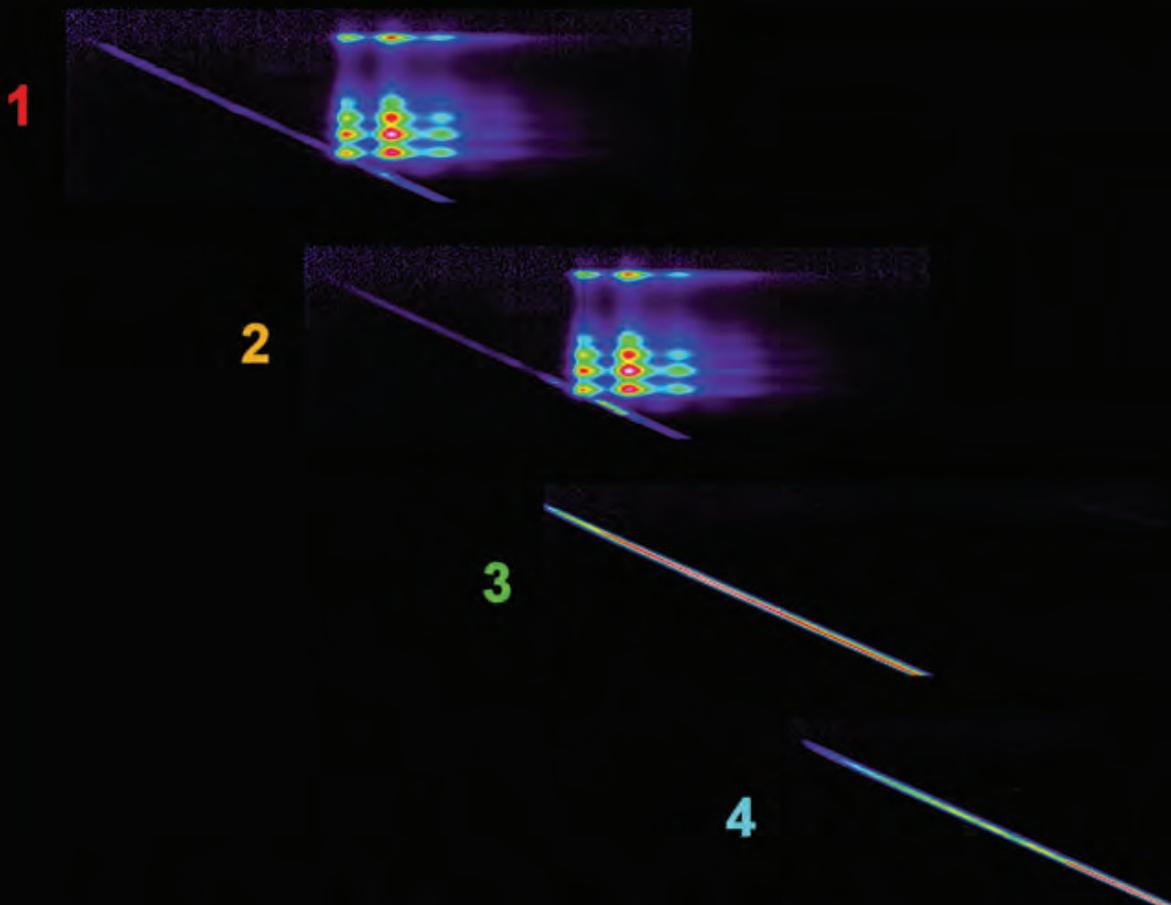
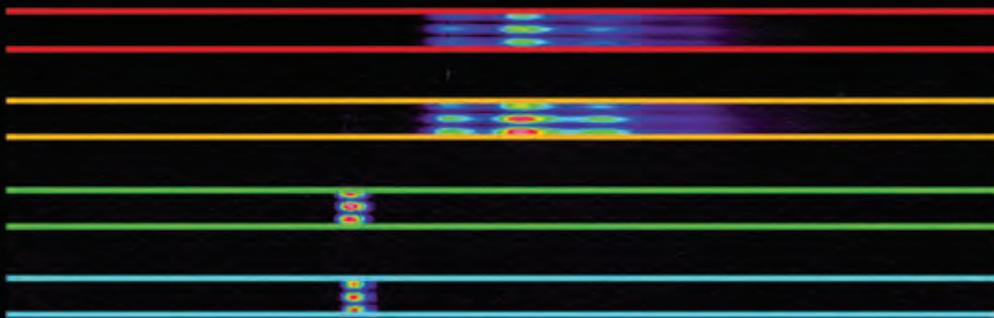


---

**Stefanie Schwedler**

Mehrdimensionale Fluoreszenzspektroskopie  
zur Analyse des Zusammenhangs zwischen  
Struktur und Funktion von Makromolekülen

---



**Cuvillier Verlag Göttingen**  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

MEHRDIMENSIONALE  
FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE  
ZUR ANALYSE DES ZUSAMMENHANGS  
ZWISCHEN STRUKTUR UND FUNKTION  
VON MAKROMOLEKÜLEN



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
Fakultät für Chemie  
Universität Bielefeld

vorgelegt von  
Stefanie Schwedler  
im Dezember 2009

## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2010

Zugl.: Bielefeld, Univ., Diss., 2009

978-3-86955-264-4

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2010

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2010

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-264-4

# *Für Nora*

*Denn manchmal bedeutet  
frei sein  
nicht zu gehen,  
sondern zu bleiben.*



# Danksagung

Zu allererst möchte ich den Menschen danken, die diese Arbeit, welche zwischen Januar 2006 und Dezember 2009 in der Arbeitsgruppe Physikalische Chemie I von Frau Prof. Kohse-Höinghaus entstanden ist, durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung überhaupt erst ermöglicht haben.

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn HD Dr. Andreas Brockhinke für das interessante Thema, die freundschaftliche Betreuung sowie seine für Fragen stets einladend geöffnete Bürotür. Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. Kohse-Höinghaus für ihr stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die Bereitstellung der hervorragenden Infrastruktur.

Herrn Prof. Dr. Mattay danke ich für die Übernahme der Zweitbegutachtung.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die erhaltene finanzielle und ideelle Förderung während der Dissertation.

Den kooperierenden Arbeitsgruppen und ihren Leitern, also der Anorganischen Chemie von Prof. Dr. Lothar Weber der Universität Bielefeld, der Arbeitsgruppe für biophysikalische Chemie von Prof. Dr. Gregor Jung der Universität Saarbrücken sowie der Laser Analytics Group von Dr. Clemens Kaminski der Universität Cambridge danke ich für die ebenso produktive wie kollegiale Zusammenarbeit. Dear LAG-members, I've been overwhelmed by your warm welcome. Thanks, Simon, for your help and patience during my stay.

Der gesamten Arbeitsgruppe Physikalische Chemie I möchte ich an dieser Stelle für ein nicht selbstverständliches Ausmaß an Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken. Ihrem umsichtigen Präventivplan zur schrittweisen Gewöhnung an den allgemeinen Wahnsinn

verdanke ich die Erhaltung eines gewissen Rests an Normalität und Verstand über die Dissertation hinaus.

Regina Brockhinke danke ich für die gute Zusammenarbeit im AES-Labor, Harald Waterbör für die fürsorgliche, technische Unterstützung zur Kompensation meiner Bastel- und Schraublegasthenie. Michael Letzgus danke ich für seine Unterstützung am Pikosekunden-system (auf dass Dein positives Karma mein Müsli jederzeit relativiert) sowie für die beeindruckende Umsetzung von Softwaresonderwünschen aller Art. Danke an Angela Seipel für psychologische Betreuung und verantwortungsvolle Verwaltung meiner Schokoladen-vorräte zum Wohle meiner Gesundheit. Vincent Vannier danke ich für die gewissenhafte Überwachung des Nacht-zu-Tag-Wechsels und den nie abreißen den Strom ablenkenden Lesestoffs zur Milderung überzogener Ambitionen.

Der ebenfalls an dieser Arbeit beteiligten Armada aus Bacherlorstudenten (Johannes Cramer, Tanja Bußmann, Raimund Noske, Julia Krüger, Natalia Bader), Forschungspraktikanten bzw. studentischen Hilfskräften (Leonhard Popilka, Lena Böhling) sowie der Diplomandin Deepa Cherian gebührt Dank für ihr fachliches Engagement, viele anregende Diskussionen und geduldiges Ertragen meiner tendenziell utopischen Erwartungen.

Ein spezieller Dank gilt Jan Momme Schwedler und der gesamten Familie Rinne/Schwedler sowohl für den liebevollen Rückhalt als auch die uneingeschränkte Unterstützung meines manchmal etwas anstrengenden Bedürfnisses nach beruflicher Selbstverwirklichung. Zu guter Letzt ist wohl noch eine Entschuldigung fällig: Liebe Nora, verzeih die vielen Stunden, die Du auf mich hast verzichten müssen.

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht als:

### Publikationen

- *Synthetic, structural, photophysical and computational studies of conjugated bis- and tris-1,3,2-benzodiazaboroles and related bis(boryl)-dithiophenes*, L. Weber, V. Werner, M. A. Fox, T. B. Marder, S. Schwedler, A. Brockhinke, H.-G. Stammer and B. Neumann; Dalton Transactions, 1339-1315, 2009.
- *Functionalized 1,3,2-benzodiazaboroles: Syntheses, structures, photoluminescence and quantum chemical studies*, L. Weber, V. Werner, T. B. Marder, M. A. Fox, S. Schwedler, A. Brockhinke, H.-G. Stammer and B. Neumann; Dalton Transactions, 2823-2831, 2009.
- *A method to unmix multiple fluorophores in microscopy images with minimal a priori information*, S. Schlachter, S. Schwedler, A. Esposito, G. Kaminski-Schierle, C. G. Moggridge and C.F. Kaminski; Optics Express, 22747-22760, 2009.
- *Imaging the nature of protein aggregation in vitro and in vivo*, G.S. Kaminski-Schierle, C.W. Bertoncini, S. Schlachter, T.J. van Ham, A.T. van der Goot, S. Schwedler, A. Esposito, J. R. Kumita, E.A. Nollen, C.M. Dobson, C.F. Kaminski; Science, **submitted**, 2009.
- *Investigation of the structure of Neuropeptide Y in solution using combined FRET and anisotropy methods*, R. Brockhinke, S. Schwedler, A. Bettio, A. G. Beck-Sickinger, A. Brockhinke; PCCP, **submitted**, 2009.

### Vorträge

- *Advanced fluorescence spectroscopy techniques reveal excited-state-processes in single-tryptophan-proteins*, S. Schwedler, K. Kohse-Höinghaus, R. Brockhinke, A. Brockhinke; 108. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie, Köln, Deutschland, 23. Mai 2009.

## Poster

- *Investigation of dyes and proteins via multidimensional static and time-resolved fluorescence spectroscopy*, S. Schwedler, K. Kohse-Höinghaus, R. Brockhinke, A. Brockhinke; 107. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie, 1. - 4. Mai 2008, Saarbrücken, Deutschland.
- *Analysing proteins via multidimensional fluorescence spectroscopy*, S. Schwedler, G.S.-Kaminski-Schierle, C.F.Kaminski, K. Kohse-Höinghaus, A. Brockhinke; **Schüco-Nachwuchspreis für Präsentation**, Science Fair 08, 13. November 2008, Bielefeld, Deutschland.
- *Investigation of excited-state relaxation in single-tryptophan and other proteins via multidimensional static and time-resolved fluorescence* S. Schwedler, K. Kohse-Höinghaus, R. Brockhinke, A. Brockhinke; 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society, 28. Februar bis 4. März 2009, Boston Massachusetts, USA.
- *Various diazaboroles as potential OLED-dyes and fluoride sensors studied via multidimensional fluorescence techniques* D. Cherian, S. Schwedler, K. Kohse-Höinghaus, R. Brockhinke, V. Werner, L. Weber, A. Brockhinke; 108. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie, Köln, Deutschland, 21. - 23. Mai 2009.
- *Analysis and quantification of multi-dimensional confocal microscopy data* S. Schlachter, S. Schwedler, A. Esposito, A. D. Elder, G. S. Kaminski Schierle, C. F. Kaminski; Focus On Microscopy, Krakau, Polen, 5. - 8. April 2009.
- *Fluorescence of benzodiazaboroles: Potential OLED-dyes and spectrally switchable fluorid sensors*, S. Schwedler, D. Eickhoff, H. Kuhtz, L. Weber, A. Brockhinke; Science Fair 09, 12. November 2009, Bielefeld, Deutschland.

# Abstract

Fluorescence spectroscopy is a powerful technique widely used in combustion, material sciences, atmospheric chemistry, astronomy and life sciences. Considering the enormous progress in related research areas such as laser technology, confocal microscopy, multiphoton excitation, computational capacities and detection instrumentation, the development of new applications and analysing strategies, which make use of the recent advances, constitutes a major task in fluorescence spectroscopy research. Therefore, this work focuses on the development and application of novel fluorescence methods in two main areas of interest: the investigation of protein structure and dynamics on the one hand, and the design of novel functional fluorophores on the other hand.

Protein function, structure and dynamics are inseparably linked; misfolding and denaturation may not only inhibit its function, causing illnesses such as sickle cell anaemia, but also lead to toxic reactions of the protein, as seen in the case of Parkinson's, Huntington's and Creutzfeldt Jakob disease. Investigating a proteins structure and dynamics in solution as well as its reactions and pathways in living organisms are hence important challenges in protein science.

Even though the possibility of protein reorganisation after tryptophan excitation with UV light, which causes spectral relaxation, has been known for several decades, proofs for this effect are still scarce. Even more important, a time-efficient tool to distinguish between spectral relaxation and the existence of multiple protein conformers is not known in literature. In this thesis the largest known investigation on spectral relaxation using twenty different peptides and proteins is presented. On that basis, a method to detect

spectral relaxation in the nanosecond range without the need to vary temperature and viscosity of the solution has been developed, revealing clear evidence for spectral relaxation for three of the analysed proteins. By varying the used timeframe, relaxation on the subnanosecond timescale was also detected. Hence this study supplies a tool for fast and efficient analysis of spectral relaxation which enables extended systematic studies on the connections between protein reorientation, structure, flexibility and sequence.

Another main topic of this work consists in the optimization of microscopic methods for the investigation of protein aggregation, folding and reactions in living cells and organisms. In cooperation with the laser analytics group of Dr. Kaminski (University of Cambridge), the performance of an especially flexible hyperspectral FLIM setup was successfully improved, allowing the detection of the whole visible wavelength range with high efficiencies. On that basis, a method to separate the fluorescence of spectrally very similar fluorophores *in vitro* and *in vivo* by their different lifetimes has been presented. These investigations can be looked at as a starting point in the quest for simultaneous analysis of three or more fluorophores, which might in the future allow statistical analysis of tissue samples with multiple markers as a tool to diagnose diseases such as cancer. The third project in microscopy focusses on the aggregation of  $\alpha$ -synuclein, a neurotoxic process in human neuronal cells, which finally leads to Parkinson's disease. By tagging the protein with GFP at its C-terminus, direct observation of the aggregation process in neuronal cells via a significant drop in fluorescence lifetime was possible. In studies succeeding this work, the method has already been applied to living organisms (*C. elegans*) and to the observation of a similar aggregation process causing Huntington's disease. Further research will concentrate on the possibility to use this approach for technical drug screening.

The possible applications of fluorescent dyes are as numerous and versatile as fluorescence spectroscopy itself. Beside the classical use as laser dyes, fluorescent markers and substances for ion or pH sensing, the comparably new area of optoelectronic materials are in great need of suitable luminescent emitters. Especially the design of stable and efficient emitters in the blue wavelength region provides a major challenge for synthetic and analytic chemists alike.

In cooperation with the inorganic chemistry group of Prof. Dr. Weber (Universität Bielefeld), a series of  $\pi$ -conjugated systems with one, two and three 1,3-diethyl-1,3,2-benzodiaz-

borolyl end-groups has systematically been investigated for luminescence characteristics in order to reveal their applicability as blue OLED dyes or fluoride sensors. Uniting synthetic and analytic expertise of both groups, it was possible to design molecules with excellent luminescent properties, combining high quantum yields with an emission in the visible. These properties do also apply for molecules in the solid state, since a similar behaviour has been observed for crystals as well as for a low concentration of benzodiazaborole molecules in thin plastic sheets. Their low lewis acidity compared to other triarylboranes was used to develop spectrally switchable fluoride sensors, which change their color upon addition of small amounts of fluoride. In view of technical applications as OLED emitters further research is necessary to insert these substances in thin films and investigate and optimize the optical properties as well as conductivity therein.

This work presents several innovative approaches to apply the grown possibilities of multi-dimensional spectroscopy to medically and technically relevant areas of scientific research. Its potential is, however, by far not exhausted. The need to develop novel analytic tools for specific applications provides one of the driving forces for interdisciplinary research projects. Hence this process, interchanging between visionary fantasy and technical feasibility, increases the diversity and variability of modern research and will further contribute to broadening the scientifically accessible horizon in the future.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Spektroskopie in der chemischen Diagnostik . . . . .	1
1.2	Proteinstruktur und -dynamik . . . . .	3
1.3	Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	4
1.4	Zielsetzung . . . . .	5
<b>2</b>	<b>Theoretischer Hintergrund</b>	<b>9</b>
2.1	Spektroskopische Grundlagen . . . . .	9
2.1.1	Absorption . . . . .	9
2.1.2	Energietransferprozesse und Lumineszenz . . . . .	10
2.1.3	Lebenszeit . . . . .	12
2.1.4	Quantenausbeute . . . . .	15
2.1.5	Quenching . . . . .	16
2.1.6	Polarisation und Anisotropie . . . . .	20
2.2	Lösungsmiteinfluss und spektrale Relaxation . . . . .	23
2.2.1	Solvenz- und spektrale Relaxation . . . . .	23
2.2.2	Statischer Solvenzeinfluss . . . . .	30
2.3	Proteinfluoreszenz . . . . .	34
2.3.1	Fluoreszente Aminosäuren . . . . .	34
2.3.2	Einfluss der Proteinstruktur . . . . .	36
<b>3</b>	<b>Experiment</b>	<b>41</b>
3.1	Anregungs-Emissions-Spektroskopie (AES) . . . . .	41
3.1.1	Aufbau . . . . .	41
3.1.2	Datenaufnahme . . . . .	44

3.2	Polarisationsaufgelöste Erweiterung der AES . . . . .	46
3.2.1	Konstruktion . . . . .	46
3.2.2	Datenaufnahme und -bearbeitung . . . . .	47
3.2.3	Testmessungen . . . . .	49
3.2.4	Diskussion . . . . .	51
3.3	Zeitaufgelöste Laserinduzierte Fluoreszenz . . . . .	52
3.3.1	Das Lasersystem . . . . .	52
3.3.2	Probe . . . . .	54
3.3.3	Detektion . . . . .	55
3.4	Absorptionsmessungen . . . . .	57
3.5	Probenpräparation . . . . .	57
3.5.1	Proteine . . . . .	57
3.5.2	Benzodiazaborole . . . . .	58
3.5.3	Referenzfarbstoffe . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Datenbearbeitung</b>	<b>61</b>
4.1	Kalibration . . . . .	61
4.1.1	Zuordnung der Zeit- und Wellenlängenskala . . . . .	62
4.1.2	Kalibration der Anregungseffizienz . . . . .	63
4.1.3	Kalibration der Detektionseffizienz . . . . .	64
4.2	Verbesserung der Kalibrationsroutine . . . . .	66
4.2.1	Zweidimensionale Detektionseffizienz der Streakereinheit . . . . .	66
4.2.2	IR-Korrektur . . . . .	71
4.3	Datenanalyse . . . . .	73
4.3.1	Korrektur der Absorptionsspektren . . . . .	73
4.3.2	Bestimmung von Absorptions- und Fluoreszenzmaxima . . . . .	74
4.3.3	Bestimmung der Lebenszeit . . . . .	74
4.3.4	Anisotropie . . . . .	77
<b>5</b>	<b>Spektrale Relaxation in <i>single tryptophan</i>-Proteinen</b>	<b>81</b>
5.1	Einleitung und Aufgabenstellung . . . . .	81
5.2	Charakterisierung der Proteine und Peptide . . . . .	84

5.2.1	Auswahl geeigneter Proteine und Peptide . . . . .	84
5.2.2	Voruntersuchungen . . . . .	86
5.3	Der <i>red edge</i> -Effekt . . . . .	90
5.4	Analyse der dynamischen Fluoreszenz . . . . .	93
5.4.1	Energieabhängigkeit . . . . .	93
5.4.2	Schnelle Relaxationsprozesse . . . . .	96
5.4.3	Entwicklung eines Modells für die Schwerpunktsverschiebung durch Konformere . . . . .	102
5.4.4	Langsame Relaxationsprozesse . . . . .	107
5.5	Zusammenfassung . . . . .	116
<b>6</b>	<b>hs-FLIM: Optimierung und Anwendung</b>	<b>121</b>
6.1	Einleitung und Aufgabenstellung . . . . .	121
6.1.1	Das Prinzip von FLIM . . . . .	122
6.1.2	hs-FLIM . . . . .	122
6.1.3	Aufgabenstellung . . . . .	124
6.2	Apparative Optimierung . . . . .	125
6.3	Separation von Fluorophorbeiträgen . . . . .	129
6.3.1	Voruntersuchungen mit Farbstoffen . . . . .	130
6.3.2	Fluorophorverteilung in lebenden Zellen . . . . .	132
6.3.3	Diskussion . . . . .	134
6.4	Aggregation von $\alpha$ -Synuclein . . . . .	135
6.5	Zusammenfassung . . . . .	141
<b>7</b>	<b>Photophysik der Benzodiazaborole</b>	<b>143</b>
7.1	Einleitung . . . . .	143
7.2	Aufgabenstellung . . . . .	145
7.3	Fluoreszenzeigenschaften in Lösung . . . . .	149
7.3.1	Absorptions- und Fluoreszenzspektren . . . . .	149
7.3.2	Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute . . . . .	152
7.3.3	Lebenszeiten . . . . .	154
7.3.4	Solvatochromismus . . . . .	155

7.4	Quenching durch Lewisbasen . . . . .	163
7.4.1	Quenching durch Pyridin . . . . .	163
7.4.2	Quenching durch TBAF . . . . .	167
7.5	Fluoreszenz in Festkörpern und Polymeren . . . . .	178
7.5.1	Kristallfluoreszenz . . . . .	179
7.5.2	Fluoreszenz dünner Schichten . . . . .	179
7.5.3	Fluoreszenz in einer Kunststoffmatrix . . . . .	180
7.5.4	Fluoreszenz in Polymeren . . . . .	181
7.6	Zusammenfassung . . . . .	183
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>187</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>191</b>
A.1	Charakterisierung der Benzodiazaborole . . . . .	191
A.2	Separation von Fluorophorbeiträgen . . . . .	194
A.3	Untersuchung verschiedener eYFP-Mutanten . . . . .	195
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>197</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>199</b>



*Und allem Anfang wohnt ein Zauber inne.*

*Hermann Hesse*

# 1 Einleitung

## 1.1 Spektroskopie in der chemischen Diagnostik

Die Vielfalt der uns heute zur Verfügung stehenden, spektroskopischen Messverfahren entspringt einem Prozess, der vor etwa hundertfünfzig Jahren seinen Anfang nahm. Im Jahre 1860 stellten Bunsen und Kirchhoff ihre Arbeiten zur „Chemischen Analyse durch Spektralbeobachtungen“ vor.<sup>[1]</sup> Darin führten sie die bereits von Fraunhofer entdeckten, dunklen Linien im Sonnenspektrum auf Lichtabsorption durch verschiedene chemische Elemente in der Sonnenatmosphäre zurück. Diese Erkenntnis lieferte nicht nur die praktische Grundlage für eine Nutzung von Licht in der chemischen Analytik und initiierte so die Entdeckung vieler bislang unbekannter Elemente. Sie läutete auch einen theoretischen Neuanfang ein: Die Erklärung von Phänomenen wie Atomspektren und Schwarzkörperstrahlung gelang mit der Entwicklung der Quantenmechanik Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts. Im Gegenzug erstarkte die Bedeutung der Spektroskopie als experimenteller Arm der neuen Theorie; sie lieferte experimentelle Ergebnisse, an denen sich neue Modelle für den Aufbau von Atomen und Molekülen, sowie deren Wechselwirkung mit Licht messen lassen mussten. Die gewonnenen Erkenntnisse führten in den sechziger Jahren zur Erfindung des Lasers, welcher als kohärente, monochromatische und wenig dispersive Lichtquelle die praktischen Aspekte der optischen Spektroskopie revolutionierte.

Unter diesem gegenseitigen Wechselspiel explodierte im Laufe des vergangenen Jahrhunderts die Zahl der verschiedenen spektroskopischen Methoden und ihrer Anwendungen. Röntgenstrukturanalytik<sup>[2]</sup>, NMR<sup>[3]</sup>-, ESR<sup>[4]</sup>-, CD<sup>[5]</sup>-, IR<sup>[6]</sup>-, Raman<sup>[7]</sup>-, Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie<sup>[8]</sup> stellen inzwischen Standardmethoden der analytischen Chemie dar. Eine besondere Rolle spielt dabei die Fluoreszenzspektroskopie, welche sich sowohl durch hohe Selektivität, Sensitivität und Anwendbarkeit auf supramolekulare Systeme

me, als auch durch die Ermöglichung nicht-invasiver Messungen unter nativen Bedingungen auszeichnet. Für die Untersuchung hochemittiver Verbindungen, z.B. fluoreszenter Farbstoffe mit ausgedehnten  $\pi$ -Systemen oder lumineszenter Proteine wie das *green fluorescent protein* (GFP)<sup>[9]</sup>, ist diese Technik sicherlich prädestiniert; allerdings ist sie nicht auf diese beschränkt. Folglich hat sie sich nicht nur als eine bevorzugte Analysemethode der Grundlagenforschung, sondern auch als Standardtechnik medizinischer, technischer, klimatologischer und umweltanalytischer Anwendungen durchgesetzt.

Ein zentrales Analyseverfahren ist die Laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie (LIF), welche unter anderem in der Verbrennungsforschung und Atmosphärenanalytik Anwendung findet.<sup>[10-12]</sup> Mit ihrer Hilfe können komplexe chemische Reaktionsmechanismen, wie Verbrennungsprozesse an Modellflammen, aber auch in Gasturbinen und Müllverbrennungsanlagen, direkt in Bezug auf Spezieskonzentrationen und Temperaturverteilungen untersucht werden.<sup>[13-15]</sup> Laseroptische Messmethoden haben den Vorteil, dass sie auch für die Untersuchung entfernter oder unwirtlicher Orte eingesetzt werden können. Sie ermöglichen daher sowohl die Beobachtung der Atmosphärenchemie in mehreren Kilometern Entfernung von der Messstation, als auch die Analyse von Gesteinsproben im Weltall.<sup>[16]</sup> Moderne fluoreszenzspektroskopische Verfahren eröffnen zudem einen tiefgehenden Einblick in biochemische Prozesse *in vitro* und *in vivo*. Sie ermöglichen nicht nur Aussagen über die dreidimensionale Struktur von Proteinen, sondern auch die Verfolgung von Reaktionen, Aggregationsprozessen und Konformationsänderungen.<sup>[17-19]</sup> Untersuchungen zum Förster Resonanz Energietransfer (FRET) werden für die Bestimmung von Abständen im Nanometerbereich genutzt,<sup>[20-22]</sup> während mikroskopische Untersuchungen Aufschluss über die Verteilung von Fluorophoren in Zellen und lebenden Organismen geben.<sup>[23-25]</sup> Eine vielfältige und äußerst leistungsfähige Methode zur Untersuchung biologischer Systeme ist die *fluorescence lifetime imaging*-Mikroskopie (FLIM), sie kombiniert die Umgebungssensitivität und Selektivität der Fluoreszenzlebenszeit mit einer für komplexe, biologische Strukturen angemessenen räumlichen Auflösung.<sup>[26-28]</sup> Einen völlig neuen Ansatz liefert die Einzelmolekülspektroskopie, welche Einblicke in das Verhalten einzelner Fluorophore unabhängig von der statistischen Gesamtheit erlaubt.<sup>[29-32]</sup> Mit der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) kann durch Korrelation einzelner Fluoreszenzereignisse ein detailliertes Bild der Dynamik der Untersuchungsobjekte erstellt werden.<sup>[33-35]</sup>

Dank der Entwicklung in für Fluoreszenzspektroskopie relevanten Forschungsgebieten, wie z.B. konfokale Optik, Mehrphotonenanregung, Rechnerkapazität, Detektortechnologie und genetisch exprimierbare Fluorophore,<sup>[9, 36, 37]</sup> haben sich ihre Einsatzmöglichkeiten innerhalb weniger Jahrzehnte deutlich erweitert. Die Vielzahl der unterschiedlichen Einsatzgebiete der Fluoreszenzspektroskopie belegt die flexible Anwendbarkeit dieser Technik in den unterschiedlichsten Forschungsbereichen. Dies bezieht sich sowohl auf apparative Aspekte, als auch auf auswertungsrelevante Fragestellungen. Aufgabe der fluoreszenzspektroskopischen Analytiker ist daher nicht nur die anwendungsorientierte Analyse der Untersuchungsobjekte mit bekannten Mitteln, sondern auch die Entwicklung neuer Analyseverfahren, welche den gesteigerten Fähigkeiten der modernen Fluoreszenzspektroskopie Rechnung tragen. Dabei konzentrieren sich die in dieser Arbeit vorgestellten Weiterentwicklungen auf zwei verschiedene Anwendungsbereiche: Proteinstruktur und -dynamik auf der einen, und die photophysikalische Charakterisierung von Fluoreszenzfarbstoffen auf der anderen Seite.

## 1.2 Proteinstruktur und -dynamik

In den letzten Jahren wurden vielfältige Anstrengungen zur Untersuchung und Dekodierung menschlicher, tierischer und pflanzlicher Gensequenzen unternommen.<sup>[38, 39]</sup> Trotz großer Erfolge auf diesem Sektor ist verhältnismäßig wenig über Struktur und Funktionsweise der Proteine, welche durch die Gensequenzen verschlüsselt werden, bekannt. Proteine sind mit der Umsetzung des durch die Gene vorgegebenen Bauplans betraut; sie übernehmen daher im menschlichen Körper die unterschiedlichsten Funktionen:<sup>[40]</sup> Strukturproteine determinieren den Körperbau und die Beschaffenheit des Gewebes, Enzyme ermöglichen oder beschleunigen chemische Prozesse, Hormone steuern neben der geschlechtlichen Reifung viele andere essentielle Vorgänge. In Muskeln sorgen Proteine für die nötige Kontraktion, und Transportproteine versorgen den Körper mit wesentlichen Substanzen wie Sauerstoff und Eisen.

All diese Funktionen können Proteine jedoch nur ausführen, solange sie ihre native, dreidimensionale Anordnung einnehmen. Fehlfaltungen können nicht nur mit einem Verlust der ursprünglichen Wirkungsweise, sondern auch mit toxischen Fehlreaktionen einher gehen; sie verursachen unter anderem neuronale Defekte wie Alzheimer und Parkinson,

aber auch Sichelzellenanämie und Diabetes Typ II.<sup>[41-44]</sup> Die Untersuchung falscher Proteinfaltungsprozesse als Ursache für die unterschiedlichsten Krankheitsbilder ist einer der aktuellsten Forschungsbereiche der heutigen biochemischen Analytik. Insbesondere die Entwicklung innovativer Methoden zur Untersuchung dynamischer Strukturveränderungen von Proteinen in lebenden Organismen stellt eine ebenso fundamentale wie dringliche Aufgabe dar.

### 1.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Im Gegensatz zu den meisten biologischen Systemen ist die Wechselwirkung zwischen Materie und Licht für Fluoreszenzfarbstoffe nicht nur ein analysierbarer Nebeneffekt, sondern ein ihrer Funktionsweise inhärentes Prinzip. Zumeist handelt es sich um organische oder anorganische Materialien mit ausgedehnten  $\pi$ -Systemen, welche über eine hohe Anregbarkeit und Emission im sichtbaren Spektralbereich verfügen. Ihre Anwendungsgebiete sind so vielfältig wie die zur Verfügung stehenden Möglichkeiten der Fluoreszenzspektroskopie: Sie können als Fluoreszenzmarker für nichtfluoreszente Substanzen oder auch als Laserfarbstoff eingesetzt werden.<sup>[45]</sup> Viele Farbstoffe reagieren sensitiv auf Änderungen des pH-Wertes oder verfügen über spezielle Gruppen zur Wechselwirkung mit spezifischen Ionen, so dass sich eine Anwendung als pH-Sonde oder als Ionensensor in chemischen oder biologischen Systemen anbietet.<sup>[46-48]</sup> In der Chemietechnik und Umweltanalytik kommen sie zum Einsatz, um das Diffusions-, Konvektions- und Fließverhalten von Gasen und Flüssigkeiten in technischen Reaktoren oder natürlichen Gewässern beobachten zu können.<sup>[49-51]</sup> Ein besonders aktuelles Forschungsgebiet ist der Einsatz von lumineszenten Substanzen als Emitter in optoelektronischen Materialien wie OLEDs (*organic light emitting diodes*). Die Hoffnung auf energieeffiziente Lichterzeugung durch flexible, kostengünstige und wiederverwertbare Leuchtstoffträger hat die Forschungstätigkeit in diesem Bereich stark beflügelt.<sup>[52, 53]</sup> Insbesondere die Herstellung robuster Emitter im blauen Spektralbereich stellt eine Herausforderung dar. Hohe Übergangsenergien führen zu vermehrt auftretenden Photoreaktionen und Degradationsprozessen, so dass nur Substanzen mit sehr hohen Konversionseffizienzen dem alltäglichen Gebrauch in einer OLED standhalten können.<sup>[54]</sup> Aus diesem Grund ist die Suche nach geeigneten Leuchtstoffen auch heute

noch nicht abgeschlossen und stellt eine der kompetitivsten Fragestellungen der heutigen Materialwissenschaften dar.

## 1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, neue apparative und auswertungstechnische Methoden im Bereich der Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie für die oben vorgestellten Anwendungsfelder zu entwickeln. Dazu ist die einzigartige Kombination aus mehrdimensionalen statischen und dynamischen Techniken, welche im Arbeitskreis Physikalische Chemie 1 der Universität Bielefeld zur Verfügung steht, hervorragend geeignet.<sup>[55,56]</sup> Die Weiterentwicklung moderner mikroskopischer Methoden erfolgt im Rahmen mehrmonatiger Aufenthalte an der Laser Analytics Group von Dr. Clemens Kaminski, Universität Cambridge, da an der Universität Bielefeld nur konventionelle Fluoreszenzmikroskope zur Verfügung stehen.<sup>[57]</sup> Die konkreten Projekte gestalten sich wie folgt:

- Die verlässliche Detektion von Proteinreorganisation nach erfolgter Lichtanregung stellt eine ebenso kontrovers diskutierte wie diffizile Herausforderung dar. Dabei ist die Lösung dieser Aufgabe zur Klärung der tatsächlich in Lösung vorliegenden Proteinstruktur, insbesondere im Hinblick auf die Zahl spektroskopisch unterscheidbarer Konformere, essentiell. Für diese Untersuchungen sind bisher aufwändige Messungen der Fluoreszenz bei verschiedenen Temperaturen und Viskositäten notwendig. Auf Basis des in Bielefeld zur Verfügung stehenden Messsystems soll eine neue Methode zur Detektion dieses Phänomens ohne Temperatur- und Viskositätsvariation entwickelt werden. Darauf aufbauend soll die Anwendung dieser Methode im Rahmen einer systematischen Studie auf etwa 20 verschiedene Peptide und Proteine angewendet, und die erhaltenen Ergebnisse mit den strukturellen Eigenheiten der Proteine korreliert werden.
- Die Laser Analytics Group verfügt über ein außergewöhnlich leistungsfähiges Fluoreszenzmikroskop für FLIM, welches sich insbesondere durch eine kontinuierliche Variabilität der Anregungs- und Emissionswellenlänge auszeichnet. Dieses Gerät soll im Rahmen dieser Arbeit apparativ so verbessert werden, dass der sichtbare

Spektralbereich vollständig für Messungen zugänglich ist. Im Hinblick auf den simultanen Einsatz möglichst vieler, verschiedener Markerfarbstoffe ist die quantitative Separation der Beiträge spektral sehr ähnlicher Farbstoffe geplant. Dazu soll eine globale Analysemethode eingesetzt und an verschiedenen Farbstoffmischungen getestet werden. Abschließend soll eine an diesem Fluoreszenzmikroskop entwickelte, leistungsfähige Methode zur Analyse der zu Parkinson führenden Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein in humanen, neuronalen Zellen vorgestellt werden. Dieses Verfahren soll in Zukunft in lebende Organismen implementiert werden und zudem einen Ansatzpunkt für medizinisches *drug screening* liefern.

- Der Arbeitskreis von Prof. Dr. Lothar Weber arbeitet zur Zeit an der Synthese von potentiell als blaue OLED-Emitter und Fluoridsensoren geeigneten Benzodiazaborolen. Die Charakterisierung der photophysikalischen Eigenschaften und der Fluoridaffinität in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden, chemischen Struktur stellt einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar. Der Abgleich mit den Ergebnissen von *ab-initio*-Kalkulationen ermöglicht in Zukunft gegebenenfalls eine verbesserte Vorhersage der Moleküleigenschaften auf Basis theoretischer Rechnungen.



*Junge Dame, in diesem Hause gehorchen wir den  
Gesetzen der Thermodynamik!*

*Homer Simpson zu Lisa Simpson, nach  
ihrer Erfindung des Perpetuum Mobile.*

## 2 Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel wird sowohl die den verwendeten Messverfahren zugrunde liegende, als auch die zur Auswertung nötige Theorie dargelegt. Während der erste Teil 2.1 in die spektroskopischen Grundlagen einführt, werden im zweiten und dritten Teil weiterführende Aspekte der Fluoreszenzspektroskopie vorgestellt: In Abschnitt 2.2 werden die Auswirkungen der Fluorophorumgebung auf die Fluoreszenz diskutiert; Abschnitt 2.3 geht auf die Besonderheiten der Proteinfluoreszenz ein.

### 2.1 Spektroskopische Grundlagen

#### 2.1.1 Absorption

Spektroskopische Methoden beruhen auf der Wechselwirkung zwischen Materie und elektromagnetischer Strahlung; die Energie der verwendeten Strahlung ist proportional zu ihrer Frequenz:

$$E = h \cdot \nu \quad (2.1)$$

*E*: Energie des eingestrahnten Lichts

*h*: Plancksches Wirkungsquantum

*ν*: Frequenz des eingestrahnten Lichts

Ein im Quantenzustand  $S_0$  vorliegendes Molekül, welches einen um genau diesen Energiebetrag höher liegenden Quantenzustand  $S_1$  besitzt, kann das eingestrahlte Photon aufnehmen, um den Zustand  $S_1$  zu erreichen. Dieser Vorgang wird als *Absorption* bezeichnet. Das Lambert-Beersche Gesetz quantifiziert die Abnahme der Intensität des auf eine absorbierende Probe eingestrahnten Lichts (siehe Gleichung 2.2). Es gilt nur für verdünnte, nicht streuende Lösungen in transparenten Lösungsmitteln und ohne Sättigung des angeregten Zustands.

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = c \cdot \epsilon \cdot d \quad (2.2)$$

- A*: Absorption  
*I*<sub>0</sub>: Intensität des eingestrahnten Lichts  
*I*: Intensität des Lichts nach der Probe  
*c*: Konzentration der absorbierenden Substanz  
*ε*: molarer Absorptionskoeffizient  
*d*: Länge des Lichtwegs in der Probe

### 2.1.2 Energietransferprozesse und Lumineszenz

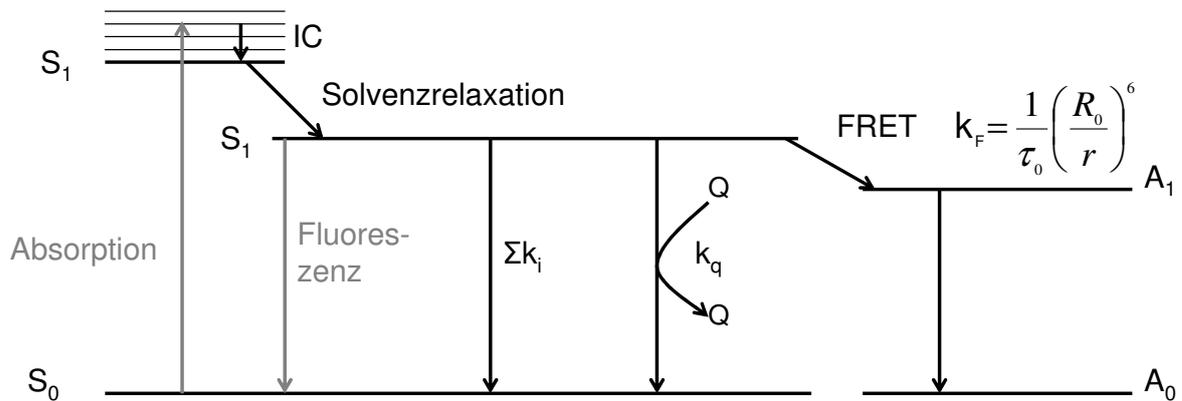
Dem durch Absorption angeregten Molekül stehen nun mehrere Möglichkeiten der Energieabgabe zur Verfügung.

- Es kann den Energieüberschuß für eine Photoreaktion mit oder ohne Reaktionspartner zu einer nichtfluoreszierenden Spezies nutzen. Diesen irreversiblen Prozess bezeichnet man als *Photobleaching*.
- Das angeregte Molekül kann seinen Energieüberschuss gegenüber dem Grundzustand durch Stöße mit der Umgebung strahlungslos wieder abgeben und unbeschadet in den Grundzustand zurückkehren. Man spricht in diesem Fall von *strahlungsloser Deaktivierung* oder *Quenching*.
- Die absorbierte Energie kann auch durch Emission von Strahlung, sogenannter *Lumineszenz*, wieder abgegeben werden. Vor der eigentlichen Lichtemission treten dabei oft Energietransferprozesse auf.

Einen Überblick über die unterschiedlichen Relaxationswege eines elektronisch angeregten Moleküls gibt das Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.1.

#### Energietransfer

Nach erfolgter Absorption gibt das Molekül zumeist einen Teil seiner Energie durch Stöße mit der Umgebung ab. Dieser Prozess wird *internal conversion* (IC) genannt und beinhaltet Vibrationsenergie transfer ebenso wie Rotationsenergie transfer. In Lösung sind die einzelnen Rotationsniveaus nicht mehr aufzulösen; zudem erfolgen so häufig Stöße mit dem Lösungsmittel, dass das Molekül schnell in den vibronischen Grundzustand des elektronisch angeregten Zustands relaxiert. Auch die Reorganisation der Lösungsmitteldipole,



**Abbildung 2.1:** Übersicht über die möglichen Relaxationswege eines Moleküls nach elektronischer Anregung. Intersystem Crossing ist nicht explizit eingezeichnet.

*Solvenzrelaxation* genannt, verringert die Energie des Systems und ist zumeist innerhalb weniger Pikosekunden abgeschlossen. In Systemen mit passenden Akzeptoren kann die Energie durch den abstandsabhängigen *Förster-Resonanz-Energietransfer* (FRET) auf ein anderes Fluorophor übertragen werden (siehe Abbildung 2.1).

## Lumineszenz

Die Lichtemission geht mit einer Relaxation des Moleküls in den elektronischen Grundzustand  $S_0$  einher. Aufgrund vorangegangener *internal conversion* und Solvenzrelaxation ist die Lumineszenz gegenüber der anfänglichen Absorption meist rotverschoben. Die Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenzahl heißt *Stokes-Verschiebung*.

Gemäß den Auswahlregeln, welche mögliche spektroskopische Übergänge als *erlaubt* (wahrscheinlich) und *verboten* (unwahrscheinlich) klassifizieren, darf sich die Spinmultiplizität des Moleküls durch Absorption eines Photons nicht ändern. Daher hat der elektronisch angeregte Zustand  $S_1$  für die meisten optischen Übergänge dieselbe Spinmultiplizität wie der Grundzustand  $S_0$ , so dass auch die nachfolgende Emission ohne eine Multiplizitätsänderung erfolgt. Lumineszenz ohne Multiplizitätsänderung heißt *Fluoreszenz*, sie erfolgt in einem Zeitfenster von  $10^{-12}$  bis  $10^{-8}$  Sekunden.

In manchen Fällen verhalten sich zwei Zustände unterschiedlicher Spinmultiplizität bei einem bestimmten Kernabstand bezüglich Energie und räumlicher Anordnung identisch. An

einem solchen Kreuzungspunkt zweier Potentialhyperflächen kann ein angeregtes Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand T anderer Spinmultiplizität übergehen. Dieser Vorgang wird als *intersystem crossing* (ISC) bezeichnet und tritt bevorzugt bei Systemen mit ausgeprägter Kopplung zwischen Spin- und Bahndrehimpuls auf. Eine folgende emittive Relaxation unter Änderung der Spinmultiplizität, *Phosphoreszenz* genannt, wird ebenfalls durch Spin-Bahn-Kopplung ermöglicht. Da Phosphoreszenz aber nicht den Auswahlregeln gehorcht, ist sie oft um viele Größenordnungen langsamer als Fluoreszenz und kann bis zu  $10^4$  Sekunden dauern.

### 2.1.3 Lebenszeit

#### Grundlagen

Alle im vorherigen Abschnitt erwähnten Prozesse beeinflussen die mittlere Verweilzeit des Chromophors im angeregten Zustand, die sogenannte *Fluoreszenzlebenszeit*  $\tau$ . Im theoretischen Falle eines Fluorophors, der keinerlei Phosphoreszenz, FRET oder strahlungsloser Deaktivierung unterliegt, liegt die natürliche Lebenszeit  $\tau_0$  vor, welche dem Kehrwert der Emissionsrate  $\Gamma$  entspricht.

$$\tau_0 = \frac{1}{\Gamma} \quad (2.3)$$

In der Realität kommt es durch Wechselwirkung mit der Umgebung zu Quenching und Photoreaktionen, deren Geschwindigkeitskonstanten  $k_q$  und  $k_i$  die Fluoreszenzlebenszeit verringern.

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + \Sigma k_q + \Sigma k_i} \quad (2.4)$$

Aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Depopulationsprozessen ist die Lebenszeit sehr gut geeignet, um Veränderungen in der unmittelbaren Umgebung des Fluorophors beobachten zu können. Im einfachsten Fall zeigt ein Fluorophor eine monoexponentielle Verringerung der Fluoreszenzintensität mit der Zeit, wie in Gleichung 2.5 dargestellt.

Häufig treten dagegen multiexponentielle (Gleichung 2.6), manchmal sogar nicht-exponentielle Zerfälle auf. Für dieses Verhalten können ganz verschiedene Sachverhalte, wie das

$$F(t) = F_0 \cdot e^{-\frac{t}{\bar{\tau}}} \quad (2.5)$$

$$F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} = F_0 \cdot \sum_i a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.6)$$

mit

$$\sum_i a_i = 1 \quad (2.7)$$

$F(t)$ : Fluoreszenzintensität

$F_0$  : Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t=0$

$t$  : Zeit

$\tau_i$  : Lebenszeiten

$\alpha_i$  : Amplituden

$a_i$  : normierte Amplituden

Auftreten verschiedener emittiver Zustände in einem Molekül oder komplexere Wechselwirkungen mit der Molekülumgebung, verantwortlich sein.

Um die Lebenszeiten multiexponentieller Zerfälle vergleichen zu können, wird die intensitätsgemittelte Lebenszeit  $\bar{\tau}$  verwendet. Dabei werden die einzelnen Lebenszeiten mit dem Ausdruck  $\alpha_i \cdot \tau_i$  gewichtet, welcher ein Maß für den Beitrag der  $i$ -ten Lebenszeit zur Gesamtfluoreszenz darstellt.

$$\bar{\tau} = \frac{\sum_i \alpha_i \cdot \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \cdot \tau_i} \quad (2.8)$$

$\bar{\tau}$  : intensitätsgemittelte Lebenszeit

$\tau_i$  : Lebenszeiten

$\alpha_i$  : Amplituden

### Lebenszeitassoziierte Emissionsspektren

Multiexponentielle Abklingkurven beruhen darauf, dass mehrere fluoreszente Spezies mit unterschiedlichen Lebenszeiten zum Zeitverlauf, also der sogenannten *dynamischen Fluoreszenz*, beitragen. Diese Spezies weisen häufig auch unterschiedliche spektrale Verteilungen auf. Die zu den Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_i$  zugehörigen, sogenannten lebenszeitassoziierten Emissionsspektren (*decay-associated spectrum*, DAS) sind für die einzelnen Spezies charakteristisch und liefern oft Hinweise auf ihre chemische Umgebung.

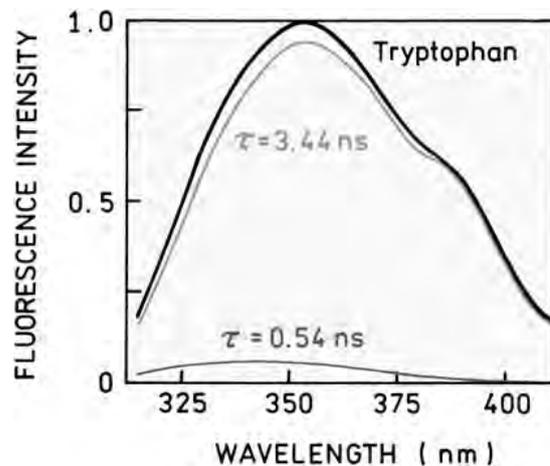
Um die lebenszeitassoziierten Emissionsspektren aus der dynamischen Fluoreszenz extrahieren zu können, müssen Fluoreszenzabklingkurven bei verschiedenen Emissionswellenlängen gemessen werden (Gleichung 2.9). Der Intensitätsbeitrag von  $\tau_i$  bei einer bestimmten Wellenlänge ist durch Gleichung 2.10 gegeben, da das Produkt  $\alpha_i(\lambda) \cdot \tau_i$  ein Maß für den Anteil der  $i$ -ten Lebenszeit an der Gesamtfluoreszenz darstellt. Auf diese Weise kann die Fluoreszenzintensität der einzelnen Lebenszeiten bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt und ein lebenszeitassoziiertes Emissionsspektrum erstellt werden.

$$F(\lambda, t) = \sum_i \alpha_i(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.9)$$

$$F_i(\lambda) = \frac{\alpha_i(\lambda) \tau_i \cdot F(\lambda)}{\sum_i \alpha_i(\lambda) \tau_i} \quad (2.10)$$

- $F(\lambda, t)$ : Fluoreszenzintensität aller Spezies  
 $F_i(\lambda)$  : Fluoreszenzintensität der  $i$ -ten Spezies  
 $t$  : Zeit  
 $\tau_i$  : Lebenszeiten  
 $\alpha_i$  : Amplituden

In Abbildung 2.2 ist beispielhaft das Emissionsspektrum von Tryptophan samt lebenszeitassoziierten Emissionsspektren dargestellt. Deutlich zu sehen ist der verhältnismäßig kleine Anteil der blauverschobenen, kurzen Lebenszeit an der Gesamtfluoreszenz.



**Abbildung 2.2:** Emissionsspektrum und DAS von Tryptophan. Bild wurde der Literatur entnommen.<sup>[8]</sup>

## Messmethoden

Zur Messung der dynamischen Fluoreszenz stehen zwei Standardverfahren zur Verfügung. Die *Pulsmethode* beruht auf der Verwendung von gepulsten Lichtquellen für die Anregung, so dass der zeitliche Verlauf im Anschluss an die Anregung beobachtet werden kann. Üblicherweise werden dabei Pulsbreiten im Femto- und Pikosekundenbereich verwendet; letzteres trifft auch auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten tr-LIF-Apparatur zu. Dem gegenüber steht die *Phasenmodulationsmethode*, bei der die Amplitude einer kontinuierlich strahlenden Lichtquelle sinusförmig moduliert wird. Das emittierte Signal weist Phasenverschiebungen und zeitliche Verzögerungen im Vergleich zum Eingangssignal auf, aus denen der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz rekonstruiert werden kann.

### 2.1.4 Quantenausbeute

Neben der Lebenszeit ist die Quantenausbeute ein Charakteristikum jedes Fluorophors. Sie beschreibt das Verhältnis der Zahl der emittierten Photonen zu der Zahl der absorbierten Photonen und wird ebenfalls maßgeblich durch strahlungslose Deaktivierung beeinflusst.

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + \Sigma k_q + \Sigma k_i} \quad (2.11)$$

$\Phi$ : *Quantenausbeute*

$\Gamma$ : *Emissionsrate*

$k_q$ : *Quenchingrate*

$k_i$ : *Rate der Photoreaktion*

Zur praktischen Bestimmung der Quantenausbeute werden Absorption und Emission der zu untersuchenden Substanz X vermessen und mit den bekannten Literaturwerten einer Referenzsubstanz R verglichen. Werden Substanz und Referenz bei verschiedenen Anregungswellenlängen und in verschiedenen Lösungsmitteln vermessen, so müssen die Intensität der Anregungslichtquelle und der Brechungsindex ebenfalls in der Berechnung berücksichtigt werden.

$$\Phi_X = \frac{F_X \cdot n_X^2}{A_X \cdot I_X} \cdot \frac{A_R \cdot I_R}{F_R \cdot n_R^2} \cdot \Phi_R \quad (2.12)$$

$\Phi$ : Quantenausbeute

$A$ : Absorption

$I$ : Anregungsintensität

$F$ : Fluoreszenzintensität

$n$ : Brechungsindex des verwendeten Lösungsmittels

### 2.1.5 Quenching

Im Allgemeinen wird zwischen *statischem* und *dynamischem* Quenching unterschieden. Dynamisches Quenching bezeichnet die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten durch Stöße zwischen Fluorophor und Quencher (*collisional quenching*). Verringert sich die Fluoreszenzintensität des Fluorophors aufgrund der Bildung eines nichtfluoreszierenden Komplexes zwischen Fluorophor und Quencher im elektronischen Grundzustand, so liegt statisches Quenching vor.

Fluoreszenzquenching wurde sowohl als fundamentales Phänomen als auch im Hinblick auf verschiedene biochemische Anwendungen ausführlich untersucht.<sup>[58,59]</sup> Diese Anwendungen beruhen auf der Tatsache, daß sowohl für dynamisches als auch für statisches Quenching ein direkter Kontakt zwischen Fluorophor und Quencher notwendig ist. Im Falle des dynamischen Quenchings muß der Quencher den Fluorophor durch Diffusion im Mittel innerhalb der Fluoreszenzlebenszeit erreichen, so dass Quenchexperimente zur Bestimmung von Diffusionsgeschwindigkeiten herangezogen werden können. Die eingeschränkte Durchlässigkeit von Proteinen und Membranen in Bezug auf den Quencher kann zur Lokalisierung der Position von Fluorophoren in diesen Systemen genutzt werden.<sup>[60,61]</sup>

#### Dynamisches Quenching

Die Fluoreszenzverminderung durch dynamisches Quenching kann quantitativ mit Hilfe der Stern-Volmer-Gleichung (Gleichung 2.13) beschrieben werden. Die Stärke des Quenchings hängt demnach sowohl von Diffusion und Erreichbarkeit des Quenchers, als auch von der Sensitivität des Fluorophors gegenüber dem Quencher ab. Dabei wird der erste Aspekt durch die Zahl der Zusammenstöße  $k_0$ , der zweite Aspekt durch die für das gewählte Fluorophor-Quencher-Paar spezifische Quenchingeffizienz  $\gamma$  repräsentiert.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \gamma \cdot k_0 \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q] \quad (2.13)$$

- $F_0$  : Fluoreszenzintensität ohne Quencher  
 $F$  : Fluoreszenzintensität mit Quencher  
 $k_0$  : Zahl der Zusammenstöße pro Zeiteinheit  
 $\gamma$  : Quenchingeffizienz  
 $\tau_0$  : Lebenszeit ohne Quencher  
 $[Q]$  : Quencherkonzentration  
 $K_D$  : Stern-Volmer-Konstante

Eine Auftragung von  $F_0/F$  gegen  $[Q]$  ergibt eine Gerade mit 1 als y-Achsenabschnitt und  $K_D$  als Steigung. Ein linearer Zusammenhang allein ist aber noch kein Beweis für dynamisches Quenching. Wie im nächsten Abschnitt erläutert, kann statisches Quenching durch eine ähnliche Gleichung beschrieben werden.

### Statisches Quenching

Beim statischen Quenching bildet sich ein nichtfluoreszierender Quencher-Fluorophor-Komplex im Grundzustand aus, so dass die Fluoreszenzintensität ohne Beeinträchtigung der Fluoreszenzlebenszeit verringert wird. Daher kann die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluorophors mit Hilfe der Komplexbildungskonstante  $K_S$  ausgedrückt werden.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S \cdot [Q] \quad (2.14)$$

- $F_0$  : Fluoreszenzintensität ohne Quencher  
 $F$  : Fluoreszenzintensität mit Quencher  
 $[Q]$  : Quencherkonzentration  
 $K_S$  : Komplexbildungskonstante

Die Abhängigkeit zwischen  $F_0/F$  und  $[Q]$  verläuft analog zur Stern-Volmer-Gleichung, nur stellt hier die Komplexbildungskonstante  $K_S$  die Steigung der Geraden dar. Allein durch die Messung der Fluoreszenzintensitäten kann also nicht festgestellt werden, ob es sich um dynamisches oder statisches Quenching handelt. Um diese Prozesse unterscheiden zu können, müssen zeitaufgelöste Messungen oder Untersuchungen zur Abhängigkeit des Quenchings von Temperatur oder Lösungsmittelviskosität durchgeführt werden. Ebenso können auch Absorptionsspektren zur Identifizierung des Quenchingphänomens genutzt werden.

### Kombiniertes dynamisches und statisches Quenching

Agiert ein Quencher sowohl dynamisch als auch statisch, so ergibt sich die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Fluorophors durch Multiplikation der beiden Einzelprozesse.

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) = (1 + K_{App} \cdot [Q]) \quad (2.15)$$

mit

$$K_{App} = (K_D + K_S) + K_D \cdot K_S \cdot [Q] \quad (2.16)$$

- $F_0$  : Fluoreszenzintensität ohne Quencher
- $F$  : Fluoreszenzintensität mit Quencher
- $[Q]$  : Quencherkonzentration
- $K_D$  : Stern-Volmer-Konstante
- $K_S$  : Komplexbildungskonstante
- $K_{App}$ : apparenter Linearitätsfaktor

Da die Auftragung von  $F_0/F$  gegen  $[Q]$  ein Polynom zweiter Ordnung ergibt, wird der von der Quencherkonzentration abhängige apparente Linearitätsfaktor eingeführt. Dieser kann für jede Quencherkonzentration aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten bestimmt werden. Eine Auftragung von  $K_{App}$  gegen  $[Q]$  ergibt eine Gerade mit  $K_D \cdot K_S$  als Steigung und  $K_D + K_S$  als y-Achsenabschnitt, so dass die beiden Konstanten ermittelt werden können.

### Sphere of Action

Bei dynamischen Quenchvorgängen mit hohen Quencherkonzentrationen wird oft beobachtet, dass die Fluoreszenz stärker mit der Konzentration des Quenchers sinkt, als durch die Stern-Volmer-Gleichung vorhergesagt wird. Dies kann mit einem erweiterten Wirkungsbereich des Quenchers, der sogenannten *sphere of action* erklärt werden. Ursache dafür sind attraktive Wechselwirkungen zwischen Quencher und Fluorophor, die in der direkten Umgebung des Fluorophors wirken. Befindet sich ein Quencher während der Anregung des Fluorophors innerhalb des Wirkkreises dieser Wechselwirkungen, so besteht eine Wahrscheinlichkeit von eins für einen fluoreszenz-verhindernden Kontakt. Anders ausgedrückt: Alle Fluorophore, in deren Nachbarschaft sich während der Anregung ein Quencher befindet, werden sofort gequenchet.

Da bei steigender Konzentration auch der Anteil der Fluorophore, in deren *sphere of action* sich mindestens ein Quencher befindet, zunimmt, weicht die gemessene Fluoreszenzintensität immer weiter von der Stern-Volmer-Gleichung ab. Dieser Sachverhalt wird quantitativ mit Hilfe der modifizierten Gleichung 2.17 ausgedrückt.

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot \exp([Q] \cdot \nu \cdot N) \quad (2.17)$$

$F_0$  : Fluoreszenzintensität ohne Quencher

$F$  : Fluoreszenzintensität mit Quencher

$[Q]$  : Quencherkonzentration

$K_D$  : Stern-Volmer-Konstante

$\nu$  : Volumen der Sphere of Action

$N$  : Avogadrokonstante

Zumeist, wie auch in dieser Arbeit, wird von einem sphärischen Wirkungsbereich um den Fluorophor ausgegangen. Die Stern-Volmer-Gleichung ergibt sich für den mathematischen Grenzfall einer theoretisch punktförmigen *sphere of action* mit einem Volumen von Null, so dass die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes nur direkt am Aufenthaltsort des Fluorophors eins beträgt.

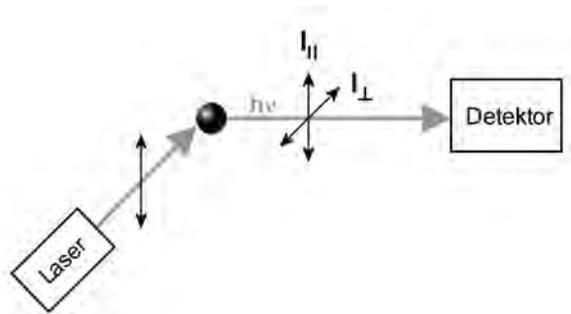
### Einfluß der elektrischen Ladung auf Quenching

Der notwendige Kontakt zwischen Fluorophor und Quencher kann sowohl durch sterische Effekte als auch durch die vorliegenden Ladungen beeinflusst werden. Attraktive und repulsive Wechselwirkungen hängen dabei nicht nur von der Ladung des Quenchers und der Ladung des Fluorophors ab, sondern werden auch mit steigender Ionenstärke des Lösungsmittels vermindert. Auch die Umgebung des Fluorophors kann entscheidenden Einfluß nehmen. So können ionische Quencher Fluorophore im Inneren eines Proteins oder an einer Membran oft nicht erreichen, da diese Bereiche zumeist unpolar sind. Die Ladungen können sich auch auf Effekte wie Auftreten und Stärke einer Sphere of Action auswirken; eine größere *sphere of action* weist dabei auf höhere attraktive Wechselwirkungen zwischen dem angeregten Fluorophor und dem Quencher hin.

## 2.1.6 Polarisation und Anisotropie

### Grundlagen

Polarisation ist eine wichtige Eigenschaft des Lichts, welche die Ausrichtung des elektrischen Feldvektors beschreibt. Bei einer Anregung mit polarisiertem Licht, also Strahlung mit einer bevorzugten Ausrichtung des elektrischen Feldvektors, bleibt diese Information zum Teil in der Fluoreszenz erhalten, da Moleküle mit einem Übergangsdipolmoment parallel zur Polarisationsrichtung des Anregungslichtes bevorzugt angeregt werden. Folglich besitzen die angeregten Moleküle – und somit auch der Feldvektor des von ihnen ausgehenden Fluoreszenzsignals – eine bevorzugte räumliche Orientierung.



*Abbildung 2.3: Orthogonale und parallele Polarisation der Fluoreszenz.*

Die sogenannte *Anisotropie* stellt ein Maß für diese Ungleichverteilung relativ zur Gesamtintensität  $I_{||} + 2I_{\perp}$  dar.

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (2.18)$$

$r$  : *Anisotropie*

$I_{||}$  : *Fluoreszenzintensität bei paralleler Detektion*

$I_{\perp}$  : *Fluoreszenzintensität bei orthogonaler Detektion*

### Zeitabhängigkeit der Anisotropie

Direkt nach der Anregung ist ein Großteil der emittierenden Dipole parallel zum Anregungslicht ausgerichtet, so dass die Anisotropie der Fluoreszenz signifikant ist. Infolge der Reorientierung der Fluorophore nähern sich die Intensitäten der parallelen und orthogonalen Fluoreszenz einander an; die Anisotropie klingt ab. Diese Zeitabhängigkeit der

Anisotropie ist durch Gleichung 2.19 gegeben, wobei die Korrelationszeiten  $\theta_i$  ein Maß für die mittlere Dauer der einzelnen Reorientierungsprozesse darstellen.

$$r(t) = r_\infty + \sum_i r_i \cdot e^{-t/\theta_i} \quad (2.19)$$

- $r$  : Anisotropie
- $t$  : Zeit
- $r_\infty$  : Grenzwert der Anisotropie für  $t \rightarrow \infty$
- $r_i$  : Amplituden
- $\theta_i$  : Korrelationszeiten

Anisotropiemessungen können Aufschluss über die Rotation des untersuchten Moleküls, und damit Anhaltspunkte für seine Größe und die Viskosität des Lösungsmittels liefern. So werden z.B. Aggregationsprozesse durch eine signifikante Erhöhung der Korrelationszeit für die Rotation des Gesamtmoleküls sichtbar.

In Proteinen kann neben der Rotation des Gesamtsystems und der Beweglichkeit des Fluorophors selber auch die Flexibilität einzelner Domänen analysiert werden. Während sich die Eigenbewegung von NATA in einem größeren Molekül mit Korrelationszeiten von 60 bis 200 ps äußert, hängt die Korrelationszeit der Gesamtrotation nach Perrin (Gleichung 2.20) stark von der Proteingröße ab.

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} \cdot (v + h) \quad (2.20)$$

- $\theta$  : Korrelationszeit der Gesamtrotation
- $\eta$  : Viskosität
- $R$  : Gaskonstante
- $T$  : Temperatur
- $v$  : spezifisches Volumen des Proteins
- $h$  : Hydratation des Proteins

Das 24 Aminosäuren umfassende Peptid ACTH 1-24 verfügt z.B. über eine Rotationskorrelationszeit von 1.8 ns,<sup>[62]</sup> für das humane Serum Albumin mit 584 Aminosäuren sind es bereits mehr als 20 ns.<sup>[63]</sup> Domänenbewegungen liegen, wenn sie denn existieren, zeitlich häufig zwischen der Korrelationszeit der Rotation und der der Fluorophorbewegung; sie können aber auch langsamer sein als die Rotation des gesamten Proteins.<sup>[8]</sup>

### Vermeidung von Polarisierungseffekten

Polarisationseffekte treten bei wellenlängenaufgelöster Fluoreszenzdetektion zwangsläufig auf, da das Gitter eines Spektrographen zumeist eine Polarisationsrichtung bevorzugt reflektiert. Um störende Polarisierungseffekte zu vermeiden, wird ihre Winkelabhängigkeit genutzt: Fluoreszenzlicht, welches eine um  $54,7^\circ$  gedrehte Polarisation relativ zur Polarisation des Anregungslichts aufweist, zeigt keinerlei Polarisierungseffekte. Die Detektion der Fluoreszenz in diesem *magischen Winkel* hat gegenüber nicht polarisationsaufgelösten Messungen allerdings den Nachteil, dass sie mit wesentlichen Intensitätsverlusten einhergeht. Bei statischen Fluoreszenzmessungen werden Polarisierungseffekte daher häufig vernachlässigt, zumal sie bei kleinen, flexiblen Fluorophoren in wenig viskosen Lösungsmitteln nur einen geringen Einfluss auf die Form des Emissionsspektrums ausüben. Für die akkurate Bestimmung von Fluoreszenzabklingkurven ohne Anisotropieeffekt, insbesondere an Makromolekülen wie Proteinen oder immobilen Proben wie Kristallen, ist dieses Verfahren jedoch unerlässlich.

## 2.2 Lösungsmiteleinfluss und spektrale Relaxation

Die chemische Umgebung des Fluorophors hat einen entscheidenden Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften der zu untersuchenden Substanz. Eigenschaften wie die spektrale Verteilung, Quantenausbeute und Lebenszeit der Fluoreszenz werden dabei nicht nur durch die Polarität der Umgebung im Hinblick auf Dipol-Dipolinteraktionen beeinflusst; Auch spezifische Wechselwirkungen, wie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, Komplexierung, interner Ladungstransfer (*internal charge transfer*), Protonentransfer, Aggregation oder Reaktionen aus dem angeregten Zustand treten häufig auf und tragen maßgeblich zu den beobachteten Charakteristika der Fluoreszenz bei.

In den folgenden Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 wird der Einfluss der chemischen Umgebung auf die photophysikalischen Eigenschaften ausführlich diskutiert. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf generellen Dipol-Dipolinteraktionen.

### 2.2.1 Solvenz- und spektrale Relaxation

Der Einfluss der Umgebungspolarität und sich daraus ergebender Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf die spektrale Verteilung der Fluoreszenz wird in Abbildung 2.4 verdeutlicht. Durch die Anregung innerhalb von  $10^{-15}$  s verändert sich das Dipolmoment des Fluorophors von  $\mu_G$  im Grundzustand auf  $\mu_E$  im angeregten Zustand, während sich die Anordnung der umgebenden Lösungsmittelmoleküle nicht verändert. Letztere befinden sich in einer ungünstigen Ausrichtung und reorientieren sich anschließend. Dieser Reorientierungsprozess vermindert die Energie des angeregten Zustandes und daher auch die Stokes-Verschiebung der auftretenden Fluoreszenz.

Im Fall der sogenannten *Solvenzrelaxation* reorientieren sich die umgebenden Lösungsmittelmoleküle; in Proteinen machen jedoch häufig Aminosäurereste einen Großteil der Umgebungsdipole aus, so dass sich das Protein selber räumlich reorganisieren muss. Dieser Reorientierungsprozess der Dipole eines Makromoleküls im angeregten Zustand wird als *spektrale Relaxation* bezeichnet. Trotz der offensichtlichen Unterschiede liegt beiden Phänomenen das selbe Prinzip zu Grunde, so dass sich die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Auswirkungen und Analysemethoden auf beide Prozesse beziehen.

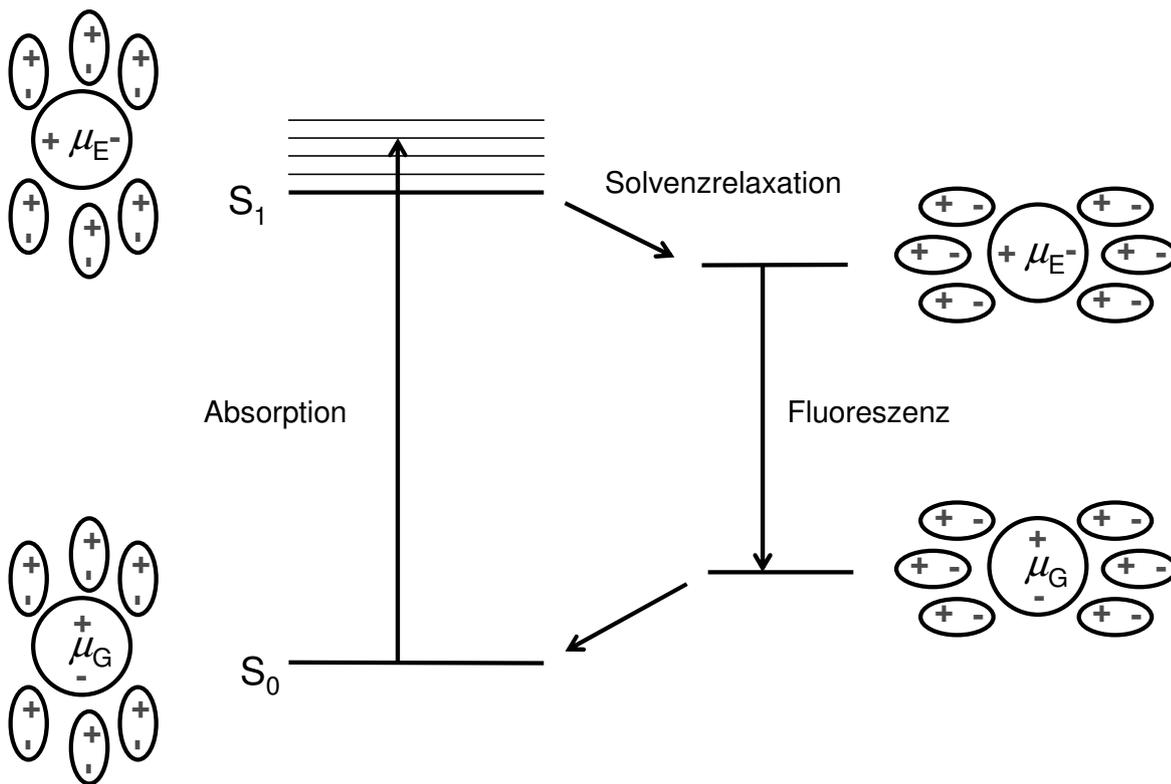
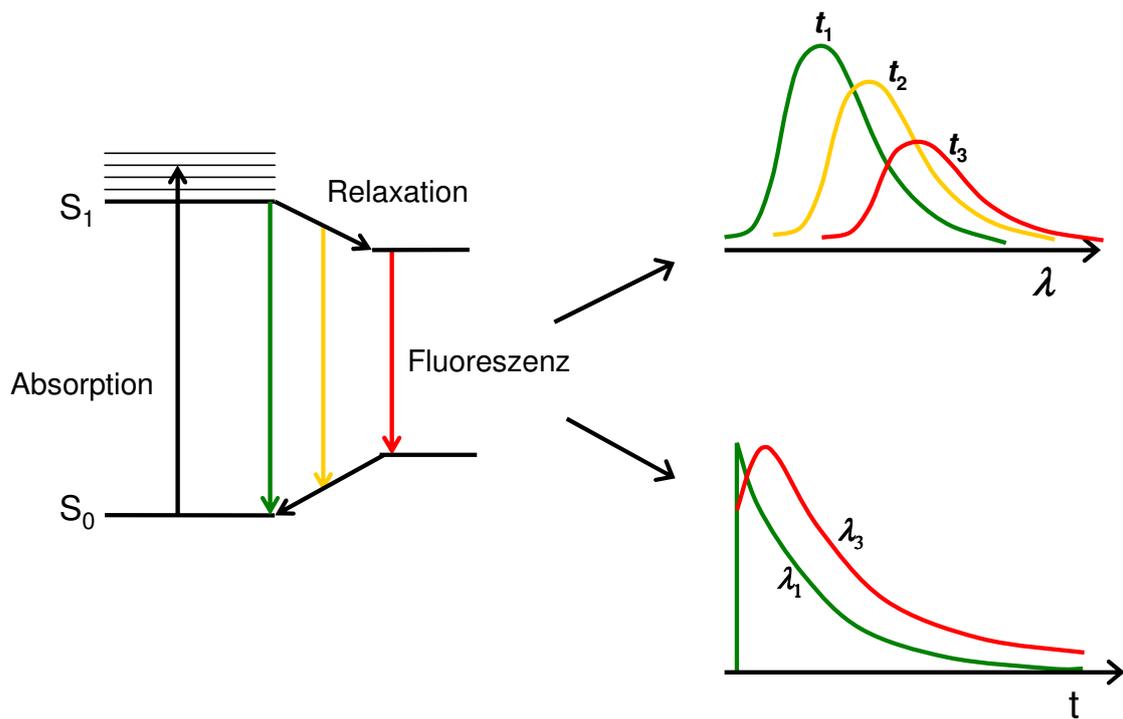


Abbildung 2.4: Erhöhung der Stokes-Verschiebung durch das Lösungsmittel.

### Auswirkung auf Abklingkurven und Emissionsspektren

Da sich während des Relaxationsprozesses die Energie des System kontinuierlich verringert, verschiebt sich die Fluoreszenz mit der Zeit zu höheren Wellenlängen (siehe Abbildung 2.5 rechts oben). Diese spektrale Verschiebung kann durch die Messung der zeitaufgelösten Emissionsspektren (*time-resolved emission spectra, TRES*) nachverfolgt werden. In den folgenden Abschnitten werden zwei Kenngrößen der spektralen Verteilung vorgestellt, mit denen die spektralen Veränderungen beobachtet werden können.

Durch die Entvölkerung der energetisch höher liegenden Zustände und die damit einhergehende Bevölkerung energetisch tiefer liegender Zustände verringert sich die Lebenszeit im blauen Spektralbereich, während im roten eine Lebenszeit mit einer negativen Amplitude (häufig *negativer präexponentieller Faktor* genannt), also eine ansteigende Komponente der Fluoreszenz hinzukommt (siehe Abbildung 2.5 rechts unten). Eine solche negative Amplitude ist ein Charakteristikum für Prozesse im angeregten Zustand, bei denen leere Zustände erst populiert werden müssen, bevor es zu einer Lumineszenz kommen kann.



**Abbildung 2.5:** Einfluss der Solvenzrelaxation auf Abklingkurven und spektrale Verteilung der Fluoreszenz.

### Zeitverlauf der spektralen Verschiebung

Die Auswertung der spektralen Verschiebung erfolgt mit Hilfe des spektralen Schwerpunktes der Fluoreszenz, dem sogenannten *center of gravity*, COG. Dabei ergibt sich das COG durch eine intensitätsgewichtete Mittelung über die Wellenzahl des Emissionsspektrums.

$$\tilde{\nu}_{COG} = \frac{\int_0^{\infty} F(\tilde{\nu}) \cdot \tilde{\nu} d\tilde{\nu}}{\int_0^{\infty} F(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}} \quad (2.21)$$

$\tilde{\nu}_{COG}$ : *Center of Gravity*  
 $F$  : *Fluoreszenzintensität*  
 $\tilde{\nu}$  : *Emissionswellenzahl*

Da sich das COG durch eine Mittelung über die Wellenzahl, und nicht über die Wellenlänge des Emissionsspektrums berechnet, entspricht eine zeitliche Rotverschiebung des Emissionsspektrums einer Verringerung des COGs mit der Zeit, wie in Abbildung 2.6 dar-

gestellt. Im Fall von Solvenz- und spektraler Relaxation folgt die Verringerung des *centers of gravity* mit der Zeit einem exponentiellen Zerfallsgesetz (siehe Gleichung 2.22).

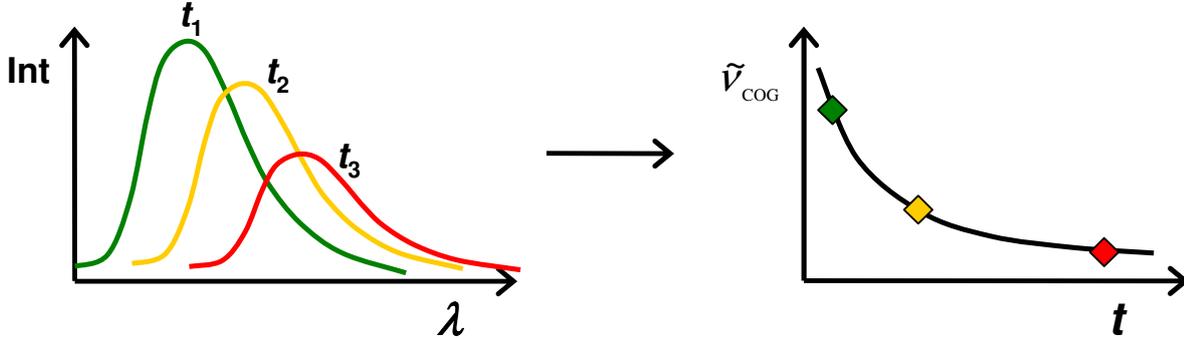


Abbildung 2.6: Verlauf des centers of gravity mit der Zeit.

$$\tilde{\nu}_{COG}(t) = \tilde{\nu}_{COG,\infty} + (\tilde{\nu}_{COG,0} - \tilde{\nu}_{COG,\infty}) \cdot \sum_i \beta_i e^{-\frac{t}{\tau_{S,i}}} \quad (2.22)$$

- $\tilde{\nu}_{COG}$  : Center of Gravity
- $\tilde{\nu}_{COG,0}$  : Center of Gravity für  $t = 0$
- $\tilde{\nu}_{COG,\infty}$  : Center of Gravity für  $t \rightarrow \infty$
- $\beta_i$  : Amplituden
- $\tau_{S,i}$  : spektrale Relaxationszeiten

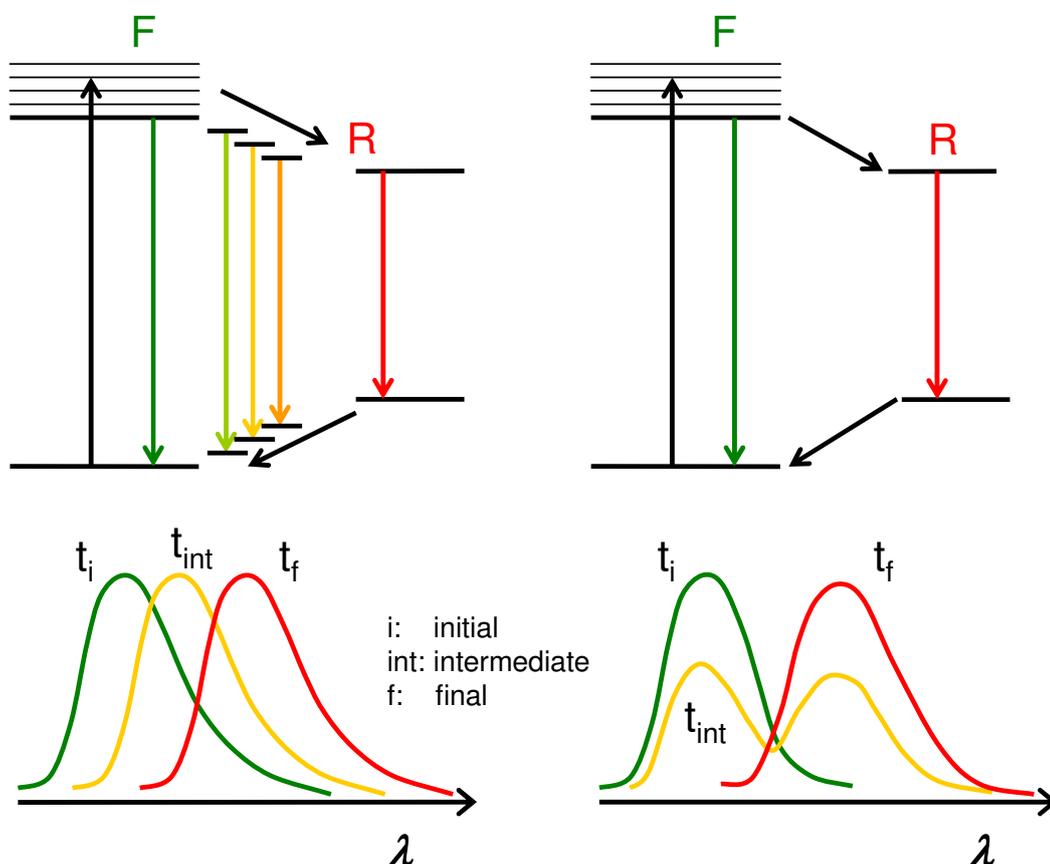
Zur besseren Vergleichbarkeit der Relaxationsverläufe verschiedener Spezies wird häufig auf die Korrelationsfunktion  $C(t)$  zurückgegriffen (Gleichung 2.23), welche sich durch Normierung der spektralen Verschiebung aus Gleichung 2.22 ergibt. Dieser Zusammenhang eignet sich sehr gut zum Vergleich der Zeitverläufe der COGs verschiedener Spezies. Allerdings geht durch die Normierung die Information über das Ausmaß der spektralen Verschiebung verloren.

$$C(t) = \frac{\tilde{\nu}_{COG}(t) - \tilde{\nu}_{COG,\infty}}{(\tilde{\nu}_{COG,0} - \tilde{\nu}_{COG,\infty})} = \sum_i \beta_i e^{-\frac{t}{\tau_{S,i}}} \quad (2.23)$$

### Zeitverlauf der Halbwertsbreite

Ein weiteres, nützliches Merkmal der Fluoreszenz ist die Halbwertsbreite der spektralen Verteilung. Mit ihrer Hilfe kann gemäß Abbildung 2.7 unterschieden werden, ob die beobachtete Relaxation einer mehrschrittigen, nahezu kontinuierlichen Veränderung der

Fluorophorumgebung, oder einem einschriftigen Übergang zwischen zwei distinkten angeregten Zuständen, ähnlich einer Reaktion im angeregten Zustand, entspricht.



**Abbildung 2.7:** Spektrale Verteilung im Falle kontinuierlicher (links) und einschriftiger (rechts) spektraler Relaxation.

Im ersten Fall stammt die Emission während der Relaxation aus Energieniveaus, welche ein Quasi-Kontinuum zwischen dem Franck-Condon-Zustand F und dem relaxierten Zustand R bilden und von der Gesamtheit der Fluorophore in schnellen kleinen Schritten durchlaufen werden. Dadurch ändert sich zwar der Schwerpunkt der Fluoreszenz signifikant, nicht aber ihre Halbwertsbreite, welche durch unterschiedliche Relaxationsgeschwindigkeiten nur geringfügig ansteigt. Dieser Fall ist typisch für Solvenzrelaxation.

Im zweiten Fall liegen während der Relaxation veränderliche Anteile der Fluoreszenz aus F und R vor. Diese Überlagerung führt nicht nur zu einer Schwerpunktsverschiebung, sondern auch zu einer deutlich erhöhten Halbwertsbreite im Vergleich zum Ausgangs- oder Endzustand der Relaxation.

Zur Bestimmung der spektralen Halbwertsbreite zu unterschiedlichen Zeitpunkten wird eine Funktion ähnlich einer Standardabweichung verwendet (siehe Gleichung 2.24). Diese mittelt intensitätsgewichtet über die Abstandsquadrate der Wellenzahl vom Schwerpunkt der Emission.

$$[\Delta\tilde{\nu}(t)]^2 = \frac{\int_0^{\infty} [\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_{COG}(t)]^2 \cdot F(\tilde{\nu}, t) d\tilde{\nu}}{\int_0^{\infty} F(\tilde{\nu}, t) d\tilde{\nu}} \quad (2.24)$$

- $\Delta\tilde{\nu}(t)$  : Halbwertsbreite
- $\tilde{\nu}$  : Wellenzahl
- $\tilde{\nu}_{COG}$  : Center of Gravity
- $F(\tilde{\nu}, t)$ : Fluoreszenzintensität

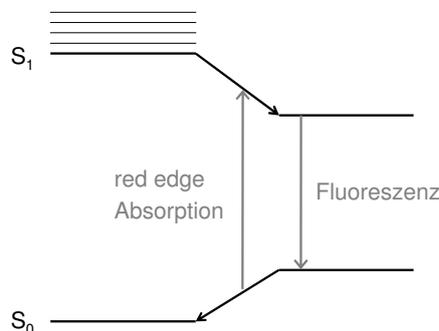
## Zeitbereich

Die Dauer der Solvenzrelaxation hängt von der Viskosität und Reorganisationsgeschwindigkeit des Lösungsmittels ab. Die Relaxationszeiten der meisten organischen Lösungsmittel betragen 5 bis 100 ps. Wässrige Lösungen weisen aufgrund der hohen Protonenbeweglichkeit sehr kurze Relaxationszeiten von wenigen Pikosekunden auf.<sup>[8]</sup> Da konventionelle Apparaturen für dynamische Fluoreszenzmessungen über eine Zeitauflösung von 50 bis 100 ps verfügen, wird der zeitliche Prozess bei Lösungsmitteln durchschnittlicher Viskosität üblicherweise nicht aufgelöst. Oft werden jedoch Mischungen mit viskoserem Solventien wie Glycerin und Ethylenglycol, oder auch Verdicker wie Zucker zur Erhöhung der Relaxationszeit bis in den Nanosekundenbereich zugesetzt. Unter Verwendung höherer Zeitauflösungen wie z.B. durch Anregung mit Femtosekundenpulsen und Detektion durch *fluorescence upconversion* kann Solvenzrelaxation auch ohne störende Zusätze beobachtet werden.<sup>[64-66]</sup> Allerdings geht dies mit einem kürzeren Zeitfenster einher, so dass nur der Beginn des Abklingprozesses eines Fluorophors mit Lebenszeiten im Nanosekundenbereich beobachtet werden kann.

Der Zeitbereich spektraler Relaxation ist mit 1 bis 10 ns erwartungsgemäß größer, bei einigen Proteinen werden sogar noch langsamere Reorientierungsprozesse vermutet.<sup>[67, 68]</sup> Da dies jedoch den Zeitbereich der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz deutlich übertrifft, sind sie nicht mehr beobachtbar.

### Der *red edge*-Effekt

Ein weiteres Indiz für das Vorliegen eines langsamen Relaxationsprozesses im angeregten Zustand liefert der statische *red edge*-Effekt. Dabei wird nicht im Absorptionsmaximum, sondern an der roten Kante des Absorptionsspektrums angeregt (siehe Abbildung 2.8). Nach einer Anregung im Absorptionsmaximum liegen zunächst unrelaxierte Moleküle vor, die in einem Relaxationsprozess, welcher im Zeitrahmen der Fluoreszenz beobachtbar ist, Energie abgeben. Die statische Fluoreszenz setzt sich somit aus Emissionsanteilen aus vielen Stadien des Relaxationsprozesses zusammen. Bei einer Anregung an der roten Kante des Absorptionsspektrums ist dies nicht der Fall. In einer relativ unbeweglichen oder viskosen Umgebung liegen ein Teil der Fluorophore mit ungünstig orientierten Umgebungsdipolen vor, so dass es zu einer selektiven Anregung dieser Fluorophore kommt. Letztere sind im angeregten Zustand bereits nahezu relaxiert, so dass sie bei besonders hohen Wellenlängen emittieren. Fluoreszenz aus den weniger relaxierten, energiereicheren Niveaus kann hier nicht beobachtet werden. Je größer also die Anregungswellenlänge ist, desto weiter verschiebt sich das statische Emissionsspektrum zu höheren Wellenlängen.



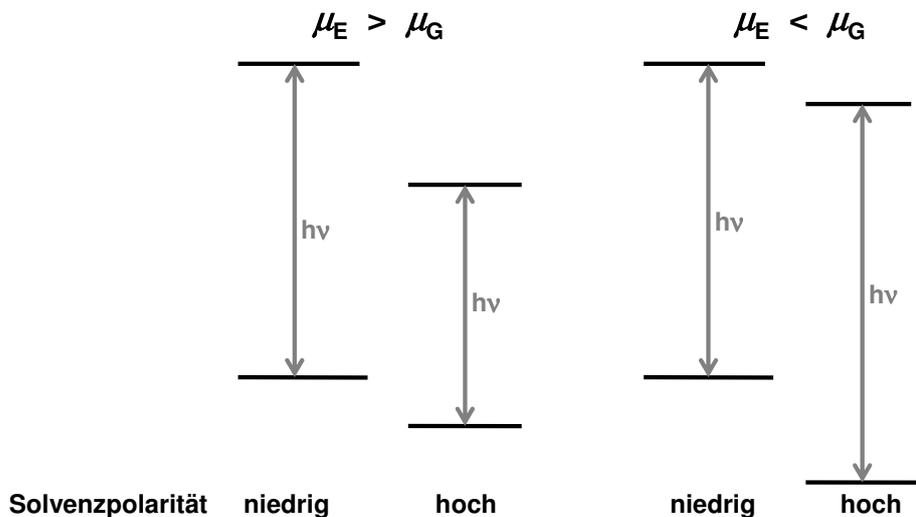
**Abbildung 2.8:** Absorption und Fluoreszenz beim *red edge*-Effekt.

Der *red edge*-Effekt ist umso ausgeprägter, je immobilierter sich die Fluorophorumgebung gestaltet. Für Tryptophan sind einige Beispiele signifikanter Verschiebungen, wie z.B. in Glycerin oder auch in membrangebundenen Melittin, bekannt.<sup>[67,69,70]</sup> Allerdings verringern sich die Fluoreszenzintensitäten bei einer Erhöhung der Anregungswellenlänge, so dass der Einfluss einer schnelleren Relaxation mit moderater spektraler Verschiebung bereits schwer zu detektieren sein kann. Die scheinbare Abwesenheit des *red edge*-Effekts kann also nicht als Ausschlusskriterium für einen Relaxationsprozess herhalten.

### 2.2.2 Statischer Solvenzeinfluss

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von Dipol-Dipolinteraktionen mit dem Lösungsmittel auf die statische Fluoreszenz vorgestellt. Dieser Einfluss kann im Gegensatz zu spezifischen Fluorophor-Solvenz-Wechselwirkungen auch ohne genauere Informationen über die chemischen Eigenschaften des Fluorophors mit einfachen Modellen dargestellt und allgemeingültig quantifiziert werden.

Die spektrale Verteilung der Fluoreszenz nach erfolgter Solvenzrelaxation hängt, wie in Abbildung 2.9 grafisch dargestellt, sowohl von der Polarität des Lösungsmittels als auch von der Differenz der Dipolmomente des Fluorophors im Grund- und angeregten Zustand ab. Ist das Dipolmoment im angeregten Zustand  $\mu_E$  größer als das des Grundzustands  $\mu_G$ , so wird der angeregte Zustand durch ein polarerer Lösungsmittel stärker stabilisiert als der Grundzustand und die Emission wird zu höheren Wellenlängen verschoben (*positiver Solvatochromismus*). Im Gegensatz dazu führt ein geringeres Dipolmoment im angeregten Zustand zu einer Verringerung der Emissionswellenlänge (*negativer Solvatochromismus*).



**Abbildung 2.9:** Einfluss der Lösungsmittelpolarität bei positivem (links) und negativem (rechts) Solvatochromismus

#### Dipolmomentbestimmung nach Onsager für kugelförmige Fluorophore

Ein Modell zur Extrapolation der Stokes-Verschiebung aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen liefert die Onsager-Theorie. Sie betrachtet das Lösungsmittel als Kon-

tinuum mit homogener Ladungsverteilung, in dem sich der Fluorophor als Dipol in einem Lösungsmittelkäfig, der sogenannten Onsager-Kavität, befindet. Chemische Interaktionen, wie Wasserstoffbrücken oder andere spezifische Wechselwirkungen, werden nicht berücksichtigt; für die Dipolmomente des Fluorophors im Grund- und angeregten Zustand wird Parallelität angenommen.

Am einfachsten gestaltet sich die Quantifizierung des Zusammenhangs zwischen Stokes-Verschiebung, Lösungsmiteleigenschaften und Dipolmomenten des Fluorophors im Falle einer kugelförmigen Onsager-Kavität, in der sich ein nicht polarisierbarer Fluorophor befindet. Diese Beziehung wird Lippert-Mataga-Gleichung genannt.

$$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F = \Delta f \cdot \frac{2(\mu_E - \mu_G)^2}{hca^3} + const. \quad (2.25)$$

mit

$$\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (2.26)$$

- $\tilde{\nu}_{A/F}$  : Wellenzahl der Absorption/Fluoreszenz
- $\Delta f$  : Orientierungspolarisation
- $\mu_{G/E}$  : Dipolmoment im Grund- /angeregten Zustand
- $h$  : Plancksches Wirkungsquantum
- $c$  : Lichtgeschwindigkeit
- $a$  : Onsager-Radius
- $\epsilon$  : Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels
- $n$  : Brechungsindex des Lösungsmittels

Die Gleichungen 2.25 und 2.26 ermöglichen die Bestimmung des Übergangsdipolmomentes (der Differenz der Dipole im Grund- und angeregten Zustand) mit Hilfe statischer Fluoreszenzmessungen: Durch Auftragung der Stokes Verschiebung gegen die für das Lösungsmittel spezifische Orientierungspolarisation ergibt sich eine Gerade, aus deren Steigung das Übergangsdipolmoment extrahiert werden kann. Trotz der Simplizität des zu Grunde liegenden Modells bietet die Lippert-Mataga-Theorie einen ersten Anhaltspunkt zur Größenordnung vorliegender Übergangsdipolmomente.

### Dipolmomentbestimmung nach Onsager für ellipsoide Fluorophore

Nicht immer reicht das einfache Modell der Lippert-Mataga-Theorie aus. Die Lösungsmittelkäfige stäbchenförmiger Fluorophore mit ausgeprägten Dipolmomenten entlang der

Molekülachse, wie z.B. Prodan und Acrylodan,<sup>[71, 72]</sup> werden deutlich besser durch einen prolaten (gestreckten) Rotationsellipsoiden beschrieben. Auch weisen sie eine deutlich von 0 verschiedene Polarisierbarkeit auf.

Die Gleichungen 2.27 bis 2.30 beschreiben einen wesentlich allgemeineren Zusammenhang zwischen Dipolmomenten und Solvenzeigenschaften auf der einen, und den sich ergebenden Wellenzahlen der Absorption und Fluoreszenz auf der anderen Seite.

$$\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F = m_1 \cdot f(\epsilon, n) + \text{const.} \quad (2.27)$$

$$\tilde{\nu}_A + \tilde{\nu}_F = m_2 \cdot \phi(\epsilon, n) + \text{const.} \quad (2.28)$$

mit

$$m_1 = \frac{2(\mu_E - \mu_G)^2}{hca^3} + \text{const.} \quad (2.29)$$

$$m_2 = \frac{2(\mu_E^2 - \mu_G^2)}{hca^3} + \text{const.} \quad (2.30)$$

- $\tilde{\nu}_{A/F}$  : Wellenzahl der Absorption/Fluoreszenz
- $f, \phi$  : Parameter der Solvenzpolarität
- $\epsilon$  : Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels
- $n$  : Brechungsindex des Lösungsmittels
- $\mu_{G/E}$  : Dipolmoment im Grund- /angeregten Zustand
- $h$  : Plancksches Wirkungsquantum
- $c$  : Lichtgeschwindigkeit
- $a$  : Onsager-Radius

Durch Auftragung der Fluoreszenzeigenschaften  $\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F$  bzw.  $\tilde{\nu}_A + \tilde{\nu}_F$  gegen die Parameter der Solvenzpolarität  $f(\epsilon, n)$  bzw.  $\phi(\epsilon, n)$  können die Dipolmomente  $\mu_E$  und  $\mu_G$  berechnet werden. Dazu müssen allerdings die Parameter der Polarisierbarkeit  $f(\epsilon, n)$  und  $\phi(\epsilon, n)$  bekannt sein, in welche konkrete Informationen über die elliptische Geometrie der Onsagerkavität und der Polarisierbarkeit des Fluorophors einfließen.

Unter der Annahme einer prolat-ellipsoiden Onsagerkavität und einer Polarisierbarkeit von  $\alpha = a^3/2$  sind  $f(\epsilon, n)$  und  $\phi(\epsilon, n)$  durch die Gleichungen 2.31 bis 2.35 gegeben. Die Entmagnetisierungskonstante  $A$  ist von der Geometrie der Kavität abhängig und kann für jede Ellipsoid-Geometrie in der Literatur<sup>[73]</sup> nachgeschlagen werden.

Neben dem generellen Problem spezifischer Solvenz-Fluorophor-Wechselwirkungen stellt die Abschätzung der Geometrie der Onsager-Kavität, aus der  $a$  und  $A$  ermittelt werden, die größte Schwierigkeit dieses Verfahren dar. Da der Onsager-Radius  $a$  kubisch in

$$\phi(\epsilon, n) = f(\epsilon, n) + 2g(n) \quad (2.31)$$

und

$$f(\epsilon, n) = \frac{\Phi - \Phi'}{(1 - \Phi)(1 - \Phi')^2} \quad (2.32)$$

$$g(n) = \frac{\Phi'(1 - 0.5\Phi')}{(1 - \Phi')^2} \quad (2.33)$$

mit

$$\Phi = \frac{3A(1 - A)(\epsilon - 1)}{2[\epsilon - (\epsilon - 1)A]} \quad (2.34)$$

$$\Phi' = \frac{3A(1 - A)(n^2 - 1)}{2[n^2 - (n^2 - 1)A]} \quad (2.35)$$

- $f, \phi$ : Parameter der Solvenzpolarität  
 $\epsilon$  : Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels  
 $n$  : Brechungsindex des Lösungsmittels  
 $A$  : geometrische Entmagnetisierungskonstante

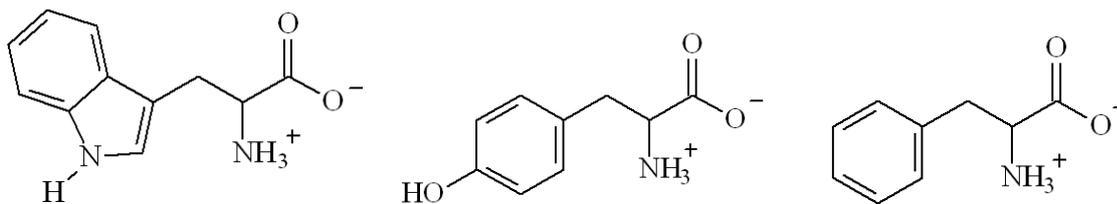
die Berechnung der Dipolmomente eingeht, resultiert ein erheblicher Fehler bereits aus kleinen Abweichungen. Eine recht zuverlässige Methode beruht auf der Annahme, dass die Kavität nahezu Fluorophorausmaße hat. Die gestreckte Achse des prolaten Ellipsoiden entspricht dabei dem Durchmesser der längsten Molekülachse, während die Länge der beiden identischen, kurzen Achse durch Mittelung über die kürzeren Durchmesser bestimmt wird. Gewöhnlicherweise werden dabei die Größe der Onsagerkavität, und somit auch die daraus berechneten Übergangsdipolmomente, leicht überschätzt.

## 2.3 Proteinfluoreszenz

Die Fluoreszenz von biologischen Systemen kann entweder auf natürlich enthaltenen (*intrinsischen*), oder auf künstlich angebrachten (*extrinsischen*) Fluorophoren beruhen. In Proteinen kommt intrinsische Fluoreszenz zumeist durch fluorophore Aminosäuren zustande. Eine prominente Ausnahme stellen das *Green Fluorescent Protein* (GFP) und seine Varianten dar, deren photophysikalische Eigenschaften auf ein aus drei Aminosäuren gebildetes p-Hydroxybenzylidenimidazolin zurück zu führen sind.<sup>[9]</sup> Extrinsische Fluorophore sind häufig kleine Farbstoffe mit hohen Quantenausbeuten wie Rhodamin und Fluorescein, die die Struktur und Funktionalität der Proteine wenig stören und gleichzeitig gut zu detektieren sind.<sup>[8]</sup>

### 2.3.1 Fluoreszente Aminosäuren

Von den 23 proteinogenen Aminosäuren weisen drei, Tryptophan (Trp, W), Tyrosin (Tyr, Y) und Phenylalanin (Phe, F), für spektroskopische Untersuchungen geeignete Fluoreszenzeigenschaften auf. Alle drei liegen, dem amphoterem Charakter von Aminosäuren entsprechend, in wässriger Lösung unter physiologischen Bedingungen als Zwitterion vor. Aufgrund der aromatischen Indol- und Benzolreste sind sie verhältnismäßig unpolar; nur die Hydroxygruppe des Tyrosins kann zusätzliche Wasserstoffbrücken ausbilden.



**Abbildung 2.10:** Strukturformeln von Trp, Tyr und Phe.

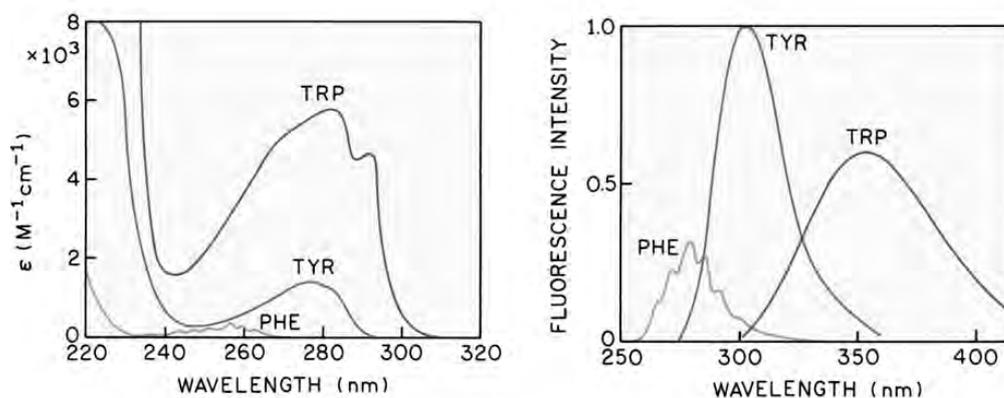
Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zeigen unterschiedliche photophysikalische Eigenschaften. Einen Überblick dazu liefert Tabelle 2.1. Insgesamt eignet sich Tryptophan nicht nur wegen der hohen Absorptionskoeffizienten und Quantenausbeuten am besten für einen Einsatz in der Fluoreszenzspektroskopie. Auch die geringere Häufigkeit erleichtert spektroskopische Untersuchungen, da das Vorliegen mehrerer Fluorophore in verschiedenen chemischen Umgebungen die Dateninterpretation verkompliziert. Oft liegt nur ein ein-

zernes Tryptophan im Protein vor, oder es kann durch Mutation gezielt in ein vormals fluorophorfrees Protein eingebaut werden.

Aminosäure	Kürzel	$\lambda_{\text{Abs, max}}$ in nm	$\lambda_{\text{Fluo, max}}$ in nm	Quantenausbeute im Protein BSA	Häufigkeit in Proteinen in %
Phenylalanin	Phe, F	257	282	0.00	3.5
Tyrosin	Tyr, Y	274	303	0.02	3.5
Tryptophan	Trp, W	280	353	0.47	1.1

**Tabelle 2.1:** Eigenschaften der drei chromophoren Aminosäuren.<sup>[8, 74]</sup>

Die analytisch gesehen interessanteste Eigenschaft der Tryptophanfluoreszenz ist jedoch ihr Solvatochromismus: Je größer die Polarität der Tryptophanumgebung ist, desto weiter erhöht sich die Stokes-Verschiebung. Dieses Charakteristikum ermöglicht die fluoreszenzspektroskopische Analyse von Prozessen wie Aggregation, Faltung, Denaturierung und Reaktionen mit anderen biochemischen Systemen, welche mit einer Veränderung der chemischen Umgebung des betroffenen Tryptophans einhergehen.



**Abbildung 2.11:** Absorption und Fluoreszenz von Trp, Tyr und Phe. Bilder wurden der Literatur entnommen.<sup>[8]</sup>

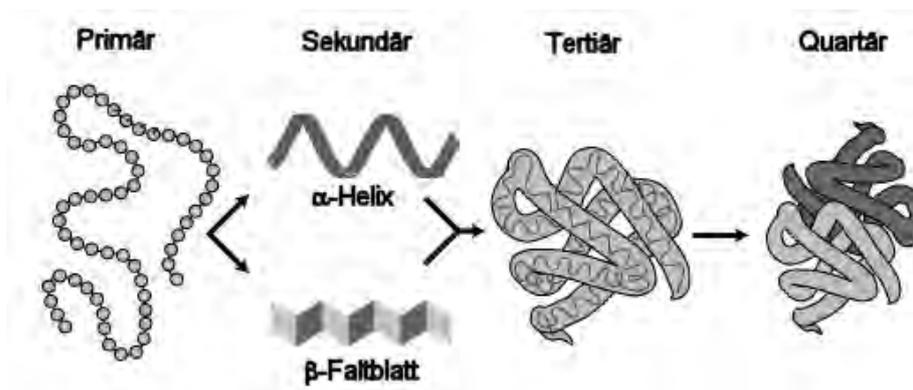
Obwohl Tryptophan sein Anregungsmaximum bei etwa 280 nm aufweist, muss für eine selektive Untersuchung in Proteinen eine Anregungswellenlänge von 295 nm gewählt werden. Auf diese Weise wird der störende Einfluss eventuell vorliegender Tyrosine umgangen. Die Fluoreszenz des Phenylalanins liegt zu weit im UV und ist insgesamt zu schwach, um als Störfaktor in Betracht zu kommen.

## 2.3.2 Einfluss der Proteinstruktur

### Proteinstruktur

Zur Beschreibung der räumlichen Struktur eines Proteins wird zwischen vier Ebenen unterschieden:

- *Primärstruktur*: Abfolge der kovalent gebundenen Aminosäuren vom N- zum C-Terminus
- *Sekundärstruktur*: Wiederkehrendes Strukturmotiv mehrerer benachbarter Aminosäuren (z.B.  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt)
- *Tertiärstruktur*: Räumliche Anordnung der gesamten Polypeptidkette
- *Quartärstruktur*: Räumliche Anordnung mehrerer Polypeptidketten



*Abbildung 2.12: Die vier Ebenen der Proteinstruktur.*

Die Faltung eines Proteins ist ebenso komplex wie entscheidend für dessen Funktionalität. Weist eine Proteinsequenz Defekte auf, welche zu einer Störung des empfindlichen Gefüges aus Wasserstoffbrücken und anderen Wechselwirkungen führt, so kann dies die Wirkung des Proteins stark beeinflussen. Ein Beispiel dafür ist die Sichelzellenanämie, eine Krankheit, bei der eine mutierte Sequenz die Form des Hämoglobins stark verändert und so dessen Fähigkeit, Sauerstoff zu transportieren, verringert.<sup>[44]</sup> Aber nicht nur Defekte im Protein selber, auch Umgebungseinflüsse, etwa ungünstige Salz- und Proteinkonzentrationen, oder unerwünschte Wechselwirkungen mit anderen Enzymen, können einen fehlgeleiteten Faltungsprozess begünstigen. So führen erhöhte Konzentrationen des natürlich

vorkommenden Amyloids  $\alpha$ -Synuklein in neuronalen Zellen zur Aggregation mit Fibrillbildung; letztendlich resultieren daraus Krankheiten wie Parkinson und Alzheimer.<sup>[41]</sup>

### **Einfluss auf die Tryptophanfluoreszenz**

Für die Fluoreszenz eines Tryptophans ist es aufgrund seiner Umgebungssensitivität entscheidend, wo es in der komplexen Proteinstruktur genau lokalisiert ist. Da sich die Stokes-Verschiebung mit der Polarität der Fluorophorumgebung erhöht, weist ein vom Lösungsmittel abgeschirmtes Tryptophan auf einem tendenziell hydrophoben  $\beta$ -Faltblatt geringere Emissionswellenlängen auf, als in einer relativ polaren  $\alpha$ -Helix. Ein fast vollständig wasserexponiertes Tryptophan wird die größte Verschiebung aufweisen.

Der Zusammenhang zwischen Emissionsbereich und Tryptophanumgebung wird auch durch die Klassifizierung der Tryptophanfluoreszenz nach Burstein reflektiert.<sup>[75]</sup> Dabei werden Emissionwellenlänge und Halbwertsbreite der Fluoreszenz eines Proteins in Pufferlösung betrachtet und so Rückschlüsse auf die Umgebung des Tryptophans gezogen. Burstein unterscheidet zwischen den folgenden drei Klassen:

- Klasse I:  $\lambda_{em} = 330\text{-}332\text{ nm}$  und  $\Delta\lambda = 48\text{-}49\text{ nm}$
- Klasse II:  $\lambda_{em} = 340\text{-}342\text{ nm}$  und  $\Delta\lambda = 53\text{-}55\text{ nm}$
- Klasse III:  $\lambda_{em} = 350\text{-}353\text{ nm}$  und  $\Delta\lambda = 59\text{-}61\text{ nm}$

Unter Klasse III fällt Tryptophan selber, sowie sehr kleine Peptide und denaturierte Proteine. Diese Klasse zeichnet sich also durch eine hohe Exponiertheit des Tryptophanrestes zur Pufferlösung aus. Sehr stark abgeschirmte Proteine, in denen sich das Tryptophan in hydrophober Umgebung befindet, sind der Klasse I zuzuordnen. Im Gegensatz dazu befinden sich die Tryptophanreste der Klasse II zwar in einer Proteinmatrix mit definierter, intakter Sekundärstruktur, allerdings sind sie gut von Quenchern zu erreichen und damit weniger vom Puffer abgeschirmt.

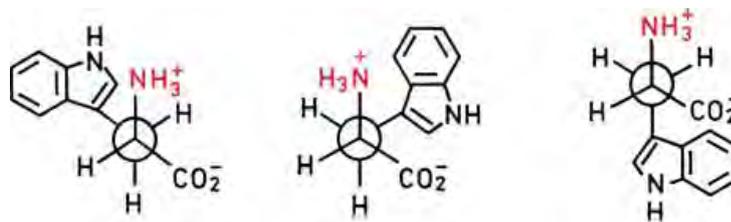
Doch nicht nur die Stokes-Verschiebung enthält strukturelle Informationen über das Protein: Lebenszeit und Quantenausbeute der Fluoreszenz hängen stark von der räumlichen Nähe zu intrinsischen Quenchern ab; Experimente mit extra eingebrachten Quenchern können zudem weitere Anhaltspunkte zur Exposition und Erreichbarkeit des Fluorophors

gegenüber dem Lösungsmittel liefern. Die Flexibilität des Tryptophans, die Beweglichkeit des zugehörigen Segments und auch die Rotation des Gesamtproteins fließen in den Zeitverlauf der Anisotropie der Fluoreszenz mit ein. Eine Kombination all dieser Techniken liefert ein detailreiches Bild von der Einbettung des Tryptophanrestes in das umgebende Protein.

Durch erhöhte Temperaturen oder Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid können die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten aufgehoben und so die Elemente der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur zerstört werden. Diese sogenannte *Denaturierung* reduziert die Proteinstruktur auf eine ungeordnete, äußerst flexible Kette (*random coil*), bei der nahezu alle Aminosäurereste stark zum Lösungsmittel exponiert sind. Mit der Struktur wird dabei auch die Funktionalität des nativen Proteins zunichte gemacht.

### Einfluss mehrerer Konformationen

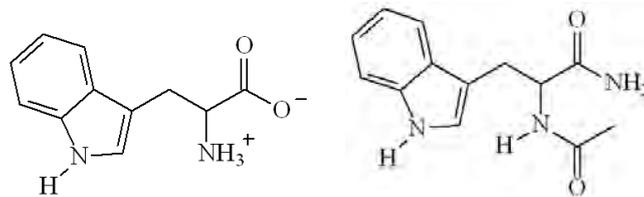
Auch wenn die räumliche Struktur von Proteinen in Lösung durch die nicht-kovalenten Interaktionen der einzelnen Aminosäurereste weitgehend festgelegt ist, behalten sie eine gewisse Flexibilität. Ihr Ausmaß hängt stark von den vorherrschenden Strukturelementen ab: *random coil*-Anordnungen zeigen wenig determinierte Struktur und geringe Flexibilität, Struktur motive aus  $\beta$ -Faltblättern sind zumeist deutlich fester gefügt. Insgesamt besteht die Möglichkeit, dass in einer Lösung verschiedene Konformationen des Proteins mit unterschiedlichen chemischen Umgebungen des Tryptophanrestes vorliegen.



**Abbildung 2.13:** Rotamere des Tryptophans, Bild aus der Literatur.<sup>[8]</sup>

Wie stark sich dies potentiell auf die intrinsische Fluoreszenz des Proteins auswirken kann, zeigt das Beispiel des Tryptophans selber: Es weist die in Abbildung 2.13 dargestellten Rotamere um die Bindung zwischen  $\alpha$  und  $\beta$ -C-Atom auf, in denen die protonierte Ammoniumfunktion als Quencher unterschiedlich nah an den fluoreszenten Indolring heranreicht.

Dadurch zeigt es ein biexponentielles Fluoreszenzabklingverhalten mit Lebenszeiten von  $\tau_1 = 0.54 \text{ ns}$  und  $\tau_2 = 3.44 \text{ ns}$ .<sup>[8]</sup> Da das Rotamer mit der kurzen Lebenszeit bei kleineren Wellenlängen emittiert als die anderen Rotamere, verschiebt sich die Fluoreszenz mit der Zeit zu größeren Wellenlängen. In Proteinen dagegen liegen Amin- und Carbonsäurefunktion aufgrund der Peptidbindungen amidiert vor; ein Modell dafür ist das Tryptophanderivat N-Acetyl-L-Tryptophanamid (NATA) (siehe Abbildung 2.14). Hier zeigen sich keinerlei Unterschiede zwischen den Rotameren, so dass NATA über eine monoexponentielle Fluoreszenzabklingkurve mit  $\tau = 3.17 \text{ ns}$  verfügt.<sup>[8]</sup>



**Abbildung 2.14:** Strukturformeln von Trp (links) und NATA (rechts).

In Proteinen, welche nur ein Tryptophan enthalten (*single tryptophan proteins*, STP) finden sich trotzdem häufig multiexponentielle Abklingkurven. Dies kann auf das Vorliegen mehrerer Konformationen hinweisen. Auffällig ist jedoch, dass für fast alle bekannten STPs mit mehreren Fluoreszenzlebenszeiten die Spezies mit der kürzeren Lebenszeit bei geringeren Wellenlängen emittiert. Da die Emissionswellenlänge des Tryptophans in Proteinen ansonsten nicht mit der Lebenszeit korreliert, wird in der Literatur ein anderer Prozess als Ursache für Multiexponentialität und spektrale Verschiebung in STPs diskutiert: Die spektrale Relaxation.<sup>[67]</sup> Prinzip und Auswirkung dieses Effektes werden in Abschnitt 2.2.1 im Detail erläutert.

*Physical Chemistry is best done in the dark.*

*P. W. Atkins*

# 3 Experiment

Die besondere Leistungsfähigkeit der in Bielefeld zur Verfügung stehenden Messapparaturen liegt in der einzigartigen Kombination mehrdimensionaler statischer und dynamischer Fluoreszenztechniken. Ihre Funktionsweise wird in diesem Kapitel erläutert. Mit der in Abschnitt 3.2 präsentierten Konstruktion zur polarisationsaufgelösten Vermessung der statischen Fluoreszenz ist zudem eine wesentliche Erweiterung der bisherigen, messtechnischen Möglichkeiten gelungen. Abschließend werden die angewandten Vorgehensweisen zur Bestimmung der Absorption und zur Probenpräparation dargelegt.

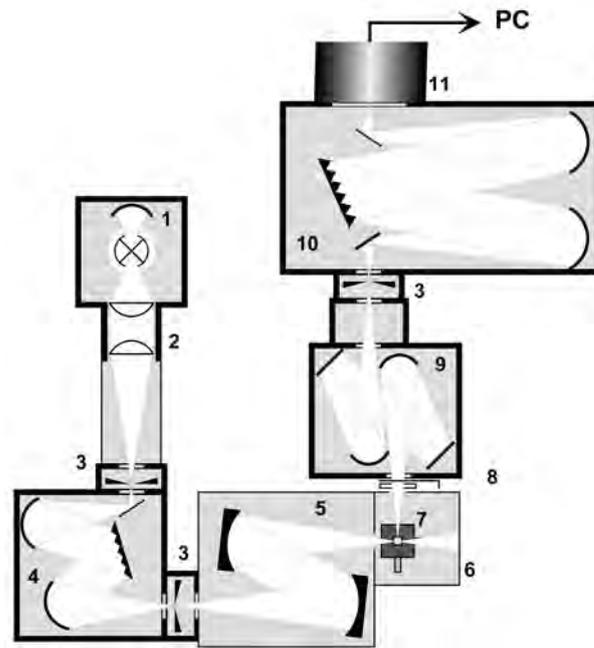
## 3.1 Anregungs-Emissions-Spektroskopie (AES)

### 3.1.1 Aufbau

Zur selektiven und sensitiven Analyse der statischen Fluoreszenz wird eine besonders leistungsfähige Apparatur zur Aufnahme mehrdimensionaler Anregungs-Emissions-Spektren (AE-Spektren) genutzt. Abbildung 3.1 gibt eine schematische Übersicht über den Aufbau. Er setzt sich im Wesentlichen aus einer Xenon-Bogenlampe mit nachgeschaltetem Monochromator als Lichtquelle, der Probe mit entsprechender Halterung, sowie einer Detektionseinheit - bestehend aus Spektrograph und CCD-Kamera - zusammen.

#### **Anregung**

Das breitbandige Spektrum der verwendeten 75 W Xenon-Bogenlampe (*L.O.T.-Oriel*) ermöglicht eine Fluoreszenzanregung zwischen 200 und 700 nm. Ein Rückreflektor erhöht das Ausgangssignal der Lampe, welches mit Hilfe eines Linsencondensors auf den Eingangsspalt des Anregungsmonochromators (*SpectraPro-150* von *Acton Research*) abgebildet wird. Drei verschiedene Gitter können rechnergesteuert angewählt werden, um das



- |   |   |     |                                 |
|---|---|-----|---------------------------------|
| 1 | <i>Xe-Lampe und Rückreflektor</i>             | 6,7 | <i>Probenhalter</i>             |
| 2 | <i>Kondensorlinsen</i>                        | 8   | <i>Filterhalter und Shutter</i> |
| 3 | <i>verstellbare Spalte</i>                    | 9   | <i>Fokussieroptik</i>           |
| 4 | <i>Monochromator</i>                          | 10  | <i>Spektrograph</i>             |
| 5 | <i>Fokussieroptik, Astigmatismuskorrektur</i> | 11  | <i>CCD-Kamera</i>               |

**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der AES-Apparatur.

Licht spektral aufzuspalten und auf den Austrittsspalt abzubilden. Die unterschiedlichen Eigenschaften dieser Gitter sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Eine gleichgeschaltete Variation der Spalte ändert sowohl die Intensität als auch die spektrale Breite des Anregungslichtes. Zur Vermeidung chromatischer Aberration wird das Licht nach dem Austrittsspalt mit Hilfe zweier Hohlspiegel in die Probe fokussiert.

Gitter	Gitterkonstante in Linien/mm	Blazewellenlänge in nm	Dispersion in nm/mm
1	2400	240	2.6
2	1800	500	3.3
3	1200	300	5.2

**Tabelle 3.1:** Eigenschaften der Gitter des Anregungsspektrographen.

## Probenhalterung

Zur Gewährleistung der Durchlässigkeit für Strahlung im ultravioletten Spektralbereich werden Präzisionsküvetten von *Hellma* aus Suprasil mit einer Größe von  $10 \times 10$  oder  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  verwendet. Der eigens konstruierte Probenhalter erlaubt es, die Probenposition in allen drei Raumrichtungen sowohl flexibel anzupassen als auch verlässlich zu reproduzieren. Zur Verminderung von Intensitätsverlusten und Reabsorptionseffekten wird die Küvette so positioniert, dass der Weg des Anregungs- und Fluoreszenzlichtes in der Küvette möglichst kurz ist. Ein temperierbarer Probenhalter mit Thermostat (DC50-K40 von *Haake*) ermöglicht Messungen bei Temperaturen zwischen 0 und  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Zudem kann die Probe mit Hilfe eines Magnetrührers von *Variomag* ( $12 \times 12 \times 5 \text{ mm}^3$ ) und passenden Rührstäbchen mit Magnetkern bei Bedarf gerührt werden.

## Detektion

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt im rechten Winkel zur Anregung. Zur Aufnahme der Fluoreszenz wird eine Kombination aus zwei Hohl- und Zylinderspiegeln (*Sopra*) eingesetzt, welche den Astigmatismus des nachgeschalteten Spektrographen korrigiert. Dies ermöglicht ein gleichzeitig entlang Orts- und Wellenlängennachse scharfes Abbild der Fluoreszenz auf dem Kamerachip. Der Spektrograph verfügt über zwei Gitter zur spektralen Aufspaltung der Fluoreszenz; ihre Eigenschaften sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Gitter	Gitterkonstante in Linien/mm	Blazewellenlänge in nm	Dispersion in nm/mm	spektrales Fenster in nm
1	150	500	24	590
2	300	300	12	290

**Tabelle 3.2:** Eigenschaften der Gitter des Emissionsspektrographen.

Die CCD-Kamera (SpectrumM:250B, *Princeton Instruments*) befindet sich in der Austrittsebene des Spektrographen und detektiert die orts- und wellenlängenaufgelöste Fluoreszenz. Sie verfügt über einen *back-illuminated* CCD-Sensor (*Hamamatsu*) mit einer Größe von  $1024 \times 252$  Pixel, welcher zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses auf  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt wird. Auf diese Weise ist die effiziente Detektion von Wellenlängen zwischen 200

und 1100 nm gewährleistet. Mit Hilfe des MicroMax ST-133-Controllers (*Princeton Instruments*) wird die Kamera gesteuert und ausgelesen.

#### 3.1.2 Datenaufnahme

Die Fluoreszenzspektren werden mit Hilfe des Programms WinSpec (*Roper Scientific*) aufgenommen. Dabei sieht das Programm verschiedene Modi vor, von denen zwei im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden.

**Fullchip-Modus:** Das aufgenommene Kamerabild, ein entlang der x-Achse wellenlängenaufgelöstes und entlang der y-Achse orts aufgelöstes Spektrum, wird ohne weitere Bearbeitung angezeigt.

**ROI-Modus:** Es wird ein dem Fullchip-Modus entsprechendes Kamerabild aufgenommen und dann ein horizontales Profil gezogen, also eine Mittelung der Intensität über einen bestimmten Ortsbereich durchgeführt. Der Bereich des Spektrums, über den gemittelt wird, wird auch als *region of interest* (ROI) bezeichnet. Dabei geht die Ortsinformation des Ursprungsbildes verloren; übrig bleibt ein einfaches Emissionsspektrum bei der gewünschten Anregungswellenlänge (siehe Abbildung 3.2). Eine Mittelung auf dem Chip vor dem Ausleseprozess bezeichnet man als *hardware binning*. Werden alle Zeilen des Chips vollständig ausgelesen und erst danach die Intensitäten in der ROI addiert, liegt *software binning* vor. Letzteres dauert aufgrund des erhöhten Ausleseaufwands länger, weist dafür aber ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis auf. Zudem ist hier ein größerer dynamischer Bereich zugänglich, welcher beim *hardware binning* auf 16 Bit beschränkt ist.

Der ROI-Modus kann genutzt werden, um mit Scans über die Anregungswellenlänge AE-Spektren zu generieren. Durch eine rechnergesteuerte, inkrementelle Änderung der Anregungsfrequenz wird für jede Anregungswellenlänge ein charakteristisches Emissionsspektrum aufgenommen. Die erhaltenen Emissionsspektren werden nun von WinSpec automatisch zu einem zweifach wellenlängenaufgelösten *Anregungs-Emissions-Spektrum* (AE-Spektrum) zusammengesetzt (siehe Abbildung 3.3), wobei die Intensität mit Hilfe einer Falschfarbenskala dargestellt wird. Die Steuerung des Scanvorgangs, also die Kom-

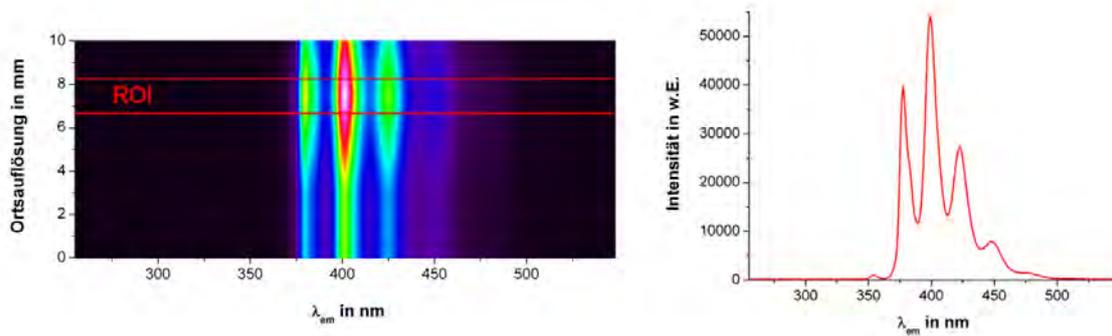


Abbildung 3.2: Kamerabild mit horizontalem Emissionsprofil.

munikation mit Kamera und Monochromator über die zugehörige Software, übernimmt das Programm AES-Control<sup>[76]</sup>, eine in der Arbeitsgruppe entwickelte LabView-Routine.

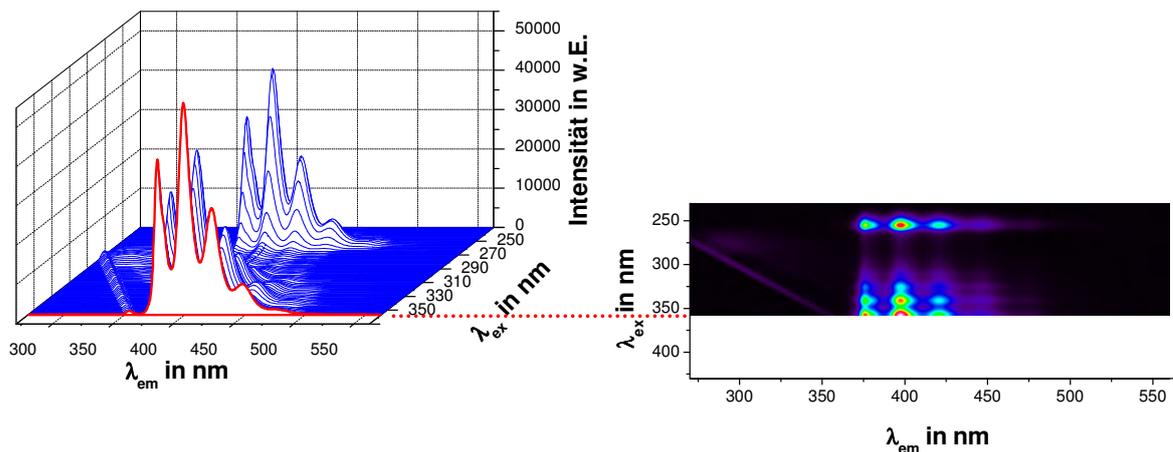


Abbildung 3.3: Emissionsprofile werden zum AE-Spektrum zusammengesetzt.

Das AE-Spektrum einer einzelnen Spezies beinhaltet so viele charakteristische Fluoreszenzinformationen, dass es als ein unverwechselbarer Fingerabdruck des vermessenen Moleküls angesehen werden kann. In Stoffgemischen erleichtert die simultane Betrachtung von Anregungs- und Emissionswellenlänge die Zuordnung der Signale zu den verschiedenen Spezies erheblich; auch Streulicht und Gittereffekte können mit Hilfe eines solchen AE-Spektrums sehr einfach identifiziert werden.

## 3.2 Polarisationsaufgelöste Erweiterung der AES

Polarisationseffekte spielen in der optischen Spektroskopie eine wichtige Rolle: Immobile oder eingeschränkt bewegliche Chromophore wie Kristalle und Membranen, aber auch Fluorophore in Lösung mit hoher Viskosität oder kurzen Lebenszeiten senden nach polarisierter Anregung anisotrope Strahlung aus. Zudem zeigen viele optische Bauteile wie z.B. Gitter polarisationsabhängige Eigenschaften. Trotzdem wird die Polarisation der detektierten Strahlung in statischen Fluoreszenzspektrometern oft nicht berücksichtigt.

Um für die Zukunft polarisationsaufgelöste statische Fluoreszenzmessungen, z.B. an den in Abschnitt 7.5 beschriebenen Diazaborolkristallen, vornehmen zu können, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine leistungsfähige Erweiterung des statischen Aufbaus konstruiert und getestet werden, welche eine simultane Detektion beider Polarisationskomponenten im ultravioletten Spektralbereich möglich macht.

### 3.2.1 Konstruktion

Grundidee der vorliegenden Konstruktion ist es (Abbildung 3.4), neben parallel und orthogonal zur Anregung polarisierter Fluoreszenz auch Anregungsintensität und Transmission simultan zu detektieren. Auf diese Weise werden Streulichteinflüsse und Reabsorptionseffekte der vorliegenden Messungen, welche in Kristallen sehr stark winkelabhängig und somit kaum reproduzierbar sind, zeitgleich mitprotokolliert. Dazu wird jedes der vier Signale in einen Arm eines vierteiligen Gabellichtleiters eingekoppelt. Für UV-Licht durchlässige Glanprismen, passende Neutraldichtfilter und eine Quarzplatte zur Entnahme eines Reflexes aus dem Anregungslicht stellen die gewünschten Polarisationen ein und gleichen die Intensitäten der vier Signale an, so dass sie alle in derselben Größenordnung liegen und auf dem gleichen Kamerachip detektiert werden können.

Die Lichtsignale der vier Kanäle zu je drei Glasfasern erreichen den Kamerachip auf unterschiedlichen Höhen, wie in Abbildung 3.5 dargestellt. Die zwischen den scharfen Abbildern der Faserenden auftretende, nach unten ansteigende Signalintensität kommt durch den Ausleseprozess zustande; das notwendige Korrekturverfahren wird in Abschnitt 3.2.2 erläutert. Die in Abbildung 3.5 dargestellten Rohdatenbilder belegen, dass die Abbildung

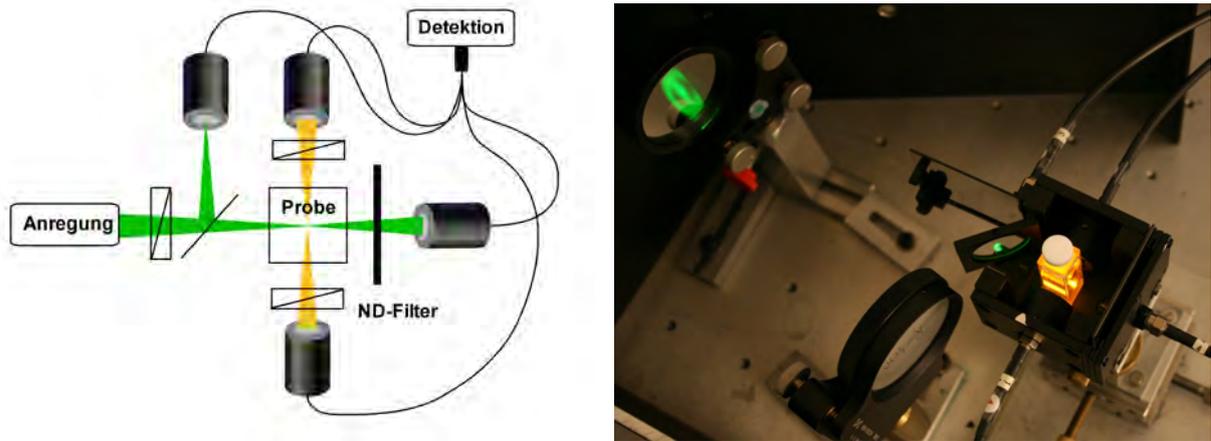


Abbildung 3.4: Aufbau der Glasfasererweiterung für die AES.

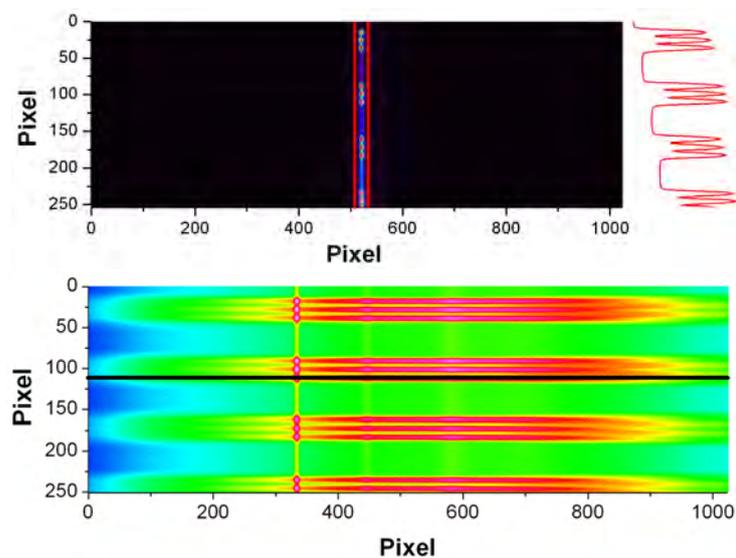


Abbildung 3.5: Kamerabild der vier Faserbündel ohne (oben) und mit (unten) spektraler Dispersion.

der Glasfaserausgänge in der Ortsachse an der Vertikalen (rote Linien), und in der spektralen Achse an der Horizontalen (schwarze Linie) des Kamerachips ausgerichtet ist.

### 3.2.2 Datenaufnahme und -bearbeitung

Die Lichtsignale der vier Kanäle erreichen den Kamerachip auf unterschiedlichen Höhen, wie in Abbildung 3.6 dargestellt. Unter Verwendung von vier verschiedenen ROIs ergibt ein Scan der Anregungswellenlänge dem entsprechend vier AE-Spektren, jeweils eins für

### 3 Experiment

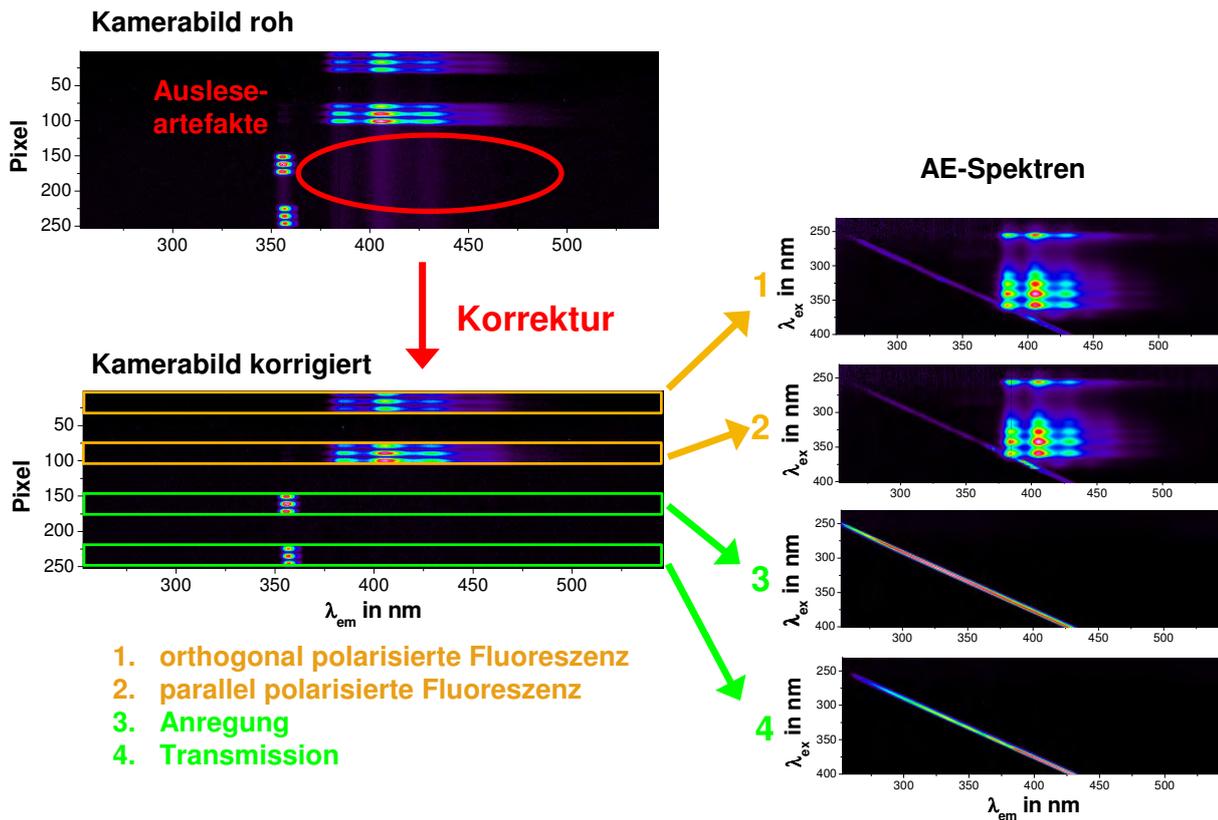


Abbildung 3.6: Simultane Detektion von vier Signalen pro Anregungsscan unter Verwendung mehrerer ROIs.

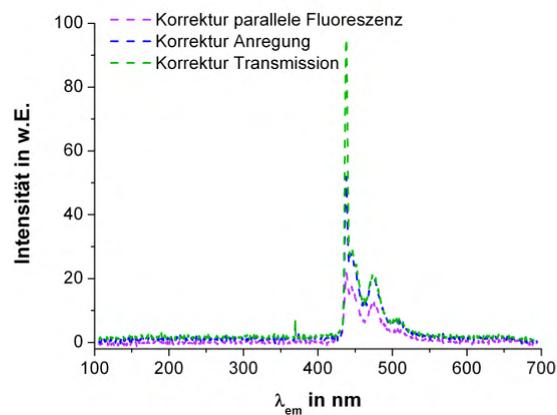
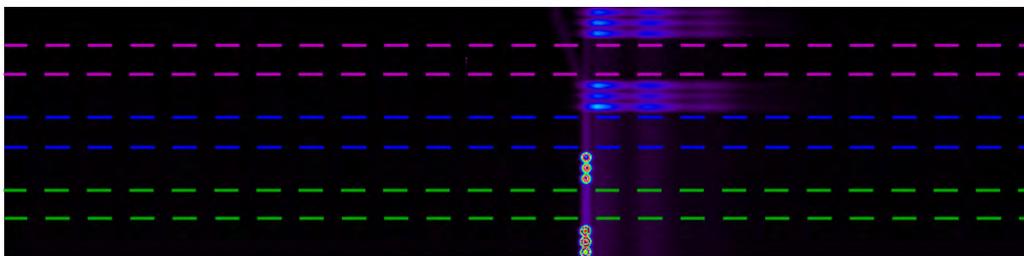


Abbildung 3.7: Kamerabild mit drei ROIs zur Korrektur der Ausleseartefakte.

die orthogonal und parallel polarisierte Fluoreszenz, für die Anregungsintensität und die Transmission.

Die Belichtung der Kamera mit verschiedenen Signalen auf unterschiedlichen Höhen führt jedoch zu einem Problem: Den Ausleseprozess beginnt das System mit der Datenübertragung für die oberste Zeile; anschließend werden die Informationen Zeile für Zeile entlang der vertikalen nach oben verschoben. Da die Apparatur jedoch über keinen elektronisch gesteuerten Shutter verfügt, wird der Chip gleichzeitig weiter belichtet. Auf diese Weise finden sich Teile der spektralen Information jeder ROI auf den jeweils tiefer liegenden Pixelzeilen der Kamera.

Um dieses Problem zu lösen, werden die Fremdbeiträge in den Spektren nachträglich eliminiert. Da der Ausleseprozess im Modus *software binning* sehr gleichmäßig verläuft, können die Areale, welche direkt oberhalb der drei betroffenen ROIs 2 bis 4 liegen, als Hintergrund verwendet werden. Insgesamt werden also sieben ROIs definiert, von denen drei nach der Aufnahme zum Abzug der Ausleseartefakte dienen (siehe Abbildung 3.7). Eine von Dr. Michael Letzgun geschriebene Programmroutine berechnet aus den Angaben der sieben ROIs und den enthaltenen Intensitätsdaten das für die einzelnen AE-Spektren abzuziehende Hintergrundbild. Dabei wird davon ausgegangen, dass der Ausleseprozess gleichmäßig verläuft.

### 3.2.3 Testmessungen

#### Polarisation

Um die Funktionsfähigkeit des neuen Systems zu testen, wurden zunächst Referenzmessungen mit Anthracen bzw. Perylen in wasserhaltigem Glycerin (87 %) vorgenommen. Beide Farbstoffe weisen einen stark emittierenden  $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang im blauen Spektralbereich auf. Durch die verminderte Rotation der Farbstoffe in viskosen Lösungsmitteln kann es zu erheblichen Anisotropieeffekten in der Emission kommen,<sup>[77]</sup> welche sich insbesondere im Intensitätsverhältnis der Anregungsbande  $S_2 \leftarrow S_0$  im UV zum  $S_1 \leftarrow S_0$ -Übergang im VIS äußern.

Ursache dafür sind die in Abbildung 3.8 für Perylen dargestellten, nahezu senkrecht aufeinander stehenden Übergangsdipolmomente der beiden Übergänge.<sup>[78,79]</sup> Bei einer Anregung im VIS sind die Übergangsdipolmomente von Anregung und Emission parallel, dem ent-

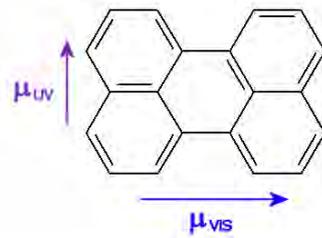


Abbildung 3.8: Perylen mit Dipolmomenten der angeregten Zustände.

sprechend wird die parallele Komponente bevorzugt emittiert. Bei einer Anregung im UV mit Emission im VIS dagegen stehen die Übergangsdipolmomente orthogonal zueinander, daher wird die orthogonale Komponente bevorzugt emittiert.

Dieser zu erwartende Effekt kann in den Anregungsspektren deutlich beobachtet werden; Ein Hinweis auf die gute Qualität der Kalibration und Kameraeinstellung ist die Tatsache, dass die Rekonstruktion der Gesamtintensität, welche durch Messung im *magic angle* (vgl. Abschnitt 2.1.6) bestimmt wird, aus den polarisationsaufgelösten Einzelkomponenten der Fluoreszenz sehr gut gelingt.

### Absorption

Aus den Transmissions- und Anregungsspektren kann durch sorgfältige Hintergrundkorrektur und Übereinanderlegen bei 430 nm ein Absorptionsspektrum von Anthracen ermittelt werden. Der Vergleich mit einer Messung der gleichen Probe in einem handelsüblichen Absorptionsspektrometer unterstreicht die Legitimität dieses Ansatzes. Das erhal-

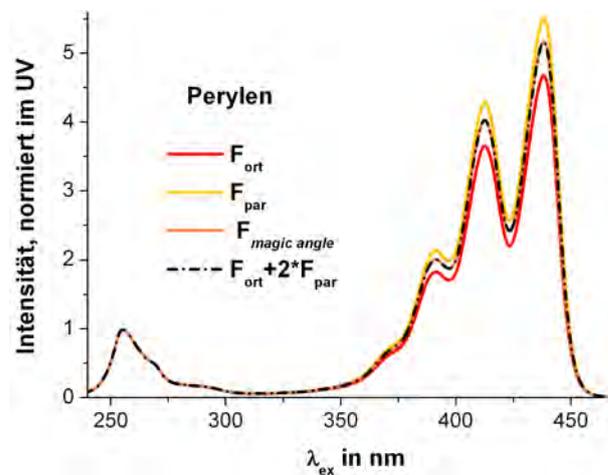
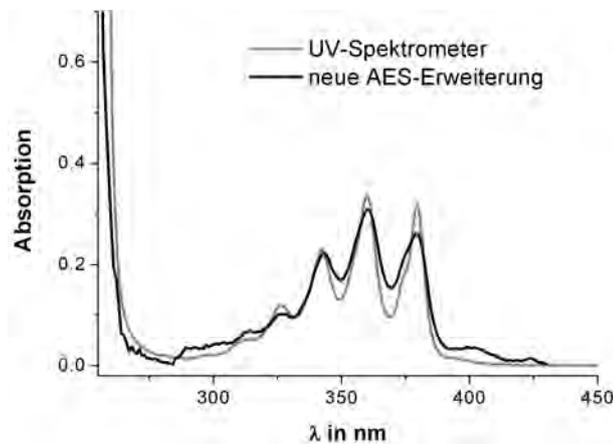


Abbildung 3.9: Polarisationsaufgelöste Anregungsspektren von Perylen in Glycerin.

tene Spektrum weist zwar eine geringere Wellenlängeauflösung und stärkerer Anfälligkeit für Streustrahlung auf, allgemeine Form und Größenordnung wird jedoch sehr treffend wiedergegeben.



**Abbildung 3.10:** Gemessene Absorption von Anthracen mit UV-VIS-Spektrometer und AES-Erweiterung.

Dieser Aufbau ist weniger gut dafür geeignet, die Absorption gering konzentrierter, schwacher Absorber mit hohem Streulichtanteil zu detektieren. Für Farbstoffe und als Hinweis auf eventuell auftretende Reabsorptionseffekte, z.B. bei der Untersuchung von Substanzen mit geringen Quantenausbeuten, ist sie jedoch sehr gut geeignet.

### 3.2.4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine fiberoptische Erweiterung der statischen AES-Apparatur entwickelt, welche die polarisationsaufgelöste Vermessung der statischen Fluoreszenz mit gleichzeitiger Aufzeichnung der Absorption ermöglicht. Erste Messungen an den Referenzsubstanzen Perylen und Anthracen zeigen vielversprechende Ergebnisse. Eine alternative Optik mit Sammellinsensystem zur Verbesserung der Detektionseffizienz könnte eine sinnvolle Weiterentwicklung der vorgestellten Konstruktion darstellen.

## 3.3 Zeitaufgelöste Laserinduzierte Fluoreszenz

Zentraler Bestandteil dieser Arbeit sind Messungen der zeitaufgelösten, laserinduzierten Fluoreszenz (tr-LIF) bei verschiedenen Emissionswellenlängen, um Reorganisationsprozesse in Proteinen anhand der Veränderung des Fluoreszenzspektrums mit der Zeit beobachten zu können. Die an der Universität Bielefeld zur Verfügung stehende Apparatur verbindet eine kurzpulsige Anregungslichtquelle mit einer leistungsstarken, zeitlich und spektral dispergierenden Detektionseinheit, und ermöglicht so die Aufnahme von simultan zeit- und wellenlängenaufgelösten Spektren.

Eine Übersicht über das für alle tr-LIF-Messungen verwendete System gibt Abbildung 3.11. Es verfügt über einen Titan:Saphir-Laser, welcher Pulse mit einer Breite von 80 oder 3 ps erzeugt. Das erhaltene Signal wird verstärkt und die Wellenlänge durch Frequenzvervielfachung und Ramanverschiebung auf den gewünschten Wert eingestellt. Um Photo-bleaching zu vermeiden, wird eine Kombination aus Fresnel-Rhombus und Rochon-Prisma zur Regulation der Anregungsintensität eingesetzt. Mit Hilfe eines Hohlspiegels wird die Fluoreszenz im rechten Winkel zur Probe auf einen Spektrographen mit nachgeschalteter Streackamera fokussiert. Die einzelnen Bestandteile des Aufbaus werden im Folgenden detaillierter erläutert.

### 3.3.1 Das Lasersystem

#### Generierung kurzer Laserpulse

Das zur Anregung notwendige Laserlicht wird von einem System mehrerer hintereinander geschalteter Laser produziert. Ein Titan:Saphir-Laser (Tsunami, *Spectra Physics*) wird durch die zweite Harmonische eines diodengepumpten Nd:YAG-Lasers (Verdi V10, *Coherent*) gepumpt und erzeugt Pulse mit einer Breite von 80 oder 3 ps und einer Repetitionsrate von 80 MHz. Dabei sind Wellenlängen zwischen 750 und 900 nm zugänglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wellenlängen zwischen 825 und 840 nm verwendet. Zur Kontrolle von Pulsform und Wellenlänge wird ein geringer Teil der emittierten Strahlung in einen Autokorrelator (409 Autokorrelator, *Spectra Physics*) und in ein Wavemeter (WS/6, *HighFinesse* oder WA-5500, *Burleigh*) eingespeist.

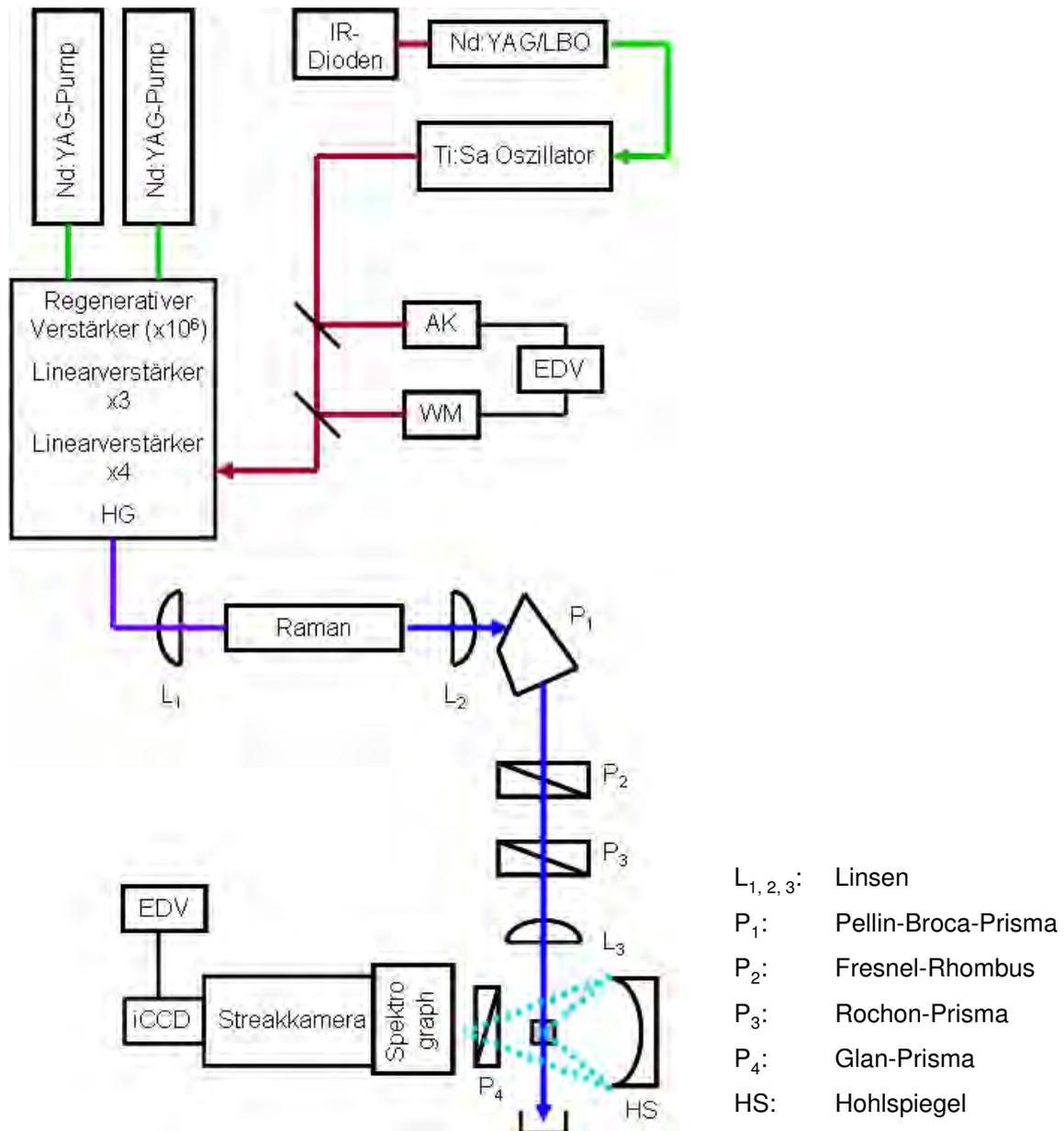


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Apparatur zur zeitaufgelösten LIF.

### Frequenzkonversion

Das Signal des Tsunami wird in der Nd:YAG-gepumpten Verstärkereinheit (TSA50, *Spectra Physics*) regenerativ und linear nachverstärkt, um anschließend die Frequenz in KDP-Kristallen verdoppeln und/oder verdreifachen zu können. Durch Fokussierung in einen mit Gas gefüllten Ramanshifter kann die Wellenlänge weiter variiert werden, wobei die gewünschte Wellenlänge mit Hilfe eines Pellin-Broca-Prismas selektiert wird. Die im Rah-

men dieser Arbeit benutzten Gase, ihr charakteristisches Vibrationsquant und der verwendete Druck im Ramanshifter sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Gas	Vibrationsquant in $\text{cm}^{-1}$	Druck in bar
H <sub>2</sub>	4155	40
CH <sub>4</sub>	2917	40
N <sub>2</sub>	2330	40

**Tabelle 3.3:** *Verwendete Shiftgase.*<sup>[80][81][82][83]</sup>

#### Polarisation und Energieregulation

Um Polarisation und Energie des Anregungsstrahls regulieren zu können, wird eine Kombination aus Fresnel-Rhombus und Rochon-Prisma eingesetzt. Während der Fresnel-Rhombus die Polarisation des Laserlichts um einen gewünschten Betrag dreht, lässt das Rochon-Prisma nur eine bestimmte Polarisationsrichtung ungehindert passieren. Auf diese Weise kann nicht nur die gewünschte Polarisationsrichtung des Laserstrahls mit dem Rochon-Prisma festgelegt, sondern auch durch Variation der Einstellung des Fresnel-Rhombus die Energie stufenlos geregelt werden.

#### 3.3.2 Probe

Der polarisations- und energiekorrigierte Laserstrahl wird mit Hilfe einer Linse in die Probe fokussiert. Eine möglichst weiche Fokussierung (2 mm Strahldurchmesser) in Kombination mit geringen Anregungsenergien verhindert das Auftreten von Photobleaching. Dank der speziell für das Experiment konstruierten Halterung kann die Position der Probe entlang aller Raumrichtungen flexibel und reproduzierbar eingestellt werden. Dabei wird die Probe zur Vermeidung von Reabsorptionseffekten und Intensitätsverlusten so in den Strahlengang eingebracht, dass der Lichtweg durch die Probe möglichst kurz ist.

### 3.3.3 Detektion

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt im rechten Winkel zum Anregungsstrahl. Das Emissionslicht wird mit einem sphärischen Hohlspiegel (Brennweite 250 mm, Durchmesser 250 mm) auf den Eintrittsspalt des Spektrographen (SpectraPro 275i, *Acton Research*) abgebildet. Im Spektrographen befinden sich drei verschiedene Gitter, unter denen das für die aktuelle Messung passende Gitter je nach gewünschter Auflösung der Emissionswellenlänge ausgewählt werden kann. Die Blazewinkel, Gitterkonstanten und spektralen Fenster der drei Gitter sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Gitter	Gitterkonstante (mm)	Blazewinkel (nm)	Spektraler Sichtbereich (nm)
1	1/150	500	202 bei 318 nm
2	1/1800	250	14,5 bei 392 nm
3	1/3600	270	3,2 bei 428 nm

**Tabelle 3.4:** Eigenschaften der verwendeten Gitter.

Nach der spektralen Zerlegung durch den Spektrographen wird das Emissionslicht mit Hilfe einer Streackkamera (C2830, *Hamamatsu*) zeitlich dispergiert (siehe Abbildung 3.12). Dazu trifft das einfallende Licht zunächst auf eine Photokathode, so dass das Photonen-signal in Elektronen umgewandelt wird. Die Elektronen werden in horizontaler Richtung beschleunigt, durchqueren einen Plattenkondensator und treffen auf einen Phosphorschirm. Ein zeitlich veränderliches, elektrisches Feld im Plattenkondensator lenkt die Elektronen von ihrer Flugbahn ab und erzeugt so eine temporale Dispersion des Signals auf dem Phosphorschirm. Dort werden die Elektronen wieder in Photonen umgewandelt, welche schließlich von einer intensivierten CCD-Kamera detektiert werden.

Ein typisches Messdatenbild der Kamera am Beispiel der intrinsischen Proteinfluoreszenz von humanem Serum Albumin (HSA) ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Vertikale Profile entlang der Zeitachse liefern Fluoreszenzabklingkurven bei verschiedenen Emissionswellenlängen, horizontale Profile entlang der spektralen Achse ergeben Emissionsspektren zu verschiedenen Zeitpunkten (TRES). Die dargestellten Profile zeigen Anpassungen an die kalibrierten Messdaten in den zugehörigen Zeit- und Emissionsbereichen.

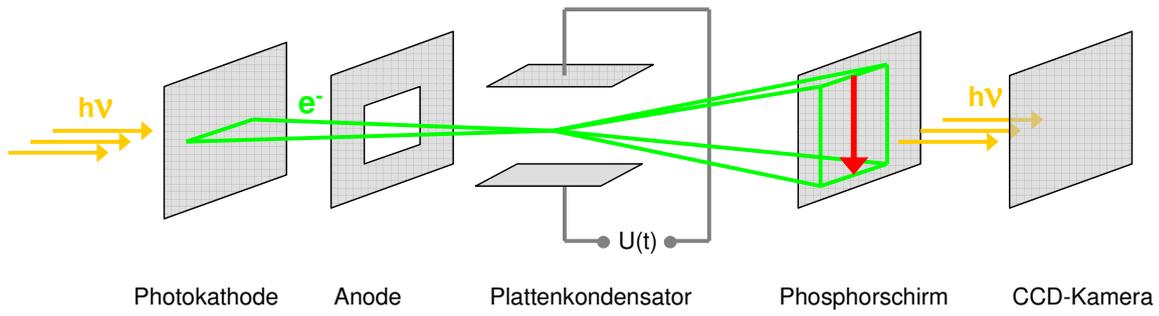


Abbildung 3.12: Funktionsprinzip der Streikkamera.

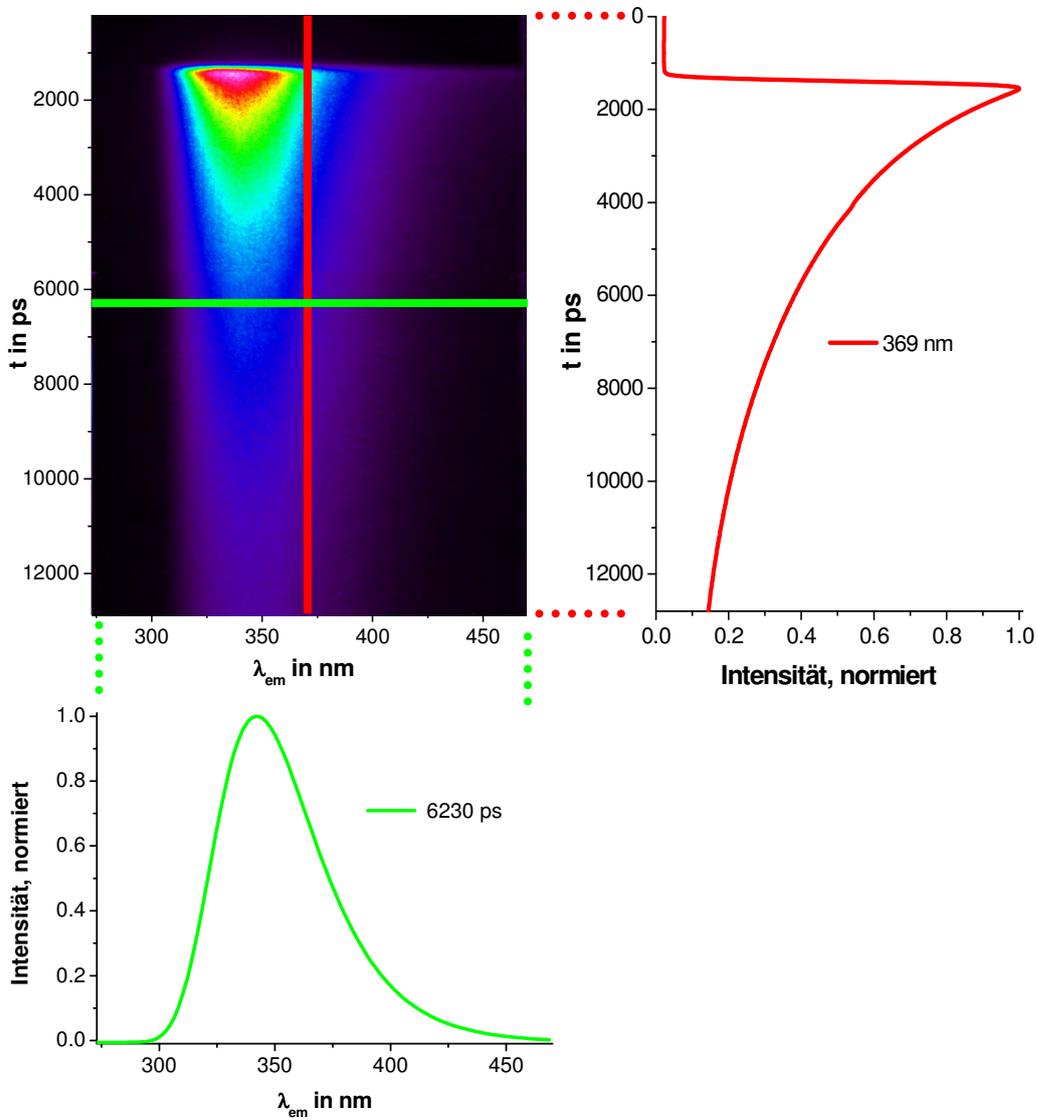


Abbildung 3.13: Messdaten der Kamera mit horizontalen und vertikalen Profilen.

## 3.4 Absorptionsmessungen

Absorptionsmessungen werden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen UV-VIS-Zweistrahlspektrometers (UV-2550, *Shimatsu*) durchgeführt. Als Lichtquelle wird eine Kombination aus D<sub>2</sub>- und Halogenlampe genutzt, so dass ein Wellenlängenbereich von 190 bis 900 nm zugänglich ist. Dank eines Vormonochromators und dem resultierenden geringen Streulichtanteil können optische Dichten bis 5 vermessen werden. Dabei sind Bandbreiten von 0,1 bis 5 nm und Scangeschwindigkeiten zwischen 85 und 1400 nm pro Minute stufenweise einstellbar.

Alle Messungen werden durch Aufnahme einer Baseline korrigiert, und (soweit nicht anders vermerkt) gegen das Lösungsmittel oder den verwendeten Puffer als Referenz vermessen. Zur Korrektur störender Offsets wird die Absorption bei hohen Wellenlängen - mindestens 100 nm von einem Absorptionssignal entfernt - auf Null gesetzt.

## 3.5 Probenpräparation

Sofern nicht anders angegeben, werden handelsübliche Substanzen in p.A.-Reinheit und bidestilliertes Wasser eingesetzt. Die Konzentration der Messlösungen für die statischen AES-Messungen sind so gewählt, dass sie einer Absorption von 0.1 auf 1 cm Wegstrecke entsprechen. Durch den kürzeren Lichtweg der Emission durch die Probe liegt die Absorption deutlich unter 0.1, so dass keine Reabsorptionseffekte auftreten. Zeitaufgelöste Messungen werden durch Reabsorptionseffekte weniger gestört und weisen zudem einen Lichtweg von nur ca. 2 mm auf, so dass hier deutlich höhere Konzentrationen (Faktor 2 bis 5) zum Einsatz kommen.

### 3.5.1 Proteine

Die Proteine und Peptide wurden zumeist als Feststoff in hoher Reinheit von Sigma-Aldrich gekauft. Die angesetzten Lösungen mit Konzentrationen von 20  $\mu$ M (AES) und 100  $\mu$ M (tr-LIF) müssen vor der Messung zur Vermeidung von Streueffekten filtriert werden. Tabelle 3.5 listet die für das jeweilige Protein bzw. Peptid verwendeten Puffer auf.

Protein/Peptid	Puffer	pH
Tryptophan	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM	7.0
NATA	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM	7.0
W-G*HCl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM	7.0
A-P-G-W	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM	7.0
ACTH, 4-10	TRIS 10 mM	7.0
ACTH, 1-10	TRIS 10 mM	7.0
ACTH, 1-17	TRIS 10 mM	7.0
ACTH, 1-24	TRIS 10 mM	7.0
Trp Cage	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM	7.0
Melittin	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM	7.2
Melittin Tetramer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM, 2.3 M NaCl	7.2
Monellin	TRIS 10 mM	7.0
RNT <sub>1</sub>	TRIS 10 mM	7.0
Azurin	HEPES 20 mM	8.0
Myelin Basic Protein	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM	7.0
β-Casein	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM	5.2, 7.0, 10.5
κ-Casein	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM	5.2, 7.0, 10.5
Nuclease Mu50	TRIS 10 mM, NaCl 50 mM, CaCl <sub>2</sub> 10 mM	7.5
Asparaginase	TRIS 10 mM	8.0
HS Albumin	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM	7.0
BS Albumin	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM	7.0

**Tabelle 3.5:** *Verwendete Puffer.*

Für die Messungen mit Glycerin werden Lösungen mit einem Glycerin/Wasser-Verhältnis von 70/30 verwendet. Die eingesetzte Natriumdodecylsulfatkonzentration (SDS) zur Mizellbildung liegt mit 45 mM deutlich über der kritischen Mizellkonzentration von 8 mM. Für Messungen in Trifluorethanol wird das reine Lösungsmittel (p.A.) genutzt.

### 3.5.2 Benzodiazaborole

Die Diazaborole sind in Kooperation mit dem Arbeitskreis Anorganische Chemie II von Prof. Lothar Weber untersucht und von dort als Feststoffe zur Verfügung gestellt worden. Die für möglichst wasserfreies Arbeiten nötigen, getrockneten Lösungsmittel und frisch destilliertes BF<sub>3</sub> · OEt<sub>2</sub> entstammen derselben Quelle. *tetra*-Butylammoniumfluorid lag als 1 M Lösung in THF von Sigma-Aldrich vor.

### 3.5.3 Referenzfarbstoffe

Tabelle 3.6 zeigt die vermessenen Referenzfarbstoffe, ihre Lösungsmittel und die für die AES- bzw tr-LIF-Messungen verwendeten Konzentrationen. Um eventuell auftretendes Sauerstoffquenching zu vermeiden, müssen die Lösungen vor der Messung ausgegast werden. Dazu werden die Proben in einem Exsikkator platziert, der Druck auf einen Wert knapp oberhalb des Siededrucks des Lösungsmittels reduziert und anschließend mit Argon belüftet. Dreimalige Wiederholung erhöht die Wirksamkeit des Prozesses.

Farbstoff	Lösungsmittel	Konzentration für AES in $\mu\text{M}$	Konzentration für tr-LIF in $\mu\text{M}$
Anthracen	<i>cyclo</i> -Hexan	10	50
Diphenylanthracen (DPA)	<i>cyclo</i> -Hexan	7.1	50
9-Cyanoanthracen (9CA)	<i>cyclo</i> -Hexan	10	50
Coumarin 153	Methanol	5.3	25
Rhodamin B	Methanol	0.94	10
POPOP	<i>cyclo</i> -Hexan	2.1	10
PPO	<i>cyclo</i> -Hexan	2.8	10
Tryptophan	H <sub>2</sub> O	18	50
NATA	H <sub>2</sub> O	20	50

**Tabelle 3.6:** Referenzfarbstoffe, Lösungsmittel und Konzentrationen.

*Ich weiss nicht, ob es besser wird, wenn es anders wird.  
Aber es muss anders werden, wenn es besser werden soll.*

*Georg Christoph Lichtenberg*

# 4 Datenbearbeitung

In diesem Kapitel wird erläutert, wie die aufgenommenen Rohdaten bezüglich der Systemeigenschaften kalibriert und ausgewertet werden. Dazu erfolgt zunächst ein Überblick über die verwendete Kalibrationsroutine. Ein wesentlicher Bestandteil der vorgelegten Arbeit ist die Optimierung der Kalibration der statischen und dynamischen Fluoreszenzmessungen: Die erstmals durchgeführte Kalibration der zweidimensionalen Detektionseffizienz des zeitaufgelösten Detektionssystems, sowie die Korrektur von unerwünschtem Infrarot-Signal in den Detektionseffizienzmessungen der statischen AES, machen die anwendungsorientierten Messprojekte, z.B. die Untersuchung der spektralen Relaxation in Kapitel 5, überhaupt erst möglich. Abschließend werden Methoden zur weiteren Datenauswertung dargelegt.

## 4.1 Kalibration

Die Verfahren zur Kalibration der statischen AES-Apparatur und des zeitaufgelösten LIF-Systems ähneln sich sehr, deswegen werden sie im Folgenden gemeinsam diskutiert. Die Bearbeitung der erhaltenen Rohdatenbilder erfolgt mit dem von Dr. Michael Letzgas geschriebenen Programm SUAP.<sup>[84]</sup> Dabei sind folgende Arbeitsschritte vorzunehmen:

- Abzug des Hintergrundes (Lösungsmittelspektrum oder Dunkelbild)
- ggf. Aufsummieren mehrerer Bilder zur Verminderung des Signal-Rausch-Verhältnisses (nur tr-LIF)
- Zuordnung von Zeit- und Wellenlängenskalen
- Kalibration der Anregungseffizienz (nur AES)
- Kalibration der Detektionseffizienz

### 4.1.1 Zuordnung der Zeit- und Wellenlängenskala

#### Zuordnung der Anregungswellenlänge

Die Anregungswellenlänge ist für das zeitaufgelöste System fixiert; für die statische Apparatur ergibt sie sich direkt aus den Scaneinstellungen und muss daher nicht über eine Kalibration ermittelt werden.

#### Zuordnung der Emissionswellenlänge

Zunächst muss jedem horizontalen Kamerapixel eine Emissionswellenlänge zugeordnet werden. Dazu werden für jedes Gitter Kalibrationsbilder des bekannten Linienspektrums einer Quecksilberdampflampe<sup>[85]</sup> aufgenommen (siehe Abbildung 4.1). Ein horizontales Profil des Kalibrationsbildes gibt Aufschluss über die genaue Pixelposition der Emissionslinien, indem jeder Peak durch eine Gaußfunktion angepasst wird. Aus einem Vergleich mit den Literaturwerten und anschließender, linearer Anpassung resultiert die Steigung der Wellenlänge pro Pixel sowie die Wellenlänge beim Pixel 0. Dieses Verfahren wird für jedes Gitter und bei allen verwendeten Zentralwellenlängen durchgeführt, so dass für alle Einstellungen eine Geradengleichung entsprechend Gleichung 4.1 zur Umrechnung von Kamerapixel in Emissionswellenlänge vorliegt.

$$\lambda = m \cdot P + \lambda_0 \quad (4.1)$$

$\lambda$  : Wellenlänge der Emission

$\lambda_0$  : Wellenlänge der Emission bei Pixel 0

$P$  : Pixelposition, für AES von 0 bis 1023, für LIF von 0 bis 999

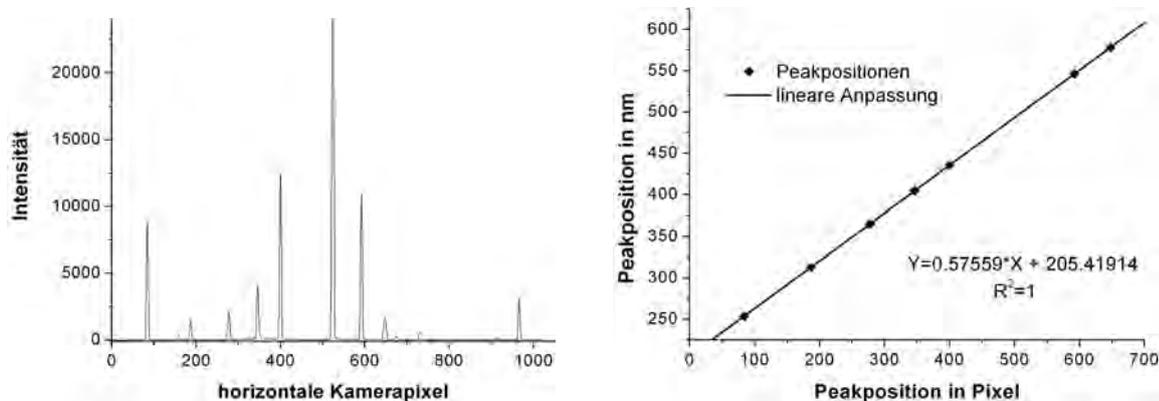


Abbildung 4.1: Bestimmung der Wellenlängenskala für eine Gittereinstellung der AES.

Für die Messung ist essentiell, dass die Hg-Lampe im Fokus der Optik liegt, um den Strahlengang der Messung exakt zu reproduzieren. Liegt eine Gittereinstellung zwischen zwei vermessenen Einstellungen, so ergeben sich die Umrechnungsfaktoren mit hoher Genauigkeit durch Interpolation aus Werten der angrenzenden Einstellungen.

### Zuordnung der Zeitskala

Die Streackkamera des zeitaufgelösten Detektionssystems verfügt über fünf verschiedene Zeitfenster zwischen 0.5 und 10 ns. Für jedes Zeitfenster liegt eine eigene Umrechnungskurve des Herstellers von vertikaler Kamerapixelposition (Pixel 0 bis 1017) in eine entsprechende Zeit vor (siehe Abbildung 4.2). Da sich die Kurven nicht exakt linear verhalten, werden sie durch ein Polynom 3. Ordnung angepasst und die erhaltenen Funktionen im Auswerteprogramm SUAP zur Erstellung einer passenden Zeitskala für jedes Rohdatenbild genutzt.

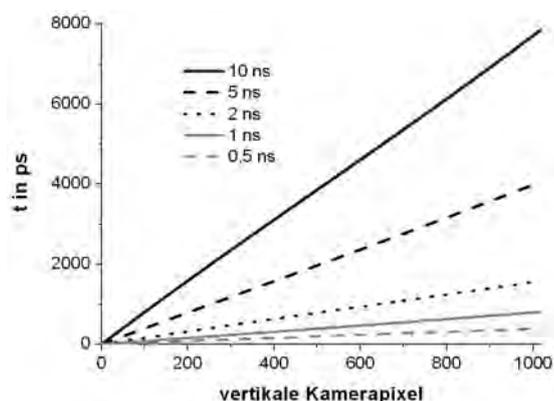
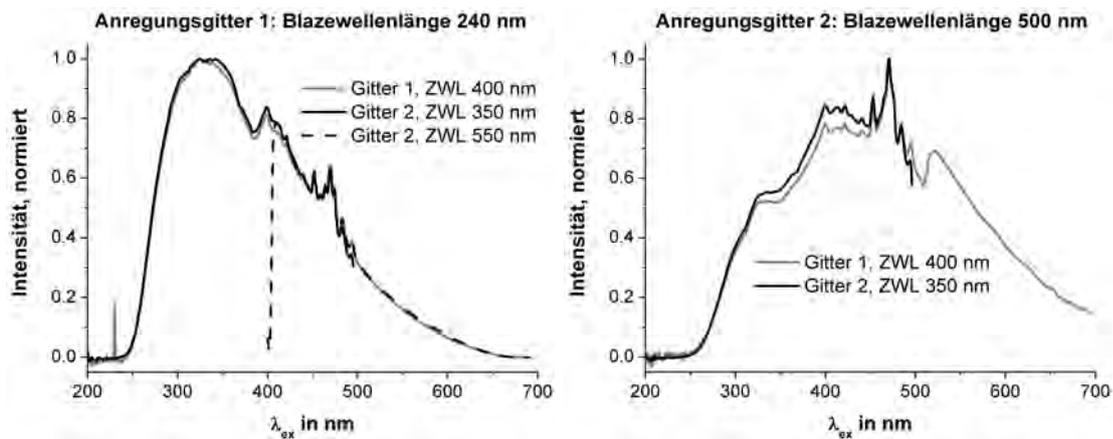


Abbildung 4.2: Zeitskalenpolynome der fünf Zeitfenster der Streackkamera.

#### 4.1.2 Kalibration der Anregungseffizienz

Die dynamischen Messungen erfolgen mit einer konstanten Anregungswellenlänge, die Anregungseffizienz muss daher nicht korrigiert werden. Für die statischen Messungen müssen jedoch Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen Anregungswellenlängen vergleichbar sein, hier ist eine Korrektur notwendig. Um die Wellenlängenabhängigkeit der Anregungsenergie zu berücksichtigen, wird das Spektrum der Xenonlampe mit Hilfe eines Reflektionsstandards (*Edmund Optics*) in einem Winkel von  $45^\circ$  vermessen. Das integrierte



**Abbildung 4.3:** Anregungseffizienz für Anregungsgitter 1 (links) und 2 (rechts).

Rayleighsignal liefert dabei für jede Anregungswellenlänge die relativen Anregungsintensitäten; die Kehrwerte können als vertikales Kalibrationsprofil verwendet werden. Da die Intensität von der Wahl des Anregungsgitters ebenso abhängig ist wie von der Breite der Anregungsspalte, muss für jede Einstellung ein solches Kalibrationsprofil erstellt werden. Die erhaltenen Profile für die Anregungsgitter 1 und 2 bei einem Anregungsspalt von 1 mm sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

Ein Hinweis auf die Konsistenz der Kalibration von Anregungs- und Detektionseffizienz liefert der Vergleich von Anregungseffizienzkurven, welche bei verschiedenen Emissionsgittereinstellungen (Gitter 1 ZWL 400, Gitter 2 ZWL 350 und Gitter 2 ZWL 550) erstellt worden sind. Die gute Übereinstimmung der in Abbildung 4.3 dargestellten Kurven weist die überzeugende Qualität der angewendeten Kalibrationsroutine aus.

### 4.1.3 Kalibration der Detektionseffizienz

Um eine akkurate Darstellung der beobachteten Intensitätsverhältnisse zu gewährleisten, muss die Detektionseffizienz der Systeme ermittelt werden. Diese hängt zum Einen von der betrachteten Emissionswellenlänge und zum Anderen von der Position des Signals auf der Kamera ab.

#### Spektrale Effizienz

Diese Kalibration berücksichtigt, dass das System unterschiedliche Wellenlängen verschieden gut detektiert. Dazu werden die bekannten Spektren einer Halogenlampe und einer

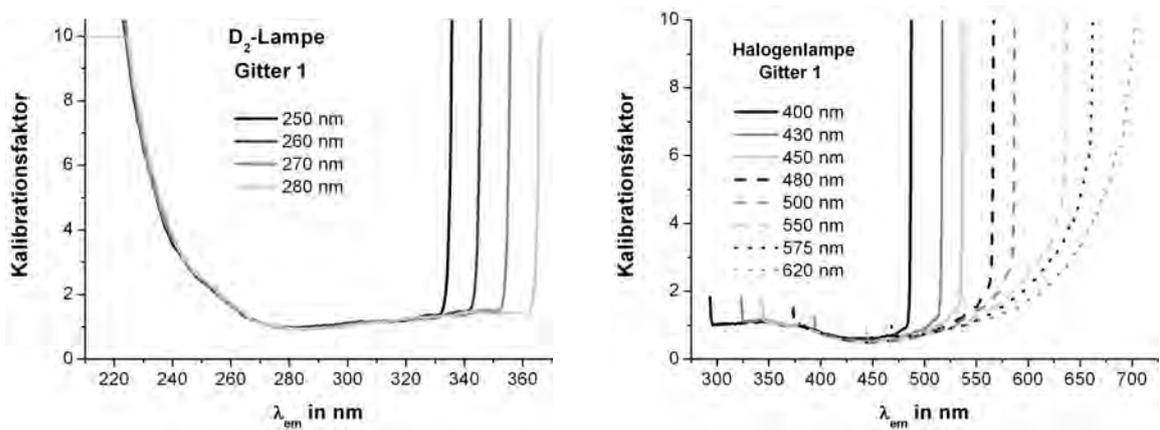


Abbildung 4.4: Kalibrationsprofile für die spektrale Detektionseffizienz, LIF.

$D_2$ -Lampe vermessen. Division der Referenzkurven durch die gemessenen Daten ergibt ein horizontales Kalibrationsprofil (siehe Abbildung 4.4), mit dem die gemessenen Spektren multipliziert werden.

### Zweidimensionale Detektionseffizienz der Streackamera

Für die Auswertung der zeitaufgelösten Daten müssen alle Datenpunkte des Kamerabildes in ihrer Intensität vergleichbar sein. Dies erfordert eine Kalibration der zweidimensionalen Detektionseffizienz des Streacksystems, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt wurde. Details zur praktischen Umsetzung finden sich in Abschnitt 4.2. Eine analoge Bearbeitung der AE-Spektren ist nicht erforderlich, da alle unmittelbar verglichenen AE-Spektren durch eine Mittelung über dieselbe *region of interest* zustande gekommen sind. Auf diese Weise wurde der etwaige Einfluss unterschiedlicher Detektionseffizienzen auf dem Kamerachip vermieden.

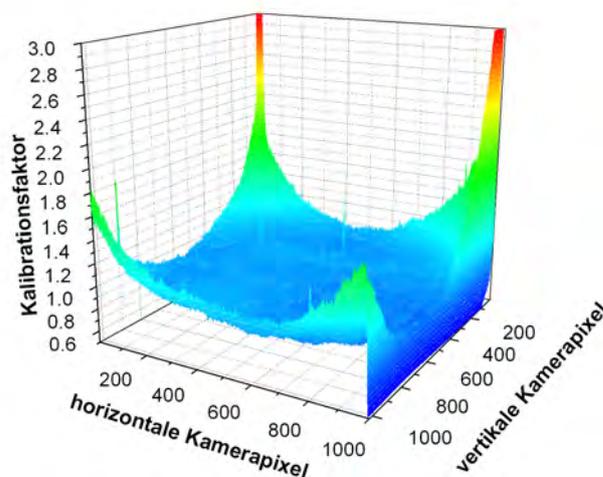
## 4.2 Verbesserung der Kalibrationsroutine

### 4.2.1 Zweidimensionale Detektionseffizienz der Streakeinheit

Für die korrekte Bestimmung von Lebenszeiten bei verschiedenen Emissionswellenlängen ist es essentiell, dass messtechnisch bedingte Unterschiede der Signalintensität auf verschiedenen Bereichen des Kamerachips korrigiert werden. Daher wurde ein neuartiges Kalibrationsverfahren entwickelt, welches die Variation der Detektionseffizienzen durch unterschiedliche Positionen auf dem Phosphorschirm der Streackkamera in verschiedenen Zeitfenstern berücksichtigt.

#### Kalibration des Zeitfensters von 10 ns mit der Halogenlampe

Zur Kalibration des langen Zeitfensters von 10 ns wird das Spektrum einer Halogenlampe mit und ohne Zeitauflösung vermessen. Die Messung mit Zeitauflösung ergibt ein zweidimensionales Rohdatenbild, die Messung ohne Zeitauflösung ein horizontales Profil, welches als Referenz zur Erstellung der zweidimensionalen Kalibrationsmatrix dient. Die Kalibrationsmatrix (siehe Abbildung 4.5) besteht dabei aus den Faktoren, mit denen die Pixelintensitäten des Rohdatenbilds multipliziert werden müssen, um die Intensität auf den Wert des horizontalen Referenzprofils einzustellen. Aufgrund der Vielzahl der zu berücksichtigenden Parameter erwies sich die technische Umsetzung dieses Verfahrens als verhältnismäßig kompliziert.



*Abbildung 4.5: Kalibrationsmatrix für die Detektionseffizienz der Streackkamera.*

Ein wesentliches Problem stellt die geringe Signalintensität der Halogenlampe in dem kurzen Zeitbereich von 10 ns dar. Aufgrund eines geringen Signal-Rausch-Verhältnisses und erhöhtem Nachleuchten des Phosphoschirms eignen sich die Verstärkerstufen 4 und 5 nicht für eine solche Kalibration; es wurde daher bei einer Verstärkerstufe von 3 gemessen. Auch eine Erhöhung der Messfrequenz über 100 Hz führte zu erheblichen Artefakten durch überhöhtes Nachleuchten. Um trotzdem ein akzeptables Signal-Rauschverhältnis zu erreichen, wurden insgesamt 40 Bilder mit jeweils drei Minuten Integrationszeit bei einer Messfrequenz von 50 Hz und einer Verstärkerstufe von 3 aufgenommen. Außerdem wurde mit einem Eintrittsspalt von 1 mm Breite auf Wellenlängenauflösung zugunsten der Signalintensität verzichtet. Damit die Messungen ohne Zeitauflösung mit derselben Spaltbreite durchgeführt werden konnten, wurden hier extrem kurze Belichtungszeiten und Neutralsichtfilter mit hohen optischen Dichten (3 oder 4) eingesetzt.

Essentiell für ein Gelingen der Kalibration ist die Feineinstellung der Triggerung. Die Streackkamera verstärkt eingehende Signale über einen Zeitraum von mindestens 100 ns, 90 % der Messzeit bestehen also aus Streusignal der kontinuierlichen Lichtquelle, welches zu einer unerwünschten Erhöhung der Signalintensität in den Randbereichen des Kamerabildes führt. Dabei ist die Position des eigentlichen Streaksweeps, also die Verschiebung des Elektronensignals über den Phosphorschirm, im Zeitraum der Verstärkung entscheidend. Durch Tests mit verschiedenen Verzögerungszeiten wurde die Position ermittelt, in der der Streaksweep eine maximale Verstärkung erfährt und somit die beschriebenen Randeffekte minimiert werden.

### **Verfeinerung der Kalibration bei 10 ns**

Die so durchgeführte Kalibration ist für das Zeitfenster von 10 ns auf alle Verstärkerstufen anwendbar. Die positive Auswirkung dieser Kalibration kann mit Hilfe von Referenzfarbstoffen gut beobachtet werden (siehe Abbildung 4.6). Durch Subtraktion der Messung bei 0.5 ns konnten zudem störende Randeffekte eliminiert werden, so dass auch die letzten 100 Pixel (ca 1000 ps) jeder Messung verwendbar sind. Dies wird durch den in Abbildung 4.7 links dargestellten Vergleich zweier Messungen mit überlappenden Zeitbereichen (Fenster 2 kommt 5000 ps nach Fenster 1) deutlich. Während die Kurven der Zeitfenster 1 und 2 ohne Korrektur zwischen 7000 und 8000 ps auseinander laufen, führt eine Korrektur

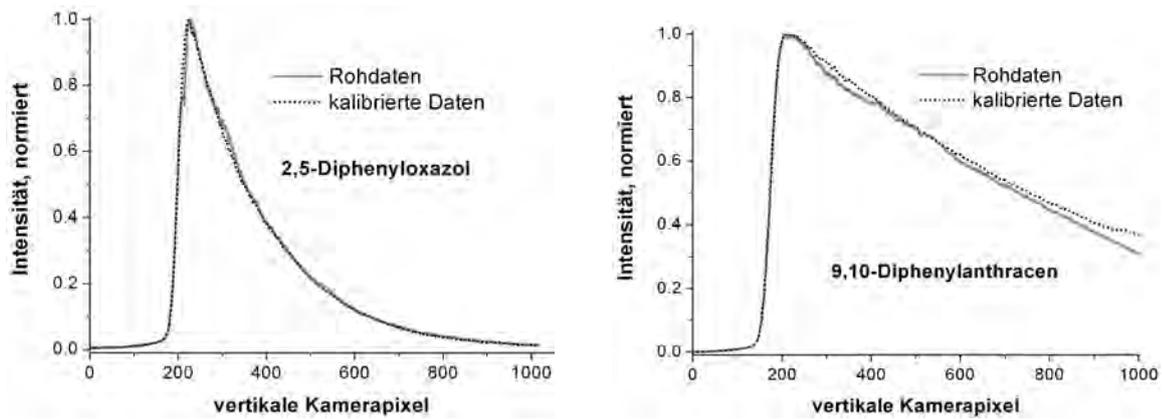


Abbildung 4.6: Auswirkung der Kalibration bei Verstärkerstufe 1 (links) und 3 (rechts).

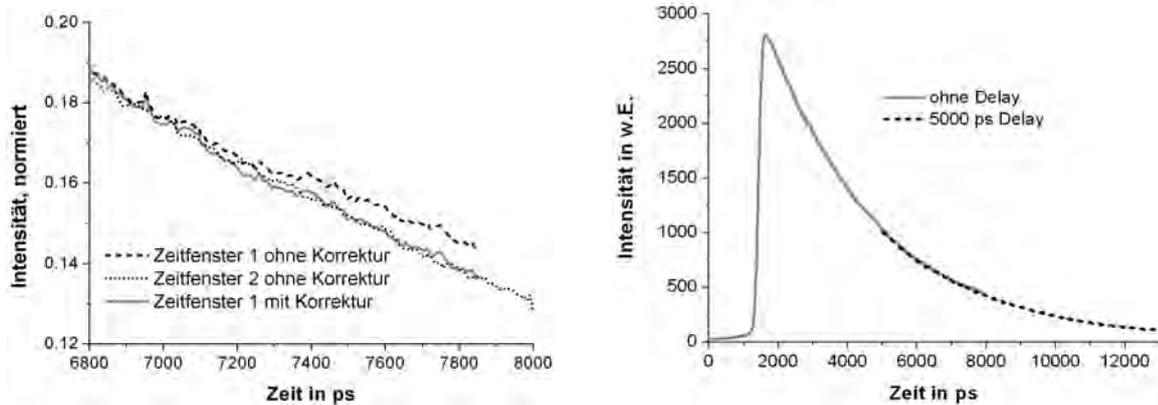


Abbildung 4.7: Eliminierung der Randeffekte (links) und Kombination zweier Zeitfenster (rechts).

des Randeffekts in Zeitfenster 1 zu optimaler Überlappung. Dank dieser Vorgehensweise können erstmals Messungen in hintereinander liegenden Zeitbereichen optimal kombiniert werden, wie in Abbildung 4.7 rechts dargestellt. Damit wird die Qualität der Anpassungen längerer Lebenszeiten signifikant erhöht.

Messungen der Fluoreszenzlebenszeiten von Referenzfarbstoffen mit verschiedenen Lebenszeiten und Emissionsbereichen zeigen, dass mit dem so kalibrierten System eine akkurate Quantifizierung der Lebenszeit möglich ist. Von den in Tabelle 4.1 aufgeführten Werten liegt nur die Lebenszeit von 9,10-Diphenylanthracen unterhalb der in der Literatur<sup>[86]</sup> angegebenen Fehlergrenzen. Ursache hierfür ist vermutlich trotz ausgiebiger Entgasungsprozedur auftretendes Sauerstoffquenching, für das Anthracenderivate sehr anfällig sind.<sup>[87][88]</sup>

Farbstoff	Lösungsmittel	$\tau_{gemessen}$ in ns	$\tau_{Literatur}$ in ns
POPOP	<i>cyclo</i> -Hexan	$1.12 \pm 0.01$	$1.12 \pm 0.04$
2,5-Diphenyloxazol	<i>cyclo</i> -Hexan	$1.37 \pm 0.01$	$1.36 \pm 0.04$
Rhodamin B	Methanol	$2.52 \pm 0.02$	$2.5 \pm 0.1$
NATA	H <sub>2</sub> O	$3.24 \pm 0.03$	$3.1 \pm 0.1$
Coumarin 153	Methanol	$4.24 \pm 0.04$	$4.3 \pm 0.2$
9,10-Diphenylanthracen	<i>cyclo</i> -Hexan	$6.1 \pm 0.1$	$7.5 \pm 0.4$

**Tabelle 4.1:** Vergleich der gemessenen Lebenszeiten mit Literaturwerten.<sup>[86]</sup>

Die oben dargestellten Ergebnisse wurden durch Integration über einen großen Emissionsbereich erzielt. Notwendig ist jedoch insbesondere eine gute Vergleichbarkeit verschiedener Bereiche auf der Kamera. Auch diese hat sich durch die Kalibration stark verbessert; Messungen mit dem über das gesamte Spektrum monoexponentiellen Farbstoff NATA als Referenz zeigten jedoch, dass ein kleiner Trend zur Erhöhung der Lebenszeit mit der Emissionswellenlänge besteht. Ein solcher systematischer Fehler hat nahezu keinen Einfluss auf die integrierten Fluoreszenzlebenszeiten, würde sich aber fatal auf die äußerst sensible Detektion der spektralen Relaxation in Kapitel 5 auswirken, und muss für diese Anwendung unbedingt korrigiert werden.

Der vorhandene Trend wurzelt vermutlich in einem intensitätsabhängigen Detektionseffekt, so dass der spezielle Intensitätsverlauf der intrinsischen Proteinfluoreszenz auf der Wellenlängen- und Zeitachse nicht mit dem kontinuierlichen Signal der Halogenlampe korrigiert werden kann. Da die wellenlängenaufgelösten Messungen im Rahmen dieser Arbeit nur für die intrinsische Proteinfluoreszenz von essentieller Bedeutung sind, wurde NATA als Referenz für eine weitere Korrektur der intrinsischen Proteinfluoreszenz herangezogen. Eine bereits mit der oben beschriebenen Kalibrationsmatrix korrigierte NATA-Messung des Emissionsgitters 1 mit einer Zentralwellenlänge von 380 nm (dies ist die Standard-einstellung für alle STPs) wird dazu mit einer aus der Fluoreszenzlebenszeit und dem statischen Spektrum konstruierten Kalibrationsmatrix abgeglichen. Die so erstellte Kalibrationsmatrix wird zusätzlich auf die STP-Messungen aufmultipliziert.

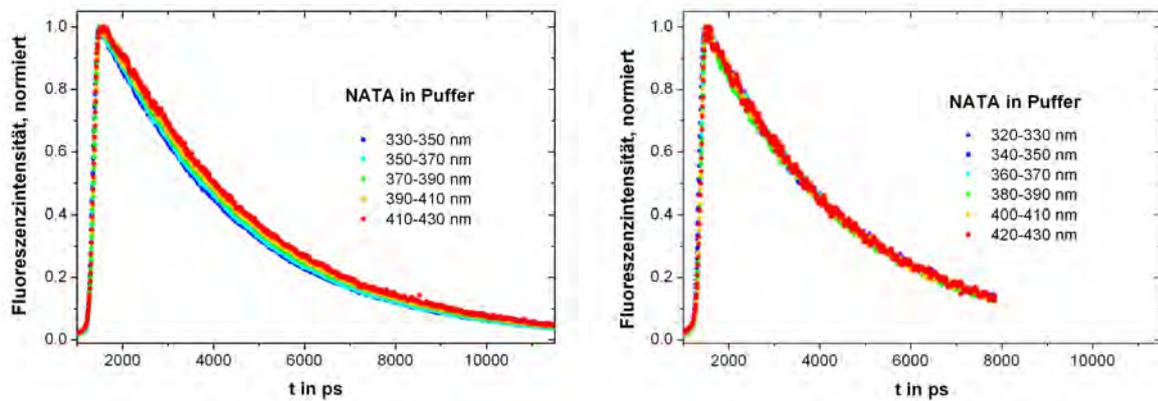


Abbildung 4.8: Abklingkurven vor und nach der Korrektur des Intensitätsverlaufes.

### Ergebnis

Tatsächlich ergeben sich mit der beschriebenen Prozedur nahezu konstante Fluoreszenzlebenszeiten für NATA, APGW und Azurin bei verschiedenen Emissionswellenlängen. Der für NATA ohne diese Kalibration beobachtete, nicht der Literatur entsprechende Trend zur stetigen Lebenszeiterhöhung mit der Emissionswellenlänge wird dabei beseitigt, wie in Abbildung 4.9 dargestellt. Auch stimmen die zwei Lebenszeiten des Tryptophans von  $0.52 \pm 0.08$  ns und  $3.39 \pm 0.39$  ns sehr gut mit den Literaturwerten von 0.54 und 3.44 ns überein.<sup>[8]</sup> Die entwickelte Kalibrationsroutine stellt eine wesentliche Verbesserung des bisherigen Verfahrens – insbesondere in den Randbereichen des Kamerachips – dar und kann auch zur Untersuchung der spektralen Relaxation bedenkenlos verwendet werden.

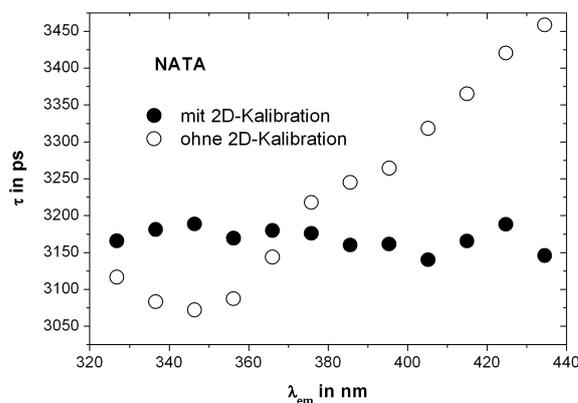


Abbildung 4.9: Auswirkung der Kalibration der zweidimensionalen Detektionseffizienz.

### Kalibration der Zeitfenster von 0.5 ns bis 2 ns mit Farbstoff

Die Halogenlampe eignet sich als Kalibrationslichtquelle aufgrund der durch die Kontinuität der Lichtquelle erzeugten Randeﬀekte und der geringen Signalintensitäten nicht für die kleinen Zeitfenster von 0.5 bis 2 ns. Daher wird für diese Einstellungen PPO in *cyclo*-Hexan mit einer Lebenszeit von  $\tau = 1.37$  ns als Referenz verwendet. Um systematische Fehler zu vermeiden entstammt die genutzte Lebenszeit nicht der Literatur, sondern ist einer Messung im kalibrierten Zeitfenster von 10 ns entnommen worden. Zur Detektion wird das Emissionsgitter 2 mit einer Zentralwellenlänge von 350 nm verwendet, um den Kamerachip über den gesamten Emissionsbereich möglichst intensiv auszuleuchten. Außerdem wird die Messung zeitlich so positioniert, dass nur die abfallende Flanke der Fluoreszenz zu sehen ist, um Komplikationen durch den anfänglichen Anstieg oder möglicher Solvenzrelaxation aus dem Weg zu gehen. Die erhaltenen Kalibrationmatrizen weisen keinerlei Randeﬀekte auf und liefern plausible Abklingkurven.

#### 4.2.2 IR-Korrektur

Zur Kalibration der Detektionseﬃzienz der AES wird, wie in Abschnitt 4.1.3 erläutert, auf die Spektren einer Deuteriumlampe und einer Halogenlampe als Referenz zurückgegriffen. Bei vielen Einstellungen ist eine Kombination der beiden Lampenspektren erforderlich. Dazu werden die Kalibrationskurven bei 370 nm zum Schnitt gebracht, wie in Abbildung 4.10 exemplarisch dargestellt. Allerdings wird bei einigen Wellenlängeneinstellungen störendes IR-Licht der 0. Gitterordnung der Halogenlampe detektiert, so dass die Kalibra-

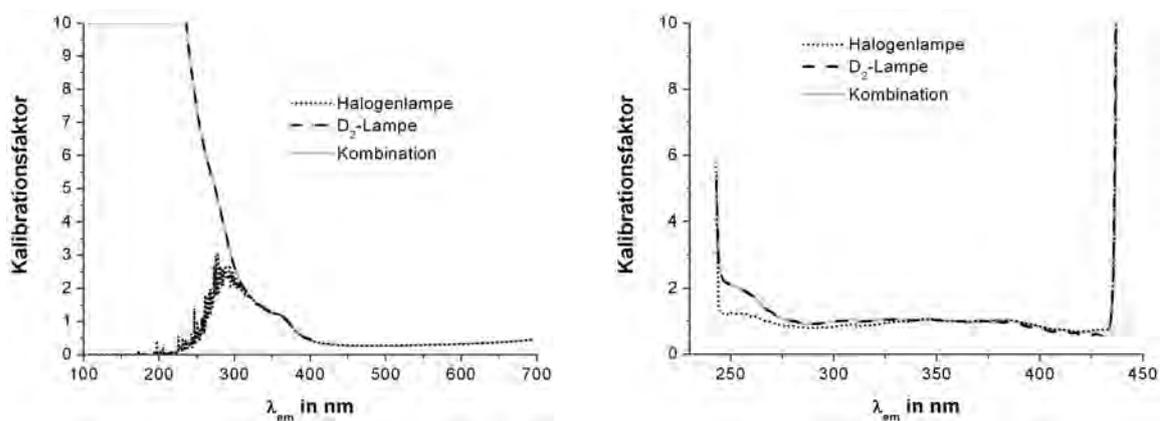


Abbildung 4.10: Kombination der Kalibrationskurven, AES (links) und LIF (rechts).

tionskurven in einem zu kleinen Bereich identisch verlaufen, um verlässlich überlagert zu werden.

Zur Korrektur wurde das Signal der Halogenlampe im störenden IR-Bereich mit Hilfe eines Kantenfilters RG850 detektiert und nach Aufskalierung von der Kalibrationsmessung abgezogen, wie in Abbildung 4.11 dargestellt. Abbildung 4.12 zeigt deutlich, dass sich die Kalibrationskurven ohne Eliminierung des IR-Signals entweder vor oder nach dem Knick bei 360 nm überlagern lassen, während sie nach vollzogener Korrektur zwischen 320 und 390 nm nahezu identisch verlaufen. Insgesamt bietet dieses Vorgehen eine deutlich höhere Sicherheit und Verlässlichkeit in der Kombination der beiden Referenzlampen und führt sowohl zu einer besseren spektralen Form als auch zu einer geringeren Fehleranfälligkeit in den bestimmten Quantenausbeuten.

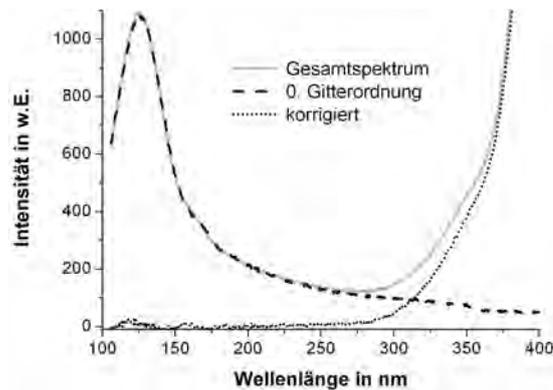


Abbildung 4.11: Einfluss der 0. Gitterordnung im Spektrum der Halogenlampe.

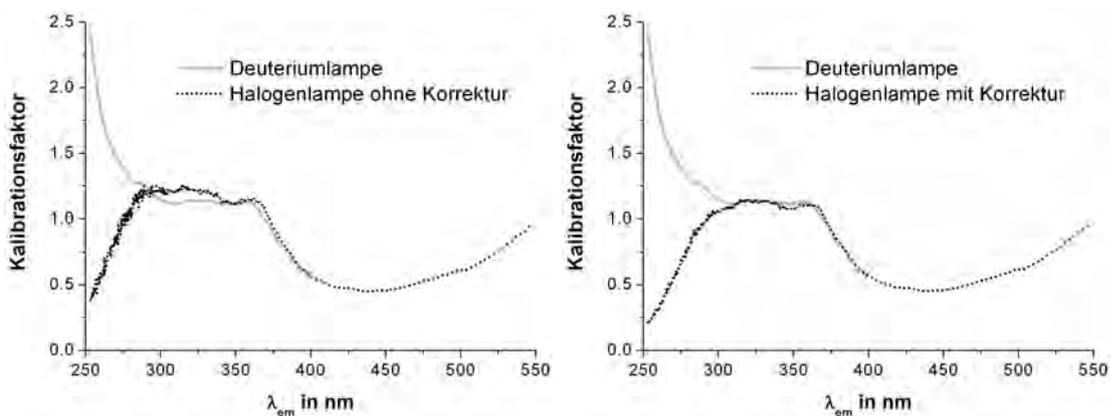


Abbildung 4.12: Kalibrationsfaktoren mit und ohne IR-Korrektur.

## 4.3 Datenanalyse

### 4.3.1 Korrektur der Absorptionsspektren

Im Allgemeinen werden durch die in Abschnitt 3.4 beschriebene Messroutine Absorptionsspektren ohne Streueffekte, also mit einer konstanten Basislinie bei  $A = 0$ , erzeugt. Bei geringen Füllhöhen oder übermäßigem Streupartikelauflaufen kann es aber dennoch zu einer wellenlängenabhängigen Basislinie kommen. Obwohl neben Rayleigh-Streuung auch Mie-Streuung auftreten kann, folgt die Basislinie zumeist der  $1/\lambda^4$ -Abhängigkeit von Rayleigh-Streuung und kann daher nachträglich angepasst und von dem eigentlichen Signal abgezogen werden.

Der Effekt einer solchen Korrektur ist in Abbildung 4.13 anhand der Vermessung eines Diazaborols in flüchtigem, organischem Lösungsmittel exemplarisch dargestellt. Dieses

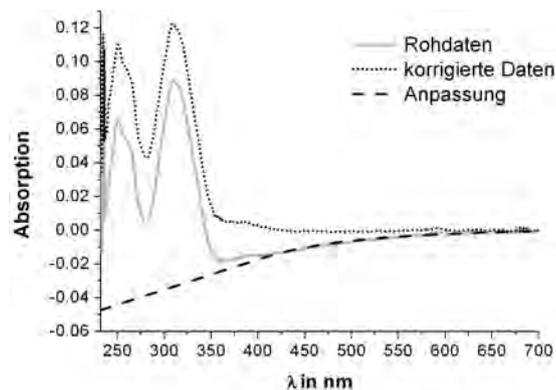


Abbildung 4.13: Korrektur des Streulichthintergrundes in Absorptionsspektren.

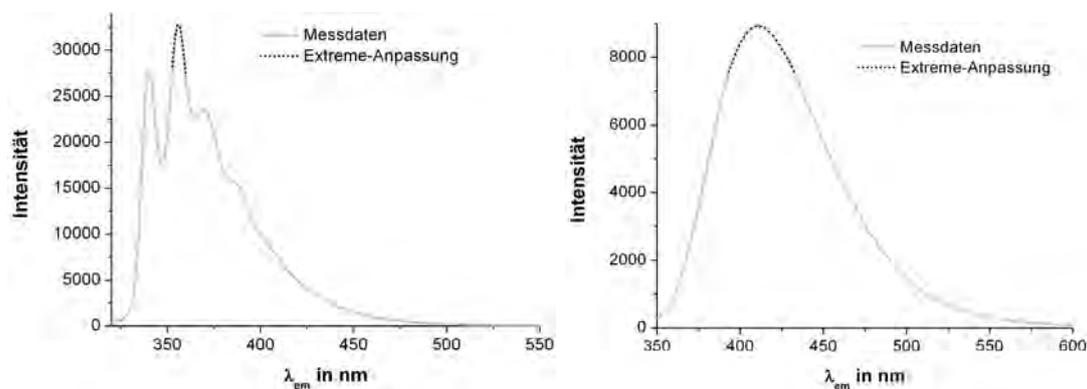


Abbildung 4.14: Anpassung spektraler Maxima mit einer Extreme-Funktion.

Beispiel zeigt eine besonders große Verschiebung des Hintergrundes, in den meisten Fällen betragen die Abweichungen von der Basisline von  $A = 0$  nicht mehr als 0.005.

Nach erfolgter Korrektur können die Daten zur weiteren Auswertung herangezogen werden. Das hier präsentierte Verfahren ist insbesondere zur korrekten Bestimmung der Quantenausbeute essentiell, da diese vom Absolutwert der Absorption bei der gewählten Wellenlänge abhängt.

### 4.3.2 Bestimmung von Absorptions- und Fluoreszenzmaxima

Zur Bestimmung maximaler Absorption und Fluoreszenzwellenlängen werden die vorhandenen Spektren um das Maximum herum mit einer Extreme-Funktion<sup>[89]</sup> angepasst, da sich diese zur Anpassung sowohl schmaler als auch breiter Verteilungen eignet, wie in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Wellenlänge maximaler Fluoreszenzintensität kann den Anpassungsparametern entnommen werden.

### 4.3.3 Bestimmung der Lebenszeit

#### Anpassung der Messdaten mit FINDFit

Zur Bestimmung von Lebenszeiten und zugehörigen Amplituden muss ein exponentielles Modell an die gemessenen Abklingkurven angepasst werden. Da der Anregungspuls allerdings eine endliche Breite hat und auch die Zeitauflösung der Detektion begrenzt ist, liegen die Messdaten als Faltung aus der Fluoreszenzabklingkurve und der sogenannten *Apparatefunktion* (engl. *instrument response function*, IRF) vor.

$$F_{det}(t) = IRF(t) \otimes F(t) = IRF(t) \otimes \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (4.2)$$

$F_{det}(t)$  : gemessenes Fluoreszenzsignal

$IRF(t)$  : Apparatefunktion

$F(t)$  : Fluoreszenz

$\alpha_i$  : Amplituden

$t$  : Zeit

$\tau_i$  : Lebenszeiten

Das für die Anpassung verwendete Programm FINDFit<sup>[90]</sup> nutzt zur Rekonstruktion der Fluoreszenzkurve eine Methode namens *numerical reconvolution*. Dabei wird die mit Hilfe

des Rayleighsignals gemessene Apparatfunktion  $IRF(t)$  mit einer ersten Abschätzung (*initial guess*) für die Parameter der Fluoreszenzabklingkurve gefaltet. Die resultierende Funktion  $F_{det,Fit}(t)$  wird durch die Minimierung der reduzierten Fehlerquadratsumme  $\chi^2$  nach Levenberg und Marquardt<sup>[91]</sup> iterativ an die Messdaten  $F_{det}(t)$  angepasst.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(F_{det}(t_i) - F_{det,Fit}(t_i))^2}{F_{det}(t_i)} \quad (4.3)$$

$N$  : Zahl der vorliegenden Messpunkte

Die reduzierte Fehlerquadratsumme ist zwar durchaus ein Maß dafür, wie gut die Anpassung den Messdaten folgt. Jedoch lässt sie keine Aussage über die Richtigkeit des zugehörigen funktionalen Zusammenhangs zu. Dafür wird auf zwei andere Größen zurückgegriffen, welche auch die Güte der der Anpassung zugrunde liegenden Funktion grafisch sichtbar machen: das Residuum und dessen Autokorrelation.

Das Residuum  $\mathfrak{R}(t_i)$  stellt den Verlauf der gewichteten Abweichung zwischen Anpassung und Messdaten mit der Zeit dar (siehe Gleichung 4.4) und kann niederfrequente, systematische Abweichungen aufspüren.

$$\mathfrak{R}(t_i) = \frac{F_{det}(t_i) - F_{det,Fit}(t_i)}{\sqrt{F_{det}(t_i)}} \quad (4.4)$$

$\mathfrak{R}(t_i)$  : Residuum am Messpunkt  $t_i$

Die Autokorrelation dagegen legt Zusammenhänge zwischen den Messpunkten des Residuums, welche sich in einem bestimmten Abstand  $\zeta$  voneinander befinden, offen. Gleichung 4.5 beschreibt, wie die Autokorrelation  $ACF_f(\zeta)$  einer allgemeinen Funktion  $f(x)$  bestimmt wird. Sie ist aufwändiger zu berechnen, aber auch sensitiver als das Residuum selber und kann sowohl hoch- als auch niederfrequente systematische Fehler aufzeigen.

$$ACF_f(\zeta) = f^*(-\zeta) \otimes f(\zeta) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x + \zeta) \cdot f^*(x) dx \quad (4.5)$$

$ACF_f(\zeta)$  : Autokorrelation  
 $\zeta$  : Korrelationslänge, engl. Lag  
 $f(x)$  : Funktion  
 $f^*(x)$  : komplex Konjugierte von  $f(x)$

Abbildung 4.15 stellt eine typische Abklingkurve mit biexponentieller Anpassung, Residuum und Autokorrelation dar. Den Daten zugrunde liegt eine Messung des Proteins

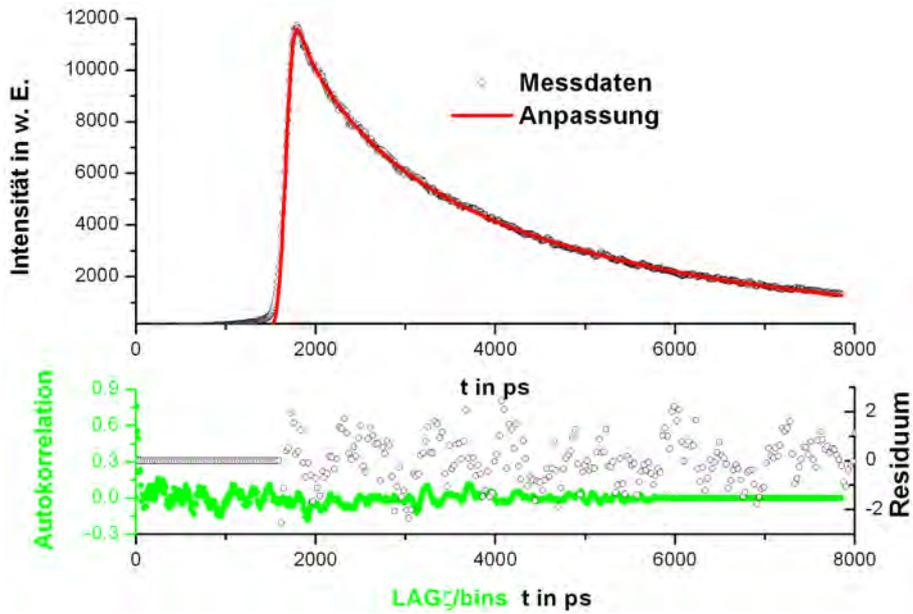


Abbildung 4.15: Biexponentielle Anpassung mit Residuum und Autokorrelation.

$\beta$ -Casein mit einer Anregungswellenlänge von 294 nm und einem Emissionsbereich zwischen 350 und 370 nm. Residuum und Autokorrelation weichen nur durch statistisches Rauschen vom Wert Null ab und weisen so die hohe Qualität der Anpassung aus.

### Fehleranalyse

Für die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Anpassung gibt es keinen analytischen Ausdruck für die Fehler in den einzelnen Parametern. Daher werden die Fehlergrenzen mit Hilfe der  $\chi^2$ -Analyse bestimmt.

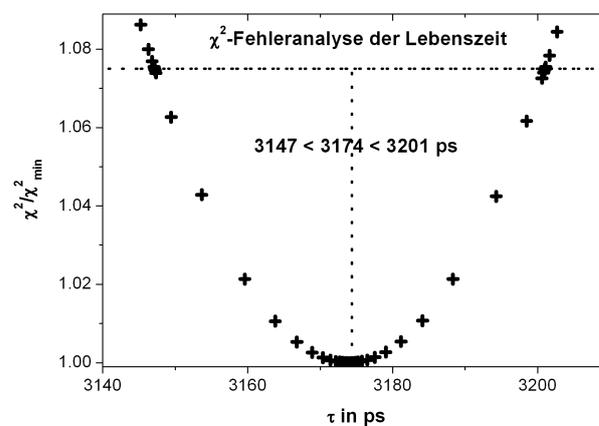


Abbildung 4.16: Rigorose Fehleranalyse für die Lebenszeit von NATA.

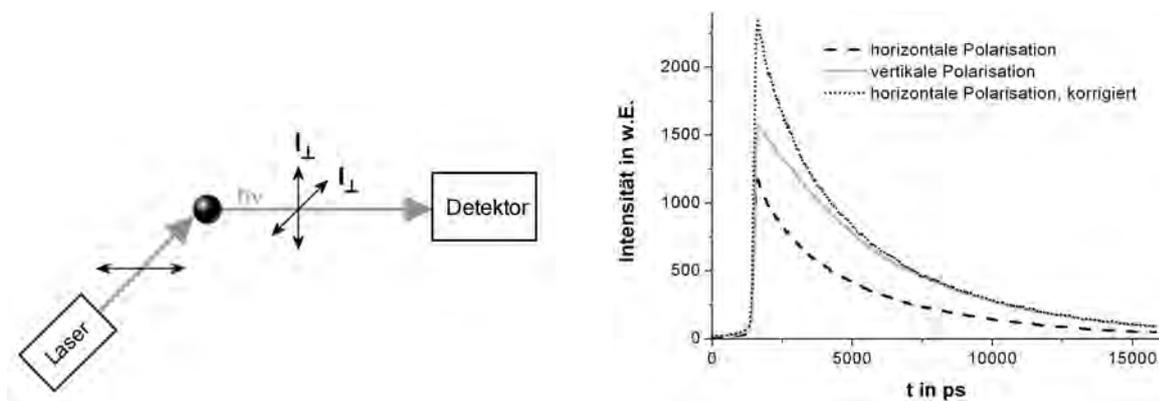
Im Rahmen der  $\chi^2$ -Analyse wird der zu untersuchende Parameter, in diesem Beispiel die Lebenszeit, konstant gehalten, und alle anderen Parameter auf das kleinste  $\chi^2$  optimiert. Dieser Vorgang wird für  $n$  verschiedene Werte der Lebenszeit, welche sich in kleinen Intervallen voneinander befinden, durchgeführt. Abschließend werden die erhaltenen  $\chi_n^2$ -Werte auf den Wert der besten Anpassung  $\chi_{min}^2$  normiert und gegen die Lebenszeit aufgetragen, wie in Abbildung 4.16 dargestellt. Unter der gegebenen Anzahl an Freiheitsgraden berechnen sich die Fehlergrenzen für die Lebenszeit aus den Schnittpunkten der Kurve bei  $\chi_n^2/\chi_{min}^2 = 1.075$ . Für diesen Wert liegt die gesuchte Lebenszeit mit einer Wahrscheinlichkeit von 68% in dem angegebenen Intervall.<sup>[8, 90]</sup>

### 4.3.4 Anisotropie

#### Korrektur der polarisationsabhängigen Detektionseffizienz

Zur Bestimmung des Zeitverlaufs der Anisotropie wird die parallel und orthogonal zum Anregungslicht polarisierte Emission detektiert. Das Detektionssystem vermisst dafür zwei senkrecht zueinander stehende Polarisationskomponenten (horizontal und vertikal im Raum). Die Polarisations sensitivität der Detektionseinheit erfordert allerdings eine Korrektur zur Angleichung der Signalintensitäten der beiden Polarisationskomponenten. Zu diesem Zweck wird ein Farbstoff so angeregt, dass beide detektierbaren Polarisationskomponenten der Emission orthogonal zur Anregungspolarisation stehen (siehe Abbildung 4.17 links). Unterschiede in der Intensität sind somit allein auf die Polarisations sensitivität der Detektionseinheit zurückzuführen.

In dieser Arbeit wurde NATA als Farbstoff verwendet, da es denselben Emissionsbereich wie die zu untersuchenden Einzeltryptophanproteine aufweist. Aus diesem Grund kann auf eine wellenlängenabhängige Betrachtung der Polarisations sensitivität verzichtet, und ein einfacher Korrekturfaktor zur Angleichung der Signalintensitäten verwendet werden. Liegen relativ kleine, flexible Moleküle in wenig viskosen Lösungsmitteln vor, so ist ein schnelles Abklingen der Anisotropie zu erwarten. Hier kann die Fluoreszenz der beiden Polarisationskomponenten zu einem späten Zeitpunkt gleichgesetzt werden. Dieses Verfahren ist exemplarisch in Abbildung 4.17 rechts dargestellt. Es besteht durch die Vermeidung von Fehlern, welche durch Laserenergieschwankungen und Photobleaching entstehen.



**Abbildung 4.17:** Aufbau zur Bestimmung des Korrekturfaktors (links), Aufskalierung der Daten (rechts).

Die Tatsache, dass die beiden Polarisationskomponenten in einem späten Zeitbereich über mehrere Nanosekunden hinweg dieselbe Intensität aufweisen, rechtfertigt die Annahme einer bereits früh abgeklungenen Anisotropie. Fallen die Kurven jedoch erst kurz vor dem gewählten Schnittpunkt zusammen, so muss eine langlebige Anisotropiekomponente vermutet und auf den Korrekturfaktor zur Anpassung der Signalintensitäten zurückgegriffen werden. Diese Methode wurde auch für bereits zur Veröffentlichung eingereichte Untersuchungen der Aggregation des NPYs angewendet.<sup>[92]</sup>

### Anpassung der Messdaten

Nach der oben beschriebenen Korrektur der Signalintensitäten der einzelnen Polarisationskomponenten kann die Anisotropie gemäß Gleichung 4.6 aus den Messdaten bestimmt werden.

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{D(t)}{S(t)} \quad (4.6)$$

- $r$  : Anisotropie  
 $I_{\parallel}$  : Fluoreszenzintensität bei paralleler Detektion  
 $I_{\perp}$  : Fluoreszenzintensität bei vertikaler Detektion

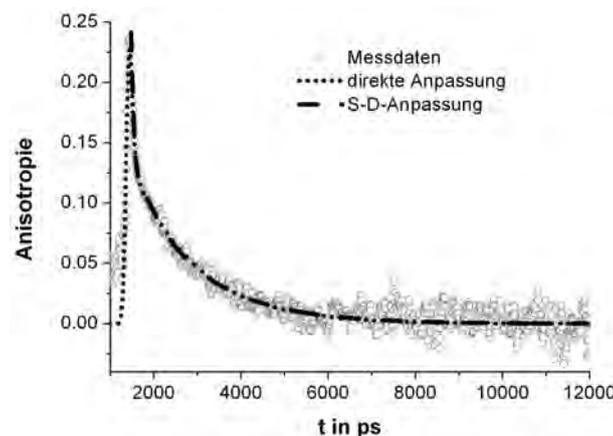
Zwei verschiedene Vorgehensweisen stehen zur Analyse der Anisotropie zur Verfügung:

- Die aus den Messdaten nach Gleichung 4.6 bestimmte, zeitabhängige Anisotropie wird ohne Entfaltung angepasst.

- Zunächst werden Zähler  $D(t)$  und Nenner  $S(t)$  der Gleichung 4.6 berechnet und mit Entfaltung multiexponentiell in FINDFit angepasst. Die Anisotropie wird anschließend als Quotient der entfalteten Funktionen berechnet und erneut angepasst.

Die direkte Berechnung und Anpassung der Anisotropie hat den Nachteil, dass keine sinnvolle Entfaltungsprozedur möglich ist. Resultierende Abweichungen zu Beginn der Abklingkurve führen häufig zu einer Überbetonung kurzer Korrelationszeiten im Bereich der Halbwertsbreite der IRF. Zudem ist durch das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis im hinteren Teil der Kurve die Fehleranfälligkeit hoch.

Dem gegenüber ermöglicht die Methode der getrennten Zähler- und Nenneranpassung die Entfaltung der Messdaten. Auf diese Weise bleiben die Proportionen zwischen langen und kurzen Korrelationszeiten gewahrt. Auch ist das Signal-Rausch-Verhältnis für Zähler und Nenner deutlich besser als für die direkt berechnete Anisotropie. Allerdings werden in den Anpassungen von  $D(t)$  und  $S(t)$  zumeist etwas unterschiedliche Zeitverschiebungen der IRF angenommen. Dies muss in der Rekombination der Kurven berücksichtigt werden, da sich sonst starke Abweichungen in den resultierenden Korrelationszeiten ergeben. Abbildung 4.18 zeigt, dass sich beide Verfahren trotz kleinerer Unterschiede zur Bestimmung der Anisotropie eignen. Im Rahmen dieser Arbeit wird jeder Datensatz nach beiden Methoden ausgewertet und voneinander abweichende Ergebnisse der verschiedenen Methoden diskutiert.



**Abbildung 4.18:** Vergleich der beiden Methoden an NATA in Glycerin.

*Die Basis einer gesunden Ordnung  
ist ein großer Papierkorb.*

*Kurt Tucholsky*

# 5 Spektrale Relaxation in *single tryptophan*-Proteinen

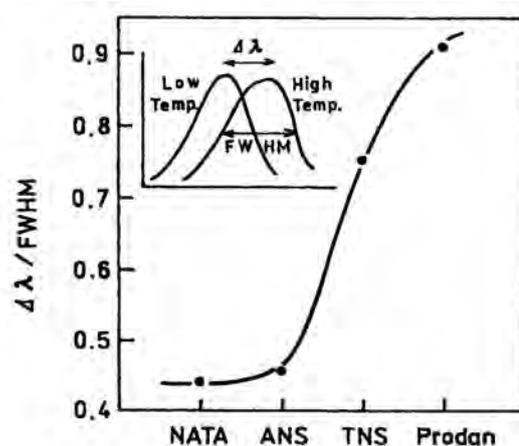
Wie in Abschnitt 2.3 erläutert, kann eine multiexponentielle dynamische Fluoreszenz eines Proteins mit nur einem Tryptophanrest sowohl auf das Vorliegen verschiedener Konformere, als auch auf einen Reorganisationsprozess im angeregten Zustand – also spektrale Relaxation – hinweisen. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Prozessen ist für die Klärung der Struktur und Dynamik vieler Proteine in Lösung essentiell, allerdings mangelt es zu diesem Zweck immer noch an handhabbaren Werkzeugen. Die in diesem Kapitel vorgestellte, systematische Studie an zwanzig verschiedenen Proteinen und Peptiden soll nicht nur ein solches Werkzeug liefern, sondern auch Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Proteincharakteristika und Reorganisationsprozess ermöglichen.

## 5.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Bereits in den 1980er Jahren mehrten sich die Hinweise auf Relaxationsprozesse in der intrinsischen Fluoreszenz von Proteinen. So erhöhen sich die intensitätsgemittelten Lebenszeiten von vielen STPs mit der Emissionswellenlänge, obwohl NATA eine über das gesamte Emissionsspektrum gleichbleibende Lebenszeit aufweist.<sup>[93–97]</sup> Quenchinguntersuchungen deckten auf, dass sich das Emissionsmaximum der Proteinfluoreszenz mit erhöhter Quencherkonzentration zumeist zu geringeren Wellenlängen verschiebt.<sup>[60, 98–100]</sup> Diese Beobachtungen können im Einzelfall auch mit Hilfe verschiedener Konformere erklärt werden; allerdings bleibt bei diesem Ansatz unverständlich, wieso nahezu ausschließlich Rotverschiebungen des Spektrums mit der Zeit festgestellt werden. Messungen von Eftink<sup>[8]</sup> belegen, dass zwischen der maximalen Emissionswellenlänge und der Lebenszeit

eines STPs kein Zusammenhang besteht. Daher sollte es ebenso häufig zu einer Verringerung der mittleren Emissionswellenlänge mit der Zeit kommen.

Statt dessen hat sich in den letzten Jahren die Vorstellung durchgesetzt, dass die spektrale Verschiebung auf einen Reorganisationsprozess im angeregten Zustand zurückzuführen ist. Messungen von Proteinen, welche mit den Polaritätssonden DANCA, PRODAN und TNS markiert wurden, zeigen die charakteristischen, negativen Amplituden an der roten Kante des Spektrums<sup>[101-103]</sup> sowie starke Rotverschiebungen der Fluoreszenz mit der Zeit.<sup>[104-106]</sup> Spektrale Relaxation in intrinsischer Proteinfluoreszenz ist experimentell schwer zu belegen. Der eindeutige Beweis für einen Prozess im angeregten Zustand, eine negative Amplitude in den Fluoreszenzabklingkurven, konnte nur in sehr seltenen Fällen - und auch nur für Prozesse mit Lebenszeiten im Subnanosekundenbereich - erbracht werden.<sup>[107]</sup> Dies hängt mit der vergleichsweise geringen Polaritätssensitivität von NATA, und somit geringen Verschiebung des Spektrums relativ zur Halbwertsbreite zusammen (siehe Abbildung 5.1). Der Hauptteil der Fluoreszenz nach der Relaxation wird also in einem Wellenlängenbereich liegen, welcher vor der Relaxation bereits über Intensität verfügt. Für Prozesse im Nanosekundenbereich ergibt sich zudem die Schwierigkeit, dass die Lebenszeit der Tryptophanfluoreszenz im selben Zeitbereich liegt. Dadurch überlagern sich Anstieg und Absinken der Fluoreszenzintensität, so dass anstelle eines Anstiegs der Fluoreszenz bei hohen Emissionswellenlängen nur eine längere Lebenszeit beobachtet wird.



**Abbildung 5.1:** Spektrale Verschiebung durch Solvenzrelaxation von NATA und anderen Farbstoffen im Verhältnis zur Halbwertsbreite, Messungen in Propylenglykol bei 20 °C (relaxiert) und -60 °C (unrelaxiert). Bild wurde der Literatur entnommen.<sup>[67]</sup>

Die wissenschaftliche Diskussion um die Existenz von spektraler Relaxation spaltet die Fachwelt im Wesentlichen in zwei Lager: Die Befürworter argumentieren mit der geringen Wahrscheinlichkeit, die beobachteten Effekte ausschließlich mit verschiedenen Konformeren erklären zu können.<sup>[67,69,108–110]</sup> Ihre Gegner zeigen dagegen an einzelnen Proteinen auf, dass die dort beobachteten Effekte durch Konformere verursacht werden.<sup>[111–113]</sup>

Ein weit verbreiteter Ansatz zur Identifizierung spektraler Relaxation stellt die Untersuchung der Temperatur- und Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenz dar.<sup>[96,109,114,115]</sup>

Doch dazu sind starke Temperatur- und Viskositätsvariationen, sowie die Verwendung von Lösungsmitteln wie Glycerin, Propylenglycol und Zuckerlösungen notwendig, welche ggf. sogar die Proteinfaltung beeinflussen. Daher ist es wünschenswert, eine Unterscheidung zwischen spektraler Relaxation auf der einen, und dem Vorliegen mehrerer Konformere auf der anderen Seite unter physiologischen Bedingungen vornehmen zu können.

Aktuelle technische Entwicklungen, wie die Etablierung der Femtosekundenspektroskopie und der Routineeinsatz von computergestützten Simulationsmodellen, liefern das Handwerkszeug für moderne Forschungsprojekte im Bereich der spektralen Relaxation. Allerdings konzentrieren sich die meisten femtosekundenspektroskopischen Untersuchungen auf die Detektion der schnellen Hydratationsdynamik, welche durch eine Mitbewegung der Proteinmatrix verlangsamt sein kann.<sup>[65,107,116,117]</sup> Langsamere Proteinbewegungen sind auf diese Art nicht detektierbar. Anpassungen an neue mathematische Modelle der spektralen Relaxation nutzen die Leistungsfähigkeit heutiger Computersysteme, allerdings wird das Vorliegen von spektraler Relaxation in diesen Studien immer als Fakt vorausgesetzt.<sup>[109,110,118]</sup>

Trotz vielfältiger Indizien für die Existenz der spektralen Relaxation ist die Forschung also bis heute eine Methode schuldig geblieben, welche spektrale Relaxation in Proteinen vom Vorliegen reiner Konformere unterscheiden kann. Die Entwicklung einer solchen Methode unter Ausnutzung des multidimensionalen Parameterfeldes des zeitaufgelösten LIF-Systems ist der zentrale Ansatzpunkt des hier vorgestellten Projekts. Im Gegensatz zu konventionellen, zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen bietet die Kombination von gepulster Anregung mit einer Streakkamera in der Detektion die Möglichkeit, alle zeitaufgelösten Emissionsspektren und Abklingkurven bei verschiedenen Emissionswellenlängen

simultan zu erfassen. Auf diese Weise kann ein detaillierter, quantitativer Abgleich des mehrdimensionalen Datensatzes erfolgen. Das geplante Projekt gliedert sich wie folgt:

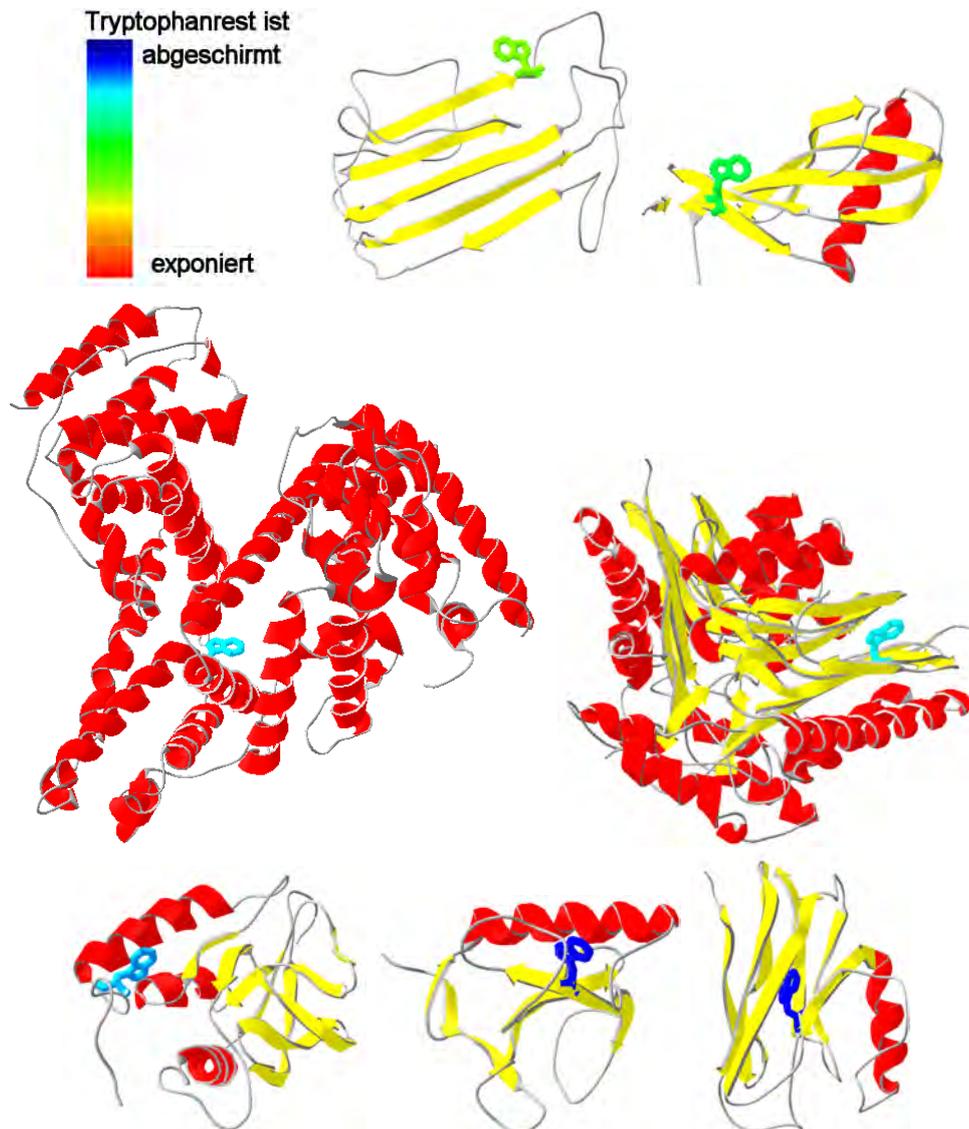
- Zunächst werden Proteine und Peptide mit möglichst vielen verschiedenen Tryptophanumgebungen zusammengestellt. Um sicher zu stellen, dass alle Proteine in der nativen Faltung vorliegen und keine Verunreinigungen stören, werden alle Verbindungen gründlich fluoreszenzspektroskopisch charakterisiert. Diese Charakterisierung umfasst neben der Lage der Emissionsmaxima auch die Lebenszeiten, die Anisotropie und das Quenchingverhalten der Peptide und Proteine. Für bereits literaturbekannte Proteine erfolgt ein Abgleich mit den Literaturwerten.
- Voruntersuchungen zum *red edge*-Effekt liefern einen ersten Hinweis auf potentiell relaxierende Proteine und Peptide und sollen die Interpretation der Ergebnisse erleichtern.
- Zentrales Instrument der Studie sind die simultan zeit- und wellenlängenaufgelösten Fluoreszenzmessungen. Untersuchungen zur Energieabhängigkeit stellen die Verlässlichkeit der Ergebnisse sicher. Messungen in einem kurzen Zeitfenster (0.5 bis 2 ns) sollen negative Amplituden als Charakteristikum für schnelle Prozesse im angeregten Zustand detektieren. Messungen in dem Zeitfenster von 10 ns ermöglichen die Beobachtung von Prozessen mit längeren Lebenszeiten.
- Aufbauend auf den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen soll eine Methode zu Detektion der spektralen Relaxation entwickelt und an den Referenzsubstanzen getestet werden. Abschließend ist die Anwendung auf alle Proteine der Studie und ein Abgleich der erhaltenen Ergebnisse mit den bereits in der Literatur vorhandenen Hinweisen auf spektrale Relaxation vorgesehen.

## 5.2 Charakterisierung der Proteine und Peptide

### 5.2.1 Auswahl geeigneter Proteine und Peptide

Für die vorliegende Studie wurden zwanzig verschiedene Proteine und Peptide, welche genau ein Tryptophan enthalten, ausgewählt. Die Verbindungen wurden so gewählt, dass

Proteine und Peptide mit sehr unterschiedlichen Tryptophanumgebungen und Strukturmotiven vorliegen. Daher variiert die Zahl der enthaltenen Aminosäuren zwischen 1 und 584, der Exponiertheitsgrad reicht von maximaler Exposition in kleinen Peptiden bis zu starker Abschirmung in Azurin. Die drei wesentlichen Struktur motive,  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *random coil* sind als Träger des Tryptophans vertreten, ebenso wie alle drei Klassen der Proteinfluoreszenz nach Burstein.



**Abbildung 5.2:** Kristallstrukturen: (von links oben nach rechts unten) Myelin Basic Protein,<sup>[119]</sup> Monellin,<sup>[120]</sup> HSA,<sup>[121]</sup> Asparaginase,<sup>[122]</sup> Nuklease,<sup>[123]</sup> RNT<sub>1</sub><sup>[124]</sup> und Azurin<sup>[125]</sup>. Darstellung mit Swiss-PdbViewer.<sup>[126]</sup> Einfärbung des Bandes nach Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix rot,  $\beta$ -Faltblatt gelb, random coil grau), Einfärbung der Tryptophanreste nach Exposition zum Lösungsmittel.

Die Abbildung 5.2 zeigt die bekannten Röntgenkristallstrukturen der größeren Proteine, wobei die Farbgestaltung der Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix rot,  $\beta$ -Faltblatt gelb und *random coil* grau) folgt. Die Farbe des Tryptophanrestes reflektiert den Grad der Exposition zum Lösungsmittel, wobei die maximale Exposition der Exposition im Pentapeptid Gly-Gly-Trp-Gly-Gly entspricht.

Für einige der Proteine, z.B. HSA und RNT<sub>1</sub>, wurden in früheren Studien bereits Hinweise auf spektrale Relaxation gefunden, sie dienen als Positivreferenz.<sup>[63,96,109,118,127]</sup> Im Falle des Melittin Tetramers liegt eine kontroverse Diskussion vor: Während einige Artikel auf spektrale Relaxation verweisen,<sup>[96,109]</sup> sehen Pandit *et al.*<sup>[112]</sup> das Vorliegen von verschiedenen Konformeren als erwiesen an. NATA und Tryptophan dienen als Negativreferenzen: NATA sollte über alle Emissionswellenlängen eine monoexponentielle Abklingkurve aufweisen und keinerlei Verschiebung aufweisen. Die Verschiebung im Tryptophan dagegen stellt sozusagen den Prototyp für das Vorliegen verschiedener Konformere dar. Messungen von Tryptophan in Glycerin dienen als Testsystem, denn hier tritt eine Kombination aus Konformeren und Relaxation auf.

### 5.2.2 Voruntersuchungen

Um sicher zu stellen, dass die untersuchten Proteine in der richtigen Faltung vorliegen, wurden umfangreiche Voruntersuchungen vorgenommen. Mit Hilfe der Emissionsmaxima, Quencheigenschaften und Lebenszeiten werden die Peptide und Proteine systematisch charakterisiert. Abweichungen von Literaturwerten können dabei auf beschädigte Strukturen bzw. Verunreinigungen hindeuten.

#### Emissionsmaxima

Die aus den statischen Fluoreszenzspektren ermittelten Emissionsmaxima und die bekannten Literaturwerte sind in Abbildung 5.3 grafisch dargestellt. Insgesamt ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung; eine Abweichung von mehr als 3 nm ist nur bei  $\beta$ -Casein zu beobachten. Allerdings liegt der Literaturwert mit 350 nm<sup>[128]</sup> im Bereich der denaturierten Proteine; hier wurde wahrscheinlich mit nicht nativem Protein gearbeitet. Zudem liegt  $\beta$ -Casein im basischen zwar unstrukturiert vor, unter den Messbedingungen von pH = 7 bildet es aber bereits Sekundärstrukturmotive aus, so dass das Emissions-

Protein/Peptid	Quelle	Anzahl der AS	Sekundärstruktur am Trp	Burstein-klasse
Tryptophan		1		3
NATA		1		3
W-G*HCl		2		3
A-P-G-W		4		3
ACTH, 4-10	human, synthetisch	6	<i>random coil</i>	3
ACTH, 1-10	human, synthetisch	10	<i>random coil</i>	3
ACTH, 1-17	human, synthetisch	17	<i>random coil</i>	3
ACTH, 1-24	human, synthetisch	24	<i>random coil</i>	3
Trp Cage	synthetisch	20	Cage	2
Melittin	honey bee venom	26	$\alpha$ -Helix	2
Monellin	Discoreophyllum cumminsii	50	$\beta$ -Sheet	2
Melittin Tetramer	honey bee venom	104	$\alpha$ -Helix	1
RNT <sub>1</sub>	Aspergillus oryzae	130	$\beta$ -Sheet	1
Azurin	Pseudomonas aeruginosa	148	$\beta$ -Sheet	1
Myelin Basic Protein	bovine brain	169	$\beta$ -Sheet	2
$\kappa$ -Casein	bovine milk	190	<i>random coil</i>	1-2
$\beta$ -Casein	bovine milk	224	<i>random coil</i>	2
Nuclease Mu50	Staphylococcus aureus	228	<i>random coil</i>	1
Asparaginase	Escherichia Coli	321	$\beta$ -Sheet	1
HS Albumin	Human Serum	584	$\alpha$ -Helix	1-2

**Tabelle 5.1:** Die untersuchten Proteine, Peptide und Aminosäuren im Überblick.

maximum hier kleiner als 350 nm sein sollte. Selbst das kleine Peptid ACTH 1-24 verfügt bereits über eine verminderte Emissionswellenlänge bei 348 nm.

### Lebenszeiten und Anisotropie

Die mittlere Lebenszeit der Fluoreszenz ist eine Größe, die noch sensibler auf Änderungen in der chemischen Umgebung reagiert als das Emissionsmaximum. Dem entsprechend eignet sie sich hervorragend für einen strukturellen Vergleich. Die gemessenen mittleren Lebenszeiten und die bekannten Literaturwerte sind in Abbildung 5.4 dargestellt und belegen eine hohe Übereinstimmung.

Der Zeitverlauf der Anisotropie kann dagegen Aufschluss über die Beweglichkeit des Tryptophanrestes geben. Die längste Korrelationszeit ist der Molekülrotation zuzuordnen und liefert daher einen Anhaltspunkt für die Größe des untersuchten Proteins. Da die Fluo-

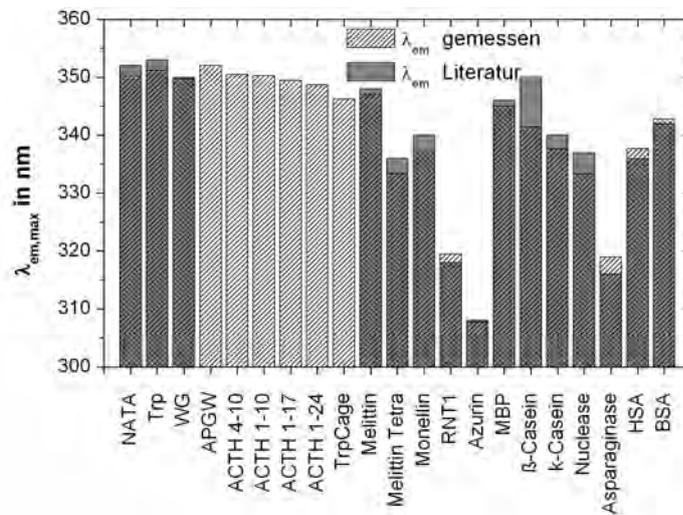


Abbildung 5.3: Emissionsmaximum mit Literaturvergleich.<sup>[96,113,128-133,133-137]</sup>

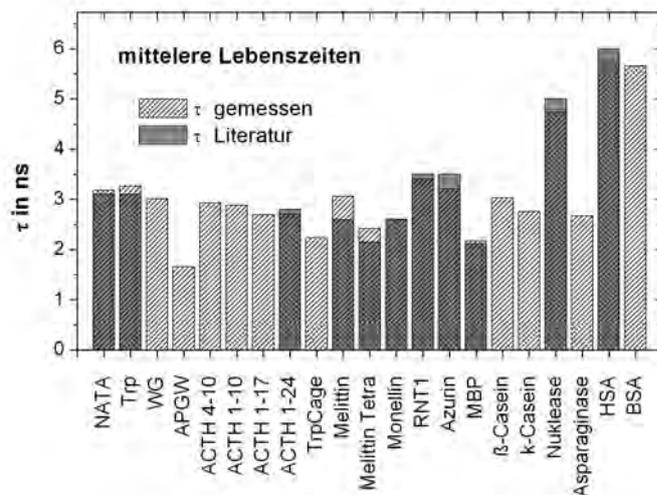


Abbildung 5.4: Mittlere Lebenszeiten der STPs mit Literaturvergleich.<sup>[8,127,129,132,138-142]</sup>

Protein/Peptid	$\theta$ in ps	$\theta_{Lit}$ in ps
NATA	61	60
ACTH, 4-10	286	240
ACTH, 1-24	1735	1800
Melittin	1670	1750
Melittin Tetramer	4735	3960

Tabelle 5.2: Korrelationszeiten der Molekülrotation mit Literaturvergleich.<sup>[62,139,143]</sup> Der Wert für ACTH 4-10 wurde nach Gleichung 2.20 mit Daten aus der Literatur<sup>[63]</sup> ermittelt.

reszenz nur bis etwa 12 ns nach der Anregung beobachtet werden kann und häufig schon vorher abklingt, gelingt die verlässliche Bestimmung von Rotationskorrelationszeiten bis etwa 5 ns. Tabelle 5.2 listet exemplarisch die gemessenen Werte für die Korrelationszeiten der Molekülrotation im Vergleich zu den Literaturwerten auf und belegt die hohe Übereinstimmung. Sehr schön ist dabei die Tetramerisierung des Melittins zu beobachten.

### Quenching mit Acrylamid

Quenchinguntersuchungen geben Aufschluss über die Erreichbarkeit des Fluorophors und sind somit in hohem Maße von der Struktur des Proteins abhängig. Ein Vergleich mit den vorhandenen Literaturwerten für Quenching mit neutralem Acrylamid soll die korrekte Faltung der Proteine bestätigen.

Abbildung 5.5 zeigt typische Stern-Volmer-Auftragungen nach Gleichung 2.13. Abweichungen von der Linearität sind in keinem Fall mit kombiniertem statischen und dynamischen Quenching zu erklären, da eine Auftragung von  $K_{app}$  gegen die Quencherkonzentration nach Gleichung 2.16 nicht zu einem linearen Zusammenhang führt. Statt dessen liegt in diesen Fällen, wie auch bei Quenching von ACTH 4-10 mit Acrylamid, eine ausgeprägte *sphere of action* gemäß Gleichung 2.17 vor.

Die erhaltenen Ergebnisse sind, zusammen mit den bekannten Literaturwerten, in Abbildung 5.6 grafisch dargestellt. Im Vergleich zu den Emissionsmaxima und den Lebenszeiten sind die ermittelten Quenchingkonstanten stärker fehlerbehaftet. Allerdings streuen auch die erhaltenen Literaturwerte je nach verwendeter Quelle, selbst wenn die verglichenen

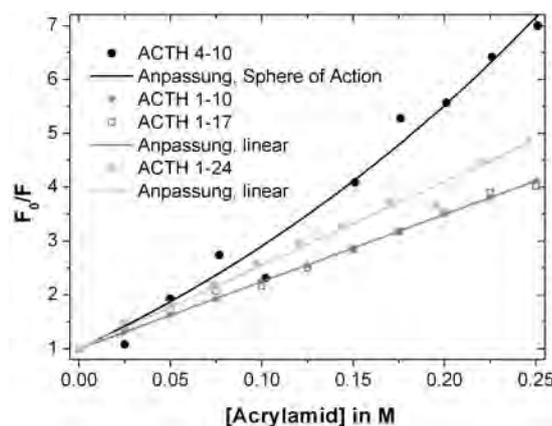
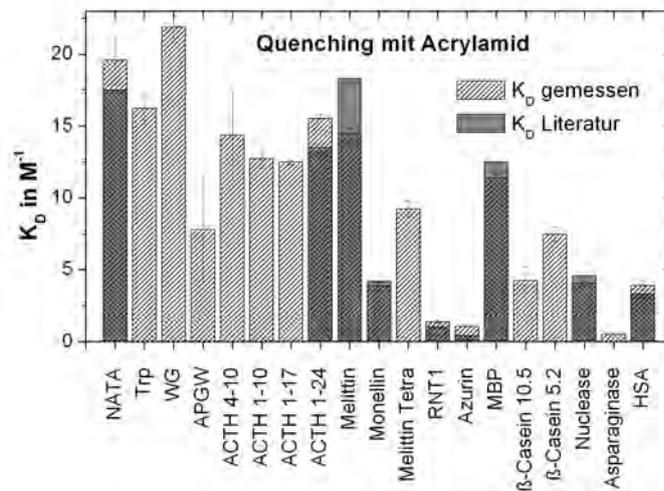


Abbildung 5.5: Quenching der ACTH-Proteine mit Acrylamid.



**Abbildung 5.6:** Quenching der Proteine mit Acrylamid mit Literaturvergleich.<sup>[138, 142, 144–146]</sup>

Publikationen vom selben Autor stammen. So wird die Stern-Volmerkonstante von Monellin in 0.01-molarem TRIS-Puffer bei  $pH = 7$  von Eftink 1976 mit  $5.0 M^{-1}$ , 1977 aber mit  $4.2 M^{-1}$  quantifiziert.<sup>[138,147]</sup> Alles in allem werden die allgemeinen Tendenzen in der Exposition der Tryptophanreste durch die Experimente daher gut wiedergegeben.

Alle untersuchten Parameter stimmen also im Rahmen experimentell bedingter Schwankungen gut mit den bekannten Literaturwerten überein. Somit ist die Vergleichbarkeit sowohl der statischen als auch der dynamischen Messergebnisse mit denen der Literatur sicher gestellt. Außerdem kann eine Fehlfaltung der untersuchten, literaturbekannten Proteine durch Denaturierung oder Verunreinigung ausgeschlossen werden. Die Tetramerisierung des Melittins unter den gewählten Messbedingungen konnte mangels Literaturwert zwar nicht anhand der verringerten Stern-Volmerkonstante, dafür aber mit Hilfe der vergrößerten Korrelationszeit der Molekülrotation einwandfrei nachgewiesen werden.

### 5.3 Der red edge-Effekt

In diesem Abschnitt werden Messungen zum red edge-Effekt der Proteine und Peptide vorgestellt. Der red edge-Effekt, also die Erhöhung des Emissionsmaximums mit der Anregungswellenlänge, dient als erster Hinweis auf die Existenz eines Relaxationsprozesses, welcher sich zeitlich in der Größenordnung der Fluoreszenzlebenszeit bewegt. So zeigt zum

Beispiel Tryptophan in einem Puffer-Glycerin-Gemisch (Vol % 30:70) eine Solvenzrelaxation im Nanosekundenbereich, welche sich in einer Verschiebung des Emissionsmaximums mit der Anregungswellenlänge äußert (siehe Abbildung 5.8).

Zur Erfassung des *red edge*-Effektes wurden die statischen Emissionsspektren der Proteine und Peptide bei verschiedenen Anregungswellenlängen vermessen, und die maximale Anregungswellenlänge mit einer Extreme-Anpassung bestimmt. Abbildung 5.7 zeigt die Emissionsspektren (links) und die zugehörigen Anpassungen (rechts) für das Protein HSA. Die erhaltenen Emissionsmaxima sind in Abbildung 5.8 in Wellenzahlen gegen die Anregungswellenlänge aufgetragen. Ein signifikanter Effekt wird in den Proteinen Asparaginase, HSA und dem Melittin Tetramer beobachtet. Diese Proteine sollten also im Fokus der weiteren Untersuchungen stehen. Die Verläufe für Nuklease und  $\kappa$ -Casein deuten ebenfalls auf einen Effekt hin; allerdings liefert eine Anregung ab 305 nm für diese beiden Proteine nicht mehr genügend Fluoreszenzintensität, um das Emissionsmaximum mit ausreichender Genauigkeit bestimmen zu können. Die starke Erhöhung der Emissionswellenlänge bis zu einer Anregung von 295 nm in HSA, Asparaginase und  $\beta$ -Casein ist auf die bis 295 nm anregbare Tyrosinfluoreszenz zurückzuführen, da diese Proteine die meisten Tyrosine aufweisen. Wie erwartet zeigt keines der kleineren, flexiblen Peptide einen signifikanten *red edge*-Effekt; dem entsprechend wird hier auch nicht mit dem Auftreten von spektraler Relaxation gerechnet.

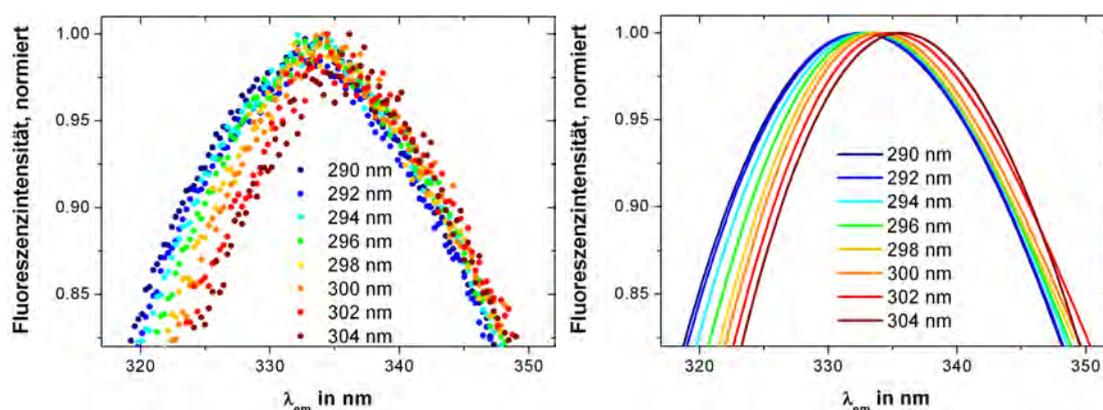


Abbildung 5.7: red edge-Effekt von HSA, Messdaten (links) und Anpassung (rechts).

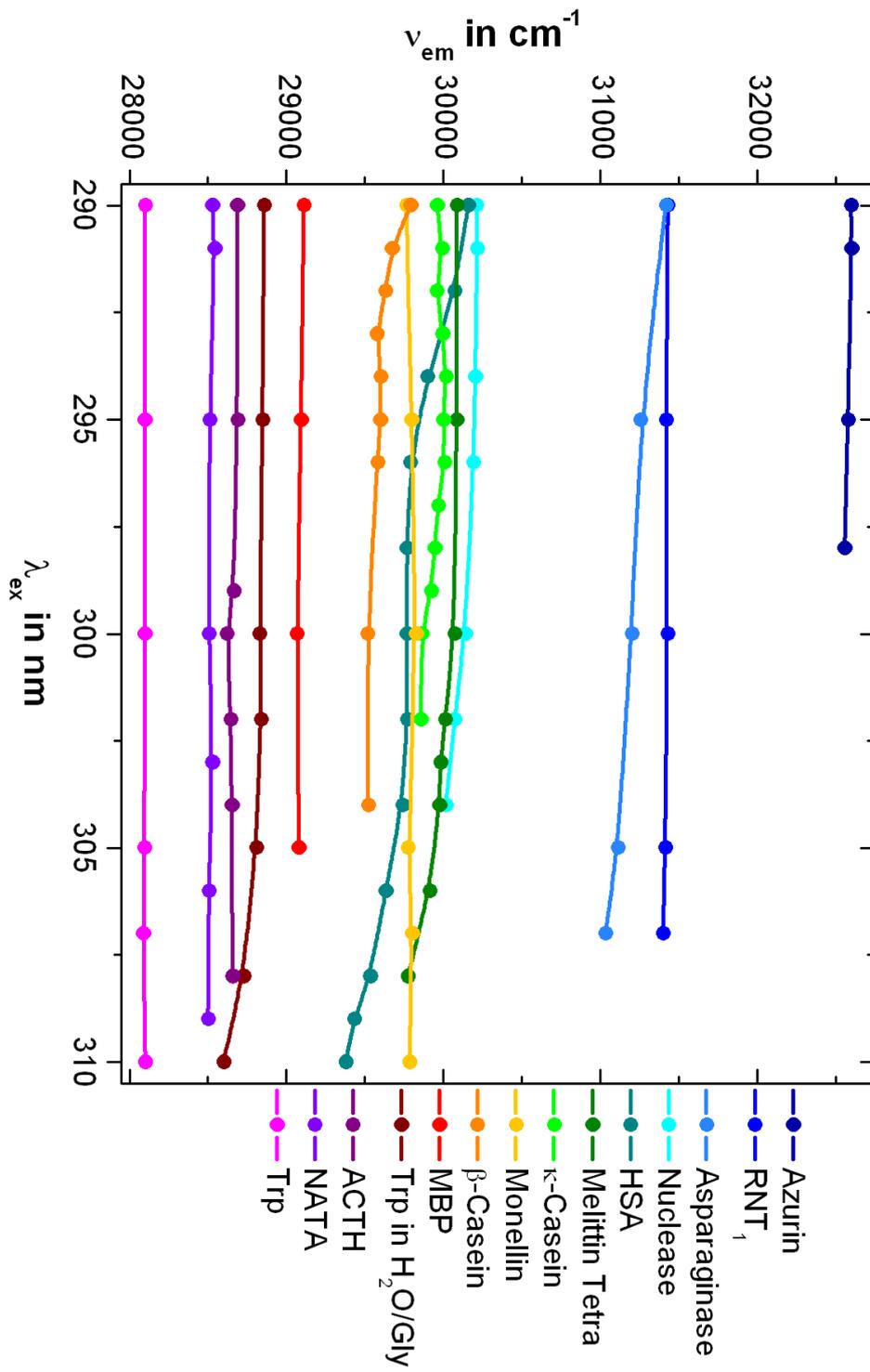


Abbildung 5.8: red edge-Effekt der untersuchten STPs. Alle nicht aufgeführten Peptide zeigen keine Verschiebung.

## 5.4 Analyse der dynamischen Fluoreszenz

### 5.4.1 Energieabhängigkeit

Ein wesentlicher Nachteil der hier vorgestellten Fluoreszenzmessungen besteht in der hohen Photonenzahl, welche für simultan zeit- und wellenlängenaufgelöste Spektren mit akzeptablem Signal-Rausch-Verhältnis nötig ist. Daher werden in der Literatur immer wieder fehlinterpretierte Ergebnisse vorgestellt, welche aufgrund von überhöhten Anregungsenergien zustande kommen. Um Sättigungseffekte und Photobleaching konsequent zu vermeiden, muss die Anregungsenergie so gewählt werden, dass die Intensität der dynamischen Fluoreszenz linear von der Energie abhängt.

Zur Feststellung optimaler Messebedingungen wird die Energieabhängigkeit von NATA exemplarisch untersucht; zur Energieabschwächung dient dabei eine Kombination aus Fresnel-Rhombus und Rochon-Prisma. Das ebenfalls in den Rohdaten enthaltene Rayleighsignal dient als Referenz für die Intensität des Lasers. Fluoreszenz- und Rayleighintensität werden durch Integration in Zeit- und Wellenlängenachse ermittelt.

Eine Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Rayleighintensität ergibt eine Gerade, die zu hohen Energien hin abflacht (siehe Abbildung 5.9). Der verwendete Messpunkt liegt innerhalb des linearen Bereichs; unter der geschätzten Annahme einer Konversionseffizienz von 5% für den Ramanshifter beträgt die Leistungsdichte hier etwa  $1.5 \text{ MW/cm}^2$ . Allerdings ist zu berücksichtigen, dass einige der vermessenen Proteine für Photobleaching deutlich anfälliger sind als NATA. Da nicht für jedes Protein eine eigene Energiereihe durchgeführt werden konnte, wurde während der Durchführung der Messungen stark auf

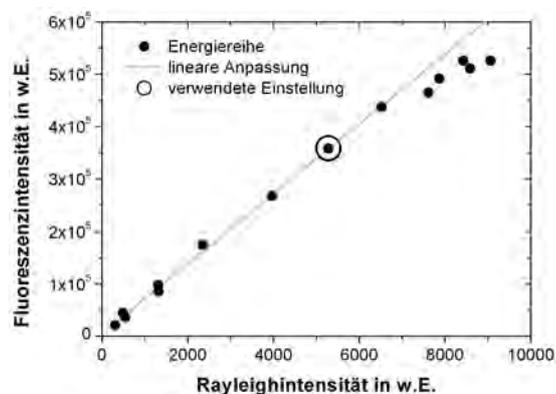
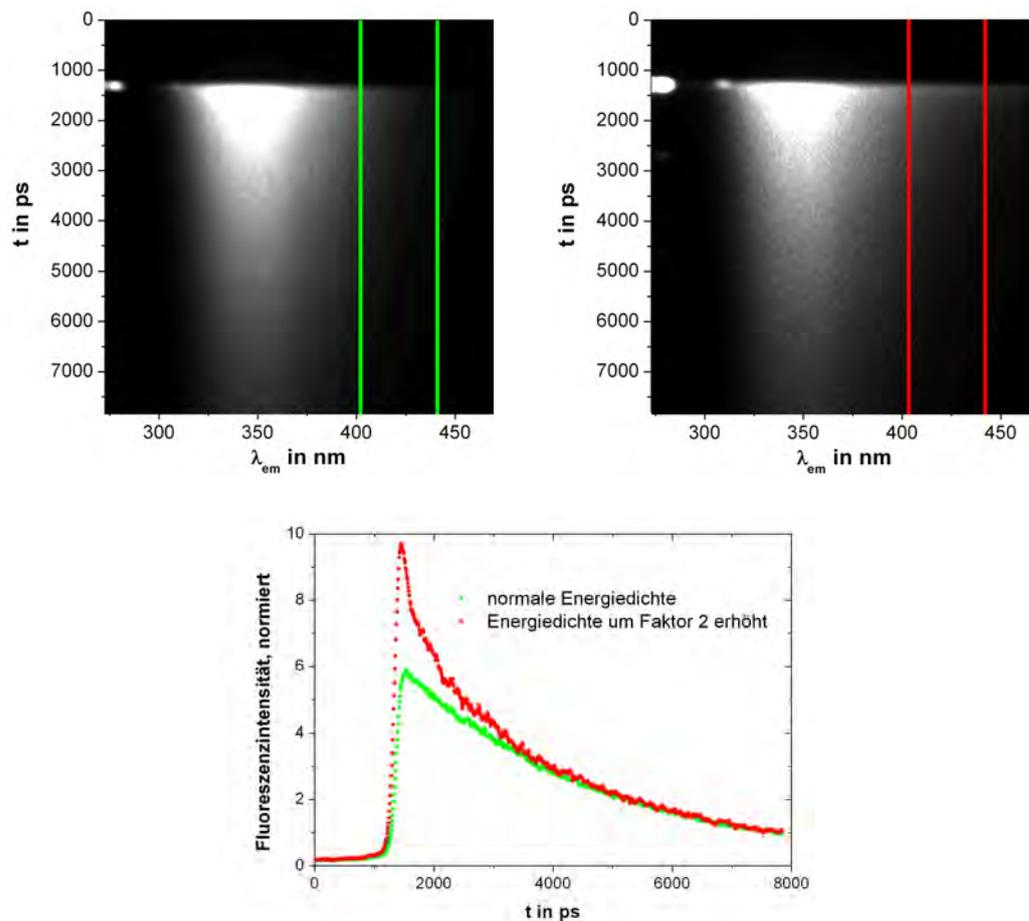


Abbildung 5.9: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Rayleighintensität.

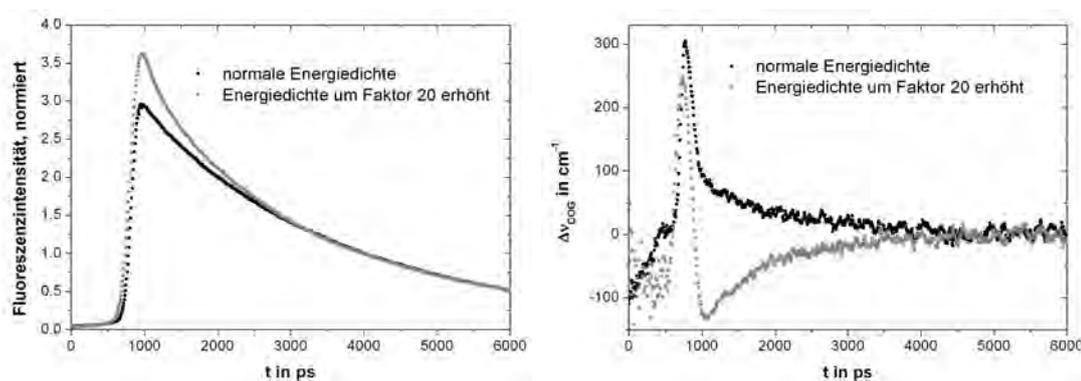


**Abbildung 5.10:** Fluoreszenz von Melittin ohne (links oben) und mit (rechts oben) Photobleaching. Einfluss auf die Fluoreszenzabklingkurve (unten).

zwei Hauptmerkmale von Photobleaching der intrinsischen Proteinfluoreszenz geachtet: Dem Rückgang der Fluoreszenzintensität mit der Messzeit trotz gleichbleibender Laserleistung und dem Auftreten eines kurzlebigen Fluoreszenzsignals bei 420 nm.

Abbildung 5.10 (oben) zeigt den Effekt einer zu hohen Energiedichte für das Peptid Melittin: Bei überhöhten Leistungsdichten wird ein kurzlebiges Signal an der roten Kante der Tryptophanfluoreszenz sichtbar. Das Emissionsmaximum um 420 nm ist ein klarer Beleg dafür, dass es sich hierbei nicht um Tryptophanfluoreszenz handeln kann. Das Störsignal hat erheblichen Einfluss auf die Zeitstruktur der Fluoreszenz (Abbildung 5.10 unten) und muss für eine sorgfältige Analyse der spektralen Relaxation daher unbedingt vermieden werden.

Durch die Fluoreszenzkomponente mit großer Emissionswellenlänge und kurzer Lebenszeit liegt der Fluoreszenzschwerpunkt bei etwas höheren Wellenlängen, also geringeren



**Abbildung 5.11:** Einfluss des Photobleachings auf Fluoreszenzabklingkurve und Fluoreszenzschwerpunkt in ACTH 4-10.

Wellenzahlen, als der Fluoreszenzschwerpunkt ohne Photobleaching. Im zeitlichen Verlauf äußert sich das Abklingen dieser Komponente in einer anfänglichen Verschiebung des Fluoreszenzschwerpunktes zu höheren Wellenzahlen. Diese Verschiebung zu höheren Wellenzahlen wurde in der Literatur bereits als Beweis für die Existenz verschiedener Konformere und als Gegenargument zur spektralen Relaxation in Melittin und im Melittin Tetramer herangezogen.<sup>[112]</sup> Im Extremfall kann das durch Photobleaching hervorgerufene Signal den Zeitverlauf des Fluoreszenzschwerpunktes sogar dominieren, wie in Abbildung 5.11 für ACTH 4-10 anhand einer Erhöhung der Energiedichte um Faktor 20 dargestellt. Die Beobachtung der oben beschriebenen Anzeichen von Photobleaching führte zum Verwerfen der Daten und zur Vermessung einer neu angesetzten Probe des untersuchten Proteins unter Verwendung deutlich geringerer Anregungsintensitäten. Auf diese Weise konnten für fast alle Proteine artefaktfreie Messdaten generiert werden.

Allein das Protein MBP ist zu photosensitiv, um ausreichend glatte Messdaten ohne Einfluss von Photobleaching zu erheben. Trotz sehr geringer Anregungsenergien, welche zu einem außerordentlich schlechten Signal-Rausch-Verhältnis führen, wurde in den Rohdaten die für Photobleaching charakteristische, kurze Lebenszeit bei hohen Emissionswellenlängen identifiziert. Dieses Protein kann daher für die Datenanalyse nicht verwendet werden.

## 5.4.2 Schnelle Relaxationsprozesse

In der Literatur sind Fälle einer kombinierten Solvenz-Proteinbewegung berichtet worden, welche bis zu 100 ps dauern und mit entsprechenden negativen Amplituden einhergehen.<sup>[107,148]</sup> Ziel der in diesem Abschnitt vorgestellten Untersuchungen ist es, negative Amplituden in der Proteinfluoreszenz zu identifizieren, welche zeitlich über die normale Solvenzrelaxation hinaus gehen und somit eine kombinierte Solvenz- und Proteinreorganisation im Subnanosekundenbereich anzeigen.

### Referenzmessungen

Um die verlässliche Detektion von negativen Amplitude zu belegen, wurden Tryptophan in Phosphatpuffer und NATA in einem Glycerin-Puffer-Gemisch als Referenzen untersucht. Tryptophan sollte dabei trotz Veränderung der Lebenszeit mit der Emissionswellenlänge keine messbare Verschiebung des Maximums zeigen, da die Solvenzrelaxation in Wasser unterhalb der Zeitauflösung des Systems liegt. Für NATA im glycerinhaltigen Puffer sollte eine ausgeprägte, negative Amplitude durch langsame Solvenzrelaxation beobachtbar sein. Die Verbindungen wurden je nach Intensität in einem Zeitfenster von 1 oder 2 ns vermessen. Zur Beobachtung einer negativen Amplitude werden die Fluoreszenzabklingkurven verschiedener Emissionsbereiche miteinander verglichen. Tritt das Fluoreszenzmaximum bei großen Emissionswellenlängen zeitlich verzögert zu dem Maximum bei kleinen Emissionswellenlängen auf, so liegt ein vorgeschalteter Prozess im angeregten Zustand vor.

Tatsächlich liegen die zeitlichen Emissionsmaxima der Fluoreszenzabklingkurven für Tryptophan in Puffer alle an derselben Stelle, während sich für NATA im glycerinhaltigen Puffer eine dramatischen Veränderung der Fluoreszenzabklingkurve ergibt. Charakteristisch ist der anfängliche Anstieg der Fluoreszenzintensität bei hohen Emissionswellenlängen. Da die Verschiebung des Fluoreszenzschwerpunktes hier ausschließlich auf Solvenzrelaxation zurückzuführen ist, kann sie nach Gleichung 2.22 angepasst werden. Die Anpassung ergibt einen biexponentiellen Verlauf mit Relaxationszeiten von 110 ps und 880 ps zu Anteilen von 52 und 48 %. Dieses Ergebnis passt gut zu der Relaxationszeit von 1.1 ns für NATA in reinem Glycerin.<sup>[109]</sup> Die Testmessungen belegen, dass das Detektionssystem auch für kurze Zeitfenster zuverlässig kalibriert wurde und es zur Detektion negativer Amplituden eingesetzt werden kann.

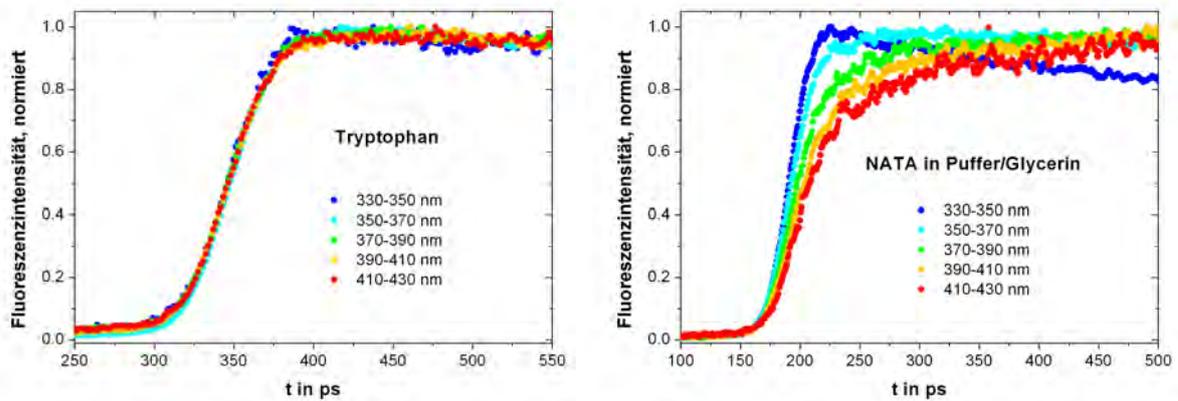


Abbildung 5.12: Fluoreszenzabklingkurven von Tryptophan und NATA in Glycerin.

### Abklingkurven ohne negative Amplitude

Die Mehrzahl der untersuchten Systeme weist, wie Tryptophan in Puffer, keine im Rahmen der hier möglichen Zeitaufösung messbare negative Amplitude auf. Neben den kleinen, flexiblen Peptiden WG, APWG und ACTH-Fragmenten zeigen auch die Proteine Monellin, Melittin, Myelin Basic Protein,  $\kappa$ -Casein und Asparaginase keinerlei Verzögerung des zeitlichen Emissionsmaximums.

Für die kleinen Peptide ist dieser Befund nicht sonderlich überraschend. Da sie noch keinerlei Sekundärstruktur ausbilden sondern als *random coil* in Lösung vorliegen, sind die Tryptophanreste hier stark zum Lösungsmittel exponiert. Eine mögliche Reorganisation erfolgt daher hauptsächlich durch das Umgebungswasser und ist damit binnen weniger Pikosekunden abgeschlossen. Für größere Peptide und Proteine ist kein so stringenter Sachverhalt zu erkennen. Monellin und Myelin Basic Protein weisen zwar ausgeprägte

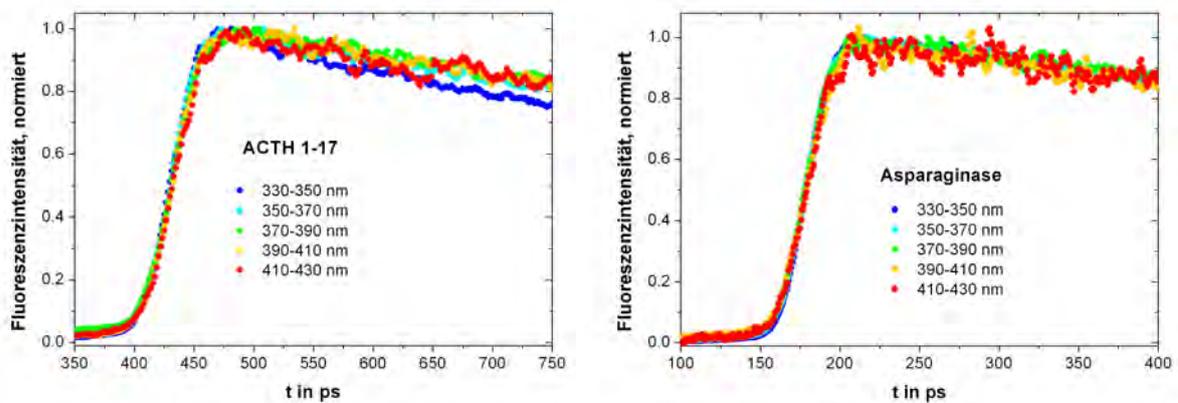


Abbildung 5.13: Fluoreszenzabklingkurven ohne negativen präexponentiellen Faktor.

Sekundärstrukturen auf, doch sind ihre Tryptophanreste ebenfalls relative gut durch das Lösungsmittel erreichbar, was die grüne Färbung der Tryptophanreste in Abbildung 5.2 in Bezug auf Lösungsmittelexposition belegt. Asparaginase hingegen stellt ein Protein mit ausgeprägter Sekundärstruktur und stark abgeschirmten Tryptophanrest dar, während über die ungeordnete Struktur des  $\kappa$ -Caseins wenig bekannt ist.

### Abklingkurven mit negativer Amplitude

Eine negative Amplitude für Proteine in wässrigem Puffer wurde ausschließlich für Proben aus der Bursteinklasse I beobachtet. Eine Verzögerung der Fluoreszenzintensität mit steigender Emissionswellenlänge konnte für das Melittin Tetramer, Trp-Cage und Nuklease ausgemacht werden, wie in den Abbildungen 5.14 und 5.15 dargestellt.

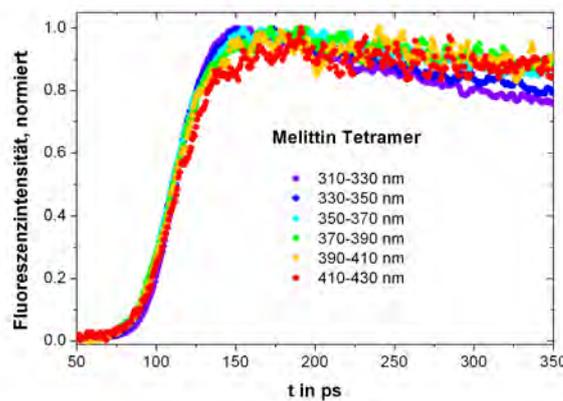


Abbildung 5.14: Fluoreszenzabklingkurven vom Melittin Tetramer.

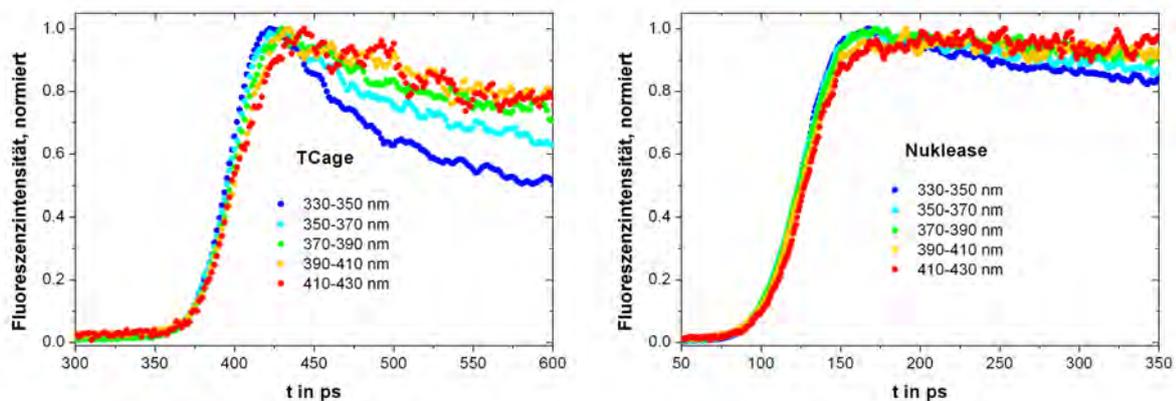
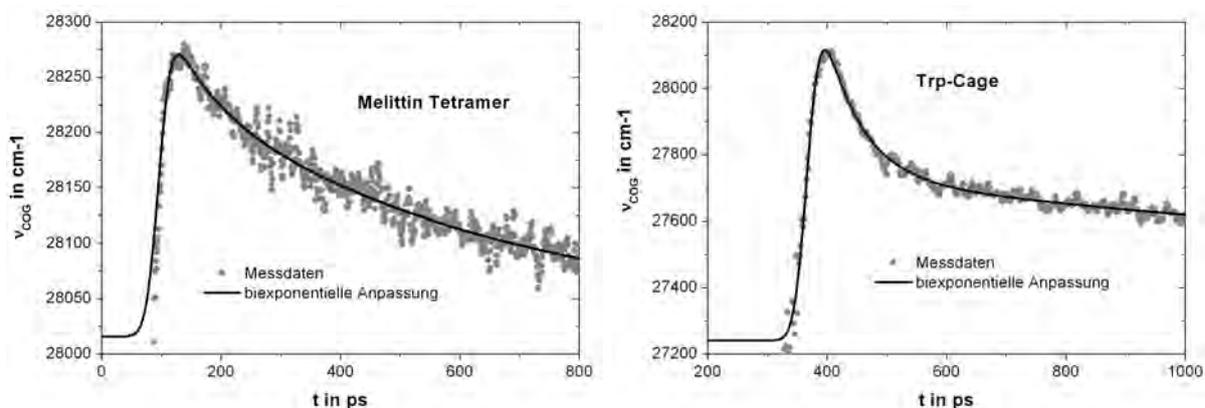


Abbildung 5.15: Fluoreszenzabklingkurven von Nuklease und Trp-Cage.

Die Quantifizierung dieses Effektes ist jedoch nicht nur aufgrund des zum Teil kleinen Signal-Rausch-Verhältnisses kompliziert; auch die Überlagerung von Intensitätsanstieg und -absinken erschwert die Bestimmung der Relaxationszeit. Selbst die globale Analyse aller Kurven setzt eine genau Kenntnis der längeren Fluoreszenzlebenszeiten voraus. Eine einfachere Methode stellt die Anpassung des Zeitverlaufes des Fluoreszenzschwerpunktes gemäß Gleichung 2.22 dar. Dabei kann jedoch nicht berücksichtigt werden, dass die Verschiebung zum Teil durch Konformere mit verschiedenen Lebenszeiten, welche zumeist größer als 500 ps sind, verursacht wird. Daher könne nur Relaxationszeiten unter 100 ps als tragfähig betrachtet werden. Diese Anpassung ist für das Melittin Tetramer und Trp-Cage in Abbildung 5.16 exemplarisch dargestellt.

Für das Melittin Tetramer existieren in der Literatur bereits umfangreiche Studien zur Solvationsdynamik.<sup>[107]</sup> Neben einer kurzen Komponente im Bereich von wenigen ps tritt hier eine langsame Relaxationskomponente von ca. 87 ps auf. Diese passt sehr gut zu der angepassten Relaxationszeit von 75 ps in der Verschiebung des Fluoreszenzschwerpunktes. Auch die Proteine Nuklease und Trp-Cage weisen einen entsprechenden Relaxationsprozess auf, allerdings ist hier mangels Referenzstudien kein Abgleich mit der Literatur möglich. Die augenfälligste negative Amplitude wurde für Trp-Cage, mit einer zugehörigen Relaxationszeit von 63 ps, beobachtet. Dieser Wert liegt deutlich oberhalb der Zeitauflösung und ist dem entsprechend solide. Nuklease weist dagegen einen deutlich schwächeren Relaxationsprozess mit einer Relaxationszeit von 29 ps auf. Allerdings liegt dieser Wert



**Abbildung 5.16:** Zeitverlauf des Fluoreszenzschwerpunktes von Melittin Tetramer und Trp-Cage mit Anpassung.

unterhalb der Apparatefunktion von 35 ps, so dass der Prozess nicht mehr richtig aufgelöst werden kann und ggf. auch deutlich schneller ist.

Insgesamt konnten also drei Proteine mit negativen Amplituden als definitivem Beweis für schnelle Relaxationsprozesse im angeregten Zustand identifiziert werden. Obwohl die für das Melittin Tetramer gemessene, kurze Relaxationszeit recht gut mit den Literaturwerten übereinstimmt, können die angegebenen Werte nur Anhaltspunkte für die beobachteten Relaxationsprozesse darstellen, da eine Überlagerung mit kurzen Abklingzeiten durchaus möglich ist und die Werte zudem im Bereich der Apparatefunktion liegen.

### Unklarer Befund

Für einige Peptide und Proteine ist das Ergebnis nicht ganz so klar. Für HSA,  $RNT_1$  und  $\beta$ -Casein könnte eine negative Amplitude vorliegen, allerdings ist der Effekt sehr klein und in Anbetracht des starken Rauschens nicht eindeutig zu identifizieren (siehe Abbildung 5.17). In diesen Fällen ist schwer zu erkennen, ob der beobachtete Effekt durch eine negative Amplitude, oder durch die Veränderung der längeren Lebenszeiten mit der Emissionswellenlänge in Kombination mit einem kleinen Signal-Rausch-Verhältnis hervorgerufen wird.

### Diskussion

Mit Hilfe der simultan zeit- und wellenlängenaufgelösten Fluoreszenzmessungen konnten in drei von 20 untersuchten Proteinen und Peptiden negative Amplituden mit zugehörigen

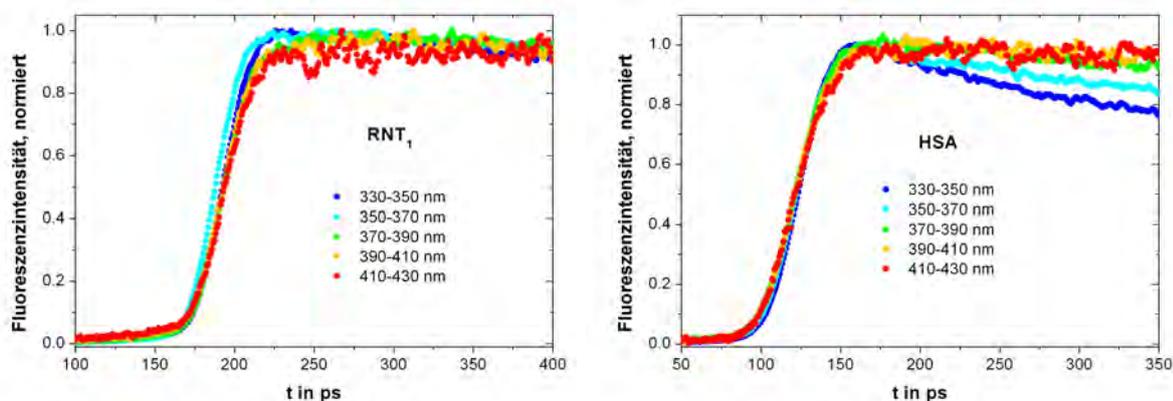


Abbildung 5.17: Fluoreszenzabklingkurven von  $RNT_1$  und HSA.

Relaxationszeiten im Zeitbereich bis 100 ps identifiziert werden. Während die Hydratationsdynamik von Melittin bereits hinreichend untersucht wurde, sind die für Nuklease und Trp-Cage beobachteten Reorganisationsprozesse noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Die erhaltenen Proben zeigen weder einen stringenten Zusammenhang mit dem in Abschnitt 5.3 beobachteten *red edge*-Effekt, noch eine klare Abhängigkeit von der Größe, Flexibilität oder Sekundärstruktur des Proteins auf. Allerdings wurde dieser Effekt nur für Proteine der Bursteinklasse I, und auch nicht für Proteine mit maximaler Flexibilität dank *random coil*-Struktur beobachtet.

### 5.4.3 Entwicklung eines Modells für die Schwerpunktsverschiebung durch Konformere

Für Relaxationsprozesse im Nanosekundenbereich ist die Beobachtung eines anfänglichen Fluoreszenzanstiegs aus den in Abschnitt 5.1 aufgeführten Gründen nahezu unmöglich. Statt dessen äußert sich die Relaxation in einer wenig charakteristischen Erhöhung der Lebenszeit mit der Emissionswellenlänge bzw. einer Verschiebung des Fluoreszenzschwerpunktes mit der Zeit zu geringeren Wellenzahlen; allerdings können diese beiden Effekte sowohl auf einen Reorganisationsprozess im angeregten Zustand, als auch auf das Vorliegen von Konformeren im Grundzustand hindeuten. Daher ist ein Werkzeug notwendig, welches zur Unterscheidung dieser beiden Phänomene beiträgt.

In der Literatur wird häufig versucht, die Verschiebung des Fluoreszenzschwerpunktes mit Hilfe eines Modells für spektrale Relaxation anzupassen.<sup>[108, 109, 118]</sup> Dazu gehört auch, dass eine multiexponentielle Anpassung an die Verschiebung Relaxationszeiten liefert. Dieser Ansatz ist sicherlich wichtig und sinnvoll für die Erfassung des Parameterfeldes unter der Annahme, dass ausschließlich spektrale Relaxation in dem Protein vorliegt. Er trägt jedoch nicht der Tatsache Rechnung, dass in vielen Proteinen das Auftreten von spektraler Relaxation noch gar nicht bewiesen ist, bzw. sich dieser Effekt mit dem Einfluss verschiedener Konformere überlagern kann. Aus diesem Grund wird auf die Ausarbeitung oder Verfeinerung eines Modells für den Prozess der spektralen Relaxation selber verzichtet. Statt dessen wird in diesem Abschnitt ein einfaches Modell für die Verschiebung des Fluoreszenzschwerpunktes unter Annahme eines reinen Konformationseffektes entwickelt. Auf Basis der mehrdimensionalen Messdaten in einem Zeitfenster von 10 ns wird für jedes einzelne Protein untersucht, ob der beobachtete Zeitverlauf dieser Gesetzmäßigkeit folgt. Alle Proteine, deren Verlauf des Fluoreszenzschwerpunkts diesem Modell nicht genügt, weisen demnach einen Relaxationseffekt in der Fluoreszenz auf.

#### Theoretischer Hintergrund

Grundstein für das verwendete Modell bildet die Annahme, dass sich die Fluoreszenz aus Emissionsbeiträgen einzelner Konformere nach Gleichung 5.1 additiv zusammen setzt. Jedem Konformer kann dabei eine bestimmte Lebenszeit zugeordnet werden.

$$F_{ges}(t) = \sum_i F_i(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (5.1)$$

- $F_{ges}(t)$ : *gesamte Fluoreszenzintensität*  
 $F_i(t)$  : *Fluoreszenzintensität des Konformers  $i$*   
 $\alpha_i$  : *Amplitude von  $i$*   
 $\tau_i$  : *Lebenszeit von  $i$*

Zudem verfügt jedes Konformer über ein zugehöriges, lebenszeitassoziiertes Emissionsspektrum mit einem definierten, zeitlich invarianten Fluoreszenzschwerpunkt. Der Zeitverlauf des Fluoreszenzschwerpunktes der Gesamtfluoreszenz ergibt sich somit aus den sich mit der Zeit verändernden Intensitätsverhältnissen der einzelnen Konformerfluoreszenzen, wie in Gleichung 5.2 beschrieben. Der Anteil  $f_i(t)$ , den das  $i$ -te Konformer an der Gesamtfluoreszenz zum Zeitpunkt  $t$  aufweist, berechnet sich mit Hilfe der zugehörigen Fluoreszenzabklingkurve.

$$\tilde{\nu}_{COG,ges}(t) = \sum_i f_i(t) \cdot \tilde{\nu}_{COG,i} = \sum_i \frac{F_i(t)}{F_{ges}(t)} \cdot \tilde{\nu}_{COG,i} \quad (5.2)$$

$$\tilde{\nu}_{COG,ges}(t) = \frac{\sum_i F_i(t) \cdot \tilde{\nu}_{COG,i}}{F_{ges}(t)} = \frac{\sum_i \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \cdot \tilde{\nu}_{COG,i}}{\sum_i \alpha_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}} \quad (5.3)$$

- $\tilde{\nu}_{COG,ges}(t)$ : *Schwerpunkt der Gesamtfluoreszenz*  
 $\tilde{\nu}_{COG,i}$  : *Schwerpunkt der  $i$ -ten Konformerfluoreszenz*  
 $f_i(t)$  : *Anteil des  $i$ -ten Konformers an der Gesamtfluoreszenz*

Die bekannten Lebenszeiten und Amplituden der integrierten Fluoreszenzabklingkurve erlauben die Bestimmung der Fluoreszenzschwerpunkte der einzelnen Konformere, sowie die Rekonstruktion des Schwerpunktverlaufs der Gesamtfluoreszenz der nach dem oben entwickelten Modell (siehe Gleichung 5.3). Zudem kann die tatsächlich vorliegende Schwerpunktsverschiebung den zweidimensionalen Messdaten direkt entnommen werden. Entspricht der nach dem Modell rekonstruierte Verlauf den direkt bestimmten Daten, so können die Eigenheiten der Fluoreszenz durchaus von Konformeren verursacht werden. Andernfalls liegt ein Relaxationsprozess vor, dessen Verschiebung nicht durch die Amplituden und Lebenszeiten der integrierten Fluoreszenzabklingkurve erfassbar ist. Dies liegt daran, dass sich durch die Integration über einen breiten Wellenlängenbereich ein schneller Entvölkerungsprozess bei kleinen Wellenlängen zum Teil mit dem Bevölkerungsprozess bei großen Wellenlängen ausgleicht. Auf diese Weise geht ein großer Teil der Informatio-

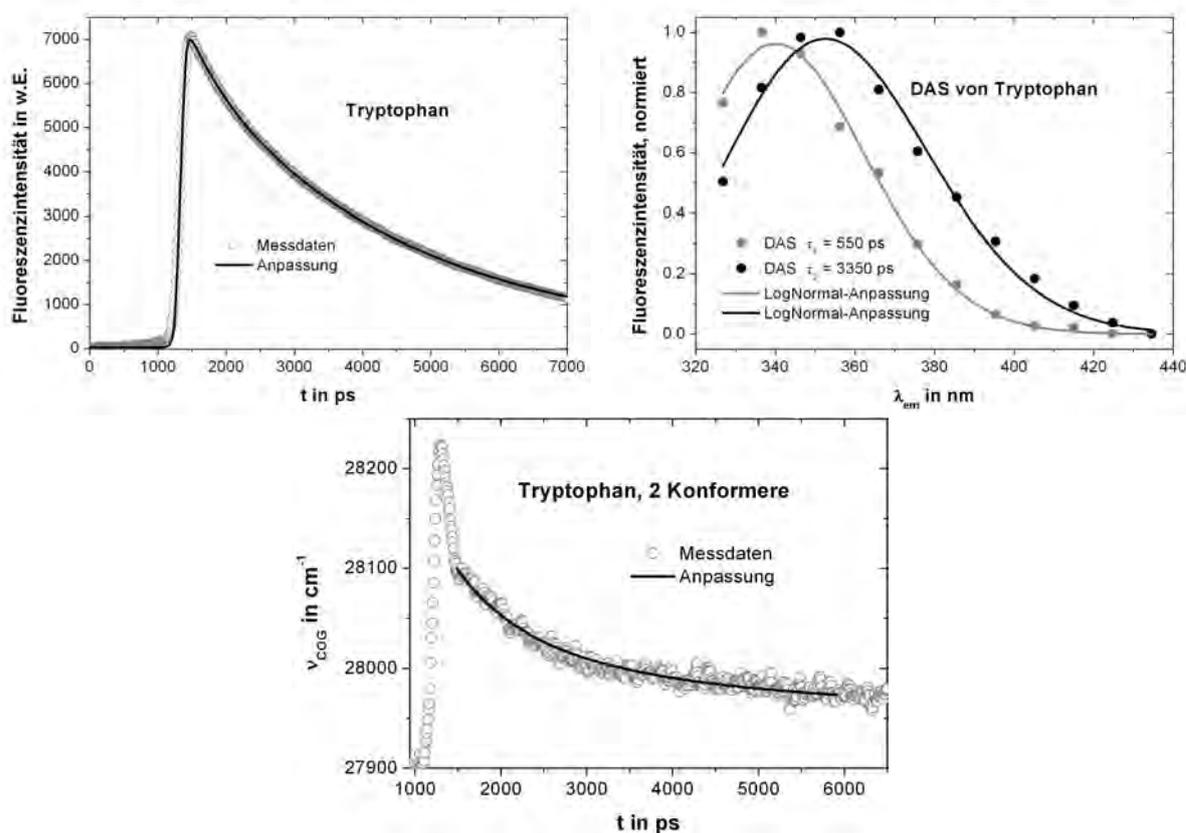
nen, die zur spektralen Verschiebung mit der Zeit beitragen, verloren, so dass die Amplituden und Lebenszeiten in der integrierten Fluoreszenzabklingkurve keine ausreichende Verschiebung wieder geben können.

### Test des Modells an Tryptophan in Puffer

Um die Tragfähigkeit dieses Ansatzes zu untersuchen, wird mit Tryptophan eine Probe analysiert, deren Fluoreszenz bekanntermaßen auf Konformere zurück zu führen ist. Zunächst wird die integrierte Fluoreszenzabklingkurve im Emissionsbereich zwischen 320 und 430 nm biexponentiell angepasst, es ergeben sich Lebenszeiten von 3350 und 550 ps mit den zugehörigen Amplituden.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzschwerpunkte müssen die lebenszeitassoziierten Emissionsspektren (DAS) bekannt sein. Dazu werden die Abklingkurven in kleineren Emissionsbereichen mit einer Breite von 10 nm mit den ermittelten Lebenszeiten angepasst und die DAS nach Gleichung 2.10 bestimmt. Mit Hilfe der DAS gelingt die Ermittlung der Fluoreszenzschwerpunkte der einzelnen Konformere  $\tilde{\nu}_{COG,i}$  nach Gleichung 2.21. Dabei müssen die Integrationsgrenzen in Wellenzahlen den Grenzen des für die Lebenszeitanpassung ausgewählten Emissionsbereichs (hier 320 bis 430 nm) entsprechen. Nur so wird die Kurve ohne störendes Rayleigh- und Ramansignal, sowie ohne ungünstige Kalibrationseffekte am Bildrand korrekt reproduziert.

Zur Überprüfung des Modells erfolgt die Anpassung einer Funktion nach Gleichung 5.3 an den gemessenen Verlauf des Fluoreszenzschwerpunktes. Dazu werden die zu Beginn ermittelten Amplituden und Lebenszeiten fest vorgegeben. Für die ebenfalls vorgegebenen Fluoreszenzschwerpunkte wird in Anbetracht der größeren Fehlerwahrscheinlichkeit ein Toleranzbereich von  $100 \text{ cm}^{-1}$  angenommen; dieser Fehler entspricht zwischen 320 und 430 nm etwa 1.0 bis 1.3 nm. Zusätzlich wird, als einziger freier Parameter, ein Offset für eventuelle Hintergrundeffekte berücksichtigt. Der Zeitbereich ist so gewählt, dass keinerlei Rayleighsignal oder Solvenzrelaxation zu Beginn die Anpassung stört, und auch extrem geringe Signalintensitäten zum Ende der Kurve vermieden werden. Auf diese Weise wird der Verlauf des Fluoreszenzschwerpunktes durch das Modell für reine Konformere mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.972 gut reproduziert.

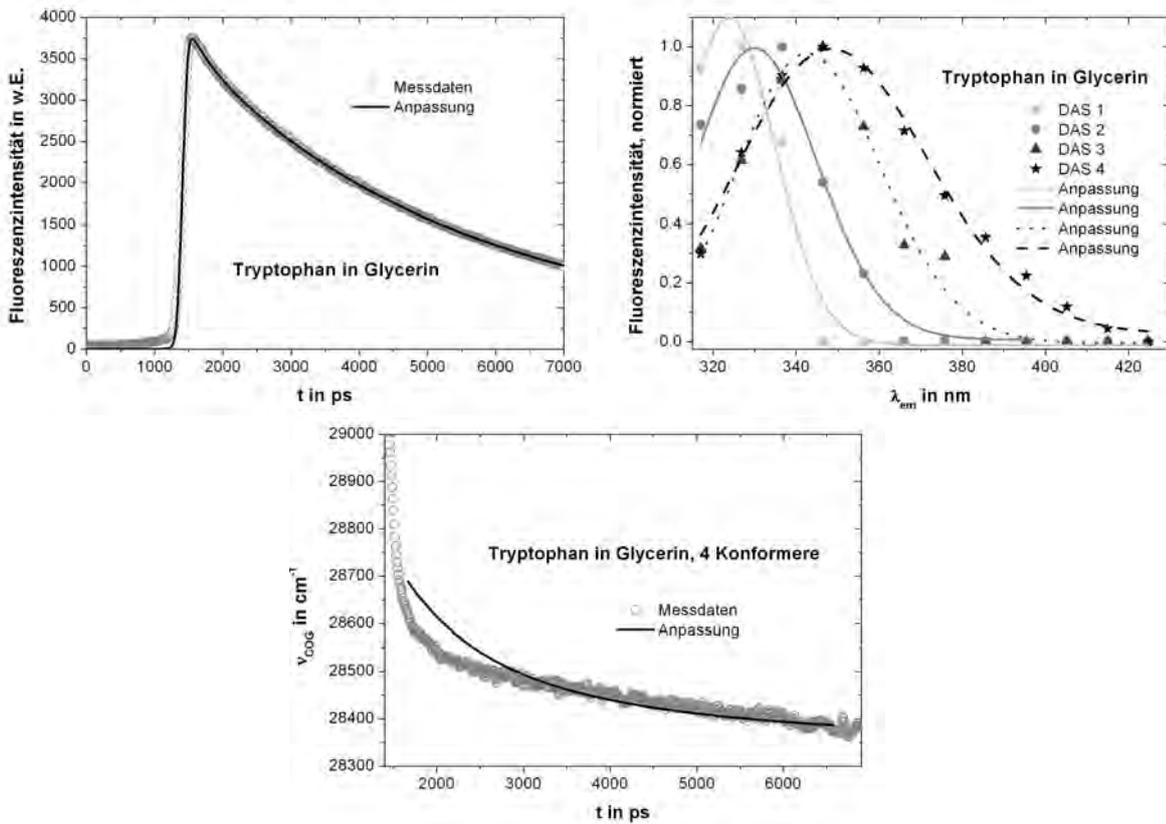


**Abbildung 5.18:** Bestimmung von Lebenszeiten und DAS, sowie Anpassung des Zeitverlaufs des Fluoreszenzschwerpunktes für Tryptophan.

### Test des Modells an Tryptophan in Glycerin

Um zu zeigen, dass dieses Verfahren auch in der Lage ist, Abweichungen vom Vorliegen reiner Konformere aufzuzeigen, wird es auf Tryptophan in einem Glycerin-Puffer-Gemisch (30 % Puffer und 70 % Glycerin) angewendet. Hier wird der Einfluss der beiden Tryptophanrotamere durch ausgeprägte Solvenzrelaxation überlagert. Diese sollte das Modell nicht erfassen können, so dass die ansteigende Komponente bei hohen Wellenlängen als lange Lebenszeit interpretiert, und die rekonstruierte Schwerpunktsverschiebung zu langsam erfolgt. Obwohl sich die integrierte Fluoreszenzabklingkurve bereits mit drei Lebenszeiten akzeptabel anpassen ließe, werden zur Sicherheit vier Lebenszeiten gewählt. Auf diese Weise ist klar, dass auch eine Erhöhung der Anzahl der Lebenszeiten die Genauigkeit der Modellvorhersage nicht wesentlich verbessert.

Die Anpassung des Zeitverlaufs des Fluoreszenzschwerpunkts ist für Tryptophan im Glycerin-Puffer-Gemisch trotz freiem Offset-Parameter und Spielraum in den Fluoreszenzschwer-



**Abbildung 5.19:** Bestimmung von Lebenszeiten und DAS, sowie Anpassung des Zeitverlaufs des Fluoreszenzschwerpunktes für Tryptophan in einem Glycerin-Puffer-Gemisch.

punkten der Konformere nicht möglich, wie der Korrelationskoeffizient von 0.656 eindrücklich belegt. Für eine korrekte Anpassung wären entweder unrealistische Fluoreszenzschwerpunkte (kleiner als 300 und größer als 400 nm), oder völlig andere Lebenszeiten und Amplituden notwendig. Mit dem Modell kann also zwischen Verschiebungen unterschieden werden, welche allein aufgrund von Konformeren im Grundzustand, oder unter Beteiligung eines Relaxationsprozesses im angeregten Zustand zustande kommen.

#### 5.4.4 Langsame Relaxationsprozesse

In diesem Abschnitt werden die Messergebnisse zur dynamischen Proteinfluoreszenz über mehrere Nanosekunden vorgestellt, wobei ein besonderes Augenmerk auf der Untersuchung des Fluoreszenzschwerpunktes nach dem entwickelten Modell für Grundzustandskonformere liegt.

##### Die gemessenen Fluoreszenzschwerpunktsverläufe

Der Verlauf des Fluoreszenzschwerpunktes ist für jedes Peptid und Protein ermittelt worden; Abbildung 5.20 gibt eine repräsentative Übersicht über die erhaltenen Kurven. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Differenz zur Wellenzahl zum Zeitpunkt  $t = 7000$  ps aufgetragen, da auf diese Weise die Verläufe aller Proteine in einem Bild darstellbar sind. Der Übersichtlichkeit halber wurden nicht alle Fluoreszenzschwerpunktsverläufe dargestellt; die fehlenden Daten zeigen entweder ein ähnliches Verhalten, oder werden im Laufe des Kapitels gesondert diskutiert.

##### NATA als Referenz

Zunächst muss mit Hilfe einer Referenz sicher gestellt werden, dass die Kalibration des Detektionssystems eine akkurate Wiedergabe des Fluoreszenzschwerpunktes und der Lebenszeiten ermöglicht. Dazu wird NATA verwendet, da es eine über das gesamte Spektrum monoexponentielle Fluoreszenz aufweist und zudem keine Verschiebung im Fluoreszenzschwerpunkt zeigen sollte.

Abbildung 5.21 zeigt die gemessenen, nahezu identischen Fluoreszenzabklingkurven bei verschiedenen Emissionswellenlängen und daraus monoexponentiell ermittelten Lebenszeiten. Die Lebenszeiten liegen zwischen 3140 und 3190 ps mit Fehlern im Bereich von 20 bis 50 ps, und passen hervorragend zu dem Literaturwert von 3170.<sup>[8]</sup> Der Fluoreszenzschwerpunkt verschiebt sich erwartungsgemäß nicht; auch diese Beobachtung weist auf ein gut kalibriertes Detektionssystem hin. Die starke Verschiebung zu Beginn der Kurve ist, je nach Wahl des Emissionsbereiches, auf Rayleighsignal, Ramansignal und Solvenzrelaxation zurückzuführen.

## 5 Spektrale Relaxation in single tryptophan-Proteinen

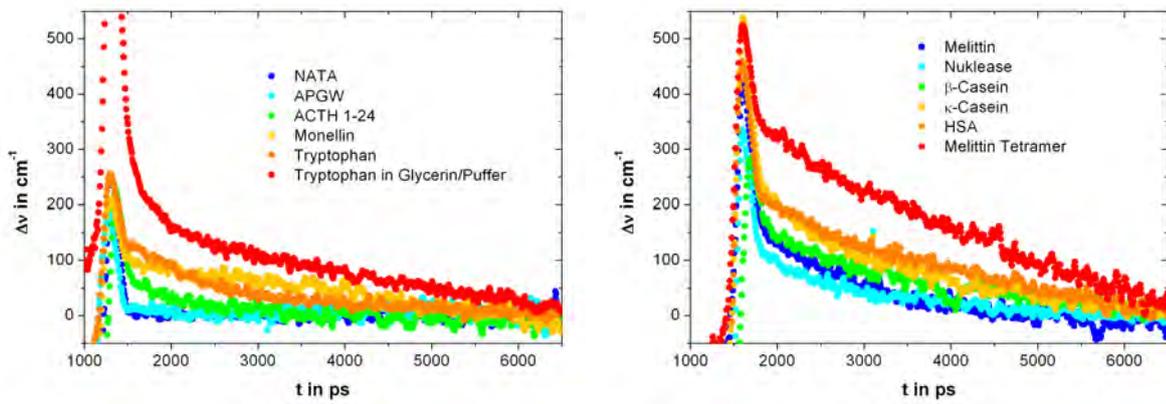


Abbildung 5.20: Verlauf der Fluoreszenzschwerpunkte in der Übersicht.

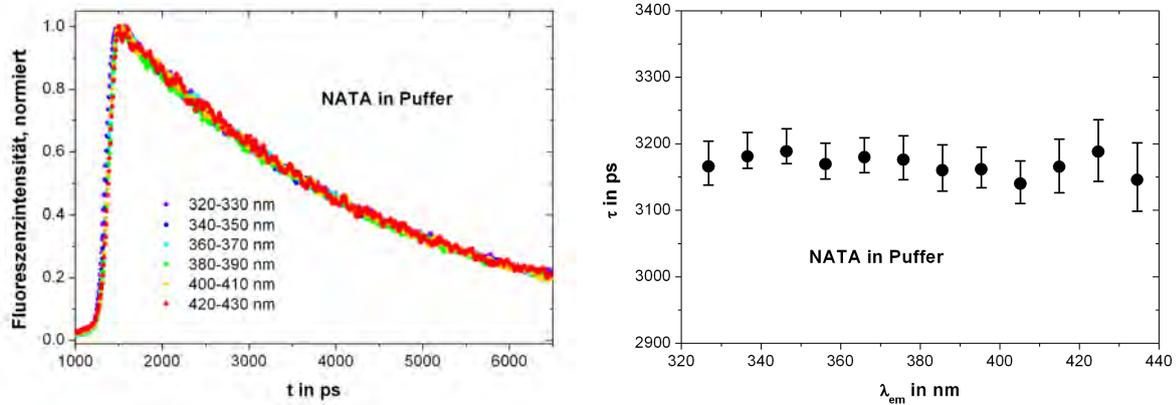


Abbildung 5.21: Fluoreszenzabklingkurven (links) und Lebenszeiten (rechts) von NATA in Puffer.

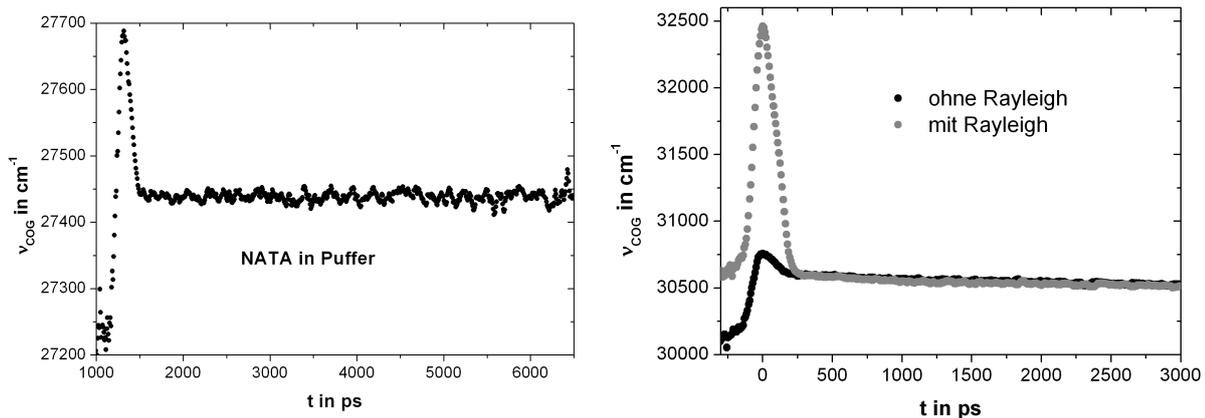


Abbildung 5.22: Verlauf des Fluoreszenzschwerpunktes für NATA in Puffer (links), Einfluss des Rayleighsignals (rechts) gemessen an  $RNT_1$ .

### Peptide und Proteine mit gleichbleibendem Fluoreszenzschwerpunkt

Neben der Referenz NATA zeigen noch drei andere Proben keinerlei Verschiebung des Fluoreszenzschwerpunkts mit der Zeit (siehe Abbildung 5.23 oben links). Neben den beiden kleinen, extrem flexiblen Peptiden APGW und ACTH 4-10 gehört auch das 148 Aminosäuren umfassende Protein Azurin dazu. Das in Azurin enthaltene Tryptophan hat von allen untersuchten Verbindungen das kleinste Emissionsmaximum und liegt in einer starren, hydrophoben Tasche.

Wie bei NATA liegen hier die Abklingkurven bei verschiedenen Emissionswellenlängen aufeinander (siehe Abbildung 5.23 oben rechts), allerdings sind sie biexponentiell. Abbildung 5.23 zeigt unten links die für APGW erhaltenen Lebenszeiten, welche ohne Vorgabe immer wieder dieselben Werte ergeben. Durch gleichbleibende Amplitudenverhältnisse ergeben sich daher gleichbleibende, mittlere Lebenszeiten (siehe Abbildung 5.23 unten rechts). Hier liegen also zwei Konformere vor, welche zudem einen nahezu identischen

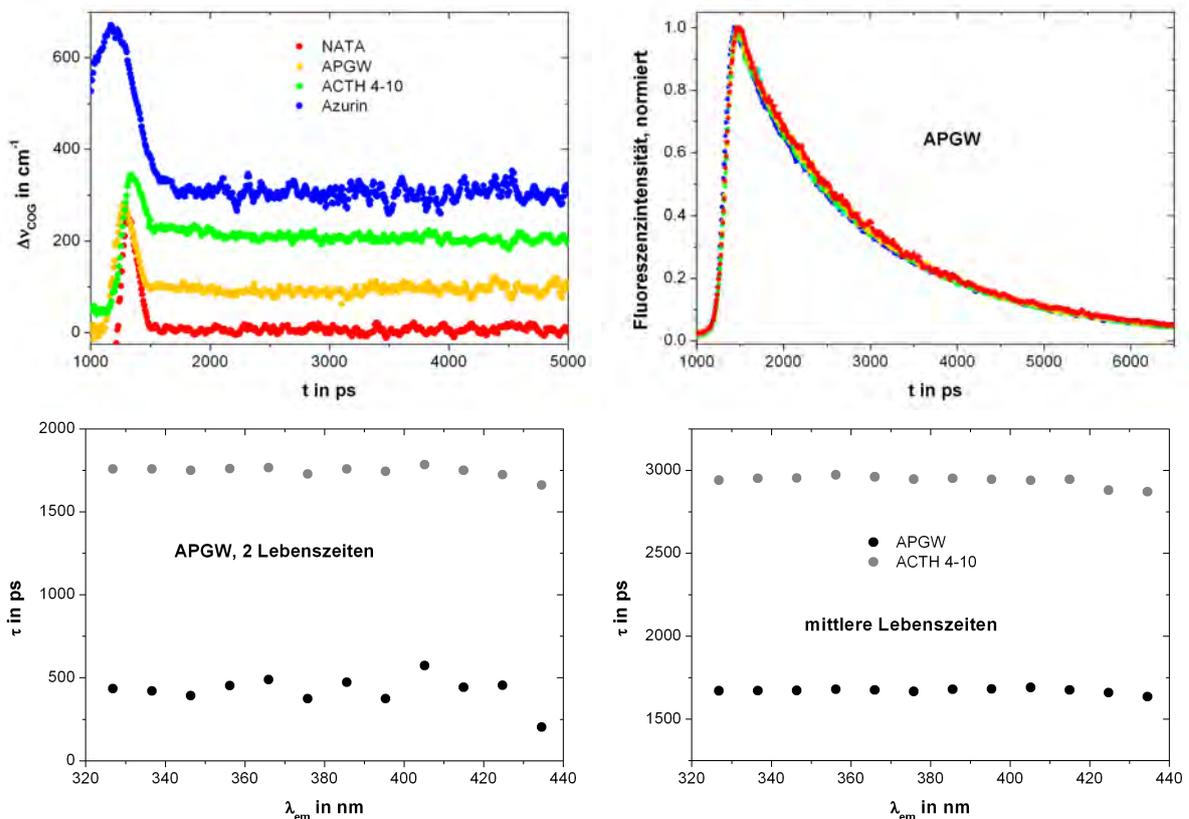


Abbildung 5.23: Proteine ohne Verschiebung im COG.

Fluoreszenzschwerpunkt aufweisen, so dass es zu keiner signifikanten Verschiebung mit der Zeit kommt.

### Peptide und Proteine mit vorhersagbarer Verschiebung

Die meisten Proteine und Peptide zeigen eine durch das Modell für Konformere vorhersagbare Verschiebung des Fluoreszenzschwerpunkts. Dazu gehören die drei größeren ACTH-Fragmente, Melittin, Monellin, Trp-Cage, RNT<sub>1</sub>, Nuklease und die beiden Caseine. Während ACTH 1-10 nur zwei Lebenszeiten zeigt, mussten alle anderen Proben triexponentiell angepasst werden.

Auch für diese Peptide und Proteine ist der Anstieg der Lebenszeit mit der Emissionswellenlänge charakteristisch, wie in Abbildung 5.24 links am Beispiel des  $\beta$ -Caseins dargestellt. Treten längere Lebenszeiten auf, wie z.B. für Nuklease, so müssen die Messungen aus zwei Zeitfenstern hinter einander gehängt werden, um verlässliche Werte für Lebenszeiten größer als 4 ns zu erhalten.

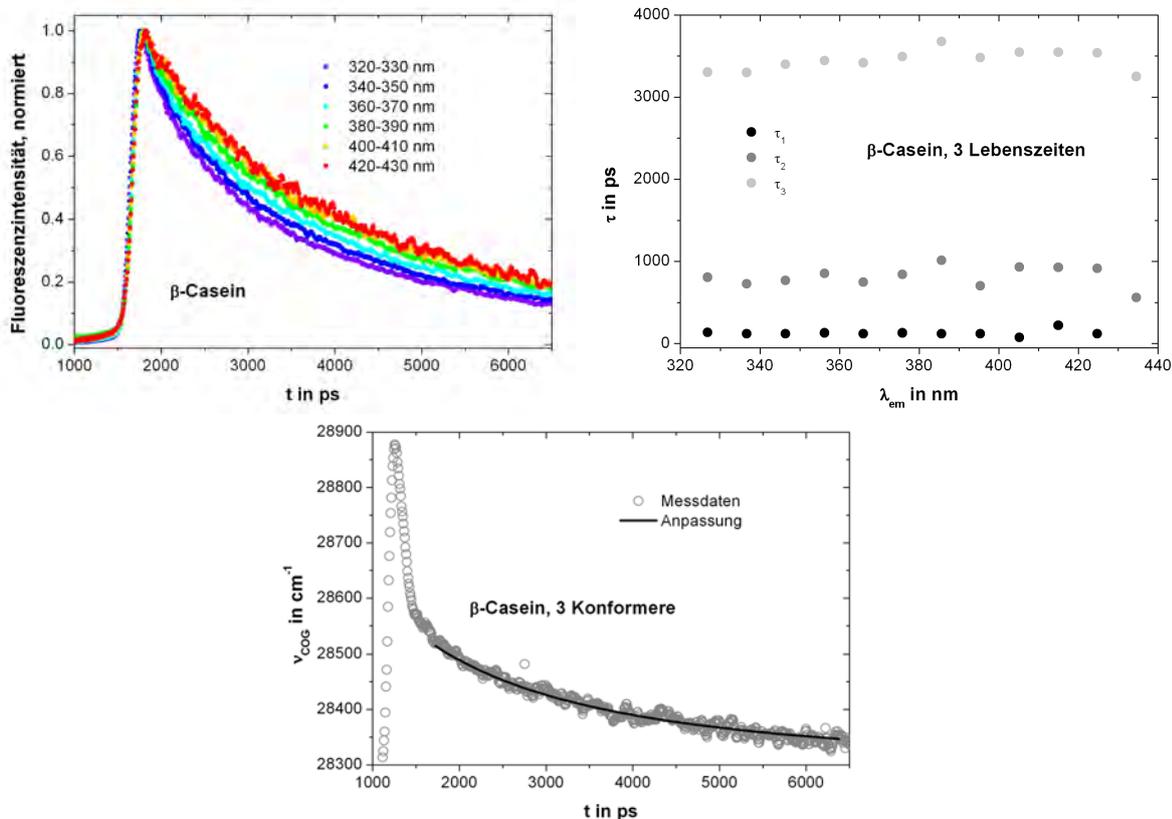


Abbildung 5.24: Abklingkurven, Lebenszeiten und Schwerpunktsanpassung für  $\beta$ -Casein.

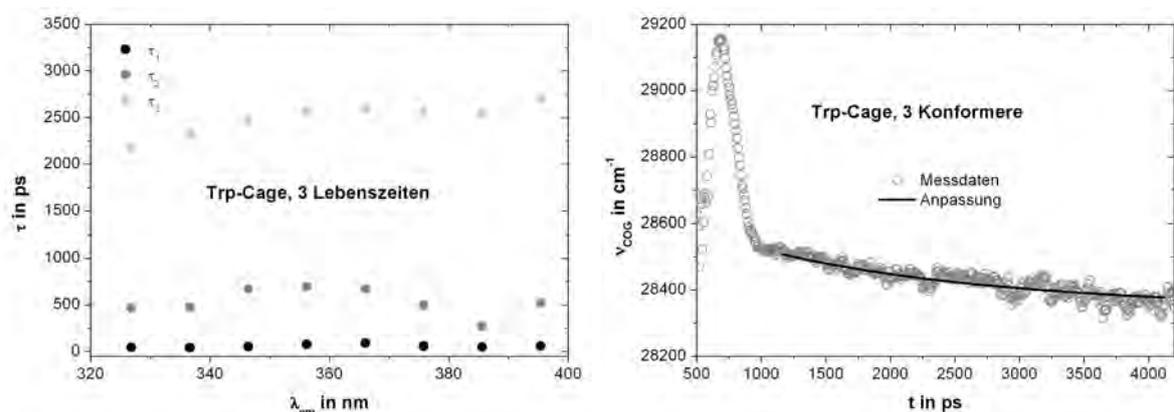


Abbildung 5.25: Lebenszeiten und Schwerpunktsanpassung von Trp-Cage.

Freie Anpassungen der Abklingkurven bei verschiedenen Emissionswellenlängen liefern für die ACTH-Fragmente und die Caseine ähnliche Lebenszeiten (siehe Abbildung 5.24 rechts), was ebenfalls als ein klarer Hinweis auf das Vorliegen verschiedener Konformere zu deuten ist. Für Melittin, Monellin, RNT<sub>1</sub> und Nuklease treten kleine Tendenzen und Schwankungen auf. Nur für Trp-Cage ist eine deutliche Erhöhung der längsten Lebenszeit mit der Emissionswellenlänge auszumachen, wie in Abbildung 5.25 links dargestellt. Dies kann zum Einen auf einen Relaxationsprozess hindeuten, ist aber auch mit einer nicht ausreichend erfassten, langen Lebenszeit oder Hintergrundeffekten bei der Anpassung zu erklären. Die resultierenden Verschiebungen im Fluoreszenzschwerpunkt sind allerdings so klein, dass das Modell für Konformere trotzdem akzeptable Anpassungen liefert, wie in Abbildung 5.25 rechts am Beispiel des Trp-Cage dargestellt.

### Peptide und Proteine mit nicht anpassbarer Verschiebung

Die Anpassung der Schwerpunktsverschiebung hat nicht für alle Proteine funktioniert. Die Kurven für HSA, Asparaginase und das Melittin Tetramer ließen sich nicht mit dem Modell für reine Grundzustandskonformere anpassen. In allen drei Proteinen war die gemessene Verschiebung größer, als das Modell vorhersagt. Außerdem wiesen alle drei Proteine starke Verschiebungen der längsten Fluoreszenzlebenszeit mit der Emissionswellenlänge auf, wie exemplarisch für HSA in Abbildung 5.26 rechts dargestellt.

Um auszuschließen, dass eine unberücksichtigte, vierte Lebenszeit diese Verschiebung verursacht, wurde die Bestimmung der Fluoreszenzschwerpunktsverschiebung nach dem Kon-

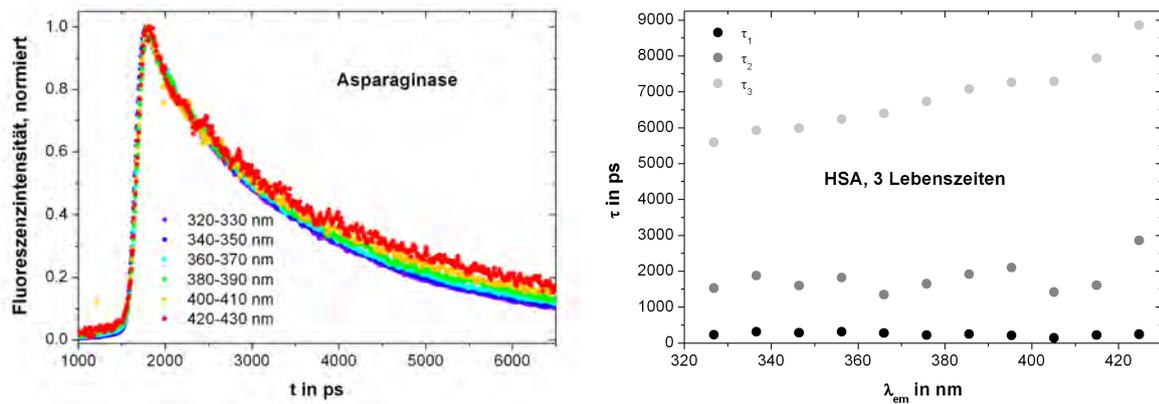


Abbildung 5.26: Abklingkurven von Asparaginase und Lebenszeiten von HSA bei freier Anpassung.

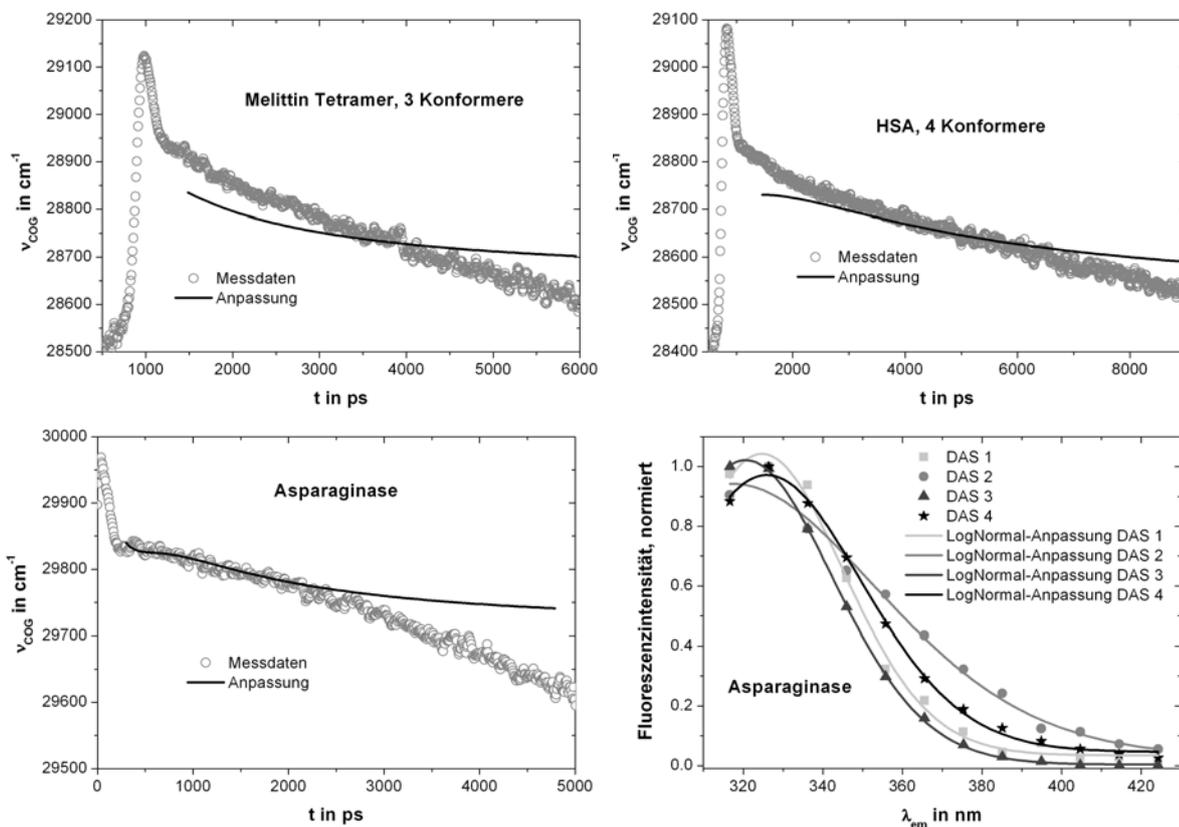


Abbildung 5.27: Verlauf des Fluoreszenzschwerpunktes für Melittin + NaCl, HSA und Asparaginase, sowie DAS für Asparaginase.

formermodell für HSA und Asparaginase exemplarisch mit vier Lebenszeiten durchgeführt. Trotz der tetraexponentiellen Anpassung kann das Modell die Schwerpunktsverschiebung nicht ausreichend vorhersagen. Korrelationskoeffizienten von 0.65 (Asparagina-

se), 0.75 (HSA) und 0.64 (Melittin Tetramer) zeigen deutlich, dass es sich dabei auch nicht um kleinere Fehler, etwa in der Bestimmung der Fluoreszenzschwerpunkte der einzelnen Konformere handeln kann. Um dies zu verdeutlichen wurde eine Anpassung für HSA und Asparaginase mit frei wählbaren Fluoreszenzschwerpunkten vorgenommen. Für HSA wäre demnach ein Fluoreszenzschwerpunkt mit einem Wert bei etwa 277 nm, für Asparaginase ein Fluoreszenzschwerpunkt mit einem Wert bei 385 nm im Rahmen des Modells notwendig. Beide Werte liegen außerhalb des für NATA akzeptablen Bereichs zwischen 305 und 360 nm; der erste Wert ist sogar kleiner als die gewählte Anregungswellenlänge von 296 nm.

Allerdings gestaltet sich die Art der Abweichung deutlich anders als bei Tryptophan im Puffer-Glycerin-Gemisch, da ein großer Teil der Verschiebung in den Proteinen über einen längeren Zeitbereich vonstatten geht. Um sicher zu gehen, dass die im vorangegangenen Abschnitt beobachteten, signifikanten aber langsamen Verschiebungen tatsächlich auf eine Reorientierung zurück geführt werden können, bietet sich der Vergleich mit einem größeren und unflexibleren Modellsystem als Tryptophan in Glycerin an.

### **Proteine in SDS-Mizellen**

In der Literatur ist bekannt, dass der Einschluss von Proteinen und Peptiden in Mizellen zu hochviskosen Umgebungen führen kann.<sup>[149,150]</sup> Für das ACTH-Fragment 1-24 sind bereits ausgedehnte Studien zur Struktur des Peptids in Mizellen durchgeführt worden.<sup>[151]</sup> Demzufolge wird der hydrophobe Teil des ACTH-Fragments, welcher auch den Tryptophanrest beinhaltet, in das hydrophobe Mizellinnere inkorporiert, wo es  $\alpha$ -helikale Strukturen ausbildet. Durch die eingeschränkte Flexibilität des Peptids in der Mizelle und das Fehlen von Umgebungswasser ist es sehr wahrscheinlich, dass auch hier spektrale Relaxation beobachtbar ist. Ein Vergleich soll zeigen, ob die hohe Viskosität im Inneren der Mizellen ähnliche Verschiebungen auslöst, wie bereits für HSA, Asparaginase und das Melittin Tetramer in reinem Puffer beobachtet wurden.

Tatsächlich zeigen alle ACTH-Fragmente in SDS-Mizellen eine ebenso ausgeprägte wie langsame Verschiebung des Fluoreszenzschwerpunkts mit der Zeit, welche in Stärke und Zeitverlauf den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Kurven ähnelt. Analog lässt sich der Verlauf des Fluoreszenzschwerpunkts, wie in Abbildung 5.29 rechts gezeigt, auch

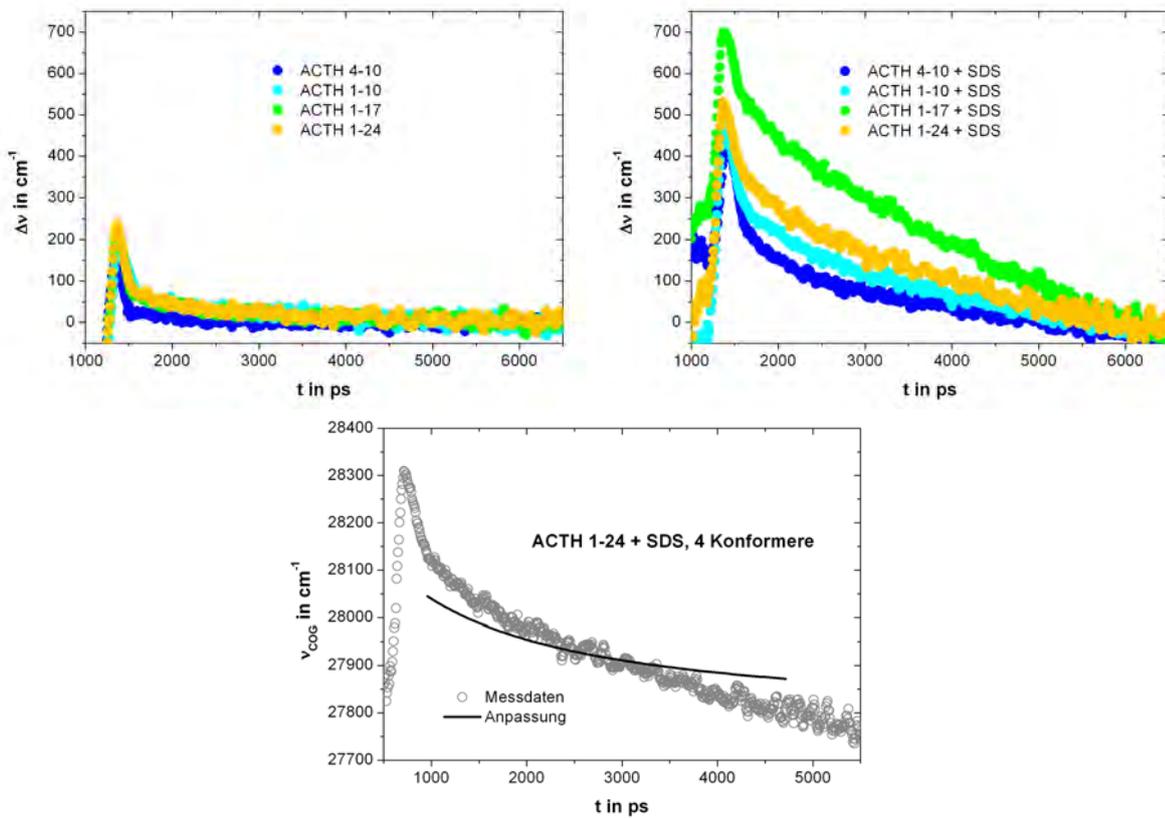


Abbildung 5.28: Fluoreszenzschwerpunkte der ACTH-Reihe mit und ohne SDS.

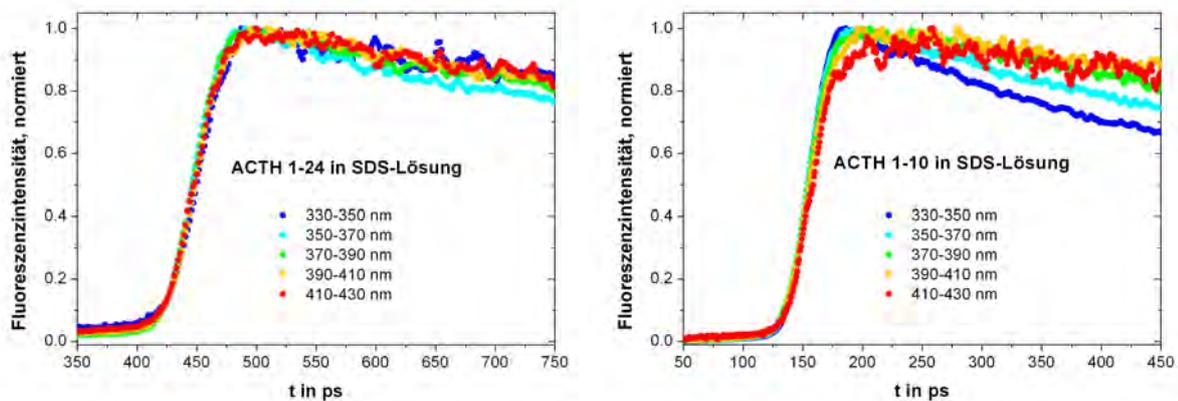


Abbildung 5.29: Abklingkurven von ACTH 1-24 und 1-10 in SDS.

nicht mit einer tetraexponentiellen Anpassung nach dem Modell für reine Konformere beschreiben.

Interessant ist zudem, dass die Verschiebung für die ACTH-Fragmente in Mizellen mit der Kettenlänge zunimmt. Allerdings zeigt das Fragment 1-17 eine aus dieser Reihe ausscherende, überproportional große Verschiebung. Die Tatsache, dass es auch in den kleinen

Fragmente 4-10 und 1-10 zu spektraler Relaxation kommt, lässt vermuten, dass der Effekt nicht auf die  $\alpha$ -helikalen Strukturen in den Fragmenten 1-17 und 1-24 zurück zu führen ist, sondern hauptsächlich auf der durch die Mizelle erzeugten Umgebungsviskosität beruht. Eine weitere Ähnlichkeit zeigt sich in den Abklingkurven bei kurzen Lebenszeiten. Während die beiden kleinen Fragmente eine negative Amplitude aufweisen, zeigen die beiden größeren Fragmente keinerlei Verschiebung des Emissionsmaximums mit der Zeit. Dieser Befund zeigt, analog zu den Proteinen in reinem Puffer, dass die Beobachtung einer langsamen Relaxation nicht an die Beobachtung einer negativen Amplitude geknüpft ist. Die Ähnlichkeit zwischen den Messdaten der ACTH-Fragmente in hochviskoser, mizellärer Umgebung und den Daten für die drei Proteine in reinem Puffer stützt die These, dass es auch in HSA, Asparaginase und dem Melittin Tetramer zu einem langsamen Reorientierungsprozess kommt.

## Diskussion

Die drei Proteine HSA, Asparaginase und Melittin Tetramer, welche den deutlichsten *red edge*-Effekt aufweisen, zeigen eine klare Abweichung vom entwickelten Modell für das Vorliegen von Konformeren. Die Kombination der beiden Phänomene muss als Beweis für die Existenz von spektraler Relaxation betrachtet werden. Während die Relaxationseffekte von HSA und dem Melittin Tetramer mit anderen Methoden bereits untersucht wurden, ist über spektrale Relaxation der Asparaginase bislang noch nichts berichtet worden.

Eine Korrelation mit den in Abschnitt 5.4.2 beobachteten, negativen Amplituden und den aus der Anisotropie bestimmten Rotationskorrelationszeiten konnte nicht festgestellt werden. Auch wird offensichtlich kein bestimmtes Sekundärstrukturmotiv als Träger des Tryptophans bevorzugt. Auffallend ist aber, dass die Tryptophanreste der drei Proteine, welche Abweichungen vom Modell aufweisen, in hydrophoben Proteintaschen verhältnismäßig großer Proteine mit klarer Sekundärstruktur und ähnlich geringer Lösungsmittelexposition liegen. Die Ähnlichkeit zeigt sich auch in den Bursteinklassen: während Asparaginase und Melittin Tetramer zu Klasse I gehören, liegt HSA auf der Grenze zwischen I und II.

Offensichtlich ist also eine gewisse Abschirmung vom Umgebungswasser nötig. Werden die Tryptophanreste von zuviel Umgebungswasser erreicht, wie in den Proteinen der Burstein-

klasse II und III, so wird die höhere Flexibilität des Wassers eine schnellere Relaxation herbeiführen. Eine stärkere Abschirmung ist jedoch auch nicht zwangsweise erfolgsversprechend. Für die beiden am stärksten abgeschirmten Proteine, Azurin und RNT<sub>1</sub>, konnte ebenfalls keine spektrale Relaxation nachgewiesen werden. In der Literatur wird zwar spektrale Relaxation in RNT<sub>1</sub> beschrieben; in Anbetracht der äußerst geringen Verschiebung von ca 50 cm<sup>-1</sup> konnte der Effekt in dieser Studie aber nicht eindeutig als spektrale Relaxation identifiziert werden, da er im Rahmen des Fehlerbereichs des entwickelten Verfahrens liegt.

Auch eine erhöhte Flexibilität des Proteingrundgerüsts führt zu einer schnelleren Relaxation. Dies ist laut Literatur z.B. in der Nuklease der Fall.<sup>[132]</sup> Das Tryptophan befindet sich hier zwar in einer ähnlich abgeschirmten, hydrophoben Tasche, doch der *random coil*-Strang des Proteins ermöglicht eine deutlich schnellere Bewegung. Dem entsprechend sind tiefe Temperaturen und viskose Lösungsmittel notwendig, um die spektrale Relaxation bis in den Nanosekundenbereich zu verlangsamen. Folgerichtig konnte der langfristige Verlauf der Relaxation mit dem Modell für reine Konformere angepasst werden, während im Bereich um die 100 ps eine verlangsamte Solvenzrelaxation beobachtbar ist.

Ein gutes Modellsystem für spektrale Relaxation in einer solchen hydrophoben Tasche stellen SDS-Mizellen dar. Die Inkorporierung von den in Mizellen  $\alpha$ -helikalen ACTH-Fragmente führt zu einem ähnlichen Zeitverlauf des Fluoreszenzschwerpunkts wie für die oben beschriebenen, relaxierenden Proteine.

## 5.5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der Relaxationsprozesse von *single tryptophan*-Proteinen im angeregten Zustand mit Hilfe einer einzigen Messung identifiziert werden können. Dazu sind zwanzig verschiedene Proteine und Peptide fluoreszenzspektroskopisch untersucht worden. Ausgedehnte Voruntersuchungen belegen anhand der vermessenen Emissionsmaxima, Quantenausbeuten, Lebenszeiten und Quencheigenschaften, dass alle Verbindungen in der gewünschten, nativen Faltung vorliegen.

Zur Detektion von Relaxationsprozessen wurde auf zwei verschiedene Fluoreszenztechniken zurückgegriffen: Zum Einen liefert der statische *red edge*-Effekt einen zeitlich un-

differenzierten Hinweis auf einen Reorganisationsprozess mittels statischer Anregungs-Emissions-Spektroskopie. Simultan zeit- und wellenlängenaufgelöste Messungen mit verschiedenen Zeitfenster ermöglichen zum Anderen sowohl die Detektion kurzlebiger Prozesse im angeregten Zustand in Form von negativen Amplituden, als auch die Betrachtung der langsameren Fluoreszenzschwerpunktsverschiebung.

Um langsame Relaxationsprozesse von Konformeren unterscheiden zu können, wurde ein simples Modell zur Rekonstruktion des Verlaufs des Fluoreszenzschwerpunkts erstellt. Dank der Multidimensionalität des in einer Messung erhaltenen Datensatzes kann der direkt bestimmte Verlauf mit einem aus Lebenszeiten und Amplituden der erwarteten Konformere rekonstruierten Verlauf abgeglichen werden. Tests an Tryptophan in Puffer und Glycerin belegen die Richtigkeit dieses Ansatzes.

Mittels der verschiedenen Untersuchungsmethoden wurden in insgesamt sechs der untersuchten Proteine und Peptide Anhaltspunkte für spektrale Relaxation im angeregten Zustand detektiert. Kombinierte Solvenz-Proteinbewegungen wurden im Melittin Tetramer, in Nuklease und am deutlichsten in Trp-Cage gefunden. Belege für das Auftreten von langsamen Relaxationsprozessen fanden sich in HSA, Asparaginase und dem Melittin Tetramer. Zudem wurden beide Prozesse an ACTH-Fragmenten in SDS-Mizellen beobachtet. Eine Korrelation mit Rotationskorrelationszeiten und dem Tryptophan-tragenden Sekundärstrukturmotiv konnte nicht festgestellt werden, allerdings weisen alle betroffenen Proteine hydrophobe Proteintaschen mit geringer Lösungsmittlexposition vor. Dem entsprechend können die zugehörigen Tryptophanfluoreszenzen der Bursteinklasse I zugeordnet werden.

Ob spektrale Relaxation tatsächlich in fast jedem Protein eine Rolle spielt, wie von Lakowicz vermutet wird,<sup>[67]</sup> kann nicht abschließend geklärt werden. Die Tatsache, dass sich der Fluoreszenzschwerpunkt, wenn überhaupt, zu geringeren Energien verschiebt, scheint diese These zu stützen. Es ist durchaus denkbar, dass in vielen flexibleren Proteinen, analog zur oben diskutierten Nuklease, ein schneller Relaxationsprozess mit Relaxationszeiten bis 200 ps vorliegt, welcher sich zu späten Zeiten durch eine relativ geringe Verschiebung äußert. Diese ist dann aufgrund der Toleranz der Anpassung mit dem Konformermmodell vereinbar. Auf der anderen Seite weisen sieben Verbindungen zwei bzw. drei nahezu

konstante Lebenszeiten in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge auf, drei weitere Proteine zeigen erst gar keine Verschiebung.

Insgesamt ermöglicht die außergewöhnliche Kombination mehrdimensionaler, fluoreszenzspektroskopischer Techniken einen völlig neuen Ansatz zur Detektion spektraler Relaxation in *single tryptophan*-Proteinen. Dabei wird erstmals berücksichtigt, dass sich in der Fluoreszenz eines Proteins sowohl spektrale Relaxation als auch der Einfluss verschiedener Konformere widerspiegeln kann. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgelegte, systematische Studie stellt zudem die erste, literaturbekannte Untersuchung der Fluoreszenzschwerpunktsverschiebung von mehr als einem halben Dutzend untersuchter Peptide und Proteinen dar.

Um die Schlagkraft des verwendeten Systems noch zu erhöhen, ist eine größere Zeitauflösung für die Untersuchung der schnellen Relaxationsprozesse bis in den einstelligen Pikosekundenbereich wünschenswert. Auf diese Weise könnte jede zeitlich über Solvenzrelaxation hinausgehende, negative Amplitude mit Sicherheit identifiziert werden. Eine Verbesserung der Wellenlängenauflösung in der Detektion könnte in Zukunft die Betrachtung des Verlaufs der Fluoreszenzhalbwertsbreite möglich machen, und somit weitere Informationen zum Verlauf des Relaxationsprozesses offen legen.

Trotz der Verbesserungsmöglichkeiten steht mit dem hier vorgestellten Messsystem und der entwickelten Auswertroutine der Forschung bereits jetzt ein nützliches Instrument zur schnellen und unkomplizierten Detektion von Reorientierungsprozessen im angeregten Zustand zur Verfügung. Dieser Baustein fehlte bisher noch, um in Zusammenarbeit mit Theoretikern und synthetischen Biochemikern umfassende Studien an eigens synthetisierten *single tryptophan*-Mutanten durchführen zu können. Diese vermögen in Zukunft vielleicht, kleinere Struktur motive und Aminosäuresequenzen, aber auch Umgebungsparameter wie Viskosität und Lösungsmittel exposition zu identifizieren, welche die spektrale Relaxation fördern oder verhindern. Auf diese Weise kann es der interdisziplinären Wissenschaft gelingen, dem Rätsel um die Ursachen und Wirkparameter der spektralen Relaxation auf die Spur zu kommen.



*If the universe came to an end every time there was  
some uncertainty about what had happened in it,  
it would never have got beyond the first picosecond.*

*Douglas Adams*

# 6 hs-FLIM: Optimierung und Anwendung

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Verbesserung und Entwicklung mehrdimensionaler Methoden im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie. Da diese Technik nicht in Bielefeld zur Verfügung steht, wurden die Arbeiten im Rahmen einer Kooperation mit der Laser Analytics Group der Universität Cambridge unter der Leitung von Dr. Clemens Kaminski durchgeführt, da diese Arbeitsgruppe über eine besonders leistungsstarke Apparatur mit ungewöhnlich großem Innovationspotential verfügt.

In Abschnitt 6.1 erfolgt zunächst eine Einführung in die Hintergründe der verwendeten, außergewöhnlich flexiblen Technik der hyperspektralen, zeitaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie. Darauf aufbauend wird die Aufgabenstellung zur Optimierung des Geräts und Entwicklung neuer Methoden, welche den vielfältigen Möglichkeiten dieser leistungsfähigen Technik Rechnung tragen, vorgestellt. Die erzielten, apparativen Fortschritte werden in Abschnitt 6.2 diskutiert. In Abschnitt 6.3 wird die Entwicklung einer neuartigen Methode zur Separation der Fluoreszenz mehrerer Farbstoffe unter Ausnutzung der spektralen Flexibilität der Technik erläutert, während in Abschnitt 6.4 Untersuchungen zur physiologisch relevanten Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein dargelegt werden.

## 6.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung biochemischer Prozesse ist aus der medizinischen Grundlagenforschung nicht mehr weg zu denken. Die Visualisierung fehlgeleiteter Proteinfaltungs- und Aggregationsprozesse, sowie die Beobachtung von Konzentrationsgradienten und vielfältiger Enzymreaktionen mit Hilfe spezieller Fluoreszenzfarbstoffe liefert die einzigartige Möglichkeit, lebenden Organismen buchstäblich beim Arbei-

ten zuzuschauen. Dazu sind allerdings im Mikrometerbereich orts aufgelöste Techniken, also der Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie, erforderlich.

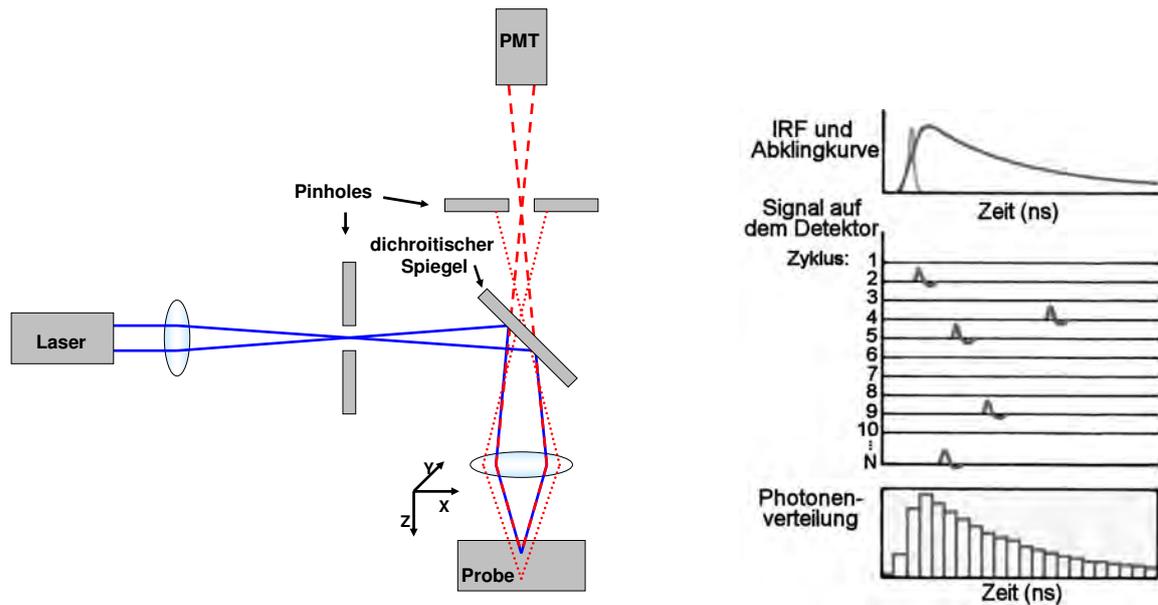
### 6.1.1 Das Prinzip von FLIM

Analog zur Laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie (LIF) wird in der *fluorescence lifetime imaging*-Mikroskopie (FLIM) die Fluoreszenz einer Probe nach Anregung mit einem kurzen Laserpuls analysiert. Das Mikroskop verfügt dank seiner konfokalen Optik zusätzlich über eine dreidimensionale Ortsauflösung, welche für die Analyse von Proteinwirkungsweisen in Zellen oder lebenden Organismen notwendig ist. Das Prinzip eines solchen konfokalen Lasermikroskops ist in Abbildung 6.1 dargestellt und kommt in fast allen kommerziell erhältlichen Geräten für FLIM-Messungen zum Einsatz. Für die Ortsauflösung wird der auf die Probe auftreffende Laserstrahl mit Hilfe einer rechnergesteuerten Spiegeloptik schnell über den zu untersuchenden Bereich der Probe gescannt. Anschließend wird die Fluoreszenz mit einem dichroitischen Spiegel vom Streulicht getrennt und auf einen Detektor geleitet. Die für eine konfokale Optik charakteristische Anordnung der beiden Pinholes sorgt für die Tiefenschärfe des Geräts, da nur Lichtstrahlen aus der fokalen Ebene der Probe das Pinhole passieren können.

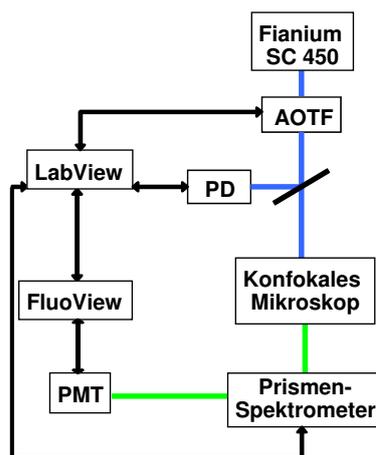
Zur Messung der orts aufgelösten Fluoreszenzlebenszeit wird auf die zeitkorrelierte Einzelpulszählung (*time correlated single photon counting*, TCSPC) zurückgegriffen. Hierbei misst der Detektor Einzelphotonen und registriert zudem ihren zeitlichen Abstand vom Anregungspuls. Nach mehreren Messzyklen ergibt sich auf diese Weise eine zeitliche Photonverteilung für jeden Punkt im vermessenen, dreidimensionalen Raum (siehe Abbildung 6.1 rechts), aus der die Fluoreszenzintensität durch Summation und die Lebenszeit durch Anpassung mit Entfaltung bestimmt werden können. Aufgrund der Sensitivität der Technik sind Messzeiten im Mikro- bis Millisekundenbereich pro Pixel ausreichend, um ein akzeptables Signal-Rausch-Verhältnis zu erzielen.

### 6.1.2 *hs-FLIM*

Das eng geknüpfte Netzwerk dynamischer, biochemischer Vorgänge durch gezieltes Markieren mit mehreren Farbstoffen zu entwirren, stellt eine der vielversprechendsten Zukunftsvisionen in der Fluoreszenzmikroskopie dar. Kommerziell erhältliche Geräte errei-



**Abbildung 6.1:** Prinzip eines konfokalen Lasermikroskops (links) und TCSPC (rechts, Bild aus der Literatur<sup>[8]</sup> nachbearbeitet).



**Abbildung 6.2:** Hyperspektrale FLIM-Apparatur.<sup>[57]</sup>

chen jedoch nur eine geringe spektrale Flexibilität und sind daher nicht in der Lage, das gegebene Parameterfeld optimal zu nutzen. In der Anregung wird zumeist auf eine Handvoll einzelner Wellenlängen zurück gegriffen; zur Variation der Emissionswellenlänge bieten dichroitische Filter nur eine moderate Selektion verschiedener Emissionsbereiche mit typischerweise 20 bis 50 nm Bandbreite. Insbesondere die verlässliche Rekonstruktion der Fluoreszenzanteile eines Farbstoffgemisches mit teilweise überlagernden Spektren stellt für die meisten FLI-Mikroskope ein nahezu unüberwindbares Hindernis dar.

Neuere Apparaturen verfügen daher über kontinuierliche Variabilität der Wellenlänge in der Anregung oder Emission. Zur Variation der Anregungswellenlänge kommen häufig zwei bis drei Diodenlaser zu Einsatz,<sup>[152]</sup> welche jedoch nur in den ca. 20 nm breiten Emissionsbereichen der Dioden akzeptable Lichtintensitäten produzieren. Besser eignen sich Superkontinuumlaser als Weißlichtquelle mit nahezu gleichbleibender Intensität über das gesamte, sichtbare Spektrum.<sup>[153]</sup> Einige Geräte setzen außerdem bereits auf Gitterspektrometer zur Selektion der Emissionswellenlänge.<sup>[154]</sup>

Um die Vorteile der oben genannten Ansätze zu kombinieren, wurde in der Laser Analytics Group der Universität Cambridge eine Apparatur entwickelt, welche die freie Wahl sowohl der Anregungs-, als auch der Emissionswellenlängen im sichtbaren Spektralbereich ermöglicht.<sup>[57]</sup> Diese Technik wird als hyperspektrale FLI-Mikroskopie (*hs-FLIM*) bezeichnet. Sie nutzt einen Superkontinuumlaser (Fianium SC450) mit nachgeschaltetem akusto-optischen Filter (AOTF) zur Auswahl von bis zu acht simultan nutzbaren Anregungswellenlängen zwischen 420 und 600 nm, sowie in der Detektion ein prismenbasiertes Spektrometer mit einem Emissionsbereich von 450 bis 750 nm. Die Details des Aufbaus sind in der Literatur ausführlich dargestellt.<sup>[57][155]</sup> Ein ähnlich flexibles Gerät ist bis dato nur von Paul French am Imperial College, London, vorgestellt worden.<sup>[153]</sup>

### 6.1.3 Aufgabenstellung

Die im Rahmen dieser Arbeit an der Universität Cambridge durchgeführten Arbeiten umfassen drei Teilgebiete:

- Die im vorigen Abschnitt vorgestellte Apparatur weist eine einzigartige spektrale Flexibilität auf, doch verfügt sie für die Vermessung rot fluoreszierender Farbstoffe über eine noch zu geringe Detektionseffizienz zwischen 550 und 690 nm. Dem entsprechend können rot fluoreszierende Farbstoffe, zu denen wichtige Marker wie TexasRed, mCherry und TOPRO 3 zählen, nur mit schlechten Signal-Rausch-Verhältnissen oder signifikantem Photobleaching untersucht werden. Daher soll zunächst die experimentelle Ursache hierfür gefunden und behoben werden.
- Mit dem optimierten System soll eine neue Methode zur simultanen Analyse und Rekonstruktion der Anteile mehrerer Farbstoffe mit überlappenden Fluoreszenzspek-

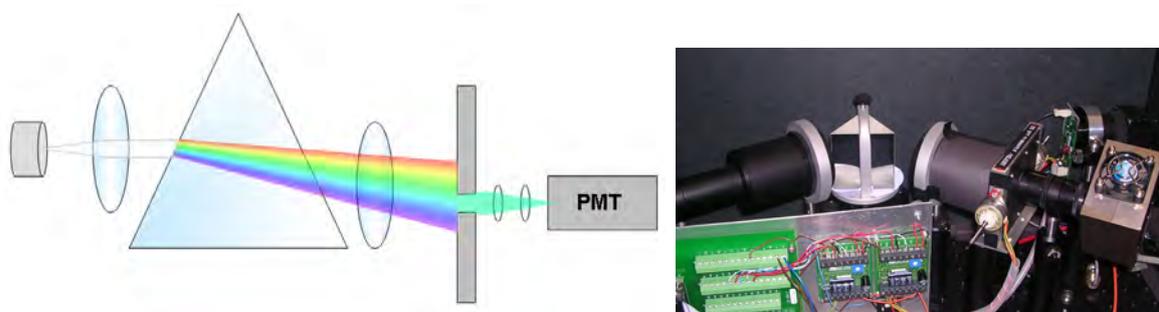
tren getestet werden. Auf diese Weise werden mehr Informationen über biochemische Vorgänge in einer einzigen Probe quasi-simultan zugänglich.

- Abschließend ist mit der Untersuchung der Aggregation des  $\alpha$ -Synucleins in neuronalen Zellen eine Anwendung des Systems auf biochemische Problemstellungen vorgesehen.

## 6.2 Apparative Optimierung

### Experimentelle Arbeiten

Um die Ursachen für die geringe Detektionseffizienz im roten Spektralbereich zu ermitteln, wurde der apparative Aufbau, insbesondere die Lichtwege der Anregung und Emission, genau untersucht. Die Analyse ergab, dass das Emissionssignal den Detektor bei einer Emission im roten Spektralbereich räumlich überstrahlt. Ursache ist eine geringfügige Veränderung des Lichtweges, welche durch die Verschiebung der variablen Spaltposition in den passenden Emissionsbereich zustande kommt. Zur Behebung ist eine stärkere Fokussierung des durch den Emissionsspalt des prismenbasierten Spektrometers austretenden Lichts auf den Detektor notwendig; diese wurde durch den Einbau einer weiteren Linse erreicht. Zusätzlich konnte das Signal-Rausch-Verhältnis durch die Verringerung von störendem Streulicht wesentlich verbessert werden. Hierzu wurden mehrere lichtdichte Gehäuse – eins für das Prismenspektrometer als Ganzes und einige für den Lichtweg im Spektrometer – konstruiert und eingebaut. Auf diese Weise konnte das Signal-Rausch-Verhältnis 20 nm vom Anregungslicht entfernt von ca. 500 auf über 1000 angehoben werden.



*Abbildung 6.3: Einbau einer weiteren Linse.*

## Bestimmung der Detektionseffizienz

Zur Quantifizierung der effizienteren Detektion roten Lichts durch die apparative Veränderung werden die Detektionseffizienzen des Mikroskops vor und nach dem Umbau in verschiedenen Wellenlängenbereichen bestimmt. Die Bestimmung der Detektionseffizienz erfolgt dabei relativ zu einem konventionellen Setup mit dichroitischen Filtern anstelle des Prismenspektrographen. Dichrotische Filter werden in vielen kommerziellen Geräten verwendet und ermöglichen eine apparativ unkomplizierte Selektion der Emissionswellenlänge; allerdings sind mit ihnen nur wenige, ausgewählte Wellenlängenbereiche von ca 20 bis 80 nm Breite zugänglich. Die Filtertypen und ihre Arbeitsbereiche sind in Tabelle 6.1 aufgeführt. Als Probe wird ein mit gelb-rot fluoreszentes Safranin eingefärbter Schnitt durch einen Maiglöckchenstängel (*convallaria*) verwendet.

Die Detektionseffizienz kann mit Hilfe zweier Verfahren aus den Messdaten extrahiert werden:

- Beim zeitaufgelösten Verfahren werden die Intensitäten für jeden Zeitpunkt über das komplette Kamerabild aufsummiert, und das Verhältnis der Signalintensität mit Spektrometer zu der mit Filter für jeden Zeitpunkt der Abklingkurve bestimmt (siehe Abbildung 6.4 links). Zwischen 5 und 20 ns ergibt sich ein Plateau, dessen Mittelwert der Detektionseffizienz relativ zum Filtersystem entspricht.
- Beim orts aufgelösten Verfahren werden die Intensitäten für jeden Kamerapixel über den kompletten Zeitbereich aufsummiert, und das Verhältnis der Signalintensität mit Spektrometer zu der mit Filter für jeden Datenpunkt des Bildes bestimmt (siehe Abbildung 6.4 rechts). Der Mittelwert liefert die Detektionseffizienz im Vergleich zum Filtersystem.

Filtertyp	$\lambda_{em}$ in nm	$\lambda_{em}$ in nm	$\lambda_{ex}$ in nm
CFP-YFP X	491 - 509	500	480
S 523/20	510 - 531	520	500
CFP-YFP M	523 - 566	544	513
BP 545-580	540 - 590	565	530
BA 610 IR	616 - 695	655	605

**Tabelle 6.1:** *Verwendete Filter mit Emissionsbereichen und Anregungswellenlänge.*

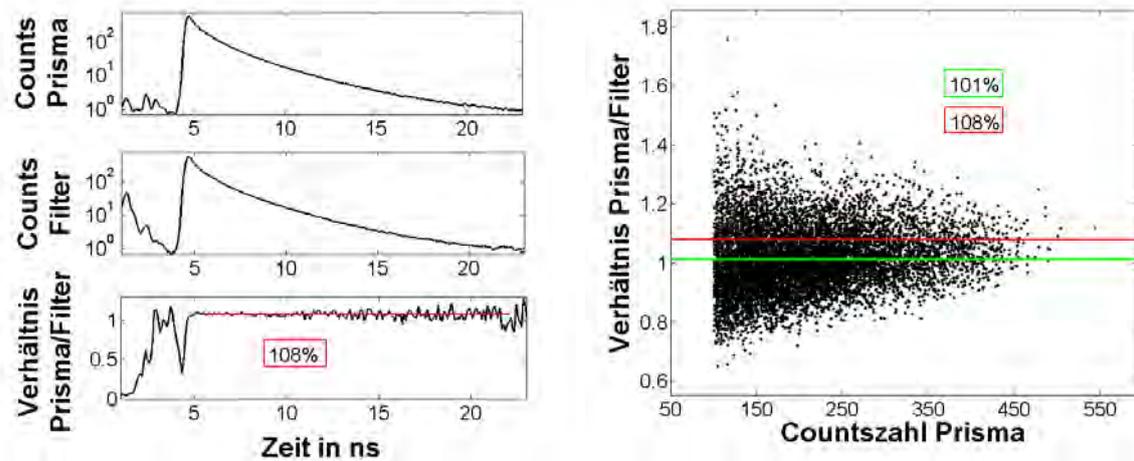


Abbildung 6.4: Bestimmung der Detektionseffizienzen.

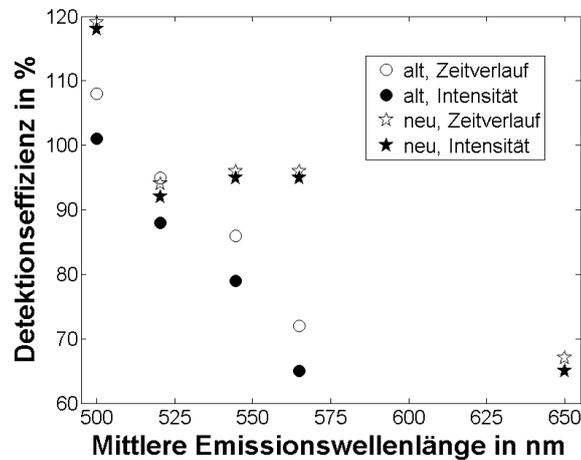


Abbildung 6.5: Vergleich der Detektionseffizienzen.

Die Ergebnisse für das alte und neue Setup sind in Abbildung 6.5 gegen die mittlere Wellenlänge des betrachteten Emissionsbereiches aufgetragen. Auffallend ist, dass für den alten Aufbau die Werte beider Verfahren um 5 bis 10 % voneinander abweichen. Offensichtlich ist bei der Filtermessung für das alte Setup eine signifikante Menge Streulicht auf den Detektor gelangt. Da das zeitaufgelöste Verfahren zwischen Streulicht und Emission unterscheiden kann, liefert es andere Werte als das orts aufgelöste Verfahren, welches Streuintensität einfach dem Fluoreszenzsignal zuschlägt.

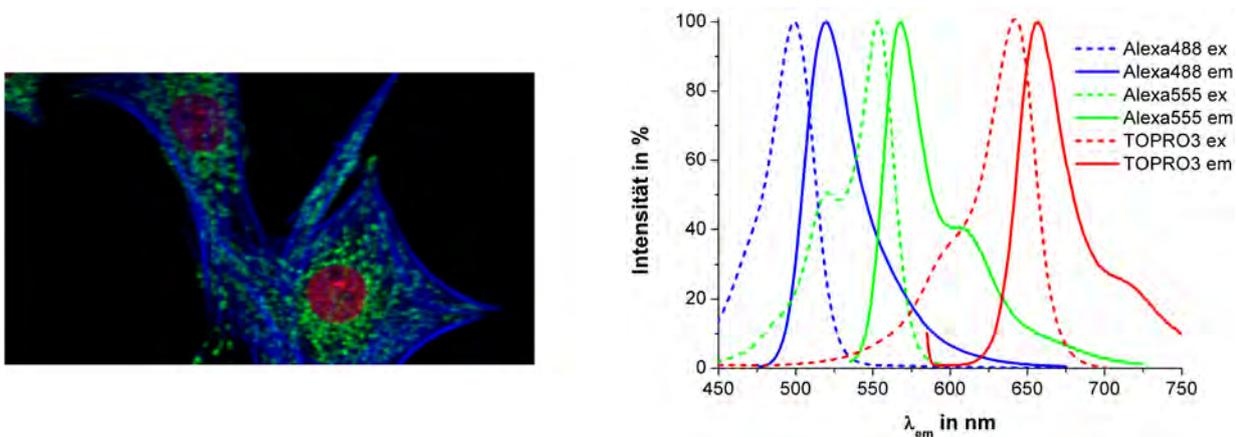
Für den neuen Aufbau liegen die Werte viel näher zusammen; durch den Einbau des lichtdichten Gehäuses konnte demnach der Streulichtanteil verringert werden. Insgesamt sind die aus den Zeitverläufen extrahierten Detektionseffizienzen vertrauenswürdiger als die Werte, die sich aus den orts aufgelösten Signalintensitäten ergaben.

Die bestimmten Detektionseffizienzen zeigen deutlich, dass der Einbau der Linse das Problem behoben hat. Für das alte Setup fallen die Werte von ca 100% bei 500 nm schnell auf 65% bei 570 nm, und sogar auf nahezu 0 bei 650 nm ab. Für das neue Setup sind die Effizienzen dagegen insbesondere bei höheren Wellenlänge deutlich besser: Aufgrund der schlechten UV-Durchlässigkeit der dichroitischen Filter liegen sie unterhalb von 500 nm bei über 100 %, zwischen 500 und 600 nm noch bei etwa 95 %. Erst bei 650 nm ist die Detektionseffizienz auf 68 % gefallen. Damit sollte selbst die weit rotverschobene Emission von TOPRO 3, mit einem Emissionsmaximum von 655 nm, noch für das System zugänglich sein.

### Testmessungen mit TOPRO 3

Anschließende Testmessungen sollen zeigen, dass sich das verbesserte System für die Untersuchung von TOPRO 3 eignet. Dazu wurden mit Alexa 488, Alexa 555 und TOPRO 3 eingefärbte Säugerzellen (*Invitrogen*, FluoCells® prepared slide #6, Katalog Nr. F-36925) unter dem Mikroskop untersucht. Dabei wurden die drei Farbstoffe selektiv angeregt und die Emissionen einzeln analysiert. Abbildung 6.6 zeigt die Signale der Fibrillen (Alexa 488, blau), Mitochondrien (Alexa 555, grün) und Kerne (TOPRO 3, rot).

Durch die hier beschriebenen apparativen Verbesserungen ist das *hs-FLI*-Mikroskop in der Lage, auch Emissionswellenlängen zwischen 550 und 700 nm mit akzeptablen Detektionseffizienzen zu detektieren. Somit konnte durch die apparativen Verbesserungen ein deutlich größerer spektraler Bereich erschlossen werden.



**Abbildung 6.6:** Dreifach gefärbte Säugerzellen unter dem *hs-FLI*-Mikroskop und die zugehörigen Farbstoffspektren.

## 6.3 Separation von Fluorophorbeiträgen

In diesem Abschnitt wird ein Verfahren vorgestellt, welches die Entflechtung einzelner Fluorophorbeiträge mit sehr ähnlichen Emissionspektren ermöglichen soll. Vermeer *et al.* erkannten im Jahr 2000, dass die ursprünglich in der Phasenmodulation (Frequenzdomäne) bekannten Parameter A und B zur globalen Datenanalyse für FLIM-Messungen in der Zeitdomäne genutzt werden können.<sup>[156]</sup> Diese Parameter berechnen sich allgemein nach Gleichung 6.1.

$$A(\lambda) = \frac{\sum_t F(t) \sin(\omega t)}{\sum_t F(t)} \quad ; \quad B(\lambda) = \frac{\sum_t F(t) \cos(\omega t)}{\sum_t F(t)} \quad (6.1)$$

$F(t)$ : Fluoreszenzintensität  
 $\omega$  : Kreisfrequenz  
 $t$  : Zeit

Um A und B in der Zeitdomäne berechnen zu können, wird als Frequenz die Repetitionsrate des Gerätes, hier 80 MHz, verwendet. Anschließend kann für jeden Pixel eines FLIM-Datenbildes ein Datenpaar A, B ohne vorherige Kenntnisse über die vermessene Probe nach Gleichung 6.1 aus der zeitlichen Fluoreszenzabklingkurve ermittelt werden. Die auf diese Weise bestimmten Parameter A und B erlauben die Ermittlung der Lebenszeiten und des Anteils der einzelnen Fluorophore an der Gesamtintensität. Grundlage dafür liefert Gleichung 6.2.

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^n \frac{f_i(\lambda) \omega \tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2} \quad ; \quad B(\lambda) = \sum_{i=1}^n \frac{f_i(\lambda)}{1 + \omega^2 \tau_i^2} \quad (6.2)$$

$f_i$ : Fluoreszenzanteil des  $i$ -ten Fluorophors  
 $\omega$ : Kreisfrequenz  
 $\tau_i$ : Lebenszeit des  $i$ -ten Fluorophors

Bei einer Mischung aus zwei Farbstoffen sind die Parameter A und B von den zugehörigen Fluoreszenzanteilen  $f_i$ , welche wegen der verschiedenen Anregungsspektren mit der Anregungswellenlänge variieren, abhängig. Örtlich verschiedene Konzentrationen führen zu einer Veränderung der Werte je nach Pixelposition p. Für die Farbstoffmischung ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen A und B gemäß Gleichung 6.3:

$$A_p(\lambda) = u + v \cdot B_p(\lambda) \quad ; \quad \tau_{1,2} = \frac{1 \pm \sqrt{1 - 4u(u+v)}}{2\omega u} \quad (6.3)$$

*u*: Achsenabschnitt

*v*: Steigung

Eine Auftragung von A gegen B (AB-Diagramm, siehe Abbildung 6.8) für alle Pixelpositionen und Anregungswellenlängen ermöglicht die akkurate Bestimmung der enthaltenen Lebenszeiten durch lineare Regression eines extrem großen Datensatzes. Diese Methode wurde in der Vergangenheit bereits zur Rekonstruktion von durch Quenching oder FRET beeinflussten Lebenszeiten genutzt, allerdings nur unter Verwendung von Farbstoffpaarungen mit sehr unterschiedlichen Emissionsspektren.<sup>[157–159]</sup> Weiterhin wurden meist nur zwei bis vier verschiedene Anregungswellenlängen eingesetzt.

In dieser Arbeit soll die Methode erstmals an stark überlappenden Farbstoffen getestet werden, wobei die einzigartige Flexibilität des hs-FLIM-Systems die Verwendung der für die jeweiligen Farbstoffkombinationen günstigsten Anregungswellenlängen erlaubt. Zur Bestimmung der Güte werden die Anregungsspektren der einzelnen Farbstoffe rekonstruiert und mit der Literatur verglichen. Anschließend soll das Potential der Methode zur Separation der Fluoreszenzanteile und Rekonstruktion der Fluorophorverteilungen in lebenden Zellen unter Beweis gestellt werden.

### 6.3.1 Voruntersuchungen mit Farbstoffen

Die Methode soll zunächst an Mischungen aus Rhodamin 6G, Rhodamin B und Rose Bengal in Ethanol getestet werden. Diese drei Farbstoffe weisen stark überlappende Anregungs- und Emissionsspektren auf, und ihre Fluoreszenzanteile können trotz der verschiedenen Lebenszeiten mit konventionellen Methoden kaum separiert werden. Alle drei Farbstoffe wurden in ethanolischer Lösung als Reinstoff unter Anregung im Absorptionsmaximum vermessen. Die für alle Kamerapixel ermittelten Parameter der reinen Farbstoffe liegen, wie in Abbildung 6.7 zu sehen, auf dem monoexponentielle Zerfälle anzeigenden Halbkreis des Diagramms nahe den Literaturwerten von 3.90, 2.59 und 0.81 ns.<sup>[160–162]</sup>

Bei der Vermessung einer Mischung von Rhodamin 6G und Rose Bengal bei verschiedenen Anregungswellenlängen liegen die Punkte im AB-Diagramm auf einer geraden Linie zwischen den Signalen der reinen Substanzen. Dabei spielt das Mischungsverhältnis eine

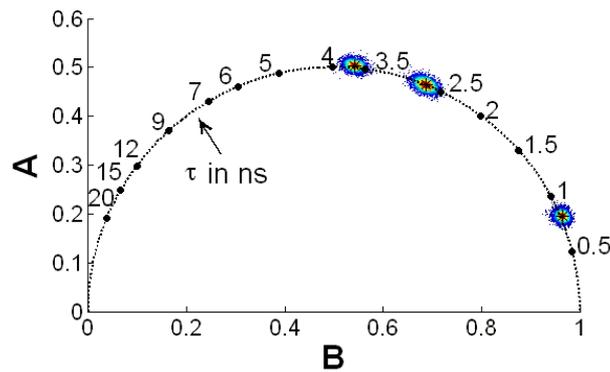


Abbildung 6.7: AB-Auftragung der reinen Farbstoffe.

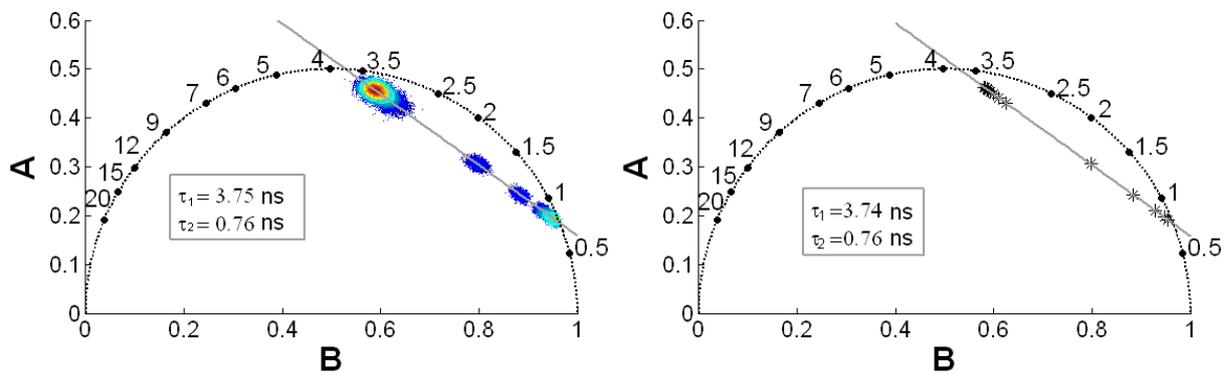
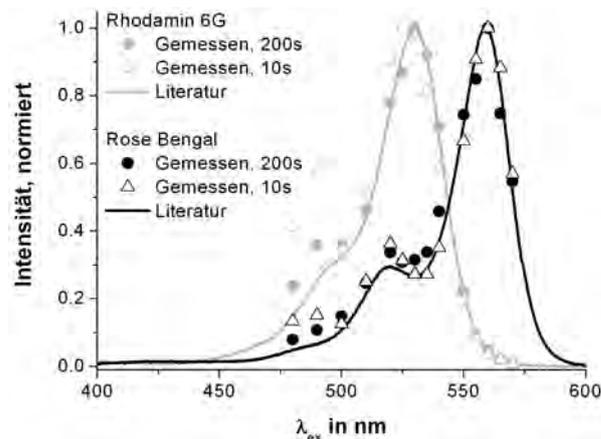


Abbildung 6.8: Anpassung aller Punkte (links) bzw. der Mittelwerte (rechts).

untergeordnete Rolle, solange beide Farbstoffe einen signifikanten Beitrag zur Fluoreszenz liefern. Eine lineare Regression liefert die Lebenszeiten der beiden Farbstoffe. Dabei hat sich für die Auftragung eine Mittelung der AB-Werte über alle Kamerapixel bei einer Anregungswellenlänge bewährt.

Mit den erhaltenen Daten lassen sich nun die Fluoreszenzanteile der Fluorophore bei verschiedenen Anregungswellenlängen, und damit die Anregungsspektren der Farbstoffe rekonstruieren. Abbildung 6.9 verdeutlicht dies für eine Mischung aus Rhodamin 6G und Rose Bengal. Auch für die anderen beiden Kombinationen funktioniert das Verfahren, obwohl die Lebenszeiten sich dort stärker ähneln und damit schwerer unterscheidbar sind. Die in Tabelle 6.2 aufgelisteten Lebenszeiten der vermessenen Farbstoffkombinationen im Vergleich zu den Literaturwerten<sup>[160–162]</sup> der reinen Substanzen in Ethanol belegen die quantitative Güte der Vorgehensweise; die zugehörigen AB-Diagramme finden sich im Anhang. Selbst sehr kurze Integrationszeiten von  $150 \mu\text{s}$  pro Pixel liefern bereits gute Werte für die Lebenszeiten der Fluorophore, allerdings wird bei geringen Signalintensi-



**Abbildung 6.9:** Rekonstruierte Anregungsspektren; Vergleich mit Literatur.<sup>[163,164]</sup>

2. Farbstoff	$\tau_{Rhodamin\ 6G}$ in ns	$\tau_{Rhodamin\ B}$ in ns	$\tau_{Rose\ Bengal}$ in ns	$\tau_{Lit}$ <sup>[160–162]</sup>
Rhodamin 6G	3.78	2.53	0.74	3.90
Rhodamin B	3.67	2.66	0.78	2.59
Rose Bengal	3.74	2.68	0.80	0.81

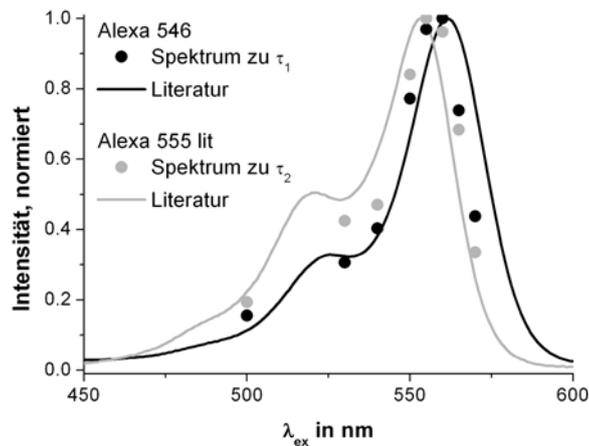
**Tabelle 6.2:** Lebenszeiten, die Diagonale zeigt die der reinen Farbstoffe.

täten der Anteil der großen Lebenszeitkomponente überbewertet. Dieses Problem tritt häufig bei Lebenszeitmessungen in der Zeitdomäne auf und resultiert aus einem als Teil der Abklingkurve interpretierten Offset. Eine Integrationszeit von 3 ms pro Pixel dagegen zeigt sowohl exzellente Lebenszeiten als auch eine hervorragende Rekonstruktion der zugehörigen Anregungsspektren.

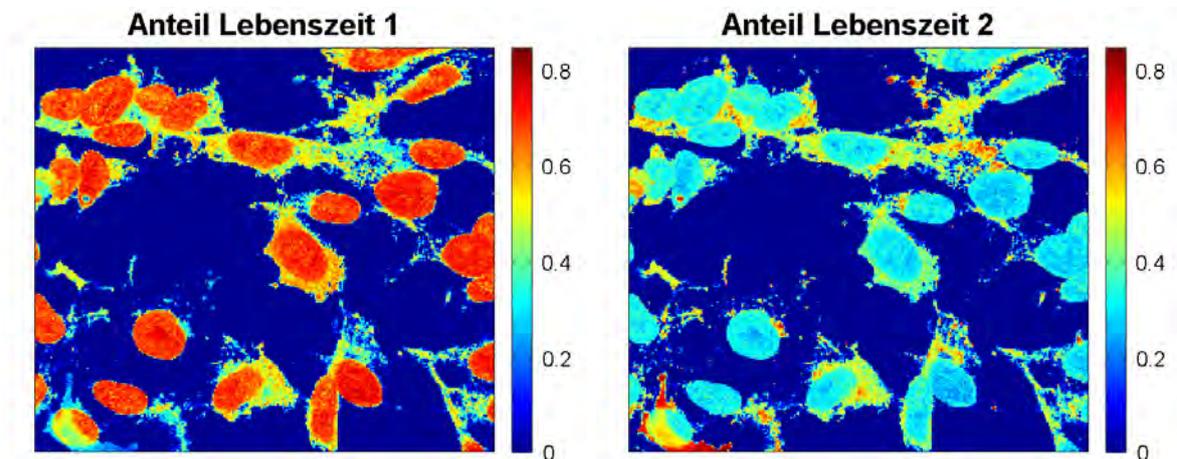
### 6.3.2 Fluorophorverteilung in lebenden Zellen

Die Anwendbarkeit des Verfahrens zur Bestimmung der Fluorophorverteilung wurde in lebenden Zellen getestet. Hierfür wurden neuronale Zellen mit den Farbstoffen Alexa 546 und Alexa 555, gebunden an die Antikörper laminin IgG und Map 2 IgG, versehen. Diese beiden Farbstoffe sind mit konventionellen FLIM-Geräten spektral nahezu ununterscheidbar. Anschließend wurden die Zellen in hs-FLIM-Mikroskop mit verschiedenen Anregungswellenlängen im Bereich von 520 bis 580 nm vermessen.

Die AB-Diagramme liefern für Alexa 546 eine Lebenszeit von 3.04 ns, und für Alexa 555 eine von 1.20 ns. Diese Werte unterscheiden sich zwar von den Literaturwerten für die reinen Farbstoffe in Wasser mit 3.9 und 0.3 ns, liegen aber in einem für analoge biochemische Systeme üblichen Parameterfeld.<sup>[165,166]</sup> Abbildung 6.10 vergleicht die aus hs-FLIM-



**Abbildung 6.10:** Rekonstruierte Anregungsspektren der Farbstoffe Alexa 546 und Alexa 555 im Vergleich zur Literatur.<sup>[165,166]</sup>



**Abbildung 6.11:** Fluoreszenzanteile der langen und kurzen Lebenszeit in den Zellen.

Messungen rekonstruierten Anregungsspektren mit der Literatur. Im Hinblick auf die Ähnlichkeit der Anregungsbereiche konnten die Anteile der Farbstoffe sehr gut separiert werden.

Mit diesen Informationen kann die Verteilung der beiden Farbstoffe in den Zellen orts aufgelöst bestimmt werden. Entsprechend den Bindungseigenschaften der verwendeten Antikörper sollte Alexa 546 hauptsächlich im Zellkern, Alexa 555 dagegen im umgebenden Cytoplasma zu finden sein. In Abbildung 6.11 ist erwartungsgemäß deutlich zu erkennen, dass sich der Farbstoff mit der längeren Lebenszeit (Alexa 546) im Zellkern anreichert, während der Farbstoff mit der kürzeren Lebenszeit (Alexa 555) vorwiegend im Cytoplasma vorliegt. Diese Tatsache untermauert die Glaubwürdigkeit der erhaltenen Ergebnisse.

### 6.3.3 Diskussion

Mit Hilfe der einzigartigen Flexibilität des *hs-FLIM*-Aufbaus konnte die örtliche Verteilung zweier Fluorophore mit sehr ähnlichen Spektren in lebenden Zellen bestimmt werden. Zur Auswertung wurde eine globale Analyse der aus den Messdaten bestimmten Wertepaare in einem AB-Diagramm genutzt. Im Gegensatz zu bisherigen Verfahren sind hierzu keine Vorabinformationen bezüglich der Lebenszeiten und Anregungsspektren nötig. Statt dessen wurden die real vorliegenden Lebenszeiten, welche sich insbesondere *in vivo* häufig stark von denen *in vitro* unterscheiden, durch globale Analyse bestimmt und direkt verwendet. Aus diesem Grund ist die vorliegende Methode hervorragend in der Lage, die oft unbekannt und schwer zu quantifizierenden Umgebungsbedingungen der Fluorophore zu berücksichtigen. Sie ermöglicht zudem den Einsatz verschiedenster Farbstoffkombinationen zur biochemischen Markierung. Die hier präsentierten Ergebnisse sind bereits Veröffentlichung worden.<sup>[167]</sup>

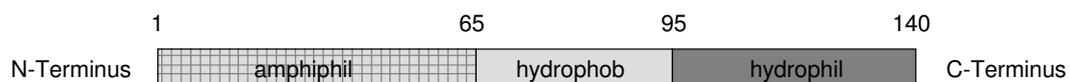
## 6.4 Aggregation von $\alpha$ -Synuclein

In diesem Abschnitt wird eine neue Methode zur *in-vivo*-Untersuchung der Parkinson verursachenden Aggregation des  $\alpha$ -Synucleins (AS) vorgestellt.  $\alpha$ -Synuclein ist ein kleines, präsynaptisches Protein, welches eine Schlüsselfunktion in der Entstehung von Parkinson spielt.<sup>[168][169][170][171]</sup> Die Lewy-Körperchen, für Parkinson typische Ablagerungen in neuronalen Zellen, bestehen zu einem Großteil aus Einschlüssen von aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein.<sup>[172]</sup> Dabei bildet es die für amyloide Proteine charakteristischen Fibrillen aus,<sup>[173][174]</sup> deren oligomeren Vorläufer im Verdacht stehen, hochgradig neurotoxisch zu wirken.<sup>[175][42][176]</sup>

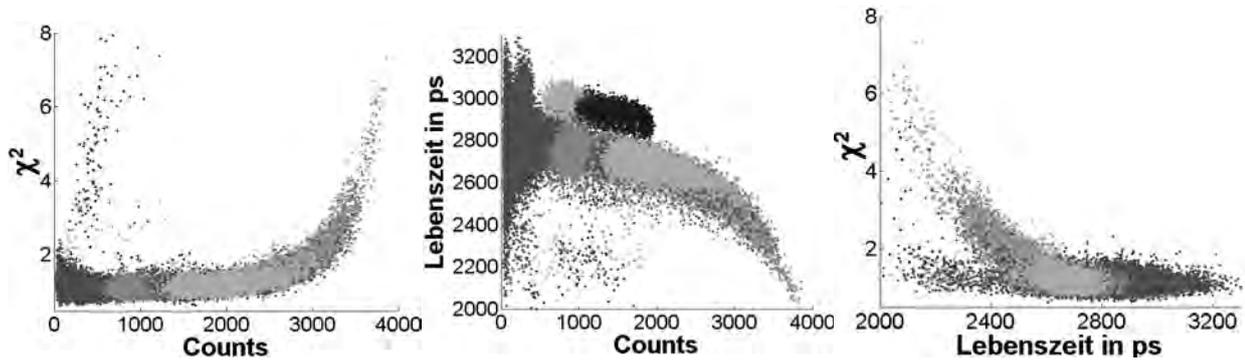
Die Sequenz des  $\alpha$ -Synucleins lässt sich im Wesentlichen in drei Abschnitte unterteilen (siehe Abbildung 6.12):

- Die amphiphile Domäne (1-64) unterstützt Wechselwirkungen mit Membranen.
- Die hydrophobe Domäne (65-94) verursacht Aggregationsprozesse und führt zur Bildung amyloider Fibrillen.
- Die hydrophile Domäne (95-140) trägt wesentlich zur Löslichkeit des Proteins in Wasser bei.

Um die Aggregation des Proteins mit FLIM beobachten zu können, wird es am C-Terminus, welcher weder bei Aggregations- noch bei Membranbindungsprozessen eine wesentliche Rolle spielt, mit dem *yellow fluorescent protein* YFP versehen (AS-YFP). YFP wurde kleineren Fluorophoren vorgezogen, da ein mit YFP markiertes Protein direkt in lebenden Organismen exprimiert werden kann.<sup>[177]</sup> Voruntersuchungen *in vitro* sollen klären, ob AS-YFP ebenfalls aggregiert, und ob dabei eine signifikante Veränderung der Lebenszeit des YFP auftritt. Im Falle einer signifikanten Lebenszeitveränderung wird das Verfahren auf lebende Zellen, potentiell auch auf lebende Organismen angewendet. Als Referenzsubstanzen dienen zum Einen ungebundenes YFP, zum Anderen mit YFP



**Abbildung 6.12:** Sequenz von  $\alpha$ -Synuclein.



**Abbildung 6.13:** Zusammenhänge zwischen Intensität, Lebenszeit und  $\chi^2$ .

versehenes  $\beta$ -Synuclein (BS-YFP). Letzteres ist dem  $\alpha$ -Synuclein sehr ähnlich; es verfügt jedoch nicht über eine ausgeprägte, hydrophobe Domäne und weist daher geringere Aggregationstendenzen auf.

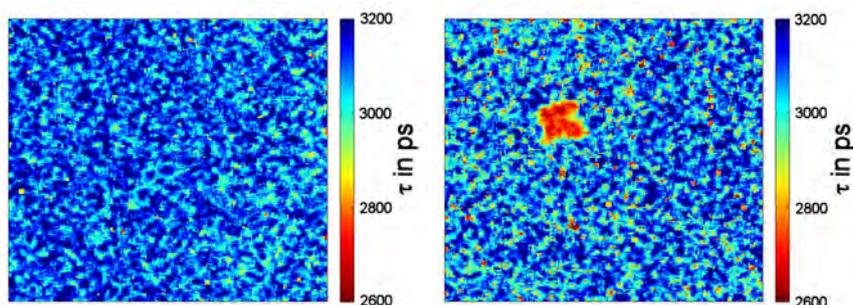
### Experimentelles

Die aufgenommenen Rohdatenbilder weisen häufig kleine Gebiete sehr hoher Intensität auf. Treffen mehr als ein Photon pro Auslesezyklus auf den TCSPC-Detektor, so wird nur das jeweils erste eintreffende Photon gezählt und daher insgesamt eine zu kurze Lebenszeit gemessen. Um diesen als *pile up* bekannten Effekt auszuschließen, muss zunächst eine Obergrenze für die Countszahl pro Pixel und Zeiteinheit ermittelt werden. Dazu werden Lebenszeit, Countszahl und  $\chi^2$  miteinander verglichen. Der *pile up*-Effekt äußert sich darin, dass unabhängig von der zugehörigen Lebenszeit die Güte einer monoexponentiellen Anpassung oberhalb von 2000 Counts pro Minute stark abnimmt (Abbildung 6.13 links). Alle verwerteten Daten haben daher Intensitäten von unter 2000 Counts pro Pixel und Minute.

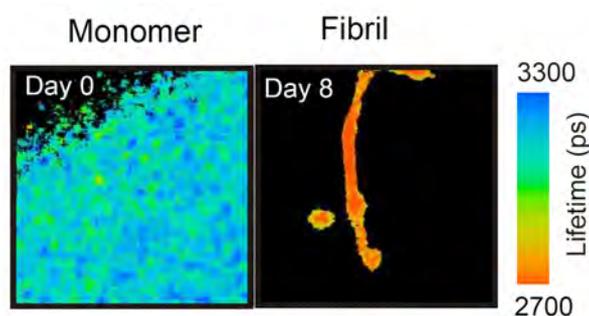
### Aggregation *in vitro*

Zunächst wird untersucht, ob bei einer Aggregation von AS-YFP *in vitro* eine signifikante Lebenszeitveränderung beobachtet werden kann. Hierfür wird AS-YFP über 4 Tage inkubiert. In diesem Zeitraum sollte sich laut Literatur ein signifikanter Anteil der Proteine zusammenlagern.<sup>[177]</sup>

In Abbildung 6.14 sind die Lebenszeitverteilungen von AS-YFP zu Beginn der Inkubation und nach vier Tagen dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass sich die Lebenszeit von



**Abbildung 6.14:** AS-YFP ohne Inkubation (links) und Aggregate nach 4 Tagen Inkubation (rechts).



**Abbildung 6.15:** AS-YFP-Fibrille nach acht Tagen Inkubation, von G. Kaminski-Schierle.<sup>[178]</sup>

in diesem Zeitraum gebildeten AS-YFP-Anhäufungen mit etwa 2700 ps stark von der des Monomers mit Werten um die 3100 ps unterscheidet. Eine amyloide Fibrillbildung konnte unter den gegebenen Bedingungen aber nicht beobachtet werden. Auf dieser Arbeit aufbauende Versuche von G. Kaminski-Schierle<sup>[178]</sup> haben jedoch gezeigt, dass sich bei einer längeren Inkubationszeit von acht Tagen tatsächlich Fibrillen mit einem analogen Lebenszeitkontrast ausbilden.

Experimente mit YFP und BS-YFP zeigen keine Veränderung der Lebenszeit, da die beiden Referenzen weder Aggregate noch Fibrillen ausbildeten. Somit sind AS-YFP-Monomere und Aggregate *in vitro* über ihre Lebenszeit ortsaufgelöst unterscheidbar.

### Aggregation *in vivo*

Zur Untersuchung der Aggregation *in vivo* wird AS-YFP per Elektroporation in humane Neuroblasten des Typs SH-SY5Y eingebracht. Nach zwei Tagen Inkubation werden die Zellen unter dem hs-FLI-Mikroskop untersucht. Die Fluoreszenzintensitätsverteilungen zeigen, dass AS-YFP im Wesentlichen in drei verschiedenen Spezies auftritt:

- Als Anhäufungen im Cytoplasma (Abbildung 6.16 links).

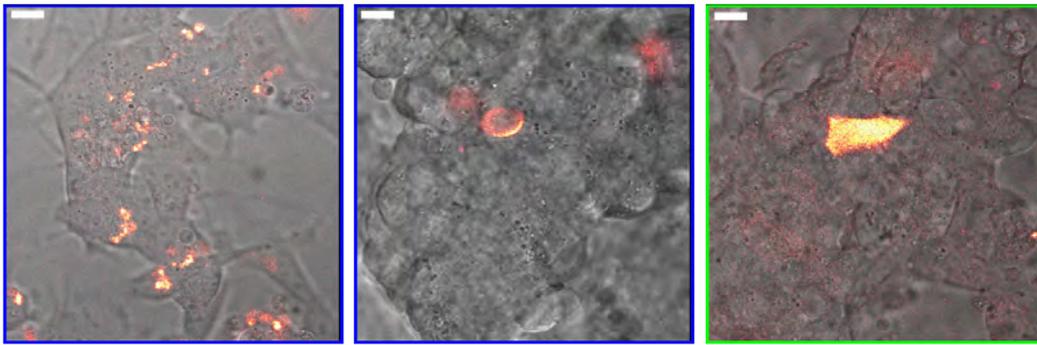
- Lokalisiert an der Plasmamembran (Abbildung 6.16 mitte).
- Gleichverteilt im Cytoplasma (Abbildung 6.16 rechts).

Die Betrachtung der Lebenszeiten in Abbildung 6.17 zeigt, dass im Cytoplasma gleichverteiltes AS-YFP über eine Lebenszeit von 3000 ps (grün) verfügt, während in den Anhäufungen im Cytoplasma und an der Zellmembran mittlere Lebenszeiten von 2750 ps (blau) auftreten. Die längere Lebenszeit von 3000 ps wird den Monomeren zugeordnet, die somit *in vivo* eine vergleichbare, wenn auch etwas geringere Lebenszeit aufweisen als *in vitro*. Bekannt ist, dass der veränderte Brechungsindex der zellulären Umgebung die Lebenszeit des *Green Fluorescent Protein* (GFP) abzusenken vermag,<sup>[179]</sup> so dass ein analoges Verhalten des YFPs sehr wahrscheinlich ist.

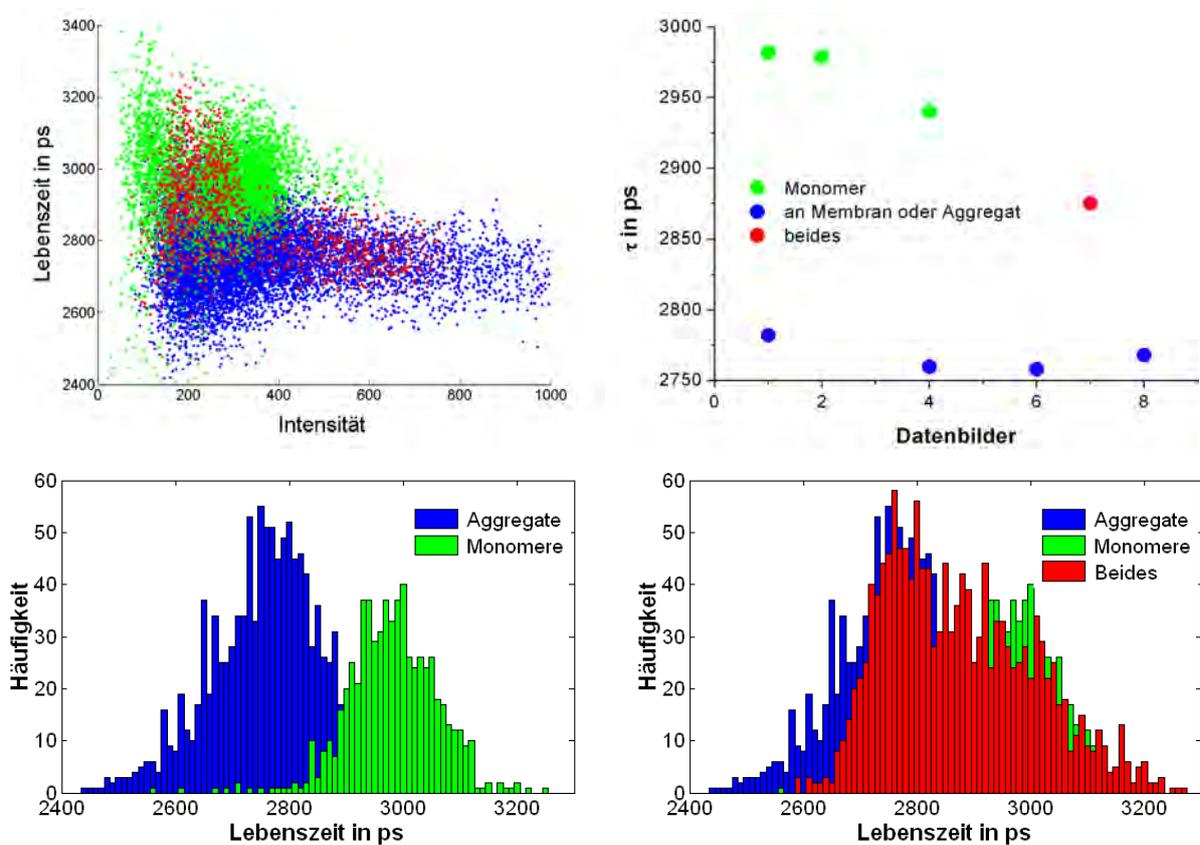
AS-YFP, welches sich entweder an der Zellmembran anlagert oder im Cytoplasma aggregiert, wies dagegen mittlere Lebenszeiten von 2750 ps auf und ist somit von monomeren Formen des Proteins gut zu unterscheiden. Da AS seine biochemische Funktion in der Faltung von SNARE-Proteinen<sup>[180]</sup> durch eine Interaktion mit Lipidmembranen, zumeist lipiden Vesikeln, wahrnimmt, ist die hier vorgestellte Visualisierung und Charakterisierung der Anlagerung von AS an den Membranen von hoher Forschungsrelevanz; zumal in der Literatur bisher nur Membrananlagerungen von AS mit GFP in Hefezellen beobachtet werden konnten.<sup>[175]</sup>

Ein messtechnisches Problem stellten die lokal sehr unterschiedlichen AS-YFP-Konzentrationen dar. Die Aggregate im Cytoplasma und die Anhäufungen an der Zellmembran wiesen eine sehr viel größere Fluorophordichte und somit Fluoreszenzintensität pro Kamerapixel auf, als das im Cytoplasma verteilte AS-YFP-Monomer. Der Versuch, Monomer und Aggregate gleichzeitig zu detektieren, und damit zu zeigen, dass die Lebenszeiten der AS-YFP-Spezies nicht von den Messeinstellungen abhängen, führte häufig zu *pile up*. Daher wurden alle Daten vor ihrer Verwendung der in Abschnitt 6.4 beschriebenen Analyseprozedur zur Identifizierung verfälschter Lebenszeiten unterzogen.

Um trotzdem ein Bild aufzunehmen, welches sowohl eine Zelle mit Monomer als auch eine Zelle mit an der Membran assoziiertem AS-YFP zeigt, wurde auf eine mit Monomer gefüllte Zelle fokussiert und das Signal einer Zelle mit an der Membran angelagertem AS-YFP aus einem Bereich außerhalb der fokalen Ebene detektiert. Dadurch wird die im Vergleich zum Monomer zu hohe Signalintensität abgesenkt und so *pile up* vermieden. Die Lebens-



**Abbildung 6.16:** Fluoreszenz (gelb-rot) von AS-YFP und Transmission (grau) der Zellen. Der weiße Balken entspricht 10  $\mu$ m.



**Abbildung 6.17:** Lebenszeiten von AS-YFP gegen die Intensität pro Pixel (oben links) und gemittelt (oben rechts). Lebenszeithistogramme unten

zeiten in den einzelnen Kamerapixeln sind in Abbildung 6.17 rot dargestellt und belegen das Vorkommen zweier distinkter Spezies mit den bereits beschriebenen Lebenszeiten.

Untersuchungen am BS-YFP als Referenz zeigten, dass dieses Protein zwar ebenfalls Monomere im Cytoplasma und Membranablagerungen mit vergleichbaren Lebenszeiten (3020

und 2780 ps) zu denen des AS-YFPs aufweist, aber keine Aggregate im Cytoplasma bildet. Dies entspricht der Tatsache, dass BS-YFP über keine ausgeprägte, hydrophobe Domäne zur Aggregatbildung, wohl aber über eine amphiphile Domäne zur Membranassoziation verfügt, und stimmt mit Forschungsergebnissen an Hefezellen überein.<sup>[181]</sup> YFP konnte nicht als Referenz verwendet werden, da per Elektroporation nur unzureichende Mengen in die Zellen gelangten.

## Diskussion

Die Beobachtung der Aggregation von YFP-markiertem  $\alpha$ -Synuclein gelang dank einer signifikanten Lebenszeitverringerung, welche sowohl bei Aggregaten und Fibrillen *in vitro* als auch in verschiedenen Strukturen in neuronalen Zellen auftritt. Referenzmessungen mit BS-YFP zeigten, dass die punktuellen Anhäufungen im Cytoplasma für AS-YFP charakteristisch, und somit auf seine Aggregationsfähigkeit zurück zu führen sind. Auch die physiologisch interessante Anlagerung von AS-YFP an den Zellmembranen kann auf diese Weise verfolgt werden.

Aufbauend auf diesen Ergebnisse wurden von der Laser Analytics Group in Cambridge in Kooperation mit Gruppen der Universität und der Medizinischen Hochschule Groningen bereits weitere Untersuchungen vorgenommen und zur Publikation eingereicht.<sup>[178]</sup> Expression von AS-YFP, BS-YFP und YFP im transparenten und als Modellsystem geeigneten Fadenwurm *C. Elegans* ermöglichte die Beobachtung des Aggregationsprozesses in lebenden Organismen über viele Tage hinweg. Dabei zeigte sich, dass die Lebenszeiten der Aggregate mit zunehmender Größe immer weiter abnehmen. Der Ansatz konnte sogar auf ein Modell für das ähnlich funktionierende Huntington-Syndrom übertragen werden: Das Polyglutamin Q40 wurde dazu mit YFP markiert und der entsprechende Aggregationsprozess in *C. Elegans* anhand einer analogen Verringerung der Lebenszeit beobachtet.

Für die Zukunft sind Tests mit potentiellen Inhibitoren für beide Aggregationsprozesse geplant, welche die Aggregatbildung verhindern und so die Funktionsfähigkeit der Zellen erhalten sollen. Auf diese Weise kann die vorgestellte Methode in Zukunft dem Screening potentieller Medikamente für Huntington und Parkinson dienen.

## 6.5 Zusammenfassung

hs-FLIM stellt eine leistungsfähige und flexible, mehrdimensionale Fluoreszenztechnik zur Untersuchung biochemischer Prozesse *in vitro* und *in vivo* dar. Dank der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen, apparativen Verbesserungen ist das an der Universität Cambridge konstruierte Gerät nun auch im roten Spektralbereich effizient und ohne Photobleaching einsetzbar. Dadurch erschließen sich nun auch Methoden, welche eine große spektrale Bandbreite benötigen, z.B. die simultane Verwendung mehrerer Farbstoffe, oder FRET-Experimente.

Die Flexibilität des hs-FLIM-Aufbaus ermöglichte erstmals die Rekonstruktion von Fluoreszenzanteilen und -spektren stark überlappender Farbstoffe *in vitro* und in lebenden, neuronalen Zellen. Dabei kommt die Methode der globalen Analyse mit AB-Auftragung ohne *a priori*-Vorgaben aus, und berücksichtigt zudem die in biologischen Systemen oft durch FRET, Quenching und variierende Brechungsindices abweichenden Lebenszeiten. Dies ist ein wichtiger Schritt im Hinblick auf die Analyse von Multifluorophorsystemen. In der Zukunft sind Messungen mit drei und mehr Farbstoffen geplant, welche als Sensoren zur statistischen Gewebeanalyse auf Krebs und andere krankhafte Veränderungen dienen. Die Beobachtung der Aggregation von YFP-markiertem  $\alpha$ -Synuclein gelang dank einer signifikanten Lebenszeitverringerung, welche sowohl bei Aggregaten und Fibrillen *in vitro* als auch in verschiedenen Strukturen in neuronalen Zellen auftritt. Auch die physiologisch interessante Anlagerung von AS-YFP an den Zellmembranen kann auf diese Weise verfolgt werden. Auf dieser Arbeit aufbauende Studien nutzen die beschriebene Methode zur Untersuchung der Aggregation in lebenden Fadenwürmern über viele Tage hinweg. Auch eine für das Huntington-Syndrom charakteristische Aggregation konnte nach diesem Prinzip, durch mit YFP markiertem Polyglutamin, in *C. Elegans* verfolgt werden. Damit ist der Weg geebnet für zukünftige Untersuchungen mit potentiellen Inhibitoren der Aggregationsprozesse, welche wichtige Hinweise auf die Grundcharakteristika möglicher Parkinson- und Huntingtonmedikamente liefern können.

*Denn er lässt seine Sonne aufgehen über Böse und Gute  
und lässt regnen über Gerechte und Ungerechte.*

*Matthäus Kapitel 5 Vers 45*

# 7 Photophysik der Benzodiazaborole

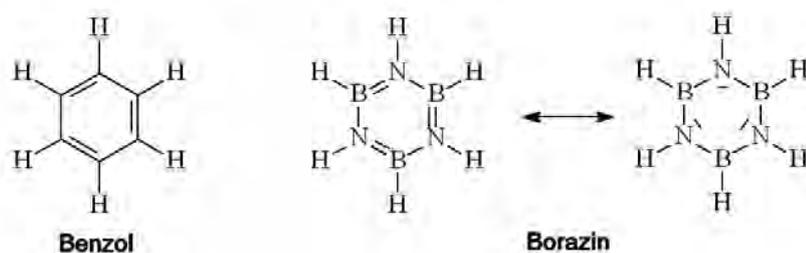
Im Arbeitskreis Anorganische Chemie II von Professor Dr. Lothar Weber an der Universität Bielefeld wird die Synthese verschiedenartig substituierter und funktionalisierter Benzodiazaborole stark vorangetrieben. Ziel ist es, Substitutionsmuster und strukturelle Eigenheiten zu entwickeln, welche sich besonders gut für Anwendungen als OLED-Farbstoff oder Fluoridsensor eignen.<sup>[182]</sup> Die notwendigen spektroskopischen Studien zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen chemischer Struktur und photophysikalischer Funktionalität sind Teil dieser Arbeit und wurden zum Teil bereits publiziert.<sup>[183, 184]</sup>

## 7.1 Einleitung

Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Carbokation ist dreifach koordiniertes Bor in den letzten Jahren vermehrt im Zusammenhang mit lumineszenten und optoelektronischen Materialien untersucht worden. Sein freies  $2p_z$ -Orbital macht dreifach koordiniertes Bor zu einem starken Elektronenakzeptor und steht gleichzeitig zur Ausbildung ausgedehnter – und potentiell lumineszenter –  $\pi$ -Systeme zur Verfügung. Dem entsprechend liegt der Schluss nahe, Kohlenstoff in elektronenleitenden Schichten organischer Licht-emittierender Dioden (OLED) durch dreifach koordiniertes Bor zu ersetzen und so neutrale p-Typ-Materialien oder emittive Schichten zu erzeugen.<sup>[185–188]</sup>

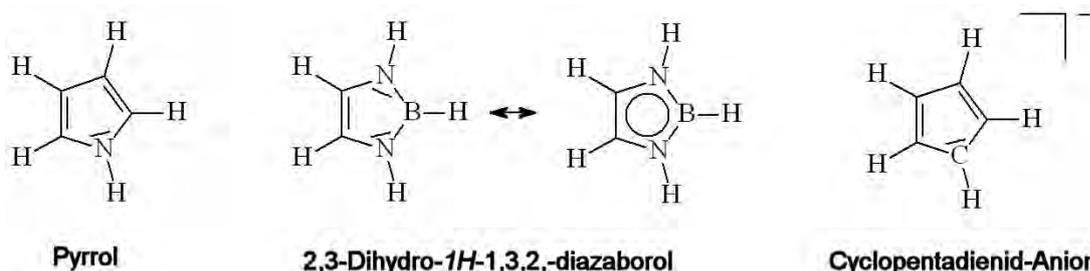
Allerdings stellt die hohe Lewisacidität des Bors ein Problem dar: Zur Stabilisierung gegenüber Nucleophilen muss neben Konjugation auch auf sterische Effekte zurück gegriffen werden. Daher kommen häufig sterisch anspruchsvolle  $\pi$ -Systeme, wie z.B. Mesitylreste, als Substituenten zum Einsatz. Die Lewisacidität eröffnet jedoch auch ein weiteres Anwendungsfeld: Lumineszente Borverbindungen können als Sensoren für Lewisbasen, wie z.B. Fluoridionen, eingesetzt werden.<sup>[189–191]</sup>

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Benzodiazaborole gehören zur Klasse der Borazaaromaten, aromatischen Verbindungen, in denen eine C-C-Einheit durch eine isoelektronische B-N-Einheit substituiert wird. Die Synthese des Borazins durch Stock und Poland im Jahre 1926<sup>[192]</sup> legte den Grundstein für eine rasante Forschungsentwicklung im Bereich der Borazaaromaten. Das zum Benzol isoelektronische Borazin leitet sich vom Benzol formal durch Substitution der drei C-C- mit drei B-N-Einheiten ab.



**Abbildung 7.1:** Benzol und Borazin.

Die Überlappung des freien  $2p_z$ -Orbital des Bors mit dem gefüllten  $2p_z$ -Orbital des Stickstoffs ermöglicht dabei die Ausbildung von Mehrfachbindungen. Der aromatische Charakter dieser Verbindung äußert sich in der Planarität des Sechsrings. Durch die verschiedenen Elektronegativitäten von Bor und Stickstoff agiert jede B-N-Einheit jedoch als elektrischer Dipol, wodurch die Elektronendelokalisation vermindert und die Aromatizität geschwächt wird. Dies äußert sich z.B. in der – im Vergleich zum Benzol – erhöhten Bereitschaft zu Additionsreaktionen.

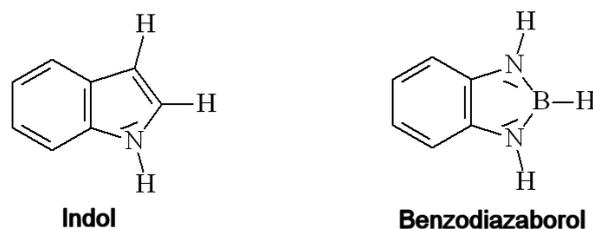


**Abbildung 7.2:** Pyrrol, 2,3-Dihydro-1H-1,3,2-Diazaborol und Cyclopentadienid-Anion.

Inzwischen sind eine Vielzahl solcher Borazaaromaten bekannt. So leitet sich das 2,3-Dihydro-1H-1,3,2-diazaborol (siehe Abbildung 7.2) gleichermaßen vom isoelektronischen

Pyrrol und Cyclopentadienid-Anion ab. Die erste Synthese eines solchen 1,3,2-Diazaborols stellten Merriam und Niedenzu 1973 vor.<sup>[193]</sup>

1964 wurde das erste Mal ein zum Indol isoelektronisches Benzodiazaborol von Goubeau hergestellt (siehe Abbildung 7.3).<sup>[194]</sup> Die Planarität des Ringsystems spiegelt seinen aromatischen Charakter wider. Allerdings belegen die kürzeren C-N-Bindungslängen, dass im Benzodiazaborol im Vergleich zum Indol eine deutlich geringere Aromatizität auftritt.<sup>[195]</sup>



**Abbildung 7.3:** Indol und isoelektronisches Benzodiazaborol.

Die Verwandtschaft zum lumineszenten Indol legt den Schluss nahe, dass sich Benzodiazaborole für photophysikalische Anwendungen eignen. Die Synthese violett-blau lumineszierender Polymere, welche auf Benzodiazaborole als Untereinheit zurückgreifen und potentiell für die Verwendung in OLEDs geeignet sind, wurden bereits 2002 von Maruyama *et al.* und 2007 von Yamamoto *et al.* veröffentlicht.<sup>[196,197]</sup>

## 7.2 Aufgabenstellung

Insgesamt stehen für die Studie zwanzig unterschiedliche Benzodiazaborole zur Verfügung; ihre Strukturformeln sind in den Abbildungen 7.4 bis 7.8 dargestellt. Sie lassen sich anhand der Substituenten am Boratom in vier Gruppen einteilen:

- Die am Boratom ethinylsubstituierten Benzodiazaborole **1** bis **5** bilden die erste Gruppe. In den Borolen **2** bis **4** sollen die heteroatomaren Gruppen am Phenylring als Elektronendonator, die Benzodiazaborolygruppe selber als Elektronenakzeptor agieren. Dadurch kann es bei Anregung zu Ladungstrennung und Bildung eines angeregten *internal charge transfer*-Zustandes kommen. Solche Substanzen weisen meist große Übergangsdipolmomente und große Emissionswellenlängen auf.

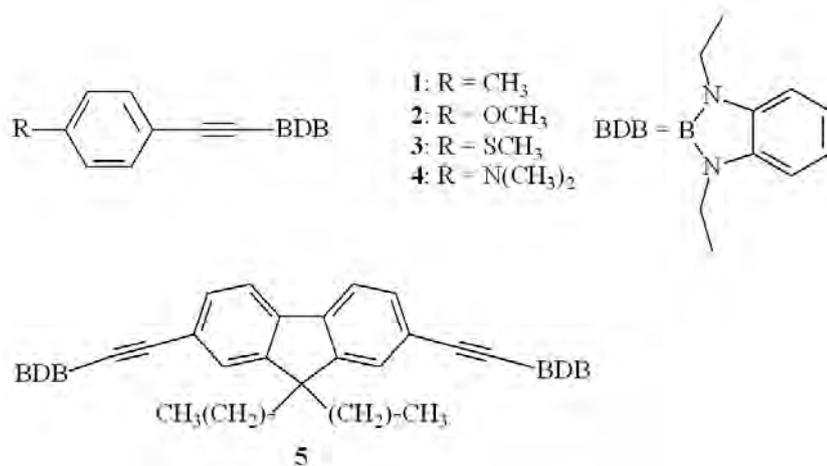


Abbildung 7.4: Strukturformeln der Diazaborole 1-5.

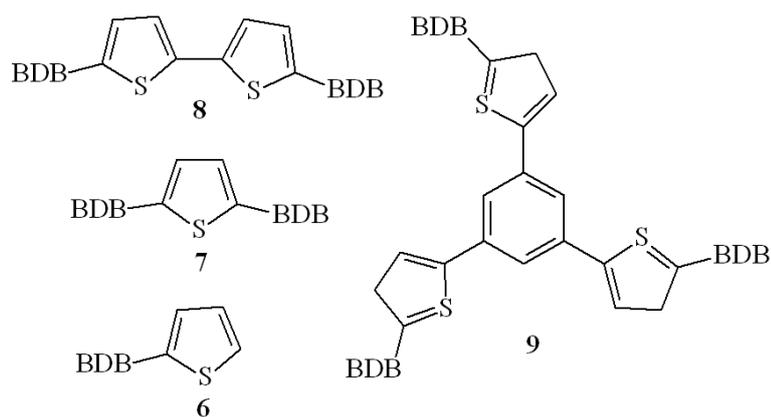


Abbildung 7.5: Strukturformeln der Diazaborole 6-9.

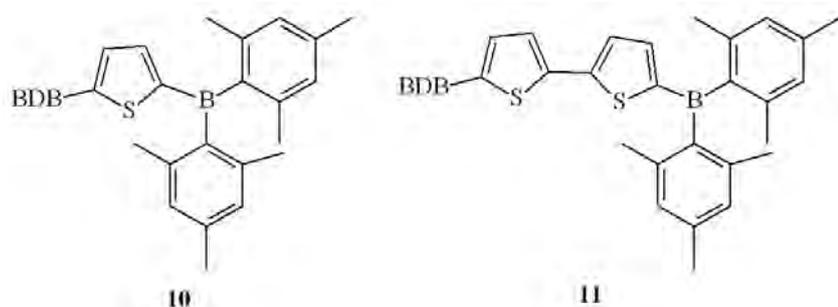


Abbildung 7.6: Strukturformeln der Diazaborole 10 und 11.

- Gruppe zwei (6-11) ist eine Thienylfunktion als Substituent am Boratom eigen. Die Borole **10** und **11** wurden zudem ebenfalls mit einem Donor-Akzeptorpaar ausgestattet, allerdings fungiert das Benzodiazaborol als Donor und die Dimesitylborylfunktion als Akzeptor.
- Die Borole **12** bis **15** weisen allesamt einen Phenylring als Substituenten am Bor auf. Als Besonderheit ist Borol **15** zu erwähnen, da diese Substanz keine Ethylreste, sondern Phenylreste an den Stickstoffen des Diazaborols trägt.
- Die Borole **16** bis **20** sind ebenfalls phenylsubstituiert, allerdings sind sie durch strukturelle Besonderheiten nicht so gut mit der dritten Gruppe vergleichbar. In Borol **17** wurde mit der Methoxy- und einer Cyanofunktion ein vom Diazaborol unabhängiges Donor-Akzeptorsystem eingeführt; als Referenz fungiert Borol **16**, welches über dasselbe Grundgerüst ohne ein Donor-Akzeptorpaar verfügt.

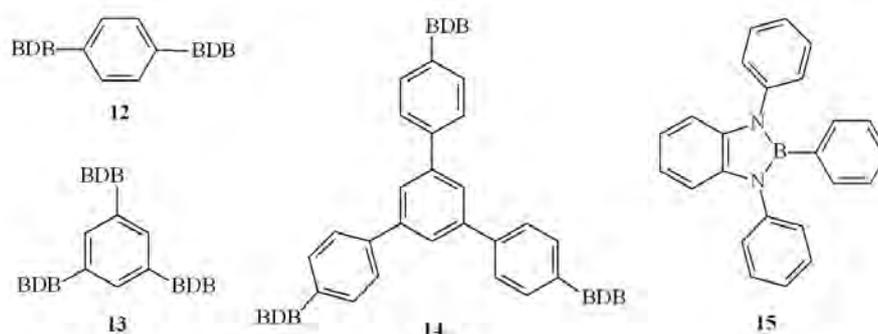


Abbildung 7.7: Strukturformeln der Diazaborole **12-15**.

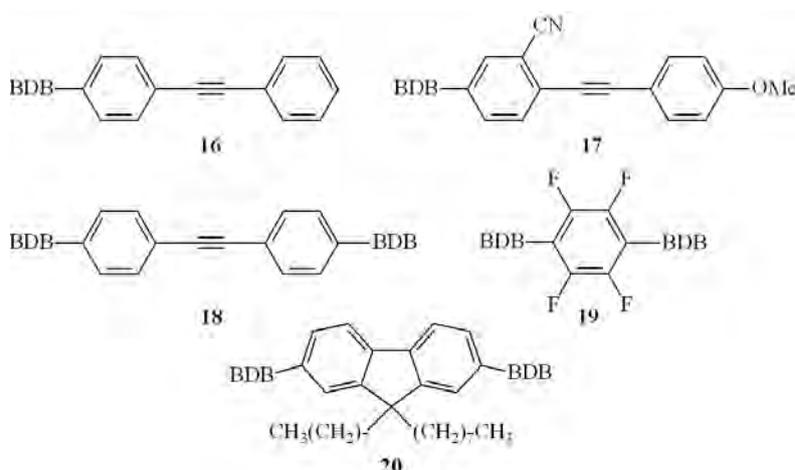


Abbildung 7.8: Strukturformeln der Diazaborole **16-20**.

Systematische Untersuchungen sollen zeigen, welche dieser vielfältigen Funktionalitäten für photophysikalische Anwendungen geeignet sind. Die geplanten Untersuchungen konzentrieren sich dabei auf folgende Aspekte:

- Zunächst soll eine grundlegende, spektroskopische Charakterisierung der einzelnen Substanzen in Lösung erfolgen. Diese umfasst Absorptionsspektren mit resultierendem Extinktionskoeffizienten, statische Fluoreszenzspektren, Quantenausbeuten und Lebenszeiten, und liefert einen ersten Hinweis auf die Eignung der Substanzen als Emitter in technischen Anwendungen.
- Darauf aufbauend werden einige ausgewählte Substanzen auf Solvatochromismus, und somit das Übergangsdipolmoment des elektronischen Übergangs untersucht. Auf diese Weise kann die Farbvariabilität der Benzodiazaborole in Abhängigkeit der chemischen Umgebung, sowie eine Eignung für die nichtlineare Optik ermittelt werden.
- Quenchingexperimente an ausgewählten Borolen mit Fluorid und Pyridin als Lewisbasen geben Aufschluss über die Lewisacidität der Verbindungen und ihrer Eignung als Fluoridsensoren.
- Messungen an Festkörpern, als Reinstoff oder als in Plastik eingeschmolzener Farbstoff, liefern Hinweise auf deren Verwendbarkeit in der festen Phase. Erste Versuche zum Einbau der Benzodiazaboroleinheit in die Seitenkette von Polymeren zielen ebenfalls auf eine Anwendung der Substanzen in emittiven OLED-Schichten.

## 7.3 Fluoreszenzeigenschaften in Lösung

In diesem Abschnitt werden die Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Diazaborole in Lösung vorgestellt. Die Diskussion der charakteristischen Absorptions- und Fluoreszenzspektren, Extinktionskoeffizienten, Quantenausbeuten und Lebenszeiten der Benzodiazaborole in verschiedenen Lösungsmitteln erfolgt in den Abschnitten 7.3.1 bis 7.3.3. Abschnitt 7.3.4 beschäftigt sich mit dem Solvatochromismus ausgewählter Substanzen.

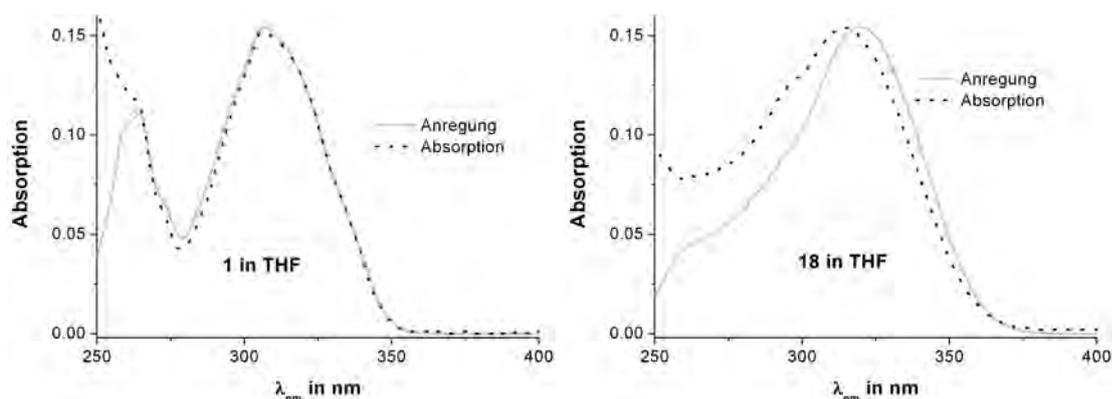
### 7.3.1 Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Um in optoelektronischen Materialien Anwendung finden zu können, sollten die Fluorophore möglichst viel Licht im sichtbaren Spektralbereich emittieren. Auch eine Anregung bei großen Wellenlängen ist aufgrund des geringeren Energiegehalts des eingestrahlten Lichts für die Stabilität des Emitters von Vorteil. Daher muss zunächst geklärt werden, ob sich Absorption und Fluoreszenz der Materialien in einem geeigneten Wellenlängenbereich bewegen.

Dazu werden Absorption und statische Fluoreszenz in THF als Lösungsmittel, welches mittlere Polaritäten und hervorragende Löslichkeitseigenschaften aufweist, vermessen. Um Reabsorptionseffekte zu vermeiden, wurden die Konzentrationen zwischen 1 und 10  $\mu\text{M}$  so gewählt, dass im Maximum der Anregung eine optische Dichte von etwa 0.1 vorlag. Die Positionen der Maxima werden durch die in Abschnitt 4.3.2 beschriebene Anpassung der Spektren ermittelt.

#### Anregung

Die untersuchten Diazaborole sind im nahen UV anregbar; ihre im Anhang in Tabelle A.2 aufgeführten Absorptionsmaxima liegen zwischen 290 und 392 nm, und somit oberhalb des für Indolderivate typischen Absorptionsmaximums von 285 nm. Besonders große Anregungswellenlängen zeigen die Borole **11** (392 nm), **8** (351 nm), **10** (350 nm), **17** (340 nm) und **9** (330 nm). Diese Substanzen schließen vier der sechs thienylsubstituierten Borole ein; besonders gut eignen sich die Borole **10** und **11**, in denen das Benzodiazaborol als Elektronendonator auftritt. Auch der Einsatz eines externen Paares in Borol **17** führt zu großen Anregungswellenlängen. Kleine Anregungswellenlängen zwischen 295 und 307 nm werden



**Abbildung 7.9:** Vergleich der Absorption und Fluoreszenzanregung von **1** (links) und **18** (rechts) in THF.

dagegen von den Borolen **1**, **2** sowie **12** bis **15** erreicht. Offensichtlich kommt über den Phenytring als Substituenten keine ausreichende Konjugation zustande. Der Einsatz der Diazaborolylfunktion als Elektronenakzeptor ist nur mäßig erfolgreich.

In den meisten Fällen stimmen die Anregungsspektren der Fluoreszenz mit den Absorptionsspektren gut überein (Abbildung 7.9 links), so dass die betrachtete Absorptionsbande allein der fluoreszenten Spezies zuzuordnen ist. Abweichungen zwischen Anregungs- und Absorptionsmaximum, wie in Abbildung 7.9 rechts dargestellt, sind kein Messartefakte, sondern können auf mangelnde Konjugation oder nichtfluoreszente Konformationen hinweisen.

## Emission

Die statischen Emissionsspektren der Verbindungen **1** bis **20** in THF sind in den Abbildungen 7.11 und 7.12 dargestellt und die Maxima im Anhang tabelliert (siehe Tabelle A.2). Zwar weisen fast alle Stoffe eine blaue Emission in Lösung auf (siehe Abbildung 7.10), jedoch resultiert diese in den meisten Fällen aus der langsam auslaufenden, niederfrequenten Flanke der Fluoreszenz mit einem relative geringen Anteil an der Gesamtintensität.

Von den zwanzig Verbindungen liegen nur die Emissionsbanden der Borole **10**, **11** und **17** vollständig im sichtbaren Spektralbereich. Für die Verbindungen **5**, **8**, **9** und **18** liegt zumindest das Emissionsmaximum im VIS, so dass der größte Teil der Emission für das Auge sichtbar ist.



Abbildung 7.10: Emission der thiophenhaltigen Borole in THF.

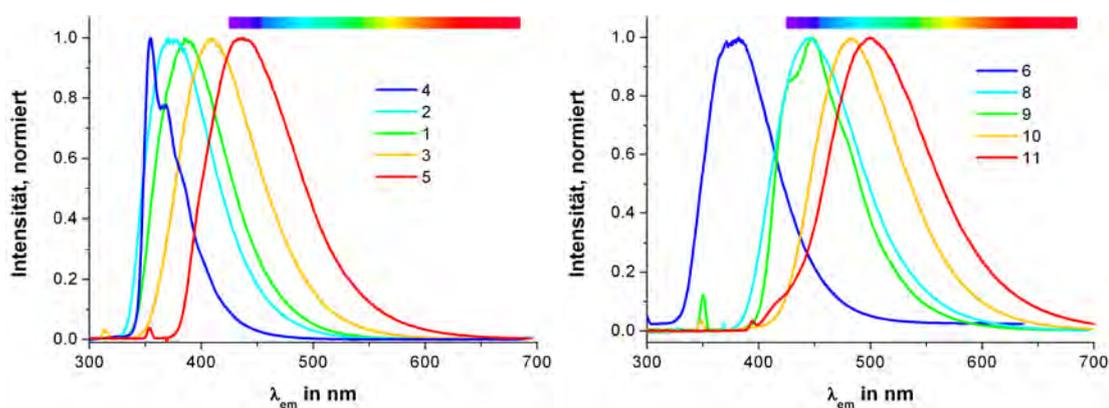


Abbildung 7.11: Emissionsspektren von 1-5 (links) und 6-11 (rechts) in THF.

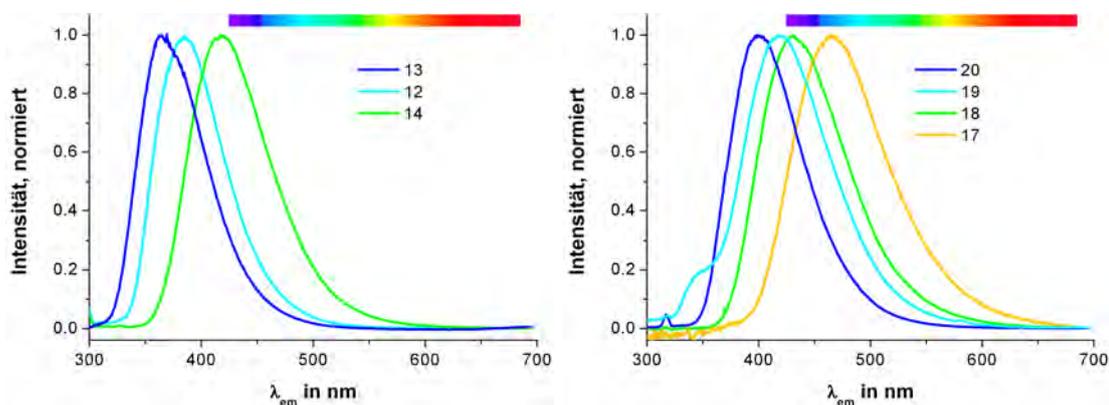


Abbildung 7.12: Emissionsspektren von 12-14 (links) und 17-20 (rechts) in THF.

Analog zur Anregung stammen vier der sieben am besten geeigneten Verbindungen aus der Gruppe der thienylsubstituierten Diazaborole (8-11). Dem gegenüber liegen die Emissionsmaxima der am Boratom phenyl- (12-15) oder ethinylsubstituierten (1-5) Benzodiazaborole zumeist deutlich unterhalb der Sehschwelle von 420 nm.

Um sicher zu gehen, dass die beobachteten Tendenzen nicht allein auf Lösungsmittelleffekten beruhen, wurden viele Verbindungen noch einmal in *cyclo*-Hexan vermessen. Durch

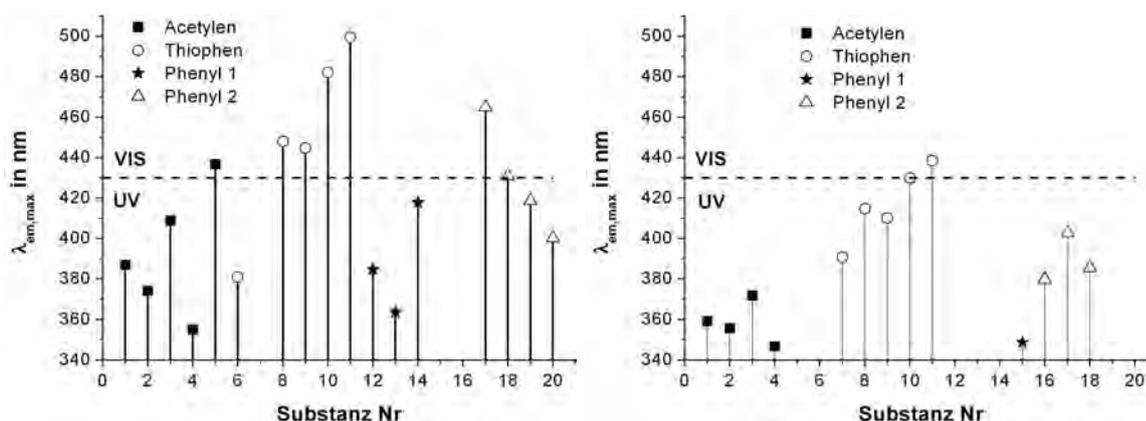


Abbildung 7.13: Emissionsmaxima in THF (links) und cyclo-Hexan (rechts).

die schlichte Alkanstruktur und vernachlässigbar kleine Polarität des *cyclo*-Hexans können spezifische Solvenzwechselwirkungen und durch Solvenzrelaxation hervorgerufene Stokes-Verschiebungen ausgeschlossen werden. Abbildung 7.13 zeigt die Emissionsmaxima der Borole in THF und in *cyclo*-Hexan. Das Borol **17** zeigt hier geringere Emissionswellenlängen als die thienylhaltigen Borole **8** und **9**, ansonsten sind die Tendenzen vergleichbar.

### 7.3.2 Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute

Neben der spektralen Verteilung an sich spielen Absorptionsvermögen und Lichtausbeute der Stoffe eine wichtige Rolle. Zur Bestimmung von Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute werden Absorption und Fluoreszenz in Proben mit einer optischen Dichte um 0.1 vermessen. Aus Konzentration und Absorption können (nach Aufarbeitung der Spektren gemäß der Anweisung in Abschnitt 4.3.1) die Extinktionskoeffizienten gemäß Gleichung 2.2 bestimmt werden. Zur Ermittlung der Quantenausbeute nach Gleichung 2.12 wird POPOP als Referenzverbindung verwendet.

#### Absorptionsvermögen

Die ermittelten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle A.1 aufgeführt und liegen für die meisten untersuchten Diazaborole zwischen  $10000$  und  $60000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Damit zeigen sie ein mit POPOP und PPO, den Standardfluoreszenzfarbstoffen im blauen Spektralbereich mit Extinktionskoeffizienten von  $47000$  und  $35700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , vergleichbares Absorptionsvermögen. Ein klarer Trend für verschiedene Struktur motive ist nicht auszumachen.

Eine Ausnahme stellt Borol **15** dar, welches als einzige Verbindung keine Ethyl- sondern Phenylgruppen als Substituenten an den Stickstoffatomen des Diazaborolsystems trägt, und in allen Lösungsmitteln äußerst geringe Extinktionskoeffizienten zwischen 5300 und 7500  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  aufweist. Diese Daten liegen noch unter dem von Indol mit 9000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ <sup>[198]</sup> in organischen Lösungsmitteln. Aufgrund der damit verbundenen, geringen Leuchtkraft eignet sich diese Verbindung nicht für photophysikalische Anwendungen.

### Quantenausbeuten

In Bezug auf das Emissionsvermögen zeigen sich dagegen deutliche Unterschiede für die verschiedenen Substitutionsmuster (siehe Tabelle A.3 im Anhang). Dabei weisen die nahezu identischen, ethinylsubstituierten Borole **1** bis **4** in THF und *cyclo*-Hexan fast alle exzellente Quantenausbeuten um 1 auf, nur die Werte des schwefelhaltigen Borols **3** fallen mit 0.81 und 0.89 ein wenig ab. Auch die schwefelhaltigen, thienylsubstituierten Borole ohne Elektronendonator und -akzeptorfunktion zeigen in beiden Lösungsmitteln ein etwas schwächeres Emissionsverhalten mit Quantenausbeuten zwischen 0.65 und 0.9. Dass Schwefelatome die Quantenausbeute vermindern, hängt wahrscheinlich mit der höheren Masse der Atome zusammen. Durch den sogenannten *heavy atom*-Effekt wird die Spin-Bahnkopplung im angeregten Molekül geschwächt, der Übergang in einen angeregten Triplettzustand erleichtert und so die Quantenausbeute des Singulettübergangs verringert.

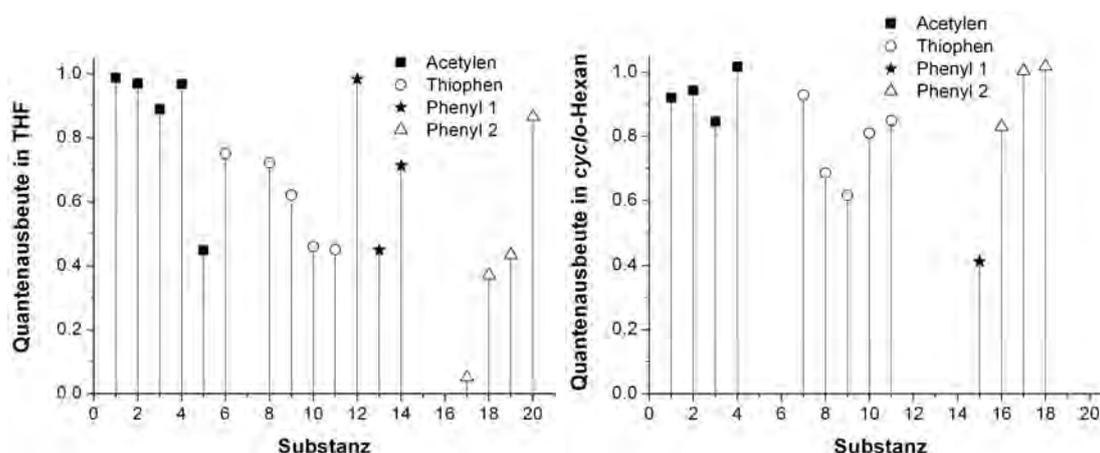


Abbildung 7.14: Quantenausbeuten in THF (links) und *cyclo*-Hexan (rechts).

Mäßige bis schlechte Quantenausbeuten in THF wurden für die Borole **10**, **11** und **17** gemessen. Diese wurden im Hinblick auf ein hohes Übergangsdipolmoment synthetisiert

und sind aufgrund der großen Polarität des angeregten Zustandes für spezifische Solvenzwechselwirkungen besonders anfällig. Diese These wird durch die ausgezeichneten Quantenausbeuten der Verbindungen im nahezu unpolaren *cyclo*-Hexan gestützt. Eine allgemeine Tendenz für phenylsubstituierte Borole ist nicht auszumachen.

### 7.3.3 Lebenszeiten

Die Lebenszeit gehört zu den charakteristischen Parametern eines Fluorophors. Mit ihrer Hilfe können Fluoreszenz und Phosphoreszenz oft unterschieden und durch einen Vergleich der Werte in verschiedenen Lösungsmitteln ungewöhnliche Solvenzwechselwirkungen identifiziert werden.

Für die Lebenszeitmessungen wurden  $100 \mu\text{M}$  Lösungen der Verbindungen verwendet, damit Reabsorptionseffekte die Resultate nicht beeinflussen. Als Anregungswellenlänge wurde 304 bzw. 334 nm gewählt. Für die Erstellung der Abklingkurven wurde über das Emissionsspektrum integriert und die resultierenden Kurven in FINDFit angepasst; die Anpassungen waren zumeist monoexponentieller, in seltenen Fällen biexponentieller Natur. In Abbildung 7.15 ist die Anpassung der Abklingkurve von Borol **15** in *cyclo*-Hexan mit IRF, Residuum und Autokorrelation exemplarisch dargestellt.

In *cyclo*-Hexan treten intensitätsgemittelte Lebenszeiten zwischen 0.97 und 1.53 ns auf; diese sind im Anhang in Tabelle A.4 aufgeführt. Es handelt sich bei der Emission also eindeutig um Fluoreszenz. Ein strukturabhängiger Trend oder eine Korrelation mit den

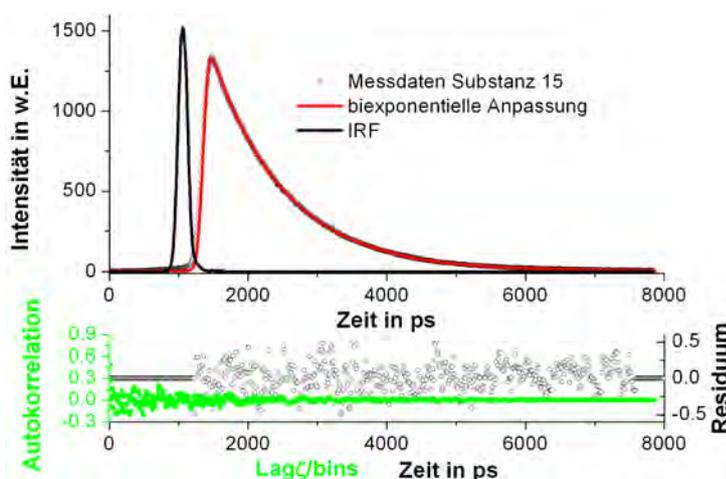


Abbildung 7.15: Anpassung an die dynamische Fluoreszenz von Borol **15** in *cyclo*-Hexan.

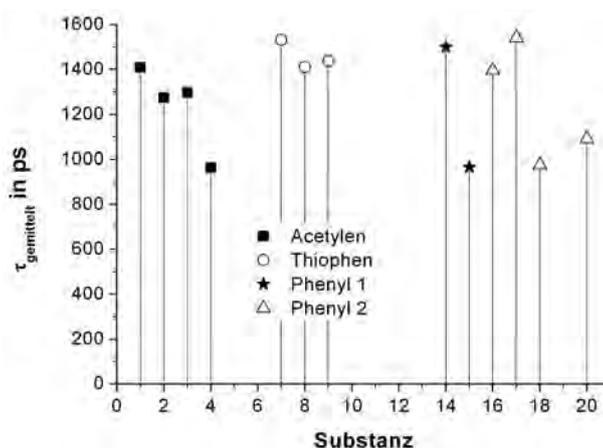


Abbildung 7.16: Intensitätsgemittelte Lebenszeiten in cyclo-Hexan.

Quantenausbeuten konnte nicht festgestellt werden. Die Anregungswellenlänge hat keinen Einfluss auf die Lebenszeit; Abweichungen zwischen den Werten bei 304 und 334 nm betragen höchstens 2% und unterstreichen die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen.

### 7.3.4 Solvatochromismus

Grundsätzlich führt ein großes Übergangsdipolmoment zu einer starken Erhöhung der Stokes-Verschiebung mit der Lösungsmittelpolarität, so dass für den entsprechenden Fluorophor ein weiter Spektralbereich durch Variation der Umgebungspolarität zugänglich ist. Da Benzodiazaborole über geringe Übergangsenergien verfügen und keine Zentrosymmetrie aufweisen, können sie im Falle großer Übergangsdipolmomente ggf. als Frequenzkonverter in der nicht-linearen Optik eingesetzt werden.<sup>[185]</sup>

Die Borole **1** bis **4**, **10** und **11**, sowie **17** wurden eigens auf ein großes Übergangsdipolmoment hin konstruiert. Es soll anhand des Solvatochromismus untersucht werden, welche Strukturelemente und Donor-Akzeptorpaarungen die größten Übergangsdipolmomente erzeugen und welche Wellenlängenbereiche dadurch zugänglich werden. Ein Vergleich mit DFT-Simulationen soll deutlich machen, inwieweit die theoretischen Modelle mit der physikalischen Wirklichkeit übereinstimmen. Dieser Abgleich liefert Theoretikern entscheidende Hinweise auf dem Weg zum präsynthetischen Fluorophordesign.

Dazu wurden die Absorptions- und Emissionsspektren der Verbindungen in verschiedenen Lösungsmitteln gemessen. Die Positionen der Maxima werden durch die in Abschnitt

4.3.2 beschriebene Anpassung der Spektren ermittelt und zur Berechnung der Stokes-Verschiebung verwendet.

### Zugängliche Spektralbereiche

Die Borole **1** bis **4**, welche ein Donor-Akzeptorpaar mit Benzodiazaborolfunktion als Akzeptor beinhalten, emittieren selbst in Acetonitril nicht komplett sichtbares Licht; dagegen liegt das Maximum der Emission von **11**, in dem der Benzodiazaborolrest als Donor fungiert, in Acetonitril sogar im gelben Spektralbereich. Ein erheblicher Teil dieser Fluoreszenz liegt bei gelb-orangen Wellenlängen. Je nach Kombination aus Diazaborol und Lösungsmittel kann - außer Rot - jede erwünschte Fluoreszenzfarbe erreicht werden.

Aus diesen Beobachtungen kann allerdings noch nicht auf das eigentliche Übergangsdipolmoment geschlossen werden, da zum Einen die Wellenlänge nicht proportional zur Übergangsenergie ist, und zum Anderen noch die geometrischen Gegebenheiten der einzelnen Borole berücksichtigt werden müssen. Eine Quantifizierung erfolgt in den folgenden Abschnitten.

### Identifizierung geeigneter Lösungsmittel

Für die Bestimmung der Übergangsdipolmomente werden Lösungen ohne spezifische Solvenzinteraktionen benötigt. Die überraschend geringe Lewisacidität der Borole (siehe Abschnitt 7.4.2) ermöglicht die Messung in sehr polaren Lösungsmitteln, auf die Verwendung protischer und sauerstoffhaltiger Lösungsmittel wurde jedoch verzichtet. Es wurden da-

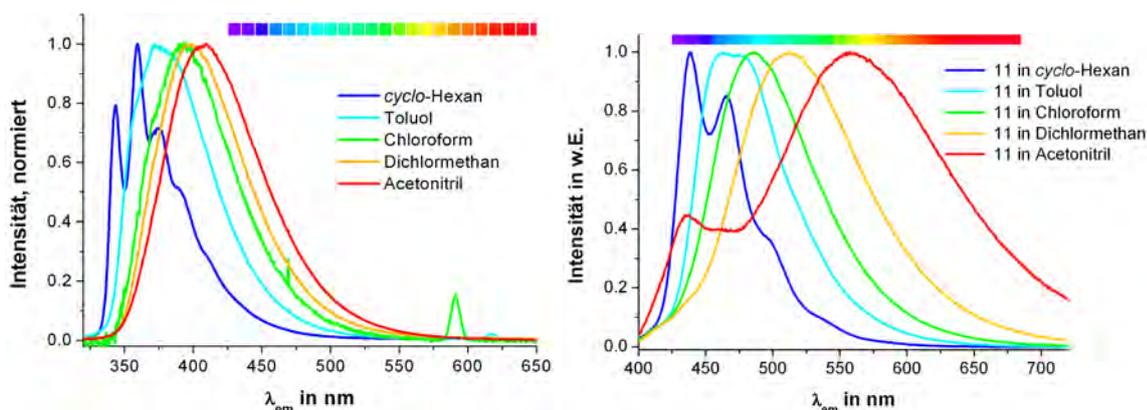


Abbildung 7.17: Solvatochromismus von **1** (links) und **11** (rechts).

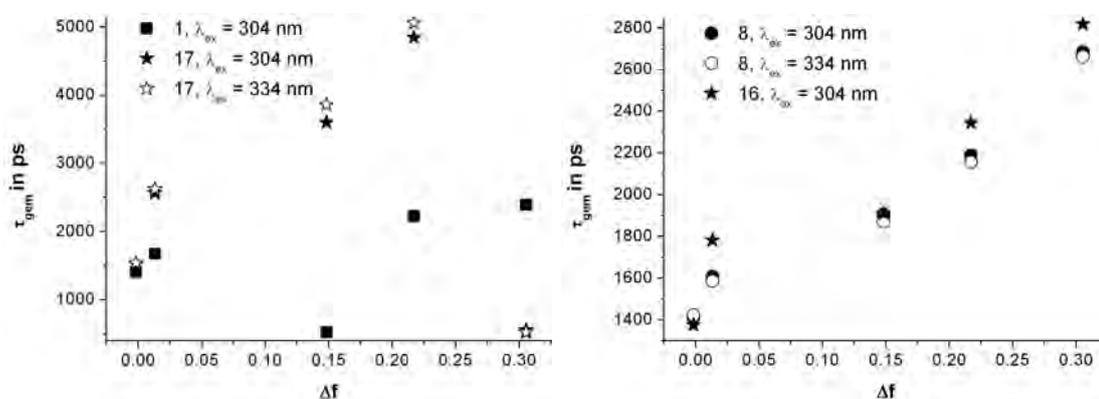
her die Lösungsmittel *cyclo*-Hexan, Toluol, Chloroform, Dichlormethan und Acetonitril ausgewählt.

Die Messung von Quantenausbeuten und Lebenszeiten der Borole **1**, **2**, **4**, **8**, **16** und **17** soll zeigen, ob die betreffenden Lösungsmittel starke spezifische Wechselwirkungen mit dem Borol eingehen. Für die Lebenszeiten ergibt sich die zu erwartende Erhöhung mit der Lösungsmittelpolarität, da durch Solvenzrelaxation der Energieabstand zwischen Grund- und angeregtem Niveau vermindert wird und die Lebenszeit dem entsprechend ansteigt. Eine Auftragung der mittleren Lebenszeit gegen die Orientierungspolarisation des Lösungsmittels sollte, solange lediglich allgemeine Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Borol und Solvenz vorliegen, eine lineare Proportionalität ergeben.

Die Quantenausbeuten der Borole in den oben genannten Lösungsmitteln gleichen zumeist denen in *cyclo*-Hexan. Allerdings lassen die geringen Werte von **17** in Acetonitril und von **1**, **2** und **4** in Chloroform vermuten, dass sich statische Komplexe bilden und diese Konstellationen daher zur Dipolmomentbestimmung ungeeignet sind.

Dagegen spricht, dass diese Konstellationen alle besonders kurze Lebenszeiten aufweisen. Daher resultieren die geringe Quantenausbeuten aus erhöhtem dynamischen Lösungsmit- telquenching und nicht aus einer statischen Wechselwirkung, welche die Emissionsspektren beeinflussen würde. Die statischen Fluoreszenzspektren können daher trotz ihrer geringen Quantenausbeute in Abschnitt 7.3.4 verwendet werden.

Auffallend ist zudem, dass für alle vier Borole die Lebenszeit in Toluol überproportio- nal hoch ist. Es kommt also zu einer über unspezifische Solvenzwechselwirkungen hin-



**Abbildung 7.18:** Mittlere Lebenszeiten von Borol **1**, **8**, **16** und **17** in verschiedenen Lösungsmitteln.

ausgehende Stabilisierung durch das Lösungsmittel, zu sogenanntem  $\pi$ -Stacking der aromatischen Ringe. Daher sollte Toluol nicht als Lösungsmittel für die Bestimmung der Dipolmomente herangezogen werden.

### Bestimmung des Übergangsdipolmomentes nach Lippert-Mataga

Zur Quantifizierung der Übergangsdipolmomente wird die gemessene Stokes-Verschiebung gegen die Orientierungspolarisation nach Lippert-Mataga (Gleichung 2.25) aufgetragen. Aus der Steigung der resultierenden Gerade kann, allerdings nur bei unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, das Übergangsdipolmoment bestimmt werden.

Die Auftragung der Stokes-Verschiebungen in den ausgewählten Lösungsmitteln gegen  $\Delta f$  folgt einem linearen Zusammenhang, lediglich die Werte für Toluol sind bei allen Messreihen etwas zu groß. Wie in Abschnitt 7.3.3 erläutert, kommt es bei Toluol sehr wahrscheinlich zu  $\pi$ -Stacking, so dass die Messdaten für die Auswertung nicht berücksichtigt werden können (siehe Abbildung 7.19).

Um aus der Auftragung einen Wert für das Übergangsdipolmoment zu bestimmen, muss zunächst der Radius  $a$  der theoretisch kugelförmigen Onsagerkavität abgeschätzt werden. Dazu wird nach den vorliegenden Röntgenkristallstrukturen die Ausdehnung des Moleküls entlang der drei Raumachsen ermittelt (siehe Abbildung 7.20). Die erhaltenen Werte sind im Anhang aufgeführt.

In die Berechnung des Radius  $a$  geht dabei die lange Achse mit zwei Teilen, die kurzen Achsen mit jeweils einem Teil ein, da sich das Dipolmoment entlang der langen Achse

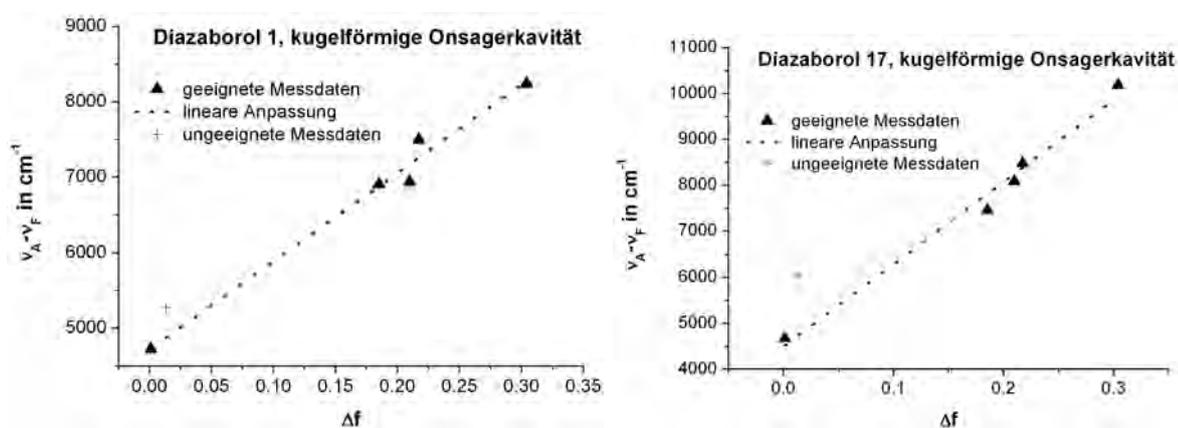


Abbildung 7.19: Lippert-Mataga-Auftragung von 1 (links) und 17 (rechts).

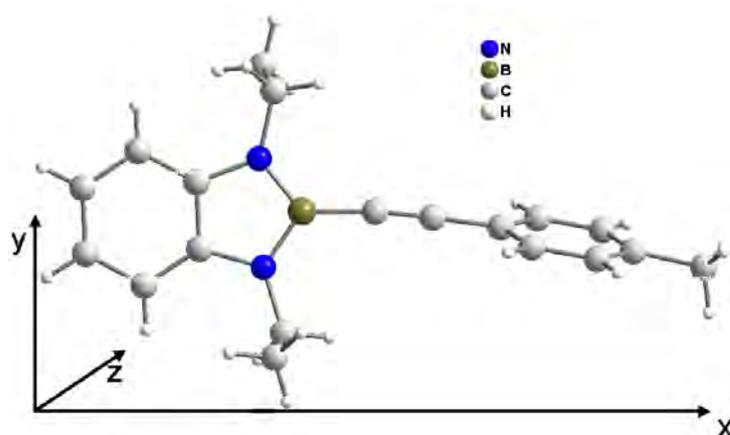


Abbildung 7.20: Geometrie von **1**.

ausrichtet und daher stärker Berücksichtigung finden muss. Diese Abschätzung lässt, insbesondere in Anbetracht der starken Varianz des berechneten Übergangsdipolmomentes mit dem Onsagerradius, beträchtliche Fehler in den absoluten Werten vermuten. Ein Vergleich der Werte untereinander ist dagegen unproblematisch. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7.1 aufgelistet und werden am Ende dieses Unterkapitels gemeinsam mit den Daten für die Dipolmomente des Grund- und angeregten Zustands diskutiert.

### Dipolmomentbestimmung für ellipsoide Onsagerkavität

Um nicht nur die Übergangsdipolmomente, sondern absolute Werte für die Dipole des Grund- und angeregten Zustandes zu ermitteln, wird auf den Formalismus für ellipsoide Fluorophore zurückgegriffen. Eine Auftragung der Stokes-Verschiebung  $\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F$  und von  $\tilde{\nu}_A + \tilde{\nu}_F$  gegen die Parameter der Solvenzpolarität  $f$  und  $\phi$  nach den Gleichungen 2.27 und 2.28 ergibt für jeden Fluorophor zwei Geraden, wie in Abbildung 7.21 für Borol **3** exemplarisch dargestellt.

Um aus den resultierenden Steigungen die Dipolmomente des Grund- und angeregten Zustandes zu berechnen, wird hier der geometrisch bedingte Parameter  $A$  benötigt. Letzterer wird nach Bestimmung des Radienverhältnisses in der Literatur<sup>[73]</sup> nachgeschlagen. Der Radius der Onsagerkavität  $a$  ist hier allerdings nicht mit einer das Molekül umfassenden Kugel assoziiert sondern mit einer deutlich kleineren Kugel, welche durch Aneinanderreihung eine ellipsoide Geometrie erzeugt (siehe Abbildung 7.22). Daher ist  $a$  hier deutlich geringer als für die Lippert-Mataga-Theorie.

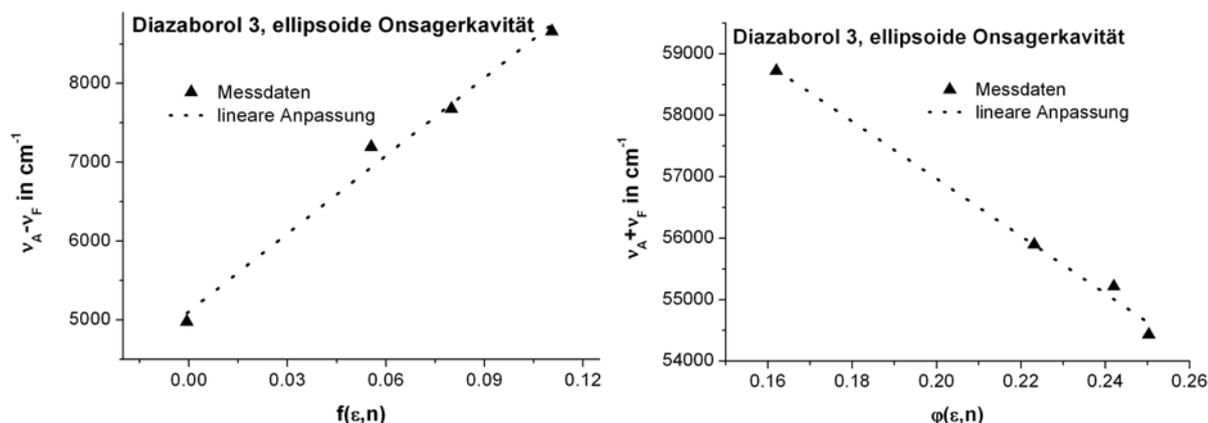


Abbildung 7.21:  $\tilde{\nu}_A - \tilde{\nu}_F$  und  $\tilde{\nu}_A + \tilde{\nu}_F$  von 3 in verschiedenen Lösungsmitteln.

Eine eigenständige, geometrische Abschätzung von  $a$  erwies sich als unzuverlässig und fehleranfällig. Daher wurden die Werte des Onsagerradius hier aus den mit der Lippert-Mataga-Gleichung berechneten Übergangsdipolmomenten rekonstruiert. Dieses Vorgehen ist zwar in der Literatur bekannt,<sup>[71,72]</sup> allerdings bieten die Werte keine Vergleichsmöglichkeit, sondern sind nur als Ergänzung zu den aus Lippert-Mataga berechneten Werten zu verstehen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7.1 aufgelistet und werden im nächsten Abschnitt gemeinsam mit den Übergangsdipolmomenten diskutiert.

## Ergebnisse

Die nach dem Lippert-Mataga-Formalismus erhaltenen Onsagerradien  $a_{Kugel}$ , Steigungen  $m_{Kugel}$  und Übergangsdipolmomente  $\Delta\mu$  sind in Tabelle 7.1 aufgeführt, ebenso wie die nach dem Formalismus für ellipsoide Geometrien erhaltenen Steigungen  $m_{1,2Ellipse}$  und Dipolmomente des Grund- und angeregten Zustandes  $\mu_E$  und  $\mu_G$ . Weitere, zur Berechnung nötige Daten sind im Anhang (siehe Tabelle A.5) tabelliert.

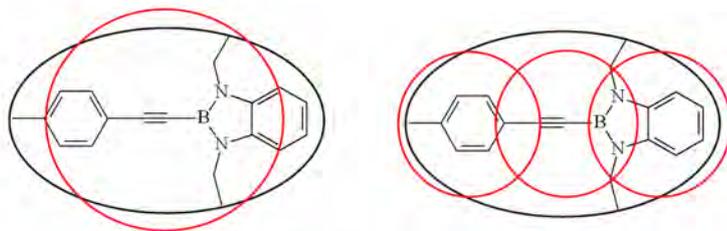


Abbildung 7.22: Geometrien der Onsagerkavitäten.

Aus den Standardabweichungen der einzelnen Steigungen und einem abgeschätzten Fehler im Radius der Onsagerkavität von  $0.25 \text{ \AA}$  kann mit Hilfe der Gaußschen Fehlerfortpflanzung eine realistische Abweichung für die Übergangsdipolmomente ermittelt werden.

Abbildung 7.23 zeigt die erhaltenen Dipolmomente und Fehler. Tatsächlich weisen die Borole **1** bis **4** ein vergleichsweise geringes Übergangsdipolmoment auf. Offensichtlich eignet sich der Benzodiazaborolrest in den ethinylsubstituierten Borolen nicht als Elektronenakzeptor. Entweder herrscht in der Benzodiazaborolfunktion kein ausreichender Elektronenmangel, oder der Winkel zwischen Borol und Phenylrest von etwa  $90^\circ$  verhindert eine erfolgreiche Konjugation. Rechnungen von Marder *et al.*<sup>[184]</sup> sowie das in Abschnitt 7.4 vorgestellte, geringe Quenchvermögen von Pyridin und Fluorid unterstützen den ersten, die geringen Emissionsmaxima der Verbindungen den zweiten Punkt. Das höchste Übergangsdipolmoment weist das schwefelhaltige Borol **3** auf, während das aminofunktionalisierte Borol **4** über erstaunlich niedrige Dipolmomente verfügt.

Im Gegensatz dazu zeigen die Borole **11** und **17** mit 17.4 und 18.3 D sehr hohe Übergangsdipolmomente. Selbst die in der Literatur etablierte Polaritätssonde Prodan erreicht mit  $14.8 \text{ D}$ <sup>[102]</sup> diese Werte nicht. Offensichtlich ist daher sowohl der Einsatz des Diazaborols als Elektronendonator (Borol **11**) als auch die Verwendung des vom Borol unabhängigen Donor-Akzeptorpaars aus Cyano- und Methoxyfunktion (Borol **17**) geeignet, große Übergangsdipolmomente in die Borole einzubringen. Messungen an Borol **16** ergeben ein mit Prodan vergleichbares Übergangsdipolmoment von  $14.9 \text{ D}$ . Demnach ist die Tendenz

Borol	$a_{Kugel}$ in $\text{\AA}$	$m_{Kugel}$ in $\text{cm}^{-1}$	$m_{1,Ellipse}$ in $\text{cm}^{-1}$	$m_{2,Ellipse}$ in $\text{cm}^{-1}$	$\Delta\mu$ in D	$\Delta\Delta\mu$ in D	$\mu_E$ in D	$\mu_G$ in D
1	4.49	10925	31921	38367	9.93	1.23	11.38	1.04
2	4.44	8758	24629	32899	8.74	1.41	10.53	1.51
3	4.44	12024	32946	46645	10.24	1.26	12.36	2.13
4	4.60	14230	24629	22024	4.70	0.84	4.54	0.25
11	5.79	15463	51146	60833	17.29	2.51	18.93	1.64
16	5.24	15572	60228	69517	14.94	1.70	16.01	1.15
17	5.29	17882	70897	101861	18.36	1.86	22.36	4.01

**Tabelle 7.1:** Ermittelte Übergangsdipolmomente.

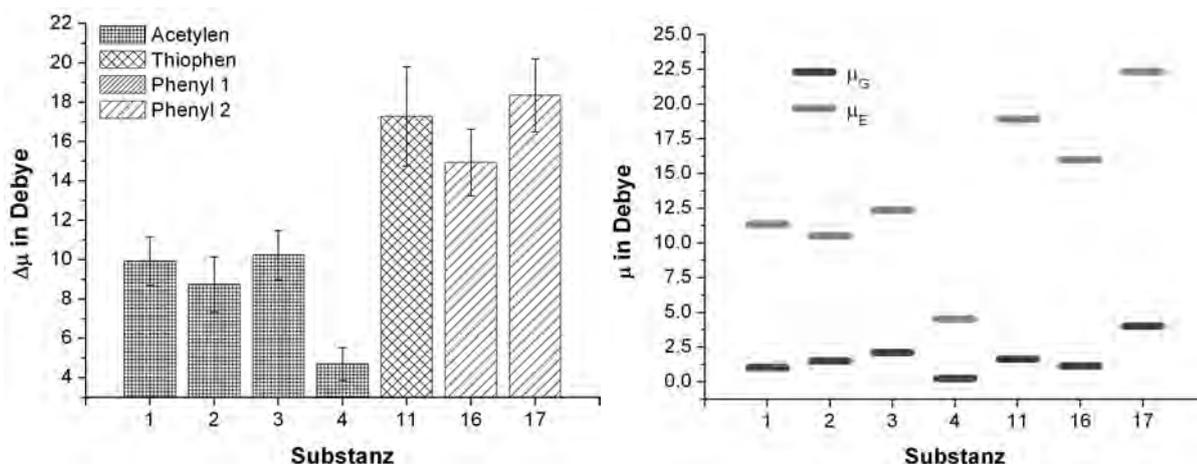


Abbildung 7.23: Ermittelte Dipolmomente.

zu hohen Übergangsdipolmomenten bereits im Grundgerüst von Borol **17** ohne Donor-Akzeptorpaar angelegt.

Der Vergleich des für Borol **17** bestimmten Übergangsdipolmomentes mit DFT-Rechnungen<sup>[199]</sup> von M. Maciejczyk der Universität de Pau et des Pays de l'Adour in Tabelle 7.2 zeigt eine gute Übereinstimmung. Allerdings stimmen die Werte der Übergangsdipolmomente, die sich innerhalb der angegebenen Fehlergrenzen bewegen, weit besser überein als die Dipole der einzelnen Zustände. Vermutlich liegt dies an der Schwierigkeit, die ellipsoide Geometrie der Onsagerkavität korrekt abzuschätzen. Insgesamt bestätigen die Simulationen die experimentell ermittelten Werte.

	$\Delta\mu$ in D	$\mu_E$ in D	$\mu_G$ in D
Messung	$18.36 \pm 1.86$	22.36	4.01
Rechnung <sup>[199]</sup>	18.72	23.84	5.12

Tabelle 7.2: Vergleich mit DFT-Rechnungen.

## 7.4 Quenching durch Lewisbasen

In diesem Abschnitt wird das Komplexierungsvermögen ausgewählter Diazaborole mit Pyridin (Abschnitt 7.4.1) und Fluorid (Abschnitt 7.4.2) untersucht. Dabei sollen Informationen über die Lewisacidität der Borole und ihre Eignung als fluoreszente Fluoridsensoren gewonnen werden. Da in der Literatur vielfältige Untersuchungen an thienylhaltigen Arylboranen bekannt sind,<sup>[200–202]</sup> liegt das Hauptaugenmerk zur besseren Vergleichbarkeit auf thienylsubstituierten Benzodiazaborolen. Um sicher zu stellen, dass sich die erhaltenen Ergebnisse auf andere Borole übertragen lassen, dient Verbindung **1** als Referenz.

### 7.4.1 Quenching durch Pyridin

Die Fähigkeit zur Komplexierung der Lewisbase Pyridin ist eng mit der Eigenschaft der Lewisacidität verknüpft. Daher liefert diese Untersuchung einen Vergleich der Lewisacidität der untersuchten Benzodiazaborole mit literaturbekannten Triarylboranen. Dafür wurden die mehrfach funktionalisierten thienylhaltigen Borole **8** und **9** und das einfach funktionalisierte Borol **1** ausgewählt. Die statische Fluoreszenz und Absorption der drei Borole wurde in Abhängigkeit der Pyridinkonzentration bei der maximalen Anregungswellenlänge der einzelnen Verbindungen untersucht.

#### Art des Quenchings

Die statische Fluoreszenz aller drei Verbindungen wurde, wie in Abbildung 7.24 exemplarisch dargestellt, durch die Zugabe von Pyridin instantan gelöscht. Eine Weiterreaktion konnte durch längere Beobachtung der Fluoreszenz ausgeschlossen werden.

Die Absorption der Borole dagegen bleibt konstant, außerdem kommt die für Pyridin charakteristische Bande unterhalb von 350 nm dazu. Die gleichbleibende Borolabsorption weist auf das Vorliegen von dynamischem Quenching hin; statt zu einer Komplexbildung kommt es zu fluoreszenzlöschenden Stößen. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen, welche eine starke Verringerung der Lebenszeit mit der Pyridinkonzentration zeigen (siehe Abbildung 7.25), liefern den endgültigen Beweis für dynamisches Quenching.

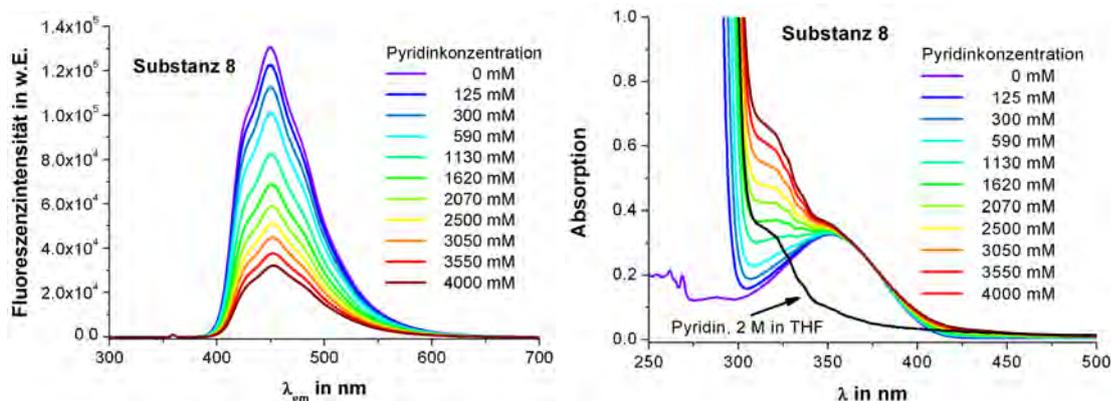


Abbildung 7.24: Quenching von 8 mit Pyridin.

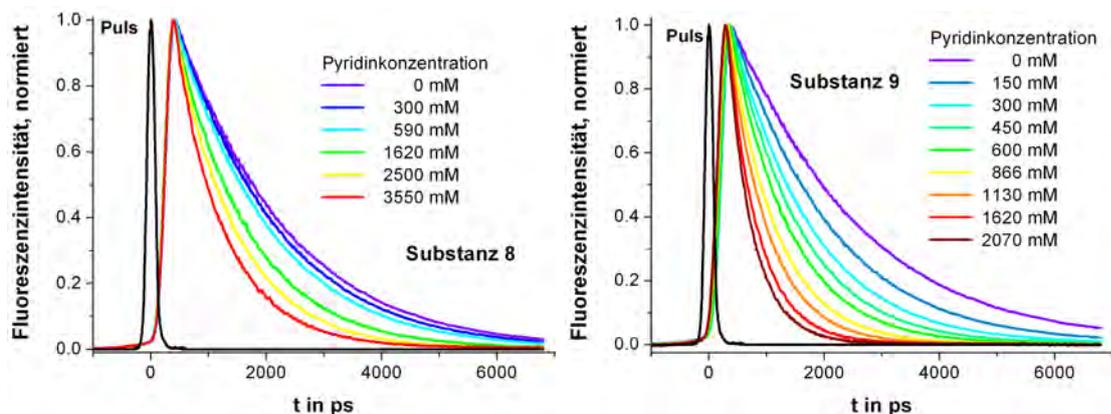


Abbildung 7.25: Lebenszeitverringerng von 8 (links) und 9 (rechts).

### Anpassung

Die Fluoreszenzintensitäten und Lebenszeiten von Borol **9** entsprechen der Gesetzmäßigkeit von Stern und Volmer in Gleichung 2.13, so dass durch lineare Anpassung der statischen und zeitaufgelösten Daten Stern-Volmer-Konstanten ermittelt werden können (siehe Abbildung 7.26).

Stern-Volmer-Auftragungen von **8** und **1** zeigen dagegen eine überproportionale Verminderung der Fluoreszenzintensität bzw. Lebenszeit mit der Pyridinkonzentration. Da die Auftragung von  $K_{app}$  gegen die Pyridinkonzentration gemäß Gleichung 2.15 keine Gerade ergibt, kann kombiniertes statisches und dynamisches Quenching ausgeschlossen werden; der Effekt wird also durch eine *sphere of action* (SoA) verursacht.

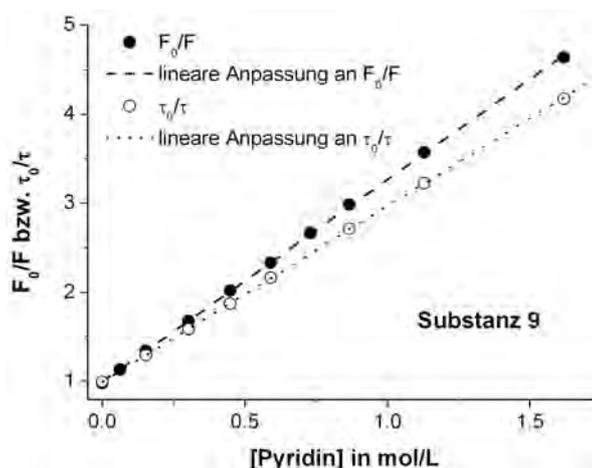


Abbildung 7.26: Stern-Volmer-Auftragungen und lineare Anpassungen für 9.

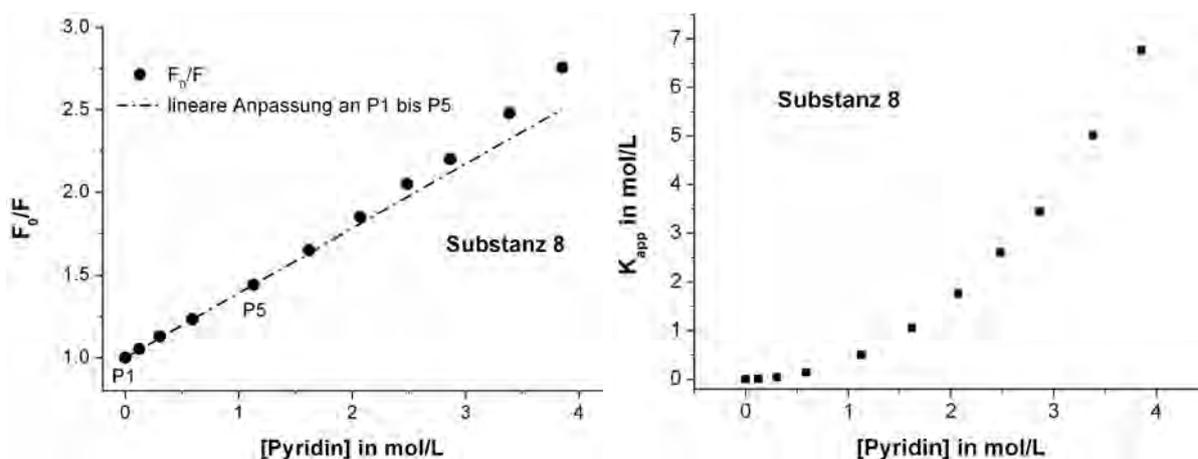


Abbildung 7.27: Abweichung von Stern-Volmer (links) und von der Linearität für  $K_{app}$  (rechts).

Eine Anpassung der statischen und dynamischen Messdaten von Borol **1** und **8** nach Gleichung 2.17 (siehe Abbildung 7.28) liefert sowohl Stern-Volmer-Konstanten als auch geometrische Daten zur Größe der *sphere of action*.

## Ergebnisse

Alle für die Anpassungen relevanten Informationen sowie die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7.3 aufgelistet. Dass die aus der statischen Fluoreszenz berechneten Stern-Volmer-Konstanten etwas größer ausfallen, liegt an der Absorption des Pyridins im Wellenlängenbereich der Anregung. Auf die Lebenszeiten hat dies jedoch keinen Einfluss; die Ergebnisse der zeitaufgelösten Messungen sind daher als weniger fehlerbehaftet zu betrachten.

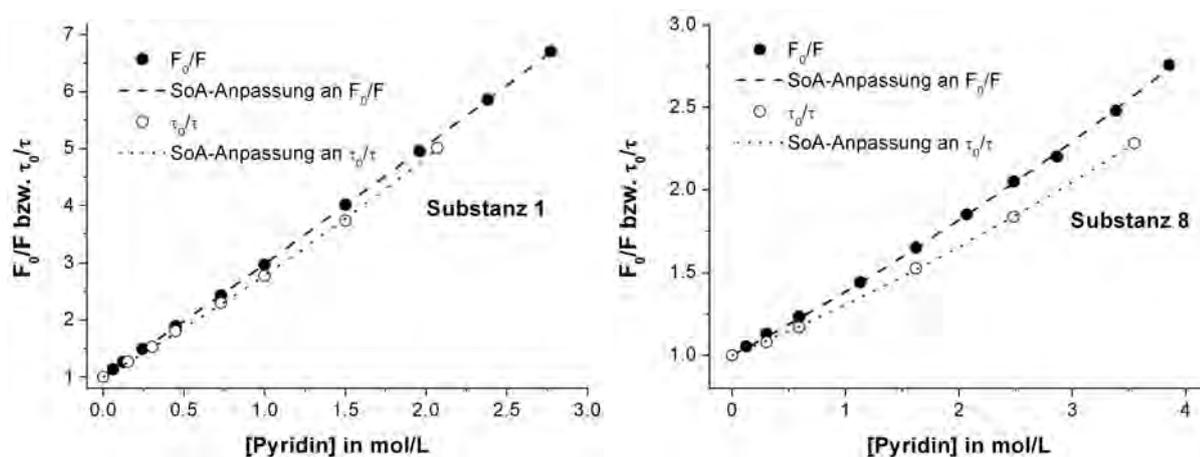


Abbildung 7.28: Stern-Volmer-Auftragungen und SoA-Anpassungen für **1** und **8**.

Nr	Methode	Anpassung	$K_D$ in $M^{-1}$	$\Delta K_D$ in $M^{-1}$	$V_{SoA}$ in $\text{\AA}^3$	$\Delta V_{SoA}$ in $\text{\AA}^3$	$r_{SoA}$ in $\text{\AA}$	$\Delta r_{SoA}$ in $\text{\AA}$
1	dynamisch	SoA	1.587	0.038	123	17	2.14	0.31
	statisch	SoA	1.924	0.012	33.8	3.8	1.39	0.19
8	dynamisch	SoA	0.220	0.014	116	14	2.10	0.29
	statisch	SoA	0.310	0.014	95.8	11	1.97	0.27
9	dynamisch	linear	1.972	0.0044	–	–	–	–
	statisch	linear	2.264	0.010	–	–	–	–

Tabelle 7.3: Parameter des Quenchings von **1**, **8** und **9** mit Pyridin.

Grundsätzlich ist überraschend, dass keine statische Komplexierung des Pyridins stattfindet. Für thienylhaltige Triarylborane wurde von Sundaraman *et al.*<sup>[201]</sup> eine starke Komplexierung des Pyridins mit Gleichgewichtskonstanten von  $5 \cdot 10^5 M^{-1}$  und  $2.2 \cdot 10^6 M^{-1}$  beobachtet: Offensichtlich vermindert das verwendete Diazaborolmotiv die Lewisacidität des dreifach koordinierten Bors im Vergleich zu anderen Triarylboranen beträchtlich. Dies zeigt sich auch in der in Abschnitt 7.4.2 untersuchten, vergleichsweise geringen Fluoridaffinität der Borole.

Bemerkenswert ist, dass die Art der Anpassung von Borol **1** und **8** identisch ist, während sich andererseits die resultierenden Quenchingkonstanten von Borol **1** und **9** in derselben Größenordnung bewegen. Aufgrund der strukturellen Eigenheiten wäre eine Ähnlichkeit von **8** und **9** eher zu erwarten gewesen.

### 7.4.2 Quenching durch TBAF

Auch die Untersuchung der Fluoridkomplexierung am Boratom der Diazaboroleinheit konzentriert sich auf die thienylhaltigen Borole **6**, **8**, **9**, **10** und **11**, wobei das Borol **1** als Referenz dient. Dabei sollten gute Fluoridsensoren bereits geringe Mengen Fluorid nach einem einfachen Mechanismus reversibel komplexieren können.

Die Ergebnisse für **10** und **11** werden in Anbetracht ihrer strukturellen Besonderheiten im letzten Abschnitt dieses Kapitels separat diskutiert. Die Borole wurden  $10\ \mu\text{M}$  in THF vorgelegt und die Anregungswellenlänge so ausgewählt, dass ohne Fluoridzugabe eine optische Dichte von 0.1 vorliegt. Als Fluoridquelle wurde *tetra*-Butylammoniumfluorid (TBAF) ausgewählt, da es mit dem chemisch inerten und sterisch gehinderten *tetra*-Butylammoniumkation über ein inaktives Gegenion zum Fluorid verfügt.

Die Zugabe von TBAF zu den Borolen führte zu einer Verminderung der Fluoreszenzintensität. Zeitaufgelöste Messungen belegen, dass es sich bei der Verringerung der Fluoreszenzintensität mit der TBAF-Konzentration um eine Komplexbildung handelt, da die Lebenszeit trotz Intensitätsverlust nach Zugabe von 5 Äquivalenten TBAF unverändert bleibt (siehe Abbildung 7.29).

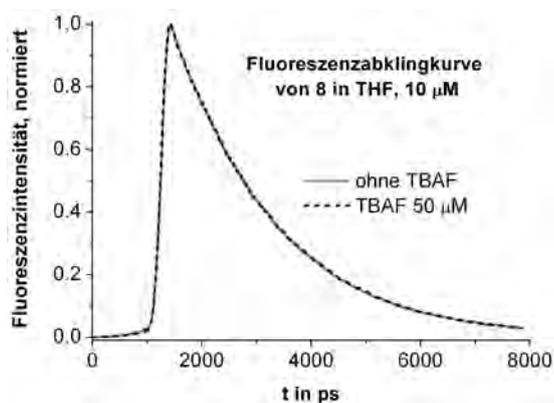
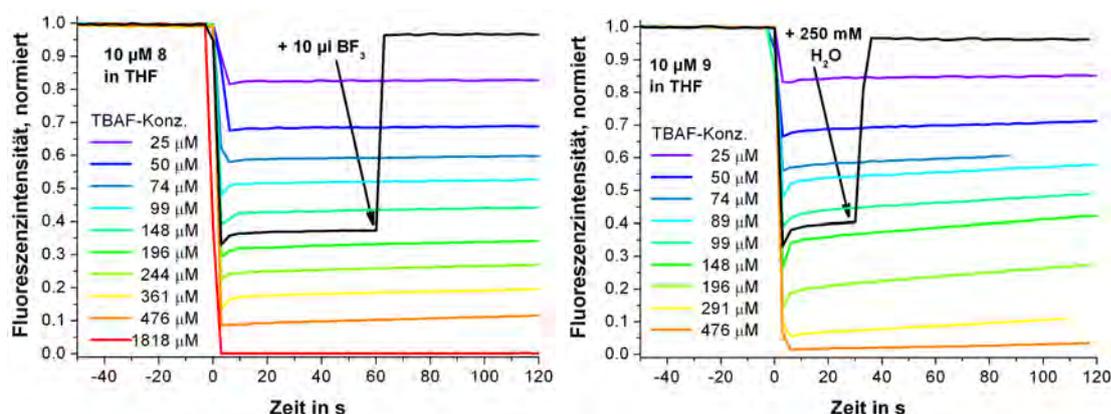


Abbildung 7.29: Fluoreszenzabklingkurve von **8** in THF mit und ohne TBAF.

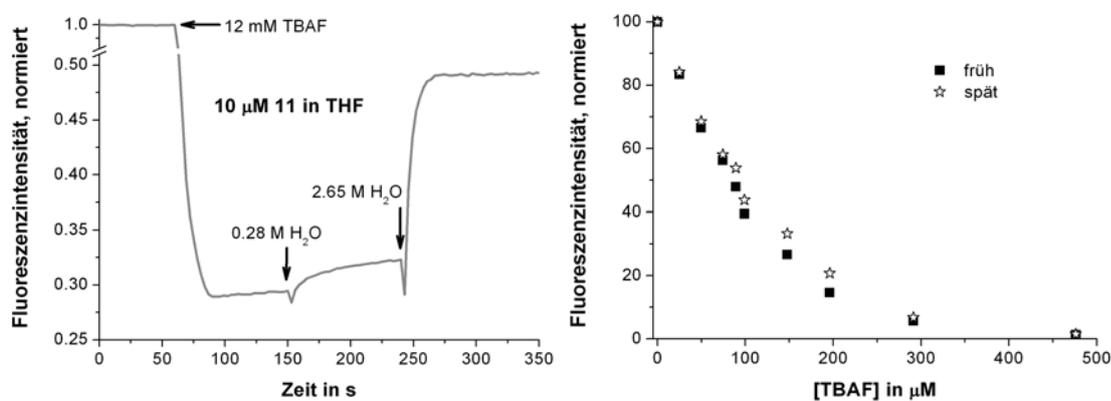
#### Zeitlicher Verlauf der statischen Fluoreszenz

Der zeitliche Verlauf der Komplexbildung im gerührten Reaktionsgemisch wurde über mehrere Minuten durch regelmäßige Fluoreszenzmessungen in Intervallen von 3 Sekunden nachverfolgt.



**Abbildung 7.30:** Abnahme der Fluoreszenzintensität nach TBAF-Zugabe zu **8** (links) und **9** (rechts) in THF, Reversibilität mit Wasser bzw.  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_3$ .

Wie in Abbildung 7.30 zu erkennen ist, fällt die Fluoreszenzintensität nach der TBAF-Zugabe instantan ab. Allerdings findet in vielen Fällen, insbesondere bei mittleren TBAF-Konzentrationen, eine Rückreaktion statt. Beobachtungen des Reaktionsgemisches über längere Zeit ergaben, dass die Fluoreszenz nicht gegen einen bestimmten Wert strebt, sondern nach einiger Zeit sehr langsam linear ansteigt. Ein stabiles Gleichgewicht wird auch nach mehreren Tagen nicht erreicht. Intensitätsverluste, die auf Photobleaching oder Luft- bzw. Sauerstoffinstabilitäten zurückzuführen sind, konnten nicht beobachtet werden. Mögliche Ursache für die Rückreaktion ist die beobachtete Reversibilität der Komplexierung mit Wasser. Sowohl die Zugabe von Wasser, als auch die von  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (siehe Abbildung 7.30), konnten die Fluoreszenzintensität aller drei Borole vollständig regenerieren. Da die verwendete TBAF-Lösung laut Herstellerangaben pro Äquivalent Fluorid



**Abbildung 7.31:** Auswirkung von Wasser auf die Komplexierung von **11** mit TBAF (links); Komplexierung von **9** direkt nach TBAF-Zugabe und 60 s später (rechts).

etwa 1.5 bis 2 Äquivalente  $\text{H}_2\text{O}$  enthält, wird vermutlich nach TBAF-Zugabe zunächst das Fluorid komplexiert und anschließend ein Teil des Komplexes durch das vorhandene Wasser wieder zurückgewonnen. Abbildung 7.31 links zeigt die Auswirkungen der Zugabe einer geringen Menge Wasser auf das Fluorid-Addukt des Borols **11**. Der Verlauf ähnelt der Rückreaktion in Abbildung 7.30 stark und stützt so die angestellte Vermutung. Der langsame, lineare Anstieg in der Fluoreszenzintensität wird dadurch verursacht, dass das System nicht vollständig abgeschlossen ist und Luftfeuchtigkeit eindringen kann.

Zudem muss bedacht werden, dass das vorhandene Wasser die Aktivität des eingesetzten Fluorids durch Hydratisierung absenkt. Die desaktivierende Wirkung des Wassers auf vorhandenes Fluorid ist auch daran zu sehen, dass nach Vorlage von Wasser in der Borollösung eine TBAF-Zugabe keine Fluoreszenzlöschung zur Folge hat. Das Fluorid wird vom Wasser abgefangen und steht nicht mehr für eine Komplexierung zur Verfügung. Eine auch wasserfrei stabile Fluoridquelle, welche keine weiteren Reaktionspartner für das Borol liefert, konnte bisher nicht ausfindig gemacht werden.

Da das Wasser als unerwünschter Reaktionspartner betrachtet werden muss, werden für die Komplexierung mit Fluorid die Werte im Minimum des Zeitverlaufs abgelesen. Ein Vergleich mit den Komplexierungswerten zu einem deutlich späteren Zeitpunkt (60 s nach der Zugabe, Abbildung 7.31 rechts) zeigt, dass insbesondere die Punkte bei mittleren TBAF-Konzentrationen Abweichungen, und dem entsprechend eine starke Beeinträchtigung durch Wasser aufweisen. Die Werte bei hohen und niedrigen TBAF-Konzentrationen sind dagegen sehr ähnlich.

### Einfache Komplexierung von **8** und **9**

Die Komplexierung von **8** und **9** zeigte die erwarteten, exponentiell abfallenden Verläufe mit der Fluoridkonzentration. Unter der Annahme, dass die Komplexierungsschritte der zwei bzw. drei Boratome in **8** bzw. **9** unabhängig voneinander sind, gilt das Reaktionsschema 7.1.



$B$  : Borolfunktionalität

$F$  : Fluorid

$BF$ : Komplex

Aus dem Massenwirkungsgesetz resultiert Ausdruck 7.2 für die Dissoziationskonstante des Komplexes. Mithilfe der Massenerhaltung lassen sich diese Konzentrationen nach den Gleichungen 7.3 und 7.4 durch die eingesetzten Anfangskonzentrationen und die Komplexkonzentration substituieren.

$$K_D = \frac{[B][F]}{[BF]} \quad (7.2)$$

$[B]$  : Konzentration der Borolfunktionalität

$[F]$  : Konzentration des Fluorids

$[BF]$ : Konzentration des Komplexes

$$[B] = [B]_0 - [BF] \quad (7.3)$$

$$[F] = [F]_0 - [BF] \quad (7.4)$$

$[B]_0$ : vorgelegte Konzentration der Borolfunktionalität

$[F]_0$ : vorgelegte Konzentration des Fluorids

Einsetzen in 7.2 liefert eine für  $[BF]$  quadratische Gleichung. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Fluoreszenzintensität mit  $[BF]$  fällt und die Fluoridkonzentration mit einem Aktivitätskoeffizienten korrigiert werden muss, ergibt sich die zur Anpassung verwendete Gleichung 7.5.

$$F = F_0 - \frac{F_0}{[B]_0} \cdot \left( \frac{[B]_0 + a[F]_0 + K_D}{2} - \sqrt{-a[F]_0[B]_0 + \left( \frac{[B]_0 + a[F]_0 + K_D}{2} \right)^2} \right) \quad (7.5)$$

$F$  : Fluoreszenzintensität

$F_0$ : Fluoreszenzintensität ohne TBAF

$a$  : Aktivitätskoeffizient des Fluorids

Die Anfangskonzentration wurden aus der Absorption bestimmt und als Anpassungsparameter vorgegeben. Die Anpassungen der Daten von **8** und **9** sind mit den Residuen in Abbildung 7.32 dargestellt; die zugehörigen Werte finden sich in Tabelle 7.4. Erfreulich ist neben den großen Korrelationskoeffizienten insbesondere, dass die Anpassungen nahezu identische Aktivitätskoeffizienten der TBAF-Lösung liefern, da sie beide mit derselben Lösung titriert wurden. Dieses Indiz unterstützt die Annahme, dass die Aktivität des Fluorids wesentlich durch Hydratisierung mit Wasser, welches in der vom Hersteller gekauften Stammlösung vorliegt, verringert wird.

Nr	$[B]_0$ in $\mu M$	$F_0$ in %	$\Delta F_0$ in %	$K_D$ $\mu M$	$\Delta K_D$ $\mu M$	$K_A$ in $M^{-1} \cdot 10^5$	$a$	$\Delta a$	$R^2$
8	1.65	100.2	2.3	7.35	0.95	1.36	0.279	0.034	0.9924
9	39.5	99.1	1.7	3.44	0.91	2.91	0.276	0.018	0.9959

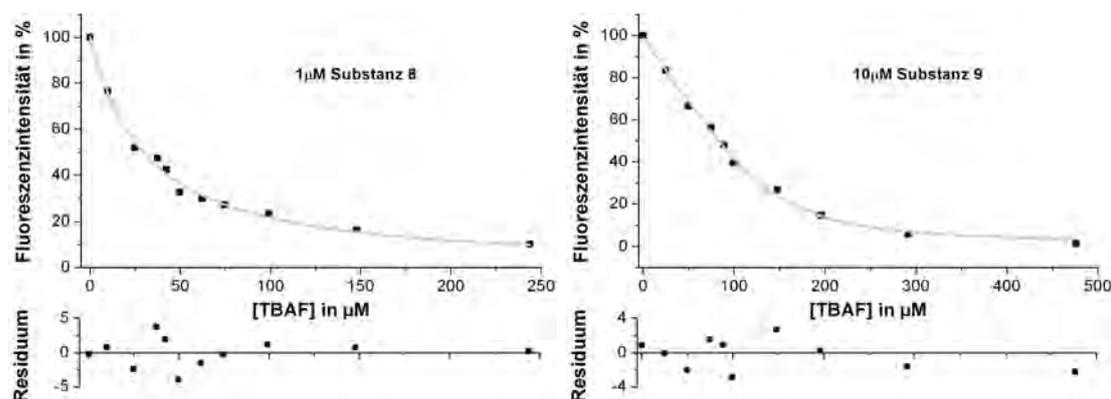
**Tabelle 7.4:** Parameter der Komplexierung von **8** und **9** mit Fluorid.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7.4 aufgeführt und passen sehr gut zu den bereits in dieser Arbeitsgruppe ermittelten Ergebnissen,<sup>[203]</sup> allein die Aktivität des Fluorids ist unterschiedlich. Dies ist wahrscheinlich auf die Verwendung verschiedener TBAF-Chargen zurückzuführen.

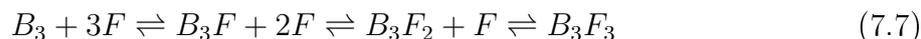
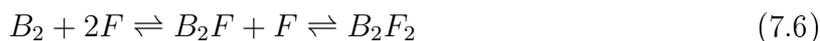
Die Komplexierungskonstanten sind im Vergleich zu denen anderer Triarylborane ungewöhnlich gering; die in der Literatur dokumentierten Werte sind größer als  $10^6 M^{-1}$ ,<sup>[204]</sup> oft sind sie sogar zu groß für eine akkurate Bestimmung.<sup>[190,191]</sup> Dabei würden die sterischen Gegebenheiten eher für eine bessere Erreichbarkeit der in dieser Arbeit präsentierten Verbindungen sprechen. Dieses Verhalten unterstreicht die in Abschnitt 7.4.1 ermittelten, geringen Lewisaciditäten des Bors in Benzodiazaborolen.

### Teilschritte der Komplexierung von **8** und **9**

Unter der Annahme, dass die Komplexierung der Boratome in einem Molekül unabhängig voneinander (also nichtkooperativ) erfolgt, lassen sich die Komplexierungskonstanten der Teilschritte berechnen.



**Abbildung 7.32:** Anpassung für den Fall einer einfachen Komplexierung.



Die nach dem Reaktionsschema 7.6 aufgestellten Dissoziationskonstanten lassen sich auf die Dissoziationskonstante des Gesamtsystems zurückführen, wie in Gleichung 7.8 exemplarisch dargestellt.

$$K_{D_1} = \frac{[B_2][F]}{[B_2F]} = \frac{1/2[B][F]}{[BF]} = \frac{1}{2}K_D \quad (7.8)$$

Nach diesem Prinzip ergeben sich die Dissoziationskonstanten der einzelnen Teilschritte gemäß den Gleichungen 7.9 für Borol **8** und 7.10 für Borol **9**.

$$K_{D_1} = \frac{1}{2}K_D \quad ; \quad K_{D_2} = 2K_D \quad (7.9)$$

$$K_{D_1} = \frac{1}{3}K_D \quad ; \quad K_{D_2} = K_D \quad ; \quad K_{D_3} = 3K_D \quad (7.10)$$

Tabelle 7.5 enthält die so berechneten Dissoziationskonstanten der einzelnen Teilschritte.

Nr	$K_{D_1}$ in $10^5 M^{-1}$	$\Delta K_{D_1}$ in $10^5 M^{-1}$	$K_{D_2}$ in $10^5 M^{-1}$	$\Delta K_{D_2}$ in $10^5 M^{-1}$	$K_{D_3}$ in $10^5 M^{-1}$	$\Delta K_{D_3}$ in $10^5 M^{-1}$
8	3.68	0.48	14.7	1.9	-	-
9	1.15	0.30	3.44	0.91	10.32	2.73

**Tabelle 7.5:** Dissoziationskonstanten der einzelnen Teilschritte.

### Komplexierung von **1** und **6**

Die für Borol **8** und **9** ermittelten Werte sollen in der Folge mit denen des einfach funktionalisierten Borols **6** verglichen werden. Der Komplexierungsverlauf von Borol **6** verhält sich jedoch völlig anders als der der Borole **8** und **9**; er ist sigmoidal (siehe Abbildung 7.33 links). Analoges ist in der Literatur auch für andere einfach funktionalisierte Arylborane beobachtet worden.<sup>[190,191]</sup> Messungen an Borol **1** belegen (siehe Abbildung 7.33 rechts), dass sich dieses Verhalten nicht auf den thienylsubstituierten Borole beschränkt, sondern ein Charakteristikum der einfach funktionalisierten Benzodiazaborole darstellt.

Obwohl Wasser die Messungen beeinflusst, kann es als direkte Ursache ausgeschlossen werden, da alle Fluoridkomplexierungen mit Wasser reversibel sind und sich für die Borole

**8** und **9** dabei nur die Fluoridaktivität verändert. Zudem konnte der sigmoidale Kurvenverlauf auch unter Annahme eines zusätzlichen Gleichgewichts zwischen Komplex und Wasser nicht simuliert werden.

Die verminderte Komplexierungsbereitschaft bei geringen TBAF-Zugaben lässt vermuten, dass das unkomplexierte Borol hier in einer weniger zugänglichen Form vorliegt als bei hohen TBAF-Zugaben. So könnten zum Beispiel zu Beginn Aggregate des Monomers vorliegen, so dass ein Teil des Borols dem Fluorid nicht zugänglich ist. Wird ausreichend Fluorid hinzugegeben, so disaggregiert das Borol aufgrund der durch Komplexierung verminderten Borolkonzentration. Dabei erscheint plausibel, dass die sterisch anspruchsvolleren und nicht planaren Borole **8** und **9** nicht so einfach Aggregate ausbilden können wie das kleine, planare Borol **6**.

Ein weiteres Indiz für diese Vermutung liefert die Anpassung der Daten nach dem sogenannten Hill-Modell. Dabei wird von einem stark kooperativen Verhalten mehrerer Boroleinheiten untereinander ausgegangen; wird eine Einheit komplexiert, verläuft die Komplexierung der anderen Einheiten quasi instantan.

Die Hill-Anpassungen der Borole **8** und **9** liefern für die Zahl der kooperierenden Einheiten einen Wert um 1, wie erwartet liegt hier also keine Kooperation vor. Für die Borole **1** und **6** dagegen liegt  $n$  zwischen 2 und 4. Die Anpassungen sind in Anbetracht der Schlichtheit des zugrunde liegenden Modells zwar nicht von optimaler Güte, können aber im Gegensatz zu allen anderen Lösungsansätzen den prinzipiellen Kurvenverlauf gut nachvollziehen.

Der physikalische Vorgang dürfte komplizierter sein. Zum einen sollte die Kooperation zwischen den Boroleinheiten etwas schwächer ausfallen, so dass durch die Komplexierung

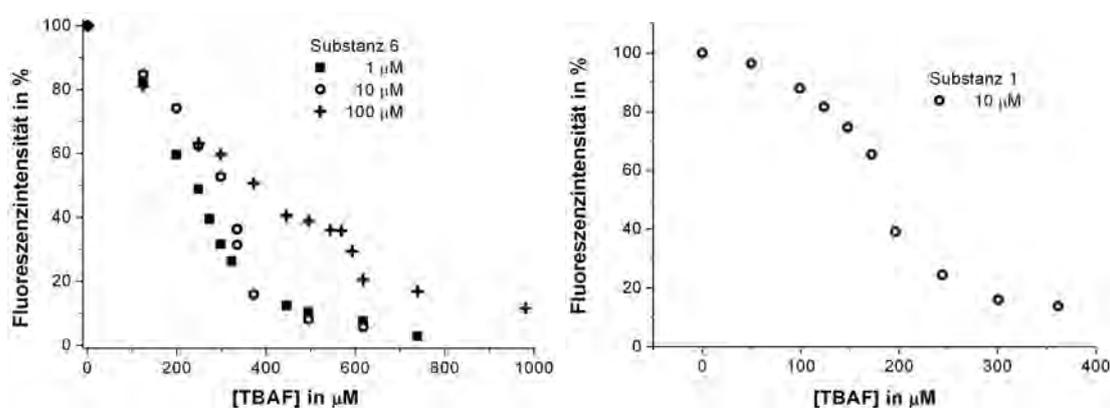


Abbildung 7.33: Komplexierung der Verbindungen **6** (links) und **1** (rechts).

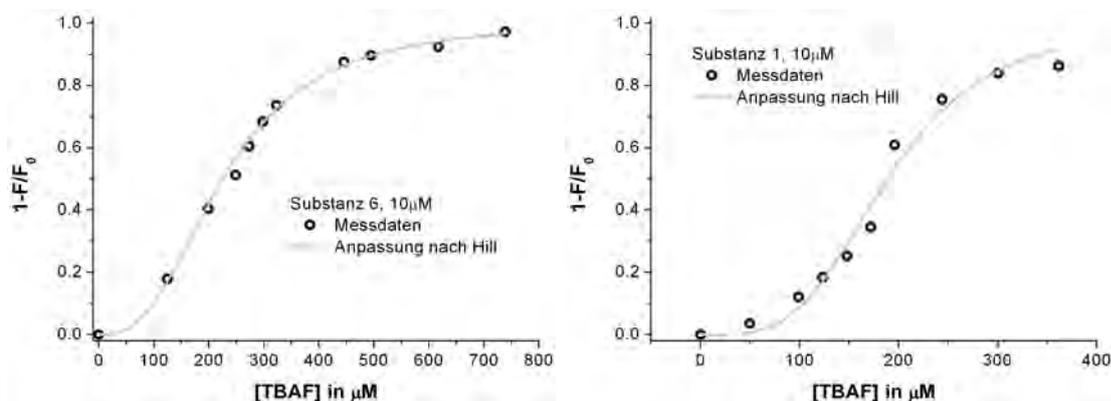


Abbildung 7.34: Anpassung nach Hill für **6** (links) und **1** (rechts).

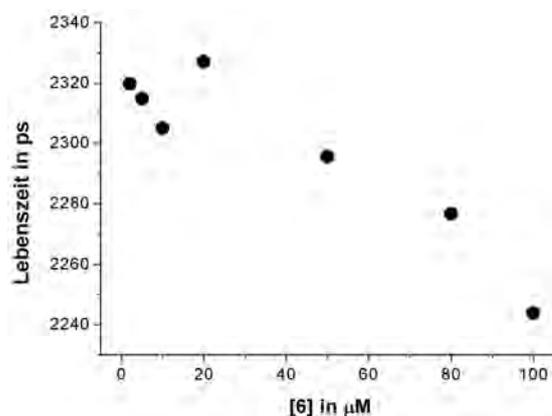


Abbildung 7.35: Lebenszeit von Borol **6** in THF in Abhängigkeit von der Konzentration.

der ersten Boroleinheit die weiteren Schritte zwar beschleunigt werden, aber nicht instantan einsetzen. Zum anderen erhöht die Zugabe von Wasser und Salz die Polarität der Lösung und damit auch die Aggregationsbereitschaft der Borole, so dass das Plateau zu Beginn der Kurve verstärkt wird. Dies könnte auch erklären, wieso die Kurven bei verschiedenen Konzentrationen von Borol **6** zu Beginn auf derselben Trajektorie linear absinken, wobei dieser Kurvenverlauf umso länger durchgehalten wird, je höher die vorgelegte Borolkonzentration ist.

Um das Auftreten von Aggregaten beweisen zu können, wurden Lebenszeit- und Anisotropiemessungen an Borol **6** bei Konzentrationen von 1 bis 100  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die Lebenszeiten in Abbildung 7.35 zeigen eine sehr geringe, aber stetige Abnahme von 2330 auf 2240 ps mit der Konzentration. Diese Beobachtung allein kann jedoch nicht als Beweis für eine Aggregation gelten. Anisotropiemessungen lieferten Rotationskorrelationszeiten zwischen 50 und 80 ps, welche sich allerdings im Bereich der Zeitauflösung bewegen. Es

könnten daher auch deutlich kürzere, reale Korrelationszeiten vorliegen. Während die Existenz größerer Aggregate mit  $n \geq 25$  ausgeschlossen werden kann, ist über kleinere Zusammenschlüsse im Bereich  $1 \leq n \leq 10$  daher keine Aussage möglich. Dazu sind aufgrund der geringen Viskosität des THFs und der geringen Molekülgröße von Borol **6** Messungen mit einer deutlich besseren Zeitauflösung nötig.

### Fluoridsensitive Fluoreszenzschalter

Die Borole **10** und **11** verfügen über eine strukturelle und funktionelle Besonderheit: Sie sind mit zwei verschiedenen Boranzentren ausgerüstet, einem Benzodiazaborol und einem Dimesitylboran. Da sich die Dimesitylborane, wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, offensichtlich leichter als die Benzodiazaborole mit Fluorid komplexieren lassen, liegen hier also zwei Komplexierungsstellen mit unterschiedlicher Fluoridaffinität vor. Dieses Phänomen soll genutzt werden, um die Fluoreszenz der Borole **10** und **11** durch gezielte TBAF-Zugabe stufenweise zu verändern.

Unter Zugabe von ein bis zwei Äquivalenten TBAF zeigt die Fluoreszenz von Borol **11** in allen Lösungsmitteln eine Verschiebung der Emission in den blauen Spektralbereich, wie in Abbildung 7.36 dargestellt. Die Änderung der Fluoreszenz mit der Fluoridkonzentration soll für Borol **10** und **11** detaillierter untersucht werden. Da TBAF als Lösung in THF vorliegt, wird THF als Lösungsmittel für eine exemplarische Analyse ausgewählt.

Abbildung 7.37 zeigt den gemessenen Verlauf der Fluoreszenzintensitäten verschiedener Wellenlängen mit der Fluoridkonzentration. Die grüne Fluoreszenz des Borols **11** und die blaue des Borols **10** werden unter Zugabe eines Äquivalentes TBAF effizient gelöscht. Die Komplexierungskonstante ist dabei so groß, dass sie nicht verlässlich berechnet werden kann und dem entsprechend der sehr lewisaciden Dimesitylborylfunktion zuzuordnen ist.<sup>[190, 191]</sup>

Nach diesem ersten Schritt fluoresziert Borol **11** blau und Borol **10** im ultravioletten Spektralbereich. Die Anregungs- und Emissionsspektren des Borols **11** und des einfachen Fluorid-Addukts von **11** sind in Abbildung 7.38 dargestellt.

Die stark unterschiedlichen Anregungsspektren weisen darauf hin, dass hier zwei völlig verschiedene Übergänge für die grüne Farbe des reinen Borols und die blaue des einfach komplexierten Borols verantwortlich sind. Offensichtlich agiert die lewisacide Dimesityl-

borylfunktion in **11** als Elektronenakzeptor und das elektronenreichere Benzodiazaborol als Elektronendonator, so dass es in den unkomplexierten Borolen **10** und **11** zu *charge transfer*-Übergängen kommt. Dieses Verhalten wurde bei Dimesitylborylresten schon in

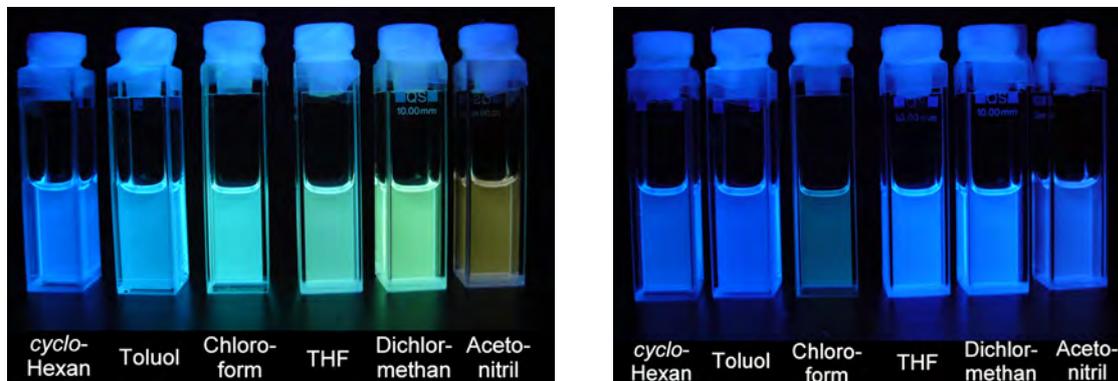


Abbildung 7.36: Fluoreszenz von **11** ohne (links) und mit TBAF (rechts).

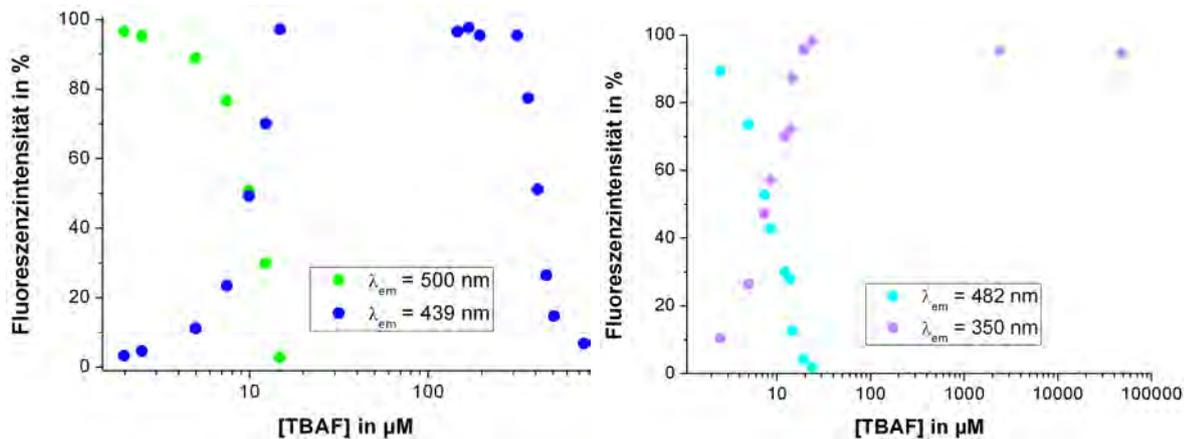


Abbildung 7.37: Komplexierungsverlauf von **10** (links) und **11** (rechts) mit TBAF.

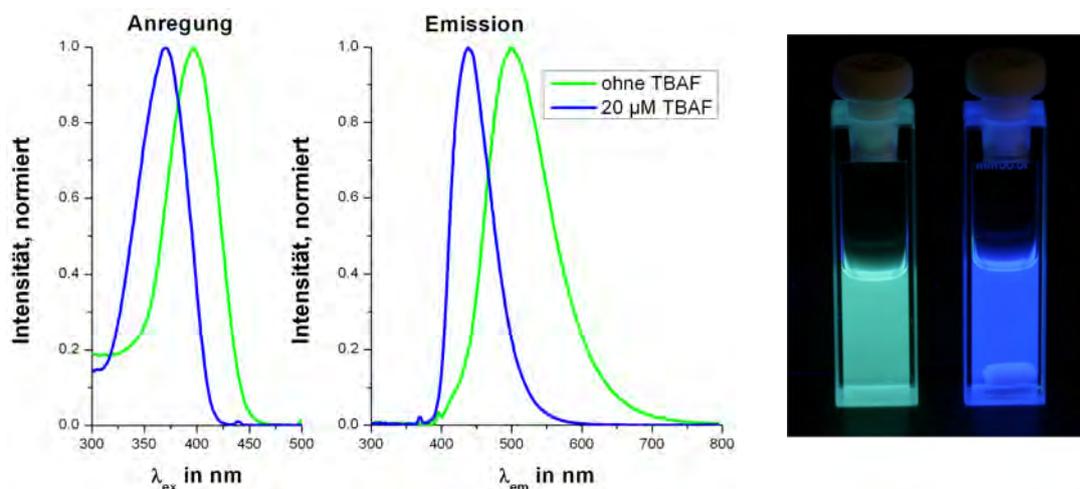
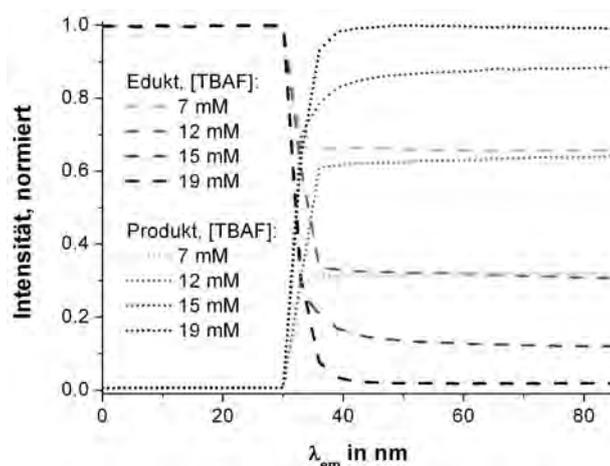


Abbildung 7.38: Anregung und Emission von Borol **11** ohne und mit 2 Äquivalenten TBAF.



**Abbildung 7.39:** Edukt- und Produktkinetik von Borol **10** bei TBAF-Zugabe.

Kombination mit Aminogruppen als Elektronendonoren beobachtet<sup>[191]</sup> und steht im Einklang mit der geringen Lewisacidität der Diazaboroleinheit sowie dem ungewöhnlich ausgeprägten Solvatochromismus der Verbindungen **10** und **11**. Nach der Komplexierung der Dimesitylborylgruppe mit Fluorid zeigt sich dagegen die charakteristische, blaue Fluoreszenz aus dem  $\pi - \pi^*$ -Übergang der Diazaboroleinheit.

Während sich die Fluoreszenz des Borols **11** in einem zweiten Schritt unter Zugabe von insgesamt 41 Äquivalenten TBAF vollständig löschen lässt, reichen für die zweite Komplexierung des Borols **10** nicht einmal 5000 Äquivalente, um die Fluoreszenz über einen Verdünnungseffekt hinaus zu senken. Dies liegt vermutlich an der schlechten sterischen Zugänglichkeit des Boratoms in der Diazaboroleinheit von Borol **10**.

Abbildung 7.39 bestätigt am Beispiel des Borols **10**, dass die Abnahme der Eduktkonzentration exakt der Zunahme der Konzentration des einfachen Fluorid-Adduktes entspricht. Dazu wurde die Komplexierung bei einer für beide Spezies funktionierenden Anregungswellenlänge von 327 nm vermessen. Ein Substanzverlust durch Reaktionen mit Wasser ist demnach nicht zu beobachten.

Dazu passt auch, dass sich der erste Komplexierungsschritt für beide Borole als nur sehr schwer mit Wasser reversibel erweist. Während  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  eine schnelle Regeneration der ursprünglichen Borole initiiert, muss ein Überschuss von 28000 Äquivalenten Wasser eingesetzt werden, um 5% des Komplexes von Borol **11** wieder aufzulösen (siehe Abbildung 7.31).

## 7.5 Fluoreszenz in Festkörpern und Polymeren

Um als leuchtende oder elektronenleitende Schicht in organischen LEDs Verwendung zu finden, müssen die Substanzen in fester Phase vorliegen. Dabei kann das Borol entweder rein als Kristall bzw. dünne Schicht (Abschnitte 7.5.1 bzw. 7.5.2), oder eingebettet in einer Feststoffmatrix (7.5.3) eingesetzt werden. Letzteres hat den Vorteil, dass nur geringe Substanzmengen benötigt werden, und die Eigenschaften des umgebenden Materials vom Borol unabhängig variiert werden können. Auch als Bestandteil eines Polymers könnten weitere Materialparameter, wie die elektrische Leitfähigkeit, den Anforderungen gemäß variiert werden. Ein erster Versuch der Einbindung eines Diazaborols in Polymere wird in Abschnitt 7.5.4 diskutiert.



Abbildung 7.40: Fotos und Fluoreszenzbilder von 1, 2, 3, 4 und 17.

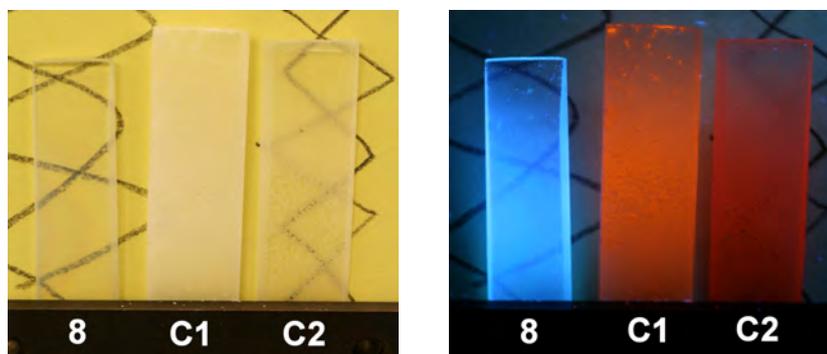


Abbildung 7.41: Foto und Emission dünner Schichten von 8, C1 und C2.

### 7.5.1 Kristallfluoreszenz

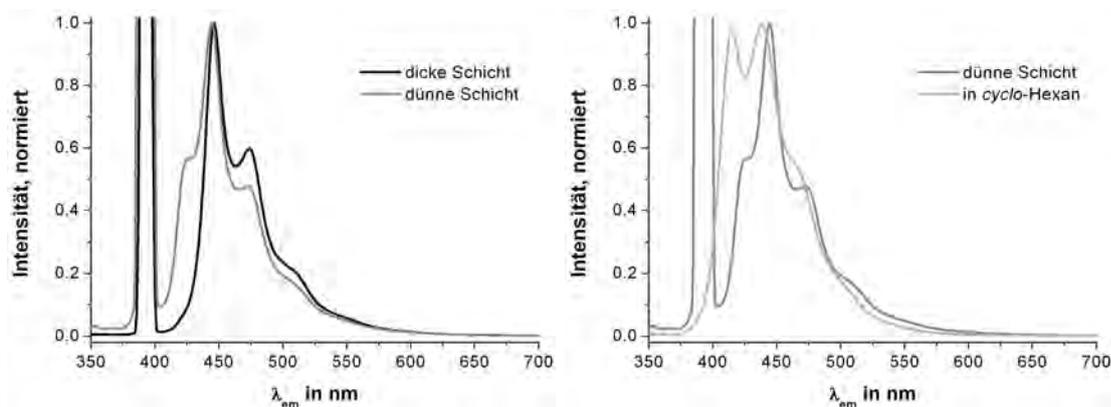
Um einen ersten Eindruck von der Leuchtfähigkeit der Verbindungen in der festen Phase zu erhalten, wurden einige Kristalle mit UV-Licht bei 260 nm bestrahlt und unter dem Mikroskop betrachtet. Alle Verbindungen, die größere Kristalle ausbilden, zeigen eine blaue Fluoreszenz. Die Fluoreszenz pulverförmiger Verbindungen konnte aufgrund der geringeren Lichtdurchlässigkeit nicht auf diese Weise sichtbar gemacht werden. Die Abbildung 7.40 stellt einfache Fotos der beobachteten Fluoreszenz gegenüber. Gut zu erkennen sind rote Verfärbungen an Kristall **4**, welche für den Zerfall an Luft charakteristisch sind. Diese Areale verlieren dabei auch ihre Leuchtkraft.

Die nach der Synthese vorhandenen Kristalle ermöglichen die Beobachtung der Fluoreszenz im Festkörper. Die Quantifizierung von Emissionsspektren, Lebenszeiten und Quantenausbeuten ist hier aber sehr schwierig. Zum Einen verfälschen Reabsorptionseffekte das Spektrum, zum Anderen weisen die gerichteten Kristalle oft erhebliche Polarisations-effekte auf. Eine Vermessung ungeordneter, dünnerer Schichten ist daher den Kristallen vorzuziehen und entspricht auch eher der technischen Applikation.

### 7.5.2 Fluoreszenz dünner Schichten

Wie im vorangegangenen Abschnitt erläutert, sind dünne, durch Sublimation erzeugte Schichten einfacher zu handhaben als Kristalle. Abbildung 7.41 zeigt drei UV-durchlässige Quarzplatten mit Diazaborolbeschichtung und der zugehörigen Fluoreszenz. Die detaillierte Untersuchung der zusätzlich mit Carboranclustern versehenen Borole **C1** und **C2** ist zwar nicht Bestandteil dieser Arbeit; sie demonstrieren jedoch mit ihrer in den rot-orangen Spektralbereich verschobenen Fluoreszenz die durch Benzodiazaborole zugängliche, spektroskopische Vielfalt.

Die Fluoreszenz einer schätzungsweise 10-100  $\mu\text{M}$  dicken Schicht von Borol **8** ist in Abbildung 7.42 dargestellt und zeigt eine ähnliche, wenn auch nicht identische Bandenstruktur wie in *cyclo*-Hexan. Beide Spektren weisen vier Banden auf, welche um etwa 5 nm zueinander verschoben sind, wobei die Bande bei 425 nm im Spektrum der dünnen Schicht nur als kleine Schulter zu erkennen ist. Die geringe Intensität dieser Bande kommt durch Reabsorptionseffekte zustande (siehe Abbildung 7.42 links); wird die Dicke der Schicht weiter vermindert, sollten sich die Intensitäten stärker aneinander angleichen. Die Verschiebung



**Abbildung 7.42:** Emission von **8** in dünner und dicker Schicht (links) und in *cyclo-Hexan* (rechts).

wurzelt dagegen in der Beeinflussung der Übergangsenergien durch Molekülgeometrie und Umgebungspolarität, und ist daher, wie in Abbildung 7.42 links zu sehen, von der Schichtdicke unabhängig.

Die beobachtete Ähnlichkeit zwischen der Fluoreszenz dünner Schichten und in *cyclo-Hexan* deutet darauf hin, dass es sich bei der Festkörperfluoreszenz um eine Eigenschaft der einzelnen Moleküle, und nicht um das Resultat einer ausgeprägten Festkörperbande handelt. Somit kann von den gemessenen Wellenlängenbereichen für die Anregung und Emission in *cyclo-Hexan* auf die spektrale Verteilung der Festkörperfluoreszenz geschlossen werden; die in Abschnitt 7.3 ermittelten Abhängigkeiten von der Borolstruktur haben also auch für Festkörper Gültigkeit. Da sich Festkörper in Bezug auf Fluoreszenzlöschung oft völlig anders verhalten als Moleküle in Lösung, ist diese Übertragung für Quantenausbeuten und Lebenszeiten jedoch nicht möglich. Mangels ausgefeilter Apparaturen, welche zur verlässlichen Bestimmung von Quantenausbeuten in Festkörpern notwendig sind, kann hier kein Vergleich angestellt werden.

### 7.5.3 Fluoreszenz in einer Kunststoffmatrix

Eine weitere Möglichkeit, die Farbstoffe in fester Phase zu nutzen, bietet die Einbettung in eine Trägermatrix. Hierzu wurden in Kooperation mit der Firma Henkel Kunststoffplatten aus Polyethylen und Polypropylen mit 30 bis 1000 ppm des Borols **11** hergestellt. Das Borol liegt dabei chemisch ungebunden und homogen verteilt in den Platten vor.

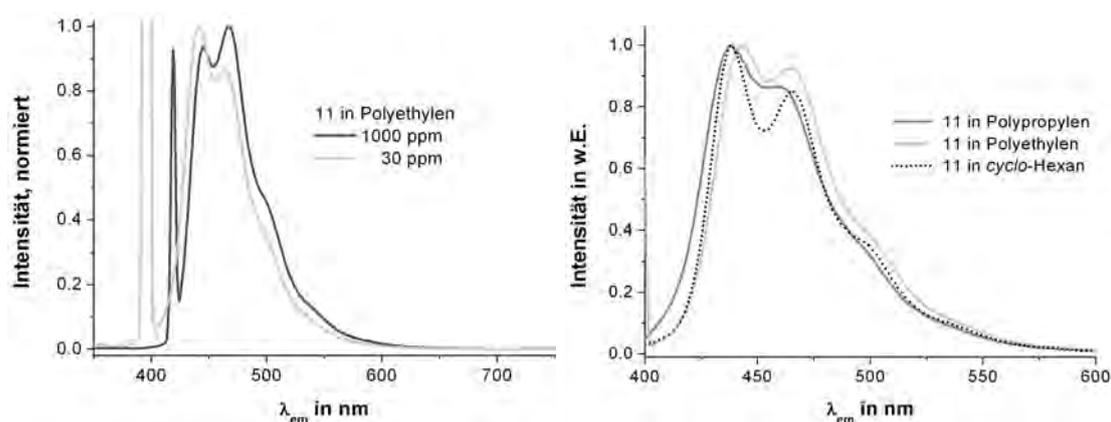


Abbildung 7.43: Emission von **11** in Kunststoff und *cyclo-Hexan*.

Die Spektren von Borol **11** in Kunststoff sind nahezu identisch mit denen des Borols **11** in *cyclo-Hexan*, Unterschiede werden hauptsächlich durch Reabsorptionseffekte verursacht (siehe Abbildung 7.43). Abweichungen zwischen Polyethylen und Polypropylen als Trägermaterial sind marginal. Quantenausbeuten konnten zwar nicht bestimmt werden; die in Relation zu den Absorptionswerten beobachteten, hohen Fluoreszenzintensitäten weisen aber auf Werte nahe denen in Lösung (ca. 50 %) hin.

#### 7.5.4 Fluoreszenz in Polymeren

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lothar Weber wurden zwei benzodiazaborolhaltige Polymere, **P1** und **P2**, synthetisiert, welche auf ihre spektroskopischen Eigenschaften hin untersucht werden. Aus Gründen der Löslichkeit wurden die zugehörigen Messungen in Dichlormethan durchgeführt.

Die in Tabelle 7.6 aufgetragenen, spektroskopischen Parameter sind für mögliche Anwendungen wenig vorteilhaft. Anregungs- und Emissionsspektren liegen vollständig im ultravioletten Spektralbereich (siehe Abbildung 7.45), zudem sorgen geringe Extinktions-effizienzen und mäßige Quantenausbeuten für eine geringe Leuchtkraft.

Hinzu kommt, dass die Polymere unter Lichteinwirkung nicht stabil bleiben. Um dies zu untersuchen wurden vier Proben derselben, frisch angesetzten Lösung von Polymer **P1** fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Drei wurden gleich nach dem Ansetzen der Lösung mit unterschiedlichen Wellenlängen bestrahlt. Eine vierte Probe wurde zunächst zwei Stunden an Luft gerührt und dann mit Licht bestrahlt.

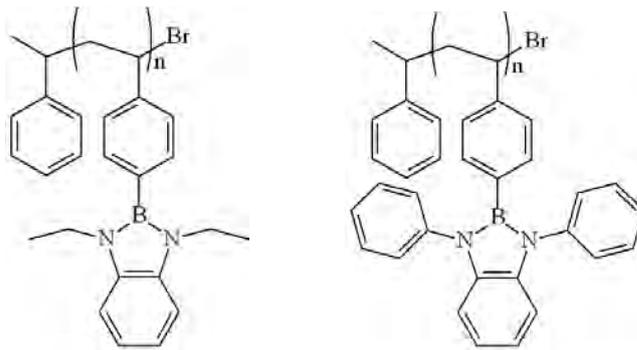


Abbildung 7.44: Strukturformeln von **P1** und **P2**.

Stoff	$\lambda_{ex}$ in nm	$\lambda_{em}$ in nm	$\epsilon$ in $M^{-1}cm^{-1}$	$\bar{\tau}$ in ps	$\phi$
P1	292	360	8290	780	0.77
P2	293	360	7840	820	0.51

Tabelle 7.6: Eigenschaften von **P1** und **P2** in DCM.

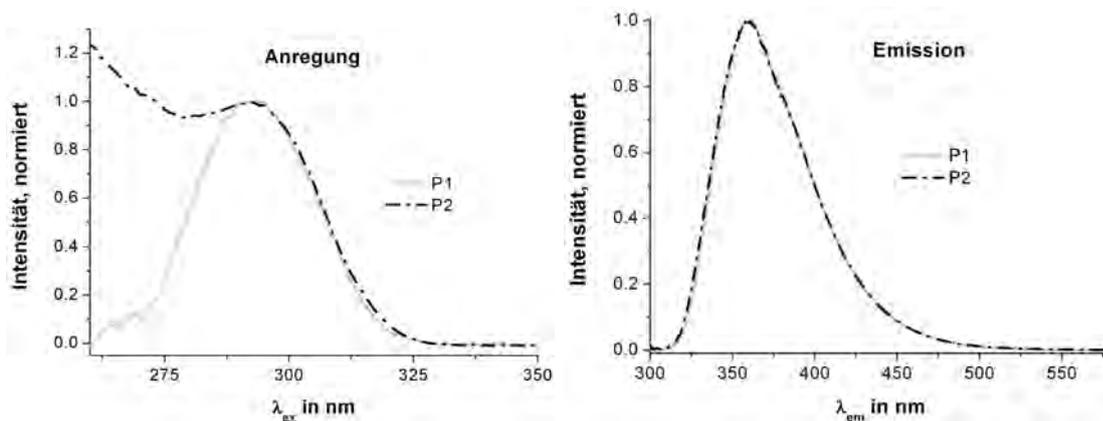


Abbildung 7.45: Anregung und Emission von **P1** und **P2**.

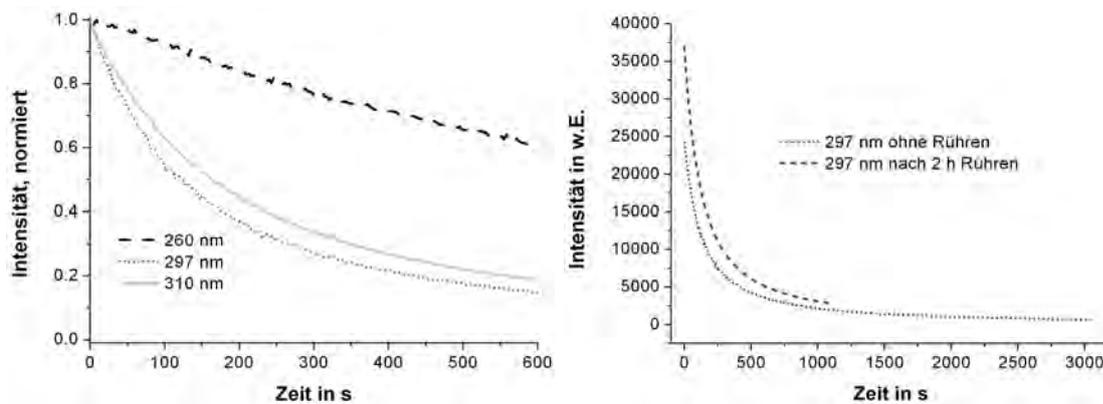


Abbildung 7.46: Photobleaching von **P1** bei verschiedenen Anregungswellenlängen (links) und nach 2h Rühren (rechts).

Abbildung 7.46 zeigt deutlich, dass unter Lichteinwirkung binnen weniger Minuten erhebliche Intensitätsverluste auftreten. Da die Signalverminderung von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes abhängt und zudem einfaches Rühren an der Luft keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität hat, ist dieser Effekt eindeutig auf Photoneneinwirkung zurückzuführen. Dabei korreliert die Stärke des Photobleachings mit der Anregbarkeit der Benzodiazaboroleinheit bei der entsprechenden Wellenlänge, und nicht mit dem Energiegehalt des eingestrahlten Lichts.

Dass die Fluoreszenzintensität nach Rühren etwas höher liegt als die ohne Rühren, wird durch unterschiedliche Verweilzeiten der Probe im Strahlengang vor dem Starten der Messung verursacht. Die Abklingkurven sind mit einer biexponentiellen Zerfallsfunktion anzupassen; neben dem Photonfluss muss also noch mindestens ein weiterer Parameter (Sauerstoff, Stoßpartner o.ä.) in die Abklingkurve eingehen.

Insgesamt sind die untersuchten Polymere für potentielle Anwendungen ungeeignet, daher erübrigen sich detaillierte Untersuchungen zu den Ursachen des Photobleachings. Weiterführende Studien werden in Zukunft klären, ob durch die Verwendung anderer Grundgerüste oder Benzodiazaboroleinheiten bessere Ergebnisse erzielt werden können.

## 7.6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist die Verbindungsklasse der Benzodiazaborole im Hinblick auf fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften in Lösung und in fester Phase, sowie in Bezug auf ihre Lewisacidität und Eignung als Fluoridsensor erstmals umfassend untersucht worden.

### Fluoreszenz in Lösung

Alle untersuchten Benzodiazaborole weisen Absorptionsmaxima im nahen UV auf. Das Absorptionsvermögen der Verbindungsklasse liegt im Bereich bekannter Fluoreszenzstandards für den blauen Spektralbereich; strukturbedingte Trends sind nicht auszumachen. Der Emissionsbereich zeigt dagegen eine deutliche Abhängigkeit von der zugrunde liegenden, chemischen Struktur. Der Einsatz von Donor-Akzeptorpaaren in den Borolen **10**, **11** und **17** liefert dabei die größten Emissionswellenlängen.

Die Emissionseffizienz verhält sich gegenläufig zu den Wellenlängenbereichen: Die UV-Emitter **1**, **2** und **4** weisen sehr gute Quantenausbeuten auf, während die thienylsubstituierten Borole **8** und **9**, sowie das schwefelhaltige Borol **3** durch den *heavy atom*-Effekt etwas geringere Quantenausbeuten zwischen 60 und 85% zeigen. Die Quantenausbeuten der Borole **10**, **11** und **17** sind in *cyclo*-Hexan zwar gut, erreichen in polaren Lösungsmitteln aber nur noch mäßige bis schlechte Werte.

Die ermittelten Dipolmomente zeigen, dass die Benzodiazaboroleinheit besser als  $\pi$ -Donor denn als  $\pi$ -Akzeptor eines *charge transfer*-Paares fungiert. Auch die Einführung eines separaten Donor-Akzeptorpaares in Borol **17** resultiert in einem großen Übergangsdipolmoment. Für Borol **11** und **17** wird daher durch Lösungsmittelvariation ein großer Wellenlängenbereich zugänglich. Die Übergangsdipolmomente lassen potentielle, nicht-lineare Effekte vermuten, welche im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiter untersucht wurden. Insgesamt bietet die Stoffklasse der Benzodiazaborole mit hohen Quantenausbeuten, gutem Absorptionsvermögen und Emissionswellenlängen im blauen Spektralbereich in Kombination mit hoher Luft- und Wasserstabilität viel Potential für technische Anwendungen. Um hohe Quantenausbeuten besser mit einer Emission im Sichtbaren zu verbinden, ist für die Zukunft die Synthese von phenylethynylsubstituierten Benzodiazaborolen mit einer Dimesitylborylfunktion am Phenylring als Elektronenakzeptor geplant. Diese Funktionalisierung führte bereits in den Borolen **10** und **11** zu hohen Emissionswellenlängen; die Verwendung des Grundgerüsts von **1** vermag eventuell die Quantenausbeute anzuheben.

### Quenching mit Lewisbasen

Die durchgeführten Quenchinguntersuchungen belegen die geringe Lewisacidität der Benzodiazaborole im Vergleich zu anderen Triarylboranen. So konnte keines der untersuchten Borole mit Pyridin komplexiert werden, statt dessen tritt bei großen Überschüssen dynamisches Quenching auf. Dagegen lassen sich **1**, **6**, **8** und **9** mit Fluorid komplexieren, allerdings weisen sie vergleichsweise geringe Komplexierungskonstanten auf. Als Sensoren für sehr kleine Mengen Fluorid sind sie daher nicht geeignet. Der diffizile Komplexierungsmechanismus konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig entschlüsselt werden.

Zur Konstruktion neuartiger, fluoridsensitiver Fluoreszenzschalter wurden die verschiedenen Lewisaciditäten von Bor in Dimesitylboranen und Benzodiazaborolen genutzt. Die

Fluoreszenz dieser Moleküle durchläuft einen Farbumschlag bei der Zugabe von bis zu einem Äquivalent Fluorid, da sich durch Komplexierung der Dimesitylborolfunktion das konjugierte System schlagartig verringert und ein *charge transfer*-Übergang nicht mehr möglich ist. Der beobachtete Farbumschlag in Kombination mit den großen Komplexierungskonstanten prädestiniert **10** und **11** für einen Einsatz als Fluoridsensor.

### Fluoreszenz in Festkörpern und Polymeren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vielfältige Methoden getestet, Benzodiazaborole in eine OLED-geeignete, feste Phase einzubringen. Erste Versuche, Polymere mit Benzodiazaborolen an den Seitenketten zu konstruieren, lieferten Verbindungen mit ungünstigen photophysikalischen Eigenschaften. Quantenausbeute, Emissionsbereich und Photostabilität der Verbindungen müssen erst optimiert werden, bevor eine Anwendung in realistische Nähe rücken kann.

Sowohl die Kristalle als auch dünne Schichten der Benzodiazaborole zeigten dagegen eine blaue Fluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich. Die Ähnlichkeit der Spektren dünner Schichten und Lösungen in *cyclo*-Hexan lässt auf das Vorliegen sogenannter *small molecules* im Gegensatz zu ausgedehnten Feststoffbändern schließen. Somit sind die Anregungs- und Emissionswellenlängen in Lösung durchaus auf den Festkörper übertragbar.

Die Einbettung des Borols **11** in eine Kunststoffmatrix hat vielversprechende Ergebnisse gezeigt: Auch hier ähneln die Spektren stark denen der *cyclo*-Hexan-Lösungen, außerdem wurde eine große Leuchtkraft beobachtet. Durch Variation der Kunststoffeigenschaften kann das System in nachfolgenden Studien stärker an die Anforderungen für OLEDs, z.B. in punkto elektrischer Leitfähigkeit, angepasst werden.

In dieser Arbeit lag der Fokus weitgehend auf den photophysikalischen Eigenschaften der Benzodiazaborole in Lösung, doch liefert sie einen guten Ausgangspunkt für ausgedehnte Studien an der festen Phase. Die in Abschnitt 3.2 vorgestellte, fiberoptische Erweiterung der AES-Apparatur kann in zukünftigen Untersuchungen wertvolle Erkenntnisse zur Festkörperfluoreszenz ohne störende Polarisierungseffekte liefern. Auch die Bestimmung von Quantenausbeuten in der festen Phase mit Hilfe einer Ulbricht-Kugel stellt eine sinnvolle Ergänzung dar.

*Im Meer des Lebens, Meer des Sterbens  
in beiden müde geworden  
sucht meine Seele den Fels,  
an dem alle Brandung zerschellt.*

*Japan, 7. Jahrhundert*

## 8 Zusammenfassung

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer Analysemethoden in der Fluoreszenzspektroskopie und deren Anwendung im Rahmen systematischer Studien in verschiedenen interdisziplinären Forschungsprojekten. Dabei stellen die an der Universität Bielefeld zur Verfügung stehenden, mehrdimensionalen statischen und dynamischen Techniken einen hervorragenden Ausgangspunkt für dieses Unterfangen dar.

Um das Potential der vorhandenen Geräte optimal nutzen zu können, wurden zunächst wesentliche Verbesserungen an der Kalibrationsroutine vorgenommen. Auf diese Weise gelang der quantitative Abgleich dynamischer Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen Emissionswellenlängen, welcher eine essentielle Voraussetzung für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur spektralen Relaxation darstellt. Auch die Kalibration des statischen Systems wurde durch die neu entwickelte IR-Korrektur verbessert, so dass sich insgesamt verlässlichere Werte für Emissionsbereiche und Quantenausbeuten ergeben. Einen weiteren Schwerpunkt der apparativen Arbeiten bildete die fiberoptische Erweiterung der AES. Mit ihrer Hilfe wird es in Zukunft möglich sein, die Fluoreszenz immobilier Proben, wie z.B. die Kristalle der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Diazaborole, polarisationsaufgelöst und somit artefaktfrei untersuchen zu können.

Auf Basis der verbesserten Kalibrationsroutine gelang die bei weitem größte, literaturbekannte systematische Studie zur Untersuchung der spektralen Relaxation an zwanzig verschiedenen Peptiden und Proteinen. Ausgangspunkt dieser Untersuchung stellt eine vollständige fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der Proteine zur Sicherstellung der korrekten Faltung dar. Vor diesem Hintergrund ist eine Methode entwickelt worden, welche die Detektion von Relaxationsprozessen im Nanosekundenbereich auf Basis einer einzigen Messung ohne Temperatur- und Viskositätsvariation ermöglicht. Mit Hilfe des neu entwickelten Verfahrens ergab sich eine klare Evidenz für spektrale Relaxation in drei der zwanzig untersuchten Proben. Durch die flexible Wahl der entsprechenden Zeit-

bereiche konnten auch Daten für Reorganisationsprozesse im Subnanosekundenbereich erhoben werden, welche das erhaltene Gesamtbild weiter abrunden. Damit steht in der Proteindynamik erstmals ein Werkzeug zur Verfügung, welches die schnelle und effiziente Untersuchung der spektralen Relaxation ermöglicht und somit den Boden für weitgreifende, systematische Studien im Hinblick auf die Zusammenhänge zwischen Reorientierung und Proteinstruktur, -beweglichkeit oder auch -aminosäuresequenz ebnet. Auf diese Weise kann die vorgestellte Methode in Zukunft gegebenenfalls dazu beitragen, ein tief greifendes Verständnis für photoinduzierte Reorganisationsprozesse in Proteinen zu entwickeln.

Ein weiterer Fokus der Arbeit lag auf der Optimierung mehrdimensionaler, fluoreszenzmikroskopischer Methoden, welche sich insbesondere zur Beobachtung von Proteinreaktionen, -aggregationen und -faltungsprozessen *in vivo* eignen. Dabei konnte der Funktionsbereich des außergewöhnlich flexiblen hs-FLIM-Mikroskops der Laser Analytics Group an der Universität Cambridge auf den roten Spektralbereich erweitert werden, so dass nun alle Anregungs- und Emissionswellenlängen im sichtbaren Spektralbereich frei wählbar zur Verfügung stehen. Auf der Grundlage dieser spektralen Flexibilität wurde eine Methode vorgestellt, mit der die Separation der Fluoreszenzbeiträge spektral sehr ähnlicher Fluoreszenzmarker *in vitro* und *in vivo* möglich wird. Diese Untersuchungen legen den Grundstein für die Ausweitung der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie auf die simultane Analyse von drei und mehr Farbstoffen, welche statistische Gewebeanalysen, z.B. im Bereich der Krebsdiagnostik, in den Bereich des Möglichen rücken würden. Im Fokus des dritten Mikroskopieprojektes stand die Parkinson erzeugende Aggregation des  $\alpha$ -Synukleins in neuronalen Zellen. Durch Markierung mit GFP am C-Terminus gelang die Beobachtung dieses Prozesses anhand einer signifikanten Lebenszeitverringerung *in vitro* und in humanen, neuronalen Zellen. In auf dieser Arbeit aufbauenden, bereits publizierten Studien gelang nicht nur die Beobachtung der Aggregation in lebenden Fadenwürmern, sondern auch die Übertragung des Messprinzips auf einen analogen Aggregationsprozess, welcher für die Entstehung von Huntington verantwortlich zeichnet. Weiterführende Forschungsarbeiten werden in Zukunft zeigen, ob dieser Ansatz tatsächlich bis zum technisch nutzbaren *drug screening* weiterentwickelt werden kann.

Den dritten Schwerpunkt der Arbeit bildete die systematische Analyse der photophysikalischen Eigenschaften lumineszenter Benzodiazaborole im Hinblick auf ihre Eignung

---

als OLED-Farbstoffe und Fluoridsensoren. Durch das Wechselspiel zwischen Synthese und Analytik gelang die gezielte Synthese von Verbindungen mit hervorragenden Leuchteigenschaften, also hohen Quantenausbeuten in Verbindung mit Emissionsbereichen im sichtbaren Spektralbereich. Die Übertragung dieser Eigenschaften in die feste Phase gestaltete sich unkompliziert; sowohl in kristallinen Schichten als auch gering konzentriert in dünnen Kunststoffplatten wurde ein analoges Verhalten beobachtet. Die geringe Lewisacidität der Benzodiazaborole im Vergleich zu anderen Triarylboranen in Kombination mit *internal charge transfer*-Systemen ermöglichte zudem die Entwicklung von Fluoreszenzschaltern, welche unter minimaler Fluoridzugabe einem Farbumschlag unterliegen. Im Hinblick auf eine technische Verwendung der Verbindungen in OLEDs sollten in Zukunft Untersuchungen zur Implementierung der Benzodiazaborole in leit- und leuchtfähige dünne Schichten im Vordergrund stehen.

Mit dieser Arbeit wurden mehrere innovative Ansätze vorgestellt, wie die in der jüngsten Vergangenheit gewachsenen Möglichkeiten der mehrdimensionalen Fluoreszenzspektroskopie in medizinisch oder technisch relevanten Forschungsgebieten instrumentalisiert werden können. Dabei ist das Potential dieser Technik noch nicht ausgeschöpft. In der Entwicklung neuer, analytischer Werkzeuge und ihrer immer wieder neu ersonnenen Anwendung auf die spezifischen Bedürfnisse verschiedenster Interessensgebiete liegt ein wesentliches Innovationspotential interdisziplinärer Forschungsprojekte. Dieser Prozess trägt seinen Teil zur Vielfalt und Variabilität der modernen Forschung bei und wird auch in Zukunft im Wechselspiel zwischen visionärer Phantasie und technischer Machbarkeit den Horizont des naturwissenschaftlich Erfassbaren erweitern.

*Wer misst, misst Mist.*

*Weisheiten aus der PC I*

# A Anhang

## A.1 Charakterisierung der Benzodiazaborole

Nr	<i>cyclo</i> -Hexan	Toluol	HC <sub>l</sub> Cl <sub>3</sub>	THF	DCM	Acetonitril
1	48500	32200	11200	35100	44300	42300
2	29600	18100	27300	26700	30900	27800
3	26300	26900	29400	31800	30900	20200
4	33000	37100	17800	44700	41200	27700
5	–	–	–	66016	–	–
6	–	–	–	16610	–	–
7	24700	–	–	–	–	–
8	37500	42500	51400	45000	42600	20500
9	34100	33400	56600	31500	58600	28100
10	–	–	–	20100	–	–
11	–	–	–	32800	–	–
12	–	–	–	20200	–	–
13	–	–	–	26000	–	–
14	–	–	–	54600	–	–
15	6700	7500	5500	–	6400	5300
16	24300	31000	35300	–	40900	15100
17	13700	30500	23800	31500	29300	30500
18	8500	21200	33600	33800	35200	4500
19	–	–	–	24900	–	–
20	–	–	–	32300	–	–

**Tabelle A.1:** Extinktionskoeffizienten in  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  in verschiedenen Lösungsmitteln.

Nr	$\lambda_{ex}$ in <i>cyclo</i> -Hexan in nm	$\lambda_{em}$ in <i>cyclo</i> -Hexan in nm	$\lambda_{ex}$ in THF in nm	$\lambda_{em}$ in THF in nm
1	307	359.1	307	386.9
2	306	355.6	307	374.1
3	314	371.8	315	408.9
4	321	346.7	325	354.9
5	–	–	355	436.9
6	–	–	298.9	381.0
7	312.5	390.8	–	–
8	345	414.8	351	448.0
9	326	410.1	330	444.7
10	348.5	430	349.7	482.0
11	390.7	438.5	392.4	499.6
12	–	–	300	385.0
13	–	–	299	363.8
14	–	–	300	417.8
15	294	348.7	–	–
16	303	380.0	–	–
17	340	402.8	340	464.9
18	311	385.6	320	431.1
19	–	–	292	418.7
20	–	–	318	400.2

**Tabelle A.2:** Absorptions- und Emissionsmaxima in *cyclo*-Hexan und THF.

Nr	<i>cyclo</i> -Hexan	Toluol	CCl <sub>3</sub> H	THF	DCM	Acetonitril
1	0.92	0.93	0.06	0.99	1.01	0.89
2	0.94	0.99	0.03	0.97	0.94	0.87
3	0.85	0.81	0.29	0.89	0.84	0.69
4	1.04	0.84	0.12	0.97	0.73	0.59
5	–	–	–	0.45	–	–
6	–	–	–	0.75	–	–
7	0.93	–	–	–	–	–
8	0.69	0.78	0.78	0.72	0.81	0.61
9	0.62	0.83	0.51	0.62	0.60	0.53
10	–	–	–	0.46	–	–
11	–	–	–	0.45	–	–
12	–	–	–	0.98	–	–
13	–	–	–	0.45	–	–
14	–	–	–	0.71	–	–
15	0.41	0.53	0.00	–	0.38	0.61
16	0.83	0.71	0.46	–	0.72	0.40
17	1.00	0.74	0.69	0.05	0.60	0.04
18	1.02	0.90	0.40	0.37	0.69	0.34
19	–	–	–	0.43	–	–
20	–	–	–	0.87	–	–

**Tabelle A.3:** Quantenausbeuten in verschiedenen Lösungsmitteln.

Nr	$\lambda_{ex}$ in nm	<i>cyclo</i> -Hexan	Toluol	CCl <sub>3</sub>	DCM	Acetonitril
1	304	1.41	1.68	0.52	0.23	2.40
2	304	1.28	–	–	–	–
3	304 (334)	1.30 (1.31)	–	–	–	–
4	304 (334)	0.96 (0.96)	–	–	–	–
7	304 (334)	1.53 (1.54)	–	–	–	–
8	304	1.41	1.61	1.91	2.19	2.69
	334	1.42	1.59	1.87	2.16	2.66
9	304 (334)	1.44 (1.44)	–	–	–	–
14	304	1.50	–	–	–	–
15	304	0.97	–	–	–	–
16	304 (334)	1.38 (1.40)	1.78	1.91	2.82	2.34
17	304	1.53	2.57	3.60	4.85	0.56
	334	1.54	2.62	3.86	5.06	0.53
18	304 (334)	1.00 (0.98)	–	–	–	–
20	304	1.09	–	–	–	–

**Tabelle A.4:** Lebenszeiten in verschiedenen Lösungsmitteln in ns.

Substanz	Durchmesser x in Å	Durchmesser y in Å	Durchmesser z in Å	Radius $a_{Kugel}$ in Å
1	13.74	5.24	3.23	4.49
2	13.54	5.24	3.22	4.44
3	13.54	5.24	3.22	4.44
4	14.15	5.26	3.23	4.60
8	19.60	5.33	3.00	5.94
9	11.41	5.27	3.23	3.91
15	11.39	9.89	3.22	4.48
16	16.73	5.25	3.24	5.24
17	18.71	5.29	3.23	5.74
18	22.81	5.27	3.24	6.77

**Tabelle A.5:** Geometrische Daten der Diazaborole.

Substanz	$a_{Ellipse}$ in Å	$m_{Kugel}$ in cm <sup>-1</sup>	$m_{1, Ellipse}$ in cm <sup>-1</sup>	$m_{2, Ellipse}$ in cm <sup>-1</sup>	$\Delta\mu$ in D	$\Delta\Delta\mu$ in D	$\mu_E$ in D	$\mu_G$ in D
1	3.23	10925	31921	38367	9.93	1.23	11.38	1.04
2	3.22	8758	24629	32899	8.74	1.41	10.53	1.51
3	3.18	12024	32946	46645	10.24	1.26	12.36	2.13
4	2.11	14230	24629	22024	4.70	0.84	4.54	0.25
8	3.46	7066	35573	61284	6.07	0.92	–	–
9	3.91	9674	–	–	7.60	0.98	–	–
15	4.48	6770	–	–	7.82	1.18	–	–
16	3.33	15572	60228	69517	14.95	1.70	16.01	1.15
17	3.63	17882	70897	101861	18.36	1.86	22.36	4.01
18	3.80	14230	79869	90067	10.47	2.40	–	–

**Tabelle A.6:** Ermittelte Übergangsdipolmomente.

## A.2 Separation von Fluorophorbeiträgen

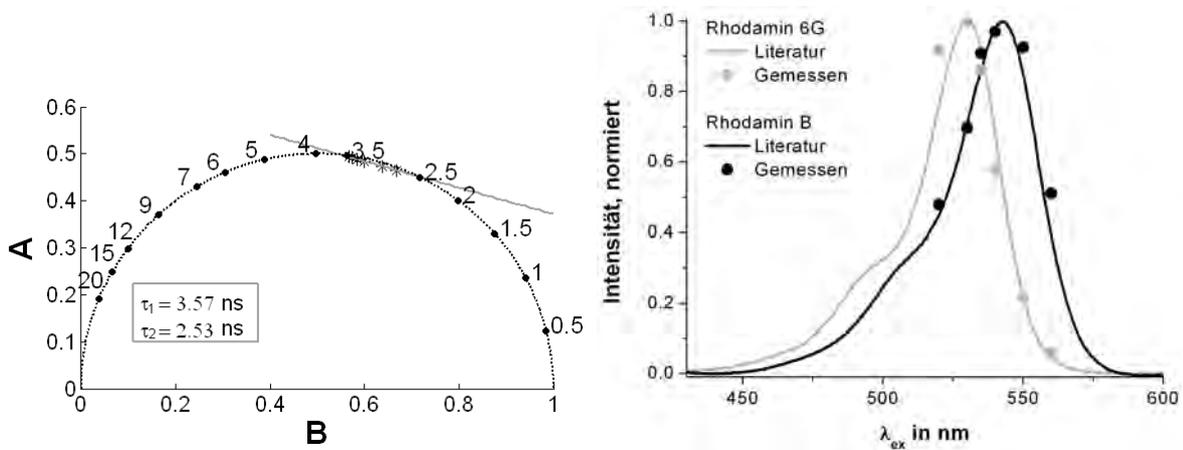


Abbildung A.1: AB-Plot und rekonstruierte Spektren der Mischung von Rhodamin 6G und B mit Literaturvergleich.<sup>[163, 205]</sup>

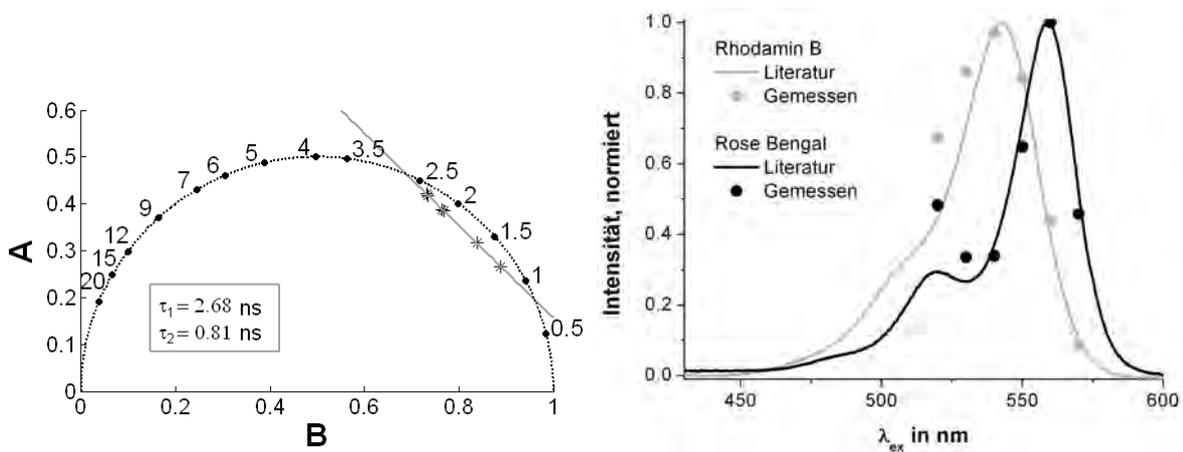


Abbildung A.2: AB-Plot und rekonstruierte Spektren der Mischung von Rhodamin B und Rose Bengal mit Literaturvergleich.<sup>[164, 205]</sup>

## A.3 Untersuchung verschiedener eYFP-Mutanten

### Zusammenhang zwischen Isomerisierungskinetik und Lebenszeit

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Jung der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, wurde an einem Projekt zur Isomerisierungskinetik von eYFP gearbeitet. Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit werden an dieser Stelle kurz aufgezeigt. Im Rahmen des Projekts sollte geklärt werden, ob die Fluoreszenzlebenszeit mit einem Isomerisierungsprozess in den Dunkelnzustand des Proteins im Zusammenhang steht. Dazu wurden die Fluoreszenzlebenszeiten verschiedener eYFP-Mutanten bei pH 7.5 und 10 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge systematisch untersucht (siehe Abbildung A.3).

Ein Vergleich der Lebenszeiten mit den an der Universität des Saarlandes bestimmten Absorptionsquerschnitten für die Isomerisierung wird zur Zeit von Prof. Dr. Gregor Jung

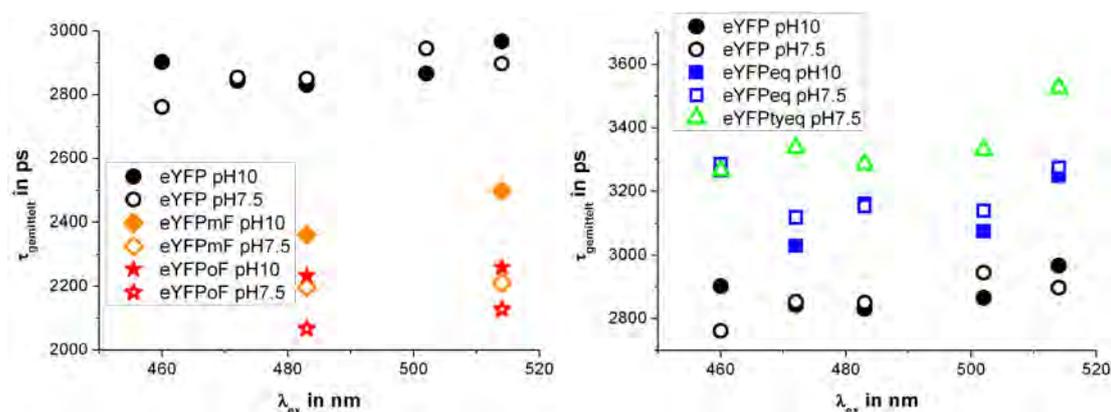


Abbildung A.3: Intensitätsgemittelte Lebenszeiten der untersuchten Mutanten.

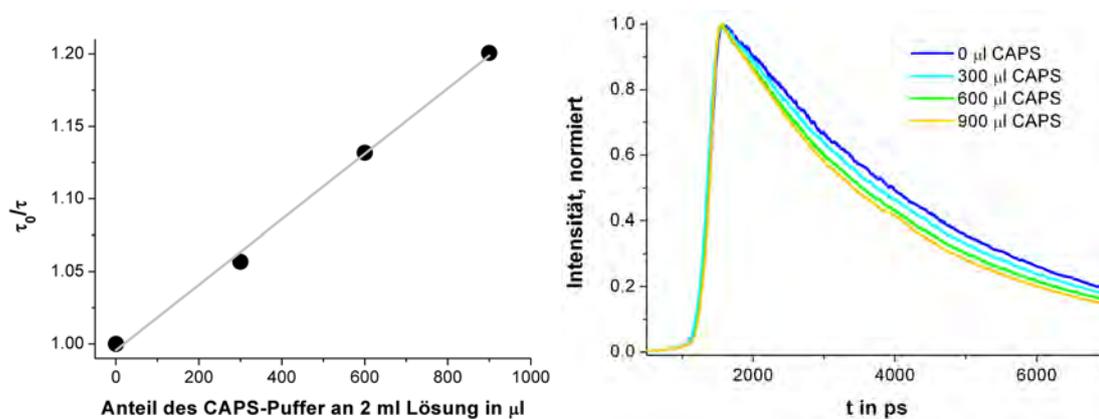


Abbildung A.4: Quenching von eYFP durch CAPS bei pH 10.

vorgenommen und soll demnächst publiziert werden. Demnach ist zwischen wellenlängenabhängiger Isomerisierungskinetik und Lebenszeit keine Korrelation zu erkennen.

### **Quenching durch CAPS**

In der Literatur wird davon ausgegangen, dass der Fluorophor im eYFP nicht durch dynamisches Quenching beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu ist bei den Messungen zur Isomerisierungskinetik jedoch eine Abhängigkeit der Fluoreszenzlebenszeit von der CAPS-Konzentration aufgefallen. Abbildung A.4 zeigt eindrücklich, wie die Lebenszeit von eYFP durch Zugabe von CAPS bei einem konstanten pH-Wert von 10 gemäß der Stern-Volmer-Gleichung verringert wird. Eine systematische Untersuchung der Quenchingeigenschaften von eYFP erscheint daher angebracht.

# Abkürzungsverzeichnis

AE-Spektrum .....	Anregungs-Emissions-Spektrum
AES .....	Anregungs-Emissions-Spektroskopie
ACTH .....	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
AOTF .....	<i>acusto-optic tunable filter</i>
AS .....	$\alpha$ -Synuklein
BS .....	$\beta$ -Synuklein
bzw. ....	beziehungsweise
ca. ....	circa
9CA .....	9-Cyanoanthracen
CCD .....	<i>charge coupled device</i>
CD .....	<i>circular dichroism</i>
COG .....	<i>center of gravity</i>
DAS .....	<i>decay associated spectrum</i>
DFT .....	Dichtefunktionaltheorie
DPA .....	9,10-Diphenylanthracen
ESR .....	Elektronenspinresonanz
FCS .....	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FLIM .....	<i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>
FRET .....	Förster Resonanzenergietransfer
GFP .....	<i>green fluorescent protein</i>
ggf. ....	gegebenenfalls
HSA .....	humanes Serum Albumin
hs-FLIM .....	<i>hyperspectral fluorescence lifetime imaging microscopy</i>
IC .....	<i>internal conversion</i>
IR .....	Infrarot

IRF .....	<i>instrument response function</i>
ISC .....	<i>intersystem crossing</i>
LIF .....	Laserinduzierte Fluoreszenz
MBP .....	<i>myelin basic protein</i>
NATA .....	N-Acetyl-L-Tryptophanamid
NMR .....	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OLED .....	<i>organic light-emitting diode</i>
p. A. ....	<i>purum analysi</i>
POPOP .....	1,4-Di[2-(5-Phenylloxazolyl)]-Benzol
ppb .....	<i>parts per billion</i>
ppm .....	<i>parts per million</i>
PPO .....	2,5-Diphenylloxazol
REE .....	<i>red edge-Effekt</i>
RNT1 .....	Ribonuklease T1
ROI .....	<i>region of interest</i>
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
SoA .....	<i>sphere of action</i>
STP .....	<i>single tryptophan protein</i>
SUAP .....	Steffis ultimatives Auswertprogramm
SW .....	Snickerswette
TBAF .....	<i>tetra-Butylammoniumfluorid</i>
TCSPC .....	<i>time-correlated single photon counting</i>
THF .....	Tetrahydrofuran
TRES .....	<i>time-resolved emission spectrum</i>
tr-LIF .....	<i>time-resolved laserinduced fluorescence</i>
UV .....	Ultraviolett
VIS .....	<i>visible</i>
w. E. ....	willkürliche Einheiten
YFP .....	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B. ....	zum Beispiel
ZWL .....	Zentralwellenlänge

# Literaturverzeichnis

- [1] R. Bunsen und G. Kirchhoff, Chemische Analyse durch Spektralbeobachtungen, Abhandlung über Emission und Absorption, in *Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften Band 72*, Verlag Harri Deutsch 1996.
- [2] G. H. W. Milburn, *X-ray Crystallography*, Butterworths, 1973.
- [3] E. D. Becker, *High resolution NMR: Theory and chemical application*, 2nd edition, Academic Press, 1980.
- [4] R. Kimse, *ESR-Spektroskopie: Anwendungen in der Chemie*, Akademischer Verlag, 1985.
- [5] N. Berova, K. Nakanishi und R. W. Woody, *Circular Dichroism: Principles and Applications*, Wiley VCH, 2000.
- [6] K. Nakanishi und P. H. Solomon, *Infrared absorption spectroscopy*, Holden-Day, 1977.
- [7] F. A. Miller und G. B. Kauffman, Raman and the discovery of the raman effect, *Journal of Chemical Education* **66**, 795–801, 1989.
- [8] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd edition, Springer Verlag, 2006.
- [9] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward und D. C. Prasher, Green Fluorescent Protein as a marker for gene-expression, *Science* **263**(5148), 802–805, 1994.
- [10] A. C. Eckbreth, *Laser diagnostics for combustion temperature and species*, Gordon and Breach, 1996.
- [11] M. Ulbricht, Dreidimensionale Analyse der Luft auf Schadstoffe mittels LIDAR, *Spek. d. Wiss.* **12**, 22, 2002.
- [12] A. Herber und G. Lange, Dicke Luft am Nordpol, *Spek. d. Wiss.* **6**, 30, 2002.
- [13] A. Brockhinke, A. Letzgus, S. Rinne und K. Kohse-Hoinghaus, Energy transfer in the  $d^3\Pi_g-a^3\Pi_u$  (0-0) swan bands of  $C_2$ : Implications for quantitative measurement, *Journal Of Physical Chemistry A* **110**(9), 3028–3035, 2006.
- [14] J. Nygren, J. Hult, M. Richter, M. Alden, M. Christensen, A. Hultqvist und B. Johansson, Three-dimensional laser induced fluorescence of fuel distributions in an HCCI engine, *Proceedings Of The Combustion Institute* **29**, 679–685, 2002.

- [15] K. Kohse-Höinghaus und J. B. Jeffries, *Applied Combustion Diagnostics*, Tayler and Francis, 2002.
- [16] G. Lange, Die deutsche Arktisstation im Netzwerk der Stratosphärenforscher, *Spek. d. Wiss.* **9**, 104, 1993.
- [17] S. T. D. Hsu, G. Blaser und S. E. Jackson, The folding, stability and conformational dynamics of  $\beta$ -barrel fluorescent proteins, *Chemical Society Reviews* **38**(10), 2951–2965, 2009.
- [18] T. Gidalevitz, A. Ben-Zvi, K. H. Ho, H. R. Brignull und R. I. Morimoto, Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases, *Science* **311**(5766), 1471–1474, 2006.
- [19] C. M. Kaiser, H. C. Chang, V. R. Agashe, S. K. Lakshmipathy, S. A. Etchells, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl und J. M. Barral, Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes, *Nature* **444**(7118), 455–460, 2006.
- [20] Z. Y. Xia und J. H. Rao, Biosensing and imaging based on bioluminescence resonance energy transfer, *Current Opinion In Biotechnology* **20**(1), 37–44, 2009.
- [21] T. Mori, R. D. Vale und M. Tomishige, How kinesin waits between steps, *Nature* **450**(7170), 750–U15, 2007.
- [22] R. Roy, A. G. Kozlov, T. M. Lohman und T. Ha, SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation, *Nature* **461**(7267), 1092–1097, 2009.
- [23] A. D. Hoppe, S. Seveau und J. A. Swanson, Live cell fluorescence microscopy to study microbial pathogenesis, *Cellular Microbiology* **11**(4), 540–550, 2009.
- [24] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman und R. Y. Tsien, Review - The fluorescent toolbox for assessing protein location and function, *Science* **312**(5771), 217–224, 2006.
- [25] K. V. Kuchibhotla, C. R. Lattarulo, B. T. Hyman und B. J. Bacskai, Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice, *Science* **323**(5918), 1211–1215, 2009.
- [26] J. A. Levitt, D. R. Matthews, S. M. Ameer-Beg und K. Suhling, Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology, *Current Opinion In Biotechnology* **20**(1), 28–36, 2009.
- [27] Y. C. Chen und R. M. Clegg, Fluorescence lifetime-resolved imaging, *Photosynthesis Research* **102**(2-3), 143–155, 2009.
- [28] B. Ballou, L. A. Ernst und A. S. Waggoner, Fluorescence imaging of tumors in vivo, *Current Medicinal Chemistry* **12**(7), 795–805, 2005.

- 
- [29] Q. Chen, R. Groote, H. Schonherr und G. J. Vancso, Probing single enzyme kinetics in real-time, *Chemical Society Reviews* **38**(9), 2671–2683, 2009.
- [30] A. Gershenson, Single molecule enzymology: Watching the reaction, *Current Opinion In Chemical Biology* **13**(4), 436–442, 2009.
- [31] T. Pons und H. Mattoussi, Investigating biological processes at the single molecule level using luminescent quantum dots, *Annals Of Biomedical Engineering* **37**(10), 1934–1959, 2009.
- [32] R. Zhao und D. Rueda, RNA folding dynamics by single-molecule fluorescence resonance energy transfer, *Methods* **49**(2), 112–117, 2009.
- [33] S. Chiantia, J. Ries und P. Schwille, Fluorescence correlation spectroscopy in membrane structure elucidation, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1788**(1), 225–233, 2009.
- [34] D. Patra, Application and new developments in fluorescence spectroscopic techniques in studying individual molecules, *Applied Spectroscopy Reviews* **43**(5), 389–415, 2008.
- [35] P. H. G. M. Willems, H. G. Swarts, M. A. Hink und W. J. H. Koopman, The use of fluorescence correlation spectroscopy to probe mitochondrial mobility and intramatrix protein diffusion, *Methods In Enzymology, Vol 456* **456**, 287–302, 2009.
- [36] F. Helmchen und W. Denk, Deep tissue two-photon microscopy, *Nature Methods* **2**(12), 932–940, 2005.
- [37] A. Stortelder, J. B. Buijs, J. Bulthuis, C. Gooijer und G. van der Zwan, Fast-gated intensified charge-coupled device camera to record time-resolved fluorescence spectra of tryptophan, *Applied Spectroscopy* **58**(6), 705–710, 2004.
- [38] E. E. Eichler et al. T. S. Mikkelsen, L. W. Hillier, Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome, *Nature* **437**, 69–87, 2005.
- [39] E. Birney et al. R. H. Waterston, K. Lindblad-Toh, Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature* **420**, 520–562, 2002.
- [40] L. Stryer, *Biochemie*, 4th edition, Spektrum Akademischer Verlag, 1999.
- [41] A. B. Singleton, M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M. R. Cookson, M. Muentner, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy und K. Gwinn-Hardy,  $\alpha$ -Synuclein locus triplication causes Parkinson’s disease, *Science* **302**(5646), 841–841, 2003.
- [42] M. Goedert, Parkinson’s disease and other  $\alpha$ -synucleinopathies, *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine* **39**(4), 308–312, 2001.

- [43] H. Ecroyd und J. A. Carver, Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding, *Iubmb Life* **60**(12), 769–774, 2008.
- [44] P. C. Singh und S. K. Ballas, Drugs for preventing red blood cell dehydration in people with sickle cell disease, *Cochrane Database Of Systematic Reviews* (4), CD003426, 2007.
- [45] U. Brackmann, *Lambdachrome Laser Dyes*, Lambda Physik, 1997.
- [46] H. Y. Xu, Z. Shen, Y. H. Yu und X. Z. You, Boron-dipyrromethene based fluorescent sensors, *Chinese Journal Of Inorganic Chemistry* **21**(5), 617–625, 2005.
- [47] E. J. O’Neil und B. D. Smith, Anion recognition using dimetallic coordination complexes, *Coordination Chemistry Reviews* **250**(23-24), 3068–3080, 2006.
- [48] E. Arunkumar, A. Ajayaghosh und J. Daub, Selective calcium ion sensing with a bichromophoric squaraine foldamer, *Journal Of The American Chemical Society* **127**(9), 3156–3164, 2005.
- [49] W. Käss, *Geohydrologische Markierungstechnik*, Gebrüder Bornträger, 1992.
- [50] M. Adler, *Durchflussmessung mit der Verdünnungsmethode*, Bundesanstalt für Gewässerkunde Koblenz, 2004.
- [51] Lambdachim GmbH & Co. KG, <http://www.lambdachim.de/fluoreszenztracer>, Angaben zur Produktpalette der Fluoreszenztracer und Sequitas.
- [52] F. So, B. Krummacher, M. K. Mathai, D. Poplavskyy, S. A. Choulis und V. E. Choong, Recent progress in solution processable organic light emitting devices, *Journal Of Applied Physics* **102**(9), 091101, 2007.
- [53] R. H. Friend, R. W. Gymer, A. B. Holmes, J. H. Burroughes, R. N. Marks, C. Taliani, D. D. C. Bradley, D. A. Dos Santos, J. L. Bredas, M. Logdlund und W. R. Salaneck, Electroluminescence in conjugated polymers, *Nature* **397**(6715), 121–128, 1999.
- [54] J. H. Burroughes, D. D. C. Bradley, A. R. Brown, R. N. Marks, K. Mackay, R. H. Friend, P. L. Burns und A. B. Holmes, Light-emitting-diodes based on conjugated polymers, *Nature* **347**(6293), 539–541, 1990.
- [55] A. Brockhinke, R. Plessow, P. Dittrich und K. Kohse-Hoinghaus, Analysis of the local conformation of proteins with two-dimensional fluorescence techniques, *Applied Physics B-Lasers And Optics* **71**(5), 755–763, 2000.
- [56] R. Plessow, A. Brockhinke, W. Eimer und K. Kohse-Hoinghaus, Intrinsic time- and wavelength-resolved fluorescence of oligonucleotides: A systematic investigation using a novel picosecond laser approach, *Journal Of Physical Chemistry B* **104**(15), 3695–3704, 2000.

- [57] C. F. Kaminski, R. S. Watt, A. D. Elder, J. H. Frank und J. Hult, Supercontinuum radiation for applications in chemical sensing and microscopy, *Applied Physics B-Lasers And Optics* **92**(3), 367–378, 2008.
- [58] M. Sikorski, E. Krystkowiak und R. P. Steer, The kinetics of fast fluorescence quenching processes, *Journal Of Photochemistry And Photobiology A-Chemistry* **117**(1), 1–16, 1998.
- [59] S. Roy, Fluorescence quenching methods to study protein-nucleic acid interactions, *Energetics Of Biological Macromolecules, Pt D* **379**, 175–187, 2004.
- [60] J. R. Lakowicz und G. Weber, Quenching of fluorescence by oxygen - Probe for structural fluctuations in macromolecules, *Biochemistry* **12**(21), 4161–4170, 1973.
- [61] S. Doose, H. Neuweiler und M. Sauer, Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer: A reporter for conformational dynamics of macromolecules, *Chemphyschem* **10**(9-10), 1389–1398, 2009.
- [62] J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, H. Szmanski, H. Cherek und N. Joshi, Anisotropy decays of single tryptophan proteins measured by Ghz frequency-domain fluorometry with collisional quenching, *European Biophysics Journal* **19**(3), 125–140, 1991.
- [63] J. K. A. Kamal und D. V. Behere, Spectroscopic studies on human serum albumin and methemalbumin: Optical, steady-state, and picosecond time-resolved fluorescence studies, and kinetics of substrate oxidation by methemalbumin, *Journal Of Biological Inorganic Chemistry* **7**(3), 273–283, 2002.
- [64] A. A. Hassanali, T. P. Li, D. P. Zhong und S. J. Singer, A molecular dynamics study of Lys-Trp-Lys: Structure and dynamics in solution following photoexcitation, *Journal Of Physical Chemistry B* **110**(21), 10497–10508, 2006.
- [65] L. Y. Zhang, Y. T. Kao, W. H. Qiu, L. J. Wang und D. P. Zhong, Femtosecond studies of tryptophan fluorescence dynamics in proteins: Local solvation and electronic quenching, *Journal Of Physical Chemistry B* **110**(37), 18097–18103, 2006.
- [66] L. Frauchiger, H. Shirota, K. E. Uhrich und E. W. Castner, Dynamic fluorescence probing of the local environments within amphiphilic starlike macromolecules, *Journal Of Physical Chemistry B* **106**(30), 7463–7468, 2002.
- [67] J. R. Lakowicz, On spectral relaxation in proteins, *Photochemistry and Photobiology* **72**(4), 421–437, 2000.
- [68] A. P. Demchenko, H. J. Apell, W. Sturmer und B. Fedderson, Fluorescence spectroscopic studies on equilibrium dipole-relaxational dynamics of Na,K-ATPase, *Biophysical Chemistry* **48**(2), 135–147, 1993.
- [69] A. P. Demchenko, Red-edge-excitation fluorescence spectroscopy of single-tryptophan proteins, *European Biophysics Journal With Biophysics Letters* **16**(2), 121–129, 1988.

- [70] A. P. Demchenko und A. S. Ladokhin, Red-edge-excitation fluorescence spectroscopy of indole and tryptophan, *European Biophysics Journal With Biophysics Letters* **15**(6), 369–379, 1988.
- [71] A. Kawski, B. Kuklinski und P. Bojarski, Thermochromic absorption, fluorescence band shifts and dipole moments of badan and acrylodan, *Zeitschrift Fur Naturforschung Section A-A Journal Of Physical Sciences* **57**(8), 716–722, 2002.
- [72] A. Kawski, B. Kuklinski und P. Bojarski, Ground and excited state dipole moments of badan and acrylodan determined from solvatochromic shifts of absorption and fluorescence spectra, *Zeitschrift Fur Naturforschung Section A-A Journal Of Physical Sciences* **56**(5), 407–411, 2001.
- [73] J. A. Osborn, Demagnetizing factors of the general ellipsoid, *Physical Review* **67**(11-1), 351–357, 1945.
- [74] A. L. Lehninger, D. L. Nelson und M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
- [75] E. A. Burstein, N. S. Vedenkin und M. N. Ivkova, Fluorescence and location of tryptophan residues in protein molecules, *Photochemistry And Photobiology* **18**(4), 263–279, 1973.
- [76] M. Letzgus, AES-Control, Programm zur automatisierten Aufnahme von AES-Bildern, 2003.
- [77] R. L. Christensen, R. C. Drake und D. Phillips, Time-resolved fluorescence anisotropy of perylene, *Journal Of Physical Chemistry* **90**(22), 5960–5967, 1986.
- [78] P. E. Zinsli, Anisotropic rotation and libration of perylene in paraffin, *Chemical Physics* **20**(2), 299–309, 1977.
- [79] L. B. A. Johansson und H. Langhals, Spectroscopic studies of fluorescent perylene dyes, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular And Biomolecular Spectroscopy* **47**(7), 857–861, 1991.
- [80] R. J. Balla und G. C. Herring, Raman shifting a tunable ArF laser to wavelengths of 190-240 nm, *Review Of Scientific Instruments* **71**(5), 2246–2247, 2000.
- [81] W. L. Glab und J. P. Hessler, Frequency-shift and asymmetric line-shape of the 4th anti-stokes component from a hydrogen raman shifter, *Applied Optics* **27**(24), 5123–5126, 1988.
- [82] V. Simeonov, V. Mitev, H. van den Bergh und B. Calpini, Raman frequency shifting in a CH<sub>4</sub> : H<sub>2</sub> : Ar mixture pumped by the fourth harmonic of a Nd : YAG laser, *Applied Optics* **37**(30), 7112–7115, 1998.

- [83] G. G. M. Stoffels, P. Schmidt, N. Dam und J. J. terMeulen, Generation of 224nm radiation by stimulated Raman scattering of ArF excimer laser radiation in a mixture of H<sub>2</sub> and D<sub>2</sub>, *Applied Optics* **36**(27), 6797–6801, 1997.
- [84] M. Letzgus, SUAP, Programm zur Bearbeitung von statischen und zeitaufgelösten Fluoreszenzbildern, 2009.
- [85] J. Reader, C. J. Sansonetti und J. M. Bridges, Irradiances of spectral lines in mercury pencil lamps, *Applied Optics* **35**(1), 78–83, 1996.
- [86] N. Boens, W. W. Qin, N. Basaric, J. Hofkens, M. Ameloot, J. Pouget, J. P. Lefevre, B. Valeur, E. Gratton, M. Vandeven, N. D. Silva, Y. Engelborghs, K. Willaert, A. Sillen, G. Rumbles, D. Phillips, A. J. W. G. Visser, A. van Hoek, J. R. Lakowicz, H. Malak, I. Gryczynski, A. G. Szabo, D. T. Krajcarski, N. Tamai und A. Miura, Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy, *Analytical Chemistry* **79**(5), 2137–2149, 2007.
- [87] S. A. Azim, H. A. ElDaly, S. A. ElDaly, K. A. AbouZeid, E. M. Ebeid und J. R. Heldt, Energy transfer and photodecomposition of anthracene laser dyes, *Journal Of The Chemical Society-Faraday Transactions* **92**(15), 2685–2688, 1996.
- [88] C. Canuel, S. Badre, H. Groenzin, M. Berheide und O. C. Mullins, Diffusional fluorescence quenching of aromatic hydrocarbons, *Applied Spectroscopy* **57**(5), 538–544, 2003.
- [89] S. Coles, *An introduction to statistical modeling of extreme values*, Springer Verlag, 2001.
- [90] M. Letzgus, Simulation und Messung der Spektroskopie und Moleküldynamik verbrennungsrelevanter Radikale in der Hochtemperatur-Gasphase, PhD thesis, Universität Bielefeld, 2007.
- [91] W. R. Cowell (Hrsg.), *Sources and Development of Mathematical Software*, Prentice-Hall Series in Computational Mathematics, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ 07458 USA, 1984.
- [92] R. Brockhinke, S. Schwedler, A. Bettio, A. G. Beck-Sickinger und A. Brockhinke, Investigation of the structure of Neuropeptide Y in solution using combined FRET and anisotropy methods, *submitted to PCCP*, 2009.
- [93] N. G. Bakhshiev, Y. T. Mazurenko und I. V. Piterskaya, Luminescence decay in different portions of luminescence spectrum of molecules in viscous solutions, *Optics And Spectroscopy-Ussr* **21**(5), 307–&, 1966.
- [94] T. V. Veselova, L. A. Limareva, A. S. Cherkaso und V. I. Shirokov, Fluorometric study of effect of solvent on fluorescence spectrum of 3-Amino-N-methylphthalimide, *Optics And Spectroscopy-Ussr* **19**(1), 39–&, 1965.

- [95] T. V. Veselova und V. I. Shirokov, Fluorometric study of mechanism of temperature variations in fluorescence spectrum of 3-Aminophthalimide solutions in frozen dioxane, *Optics And Spectroscopy-Ussr* **22**(6), 540–&, 1967.
- [96] J. R. Lakowicz und H. Cherek, Dipolar relaxation in proteins on the Nanosecond timescale observed by wavelength-resolved phase fluorometry of tryptophan fluorescence, *Journal Of Biological Chemistry* **255**(3), 831–834, 1980.
- [97] A. Grinvald und I. Z. Steinberg, Fluorescence decay of tryptophan residues in native and denatured proteins, *Biochimica Et Biophysica Acta* **427**(2), 663–678, 1976.
- [98] J. R. Lakowicz und G. Weber, Quenching of protein fluorescence by oxygen - Detection of structural fluctuations in proteins on nanosecond time scale, *Biochemistry* **12**(21), 4171–4179, 1973.
- [99] Z. Wasylewski, P. Kaszycki und M. Drwiega, A fluorescence study of Tn10-encoded Tet repressor, *Journal Of Protein Chemistry* **15**(1), 45–58, 1996.
- [100] Z. Wasylewski, H. Koloczek und A. Wasniowska, Fluorescence-quenching-resolved spectroscopy of proteins, *European Journal Of Biochemistry* **172**(3), 719–724, 1988.
- [101] D. W. Pierce und S. G. Boxer, Dielectric relaxation in a protein matrix, *Journal Of Physical Chemistry* **96**(13), 5560–5566, 1992.
- [102] G. Weber und F. J. Farris, Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent-probe - 6-Propionyl-2-(dimethylamino)-naphthalene, *Biochemistry* **18**(14), 3075–3078, 1979.
- [103] J. R. Lakowicz, E. Gratton, H. Cherek, B. P. Maliwal und G. Laczko, Determination of time-resolved fluorescence emission-spectra and anisotropies of a fluorophore-protein complex using frequency-domain phase-modulation fluorometry, *Journal Of Biological Chemistry* **259**(17), 967–972, 1984.
- [104] J. H. Easter, R. P. De Toma und L. Brand, Nanosecond time-resolved emission-spectroscopy of a fluorescence probe adsorbed to L- $\alpha$ -Egg lecithin vesicles, *Biophysical Journal* **16**(6), 571–583, 1976.
- [105] M. G. Badea und L. Brand, Time-resolved fluorescence measurements, *Methods Enzymol* **61**, 378–425, 1979.
- [106] J. R. Lakowicz, H. Cherek, G. Laczko und E. Gratton, Time-resolved fluorescence emission-spectra of labeled phospholipid-vesicles, as observed using multi-frequency phase-modulation fluorometry, *Biochimica Et Biophysica Acta* **777**(2), 183–193, 1984.
- [107] W. H. Qiu, L. Y. Zhang, Y. T. Kao, W. Y. Lu, T. P. Li, J. Kim, G. M. Sollenberger, L. J. Wang und D. P. Zhong, Ultrafast hydration dynamics in melittin folding and aggregation: Helix formation and tetramer self-assembly, *Journal Of Physical Chemistry B* **109**(35), 16901–16910, 2005.

- 
- [108] L. Nilsson und B. Halle, Molecular origin of time-dependent fluorescence shifts in proteins, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **102**(39), 13867–13872, 2005.
- [109] G. Mei, A. Di Venere, A. F. Agro, F. De Matteis und N. Rosato, Dipolar relaxation times of tryptophan and tyrosine in glycerol and in proteins: A direct evaluation from their fluorescence decays, *Journal Of Fluorescence* **13**(6), 467–477, 2003.
- [110] D. Topygin, A. M. Gronenborn und L. Brand, Nanosecond relaxation dynamics of protein GB1 identified by the time-dependent red shift in the fluorescence of tryptophan and 5-fluorotryptophan, *Journal Of Physical Chemistry B* **110**(51), 26292–26302, 2006.
- [111] G. Maglia, A. Jonckheer, M. De Maeyer, J. M. Frere und Y. Engelborghs, An unusual red-edge excitation and time-dependent Stokes shift in the single tryptophan mutant protein DD-carboxypeptidase from *Streptomyces*: The role of dynamics and tryptophan rotamers, *Protein Science* **17**(2), 352–361, 2008.
- [112] A. Pandit, O. F. A. Larsen, I. H. M. van Stokkum, R. van Grondelle, R. Kraayenhof und H. van Amerongen, Ultrafast polarized fluorescence measurements on monomeric and self-associated melittin, *Journal Of Physical Chemistry B* **107**(13), 3086–3090, 2003.
- [113] J. H. Xu, D. Topygin, K. J. Graver, R. A. Albertini, R. S. Savtchenko, N. D. Meadow, S. Roseman, P. R. Callis, L. Brand und J. R. Knutson, Ultrafast fluorescence dynamics of tryptophan in the proteins monellin and IIA(Glc), *Journal Of The American Chemical Society* **128**(4), 1214–1221, 2006.
- [114] A. V. Pastukhov, V. R. Fogel und A. I. Kotelnikov, Properties of low-temperature spectral relaxation of eosin phosphorescence in a glycerol-water mixture, *Optics And Spectroscopy* **88**(3), 346–351, 2000.
- [115] B. Somogyi, M. Punyiczki, J. Hedstrom, J. A. Norman, F. G. Prendergast und A. Rosenberg, Coupling between external viscosity and the intramolecular dynamics of Ribonuclease-T1: A 2-phase model for the quenching of protein fluorescence, *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology* **1209**(1), 61–68, 1994.
- [116] W. H. Qiu, L. Y. Zhang, O. Okobiah, Y. Yang, L. J. Wang, D. P. Zhong und A. H. Zewail, Ultrafast solvation dynamics of human serum albumin: Correlations with conformational transitions and site-selected recognition, *Journal Of Physical Chemistry B* **110**(21), 10540–10549, 2006.
- [117] L. Y. Zhang, L. J. Wang, Y. T. Kao, W. H. Qiu, Y. Yang, O. Okobiah und D. P. Zhong, Mapping hydration dynamics around a protein surface, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **104**(47), 18461–18466, 2007.

- [118] G. Mei, A. Di Venere, F. De Matteis und N. Rosato, The recovery of dipolar relaxation times from fluorescence decays as a tool to probe local dynamics in single tryptophan proteins, *Archives Of Biochemistry And Biophysics* **417**(2), 159–164, 2003.
- [119] Protein Knowledgebase, <http://www.uniprot.org>, Myelin Basic Protein, Eintrag P02687.
- [120] Protein Knowledgebase, <http://www.uniprot.org>, Monellin, Eintrag P02882.
- [121] Protein Knowledgebase, <http://www.uniprot.org>, Humanes Serum Albumin, Eintrag P02768.
- [122] Protein Knowledgebase, <http://www.uniprot.org>, Asparaginase, Eintrag P0A962.
- [123] Protein Knowledgebase, <http://www.uniprot.org>, Staph. Nuclease, Eintrag Q99VJ0.
- [124] Protein Knowledgebase, <http://www.uniprot.org>, Ribonuclease T1, Eintrag P00651.
- [125] Protein Knowledgebase, <http://www.uniprot.org>, Azurin, Eintrag Q02F96.
- [126] N. Guex und M. C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* **18**, 2714–2723, 1997.
- [127] A. Buzady, J. Erostyak und B. Somogyi, Phase-fluorimetry study on dielectric relaxation of human serum albumin, *Biophysical Chemistry* **88**(1-3), 153–163, 2000.
- [128] T. K. Dalsgaard, D. Otzen, J. H. Nielsen und L. B. Larsen, Changes in structures of milk proteins upon photo-oxidation, *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* **55**(26), 10968–10976, 2007.
- [129] G. Gilardi, G. Mei, N. Rosato, G. W. Canters und A. Finazziagro, Unique environment of Trp48 in *Pseudomonas aeruginosa* Azurin as probed by site-directed mutagenesis and dynamic fluorescence spectroscopy, *Biochemistry* **33**(6), 1425–1432, 1994.
- [130] S. Gorinstein, I. Goshev, S. Moncheva, M. Zemser, M. Weisz, A. Caspi, I. Libman, H. T. Lerner, S. Trakhtenberg und O. Martin-Belloso, Intrinsic tryptophan fluorescence of human serum proteins and related conformational changes, *Journal Of Protein Chemistry* **19**(8), 637–642, 2000.
- [131] C. Y. Wong und M. R. Eftink, Incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease, its V66W mutant, and Delta 137-149 fragment: Spectroscopic studies, *Biochemistry* **37**(25), 8938–8946, 1998.
- [132] A. P. Demchenko, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, W. Wiczak, H. Malak und M. Fishman, Intramolecular dynamics in the environment of the single tryptophan residue in staphylococcal nuclease, *Biophysical Chemistry* **48**(1), 39–48, 1993.

- [133] R. W. Alston, L. Urbanikova, J. Sevcik, M. Lasagna, G. D. Reinhart, J. M. Scholtz und C. N. Pace, Contribution of single tryptophan residues to the fluorescence and stability of ribonuclease sea, *Biophysical Journal* **87**(6), 4036–4047, 2004.
- [134] A. J. S. Jones und M. G. Rumsby, Intrinsic fluorescence characteristics of myelin basic-protein, *Journal Of Neurochemistry* **25**(5), 565–572, 1975.
- [135] S. C. Quay und C. C. Condie, Conformational studies of aqueous melittin - Thermodynamic parameters of the monomer-tetramer self-association reaction, *Biochemistry* **22**(3), 695–700, 1983.
- [136] Y. K. Reshetnyak und E. A. Burstein, Assignment of log-normal components of protein fluorescence spectra to individual tryptophan residues using their microenvironment properties in tridimensional structure, *Biofizika* **42**(2), 293–300, 1997.
- [137] R. F. Chen, J. R. Knutson, H. Ziffer und D. Porter, Fluorescence of tryptophan dipeptides - correlations with the rotamer model, *Biochemistry* **30**(21), 5184–5195, 1991.
- [138] M. R. Eftink und C. A. Ghiron, Exposure of tryptophanyl residues and protein dynamics, *Biochemistry* **16**(25), 5546–5551, 1977.
- [139] J. R. Lakowicz, B. P. Maliwal, H. Cherek und A. Balter, Rotational freedom of tryptophan residues in proteins and peptides, *Biochemistry* **22**(8), 1741–1752, 1983.
- [140] J. M. Brewer, P. Bastiaens und J. Lee, Fluorescence lifetime and spectral study of the acid expansion of bovine serum-albumin, *Biophysical Chemistry* **28**(1), 77–88, 1987.
- [141] J. M. Beechem und L. Brand, Time-resolved fluorescence of proteins, *Annual Review Of Biochemistry* **54**, 43–71, 1985.
- [142] L. Fuentes, J. Oyola, M. Fernandez und E. Quinones, Conformational changes in azurin from *Pseudomonas aeruginosa* induced through chemical and physical protocols, *Biophysical Journal* **87**(3), 1873–1880, 2004.
- [143] J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, Cherek und G. Laczko, Anisotropy decays of indole, melittin monomer and melittin tetramer by frequency-domain fluorometry and multiwavelength global analysis, *Biophysical Chemistry* **39**(3), 241–251, 1991.
- [144] M. R. Eftink und C. A. Ghiron, Fluorescence quenching studies with proteins, *Analytical Biochemistry* **114**(2), 199–227, 1981.
- [145] S. J. Morris, D. Bradley, A. T. Campagnoni und G. L. Stoner, Myelin basic-protein binds heme at a specific site near the tryptophan residue, *Biochemistry* **26**(8), 2175–2182, 1987.

- [146] G. Wright und R. B. Freedman, Structure and dynamics of staphylococcal nuclease mutants as studied by fluorescence quenching techniques, *Protein Engineering* **2**(8), 583–588, 1989.
- [147] M. R. Eftink und C. A. Ghiron, Exposure of tryptophanyl residues in proteins - Quantitative determination by fluorescence quenching studies, *Biochemistry* **15**(3), 672–680, 1976.
- [148] T. P. Li, A. A. Hassanali und S. J. Singer, Origin of slow relaxation following photoexcitation of W7 in myoglobin and the dynamics of its hydration layer, *Journal Of Physical Chemistry B* **112**(50), 16121–16134, 2008.
- [149] I. Capek, Fate of excited probes in micellar systems, *Advances In Colloid And Interface Science* **97**(1-3), 91–149, 2002.
- [150] M. G. Kuzmin und I. V. Soboleva, Effect of solubilization in micelles on the Kinetics of electron-transfer photoreactions and redox properties of reactants - Quenching of  $\text{Ru}_6^{2+}$  luminescence in SDS micelles, *Journal Of Photochemistry And Photobiology A-Chemistry* **87**(1), 43–54, 1995.
- [151] X. F. Gao und T. C. Wong, Studies of the binding and structure of adrenocorticotropin peptides in membrane mimics by NMR spectroscopy and pulsed-field gradient diffusion, *Biophysical Journal* **74**(4), 1871–1888, 1998.
- [152] G. T. Kennedy, D. S. Elson, J. D. Hares, I. Munro, V. Poher, P. M. W. French und M. A. A. Neil, Fluorescence lifetime imaging using light emitting diodes, *Journal Of Physics D-Applied Physics* **41**(9), 094012, 2008.
- [153] D. M. Owen, E. Auksorius, H. B. Manning, C. B. Talbot, P. A. A. de Beule, C. Dunsby, M. A. A. Neil und P. M. W. French, Excitation-resolved hyperspectral fluorescence lifetime imaging using a UV-extended supercontinuum source, *Optics Letters* **32**(23), 3408–3410, 2007.
- [154] W. Becker, A. Bergmann und C. Biskup, Multispectral fluorescence lifetime imaging by TCSPC, *Microscopy Research And Technique* **70**(5), 403–409, 2007.
- [155] Alan Elder, Quantitative Fluorescence Microscopy, PhD thesis, University of Cambridge, 2008.
- [156] P. J. Verveer, A. Squire und P. I. H. Bastiaens, Global analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy data, *Biophysical Journal* **78**(4), 2127–2137, 2000.
- [157] A. H. A. Clayton, Q. S. Hanley und P. J. Verveer, Graphical representation and multicomponent analysis of single-frequency fluorescence lifetime imaging microscopy data, *Journal Of Microscopy-Oxford* **213**, 1–5, 2004.
- [158] Q. S. Hanley, D. J. Arndt-Jovin und T. M. Jovin, Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging microscopy, *Applied Spectroscopy* **56**(2), 155–166, 2002.

- [159] Q. S. Hanley und A. H. A. Clayton, AB-plot assisted determination of fluorophore mixtures in a fluorescence lifetime microscope using spectra or quenchers, *Journal Of Microscopy-Oxford* **218**, 62–67, 2005.
- [160] Zain Hassan Yamani, Experimental determination of the frequency spectrum of the Rose Bengal picosecond fluorescence using two beating ring dye lasers, Master thesis, King Fahd University of petroleum and minerals, 1993.
- [161] R. Niesner, B. Peker, P. Schlusche und K. H. Gericke, Noniterative biexponential fluorescence lifetime imaging in the investigation of cellular metabolism by means of NAD(P)H autofluorescence, *Chemphyschem* **5**(8), 1141–1149, 2004.
- [162] D. Magde, G. E. Rojas und P. G. Seybold, Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes, *Photochemistry And Photobiology* **70**(5), 737–744, 1999.
- [163] Oregon Medical Laser Center, <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/>, Anregung und Emission von Rhodamin 6G in Ethanol.
- [164] Oregon Medical Laser Center, <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/>, Anregung und Emission von Rose Bengal in Ethanol.
- [165] Invitrogen molecular probes, <http://www.invitrogen.com>, Produktspezifikation von Alexa Fluor 546 an Oligonukleotiden in H<sub>2</sub>O.
- [166] Invitrogen molecular probes, <http://www.invitrogen.com>, Produktspezifikation von Alexa Fluor 555 an goat anti-mouse IgG Antikörper bei pH 7.2.
- [167] S. Schlachter, S. Schwedler, A. Esposito, G. S. Kaminski Schierle, G. D. Moggridge und C. F. Kaminski, A method to unmix multiple fluorophores in microscopy images with minimal a priori information, *Opt. Express* **17**, 22747–22760, 2009.
- [168] M. G. Spillantini, R. A. Crowther, R. Jakes, N. J. Cairns, P. L. Lantos und M. Goedert, Filamentous  $\alpha$ -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, *Neuroscience Letters* **251**(3), 205–208, 1998.
- [169] R. Kruger, W. Kuhn, T. Muller, D. Voitalla, M. Graeber, S. Kosel, H. Przuntek, J. T. Eppelen, L. Schols und O. Riess, Ala30Pro mutation in the gene encoding  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease, *Nature Genetics* **18**(2), 106–108, 1998.
- [170] M. H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. DiIorio, L. I. Golbe und R. L. Nussbaum, Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science* **276**(5321), 2045–2047, 1997.

- [171] J. Alegre, J. Zarranz, J. Hoenicka, J. C. G. Esteban, J. G. de Yebenes und E. Lezcano, The new mutation, E46K, of  $\alpha$ -synuclein causes Parkinson, insomnia and Lewy body dementia, *Movement Disorders* **19**, P1027, 2004.
- [172] C. B. Lucking und A. Brice,  $\alpha$ -Synuclein and Parkinson's disease, *Cellular And Molecular Life Sciences* **57**(13-14), 1894–1908, 2000.
- [173] S. J. Wood, J. Wypych, S. Steavenson, J. C. Louis, M. Citron und A. L. Biere,  $\alpha$ -Synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent - Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease, *Journal Of Biological Chemistry* **274**(28), 19509–19512, 1999.
- [174] K. A. Conway, S. J. Lee, J. C. Rochet, T. T. Ding, R. E. Williamson und P. T. Lansbury, Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both  $\alpha$ -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **97**(2), 571–576, 2000.
- [175] T. F. Outeiro und S. Lindquist, Yeast cells provide insight into  $\alpha$ -synuclein biology and pathobiology, *Science* **302**(5651), 1772–1775, 2003.
- [176] W. Dauer und S. Przedborski, Parkinson's disease: Mechanisms and models, *Neuron* **39**(6), 889–909, 2003.
- [177] T. J. van Ham, K. L. Thijssen, R. Breitling, R. M. W. Hofstra, R. H. A. Plasterk und E. A. A. Nollen, *C. elegans* model identifies genetic modifiers of  $\alpha$ -synuclein inclusion formation during aging., *PLoS Genet* **4**(3), e1000027, 2008.
- [178] G. S. Kaminski-Schierle, C. W. Bertoncini, S. Schlachter, A. T. van der Goot, S. Schwedler, A. Esposito, T. J. van Ham, R. Kumita, E. A. Nollen, C. M. Dobson und C. F. Kaminski, Imaging the nature of protein aggregation *in vitro* and *in vivo*, *submitted to Science* , 2009.
- [179] K. Suhling, J. Siegel, D. Phillips, P. M. W. French, S. Leveque-Fort, S. E. D. Webb und D. M. Davis, Imaging the environment of green fluorescent protein, *Biophysical Journal* **83**(6), 3589–3595, 2002.
- [180] S. Chandra, G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O. M. Schluter und T. C. Sudhof,  $\alpha$ -synuclein cooperates with CSP $\alpha$  in preventing neurodegeneration, *Cell* **123**(3), 383–396, 2005.
- [181] J. H. Soper, S. Roy, A. Stieber, E. Lee, R. B. Wilson, J. Q. Trojanowski, C. G. Burd und V. M. Y. Lee,  $\alpha$ -Synuclein-induced aggregation of cytoplasmic vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Biology Of The Cell* **19**(3), 1093–1103, 2008.
- [182] Vanessa Werner, Synthetische, strukturelle und photophysikalische Untersuchungen an  $\pi$ -konjugierten 1,3,2-Benzodiazaborolsystemen, PhD thesis, Universität Bielefeld, 2009.

- [183] L. Weber, V. Werner, M. A. Fox, T. B. Marder, S. Schwedler, A. Brockhinke, H. G. Stammer und B. Neumann, Synthetic, structural, photophysical and computational studies of  $\pi$ -conjugated bis- and tris-1,3,2-benzodiazaboroles and related bis(boryl) dithiophenes, *Dalton Transactions* (8), 1339–1351, 2009.
- [184] L. Weber, V. Werner, M. A. Fox, T. B. Marder, S. Schwedler, A. Brockhinke, H. G. Stammer und B. Neumann, Synthetic, structural, photophysical and computational studies on 2-arylethynyl-1,3,2-diazaboroles, *Dalton Transactions* (15), 2823–2831, 2009.
- [185] C. D. Entwistle und T. B. Marder, Applications of three-coordinate organoboron compounds and polymers in optoelectronics, *Chemistry Of Materials* **16**(23), 4574–4585, 2004.
- [186] A. P. Kulkarni, C. J. Tonzola, A. Babel und S. A. Jenekhe, Electron transport materials for organic light-emitting diodes, *Chemistry Of Materials* **16**(23), 4556–4573, 2004.
- [187] R. Stahl, Electroactive conjugated polymers as charge-transport materials for optoelectronic thin-film devices, PhD thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2005.
- [188] S. Yamaguchi und A. Wakamiya, Boron as a key component for new  $\pi$ -electron materials, *Pure And Applied Chemistry* **78**(7), 1413–1424, 2006.
- [189] Y. Kubo, M. Yamamoto, M. Ikeda, M. Takeuchi, S. Shinkai, S. Yamaguchi und K. Tamao, A colorimetric and ratiometric fluorescent chemosensor with three emission changes: Fluoride ion sensing by a triarylborane-porphyrin conjugate, *Angewandte Chemie-International Edition* **42**(18), 2036–2040, 2003.
- [190] Y. Cui, F. H. Li, Z. H. Lu und S. N. Wang, Three-coordinate organoboron with a B=N bond: substituent effects, luminescence/electroluminescence and reactions with fluoride, *Dalton Transactions* (25), 2634–2643, 2007.
- [191] D. R. Bai, X. Y. Liu und S. I. Wang, Charge-transfer emission involving three-coordinate organoboron: V-shape versus U-Shape and impact of the spacer on dual emission and fluorescent sensing, *Chemistry-A European Journal* **13**(20), 5713–5723, 2007.
- [192] A. Stock und E. Pohland, Boric acid solution IX B<sub>3</sub>N<sub>3</sub>H<sub>6</sub>, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **59**, 2215–2223, 1926.
- [193] J. S. Merriam und K. Niedenzu, Synthesis and characterization of 1,3-Dimethyl-2-Phenyldiazaborolin, *Journal Of Organometallic Chemistry* **51**(APR16), C1–C2, 1973.

- [194] J. Goubeau und H. Schneider, Darstellung von Diaminborinen aus Diamin-Monohydrochloriden und Natruiaborhydrid, *Annalen Der Chemie-Justus Liebig* **675**(JUL), 1–&, 1964.
- [195] L. Weber, The chemistry of 1,3,2-diazaborolines (2,3-dihydro-1H-1,3,2-diazaboroles), *Coordination Chemistry Reviews* **215**, 39–77, 2001.
- [196] S. Maruyama und Y. Kawanishi, Syntheses and emission properties of novel violet-blue emissive aromatic bis(diazaborole)s, *Journal Of Materials Chemistry* **12**(8), 2245–2249, 2002.
- [197] I. Yamaguchi, B. J. Choi, T. A. Koizumi, K. Kubota und T. Yamamoto,  $\pi$ -Conjugated polyphenylenes with diazaborole side chains synthesized via 1,2-phenylenediamine polymer, *Macromolecules* **40**(3), 438–443, 2007.
- [198] F. W. Ward, The absorption spectra of some indole derivatives., *Biochemical Journal* **17**(6), 891–897, 1923.
- [199] A. Chrostowska, M. Maciejczyk, A. Dargelos, L. Weber und V. Werner, IMEBORON XIII International Conference on Boron Chemistry, in *From 1,3,2-diazaboroline to polyconjugated benzodiazaborole frameworks – electronic structure studies* 2008.
- [200] A. Sundararaman, M. Victor, R. Varughese und F. Jakle, A family of main-chain polymeric Lewis acids: Synthesis and fluorescent sensing properties of boron-modified polythiophenes, *Journal Of The American Chemical Society* **127**(40), 13748–13749, 2005.
- [201] A. Sundararaman, K. Venkatasubbaiah, M. Victor, L. N. Zakharov, A. L. Rheingold und F. Jakle, Electronic communication and negative binding cooperativity in diborylated bithiophenes, *Journal Of The American Chemical Society* **128**, 16554–16565, 2006.
- [202] L. Weber, V. Werner, I. Domke, H. G. Stammler und B. Neumann, 1,3,2-Diazaborolyl-functionalized thiophenes and dithiophenes: Synthesis, structure, electrochemistry and luminescence, *Dalton Transactions* (31), 3777–3784, 2006.
- [203] D. Cherian, Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von 1,3,2-Benzodiazaborolen als potentielle OLED-Farbstoffe und Fluoridsensoren, Master thesis, Universität Bielefeld, 2009.
- [204] Y. Sun, N. Ross, S. B. Zhao, K. Huszarik, W. L. Jia, R. Y. Wang, D. Macartney und S. N. Wang, Enhancing electron accepting ability of triarylboron via  $\pi$ -conjugation with 2,2'-bipy and metal chelation: 5,5'-bis(BMes(2))-2,2'-bipy and its metal complexes, *Journal Of The American Chemical Society* **129**(24), 7510–+, 2007.
- [205] Oregon Medical Laser Center, <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/>, Anregung und Emission von Rhodamin B in Ethanol.

*Kurz vor Schluß*

*Schön ist der Wein, bevor er getrunken,  
schön ist das Schiff, bevor es gesunken,  
schön ist der Herbst, solange es Mai ist,  
schön ist der Leutnant, solang er aus Blei ist.*

*Schön ist das Glück, wenn man es nur fände,  
schön ist dies Buch, denn gleich ist's zu Ende.*

*Heinz Erhardt*





