

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

3D Orientierung und Multi-Parameter-Analyse
einzelner Moleküle mithilfe der konfokalen
Fluoreszenzmikroskopie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

DIPL.-PHYSIKER (MED.) RICHARD BÖRNER

aus Marienberg, geboren am 10. Mai 1983



Lübeck, 15. Oktober 2012

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Christian G. Hübner

2. Berichterstatter:

Professor Dr. Thomas Gutschmann

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den

Inhaltsverzeichnis

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	3
2.1 Das fluoreszente Molekül	3
2.1.1 Die Absorption elektromagnetischer Strahlung im visuellen Bereich	3
2.1.2 Die Emission elektromagnetischer Strahlung	6
2.1.3 Die Lebensdauer fluoreszenter Zustände in isotropen Medien	8
2.1.4 Modulation der Lebensdauer nahe einer Grenzfläche	9
2.1.5 Absorptions- vs. Emissionsspektrum	12
2.2 Orientierung eines Dipols im Raum	13
2.2.1 Fluoreszenz-Anisotropie	13
2.2.2 3D Orientierung fluoreszenter Moleküle in der konfokalen Mikroskopie	17
2.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	27
2.3.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	28
3 Grundlagen der 3D Orientierung fluoreszenter Moleküle	33
3.1 Der Einfluss einer dielektrischen Grenzfläche auf die Abstrahlcharakteristik eines Dipols	33
3.1.1 Erlaubte und verbotene Bereiche bei der Ausbreitung von Licht	35
3.1.2 Zur theoretischen Modellbeschreibung	35
3.1.3 Die Bestimmung der 3D Orientierung	43
3.1.4 Zusammenfassung und Ausblick	52
3.2 Der Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit auf die Bestimmung der 3D Orientierung	52
3.2.1 Zur theoretischen Modellbeschreibung	53
3.2.2 Simulation der 3D Orientierung	54
3.2.3 Zusammenfassung und Ausblick	69
3.3 Experimentelle Realisierung	69
4 Multi-Parameter-Messungen einzelner Moleküle an einer Grenzfläche	73
4.1 Methoden	75
4.1.1 Parallele Datenaufnahme verschiedener Parameter des Fluoreszenzsignals	75
4.1.2 Bestimmung der 3D Orientierung	76
4.1.3 Spektrale Analyse	76

4.1.4	Bestimmung der Lebensdauer	76
4.1.5	Probenpräparation von PP	77
4.1.6	Simulation orientierungsabhängiger Zeitspuren	78
4.1.7	Korrelationsanalyse	78
4.2	Ergebnisse	78
4.2.1	Aufnahme orientierungsaufgelöster Bilder einzelner PP- Moleküle	78
4.2.2	Aufnahme von Multi-Parameter-Zeitspuren einzelner PP- Moleküle	82
4.2.3	Simulationen	89
4.2.4	Modellabhängigkeit der Orientierungsauswertung	91
4.2.5	Korrelationsanalyse als Werkzeug für die Beschreibung der Orientierungsdynamik	94
4.3	Diskussion	95
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	98
5	GUV als Modellsystem für die Bestimmung der 3D Orientierung fluoreszent markierter Strukturen	101
5.1	Methoden	101
5.1.1	Lipide und Lipidfarbstoffe	101
5.1.2	Probenpräparation der GUV	105
5.1.3	Aufnahme orientierungsaufgelöster Vesikelscans	108
5.1.4	Simulationen	110
5.2	Ergebnisse und Diskussion	110
5.2.1	Simulation fluoreszent markierter GUV	110
5.2.2	3D Orientierung hochgradig fluoreszent markierter GUV	114
5.2.3	3D Orientierung gering fluoreszent markierter GUV	116
5.2.4	Korrelationsanalyse	119
5.3	Zusammenfassung und Ausblick	121
6	Zusammenfassung	123
A	Anhang	I
A.1	Nachtrag: Grundlagen	I
A.1.1	Zur Lebensdauer fluoreszenter Zustände nahe einer Grenzfläche	I
A.1.2	Zur dynamischen Anisotropie	II
A.1.3	Zur Korrelationsanalyse des Fluoreszenzsignals	IV
A.1.4	Makroskopische Maxwell Gleichungen	VIII
A.2	Analysemethoden	IX
A.2.1	Kalibrierung des konfokalen Mikroskops	IX
A.2.2	Kalibrierung des Spektrometers	X
A.2.3	Spektrenanalyse	X
A.2.4	Kalibrierung der Lebensdauerhistogramme	XI
A.2.5	Lebensdaueranalyse für ein 2-Niveau System	XII
A.3	Nachtrag: Simulationen der 3D Orientierung	XIV
A.3.1	Simulation des Photonenrauschens	XIV
A.3.2	Simulation der 3D Orientierung von Molekülen	XVI

A.3.3 Simulation der 3D Orientierung von farbstoffmarkierten Latexbeads	XVII
A.3.4 Simulation der 3D Orientierung von Lipidvesikeln	XVIII
Literaturverzeichnis	i

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

APD	avalanche photo diode
TCSPC	time-correlated single photon counting
CCD	charged coupled device
cw	continuous wave
DC	dichroic mirror
FCS	fluorescence correlation spectroscopy
FWHM	full width at half maximum
GUV	giant unilamellare vesicle
HOMO	highest occupied molecular orbital
IC	internal conversion
ISC	intersystem crossing
LSF	least-square fit
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
MC	Monte Carlo
MLE	maximum likelihood estimation
NA	numerische Apertur
nr	non-radiative
PDI	Perylendiimid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMT	photomultiplier
PP	(Pyridyl) ₁ -funktionalisiertes Perylendiimid
r	radiative

SCOM	scanning confocal optical microscopy
SiO ₂	Siliziumdioxid
ST	Strahlteiler
TDV	Trennung der Variablen

1 Einleitung

Die Entwicklung der Lichtmikroskopie im frühen 17. Jahrhundert stellt die Geburtsstunde der modernen Biophysik dar. Über Jahrhunderte gab es in der Lichtmikroskopie nur wenige Weiterentwicklungen, während mit Elektronen-, Rasterkraft- und Rastertunnelmikroskopen die Auflösung immer weiter verbessert wurde, um schließlich Bilder von Molekülen und Atomen zu erhalten. Der Lichtmikroskopie blieb dieser Vorstoß in die Welt der Atome und Moleküle zunächst aufgrund des Abbe'schen Auflösungskriteriums verwehrt. Erst die Erfindung des Lasers und des konfokalen Prinzips gaben der Lichtmikroskopie neuen Schub und führten zur Entwicklung wegweisender Methoden (STED, STORM, PALM etc.), die das Auflösungskriterium so erweiterten, dass selbst die Abbildung von Strukturen deutlich kleiner als die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes gelang [1]. Außerdem konnte durch die Kombination minimaler Detektionsvolumina in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie mit der Reduktion der Probenkonzentration in den subnanomolaren Bereich die beugungsbegrenzte optische Abbildung einzelner Moleküle gelingen [2]. Heute ist die intensitätsbasierte Abbildung einzelner Moleküle und fluoreszenzmarkierter Strukturen nur ein Teil der zugänglichen Parameter. Die Messung der Lebensdauer (FLIM), des Bewegungszustandes (FCS) und der 3D Orientierung des einzelnen Moleküls ermöglichen einen umfassenden Einblick in das dynamische Verhalten des Moleküls und seiner Umgebung.

Die konfokale Mikroskopie wird heute durch die rasante Entwicklung der Elektronik zur Datenaufnahme und Datenverarbeitung getragen, durch die die gleichzeitige Erfassung einer maximalen Anzahl von Fluoreszenzparametern möglich wird. Ein wichtiger Parameter ist dabei die Orientierung des einzelnen Moleküls. Zugänglich wird diese Größe durch die Anisotropie der Dipolemission. Dafür wurden in den vergangenen zwanzig Jahren zahlreiche Methoden zur Abbildung der Orientierung des Dipolmomentes fluoreszenter Moleküle entwickelt. Einige dieser Methoden basieren auf der Einzelquanteninterferenz, einem quantenmechanischen Prozess, der zu charakteristischen Beugungsbildern führt, die von der Orientierung des Dipols abhängig sind [3]. Die in dieser Arbeit zur Anwendung kommende Methode basiert auf der Polarisierung sowie der richtungsabhängigen Intensitätsverteilung der vom Dipol emittierten elektromagnetischen Strahlung [4]. Die theoretische Beschreibung dieser Methode lieferte Fourkas [5]. Er bediente sich eines Matrix-Algorithmus zur Beschreibung der Abbildung der Dipolemission in einem homogenen, isotropen Medium durch ein konfokales Mikroskop [6]. Da die 3D Orientierung einzelner Moleküle in anisotropen Umgebungen von besonderem Interesse ist, soll die Theorie in dieser Arbeit um den Einfluss einer Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes erweitert werden. Die dafür notwendige Herleitung basiert auf der Arbeit von Novotny [7] zur Dipolemission im Nahfeld, die hier auf das konfokale Mikroskop erweitert werden soll.

Die Güte der intensitätsbasierten Methode zur Bestimmung der 3D Orientierung ist maßgeblich durch die Anzahl der detektierten Fluoreszenzphotonen des einzelnen Moleküls bestimmt [8]. Da es sich bei der Emission um einen Einzelquantenprozess handelt, wird die messbare Fluoreszenzintensität durch das Schrotrauschen beeinflusst. Je höher dabei die Intensität ist, umso geringer ist der Einfluss des Rauschens und damit die Unsicherheit der zu bestimmenden Orientierung. Die Anzahl an Photonen, die durch das Fluorophor in einer gewissen Zeit emittiert wird, hängt von der orientierungsabhängigen Anregungswahrscheinlichkeit des Moleküls ab. Die auf MC Simulationen basierende Untersuchung von Hohlbein u. Hübner zum Einfluss verschiedener Parameter auf die Bestimmung der 3D Orientierung soll daher um die Anregungswahrscheinlichkeit erweitert werden.

Das fluoreszente Licht eines Fluorophors trägt zahlreiche Informationen, die Aufschluss über das Molekül selbst, seine Umgebung und die Interaktion zwischen beiden liefert. Es war, ist und wird deshalb stets von großem Interesse sein, eine größtmögliche Anzahl dieser Parameter gleichzeitig und mit einer hohen Zeitaufösung zu erfassen, um molekulare und auf Bindungsebene sogar atomare Prozesse mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie aufklären zu können. Das von Hohlbein u. Hübner entwickelte Detektionsschema soll dafür durch TCSPC-basierte Lebensdauermessungen und die Messung des Fluoreszenzspektrums zu einer Multi-Parameter-Methode erweitert werden.

Die 3D Orientierung ist besonders in anisotropen Systeme von Interesse. Das einzelne Molekül auf einer Oberfläche stellt ein solches System dar. Dabei ist jeder Fluoreszenzparameter in charakteristischer Art und Weise mit intrinsischen Änderungen des Moleküls und Änderungen der molekularen Umgebung verbunden. So beeinflusst z.B. die Änderung der Orientierung eines fluoreszenten Moleküls in unmittelbarer Nähe zu einer Grenzfläche sowohl dessen Lebensdauer als auch seine Fluoreszenzintensität. Gleichzeitig kann es durch z.B. Konformationsänderungen des Fluorophors zur spektralen Diffusion oder Intensitätsänderungen aufgrund eines veränderten Absorptionsquerschnitts kommen. Untersuchungen an (Pyridyl)₁-funktionalisiertem Perylendiimid (PP) lassen beide Einflüsse auf die Fluoreszenzparameter vermuten [9]. Dieses Molekül soll in dieser Arbeit daher als Testsystem für das Multi-Parameter-Schema dienen. Durch die gleichzeitige Messung der Orientierung, des Spektrums, der Lebensdauer und der Intensität des Moleküls soll zwischen orientierungsbedingten und durch eine Konformationsänderung verursachte Änderungen der Fluoreszenzintensität von PP- Molekülen unterschieden werden können. Außerdem soll anhand der Orientierungsmessung die Vermutung bestätigt werden, dass PP- Moleküle eine bevorzugte Orientierung bei der Adsorption an Glasoberflächen zeigen.

Die Bildung von abgeschlossenen Kompartimenten ist ein wesentliches Konzept der belebten Natur. Lipidvesikel stellen solche Kompartimente dar und bilden ein anisotropes System. Die Bestimmung der Orientierung einzelner Moleküle, sowohl des Fluorophors an sich als auch von fluoreszenzmarkierten Molekülen (Protein, Lipide etc.) in der Membran, ist für biologische Fragestellungen von großer Bedeutung. Die definierte Form des Vesikels ermöglicht die kontrollierte Messung der Orientierung von Fluorophoren, die als Marker in die Membran integriert sind. Es soll daher die Orientierung und deren Dynamik von DiO-Farbstoffen in der Lipidmembran von *giant unilamellar vesicles* untersucht werden.

2 Grundlagen

2.1 Das fluoreszente Molekül

Das fluoreszente Molekül ist Grundlage aller in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen und soll deshalb in prägnanter Weise Einführung finden. Dazu soll zunächst die Anregung des Moleküls, sprich die Absorption elektromagnetischer Strahlung und damit von Energie, sowie die anschließende Emission elektromagnetischer Strahlung, also der Übergang zurück in den Grundzustand, besprochen werden. Dabei wurden maßgeblich die Ausführungen von Valeur [10] und Lakowicz [11] zu Rate gezogen. Im folgenden soll dann die Charakteristik der emittierten Strahlung im Mittelpunkt stehen, die in den folgenden Kapiteln in experimenteller und theoretischer Weise genutzt wird, um das Molekül und seine Umgebung beschreiben zu können.

2.1.1 Die Absorption elektromagnetischer Strahlung im visuellen Bereich

Grundlage der Lumineszenz, dem Abstrahlen von elektromagnetischer Strahlung bzw. von Photonen im sichtbaren Bereich, ist der elektronische Übergang eines Elektrons aus einem Orbital des Moleküls im Grundzustand in ein unbesetztes Orbital des Moleküls, das dann als angeregter Zustand bezeichnet wird. Zwei Elektronen, die sich jeweils in einem atomaren p-Orbital befinden, die sich lateral überlappen, bilden ein so genanntes π -Orbital. Die entsprechende Bindung heißt π -Bindung. Durch die Absorption eines Photons der entsprechenden Energie kann eines der beiden Elektronen aus dem bindenden π -Orbital in das energetisch höhere anti-bindende π^* -Orbital überführt werden. Auch nicht-bindende Elektronen, z. B. von Heteroatomen wie Sauerstoff oder Stickstoff, deren Orbital mit n bezeichnet wird, können in ein anti-bindendes π^* -Orbital überführt werden. Der Übergang kann energetisch wie folgt geordnet werden:

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^*.$$

Andere Übergänge sind für die Anregung durch elektromagnetische Strahlung im sichtbaren Bereich aufgrund der deutlich höheren Energie in der Regel nicht möglich und sollen deshalb hier außer Acht gelassen werden.

Beim Übergang eines Elektrons vom Grundzustand, man spricht in der Fluoreszenzspek-

trokopie vom energetisch höchsten, besetzten Orbital (HOMO¹), in den ersten angeregten Zustand, also dem energetisch niedrigsten, unbesetzten Orbital (LUMO²), bleibt der Spin s erhalten. Die Spinquantenzahl $S = \sum s_i$ mit $s_i = \pm 1/2$ ist Null und die Multiplizität $M = 2S + 1$ gleich 1. Beide Zustände werden als Singulett-Zustand $S_{0,1}$ (S_0 für den Grundzustand, $S_{1,2,\dots}$ für den ersten, zweiten usw. angeregten Zustand), der entsprechende Übergang als Singulett-Singulett-Übergang bezeichnet. Obwohl in der klassischen Quantenmechanik verboten, kommt der Übergang eines Elektrons zwischen zwei Zuständen (z. B. $S_1 \rightarrow T_1$) unter Spin-Umkehr mit einer geringen, aber endlichen Wahrscheinlichkeit in der Natur vor und kann heute mithilfe der quantenmechanischen Störungstheorie bei Spin-Bahn-Kopplung beschrieben werden. Bei einem solchen Übergang ändert sich die Gesamtspinzahl zu $S = 1$ und damit die Multiplizität zu $M = 3$. Der angeregte Zustand wird entsprechend mit Triplett T_1 ($T_{1,2,\dots}$ für den ersten, zweiten usw. angeregten Zustand), der Übergang mit Singulett-Triplett-Übergang bezeichnet. Gemäß der Hundschenschen Regel über die Besetzung von Zuständen und deren Energie hat der Triplett-Zustand eine niedrigere Energie als der Singulett-Zustand.

Die Elektronen und damit ihr entsprechendes Orbital sind in Molekülen nicht mehr zwingend lokalisiert. Dies gilt insbesondere für Elektronen in π -Orbitalen von benachbarten Kohlenstoffatomen. Anders als bei isolierten Doppelbindungen, können im Falle alternierender Einfach- und Doppelbindungen, so genannter konjugierter Systeme, dank der Überlappung der π -Orbitale die Elektronen als über das gesamte System verteilt, man sagt delokalisiert, betrachtet werden. Man nennt dies Resonanz-Effekt. Konjugierte Systeme können sowohl linear (Polyene) als auch zyklisch (Aromaten) auftreten. Das einfachste zyklische System eines solchen delokalisierten π -Elektronensystems ist der Benzenring. Dieses System kann quantenmechanisch als Elektron im Kastenpotential betrachtet werden. Es gilt: Je größer das π -Elektronensystem, also je niedriger das Energieniveau des Grundzustandes S_0 , desto größer ist die Wellenlänge des Absorptionsbandes.

Die Bestimmung der Wahrscheinlichkeit für den elektronischen Übergang (siehe Abbildung 2.1), sprich für die Absorption eines Photons mit einer Energie von

$$\Delta E \geq E_1 - E_0 = h\nu_{\text{abs}} = h \frac{c}{\lambda_{\text{abs}}} \quad (2.1)$$

mit dem Planckschen Wirkungsquantum h , der Lichtgeschwindigkeit c und der Wellenlänge λ_A bzw. der Frequenz ν_A des eingestrahlt Lichtes, ist durch das Lambert-Beer-Gesetz experimentell zugänglich:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda)lc \quad (2.2)$$

mit dem molaren Absorptionskoeffizienten ε , der Konzentration c des fluoreszenten Moleküls und der Dicke l des durchstrahlten Mediums. Das Absorptionsvermögen des einzelnen Moleküls ist dann durch den Wirkungsquerschnitt³ σ gegeben, sprich der relativen, absorbierenden Fläche, die das Molekül einem Photonenstrom entgegensetzt. Diese sich auf das

¹engl. highest occupied molecular orbital

²engl. lowest unoccupied molecular orbital

³engl. absorption cross-section

einzelne Molekül beziehende Größe ist durch den Ausdruck

$$\sigma = \frac{2.303\varepsilon}{N_a} \quad (2.3)$$

mit der experimentell zugänglichen Größe des molaren Absorptionskoeffizienten ε verbunden (N_a als Avogadro-Zahl). Der Photonenstrom ist im Experiment durch die Intensität I der Anregungsquelle, zum Beispiel einem Laser, gegeben. Mit dem Wirkungsquerschnitt σ und der Intensität I kann nun den experimentellen Bedingungen Rechnung getragen werden und die Rate für den Absorptionsübergang k_{abs} bestimmt sich zu

$$k_{\text{abs}} = \frac{\sigma I}{h\nu_{\text{abs}}}. \quad (2.4)$$

In der quantenmechanischen Betrachtung wird der Übergang zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand mit dem Übergangsdipolmoment $M_{01} = \langle \Psi_0 | \hat{M} | \Psi_1 \rangle$ beschrieben, wobei \hat{M} den Dipolmomentoperator und $\Psi_{0,1}$ die Wellenfunktionen der beiden Zustände darstellt. Durch die separaten Wellenfunktionen, die letztendlich Ortsfunktionen des elektronischen Systems im jeweiligen Zustand sind, wird der Ladungsverschiebung bei der Anregung Rechnung getragen. Das Übergangsdipolmoment repräsentiert damit den vorübergehenden Dipol, der durch die Ladungsverschiebung während des Übergangs zwischen den beiden beteiligten Zuständen entsteht. Da die Absorption mit 10^{-15}s extrem schnell im Vergleich zur Molekülschwingung von 10^{-12} - 10^{-10}s ist, kommt die Born-Oppenheimer Näherung zum Tragen, bei der der Einfluss der Kernbewegung gegenüber der der Elektronenbewegung vernachlässigt wird. Dadurch kann die Wellenfunktion des Moleküls in ein Produkt aus der Wellenfunktion der Elektronen Ψ und eine Wellenfunktion der Molekülschwingung (vibronisch) χ zerlegt werden. Da der Operator des Dipolmomentes \hat{M} nur von der elektronischen Konfiguration abhängt, entkoppelt χ von Ψ und man erhält den Einstein-Koeffizienten B_{01} für die induzierte Absorption

$$B_{01} \sim |\langle \psi_0 | \hat{M} | \psi_1 \rangle|^2 |\langle \chi_a | \chi_b \rangle|^2. \quad (2.5)$$

Der zweite Term wird als Franck-Condon-Faktor bezeichnet. Da bei Raumtemperatur gemäß der Boltzmann-Verteilung stets der niedrigste vibronische Zustand im elektronischen Grundzustand besetzt ist, erfolgt die Anregung aus diesem Zustand in genau das vibronische Niveau des LUMO, bei dem der Überlapp der vibronischen Wellenfunktionen, also der Frank-Condon-Faktor, am größten ist.

Der Einstein-Koeffizient des jeweiligen Übergangs kann als Erwartungswert der Übergangsrates interpretiert werden. Ohne dabei weiter ins Detail gehen zu wollen, ist damit die Brücke zwischen der quantenmechanischen und klassischen Betrachtung gegeben, die in der Relation zwischen Einstein-Koeffizient und dem experimentell zugänglichen molarem Absorptionskoeffizienten des entsprechenden Übergangs mündet:

$$B_{01} \sim \varepsilon_{01}. \quad (2.6)$$

2.1.2 Die Emission elektromagnetischer Strahlung

Die Anregungs- und Relaxationsvorgänge eines fluoreszenten Moleküls werden in einem Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.1) dargestellt, das in dieser Art erstmals von Alexander Jablonski (1898-1980) im Jahre 1935 formuliert wurde [12]. Nach der Absorption eines Photons im Grundzustand S_0 gelangt das Elektron, entsprechend der aufgenommenen Photoenergie ΔE , auf ein vibronisches Schwingungsniveau eines höher gelegenen elektronischen Singulett-Zustandes. Von den höheren Schwingungszuständen findet eine schnelle Relaxation (10^{-12} s) auf das energetisch niedrigste Schwingungsniveau des angeregten Singulett-Zustandes $S_{1,2,\dots}$ statt. Dieser Vorgang läuft strahlungslos durch Wärmeabgabe an die Umgebung ab und wird als Kashas-Regel bezeichnet [13].

Die Relaxation des angeregten Singulett-Zustandes kann sowohl strahlungslos (nr^4) als auch strahlend (r^5) erfolgen. Strahlungsfreie Übergänge sind unter anderem die Innere Umwandlung (IC⁶), welche einen Übergang zwischen Singulett-Zuständen beschreibt und der Interkombinationsübergang (ISC⁷), der den Übergang eines Elektrons zwischen Singulett- und Triplett-Zustand unter Spinumkehr darstellt. In Abbildung 2.1 sind diese Übergänge aus dem ersten angeregten Zustand S_1 gezeigt.

Ist die Relaxation des angeregten Zustandes gekoppelt an das Aussenden von elektromagnetischer Strahlung, spricht man von Photolumineszenz, welche sich in Fluoreszenz und Phosphoreszenz aufgliedert.

Für die durchgeführten Untersuchungen ist die Fluoreszenz die wichtigste Emission. Hierbei handelt es sich um die Relaxation aus einem angeregten Singulett-Zustand $S_{1,2,\dots}$ (10^{-10} - 10^{-7} s) in den elektronischen Grundzustand S_0 . An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass der eigentliche Relaxationsvorgang des Elektrons genau so schnell abläuft wie bei der Absorption, entscheidend ist aber die Verweildauer im angeregten Zustand. Da die Relaxation stets aus dem vibronischen Grundzustand des angeregten elektronischen Zustandes erfolgt, ist das Emissionsspektrum unabhängig von der eingestrahlten Anregungswellenlänge. Des Weiteren erfolgt die Relaxation in verschiedene vibronische Niveaus des Grundzustandes S_0 und relaxiert dann durch strahlungslose Übergänge in den Schwingungsgrundzustand. Beide Prozesse führen zu einer Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums gegenüber dem Absorptionsspektrum (siehe Stokes-Verschiebung in Abschnitt 2.1.5) [11].

Bei der Phosphoreszenz kommt es zur Relaxation des Elektrons unter Spinumkehr (Pauli-Prinzip [14] und Spin-Bahnkopplung) aus dem angeregten Triplett-Zustand (10^{-6} - 10^0 s) in den Singulett-Grundzustand. Auch hier kommt es anschließend zur Relaxation in den Schwingungsgrundzustand. Aufgrund der langen Lebensdauer des angeregten Triplett-Zustandes, sind strahlungslose Relaxationskanäle wie das IC und die vibronische Relaxation

⁴engl. non-radiative

⁵engl. radiative

⁶engl. internal conversion

⁷engl. intersystem crossing

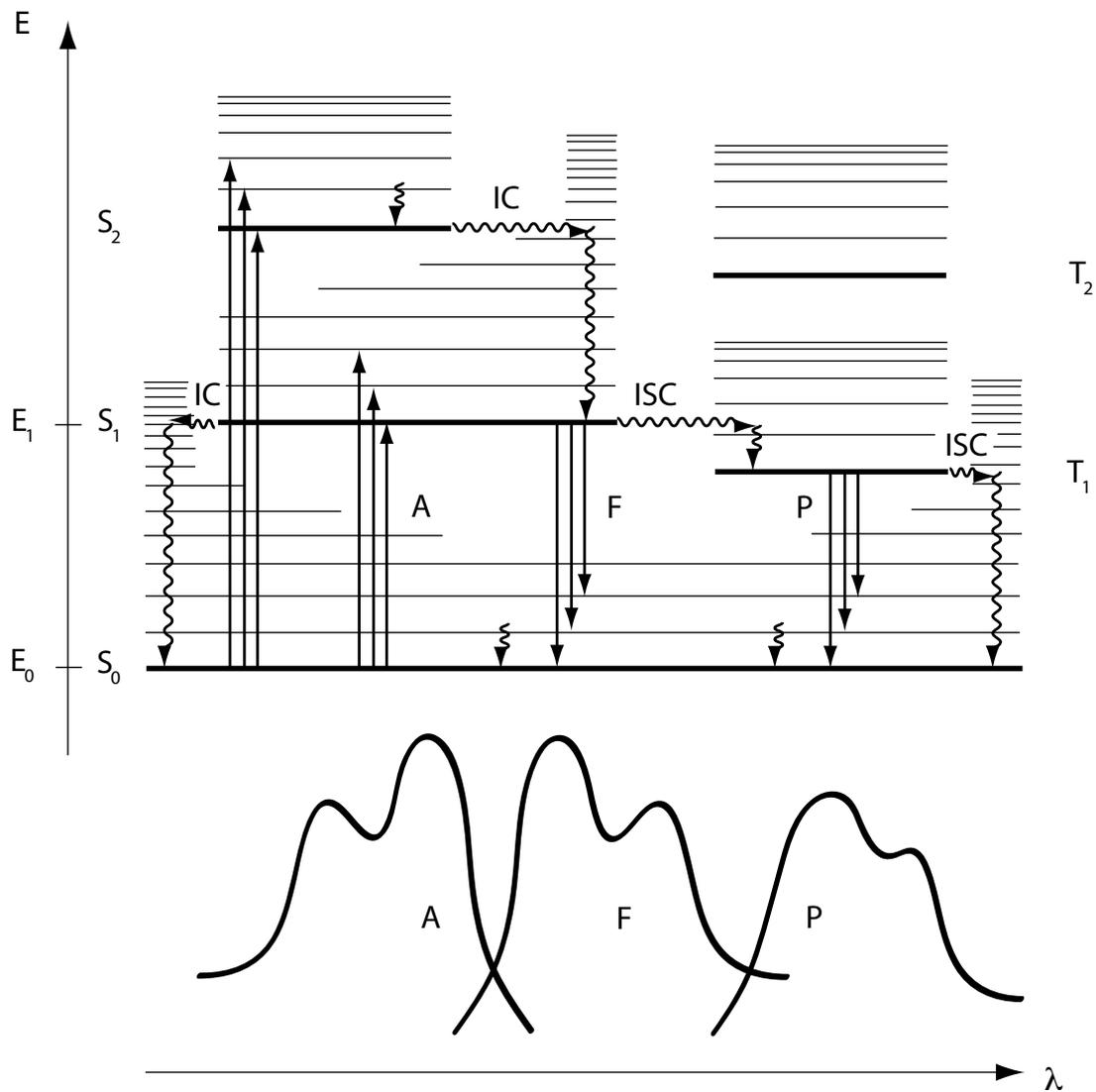


Abb. 2.1: Vereinfachtes Energieniveauschema (JABLONSKI-Diagramm) und entsprechende Spektren für radiative Übergänge: S_0 - elektronischer Grundzustand; S_1 - erster angeregter elektronischer Singulett-Zustand; S_2 - zweiter angeregter Singulett-Zustand; T_1 - erster angeregter Triplett-Zustand; T_2 - zweiter angeregter Triplett-Zustand; A - Absorption eines Photons der Energie $h\nu_{\text{abs}}$ und Absorptionsspektrum; F - Fluoreszenz-Emission eines Photons $h\nu_{\text{F}}$ und Fluoreszenzspektrum; P - Phosphoreszenz-Emission eines Photons $h\nu_{\text{P}}$ und Phosphoreszenzspektrum; IC - Innere Umwandlung; ISC - Interkombinationsübergang. Nach [10].

aufgrund der Wechselwirkung des Moleküls mit seiner Umgebung wahrscheinlicher. Da der Triplett-Zustand energetisch niedriger als der Singulett-Zustand liegt, ist das entsprechende Phosphoreszenzspektrum gegenüber dem der Fluoreszenz weiter rotverschoben.

2.1.3 Die Lebensdauer fluoreszenter Zustände in isotropen Medien

Will man die Lebensdauer fluoreszenter Zustände betrachten, so geht man zunächst davon aus, dass sich das fluoreszente Molekül in einem isotropen Medium befindet und man die Abstrahlcharakteristik des Dipols außer Acht lassen kann (4π -Emission). Für diesen Fall lässt sich das in Abbildung 2.1 dargestellte System von Übergängen eines fluoreszenten Moleküls durch folgende Ratengleichungen beschreiben [15]:

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}[S_0] &= -k_{\text{abs}}[S_0] + k_{\text{F}}[S_1] + k_{\text{IC}}[S_1] + k_{\text{P}}[T_1] \\ \frac{d}{dt}[S_1] &= +k_{\text{abs}}[S_0] - k_{\text{F}}[S_1] - k_{\text{IC}}[S_1] - k_{\text{ISC}}[T_1] - k_{\text{bl},1}[S_1] \\ \frac{d}{dt}[T_1] &= +k_{\text{ISC}}[S_1] - k_{\text{P}}[T_1] - k_{\text{bl},2}[T_1]\end{aligned}\quad (2.7)$$

mit den Raten

- k_{abs} : Absorptionsrate $S_0 \rightarrow S_1$,
- k_{F} : Emissionsrate der Fluoreszenz $S_1 \rightarrow S_0$,
- k_{P} : Emissionsrate der Phosphoreszenz $T_1 \rightarrow S_0$,
- k_{IC} : Rate der Inneren Umwandlung $S_1 \rightarrow S_0$ und
- k_{ISC} : Rate des Interkombinationsüberganges $S_1 \rightarrow T_1$.
- $k_{\text{bl},1/2}$: Rate für eine chemische Umwandlung des Moleküls⁸

Die Rate k_{bl} steht für die Moleküle, die aufgrund der ihnen zugeführten Photoenergie einer irreversiblen chemischen Umwandlung unterliegen und damit für die Fluoreszenz nicht mehr zur Verfügung stehen. Diese Rate macht für Lösungsexperimente häufig eine nicht zu vernachlässigende Größe aus; ist im Falle einer Messung am einzelnen Molekül aber gleich Null zu setzen. Die Raten für die nicht-strahlenden Prozesse fasst man in der Regel zu $k_{\text{nr}} = k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}}(+k_{\text{bl}})$ zusammen. Die Lösung des Gleichungssystems 2.7 würde über den Rahmen der Arbeit hinaus gehen. Jedoch kann die hier relevante Lösung für die Besetzung des fluoreszenten Zustandes $[S_1]$ leicht durch die Lösung des homogenen Anteils $d[S_1]/dt = -k_{\text{F}}[S_1] - k_{\text{nr}}[S_1]$ der inhomogenen DGL gefunden werden und ergibt sich durch

⁸bl für bleichen

Trennung der Variablen⁹ (TDV) zu:

$$[S_1](t) = [S_1]_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.8)$$

wobei $[S_1]_0$ die Besetzung des angeregten Zustandes S_1 zum Zeitpunkt $t = 0$ z. B. nach der Anregung durch einen gepulsten Laser ist und die Lebensdauer τ wie folgt definiert wird:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} = \frac{1}{k_F + k_{nr}}. \quad (2.9)$$

Die Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_F ist als das Verhältnis von emittierten Fluoreszenzphotonen zu absorbierten Photonen definiert. Ausgehend von Gleichung 2.8 ist die Emission eines Photons gerade von der Besetzung des angeregten Zustandes $[S_1]$ zum Zeitpunkt $t > 0$ und der Emissionsrate der Fluoreszenz k_F abhängig. Da der Zustand von Null ausgehend nach unendlich langer Zeit vollständig entvölkert sein muss, erhält man damit:

$$\Phi_F = k_F \int_0^{\infty} e^{-\frac{t}{\tau}} dt = k_F \tau \quad (2.10)$$

Im dem Fall, dass der angeregte Zustand nur über den Fluoreszenzkanal relaxiert, also $\Phi_F \stackrel{!}{=} 1$, spricht man auch von radiativer oder auch natürlicher Lebensdauer τ_F .

2.1.4 Modulation der Lebensdauer nahe einer Grenzfläche

Nachdem die Lebensdauer des angeregten Zustandes eines fluoreszenten Moleküls in einem homogenen Medium beschrieben wurde, soll nun der Einfluss einer inhomogenen Umgebung auf das fluoreszente Molekül betrachtet werden. Dafür kann die bereits beschriebene Dipolnatur des Moleküls nicht mehr außer Acht gelassen werden. Das in Kapitel 2.1.1 vorgestellte Konzept des Übergangsdipolmomentes M für die Anregung des fluoreszenten Zustandes $S_0 \rightarrow S_1$ kann in gleicher Weise auf die spontane Emission, also die Relaxation des angeregten Zustandes $S_1 \rightarrow S_0$ unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons angewendet werden. Wie bereits erwähnt, ist durch das Betragsquadrat des Übergangsdipolmomentes $|M|^2$ die Verbindung zur klassischen Elektrodynamik gegeben. In der klassischen Theorie ergibt das Elektron oder das System von Elektronen, das am Übergang beteiligt ist, einen harmonischen Oszillator, sprich einen elektrischen Dipol, dessen Dipolmoment $\vec{p} = (p_x, p_y, p_z)$ mit dem Polarwinkel Θ und dem Azimutwinkel Φ in Polarkoordinaten gegeben ist:

$$\vec{p} = \sin \Theta \cos \Phi \vec{e}_x + \sin \Theta \sin \Phi \vec{e}_y + \cos \Theta \vec{e}_z. \quad (2.11)$$

Befindet sich der Dipol in der Nähe einer Grenzfläche (siehe Abbildung 3.1) zweier dielektrischer Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes $n_{1,2}$, so ist die Emission des Dipols gestört. Dies beeinflusst sowohl die Abstrahlcharakteristik des Dipols (siehe Kapitel 3.1) als auch seine Lebensdauer τ .

⁹Ansatz zur Lösung homogener Differentialgleichungen 1. Ordnung

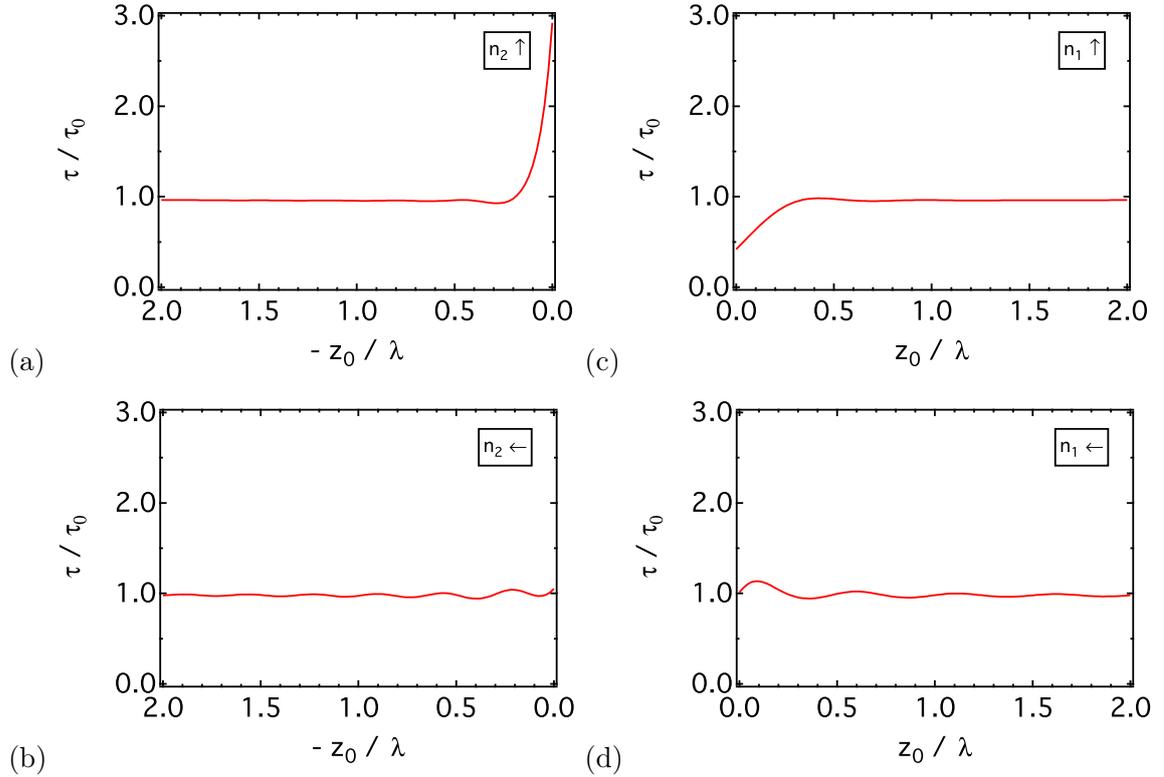


Abb. 2.2: Lebensdauer τ_F eines fluoreszenten Moleküls in Abhängigkeit vom Abstand z_0 zur Oberfläche zweier dielektrischer Medien mit Brechungsindex $n_1 = 1$ (Vakuum) und $n_2 = 1.515$ (BK7-Glas). Dabei ist die Annäherung des Dipols vom optisch dichteren n_2 in Richtung des optisch dünneren n_1 Mediums bzw. vom optisch dünneren zum optisch dichteren Medium für die beiden Fundamentalkomponenten des Dipols senkrecht (a,c) und parallel (b,d) zu der Oberfläche dargestellt. Die Normierung entspricht $z_0 \rightarrow \infty$, sprich dem Fall des homogenen Mediums mit Brechungsindex $n_{1,2}$.

Der Einfluss einer Grenzfläche auf die Dipolstrahlung wurde erstmals durch Arnold Sommerfeld im Jahre 1909 [16] beschrieben und durch zahlreiche Autoren auf atomarer bzw. molekularer Ebene in Theorie [17–21] und Experiment [22–26] wieder aufgenommen.

Die radiative Rate k_r oder auch Fluoreszenzrate k_F des angeregten Zustandes ist proportional zur abgestrahlten Leistung P des Dipols. Damit erhält man gemäß Gleichung 2.9 für den Fall, dass nicht-radiative Kanäle vernachlässigbar sind, also $k_{nr} = 0$ gilt, den Ausdruck

$$\tau_F \sim \frac{1}{P}. \quad (2.12)$$

Die Lebensdauer ist damit eine Funktion der abgestrahlten Leistung des Dipols. Durch Normierung mit der Lebensdauer $\tau_{F,0}$ und der Leistung $P_{F,0}$ für einen Dipol in einem

homogenen Medium erhält man

$$\frac{\tau_F}{\tau_{F,0}} = \left(\frac{P}{P_0} \right)^{-1}. \quad (2.13)$$

Die abgestrahlte Leistung eines Dipols mit der Frequenz ν , ergibt sich für das lokale elektrische Feld $\vec{E}(\vec{r})$ am Ort \vec{r}_0 des Dipols \vec{p} gemäß dem Poynting-Theorem zu [18, 25, 27]

$$P = \pi\nu \text{Im} \left\{ {}^* \vec{p} \cdot \vec{E}(\vec{r}_0) \right\}. \quad (2.14)$$

Dabei lässt sich das lokale elektrische Feld $\vec{E}(\vec{r}_0)$ in die beiden Komponenten

$$\vec{E}(\vec{r}_0) = \vec{E}_0(\vec{r}_0) + \vec{E}_s(\vec{r}_0) \quad (2.15)$$

zerlegen, wobei $\vec{E}_0(\vec{r}_0)$ das primäre Dipolfeld und $\vec{E}_s(\vec{r}_0)$ das durch die Umgebung gestreute Feld am Ort des Dipols ist. Damit erhält man für die abgestrahlte Leistung:

$$P = \pi\nu \text{Im} \left\{ {}^* \vec{p} \cdot \vec{E}_0(\vec{r}_0) + {}^* \vec{p} \cdot \vec{E}_s(\vec{r}_0) \right\}. \quad (2.16)$$

Der erste Term der Summe entspricht der abgestrahlten Leistung eines Dipols mit der Wellenzahl k_1 in einem homogen Medium mit Brechungsindex n_1 [7, 28]

$$P_0 = \frac{p_0^2}{6} \frac{\nu}{\varepsilon_0 \varepsilon_1} k_1^3. \quad (2.17)$$

Der zweite Term ist das gestreute Feld am Ort des Dipols. Das gestreute Feld stellt hier das an der Grenzfläche reflektierte Feld dar. Es gilt: $\vec{E}_s = \vec{E}_{\text{ref}}$. An der Grenzfläche beider Medien kommt es in Abhängigkeit von der Polarisationsrichtung des emittierten Fluoreszenzlichtes zur teilweisen Reflektion von diesem und damit zur Interferenz mit dem primären Dipolfeld $\vec{E}_0(\vec{r}_0)$. Durch Division der Gleichung 2.14 mit P_0 erhält man die normierte abgestrahlte Leistung des Dipols am Ort \vec{r}_0 :

$$\frac{P}{P_0} = 1 + \frac{6\pi\varepsilon_0\varepsilon_1}{p_0^2} \frac{1}{k_1^3} \text{Im} \left\{ {}^* \vec{p}_0 \cdot \vec{E}_{\text{ref}}(\vec{r}_0) \right\}. \quad (2.18)$$

Mit dem reflektierten Feld $\vec{E}_{\text{ref}}(\vec{r}_0)$ gemäß Gleichung A.1¹⁰ und der Substitution von $s = k_\rho/k_1$ und $s_z = \sqrt{1-s^2} = k_{z_1}/k_1$ mit k_ρ bzw. k_{z_1} als Projektion der Wellenzahl in einem zylindrischen- bzw. kartesischen Koordinatensystem erhält man für einen Dipol mit dem Abstand z_0 vor einer dielektrischen Grenzfläche

$$\begin{aligned} \frac{P}{P_0} = 1 &+ \frac{p_x^2 + p_y^2}{p_0^2} \frac{3}{4} \left(\int_0^1 + \int_1^\infty \right) \text{Re} \left\{ \frac{s}{s_z} (r^s - s_z^2 r^p) e^{2ik_1 z_0 s_z} \right\} ds \\ &+ \frac{p_z^2}{p_0^2} \frac{3}{2} \left(\int_0^1 + \int_1^\infty \right) \text{Re} \left\{ \frac{s^3}{s_z} r^p e^{2ik_1 z_0 s_z} \right\} ds. \end{aligned} \quad (2.19)$$

¹⁰Die konzeptionelle Herleitung des Dipolfeldes erfolgt in Kapitel 3. Die Herleitung für den Fall des reflektierten Feldes am Ort des Dipols erfolgt im Anhang A.1.1.

Dabei sind die Fresnelschen Reflektionskoeffizienten r^s und r^p als Funktionen von s definiert (siehe Anhang Gleichung A.5). Das Integrationsintervall $[0 \dots \infty]$ kann in die zwei Teilintervalle $[0 \dots 1]$ und $[1 \dots \infty]$ aufgeteilt werden. Das erste Intervall spiegelt den Anteil ebener Wellen und das zweite den evaneszenten Wellen wieder. Das Feld des Dipols wechselwirkt damit mit seinen eigenen von der Oberfläche reflektierten Wellen. Der Integrand ist dabei oszillierend für den Anteil ebener Wellen und exponentiell fallend für den Fall evaneszenten Wellen. Setzt man nun den Ausdruck für die normierte Leistung gemäß Gleichung 2.19 in Gleichung 2.13 ein, so erhält man den Verlauf für die normierte Lebensdauer $\tau_F/\tau_{F,0}$ eines fluoreszenten Moleküls in Abhängigkeit vom Abstand z_0 zur Grenzfläche zweier Medien mit verschiedenen Brechungsindizes $n_{1,2}$ (siehe Abbildung 2.2). Der zweite und dritte Term von Gleichung 2.19 entsprechen jeweils dem Dipol, der parallel und senkrecht zur Oberfläche orientiert ist.

Demnach kann ein Dipol mit beliebiger Orientierung (Θ, Φ) stets in seine Fundamentalkomponenten zerlegt werden. Das sind seine senkrechte Komponente $(\Theta = 0^\circ)$, also der Dipol entlang der z -Achse, und seine parallele Komponente $(\Theta = 90^\circ)$, für die man ohne Beschränkung der Allgemeinheit die x -Achse $(\Phi = 0^\circ)$ wählt:

$$\vec{p} = p_z \vec{e}_z + p_x \vec{e}_x = \cos \Theta p \vec{e}_z + \sin \Theta p \vec{e}_x. \quad (2.20)$$

Damit erhält man die abgestrahlte Leistung P eines beliebig in Θ orientierten Dipols durch die Summation der abgestrahlten Leistung des senkrechten und des parallelen Dipols:

$$P = P_\perp \cos^2 \Theta + P_\parallel \sin^2 \Theta. \quad (2.21)$$

Ist die Rotation des Dipols τ_{rot} (siehe Kapitel 2.2.1) deutlich schneller als die Lebensdauer τ des angeregten Zustandes oder ist die inkohärente Abstrahlung eines Ensembles von Molekülen mit beliebiger Orientierung gegeben, so erhält man die abgestrahlte Leistung aus der Summe dreier inkohärent strahlender Dipole entlang der Hauptachsen x , y und z [19]:

$$P = \frac{1}{3} P_\perp + \frac{2}{3} P_\parallel. \quad (2.22)$$

Mit Gleichung 2.13 und 2.21 ergibt sich die Lebensdauer eines beliebig in Θ orientierten Dipols mit einem Abstand z_0 von der Grenzfläche zu [29]

$$\frac{1}{\tau_F(z_0, \Theta)} = \frac{\cos^2(\Theta)}{\tau_{F,\perp}(z_0)} + \frac{\sin^2(\Theta)}{\tau_{F,\parallel}(z_0)}. \quad (2.23)$$

2.1.5 Absorptions- vs. Emissionsspektrum

Das Emissionsspektrum eines fluoreszenten Moleküls ist gegenüber dem Absorptionsspektrum rotverschoben (bathochromer Effekt). Man spricht im Allgemeinen von der Stokes-Verschiebung¹¹. Die Ursache für diese Rotverschiebung kann vielfältig sein und ist im Fall

¹¹engl. stokes shift

der fluoreszenzmikroskopischen Messung in wässriger Lösung mit der nicht-strahlenden Lösungsmittelrelaxation zu erklären, die mit einem Energieverlust einhergeht. Die Stokes-Verschiebung ist die Grundvoraussetzung für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie, da dadurch die Trennung des Emissionslichts vom Anregungslicht mittels eines dichroitischen Spiegels ermöglicht wird.

2.2 Orientierung eines Dipols im Raum

“The dependence of the density of the energy flow (...) from the angle (...) of observation (and from the polarization) on a large hemisphere around the dipole gives rise to significant interference patterns (...) which maybe used for the study of the multipole nature and the orientation of the emitter.“

“Die Abhängigkeit der Dichte des Energieflusses (also der Photonenstromdichte, Anm. d. A.) vom Beobachtungswinkel und der Polarisation auf einer (entsprechend, Anm. d. A.) großen Kugeloberfläche um den Dipol herum führt zu einem unverwechselbaren Interferenzbild (...), das vielleicht dazu genutzt werden kann, die Natur des Multipols und die Orientierung des Senders zu untersuchen.“

K. H. Tews, Göttingen, 1974 [29]

Die Bestimmung der dreidimensionalen (3D) Orientierung eines fluoreszenten Moleküls ist untrennbar mit der Orientierung seines Dipolmomentes verbunden. Die Emission von Strahlung durch einen Dipol ist neben der Energie, insbesondere durch seine Abstrahlcharakteristik ausgezeichnet. Dabei ist sowohl der Polarisationsgrad als auch die Leistung abhängig von der Richtung der Emission. Dieser Umstand wurde 1974 durch Karl-Heinz Tews bereits treffend und weitsichtig formuliert und fand Eingang in einen Übersichtsartikel zum Thema “Lebensdauer fluoreszenter Moleküle in der Nähe einer Grenzfläche“ [29].

Aus Gründen der Übersichtlichkeit soll zunächst die rein polarisationsabhängige Untersuchung der Dipolemission durch die Betrachtung der Fluoreszenzanisotropie im Mittelpunkt stehen. Eine Anisotropie-Messung ist zunächst eine Methode am Molekül-Ensemble. Erst durch spezielle experimentelle Anpassungen kann diese Methode auch am Einzelmolekül Anwendung finden. Danach soll die Untersuchung auf die richtungsabhängige Emission und damit auf die 3D Orientierung erweitert werden.

2.2.1 Fluoreszenz-Anisotropie

Licht als elektromagnetische Welle besteht aus einem elektrischen Feld \vec{E} und einem magnetischen Feld \vec{B} , die beide senkrecht zueinander ausgerichtet sind und eine feste Phasenbeziehung besitzen. Dabei ist die Ausbreitungsrichtung der Welle durch das Kreuzprodukt

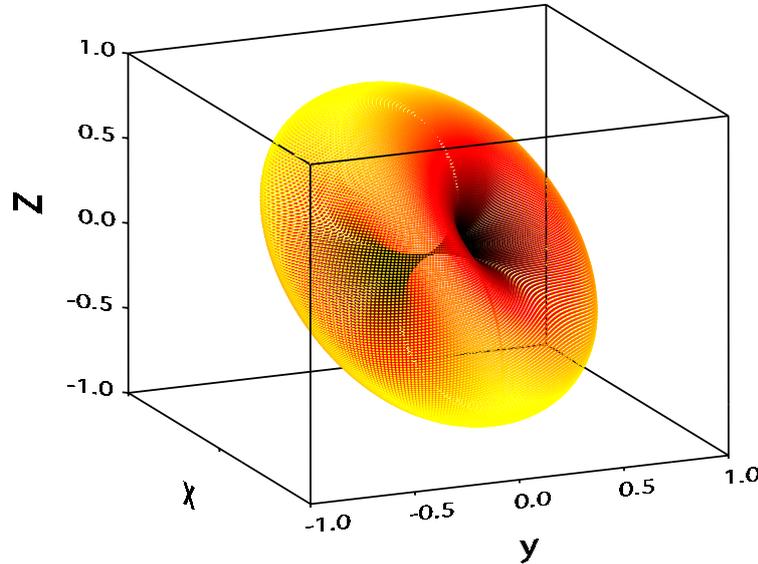


Abb. 2.3: Normierte Abstrahlcharakteristik P/P_0 eines Dipols als Funktion der Raumwinkel θ und φ . Die 3D Orientierung des Dipols ist $\Theta = 60^\circ$ und $\Phi = 45^\circ$. Entlang der Dipolachse \vec{p} ist die Emission gleich Null.

beider Felder, den Poynting-Vektor $\vec{S} = \vec{E} \times \vec{B}$, gegeben. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit definiert man die Richtung des \vec{E} -Feldes als die Polarisationsrichtung des Lichtes. Oszilliert das elektrische Feld entlang einer festen Richtung, so spricht man von linear polarisiertem Licht. Legt man das Koordinatensystem aus Abbildung 2.4 zu Grunde, so wird im Folgenden Licht, das entlang der y -Achse polarisiert ist, als s- polarisiert (0°) und Licht, das entlang der x -Achse polarisiert ist, als p- polarisiert (90°) bezeichnet. Alterniert der \vec{E} - Feldvektor zwischen beiden Achsen mit fester Periode und konstanter Amplitude, so handelt es sich um zirkular polarisiertes Licht. Ist die Amplitude nicht konstant, so spricht man von elliptisch polarisiertem Licht.

Die meisten Farbstoffe absorbieren Licht in Abhängigkeit ihres elektronischen Zustandes entlang einer bevorzugten Richtung. Diese Richtung ist durch das Übergangsdipolmoment M bzw. in der klassischen elektrodynamischen Beschreibung durch das Absorptionsdipolmoment \vec{p}_{abs} gegeben. Die Wechselwirkung zwischen dem äußeren elektrischen Feld \vec{E}_0 des Anregungslichtes und dem Dipol des Farbstoffes, und damit die Wahrscheinlichkeit für die Absorption, ist dann am größten, wenn beide parallel zueinander ausgerichtet sind, d.h.

$$|\vec{p}_{\text{abs}} \cdot \vec{E}_0|^2 \sim \cos^2 \Theta_{\text{abs}}, \quad (2.24)$$

dabei ist Θ_{abs} der Winkel zwischen dem \vec{E}_0 - Feldvektor des einfallenden Lichtes und der

Richtung des Absorptionsdipolmomentes \vec{p}_{abs} . Damit werden in einem Ensemble von Molekülen die Farbstoffe bevorzugt angeregt, deren Dipolmoment in Richtung des äußeren Feldes ausgerichtet ist. Dies nennt man *Photoselektion*. Das anschließende von einem Fluorophore emittierte Fluoreszenzlicht ist dann entsprechend der Richtung seines Dipolmomentes polarisiert. Da die Moleküle des Ensembles aber beliebig orientiert sein können, ist die Emission des Ensembles nicht vollständig polarisiert; man spricht von anisotroper Emission. Jede Änderung der Ausrichtung des Übergangsdipolmomentes der Emission relativ zu der der Absorption, z. B. durch Brownsche Molekularbewegung, verstärkt diese Anisotropie und führt zur Depolarisation der Fluoreszenz.

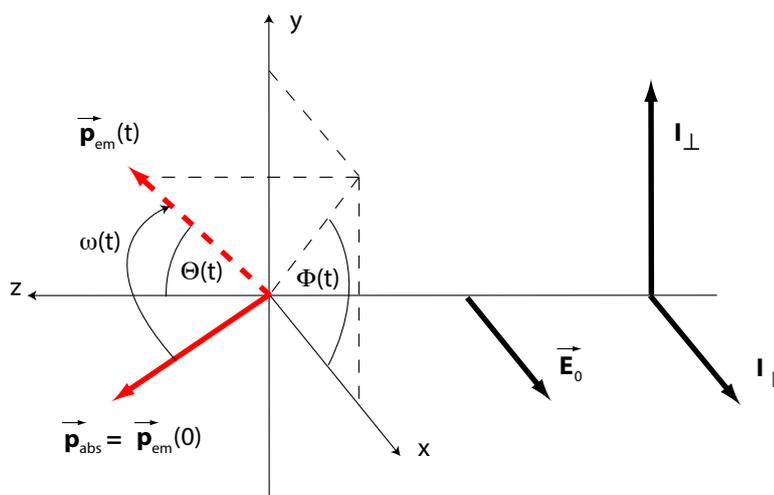


Abb. 2.4: Schematische Darstellung für den Messaufbau bei einer Fluoreszenzanisotropiemessung in konfokaler Mikroskopie.

Dynamische Anisotropie Wie im Abschnitt 2.1.4 beschrieben, kann jeder Dipol in seine Fundamentalkomponenten zerlegt werden. Diesen Komponenten entsprechen die Intensitäten I_x , I_y und I_z . Daraus ergibt sich die Gesamtintensität zu $I = I_x + I_y + I_z$. Gemäß Gleichung 2.24 ist die Intensität der drei Komponenten abhängig von ihrer Orientierung relativ zur Orientierung des elektrischen Feldes \vec{E}_0 des Anregungslichtes. O. B. d. A. wählt man die Orientierung des Anregungslichtes entlang der x -Achse, also s -polarisiertes Licht $\vec{E}_0 = (E_0, 0, 0)$. Die Komponenten des Dipols, die parallel bzw. senkrecht zur Polarisationsrichtung des Anregungslichtes stehen, werden mit I_{\parallel} und I_{\perp} bezeichnet. Anders als in der Fluorimetrie ist die Richtung von Anregung und Detektion in der konfokalen Mikroskopie entlang derselben Achse. Sie entspricht in der Regel der z -Achse. Damit erhält man für die Detektion durch einen Polarisator die beiden Polarisationskomponenten $I_{\parallel} = I_x$ und $I_{\perp} = I_y$. Die Komponente $I_{\perp} = I_z$ kann in der Fluorimetrie nicht gemessen werden, da die Emission eines Dipols entlang seiner Achse gleich Null ist (siehe Abbildung 2.3). In der konfokalen Mikroskopie trägt der Anteil I_z aufgrund der Depolarisationseffekte des

Objektivs durchaus zur Anisotropie bei [30]. Dieser Effekt soll hier aber vernachlässigt werden.

Wird die Probe durch eine gepulste Lichtquelle, z. B. einen Laserpuls, angeregt, so ist die Gesamtintensität zur Zeit t gerade $I(t) = I_{\parallel}(t) - 2I_{\perp}(t)$ und man definiert den Polarisationszustand $r(t)$ des emittierten Fluoreszenzlichtes mit der dynamischen Emissionsanisotropie zur Zeit t :

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I(t)}. \quad (2.25)$$

Wie im Folgenden noch gezeigt werden soll, ist der Verlauf von $r(t)$ sowohl durch die Lebensdauer τ_F des fluoreszenten Zustandes als auch durch die Rotation des Moleküls bestimmt.

Neben der Anisotropie r ist auch die Polarisation P gebräuchlich, um den Polarisationszustand des Fluoreszenzlichtes zu charakterisieren:

$$P(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + I_{\perp}(t)}. \quad (2.26)$$

Obwohl sich beide Ausdrücke nicht prinzipiell voneinander unterscheiden, ist mit der Definition der Anisotropie in vielen Fällen ein einfacherer mathematischer Ausdruck möglich.

Statische Anisotropie Wird die Probe durch eine kontinuierliche Lichtquelle angeregt, z. B. einem *continuous wave*¹² (cw) Laser, so detektiert man in den Polarisationskanälen eine mittlere Intensität $\langle I_{\parallel} \rangle$ bzw. $\langle I_{\perp} \rangle$. Man spricht nun von der statischen Anisotropie $\langle r \rangle$. Gemäß dem zeitlichen Mittel der zeitabhängigen Größe $r(t)$ erhält man die auf die Gesamtintensität normierte statische Anisotropie zu

$$\langle r \rangle = \frac{\int_0^{\infty} r(t) I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}. \quad (2.27)$$

Mit Gleichung 2.8 ergibt sich im Falle einer konstanten Lebensdauer τ_F des angeregten Zustandes

$$\langle r \rangle = \frac{1}{\tau_F} \int_0^{\infty} r(t) e^{-t/\tau_F} dt. \quad (2.28)$$

Brownsche Molekularbewegung oder freie Rotation Wenn das Molekül innerhalb der Lebensdauer τ_F des angeregten fluoreszenten Zustandes rotiert, so ist das emittierte Fluoreszenzlicht teilweise oder total depolarisiert. Der Grad der Depolarisation gibt Auskunft

¹²engl. continuous wave laser, deutsch Dauerstrichlaser

über die Beweglichkeit des Moleküls, die von Form und Größe des Moleküls selbst sowie von der Viskosität des umgebenden Lösungsmittels abhängt. Für die dynamische Anisotropie $r(t)$ ergibt sich bei freier Rotation der Ausdruck (siehe Anhang A.1.2)

$$r(t) = r_0 e^{-6D_{\text{rot}}t} = r_0 e^{-t/\tau_{\text{rot}}} \quad (2.29)$$

mit der Rotationskorrelationszeit $\tau_{\text{rot}} = (6D_{\text{rot}})^{-1}$. Mit der Stokes-Einstein-Relation $D_{\text{rot}} = RT/6V\eta$ und $V = 3/4\pi r^3$ als hydrodynamisches Volumen und r als hydrodynamischem Radius im Falle eines sphärischen Moleküls, der Viskosität η , der universellen Gaskonstante R sowie der absoluten Temperatur T ergibt sich die Verbindung aus Rotationskorrelationszeit und den Parametern des Moleküls und seiner Umgebung. Das Zeitfenster für quantitative Aussagen des Anisotropieverlaufs ist abhängig von der Geschwindigkeit der Rotation in Bezug auf die Lebensdauer τ_{F} . Ist die Rotation langsam im Vergleich zur Lebensdauer, so gilt $r(t) \approx r_0$. Ist die Rotation deutlich schneller als die Lebensdauer, erhält man $r(t) \approx 0$. Für die statische Anisotropie $\langle r \rangle$ erhält man

$$\langle r \rangle = r_0 \frac{\tau_{\text{rot}}}{\tau_{\text{rot}} + \tau_{\text{F}}}. \quad (2.30)$$

2.2.2 3D Orientierung fluoreszenter Moleküle in der konfokalen Mikroskopie

Ein historischer Überblick

Nachdem die konfokale Mikroskopie ihre erste Anwendung an einzelnen, fluoreszenten Molekülen fand, kam bereits nach kurzer Zeit die Frage nach der Orientierung solcher Moleküle im Raum auf, die im Folgenden als 3D Orientierung bezeichnet werden soll. Wie bereits dargestellt, findet die Fluoreszenz ihren Ursprung in einem delokalisierten π -Elektronensystem, welches seinerseits als Dipol beschrieben werden kann. Die Abstrahlung eines Dipols ist anisotrop und ist in Abbildung 2.3 für einen Dipol in einem homogenen Medium graphisch dargestellt. D.h., die Wahrscheinlichkeit für die Emission eines Photons ist abhängig vom Raumwinkel, in den das Photon emittiert wird. Ausgehend von dieser Grundlage wurde erst die 2D Orientierung [30–33] und später zahlreiche Methoden zur Bestimmung der 3D Orientierung entwickelt. Grundsätzlich kann man bei der 3D Orientierung zwischen zwei Klassen unterscheiden: Zum einen ist die Orientierung durch das Interferenzbild der abgestrahlten Fluoreszenzphotonen zugänglich [3, 34–38]. Zum anderen kann anhand der richtungsabhängigen Intensität und deren Polarisierung die Orientierung bestimmt werden [4, 5, 8, 39–46]. Die hier vorgestellte Methode kann prinzipiell in die Klasse der Intensitätsverteilungen eingeordnet werden. Die Methode basiert auf einer im Jahre 2001 von Fourkas vorgestellten theoretischen Arbeit, die die Aufspaltung der konfokal detektierten Fluoreszenzintensität in drei bzw. vier Polarisationskanäle vorsieht[5]. Die von Hohlbein u. Hübner im Jahre 2005 vorgestellte erste experimentelle Realisierung[8], wandelt diese Aufspaltung derart ab, als das neben der Polarisierung eine zusätzliche Aufspaltung in zwei Raumwinkelbereiche erfolgt. Die Funktionsweise der Methode wurde zunächst an fluoreszenten Latexkügelchen sowie an einfachen Perylenen

eingebettet in PMMA¹³ gezeigt. Später folgte eine Arbeit über die rauschbedingten Grenzen bei der Bestimmung der 3D Orientierung[8]. In der hier vorliegenden Arbeit sollen nun erstmals konkrete Fragestellungen für Moleküle beantwortet werden, die die Kenntnis der Orientierung des Moleküls voraussetzen.

Experimentelle Realisierung

Ausgehend von der anisotropen Abstrahlung des Dipols, kann neben der Polarisation des Fluoreszenzlichtes auch die unterschiedliche Abstrahlung in verschiedene Raumwinkelbereiche $d\Omega = \sin\theta d\theta d\phi$ für die Bestimmung der 3D Orientierung genutzt werden. In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie werden für die Detektion der Fluoreszenz Objektive mit einer hohen numerischen Apertur (NA), d.h. mit einem großen Sammelnwinkel, benutzt. Der Sammelnwinkel ist mit dem halben Öffnungswinkel α_r des Objektivs gegeben. Es gilt: $NA = n \sin \alpha_r$ mit n als Brechungsindex des Immersionsmediums. Dieser Sammelnwinkel wird in verschiedene Bereiche aufgeteilt. Das Verhältnis des jeweils in diesen Bereichen gesammelten Fluoreszenzlichtes, gibt Aufschluss über die Orientierung des Dipols. In Abbildung 2.5 (a) ist der experimentelle Aufbau schematisch dargestellt. Das mit dem Objektiv gesammelte fluoreszente Licht wird durch einen Lochspiegel und einen polarisierenden Strahlteiler (ST) in drei Komponenten aufgeteilt. Durch den Lochspiegel in der konjugierten Ebene des Objektivs, dessen elliptische Apertur in der Projektion bei 45° eine Kreisscheibe ergibt, kann der Teil des Fluoreszenzlichtes, der nahe der optischen Achse emittiert wird, passieren. Dieser Bereich wird als zentraler Bereich bezeichnet. Der Bereich für Fluoreszenzlicht, das mit größerem Winkel relativ zur optischen Achse emittiert und somit durch den Spiegel reflektiert wird, soll als Rand- bzw. Kranzbereich bezeichnet werden. Das Licht des zentralen Bereiches wird zusätzlich durch den polarisierenden Strahlteiler in seine beiden Polarisationskomponenten aufgeteilt. Die Detektion der Fluoreszenzphotonen erfolgt schließlich mithilfe von Lawinendetektoren (APD).

In Abbildung 2.5 (b) ist die Abstrahlcharakteristik eines Dipols und die Aufteilung in die beiden ausgezeichneten Raumwinkelbereiche schematisch dargestellt. Der zentrale Bereich ist durch den Winkelbereich $0 < \theta < \alpha_c$ definiert. Dabei ist α_c durch die Öffnung des Lochspiegels gegeben¹⁴. Der Randbereich wird durch den Winkelbereich $\alpha_c < \theta < \alpha_r$ bestimmt. Der Winkel α_r ist gerade der halbe Öffnungswinkel des Objektivs¹⁵.

Die Orientierung des Dipols und damit des fluoreszenten Moleküls soll im Folgenden durch zwei ausgezeichnete Winkel charakterisiert werden. Das dafür verwendete Koordinatensystem ist in Abbildung 2.5 (c) gezeigt. Die Orientierung des Moleküls in der konfokalen Ebene (x - y) ist durch die Projektion des Dipols auf die Ebene mit dem azimuthalen Winkel Φ gegeben. Die Orientierung aus der konfokalen Ebene heraus ist nach Konvention durch

¹³umgangssprachlich Acrylglas

¹⁴Hier steht c für das englische *center* entsprechend dem Deutschen für Zentrum.

¹⁵Hier steht r für das englische *rim* entsprechend dem Deutschen für Kranz bzw. Rand.

die Projektion des Dipolmomentes auf die optische Achse (z) mit dem polaren Winkel Θ gegeben.

Um die Vorgehensweise zur Bestimmung der 3D Orientierung zu illustrieren, zeigt Abbildung 2.6 die vier Fälle der Orientierung eines Moleküls, die die Grenzen des Wertebereiches

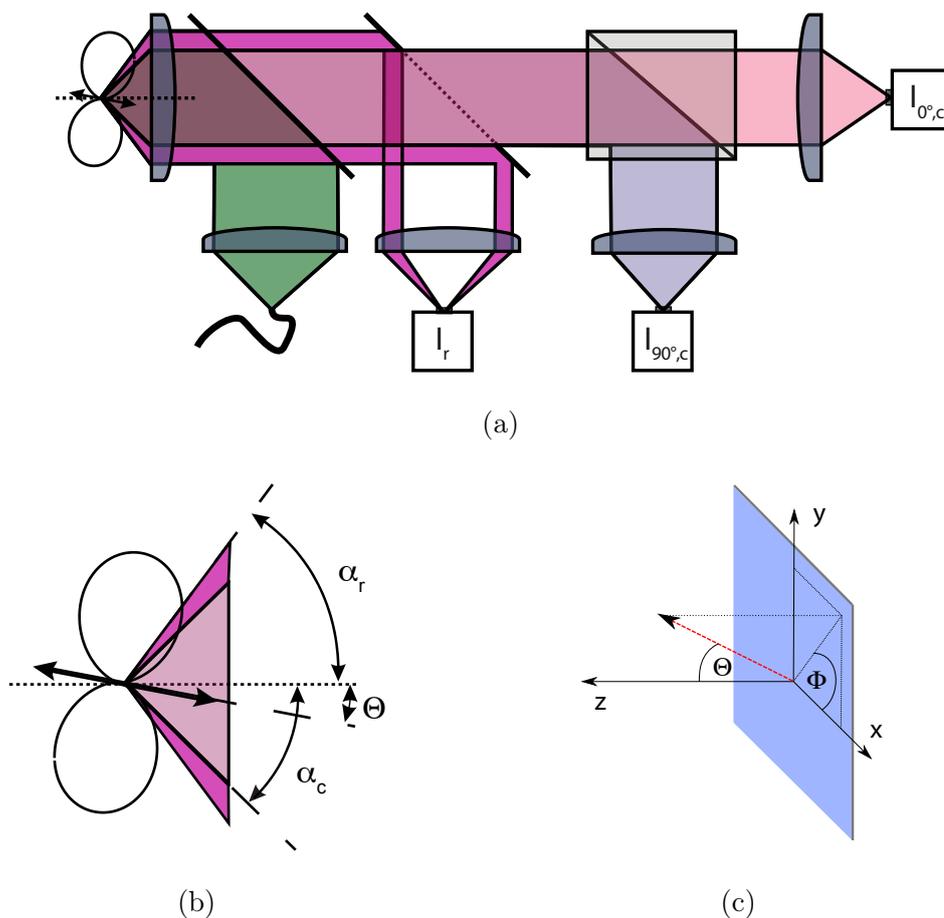


Abb. 2.5: (a) Schematische Darstellung des verwendeten konfokalen Mikroskops mit Anregungs- und Detektionsstrahlengang. Der Lochspiegel und der polarisationsabhängige Strahlteiler hinter dem dichroitischen Spiegel dienen der Aufteilung der orientierungsabhängigen Dipolemission eines einzelnen fluoreszenten Moleküls in drei ausgezeichnete Intensitätskanäle $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r . (b) Schematische Darstellung eines Dipols in unmittelbarer Nähe des Anregungs- bzw. Detektionsfokus in einem homogenen Medium. Winkeldefinitionen: Der Polarwinkel Θ als Winkel zwischen der optischen Achse und der Dipolachse bzw. der Achse des Übergangsdipolmomentes, der Grenzwinkel für die zentrale Apertur des Lochspiegels α_c , sowie der Öffnungswinkel des benutzten Objektivs α_r . (c) Definition des Koordinatensystems. Die optische Achse ist die z -Achse. Die x - y -Ebene repräsentiert die konfokale Ebene. Der rote Pfeil stellt die Orientierung des Dipols \vec{p} bzw. des Übergangsdipolmomentes M dar.

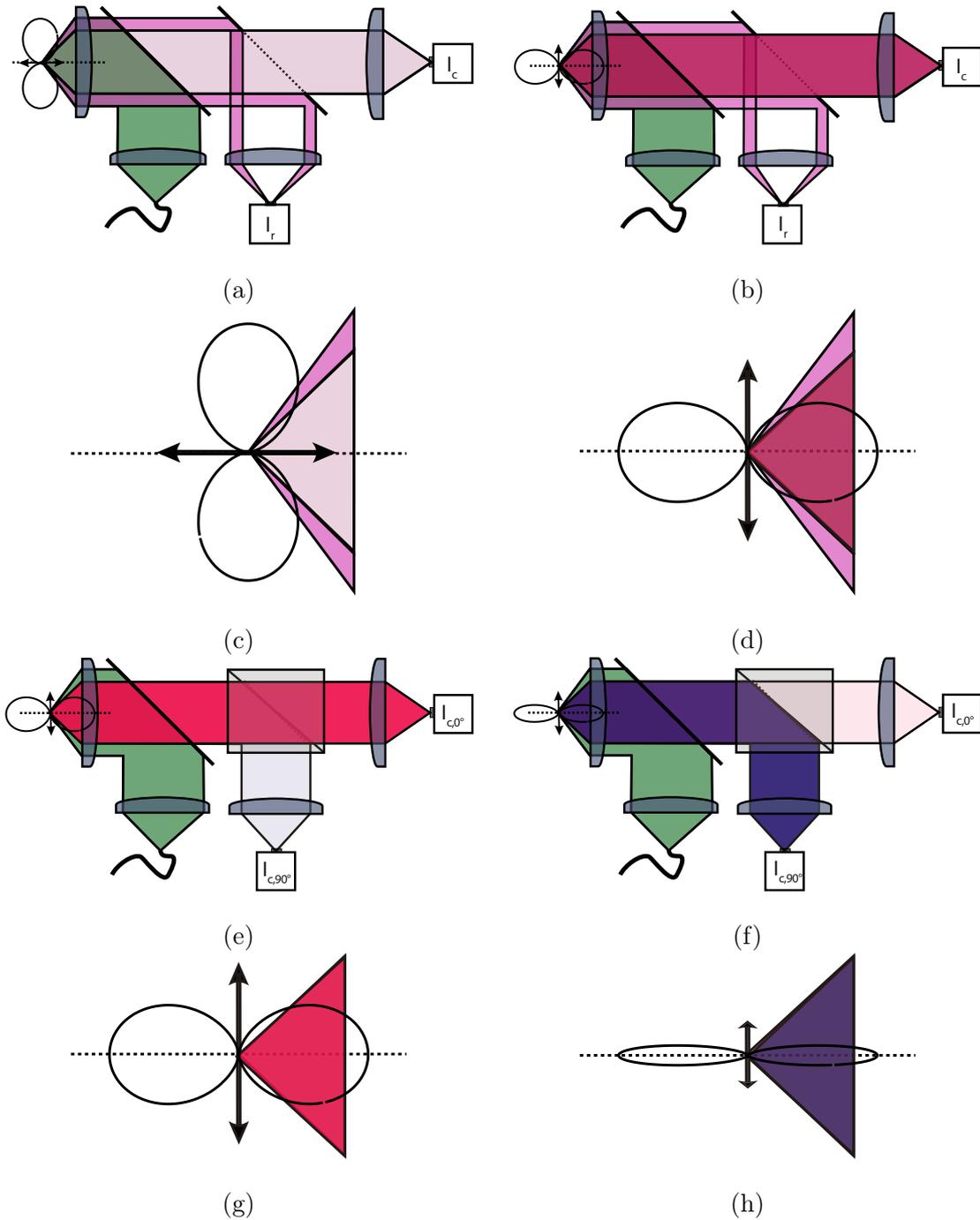


Abb. 2.6: Schematische Darstellung für die Aufteilung des Fluoreszenzlichtes durch den Lochspiegel (Inklination N) und durch den polarisierenden Strahlteiler (Polarisation P) jeweils für die Grenzfälle der Orientierung bei einem Polarwinkel von $\Theta = 0^\circ$ (a,c) bzw. 90° (b,d) und einem Azimutwinkel von $\Phi = 0^\circ$ (e,g) bzw. 90° (f,h).

für Θ (c,d) und Φ (g,h) darstellen. Dabei ist neben dem Dipol auch der Strahlengang des emittierten Fluoreszenzlichtes schematisch dargestellt. Für die Inklination N ist die Polarisationsrichtung zunächst ohne Bedeutung. Daher ist für die Grenzfälle des Polarwinkels nur der Lochspiegel dargestellt. Für $\Theta = 0^\circ$ (a,c) ist die Emission in den zentralen Bereich am geringsten. Für $\Theta = 90^\circ$ (b,d) ist die Emission in den zentralen Bereich hingegen am größten. Auffällig ist hier, dass die Emission im Kranzbereich nur schwach von der Orientierung abhängt. Die Polarisation wird nur im zentralen Bereich getrennt. Für $\Phi = 0^\circ$ (e,g) emittiert der Dipol nur s- polarisiertes Licht, entsprechend für $\Phi = 90^\circ$ (e,g) nur p- polarisiertes Licht. Dieser Umstand gilt so jedoch nur im Falle $\Theta = 90^\circ$. Nimmt der Polarwinkel ab, so nimmt der Grad der maximalen Polarisation ab. Man spricht auch von Depolarisation. Dieser Umstand soll in Kapitel 3 noch näher beleuchtet werden.

Theoretische Grundlagen

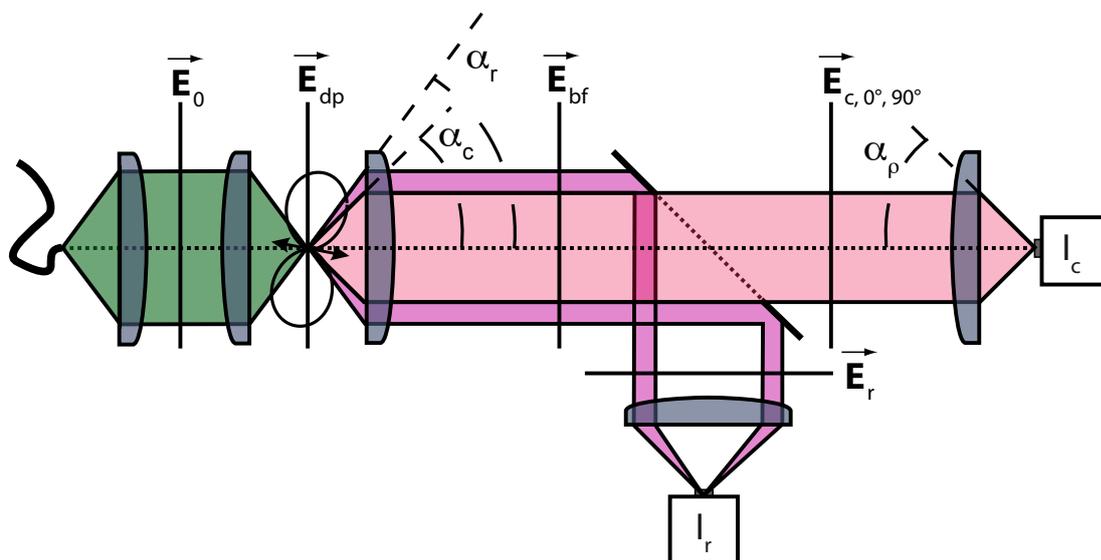


Abb. 2.7: Schematische Darstellung des Lichtweges bei konfokaler Anregung zur Ableitung der entsprechenden Intensitäten für die Bestimmung der 3D Orientierung eines fluoreszenten Moleküls. Zur Nomenklatur siehe Text.

Die folgende theoretische Abhandlung folgt den Ausführungen von Hohlbein u. Hübner [4] basierend auf den theoretischen Grundlagen von Fourkas [5] und Török et al. [6].

Für die theoretische Beschreibung wird angenommen, dass sich der Dipol \vec{p} nach Gleichung 2.11 als Punktlichtquelle in einem homogenen Medium mit Brechungsindex n befindet. Das Feld des Dipols ist also nicht gestört. Des Weiteren soll der Dipol im Zentrum des Anregungs- bzw. Detektionsfokus sitzen, also $\vec{r}_0 = (0, 0, 0)$ gelten. Der Richtungsvektor eines vom Dipol ausgehenden Strahls $\vec{s} = (s_x, s_y, s_z)$ ist mit dem Polarwinkel θ und dem

Azimutwinkel ϕ durch folgenden Ausdruck gegeben:

$$\vec{s} = \sin \theta \cos \varphi \vec{e}_x + \sin \theta \sin \varphi \vec{e}_y + \cos \theta \vec{e}_z. \quad (2.31)$$

Die Anregung des Dipols wird zunächst als unabhängig vom eingestrahnten Feld \vec{E}_0 angenommen. Damit erhält man das elektrische Feld des Dipols für jede beliebige Richtung mit $\vec{E}_{\text{dp}} = \vec{s} \times \vec{p} \times \vec{s}$ zu [31]:

$$\vec{E}_{\text{dp}}(\theta, \varphi, \Theta, \Phi) = \begin{pmatrix} (\cos^2 \theta + \sin^2 \theta \sin^2 \varphi) \sin \Theta \cos \Phi - \sin \theta \cos \theta \cos \varphi \cos \Theta - \sin^2 \theta \sin \varphi \cos \varphi \sin \Theta \sin \Phi \\ -\sin 2\theta \sin \varphi \cos \varphi \sin \Theta \cos \Phi - \sin \theta \cos \theta \sin \varphi \cos \Theta + (\cos^2 \theta + \sin^2 \theta \cos^2 \varphi) \sin \Theta \sin \Phi \\ -\sin \theta \cos \theta \cos \varphi \sin \Theta \cos \Phi + \sin^2 \theta \cos \Theta - \sin \theta \cos \theta \sin \varphi \sin \Theta \sin \Phi \end{pmatrix}. \quad (2.32)$$

Das vom Dipol emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Mikroskopobjektiv gesammelt und nach dem Objektiv durch einen Polarisator in die beiden Polarisationskomponenten s und p zerlegt. Die oben gemachten Annahmen werden insofern erweitert, als dass das Objektiv als ideal und polarisationserhaltend beschrieben werden kann. Damit ist jeder Strahl ausgehend vom Dipol ein Brennpunktstrahl der durch das Objektiv in einen Parallelstrahl übergeht. Das optische System ist in Abbildung 2.7 schematisch dargestellt. Die Wirkung des Objektivs kann durch einen Matrix-Algorithmus wie folgt beschrieben werden [6, 47]

$$\vec{E}_{\text{bf}} = \mathbf{A} \cdot \mathbf{R}^{-1} \cdot \mathbf{L}^{-1} \cdot \mathbf{T} \cdot \mathbf{R} \vec{E}_{\text{dp}}. \quad (2.33)$$

wobei die Matrix \mathbf{R} die Koordinatentransformation für die Rotation um die z -Achse ($\mp\varphi$) beschreibt:

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} \cos \varphi & \sin \varphi & 0 \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \quad (2.34)$$

die Matrix \mathbf{L} den Einfluss der Linse auf das Elektrische Feld, insbesondere dessen Polarisation ($+\theta$), beschreibt:

$$\mathbf{L} = \begin{pmatrix} \cos \theta & 0 & \sin \theta \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin \theta & 0 & \cos \theta \end{pmatrix}, \quad (2.35)$$

die Matrix \mathbf{T} die winkel- und polarisationsabhängige Transmission der Linse berücksichtigt:

$$\mathbf{T} = \sqrt{\cos \theta} \begin{pmatrix} \tau_p & 0 & 0 \\ 0 & \tau_s & 0 \\ 0 & 0 & \tau_p \end{pmatrix}, \quad (2.36)$$

und der Polarisator \mathbf{A} , der die beiden fundamentalen Polarisationsrichtungen s ($\gamma = 0^\circ$) und p ($\gamma = 90^\circ$) trennt:

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} \cos^2 \gamma & \sin \gamma \cos \gamma & 0 \\ -\sin \gamma \cos \gamma & \sin^2 \gamma & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}. \quad (2.37)$$

Für die Ableitung des elektrischen Feldes beider Polarisationsrichtungen in der hinteren Brennebene soll die polarisationsabhängige Transmission des Objektivs nicht berücksichtigt werden ($\tau_s = \tau_p = 1$). In skalarer Darstellung des Vektorfeldes

$$E_{\text{bf}} = \vec{O} \cdot \vec{E}_{\text{bf}},$$

mit $\vec{O} = (1, 1, 1)$ als den Einheitsvektor folgt:

$$\begin{aligned} E_{\text{bf},0^\circ}(\theta, \varphi, \Theta, \Phi) &= (\cos \theta \cos^2 \varphi + \sin^2 \varphi) \sin \Theta \cos \Phi + \dots \\ &\dots (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi \sin \Theta \sin \Phi - \dots \\ &\dots \sin \theta \cos \varphi \cos \Theta \end{aligned} \quad (2.38)$$

$$\begin{aligned} E_{\text{bf},90^\circ}(\theta, \varphi, \Theta, \Phi) &= (\cos \theta - 1) \cos \varphi \sin \varphi \sin \Theta \cos \Phi + \dots \\ &\dots (\cos \theta \sin^2 \varphi + \cos^2 \varphi) \sin \Theta \sin \Phi - \dots \\ &\dots \sin \theta \sin \varphi \cos \Theta \end{aligned} \quad (2.39)$$

Gemäß den Ausführungen von Török et al. [6] ergibt sich die Intensität in der hinteren Brennebene¹⁶ zu

$$I = |E|^2 \quad (2.40)$$

Integriert man nun über die entsprechenden Bereiche der hinteren Brennebene, so erhält man die Gesamtintensität des jeweiligen Kanals für die Bestimmung der 3D Orientierung bei sogenannten inkohärenter Detektion, also bei einem intensitätsabhängigen Detektor in der hinteren Brennebene. Die Integration wird für φ von 0 bis 2π und für θ von 0 bis α_c für den Bereich niedriger Emissionswinkel (Zentrum) und von α_c bis α_r für den Bereich hoher Emissionswinkel (Kranz) durchgeführt. Die Integrale sind geschlossen analytisch lösbar und man erhält nach entsprechend algebraischer Umformung die folgenden Ausdrücke für die drei Intensitätskanäle $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r [4, 5, 8]:

$$I_r(\Theta) = 2I_{\text{tot}}(t, t + \tau) \left[(A_r - A_c) + (B_r - B_c) \sin^2 \Theta \right], \quad (2.41)$$

$$I_{0^\circ,c/90^\circ,c}(\Theta, \Phi) = I_{\text{tot}}(t, t + \tau) \left[A_c + B_c \sin^2 \Theta \begin{matrix} 0^\circ,c \\ \pm \\ 90^\circ,c \end{matrix} C_c \sin^2 \Theta \cos 2\Phi \right], \quad (2.42)$$

$$\begin{aligned} I_c(\Theta) &= I_{0^\circ,c}(\Theta, \Phi) + I_{90^\circ,c}(\Theta, \Phi) \\ &= 2I_{\text{tot}}(t, t + \tau) [A_c + B_c \sin^2 \Theta], \end{aligned} \quad (2.43)$$

dabei ist I_{tot} die in 4π Raumwinkel abgestrahlte totale Fluoreszenzintensität des Fluorophors. Die Variablen $A_{c,r}$, $B_{c,r}$, und $C_{c,r}$ sind

$$\begin{aligned} A_{c,r} &= \frac{1}{6} - \frac{1}{4} \cos \alpha_{c,r} + \frac{1}{12} \cos^3 \alpha_{c,r}, \\ B_{c,r} &= \frac{1}{8} \cos \alpha_{c,r} - \frac{1}{8} \cos^3 \alpha_{c,r}, \\ C_{c,r} &= \frac{7}{48} - \frac{1}{16} \cos \alpha_{c,r} - \frac{1}{16} \cos^2 \alpha_{c,r} - \frac{1}{48} \cos^3 \alpha_{c,r}, \end{aligned} \quad (2.44)$$

und werden vollständig durch die Detektionswinkel α_c und α_r bestimmt. Die detektierbare Intensität I_D ist damit nur eine Funktion des Polarwinkels Θ :

$$\begin{aligned} I_D(\Theta, \Phi) &= I_r(\Theta, \Phi) + I_c(\Theta, \Phi) \\ &= 2I_{\text{tot}}(t, t + \tau) [A_r + B_r \sin^2 \Theta]. \end{aligned} \quad (2.45)$$

¹⁶engl. back focal plane (bf), deutsch hintere Brennebene

Mit der üblichen Definition für die Polarisation $P := \frac{(I_{90^\circ,c} - I_{0^\circ,c})}{(I_{90^\circ,c} + I_{0^\circ,c})}$ und der in korrespondierender Weise zu definierenden Inklination $N := \frac{(I_r - I_c)}{(I_r + I_c)}$, kann der Polarwinkel Θ und der Azimutwinkel Φ wie folgt berechnet werden:

$$\Theta = \arcsin \sqrt{-\frac{2A_c - A_r + A_r N}{2B_c - B_r + B_r N}} \quad (2.46)$$

und

$$\Phi = \frac{1}{2} \arccos \left(-P \frac{A_c + B_c \sin^2 \Theta}{C_c \sin^2 \Theta} \right). \quad (2.47)$$

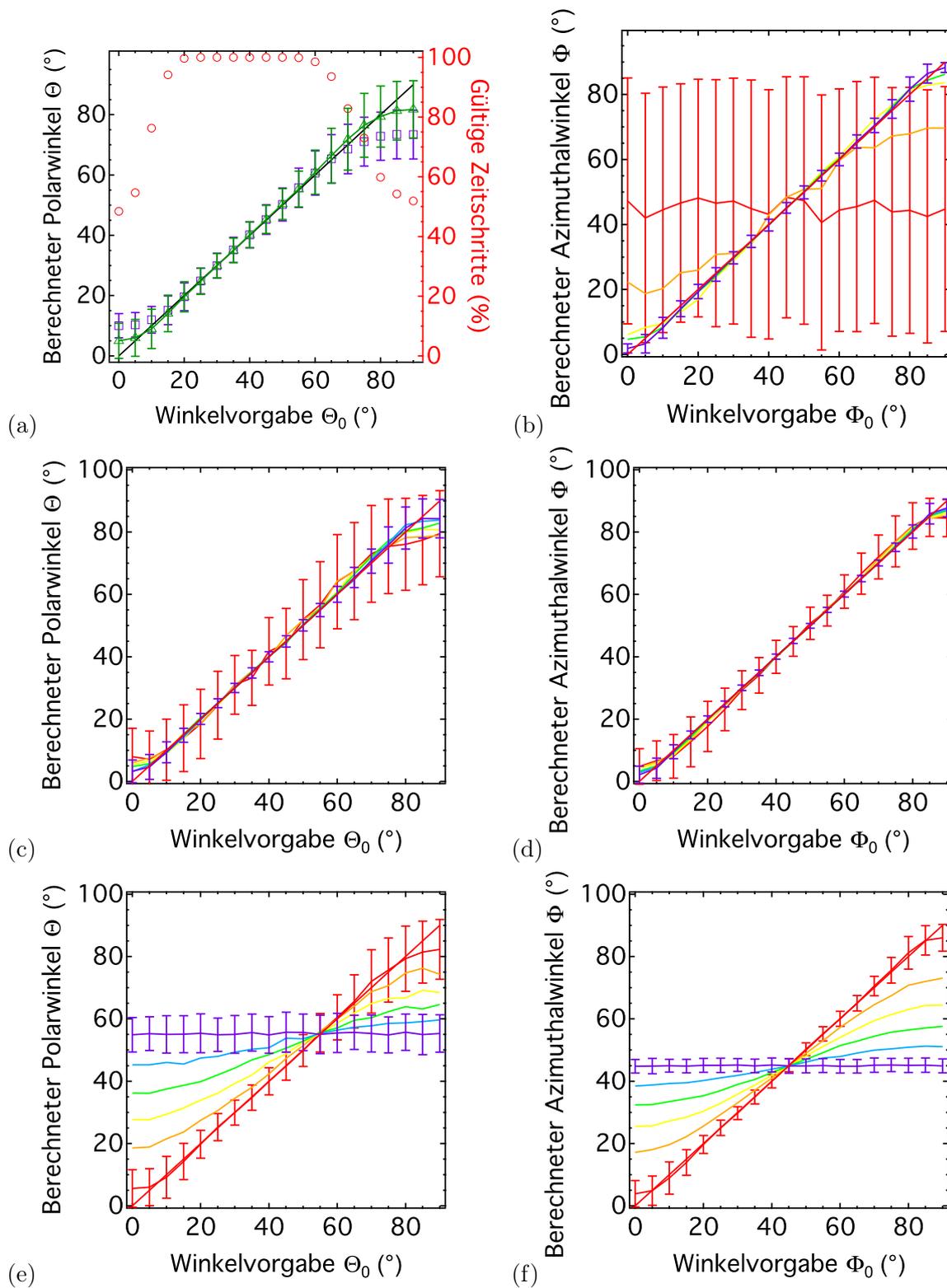
N und P sind unabhängig vom Vorzeichen der Winkel Θ und Φ . Zusammen mit der Symmetrie des Dipols ist der ermittelbare Zustandsraum für ein gegebenes Paar (P, N) auf ein Intervall für Θ und Φ von 0° bis 90° beschränkt. Der Zustandsraum ist damit achtfach degeneriert.

Der hier skizzierte Ansatz für die Bestimmung der 3D Orientierung eines Dipols im isotropen Medium soll in Kapitel 3 wieder aufgegriffen werden und um den Einfluss einer Grenzfläche zwischen zwei Medien unterschiedlicher Brechungsindizes erweitert werden.

Grenzen der Methode

Nachdem Hohlbein u. Hübner [4] im Jahr 2005 die im vorhergehenden Kapitel vorgestellte Methode zur Bestimmung der 3D Orientierung fluoreszenter Moleküle veröffentlichten, folgte im Jahr 2008 eine daran anschließende Arbeit, deren Ziel es war, die Güte der Methode in Bezug auf das Schrotrauschen als intrinsische Eigenschaft des Einzelquantenprozesses bei der Emission eines Fluoreszenzphotons zu untersuchen. Dafür wurde der Einfluss verschiedener Parameter (Ausgangsorientierung, Anzahl detektierbarer Photonen, Hintergrund etc.) auf die Bestimmung der Orientierung untersucht. Da es zum einen experimentell schwierig ist, die Orientierung eines Moleküls beliebig festzulegen oder gar gezielt

Abb. 2.8: (auf der nächsten Seite) Darstellung verschiedener Einflüsse auf die Bestimmung der 3D Orientierung anhand von MC- Simulationen vom Typ B (siehe Kapitel 3.2.2). (a) Berechnung des mittleren Polarwinkels und dessen Standardabweichung in Abhängigkeit des vorgegebenen Winkels Θ_0 ohne (lila Quadrate) und mit (grüne Dreiecke) Korrektur ungültiger Intensitätsverhältnisse. Der Anteil gültiger Intensitätsverhältnisse aller simulierter Zeitschritte (bins) ist in Form roter Kreise dargestellt. (b) Abhängigkeit des mit Korrektur ungültiger Intensitätsverhältnisse berechneten Azimutwinkels vom vorgegebenen Polarwinkel Θ_0 . (c,d) Abhängigkeit des berechneten Polarwinkels (c) und Azimutwinkels (d) von der Anzahl detektierbarer Photonen I_D . (e,f) Abhängigkeit des berechneten Polarwinkels (c) und Azimutwinkels (d) vom prozentualen Anteil des isotropen Hintergrundes. Für die Simulationen (a,b,e,f) wurde eine Gesamtzahl detektierbarer Photonen I_D von 500 Photonen je Simulation festgelegt. Vgl. [8]



zu ändern und zum anderen der Vergleich der Ergebnisse mit anderen optischen/nichtoptischen Methoden zur Bestimmung der Orientierung einzelner, fluoreszenter Moleküle nur schwer realisierbar ist, wurde die Untersuchung anhand von Monte Carlo (MC) Simulationen durchgeführt. Schließlich konnte anhand ausgewählter Testsysteme zumindest ein Teil der Simulationsergebnisse verifiziert werden.

Die Ergebnisse der Simulationen sind in Abbildung 2.8 dargestellt und werden dort in geraffter Form wiedergegeben (vgl. [8, 43]). Da die Methode auf der Berechnung von Intensitätsverhältnissen, der Polarisierung und Inklination, beruht, die gemäß der Gleichungen 2.46 und 2.47 in die entsprechenden Winkelwerte transformiert werden, kann es durch rauschbedingte Schwankungen der Intensität zu ungültigen Verhältnissen kommen, die nicht im Definitionsbereich der benannten Gleichungen liegen. In einem solchen Fall kann der erhaltene Wert entweder verworfen und damit von der Berechnung ausgeschlossen werden, oder auf den nächstmöglichen Wert korrigiert werden. Der Anteil ungültiger Intensitätsverhältnisse ist stark vom jeweils vorgegebenen Winkelwert abhängig und in Abbildung 2.8 (a) dargestellt. Es zeigt sich, dass die Korrektur ungültiger Werte bei der Bestimmung des Polarwinkels Θ zu Werten führt, die deutlich weniger vom jeweils vorgegebenen Winkel abweichen, jedoch durch eine Zunahme der Standardabweichung gekennzeichnet sind. Bei der Simulation des azimutalen Winkels in Abhängigkeit vom dazugehörigen Polarwinkel wird die fundamentale Kopplung der Abstrahlung polarisierten Lichtes durch einen Dipol vom beobachteten Raumwinkelelement deutlich. Da in Richtung des Dipolmomentes die beiden fundamentalen Polarisationsrichtungen gleichberechtigt emittiert werden, also die Nettopolarisation Null ist, schlägt die Bestimmung des azimutalen Winkels für kleine Polarwinkel $\Theta < 10^\circ$ fehl. In Abbildung 2.8 (b) ist dieser Effekt graphisch dargestellt. Für $\Theta \simeq 0^\circ$ ergibt sich der mittlere Azimutwinkel unabhängig vom vorgegebenen Winkel Φ zu $\langle \Phi \rangle = 45^\circ \pm 26^\circ$.

Abbildung 2.8 (c,d) zeigt die Abhängigkeit bei der Winkelbestimmung von der Anzahl detektierbarer Photonen I_D . Mit zunehmender Zahl emittierter Photonen nimmt der Einfluss des Schrotrauschen ab. Damit sinkt die Zahl ungültiger Intensitätswerte und damit die Standardabweichung des ermittelten mittleren Winkels. Da bereits für 100 detektierte Photonen der Einzelwert des polaren Winkels mit einer Standardabweichung von $\Delta\Theta < |\pm 15^\circ|$ bestimmt werden kann, sind bereits bei solch niedrigen Intensitätswerten Aussagen über relative Winkeländerungen möglich. Geht man von einer mittleren Emissionsrate des fluoreszenten Moleküls von 200 kHz aus, so ergibt dies eine Zeitauflösung von $500\mu s$ bei der Berechnung der Orientierung mit 100 Photonen / Zeitschritt.

Schließlich ist der Einfluss des unkorrelierten Hintergrundes in Abbildung 2.8 (e,f) dargestellt. Es zeigt sich, dass mit zunehmendem Hintergrund die Winkel in den jeweiligen Grenzwert eines isotropen Emitters münden, die durch das Verhältnis der Raumwinkel von Zentrum und Kranz definiert sind ($\langle \Theta \rangle = 57^\circ$ bzw. $\langle \Phi \rangle = 45^\circ$). Ist der Anteil des Hintergrundes am Gesamtsignal kleiner als 10% so kann der Einfluss weitestgehend vernachlässigt werden.

Es zeigt sich also, dass die Bestimmung der 3D Orientierung bei der hier zur Anwendung

kommenden intensitätsbasierten Methode maßgeblich von der vom Einzelmolekül stammenden Zahl an Photonen abhängig ist.

Die Bestimmung der Orientierung über verschiedene Intensitätskanäle hat entscheidende Vorteile gegenüber anderen Methoden zur Bestimmung der 3D Orientierung. Zum einen entfallen aufwendige Analyse- und Anpassungsalgorithmen, da man die Orientierung direkt aus der gemessenen Intensität berechnen kann. Zum Anderen kann die Intensität aus sogenannten Einzelphotonaten gewonnen werden. Diese Methodik eröffnet ein großes Feld neuer Möglichkeiten, die letztlich zur in Kapitel 4 vorgestellten Multi-Parameter-Messung führen soll.

2.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Nach der Entwicklung des ersten Konfokalmikroskops durch Minsky, der seine Entwicklung im Jahre 1957 als Patent anmeldete [48], wurde das Konfokalmikroskop aufgrund der hohen Sammeffizienz, der exzellenten Hintergrundreduktion sowie der höheren Auflösung ein Standard in der modernen Fluoreszenzmikroskopie.

Das konfokale Prinzip In Abbildung 2.9 ist das Prinzip eines Konfokalmikroskops gezeigt. Licht einer Punktlichtquelle wird über einen halbdurchlässigen Spiegel auf eine Linse gelenkt und von dieser in der Objektebene fokussiert. Von einem Objekt reflektiertes, gestreutes oder z. B. als Fluoreszenzlicht emittiertes Licht wird von derselben Linse gesammelt und auf eine Blende – das sogenannte *pinhole*¹⁷ – fokussiert. Licht, das nicht aus dem Fokus stammt, kann diese Blende nicht passieren und wird damit nicht detektiert. Da sowohl die Anregung als auch die Detektion durch das gleiche Objektiv erfolgen, wird der Aufbau konfokal genannt [49].

In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wird der Anregungs- vom Detektionsstrahlengang wellenlängenabhängig durch einen dichroitischen Spiegel getrennt. Dies ist durch die fundamentale Eigenschaft der Stokes-Verschiebung des Fluoreszenz gegenüber dem Anregungslicht möglich.

Scanning confocal optical microscopy (SCOM) ¹⁸ Die Abbildung mittels eines konfokalen Mikroskopes wird erst durch das punktweise Abrastern des untersuchten Objektes möglich. Dafür wird die Probe durch piezoelektrische Motoren mit einer Positioniergenauigkeit im nm-Bereich über das Objektiv und damit über das konfokale Volumen bewegt. Das Rasterbild entsteht als Summe der Intensitäten jedes angefahrenen Punktes. Zusätzlich zur Rasterung in der x - y -Ebene wird das Objektiv an sich piezoelektrisch in z -Richtung

¹⁷engl. pinhole, deutsch Nadelöhr

¹⁸engl. scanning confocal optical microscopy, deutsch für Rasterkonfokalmikroskop

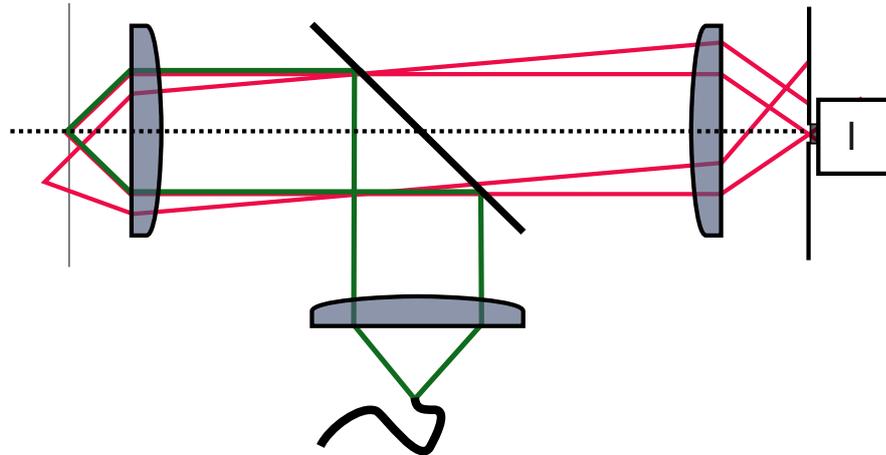


Abb. 2.9: Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips.

bewegt, wodurch die Abbildung in drei Dimensionen ermöglicht wird. Neben der direkten Bewegung der Probe kann das Rasterbild auch durch die Bewegung des Laserfokus in einem Laserscanverfahren¹⁹ realisiert werden [50].

TCSPC Die Wahrscheinlichkeit für die Emission eines Fluoreszenzphotons in einem bestimmten Zeitintervall ist durch die Lebensdauer des fluoreszenten Zustandes gegeben (siehe Abschnitt 2.1.3). Regt man die fluoreszenten Moleküle mit einem Laserpuls an und misst die Zeit zwischen dem Laserpuls selbst und der Detektion des emittierten Photons, so kann mithilfe des ermittelten Zeitintervalls auf die Lebensdauer zurückgeschlossen werden. Man spricht bei einer solchen Messung von zeitlich-korrelierter Detektion des einzelnen Photons, entsprechend in englischer Sprache *time-correlated single photon counting* (TCSPC) [51]. Um diese Messung realisieren zu können, muss der Laserpuls entsprechend kurz sein, um das Fluoreszenzsignal nicht zu überdecken. Außerdem muss die Wiederholrate des Lasers hoch sein (80 MHz), um eine entsprechende Anzahl an Ereignissen zu akquirieren. Die Zeitauflösung einer solchen Messung ist üblicherweise durch die Hardware, d.h. durch die Elektronik an sich (meist ps), der Breite des Laserpulses und den *jitter*²⁰ des Detektors (APD \approx 100-500 ns) gegeben.

2.3.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Durch die Brownsche Molekularbewegung kommt es in Flüssigkeiten zu lokalen Konzentrationsänderungen, die bei der Anregung fluoreszenter Moleküle und der anschließenden

¹⁹laser scanning microscop (LSM)

²⁰engl. jitter, deutsch Fluktuation

Detektion des Fluoreszenzsignals zu Intensitätsschwankungen führen. Diese Schwankungen können direkt mit der Diffusion und der lokalen Konzentration der fluoreszenten Moleküle in Verbindung gebracht werden. Im Jahre 1972 zeigten Magde et al. [52], das mit der Korrelationsanalyse des Fluoreszenzsignals beide Größen direkt zugänglich sind. Diese Methode ist als Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) bekannt. In den darauf folgenden Jahren erschienen mehrere Arbeiten, die die Methode detailreich ausführten [53, 54] und auf die Rotationsdiffusion [55] sowie laminare Ströme [56] erweiterten. Schließlich etablierten Rigler et al. [2] die konfokale FCS-Messungen mit einem sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis und ebneten damit den Weg hin zur Korrelationsanalyse auf Einzelmolekülniveau.

Das zeitabhängige Fluoreszenzsignal $I_D(t)$ ist durch den Mittelwert $\langle I_D \rangle$ und die zeitlichen Fluktuationen des Signals $\delta I_D(t)$ charakterisiert:

$$I(t) = \langle I_D \rangle + \delta I_D(t). \quad (2.48)$$

Im einfachsten Fall ist die mittlere Intensität des Signals konstant und die Fluktuationen ausschließlich durch die Brownsche Molekularbewegung einzelner fluoreszenter Moleküle in einem geeignet gewähltem Anregungs-/Detektionsvolumen bestimmt. Das Produkt aus Anregungs- und Detektionsvolumen entspricht im Falle der konfokalen Mikroskopie in erster Näherung einem drei-dimensionalen Gauß und wird als Moleküldetektionsfunktion

$$MDF(\vec{r}, t) = I_0 e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} \quad (2.49)$$

bezeichnet, deren Halbachsen durch w_0 in der konfokalen x - y -Ebene und durch z_0 entlang der optischen Achse z charakterisiert sind [2]. Geht man nun davon aus, dass sich ein fluoreszentes Molekül zum Zeitpunkt t_0 am Ort $\vec{r}(t_0)$ in unmittelbarer Nähe des konfokalen Volumens MDF befindet, so wird zu diesem Zeitpunkt das Fluoreszenzsignal $I_D(t_0)$ detektiert. Wählt man nun einen Zeitschritt τ so, dass sich das Molekül zum Zeitpunkt $t_1 = t_0 + \tau$ weiter in der Nähe des fokalen Volumens befindet und gemäß der Brownschen Molekularbewegung bewegt, so detektiert man die Intensität $I_D(t_1)$. Die zu den einzelnen Zeitpunkten t_i gemessenen Intensitäten $I_D(t_i)$ sind dann in bestimmter Weise voneinander abhängig, man sagt korreliert. Die Abhängigkeit der Korrelation von der Zeit t wird durch die Korrelationsfunktion $G(\tau)$

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I_D(t) \delta I_D(t + \tau) \rangle}{\langle I_D \rangle^2} \quad (2.50)$$

erfasst. Eine detaillierte Herleitung ist im Anhang A.1.3 dieser Arbeit zu finden. Sie beruht im wesentlichen auf der fundamentalen Arbeit von Magde et al., die von verschiedenen Autoren aufgegriffen wurde und Eingang in zahlreiche Bücher [57–59] und Übersichtsartikel fand [60, 61]. Für die Korrelationsfunktionen, die sich für den Fall der Diffusion fluoreszenter Moleküle in Abhängigkeit des Freiheitsgrades der Bewegung des einzelnen Moleküls

ergeben, folgt:

$$G_{n,m}^{1D}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \sqrt{\left(\frac{\tau}{\tau_D} + 1\right)} \quad (2.51)$$

$$G_{n,m}^{2D}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \quad (2.52)$$

$$G_{n,m}^{3D}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \sqrt{\left(\frac{\tau}{\tau_D} S^2 + 1\right)}. \quad (2.53)$$

Dabei sind N die mittlere Teilchenzahl fluoreszenter Moleküle im fokalen Volumen, $S = w_0/z_0$ der Strukturparameter des konfokalen Volumens und τ_D die Diffusionszeit der fluoreszenten Moleküle, die durch

$$\tau_D^{1D} = \frac{z_0^2}{4D}$$

im 1-dimensionalen Fall und

$$\tau_D^{2D,3D} = \frac{w_0^2}{4D}$$

im 2- bzw. 3-dimensionalen Fall mit dem Diffusionskoeffizienten D verbunden ist.

Im Allgemeinen liefern die Foki mit den Volumina V_m , $m = 1, 2, \dots$ und V_n , $n = 1, 2, \dots$ die Fluoreszenzsignale I_m , $m = 1, 2, \dots$ bzw. I_n , $n = 1, 2, \dots$. Für den Fall $n = m$ wird das Intensitätssignal eines Kanals mit sich selbst korreliert. Man spricht in diesem Fall von Autokorrelation. Entsprechend liefert die Korrelation zweier verschiedener Kanäle $n \neq m$ die sogenannte Kreuzkorrelation [62].

Erweiterung der FCS

Neben der rein diffusiven Komponente ist durch die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie auch die Rotationsdiffusion einzelner fluoreszent markierter Moleküle zugänglich. Bereits 1974 veröffentlichten Ehrenberg u. Rigler die erste Arbeit zur mathematischen Beschreibung und Lösung des Problems. Trotz des großen Potentials dieser Methode ist die Zahl der Veröffentlichungen auf diesem Gebiet seither gering. Die Ursache dafür liegt sowohl auf technischer als auch auf physikalischer Seite [11]. Erst durch die Entwicklung entsprechender Elektronik und Detektoren (TCSPC, APD etc.) konnte das Feld mit der entsprechend nötigen Zeitauflösung erschlossen werden. Aus physikalischer Sicht erschweren zwei Effekte, die auf der gleichen Zeitskala ablaufen die Messung: Antibunching und Anregung von Triplett-Zuständen.

Prinzipiell ist die Messung der Rotationsdiffusionszeit τ_{rot} wie bei einer Anisotropie-Messung durchzuführen. Die Anregung erfolgt in der Regel polarisiert. Durch Photoselektion und der entsprechenden Depolarisation der Fluoreszenzemission infolge der Rotation des Moleküls wird der Intensitätsverlauf der Fluoreszenz auf der Zeitskala der Rotation moduliert. Die Ableitung der entsprechenden Korrelationsfunktion $G(\tau)$ ist komplex [63, 64] und soll

daher nur für den einfachsten Fall erfolgen. Für eine s- polarisierte Anregung globulärer Moleküle, deren Absorptions- und Emissionsdipol parallel zueinander liegen und deren Rotationsdiffusionszeit im Bereich $\tau_F < \tau_{\text{rot}} < \tau_D$ zu erwarten ist, ergibt sich der Beitrag der Rotationsdiffusion zur gesamten Korrelationsfunktion zu

$$G(\tau) \sim e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{rot}}}}. \quad (2.54)$$

Die Rotationsdiffusionszeit ist durch

$$\tau_{\text{rot}} = \frac{1}{6D_{\text{rot}}}$$

mit dem Rotationsdiffusionskoeffizienten D_{rot} verbunden. Aufgrund der Photo Selektion kann bei dieser Darstellung auf die polarisationsaufgelöste Detektion verzichtet werden. Verallgemeinert man die oben gemachten Annahmen, so ist der hier dargestellte Ausdruck nur noch bedingt gültig und muss entsprechend abgewandelt werden [65, 66].

Neben der freien Rotation in Lösung ist die freie Rotation oder zumindest teilweise Rotation auch für immobilisierte Moleküle denkbar. Da die Rotation eng mit der hier bereits vorgestellten 3D Orientierung einzelner Moleküle zusammenhängt, kann ein der Polarisation entsprechender Ansatz für die Inklination, also der orientierungsbedingten Dipolemission in verschiedene Raumwinkelbereiche, gefunden werden (siehe Kapitel 4.1.7).

3 Grundlagen der 3D Orientierung fluoreszenter Moleküle

Mit der Arbeit von Hohlbein u. Hübner wurde eine Methode für die Bestimmung der 3D Orientierung entwickelt, die vergleichsweise einfach in ein konfokales Mikroskop implementierbar ist und dank des Messprinzips durch verschiedene Erweiterungen ergänzt werden kann. In diesem Kapitel soll sich der Methode zunächst von theoretische Seite genähert werden. Im folgenden Abschnitt wird die ursprüngliche Theorie, die so nur für Dipole in isotroper Umgebung gilt, um den Einfluss einer Grenzfläche erweitert. Danach wird die von der Orientierung des Dipols abhängige Anregungswahrscheinlichkeit fluoreszenter Moleküle in die Betrachtung der Arbeit von Hohlbein u. Hübner aus dem Jahre 2008 mit einbezogen und damit ergänzt. Schließlich wird der in dieser Arbeit benutzte experimentelle Aufbau beschrieben.

3.1 Der Einfluss einer dielektrischen Grenzfläche auf die Abstrahlcharakteristik eines Dipols

Bei der Einführung der Fluoreszenz von Einzelmolekülen, insbesondere deren anisotrope Abstrahlcharakteristik in Kapitel 2.2.2, die wir für die Bestimmung der 3D Orientierung einzelner fluoreszenter Moleküle nutzen wollen, wurde bisher der Einfluss einer inhomogenen Umgebung vernachlässigt. Die Ausbreitung einer von dem Dipol abgestrahlten elektromagnetischen Welle in dem homogenen Medium wurde als ungestört betrachtet. Häufig tritt jedoch der Fall auf, dass sich das fluoreszente Molekül und damit der Dipol in unmittelbarer Nähe einer Grenzfläche zwischen zwei Medien mit verschiedenen Brechungsindizes $n_{1,2}$ befindet. Als nah bezeichnet man dabei eine Entfernung z_0 , die deutlich kleiner als die Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichtes ist: $z_0 \ll \lambda$. Eine solche Grenzfläche ist zum Beispiel durch den Übergang zweier dielektrischer Medien (Luft / Glas, PMMA / Glas etc.) gegeben. Die Wahrscheinlichkeit, ein Photon in einer bestimmten Richtung zu detektieren hängt damit nicht mehr nur von dem Dipol selbst ab, sondern zusätzlich von der Wechselwirkung der Dipolstrahlung mit der Grenzfläche. Im Vergleich zum isotropen Medium ist dadurch die Abstrahlcharakteristik des Dipols gestört [21, 27, 67–69].

Im Folgenden sollen drei Fälle für die Störung der Abstrahlcharakteristik untersucht werden. Legt man die Abbildung 2.2.2 zugrunde, so soll der Dipol sich in jedem Fall im oberen

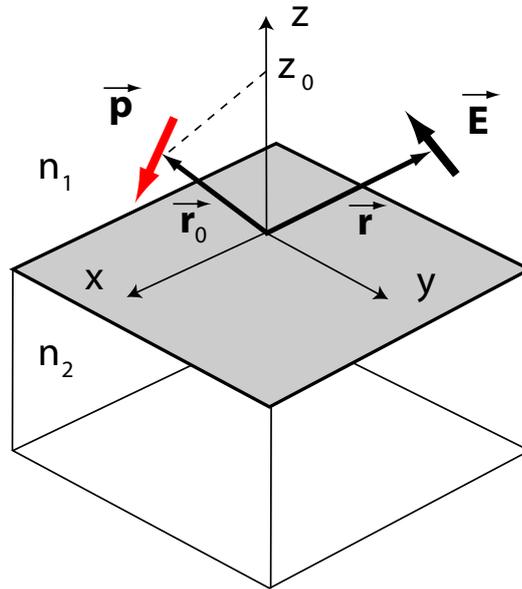


Abb. 3.1: Der Dipol sitzt am Ort $\vec{r}_0 = (x_0, y_0, z_0)$. Die Grenzfläche zwischen den zwei Medien mit Brechungsindex n_1 und n_2 liegt bei $z = 0$ und fällt mit dem Koordinatenursprung zusammen. Für $z > 0$ gilt das Medium 1, entsprechend für $z < 0$ das Medium 2. Nach [28].

Halbraum befinden. Im Fall 1 (Transmission) gilt $n_1 < n_2$, d.h. der Dipol befindet sich z. B. in Luft und ist an eine Glasoberfläche angehaftet. Das Licht wird in Richtung $-z$ detektiert, also von *unten*. Im Fall 2 (Reflektion) gilt $n_1 > n_2$, d.h. der Dipol befindet sich z. B. in PMMA und sitzt in der Nähe der Grenzfläche zur Luft. Das Licht wird in diesem Fall in Richtung $+z$ detektiert, also von *oben*. Im Fall 3 (isotrop) gilt $n_1 = n_2$. Das ist der wohl bekannte Fall des homogenen Mediums. In diesem Fall müssen die Ergebnisse mit den vorher in Kapitel 2.2.2 dargestellten Grundlagen übereinstimmen.

Die hier vorgestellte Lösung des Problems beruht in wesentlichen Teilen auf der Arbeit von Lukas Novotny aus dem Jahr 1996 [7], in der mit der *Greenschen Funktion* ein sehr eleganter Ansatz zur Lösung der Maxwell-Gleichungen unter entsprechenden Randbedingungen gewählt wurde und schließlich Eingang in das 2006 erschienene Buch *Principals in Nano-optics* gefunden hat [28]. Die Lösung des Problems erfolgt zunächst in kartesischen Koordinaten. Dabei soll die Entwicklung des Problems anhand der Aufspaltung in ebene und evaneszente Wellen durchgeführt werden; allgemein bekannt als Darstellung des sogenannten Winkelspektrums¹. Später erfolgt dann die Koordinatentransformation in Polarkoordinaten, um eine entsprechend einfache Darstellung für die numerische Implementierung zu erhalten.

¹engl. angular spectrum representation, deutsch Darstellung im Winkelspektrum

3.1.1 Erlaubte und verbotene Bereiche bei der Ausbreitung von Licht

Befindet sich ein Dipol im optisch dünneren Medium 1 in der Nähe einer Grenzfläche zu einem optisch dichteren Medium 2, so wechselwirkt dessen elektrisches Feld sowohl in Form ebener als auch in Form evaneszenter Wellen mit dieser Grenzfläche. Dabei erfolgt die Transmission bzw. Reflektion gemäß dem Snelliusschen Brechungsgesetz. Neben dieser erlaubten Ausbreitung des Lichtes, existieren aber auch Wellen, deren Ausbreitungsrichtung über dem kritischen Winkel $\theta_c = \arcsin n_1/n_2$ liegt. Man spricht deshalb von Licht im verbotenen Bereich. Die Amplitude dieser Wellen nimmt exponentiell mit der Entfernung z_0 des Dipols von der Grenzfläche ab. Betrachtet man einen Dipol, der sich mehrere Wellenlängen entfernt von der Grenzfläche befindet, so beobachtet man nur noch das erlaubte Licht, nicht aber den verbotenen Anteil. Ein ähnlicher Ansatz gilt für den Fall, dass sich der Dipol im optisch dichteren Medium befindet.

3.1.2 Zur theoretischen Modellbeschreibung

Zunächst betrachtet man das Dipolfeld am Ort $\vec{r} = (x, y, z)$ in einem homogenen, linearen und isotropen Medium 1, das durch seine Permittivitätszahl ϵ_1 und seine Permeabilitätszahl μ_1 charakterisiert wird. Diese sollen im Folgenden durch den geläufigeren Brechungsindex $n_1 = \sqrt{\epsilon_1 \mu_1}$ zusammengefasst werden. Im Falle nicht magnetisierbarer Materialien $\mu_1 \approx 1$ vereinfacht sich dieser zu $n_1 = \sqrt{\epsilon_1}$. Das fluoreszente Molekül und damit sein Dipolmoment \vec{p} befindet sich am Ort $\vec{r}_0 = (x_0, y_0, z_0)$ (Vergleiche Abbildung 3.1). Damit ergibt sich das elektrische Feld $\vec{E}(\vec{r})$ des Dipols \vec{p} mit der dyadischen Greenschen Funktion $\mathbf{G}_0(\vec{r}, \vec{r}_0)$ zu

$$\vec{E}(\vec{r}) = \omega^2 \mu_0 \mathbf{G}_0(\vec{r}, \vec{r}_0) \vec{p}. \quad (3.1)$$

Das von diesem Dipol abgestrahlte Licht zeichnet sich durch seine Frequenz ω bzw. seiner Wellenlänge λ aus. Mit den Materialparametern und der Kreisfrequenz des Lichtes ergibt sich der Wellenvektor

$$\vec{k}_1 = (k_x, k_y, k_{z_1})$$

mit seiner longitudinalen Komponente

$$k_{\perp} = k_{z_1} = \sqrt{k_1^2 - (k_x^2 + k_y^2)}$$

und seiner transversalen Komponente

$$k_{\parallel} = \sqrt{k_x^2 + k_y^2} = k_1 \sin \theta_1.$$

Die Wellenzahl ergibt sich zu $k_1 = 2\pi n_1/\lambda = n_1 \omega/c$.

Wir suchen nun eine geeignete Greensche Funktion \mathbf{G} , also eine Beschreibung des Dipols als Punktquelle, die insbesondere für alle Raumrichtungen (dyadisch) gültig ist und der Maxwell'schen Gleichung A.33 genügt. Durch die Darstellung des elektrischen Feldes

in Potentialform (siehe Gleichung A.39) erhält man zunächst die inhomogene Helmholtz Gleichung für das Vektor Potential \vec{A} im Medium 1:

$$[\nabla^2 + k_1^2] \vec{A}(\vec{r}) = -\mu_0 \vec{j}(\vec{r}). \quad (3.2)$$

Mit der Ladungsdichte \vec{j} des Dipols \vec{p}

$$\vec{j}(\vec{r}) = -i\omega\delta(\vec{r} - \vec{r}_0)\vec{p} \quad (3.3)$$

ergibt sich die einzig physikalisch sinnvolle Lösung dieser Gleichung zu [70]

$$\vec{A}(\vec{r}) = \vec{p} \frac{k_1^2}{i\omega\varepsilon_0\varepsilon_1} \frac{e^{ik_1|\vec{r}-\vec{r}_0|}}{4\pi|\vec{r}-\vec{r}_0|}. \quad (3.4)$$

Dieser Ausdruck beinhaltet durch die Verbindung mit dem Dipolmoment bereits die Polarisation des Feldes in Richtung des Dipolmomentes selbst. Mit der sogenannten Weyl-Identität [71] folgt unmittelbar

$$\vec{A}(\vec{r}) = \vec{p} \frac{k_1^2}{i\omega\varepsilon_0\varepsilon_1} \frac{1}{4\pi} \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{+\infty} \frac{1}{k_{z_1}} e^{i[k_x(x-x_0)+k_y(y-y_0)+k_{z_1}|z-z_0|]} dk_x dk_y. \quad (3.5)$$

Mit der Potentialform für das elektrische Feld (siehe Gleichung A.42) erhält man schließlich den Ausdruck für \vec{E} , der durch Vergleich mit Gleichung 3.1 die dyadische Greenschen Funktion liefert

$$\mathbf{G}_0(\vec{r}, \vec{r}_0) = \frac{i}{8\pi^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} \mathbf{M} e^{i[k_x(x-x_0)+k_y(y-y_0)+k_{z_1}|z-z_0|]} dk_x dk_y \quad (3.6)$$

$$\mathbf{M}(k_x, k_y) = \frac{1}{k_1^2 k_{z_1}} \begin{bmatrix} k_1 - k_x^2 & -k_x k_y & \mp k_x k_{z_1} \\ -k_x k_y & k_1 - k_y^2 & \mp k_y k_{z_1} \\ \mp k_x k_{z_1} & \mp k_y k_{z_1} & k_1 - k_{z_1}^2 \end{bmatrix}$$

Für die Terme der Matrix \mathbf{M} mit verschiedenen Vorzeichen gilt jeweils das obere Vorzeichen für den Bereich $z > z_0$ und das untere Vorzeichen für den Bereich $z < z_0$. Damit ist das Feld eines Dipols für jede beliebige Orientierung im isotropen Medium gegeben (Fall 3).

Aufspaltung der Greenschen Funktion in ihre Polarisationsanteile

Da die Reflexion bzw. die Transmission elektromagnetischer Strahlung an einer Grenzfläche abhängig von ihrer Polarisation ist, muss die oben erhaltene Lösung für die Greensche Funktion in ihre Polarisationsanteile aufspalten werden. Das wird durch die Separierung der Matrix \mathbf{M} in ihre Polarisationsanteile erreicht

$$\mathbf{M}(k_x, k_y) = \mathbf{M}^s(k_x, k_y) + \mathbf{M}^p(k_x, k_y). \quad (3.7)$$

Die beiden Polarisationsanteile erhält man nun, indem man zwei Spezialfälle für die Orientierung eines Dipols nahe einer Grenzfläche untersucht: Den senkrecht zur Grenzfläche orientierten Dipol $\vec{p} = p \cdot \vec{e}_z$ und den parallel zur Grenzfläche orientierten Dipol $\vec{p} = p \cdot \vec{e}_x$. Für die Lösung dieses Problems wurden verschiedene Wege vorgeschlagen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll [18, 21, 29]. Als Ergebnis erhält man die beiden Polarisationsanteile

$$\begin{aligned} \mathbf{M}^s(k_x, k_y) &= \frac{1}{k_{z_1}(k_x^2 + k_y^2)} \begin{bmatrix} k_y^2 & -k_x k_y & 0 \\ -k_x k_y & k_x^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \\ \mathbf{M}^p(k_x, k_y) &= \frac{1}{k_1^2(k_x^2 + k_y^2)} \begin{bmatrix} k_x^2 k_{z_1} & k_x k_y k_{z_1} & \mp k_x(k_x^2 + k_y^2) \\ k_x k_y k_{z_1} & k_y^2 k_{z_1} & \mp k_y(k_x^2 + k_y^2) \\ \mp k_x(k_x^2 + k_y^2) & \mp k_y(k_x^2 + k_y^2) & (k_x^2 + k_y^2)^2/k_{z_1} \end{bmatrix}. \end{aligned} \quad (3.8)$$

Die Greensche Funktion für das reflektierte und das transmittierte elektrische Feld

Nachdem wir nun in den vorangegangenen Abschnitten die Greensche Funktion \mathbf{G}_0 für das elektrische Feld eines Dipolstrahlers in einem isotropen Medium für die beiden Polarisationskomponenten abgeleitet haben, soll nun die Wirkung der Grenzfläche in Betracht gezogen werden. Dabei zeigt sich die Eleganz des vorgestellten Formalismus. Das von der Grenzfläche reflektierte Feld des Dipolstrahlers ergibt sich durch Multiplikation der beiden Polarisationskomponenten mit den entsprechenden Fresnelschen Reflektionskoeffizienten r^s und r^p (siehe Gleichung A.5 für Zylinderkoordinaten)

$$r^s(k_x, k_y) = \frac{\mu_2 k_{z_1} - \mu_1 k_{z_2}}{\mu_2 k_{z_1} + \mu_1 k_{z_2}} \quad \text{und} \quad r^p(k_x, k_y) = \frac{\varepsilon_2 k_{z_1} - \varepsilon_1 k_{z_2}}{\varepsilon_2 k_{z_1} + \varepsilon_1 k_{z_2}} \quad (3.9)$$

zu

$$\mathbf{G}_{\text{ref}}(\vec{r}, \vec{r}_0) = \frac{i}{8\pi^2} \iint_{-\infty}^{\infty} (\mathbf{M}_{\text{ref}}^s + \mathbf{M}_{\text{ref}}^p) e^{i[k_x(x-x_0) + k_y(y-y_0) + k_{z_1}(z+z_0)]} dk_x dk_y \quad (3.10)$$

$$\begin{aligned} \mathbf{M}_{\text{ref}}^s(k_x, k_y) &= \frac{r^s(k_x, k_y)}{(k_x^2 + k_y^2)k_{z_1}} \begin{bmatrix} k_y^2 & -k_x k_y & 0 \\ -k_x k_y & k_x^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \\ \mathbf{M}_{\text{ref}}^p(k_x, k_y) &= \frac{-r^p(k_x, k_y)}{k_1^2(k_x^2 + k_y^2)} \begin{bmatrix} k_x^2 k_{z_1} & k_x k_y k_{z_1} & k_x(k_x^2 + k_y^2) \\ k_x k_y k_{z_1} & k_y^2 k_{z_1} & k_y(k_x^2 + k_y^2) \\ -k_x(k_x^2 + k_y^2) & -k_y(k_x^2 + k_y^2) & -(k_x^2 + k_y^2)^2/k_{z_1} \end{bmatrix} \end{aligned}$$

Man beachte die entsprechende Wahl der Vorzeichen, um die Ausbreitungsrichtung der Wellen des reflektierten Feldes zu berücksichtigen. Das elektrische Feld des oberen Halbraums

$z > 0$ ergibt sich dann aus der Summe der Greenschen Funktion für das ursprüngliche und das reflektierte Feld (Fall 2):

$$\vec{E}(\vec{r}) = \omega^2 \mu_0 (\mathbf{G}_0(\vec{r}, \vec{r}_0) + \mathbf{G}_{\text{ref}}(\vec{r}, \vec{r}_0)) \vec{p}. \quad (3.11)$$

Entsprechend ergibt sich das elektrische Feld für das an der Grenzfläche transmittierte Licht durch Multiplikation mit den entsprechenden Fresnelschen Transmissionskoeffizienten t^s und t^p

$$t^s(k_x, k_y) = \frac{2\mu_2 k_{z1}}{\mu_2 k_{z1} + \mu_1 k_{z2}} \quad \text{und} \quad t^p(k_x, k_y) = \frac{2\varepsilon_2 k_{z1}}{\varepsilon_2 k_{z1} + \varepsilon_1 k_{z2}} \sqrt{\frac{\mu_2 \varepsilon_1}{\mu_1 \varepsilon_2}} \quad (3.12)$$

zu

$$\mathbf{G}_{\text{tr}}(\vec{r}, \vec{r}_0) = \frac{i}{8\pi^2} \iint_{-\infty}^{\infty} (\mathbf{M}_{\text{tr}}^s + \mathbf{M}_{\text{tr}}^p) e^{i[k_x(x-x_0) + k_y(y-y_0) + k_{z1}z_0 - k_{z2}z]} dk_x dk_y \quad (3.13)$$

$$\mathbf{M}_{\text{tr}}^s(k_x, k_y) = \frac{t^s(k_x, k_y)}{(k_x^2 + k_y^2)k_{z1}} \begin{bmatrix} k_y^2 & -k_x k_y & 0 \\ -k_x k_y & k_x^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{M}_{\text{tr}}^p(k_x, k_y) = \frac{t^p(k_x, k_y)}{k_1 k_2 (k_x^2 + k_y^2)} \begin{bmatrix} k_x^2 k_{z2} & k_x k_y k_{z2} & k_x (k_x^2 + k_y^2) k_{z2} / k_{z1} \\ k_x k_y k_{z2} & k_y^2 k_{z2} & k_y (k_x^2 + k_y^2) k_{z2} / k_{z1} \\ k_x (k_x^2 + k_y^2) & \mp k_y (k_x^2 + k_y^2) & (k_x^2 + k_y^2)^2 / k_{z1} \end{bmatrix}$$

Das elektrische Feld des unteren Halbraums $z < 0$ kann dann mit der Greenschen Funktion für das transmittierte Feld (Fall 1) wie folgt geschrieben werden:

$$\mathbf{E}_{\text{tr}}(\vec{r}) = \omega^2 \mu_0 \mathbf{G}_{\text{tr}}(\vec{r}, \vec{r}_0) \vec{p}. \quad (3.14)$$

Für eine einfache numerische Auswertung der sich daraus ergebenden Integrale, die so analytisch nicht lösbar sind, geht man in der Regel zu Zylinderkoordinaten über. Eine solche Transformation ist im Anhang A.1.1 für das reflektierte Feld für die Problemstellung der Lebensdauer fluoreszenter Zustände in der Nähe von Grenzflächen ausführlich dargestellt.

Das Fernfeld des Dipolstrahlers

Durch die konfokale Detektion des vom fluoreszenten Molekül abgestrahlten elektromagnetischen Feldes ist weniger das Feld am Ort des Dipols, sondern dessen Fernfeld für die Bestimmung der Orientierung von Interesse. Mit der zweidimensionalen Fourier Transformation des lokalen Feldes $\vec{E}(\vec{r})$ in einer beliebigen Ebene senkrecht zur z -Achse an der Stelle $z = \text{const}$

$$\hat{\vec{E}}(k_x, k_y; z) = \frac{1}{4\pi^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} \vec{E}(\vec{r}) e^{-i(k_x x + k_y y)} dx dy \quad (3.15)$$

ergibt sich das Fernfeld des Dipols $\vec{E}_\infty(\vec{s})$ durch das Fourierspektrum des lokalen Feldes \hat{E} an der Stelle $z = 0$ zu

$$\vec{E}_\infty(\vec{s}) = -iks_z \hat{E}(k_x, k_y; 0) \frac{e^{ikr}}{r}. \quad (3.16)$$

Dabei ist die Richtung durch den Einheitsvektor $\vec{s} = (s_x, s_y, s_z) = (x/r, y/r, z/r)$ und $r = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$ als Entfernung zum Koordinatenursprung gegeben. Die lokalen Felder für den oberen und unteren Halbraum wurden in den vorangegangenen Abschnitten abgeleitet. Setzt man nun die von der jeweiligen Greenschen Funktion abhängigen Ausdrücke für die Felder aus den Gleichungen 3.1, 3.11 und 3.14 in die Gleichung 3.16 für das Fernfeld ein, so ist das Problem mit dem Fourierspektrum der jeweiligen Greenschen Funktion gelöst (siehe Anhang C in [28]).

Das Ergebnis für das Fernfeld soll in sphärischen Koordinaten (θ, φ) angegeben werden. Der Dipol befindet sich dabei an der Position $\vec{r}_0 = (0, 0, z_0)$. Um die Notation möglichst einfach zu halten, drückt man den Wellenvektor \vec{k} in Form des Einheitsvektors \vec{s} aus. Da sich der obere und untere Halbraum durch verschiedene optische Eigenschaften auszeichnet, muss man folgende Fallunterscheidung einführen:

$$\vec{s} = \begin{cases} \left(\frac{k_x}{k_1}, \frac{k_y}{k_1}, \frac{k_z}{k_1} \right) & z > 0 \\ \left(\frac{k_x}{k_2}, \frac{k_y}{k_2}, \frac{k_z}{k_2} \right) & z < 0 \end{cases} \quad (3.17)$$

Darüber hinaus führt man die folgende Substitution ein:

$$s_z^* = \sqrt{(n_1/n_i)^2 - (s_x^2 + s_y^2)} = \sqrt{(n_1/n_i)^2 - \sin^2 \theta_1}, \quad (3.18)$$

wobei mit $i = 1, 2$ gerade der obere bzw. untere Halbraum indiziert wird. Das entsprechende Fernfeld des Dipols $\vec{p}(\Theta, \Phi)$ ergibt sich dann zu

$$\vec{E}(r, \theta, \varphi) = \begin{pmatrix} E_r \\ E_\theta \\ E_\varphi \end{pmatrix} = \frac{k_1^2}{n_1^2} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^{ik_1 r}}{r} \begin{bmatrix} 0 \\ (p_x \cos \varphi + p_y \sin \varphi) \cos \theta \sigma_x - p_z \sin \theta \sigma_z \\ -(p_x \sin \varphi - p_y \cos \varphi) \sigma_y \end{bmatrix} \quad (3.19)$$

mit den Potentialfunktion $\vec{\sigma}_{\text{tr}} = (\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z)$ für das transmittierte Licht

$$\begin{aligned} \sigma_x &= -\frac{n_2}{n_1} t^{\text{P}}(\theta) e^{ik_2 z_0 s_z^*(\theta)}, \\ \sigma_y &= \frac{\cos(\theta)}{s_z^*(\theta)} t^{\text{S}}(\theta) e^{ik_2 z_0 s_z^*(\theta)}, \\ \sigma_z &= \frac{n_2 \cos(\theta)}{n_1 s_z^*(\theta)} t^{\text{P}}(\theta) e^{ik_2 z_0 s_z^*(\theta)}, \end{aligned}$$

und entsprechend die Potentialfunktionen $\vec{\sigma}_{\text{ref}} = (\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z)$ für den reflektierten Anteil

$$\begin{aligned} \sigma_x &= e^{-ik_1 z_0 \cos \theta} - r^{\text{P}}(\theta) e^{ik_1 z_0 \cos \theta}, \\ \sigma_y &= e^{-ik_1 z_0 \cos \theta} + r^{\text{S}}(\theta) e^{ik_1 z_0 \cos \theta}, \\ \sigma_z &= e^{-ik_1 z_0 \cos \theta} + r^{\text{P}}(\theta) e^{ik_1 z_0 \cos \theta}. \end{aligned}$$

Die Fresnelschen Transmissions und Reflektionskoeffizienten sind in der hier gewählten Darstellung sphärischer Koordinaten

$$t^s = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_1 \cos \psi + n_2 \cos \theta} \quad (3.20)$$

$$t^p = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_1 \cos \theta + n_2 \cos \psi} \quad (3.21)$$

$$r^s = \frac{n_1 \cos \theta_1 - n_2 \cos \psi}{n_1 \cos \psi + n_2 \cos \theta} \quad (3.22)$$

$$r^p = \frac{n_2 \cos \theta_1 - n_1 \cos \psi}{n_1 \cos \theta + n_2 \cos \psi} \quad (3.23)$$

mit ψ für den Winkel des einfallenden bzw. reflektierten Lichtes und θ für den Ausfallswinkel des an der Grenzfläche gebrochenen Lichtes, die über das Snelliussche Brechungsgesetz miteinander verbunden sind, $n_1 \sin \psi = n_2 \sin \theta$ (siehe Abbildung 3.3). Das entsprechende Fernfeld in kartesischen Koordinaten erhält man durch Koordinatentransformation gemäß $\vec{E}_{xyz}^T = (E_x, E_y, E_z)^T = \mathbf{S} \cdot (E_r, E_\theta, E_\phi)^T = \mathbf{S} \cdot \vec{E}_{r\theta\phi}^T$ mit \mathbf{S} als Rotationsmatrix zu

$$\vec{E}(r, \theta, \varphi) = \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} = \frac{k_1^2}{n_1^2} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{e^{ik_1 r}}{r} \vec{m} \quad (3.24)$$

$$\vec{m} = \begin{bmatrix} (\sin^2 \varphi \sigma_y + \cos^2 \theta \cos^2 \varphi \sigma_x) p_x + (-\sigma_y + \cos^2 \theta \sigma_x) \sin \varphi \cos \varphi p_y - \sin \theta \cos \theta \cos \varphi \sigma_z p_z \\ (-\sigma_y + \cos^2 \theta \sigma_x) \sin \varphi \cos \varphi p_x + (\cos^2 \varphi \sigma_y + \cos^2 \theta \sin^2 \varphi \sigma_x) p_y - \sin \theta \cos \theta \sin \varphi \sigma_z p_z \\ -\sin \theta \cos \theta \cos \varphi \sigma_x p_x - \sin \theta \cos \theta \sin \varphi \sigma_x p_y + \sin^2 \theta \sigma_z p_z \end{bmatrix}.$$

Mit dem Fernfeld aus Gleichung 3.19 bzw. 3.24 für den Dipol in der Nähe einer Grenzfläche ist nun der in Abschnitt 2.2.2 vorgestellte Ansatz für die Beschreibung des optischen Systems durchzuführen. Man erhält schließlich das skalare Feld in der hinteren Brennebene des Objektivs hoher numerischer Apertur mit dem Öffnungswinkel $\alpha_r = \sin^{-1}(N.A./n_2)$ für die beiden Polarisationsrichtungen zu

$$E_{\text{bf},0^\circ}(\theta, \varphi, \Theta, \Phi) = \frac{k_1^2}{n_1^2} \frac{1}{4\pi\epsilon_0\mu_0} \frac{e^{ik_1 r}}{r} (\cos \theta \cos^2 \varphi \sigma_x + \sin^2 \varphi \sigma_y) p_x \quad (3.25)$$

$$\dots + (\cos \theta \cos \varphi \sin \varphi \sigma_x - \cos \varphi \sin \varphi \sigma_y) p_y$$

$$\dots - \sin \theta \cos \varphi \sigma_z p_z$$

$$E_{\text{bf},90^\circ}(\theta, \varphi, \Theta, \Phi) = \frac{k_1^2}{n_1^2} \frac{1}{4\pi\epsilon_0\mu_0} \frac{e^{ik_1 r}}{r} (\cos \theta \cos \varphi \sin \varphi \sigma_x - \cos \varphi \sin \varphi \sigma_y) p_x \quad (3.26)$$

$$\dots + (\cos \theta \sin^2 \varphi \sigma_x + \cos^2 \varphi \sigma_y) p_y$$

$$\dots - \sin \theta \sin \varphi \sigma_z p_z$$

Das Strahlungsfeld des Dipols in der Nähe einer Grenzfläche

Ausgehend von Poynting's Theorem [72] ergibt sich der Poynting Vektor zu

$$\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H}, \quad (3.27)$$

der die Energieflussdichte einer elektromagnetischen Welle beschreibt. Die Richtung des Energieflusses entspricht in der Regel der Ausbreitungsrichtung des Welle selbst. Die mittlere Energieflussdichte eines zeitlich periodischen Feldes folgt dann zu

$$\langle \vec{S} \rangle = \frac{1}{2} \text{Re} \left\{ \vec{E} \times \vec{H}^* \right\}. \quad (3.28)$$

Da das Feld des Dipols im Fernfeld als rein transversal (nur ebene Wellen) betrachtet werden kann, kann der Mittelwert von \vec{S} allein durch das elektrische Feld angegeben werden:

$$\langle \vec{S} \rangle = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon}{\mu_0 \mu}} |\vec{E}|^2 \vec{n}_r, \quad (3.29)$$

mit \vec{n}_r als Einheitsvektor in radialer Richtung.

Dieser Ausdruck ist wohl bekannt für die Annahme eines inkohärenten Detektors, also einem intensitätsabhängigen Detektor in der hinteren Brennebene, bei dem die messbare Intensität für ein bestimmtes Raumwinkelelement $d\Omega = \sin\theta d\theta d\varphi$ durch den folgenden Ausdruck gegeben ist [6]:

$$I(\theta, \phi) \sim |\vec{E}|^2 = |\vec{E} \vec{E}^*| \quad (3.30)$$

mit \vec{E}^* als komplex konjugiertem Feld. In Abbildung 3.2 ist die vom Dipol abgestrahlte Leistung normiert auf die Gesamtleistung für die Fälle 1 (Transmission, $n_1 < n_2$) und 2 (Reflektion, $n_2 < n_1$) graphisch dargestellt.

Integriert man nun über die entsprechenden Bereiche der hinteren Brennebene, so erhält man die Gesamtintensität des jeweiligen Kanals für die Bestimmung der 3D Orientierung. Die Integration wird für φ von 0 bis 2π und für θ von 0 bis α_c für den Bereich niedriger Emissionswinkel (Zentrum) $I_{0^\circ, c/90^\circ, c}$ und von α_c bis α_r für den Bereich hoher Emissionswinkel (Kranz) I_r durchgeführt:

$$I_r(\Theta, \Phi) = \int_{\alpha_c}^{\alpha_r} \int_0^{2\pi} |E_{\text{bf}, 0^\circ}(\theta, \varphi, \Theta, \Phi)|^2 + |E_{\text{bf}, 90^\circ}(\theta, \varphi, \Theta, \Phi)|^2 \sin\theta d\theta d\varphi, \quad (3.31)$$

$$I_{0^\circ, c/90^\circ, c}(\Theta, \Phi) = \int_0^{\alpha_c} \int_0^{2\pi} |E_{0^\circ/90^\circ}(\theta, \varphi, \Theta, \Phi)|^2 \sin\theta d\theta d\varphi. \quad (3.32)$$

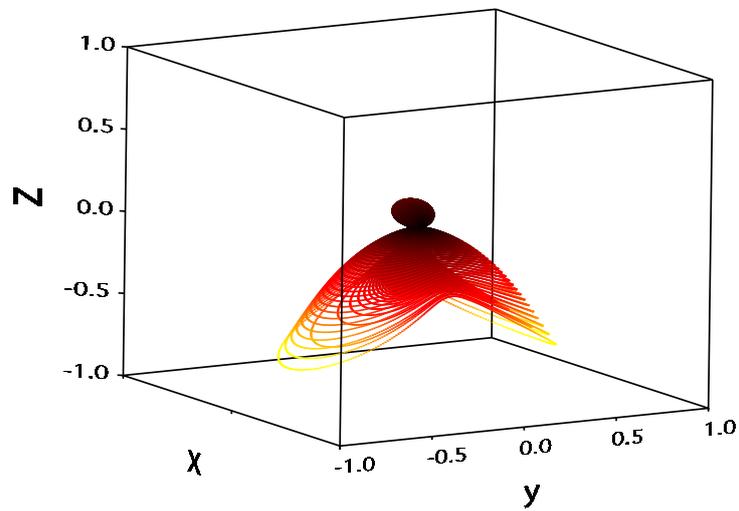
Sowohl die Intensität im Bereich niedriger Emissionswinkel

$$I_c(\Theta, \Phi) = I_{0^\circ, c}(\Theta, \Phi) + I_{90^\circ, c}(\theta, \phi), \quad (3.33)$$

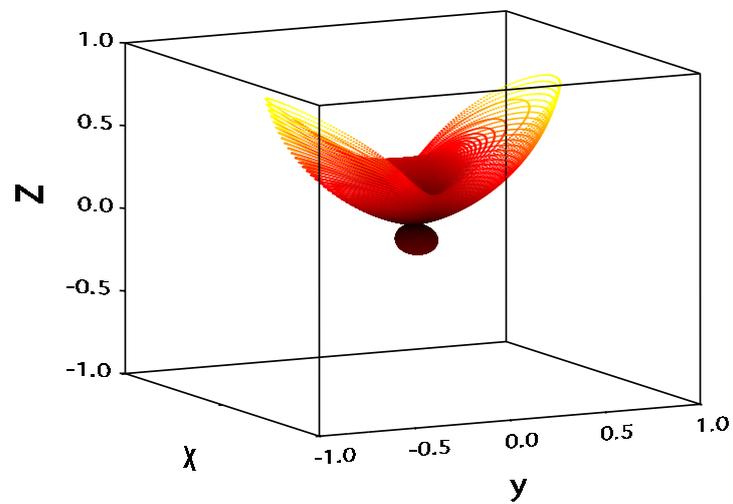
als auch die Gesamtintensität I_D

$$I_D(\Theta, \Phi) = I_r(\Theta, \Phi) + I_c(\Theta, \Phi)$$

werden durch die oben abgeleiteten Integrale definiert.



(a)



(b)

Abb. 3.2: Normierte Abstrahlcharakteristik $I_D/I_{tot,em}$ eines Dipols als Funktion der Raumwinkel θ und φ im Abstand $z_0 = 5\text{nm}$ zu einer Grenzfläche zwischen zwei Medien verschiedenen Brechungsindizes (a) $n_1 = 1 < n_2 = 1,515$ und (b) $n_1 = 1,515 > n_2 = 1$. Die Orientierung des Dipols \vec{p} ist mit $\Theta = 60^\circ$ und $\Phi = 0^\circ$ gegeben.

Kohärente und Inkohärente Detektion in der Dektorebene

Die im vorhergehenden Abschnitt erhaltene Lösung des Problems gilt für die Detektion der Fluoreszenzintensität in der hinteren Brennebene des Objektivs. Dafür muss der entsprechende Detektor, besser das Detektorarray z. B. in Form einer Kamera, in dieser Ebene positioniert werden. Meist detektiert man das Fluoreszenzsignal nicht in der hinteren Brennebene, sondern durch die Abbildung der hinteren Brennebene auf den Detektor z. B. eine APD durch eine Detektorlinse. Eine solche Detektorlinse soll im Abstand f (mit f als Brennweite der Linse) zur hinteren Brennebene positioniert werden, um das Feld auf den Detektor zu fokussieren. Geht man davon aus, dass eine solche Linse in der Regel eine niedrige numerische Apertur besitzt $N.A. < 0.1$, so kann man eine solche Anordnung optischer Elemente allein mithilfe einer Fourier-Transformation beschreiben [73]. Das skalare Feld $E(\rho, \phi_\rho)$ in der fokalen Ebenen der Detektorlinse folgt damit aus der Fouriertransformation des elektrischen Feldes in der hinteren Brennebene des Objektivs:

$$E(\rho, \phi_\rho) = \int_0^{\alpha_D} \int_0^{2\pi} E(\theta, \phi) \sin 2\theta e^{[ik\rho \sin \theta \cos \phi - \phi_\rho]} d\theta d\phi. \quad (3.34)$$

mit α_D als halben Öffnungswinkel der Detektorlinse. Ein Detektor, der im Fokus der Detektorlinse steht, kann sowohl empfindlich gegenüber dem Feld selbst, als auch gegenüber der Intensität am Ort des Fokus sein. Man spricht von inkohärenter und kohärenter Detektion. Im ersten Fall wird die Intensität gemäß

$$I = \int_0^R \int_0^{2\pi} |E(\rho, \phi_\rho)|^2 f(\rho) d\rho d\phi_\rho \quad (3.35)$$

detektiert. Für den zweiten Fall ist der Detektor empfindlich für das Feld. Man erhält dann z. B. bei einer single-mode Glasfaser

$$I = \left| \int_0^R \int_0^{2\pi} E(\rho, \phi_\rho) f(\rho) d\rho d\phi_\rho \right|^2. \quad (3.36)$$

Für einen rotationssymmetrischen Detektor stellt $f(\rho)$ die Funktion für die Empfindlichkeit der Detektorfläche und R den Radius des Detektors dar.

3.1.3 Die Bestimmung der 3D Orientierung

Anders als für den Fall eines isotropen Mediums ist im Falle einer anisotropen Umgebung das Problem des Dipolstrahlers nicht geschlossen analytisch lösbar. Dadurch existieren auch keine geschlossenen Ausdrücke für die beiden charakteristischen Winkel Θ und Φ . Für die Bestimmung der 3D Orientierung muss demnach ein neuer Ansatz gefunden werden. Dieser beruht im Wesentlichen auf der numerischen Lösung der oben abgeleiteten Integrale 3.31 sowie 3.32 und damit der für die Bestimmung der 3D Orientierung notwendigen Intensitätskanäle $I_{0^\circ, c}$, $I_{90^\circ, c}$ und I_r . Analog zur Darstellung im Kapitel 2.2.2 definiert

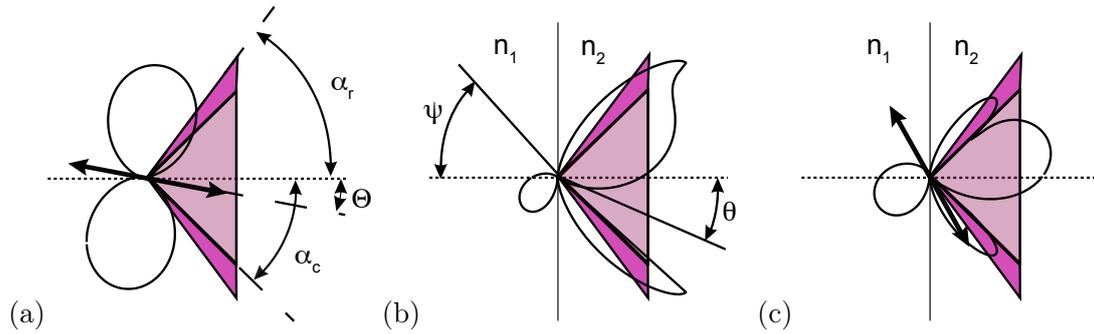


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Abstrahlcharakteristik eines Dipols in verschiedenen Umgebungen: (a) Dipol im isotropen Medium und die Winkeldefinition des Polarwinkels Θ als Winkel zwischen der optischen Achse und der Dipolachse \vec{p} , der Grenzwinkel für die zentrale Apertur des Lochspiegels α_c , sowie der Öffnungswinkel des Objektivs α_r . (b) Dipol im optisch dünneren Medium n_1 im Abstand $z_0 \ll \lambda$ vor der Grenzfläche zum optisch dichteren Medium dessen Strahlung als transmittiertes Licht detektiert wird. (c) Dipol im optisch dichteren Medium n_2 im Abstand $|z_0| \ll \lambda$ vor der Grenzfläche zum optisch dünneren Medium dessen Strahlung als Summe des von der Grenzfläche reflektiertem und des direkt vom Dipol emittierten Lichtes detektiert wird.

man die beiden Größen Polarisation $P := \frac{(I_{90^\circ,c} - I_{0^\circ,c})}{(I_{90^\circ,c} + I_{0^\circ,c})}$ und Inklination $N := \frac{(I_r - I_c)}{(I_r + I_c)}$, mit der die 3D Orientierung an Stelle des Winkelpaares beschrieben werden kann. Durch Vergleich experimentell erhaltener Wertepaare (P, N) mit numerisch berechneten Werten, die für eine vorgegebene Orientierung des Dipols in der Nähe der Grenzfläche zu erwarten sind, kann man schließlich auf die eigentliche 3D Orientierung des fluoreszenten Moleküls zurückschließen.

Für die numerische Lösung der Integrale muss zunächst ein Parametersatz bestimmt werden, der das Problem vollständig beschreibt. Dafür geht man von einem fluoreszenten Molekül aus, das Photonen mit einer Energie der Frequenz ω bzw. der Wellenlänge λ emittiert und sich in einer gewissen Entfernung z_0 vor einer Grenzfläche zwischen zwei Medien mit bekannten Brechungsindizes n_1 und n_2 befindet. Die beiden Integrationsgrenzen sind durch das optische System gegeben.

Der Parametersatz soll für das in Kapitel 4 untersuchte System des Perylendiimides, angelagert an eine Glassoberfläche, angepasst sein:

- $\lambda = 620 \text{ nm}$: Wellenlänge angegeben als Schwerpunkt des Emissionsspektrums des untersuchten Perylen-Moleküls,
- $n_1 = 1$: Brechungsindex des oberen Halbraums (Luft),
- $n_2 = 1,515$: Brechungsindex des unteren Halbraums (Glas),

- $z_0 = \pm 5 \text{ nm}$: Abstand des Moleküls von der Grenzfläche. Das obere Vorzeichen gilt für den Fall des Dipols im optisch dünneren Medium (Transmission), das untere Vorzeichen entsprechend für den Fall des Dipols im optisch dichteren Medium (Reflektion).
- $\alpha_r = 67,5^\circ$: halber Öffnungswinkel des Ölimmersionsobjektivs
- $\alpha_r = 55^\circ$: Öffnungswinkel des Lochspiegels (theoretisch).
- $\alpha_r = 43^\circ$: Öffnungswinkel des Lochspiegels (kalibriert).

Um eine entsprechende Bewertung der Ergebnisse liefern zu können, sollen die drei Fälle

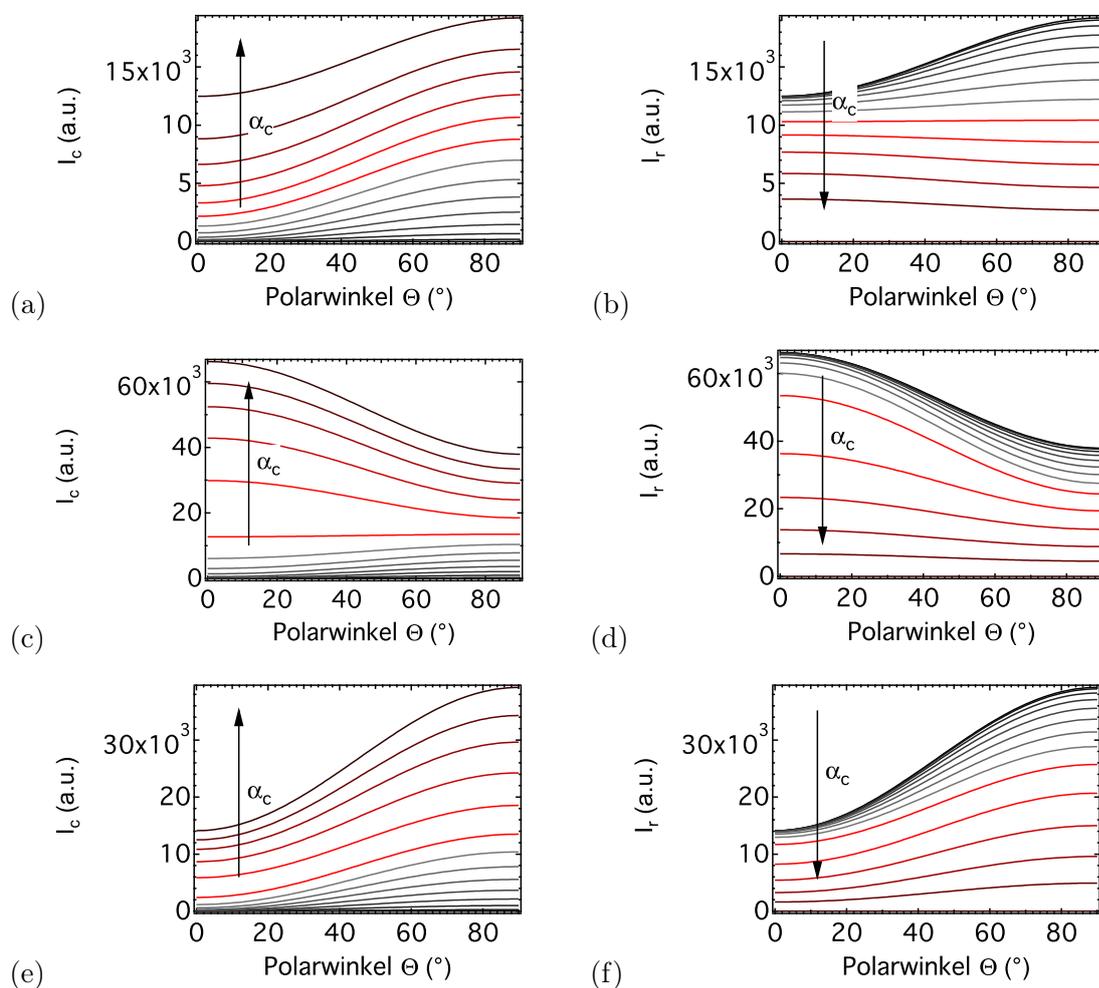


Abb. 3.4: Abhängigkeit der Intensität im Zentrum I_c und im Kranz I_r in Abhängigkeit des Polarwinkels θ des Dipols für die drei ausgezeichneten Fälle (a-b) isotropes Medium, (c-d) Transmission und (e-f) Reflektion.

des isotropen Mediums ($n_1 = n_2$), des Dipols im optisch dünneren Medium (Transmission, $n_1 < n_2$) sowie des Dipols im optisch dichteren Medium (Reflektion, $n_1 > n_2$) jeweils in der Nähe der Grenzfläche im Vergleich betrachtet werden. Zunächst soll die Inklination N im Mittelpunkt stehen. Dafür werden die beiden Intensitäten I_c und I_r in Abhängigkeit des polaren Winkels $\Theta = [0^\circ, 90^\circ]$ sowie des Grenzwinkels $\alpha_c = [0, \alpha_r]$ der zentralen Apertur numerisch berechnet. Wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, ergeben sich für die drei Fälle qualitativ verschiedene Verläufe. Generell nimmt die Intensität im Zentrum mit zunehmenden Öffnungswinkel der zentralen Apertur zu, entsprechend die Intensität des Kranzes ab. Im Fall des transmittierten Lichtes in Abbildung 3.4 (c-d) ist die Zu- bzw. Abnahme im Bereich kleiner Polarwinkel im Vergleich zum isotropen Medium jedoch überproportional hoch. Dieser Effekt ist so stark, dass die Intensität des detektierbaren Lichtes für diesen Fall mit zunehmenden Polarwinkel abnimmt. Dieser Verlauf kann mit der besonders effizienten Kopplung des Dipolfeldes in das optisch dichtere Medium erklärt werden. Im Fall kleiner Polarwinkel trägt dabei das vom Dipol abgestrahlte Licht im verbotenen Winkelbereich oberhalb des kritischen Winkels θ_c überproportional stark zum Anteil des detektierbaren Lichtes bei. Für den Fall des reflektierten Lichtes in Abbildung 3.4 (e-f) ist der Verlauf qualitativ ähnlich im Vergleich zum isotropen Medium. Aber auch hier ist die detektierbare Intensität deutlich erhöht. Die Ursache dafür besteht in der Überlagerung des direkten Dipolfeldes mit dem von der Grenzfläche reflektierten. Damit wird prinzipiell das Licht, das nicht in Richtung des Objektivs und damit des Detektors emittiert wird, für die Messung zugänglich.

Aus den so erhaltenen Intensitäten berechnet man die Inklination $N := N(\alpha_c, \alpha_r, \Theta)$ und erhält mit

$$\Delta N(\alpha_c) = N_{\Theta=0^\circ} - N_{\Theta=90^\circ} \quad (3.37)$$

die Intervallbreite der Inklination ΔN in Abhängigkeit des Grenzwinkels der zentralen Apertur. Die Ergebnisse sind für die drei zu betrachtenden Fälle in Abbildung 3.5 graphisch dargestellt. Es zeigt sich, dass der prinzipielle Verlauf der Inklination nicht von dem Vorhandensein einer Grenzfläche beeinflusst wird. Damit ist die Bestimmung der Orientierung, im Speziellen des polaren Winkels Θ , prinzipiell mit der hier vorgestellten intensitätsbasierten Methode auch im Falle einer Grenzfläche möglich. Ein entscheidender Unterschied besteht jedoch in der Intervallbreite der Inklination. Im Falle der Grenzfläche wird diese im Vergleich zum isotropen Fall zum Teil halbiert. Die maximale Breite liegt beim isotropen Fall bei $\alpha_c = 44^\circ$, im Fall des transmittierten bzw. reflektierten Lichtes bei $\alpha_c = 37^\circ$.

In Abbildung 3.6 ist der Verlauf der Intervallbreite der Inklination für die drei betrachteten Fälle im Vergleich dargestellt.

Geht man nun zur Polarisation P über, so werden die beiden Intensitäten $I_{0^\circ,c}$ und $I_{90^\circ,c}$ in Abhängigkeit des Polarwinkels Θ und des Grenzwinkels α_c berechnet. Die eigentliche Abhängigkeit der Polarisation vom azimuthalen Winkel Φ soll im nächsten Abschnitt betrachtet werden. In Abbildung 3.7 sind die Polarisation und die entsprechende Inklination als Falschfarbenbild für die drei zu betrachtenden Fälle dargestellt. Obwohl beide Größen

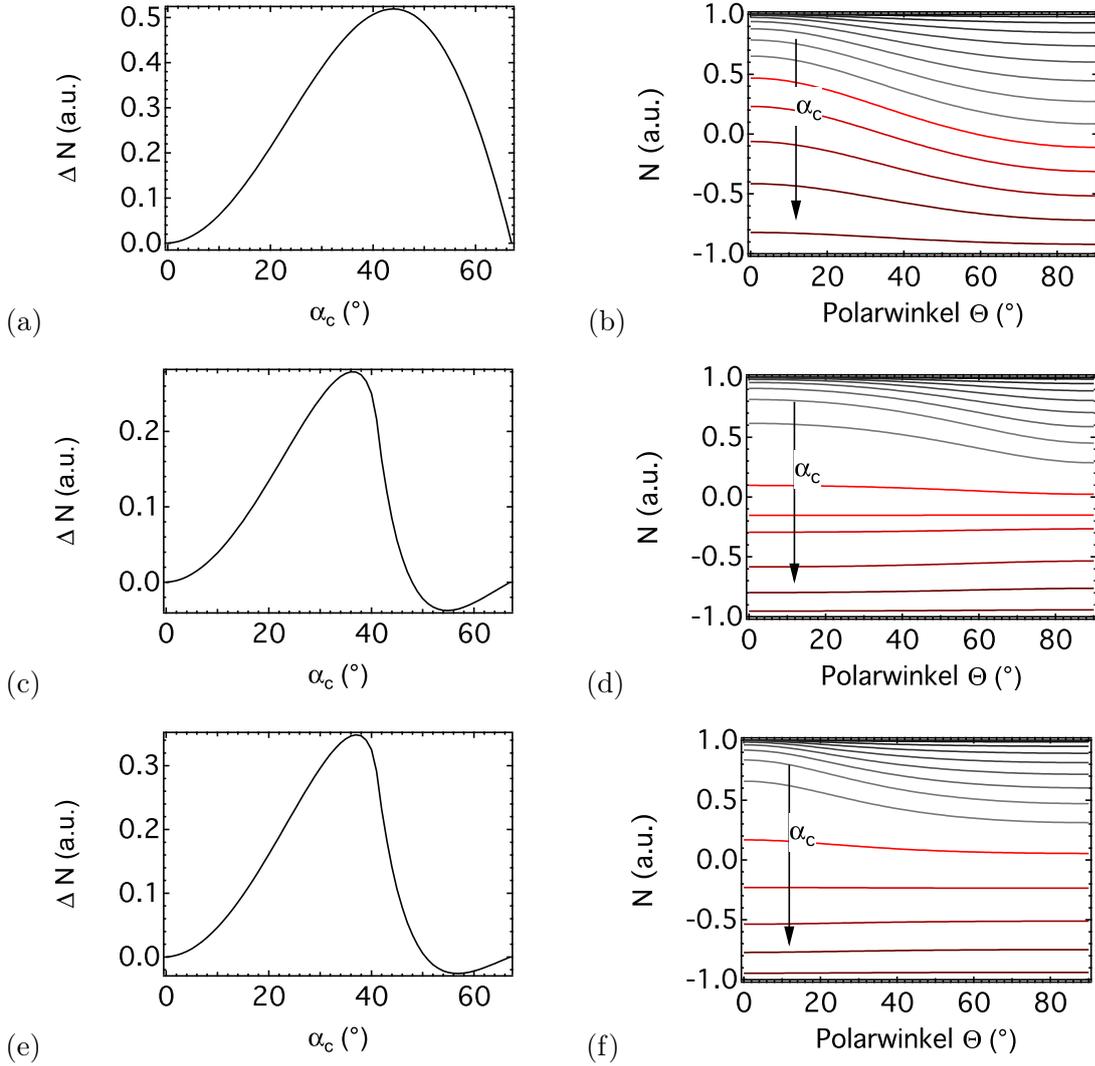


Abb. 3.5: Abhängigkeit der Inklination N in Abhängigkeit des Polarwinkels Θ des Dipols sowie der Verlauf der Intervallbreite der Inklination ΔN in Abhängigkeit des Grenzwinkels der zentralen Apertur α_c für die drei ausgezeichneten Fälle (a-b) isotropes Medium, (c-d) Transmission und (e-f) Reflektion.

unabhängig voneinander berechnet werden, sind beide Größen doch in bestimmter Weise voneinander abhängig. Die Ursache dafür liegt in der Abhängigkeit des Polarisationsgrades, also des relativen Anteils an Photonen der beiden fundamentalen Polarisationsrichtungen s und p , von der Orientierung des Dipols relativ zur optischen Achse z bzw. seines Polarwinkels Θ . In einfacher Weise wird das deutlich, wenn man einen Dipol betrachtet, der parallel zur optischen Achse ausgerichtet ist $\Theta = 0^\circ$. Unabhängig von dessen Orientierung in Φ , die z. B. bei einer Ausrichtung entlang der x -Achse ($\Phi = 0^\circ$) nur s -polarisiertes Licht erwarten lässt, wird in diesem Fall in beiden Polarisationskanälen die gleiche Intensität detektiert.

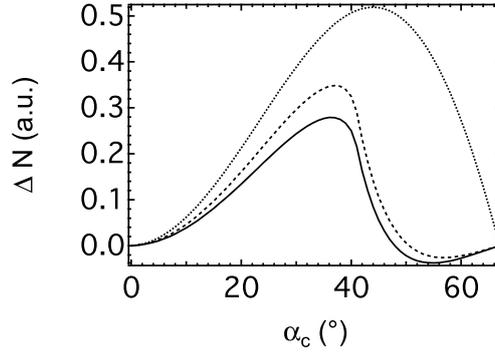


Abb. 3.6: Vergleich der Intervallbreite der Inkliniation ΔN in Abhängigkeit des Grenzwinkels der zentralen Apertur α_c für das isotrope Medium (gepunktet), das transmittierte Licht (durchgezogen) sowie das reflektierte Licht (gestrichelt).

Die Nettopolarisation ist somit Null. Das heißt, die Orientierung in Φ kann für einen Dipol parallel zur optischen Achse nicht bestimmt werden. In Abbildung 3.7 entspricht der Polarisation $P = 0$ die Farbe grün im Falschfarbenbild. Es zeigt sich, dass auch für den isotropen Fall der Bereich, in dem die Bestimmung des azimutalen Winkels anhand der Polarisation fehlschlägt, deutlich über den Bereich $\Theta = 0^\circ$ hinaus geht. Insbesondere für den Fall des transmittierten Lichtes ist die Bestimmung der Orientierung des Dipols in der Ebene nicht eindeutig. Auffällig ist das Abknicken der Konturlinien für einen bestimmten Öffnungswinkel der zentralen Apertur. Dieser Winkel ist gerade gleich dem Grenzwinkel $\theta_c = 41^\circ$ der Totalreflektion, der den Bereich des erlaubten und verbotenen Lichtes trennt. Im Bereich $\alpha_c > \theta_c$ ist der Polarisationsgrad aufgrund der Wechselwirkung evaneszenter und ebener Wellen deutlich geringer ausgeprägt.

Wie aus Abbildung 3.7 hervorgeht, ist sowohl die Inkliniation als auch die Polarisation abhängig vom Öffnungswinkel der zentralen Apertur. Für eine eindeutige Bestimmung der Orientierung muss aber einem experimentell bestimmten Wertepaar genau ein berechnetes Wertepaar aus Inkliniation und Polarisation zugeordnet werden können. Dies wird erreicht, indem man die Intensitäten I_c und I_r und damit den Inklinationsverlauf für genau ein α_c berechnet und somit eindeutig einen Polarwinkel Θ zuordnet ($f : N(\alpha_c) \rightarrow \Theta$). Legt man die Kalibrierung aus Abschnitt 3.3 zugrunde, so erhält man den Verlauf der Inkliniation in Abhängigkeit des Polarwinkels für $\alpha_c = 43^\circ$. Abbildung 3.8 zeigt dabei deutlich, dass die Intervallbreite ΔN im Falle einer Grenzfläche deutlich geringer ist als im isotropen Medium. Dieser Kontrastverlust bedeutet, dass für die Bestimmung der Orientierung bei gleicher zu erzielender Standardabweichung, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bzw. die Anzahl der Photonen höher sein muss.

In gleicher Weise wird die Polarisation durch die Kalibrierung eindeutig bestimmt. Dafür berechnet man die Intensitätswerte $I_{0^\circ, c}$ und $I_{90^\circ, c}$ und damit die möglichen Polarisationswerte für $\alpha_c = 43^\circ$ (siehe Abbildung 3.9 auf der rechten Seite) und bestimmt dann mithilfe

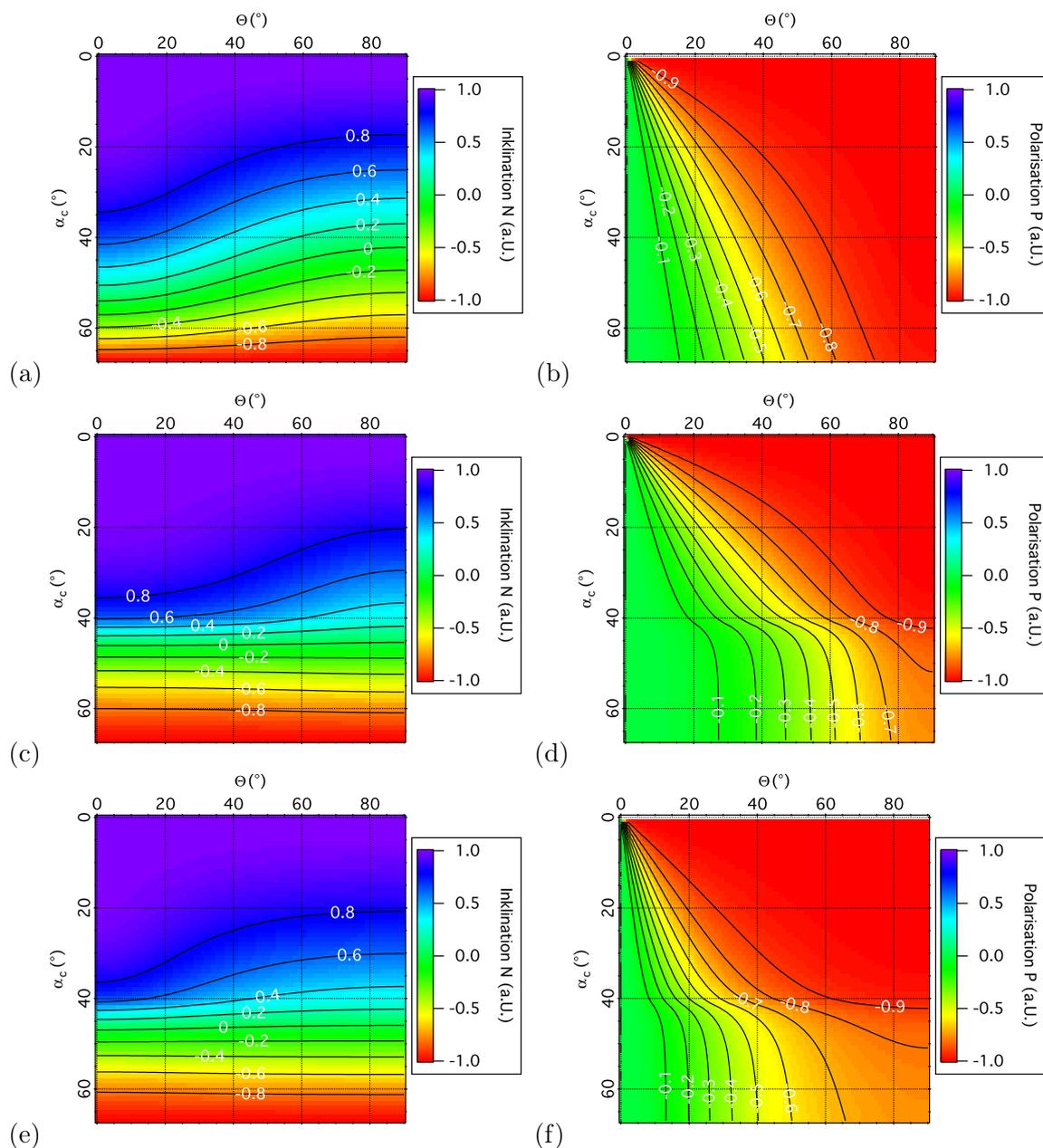


Abb. 3.7: Falschfarbendarstellung der Inklination N und Polarisation P eines Dipols der entlang der x -Achse ($\Phi = 0^\circ$) ausgerichtet ist in Abhängigkeit des Polarwinkels Θ und des Grenzwinkels θ_c . Die Konturlinien markieren Orte gleicher Werte mit einem Abstand von 0,2 für das Inklinationsintervall $[-1, 1]$ und einem Abstand von 0,1 für das Polarisationsintervall $[-1, 0]$

des bereits bekannten Polarwinkels Θ den azimutalen Winkel Φ ($f : P(\Theta, \alpha_c) \rightarrow \Phi$). Das Falschfarbenbild für die Polarisation zeigt neben der bereits besprochenen Abhängigkeit

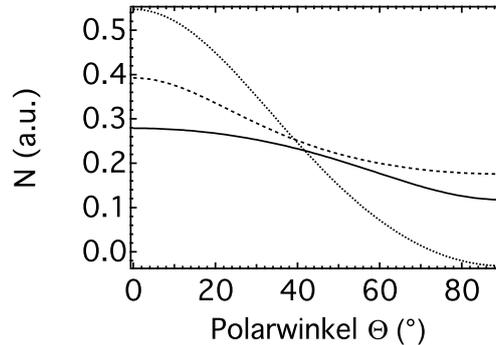


Abb. 3.8: Inklinationsverlauf in Abhängigkeit des Polarwinkels Θ für einen festen Wert $\alpha_c = 43^\circ$ für das isotrope Medium (gepunktet), das transmittierte Licht (durchgezogen) sowie das reflektierte Licht (gestrichelt).

von Θ auch die Abhängigkeit vom azimutalen Winkel Φ . Die Farbskala reicht von rot bis blau und entspricht damit einem vollständig entlang der x -Achse orientierten, also s-polarisierten Dipol mit $\Phi = 0^\circ$ bis zu einem vollständig entlang der y -Achse orientierten, also p-polarisierten Dipol mit $\Phi = 90^\circ$. Im grünen Bereich ist die Nettopolarisation gleich Null. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, ist die Polarisation für niedrige Polarwinkel stets identisch Null (grüner Bereich). Vergleicht man nun die drei hier betrachteten Fälle, so wird deutlich, dass dieser Effekt unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Im Vergleich ist die Bestimmung der Orientierung des Dipols in Φ für den Fall des Dipols im optisch dünneren Medium, dessen durch die Grenzfläche transmittiertes Licht detektiert wird, am schlechtesten. Hier ist auch für große Polarwinkel die Breite und damit der Kontrast der Polarisation eher gering. Dieser Umstand muss bei der Bestimmung der azimutalen Komponente stets berücksichtigt werden und ist in der Literatur bisher unterrepräsentiert.

Schließlich sind in Abbildung 3.9 zusätzlich der Verlauf der Intensitätskanäle für den Fall $\alpha_c = 43^\circ$ dargestellt. Neben den Intensitäten für den zentralen Bereich I_c und den Kranzbereich I_r ist die detektierbare Intensität I_D und die Gesamtintensität $I_{\text{tot,em}}$, die vom Dipol abgestrahlt wird, normiert auf die von einem Dipol im isotropen Medium emittierte Strahlung dargestellt. Die der Bestimmung der Orientierung zugrunde liegende Berechnung der Inklination und Polarisation ist von der durchgeführten Normierung unabhängig. Diese Darstellung zeigt eindrucksvoll, dass durch die Störung des Dipolfeldes und die Nähe zur Grenzfläche sowohl der Verlauf als auch die Amplitude des detektierbaren Strahlungsfeldes verändert wird. Die von der Orientierung des Dipols abhängige detektierbare Intensität beträgt sowohl bei der Transmission als auch bei der Reflektion mehr als 70% des vom Dipol emittierten Lichtes. Im Vergleich dazu kann von einem Dipol im isotropen Medium nur 15% bis 25% gesammelt werden. Wie bereits erwähnt, ist dieser Umstand der effizienten Kopplung des Dipolfeldes in das optisch dichtere Medium (transmittiertes Licht) bzw. der Reflektion des Lichtes an der Grenzfläche zum optisch dünneren Medium (reflektiertes

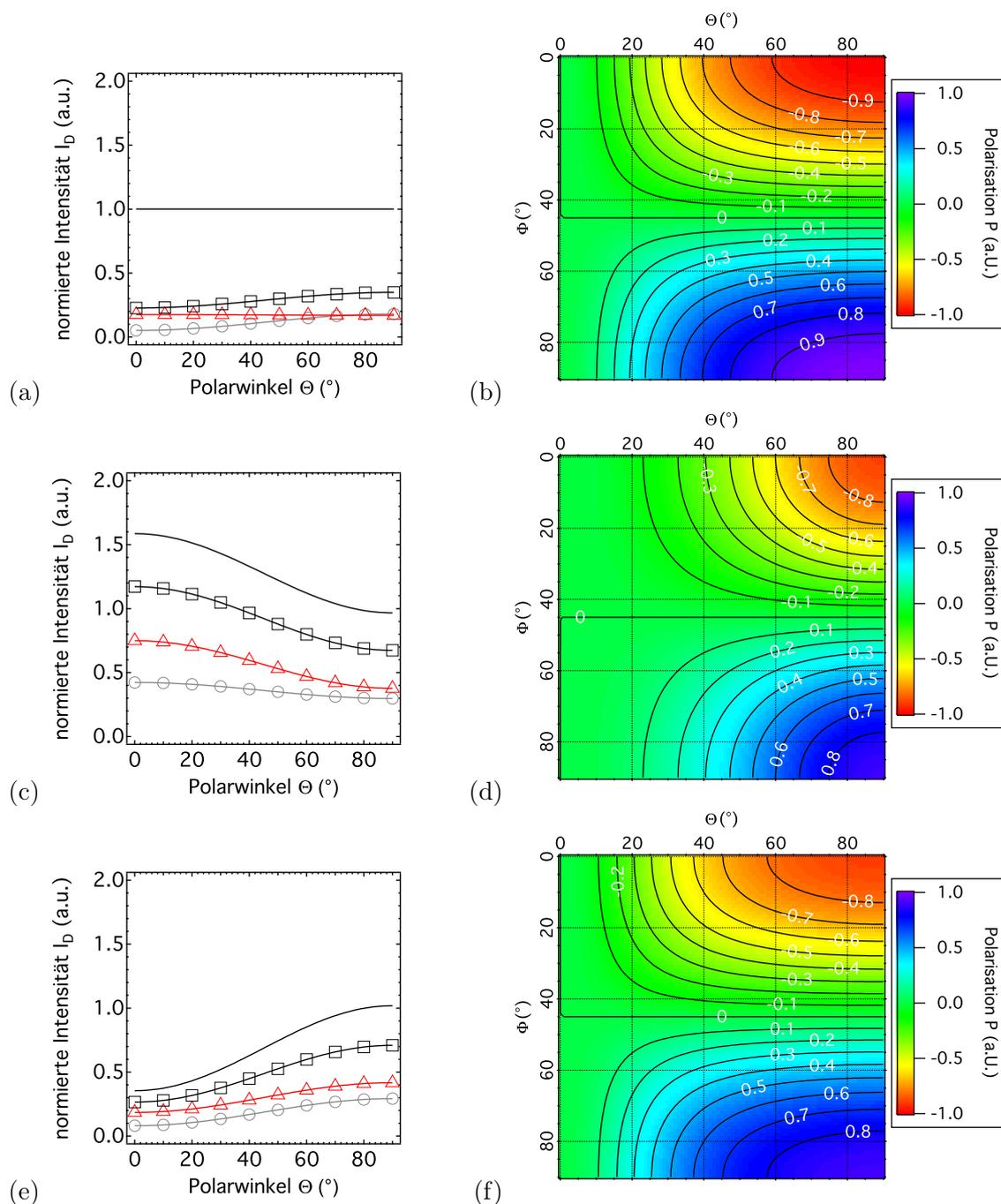


Abb. 3.9: Die normierte, abgestrahlte Gesamtintensität $I_{\text{tot,em}}$ (durchgezogen), die detek-
 tierbare Intensität I_D (schwarze Quadrate), die Intensität des Zentrums I_c (graue Kreise)
 sowie die Intensität des Kranzes I_r (rote Dreiecke) in Abhängigkeit des Polarwinkels Θ
 sind neben der Polarisation P in Abhängigkeit des Polarwinkels Θ und des Azimutwinkels
 Φ für einen festen Wert $\alpha_c = 43^\circ$ für (a-b) das isotrope Medium, (c-d) das transmittierte
 Licht sowie (e-f) das reflektierte Licht dargestellt.

Licht) zu verdanken. Dieser Umstand wiegt den schlechteren Kontrast von Inklination und Polarisation zum Teil auf.

3.1.4 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel konnte eine umfassende Beschreibung für den Dipol nahe einer Grenzfläche zweier Medien verschiedener Brechungsindizes gefunden werden. Insbesondere gelang die Darstellung der Abstrahlcharakteristik des Dipols, die Grundlage für die Bestimmung der Orientierung eines fluoreszenten Moleküls ist. Die daran angeschlossene Herleitung für die Bestimmung der 3D Orientierung wurde im Rahmen der in Kapitel 2.2.2 vorgestellten theoretischen Beschreibung eines konfokalen Mikroskops durchgeführt und kann nun für die Bestimmung der Orientierung eines fluoreszenten Moleküls in diversen Szenarien genutzt werden.

Gegenstand weiterer Untersuchungen muss es sein, das optische System in seiner Gänze theoretisch zu beschreiben, um alle Einflüsse auf die Orientierungsbestimmung beachten zu können. Dafür flossen entsprechende Überlegungen bereits in der hier vorliegenden Arbeit ein. So muss die polarisationsabhängige Transmission der Linsen, insbesondere des Objektivs, Beachtung finden (siehe Kapitel 2.2.2). Außerdem ist der Einfluss des Detektor-Detektorlinse-Ensembels bisher nicht erfasst und stellt eine weitere Fehlerquelle, zumindest bei der Bestimmung exakter Winkelwerte einzelner, fluoreszenter Moleküle, dar (siehe Abschnitt 3.1.2).

3.2 Der Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit auf die Bestimmung der 3D Orientierung

Betrachtet man ein fluoreszentes, frei bewegliches Molekül in einem isotropen Medium über einen längeren Zeitraum, so kann dieses Molekül theoretisch jeden beliebigen Orientierungszustand einnehmen. Für die beiden Winkel Θ und Φ , die den jeweiligen Zustand der Orientierung zu einem beliebigen Zeitpunkt t beschreiben, ergibt sich dann eine typische Verteilung, die in Abbildung 3.12 für den Polarwinkel (rote Linie) dargestellt ist. Der azimutale Winkel ist gleichverteilt und der polare Winkel ist aufgrund der Projektion sinusoidal verteilt. Vergleicht man nun eine solche Verteilung mit experimentell gewonnenen Daten, so fällt auf, dass diese deutlich von der theoretischen Verteilung abweichen (vgl. dazu Hohlbein [43] Abbildung 5.16 (a,b)). Beispielhaft dafür ist der Rand der Verteilung, also die jeweiligen Grenzen 0° und 90° der Winkelverteilung. Diese sind auffällig überpopuliert und depopulieren den nahen Randbereich für $\Theta > 80^\circ$ und $\Theta < 10^\circ$ bzw. $\Phi > 80^\circ$ und $\Phi < 10^\circ$. Dieses Verhalten wurde umfangreich von Hohlbein u. Hübner [8] diskutiert. Dabei wurde maßgeblich der Einfluss des Rauschens aufgrund der Einzelquantennatur des fluoreszenten Emitters untersucht (siehe Kapitel 2.2.2). Insbesondere wurde dabei festge-

stellt, dass dieser Effekt deutlich von der Zahl detektierbarer Photonen abhängig ist. Nun ist die Zahl der Photonen, die ein fluoreszentes Molekül emittiert, von verschiedenen Parametern abhängig. Einer dieser Parameter ist die Anregungswahrscheinlichkeit aufgrund der Orientierung des Dipols relativ zum eingestrahlten Feld. Das soll Gegenstand des folgenden Abschnittes sein.

3.2.1 Zur theoretischen Modellbeschreibung

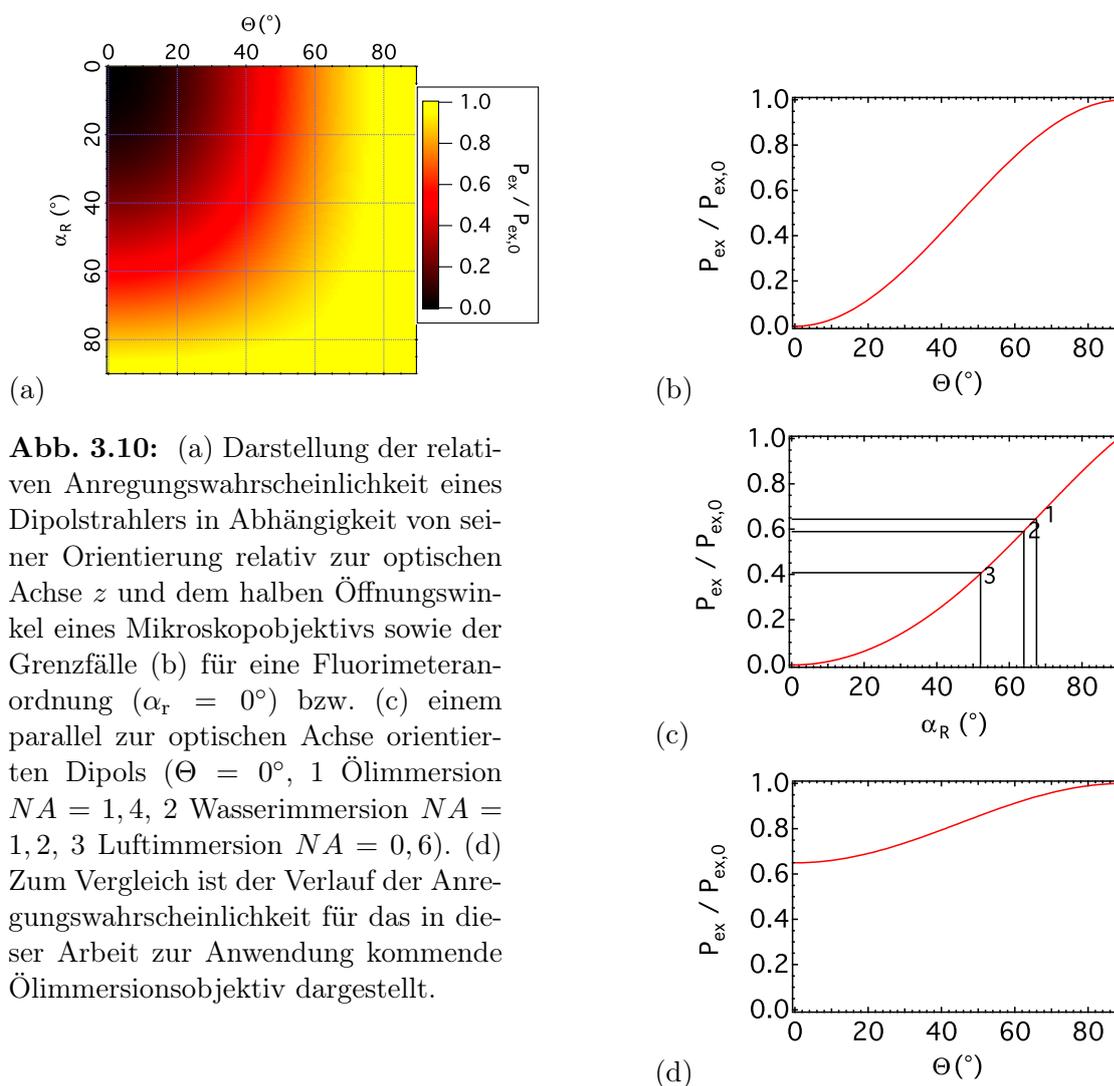


Abb. 3.10: (a) Darstellung der relativen Anregungswahrscheinlichkeit eines Dipolstrahlers in Abhängigkeit von seiner Orientierung relativ zur optischen Achse z und dem halben Öffnungswinkel eines Mikroskopobjektivs sowie der Grenzfälle (b) für eine Fluorimeteranordnung ($\alpha_r = 0^\circ$) bzw. (c) einem parallel zur optischen Achse orientierten Dipols ($\theta = 0^\circ$, 1 Ölimmersion $NA = 1,4$, 2 Wasserimmersion $NA = 1,2$, 3 Luftimmersion $NA = 0,6$). (d) Zum Vergleich ist der Verlauf der Anregungswahrscheinlichkeit für das in dieser Arbeit zur Anwendung kommende Ölimmersionsobjektiv dargestellt.

Für die Betrachtung der Anregungswahrscheinlichkeit in Bezug auf die Bestimmung der 3D Orientierung wollen wir uns auf den Fall des isotropen Mediums beschränken. Dafür geht man zunächst gemäß der Ausführungen aus Kapitel 2.2.2 davon aus, dass die Anregung des Dipols abhängig von der Orientierung des Anregungsdipolmomentes \vec{p}_{abs} relativ zum

elektrischen Feldvektor des eingestrahnten Lichtes \vec{E}_0 ist. Ist das eingestrahlte Feld in der konfokalen Ebene zirkular polarisiert $\vec{E} = (1, 1, 0)$, so ist die Anregung unabhängig von der Orientierung des Dipols in Φ und man erhält den einfachen Ausdruck

$$|\vec{p}_{\text{abs}} \cdot \vec{E}_0|^2 \sim \sin^2 \Theta, \quad (3.38)$$

der dem Ausdruck aus Gleichung 2.24 mit der Winkeldefinition $\Theta = 90^\circ - \Theta_{\text{abs}}$ entspricht. Bei dieser Betrachtung wird der sogenannten Fluorimeteranordnung² Rechnung getragen. Im Falle eines konfokalen Mikroskops kann jedoch der Einfluss des hochnumerischen Objektivs auf die Polarisation des eingestrahnten Feldes nicht vernachlässigt werden. Folgt man den theoretischen Ausführungen für die Bestimmung der 3D Orientierung aus Kapitel 2.2.2 weiter, so erhält man die Abhängigkeit des mit dem verwendeten Objektiv detektierbaren Anteils der vom Dipol emittierten Strahlung vom polaren Winkels Θ gemäß Gleichung 2.45. Aus dem Fermatschen Prinzip und der Umkehrbarkeit des Lichtweges folgt damit die Anregungswahrscheinlichkeit des Dipols bei zirkularer Anregung zu

$$\frac{I_{\text{tot,em}}(\Theta, \alpha_r)}{I_{\text{tot,em}}(\Theta = 90^\circ)} = \frac{A_r + B_r \sin^2 \Theta}{A_r + B_r}. \quad (3.39)$$

mit den Konstanten A_r und B_r gemäß Gleichung 2.44. Der entsprechende funktionelle Zusammenhang ist in Abbildung 3.10 (a) graphisch dargestellt. In dieser Darstellung entsprechen dunkle Bereiche einer schlechten Anregung, entsprechend helle Bereiche einer guten Anregung. Obwohl sich ein Objektiv mit einem halben Öffnungswinkel von 90° praktisch nicht realisieren lässt, so wird dadurch klar, dass die Anregung mit dem größeren Öffnungswinkel zunehmend von der Orientierung des Dipols unabhängig wird. Betrachtet man die Grenzfälle für die Orientierung und den Öffnungswinkel des benutzten Objektivs

$$\frac{I_{\text{tot,em}}(\Theta, \alpha_r)}{I_{\text{tot,em}}(\Theta = 90^\circ)} = \begin{cases} \sin^2 \Theta & : \alpha_r = 0^\circ \\ 0 & : \alpha_r = 0^\circ \text{ und } \Theta = 0^\circ \\ \frac{A_r}{A_r + B_r} & : \Theta = 0^\circ \\ 1 & : \alpha_r = 90^\circ \text{ und } \Theta = 90^\circ \end{cases} \quad (3.40)$$

so erhält man in Abbildung 3.10 (b) den Verlauf der relativen Anregungswahrscheinlichkeit für $\alpha_r = 0^\circ$, also der sogenannten Fluorimeteranordnung und in Abbildung 3.10 (c) den Verlauf der relativen Anregungswahrscheinlichkeit für $\Theta = 0^\circ$, also die reine Abhängigkeit vom Objektiv. Zusätzlich sind in Abbildung 3.10 (c) die Öffnungswinkel typischer Objektive eingezeichnet. Das in dieser Arbeit zur Anwendung kommende Ölimmersionsobjektiv zeichnet sich durch einen Öffnungswinkel $\alpha_r = 67,5^\circ$ aus. Das entspricht einer minimalen Anregungswahrscheinlichkeit von 65%.

3.2.2 Simulation der 3D Orientierung

Die Dipolemission ist ein Einzelquantenprozess und unterliegt statistischen Schwankungen, die in Form des Schrotrauschens³ beschrieben werden können. Das Schrotrauschen genügt

²Objektiv mit niedriger numerischer Apertur

³engl. shot-noise

der Poisson-Statistik, bei der die Wahrscheinlichkeit P gerade n Photonen mit einem Erwartungswert von $\lambda > 0$ zu detektieren durch den folgenden Zusammenhang gegeben ist

$$P_\lambda(n) = \frac{\lambda^n}{n!} \exp(-\lambda)$$

wobei $n \in \mathbb{N}_0$ und $\lambda > 0$ ist. Grundsätzlich ist die Varianz oder auch Standardabweichung einer Poisson-Verteilung in der Form $\lambda = \sigma^2$ gegeben.

Der Erwartungswert, umgangssprachlich auch Mittelwert genannt, kann im Sinne der Poisson-Statistik sowohl als Wahrscheinlichkeit des Einzelprozesses der Photonenemission, als auch als mittlere Anzahl detektierter Photonen, also einer mittleren Intensität, interpretiert werden. Damit sind im Grunde zwei Zugänge für die Simulation denkbar: Im ersten Fall wird der Einzelquantenprozess anhand der Wahrscheinlichkeit ein Photon innerhalb eines imaginären Zeitschrittes in einem definierten Detektionskanal zu detektieren simuliert und solange wiederholt, bis die vorgegebene Anzahl der zu detektierenden Photonen aller Kanäle erreicht ist. Im zweiten Fall wird die mittlere Anzahl detektierter Photonen in einem Kanal, also die mittlere Intensität, vorgegeben und das Rauschen simuliert. Für beide Fälle wird die Poisson-Verteilung zufällig durch einen Monte-Carlo Generator erzeugt, der in der Software Igor Pro (Wavemetrics) zur Verfügung gestellt wird [8, 43].

Für die Simulation der Orientierung eines einzelnen Moleküls anhand von Intensitätszeitspuren (hier im Folgenden als Typ A bzw. B bezeichnet) wird das Molekül in das Zentrum des Anregungsfokus $x = y = z = 0$ gesetzt. Damit wird die Anregungswahrscheinlichkeit unabhängig vom ortsabhängigen Intensitätsprofil des Laserfokus (siehe Gleichung 2.49). Für Simulationen vom Typ A wird die von dem Molekül pro Sekunde total emittierte Intensität $I_{\text{tot,em}}$ vorgegeben, und die Intensitäten der drei Kanäle $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r werden gemäß der Gleichungen 2.41 und 2.42 berechnet. Die Anregungswahrscheinlichkeit wird abhängig vom Polarwinkel Θ gemäß den Ausführungen im vorhergehenden Abschnitt nach Gleichung 3.39 berechnet und damit die total emittierte Intensität $I_{\text{tot,em}}(\Theta)$ moduliert. Dabei wird die Orientierung des Moleküls anhand des polaren Winkels Θ_0 und des azimuthalen Winkels Φ_0 für jeden Zeitschritt vorgegeben. Die so berechneten Intensitäten werden dann als Erwartungswert der Poisson-Verteilung λ interpretiert und man erhält den verrauschten Intensitätswert mithilfe des oben beschriebenen MC Generators. Die Zeitspur ergibt sich dann aus der Wiederholung des Simulationsschrittes. Geht man z. B. von einer typischen Emissionsrate von einer Million Photonen pro Sekunde und einer Zeitauflösung von 1 ms aus, so ergibt sich die total emittierte Intensität zunächst unabhängig von der Anregung pro Simulationsschritt zu $I_{\text{tot,em}} = 1000 \text{ Photonen/ms}$.

Für Simulationen vom Typ B wird die Wahrscheinlichkeit λ , ein Photon in einem der drei Intensitätskanäle zu detektieren, anhand der Orientierung (Θ, Φ) des Moleküls gemäß der Gleichungen 2.41 und 2.42 vorgegeben. Dies wird erreicht, indem man die total emittierte Intensität je Simulationsschritt auf $I_{\text{tot,em}} = 1$ setzt. Auch hier geht die Wahrscheinlichkeit des einzelnen Kanals im Sinne des Erwartungswertes λ in die MC basierte Poisson-Verteilung ein, und man erhält den jeweils Poisson-verrauschten Wahrscheinlichkeitswert. Damit kann für den einzelnen Intensitätskanal je Simulationsschritt ermittelt werden, ob

ein Photon detektiert wird oder nicht. Die Simulation wird solange fortgeführt, bis eine definierte Gesamtzahl von Photonen I_D erreicht wird. Die Anregungswahrscheinlichkeit wird abhängig vom Polarwinkel Θ berechnet und damit die Anzahl der zu detektierenden Photonen I_D moduliert. Diese Anzahl, aufgeteilt auf die drei Intensitätskanäle, wird dann genau einem Simulations- bzw. Zeitschritt zugeordnet.

Die Abbildung einzelner Moleküle oder durch fluoreszente Moleküle markierte Strukturen erfolgt durch ein Rasterverfahren (SCOM). Dafür ist die Simulation orientierungsaufgelöster Bilder nötig. Für Simulationen vom Typ C wird eine beliebige Anzahl von Molekülen n zunächst zufällig auf einem Gebiet der Größe $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ mit der Position $(x_{0,i}, y_{0,i})$ platziert. Die Orientierung des einzelnen Moleküls wird mit $(\Theta_{0,i}, \Phi_{0,i})$ vorgegeben. Der azimutale Winkel ist dabei in der Regel gleich verteilt. Der polare Winkel genügt einer sinusoidalen Verteilung, um der Gleichverteilung des Oberflächenelementes auf einer Kugel Rechnung zu tragen. Die Intensitäten der Kanäle $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r werden gemäß der Gleichungen 2.41 und 2.42 für eine vorgegebene, total emittierte Intensität $I_{\text{tot,em}}$ berechnet. Dabei wird die Intensität $I_{\text{tot,em}}$ mit dem Intensitätsprofil $w_0 = 250 \text{ nm}$ des Laserfokus (siehe Gleichung 2.49) ortsabhängig gewichtet. Der Laserfokus wird dabei exakt auf die betrachtete Ebene positioniert $z = 0$. Das Bild ergibt sich schließlich aus der Summe der Intensitätsbilder der n Moleküle.

Neben einzelnen Molekülen sollen auch hochmarkierte Strukturen, z. B. Latexkügelchen, simuliert werden (Typ D). Dafür werden zunächst k solcher Strukturen zufällig auf einem Gebiet der Größe $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ mit der Position $(x_{0,i}, y_{0,i})$ platziert. Jeder dieser Strukturen werden nun $n = 500$ Moleküle zugeordnet. Die Position jedes Einzelnen ist zufällig über ein Kreisgebiet mit dem Radius $R = 100 \text{ nm}$ um den Ort $(x_{0,i}, y_{0,i})$ verteilt. Das Bild ergibt sich aus der Summe der Simulation aller $k \times n$ Moleküle.

Eine weitere mit fluoreszenten Molekülen markierte Struktur ist ein Lipidvesikel. Die Simulation dieser Struktur (Typ E) wird im Prinzip wie bei den Latexkügelchen durchgeführt. Da die Ausdehnung der Vesikel mit $r = 5 \mu\text{m}$ jedoch deutlich größer als die des Laserfokus ist, wird das Vesikel in Richtung der z -Achse in Schichten mit einem Abstand von $\Delta z = 1 \mu\text{m}$ aufgeteilt. Die Position der $n = 500$ Moleküle wird über diese Ebenen auf der simulierten Vesikeloberfläche verteilt:

$$(x_{0,i}, y_{0,i}, z_{0,i}) \in \{U(r) : r^2 = (x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 + (z - z_0)^2\}$$

Der Mittelpunkt des Vesikels (x_0, y_0, z_0) ist dabei auf dem Gebiet der Größe $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$ beschränkt. Dabei muss die Gleichverteilung der Moleküle auf der Oberfläche des Vesikels beachtet werden. Die Orientierung der fluoreszenten Moleküle ist in solchen Vesikeln unter Umständen nicht mehr frei, sondern durch die Topologie der Struktur sowie der Art der Inkorporation des Markers vorgegeben. Bei der Simulation von Di-Farbstoffen in Lipidvesikeln, geht man davon aus, dass das Dipolmoment des Fluorophors tangential zur Oberfläche des Vesikels liegt und gleichzeitig die freie Rotationsachse darstellt. Es wird daher angenommen, dass der Farbstoff innerhalb der Membran frei rotieren kann und damit dessen Orientierung relativ zur Membran gleich verteilt ist. Aus der Projektion der Dipolachse in

der Membran auf das Laborkoordinatensystem kann sowohl der azimutale Winkel $\Phi_{0,i}$ als auch der polare Winkel $\Theta_{0,i}$ berechnet werden. Aus Symmetriegründen kann der Wechsel des Farbstoffs zwischen innerer und äußerer Lipidschicht der Doppelmembran vernachlässigt werden. Die Rotations- und Diffusionsbewegung der Moleküle in der Membran wird für diese Simulation nicht beachtet.

Die Parameter des optischen Systems werden gemäß der Kalibrierung aus Abschnitt 3.3 herangezogen.

Für alle Simulationen wird der Beitrag des Hintergrundes nicht als anisotroper Dipolstrahler, sondern als isotroper Streuer, z. B. des eingestrahltten Anregungslichtes durch einen Laser, betrachtet. Gibt man einen frei wählbaren Prozentsatz des Hintergrundes relativ in Bezug auf die detektierte Intensität vor, so gibt das Verhältnis der Raumwinkelintervalle für die Detektion eines Photons im zentralen Bereich und im Kranzbereich die Verteilung des Hintergrundes wieder [43]:

$$\Delta\Omega = \frac{1 - \cos \alpha_c}{1 - \cos \alpha_r} = \frac{1 - \cos 43^\circ}{1 - \cos 67,5^\circ} = 0,44. \quad (3.41)$$

Damit ist der Anteil des Hintergrundes im Zentrum $I_{c,Bg}$ mit 44% und entsprechend im Kranz $I_{r,Bg}$ mit 56% gegeben.

Ausgehend von den für die verschiedenen Typ n von Simulationen erhaltenen Intensitätswerten, egal ob pro Zeit- bzw. Simulationsschritt (bin) der simulierten Zeitspuren oder je Pixel der simulierten Bilder, wird schließlich die Orientierung anhand der Gleichungen 2.46 bis 2.47 zurückgerechnet und kann so mit den vorher festgelegten Parametern verglichen werden. Aufgrund des Schrotrauschens ist es sinnvoll, die erhaltenen Winkelverteilungen anhand ihres Mittelwertes und ihrer Standardabweichung zu bewerten.

Abbildung einer sinusoidalen Polarwinkelverteilung

Betrachtet man die beiden Winkel Θ und Φ , die zur Charakterisierung der 3D Orientierung herangezogen werden, so unterscheiden sich die Verteilungen beider in fundamentaler Art und Weise. Um den Unterschied beider Verteilungen erklären zu können, geht man zunächst davon aus, dass sich das untersuchte Einzelmolekül frei bewegen, es insbesondere frei rotieren kann. Vor allem soll keine Orientierung gegenüber einer anderen ausgezeichnet sein. Man spricht von Isotropie. Ausgehend von dieser Eigenschaft betrachtet man nun die beiden Winkel. Der azimutale Winkel Φ beschreibt per Definition die Orientierung des Moleküls in der x - y -Ebene. Wenn keine Orientierung ausgezeichnet sein soll, so muss dieser Winkel gleich verteilt sein. Betrachtet man den polaren Winkel Θ , so zeigt sich, dass bei einer Gleichverteilung der Winkelwerte die Orientierung des Moleküls in Richtung der Pole bevorzugt wäre. Eine isotrope Verteilung in Θ erhält man daher nur durch eine entsprechende Abbildung auf äquidistante Schritte in der entsprechenden Ebene, hier

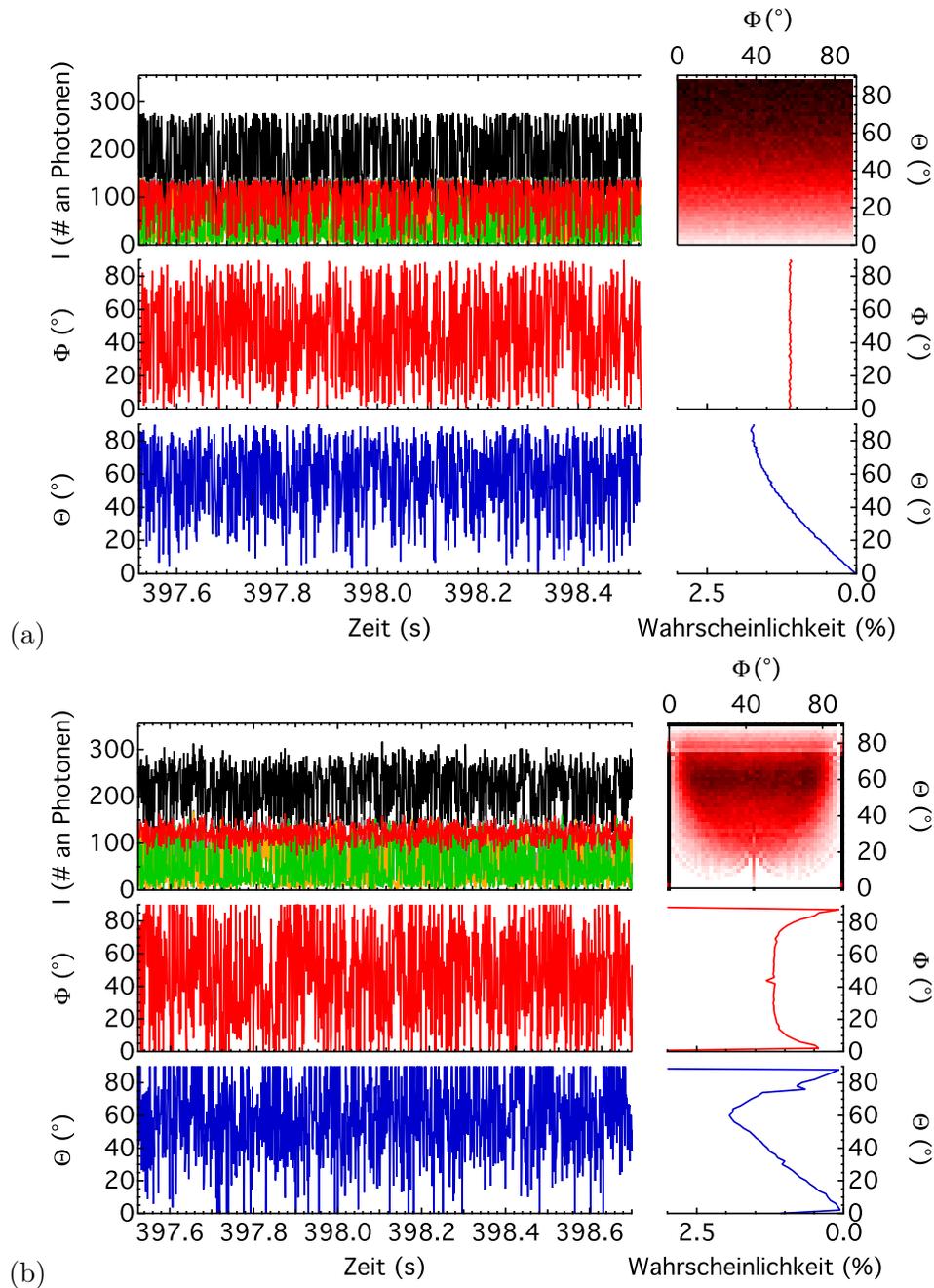


Abb. 3.11: Simulationen vom Typ A. Die Winkel werden für jeden Zeitschritt zufällig generiert. Die von dem Molekül emittierte Intensität wird auf $I_{\text{tot,em}} = 1000000$ Photonen / s gesetzt. (a) Simulierte Zeitspur ohne Poisson-Rauschen und ohne Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit. (b) Simulierte Zeitspur mit Rauschen und unter Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit für ein Ölimmersionsobjektiv.

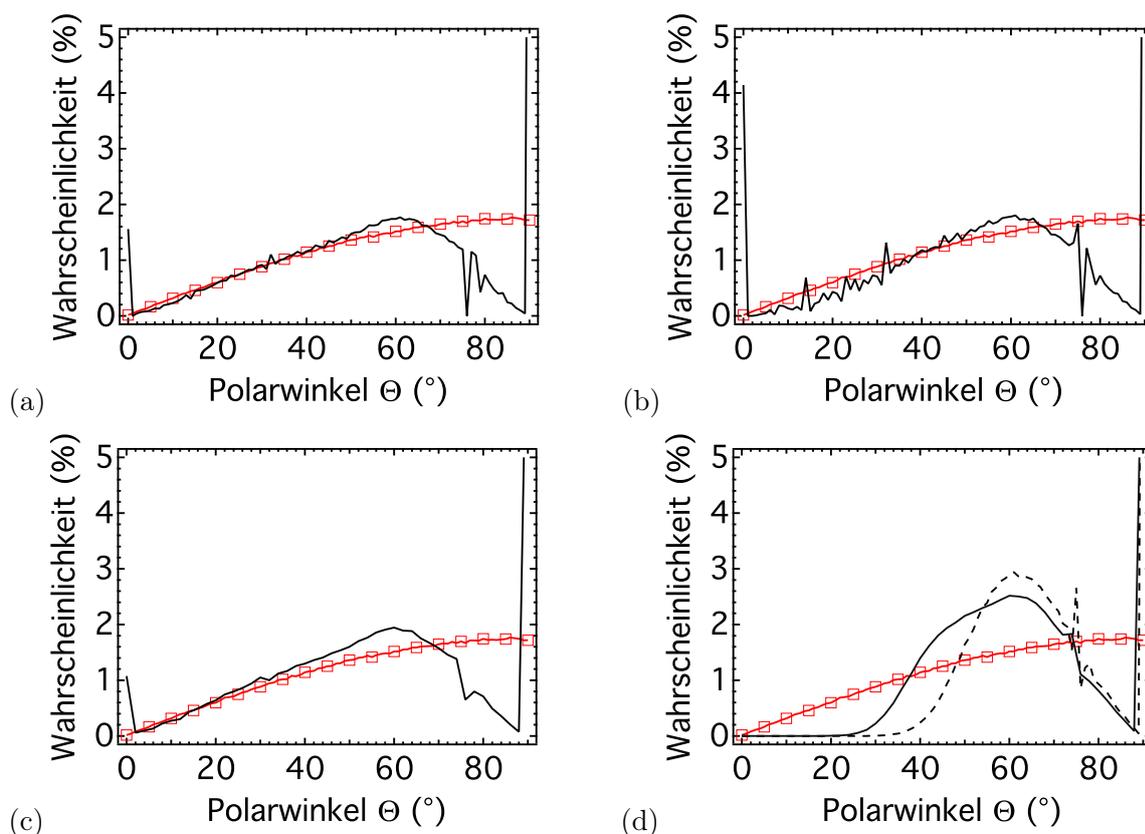


Abb. 3.12: (a) Vergleich der Verteilung des Polarwinkels mit (rote Linie) und ohne (schwarze Linie) Poisson-Rauschen. Verteilung des Polarwinkels unter Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit in (b) Fluorimeteranordnung und in (c) konfokaler Anordnung sowie (d) mit 10% Hintergrund in Fluorimeteranordnung (gestrichelte Linie) und in konfokaler Anordnung (durchgezogene Linie).

die x - z - bzw. y - z -Ebene. Diese Projektion ist durch die arccos-Funktion gegeben, deren Werte- bzw. Winkelbereich $[0^\circ, 90^\circ]$ dem entsprechenden Definitionsbereich $[0, 1]$ einer gleichverteilten Größe auf der z -Achse entspricht. Die sich daraus ergebende Verteilung des Polarwinkels Θ wird sinusoidal genannt und ist in Abbildung 3.12 vergleichend in rot graphisch dargestellt.

Ausgehend von der zu erwartenden sinusoidalen Verteilung des Polarwinkels sollen nun verschiedene Einflüsse untersucht werden. Dazu wird die Simulation gemäß Typ A durchgeführt und die Orientierung des Moleküls für jeden Simulations- bzw. Zeitschritt zufällig gemäß der oben beschriebenen Verteilungen neu bestimmt. Die von dem Molekül emittierte Intensität wird auf $I_{\text{tot,em}} = 1000000$ Photonen / s gesetzt. Der minimale Zeitschritt ist $\Delta t = 1$ ms. Die Berechnung der Winkel erfolgt mit Korrektur ungültiger Intensitätsverhältnisse. Zunächst soll der Einfluss des Poisson-Rauschens auf die Verteilung untersucht werden. In Abbildung 3.12 (a) ist neben der rein sinusoidalen Verteilung, also der Verteilung

des Polarwinkels ohne Rauschen, die Verteilung des polaren Winkels mit Rauschen dargestellt. Vergleicht man beide miteinander, so kommt es insbesondere an den Grenzen der Verteilung zu erheblichen Abweichungen. Diese Abweichungen können maßgeblich durch das Auftreten sogenannter ungültiger Intensitätsverhältnisse erklärt werden, die rauschbedingt bei der Berechnung des Winkels gemäß Gleichung 2.46 auftreten und derart korrigiert werden, in dem man den nächstmöglichen Wert des Wertebereiches für den Winkel Θ zuordnet. Diese Korrektur führt dazu, dass für die beiden Grenzfälle 0° und 90° die relative Häufigkeit besonders hoch ist. Der Population der Grenzwerte folgt eine Depopulation der Grenzbereiche, wie man insbesondere für den Bereich $\Theta > 70^\circ$ beobachten kann. Die leichte Zunahme der relativen Häufigkeit im Bereich $\Theta \simeq 60^\circ$ ist ebenfalls rauschbedingt.

Die Abbildungen 3.12 (b,c) zeigen den Verlauf der Verteilung, der sich unter Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit des Fluorophors ergibt. Betrachtet man den Einfluss der Anregung in der sogenannten Fluorimeteranordnung (b), so ist vor allem der Bereich kleiner Polarwinkel betroffen. Da hier die Anregung zu sehr niedrigen Emissionsraten führt, ist auch der Anteil ungültiger Intensitätsverhältnisse hoch. Das führt schließlich zur Depopulation des Bereichs $\Theta < 30^\circ$. Für die konfokale Anregung eines Ölimmersionsobjektivs (c) zeigt sich diese Depopulation für kleine Polarwinkel nicht. Das zeigt, dass trotz der Winkelabhängigkeit der Anregungswahrscheinlichkeit, der Einfluss bei einem Objektiv hoher numerischer Apertur gering ist.

Schließlich ist in Abbildungen 3.12 (d) der Einfluss des Hintergrundes, der mit 10% der total emittierten Intensität angenommen wird, dargestellt. Diese Darstellung zeigt den drastischen Einfluss des Hintergrundes auf die Verteilung und damit auf die Bestimmung der 3D Orientierung eines fluoreszenten Moleküls. Insbesondere der Bereich kleiner Polarwinkel wird sowohl in der Fluorimeteranordnung (gestrichelte Linie) als auch in der konfokalen Anordnung (durchgezogene Linie) vollständig depopuliert. Entsprechend wird der Bereich $\Theta \sim 60^\circ$ überbewertet. Da in den meisten Experimenten der Hintergrund auf unter 5% der detektierbaren Fluoreszenz des Einzelmoleküls reduzierbar ist, kann diese drastische Verzerrung der Verteilung als Grenzfall betrachtet werden.

Die Winkelabhängigkeit

In der Arbeit von Hohlbein [43] wurde das Schrotrauschen als fundamentale Eigenschaft der Emission von Photonen zur Erklärung verschiedener Effekte bei der Bestimmung der 3D Orientierung herangezogen. In den folgenden Abschnitten sollen diese Ausführungen um den Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit ergänzt werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse beruhen auf der Simulation des Typs B.

Zunächst soll die Abhängigkeit der Orientierungsbestimmung von den vorgegebenen Winkelwerten (Θ_0, Φ_0) untersucht werden. Dafür wird die Anzahl der maximal detektierbaren Photonen auf $I_D(\Theta = 90^\circ) = 500$ festgesetzt und die Simulation 200 mal wiederholt. Die Anfangswerte für Θ_0 und Φ_0 werden von 0° bis 90° in 5° Schritten variiert. Es wird kein

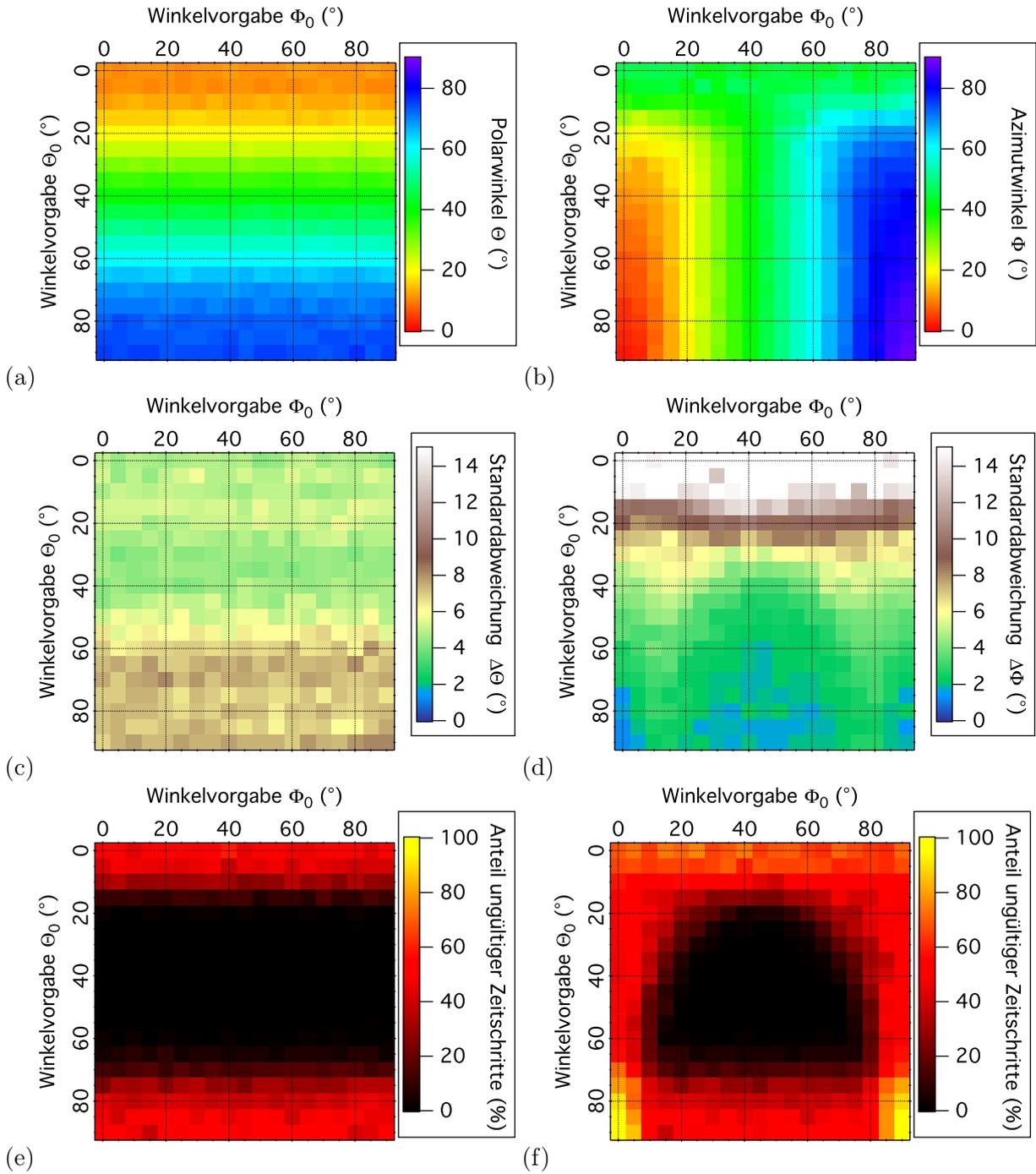


Abb. 3.13: Simulationen vom Typ B für die Bestimmung der 3D Orientierung unter Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit. Die Falschfarbenbilder stellen (a,b) die Mittelwerte der Winkel $\langle \Theta \rangle$ und $\langle \Phi \rangle$, berechnet aus den simulierten Intensitätswerten $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r , in Abhängigkeit von der vorgegeben Orientierung (Θ_0, Φ_0) , (c,d) die Standardabweichung der Winkelwerte $\Delta \Theta$ und $\Delta \Phi$ sowie (e,f) den Anteil ungültiger Intensitätswerte für die Berechnung der Winkel Θ und Φ dar. Vgl. [8]

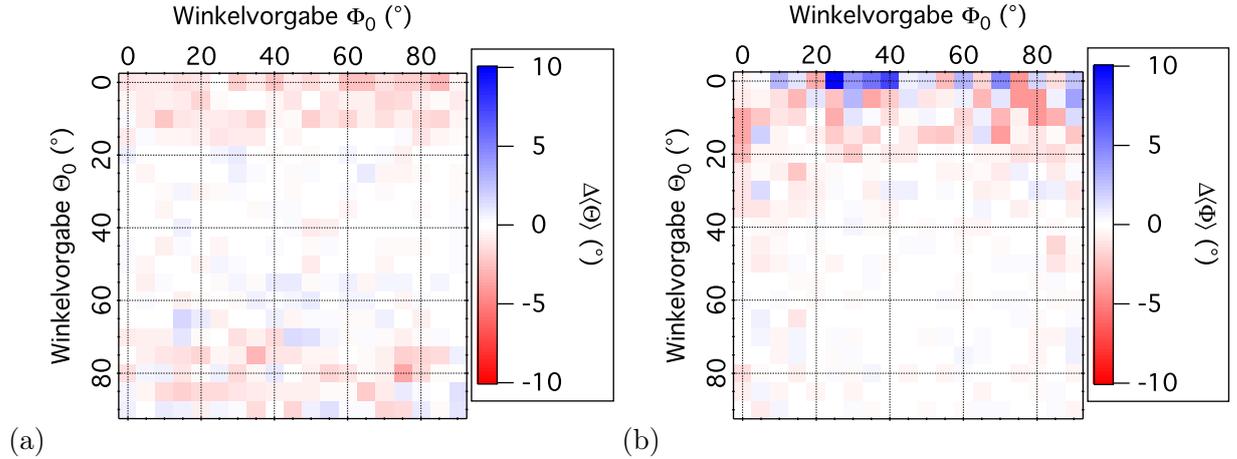


Abb. 3.14: Vergleich der Simulationen vom Typ B für die Bestimmung der 3D Orientierung mit und ohne Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit. Die Falschfarbender stellen die mittlere Abweichung (a) $\Delta\langle\Theta\rangle$ und (b) $\Delta\langle\Phi\rangle$ dar.

Hintergrundsignal generiert. Durch das zufällig erzeugte Poisson-Rauschen ergeben sich bei der Simulation Intensitätsverhältnisse der drei Kanäle $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r , die nicht dem Definitionsbereich der Winkel-Gleichungen 2.46 und 2.47 entsprechen. Sie werden zunächst als ungültig betrachtet und bei der Auswertung außer acht gelassen. Abbildung 3.13 (a,b) zeigt die aus den simulierten Intensitätszeitserien berechneten Mittelwerte für den Polarwinkel Θ und den Azimutwinkel Φ als Falschfarbender. Die berechneten Werte für den Polarwinkel stimmen bis auf die Grenzfälle $\Theta_0 = 0^\circ$ bzw. $\Theta_0 = 90^\circ$ sehr gut mit den Anfangswerten überein. Die Abweichung an den Grenzen kann mit dem bereits ausführlich diskutierten Einfluss des Rauschens erklärt werden. Die berechneten Werte für den Azimutwinkel zeigen die bereits im Kapitel 3.1 beschriebene Abhängigkeit der Polarisation von der Orientierung des Dipols relativ zur optischen Achse z , die im Falle kleiner Polarwinkel $\Theta < 10^\circ$ zur vollständigen Depolarisation der Dipolemission führt. Zusätzlich zu diesem Effekt führt auch beim Azimutwinkel das Rauschen zu ungültigen Intensitätsverhältnissen, die eine Abweichung des berechneten Winkelwertes vom ursprünglich angenommenen Wert verursachen. In Abbildung 3.13 (c,d) wird die Standardabweichung der berechneten Mittelwerte dargestellt. Interessanterweise steigt diese für den Polarwinkel mit der Zunahme des Anfangswertes an. Die Ursache dafür ist die nichtlineare Form der Gleichung 2.46, die für größere Werte des Polarwinkels anfälliger für verrauschte Intensitätswerte wird. Für den Azimutwinkel entspricht die Standardabweichung den Erwartungen. Die im Bereich kleiner Polarwinkel erhaltenen Werte für Φ sind aufgrund des Depolarisationseffektes ausschließlich rauschbedingt. Das führt zu den hohen Werten der Standardabweichung in diesem Bereich. Schließlich zeigt Abbildung 3.13 (e,f) den Anteil ungültiger Intensitätsverhältnisse bei der Berechnung der Winkelwerte. Die Falschfarbender zeigen deutlich, dass der Anteil ungültiger Werte insbesondere an den Grenzen der Definitionsbereiche 0° und 90° für beide Winkel auf hohe Werte ansteigt ($> 50\%$). Da die Berechnung der Azimutwinkel von der Berechnung der Polarwinkel abhängt, ist sowohl der Grenzbereich des Azimutwinkels selbst als auch der des Polarwinkels betroffen.

Zusammenfassend stimmen die Ergebnisse mit den in der Literatur aufgeführten Argumentationen überein [8, 43]. Im Folgenden soll daher ein Vergleich der berechneten Mittelwerte mit und ohne Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit erfolgen. Dafür wird die Differenz der Mittelwerte für beide Winkel Θ und Φ für die Simulation mit und ohne Anregungswahrscheinlichkeit voneinander subtrahiert. Das Ergebnis ist als mittlere Abweichung $\Delta\langle\Theta\rangle$ und $\Delta\langle\Phi\rangle$ in Abbildung 3.14 dargestellt. Der Unterschied fällt für beide Winkel gering aus. Der Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit auf die Bestimmung des Polarwinkels ist gering ($\Delta\langle\Theta\rangle < 4^\circ$) und liegt im Rahmen der Standardabweichung $\pm 5^\circ$ der entsprechenden Mittelwerte. Die deutlich größeren Abweichungen für den Azimutwinkel sind mit der im Bereich kleiner Polarwinkel größeren Standardabweichung zu erklären und nicht mit dem Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit.

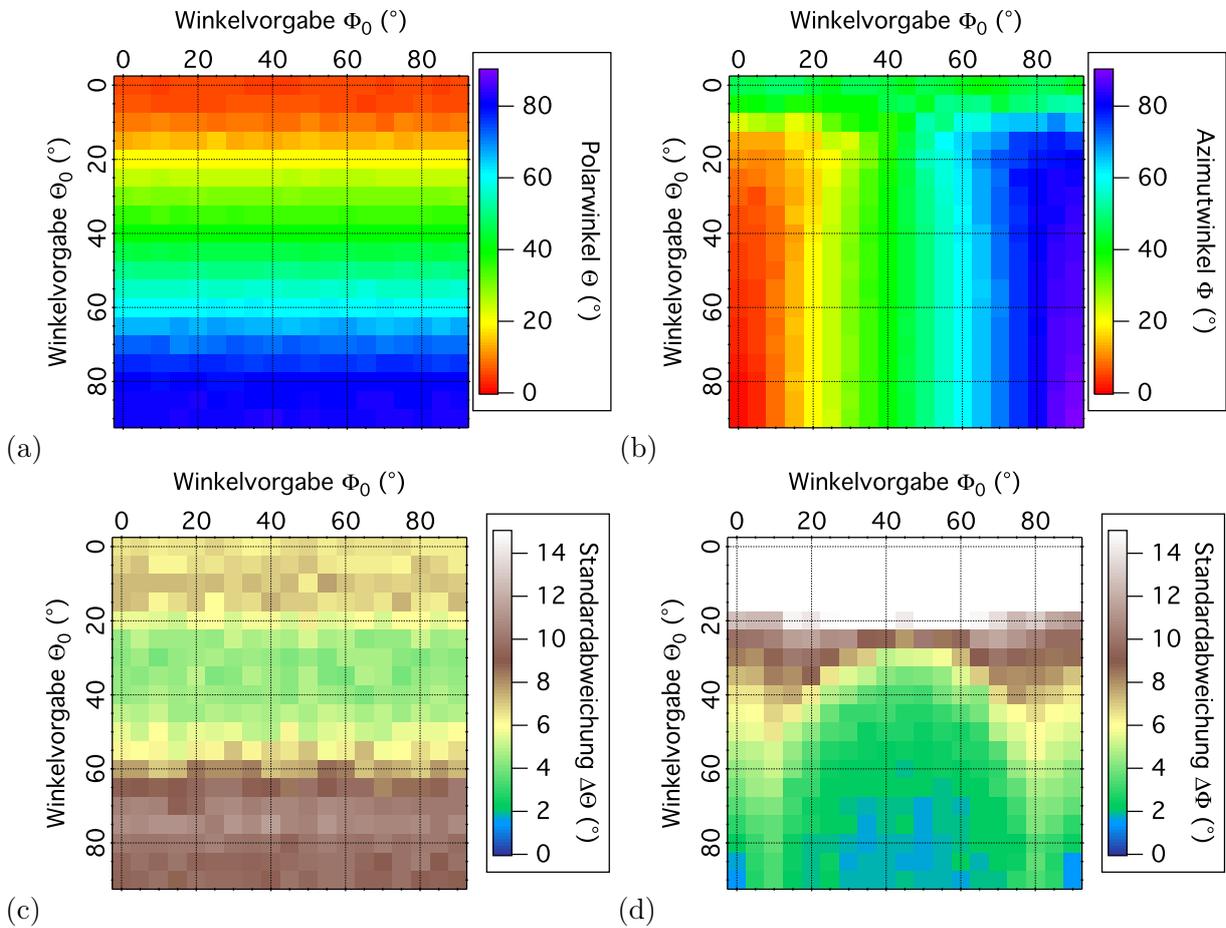


Abb. 3.15: Simulationen vom Typ B für die Bestimmung der 3D Orientierung unter Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit. Die Falschfarbenbilder stellen (a,b) die Mittelwerte der Winkel Θ und Φ , berechnet aus den simulierten Intensitätswerten $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r , in Abhängigkeit von der vorgegebenen Orientierung (Θ_0, Φ_0) sowie (c,d) die Standardabweichung der Winkelwerte $\Delta\Theta$ und $\Delta\Phi$ dar. Vgl. [8]

Um den Einfluss ungültiger Intensitätsverhältnisse zu minimieren, kann man in diesem Fall

die Intensitätswerte auf den nächstmöglichen, gültigen Wert setzen. Das bedeutet, dass die Winkelwerte entsprechend auf die Werte 0° und 90° als Grenzen des Wertebereiches bei der Berechnung gesetzt werden. Damit erhält man die in Abbildung 3.15 dargestellten Ergebnisse. Grundsätzlich stimmen durch diesen Mechanismus die berechneten Winkelwerte an den Grenzen deutlich besser mit den Anfangswerten überein. Anders als bei der Betrachtung ohne den Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit, fällt die Standardabweichung durch die Korrektur ungültiger Intensitätsverhältnisse deutlich höher aus, als ohne diese Korrektur. Für den Bereich kleiner Polarwinkel kann die Abweichung mit der Anregungswahrscheinlichkeit und der dadurch geringeren Photonenzahl begründet werden. Dadurch ist der Einfluss des Poisson-Rauschens für kleine Polarwinkel deutlich höher.

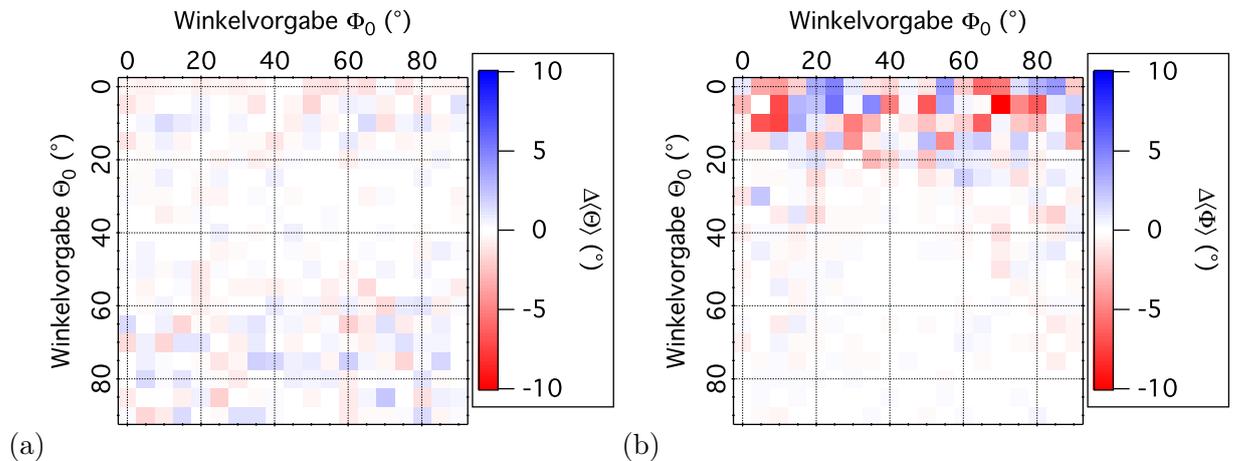


Abb. 3.16: Vergleich der Simulationen vom Typ B für die Bestimmung der 3D Orientierung mit und ohne Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit. Die Falschfarbenbilder stellen die mittlere Abweichung (a) $\Delta\langle\Theta\rangle$ und (b) $\Delta\langle\Phi\rangle$ dar.

Im folgenden soll auch hier ein Vergleich der berechneten Mittelwerte mit Korrektur ungültiger Intensitätsverhältnisse mit und ohne Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit erfolgen. Dafür wird die Differenz der Mittelwerte für beide Winkel Θ und Φ für die Simulation mit und ohne Anregungswahrscheinlichkeit voneinander subtrahiert. Das Ergebnis ist als mittlere Abweichung $\Delta\langle\Theta\rangle$ und $\Delta\langle\Phi\rangle$ in Abbildung 3.16 dargestellt. Der Unterschied fällt für beide Winkel gering aus. Insbesondere ist der Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit auf die Bestimmung des Polarwinkels unter den bisher gemachten Annahmen vernachlässigbar ($\Delta\langle\Theta\rangle < 2$). Die deutlich größeren Abweichungen für den Azimutwinkel sind auch hier mit der im Bereich kleiner Polarwinkel größeren Standardabweichung zu erklären.

Der Intensitätseinfluss

Der Einfluss des Schrotrauschens ist von der Anzahl detektierter Photonen abhängig. Daher soll nun der Einfluss der Intensität durch die Variation der detektierbaren Photonen

auf die Bestimmung der 3D Orientierung untersucht werden. Dafür wird die Anzahl der maximal detektierbaren Photonen $I_D(\Theta = 90^\circ) = 100 \cdot 2^{m/2}$ mit $m = 0, 1, 2, \dots, 12$ (siehe Abbildung 3.17) variiert und die Simulation 200 mal wiederholt. Die Simulation ist vom Typ B. Für die Simulation wird der Azimutwinkel auf $\Phi = 45^\circ$ gesetzt und nur der Polarwinkel wie im vorhergehenden Abschnitt variiert. Ungültige Intensitätsverhältnisse werden entsprechend korrigiert.

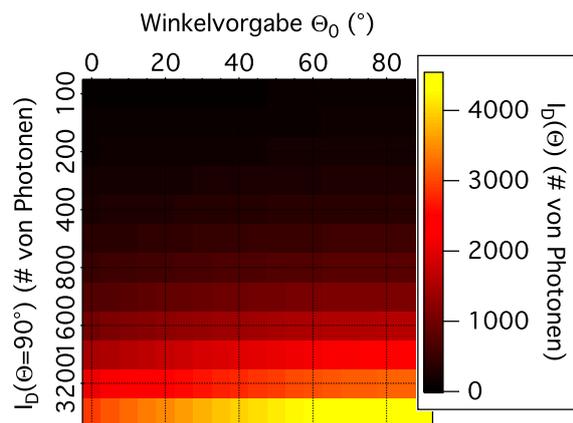


Abb. 3.17: Intensitätsverlauf $I_D(\Theta)$ in Abhängigkeit des Polarwinkels Θ für verschiedene maximal detektierbare Photonenanzahlen $I_D(\Theta = 90^\circ) = 100 \cdot 2^{m/2}$ mit $m = 0, 1, 2, \dots, 12$.

Analog zur Darstellung der Winkelabhängigkeit ist in Abbildung 3.18 (a,b) der Mittelwert des aus den simulierten Intensitätswerten I_c und I_r berechneten Polarwinkels Θ dargestellt. Dabei wurde die Simulation zum einen (a) ohne Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit und zum anderen (b) mit Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit gegenübergestellt. In dieser Darstellung sind Unterschiede zunächst nur schwer ausfindig zu machen. Betrachtet man aber die in Abbildung 3.18 (c,d) aufgeführte Standardabweichung im Vergleich, so ist die Höhe der Standardabweichung insbesondere für kleine Θ -Werte und im Bereich niedriger Intensitäten für die Simulation unter Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit deutlich größer.

Vergleicht man die berechneten Mittelwerte in Abhängigkeit von der maximal, detektierbaren Photonenzahl I_D mit und ohne Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit, so ist die mittlere Abweichung $\Delta\langle\Theta\rangle$, dargestellt in Abbildung 3.19, beider Simulationen gering. Damit zeigt sich auch hier, dass der Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit zumindest auf die Bestimmung des mittleren Polarwinkels gering ausfällt. Die Analyse der Standardabweichung zeigt jedoch, dass der von Hohlbein u. Hübner aufgestellten Untergrenze zu detektierender Photonen für die Bestimmung der 3D Orientierung eines fluoreszenten Moleküls besondere Beachtung geschenkt werden muss. Insbesondere für kleine Polarwinkel ist der Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit und damit die Ausbeute von Photonen auf die Güte der Winkelbestimmung nicht zu vernachlässigen.

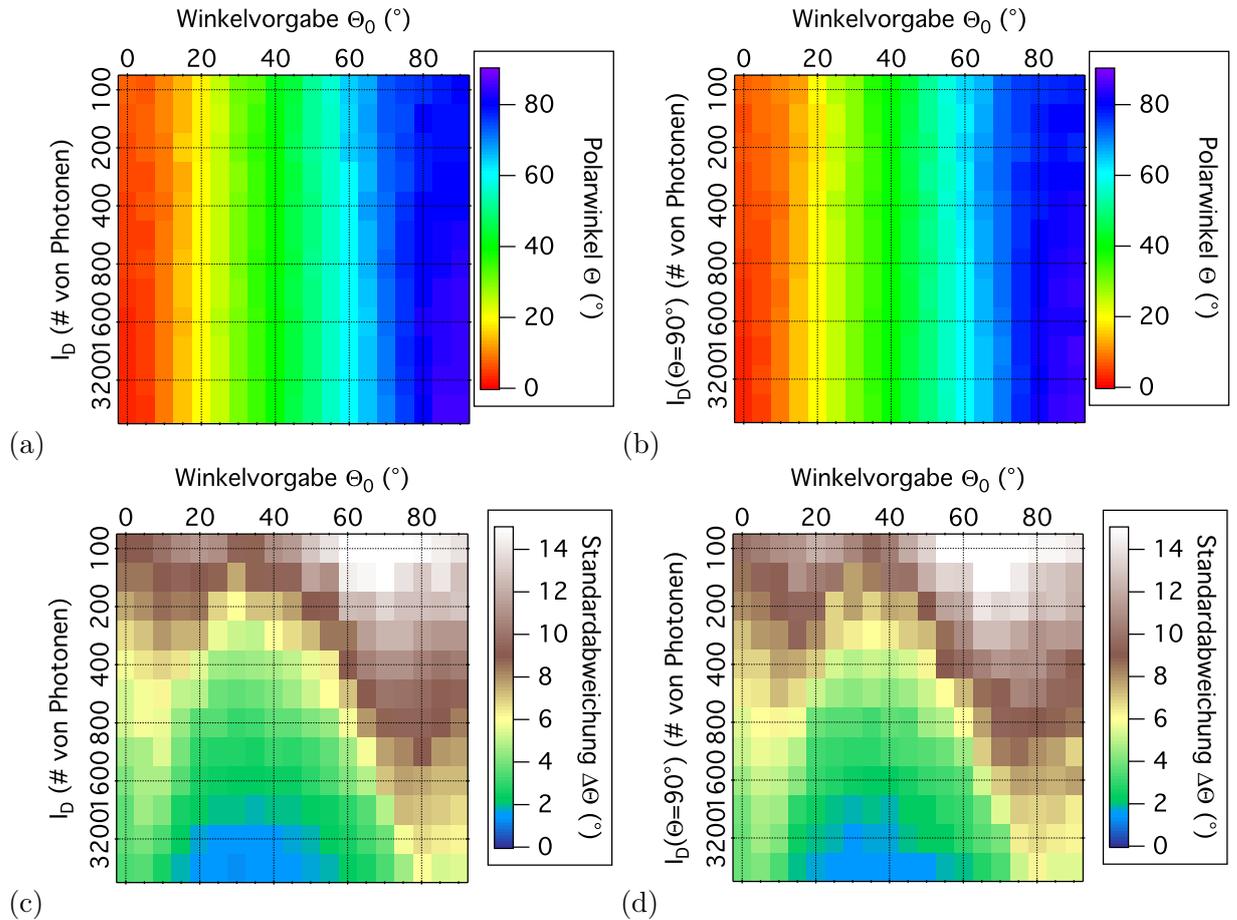


Abb. 3.18: Simulationen vom Typ B für die Bestimmung der 3D Orientierung ohne (linke Spalte) und mit (rechte Spalte) Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit. Die Falschfarbenbilder stellen (a,b) die Mittelwerte der Winkel Θ und Φ berechnet aus den simulierten Intensitätswerten $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r in Abhängigkeit von der vorgegebenen Orientierung Θ_0 und der Anzahl detektierbarer Photonen $I_D(\Theta = 90^\circ) = 100 \cdot 2^{m/2}$ mit $m = 0, 1, 2, \dots, 12$ und (c,d) die Standardabweichung der Winkelwerte $\Delta\Theta$ und $\Delta\Phi$ dar. Vgl. [8]

Das Hintergrund-Rauschen

Zum Abschluss soll der Einfluss des isotropen Hintergrundes untersucht werden. Dafür wird der Anteil des Hintergrundes an der Gesamtzahl detektierbarer Photonen in Schritten von 10% von 0% bis 100% variiert. Die Anzahl der maximal detektierbaren Photonen wird auf $I_D(\Theta = 90^\circ) = 500$ festgelegt und die Simulation 200 mal wiederholt. In Abbildung 3.20 ist der Verlauf für den Beitrag an Photonen (a) des Dipolstrahlers an sich sowie (b) des unkorrelierten, isotropen Hintergrundes in Abhängigkeit von der Anregungswahrscheinlichkeit dargestellt. Die Simulation ist vom Typ B. Für die Simulation wird der Azimutwinkel

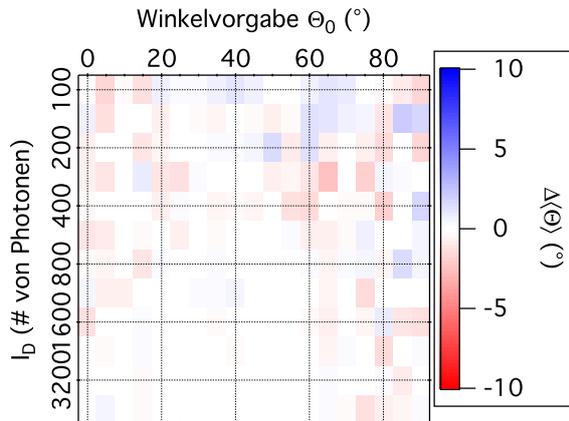


Abb. 3.19: Vergleich der Simulationen vom Typ B aus Abbildung 3.18 (a,b) für die Bestimmung des Polarwinkels mit und ohne Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Anzahl simulierter Photonen I_D sowie der vorgegebenen Orientierung in Θ_0 . Das Falschfarbenbild stellt die mittlere Abweichung $\Delta\langle\Theta\rangle$ der berechneten Polarwinkel dar.

auf $\Phi = 45^\circ$ gesetzt und nur der Polarwinkel variiert. Ungünstige Intensitätsverhältnisse werden entsprechend korrigiert.

Analog zur Darstellung der Intensitätsabhängigkeit ist in Abbildung 3.21 (a,b) der Mittelwert sowie (c,d) die Standardabweichung des Polarwinkels Θ dargestellt. Dabei wurde die Simulation (a,c) ohne Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit und (b,d) mit Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit gegenübergestellt. Sowohl für die Mittelwerte als auch für die Standardabweichung können kaum Unterschiede ausgemacht werden. Mit zunehmenden Hintergrund nähert sich die Verteilung des Polarwinkels dem Schwerpunkt einer sinusoidalen Verteilung $\langle\Theta\rangle = 57^\circ$ an, und die Berechnung des Winkelwertes spiegelt nicht mehr den vorgegebenen Winkel Θ_0 wieder. Der Verlauf der Standardabweichung ist gleich dem Verlauf bei der Simulation der reinen Winkelabhängigkeit und

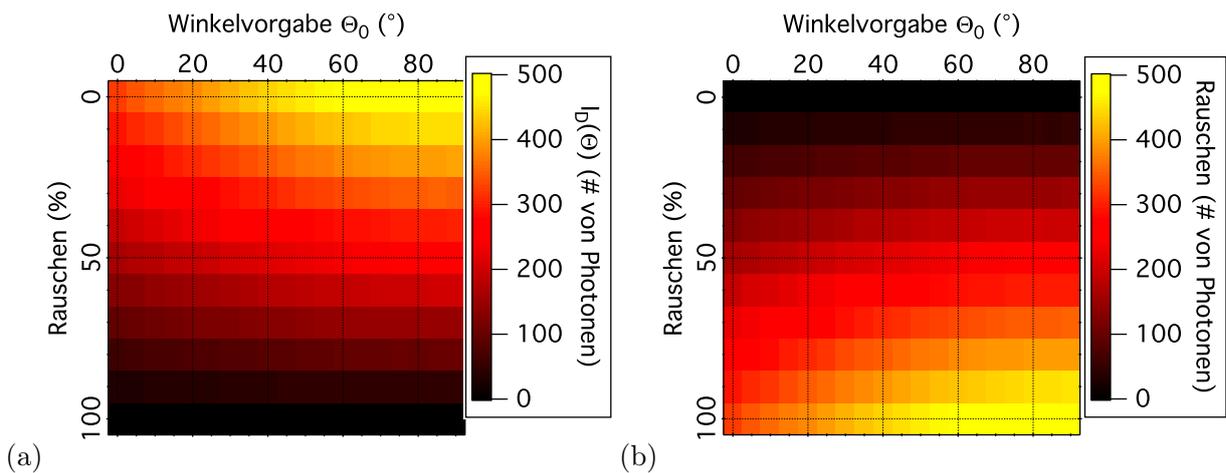


Abb. 3.20: Intensitätsverlauf $I_D(\Theta)$ in Abhängigkeit des Polarwinkels Θ für verschiedene Anteile des Hintergrundes an der Gesamtzahl detektierbarer Photonen der in Schritten von 10% von 0% bis 100% variiert wird.

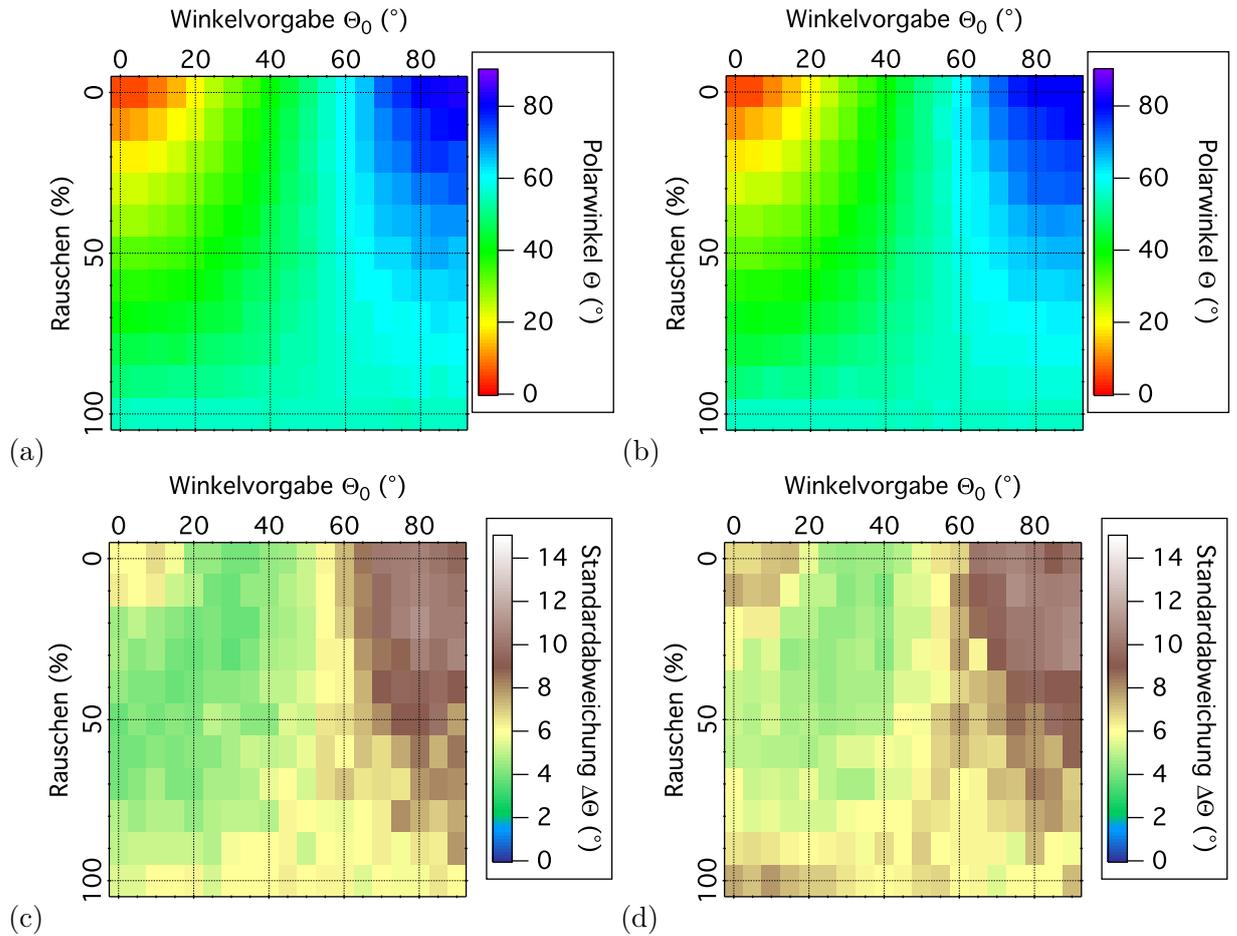


Abb. 3.21: Simulationen vom Typ B für die Bestimmung der 3D Orientierung ohne (linke Spalte) und mit (rechte Spalte) Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit. Die Falschfarbenbilder stellen (a,b) die Mittelwerte der Winkel Θ und Φ berechnet aus den simulierten Intensitätswerten $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r in Abhängigkeit von der vorgegebenen Orientierung Θ_0 und dem prozentualen Anteil von detektierten Photonen, die durch isotropes Hintergrundrauschen verursacht und (c,d) die Standardabweichung der Winkelwerte $\Delta\Theta$. Die Anzahl der maximal detektierbaren Photonen beträgt $I_{\text{tot,em}}(\theta = 90^\circ) = 500$. Im Falle ungültiger, simulierter Intensitätsverhältnisse wird der berechnete Winkel auf den jeweils zutreffenden Grenzwert gesetzt. Vgl. [8]

kann prinzipiell mit der Nichtlinearität der Funktion für die Berechnung des Polarwinkels erklärt werden.

Schließlich zeigt Abbildung 3.22 die mittlere Abweichung $\Delta\langle\Theta\rangle$ zwischen der Simulation mit und ohne Anregungswahrscheinlichkeit. Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Simulationen.

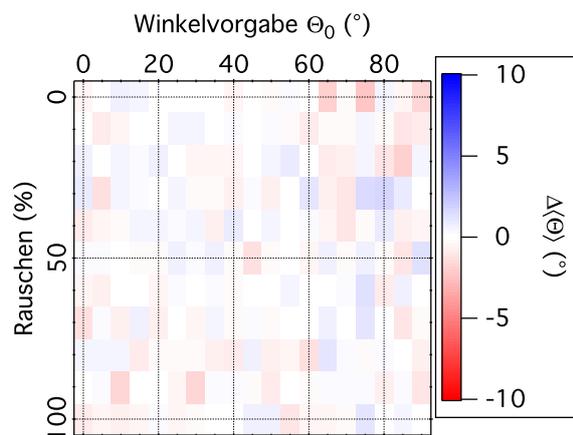


Abb. 3.22: Vergleich der Simulationen vom Typ B aus Abbildung 3.21 (a,b) für die Bestimmung des Polarwinkels mit und ohne Berücksichtigung der Anregungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des prozentualen Anteils isotropen Hintergrund-Rauschens sowie der vorgegebenen Orientierung in Θ_0 . Das Falschfarbenbild stellt die mittlere Abweichung $\Delta\langle\Theta\rangle$ der berechneten Polarwinkel dar.

3.2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die in diesem Kapitel untersuchten Simulationen erweitern die Ergebnissen von Hohlbein u. Hübner. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest unter den idealen Bedingungen einer Simulation das Ergebnis einer Winkelbestimmung sowohl für Φ als auch für Θ nur gering durch die Anregungswahrscheinlichkeit beeinflusst wird. Das ist damit zu erklären, dass die z -Komponente des E-Feldes bei konfokaler Anregung und hoher numerischer Apertur des verwendeten Objektivs vergleichbar mit den Komponenten des E-Feldes in der x - y -Ebene ist. Die minimale Anregungswahrscheinlichkeit eines Ölimmersionsobjektivs beträgt 65% der maximalen Anregung. Bei der Abbildung einer sinusoidalen Verteilung für den Polarwinkel wird der Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit insofern sichtbar, als dass der Bereich kleiner Polarwinkel schon bei niedrigen Hintergrundanteilen vollständig depopuliert wird. Um den gesamten Wertebereich der Methode überhaupt erfassen zu können, muss daher der Einfluss des Hintergrundes minimiert werden.

Gegenstand weiterführender Arbeiten kann der Vergleich in Bezug auf Auflösungsvermögen und Fehleranfälligkeit mit anderen Methoden zur Bestimmung der 3D Orientierung sein. Da der direkte Vergleich zwischen den einzelnen Methoden experimentell nur zum Teil realisierbar ist, können Simulationen eine entscheidende Rolle dabei spielen, die einzelnen Methoden zu quantifizieren [74].

3.3 Experimentelle Realisierung

Die Messungen wurden an einem selbst konstruierten konfokalen Mikroskop (SCOM, siehe Abbildung 2.5) durchgeführt [4]. Das Licht eines gepulsten Lasers mit einer Wellenlänge $\lambda = 470$ nm und einer Repetitionsrate von 20 MHz (LDH-P-C-470, PicoQuant, Berlin, Deutschland) wird in eine optische Faser (SMC-400-3, Schäfter & Kirchhoff, Hamburg, Deutschland) eingekoppelt, am Faseraustritt durch ein apochromatisches Mikroskopobjek-

tiv (UplanApo 4x/0.16, Olympus, Tokyo, Japan) kollimiert und über einen dichroitischen Spiegel (Z488RDC, Chroma Technology Corporation, Bellows Falls, USA) in die rückwärtige Apertur eines Öl- (100x Plan Achromat, NIKON, Melville, NY) bzw. Wasserimmersionsmikroskopobjektivs (60x Plan Achromat, NIKON, Melville, NY) eingekoppelt. Die Objektive haben eine numerische Apertur von 1,4 bzw. 1,2. Dies entspricht einem Öffnungswinkel für die Aufnahme des fluoreszenten Lichtes von $\alpha_r^{\text{Öl}} = 67,5^\circ$ bei einem Brechungsindex des Immersionsöls von $n = 1,515$ sowie von $\alpha_r^{\text{H}_2\text{O}} = 64^\circ$, jeweils bei Raumtemperatur. Mithilfe einer $\lambda/4$ und einer $\lambda/2$ Verzögerungsplatte vor dem Eingang der optischen Faser kann der Polarisationszustand des Anregungslichtes kontrolliert werden. Dieser wurde auf zirkular polarisiert eingestellt. Dem konfokalen Prinzip entsprechend dient das Mikroskopobjektiv für die Anregung gleichzeitig der Aufnahme des fluoreszenten Lichtes. Das fluoreszente Licht passiert aufgrund der Stokes-Verschiebung den dichroitischen Spiegel sowie einen 500 nm Langpassfilter (HQ500LP, Chroma Technology Corporation), durch den rückgestreutes bzw. reflektiertes Licht der Anregungswellenlänge des Lasers geblockt wird.

Entsprechend der Realisierung durch Hohlbein u. Hübner [4] wurde für die Bestimmung der 3D Orientierung das Fluoreszenzlicht in drei Teile aufgeteilt. Dabei wird das emittierte Fluoreszenzlicht zunächst mittels eines Lochspiegels (elliptische Apertur entsprechend 3 mm Durchmesser, Artifex engineering, Emden, Deutschland) in einen Bereich niedriger Emissionswinkel (zentrale Region) und einen Bereich hoher Emissionswinkel (Kranzregion) aufgeteilt. Der Durchmesser der projizierten kreisförmigen Apertur des Lochspiegels war 3 mm. Dies entspricht einem theoretischen Öffnungswinkel für die zentrale Apertur von $\alpha_c^{\text{Öl}} = 52^\circ$ bzw. $\alpha_c^{\text{H}_2\text{O}} = 38^\circ$. Das Fluoreszenzlicht der zentralen Region wird zusätzlich durch einen polarisationsabhängigen Strahlteiler (PBSH-450-700-050, CVI Melles Griot, Bensheim, Germany) in die beiden Polarisationskomponenten aufgeteilt.

Das so aufgeteilte Fluoreszenzlicht wird für den jeweiligen Intensitätskanal mittels einer achromatischen Linse auf drei Lawinenphotodioden⁴ (APD) (SPCM AQR14, Perkin-Elmer, Fremont, CA, USA) fokussiert. Der Puls für ein einzelnes, detektiertes Photon wird durch eine Vielkanal-Zählkarte (TimeHarp 200, PicoQuant, Berlin, Germany) registriert, welche mit einer ttr^5 -Logik bestückt ist. Die Photonenankunftszeit relativ zum Anregungspuls und damit die Lebensdauer des angeregten, fluoreszenten Zustandes kann mit einer Quantisierungsbreite der Elektronik von 35 ps bei 4096 Kanälen dargestellt werden. Die Zeitauflösung der Messung an sich wird durch den *jitter* des Detektors zu ca. 400 ns bestimmt.

Um den Messaufbau zu justieren, wurden 100 nm fluoreszente Latexkügelchen (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) immobilisiert auf einer Glasoberfläche mit dem Ölimmersionsobjektiv gescannt und die azimutalen Φ und polaren Θ Winkel je Pixel gemäß der Gleichungen 2.47 und 2.46 berechnet (siehe Abbildung 3.23). Durch den hohen Label-Grad mit fluoreszenten Farbstoffen, können die Latexkügelchen als isotrope Strahler angesehen

⁴engl. avalanche photo diode

⁵engl. time-tagged time correlated single photon counting, deutsch für zeitaufgelöst, zeitlich korrelierte Einzelphotonenaufnahme

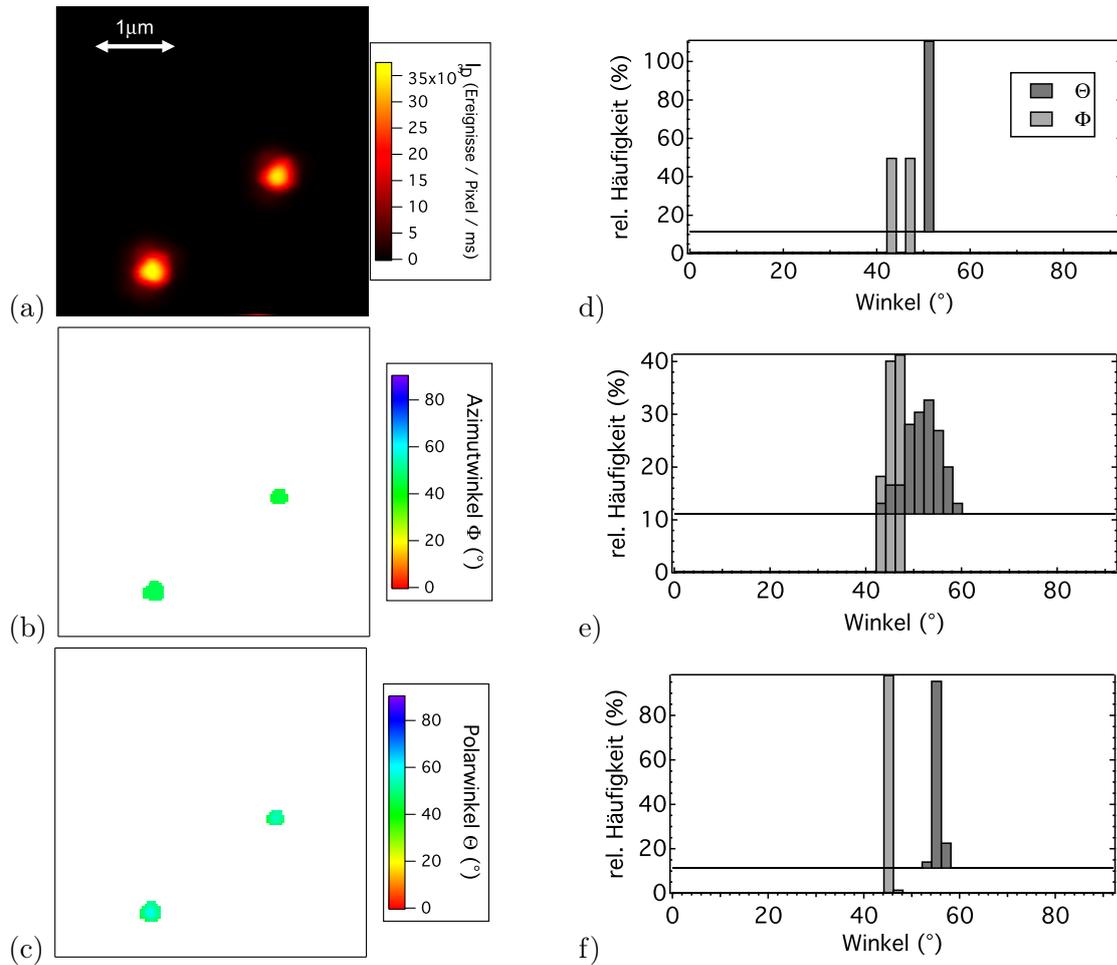


Abb. 3.23: Aufnahmen einzelner auf einer SiO_2 -Oberfläche immobilisierten 100 nm Latexkugeln zur Kalibrierung der 3D Orientierung. Die Falschfarbenbilder zeigen (a) die totale detektierbare Fluoreszenzintensität I_D , (b) die mittlere Orientierung der Moleküle in der fokalen Ebene (Φ) und (c) die mittlere Orientierung der Moleküle im Latexkugeln zwischen der optischen Achse und dem Dipolmoment (Θ). Vergleiche dazu Abbildung 4.1 (c). Für die Winkel Φ (hellgrau) und Θ (dunkelgrau) erstellte Histogramme (d) für den Mittelwert der Winkel aller Pixel, die genau einem Latexkugeln zugeordnet werden können, (e) für Winkelwerte aller Pixel, die das Schwellwertkriterium erfüllen, und (f) für Winkelwerte einer simulierten Orientierungsverteilung bei vorgegebenen Eingabewerten für die Orientierung (mittlerer Orientierung in $\Phi = 45^\circ$; Die Θ Verteilung ist maßgeblich durch das Rauschen bestimmt, wobei der Mittelwert der Verteilung mit 54° vorgegeben wird und einem FWHM von 4°) charakterisiert ist.)

werden. Ein isotroper Strahler zeichnet sich durch eine Gleichverteilung der Winkelwerte in der fokalen Ebene aus. Damit ergibt sich der mittleren Azimutwinkel zu $\langle \Phi \rangle = 45^\circ$. Für die Winkelwerte senkrecht zur fokalen Ebene ergibt sich eine sinusoidale Verteilung und damit ein mittlerer Polarwinkel von $\langle \Theta \rangle = 57^\circ$ (siehe Kapitel 2.2). Die experimentell

erhaltenen Verteilungen für die fluoreszenten Latexkugeln werden mit diesen Werten kalibriert. Damit ergibt sich für das Ölimmersionsobjektiv mit $\alpha_r^{\text{Öl}} = 67,5^\circ$ ein Öffnungswinkel für die zentrale Apertur von $\alpha_c^{\text{Öl}} = 43^\circ$. Für die analog durchgeführte Kalibrierung des Wasserimmersionsobjektivs ergibt sich ein Öffnungswinkel der zentralen Apertur von $\alpha_c^{\text{H}_2\text{O}} = 32^\circ$ bei einem entsprechenden Öffnungswinkel des Objektivs von $\alpha_r^{\text{H}_2\text{O}} = 64^\circ$.

4 Multi-Parameter-Messungen einzelner Moleküle an einer Grenzfläche

Die gleichzeitige Aufnahme verschiedener Parameter der Fluoreszenz, wie der Lebensdauer, dem Spektrum und der Polarisierung, ist heute in der konfokalen Mikroskopie bereits weit verbreitet [75–78].

Um das Verhalten einzelner, fluoreszenter Moleküle untersuchen zu können, werden diese unter anderem an einer Oberfläche immobilisiert. Diese Oberfläche stellt in den meisten Fällen eine Grenzfläche zwischen Medien unterschiedlicher Brechungsindizes dar. Eine Änderung der Orientierung des Moleküls an dieser Oberfläche geht nicht nur mit einer Änderung der Fluoreszenzintensität, sondern auch mit einer Änderung der Lebensdauer einher [79]. Neben der Änderung der Orientierung des Molekülkörpers an sich, kann die Orientierung auch als Reporter einer intrinsischen Änderung des Moleküls dienen. Dies kann z. B. eine Konformationsänderung sein [80], die dann mit der Änderung weiterer Parameter der Fluoreszenz einhergeht.

Die Bestimmung der Orientierung des einzelnen Moleküls ist deshalb maßgebend für das Verständnis solcher Vorgänge und wurde in den vergangenen Jahren mit großem Interesse in der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Die Vielzahl der Methoden lassen sich grundsätzlich in zwei Klassen aufteilen: dem orientierungsabhängigen Quanten-Interferenz-Bild [3, 34–38] und der raumwinkelabhängigen Intensitätsverteilung des fluoreszenten Lichtes [4, 39–42, 45, 46]. Die intensitätsbasierten Methoden können durch die Detektion von Einzelphotonen realisiert werden, wodurch eine große Zahl an Fluoreszenzparametern zugänglich wird [81].

Bisher wurde die Bestimmung der 3D Orientierung mit der Messung der Fluoreszenzlebensdauer [25, 26, 79] oder einer Untersuchung zur spektralen Dynamik [82–84] kombiniert. Schroyers et al. untersuchten Moleküle anhand ihrer Lebensdauer bei gleichzeitiger Erfassung ihrer 2D Orientierung. Die Erfassung der 3D Orientierung erfolgte in dieser Arbeit jedoch statisch durch defokussierte Bildgebung, also einem Quanten-Interferenz-Bild [85]. Trotz dieser hervorragenden Arbeiten konnte das komplexe Zusammenspiel zwischen einer Konformationsänderung und den photophysikalischen Eigenschaften des untersuchten Moleküls bisher nicht oder nur unzureichend aufgeklärt werden. Das von uns entwickelte Schema zur gleichzeitigen Erfassung verschiedener Parameter der Fluoreszenz, wie der Intensität, der Lebensdauer, dem Spektrum sowie der nur durch das Schrotrauschen begrenzten Bestimmung der Orientierung des Emissionsdipols, soll diese Lücke schließen

und insbesondere Aussagen zur Dynamik der Moleküle ermöglichen.

(Pyridyl)₁-funktionalisierte Perylendiimid-Moleküle (PP) werden auf einer Glasoberfläche immobilisiert und dienen so als Testsystem für unseren Aufbau. Perylendiimide (PDI) zeichnen sich insbesondere durch ihre Photostabilität sowie ihre hohe Quanteneffizienz aus und sind daher hervorragend für Fluoreszenzuntersuchungen am einzelnen Molekül geeignet [86–88]. Aufgrund ihrer Seitenketten zeigen diese Moleküle intramolekulare Dynamik [89, 90]. Die Seitenketten bestimmen dabei die Bildung verschiedener Konformationszustände und die Übergänge zweier Klassen von Konformationen, die die Grenzen des Konformationsraumes bilden. Verschiedene Konformationen gehen dabei mit einer Verdrillung des Perylenkörpers einher [91, 92]. Diese Verdrillung beeinflusst die Fluoreszenz des Moleküls, da es dabei zu einer Änderung des Zustandsraumes des delokalisierten π -Elektronensystems und damit zur Änderung des Anregungs- bzw. Emissionsdipols kommt.

PDI-Moleküle, deren Anbindung an eine Glasoberfläche aus amorphen Siliziumdioxid (SiO₂) über Pyridyl-Gruppen koordiniert wird, waren bereits Gegenstand intensiver Untersuchungen [9, 93, 94]. Dabei wurde insbesondere die Konformationsdynamik und das Anbindungsverhalten an eine Glasoberfläche untersucht. Bei diesen Untersuchungen gab es erste Anzeichen für eine bevorzugte Orientierung der PP- Moleküle an die SiO₂-Oberfläche. Beobachtete Intensitätsänderungen wurden dabei zunächst der Konformationsdynamik bzw. verschiedener konformationaler Zustände zugeordnet. Da Intensitätsänderungen der Fluoreszenz sowohl durch Konformationsänderungen als auch durch Änderungen der Orientierung des Dipolmomentes verursacht werden können, bleibt die Frage offen, ob die Konformationsänderung an sich oder eine Reorientierung des Moleküls dafür verantwortlich ist. Diese Fragestellung kann nur durch die Kombination von der Bestimmung der 3D Orientierung mit weiteren Parametern, wie der spektralen Diffusion, Intensität und Lebensdauer, beantwortet werden. Insbesondere kann die hohe Zeitauflösung, die durch die Einzelphotonenmessung erreicht werden kann, bei der Aufklärung dynamischer Prozesse genutzt werden.

Die hier vorgestellte Methode ermöglicht es, zwischen einer Umorientierung des Moleküls und den besagten Konformationsänderungen zu unterscheiden.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden bereits teilweise oder in ähnlicher Form veröffentlicht [81, 95].

4.1 Methoden

4.1.1 Parallele Datenaufnahme verschiedener Parameter des Fluoreszenzsignals

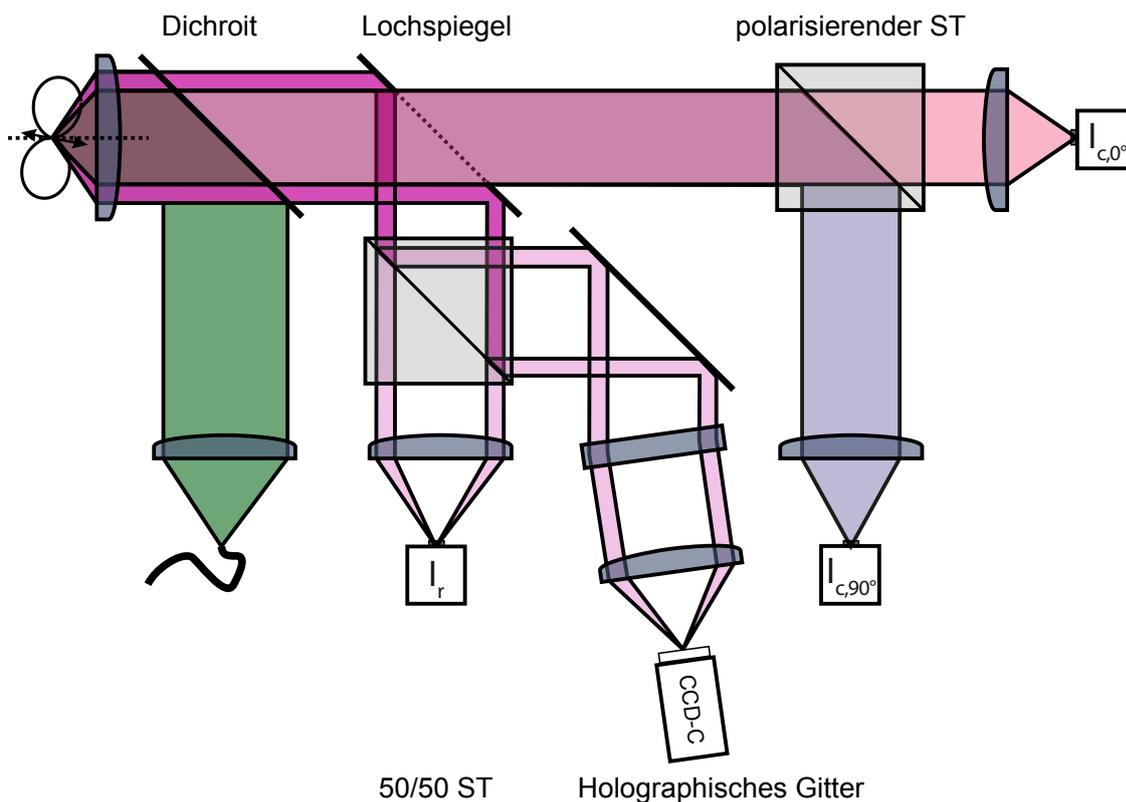


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des verwendeten konfokalen Mikroskops mit Anregungs- und Detektionsstrahlengang. Der Lochspiegel und der polarisationsabhängige Strahlteiler hinter dem dichroitischen Spiegel dienen der Aufteilung der orientierungsabhängigen Dipolemission eines einzelnen fluoreszenten Moleküls in drei ausgezeichnete Intensitätskomponenten. Für die Aufnahme des Emissionsspektrums wurde in den Strahlengang für die Emission der Kranzregion ein 50/50-Strahlteiler eingeführt. Durch das holographische Gitter wird das einfallende Fluoreszenzlicht in seine spektralen Komponenten aufgeteilt und entsprechend auf der CCD-Kamera abgebildet.

Für die parallele Datenaufnahme wurde der experimentelle Aufbau gemäß den Ausführungen aus Kapitel 3.3 realisiert. Für die Aufnahme des Fluoreszenzspektrums wurde das Fluoreszenzlicht der Kranzregion zusätzlich durch einen 50/50-Strahlteiler (BSC-450-700-050, CVI Melles Griot, Bensheim, Deutschland) gemäß der schematischen Darstellung in Abbildung 4.1 aufgeteilt. Um das Spektrum zu erhalten, wird das Licht über ein holographisches Gitter (NT48-587, 600 lp/mm, Edmund Optics, Karlsruhe, Germany) in seine

spektralen Komponenten zerlegt und auf eine *charged coupled device*¹ (CCD) Kamera fokussiert (peltier-gekühlte Sensicam[®] qe, PCO, Germany). Das Spektrum wurde mit einer Wiederholrate von 1 Hz und mit 512 Pixel² aufgenommen.

4.1.2 Bestimmung der 3D Orientierung

Die 3D Orientierung der fluoreszenten Moleküle wurde mittels der Intensitätskanäle $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r (siehe Abbildung 4.1) bestimmt. Für den Fall einer isotropen Umgebung erfolgte die Berechnung nach Gleichung 2.46 und 2.47. Für den Fall einer anisotropen Umgebung wurde die Orientierung gemäß den Ausführungen aus Kapitel 3.1 ff. durch Vergleich mit numerischen Werten bestimmt.

4.1.3 Spektrale Analyse

Die Kalibrierung des Spektrometers erfolgte anhand der drei Laserlinien 488 nm, 594 nm und 633 nm (siehe Abbildung A.5 im Anhang). Das je Sekunde aufgenommene Einzelmolekülspektrum wurde hintergrundkorrigiert, indem vom eigentlichen Spektrum eine ohne Fluoreszenzsignal aufgenommene Bildzeile abgezogen wurde. Danach wurde an jedes Spektrum eine doppelte Gauß-Funktionen angepasst, die den 1. elektronischen Übergang (Hauptpeak) und das erste vibronische Seitenband widerspiegelt (siehe Anhang ab Seite X).

4.1.4 Bestimmung der Lebensdauer

Die Ankunftszeithistogramme wurden aus dem Zeitintervall zwischen Laserpuls und detektiertem Photon erstellt, das von der benutzten TCSPC- Elektronik zur Verfügung gestellt wurde. Im Anschluss wurden die Zeitintervalle aller Photonen histogrammiert, die innerhalb von je 1 s detektiert wurden. Damit wurde zum einen eine ausreichende Anzahl an Photonen akquiriert, um aussagekräftige Histogramme zu erstellen, und zum anderen eine Übereinstimmung mit der Integrationszeit der Fluoreszenzspektren erzielt. Für die eigentliche Bestimmung der Lebensdauer τ_F wurde eine nicht-lineare Regression des Intensitätsverlaufs $I(t)$ nach der Methode der kleinsten Quadrate³ (LSF) mit einem Marquardt-Levenberg Algorithmus durchgeführt, der in der Software Igor Pro (v.6.22A, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) zur Verfügung gestellt wird. Da die Intensität $I(t)$ proportional zur Besetzung des angeregten Zustandes ist, erhält man gemäß Gleichung 2.8 das Modell für die Regression zu:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau_F) + bg \quad (4.1)$$

¹engl. charged coupled device, deutsch Ladungsträger gekoppelte Schaltung

²engl. pixel, deutsch Bildpunkt

³engl. least-square-fit

mit I_0 als Intensität zum Zeitpunkt des Laserpuls und bg als Hintergrundintensität I_{bg} (siehe Seite XI im Anhang). Für die Untersuchung der Dynamik der Moleküle sind relative Änderungen der Lebensdauer maßgebend. Daher konnte trotz der zum Teil niedrigen Zahl an Photonen die Anpassung der nicht-linearen Regressionsfunktion mit der LSF-Methode erfolgen, obwohl mit dieser Methode bei geringen Zählraten keine exakten Absolutwerte ermittelt werden können [96]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit sowohl auf die Faltung mit der Instrumentenfunktion⁴ als auch die Anpassung der Regressionsfunktion mit einem Maximum-Likelihood-Algorithmus (MLE) verzichtet.

4.1.5 Probenpräparation von PP

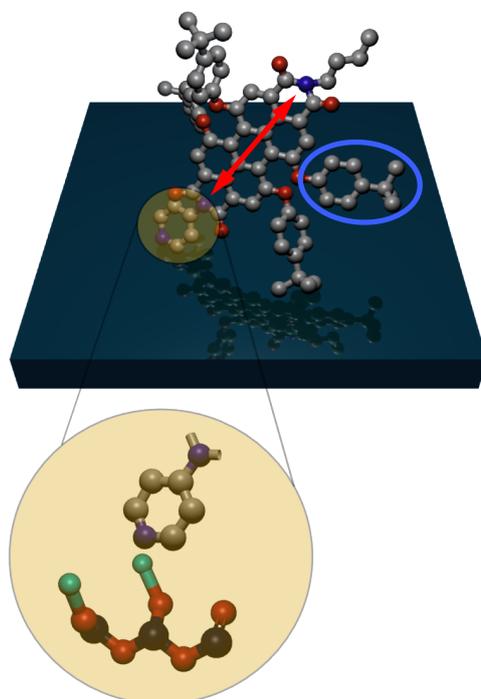


Abb. 4.2: Schema der Molekülstruktur sowie der angenommenen Orientierung eines PP-Moleküls angelagert an eine SiO_2 -Oberfläche. Die PDI-Adsorption an eine Siliziumoxid-Oberfläche wird über eine Wasserstoffbrücke zwischen einer Silanolgruppe der Oberfläche (im Ausschnitt grün) und dem Stickstoffatom der Pyridylgruppe (im Ausschnitt blau) koordiniert [97]. Eine Phenoxy-Seitengruppe ist durch ein blaues Oval markiert. Der Übergangsdipol (roter Pfeil) liegt entlang der langen Molekülachse des Perylenkörpers [10, 89].

Das (Pyridyl)₁-funktionalisierte Perylendiimid (PP) mit Phenoxy Seitenketten in der soge-

⁴engl. instrument response function (IRF)

nannten *bay*⁵ Position [98] (vgl. Abbildung 4.2) wurde auf Einzelmolekülniveau mit einer Konzentration von ca. 50 pM in Toluol (uvasol-spectroscopic grade, Merck, Deutschland) gelöst. Danach wurde ein Standard Deckglas (150 μm , Roth, Deutschland) durch sogenanntes *spin coating*⁶ mit dieser Lösung beschichtet. Dabei wurde die Rotationsfrequenz auf ca. 100 rps für 10 s eingestellt. Vor dem Beschichtungsprozess wurde der Objektträger für ca. 2 h bei 500 °C ausgeheizt, um fluoreszente Kontaminationen zu entfernen und die Oberfläche für die Anbindung der PP- Moleküle zu aktivieren. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur ((295 \pm 3) K) und innerhalb von 2 h nach der Probenpräparation durchgeführt.

4.1.6 Simulation orientierungsabhängiger Zeitspuren

Die Simulationen vom Typ A erfolgten gemäß der Ausführungen in Kapitel 3.2.2. Die Parameter der Simulation ($I_{\text{tot,em}}$, (Φ, Θ) , $\Delta t = 50 \text{ ms}$) wurden durch die im Experiment bestimmten Werte festgelegt. Die Simulation wurden mit Igor Pro durchgeführt.

4.1.7 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse wurde prinzipiell gemäß der Darstellung aus Abschnitt 2.3.1 durchgeführt. Die Korrelationsfunktion $G_{i,j}(\tau)$ wurde als Kreuzkorrelation der Polarisationskanäle $I_{0^\circ,c}$ und $I_{90^\circ,c}$ sowie der Inklinationskanäle I_c und I_f berechnet. Mithilfe der Kreuzkorrelation der Polarisationskanäle $I_{0^\circ,c}$ und $I_{90^\circ,c}$ soll die Dynamik der azimuthalen Komponente untersucht werden. Die Kreuzkorrelation der Inklinationskanäle I_c und I_f dient der Untersuchung der Dynamik der polaren Komponente. Die Autokorrelation der gesamten detektierbaren Intensität I_D gibt Aufschluss über den rein diffusiven Anteil der beobachteten Dynamik.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Aufnahme orientierungsaufgelöster Bilder einzelner PP- Moleküle

In Abbildung 4.3 (a) ist das Rasterscanbild für die Gesamtintensität gezeigt, die man nach der Summation der drei Intensitätskanäle für die Bestimmung der 3D Orientierung erhält. Das $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ große Bild einzelner PP- Moleküle auf einer SiO_2 -Oberfläche wurde mit einer Auflösung von 128×128 Pixel bei einer Integrationszeit von 1 ms je Pixel durch einen Rasterscan (SCOM) aufgenommen. Die Anregung der fluoreszenten Moleküle erfolgte mit

⁵engl. bay, deutsch für Bucht bzw. in diesem Kontext als Rand zu bezeichnen

⁶engl. spin coating, deutsch für Rotationsbeschichtung

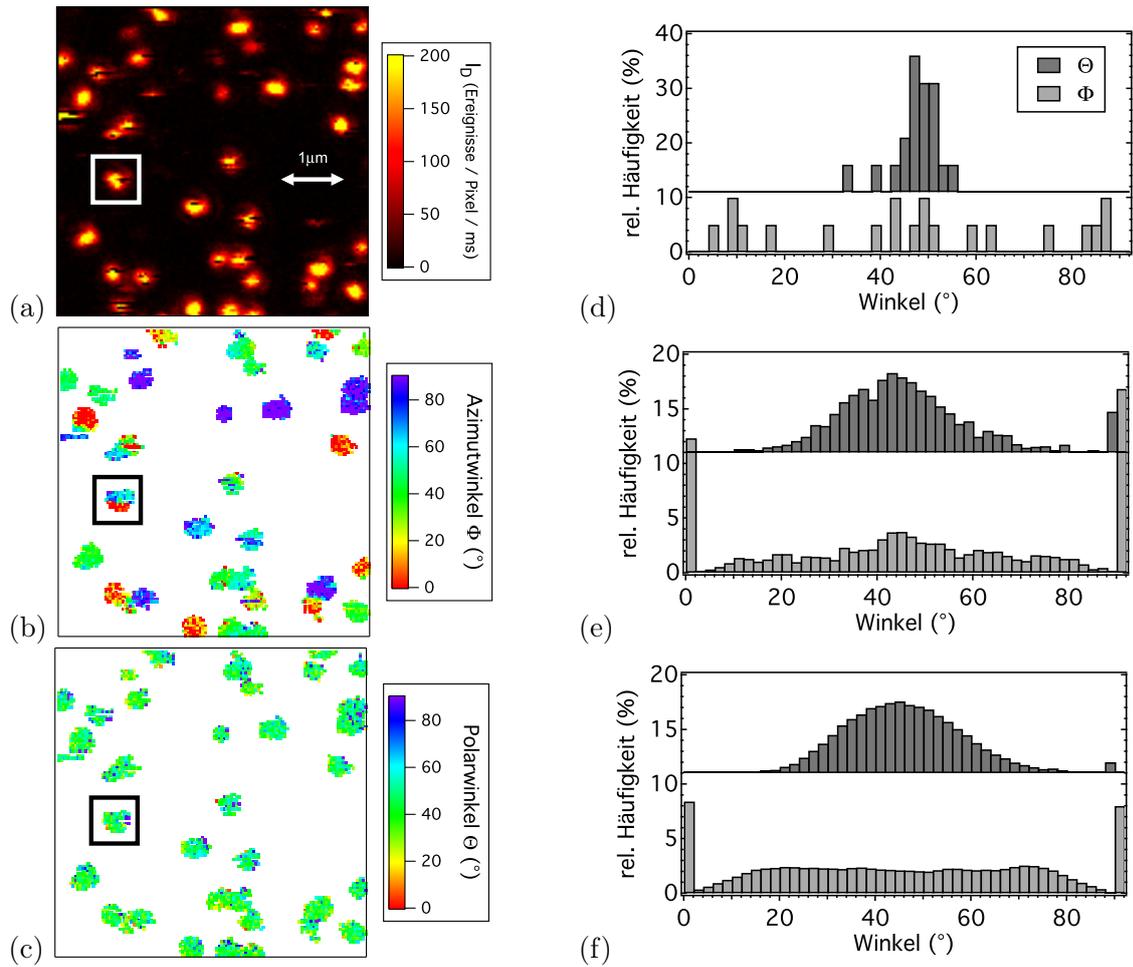


Abb. 4.3: Aufnahmen einzelner PP- Moleküle auf einer Glasoberfläche. Die Falschfarbenbilder zeigen (a) die totale, detektierbare Fluoreszenzintensität I_D einzelner Moleküle mit *on-off* Verhalten (weißer Rahmen), (b) die Orientierung der Moleküle in der fokalen Ebene (Φ) und (c) die Orientierung der Moleküle zwischen der optischen Achse und dem Dipolmoment (Θ). Vergleiche dazu Abbildung 2.5 (c). Für die Winkel Φ (hellgrau) und Θ (dunkelgrau) erstellte Histogramme (d) für den Mittelwert der Winkel aller Pixel, die genau einem Molekül zugeordnet werden können, (e) für Winkelwerte aller Pixel, die das Schwellwertkriterium erfüllen, und (f) für Winkelwerte einer simulierten Orientierungsverteilung bei vorgegebenen Eingabewerten für die Orientierung (Gleichverteilung für Φ . Die Θ - Verteilung ist durch das Rauschen bestimmt, wobei der Mittelwert der Verteilung mit 46° vorgegeben wird und durch ein FWHM von 30° charakterisiert ist.).

zirkular polarisiertem Licht bei einer Intensität von $10\text{kW}/\text{cm}^2$. Die Intensitätsbilder, die den drei Intensitätskanälen $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r entsprechen (siehe Anhang), werden genutzt, um die Winkelkoordinaten Θ und Φ entsprechend der Gleichungen 2.46 und 2.47 Pixel für Pixel zu berechnen. Obwohl die Moleküle an der Oberfläche adsorbiert sind und damit in unmittelbarer Nähe zur Grenzfläche zwischen Luft und Glas sitzen, soll zunächst die

Theorie für die Bestimmung der Orientierung in einer isotropen Umgebung zur Anwendung kommen. Dies kann zum einen damit begründet werden, dass für die Untersuchung der Dynamik des Einzelmoleküls relative Winkeländerungen vollkommen ausreichend sind und diese durch das isotrope Modell hervorragend abgebildet werden. Zum anderen zeigt sich, dass das in Kapitel 3.1 genutzte Modell und die daraus abgeleitete Erweiterung der Theorie den tatsächlichen Verhältnissen an der vermuteten Grenzfläche nur zum Teil Rechnung tragen können.

Die Berechnung der Winkel Θ und Φ erfolgt mit der Korrektur ungültiger Intensitätsverhältnisse von Polarisation P und Inklination N , bei denen aufgrund des Rauschens der Wert außerhalb des entsprechenden Definitionsbereiches für die Winkelberechnung liegt [8]. Auf die Korrektur für die Detektionseffizienz der einzelnen Intensitätskanäle wird bewusst verzichtet. Derartige Korrekturen für die Bestimmung der Orientierung an einer Grenzfläche sind zum einen nicht oder nur teilweise bestimmbar und zum anderen soll das Augenmerk der Untersuchung auf Änderungen der Orientierung liegen und weniger auf der Bestimmung absoluter Winkelwerte. Um das Signal einzelner Moleküle vom Hintergrund der Aufnahme zu trennen, wurde ein Schwellwertkriterium entsprechend 5% der maximal detektierten Intensität eingeführt. Außerdem wurde eine Molekülauswahl durchgeführt (*particle analysis tool*, Igor Pro), bei der das Signal eines Pixels nur dann in die Auswertung eingeht, wenn es zusätzlich zum Schwellwert- ebenfalls einem Zusammenhangskriterium ⁷ genügt, also genau einem Molekül zugeordnet werden kann. In Abbildung 4.3 (b) und (c) werden die Falschfarbenbilder für den azimutalen Winkel Φ und dem polaren Winkel Θ gezeigt. Bei der Bewertung der erhaltenen Spots, also Orte hoher Fluoreszenzintensität I_D , sprechen zwei Kriterien für die Beobachtung einzelner Moleküle: Solche Spots sind in ihrer lateralen Ausdehnung vergleichbar und zeigen zum Teil das für einzelne Farbstoffe typische *on-off*⁸ Verhalten (siehe weißer Rahmen). Außerdem zeigen einzelne Moleküle, die klar von anderen Molekülen abgegrenzt sind, konstante Winkelwerte (Farbe) innerhalb einer Pixelzeile. Kommt es zur Umorientierung des Moleküls während der Aufnahme, zeigt sich ein deutlicher Farbumschlag zwischen benachbarten Zeilen (siehe schwarzer Rahmen). Feine Farbunterschiede zwischen den Pixel einzelner Moleküle resultieren aus dem Schrotrauschen des Fluoreszenzsignals[43]. Überlappen sich die Fluoreszenzsignale von Molekülen, so beeinflussen sich die Intensitätsverteilungen gegenseitig, so dass keine eindeutige Aussage über die Orientierung des einzelnen Moleküls gemacht werden kann. Deshalb sollte bei der Aufnahme von Intensitätszeitspuren darauf geachtet werden, dass nur die Moleküle in Frage kommen, die klar gegenüber ihrer Umgebung abgegrenzt sind.

Histogramme der berechneten Winkelwerte erleichtern die Interpretation der Bilder für Φ und Θ und ermöglichen es damit, die Anbindung einzelner PP- Moleküle an die Glasoberfläche zu untersuchen. Insbesondere kann so der Frage nachgegangen werden, ob derartige Moleküle eine bevorzugte Orientierung an der Oberfläche zeigen oder nicht. In Abbildung 4.3 (d) ist das Histogramm für die Winkel Φ und Θ dargestellt, die einzelnen Spots

⁷Das Pixel hat mindestens zwei nächste Nachbarn, die das Schwellwertkriterium erfüllen und gehört damit zu einer Gruppe von mindestens 15 Pixel, die das Zusammenhangskriterium erfüllen.

⁸engl. on-off, deutsch an-aus

und damit einzelnen Molekülen zugeordnet werden können. Die Werte erhält man, indem man den Mittelwert der Winkel aller Pixel berechnet, die eindeutig einem Spot und damit einem Molekül (Schwellwert- und Zusammenhangskriterium) zugeordnet werden können. Der Unterschied zwischen den Verteilungen für Φ und Θ ist offensichtlich. Wie vermutet, zeigen die PP- Moleküle keine bevorzugte Orientierung in der fokalen Ebene. Die Werte des azimutalen Winkels Φ sind gleich verteilt. Im Gegensatz dazu häufen sich die Werte für den polaren Winkel bei $\Theta = 46^\circ$, mit einer Breite der Verteilung (FWHM⁹) von 30° . Damit ist die Verteilung der Θ -Winkel im Vergleich zu einer sinusoidalen Verteilung, die durch einen Mittelwert von $\Theta = 57^\circ$ und einem FWHM von 48° charakterisiert ist, deutlich zu kleineren Werten hin verschoben. Eine sinusoidale Verteilung würde man für den Fall beliebig in Θ orientierter Moleküle erhalten (siehe Kapitel 3.2.2 oder 3.3). Dies lässt den Schluss zu, dass die hier untersuchten Moleküle einer bevorzugten Orientierung oder zumindest einer deutlichen Einschränkung ihrer Bewegung aus der Ebene heraus unterliegen.

Abbildung 4.3 (e) zeigt das Histogramm der je Pixel berechneten Winkelwerte, die das Schwellwertkriterium erfüllen. Mithilfe dieser Darstellung wird der Einfluss des Schrotrauschens sichtbar. Zum Vergleich zeigt Abbildung 4.3 (f) das Histogramm für eine simulierte Verteilung von Molekülen. Für die Simulation vom Typ C wurde eine Gleichverteilung der Orientierung in Φ sowie ein Intervall für den polaren Winkel $\Theta = [37^\circ, 47^\circ]$ angenommen, das der beobachteten, eingeschränkten Bewegung entsprechen soll. Das Experiment und die Simulation zeichnen sich durch zwei gemeinsame Eigenschaften aus. Zum einen sind in beiden Fällen die Winkelverteilungen durch den Einfluss des Rauschens verbreitert – diskrete Werte aus der Darstellung in Abbildung 4.3 (d) gehen in eine breite Verteilung über. Zum anderen zeigt insbesondere die Verteilungen des Azimutwinkels das bereits intensiv diskutierte Verhalten für die Grenzfälle 0° und 90° (vgl. Kapitel 3.2.2 und Hohlbein u. Hübner [8]). Das Fehlen von Werten für Φ in den Intervallen von 0° bis 20° sowie 70° bis 90° ist eine direkte Folge des Schrotrauschens und der damit verbundenen ungünstigen Intensitätsverhältnisse, die hier korrigiert werden. Die Korrektur führt zu einer verhältnismäßig hohen relativen Häufigkeit für die Werte $\Phi = 0^\circ$ bzw. $\Phi = 90^\circ$. Diese Form der Verteilung ist im Prinzip auch für den polaren Winkel zu erwarten. Im Experiment fehlt der überbetonte Rand der Verteilung, insbesondere für $\Theta = 90^\circ$. Eine solche Verteilung des Polarwinkels Θ spricht für eine bevorzugte Orientierung der Moleküle bei der Anbindung an die Oberfläche. Die sehr gute Übereinstimmung zwischen den Winkelverteilungen aus Experiment und Simulation zeigt, wie zuverlässig die zur Anwendung gekommene Methode bei der Bestimmung der 3D Orientierung von Dipolen ist.

Wie bereits in einem vorhergehenden Abschnitt erwähnt, sind die hier angegebenen Absolutwerte der Winkel abhängig von dem gewählten Modell zur Beschreibung der Moleküle an der Glasoberfläche. Wie später noch gezeigt werden kann, sind relative Änderungen oder Angaben über die Form der Verteilung nicht oder nur im geringen Maße von der Wahl des Modells abhängig.

⁹engl. full width at half maximum

4.2.2 Aufnahme von Multi-Parameter-Zeitspuren einzelner PP- Moleküle

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt der Schwerpunkt auf der stationären Orientierung einzelner PP- Moleküle lag, soll nun die Dynamik solcher Moleküle im Vordergrund stehen. Die Aufnahme der Zeitspuren einzelner Moleküle erfolgte mit dem bereits vorgestellten experimentellen Aufbau für die Multi-Parameter-Messung. Dafür wurde aus einem der im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten Raster-Scan-Bildern ein klar gegenüber anderen abgegrenzter Spot, sprich ein einzelnes Molekül, ausgewählt (siehe Abbildung 4.3 (a) weißer Rahmen), der Anregungs- bzw. Detektionsfokus darauf positioniert und schließlich eine Zeitspur von ca. 30 s aufgenommen. Um für die Berechnung der Orientierungsinformation das von Hohlbein u. Hübner [8] genannte Rauschkriterium zu erfüllen, also genügend Photonen je Zeitintervall zu registrieren, um eine entsprechend scharfe Verteilung in Φ bzw. Θ zu erhalten, wird die Anregungsintensität auf 10 kW/cm^2 eingestellt. Die Multi-Parameter-Messungen beinhalten das Fluoreszenzspektrum, die Fluoreszenzlebensdauer, die Fluoreszenzintensität sowie die 3D Orientierung des fluoreszenten Moleküls. Die Zeitspuren für zwei ausgewählte Moleküle A und B, die sich grundsätzlich in ihrem Verhalten unterscheiden, sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

Das Fluoreszenzspektrum ist einer der fünf unabhängig voneinander aufgenommenen Fluoreszenzparameter. Um bei der Spektrenaufnahme einzelner Moleküle ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis¹⁰ zu garantieren, wurde das Spektrum mit einer Integrationszeit von 1 s aufgenommen. Zusätzlich zum Spektrum ist die Wellenlänge λ_F für den 1. elektronischen Übergang dargestellt. Der Verlauf von λ_F macht Änderungen in der spektralen Position sichtbar. Die Werte für λ_F liegen für beide Moleküle zwischen 584 nm und 626 nm. Die Verteilung der spektralen Position hat ihre maximale Häufigkeit bei 620 nm und stimmt mit den Beobachtungen von Kowerko et al. [9] sehr gut überein. Der zweite Parameter ist die Lebensdauer τ_F der fluoreszenten Zustände. Die Werte der Lebensdauer liegen für beide Moleküle in einem Intervall von $\tau_F = [3,8;6,1] \text{ ns}$. Der Mittelwert für die Lebensdauer ergibt $\tau_F = (5,1 \pm 0,9) \text{ ns}$ und stimmt mit Literaturwerten aus Ensemblemessungen überein [90]. Die drei Intensitätskanäle für die Bestimmung der 3D Orientierung $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r sowie die Summenintensität I_D und die Summe der Polarisationskanäle I_c werden mit einer Integrationszeit von 50 ms dargestellt. Der plötzliche Intensitätsabfall am Ende der Zeitspur von Molekül A in Abbildung 4.4 zeichnet das sogenannte *single step*¹¹ Photobleichen aus und ist ein charakteristisches Merkmal für die Aufnahme von Einzelmolekül-Zeitspuren. Damit kann auch das Signal-zu-Rausch Verhältnis, also das Verhältnis der Intensität I_D vor und nach dem Bleichschritt, ermittelt werden. Dies beträgt für die hier gewählte Anregungsintensität 20:1 und ist repräsentativ für alle aufgenommenen Zeitspuren. Wie schon im vorhergehenden Abschnitt erläutert, soll auch für die Zeitspuren die Bestimmung der Orientierung anhand des Modells des Dipols im isotropen Medium zur Anwendung kommen. Aufgrund des 50/50- Strahlteilers im Strahlengang für den Intensitätskanal I_r , der die simultane Aufnahme des Fluoreszenzspektrums ermöglicht, muss die Intensität I_r entsprechend mit einem Faktor 2 multipliziert werden ($I_r = 2I'_r$), um die richtigen Intensitätswerte

¹⁰engl. signal-to-noise ratio

¹¹engl. single step, deutsch einstufig

für die Berechnung der Orientierung zu erhalten. Für die Berechnung der Winkelwerte wurde kein Schwellwertkriterium eingeführt, da die untersuchten Moleküle, anders als bei den Rasterbildern, die mit einer Auflösung von 1 ms aufgenommen werden, auf der Zeitskala von 50 ms kein *on-off* Verhalten zeigen. Neben der Zeitspur des Winkels sind rechts davon die Werte für Φ und Θ als Histogramm dargestellt. Beide dargestellten Moleküle A und B zeigen ein charakteristisches Verhalten. Um die Unterschiede zwischen beiden hervorzuheben, wurden ausgewählte Abschnitte der Zeitspuren histogrammiert und, normiert auf die Gesamtlänge der Zeitspur, zusätzlich zu den Histogrammen der gesamten Zeitspur dargestellt. Im Vergleich der Histogramme erkennt man, dass die Verteilung der Winkel für Abschnitte niedriger Intensität deutlich gegenüber der hoher Intensität verbreitert sind. Die Breite der Verteilung ist also intensitätsabhängig. Deshalb werden alle absoluten Winkelangaben als Mittelwerte der Verteilungen angegeben. Der jeweilige Fehler entspricht dann dem FWHM dieser Verteilung. Neben der Verteilung der Winkel an sich soll die Korrelation zwischen beiden Winkeln durch die Darstellung als Φ - Θ -Histogramm verdeutlicht werden. Neben den Winkelwerten sind auch die der Berechnung zugrunde liegenden Werte der Polarisation P und Inklination N dargestellt. Beiden ist gemein, dass sie unabhängig vom jeweils gewählten Modell zur Berechnung der Orientierung sind. Eine Änderung in P und N weist damit auf eine tatsächliche Änderung der 3D Orientierung hin.

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Zeitspuren wurden für zahlreiche Moleküle aufgenommen. Daraus wurden zwei Zeitspuren (Moleküle A und B) ausgewählt, die eine Korrelation zwischen den verschiedenen Fluoreszenzparametern kennzeichnet. Die Orientierungszeitspur für Molekül A in Abbildung 4.4 zeigt keine offensichtlichen Änderungen; ganz anders die Zeitspur für Molekül B. Ein entscheidender Unterschied, der im folgenden Abschnitt herausgearbeitet wird.

Zunächst soll das Molekül A beschrieben und analysiert werden. Das Spektrum für Molekül A ist durch deutliche Fluktuationen im Verlauf der spektralen Position gekennzeichnet. Dabei sind die Änderungen von λ_F für die ersten 20 s der Zeitspur gering und verteilen sich gleichmäßig um einen Mittelwert. Die letzten 10 s der Zeitspur zeichnen sich jedoch durch große spektrale Sprünge von bis zu 40 nm hin zu kürzeren Wellenlängen aus. Ein ähnliches Verhalten kann für die Lebensdauer τ_F beobachtet werden. Auch hier zeigt der erste Abschnitt konstante Werte (4.0 ns). Beim Übergang zum zweiten Abschnitt ändert sich die Lebensdauer drastisch hin zu größeren Werten (5.8 ns). Dies gilt auch für die aufgenommene Fluoreszenzintensität I_D . Der anfängliche Wert wird beim Übergang zwischen den beiden Zeitabschnitten mehr als verdoppelt. Generell lässt sich der Zusammenhang zwischen Intensität und Spektrum wie folgt beschreiben. Je größer die Intensitätsänderung, umso größer die Verschiebung der Wellenlänge hin zu kürzeren Wellenlängen. Da sich die beiden Abschnitte derart deutlich voneinander unterscheiden, sollen sie im weiteren Verlauf als Zustand I und Zustand II bezeichnet werden. Für Zustand I wird der Azimutwinkel zu 22° und der dazugehörige Polarwinkel zu 30° ermittelt. Entsprechend für Zustand II kann der Azimutwinkel mit 18° und der Polarwinkel mit 28° angegeben werden. Die Änderung des Polarwinkels von $\Delta\theta = 2^\circ$ liegt innerhalb der Standardabweichung der Methode und ist somit nicht signifikant [8]. Da für beide Zustände von Molekül A keine große Änderung des Polarwinkels Θ beobachtet werden kann, ist die Änderung der Inten-

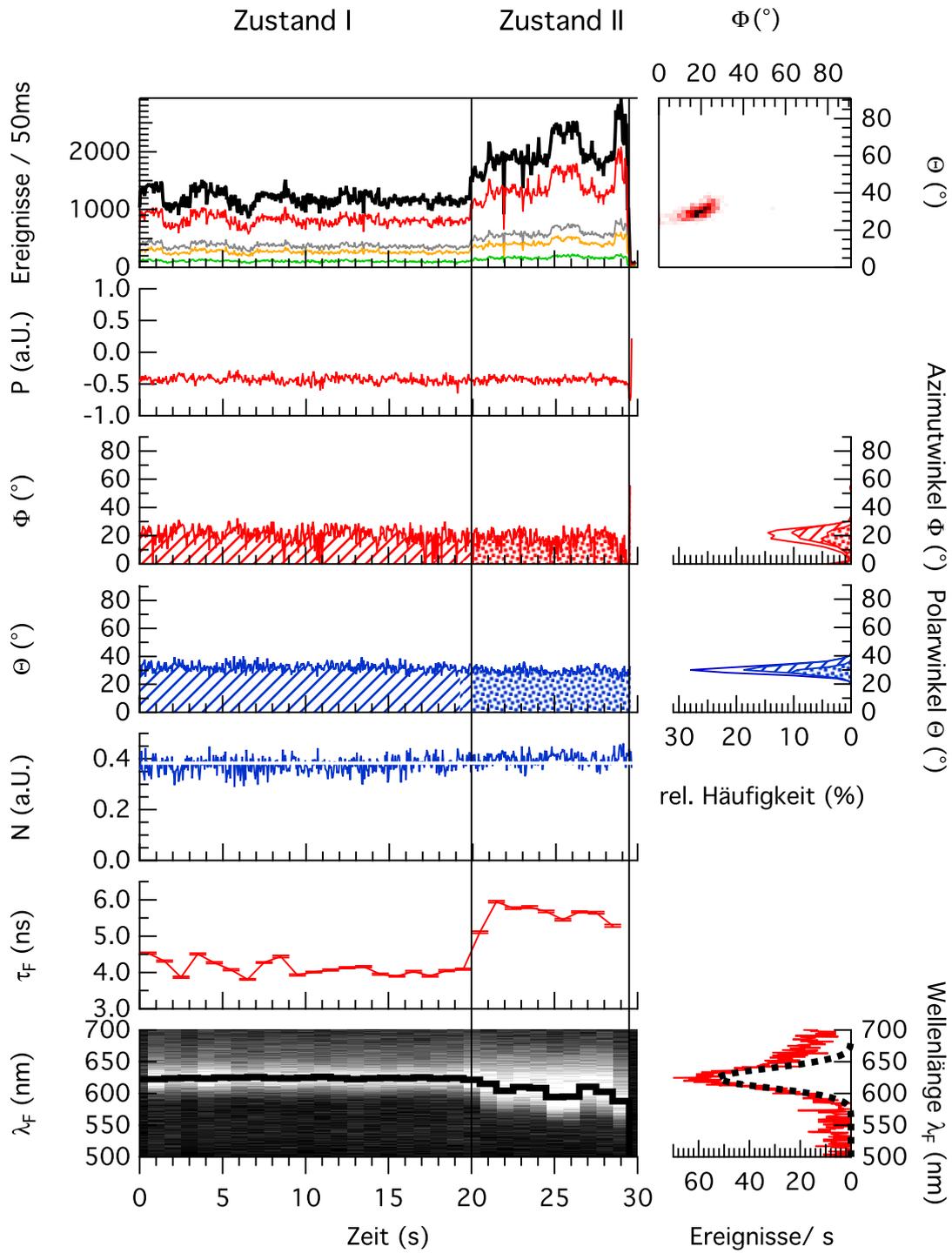
sität nicht mit einer Orientierungsänderung erklärbar, die eine Änderung der Anregungs- und Detektionswahrscheinlichkeit verursachen und somit die Intensitätsänderung erklären würde. Das Fehlen einer Änderung der Inklination N zwischen beiden Zuständen stützt diese Argumentation.

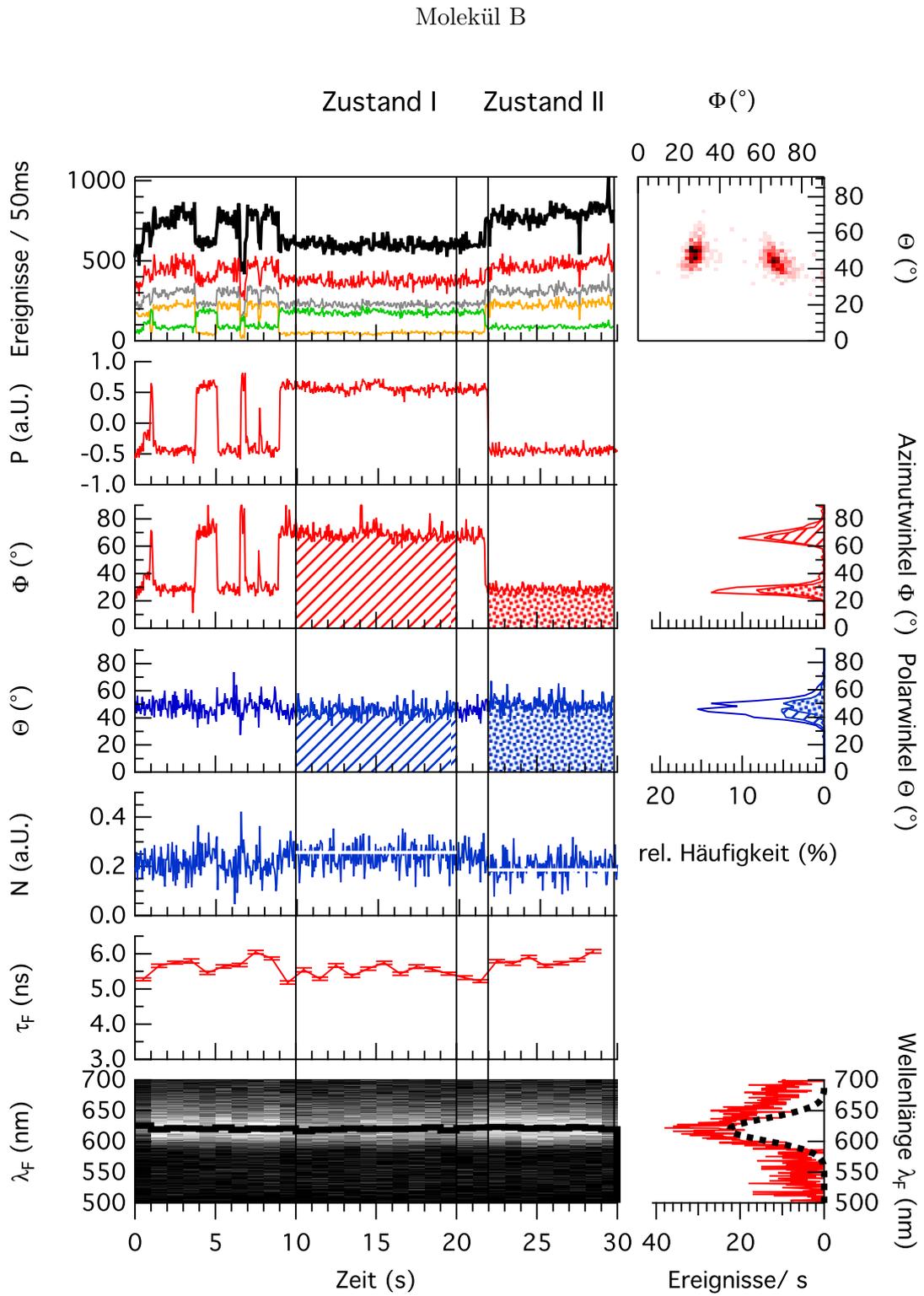
Ein weiteres Indiz dafür, dass die Orientierung nicht für die Intensitätsfluktuation verantwortlich sein kann, ist die Richtung der Änderung. Die beobachtete Änderung des Polarwinkels hin zu kleineren Werten würde - zumindest im Modell der isotropen Umgebung - zu einem leichten Abfall der Intensität führen. Dies ist hier aber nicht der Fall. Das zu erwartende Verhalten soll in einem späteren Abschnitt anhand einer Simulation nachvollzogen werden (zum Vergleich siehe Abbildung 4.6).

Für Molekül B ist das Verhalten grundsätzlich anders. Dieses Molekül zeigt ein korreliertes Verhalten zwischen Intensitätsänderungen und seiner Orientierung. Im Vergleich

Abb. 4.4: (auf den beiden folgenden Seiten) Ausgewählte Zeitspuren für Multi-Parameter-Messungen an einzelnen PP- Molekülen auf einer Glasoberfläche (amorphes SiO_2). Die Zeitspuren der dargestellten Moleküle zeigen Intensitätsänderungen aufgrund von Konformationsänderungen (Molekül A) sowie durch Umorientierungen des Dipolmomentes (Molekül B). (von oben nach unten) Dargestellt sind die gleichzeitig erfasste Fluoreszenzintensität, die daraus berechnete 3D Orientierung, die Fluoreszenzlebensdauer und das Fluoreszenzspektrum. Die Summenintensität I_D (schwarz) ist zusammen mit den drei Intensitätskanälen für die Berechnung der 3D Orientierung $I_{0^\circ,c}$ (gelb), $I_{90^\circ,c}$ (grün) und I_r (rot) sowie der Summenintensität der zentralen Apertur I_c (hellgrau) dargestellt. Die Integrationszeit beträgt 50ms. Die vom jeweiligen Modell unabhängigen Parameter P (rot) und N (blau) sind im Vergleich der beiden berechneten Winkel der 3D Orientierung Φ (rot) und Θ (blau) aufgeführt. Neben den Zeitspuren für Φ und Θ sind die Histogramme für die relative Häufigkeit der beiden Winkel dargestellt. Für die Skalenbreite wurde 2° gewählt. Die für das Molekül A und B charakteristischen Bereiche werden als Zustand I (quer gestreift) bzw. Zustand II (gepunktet) in der Zeitspur für die Orientierung markiert und normiert auf die Gesamtlänge der Zeitspuren in die Häufigkeitshistogramme eingetragen. Um den Sprung der Orientierung für das Molekül B zu verdeutlichen, ist für die Inklination N zusätzlich deren Mittelwert als weiße Linie eingezeichnet. Um die Korrelation zwischen den beiden Winkel für die Orientierung in der fokalen Ebene und aus dieser heraus zu verdeutlichen, wird neben den Häufigkeitsverteilungen des Einzelwinkels auch das Φ - Θ -Histogramm (gleiche Skalenbreite, dunkle Bereiche entsprechen einer hohen relativen Häufigkeit) dargestellt. Unter der Winkelinformation ist die Lebensdauer τ_F dargestellt. Das Spektrum ist ebenfalls mit einer Auflösung von 1 s aufgenommen worden und hier als Falschfarbenbild (Grauskala) dargestellt. Dabei ist die Intensität umso höher, je heller das Bild ist. Die über das Bild gelegte, schwarze Linie zeigt die Wellenlänge λ_F des Hauptpeaks (1. elektronischer Übergang) des Spektrums. Rechts neben dem spektralen Verlauf ist zusätzlich ein Spektrum sowie die Anpassung einer Gaußkurve an dieses Spektrum gezeigt. Die Lage der Gaußkurve entspricht dabei der Wellenlänge λ_F .

Molekül A





zu Molekül A wechselt die Fluoreszenzintensität I_D bei Molekül B reversibel zwischen zwei beobachtbaren Zuständen, dem Zustand I ($I_D \approx 600$ Ereignisse/50ms) und dem Zustand II ($I_D \approx 800$ Ereignisse/50ms), hin und her. Dabei kommt es weder zu der für das Molekül A charakteristischen Änderung der spektralen Position noch zu der Änderung der Lebensdauer beim Übergang zwischen den beiden Intensitätszuständen. Im Gegenteil zu Molekül A ändern sich beide Parameter, bis auf kleine Änderungen der Lebensdauer, die in einem späteren Abschnitt wieder aufgegriffen werden sollen, kaum. Betrachtet man nun die Orientierung von Molekül B, so zeigt sich, dass jede Änderung der Intensität mit einer Änderung der 3D Orientierung einhergeht. Zunächst kann das reversible Schalten zwischen den beiden Zuständen anhand der zwei Polarisationskanäle $I_{0^\circ,c}$ und $I_{90^\circ,c}$ (siehe Abbildung 4.2) nachvollzogen werden. Jede Änderung der Summenintensität geht mit einem Austausch der Intensitätsniveaus der Polarisationskanäle und damit der Orientierung in der fokalen Ebene einher. Die mittleren Azimutwinkel für beide Zustände sind $\Phi = 66^\circ$ für Zustand I und $\Phi = 28^\circ$ für Zustand II. Im Histogramm für die relative Häufigkeit des azimutalen Winkels zeigt sich dieser Umstand durch zwei deutlich voneinander getrennte Maxima. Die Breite der Verteilungen für die Φ - Winkel ist ausschließlich rauschbedingt, wie im Kapitel 4.2.3 anhand der Simulation dieses Zwei-Zustands-Verhalten gezeigt werden kann. Obwohl dieses Verhalten beim Polarwinkel nicht so stark ausgeprägt ist, zeigt das Häufigkeitshistogramm auch hier zwei deutlich voneinander getrennte Maxima. Dies wird besonders deutlich, wenn man zwei Zeitintervalle exemplarisch für den Zustand I und II auswählt, histogrammiert und auf die Gesamtlänge der Zeitspur normiert in das Histogramm einträgt. Der Unterschied beider Maxima ergibt sich zu $\Delta\Theta = 6^\circ$. Für den Polarwinkel des ersten Zustandes erhält man $\Theta = 44 \pm 2^\circ$ und für den zweiten Zustand $\Theta = 50 \pm 2^\circ$. Betrachtet man die Inklination N , so zeigt sich auch in deren Verlauf ein deutlicher Sprung beim Übergang zwischen den beiden beobachtbaren Zuständen. Diese Größe, die unabhängig von der Wahl des jeweiligen Modells zur Beschreibung der Moleküle an der Oberfläche ist, stellt die Grundlage für die Interpretation der beiden Zustände im Sinne einer Orientierungsänderung dar.

Unter der Annahme, dass das Photonen-Rauschen im Falle von mehr als 500 Photonen je Integrationsschritt eine Genauigkeit in der Bestimmung des Polarwinkels von $\pm 2^\circ$ erlaubt und die Methode für die Bestimmung der Orientierung im Bereich $20^\circ < \Theta < 70^\circ$ sichere Ergebnisse liefert, kann der Unterschied im Polarwinkel von 6° als signifikant angesehen werden [8].

Bevor die beiden Moleküle im Rahmen der Grenzflächentheorie betrachte werden, wird zunächst die Fluktuation der Lebensdauer im Mittelpunkt stehen. Wie oben bereits erwähnt, sind die Änderungen der Lebensdauer für das Molekül B zwischen den Zuständen I und II eher gering. Es zeigt sich jedoch, dass die feinen Schwankungen einem Trend folgen. Größere Werte der Lebensdauer korrespondieren mit einem größeren Polarwinkel. Im Prinzip ist die Lebensdauer eines fluoreszenten Zustandes für einen Dipol nahe einer Grenzfläche zwischen zwei Medien unterschiedlichen Brechungsindizes n_1 und n_2 sowohl eine Funktion des Abstandes d von der Grenzfläche als auch eine Funktion der Orientierung Θ des Dipols relativ zur Normale der Grenzfläche [22]. Da in unserem Fall das fluoreszente Molekül direkt an die Oberfläche anbindet, kann der Abstand gleich null gesetzt und für

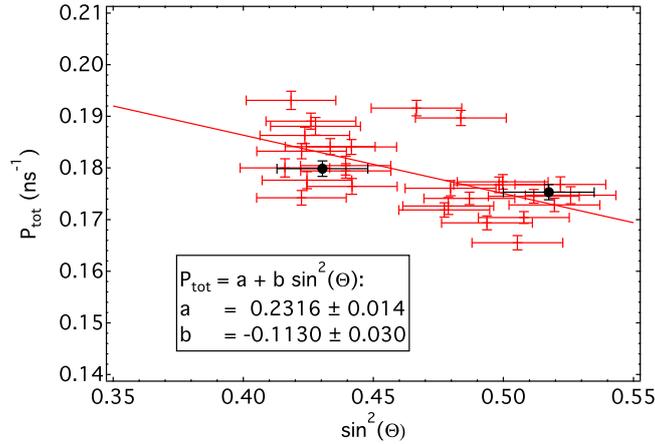


Abb. 4.5: Die totale Fluoreszenzzerfallsrate P_{tot} des PP- Moleküls B ist als Funktion von $\sin^2 \Theta$ dargestellt. Die Parameter einer linearen Kurvenanpassung (gerade, rote Linie) und deren Fehler sind im Text erklärt. Zusätzlich zu den Einzelwerten (rot) sind die Werte für eine Zwei-Zustands-Analyse (schwarz) eingetragen.

alle weiteren Betrachtungen vernachlässigt werden. In Abbildung 4.5 ist die experimentell erhaltene Zerfallsrate des fluoreszenten Zustandes $P_{\text{tot}} = \tau_{\text{F}}^{-1}$ in Abhängigkeit des Quadrates für den Sinus des entsprechenden Polarwinkels aufgetragen. Der Polarwinkel wurde dafür mit einer Integrationszeit von 1 s neu berechnet, um dem Integrationsintervall der Lebensdauer zu entsprechen. Für diese Darstellung ist gemäß Kreiter et al. [25] ein linearer Zusammenhang zu erwarten. Die lineare Korrelation zwischen beiden Größen ergibt einen Pearson-Korrelationskoeffizient¹² von $r = -0.59$. Dieser Wert ist deutlich höher als in vergleichbaren Messungen [25] erreicht wurde und unterstreicht damit die Linearität des gefundenen Zusammenhangs. Die Standardabweichung von $\sin^2(\Theta)$ ist durch das FWHM der zugrunde liegenden Winkelverteilung beider Orientierungszustände des Moleküls B gegeben $\Delta\Theta = \pm 2^\circ$. Die Standardabweichung der Zerfallsrate P_{tot} ist durch die Unsicherheit der Kurvenanpassung an das TCSPC- Histogramm gegeben (siehe Anhang XI). Die lineare Regression der Zerfallsrate in Abbildung 4.5 ergibt für den Quotienten der parallelen und senkrechten Dipolausrichtung

$$\frac{P_{\text{tot},\parallel}}{P_{\text{tot},\perp}} = \frac{a+b}{a} = 0.51 \pm 0.13 \quad (4.2)$$

mit den Parametern a und b aus der linearen Regression (siehe in Abbildung 4.5). Die beiden schwarzen Punkte in Abbildung 4.5 stellen die Werte für die Auswertung aller Photonen des jeweiligen Zustandes I und II dar. Im Rahmen der Fehlergrenzen stimmen sie mit der linearen Regression überein.

Gemäß den Ausführungen in Kapitel 2.1.4 ergibt sich mit der klassischen Elektrodynamik des Dipols an einer Grenzfläche von Luft zu Glas das Verhältnis der radiativen Raten

¹²Erfasst die lineare Korrelation einer Punkteschar $P(x, y)$. $r = \pm 1$: linear korreliert. $r = 0$: zufällig verteilt.

zu [18]

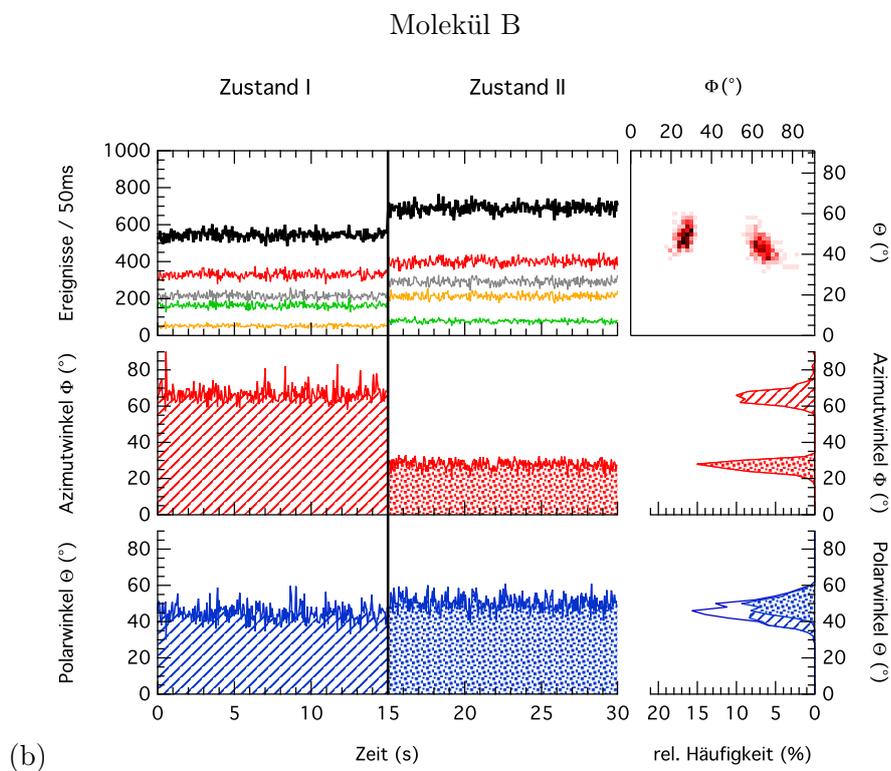
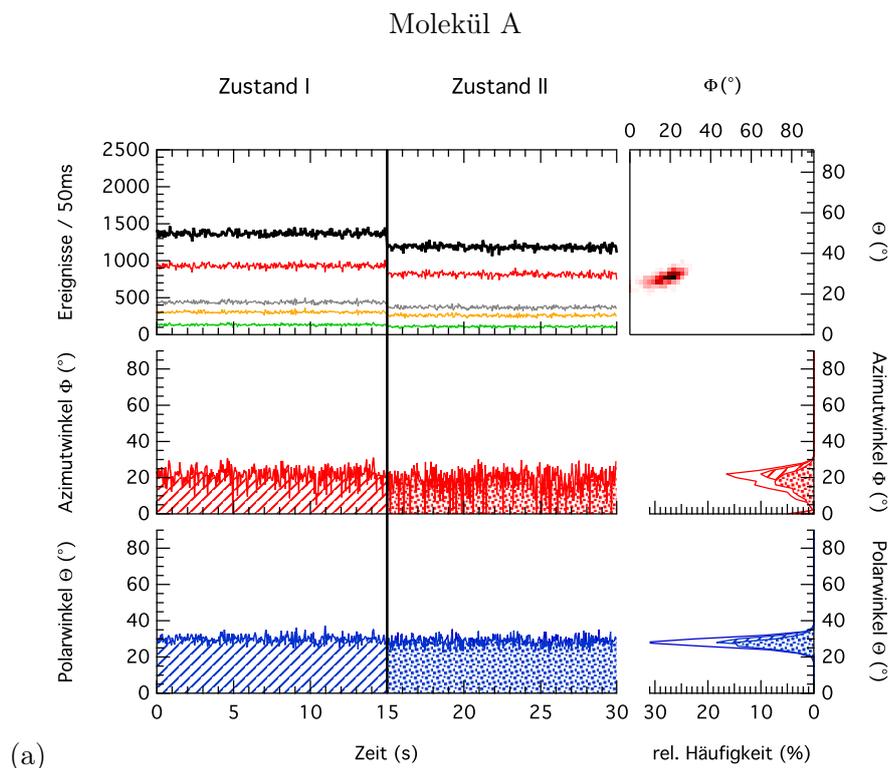
$$\frac{P_{\text{rad},\parallel}}{P_{\text{rad},\perp}} = 0.59. \quad (4.3)$$

Die Übereinstimmung im Rahmen des Fehlerintervalls zwischen dem theoretischen und dem experimentellen Wert, spricht für die Anwendbarkeit des verwendeten Modells für die Berechnung der 3D Orientierung. In der Regel tragen konkurrierende nicht-strahlende Prozesse zur Abregung der Fluoreszenz bei [25]. In dem hier vorliegenden Fall würde diese Rate jedoch einen negativen Wert annehmen, der, da physikalisch nicht sinnvoll, verworfen werden muss. Da das Molekül direkt an der Oberfläche sitzt, ist eine Orientierungsabhängigkeit von nicht-strahlenden Prozessen für die Abregung angeregter Zustände durchaus vorstellbar. Eine orientierungsabhängige, nicht-strahlende Rate $P_{\text{nr}}(\Theta)$ kann durchaus positive Werte liefern und wäre damit mit den experimentellen Ergebnissen vereinbar. Ein Modell zur Beschreibung dieses Zusammenhangs existiert jedoch nicht und muss Gegenstand weiterer Arbeiten sein. Wie bereits mehrfach erwähnt, ist die Bestimmung exakter Winkelwerte durch die hier verwendete Methode nur unzureichend gesichert. Dieser Umstand würde die leichte Abweichung zwischen Theorie und Experiment ebenfalls erklären.

4.2.3 Simulationen

Der Zusammenhang zwischen der Orientierung des Dipols und der Intensität des fluoreszenten Lichtes ist durch das in Kapitel 2.2 vorgestellte Modell von Abstrahlcharakteristik und Detektion gegeben. Inwieweit die experimentell erhaltenen Daten mit den Modellvorhersagen des Dipols im isotropen Medium übereinstimmen, kann anhand von MC Simulationen überprüft werden (siehe Abbildung 4.6). Der Parametersatz für die Simulation vom Typ A wird durch die experimentell gewonnenen Daten bestimmt. Die Winkel (Φ, Θ) von Molekül A ergeben für Zustand I $(30^\circ, 22^\circ)$ bzw. Zustand II $(28^\circ, 18^\circ)$ und von Molekül B für Zustand I $(66^\circ, 44^\circ)$ bzw. Zustand II $(28^\circ, 50^\circ)$. Der für die Simulation nötige Wert für die totale Fluoreszenzintensität $I_{\text{tot,em}}$ wird gemäß Gleichung 2.45 aus der Summenin-

Abb. 4.6: (auf der folgenden Seite) Die beiden simulierten Zeitspuren zeigen die gleichen Änderungen in der 3D Orientierung wie im Experiment für Molekül A und Molekül B beobachtet. Wie beim Experiment sind die Summenintensität I_D (black), die drei Intensitätskanäle $I_{0^\circ,c}$ (gelb), $I_{90^\circ,c}$ (grün) und I_r (rot) für die Bestimmung der Orientierung sowie die Summe der Polarisationskanäle I_c (grau) dargestellt. Die Integrationszeit beträgt auch hier 50 ms. Die sich aus der simulierten Intensität ergebende 3D Orientierung Φ (rot) und Θ (blau) ist darunter dargestellt. Die Häufigkeitsverteilung der Winkel ist neben den Zeitspuren mit einer Skalenbreite von 2° aufgeführt. Die Zeitintervalle für Zustand I und II werden zusätzlich zur Gesamtverteilung relativ zur Gesamtlänge der Simulation gewichtet in die Häufigkeitsverteilungen eingetragen. Um die Zustandsänderung, insbesondere die Korrelation zwischen den beiden Winkeln der Orientierung, sichtbar zu machen, ist rechts neben der Intensitätszeitspur das Φ - Θ -Histogramm dargestellt.



tensität I_D des Zustands I beider Moleküle berechnet. Im Falle von Molekül B stimmen die simulierten Zeitspuren nahezu perfekt mit dem Experiment überein. Im Gegensatz dazu ist die Intensitätsänderung für Molekül A deutlich größer als durch die Änderung der Orientierung zu erwarten ist. Die Intensitätsänderung für Molekül A muss daher durch andere Mechanismen, wie z. B. eine Konformationsänderung des Moleküls, hervorgerufen werden.

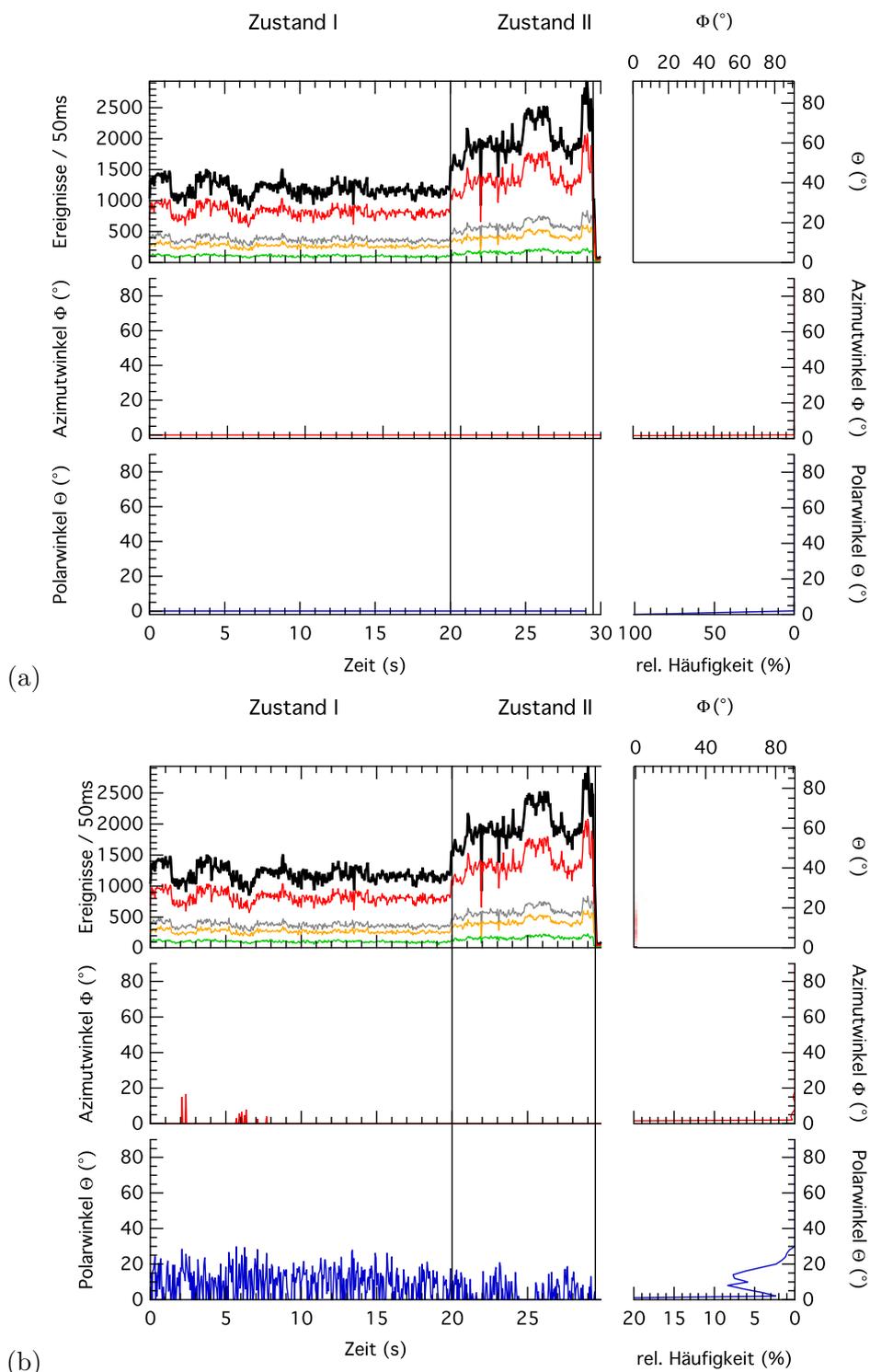
4.2.4 Modellabhängigkeit der Orientierungsauswertung

Für die Berechnung der 3D Orientierung kam bisher stets das Modell des Dipols im isotropen Medium zur Anwendung. Ausgehend von der Präparation der PDI- Moleküle auf dem Objektglaträger und der Lebensdaueranalyse, insbesondere für das Molekül B, muss man jedoch von einer Grenzflächensituation ausgehen. Das heißt, der Dipol befindet sich in unmittelbarer Nähe einer Grenzfläche zwischen einem optisch dünneren und einem optisch dichteren Medium. Dafür wurde in Kapitel 3.1 die Theorie für die Bestimmung der Orientierung einzelner, fluoreszenter Moleküle entsprechend um den Einfluss einer Grenzfläche erweitert und soll hier zur Anwendung kommen.

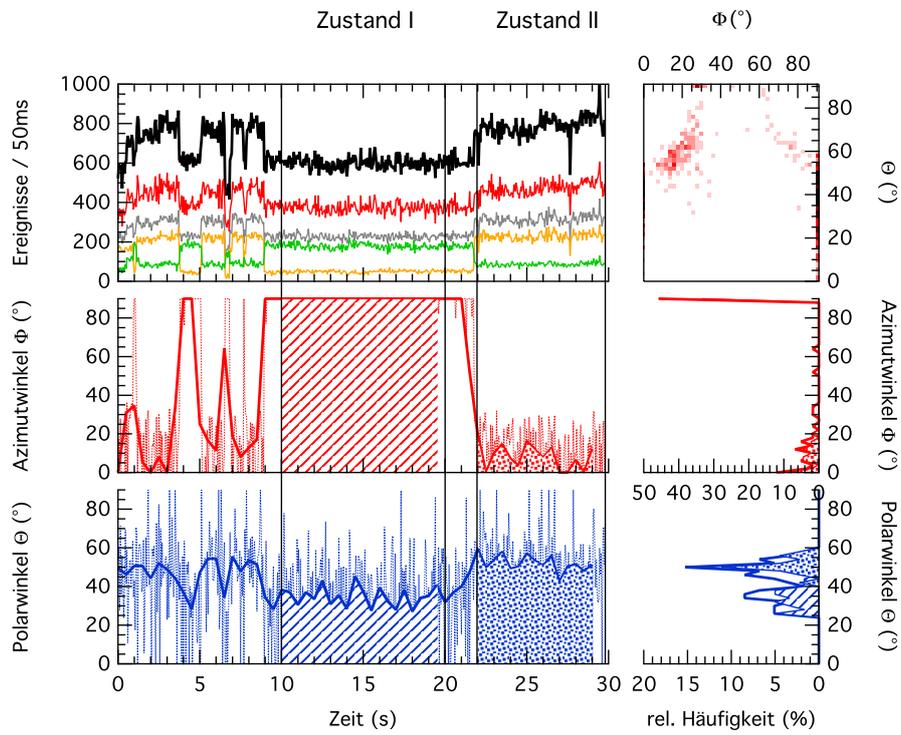
Abbildung 4.7 zeigt die Orientierungstrajektorien Φ und Θ beider Moleküle für zwei Szenarien. Im ersten Szenario (a) erwartet man die fluoreszenten Moleküle auf der Oberfläche des amorphen SiO_2 . Der Dipol selbst befindet sich damit im optisch dünneren Medium (Luft) an der Grenzfläche zum optisch dichteren Medium. Das im Experiment detektierbare Licht entspricht damit dem an der Grenzfläche transmittierten Fluoreszenzlicht. Im

Abb. 4.7: (auf den beiden folgenden Seiten) Für die beiden Moleküle A und B ist die Simulation der Fluoreszenzintensität und die daraus berechnete 3D Orientierung dargestellt. Die Summenintensität I_D (schwarz) ist zusammen mit den drei Intensitätskanälen für die Berechnung der 3D Orientierung $I_{0^\circ,c}$ (gelb), $I_{90^\circ,c}$ (grün) und I_r (rot) sowie der Summenintensität der zentralen Apertur I_c (hell grau) dargestellt. Die Integrationszeit beträgt 50ms. Die Berechnung der beiden Winkel der 3D Orientierung Φ (rot) und Θ (blau) erfolgt für das transmittierte Licht (a) eines Dipols an der Grenzfläche vom optisch dünneren (Luft) zum optisch dichteren Medium (Glas) sowie für das reflektierte Licht (b) des Dipols vor der Grenzfläche vom optisch dichteren Medium (Toluol) zum optisch dünneren Medium (Luft). Neben den Zeitspuren für Φ und Θ sind die Histogramme für die relative Häufigkeit der beiden Winkel dargestellt. Für die Skalenbreite wurde 2° gewählt. Die für das Molekül A und B charakteristischen Bereiche werden als Zustand I (quer gestreift) bzw. Zustand II (gepunktet) in der Zeitspur für die Orientierung markiert und normiert auf die Gesamtlänge der Zeitspuren in die Häufigkeitshistogramme eingetragen. Um die Korrelation zwischen den beiden Winkel für die Orientierung in der fokalen Ebene und aus dieser heraus zu verdeutlichen, wird neben den Häufigkeitsverteilung des Einzelwinkels auch das Φ - Θ -Histogramm (gleiche Skalenbreite, dunkle Bereiche entsprechen einer hohen relativen Häufigkeit) dargestellt.

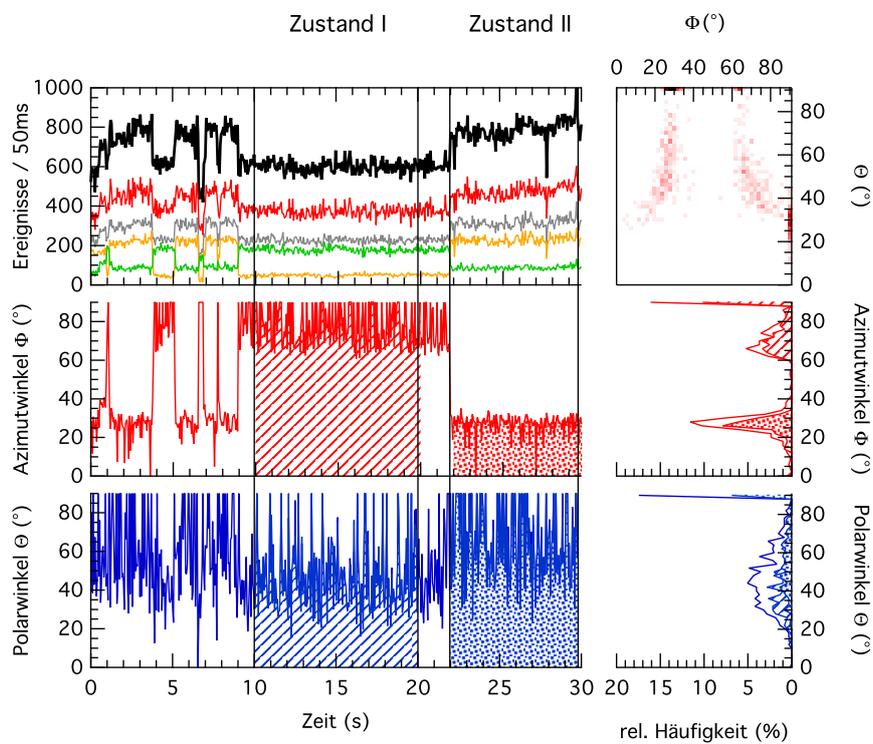
Molekül A



Molekül B



(a)



(b)

zweiten Szenario (b) geht man davon aus, dass sich der Dipol im optisch dichteren Medium z. B. in einer Toluol-Umgebung befindet und man die Summe aus direkt emittierten und an der Grenzfläche zur Luft reflektierten Fluoreszenzlicht des Dipols detektiert. Die Auswertung der Zeitspuren beider Moleküle ergibt zwar deutlich andere Winkelwerte, qualitativ ergibt sich jedoch unabhängig vom Modell ein ähnliches Bild für den Verlauf der Orientierung. Die prinzipiellen Aussagen für die Orientierung müssen daher keinesfalls revidiert werden. Vergleicht man die Inklinationswinkel N in Abhängigkeit des Polarwinkels für die drei Modelle (siehe Abbildung 3.8), so unterscheiden sich diese zwar in ihrem Kontrast und Wertebereich, nicht jedoch im qualitativen Verlauf. Die Unterschiede im Wertebereich führen sowohl im Fall des transmittierten als auch im Fall des reflektierten Lichts zu unterschiedlichen Absolutwerten der beiden Winkel. Der geringe Kontrast verursacht die breite Verteilung der Winkelwerte, da nun bei gleicher Intensität bzw. bei gleicher Integrationszeit der Einfluss des Schrotrauschens größer ist. Anhand der Orientierung selbst ist die Bewertung der Wahl des Modells für die Beschreibung des fluoreszenten Moleküls daher schwierig. Schaut man sich nun die mit der Orientierungsänderung einhergehende Intensitätsänderung an, so ist der qualitative Verlauf von der Wahl des Modells abhängig (siehe Abbildung 3.9). Die beobachtete Intensitätsänderung würde im Fall des Moleküls A für das Modell des Dipols im optisch dünneren Medium sprechen, jedoch im Fall des Moleküls B für das Modell des Dipols im optisch dichteren Medium, oder sogar den Fall des isotropen Mediums bestätigen. Auch hier ist kein eindeutiger Trend auszumachen.

Im Rahmen dieser Auswertung ist es schwierig sich für eines der Modelle zu entscheiden, insbesondere vor dem Hintergrund, dass mit der Änderung des Polarwinkels auch eine Änderung im Azimutwinkel einhergehen kann. Die Änderung des azimutalen Winkels beträgt im Fall des Moleküls B ca. $\Delta\Phi = 40^\circ$. Eine derart deutliche Änderung der Polarisation kann durchaus die detektierbare Intensität in dem beobachteten Maße beeinflussen. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn das Anregungslicht nicht perfekt zirkular polarisiert ist. Eine Änderung in Φ führt dann ebenfalls zu einer Änderung der Anregungswahrscheinlichkeit und damit der detektierbaren Intensität I_D . Eine weitere Ursache kann in der polarisationsabhängigen Transmission des dichroitischen Spiegels gesucht werden, da auch in diesem Fall das Intensitätsverhältnis verfälscht würde.

4.2.5 Korrelationsanalyse als Werkzeug für die Beschreibung der Orientierungsdynamik

Mit der Korrelation bestimmter Orientierungskanäle soll die Dynamik einzelner PP- Moleküle auf der gesamten zur Verfügung stehenden Zeitskala ($10^{-6} - 10^{+1}$ s) untersucht werden. In Abbildung 4.8 sind dafür die Kreuzkorrelationen der beiden Polarisationskanäle $I_{0^\circ,c}$ und $I_{90^\circ,c}$ sowie zwischen dem Kanal der Kranzregion I_r und der Summe der beiden Kanäle für das Zentrum I_c beider Moleküle dargestellt. Molekül A zeigt für beide Korrelationen einen korrelierten Anteil auf der Sekunden-Zeitskala. Für den Zeitbereich $< 10^0$ s sind keine Korrelation erkennbar. Der steile Abfall am Ende ($\tau = 10$ s) der Korrelationsfunktion ist mit dem einmaligem Auftreten des Intensitätssprunges in der Intensitätszeitspur des Moleküls

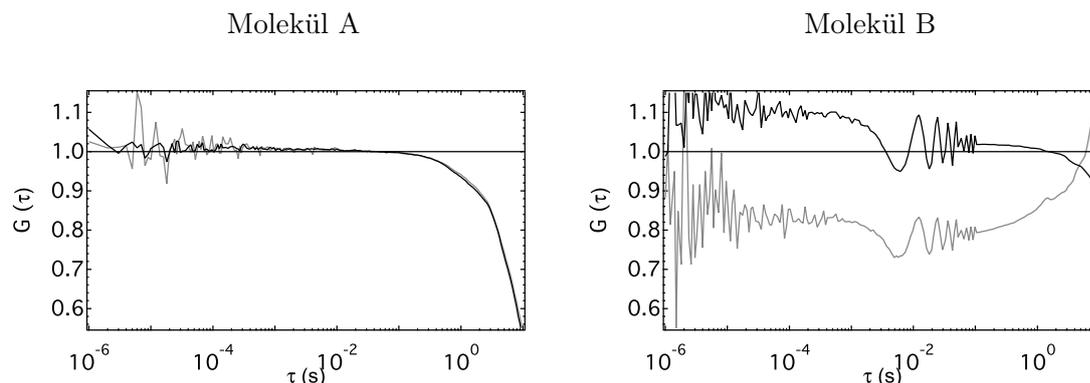


Abb. 4.8: Ergebnisse für die Korrelation der beiden Moleküle A und B. Die Graphik zeigt die Kreuzkorrelation der beiden Polarisationsrichtungen für das Zentrum $I_{0^\circ,c}$ und $I_{90^\circ,c}$, also der Polarisation P (grau) sowie zwischen dem Kanal der Kranzregion I_r und des Zentrums I_c , also der Inklination N (schwarz).

zu begründen. Damit bestätigt die Kreuzkorrelation die Aussagen aus der Zeitspuranalyse und zeigt, dass das Molekül keine weitere Dynamik auf dem erfassten Zeitbereich zeigt. Die Korrelation der Intensitätskanäle für das Molekül B zeigt, dass sich die Dynamik von Polarisation und Inklination voneinander unterscheiden lassen. Die Polarisationskanäle zeigen ein antikorreliertes Verhalten, die Inklinationskanäle ein korreliertes Verhalten, dass in beiden Fällen auf der Sekunden Zeitskala zu finden ist. Die Anti-Korrelation der Polarisation spiegelt den in der Zeitspuranalyse gefunden Wechsel zwischen den beiden Orientierungszuständen in Φ wieder. Die Korrelation der Inklination zeigt die Dynamik des Polarwinkels, die stets in Kombination mit der Änderung des Azimutwinkels einhergeht. Die Korrelation der Inklinationskanäle zeigt im Gegensatz zu den Polarisationskanälen kein antikorreliertes Verhalten, da eine Änderung des Polarwinkels eine gleichsinnige Änderung für die Intensität im Zentrum und im Kranz bedeutet.

Die für Molekül B auftretende Schwingung des Signals ist ein Messartefakt und entspricht der Lüfterfrequenz der verwendeten Kamera des Spektrometers.

4.3 Diskussion

Das in diesem Kapitel vorgestellte Experiment erweitert das bereits durch Hohlbein u. Hübner [4] eingeführte Detektionsschema für die Bestimmung der 3D Orientierung so, dass die gleichzeitige Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer und die Messung des Fluoreszenzspektrums einzelner Moleküle möglich wird. Die bisher mit dieser Methode zur Bestimmung der 3D Orientierung untersuchten Systeme zeichnen sich sowohl durch eine isotrope Verteilung der Orientierung als auch einer im Rahmen der erreichten Zeitauflösung fehlenden Orientierungsdynamik aus [4, 8]. Im Gegensatz dazu zeigt das hier untersuchte System einzelner PP- Moleküle auf Glas sowohl bevorzugte Zustände in der Orientierung

als auch Änderungen dieser auf einer Zeitskala, die mit dieser Methode zugänglich ist. Neben der Orientierungsdynamik konnten auch korrelierte Änderungen anderer photophysikalischer Parameter beobachtet werden. Damit können die Vorteile der Multi-Parameter-Messung, insbesondere in Bezug auf die gleichzeitige Bestimmung der 3D Orientierung, hervorragend an dem Modellsystem gezeigt werden. Im Gegensatz zu den bildbasierten Methoden [34, 35, 99], in denen das Quanten-Interferenzbild mit einer Kamera aufgenommen wird und die Zeitauflösung dieser Methode durch die relativ hohe Integrationszeit auf den Millisekundenbereich limitiert ist, kann mit der hier vorgestellten Methode prinzipiell die Zeitauflösung der Einzelphotonenmessung erreicht werden. Insbesondere ist die Einzelphotonenmessung dadurch charakterisiert, dass alle Informationen, die das einzelne Photonensignal liefern kann, erhalten bleiben. So ist die gleichzeitige Erfassung von Lebensdauer und Orientierung überhaupt möglich. Im Vergleich dazu muss bei kamera-basierten Methoden der Photonenstrom für die Abbildung und die gleichzeitige Lebensdauererfassung aufgeteilt werden, wodurch die Anzahl der für den einzelnen Parameter gemessenen Photonen reduziert wird. Bildgebende Methoden sind nicht grundsätzlich von der gleichzeitigen Erfassung mehrere Parameter ausgeschlossen. In der von Sick et al. [37] vorgestellten Methode ist die gleichzeitige Erfassung des Quanten-Interferenz-Bildes und damit der Orientierung des Einzelmoleküls und dessen Lebensdauer durch einen konfokalen Scan prinzipiell möglich und wurde auch experimentell durch die Untersuchung von Fluoreszenzfarbstoffen eingebettet im Polymer von Kreiter et al. [25] gezeigt. Die Bestimmung der Orientierung erfordert jedoch den kompletten Scan eines Moleküls. Dieser zeitraubende Scanvorgang macht eine schnelle Erfassung beider Parameter prinzipiell unmöglich. Die effektive Nutzung des Einzelphotonenstroms sowie die relativ einfache Implementierung des Detektionsschemas in den Strahlengang eines konfokalen Mikroskops zeichnet die hier vorgestellte Methode gegenüber anderen aus. Dies zeigt sich vor allem dadurch, dass sich andere Techniken zur Orientierungsbestimmung nicht oder nur unzureichend auf eine große Anzahl von Molekülen anwenden lassen.

Bei der Untersuchung einzelner PP- Moleküle auf Glas konnte anhand der vorgestellten Multi-Parameter-Messung die Änderung von Fluoreszenzintensität und Lebensdauer eindeutig einer Konformationsänderung des Einzelmoleküls zugeordnet werden. Die Zeitspur von Molekül A zeigt, dass eine Änderung der spektralen Position sowohl mit einer Änderung der Fluoreszenzintensität als auch der Lebensdauer einhergeht. Dank der gleichzeitigen Erfassung der Orientierung des Moleküls konnte eine im selben Augenblick stattfindende Re-orientierung, die ähnliche Auswirkungen auf Lebensdauer und Intensität hätte, ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass die verschiedenen spektralen Positionen mit unterschiedlichen Konformationen der PDI- Moleküle in Verbindung gebracht werden [9, 90], die durch die Orientierung ihrer Phenoxy-Seitengruppen bestimmt sind. Änderungen in der Fluoreszenzintensität können ohne weiteres der Konformationsänderung zugeschrieben werden, ohne dass sich dabei zwingend die Ausrichtung des Übergangsdipolmomentes des Fluorophors ändern muss [89]. Die von Kowerko et al. [9] beschriebene Änderung des Absorptionsbandes um 10 nm bei Molekülen, deren Intensität sich dabei bis zu verdoppelt, spricht für eine Erhöhung des Absorptionsquerschnitts bei Molekülen, deren Spektrum blauverschoben ist. Tatsächlich werden in der Literatur Moleküle, deren Spektrum blauverschoben ist, gerade einer ausgedehnten Konformationsstruktur zugeordnet, die sich durch

eine erhöhte radiative Rate auszeichnet [90]. Diese durch Simulation erhaltenen Ergebnisse widersprechen den hier dargestellten experimentellen Funden bei Molekül A. Dies zeigt gerade im blauverschoben Teil der Zeitspur eine Erhöhung der Lebensdauer, sprich eine Reduzierung der radiativen Rate, die mit einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenzintensität einhergeht. Diese Änderung könnte mit dem Verlust von strahlungslosen Kanälen erklärt werden. Wie schon erwähnt, kann diese Änderung aber auch durch einen erhöhten Absorptionsquerschnitt bei konstanter Anregungswellenlänge aufgrund der Blauverschiebung erklärt werden.

Dank der Multi-Parameter-Messung können Orientierungsunterschiede wie bei Molekül B zeitabhängig mit anderen Fluoreszenzparametern korreliert werden. Bei diesem Molekül ist die Intensitätsänderung mit einer Änderung der 3D Orientierung verbunden. Perylen-derivate können durchaus einer Änderung der Orientierung des Übergangsdipols zwischen verschiedenen Konformationen unterliegen [89]. Allen Methoden, die zur Bestimmung der Orientierung des Moleküls die Orientierung des Dipolmomentes ausnutzen, ist gemein, dass sie nicht zwischen einer Änderung des Übergangsdipolmomentes in Bezug auf die Molekülstruktur und einer Änderung der Orientierung des Moleküls an sich unterscheiden können. Dank der drastischen Änderung des azimutalen Winkel $\Delta\Phi = 30^\circ$ zwischen beiden Zuständen sowie dem Fehlen spektraler Sprünge etc. kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich hier nicht um eine Änderung des Übergangsdipolmomentes handelt. Neben der Intensitätsänderung ist die Änderung der Orientierung auch mit Fluktuationen der Lebensdauer verbunden. Es zeigt sich, dass das Molekül B für Zeitintervalle, in denen es durch einen größeren Polarwinkel ausgezeichnet ist, auch eine längere Lebensdauer besitzt. Dieser Zusammenhang entspricht dem theoretisch vorhergesagten Verhalten von Fluorophoren an einer Luft-Glas-Grenzfläche [18, 22]. Die Abhängigkeit der Lebensdauer von der 3D Orientierung des Fluorophors in der Nähe einer Grenzfläche zweier Medien verschiedenen Brechungsindizes wurde von Kreiter et al. [25] für Fluorophore, eingebettet in eine Polymermatrix, studiert. Hier handelt es sich jedoch um Moleküle, die auf amorphen SiO_2 verteilt sind und sich in Luft befinden. Ein derartiges System bisher nicht in Bezug auf seine 3D Orientierung in Verbindung mit anderen Fluoreszenzparametern untersucht. Das für ein solches Szenario passende Modell für die Bestimmung der 3D Orientierung fordert eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei steigendem Polarwinkel. Dies entspricht nicht den experimentellen Funden, die eher einem Dipol in einer isotropen Umgebung entsprechen. Da jedoch keines der untersuchten PP- Moleküle eine Änderung des Polarwinkels ohne gleichzeitige Änderung des azimutalen Winkels zeigt, kann dessen Einfluss, z. B. auf Anregungsunterschiede, nicht ausgeschlossen werden. Die beobachteten Änderungen der Lebensdauer legen das Modell des Moleküls an der Grenzfläche nahe, da sowohl Lebensdaueränderungen als auch Änderungen in der Orientierung auf Intensitätsverhältnissen beruhen, die weniger anfällig für Artefakte als reine Intensitätsmessungen sind.

Weiterführende Experimente müssen daher eine definierbare Oberfläche aufweisen oder Modellmoleküle nutzen, bei denen verschiedene, unter Umständen sogar bestimmbare, Orientierungen leicht zugänglich sind.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

In dem vorangegangenen Kapitel wurde ein Detektionsschema als Teil eines konfokalen Mikroskops vorgestellt, mit dem man in der Lage ist, gleichzeitig die 3D Orientierung, die Fluoreszenzintensität, Lebensdauer sowie das Fluoreszenzspektrum einzelner Farbstoffmoleküle zu messen.

Um die Methode zu testen und ihre Anwendbarkeit zu zeigen, wurden einzelne PP- Moleküle auf einer SiO_2 - Oberfläche untersucht. Die dabei erzielten experimentellen Ergebnisse stimmen zum großen Teil mit vorhergehenden Veröffentlichungen überein [9, 89, 90], erlauben aber zusätzlich zwischen den rein orientierungsabhängigen und den durch intramo-

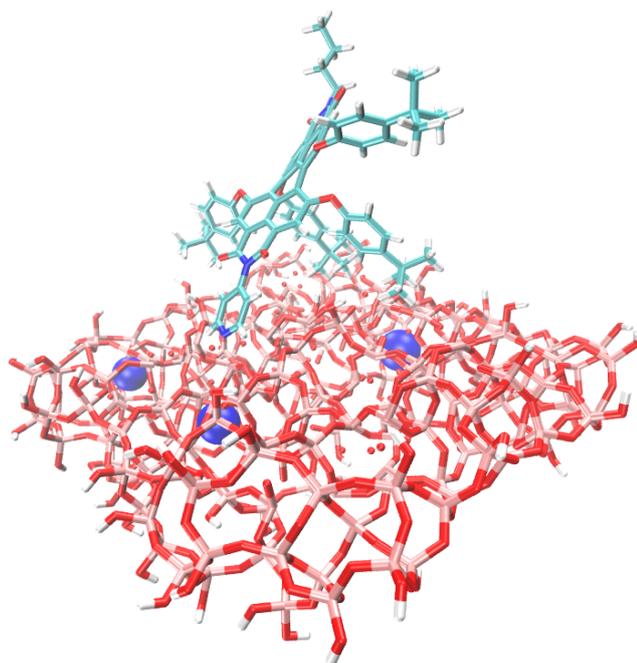


Abb. 4.9: Maßstabgerechte Darstellung des Atomgerüsts eines (Pyridyl)₁-funktionalisierten Perylendiimids (türkis) angelagert an eine amorphe SiO_2 -Oberfläche (rot). Beliebiger Simulationsschritt einer MD- Simulation. Die drei Punkte (lila) in der SiO_2 -Schicht geben die Vektorkoordinaten der Ebene wieder, von der aus die relative Orientierungsänderung des Perylen-Moleküls quantitativ erfasst werden kann.

lekulare Strukturänderungen verursachten Intensitätsänderungen zu unterscheiden. Dieses Ergebnis zeigt eindrucksvoll das Potential der Methode. Mögliche Anwendungen reichen von der Untersuchung von Membranproteinen und dem Verhalten von Farbstoffen in nanoporösen Materialien [82, 100] bis hin zu Fragestellung zur Natur des Molekülverhaltens an Oberflächen, wie zum Beispiel im Falle von der Katalyse an Oberflächen.

Um die Zeitauflösung für die Spektrenaufnahme zu verbessern, ist prinzipiell eine Detektion über einen *photomultiplier*¹³ (PMT) möglich. Dies erlaubt dann die Korrelation zwischen Orientierung und Spektrum auf der Einzelphotonenebene und damit die Untersuchung dynamischer Prozesse der Fluorophore auf noch kleineren Zeitskalen mithilfe von Korrelationsanalysen.

Nachdem in diesem Kapitel die Analyse einzelner Moleküle im Mittelpunkt stand und die Vermutung einer bevorzugten Orientierung bei der Anbindung von PP- Molekülen an eine Glasoberfläche durch die Auswertung von SCOM-Bildern experimentell bestätigt werden konnte, muss die Analyse des quasi-Ensembles, also die Auswertung und Statistik von vielen Einzelmolekülzeitspuren, Thema weiterführender Arbeiten sein.

Außerdem sollen MD- Simulationen (siehe Abbildung 4.9) im Vergleich zu experimentellen Ergebnissen durchgeführt werden, um die im Experiment zugänglichen Orientierungsänderungen tatsächlichen Konformations- bzw. Orientierungszuständen der PP- Moleküle auf der SiO₂-Oberfläche zuordnen zu können.

¹³engl. photomultiplier, deutsch Photoelektronenvervielfacher

5 GUV als Modellsystem für die Bestimmung der 3D Orientierung fluoreszent markierter Strukturen

Die 3D Orientierung von Molekülen ist besonders in anisotropen Umgebungen von Interesse. Anders als in isotropen Medien ist hier die Orientierung bei der Interaktion mit der unmittelbaren Umgebung des Moleküls von großer Bedeutung. Lipidmembranen stellen solche anisotrope Umgebungen dar. Durch ihre Bedeutung bei der Abgrenzung von Kompartimenten biologischer Systeme, wie Zellen, Zellorganellen etc. sowie als Reaktionsort bei Stoffwechselfvorgängen ist das Verständnis von Lipidmembranen von zentraler Bedeutung für das Verständnis von Lebensvorgängen. Lipide bilden unter bestimmten Bedingungen Vesikel. Diese Vesikel zeichnen sich durch eine definierte Kugelstruktur aus. Markiert man die Vesikelmembran mit fluoreszenten Farbstoffen, so sind alle möglichen Orientierungen des Farbstoffmoleküls in vorhersagbarer Weise zugänglich. Als Modellsystem kommen farbstoffmarkierte *giant unilamellare vesicle*¹ (GUV) zur Anwendung. Mithilfe dieser Vesikel kann die intensitätsbasierte Methode zur Bestimmung der 3D Orientierung in Bezug auf verschiedene Farbstoffkonzentrationen untersucht werden. Des Weiteren kann so der Einfluss der Rotations- und Translationsdiffusion des Farbstoffs in der Membran auf die Bestimmung der Orientierung charakterisiert werden. Zum Vergleich der experimentellen Ergebnisse werden MC Simulationen der 3D Orientierung für das Modellsystem herangezogen.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden teilweise und in ähnlicher Form bereits veröffentlicht [101–103].

5.1 Methoden

5.1.1 Lipide und Lipidfarbstoffe

Die untersuchten Vesikel bestehen aus drei verschiedenen Lipiden. DOPC stellt als ungeladenes Lipid den Hauptteil der Vesikel dar. Durch seine niedrige Schmelztemperatur von

¹engl. giant unilamellare vesicle, deutsch riesige einschichtige Lipidvesikel

-20°C [104] ermöglicht DOPC die fluide Struktur des Vesikel bei verhältnismäßig niedrigen Temperaturen (z. B. Raumtemperatur) aufrecht zu erhalten. Das negativ geladene Lipid DOPG erleichtert bei der Elektroformation die Trennung der Doppellipidmembranen durch elektrostatische Abstoßung und gibt dem Vesikel eine negative Gesamtladung [105]. Geladene Liposome zeichne sich außerdem durch eine hohe Stabilität ihrer Kugelform aus. DOPE-Biotin ist ein biotinyliertes Lipid, welches der nachträglichen Immobilisierung am Deckglas mittels einer Streptavidin-Biotin-Bindung dient.

DOPC

Schmelzpunkt $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Molekulargewicht $m = 786,113\text{ g/mol}$

Sys Name = 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine

CAS Nummer 4235-95-4

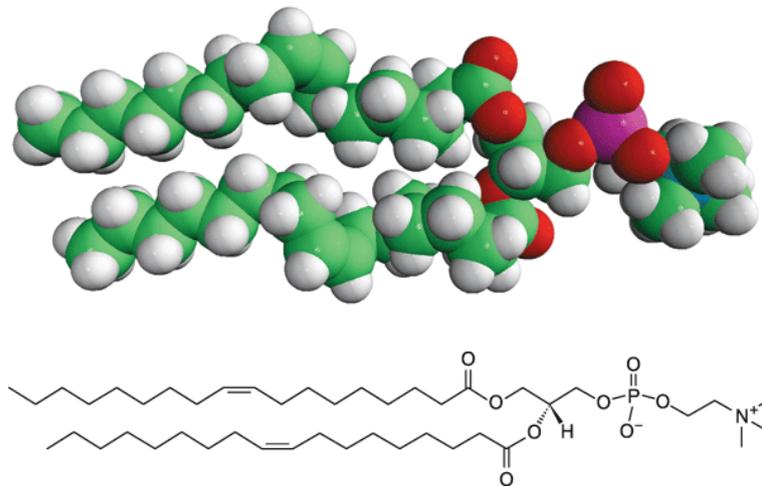


Abb. 5.1: Strukturformel von DOPC [104].

DOPG

Schmelzpunkt $T = -18\text{ }^{\circ}\text{C}$

Molekulargewicht $m = 797,026\text{ g/mol}$

Sys Name = 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]

CAS Nummer 67254-28-8

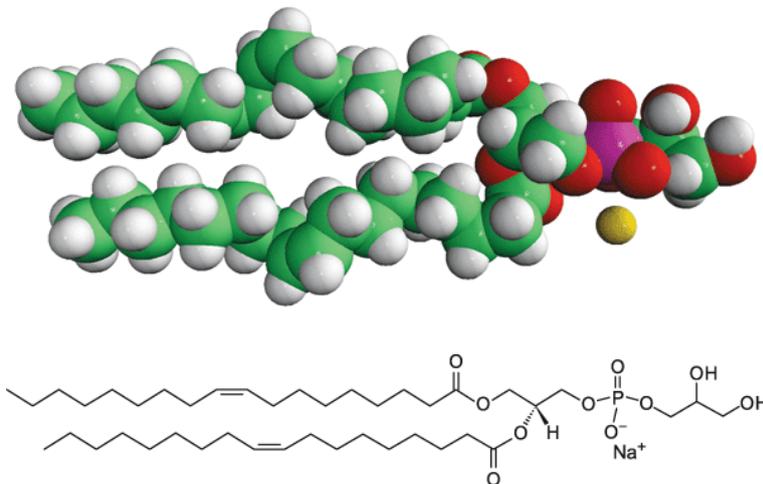


Abb. 5.2: Strukturformel von DOPG [104].

DOPE-Biotin

Schmelzpunkt $T = -16\text{ }^{\circ}\text{C}$

Molekulargewicht $m = 1105,470\text{ g/mol}$

Sys Name = 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(Cap Biotinyl)

CAS Nummer 384835-51-2

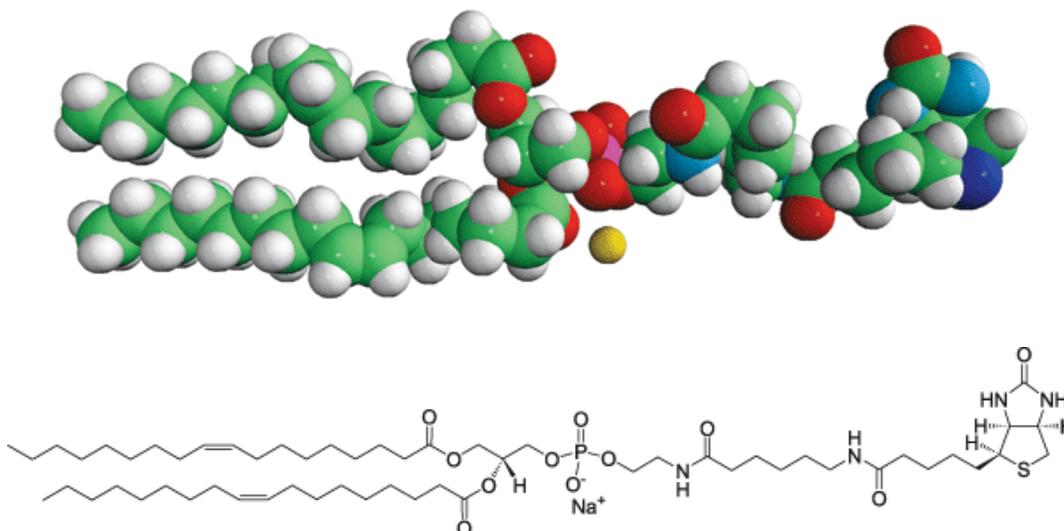


Abb. 5.3: Strukturformel von DOPE-Biotin [104].

In den durchgeführten Experimenten wird die Einlagerung und räumliche Ausrichtung von DiO-C₁₈ (3,3'-Dioctadecyloxycarbocyaninperchlorat) in GUUV untersucht. DiO gehört, wie alle Di-Farbstoffe, zu den lipidartigen Cyaninfarbstoffen. Diese bestehen aus zwei verlink-

ten, konjugierten Ringpaaren, die sich nur durch die Y-Position voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 5.4). Durch Substitution der Y-Position erhält man Di-Farbstoffe mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsmaxima. Häufig verwendete Substituenten sind Isopropyl, Sauerstoff und Schwefel. Die Verbindung zwischen den Ringen besteht aus einer ungeraden Anzahl von Kohlenwasserstoffen, die zusammen mit dem Substituenten das Absorptionsmaximum und Emissionsmaximum festlegen. An die Ringpaare sind Alkylketten gebunden, die zu einer hohen Affinität des Farbstoffs zur Doppellipidmembran führen. Je nach Zusammensetzung der Fettsäuren der Phospholipide in Bezug auf Kettenlänge und Sättigungsgrad können unterschiedlich lange, hydrophobe Seitenketten (u.a. C₆ - C₂₂) hergestellt werden, um eine optimale Inkorporation in die Membran zu gewährleisten. Der lipophile Charakter von Cyaninfarbstoffen überwiegt erst mit langen Alkylketten (≥ 12 Verbindungen).

DiO-C₁₈

Molekulargewicht $m = 881,7173 \text{ g/mol}$

Sys Name = 3-octadecyl-2-[3-(3-octadecyl-2(3H)-benzoxazolylidene)-1-propenyl]-perchlorate

CAS Nummer = 34215-57-1

Absorption λ_{max} (inkorporiert) = 484 nm

Emission λ_{max} (inkorporiert) = 501 nm

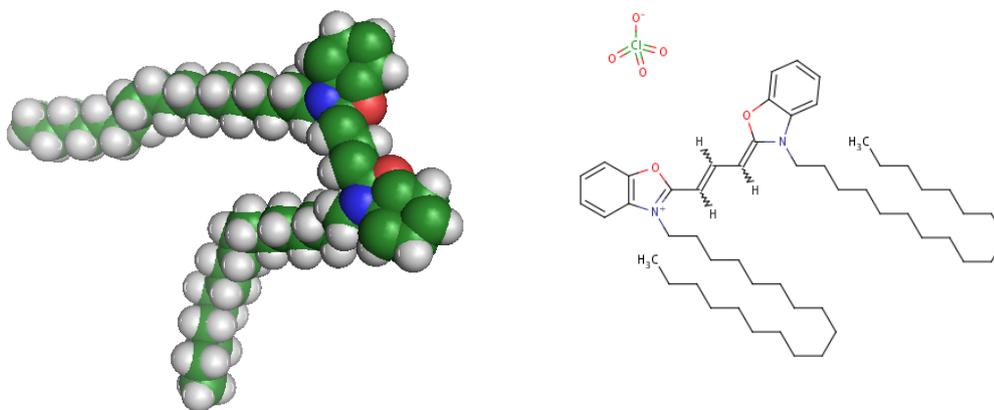


Abb. 5.4: Allgemeine Strukturformel des DiO-C₁₈-Farbstoffs [106].

Als grün fluoreszierender, lipophiler Cyaninfarbstoff ist DiO-C₁₈ ein weit verbreiteter Lipidfarbstoff, der, in eine Membranschicht eingelagert, ein Absorptionsmaximum bei 484 nm und ein Emissionsmaximum bei 501 nm besitzt. Außerdem hat DiO-C₁₈ einen sehr hohen molaren Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{484} > 125000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und in der Membran eine kurze Lebensdauer im angeregten Zustand $\tau_{\text{F}} \approx 1 \text{ ns}$. Der Übergangsdipol von DiO-C₁₈ liegt parallel zu der Alkylkette zwischen den aromatischen Ringpaaren [31].

Eigenschaften, die DiO-C₁₈ mit verwandten Di-Fluorophoren teilt, können wie folgt zusammengefasst werden. Cyaninfarbstoffe werden sehr schnell in Lipidmembranen (z. B. Zellmembranen) eingebaut und können dort lateral frei diffundieren und rotieren. Dabei befindet sich der fluorophore Teil des Moleküls im Bereich der polaren Kopfgruppen der Lipide in unmittelbarer Nähe zur Grenzfläche zwischen Lipidmembran und Wasser. Die beiden Alkylketten sitzen in der Membran und sind senkrecht zur Membranoberfläche ausgerichtet. Obwohl die Rotation der Di-Farbstoffe durch die zwei Alkylketten in der Membran im Vergleich zu anderen Membranfarbstoffen (z. B. Bodipy-PC) leicht behindert wird, ist deren Rotationskorrelationszeit τ_{rot} im ns-Bereich [107, 108]. In fluiden Membranen unterliegt die im Mittel parallel zur Membranoberfläche ausgerichtete Kopfgruppe der Di-Farbstoffe einer starken Taumelbewegung. Die Beschreibung dieser Bewegung wird als *wobbling-in-cone*²-Modell bezeichnet [107]. Der Öffnungswinkel des die Taumelbewegung begrenzten Kegels wird für DiI-C₁₂ mit 54° angegeben und kann als Obergrenze für Di-Farbstoffe mit längeren Alkylketten angesehen werden. Cyaninmoleküle fluoreszieren intensiv und sind sehr photostabil. Die Lebensdauer von Di-Farbstoffen ist in der Lipidmembran deutlich länger als in wässriger Lösung. Das ist mit der in wässriger Lösung stattfindenden Photoisomerization als Konkurrenzprozess zur Fluoreszenz zu erklären. Die Photoisomerization wird in der Membran behindert [108, 109]. Di-Farbstoffe sind nicht toxisch und können deshalb bedenkenlos in-vivo eingesetzt werden [106].

5.1.2 Probenpräparation der GUV

Die Herstellung der fluoreszent markierten GUV erfolgte mit der *electroswelling*³ Methode. Die Vesikel wurden im Rahmen einer Kooperation von Nicky Ehrlich (Universität Kopenhagen) zur Verfügung gestellt. Dabei wurden zwei verschiedene Markerkonzentrationen realisiert. Der Anteil des Farbstoffs wurde für die hochgradig markierte Membran mit 0,5% am Lipidbestand und für die gering markierte Membran mit 0,00005% gewählt. Der zweite Wert entspricht Einzelmolekülniveau, bei dem im Mittel ein Molekül im Fokus detektiert werden kann. Dieser Wert ergibt sich mit der Fläche der Kopfgruppe von DOPC als Hauptbestandteil der Membran ($A_{\text{DOPC}} = 0,71 \text{ nm}^2$) und der fokalen Fläche [110].

Chemikalien

- D-Sorbitol

- Konzentration: 303 mM

- Molekülmasse: 182,17 g/mol

²engl. wobbling-in-cone, deutsch im Kegel eingeschränktes Taumeln

³engl. electroswelling, deutsch Elektroformation

– 2,252 g in 40 ml MilliQ⁴

– Osmolarität: **309 mOsm**

• **PBS⁵ (GIBCO Tabletten)**

– gelöste Tabletten in 500 ml MilliQ (pH = 7,4)

– Konzentration: 150 mM PBS (entspricht 140 mM NaCl, 10 mM PO₄, 3 mM KCl)

– Osmolarität: NaCl = 280 mOsm; PO₄ = 23 mOsm; KCl = 6 mOsm; ⇒ **309 mOsm**

• **Lipide**

– DOPC = 20 g/l

– DOPE-biot. = 1 g/l

– DOPG = 10 g/l

– DiO-C₁₈ = 0,5 g/l (Lipidfarbstoff)

Vesikelvorbereitung für die Elektroformation

Folgende Arbeitsschritte werden benötigt, bevor man mit der Elektroformation der Lipidlösung beginnt.

- Vorbereitung von Sorbitolpuffer
- Säuberung der Hamilton Spritzen vor deren Benutzung (min. 5 x Spülen)
- Vermischung der Lipide in 2 ml Phiolen
- Hinzufügen von Chloroform als Lösungsmittel auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l → 4 mg/ml Lipid
- Schütteln⁶ der Lipidmischung

⁴MilliQ ist zu einem hohen Grad deionisiertes und aufgereinigtes Wasser

⁵engl. phosphate buffered saline, deutsch phosphatgepufferte Salzlösung

⁶engl. vortexing

- Hinzufügen von 20 μl Einzeltropfen oder mehrerer kleiner Tropfen auf ITO⁷-Objektträger (ca. 0,1 μg Lipide auf der Oberfläche)
- Hinzufügen von 350 μl des D-Sorbitols
- Elektroformation mit dem *Vesicle Prep Pro*[®]

Tab. 5.1: Mischungsverhältnis der verwendeten Lipide

	DOPC	DOPE-biot.	DiO-C ₁₈	DOPG	Total
Anteil [%]	79	0,5	0,5 - 0,0005	20	100
Volumen [μl]	77,6	13,8	22,0	39,9	153,3
m [m]	1,553	0,0138	0,011	0,399	1,976

Elektroformation

Die als Elektroformation oder auch *electroswelling* bezeichnete Methode beschreibt die Hydratation von trockenen Lipidfilmen in einem oszillierenden elektrischen Feld. Nach Herstellung einer geeigneten Lipidlösung und Hinzugabe eines Lösungsmittels (meist Chloroform) wird diese auf die Elektroden aufgetragen und im Stickstoffstrom oder unter Vakuum getrocknet und so vom Lösungsmittel befreit. Danach wird die getrocknete Lipidschicht hydratisiert. Im Herstellungsprozess kommt D-Sorbitol zur Hydratation zur Anwendung. D-Sorbitol hat eine höhere Dichte als Wasser und erleichtert damit das Absinken der GUVs bei der Probenpräparation. Des Weiteren besitzt es die gleiche Osmolarität wie der später eingesetzte PBS-Puffer und verhindert so das Anschwellen oder Schrumpfen der Vesikel im Puffer. Zudem ist D-Sorbitol nicht geladen und schirmt dadurch nicht die Ladung der teilweise geladenen Lipidmoleküle ab. Während der Elektroformation können sich so die Lipidschichten leichter voneinander trennen. Ist die Hydratation abgeschlossen, wird die Lipidschicht auf den Elektroden mit einer Wechselspannung zur Bildung von Vesikeln angeregt. Dabei ist die Wahl der optimalen Parameter der Wechselspannung ($U_{AC} < 10\text{ V}$), Frequenz ($\nu < 10\text{ Hz}$), Temperatur und Zeitdauer genauso entscheidend zur Ausbildung von GUVs, wie die Wahl der Lipidzusammensetzung und des Lösungsmittels [111]. Die Temperatur wird entsprechend der Temperatur des Phasenübergangs der Lipide gewählt. Nach ungefähr ein bis zwei Stunden haben sich GUVs ausgeformt.

Für die Herstellung der im Experiment verwendeten Vesikel wurde das *Vesikel Prep Pro* (Nanion Technologies[®]) genutzt. Dies ist ein automatisiertes Gerät für die Herstellung von GUVs mit einem Durchmesser im Bereich von (1 - 30) μm . Die Kammer zur Vesikelformation besteht aus zwei mit ITO beschichteten Deckgläsern (L x B x H: 8,3 x 6 x 1,3 cm), die als Elektroden fungieren. Zur GUV-Herstellung wurde die Standardprozedur des Gerätes verwendet, mit den Parametern: Frequenz $\nu = 5\text{ Hz}$, Spannung $U_{AC} = 3\text{ V}$, Dauer

⁷engl. indium-tin-oxide, deutsch Indium-Zinn-Oxid

$t = 120$ min bei einer Temperatur von $T = 36^\circ\text{C}$. Nach dem abgeschlossenen Erzeugungsprozess werden die Vesikel mittels flüssigem Stickstoff eingefroren, um ihren amorphen Zustand mit großer Lebensdauer zu erhalten [110].

Immobilisierung mit Biotin-Streptavidin

Die hergestellten GUV wurden mit einer Biotin-Streptavidin-Bindung, einer der stärksten nichtkovalenten Bindungen in der Natur [112], nach der von Lohse et al. beschriebenen Methode auf einem Deckglas immobilisiert [113]. Die Deckgläser (Präzisionsdeckgläser, LH24.1, 22×22 mm, $150 \mu\text{m}$, ROTH, Karlsruhe, Deutschland) wurden im Ofen für zwei Stunden bei 500°C gebrannt, um Fluoreszenzkontaminationen zu eliminieren.

Als erster Schritt wurde mit einem Lack (Roti®-Liquid Barrier Marker, ROTH, Karlsruhe, Deutschland) ein Ring auf die Deckgläser aufgebracht, der eine Fläche von ca. $5 \times 5 \text{ mm}^2$ begrenzt. Im zweiten Schritt wurde auf diese so umrandete Fläche eine $20 \mu\text{l}$ BSA-Biotin/BSA-Lösung (1:1) bei einer Konzentration von $1,0 \text{ g/l}$ aufgetragen. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, erfolgten 5 Waschschrte á $10 \mu\text{l}$ mit einem 50 mM Natriumphosphatpuffer. Im dritten Schritt wurde $20 \mu\text{l}$ Streptavidinlösung bei einer Konzentration von $0,025 \text{ g/l}$ auf die kreisförmigen Flächen aufgetragen, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und gewaschen. Schließlich im vierten Schritt wurden $20 \mu\text{l}$ der vorbereiteten Liposomenlösung auf die beschichteten Deckgläser gegeben.

Dafür wurde die bei -20°C gelagerte Liposomenlösung zunächst bei Zimmertemperatur aufgetaut. Die $20 \mu\text{l}$ müssen sehr vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze ($100 \mu\text{l}$) auf die vorbereiteten Deckgläser gegeben werden. Die Probe wird auf den Probenstisch des konfokalen Mikroskops positioniert und zum Schutz vor Verunreinigung und Austrocknung abgedeckt. Nach einer Ruhephase von 10 Minuten wurden die ersten Übersichtsaufnahmen (xyz -Scans) durchgeführt.

5.1.3 Aufnahme orientierungsaufgelöster Vesikelscans

Die Aufnahme der SCOM Bilder erfolgte anhand des in Kapitel 3.3 beschriebenen konfokalen Mikroskops, in das ein WI Objektiv eingesetzt wurde. Die Lipidvesikel wurden mit einem Schichtbildverfahren erfasst. Dafür wurde in Abständen von $\Delta z = 1 \mu\text{m}$ ein x - y -Scanbild von $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ mit einer Auflösung von 128×128 Pixel bei einer Integrationszeit von 1 ms je Pixel aufgenommen. Die Anregung der fluoreszenten Moleküle erfolgte mit zirkular polarisiertem Licht bei einer Intensität von 1 kW/cm^2 . In Abhängigkeit der Größe des gescannten GUV können damit im Schnitt 15 Schichtaufnahmen pro Vesikel erfasst werden. Die 3D Orientierung der fluoreszenten Moleküle in der Lipidmembran wird mittels der drei Intensitätskanäle $I_{0^\circ, c}$, $I_{90^\circ, c}$ und I_r (siehe Abbildung 2.5) anhand der Gleichungen 2.46 und 2.47 berechnet.

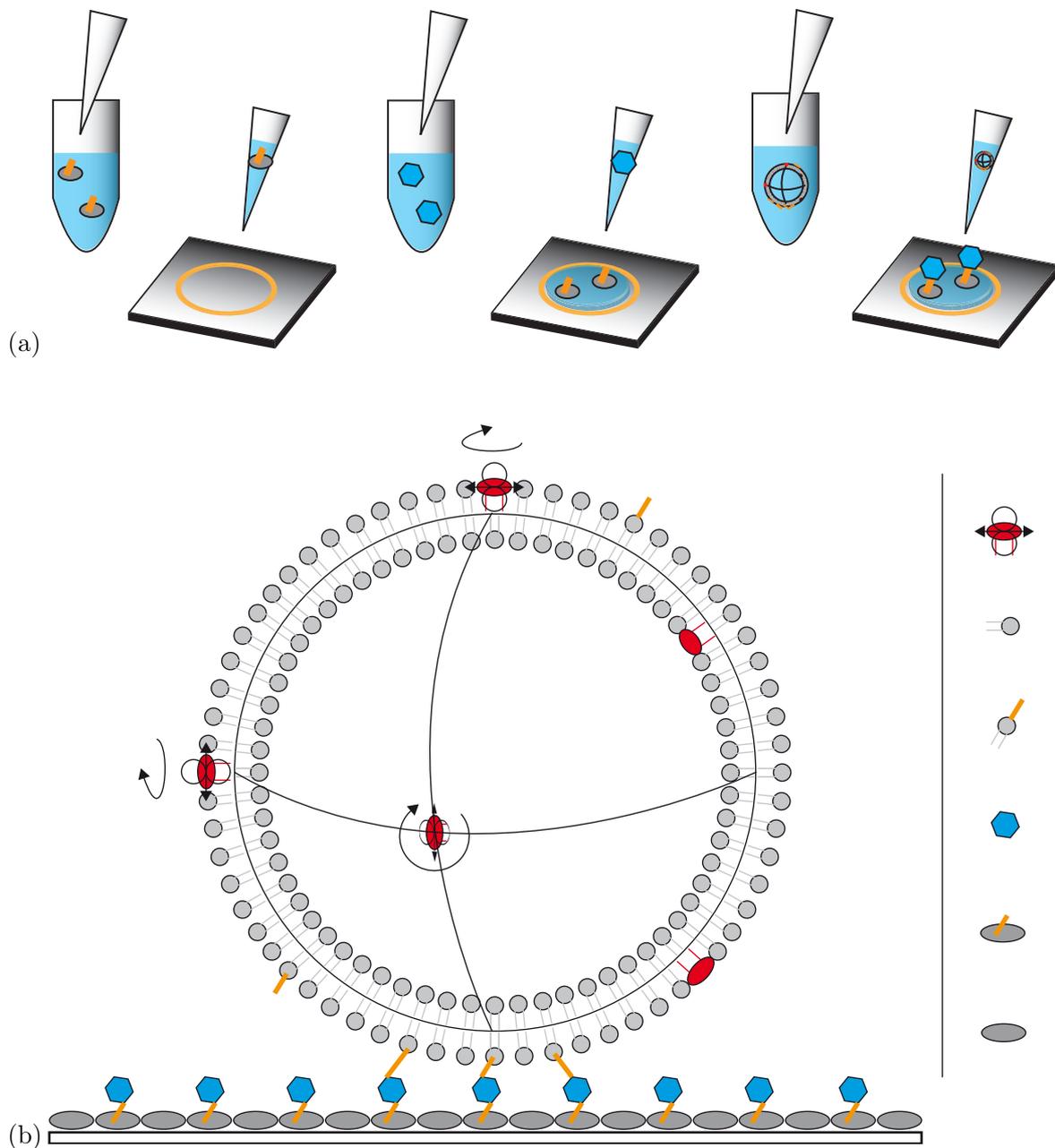


Abb. 5.5: (a) Schematische Darstellung der GUV-Präparation (siehe Text). (b) Übersichtsschema Biotin-Streptavidin-immobilisierter GUV auf einem entsprechend beschichteten Deckglas sowie aller beteiligten Moleküle (von oben nach unten) Lipidfarbstoff DiO und angenommenes Dipolmoment, Lipid DOPG/DOPC, Lipid DOPE-Biotin, Streptavidin, Protein BSA-Biotin, Protein BSA.

5.1.4 Simulationen

Die Simulation vom Typ E erfolgt gemäß den Ausführungen in Kapitel 3.2.2. Die mittlere detektierbare Intensität I_D wird durch das Experiment vorgegeben und $I_{\text{tot,em}}$ entsprechend angepasst.

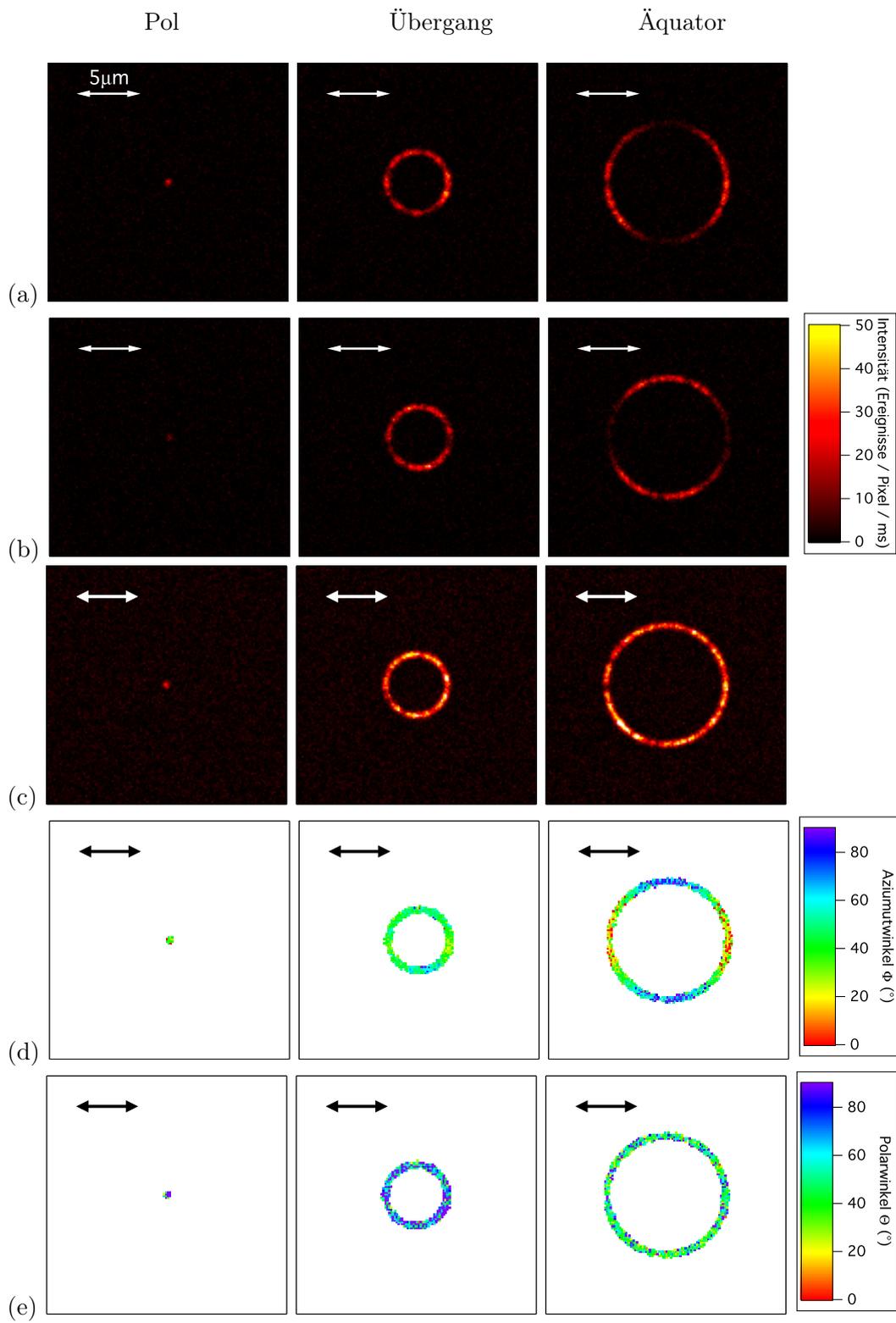
5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Simulation fluoreszent markierter GUV

Simulationen stellen einen exzellenten Ansatz dafür dar, experimentelle Ergebnisse mit Modellvorhersagen zu vergleichen. Sie sind insbesondere dann von großem Interesse, wenn es an anderen Vergleichsmethoden fehlt. Dies ist bei der Bestimmung der 3D Orientierung der hier untersuchten, fluoreszent markierten Lipidvesikel der Fall. Ausgehend von der Struktur der Lipidmembran und dem bekannten Lipidfarbstoff kann ein Modell für die Inkorporation des Farbstoffs in die Membran abgeleitet werden. In diesem Modell ist der Di-Farbstoff mit seinen apolaren Resten in der Membran verankert. Die polare und gleichzeitig fluoreszente Kopfgruppe befindet sich entsprechend auf der polaren Seite der Lipidschicht. Aus Symmetriegründen ist es dabei unwichtig, ob sich der Farbstoff auf der Innen- oder Außenseite der Doppelmembran befindet. Das Dipolmoment des Di-Farbstoffs liegt entlang der Kopfgruppe des Moleküls [31]. Um das Modell möglichst einfach zu halten wird die Taumelbewegung der Kopfgruppe in der Membran vernachlässigt. Damit liegt der Dipol stets tangential zur Oberfläche des Lipidvesikels. Um der schnellen Rotation der Farbstoffmoleküle Rechnung zu tragen, wird eine große Zahl von Molekülen simuliert, da durch den Mittelwert des Ensembles die Mittelung durch die Rotation simuliert werden kann. Damit ergibt sich ein vollständiges Bild für die Orientierungsparameter Φ und Θ der Membranfarbstoffe. Die Simulationsergebnisse sind in Abbildung 5.6 und 5.7 dargestellt und sollen im Folgenden diskutiert werden.

Aufgrund der Kugelform des Vesikels ist die Beschreibung der Vesikeloberfläche in geographischen Koordinaten mit sich rechtwinklig schneidenden Längen- und Breitenkreisen sinnvoll. Ausgezeichnete Regionen des Vesikels sind der Äquator, der Pol und eine Übergangsregion. Die Breitengrade werden dabei vom Äquator aus gezählt, die Pole liegen bei

Abb. 5.6: (auf der folgenden Seite) Ergebnisse der Simulation vom Typ E für die drei ausgezeichneten Vesikelebenen Pol (1. Spalte), Übergangsbereich (2. Spalte) und Äquator (3. Spalte). Aus den drei simulierten Intensitätskanälen (a) $I_{0^\circ,c}$, (b) $I_{90^\circ,c}$ und (c) I_r wird die Orientierung der simulierten Moleküle für (d) den azimutalen Winkel Φ und (e) den polaren Winkel Θ berechnet und zum Vergleich mit experimentellen Ergebnissen herangezogen.



90° Nord bzw. Süd, die Längengrade werden von einem willkürlichen Nullmeridian bis 360° gezählt. Schaut man von oben auf das Vesikel so soll die Ostrichtung 0°, die Nordrichtung 90° usw. entsprechen. In der Äquatorialebene ist die Rotationsebene des Fluorophors stets parallel zur z -Achse. Das heißt, der polare Winkel Θ kann jeden beliebigen Wert annehmen. Er ist gleich verteilt. Betrachtet man jedoch viele Moleküle gleichzeitig oder ist die Rotation des Fluorophors schneller als die Beobachtungszeit, so erhält man den Mittelwert der Verteilung $\langle \Theta \rangle = 45^\circ$. Aufgrund der Lage der Rotationsebene ist der azimutale Winkel Φ von der Position des Fluorophors auf dem Äquator abhängig. Befindet sich der Fluorophor bei 0° auf dem Äquator, so ist das Licht des Fluorophors s- polarisiert; es gilt also $\Phi = 0^\circ$. Bewegt man sich auf dem Äquator kontinuierlich entgegen dem Uhrzeigersinn, so wird der Anteil p- polarisierten Lichtes immer größer. Bei 90° ist das Licht ausschließlich p- polarisiert; es gilt also $\Phi = 90^\circ$. Aus Symmetriegründen erhält man bei 180° wieder s- polarisiertes und entsprechend bei 270° wieder p- polarisiertes Licht. Dieses Verhalten ist in Abbildung 5.6 graphisch erfasst. Entsprechend des Azimutwinkels sind die Bereiche des Äquators in den beiden Polarisationskanälen $I_{0^\circ,c}$ und $I_{90^\circ,c}$ in Abbildung 5.6 (a) und (b) hell oder dunkel. Das Falschfarbenbild des Azimutwinkels in Abbildung 5.6 (d) zeigt das beschriebene Verhalten anhand der roten Färbung in der vertikalen und der blauen Färbung in der horizontalen Schnittachse. Bereiche dazwischen nehmen alle Werte der gewählten Falschfarbenskala an. Der Polarwinkel in Abbildung 5.6 (d) zeigt im Falschfarbenbild maßgeblich den erwarteten Mittelwert der Verteilung bei 45°. Die Pixel anderer Farbe sind rauschbedingt und ein wesentliches Merkmal der Dipolnatur.

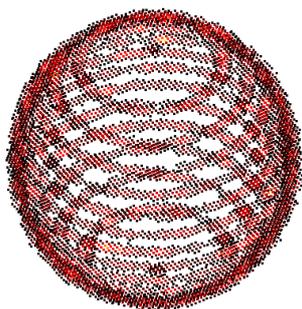
In der Polregion ist die Rotationsebene parallel zur x - y -Ebene. Damit ist der polare Winkel unabhängig von der Rotation stets $\Theta = 90^\circ$. Der azimutale Winkel kann jeden beliebigen Wert annehmen. Ähnlich der Argumentation für den Polarwinkel in der Äquatorialebene, ist im Falle hoher Konzentration oder schneller Rotation aber nur der Mittelwert $\langle \Phi \rangle = 45^\circ$ messbar (vgl. Abbildung 5.6 (d,e) 1. Spalte).

Wie verhält sich der Übergangsbereich? Ausgehend von der Projektion des Dipolmomentes auf die x - y -Ebene und damit den azimutalen Winkel Φ nimmt die Depolarisation mit zunehmenden Breitengrad zu. Dies ist in Abbildung 5.6 (d) in der zweiten Spalte sehr gut sichtbar. Anders als in der Äquatorialebene kann man in der Ebene, die dem 60. Breitengrad entspricht, weder in den Intensitätsbildern noch im Winkelbild eine ausgezeichnete Region für s- bzw. p- polarisiertes Licht erkennen. Die Depolarisation führt zu den gleichen Effekten wie am Pol für den Azimutwinkel und am Äquator für den Polarwinkel. Der Übergang für den Polarwinkel ist abhängig vom jeweiligen Breitengrad. Da der Wertebereich des Polarwinkels nicht ausgeschöpft wird $\Theta = [45^\circ, 90^\circ]$, ist der Kontrast des Übergangs wesentlich schlechter als für den Azimutwinkel.

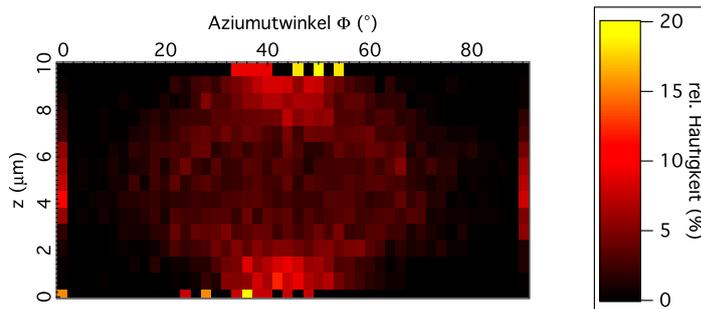
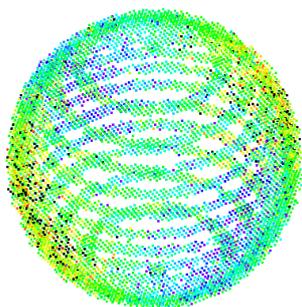
Ausgehend von den simulierten Schichtbildern kann eine 3D Projektion des Vesikels rekonstruiert werden (siehe Abbildung 5.7). Dafür werden die Schichten entsprechend ihrer z -Koordinate übereinander angeordnet und nur die Intensitätswerte und deren dazugehörige Winkelwerte dargestellt, die größer als ein Schwellwert sind. Der Schwellwert wird mit 10% der Maximalintensität vorgegeben. Zur quantitativen Analyse werden die Winkelwerte für die einzelnen Ebenen gemäß ihrer relativen Häufigkeit histogrammiert und neben

den 3D Projektionen dargestellt. Prinzipiell zeigt sich für die Verteilung des Azimutwinkels und des Polarwinkels das oben beschriebene Verhalten. Der Äquatorregion entspricht $z = 4\text{-}6\ \mu\text{m}$, dem Übergangsbereich $z = 1\text{-}4\ \mu\text{m}$ bzw. $6\text{-}9\ \mu\text{m}$ sowie der Polregion $z = 0\ \mu\text{m}$ bzw. $10\ \mu\text{m}$. Für die Φ -Werte ist der Übergang von der Gleichverteilung am Äquator hin zum Mittelwert der Verteilung am Pol sehr gut nachvollziehbar. Für die Θ -Werte zeigt sich die Verschiebung der Verteilung um $\langle\Theta\rangle = 45^\circ$ am Äquator hin zu $\Theta = 90^\circ$ am Pol. Für beide Fälle führt das Schrotrauschen zu der auffälligen Depopulation der Randgebiete, die

I_D



Φ



Θ

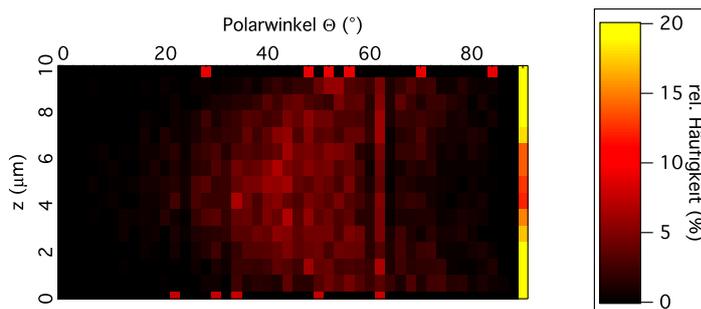
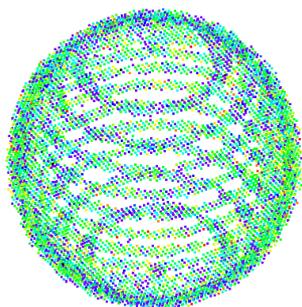


Abb. 5.7: Zusammenfassung der Schichtbildaufnahmen: Auf der linken Seite sind die aus den simulierten Schichtaufnahmen der Vesikel rekonstruierten drei-dimensionalen Projektionen für die detektierbare Intensität I_D sowie der zu erwartenden Orientierung in Φ und Θ dargestellt. Neben den 3D Rekonstruktionen für Φ und Θ sind entsprechende Falschfarbender für die relativen Häufigkeitsverteilungen der Winkel in den jeweiligen z -Ebenen dargestellt.

sich als schwarzer Hintergrund darstellen. Die Korrektur ungültiger Intensitätsverhältnisse aufgrund des Schrotrauschens führt zu der bekannten Überhöhung an den Grenzen der Winkelbereiche.

5.2.2 3D Orientierung hochgradig fluoreszent markierter GUV

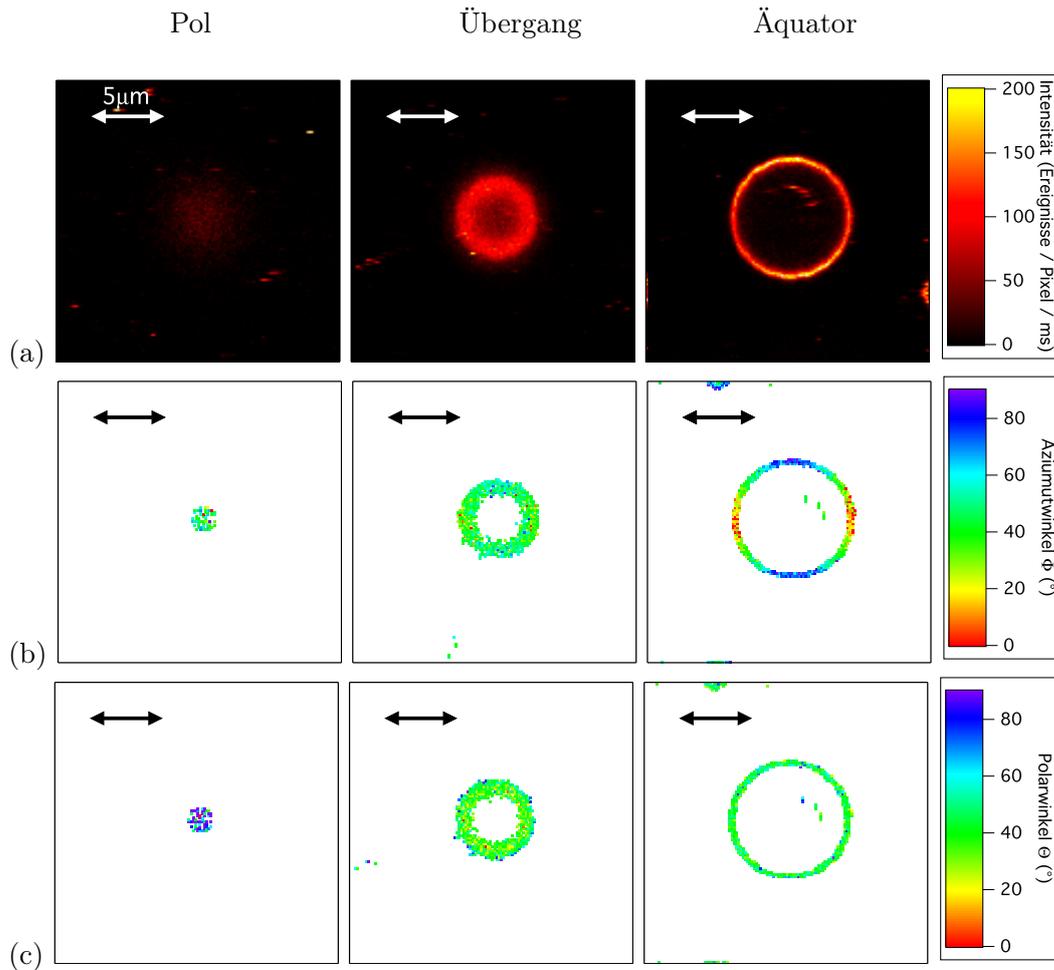


Abb. 5.8: Darstellung der experimentell erhaltenen SCOM Bilder der drei ausgezeichnete Vesikelebenen Pol (1. Spalte), Übergangsbereich (2. Spalte) und Äquator (3. Spalte) hochgradig fluoreszent markierter Vesikel. In Zeile (a) sind die Summenbilder der drei Intensitätskanäle $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r dargestellt aus denen (b) der azimutale Winkel Φ und (c) der polare Winkel Θ berechnet wird.

Für das im vorangegangenen Kapitel vorgestellte Modell der Farbstoffinkooperation in das Lipidvesikel soll nun der Vergleich mit experimentell erhaltenen Daten erfolgen. Dafür werden zunächst hochgradig fluoreszenzmarkierte Vesikel untersucht. Hochgradig heißt, dass der Anteil an Farbstoff mit 0,5% am Lipidbestand des Vesikels deutlich über der

Einzelmolekülkonzentration liegt. Die Ergebnisse der aufgenommenen Schichtbilder sind für die drei ausgezeichneten Ebenen in Abbildung 5.8 (a-c) dargestellt.

Vergleicht man die Intensitätsbilder in Abbildung 5.8 (a) mit denen der Simulation, so kann zumindest für den Übergangsbereich keine Übereinstimmung festgestellt werden. Die experimentell gewonnenen Bilder weisen eine unscharfe Begrenzung der farbstoffmarkierten Lipidmembran auf. Da die Ausdehnung des Laserfokus in z -Richtung deutlich größer als

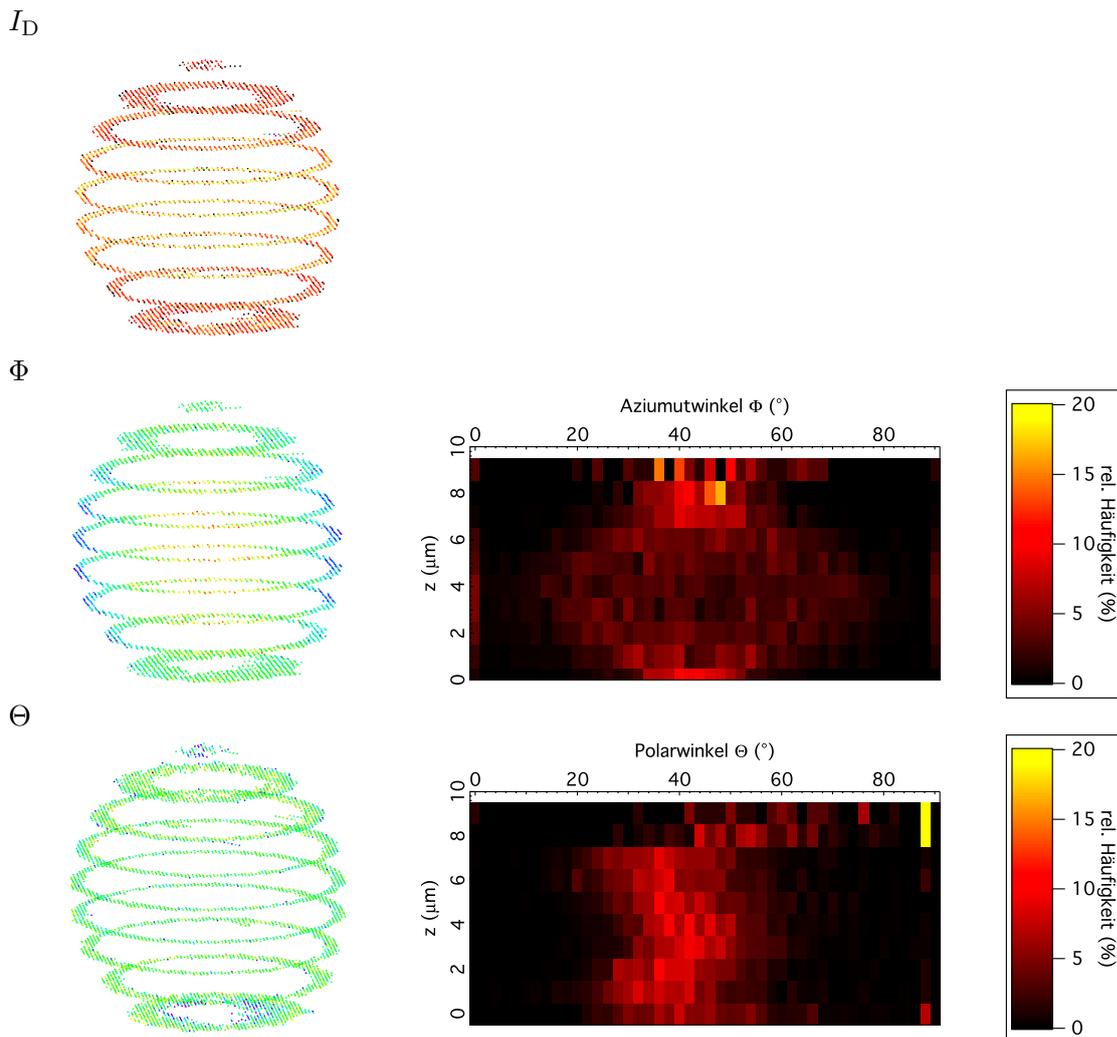


Abb. 5.9: Zusammenfassung der Schichtbildaufnahmen für hochgradig fluoreszent markierte Vesikel: Auf der linken Seite sind die aus den Schichtaufnahmen rekonstruierten drei-dimensionalen Projektionen für die detektierbare Intensität I_D sowie der zu erwartenden Orientierung in Φ und Θ dargestellt. Neben den 3D Rekonstruktionen für Φ und Θ sind entsprechende Falschfarbenbilder für die relativen Häufigkeitsverteilungen der Winkel in den jeweiligen z -Ebenen dargestellt.

in lateraler Richtung ist ($z_0 = 4 \cdot w_0$), kann die unscharfe Begrenzung der Vesikelmembran mit der Detektion von Fluoreszenzlicht außerhalb dieser Ebene begründet werden. Der Einfluss benachbarter Ebenen aufgrund der Ausdehnung des Laserfokus in z -Richtung ist in der Simulation nicht mit einbezogen worden. Trotz dieser Abweichung stimmen die experimentell ermittelten Werte für den azimutalen Winkel sehr gut mit der Simulation überein. Dies ist sowohl an den Schichtbildaufnahmen der drei ausgezeichneten Regionen als auch in der Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung in Abbildung 5.9 ersichtlich. Insbesondere die im Modell erwartete Depolarisation im Übergangsbereich kann experimentell bestätigt werden und stützt die Annahmen des Modells. Da die Bestimmung des Azimutwinkels maßgeblich durch die Polarisation P bestimmt wird, ist davon auszugehen, dass die Polarisationsmessung nur gering durch Beiträge anderer Ebenen beeinflusst wird. Dies gilt nicht für den Polarwinkel. Vergleicht man das Bild des Polarwinkels in der Falschfarbendarstellung aus Abbildung 5.8 (c) mit der Simulation in Abbildung 5.8 (e), so sind die experimentellen Werte im Vergleich zur Simulation deutlich zu kleinere Werten verschoben. Der aus der Simulation erwartete Übergang vom Äquator zum Pol kann damit experimentell nicht bestätigt werden.

Grundlage der Winkelberechnung der von Hohlbein u. Hübner eingeführten Methode ist die in Kapitel 2.2.2 vorgestellte theoretische Arbeit von Fourkas. Dessen Modell basiert auf zwei Grundannahmen. Zum einen wird in diesem Modell davon ausgegangen, dass der Dipol, sprich das fluoreszente Molekül, sich in unmittelbarer Nähe des fokalen Punktes befindet. Zum anderen erfolgt die Herleitung anhand der Abstrahlcharakteristik genau eines Dipols, also von einem Molekül. Experimentell werden diese Bedingungen in dem hier vorgestellten Fall nicht eingehalten. Durch den hohen Markierungsgrad der Membran überlappen sich die einzelnen Fluorophore in ihrer abgestrahlten Fluoreszenzintensität. Dies führt in der Berechnung zu Winkelwerten, die nicht der Orientierung des Dipols entsprechen [43]. Des Weiteren muss davon ausgegangen werden, dass durch die Ausdehnung des Fokus, dem hohen Markierungsgrad der Membran und der Diffusion der Marker in der Lipidmembran das Modell des Dipols im fokalen Punkt nicht erfüllt ist. Im weiteren Verlauf sollen diese Effekte mit dem Begriff *out-of-focus* Licht zusammengefasst werden.

5.2.3 3D Orientierung gering fluoreszent markierter GUV

Ausgehend von den Beobachtungen hochgradig markierter Lipidvesikel soll nun der Vergleich mit gering markierten GUV erfolgen. Gering markiert heißt, dass der Anteil des Fluoreszenzfarbstoffes am Lipidbestand mit 0.00005% auf Einzelmolekülniveau ist.

Betrachtet man die Intensitätsbilder in Abbildung 5.10 (a) so zeigt sich der geringe Labelgrad wie erwartet in der deutlich geringeren mittleren Intensität. Insbesondere ist die Abbildung der Membran durch einzelne Spots ausgezeichnet. Anders als bei den hochgradig markierten Vesikeln, sind jedoch diverse artifizielle Strukturen zu erkennen, die durch die Anlagerung weiterer Vesikel oder von Membranfragmenten hervorgerufen werden. Durch den geringen Labelgrad sind diese Vesikel im Vergleich deutlich geringer geladen und nei-

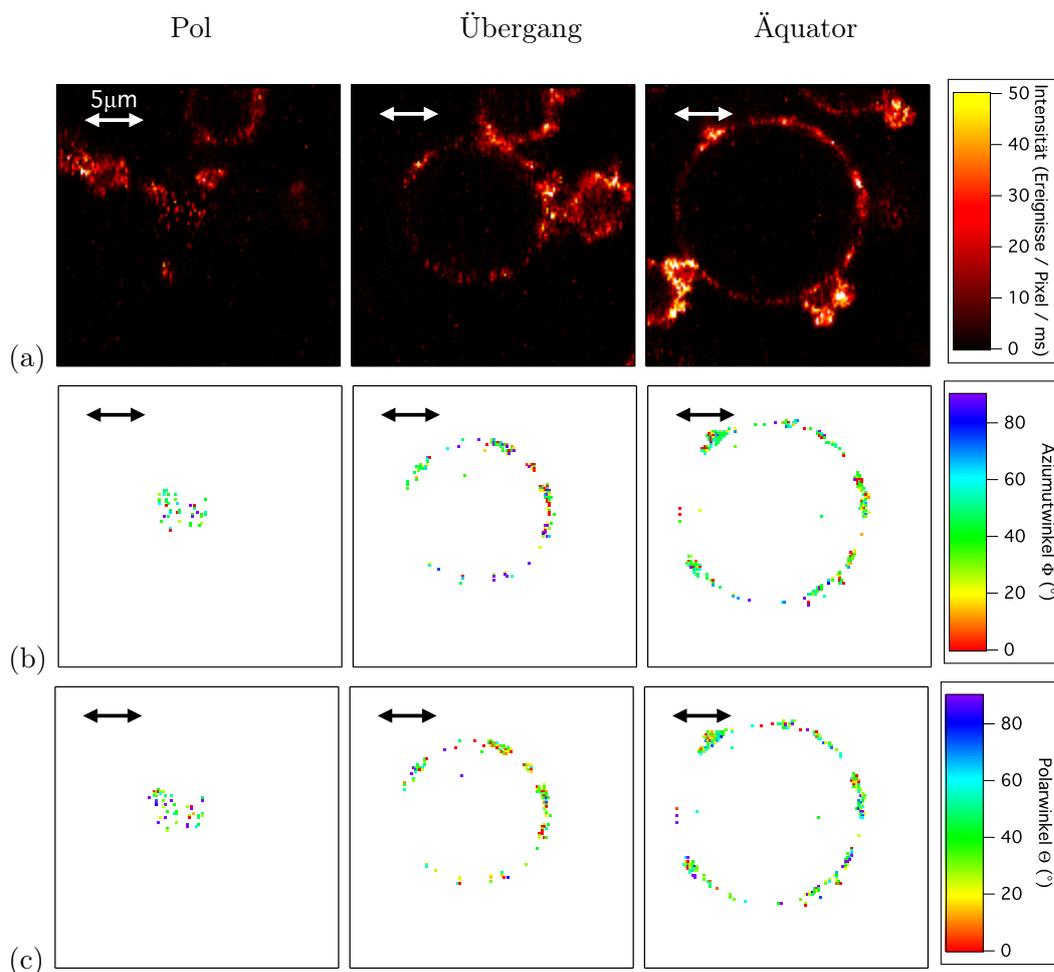


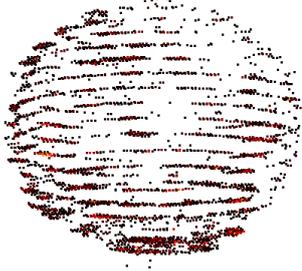
Abb. 5.10: Darstellung der experimentell erhaltenen $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ SCOM Bilder mit einer Auflösung von 128×128 Pixel der drei ausgezeichnete Vesikelebenen Pol (1. Spalte), Übergangsbereich (2. Spalte) und Äquator (3. Spalte) gering fluoreszent markierter Vesikel. In Zeile (a) sind die Summenbilder der drei Intensitätskanäle $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r dargestellt aus denen (b) der azimutale Winkel Φ und (c) der polare Winkel Θ berechnet wird.

gen daher zu einer verstärkten Aggregation. Durch eine geeignete Wahl des Bereichs für die Berechnung der Winkel kann der Einfluss der Artefakte auf die Auswertung jedoch verringert werden. Vergleicht man die Winkelbilder mit denen der Simulation, so zeichnen sich diese durch eine starke Fragmentierung aufgrund des geringen Labelgrades aus.

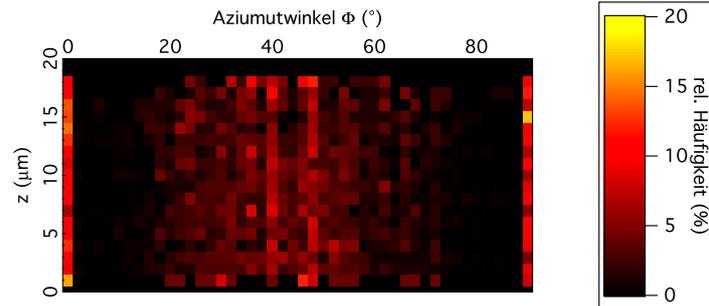
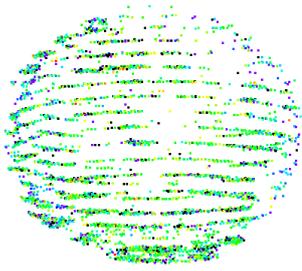
Betrachtet man dazu das in Abbildung 5.10 (b) in der ersten Spalte dargestellte Bild des Azimutwinkels am Pol, so ist auch hier der bei hoher Markerkonzentration beobachteten Mittelungseffekt noch zum Teil sichtbar. In ähnlicher Weise gilt dies auch für die Beobachtung des Polarwinkels am Äquator. Beachtet man das Auflösungsvermögen der in Abbildung 5.10 aufgenommen SCOM-Bilder und vergleicht es mit dem Auflösungsvermögen des verwendeten konfokalen Mikroskops (siehe Anhang A.2.1), so entspricht jeder Rasterpunkt

gerade der Ausdehnung des Laserfokus. Aufgrund der Auflösung und in Anbetracht der geringen Konzentration des fluoreszenten Farbstoffs entspricht damit theoretisch jedes Pixel des Bildes gerade einem Molekül. Die vorher diskutierten Mittellungseffekte aufgrund der gleichzeitigen Detektion mehrerer Moleküle können daher nur noch bedingt als Erklärung dienen. Die Mittelwerte am Pol $\langle \Phi \rangle = 45^\circ$ bzw. am Äquator $\langle \Theta \rangle = 45^\circ$ ergeben sich hier aufgrund der schnelle Rotation der einzelnen Farbstoffmoleküle in der Membran. Bei einer Integrationszeit von 1 ms und einer Rotationskorrelationszeit τ_{rot} im ns-Bereich kann

I_D



Φ



Θ

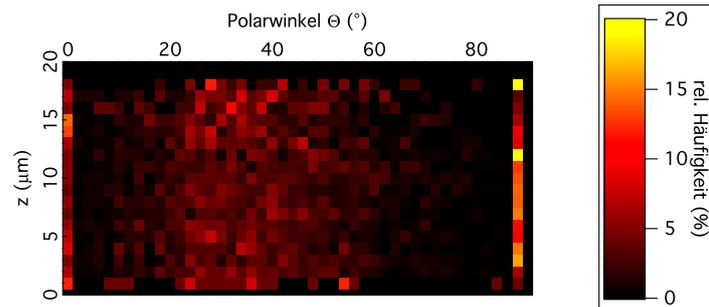
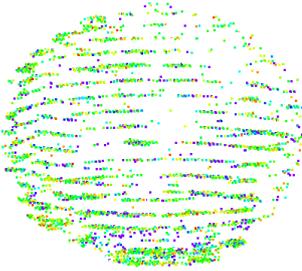


Abb. 5.11: Zusammenfassung der Schichtbildaufnahmen für gering fluoreszent markierte Vesikel: Auf der linken Seite sind die aus den Schichtaufnahmen rekonstruierten drei-dimensionalen Projektionen für die detektierbare Intensität I_D sowie der zu erwartenden Orientierung in Φ und Θ dargestellt. Neben den 3D Rekonstruktionen für Φ und Θ sind entsprechende Falschfarbenbilder für die relativen Häufigkeitsverteilungen der Winkel in den jeweiligen z -Ebenen dargestellt.

die Orientierung des Moleküls in der Rotationsebene nicht mehr aufgelöst werden und es kommt zu den beobachteten Mittelwerten. Die Heterogenität in den Falschfarbenbildern wird allein durch den Einfluss des Schrotrauschens aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität verursacht.

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilungen der Winkel Φ und Θ in Abbildung 5.9, zeigt sich, dass die in der Simulation erhaltenen Verteilungen nicht vollständig mit den experimentellen Beobachtungen übereinstimmen. Für den Azimutwinkel gilt dies vor allem im Äquatorbereich. Die in der Simulation beobachtete Gleichverteilung in Φ wird durch den Hintergrund und das Schrotrauschen bei der geringen Fluoreszenzintensität beeinflusst. Dadurch nähert sich die Winkelverteilung dem Mittelwert bei $\langle\Phi\rangle = 45^\circ$ an (vgl. Abbildung 2.8 [8]). Die in der Simulation erwartete Verschiebung der Verteilung des Polarwinkels von $\langle\Theta\rangle = 45^\circ$ am Äquator zu $\Theta = 90^\circ$ am Pol ist auch im Einzelmolekülexperiment nicht beobachtbar. Da der Einfluss mehrere Fluorophore auf die Bestimmung der Orientierung dank der niedrigen Konzentration vernachlässigbar ist, kann diese Diskrepanz nur mit dem vorher beschriebenen *out-of-focus* Licht erklärt werden, das sowohl durch die laterale Diffusion der Farbstoffe, dem Taumeln der Kopfgruppe des Farbstoffes als auch einer Bewegung der Membran in z -Richtung verursacht werden kann.

5.2.4 Korrelationsanalyse

Abschließend soll die durch die Einzelphotonendetektion bereitgestellte Zeitauflösung der Fluoreszenzdaten genutzt werden. Dafür wurden sowohl am Pol als auch am Äquator der gering markierten Lipidvesikel Einzelphotonenzeitspuren der drei Intensitätskanäle aufgenommen. Um trotz des Bleichens der Farbstoffe in der Membran entsprechend lange Zeitspuren zu ermöglichen, wurde dafür Vesikel mit einer leicht höheren Farbstoffkonzentration von 0,0005% benutzt. In Abbildung 4.8 sind dafür die Kreuzkorrelationen der beiden Polarisationskanäle $I_{0^\circ,c}$ und $I_{90^\circ,c}$ sowie zwischen dem Kanal der Kranzregion I_r und der Summe der beiden Kanäle für das Zentrum I_c der beiden Vesikelregionen dargestellt. Für beide Regionen ist sowohl für die Korrelation der Polarisationskanäle als auch für die Korrelation der Inklinationskanäle ein korreliertes Verhalten erkennbar. Um neben qualitativer auch quantitative Aussagen treffen zu können, wird die Kreuzkorrelationskurve der Inklinationskanäle mit den in Kapitel 2.3.1 vorgestellten Modellen für die 1D, 2D und 3D Diffusion gemäß der Gleichungen 2.51 - 2.53 angepasst. Da sich die angepassten Kurven nur geringfügig voneinander unterscheiden, sind zum Vergleich der Regressionen die einzelnen Residuen dargestellt. Je geringer die Abweichung des gewählten Modells von der Korrelationskurve, desto kleiner sind auch die Residuen. Für die Diffusion der Farbstoffmoleküle am Vesikeläquator zeigt das 1D Modell die geringsten Abweichungen. Die Diffusion der Farbstoffe in der Membran unterliegt jedoch einer 2D Diffusion. Die Abweichung zwischen dem zunächst erwarteten und experimentell bestimmten Verhalten kann mit der Form des Laserfokus erklärt werden. Die Ausdehnung des Laserfokus ist in z -Richtung deutlich größer als in seiner lateralen Richtung. Damit trägt die Diffusion entlang der x -Richtung maßgeblich zum korrelierten Anteil bei und ist somit bestimmend für das Diffusionsmodell. Die

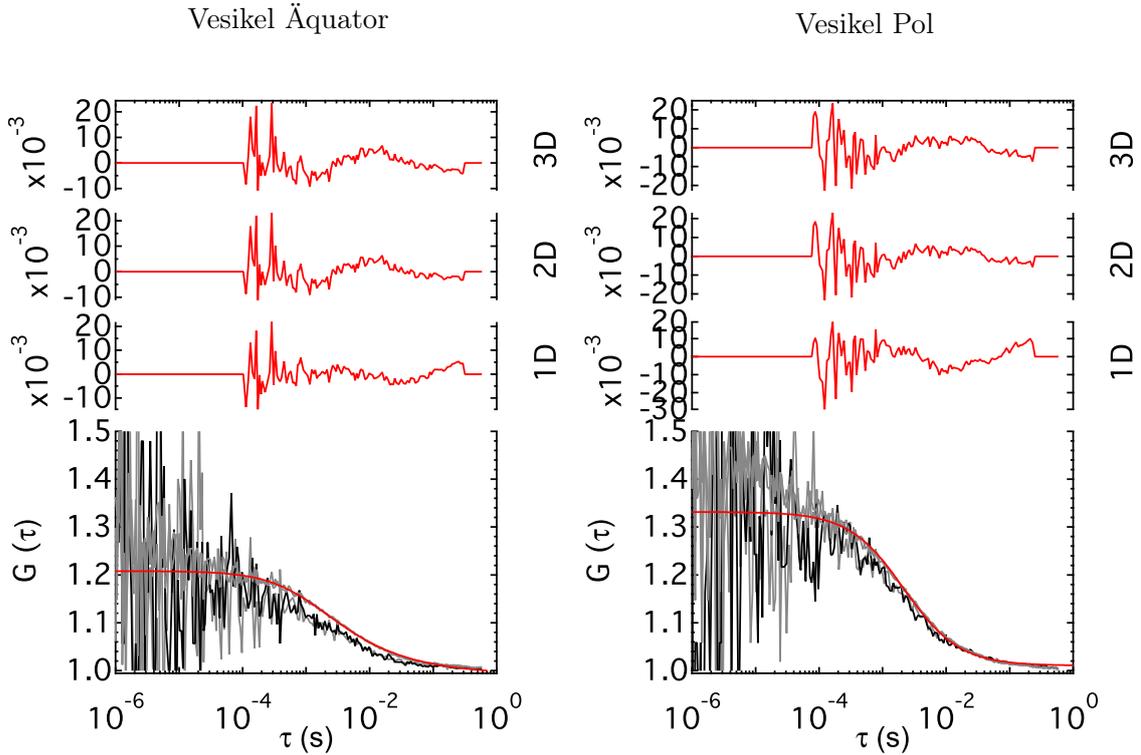


Abb. 5.12: Ergebnisse für die Korrelation zweier ausgezeichneten Regionen der Vesikeloberfläche - Äquator und Pol. Die Graphik zeigt die Kreuzkorrelation der beiden Polarisationsrichtungen für das Zentrum $I_{0^\circ,c}$ und $I_{90^\circ,c}$ (grau) sowie zwischen dem Kanal der Kranzregion I_r und des Zentrums I_c (schwarz). Neben den Korrelationen an sich, zeigt die Graphik die Residuen für die Anpassung der Regressionsfunktionen für die 1D, 2D und 3D Diffusion in der Membran.

Diffusionszeit der Lipidfarbstoffe in der Äquatorregion wird zu $\tau_D^{1D} = (1 \pm 0,05)$ ms sowie $\tau_D^{2D/3D} = (3 \pm 0,05)$ ms bestimmt. Für die Diffusion am Pol zeigt das 2D Modell die geringsten Abweichungen. Die Diffusionszeit beträgt hier $\tau_D^{1D} = (0,7 \pm 0,05)$ ms sowie $\tau_D^{2D/3D} = (2,1 \pm 0,05)$ ms. Das 2D und 3D Modell für die Diffusion liefert jeweils den gleichen Wert für die Diffusionszeit. Dies ist damit zu begründen, dass der Anteil der Diffusion in lateraler Richtung das Modell für die 3D Diffusion maßgeblich bestimmt. Fehlt die 3. Komponente der Diffusion, so geht das 3D Modell quasi in das 2D Modell über. Fasst man die Ergebnisse zusammen so erhält man für die 2D Diffusion am Pol einen Diffusionskoeffizienten von $D = (5,7 \pm 0,1) 10^{-8} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Dieser Wert stimmt gut mit Literaturangaben für Di-Farbstoffe in fluiden Lipidmembranen überein [109, 114–116].

Das Rotationsverhalten kann in der Korrelation nicht nachgewiesen werden. Die Zeitauflösung der Korrelationsfunktion ist durch das minimale Zeitinkrement der ttr-Elektronik bestimmt und mit $\Delta t = 0,1 \mu\text{s}$ zu gering, um das Rotationsverhalten im ns-Bereich untersuchen zu können [107, 108, 117].

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurden GUV und die Inkorporation von Fluorophoren in deren Doppel-lipidmembran untersucht. Dafür wurde anhand der Vesikelform, der Farbstoffinkorporation und den Eigenschaften des DiO-Farbstoffs ein Modell für die 3D Orientierung der Farbstoffe in verschiedenen Regionen der Kugeloberfläche des Vesikels entwickelt.

Anhand des Modells konnte eine Simulation für die Orientierung der Farbstoffe auf der Vesikeloberfläche durchgeführt werden. Diese diente als Grundlage für den Vergleich des Modells mit experimentell erhaltenen Daten für zwei Markerkonzentrationen der Lipidmembran.

Für die hochgradig markierten GUV konnte eine sehr gute Übereinstimmung der azimutalen Komponente zwischen Experiment und Simulation festgestellt werden. Die im Experiment bestimmte polare Komponente stimmt im Rahmen der Unsicherheit des Modells sowohl in der Äquator- als auch der Polregion sehr gut mit der Simulation überein. Lediglich für den Übergangsbereich stimmt das experimentelle Ergebnis nicht mit dem der Simulation überein. Da durch den hohen Labelgrad und der Diffusion des Farbstoffs in der Membran die von Fourkas [5] gewählten Randbedingungen für die Herleitung der Theorie zur Bestimmung der 3D Orientierung nur zum Teil eingehalten werden können, wurde das Experiment mit einem Labelgrad auf Einzelmolekülniveau wiederholt.

Durch den geringen Labelgrad konnten die zuvor beobachteten Mittelungseffekte, die durch die gleichzeitige Beobachtung von mehr als einem Molekül im Fokus verursacht werden [43], vernachlässigt werden. Trotzdem konnte insbesondere für den Polarwinkel keine Übereinstimmung mit der Simulation und damit dem vorher aufgestellten Modell erzielt werden. Durch die Membrandiffusion ist die Position des Fluorophors nicht auf die unmittelbare Umgebung des fokalen Punktes beschränkt. Da somit eine zentrale Forderung der Theorie nach Fourkas nicht erfüllt ist, ist ein Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit der Simulation nur bedingt möglich. Ein Ziel weiterführender Arbeiten muss es daher sein, sowohl die Diffusion in die Simulation zu integrieren, als auch die Theorie der intensitätsbasierten Bestimmung der 3D Orientierung auf beliebige Dipolpositionen zu erweitern.

Mithilfe der Korrelationsanalyse konnte die Diffusion der Farbstoffe auf der Lipidoberfläche untersucht werden. Die experimentell erhaltenen Diffusionskoeffizienten stimmen gut mit Literaturwerten überein [116]. Die Farbstoffrotation kann auf der untersuchten Zeitskala nicht nachgewiesen werden. In weiterführenden Experimenten kann die Rotation der Farbstoffe in der Membran entweder durch Anisotropieexperimente oder durch Korrelationsanalyse auf der Basis von ttr-Messungen mit einer höherer Zeitaufösung untersucht werden [66].

6 Zusammenfassung

Das elektronische System eines Moleküls bestimmt den Übergangsdipolmoment und damit die charakteristischen Parameter der Fluoreszenz. Jede Änderung dieses Systems, sowohl von außen induziert als auch durch das Molekül selbst verursacht, spiegelt sich schließlich in einer Änderung der Parameter wieder. Anhand der Detektion der Fluoreszenz konnte so das Verhalten einzelner Moleküle, z. B. im Fall des PP adsorbiert an eine amorphe SiO₂- Oberfläche oder die Orientierung und deren Dynamik in fluoreszenzmarkierten GUVs, untersucht werden.

Die 3D Orientierung des Dipols ist besonders in anisotropen Umgebungen interessant. Dafür wurde in dieser Arbeit die Theorie um den Einfluss einer Grenzfläche auf die Abstrahlcharakteristik des Dipols erweitert. Dies ermöglicht die Berechnung des azimutalen Winkels Φ und des polaren Winkels Θ aus den Intensitätskanälen in Abhängigkeit vom Abstand des Dipols zur Grenzfläche zwischen zwei beliebigen Medien bekannten Brechungsindizes.

Anhand von MC Simulationen wurde das Auflösungsvermögen der Methode hinsichtlich der Anregungswahrscheinlichkeit des Dipols in Abhängigkeit seines Polarwinkels untersucht. Die Aussagen von Hohlbein u. Hübner konnten dabei bestätigt werden. Insbesondere ist das Kriterium, dass eine Zahl von 100 Photonen je Integrationsschritt als Mindestmaß für die Orientierungsbestimmung einzuhalten ist, hervorzuheben. Ist dieses Kriterium erfüllt, so kann der Einfluss der Anregungswahrscheinlichkeit zumindest in der konfokalen Mikroskopie, also bei der Anwendung hochnumerischer Objektive, bei der Bestimmung der 3D Orientierung vernachlässigt werden.

Für die Untersuchung von PP- Molekülen auf einer Glasoberfläche wurde die von Hohlbein u. Hübner im Jahre 2005 publizierte Methode zur Bestimmung der 3D Orientierung um die gleichzeitige Erfassung der Lebensdauer und des Fluoreszenzspektrums erweitert. Die zeitabhängige Erfassung von fünf unabhängig voneinander detektierbaren Fluoreszenzparametern ergibt eine 6D Messung.

Anhand dieser Multi-Parameter-Detektion konnte für einzelne PP- Moleküle an einer Glasoberfläche eindeutig geklärt werden, ob die von Kowerko et al. [9] beschriebenen Intensitätsänderungen durch intrinsische Konformationsänderungen oder eine Reorientierung des Moleküls verursacht werden. Bei der Auswertung der Orientierungsdaten wurden drei verschiedene Modelle des Dipols und seiner Umgebung untersucht. Obwohl keines der Modelle die Beobachtungen restlos erklären kann, stimmt das Modell des Dipols im optisch dünneren Medium am besten mit den Ergebnissen überein. Die gleichzeitige Erfassung ermöglicht die Korrelation diverser Fluoreszenzparameter. So ergab die Analyse der Lebensdauer in

Abhängigkeit von der Orientierung das theoretisch vorhergesagte Verhalten eines Dipols im optisch dünneren Medium in unmittelbarer Nähe zur Grenzfläche zum optisch dichteren Medium und stützt somit die Ergebnisse der Orientierungsanalyse [18]. Durch eine Korrelationsanalyse der Intensitätszeitspuren konnte der gesamte durch die tttr-Messung zur Verfügung stehende Zeitbereich ($10^{-7} - 10^1$)s hinsichtlich der Orientierungsdynamik untersucht werden. Damit konnte erstmals das Potential der Methode in Bezug auf die Zeitauflösung genutzt werden, die durch die Einzelphotonendetektion möglich ist. Schließlich konnte die orientierungsaufgelöste SCOM Bildgebung klären, dass PP- Moleküle einer bevorzugten Orientierung bei der Anbindung an die Glasoberfläche unterliegen.

Die Anwendung der Methode auf GUV zeigt, dass die Bestimmung der 3D Orientierung von der Konzentration des Markers abhängig ist. Dies trifft insbesondere auf die Bestimmung des Polarwinkels zu. Hier konnte nur im Fall niedriger Konzentration des Markers in der Lipidmembran eine Übereinstimmung der experimentell gewonnenen Ergebnisse mit den Ergebnissen einer MC Simulation erzielt werden. Die Ursache für diese Diskrepanz zwischen Experiment und Theorie liegt vor allem darin, dass die Theorie für die Bestimmung der Orientierung anhand der Abstrahlcharakteristik des Fluorophors den Sitz des Dipols in unmittelbarer Nähe des fokalen Punktes voraussetzt [4, 5]. Da der Marker aber einer lateralen Diffusion in der Membran unterliegt, kann diese Bedingung nur unzureichend erfüllt werden. Das sogenannte *out-of-focus* Licht stört die Bestimmung der Orientierung maßgeblich und verfälscht die erhaltenen Werte.

Betrachtet man den mit dieser Arbeit erfassten wissenschaftlichen Stand, so kann folgender Ausblick für zukünftige Arbeiten gegeben werden: Die hier vorgestellte, erweiterte Theorie der 3D Orientierung beruht auf der kohärenten Detektion der Fluoreszenzintensität in der hinteren Brennebene eines hochnumerischen Objektivs. Die Erweiterung der Theorie durch eine vollständige Beschreibung des optischen Systems, wie dem Dektor-Dektorlinse-Ensemble sowie der polarisationsabhängigen Transmission der verwendeten Komponenten (Objektiv, Linsen, Dichroit etc.) im Detektionsstrahlengang, kann zur Bestimmung exakter Winkelwerte beitragen. Wie bereits von Hohlbein u. Hübner konstatiert, ist der Vergleich der erhaltenen Orientierungswerte mit anderen Methoden kaum oder gar nicht möglich. MC Simulationen spielen daher eine entscheidende Rolle bei der Bewertung der experimentellen Ergebnisse. Bisher beruht die Simulation auf der analytischen Lösung für die drei verwendeten Intensitätskanäle. Verlässt man diesen Ansatz und beschreibt das Dipolfeld und dessen Detektion anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Feldkomponenten und deren Transformation durch ein optisches System, so ist die Simulation von anisotropen Umgebungen und komplexen Szenarien, wie der lateralen Diffusion eines fluoreszenten Markers in einer Lipidmembran, möglich.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit anhand konkreter Beispiele das Potential der Kombination aus 3D Orientierung und Multi-Parameter-Analyse. Diese Methode ermöglicht die simultane Erfassung diverser Fluoreszenzparameter mit einer sonst unerreichten Zeitauflösung. Durch die Anwendung auf komplexe molekulare Systeme wird es dank der Korrelation zwischen den verschiedenen Parametern möglich sein, deren Dynamik und Struktur aufzuklären.

A Anhang

A.1 Nachtrag: Grundlagen

A.1.1 Zur Lebensdauer fluoreszenter Zustände nahe einer Grenzfläche

Das reflektierte, elektrische Feld $\vec{E}_{\text{ref}}(\vec{r}_0)$ am Ort \vec{r}_0 des Dipols \vec{p} im Abstand z_0 von der Grenzfläche zweier Medien mit Brechungsindex $n_{1,2}$, der sich ohne Beschränkung der Allgemeinheit auf der z -Achse $(x_0, y_0) = (0, 0)$ befindet, ergibt sich mit dem Ansatz der dyadischen Greenschen Funktion (siehe Kapitel 3) zu [28]

$$\vec{E}_{\text{ref}}(\vec{r}_0) = \omega^2 \mu_0 \mathbf{G}_{\text{ref}}(\vec{r}_0, \vec{r}_0) \vec{p}. \quad (\text{A.1})$$

Mit der Substitution

$$k_x = k_\rho \cos \phi, \quad k_y = k_\rho \sin \phi, \quad dk_x dk_y = k_\rho dk_\rho d\phi, \quad (\text{A.2})$$

die eine analytische Lösung des Integrals für \mathbf{G}_{ref} in ϕ erlaubt, folgt

$$\mathbf{G}_{\text{ref}}(\vec{r}_0, \vec{r}_0) = \frac{i}{8\pi^2} \int_0^\infty \mathbf{M}_{\text{ref}} e^{2ik_{z_1}z_0} dk_\rho \quad (\text{A.3})$$

mit \mathbf{M}_{ref} in Diagonalform am Ort \vec{r}_0 des Dipols

$$\mathbf{M}_{\text{ref}} = \frac{k_\rho}{k_1^2 k_{z_1}} \begin{pmatrix} r^s k_1^2 - r^p k_{z_1}^2 & 0 & 0 \\ 0 & r^s k_1^2 - r^p k_{z_1}^2 & 0 \\ 0 & 0 & 2r^p k_\rho^2 \end{pmatrix}. \quad (\text{A.4})$$

Die Fresnelkoeffizienten für die Reflektion an einer Grenzfläche gemäß der Definition für $s = k_\rho/k_1$ bzw. $s_z = \sqrt{1-s^2}$ und dem relativen Brechungsindex $n = n_1/n_2$ lauten dann:

$$\begin{aligned} r^s &= \frac{k_1 \sqrt{1-s^2} - k_2 \sqrt{1-n^{-2}s^2}}{k_1 \sqrt{1-s^2} + k_2 \sqrt{1-n^{-2}s^2}}, \\ r^p &= \frac{n^2 k_1 \sqrt{1-s^2} - k_2 \sqrt{1-n^{-2}s^2}}{n^2 k_1 \sqrt{1-s^2} + k_2 \sqrt{1-n^{-2}s^2}}. \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

A.1.2 Zur dynamischen Anisotropie

Anisotropie im Molekülensemble

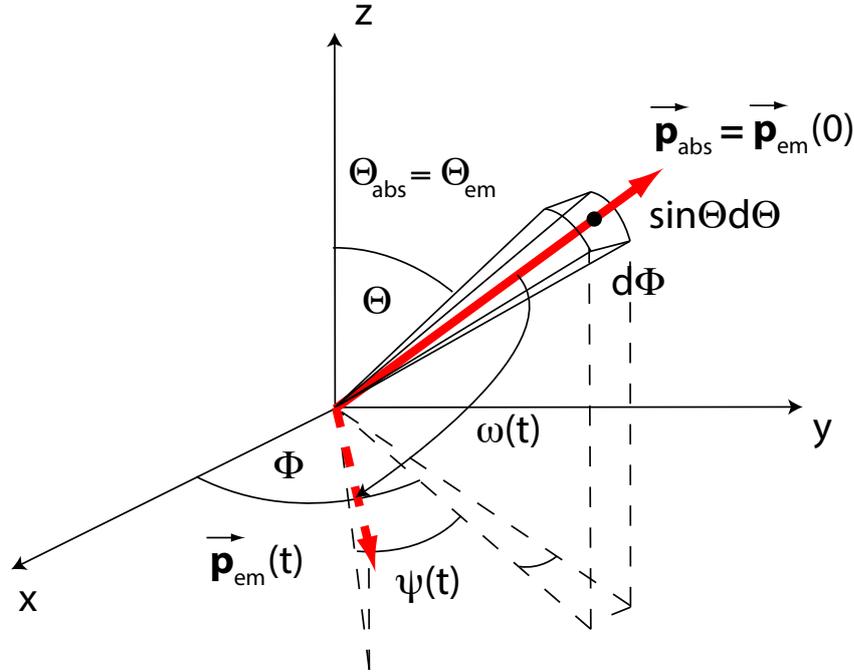


Abb. A.1: Koordinatensystem für das Dipolmoment \vec{p} eines fluoreszenten Moleküls unter der Annahme, dass der Absorptions- \vec{p}_{abs} und Emissionsdipol \vec{p}_{em} parallel zueinander sind. Die Orientierung des Dipols ist durch Θ und Φ gegeben; die Änderung der Orientierung des Moleküls durch die Funktion $\omega(t)$. Nach [10].

Für den Fall dass der Absorptions- und Emissionsdipol parallel zueinander sind, also $\Theta_{\text{abs}} = \Theta_{\text{em}}$ ist, gilt

$$\cos^2 \Theta_{\text{abs}} = \cos^2 \Theta_{\text{em}} = \cos^2 \Theta.$$

Damit ist der Anteil der Moleküle in einem Raumwinkelement $\sin \Theta d\Theta d\Phi$ mit der Dipolorientierung Θ durch folgenden Ausdruck gegeben

$$W(\Theta, \Phi) d\Theta d\Phi = \frac{|\vec{p} \cdot \vec{E}|^2 \sin \Theta d\Theta d\Phi}{\int_0^\pi d\Phi \int_0^\pi |\vec{p} \cdot \vec{E}|^2 \sin \Theta d\Theta} = \frac{3}{4\pi} \cos^2 \Theta \sin \Theta d\Theta d\Phi. \quad (\text{A.6})$$

Der Mittelwert für die Anregungswahrscheinlichkeit über alle möglichen Orientierungen

des Molekülensembles ergibt sich damit zu:

$$\langle \cos^2 \Theta \rangle = \int_0^{2\pi} d\Phi \int_0^\pi \cos^2 \Theta W d\Theta(\Theta, \Phi) = 0.6 \quad (\text{A.7})$$

und man erhält die Anisotropie zum Zeitpunkt $t = 0$ der Anregung

$$r_0 = \frac{3\langle \cos^2 \Theta_{\text{abs}} \rangle - 1}{2} = 0.4. \quad (\text{A.8})$$

Dieser Wert r_0 wird fundamentale Anisotropie genannt und entspricht der Anisotropie eines Ensembles unbeweglicher Moleküle [10].

Einfluss der Rotation

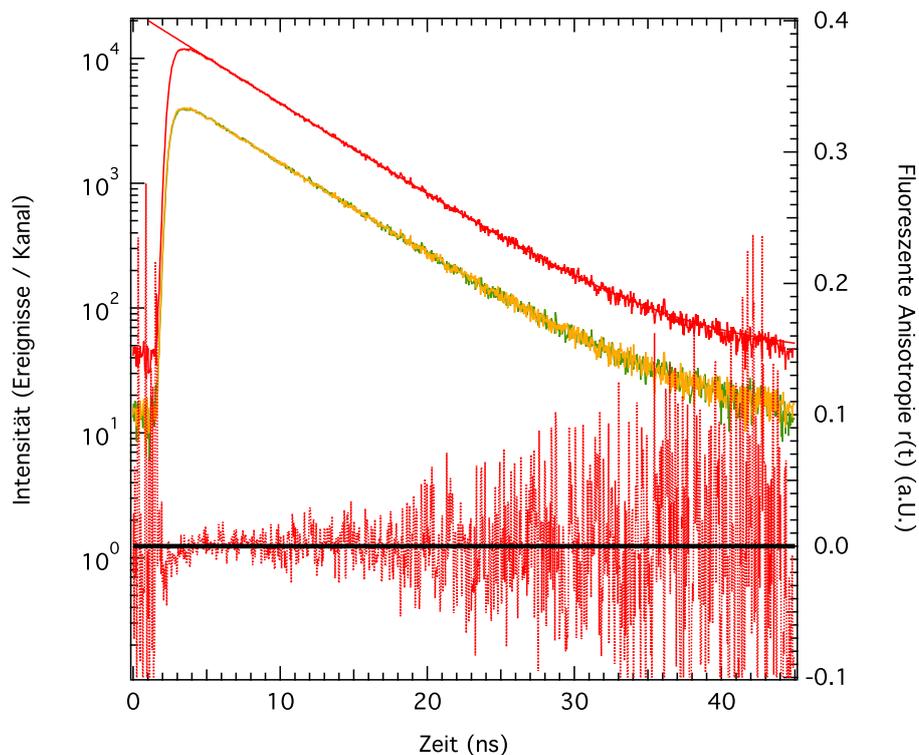


Abb. A.2: Lebensdauer und Anisotropie fluoreszenter (Pyridyl)₁-funktionalisierter Perylendiimide (PP) gelöst in Toluol. Die Regression der Lebensdauer mit einer einfachen Exponentialfunktion ergibt $\tau_F = 5.8$ ns. Die Rotationskorrelationszeit τ_{rot} kann für PP in Toluol nicht bestimmt werden, da die Rotation deutlich schneller als die Lebensdauer des fluoreszenten Zustandes ist.

Für den Fall, dass der Absorptionsdipol parallel zum Emissionsdipol liegt ($\Theta_{\text{abs}} = \Theta_{\text{em}}$), ist nur die Rotation des fluoreszenten Moleküls aufgrund der Brownschen Molekularbewegung

für die Depolarisation und damit für den zeitlichen Verlauf der Anisotropie verantwortlich. Die Rotation des Dipolmomentes wird mit dem Winkel $\omega(t)$ zwischen dem Dipolmoment zum Zeitpunkt der Anregung $t = 0$ und dem Dipolmoment zum Zeitpunkt der Emission $t > 0$ beschrieben (siehe Abbildung A.1). Ausgehend von Gleichung A.8 erhält man mit der Rotationstransformation

$$\cos \Theta_{\text{em}}(t) = \cos \Theta_{\text{em}}(0) \cos \omega(t) + \cos \psi(t) \sin \Theta_{\text{em}}(0) \sin \omega(t), \quad (\text{A.9})$$

mit dem Winkel $\psi(t)$ zwischen den Ebenen $(\vec{e}_z, \vec{p}_{\text{em}}(t=0))$ und $(\vec{e}_z, \vec{p}_{\text{em}}(t))$, durch einfache trigonometrische Umformungen und unter der Annahme $\langle \cos \psi \rangle = 0$ und $\langle \cos^2 \psi \rangle = 0,5$ den Ausdruck für die Anisotropie

$$\begin{aligned} r(t) &= \frac{3\langle \cos^2 \Theta_{\text{em}}(t) \rangle - 1}{2} = \frac{3\langle \cos^2 \Theta_{\text{abs}}(0) \rangle - 1}{2} \times \frac{3\langle \cos^2 \omega(t) \rangle - 1}{2}, \\ r(t) &= r_0 \frac{3\langle \cos^2 \omega(t) \rangle - 1}{2}. \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

Der Ausdruck für den im Mittel nach der Zeit t rotierten Winkel ist durch den folgenden Ausdruck

$$\langle \cos^2 \omega(t) \rangle = \int_0^\infty \cos^2 \omega W(\omega, t) \sin \omega d\omega \quad (\text{A.11})$$

gegeben. Hier ist $W(\omega, t)$ die Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Orientierung des Moleküls nach der Zeit t , die durch die Diffusionsgleichung in sphärischen Koordinaten gegeben

$$\frac{\partial W}{\partial t} = D_{\text{rot}} \frac{1}{\sin \omega} \frac{\partial}{\partial \omega} \left(\sin \omega \frac{\partial W}{\partial \omega} \right) \quad (\text{A.12})$$

deren Lösung durch Vergleich mit Gleichung zu dem wohl bekannten Ausdruck für die Anisotropie führt [10]

$$r(t) = r_0 e^{-6D_{\text{rot}}t}. \quad (\text{A.13})$$

A.1.3 Zur Korrelationsanalyse des Fluoreszenzsignals

Zunächst stellt man das Fluoreszenzintensitätssignal als Summe aus Mittelwert und Intensitätsfluktuationen dar

$$I_{\text{D}}(t) = \langle I_{\text{D}}(t) \rangle + \delta I_{\text{D}}(t), \quad (\text{A.14})$$

wobei $\langle \cdot \rangle$ den Mittelwert und $\delta \cdot$ die Fluktuationen zum Zeitpunkt t darstellt. Die Intensitätsfluktuationen, die sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung, also rein diffusiver Prozesse, ergeben, lassen sich mithilfe der Korrelationsfunktion quantifizieren:

$$G(t_1, t_2) = \langle I_{\text{D}}(t_1) \cdot I_{\text{D}}(t_2) \rangle. \quad (\text{A.15})$$

Sofern das betrachtete System ergodisch und sich im Gleichgewichtszustand befindet, lässt sich (A.15) mithilfe des Zeitintervalls τ schreiben:

$$G(\tau) = \langle I_{\text{D}}(t) \cdot I_{\text{D}}(t + \tau) \rangle. \quad (\text{A.16})$$

Setzt man nun Gleichung A.14 in diese Gleichung ein, so erhält man:

$$G(\tau) = \langle \langle I_D(t) \rangle \langle I_D(t + \tau) \rangle + \langle I_D(t) \rangle \delta I_D(t + \tau) + \dots \quad (\text{A.17}) \\ \dots + \delta I_D(t) \langle I_D(t + \tau) \rangle + \delta I_D(t) \delta I_D(t + \tau) \rangle.$$

Da das System als ergodisch angenommen werden soll, gilt $\langle I_D(t) \rangle = \langle I_D(t + \tau) \rangle$. Damit vereinfacht sich der Ausdruck zu

$$G(\tau) = \langle \langle I_D(t) \rangle^2 + \langle I_D(t) \rangle \delta I_D(t + \tau) + \delta I_D(t) \langle I_D(t) \rangle + \delta I_D(t) \delta I_D(t + \tau) \rangle. \quad (\text{A.18})$$

In der obigen Gleichung sind die beiden mittleren Terme $\langle I_D(t) \rangle \delta I_D(t + \tau)$ und $\delta I_D(t) \langle I_D(t) \rangle$ gleich Null, weil die Fluktuationen, die durch $\delta I_D(t)$ und $\delta I_D(t + \tau)$ beschrieben werden, keinen Beitrag zum zeitlichen Mittel leisten, wie folgende Überlegung zeigt:

$$\begin{aligned} \langle I_D(t) \rangle &= \int_{-\infty}^{\infty} w(t) \cdot I_D(t) dt; \int_{-\infty}^{\infty} w(t) dt = 1 \\ &\Leftrightarrow \\ \langle I_D(t) \rangle &= \int_{-\infty}^{\infty} w(t) (\langle I_D(t) \rangle + \delta I_D(t)) dt \\ &\Leftrightarrow \\ \langle I_D(t) \rangle &= \langle I_D(t) \rangle \int_{-\infty}^{\infty} w(t) dt + \int_{-\infty}^{\infty} w(t) \delta I_D(t) dt \\ &\Leftrightarrow \\ \langle I_D(t) \rangle &= \langle I_D(t) \rangle \cdot 1 + \int_{-\infty}^{\infty} w(t) \delta I_D(t) dt \\ &\Rightarrow \int_{-\infty}^{\infty} \delta I_D(t) \cdot w(t) dt = 0 \end{aligned}$$

Somit erhält man aus Gleichung A.18

$$G(\tau) = \langle \langle I_D(t) \rangle^2 + \delta I_D(t) \delta I_D(t + \tau) \rangle. \quad (\text{A.19})$$

Das Messsignal – die Fluoreszenzintensität I_D – hängt von der Anregung der Moleküle durch den Laser, der Detektion der emittierten Photonen und von der Konzentration $c(\vec{r}, t)$ der fluoreszierenden Moleküle im Anregungs- / Detektionsvolumen zu dem betrachteten Zeitpunkt t ab. Anregung und Detektion werden zu der sogenannten Molekül-Detektionsfunktion $MDF(\vec{r}, t)$ zusammengefasst, sodass sich das Messsignal als

$$I_D(t) = \int c(\vec{r}, t) MDF(\vec{r}, t) d\vec{r} \quad (\text{A.20})$$

beschreiben lässt. Die MDF lässt sich näherungsweise als Gaußverteilung beschreiben:

$$I_D(t) = \int_V c(\vec{r}, t) Q I_0 e^{-2 \cdot \frac{x^2 + y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} d\vec{r}, \quad (\text{A.21})$$

wobei w_0 und z_0 die Entfernungen vom Intensitätsmaximum I_0 angeben, bei denen die Intensität in der x - y -Ebene senkrecht zur optischen Achse bzw. entlang der optischen

Achse z auf $\frac{I_0}{c^2}$ abgefallen ist. Q ist die Quanteneffizienz des fluoreszenten Moleküls. Sie wird ohne Beschränkung der Allgemeinheit mit $Q = 1$ angenommen. Durch Einsetzen von Gleichung A.21 in Gleichung A.19 erhält man

$$G(\tau) = \int_V \int_{V'} \langle \delta c(\vec{r}, t) \delta c(\vec{r}', t + \tau) \rangle I_0 e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} \dots \quad (\text{A.22})$$

$$\dots \cdot I_0 e^{-2 \cdot \frac{x'^2+y'^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z'^2}{z_0^2}} d\vec{r}' + \left(\int_V \langle c(t, \vec{r}) \rangle I_0 e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} d\vec{r} \right)^2.$$

Das zeitliche Mittel $\langle \delta c(\vec{r}, t) \delta c(\vec{r}', t + \tau) \rangle$ ist wegen der Ergodizität gleich dem räumlichen Mittel $\langle \delta c(\vec{r}, 0) \delta c(\vec{r}, \tau) \rangle$ und kann mithilfe der von Einstein [118] hergeleiteten Lösung der Diffusionsgleichung beschrieben werden:

$$\langle \delta c(\vec{r}, 0) \delta c(\vec{r}', \tau) \rangle = \langle c \rangle \frac{e^{-\frac{|\vec{r}-\vec{r}'|^2}{4D\tau}}}{4\pi D\tau^{\frac{1}{d}}}, \quad (\text{A.23})$$

wobei $d = 1, 2, 3$ die Anzahl der Dimensionen ist. Durch erneutes Einsetzen von Gleichung A.23 in Gleichung A.22) erhält man nun:

$$G(\tau) = \int_V \int_{V'} \langle c \rangle \frac{e^{-\frac{|\vec{r}-\vec{r}'|^2}{4D\tau}}}{(4\pi D\tau)^{\frac{1}{d}}} I_0 e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} I_0 e^{-2 \cdot \frac{x'^2+y'^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z'^2}{z_0^2}} d\vec{r}' + \dots \quad (\text{A.24})$$

$$\dots + \underbrace{\left(\int_V \langle c(\vec{r}, t) \rangle I_0 e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} d\vec{r} \right)^2}_{\langle I(t) \rangle}.$$

Die Normierung erfolgt anhand der mittleren Fluoreszenzintensität und man erhält

$$\frac{G(\tau)}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\int_V \int_{V'} \frac{e^{-\frac{|\vec{r}-\vec{r}'|^2}{4D\tau}}}{(4\pi D\tau)^{\frac{1}{d}}} e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} e^{-2 \cdot \frac{x'^2+y'^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z'^2}{z_0^2}} d\vec{r}' d\vec{r}}{\langle c \rangle \left(\int_V e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} d\vec{r} \right)^2} + 1. \quad (\text{A.25})$$

Schließlich kann die mittlere Konzentration fluoreszierender Teilchen $\langle c \rangle$ durch die mittlere Anzahl der Teilchen $\langle N \rangle$ in dem vom Fokus definierten effektiven Volumen ersetzt werden:

$$\langle c \rangle = \frac{\langle N \rangle}{V_{\text{eff}}} \quad (\text{A.26})$$

mit

$$V_{\text{eff}} := \frac{\left(\int_V e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} d\vec{r} \right)^2}{\int_V \left(e^{-2 \cdot \frac{x^2+y^2}{w_0^2} - 2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}} \right)^2 d\vec{r}} = \pi^{\frac{3}{2}} w_0^2 z_0, \quad (\text{A.27})$$

sodass man

$$G'(\tau) = \frac{\int_V \int_{V'} \frac{e^{\frac{-|\vec{r}-\vec{r}'|^2}{4Dt}}}{(4\pi Dt)^{\frac{3}{2}}} e^{-2\frac{x^2+y^2}{w_0^2}-2\frac{z^2}{z_0^2}} e^{-2\frac{x'^2+y'^2}{w_0^2}-2\frac{z'^2}{z_0^2}} d\vec{r}' d\vec{r}}{\langle N \rangle \left(\int_V e^{-4\frac{x^2+y^2}{w_0^2}-4\frac{z^2}{z_0^2}} d\vec{r} \right)} + 1 \quad (\text{A.28})$$

erhält. Dieser Ausdruck wurde mit der Software *Mathematica* (Wolfram Research) analytisch ausgewertet, die Ergebnisse für die drei räumlichen Dimensionen sind:

$$G^{1D}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \sqrt{\frac{4D\tau}{w_0^2} + 1} \quad (\text{A.29})$$

$$G^{2D}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{4D\tau}{w_0^2} + 1 \right)^{-1} \quad (\text{A.30})$$

$$G^{3D}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{4D\tau}{w_0^2} + 1 \right)^{-1} \sqrt{\frac{4D\tau}{z_0^2} + 1}. \quad (\text{A.31})$$

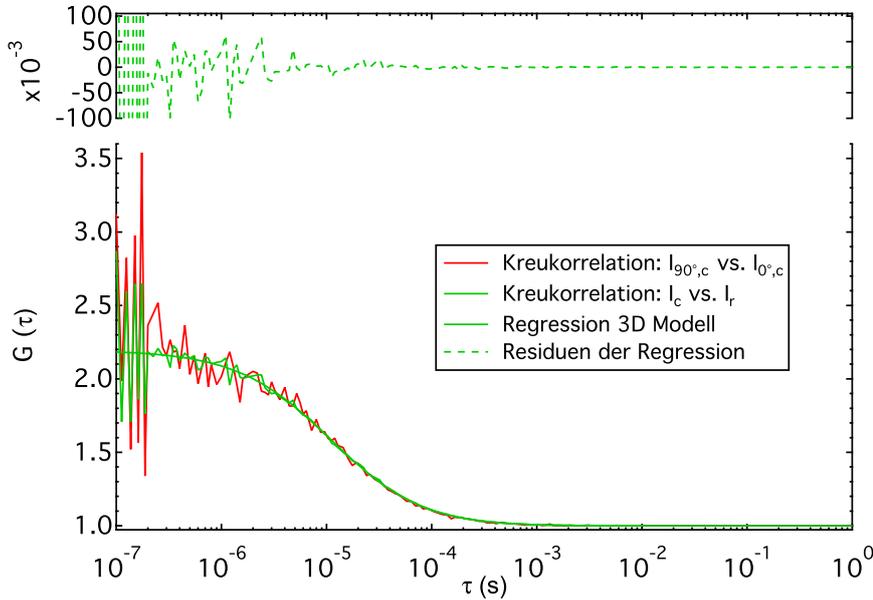


Abb. A.3: Kreuzkorrelationen der Intensitätskanäle $I_{0^\circ,c}$, $I_{90^\circ,c}$ und I_r für die Bestimmung der 3D Orientierung fluoreszenter Moleküle für PP in Toluol. Die Kurvenanpassung erfolgte mit dem Modell gemäß Gleichung 2.53. Die Parameter der Kurvenanpassung sind $\tau_D = (10,9 \pm 0,5) \mu\text{s}$, $N = 0,84 \pm 0,01$, $S = 0,2 \pm 0,1$. Die Aufnahme erfolgte mit *pinhole* ($50 \mu\text{m}$). Die Kreuzkorrelation der Polarisations- und Inklinationskanäle liegen perfekt übereinander.

A.1.4 Makroskopische Maxwell Gleichungen

In der makroskopischen Betrachtung der Elektrodynamik vermeidet man die Betrachtung von Einzelladungen und der damit verbundenen Bewegung dieser Ladungen, besser bekannt als Strom, durch die Betrachtung von der Ladungsverteilung bzw. der Ladungsdichte ρ und dem dazugehörigen Strom bzw. der Stromdichte \vec{j} . Die Maxwell-Gleichungen in differentieller Form im *SI* Einheitensystem ergeben sich dann zu [70]:

$$\nabla \times \vec{E}(\vec{r}, t) = -\frac{\partial \vec{B}(\vec{r}, t)}{\partial t}, \quad (\text{A.32})$$

$$\nabla \times \vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{\partial \vec{D}(\vec{r}, t)}{\partial t} + \vec{j}(\vec{r}, t), \quad (\text{A.33})$$

$$\nabla \cdot \vec{D}(\vec{r}, t) = \rho(\vec{r}, t), \quad (\text{A.34})$$

$$\nabla \cdot \vec{B}(\vec{r}, t) = 0. \quad (\text{A.35})$$

Dabei ist \vec{E} das elektrische Feld, \vec{D} die elektrische Verschiebung, \vec{H} das magnetische Feld und \vec{B} die magnetische Induktion. Für die elektrische Verschiebung und das magnetische Feld ergeben sich die Materialgleichungen zu:

$$\vec{D}(\vec{r}, t) = \varepsilon_0 \varepsilon \vec{E}(\vec{r}, t) + \vec{P}(\vec{r}, t), \quad (\text{A.36})$$

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{1}{\mu_0 \mu} \vec{B}(\vec{r}, t) - \vec{M}(\vec{r}, t). \quad (\text{A.37})$$

$$(\text{A.38})$$

Mit \vec{P} als makroskopische Polarisierbarkeit und \vec{M} als makroskopische Magnetisierbarkeit des Mediums sowie den beiden Konstanten der Permittivität ε_0 und der Permeabilität μ_0 . Des Weiteren sollen die Felder in Potentialform Einführung finden:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = i\omega \vec{A}(\vec{r}, t) - \nabla \phi(\vec{r}, t), \quad (\text{A.39})$$

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{1}{\mu_0 \mu} \nabla \times \vec{A}(\vec{r}, t), \quad (\text{A.40})$$

wobei \vec{A} ein zeit-harmonisches Vektorpotential und ϕ ein skalares Potential darstellt. Durch die Lorenz-Eichung

$$\nabla \times \vec{A}(\vec{r}, t) = i\omega \mu_0 \mu \varepsilon_0 \varepsilon \phi(\vec{r}, t) \quad (\text{A.41})$$

erhält man die ebenfalls übliche Form der Potentialdarstellung des elektrischen bzw. magnetischen Feldes

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = i\omega \left(1 + \frac{1}{k^2} \Delta\right) \vec{A}(\vec{r}, t), \quad (\text{A.42})$$

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{1}{\mu_0 \mu} \nabla \times \vec{A}(\vec{r}, t). \quad (\text{A.43})$$

A.2 Analysemethoden

A.2.1 Kalibrierung des konfokalen Mikroskops

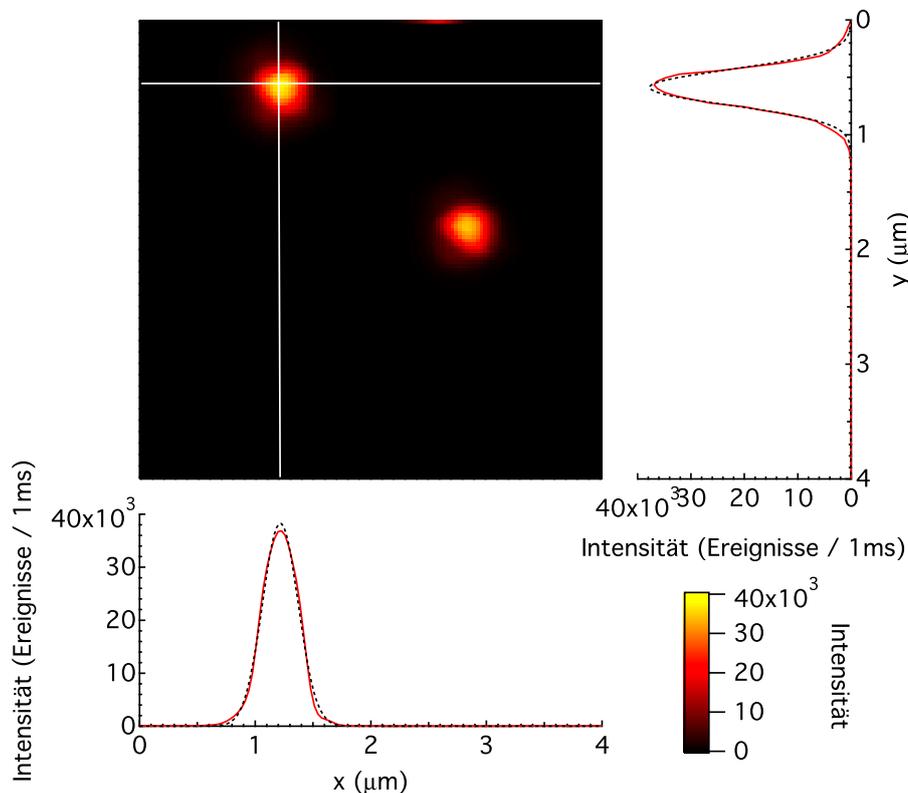


Abb. A.4: Intensitätsbild fluoreszenter Latexkügelchen zur Bestimmung der lateralen Auflösung des konfokalen Mikroskops. Die Anpassung der zwei-dimensionalen Gauß-Funktion an die Intensitätsverteilung ergibt $\sigma_{x,y}=154$ nm.

Für die Kalibrierung des konfokalen Mikroskops (siehe Abbildung und Text für Spezifikationen) werden farbstoffmarkierte Latexkügelchen (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit einem Durchmesser von 100 nm als Rasterscan aufgenommen. Die Anregung erfolgt mit einem 488 nm Laser bei einer Intensität von 1 kW/cm^2 . Die Größe der Kügelchen ist deutlich kleiner als die beugungsbegrenzte Auflösung des Mikroskops. Damit ist eine Aufnahme des Laserfokus möglich. Dies lässt die Bestimmung der tatsächlichen Auflösung des Mikroskops und den Vergleich mit dem theoretischen Auflösungsvermögen zu. Neben der Summenintensität sind in Abbildung A.4 zwei Schnitte entlang der x - bzw. y -Achse durch das Latexkügelchen gezeigt. Zur Bestimmung der Güte der Kalibrierung bzw. dem Auflösungsvermögen wird für beide Schnitte eine Kurvenanpassung mit einer Gauß-Funktion durchgeführt.

$$I(x) = A_x \exp\left(-\frac{x-x_0}{w_x}\right)^2 + bg \quad (\text{A.44})$$

mit den Parametern A_x und w_x als Höhe und Breite der Gauß-Funktionen exemplarisch für die x -Achse sowie bg als Hintergrund. Die Breite ergibt sich für beide Achsen zu $w = (218 \pm 2)$ nm. Die Standardabweichung $\sqrt{2}\sigma = w$ ergibt sich damit zu 154 nm. Das FWHM lässt sich mit $2\sigma\sqrt{2\ln 2}$ zu 362 nm berechnen. Das theoretische Auflösungsvermögen für ein konfokales Mikroskop mit einem Ölimmersionsobjektiv ($NA = 1,4$, $\lambda = 488$ nm) ist $d = 0,4\lambda/NA = 139$ nm. Damit entspricht das hier erreichte Auflösungsvermögen σ fast dem theoretisch Möglichen. Mithilfe der maximalen Intensität des Latexkügelchens $A = I_D = 37285$ Ereignisse / Pixel / 1ms lässt sich im Vergleich zum nicht markierten Deckglas das S-N-Verhältnis zu 1000:1 bestimmen.

A.2.2 Kalibrierung des Spektrometers

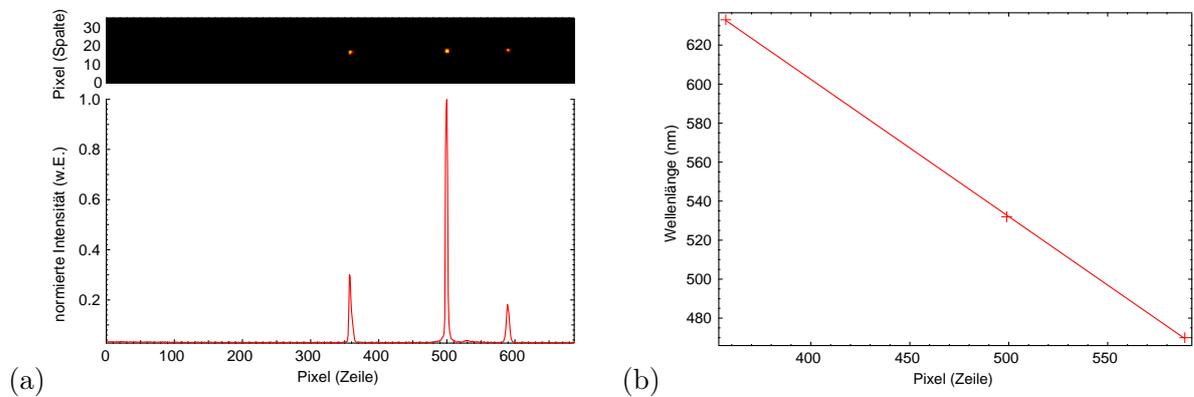


Abb. A.5: (a) Intensitätsprofil für die drei Laserlinien 470 nm, 532 nm und 633 nm in Abhängigkeit der Pixelnummer einer Zeile der verwendeten CCD-Kamera Sensicam[®] qe. (b) Kalibrierkurve für die Wellenlänge in Abhängigkeit der Pixelnummer. Für die drei Kalibrierpunkte wurde eine lineare Regression durchgeführt (siehe Text).

Die Kalibrierung des Spektrometers erfolgte anhand einer Dreipunktkalibrierung. Dafür wurden die Laserlinien 470 nm, 532 nm und 633 nm benutzt und deren Rückreflex bei einer Laserleistung von ca. 1 nW mit der Kamera aufgenommen (siehe Abbildung A.5 (a)). Die Kalibrierung erfolgt dann durch eine lineare Regression der Wellenlänge in Abhängigkeit des Pixelwertes (siehe Abbildung A.5 (b)).

$$\text{Wellenlänge (nm)} = a + b \cdot \text{Pixelwert} \quad (\text{A.45})$$

mit $a = (884 \pm 3)$ nm und $b = (-0.703 \pm 0.006)$ 1/Pixel.

A.2.3 Spektralanalyse

Für die Kurvenanpassung und damit für die Bestimmung der Spektralenposition λ_1 (1. elektronischer Übergang, Hauptpeak) wird unter der Annahme eines detektierbaren, vi-

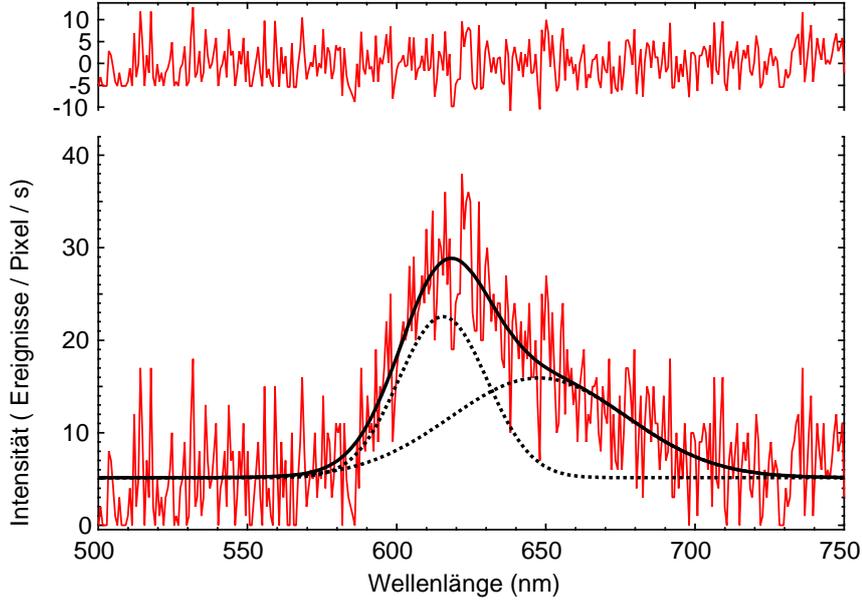


Abb. A.6: Ausgewähltes Spektrum (rot) und dessen Analyse (schwarz) eines einzelnen PP- Moleküls auf einer Glasoberfläche. Integrationszeit $\Delta t = 1$ s. Zusätzlich zum Spektrum selbst ist die Kurvenanpassung und deren Residuen (rote Kurve oben) einer doppelten Gauß-Funktion (schwarz, durchgehend) dargestellt. Die beiden Anteile (scharz, gestrichelt, Hauptpeak: 1. elektronischer S_1S_2 -Übergang, Seitenpeak: 1. vibronisches Seitenband $\nu_1\nu_2$) sind zur besseren Verdeutlichung zusätzlich eingetragen. Die Parameter der Kurvenanpassung lauten je für die beiden Gauß-Kurven: $A_{1,2}$: Amplitude, $\bar{x}_{1,2}$: Position, $\sigma_{1,2}$: Breite und bg : Hintergrund.

bronischen Bandes mit der Position λ_2 eine doppelte Gauß-Funktion gemäß:

$$I(\lambda) = A_1 \exp\left(-\frac{\lambda - \lambda_1}{w_1}\right)^2 + A_2 \exp\left(-\frac{\lambda - \lambda_2}{w_2}\right)^2 + bg \quad (\text{A.46})$$

angepasst. Mit den Parametern $A_{1,2}$ und $w_{1,2}$ als Höhe und Breite der Gauß-Funktionen sowie bg als Hintergrund.

A.2.4 Kalibrierung der Lebensdauerhistogramme

Aufgrund der unterschiedlichen Lichtwege für die drei Intensitätskanäle für die Bestimmung der 3D Orientierung, müssen die Kanalinformationen der TCSPC- Logik entsprechend korrigiert werden. Dafür wird die Anstiegsflanke des Lebensdauerhistogramms mit einer linearen Funktion angepasst und entsprechend auf Null verschoben (siehe Abbildung A.7).

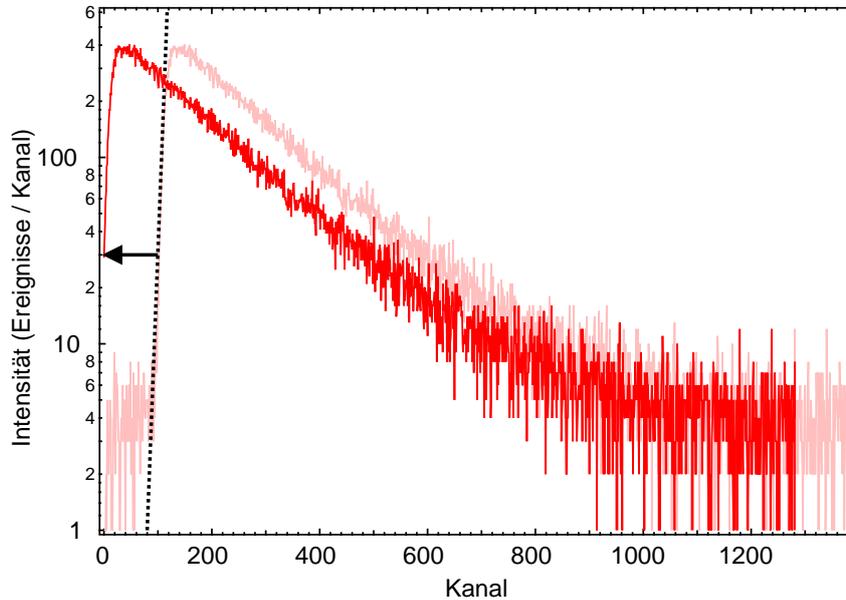


Abb. A.7: Kalibrierung des Histogramms für die Ankunftszeiten der Photonen des Intensitätskanals I_r .

TCSPC- Kanal 1 (I_r):	21
TCSPC- Kanal 2 ($I_{c,0^\circ}$):	102
TCSPC- Kanal 3 ($I_{c,90^\circ}$):	89

A.2.5 Lebensdaueranalyse für ein 2-Niveau System

Für die Analyse der Fluoreszenzlebensdauer des zwei-Niveausystems von Molekül B aus Kapitel 4 werden die Photonen die je Sekunde detektiert werden als Ankunftszeitdiagramme histogrammiert. In Abbildung A.8 sind diese Histogramme als Konturliniengraphik in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Für die beiden Zustände I und II von Molekül B werden je ein repräsentatives Intervall ausgewählt und neben der Konturgraphik als Histogramm dargestellt.

Für die Zuordnung des Einzelphotonensignal der beiden Zuständen von Molekül B wird die Intensitätszeitspur I_D mit einem zwei-Zustandsmodell untersucht. Dafür wird angenommen, dass die Intensitätswerte des jeweiligen Zustands gaußverteilt sind. Die Analyse erfolgte mit der Funktion *analyseTLS* von W. Harneit in Igor Pro. In Abbildung A.9 ist die Intensitätszeitspur von Molekül B, die Zuordnung der beiden Zustände sowie das Häufigkeitshistogramm für die Intensität dargestellt. Anhand der so eingeteilten Intensitätszeitspur können die Photonen genau einem Zustand zugeordnet werden und entsprechend ihrer Ankunftszeiten histogrammiert werden (siehe Abbildung A.10).

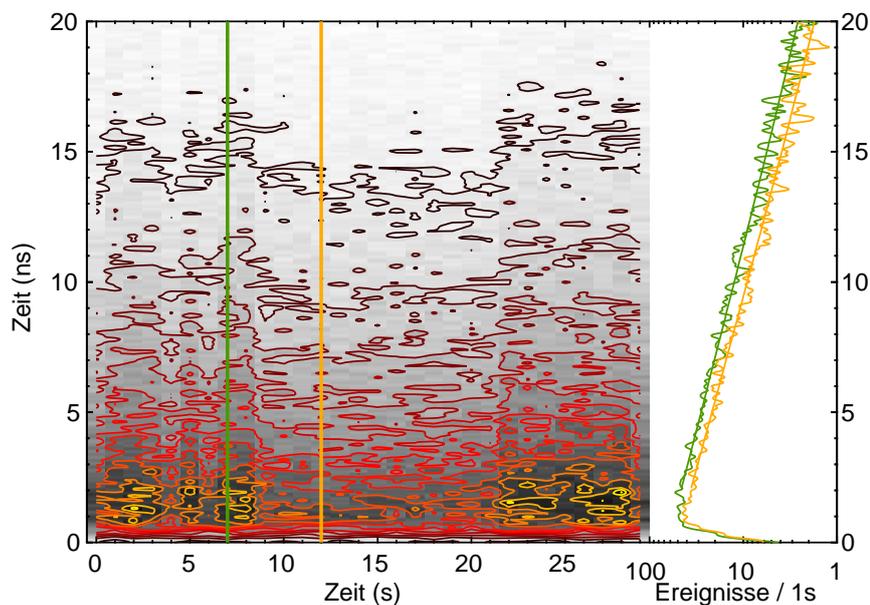


Abb. A.8: Konturgraphik für die Lebensdauerhistogramme von Molekül B aus Kapitel 4. Die Zustände I (gelb) und II (grün) des Moleküls B werden durch zwei repräsentative Intervalle rechts neben der Konturgraphik dargestellt. Die Regression für das Histogramm von Zustand I ergibt $\tau_F = (5,66 \pm 0,05)$ ns und für Zustand II $\tau_F = (6,04 \pm 0,05)$ ns.

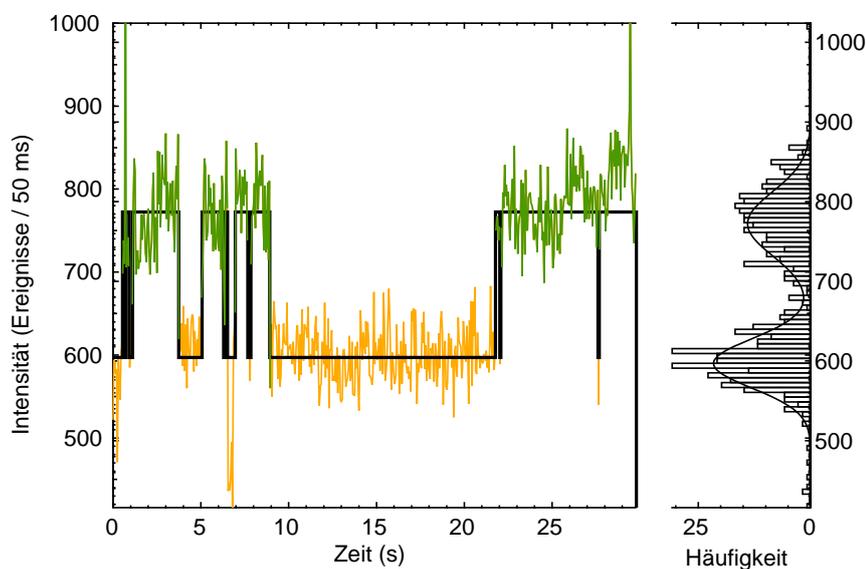


Abb. A.9: Anpassung eines zwei-Zustandsmodells an die Intensitätszeitspur von Molekül B (Zustand I in gelb, Zustand II in grün). Neben der Zeitspur ist das Häufigkeitsdiagramm der Intensitätswerte von Molekül B und die Anpassung einer doppelten Gauß-Funktion dargestellt.

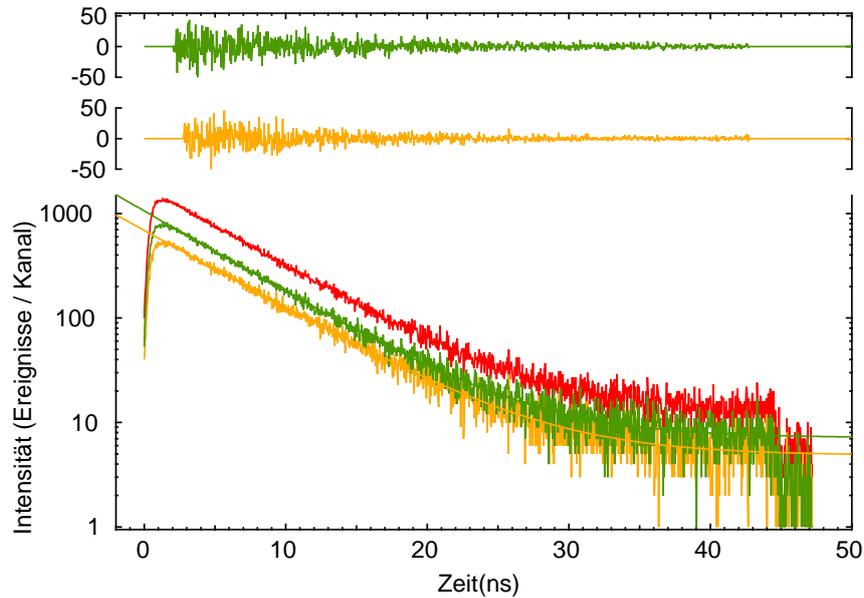


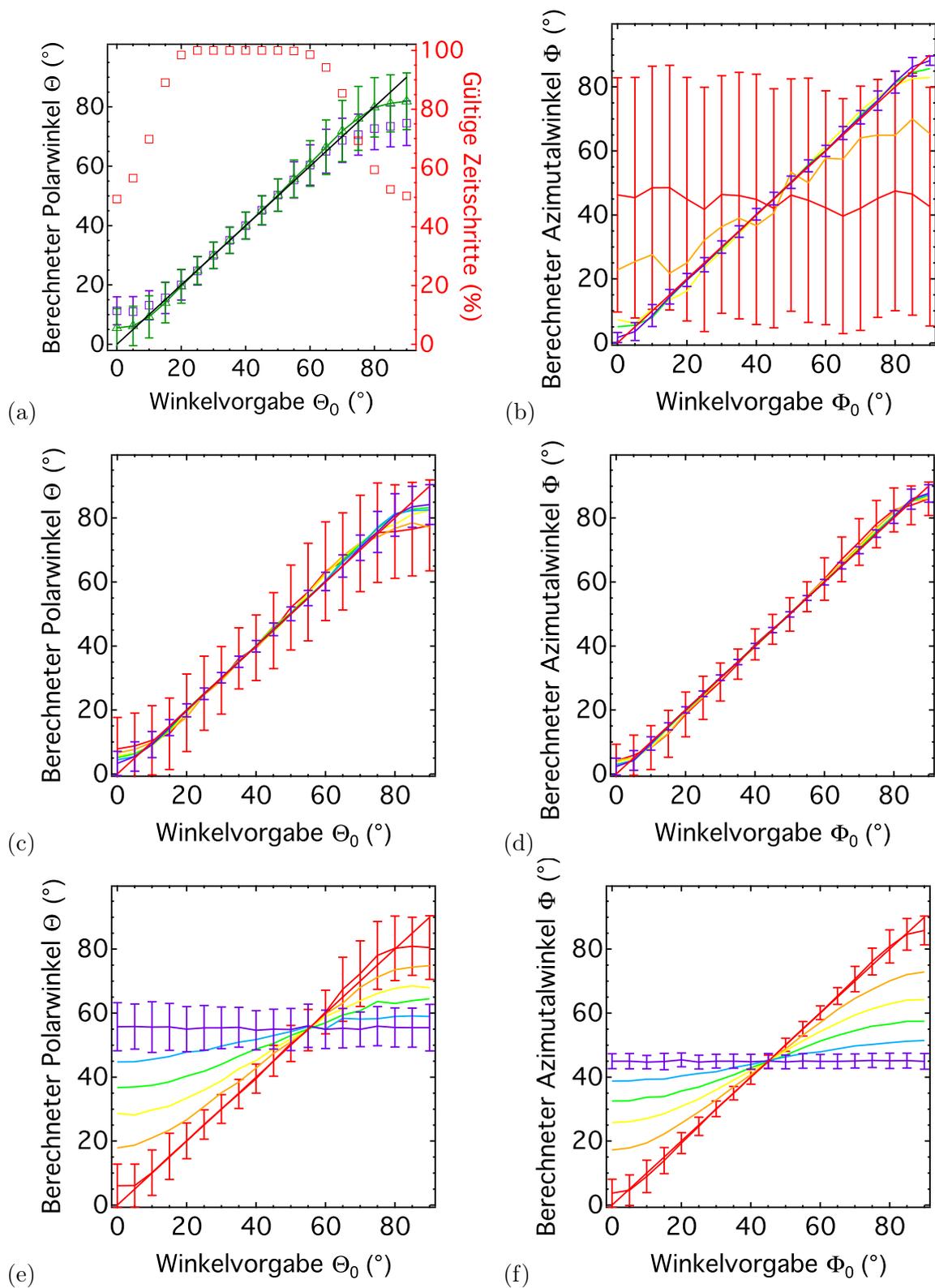
Abb. A.10: Ankunftszeithistogramme für die beiden Zustände I und II von Molekül B. Aus der Regression für Zustand I ergibt $\tau_F = (5,54 \pm 0,02)$ ns und für Zustand II $\tau_F = (5,70 \pm 0,03)$ ns.

A.3 Nachtrag: Simulationen der 3D Orientierung

A.3.1 Simulation des Photonenrauschens

Gemäß der Ausführung in Kapitel 3.2 wurden verschiedene Simulationen für die Bestimmung der 3D Orientierung dargestellt. Für die Parametersätze der Simulationen gelten die in Kapitel 3.2.2 gemachten Angaben.

Abb. A.11: (auf der nächsten Seite) Darstellung verschiedener Einflüsse auf die Bestimmung der 3D Orientierung anhand von MC Simulationen vom Typ B (siehe Kapitel 3.2.2). (a) Berechnung des mittleren Polarwinkels und dessen Standardabweichung in Abhängigkeit des vorgegebenen Winkels Θ_0 ohne (lila Quadrate) und mit (grüne Dreiecke) Korrektur ungültiger Intensitätsverhältnisse. Der Anteil gültiger Intensitätsverhältnisse aller simulierter Zeitschritte (bins) ist in Form roter Kreise dargestellt. (b) Abhängigkeit des mit Korrektur ungültiger Intensitätsverhältnisse berechneten Azimutwinkels vom vorgegebenen Polarwinkel Θ_0 . (c,d) Abhängigkeit des berechneten Polarwinkels (c) und Azimutwinkels (d) von der Anzahl detektierbarer Photonen I_D . (e,f) Abhängigkeit des berechneten Polarwinkels (c) und Azimutwinkels (d) vom prozentualen Anteil des isotropen Hintergrundes. Für die Simulationen (a,b,e,f) wurde eine Gesamtzahl detektierbarer Photonen I_D von 500 Photonen je Simulation festgelegt. Im Vergleich zu [8].



A.3.2 Simulation der 3D Orientierung von Molekülen

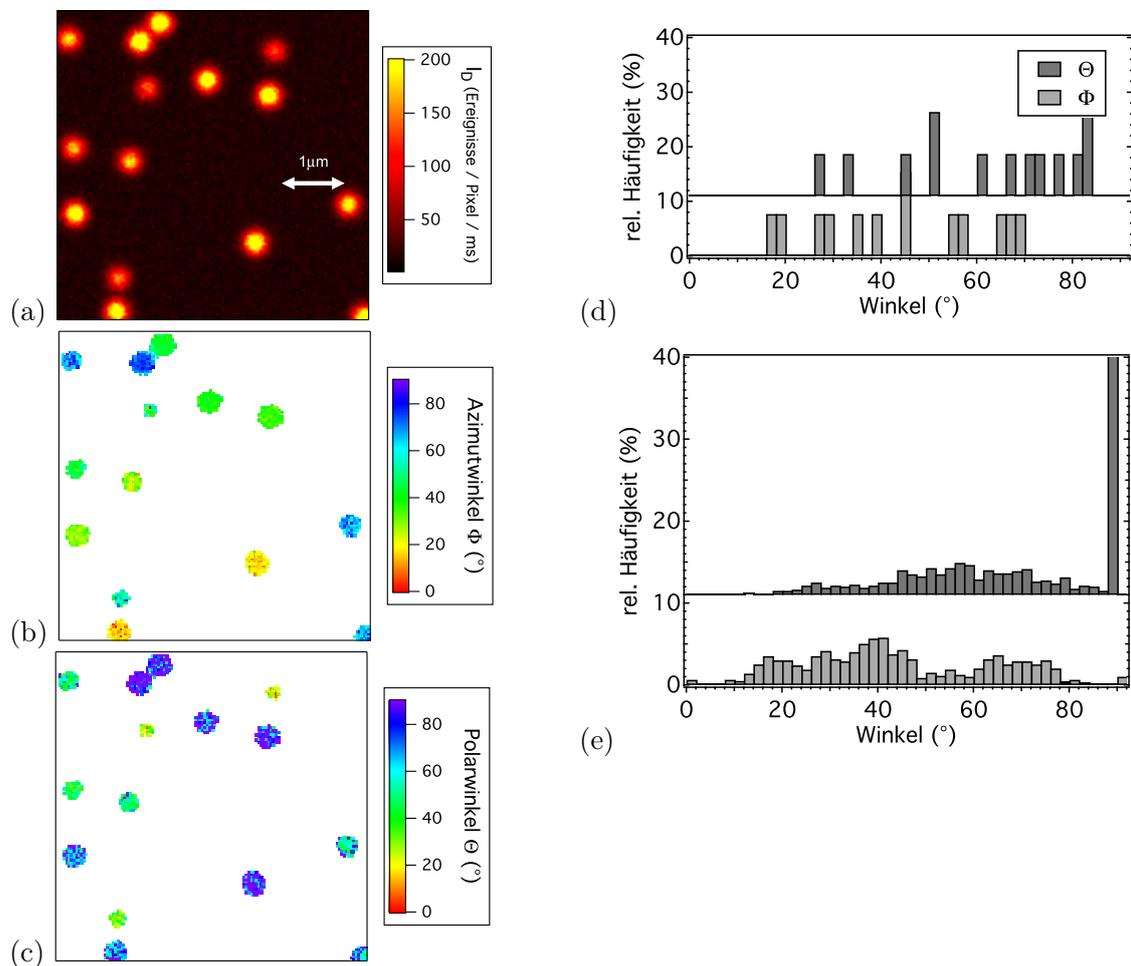


Abb. A.12: Simulationen einzelner Moleküle vom Typ C deren Polarwinkel sinusoidal und Azimutwinkel gleich verteilt sind. Die Falschfarbenbilder zeigen (a) die totale detektierbare Fluoreszenzintensität I_D einzelner, fluoreszenter Moleküle, (b) die Orientierung der Moleküle in der fokalen Ebene (Φ) und (c) die Orientierung der Moleküle zwischen der optischen Achse und dem Dipolmoment (Θ). Für die Winkel Φ (hellgrau) und Θ (dunkelgrau) erstellte Histogramme (d) für den Mittelwert der Winkel aller Pixel, die genau einem Molekül zugeordnet werden können sowie (e) für Winkelwerte aller Pixel, die das Schwellwertkriterium erfüllen.

A.3.3 Simulation der 3D Orientierung von farbstoffmarkierten Latexbeads

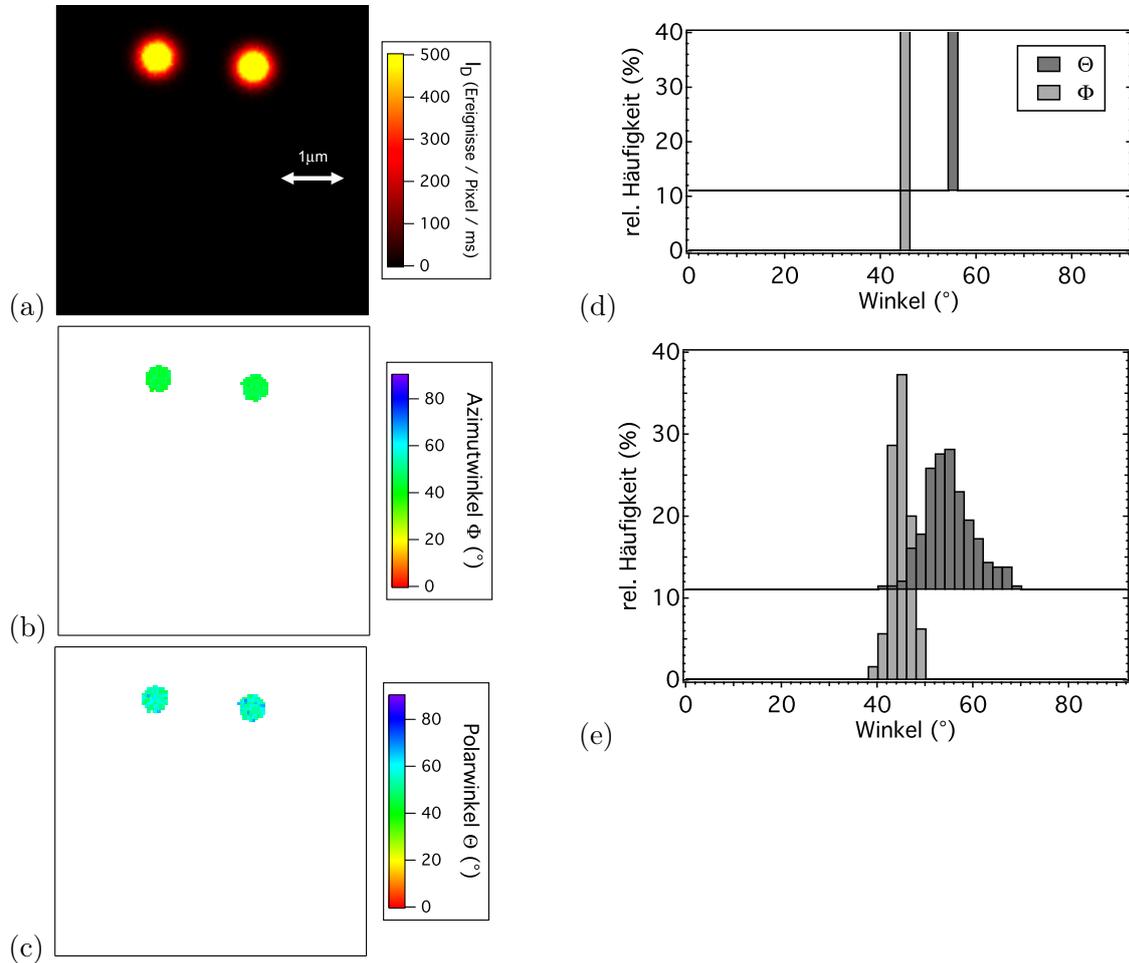


Abb. A.13: Simulationen vom Typ D. Die Falschfarbenbilder zeigen (a) die totale detektierbare Fluoreszenzintensität I_D einzelner, farbstoffmarkierter Latexkügelchen, (b) die Orientierung der Moleküle in der fokalen Ebene (Φ) und (c) die Orientierung der Moleküle zwischen der optischen Achse und dem Dipolmoment (Θ). Für die Winkel Φ (hellgrau) und Θ (dunkelgrau) erstellte Histogramme (d) für den Mittelwert der Winkel aller Pixel, die genau einem Latexkügelchen zugeordnet werden können sowie (e) für Winkelwerte aller Pixel, die das Schwellwertkriterium erfüllen.

A.3.4 Simulation der 3D Orientierung von Lipidvesikeln

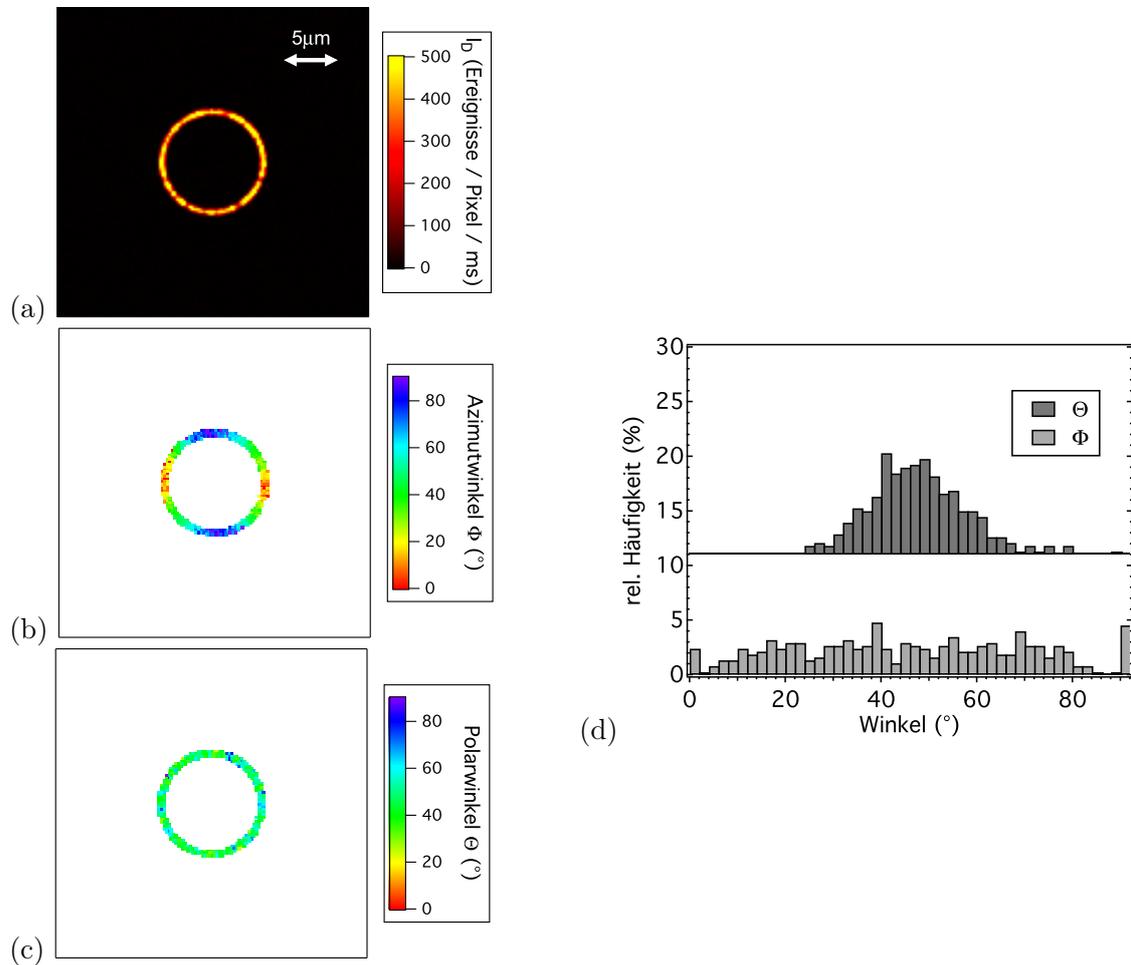


Abb. A.14: Simulationen vom Typ E. Die Falschfarbenbilder zeigen (a) die totale detektierbare Fluoreszenzintensität I_D einer Ebene eines farbstoffmarkierten Vesikels mit Radius $r = 5\mu\text{m}$ (b) die Orientierung der Moleküle in der fokalen Ebene (Φ) und (c) die Orientierung der Moleküle zwischen der optischen Achse und dem Dipolmoment (Θ). (e) Für die Winkel Φ (hellgrau) und Θ (dunkelgrau) erstellte Histogramme für den Winkelwerte aller Pixel, die das Schwellwertkriterium erfüllen.

Literaturverzeichnis

- [1] HELL, Stefan W. ; WICHMANN, Jan: Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. In: *Optics Letters* 19 (1994), Jun, Nr. 11, 780–782
- [2] RIGLER, R. ; METS, U. ; WIDENGREN, J. ; KASK, P.: Fluorescence Correlation Spectroscopy With High Count Rate and Low-background - Analysis of Translational Diffusion. In: *European Biophysics Journal With Biophysics Letters* 22 (1993), August, Nr. 3, S. 169–175
- [3] BETZIG, E. ; CHICHESTER, R. J.: Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy. In: *Science* 262 (1993), Nr. 5138, S. 1422–8
- [4] HOHLBEIN, Johannes ; HÜBNER, Christian G.: Simple scheme for rapid three-dimensional orientation determination of the emission dipole of single molecules. In: *Applied Physical Letters* 86 (2005), Nr. 12, 121104
- [5] FOURKAS, J. T.: Rapid determination of the three-dimensional orientation of single molecules. In: *Optics Letters* 26 (2001), Nr. 4, 211–213
- [6] TÖRÖK, P ; HIGDON, PD ; WILSON, Ts: On the general properties of polarised light conventional and confocal microscopes. In: *Optics Communications* 148 (1998), Mar 15, Nr. 4-6, S. 300–315
- [7] NOVOTNY, Lukas: *Light propagation and light confinement in near-field optics*, Swiss federal institute of technology, Dissertation, 1996
- [8] HOHLBEIN, Johannes ; HÜBNER, Christian G.: Three-dimensional orientation determination of the emission dipoles of single molecules: The shot-noise limit. In: *The Journal of Chemical Physics* 129 (2008), Nr. 9, 094703
- [9] KOWERKO, Danny ; SCHUSTER, Joerg ; BORCZYKOWSKI, Christian von: Restricted conformation dynamics of single functionalized perylene bisimide molecules on SiO₂ surfaces and in thin polymer films. In: *Molecular Physics* 107 (2009), Nr. 18, S. 1911–1921

-
- [10] VALEUR, Bernard: *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. 1. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002. – ISBN 3-527-29919-X
- [11] LAKOWICZ, Joseph R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Berlin : Springer, 2006. – ISBN 0-387-31278-1
- [12] JABŁOŃSKI, A.: Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. In: *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 94 (1935), 38-46
- [13] KASHA, Michael: Characterization of electronic transitions in complex molecules. In: *Faraday Society* 9 (1950)
- [14] PAULI, Wolfgang: Über den Zusammenhang des Abschlusses von Elektronengruppen im Atom mit der Komplexstruktur der Felder. In: *Zeitschrift für Physik* 31 (1925), S. 765-783
- [15] *Kapitel 4*. In: LAKOWICZ, Joseph R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd. Berlin : Springer, 2006, S. 97 – 155
- [16] SOMMERFELD, A.: Über die Ausbreitung der Wellen in der drahtlosen Telegraphie. In: *Annalen der Physik* 28 (1909), S. 665-736
- [17] TEWS, K.H.: Zur Variation von Lumineszenz-Lebensdauern. In: *Annalen der Physik* 29 (1973), S. 97-120
- [18] LUKOSZ, W. ; KUNZ, R.E.: Fluorescence lifetime of magnetic and electric dipoles near a dielectric interface. In: *Optics Communications* 20 (1977), Nr. 2, 195 - 199
- [19] LUKOSZ, W. ; KUNZ, R. E.: Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane interface. I. Total radiated power. In: *Journal of the Optical Society of America* 67 (1977), Dec, Nr. 12, 1607-1615
- [20] LUKOSZ, W. ; KUNZ, R. E.: Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane dielectric interface. II. Radiation patterns of perpendicular oriented dipoles. In: *Journal of the Optical Society of America* 67 (1977), Dec, Nr. 12, 1615-1619
- [21] LUKOSZ, W.: Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane dielectric interface. III. Radiation patterns of dipoles with arbitrary orientation. In: *Journal of the Optical Society of America* 69 (1979), Nov, Nr. 11, 1495-1503
- [22] DREXHAGE, K.H.: Influence of a dielectric interface on fluorescence decay time. In: *Journal of Luminescence* 1-2 (1970), Nr. 0, 693 - 701
- [23] HELLEN, E.H. ; AXELROD, D.: Fluorescence emission at dielectric and metal film interfaces. In: *Journal of the Optical Society of America A* 4 (1987), S. 337-350

- [24] VALLEE, R. ; TOMCZAK, N. ; GERSEN, H. ; DIJK, Emhp van ; GARCIA-PARAJO, M. F. ; VANCOSO, G. J. ; HULST, N. F.: On the role of electromagnetic boundary conditions in single molecule fluorescence lifetime studies of dyes embedded in thin films. In: *Chemical Physics Letters* 348 (2001), Nr. 3-4, 161–167
- [25] KREITER, M. ; PRUMMER, M. ; HECHT, B. ; WILD, U. P.: Orientation dependence of fluorescence lifetimes near an interface. In: *Journal of Chemical Physics* 117 (2002), Nr. 20, 9430–9433
- [26] POMOZZI, Andrea ; PARK, Mi-Kyoung ; KREITER, Maximilian: Ensemble measurement of the orientation-dependent variations in chromophore lifetimes near a dielectric interface. In: *Physical Review B* 79 (2009), APR, Nr. 16
- [27] NOVOTNY, L.: Single molecule fluorescence in inhomogeneous environments. In: *Applied Physics Letters* 69 (1996), Nr. 25, S. 3806–3808
- [28] NOVOTNY, Lukas ; HECHT, Bert: *Principals of Nano-optics*. Cambridge University Press, 2006. – 558 S. – ISBN 0–521–53988–9
- [29] TEWS, K.H.: On the variation of luminescence lifetimes. The approximations of the approximative methods. In: *Journal of Luminescence* 9 (1974), Nr. 3, 223 - 239
- [30] HA, T. ; LAURENCE, T.A. ; CHEMLA, D.S. ; WEISS, S.: Polarization Spectroscopy of Single Fluorescent Molecules. In: *Journal of Physical Chemistry* 103 (1999), Nr. 33, S. 6839–6850
- [31] AXELROD, D.: Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. In: *Biophysical Journal* 26 (1979), Jun, Nr. 3, 557–573
- [32] GÜTTLER, F. ; SEPIOL, J. ; PLAKHOTNIK, T. ; MITTERDORFER, A. ; RENN, A. ; WILD, U. P.: Single molecule spectroscopy: fluorescence excitation spectra with polarized light. In: *Journal of Luminescence* 56 (1993), S. 29–38
- [33] HA, T. ; ENDERLE, T. ; CHEMLA, D. S. ; SELVIN, P. R. ; WEISS, S.: Single molecule dynamics studied by polarization modulation. In: *Physical Review Letters* 77 (1996), Nr. 19, S. 3979–3982
- [34] LIEB, M. A. ; ZAVISLAN, J. M. ; NOVOTNY, L.: Single-molecule orientations determined by direct emission pattern imaging. In: *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 21 (2004), Nr. 6, 1210–1215
- [35] BÖHMER, M. ; ENDERLEIN, J.: Orientation imaging of single molecules by wide-field epifluorescence microscopy. In: *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics* 20 (2003), Nr. 3, 554–559

- [36] DEBARRE, A. ; JAFFIOL, R. ; JULIEN, C. ; NUTARELLI, D. ; RICHARD, A. ; TCHENIO, P. ; CHAPUT, F. ; BOILOT, J. P.: Quantitative determination of the 3D dipole orientation of single molecules. In: *European Physical Journal D* 28 (2004), Nr. 1, 67–77
- [37] SICK, B. ; HECHT, B. ; NOVOTNY, L.: Orientational imaging of single molecules by annular illumination. In: *Physical Review Letters* 85 (2000), Nr. 21, S. 4482–4485
- [38] BARTKO, A. P. ; DICKSON, R. M.: Three-dimensional orientations of polymer-bound single molecules. In: *Journal of Physical Chemistry B* 103 (1999), Nr. 16, S. 3053–3056
- [39] JASNY, Jan ; SEPIOL, Jerzy: Single molecules observed by immersion mirror objective. A novel method of finding the orientation of a radiating dipole. In: *Chemical Physics Letters* 273 (1997), Juli, Nr. 5-6, 439–443
- [40] EMPEDOCLES, S.A. ; NEUHAUSER, R. ; BAWENDI, M.G.: Three-dimensional orientation measurements of symmetric single chromophores using polarization microscopy. In: *Nature* 399 (1999), S. 126–130
- [41] FORKEY, J.N. ; QUINLAN, M.E. ; SHAW, M.E. ; CORRIE, J.E.T. ; GOLDMAN, Y.E.: Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization. In: *Nature* 422 (2003), Nr. 27, S. 399–404
- [42] PRUMMER, M. ; SICK, B. ; HECHT, B. ; WILD, U. P.: Three-dimensional optical polarization tomography of single molecules. In: *Journal of Chemical Physics* 118 (2003), Nr. 21, 9824–9829
- [43] HOHLBEIN, Johannes: *Single Molecule Fluorescence Detection in Nanoscale Confinement*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation, March 2008
- [44] FOREMAN, Matthew R. ; ROMERO, Carlos M. ; TÖRÖK, Peter: Determination of the three-dimensional orientation of single molecules. In: *Optical Letters* 33 (2008), May, Nr. 9, S. 1020–1022
- [45] LU, Chun-Yaung ; BOUT, David A. V.: Analysis of orientational dynamics of single fluorophore trajectories from three-angle polarization experiments. In: *The Journal of Chemical Physics* 128 (2008), Nr. 24, 244501
- [46] OHMACHI, Masashi ; KOMORI, Yasunori ; IWANE, Atsuko H. ; FUJII, Fumihiko ; JIN, Takashi ; YANAGIDA, Toshio: Fluorescence microscopy for simultaneous observation of 3D orientation and movement and its application to quantum rod-tagged myosin V. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (2012), Nr. 14, 5294–5298
- [47] TÖRÖK, P. ; HIGDON, PD ; WILSON, T: Theory for confocal and conventional micros-

- copies imaging small dielectric scatterers. In: *Journal of Modern Optics* 45 (1998), AUG, Nr. 8, S. 1681–1698
- [48] MINSKY, Marvin: *Microscopy Apparatus*. 1961
- [49] WEBB, R. H.: Theoretical basis of confocal microscopy. In: *Methods Enzymol* 307 (1999), S. 3–20
- [50] WEBB, R. H. ; HUGHES, G. W. ; DELORI, F. C.: Confocal scanning laser ophthalmoscope. In: *Applied Optics* 26 (1987), Apr, Nr. 8, S. 1492–1499
- [51] ERDMANN, R. ; ENDERLEIN, J. ; BECKER, W. ; WAHL, M.: High-speed electronics for fast detection of time-resolved fluorescence in single molecule experiments. In: *Experimental Technique of Physics* 41 (1995), Nr. 2, S. 189–93
- [52] MAGDE, Douglas ; ELSON, Elliot ; WEBB, W. W.: Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Physical Review Letters* 29 (1972), September, Nr. 11, 705–
- [53] ELSON, Elliot L. ; MAGDE, Douglas: Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. In: *Biopolymers* 13 (1974), Nr. 1, 1–27
- [54] MAGDE, D. ; ELSON, E. L. ; WEBB, W. W.: Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. In: *Biopolymers* 13 (1974), Jan, Nr. 1, 29–61
- [55] EHRENBERG, M. ; RIGLER, R.: Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. In: *Chemical Physics* 4 (1974), Nr. 3, 390 - 401
- [56] MAGDE, D. ; WEBB, W. W. ; ELSON, E. L.: Fluorescence Correlation Spectroscopy. III. Uniform Translation and Laminar-flow Rid B-5905-2011. In: *Biopolymers* 17 (1978), Nr. 2, S. 361–376
- [57] ZANDER, C. ; ENDERLEIN, J. ; KELLER, R.A.: *Single-molecule detection in solution - Methods and applications*. Berlin/New York : VCH-Wiley, 2002. – ISBN 3–527–40310–8
- [58] GELL, C. ; BROCKWELL, D. ; SMITH, Alastair: *Handbook of single molecule fluorescence spectroscopy*. New York : Oxford Univ Press, 2006
- [59] Kapitel 24. In: LAKOWICZ, Joseph R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd. Berlin : Springer, 2006, S. 797 – 840
- [60] KRICHEVSKY, Oleg ; BONNET, Grégoire: Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. In: *Reports on Progress in Physics* 65 (2002), Nr. 2, 251

- [61] HAUSTEIN, E. ; JAHNZ, M. ; SCHWILLE, P.: Triple FRET: A tool for studying long-range molecular interactions. In: *Chemphyschem* 4 (2003), Nr. 7, 745–748
- [62] SCHWILLE, P. ; MEYER-ALMES, F. J. ; RIGLER, R.: Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. In: *Biophysical Journal* 72 (1997), Apr, Nr. 4, S. 1878–1886
- [63] ARAGÓN, S. R. ; PECORA, R.: Fluorescence correlation spectroscopy and Brownian rotational diffusion. In: *Biopolymers* 14 (1975), Nr. 1, 119–137
- [64] SCALETTAR, Bethe A. ; KLEIN, Melvin P. ; HEARST, John E.: A theoretical study of the effects of driven motion on rotational correlations of biological systems. In: *Biopolymers* 26 (1987), Nr. 8, 1287–1299
- [65] HINZE, G. ; DIEZEMANN, G. ; BASCHE, T.: Rotational correlation functions of single molecules. In: *Physical Review Letters* 93 (2004), November, Nr. 20, S. 203001
- [66] LOMAN, Anastasia ; GREGOR, Ingo ; STUTZ, Christina ; MUND, Markus ; ENDERLEIN, Jorg: Measuring rotational diffusion of macromolecules by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Photochemistry and Photobiology Sciences* 9 (2010), Nr. 5, –
- [67] ENDERLEIN, J.: Fluorescence detection of single molecules near a solution/glass interface - an electrodynamic analysis. In: *Chemical Physics Letters* 308 (1999), Nr. 3-4, S. 263–266
- [68] ENDERLEIN, J ; RUCKSTUHL, T ; SEEGER, S: Highly efficient optical detection of surface-generated fluorescence. In: *Applied Optics* 38 (1999), FEB 1, Nr. 4, S. 724–732
- [69] ENDERLEIN, Jörg ; BÖHMER, Martin: Influence of interface dipole interactions on the efficiency of fluorescence light collection near surfaces. In: *Optics Letters* 28 (2003), Juni, Nr. 11, 941–943
- [70] JACKSON, J.D.: *Classical Electrodynamics*. Wiley, 1998. – ISBN 9780471309321
- [71] WEYL, H.: Ausbreitung elektromagnetischer Wellen über einem ebenen Leiter. In: *Annalen der Physik* 365 (1919), Nr. 21, 481–500
- [72] POYNTING, J. H.: On the Transfer of Energy in the Electromagnetic Field. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 175 (1884), 343-361
- [73] PEDROTTI, F. ; PEDROTTI, L. ; BAUSCH, W. ; HCHMIDT, H.: *Optik für Ingenieure*. 4. Springer, 2007. – ISBN 3540734716

- [74] FOREMAN, Matthew R. ; TÖRÖK, Peter: Fundamental limits in single-molecule orientation measurements. In: *New Journal of Physics* 13 (2011), Nr. 9, 093013
- [75] KÜHNEMUTH, R. ; SEIDEL, C. A. M.: Principles of single molecule multiparameter fluorescence spectroscopy. In: *Single Molecules* 2 (2001), Nr. 4, 251–254
- [76] ROTHWELL, P. J. ; BERGER, S. ; KENSCH, O. ; FELEKYAN, S. ; ANTONIK, M. ; WOHL, B. M. ; RESTLE, T. ; GOODY, R. S. ; SEIDEL, C. A. M.: Multiparameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 reverse transcriptase: primer/template complexes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003), Nr. 4, 1655–1660
- [77] PRUMMER, M. ; HÜBNER, C. G. ; SICK, B. ; HECHT, B. ; RENN, A. ; WILD, U. P.: Single-molecule identification by spectrally and time resolved fluorescence detection. In: *Analytical Chemistry* 72 (2000), Nr. 3, S. 443–447
- [78] PRUMMER, M. ; SICK, B. ; RENN, A. ; WILD, U. P.: Multiparameter microscopy and spectroscopy for single-molecule analytics. In: *Analytical Chemistry* 76 (2004), Nr. 6, 1633–1640
- [79] MACKLIN, J. J. ; TRAUTMAN, J. K. ; HARRIS, T. D. ; BRUS, L. E.: Imaging and time-resolved spectroscopy of single molecules at an interface. In: *Science* 272 (1996), Nr. 5259, S. 255–258
- [80] KAIM, G. ; PRUMMER, M. ; SICK, B. ; ZUMOFEN, G. ; RENN, A. ; WILD, U. P. ; DIMROTH, P.: Coupled rotation within single F0F1 enzyme complexes during ATP synthesis or hydrolysis. In: *Febs Letters* 525 (2002), Nr. 1-3, 156–163
- [81] BÖRNER, Richard ; KOWERKO, Danny ; BORCZYKOWSKI, Christian von ; HÜBNER, Christian G.: Efficient simultaneous fluorescence orientation, spectrum, and lifetime detection for single molecule dynamics. In: *Journal of Chemical Physics* (2012)
- [82] JUNG, Christophe ; HELLRIEGEL, Christian ; MICHAELIS, Jens ; BRAEUCHLE, Christoph: Single-molecule traffic in mesoporous materials: Translational, orientational, and spectral dynamics. In: *Advanced Materials* 19 (2007), APR 6, Nr. 7, S. 956+
- [83] JUNG, Christophe ; HELLRIEGEL, Christian ; PLATSCHEK, Barbara ; WOHRLE, Dieter ; BEIN, Thomas ; MICHAELIS, Jens ; BRÄUCHLE, Christoph: Simultaneous Measurement of Orientational and Spectral Dynamics of Single Molecules in Nanostructured Host Guest Materials. In: *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), Nr. 17, 5570–5579
- [84] LIETO, Alena M. ; CUSH, Randall C. ; THOMPSON, Nancy L.: Ligand-Receptor Kinetics Measured by Total Internal Reflection with Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 85 (2003), Nr. 5, 3294–3302

- [85] SCHROEYERS, W. ; VALLEE, R. ; PATRA, D. ; HOFKENS, J. ; HABUCHI, S. ; VOSCH, T. ; COTLET, M. ; MULLEN, K. ; ENDERLEIN, J. ; DE SCHRYVER, F. C.: Fluorescence lifetimes and emission patterns probe the 3D orientation of the emitting chromophore in a multichromophoric system. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Nr. 44, 14310–14311
- [86] SADRAI, Mahin ; HADEL, Linda ; SAUERS, Ronald R. ; HUSAIN, Syeda ; KROGH-JESPERSEN, Karsten ; WESTBROOK, John D. ; BIRD, George R.: Lasing action in a family of perylene derivatives: singlet absorption and emission spectra, triplet absorption and oxygen quenching constants, and molecular mechanics and semiempirical molecular orbital calculations. In: *The Journal of Physical Chemistry* 96 (1992), Nr. 20, 7988–7996
- [87] WÜRTHNER, Frank: Perylene bisimide dyes as versatile building blocks for functional supramolecular architectures. In: *Chemical Communications* (2004), Jul, Nr. 14, 1564–1579
- [88] LANG, E. ; WÜRTHNER, F. ; KOHLER, J.: Photophysical properties of a tetraphenoxy-substituted perylene bisimide derivative characterized by single-molecule spectroscopy. In: *ChemPhysChem* 6 (2005), Nr. 5, 935–941
- [89] HOFKENS, J. ; VOSCH, T. ; MAUS, M. ; KOHN, F. ; COTLET, M. ; WEIL, T. ; HERRMANN, A. ; MULLEN, K. ; DE SCHRYVER, F. C.: Conformational rearrangements in and twisting of a single molecule. In: *Chemical Physics Letters* 333 (2001), Nr. 3-4, 255–263
- [90] FRON, Eduard ; SCHWEITZER, Gerd ; OSSWALD, Peter ; WÜRTHNER, Frank ; MARSAL, Philippe ; BELJONNE, David ; MUELLEN, Klaus ; DE SCHRYVER, Frans C. ; AUWERAER, Mark Van d.: Photophysical study of bay substituted perylenediimides. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 7 (2008), Nr. 12, S. 1509–1521
- [91] LANGHALS, H.: Cyclic Carboxylic Imide Structures as Structure Elements of High-Stability - Novel Developments in Perylene Dye Chemistry. In: *Heterocycles* 40 (1995), Nr. 1, S. 477–500
- [92] OSSWALD, Peter ; WÜRTHNER, Frank: Conformational effects of bay substituents on optical, electrochemical and dynamic properties of perylene bisimides: Macrocyclic derivatives as effective probes. In: *Chemistry-A european journal* 13 (2007), Nr. 26, S. 7395–7409
- [93] KRAUSE, Stefan ; ARAMENDIA, Pedro F. ; TAEUBER, Daniela ; BORCZYKOWSKI, Christian von: Freezing single molecule dynamics on interfaces and in polymers. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011), Nr. 5, S. 1754–1761
- [94] KRAUSE, S. ; KOWERKO, D. ; BÖRNER, R. ; HÜBNER, C. G. ; BORCZYKOWSKI, C.

- von: Spectral Diffusion of Single Molecules in a Hierarchical Energy Landscape. In: *ChemPhysChem* 12 (2011), feb, Nr. 2, S. 303–312
- [95] BÖRNER, Richard ; KOWERKO, Danny ; BORCZYKOWSKI, Christian von ; HÜBNER, Christian G.: Time resolved 3D orientation spectroscopy: experimental realization and simulation. In: ENDERLEIN, Jörg (Hrsg.) ; GRYCZYNSKI, Zygmunt K. (Hrsg.) ; ERDMANN, Rainer (Hrsg.) ; SPIE (Veranst.): *Single Molecule Spectroscopy and Imaging IV* Bd. 7905 SPIE, SPIE, 2011, 79050D
- [96] MAUS, M. ; COTLET, M. ; HOFKENS, J. ; GENSCHE, T. ; DE SCHRYVER, F. C. ; SCHAFFER, J. ; SEIDEL, C. A. M.: An experimental comparison of the maximum likelihood estimation and nonlinear least squares fluorescence lifetime analysis of single molecules. In: *Analytical Chemistry* 73 (2001), Nr. 9, S. 2078–2086
- [97] ZHURAVLEV, L.T.: The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 173 (2000), Nr. 1–3, 1 - 38
- [98] WÜRTHNER, F. ; SAUTTER, A. ; SCHMID, D. ; A.WEBER, P. J.: Fluorescent and electroactive cyclic assemblies from perylene tetracarboxylic acid bisimide ligands and metal phosphane triflates. In: *Chemistry* 7 (2001), Nr. 4, S. 894–902
- [99] UJI-I, H. ; MELNIKOV, S. M. ; DERES, A. ; BERGAMINI, G. ; DE SCHRYVER, F. ; HERRMANN, A. ; MULLEN, K. ; ENDERLEIN, J. ; HOFKENS, J.: Visualizing spatial and temporal heterogeneity of single molecule rotational diffusion in a glassy polymer by defocused wide-field imaging. In: *Polymer* 47 (2006), Nr. 7, S. 2511–2518
- [100] HOHLBEIN, J. ; STEINHART, M. ; SCHIENE-FISCHER, C. ; BENDA, A. ; HOF, M. ; G., Hübner C.: Confined diffusion in ordered nanoporous alumina membranes. In: *Small* 3 (2007), März, Nr. 3, S. 380–385
- [101] Hungarian Biophys Soc; European Biophys Soc Assoc (Veranst.): *Giant unilamellar vesicle (GUV) as model system in advanced 3d orientation determinations*. Bd. 40. 233 SPRING ST, NEW YORK, NY 10013 USA : SPRINGER, AUG 2011 . – 196 S. – 8th EBSA European Biophysics Congress, Budapest, HUNGARY, AUG 23-27, 2011
- [102] KLAWITTER, Dominico: *3-D-Orientierung von Fluorophoren in GUV*, Universität zu Lübeck, Bachelorarbeit, 2011
- [103] BÖRNER, Richard ; EHRLICH, Nicky ; HÜBNER, Christian G.: Giant unilamellar vesicle (GUV) as model system in advanced 3D orientation determination. In: ENDERLEIN, Jörg (Hrsg.) ; GRYCZYNSKI, Zygmunt K. (Hrsg.) ; ERDMANN, Rainer (Hrsg.) ; SPIE (Veranst.): *Single Molecule Spectroscopy and Imaging IV* Bd. 8228 SPIE, SPIE, Jan 2012

-
- [104] INC., Avanti Polar L.: *Lipids For Liposome Formation*. http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1598&Itemid=379, . – Letzter Aufruf: 05.10.2012
- [105] ESTES, Daniel J. ; MAYER, Michael: Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1712 (2005), Jun, Nr. 2, 152–160
- [106] HONIG, M. G. ; HUME, R. I.: Dil and diO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. In: *Trends in Neurosciences* 12 (1989), Sep, Nr. 9, S. 333–5, 340–1
- [107] KRISHNA, M. M. ; SRIVASTAVA, A. ; PERIASAMY, N.: Rotational dynamics of surface probes in lipid vesicles. In: *Biophysical Chemistry* 90 (2001), Apr, Nr. 2, S. 123–133
- [108] ARIOLA, Florly S. ; MUDALIAR, Deepti J. ; WALVICK, Ronn P. ; HEIKAL, Ahmed A.: Dynamics imaging of lipid phases and lipid-marker interactions in model biomembranes. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 8 (2006), Oct, Nr. 39, 4517–4529
- [109] WIDENGREN, J ; SCHWILLE, P: Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Journal of Physical Chemistry A* 104 (2000), Juli, Nr. 27, 6416–6428
- [110] EHRlich, Nicky: *Probenpräparation DiO markierter GUV*. mündliche Kommunikation, April 2011
- [111] RISKE, Karin A. ; DIMOVA, Rumiana: Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. In: *Biophysical Journal* 88 (2005), Feb, Nr. 2, 1143–1155
- [112] HOLMBERG, Anders ; BLOMSTERGREN, Anna ; NORD, Olof ; LUKACS, Morten ; LUNDEBERG, Joakim ; UHLÉN, Mathias: The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. In: *Electrophoresis* 26 (2005), Feb, Nr. 3, 501–510
- [113] LOHSE, Brian ; BOLINGER, Pierre-Yves ; STAMOU, Dimitrios: Encapsulation efficiency measured on single small unilamellar vesicles. In: *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008), Nov, Nr. 44, 14372–14373
- [114] KORLACH, J. ; SCHWILLE, P. ; WEBB, W. W. ; FEIGENSON, G. W.: Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. In: *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 96 (1999), Jul, Nr. 15, S. 8461–8466
- [115] SCHWILLE, P. ; HAUPTS, U. ; MAITI, S. ; WEBB, W. W.: Molecular dynamics

- in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. In: *Biophysical Journal* 77 (1999), Nr. 4, S. 2251–2265
- [116] HAC, Agnieszka E. ; SEEGER, Heiko M. ; FIDORRA, Matthias ; HEIMBURG, Thomas: Diffusion in Two-Component Lipid Membranes—A Fluorescence Correlation Spectroscopy and Monte Carlo Simulation Study. In: *Biophysical Journal* 88 (2005), Nr. 1, 317–333
- [117] GULLAPALLI, Ramachandra R. ; DEMIREL, Melik C. ; BUTLER, Peter J.: Molecular dynamics simulations of DiI-C18(3) in a DPPC lipid bilayer. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 10 (2008), Jun, Nr. 24, 3548–3560
- [118] EINSTEIN, A.: Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. In: *Annalen der Physik* 322 (1905), Nr. 8, 549–560

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit

3D Orientierung und Multi-Parameter-Analyse einzelner Moleküle mit-
hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie

selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.
Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form weder einer anderen Prüfungsbehörde
vorgelegt, noch veröffentlicht.

Richard Börner Lübeck, 15. Oktober 2012

Curriculum Vita

Name: Richard Börner
Geburtsdatum/-ort: 10.05.1983, Marienberg (Erzgebirge)
Adresse: Fischergrube 64, 23552 Lübeck
Familiestand: ledig

07.2007 - 2012 Promotionsstudium, Universität zu Lübeck
10.2001 - 06.2007 Studium der Medizinischen Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
01.2007 - 06.2007 Auslandssemester mit Besuch der Sprachschule *Escuela De Lengua*, Granada, Spanien
01.2006 - 12.2006 Diplomarbeit „Verifikation zweidimensionaler Dosisverteilungen mithilfe des Beam Image Systems von Wellhöfer“, Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
05.2005 - 08.2005 Forschungspraktikum, Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
07.2004 Forschungspraktikum, BESSY (Berliner Elektronen Speicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung), Berlin-Adlershof
02.2003 - 03.2003 Forschungspraktikum, PET (Positron Emissions Tomographie) Center am Forschungszentrum Rossendorf bei Dresden
06.2001 Abitur am Gymnasium Olbernhau
07.1993 - 06.2001 Gymnasium Olbernhau, Olbernhau (Erzgebirge)
07.1989 - 06.1993 Grundschule, Neuhausen (Erzgebirge)

Wissenschaftliche Beiträge

Konferenzband - und Journalbeiträge

- September 2012 Efficient simultaneous fluorescence orientation, spectrum, and lifetime detection for single molecule dynamics; Börner, Richard; Kowerko, Danny; Krause, Stefan; von Borczyskowski, Christian; and Hübner, Christian G.; Journal of Chemical Physics, 2012, Volume, Issue, p., (2012), accepted
- Februar 2011 Spectral diffusion of single molecules in a hierarchical energy landscape; Krause, Stefan; Kowerko, Danny; Börner, Richard; Hübner, Christian G.; and von Borczyskowski, Christian; ChemPhysChem, 2011, Volume 12, Issue 2, p.303 - 312, (2011)
- Oktober 2011 Giant unilamellar vesicle (GUV) as model system in advanced 3D orientation determination; Börner, Richard; Ehrlich, Nicky; and Hübner, Christian G.; European Biophysics Journal with Biophysics Letters, Volume 40, p.196-196, (2011)
- Januar 2011 Time resolved 3D orientation spectroscopy: experimental realization and simulation; Börner, Richard; Kowerko, Danny; von Borczyskowski, Christian; and Hübner, Christian G.; Single Molecule Spectroscopy and Imaging IV, Volume 7905, Number 1, p.79050D, (2011)
- Oktober 2007 Verifikation zweidimensionaler Dosisverteilungen mithilfe des Beam Image Systems von Wellhöfer; Börner, Richard; Janich, Martin; Scharf, Rüdiger; and Gerlach, Reinhard; Dreiländertagung Medizinische Physik 2007, 25/09/2007, Bern, Schweiz, (2007)

Vorträge

- März 2012 Membranes in Health and Disease, Gomadingen, „Giant unilamellar vesicle (GUV) as model system in advanced 3D orientation determination“, R. Börner, N. Ehrlich und C. G. Hübner
- Januar 2012 Gastvortrag, Brandeis University, Waltham, MA, „Advanced Methods in Confocal Fluorescence Microscopy“, R. Börner
- Januar 2012 SPIE Photonics West 2012, Moscone Center, San Francisco, „Giant unilamellar vesicle (GUV) as model system in advanced 3D orientation determination“, R. Börner, N. Ehrlich und C. G. Hübner

- Januar 2011 SPIE Photonics West 2011, Moscone Center, San Francisco, „Time resolved 3D orientation spectroscopy - experimental realization and simulation“, R. Börner, D. Kowerko, St. Krause, C. von Borczyskowski und C. G. Hübner
- Juni 2010 Gastvortrag, TU Chemnitz, Chemnitz, „Time resolved 3D orientation spectroscopy - experimental realization and simulation“, R. Börner
- März 2010 Frühjahrstagung 2010, DPG, Regensburg, „Time resolved 3D orientation spectroscopy - experimental realization and simulation“, R. Börner, D. Kowerko, C. v. Borczyskowski und C. G. Hübner
- Juni 2009 Gastvortrag, TU Chemnitz, Chemnitz, „Time resolved 3D orientation of single molecules“ R. Börner
- März 2009 Frühjahrstagung 2009, DPG, Dresden, „Time resolved three-dimensional orientation of eGFP“, R. Börner und C. G. Hübner

Poster

- September 2011 17th international Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences“, Picoquant, Berlin, „Giant unilamellar vesicle (GUV) as model system in advanced 3d orientation determination“, R. Börner, N. Ehrlich, D. Klawitter and C. G. Hübner
- August 2011 EBSA, Budapest, „Giant unilamellar vesicle (GUV) as model system in advanced 3D orientation determination“, R. Börner, N. Ehrlich and C. G. Hübner
- Juli 2011 488. WE Heraeus Seminar „Single Molecule Spectroscopy: Current Status and Perspectives, Chemnitz, „Giant unilamellar vesicle (GUV) as model system in advanced 3D orientation determination“, R. Börner, N. Ehrlich and C. G. Hübner
- März 2011 Frühjahrstagung, DPG, Dresden, „A theoretical description of the 3D orientation determination of dipoles near interfaces“, R. Börner and C. G. Hübner
- März 2010 Frühjahrstagung, DPG, Regensburg „Single molecule 3D orientation: A multiparameter measurement on PBI“ R. Börner, D. Kowerko, C. von Borczyskowski and C. G. Hübner
- September 2009 15th international Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences“, Picoquant, Berlin, „Single molecule 3D orientation: A multiparameter measurement on PBI“, R. Börner, D. Kowerko, C. von Borczyskowski and C. G. Hübner

Juni 2009	Doktorandentag - Uni im Dialog, Universität zu Lübeck, Lübeck, „Orientierung in drei Dimensionen - Einzelnen Molekülen auf der Spur“, R. Börner and C. G. Hübner
September 2008	14th International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences“, Picoquant, Berlin „Time-dependent 3D orientation of eGFP in different surroundings“, R. Börner, J. Hohlbein and C. G. Hübner
Juni 2008	Doktorandentag - Uni im Dialog, Universität zu Lübeck, Lübeck, „TIRFM - Beleuchtung von Oberflächen“, R. Börner and C. G. Hübner

Stipendien

Januar 2012	DAAD Reisestipendium für eine Vortragsreise, Gastvortrag an der Brandeis Universität, Boston, MA, USA
Januar 2012	Reisestipendium der Freunde und Förderer der Universität zu Lübeck e.V. für eine Konferenzreise, Vortrag auf der SPIE Photonics WEST, San Francisco, CA, USA
September 2011	Reisestipendium der DGfB e.V. für eine Konferenzreise, EB-SA, Budapest, Ungarn
März 2011	Reisestipendium der WE Hereaus Stiftung für eine Konferenzreise, Poster auf der DPG Frühjahrstagung, Dresden, Deutschland
Januar 2011	Reisestipendium der Freunde und Förderer der Universität zu Lübeck e.V. für eine Konferenzreise, Vortrag auf der SPIE Photonics WEST, San Francisco, CA, USA
März 2010	Reisestipendium der WE Hereaus Stiftung für eine Konferenzreise, Vortrag auf der DPG Frühjahrstagung, Regensburg, Deutschland

Lehre

SoSe 2012	Praktikumsbetreuer für das Grundpraktikum Physik für Mediziner, Universität zu Lübeck (3 SWS)
WS 2011/12	Seminarleiter für die Übung zur Biophysik I, Master in Medizinische Ingenieurwissenschaften (MIW), Universität zu Lübeck (2 SWS)
SoSe 2011	Betreuer im Biophysikpraktikum für Molecular Life Science (MLS), Universität zu Lübeck (2 SWS)
WS 2010/11	Seminarleiter für die Übung zur Biophysik I, Master in MIW, Universität zu Lübeck (2 SWS)

SoSe 2010	Betreuer im Biophysikpraktikum für MLS, Universität zu Lübeck (3 SWS)
WS 2009/10	Betreuer im Biophysikpraktikum für MIW, Universität zu Lübeck (3 SWS)
SoSe 2009	Praktikumsbetreuer für das Grundpraktikum Physik für Mediziner (3 SWS) Betreuer im Biophysikpraktikum für MLS, Universität zu Lübeck (3 SWS)
WS 2008/09	Praktikumsbetreuer für das Grundpraktikum Physik für MLS, Universität zu Lübeck (4 SWS)
SoSe 2008	Praktikumsbetreuer für das Grundpraktikum Physik für Mediziner, Universität zu Lübeck (6 SWS)
WS 2007/08	Vorlesung der Experimentellen Physik, Fachhochschule Lübeck (4 SWS)
2003-2006	Praktikumsbetreuer für das Grundpraktikum Physik für Mediziner und Pharmazeuten, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg (3 SWS)

Betreuung wissenschaftlicher Arbeiten

SoSe 2011	Betreuung der Bachelorarbeit <i>3-D-Orientierung von Fluorophoren in GUV</i> von Dominico Klawitter
SoSe 2010	Betreuung der Bachelorarbeit <i>Drei-Fokus-Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie</i> von Lars Kreutzburg

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian G. Hübner. Er hat die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation übernommen und deren Entstehung mit kritischen und inspirierenden Diskussionen bereichert. Ich möchte ihm insbesondere für den kreativen Rahmen und dem mir eingeräumten Freiraum bei der Verwirklichung meiner Ziele in Wissenschaft und Lehre, aber auch im persönlichen Bereich, danken.

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gutsmann.

Für die mir entgegengebrachte Unterstützung bei der Formulierung diverser Anträge für Stipendien danke ich Herrn Prof. Dr. em. Alfred X. Trautwein, dessen Lebenserfahrung und wissenschaftlicher Weitblick mich stets beeindruckt haben.

Herrn PD Dr. Hauke Paulsen danke ich für seine bereitwillige und fortwährende Unterstützung in Sachen theoretischer Physik.

Ein großer Dank gilt meinen Kooperationspartnern Danny Kowerko, Stefan Krause und Nicky Ehrlich. Gemeinsam haben wir der Welt der fluoreszenten Moleküle einige Geheimnisse entrissen und publikationsreif der Wissenschaft zur Verfügung gestellt. Meine Arbeit wäre ohne diese Zusammenarbeit sicher eine Andere!

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für jegliche Art der Unterstützung, die schließlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Dabei sollen auch die zahlreichen Kaffee-Runden nicht in Vergessenheit geraten, die meinen Horizont in Sachen Automobil, Politik und Kindererziehung wesentlich erweitert haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinen Kollegen. Ich danke Lars, der sicher aufgrund der Kürze des Weges die Fragen auf Zuruf ertrug und immer nach besten Wissen und Gewissen in besonnener Weise antwortete. Verena möchte ich für die vielen Korrekturen zahlreicher Arbeiten und Anträge der vergangenen Jahre danken, durch die mir wohl oft die Schmach erspart blieb. Dana und Henning danke ich vor allem für ihre Hilfe beim experimentellen Aufbau. Wie viele Stunden sind wohl bei der Justage des *setups* und der Programmierung der Steuersoftware vergangen, bis schließlich alles auf diesem Niveau funktionierte?

Ich danke Herrn K.-H. Finder und Herrn R. Schultz für alle bearbeiteten Aufträge für elektronische und feinmechanische Problemstellungen, ohne die kein experimenteller Aufbau ein Erfolg gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie. Ihr wart stets in Zeiten des Glücks, aber eben auch in schwierigen Zeiten bei mir, habt hinter mir gestanden und mich mit Rat und Tat unterstützt. Der Weg in die Ferne war wichtig, der Weg zurück ist - nicht zuletzt dadurch - umso schöner.

Warum das Alles, wenn man es mit niemanden teilen kann? - Ich teile am liebsten mit meiner Heidi!