

**Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie und
-Spektroskopie von Sauerstofftransportproteinen:
Experimente zur Sauerstoffbindung und an
einzelnen Proteinen**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg–Universität in Mainz

Markus Lippitz
geb. in Kösching

Mainz, 2002

1. Gutachter:
2. Gutachter:
3. Gutachter:

Datum der mündlichen Prüfung: 22. August 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische und experimentelle Grundlagen	6
2.1	Intrinsische Protein-Fluoreszenz	6
2.1.1	Überblick	6
2.1.2	Tryptophan	8
2.1.3	Hämocyanin	8
2.2	Molekulare Kooperativität	12
2.2.1	Methoden zur Beschreibung von molekularer Kooperativität . . .	13
2.2.2	Modelle der kooperativen Bindung	16
2.2.3	Verteilung der Beladung	21
2.3	Mikroskopie und Spektroskopie einzelner Moleküle	22
2.3.1	Methoden	24
2.3.2	Auflösungsvermögen	27
2.3.3	Detektionseffizienz	30
2.3.4	Photodynamik	33
2.3.5	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	36
2.4	Nichtlineare Optik	41
2.4.1	Einführung	41
2.4.2	Erzeugung neuer Frequenzen	43
2.4.3	Erzeugung kurzer Pulse	49
2.4.4	Zwei-Photonen-Absorption	53
3	Experimenteller Aufbau	59
3.1	Lasersystem	59
3.1.1	Pumplaser	60
3.1.2	Titan-Saphir-Laser	60
3.1.3	Optisch-parametrischer Oszillator	62
3.2	Mikroskop	63
3.2.1	Anregungsstrahlengang	65
3.2.2	Objektiv und Probenhalterung	67
3.2.3	Detektionsstrahlengang	69
3.3	Erweiterung für Sauerstoffbindungskurven	73
3.4	Experimentsteuerung und Datenerfassung	74
3.5	Charakterisierung und Funktionstest	80
3.5.1	Pulsverbreiterung	80

3.5.2	Detektion einzelner Moleküle: Rhodamin 6G	82
3.6	Proben und Probenpräparation	83
4	Ensemblemessungen	87
4.1	Spektraler Vergleich	87
4.1.1	Emissionsspektren	87
4.1.2	Anregungsspektren	91
4.2	Fluoreszenzlöschung	94
4.2.1	Löschung mit Iodid	94
4.2.2	Löschung durch Sauerstoffbindung	95
4.3	Intensitätsabhängigkeit und Photostabilität	97
4.3.1	Messungen	97
4.3.2	Ergebnisse	99
4.3.3	Mögliche Ursachen	103
4.3.4	Messungen an oxygeniertem Hämocyanin	107
4.4	Drei-Photonen-Anregung	109
4.5	Zusammenfassung	113
5	Sauerstoffbindung bei Hämocyanin	114
5.1	Bindungskurven von Hc-Dissoziat	114
5.1.1	Messungen	114
5.1.2	Modell zur Beschreibung der Sauerstoffbindungskurven	115
5.1.3	Anpassung an die Daten	118
5.1.4	Vergleich mit CO-Dissoziation aus Myoglobin	123
5.1.5	Diskussion und Zusammenfassung	125
5.2	Bindungskurven von 24-merem Hämocyanin	126
5.2.1	Messungen	126
5.2.2	Modell	126
5.2.3	Anpassung an die Daten	130
5.2.4	Diskussion und Zusammenfassung	132
6	Einzelmolekülspektroskopie	135
6.1	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie an Hämocyanin	136
6.1.1	Messungen mit Zwei-Photonen-Anregung	136
6.1.2	Vergleich mit Ein-Photonen-Anregung	140
6.1.3	Berechnung des Diffusionskoeffizienten	140
6.1.4	Intensitätsabhängige Messungen	142
6.1.5	Diskussion und Zusammenfassung	143
6.2	Abbildung von Avidin-markierten Latexkugeln	144
6.2.1	Messungen	144
6.2.2	Einfluß von Photobleichen auf die Spot-Form	146
6.2.3	Diskussion und Zusammenfassung	148
6.3	Diskussion weiterer Methoden	148
6.3.1	Analyse des Zählratenhistogramms	148

6.3.2	Fluoreszenz nahe einer Grenzfläche	153
7	Zusammenfassung	157
A	Anhang	161
A.1	IDL Prozeduren zur Monte Carlo Simulation der Diffusion	161
A.2	Sellmeier-Koeffizienten und Tuning-Kurve des KTA-OPOs	163
A.3	IDL Prozeduren zum Fitten der Bindungskurven	163
A.3.1	Dissoziat	163
A.3.2	24-meres Hämocyanin	165
A.4	Alternatives Modells zur Sauerstoffbindung von dissoziiertem Hämocyanin	167
	Literaturverzeichnis	170

1 Einleitung

Die Modellbildung in Physik und Chemie wird seit Ende des 19. Jahrhunderts durch die Vorstellung von Atomen und Molekülen bestimmt. Die entsprechenden Experimente lieferten immer deutlichere Hinweise auf die atomare, diskontinuierliche Struktur der Materie. Dies schlug sich in den Modellvorstellungen nieder, die von der kinetischen Gastheorie bis zur Quantenmechanik reichen. Lange Zeit waren individuelle Atome und Moleküle einer direkten Beobachtung allerdings nicht zugänglich. Einen ersten Schritt in diese Richtung stellte die hochauflösende Elektronenmikroskopie dar [1], doch erst die Entwicklung des Raster-Tunnel-Mikroskops durch G. Binnig und H. Rohrer [2] gab den Anstoß zu immer neuen mikroskopischen Techniken wie der Nahfeldmikroskopie [3, 4] und der Rasterkraftmikroskopie [5], mit denen es schließlich möglich wurde, einzelne Moleküle und Atome abzubilden und zu untersuchen.

Optische Spektroskopie besitzt eine lange Tradition in der Untersuchung von Atomen und Molekülen. Die Erfolge der Rastersondentechniken bis hin zu atomaren Dimensionen bei abbildenden Techniken vorzustoßen, ließen es möglich erscheinen, auch einzelne Atome und Moleküle mit optischen Methoden zu untersuchen. Bereits 1980 wurde ein einzelnes Ba^+ -Ion in einer Paul-Falle über seine Fluoreszenz nachgewiesen [6, 7]. Ende der 80er Jahre wurde dies dann auch nahezu zeitgleich von verschiedenen Gruppen mit einzelnen Molekülen erreicht. Ein einzelnes Pentacen-Molekül konnte in der festen p-Terphenyl-Matrix bei der Temperatur von flüssigem Helium von W. E. Moerner und L. Kador durch seine Absorption detektiert werden [8]. Kurze Zeit später gelang es M. Orrit und J. Bernard am gleichen Probensystem, die Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls nachzuweisen [9]. Dieser Ansatz ist experimentell einfacher zu realisieren, da die Fluoreszenz durch die Stokes-Verschiebung leichter von gestreutem Anregungslicht getrennt werden kann. Beide Gruppen nutzten die sehr scharfen elektronischen Übergänge der Chromophore bei tiefen Temperaturen aus. Dadurch können einzelne Moleküle anhand ihrer Übergangsfrequenz spektral selektiert werden. Bei Raumtemperatur ist dies wegen der dann sehr breiten elektronischen Übergänge nicht möglich, so daß einzelne Moleküle durch starke Verdünnung räumlich separiert werden müssen. Es war die Gruppe um R. A. Keller, die die Nachweisgrenze immer weiter senkte, bis ihr 1990 die Detektion eines einzelnen Farbstoffmoleküls in wäßriger Lösung gelang [10]. Schon zuvor wurde die Fluoreszenz des Proteins Phycoerythrin, das mehrere Chromophore beinhaltet, mit einem ähnlichen Aufbau detektiert [11, 12]. Auf einer Oberfläche immobilisierte Moleküle wurden 1993 mit Hilfe der Nahfeldmikroskopie [13] und 1995 im Fernfeld [14, 15] abgebildet. Einen Überblick über dieses in den letzten 12 Jahren stetig gewachsene Forschungsgebiet geben zahlreiche Übersichtsartikel und Bücher [16, 17, 18, 19, 20].

Einzelmolekülspektroskopie liefert Ergebnisse, die ohne die Mittelung über ein Ensem-

ble zustände kommen. Dadurch ist zum einem die Verteilung eines Parameters zugänglich, zum anderen können auch zeitliche Variationen eines Parameters verfolgt werden. Diese würden bei einer Mittelung über ein Ensemble verschwinden. Viele interessante Experimente wurden auf dieser Grundlage durchgeführt: Bei tiefen Temperaturen konnten die quantenmechanischen Eigenschaften eines einzelnen Fluorophores untersucht werden: Direkt nach der Emission befindet er sich im Grundzustand, was zum *photon antibunching* führt [21]. Aus dem Triplett-Zustand kann er nicht emittieren, wodurch die spontanen Quantensprünge [22] in und aus dem Triplett-Zustand beobachtet werden können (*photon bunching*) [23]. Wenn intensive elektromagnetische Wellen eingestrahlt werden, so modifizieren diese die Eigenschaften des Moleküls, was dann z.B. zum ac-Stark-Effekt führt [24]. Andererseits reagiert ein Molekül auch empfindlich auf Variationen seiner lokalen Umgebung, so daß es als mikroskopische Sonde im Wirtskristall eingesetzt werden kann [25, 26, 27]. Bei Raumtemperatur-Experimenten wurde ebenso die Möglichkeit ausgenutzt, ohne Ensemblemittelung messen zu können, um neue Einsichten in komplexe Systeme zu erhalten. So konnte bei kolloidalen CdSe-Nanokristallen durch temperaturvariable Experimente ein Modell zur Natur des Dunkelzustandes dieser Partikel aufgestellt werden [28]. Die Gruppe um P. Barbara analysierte die von Polymeren eingenommenen Konformationen [29]. Die Arbeit von T. Ha *et al.* [30] ist ein Beispiel dafür, wie Aktivität und Konformationsänderung individueller Enzyme verfolgt werden können. Diese Komplexität biologischer Systeme ist es, die in den letzten Jahren zunehmend das Interesse verschiedener Gruppen geweckt hat, die nun versuchen, auch hier mit den Methoden der Einzelmolekülspektroskopie neue Erkenntnisse zu gewinnen. Es wurden Konformationsübergänge [31, 32], die Kinetik von Enzymen [33], der lokale pH in Zellen [34] sowie Diffusion in Membranen [35] und Zellen [36] untersucht. Die lichtinduzierte Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften natürlicher Fluorophore [37], die Photodynamik von Lichtsammelkomplexen [38], die Aktivität der Motorproteine Myosin [14] und Kinesin [39] sowie die Kolo-kalisation von Liganden an Rezeptoren [40] konnten beobachtet werden.

Die meisten der genannten Experimente an biologischen Systemen benutzen synthetische Farbstoffe, die spezifisch an die interessierenden Biomoleküle gebunden werden. Die Bindung ist häufig schwierig zu kontrollieren und bedarf immer eines anschließenden Reinigungsschrittes. Der Einbau des Farbstoffes bedeutet in den meisten Fällen eine Modifikation des zu untersuchenden Systems [41]. Alternativ kann die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen ausgenutzt werden. Unter intrinsischer Fluoreszenz versteht man die Fluoreszenz, die ein Protein ohne weitere Modifikationen emittieren kann. Verschiedene Proteine besitzen für sie spezifische Chromophore. Beispiele sind die Pigmente des Photosyntheseapparates [42] und das *green fluorescent protein* (GFP) [43]. Während bei ersteren die Chromophore aus ausgedehnten π -Elektronensystemen bestehen, die nicht aus Aminosäuren aufgebaut sind, wird der Chromophor des GFP durch einen Teil der Aminosäuresequenz gebildet. Eine Vielzahl von Experimenten nutzen die Fluoreszenz der Lichtsammelkomplexe oder ihrer Komponenten (z.B. Ref. [12, 11, 38, 44]) sowie des GFP (z.B. Ref. [36, 34, 37, 45]).

Eine weitere Quelle von intrinsischer Fluoreszenz sind die aromatischen Reste der drei Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin [46]. Diese sind im Gegensatz zu

den proteinspezifischen Chromophoren in den allermeisten Proteinen vorhanden. Den größten Absorptionskoeffizienten dieser drei Aminosäuren hat Tryptophan bei 280 nm mit $\epsilon \approx 5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [46]. Die Tryptophanfluoreszenz wird auf Ensemble-Ebene häufig zur Untersuchung von Proteinen verwendet [46, 47, 48], da sie empfindlich von der Polarität der Umgebung abhängt. Daher kann diese Aminosäure als lokale Sonde im Protein eingesetzt werden. Variationen in der Umgebung, z.B. durch Konformationswechsel [49] oder Proteinfaltung [50], können dann zu einer veränderten Emission führen. Als Fluorophore für Einzelmolekülexperimente wurden diese Aminosäuren mit aromatischem Rest bisher allerdings noch nicht eingesetzt. Als Gründe dafür werden die Schwierigkeiten bei der Anregung im Ultravioletten, die geringe Photostabilität und Quanteneffizienz aufgeführt.

Das Ziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob Tryptophan als Fluorophor für Einzelmolekülexperimente geeignet ist. Dies würde es ermöglichen, einzelne Proteine ohne einen verändernden Eingriff in das biochemische System, wie er beispielsweise bei einer Farbstoffmarkierung erfolgen muß, zu detektieren. Gleichzeitig könnte auch im Einzelmolekülexperiment Tryptophan als Sonde seiner lokalen Umgebung dienen und ohne Ensemblemittelung individuelle Variationen zwischen einzelnen Proteinen erkennbar machen. Wegen des niedrigen Absorptionskoeffizienten und der geringen Quanteneffizienz (1–30 %) [46] erscheint es allerdings nicht aussichtsreich, die Emission eines einzelnen Tryptophanmoleküls zu detektieren. Es werden daher keine Einzelmolekülexperimente in dem Sinne möglich sein, daß nur ein Fluorophor beobachtet wird, sondern es wird im Idealfall ein einzelnes Makromolekül mit relativ vielen Fluorophoren, d.h. ein Protein mit vielen Tryptophanseitenketten untersucht werden. Besonders interessant erscheint hierbei das Sauerstofftransportprotein der Vogelspinne *Eurypelma californicum*.

Dieses Protein gehört zur Klasse der Hämocyanine, die als große, multimere Sauerstofftransportproteine der Weichtiere (Mollusken) und Gliederfüßer (Arthropoden) dienen [51, 52, 53]. Es ist vergleichbar mit dem Hämoglobin des Menschen, jedoch wird hier das Sauerstoffmolekül nicht an ein Eisenatom sondern zwischen zwei Kupferatome gebunden. Die molekulare Kooperativität macht dieses Protein zusätzlich interessant: Die Affinität der einzelnen Sauerstoff-Bindungsstellen des Proteins hängt vom Beladungsgrad des Gesamtmoleküls ab. Dieses Phänomen der Informationsübertragung innerhalb eines Makromoleküls wird seit langer Zeit intensiv untersucht [54, 55, 56, 57] und ist noch nicht vollständig geklärt. Gerade die Hämocyanine eignen sich gut zur Untersuchung der Kooperativität, weil sich hier die Sauerstoffbeladung in der Fluoreszenz der 148 Tryptophane widerspiegelt und bereits eingehend untersucht ist [58, 59, 60, 61]. Im Institut für molekulare Biophysik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz werden Hämocyanine seit mehreren Jahren intensiv untersucht. Die vorliegende Dissertation ist im Rahmen einer Kooperation mit Prof. H. Decker und W. Erker (Institut für molekulare Biophysik) entstanden. Die proteinbiochemischen Arbeiten fanden dort statt, während die spektroskopischen Untersuchungen zum größten Teil im Institut für physikalische Chemie durchgeführt wurden.

Aus den vorstehenden Gründen scheint das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* ein idealer Kandidat zur Spektroskopie einzelner Proteine auf Basis ihrer Tryptophanfluoreszenz zu sein. Mit Einzelmolekülexperimenten könnte nicht nur

das Protein detektiert, sondern auch die molekulare Kooperativität untersucht werden. Da Einzelmolekülspektroskopie nicht den Mittelwert, sondern die Verteilung z.B. der Fluoreszenzintensität und damit der Sauerstoffbeladung des Proteins liefert, wäre zu erwarten, daß mit dieser Methode auch neue Erkenntnisse über den Mechanismus der molekularen Kooperativität gewonnen werden können.

Die Schwierigkeiten der Anregung im Ultravioletten (hohe Untergrundfluoreszenz, Einschränkungen in der Wahl der optischen Komponenten) soll durch die nichtlineare Zwei-Photonen-Anregung umgangen werden. Dabei liefern zwei Photonen gemeinsam die Übergangsenergie eines elektronischen Übergangs. Die Eigenschaften dieses Prozesses wurden 1931 von Maria Göppert-Mayer berechnet [62] und 1990 von W. Denk *et al.* für die Mikroskopie genutzt [63]. Mit dieser Technik ist es möglich, mit einem sichtbaren, gepulsten Laserstrahl die Tryptophane anzuregen, ohne die breite, unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu erhalten, die konventionelle Ein-Photonen-Anregung im Ultravioletten bewirken würde. Nach den ersten Arbeiten zur Einzelmoleküldetektion von Fluorophoren in Lösung [64] oder auf Glas [65] wird diese Methode nun von vielen Gruppen eingesetzt, wobei jedoch in der Mehrzahl der Fälle Übergänge im Sichtbaren mit infraroten Pulsen anregt werden. Verglichen mit einem synthetischen Farbstoff [66] besitzt Tryptophan einen geringen Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt [67], so daß bei Zwei-Photonen-Anregung nicht auf eine große Anzahl Tryptophan-Seitenketten pro Molekül verzichtet werden kann.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich folgende Gliederung der hier vorgestellten Arbeit: In Kapitel 2 werden die theoretischen und experimentellen Grundlagen dargestellt. Es wird ein Überblick über die Eigenschaften des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* gegeben. Darauf folgt eine Einführung in die Theorien zur molekularen Kooperativität, in der auch gezeigt wird, welche Vorteile die Einzelmoleküldetektion hier bietet. Dies motiviert die darauf folgende Darstellung der Grundlagen der Mikroskopie einzelner Moleküle. Verschiedene mikroskopische Techniken werden vorgestellt und verglichen, um so die Entscheidung für die Zwei-Photonen-Mikroskopie zu begründen. Weiterhin werden die notwendigen Methoden zur Analyse der experimentellen Ergebnisse eingeführt. Das Kapitel schließt mit einer Darstellung der nichtlinearen Optik und der theoretischen Grundlagen der Zwei-Photonen-Anregung.

Im Kapitel 3 wird der Aufbau des Experiments vorgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein kommerzielles Lasersystem in Betrieb genommen, das Pulse von 100 fs Länge im gesamten sichtbaren Spektralbereich liefern kann. Für die speziellen Erfordernisse der Zwei-Photonen-Mikroskopie von einzelnen Hämocyaninen wird ein Mikroskop entwickelt und aufgebaut, dessen optische und elektronische Komponenten beschrieben werden. In diesem Kapitel werden auch die im folgenden verwendeten Proben und ihre Präparation vorgestellt.

Kapitel 4 befaßt sich mit Ensemble-Messungen der Fluoreszenz von Tryptophan in Proteinen und in Wasser gelöst. Da Tryptophan als lokale Sonde im Protein verwendet werden soll, muß sichergestellt werden, daß die Folgerungen, die aus der Fluoreszenz nach konventioneller Ein-Photonen-Anregung gezogen werden können, auch bei Zwei-Photonen-Anregung möglich sind. In diesem Kapitel werden darum sorgfältig verschiedene Aspekte der Tryptophanfluoreszenz nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung

verglichen. Diese umfassen die Spektren, den Einfluß von Fluoreszenzlöschern sowie die Intensitätsabhängigkeit der Fluoreszenz. Letztere wird es erlauben, die Photostabilität von Tryptophan in verschiedenen Umgebungen zu quantifizieren. In einem Exkurs wird hier die Drei-Photonen-Anregung mit in den Vergleich einbezogen.

Das folgende Kapitel 5 „Sauerstoffbindung bei Hämocyanin“ beschäftigt sich ebenfalls mit Ensemblemessungen. Es hat sich herausgestellt, daß die zur Zwei-Photonen-Anregung erforderliche hohe Lichtintensität durch lineare Absorption im Sauerstoffbindungszentrum in das Bindungsgleichgewicht eingreift. Daher wird es möglich, dieses Gleichgewicht von außen zu modifizieren und die Reaktion des Proteins darauf zu untersuchen. Bereits auf Ensemble-Ebene lassen sich so neue Einblicke in das Bindungsverhalten der Hämocyanine gewinnen. Geeignete Modelle werden in diesem Kapitel eingeführt und mit den Ergebnissen der Experimente verglichen.

Im sechsten Kapitel schließlich werden Untersuchungen an einzelnen Molekülen vorgestellt. Die geringe Photostabilität des Tryptophans schränkt die Art der möglichen Experimente stark ein. Es wird gezeigt, daß die Diffusion einzelner Hämocyanine aufgrund ihrer Tryptophanfluoreszenz nachgewiesen werden kann. Wenn die Photostabilität der Tryptophane ausreicht, können auch einzelne Proteine abgebildet werden. Dieses Resultat wird anhand eines künstlichen Modellsystems demonstriert. In einem Ausblick werden Methoden zur Verbesserung der Photostabilität bzw. zur Auswertung der Daten bei geringer Photostabilität vorgestellt und diskutiert. Die Arbeit schließt mit einer Zusammenfassung der Resultate.

2 Theoretische und experimentelle Grundlagen

Dieses Kapitel soll die theoretischen und experimentellen Grundlagen der vorliegenden Arbeit darstellen, die dann zur Auswertung der experimentellen Ergebnisse herangezogen werden. Den Ausgangspunkt bildet im ersten Teil dieses Kapitels die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen. Sowohl einzelne Aminosäuren als auch proteinspezifische Fluorophore können optisch angeregt werden. Damit ist es einerseits möglich, diese Proteine ohne Modifikation zu detektieren, andererseits beinhaltet die Proteinfluoreszenz Informationen über die lokale Umgebung des Fluorophors. Ein besonders interessantes Beispiel dazu ist die Sauerstoffbeladung der Sauerstofftransportproteine der Spinnen, die sich aus einem intrinsischen Fluoreszenzsignal ablesen läßt. Die Sauerstoffbeladung wird durch kooperative Wechselwirkung der Bindungsstellen bestimmt. Der zweite Teil dieses Kapitels gibt darum eine Einführung in die Theorie der molekularen Kooperativität. Im dann folgenden Abschnitt sollen die Voraussetzungen und Methoden der Einzelmolekülspektroskopie dargestellt werden, die es erlauben, einzelne Proteine durch ihre intrinsische Fluoreszenz zu detektieren. Das Kapitel schließt mit den Grundlagen der nichtlinearen Optik, da sich herausstellen wird, daß die nichtlineare Zwei-Photonen-Anregung eine geeignete Methode zur spektroskopischen Untersuchung der intrinsischen Fluoreszenz einzelner Proteine ist.

2.1 Intrinsische Protein-Fluoreszenz

2.1.1 Überblick

Unter intrinsischer Fluoreszenz von Proteinen wird die Fluoreszenz verstanden, die Proteine ohne weitere Modifikationen emittieren können. Intrinsische Fluoreszenz stammt zum einen von den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, die in nahezu jedem Protein vorhanden sind, zum anderen von nur in manchen Proteinen vorkommende, für diese Proteine spezifische Fluorophoren [46,41]. Beispiele für diese zweite Gruppe sind die Pigmente der Lichtsammelkomplexe und das *green fluorescent protein* (GFP).

In den Lichtsammelkomplexen (*light harvesting complexes*, LHC) des Photosyntheseapparats sind es die Pigmente, welche die Photonen absorbieren und die Energie weiterleiten [42]. Diese Pigmente besitzen mehrere Chromophore mit einem ausgedehnten π -Elektronen-System, die nicht aus Aminosäuren aufgebaut sind. Neben den Chlorophyllen gibt es weitere Pigmente, um das Sonnenspektrum möglichst vollständig abzudecken.

Insbesondere das Phycoerythrin zeichnet sich dadurch aus, daß es in Lösung, also außerhalb seiner natürlichen Umgebung, mit einer Wahrscheinlichkeit von nahezu Eins ein absorbiertes Photon auch wieder emittiert. Phycoerythrin stellt daher ein gut geeignetes System von Fluorophoren dar, und bereits 1989 konnten einzelne Moleküle dieses Proteins auf Grund ihrer starken Fluoreszenz nachgewiesen werden [12]. Die Spektroskopie einzelner Lichtsammelkomplexe gelang 1997 bei Raumtemperatur [38] und ein Jahr später bei tiefen Temperaturen [44].

Die Klasse der *green fluorescent proteins* (GFP) stellt insofern eine Ausnahme dar, da hier der Chromophor durch drei Aminosäuren gebildet wird. Die Abfolge der Aminosäuren Serin–Tyrosin–Glycin in diesem Protein führt bei Zyklisierung und Oxidierung zu einer Absorptionsbande im blauen und einer Emissionsbande im grünen Spektralbereich [41]. Variation der lokalen Umgebung durch Mutation der Aminosäuresequenz führt zu veränderten Spektren. Da der Farbstoff alleine aus Aminosäuren gebildet wird, kann ihn eine Zelle nach Manipulation des genetischen Codes in beliebige Proteine einbauen. Damit ist es möglich, Proteine gezielt zu markieren, ohne zellfremde Moleküle einbringen zu müssen. Aus diesem Grund hat die Markierung mit GFP eine weite Verbreitung gefunden (siehe z.B. Ref. [68]). Auch einzelne GFP konnten spektroskopiert werden [36, 34, 37, 45].

Neben diesen proteinspezifischen Fluorophoren absorbieren und emittieren aber auch einige Aminosäuren selbst Photonen im nahen Ultraviolett. Dies sind die Aminosäuren, die einen aromatischen Rest besitzen: Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe). Dadurch ist es möglich, nahezu jedes Protein zur Fluoreszenz im nahen Ultravioletten anzuregen. Abbildung 2.1 zeigt die molekulare Struktur dieser drei Aminosäuren und deren Absorptionsspektren auf einer logarithmischen Skala. Je nach An-

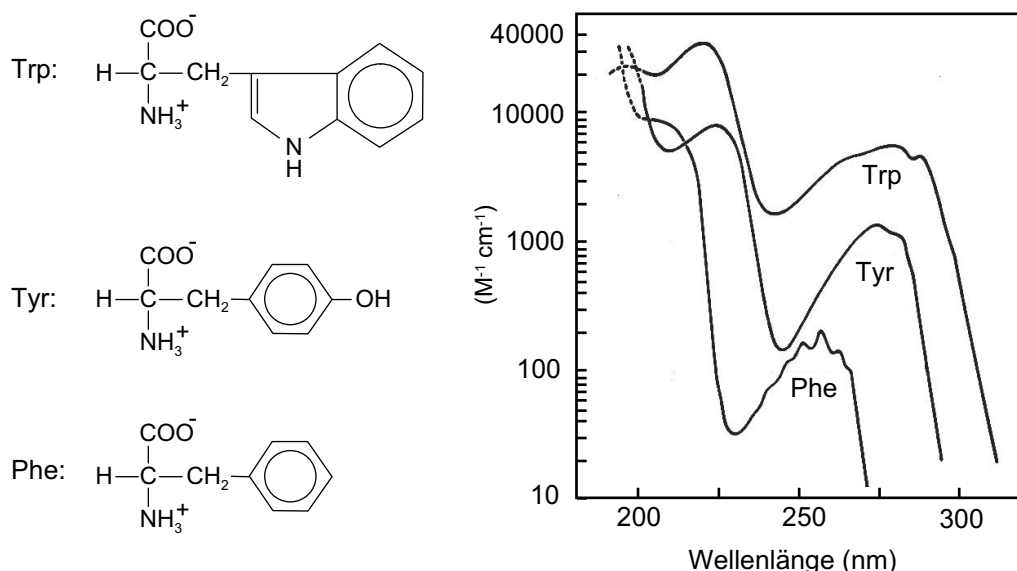


Abbildung 2.1: Aminosäuren mit aromatischem Rest und deren Absorptionsspektren auf einer logarithmischen Skala [46].

regungswellenlänge tragen die drei Aminosäuren unterschiedlich zur Proteinfluoreszenz bei. Oberhalb von etwa 295 nm wird fast nur noch Tryptophan angeregt. Bei niedrigeren Wellenlängen trägt Tyrosin wegen seiner größeren Häufigkeit (durchschnittliche Häufigkeit in Proteinen: Trp 1.1 %, Tyr 3.5 %, Phe 3.5 % [69]) ebenfalls deutlich zur Fluoreszenz bei. Die Tryptophanfluoreszenz ist stark umgebungsabhängig, so daß Tryptophan als lokale Sonde geeignet ist.

2.1.2 Tryptophan

Tryptophanfluoreszenz ist ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Proteinen. Sie wird in einer Reihe von Übersichtsartikeln und Büchern behandelt [46, 48, 47]. Die Absorptionsbande bei 280 nm besteht aus zwei nahe beieinander liegenden Übergängen des Indols, die entsprechend der Notation von Platt [70] mit 1L_a und 1L_b bezeichnet werden [71]. Die Lage der Emissionsbande hängt deutlich von der Polarität der Umgebung des Moleküls ab. Ebenso variieren die Fluoreszenz- [47] und die Phosphoreszenzlebenszeit [72] stark mit der Umgebung. Daher kann diese Aminosäure als lokale Sonde im Protein eingesetzt werden. Variationen in der Umgebung, z.B. durch Konformationswechsel [49], Proteinfaltung [50] oder Bindung eines Liganden [73], führen dann zu einer veränderten Emission. Ebenso läßt sich die Tryptophanfluoreszenz durch verschiedene Stoffe löschen und so die Zugänglichkeit dieser Tryptophanseitenkette in der Proteinstruktur für die Löscher untersuchen [74].

Der geringe Absorptionskoeffizient $\epsilon_{\max} \approx 5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ zusammen mit der Quantenausbeute von maximal 30 % [46] lassen es allerdings im gegenwärtigen Stand der Technik aussichtslos erscheinen, einzelne Tryptophane zu detektieren. Es muß also ausgenutzt werden, daß sich in einem Protein viele Tryptophan-Seitenketten befinden können. Ein ideales Protein zur Einzelmolekülspektroskopie auf Basis der Tryptophanfluoreszenz sollte daher einerseits relativ groß sein und andererseits sollte die Tryptophanfluoreszenz Informationen über das Protein in der oben geschilderten Weise beinhalten.

2.1.3 Hämocyanin

Ein besonders geeigneter Kandidat zur Spektroskopie einzelner Proteine mit Hilfe ihrer Tryptophanfluoreszenz findet sich im Hämocyanin (Hc) der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Einen Überblick über diese Klasse der Proteine geben van Holde und Miller [51]. Dieses Protein ist sehr groß und besitzt 148 Tryptophan-Seitenketten, wodurch sich der geringe Absorptionskoeffizient des Tryptophans kompensieren lassen sollte. Der relative Anteil der Tryptophane an den Aminosäuren dieses Proteins liegt mit etwa 1.0 % [61] aber sogar etwas unterhalb des Durchschnittes aller Proteine (1.1 % [69]). Auf der anderen Seite zeigt es als Sauerstofftransportprotein molekulare Kooperativität. Es bindet Sauerstoff an insgesamt 24 Bindungsstellen und die Affinität der Bindungsstellen zu Sauerstoff steigt mit der Anzahl der bereits beladenen Bindungsstellen, was als (positive) Kooperativität bezeichnet wird. Dieses Phänomen der Informationsübertragung innerhalb eines Makromoleküls wird seit langer Zeit intensiv untersucht. Gerade die Hämocyanine eignen sich gut zur Untersuchung der Kooperativität, weil sich hier die

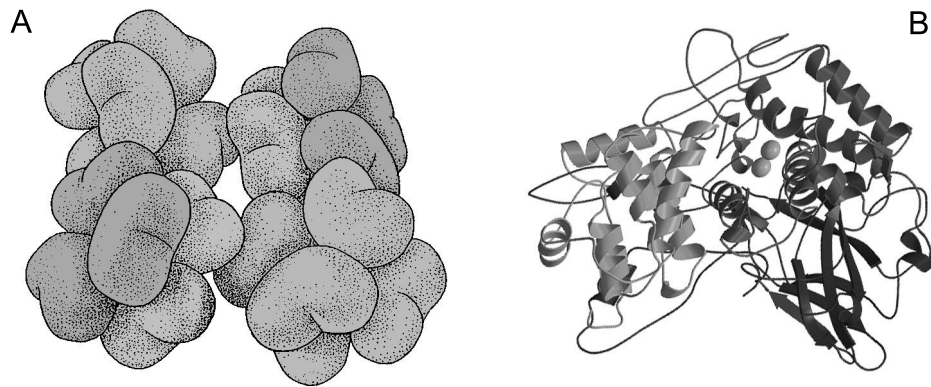


Abbildung 2.2: Das Hämocyanin der Spinne *Eurypelma californicum*. A: Quartärstruktur bestehend aus 4 Hexameren. Gesamtgröße $20 \times 20 \times 10 \text{ nm}^3$ (nach Ref. [75]). B: Sekundärstruktur einer Untereinheit (ca. 7 nm). Ein Sauerstoffmolekül wird zwischen zwei Kupferatomen gebunden, die als Kugeln dargestellt sind.

Sauerstoffbeladung in der Tryptophanfluoreszenz widerspiegelt. In diesem Abschnitt sollen die Eigenschaften des Proteins dargestellt werden, wohingegen Kapitel 2.2 eine Einführung in das Gebiet der molekularen Kooperativität gibt.

Hämocyanine (Hc) sind die Sauerstofftransportproteine der Weichtiere (Mollusken) und Gliederfüßer (Arthropoden). Sie sind vergleichbar mit dem Hämoglobin des Menschen, nur daß hier das Sauerstoffmolekül statt an ein Eisenatom zwischen zwei Kupferatomen gebunden wird. Insbesondere das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* gehört zu den am besten untersuchten Transportproteinen [51]. Hämocyanine liegen frei gelöst in der Hämolymphe vor, d.h. sie sind nicht wie das Hämoglobin in Blutzellen eingelagert. Um die Teilchenzahlkonzentration niedrig zu halten, sind es darum relativ große Proteine mit bis zu 160 Bindungsstellen für Sauerstoff. Die Quartärstruktur von Arthropoden-Hämocyanin ist aus Hexameren aufgebaut. Das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* besteht aus 4 Hexameren (Abb. 2.2A), hat eine Größe von etwa $20 \times 20 \times 10 \text{ nm}^3$ und eine Masse von 1720 kg/mol. Es werden insgesamt 7 verschiedene Untereinheiten (a-g) gefunden, von denen 5 (a, d-f) in jedem Hexamer vorkommen. Die sechste Untereinheit des Hexamers ist dann entweder Untereinheit b oder c, wobei über diese die Hexamere untereinander verbunden sind [76]. Die Untereinheiten unterscheiden sich geringfügig in der Sequenz der Aminosäuren, zeigen jedoch ein fast identisches Sauerstoffbindungsverhalten [77]. Jede Untereinheit besitzt ein Bindungszentrum, in dem ein Sauerstoffmolekül zwischen zwei Kupferatomen gebunden werden kann (Abb. 2.2B), so daß insgesamt 24 Moleküle Sauerstoff transportiert werden können. Die vollständige Sequenz dieses Proteins ist bekannt [61]. Die Kristallstruktur vergleichbarer Hämocyanine des Pfeilschwanz-Krebsses *Limulus polyphemus* zeigt je nach Sauerstoffbeladung zwei verschiedene Konformationen, die im folgenden als R- und T-Zustand bezeichnet werden [78].

Einen Überblick über den molekularen Mechanismus der Sauerstoffbindung geben Metz *et al.* [79]. Die Bindung des Sauerstoffmoleküls erfolgt zwischen zwei Kupferatomen,

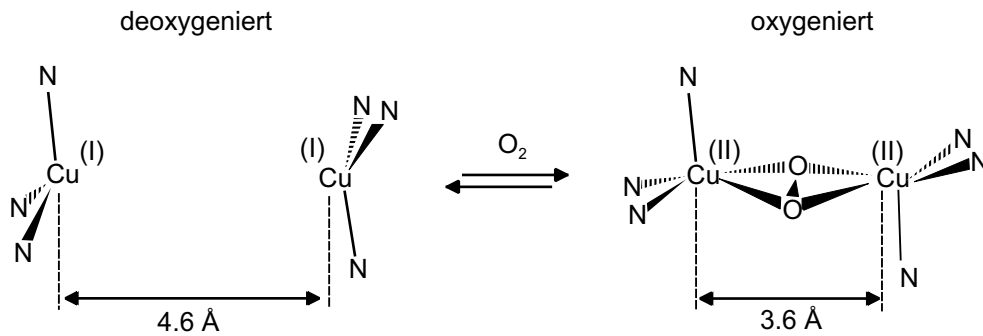


Abbildung 2.3: Bindungszentrum bestehend aus zwei Kupferatomen, die jeweils durch Bindung an Stickstoffatome dreier Histidin-Seitenketten verankert sind (nach Metz *et al.* [79]).

die jeweils durch Bindung an Stickstoffatome dreier Histidin-Seitenketten verankert sind (Abb. 2.3). Im unbeladenen Zustand ist die pyramidale Struktur dieser Cu-N-Bindungen verspannt. Bei Bindung eines Sauerstoffmoleküls liegen alle an der Bindung beteiligten Atome mit Ausnahme zweier Histidine in einer Ebene. Das Sauerstoffmolekül wird in einer *side-on* Koordination gebunden, bei der jeweils ein Elektron von den Kupferatomen auf den Sauerstoff übertragen wird.

Alle bisher aufgeführten Eigenschaften der Hämocyanine wären für die geplanten Experimente nicht von Bedeutung, wenn nicht die Tryptophanfluoreszenz die Sauerstoffbeladung widerspiegeln würde. Damit enthält die Fluoreszenz der Tryptophane weitere Informationen und es wird möglich, die Sauerstoffbeladung zu messen [60]. Die Ursache hierfür ist, daß der Sauerstoff-Kupfer-Komplex zwei *charge transfer* Banden besitzt [80], von denen eine die Tryptophanfluoreszenz löscht. Im Rahmen dieser Arbeit sollen diese beiden Banden mit CT1 ($\lambda = 340$ nm, $\epsilon \approx 20\,000$ M⁻¹cm⁻¹) und CT2 ($\lambda = 550$ nm, $\epsilon \approx 1\,000$ M⁻¹cm⁻¹) bezeichnet werden. In beiden Fällen wird bei der Anregung ein Elektron des Sauerstoffmoleküls zu den Kupferatomen verschoben. Dies macht den Ladungstransfer bei der Bindung teilweise rückgängig. Die intensive Bande bei 340 nm überlappt nahezu vollständig mit dem Tryptophan-Emissionsspektrum von Hämocyanin. Aus diesem Grund wird die Tryptophanemission bei besetztem Bindungszentrum durch Förstertransfer mit einem Verhältnis von 1:13 gelöscht [81, 82, 83]. Abbildung 2.4 zeigt im oberen Teil das Absorptions- und Emissionsspektrum von Hämocyanin in beladenem und unbeladenem (oxygeniertem und deoxygeniertem) Zustand und im unteren Teil eine schematische Darstellung der beteiligten Niveaus. Die Absorptionsbande des Hämocyanins bei 280 nm ist auf die Tyrosine und Tryptophane zurückzuführen, wobei bei etwa 295 nm nur Tryptophanabsorption vorliegt [46]. Die Lage des Emissionsmaximums von Tryptophan ist stark umgebungsabhängig und liegt im Falle von Hämocyanin bei etwa 335 nm. Bei beladenem Bindungszentrum kann daher die Anregungsenergie per Förster-Transfer in die Bande CT1 des Bindungszentrums übertragen werden. Der entsprechende Zustand relaxiert mit einer Lebenszeit $\tau < 1$ ps in den Grundzustand [84]. Durch diese schnelle Relaxation beeinflußt die Anregung der Tryptophane das Bindungszentrum kaum. Wenn das Bindungszentrum nicht beladen ist, findet kein Förstertransfer statt und die Tryptophanfluoreszenz wird nicht gelöscht.

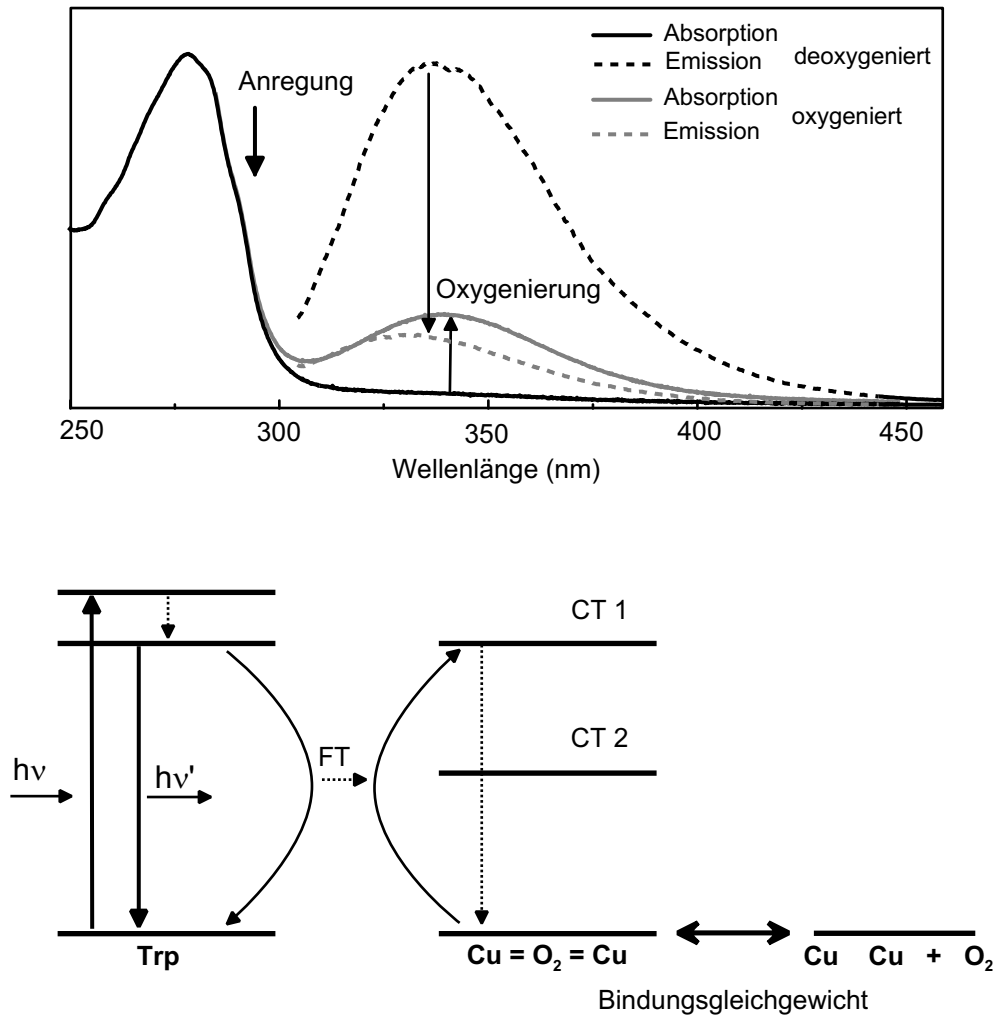


Abbildung 2.4: *Oben:* Absorptions- und Emissionsspektren von Hämocyanin mit beladenen und unbeladenen (oxygenierten und deoxygenierten) Bindungszentren. Zur Aufnahme der Emissionsspektren wurden die Moleküle bei 295 nm angeregt, so daß nur Tryptophanfluoreszenz zu erwarten ist. Diese wird durch die Absorptionsbande des beladenen Kupfer-Bindungszentrums bei 340 nm gelöscht. *Unten:* Schematische Darstellung der Zustände, die an der Bestimmung der Sauerstoffbeladung über die Tryptophanfluoreszenz beteiligt sind. Die Fluoreszenz wird über Förstertransfer (FT) in das höherenergetische der beiden *charge transfer* (CT) Niveaus des beladenen Kupfer-Bindungszentrums gelöscht. Wenn das Bindungszentrum nicht beladen ist, existieren diese Niveaus nicht, so daß die Fluoreszenz nicht gelöscht wird.

2.2 Molekulare Kooperativität

Unter molekularer Kooperativität versteht man die Interaktion der einzelnen Bindungsstellen eines Liganden in einem Makromolekül [69]. Die Bindung eines Liganden an eine Bindungsstelle beeinflusst das Bindungsverhalten anderer Bindungsstellen. Ein prominentes Beispiel hierzu stellt die Sauerstoffbindung an Hämoglobin, dem Sauerstofftransportprotein des Menschen, dar. Um effektiv Sauerstoff von der Lunge zu den Zellen zu transportieren, muß das Protein in der Lunge möglichst vollständig beladen sein, also eine hohe Sauerstoffaffinität besitzen, aber um andererseits auch im Gewebe den Sauerstoff nahezu vollständig abgeben zu können, eine geringe Affinität zeigen. Abbildung 2.5 zeigt den Beladungsgrad θ der Proteine als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks. Die gestrichelte Kurve beschreibt nicht-kooperatives Verhalten. Das Protein besitzt eine konstante Affinität zu Sauerstoff. Durchgezogen ist das von der Natur realisierte kooperative Bindungsverhalten dargestellt. Der Übergang zwischen be- und entladem Zustand erfolgt wesentlich schneller, so daß auch der Unterschied im Beladungsgrad zwischen zwei typischen Sauerstoffpartialdrücken deutlich größer wird (durch die schwarzen senkrechten Striche in Abb. 2.5 angedeutet).

Ein weiterer Vorteil, der sich aus kooperativem Bindungsverhalten ergibt, ist die leichte Beeinflussbarkeit des Bindungsverhaltens durch externe Parameter, sog. Effektoren. Damit wird es möglich, die gesamte Bindungskurve zu höheren oder niedrigeren Partialdrücken zu verschieben. Ein Beispiel hierfür ist die Anpassung an einen geringeren Sauerstoffpartialdruck der Atemluft, z.B. in großen Höhen. Obwohl der angebotene Partialdruck auf die Hälfte seines Wertes auf Meeresniveau fällt, bleibt die Transportkapazität (die Länge des schwarzen Balkens in Abb. 2.5) fast konstant [69].

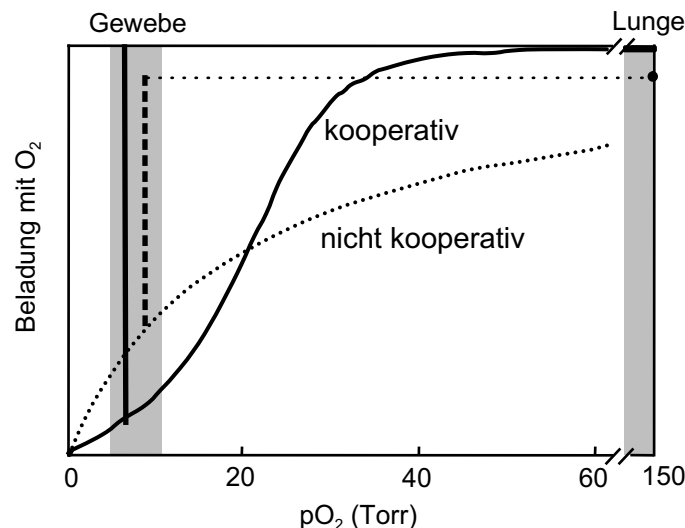


Abbildung 2.5: Beispiel für kooperative Sauerstoffbindung. Typische Sauerstoff-Partialdrücke in Lunge und Gewebe sind grau unterlegt. Gegenüber der nicht-kooperativen Bindung erhöht sich die Transportkapazität zwischen Lunge und Gewebe (durch die senkrechten Striche angedeutet).

Wie findet nun die Informationsübertragung innerhalb des Proteins statt? Nach obiger Beschreibung müssen alle Bindungsstellen „wissen“, wieviel Sauerstoff insgesamt im Protein gebunden ist. Die Übertragung der Beladungsinformation erfolgt über die Konformation des Proteins. Kleine Änderungen der Position einzelner Aminosäuren relativ zu ihrer Umgebung können über eine relativ starre Aminosäuresequenz weitergegeben werden, so daß damit andere Bindungsstellen beeinflußt werden können. Dies wird als allosterische Wechselwirkung bezeichnet [57]. Um molekulare Kooperativität zu beschreiben, muß ein Modell also den Zusammenhang zwischen Beladung und Konformation darstellen.

2.2.1 Methoden zur Beschreibung von molekularer Kooperativität

Für ein Makromolekül ergibt sich aus obiger Beschreibung eine Matrix aus möglichen Zuständen $S_{i,j}$, die sich in ihrer Beladung i und Konformation j unterscheiden. Abbildung 2.6 skizziert eine solche Matrix von Zuständen. Typische Werte für die Anzahl der Bindungsstellen liegen zwischen 4 und 48, die Anzahl der Konformationen wird häufig geringer angenommen. Ein Modell der Kooperativität muß die Besetzung dieser Zustände als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks beschreiben. Im folgenden soll eine Methode vorgestellt werden, ein Modell mit einer solch großen Anzahl an Zuständen effektiv aufzustellen. Einen guten Überblick gibt Wyman [57], dem auch diese Einführung in weiten Teilen folgt.

Der Ausgangspunkt ist die großkanonische (normierte) Zustandssumme. Sie wird hier mit P bezeichnet, da sie auch Bindungspolynom genannt wird (s.u.). Es muß die groß-

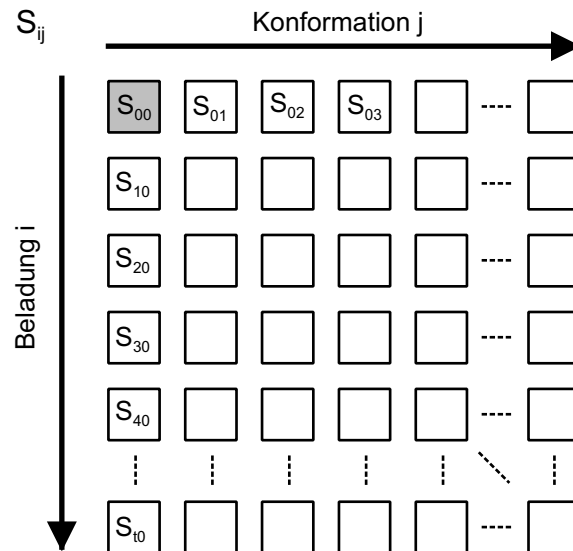


Abbildung 2.6: Beladungs-Konformations-Matrix. Alle Modelle zur kooperativen Bindung lassen sich über die Besetzung der Zustände in dieser Matrix und deren Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration beschreiben.

kanonische Zustandssumme verwendet werden, da ja gerade Variationen in der Teilchenzahl des Liganden untersucht werden sollen. In den Experimenten wird nur mit einer Sorte Liganden gearbeitet werden. Daher soll in der hier vorgestellten theoretischen Beschreibung nur eine Sorte Liganden betrachtet werden, auch wenn dadurch ein großer Bereich der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Liganden ausgeschlossen wird. In diesem Fall lautet die großkanonische Zustandssumme P [85]

$$P = \sum_{i,j} e^{-\frac{G_{i,j}}{RT}} e^{+\frac{i\mu}{RT}} = \sum_{i,j} e^{-\frac{G_{i,j}-i\mu}{RT}} . \quad (2.1)$$

Dabei bezeichnet $G_{i,j}$ die freie Energie des Zustandes $S_{i,j}$ und μ das chemische Potential des Liganden X . Die freie Energie des Zustandes $S_{0,0}$ wird gleich Null gesetzt. Damit gilt für die $G_{i,j}$ der anderen Zustände

$$G_{i,j} = -RT \ln \beta_{i,j} , \quad (2.2)$$

wenn $\beta_{i,j}$ die (dimensionslose) Gleichgewichtskonstante der Reaktion von Zustand $S_{0,0}$ nach Zustand $S_{i,j}$ bezeichnet:

$$S_{0,0} + i X \rightleftharpoons S_{i,j} , \text{ so da\ss } \beta_{i,j} = \frac{[S_{i,j}]}{[S_{0,0}] x^i} . \quad (2.3)$$

x bezeichnet die Aktivität des Liganden X . Für das chemische Potential μ gilt

$$\mu = \mu^\circ + RT \ln x . \quad (2.4)$$

Die Standardbedingungen werden so gewählt, daß $\mu^\circ = 0$ [85]. Damit gilt dann für die großkanonische Zustandssumme P

$$P = \sum_{i,j} e^{-\frac{G_{i,j}}{RT}} e^{+\frac{i\mu}{RT}} = \sum_{i,j} \beta_{i,j} x^i . \quad (2.5)$$

Dieser letzte Ausdruck macht deutlich, warum P hier als Bindungspolynom bezeichnet wird.

Mit Hilfe der Zustandssumme lassen sich nun einige Eigenschaften des Gesamtsystems beschreiben. Die Besetzungswahrscheinlichkeit $\alpha_{i,j}$ eines Zustandes $S_{i,j}$ lautet

$$\alpha_{i,j} = \frac{\beta_{i,j} x^i}{P} . \quad (2.6)$$

Für die mittlere Anzahl beladener Bindungsstellen $\bar{X}$ gilt

$$\bar{X} = \sum_{i,j} \alpha_{i,j} i = \frac{\sum_{i,j} \beta_{i,j} x^i i}{\sum_{i,j} \beta_{i,j} x^i} = \frac{d \ln P}{d \ln x} = \frac{d \mathcal{L}}{d \mu} . \quad (2.7)$$

Bei der letzten Umformung wurde der Bruch mit RT erweitert, um auf das von Wyman definierte Bindungspotential $\mathcal{L} = RT \ln P$ zu kommen [86]. Wenn t die Anzahl der Bindungsstellen bezeichnet (und damit $0 \leq i, \bar{X} \leq t$), dann gilt für die mittlere Beladung θ

$$\theta = \frac{\bar{X}}{t} = \frac{1}{t} \frac{d \ln P}{d \ln x} , \text{ so da\ss } 0 \leq \theta \leq 1 . \quad (2.8)$$

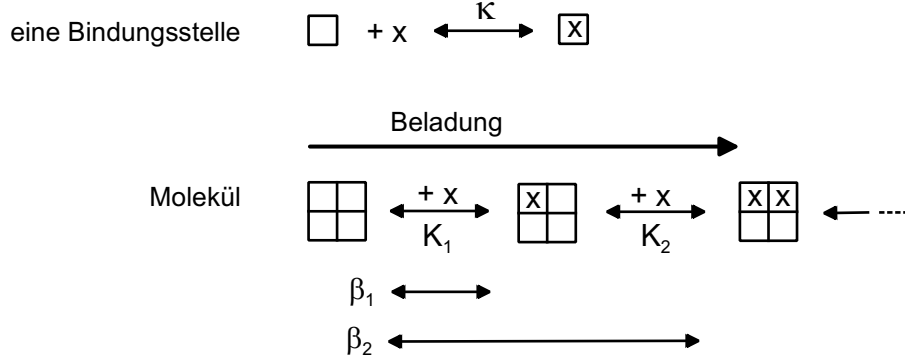


Abbildung 2.7: System mit 4 Bindungsstellen, die nicht kooperieren. Unabhängig von der Beladung bleibt die intrinsische Bindungskonstante κ konstant, nur die statistischen Gewichte bewirken unterschiedliche Bindungskonstanten K_i .

Als Beispiel soll nun ein einfaches, nicht-kooperatives Modell betrachtet werden. Nicht-kooperative Bindung dient einerseits als Vergleichswert zur kooperativen Bindung, andererseits werden Modelle zur kooperativen Bindung häufig aus nicht-kooperativen Teileinheiten zusammengefügt. Das Makromolekül habe t Bindungsstellen und besitze nur eine Konformation. Der Konformations-Index j wird darum der Übersichtlichkeit halber in diesem Beispiel ausgelassen. Abbildung 2.7 skizziert diese Situation. Die intrinsische Gleichgewichtskonstante der Bindung an eine Bindungsstelle sei κ . Die Anzahl der belegten Bindungsstellen im Ausgangs- und Endzustand bestimmt dann die statistischen Gewichte, mit denen aus der intrinsischen Gleichgewichtskonstante κ die Gleichgewichtskonstante K eines Reaktionsschritts gewonnen wird:

$$S_{i-1} + X \rightleftharpoons S_i \quad \text{und} \quad K_i = \frac{t - (i - 1)}{i} \kappa \quad . \quad (2.9)$$

Die Gleichgewichtskonstante β_i für die Gesamtreaktion

$$S_0 + i X \rightleftharpoons S_i \quad \text{lautet} \quad \beta_i = \prod_{j=1}^i K_j = \binom{t}{i} \kappa^i \quad (\text{wobei } \beta_0 = 1) \quad . \quad (2.10)$$

Daraus ergibt sich die Zustandssumme (das Bindungspolynom) P , die Besetzungswahrscheinlichkeit α_i der Zustände S_i sowie die mittlere Beladung θ zu

$$P = \sum_{i=0}^t \beta_i x^i = (1 + \kappa x)^t \quad , \quad (2.11)$$

$$\alpha_i = \frac{\beta_i x^i}{P} = \binom{t}{i} \frac{\kappa^i x^i}{(1 + \kappa x)^t} \quad , \quad (2.12)$$

$$\theta = \frac{1}{t} \frac{d \ln P}{d \ln x} = \frac{\kappa x}{1 + \kappa x} \quad . \quad (2.13)$$

Die mittlere Beladung θ ist also von der Anzahl der Bindungsstellen im Makromolekül unabhängig, die einzelnen Bindungsstellen interagieren, wie angenommen, nicht. Halbsättigung, also $\theta = 1/2$, wird bei $x_{50} = 1/\kappa$ erreicht.

Kooperatives Bindungsverhalten bedeutet eine scheinbare Abhängigkeit der intrinsischen Gleichgewichtskonstante κ von der Beladung i . Wie im folgenden Abschnitt dargestellt wird, entsteht diese Abhängigkeit durch einen Konformationswechsel, so daß die Gewichtung zwischen verschiedenen intrinsischen Gleichgewichtskonstanten verschoben wird. Nach außen hin sichtbar ist nur der Mittelwert, die apparente Gleichgewichtskonstante κ_{app} . Durch geschickte Auftragung der mittleren Beladung θ gegenüber der Ligandenaktivität x läßt sich für ein gegebenes Bindungsverhalten entscheiden, ob Kooperativität vorliegt, d.h. ob sich die apparente Gleichgewichtskonstante κ_{app} mit der Beladung ändert. Dazu wird Gleichung 2.13 umgeformt:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = \kappa_{\text{app}} x \quad . \quad (2.14)$$

Im sogenannten Hill-Plot wird, wie in Abbildung 2.8 gezeigt, $\theta/(1 - \theta)$ gegenüber x doppellogarithmisch aufgetragen. Die apparente Gleichgewichtskonstante κ_{app} ergibt sich dann als Achsenabschnitt einer Geraden mit Steigung Eins. Im Falle positiver Kooperativität ist die Bindungskonstante für die erste Bindung κ_1 kleiner als die für die letzte Bindung κ_t . Diese beiden Gleichgewichtskonstanten dominieren das Bindungsverhalten im Grenzwert sehr niedriger bzw. sehr hoher Ligandenkonzentrationen, da dann nur der erste bzw. der letzte Ligand bindet. Die kooperative Bindungskurve nähert sich also im Grenzwert niedriger Konzentrationen an eine nicht-kooperative Bindungskurve mit $\kappa_{\text{app}} = \kappa_1$ an, im Grenzwert hoher Konzentrationen an eine mit $\kappa_{\text{app}} = \kappa_t$. Da $\kappa_t > \kappa_1$ muß dazwischen ein Übergang mit einer Steigung $n > 1$ erfolgen. Diese Steigung n bzw. ihr Wert bei Halbsättigung n_{50} wird als Hill-Koeffizient bezeichnet und ist ein Maß für die Kooperativität des Systems. Eine genauere Analyse ergibt, daß der Hill-Koeffizient n maximal gleich der Anzahl der Bindungsstellen t sein kann [57].

2.2.2 Modelle der kooperativen Bindung

Seit dem ersten Vorschlag zur Beschreibung kooperativer Sauerstoffbindung von Hämoglobin durch Hill im Jahr 1910 [54], sind viele weitere gefolgt [57]. In diesem Abschnitt sollen die drei wichtigsten vorgestellt werden.

Sequentielles Modell

Das sequentielle Modell wurde 1966 von Koshland, Nemethy und Filmer vorgeschlagen und wird nach seinen Autoren auch KNF-Modell genannt [56]. Den Grundgedanken bildet die Vorstellung, daß die Bindung eines Liganden an eine Bindungsstelle die Bindungsstellen in der Umgebung so beeinflusst, daß ihre Affinität steigt. Je nach geometrischer Anordnung unterscheidet sich die Anzahl der direkt beeinflussten Nachbarn. Außerdem hängt der Grad der Wechselwirkung zwischen Bindungsstellen von ihrer Kopplung ab. Abbildung 2.9A zeigt dieses Modell in der Beladungs-Konformations-Matrix für eine quadratische 2×2 -Anordnung der Bindungsstellen, bei der senkrecht und waagerecht angrenzende Bindungsstellen gleichermaßen beeinflusst werden, diagonal angrenzende aber unbeeinflusst bleiben.

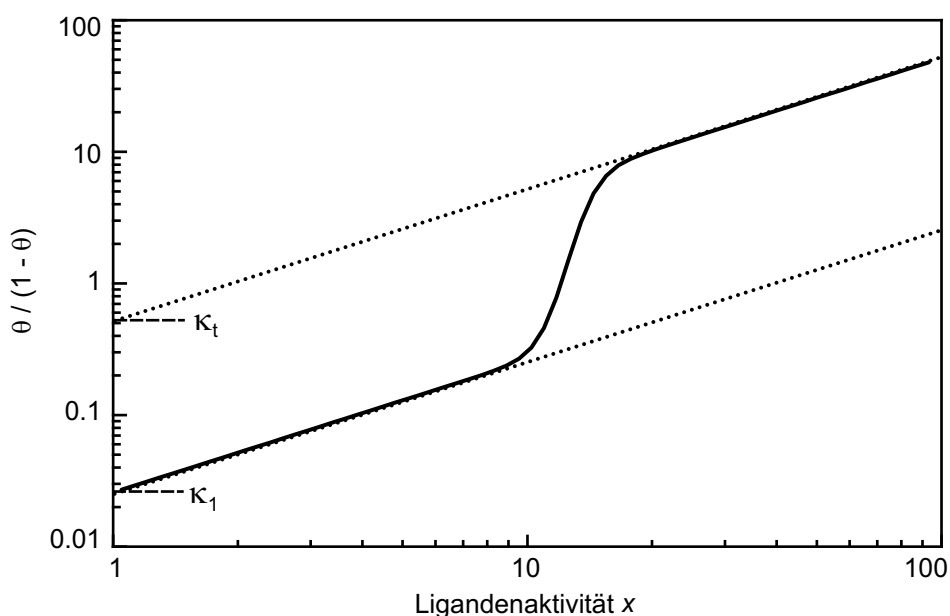


Abbildung 2.8: Beispiel eines Hill-Plots. Nicht-kooperative Bindung liefert eine Gerade mit Steigung 1 (gepunktet). Kooperative Bindungskurven sind im Grenzwert niedriger und hoher Ligandenaktivität nicht-kooperativ. Aus dem Wert bei $x = 1$ läßt sich die Bindungskonstante für den ersten und letzten Liganden bestimmen.

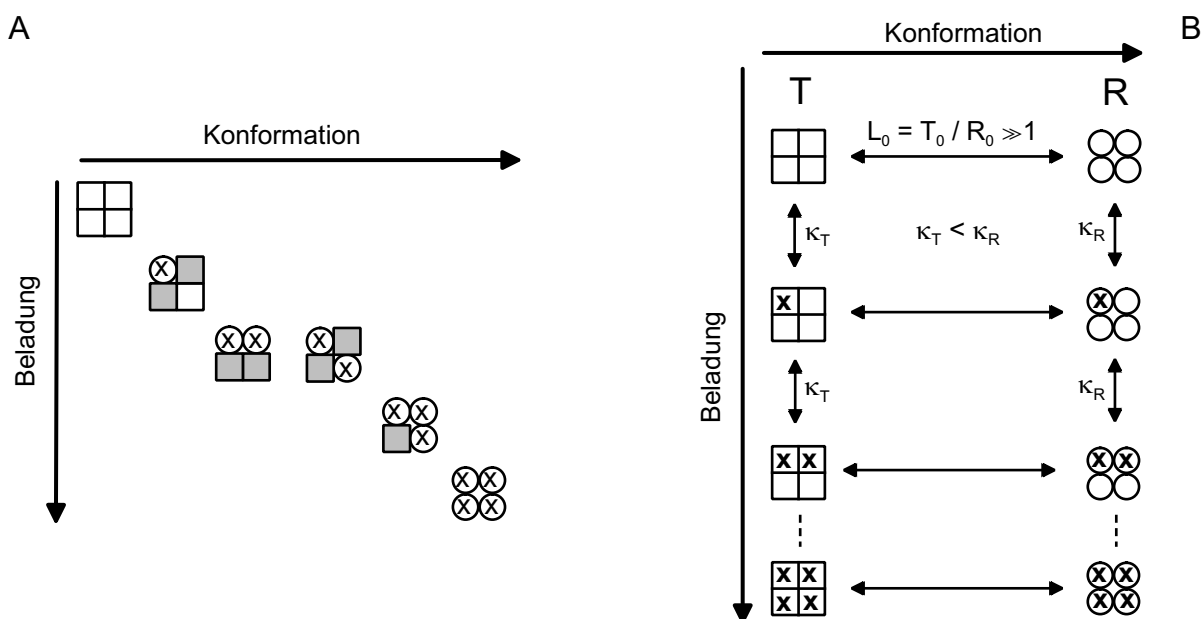


Abbildung 2.9: Modelle zur Kooperativität. A: Sequentielles Modell von Koshland *et al.* Die Konformation einer Bindungsstelle wechselt bei Bindung eines Liganden von $\square$ auf $\circ$. Dabei werden benachbarte Bindungsstellen so beeinflusst, daß ihre Affinität steigt, was durch graue Unterlegung angedeutet ist. B: Konzertierte Modell von Monod *et al.* Alle Bindungsstellen wechseln gleichzeitig die Konformation.

Es ist unmittelbar einsichtig, daß mit diesem Modell positive Kooperativität beschrieben werden kann. Ausgehend von der ersten besetzten Bindungsstelle breitet sich eine Region von höher affinen Bindungsstellen aus, die schließlich das gesamte Molekül umfaßt. Das Modell erlaubt für verschiedene Arten der Nachbarschaft zwischen Bindungsstellen (in obigem Beispiel waagrecht, senkrecht und diagonal) unterschiedliche Wechselwirkungskonstanten. Hinzu kommt, daß bei vielen Transportproteinen auch komplexe Nachbarschaftsbeziehungen vorliegen (siehe z.B. Abb. 2.2). Das Modell stellt also viele Parameter zur Beschreibung des Bindungsverhalten zur Verfügung, so daß die Anpassung an gemessene Bindungskurven immer recht gut gelingen wird, man aber andererseits wenig neue Erkenntnisse gewinnt.

Konzertiertes Modell

Das konzertierte Modell wurde 1965 von Monod, Wyman und Changeaux aufgestellt [55] und wird im folgenden als MWC-Modell bezeichnet. Im Gegensatz zum sequentiellen Modell wechseln hier alle Untereinheiten konzertiert von der einen in die andere Konformation. Dies ist in Teil B von Abbildung 2.9 dargestellt. Die beiden Konformationen werden mit T (tense) und R (relaxed) bezeichnet. Innerhalb einer Konformation sind die Bindungsstellen unabhängig, und so läßt sich das Bindungsverhalten innerhalb einer Konformation durch das oben beschriebene nicht-kooperative Modell mit einer intrinsischen Gleichgewichtskonstante κ_R bzw. κ_T beschreiben. Die beiden Konformationen stehen im Gleichgewicht, das durch die Gleichgewichtskonstante L_0 zwischen den unbeladenen Zuständen R_0 ($=S_{0,0}$) und T_0 ($=S_{0,1}$) beschrieben wird:

$$L_0 = \frac{[T_0]}{[R_0]} \quad . \quad (2.15)$$

Positiv kooperatives Verhalten tritt auf, wenn einerseits das Gleichgewicht im Grenzfall niedriger Ligandenkonzentration auf Seite des T-Zustandes liegt ($L_0 \gg 1$), aber andererseits die Affinität des R-Zustandes höher ist ($\kappa_R > \kappa_T$). Sobald ein Ligand an eine Bindungsstelle im R-Zustand bindet, bringt er damit $t - 1$ weitere Bindungsstellen in den hoch affinen R-Zustand, da das einfach beladene Molekül bei dem durch L_0 beschriebenen Gleichgewicht nicht berücksichtigt wird. Im folgenden soll dieses Verhalten mit den im letzten Abschnitt eingeführten Methoden beschrieben werden.

Die Zustandssumme eines nicht kooperativen Moleküls mit t Bindungsstellen wurde in Gleichung 2.11 aufgestellt. Dies ist auch die Zustandssumme einer Konformation:

$$P_{R,T} = (1 + \kappa_{R,T} x)^t \quad . \quad (2.16)$$

Der Referenzzustand $S_{0,0}$ ist R_0 , so daß die Gesamtzustandssumme lautet

$$P = P_R + L_0 P_T \quad . \quad (2.17)$$

Der Anteil α_i der Moleküle, die unabhängig von ihrer Konformation mit i Liganden besetzt sind, läßt sich berechnen durch

$$\alpha_i = \frac{\sum_j \beta_{i,j} x^i}{P} = \binom{t}{i} \frac{\kappa_R^i + L_0 \kappa_T^i}{P} x^i \quad . \quad (2.18)$$

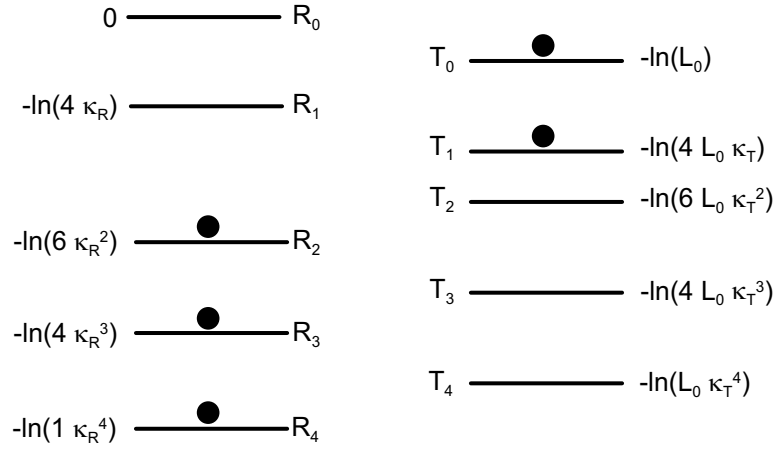


Abbildung 2.10: Energetische Lage der Zustände $S_{i,j}$ in Einheiten von RT im MWC-Modell ($L_0 > 1$, $\kappa_T < \kappa_R$) (nach Ref. [57]). Die Konformation, die bei gegebener Beladung dominiert, ist jeweils durch den Kreis gekennzeichnet.

Der Anteil α_R der Moleküle im R-Zustand ergibt sich zu

$$\alpha_R = \frac{P_R}{P_R + L_0 P_T} = \left(1 + L_0 \left(\frac{1 + \kappa_T x}{1 + \kappa_R x} \right)^t \right)^{-1}. \quad (2.19)$$

Damit läßt sich die mittlere Beladung θ schreiben als

$$\theta = \frac{1}{t} \frac{d \ln P}{d \ln x} = \alpha_R \theta_R + (1 - \alpha_R) \theta_T. \quad (2.20)$$

Die mittlere Beladung des Gesamtsystems ist also ein gewichteter Mittelwert der Beladung der Moleküle im R-Zustand und derer im T-Zustand. Die $\theta_{R,T}$ beschreiben nicht-kooperative Bindungskurven mit unterschiedlichen Halbsättigungswerten (unterschiedlichen Gleichgewichtskonstanten κ) und werden durch Gl. 2.13 definiert. Zwischen ihnen wird durch eine Änderung der Konformation, also durch eine Änderung von α_R , gewechselt. Die Steilheit dieses Konformationswechsels führt zur Steilheit der Bindungskurven.

Wann es zu diesem konzertierten Wechsel der Konformation kommt, läßt sich gut an der energetischen Lage der einzelnen Zustände $S_{i,j}$ erkennen [57]. Diese ist durch

$$G_{i,j} = -RT \ln \beta_{i,j} = -RT \ln \left[\binom{t}{i} \kappa_j^i c \right] \quad \text{mit} \quad c = \begin{cases} 1 & \text{R-Zustand} \\ L_0 & \text{T-Zustand} \end{cases} \quad (2.21)$$

gegeben und in Abbildung 2.10 skizziert¹. Für $i = 0$ und 1 liegen die Zustände der T-Konformation energetisch günstiger und werden darum den Schwerpunkt der Population bilden. Für höhere Beladungen ($i \geq 2$) ist dann aber die R-Konformation vorteilhafter. Wenn die energetische Bandbreite der einen Konformation nicht die der anderen

¹Durch die energetische Lage der Zustände wird beschrieben, in welcher Konformation sich bei gegebener Beladung die *Mehrheit* der Moleküle befindet. Es wird immer Moleküle geben, die nicht die Konformation wechseln.

vollständig überdeckt, wird es keinen Konformationswechsel geben, da unabhängig von der Beladung immer eine Konformation die energetisch günstigere ist [57].

Die Annahme des konzertierten MWC-Modells, nach der alle Untereinheiten gleichzeitig die Konformation wechseln, ist gleichbedeutend mit einer starken langreichweitigen Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten. Sie zwingen sich gegenseitig in die gleiche Konformation, führen somit den Konformationswechsel gleichzeitig aus. Im vorher dargestellten sequentiellen KNF-Modell wird die Wechselwirkung der Untereinheiten als kurzreichweitiger angenommen. Es wird nur jeweils die nächst benachbarte Bindungsstelle beeinflusst. Dadurch können verschiedene Untereinheiten eines Moleküls in verschiedenen Konformationen vorliegen.

Das MWC-Modell beschreibt das Bindungsverhalten mit einer geringen Anzahl Parametern: die Bindungskonstanten der Konformationen κ_R und κ_T , einer Gleichgewichtskonstanten zwischen den unbeladenen Zuständen L_0 sowie der Größe der allosterischen Einheit t , die nicht unbedingt das gesamte Molekül umfassen muß. Trotz dieser geringen Parameterzahl lassen sich gemessene Bindungskurven recht gut wiedergeben. Allerdings kann der Einfluß äußerer Parameter, sog. Effektoren, wie z.B. dem pH , nur unbefriedigend erklärt werden. Im Experiment zeigt sich, daß die Bindungskurven bei Variation des pH mit nur geringen Änderungen der Form verschoben werden. Dies müßte durch eine identische pH -Abhängigkeit der beiden Bindungskonstanten κ_R und κ_T erklärt werden. Andererseits sollten die Konformationen gerade durch ihre $\kappa_{R,T}$ beschrieben werden und Effektoren nur die Gleichgewichtskonstante L_0 beeinflussen [58]. Dieser Mangel wird nun im dritten hier vorgestellten Modell beseitigt.

Nesting-Modell

Der Ausgangspunkt des *nesting*-Modells ist die hierarchische Struktur der Transportproteine. Die einzelnen Untereinheiten sind nahezu identisch und in Modulen angeordnet, die wenige Untereinheiten umfassen. Mehrere dieser Module bilden dann das gesamte Molekül (siehe z.B. Abb. 2.2). Es liegt darum nahe, für jede dieser Hierarchie-Ebenen getrennte Wechselwirkungen und getrennte Konformationen einzuführen. Wie die Art der Wechselwirkung innerhalb einer Ebene ausfällt – ob sie durch das KNF- oder das MWC-Modell beschrieben wird – liegt bei diesem Modell zuerst einmal nicht fest und kann sich auch von einer Hierarchie-Ebene zur nächsten unterscheiden. Das *nesting*-Modell stellt also eigentlich eine Klasse von Modellen dar. Im folgenden soll unter *nesting*-Modell ein spezielles Modell dieser Klasse verstanden werden, das 1986 von Decker *et al.* [87] zur Beschreibung der Sauerstoffbindung von Hämocyaninen vorgeschlagen wurde. Es verwendet hierfür zwei Hierarchie-Ebenen, die beide durch das MWC-Modell beschrieben werden. Die Konformationen der oberen Ebene (das Gesamtmolekül) werden mit R und T bezeichnet. Die untere Ebene (ein Modul) besitzt ebenfalls zwei Konformationen r und t , die aber durch die Konformation der oberen Hierarchieebene beeinflusst werden, so daß zwischen vier Modul-Konformationen rR , rT , tR und tT unterschieden wird. Weiterhin soll das Gesamtmolekül aus zwei Modulen der unteren Hierarchie-Ebene gebildet werden. Für das Gesamtmolekül ergeben sich dann 6 verschiedene Konformationen der 2^4 möglichen Kombinationen, da einerseits für beide Module die gleiche Konformation

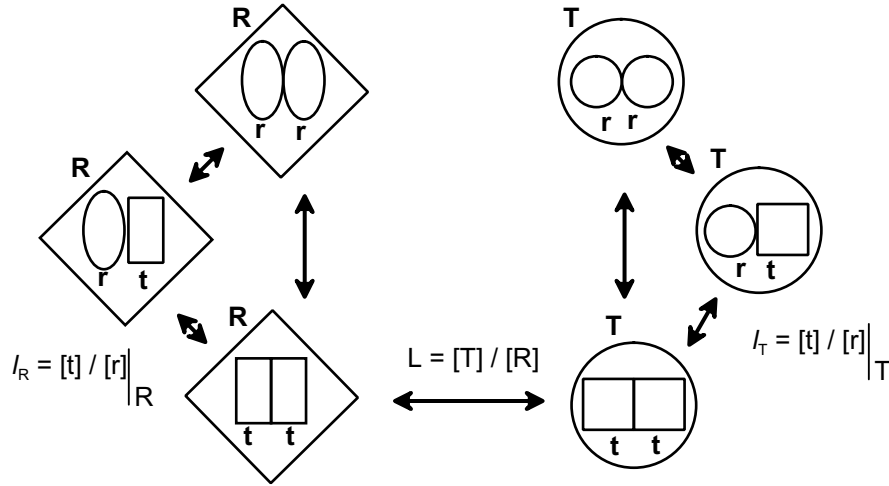


Abbildung 2.11: Die hier besprochene Variante des *nesting*-Modells [87]. Das Molekül besteht aus zwei Modulen, deren Konformation r oder t durch die Konformation des Moleküls R oder T beeinflusst wird. Sowohl innerhalb eines Moduls als auch zwischen den Modulen wird das MWC-Modell verwendet.

des Gesamtmoleküls gelten muß (also xR oder xT) und andererseits die Module als ununterscheidbar angenommen werden ($rR-tR = tR-rR$). Diese Konformationen sind in Abbildung 2.11 dargestellt.

Die Gesamt-Zustandssumme P setzt sich zusammen aus den Zustandssummen P_a der einzelnen Module, die von der Konformation $a \in \{R, T\}$ des Moleküls abhängen [87]:

$$P_a = (1 + \kappa_{r,a} x)^{n_1} + l_a (1 + \kappa_{t,a} x)^{n_1} \quad (2.22)$$

$$P = P_R^{n_2} + L_0 P_T^{n_2} \quad (2.23)$$

Dabei bezeichnet n_1 die Anzahl der Untereinheiten pro Modul und n_2 die Anzahl der Module pro Molekül, so daß $n_1 \times n_2 = t$. Alle weiteren Größen lassen sich daraus mit den Gleichungen 2.6–2.8 berechnen.

Dieses Modell wird durch experimentelle Befunde untermauert. Das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* zeigt mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{\text{Hill}} = 7$ besonders ausgeprägtes kooperatives Verhalten. Durch Fluoreszenzmarkierung lassen sich hier 4 diskrete Konformationen der Untereinheiten unterscheiden, die als die 4 Konformationen der Untereinheiten im *nesting*-Modell identifiziert wurden [88].

2.2.3 Verteilung der Beladung

Wie läßt sich nun für ein gegebenes Molekül entscheiden, durch welchen theoretischen Ansatz sein Bindungsverhalten am besten beschrieben wird? Die einzelnen Modelle unterscheiden sich darin, wie die Zustände $S_{i,j}$ der Beladungs-Konformations-Matrix Abb. 2.6 als Funktion der Ligandenkonzentration besetzt sind. Im Idealfall müßte die Besetzung dieser Matrix durch ein Experiment bestimmt werden. Viele Schlüsse lassen sich aber schon aus Teilinformationen ziehen. Ob kooperatives Verhalten vorliegt oder

nicht, läßt sich schon anhand des mittleren Beladungsgrades θ als Funktion der Ligandenaktivität x feststellen. Der Beladungsgrad θ ist, um im Bild der Zustandsmatrix zu bleiben, der Mittelwert der Projektion der Matrix auf die Beladungs-Achse. Für komplexe Moleküle folgt aus diesen Daten – der sog. Bindungskurve – auch, daß sie nicht durch ein einfaches MWC-Modell zu beschreiben sind, was dann zum *nesting*-Modell führt. Aus wie vielen Modulen ein Molekül allerdings im Rahmen dieses Modells besteht, läßt sich mit der Bindungskurve alleine nicht mehr feststellen. Es gibt verschiedene plausible Kombinationen von n_1 und n_2 , mit denen die Bindungskurve beschrieben werden kann. Um dieses Problem zu lösen, müssen mehr Informationen berücksichtigt werden, z.B. die Verteilung der Beladung α_i , nicht nur ihr Mittelwert θ . Im Bild der Zustandsmatrix entspricht dies der Projektion auf die Beladungsachse selbst.

Abbildung 2.12 zeigt die Verteilung der Beladung an einem Beispiel eines Moleküls mit 24 Bindungsstellen. Die zugrunde liegenden Parameter entsprechen dem in Abschnitt 2.1.3 vorgestellten Hämocyanin. Für vier verschiedene Modelle ist jeweils die Verteilung der Beladung α_i ($i = 0 \dots 24$) als Funktion der Ligandenaktivität, in diesem Fall des Sauerstoffpartialdrucks, berechnet. Zusätzlich ist der Verlauf der Bindungskurve, also der mittleren Beladung θ eingetragen. Sie entspricht dem Mittelwert der zweidimensionalen Darstellung in vertikaler Richtung. Während im nicht-kooperativen Fall die Bindungsstellen nach und nach besetzt werden, erfolgt im MWC-Modell ein Sprung in der Besetzung. Moleküle mit einer Beladung von z.B. $i = 12$ sind nie anzutreffen. Bei Halbsättigung läßt sich das Ensemble in zwei Gruppen teilen, von denen die eine mit etwa 4 und die andere mit etwa 20 Liganden pro Molekül beladen ist.

Die beiden Varianten des *nesting*-Modells unterscheiden sich in der Größe der Module. Links umfaßt ein Modul 12 Untereinheiten, rechts nur 6. Wie in Abb. 2.2 zu sehen, sind beides realistische Annahmen auf Grund der Struktur des Hämocyanins. Die sich daraus ergebenden Ensemble-Bindungskurven unterscheiden sich nicht. In der Verteilung der Beladung sind allerdings deutliche Unterschiede zu erkennen. Bei Halbsättigung sind in der „ 2×12 “-Variante 4 Maxima zu erkennen, in der „ 4×6 “-Variante dagegen 5. Hier sind sie zudem schärfer gegeneinander abgegrenzt. Mit Einzelmolekülspektroskopie läßt sich nun nicht nur die mittlere Beladung (die Punkte in Abb. 2.12) bestimmen, sondern die gesamte Verteilung der Beladung. Für eine große Anzahl von Molekülen müßte die individuelle Beladung bei fixiertem Sauerstoffpartialdruck bestimmt werden. Mit dieser Methode wäre es also möglich, z.B. zwischen diesen beiden Varianten des *nesting*-Modells zu unterscheiden. Ein weiterführendes Experiment, auf das hier nicht eingegangen werden soll, ist die simultane Bestimmung von Beladung und Konformation einzelner Moleküle. Dies würde dann die vollständige Zustandsmatrix (Abb. 2.6) liefern.

2.3 Mikroskopie und Spektroskopie einzelner Moleküle

In diesem Abschnitt sollen die Grundlagen der optischen Mikroskopie und Spektroskopie einzelner Moleküle dargestellt werden (einen Überblick liefern Ref. [18] und [16]). Um

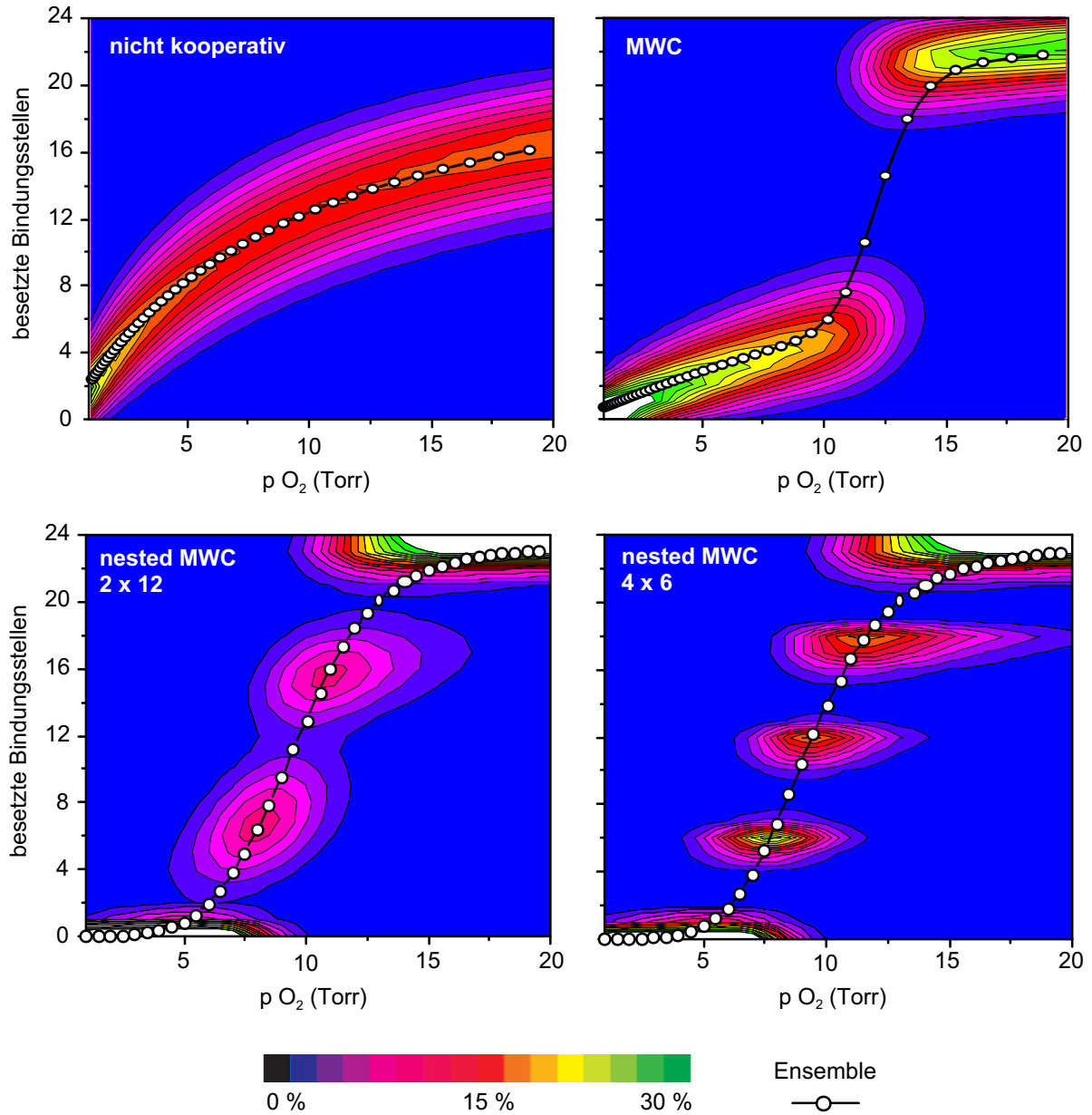


Abbildung 2.12: Verteilung der besetzten Zustände α_i als Funktion des Sauerstoffpartialdrucks berechnet für vier verschiedene Modelle. Der Ensemble-Mittelwert ist als Linie eingezeichnet. Die beiden Varianten des *nesting*-Modells sind auf Grund des Ensemble-Mittelwerts nicht zu unterscheiden. Einzelmolekülspektroskopie würde aber die Verteilung der Beladung liefern und somit eine Unterscheidung ermöglichen.

Parameter der beiden *nesting*-Modelle:

Variante 2×12 : $l_r = 10^{14}$, $l_t = 10^{19}$, $L'_0 = ((1 + l_r)/(1 + l_t))^2$, $L_0 = 10^3 L'_0$,

$\kappa_{rR} = 2.00$, $\kappa_{rT} = 3.00$, $\kappa_{tR} = 0.0500$, $\kappa_{tT} = 0.001$

Variante 4×6 : $l_r = 10^{7.66}$, $l_t = 10^{9.6}$, $L'_0 = ((1 + l_r)/(1 + l_t))^4$, $L_0 = 10^{-0.96} L'_0$,

$\kappa_{rR} = 1.96$, $\kappa_{rT} = 3.16$, $\kappa_{tR} = 0.0014$, $\kappa_{tT} = 0.001$

das Fluoreszenzlicht eines einzelnen Moleküls detektieren zu können, müssen mehrere Voraussetzungen gegeben sein: der Untergrund an Photonen anderen Ursprungs muß so gering wie möglich sein. Ein Untergrundsignal kann zum Beispiel durch Fluoreszenz der das Molekül umgebenden Matrix entstehen, falls es in eine solche eingebettet ist. Andererseits muß ein möglichst großer Anteil der Fluoreszenzphotonen des zu untersuchenden Moleküls eingesammelt und detektiert werden. Schließlich muß das Molekül stabil genug sein, damit eine genügend große Anzahl an Photonen detektiert werden kann, um die gewünschten Informationen zu gewinnen. Hierzu bedient man sich unterschiedlicher Methoden der Analyse des detektierten Photonenstroms. Diese Anforderungen werden in den folgenden Abschnitten dieses Unterkapitels diskutiert.

Wie diese Bedingungen erfüllt werden können, hängt stark von dem zu untersuchenden System ab, ob es bei Raumtemperatur oder bei tiefen Temperaturen, in fester oder in flüssiger Umgebung untersucht werden soll. Es wurden verschiedene experimentelle Methoden entwickelt, um diesen Anforderungen gerecht zu werden [18]. Im ersten Abschnitt sollen darum einige Methoden vorgestellt werden, die sich für die Untersuchung einzelner Moleküle bei Raumtemperatur eignen, um sie von der in dieser Arbeit verwendeten Zwei-Photonen-Mikroskopie abzugrenzen.

2.3.1 Methoden

Alle im folgenden vorgestellte Methoden haben die Eigenschaft, daß ihre optische Auflösung nicht ausreicht, um direkt benachbarte, identische Moleküle zu unterscheiden. Die Konzentration der Moleküle muß daher so weit verringert werden, daß ihr mittlerer Abstand deutlich über der Auflösung des Mikroskops liegt.

Weitfeld-Mikroskopie

Bei der Weitfeld-Mikroskopie wird ein relativ großer Bereich der Probe ($10 \times 10 - 100 \times 100 \mu\text{m}^2$) homogen ausgeleuchtet und auf eine empfindliche Kamera abgebildet [14, 39]. Das Auflösungsvermögen ist durch das verwendete Objektiv und die Größe der Bildelemente der Kamera gegeben. Unerwünschte Hintergrundfluoreszenz und Streulicht können nur spektral abgetrennt werden. Die Entwicklung effizienter Kamera-Systeme und photostabiler Farbstoffe hat es ermöglicht, auch mit dieser eher konventionellen Mikroskopietechnik einzelne Moleküle zu detektieren. Der Vorteil dieser Methode ist, daß viele Moleküle gleichzeitig abgebildet werden können und auch räumliche Dynamik gut verfolgt werden kann. So läßt sich die Diffusion von Peptiden auf der Zellmembran [89] oder die Kollokalisierung von Liganden an Rezeptoren [40] untersuchen. Wenn die Anregung der Fluorophore nicht durch das Objektiv, sondern durch evaneszente Wellen nach Totalreflexion (*total internal reflection*, TIR) an der Glas-Probe-Grenzfläche erfolgt, wird nur eine dünne Schicht der Probe angeregt und so die Bildung von Hintergrundfluoreszenz vermieden. Gleichzeitig läßt sich aus der exponentiellen Abhängigkeit der Anregungsintensität vom Abstand zur Grenzfläche auch die Position des Moleküls in Strahlrichtung genau bestimmen [90].

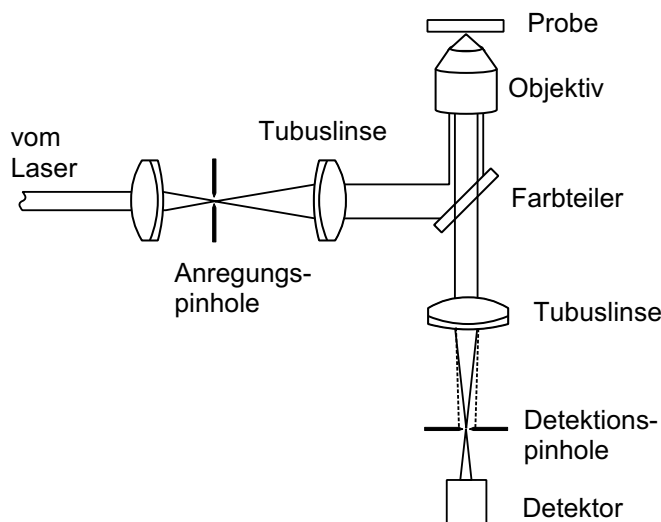


Abbildung 2.13: Prinzip des konfokalen Mikroskops. Das Anregungspinhole dient als punktförmige Lichtquelle, die auf die Probe abgebildet wird. Durch das Detektionspinhole wird der Bereich der Probe definiert, aus dem die Fluoreszenz detektiert werden kann. Licht aus anderen Bereichen der Probe wird nicht scharf auf das Pinhole abgebildet (gepunktet) und daher unterdrückt.

Nahfeldmikroskopie

Ein optisches Nahfeldmikroskop (*scanning near-field optical microscope*, SNOM) [3, 4, 91, 92] führt eine kleine Apertur (Durchmesser ca. 100 nm) über die Probe und baut das Bild punktwise auf. Dabei wird das Nahfeld des Moleküls detektiert oder angeregt, so daß auch Wellenvektoren mit imaginärem Anteil in Strahlrichtung zum Bild beitragen und sich so auch Raumfrequenzen $k_{||} > 2\pi/\lambda$ auflösen lassen. Dieses Verfahren erhöht die Auflösung deutlich, allerdings auf Kosten der Detektions- bzw. Anregungseffizienz, da nur ein geringer Teil des Lichts die Apertur passiert. Als Apertur wird häufig eine metallbedampfte, zur Spitze ausgezogene Glasfaser verwendet, die im Abstand von wenigen Nanometern über die Probe geführt wird. Dieser Abstand wird über die Scherkraft-Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe detektiert und durch eine Regelschleife konstant gehalten. Aus dem Signal der Regelschleife erhält man neben der optischen auch eine topographische Information der Probe. 1993 zeigten Betzig und Chichester, daß mit dieser Methode einzelne Moleküle detektiert werden können [13]. Die Spitze im Nahfeld des Moleküls verändert dessen Abstrahlcharakteristik. Im ungünstigsten Fall wird die Fluoreszenz gelöscht. Andererseits kann aber auch die Feldüberhöhung an einer scharfen Metallspitze alleine als positionsbestimmendes Element dienen, so daß gar keine Apertur benötigt wird (*apertureless SNOM*) [93, 94]. Bei der Interpretation des erhaltenen optischen Kontrastes müssen solche Effekte berücksichtigt werden.

Konfokale Mikroskopie

In der konfokalen Mikroskopie wird im Gegensatz zu einem Weitfeld-Mikroskop nur der minimal mögliche Bereich auf der Probe ausgeleuchtet und auch nur Fluoreszenzlicht aus diesem Bereich detektiert [95, 96, 97, 98]. Abbildung 2.13 skizziert dieses Prinzip. Die zentralen Elemente sind die zwei Lochblenden (*pinhole*), die in der Bildebene des Objektivs hoher numerischer Apertur liegen. Sie definieren den Anregungs- und den Detektionsfokus und werden über eine sogenannte Unendlich-Optik in die Objekt-Ebene des Objektivs abgebildet. Der Name zeigt an, daß das Objektiv ein Bild im Unendlichen erzeugt (also einen parallelen Strahl liefert) der erst von der Tubuslinse in ein reelles Bild umgewandelt wird. Ein gut justierter Laserstrahl kommt einem parallelen Strahl recht nahe, so daß auf das Anregungspinhole oft verzichtet werden kann. Dies ändert das Prinzip dieses Mikroskops aber nicht. Fluoreszenzlicht, das nicht aus dem Detektionsfokus stammt, wird nicht scharf auf das Detektionspinhole abgebildet, kann dieses also nur unter großen Verlusten passieren. Dies sorgt für eine hohe Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz. Das Bild wird wie in der Nahfeldmikroskopie punktwise aufgebaut, in dem die Probe durch den Fokus des Objektivs gefahren wird. Die räumliche Auflösung ist höher als in der Weitfeldmikroskopie, da zwar die Detektion vergleichbar ist, aber nur punktwise angeregt wird. (Die räumliche Auflösung wird in Abschnitt 2.3.2 verglichen werden.) Diese punktwise Anregung ermöglicht es zum einen, sehr hohe Anregungsintensitäten zu erreichen, zum anderen stammt das Licht im Detektionsstrahlengang im Idealfall von nur einem Objekt. Dessen Fluoreszenzeigenschaften wie Polarisierung oder Fluoreszenz-Autokorrelation können so einfach untersucht werden. Aus diesen Gründen hat sich die konfokale Mikroskopie zu der am häufigsten eingesetzten Methode bei der Detektion einzelner Moleküle bei Raumtemperatur entwickelt (siehe z.B. Ref. [17, 19])

Zwei-Photonen-Mikroskopie

Bei der Zwei-Photonen-Anregung (*two photon excitation*, TPE) wird ein elektronischer Übergang eines Moleküls durch die gleichzeitige Absorption zweier Photonen angeregt, wobei jedes Photon die Hälfte der Energie des Übergangs aufbringt [99]. Da zwei Photonen gleichzeitig absorbiert werden müssen, ist die Anregungswahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der Lichtintensität. Eine störungstheoretische Herleitung dieses Effekts und eine Diskussion seiner Eigenschaften finden sich in Kapitel 2.4.4. Die Anregungswellenlänge ist bei Zwei-Photonen-Absorption doppelt so groß wie die für die Ein-Photonen-Anregung (*one photon excitation*, OPE) dieses Übergangs erforderliche. Dies ermöglicht es, Übergänge in ansonsten nur schwer zugänglichen Spektralbereichen anzuregen. Mikroskopie im Ultraviolett – wie sie zur Anregung der Tryptophane bei 280 nm erforderlich wäre – ist wegen der eingeschränkten Auswahl an transmittierenden Gläsern aufwendig, z.B. lassen sich achromatische Linsen nur schwer herstellen. Dies ist einer der Gründe, warum die Spektroskopie einzelner Proteine auf Basis ihrer Tryptophanfluoreszenz durch Zwei-Photonen-Anregung erfolgen soll. Weitere Gründe werden im folgenden diskutiert: Das Anregungsvolumen ist stärker lokalisiert, so daß nur die Moleküle angeregt werden, deren Fluoreszenz auch detektiert

wird. Außerdem werden störende Verunreinigungen der Proben weniger leicht angeregt, da der Zwei-Photonen-Absorptionskoeffizient in erster Näherung das Quadrat des Ein-Photonen-Absorptionskoeffizienten ist, wie in Kap. 2.4.4 dargestellt werden wird. Wenn nun die Verunreinigungen z.B. einen um den Faktor 5 niedrigeren Ein-Photonen-Absorptionskoeffizienten als die eigentliche Probe besitzen, so wird daraus bei Zwei-Photonen-Anregung ein Unterschied um den Faktor 25. Gerade im ultravioletten Spektralbereich, in dem durch die hohe Energie der Photonen viele Übergänge angeregt werden können, bedeutet dies einen sehr entscheidenden Vorteil.

Von der mikroskopischen Technik her ist die Zwei-Photonen-Mikroskopie [63, 100, 66] der konfokalen Mikroskopie relativ ähnlich. Auch hier wird ein paralleler Laserstrahl mit Hilfe des Objektivs auf die Probe fokussiert. Da die Anregungswahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der Lichtintensität ist, ist die Fokusgröße kleiner, so daß nur ein geringerer Anteil der Probe angeregt wird. Der spektrale Abstand zwischen Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge ist größer als bei einem Ein-Photonen-Prozeß, so daß Streulicht leichter spektral abgetrennt werden kann. Die starke Lokalisierung der Anregung erlaubt es, zusammen mit dem größeren spektralen Abstand der beteiligten Wellenlängen, auf das Detektionspinhole zur Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz zu verzichten und trotzdem die gleiche Auflösung zu erhalten (siehe Abschnitt 2.3.2). Einzelne Moleküle konnten mit dieser Methode von verschiedenen Gruppen detektiert werden: beispielsweise von Mertz *et al.* in Lösung [64], von Plakhotnik *et al.* bei tiefen Temperaturen (1.7 K) in einem Kristall [101], von Sanchez *et al.* bei Raumtemperatur adsorbiert auf einer Glasoberfläche [65] sowie von Sonnleiter *et al.* mit Weitfeld-Anregung und Detektion [35].

Insbesondere bei stark streuenden, „trüben“ Proben ist es von Vorteil [100], daß kein Detektionspinhole benötigt wird. Wenn Fluoreszenzphotonen auf dem Weg zum Detektionspinhole abgelenkt werden, so können sie es nicht mehr passieren, auch wenn sie aus dem Detektionsfokus stammen. Dies reduziert den erzielbaren Kontrast des Bildes. Bei Zwei-Photonen-Anregung kann auf dieses Pinhole verzichtet werden, so daß mit einem großflächigen Detektor auch diese abgelenkten Photonen detektiert werden. Damit wird es möglich, eine hohe räumliche Auflösung auch in Zellen [36] oder in tieferen Gewebeschichten [102] zu erreichen.

2.3.2 Auflösungsvermögen

Wie oben schon dargestellt wurde, ist die Auflösung eines optischen Mikroskops nicht groß genug, um Moleküle unterscheiden zu können, solange ihr Abstand nicht in die Größenordnung der optischen Wellenlänge kommt. Trotzdem ist das Auflösungsvermögen für die Einzelmolekülspektroskopie relevant, da es die Größe des Anregungs- und Detektionsfokus beschreibt. Diese bestimmt, wieviele Moleküle der umgebenden Matrix des zu untersuchenden Moleküls mit angeregt werden und somit, wieviel Hintergrundfluoreszenz erzeugt und detektiert wird. In diesem Abschnitt soll darum die Größe und Form des Fokus bei konfokaler und Zwei-Photonen-Mikroskopie beschrieben werden.

Für den Anregungsfokus lassen sich zwei Grenzfälle unterscheiden: im ersten Fall wird der einlaufende Laserstrahl als ebene Welle angesehen, die an der Apertur des

Mikroskopobjektivs gebeugt und von ihm fokussiert wird. Der andere Grenzfall ist ein gaußförmiger Strahl, der durch das Objektiv nicht beschnitten wird und entsprechend der Gauß-Optik fokussiert wird. Ein Laserstrahl läßt sich gut im Rahmen der Gauß-Optik beschreiben. Um in den Grenzfall der ebenen Welle zu gelangen, muß er sehr stark aufgeweitet werden. Andererseits ist die Apertur des Objektivs gewöhnlich so klein, daß der Laserstrahl unter Umständen sogar verkleinert werden muß, um es ohne Abschattung passieren zu können.

Für den Fall der ebenen Welle ergibt sich als Intensitätsverteilung im Fokus [103, 104]

$$h(u, v) = \left| 2 \int_0^1 J_0(v\rho) \exp(i u \rho/2) \rho d\rho \right|^2, \quad (2.24)$$

wobei u und v die normierten Koordinaten in axialer und radialer Richtung sind

$$u = \frac{8\pi}{\lambda} z \sin^2(\alpha/2) \quad , \quad v = \frac{2\pi}{\lambda} r \sin \alpha \quad (2.25)$$

und α den halben Öffnungswinkel beschreibt (numerische Apertur $NA = n \sin \alpha$). J_0 bezeichnet die Bessel-Funktion nullter Ordnung. Diese Funktion $h(u, v)$ wird auch *point spread function* (PSF) genannt: eine punktförmige Lichtquelle S würde mit Hilfe der Tubuslinse (siehe Abbildung 2.13) die verlangte ebene Welle erzeugen, die dann zur beschriebenen Intensitätsverteilung führt. Wegen der Umkehrbarkeit des Lichtweges beschreibt diese Funktion auch die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Photon, das von Punkt (u, v) ausgeht, am Punkt S detektiert werden kann [105]. Sie ist darum von grundlegender Bedeutung bei der Analyse der Abbildungseigenschaften eines Mikroskops und in Abbildung 2.14A linear (h) sowie in Teil B quadratisch (h^2) dargestellt.

Je nach verwendeter Mikroskopie-Methode kommen unterschiedliche *point spread functions* h für die Anregung und Detektion zum Einsatz. Die räumliche Variation der Molekül-Detektions-Effizienz $MDE(\mathbf{r})$ wird darum als Produkt der entsprechenden PSFs für Anregung und Detektion gebildet [104]:

$$MDE_{\text{ges}}(u, v) = h_{\text{Anregung}}(u, v) \times h_{\text{Detektion}}(u, v) \quad (2.26)$$

$$MDE_{\text{Weitfeld}}(u, v) = 1 \times h(u, v) \quad (2.27)$$

$$MDE_{\text{konfokal}}(u, v) = h(u, v) \times h(u, v) = h^2(u, v) \quad (2.28)$$

$$MDE_{\text{TPE}}(u, v) = h^2(u/2, v/2) \times 1 \quad (2.29)$$

Im konfokalen Fall wurde die Anregungswellenlänge gleich der Fluoreszenzwellenlänge angenommen. Wenn bei der Zwei-Photonen-Anregung (*two photon excitation*, TPE) der gleiche Farbstoff angeregt werden soll, so muß mit der doppelten Wellenlänge gearbeitet werden. Die Intensitätsverteilung im Fokus wird dann durch $h(u/2, v/2)$ beschrieben, wenn λ weiterhin die Ein-Photonen-Wellenlänge bezeichnet. Das Quadrat berücksichtigt die quadratische Intensitätsabhängigkeit. Wenn aber die gleiche Anregungswellenlänge und dafür ein anderer Farbstoff verwendet wird, so stimmt $MDE_{\text{TPE}}(u, v)$ mit

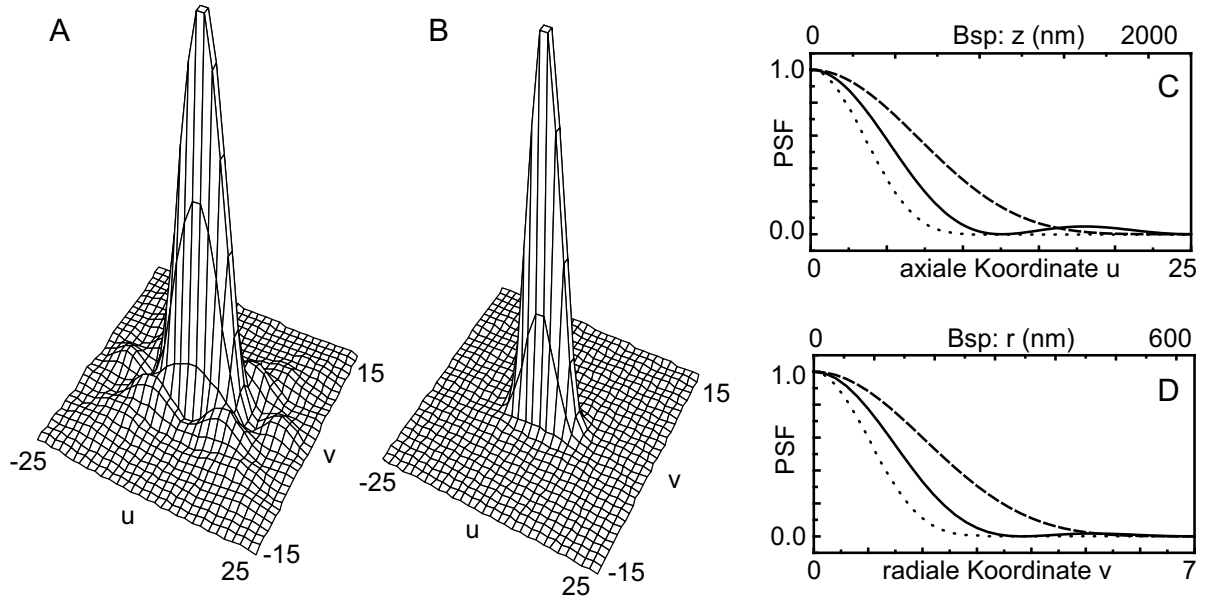


Abbildung 2.14: *point spread function* (PSF) $h(u, v)$. A: lineare Darstellung. B: Quadrat der PSF. C und D: Produkt der PSF von Anregung und Detektion für ein Weitfeld-Mikroskop (durchgezogen), ein konfokales Mikroskop (gepunktet) und für Zwei-Photonen-Anregung (gestrichelt). Als Beispiel sind absolute Werte für die Parameter numerische Apertur $NA = n \sin \alpha = 1.2$, Brechungsindex $n = 1.33$ (Wasser) und Wellenlänge $\lambda = 600$ nm angegeben.

$MDE_{\text{konfokal}}(u, v)$ überein. Die Funktionen 2.27–2.29 sind in Abbildung 2.14 entlang der axialen (Teil C) und radialen Achse (Teil D) gezeigt. Als Beispiel sind absolute Werte für die Parameter numerische Apertur $NA = n \sin \alpha = 1.2$, Brechungsindex $n = 1.33$ (Wasser) und Wellenlänge $\lambda = 600$ nm angegeben. Die Verbesserung der Auflösung bei konfokaler Mikroskopie ist deutlich zu erkennen. Zwei-Photonen-Mikroskopie verbessert die Auflösung also nur dann, wenn nicht der gleiche Übergang, sondern die gleiche Laserwellenlänge verwendet wird (dann stimmt die Auflösung mit der eines konfokalen Mikroskops überein).

Wenn nur die Verbesserung der Auflösung interessiert, ist demnach die Zwei-Photonen-Anregung nicht unbedingt geeignet. Sie liefert aber eine stärkere Lokalisierung der Anregung als die konfokale Mikroskopie [100, 106]. Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie wird kein Fluoreszenzlicht am Detektionsspinhole gestoppt. Es werden nur die Moleküle angeregt, deren Fluoreszenz auch detektiert wird. Dies führt zu einer verlängerten Lebenszeit der Farbstoffe, da sie seltener angeregt werden. Beim Abrastern der Probe senkrecht zur Strahlrichtung integriert ein Molekül an einer festen Position über die Intensitätsverteilung senkrecht zur Strahlrichtung. Die Zahl der Anregungszyklen ist proportional zu

$$N_{\text{OPE}}(u) = \int_0^\infty v h(u, v) dv \quad \text{bzw.} \quad N_{\text{TPE}}(u) = \int_0^\infty v h^2(u, v) dv \quad . \quad (2.30)$$

Aus Gründen der Energieerhaltung ist aber $N_{\text{OPE}}(u)$ konstant: durch jede Ebene senkrecht zum Laserstrahl muß die gleiche Anzahl Photonen gehen. Bei $N_{\text{TPE}}(u)$ ist dies nicht mehr der Fall, diese Funktion fällt mit u ab, so daß Moleküle außerhalb des Fokus' nicht mehr bleichen. Das Ergebnis dieses Effekts ist in Abbildung 2.15 dargestellt [100]. Ein Polymerfilm, der mit Farbstoff dotiert ist, wurde in x -Richtung bei hoher Anregungsintensität abgerastert (durch die dünnen Linien angedeutet), während der Strahl sich in z Richtung ausbreitet. Anschließend wurde die Verteilung der noch fluoreszierenden Moleküle bei niedriger Intensität in beiden Dimensionen abgebildet. Im Fall der Ein-Photonen-Anregung fluoresziert wegen des Photobleichens keines der Moleküle in Strahlrichtung vor und hinter dem eigentlich untersuchten Bereich nicht mehr. Bei Zwei-Photonen-Anregung bleichen hauptsächlich nur die Moleküle, die auch untersucht wurden.

2.3.3 Detektionseffizienz

Damit die Fluoreszenz einzelner Moleküle detektiert werden kann, muß zum einen die Hintergrundfluoreszenz durch Reduktion des Anregungs- und Detektionsvolumens verringert (wie im letzten Abschnitt dargestellt), zum anderen die Fluoreszenz eines Moleküls im Zentrum des Fokus zu einem möglichst hohen Anteil eingesammelt werden. Dieser Aspekt soll nun diskutiert werden.

Eine punktförmige Lichtquelle im Fokus eines Objektivs strahlt in alle Raumrichtungen ab. Von diesem Licht passiert ein Kegel mit dem halben Öffnungswinkel α das Objektiv, ohne abgeschattet zu werden. Der Öffnungswinkel α ist über die numerische Apertur (NA) des Objektivs definiert: $NA = n \sin \alpha$, wobei n den Brechungsindex der Umgebung des Moleküls bezeichnet. Der Kegel umfaßt einen Raumwinkel $\Omega = 2\pi(1 - \cos \alpha)$. Sein Verhältnis zum vollen Raumwinkel $\Omega_0 = 4\pi$ liefert die geometrische Detektionseffizienz

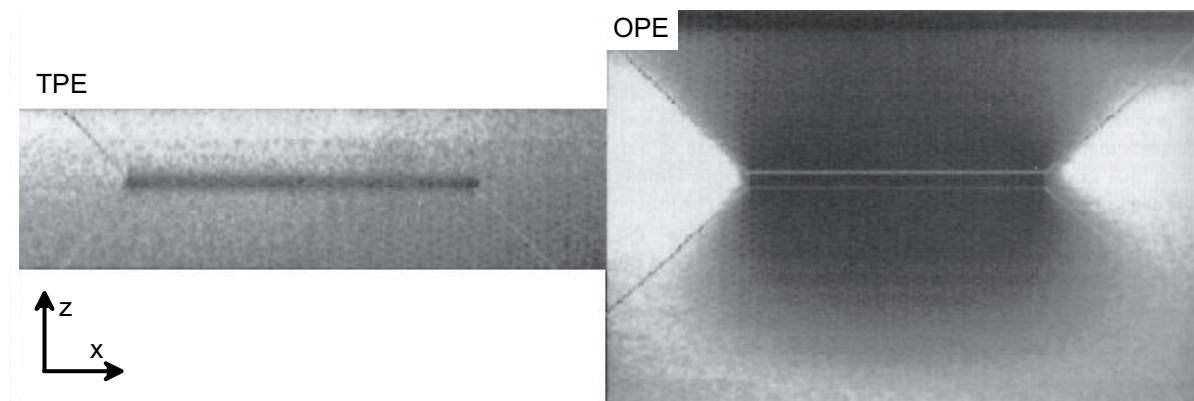


Abbildung 2.15: Lokalisierung der Anregung bei Zwei-Photonen-Anregung (TPE). Bei TPE werden nur die Moleküle angeregt, die auch detektiert werden. Hier wurde die Probe in x -Richtung abgerastert (dünne Linien) und danach die verbleibenden Moleküle abgebildet [100]. Bei Ein-Photonen-Anregung (OPE) sind große Bereich vor und hinter dem eigentlich abgebildeten Bereichs gebleichen, erscheinen also dunkel.

η_{geo} :

$$\eta_{\text{geo}} = \frac{1}{2} (1 - \cos \alpha) \quad . \quad (2.31)$$

Das bei den Experimenten verwendete Objektiv hat eine numerische Apertur $\text{NA} = 1.2$. Für auf Glas präparierte Proben muß der Brechungsindex n_g von Glas $n_g = 1.5$ angenommen werden, so daß der halbe Öffnungswinkel $\alpha = 53^\circ$ beträgt. Damit ergibt sich eine geometrische Detektionseffizienz $\eta_{\text{geo}} = 20\%$.

Bei dieser Rechnung ist nicht berücksichtigt, daß das Molekül nicht vollständig von Glas umgeben ist, sondern sich auf einer Glas-Luft oder Glas-Wasser-Grenzfläche befindet. Die Abstrahlcharakteristik des Moleküls wird also nicht völlig symmetrisch sein. Detaillierter läßt sich die Abstrahl- und damit Detektionscharakteristik eines Moleküls nahe einer Grenzfläche mit einer Methode untersuchen, wie sie z.B. von J. Enderlein [107, 108] oder J. Y. Courtois *et al.* [109] vorgestellt wurde. Das Molekül wird als Hertz'scher Dipol angenommen. Dessen Abstrahlcharakteristik ist gleich seiner Absorptionscharakteristik [109]. Es wird untersucht, wie gut ein gegebener Dipol eine ebene Welle absorbiert, die aus der durch die Raumwinkel (θ, ϕ) definierten Richtung einläuft. Dieses Verfahren soll im folgenden anhand von Ref. [109] vorgestellt werden.

Der Dipol befinde sich im Abstand z zur Grenzfläche. Der Raum wird in drei Teilbereiche unterteilt (siehe Abbildung 2.16). Region I umfaßt den gesamten Halbraum, in dem sich das Molekül befindet. Dieser Halbraum wird als homogen angenommen, z.B. als Wasser-Deckschicht oder als sehr dicker Polymerfilm. Der andere Halbraum kann weitere Grenzflächen beinhalten, wie es durch die graue Zwischenschicht in Abbildung 2.16 angedeutet ist. Eine Erweiterung, in der auch Region I Grenzflächen beinhalten kann, ist in Ref. [107] dargestellt. Typischerweise besteht der zweite Halbraum aus Glas. Sein Brechungsindex n_g ist also höher als der von Region I n_w . Deswegen wird er in zwei Regionen unterteilt. Licht aus Region II kann die Grenzfläche passieren, solches aus Region III wird totalreflektiert (*total internal reflection*, TIR). Der Grenzwinkel θ_{TIR} beträgt

$$\theta_{\text{TIR}} = \arcsin \frac{n_w}{n_g} \quad . \quad (2.32)$$

Die einfallende Welle kann s oder p-polarisiert sein ($a = s$ oder p). Ebenso kann der Dipol senkrecht oder parallel zur Grenzfläche orientiert sein ($b = s$ oder p), wobei im

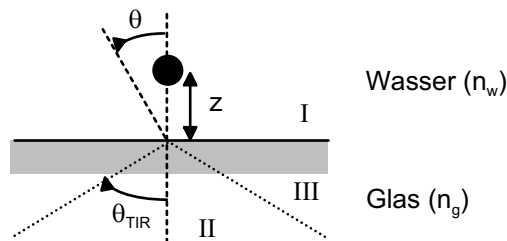


Abbildung 2.16: Verwendete Bezeichnung der einzelnen Regionen. Das Molekül befindet sich im Abstand z zur Grenzfläche. Der Grenzwinkel der Totalreflexion θ_{TIR} trennt die Regionen II und III.

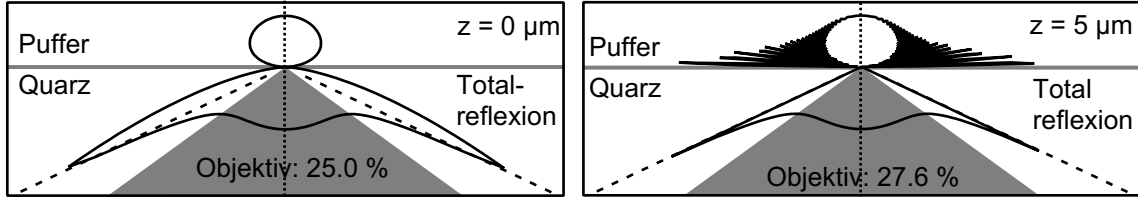


Abbildung 2.17: Abstrahlcharakteristik von einer isotropen Anordnung von Dipolen (z.B. Hämocyanin) nahe einer Grenzfläche. Sie ist rotationssymmetrisch um die senkrechte Achse. Integration über den Detektions-Raumwinkel des Objektivs liefert Detektionseffizienzen um 25 %, die leicht mit dem Abstand zur Grenzfläche variieren.

Fälle senkrechter Orientierung und s-Polarisation keine Absorption stattfindet. Damit ergibt sich für die drei Regionen eine Winkelabhängigkeit der Absorption $L_{ab}(\theta)$ des Dipols von [109]

$$L_{ab}^I = n_w A_{ab} |1 + r_a \exp(2ikz \cos \theta)|^2, \quad (2.33)$$

$$L_{ab}^{II} = n_g A_{ab} |t_a|^2, \quad (2.34)$$

$$L_{ab}^{III} = n_g A_{ab} |t_a|^2 \exp \left(-2kz \sqrt{\frac{n_g^2}{n_w^2} \sin^2 \theta - 1} \right) \quad (2.35)$$

mit

$$A_{ps} = \sin^2 \theta, \quad A_{pp} = \cos^2 \theta, \quad A_{sp} = 1, \quad A_{ss} = 0. \quad (2.36)$$

r_a und t_a bezeichnen die Fresnel'schen Reflexions- und Transmissionskoeffizienten für entsprechend polarisierte Wellen. Sie beinhalten die Eigenschaften der Grenzfläche bzw. der aufeinander folgenden Grenzflächen [109, 103]. Die Struktur der Gleichungen ist einseitig: Für Licht aus Region I findet Absorption sowohl auf direktem Weg (die 1 in Gl. 2.33), als auch über Reflektion an der Grenzfläche statt. Beide Terme können interferieren und müssen phasenrichtig addiert werden. Licht aus Region II passiert die Grenzfläche ungehindert und wird nur durch den Transmissionskoeffizienten moduliert. Aus Region III kann Licht nur dann absorbiert werden, wenn das Molekül sich innerhalb des evaneszenten Feldes nahe der Grenzfläche befindet. Dies beschreibt die Exponentialfunktion in Gl. 2.35.

Einzelne Farbstoffe frei in Lösung oder die vielen Tryptophan-Seitenketten in Hämocyanin können als isotrop orientiert angenommen werden. Diese isotrope Anordnung lässt sich durch Mittelung über alle drei Funktionen L_{ps} , L_{pp} , L_{sp} berechnen [110]. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.17 dargestellt. Als Parameter wurden für Tryptophan typische Werte angenommen ($n_g = 1.5$, $n_w = 1.33$, $\lambda = 350$ nm, $NA = 1.2$). Die Detektionseffizienz kann durch Integration über den Detektions-Raumwinkelbereich des Objektivs bestimmt werden. Sie beträgt etwa 25 % und variiert leicht mit dem Abstand zur Grenzfläche. Dies rührt nicht von einem veränderten Photonenstrom in das Objektiv her (Gl. 2.34 hängt nicht von z ab), sondern von einer geringeren Gesamtemission, wenn sich das Molekül in größerer Entfernung zur Grenzfläche befindet. Es kann dann nicht mehr an die evaneszenten Moden koppeln.

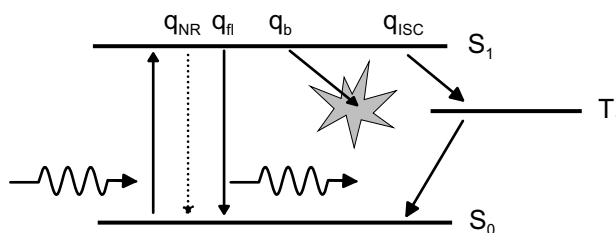


Abbildung 2.18: Mögliche photodynamische Prozesse eines Moleküls in vereinfachter Darstellung (es sind nur die elektronischen Niveaus eingezeichnet). Ein angeregtes Molekül kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit q strahlungslos rekombinieren (q_{NR}), ein Photon emittieren (q_{fl}), in den Triplett-Zustand übergehen (q_{ISC}) oder photobleichen (q_b).

Der Sprung im Brechungsindex an der Glas-Wasser-Grenzfläche führt zu einer verbesserten Detektionseffizienz (25 statt 20 %). Wenn das Objektiv eine höhere numerische Apertur hätte, so daß es auch aus Region III detektieren könnte, so wäre die Abstandsabhängigkeit der Detektionseffizienz ausgeprägter.

In einem gewissen Sinne ist dieser Abschnitt komplementär zum vorangegangenen: Hier wurden die Brechungsindizes der Umgebung des Moleküls vollständig berücksichtigt, dafür allerdings die Position des Moleküls auf das Zentrum des Fokus festgelegt. Im vorangegangenen Abschnitt mußte der Brechungsindex als konstant angenommen werden, um die räumliche Variation der Detektionseffizienz, die *point spread function* bestimmen zu können. Für die vollständige Lösung dieses Problems, die sowohl eine räumliche Variation der Detektionseffizienz als auch des Brechungsindex beinhaltet, sei hier auf Ref. [111] verwiesen.

2.3.4 Photodynamik

Abbildung 2.18 zeigt ein vereinfachtes Schema von einigen der möglichen photodynamischen Prozesse eines Moleküls. Durch Absorption eines Photons im Grundzustand S_0 gelangt das Molekül in seinen ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 . Von dort kann es auf verschiedenen Wegen zum Grundzustand zurückkehren, wobei jeder Prozeß mit einer Wahrscheinlichkeit q erfolgt. Es kann strahlungslos rekombinieren (q_{NR}), ein Photon emittieren (q_{fl}), in den Triplett-Zustand übergehen (q_{ISC}) oder photobleichen (q_b). Unter dem Begriff „Photobleichen“ seien hier rein phänomenologisch alle die Prozesse zusammengefaßt, die zu einem unwiderruflichen Dunkelzustand des Moleküls führen, so daß es also keine weiteren Photonen emittieren kann. In Kapitel 4.3.3 werden einige mögliche Ursachen des Photobleichens diskutiert. Wie die Wahrscheinlichkeiten q hier eingeführt wurden, muß ihre Summe Eins ergeben. Die Wahrscheinlichkeit q_{fl} , daß ein Photon emittiert wird, bezeichnet man auch als Fluoreszenz-Quanteneffizienz, für die im folgenden das Symbol η verwendet wird.

Ein solches System zeigt auf verschiedenen Zeitskalen unterschiedliche Effekte, wenn der emittierte Photonenstrom bei konstanter Anregung betrachtet wird. Für sehr kurze Zeiten läßt sich das sog. *photon antibunching* [21, 112] feststellen: ein einzelnes Molekül

kann nicht zwei Photonen zum gleichen Zeitpunkt aussenden. Direkt nach der Emission eines Photons muß es sich im Grundzustand befinden, aus dem es nicht emittieren kann. Auf längeren Zeitskalen findet das sog. *photon bunching* [23, 112] statt: solange sich das Molekül im Triplett-Zustand befindet, kann es keine Photonen emittieren, so daß Dunkelphasen im Fluoreszenz-Photonenstrom festzustellen sind. Dadurch werden die Photonen in Paketen emittiert, die durch Triplett-Phasen unterbrochen sind. Nach einer typischerweise noch längeren Zeit bleicht dann der Farbstoff, so daß keine weiteren Photonen detektiert werden können. Wenn sich allerdings die Moleküle in Lösung befinden, so kann durch Diffusion ein gebliches Molekül im Fokus durch ein intaktes ersetzt werden, so daß dadurch der Photonenstrom wieder beginnt. In diesem Fall ist also eine zweite Art von Dunkelphasen erkennbar, die durch Photobleichen und Diffusion bestimmt ist.

Das Problem bei der Beschreibung von Prozessen, die Diffusion mit einbeziehen, ist die unendliche Ausdehnung des Fokus. Unabhängig in welcher Näherung der Fokus beschrieben wird, gibt es keine Grenze, außerhalb derer die Detektionswahrscheinlichkeit Null wäre. In einem ersten Schritt wird darum ein äquivalenter Fokus konstruiert, der in bezug auf die Photodynamik die gleichen Eigenschaften ausweist, aber scharfe Grenzen besitzt. Die Detektionswahrscheinlichkeit soll innerhalb dieser Grenzen konstant Eins und außerhalb Null sein.

Das Volumen eines solchen Fokus läßt sich dadurch definieren, daß jedes Volumenelement mit seiner Detektionswahrscheinlichkeit gewichtet und dann über den ganzen Raum integriert wird [113]. Hier soll ein gaußförmiger Fokus mit der oben beschriebenen Zwei-Photonen-Mikroskopie angenommen werden. Für die Molekül-Detektions-Effizienz (MDE) gilt dann

$$\text{MDE}(\mathbf{r}) = \frac{\omega_0^2}{\omega^4(z)} \exp\left(-\frac{4r^2}{\omega^2(z)}\right) \quad (2.37)$$

mit $\omega^2(z) = \omega_0^2(1 + z\lambda/\pi\omega_0^2)$. λ bezeichnet die Anregungswellenlänge und ω_0 den $1/e$ -Radius des elektrischen Feldes im Fokus. Integration liefert das effektive Fokalkvolumen V_{eff} :

$$V_{\text{eff}} = \int \text{MDE}(\mathbf{r}) dV = \pi^3 \omega_0^4 / 4\lambda \quad . \quad (2.38)$$

Mit dieser Definition ergibt sich direkt die Fluoreszenzzählrate einer Ensemble-Probe, bei der sich mehrere Moleküle im Fokalkvolumen befinden: Von einem einzelnen Molekül im Zentrum des Fokus lassen sich F_1 Photonen pro Sekunde detektieren

$$F_1 = \alpha \eta \phi \quad . \quad (2.39)$$

Dabei bezeichnet α die Anregungsrate im Zentrum des Fokus, η die Fluoreszenz-Quanteneffizienz (q_{fl} in Bild 2.18) und ϕ die Detektionseffizienz, also die Wahrscheinlichkeit, ein Photon zu detektieren, das im Zentrum des Fokus ausgesandt wurde. Der Zusammenhang zwischen der Anregungsrate α und der Anregungsintensität wird in Abschnitt

2.4.4 für die Zwei-Photonen-Anregung hergeleitet werden. Für die Gesamt-Zählrate F gilt dann

$$F = C \alpha \eta \phi \int \text{MDE}(\mathbf{r}) dV = C \alpha \eta \phi V_{\text{eff}} \quad , \quad (2.40)$$

wobei C die Farbstoffkonzentration bezeichnet. Die Abhängigkeit der Anregungsrate und der Detektionseffizienz vom Ort des Moleküls ist in der Molekül-Detektions-Effizienz $\text{MDE}(\mathbf{r})$ zusammengefaßt. Der konstruierte äquivalente Fokus – beschrieben durch das effektive Volumen – liefert also die gleiche Zählrate wie die Integration über den wirklichen, bis ins Unendliche ausgedehnten Fokus.

Später wird noch ein Maß für die Schärfe der Grenzen des Fokus benötigt werden. Diese läßt sich mit dem Volumen-Kontrast-Faktor γ quantifizieren. Er ist definiert als [113,114]

$$\gamma = \frac{\int \text{MDE}(\mathbf{r})^2 dV}{\int \text{MDE}(\mathbf{r}) dV} \quad . \quad (2.41)$$

Bei scharfen Grenzen, wenn also $\text{MDE}(\mathbf{r})$ nur die Werte Null und Eins annimmt, gilt $\gamma = 1$, für Zwei-Photonen-Anregung im Rahmen der Gauß-Optik $\gamma = 3/16$.

Mit diesen Definitionen läßt sich nun das durch Abbildung 2.18 beschriebene Differentialgleichungssystem lösen [114]. Die Diffusion wird dadurch einbezogen, daß jeder Zustand mit einer Rate $1/\tau_D$ aus den äquivalenten Fokus hinaus diffundieren kann, aber nur der Grundzustand S_0 mit eben dieser Rate auch wieder hinein diffundiert. Die Umgebung des Fokus wird als Reservoir angesehen, in dem keine Moleküle im angeregten oder Triplett-Zustand vorliegen. Die Besetzungswahrscheinlichkeit des Grundzustandes S_0 ist identisch mit dem Verhältnis R zwischen der Konzentration der aktiven, d.h. am Fluoreszenzzyklus teilnehmenden Moleküle zu der aller Moleküle. Es gilt dann [114]

$$R = \frac{C_{\text{aktiv}}}{C_{\text{ges}}} = \frac{1}{1 + \gamma \alpha \bar{\tau}} \quad \text{mit} \quad \bar{\tau} = q_b \tau_D + q_{ISC} \frac{\tau_T \tau_D}{\tau_T + \tau_D} \quad . \quad (2.42)$$

Dabei bezeichnet τ_D die Aufenthaltszeit des Moleküls im Fokus, also die Zeit zwischen dem ersten Betreten und dem letzten Verlassen des Fokalvolumens und τ_T die Triplett-Lebenszeit. Gewichtet mit der Wahrscheinlichkeit der Prozesse ergeben sie zusammen die mittlere Dunkelzeit $\bar{\tau}$. Der Quotient im rechten Summanden rührt daher, daß ein Molekül im Triplett-Zustand auch aus dem Fokus diffundieren kann und durch ein anderes im Grundzustand ersetzt wird.

Ein Zusammenhang zwischen der mittleren Aufenthaltszeit im Fokus τ_D und dem Diffusionskoeffizienten D läßt sich nur über eine numerische Lösung der Diffusionsgleichung für die reale Intensitätsverteilung des Fokus herstellen [114]. Die Konzentration der aktiven Moleküle am Ort $\mathbf{r}$ ändert sich entweder durch Diffusion oder durch Photobleichen, also

$$\frac{\partial}{\partial \tau} C(\tau, \mathbf{r}) = D \nabla^2 C(\tau, \mathbf{r}) - q_b \alpha \text{MDE}(\mathbf{r}) C(\tau, \mathbf{r}) \quad . \quad (2.43)$$

Daraus ergibt sich pro Parametersatz im Gleichgewichtszustand eine Konzentrationsverteilung $C(\mathbf{r})$, die in die Konzentration C_{aktiv} des äquivalenten Fokus umgerechnet werden kann. Die Abhängigkeit von der Fokusform läßt sich dann für den Fokus in der Näherung der Gauß-Optik parametrisieren [114]:

$$\tau_D \approx \frac{\omega_0^2}{1.8 D} \ln \left(6 \frac{\pi \omega_0}{\lambda} \right) \quad . \quad (2.44)$$

Durch die Einführung des äquivalenten Fokus ist es also möglich, die Photodynamik von Fluorophoren auch in Lösung zu untersuchen. Obwohl sich die individuelle Anregungsrate eines Moleküls durch Diffusion durch den Fokus ständig ändert, kann das *gemittelte* Verhalten der Moleküle beschrieben werden. Die Untersuchung individueller Moleküle verlangt aber weiterhin, daß diese immobilisiert sind.

2.3.5 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Diffusion von einzelnen Molekülen in das und aus dem Detektionsvolumen führt zu charakteristischen Variationen in der Fluoreszenzzählrate, wie es im letzten Abschnitt anhand der mittleren Dunkelzeit $\bar{\tau}$ dargestellt wurde. Die von einem Molekül emittierten Photonen sind miteinander korreliert, da sie alle innerhalb der Transit-Zeit durch den Fokus emittiert worden sind. Diese Art der Korrelation innerhalb einer Fluoreszenzzeitspur läßt sich mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) analysieren. Die FCS ist in dem Sinne eine Einzelmolekül-Methode, da ein einzelnes Molekül Intensitätsfluktuationen durch das Verlassen des Fokus' hervorruft. Die relative Stärke der Fluktuation wird geringer, wenn die Anzahl der Moleküle im Fokus steigt, da dann auch die lokale Konzentrationsfluktuation verschwindet. Andererseits benötigt die statistische Methode der Korrelationsanalyse sehr viele solcher Transit-Ereignisse, um Aussagen über die Moleküle treffen zu können. Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie der Diffusion daher nichts über *ein einzelnes* Molekül aussagen.

Die Methodik der FCS geht zurück auf Elson und Madge, die 1974 kinetische Konstanten von chemischen Reaktionen bestimmt haben, in dem sie die Dämpfungsraten von spontanen Konzentrationsfluktuationen untersuchten [115]. Durch die konfokale Mikroskopie ist es möglich geworden, das Detektionsvolumen deutlich zu verkleinern, so daß Konzentrationsfluktuationen ausreichen, wie sie durch einzelne Moleküle hervorrufen werden [116]. Die starke Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz ermöglicht es, die FCS in vielen verschiedenen Medien einzusetzen. Eine Einführung in die Methode liefert Ref. [113], und Ref. [20] gibt einen Überblick über aktuelle Untersuchungen. Hier seien exemplarisch nur einige Veröffentlichungen genannt: Zunächst ist die Translations-Diffusion direkt zugänglich [117]. Weiterhin läßt sich aber auch molekulare Dynamik auf einer kürzeren Zeitskala innerhalb des durch die Diffusion gegebenen Zeitfensters untersuchen. Ein Beispiel dafür ist die Fluktuation der Konformation von DNA-Molekülen [31] oder des Proteins GFP [34]. Letztere ist pH abhängig und kann so als lokaler Sensor verwendet werden. Zusammen mit der Zwei-Photonen-Anregung ist es möglich, die Diffusion innerhalb einer Zelle zu verfolgen [118] und dabei eine Ortsauflösung von wenigen Mikrometern zu erreichen [36].

Die Autokorrelation $G(\tau)$ einer Größe $A(t)$ ist definiert als [112]

$$G(\tau) = \langle A(t) A(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T A(t) A(t + \tau) dt \quad . \quad (2.45)$$

Anschaulich beschreibt die Autokorrelationsfunktion, wie ähnlich sich eine Größe A nach einem Zeitintervall τ noch ist. Falls A konstant ist, so ist $G(\tau)$ ebenfalls konstant. Der Einfluß des absoluten Wertes von A läßt sich durch Normierung beseitigen:

$$g(\tau) = \frac{\langle A(t) A(t + \tau) \rangle}{\langle A \rangle^2} - 1 = \frac{\langle \delta A(t) \delta A(t + \tau) \rangle}{\langle A \rangle^2} \quad , \quad (2.46)$$

wobei $\delta A(t) = A(t) - \langle A \rangle$. Gleichzeitig wurde die Kurve so verschoben, daß nun $g(\tau \rightarrow \infty) \rightarrow 0$.

In der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) wird die Autokorrelation der Fluoreszenzintensität F gemessen. Die Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$ wird, weil Intensitäten und nicht Amplituden korreliert werden, oft auch Intensitäts-Korrelationsfunktion oder Korrelationsfunktion zweiter Ordnung ($g^{(2)}(\tau)$) genannt. Da im Rahmen dieser Arbeit immer nur dieser Typ von Korrelationsfunktionen bestimmt wird, wird im folgenden auf den Zusatz *Intensitäts*-Korrelationsfunktion bzw. den Index (2) verzichtet.

Im folgenden soll der Ausdruck für die Autokorrelationsfunktion $g^{(2)}(\tau)$ bei Translationsdiffusion für verschiedene Fokusgeometrien dargestellt werden. Die Herleitung folgt dabei N. L. Thompson [113]. Fluktuationen δF der Fluoreszenzintensität werden durch Fluktuationen δC der lokalen Konzentration der Fluorophore ausgelöst. Mit Gl. 2.40 gilt der Zusammenhang

$$\delta F = \alpha \eta \phi \int \text{MDE}(\mathbf{r}) \delta C(\mathbf{r}) dV \quad . \quad (2.47)$$

Damit folgt für die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität

$$g(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (2.48)$$

$$= \frac{\int \int \text{MDE}(\mathbf{r}) \text{MDE}(\mathbf{r}') \langle \delta C(\mathbf{r}, t) \delta C(\mathbf{r}', t + \tau) \rangle d\mathbf{r} d\mathbf{r}'}{[\langle C \rangle \int \text{MDE}(\mathbf{r}) d\mathbf{r}]^2} \quad . \quad (2.49)$$

Die Diffusionsgleichung für Translationsdiffusion

$$\frac{\partial}{\partial \tau} C(\tau, \mathbf{r}) = D \nabla^2 C(\tau, \mathbf{r}) \quad (2.50)$$

liefert durch Fouriertransformation und Bildung des Ensemble-Mittelwerts einen Term für die Autokorrelation der Konzentrationsfluktuationen [113]:

$$\langle \delta C(\mathbf{r}, t) \delta C(\mathbf{r}', t + \tau) \rangle = \langle C \rangle (4\pi D \tau)^{3/2} \exp \left(-|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|^2 / 4 D \tau \right) \quad . \quad (2.51)$$

Der verwendete experimentelle Aufbau bestimmt die Größe und Form des Detektionsvolumens, das durch die Molekül-Detektions-Effizienz $MDE(\mathbf{r})$ beschrieben wird. Je nach Fokusgeometrie liefert Gl. 2.49 darum ein unterschiedliches Ergebnis. Für den Fall der Ein-Photonen-Anregung bei konfokaler Detektion haben Rigler *et al.* [117] gezeigt, daß sich $MDE(\mathbf{r})$ durch eine dreidimensionale Gauß-Funktion mit den $1/e^2$ -Radien ω_0 (senkrecht zur Strahlrichtung) und z_0 (in Strahlrichtung) annähern läßt:

$$MDE(\mathbf{r}) = \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega_0^2}\right) \exp\left(-\frac{2z^2}{z_0^2}\right) \quad . \quad (2.52)$$

Ein solcher Fokus hat mit den Definitionen aus Abschnitt 2.3.4 ein Volumen V_{eff} und ein Volumen-Kontrast-Faktor γ von

$$V_{\text{eff}} = \int MDE(\mathbf{r}) dV = \sqrt{\pi^3/8} \omega_0^2 z_0 \quad \text{und} \quad \gamma = \frac{1}{\sqrt{8}} \approx 0.35 \quad . \quad (2.53)$$

Diese Fokusgeometrie hat den Vorteil, daß sich die Korrelationsfunktion $g(\tau)$ der freien Diffusion (Gl. 2.49) leicht berechnen läßt [113, 36]

$$g(\tau) = \frac{\gamma}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{AC}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\omega_0^2 \tau}{z_0^2 \tau_{AC}}\right)^{-1/2} \quad \text{mit} \quad \tau_{AC} = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad . \quad (2.54)$$

Die charakteristische Autokorrelationszeit τ_{AC} ist zu unterscheiden von der Aufenthaltszeit τ_D im Fokus [114]. Die mittlere Konzentration der Moleküle ist mit $\langle C \rangle$ bezeichnet und $N = V_{\text{eff}} \langle C \rangle$ beschreibt die Anzahl der Moleküle im effektiven Fokalkvolumen. Alternativ kann auch die Amplitude der Autokorrelationsfunktion im Zeitnullpunkt direkt als inverse Teilchenzahl angenommen werden, also

$$N' = \frac{1}{g(0)} = \frac{N}{\gamma} \quad . \quad (2.55)$$

In diesem Fall wird auch das effektive Volumen anders definiert, so daß

$$V'_{\text{eff}} = V_{\text{eff}}/\gamma \quad \text{und} \quad N' = V'_{\text{eff}} \langle C \rangle \quad . \quad (2.56)$$

Schon in der Arbeit von Rigler *et al.* [117] wird darauf hingewiesen, daß die Parameter ω_0 und z_0 des Fokus effektive Parameter sind. Wenn die wirkliche Feldverteilung im Fokus bestimmt und Gleichung 2.52 daran angepaßt wird, so ergeben sich andere Parameter ω_0 und z_0 als zur Beschreibung der Autokorrelation (bei bekanntem Diffusionskoeffizienten) benötigt werden. Je nach Durchmesser des Detektionsspinholes ergeben sich gerade bei z_0 Abweichungen um den Faktor 2–4.

Bei der Zwei-Photonen-Anregung ergibt sich in der Näherung von $MDE(\mathbf{r})$ durch die dreidimensionale Gauß-Funktion (Gl. 2.52) eine Autokorrelationszeit τ_{AC} von [36]

$$\tau_{AC} = \frac{\omega_0^2}{8D} \quad . \quad (2.57)$$

Auch in diesem Fall muß die Fokusgröße als effektiver Parameter gesehen werden, insbesondere da der Pinhole-Durchmesser nicht mehr zur Variation des Detektionsvolumens zur Verfügung steht. Ansonsten führt dies zu nicht konsistenten absoluten Werten der Fokusgröße, der Konzentration C und des Diffusionskoeffizienten D , wenn diese mit aus unabhängigen Messungen gewonnenen Werten verglichen werden [118, 36]. In keinem Fall stimmen alle Fit-Parameter gleichzeitig mit den realen Werten überein. Die Fokusgröße muß durch Vergleichsmessung einer Probe mit bekanntem Diffusionskoeffizienten bestimmt werden und nicht durch Abtasten der Intensitätsverteilung. Eine andere Möglichkeit ist, den Fokus nicht mehr durch eine dreidimensionale Gauß-Funktion, sondern durch seine Gauß-Lorentz-Form im Rahmen der Gauß-Optik zu beschreiben (Gl. 2.37, S. 34). Dies haben Berland *et al.* [118] vorgestellt. Die Integrale in Gl. 2.49 lassen sich dadurch allerdings nicht mehr vollständig auflösen, so daß sich für die Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$ ergibt

$$g(\tau) = \frac{4}{\omega_0^3 C \sqrt{a} \pi^{5/2}} \int db \frac{\exp(-z_0^2 b^2 / 2D\tau)}{b^4 + (2+a)b^2 + (a/2)^2} \times \left[\frac{2b^2 + a - 4}{(2+b^2)\sqrt{2}} + \frac{2}{\sqrt{2+b^2+a}} \right] \quad (2.58)$$

mit $a = 16D\tau/\omega_0^2$ und $z_0 = \pi\omega_0^2/\lambda$. Hier stimmen die wirkliche Fokusgeometrie und die von der Autokorrelation geforderte überein.

Der Unterschied dieser beiden Näherungen der Fokusform und der daraus folgenden Autokorrelationsfunktionen ist in Abbildung 2.19 dargestellt. In einer Monte-Carlo-Simulation wurde die Diffusion von Molekülen durch einen Gauß-Lorentz-förmigen Fokus ($\omega_0 = 430$ nm, $\lambda = 580$ nm) über $2.6 \cdot 10^6$ Zeitschritte t_{MC} verfolgt. Das betrachtete Volumen betrug $4 \times 4 \times 20 \mu\text{m}^3$ bei einer Konzentration von 5 Molekülen/ μm^3 . Der Diffusionskoeffizient wurde auf $D = 2.67 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/t_{MC}$ festgesetzt. Wenn ein Molekül das Simulationsvolumen verläßt, wird es zufällig an einer neuen Position am Rand des Volumens wieder eingesetzt. In jedem Zeitschritt wurde die Molekül-Detektions-Effizienz $\text{MDE}(\mathbf{r})$ über alle Moleküle summiert. Dies bildet einen Punkt der Zeitspur. Die Poisson-Verteilung der Photonenstatistik wurde also nicht berücksichtigt, was einer unendlich großen molekularen Helligkeit entspricht. Der Mittelwert der Zeitspur entspricht einer Konzentration von 3.7 Molekülen / μm^3 , was darauf hindeutet, daß das Simulationsvolumen noch zu klein ist. Ein größeres hätte die Rechenzeit aber zu sehr verlängert. Aus der Zeitspur wurde die Autokorrelation berechnet und an diese die Modelle von Berland *et al.* [118] sowie das der dreidimensionalen Gauß-Funktion angepaßt. Die wichtigsten Teile der Simulation sind im Anhang A.1 als IDL-Quelltext angegeben. Die Ergebnisse faßt Tabelle 2.1 zusammen. Bei der Autokorrelationsfunktion Gl. 2.54 kann je nach angenommenem Fokusradius ω_0 entweder der Diffusionskoeffizient oder die Teilchenzahl mit den Vorgaben zur Übereinstimmung gebracht werden. Bei der Anpassung von Gl. 2.58 liefert der vorgegebene Wert von ω_0 sowohl den richtigen Diffusionskoeffizienten als auch die richtige Teilchenzahlkonzentration. Wenn die Autokorrelation also nicht durch einen Farbstoff mit bekannten Diffusionskoeffizienten geeicht werden kann, so muß im Fall der Zwei-Photonen-Anregung die Anpassung mit Gl. 2.58 nach Berland *et al.* erfolgen, um richtige Absolutwerte zu erhalten. Aber auch in diesem Fall muß der Fokusradius ω_0 vor-

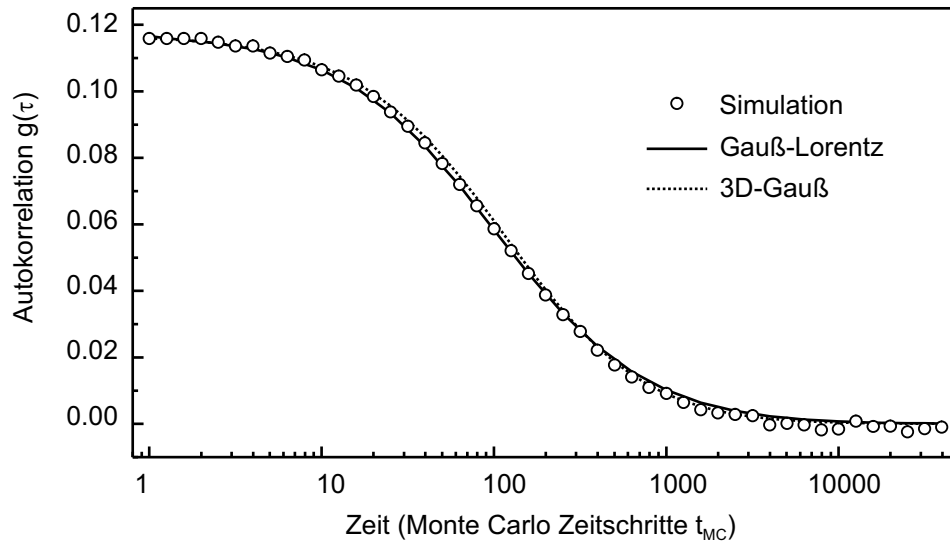


Abbildung 2.19: Monte Carlo Simulation der Diffusion durch einen Fokus im Rahmen der Gauß-Optik. An die simulierten Daten wurde die Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$ in der Näherung des Fokus durch eine dreidimensionale Gauß-Funktion (Gl. 2.54) und ohne diese Näherung (Gl. 2.58) angepaßt.

her bekannt sein. Eine Vereinfachung in dieser Hinsicht scheint die kürzlich von Enderlein und Böhmer vorgestellte Methode zu sein [119], die sowohl $MDE(\mathbf{r})$ als auch die Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$ direkt ausgehend von den Daten des Mikroskopobjektivs und des Laserstrahls *vor* dem Objektiv berechnet.

Berechnung des Diffusionskoeffizienten aus dem Sedimentationskoeffizienten

Für einige Moleküle, insbesondere Proteine, liegen in der Literatur keine Diffusionskoeffizienten vor; im folgenden werden sie jedoch z.B. zur Berechnung der Transit-Zeiten durch den Fokus τ_D benötigt. Der Diffusionskoeffizient kann wie folgt aus dem Sedi-

Parameter	3D Gauß		Gauß-Lorentz	Simulation
$\tau_{AC} (t_{MC})$	108			
z_0/ω_0	3.5			
Amplitude	0.117			
ω_0 (nm)	430	510	430	430
D ($10^{-4} \mu\text{m}^2/t_{MC}$)	1.9	2.67	2.67	2.67
C (μm^{-3})	3.5	1.8	3.5	3.7

Tabelle 2.1: Ergebnisse der Anpassung der Modelle an die simulierten Daten aus Abbildung 2.19. Bei der 3D-Gauß-Funktion stimmt je nach angenommenem ω_0 entweder die Konzentration oder der Diffusionskoeffizient mit der Vorgabe überein. Wenn die Autokorrelationsfunktion auf Grundlage der Gauß-Lorentz-Form des Fokus berechnet wird, so stimmen *beide* Parameter bei dem vorgegebenen Fokusradius überein.

mentationskoeffizienten s berechnet werden, der gerade für Proteine gut bekannt ist (für Hämocyanin z.B. Ref. [120]): Der Sedimentationskoeffizient s verknüpft die Sedimentationsgeschwindigkeit v_s mit der in der Zentrifuge herrschenden Beschleunigung $a = r \omega^2$ [121]:

$$v_s = s a = s r \omega^2 \quad . \quad (2.59)$$

Aus dem Gleichgewicht zwischen Zentrifugal- und Reibungskraft läßt sich unter Benutzung der Stokes-Einstein Beziehung zwischen Reibungskoeffizient und Diffusionskoeffizient die Svedberg-Gleichung herleiten [121, 122], die aufgelöst nach D lautet

$$D = \frac{sRT}{M(1 - V\rho)} \quad . \quad (2.60)$$

Dabei bezeichnet R die molare Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Der Sedimentationskoeffizient s , die molekulare Masse M , das spezifische molare Volumen V sowie die Dichte des Lösungsmittels ρ müssen bekannt sein, um damit den Diffusionskoeffizienten zu berechnen.

2.4 Nichtlineare Optik

Die Anregung der Tryptophane soll mit einem Zwei-Photonen-Prozeß erfolgen, um Probleme bei der Mikroskopie im Ultraviolett zu umgehen, wie sie im letzten Abschnitt dargestellt wurden. Zu diesem Zweck müssen kurze Laserpulse im Sichtbaren erzeugt werden, wie im folgenden gezeigt werden wird. Dies geschieht mit den Mitteln der nichtlinearen Optik.

2.4.1 Einführung

Die Wechselwirkung von Licht mit einem dielektrischen Medium läßt sich durch die Suszeptibilität χ beschreiben (soweit nicht anders angegeben folgt diese Einführung Ref. [123, 124]). Ein elektrisches Feld E erzeugt durch Verschieben der Ladungsträger eine Polarisation P , die über die Suszeptibilität χ und die Dielektrizitätskonstante ϵ_0 mit dem Feld E verknüpft ist:

$$P(E) = \epsilon_0 \chi E \quad . \quad (2.61)$$

Dies läßt sich anhand des klassischen Lorentz-Modells verstehen, in dem Elektronen in einem eindimensionalen Potential $V(x)$ gebunden sind. In erster Näherung kann dieses Potential durch ein harmonisches Potential beschrieben werden, so daß die Auslenkung x der Elektronen proportional zum anliegenden Feld E ist. Steigt die Feldstärke des Feldes E an, so wird die Auslenkung x irgendwann so groß, daß die Näherung des Potentials durch eine Parabel nicht mehr gegeben ist und Terme höherer Ordnung im Potential hinzu kommen. Dies führt dann dazu, daß die Auslenkung x und damit auch die Polarisation P ebenfalls in höherer Ordnung vom elektrischen Feld E abhängen:

$$P(E) = \epsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \dots) \quad . \quad (2.62)$$

Durch die Terme höherer Ordnung in E wird das Superpositionsprinzip aufgehoben, so daß Wellen unterschiedlicher Frequenz ω nicht mehr unabhängig behandelt werden können. Ein Prozeß n -ter Ordnung in E mischt n monochromatische Wellen $E(\omega_i)$. Hinzu kommt, daß die einzelnen Wellen E_{ω_i} nicht parallel einfallen müssen und auch die Polarisation P nicht unbedingt parallel zum elektrischen Feld erfolgt. Die Suszeptibilitäten $\chi^{(i)}$ sind darum Tensoren $(i+1)$ -ter Stufe, so daß obige Gl. 2.62 korrekt lautet

$$P_i = \epsilon_0 \left(\sum_j \chi_{ij}^{(1)} E_j(\omega_1) + \sum_{j,k} \chi_{ijk}^{(2)} E_j(\omega_1) E_k(\omega_2) + \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)} E_j(\omega_1) E_k(\omega_2) E_l(\omega_3) + \dots \right), \quad (2.63)$$

wobei $E_i(\omega_j)$ die i -te Vektorkomponente einer monochromatischen Welle mit Frequenz ω_j ist. Die Polarisation P wiederum ist Quelle des elektrischen Feldes E :

$$\nabla^2 E - \epsilon_0 \mu_0 \ddot{E} = \mu_0 \ddot{P} \quad . \quad (2.64)$$

Durch den nichtlinearen Zusammenhang zwischen dem Feld E und der Polarisation P treten in E neue Frequenzkomponenten auf. Dies ist in Abbildung 2.20 dargestellt, wobei die Reihenentwicklung in Gl. 2.62 nach dem quadratischen Glied abgebrochen wurde. Im Ausgangsfeld E ist zusätzlich zur Eingangsfrequenz ω ein Anteil mit Frequenz Null und – anhand der Asymmetrie der positiven und negativen Halbwelle – einer mit doppelter Frequenz zu erkennen. Der erste bewirkt ein Verschieben des Mittelwerts gegenüber dem Eingangsfeld, der zweite eine Asymmetrie der Oszillation um diesen Mittelwert. Der Betrag der Polarisation P ist hier nicht invariant gegenüber Vorzeichenwechsel des elektrischen Feldes E , wie in Teil A der Abbildung zu erkennen ist.

Das Mischen der einzelnen Wellen soll noch etwas genauer betrachtet werden. Die Wellen $E(\omega)$ werden als ebene Wellen angenommen:

$$E(\omega) = \frac{1}{2} \left(\hat{E}(z) e^{-i(\omega t - k z)} + c.c. \right) \quad \text{mit} \quad k = n\omega/c = \omega \sqrt{\epsilon_0 \mu_0 [1 + \chi^{(1)}(\omega)]} \quad .$$

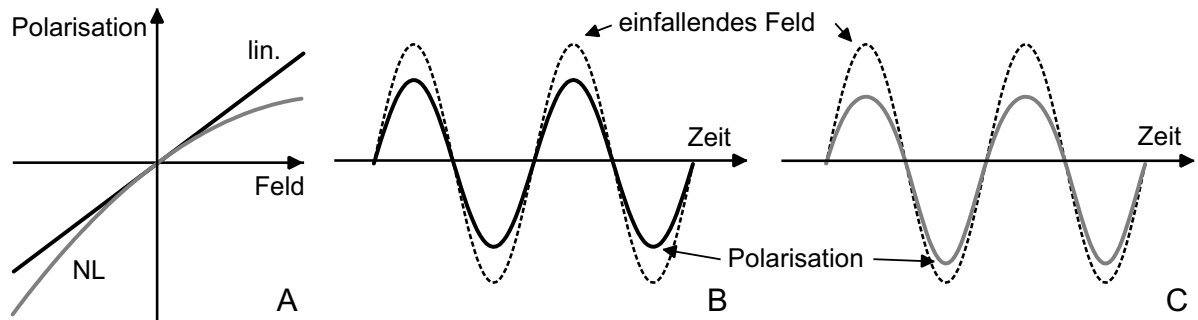


Abbildung 2.20: Einfluß eines nichtlinearen Zusammenhangs zwischen einfallendem Feld E und Polarisation P (Abbildung nach Ref. [124]). A: linearer und nichtlinearer Zusammenhang zwischen E und P . B: im linearen Fall folgt die Polarisation dem Feld. C: im nichtlinearen Fall wird einerseits der Mittelwert verschoben (DC-Anteil des Ausgangsfeldes) und andererseits die Kurve verformt (zusätzlicher Anteil mit doppelter Frequenz).

(2.65)

Die linke Seite der Wellengleichung 2.64 berechnet sich unter der Annahme, daß sich die Amplitude $\hat{E}(z)$ auf der Skala der Wellenlänge nur langsam ändert, zu

$$\nabla^2 E \approx \frac{1}{2} \left(2ik \frac{d\hat{E}(z)}{dz} - k^2 \hat{E}(z) \right) e^{-i(\omega t - k z)} + c.c. \quad , \quad (2.66)$$

$$\epsilon_0 \mu_0 \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = -\epsilon_0 \mu_0 \omega^2 E(\omega) \quad . \quad (2.67)$$

Im kollinearen Fall werden die ersten beiden Glieder von $\ddot{P}$ auf der rechten Seite von Gl. 2.64

$$\mu_0 \ddot{P} = -\mu_0 \epsilon_0 \left(\sum_j \chi_j^{(1)} \omega_j^2 E(\omega_j) + \sum_{j,k} \chi_{jk}^{(2)} (\omega_j + \omega_k)^2 E(\omega_j) E(\omega_k) \right) \quad . \quad (2.68)$$

Wenn die Wellengleichung 2.64 für drei feste, aber verschiedene Frequenzen ω_i für alle Zeiten t erfüllt sein soll, so muß sie zeitunabhängig für jedes ω_i erfüllt sein. Zur Vereinfachung der Schreibweise werden einfallende von ausfallenden Wellen durch das Vorzeichen der Frequenz ω bzw. des Wellenvektors k unterschieden, wobei einfallende Wellen mit einem negativen Vorzeichen versehen werden. Ebenso wird deren Amplitude $\hat{E}$ konjugiert komplex eingesetzt. Der Energieerhaltungssatz läßt sich dann als $\sum \omega_i = 0$ schreiben. Ohne die Energieerhaltung würde durch Mischen zweier der Wellen keine Polarisation mit der Frequenz der dritten Welle erzeugt werden können. Schließlich erhält man durch Umsortieren und Kürzen aus den Gleichungen 2.64–2.68 drei Gleichungen, die sich durch zyklisches Vertauschen der Indizes $\{a, b, c\} = \{1, 2, 3\}$ aus

$$\frac{d\hat{E}_a(z)}{dz} = -\frac{i}{2} \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_a}} \epsilon_0 \omega_a \chi^{(2)} \hat{E}_b^* \hat{E}_c^* e^{-i\Delta k z} \quad \text{mit} \quad \Delta k = \sum k_i \quad (2.69)$$

ergeben. Dieses Gleichungssystem soll im folgenden für einige Prozesse diskutiert werden, die im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung sind.

2.4.2 Erzeugung neuer Frequenzen

Frequenzverdopplung

Der einfachste Fall der nichtlinearen Erzeugung neuer Frequenzen ist die schon in Abbildung 2.20 gezeigte Frequenzverdopplung. Sie ergibt sich aus Gleichung 2.69, wenn

$$\omega_1 = \omega_2 = -\omega \quad \text{und} \quad \omega_3 = 2\omega \quad (2.70)$$

gesetzt wird. Dies erfüllt die Energieerhaltung. Die Impulserhaltung, die in diesem Zusammenhang auch Phasenanpassung genannt wird, wird durch

$$\Delta k = 2k_\omega - k_{2\omega} = 2\omega \sqrt{\epsilon_0 \mu_0} [n(\omega) - n(2\omega)] \quad (2.71)$$

beschrieben. Hier soll nur der vereinfachte Fall betrachtet werden, daß sich die Intensität der anregenden Welle durch den Konversionsprozeß nicht ändert, also $\hat{E}_1(z) = \hat{E}_2(z) = \text{const.}$ Damit läßt sich $\hat{E}_3(z) = \hat{E}_{2\omega}(z)$ leicht integrieren

$$\hat{E}_{2\omega}(L) = -\frac{i}{2} \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_{2\omega}}} \epsilon_0 (2\omega) \chi^{(2)} (\hat{E}_\omega)^2 \int_0^L e^{i\Delta k z'} dz = -\sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_{2\omega}}} \epsilon_0 \omega \chi^{(2)} (\hat{E}_\omega)^2 \frac{e^{i\Delta k L} - 1}{\Delta k} \quad (2.72)$$

und

$$\left| \hat{E}_{2\omega}(L) \right|^2 = \frac{\mu_0}{\epsilon_{2\omega}} (\epsilon_0 \omega \chi^{(2)})^2 (\hat{E}_\omega)^4 L^2 \text{sinc}(\Delta k L/2) \quad . \quad (2.73)$$

Die Intensität bei der doppelten Frequenz ist proportional zum Quadrat der Intensität der einfallenden Welle, da zwei Photonen der Frequenz ω in ein Photon der Frequenz 2ω umgewandelt werden. Die Konversionseffizienz steigt mit dem Quadrat der Länge L des Kristalls. Gleichzeitig wird durch ein wachsendes L die Bedingung an die Phasen Anpassung strenger, da $\Delta k L/2 \ll 1$ sein muß. Um eine hohe Konversionseffizienz zu erreichen, sollte also die Phasen Anpassung optimal sein. Dies gilt auch, wenn obige Einschränkung auf konstante Intensität der anregenden Welle fallengelassen wird.

Der Einfluß der Phasen Anpassung ist qualitativ in Abbildung 2.21 skizziert. Im oberen Teil ist die Polarisation $P \propto E_\omega^2$ aufgetragen. Sie oszilliert mit der doppelten Frequenz des einfallenden Feldes. In den durch Kreise markierten Intervallen soll nun eine Teilwelle mit doppelter Frequenz (halber Wellenlänge) erzeugt werden. Falls der Brechungsindex n für beide Wellenlängen λ_1 und λ_2 gleich ist, so überlagern sich beide Teilwellen konstruktiv und die Ausgangsintensität der zweiten Harmonischen steigt. Ist der Brechungsindex $n(\lambda_2)$ allerdings größer, so löschen sich die beiden Teilwellen teilweise aus und die Ausgangsintensität ist geringer. Gleichung 2.73 zeigt aber auch, daß die Phasen Anpassung (d.h. die Impulserhaltung) nicht exakt erfüllt sein muß. Dies ist in der Orts-Impuls-Unschärfe begründet [99, 125]: Die Umwandlung der zwei Photonen in eines mit der doppelten Frequenz muß irgendwo im Kristall erfolgen. Dadurch ist die Ortsunschärfe nach oben und mit der Orts-Impuls-Unschärferelation auch die Impulsunschärfe nach unten hin abgegrenzt. Innerhalb dieses Impulsbereiches muß also immer Frequenzverdopplung möglich sein, was gerade durch die Funktion $\text{sinc}(\Delta k L/2)$ beschrieben wird.

Zur optimalen Phasen Anpassung muß der Brechungsindex von Anregungswelle und zweiter Harmonischer übereinstimmen. Da der Brechungsindex aber von der Frequenz des Feldes abhängt, ist diese Übereinstimmung normalerweise nicht gegeben. Einen Ausweg bieten doppelbrechende Kristalle. Hier unterscheidet sich der Brechungsindex zwischen ordentlich und außerordentlich polarisierten Wellen, solange die Ausbreitung nicht entlang der optischen Kristallachse erfolgt. Abbildung 2.22 zeigt die Beziehung zwischen den Achsen. Für den Brechungsindex $n_{eo}(\omega, \theta)$ einer außerordentlichen Welle gilt

$$\frac{1}{n_{eo}^2(\omega, \theta)} = \frac{\cos^2 \theta}{n_o^2(\omega)} + \frac{\sin^2 \theta}{n_{eo}^2(\omega)} \quad , \quad (2.74)$$

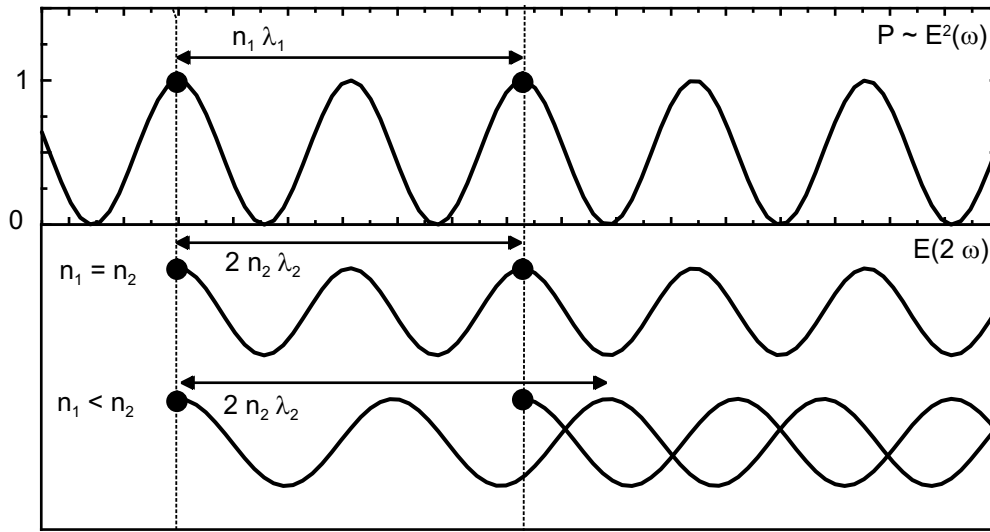


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung der Bedeutung der Phasenanpassung (Abbildung nach Ref. [126]). In den durch Kreise gekennzeichneten Intervallen werde eine Teilwelle mit doppelter Frequenz generiert. Wenn die Brechungsindizes $n(\omega)$ und $n(2\omega)$ nicht übereinstimmen, so löschen sich die Teilwellen gegenseitig aus und die Intensität der zweiten Harmonischen steigt nicht an.

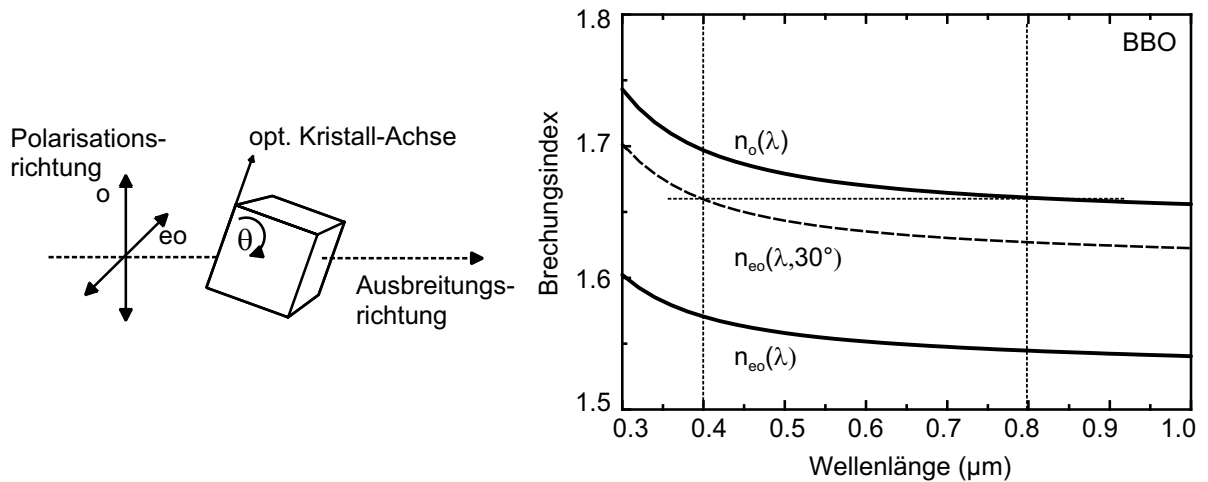


Abbildung 2.22: Phasenanpassung durch Doppelbrechung am Beispiel von β -Bariumborat (BBO). Durch passende Wahl des Winkels θ der optischen Kristallachse zur Ausbreitungsrichtung der Wellen lässt sich der Brechungsindex für die außerordentliche Welle so einstellen, daß $n_{eo}(2\omega, \theta) = n_o(\omega)$.

wobei $n_{eo}(\omega) = n_{eo}(\omega, \theta = \pi/2)$. Durch die Wahl des Winkels θ zwischen der Ausbreitungsrichtung und der optischen Kristallachse kann nun der Brechungsindex so gewählt werden, daß (im Falle eines negativ uniaxialen Kristalls mit $n_{eo} < n_o$)

$$n_{eo}(2\omega, \theta) = n_o(\omega) \quad . \quad (2.75)$$

Dies ist am Beispiel von β -Bariumborat (BBO, β -BaB₂O₄) in Abbildung 2.22 gezeigt. Anregungswelle und zweite Harmonische sind senkrecht zueinander polarisiert. Mit dieser Methode ist es also möglich, optimale Phasenanpassung für ein Paar von Frequenzen ω , 2ω zu erreichen. Sie besitzt allerdings mehrere Nachteile: Der Kristall muß gedreht werden, um die Phasenanpassung zu erzielen. Dadurch ergibt sich beim Durchstimmen der zu verdoppelnden Frequenz ein variabler Versatz, so daß dieses Verfahren nur unter großem Aufwand in einem Resonator eingesetzt werden kann. Um eine große Intensität des einfallenden Feldes zu erzielen, wird der Laserstrahl stark fokussiert. Dadurch verändert sich der Einfallswinkel aber über den Strahlquerschnitt und damit auch die Qualität der Phasenanpassung, so daß nicht der ganze Strahl frequenzverdoppelt wird. Schließlich zeichnet es gerade doppelbrechende Kristalle aus, daß der ordentliche und der außerordentliche Strahl eine unterschiedliche Ausbreitungsrichtung besitzen [127], wodurch sie nicht auf der gesamten Kristalllänge optimal überlappen. Alle diese Nachteile werden durch das sogenannte *non-critical phase matching* umgangen [99, 128]: der Winkel θ wird zu 90° gewählt. Damit hängt der Brechungsindex $n_{eo}(\omega, \theta)$ nur noch sehr schwach (nicht kritisch) vom Einfallswinkel θ ab, so daß die Phasenanpassung auch bei starker Fokussierung für den gesamten Strahlquerschnitt gleich gut ist. In diesem Fall unterscheidet sich auch die Ausbreitungsrichtung zwischen ordentlichem und außerordentlichem Strahl nicht, so daß die ganze Kristalllänge ausgenutzt werden kann. Um in dieser Konfiguration die Phasenanpassung zu erzielen, wird die unterschiedliche Temperaturabhängigkeit der beiden Brechungsindizes ausgenutzt und der Kristall entweder gekühlt oder beheizt. Dieses Verfahren erfordert dann auch keine Änderung des Strahlweges bei Variation der Wellenlänge mehr, womit es auch für den Einsatz in einem Resonator gut geeignet ist.

Parametrische Verstärkung

Unter parametrischer Verstärkung versteht man einen Prozeß, bei dem eine Schwingung nicht von außen getrieben, sondern durch periodische Variation eines Parameters verstärkt wird [123]:

$$\text{getrieben:} \quad \ddot{x} + \omega_0^2 x = F(t) \quad (2.76)$$

$$\text{parametrisch:} \quad \ddot{x} + \omega^2(t) x = 0 \quad (2.77)$$

Ein einfaches Beispiel für parametrische Verstärkung ist ein Pendel, dessen Pendellänge periodisch mit der Frequenz ω' variiert wird. In diesem Fall kommt es zur Verstärkung der schon vorhandenen Oszillation, wenn $\omega' \approx 2\omega_0$. Falls das Pendel zu Beginn vollständig in Ruhe ist, also $x \equiv 0$, so hat die Variation der Pendellänge keinen Einfluß, sie kann die

Schwingung nur verstärken. Ein getriebenes Pendel dagegen kann zu Beginn durchaus in Ruhe sein.

Ein starkes Laserfeld der Frequenz ω_L sorgt in einem nichtlinearen Kristall für die Variation eines Parameters, der Dielektrizitätskonstanten ϵ , da [129]

$$P = \epsilon_0 \chi(E) E = \epsilon_0 (\epsilon(E) - 1) E = \epsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \dots) \quad (2.78)$$

Dies gibt dem folgenden Prozeß den Namen. In der Gegenwart einer starken Pumpwelle E_3 wird die sogenannte Signal-Welle E_1 verstärkt und dabei eine sog. Idler-Welle E_2 erzeugt, da diese zur Energie- und Impulserhaltung notwendig ist:

$$\omega_1 + \omega_2 = \omega_3 \quad \text{und} \quad \Delta k = k_1 + k_2 - k_3 \quad (2.79)$$

Bei optimaler Phasenanpassung ($\Delta k = 0$) und unter der Annahme, daß die Pumpintensität über die Länge des Kristalls konstant ist ($\hat{E}_3(z) = \text{const.}$), folgt durch Integration

$$\left| \hat{E}_1(z) \right|^2 = \left| \hat{E}_1(0) \right|^2 \cosh^2 Kz \quad (2.80)$$

$$\left| \hat{E}_2(z) \right|^2 = \frac{\omega_1}{\omega_2} \left| \hat{E}_1(0) \right|^2 \sinh^2 Kz \quad (2.81)$$

wobei $K \propto \chi^{(2)} \left| \hat{E}_3(0) \right|$. Diese Situation ist in Abbildung 2.23 zusammengefaßt. Die Intensität der Signal- und Idler-Welle steigt also fast quadratisch mit der Länge z an.

In einem optisch-parametrischen Oszillator (OPO) wird diese parametrische Verstärkung als Lasermedium benutzt, das durch ein Pumpfeld E_3 mit Energie versorgt wird. Bei gegebener Frequenz ω_3 des Pumplasers entscheidet die Phasenanpassung, welche der Photonenpaare der Frequenz $\{\omega_1, \omega_2\}$, die die Energieerhaltung erfüllen, erzeugt werden. Das erste Signal-Photon, das dann verstärkt wird, entsteht durch sogenannte parametrische Fluoreszenz analog zur spontanen Emission in einem herkömmlichen Laser [123]. Abbildung 2.24 zeigt dies für einen Kalium-Titanyl-Arsenat-Kristall (KTA, KTiOAsO_4), wie er auch im hier eingesetzten OPO verwendet wird (siehe Abschnitt 3.1.3). Da KTA

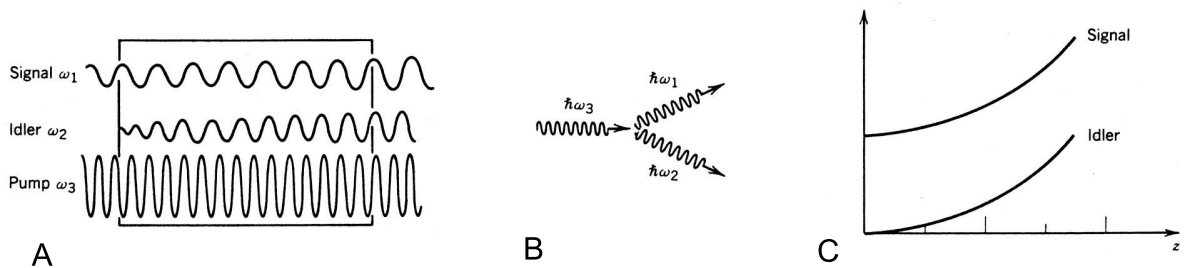


Abbildung 2.23: Parametrische Verstärkung [125]. A: in Gegenwart einer pump-Welle wird die Signal-Welle verstärkt und eine Idler-Welle erzeugt. B: Dabei wird die Energie eines Pump-Photons auf je ein Signal- und ein Idler-Photon aufgeteilt. C: Signal- und Idler-Intensität zeigen den gleichen Verlauf mit steigender Kristalldicke z , wobei zu Beginn keine Idler-Welle vorhanden ist.

biaxial ist, also zwei ausgezeichnete optische Achsen besitzt, kann durch die Orientierung des Kristalls der Brechungsindex des ordentlichen und des außerordentlichen Strahls in weiten Bereichen beeinflusst werden. Mit der gleichen Begründung wie bei der Frequenzverdopplung ist auch der KTA-Kristall nicht-kritisch phasenangepaßt ($\theta = 90^\circ$, $\phi = 0^\circ$). Die Brechungsindizes hängen bei Raumtemperatur nur schwach von der Temperatur ab, so daß der Kristall nicht thermostatisiert werden muß. Teil C der Abbildung skizziert, wie durch unterschiedliche Polarisationsrichtungen von Signal- und Idler-Welle Energie- und Impulserhaltung für ein Frequenzpaar gleichzeitig erfüllt sind. Daraus ergibt sich dann die Abhängigkeit der Signalwellenlänge von der Pumpwellenlänge, wie sie in Teil B dargestellt ist. Im Anhang A.2 ist zusammengefaßt, wie sich aus den Sellmeier-Koeffizienten

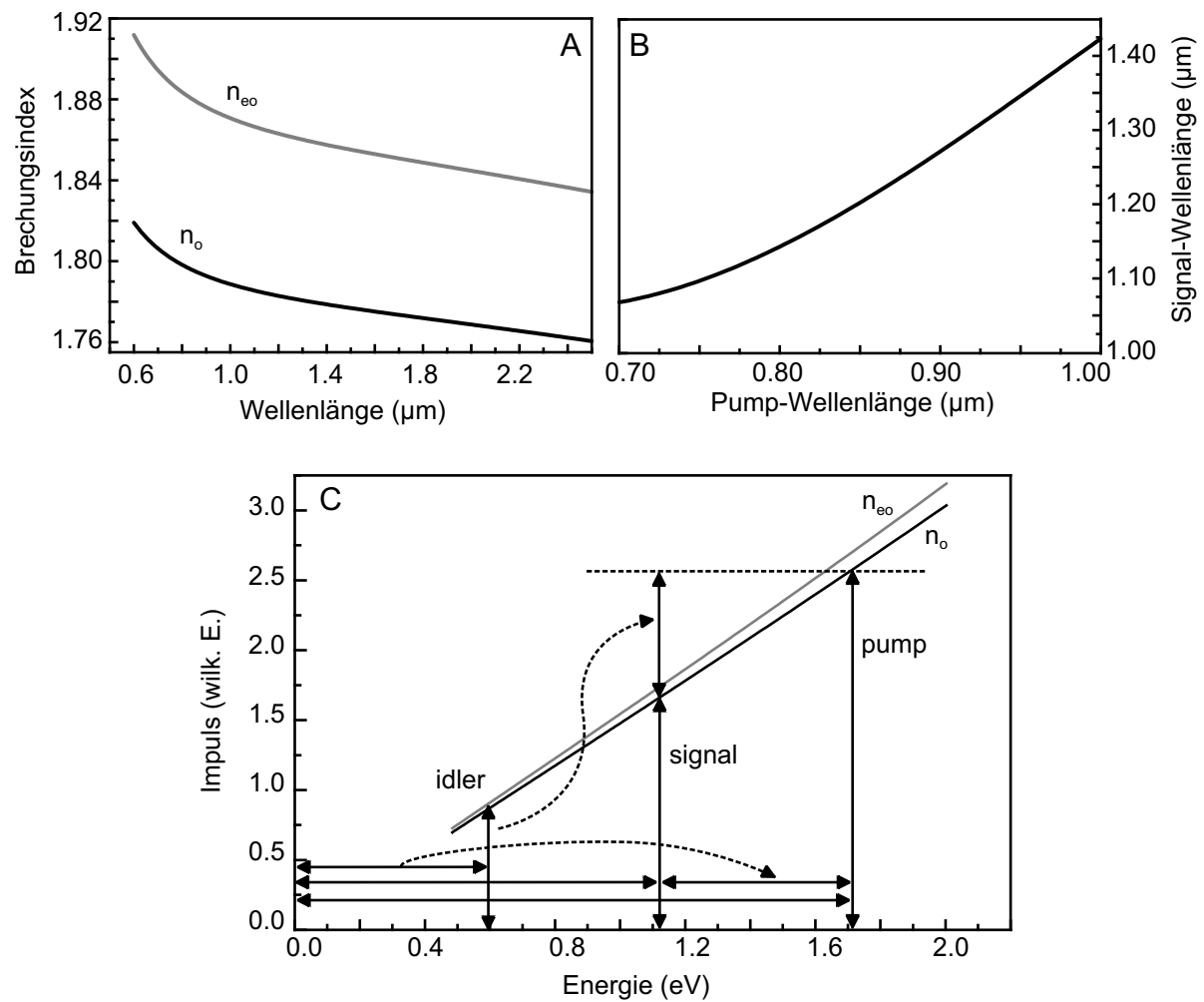


Abbildung 2.24: Phasenanpassung und Durchstimmen eines optisch-parametrischen Oszillators (OPO) mit einem Kalium-Titanyl-Arsenat-Kristall (KTA, KTiOAsO_4). A: Verlauf der Brechungsindizes für ordentliche und außerordentliche Wellen bei nicht-kritischer Phasenanpassung ($\theta = 90^\circ$, $\phi = 0^\circ$). B: Die Signal-Wellenlänge als Funktion der Pump-Wellenlänge. Dieser Zusammenhang ist über die Brechungsindizes gegeben. C: Nur für ein Paar von Signal- und Idler-Energien ist gleichzeitig Energie- und Impulserhaltung gegeben.

zur Beschreibung des Brechungsindex diese Kurve bestimmen läßt.

Kerr-Effekt

Als nichtlineare Effekt dritter Ordnung spielte in den durchgeführten Experimenten der Kerr-Effekt eine Rolle. Er soll hier kurz vorgestellt werden, auch wenn er nicht zur Erzeugung neuer Frequenzkomponenten dient. In einem inversionssymmetrischen Medium verschwindet $\chi^{(2)}$, so daß die ersten zwei Glieder von Gl. 2.62 lauten

$$P(E) = \epsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(3)} E^3) = \epsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(3)} |E|^2 E) = \epsilon_{\text{total}} E \quad . \quad (2.82)$$

Damit kann ein intensitätsabhängiger Brechungsindex n_{total} gebildet werden [124]:

$$n_{\text{total}} = \sqrt{\epsilon_{\text{total}}} \approx n + n^{(2)} |E|^2 \quad . \quad (2.83)$$

Wenn für zwei der vier an diesem nichtlinearen Effekt dritter Ordnung beteiligten Wellen Gleichspannungsfelder eingesetzt werden, so wird dieser Kerr-Effekt zur Modulation des Brechungsindex z.B. in variablen Polarisatoren verwendet. Die Modulationstiefe verhält sich dann quadratisch zur angelegten Spannung. Wenn allerdings der Laserstrahl intensiv genug ist, so kann er sich selbst den Brechungsindex modulieren. Hohe Intensitäten in der Mitte des Strahlprofils bewirken einen hohen Brechungsindex, was gleichbedeutend mit einer Linse positiver Brennweite ist.

2.4.3 Erzeugung kurzer Pulse

Alle beschriebenen nichtlinearen Effekte benötigen hohe Intensitäten mindestens einer Welle. Dies läßt sich relativ einfach erreichen, wenn nicht eine für die gesamte Zeitspanne konstant hohe Intensität gefordert wird, sondern periodische Intensitätsspitzen ausreichen. Während dieser Pulse reicht die Intensität aus, um nichtlineare Optik zu betreiben. In den Pausen ist die Intensität so gering, daß keine weiteren Prozesse ablaufen. Die gemittelte Leistung eines solchen Lasers kann darum im Bereich von etwa einem Watt liegen und trotzdem werden Spitzenwerte von rund 100 kW erreicht, wenn eine Pulsdauer von 100 fs einem Pulsabstand von 13 ns gegenübergestellt wird. In diesem Abschnitt soll dargestellt werden, wie solche kurzen Laserpulse erzeugt werden können.

Der Ausgangspunkt ist der breite Verstärkungsbereich eines Titan-Saphir-Lasers. Die Kopplung der Titan-Niveaus an Schwingungszustände des Saphir-Kristalls bewirken eine starke homogene Verbreiterung der Übergänge [130], so daß dieser Typ von Laser den breiten Verstärkungsbereich 700–1000 nm besitzt. Damit wird es vielen longitudinalen Moden des elektrischen Feldes E_n ermöglicht, über die Laserschwelle zu kommen. Die Resonatorlänge L definiert den Frequenzabstand der Moden, so daß für die ω_n gilt

$$\omega_n = n \pi c / L \quad . \quad (2.84)$$

Das Ausgangsfeld eines Multimodenlaser ist in der Summe seiner Moden:

$$E(t) = \sum_n E_n(t) = \sum_n \hat{E}_n e^{i\phi_n} e^{i(c/L)\pi n t} \quad . \quad (2.85)$$

Der zeitliche Verlauf des Ausgangsfeldes ist also die Fouriertransformierte des mit einem Phasenfaktor multiplizierten spektralen Verlaufes der Amplituden $\hat{E}_n$. Die zeitliche Periode $T = 2L/c$ entspricht gerade der Umlaufzeit im Resonator. Wenn keine weiteren Vorkehrungen getroffen werden, so besitzt die Phase ϕ_n der einzelnen Moden einen zufälligen Wert. Dann ergibt sich ein mit der Periode T wiederholender Verlauf von inkohärentem Licht [131]. Wenn allerdings die einzelnen Moden gekoppelt sind, d.h. in einer festen Phasenbeziehung zueinander stehen,

$$\delta\phi = \phi_{n+1} - \phi_n = \text{const.} \quad , \quad (2.86)$$

dann entspricht der zeitliche Verlauf des elektrischen Feldes der Fouriertransformierten der Amplitudenverteilung. Die Konstante $\delta\phi$ führt zu einer Verschiebung des zeitlichen Nullpunkts. Eine typische Resonatorlänge beträgt $L = 2$ m. Bei einer Zentralwellenlänge von $\lambda_0 = 800$ nm und einer spektralen Breite des Verstärkungsbereichs (durch das wellenlängenselektive Lyot-Filter begrenzt) von $\Delta\lambda = 4$ nm schwingen etwa

$$N \approx \frac{\Delta\lambda}{\lambda^2} \frac{L}{\pi} = 3980 \quad (2.87)$$

Moden an. Deshalb ist es gerechtfertigt, im folgenden von einer kontinuierlichen Amplitudenverteilung $\hat{E}(\omega)$ auszugehen.

Als Beispiel soll hier eine gaußförmige Verteilung betrachtet werden. Einen Überblick über diese und weitere Pulsformen geben Ref. [131, 132]. Für die Amplitudenverteilung $\hat{E}(\omega)$ soll gelten

$$\hat{E}(\omega) = \hat{E}_0 \sqrt{\pi} \tau_G e^{-\frac{1}{4} (\omega - \omega_0)^2 \tau_G^2} \quad . \quad (2.88)$$

Der zeitliche Verlauf des elektrischen Feldes folgt daraus per Fouriertransformation

$$\hat{E}(t) = \hat{E}_0 e^{-(t/\tau_G)^2} \quad \text{und} \quad E(t) = \hat{E}(t) e^{i\omega_0 t} \quad . \quad (2.89)$$

Als Pulsbreite τ_p wird die zeitliche Halbwertsbreite des elektrischen Feldes bezeichnet

$$\tau_p = \sqrt{2 \ln 2} \tau_G \quad . \quad (2.90)$$

Die spektrale Breite des Lasers wird als Halbwertsbreite $\Delta\nu$ der spektralen Intensitätsverteilung $S(\omega) = |\hat{E}(\omega)|^2$ angegeben

$$\Delta\nu = \frac{\Delta\omega}{2\pi} = \frac{\sqrt{8 \ln 2}}{2\pi \tau_G} \quad . \quad (2.91)$$

Durch die Verknüpfung über die Fouriertransformation gilt für die letztgenannten Größen ein Pulsdauer-Bandbreiten-Produkt

$$\Delta\nu \tau_p = \frac{2 \ln 2}{\pi} \approx 0.441 \quad . \quad (2.92)$$

Laserpulse, deren Pulsdauer-Bandbreiten-Produkt diesen Wert erreicht, werden fourierlimitiert genannt. Wenn die zur Verfügung stehende spektrale Bandbreite $\Delta\nu$ nicht ausgenutzt wird, um die kürzest möglichen Pulse, also das kleinste τ_p zu erzeugen, dann liegt das gemessene Pulsdauer-Bandbreiten-Produkt über dem Wert von 0.441. Unter der Voraussetzung, daß der zeitliche und spektrale Verlauf einer Gaußkurve entspricht, gibt das Pulsdauer-Bandbreiten-Produkt also Auskunft darüber, ob das Lasersystem optimal eingestellt ist.

Wie kann es zu einem vergrößerten Pulsdauer-Bandbreiten-Produkt kommen? Dazu soll der Einfluß einer zeitabhängigen Phase $\phi(t)$ des elektrischen Feldes betrachtet werden. Zur Vereinfachung wird angenommen, daß sich $\phi(t)$ als ein Polynom in t darstellen läßt. Damit gilt dann

$$E(t) = \hat{E}(t) e^{i(\omega_0 t + \phi(t))} = \hat{E}(t) e^{i(\omega_0 + d\phi(t)/dt) t} e^{i\phi_0} \quad . \quad (2.93)$$

Solange $\phi(t)$ nur linear von der Zeit t abhängt, bewirkt dies nur ein Verschieben der Zentralfrequenz ω_0 nach $\omega'_0 = \omega_0 + d\phi(t)/dt$. Im Frequenzraum – durch Fouriertransformation obiger Gleichung – bedeutet dies, daß die Phase ϕ nur linear von der Frequenz ω abhängt. Dies wurde oben in Gl. 2.86 schon durch $\delta\phi = \text{const.}$ gefordert. Bei einer quadratischen Abhängigkeit der Phase von der Zeit tritt eine zeitliche Änderung der Zentralfrequenz ω_0 des Pulses auf. Man spricht dann von *chirp* (zwitschern), da es im Akustischen einer ansteigenden oder abfallenden Tonfolge entspricht. Quadratische (und höhere) Abhängigkeit der Phase von der Zeit (und damit von der Frequenz) wird durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (*group velocity dispersion*, GVD) in optischen Elementen, z.B. Gläsern, aber auch Spiegeln, hervorgerufen. Diese ist mit der ersten und zweiten Ableitung des Brechungsindex nach der Wellenlänge verknüpft. Aus Gl. 2.93 wird dann mit $\phi = -a t^2/\tau_G^2$

$$\hat{E}(t) = \hat{E}_0 e^{-(1+i a) (t/\tau_G)^2} \quad (2.94)$$

und für das Pulsdauer-Bandbreiten-Produkt gilt

$$\Delta\nu \tau_p = \frac{2 \ln 2}{\pi} \sqrt{1 + a^2} \approx 0.441 \sqrt{1 + a^2} \quad , \quad (2.95)$$

da die spektrale Bandbreite $\Delta\nu$ gerade um den Faktor $\sqrt{1 + a^2}$ ansteigt. Auf den Einfluß höherer Ordnungen von t in $\phi(t)$ soll hier nicht eingegangen werden.

Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) läßt sich in einem optischen Resonator nicht vermeiden. Sowohl transmittierende als auch reflektierende Elemente ändern die Phase der elektromagnetischen Welle je nach Wellenlänge unterschiedlich stark. Um trotzdem einen optimalen, d.h. fourierlimitierten Puls zu erzeugen, muß die Gesamt-GVD möglichst wellenlängenunabhängig werden. Der Einfluß der einzelnen Elemente sollte sich also gegenseitig kompensieren. Abbildung 2.25 zeigt den Brechungsindex von BK7-Glas und dessen Ableitungen. Die positive zweite Ableitung dominiert die GVD. Um dies zu kompensieren, muß ein Teilstück mit negativer GVD in den Resonator gebracht werden. Dies läßt sich mit einer Prismenstrecke, wie sie Abbildung 2.26 zeigt,

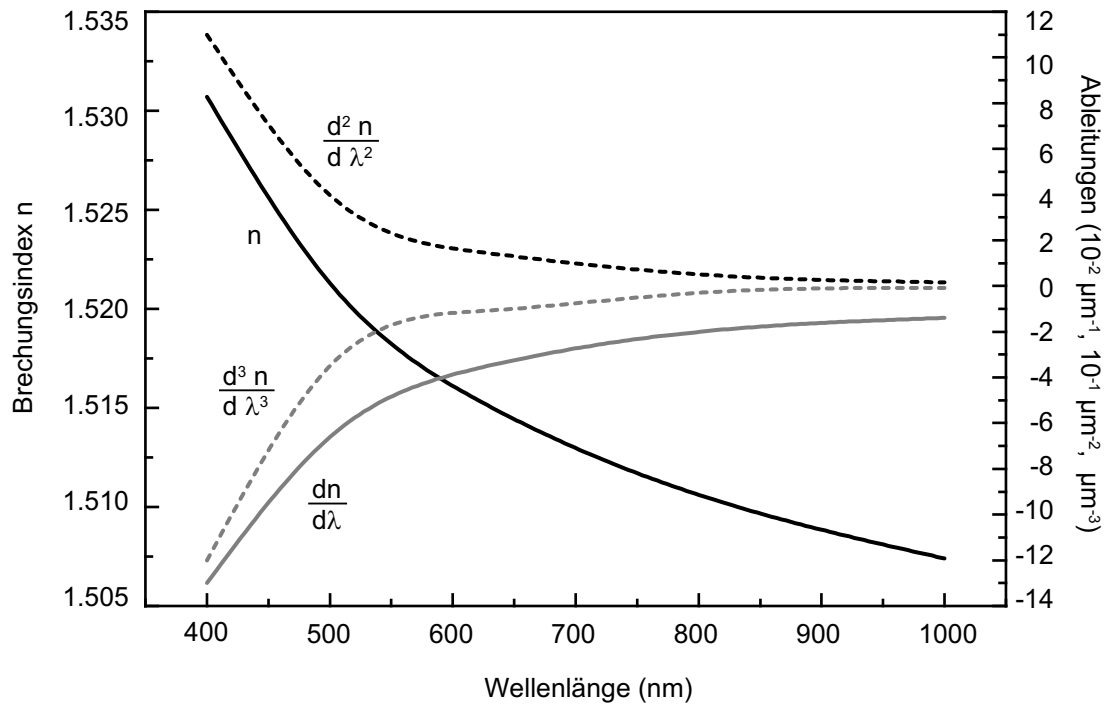


Abbildung 2.25: Der Brechungsindex des Glases BK7 und seine Ableitungen (Daten aus Ref. [131]). Die positive zweite Ableitung des Brechungsindex dominiert die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD).

erzielen. Zwei gleiche Prismen sind so vor dem hochreflektierenden Endspiegel angebracht, daß alle spektralen Komponenten senkrecht auf den Spiegel treffen und so der Resonator für alle Komponenten geschlossen ist. Durch die spektrale Aufspaltung in den Prismen entsteht aber ein geometrischer Weglängenunterschied, der von der Wellenlänge abhängt. Wie oben dargestellt ist aber nicht die erste, sondern erst die zweite (und evtl. dritte) Ableitung des Phasenunterschiedes nach der Wellenlänge interessant. Dieser Zusammenhang erschließt sich leider nicht intuitiv. Genaue Rechnungen, die z.B. in Ref. [131] dargestellt sind, ergeben, daß der reine geometrische Weglängenunterschied eine negative GVD bewirkt, je nach Länge der Strecken *innerhalb* der Prismen durch das Glas aber auch eine insgesamt positive GVD erzielt werden kann. Durch Variation der Position z läßt sich also die GVD des Gesamtsystems minimieren.

Die zeitliche Pulsbreite τ_P läßt sich bei Pulsen von etwa 100 fs Länge nicht mehr elektronisch messen, da die dabei auftretenden Frequenzen um mehrere Größenordnungen über der höchsten elektronisch noch handhabbaren Frequenz liegen. Die Pulsbreite τ_P muß also rein optisch gemessen werden. Dazu wird der Puls mit sich selbst abgetastet, indem der Strahl in zwei Teile geteilt wird, von denen der eine variabel gegen den anderen verzögert wird, bevor sie wieder überlagert werden. Zeiten im Bereich von Femtosekunden entsprechen Längen im Bereich von Mikrometern, die gut kontrolliert werden können. Um unterscheiden zu können, ob die beiden Hälften a und b des Pulses überlappen oder zeitlich nacheinander auf dem Detektor eintreffen, muß dieser quadratisch

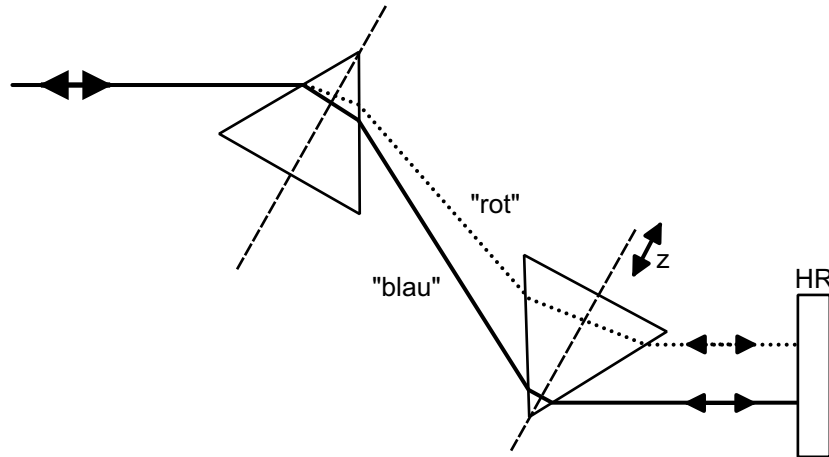


Abbildung 2.26: Prismenstrecke, mit der die Gruppengeschwindigkeitsdispersion eingestellt werden kann.

auf die Lichtintensität reagieren:

$$\text{nacheinander} \quad a^2 + b^2 \neq (a + b)^2 \quad \text{gleichzeitig.} \quad (2.96)$$

Häufig wird dazu die Frequenzverdopplung ausgenutzt, indem der wieder vereinigte Strahl auf einen frequenzverdoppelnden Kristall gegeben wird und der Detektor nur für Licht der halben Wellenlänge empfindlich ist. Bei variabler Verzögerung τ kann mit diesem Verfahren zeitintegriert gemessen werden; die zeitliche Auflösung des Detektors spielt also keine Rolle:

$$G(\tau) = \langle I(t) \times I(t - \tau) \rangle \quad . \quad (2.97)$$

Die Funktion $G(\tau)$ wird als Intensitäts-Autokorrelation bezeichnet. Sie ist immer symmetrisch ($G(\tau) = G(-\tau)$) und ist relativ unempfindlich gegenüber der eigentlichen Pulsform [131]. Es muß also vorher angenommen werden, ob der Puls eher gaußförmig oder sech²-förmig ist. Mit dieser Annahme kann dann die Pulsbreite τ_P aus der Halbwertsbreite der Autokorrelation τ_{AC} berechnet werden [131]:

$$\tau_P = \tau_{AC} / \sqrt{2} \quad \text{für Gauß-Pulse,} \quad (2.98)$$

$$= \tau_{AC} / 1.543 \quad \text{für sech}^2\text{-förmige Pulse.} \quad (2.99)$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Pulse immer als gaußförmig angenommen und angegebene Pulslängen sind immer die so aus der Autokorrelationsbreite τ_{AC} berechneten Werte.

2.4.4 Zwei-Photonen-Absorption

Die Möglichkeit der gleichzeitigen Absorption von zwei Photonen in einem Quantenprozeß wurde bereits 1931 von Maria Göppert-Mayer in ihrer Dissertation „Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen“ vorhergesagt [62]. Ein Jahr nach der Realisierung des

Rubin-Lasers durch Maiman [133] gelang 1961 der erste experimentelle Nachweis von Zwei-Photonen-Anregung von $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ durch Kaiser und Garrett [134]. Zwei Jahre später wurde auch Fluoreszenz organischer Kristalle (Pyren, Anthracen) nach Zwei-Photonen-Anregung beobachtet [135]. Wichtige Anwendungsgebiete der Zwei-Photonen-Absorption sind die dopplerfreie Spektroskopie von Atomen und Molekülen im Molekularstrahl (Einführung in Ref. [99]) und die optische Spektroskopie von Übergängen, die für einen Ein-Photonen-Prozeß verboten sind [136]. Die Entwicklung der Zwei-Photonen-Mikroskopie mit dem Ziel der Detektion einzelner Molekül begann mit der Arbeit von Denk *et al.* [63] und ist bereits in Abschnitt 2.2.1 dargestellt worden. In diesem Abschnitt soll nun ein Ausdruck für die Absorptionsrate eines Zwei-Photonen-Übergangs mit Hilfe der zeitabhängigen Störungsrechnung hergeleitet und diskutiert werden [137, 138].

Abbildung 2.27 skizziert die beteiligten Zustände und ihre Bezeichnung. Es wird nur der Fall betrachtet, daß beide absorbierte Photonen aus der gleichen, monochromatischen Welle der Frequenz ω stammen. Der Zwischenzustand $|e' >$ muß nicht unbedingt energetisch unter dem Endzustand $|e >$ liegen. Die Wellenfunktion ψ des Gesamtsystems lautet

$$\psi = \sum_{\mu \in \{i, x, f\}} c_{\mu} \psi_{\mu} \quad . \quad (2.100)$$

Zu Beginn befindet sich das System in Grundzustand, so daß $c_i(0) = 1$ und alle anderen $c_{\mu}(0) = 0$. Gesucht ist die Besetzung des Endzustandes $|f >$ in Abhängigkeit von der Zeit t , also $|c_f(t)|^2$. Der Hamilton-Operator H wird im Rahmen der Störungsrechnung als $H = H^0 + H^S$ angesetzt und die Zeitentwicklung der Matrixelemente des Stör-Terms lautet

$$H_{\mu\nu}^S(t) = H_{\mu\nu}^S(0) e^{i\omega_{\mu\nu}t} \quad (2.101)$$

mit $\hbar\omega_{\mu\nu} = E_{\mu} - E_{\nu}$. Daraus folgt dann für die zeitliche Entwicklung von $c_f(t)$, wenn nur Prozesse berücksichtigt werden, die die Absorption zweier Photonen verlangen [137]

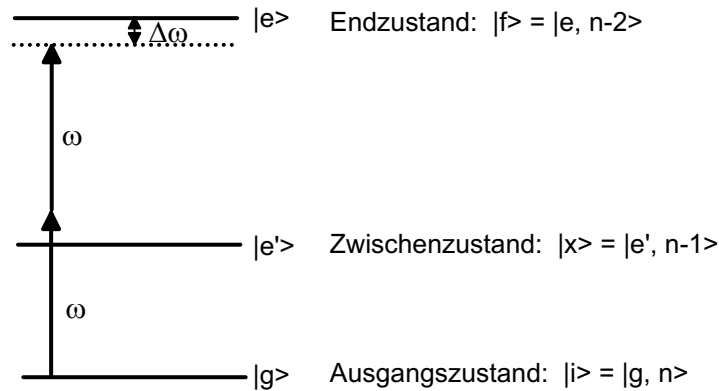


Abbildung 2.27: Verwendete Bezeichnungen des quantenmechanischen Systems. Unterschieden werden die Zustände des absorbierenden Systems ($|g >$, $|e' >$, $|e >$) und die Zustände des Gesamtsystems, das auch das Lichtfeld mit anfänglich n Photonen umfaßt.

$$c_f(t) = -\frac{1}{\hbar^2} \sum_{\mu} H_{f\mu}^S(0) H_{\mu i}^S(0) \int_0^t e^{i\omega_{f\mu}t_1} dt_1 \int_0^{t_1} e^{i\omega_{\mu i}t_2} dt_2 \quad . \quad (2.102)$$

Während $\omega_{f\mu} + \omega_{\mu i} = (E_e - E_g)/\hbar - 2\omega = \Delta\omega \approx 0$ die Energieerhaltung garantiert, oszillieren Terme mit $\omega_{f\mu} \gg 1$ so schnell, daß sie im zeitlichen Mittel Null ergeben und darum vernachlässigt werden können (*rotating wave approximation*). Damit ergibt sich

$$c_f(t) = \frac{1}{\hbar} \frac{e^{i\Delta\omega t} - 1}{\Delta\omega} \sum_{\mu} \frac{H_{f\mu}^S(0) H_{\mu i}^S(0)}{E_{\mu} - E_i} = \frac{1}{\hbar} \frac{e^{i\omega_{fi}t} - 1}{\omega_{fi}} X_{fi} \quad (2.103)$$

und

$$|c_f(t)|^2 = \frac{|X_{fi}|^2}{\hbar^2} \cdot t^2 \cdot \text{sinc}^2(\Delta\omega t/2) \quad . \quad (2.104)$$

Mit den bisher als infinitesimal scharf angenommenen Übergängen würde die Übergangsrate w_{fi} bei Resonanz ($\Delta\omega = 0$) linear mit der Zeit t ansteigen:

$$w_{fi} = \frac{d|c_f(t)|^2}{dt} = 2 \frac{|X_{fi}|^2}{\hbar^2} \cdot t \cdot \text{sinc}^2(\Delta\omega t/2) \quad . \quad (2.105)$$

Mit Annahme einer lorentzförmigen Linie der Breite Γ , deren Form durch die Funktion $D(\Delta\omega)$ beschrieben wird,

$$D(\Delta\omega) = \frac{\Gamma/\pi}{(\Delta\omega)^2 + \Gamma^2} \quad (2.106)$$

läßt sich die Populierung P_e von $|e\rangle$ berechnen [138]:

$$P_e = \int D(\Delta\omega) \frac{|X_{fi}|^2}{\hbar^2} t^2 \text{sinc}^2[\Delta\omega t/2] d(\Delta\omega) \quad . \quad (2.107)$$

Für Zeiten $t \gg 1/\Gamma$ ist $\text{sinc}^2[\Delta\omega t/2]$ nur für $\Delta\omega = 0$ von Null verschieden, so daß

$$P_e = \frac{2}{\Gamma} \frac{|X_{fi}|^2}{\hbar^2} t \quad \text{und} \quad w_{fi} = \frac{2}{\Gamma} \frac{|X_{fi}|^2}{\hbar^2} \quad . \quad (2.108)$$

Nun muß noch der Term $|X_{fi}|^2$ genauer betrachtet werden. Die Matrixelemente des Stör-Operators H^S sind das Produkt aus dem komplexen Dipolmatrixelement $\mu_{\mu\nu}$ und der Amplitude $\hat{E}(\omega)$ des elektrischen Feldes [112]:

$$H_{\mu\nu}^S = \hat{E}(\omega) \mu_{\mu\nu} \quad . \quad (2.109)$$

Die Energiedifferenz $E_{\mu} - E_i$ läßt sich auch als $E_u - \hbar\omega$ schreiben ($u \in \{g, e', e\}$), so daß

$$|X_{fi}|^2 = \left| \sum_{\mu} \frac{H_{f\mu}^S(0) H_{\mu i}^S(0)}{E_{\mu} - E_i} \right|^2 = \left| \hat{E}(\omega) \right|^4 \left| \sum_u \frac{\mu_{eu} \mu_{ug}}{E_u - \hbar\omega} \right|^2 \quad . \quad (2.110)$$

Insgesamt ergibt sich damit für die Übergangsrate w_{fi}

$$w_{fi} = \frac{2}{\hbar^2 \Gamma} I(\omega)^2 \left| \sum_u \frac{\mu_{eu} \mu_{ug}}{E_u - \hbar \omega} \right|^2 = \frac{1}{2} \sigma_{TPE} \left(\frac{I(\omega)}{\hbar \omega} \right)^2, \quad (2.111)$$

wobei σ_{TPE} den Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt bezeichnet und der Faktor $1/2$ berücksichtigt, daß zwei Photonen für eine Anregung absorbiert werden müssen [139]. Die Anregungsintensität I ist nun zeitlich in der Regel nicht konstant, da es vorteilhaft ist, mit einem gepulsten Laser zu arbeiten. Dies wird in der mittleren Anregungsrate α berücksichtigt:

$$\alpha = \langle w_{fi} \rangle = \frac{1}{2} \sigma_{TPE} \frac{\langle I^2 \rangle}{(\hbar \omega)^2} = \frac{1}{2} \sigma_{TPE} g^{(2)}(\tau = 0) \left(\frac{\langle I \rangle}{\hbar \omega} \right)^2. \quad (2.112)$$

Dabei bezeichnet $g^{(2)}(\tau = 0)$ die schon mehrfach verwendete Intensitäts-Autokorrelation, die hier im Zeitnullpunkt ausgewertet wird. Bei bekannter Pulsform läßt sich $g^{(2)}(\tau = 0)$ berechnen, so daß

$$\alpha = \frac{1}{2} \sigma_{TPE} \frac{g_P}{f \tau_P} \left(\frac{\langle I \rangle}{\hbar \omega} \right)^2. \quad (2.113)$$

Für gaußförmige Pulse besitzt der Pulsformfaktor g_P den Wert $g_P = 0.66$, für sech²-förmige Pulse gilt $g_P = 0.59$ [139]. f bezeichnet die Repetitionsrate des Lasers und τ_P die bereits in Abschnitt 2.4.3 eingeführte Halbwertsbreite des Pulses. Schließlich kann die Intensität im Fokus bei bekanntem Radius ω_0 noch durch die Leistung P ausgedrückt werden. Für die zeitlich gemittelte Anregungsrate im Zentrum des Fokus gilt also

$$\alpha = \frac{1}{2} \sigma_{TPE} \frac{g_P}{f \tau_P} \left(\frac{P/\hbar \omega}{0.5 \pi \omega_0^2} \right)^2. \quad (2.114)$$

Damit Zwei-Photonen-Absorption stattfinden kann, muß der Endzustand $|e\rangle$ über zwei aufeinanderfolgende elektrische Dipolübergänge aus dem Grundzustand $|g\rangle$ zu erreichen sein. Zum Zwei-Photonen-Übergang tragen alle Zwischenzustände $|x\rangle$ des Moleküls bei, allerdings werden sie mit ihrem energetischen Abstand zur Photonenenergie gewichtet. Da die Summenbildung innerhalb des Betragsquadrats erfolgt, kann es dabei zu Interferenz zwischen den einzelnen Termen in Gl. 2.111 kommen.

Eine Abschätzung für die Größenordnung typischer Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitte erhält man, wenn man nur einen Zwischenzustand $|x\rangle$ annimmt, der außerdem nahe bei dem Endzustand $|e\rangle$ liegt. Aus Gleichung 2.111 ergibt sich, daß der Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt dann auf das Produkt zweier Ein-Photonen-Absorptionskoeffizienten zurückgeführt werden kann [139]:

$$\sigma_{TPE} \approx \frac{\sigma_{OPE} \sigma_{OPE}}{\omega} = \frac{(10^{-17} \text{ cm}^2)^2}{10^{15} \text{ sec}^{-1}} = 10^{-49} \text{ cm}^4 \text{ sec}^{-1} = 10 \text{ GM}. \quad (2.115)$$

In einer ersten Näherung ist der TPE-Absorptionsquerschnitt also proportional zum Quadrat des OPE-Absorptionsquerschnitts. Der Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt

Farbstoff	λ_{ex} (nm)	σ_{TPE} (GM)
Rhodamin B	840	210 ± 55
DiI	700	95 ± 28 *
Fluorescein	782	38 ± 9.7
Coumarin 307	776	19 ± 5.5 *
Indo-1	700	12 ± 4
Bis-MSB	691	6.3 ± 1.8
Lucifer Yellow	860	0.95 ± 0.3 *

Tabelle 2.2: Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitte σ_{TPE} einiger Farbstoffe bei verschiedenen Anregungswellenlängen λ_{ex} [66]. Bei den mit einem Stern (*) gekennzeichneten Farbstoffen ist das Produkt aus Absorptionsquerschnitt σ_{TPE} und Fluoreszenz-Quanteneffizienz η angegeben. Speziell für die Zwei-Photonen-Absorption synthetisierte Farbstoffe erreichen Absorptionsquerschnitte σ_{TPE} von mehr als 1000 GM [142].

σ_{TPE} wird häufig in der Einheit „Göppert-Meier“ angegeben ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ sec}^{-1}$) und typische Werte liegen zwischen 1 und 500 GM. Tryptophan besitzt einen Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt σ_{TPE} von etwa $\sigma_{TPE} \approx 1 \text{ GM}$ [67]. Für eine große Reihe von in der Mikroskopie verwendeten Farbstoffen wurde σ_{TPE} von der Gruppe um W. W. Webb vermessen [66, 140, 141]. Einige dieser Werte sind in Tabelle 2.2 zusammengefaßt

Besonders einfach läßt sich Gleichung 2.111 dann berechnen, wenn *kein* Zwischenzustand x angenommen wird, z.B. weil alle in Frage kommenden energetisch zu weit entfernt sind. Dann läuft die Summe nur über die Zustände e und g , so daß

$$\sigma_{TPE} \propto \left| \frac{\mu_{eg}}{\omega} \right|^2 |\mu_{ee} - \mu_{gg}|^2 . \quad (2.116)$$

Der Absorptionsquerschnitt ist also proportional zur Änderung des statischen Dipolmoments μ_{ii} vom Grund- in den angeregten Zustand. Die Änderung des Dipolmoments wird dann besonders groß, wenn bei der Anregung Ladungen im Molekül verschoben werden. Bemühungen, Moleküle mit besonders großem Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt zu synthetisieren, konzentrieren sich auf diesen Effekt [142].

Auswahlregeln

Mit der Zwei-Photonen-Anregung (*two photon excitation*, TPE) lassen sich Zustände in Atomen und Molekülen erreichen, die für die Ein-Photonen-Absorption (*one photon absorption*, OPA) nicht zugänglich sind, da bei der TPE die Parität des Ausgangszustandes gleich der des Endzustandes ist, wohingegen sie sich bei der OPE unterscheiden muß. Allerdings werden schon bei großen Atomen die Auswahlregeln der Übergänge durch Zumischen andere Zustände aufgeweicht, so daß die Unterscheidung zwischen verschiedenen Klassen von Zuständen bei Molekülen nicht immer möglich ist. Abbildung 2.28 zeigt Absorptionsspektren von zwei Aminosäuren, Tryptophan und Tyrosin, die mit

OPA und TPE aufgenommen wurden. In beiden Fällen werden Übergänge des aromatischen Teils des Moleküls angeregt (siehe Kap. 2.1). In den Spektren von Tyrosin ist zu erkennen, daß der Zwei-Photonen-Übergang bei kürzeren Wellenlängen erfolgt als von der Ein-Photonen-Absorption erwartet. Letztere ist zur besseren Vergleichbarkeit bei der doppelten Wellenlänge eingezeichnet. Mit TPE wird also ein Zustand erreicht, der energetisch höher als der mit OPA erreichte liegt. Die Fluoreszenz erfolgt allerdings aus dem selben Zustand. Im Fall von Tryptophan dagegen überlappen dann die Spektren fast vollständig. Mit TPE wie mit OPA wird der gleiche Zustand erreicht. Die Auswahlregeln sind nicht mehr streng gültig. Der Unterschied in den Auswahlregeln zwischen Tryptophan und Tyrosin führt dazu, daß eine Mischung dieser beiden Aminosäuren im Verhältnis Trp:Tyr = 1:25 bei Ein-Photonen-Anregung ($\lambda = 285$ nm) durch die Tyrosin-Emission dominiert wird, bei Zwei-Photonen-Anregung bei der doppelten Wellenlänge aber die Tryptophan-Emission überwiegt [143]. Daher können Proteine mit TPE auch mit Wellenlängen kürzer als 295 nm angeregt werden, ohne daß dabei Tyrosinfloureszenz zu erwarten ist, was bei OPA nicht der Fall ist.

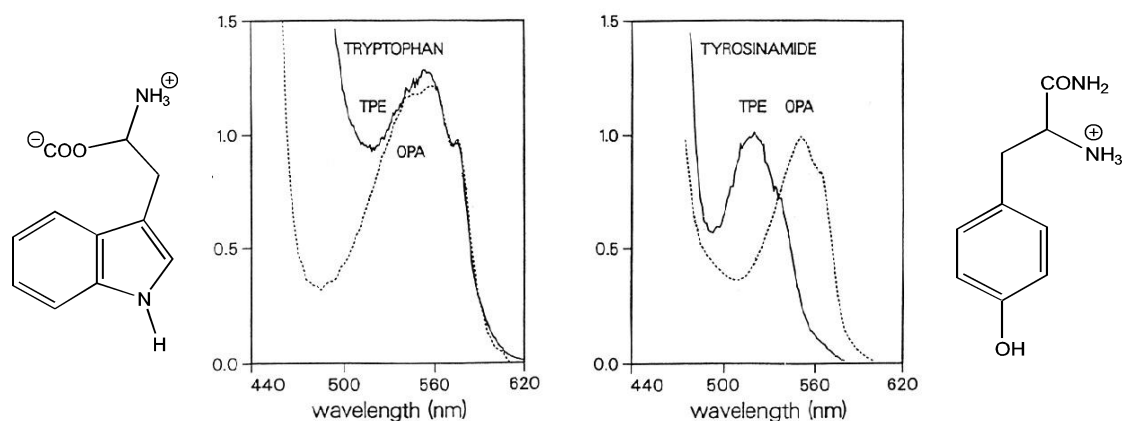


Abbildung 2.28: Ein- und Zwei-Photonen-Absorption von Tryptophan und Tyrosin(amid). *Innen:* Spektren der Ein-Photonen-Absorption (OPA) und Zwei-Photonen-Anregung (TPE) [67]. Die OPA-Spektren sind zum besseren Vergleich bei der doppelten Wellenlänge eingezeichnet. *Außen:* Struktur der Moleküle.

3 Experimenteller Aufbau

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Aufbau für die Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Mikroskopie erstellt, der in diesem Kapitel beschrieben werden soll. Das gesamte System wurde dabei so flexibel gestaltet, daß neben der Zwei-Photonen-Anregung auch Ein-Photonen-Anregung im sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich durchgeführt werden kann. Die Fluoreszenz kann sowohl zeitlich als auch spektral aufgelöst analysiert werden.

Im ersten Abschnitt wird das kommerzielle Lasersystem beschrieben, das bei allen Experimenten zum Einsatz kam und in einem großen Spektralbereich Pulse von etwa 150 fs Länge liefern kann. Die nächsten drei Abschnitte befassen sich mit den optischen Komponenten des Mikroskops, der Erweiterung auf spezielle Erfordernisse der Spektroskopie von Hämocyanin sowie der Experimentsteuerung. In Abschnitt 3.5 werden einige Vorversuche dargestellt, die den experimentellen Aufbau charakterisieren und seine Funktionsfähigkeit testen. Im letzten Abschnitt dieses Kapitels werden schließlich die Proben und die Probenpräparation beschrieben.

3.1 Lasersystem

Für die Zwei-Photonen-Anregung von Tryptophanen wird eine hohe Lichtintensität bei einer Wellenlänge zwischen 550 und 600 nm benötigt. Durch die quadratische Intensitätsabhängigkeit der Zwei-Photonen-Anregung ist es sinnvoll, den zur Verfügung stehenden Photonenstrom auf kurze Zeitintervalle zu bündeln, wie es schon im letzten Kapitel dargestellt wurde. Kurze Laserpulse einer Dauer von etwa 100–200 fs lassen sich heute mit kommerziell erhältlichen Lasersystemen erzeugen. Der geforderte Wellenlängenbereich erhöht den Aufwand etwas, läßt sich aber immer noch mit käuflichen Systemen erreichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Lasersystem verwendet, das aus einem Pump-laser, einem Titan-Saphir-Laser sowie einem damit gepumpten optisch-parametrischen Oszillator mit Frequenzverdopplung innerhalb des Resonators bestand. Mit diesem System lassen sich Pulse mit den oben genannten Eigenschaften mit einer Repetitionsrate von 76 MHz und einer Leistung von etwa 200 mW erzeugen. Das gesamte Lasersystem befindet sich auf einem schwingungsgedämpften optischen Tisch, zusammen mit dem weiter unten beschriebenen experimentellen Aufbau, und wird durch eine Flow-Box von laminarer, staubfreier und temperierter Luft umspült.

3.1.1 Pumplaser

Als Pumplaser wurde für die meiste Zeit dieser Arbeit ein Argon-Ionen-Laser (Innova Sabre TSM 15, Coherent Radiation) verwendet. Er war mit einem System zur Nachregelung der Spiegelstellung (*power track*) ausgestattet. Trotzdem führte der nicht unerhebliche Wärmeeintrag des Lasers – bei einem Wirkungsgrad von etwa 0.05 % – zu langen Aufwärmzeiten des gesamten Lasersystems. Als Anregungslaser wurde er *multi line*, also ohne linienselektives Element, bei einer Ausgangsleistung um 11 W im *light mode* betrieben. Dieser Modus regelt den Strom durch die Gasentladung nach, so daß die Ausgangsleistung konstant bleibt.

Die Vorteile des Argon-Ionen-Lasers – die Möglichkeit, Linien im Ultravioletten erzeugen zu können – überwogen den Nachteil der langen Aufwärmzeit nicht, so daß er gegen Ende der Arbeit gegen einen diodengepumpten, frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (mit Neodym dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat, Verdi V10, Coherent Radiation) ausgetauscht wurde. Bei diesem Lasersystem erzeugen zwei Diodenbänke jeweils etwa 20 W Laserlicht bei 808 nm, mit dem ein Nd:YAG-Kristall gepumpt wird. Im Laserresonator befindet sich weiterhin ein temperaturstabilisierter Lithium-Triborat-Kristall (LBO, LiB_3O_5), der sehr effizient die 1064 nm Strahlung des Nd:YAG frequenzverdoppelt. Die Ausgangsleistung beträgt maximal 10.5 W bei 532 nm. Da die Anschlußleistung des Systems nur etwa 1/40 des Argon-Ionen-Lasers beträgt, ist die Aufwärmzeit des Gesamtsystems deutlich reduziert. Bereits nach 5 Minuten erreicht der optisch-parametrische Oszillator 60 % seiner Endleistung.

3.1.2 Titan-Saphir-Laser

Aus dem kontinuierlichen Licht des Anregungslasers erzeugt ein Titan-Saphir-Laser (Mira 900-D, Coherent Radiation) etwa 120 fs kurze Laserpulse im nahen Infraroten (700–1000 nm). Das verwendete Modell ist auch in der Lage, etwa 1–2 ps lange Pulse im gleichen Wellenlängenbereich zu erzeugen. Da diese Option für die Zwei-Photonen-Experimente keine Verwendung fand, wird sie hier nicht weiter vorgestellt. Abbildung 3.1 zeigt den Aufbau des Laserresonators. Im folgenden fett gedruckte Bezeichnungen beziehen sich auf diese Abbildung. Der Strahl des Anregungslasers wird durch die Linse **L** auf den Titan-Saphir-Kristall **C** fokussiert, der sich in einer temperaturstabilisierten Halterung befindet. Mit Hilfe eines doppelbrechenden Lyot-Filters (*birefringent filter*, **BRF**) wird aus dem Verstärkungsbereich ein Wellenlängenintervall ausgewählt. In diesem Filter dreht ein doppelbrechender Kristall die Polarisationsrichtung des Lichtes [99]. Die Orientierung des Kristalls bestimmt, für welche Wellenlänge diese Drehung verschwindet und somit das Licht nicht aus der für den Resonator optimalen horizontalen Polarisationsrichtung gedreht wird. Um die Justage des Resonators zu vereinfachen, kann ein relativ komplexer Teil durch einen einfacheren (**aux. cavity**) ersetzt werden. Beim modengekoppelten Betrieb des Lasers muß aber der vollständige Resonator verwendet werden. Alle weiteren Elemente im Resonator werden für die Erzeugung kurzer Pulse benötigt. Die Modenkopplung wird passiv durch eine Kerr-Linse (siehe Abschnitt 2.4.2) erzielt. Als Medium dient dabei der Titan-Saphir-Kristall selbst. Sein Brechungsindex variiert

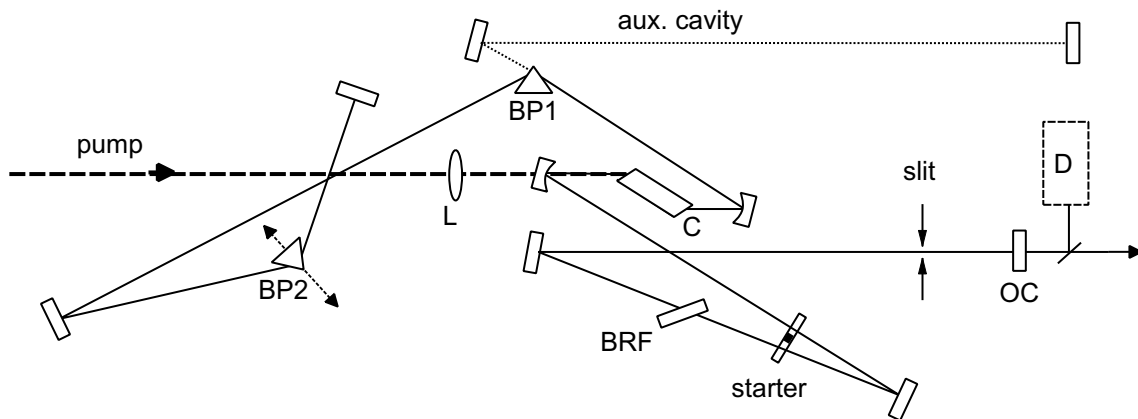


Abbildung 3.1: Titan-Saphir-Laser: Er wird durch den Pumplaser im Wellenlängenbereich 488–532 nm angeregt und liefert im nahen Infraroten (700–1000 nm) Pulse einer Breite von etwa 120 fs mit einer Wiederholfrequenz von 76 MHz. Zur Beschreibung der Bauteile sei auf den Text verwiesen.

intensitätsabhängig und fokussiert den Strahl bei optimaler Leistung auf den Spalt (**slit**). Die Breite des Spalts bestimmt den Verlust für den nicht-pulsenden Anteil der Energie im Oszillator, darum wird sie solange verringert, bis der Laser zu pulsen beginnt. Um dies zu überwachen, wird nach dem Auskoppelspiegel des Resonators ein geringer Teil der Leistung abgetrennt und auf mehrere Dioden **D** geleitet. Diese messen die Ausgangsleistung, liefern einen elektrischen Trigger-Puls synchron mit dem Laser-Puls und bestimmen den Dauerstrich-Anteil (*continuous wave*, cw) des Lasers, indem ein Etalon kontinuierlich moduliert wird [144]. Ist die spektrale Breite des Lasers geringer als der freie Spektralbereich des Etalons, wie es im cw-Modus der Fall ist, so moduliert das Etalon die transmittierte Intensität. Wenn die spektrale Breite des Lasers allerdings größer ist, so hat eine Modulation des Etalons keinen Einfluß auf die transmittierte Intensität. Mit diesem Verfahren kann eine dritte Diode bestimmen, ob ein Rest an kontinuierlicher Laserleistung vorhanden ist. Um die bei passiver Modenkopplung notwendigen zufälligen Leistungsspitzen zu provozieren, befindet sich im Resonator ein sogenannter **starter**. Ein kleines Glasplättchen wird schnell verkippt, so daß sich die effektive Resonatorlänge ändert und dies Intensitätsfluktuationen bewirkt [132]. Die Kontrollelektronik des Lasers zeigt einerseits die Werte der Dioden an, andererseits kann mit ihr auch die modengekoppelte Betriebsart ausgewählt werden. In dieser wird der cw-Anteil der Ausgangsleistung überwacht und der **starter** betätigt, sobald solche festgestellt werden.

Die Dispersion der Gruppengeschwindigkeit (GVD) wird durch eine Prismenstrecke bestehend aus zwei Brewster-Prismen (**BP1** und **BP2**) vor dem hochreflektierenden Endspiegel kontrolliert. Dabei steht das erste Prisma **BP1** fest und durch Translation des zweiten, senkrecht zu seiner Basis wird die Länge des Strahlweges durch das Glas und damit der Anteil der positiven GVD zusätzlich zur negativen GVD des Weglängenunterschieds kontrolliert. Durch die Wahl der Position von Prisma **BP2** läßt sich die Pulsbreite einstellen. Für genau eine Position erfüllen die Pulse dann das Fourier-Limit. Bei optimaler Justage ist dies die einzige Einstellung des Resonators, die von der Zentral-

wellenlänge abhängt. Der hochreflektierende Endspiegel wird immer senkrecht getroffen.

3.1.3 Optisch-parametrischer Oszillator

Der optisch-parametrische Oszillator (OPO) hat die Aufgabe, aus dem Licht des Titan-Saphir-Lasers im nahen Infraroten über den Zwischenschritt des infraroten Lichts sichtbare Pulse bei ähnlicher Pulsbreite zu erzeugen. Der verwendete Oszillator (APE Angewandte Physik und Elektronik, Berlin) ist verglichen mit dem Titan-Saphir-Laser relativ einfach aufgebaut (siehe Abb. 3.2). Der Anregungsstrahl wird durch die Linse **L1** und einen transmittierenden Resonatorspiegel auf den eigentliche **OPO**-Kristall fokussiert. Dabei handelt es sich um einen Kalium-Titanyl-Arsenat-Kristall (KTA, KTiOAsO_4), der nicht-kritisch phasenangepaßt ist ($\theta = 90^\circ$, siehe Kap. 2.4.2). Die infraroten Photonen des Signal- und Idler-Strahls entstehen in Strahlrichtung und definieren damit den Umlaufsinn des Ringoszillators, der allerdings nur den Signal-Strahl reflektiert. Der Oszillator hat nur einen weiteren Fokus, in dem sich der Kristall zur Frequenzverdopplung (**SHG**) befindet. Dies ist ein Lithium-Triborat-Kristall (LBO, LiB_3O_5), bei dem die Phasenanpassung durch Variation der Kristalltemperatur zwischen 10 und 200 °C erreicht wird. Der nun sichtbare Laserstrahl verläßt den Resonator durch den Auskoppelspiegel (**OC**) und wird durch Linse **L2** kollimiert.

Damit der OPO synchron gepumpt werden kann, muß sein Ring-Resonator die gleiche Länge wie der des ihn pumpenden Titan-Saphir-Lasers besitzen, also etwa 4 Meter. Dies bedingt die große Anzahl Spiegel, von denen einer (**M**) sowohl per Mikrometerschraube von Hand als auch per Piezo über die Elektronik verschoben werden kann. Die Längen der beiden Resonatoren müssen deutlich besser als eine Pulslänge (etwa 30 μm) übereinstimmen. Eine Regelektronik optimiert darum ständig die Position dieses Spiegels, um temperaturbedingte Änderungen der Länge des Titan-Saphir-Lasers oder des OPO zu kompensieren. Als Regelgrößen stehen verschiedene Signale zu Verfügung: zusätzlich zum

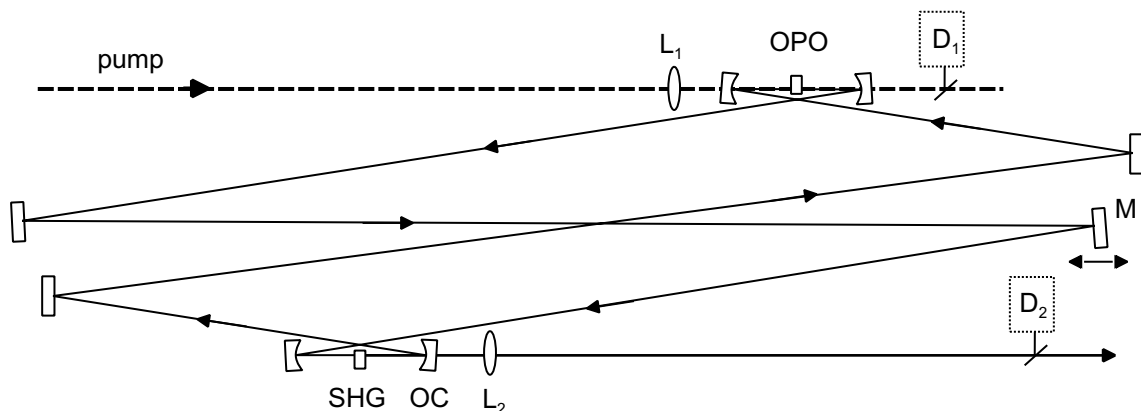


Abbildung 3.2: Der optisch-parametrische Oszillator (OPO). Durch den nichtlinearen Prozeß der parametrischen Verstärkung erzeugt dieser Laser aus Licht der Wellenlänge um 800 nm zuerst Licht im Infraroten, dessen Frequenz dann verdoppelt wird, so daß schließlich Pulse im Sichtbaren erzeugt werden. Auch hier sind die einzelnen Bauteile im Text beschrieben.

eigentlichen OPO-Prozeß laufen im KTA-Kristall weitere nichtlineare Mischprozesse ab. Eines dieser Mischprodukte im blauen Spektralbereich wird durch Diode **D1** aufgezeichnet. Dies ist die einfachste Regelgröße. Weiterhin ist sowohl ein kleines Spektrometer als auch ein Autokorrelator an die Regelelektronik angeschlossen, so daß auf konstante spektrale oder zeitliche Breite geregelt werden kann. Schließlich mißt Diode **D2** direkt die Intensität des erzeugten sichtbaren Lichts. Wenn auf konstante Ausgangsleistung geregelt werden soll, so muß zusätzlich einer der spektralen Parameter herangezogen werden, um die Richtung der Abweichung festzustellen. Bei den in den folgenden Kapiteln vorgestellten Experimenten wurde in den allermeisten Fällen auf konstante spektrale Breite geregelt, da so das stabilste Verhalten des Lasers erzielt werden konnte.

Um eine gleichbleibende Charakteristik des Laserlichts zu gewährleisten und eventuelle Abweichungen zu erkennen, wurde ein Teil der Laserleistung (bis zu 60 %) ausgekoppelt und wie oben erwähnt auf ein Spektrometer und einen Autokorrelator geleitet. Das Spektrometer besitzt ein rotierendes Gitter, das das Licht auf eine Photodiode ablenkt und so kontinuierlich ein Wellenlängenspektrum des Pulses mit einer Auflösung von etwa 0.2 nm zu Verfügung stellt. Der Autokorrelator wurde in der sog. untergrundfreien Konfiguration betrieben und lieferte ebenfalls kontinuierlich eine Autokorrelation des Pulses. Beide Geräte sind an die Regelelektronik des OPO angeschlossen und über diese vom Computer auslesbar (siehe Abschnitt 3.4).

3.2 Mikroskop

Zur Detektion einzelner Moleküle wird ein hochauflösendes optisches Mikroskop benötigt, da hohe optische Auflösung bei vergleichbarer Abbildungsqualität gleichbedeutend mit hoher Einsammeleffizienz ist, auf die es letztendlich ankommt. Außerdem soll so wenig Untergrundfluoreszenz wie möglich entstehen, was durch einen kleinen Anregungsfokus erzielt werden kann. Bei der Zwei-Photonen-Anregung kommt hinzu, daß die benötigte Anregungsintensität um mehrere Größenordnungen höher als bei der konventionellen Ein-Photonen-Anregung ist, die Fluoreszenzintensität aber bestenfalls gleich bleibt. Die Unterdrückung des Anregungslichts muß also deutlich besser sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mikroskop entwickelt und aufgebaut, das diesen Anforderungen genügt. Bei Raumtemperatur können Proben sowohl in Flüssigkeit bzw. unter einer Flüssigkeitsschicht, als auch direkt auf einem Deckglas oder in einem Polymerfilm untersucht werden. Der Strahlengang ist so gehalten, daß sowohl Ein- als auch Zwei-Photonen-Messungen durchgeführt werden können. Abbildung 3.3 zeigt eine Skizze des gesamten Versuchsaufbaus. Vom Filter **F1** im Anregungsstrahlengang an befindet sich der ganze Aufbau in drei optisch voneinander abgeschirmten Kästen, um den Einfluß von Raumlicht gering zu halten. Im folgenden sollen nun die einzelnen Komponenten des Mikroskops besprochen werden. Das in Abbildung 3.3 ebenfalls dargestellte Lasersystem wurde bereits im vorangehenden Abschnitt erläutert.

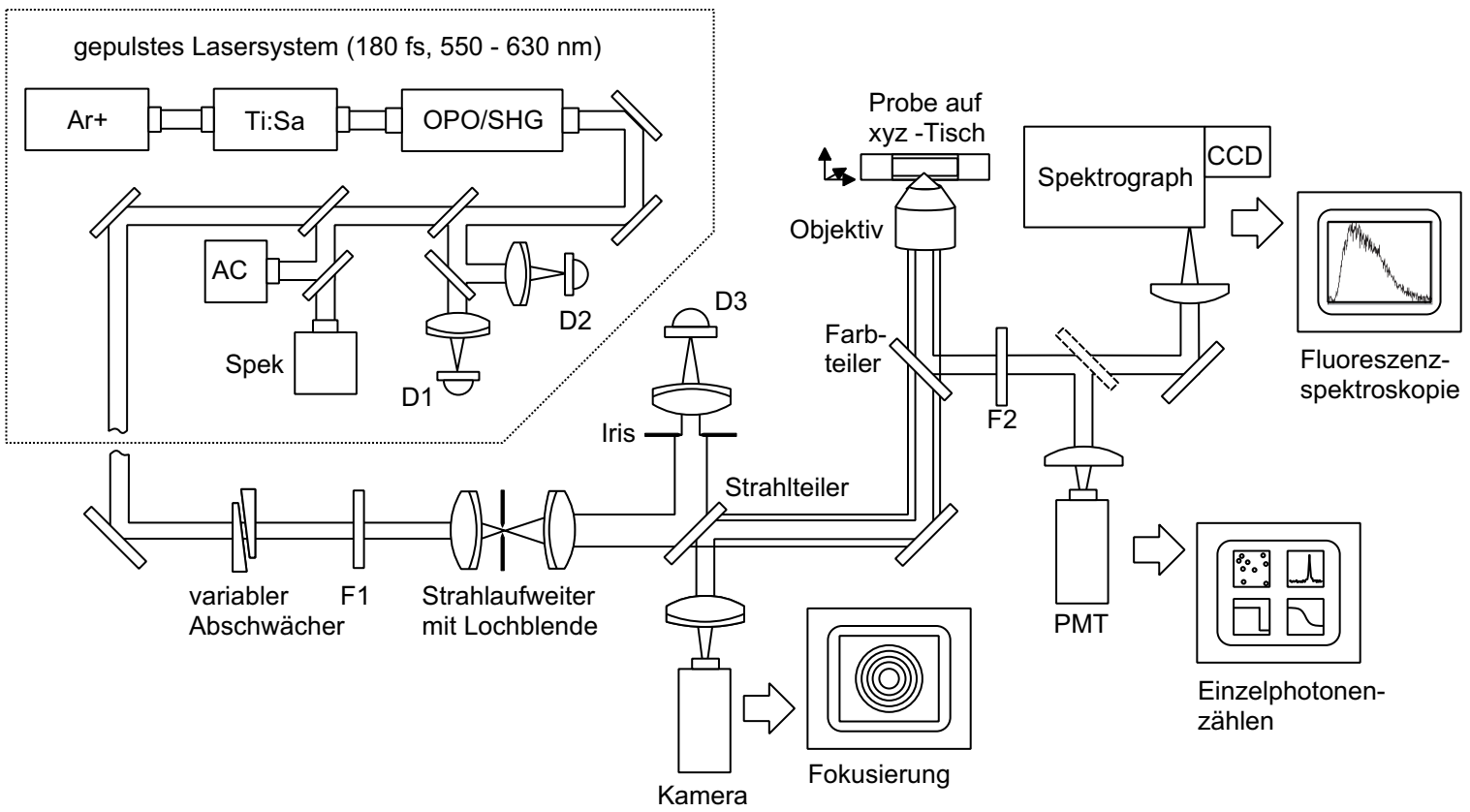


Abbildung 3.3: Überblick über die optischen Komponenten des Versuchsaufbaus, die im Text beschrieben sind.

3.2.1 Anregungsstrahlengang

Das Laserlicht der Wellenlänge 550–600 nm wird vom optisch-parametrischen Oszillator zum eigentlichen Experiment geleitet. Um die Pulsbreite durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion in einer Glasfaser nicht zu vergrößern, muß der Strahl über Spiegel geführt werden, wodurch etwaige Variationen in der Strahlrichtung größeren Einfluß haben. Dies wird durch die permanente Kontrolle der Anregungsrate überwacht (s.u.). Der Strahl wird mit einem variablen Graufilter abgeschwächt (**variabler Abschwächer**). Dieser Filter besteht aus zwei gegeneinander verschiebbaren Graukeilen, so daß die Transmission über das Strahlprofil homogen ist (M-925B, Newport). Anschließend werden durch einen Schott-Langpaß-Glasfilter (OG 530, **F1**) nichtlineare Mischprodukte des OPO im späteren Detektionswellenlängenbereich abgetrennt. Mischprodukte mit größerer Wellenlänge werden im Detektionsfilter absorbiert und sind von so geringer Intensität, daß sie auf die Probe keinen Einfluß haben.

Kontrolle der Anregungsrate

Bei der Zwei-Photonen-Anregung hängt die Anregungsrate nicht nur vom Quadrat der mittleren Intensität ab, sondern auch von der Form des Pulses (siehe Abschnitt 2.4.4). In vielen der im folgenden vorgestellten Experimenten soll die Fluoreszenzintensität von Molekülen unter unterschiedlichen Bedingungen verglichen werden. Daher ist es wichtig, bei allen Experimenten gleiche Anregungsraten einzustellen oder wenigstens den Einfluß einer veränderten Anregungsrate im nachhinein auszugleichen. Das hierzu verwendete Verfahren soll nun vorgestellt werden.

Eine Kombination von drei Photodioden ermöglicht es in einem gewissen Maße, den Einfluß von Variationen in der Pulsform oder Laserleistung nachträglich aus der Fluoreszenzzählrate herauszurechnen. Eine Siliziumcarbid-Photodiode (**D1**, JEC 1S, Laser Components, bezogen über NT&C, siehe Abschnitt 3.5.1) absorbiert nur Photonen im Wellenlängenbereich 210–380 nm, allerdings kann in ihr auch Zwei-Photonen-Absorption stattfinden [145]. In diesem Fall ist die Abhängigkeit des Diodenstromes und der Fluoreszenzzählrate von Form und Intensität der Laserpulse identisch. Somit kann die Zählrate um diese Variationen korrigiert werden. Allerdings ist die Siliziumcarbid-Photodiode (SiC) relativ unempfindlich und benötigt deshalb eine höhere Leistung, als kurz vor dem Mikroskopobjektiv vorhanden wäre. Die SiC-Diode wurde darum relativ nahe am Laser plziert. Mit Hilfe zweier linearer Photodioden (**D2** und **D3**), eine in der Nähe der SiC-Diode, die andere kurz vor dem Mikroskopobjektiv, wird dann nur noch die Strahlstabilität überwacht. Insbesondere bei Verwendung einer Lochblende im Strahlaufweiter ist dies kritisch. Die zweite lineare Diode **D3** liefert ein Signal, das proportional der Anregungsleistung am Ort der Probe ist. Dazu wird mit einer Iris vor der Diode der aufgeweitete Anregungsstrahl (s.u.) auf den Durchmesser der Eingangsapertur des Objektivs beschnitten. Die Diode detektiert damit den gleichen Ausschnitt des Strahlprofils, der auch auf die Probe fällt. Mit Hilfe eines Leistungsmeßgeräts (13PEM001, Melles Griot), wurde die Diode **D3** auf die Leistung *vor* dem Objektiv kalibriert. In dieser Arbeit sind diese Werte dann immer mit der Transmission des Objektivs (56 % [146]) auf die Lei-

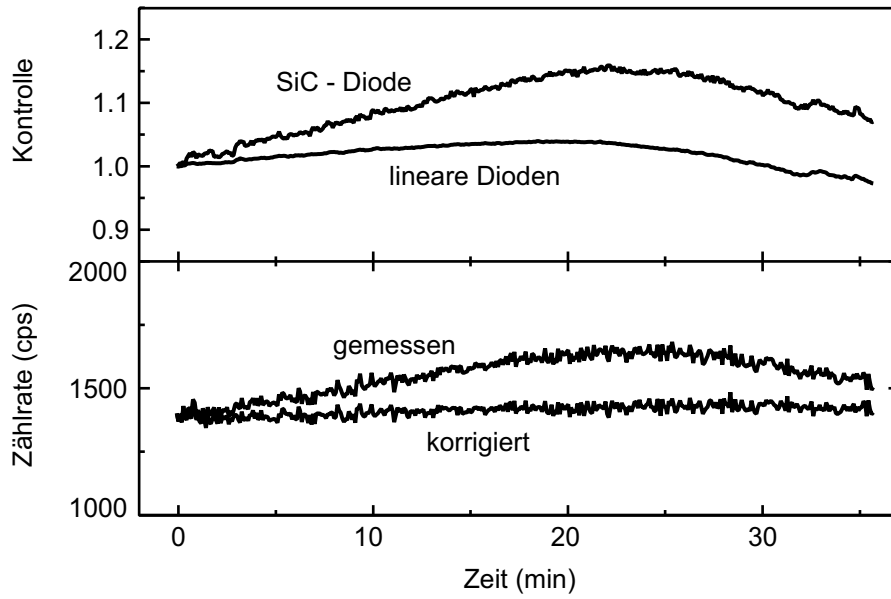


Abbildung 3.4: Einfluß des Normierungssignals auf den zeitlichen Verlauf der Zählrate. Hier ist als Beispiel die Fluoreszenz-Zeitspur einer Tryptophanlösung dargestellt, wobei der Übersichtlichkeit wegen nicht auf den Mittelwert, sondern auf den Anfangswert normiert wurde. Alle Variationen der Zählrate sind Artefakte des experimentellen Aufbaus. Sie lassen sich zum großen Teil durch das Kontrollsignal beseitigen.

stung bzw. Intensität im Zentrum des Fokus umgerechnet. Wegen des gepulsten Betriebs des Lasers muß die zeitlich gemittelte Leistung bzw. Intensität von der Peak-Intensität unterschieden werden. Falls nicht abweichend angegeben, sind in dieser Arbeit immer die zeitlich gemittelten Werte gemeint.

Aus den Signalen der quadratisch-intensitätsabhängigen SiC-Diode $D1$ und der beiden linearen Dioden $D2$ und $D3$ läßt sich dann ein Normierungssignal N berechnen:

$$N = D1 \left(\frac{D3}{D2} \right)^2 . \quad (3.1)$$

Die korrigierte Zählrate Z_{corr} lautet dann

$$Z_{\text{corr}} = Z_{\text{orig}} \frac{\overline{N}}{N} , \quad (3.2)$$

wobei der Überstrich den zeitlichen Mittelwert bedeutet. Durch dieses Verfahren ist der Mittelwert der Normierung 1 und deren Einfluß auf die absoluten Zählrate minimal. Abbildung 3.4 zeigt den Einfluß des Normierungssignals auf den zeitlichen Verlauf der Zählrate.

Strahlaufweitung

Die optimale Auflösung erzielt ein optisches Mikroskop, wenn die einfallende Wellenfront einer ebenen Welle entspricht [103]. Dies läßt sich durch starkes Aufweiten des

gaußförmigen Strahlprofils des Lasers erzielen. Der Nachteil dieses Verfahren ist, daß nur noch ein sehr geringer Anteil der Leistung wirklich durch die Apertur des Objektivs fällt. Je nach Experiment muß also ein anderer Kompromiß zwischen Fokusbereich und Laserleistung gefunden werden. Bei der Vorstellung der Experimente ist darum immer der durch Abrastern eines nahezu punktförmigen Objektes (markierte Latexkugel, einzelnes Molekül) ermittelte Fokusbereich angegeben. Der hier aufgebaute Strahlaufweiter ist so variabel gestaltet, daß Aufweitungsverhältnisse von 1:5, 3:5 und 5:3 möglich sind. Im letzteren Fall wird der Strahldurchmesser leicht verkleinert, um die maximale Laserleistung am Ort der Probe zu ermöglichen. Als Linsen wurden entweder präzise Achromate der Brennweite $f = 30, 50$ oder 80 mm oder ein Mikroskopobjektiv der Brennweite $f = 16$ mm eingesetzt. In diesem Fall kann auch eine Lochblende im Fokus des Strahlaufweiters positioniert werden, die als Raumfilter dient und so eine optimale Wellenfront am Objektiv garantiert. Aus diesem Grund ist auch die Zahl der optischen Elemente nach dem Raumfilter so gering wie möglich gehalten worden, damit diese nicht die Wellenfront wieder verändern.

Farbteiler

Die Farbteiler sind überwiegend so aufgebaut, daß ihr Reflexionsbereich kurzwellig vom Transmissionsbereich liegt. Bei der Zwei-Photonen-Anregung ist aber im Unterschied zur Ein-Photonen-Anregung die Anregungswellenlänge langwelliger als die Fluoreszenz. Um also zwischen Ein- und Zwei-Photonen-Anregung wechseln zu können, ohne auf spezielle Farbteiler ausweichen zu müssen, muß der Strahlweg variabel sein. Hinzu kommt, daß sowohl Anregungs- als auch Detektionsstrahlengang die gleiche Strahlhöhe über dem optischen Tisch erhalten sollen – was den Austausch von einzelnen Komponenten vereinfacht. Schließlich soll das Mikroskopobjektiv senkrecht eingebaut sein, um flüssige Proben einfacher verwenden zu können. Diese Anforderungen erfüllt vollständig ein System aus drei Umlenkspiegeln, das den Anregungsstrahl kurz vor dem Farbteiler in der Höhe versetzt (in Abbildung 3.3 der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet).

Für die Zwei-Photonen-Anregung wurde schließlich ein speziell angefertigter Farbteiler eingesetzt (510 DCXRU, AHF Analysentechnik, Tübingen). Sein Reflexionsband liegt zwischen 330 und 450 nm, und er transmittiert im Bereich 550–600 nm.

3.2.2 Objektiv und Probenhalterung

Die zentrale Komponente des Mikroskops ist das **Objektiv**. Es muß das Fluoreszenzlicht im nahen Ultravioletten (300–400 nm) mit großer Effizienz einsammeln. Gleichzeitig muß es chromatisch so gut korrigiert sein, daß der Anregungsfokus bei 590 nm mit dem Detektionsfokus im UV übereinstimmt. Nur ein Objektiv erfüllt diese Anforderungen: das Ultrafluor 100x, NA=1.2 von Zeiss. Es besitzt eine relativ gleichmäßige Transmission im Bereich 250–900 nm, da seine Linsen nicht entspiegelt sind. Aus dem gleichen Grund beträgt die Transmission aber nur etwa 56 % [146]. Das Objektiv ist für den Betrieb mit Glycerin-Immersion und Quarz-Deckgläsern ausgelegt. Die Korrektur von chromatischen und sphärischen Linsenfehlern ist besser, als es die Experimente benötigen, da das

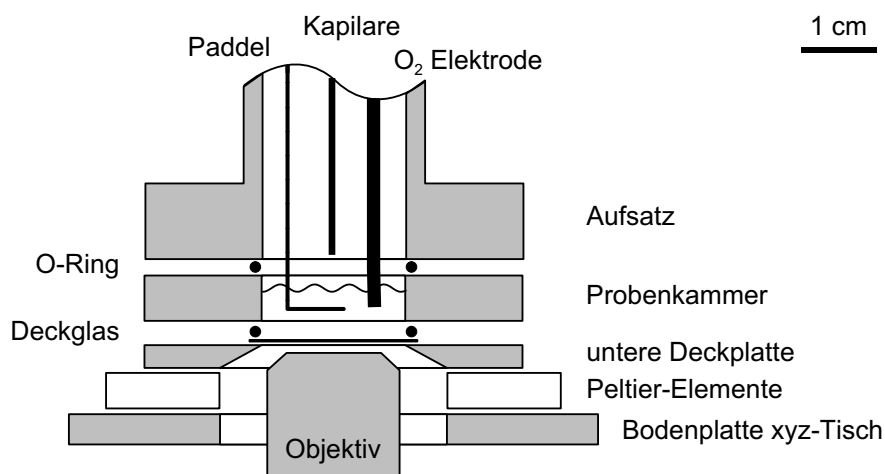


Abbildung 3.5: Die Probenkammer im Mikroskop. Der Aufsatz sowie das Paddel, die Kapillare und die Elektrode werden für die Sauerstoffbindungskurven benötigt und sind in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Gesichtsfeld auf der Probe etwa $180\ \mu\text{m}$ Durchmesser umfaßt, aber in den Experimenten nur auf der optischen Achse gearbeitet wird.

Das Objektiv befindet sich in einer Halterung, mit der es einerseits um zwei Achsen gekippt und andererseits in alle drei Raumrichtungen verschoben werden kann. Die Translation in Strahlrichtung wird zum Fokussieren benötigt (s.u.), die vier anderen Freiheitsgrade sind notwendig, um das Objektiv optimal zum Anregungsstrahl zu positionieren. Es muß sich sowohl zentrisch als auch senkrecht zum vorgegebenen Strahl befinden, um eine optimale Qualität des Fokus zu erzielen. Dies läßt sich anhand des Rückreflexes der Objektivlinsen auf der Justage-Videokamera (**Kamera** in Abb. 3.3, YC05, IPPI) überprüfen, solange keine Probe eingelegt ist. Der an den nicht entspiegelten Linsen reflektierte Anregungsstrahl wird wieder vom Farbteiler transmittiert und ein Teil dieses zurücklaufenden Strahls wird von einer Glasplatte auf die Kamera geleitet. Dazu reicht die normale Reflektivität einer Glas-Luft-Grenzfläche aus. Die Dicke der Glasplatte ist so gewählt, daß die Reflexe von Vorder- und Rückseite gut getrennt sind.

Die **Probe** befindet sich in einer Probenkammer aus Edelstahl, die nach unten durch das Quarz-Deckglas abgeschlossen wird (Abb. 3.5). Auch nach oben kann die Kammer durch ein zweites Deckglas verschlossen werden. Ein O-Ring dichtet beide Verbindungen gegen Flüssigkeitsaustritt und zu einem gewissen Grad auch gegen Gasaustritt ab. Die Probenkammer liegt auf zwei Peltier-Elementen (PKE 36A0020, Peltron, Fürth) auf einem piezoelektrischen xyz-Verschiebetisch auf. Die Peltier-Elemente ermöglichen es zusammen mit einem temperaturempfindlichen Widerstand, der an die Probenkammer geschraubt werden kann, die Temperatur in der Probe zu regeln. Es hat sich allerdings herausgestellt, daß die Konstanz der Raumtemperatur durch die Klimaanlage gut genug war, so daß der Aufwand der gesonderten Temperaturregelung die dadurch erreichte bessere Temperaturstabilität nicht gerechtfertigt hat. Darum wurde die Peltier-Temperaturregelung in den Experimenten nicht verwendet.

Der piezoelektrische **xyz-Verschiebetisch** (PI-517.3CL, Physik Instrumente) hat einen Verstellbereich von $100 \times 100 \times 20 \mu\text{m}^3$. Er besitzt einen geschlossenen Regelkreis (*closed loop*), der die Position in allen drei Raumrichtungen mit Hilfe von kapazitiven Positionssensoren überwacht und nachregelt. Dadurch liegt seine Anfahrgenauigkeit bei etwa 0.5 nm, die im Experiment durch das Rauschen der analogen Sollgrößen bestimmt ist. Die beiden horizontalen Achsen x und y werden zum Verfahren der Probe beim Aufnehmen von Bildern verwendet und vom Computer aus angesteuert (siehe Abschnitt 3.4). Es besteht bei allen drei Achsen zusätzlich zu den analogen Eingängen der Sollposition noch die Möglichkeit, manuell einen Offset vorzugeben. Um die Probe manuell über eine große Distanz verschieben zu können, ist der piezoelektrische Verschiebetisch auf einen rein mechanischen Kreutztisch (MT 25x25, Märzhäuser) montiert. Der maximale Translationsweg mit diesem Kreutztisch ist durch die Größe des Fensters im Probenhalter limitiert.

Zur Fokussierung der Probe kann das Mikroskopobjektiv mit einer Mikrometerschraube in Strahlrichtung um mehrere Millimeter verschoben werden. Die Feineinstellung erfolgt über die vertikale z-Achse des piezoelektrischen Verschiebetisches. Diese Trennung erlaubt es, den Fokus nachzuregulieren, ohne das lichtdichte Gehäuse des Mikroskops zu öffnen und ohne die empfindliche Mechanik der Objektiv- und Probenhalterung zu berühren. Zur Kontrolle des Fokus' dient der Rückreflex des Anregungslichts von der Deckglas-Puffer (bzw. -Luft) -Grenzfläche. Wie schon bei der Justage des Objektivs beschrieben, wird er auf die Justage-Kamera (**Kamera**) geleitet und kann so ständig auf einem Videomonitor kontrolliert werden, ohne die laufende Messung zu unterbrechen.

3.2.3 Detektionsstrahlengang

Das Fluoreszenzlicht im Wellenlängenbereich 300–450 nm wird vom Mikroskopobjektiv eingesammelt (Abb. 3.3) und als kollimierter Strahl abgegeben (sog. unendlich Optik). Der **Farbteiler** reflektiert das Licht in Richtung der Detektoren. Eine Filterkombination **F2** absorbiert das Anregungslicht und transmittiert nur ein definiertes Wellenlängenintervall. Die Filterkombination besteht aus einem Schott-Glasfilter (BG3, 2 mm dick) und einem Interferenzfilter. Der Glasfilter ist so in eine Trennwand eingebaut, daß kein Licht in den Bereich der Detektoren eintritt, das nicht den Filter durchlaufen hat. Dies reduziert die Untergrundzählrate des Detektors erheblich. Als Interferenzfilter kamen zwei verschiedene Modelle zum Einsatz, die sich in der Lage ihres Transmissionsbereiches unterscheiden (langwellig D390/120, kurzwellig D337/75, beide AHF Analysentechnik, Tübingen). Im folgenden werden diese beiden Kombinationen jeweils nur noch als die langwellige oder die kurzwellige Filterkombination bezeichnet. Abbildung 3.6 zeigt die Filtercharakteristik für beide Kombinationen zusammen mit Emissionsspektren von Hämocyanin (oxygeniert und deoxygeniert) sowie von Tryptophan in Puffer. Man erkennt, daß die langwellige Kombination besser auf Tryptophan in Puffer angepaßt ist, die kurzwellige aber die Lage des Maximums der Hämocyaninfluoreszenz besser bestimmen kann.

Nach den Filtern wird das Fluoreszenzlicht entweder auf den Photomultiplier oder auf den Eingangsspalt des Spektrometers umgeleitet, indem ein Spiegel in den Strahlengang

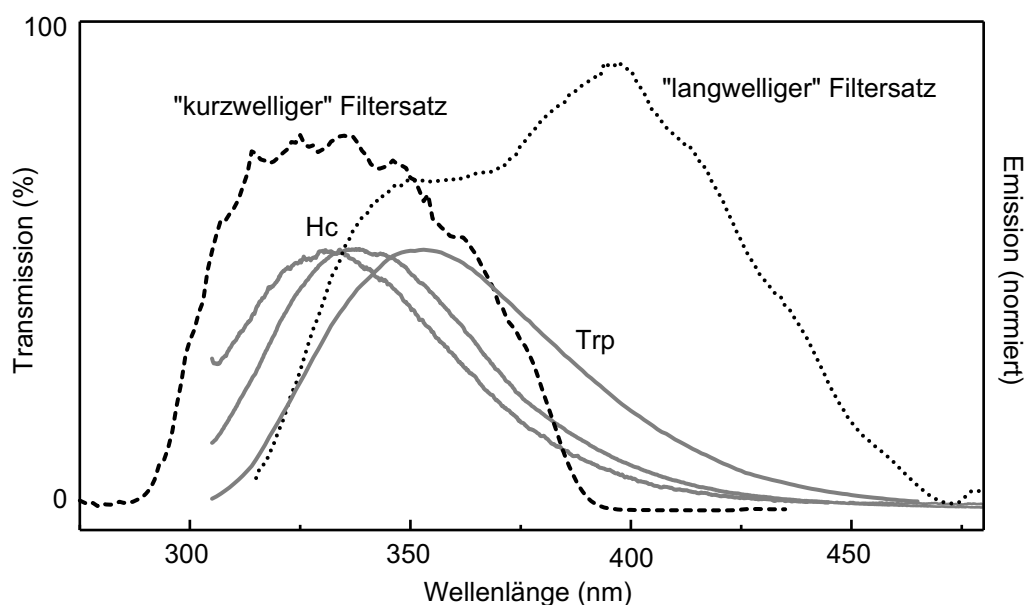


Abbildung 3.6: Charakteristik der beiden Filterkombinationen im Detektionsstrahlengang. Zum Vergleich sind die Emissionsspektren von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämocyanin sowie von Tryptophan in Puffer eingetragen (von kurzen zu langen Wellenlängen).

geklappt wird. Beide Umlenkspiegel im Detektionsstrahlengang sind Aluminium-Spiegel (RAL UV, Linos), da sie in diesem Wellenlängenbereich besser und spektral homogener reflektieren als die ansonsten wegen ihrer höheren Reflektivität verwendeten Silberspiegel.

Photomultiplier

Als spektral integrierender Detektor wurde ein Photomultiplier (**PMT**) mit Bialkali-Kathode (R4420P, Hamamatsu) eingesetzt. Eine Quarz-Linse fokussiert das Fluoreszenzlicht auf seine Kathode. Bei 300 nm hat er eine maximale Quanteneffizienz von etwa 20 %. Die spektrale Abhängigkeit der Quanteneffizienz ist über das durch die Filter vorgegebene Intervall zu vernachlässigen. Diese Quanteneffizienz ist verglichen mit den in Einzelmolekülexperimenten gewöhnlich verwendeten Avalanche-Photodioden deutlich geringer, die im Optimum bei $\lambda = 630$ nm auf eine Quanteneffizienz von 70 % kommen. Im Ultravioletten liegt sie dann allerdings unter 2 %, so daß diese Detektoren hier nicht verwendet werden konnten. Der benutzte Photomultiplier ist speziell zum Photonen zählen auf eine geringe Dunkelzählrate selektiert worden. Bei Raumtemperatur besitzt er eine Dunkelzählrate von 10 counts/sec, in seinem auf -20 °C gekühltem Gehäuse (PC177CE, Products for Research) sind es nur noch 1 count/sec. Die Betriebsspannung wurde auf ein optimales Signal-zu-Untergrund-Verhältnis eingestellt und betrug 800 V. Die Ausgangspulse wurden mit einem kombinierten Verstärker und Diskriminator (PM-PD, ALV, Langen) in TTL-Pulse (Transistor-Transistor-Logik, $5V \hat{=}$ ein) umgewandelt. Dieser Diskriminator zeichnet sich durch eine gute Stabilität der Diskriminator-Schwelle

und eine geringe Variation der Transitzeit aus, wie es für Fluoreszenz-Korrelations-Messungen erforderlich ist. Außerdem liefert er TTL-Pulse, die sich gut auf verschiedene Geräte verteilen lassen, so daß nur an einer Stelle die Pulse diskriminiert werden müssen. Sobald dieser Diskriminator einen Puls als „echt“ definiert hat, wird er auch von allen zur Auswertung angeschlossenen Geräten als solcher behandelt.

Spektrograph

Als spektral auflösende Detektionseinheit diente eine Kombination aus **Spektrograph** und **CCD-Kamera**. Eine Quarz-Linse ($f = 30$ mm) fokussiert das Fluoreszenzlicht auf den Eingangsspalt des Spektrographen (SpectraPro 500i, Acton Research) der Brennweite $f = 500$ mm, der mit einem für ultraviolettes Licht optimiertem Gitter (*blazing wavelength* $\lambda = 300$ nm) mit 300 Linien/mm ausgestattet ist. Hier zeigte sich deutlich die Wellenlängenabhängigkeit der Linsenbrennweite in diesem Spektralbereich. Nur ein Teil des Spektrums konnte optimal auf den Eingangsspalt fokussiert werden. Da der Spektrograph ein sogenannter *imaging*-Spektrograph ist, bildet er den Eingangsspalt in vertikaler Richtung auf die Kamera ab, mit der so die Qualität des Fokus beurteilt werden kann. Als Kamera diente eine flüssig-Stickstoff-gekühlte CCD-Kamera (Roper Scientific vormals Princeton Instruments, LN/CCD-1100PB). Sie besaß einerseits eine besonders hohe Quanteneffizienz, da der eigentliche Detektor-Chip durch das Substrat belichtet wird (*back illuminated*), und so die Kontakte auf der Oberfläche nicht einen Teil der Fläche abschatten. Zum anderen ist eine Schicht aufgebracht, die Reflexionsverluste im Ultravioletten reduziert. Dadurch liegt die Quanteneffizienz dieser Kamera im hier interessierenden Spektralbereich bei etwa 60 %. Bei der Verstärkung und Analog-Digital-Wandlung der erzeugten Elektronen werden durchschnittlich 4.2 Elektronen in ein count umgerechnet, so daß die effektive Quanteneffizienz bei etwa 15 % liegt. Durch die Stickstoffkühlung beträgt die Dunkelzählrate 0.1 counts/ (pixel h) und das Ausleserauschen 1–2 counts.

Der Detektor hat eine Größe von 26.4×7.9 mm² und ist in 1100×330 Pixel unterteilt. Die Ausdehnung des Spektrums auf der Detektorfläche umfaßte vertikal etwa 20 Pixel und horizontal, je nach Filter, etwa 800 Pixel. Um alle detektierten Photonen im Spektrum zu berücksichtigen, wurde vertikal ein Streifen von 20 Pixeln Höhe schon vor dem Auslesen zusammengefaßt (*hardware binning*). Pixel außerhalb dieses Streifens werden nicht berücksichtigt, tragen also nicht zum Rauschen bei. In horizontaler Richtung, also auf der Wellenlängenskala, werden nicht 800 Datenpunkte benötigt, um das Spektrum aufzulösen. Darum sind auch in diese Richtung jeweils 5 Pixel zu einem Punkt schon vor dem Auslesen zusammengefaßt worden.

Sowohl die CCD-Kamera als auch das Gitter des Spektrographen haben in dem hier interessierenden Wellenlängenbereich eine nicht zu vernachlässigende spektrale Variation in der Empfindlichkeit bzw. Reflexion. Zusammen mit der Transmissionscharakteristik der Filter im Detektionsstrahlengang führt dies zu einer deutlichen Modifizierung der gemessenen Spektren. Um die in diesem Aufbau gemessenen Spektren mit anderen vergleichen zu können, muß die spektrale Charakteristik des gesamten Detektionssystems bestimmt werden. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Wolframbandlampe (1000 W,

EG&G), deren Spektrum tabelliert ist. Sie wird aus etwa einem Meter Entfernung über einen Aluminiumspiegel in den Detektionsstrahlengang eingekoppelt, wofür das Objektiv entfernt wurde. An drei Stellen sorgte eine Iris dafür, daß der Strahlengang bei der Kalibrierung mit dem bei der späteren Detektion übereinstimmt. Die beiden Strahlengänge unterscheiden sich nur in dem zusätzlichen Spiegel, dem fehlenden Objektiv und in einer größeren Divergenz der Wolframbandlampe. Die Transmissionscharakteristik des Objektivs kann nicht mit vermessen werden, da dazu das Licht der Lampe mit hoher numerischer Apertur fokussiert werden müßte, was eine zusätzliche unbekannte Wellenlängenabhängigkeit einbringt. Aus gleichem Grund kann auch die Divergenz der Lampe nicht korrigiert werden, wodurch die Einkopplung in den Spektrographen etwas anders ausfällt. Das Verhältnis zwischen dem so gemessenen Kalibrierspektrum und dem tabellierten Spektrum wird als Detektionscharakteristik des Spektrographen verwendet.

Detektionseffizienz

Die Detektionseffizienz des Mikroskops beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Photon detektiert wird, das im Fokus der Objektivs emittiert wurde. Sie läßt sich als Produkt der einzelnen Transmissions- und Reflexionswerte der Bauteile im Detektionsstrahlengang berechnen. Die Werte sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Die Einsammeleffizienz des Objektivs wurde in Abschnitt 2.3.3 unter Berücksichtigung des Brechungsindexsprungs für eine isotrope Anordnung von Dipolen an der Grenzfläche berechnet. Die Transmission des verwendeten Objektivs beträgt im Ultravioletten etwa 52 % (verglichen mit etwa 56 % im Sichtbaren) [146]. Die Reflektivität des Farbteilers ist auf 90 % spezifiziert. Die Transmissionscharakteristik der langwelligen Filterkombination wurde mit dem Emissionsspektrum von oxygeniertem Hämocyanin gewichtet und ergibt einen Mittelwert von 44 %. Für Tryptophan ergibt sich eine gewichtete Transmission von 57 %. Die kurzwellige Kombination ist etwas schlechter. Die Reflektivität der Spiegel wurde dem Datenblatt des Herstellers entnommen. Für Reflexionsverluste an der Linse und am doppelwandigen Isolationsfenster des PMT-Gehäuses wurden 4 % je Grenzfläche angenommen. Die Detektionseffizienz des PMT ist vom Hersteller mit

Element	Effizienz (%)
Objektiv, Einsammeleffizienz	25
Objektiv, Transmission	52
Farbteiler	90
Filterkombination	44
Spiegel	80
Linse	92
Fenster	85
PMT, Quanteneffizienz	20
Gesamtsystem	0.65

Tabelle 3.1: Die Detektionseffizienz ϕ des Mikroskops zurückgeführt auf die Transmissions- bzw. Reflexionswerte der einzelnen Bauelemente im Detektionsstrahlengang.

20 % angegeben. Damit ergibt sich eine Gesamt-Detektionseffizienz von 0.65 %. Dieser Wert liegt im unteren Bereich der für Einzelmoleküldetektion verwendeten Mikroskope, die Detektionseffizienzen zwischen 1 und 5 % erreichen [147]. Insbesondere die geringe Transmission des Objektivs und die geringe Quanteneffizienz des Detektors machen sich hier bemerkbar. Zur Zeit gibt es jedoch keine Alternative zu den hier verwendeten Komponenten.

3.3 Erweiterung für Sauerstoffbindungskurven

Um die Sauerstoffabhängigkeit der Tryptophanfluoreszenz in Hämocyanin zu untersuchen, wurde in das Mikroskop ein Aufbau integriert, wie er in der AG Decker für Sauerstoffbindungskurven verwendet wird. Verschiedene Gase können über die Probe geleitet werden, um den Sauerstoffpartialdruck in der Lösung zu variieren. Ein Nadelventil erlaubt die genaue Dosierung der Durchflußmenge, die über einen Schwebekörper-Durchflußmesser (PM2044, Tablar) abgelesen werden kann. Eine Waschflasche reichert das Gas mit Wasserdampf an, um ein Verdunsten der Proben-Lösung (und eine damit einher gehende Veränderung der Konzentration) möglichst zu vermeiden. Schließlich wird das Gas zum Probenhalter geleitet und mit Hilfe einer Kapillare kurz oberhalb des Flüssigkeitsspiegels ausströmen gelassen (siehe Abbildung 3.5 auf Seite 68). Die Probe wird von einem sich langsam bewegenden Paddel durchmischt (ca. 1 Schlag/ Sekunde). Dies stellt nach Erfahrung der AG Decker die für die Proteine schonendste Weise dar, für eine gleichmäßige Sauerstoffverteilung zu sorgen. Der Probenhalter ist in diesem Fall nach oben hin nicht durch ein zweites Deckglas abgeschlossen, sondern wird durch ein Kunststoffrohr bis zur Halterung des Paddels verlängert, wobei die Verbindung Probenhalter – Rohr durch einen O-Ring abgedichtet ist. Durch einen permanenten Gasstrom wird verhindert, daß Sauerstoff aus der Umgebung eindringt.

Da es technisch sehr aufwendig ist, einen beliebigen Sauerstoffpartialdruck in einem Gas einzustellen und zu halten, erfolgt die Messung einer Sauerstoffbindungskurve in der AG Decker auf andere Art: Die Probe wird vom oxygenierten Zustand ausgehend unter permanentem Stickstoff-Fluß (2 l/min) deoxygeniert. Je nach Probe und Ausgangs-Partialdruck benötigt dies zwischen 30 und 60 Minuten. Durch die lange Dauer der Messung soll gewährleistet werden, daß die Sauerstoffbindung sich die gesamte Zeit über im Gleichgewicht befindet.

Der Sauerstoffgehalt der Probe wird mit einer Clark-Elektrode bestimmt [148]. Der Stromfluß durch ihre Membran ist proportional zum gelösten Sauerstoff. Die Ausgangsspannung ihrer Ansteuerelektronik wird mit Hilfe eines Oszilloskops gemessen und vom Computer abgefragt und aufgezeichnet. Ein Eichpunkt ist die Spülung mit reinem Stickstoff, ein weiterer die mit reinem Sauerstoff. Zur Kontrolle der Eichung kann die Probe noch mit einem Eichgas mit 4 % Sauerstoff gespült werden. Der Sauerstoffgehalt wird im folgenden als Sauerstoffpartialdruck in Torr angegeben ($760 \text{ Torr} = 1013 \text{ mbar} = 1013 \text{ hPa}$). Der maximal erreichbare Partialdruck p_{max} liegt unter dem Luftdruck, da das Gas mit Wasserdampf gesättigt ist. Der Dampfdruck von Wasser bei 20 °C beträgt 17 Torr [122], so daß sich für den Maximaldruck ein Wert von 743 Torr ergibt. Variatio-

nen im Luftdruck wurden nicht berücksichtigt. Eine nachträgliche Auswertung ergibt, daß sie maximal 2 % betragen [149].

3.4 Experimentsteuerung und Datenerfassung

Die Steuerung der Experimente und die Erfassung der Daten geschah zum großen Teil durch einen zentralen Computer (**PC 1** in Abbildung 3.7). Aus verschiedenen Gründen, die weiter unten erläutert werden, wurden bis zu zwei weitere Computer (**PC 2** und **PC 3**) eingesetzt. Im folgenden soll das Vorgehen bei den verschiedenen Experimenten dargestellt werden.

Fluoreszenzbilder

Der piezoelektrische xyz-Verschiebetisch (**xyz Tisch**), auf dem die Probe montiert ist, wird von der **PI Steuerung** kontrolliert. Diese erhält für die horizontalen Achsen die Soll-Position in Form von analogen Spannungen aus dem universellen Photonen-zähler **SR 400** (Stanford Research Systems). Dieser Zähler koordiniert das Aufnehmen der Bilder, indem er für die Dauer eines Zeitfensters die Ereignisse zählt, per *general purpose interface bus* (GPIB) an den Computer schickt und danach den analogen Ausgang einer Achse um die Pixelbreite inkrementiert. Dies wird entsprechend der Anzahl der Pixel in einer Bildzeile wiederholt. Am Ende der Zeile wird der Zähler vom Computer aus neu programmiert und wieder gestartet. Der Verschiebetisch wird bidirektional betrieben; die einzelnen Bildzeilen werden also abwechselnd von links nach rechts und dann von rechts nach links aufgebaut. Dies ist durch die hohe Anfahrgenauigkeit des Verschiebetisches ohne Versatz möglich, so daß die Belastung der Probe durch Anregungslicht im Rücklauf vermieden wird. Wie schon in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, erzeugt der Photomultiplier (**PMT**) pro detektiertes Photon einen Strompuls, der verstärkt und diskriminiert wird (**Diskrimin.**), um Pulse, die auf thermische Elektronen zurückgehen, weitestgehend abzutrennen. Der Diskriminator produziert TTL-Pulse, die durch einen **1 auf 4-Treiber** (74ABT245B, Texas Instruments) an 4 Ausgängen gleichzeitig zur Verfügung stehen. An einen dieser Ausgänge ist der oben genannte universelle Photonen-zähler **SR 400** angeschlossen.

Zeitspuren

Unter einer „Zeitspur“ wird der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzzählrate verstanden. Ihre Messung unterscheidet sich nicht wesentlich vom oben geschilderten Aufnehmen von Fluoreszenzbildern. Der Fokus des Objektivs wird dazu mit Hilfe des Verschiebetisches an den gewünschten Ort auf der Probe gefahren, der in einem vorher aufgenommenen Fluoreszenzbild ausgewählt werden kann. Dann liefert der Photonen-zähler **SR 400** kontinuierlich die Anzahl der Ereignisse pro vorher festgelegter Zeitspanne über den GPIB-Bus an den Computer. Die Datentransferrate ist durch den SR 400 limitiert, so daß die minimale Zeitspanne 10 ms beträgt. Für deutlich kürzere Intervallbreiten eignet sich der Vielkanalzähler **SR 430** (Stanford Research Systems). Er erlaubt Intervallbreiten

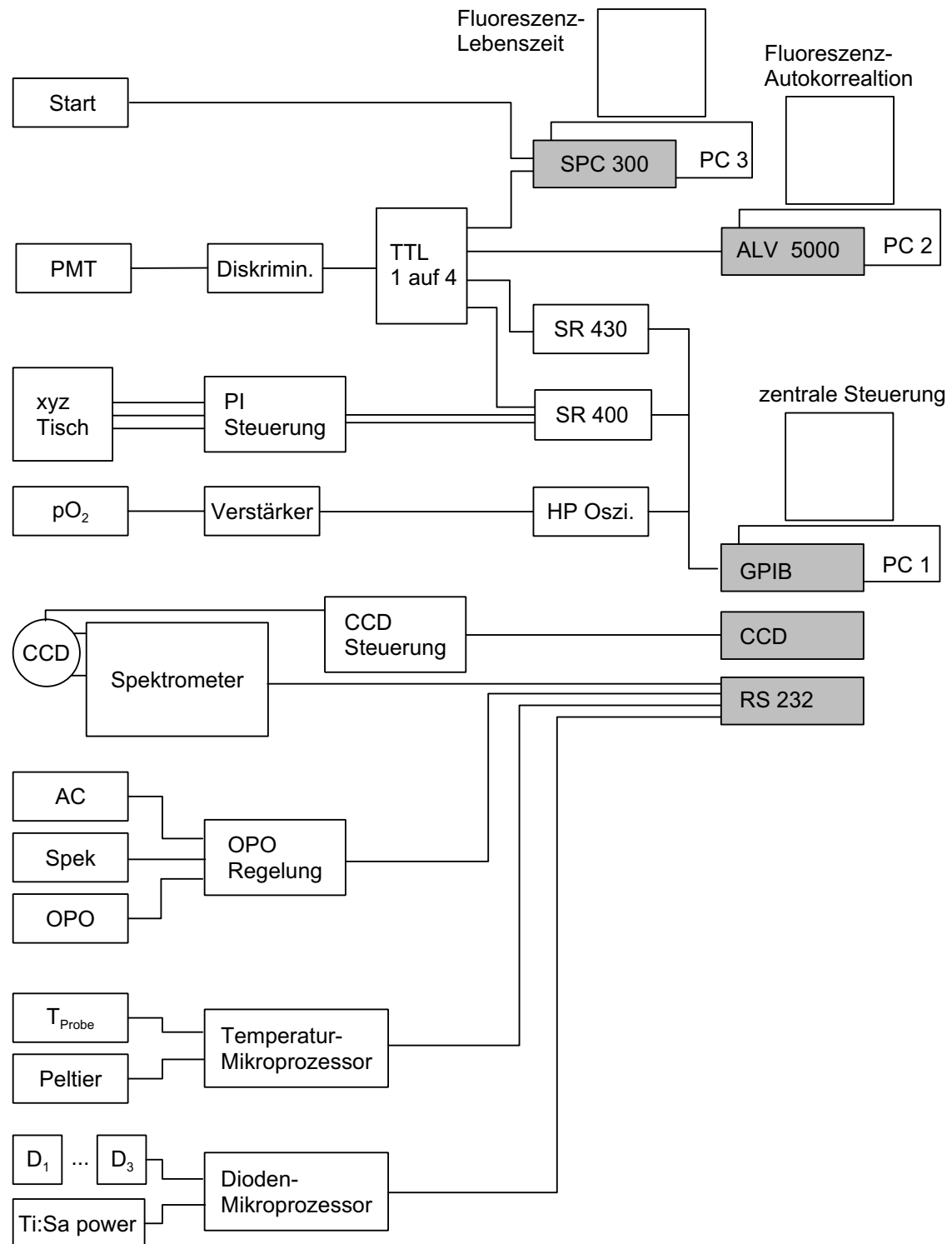


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der elektronischen Komponenten des Versuchsaufbaus, die zur Steuerung und Datenerfassung verwendet wurden. Sie werden im Text erläutert werden.

bis hinab zu 5 ns, kann allerdings nur Zeitspuren mit maximal rund 32000 Intervallen aufnehmen.

Autokorrelation der Fluoreszenzzählrate

Autokorrelationsfunktionen der Fluoreszenzzählrate lassen sich im Prinzip aus der Zeitspur berechnen. Für die gewünschte Auflösung im Bereich um 10 μs muß die Auflösung der Zeitspur aber auch diesen Wert erreichen, was bei einer Integrationszeit von 30 Minuten eine immense Datenmenge bedeutet. Dieses Problem umgeht die digitale Autokorrektorkarte **ALV 5000/E** (ALV, Langen). Das Prinzip ist in Abbildung 3.8 dargestellt [150]. Die Fluoreszenzphotonen werden innerhalb eines Zeitintervalls τ_S gezählt. Am Ende dieser Zeitspanne wird der Wert n in ein Schieberegister eingeführt. Gleichzeitig wird er mit allen schon im Schieberegister vorhandenen Werten multipliziert und das Ergebnis in einem Speicher aufsummiert. Damit beinhaltet dieser Speicher die (nicht normierte) Autokorrelation $G(\tau)$ (F bezeichnet die Fluoreszenzzählrate):

$$G(\tau) = \langle F(t) F(t - \tau) \rangle = \sum_{i=1}^N n(i) n(i - \tau/\tau_S) \quad . \quad (3.3)$$

Zur Normierung werden sog. Monitorkanäle M_j mitgeführt, die jeweils den Wert

$$M_j = \sum_{i=1}^N n(i - j) \quad (3.4)$$

beinhalten (in Abb. 3.8 nicht dargestellt). Mit ihrer Hilfe läßt sich die normierte Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$ berechnen:

$$g(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t - \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} - 1 = \frac{NG(\tau)}{M_0 M_{(\tau/\tau_S)}} - 1 \quad . \quad (3.5)$$

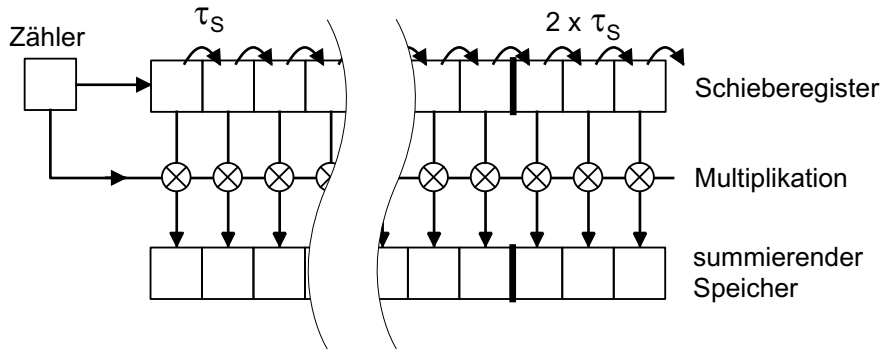


Abbildung 3.8: Funktionsweise des digitalen Autokorrektors. Die Zahl der im letzten Zeitintervall gezählten Photonen wird mit denen aus den vorhergehenden Intervallen multipliziert und das Ergebnis in Speicherzellen aufsummiert.

Bei dem verwendeten Autokorrelator handelt es sich um einen sog. *multiple tau autocorrelator*. Dies bedeutet, daß die Verweilzeit in einer Zelle des Schieberegisters alle 8 Zellen verdoppelt wird, indem am Übergang (durch breiteren Strich in Abb. 3.8 angedeutet) zwei aufeinanderfolgende Zellen summiert werden. Dies ist äquivalent mit einer Messung, die gleich mit doppeltem τ_S gestartet wäre, allerdings wird so einerseits die hohe Auflösung bei kleinen Zeiten erhalten und andererseits ermöglicht, auch sehr lange Korrelationszeiten τ zu messen. Die Karte ALV5000/E besitzt insgesamt 288 Zellen im Schieberegister und erreicht von einer anfänglichen Integrationszeit $\tau_S = 200$ ns ausgehend eine maximale Korrelationszeit von 3221 Sekunden bei einer maximalen Zählrate von 100 MHz.

Der in der Arbeitsgruppe vorhandene Autokorrelator ist als Einsteckkarte für PCs aufgebaut und verlangt einen sog. ISA-slot mit einer maximalen Taktfrequenz von 8 MHz. Dieser ist in neueren Rechnern nicht mehr vorhanden, so daß diese Karte in einen separaten, alten Rechner (**PC 2**) eingebaut ist. Die Datenerfassung erfolgte mit dem der Karte beiliegenden Programm. Die Meßwerte wurden als ASCII-Datei gespeichert.

Fluoreszenzabklingkurven

Der Aufbau ermöglicht es auch, Fluoreszenzabklingkurven zu messen. Dazu wird die Zeit zwischen dem anregenden Laserpuls und dem detektierten Fluoreszenzphoton mit einer Start-Stop-Karte (**SPC 300**, Becker & Hickl, Berlin) gemessen. Um die Datenrate zu verringern, arbeitet diese Karte mit einem invertierten Start-Stop-Verfahren; die Uhr wird also durch das Photon gestartet und durch den nächstfolgenden Puls wieder gestoppt. Dies ist bei der hohen Frequenzstabilität des modengekoppelten Lasers ohne Nachteile möglich. Der Laserpuls wird von einer separaten „Start“-Diode registriert und die Ankunftszeit des Photons erhält die Karte über den **1 auf 4**-Verteiler. Sie befindet sich in einem dritten Rechner (**PC 3**), da sie hauptsächlich für Ein-Photonen-Experimente mit einem anderen Aufbau verwendet wird. Die Messungen der Fluoreszenzlebenszeit von Tryptophan in Puffer und in Hämocyanin ergaben die in der Literatur zu findenden Werte [48, 83]. Sie werden in dieser Arbeit aber nicht weiter vorgestellt. Der Unterschied in der mittleren Fluoreszenzlebenszeit von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämocyanin ist mit 1.2 zu 2.3 ns bei einem dreifach-exponentiellen Zerfall [83] zu gering, als daß damit 25 verschiedene Beladungsstufen aufgelöst werden könnten. Diese Art von Messung wurde darum über reine Kontrollmessungen hinaus nicht weiter verfolgt.

Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe der bereits in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Kombination aus **Spektrograph** und **CCD-Kamera** aufgenommen. Das der Kamera beiliegende Programm (WinSpec/32, Roper Scientific) steuerte sowohl den Spektrographen, der über eine serielle RS 232-Schnittstelle angeschlossen war, als auch die Kamera selbst an. Die Kamera wird an einer externen Steuerelektronik (**CCD Steuerung**, ST-133, Princeton Instruments) betrieben, die die Daten aufbereitet und über eine serielle

Hochgeschwindigkeitsverbindung zu einer speziellen Schnittstellenkarte in Rechner **PC 1** schickt. Das Programm ermöglicht es, den Spektrographen mit Hilfe einer Quecksilberdampflampe zu eichen, wobei die Eichung von der Gitterposition unabhängig ist. Einzelne Spektren und Serien von Spektren können mit variabler Integrationszeit aufgenommen werden. Das Programm steuert den mechanischen Verschluß der Kamera und das Auslesen des Detektors an. Dies geschieht asynchron zum restlichen experimentellen Aufbau. Die Integrationszeiten lagen zwischen 10 Sekunden und 80 Minuten, so daß eine Synchronisation nicht als notwendig erachtet wurde. Die Daten wurden als ASCII-Dateien gespeichert.

Systemmonitor und Datenerfassung

Um auch nachträglich einen Überblick über die Stabilität des Lasersystems zu ermöglichen, werden während der ganzen Laserlaufzeit verschiedene Betriebsparameter aufgezeichnet und im 5-Sekunden-Rhythmus gespeichert. Tabelle 3.2 gibt einen Überblick. Die Parameter, die den sichtbaren Laserstrahl charakterisieren, entstammen der **OPO Regelung**. Alle externen Dioden sowie eine Spannung, die proportional der Leistung des Titan-Saphir-Lasers ist, wurden über einen externen Mikroprozessor digitalisiert und an **PC 1** geschickt. Dieses Mikroprozessorsystem (**Dioden-Mikroprozessor**) wurde auf Basis des Motorola 68HC12 von der Elektronikwerkstatt (U. Wannek) entwickelt und aufgebaut. Ein vergleichbares System (**Temp.-Mikroprozessor**) mißt die Proben temperatur und steuert die Peltier-Elemente. Diese Protokollfunktion wurde auch verwendet, um Sauerstoffbindungskurven aufzuzeichnen, da einer der Parameter die Ausgangsspannung der Clark-Elektrode ist. Um das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffpartialdruck und Beladung der Proteine nicht zu verlassen, mußten die Bindungskurven langsam aufgenommen werden. Daher reichte ein Datenpunkt je 5 Sekunden bei Mittelung über dazwischen liegende Werte aus.

Auf dem zentralen Rechner **PC 1** mußten mehrere Aufgaben parallel ablaufen. Die Ansteuerung des Spektrographen erledigte die kommerzielle Software, alle anderen Bestandteile wurden im Rahmen dieser Arbeit in der Programmiersprache LabView (National Instruments) entwickelt. Die Programmiersprache LabView zeigt sich besonders geeignet, um Programme zur Datenerfassung und -auswertung zu schreiben. Sie unterstützt diverse Ein-Ausgabe-Schnittstellen und ermöglicht es, Programmteile parallel ablaufen zu lassen. Abbildung 3.9 zeigt schematisch die einzelnen Module, die parallel zueinander arbeiten. Es wird zwischen zwei Arten von Datenübergabe unterschieden: eine synchrone, bei der das aufrufende Modul auf die Erledigung der Aufgabe wartet (durchgezogene Pfeile) und eine asynchrone, bei der das aufrufende Modul nicht warten muß (strichlierte Pfeile). Diese letzte Variante ermöglicht es, daß das Scan-Modul mit hoher Priorität den Aufbau eines Bildes koordiniert, die Daten des Photonen zählers **SR 400** entgegennimmt und darin nicht durch die Darstellung auf dem Bildschirm oder durch Interaktionen mit dem Benutzer beeinflusst wird. Genauso protokolliert das System-Monitor-Modul permanent die oben genannten Parameter, läuft dabei aber mit niedriger Priorität, da es unter Umständen auch die Daten erst etwas später auslesen kann. Alle durchgeführten Messungen werden in einem automatisierten „Laborbuch“

Parameter	Beschreibung	Ursprung
time	Zeitpunkt des Eintrags	PC
loop	Status der OPO-Längenregelung	OPO-Regelung
$\Delta\lambda$ (nm)	spektrale Pulsbreite	OPO-Regelung
λ (nm)	Wellenlänge	OPO-Regelung
power (arb.u.)	Leistung des OPOs	OPO-Regelung
τ (fs)	Pulsdauer	OPO-Regelung
quad	quadrat. SiC - Diode	Dioden-MP
linext	lineare Diode 1	Dioden-MP
linint	lineare Diode 2	Dioden-MP
aux1-3	zus. Eingänge	Dioden-MP
mira (arb.u.)	Leistung des Titan-Saphir-Lasers	Dioden-MP
# points	Anzahl der Mittelungen	Dioden-MP
temp (°C)	Temperatur des Probenhalters	Temp.-MP
relais	Position des Relais	Temp.-MP
shutter	Position des Shutter	Temp.-MP
exWK (arb.u)	errechnete Anregungswahrsch.	Dioden-MP
cps	Zählrate	Bilder & Zeitspuren-Modul
hp scope	Spannung am Oszilloskop (pO ₂)	HP Oszilloskop

Tabelle 3.2: Aufgezeichnete Betriebsparameter des Experiments und des Lasersystems. MP – Mikroprozessor (siehe Abb. 3.7)

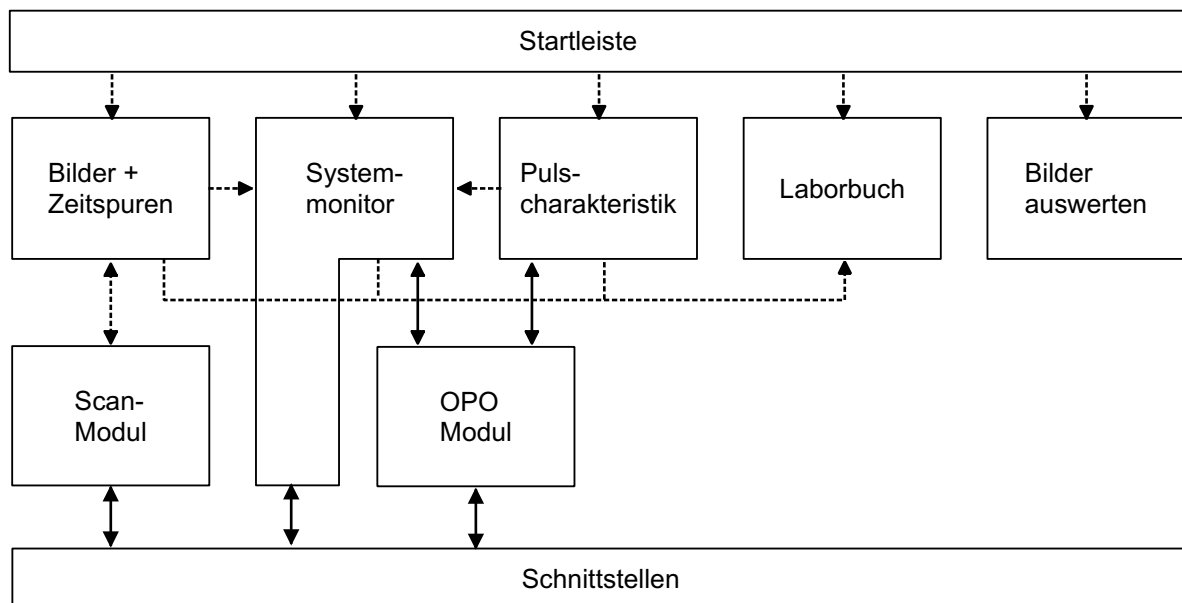


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Programms zur Experimentsteuerung. Die einzelnen Module laufen parallel zueinander ab. Die Datenübergabe erfolgte teilweise synchron (durchgezogene Pfeile), teilweise asynchron (gestrichelte Pfeile).

protokolliert. Ein anderes Modul, das auf F. Kulzer zurückgeht [151], erlaubt schließlich, die Fluoreszenzbilder auszuwerten.

3.5 Charakterisierung und Funktionstest

3.5.1 Pulsverbreiterung

Für die Anregungsrate α bei einem Zwei-Photonen-Prozeß gilt nach Gl. 2.114

$$\alpha \propto \frac{g_P}{f \tau_P} I^2, \quad (3.6)$$

wobei g_P die Pulsform, τ_P die Pulslänge und f die Repetitionsrate des Lasers bezeichnet. Durch Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) kann sich die Pulslänge τ_P vergrößern, wie bereits in Abschnitt 2.4.3 dargestellt wurde. Um eine optimale Anregung zu gewährleisten, muß sichergestellt sein, daß sich der Puls auf dem Weg vom Laser zur Probe nicht wesentlich verlängert, was eine verringerte Anregungsrate zur Folge hätte. Bei einer spektralen Breite von mehreren Nanometern reicht dazu schon die Dispersion des Brechungsindex in üblichen Glasbauteilen aus. Insbesondere das Mikroskopobjektiv selbst besteht aus vielen Linsen und sorgt so für einen großen Strahlweg durch Glas. In der Literatur finden sich widersprüchliche Aussagen, ob die für die Ultrakurzzeitspektroskopie relativ langen und damit spektral schmalen Pulse mit $\tau_P = 100\text{--}200$ fs schon nennenswert beeinflußt werden. M. Müller *et al.* [152] zeigen, daß sich ein Laserpuls bei Transmission durch ein Mikroskopobjektiv hoher numerischer Apertur von ursprünglich 47 fs Länge nur auf 51 fs verlängert. Bei ursprünglich drei mal längeren Pulsen sollte darum kein Einfluß feststellbar sein. J.G. Guild *et al.* [153] stellen hingegen dar, wie sich bereits ein 150 fs-Puls um etwa 15 % verlängert, wenn er ein Mikroskopobjektiv (NA=1.4) passiert. Ein 50 fs-Puls würde ihren Angaben zufolge fünf mal länger werden.

Es muß für den hier benutzten experimentellen Aufbau also gemessen werden, ob eine Verlängerung der Pulse stattfindet. Wenn dies der Fall wäre, müßte sie durch

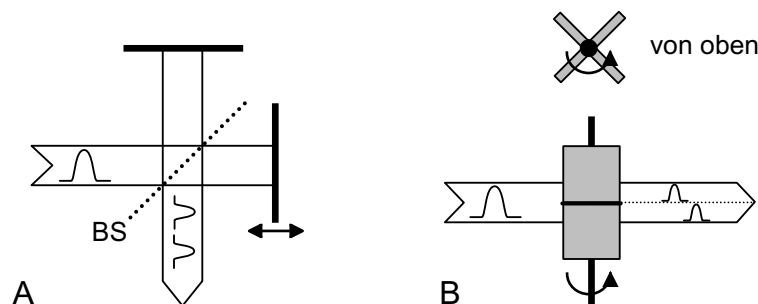


Abbildung 3.10: Verschiedene Prinzipien, einen Teil des Strahls gegen den anderen zu verzögern. A: üblicher Aufbau ähnlich einem Michelson-Interferometer. B: hier verwendeter Aufbau. Zwei Glasplättchen drehen sich um 90 Grad versetzt und verzögern die beiden Strahlhälften gegeneinander. Diese werden erst im Fokus überlagert.

den Einsatz einer Prismenstrecke zur Kompensation der GVD reduziert werden (siehe Abb. 2.26, [154]). Um dies feststellen zu können, muß die Autokorrelation der Pulse am Ort der Probe gemessen werden. Die beiden oben zitierten Arbeiten verwenden dazu den aus Autokorrelatoren bekannten Aufbau, der ähnlich einem Michelson-Interferometer den Strahl teilt, verzögert und wieder kollinear überlagert (Abb. 3.10A). Deutlich einfacher ist es aber, auf einen anders aufgebauten kommerziellen Autokorrelator (Auto\$korre, NT&C, Marnheim) zurückzugreifen. Dieser verwendet zwei Glasplättchen, die übereinander um 90° versetzt angeordnet sind (Abb. 3.10B) und um ihre Achse gedreht werden. Je nach Winkel der Platte zum Strahl ändert sich die effektive Weglänge und damit die Verzögerung der einen Strahlhälfte gegen die andere. Beide Hälften werden erst wieder im Fokus des Objektivs überlagert. Diese von einem kleinen Motor getriebene Plattenkombination ist einfach in den Strahlengang einzufügen, so daß keine aufwendige Neujustage wie bei einem Michelson-Interferometer erforderlich ist. Eigentlich ist diese Plattenkombination in einen Autokorrelator eingebaut, dessen nichtlineares Element die schon in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Siliziumcarbid-Photodiode ist. Deren Signal würde dann auf einem Oszilloskop dargestellt werden. Hier sind beide Bauteile getrennt eingesetzt: die Diode für permanente Pulskontrolle und der Plattenstapel für diesen einmaligen Test. Die Fluoreszenz einer Tryptophan-Probe nach Zwei-Photonen-Anregung wird mit hoher Zeitauflösung mit Hilfe des Vielkanalzählers SR 430 (Stanford Research Systems) als Funktion der Plattenposition aufgezeichnet. Dazu wird der Zähler über eine Lichtschranke von den rotierenden Platten getriggert, so daß über viele Umdrehungen integriert werden kann. Die Abmessung der Plattenkombination und ihr Brechungsindex

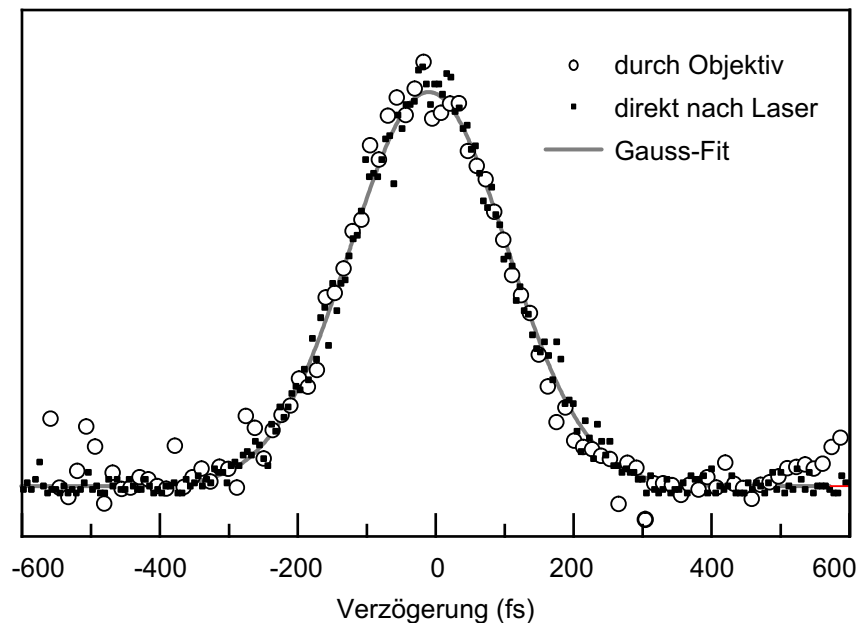


Abbildung 3.11: Autokorrelation des Laserpulses am Ort der Probe verglichen mit der direkt nach dem Laser. Es ist kein Unterschied festzustellen, so daß keine Korrektur der GVD notwendig ist.

erlauben es schließlich, den Drehwinkel in eine relative Verzögerung umzurechnen.

Abbildung 3.11 zeigt eine so aufgenommene Autokorrelationsfunktion des Laserpulses am Ort der Probe. Zum Vergleich ist die Autokorrelation nahe am Laser eingezeichnet, wie sie mit dem Autokorrelator des OPOs gemessen wird. An letztere wurde eine Gauß-Kurve angepaßt, um die Pulsbreite zu bestimmen. Es ergibt sich eine Autokorrelationsbreite $\tau_{AC} = 225$ fs, was einer Pulsbreite von $\tau_P = \sqrt{0.5} \tau_{AC} = 160$ fs entspricht. Obwohl Guild *et al.* [153] für diese Pulsbreite eine Verlängerung um 15 % vorhersagen, unterscheiden sich die beiden Autokorrelationen im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht. Das hier verwendete Mikroskopobjektiv hat also keinen Einfluß auf die Pulscharakteristik, so daß seine GVD nicht vorkompensiert werden muß. Für weitere Rechnungen ist es gerechtfertigt, die direkt am OPO gemessene Pulsbreite als die in der Probe anzunehmen.

3.5.2 Detektion einzelner Moleküle: Rhodamin 6G

Zum Test der Funktionstüchtigkeit des Mikroskops sollten einzelne Farbstoffmoleküle durch Zwei-Photonen-Anregung abgebildet werden. Alle in der Literatur vorliegenden Ergebnisse sind im Spektralbereich des Titan-Saphir-Lasers (700–1000 nm) erzielt worden, da dies ein weit verbreitetes Lasersystem ist. Die Abbildung einzelner Rhodamin B-Moleküle ist von Sanchez *et al.* [65] gezeigt worden. Einzelne Moleküle wurden dabei durch *spin coating* einer stark verdünnten Farbstofflösung direkt auf einem Deckglas präpariert und bei $\lambda = 840$ nm angeregt. Diesem Artikel folgend wurde Licht dieser Wellenlänge unter Umgehung des OPOs direkt in das Mikroskop eingekoppelt. Als Farbteiler diente eine dicke Glasplatte, so daß nur der Reflex der Vorderseite in das Objektiv gelangt. Die Laserleistung reicht in diesem Wellenlängenbereich aus, um nur den so ausgekoppelten Strahl zur Anregung zu verwenden. Als Detektionsfilter wurde eine Kupfersulfat-Lösung in einer Küvette eingesetzt [66]. Die Absorption des Filters läßt sich mit dieser Lösung für Wellenlängen $\lambda > 690$ nm stufenlos einstellen. Die Proben wurden durch *spin coating* einer Lösung von Rhodamin 6G in Methanol direkt auf Deckgläsern hergestellt. Die Konzentration der Lösung variierte zwischen 0.1 und 10 nM.

Abbildung 3.12 zeigt das Ergebnis zweier solcher Proben. Die Proben wurden mit etwas unterschiedlichen Präparationsbedingungen hergestellt und auch die Justage des Mikroskops wurde zwischen den beiden Aufnahmen verändert. Die absoluten Zahlen sind also nicht direkt vergleichbar. In beiden Abbildungen ist die Fluoreszenz einzelner Moleküle zu erkennen. Bei Abbildung 3.12A wurde der innere Bereich durch zweimaliges Abbilden fast vollständig geblichen. In dieser Abbildung ist die Anregungsleistung größer (etwa 6 mW am Ort der Probe), so daß einige Moleküle bleichen und länglich erscheinen. In Abbildung 3.12B beträgt die Anregungsleistung etwa 0.8 mW und die Moleküle erscheinen fast vollständig rund. Die Halbwertsbreite des Spots beträgt etwa 330 nm und das Signal zu Untergrund-Verhältnis etwa 2:1. Damit werden nicht die von Sanchez *et al.* angegebenen Werte erreicht [65]. Die Ursache kann zum einen in dem etwas unterschiedlichen Farbstoff liegen (Rhodamin 6G statt B). Zum anderen sollte dieses Experiment als Test des Mikroskops dienen, so daß die zum Optimieren des Signals verwendete Zeit limitiert war. Trotz dieser Einschränkungen läßt sich sagen, daß

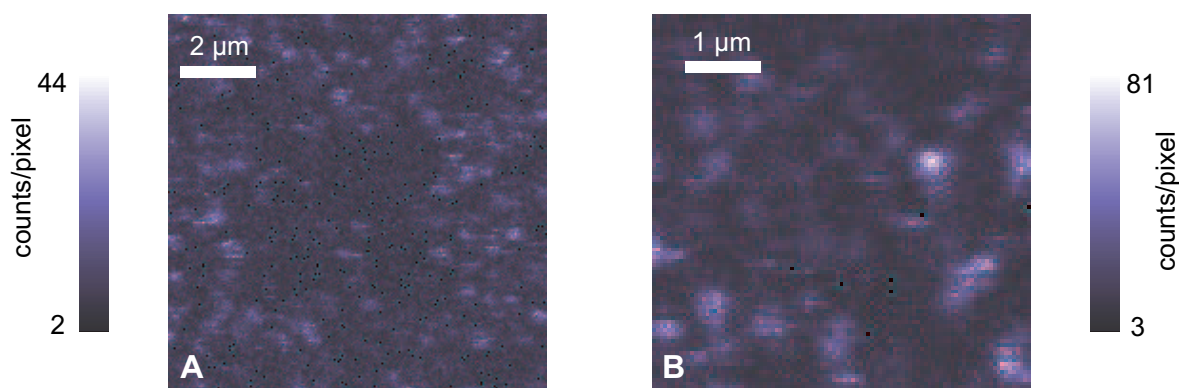


Abbildung 3.12: Einzelne Rhodamin 6G Moleküle nach Zwei-Photonen-Anregung bei $\lambda = 840$ nm. A: Bildgröße $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. Moleküle in der Mitte des Bildes wurden durch wiederholtes Abrastern eines $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ Bereiches geblichen. B: Bildgröße $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Diese Probe entstammt einer anderen Charge.

der vorgestellte Versuchsaufbau in der Lage ist, einzelne Farbstoffmoleküle mit Hilfe ihrer Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung abzubilden.

3.6 Proben und Probenpräparation

Zum Abschluß dieses Kapitels sollen die untersuchten Proben und ihre Präparation vorgestellt werden. Die für Zwei-Photonen-Anregung relevanten Eigenschaften von Tryptophan und Hämocyanin wurden schon in Kapitel 2.1 und 2.4.4 dargestellt. Hier werden noch Methoden zur Immobilisierung sowie ein Testsystem – Avidin-markierte Latexkugeln – vorgestellt. Die Präparation der Proben erfolgte zum größten Teil durch W. Erker in der AG Decker [82].

Zur Spektroskopie im Ultravioletten können die Proben nicht auf gewöhnlichen Glas-Deckgläsern präpariert werden, da deren Transmission für Wellenlängen $\lambda < 350$ nm deutlich abfällt. Aus diesem Grund wurden Quarz-Deckgläser verwendet (Spectrosil 2000, Thermal Quarz-Schmelze, Wiesbaden). Sie hatten einen Durchmesser von 22 mm und eine Dicke von $220 \pm 50 \mu\text{m}$. Wegen ihres hohen Stückpreises wurden sie gereinigt und wiederverwendet. Zur Reinigung wurden die Deckgläser einzeln nacheinander in Kalilauge (1 M), destilliertem Wasser und spektroskopisch reinem Methanol in ein Ultraschallbad gegeben.

Tryptophan

Tryptophan (Fluka, Neu-Ulm) wurde in Tris-Puffer (Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan) gelöst. Der Puffer setzt sich zusammen aus 100 mM Tris / HCl (pH = 7.8 bei 20 °C) sowie 5 mM CaCl_2 und 5 mM MgCl_2 . Durch Abwiegen und Auffüllen mit entsprechender Menge Puffer wurde eine Konzentration von 10 mM Tryptophan eingestellt und diese Stammlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert.

Hämocyanin

Das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* wird in der AG Decker aus der Hämolymphe lebender Tiere gewonnen, aufbereitet und getestet [82]. Am Ende dieser Prozedur liegen die Proteine im oben genannten Tris-Puffer vor. Für Ensemble-Experimente lag die verwendete Konzentration bei 3 g/l (2 μ M). Für Einzelmolekül-Experimente wurden entsprechende Verdünnungen hergestellt und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

Zur Abbildung einzelner Moleküle ist es notwendig, daß diese auf einer Oberfläche oder in einer Matrix immobilisiert sind. Da die Funktion des Proteins nicht beeinträchtigt werden darf, stehen dafür nur wenige Methoden zur Verfügung. Um die Immobilisierung zu überprüfen, ohne gleichzeitig einzelne Moleküle per Zwei-Photonen-Anregung nachweisen zu müssen, wurden die Proteine mit Tetramethylrhodamin (TMR) farbstoffmarkiert [82]. Zehn Teile Hämocyaninlösung (2 μ M) in Borat-Puffer (25 mM Borsäure / NaOH, pH 8.5 / 5 mM CaCl_2 / 5 mM MgCl_2) wurden mit drei Teilen der Farbstofflösung (1 mM TMR in 9 Teilen Borat-Puffer / 1 Teil DMSO) gemischt und für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Danach wurde das Protein durch Gelfiltration und Ultrazentrifugation gereinigt und in Tris-Puffer überführt. Die so markierten Proteine wurden in einem konfokalen Ein-Photonen-Mikroskop abgebildet [155, 156]. Es hat sich herausgestellt, daß Hämocyanin leicht auf der Oberfläche eines Deckglases adsorbiert. Diese Adsorption geschieht ohne weitere Modifikation des Proteins oder des Glases. Abbildung 3.13 zeigt einzelne Hämocyanin-Moleküle auf einer Glas-Puffer-Grenzfläche. Die Konzentration der Lösung war 0.3 mg/l (0.2 nM), so daß sich in einem Kubikmikrometer nur 0.1 Moleküle befinden. Trotzdem ist die Oberfläche nach kurzer Zeit relativ dicht belegt.

Wenn das Protein entfernt von der Grenzfläche immobilisiert werden soll, so bietet

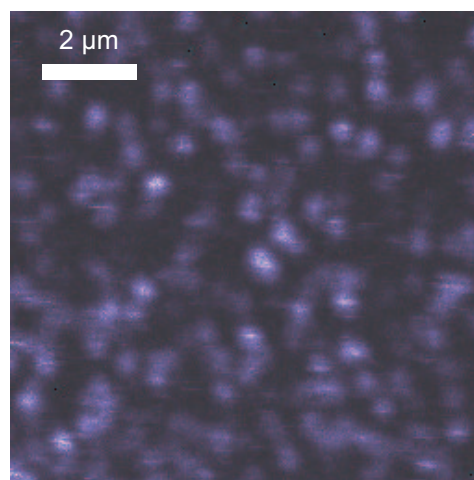


Abbildung 3.13: Adsorption einzelner Hämocyanin-Moleküle auf einer Glasoberfläche unter Puffer. Die Moleküle ($C = 0.2$ nM) wurden mit Tetramethylrhodamin markiert und in einem konfokalen Ein-Photonen-Mikroskop abgebildet.

sich das Einbetten in Agarose-Gel an. Das ebenfalls häufig verwendete Polyacrylamid-Gel [90] kann hier nicht eingesetzt werden, da einerseits das nicht vollständig polymerisierte Acrylamid die Fluoreszenz löscht und andererseits das Gel selbst im Ultravioletten fluoresziert [82]. In der Literatur finden sich mehrere Arbeiten, die von erfolgreicher Immobilisierung kleiner Proteine in Agarose-Gelen berichten. Wird die Probe dabei allerdings per Totalreflexion (TIR) angeregt [45], so daß sich alle fluoreszierenden Moleküle innerhalb weniger 100 nm von der Grenzfläche befinden, so läßt sich die Immobilisierung nicht unbedingt auf das Gel zurückführen. Abb. 3.13 zeigt, daß sie dort auch ohne Gel an der Grenzfläche fixiert sind. In anderen Arbeiten wird aber auch konfokal detektiert [33, 157]. Obwohl z.B. das von H. P. Lu *et al.* [33] verwendet Protein Cholesterol Oxydase relativ klein ist (Molekulargewicht 53 kg/mol), wird es im Gel immobilisiert. Hämocyanin ließ sich allerdings selbst bei Verwenden der gleichen Agarose *nicht* fixieren. Nahe der Oberfläche (innerhalb der Tiefenauflösung des Mikroskops) waren die Proteine immobilisiert, wie sie es auch ohne Gel sind (siehe Abb. 3.13). Sobald der Fokus etwa 20 μm in das Gel hinein gelegt wurde, waren keine Moleküle mehr zu erkennen. Gelegentlich erscheinen horizontale Streifen von durch den Fokus driftenden Molekülen. Selbst wenn die Konzentration der Agarose erhöht wird (von 1 % auf 5 % des Gewichts), ändert sich das Ergebnis nicht wesentlich. Die Durchmischung der Probe wird zu dem schwieriger, weil die Viskosität steigt. Zur Immobilisierung einzelner Hämocyanine bleibt also nur die Adsorption an der Glasoberfläche.

Avidin auf Latexkugeln

Als Test-System wurden NeutrAvidin-markierte Latexkugeln verwendet. NeutrAvidin ist eine Modifikation des Proteins Avidin, die unspezifische Bindung reduzieren soll, so daß nur noch die Bindung an Biotin relevant ist. Das Protein Avidin besteht aus 4 Untereinheiten, von denen jede eine Biotin-Bindungsstelle besitzt. In jeder Untereinheit kommen

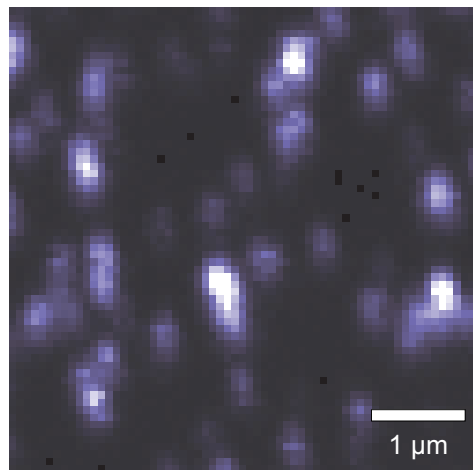


Abbildung 3.14: NeutrAvidin-markierte Latexkugeln ($d = 40 \text{ nm}$) gefüllt mit Farbstoff auf einer Glasoberfläche adsorbiert. Sie wurden mit Ein-Photonen-Anregung bei 488 nm abgebildet. Die Konzentration der Lösung betrug 0.2 nM.

4 Tryptophan-Seitenketten vor [73]. Latexkugeln mit Avidinbeschichtung sind kommerziell erhältlich (FluoSpheres, Molecular Probes), da sie mit einer Farbstoff-Füllung als relativ leuchtstarke Markierung mit einer Avidin-Biotin-Bindung an die interessierenden Objekte angebracht werden können. Hier wurden sie verwendet, weil einerseits die Tryptophane des Avidin angeregt werden können, andererseits aber auch der Farbstoff in der Latexkugel, so daß sich die Adsorption der Kugeln leicht nachweisen läßt. Benutzt wurden Kugeln mit einem Durchmesser von $d = 200$ nm und gelb-grünem Farbstoff (F-8774, $\lambda_{em} = 515$ nm, Molecular Probes), sowie solche mit $d = 40$ nm mit gelb-grünem Farbstoff (F-8771) und nicht fluoreszierende (F-8772). Vom Hersteller ist die Biotin-Bindungskapazität angegeben, aus der sich die Anzahl der Avidin-Untereinheiten pro Kugel errechnen läßt. Damit ergibt sich ein Tryptophangehalt pro Kugel von 23000 ($d = 200$ nm) bzw. 340 ($d = 40$ nm).

Die Latexkugeln wurden durch Verdünnung mit dem vom Hersteller angegebenen Phosphat-Puffer in die gewünschte Konzentration gebracht. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, daß die Ausgangssuspension so homogen wie möglich war. Wie Abbildung 3.14 zeigt, adsorbieren diese Kugeln ebenfalls leicht auf der Glasoberfläche. Dasselbe, modifizierte NeutrAvidin sowie das unmodifizierte Avidin wurden außerdem in Lösung untersucht, um den Einfluß der Bindung an die Latexkugel zu ermitteln. Dazu wurden die Proteine wie bei Tryptophan beschrieben in Tris-Puffer gelöst.

4 Ensemblemessungen

In diesem Kapitel sollen Experimente auf Ensemble-Ebene an Tryptophan, Hämocyanin und Avidin vorgestellt werden. In den ersten beiden Abschnitten wird der Schwerpunkt auf dem Vergleich zwischen Ein- und Zwei-Photonen-Anregung liegen. Es soll überprüft werden, ob mit der Zwei-Photonen-Anregung wirklich der gleiche fluoreszierende Zustand bevölkert wird, der auch bei Ein-Photonen-Anregung fluoresziert. Dies geschieht im ersten Abschnitt durch Vergleich der Fluoreszenz-Emissions- und Anregungsspektren. Im zweiten Abschnitt wird das Verhalten bei Fluoreszenzlöschung verglichen. Wenn mit Zwei-Photonen-Anregung die Sauerstoffbindung im Hämocyanin untersucht werden soll, so muß sichergestellt sein, daß bei beiden Anregungsarten derselbe Zusammenhang zwischen Sauerstoffbeladung und Fluoreszenzintensität besteht.

In den letzten beiden Abschnitten dieses Kapitels wird dann das Problem des Photobleichens behandelt werden. Zunächst wird es unter Zwei-Photonen-Anregung untersucht und quantifiziert. Weiterhin soll die Drei-Photonen-Anregung des Tryptophans in Hämocyanin dargestellt und in bezug auf die Photostabilität mit der Zwei-Photonen-Anregung verglichen werden.

4.1 Spektraler Vergleich

4.1.1 Emissionsspektren

Die im folgenden vorgestellten Emissionsspektren nach Zwei-Photonen-Anregung (*two photon excitation*, TPE) wurden mit dem in Abschnitt 3.2 beschriebenen Mikroskop aufgenommen, dessen spektrale Charakteristik vorher mit Hilfe einer kalibrierten Wolframbandlampe vermessen wurde (siehe Abschnitt 3.2.3). Die Spektren nach Ein-Photonen-Anregung (*one photon excitation*, OPE) wurden in einem kommerziellen Spektrometer (Hitachi) aufgenommen. Zum spektralen Vergleich sind alle Spektren auf gleiche Maximalintensität normiert.

Tryptophan

Abbildung 4.1 zeigt die Emissionsspektren einer Tryptophanlösung. Die Konzentration betrug 1 mM für TPE und 2 μ M für OPE, da im zweiten Fall die Absorption der Lösung bei der Anregungs- und Emissionswellenlänge nicht mehr zu vernachlässigen war. Im Mikroskop dagegen beträgt der Strahlweg durch die Lösung nur wenige Mikrometer. Wie in Abschnitt 3.2.3 schon dargestellt, kamen zwei verschiedene Filtersätze bei der Zwei-Photonen-Anregung zum Einsatz. Beide beschneiden die Fluoreszenz mehr

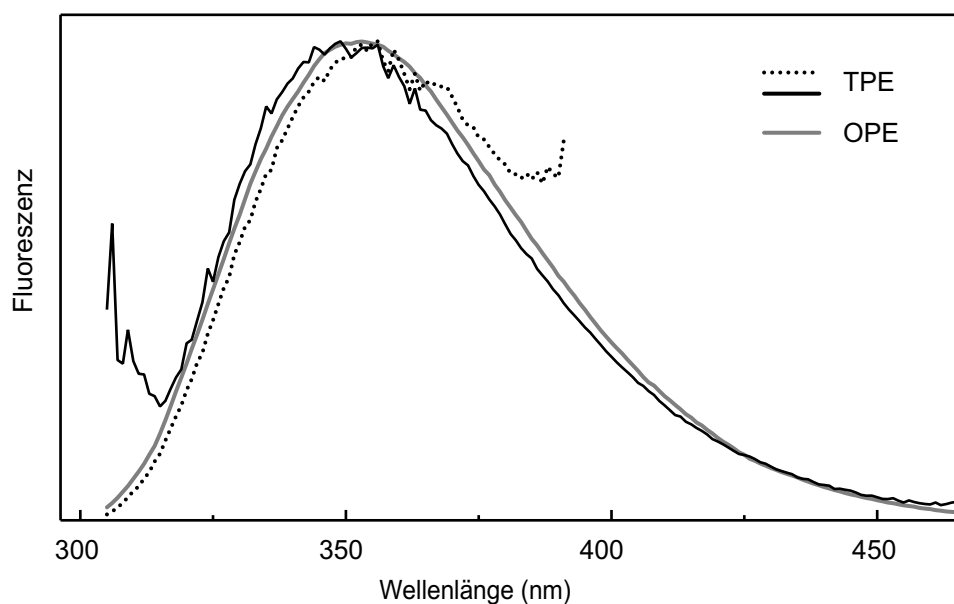


Abbildung 4.1: Tryptophanemission nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung. Die TPE-Kurven sind durch zwei verschiedene Filtersätze detektiert, deren Einfluß auf die Spektren korrigiert wurde. Abweichungen der Kurven voneinander sind durch Ungenauigkeiten in der Kalibration dieser Charakteristik begründet.

oder weniger stark. Dies kann korrigiert werden, indem die gemessenen Spektren durch die Filtercharakteristik geteilt werden. Daraus ergeben sich die beiden TPE-Spektren in Abbildung 4.1. Die geringe spektrale Verschiebung gegenüber der OPE Kurve rührt daher, daß der Kalibrationsstrahlengang nicht exakt mit dem späteren Detektionsstrahlengang übereinstimmt, da die Wolframbandlampe divergent abstrahlt. Eine Korrektur dieser Divergenz würde, insbesondere da sie mit nur aus einem Element bestehenden Linsen im UV durchgeführt werden müßte, eine zusätzliche unbekannte spektrale Charakteristik einführen. An beiden Seiten des Spektrums weicht eine der beiden Kurven nach Zwei-Photonen-Anregung deutlich von den anderen beiden ab. Dies sind die Bereiche, in denen der jeweilige Filter nur noch eine sehr geringe Transmission aufweist. An diesen Stellen wird bei der Korrektur der Detektionscharakteristik eine geringe (und darum verrauschte) Fluoreszenzintensität durch einen kleinen Transmissionswert geteilt und dadurch verstärkt, was auch die Abweichungen verstärkt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Emission aus Tryptophan nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung wie erwartet keine spektralen Unterschiede aufzeigt. Die Emission erfolgt aus dem selben Zustand. Auch wenn eventuell verschiedene Zustände angeregt werden, relaxiert das Molekül dann schnell zum gemeinsamen emittierenden Zustand. Die gefundenen geringen Abweichungen lassen sich durch den Versuchsaufbau und seine Kalibration begründen.

Hämocyanin

Analog zum Tryptophan soll nun eine Hämocyaninlösung untersucht werden. Von der Ein-Photonen-Anregung ist bekannt, daß die Emission des oxygenierten Hämocyanin gegenüber dem deoxygenierten um etwa 5 nm blauverschoben ist [82,83]. Das beladene Bindungszentrum löscht die Fluoreszenz der meisten Tryptophane in seiner Umgebung. Nur solche, die sich eher am Rande der Untereinheit befinden, liegen außerhalb des Försterradius. Diese Tryptophane befinden sich in einer anderen Umgebung und ihre Fluoreszenz ist blauverschoben gegenüber der von Seitenketten in der Nähe des Bindungszentrums. Letztere dominieren aber die Fluoreszenz, wenn das Bindungszentrum nicht beladen ist und darum die Fluoreszenz nicht löschen kann. Dieser Unterschied zwischen oxygeniertem und deoxygeniertem Hämocyanin sollte auch nach Zwei-Photonen-Anregung sichtbar sein.

Abbildung 4.2 zeigt die Ergebnisse der Messungen. Die Konzentrationen betrugen 2.6 g/l (TPE) und 0.2 g/l (OPE). Um die spektrale Verschiebung möglichst gut detektieren zu können, wurden diese Messungen mit dem kurzwelligen der beiden Detektionsfiltersätze durchgeführt, da seine Transmission gerade das Maximum der Hämocyanin-Emission überdeckt. Bei hohen Anregungsintensitäten (Abbildung 4.2A, 3.5 MW/cm²) stimmen die Spektren von deoxygeniertem Hämocyanin gut überein. Allerdings scheint auch das oxygenierte Hämocyanin wie deoxygeniertes zu emittieren. Dieser Unterschied verschwindet, wenn die Anregungsintensität auf 175 kW/cm² reduziert wird (Abb. 4.2B), worunter aber die Signalqualität leidet. Die deoxygenierte Probe liefert immer noch ein mit der Ein-Photonen-Anregung übereinstimmendes Spektrum. Bei der oxygenierten Probe ist die Zählrate aber so gering, daß selbst bei 80 Minuten Integrationszeit die Korrektur der Detektionscharakteristik zu einem sehr verrauschten Signal führt, weil dabei durch kleine Zahlen geteilt wird. Dieses Problem wird umgangen, wenn nicht das Zwei-Photonen-Spektrum korrigiert wird, sondern das Ein-Photonen-Spektrum mit der Detektionscharakteristik *multipliziert* wird, als ob es im Mikroskop gemessen worden wäre. Dies zeigt Abbildung 4.2C. Die gemessene TPE-Kurve stimmt eher mit der blauverschobenen Kurve der oxygenierten Probe überein als mit der rotverschobenen. Um sich hier nicht auf die Anschauung verlassen zu müssen, wurde die OPE-Kurve der *deoxygenierten* Probe durch spektrales Verschieben an die TPE-Messung der oxygenierten Probe angepaßt. Dies liefert als Fit-Parameter eine Verschiebung von 6 nm, was gut mit dem aus den Ein-Photonen-Messungen erwarteten Wert von 5 nm übereinstimmt [82,83].

Auf die Anregungsintensitätsabhängigkeit der Hämocyaninfluoreszenz soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Sie wird in Kapitel 4.3.4 genauer untersucht werden. Es kann zusammenfassend festgestellt werden, daß sich auch die Emission von Hämocyanin – zumindest bei niedrigen Anregungsintensitäten – zwischen Ein- und Zwei-Photonen-Anregung nicht unterscheidet.

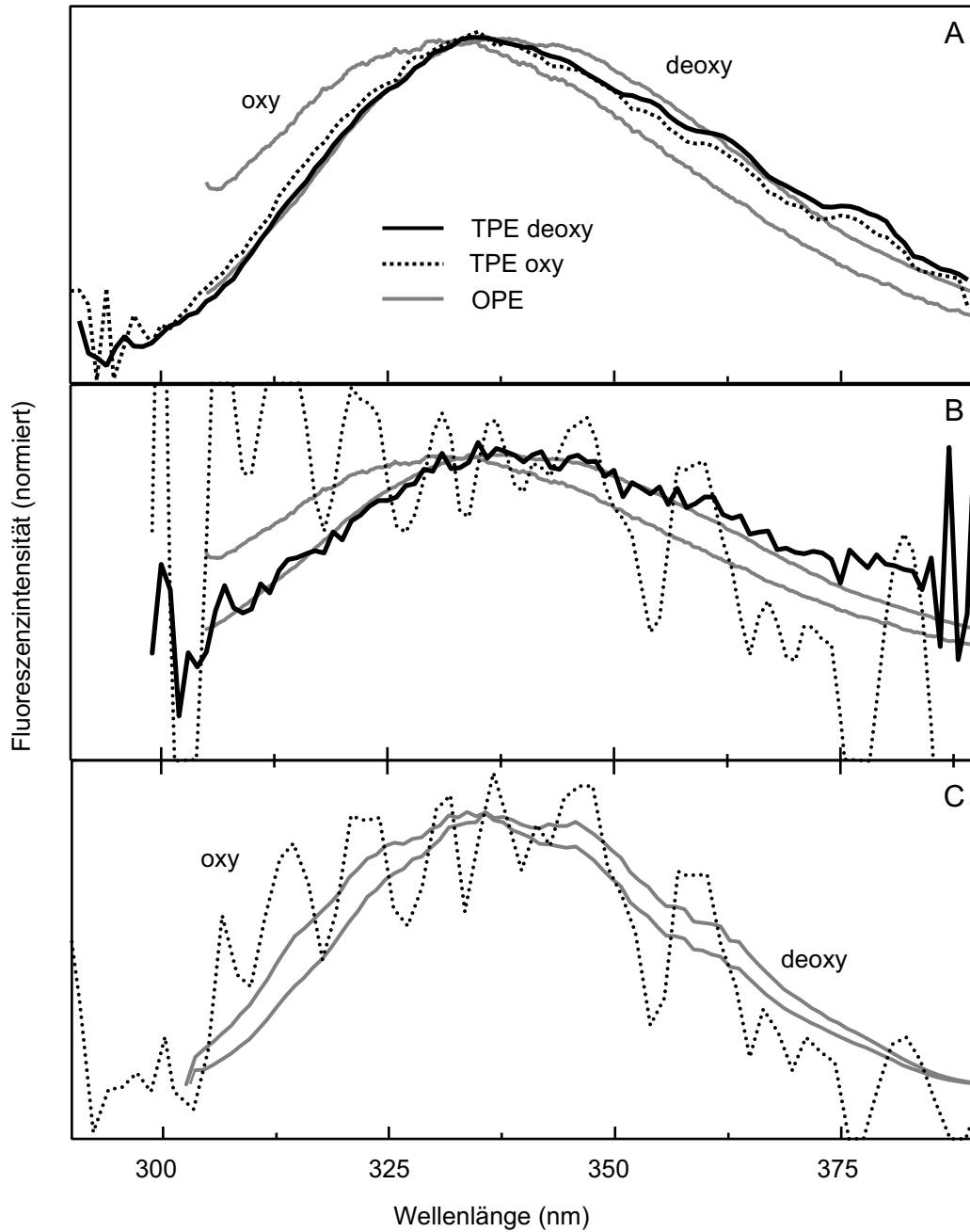


Abbildung 4.2: Hämocyanin-Emission nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung der Tryptophane (Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{OPE}} = 295$ nm, $\lambda_{\text{TPE}} = 590$ nm). A: TPE-Anregungsintensität 3.5 MW/cm^2 ; Integrationszeit 100 bzw. 150 sek. B: TPE-Anregungsintensität 175 kW/cm^2 ; Integrationszeit 25 bzw. 80 min. Sowohl in A als auch in B sind die TPE-Kurven korrigiert, was das Rauschen verstärkt. C: wie B, nur auf die TPE-Detektionscharakteristik umgerechnete OPE-Kurven.

Avidin

Es wurden drei verschiedene Avidin-Proben untersucht, die schon in Kapitel 3.6 vorgestellt worden sind: das unmodifizierte Avidin in Puffer, das leicht modifizierte NeutrAvidin ebenfalls in Puffer sowie NeutrAvidin gebunden an Latex-Kugeln. Alle drei Proben zeigen bei Ein-Photonen-Anregung bei 295 nm ein identisches Emissionsspektrum (Abbildung 4.3A). Die Latex-Kugeln streuen stärker, so daß die effektive Tryptophankonzentration niedriger gewählt werden mußte, wodurch das Signal verrauschter ist. Bei Zwei-Photonen-Anregung bei 590 nm unterscheiden sich auch hier die Emissionsspektren nicht von denen nach Ein-Photonen-Anregung. In Abbildung 4.3B sind die Spektren einer 25 μM NeutrAvidin-Lösung nach 4 Minuten Integration bei einer Anregungsintensität von 770 kW/cm^2 dargestellt. Wieder wurde der Einfluß der beiden Filtersätze korrigiert. Teil C zeigt schließlich eine 50 nM Lösung von NeutrAvidin-markierten Latexkugeln (ohne Farbstoff-Füllung), die mit 10 Minuten Integrationszeit bei 1.2 MW/cm^2 durch den langwelligen der beiden Filtersätze aufgenommen wurde. Dies geschah allerdings nicht am gleichen Tag, an dem auch das Spektrometer kalibriert wurde, wodurch der Detektionsstrahlengang leicht anders verlaufen sein kann. Solche Änderungen im Strahlengang bewirken ein Verschieben des Spektrums, wie es auch hier festzustellen ist. Wenn das gemessene Spektrum um 7 nm verschoben wird, so stimmt es mit dem Ein-Photonen-Spektrum überein. Da alle drei Ein-Photonen-Spektren in Teil A die gleiche Lage des Maximums aufweisen, kommt es anscheinend nicht zu einer umgebungsabhängigen Verschiebung der Tryptophanfluoreszenz. Die in Teil C zu sehende Verschiebung können ein experimentelles Artefakt sein. Auch bei Avidin stimmen die Emissionsspektren nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung überein.

4.1.2 Anregungsspektren

Die im folgenden vorgestellten Zwei-Photonen-Anregungsspektren waren eines der ersten Zwei-Photonen-Experimente dieser Arbeit. Sie wurden nicht im Mikroskop durchgeführt, sondern in einem rechtwinkligen Küvetten-Aufbau. Abbildung 4.4 gibt einen Überblick. Die Anregung erfolgte durch ein Objektiv mit einer numerischen Apertur $\text{NA}=0.2$ (Melles-Griot, 10x). Die Anregungsintensität variierte je nach Wellenlänge zwischen 20 und 30 kW/cm^2 . Die Fluoreszenz wurde im rechten Winkel durch eine Quarzlinse ($f = 30 \text{ mm}$) eingesammelt, mit Hilfe eines Farbglasfilters (Schott, BG3, 2mm) vom Anregungslicht getrennt und schließlich mit einer zweiten Quarzlinse ($f = 50 \text{ mm}$) auf den Eintrittsspalt des Spektrographen fokussiert. Die Einsammeleffizienz beträgt etwa 0.3 %. Als Referenz-Probe wurde p-Bis(o-methylstyryl)-benzol (bis-MSB, Lamdaphysik) in Cyclohexan verwendet (10 μM). Dessen Zwei-Photonen-Anregungsspektrum ist in Ref. [158] tabelliert. Der dort angegebene Absorptionskoeffizient ist fehlerhaft [159,100], so daß MSB nicht als Referenz für Absolutwerte geeignet ist. Es wurden immer abwechselnd die Probe und die Referenz in den Küvettenhalter gestellt und pro Wellenlänge so drei Meßwerte erhalten. Die Daten sind – korrigiert auf die MSB-Referenz – in Abbildung 4.5 dargestellt. Zum Vergleich ist ein Ein-Photonen-Anregungsspektrum eingezeichnet. Im Fall von Tryptophan war dabei der Detektionsmonochromator auf eine Bandbreite

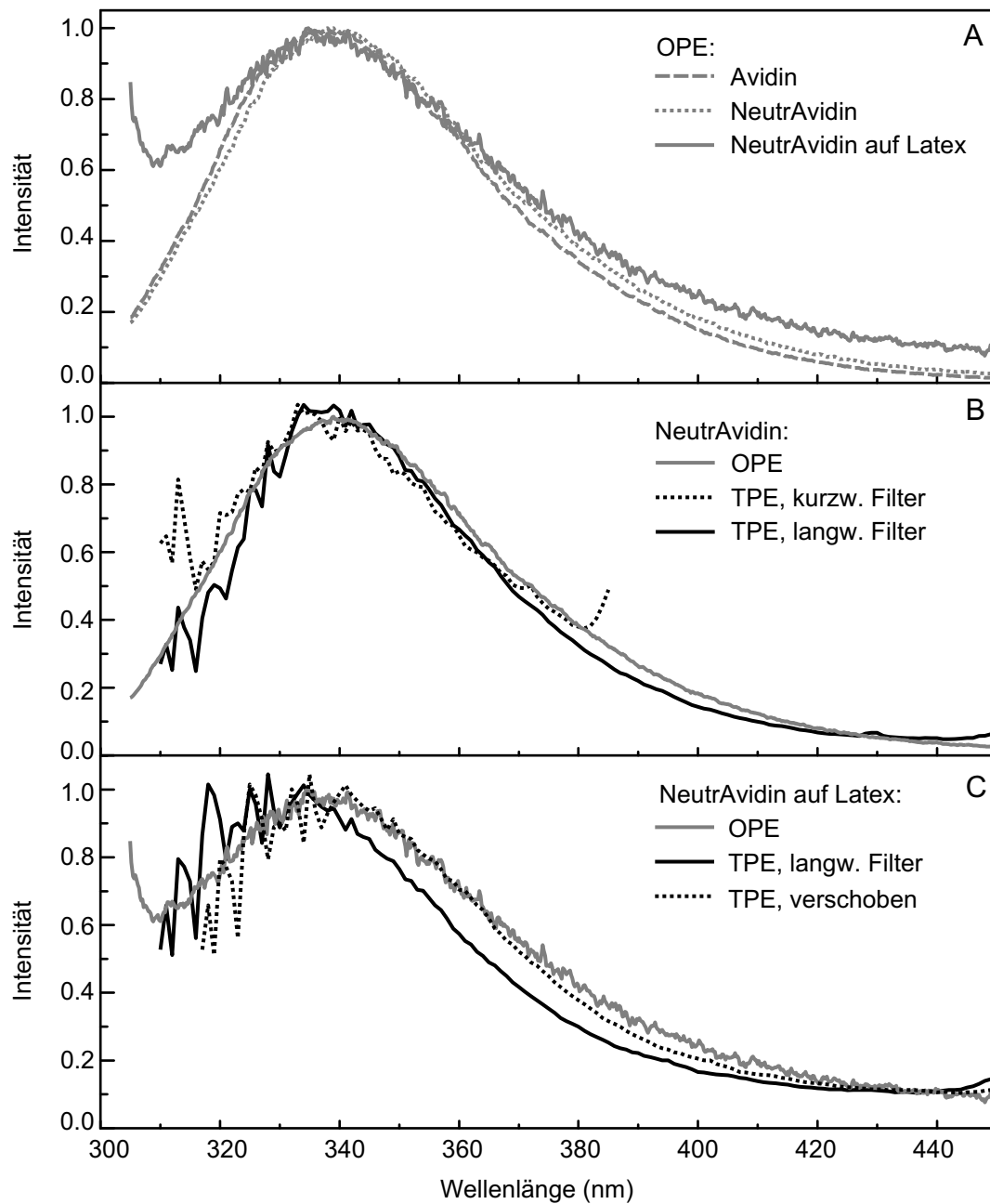


Abbildung 4.3: Emissionsspektren von Avidin und NeutrAvidin in verschiedenen Umgebungen nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung der Tryptophane. A: Ein-Photonen-Anregung aller drei Proben bei 295 nm. B: NeutrAvidin in Puffer. Vergleich der Ein- und Zwei-Photonen-Anregung. C: NeutrAvidin auf Latexkugeln. Vergleich der Ein- und Zwei-Photonen-Anregung. Die Verschiebung des Zwei-Photonen-Spektrums ist ein experimentelles Artefakt.

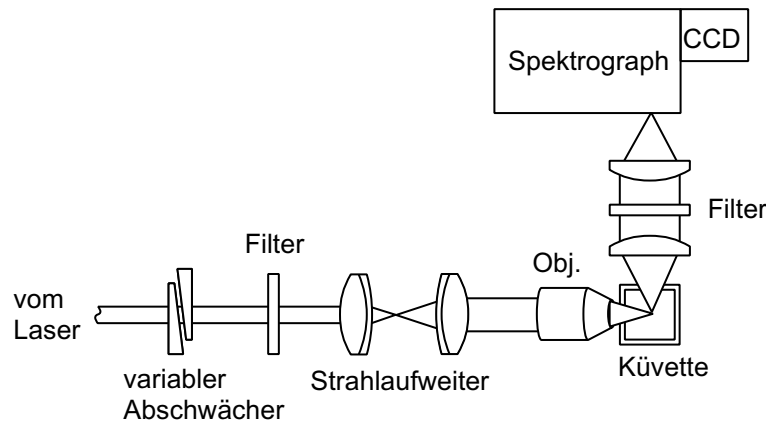


Abbildung 4.4: Küvetten-Aufbau zur Messung der Anregungsspektren.

von 20 nm bei einer Zentralwellenlänge von 350 nm eingestellt. Bei der Hämocyaninmessung betrug die Bandbreite 3 nm.

Die Variation der Signalintensität bei gleicher Wellenlänge ist hauptsächlich auf die schlechte Reproduzierbarkeit der Küvettenposition in ihrem Halter zurückzuführen. Geringe Änderungen der Position führen zu einer veränderten Lage des Fokus, da sich das Verhältnis des Strahlweges in Luft (Brechungsindex $n = 1$) zu dem in Wasser / Cyclohexan ($n = 1.33$ bzw. $n = 1.45$ [160]) ändert. Anregungs- und Detektionsfokus stimmen dann nicht mehr überein.

Bei beiden Proben stimmen die Spektren nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung im Rahmen des Meßfehlers überein. Bereits in Abschnitt 2.4.4 wurde der reduzierte Einfluß der Auswahlregeln bei der Zwei-Photonen-Anregung von Molekülen diskutiert. Im Fall von Tryptophan zeigten Rehms *et al.* [67], daß sich die Ein-Photonen-Absorption gut mit

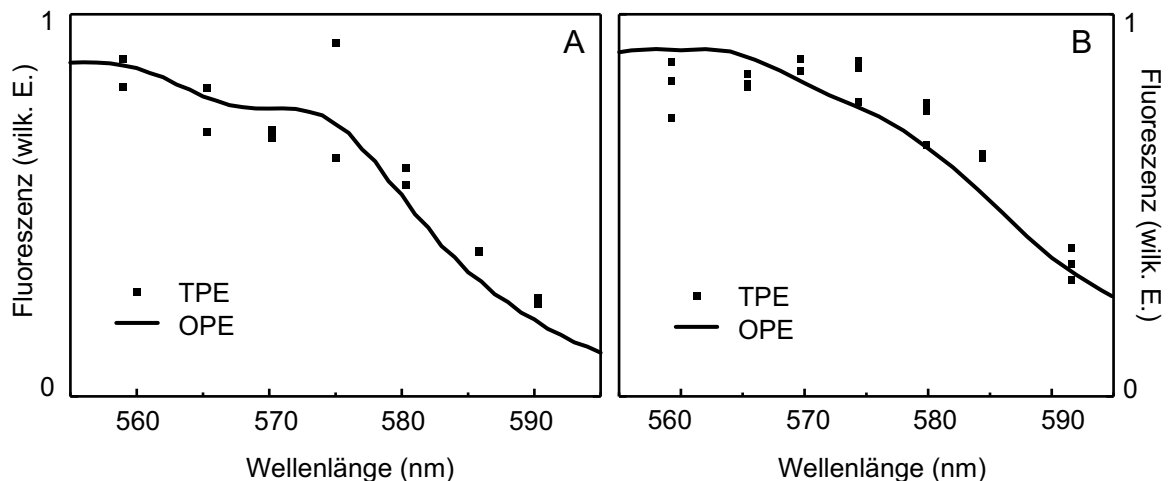


Abbildung 4.5: Fluoreszenz-Anregungsspektren bei Ein- und Zwei-Photonen-Anregung. A: Tryptophan in Puffer. B: Tryptophan in oxygeniertem Hämocyanin.

dem Zwei-Photonen-Anregungsspektrum deckt (Abb. 2.28). Bei anderen Fluorophoren ist dies, wie ebenfalls in Abschnitt 2.4.4 gezeigt, nicht der Fall. Wie zu erwarten war, ändert auch die Proteinumgebung nichts an der reduzierten Symmetrie des Tryptophan-Moleküls, so daß sich auch hier Ein- und Zwei-Photonen-Anregungsspektren nicht unterscheiden.

4.2 Fluoreszenzlöschung

Die Sauerstoffbeladung des Hämocyanin wird durch Löschung der Tryptophanfluoreszenz signalisiert. Darum ist es für die weiteren Experimente wichtig sicherzustellen, daß die Löschung der Fluoreszenz unabhängig vom Anregungsprozeß ist. Dazu wurden zwei Kontrollexperimente durchgeführt: Zum einen wurde die Fluoreszenz einer Tryptophanlösung durch Zugabe von Iodid gelöscht. Zum anderen wurde die Löschung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz in Hämocyanin durch Beladung des Bindungszentrums mit Sauerstoff verglichen.

4.2.1 Löschung mit Iodid

Iodid löscht die Tryptophanfluoreszenz durch Stoß [46]. Dies sollte vom Anregungsprozeß unabhängig sein. Zur Kontrolle wurde die Fluoreszenzintensität einer Probenreihe bei Zwei-Photonen-Anregung im Mikroskop und bei Ein-Photonen-Anregung im Spektrometer vermessen. Die Iodid-Konzentration variierte zwischen 0 und 90 mM und die Tryptophankonzentration sinkt durch die Zugabe von Iodid von 10 μM auf 9 μM .

Löschung durch Stoß wird durch die Stern-Vollmer-Gleichung beschrieben [46]

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k [\text{Iodid}] \quad . \quad (4.1)$$

Dabei bezeichnet F die gemessene Fluoreszenzintensität und F_0 diejenige vor Zugabe des Löschers. Entsprechend ist in Abbildung 4.6 die Zählrate als F_0/F aufgetragen. Sie wurde im Fall der Zwei-Photonen-Anregung durch Integration über 100 sec gewonnen und später auf die Verdünnung der Probe korrigiert. Sämtliche Proben wurden in kurzen zeitlichen Abstand vermessen, um den Einfluß von Schwankungen der Laserleistung zu reduzieren. Im Fall der Ein-Photonen-Anregung wurde die Fluoreszenzintensität aus dem Maximum der Emissionsbande gewonnen und auf Verdünnung und Absorption der Iodid-Lösung bei 295 nm korrigiert. Wie zu erwarten war, stimmen beide Messungen gut überein. Dies ist eine der wenigen Messungen, bei der das Ergebnis der Ein-Photonen-Anregung größeren Schwankungen unterworfen ist als das der Zwei-Photonen-Anregung. Ein Grund dafür wird die bessere Durchmischung der Probe durch das Paddel im Mikroskop sein. Die Löschung der Tryptophanfluoreszenz mit Iodid unterscheidet sich also nicht bei Ein- und Zwei-Photonen-Anregung.

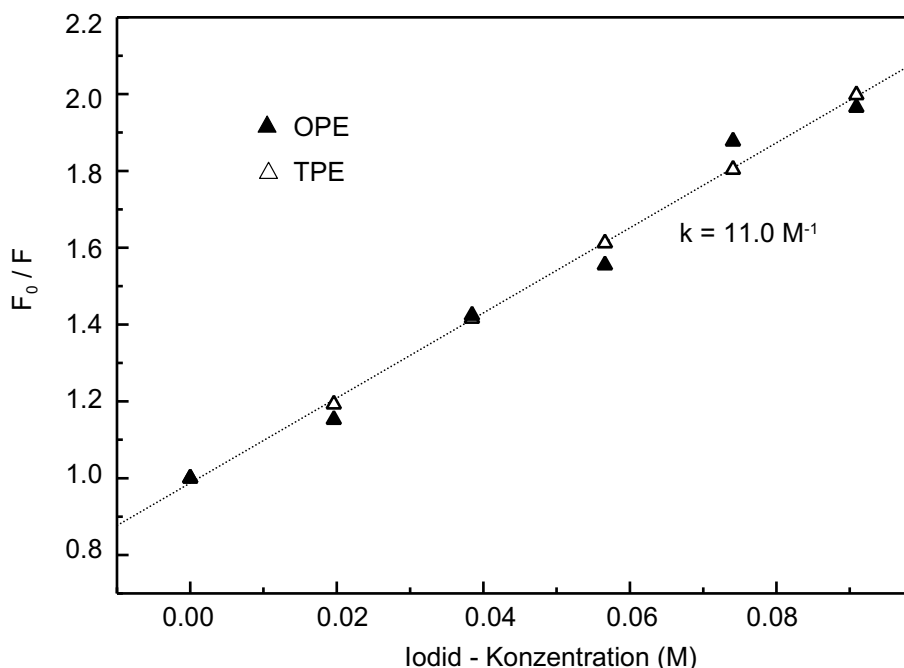


Abbildung 4.6: Fluoreszenzlöschung mit Iodid. Vergleich zwischen Ein- und Zwei-Photonen-Anregung. Die eingezeichnete Gerade liefert mit dem Stern-Vollmer-Modell eine Löschkonstante $k = 11 \text{ M}^{-1}$.

4.2.2 Löschung durch Sauerstoffbindung

Die Bindung von Sauerstoff führt zu einer Verringerung der Tryptophanfluoreszenz in Hämocyanin. R. Loewe hat gezeigt [60], daß diese Löschung proportional zur Sauerstoffbindung ist, die direkt über die *charge transfer* Bande bei 340 nm beobachtet werden kann (siehe Abschnitt 2.1.3). Um diese Proportionalität für unsere Experimente nutzen zu können, muß noch gezeigt werden, daß der Zusammenhang auch für die Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung gilt.

Dazu wurde eine Hämocyaninlösung (0.3 g/l) bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken sowohl mit Ein- als auch mit Zwei-Photonen-Anregung untersucht. Die Lösung befand sich in einer Küvette mit Gummidichtung und Schraubverschluß, so daß Sauerstoff nur langsam eindiffundieren konnte. Zu Beginn der Messung wurde die Probe in der AG Decker deoxygeniert. Im Laufe der Messungen über mehrere Stunden erhöhte sich der Sauerstoffpartialdruck dann wieder. Um ihn innerhalb der Probe homogen zu halten, wurde sie vor jeder Messung leicht geschüttelt. Das Objektiv des Mikroskops wurde durch eine einelementige Quarzlinse ($f = 50 \text{ mm}$) ersetzt, um in der Küvette mit einer Wandstärke von einem Millimeter messen zu können. Die dadurch verringerte Anregungs- und Detektionseffizienz war bei der hier verwendeten Probenkonzentration nicht bedeutend. Die Anregungsintensität betrug 20 kW/cm^2 bei 590 nm. Es wurden immer abwechselnd die Ein-Photonen-Absorption und -Fluoreszenz und die Zwei-Photonen-Fluoreszenz gemessen, wobei zur Kontrolle eine vollständig oxygenierte Probe mit vermessen wurde. Dies ermöglichte, Schwankungen der Anregungseffizienz zu

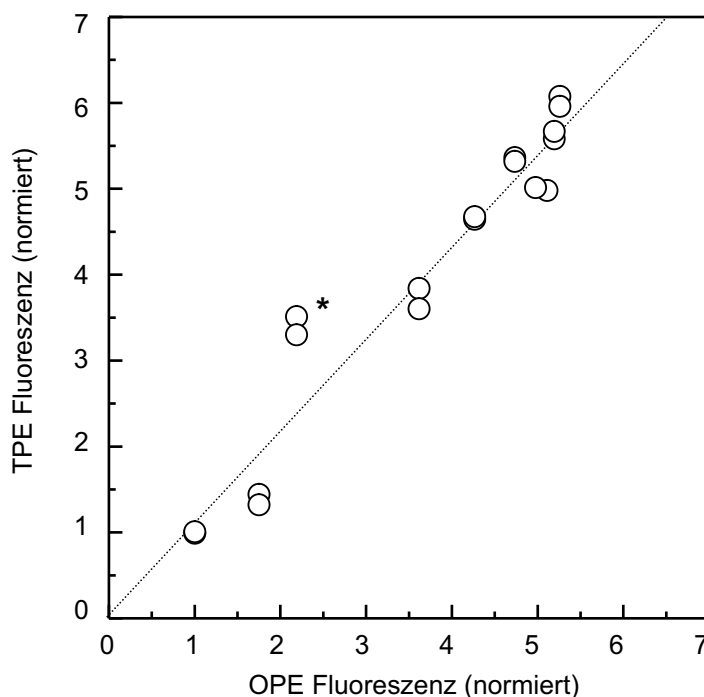


Abbildung 4.7: Vergleich der Löschung der Tryptophanfluoreszenz durch Sauerstoffbindung in Hämocyanin. Gemessen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Re-Oxygenierung einer Probe (zeitlicher Verlauf von rechts oben nach links unten). Vor der mit einem Stern gekennzeichneten Messung wurde die Küvette kurzzeitig geöffnet. Danach befand sich die Probe für einige Zeit nicht mehr im Gleichgewicht, so daß sich die Sauerstoffbeladung zwischen der Ein- und der Zwei-Photonen-Messung deutlich änderte.

korrigieren, wie sie insbesondere bei den Zwei-Photonen-Messungen aufgetreten sind. Die Fluoreszenz nach Ein-Photonen-Anregung wurde auf die Absorption der Anregung (295 nm) und im gesamten Detektionsintervall (310–400 nm) korrigiert und anschließend über dieses Intervall integriert.

Abbildung 4.7 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Aufgetragen ist die Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung gegenüber der nach Ein-Photonen-Anregung. Sie wurde jeweils auf die letzte Messung bei vollständiger Oxygenierung normiert. Das Verhältnis von maximaler zu minimaler Fluoreszenz beträgt etwa 7. Dies bedeutet, daß die Probe zu Beginn der Messungen nicht vollständig deoxygeniert war, da ansonsten ein Wert von etwa 13 erwartet würde [82, 83]. Um den zeitlichen Verlauf der Re-Oxygenierung zu beschleunigen, wurde kurz vor der mit einem Stern markierten Messung die Küvette geöffnet. Darum befindet sich hier die Sauerstoffbeladung der Probe nicht im Gleichgewicht und die Oxygenierung änderte sich zwischen der Ein- und der Zwei-Photonen-Messung, so daß der Wert von der Geraden abweicht. Die eingezeichnete Ausgleichsgerade besitzt die Steigung 1.2, wobei ein Wert von Eins erwartet wird. Diese Abweichung liegt im Rahmen der Fehler der Einzelmessungen, wie an der Ausdehnung der Punktwolke zu erkennen ist. Mit diesen Messungen ist gezeigt, daß auch die Fluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung als Maß für die Sauerstoffbeladung der Hämocyanine verwendet

werden kann. Wie sich im nächsten Abschnitt zeigen wird, ist dies bei höherer als der hier verwendeten Anregungsintensität nicht mehr der Fall.

4.3 Intensitätsabhängigkeit und Photostabilität

Nachdem in den beiden vorangegangenen Abschnitten eine weitgehende Übereinstimmung zwischen der Tryptophanfluoreszenz nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung festgestellt werden konnte, soll in diesem Abschnitt die Abhängigkeit der Fluoreszenzzählrate von der Anregungsintensität untersucht werden. Bereits in Abschnitt 4.1.1 wurde gezeigt, daß das Emissionsspektrum von Hämocyanin nach Zwei-Photonen-Anregung nur bei niedrigen Intensitäten mit dem erwarteten übereinstimmt. Hinzu kommt, daß die Photostabilität der Fluorophore für die Einzelmolekülspektroskopie eine wichtige Voraussetzung ist. Von einem einzelnen Molekül müssen genügend Photonen detektiert werden können, um es vom Untergrund zu unterscheiden und Informationen aus seiner Fluoreszenz zu gewinnen.

4.3.1 Messungen

Zur Messung der Photostabilität sollten sich die Moleküle in Lösung befinden und nicht an einer Oberfläche fixiert sein. Dies hat verschiedene Gründe: Die Puffer-Lösung ist der natürlichen Umgebung der Proteine am ähnlichsten, die Fixierung auf einer Oberfläche oder in einer Matrix birgt die Gefahr der Modifikation des Proteins. Ein praktischer Grund besteht darin, daß nicht einzelne Moleküle auf der Oberfläche gesucht werden müssen, sondern durch Diffusion in den Detektionsfokus gelangen.

Alle im folgenden vorgestellten Messungen wurden im Probenhalter des Mikroskops durchgeführt. Der Fokus lag dabei etwa $5\ \mu\text{m}$ weit in der Lösung. Die Qualität des Fokus verringert sich durch den Sprung im Brechungsindex rasch, wenn er weiter in die Lösung gelegt wird [161]. Die Anregungsleistung wurde durch den variablen Graufilter schrittweise variiert und von Photodiode D3 (siehe Abb. 3.3, Seite 64) kontinuierlich gemessen. Die Fluoreszenz wurde durch den langwelligen der beiden Filtersätze mit dem Photomultiplier detektiert und über etwa 60 Sekunden pro Anregungsleistung integriert. Die Größe des Fokus wurde durch Abbilden einer Avidin-markierten Latexkugel ($d = 200\ \text{nm}$) zu $\omega_0 = 350\ \text{nm}$ bestimmt. Die Fluoreszenz einer Referenz-Probe, in der sich nur Puffer befand, wurde jeweils abgezogen. Bei niedrigen Anregungsintensitäten ist sie durch die etwa 1–2 counts/sec Dunkelzählrate des Photomultipliers bestimmt. Ab etwa $700\ \text{kW/cm}^2$ steigt sie an und erreicht bei $20\ \text{MW/cm}^2$ etwa 500 counts/sec. Daraus läßt sich erkennen, daß erwartungsgemäß die Korrektur des Untergrunds nur bei niedrigen Zählraten bedeutend ist.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 4.8 für eine 1 mM Tryptophanlösung und für zwei $2\ \mu\text{M}$ Hämocyaninlösungen im oxygenierten (Hc_{oxy}) und deoxygenierten (Hc_{deoxy}) Zustand gezeigt. Schon in Teil A dieser Abbildung sieht man, daß die Zählrate zwar bei niedrigen Intensitäten in der doppellogarithmischen Darstellung einen linearen Verlauf hat, also einem Potenzgesetz folgt, bei höheren aber davon abweicht.

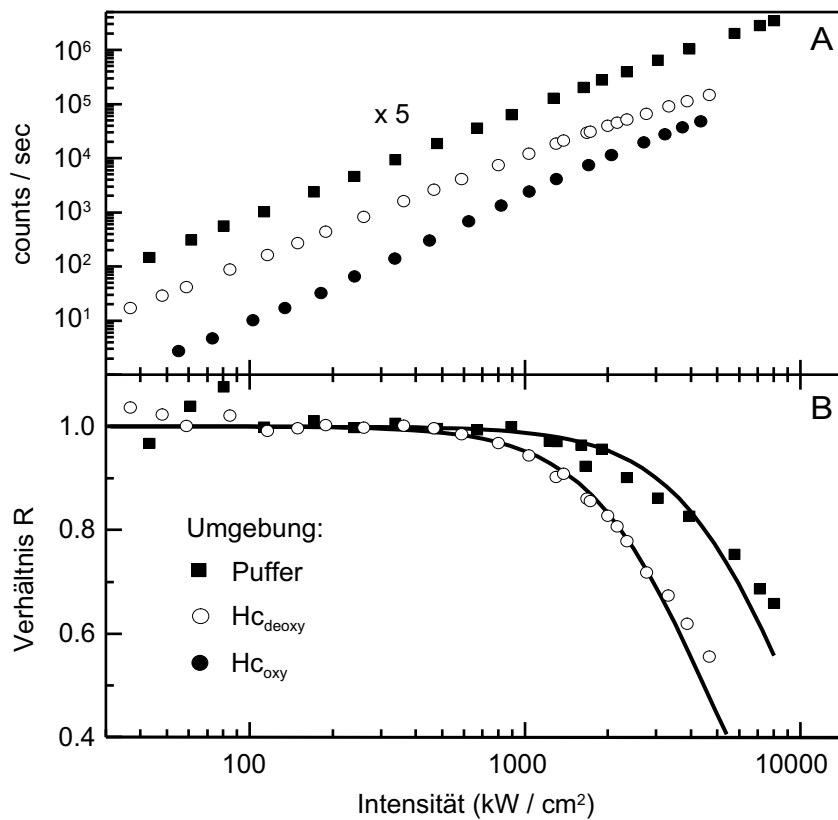


Abbildung 4.8: Abhängigkeit der Fluoreszenzzählrate von der Anregungsintensität bei Tryptophan in Puffer und Tryptophan in oxygeniertem und deoxygeniertem Hämocyanin. A: Doppellogarithmische Auftragung. B: Verhältnis R zwischen gemessener und erwarteter, idealer Fluoreszenz. Zum Verhalten von Hc_{oxy} siehe Abb. 4.13.

Dies wird deutlicher, wenn man nur die Abweichung von der quadratischen Intensitätsabhängigkeit betrachtet. In Abbildung 4.8B ist darum das Verhältnis R_{exp} aufgetragen:

$$R_{\text{exp}} = \frac{\text{gemessene Fluoreszenz}}{\text{ideale Fluoreszenz}} = \frac{F}{F_0} = \frac{F}{\beta I^2} \quad (4.2)$$

Die Konstante β , die die Anregungs-, Fluoreszenz- und Detektionseffizienz beinhaltet, wurde so bestimmt, daß R_{exp} für niedrige Intensitäten den Wert 1 annimmt. Sobald R_{exp} von diesem Wert abweicht, folgt die gemessene Fluoreszenz nicht mehr dem erwarteten Ideal der quadratischen Intensitätsabhängigkeit. Mit dieser Definition ist das Verhältnis R_{exp} identisch mit dem in Abschnitt 2.3.4 definierten Verhältnis R_{theo} der Konzentration der aktiven, fluoreszierenden Fluorophore zu der aller Fluorophore:

$$R_{\text{theo}} = \frac{\text{aktive Fluorophore}}{\text{alle Fluorophore}} = \frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + \gamma \alpha \bar{\tau}} \quad (4.3)$$

Dieses Modell wurde an die Daten angepaßt und in Abbildung 4.8B dargestellt. Das oxygenierte Hämocyanin zeigt schon in Abbildung 4.8A einen deutlich anderen Verlauf und soll in Abschnitt 4.3.4 getrennt behandelt werden.

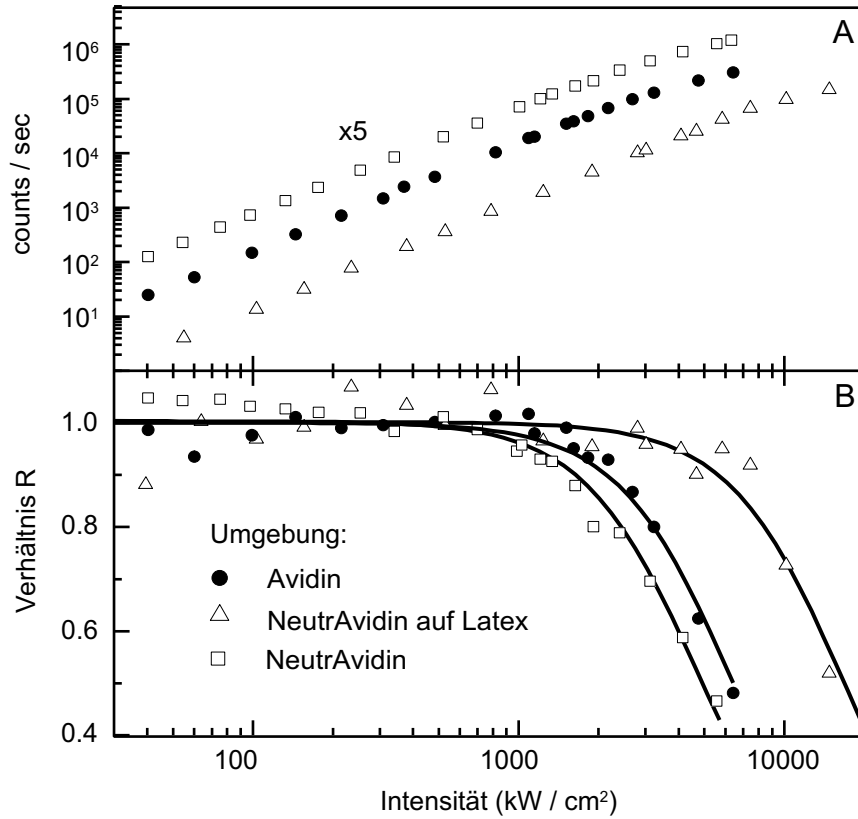


Abbildung 4.9: Abhängigkeit der Fluoreszenzzählrate von der Anregungsintensität bei Avidin-Proben. A: Doppellogarithmische Auftragung. B: Verhältnis R zwischen gemessener und erwarteter, idealer Fluoreszenz.

Analog zu diesen Messungen an Hämocyanin und Tryptophan wurden auch drei Avidin-Proben untersucht. Die Avidin-markierten Latexkugeln dienen als Modell des Hämocyanins und besitzen eine größere Anzahl an Tryptophanen pro Partikel. Auf den Kugeln mit 200 nm Durchmesser sind dies etwa 23000 und auf denen mit 40 nm Durchmesser etwa 340 Tryptophane, verglichen mit 148 pro Hämocyanin. Wie schon in Abschnitt 3.6 beschrieben, sind die Kugeln mit einem leicht modifizierten Protein (NeutrAvidin) beschichtet, darum wurden hier das unmodifizierte Avidin, das leicht modifizierte NeutrAvidin und NeutrAvidin gebunden an Latexkugeln ($d = 40$ nm) untersucht. Abbildung 4.9 zeigt die Meßwerte analog zu Abb. 4.8. Auch hier ist wieder das Modell nach Gl. 4.3 angepaßt und eingezeichnet.

4.3.2 Ergebnisse

An die Meßwerte wurde die Funktion

$$R = \frac{1}{1 + (P/P_0)^2} \quad (4.4)$$

angepaßt, da die Daten als Funktion der Anregungsleistung aufgenommen wurden. Der Zusammenhang mit Gl. 4.3 ergibt sich mit der Anregungsrate α im Fokus (siehe Kap. 2.4.4)

$$\alpha = \frac{1}{2} \sigma \frac{g_p}{f t} \left(\frac{P/h\nu}{0.5 \pi \omega_0^2} \right)^2 . \quad (4.5)$$

Damit gilt für die mittlere Dunkelzeit $\bar{\tau}$

$$\bar{\tau} = \left[\gamma \frac{1}{2} \sigma \frac{g_p}{f t} \left(\frac{1}{h\nu 0.5 \pi \omega_0^2} \right)^2 P_0^2 \right]^{-1} . \quad (4.6)$$

Sie setzt sich zusammen aus der Lebenszeit des Triplett-Zustandes τ_T und aus der Zeit τ_D , die ein Molekül im Mittel für die Diffusion durch den Fokus benötigt (siehe Gl. 2.42):

$$\bar{\tau} = q_b \tau_D + q_{ISC} \frac{\tau_T \tau_D}{\tau_T + \tau_D} \quad \text{für } \tau_T \ll \tau_D \quad q_b \tau_D + q_{ISC} \tau_T . \quad (4.7)$$

Dabei bezeichnet q_b die Bleich-Quanteneffizienz und q_{ISC} die Wahrscheinlichkeit des Übergangs in den Triplett-Zustand. Die Auswertung soll zunächst unter Vernachlässigung des Triplett-Zustandes ($\tau_T = 0$) erfolgen und ist in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Weiter unten wird die Gültigkeit dieser Annahme diskutiert werden.

Die Zeit τ_D läßt sich nach Gl. 2.44 aus dem Diffusionskoeffizienten D und der Fokusgröße ω_0 berechnen. Der Diffusionskoeffizient muß je nach Probe aus unterschiedlichen Quellen beschafft werden. Für Tryptophan wird er mit dem von Cumarin gleichgesetzt [162], für Hämocyanin mit der Svedberg-Gleichung (Abschnitt 2.3.5) aus dem Sedimentationskoeffizienten berechnet [120]. Bei Avidin und NeutrAvidin wird angenommen, daß diese Proteine in etwa den gleichen Sedimentationskoeffizienten wie die Untereinheiten des Hämocyanin besitzen. Damit kann der Wert aus Ref. [163] verwendet werden. Der Diffusionskoeffizient von Latexkugeln mit 40 nm Durchmesser läßt sich aus einer Meßreihe mit Kugeln verschiedenen Durchmessers [118] berechnen. Die Bleichquanteneffizienz q_b ergibt sich dann als Verhältnis von mittlerer Dunkelzeit $\bar{\tau}$ zu Diffusionszeit τ_D .

Die Fluoreszenzquanteneffizienzen η von Tryptophan in den verschiedenen Umgebungen sind für Puffer [164] und Avidin [73] aus der Literatur entnommen. Für NeutrAvidin in Puffer und auf Latexkugeln wird sie als mit Avidin übereinstimmend angenommen. Die Quanteneffizienz von deoxygeniertem Hämocyanin hat W. Erker bestimmt [82].

Insbesondere die mittlere Anzahl der emittierten bzw. detektierten Photonen ist für die Experimente relevant. Eine Beziehung soll dafür im folgenden hergeleitet werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Fluorophor genau n Photonen emittiert und dann photobleicht, lautet

$$P(n) = q (1 - q)^n . \quad (4.8)$$

Dabei bezeichnet $q = q_b/(\eta + q_b)$ die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Fluorophor bleicht, eingeschränkt auf die Fälle, daß er entweder fluoresziert oder bleicht. Die strahlungslose

	Umgebung				
	Puffer	Hc _{deoxy}	Avidin	NeutrAvidin	+ Latex
P_0 (mW)	24.1	7.3	10.1	7.5	26.5
$\bar{\tau}$ (μ s)	18	237	102	186	15
D (10^{-7} cm ² /s)	80	2.0	6.6	6.6	1.1
τ_D (ms)	0.2	9.2	2.8	2.8	16.8
q_b (%)	7.7	2.1	3.7	6.7	0.09
η (%)	13	7	13.5	13.5	13.5
$\bar{n} = \eta/q_b$	1.7	3.3	3.7	2.0	152.1
N	1	148	16	16	340
$\bar{c} = \phi N \bar{n}$	0.01	3.2	0.4	0.2	341
$F_{\text{theo}}/F_{\text{exp}}$	10.8	2.3	4.7	5.0	2.3

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Anpassung an die Daten für alle untersuchten Proben.

Rekombination fließt hier nicht ein, da sie weder zur Emission eines Photons noch zum Photobleichen führt. Diese Wahrscheinlichkeitsverteilung ist normiert ($\sum P(n) = 1$). Sie besitzt den Erwartungswert

$$\bar{n} = \sum_0^{\infty} n P(n) = \frac{1-q}{q} = \frac{\eta}{q_b} \quad . \quad (4.9)$$

Sie kann nicht mit einer Poisson-Statistik beschrieben werden, da die Annahme seltener Ereignisse bei einem großen Stichprobenumfang n nicht gegeben ist. Dazu müßten die Bedingungen $n q > 4$ und $n (1 - q) > 4$ erfüllt sein [165]. Bei insgesamt N Fluorophoren pro Molekül und einer Detektionseffizienz ϕ werden im Mittel $\bar{c} = \bar{n} N \phi$ Photonen pro Molekül detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität F eines solchen Moleküls entwickelt sich als Funktion der Anzahl der detektierten Photonen c wie

$$F(c) = (1 - q')^c \quad \text{mit} \quad q' = 1/(\bar{c} + 1) \quad , \quad (4.10)$$

wobei $F(0) = 1$. Sowohl die mittlere Anzahl $\bar{n}$ emittierter Photonen pro Fluorophor als auch die mittlere Anzahl $\bar{c}$ detektierter Photonen pro Molekül sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Um ein Maß für die Genauigkeit dieser Berechnungen zu erhalten, ist in Tabelle 4.1 auch das Verhältnis von berechneter zu gemessener Fluoreszenzzählrate $F_{\text{theo}}/F_{\text{exp}}$ eingetragen. Als Meßwert wurde ein Wert bei etwa 350 kW/cm² verwendet, der also nicht durch Photobleichen beeinflusst ist. Berechnet wird die Zählrate mit (Gl. 2.40)

$$F_{\text{theo}} = C V_{\text{eff}} N \alpha \eta \phi \quad . \quad (4.11)$$

Damit hängt diese Kontroll-Rechnung in ähnlicher Weise wie obige Rechnung zur Bestimmung von $\bar{n}$ von den einzelnen experimentellen Parametern ab.

Diskussion

Die oben vorgestellte Auswertung der Meßwerte ist mit einer nicht zu vernachlässigenden Unsicherheit behaftet. Die Photostabilität wird sehr indirekt gemessen, wobei sehr viele, teilweise nur ungenau bekannte Parameter einfließen. Die größten Unsicherheiten liegen bei dem Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt σ und bei der Detektionseffizienz ϕ . Der Absorptionsquerschnitt von Tryptophan $\sigma = 1$ GM ist nur aus Ref. [67] aus quantenchemischen Berechnungen von 3-Methylindol zu erhalten. Seine Unsicherheit wird mit $\Delta\sigma = 0.5$ GM abgeschätzt. Die Detektionseffizienz ϕ wurde in Abschnitt 3.2.3 durch die Multiplikation der (zum Teil nur aus den Datenblättern bekannten) Transmission durch die einzelnen Bauelemente berechnet ($\phi = (0.66 \pm 0.05)\%$). Da aber ein verlässlicher Standard in diesem Wellenlängenbereich fehlt, ist es nicht möglich, sie experimentell zu verifizieren. Die vollständige Fehlerrechnung mit Hilfe der partiellen Ableitungen der zu berechnenden Werte führt schließlich zu Fehlerwerten in der Größenordnung der Ergebnisse. Die in Tabelle 4.1 aufgeführten Werte sind deshalb nur als Angabe der Größenordnung zu verstehen. Etwa die Hälfte der Unsicherheit beruht auf dem oben diskutierten, nur ungenau bekannten Absorptionskoeffizienten. Auf dieser Grundlage muß die Abweichung zwischen experimentell ermittelter und berechneter Fluoreszenzzählrate um Faktoren zwischen 2 und 10 toleriert werden.

Insgesamt ist die Photostabilität der untersuchten Proben sehr gering. Die mittlere Anzahl emittierter Photonen $\bar{n}$ liegt zwischen 1.7 und 152. Für einen guten Farbstoff dagegen werden etwa 10^5 – 10^6 Photonen erwartet [166, 19, 147]. Dabei liegen fast alle Proben im Bereich um $\bar{n} \approx 2$, einzig die NeutrAvidin-markierten Latexkugeln heben sich deutlich von den anderen Proben ab. Hier scheint Tryptophan mehr als 40 mal stabiler zu sein. Dies äußert sich dann auch in der mittleren Anzahl detektierbarer Photonen $\bar{c}$. Sie liegt mit 341 für diese Latexkugeln deutlich höher als die etwa 3 Ereignisse, die bei Hämocyanin erwartet werden können. Für einzelne Avidine und gar einzelne Tryptophane reicht die Photostabilität nicht aus, um sie zu detektieren. Es wird jeweils deutlich weniger als ein Photon pro Molekül detektiert.

Die Meßwerte in Abbildung 4.8 und 4.9 könnten auch ohne jegliches Photobleichen nur durch die Populierung des Triplett-Zustandes erklärt werden. Solange der Fluorophor sich im Triplett-Zustand befindet, kann er nicht aus dem ersten angeregten Singulett-Zustand emittieren, erscheint also dunkel. Mit oben vorgestelltem Experiment ist nicht zu unterscheiden, ob ein Fluorophor dunkel erscheint, weil er gebleichen ist, oder weil er sich im Triplett-Zustand befindet. Im ersten Fall wird die Dauer der Dunkelphase durch die Diffusionszeit durch den Fokus bestimmt; danach wird der gebleichene Fluorophor durch einen neuen, ungebleichenen ersetzt. Im zweiten Fall ist die Dauer der Dunkelphase gleich der Triplett-Lebenszeit, wenn Diffusion vernachlässigt wird. Die Triplett-Lebenszeit τ_T von Tryptophan in Proteinen streut allerdings stark, da sie von der jeweiligen Umgebung abhängt. Es sind Werte zwischen kleiner $10\ \mu\text{s}$ und größer $2\ \text{s}$ gemessen worden [72]. Wenn die Triplett-Lebenszeit τ_T kürzer oder gar viel kürzer als die mittlere Dunkelzeit $\bar{\tau}$ ist, dann kann die abnehmende Fluoreszenzintensität *nicht* mit der Populierung des Triplett-Zustandes erklärt werden: Die Triplett-Quantenausbeute q_{ISC} kann in Gl. 4.7 maximal den Wert Eins annehmen. Bei Triplett-Lebenszeiten in der Größen-

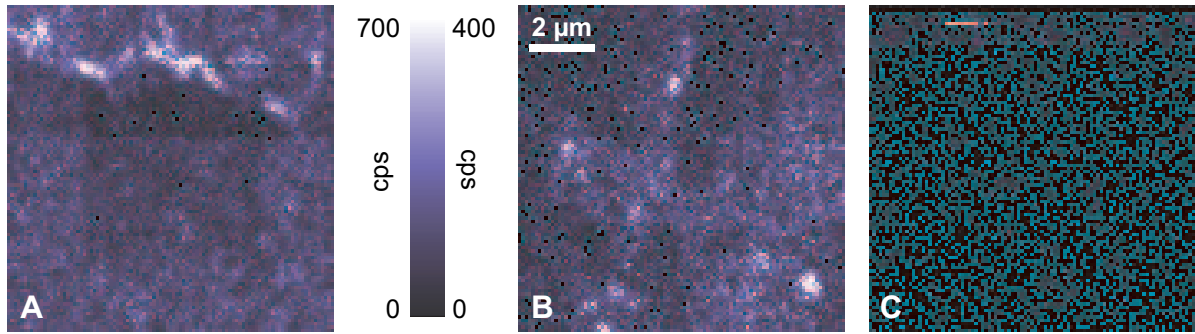


Abbildung 4.10: Deoxygeniertes Hämocyanin adsorbiert auf einer Glasoberfläche. A: hohe Konzentration. In der Mitte wurde ein Bereich schon einmal abgerastert und ist geblichen. B: niedrigste Konzentration, bei der noch ein Kontrast im Bild festzustellen war. C: eine unbelegte Grenzfläche zum Vergleich bei gleicher Skalierung wie in der Mitte.

ordnung der Diffusionszeit τ_D hilft eine solche Argumentation nicht. In diesem Fall kann zwischen Photobleichen und Populierung des Triplett-Zustandes nur durch Messungen bei unterschiedlicher Diffusionszeit unterschieden werden. Die Viskosität müßte also um mehrere Größenordnungen erhöht werden, gleichzeitig sollte das Protein aber so wenig wie möglich modifiziert werden.

Alle Ergebnisse in dieser Arbeit sprechen allerdings dafür, daß das Photobleichen der Tryptophane nicht zu vernachlässigen ist. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 4.10A zu sehen. Auf der Deckglasoberfläche adsorbierte deoxygenierte Hämocyanine ($C = 200$ nM) sind bei einer Intensität von 700 kW/cm^2 abgebildet worden. Die Oberfläche ist dicht belegt (siehe auch Abb. 3.13). In der Mitte ist ein Bereich von $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ zu erkennen, der schon einmal abgerastert wurde (50 ms/pixel , Pixelgröße $50 \times 50 \text{ nm}^2$). Dort sind die meisten Hämocyanine geblichen. Wenn die Intensitätsabhängigkeit in Abbildung 4.8 und 4.9 *nur* auf die Populierung des Triplett-Zustandes zurückzuführen wäre, dann sollte dies bei der langen Integrationszeit keinen Einfluß haben. So verhindert das schnelle Photobleichen aber die Abbildung einzelner Hämocyanine: Abbildung 4.10B zeigt die niedrigste Hämocyaninkonzentration, bei der noch ein Kontrast im Bild festzustellen war ($C = 2$ nM). Trotzdem ist hier die Oberfläche immer noch dicht mit Molekülen belegt, wie im Vergleich mit Abbildung 3.13 zu erkennen ist.

4.3.3 Mögliche Ursachen

Es bleibt noch zu diskutieren, wie es zu solch großen Bleicheffizienzen kommen kann und warum gerade bei NeutrAvidin-markierten Latexkugeln die Photostabilität am größten ist. Das verwendete Modell des Photobleichens macht darüber keine Aussage. Es geht davon aus, daß der Fluorophor ohne weitere Absorption direkt aus dem angeregten Singulett-Zustand S_1 bleicht.

Eine proteinspezifische Ursache des Photobleichens könnte die Denaturierung des Proteins durch Lösen seiner Disulfid-Brücken sein. Die Tertiärstruktur von Proteinen wird durch Disulfid-Brücken zwischen Cysteinen stabilisiert [69]. Sie können durch Einstrah-

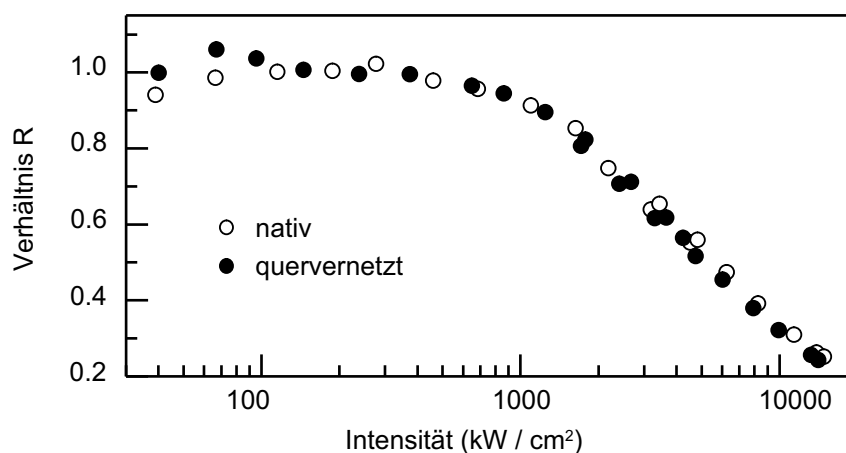


Abbildung 4.11: Vergleich des Photobleichens zwischen nativem und an der Oberfläche quervernetztem deoxygeniertem Hämocyanin. Es ist kein Unterschied feststellbar, darum scheint das Photobleichen nicht mit einem Aufbrechen der Struktur des Proteins verbunden zu sein.

len von UV-Licht oder durch Energieübertrag von benachbarten Tryptophanen gebrochen werden [167, 168]. Im Hämocyanin liegt diese Nachbarschaft für eine der beiden Brücken pro Untereinheit vor [82]. Um zu überprüfen, ob ein Aufbrechen der Tertiär- und damit auch der Quartärstruktur für das Photobleichen der Hämocyanine verantwortlich ist, wurden die Proteine an ihrer Oberfläche quervernetzt und dadurch in ihrer Struktur stabilisiert. Genauere Angaben zum Vorgehen finden sich in Ref. [82]. Abbildung 4.11 zeigt das Verhältnis R zwischen gemessener und erwarteter Fluoreszenzzählrate für deoxygeniertes Hämocyanin (0.3 g/l), sowohl in nativer als auch in quervernetzter Form. Es ist kein Unterschied feststellbar. Beide Varianten zeigen ein vergleichbares Bleichverhalten. Das Photobleichen ist also nicht auf ein Aufbrechen der Struktur der Proteine zurückzuführen. Dies wird auch dadurch unterstützt, daß sich die Bleichquanteneffizienz q_b zwischen Tryptophan in Lösung und Tryptophan in einer Proteinumgebung nur minimal unterscheidet.

Außer diesem proteinspezifischen Weg des Photobleichens kommen für Tryptophan die Modelle in Frage, die für Farbstoffe allgemein in der Literatur diskutiert werden. Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen: zum einen solche Modelle, die keine weitere Absorption eines Photons verlangen, sondern z.B. durch Stoß eines Sauerstoff-Moleküls mit einem Farbstoff im Triplett-Zustand über Spinumkehr Singulett-Sauerstoff erzeugen. Zum anderen Modelle, die, von der hohen Anregungsintensität gerade bei Mehrphotonenanregung ausgehend, eine oder mehrere weitere Absorptionen postulieren, die schließlich zur Photoionisation des Moleküls führen. Beide Möglichkeiten sollen im folgenden dargestellt werden.

Photobleichen von Farbstoffen ist unter Ein-Photonen-Anregung gut, wenn auch nicht abschließend untersucht worden. Eine umfassende Darstellung findet sich in Ref. [169] und mit Schwerpunkt auf FCS-Messungen in Ref. [170]. Ein häufig dominanter Weg ist das Photobleichen durch Singulett-Sauerstoff. Bei allen Experimenten ist Sauerstoff in der Lösung vorhanden. Durch Stoß eines Sauerstoffmoleküls, dessen Grundzustand

ein Triplett-Zustand ist, mit einem Fluorophor, der sich ebenfalls im Triplett-Zustand befindet, können beide Moleküle in den Singulett-Zustand übergehen. Dies bringt den Fluorophor wieder zurück in den Photozyklus, erhöht also die Zählrate, produziert aber gleichzeitig hoch reaktiven Singulett-Sauerstoff, der zu einer Oxydation des Moleküls führen kann. Damit werden die Eigenschaften des Moleküls so verändert, daß danach keine weiteren Absorptionen und/ oder Emissionen stattfinden [171]. In der Einzelmolekülspektroskopie wird dieses Problem umgangen, indem so sauerstoffarm wie möglich gearbeitet wird [172]. Bei dem Ziel der Sauerstoffbindungskurven ist dies allerdings nicht möglich, da in diesem Fall gerade der Sauerstoffpartialdruck variiert werden muß.

Andere Arten von Proteinen sind besser als das Hämocyanin vor Singulett-Sauerstoff geschützt. Die Natur hat zum Beispiel bei Lichtsammelkomplexen dafür gesorgt, daß der entstehende Singulett-Sauerstoff durch Karotinoide unschädlich gemacht wird [42]. Im Unterschied zu Lichtsammelkomplexen ist das Sauerstofftransportprotein Hämocyanin zwar auf eine erhöhte lokale Sauerstoffkonzentration eingerichtet, jedoch nicht darauf, daß Photoabsorption in den Tryptophanen stattfindet. Die Bildung von Singulett-Sauerstoff stellt also den Ausnahmezustand dar, auf den das Protein wahrscheinlich nicht eingestellt ist. Damit ist es durchaus möglich, daß die Oxydation durch Singulett-Sauerstoff zum Bleichen des Fluorophors führt. Zwar sind die Tryptophane zum größten Teil im Inneren des Proteins angeordnet, jedoch muß auch der Sauerstoff ins Innere zum Bindungszentrum gelangen, so daß Stöße stattfinden können. Ein Stoß des Sauerstoffmoleküls mit einem Tryptophan im angeregten *Singulett*-Zustand S_1 löscht zwar ebenfalls die Fluoreszenz, doch ist dieser Prozeß vernachlässigbar, da er diffusionskontrolliert bei der kurzen Lebenszeit des S_1 -Zustandes nur selten auftritt. Für 760 Torr Sauerstoffpartialdruck wird eine Fluoreszenzlöschung um 3 % angegeben [74].

Der zweite in der Literatur diskutierte Weg zum Photobleichen ist die Bildung von Radikalen oder Ionen durch mehrfaches Anregen in höherenergetische Zustände (für eine Übersicht siehe Ref. [173]). Insbesondere bei den hohen, für die Zwei-Photonen-Anregung benötigten Intensitäten scheint dies der vorherrschende Weg zu sein. Dittrich *et al.* konnten zeigen [173], daß bei Zwei-Photonen-Anregung die Änderung der Sauerstoffkonzentration keinen Einfluß auf das Photobleichen hat, Singulett-Sauerstoff also nicht beteiligt ist. Andererseits konnte das Photobleichen durch Zugabe des Antioxydationsmittels Ascorbinsäure reduziert werden. Beides spricht für die Bildung von Radikalen, die schließlich zum Photobleichen führen. Im Fall von Tryptophan wird dies durch quantenchemische Rechnungen des Indols, dem absorbierenden Teil des Tryptophans, untermauert. Sobolewski und Domcke zeigen [174,175], daß es durch Anregung mit Wellenlängen $\lambda < 285$ nm zu einer Ladungstrennung an der N-H-Bindung kommen kann, bei der ein Elektron auf das umgebende Wasser übergeht und bei Anregungsenergien größer 5 eV ($\lambda < 250$ nm) auch das verbleibende Proton abgespalten wird [176]. Die beiden optisch angeregten Zustände 1L_a und 1L_b sind prädissoziierende Zustände zum Zustand $^1A''$, der schließlich zur Abspaltung führt [176,47].

Sollte der bleichende Prozeß nicht vom ersten angeregten Zustand (S_1 oder T_1), sondern von einem höher angeregten erfolgen, so müßte die Abhängigkeit der Bleichrate mit einer höheren Potenz als zwei von der Anregungsintensität abhängen. Dies ist bei verschiedenen Farbstoffen auch der Fall [166,177,173]. Der Effekt zeigt sich deutlich

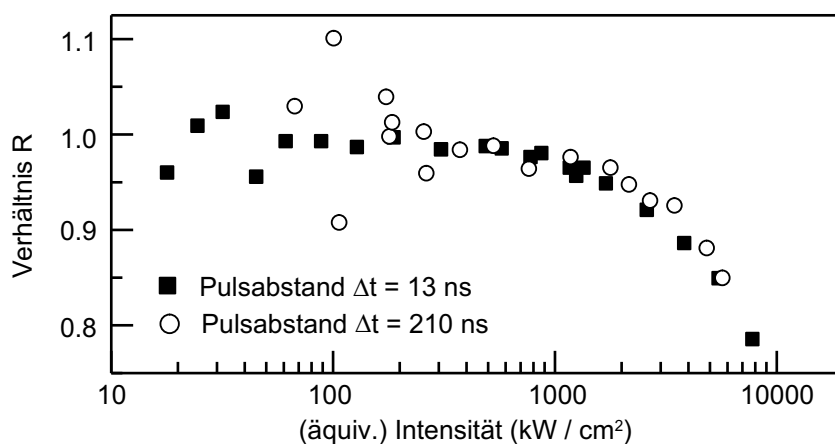


Abbildung 4.12: Vergleich des Photobleichens von Tryptophan bei unterschiedlichen Pulsabständen. Die Intensität ist auf gleiche Peakintensität umgerechnet.

allerdings erst bei hohen Anregungsintensitäten, bei denen in den hier durchgeführten Experimenten schon andere Effekte wie Denaturierung und Aggregatbildung überwiegen. In dem untersuchten Intensitätsbereich konnten, wie Abbildung 4.8 zeigt, keine Abweichung von einer *quadratischen* Intensitätsabhängigkeit des Photobleichens festgestellt werden. Sollte allerdings der zweite Anregungsschritt (z.B. $T_1 \rightarrow T_n$) durch die hohe Anregungsintensität schon gesättigt sein, so wäre ebenfalls keine Abweichung vom quadratischen Verhalten zu erwarten. Gerade bei langen Triplett-Lebenszeiten ist dies möglich [65]. Die Bleicheffizienz hängt bei einem solchen Prozeß von der Lebenszeit des Zwischenzustandes (z.B. S_1 oder T_1) ab. Wenn der zweite Anregungsschritt nicht quasi instantan mit dem gleichen Laserpuls erfolgt, so muß die Lebenszeit des Zwischenzustandes länger als der zeitliche Abstand zwischen zwei Laserpulsen sein. Eggeling *et al.* konnten zeigen [178], daß man das Photobleichen von Coumarin reduzieren kann, wenn der zeitliche Abstand zwischen zwei Laserpulsen von 13 ns auf 210 ns erhöht wird. In diesem Fall scheint die Lebenszeit des Zwischenzustandes gerade zwischen diese beiden Werte zu fallen. Dies ist aber bei Tryptophan nicht der Fall. Wie Abbildung 4.12 zeigt, ist kein Unterschied im Bleichverhalten von Tryptophan in Puffer zu erkennen, wenn der Pulsabstand mit Hilfe eines sog. *pulse pickers* (Coherent Radiation) erhöht wird. Aufgetragen ist dort das Verhältnis R als Funktion der äquivalenten Anregungsintensität. Durch das Reduzieren der Repetitionsrate um den Faktor 16 verringert sich die über einen langen Zeitraum gemittelte Intensität ebenfalls um diesen Faktor 16, allerdings nicht die über nur einen Puls gemittelte. Da letztere für das Photobleichen verantwortlich ist, wurde im Fall der langen Pulsabstände dieser Faktor 16 korrigiert. Bei Tryptophan ist also die Lebenszeit der Zwischenzustände entweder deutlich kleiner als 13 ns oder deutlich größer als 210 ns, so daß eine Variation zwischen diesen beiden Werten keinen Einfluß hat. Es war nicht möglich, mit längeren Pulsabständen zu messen, da dies die Anregungsrate und damit auch die Fluoreszenzrate zu sehr verringert hätte.

Die um etwa den Faktor 40 verbesserte Photostabilität von Tryptophan, wenn es sich in an einer Latexkugel gebundenem NeutrAvidin befindet, ist überraschend. Die direkte

Umgebung des Tryptophan ändert sich bei der Bindung nicht, soweit man das aufgrund der Fluoreszenz-Emissionsspektren Abb. 4.3 sagen kann. Der hydrophobe Charakter der Latexoberfläche kann zu einer verringerten lokalen Wasser-Konzentration führen. Die Umgebung würde weniger polar werden, und ein Elektron würde sich nicht mehr so leicht abspalten lassen. Dies sollte aber auch einen Einfluß auf das Emissionsspektrum haben, da gerade die Tryptophanemission stark von der Polarität der Umgebung abhängt [46]. Ein weiterer Unterschied zwischen dem gebundenen und dem ungebundenem NeutrAvidin besteht in der Nähe zu einem Medium (Polystyren) mit anderem Brechungsindex als Wasser ($n = 1.56$ gegenüber $n_w = 1.33$). Wie schon in Abschnitt 2.3.3 dargestellt, beeinflußt dies die Abstrahlcharakteristik eines Dipols. Die Proteinschicht auf der Kugel ist dünn gegenüber der Wellenlänge, so daß das ganze Protein diesen Einfluß erfährt. In Kapitel 6.3.2 wird im Rahmen des *radiative decay engineering* (RDE) diskutiert werden, wie dies auch die Photostabilität beeinflussen kann. Allerdings ist der Unterschied in den Brechungsindizes relativ gering, vergleichbar mit dem zwischen Quarz und Wasser. Es müßte hier schon zu einem Resonanzeffekt kommen, um eine Verbesserung der Photostabilität um mehr als eine Größenordnung zu erreichen (siehe Kap. 6.3.2). Als letzte denkbare Möglichkeit bleibt noch, daß die Quervernetzung der Proteine, die zur Fixierung auf den Kugeln führt, einen Einfluß auf die Photostabilität hat. Da der Hersteller dieser NeutrAvidin-markierten Kugeln dazu aber keine Aussagen macht, kann dies nicht weiter beurteilt werden.

4.3.4 Messungen an oxygeniertem Hämocyanin

Während bei allen anderen Proben die Fluoreszenzzählrate mit der Anregungsintensität weniger stark als erwartet stieg, so zeigte sich für oxygeniertes Hämocyanin in Abbildung 4.8, daß die Zählrate *stärker* als erwartet anstieg. Dies ist in Abbildung 4.13 noch einmal, nun auch als Verhältnis R zwischen gemessener und erwarteter Fluoreszenz, dargestellt. Bei einer Anregungsintensität von 2 MW/cm^2 werden mehr als dreimal soviel Photonen detektiert als von den Daten bei niedrigen Anregungsintensitäten her erwartet würde. Dieses Verhalten läßt sich mit einem einfachen Modell erklären, welches die folgenden Gleichgewichte zwischen Zuständen einer einzelnen Bindungsstelle des Hämocyanin verwendet:



Ohne Lichteinstrahlung wird das Gleichgewicht zwischen dem mit Sauerstoff beladenen Zustand O_x und dem unbeladenen Zustand D_x durch die Raten k_{on} und k_{off} definiert. Die kooperative Wechselwirkung zwischen den 24 Untereinheiten des Hämocyanins beeinflußt dieses Gleichgewicht. Wenn im Zustand O_x ein Sauerstoffmolekül im aktiven Zentrum zwischen zwei Kupferatomen gebunden ist, so führt dies zu zwei *charge transfer* Banden (siehe Kap. 2.1). Die Bande CT1 bei 340 nm löscht die Tryptophanfluoreszenz über Förster-Transfer, so daß die Tryptophanfluoreszenz ein Maß für die Populierung des Zustandes O_x ist. Die zweite Bande (CT2) entsteht bei etwa 570 nm und ist relativ

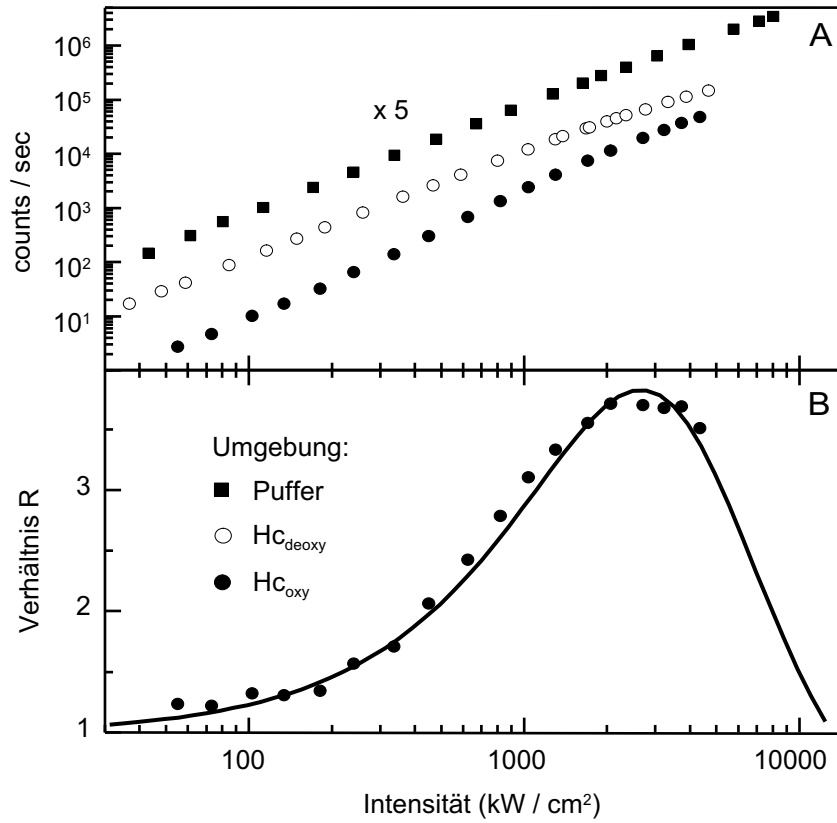


Abbildung 4.13: Abhängigkeit der Fluoreszenzzählrate von der Anregungsintensität bei Hämocyanin. A: Doppellogarithmische Auftragung (identisch mit Abb. 4.8A). B: Verhältnis R zwischen gemessener und erwarteter, idealer Fluoreszenz für oxygeniertes Hämocyanin.

schwach und breit ($\epsilon \approx 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [80]). Allerdings wird für die Zwei-Photonen-Anregung der Tryptophane eine sehr hohe Lichtintensität bei einer Wellenlänge von 590 nm benötigt, so daß trotz des geringen Absorptionsquerschnitts auch dieser Ein-Photonen-Übergang des Bindungszentrums angeregt wird. Der angeregte Zustand O_x^* des Bindungszentrums wird also mit einer Rate k proportional zur Lichtintensität bei 590 nm bevölkert. Dieser Zustand löscht die Tryptophanfluoreszenz nicht. Daher nimmt mit steigender Anregungsintensität die Populierung des Fluoreszenz-löschenden Zustandes O_x ab und so die Zählrate überproportional zu.

Dies soll nun quantifiziert werden. Obiges Modell führt zu folgendem Differentialgleichungssystem, wobei eckige Klammern die Konzentration des jeweiligen Zustandes bezeichnen:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} [O_x] \\ [O_x^*] \\ [D_x] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(k_{\text{off}} + k) & k_4 & k_{\text{on}}[O_2] \\ k & -k_4 & 0 \\ k_{\text{off}} & 0 & -k_{\text{on}}[O_2] \end{pmatrix} \begin{pmatrix} [O_x] \\ [O_x^*] \\ [D_x] \end{pmatrix} . \quad (4.13)$$

Für das Experiment ist nur der Gleichgewichtszustand von Bedeutung. Außerdem wurde die Messung an oxygeniertem Hämocyanin durchgeführt, so daß hier nur der Grenzwert der vollständigen Oxygenierung ($[O_2] \rightarrow \infty$) betrachtet wird. Eine Verallgemeinerung

und Ausweitung des Modells wird in Kapitel 5 vorgestellt werden. Für die relative Besetzung Θ' des Zustandes O_x ergibt sich damit

$$\Theta' = \frac{[O_x]}{[O_x] + [O_x^*] + [D_x]} = \left(1 + \frac{k}{k_4}\right)^{-1} = (1 + \kappa I)^{-1} \quad , \quad (4.14)$$

wobei $k/k_4 = \kappa I$. Daraus folgt, daß eine oxygenierte Probe bei Einstrahlung von Licht einer Wellenlänge um 570 nm nicht vollständig im Zustand O_x ist, da $\Theta' < 1$, was wiederum dazu führt, daß die Fluoreszenz nicht mehr so effektiv gelöscht wird.

Wie Abbildung 4.13 zeigt, bleibt das Verhältnis R bei niedrigen Intensitäten konstant nahe dem Wert Eins und die Fluoreszenzzählrate folgt der quadratischen Abhängigkeit von der Anregungsintensität, da sich die meisten Bindungszentren im Zustand O_x befinden. Da jede Untereinheit, deren Fluoreszenz nicht gelöscht wird und sich also im Zustand D_x oder O_x^* befindet, etwa 13 mal heller erscheint [81, 82], führt jede Depopulierung von O_x zu einem Anstieg der Zählrate.

Damit kann nun das Verhältnis R für oxygeniertes Hämocyanin berechnet werden:

$$R_{\text{oxy}} = 1 \Theta' B_{\text{oxy}}(I) + 13 (1 - \Theta') B_{\text{deoxy}}(I) \quad , \quad (4.15)$$

wobei die Funktionen $B(I)$ das Photobleichen analog zu Gleichung 4.3 beschreiben. Es wäre nun interessant, das Photobleichen von Tryptophan in oxygeniertem und deoxygeniertem Hämocyanin vergleichen zu können. Einerseits müßte der Förster-Transfer aus dem angeregten Zustand des Tryptophans in das Bindungszentrum mit dem Bleichen des Tryptophans konkurrieren, so daß im oxygenierten Zustand die Bleicheffizienz geringer sein sollte: Die Bleichrate k_B sollte konstant bleiben, aber die Summe aller Raten zunehmen. Andererseits wird Bleichen durch Stoß eines Sauerstoffmoleküls mit einem Tryptophan im Triplett-Zustand mit steigender Sauerstoffkonzentration häufiger. Leider ist aber der Einfluß des oxygenierten Zustandes in dem Intensitätsbereich, in dem das Bleichen beginnt, schon sehr gering. Die Variation der oxy-Bleicheffizienz hat einen vernachlässigbaren Einfluß auf die Qualität der Anpassung an die Daten. Mit diesen Daten kann darum keine Aussage über den Unterschied der Bleicheffizienzen zwischen oxygeniertem und deoxygeniertem Hämocyanin getroffen werden. Für die Kurve in Abbildung 4.13 wurde deshalb $B_{\text{oxy}}(I) = B_{\text{deoxy}}(I) = R_{\text{deoxy}}$ gesetzt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß dieses einfache Modell der Populierung eines angeregten Zustandes O_x^* den überproportionalen Anstieg der Fluoreszenzzählrate bei oxygeniertem Hämocyanin erklären kann. Dies legt den Grundstein zu weiteren Untersuchungen der Photophysik des Sauerstoffbindungszentrums, die in Kapitel 5 vorgestellt werden. Die Abhängigkeit der Bleichquanteneffizienz von der Sauerstoffkonzentration kann mit diesen Daten allerdings nicht geklärt werden.

4.4 Drei-Photonen-Anregung

Zum Abschluß dieses Kapitels über Ensemblemessungen soll noch der Frage nachgegangen werden, ob die Photostabilität der Tryptophane in Hämocyanin bei Drei-Photonen-Anregung größer wird. Zum einen gelten für den Drei-Photonen-Prozeß dieselben Auswahlregeln wie für den Ein-Photonen-Prozeß, so daß auch bei strenger Gültigkeit der

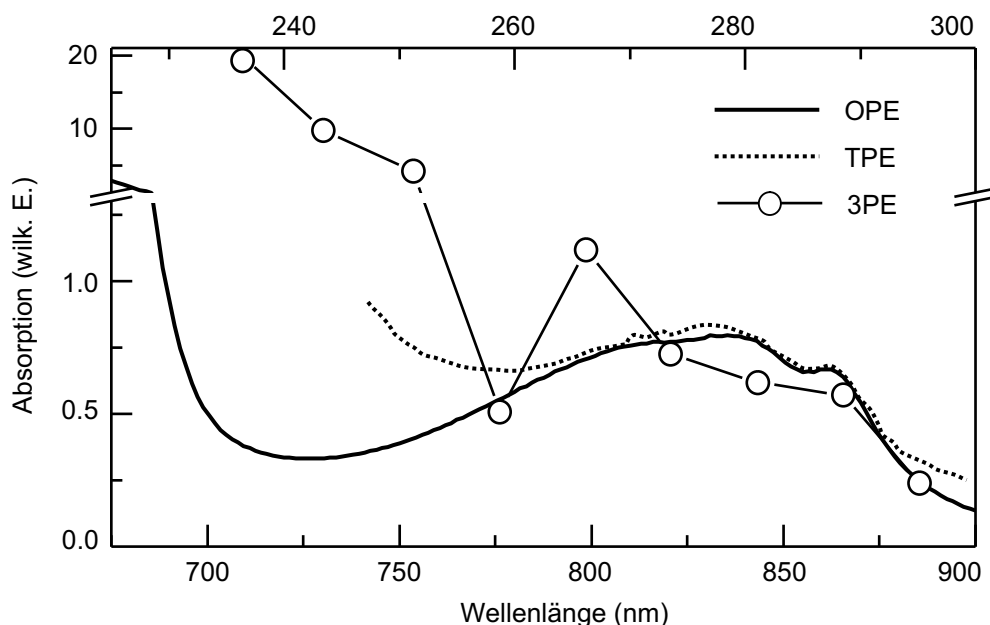


Abbildung 4.14: Drei-Photonen-Absorptionsquerschnitt von Tryptophan (Daten aus Ref. [179]). Zum Vergleich ist das Ein-Photonen-Absorptionsspektrum bei einem Drittel der Wellenlänge (obere Wellenlängenskala) sowie das Zwei-Photonen-Anregungsspektrum [67] eingezeichnet.

Auswahlregeln derselbe angeregte Zustand erreicht werden kann. Zum anderen ist die Energie pro Photon um ein Drittel niedriger, so daß vom angeregten Zustand ausgehend weniger andere Zustände, die eventuell beim Photobleichen eine Rolle spielen, erreicht werden können.

Von der Gruppe um J. R. Lakowicz liegen Ergebnisse zur Fluoreszenz-Lebenszeit und Fluoreszenz-Anisotropie von Tryptophan und Tyrosin bei Drei-Photonen-Anregung vor [180,181]. Die Gruppe von W.W. Webb hat den Drei-Photonen-Absorptionsquerschnitt von Tryptophan über einen großen Wellenlängenbereich vermessen [179]. Abbildung 4.14 zeigt diese Daten zusammen mit einem Ein-Photonen-Absorptionsspektrum, das entsprechend auf die dreifache Anregungswellenlänge skaliert wurde, sowie das TPE Anregungsspektrum von Rehms *et al.* [67]. Die Bande um 280 nm (bzw. 840 nm) stimmt noch gut zwischen beiden Anregungsarten überein. Kurzweilig von 260 nm (780 nm) steigt aber der Drei-Photonen-Absorptionsquerschnitt sehr stark an. Dies ist ein ähnliches Verhalten wie es bereits der Zwei-Photonen-Absorptionsquerschnitt gezeigt hat (im Bild punktiert): die Bande bei 280 nm entspricht der bei 560 nm, aber kurzweilig von etwa 260 nm liegt auch hier keine Übereinstimmung vor. Im spektralen Verlauf der Absorptionsquerschnitte gibt es also bei der 280 nm-Bande keinen signifikanten Unterschied zwischen Ein-, Zwei- und Drei-Photonen-Anregung in dem hier interessierenden Wellenlängenbereich. Die Änderung der Parität zwischen den Zuständen scheint nicht festgelegt zu sein. Das Absorptionsverhalten von Hämocyanin läßt sich nicht durch einfache, aus der Spektroskopie leichter Atome hergeleitete Überlegungen beschreiben.

Zur Anregung im Wellenlängenbereich 700–900 nm wurde direkt der Titan-Saphir-

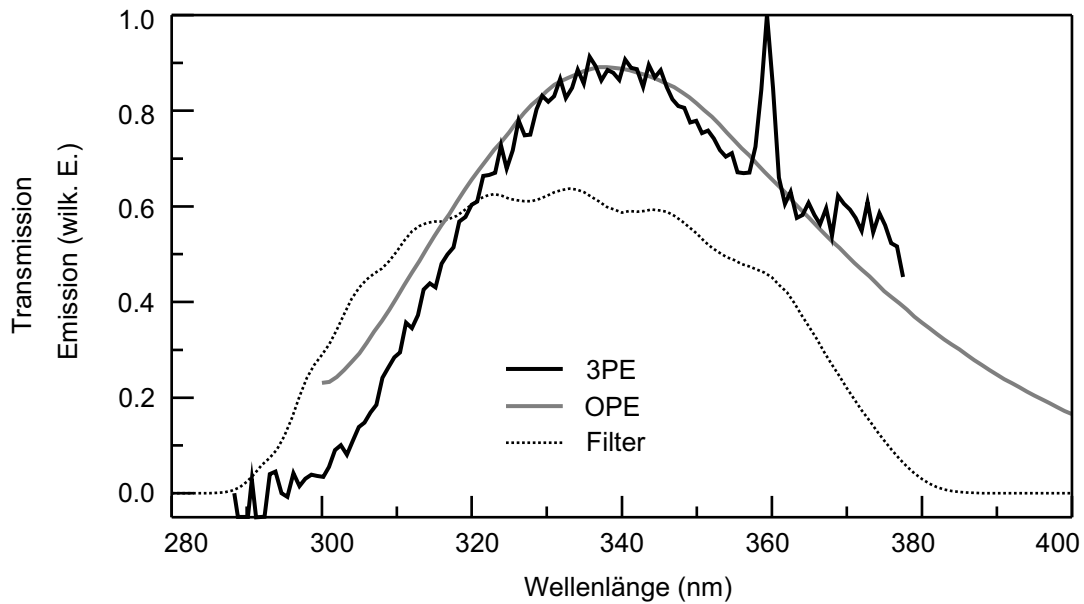


Abbildung 4.15: Emission von deoxygeniertem Hämocyanin nach Drei-Photonen-Anregung bei 720 nm ($C = 3$ g/l, $I = 16$ MW/cm², $t = 100$ sec). Die spektrale Charakteristik des verwendeten Filtersatzes ist korrigiert. Zum Vergleich ist das Ein-Photonen-Spektrum und die Filtercharakteristik eingezeichnet. Der Peak bei 360 nm entsteht durch Hyper-Rayleigh-Streuung [139] in der Probe.

Laser unter Umgehung des OPO verwendet. Der dichroitische Strahlteiler wurde gegen einen mit einer besseren Transmission im Infraroten ausgetauscht – bei vergleichbarer Reflexion im Ultravioletten (510 DCXRU-LP510, AHF, Tübingen). Als Filter im Detektionsstrahlengang kam der kurzwellige der beiden Interferenzfilter zum Einsatz, der auch schon bei der Zwei-Photonen-Anregung benutzt wurde. Nur der Schott-Glasfilter BG3 wurde gegen einen Filter UG11 ausgetauscht, der im Infraroten eine stärkere Absorption zeigt. Das Emissionsspektrum einer deoxygenierten Hämocyaninlösung bei Anregung mit 720 nm ist in Abbildung 4.15 zusammen mit der Filtercharakteristik gezeigt. Wie schon in Abschnitt 4.1.1 wurde der Einfluß der Filter korrigiert, in dem das gemessene Spektrum durch die Filtercharakteristik geteilt wurde. Hier ist allerdings nicht die spektrale Charakteristik des Spektrographen und der Kamera korrigiert. Bei Anregung mit 720 nm stimmen die Emissionsspektren, trotz deutlicher Unterschiede in der Absorption (Abb. 4.14), immer noch überein. Der Peak bei 360 nm ist reproduzierbar und auch in einer reinen Wasser-Probe vorhanden. Er entsteht durch Hyper-Rayleigh-Streuung [139] in der Probe und zeigt die erwartete quadratische Abhängigkeit von der Anregungsintensität. Bei langwelligerer Anregung oder bei Zwei-Photonen-Anregung liegt die halbe Anregungswellenlänge immer im Sperrbereich des Detektionsfilters, so daß eine solche Peaks normalerweise nicht beobachtet wurden.

Um die Photostabilität bei Drei-Photonen-Anregung zu untersuchen, wurde bei verschiedenen Anregungswellenlängen die Fluoreszenzzählrate in Abhängigkeit von der Anregungsintensität gemessen. Für den Drei-Photonen-Prozeß sind allerdings sehr hohe

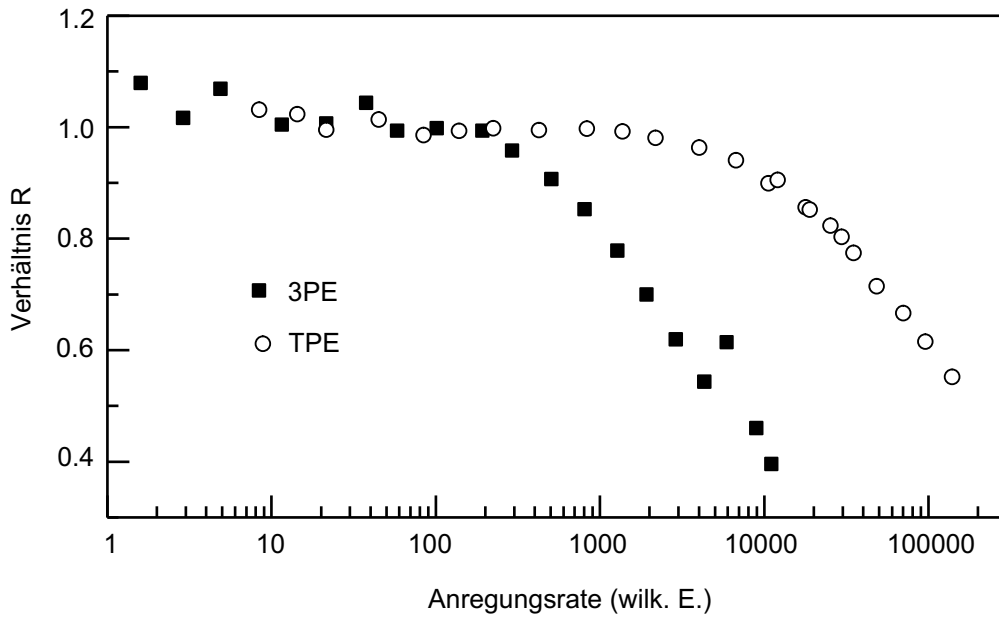


Abbildung 4.16: Vergleich des Photobleichens nach Zwei- und Drei-Photonen-Anregung der Tryptophane in deoxygeniertem Hämocyanin. Um die Kurven vergleichen zu können, wurde als Abszisse nicht die Anregungsintensität, sondern die Anregungsrate gewählt.

Leistungen nötig (bis etwa 120 mW, entspricht 24 MW/cm²). Bei diesen Intensitäten trat häufig eine deutliche Denaturierung und Verklumpung der Proteine auf, so daß keine reproduzierbaren Kurven aufgenommen werden konnten. Es konnte also nicht das in Abschnitt 4.3.2 beschriebene Verfahren verwendet werden, bei dem das Modell des Photobleichens an die Daten angepaßt wird. Um trotzdem die Drei-Photonen-Anregung mit der Zwei-Photonen-Anregung vergleichen zu können, wird das Verhältnis R zwischen gemessener und erwarteter, idealer Fluoreszenz als Funktion der Anregungsrate aufgetragen. Die Anregungsrate kann ohne die Annahme von Absorptionsquerschnitten aus der Fluoreszenzrate berechnet werden. Die erwartete, ideale Fluoreszenzrate $F_0 = F/R$ ist proportional zur Anregungsrate, wobei die Proportionalitätskonstante unabhängig vom Anregungsprozeß ist, da sie nur die Detektionseffizienz und die Fluoreszenzquantenausbeute beinhaltet. Erstere unterscheidet sich zwischen Zwei- und Drei-Photonen-Anregung kaum (44 zu 43 % gemittelte Filter-Transmission), letztere sollte nur vom emittierenden Zustand abhängen. Somit liefert $F_0 = F/R$ die Abszisse in Abbildung 4.16. Man erkennt deutlich, daß die Fluoreszenzzählrate bei Drei-Photonen-Anregung schon bei niedrigeren Anregungsraten von dem idealen Verhalten abweicht, die Fluorophore also schneller photobleichen. Der Unterschied ist so groß, daß die Vernachlässigung der unterschiedlichen Fokusgröße und -form zu tolerieren ist. Bei der Zwei-Photonen-Anregung ist die räumliche Verteilung der Anregungsraten proportional zur zweiten Potenz des Gaußschen Fokus mit $\omega_0 = 350$ nm, bei der Drei-Photonen-Anregung proportional zur dritten Potenz mit $\omega_0 = 520$ nm, da die Wellenlänge um den Faktor 1.5 größer ist. Dies modifiziert damit auch die Verweilzeit τ_D im Fokus.

Die Verwendung eines Drei-Photonen-Prozesses zur Anregung der Tryptophane be-

wirkt also keine Verbesserung der Photostabilität. Eher ist das Gegenteil der Fall, sie wird noch geringer als sie bei Zwei-Photonen-Anregung schon ist. Damit lohnt sich die Drei-Photonen-Anregung nur dann, wenn sie zu einer verringerten Untergrundfluoreszenz führt. Diese ist aber bei den hier vorgestellten Proben in den meisten Fällen allein durch die Dunkelzählrate des Photomultipliers gegeben.

4.5 Zusammenfassung

Die Ensemblemessungen an Tryptophan in verschiedenen Umgebungen haben gezeigt, daß sich die Fluoreszenzcharakteristik nach Ein- und Zwei-Photonen-Anregung nicht unterscheidet. Es wird derselbe fluoreszierende Zustand populiert, was zu übereinstimmenden Emissions- und Anregungsspektren führt. Auch die Löschung der Fluoreszenz, sei es durch Stoß mit Iodid oder Förster-Transfer zum Kupfer-Bindungszentrum, unterscheidet sich nicht. Mit Zwei-Photonen-Anregung kann also die Sauerstoffbeladung der Hämocyanine bestimmt werden. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß durch einen Ein-Photonen-Prozeß die Populierung des oxygenierten Zustandes des Bindungs-zentrums reduziert werden kann, was die Tryptophanfluoreszenz erhöht. Dieser Effekt kann aber gut durch ein passendes Modell beschrieben werden.

Für die weiteren Messungen hat die geringe Photostabilität der Tryptophans Bedeutung. Je nach Größe und Art des Proteins können zwischen 0.2 und 3 Photonen pro Protein detektiert werden, bevor alle Fluorophore in diesem Protein geblichen sind. Dieses Bleichverhalten schränkt sehr stark die möglichen Experimente auf Einzelmolekülebene ein, die typischerweise mit Molekülen durchgeführt werden, die 10^3 – 10^4 Zählereignisse pro Molekül produzieren. Nur die Tryptophane in Avidin-markierten Latexkugeln weisen eine höhere Photostabilität auf. Hier können etwa 340 counts pro Kugel detektiert werden. Abschließend wurde gezeigt, daß die Drei-Photonen-Anregung keine Alternative darstellt, da sie zu einer eher noch geringeren Photostabilität führt.

5 Sauerstoffbindung bei Hämocyanin

In diesem Kapitel sollen Messungen an Hämocyanin auf der Ensemble-Ebene vorgestellt werden, mit denen Einblicke in das kooperative Sauerstoffbindungsverhalten gewonnen werden können, die über die Erkenntnisse aus herkömmlichen Ein-Photonen-Bindungskurven hinausgehen. Im ersten Teil dieses Kapitels wird gezeigt werden, daß durch die zur Zwei-Photonen-Anregung benutzten Laserpulse gleichzeitig das Sauerstoffbindungszentrum angeregt wird, wodurch das Sauerstoffmolekül mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit aus dem Bindungszentrum dissoziiert. Im zweiten Teil wird dieses Verhalten dann als Methode benutzt, um das kooperative Bindungsverhalten zu untersuchen. Bereits in Kapitel 4.3.4 wurde dargestellt, wie sich der scheinbare Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute von oxygeniertem Hämocyanin durch die Populierung eines angeregten *charge transfer* Zustandes des Bindungszentrums erklären läßt. Es scheint so zu sein, daß die angeregten Zustände des Kupfer-Bindungszentrums das Sauerstoffmolekül weniger gut binden als der Grundzustand. Dies ist intuitiv einsichtig, da die Bindung durch Verschieben zweier Elektronen auf die Sauerstoffatome zustande kommt [79]. Wenn nun durch optische Anregung die Elektronenverteilung modifiziert wird, so kann dies zu einer Reduzierung der Bindungsstärke führen. Falls Sauerstoffmoleküle lichtinduziert die Bindungsstelle verlassen, so führt dies zu einer Verschiebung des Bindungsgleichgewichtes. Sauerstoffbindungskurven sollten also von der Intensität des Anregungslichts abhängen. Die Art der Abhängigkeit muß mit einem passenden Modell beschrieben werden. Bei der Entwicklung der hier vorgestellten Modelle waren Diskussionen mit Dr. N. Hellmann und Prof. K. E. van Holde sehr fruchtbar. Um das System so einfach wie möglich zu halten, werden die ersten Experimente mit dissoziiertem Hämocyanin durchgeführt. Hier interagieren die Bindungsstellen nicht, so daß die Bindungskurven nicht durch Kooperativität beeinflusst werden und einfacher zu interpretieren sind. Im zweiten Teil dieses Kapitels wird diese Beschränkung dann aufgehoben und vollständige 24-mere Hämocyanine untersucht.

5.1 Bindungskurven von Hc-Dissoziat

5.1.1 Messungen

Das 24-mere Hämocyanin dissoziiert bei pH 9.6 in seine Untereinheiten, die bei geringer Konzentration (hier 0.8 g/l) auch nicht wieder reassoziieren [76]. Die verwendeten Proben wurden nicht weiter behandelt; es sind alle Untereinheiten in der Lösung vorhanden, nur die Interaktion zwischen ihnen wird unterbunden. Die Sauerstoffbindungskurven wurden aufgenommen, indem die Probe zuerst solange mit 100 % Sauerstoff gespült wurde,

Satz	Anregungsleistung (mW)	Zeitraumen
A	0.3 – 1.0 – 4.0	1 Tag
B	0.3 ^a – 0.6 – 1.0 ^a – 1.3 – 1.6 – 2.0 ^a	2 Tage (^a : 1. Tag)

Tabelle 5.1: Datensätze von Bindungskurven, die an dissoziiertem Hämocyanin gemessen wurden. Zu Satz B gehört außerdem noch eine leistungsabhängige Messung der Fluoreszenzzählrate bei maximalen Sauerstoffpartialdruck.

bis die Ausgangsspannung der Sauerstoffelektrode konstant blieb. Dann wurde auf reinen Stickstoff umgeschaltet, bis wiederum ein Gleichgewichtswert der Elektrode erreicht war. Dieser Vorgang benötigte etwa 1 Stunde. Während der gesamten Zeit wurden im Abstand von 5 Sekunden die in Tabelle 3.2 genannten Werte aufgezeichnet. Pro Tag konnten so 3–4 Kurven mit unterschiedlichen Anregungsintensitäten aufgenommen werden. Die Sauerstoffelektrode wurde für jede Bindungskurve getrennt geeicht. Variationen der Eichkonstanten um etwa 10 % wurden nicht weiter berücksichtigt. Bei dieser Probe von dissoziiertem Hämocyanin war es relativ schwierig, reproduzierbare Verhältnisse herzustellen. Als verwertbar haben sich schließlich nur zwei Sätze von Kurven herausgestellt, die in Tabelle 5.1 beschrieben werden. Abbildung 5.1 zeigt als Beispiel zwei dieser Kurven aus Datensatz B. Mit fallendem Sauerstoffpartialdruck und mit steigender Anregungsleistung steigt die Fluoreszenzzählrate an. Änderungen in der Form dieser Kurven, die über die erwartete quadratische Intensitätsabhängigkeit hinausgehen, sollen untersucht werden.

5.1.2 Modell zur Beschreibung der Sauerstoffbindungskurven

Abbildung 5.2 zeigt noch einmal das Termschema der Tryptophanfluoreszenz in Hämocyanin. Die Tryptophan-Fluoreszenz wird durch Förster-Transfer in den angeregten Zu-

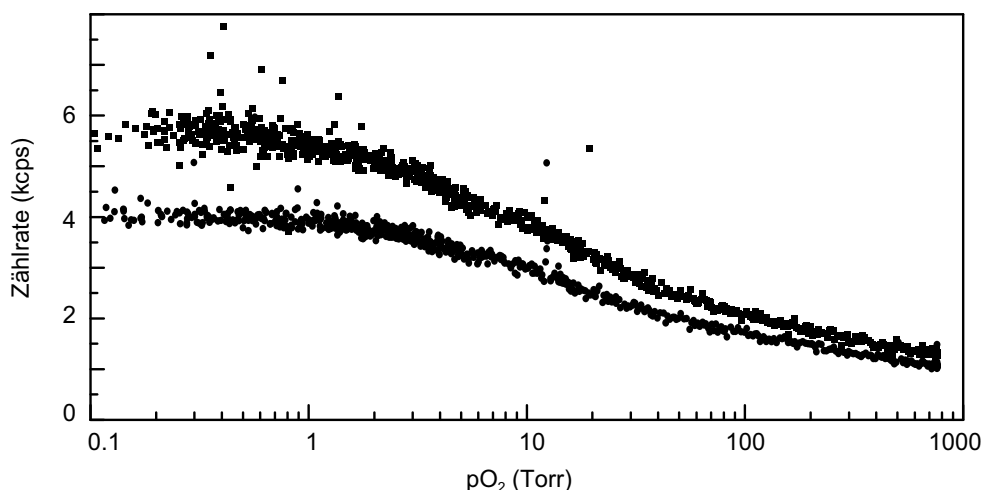


Abbildung 5.1: Beispiel zweier Sauerstoffbindungskurven von dissoziiertem Hämocyanin bei unterschiedlichen Anregungsleistungen (Datensatz B, 1.3 und 1.6 mW).

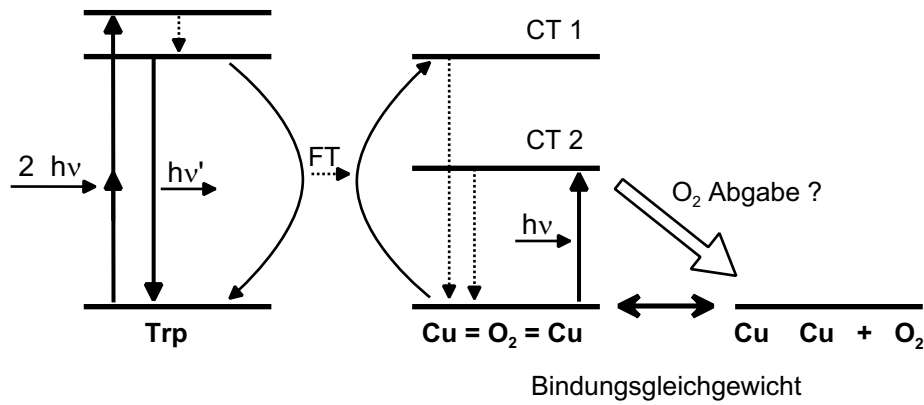


Abbildung 5.2: Termschema zur Tryptophanfluoreszenz in Hämocyanin.

stand CT1 des Kupfer-Bindungscenters gelöscht. Dieser angeregte Zustand relaxiert aber sehr schnell ($\tau \approx 1$ ps [84]), so daß die Depopulierung des Grundzustandes des Bindungscenters hier vernachlässigt werden kann. Damit ist die Tryptophan-Fluoreszenz ein gutes Maß für die Besetzung des oxygenierten Grundzustandes, weil sie selbst nur sehr geringen Einfluß darauf hat. Im folgenden soll nun untersucht werden, ob eine Anregung des Zustands CT2 zu einer Sauerstoffabgabe führt. Dazu wird das Termschema auf die drei Zustände deoxygenierter Grundzustand (D_x), oxygenierter Grundzustand (O_x) und oxygenierter angeregter Zustand CT2 (O_x^*) reduziert. Abbildung 5.3 zeigt die Verhältnisse im Bereich *Fokolvolumen*. Das Bindungsgleichgewicht zwischen oxygeniertem und deoxygeniertem Grundzustand (O_x und D_x) wird durch die Bindungskonstanten k_{on} und k_{off} beschrieben (s. Abb. 5.3). Die Anregungsrate k ist proportional zur Lichtintensität bei der hier verwendeten Anregungswellenlänge von 590 nm.

Durch die Anregung mit Hilfe eines Mikroskopobjektivs ist die Laserleistung auf einen sehr kleinen Bereich konzentriert. Dies führt dazu, daß der Austausch von Molekülen mit der Umgebung nicht zu vernachlässigen ist. Außerhalb des Fokus' befinden sich die Bindungsstellen in einem Gleichgewicht, das nur durch den Sauerstoffpartialdruck beschrie-

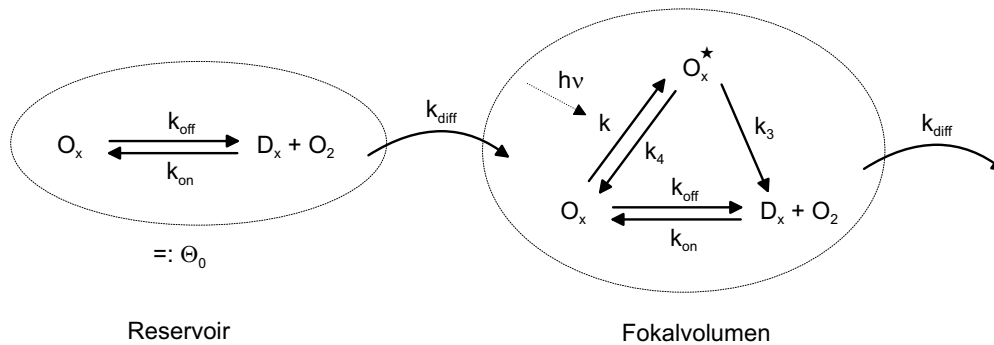


Abbildung 5.3: Modell zur Beschreibung der Sauerstoffbindungskurven von dissoziiertem Hämocyanin. Im Fokus des Objektivs wird das Bindungscenter angeregt und dadurch die Bindung zum Sauerstoffmolekül mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit gebrochen.

ben wird und von der Lichtintensität unabhängig ist. Bindungsstellen im angeregten Zustand CT2 existieren in diesem Bereich nicht. Da das Gesamtvolumen der Probe viel größer ist als das Fokalvolumen (500 μl gegen 1 fl), kann das Probenvolumen als Reservoir gesehen werden, welches unbeeinflusst bleibt. Der Austausch zwischen Reservoir und Fokus geschieht durch Diffusion mit der Rate k_{diff} . Diese Verhältnisse sind in Abbildung 5.3 zusammengefaßt.

Einen Anhaltspunkt für die Größe der Diffusionsrate k_{diff} ergibt sich wie im Fall des Photobleichens (Abschnitt 2.3.4) aus Ref. [114]:

$$\frac{1}{k_{\text{diff}}} = \tau_D \approx \frac{\omega_0^2}{1.8 D} \ln \left(6 \frac{\pi \omega_0}{\lambda} \right) \quad , \quad (5.1)$$

wobei D den Diffusionskoeffizienten bezeichnet. In dieser Näherung wird die Anregungsrate k innerhalb des Fokalvolumens als konstant angesehen. Für Untereinheiten erhält man mit $D = 6.6 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ($s = 5 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ [163]) $k_{\text{diff}} = 360 \text{ s}^{-1}$.

Auf eine bedeutende Näherung muß in diesem Zusammenhang hingewiesen werden: Der Detektionsprozeß ist ein Zwei-Photonen-Prozeß, die Veränderung des Bindungsgleichgewichtes dagegen ein Ein-Photonen-Prozeß. Dadurch hängt erster quadratisch, letzter aber nur linear von der Anregungsintensität ab, was zu unterschiedlichen Formen des Detektions- bzw. Anregungsfokus führt. Bei dem hier vorgeschlagenen Modell wurde aber darauf verzichtet, zwischen diesen beiden Volumina zu unterscheiden. Ein rein praktischer Grund liegt darin, daß das Ein-Photonen-Anregungsvolumen gegen unendlich konvergiert, wie sich z.B. bei der Lokalisierung der Anregung (Abschnitt 2.3.2 und dort in Abbildung 2.15) gezeigt hat.

Das durch Abbildung 5.3 beschriebene Gleichungssystem soll nun gelöst werden. Zuerst wird nur das Fokalvolumen betrachtet. Die eckigen Klammern bezeichnen die Konzentrationen der jeweiligen Zustände.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} [O_x] \\ [O_x^*] \\ [D_x] \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{\text{off}} - k & k_4 & k_{\text{on}}[O_2] \\ k & -k_3 - k_4 & 0 \\ k_{\text{off}} & k_3 & -k_{\text{on}}[O_2] \end{pmatrix} \begin{pmatrix} [O_x] \\ [O_x^*] \\ [D_x] \end{pmatrix} \quad (5.2)$$

$$= M \begin{pmatrix} [O_x] \\ [O_x^*] \\ [D_x] \end{pmatrix} \quad (5.3)$$

Da alle 3 Zustände aus dem Fokus heraus diffundieren, aber der Zustand O_x^* nicht hinein diffundiert, lautet das gesamte Gleichungssystem schließlich

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} [O_x] \\ [O_x^*] \\ [D_x] \end{pmatrix} = (M - k_{\text{diff}} \mathbf{1}) \begin{pmatrix} [O_x] \\ [O_x^*] \\ [D_x] \end{pmatrix} + k_{\text{diff}} C \begin{pmatrix} \Theta_0 \\ 0 \\ 1 - \Theta_0 \end{pmatrix} \quad , \quad (5.4)$$

wobei $\mathbf{1}$ die Einheitsmatrix und C die Gesamt-Konzentration der Hämocyanin-Moleküle bezeichnet. Θ_0 beschreibt schließlich den Anteil der oxygenierten Bindungsstellen außerhalb des Fokus, der nur vom Sauerstoffpartialdruck abhängt: $\Theta_0 = k_{\text{on}}[O_2]/(k_{\text{on}}[O_2] + k_{\text{off}})$.

Zur Analyse der Bindungskurven wird nur der Gleichgewichtsfall benötigt, so daß die Zeitableitung Null gesetzt werden kann. Mit Einführung des Verhältnisses α zwischen den beladenen Bindungsstellen, die angeregt sind, und jenen im Grundzustand $\alpha = [O_x^*]/[O_x] = k/(k_3 + k_4 + k_{\text{diff}})$ ergibt sich für den Anteil Θ' der beladenen Bindungsstellen im Grundzustand

$$\Theta' = \frac{[O_x]}{[O_x] + [O_x^*] + [D_x]} \quad (5.5)$$

$$\Theta' = \left[\left(\frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}} [O_2]} + 1 \right) \left(1 + \alpha \frac{k_3 + k_{\text{diff}} + k_{\text{on}} [O_2]}{k_{\text{off}} + k_{\text{diff}} + k_{\text{on}} [O_2]} \right) \right]^{-1} . \quad (5.6)$$

Hier muß zwischen Θ und Θ' unterschieden werden, da die Beladung Θ als der Anteil aller beladenen Bindungsstellen (angeregt und im Grundzustand) definiert ist.

Im deoxygenierten Grenzfall sind, wie zu erwarten war, keine Bindungsstellen besetzt und darum auch keine Bindungsstellen im oxygenierten Grundzustand ($\Theta' \rightarrow 0$ für $[O_2] \rightarrow 0$). Im oxygenierten Grenzfall sind aber nicht alle Bindungsstellen im oxygenierten Grundzustand, da sich der Anteil $\alpha/(1 + \alpha)$ der beladenen Bindungsstellen im angeregten Zustand befindet ($\Theta' \rightarrow 1/(1 + \alpha) = (1 + \kappa I)^{-1}$ für $[O_2] \rightarrow \infty$). Dieser Grenzfall wird auch mit dem maximal einstellbaren Sauerstoffpartialdruck von 747 Torr schon erreicht. Der erste Teil des Produkts in Gl. 5.6 geht gegen Eins, $k_{\text{off}}/(k_{\text{on}} [O_2]) \approx 0.007 \ll 1$ [182]. Der zweite Teil läßt sich als $1 + \kappa I$ schreiben, auch wenn κ noch eine Funktion des Partialdrucks ist. In Abschnitt 2.2.1 wurde schon gezeigt, daß kooperatives Verhalten bei fast vollständiger Beladung verschwindet. Das in Abschnitt 4.3.4 zur Beschreibung der Intensitätsabhängigkeit der Fluoreszenz von oxygeniertem Hämocyanin verwendete Modell ist somit aus dem oben vorgestellten herleitbar. Ein vollständiges Modell, das auch Kooperativität beinhaltet, wird im zweiten Teil dieses Kapitels vorgestellt.

5.1.3 Anpassung an die Daten

Formel 5.6 sollte nun gleichzeitig alle Bindungskurven eines Datensatzes aus Tabelle 5.1 beschreiben. Die Fluoreszenz-Zählrate F wird für jeden Datenpunkt jeder Kurve berechnet:

$$F_{\text{Kurve, Punkt}} = \text{Offset} + A_{\text{Tag}} * \text{Leistung}_{\text{Kurve}}^2 * [1 \times \Theta' + \text{Kontrast} \times (1 - \Theta')] \quad (5.7)$$

Der *Offset* berücksichtigt die Dunkelzählrate des Detektors und die Untergrundzählrate, die auch in einer Referenzprobe vorhanden sind. Die Amplitude A beinhaltet alle Konstanten wie den Absorptionsquerschnitt, die Quanteneffizienz, die Konzentration der Probe sowie die Detektionseffizienz. Bei Datensatz B, der über zwei Tage gemessen wurde, werden zwei Amplituden verwendet, um Unterschiede zwischen den Tagen auszugleichen. Die Fluoreszenz ist quadratisch abhängig von der Anregungsleistung, die konstant innerhalb jeder Kurve war. Etwaige Variationen sind vorher durch Normierung auf ein Referenzsignal bereinigt, das mit Hilfe der quadratisch-intensitätsabhängigen SiC-Diode und zweier linearer Dioden gebildet wird (siehe Abschnitt 3.2.1). Damit ist

die Anregungsleistung kein Fit-Parameter. Durch Förster-Transfer wird die Tryptophan-Fluoreszenz gelöscht, wenn die Bindungsstelle im oxygenierten Grundzustand O_x ist. Das Lösungsverhältnis wird durch *Kontrast* beschrieben und ist für alle Kurven identisch. Θ' wird punktweise mit Gl. 5.6 berechnet, wobei k_3 , k_{diff} und $p_{50} = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ die für alle Kurven identischen Fit-Parameter sind. k_{on} wird für die Dissoziat-Probe auf $2 \text{ Torr}^{-1}\text{sec}^{-1}$ gesetzt [182]. Das Verhältnis α zwischen den beladenen Bindungsstellen, die angeregt sind, und jenen im Grundzustand wird für jeden Datenpunkt aus der Laserleistung berechnet: $\alpha = \text{Leistung} \times \alpha_0$, da Variationen in der Anregungsleistung für die quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenz schon korrigiert sind, nicht aber für die lichtinduzierte Sauerstoffabgabe. Bei der Anpassung an die Daten wird jeder Punkt mit seinem statistischem Gewicht, der Wurzel aus der Zählrate, berücksichtigt.

Da das Modell die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungsintensität und dem Sauerstoffpartialdruck beschreibt, können nicht nur Bindungskurven (konstante Anregungsintensität), sondern auch intensitätsabhängige Messungen (konstanter Partialdruck) untersucht werden. Eine solche Messung der Fluoreszenzzählrate als Funktion der Anregungsleistung bei konstantem, maximalen Sauerstoffpartialdruck gehört zu Datensatz B. Der Leistungsbereich wird nach oben hin durch das Einsetzen von Photo-bleichen begrenzt, das ja in diesem Modell nicht berücksichtigt ist. Wenn diese Daten mit verwendet werden, so kann die Relation zwischen Anregungsleistung und Population des Zustandes O_x^* besser bestimmt werden, weil Variationen der Probenkonzentration und Detektionseffizienz wegfallen. Allerdings muß das statistische Gewicht der 9 Datenpunkte erhöht werden, da sie sonst keinen Einfluß gegenüber den etwa 5000 Punkten in den Bindungskurven hätten.

Die Anpassung des Modells an die Meßdaten erfolgte mit der Levenberg-Marquardt-Methode [183], die in IDL implementiert ist [184]. Die wichtigsten Prozeduren sind im Anhang A.3.1 abgedruckt. Tabelle 5.2 faßt die Ergebnisse der Anpassung an die Daten zusammen. Der Parameter *Offset* war für alle Anpassungen auf 2 counts/sec festgehalten, was einer typischen Untergrundzählrate in diesem Intensitätsbereich entspricht. Für Datensatz A sind Fits mit freier Sauerstoff-Abgaberate k_3 und zum Vergleich auf Null fixierter Rate angegeben (Fit Nr. 1 und 2). Bei Datensatz B kommt die Messung der leistungsabhängigen Zählrate hinzu. Sie kann nicht berücksichtigt werden (Fit Nr. 3), oder aber mit einbezogen werden (Fit Nr. 4). In beiden Fällen liefert das Modell eine entsprechende Leistungsabhängigkeit der Fluoreszenzzählrate. Diese ist als Verhältnis R zwischen gemessener und von rein quadratischer Leistungsabhängigkeit her erwarteter Zählrate (siehe Kap. 4.3) in Abbildung 5.4 zusammen mit den Meßwerten dargestellt. Auch wenn die neun Meßpunkte in dieser Abbildung im Fit nicht berücksichtigt werden, sondern nur die 6 Bindungskurven, so beschreibt das Modell doch relativ gut die Messung in Abbildung 5.4. Wird die leistungsabhängige Messung berücksichtigt, so sinkt die Unsicherheit in k_3 und α_0 .

Die absoluten Werte dieser beiden Parameter ändern sich deutlich, ihr Produkt allerdings nur um etwa 5 %. Wenn nun die Abgabe von Sauerstoff aus dem angeregten Zustand im Modell verboten wird ($k_3 = 0$), so steigt auch bei Datensatz B die Abweichung χ^2 deutlich an und der gefundene Partialdruck bei Halbsättigung p_{50} liegt mit etwa 15 Torr deutlich über dem für diese Probe erwarteten Wert von 5 Torr [77]. Darum

Fit	Satz A		Satz B		
	1	2	3 ^a	4 ^b	5 ^b
p_{50} (Torr)	8.5 ± 0.3	48.6 ± 0.9	5.3 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.5 (fix)
k_3 (sec ⁻¹)	1941 ± 146	0 (fix)	3333 ± 688	2080 ± 205	0 (fix)
k_{diff} (sec ⁻¹)	190 ± 11	$9 \cdot 10^6 \pm 0$	87 ± 6	96 ± 7	$4 \cdot 10^6 \pm 0$
A_1	572 ± 5	406 ± 9	262 ± 5	240 ± 2	303 ± 4
A_2	–	–	333 ± 7	306 ± 3	392 ± 5
Kontrast	3.2 ± 0.03	4.3 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.7 ± 0.05	5.6 ± 0.07
α_0 (W ⁻¹)	41 ± 2	141 ± 3	13 ± 6	22 ± 1	68 ± 2
χ^2	4.6	11.6	7.4	7.5	27.5

Tabelle 5.2: Übersicht über die Ergebnisse der Anpassung an die Daten. Wenn die Sauerstoffabgabe im Modell verhindert wird ($k_3 = 0$), verschlechtert sich die Anpassung erheblich, insbesondere wenn der Halbsättigungs-Partialdruck p_{50} auf übliche Werte festgesetzt wird (Fit Nr. 5). ^a ohne bzw. ^b mit Verwendung der Leistungsabhängigkeit der Zählrate (Abb. 5.4).

ist bei Fit Nr. 5 zusätzlich der Parameter p_{50} fixiert. Dies führt zu einem weiteren Anstieg der Abweichung χ^2 . Beiden Fits mit $k_3 = 0$ ist gemein, daß sie die höchste Abweichung χ^2 des Datensatzes zeigen und auch die Diffusionsrate k_{diff} deutlich über dem erwarteten Wert von 360 sec^{-1} liegt. Daß die Diffusionsrate k_{diff} bei den anderen Fits um den Faktor 2–4 unter dem erwarteten Wert liegt, deutet darauf hin, daß das eigentlich benötigte

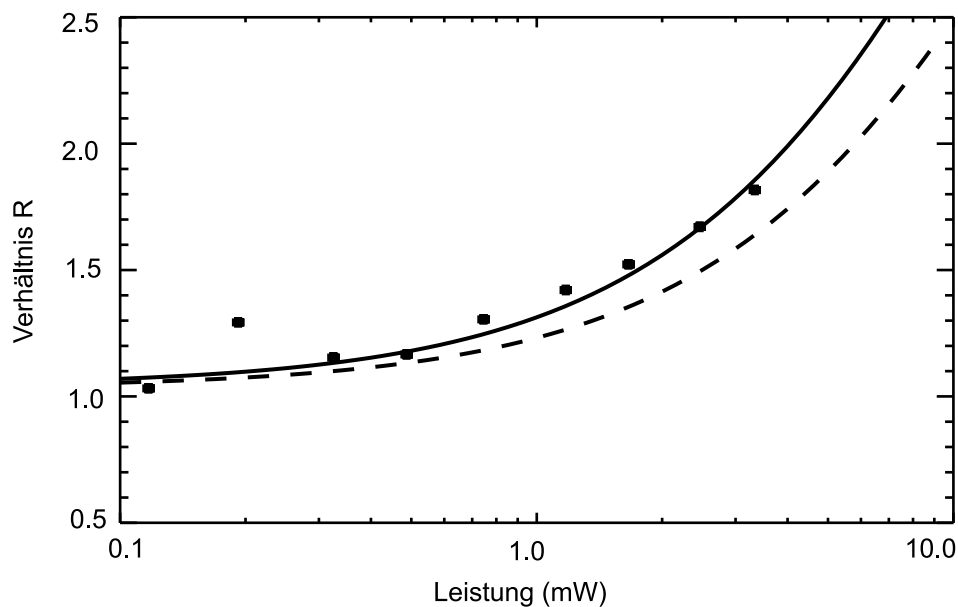


Abbildung 5.4: Leistungsabhängigkeit der Zählrate bei maximalen Sauerstoffpartialdruck (747 Torr): Vergleich der Ergebnisse der Fits ohne (strichliert) und mit (durchgezogen) Berücksichtigung der hier gezeigten Meßwerte (Fit Nr. 3 und 4 in Tab. 5.2).

einheitliche Volumen von Ein- und Zwei-Photonen-Anregung mit dem Zwei-Photonen-Volumen etwas zu klein abgeschätzt wurde. Der Parameter *Kontrast* entspricht ebenfalls dem erwarteten Wert von etwa 6: Bei dissoziiertem Hämocyanin ist die Fluoreszenz im oxygenierten Zustand bei gleicher Gesamtkonzentration etwa doppelt so stark wie bei 24-merem Hämocyanin [76], im deoxygenierten Zustand ist sie dagegen vergleichbar. Damit ergibt sich statt eines *Kontrastes* von 11 bis 13 bei 24-merem Hämocyanin [83,82] ein Wert von etwa 6.

In Abbildung 5.5 sind die Fits Nr. 4 und 5 dargestellt. Man erkennt deutlich, daß Fit Nr. 4 die Daten gut beschreibt und dabei die Kurven sowohl in Form als auch in absoluter Lage gut wiedergibt. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß die absoluten Werte der Daten im Fit nur durch zwei Amplituden (für je drei Kurven eine) und einen Kontrast-Parameter beschrieben werden. Mit der Annahme, daß keine lichtinduzierte Sauerstoffabgabe erfolgt ($k_3 = 0$), läßt sich die Form der Kurven nicht wiedergeben, wie die rechte Spalte in Abbildung 5.5 zeigt.

Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß Sauerstoff aus dem angeregten Zustand des oxygenierten Bindungszentrums abgegeben wird. Die Abgaberate k_3 ist mit etwa

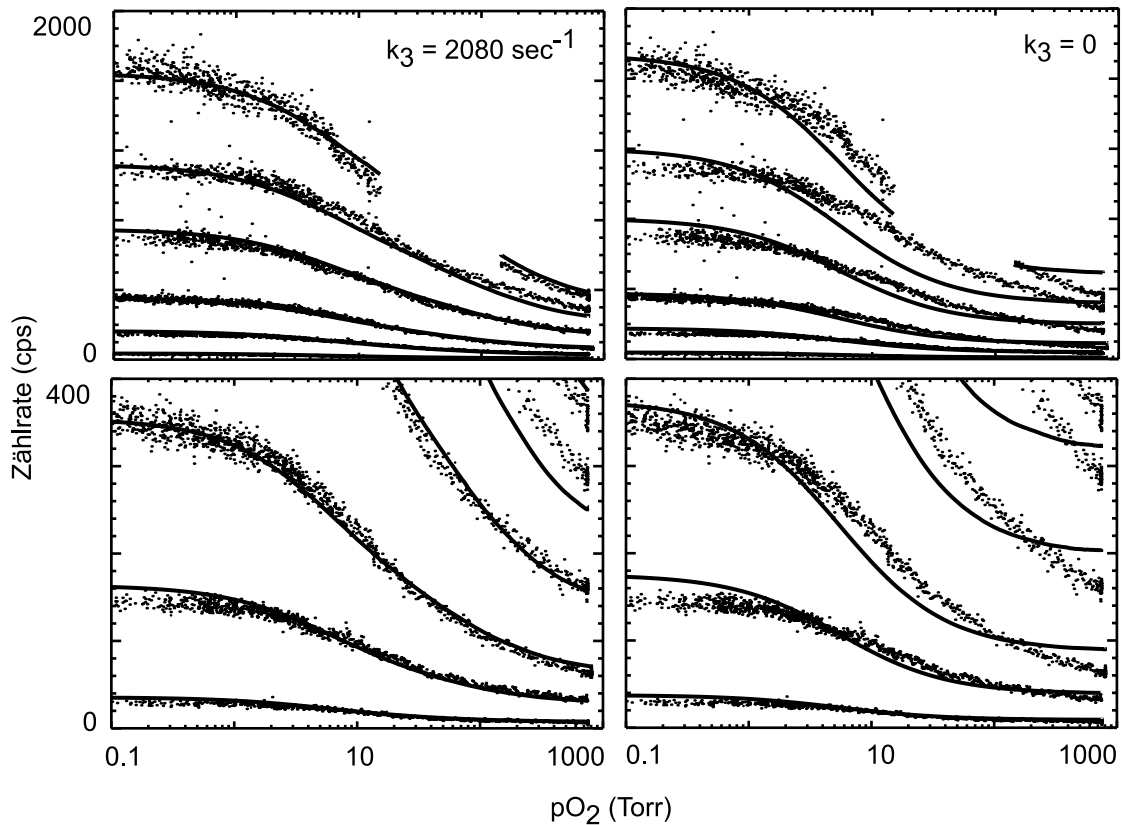


Abbildung 5.5: Vergleich der Anpassung an die Daten. *Links:* Fit Nr. 4 in Tab. 5.2. *Rechts:* Fit Nr. 5. Die unteren beiden Diagramme sind Ausschnittsvergrößerungen der oberen. Bei der Bindungskurve mit der höchsten Anregungsleistung ist die Aufzeichnungselektronik kurzzeitig ausgefallen, wodurch einige Datenpunkte fehlen.

2000 sec^{-1} deutlich höher als die spontane Dissoziationsrate aus dem Grundzustand $k_{\text{off}} = 11 \text{ sec}^{-1}$. Aus dem Wert von $\alpha_0 = 22 \text{ W}^{-1}$ folgt, daß bei einer Anregungsleistung von 1 mW etwa 2 % der beladenen Bindungszentren im angeregten Zustand sind. Diese Populierung des angeregten Zustandes o_x^* kann nicht vernachlässigt werden, wie im Anhang A.4 anhand eines alternativen Modells gezeigt wird. Sobald die Population des angeregten Zustandes vernachlässigt wird, stimmen die berechneten Bindungskurven zwar noch von der Form, aber nicht mehr von den absoluten Werten her mit den Meßwerten überein.

Vergleich der Raten

Zum Abschluß dieses Abschnittes sollen nun die erhaltenen Raten genauer betrachtet werden. Dazu muß zuerst der Zusammenhang zwischen Anregungsleistung und Anregungsrate k quantifiziert werden. Die Absorptionsbande bei etwa 570 nm hat einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon \approx 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 10 \text{ m}^2\text{mol}^{-1}$. Daraus läßt sich der Absorptionsquerschnitt berechnen [122, 99]:

$$\sigma = \frac{\alpha}{N_A} = \frac{\epsilon \ln(10)}{N_A} \approx 4 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^{-2} \quad . \quad (5.8)$$

Die eingestrahlte Photonenstromdichte beträgt bei 1 mW Laserleistung im Zentrum des Fokus'

$$I = \frac{2 \eta P \lambda}{\pi \omega^2 h c} \approx 1 \cdot 10^{24} \text{ sec}^{-1}\text{cm}^{-2} \quad , \quad (5.9)$$

wobei $\eta = 0.56$ die Transmission des Objektivs, $\lambda = 590 \text{ nm}$ die Anregungswellenlänge und $\omega_0 = 430 \text{ nm}$ den $1/e^2$ -Radius des Fokus' bezeichnet. Die mittlere Photonenstromdichte ergibt sich durch Gewichtung der linearen Intensitätsverteilung mit der quadratischen Detektionseffizienz, was einen Faktor $1/3$ gegenüber dem Wert im Zentrum des Fokus' liefert. Damit ergibt sich für $P = 1 \text{ mW}$ eine Anregungsrate k von $k = \sigma I/3 \approx 1.3 \cdot 10^6 \text{ sec}^{-1}$.

Die relative Populierung α des angeregten Zustandes O_x^* beträgt $\alpha = P \alpha_0 = k/(k_3 + k_4 + k_{\text{diff}}) = 0.02$. Da sowohl k_3 als auch k_{diff} nicht in der Größenordnung von k liegen, wird die Relaxationsrate k_4 durch $k_4 \approx \alpha/k = 6.7 \cdot 10^7 \text{ sec}^{-1}$ bestimmt. Dies bedeutet, daß fast alle Anregungen wieder relaxieren, ohne daß das Sauerstoffmolekül abgegeben wird. Die Dissoziations-Quantenausbeute η_{diss} beträgt nur

$$\eta_{\text{diss}} = \frac{k_3}{k_3 + k_4} \approx \frac{k_3}{k_4} \approx 3 \cdot 10^{-5} \quad . \quad (5.10)$$

Nur durch die starke Fokussierung des Anregungslichts werden Absorptionsraten erreicht, die es ermöglichen, die lichtinduzierte Sauerstoffdissoziation zu detektieren. Die effektive Dissoziationsrate $\alpha' = \alpha k_3$, die Absorption und anschließende Dissoziation umfaßt, beträgt 40 sec^{-1} und liegt damit in der Größenordnung der spontanen Dissoziationsrate k_{off} . Bei niedrigeren Anregungsintensitäten wäre α' gegen k_{off} zu vernachlässigen.

5.1.4 Vergleich mit CO-Dissoziation aus Myoglobin

Myoglobin (Mb) ist das kleinste der sauerstoffbindenden Proteine. Es besitzt nur eine Bindungsstelle und ist von der Struktur her verwandt mit den Untereinheiten des tetrameren Hämoglobins [69]. Schon seit 1895 ist bekannt [185], daß in Myoglobin gebundenes Kohlenmonoxid durch Einstrahlen von sichtbarem Licht von der Bindungsstelle abgegeben wird. Dies geschieht mit einer Quantenausbeute von nahezu Eins [186]. Jede Anregung des Bindungszentrums führt zu einer Dissoziation. Damit ist dieser Prozeß auch bei geringen Anregungsintensitäten gut nachweisbar. In diesem Abschnitt soll die CO-Bindung von Myoglobin mit der O₂-Bindung von Hc-Untereinheiten unter Lichteinfluß verglichen werden.

Brunori *et al.* [186] haben untersucht, wie sich die CO-Bindungskurven unter Bestrahlung verändern. Die CO-Beladung von Myoglobin wurde über die Absorptionsbande bei 436 nm gemessen. In Abbildung 5.6A ist die relative Beladung Θ als Funktion der CO-Konzentration dargestellt. Abbildung 5.6B zeigt eine äquivalente Darstellung der oben vorgestellten O₂-Bindung in Hämocyanin: die aus der Anpassung an die Daten gewonnenen Kurven aus Abbildung 5.5 (Fit Nr. 4) sind auf Beladungswerte umgerechnet. Während sich bei CO in Mb die Form der Bindungskurven nicht ändert, sondern sie nur verschoben werden, ändert sich bei der Sauerstoffbindung in Hc die Form merklich. Dieser Unterschied rührt aber nicht von einem anderen Bindungsverhalten her, sondern ist im unterschiedlichen experimentellen Aufbau begründet. Brunori *et al.* haben nicht mikroskopisch gearbeitet, sondern mehr oder weniger das ganze Probenvolumen ausgeleuchtet und auch bei der Beladungsmessung einbezogen. In den hier vorgestellten Experimenten zur Sauerstoffbindung dagegen wurde nur das Fokaltvolumen bestrahlt und unbeeinflusste Proteine konnten aus dem restlichen Probenvolumen, praktisch einem Reservoir, in das zur Messung herangezogene Volumen eindiffundieren. Diese Diffusion sorgt für die Verformung der Bindungskurven. Wenn im Modell die Diffusionsrate k_{diff} auf Null gesetzt wird, so zeigt sich das nach Brunori *et al.* erwartete Verhalten, wie in Abbildung 5.6C. Wie bereits erwähnt, ist bei der CO-Dissoziation aus Myoglobin die Quanteneffizienz deutlich größer, so daß die Verschiebung der Kurven deutlicher ausfällt.

Wenn nur die Bindungskurven aus Abbildung 5.6B betrachtet würden, ohne daß die experimentelle Anordnung in Betracht gezogen wird, so würden diese Kurven als Zeichen für kooperative Wechselwirkung zwischen den Bindungsstellen des Proteins gesehen werden: Bei höheren Anregungsleistungen besitzen sie keine hyperbolische Form. Dieser Effekt wird in der Literatur am Beispiel des *turning wheel model* diskutiert [187]. Sobald sich ein System nicht mehr im Gleichgewichtszustand, sondern nur in einem stationären Zustand befindet, kann sowohl scheinbar positive als auch negative Kooperativität auch bei Molekülen mit nur einer Bindungsstelle auftreten. Das Fokaltvolumen ist hier so klein gegenüber dem Probenvolumen (1 fl gegen 500 μl), daß sich durch diffusiven Austausch während der Messung kein Gleichgewichtszustand einstellen wird. Die Voraussetzungen des *turning wheel model* sind damit gegeben.

Obwohl das Protein nur eine Bindungsstelle besitzt, scheint bei höheren Anregungsleistungen im Partialdruckintervall 10 – 30 Torr negative Kooperativität vorzuliegen. Dies wird besonders deutlich, wenn die Bindungskurve als Hill-Plot dargestellt wird:

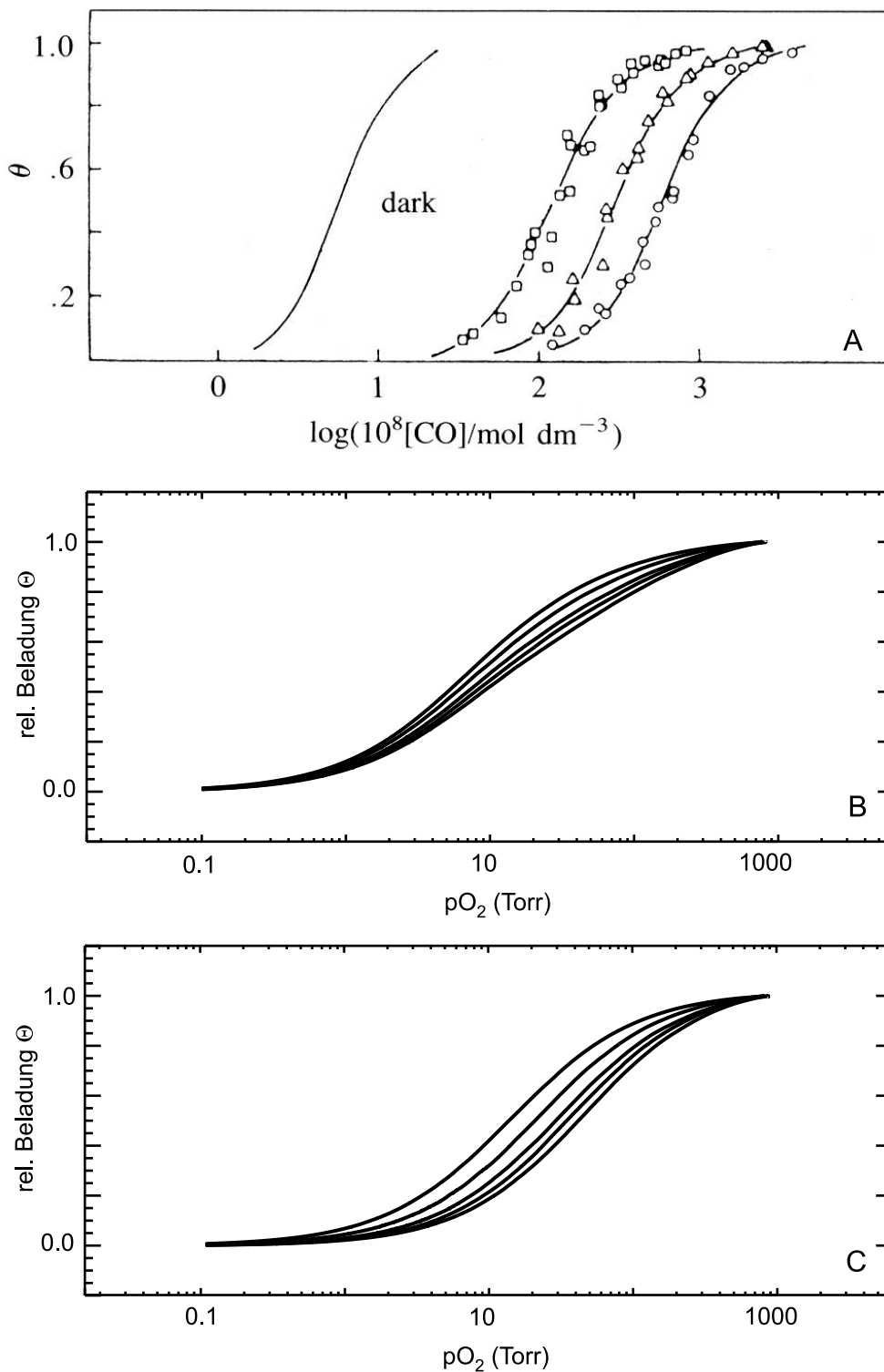


Abbildung 5.6: Bindungskurven. A: CO-Bindung in Myoglobin bei verschiedenen Beleuchtungsstärken [186] (Grafik aus [57]). B: O_2 -Bindung in Hämocyanin-Dissoziat, gerechnete Kurven nach Fit Nr. 4 für 5 verschiedene Anregungsleistungen (von links nach rechts ansteigend). C: wie B, nur $k_{\text{diff}} = 0$ gesetzt.

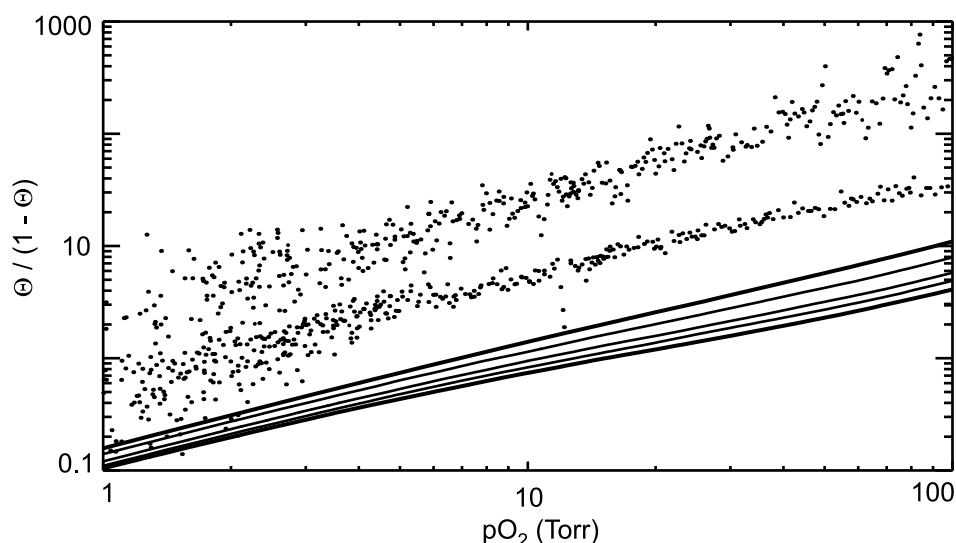


Abbildung 5.7: Bindungskurven des dissoziierten Hämocyans als Hill-Plot dargestellt. Die Meßwerte sind gegenüber dem Modell um den Faktor 10 bzw. 30 verschoben. Die korrespondierenden Kurven des Modells sind breiter gezeichnet. Sowohl im Modell als auch in den Meßwerten läßt sich eine Änderung der Steigung feststellen.

Abbildung 5.7 zeigt das Modell und die Meßwerte (verschoben). Wie in Abschnitt 2.2.1 eingeführt, bedeutet eine Abweichung der Steigung vom Wert 1 kooperative Wechselwirkung der Bindungsstellen, sofern es sich nicht um mehrere unabhängige Bindungsstellen mit *verschiedener* Ligandenaffinität handelt. Der Unterschied in der Affinität der einzelnen Hämocyanin-Untereinheiten ist aber vernachlässigbar [77] (also im Experiment nicht festzustellen), und wurde deshalb auch nicht in das Modell einbezogen.

5.1.5 Diskussion und Zusammenfassung

Die Abhängigkeit der Sauerstoffbindungskurven von der Anregungsleistung läßt sich im Rahmen des oben aufgestellten Modells erklären. Die Anregung des *charge transfer* Übergangs führt zu einer Lockerung der Bindung des Sauerstoffmoleküls zu den Kupfer-Atomen. Als Folge dissoziiert das Sauerstoffmolekül mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit von etwa 10^{-5} . Die Anpassung des Modells an die Daten ergibt eine Dissoziationsrate aus dem angeregten Zustand von etwa 2000 sec^{-1} , die deutlich schneller als die spontane Dissoziationsrate von etwa 10 sec^{-1} ist. Zusammen mit einer typischen Anregungsrate von 10^6 sec^{-1} ergibt sich eine effektive Dissoziationsrate von typisch 40 sec^{-1} . Nur bei den hohen Anregungsintensitäten, die für die Zwei-Photonen-Mikroskopie benötigt werden, hat die über einen Ein-Photonen-Prozeß induzierte Dissoziation einen merklichen Einfluß auf das Sauerstoffbindungsverhalten des Hämocyans.

Bei diesen Anregungsraten reicht es nicht aus, die Dissoziationsrate des Sauerstoffs um einen anregungsleistungsabhängigen Anteil zu erweitern. Nur wenn das angeregte Bindungszentrum mit in das Modell aufgenommen wird, seine Konzentration also nicht vernachlässigt wird, können die experimentellen Ergebnisse korrekt beschrieben werden.

Ein vergleichbarer Effekt ist von der CO-Dissoziation aus Myoglobin schon seit langem bekannt. Bei diesem System läßt er sich wegen der deutlich höheren Dissoziations-Quantenausbeute (nahe Eins) sehr viel leichter beobachten. Vom Prinzip her unterscheiden sich die hier vorgestellten Ergebnisse aber nicht von diesen Messungen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß hier im Fokus eines Objektivs detektiert wurde und so die Diffusion in das Detektionsvolumen nicht vernachlässigt werden kann.

5.2 Bindungskurven von 24-merem Hämocyanin

Die lichtinduzierte Dissoziation des Sauerstoffs aus der Bindungsstelle ermöglicht es, von außen in das Bindungsgleichgewicht des Proteins einzugreifen und die Reaktion des Proteins darauf zu untersuchen. Die in Abschnitt 2.2.2 vorgestellten Modelle beschreiben nur den Gleichgewichtszustand und machen keine Aussagen darüber, wie er erreicht wird. Die lichtinduzierte Sauerstoffabgabe ermöglicht es nun, die Dynamik der Sauerstoffbindung zu untersuchen. Dabei wird die Annahme gemacht, daß der lichtinduziert abgegebene Sauerstoff wie der spontan abgegebene Sauerstoff rückgebunden wird.

5.2.1 Messungen

Mit 24-merem (also vollständigem) Hämocyanin wurden die Messungen aus Abschnitt 5.1.1 wiederholt. Die Proben hatten eine Konzentration von 3 mg/ml. Der Ablauf der Messungen war identisch: nachdem die Probe mit reinem Sauerstoff gespült worden war, um den maximalen Sauerstoffpartialdruck von 747 Torr einzustellen, wurden sie mit einem konstanten Fluß von 2 l/min reinem Stickstoff deoxygeniert. Dabei wurden die Parameter aus Tabelle 3.2 aufgezeichnet. Diese Messungen wurden bei verschiedenen Anregungsleistungen durchgeführt. Tabelle 5.3 faßt die auswertbaren Datensätze zusammen.

5.2.2 Modell

Die Sauerstoffbindung des 24-meren Hämocyanins läßt sich vollständig nur mit dem *nesting*-Modell (siehe Abschnitt 2.2.2) beschreiben. Dieses Modell kann die Abhängigkeit der Bindungskurven von äußeren Effektoren, z.B. dem pH , beschreiben, ohne eine unrealistische Abhängigkeit der einzelnen Raten von diesem Effektor anzunehmen. In

Satz	Anregungsleistungen (mW)	Zeitraumen
A	0.3 – 1.0 – 2.0	1 Tag
B	0.3 – 1.0	1 Tag
C	0.3 – 1.0 – 2.0	1 Tag

Tabelle 5.3: Datensätze von Bindungskurven, die an 24-merem Hämocyanin gemessen wurden.

diesem Abschnitt soll ein Modell entwickelt werden, das zusätzlich auch die Intensitätsabhängigkeit der Bindungskurven, also den Einfluß der lichtinduzierten Sauerstoffabgabe beinhaltet. Um das Modell nicht zu komplex werden zu lassen, wird als Grundlage nicht das eigentlich erforderliche *nesting*-Modell verwendet, sondern ein MWC-Modell (s. Abschnitt 2.2.2), das auf einer allosterischen Einheit von $t = 12$ Untereinheiten beruht [188]. Dies beschreibt, gerade bei dem hier verwendeten pH von 7.8, die Bindungskurven mit oben genannter Einschränkung ebenfalls zufriedenstellend.

Die einzelnen Untereinheiten werden im MWC-Modell als unabhängig angesehen, bis auf die Annahme, daß sie alle in der gleichen Konformation vorliegen müssen, sie die Konformation also nur konzertiert wechseln können. Innerhalb einer Konformation zeigen sie nicht-kooperatives Bindungsverhalten. In Abschnitt 5.1.4 wurde dargestellt, daß der Nichtgleichgewichtszustand, der durch die Diffusion und lichtinduzierte Sauerstoffabgabe hervorgerufen wird, nach außen hin zu auf den ersten Blick überraschenden Ergebnissen führt: Bereits eine einzelne Bindungsstelle zeigt scheinbar negative Kooperativität. Es muß in einem ersten Schritt sichergestellt werden, daß dieser Nichtgleichgewichtszustand bei einem oligomeren Portion nicht zu einer ähnlichen scheinbaren Veränderung des Bindungsverhaltens führt, das bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden müßte.

Es soll das in Abbildung 5.8 dargestellte Modell betrachtet werden, das jenes aus Abbildung 5.3 auf zwei Bindungsstellen erweitert. Jedes Bindungszentrum kann angeregt werden, so daß auch ein Molekül mit zwei angeregten Bindungszentren möglich ist. Bei der Aufstellung des Gleichungssystems muß dann das statistische Gewicht entsprechend berücksichtigt werden. Analog zu Gleichung 5.3 ff. soll nun dieses Modell diskutiert wer-

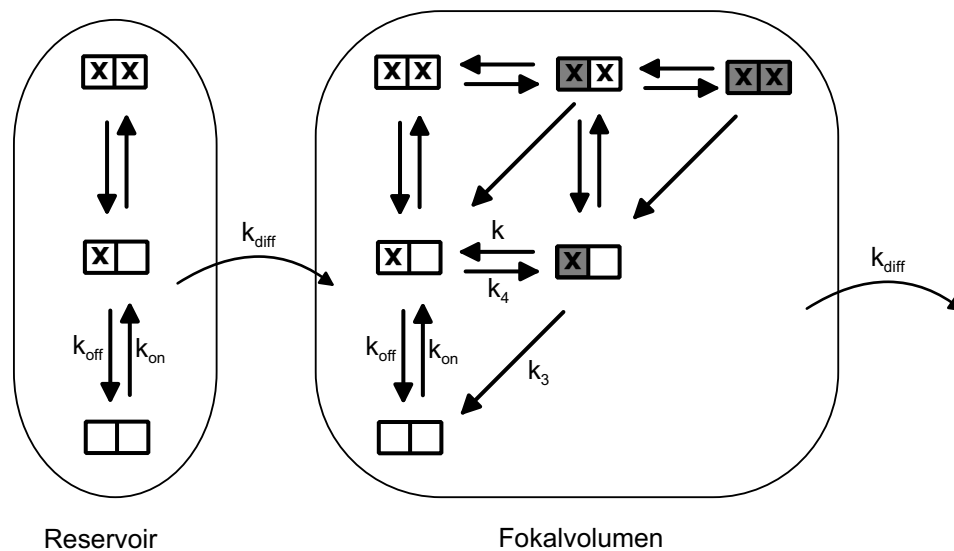


Abbildung 5.8: Modell zur Untersuchung, ob der durch Diffusion und Dissoziation hervorgerufene Nichtgleichgewichtszustand die Unabhängigkeit der Bindungsstellen beeinflusst. Grau unterlegte Bindungsstellen sind angeregt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die statistischen Gewichte nicht eingezeichnet.

den. Die Konzentration der Zustände ist mit m_{xy} bezeichnet, wobei x die Anzahl der beladenen Bindungszentren und y die Anzahl der angeregten Bindungszentren bezeichnet. Es ist also immer $y \leq x$.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} m_{00} \\ m_{10} \\ m_{20} \\ m_{11} \\ m_{21} \\ m_{22} \end{pmatrix} = (M - k_{\text{diff}} I) \begin{pmatrix} m_{00} \\ m_{10} \\ m_{20} \\ m_{11} \\ m_{21} \\ m_{22} \end{pmatrix} + k_{\text{diff}} C \begin{pmatrix} a_{00} \\ a_{10} \\ a_{20} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (5.11)$$

Dabei bezeichnen die a_{i0} die relativen Anteile der Zustände im Reservoir (per Definition keine angeregten Bindungsstellen) und M die Raten innerhalb des Fokus:

$$M = \begin{pmatrix} -2k'_{\text{on}} & k_{\text{off}} & 0 & k_3 & 0 & 0 \\ 2k'_{\text{on}} & -k_{\text{off}} - k_{\text{on}} - k & 2k_{\text{off}} & k_4 & k_3 & 0 \\ 0 & k'_{\text{on}} & -2k_{\text{off}} - 2k & 0 & k_4 & 0 \\ 0 & k & 0 & -k_{34} - k'_{\text{on}} & k_{\text{off}} & 2k_3 \\ 0 & 0 & 2k & k'_{\text{on}} & -k_{34} - k - k_{\text{off}} & 2k_4 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k & -2k_{34} \end{pmatrix}$$

mit $k_{34} = k_3 + k_4$, $k'_{\text{on}} = k_{\text{on}} [O_2]$ sowie (siehe Gl. 2.6)

$$a_{i0} = \binom{2}{i} \left(\frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} \right)^i \bigg/ \left(1 + \frac{k'_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} \right)^2 \quad (5.12)$$

Der Anteil der beladenen Bindungszentren im Grundzustand Θ' berechnet sich für dieses Modell als

$$\Theta' = \frac{1}{2} \frac{m_{10} + 2 m_{20} + m_{21}}{\sum_{xy} m_{xy}} = \left[\left(\frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}} [O_2]} + 1 \right) \left(1 + \frac{\kappa P}{k_{\text{off}} + k_{\text{diff}} + k_{\text{on}} [O_2]} \right) \right]^{-1} \quad (5.13)$$

Der Faktor $1/2$ berücksichtigt, daß jedes Molekül zwei Bindungszentren besitzt. $\Theta' = 1$ bedeutet bei dieser Normierung, daß alle Bindungszentren beladen und im Grundzustand sind. Θ' ist identisch mit Gleichung 5.6 (nur eine Bindungsstelle). Damit ist gezeigt, daß die einzelnen Bindungsstellen eines Proteins auch bei Diffusion und lichtinduzierter Sauerstoffdissoziation im Laserfokus wie erwartet nicht wechselwirken. Das 24-mere Hämocyanin verhält sich auch unter diesen Bedingungen *innerhalb einer Konformation* wie eine unabhängige Ansammlung von Untereinheiten.

Wie läßt sich nun die lichtinduzierte Sauerstoffabgabe in das konzertierte MWC-Modell integrieren? Die einzelnen Untereinheiten (UE) des Makromoleküls werden bis auf die gemeinsame Konformation als unabhängig angenommen. Die Funktion Θ_{ges} , die die Beladung des Makromoleküls beschreibt, setzt sich daher zusammen aus dem Beladungsgrad $\Theta_{R,T}$ der beiden Konformationen und der aktuellen Gewichtung α_R zwischen diesen Konformationen (siehe Kapitel 2.2.2, Gl. 2.20):

$$\Theta_{\text{ges}} = \alpha_R \Theta_R + (1 - \alpha_R) \Theta_T \quad (5.14)$$

Die beide Komponenten $\Theta_{R,T}$ und α_R können unterschiedlich auf die lichtinduzierte Sauerstoffabgabe reagieren. Im Rahmen des MWC-Modells wird $\Theta_{R,T} = \Theta_{\text{unabh. UE}}$ angenommen, also sollte sich $\Theta_{R,T}$ durch das in Kapitel 5.1.2 aufgestellte Modell beschreiben lassen. Es bleibt noch zu untersuchen, wie sich die relative Gewichtung der Konformationen α_R verhält.

Ein Zusammenhang zwischen α_R und den Parametern $\mathbf{z} = \{k_{\text{on}}, k_{\text{off}}, k_3, k_{\text{diff}}, \alpha_0\}$ der lichtinduzierten Sauerstoffabgabe ergibt sich ohne weitere Annahmen aus dem MWC-Modell, da sowohl $\Theta_{R,T}$ als auch α_R im MWC-Modell von nur vier Parametern abhängen: der Größe t der allosterischen Einheit, der Gleichgewichtskonstanten L_0 zwischen den *unbeladenen* Zuständen der beiden Konformationen und den beiden intrinsischen Gleichgewichtskonstanten $\kappa = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ der beiden Konformationen. Die ersten beiden Parameter sollten nicht von der Lichtintensität abhängen: die allosterische Einheit ist durch das Molekül definiert und die Gleichgewichtskonstante L_0 ist zwischen den unbeladenen Zuständen definiert, die keine Absorptionsbande bei 570 nm zeigen. Damit ist nur der Zusammenhang zwischen Lichtintensität und den intrinsischen Gleichgewichtskonstanten $\kappa_{R,T}$ von Bedeutung.

Wenn ein solcher Zusammenhang aufgestellt werden könnte, also $\kappa = \kappa(I)$, dann wäre damit sowohl $\Theta = \Theta(\kappa(I))$ als auch $\alpha_R = \alpha_R(\kappa(I))$ gegeben.

Der Zusammenhang $\kappa = \kappa(I)$ kann leider nicht ohne weiteres direkt abgeleitet werden, allerdings ist bereits vom dissoziierten Hämocyanin eine Funktion $\Theta' = \Theta'(I)$ bekannt (Gl. 5.6). Aus dieser läßt sich ein $\kappa(I)$ und damit ein $\alpha_R(I)$ konstruieren. Das Vorgehen ist also

$$\Theta'(I) \xrightarrow{1} \{[O_x], [D_x], [O_x^*]\} \xrightarrow{2} \Theta(I) \xrightarrow{3} \kappa(I) \xrightarrow{4} \alpha_R(I) \quad . \quad (5.15)$$

Der Übersichtlichkeit wegen ist hier nicht zwischen den Konformationen R und T unterschieden, es werden jedoch die Raten k_{off} und k_3 als von der Konformation abhängig angesehen und k_{on} für beide Konformationen gleich angesetzt¹. Schritt 1 ist durch Gl. 5.5 beschrieben. Die Schritte 2 und 3 ergeben sich aus

$$\Theta(I) = \frac{\kappa(I)x}{1 + \kappa(I)x} = \frac{1}{1 + 1/(\kappa(I)x)} = \frac{[O_x] + [O_x^*]}{[O_x] + [O_x^*] + [D_x]} \quad (5.16)$$

und Schritt 4 schließlich mit Gl. 2.19. Die endgültige Gleichung für $\alpha_R = \alpha_R(I, \mathbf{z})$ ist relativ unübersichtlich und darum nur im Anhang A.3.2 dem IDL-Quelltext zu entnehmen.

Damit ist ein Modell konstruiert, in dem beide Anteile von Gl. 5.14, die relative Gewichtung α_R der Konformationen und die Beladung $\Theta_{R,T}$ in gleicher Weise auf die lichtinduzierte Sauerstoffabgabe reagieren. Eine weitere, einfach zu beschreibende Möglichkeit besteht darin, daß die Konformation *gar nicht* auf die Sauerstoffabgabe reagiert. Dazu wird α_R auf dem durch das MWC-Modell beschriebenen Wert (Gl. 2.19) festgehalten. Die dritte einfach zu beschreibende Möglichkeit, nach der *nur* die Konformation und nicht die Beladung von der Lichtintensität abhängt, scheidet aus, da in diesem Fall die

¹Die Rate k_{on} hängt nur schwach von der Konformation ab: 4.2 Torr⁻¹sec⁻¹ (T-Zustand) gegenüber 5.5 Torr⁻¹sec⁻¹ (R-Zustand) [188].

unabhängigen Untereinheiten keinen Lichteinfluß zeigen sollten, was nicht der Fall ist (Kapitel 5.1). Die beiden zu untersuchenden Modelle lassen sich also schreiben als

$$\Theta'_{\text{ges}} = \alpha_R \Theta'_R(I) + (1 - \alpha_R) \Theta'_T(I) \quad \text{Modell 1: Konf. konstant,} \quad (5.17)$$

$$\Theta'_{\text{ges}} = \alpha_R(I) \Theta'_R(I) + (1 - \alpha_R(I)) \Theta'_T(I) \quad \text{Modell 2: Konf. variabel.} \quad (5.18)$$

Dabei wird $\Theta'_{RT}(I)$ aus Gleichung 5.6 mit konformationsabhängigen Raten k_{off} und k_3 gebildet. Das lichtunabhängige α_R ist in Gl. 2.19 beschrieben und das lichtabhängige $\alpha_R(I)$ wird wie dargestellt auf dem Weg über lichtabhängige Gleichgewichtskonstanten $\kappa_{R,T}$ konstruiert.

5.2.3 Anpassung an die Daten

Analog zum Vorgehen in Abschnitt 5.1.3 wurden nun die Modelle 1 (Gl. 5.17) und 2 (Gl. 5.18) an die Daten angepaßt. Die Fluoreszenzzählrate wurde für jeden Datenpunkt jeder Kurve analog zu Gl. 5.7 berechnet:

$$F_{\text{Kurve, Punkt}} = \text{Offset} + A * \text{Leistung}_{\text{Kurve}}^2 * [1 \times \Theta'_{\text{ges}} + \text{Kontrast} \times (1 - \Theta'_{\text{ges}})] \quad (5.19)$$

Im Unterschied zu Gleichung 5.7 muß hier nur eine Amplitude A verwendet werden, da alle Kurven eines Datensatzes an einem Tag gemessen wurden. Die Diffusionsrate k_{diff} wird analog zu Abschnitt 5.1.2 verwendet. Die Gleichgewichtskonstanten der jeweiligen Konformation $\kappa_{R,T} = k_{\text{off}; R,T} / k_{\text{on}}$ werden als Parameter benutzt. Es hat sich als vorteilhaft herausgestellt, nicht die relative Populierung α des Zustandes O_x^* als Parameter zu verwenden, sondern eine effektive, lichtinduzierte Rate $O_x \rightarrow D_x$: $\alpha' = \alpha k_3 = k k_3 / (k_3 + k_4 + k_{\text{diff}})$. Auf diese Weise kompensieren sich die Unsicherheiten in α und k_3 , so daß die Unsicherheit in α' deutlich geringer wird. Es kann allerdings nur eine, für beide Konformationen identische, lichtinduzierte Dissoziationsrate k_3 aus den Daten gewonnen werden. Dies ist darin begründet, daß sich nur sehr wenige beladene Bindungsstellen im T-Zustand befinden: bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken sind fast keine Bindungsstellen beladen, bei hohen wechselt das gesamte Molekül in den R-Zustand. Darum kann aus dem T-Zustand nur in einem schmalen Partialdruck-Intervall lichtinduziert Sauerstoff entfernt werden, so daß ein Parameter $k_{3,T}$ nur einen sehr geringen Einfluß auf die Gesamtabweichung der Datenanpassung hat. Abbildung 5.9 zeigt diesen Zusammenhang: maximal 15 % der Bindungsstellen sind besetzt und im T-Zustand bei etwa 15 Torr Sauerstoffpartialdruck. Nur aus diesen 15 % der Bindungsstellen kann ein Sauerstoffmolekül mit der Rate $k_{3,T}$ entfernt werden. Hingegen sind ab etwa 40 Torr Partialdruck mehr als 90 % der Bindungsstellen besetzt und im R-Zustand, so daß eine Rate $k_{3,R}$ Auswirkungen haben kann. Die Unsicherheit in $k_{3,T}$ wäre so groß, daß keine Schlüsse aus dem Wert des Parameters gezogen werden könnten. Darum wurde eine einheitliche Rate $k_3 = k_{3,T} = k_{3,R}$ verwendet.

In Tabelle 5.4 sind die Ergebnisse der Anpassung der Modelle an die drei Datensätze dargestellt. Abbildung 5.10 zeigt exemplarisch Datensatz C. Es ist deutlich zu erkennen, daß Modell 2 die Daten nicht beschreibt. Die χ^2 -Abweichung liegt in allen Fällen deutlich höher und auch die Kurvenform in Abbildung 5.10 unterscheidet sich von der

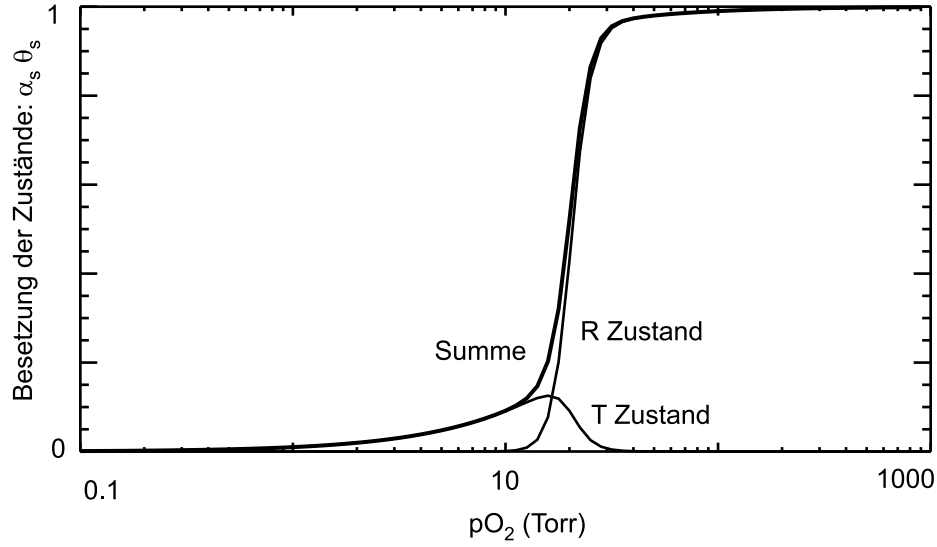


Abbildung 5.9: Besetzung der Zustände im MWC-Modell, berechnet mit Gl. 2.13 und 2.19. Maximal 15 % der Bindungsstellen sind beladen und im T-Zustand, wohingegen dieser Wert 100 % für den R-Zustand erreicht. Aus diesem Grund ist der Einfluß der lichtinduzierten Sauerstoffdissoziation aus dem T-Zustand auf die gesamte Bindungskurve sehr gering.

Modell	Satz A		Satz B	Satz C	
	1	2	1	1	2
κ_R (Torr ⁻¹)	1.28 ± 0.01	1.86 ± 0.02	1.08 ± 0.01	1.11 ± 0.01	1.71 ± 0.02
κ_T (10 ⁻³ Torr ⁻¹)	9.8 ± 0.5	31.2 ± 0.7	14.0 ± 0.3	5.7 ± 0.7	29.6 ± 0.9
k_3 (sec ⁻¹)	1649 ± 128	$3.9 \cdot 10^7 \pm 0$	$(1.3 \pm 7.1) \cdot 10^5$	3344 ± 767	$1.6 \cdot 10^8 \pm 0$
k_{diff} (sec ⁻¹)	58 ± 7	409 ± 18	209 ± 22	118 ± 18	536 ± 33
α' (mW ⁻¹ sec ⁻¹)	44.4 ± 1.4	3.8 ± 0.1	53.2 ± 3.1	45.7 ± 3.0	3.8 ± 0.2
A	444 ± 16	807 ± 13	595 ± 14	335 ± 26	595 ± 18
Kontrast	16.0 ± 0.6	9.0 ± 0.1	14.0 ± 0.3	19.6 ± 1.5	11.6 ± 0.3
χ^2	19.8	60.6	5.4	55.1	107.8

Tabelle 5.4: Ergebnis der Anpassung der Modelle an die Daten. Als feste Parameter wurden jeweils verwendet $L_0 = 10^{15}$, $Offs = 2$ cps, $k_{\text{on}} = 5$ Torr⁻¹sec⁻¹ und Größe der allosterischen Einheit $t = 12$ [188]. Aus Platzgründen kann das Ergebnis des Fits mit Modell 2 an Datensatz B nicht dargestellt werden. Es stimmt von der Tendenz aber mit den anderen Datensätzen überein. Bei diesem Datensatz sind die Unsicherheiten in k_3 besonders hoch, da er aus nur zwei Kurven mit maximal 1 mW Anregungsleistung besteht (siehe Tabelle 5.3).

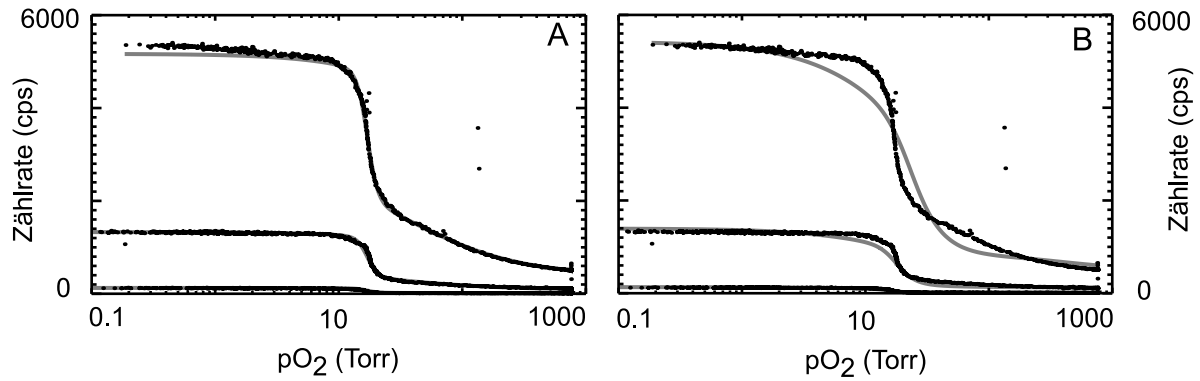


Abbildung 5.10: Anpassung an Datensatz C. A: Modell 1, α_R unabh. von Lichtintensität. B: Modell 2, α_R hängt von Lichtintensität ab.

gemessenen. Die Gleichgewichtskonstanten für den R- und T-Zustand liegen im von den Literaturwerten erwarteten Bereich ($k_R = 1.85 \text{ Torr}^{-1}$, $k_T = 16.8 \cdot 10^{-3} \text{ Torr}^{-1}$ [188]). Der *Kontrast* wird etwas höher ermittelt als der erwartete Faktor 13 [82], die Diffusionsrate schwankt um den erwarteten Wert von 115 sec^{-1} . Wie schon im Fall der Monomer-Bindungskurven diskutiert, ist dies auf die Näherung für die Volumina in diesen Modellen zurückzuführen. Die effektive, lichtinduzierte Dissoziationsrate α' stimmt zwischen den Datensätzen und auch mit den Monomer-Datensätzen gut überein. Dort wurde $\alpha' = \alpha_0 k_3$ zu 80; 43; 46 $\text{mW}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ermittelt (Fit 1; 3; 4 in Tabelle 5.2).

Diese Ergebnisse zeigen, daß Modell 2 die Daten nicht beschreiben kann, dies aber im Rahmen von Modell 1 möglich ist. Die relative Verteilung der Zustände α_R wird also durch die lichtinduzierte Sauerstoffdissoziation nicht verändert. Obwohl intuitiv Modell 2 den Einfluß der Sauerstoffabgabe in einem kooperativen Protein umfassender beschreibt, da es eine Änderung der Verteilung der Konformationen α_R mit beinhaltet, kann es die Daten nicht wiedergeben. Alle anderen Ergebnisse stimmen mit den von den Messungen am Dissoziat erwarteten überein: Für die lichtinduzierte Dissoziationsrate k_3 und die Populierung des angeregten Zustandes O_x^* , beschrieben durch $\alpha_0 = \alpha'/k_3$, werden vergleichbare Werte gefunden.

5.2.4 Diskussion und Zusammenfassung

Die im ersten Teil dieses Kapitels dargestellten Ergebnisse legten es nahe, die lichtinduzierte Dissoziation von Sauerstoff aus der Bindungsstelle als Werkzeug einzusetzen, um die Dynamik der kooperativen Sauerstoffbindung zu untersuchen. Dazu mußte zuerst sichergestellt werden, daß das verwendete Modell zur Beschreibung des Dissoziats auf mehrere, *unabhängige* Bindungsstellen erweitert werden kann, ohne eine scheinbare Interaktion der Bindungsstellen über die Diffusion in und aus dem Fokalkvolumen einzuführen. Obwohl die lokale Anregung der Probe verhindert, daß sich ein Gleichgewichtszustand einstellt, konnte gezeigt werden, daß sich ein Makromolekül mit mehreren Bindungsstellen auch unter diesen Bedingungen nicht kooperativ verhält, sofern nur eine Konformation erlaubt ist.

Damit ist es möglich, das Dissoziat-Modell als Basis für ein Modell zu verwenden, welches die Sauerstoffbindung des kooperativen Proteins im konzertierten MWC-Modell beschreibt. Das lichtabhängige Verhalten der Beladung innerhalb einer Konformation war durch das Dissoziat-Modell vorgegeben. Die Lichtabhängigkeit der relativen Gewichtung der Konformationen – die also den Konformationswechsel beschreibt – läßt sich auf zwei Arten einfach beschreiben: Modell 1 nimmt an, daß sie *nicht* lichtabhängig ist und Modell 2 nimmt an, daß sie in derselben Weise wie die Beladung von der Lichtintensität abhängt. Dies ist möglich, weil sich sowohl die Beladung als auch die Konformation als Funktion derselben Variablen darstellen lassen, so daß keine zusätzlichen Annahmen getroffen werden müssen. Die Anpassung des Modells an die Daten zeigt deutlich, daß dieser eher durch Modell 1 als durch Modell 2 beschrieben werden.

Wie lassen sich nun diese beiden Modelle interpretieren, die bisher nur rein formal gebildet wurden? Dazu bietet es sich an, einen Zwischenzustand X einzuführen, der zwischen den beiden Endzuständen in den Konformationen R und T liegt. Dieser Zustand wird während des Konformationswechsels durchlaufen und entkoppelt diesen von der Sauerstoffabgabe. Der Zustand X könnte z.B. durch ein Sauerstoffmolekül gebildet werden, das sich in der Bindungstasche des Proteins befindet, aber nicht gebunden ist. Solche Zustände sind für CO in Myoglobin bekannt [189]. Eine Sauerstoffabgabe (ob lichtinduziert oder nicht) würde also so erfolgen (als Beispiel ist der Ausgangszustand als R -Konformation gewählt):



Die oxygenierte Bindungsstelle befindet sich im R -Zustand und gibt das Sauerstoffmolekül ab. Da im Zustand X die Bindungsstelle nicht mehr besetzt ist, erscheint dieser Zustand spektroskopisch wie der Zustand D_x . Die Konformation entspricht aber immer noch der des Ausgangszustandes (in diesem Beispiel R). Je nach Geschwindigkeit der beteiligten Reaktionen a und b geht das System entweder wieder zurück in den Zustand R_i (Reaktion a), wobei der Sauerstoff wieder gebunden wird, ohne daß die T -Konformation erreicht würde, oder es geht in den T_{i-1} -Zustand über (Reaktion b) und der Sauerstoff ist endgültig ungebunden. Im ersten Fall führt eine lichtinduzierte Sauerstoffabgabe nicht zu einem Konformationswechsel, da das System nie die T -Konformation erreicht (Modell 1). Im zweiten Fall würde auch eine lichtinduzierte Sauerstoffabgabe direkt zu einem Konformationswechsel führen, da die gesamte Reaktionskette schnell durchlaufen wird (Modell 2).

Analog kann auch mit der energetischen Lage der Zustände, also der Gleichgewichtsverteilung der Besetzung an Stelle der Raten der Übergänge argumentiert werden. Im Bild der energetischen Lage der Zustände ist dies in Abbildung 5.11 analog zu Abbildung 2.10 dargestellt. Die Lage der R - und T -Zustände ist in beiden Teilen der Abbildung gleich. Die schwarzen Kreise geben die Konformation an, in der sich die Mehrzahl der Moleküle bei gegebener Beladung befinden. Für diese ist durch die Pfeile der Reaktionsweg bei Sauerstoffabgabe eingezeichnet. In Modell 1 (Abbildung 5.11A) erfolgt der größere Sprung in der Energie der Zustände erst beim Übergang vom Zustand X

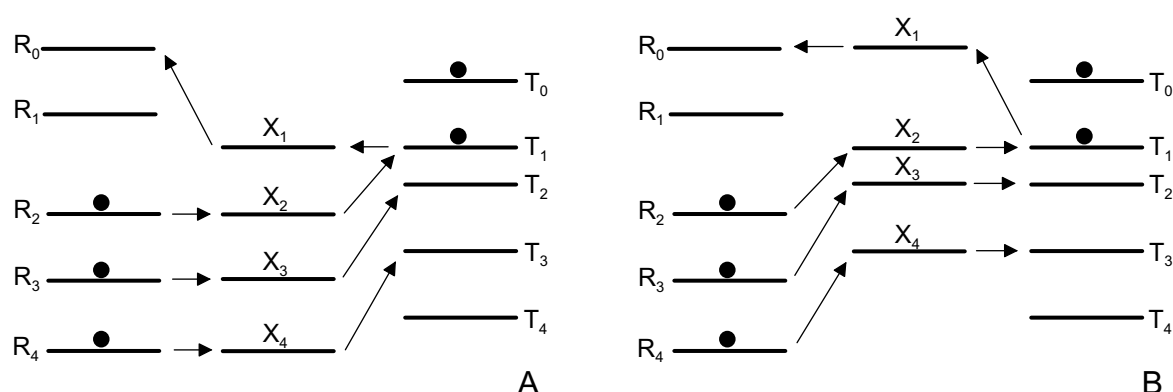


Abbildung 5.11: Energetische Lage des Zwischenzustandes X verglichen mit den R - und T -Zuständen. Die Kreise markieren die bei dieser Beladung hauptsächlich vertretene Konformation im MWC-Modell. A: Der Zwischenzustand X befindet sich energetisch in der Nähe des beladenen Ausgangszustandes. Es ist wahrscheinlicher, daß das System aus dem Zustand X wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt, als den Konformationswechsel auszuführen. B: Der Zustand X befindet sich energetisch in der Nähe des unbeladenen Endzustandes. Der Konformationswechsel wird wahrscheinlicher.

in die neue Konformation. Dieser Übergang wird darum seltener ablaufen. In Modell 2 (Abb. 5.11B) dagegen ist diese zweite Reaktion (Reaktion b in Gl. 5.20) leichter möglich. Sobald der Zustand X erreicht ist, kann auch der Konformationswechsel erfolgen.

Die Experimente zeigen nun deutlich, daß Hämocyanin eher durch Modell 1 als durch Modell 2 beschrieben wird. Die lichtinduzierte Sauerstoffabgabe scheint nicht zu einem Konformationswechsel zu führen. Unter der Annahme, daß die lichtinduzierte Sauerstoffabgabe aus dem Bindungszentrum vergleichbar mit der spontanen Abgabe ist, zeigt dies, daß die Sauerstoffbindung von der Konformation entkoppelt ist. Im Gleichgewichtszustand stellt sich die der Beladung entsprechende Konformation ein, dynamisch folgt der Konformationswechsel aber nicht sofort.

6 Einzelmolekülspektroskopie

Die Untersuchung einzelner Proteine mit Hilfe ihrer intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz würde vielfältige Möglichkeiten eröffnen, ohne daß dabei das biologische System biochemisch modifiziert werden müßte. Ein wichtiges Argument betrifft auch die Tryptophanfluoreszenz selbst, die in vielen Proteinen aussagekräftige Informationen über die lokale Umgebung liefert. Beispiele dafür wurden in Abschnitt 2.1.2 aufgezeigt. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Hämocyanin würde es die Einzelmolekülspektroskopie ermöglichen, über die Tryptophanfluoreszenz nicht nur den Mittelwert der Sauerstoffbeladung, sondern deren Verteilung zu bestimmen. Wie in Kapitel 2.2.2 dargestellt wurde, würde dies wichtige Hinweise liefern, durch welches Modell sich die kooperative Sauerstoffbindung am besten beschreiben läßt.

Die größte Hürde auf dem Weg zum oben genannten Ziel scheint die Photostabilität der Proteine zu sein, die in Kapitel 4.3 beschrieben wurde. Nach den dort durchgeführten Rechnungen können pro Hämocyanin-Molekül etwa 3 Counts am Photodetektor registriert werden, bevor die Tryptophane geblichen sind. Dies limitiert die möglichen Experimente sehr. Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden darum Experimente zur Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie an Hämocyanin vorgestellt, mit denen – wie gezeigt werden wird – auch bei diesen niedrigen Zählraten die Diffusion einzelner Proteine in und aus dem Fokolvolumen nachgewiesen werden kann.

Im zweiten Teil dieses Kapitels soll gezeigt werden, daß es bei ausreichender Photostabilität möglich wäre, einzelne Proteine über ihre Tryptophanfluoreszenz abzubilden. Als Modellsystem werden dazu die bereits beschriebenen Avidin-markierten Latexkugeln verwendet, da es sich herausgestellt hat, daß hier die Photostabilität der Tryptophane besonders hoch ist. In den anderen Eigenschaften unterscheiden sich diese Kugeln kaum von dem untersuchten Hämocyanin, insbesondere die Anzahl der Tryptophane pro „Molekül“ ist nur um einen Faktor 2 größer.

In einem Ausblick sollen schließlich zwei Methoden diskutiert werden, die es eventuell ermöglichen, auch unter den bei Hämocyanin vorherrschenden Bedingungen eine Beladungsverteilung zu messen. Die Methode des *pulse counting histogram* ist komplementär zur Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Es wird nicht der Diffusionskoeffizient sondern die sogenannte molekulare Helligkeit bestimmt, während die Moleküle durch den Fokus diffundieren. Die Anforderungen an die Photostabilität sind also vergleichbar. Weiterhin soll das sogenannte *radiative decay engineering* diskutiert werden, bei dem die strahlende Rate und damit die Photostabilität durch geeignete Wahl der umgebenden Brechungsindizes verändert wird.

6.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie an Hämocyanin

6.1.1 Messungen mit Zwei-Photonen-Anregung

Die Autokorrelation des Fluoreszenzsignals wird mit dem in Kapitel 3.4 beschriebenen Verfahren gemessen. Als Probe dient eine 20 nM Hämocyaninlösung (0.03 g/l, 10 Moleküle/ μm^3), die im Probenhalter im Mikroskop unter Rühren und einem Stickstoffstrom vollständig deoxygeniert wurde. Während der Messungen war dann das Paddel abgeschaltet, um die Diffusion der Moleküle nicht mit einer erzwungenen Strömung zu überlagern. Der Stickstoffstrom blieb unvermindert, damit kein Luftsauerstoff an die Probe gelangen konnte.

Wegen der geringen Zählrate mußte die Integrationszeit zwischen 30 und 60 Minuten betragen, jedoch wurde die Autokorrelation als Durchschnitt aus mehreren Autokorrelationen mit jeweils 5 Minuten Integrationszeit gebildet. Dieses Verfahren bietet zwei Vorteile: zum einen erhält man so ein Maß für den statistischen Fehler der Autokorrelation, zum anderen wirken sich störende Ereignisse nicht auf die gesamte Messung aus. Gerade bei höheren Anregungsintensitäten erschienen manchmal kurze Peaks mit sehr viel größerer Zählrate, die entweder auf Verunreinigungen in der Probe oder auf denaturiertes Protein zurückzuführen sind. Diese Peaks führen zu einem Überlauf in der Zählkaskade der Autokorrelatorkarte, so daß die gesamte Autokorrelation unbrauchbar wird. Bei der Bildung des Mittelwertes werden diese Autokorrelationen nicht berücksichtigt. Jede der im folgenden dargestellten Autokorrelationen $g(\tau)$ ist also der Mittelwert aus $N = 6\text{--}10$ Autokorrelationen $g_i(\tau)$ mit jeweils 5 Minuten Integrationszeit:

$$g(\tau) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N g_i(\tau) \quad . \quad (6.1)$$

Der angegebene Fehler je Datenpunkt $\sigma(\tau)$ ist die aus diesem Datensatz berechnete Standardabweichung, die durch die Wurzel der Anzahl der Datensätze geteilt wird und so nicht den Fehler der einzelnen 5-Minuten-Korrelation, sondern den Fehler des Mittelwertes wiedergibt [190]:

$$\sigma(\tau) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (g_i(\tau) - g(\tau))^2}{N(N-1)}} \quad . \quad (6.2)$$

Der digitale Autokorrelator liefert die Autokorrelation im Zeitintervall zwischen $\tau = 200 \text{ ns}$ und 3000 sec . Nur ein Ausschnitt aus diesem Bereich beinhaltet die für die Diffusion von Molekülen relevanten Informationen. Abbildung 6.1A zeigt als Beispiel eine Autokorrelation der Hämocyaninprobe bei einer Anregungsintensität von 1.4 MW/cm^2 . Der steile Anstieg der Kurve für Zeiten $\tau < 2 \mu\text{s}$ ist auf ein Nachpulsen des Photomultipliers zurückzuführen. Mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit wird bei der Detektion eines Photons nicht nur ein Puls, sondern nach einer charakteristischen Zeit

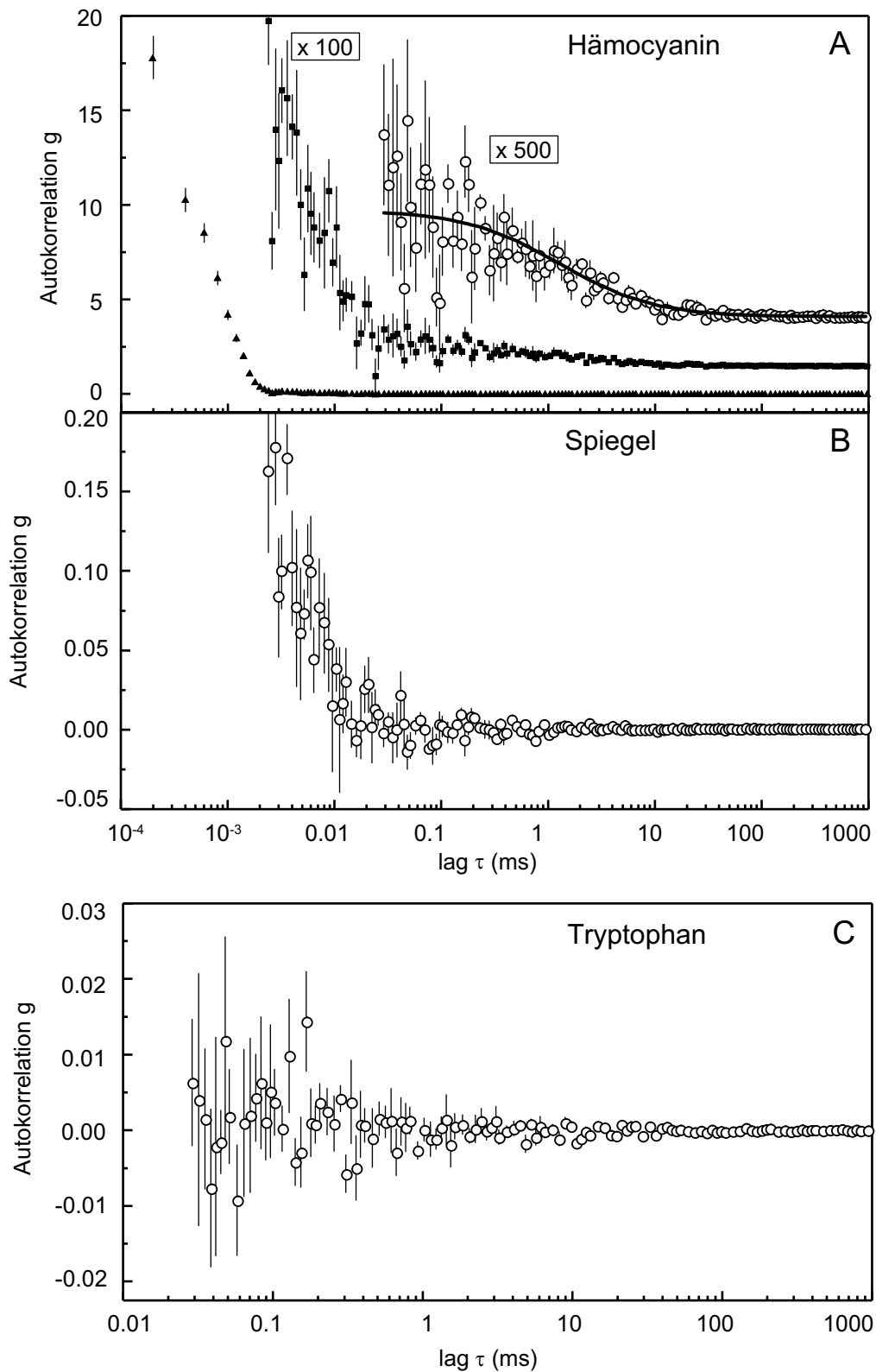


Abbildung 6.1: Übersicht über Autokorrelationen. A: 20 nM Hämocyaninprobe bei TPE. B: Spiegel als Probe. C: 1 mM Tryptophan ($> 10^5$ Moleküle/Fokualvolumen).

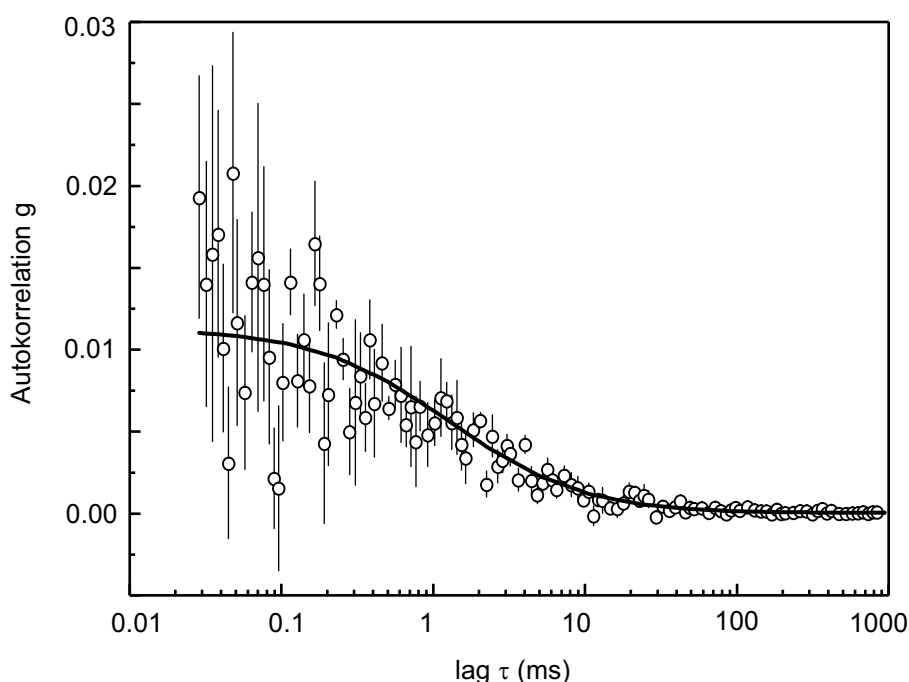


Abbildung 6.2: Beispiel einer Autokorrelation der Tryptophanfluoreszenz von Hämocyanin. Die Diffusion einzelner Proteine ist mit TPE nachweisbar. Die eingezeichnete Anpassung des Modells liefert einen Diffusionskoeffizienten $D = (2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$.

noch ein zweiter Strompuls abgegeben [191, 150]. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Prozeß ist so gering, daß er bei der Bestimmung der Zählrate nicht ins Gewicht fällt, durch die Autokorrelation aber einfach festzustellen ist. Der in Abbildung 6.1A durch 100-fache Vergrößerung sichtbar werdende Anstieg der Korrelationsfunktion $g(\tau)$ für $2 \mu\text{s} < \tau < 20 \mu\text{s}$ ist ebenfalls auf das Nachpulsen und nicht auf Triplett-Übergänge zurückzuführen: wie Abbildung 6.1B zeigt, ist dieser Anstieg in vergleichbarer Größe auch dann vorhanden, wenn die Probe gegen einen Spiegel ausgetauscht wird und die Anregungsintensität so eingestellt wird, daß gleiche Zählraten erzielt werden. Erst bei Zeiten $\tau > 20 \mu\text{s}$ sind alle Artefakte abgeklungen und der charakteristische Anstieg der Autokorrelationsfunktion durch Diffusion wird in Abbildung 6.1A sichtbar. Bei der Anpassung der Modelle aus Abschnitt 2.3.5 an die Daten werden nur die Datenpunkte zwischen $25 \mu\text{s}$ und 1 s entsprechend ihrer Standardabweichung berücksichtigt. Die durchgezogene Linie in Abbildung 6.1A zeigt eine solche Anpassung.

Daß dieser Anstieg nicht eventuell doch seine Ursache im experimentellen Aufbau hat, zeigt Abbildung 6.1C. Hier wurde als Probe eine 1 mM Tryptophanlösung verwendet. Zählrate und Integrationszeit waren wiederum vergleichbar mit der Messung aus Abbildung 6.1A. Die Konzentration ist so groß, daß sich mehr als 10^5 Moleküle gleichzeitig im Fokolvolumen befinden. Dadurch verschwindet der Kontrast der Autokorrelation, da die Diffusion eines Teilchens in oder aus dem Fokus nur noch zu einer minimalen Änderung der Fluoreszenz führt. Die Kurve in Abbildung 6.1C liegt darum symmetrisch um den Wert Null herum.

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie läßt sich also die Diffusion einzelner Hämocyanine aufgrund ihrer intrinsischen Tryptophanfluoreszenz nachweisen, obwohl pro Molekül nur etwa 3 Photonen am Detektor registriert werden können. Abbildung 6.2 zeigt noch einmal vergrößert die Daten aus Abbildung 6.1A. Die Anpassung des Diffusions-Modells nach Berland *et al.* (siehe Kap. 2.3.5, Gl. 2.58) ist eingezeichnet und liefert die Parameter Diffusionskoeffizient $D = (2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2\text{sec}^{-1}$ und Teilchenzahldichte $N = (37 \pm 2) \mu\text{m}^{-3}$ bei einer Abweichung von $\chi^2 = 2.5$. Der Radius ω_0 des Fokus' wurde durch Abbilden von mit Avidin markierten Latexkugeln ($d = 200 \text{ nm}$) zu $\omega_0 = 430 \text{ nm}$ bestimmt und war als konstant vorgegeben. Bei diesen Messungen war der Anregungslaserstrahl nicht aufgeweitet, so daß die Eingangsapertur des Mikroskopobjektivs nicht vollständig ausgeleuchtet und dadurch die laterale gaußförmige Intensitätsverteilung nicht beschnitten wurde.

Bevor in Abschnitt 6.1.4 Autokorrelationen bei verschiedenen Anregungsleistungen dargestellt werden, soll in den nächsten beiden Abschnitten der Diffusionskoeffizient D von Hämocyanin mit unabhängigen Methoden bestimmt werden, um zu zeigen, daß der Kontrast und Zerfall der Autokorrelation wirklich auf die Diffusion einzelner Hämocyanine zurückzuführen ist.

6.1.2 Vergleich mit Ein-Photonen-Anregung

Für Vergleichsmessungen mit Ein-Photonen-Anregung wurden die Proteine mit Tetramethylrhodamin (TMR, Molecular Probes) markiert (siehe Abschnitt 3.6). Die Probe wurde anschließend durch Gel-Filtration aufgereinigt, so daß keine ungebundenen Farbstoffmoleküle mehr in der Lösung vorhanden waren [82]. Die Messung der Autokorrelationen erfolgte in einem konfokalen Mikroskop [155, 156] bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Fluoreszenz wurde konfokal durch einen Bandsperrfilter mit Hilfe einer Avalanche-Photodiode detektiert. Die Autokorrelation wurde wiederum von der digitalen Korrelatorkarte ALV-5000 aufgezeichnet. Abbildung 6.3 zeigt die Autokorrelation einer 200 nM Hämocyanin-Probe (0.3 g/l, 100 Moleküle/ μm^3) bei einer Anregungsintensität von 1.4 kW/cm², was eine Zählrate von 11 kcps ergab. Die Integrationszeit betrug 30 Minuten.

Bei diesem konfokalen Versuchsaufbau läßt sich die übliche Näherung des Fokalvolumens durch eine 3-dimensionale Gauß-Funktion durchführen. Die darauf basierende Autokorrelationsfunktion wurde in Abschnitt 2.3.5 (Gl. 2.54) dargestellt und an die Daten in Abbildung 6.3 angepaßt. Die laterale Größe des Fokus' wurde wie im Zwei-Photonen-Fall durch Abtasten mit einer punktförmigen Fluoreszenzquelle, in diesem Fall ein einzelnes TMR-markiertes Hämocyanin-Molekül, zu $\omega_0 = 370 \text{ nm}$ bestimmt. Das Aspekt-Verhältnis $r = z_0/\omega_0$ des Fokus' konnte nicht experimentell bestimmt werden, da dieser Versuchsaufbau keine piezoelektrische Verfahrensmöglichkeit in Strahlrichtung besitzt. Aus der numerischen Apertur des Objektivs läßt sich unter Annahme der Gaußschen Optik ein Verhältnis r von etwa 3.5 ermitteln. Wie von Rigler *et al.* dargestellt [117], verlangt die Annäherung des Fokus' durch eine 3-dimensionale Gauß-Funktion aber ein um etwa den Faktor 2 größeres Aspekt-Verhältnis als das unabhängig berechnete, um zuverlässig Diffusionskoeffizient und Teilchenzahldichte bestimmen zu können. In der Anpassung an

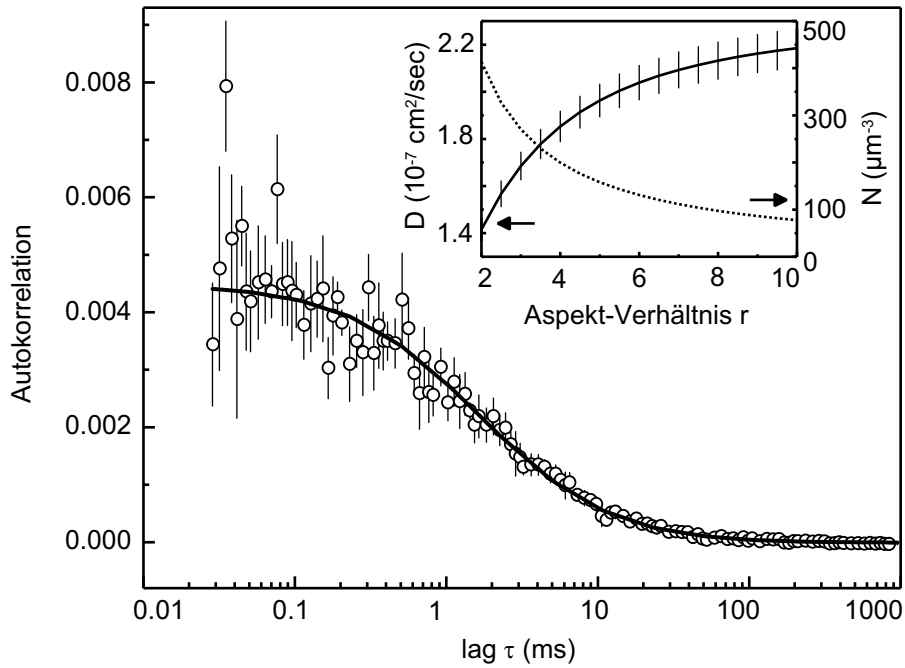


Abbildung 6.3: Autokorrelation nach Ein-Photonen-Anregung. Die Proteine wurden mit einem Farbstoff markiert. Das eingefügte Diagramm zeigt die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten D , seines Fehlers (vertikale Striche) und der Teilchenzahldichte N vom Aspekt-Verhältnis $r = z_0/\omega_0$, das zu $r \approx 7$ nur abgeschätzt werden konnten. Damit stimmt der Diffusionskoeffizient mit dem aus Abbildung 6.2 überein. Geringe Variationen in r beeinflussen ihn kaum.

die Daten wurde darum ein Aspekt-Verhältnis $r = 7$ verwendet. Es stellt sich aber heraus, daß der Diffusionskoeffizient D nur schwach von der Wahl des Aspekt-Verhältnisses abhängt (in Abbildung 6.3 eingefügte Grafik). Mit den hier getroffenen Annahmen ergibt sich ein Diffusionskoeffizient $D = (2.1 \pm 0.1) 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ und eine Teilchenzahldichte $N = (112 \pm 2) \mu\text{m}^{-3}$ bei einer Abweichung von $\chi^2 = 0.52$. Aus beiden Fluoreszenz-Korrelations-Messungen – mit Ein- und mit Zwei-Photonen-Anregung – ergibt sich ein im Rahmen der Meßgenauigkeit identischer Diffusionskoeffizient. In beiden Experimenten wurde also die Diffusion der gleichen Moleküle – Hämocyanine – beobachtet.

6.1.3 Berechnung des Diffusionskoeffizienten

Von Hämocyanin liegt in der Literatur kein Diffusionskoeffizient vor, mit dem der hier gemessene Wert verglichen werden könnte. Man kann allerdings den Diffusionskoeffizient D aus dem Sedimentationskoeffizient s berechnen, der für Hämocyanin bekannt ist und häufig zur Identifikation seiner Teileinheiten eingesetzt wird (z.B. Ref. [120]). Mit der Svedberg-Gleichung (siehe Abschnitt 2.3.5)

$$D = \frac{sRT}{M(1 - V\rho)} \quad (6.3)$$

und den Parametern Sedimentationskoeffizient $s = 3.7 \cdot 10^{-12}$ sec [120], molekulare Masse $M = 1.72$ kg/mol [61], spezifisches molares Volumen $V = 0.74$ cm³/g [121] und Dichte des Lösungsmittels $\rho = 1$ g/cm³ ergibt sich ein Diffusionskoeffizient $D = 2.0 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec. Dies stimmt gut mit den oben vorgestellten experimentellen Ergebnissen überein.

Weiterhin soll noch abgeschätzt werden, wie stark der Diffusionskoeffizient D von der Größe des Moleküls abhängt. Ein erster Ansatz ist die Stokes-Einstein-Gleichung: D ist umgekehrt proportional zum Radius der Kugel. Allerdings wird sich gerade bei der Bildung kleiner Aggregate die Form deutlich ändern. Darum soll der Diffusionskoeffizient von Teileinheiten des 24-meren Hämocyanins untersucht werden, um eine Abschätzung für diesen Wert bei Aggregaten zu erhalten. Dieses Verfahren berücksichtigt zumindest vom Ansatz her eine Änderung der Geometrie. Bei einem 12-meren Hämocyanin beträgt der Sedimentationskoeffizient $s = 2.4 \cdot 10^{-12}$ sec, bei einem 6-meren $s = 1.6 \cdot 10^{-12}$ sec [120]. Damit würde sich ein Diffusionskoeffizient von $D = 2.6 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec bzw. $D = 3.5 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec ergeben. Der erste Wert liegt an der Fehlergrenze, der zweite aber deutlich außerhalb. Es kann also davon ausgegangen werden, daß spätestens ein Aggregat von 4 der jeweils 24-meren Hämocyanine zu einem deutlich *niedrigeren* Diffusionskoeffizienten geführt hätte als der hier gemessene.

Diese Berechnung zeigt, daß in beiden FCS-Messungen die Diffusion *einzelner* Hämocyanine beobachtet wird und nicht die molekularer Aggregate.

6.1.4 Intensitätsabhängige Messungen

Zum Abschluß dieses Kapitels über FCS-Messungen soll ein Satz von Autokorrelationen vorgestellt werden, der aufeinanderfolgend an der selben Hämocyanin-Probe (20 nM) bei 5 verschiedenen Anregungsintensitäten gemessen wurde. Abbildung 6.4 stellt die Ergebnisse der Anpassung des Models von Berland *et al.* (Gl. 2.58) an die Daten dar.

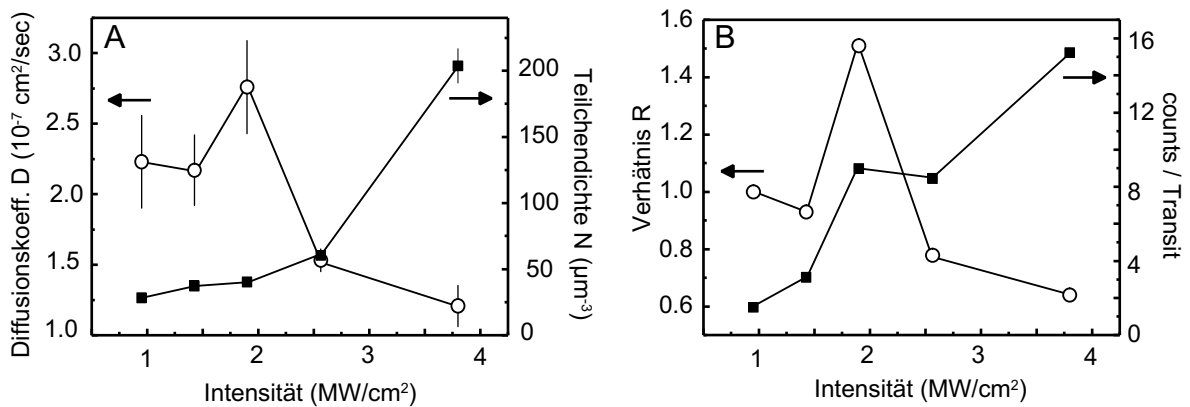


Abbildung 6.4: Übersicht über die Ergebnisse der intensitätsabhängigen Messungen. A: Diffusionskoeffizient D und Teilchenzahldichte N als Funktion der Anregungsintensität. B: Fluoreszenzzählrate als Verhältnis R zwischen gemessener und erwarteter Zählrate sowie als Anzahl der Photonen pro Molekül und Transit-Zeit.

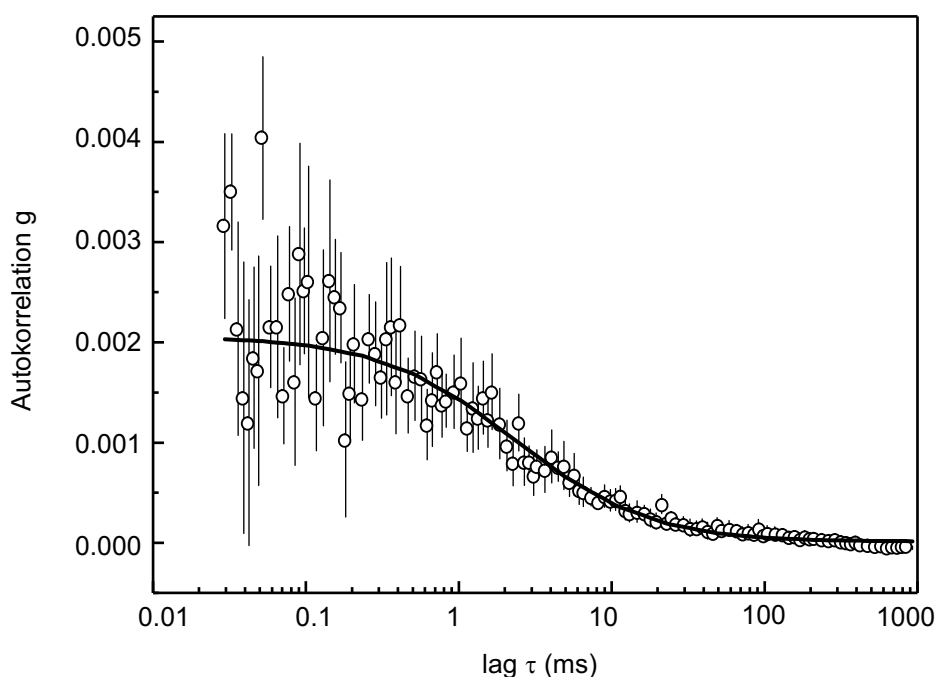


Abbildung 6.5: Autokorrelation bei $I = 3.8 \text{ MW/cm}^2$. Diese Korrelation wurde bei der maximalen Anregungsintensität aus Abb. 6.4 aufgenommen. Sie ist von den anderen experimentellen Parametern her direkt mit Abb. 6.2 bei niedriger Anregungsintensität vergleichbar.

Eine der zugrunde liegenden Kurven wurde schon in Abbildung 6.2 gezeigt; Abbildung 6.5 stellt eine weitere dar.

Bereits in Kapitel 4.3 wurde gezeigt, daß das Photobleichen der Hämocyanine schon bei relativ geringen Anregungsintensitäten einsetzt. Der Einfluß des Photobleichens auf die Autokorrelation läßt sich anschaulich wie folgt erklären: Moleküle, die auf ihrem Weg durch den Fokus bleichen, erscheinen für die Autokorrelation so, als hätten sie den Fokus schon verlassen, die charakteristische Korrelationszeit τ_{AC} wird kleiner. Bei konstanter Fokusgröße wird dies als größerer Diffusionskoeffizient interpretiert, da (siehe Abschnitt 2.3.5)

$$D = \frac{\omega_0^2}{8 \tau_{AC}} \quad . \quad (6.4)$$

Auf einer theoretisch fundierteren Basis wird dieser Effekt von J. Mertz behandelt [114]. Andererseits würde die Bildung von Aggregaten, wie im letzten Abschnitt diskutiert, zu einer Verringerung des Diffusionskoeffizienten führen. Um verlässliche Aussagen über den Diffusionskoeffizienten treffen zu können, muß also sichergestellt sein, daß beide Effekte nicht ins Gewicht fallen.

Die beiden Messungen bei den niedrigen Anregungsintensitäten ($I = 0.95 \text{ MW/cm}^2$ und 1.4 MW/cm^2) stellen die zuverlässigsten Messungen dar und stimmen mit den Referenzmessungen überein. Die Korrelation bei $I = 1.9 \text{ MW/cm}^2$ weicht davon deutlich hin zu größerem Diffusionskoeffizienten ab; allerdings zeigt sich diese Abweichung auch

bei der Zählrate im rechten Teil von Abbildung 6.4. Auch wegen des hier noch geringen Photobleichens wird diese Abweichung nicht auf eine Verkürzung der charakteristischen Zeit τ_{AC} zurückzuführen sein.

Bei hohen Anregungsintensitäten fällt der Diffusionskoeffizient scheinbar deutlich ab. Wie schon in Abschnitt 6.1.1 dargestellt, ist bei diesen Anregungsintensitäten die Denaturierung des Proteins auch im zeitlichen Verlauf der Zählrate zu erkennen: es treten vermehrt Ereignisse mit deutlich höherer Zählrate auf, wenn ein großes Aggregat durch den Fokus driftet. Die besonders hellen Ereignisse führen zu einem Überlauf der Autokorrelatorkarte und wurden vor der Mittelung der einzelnen Korrelationen entfernt. Kürzere, weniger helle Ereignisse lassen sich nachträglich aber nicht mehr korrigieren, so daß sie einen Einfluß auf die Korrelation haben. Sie bewirken, daß der Diffusionskoeffizient scheinbar kleiner wird, da eine Mittelung über die Diffusion einzelner Proteine und Proteinaggregate stattfindet.

Bei diesen hohen Anregungsintensitäten steigt außerdem die Teilchenzahldichte N scheinbar an. Dies ist auf den Anstieg der Untergrundzählrate zurückzuführen. Bei der maximalen hier verwendeten Intensität werden etwa 250 der 8700 cps auch in einer Blanko-Probe zu finden sein. Schwerwiegender wird der Anteil der Moleküle sein, die im Fokus bleichen und von denen nur ein Photon detektiert wird. Dieses singuläre Ereignis ist unkorreliert und erscheint wie ein Untergrundphoton. Der Effekt des Photobleichens ist auch in der Zählrate zu erkennen, wie im rechten Teil von Abbildung 6.4 dargestellt ist. Die Zählrate – hier die Anzahl detektierter Photonen pro in der Lösung vorhandenem Molekül und Transit-Zeit – steigt zwar mit der Anregungsintensität an, jedoch nicht so schnell, wie es die quadratische Intensitätsabhängigkeit der Zwei-Photonen-Anregung erwarten läßt. Das in Kapitel 4.3 eingeführte Verhältnis R zwischen gemessener und erwarteter Fluoreszenz fällt (von einer Abweichung abgesehen) kontinuierlich ab.

6.1.5 Diskussion und Zusammenfassung

In der Autokorrelation der Fluoreszenz einer Hämocyaninlösung konnte der für Diffusion typische Verlauf gefunden werden. Der daraus ermittelte Diffusionskoeffizient stimmt einerseits für sowohl zwischen Zwei-Photonen-Anregung der Tryptophane und Ein-Photonen-Anregung einer Farbstoffmarkierung überein, als auch mit dem aus dem Sedimentationskoeffizienten berechneten Wert. Es läßt sich abschätzen, daß eine mögliche intensitätsabhängige Aggregation der einzelnen Proteine zu einem deutlich niedrigeren Diffusionskoeffizienten geführt hätte, wie es auch in Messungen bei hohen Anregungsintensitäten zu beobachten ist. Bei niedrigen Intensitäten ist der Diffusionskoeffizient aber im Rahmen des Fehlers davon unabhängig.

Es ist also gelungen, die Diffusion einzelner Hämocyanine in und aus dem Fokalausvolumen mit Hilfe ihrer intrinsischen Fluoreszenz zu beobachten. Dies ist ein Einzelmoleküleffekt, der durch ein einzelnes Protein, das durch sein Betreten oder Verlassen des Detektionsvolumens zu einer Änderung der Fluoreszenz führt, hervorgerufen wird. Allerdings ermöglicht erst die statistische Auswertung vieler solcher Ereignisse – die Berechnung der Autokorrelation – diesen Nachweis.

6.2 Abbildung von Avidin-markierten Latexkugeln

Die Photostabilität der Tryptophane in Hämocyanin ist so gering, daß nur etwa 3 Photonen detektiert werden können, bevor alle Tryptophane geblichen sind. Dies reicht aus, wie im letzten Abschnitt dargestellt wurde, um die Diffusion einzelner Proteine nachzuweisen, da jedes einzelne Molekül nur kurze Zeit im Fokus verbringt und die statistische Methode der Autokorrelation – bei langer Integration – entsprechende Fluktuationen findet. Für viele Anwendungen ist allerdings die Abbildung der Proteine notwendig, um zum Beispiel ihre räumliche Verteilung oder – wie in unserem Fall – die individuelle Helligkeit festzustellen. Dies kann mit der geringen Anzahl detektierbarer Photonen nicht gelingen. Allerdings hat sich bereits in Kapitel 4.3 herausgestellt, daß das Protein Avidin, wenn es an kleine Latexkugeln gebunden ist, deutlich photostabiler ist. Die Kugeln mit 40 nm Durchmesser sind mit durchschnittlich 21 Avidin-Molekülen belegt, so daß dieses künstliche „Makromolekül“ 340 Tryptophane besitzt. In Kapitel 4.3 wurde eine Zahl von etwa 340 detektierbarer Photonen pro Latexkugel berechnet. Dies ermöglicht es, einzelne Kugeln mit Hilfe ihrer Tryptophanfluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung abzubilden.

6.2.1 Messungen

Die Originallösung der Avidin-markierten Latexkugeln (die keinerlei Farbstofffüllung enthielten) wurde schrittweise in entsprechender Pufferlösung bis auf eine Konzentration von 0.2 nM verdünnt und in den Probenhalter gegeben. Nach etwa 30 Minuten ist das Deckglas mit adsorbierten Kugeln bedeckt (siehe Kap. 3.6) und kann durch den Fokus des Mikroskops gerastert werden. Abbildung 6.6 zeigt ein entsprechendes Ergebnis in verschiedenen Darstellungsformen. Die Anregungsintensität betrug 900 kW/cm^2 bei 587 nm, die Integrationszeit pro Pixel 50 ms bei 100×100 Pixel ($5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}^2$) pro Bild. Wegen der Nichtlinearität der Graustufenskala in Teil A sind in Teil B zwei horizontale Schnitte angegeben und in Teil C eine pseudo-dreidimensionale Darstellung gezeigt. Dort beträgt die maximale Peakhöhe 30 counts / 50 ms.

Die Kugeln sind mit einem Signal-zu-Untergrund-Verhältnis von etwa 1:10 zu erkennen. Ihre Konzentration auf der Oberfläche ist vergleichbar mit der in Abbildung 3.14 (S. 85), die unter vergleichbaren Präparationsbedingungen, aber mit Ein-Photonen-Anregung der in diesem Fall vorhandenen Farbstofffüllung aufgenommen wurde. Einzelne horizontale Linien sind auf durch den Fokus driftende Kugeln zurückzuführen. Fast alle Spots scheinen nach oben hin abgeschnitten zu sein. Eine mögliche Ursache hierfür soll im folgenden Abschnitt genauer diskutiert werden.

Die zu erwartende Zählrate einer einzelnen Avidin-markierten Latexkugel im Fokus des Objektivs läßt sich mit Hilfe von Gl. 2.39 und 2.114 abschätzen. Bei einer Anregungsintensität $I = 900 \text{ kW/cm}^2$, etwa $N = 340$ Tryptophane pro Kugel und einer Quanteneffizienz von $\eta = 0.135$ für Tryptophan in Avidin [73] ergibt sich (zusammen mit den üblichen Parametern des Aufbaus aus Abschnitt 3.2.3) eine Zählrate von 417 cps. Innerhalb der Integrationszeit eines Pixels von 50 ms würden im Fokus also etwa 21 counts detektiert werden. Dies stimmt recht gut mit der Zählrate im Zentrum der hellen Spots

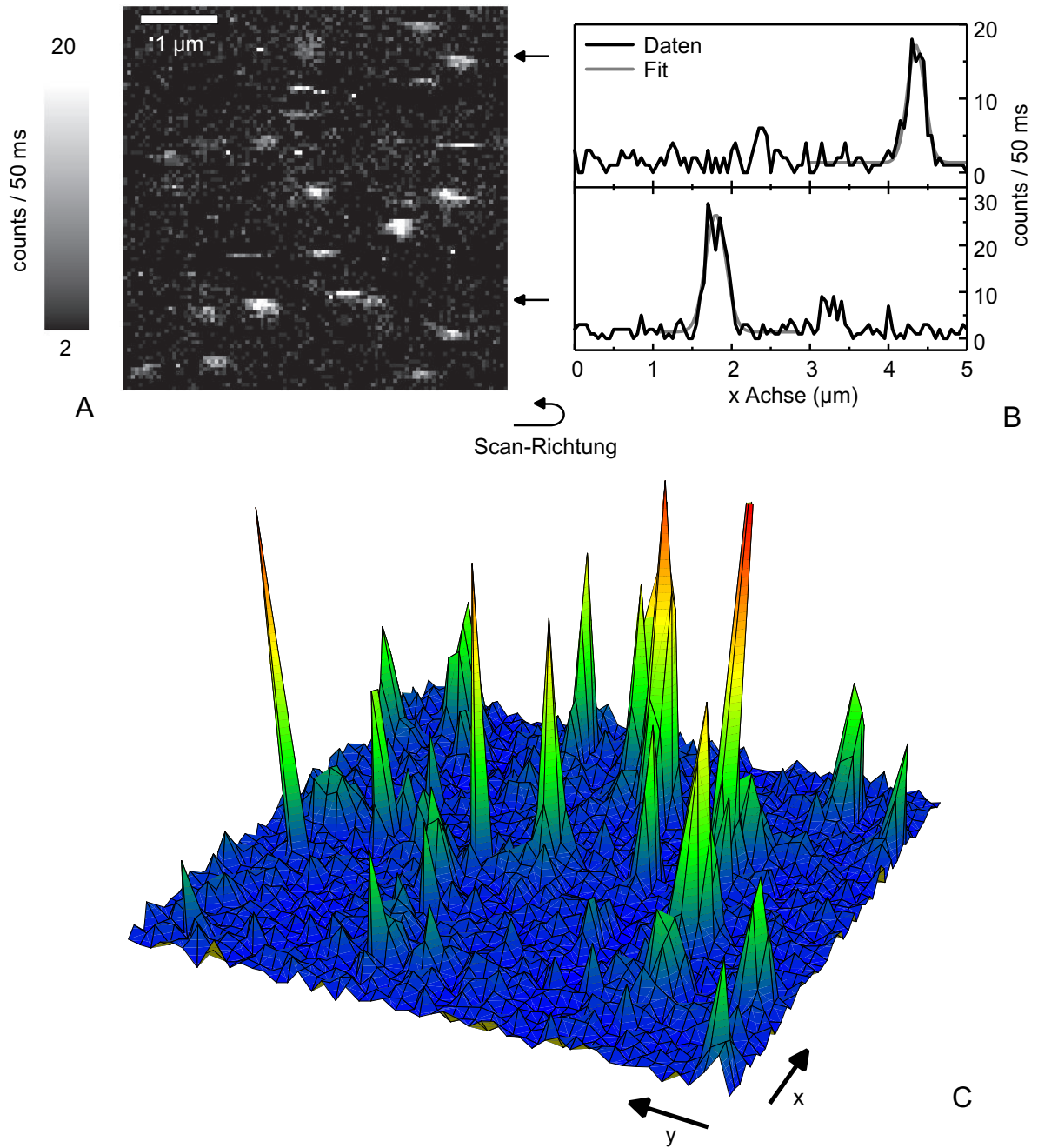


Abbildung 6.6: Avidin-markierte Latexkugeln abgebildet durch ihre Tryptophanfluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung. Bildgröße $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ bzw. 100×100 Pixel. Aus drucktechnischen Gründen ist die Graustufenskala nicht linear. Teil B zeigt zwei horizontale Schnitte an den in Teil A markierten Stellen. Die Anpassung eines gaußförmigen Fokus liefert $\omega_0 = 350 \text{ nm}$. Zur besseren Darstellung ist in Teil C die Größe der Pixel rechnerisch auf 100 nm erhöht. Die maximale Peakhöhe beträgt dann 30 counts/pixel .

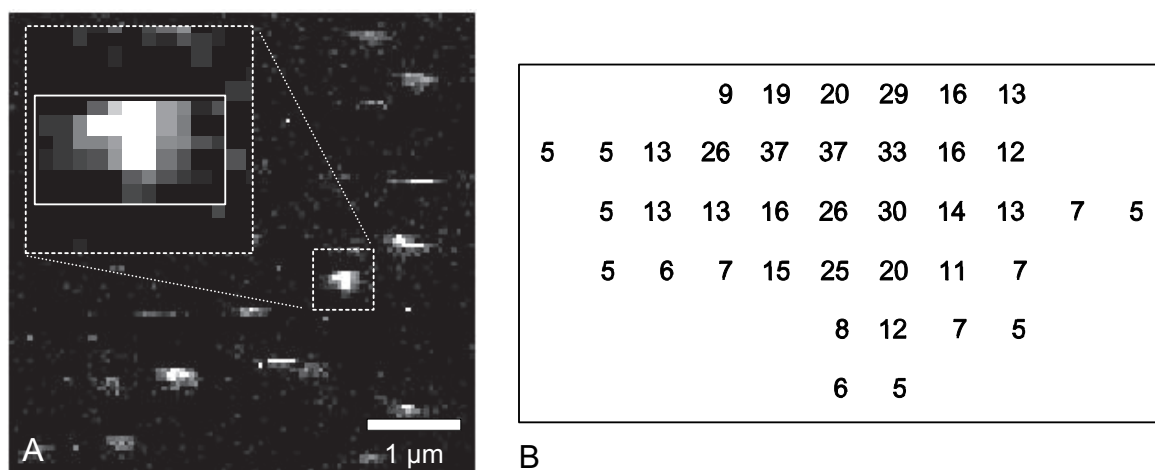


Abbildung 6.7: Integration der von einer Kugel detektierten Photonen. A: Der gewählte Ausschnitt ist vergrößert dargestellt. B: Counts pro Pixel in diesem Ausschnitt. Pixel mit weniger als 5 counts sind nicht einbezogen. Der Untergrund beträgt 2 counts/pixel. Summe aller Pixel minus Untergrund: 493 counts.

aus Abbildung 6.6 überein.

Photobleichen limitiert die maximal erreichbare Anzahl detektierter Photonen pro Latexkugel. Wie in Abschnitt 4.3 dargestellt, werden im Mittel etwa 340 Photonen detektiert, bis alle Tryptophane auf der Kugel geblieben sind. Das Integral über einen Spot aus Abbildung 6.6 sollte also nicht deutlich größer als dieser Wert sein. In Abbildung 6.7 ist diese Integration für einen der hellsten Spots durchgeführt und liefert den Wert von 493 counts. Die Messung stimmt mit dem erwarteten Wert überein.

6.2.2 Einfluß von Photobleichen auf die Spot-Form

In Abbildung 6.6 erscheinen viele, insbesondere die helleren Spots länglich, in Scanrichtung nach oben hin abgeschnitten. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, inwieweit Photobleichen für diese Veränderung der Spot-Form verantwortlich sein kann.

In Kapitel 4.3.2 (S. 99) wurde für die Helligkeit eines Moleküls mit mehreren Fluorophoren die Beziehung Gl. 4.10 hergeleitet:

$$F(c) = (1 - q')^c \quad \text{mit} \quad q' = 1/(\bar{c} + 1) \quad . \quad (6.5)$$

Dabei bezeichnet $\bar{c}$ die mittlere Anzahl detektierbarer Photonen pro Molekül und hat für die Avidin-markierten Latexkugeln den Wert 340 counts. Die Anzahl der emittierten Photonen ist dann proportional zu $F(c) \times B(\mathbf{r})$, wobei $B(\mathbf{r})$ die Anregungswahrscheinlichkeit an der Stelle $\mathbf{r}$ bezeichnet. Nun kann das Scannen des Moleküls durch den Fokus simuliert werden, in dem für ein Raster von Positionen $\mathbf{r}$ die Anzahl der dort emittierten Photonen berechnet und die Gesamtzahl der emittierten Photonen aufsummiert wird. Mit steigender Zahl der schon emittierten Photonen verringert sich $F(c)$, so daß immer weniger Photonen emittiert werden. Abbildung 6.8 zeigt das Ergebnis einer solchen Simulation. Im Teil A ist der Fall ohne Bleichen der Fluorophore dargestellt. Insgesamt

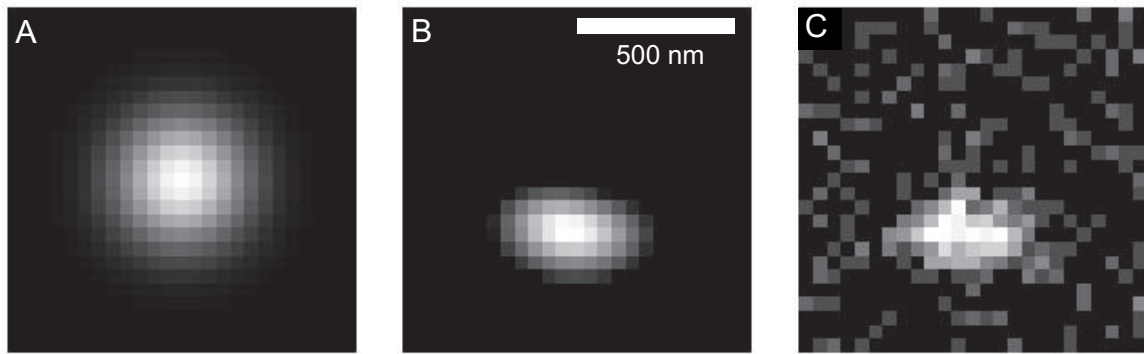


Abbildung 6.8: Simulation des Einflusses von Photobleichen auf die Form des Spots bei horizontaler Scanrichtung. A: ursprüngliche Form. B: bei starkem Bleichen. C: zusätzlich Schrottrauschen.

würden von dieser Kugel 4000 Photonen detektiert werden. Die mittlere Abbildung zeigt den Einfluß von Photobleichen, wie es bei den Avidin-markierten Kugeln auftritt. Der Spot erscheint oval, in y-Richtung verkürzt und das Zentrum ist gegenüber dem ungebleichten Spot verschoben. Durch das Bleichen würden in diesem Fall nur etwa 360 Photonen detektiert werden können. Bei dieser geringen Anzahl Ereignisse pro Pixel wird das Schrotrauschen deutlich sichtbar. Dieser Einfluß ist in Abbildung 6.8C dargestellt: jedes Pixel aus Teil B wurde durch eine Zufallszahl ersetzt, die aus einer Poisson-Verteilung gezogen wurde, deren Erwartungswert dem ursprünglichen Wert des Pixels entsprach. Außerdem wurde eine Untergrundzählrate von 1 count/pixel hinzugefügt. Dieser Spot ähnelt durchaus den gemessenen in Abbildung 6.6.

Allerdings mußte eine Gesamtzahl von 4000 detektierten Photonen im ungebleichten Fall angenommen werden. Im letzten Abschnitt wurde aber für die verwendete Anregungsintensität eine erwartete Zählrate ohne Bleichen von 417 counts/spot errechnet. In der Simulation ist die Anregungsintensität um etwa den Faktor $\sqrt{10}$ höher, um diese Spotform zu erreichen. Bei dieser Art der Abschätzungen werden allerdings viele experimentell nur schwer zugängliche Parameter miteinander multipliziert, so daß sich auf beiden Seiten (Photobleichen und erwartete Zählrate) relativ große Unsicherheiten ergeben. Auf dieser Grundlage kann nicht eindeutig entschieden werden, ob nun das Photobleichen für die veränderte Form der Spots verantwortlich ist oder nicht.

6.2.3 Diskussion und Zusammenfassung

Das vorstehend beschriebene Demonstrationsexperiment hat gezeigt, daß sich einzelne Proteine mit Hilfe ihrer Tryptophanfluoreszenz abbilden lassen, wenn die Photostabilität und die Anzahl der Tryptophane pro Protein groß genug sind. Als Modell für ein solches System wurden avidinmarkierte Latexkugeln verwendet, die den Vorteil haben, kommerziell auch mit Farbstoff-Füllung erhältlich zu sein. Dadurch ließ sich ihre Adsorption auf einem Deckglas mit Ein-Photonen-Anregung überprüfen, wie in Abschnitt 3.6 gezeigt wurde. Die gemessenen Zählraten entsprechen sowohl im Maximalwert als auch

über eine Kugel integriert den theoretischen Abschätzungen. Einige der Spots erscheinen oval und abgeschnitten. Eine mögliche Ursache dafür ist das sukzessive Bleichen der Fluorophore, so daß bei später aufgenommenen Bildpunkten immer weniger Fluoreszenz detektiert wird.

6.3 Diskussion weiterer Methoden

Eines der Ziele dieser Arbeit, eine Verteilung der Sauerstoffbeladung einzelner Hämocyane zu bestimmen, konnte nicht erreicht werden. Die Photostabilität des Tryptophans ist so gering, daß nicht genügend Photonen detektiert werden können, um einzelne Hämocyane abzubilden. Allerdings hat sie ausgereicht, die Diffusion dieser Proteine zu verfolgen. In diesem letzten Abschnitt sollen abschließend zwei Methoden vorgestellt und diskutiert werden, wie unter den gegebenen Bedingungen eventuell doch Beladungsverteilungen gemessen werden könnten.

Die erfolgreichen FCS-Experimente legen es nahe, eine andere Methode der statistischen Auswertung der Fluoreszenzzeitspur zu verwenden, die ebenfalls nur eine kurze Verweildauer der Moleküle im Fokus verlangt. Sie sollte nicht den Diffusionskoeffizienten – der von der Beladung unabhängig ist – sondern die Helligkeit jedes Moleküls liefern. Ein solches Verfahren ist in der Literatur unter *fluorescence-intensity distribution analysis* (FIDA) bzw. *pulse counting histogram* (PCH) bekannt.

Weiterhin ist zu überlegen, ob die Umgebung des Proteins so modifiziert werden kann, daß ein größerer Anteil der emittierten Photonen detektiert werden kann. Dies wird zum Beispiel durch eine geschickte Anordnung von Ebenen unterschiedlicher Brechungsindizes ermöglicht. Außerdem ist es damit möglich, die strahlende Zerfallsrate zu erhöhen und damit den Fluoreszenzkanal gegenüber dem Photobleichen zu bevorzugen, um mehr Photonen vor dem Bleichen des Moleküls zu detektieren. Dies wird als *radiative decay engineering* (RDE) bezeichnet und im zweiten Abschnitt dargestellt.

6.3.1 Analyse des Zählratenhistogramms

Die Methoden zur Analyse von Zählratenhistogrammen mit dem Ziel der Bestimmung molekularer Helligkeitsverteilungen wurden unabhängig voneinander von den Gruppen um K. Gall (*fluorescence intensity distribution analysis*, FIDA [192, 193]) und E. Gratton (*pulse counting histogram*, PCH [194, 195, 196]) entwickelt. Die folgende Darstellung orientiert sich an Ref. [194]. Ausgangspunkt ist das Zählratenhistogramm, die Darstellung der Häufigkeit, mit der innerhalb eines festen Zeitfensters der Länge T n Photonen detektiert wurden. Selbst wenn das Licht eines ideal intensitätsstabilisierten Lasers auf einen Photomultiplier gegeben würde, so gehorcht doch das Zählratenhistogramm einer Poisson-Verteilung, deren Erwartungswert durch die Lichtintensität und Detektionseffizienz definiert ist [197]. Dies gilt auch für die Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls, das sich in einem Volumenelement dV mit homogener Anregungs- und Detektionseffizienz befindet, vorausgesetzt, die Länge des Zeitfensters ist so gewählt, daß sich alle interne

Dynamik des Moleküls herausgemittelt hat:

$$P_{\text{hom}}(n) = \frac{\langle n \rangle^n e^{-\langle n \rangle}}{n!} . \quad (6.6)$$

$\langle n \rangle$ bezeichnet den Erwartungswert der Ereignisse n pro Zählintervall T . Bei räumlich inhomogener Detektionseffizienz muß über ein Volumen V_0 gemittelt werden. Die in Abschnitt 2.3.2 eingeführte Molekül-Detektions-Effizienz $\text{MDE}(\mathbf{r}) \leq 1$ umfaßt sowohl Anregungs- als auch Detektionseffizienz. Bei einem Wert von $\text{MDE} = 1$ werden ϵ Ereignisse pro Zeitintervall T erwartet. ϵ wird als molekulare Helligkeit bezeichnet. Damit ergibt sich [194]

$$P_{\text{inhom}}(n) = \frac{1}{V_0} \int_{V_0} \frac{(\epsilon \text{MDE}(\mathbf{r}))^n e^{-\epsilon \text{MDE}(\mathbf{r})}}{n!} d\mathbf{r} . \quad (6.7)$$

Befindet sich mehr als ein Molekül im Volumen V_0 , so ergeben sich mehrere Möglichkeiten, n Photonen zu detektieren: bei zwei Molekülen können k Photonen von Molekül a und $n - k$ von Molekül b detektiert werden:

$$P^{(2)}(n) = \sum_{k=0}^n P_a(k) P_b(n - k) = P_a \otimes P_b . \quad (6.8)$$

Entsprechend kann $P^{(N)}(n)$ für N Moleküle durch mehrfache Faltung gewonnen werden. Bei einem offenen System folgt die Zahl N der Moleküle in V_0 ebenfalls einer Poisson-Verteilung $P_C(N)$ mit dem Mittelwert $C V_0$, so daß für die Verteilung Π der Zählrate eines offenen Systems gilt

$$\Pi_{\epsilon,C}(n) = \sum_{N=0}^{\infty} P^{(N)}(n) P_C(N) . \quad (6.9)$$

Bei mehreren Spezies mit verschiedener molekularer Helligkeit ϵ_i , die jeweils in der Konzentration C_i vorliegen, wird die Gesamtverteilung Π_{ges} wieder durch Faltung aus den einzelnen Verteilungen Π gewonnen

$$\Pi_{\text{ges}} = \Pi_{\epsilon_1,C_1} \otimes \Pi_{\epsilon_2,C_2} \otimes \dots \otimes \Pi_{\epsilon_n,C_n} . \quad (6.10)$$

Die unabhängig von der hier dargestellten Herleitung [194] entwickelte Methode der Gruppe um K. Gall [192] setzt die Gesamt-Wahrscheinlichkeitsverteilung Π_{ges} in einer anderen Reihenfolge zusammen. Außerdem wird dort die Faltung durch Übergang auf die Fouriertransformierte umgangen.

Um einen Eindruck von dieser Methode zu bekommen, ist in Abbildung 6.9 ein Beispiel für Zählratenhistogramme zweier Proben mit gleicher mittlerer Zählrate und gleicher Gesamtkonzentration gegeben. Die eine Probe ist homogen, die andere besteht aus zwei um den Faktor 7 in der molekularen Helligkeit ϵ verschiedenen Molekülsorten. Mit Hilfe der Autokorrelation ließen sich diese beiden Proben nicht unterscheiden, da sowohl die Gesamtkonzentration als auch der Diffusionskoeffizient übereinstimmen. Die

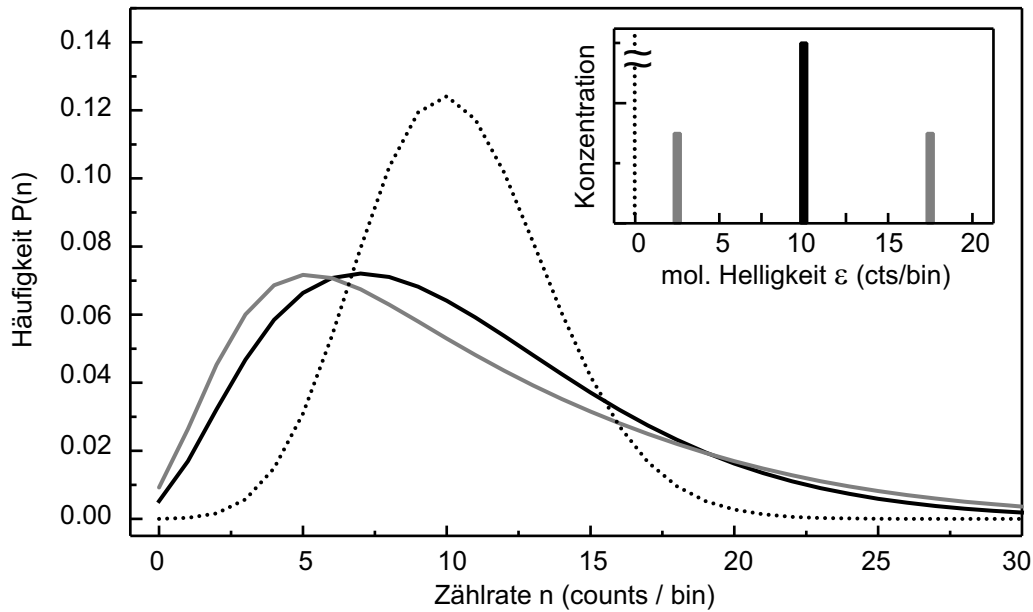
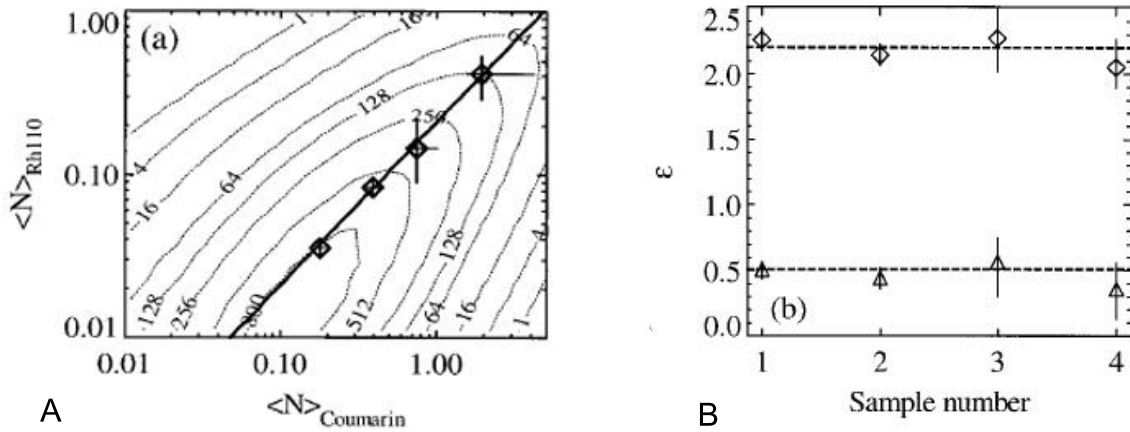


Abbildung 6.9: Beispiel eines Zählratenhistogramms für 3 Proben mit gleicher mittlerer Zählrate. *schwarz:* eine Molekülsorte. *grau:* zwei Molekülsorten mit gleicher mittlerer Helligkeit. *gepunktet:* Grenzwert hoher Konzentration bei gleicher mittlerer Zählrate (reine Poissonverteilung).

Zählratenhistogramme differieren aber deutlich. Zum Vergleich ist auch der Grenzfall einer Poisson-Verteilung eingezeichnet, der im Falle sehr vieler, relativ schwach leuchtender Moleküle auftritt (wieder mit gleicher mittlerer Zählrate). Sowohl ganz niedrige als auch ganz hohe Zählraten treten häufiger auf, wenn die Helligkeit in wenigen Molekülen konzentriert ist. Es ist intuitiv einsichtig, daß es dann besonders einfach ist, die maximale und die minimale Zählrate zu erhalten, da sich dann relativ wenige Moleküle am „richtigen“ Ort befinden müssen.

Zählratenhistogramme lassen sich einfach messen, indem eine oder mehrere genügend lange Zeitspuren entsprechend ausgewertet werden. Das Zeitintervall T muß so gewählt werden, daß einerseits alle interne Dynamik der Moleküle ausgemittelt ist (*photon antibunching*, Triplett-Zustand), auf der anderen Seite das Molekül aber im Verhältnis zur Fokusgröße keine wesentliche Entfernung durch Diffusion zurücklegt. Die Moleküldetektions-Effizienz $MDE(\mathbf{r})$ wird als innerhalb des Intervalls T konstant angesehen. Je nach Größe der erwarteten Abweichung von der Poisson-Verteilung müssen Artefakte des Zählprozesses wie Totzeit und Nachpulsen des Photomultipliers korrigiert werden [198,191]. Aus dem so gewonnenen Histogramm muß dann die Verteilung der molekularen Helligkeiten ϵ_i ermittelt werden. Für den Fall weniger Spezies (i klein) kann dies durch nichtlineare Kurvenanpassung des Modells aus Gl. 6.10 geschehen. Als Beispiel ist in Abbildung 6.10 die Bestimmung der Konzentration und molekularen Helligkeit einer Mischung aus Coumarin und Rhodamin dargestellt [195]. Durch Verdünnung wurden 4 Proben mit ansonsten gleichen Verhältnissen hergestellt. Daher bleiben die molekularen Helligkeiten ϵ_i konstant und das Verhältnis der Konzentrationen ändert sich nicht. Die



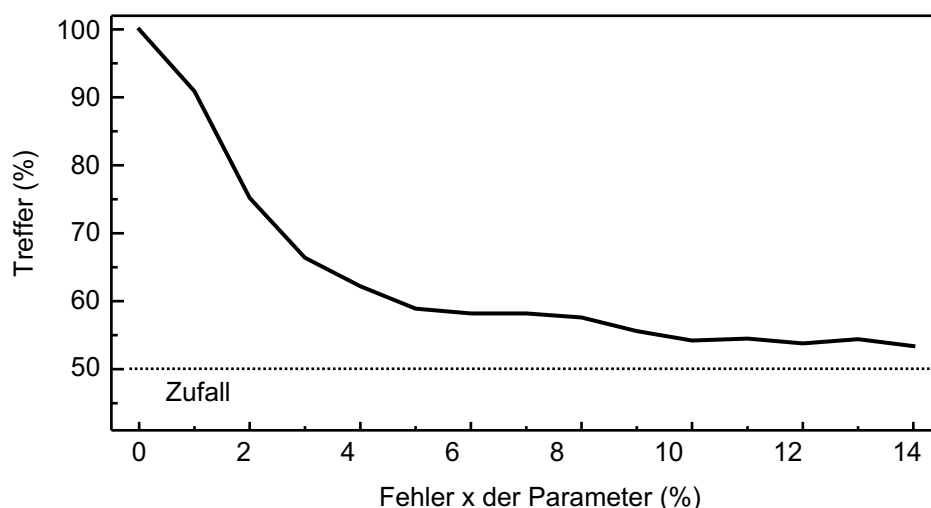


Abbildung 6.11: Simulation eines Experimentes zur Trefferwahrscheinlichkeit, mit der bestimmt werden kann, welchem von zwei *nesting*-Modellen die Beladungsverteilung folgt. Sobald der relative Fehler x der vorher bekannten Parameter größer als 2–3 % wird, kann keine Aussage mehr getroffen werden.

delle eine bessere Beschreibung liefert. Die Meßwerte werden durch Berechnung aus oben genanntem Parametersatz und Addition von Schrotrauschen simuliert. Die Test-Modelle werden unter Verwendung eines zufällig variierenden Parametersatzes erzeugt, welcher aus einer Normalverteilung der Breite x gezogen wird. Dies simuliert die Annahme, daß die Parameter nur bis auf einen relativen Fehler x bekannt sein sollen. Als Treffer wird ein Versuch gewertet, wenn die Abweichung χ^2 des richtigen Modells niedriger ist als die des falschen Modells. Es wird immer abwechselnd eines der beiden Modelle vorgegeben und je Fehler x 1000 Versuche durchgeführt. Abbildung 6.11 zeigt die Ergebnisse. Sobald der relative Fehler x den Wert von 2–3 % übersteigt, ist die Trefferwahrscheinlichkeit nicht wesentlich besser als eine zufällige Wahl. Es kann damit also keine Aussage getroffen werden, durch welches Modell die Messung beschrieben wird. Selbst diese auf ein Minimum reduzierte Fragestellung ist auch unter günstigen Annahmen (Integrationszeit $10^7 \times 1 \text{ ms} > 2 \text{ h}$, große molekulare Helligkeit) nicht zu beantworten.

6.3.2 Fluoreszenz nahe einer Grenzfläche

Sowohl die strahlende Rate k_r als auch die nichtstrahlende Rate k_{nr} eines Moleküls kann durch seine dielektrische Umgebung auf der Längenskala der Wellenlänge des Lichtes beeinflußt werden. Das gezielte Ausnutzen dieses Effekts wird durch J. R. Lakowicz als *radiative decay engineering* (RDE) bezeichnet [201, 202]. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob sich diese Methode für Hämocyanine nutzen läßt. Die relativ langreichweitige Abhängigkeit der Zerfallsraten eines angeregten Moleküls von seiner Umgebung läßt sich auf verschiedene Weisen erklären [107]: quantenmechanisch modifiziert die Umgebung die Modendichte, in die ein Dipol emittieren kann. Im Extremfall könnte die Umgebung so gestaltet werden, daß es nur Moden in Richtung des Mikro-

skopobjektivs gibt, so daß alle emittierten Photonen eingesammelt werden. Eine andere Betrachtungsweise ist die Rückwirkung des abgestrahlten Feldes eines Dipols auf den Dipol selbst. Je nach Phasenbeziehung und Amplitude des z.B. von einer Grenzfläche reflektierten Feldes wird die Dipolemission entweder verstärkt oder unterdrückt.

Im folgenden sollen verschiedene Geometrien betrachtet werden, die eventuell eine verbesserte Einsammeleffizienz oder Photostabilität bewirken. Der verwendete Formalismus beruht auf dem bereits in Abschnitt 2.3.3 benutzten Lorentz'schen Äquivalenzprinzip [109], aus dem gefolgert werden kann, daß die Abstrahlcharakteristik eines Dipols gleich seiner Absorptionscharakteristik ist. Für einen Dipol in einer gewissen Entfernung zu einer oder mehreren dielektrischen Grenzflächen wird berechnet, wie gut er sich durch Strahlung aus einer gegebenen Richtung anregen läßt. Dieses einfallende Feld erfährt dabei in der Regel mehrfache Reflexionen und Transmissionen an den beteiligten Grenzflächen. In Abschnitt 2.3.3 wurde dies bereits mit einer Glas-Wasser-Grenzfläche bei der Bestimmung der Einsammeleffizienz verwendet. Die Erweiterung ist relativ einfach, da sich die Fresnel-Koeffizienten für Reflexion und Transmission an mehreren Schichten rekursiv aus denen für eine Grenzfläche herleiten lassen [109, 103]. Der gesamte Formalismus ist in Ref. [109] gut dargestellt und vom Prinzip her mit dem von J. Enderlein [107, 203] vergleichbar.

Zur Veranschaulichung sollen zunächst zwei einfache Beispiele diskutiert werden. Das Hämocyanin-Molekül mit seinen 148 Tryptophanen wird durch eine isotrope Anordnung von Dipolen beschrieben. Abbildung 6.12A zeigt die strahlende Rate k_r eines solchen Moleküls in Abhängigkeit von seinem Abstand z zu einer Glas-Wasser-Grenzfläche. Die Rate ist so normiert, daß sie den Wert Eins dann annimmt, wenn das Molekül nur von Wasser (Brechungsindex $n_w = 1.33$) umgeben ist. Der Gesamtraum ist auch hier wieder in drei Regionen aufgeteilt: Region I umfaßt den gesamten Wasser-Halbraum mit $n_w = 1.33$. Im Unterschied zu Abschnitt 2.3.3 wird hier die Grenze zwischen den Regionen

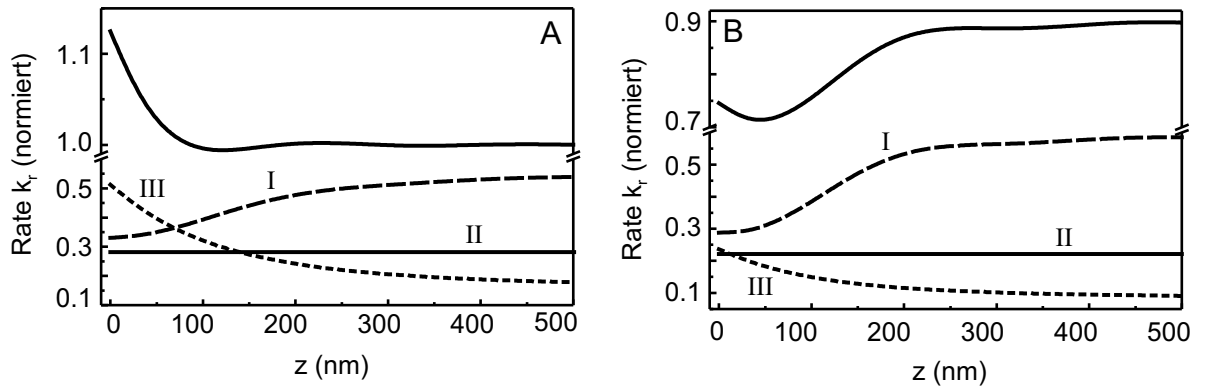


Abbildung 6.12: Abhängigkeit der strahlenden Rate k_r vom Abstand zur Grenzfläche. A: Glas-Wasser-Grenzfläche ($n = 1.5/1.33$) für eine isotrope Anordnung von Dipolen, $\lambda = 335$ nm. Die Gesamtrate k_r (oben) ist aufgeteilt in ihre Anteile in drei Regionen, die im Text definiert sind und sich leicht von denen in Abbildung 2.16 unterscheiden. B: wie A, nur mit einer zusätzlichen Silberschicht ($d = 10$ nm).

II und III im Glas-Halbraum ($n_g = 1.5$) nicht durch den Totalreflexionswinkel sondern durch den maximalen Einsammelwinkel des Objektivs gezogen ($\theta_{\max} = \arcsin(NA/n_g)$, $NA = 1.2$). Alle Photonen in Region II können also detektiert werden. Bei der hier angenommenen numerischen Apertur propagieren in Region III diejenigen Wellen, die als evaneszente Wellen vom Dipol ausgegangen sind. In diesen Bereich werden hauptsächlich dann Photonen abgestrahlt, wenn das Molekül sich nahe an der Grenzfläche befindet. Die strahlende Rate k_r nimmt durch diesen Effekt in der Nähe der Grenzfläche um etwa 10 % zu, die Zahl der detektierbaren Photonen ändert sich bei dieser numerischen Apertur aber nicht. Erst wenn sie größer als der Brechungsindex des Lösemittels wäre, würden auch Teile der evaneszenten Wellen detektiert werden können.

Abbildung 6.12B zeigt den Einfluß einer Metallschicht in der Nähe des Moleküls. Es wurde die gleiche Geometrie wie oben angenommen, nur zusätzlich eine 10 nm starke Silberschicht eingefügt ($n_m = 0.294 + 0.986 i$ bei $\lambda = 335$ nm [204]). In diesen Beispielen ist immer die strahlende Rate angegeben. Dies entspricht Wellen, die bis ins Unendliche propagieren können (auch wenn sie evtl. nicht detektiert werden können). Die nichtstrahlende Rate würde man in diesem Formalismus erhalten, wenn über alle nicht-propagierenden Wellen integriert würde [205]. Für diese Wellen ist eine Komponente des Wellenvektors $\mathbf{k}$ imaginär, so daß für eine andere Komponente $k_j > |\mathbf{k}|$ gilt. Löschung der Fluoreszenz durch Förster-Transfer ins Metall findet in diesem Modell durch virtuelle Photonen, d.h. nicht-propagierende Wellen statt [206]. Dieser Effekt ist aber *nicht* in Abbildung 6.12B enthalten. Das Verhalten der strahlenden Rate k_r in dieser Abbildung läßt sich am besten unter Verwendung des Lorentz'schen Äquivalenzprinzip verstehen. Aus Richtung des Wasser-Halbraums (Region I) lassen sich die Dipole bei großen z besser anregen, wenn die Silberschicht vorhanden ist, da die Reflexion an der Silberschicht größer ist als an der Wasser-Glas-Grenzfläche ist (4 % gegenüber 0.4 % bei senkrechtem Einfall). Aus Richtung des Mikroskopobjektivs (Region II) wird die Anregungswahrscheinlichkeit dagegen geringer, da die Absorption der Silberschicht hinzu kommt. Sie ist unabhängig von der Position z des Moleküls. Anregung über evaneszente Wellen ist ebenfalls ohne die Silberschicht effizienter, solange das Molekül sich nahe genug an der Grenzfläche befindet. Diese Effekte summieren sich zu einer insgesamt geringeren Anregungswahrscheinlichkeit für kleine Abstände z , und damit auch zu einer geringen strahlenden Rate. Selbst bei großem z ist sie kleiner als Eins, da Licht aus Region II immer von der Silberschicht absorbiert wird. Ohne sie strebt die Rate k_r für großes z gegen Eins, wie Abbildung 6.12A zeigt.

Diese beiden Beispiele zeigen, daß eine Variation des Brechungsindex auf der dem Objektiv zugewandten Seite der Probe keinen Einfluß auf die Anzahl detektierbarer Photonen hat, solange die numerische Apertur kleiner als $n_g/n_w = 1.33$ ist. Sobald sie diesen Wert überschreitet, wird es möglich, auch die evaneszenten Wellen einzusammeln. Außerdem ist es möglich, auf der dem Objektiv abgewandten Seite eine Art Spiegel einzurichten, der die dorthin emittierten Photonen ins Objektiv umlenkt. Beides ist im folgenden Beispiel aus Ref. [107] vorgenommen worden. Die in diesem Fall benötigte Metallschicht in der Nähe der Moleküle führt zu einer Erhöhung der nichtstrahlenden Rate k_{nr} und damit zu einer Verringerung der Quanteneffizienz. Wie sich in Kapitel 4.3 aber heraus gestellt hat, ist im Fall von Hämocyanin nicht die geringe Quanteneffizienz η ,

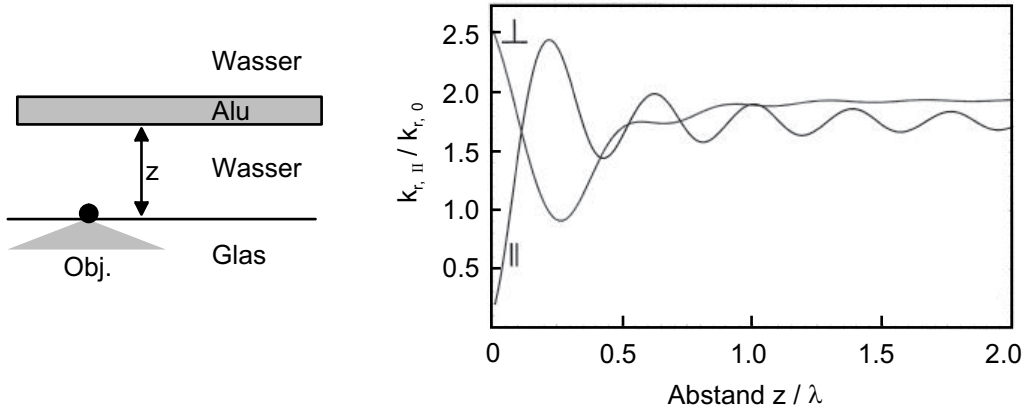


Abbildung 6.13: Verbesserte Einsammeffizienz durch eine reflektierende Grenzfläche (aus [107]). Links ist die Anordnung der Materialien dargestellt. Rechts das Verhältnis in Richtung Objektiv abgestrahlter Photonen $k_{r,II}$ zu den insgesamt, *ohne Metallschicht* emittierten Photonen $k_{r,0}$.

sondern die geringe Photostabilität limitierend. Die Photostabilität hängt aber nicht von der Größe der nichtstrahlenden Rate k_{nr} ab, denn für die mittlere Anzahl $\bar{n}$ emittierter Photonen, bevor der Fluorophor photobleicht, gilt $\bar{n} = \eta/q_b = k_r/k_b$. Zusammen mit der Detektionseffizienz ϕ führt dies zu $\bar{c} = \phi\bar{n}$ detektierten Photonen. Diese Größe läßt sich mit dem oben vorgestellten Formalismus bestimmen [107]:

$$\frac{\bar{n}}{\bar{n}_0} = \frac{k_r}{k_{r,0}} \quad , \quad (6.11)$$

wobei der Index 0 den unveränderten Ausgangszustand bezeichnet. Die Detektionseffizienz ist proportional zur Einsammeffizienz, die sich aus dem Quotient von strahlender Rate in Richtung in Region II $k_{r,II}$ zur gesamten strahlenden Rate k_r ergibt. Daraus folgt

$$\bar{c} = \phi \bar{n} = \frac{k_{r,II}}{k_r} \frac{k_r}{k_{r,0}} \bar{n}_0 = \frac{k_{r,II}}{k_{r,0}} \bar{n}_0 \quad . \quad (6.12)$$

Die Größe $k_{r,II}/k_{r,0}$ ist in Abbildung 6.13 aus Ref. [107] dargestellt. Berechnet wurde sie für den Fall $\lambda = 670$ nm, $NA = 1.4$ sowie einer 20 nm dicken Aluminiumschicht ($n = 1.45 + 7.7i$). Eine isotrope Anordnung von Dipolen erhält man durch Mittelung über senkrecht und parallel zur Oberfläche ausgerichtete Dipole, wenn der parallel ausgerichtete doppelt gewichtet wird. Damit ergibt sich für die (nicht eingezeichnete) Kurve bei isotroper Anordnung ein Maximum bei $z = 0.25\lambda$ mit dem Wert von $k_{r,II}/k_{r,0} \approx 2.0$. Es werden also in dieser Konfiguration doppelt so viele Photonen *eingesammelt* wie in homogener Umgebung ($n=1.33$) *emittiert* worden wären. Ohne die Metallschicht beträgt die Einsammeffizienz etwa 40 % [203], so daß die Effizienz der Detektion um etwa einen Faktor 5 gesteigert werden konnte.

In der von J. Enderlein vorgeschlagenen Anordnung werden die Moleküle vorzugsweise über Totalreflexion an der Metallschicht angeregt. Dabei treten nur evaneszente

Wellen in Richtung Mikroskopobjektiv auf, so daß kein Anregungslicht in das Objektiv zurückreflektiert wird. Diese Art der Anregung ist für Zwei-Photonen-Absorption bisher nur am Beispiel eines guten Farbstoffes gezeigt worden [207]. Wenn allerdings durch das Objektiv angeregt wird, so wird auch das gesamte Anregungslicht wieder in den Detektionsstrahlengang zurück reflektiert. In diesem Fall müßte der Detektionsfilter das Anregungslicht um etwa zwei Größenordnungen besser unterdrücken, um zu mit konventioneller Probengeometrie vergleichbaren Untergrundzählraten zu kommen. Gleichzeitig darf sich die Absorption im Transmissionsbereich des Filters nicht ändern. Dies dürfte den Vorteil der oben dargestellten Anordnung einer reflektierenden Schicht hinter den Molekülen wieder reduzieren, so daß insgesamt bestenfalls eine Steigerung um den Faktor 2–3 möglich zu sein scheint.

Deutlich größere Verstärkungen der Fluoreszenzrate lassen sich in der Nähe von kleinen Metallpartikeln erzielen. Durch die sehr kleinen Radien der Oberfläche – eventuell auch von Unebenheiten der Oberfläche dieser Partikel – erhöht sich die lokale Feldstärke drastisch. Dies führt einerseits zu einer erhöhten lokalen Anregungsintensität und andererseits zu einer erhöhten strahlenden Rate [208]. Der erste Effekt wird z.B. bei der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (*surface enhanced raman spectroscopy*, SERS) verwendet, um die für Raman-Spektroskopie erforderlichen hohen Intensitäten leichter zu erreichen [209]. Mit dieser Methode ist es zum Beispiel möglich, Raman-Spektren einzelner, an zwei Silberpartikeln adsorbierter Hämoglobine aufzunehmen [210]. Der zweite Effekt verläuft analog zu den oben dargestellten Beispielen mit ebenen Oberflächen und ist in Ref. [211] für spheroide Metallpartikel behandelt. Beide Effekte zusammen bewirken, wie z.B. J. R. Lakowicz *et al.* im Fall von DNA auf Silber-Inseln berichten, eine etwa 2000-fach größere Fluoreszenzintensität [208]. Die Autoren schätzen ab, daß mehr als ein Faktor 15 (aber weniger als ein Faktor 2000) auf die Erhöhung der strahlenden Rate zurückzuführen ist. Nur dies ist für die vorgestellten Experimente interessant, da die Anregungsleistung weder durch den Laser noch durch die Untergrundfluoreszenz begrenzt wird. Eine solche Steigerung der Fluoreszenzrate würde die Möglichkeit der Einzelmolekülspektroskopie an Hämocyanin deutlich verbessern. Der Nachteil ist allerdings, daß dann die Fluoreszenzintensität stark vom jeweiligen Ort des Moleküls abhängt. Intensitäten können nicht mehr einfach verglichen werden, da die jeweilige Verstärkung durch Oberflächeneffekte unbekannt ist. Mit diesem Verfahren wäre es dann zwar wahrscheinlich möglich, einzelne Hämocyane abzubilden, eine Verteilung der Beladung ließe sich aber immer noch nicht bestimmen.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von Proteinen nach Zwei-Photonen-Anregung untersucht. Als interessantes Modellsystem wurde das Sauerstofftransportprotein der Vogelspinne *Eurypelma californicum* gewählt. Dieses große Protein besitzt zum einen 148 Tryptophan-Seitenketten, so daß deren geringer Absorptionsquerschnitt kompensiert werden kann. Zum anderen zeigt es kooperatives Bindungsverhalten: Die Affinität der 24 Sauerstoff-Bindungsstellen steigt mit dem Beladungsgrad des Moleküls. Verschiedene Modelle beschreiben mit vergleichbar plausiblen Annahmen das Bindungsverhalten. Für das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* wird aufgrund von verschiedenen Ensemblemessungen in der Literatur ein *nesting*-Modell mit zwei Hierarchieebenen favorisiert. Die Ensemblemessungen erlauben es aber nicht zu entscheiden, wo die Trennlinie zwischen den Hierarchieebenen verläuft. In Kapitel 2.2.3 konnte anhand von Rechnungen für zwei *nesting*-Modelle gezeigt werden, daß Einzelmolekülspektroskopie diese Entscheidung treffen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kommerzielles Lasersystem bestehend aus einem Pumplaser, einem Titan-Saphir-Laser sowie einem optisch-parametrischen Oszillator mit Frequenzverdopplung im Resonator in Betrieb genommen. Dieses Lasersystem ist in der Lage, im gesamten sichtbaren und nahen infraroten Spektralbereich Pulse einer Länge von etwa 150 fs zu liefern. Mit dieser Laserquelle konnten Schwierigkeiten, die bei der direkten Anregung der Tryptophane im Ultraviolett bei 295 nm auftreten, umgangen werden, indem die Zwei-Photonen-Anregung bei einer Wellenlänge von 590 nm eingesetzt wurde. Zur Mikroskopie und Spektroskopie einzelner Hämocyanine wurde ein optisch hochauflösendes Mikroskop entworfen und aufgebaut, das die zeitlich und spektral aufgelöste Detektion von Fluoreszenzlicht im ultravioletten Spektralbereich ermöglicht. Mit Hilfe von zeitaufgelösten Messungen kann zusätzlich der Zerfall angeregter, fluoreszierender Zustände beobachtet sowie die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenz aufgezeichnet werden. Zu Messungen mit hoher räumlicher Auflösung kann die Probe auf einem Piezoverschiebetisch in drei Raumrichtungen durch den Fokus gefahren werden. Bei allen Messungen ist es möglich, den Sauerstoffpartialdruck in der Probe durch Spülen mit verschiedenen Gasen zu kontrollieren. Der gesamte experimentelle Aufbau bestehend aus Lasersystem, Mikroskop und computergesteuerter Datenerfassung ist so flexibel gestaltet, daß neben den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen mit Zwei-Photonen-Anregungen auch solche mit konventioneller Ein-Photonen-Anregung im sichtbaren Spektralbereich möglich sind.

Alle bisher an Hämocyaninen durchgeführten optischen Experimente beruhten auf der konventionellen Ein-Photonen-Anregung. In einem ersten Schritt mußte daher überprüft werden, ob die Zwei-Photonen-Anregung zu anderen Ergebnissen führt. Anhand von En-

seblemessungen wurde gezeigt, daß die Fluoreszenzeigenschaften von Tryptophan nicht von der Natur des Anregungsprozesses abhängen. Die Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren ändern sich nicht beim Übergang von Ein- auf Zwei-Photonen-Anregung. Weiterhin wurde gefunden, daß auch die Löschung der Tryptophanfluoreszenz in Hämocyanin durch Förster-Transfer in die Absorptionsbande des beladenen Bindungszentrums von der Anregungsart unabhängig ist. Somit kann die Sauerstoffbeladung verläßlich durch die Tryptophanfluoreszenz nach Zwei-Photonen-Anregung bestimmt werden.

Überraschend hat sich jedoch gezeigt, daß der zu erwartende Zusammenhang zwischen Sauerstoffbeladung und Fluoreszenzintensität nur bei niedrigen Anregungsintensitäten gilt. Bei höheren Anregungsintensitäten wurde ein stärker als quadratischer Anstieg der Fluoreszenzzählrate bei intensitätsabhängigen Messungen von oxygeniertem, also beladenem Hämocyanin gefunden. Als Ursache dafür konnte die Ein-Photonen-Anregung des beladenen Sauerstoffbindungszentrum identifiziert werden, die bei der zur Zwei-Photonen-Anregung der Tryptophane verwendeten Wellenlänge ebenfalls möglich ist. Der angeregte Zustand des Bindungszentrums löscht dann die Tryptophanfluoreszenz nicht mehr, so daß das Protein „heller“ erscheint. Es konnte gleichzeitig gezeigt werden, daß der gebundene Sauerstoff mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit aus dem angeregten Zustand des Bindungszentrums abgegeben wird. Intensitätsabhängige Sauerstoffbindungskurven von dissoziiertem Hämocyanin ließen sich durch ein im Rahmen dieser Arbeit aufgestelltes Modell beschreiben. Es ergab sich eine lichtinduzierte Dissoziationsrate aus dem angeregten Zustand von etwa 2000 sec^{-1} verglichen mit einer spontanen Dissoziationsrate aus dem Grundzustand von 10 sec^{-1} . Der Effekt wird nur dann sichtbar, wenn der angeregte Zustand des Bindungszentrums deutlich populiert wird. Dies geschieht wegen des geringen Absorptionsquerschnitts des Übergangs erst bei den hohen für die Zwei-Photonen-Anregung notwendigen Intensitäten.

Die lichtinduzierte Sauerstoffabgabe wurde verwendet, um von außen in das Sauerstoffbindungsgleichgewicht einzugreifen und die Reaktion des Proteins auf die Auslenkung aus dem Gleichgewichtszustand zu beobachten. In dem zur Beschreibung des Bindungsverhaltens der Hämocyanine benutzten konzertierten MWC-Modell wird die kooperative Sauerstoffbindung als Gleichgewicht zwischen zwei Konformationen des Moleküls dargestellt, wobei die Bindungszentren innerhalb einer Konformation als unabhängig angesehen werden. An die intensitätsabhängigen Sauerstoffbindungskurven von kooperativem, 24-merem Hämocyanin wurden zwei verschiedene Modelle angepaßt. Das eine geht davon aus, daß die lichtinduzierte Auslenkung der Sauerstoffbeladung aus dem Gleichgewichtszustand nur die Beladung aber nicht die Konformation beeinflusst. Im zweiten Modell folgt die Konformation zu jedem Zeitpunkt der Beladung, wie es bei einer Veränderung des Gleichgewichtszustandes beispielsweise durch Variation des Sauerstoffpartialdrucks der Fall wäre. Die Messungen werden deutlich besser durch das erste Modell beschrieben als durch das zweite. Als mögliche Erklärung bietet sich an, daß die Rückbindung des Sauerstoffs schneller erfolgt als der Konformationswechsel. Dadurch ist das Sauerstoffmolekül im Mittel einige Zeit nicht gebunden, die Fluoreszenzintensität steigt, aber ein Konformationswechsel findet nicht oder nur selten statt. Mit diesen Messungen war es also möglich, den ansonsten nur schwer zugänglichen dynamischen Zusammenhang zwischen Sauerstoffbindung und Konformationswechsel in kooperativen Proteinen zu

untersuchen.

Die Photostabilität von Tryptophan in Pufferlösung und in verschiedenen Proteinen konnte durch Auswertung der Intensitätsabhängigkeit der Fluoreszenz einer Ensembleprobe quantifiziert werden. Dabei stellte sich heraus, daß je nach Umgebung die Bleich-Quanteneffizienz von Tryptophan nur um den Faktor 2–4 unter der Fluoreszenzquanteneffizienz liegt. Damit ist offensichtlich, daß einzelne Tryptophanmoleküle oder Proteine mit nur wenigen Tryptophan-Seitenketten nicht mit optischen Einzelmolekültechniken nachgewiesen werden können, da nur 2–4 Photonen pro Tryptophan emittiert werden. Aufgrund der limitierten Detektionseffizienz können von diesen Photonen dann nur 0.65 % registriert werden. Im Falle des Hämocyanins mit 148 Tryptophan-Seitenketten ergaben sich durchschnittlich 3 detektierte Photonen pro Molekül. Gängige Farbstoffe wie TMR oder Cy5 erreichen Werte von etwa 10^3 – 10^4 detektierten Photonen pro Molekül. Zum Vergleich durchgeführte Messungen mit Drei-Photonen-Anregung der Tryptophane zeigten, daß in diesem Fall die Photostabilität noch geringer ist. Der in der Literatur diskutierte Weg der lichtinduzierten Radikalbildung scheint für die geringe Photostabilität verantwortlich zu sein. Einzig bei mit dem Protein NeutrAvidin beschichteten Latexkugeln ist die Photostabilität des Tryptophans um einen Faktor 40–50 größer. Zusammen mit der größeren Anzahl an Tryptophanen pro Latexteilchen (340) können etwa 341 Photonen pro Latexteilchen detektiert werden. Wie es zu dieser höheren Photostabilität kommt, kann momentan nicht befriedigend erklärt werden. Das Emissionsspektrum von NeutrAvidin gebunden an Latexkugeln deutet keine Veränderung der Umgebung der Tryptophane gegenüber ungebundenen Proteinen an.

Die Diffusion von einzelnen Hämocyaninen durch den Fokus des Mikroskopobjektivs konnte nach Zwei-Photonen-Anregung der Tryptophane nachgewiesen werden. Trotz durchschnittlich nur 3 detektierten Photonen pro Protein konnte mit der statistischen Methode der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie eine Korrelation im Photonenstrom gefunden werden, die es ermöglicht, aus dem Zerfall der Korrelationsfunktion einen Diffusionskoeffizienten von $D = (2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ zu bestimmen. Zum Vergleich wurde das Hämocyanin mit einem Farbstoff markiert und dieser über einen Ein-Photonen-Prozeß angeregt. Der so ermittelte und der zusätzlich aus dem Sedimentationskoeffizienten berechnete Diffusionskoeffizient stimmen beide mit dem durch Zwei-Photonen-Anregung gemessenen Wert im Rahmen der Meßgenauigkeit überein. Damit ist es zum ersten Mal gelungen, die Diffusion einzelner Proteine mit Hilfe ihrer intrinsischen Tryptophanfluoreszenz zu beobachten.

Es war nicht möglich, einzelne Hämocyanine abzubilden, da wegen der geringen Photostabilität nicht genügend Photonen eines Proteins detektiert werden konnten. Anhand von NeutrAvidin-markierten Latexkugeln konnte aber demonstriert werden, daß die Zahl der detektierten Photonen ausreichen würde, um einzelne Teilchen abzubilden, wenn in einer geeigneten Umgebung die Photostabilität der Tryptophane hoch genug ist. Die markierten Latexkugeln besitzen als künstliche „Moleküle“ 340 Tryptophan-Seitenketten, die wie oben erwähnt eine höhere Photostabilität aufweisen.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob eine zur Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie komplementäre statistische Auswertung der Fluktuationen der Fluoreszenzzahlrate (*pulse counting histogram*, PCH) eine Verteilung molekularer Helligkeiten

liefern kann. Diese Verteilung ist verknüpft mit der Beladungsverteilung der Proteine und sollte so Informationen über die kooperative Sauerstoffbindung beinhalten. Die Aufenthaltsdauer im Fokus und damit die Anforderungen an die Photostabilität sind hier mit der erfolgreich angewandten Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie vergleichbar. Es stellt sich allerdings heraus, daß die zur Unterscheidung konkurrierender Modelle geforderte Auflösung der Helligkeitsabstufungen bei den gegebenen Randbedingungen nicht erreicht werden kann. Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Ergebnisse zur molekularen Kooperativität auf Einzelmolekülebene gewonnen werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann gefolgert werden, daß sich Tryptophanfluoreszenz in zwei Grenzfällen zur Spektroskopie einzelner Moleküle mit einer großen Anzahl Tryptophan-Seitenketten eignet: Wenn entweder die lokale Umgebung die Photostabilität des Fluorophores deutlich erhöht, wie es bei den NeutrAvidin-markierten Latexkugeln der Fall ist, oder wenn die Fragestellung an die geringe Zahl der detektierbaren Photonen angepaßt werden kann. Für weitere Arbeiten ist es daher wichtig herauszufinden, wodurch die erhöhte Photostabilität im Fall der Latexkugeln bewirkt wird und ob dieser Effekt systematisch ausgenutzt werden kann. Dann könnte entweder gezielt nach Proteinen gesucht werden, die den Tryptophanen eine entsprechende Umgebung bieten, oder es könnten zu stabilisierende Proteine an Latexkugeln geheftet werden.

Weiterführende Arbeiten zur lichtinduzierten Sauerstoffabgabe sind sowohl im theoretischen als auch im experimentellen Bereich möglich. Von Seiten der Modellbildung bietet es sich an, die stark von der Struktur der Gleichungen motivierte Unterscheidung zwischen den Modellen mit erlaubtem bzw. verbotenen Konformationswechsel auf eine mikroskopische Basis zu stellen. Der in Kapitel 5.2.4 eingeführte Zwischenzustand X kann in ein detailliertes Ratenmodell eingefügt werden, das dann ebenfalls die gemessenen Bindungskurven wiedergeben muß. So ließe sich die in dieser Arbeit erfolgte Interpretation der beiden Modelle überprüfen. Auf experimenteller Seite ist es interessant, die zeitliche Dynamik der Sauerstoffrückbindung genauer zu verfolgen. In einem Pump-Abfrage-Experiment könnte im Fokus des Objektivs ein Nichtgleichgewichtszustand hergestellt werden, dessen Relaxation dann verfolgt wird. Wenn das beobachtete Signal die Fluoreszenz der Tryptophane ist, so ist die Rückbindungsdynamik allerdings mit dem Zerfall der Fluoreszenz überlagert. Die Änderung eines Absorptionssignals hingegen wird wegen des geringen Fokalvolumens äußerst schwach ausfallen.

Ein Teil dieser Arbeit (Kapitel 4.3 und 6) ist bereits in einer Fachzeitschrift erschienen [212]; die Veröffentlichung eines weiteren Teils (Kapitel 5) ist in Vorbereitung. Eine Übersicht der Konferenzbeiträge in Form von Vorträgen und Postern findet sich im Anschluß an das Literaturverzeichnis.

A Anhang

A.1 IDL Prozeduren zur Monte Carlo Simulation der Diffusion

Die Prozedur *amRand* generiert für die Moleküle neue Positionen, die sich am Rand des Simulationsvolumens befinden (durch *index* übergeben). Diese befinden sich wieder am Rand des Volumens, da neue Moleküle nur von dort eindiffundieren dürfen.

```
24 pro amRand, index, grenze
25 common global_seed
26 common pos
27   anz = n_elements(index)
28
29   ; neue Position mitten im Raum
30   posx[index] = (Randomu(seed, anz) - 0.5) * (2 * grenze[0])
31   posy[index] = (Randomu(seed, anz) - 0.5) * (2 * grenze[1])
32   posz[index] = (Randomu(seed, anz) - 0.5) * (2 * grenze[2])
33
34   ; eine Achse wird auf eine Wand gesetzt
35   achse = fix(randomu(seed, anz) * 3)
36   vz = fix(randomu(seed, anz) * 2) * 2 - 1
37   for i = 0L,anz - 1 do begin
38     case achse[i] of
39       0: posx[index[i]] = vz[i] * grenze[0]
40       1: posy[index[i]] = vz[i] * grenze[1]
41       2: posz[index[i]] = vz[i] * grenze[2]
42     else: posx[index[i]] = vz[i] * grenze[0]
43     endcase
44   end
45 end
```

Die Prozedur *bewegung* bewegt alle Moleküle einen Zeitschritt. Die Geschwindigkeit ist als mittlere Verschiebung $\sigma^2 = \langle (\Delta \mathbf{r})^2 \rangle$ gegeben. Der Diffusionskoeffizient D ist dann $D = \sigma^2 / (6t)$. [213]

```
51 pro bewegung, grenze, deltax
52 common global_seed
53 common pos
54   anz = n_elements(posx)
55   deltax = deltax / sqrt(3)
```

```
56
57     posx = posx + randomn(seed, anz) * deltax
58     posy = posy + randomn(seed, anz) * deltax
59     posz = posz + randomn(seed, anz) * deltax
60
61     ; Test, ob Molekuel ausserhalb der Grenzen
62     index = where((abs(posx) gt grenze[0]) $
63                 or (abs(posy) gt grenze[1]) $
64                 or (abs(posz) gt grenze [2]), count)
65     if (count gt 0) then amRand, index, grenze
66 end
```

In der eigentlichen Simulationsschleife wird in jedem Zeitschritt der Wert der MDE(**r**) berechnet (Prozedur *psf*) und aufsummiert. Aus der Zeitspur wird dann die Autokorrelation ermittelt und entsprechend Abschnitt 2.3.5 normiert.

```
73 pro psf, fokus, hell
74 common pos
75     w0 = fokus[0]
76     lambda = fokus[1]
77     Pi = !dpi
78
79     omega2 = w0^2 * ( 1. + (posz / ( Pi * w0^2 / lambda))^2 )
80     hell = w0^4 / ( omega2^2 ) * exp( - 4. * (posx^2 + posy^2) / omega2)
81 end

84 pro simula, runden, trace
85     grenze = [2., 2. , 10.]
86     fokus = [0.43, 0.58]
87
88     volumen = grenze[0] * grenze[1] * grenze [2] * 8
89     neue_molekuele, 5. * volumen, grenze
90     trace = ftarr (runden)
91
92     for k = 0L,runden -1 do begin
93         bewegung, grenze, 0.04 ; sigma in Mikrometer
94         psf, fokus, hell
95         trace[k] = total ( hell )
96     end
97
98     lag = 10^(findgen(48)/10)
99     ac = a_correlate(trace, lag, /covariance) / total(trace)^2
100     plot, lag, ac, /xlog
101 end
```


A.2 Sellmeier-Koeffizienten und Tuning-Kurve des KTA-OPOs

Die Wellenlängenabhängigkeit des Brechungsindex läßt sich in guter Näherung durch eine Variante der Sellmeier-Gleichung beschreiben [127]:

$$n(\lambda)^2 = A + \frac{B \lambda^2}{\lambda^2 - C^2} - D \lambda^2 \quad . \quad (\text{A.1})$$

Der nichtlineare Kristall KTA ist biaxial. Er besitzt zwei ausgezeichnete optische Achsen. Der Brechungsindex wird darum entlang der Achsen x , y und z angegeben. Die Wellenlänge muß in Mikrometern eingesetzt werden [214].

Achse	A	B	C	D
x	1.90713	1.23522	0.19692	0.01025
y	2.15912	1.00099	0.21844	0.01096
z	2.14786	1.29559	0.22719	0.01436

Für eine beliebige Richtung $\mathbf{s} = (s_x, s_y, s_z)$ mit $|\mathbf{s}| = 1$ läßt sich der Brechungsindex für ordentliche n_o und außerordentliche Polarisation n_{eo} als Lösung der Fresnel'schen Gleichung [127] berechnen:

$$\frac{s_x^2}{\frac{1}{n(s)^2} - \frac{1}{n_x^2}} + \frac{s_y^2}{\frac{1}{n(s)^2} - \frac{1}{n_y^2}} + \frac{s_z^2}{\frac{1}{n(s)^2} - \frac{1}{n_z^2}} = 0 \quad . \quad (\text{A.2})$$

Der Kristall im verwendeten optisch-parametrischen Oszillator ist so geschnitten, daß $\mathbf{s} = (0, 1, 0)$. Der Zusammenhang zwischen Pumpwellenlänge λ_P und Signal-Wellenlänge λ_S ergibt sich dann aus der Lösung der Gleichung zur Impulserhaltung:

$$\frac{n_o}{\lambda_P} = \frac{n_o}{\lambda_S} + \frac{n_{eo}}{(1/\lambda_P - 1/\lambda_S)^{-1}} \quad . \quad (\text{A.3})$$

A.3 IDL Prozeduren zum Fitten der Bindungskurven

A.3.1 Dissoziat

Die Funktion *bindung* entspricht Gleichung 5.6 und erwartet die Parameter Sauerstoffpartialdruck x , Partialdruck bei Halbsättigung $p_{50} = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$, lichtinduzierte Dissoziationsrate k_3 und relative Konzentration des angeregten Zustandes α .

```

12 function bindung, x, p50, k3, diff, alpha
13
14     kon = 2 ; 1 / Torr sec
15     koff = kon * p50 ; p50 = 1 / kgg
16
```

```

17     return , 1. / ( (( koff / (kon * x) ) + 1.) * $
18                 (1. + alpha * (k3 + (diff + kon * x) ) / (koff + diff + kon * x)))
19     end

```

Die Funktion *bindung2* bildet Gleichung A.4 nach und erwartet dieselben Parameter wie *bindung*.

```

25     function bindung2, x, p50, diff, alpha
26
27     kon = 2           ; 1 / Torr sec
28     koff = kon * p50 ; p50 = 1 / kgg
29
30     return, 1. / ( ((koff / (kon * x)) + 1.) * ( 1 + alpha / ( koff + diff + kon * x)))
31     end

```

Jenachdem welches Modell an die Daten angepaßt werden soll, wird entweder *bindung* oder *bindung2* in der Funktion *model* aktiviert. Sie berechnet die Fluoreszenzzählrate und verlangt als Parameter den Sauerstoffpartialdruck x , ein zweidimensionales Feld y , das neben der gemessenen Fluoreszenzzählrate u.a. auch die Anregungsleistung beinhaltet, sowie ein Feld p , das alle benötigten Parameter des Modells zur Verfügung stellt.

```

41     function model, x, y, p
42     common global ; liefert "intensitaet" = gemittelt ueber Kurve
43
44     p50 = p[0]
45     k3 = p[1]
46     diff = p[2]
47     amp1 = p[3]
48     amp2 = p[4]
49     hub = p[5]
50     alpha = p[6]
51     offs = p[7]
52
53     ; 0.3 / 1 / 2      ** erster Tag
54     ; 0.6 / 1.3 / 1.6 ** zweiter Tag
55     amp = [amp1, amp2, amp1, amp2, amp2, amp1] ; ** jeder Tag eigene Amplitude
56
57     flag = transpose(y[1,*])
58     intensi = transpose(y[3,*])
59
60     theta = bindung(x, p50, k3, diff, intensi * alpha);
61     ; theta = bindung2(x, p50, diff, intensi * alpha);
62
63     return, offs + amp[flag] * ( intensitaet [ flag ] )^2 * (1.* theta + hub * (1.-theta))
64     end

```

Schließlich wird in der Funktion *bindungfit* die gewichtete Differenz zwischen Daten und Modell gebildet. Dabei liefert die Funktion *test_intensi* die Abweichung zur leistungsabhängigen Kurve in Datensatz B.

```

73 function bindungfit, p, dp, X=x, Y=y, ERR=err
74
75     return, [transpose(( y [0,*] - model(x,y,p))/y [2,*]), $
76             transpose( test_intensi (p) ) * 100.]
77 end

```

Die Summe der Quadrate dieser Differenzen wird dann mit Hilfe des Levenberg-Marquardt Algorithmus in der Implementierung von C. Markwart (*MPFit* [184]) minimiert.

A.3.2 24-meres Hämocyanin

Die Funktion *monomer* berechnet nach Gl. 5.6 den Anteil Θ' der beladenen Bindungsstellen im Grundzustand. Parameter sind der Sauerstoffpartialdruck x , die Gleichgewichtskonstante κ der jeweiligen Konformation, sowie wie üblich k_3 , k_{diff} und α .

```

11 function monomer, x, kgg, k3, diff , alpha
12
13     kon = 5                ; Einheit: 1/ Torr * sec
14     koff = kon / kgg;     ; kgg = 1 / p50 !!
15
16     return, 1. / ((( koff / (kon * x)) + 1.) * $
17             (1.+ alpha * (k3 +diff + kon * x)/(koff + diff + kon * x)))
18 end

```

Ebenso wird der relative Anteil α_R des R-Zustandes berechnet.

```

27 function alpha_R, x, kr, kt , lo
28
29     return, 1. / ( 1. + lo * (( 1. + kt * x)/(1. + kr * x))^12.)
30 end

```

Für Modell 2 muß der Anteil Θ der belegten Bindungsstellen (angeregt oder nicht) nach Gl. 5.16 bestimmt werden. Dies erledigt die Funktion *beladung*.

```

39 function beladung, x, kgg, k3, kdiff , alpha
40 ; beladung = (ox + oxex) / (ox + oxex + dx)
41
42     k2 = 5                ; kon Einheit: 1/ Torr * sec
43     k1 = k2 / kgg ; koff
44     k = alpha * (k3 + kdiff)
45
46     return,      (k2 * (k + k3 + kdiff) * x * (k1 + kdiff + k2 * x)) / $
47             ((k1 + k2 * x) * ((k3 + kdiff)* (k1 + kdiff + k2* x) + k* (k3 + kdiff + k2 * x)))
48 end

```

Daraus wird nun mit Hilfe effektiver Gleichgewichtskonstanten eine effektive Verteilung der Konformationen $\alpha_{R,\text{eff}}$ berechnet.

```

61 function alpha_Reff, x, kr, kt , lo , k3r, k3t, diff , inten
62

```

```
63     beladr = beladung( x, kr, k3r, diff , inten);           ; (ox + oxe) / alles
64     beladt = beladung( x, kt, k3t, diff , inten);
65
66     kapprx = beladr / ( 1. - beladr)
67     kapptx = beladt / ( 1. - beladt)
68
69     return, 1. / ( 1. + lo * ((1. + kapptx)/(1. + kapprx))^12.)
70 end
```

Analog zu den Dissoziat-Bindungskurven im letzten Abschnitt berechnet die Funktion *model* daraus die Fluoreszenzzählrate.

```
79 function model, x, y, p
80 common global
81
82     kr = p[0]
83     kt = p[1]
84     lo = p[2]
85     k3 = p[3]
86     diff = p[5]
87     alpha = p[6] / p[3]    ; p[6] = alpha * k3
88
89     amp = p[7]
90     hub = p[8]
91     offs = p[9]
92
93     k3t = k3
94     k3r = k3
95     flag = transpose(y[1,*])
96     intensi = transpose(y[3,*])
97
98     thetar = monomer( x, kr, k3r, diff , intensi * alpha);
99     thetat = monomer( x, kt, k3t, diff , intensi * alpha);
100
101     ; alpha_r != f(Intensitaet)
102     ; mischung = alpha_R(x, kr, kt, lo)
103
104     ; alpha_r = f(Intensitaet)
105     mischung = alpha_Reff(x, kr, kt, lo, k3r, k3t, diff , intensi * alpha)
106
107     theta = mischung * thetar + (1. - mischung) * thetat
108
109     return, offs + amp * intensitaet[flag]^2 * (1. * theta + hub * (1. - theta))
110 end
```

Die Funktion *bindungfit* bildet schließlich die gewichtete Abweichung zwischen Modell und Daten.

```
119 function bindungfit, p, dp, X=x, Y=y, ERR=err
```

```

120
121     return, transpose( ( y[0,*] - model(x,y,p)) / y[2,*])
122
123 end

```

A.4 Alternatives Modells zur Sauerstoffbindung von dissoziiertem Hämocyanin

Es soll untersucht werden, ob die Populierung des angeregten Zustandes O_x^* notwendig ist, um die Abhängigkeit der Bindungskurven von der Anregungsleistung zu erklären. Es könnte auch möglich sein, daß der angeregte Zustand nur ein kurzlebiger Zwischenzustand ist, dessen Konzentration vernachlässigbar sein könnte. Er würde bei lichtinduzierter Sauerstoffabgabe durchlaufen, aber nie nennenswert populierte. Diese Annahme wird durch die kurze Lebenszeit (1 ps [84]) des höherenergetischen Zustands CT1 motiviert. Dazu kommt ein modifiziertes Modell zum Einsatz, in dem sich die Dissoziationsrate k_{off} vom oxygenierten Grundzustand in den deoxygenierten Zustand aus einem konstanten Anteil $k_{\text{off},0}$ und einem laserleistungsabhängigen Anteil κP zusammensetzt. Dadurch bleibt die aus den Ein-Photonen-Messungen gewohnte Kurvenform erhalten, nur der Halbsättigungs-Partialdruck p_{50} ist intensitätsabhängig. Dieses Modell ist in Abbildung A.1 dargestellt.

Das gleiche Vorgehen, das zu Gleichung 5.6 geführt hat, liefert nun die folgende Gleichung für die mittlere Beladung Θ :

$$\begin{aligned}
 \Theta &= \frac{[O_x]}{[O_x] + [D_x]} \\
 &= \left[\left(\frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}} [O_2]} + 1 \right) \left(1 + \frac{\kappa P}{k_{\text{off}} + k_{\text{diff}} + k_{\text{on}} [O_2]} \right) \right]^{-1}.
 \end{aligned} \tag{A.4}$$

In Tabelle A.1 ist das Ergebnis der Anpassung an die Daten dargestellt, hier nur für Datensatz B unter Verwendung der leistungsabhängigen Fluoreszenzdaten. Die Voraussetzungen sind also gleich denen bei Fit Nr. 4. Abbildung A.2 zeigt die dazugehörigen Kurven. Sowohl der Halbsättigungspartialdruck p_{50} als auch die Diffusionsrate k_{diff} sind

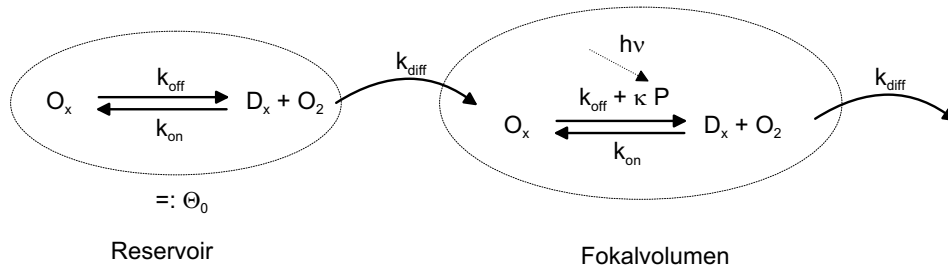


Abbildung A.1: Modell zur Beschreibung der Bindungskurven, das keine Populierung des angeregten Zustandes O_x^* voraussetzt.

Fit	Satz B	
	4	6
p_{50} (Torr)	5.6 ± 0.2	13.9 ± 0.6
k_3 (sec ⁻¹)	2080 ± 205	–
k_{diff} (sec ⁻¹)	96 ± 7	476 ± 93
A_1	240 ± 2	265 ± 5
A_2	306 ± 3	302 ± 6
Kontrast	6.7 ± 0.05	5.7 ± 0.1
α_0 (W ⁻¹)	22 ± 1	–
κ (mW ⁻¹ sec ⁻¹)	–	65 ± 6
χ^2	7.5	34.2

Tabelle A.1: Ergebnis der Anpassung an die Daten. Fit Nr. 6 liegt ein Modell zugrunde, das keine Populierung des angeregten Zustandes O_x^* voraussetzt. Fit Nr. 4 ist zum Vergleich aus Tabelle 5.2 übernommen und wurde unter den gleichen Annahmen wie Fit Nr. 6 gestartet (alle Parameter frei, leistungsabh. Daten eingeschlossen).

etwas zu hoch. Die Abweichung ist allerdings nicht so groß wie bei Fit Nr. 2 und 5. Der χ^2 -Wert ist aber der höchste aller hier vorgestellten Fits. Abbildung A.2 zeigt die Ursache: Das Modell gibt den Verlauf der Daten wieder, stimmt aber – insbesondere bei höheren Anregungsleistungen – in den absoluten Werten nicht überein. Dadurch wird die Abweichung zum Modell größer als in allen anderen Fällen. Dies bedeutet, daß das redu-

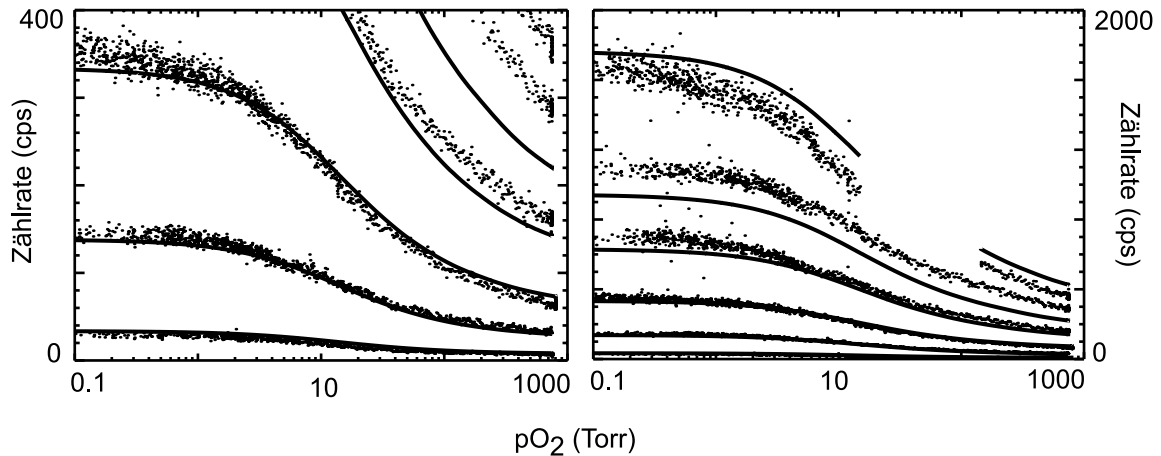


Abbildung A.2: Daten und Modell unter der Annahme, daß die Populierung des angeregten Zustandes O_x^* vernachlässigt werden kann (Fit Nr. 6). Der linke Teil der Abbildung ist eine Ausschnittsvergrößerungen des rechten. Der Verlauf der Meßwerte wird gut wiedergegeben, allerdings nicht ihre absolute Lage. Die beiden oberen Kurven im rechten Teil sind an unterschiedlichen Tagen gemessen worden und werden darum durch unterschiedliche Amplitudenparameter beschrieben.

zierte Modell zwar den Effekt richtig wiedergeben kann – Sauerstoff wird lichtinduziert abgegeben – allerdings spielt bei den Bindungskurven die Populierung des angeregten Zustandes O_x^* eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Bindungszentren in diesem Zustand erhöhen die Fluoreszenzzählrate, nehmen aber am Bindungsgleichgewicht zwischen den beiden Grundzuständen nicht teil.

Literaturverzeichnis

- [1] AMELINCKX, S. und J. V. LANDUYT: *Transmission Electron Microscopy*. In: MEYERS, R. A. (Hrsg.): *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, Band 17. Academic Press, 3. Aufl., 2002.
- [2] BINNIG, G., H. ROHRER und C. GERBER: *Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy*. Phys. Rev. Lett., 49:57–60, 1982.
- [3] POHL, D. W., W. DENK und M. LANZ: *Optical Stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda / 20$* . Appl. Phys. Lett., 44(7):651–653, 1984.
- [4] LEWIS, A., M. ISAACSON, A. HAROOTUNIAN und A. MURRAY: *Development of a 500 Å resolution light microscope*. Ultramicroscopy, 12:227–232, 1984.
- [5] BINNIG, G., C. F. QUATE und C. GERBER: *Atomic Force Microscope*. Phys. Rev. Lett., 56:930–933, 1986.
- [6] NEUHAUSER, W., M. HOGENSTATT, P. E. TOSCHEK und H. DEHMELT: *Localized visible Ba^+ mono-ion oscillator*. Phys. Rev. A, 22(3):1137–1140, 1980.
- [7] ITANO, W. M., J. C. BERGQUIST und D. J. WINELAND: *Laser Spectroscopy of Trapped Atomic Ions*. Science, 237:612–615, 1987.
- [8] MOERNER, W. E. und L. KADOR: *Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid*. Phys. Rev. Lett., 62(21):2535–2538, 1989.
- [9] ORRIT, M. und J. BERNARD: *Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a p-Terphenyl Crystal*. Phys. Rev. Lett., 65(21):2716–2719, 1990.
- [10] SHERA, E. B., N. K. SEITZINGER, L. M. DAVIES, R. A. KELLER und S. A. SOPER: *Detection of single fluorescent molecules*. Chem. Phys. Lett., 174:553–557, 1990.
- [11] NGUYEN, C., R. A. KELLER, J. H. JETT und J. C. MARTIN: *Detection of single molecules of phycoerythrin in hydrodynamically focused flows by laser-induced fluorescence*. Anal. Chem., 59:2158–2161, 1987.
- [12] PECK, K., L. STRYER, A. N. GLAZER und R. A. MATHIES: *Single-molecule fluorescence detection: Autocorrelation criterion and experimental realization with phycoerythrin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:4087–4091, 1989.

-
- [13] BETZIG, E. und R. J. CHICHESTER: *Single Molecules Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy*. Science, 262:1422–1425, 1993.
- [14] FUNATSU, T., Y. HARADA, M. TOKUNAGA, K. SAITO und T. YANAGIDA: *Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution*. Nature, 374(6522):555–559, 1995.
- [15] MACKLIN, J. J., J. K. TRAUTMAN, T. D. HARRIS und L. E. BRUS: *Imaging and time-resolved spectroscopy of single molecules at an interface*. Science, 272(5259):255–258, 1996.
- [16] BASCHÉ, T., W. E. MOERNER, M. ORRIT und U. P. WILD (Hrsg.): *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*. VCH, Weinheim, 1997.
- [17] WEISS, S.: *Fluorescence spectroscopy of single biomolecules*. Science, 283(5408):1676–1683, 1999.
- [18] TAMARAT, P., A. MAALI, B. LOUNIS und M. ORRIT: *Ten years of single-molecule spectroscopy*. J. Phys. Chem. A, 104(1):1–16, 2000.
- [19] AMBROSE, W. P., P. M. GOODWIN, J. H. JETT, A. V. ORDEN, J. H. WERNER und R. A. KELLER: *Single molecule fluorescence spectroscopy at ambient temperature*. Chem. Rev., 99(10):2929–2956, 1999.
- [20] RIGLER, R. und E. S. ELSON (Hrsg.): *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Application*. Springer, 2001.
- [21] BASCHÉ, T., W. E. MOERNER, M. ORRIT und H. TALON: *Photon Antibunching in the Fluorescence of a Single Dye Molecule Trapped in a Solid*. Phys. Rev. Lett., 69(10):1516–1519, 1992.
- [22] BASCHÉ, T., S. KUMMER und C. BRÄUCHLE: *Direct Spectroscopic Observation Of Quantum Jumps Of A Single- Molecule*. Nature, 373(6510):132–134, 1995.
- [23] BERNARD, J., L. FLEURY, H. TALON und M. ORRIT: *Photon bunching in the fluorescence from single molecules: A probe for intersystem crossing*. J. Chem. Phys., 98(2):850–859, 1993.
- [24] TAMARAT, P., B. LOUNIS, J. BERNARD, M. ORRIT, S. KUMMER, R. KETTNER, S. MAIS und T. BASCHÉ: *Pump-Probe Experiments with a Single Molecule: ac-Stark Effect and Nonlinear Optical Response*. Phys. Rev. Lett., 75(8):1514–1517, 1995.
- [25] BASCHÉ, T., W. P. AMBROSE und W. E. MOERNER: *Optical spectra and kinetics of single impurity molecules in a polymer: spectral diffusion and persistent spectral hole burning*. J. Opt. Soc. Am. B, 9(5):829–836, 1992.

- [26] KULZER, F., S. KUMMER, R. MATZKE, C. BRÄUCHLE und T. BASCHÉ: *Single-molecule optical switching of terrylene in p-terphenyl*. Nature, 387(6634):688–691, 1997.
- [27] KULZER, F. und T. BASCHÉ: *Photo-Induced Jumps of Single Molecules: Probing Structural Relaxation in Solids on a Nanoscopic Scale*. In: MASUHARA, H. und F. C. D. SCHRYVER (Hrsg.): *Organic Mesoscopic Chemistry*, Chemistry for the 21st Century: A IUPAC Monograph, Seiten 29–59. Blackwell Science, London, 1999.
- [28] SHIMIZU, K. T., R. G. NEUHAUSER, C. A. LEATHERDALE, S. A. EMPEDOCLES, W. K. WOO und M. G. BAWENDI: *Blinking statistics in single semiconductor nanocrystal quantum dots*. Phys. Rev. B, 63(20):205316, 2001.
- [29] HU, D. H., J. YU, K. WONG, B. BAGCHI, P. J. ROSSKY und P. F. BARBARA: *Collapse of stiff conjugated polymers with chemical defects into ordered, cylindrical conformations*. Nature, 405(6790):1030–1033, 2000.
- [30] HA, T. J., A. Y. TING, J. LIANG, W. B. CALDWELL, A. A. DENIZ, D. S. CHEMLA, P. G. SCHULTZ und S. WEISS: *Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(3):893–898, 1999.
- [31] WENNMALM, S., L. EDMAN und R. RIGLER: *Conformational fluctuations in single DNA molecules*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(20):10641–10646, 1997.
- [32] EGGELING, C., J. R. FRIES, L. BRAND, R. GUNTHER und C. A. M. SEIDEL: *Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(4):1556–1561, 1998.
- [33] LU, H. P., L. Y. XUN und X. S. XIE: *Single-molecule enzymatic dynamics*. Science, 282(5395):1877–1882, 1998.
- [34] HAUPTS, U., S. MAITI, P. SCHWILLE und W. W. WEBB: *Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(23):13573–13578, 1998.
- [35] SONNLEITNER, M., G. J. SCHÜTZ und T. SCHMIDT: *Imaging individual molecules by two-photon excitation*. Chem. Phys. Lett., 300(1-2):221–226, 1999.
- [36] SCHWILLE, P., U. HAUPTS, S. MAITI und W. W. WEBB: *Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation*. Biophys. J., 77(4):2251–2265, 1999.
- [37] DICKSON, R. M., A. B. CUBITT, R. Y. TSIEN und W. E. MOERNER: *On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein*. Nature, 388:355–358, 1997.

-
- [38] BOPP, M. A., Y. W. JIA, L. Q. LI, R. J. COGDELL und R. M. HOCHSTRASSER: *Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(20):10630–10635, 1997.
- [39] VALE, R. D., T. FUNATSU, D. W. PIERCE, L. ROMBERG, Y. HARADA und T. YANAGIDA: *Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules*. Nature, 380(6573):451–453, 1996.
- [40] SCHÜTZ, G. J., W. TRABESINGER und T. SCHMIDT: *Direct observation of ligand colocalization on individual receptor molecules*. Biophys. J., 74(5):2223–2226, 1998.
- [41] HEIM, R., D. C. PRASHER und R. Y. TSIEN: *Wavelength mutation and post-translational autooxidation of green fluorescent protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:12501–12504, 1994.
- [42] HELDT, H. W.: *Pflanzenbiochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 1999.
- [43] CHALFIE, M., Y. TU, G. EUSKIRCHEN, W. W. WARD und D. C. PRASHER: *Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression*. Science, 263:802–805, 1994.
- [44] OIJEN, A. M. VAN, M. KETELAARS, J. KOHLER, T. J. AARTSMA und J. SCHMIDT: *Spectroscopy of single light-harvesting complexes from purple photosynthetic bacteria at 1.2 K*. J. Phys. Chem. B, 102(47):9363–9366, 1998.
- [45] PETERMAN, E. J. G., S. BRASSELET und W. E. MOERNER: *The fluorescence dynamics of single molecules of green fluorescent protein*. J. Phys. Chem. A, 103(49):10553–10560, 1999.
- [46] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, 1983.
- [47] BEECHEM, J. M. und L. BRAND: *Time-resolved fluorescence of proteins*. Ann. Rev. Biochem., 54:43–71, 1985.
- [48] LAKOWICZ, J. R.: *On Spectral Relaxation in Proteins*. Photochem. Photobiol., 72(4):421–437, 2000.
- [49] KULINSKI, T., A. B. A. WENNERBERG, R. RIGLER, S. W. PROVENCHER, M. POOGA, U. LANGEL und T. BARTFAI: *Conformational analysis of galanin using end to end distance distribution observed by Forster resonance energy transfer*. Eur. Biophys. J., 26(2):145–154, 1997.
- [50] RISCHER, C., P. THYBERG, R. RIGLER und F. M. POULSEN: *Time-resolved fluorescence studies of the molten globule state of apomyoglobin*. J. Mol. Biol., 257(4):877–885, 1996.

- [51] HOLDE, K. VAN und K. I. MILLER: *Hemocyanins*. Advances in Protein Chemistry, 47:1–81, 1995.
- [52] SALVATO, B. und M. BELTRAMINI: *Hemocyanins: molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper active site*. Life Chem. Rep., 8:1–47, 1990.
- [53] HOLDE, K. VAN, K. I. MILLER und H. DECKER: *Hemocyanin and invertebrate evolution*. J. Biol. Chem., 276(19):15563–15566, 2001.
- [54] HILL, A. V.: *The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on the dissociation curves*. J. Physiol. (London), 40:iv–vii, 1910.
- [55] MONOD, J., J. WYMAN und J. P. CHANGEAUX: *On the nature of allosteric transitions: A plausible model*. J. Mol. Biol., 6:306–329, 1965.
- [56] D. E. KOSHLAND, J., G. NEMETHY und G. FILMER: *Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits*. Biochem., 5:365–385, 1996.
- [57] WYMAN, J. und S. J. GILL: *Binding and Linkage*. University Science Books, Mill Valley, 1990.
- [58] DECKER, H. und R. STERNER: *Nested allostery of Arthropodan hemocyanin (*Eurypelma californicum* and *Homarus americanus*): The role of the protons*. J. Mol. Biol., 211:281–293, 1990.
- [59] ROBERT, C. H., H. DECKER, B. RICHEY, S. J. GILL und J. WYMAN: *Nesting: Hierarchies of allosteric interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:1891–1895, 1987.
- [60] LOEWE, R.: *Hemocyanins in spiders. V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin*. J. Comp. Physiol. B, 128:161–168, 1978.
- [61] VOIT, R., G. FELDMAIER-FUCHS, T. SCHWEIKARDT, H. DECKER und T. BURMESTER: *Complete sequence of the 24mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*: structure and intramolecular evolution of the subunits*. J. Biol. Chem., 275:39339–39344, 2000.
- [62] GÖPPERT-MAYER, M.: *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. Ann. Phys., 9:273–295, 1931.
- [63] DENK, W., J. H. STRICKLER und W. W. WEBB: *Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy*. Science, 248:73–76, 1990.
- [64] MERTZ, J., C. XU und W. W. WEBB: *Single-molecule detection by two-photon-excited fluorescence*. Opt. Lett., 20(24):2532–2534, 1995.

-
- [65] SANCHEZ, E. J., L. NOVOTNY, G. R. HOLTOM und X. S. XIE: *Room-temperature fluorescence imaging and spectroscopy of single molecules by two-photon excitation*. J. Phys. Chem. A, 101(38):7019–7023, 1997.
- [66] XU, C. und W. W. WEBB: *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. J. Opt. Soc. Am. B, 13(3):481–491, 1996.
- [67] REHMS, A. und P. CALLIS: *Two-photon fluorescence excitation spectra of aromatic amino acids*. Chem. Phys. Lett., 208:276–282, 1993.
- [68] IINO, R. und A. KUSUMI: *Single-Fluorophore Dynamic Imaging in Living Cells*. J. Fluoresc., 11(3):187–195, 2001.
- [69] VOET, D. und J. G. VOET: *Biochemie*. VCH, Weinheim, 1992.
- [70] PLATT, J. R.: *Classification of Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons*. J. Chem. Phys., 17(5):484–489, 1949.
- [71] CALLIS, P. R.: *1L_a and 1L_b transitions of tryptophan: applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins*. Methods Enzymol., 278:113–150, 1997.
- [72] GONNELLI, M. und G. B. STRAMBINI: *Phosphorescence Lifetime of Tryptophan in Proteins*. Biochem., 34:13847–13857, 1995.
- [73] KURZBAN, G. P., G. GITLIN, E. A. BAYER, M. WILCHEK und P. M. HOROWITZ: *Shielding of Tryptophan Residues of Avidin by the Binding of Biotin*. Biochem., 28:8537–8542, 1989.
- [74] LAKOWICZ, J. R. und G. WEBER: *Quenching of Fluorescence by Oxygen. A Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules*. Biochem., 12(21):4161–4170, 1973.
- [75] SAVEL-NIEMANN, A., J. MARKL und B. LINZEN: *Hemocyanins in Spiders XXII. Range of Allosteric Interaction in a Four-Hexamer Hemocyanin. Co-operativity and Bohr Effect in Dissociation Intermediates*. J. Mol. Biol., 204:385–395, 1988.
- [76] HÜBLER, R., B. FERTL, N. HELLMANN und H. DECKER: *On the stability of the hemocyanin from the tarantula Eurypelma californicum*. Biochem. Biophys. Acta, 1383:327–339, 1998.
- [77] DECKER, H., J. MARKL, R. LOEWE und B. LINZEN: *Oxygen affinity of the individual subunits isolated from Eurypelma californicum hemocyanin*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 360:1505–1507, 1979.
- [78] MAGNUS, K. A., B. HAZES, H. TON-THAT, C. BONAVENTURA und J. BONAVENTURA: *Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences*. Proteins, 19(4):302–309, 1994.

- [79] METZ, M. und E. I. SOLOMON: *Dioxygen Binding to Deoxyhemocyanin: Electronic Structure and Mechanism of Spin-Forbidden Two-Electron Reduction of O₂*. J. Am. Chem. Soc., 123:4938–4950, 2001.
- [80] SOLOMON, E. I., F. TUCZEK, D. E. ROOT und C. A. BROWN: *Spectroscopy of binuclear dioxygen complexes*. Chem. Rev., 94:827–856, 1994.
- [81] ERKER, W., R. HÜBLER und H. DECKER: *Multi-donor and multi acceptor quenching of oxy-hemocyanin by Förster transfer*. Prot. Sci., 10,Suppl.1:144, 2001.
- [82] ERKER, W.: *Zur Kooperativität des Vogelspinnen- Hämocyanins: Untersuchungen am Ensemble und an Einzel-Molekülen*. Dissertation, Universität Mainz, 2001.
- [83] BOTEVA, R., F. RICCHELLI, G. SARTOR und H. DECKER: *Fluorescence properties of hemocyanin from tarantula (Eurypelma californicum): A comparison between the whole molecule and isolated subunits*. J. Photobiol. Photochem. B, 17:145–153, 1993.
- [84] FLOYD, J. S., N. HARALAMPUS-GRYNAVSKI, T. YE, B. ZHENG, J. D. SIMON und M. D. EDINGTON: *Time-Resolved Spectroscopy Studies of Radiationless Decay Processes in Photoexcited Hemocyanins*. J. Phys. Chem. B, 105:1478–1483, 2001.
- [85] GÖPEL, W. und H.-D. WIEMHÖFER: *Statistische Thermodynamik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2000.
- [86] WYMAN, J.: *The Binding Potential, A neglected Linkage Concept*. J. Mol. Biol., 11:631–644, 1965.
- [87] DECKER, H., C. H. ROBERT und S. J. GILL: *Nesting: An extension of the allosteric model and its application to tarantula hemocyanin*. In: *Invertebrate Oxygen Carriers*. Springer, 1986.
- [88] LEIDSCHER, T. und H. DECKER: *Conformational changes of tarantula (Eurypelma californicum) haemocyanin detected with a fluorescent probe, 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxy-1,3-diazole*. Eur. J. Biochem., 187:617–625, 1990.
- [89] SCHMIDT, T., G. J. SCHÜTZ, W. BAUMGARTNER, H. J. GRUBER und H. SCHINDLER: *Imaging of single molecule diffusion*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(7):2926–2929, 1996.
- [90] DICKSON, R. M., D. J. NORRIS, Y. L. TZENG und W. E. MOERNER: *Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly(acrylamide) gels*. Science, 274(5289):966–969, 1996.
- [91] BETZIG, E., J. K. TRAUTMAN, T. D. HARRIS, J. S. WEINER und R. L. KOSTALEK: *Breaking the Diffraction Barrier: Optical Microscopy on a Nanometric Scale*. Science, 251:1468–1470, 1991.

- [92] PAESLER, M. A. und P. J. MOYER: *Near-Field Optics*. John Wiley & Sons, New York, 1996.
- [93] ZENHAUSERN, F., M. P. O'BOYLE, und H. K. WICKRAMASINGHE: *Apertureless near-field optical microscope*. Appl. Phys. Lett., 65(13):1623–1625, 1994.
- [94] SANCHEZ, E. J., L. NOVOTNY und X. S. XIE: *Near-field fluorescence microscopy based on two-photon excitation with metal tips*. Phys. Rev. Lett., 82(20):4014–4017, 1999.
- [95] NIE, S. M., D. T. CHIU und R. N. ZARE: *Probing Individual Molecules With Confocal Fluorescence Microscopy*. Science, 266(5187):1018–1021, 1994.
- [96] METS, Ü. und R. RIGLER: *Submillisecond Detection of Single Rhodamine Molecules in Water*. J. Fluoresc., 4:259–264, 1994.
- [97] TRAUTMAN, J. K. und J. J. MACKLIN: *Time-resolved spectroscopy of single molecules using near-field and far-field optics*. Chem. Phys., 205(1-2):221–229, 1996.
- [98] PAWLEY, J. B. (Hrsg.): *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press, 2. Aufl., 1995.
- [99] DEMTRÖDER, W.: *Laserspektroskopie*. Springer, Berlin, 4. Aufl., 2000.
- [100] DENK, W., D. W. PISTON und W. W. WEBB: *Two-Photon Molecular Excitation in Laser-Scanning Microscopy*. In: PAWLEY, J. B. (Hrsg.): *Handbook of biological confocal microscopy*, Seiten 445–458. Plenum Press, 2. Aufl., 1995.
- [101] PLAKHOTNIK, T., D. WALSER, M. PIROTTA, A. RENN und U. P. WILD: *Non-linear spectroscopy on a single quantum system: Two-photon absorption of a single molecule*. Science, 271(5256):1703–1705, 1996.
- [102] GUO, Y., P. HO, F. LIU, Q. Z. WANG und R. R. ALFANO: *Noninvasive two-photon-excitation imaging of tryptophan distribution in highly scattering biological tissues*. Opt. Comm., 154:383–389, 1998.
- [103] BORN, M. und E. WOLF: *Principles of Optics*. Cambridge University Press, 6. Aufl., 1993.
- [104] SHEPPARD, C. J. R. und M. GU: *Image formation in two-photon fluorescence microscopy*. Optik, 86(3):104–106, 1990.
- [105] HELL, S. W.: *Increasing the Resolution of Far-Field Fluorescence Light Microscopy by Point-Spread-Function Engineering*. In: LAKOWICZ, J. R. (Hrsg.): *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 5: nonlinear and two-photon induced fluorescence*, Seiten 361–426. Plenum Press, New York, 1997.

- [106] WILLIAMS, R. M., D. W. PISTON und W. W. WEBB: *Two-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry*. FASEB J., 8:804–813, 1994.
- [107] ENDERLEIN, J.: *Single-molecule fluorescence near a metal layer*. Chem. Phys., 247(1):1–9, 1999.
- [108] ENDERLEIN, J., T. RUCKSTUHL und S. SEEGER: *Highly efficient optical detection of surface-generated fluorescence*. Appl. Opt., 38(4):724–732, 1999.
- [109] COURTOIS, J. Y., J. M. COURTY und J. C. MERTZ: *Internal dynamics of multilevel atoms near a vacuum-dielectric interface*. Phys. Rev. A, 53(3):1862–1878, 1996.
- [110] POLERECKI, L., J. HAMRLE und B. D. MACCRAITH: *Theory of the radiation of dipoles placed within a multilayer system*. Appl. Opt., 39(22):3968–3977, 2000.
- [111] J. ENDERLEIN, M. B.: *Calculation of the light collection efficiency function in fluorescence correlation spectroscopy*. J. Opt. Soc. Am. B, 2002, submitted.
- [112] LOUDON, R.: *The Quantum Theory of Light*. Clarendon Press, 2. Aufl., 1983.
- [113] THOMPSON, N. L.: *Fluorescence correlation spectroscopy: new methods and applications*. In: LAKOWICZ, J. R. (Hrsg.): *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 1: techniques*, Seiten 337–378. Plenum Press, New York, 1991.
- [114] MERTZ, J.: *Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy*. Eur. Phys. J. D, 3:55–66, 1998.
- [115] ELSON, E. L. und D. MAGDE: *Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory*. Biopolymers, 13:1–27, 1974.
- [116] EIGEN, M. und R. RIGLER: *Sorting Single Molecules - Application To Diagnostics And Evolutionary Biotechnology*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(13):5740–5747, 1994.
- [117] RIGLER, R., Ü. METS, J. WIDENGREN und P. KASK: *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*. Eur. Biophys. J., 22:169–175, 1993.
- [118] BERLAND, K. M., P. T. C. SO und E. GRATTON: *Two-Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy: Method and Application to the Intracellular Environment*. Biophys. J., 68:694–701, 1995.
- [119] BÖHMER, M. und J. ENDERLEIN: *Ab-initio modeling of fluorescence correlation spectroscopy experiments*. J. Phys. Chem. A, 2002, submitted.

-
- [120] MARKL, J., H. DECKER, B. LINZEN, W. SCHUTTLER und E. F. J. VAN BRUGGEN: *Hemocyanins in spiders, XV. The role of the individual subunits in the assembly of Eurypelma hemocyanin*. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 363(1):73–87, 1982.
- [121] CANTOR, C. R. und P. R. SCHIMMEL: *Biophysical Chemistry, Part 2: Techniques for the study of biological structure and function*. Freeman, San Francisco, 1980.
- [122] ATKINS, P. W.: *Physikalische Chemie*. VCH, Weinheim, 2. Aufl., 1990.
- [123] MILONNI, P. W. und J. H. EBERLY: *Lasers*. Wiley, 1988.
- [124] YARIV, A.: *Quantum Electronics*. Wiley, 1989.
- [125] SALEH, B.: *Fundamentals of photonics*. Wiley, 1991.
- [126] OTTEN, E. W.: *Physik des Lasers*. Skript zur Vorlesung, 1999.
- [127] NIEDRIG, H. (Hrsg.): *Bergmann; Schäfer / Lehrbuch der Experimentalphysik*, Band 3. Optik. De Gruyter, 9. Aufl., 1993.
- [128] HOPF, F. A. und G. I. STEGEMAN: *Applied Classical Electrodynamics*, Band II: Nonlinear Optics. Krieger Publishing, 1992.
- [129] KROLL, N. M.: *Parametric Amplification in Spatially Extended Media and Application to the Design of Tuneable Oscillators at Optical Frequencies*. Phys. Rev., 127(4):1207–1211, 1962.
- [130] HIRLIMANN, C.: *Further Methods for the Generation of Ultrashort Optical Pulses*. In: RULLIÈRE, C. (Hrsg.): *Femtosecond Laser Pulses*, Kapitel 4. Springer, 1998.
- [131] DIELS, J.-C. und W. RUDOLPH: *Ultrashort laser pulse phenomena*. Academic Press, 1996.
- [132] DUCASSE, A., C. RULLIÈRE und B. COUILLAUD: *Methods for the Generation of Ultrashort Optical Pulses: Mode-Locking*. In: RULLIÈRE, C. (Hrsg.): *Femtosecond Laser Pulses*, Kapitel 3. Springer, 1998.
- [133] MAIMAN, T. H.: *Stimulated Optical Radiation in Ruby*. Nature, 187(4736):493–494, 1960.
- [134] KAISER, W. und C. G. B. GARRETT: *Two-Photon excitation in $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$* . Phys. Rev. Lett., 7(6):229–231, 1961.
- [135] PETICOLAS, W. L., J. P. GOLDSBOROUGH und K. E. RIECKHOFF: *Double photon excitation in organic crystals*. Phys. Rev. Lett., 10(2):43–45, 1963.
- [136] BIRGE, R. R.: *Two-Photon Spectroscopy of Protein-Bound Chromophores*. Acc. Chem. Res., 19:138–146, 1986.

- [137] HAKEN, H. und H. C. WOLF: *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer, 1998.
- [138] MYSTRE, P. und M. SARGENT III: *Elements of Quantum Optics*. Springer, 3. Aufl., 1999.
- [139] XU, C. und W. W. WEBB: *Multiphoton Excitation of Molecular Fluorophores and Nonlinear Laser Microscopy*. In: LAKOWICZ, J. R. (Hrsg.): *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 5: nonlinear and two-photon induced fluorescence*, Seiten 471–540. Plenum Press, New York, 1997.
- [140] XU, C., W. ZIPFEL, J. B. SHEAR, R. M. WILLIAMS und W. W. WEBB: *Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(20):10763–10768, 1996.
- [141] ALBOTA, M. A., C. XU und W. W. WEBB: *Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm*. Appl. Opt., 37(31):7352–7356, 1998.
- [142] ALBOTA, M., D. BELJONNE, J.-L. BRÉDAS und OTHERS: *Design of Organic Molecules with Large Two-Photon Absorption Cross Section*. Science, 281:1653–1656, 1998.
- [143] KIERDASZUK, B., I. GRZYŃSKI, A. MODRAK-WOJCIK, A. BZOWSKA, D. SHUGAR und J. R. LAKOWICZ: *Fluorescence of Tyrosine and Tryptophan in proteins using one- and two-photon excitation*. Photochem. Photobiol., 61(4):319–324, 1995.
- [144] COHERENT, INC.: *Operator's manual. The Coherent Mira Model 900-F Laser*, 1997.
- [145] FEURER, T., A. GLASS und R. SAUERBREY: *Two-photon photoconductivity in SiC photodiodes and its application to autocorrelation measurements of femtosecond optical pulses*. Appl. Phys. B, 65:295–297, 1997.
- [146] A. BODEMANN, ZEISS, JENA. Pers. Mitteilung.
- [147] SCHMIDT, T.: *Photostability Data for Fluorescent Dyes*. Single Molecules, 2(3):217, 2001.
- [148] OTTO, M.: *Analytische Chemie*. VCH, 1995.
- [149] *Archiv der AVN-Nordhemisphärenanalysen*. <http://www.wetterzentrale.de/topkarten/tkhavn>, 2002.
- [150] SCHÄTZLE, K.: *single-photon correlation techniques*. In: BROWN, W. (Hrsg.): *Dynamic Light Scattering*, Seiten 76–148. Clarendon Press, 1993.

-
- [151] KULZER, F.: *Untersuchungen zum nichtphotochemischen Lochbrennen auf Einzelmolekülebene am Modellsystem Terrylen in p-terphenyl*. Dissertation, Universität Mainz, 2000.
- [152] MÜLLER, M., J. SQUIER und G. J. BRAKENHOFF: *Measurement of femtosecond pulses in the focal point of a high-numerical-aperture lens by two-photon absorption*. Opt. Lett., 20(9):1038–1040, 1995.
- [153] GUILD, J. B., C. XU und W. W. WEBB: *Measurement of group delay dispersion of high numerical aperture objective lenses using two-photon excited fluorescence*. Appl. Opt., 36(1):397–401, 1997.
- [154] WOLLESCHENSKY, R., T. FEURER, R. SAUERBREY und U. SIMON: *Characterization and optimization of a laser-scanning microscope in the femtosecond regime*. Appl. Phys. B, 67, 1998.
- [155] KOBERLING, F.: *Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung an einzelnen Halbleiter-Nanokristallen*. Dissertation, Universität Mainz, 2001.
- [156] KULZER, F., F. KOBERLING, T. CHRIST, A. MEWS und T. BASCHÉ: *Terrylene in p-terphenyl: single-molecule experiments at room temperature*. Chem. Phys., 247(1):23–34, 1999.
- [157] BRASSELET, S., E. J. G. PETERMAN, A. MIYAWAKI und W. E. MOERNER: *Single-molecule fluorescence resonant energy transfer in calcium concentration dependent cameleon*. J. Phys. Chem. B, 104(15):3676–3682, 2000.
- [158] KENNEDY, S. M. und F. E. LYTLE: *p-Bis(o-methylstyryl)benzene as a Power-Squared Sensor for Two-Photon Absorption Measurements between 537 and 594 nm*. Anal. Chem., 58:2643–2647, 1986.
- [159] FREEMAN, R. G., D. L. GILLILAND und F. E. LYTLE: *Second Harmonic Detection of Sinusoidally Modulated Two-Photon Excited Fluorescence*. Anal. Chem., 62:2216–2219, 1990.
- [160] WEAST, R. C. (Hrsg.): *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC, 51. Aufl., 1971.
- [161] JACOBSEN, H., P. HÄNNINEN, E. SOINI und S. W. HELL: *Refractive-index-induced aberrations in two-photon confocal fluorescence microscopy*. J. Microsc., 176(3):226–230, 1994.
- [162] BRAND, L., C. EGGELING, C. ZANDER, K. H. DREXHAGE und C. A. M. SEIDEL: *Single-molecule identification of Coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection: Comparison of one- and two-photon excitation in solution*. J. Phys. Chem. A, 101(24):4313–4321, 1997.

- [163] DECKER, H., R. SCHMID, J. MARKL und B. LINZEN: *Dissociation and Reassociation of Europolma Hemocyanin*. Hoope-Seyler's Z. Physiol. Chem., 361:1707–1717, 1980.
- [164] CHEN, R. F.: *Fluorescence Quantum Yields of Tryptophan and Tyrosine*. Anal. Lett., 1(1):35–42, 1967.
- [165] HEUSER, H.: *Lehrbuch der Analysis, Teil 1*. Teubner, 9. Aufl., 1991.
- [166] EGGELING, C., J. WIDENGREN, R. RIGLER und C. A. M. SEIDEL: *Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis*. Anal. Chem., 70(13):2651–2659, 1998.
- [167] DOSE, K.: *The photolysis of free cystine in the presence of aromatic amino acids*. Photochem. Photobiol., 8:331–335, 1968.
- [168] PROMPERS, J. J., C. W. HILBERS und H. A. PEPERMANS;: *Tryptophan mediated photoreduction of disulfide bond causes unusual fluorescence behaviour of Fusarium solani pisi cutinase*. FEBS Lett., 456(3):409–416, 1999.
- [169] SONG, L., E. J. HENNINK, I. T. YOUNG und H. J. TANKE: *Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy*. Biophys. J., 68:2588–2600, 1995.
- [170] WIDENGREN, J. und R. RIGLER: *Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy*. Bioimaging, 4:149–157, 1996.
- [171] CHRIST, T., F. KULZER, P. BORDAT und T. BASCHÉ: *Watching the photo-oxidation of a single aromatic hydrocarbon molecule*. Angewandte Chemie - international edition, 40(22):4192–4195, 2001.
- [172] ENGLISH, D. S., A. FURUBE und P. F. BARBARA: *Single-molecule spectroscopy in oxygen-depleted polymer films*. Chem. Phys. Lett., 324(1-3):15–19, 2000.
- [173] DITTRICH, P. S. und P. SCHWILLE: *Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation*. Appl. Phys. B, 73:829–837, 2001.
- [174] SOBOLEWSKI, A. L. und W. DOMCKE: *Photoinduced charge separation in indole-water clusters*. Chem. Phys. Lett., 329:130–137, 2000.
- [175] SOBOLEWSKI, A. L. und W. DOMCKE: *Photoinduced Electron and Proton Transfer in Phenol and Its Clusters with Water and Ammonia*. J. Phys. Chem. A, 105(40):9275–9283, 2001.
- [176] SOBOLEWSKI, A. L. und W. DOMCKE: *Ab initio investigation of the photophysics of indole*. Chem. Phys. Lett., 315:293–298, 1999.

- [177] PATTERSON, G. H. und D. W. PISTON: *Photobleaching in Two-Photon Excitation Microscopy*. Biophys. J., 78:2159–2162, 2000.
- [178] EGGELING, C., L. BRAND und C. A. M. SEIDEL: *Laser-induced fluorescence of coumarin derivatives in aqueous solution: photochemical aspects for single molecule detection*. Bioimaging, 5:105–115, 1997.
- [179] MAITI, S., J. B. SHEAR, R. M. WILLIAMS, W. R. ZIPFEL und W. W. WEBB: *Measuring serotonin distribution in live cells with three-photon excitation*. Science, 275(5299):530–532, 1997.
- [180] GRYCZYNSKI, I., H. MALAK und J. R. LAKOWICZ: *Three-photon Excitation of a Tryptophan Derivative Using a fs Ti:Sapphire Laser*. Biospectroscopy, 2(9–15), 1996.
- [181] GRYCZYNSKI, I., H. MALAK und J. R. LAKOWICZ: *Three-photon excitation of N-acetyl-L-tyrosinamide*. Biophys. Chem., 65, 1999.
- [182] MARKL, J., C. BONAVENTURA und J. BONAVENTURA: *Kinetics of Oxygen Dissociation from Individual Subunits of Eurypelma and Cupiennius Hemocyanin*. Hoope-Seyler's Z. Physiol. Chem., 362:429–437, 1981.
- [183] PRESS, W. H., S. A. TEUKOLSKY, W. T. VETTERLING und B. FLANNERY: *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, 2. Aufl., 1997.
- [184] MARKWARDT, C.: *MPFIT – Robust non-linear least squares curve fitting*. <http://cow.physics.wisc.edu/~craigm/idl/fitting.html>, 1999.
- [185] HALDANE, J. und J. LORRAINE-SMITH: *The oxygen tension of arterial blood*. J. Physiol., 20:497–520, 1895.
- [186] BRUNORI, M., J. BONAVENTURA, C. BONAVENTURA, E. ANTONINI und J. WYMAN: *Carbon Monoxide Binding by Hemoglobin and Myoglobin under Photodissociating Conditions*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69(4):868–871, 1972.
- [187] WYMAN, J.: *The turning wheel: A study in steady states*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72(10):3983–3987, 1975.
- [188] COLETTA, M., L. ZOLLA, H. DECKER und M. BRUNORI: *Kinetic control of cooperativity for oxygen binding to arthropodan and molluscan hemocyanins*. In: PRÉAUX, G. und R. LONTIE (Hrsg.): *Invertebrate Dioxygen Carriers*, Seiten 387–391. Leuven University Press, 1990.
- [189] OSTERMANN, A., R. WASCHIPKY, F. G. PARAK und G. U. NIENHAUS: *Ligand binding and conformational motions in myoglobin*. Nature, 404:205–208, 2000.
- [190] BRONSTEIN, I. N., K. A. SEMENDJAJEW, G. MUSIOL und H. MÜHLIG: *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harry Deutsch, 1. Aufl., 1993.

- [191] BIRCH, D. J. S. und R. E. IMHOF: *Time-Correlated Single-Photon Counting*. In: LAKOWICZ, J. R. (Hrsg.): *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 1: techniques*, Seiten 1–95. Plenum Press, New York, 1991.
- [192] KASK, P., K. PALO, D. ULLMANN und K. GALL: *Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(24):13756–13761, 1999.
- [193] KASK, P. und K. PALO: *Introduction to the Theory of Fluorescence Intensity Distribution Analysis*. In: RIGLER, R. und E. S. ELSON (Hrsg.): *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Application*, Seiten 396–409. Springer, 2001.
- [194] CHEN, Y., J. MÜLLER, P. T. C. SO und E. GRATTON: *The Photon Counting Histogram in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy*. Biophys. J., 77:553–567, 1999.
- [195] MÜLLER, J. D., Y. CHEN und E. GRATTON: *Resolving Heterogeneity on the Single Molecular Level with the Photon-Counting Histogram*. Biophys. J., 78:474–486, 2000.
- [196] MÜLLER, J. D., Y. CHEN und E. GRATTON: *Photon Counting Histogram Statistics*. In: RIGLER, R. und E. S. ELSON (Hrsg.): *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Application*, Seiten 410–437. Springer, 2001.
- [197] MANDEL, L. und E. WOLF: *Optical coherence and quantum optics*. Cambridge University Press, 1995.
- [198] SALEH, B.: *Photoelectron statistics*. Springer, 1978.
- [199] ENGL, H. W., M. HANKE und A. NEUBAUER: *Regularization of Inverse Problems*. Kluwer Academic Press, 2000.
- [200] BIEMOND, J., R. L. LAGENDIJK und R. M. MERSEREAU: *Iterative Methods for Image Deblurring*. Proc. IEEE, 78(5):856–883, 1990.
- [201] LAKOWICZ, J. R.: *Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications*. Anal. Biochem., 298:1–24, 2001.
- [202] LAKOWICZ, J. R., Y. SHEN, S. D’AURIA, J. MALICKA, J. FANG, Z. GRYCZYNSKI und I. GRYCZYNSKI: *Radiative Decay Engineering. 2. Effects of Silver Island Films on Fluorescence Intensity, Lifetimes, and Resonance Energy Transfer*. Anal. Biochem., 301:261–277, 2002.
- [203] ENDERLEIN, J.: *Fluorescence detection of single molecules near a solution/glass interface - an electrodynamic analysis*. Chem. Phys. Lett., 308(3-4):263–266, 1999.
- [204] PALIK, E. D. (Hrsg.): *Handbook of Optical Constants of Solids*. Academic Press, 1985.

- [205] CHANCE, R. R., A. PROCK und R. SILBEY: *Molecular Fluorescence and Energy Transfer near Interfaces*. In: PRIGOGINE, I. und S. A. RICE (Hrsg.): *Advances in Chemical Physics*, Band 38, Seiten 1–65. Wiley, 1978.
- [206] ENDERLEIN, J. , Pers. Mitteilung.
- [207] GRYCZYNSKI, I., Z. GRYCZYNSKI und J. R. LAKOWICZ: *Two-Photon Excitation by the Evanescent Wave from Total Internal Reflection*. *Anal. Biochem.*, 247:69–76, 1997.
- [208] LAKOWICZ, J. R., B. SHEN, Z. GRYCZYNSKI, S. D’AURIA und I. GRYCZYNSKI: *Intrinsic fluorescence from DNA can be enhanced by metallic particles*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 286:875–879, 2001.
- [209] WEITZ, D. A., S. GAROFF, J. I. GERSTEN und A. NITZAN: *The enhancement of Raman scattering, resonance Raman scattering, and fluorescence from molecules adsorbed on a rough silver surface*. *J. Chem. Phys.*, 78(9):5324–5338, 1983.
- [210] XU, H., E. J. BJERNELD, M. KÄLL und L. BÖRJESSON: *Spectroscopy of Single Hemoglobin Molecules by Surface Enhanced Raman Scattering*. *Phys. Rev. Lett.*, 83(21):4357–4360, 1999.
- [211] GERSTEN, J. und A. NITZAN: *Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles*. *J. Chem. Phys.*, 75(3):1139–1152, 1981.
- [212] LIPPITZ, M., W. ERKER, H. DECKER, K. E. VAN HOLDE und T. BASCHÉ: *Two-photon excitation microscopy of tryptophan containing proteins*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99(5):2772–2777, 2002.
- [213] BARROW, G. M.: *Physikalische Chemie*. Bohmann Verlag, 1984.
- [214] FENIMORE, D. L., K. L. SCHEPLER, U. B. RAMABADRAN und S. R. MCPHERSON: *Infrared corrected Sellmeier Coefficients for Potassium Titanyl Arsenate*. *J. Opt. Soc. Am. B*, 12(5):794–796, 1995.

Vorträge und Poster

- Poster:** 3rd European Biophysics Congress, 9.–13. September 2000, München
Two Photon Fluorescence Spectroscopy and Imaging of Tryptophan Containing Proteins
M. Lippitz, W. Erker, H. Decker, T. Basché
- Poster:** 2nd International Symposium on Physics, Chemistry and Biology with Single Molecules, Volkswagenstiftung, 5.–7. Mai 2001, Staffelstein
Two-Photon Fluorescence Spectroscopy of Tryptophan Containing Proteins
M. Lippitz, W. Erker, H. Decker, T. Basché
- Vortrag:** 7th International Workshop on Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Science, PicoQuant, 26.–28. September 2001, Berlin
Two Photon Fluorescence Spectroscopy of Tryptophan Containing Proteins
M. Lippitz, W. Erker, H. Decker, T. Basché
- Vortrag:** Einladung zum Huygens Laboratory, Universiteit Leiden, Niederlande, 14. Dezember 2001
Two Photon Fluorescence Spectroscopy of Tryptophan Containing Proteins
M. Lippitz, W. Erker, H. Decker, T. Basché
- Poster:** Frühjahrstagung der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, 4.–8. März 2002, Osnabrück
Two-Photon Fluorescence Spectroscopy of Tryptophan Containing Proteins
M. Lippitz, W. Erker, H. Decker, T. Basché