normierung entspricht die stationäre Lösung dem Fluoreszenzverhalten wie man es bei Anregung des α_{84} - und bei Anregung des β_{84} -Chromophors, ebenfalls nach entsprechender Normierung, erhält. Die Werte in Zeile β_{155} normiert aus Tabelle 5.9 entsprechen direkt dem Energietransferkoeffizient γ wie er im Einzelmolekülexperiment in Kapitel 5.1.2 definiert wurde. Für die dort vorgestellten Untersuchungen erwartet man folglich eine mittlere Verteilung der Anregungsenergie auf die beiden PCB-Chromophore im Verhältnis 85/15. Dieser Mittelwert kann aus den Ergebnissen des Einzelmolekülexperiments nicht direkt herausgelesen werden. Stattdessen findet man eine breite Verteilung an minimalen Energietransferkoeffizienten γ_{\min} . Der Koeffizient eines einzelnen Moleküls gibt eine untere Grenze für das Verhältnis an. Diese Grenze ist jedoch für ca. 50% der Moleküle deutlich über dem aus der Försterrechnung vorhergesagten Wert von 85/15. Der berechnete Mittelwert muss sich folglich aus der breiten Verteilung der Energietransferkoeffizienten zusammensetzen. Im Folgenden werden deshalb die Ursachen untersucht, die dazu führen können, dass ein einzelnes Molekül vom mittleren Energietransfer abweicht.

5.3.4 Einflüsse auf den Energietransferkoeffizienten γ

Die Simulation bei der der PVB-Chromophor die initiale Anregung trägt, entspricht dem unter Kapitel 5.1.2 dargestellten Einzelmolekülexperiment zur Untersuchung des Energietransfers in der monomeren Einheit. Dort wurde mit 568 nm der PVB-Chromophor angeregt und über entsprechende Filter die Fluoreszenz der beiden PCB-Chromophore detektiert. Der Energietransfer konnte über den Energietransferkoeffizienten γ quantifiziert werden. Bei der Berechnung des Energietransfers nach Förster und anschließender Simulation erhält man, abhängig von den gewählten Ausgangsparametern, jedoch nur einen Wert für den mittleren Energietransfer. Auch wenn aus dem Einzelmolekülexperiment nicht ersichtlich ist, welchen genauen Wert der Energietransferkoeffizient γ annimmt, so sieht man doch, dass für den minimalen Energietransferkoeffizienten γ_{\min} eine breite Verteilung existiert (vgl. Abbildung 5.9). Dieser minimale Energietransferkoeffizient γ_{\min} weicht für viele Mo-

leküle deutlich von dem nach der Förstertheorie vorhergesagten Wert ($\gamma = 15\%$) ab. Die einzige Konsequenz kann sein, dass die gemittelten, eingesetzte Parameter der Försterrechnung den Energietransfer eines einzelnen Moleküls nicht ausreichend beschreiben. Jedes Molekül besitzt seinen eigenen, individuellen Parametersatz. Erst die Mittelung der individuellen Parameter führt zur dem im Ensemble beobachteten Mittelwert. Für einzelne Moleküle jedoch können signifikante Abweichungen von diesem beobachtet werden. Sieht man die in Gleichung 3.19 eingehenden Parameter als die Parameter eines einzelnen Moleküls an, dann gilt die resultierende Rate des Energietransfers folglich auch nur für den Energieaustausch der beiden betrachteten Moleküle. Durch die Variation der eingesetzten Parameter kann versucht werden, den experimentell gemessenen Energietransfer mit der Berechnung aus der Förstertheorie zur Deckung zu bringen. Der jeweilige Einfluss, den diese Parameter für den Energietransfer in PEC mit sich bringt, wird deshalb nun dargestellt:

Aus den Fluoreszenzzerfällen der Untereinheiten des PECs ist ersichtlich, dass sie mehrfachexponentiellen Zerfallsgesetzen folgen (siehe Abschnitt 5.2). Parallel zu unterschiedlichen Zerfallskanälen in einem Chromophor, lassen sich unterschiedliche Subpopulationen in der Ensembleprobe nicht ausschließen. Diese Subpopulationen müssen für das Auftreten der Energietransferheterogenitäten berücksichtigt werden. Aus Gleichung 3.19 ist ersichtlich, dass sich die Transferrate weg von einem Chromophor direkt proportional zur Fluoreszenzrate verhält. Das Verhältnis der beiden Raten ändert sich dabei jedoch nicht. Genau dieses ist jedoch ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, ob die Anregung über Fluoreszenz oder Energietransfer abgegeben wird (vgl. Gleichung 5.12). Lediglich die Geschwindigkeit des Übergangs wird dadurch beeinflusst. Heterogenitäten in der Fluoreszenzlebensdauer können deshalb für die breite Verteilung des Energietransferkoeffizienten γ_{\min} ausgeschlossen werden.

Der geometrische Parameter κ^2 , der Brechungsindex und der Abstand R der Chromophore zueinander erlauben die Änderung der Hin- und Rückraten unabhängig von der Fluoreszenzrate. Für Modifikationen an diesen Parametern gilt: $\frac{k_{\rightarrow}}{k_{\leftarrow}} = \text{konst.}$ Untersucht wurde der Einfluss bei Änderung der Orientierungen der Chromophore auf den Energietransfer. Dabei wurden Auslenkungen des β_{84} - und des β_{155} -Chromophors um $\pm 20^\circ$ für den Azimutalwinkel und der Polhöhe bezüglich der von der Kristallstruktur vorgegebenen Orientierung berücksichtigt. Die durch die geometrische Variation erhaltenen Raten werden der oben vorgestellten Monte Carlo Simulation unterworfen. Es zeigt sich, dass der Energietransferkoeffizient sich dabei im Intervall $\gamma = [0, 00; 0, 17]$ bewegt. Änderungen im Abstand und im Brechungsindex ergeben ähnliche Ergebnisse. Bei einer Abstandsänderung von 10% zwischen den Chromophoren findet für den Energietransferkoeffizienten lediglich eine Änderung im Bereich $\gamma = 0,15 (\pm 0,01)$ statt. Für unterschiedliche Brechungsindizes

zwischen $n = 1,33$ (Wasser) und $n = 1,50$ (Glas) ist der Einfluss nochmals deutlich geringer ($\gamma = 0,15 (\pm 0,002)$).

Die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ kann sich theoretisch über den gesamten Bereich von 0...1 erstrecken. Die Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_A beeinflusst alle Energietransferraten die von einem Chromophor wegführen, also k_{AB} und k_{AC} . Lässt man in einer Simulation jede beliebige Änderung zu, dann kann der Energietransferkoeffizient γ den gesamten Bereich von 0 bis 1 abdecken. In einer Simulation wurden alle drei Fluoreszenzquantenausbeute mit Faktoren von 0,5 bis 2 gewichtet. Alle Kombinationen der geänderten Fluoreszenzquantenausbeuten wurden durchpermutiert. Unter diesen Bedingungen konnte der Energietransferkoeffizient den Bereich von 0 bis 0,4 abdecken. Die hier betrachteten Abweichungen der individuellen Fluoreszenzquantenausbeute eines einzelnen Chromophors vom Ensemblemittelwert führen folglich zu einer starken Änderung der Energieverteilung in einem PEC Monomeren und können als Erklärung für die beobachteten Heterogenitäten herangezogen werden.

Ähnlich lässt sich der Energietransfer bei Abweichungen der individuellen Spektren vom Ensemblemittelwert simulieren. Die Spektrenfunktionen aus Abschnitt 5.2.3 erlauben es dabei sehr leicht, die Fluoreszenz- und Absorptionsmaxima zu verschieben. Die Verschiebung von Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum eines Chromophors hat direkt Einfluss auf alle ihn betreffenden Energietransferraten. Die Änderung dieser Raten wird durch die Bandenform der Spektren bestimmt. Spektrale Fluktuationen einzelner Moleküle sind ein bekanntes Phänomen und wurden sowohl in Tieftemperaturexperimenten [154], als auch bei Raumtemperatur beobachtet [155, 156]. Blum et al.[156] berichteten dabei von spektralen Änderungen von mehr als 1000 cm^{-1} .

Für die hier durchgeführten Simulationen des spektralen Einflusses wurden die Spektren der beiden β -Chromophore gegeneinander verschoben, ohne die Stokes Verschiebung zu verändern. Absorptions- und Fluoreszenzspektrum wurden also synchron um den jeweils selben Wert verschoben. Die Spektren des PVB Chromophors wurden konstant gehalten. In Abbildung 5.15 ist der Einfluss der spektralen Variation auf den Energietransferkoeffizienten γ dargestellt. Als Ordinate ist dabei die relative Auslenkung der β -Spektren zueinander aufgetragen. Für $\Delta\tilde{\nu} = -1000 \text{ cm}^{-1}$ gilt z.B. das die Spektren des β_{84} -Chromophors um $+500 \text{ cm}^{-1}$ vom Ensemblemittelwert verschoben wurden, während die Spektren des β_{155} -Chromophors um -500 cm^{-1} verschoben wurde. Bereits kleine spektrale Abweichungen ($\Delta\tilde{\nu} \approx 240 \text{ cm}^{-1}$) führen zu einer 100%igen Änderung des Energietransferkoeffizienten γ .

Der Einfluss der Fluoreszenzquantenausbeute und die spektralen Unterschiede ein-

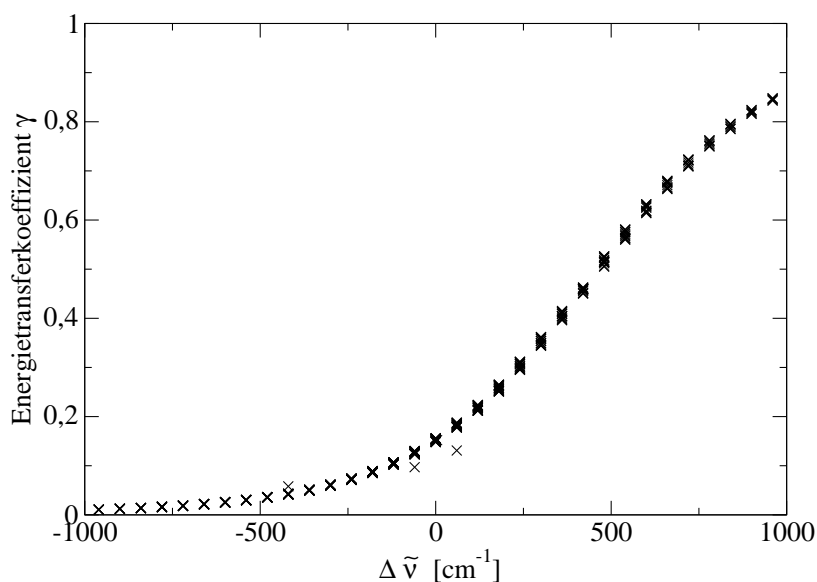


Abbildung 5.15: Einfluss der spektralen Position der β -Spektren auf den Energietransferkoeffizienten γ . Bereits kleine spektrale Änderungen gegenüber dem Ensemblemittelwert führen zur einer 100%igen Änderung im Energietransfer.

zelter PEC Monomere sind zwei mögliche Ansatzpunkte um die Heterogenitäten im Energietransferverhalten des PEC Monomers zu erklären. Während spontane, spektrale Fluktuationen an einzelnen Molekülen bereits beobachtet werden konnten, fehlt bisher der Nachweis über Heterogenitäten in den Fluoreszenzquantenausbeuten. Wie in der Einführung zum PEC (vgl. Abschnitt Abschnitt 5) dargestellt, reagieren Bilinfarbstoffe sehr empfindlich auf ihrer lokalen Umgebung. Zum Ausdruck kommt dies in Änderungen ihrer photophysikalischen Eigenschaften, wie eben z.B dem Spektrum. Genau aus diesem Grund ist es ihnen auch möglich mit nur wenig, chemisch unterschiedlichen Chromophoren große Teile des Spektrums des sichtbaren Lichts zur Lichtsammlung abzudecken. Daneben ist auch die Fluoreszenzquantenausbeute sehr stark von der Struktur des Chromophors abhängig. Während freie Biline mit vielen Freiheitsgraden eine sehr geringe Fluoreszenzquantenausbeute im Bereich von 10^{-2} - 10^{-3} [123] besitzen, erhöht sich diese beim Einbau in ein Protein im Falle des PEC auf ca. 0,2. Sowohl die spektrale Sensitivität von Biliproteinen, wie auch der Fluoreszenzquantenausbeute können somit direkt mit Änderungen in der Struktur in Zusammenhang gebracht werden. Es ist deshalb anzunehmen, dass auch das unterschiedliche Energietransferverhalten einzelner Monomere auf solche

Einflüsse zurückzuführen ist. Gestützt wird diese Annahme durch die Messungen der Fluoreszenzlebenszeiten der unterschiedlichen Einheiten (vgl. Abschnitt 5.2). Auch in diesen kann die komplizierte Zerfallskinetik strukturellen Subpopulationen, wie bereits von Holzwarth [124] diskutiert, zugeschrieben werden.

5.4 Photostabilität und Dunkelzustände

Die Photostabilität von einzelnen Chromophoren stellt für die Spektroskopie an einem einzelnen Molekül die größte Limitierung dar. Die detektierten Fluoreszenzphotonen sind die alleinige Informationsquelle, die man zur Verfügung hat, um Aussagen treffen zu können. Speziell in Lichtsammelantennen kommt der Photostabilität eine weitere wichtige Rolle zu. Die Aufgabe von Lichtsammelantennen ist es, möglichst effizient Anregungsenergie aufzunehmen und sie über den Energietransfer weiterzuleiten. Findet in diesen Systemen ein Photobleichen statt, dann beeinflusst dies oftmals die Funktion des gesamten Komplexes. Einen wesentlichen Anteil zur Photolabilität trägt, wie in Abschnitt 2.1.7 gezeigt, der Triplettzustand eines Chromophors. Über diesen kann reaktiver $^1\Delta$ -Sauerstoff gebildet werden, der im weiteren Verlauf mit dem Chromophor reagiert. Der chemisch veränderte Chromophor kann dadurch seine ursprüngliche Aufgabe nicht mehr erfüllen. Während chlorophyllhaltige Antennen zum Schutz vor Photobleichen Carotinoide tragen, fehlt dieser Schutzmechanismus in Biliproteinen. Die Bedeutung von Sauerstoff auf die Photostabilität des PEC wird deshalb hier näher untersucht.

Ebenfalls negativ auf die Effizienz einer Lichtsammelantenne wirken sich Dunkelzustände des Systems aus. Unter diesen versteht man, dass sich das Molekül nicht im S_0/S_1 -Fluoreszenzzyklus befindet. Es kann dann keine Anregungsenergie mehr aufgenommen werden, die über Fluoreszenz emittiert wird. Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie können diese Zustände beobachtet werden. Während eine geringe Dunkelzustandspopulation/Integrationsintervall zu einem reduzierten Fluoreszenzsignal führt, findet man bei höherer Zeitauflösung Integrationsintervalle in denen wegen der Besetzung eines nicht emittierenden Zustands keine Fluoreszenz auftritt [157]. Ein typischer Dunkelzustand ist der Triplettzustand. Während dieser Lebensdauern im μs -Bereich besitzt, existieren auch Zustände in denen sich ein System bis zu mehreren Stunden aufhalten kann [119]. Eine Unterscheidung vom Photobleichen ist deshalb oft nicht möglich. Solche Phänomene lassen sich nur durch die Untersuchung einzelner Moleküle beobachten, weil sich im Ensembleexperiment immer genug Moleküle im S_0/S_1 -Fluoreszenzzyklus befinden. Das Ausbleiben der Fluoreszenz, hervorgerufen durch die Population eines Dunkelzustands, kann deshalb bei Experimenten am Ensemble nicht beobachtet werden.

5.4.1 Der Einfluss von Temperatur und Sauerstoff auf die Photostabilität

Die Photostabilität von monomerem PEC bei tiefen Temperaturen (4K) wird mit der Photostabilität bei Raumtemperatur verglichen. Für diese Experimente wird von einer Probenfläche ein Fluoreszenzbild aufgenommen. Im Anschluss wird ein einzelnes Molekül in den Fokus des Laser gebracht und eine Fluoreszenzzeitspur aufgenommen. Aus diesen Zeitspuren werden die Zeiten bis zum Verschwinden der Fluoreszenz in ein Histogramm aufgetragen. Dieses Histogramm ist in Abbildung 5.16 dargestellt.

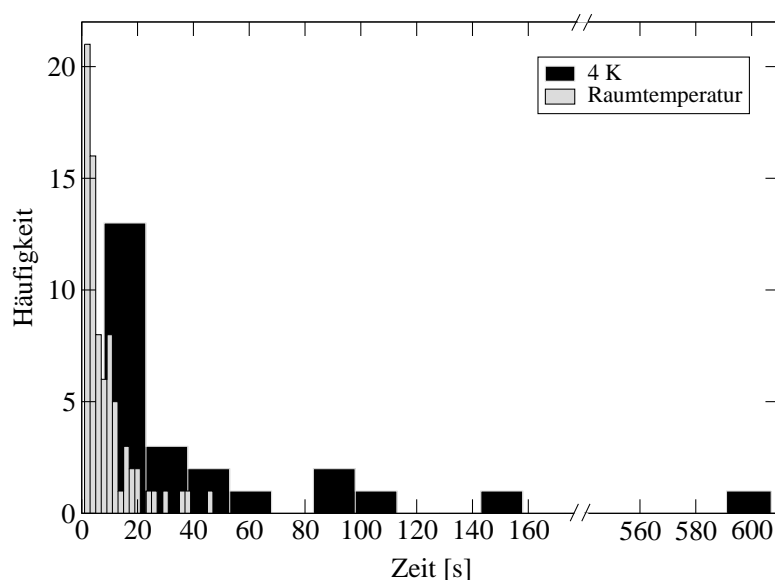


Abbildung 5.16: Histogramm über die Dauer der Fluoreszenz einzelner PEC-Monomere. Die schwarze Kurve entspricht dem Verhalten bei 4K. Die graue Kurve entspricht den Raumtemperaturmessungen. Bei 4K ist die Halbwertszeit $t_{1/2} = 20$ s fünfmal länger als bei Raumtemperatur $t_{1/2} = 4$ s.

Es zeigt sich, dass monomerem PEC bei tiefen Temperaturen ca. 5 mal länger Fluoreszenzphotonen emittiert als bei Raumtemperatur. Die Untersuchungen des PEC wurden, trotz der verbesserten Photostabilität bei tiefen Temperaturen, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die eingesetzten Objektive zur Mikroskopie bei tiefen Temperaturen verloren, wie in Abschnitt 4.2 gezeigt, durch das Abkühlen auf 4K ihre guten optischen Eigenschaften. Eine alternative Detektionsoptik mit hoher numeri-

scher Apertur, wie sie in naher Zukunft unserem Arbeitskreis zur Verfügung stehen wird, soll weitere interessante Tieftemperaturuntersuchungen zur intramolekularen Dynamik im PEC erlauben. Ein mögliches Experiment wäre dabei die Korrelation der Fluoreszenzphotonen eines einzelnen Moleküls. Die Anzahl an Fluoreszenzphotonen die man bisher bei Raumtemperatur erhält reicht für ein derartiges Experiment nicht aus. Durch das Abkühlen auf 4K können Einflüsse der Umgebung auf das Monomer eingefroren werden und die beobachteten Eigenschaften des Fluoreszenzlichts sind nur noch durch die eigentlichen Molekülparameter bestimmt.

Um den Einfluss von Sauerstoff auf die Photostabilität von PEC zu erfassen, wurde in Ensembleuntersuchungen dem Probensystem ein Enzymsystem aus Glucoseoxidase/Katalase (GOD) zugesetzt. Dieses Enzymsystem erniedrigt über Redoxreaktionen die Sauerstoffkonzentration in wässriger Lösung [73]. Zusätzlich zu der üblichen Probenpräparation, wie sie in Abschnitt 4.6 beschrieben ist, wurde in 1 ml der hochkonzentrierten Lösung ca. 3 mg β -D-Glucose (*Sigma*, GD 5250) gelöst und mit ca. 16,8 Einheiten ($\approx 0,15 \mu\text{l}$) Katalase (*Sigma*, C3515) versetzt. Zu der gut durchmischten Lösung wurden 16,8 Einheiten ($\cong 10 \mu\text{l}$) Glucoseoxidase (*Sigma*, G9010) gegeben. Eine Einheit Katalase ist so definiert, dass 1 μmol H_2O_2 bei pH=7 und 25°C pro Minute zersetzt wird [158]. Für die Glucoseoxidase ist die Einheit so definiert, dass 1 μmol β -D-Glucose bei pH=5,1 und 35°C pro Minute oxidiert wird [158].

200 μl dieser Lösung werden auf ein Deckglas gegeben. Anschließend wird der Laserfokus an die hochbelegte Probenstelle gefahren und die Fluoreszenzintensität mit der Zeit detektiert. Dieses Experiment wurde mit dem konfokalen Mikroskop wie es in Abschnitt 4 beschrieben wurde, durchgeführt. Bei einer hochbelegten Probe erfolgt die Anregung der Moleküle nicht nur im Fokuspunkt. Das Anregungslicht ist nach dem Fokus stark divergent und besitzt in axialer Richtung deshalb kein homogenes Intensitätsprofil. Damit werden nun auch Moleküle ausserhalb der Fokalebene angeregt. Trotz der Detektionslochblende wird ein Teil dieser Fluoreszenz auf den Detektor abgebildet. Dies führt zu der gemessenen, nicht einfach monoexponentielle Abnahme des Fluoreszenzsignals (siehe Abbildung 5.17).

Mit Gleichung 2.8 wird aus den Fluoreszenzzerfällen die mittlere Zerfallszeit für die α -Untereinheit, das Monomer und das Trimer, jeweils mit bzw. ohne Enzymsystem, ermittelt. Der Vergleich zwischen den Zerfallszeiten ohne Enzymsystem mit den Zerfallszeiten unter Verwendung des Enzymsystems zeigt für die α -Untereinheit und für trimeres PEC eine Zunahme der Photostabilität um den Faktor 3-4. Für monomeres PEC beträgt der Faktor für die Verbesserung der Photostabilität nur 1,5. Der geringere Zuwachs des Monomers ist vermutlich auf die Präparation zurückzuführen. Der zur Darstellung von monomerem PEC benötigte Harnstoff scheint auf das Enzymsystem bereits eine denaturierende Wirkung zu haben und setzt da-

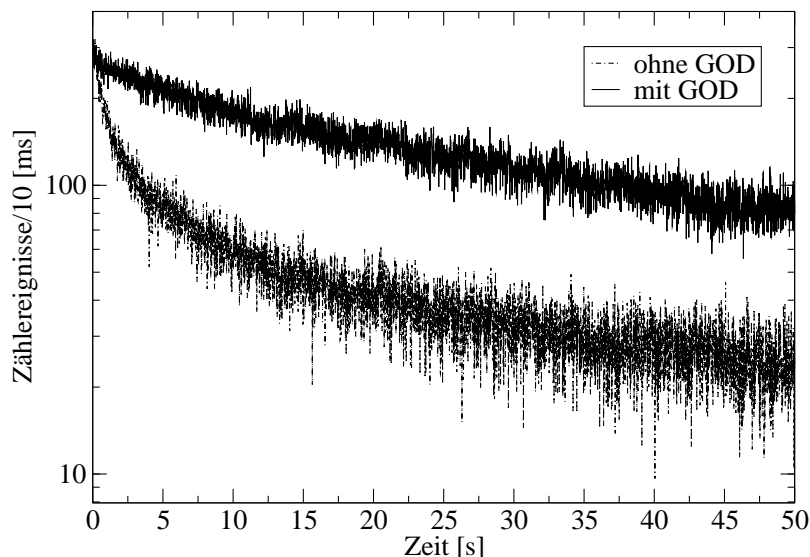


Abbildung 5.17: Beispiele für Fluoreszenzzerfälle der α -Untereinheit. Bei Zusatz des Glucoseoxidase/Katalase Enzymsystem (GOD) zeigt sich eine deutlich langsamere Abnahme des Fluoreszenzsignals als ohne. Wegen der komplexen Anregungs- und Detektionsbedingungen folgen die Zerfälle keinem monoexponentiellen Zerfallsgesetz.

mit die Wirksamkeit herab.

Die verbesserte Photostabilität, sowohl bei tiefen Temperaturen, als auch mit dem Enzymsystem Glucoseoxidase/Katalase bei Raumtemperatur, deutet darauf hin, dass molekularer Sauerstoff für das Photobleichen im PEC eine entscheidende Rolle spielt. Sowohl die chemische Entfernung von Sauerstoff aus der Lösung, als auch der physikalische Ausschluss, bringen eine deutliche Zunahme in der Photostabilität von PEC. Wie in Kapitel 2.1.7 gezeigt wurde, ist die Triplettbildung eines Chromophorensystems zu ca. $2/3$ für die Darstellung der reaktiven $^1\Delta$ -Sauerstoffspezies verantwortlich. Während die Lichtsammelkomplexe LH-1 und LH-2 zur Depopulierung des Triplettsystems einen Schutzmechanismus aus Carotinoiden besitzen, hat die Natur in Biliproteinen darauf verzichtet. Es kann deshalb angenommen werden, dass die Bildung von $^1\Delta$ -Sauerstoff aus dem Triplet in Biliproteinen eine bedeutende Rolle spielt. Neben der in Kapitel 5.4.1 dargestellten Bedeutung von $^1\Delta$ -Sauerstoff auf die Photostabilität kennt man in Biliproteinen noch andere Prozesse die zum Photobleichen führen. So sind reaktive Sauerstoffspezies, wie OH oder O_2^- , die durch Photosensibilisierung von Biliproteinen entstehen, bekannt [159]. Diese Art der Pho-

tochemie führt zu weiteren Prozessen, die in der Folge zum Photobleichen führen können. Die Entfernung von Sauerstoff aus der Lösung scheint jedoch ein guter Weg zu sein, einzelne Prozesse zu unterdrücken. Auch bei der Anregung mit gepulsten Lasern zeigen Biliproteine eine besondere Photolabilität [55, 160]. Allophycocyanin zeigt bei der Anregung mit einem gepulsten Laser im Vergleich zur Anregung mit einem Laser im Dauerstrichbetrieb eine ca. 16-fach höhere Photolabilität [55]. Auch die Anzahl der emittierten Fluoreszenzphotonen bis zum Photobleichen ist um den Faktor 21 geringer. Die Photolabilität von Biliproteinen kann jedoch auch sinnvoll eingesetzt werden. Aufgrund der leichten Bildung reaktiver Spezies, wird ihr Einsatz für photodynamische Therapien in der Krebsbekämpfung diskutiert [160]. So zeigt C-PC aus der Alge *Spirulina platensis* eine grössere photodynamische Reaktion auf Tumorzellen als das in der Medizin oftmals verwendete Hematoporphyrin.

Es sei darauf hingewiesen, dass kommerzielle "Anti-Fading-Kits", wie sie von der Firma *Molecular Probes* angeboten werden, sich als unwirksam zur Photostabilitätssteigerung bei Biliproteinen herausgestellt haben [161]. Durch den Einsatz des Enzymsystems Glucoseoxidase/Katalase wurde ein Weg aufgezeigt, um auch in Biliproteinen das Photobleichen zu verringern.

5.4.2 Dunkelzustände im Phycoerythrocyanin

Der Nachweis von Dunkelzuständen in einem System gelingt über Fluoreszenz nur indirekt. Aus Fluoreszenztrajektorien einzelner Moleküle kann man aus der Zählrate/Integrationsintervall ein Histogramm bilden. Wie in Abschnitt 2.1.6 gezeigt, ist die Breite der Verteilung in diesem Histogramm von den Dunkelzuständen in einem einzelnen Molekül abhängig. Besitzt ein einzelnes Molekül keinen Dunkelzustand, ist die Breite dieser Verteilung durch die Poissonstatistik vorgegeben. Existiert ein, im Vergleich zu Integrationszeit, kurzlebiger Dunkelzustand, kommt es bei den Histogrammen zu einer Verbreiterung der Verteilung. Je öfter dieser Dunkelzustand während der Integrationszeit populiert wird, desto breiter wird sie. Ein im Vergleich zur Integrationszeit langlebiger Dunkelzustand bringt in solchen Histogrammen eine zusätzliche Verteilung um das mittlere Untergrundsignal zum Vorschein. Langlebige Dunkelzustände lassen sich damit leicht identifizieren. Um entscheiden zu können ob kurzlebige Dunkelzustände im System vorhanden sind, muss man die Verteilung des Histogramms mit der in Abschnitt 2.1.6 besprochenen Näherung einer Gaußfunktion anpassen. Über die Standardabweichung σ aus dieser Kurvenanpassung kann dann entschieden werden ob kurzlebige Dunkelzustände im System vorhanden sind.

Abbildung 5.18 zeigt solch ein Histogramm aus der Fluoreszenzzeitspur eines einzelnen PEC Moleküls und die daran angepassten Verteilungsfunktionen. Die Normal-

verteilung zeigt eine deutlich bessere Übereinstimmung mit der Breite der Verteilung des Histogramms, als die schmalere Poissonverteilung. Man sieht auch deutlich, dass es sich bei dieser Art der Kurvenanpassung, wie in Abschnitt 2.1.6 gezeigt, nur um eine Näherung handelt. Zur Zeit ist es noch nicht gelungen den exakten Ausdruck aus Gleichung 2.17 an diese Verteilungen anzupassen. Aus Tabelle 2.1 ist jedoch ersichtlich, dass, verglichen mit dem Idealfall des Zweiniveausystems, bereits kleine Dunkelzustandspopulationen zu einer Verbreiterung der Verteilungsfunktion führen. Leider kann über die Natur der beteiligten Dunkelzustände nur spekuliert werden.

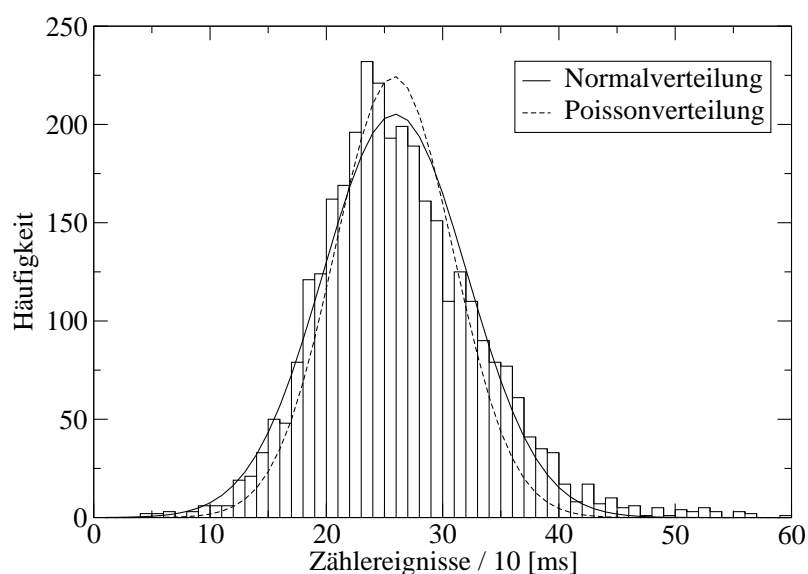


Abbildung 5.18: Histogramm über die Zählrate eines einzelnen PEC Moleküls. Die Verteilungsbreite des Histogramms lässt sich besser durch eine Normalverteilung als durch eine Poissonverteilung beschreiben. Dies deutet auf die Existenz mindestens eines kurzlebigen Dunkelzustands hin.

Aus der literaturbekannten Photochemie des PVB-Chromophors im PEC ergibt sich, dass der E-Zustand, der durch Isomerisierung um die Doppelbindung C-15/C-16 gebildet werden kann, einen relevanten Dunkelzustand im PEC darstellt. Der Übergang des PVB-Chromophors in seine E-Form verschiebt sein Absorptionsspektrum um ca. 70 nm zu höheren Energien. Die Fluoreszenzquantenausbeute dieses Isomers ist so gering, dass aus diesem Zustand bis heute keine Fluoreszenz beobachtet werden konnte [162]. Die E/Z-Isomerisierung des PVB-Chromophors ist photoinduziert und reversibel [132]. Dies bedeutet, dass man durch Beleuchtung mit 500 nm das nicht

fluoreszierende E-Isomer wieder in den fluoreszierenden Z-Zustand bringen kann. Findet dieser Übergang bei der alleinigen Anregung des Z-Isomers laufend statt, dann handelt sich um genau einen jener Dunkelzustände die durch die Photonenstatistik an einzelnen Molekülen beobachtet werden kann. Es kommt während der Fluoreszenzdetektion immer wieder vor, dass wegen der kurzzeitigen Populierung des E-Isomers weniger Signal detektiert wird. Beleuchtet man während der Fluoreszenzdetektion mit 500 nm und 568 nm, dann tritt bei Besetzung des E-Zustands eine erneute Isomerisierung in die Z-Konformation ein. Für die Detektion des Fluoreszenzsignals bedeutet dies eine Zunahme, da der dunkle E-Zustand nun im Mittel seltener besetzt ist. Jung et al. [163] konnte diese Technik bereits erfolgreich am Grün Fluoreszierenden Protein einsetzen. Dieser Fluoreszenzzuwachs lässt sich in erster Linie auch im Ensemble beobachten. Der Einzelmolekülspektroskopie kommt in diesem Experiment jedoch eine besondere Bedeutung zu. Nur durch die Spektroskopie einzelner Moleküle erhält man über die Fluoreszenztrajektorien den Zugang zur Photonenstatistik während der Beleuchtung beider Zustände. Damit lässt sich dann beurteilen, ob bereits alle Dunkelzustände im System erkannt sind oder ob bisher noch unbekannte existieren.

Für die Anregung des E-Isomers diente die 496 nm Linie (500 nW) eines Argonionenlasers. Über den Strahlteiler BS3 wurde diese zusätzliche Anregungswellenlänge in den normale Strahlengang eingekoppelt. Die Anregung des Z-Isomers der α -Untereinheit erfolgte mit 568 nm (600 nW) aus dem Farbstofflaser. Die Probenpräparation von monomeren PEC erfolgt wie unter 4.6 beschrieben. Nach der Lokalisierung einzelner PEC Monomere über ein Fluoreszenzbild der Probe, wurden Fluoreszenzzeitspuren einzelner Moleküle aufgenommen. Während dieser Aufnahme wurden die Anregungswellenlängen mit dem elektronischen Shutter S1 und S2 hinzu- bzw. abgeschaltet. Abbildung 5.19 zeigt an einer Fluoreszenzzeitspur die abwechselnde Anregung eines Moleküls mit den Anregungswellenlängen 496 nm, 568 nm sowie 496 nm und 568 nm gleichzeitig. Während die Anregung mit 568 nm im Mittel 65 Zählereignisse pro 20 ms Integrationsintervall zeigt, führt die Anregung am Rande der Absorptionsbande mit 496 nm nur zu einem mittleren Fluoreszenzsignal von 20 Zählereignissen. Bei der gleichzeitigen Anregung mit 568 nm und 496 nm erwartet man für den Fall niedriger Anregungsleistungen ein additives Verhalten (vgl. Abschnitt 2.1.5). Tatsächlich findet man mit 98 Zählereignissen pro Integrationsintervall eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals, verglichen mit den 85 Zählereignissen, die der Summe der individuellen Zählraten für die getrennte Anregung mit 496 nm und 568 nm entspricht.

Während der Beleuchtung mit 568 nm findet eine rasche Isomerisierung zwischen beiden Zuständen statt. Das mittlere Fluoreszenzsignal bei alleiniger Anregung

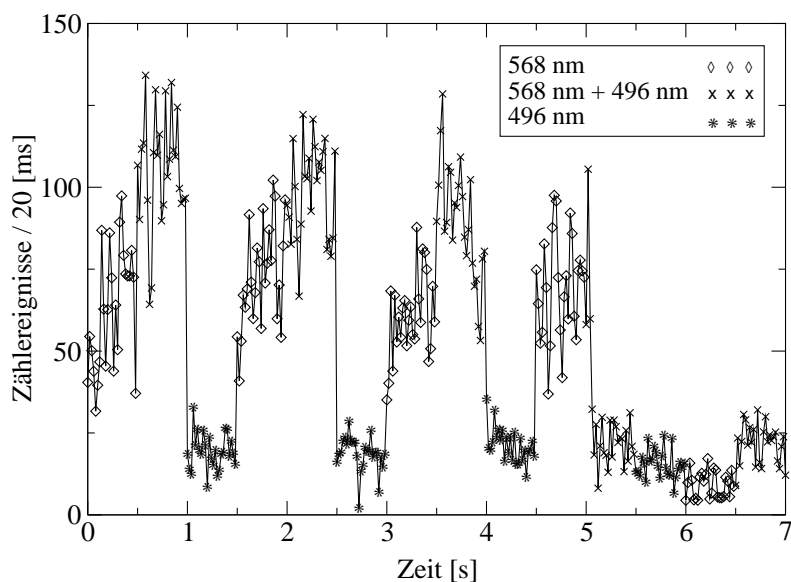


Abbildung 5.19: Fluoreszenzzeitspur eines monomeren PEC Moleküls bei alternierenden Anregungswellenlängen. Bei der gleichzeitigen Anregung mit 568 nm und 496 nm ergibt sich ein 15%iger Fluoreszenzzuwachs im Vergleich zur Summe bei getrennter Anregung.

mit 568 nm spiegelt die mittlerer Besetzung des fluoreszierenden Z-Isomers wieder. Durch das zusätzliche Einstrahlen mit 496 nm kann dieses Isomerisierungs-gleichgewicht verschoben werden. Die 15%ige Steigerung der Fluoreszenzinten-sität bei simultaner Zweifarbenanregung resultiert aus genau dieser Verschiebung zugunsten des fluoreszierenden Z-Isomers. Das E-Isomer des PVB-Chromophors ist folglich ein kurzlebiger Dunkelzustand, der durch die zweite Anregungswel-lenlänge zusätzlich depopuliert werden kann. Trotz der schnelleren Depopulierung des E-Dunkelzustands findet man im Fluoreszenzsignal weiterhin große Fluktuationen in den Signalintensitäten und folglich eine breite Verteilung in den Histogrammen der Fluoreszenzzeitspuren einzelner Monomere. Dieser Umstand zeigt auf, dass neben dem E-Zustand des PVB Chromophors noch weitere Dunkelzustände existieren. Biliproteine sind sehr empfindlich auf den Einfluss der Umgebung. So sind ebenso Protonierungsreaktionen des Chromophors mit Ladungsstabilisierung durch das Proteingerüst möglich [124]. Diese Tatsache kann zu weiteren, bisher nicht auf-geklärten, Dunkelzuständen führen. Mit intensitätsabhängigen Messungen könnte man mit der Technik der Zweifarbenanregung, höhere Photostabilität des PEC vor-ausgesetzt, zumindest die Kinetik des bekannten Dunkelzustands vermessen [164].

5.4.3 Spektrale Untersuchungen zur Photostabilität

Bei der Anregung eines Monomers im Bereich der Absorption der α -Untereinheit kommt es zum Energietransfer der Anregungsenergie auf einen der beiden PCB-Chromophore. Die Fluoreszenz aus einem PCB-Chromophor ist gegenüber der Fluoreszenz des α -Chromophors um 12-35 nm bathochrom verschoben. Ein Teil der Anregungsenergie relaxiert weiterhin über Fluoreszenz aus dem PVB-Chromophor. Durch eine geeignete Filterwahl im Detektionsstrahlengang kann die Fluoreszenz der α -Untereinheit von der Fluoreszenz der β -Untereinheit abgetrennt werden und die beiden Fluoreszenzemissionen auf getrennten Detektoren aufgezeichnet werden. Bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm kam als Anregungs- und Detektionsfilter BS4 ein dichroitischer Strahlteiler mit einer Kante bei 575 nm (*Chroma*, 575 DCXR) zum Einsatz. Zur spektralen Separierung der Fluoreszenz der beiden Untereinheiten wurde im Detektionsstrahlengang ein dichroitischer Strahlteiler BS5 mit einer Kante um 595 nm (*Chroma*, 595 DCXR) verwendet. Auf dem Detektor A2 wird damit der Wellenlängenbereich $575 \text{ nm} > \lambda < 595 \text{ nm}$ und auf dem Detektor A1 $\lambda > 595 \text{ nm}$ abgebildet. Dem Detektor A2 wird damit ein kleiner spektraler Bereich der Fluoreszenz des PVB-Chromophors (α -Kanal) zugeordnet, dem Detektor A1 der Spektralbereich der Fluoreszenz der PCB-Chromophore (β -Kanal). Ein Notchfilter F2 (*Kaiser Optical Systems*, HNPF-568-10) sorgt für eine zusätzliche Abtrennung des Anregungslichts.

130 Monomere wurden mit dieser experimentellen Anordnung auf ihr spektrales Fluoreszenzverhalten untersucht. Dabei zeigt sich, dass in 97% aller Fluoreszenzzeitpuren ein Photobleichen synchron auf beiden Kanälen erfolgt. In den restlichen 3% findet, nachdem die Fluoreszenz auf dem β -Kanal verschwunden ist, weiterhin Fluoreszenz auf dem α -Kanal statt. Zwei Beispiele für dieses Verhalten sind in Abbildung 5.20 dargestellt.

Der Fluoreszenzverlauf in Abbildung 5.20a, bei dem auf beiden Kanälen die Fluoreszenz synchron abbricht, kann dem Photobleichen oder einem langlebigen Dunkelzustand des absorbierenden PVB-Chromophors zugeordnet werden. Nur wenn der PVB-Chromophor nicht mehr in der Lage ist zu absorbieren, kann aus den PCB-Chromophoren keine weitere Fluoreszenz erfolgen. Es mag auf den ersten Blick offensichtlich erscheinen, dass der PVB-Chromophor aufgrund der direkten Anregung durch das Laserlicht zuerst photobleicht. Der erste Schritt des Photobleichprozesses setzt aber in der Regel den elektronisch angeregten Singulett- oder Triplettzustand voraus (vgl. Abschnitt 2.1.7). Durch Energietransfer verliert der PVB-Chromophor seine Anregungsenergie jedoch innerhalb weniger hundert ps-Sekunden und findet sich im Anschluß wieder in seinem elektronischem Grund-

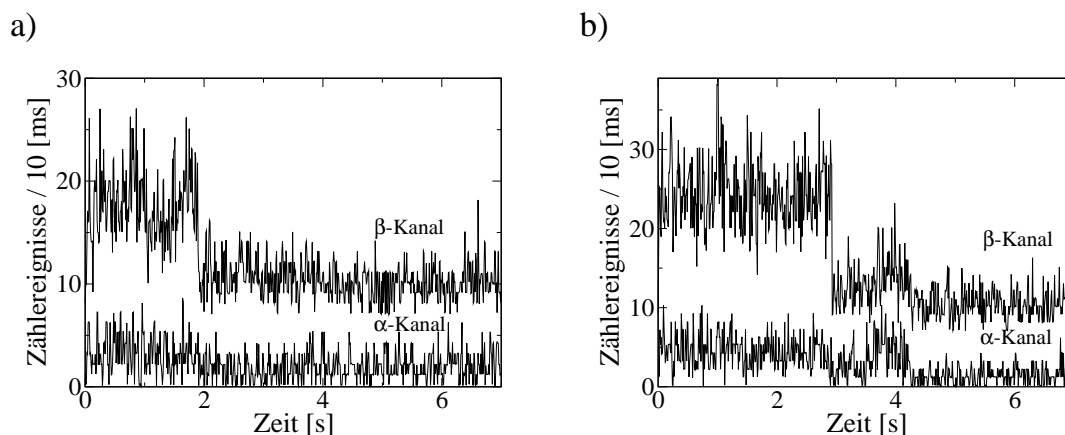


Abbildung 5.20: Spektrale Selektion der Fluoreszenz von α - und β -Untereinheit. Der obere Kanal entspricht dem Detektionswellenlängenbereich von $\lambda > 595$ nm. Der untere Kanal entspricht dem Wellenlängenbereich $575 \text{ nm} < \lambda < 595 \text{ nm}$ ($P = 2,5 \mu\text{W}$; Integrationszeit: 20 ms). a) Nach Photobleichen des absorbierenden α -Chromophors verschwindet das Fluoreszenzsignal auf beiden Kanälen. b) Photobleichen der β -Chromophore hinterlässt einen intakten α -Chromophor, der weiterhin fluoresziert. Im β -Kanal lässt sich ein Überspringen der Fluoreszenz des α -Chromophors in den β -Kanal beobachten.

zustand. Die beiden PCB-Chromophore übernehmen diese Anregung und geben die Energie durch Fluoreszenzrelaxation ab. Durch den schnellen Energietransfer finden sich die beiden PCB-Chromophore im Mittel länger in einem, für den Photobleichprozess nötigen, angeregten Zustand. Auch Photobleichprozesse durch Mehrphotonenabsorption können durch die moderate Anregungsleistung $P = 2,5 \mu\text{W}$ des eingesetzten Farbstofflasers im Dauerstrichbetrieb ausgeschlossen werden. Eine Erklärung warum der PVB-Chromophor trotzdem häufiger photobleicht als die PCB-Chromophore kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gegeben werden.

Das wesentlich seltenerere Ereignis in Abbildung 5.20b zeigt, wie auf dem α -Kanal Fluoreszenz auftritt, während das wesentlich stärkere Fluoreszenzsignal des β -Kanals erloschen ist. Wenn nach der Anregung der PVB-Chromophors kein Akzeptor mehr zur Verfügung steht, dann muss dieser seine Anregungsenergie über Fluoreszenzrelaxation verlieren. Ein Grund dafür kann das Photobleichen der PCB-Chromophore sein. Auch die Dissoziation des Monomers in die α - und β -Untereinheit kann zu diesem Verhalten führen.

Das Überspringen der Fluoreszenz, vom α -Kanal in den β -Kanal, wie in Abbildung 5.20b gezeigt, lässt sich durch den Einsatz eines Farbglasfilters (Schott, 610) oder eines Bandpassfilters (Chroma, HQ 620-60) weiter unterdrücken. Bei niedrigen Anregungsleistungen ($1 \mu\text{W}$) lässt sich dann überhaupt keine Fluoreszenz aus dem α -Chromophor mehr beobachten. Die ausschließliche Fluoreszenzdetektion der

β -Untereinheit bei Anregung des α -Chromophors lässt sich auf diese Weise sicherstellen und ist für die in Abschnitt 5.1 beschriebenen Experimente wichtig. Eine Einzelmolekülprobe, die mit der β -Untereinheit belegt wurde, bei einer Anregungsleistung von $1 \mu\text{W}$ und der Anregungswellenlänge $\lambda = 568 \text{ nm}$ zeigt kein, zur Detektion ausreichendes, Fluoreszenzsignal mehr. Erst ab Anregungsleistungen von $3,5 \mu\text{W}$ ist genügend Signalintensität vorhanden, um die β -Untereinheit durch direkte Anregung bei 568 nm detektieren zu können. Dieser Befund ist ebenfalls essentiell für die bereits oben vorgestellten, polarisationssensitiven Untersuchungen zum Energietransfer einzelner Moleküle.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die Einzelmolekülspektroskopie war in den letzten 10 Jahren einer rasanten Entwicklung unterworfen. Während anfangs die technische Weiterentwicklung im Vordergrund stand, galt das Interesse sehr bald den photophysikalischen und quantenmechanischen Phänomenen einzelner Moleküle. Die parallele Entwicklung bei Raumtemperatur machte die Einzelmolekülspektroskopie zu einer Technik, die für die Aufklärung von biologischen Fragestellungen herangezogen wurde. Eine besondere Stellung nehmen dabei die Untersuchungen zum besseren Verständnis des Energietransfers in photosynthetisch aktiven Organismen ein. Die zur Lichtabsorption nötigen Lichtsammelantennen eignen sich gut für einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen, da sie in isolierter Form gut fluoreszieren. Ihre Separation vom Reaktionszentrum nimmt ihnen ihren eigentlichen Relaxationskanal über Energietransfer und macht sie so der Einzelmoleküldetektion zugänglich. Generell kommt es vor der Weiterleitung der Anregungsenergie an energetisch tieferliegende Lichtsammelantennen im angeregten Lichtsammelkomplex zu einer schnellen intramolekularen Energieverteilung. Sie stellt somit den primären Schritt der Photosynthese dar. In dieser Arbeit wurde genau diesem Vorgang, am Lichtsammelprotein PEC aus *Mastigocladus laminosus*, mit konventionellen spektroskopischen Methoden, sowie der Einzelmolekülspektroskopie, besondere Beachtung geschenkt.

Dazu fand eine ausführliche Charakterisierung der photophysikalisch relevanten Parameter der einzelnen Einheiten, die nach Aggregation das integrale Protein bilden, statt. Im Detail wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten der beiden Untereinheiten und deren Fluoreszenzlebenszeiten ermittelt. Letztere wurden ebenfalls für das Monomer und das Trimer erhalten. Die Interpretation der wellenlängenabhängigen Trends in den individuellen Zerfallszeiten bei Aggregation der Untereinheiten zu höheren Komplexen gibt dabei bereits Einblick in den stattfindenden Energietrans-

fer. Um das komplexe Lichtsammelsystem PEC besser verstehen zu können, beschränkte sich der weitere Teil dieser Arbeit auf die Vorgänge im Monomer. Das Monomer setzt sich aus den zwei Untereinheiten des PEC zusammen und beinhaltet bereits drei Chromophore. Bereits zur Beschreibung des Energietransfers im Monomer sind neun Raten zu berücksichtigen, um dieses System zu charakterisieren.

Die polarisationssensitive Detektion des Fluoreszenzlichts einzelner Moleküle gab einen ersten Einblick in die Dynamik des Energietransfers innerhalb eines monomeren PEC Moleküls. Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass sich die Raten des Energietransfers auf einer kurzen Zeitskala nicht ändern. Auf einer längeren Zeitskala ist dieses Verhalten jedoch nicht statisch. Es kann stattdessen eine schnelle Änderung der Energietransferraten stattfinden. Dieses Verhalten kann lediglich durch die Spektroskopie einzelner Moleküle nachgewiesen werden. Die isotrope Molekülverteilung verhindert dabei jedoch die direkte Zuordnung der Fluoreszenzintensitäten zu einem der beiden emittierenden PCB-Chromophore. Angespornt durch diese ersten Erkenntnisse über den Energietransfer im Monomer, wurde zur polarisationssensitiven Detektion ebenfalls die Anregung um die Polarisationsselektivität erweitert. Durch Kombination beider Techniken kann man mehr Informationen über die Orientierung eines Monomers auf der Probenoberfläche erhalten. Diese zusätzlichen Orientierungsinformationen erlauben eine Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu den beiden PCB-Chromophoren. Durch dieses Vorgehen können Einschränkungen bezüglich des Energietransfers auf einen der beiden Chromophore getroffen werden. Damit ist es möglich, den intramolekularen Energietransfer für einzelne PEC Moleküle zu bestimmen. Die anfangs ermittelten photophysikalischen Parameter aus dem Ensembleexperiment erlauben die Berechnung des Energietransfers nach Förster und ermöglichen den Vergleich mit den im Einzelmolekülexperiment gewonnenen Erkenntnissen. Während die Försterrechnung für den Energietransfer auf die Chromophore einen festen Wert vorgibt, findet man in den Ergebnissen der Einzelmoleküluntersuchungen eine breite Verteilung an möglichen Energietransferparametern.

Um diese Verteilung zu verstehen, wurden mit Monte Carlo Simulationen die Ursachen für die Abweichungen zum statischen, nach Förster berechneten Energietransfer ausgemacht. Die in die Försterrechnung eingehenden Parameter sind alle aus den Ensembleeigenschaften des Monomers gewonnen und führen damit zu einem Mittelwertverhalten. Die aus Einzelmolekülexperimenten typischen Verteilungen um diesen Mittelwert können damit jedoch nicht wiedergespiegelt werden. Die zur Berechnung eingehenden Parameter, wie die individuellen Molekülgeometrien, die Fluoreszenzlebenszeiten oder umgebungsbedingte Brechungsindexvariationen konnten jedoch als Ursache für dieses Verhalten ausgeschlossen werden. Erst Änderungen

in den individuellen Spektren der Chromophore in einem Monomer oder individuelle Fluoreszenzquantenausbeute führen zu deckungsgleichen Ergebnissen zwischen den Einzelmolekülexperimenten und der Försterrechnung wie sie aus Ensemblesmessungen durchgeführt wird.

Im Unterschied zu anderen Biliproteinen hat die Natur im PEC ein weiteres Isomer der Phycobiline, den PVB-Chromophor, eingesetzt. Dieser besitzt im Vergleich zu den anderen Bilinfarbstoffen eine ungewöhnliche Photochemie, die sich direkt auf den Energietransfer auswirkt. Die Photochemie war aus Ensemblesmessungen bereits gut charakterisiert. In einem Einzelmolekülexperiment, konnte das nicht fluoreszierende E-Isomer als einer der kurzlebigen Dunkelzustände ausgemacht werden. Weitere Untersuchungen fanden zum Photobleichverhalten der Chromophore im monomeren PEC statt. In Experimenten, in denen das Fluoreszenzlicht eines einzelnen Monomers spektral getrennt auf zwei Detektoren aufgezeichnet wurde, konnte das individuelle Photobleichen einer der beiden Untereinheiten verdeutlicht werden. Bei diesen Experimenten zeigt sich erneut der labile Charakter des PVB-Chromophors. Bei der Mehrzahl der untersuchten Moleküle konnte das Ausbleiben des Fluoreszenzsignals dem Photobleichen des PVB-Chromophors zugeordnet werden. Ergänzend zu diesen Ergebnissen wurde der Grund für das Photobleichen näher beleuchtet. Es wurden Untersuchungen angestellt, die den Einfluss von Sauerstoff auf die Photostabilität in Biliproteinen, sowohl bei Raum- als auch bei Tieftemperatur, quantifizieren. Es zeigt sich dabei, dass bei Abwesenheit von Sauerstoff ca. 3-5 mal länger Fluoreszenzphotonen erhalten werden können.

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden in internationalen Zeitschriften veröffentlicht oder sind zur Publikation eingereicht. Ebenso wurden die Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen der Öffentlichkeit vorgestellt. Eine detaillierte Übersicht darüber findet sich im Anschluss an das Literaturverzeichnis im Abschnitt "Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge".

Anhang A

Tabellen

	Anregungs- wellenlänge λ	$\phi(\lambda)$ [%]	$\bar{\phi}$ [%]
α -Untereinheit	504 nm	12	17
	526 nm	13	
	545 nm	14	
	547 nm	16	
	557 nm	19	
	564 nm	18	
	572 nm	16	
	587 nm	14	
β -Untereinheit	520 nm	21	27
	521 nm	24	
	557 nm	25	
	559 nm	25	
	575 nm	27	
	584 nm	24	
	598 nm	37	
	615 nm	24	
	624 nm	20	
	630 nm	16	

Tabelle A.1: Tabellarische Übersicht der ermittelten Quantenausbeuten. Durch Mittelwertbildung wurde eine von der Anregungswellenlänge unabhängige Fluoreszenzquantenausbeute $\bar{\phi}$ gebildet.

	A_1	x_1	b_1	A_2	x_2	b_2
Absorption						
α -84	50729	17539	486	89335	18376	1185
β -84	71896	16430	536	47499	17346	1217
β -155	71896	16873	536	47499	17788	1217
Emission						
α -84	$2,88 * 10^{-4}$	16345	1107	$4,62 * 10^{-4}$	17125	532
β -84	$4,21 * 10^{-4}$	15792	536	$2,78 * 10^{-4}$	14877	1217
β -155	$4,21 * 10^{-4}$	16234	536	$2,78 * 10^{-4}$	15391	1217

Tabelle A.2: Fitparamter zur Beschreibung der individuellen Chromophorspektren. Die Absorptionsbanden sind im Maximum auf den Extinktionskoeffizienten, die Fluoreszenzspektren auf die Fläche normiert.

Akzeptor	Donor		
	α -84	β -84	β -155
α -84	-	$1,87 * 10^{-14}$	$6,06 * 10^{-14}$
β -84	$7,52 * 10^{-13}$	-	$5,84 * 10^{-13}$
β -155	$7,05 * 10^{-13}$	$1,05 * 10^{-13}$	-

Tabelle A.3: Überlappintegrale der Chromophore.

Anhang B

Programme

B.1 Photonenstatistik

C-Programm zur Berechnung der Verteilungsfunktion der Fluoreszenzzählrate eines einzelnen Moleküls nach Abschnitt 2.1.6 mit folgenden Parametern:

- Integrationszeit $T = 10$ ms
- Dunkelzustandspopulation $k_{\text{on}} = 0.01$ / Integrationszeit
- Dunkelzustandsdepopulation $k_{\text{off}} = 1$ / Integrationszeit
- 1 Ereignis Untergrund / 1 ms
- 5 Ereignisse Fluoreszenzsignal / 1 ms

Das Programm benötigt zum Übersetzen die *GNU Scientific Library* [66].

```
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <gsl/gsl_sf.h>
#include <gsl/gsl_monte.h>
#include <gsl/gsl_monte_plain.h>

double time = 10;      //Integrationszeit
double k_on = 0.01;   //Dunkelzustandspopulation
double k_off = 1;     //Dunkelzustandsdepopulation
double I_b= 1.0;      //Untergrundsignal / [ms]
```

```

double I_m= 5.0;          //Fluoreszenzsignal / [ms]

double unintP (double[], size_t,void*);
/*
   Struktur zur Parameteruebergabe an
   die integrierbare Funktion unintP
*/
struct iparam {int i;double fac;};
struct iparam params = {0,0};

main (void) {

    int i,counter;
    double erg,fac;
    double xl[1] = {0};
    double xu[1] = {1};
    double p_on,p_off,x,y;
    double res, err;
    //GSL spezifische Initialisierung
    size_t calls = 2*1000000;
    gsl_rng *r;
    const gsl_rng_type *T;
    gsl_monte_function F={&unintP,1,&params};
    gsl_monte_plain_state *gsl_space;
    gsl_rng_env_setup ();
    T = gsl_rng_default;
    r = gsl_rng_alloc (T);
    gsl_space=gsl_monte_plain_alloc(1);

    /*
       Ab hier erfolgt die Berechnung der Wahr-
       scheinlichkeiten fuer bist zu
       120 Zaehlereignisse / Integrationzeit
    */
    for (i = 1;i<=120;i++){
        params.i = i;
        fac = 1;
        for (counter=1;counter<=params.i;counter++){
            fac = fac*counter;

```

```

    }
    params.fac = fac;
    // Integration der Besselfunktion unintP (s.u.)
    gsl_monte_plain_init(gsl_space);
    gsl_monte_plain_integrate
        (&F,xl,xu,1,calls,r,gsl_space,&erg,&err);
    /*
        restliche Terme der Verteilungsfunktion
        aufsummieren (vgl. Abschnitt 2.1.6)
    */
    erg = erg +
        exp(-k_off*time)*(k_on/(k_on+k_off))*
        exp(-I_b*time)*pow(I_b*time,i)/fac+
        exp(-k_on*time)*(k_off/(k_on+k_off))*
        exp(-(I_b+I_m)*time)*pow((I_b+I_m)*
        time,i)/fac;
    /*
        Ausgabe der Wahrscheinlichkeit erg, i Zaehl-
        ereigniss, waehrend der Integrationszeit time,
        detektieren zu koennen.
    */
    printf ("%d\t% .15f\n",i, erg);
}
gsl_monte_plain_free(gsl_space);

}

//Definition des Integrals
double unintP (double *array,size_t dim ,void *p) {
    int i;
    double x,prop,fac;
    double y,p_on,p_off;
    x = array[0];
    i = params.i;
    fac = params.fac;
    y = 2*time*sqrt(k_on*k_off*x*(1-x));
    p_on = k_on*time*(gsl_sf_bessel_I0(y)+gsl_sf_bessel_I1(y)*
        sqrt((k_off*x)/(k_on*(1-x)))) *
        exp(-(k_on*x+k_off*(1-x))*time);

```

```

p_off = k_off*time*(gsl_sf_bessel_I0(y)+gsl_sf_bessel_I1(y)*
                sqrt((k_on*(1-x))/(k_off*x))) *
                exp(-(k_on*x+k_off*(1-x))*time);
prop = k_off/(k_on+k_off)*p_on + k_on/(k_on+k_off)*p_off;
return exp(-(I_b+x*I_m)*time)*pow((I_b+x*I_m)*time,i)/fac*
        prop;
}

```

B.2 Programm zur Berechnung des Energietransferkoeffizienten γ

Programm zur Berechnung der Energietransferkoeffizienten γ eines Monomers bei gegebener Orientierung des PVB-Chromophors durch seine beiden Polarkoordinaten ϕ und θ .

```

#include <math.h>
#include <stdlib.h>
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

double  xachse[3]={1,0,0};
double  yachse[3]={0,1,0};
double  zachse[3]={0,0,1};
double  einheitsmatrix[3][3]={1,0,0,
                               0,1,0,
                               0,0,1};

double  dymatrix[3][3]={0,0,0,
                       0,0,0,
                       0,0,0};

double  dzmatrix[3][3]={0,0,0,
                       0,0,0,
                       0,0,0};

double  d0matrix[3][3]= {0,0,0,
                        0,0,0,
                        0,0,0};

double  dmatrix[3][3]= {0,0,0,
                       0,0,0,
                       0,0,0};

```

```

        0,0,0};
double alpha84[3]={-0.25,-0.96,0.14};
double beta84[3]={0.31,0.81,-0.50};
double beta155[3]={-0.27,0.47,-0.84};

double laenge          (double[]);
void normierung        (double[],double[]);
double skalarprodukt   (double[],double[]);
void kreuzprodukt      (double[],double[],double[]);
void drehungumxachse   (double,double[] []);
void drehungumyachse   (double,double[] []);
void drehungumzachse   (double,double[] []);
void matrixmultiplikation (double[] [],double[] [],double[] []);
void matrixtransposition (double[] [],double[] []);
void quadrat           (double[] [],double[] []);
void normalise_chromophors (double[] []);
void fixchromos_zx     (double[] [],double[] []);
double eff_calc        (void);

int main (int argc, char *argv[])
{
    double psi;
    int psiloop;
    double eff;
    double eff_end;

    if (argc !=2)
    {
        printf ("Usage: eff filename \n");
        exit (3);
    }
    if ( (fd = fopen(argv[1],"r")) == NULL)
    {
        printf("error opening file\n");
        exit(3);
    }
    normalise_chromophors(org_chromos);
    fixchromos_zx(org_chromos,z_chromos);
    while ((fscanf(fd,"%f%f%f",&phi0,&r,&theta0)) != EOF)

```

```

{
    eff_end=10;
    drehungumyachse(theta0,dymatrix);
    drehungumzachse(phi0,dzmatrix);
    matrixmultiplikation(dzmatrix,dymatrix,d0matrix);
    for (psiloop=0;psiloop<winkelsteps+1;psiloop++)
    {
        psi=(2*M_PI/(winkelsteps))*psiloop-M_PI;
        drehungumzachse(psi,dzmatrix);
        matrixmultiplikation
        (d0matrix,dzmatrix,dmatrix);
        matrixmultiplikation
        (dmatrix,z_chromos,psichromos);
        quadrat(psichromos,quadchromos);
        eff = eff_calc();
        if ((eff >=0) && (eff <=1))
        {
            if (eff_end > eff) eff_end = eff;
        }
    }
    printf("%f\n",eff_end);
}
fclose(fd);
return 0;
}

double eff_calc(){
    double x1h2,x2h2,y1h2,y2h2,z1h2,z2h2;
    double k1 = 0.3207727610;
    double k2 = 0.005623609689;
    double k3 = 0.09703495034;
    double x1,x2,y1,y2;
    x1h2 = quadchromos[0][1];
    y1h2 = quadchromos[1][1];
    z1h2 = quadchromos[2][1];
    x2h2 = quadchromos[0][2];
    y2h2 = quadchromos[1][2];
    z2h2 = quadchromos[2][2];

```

```

    x1 = k1*x1h2+k2*y1h2+k3*z1h2;
    x2 = k1*x2h2+k2*y2h2+k3*z2h2;
    y1 = k2*x1h2+k1*y1h2+k3*z1h2;
    y2 = k2*x2h2+k1*y2h2+k3*z2h2;
    return ((r*x1-y1)/(r*x1-r*x2-y1+y2));
}
/*
Funktionen zum Rechnen mit Matrizen
und Vektoren. Diese wurden von Th. Hellerer zusammengetragen.
*/
double laenge(double x[3])
{
    return sqrt(pow(x[0],2)+pow(x[1],2)+pow(x[2],2));
}
void normierung (double vektor[3],double norm[3])
{
    norm[0]=vektor[0]/laenge(vektor);
    norm[1]=vektor[1]/laenge(vektor);
    norm[2]=vektor[2]/laenge(vektor);
}
void drehungumxachse(double phi,double x[3][3])
{
    x[0][0]=1;      x[0][1]=0;      x[0][2]=0;
    x[1][0]=0;      x[1][1]=cos(phi);  x[1][2]=sin(phi);
    x[2][0]=0;      x[2][1]=-sin(phi); x[2][2]=cos(phi);
}

void drehungumyachse(double phi,double x[3][3])
{
    x[0][0]=cos(phi);    x[0][1]=0;    x[0][2]=-sin(phi);
    x[1][0]=0;           x[1][1]=1;    x[1][2]=0;
    x[2][0]=sin(phi);   x[2][1]=0;    x[2][2]=cos(phi);
}

void drehungumzachse(double phi,double x[3][3])
{
    x[0][0]=cos(phi);    x[0][1]=sin(phi);    x[0][2]=0;
    x[1][0]=-sin(phi);   x[1][1]=cos(phi);    x[1][2]=0;
    x[2][0]=0;           x[2][1]=0;           x[2][2]=1;
}

```

}

```
double skalarprodukt(double vektor1[3],double vektor2[3])
```

```
{
```

```
    double x=0;
```

```
    int i;
```

```
    for (i=0;i<3;i++) x+=vektor1[i]*vektor2[i];
```

```
    return x;
```

```
}
```

```
void kreuzprodukt(double vektor1[3],double vektor2[3],double x [3])
```

```
{
```

```
    int i;
```

```
    for (i=0;i<3;i++) x[i]=vektor1[(i+1)%3]*vektor2[(i+2)%3]-
                        vektor1[(i+2)%3]*vektor2[(i+1)%3];
```

```
}
```

```
void matrixmultiplikation(double matrix1[3][3],
```

```
    double matrix2[3][3], double x[3][3])
```

```
{
```

```
    int i,j,k;
```

```
    x[0][0]=0;      x[0][1]=0;      x[0][2]=0;
```

```
    x[1][0]=0;      x[1][1]=0;      x[1][2]=0;
```

```
    x[2][0]=0;      x[2][1]=0;      x[2][2]=0;
```

```
    for (i=0;i<3;i++)
```

```
    {
```

```
        for (j=0;j<3;j++)
```

```
        {
```

```
            for (k=0;k<3;k++) x[i][j]+= matrix1[i][k]*
                                matrix2[k][j];
```

```
        }
```

```
    }
```

```
}
```

```
void matrixtransposition(double matrix[3][3],double x[3][3])
```

```
{
```

```
    int i,j;
```

```
    for (i=0;i<3;i++)
```

```
    {
```

```
        for (j=0;j<3;j++)x[i][j]=matrix [j][i];
```



```

    }
}

void quadrat(double einfach[3][3],double quadrat[3][3])
{
    int i,j;
    for (i=0;i<3;i++)
    {
        for (j=0;j<3;j++) quadrat[i][j]=
            einfach[i][j]*einfach[i][j];
    }
}

```

B.3 Berechnung der Energietransferraten

Maple©-Arbeitsblatt zur Berechnung der Energietransferraten in monomerem PEC:

```

with (linalg):
#Definition des Orientierungsparameters kappa
kappa := 3*cphid*cphia-cphida;
# Winkel zwischen 2 Vektoren cos (phi) =....
ciangle := proc(a,b) multiply(a,b)/(sqrt(multiply(a,a))*
    sqrt(multiply(b,b))) end;
#Definition der Richtungsvektoren
mya84 := vector (3,[-0.25,-0.96,0.14]):
myb84 := vector (3,[0.31,0.81,-0.50]):
myb155 := vector (3,[-0.27,0.47,-0.84]):
#.... und ihrer Laengen
a84 := vector (3,[29.70,113.85,-1.07]):
b84 := vector (3,[7.67,71.68,2.18]):
b155 := vector (3,[41.23,68.95,-5.86]):

#Es werden im Folgenden die Orientierungsparamter zwischen den
#einzelnen Chromophoren und deren Abstaende zueinander ermittelt.

#alpha84 in den Ursprung
cphid := ciangle(b84-a84,mya84);

```

```

cphia := ciangle(b84-a84,myb84);
cphida := ciangle(mya84,myb84);
k_a84_b84 := kappa^2;
r_a84_b84 := evalf(sqrt(multiply((b84-a84),(b84-a84))))*10^(-10);

cphid := ciangle(a84-b155,mya84);
cphia := ciangle(a84-b155,myb155);
cphida := ciangle(mya84,myb155);
k_a84_b155 := kappa^2;
r_a84_b155 := evalf(sqrt(multiply((b155-a84),(b155-a84))))*10^(-10);

#beta-84 in den Ursprung
cphid := ciangle(b155-b84,myb84);
cphia := ciangle(b155-b84,myb155);
cphida := ciangle(myb84,myb155);
k_b84_b155 := kappa^2;
r_b84_b155 := evalf(sqrt(multiply((b155-b84),(b155-b84))))*10^(-10);

#Parameterdefinition zur Beschreibung der Spektren durch die Summe
#zweier Gaussfunktionen. abs... bezeichnet dabei die Absorptions-
#spektren, fluor... die Fluoreszenzspektren. amp ist die Amplitude,
#mid die spektrale Lage und w die Breite

absalpha84amp1:=0.139254:
absalpha84mid1 := 17538.9:
absalpha84w1 := 486.103:
absalpha84amp2:= 0.245227:
absalpha84mid2 := 18375.8:
absalpha84w2 := 1185.44:

absbeta84amp1:= 61242.4:
absbeta84mid1 := 16430.4:
absbeta84w1 := 535.77:
absbeta84amp2:= 40460.4:
absbeta84mid2 := evalf(16430.4+915.2):
absbeta84w2 := 1216.83:

absbeta155amp1:=61242.4:

```

```

absbeta155mid1 := 16872.5:
absbeta155w1 := 535.77:
absbeta155amp2:= 40460.4:
absbeta155mid2 := evalf(16872.5+915.2):
absbeta155w2 := 1216.83:

fluoralpha84amp1:=9969.07:
fluoralpha84mid1 := 16345.2:
fluoralpha84w1 := 1107.4:
fluoralpha84amp2:= 16005.1:
fluoralpha84mid2 := 17125.1:
fluoralpha84w2 := 532.324:

fluorbeta84amp1:= 61242.4:
fluorbeta84mid1 := evalf(16430.4-638.2):
fluorbeta84w1 := 535.77:
fluorbeta84amp2:= 40460.4:
fluorbeta84mid2 := evalf(16430.4-915.2-638.2):
fluorbeta84w2 := 1216.83:

fluorbeta155amp1:=61242.4:
fluorbeta155mid1 := evalf(16872.5-638.2):
fluorbeta155w1 := 535.77:
fluorbeta155amp2:= 40460.4:
fluorbeta155mid2 := evalf(16872.5-915.2-638.2):
fluorbeta155w2 := 1216.83:

#Definition der Spektren als Summe zweier Gaussfunktionen

absalpha84 := absalpha84amp1*exp(-(x-absalpha84mid1)^2/
      absalpha84w1^2)+absalpha84amp2*
      exp(-(x-absalpha84mid2)^2/absalpha84w2^2);
absbeta84 := absbeta84amp1*exp(-(x-absbeta84mid1)^2/
      absbeta84w1^2)+absbeta84amp2*
      exp(-(x-absbeta84mid2)^2/absbeta84w2^2);
absbeta155 := absbeta155amp1*exp(-(x-absbeta155mid1)^2/
      absbeta155w1^2)+absbeta155amp2*
      exp(-(x-absbeta155mid2)^2/absbeta155w2^2);
fluoralpha84 := fluoralpha84amp1*exp(-(x-fluoralpha84mid1)^2/

```

```

        fluoralpha84w1^2)+fluoralpha84amp2*
        exp(-(x-fluoralpha84mid2)^2/fluoralpha84w2^2);
fluorbeta84 := fluorbeta84amp1*exp(-(x-fluorbeta84mid1)^2/
        fluorbeta84w1^2)+fluorbeta84amp2*
        exp(-(x-fluorbeta84mid2)^2/fluorbeta84w2^2);
fluorbeta155 := fluorbeta155amp1*exp(-(x-fluorbeta155mid1)^2/
        fluorbeta155w1^2)+fluorbeta155amp2*
        exp(-(x-fluorbeta155mid2)^2/fluorbeta155w2^2);

#Normierung der Fluoreszenzspektren auf die Flaeche 1

nfluoralpha84 := 1/(int(fluoralpha84,x=0..infinity))*fluoralpha84;
nfluorbeta84 := 1/(int(fluorbeta84,x=0..infinity))*fluorbeta84;
nfluorbeta155 := 1/(int(fluorbeta155,x=0..infinity))*fluorbeta155;

#Die Maxima der Absorptionsspektren werden ueber
#Differenzierung der Funktionen ermittelt.

x := fsolve(0=diff (absalpha84,x)):
printf ("alpha84-Absmax: %f",1/x*10^7);
alpha84absmax := absalpha84;
unassign('x');
x:=fsolve(0=diff (absbeta84,x));
printf ("beta84-Absmax: %f",1/x*10^7);
beta84absmax := absbeta84;
unassign('x');
x:=fsolve(0=diff (absbeta155,x));
printf ("beta155-Absmax: %f",1/x*10^7);
beta155absmax := absbeta155;
unassign('x');

#Die Absorptionsspektren werden im Maximum
#auf ihren Extinktionskoeffizienten skaliert.

epsilon := 1.1*10^5/alpha84absmax;
epsilonb84 := 1.0*10^5/beta84absmax;
epsilonb155 := 1.0*10^5/beta155absmax;
nabsalpha84 := epsilon*absalpha84;
nabsbeta84 := epsilonb84*absbeta84;

```

```

nabsbeta155 := epsilonb155*absbeta155;

#Ueberlappintegrale J berechnen

over_a84_b84 := evalf(int((nfluoralpha84*nabsbeta84/x^4),
                          x=12000..30000));
over_b84_a84 := evalf(int((nfluorbeta84*nabsalpha84/x^4),
                          x=12000..30000));
over_a84_b155 := evalf(int((nfluoralpha84*nabsbeta155/x^4),
                          x=12000..30000));
over_b155_a84 := evalf(int((nfluorbeta155*nabsalpha84/x^4),
                          x=12000..30000));
over_b84_b155 := evalf(Int((nfluorbeta84*nabsbeta155/x^4),
                          x=12000..30000));
over_b155_b84 := evalf(Int((simplify(nfluorbeta155*nabsbeta84)/x^4),
                          x=12000..30000));

#Definition von Parametern fuer den Foersterenergietransfer
#NA = Avogadrokonstante
#rx = Abstand zwischen den Chromophore
#taux = Fluoreszenzlebenszeit
#nd = Brechungsindex
#qa = Fluoreszenzquantenausbeute

NA := 6.022*10^23;
#r in cm !!!
r1:= r_a84_b84*100;
r2:= r_a84_b155*100;
r3:= r_b84_b155*100;

tau1 := 0.8*10^(-9);
tau2 := 1.2*10^(-9);
tau3 := 1.2*10^(-9);
nd := 1.34;

qa1 := 0.17;
qa2 := 0.27;
qa3 := 0.27;

```

```

#Berechnung der Energietransferraten nach dem
#Foerstermechanismus

ka84b84 := evalf((9000*(ln (10))*k_a84_b84*qa1)/
  (128*Pi^5*nd^4*NA*r1^6*tau1)*over_a84_b84)/10^9;
kb84a84 := evalf((9000*(ln (10))*k_a84_b84*qa2)/
  (128*Pi^5*nd^4*NA*r1^6*tau2)*over_b84_a84)/10^9;
ka84b155 := evalf((9000*(ln (10))*k_a84_b155*qa1)/
  (128*Pi^5*nd^4*NA*r2^6*tau1)*over_a84_b155)/10^9;
kb155a84 := evalf((9000*(ln (10))*k_a84_b155*qa3)/
  (128*Pi^5*nd^4*NA*r2^6*tau3)*over_b155_a84)/10^9;
kb84b155 := evalf((9000*(ln (10))*k_b84_b155*qa2)/
  (128*Pi^5*nd^4*NA*r3^6*tau2)*over_b84_b155)/10^9;
kb155b84 := evalf((9000*(ln (10))*k_b84_b155*qa3)/
  (128*Pi^5*nd^4*NA*r3^6*tau3)*over_b155_b84)/10^9;

#Ratensystems fuer den Fall der stationaeren Loesung

erg := solve ({-(k12+k13)*A+k21*B+k31*C=0,
  k12*A-(k21+k23)*B+k32*C=0,
  k13*A+k23*B-(k32+k31)*C=0,
  A +B +C = 1},
  {A,B,C});
k12 := ka84b84; k21 := kb84a84;
k13 := ka84b155; k31 :=kb155a84;
k23 := kb84b155; k32 :=kb155b84;
subs(erg,A);
subs(erg,B);
subs(erg,C);

```

B.4 Monte Carlo Simulation

Beispiel für ein Fortran-Programm zur Simulation der Energieverteilung in einem Monomer nach Anregung auf dem PVB-Chromophor.

Das Programm setzt auf den Mersenne Twister Zufallszahlengenerator auf. Er kann über <http://www.math.keio.ac.jp/~matumoto/emt.html> bezogen werden. Auf die-

ser Homepage sind ebenfalls die Modifikationen beschrieben, um Zufallszahlen im Intervall $[0, 1[$ zu erhalten.

```
PROGRAM RATEN
```

```
IMPLICIT REAL*8 (A-Z)
```

```
INTEGER a,b,c,iostatus
```

```
C Ueber F1 - F6 kann eine Gewichtung der Energietransferraten
C erfolgen. Sie werden benoetigt um den Einfluss von Aenderungen
C in den photophysikalischen Parametern auf die Energietransfer-
C raten zu simulieren.
```

```
F1=1
```

```
F2=1
```

```
F3=1
```

```
F4=1
```

```
F5=1
```

```
F6=1
```

```
5      CONTINUE
```

```
C Energietransferraten, wie sie sich aus der Foersterrechnung ergeben
C Chromophor A: alpha84, Chromophor B: beta84, Chromophor C: beta155
```

```
KAB=10.45*F1
```

```
KBA=0.28*F2
```

```
KAC=1.44*F3
```

```
KCA=0.13*F4
```

```
KBC=2.56*F5
```

```
KCB=14.20*F6
```

```
C inverser Fluoreszenzlebenszeit der individuellen Chromophore
```

```
KFA=1/0.8
```

```
KFB=1/1.2
```

```
KFC=1/1.2
```

```
C Zaehler der Relaxationseignisse
```

```
a=0
```

```
b=0
```

```
c=0
```

```
C Seed des Zufallszahlengenerators setzen
  call sgrnd (23305)

C ---- Anregung auf Chromophor alpha-84 ----
10 CONTINUE
  X = grnd ()
  KATOT=KAB+KAC+KFA
  X=X*KATOT
  IF (X.LT.KAB) THEN
    GOTO 20
  ELSEIF (X.LT.(KAB+KAC)) THEN
    GOTO 30
  ELSE
    a=a+1
    GOTO 40
  ENDIF
GOTO 50

C ---- Anregung auf Chromophor beta-84 ----
20 CONTINUE
  X = grnd()
  KBTOT=KBA+KBC+KFB
  X=X*KBTOT
  IF (X.LT.KBA) THEN
    GOTO 10
  ELSEIF (X.LT.(KBA+KBC)) THEN
    GOTO 30
  ELSE
    b=b+1
    GOTO 40
  ENDIF
GOTO 50

C ---- Anregung auf Chromophor beta-155 ----
30 CONTINUE
  X = grnd()
  KCTOT=KCA+KCB+KFC
  X=X*KCTOT
  IF (X.LT.KCA) THEN
```



```
        GOTO 10
    ELSEIF (X.LT.(KCA+KCB)) THEN
        GOTO 20
    ELSE
        c=c+1
        GOTO 40
    ENDIF
    GOTO 50
C      ---- error ----
50 CONTINUE
    STOP 'BLOEDSINN'

C      ---- Neue Runde, falls Relaxation erfolgte mit evtl.
C            wahrer Abbruchbedingung ----
40 CONTINUE
    IF((a+b+c).LT.1000000) GOTO 10
    aerg = REAL(a) / (REAL (a+b+c)) *100
    berg = REAL(b) / (REAL (b+c)) *100
    cerg = REAL(c) / ( REAL(b+c)) *100
    WRITE(*,*)berg,cerg
    a=0
    b=0
    c=0
    END
```

Anhang C

Abbildungen

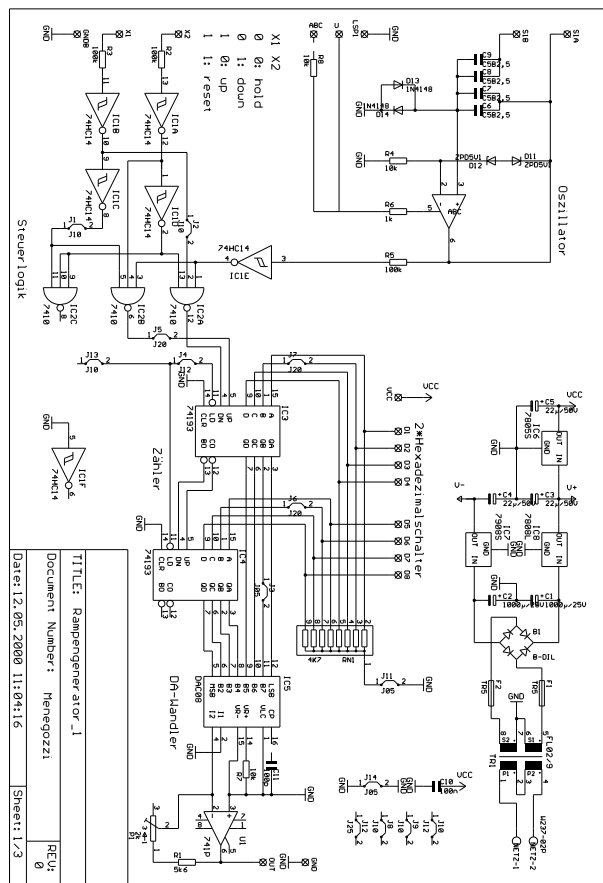


Abbildung C.1: Schaltplan des von B. Menegozzi nach eigener Vorgabe entwickelten Rampengenerators.

Literaturverzeichnis

- [1] G. Binning, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel; Phys. Rev. Lett. 49 (1982) 57.
- [2] H. Ohtani, R. J. Wilson, S. Chiang, C. M. Mate; Phys. Rev. Lett. 60 (1988) 2398.
- [3] W. M. Yen, P. M. Stelzer; Laserspectroscopy of solids (Springer, Berlin, 1986).
- [4] W. E. Moerner; Persisten Spectral Hole-Burning (Springer, Berlin, 1988).
- [5] D. A. Wiersma; Photoselective Chemistry Part 2 (Wiley, New York, 1981).
- [6] W. E. Moerner, L. Kador; Phys. Rev. Lett. 62 (1989) 2535.
- [7] L. Kador, T. Latychevskaia, A. Renn, U. P. Wild; J. Chem. Phys. 111 (1999) 8755.
- [8] M. Orrit, J. Bernard; Phys. Rev. Lett. 65 (1990) 2716.
- [9] M. Orrit, J. Bernard; Mod. Phys. Lett. B 11 (1991) 747.
- [10] M. Croci; H.-J. Müschenborn, F. Güttler, A. Renn, U. P. Wild; Chem. Phys. Lett. 212 (1993) 71.
- [11] M. Orrit, J. Bernard, A. Zumbusch; Chem. Phys. Lett. 196 (1992) 595.
- [12] U. P. Wild, F. Güttler, M. P. Pirotta, A. Renn; Chem. Phys. Lett. 193 (1992) 451.
- [13] J. Bernard, L. Fleury, H. Talon, M. Orrit; J. Chem. Phys. 98 (1993) 850.
- [14] T. Basché W. E. Moerner, M. Orrit, H. Talon; Phys. Rev. Lett. 69 (1992) 1516.
- [15] M. Pirotta, F. Güttler, H. Gygax, A. Renn, J. Serpiol, U. P. Wild; Chem. Phys. Lett. 208 (1993) 379.
- [16] T. Hirschfeld, Appl. Opt. 15 (1976) 2965.

- [17] N. J. Dovichi, J. C. Martin, J. H. Jett, M. Trkula, R. A. Keller; *Anal. Chem.* 56 (1984) 348.
- [18] D. C. Nguyen, R. A. Keller, J. H. Jett, J. C. Martin; *Anal. Chem.* 59 (1987) 2158.
- [19] K. Peck, L. Stryer, A. N. Glazer, R. A. Mathies; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1987) 4087.
- [20] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper; *Chem. Phys. Lett.* 174 553.
- [21] S. A. Soper, E. B. Shera, J. C. Martin, J. H. Jett, J. H. Hahn, H. L. Nutter, R. A. Keller; *Anal. Chem.* 63 (1991) 432.
- [22] W. B. Whitten, J. M. Ramsey, S. Arnold, B. V. Bronk; *Anal. Chem.* 63 (1991) 1027.
- [23] E. Betzig, R. J. Chichester; *Science* 262 (1993) 1422.
- [24] R. Kopelman, W. Tan; *Science* 262 (1993) 1382.
- [25] D. Birnbaum, S.-K. Kook, R. Kopelman; *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 3091.
- [26] X. S. Xie, R. C. Dunn; *Science* 265 (1994) 361.
- [27] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida; *Nature* 374 (1995) 555.
- [28] I. Sase, H. Miyata, J. E. T. Corrie, J. S. Craik, K. Kinoshita Jr.; *Biophys. J.* 69 (1995) 323.
- [29] J. J. Macklin, J. K. Trautman, T. D. Harris, L. E. Brus; *Science* 272 (1996) 255.
- [30] J. K. Trauman, J. J. Macklin. *Chem. Phys.* 205 (1996) 221.
- [31] R. M. Dickson, D. J. Norris, Y.-L. Tzeng, W. E. Moerner; *Science* 274 (1996) 966.
- [32] S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare; *Anal. Chem.* 67 (1995) 2849.
- [33] R. D. Vale, T. Funastu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, T. Yanagida; *Nature* 380 (1996) 451.

- [34] D. M. Warshaw, E. Hayes, D. Gaffney, A.-M. Lauzon, J. Wu, G. Kennedy, K. Trybus, S. Lowey, C. Berger; *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95 (1998) 8034.
- [35] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita; *Nature* 386 (1997) 299.
- [36] K. Häslér, S. Engelbrecht, W. Junge; *FEBS Lett.* 426 301.
- [37] H. P. Lu, L. Xun; X. S. Xie; *Science* 282 (1998) 1877.
- [38] Q. Xue, E. S. Yeung; *Nature* 373 (1995) 681.
- [39] V. Uhl, G. Pilarczyk, K. O. Greulich; *Biol. Chem.* 379 (1998) 1175.
- [40] T. Ha, A. Y. Ting, J. Liang, W. B. Caldwell, A. A. Deniz, D. S. Chemla, P. G. Schultz, S. Weiss; *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96 (1999) 893.
- [41] T. Schmidt, G. J. Schütz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler; *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 17662.
- [42] T. Schmidt, G. J. Schütz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 2926.
- [43] G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endress, H. Büning, M. Hallek, C. Bräuchle; *Science* 294 (2001) 1929.
- [44] D. Prasher, V. Eckenrode, W. Ward, F. Prendergast, M. Cormier; *Gene* 111 (1992) 229.
- [45] C. Docy, D. Prasher, W. Westler, F. Prendergast, W. Ward; *Biochemistry* 32 (1993) 1212.
- [46] D. W. Pierce, N. Hom-Booher, R. D. Vale; *Nature* 388 (1997) 338.
- [47] S. Brasselet, E. J. G. Peterman, A. Miyawaki, W. E. Moerner; *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 3676.
- [48] R. C. Dunn, G. R. Holtom, L. Mets, X. S. Xie; *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 3094.
- [49] M. A. Bopp, Y. Jia, L. Li, R. J. Cogdell, R. M. Hochstrasser; *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94 (1997) 10630.
- [50] A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T. J. Aarstma, J. Schmidt; *Chem. Phys.* 247 (1999) 53.
- [51] A. M. Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T. J. Aarstma, J. Schmidt; *Science* 285 (1999) 400.

- [52] A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T. J. Aarstma, J. Schmidt; *Biophys. J.* **78** (2000) 1580.
- [53] R. C. Dunn, E. V. Allen, S. A. Joyce, G. A. Anderson, X. S. Xie; *Ultramicroscopy* **57** (1995) 113.
- [54] M. Wu, P. M. Goodwin, W. P. Ambrose, R. A. Keller; *J. Phys. Chem.* **100** 17406.
- [55] L. Ying, L.S. Xie; *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 10399.
- [56] D. Wöhrle, T. Tausch, W. Stohrer; *Photochemie* (Wiley-VCH, Weinheim, 1998).
- [57] P. W. Atkins; *Physical Chemistry* (Oxford University Press, Oxford, 1987)
- [58] S. Strickler, R. Berg; *J. Chem. Phys.* **37** (1962) 814.
- [59] J. R. Lakowicz; *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 1999)
- [60] D. F. Eaton; *Pure & Appl. Chem.* **7** (1988) 1107.
- [61] R. Loudon; *The Quantum Theory of Light* (Clarendon Press, Oxford, 1995).
- [62] J. Enderlein; *Appl. Opt.* **34** (1995) 514.
- [63] A. Molski, *Chem. Phys. Lett.* **325** (2000) 301.
- [64] A. M. Berezhkovskii, A. Szabo, G. H. Weiss; *J. Chem. Phys.* **110** (1999) 9145.
- [65] W.-T. Yip, D. Hu, J. Yu, D. A. V. Bout, P. F. Barbara; *J. Phys. Chem. A* **102** (1998) 7564.
- [66] <http://sources.redhat.com/gsl/>
- [67] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, C. A. M. Seidel; *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine* (edited by W. Rettig, S. Schrader, B. Strehmel, H. Seifert; Springer, Berlin, 1999).
- [68] N. J. Turro; *Modern Molecular Photochemistry* (Benjamin/Cummings Publishing, Menlo Park, 1978).
- [69] C. G. Hübner, A. Renn, I. Renge, U. P. Wild; *J. Chem. Phys.* **115** (2001) 9619.
- [70] D. Kearns, *Chem. Rev.* **91** (1971) 395.

- [71] O. L. J. Gijzman et al.; Faraday Trans. II 70 (1973) 708.
- [72] J. A. Bloom, W. W. Webb; J. Histochem. Cytochem. 32 (1984) 608.
- [73] M. A. Bopp, A. Stytnik, T. D. Howard, R. J. Cogdell, R. M. Hochstrasser; Proc. Natl. Acad. Sci USA 96 (1999) 11271.
- [74] T. Christ, F. Kulzer, P. Bordat, T. Basché; Angew. Chem. Int. Ed. 40 (2001) 4192.
- [75] J. Enderlein; Opt. Lett. 25 (2000) 634-636.
- [76] S. Mais, Dissertation (Universität München, 2000).
- [77] E. Hecht; Optics (Addison-Wesley Publishing Company, Amsterdam, 1974).
- [78] J. B. Pawley; Handbook of biological confocal Microscopy (Plenum Press, New York and London, 1995).
- [79] T. R. Corle, G. S. Kino; Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging System (Academic Press, San Diego, 1996).
- [80] G. J. Schütz, V. P. Pastushenko, H. J. Gruber, H. Knaus, B. Pragl, H. G. Schindler; Single Mol. 1 (2000) 25.
- [81] U. Kubitschek, O. Kückmann, T. Kues, R. Peters; Biophys. J. 78 (2000) 2170.
- [82] G. J. Schütz, G. Kada, V. P. Pastushenko, H. G. Schindler; EMBO J. 19 (2000) 892.
- [83] M. Goulian, S. M. Simon; Biophys. J. 79 (2000) 2188.
- [84] M. Minski, U.S. Patent 3,013,467 (19. Dezember 1961).
- [85] M. Minski, Scanning 10 (1988) 128.
- [86] C. Seebacher, C. Hellriegel, F.-W. Deeg, C. Bräuchle; J. Phys. Chem. 106 (2002) 5591.
- [87] M. Eigen, R. Rigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 5740.
- [88] P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, M. Orrit; J. Phys. Chem. A 104 (2000) 1.
- [89] T. Ruppert, Dissertation (Universität München, 2002).
- [90] K. D. Westen, L. S. Goldner; J. Phys. Chem. B 105 (2001) 3453.

- [91] T. Ha, T. A. Laurence, D. S. Chemla, S. Weiss; *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 6839.
- [92] E. J. G. Peterman, H. Sosa, L. S. B. Goldstein, W. E. Moerner; *Biophys. J.* **81** (2001) 2851.
- [93] I. N. Levine; *Quantum Chemistry* (Prentice Hall, New Jersey, 1991).
- [94] J. B. Birks; *Photophysics of Aromatic Molecules* (Wiley-Interscience, London, New York, Sydney, Toronto, 1969).
- [95] A. Jablonski; *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. A* **8** (1960) 259.
- [96] G. Weber; *Fluorescence and Phosphorescence Analysis* (John Wiley & Sons, New York, 1966) 217.
- [97] T. Förster; *Naturwiss.* **33** (1946) 166.
- [98] M. Klessinger, J. Michl; *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules* (VCH-Weinheim, Weinheim, 1995).
- [99] D. L. Dexter; *J. Chem. Phys.* **21** (1953) 836.
- [100] T. Förster; *Ann. Phys.* **2** (1948) 55.
- [101] J. D. Jackson; *Classical Electrodynamics* (John Wiley & Sons, New York, 1966) 102.
- [102] T. Förster; *Modern Quantum Chemistry, Part III Action of Light and Organic Crystals* (edited by O. Sinanoglu, Academic Press, New York, 1965).
- [103] I. Z. Steinberg; *Annu. Rev. Biochem.* **40** (1971) 83.
- [104] G. R. Fleming, J. M. Morris, G. W. Robinson; *Chem. Phys.* **17** (1976) 91.
- [105] P. Debye; *Polar Molecules* (Dover Press, New York, 1929).
- [106] G. Weber; *Biochem. J.* **51** (1952) 155.
- [107] J. Yguerabide, H. Epstein, L. Stryer; *J. Mol. Biol.* **51** (1970) 573.
- [108] B. Richards, W. Wolf; *Proc. R. Soc. London A* **253** (1959) 358.
- [109] K. Bahlmann, S. W. Hell; *Appl. Phys. Lett.* **77** (2000) 612.
- [110] D. Axelrod; *Biophys. J.* **26** (1979) 557.

- [111] B. Richards, W. Wolf; Proc. R. Soc. London A 253 (1959) 349.
- [112] H.-W. Augustin, Dissertation (Universität München, 1998).
- [113] P. Zehetmayer; Diplomarbeit (Universität München, 1999).
- [114] Auskunft der Fima attocube systems, München.
- [115] R. Baumann; Dissertation (Universität München, 2000).
- [116] J. Rau; Dissertation (Universität München, 1999).
- [117] Becker & Hickl (Berlin), Handbuch zum SPC 300 TCSP-Modul
- [118] A. Parbel, Dissertation (Universität München, 1997).
- [119] G. Jung, J. Wiehler, W. Göhde, J. Tittel, T. Basché, B. Steipe, C. Bräuchle; Bioimaging 6 (1998) 54.
- [120] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner; Nature 388 355.
- [121] W. Reuter, C. Nickel-Reuter; J. Photochem. Photobiol. B Biol. 18 (1993) 51.
- [122] W. Sidler; The Molecular Biology of Cyanobacteria (edited by A. D. Bryant, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1994).
- [123] H. Scheer; persönliche Mitteilung.
- [124] A. R. Holzwarth; Physiol. Plant. 83 (1991) 518.
- [125] R. Rübli, H. Zuber; Photosynthetic Light-Harvesting Systems, Organization and Function (edited by H. Scheer, S. Schneider, de Gruyter, Berlin, 1988).
- [126] M. Glauser, W. Sidler, W. Zuber; Photochem. Photobiol. 57 (1993) 344.
- [127] A. N. Glazer; J. Biol. Chem. 264 (1989) 1.
- [128] A. Manodori, M. Alhadeff, A. N. Glazer, A. Melis; Arch. Microbiol. 139 (1984) 117.
- [129] A. Manodori, M. Alhadeff, A. N. Glazer, A. Melis; FEBS Lett. 181 (1985) 79.
- [130] D. A. Bryant; J. Gen. Microbiol. 128 (1982) 835.
- [131] S. Siebzehnriibl, R. Fischer, W. Kufer, H. Scheer; Photochem. Photobiol. 49 (1989) 763.

- [132] K.-H. Zhao, H. Scheer; *Biochim. Biophys. Acta* 1228 (1995) 244.
- [133] P. S. M. Sai, S. Siebzehnrübl, S. Mahajan, H. Scheer; *Photochem. Photobiol.* 55 (1992) 119.
- [134] M. Düring, R. Huber, W. Bode, R. Rumbeli, H. Zuber; *J. Mol. Biol.* 211 (1990) 633.
- [135] J. Zhao, J. Zhu, L. Juang; *Science in China B* 39 (1996) 519.
- [136] T. Schirmer, W. Bode, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 677.
- [137] B. Sick, B. Hecht, L. Novotny; *Phys. Rev. Lett.* 85 (2000) 4482.
- [138] L. Novotny, M. R. Beversluis, K. S. Youngworth, T. G. Brown; *Phys. Rev. Lett.* 86 (2001) 5251.
- [139] S. C. Switalski, K. Sauer; *Photochem. Photobiol.* 40 (1984) 423.
- [140] P. Hefferle, P. Geiselhard, T. Mindl, S. Schneider, W. John, H. Scheer; *Z. Naturforsch.* 39c (1984) 606.
- [141] S. Schneider, W. Jäger, C.-J. Prenzel, G. Brehm, P. S. M. Sai, H. Scheer, F. Lottspeich; *J. Photochem. Photobiol. B Biology* 26 (1994) 75.
- [142] M. P. Debreczeny, K. Sauer, J. Zhou, D. A. Bryant; *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 8412.
- [143] K. Sauer, H. Scheer; *Biochim. Biophys. Acta* 936 (1988) 157.
- [144] J. S. Kang; Grzegorz Piszczek, J. R. Lakowicz; *J. of Fluorescence* 12 (2002) 97.
- [145] A. R. Holzwarth, J. Wendler, G. W. Suter; *Biophys. J.* 51 (1987) 1.
- [146] J. Zhang, J. Zhang, Z. Yang, J. Zhao, L. Jiang, J. Chen, T. Ye, Q. Zhang; *Science in China B* 40 (1997) 286.
- [147] T. Karsten, K. Knobs; *J. Phys. Chem.* 84 (1980) 1871.
- [148] D. Magde, J. H. Brannon, T. L. Cremers, J. Olmsted III; *J. Phys. Chem.* 83/6 (1979) 696.
- [149] K. Sauer, H. Scheer, P. Sauer; *Photochem. Photobiol.* 46 (1987) 427.
- [150] M. P. Debreczeny, K. Sauer, J. Zhou, D. Bryant; *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 9852.

- [151] A. Parbel, K.-H. Zhao, J. Breton, H. Scheer; *Photosynth. Res.* **54** (1997) 25.
- [152] R. S. Moog, A. Kuki, M. D. Fayer, S. G. Boxer; *Biochemistry* **23** (1984) 1564.
- [153] M. Matsumoto and T. Nishimura; *ACM Trans. on Modeling and Computer Simulation* **8** (1998) 3-30.
- [154] Y. Durand, A. Bloef, A. M. van Oijen, J. Köhler, E. J. J. Groennen, J. Schmidt; *Chem. Phys. Lett.* **317** (2000) 232.
- [155] H. P. Lu, S. Xie; *Nature* **385** (1997) 143.
- [156] C. Blum, F. Stracke, S. Becker, K. Müllen, A. J. Meixner; *J. Phys. Chem. A* **105** (2001) 6983.
- [157] T. Basché, S. Kummer, C. Bräuchle; *Nature* **373** (1995) 132.
- [158] Produktkatalog; Biochemikalien und Reagenzien für die Life Science Forschung, Sigma (2000/2001).
- [159] J.-A. He, Y.-Z. Hu, L.-J. Jiang; *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 8957.
- [160] S.-P. Zhang, S.-P. Qian, J.-Q. Zhao, S.-D. Yao, L.-J. Jiang; *Biochim. Biophys. Acta* **1472** (1999) 270.
- [161] Molecular Probes Inc., Slow Fade Produktinformation.
- [162] P. S. Maruthi Sai, S. Siebzehrübl, S. Mahajan, H. Scheer; *Photochem. Photobiol.* **57** (1993) 71.
- [163] G. Jung, J. Wiehler, B. Steipe, C. Bräuchle, A. Zumbusch; *Chem. Phys. Chem.* **2** (2001) 392.
- [164] M. F. Garcia-Parajo, M. J. Segers-Nolten, J.-A. Veerman, J. Greve, N. F. Hulst; *Proc. Natl. Soc. USA* **97** (2000) 7237.

Veröffentlichungen

1. P. Zehetmayer, Th. Hellerer, A. Parbel, H. Scheer, A. Zumbusch;
Spectroscopy of single phycoerythrocyanin monomers: Dark state identification and observation of energy transfer heterogeneities,
Biophys. J. 83 (2002) 407.
2. P. Zehetmayer, M. Kupka, H. Scheer, A. Zumbusch;
Energy transfer in monomeric Phycoerythrocyanin (PEC),
Biophys. Biochem. Acta, eingereicht.

Tagungsbeiträge

1. DPG-Tagung, März 1999, Münster
Poster: Konfokale Mikroskopie und Spektroskopie einzelner Moleküle zwischen 1,4 K und Raumtemperatur,
S. Mais, P. Zehetmayer, C. Bräuchle.
2. Tagung der VW-Stiftung: New Trends in Physics, Chemistry and Biology with Single Molecules, Juli 1999, Wiesbaden
Poster: Confocal Microscopy and Spectroscopy of Single Molecules between 1.4 K and Room Temperature,
P. Zehetmayer, S. Mais, A. Zumbusch, C. Bräuchle.
3. DPG-Tagung, März 2000, Potsdam
Poster: Konfokale Einzelmolekülmikroskopie und -spektroskopie von Phycoerythrocyanin bei 1,4 K bis Raumtemperatur,
P. Zehetmayer, S. Mais, A. Zumbusch, C. Bräuchle.
4. World Congress of Cellular and Molecular Biology, Oktober 2000, Jena
Vortrag: Single Molecule Spectroscopy of the Phycoerythrocyanin (PEC),
P. Zehetmayer, A. Parbel, H. Scheer, C. Bräuchle, A. Zumbusch.
5. ACS National Meeting and Exposition, April 2001, San Diego, USA
Vortrag: Energy transfer studies of single phycoerythrocyanin molecules,
P. Zehetmayer, H. Scheer, C. Bräuchle, A. Zumbusch.
6. DPG-Tagung, März 2002, Regensburg
Poster: Spektrale und polarisationsabhängige Einzelmoleküluntersuchungen am Phycoerythrocyanin,
P. Zehetmayer, Th. Hellerer, A. Parbel, H. Scheer, A. Zumbusch.

Danksagungen

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. Christoph Bräuchle für die interessante Themenstellung, die hervorragende Ausstattung, sowie die Möglichkeit das vorliegende Thema in großer Freiheit bearbeiten zu können.
- Dr. Andreas Zumbusch für die ausgezeichnete Betreuung, die wissenschaftliche und private Unterstützung, sowie für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit.
- meinen Kooperationspartnern aus der Biologie Prof. Dr. Hugo Scheer, Michaela Kupka und Axel Parbel für die Probenpräparation und stete Diskussionsbereitschaft.
- Thomas Hellerer für alles.
- Dr. Gregor Jung für seine Anregungen und die gemeinsamen Pausen im Freien.
- Dr. Moritz Ehrl, der einem die Welt aus einer ganz anderen Perspektive näher bringt.
- Christina Cecco, die mich ertragen durfte ;-).
- Dr. Christian Seebacher, Christian Hellriegel, Andrew Hards und Erwin Kneuper für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.
- meinen F-Praktikanten Till Schwarz, Christoph Kressierer und Julia Schwartz.
- der Elektronikwerkstatt und der Feinmechanischen Werkstatt für die reibungslose Zusammenarbeit.
- den unzählig vielen anderen Kollegen.
- und in besonderem Maße meiner Familie, die dies hier alles erst ermöglicht hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Peter Zehetmayer
Geburtsdatum: 13.10.1973
Geburtsort: Erding
Anschrift: Waldwiesenstr. 51, 81375 München
Familienstand: ledig

Schulbildung

9/1980 - 7/1984 Grundsschule an der Fürstenrieder Straße in München
9/1984 - 5/1988 Gymnasium Penzberg
5/1988 - 8/1993 Erasmus-Grasser-Gymnasium in München
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium

11/1993 - 3/1999 Studium der Chemie (LMU München)
Abschluß: Diplom
seit 3/1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter am LS Prof. Bräuchle,
Institut für Physikalische Chemie der LMU München,
Bearbeitung des vorliegenden Themas