

# Einzelmolekül-Diffusionsmessungen mit erhöhter Genauigkeit unter Verwendung einer photospaltbaren Energieübertragungsdyade\*\*

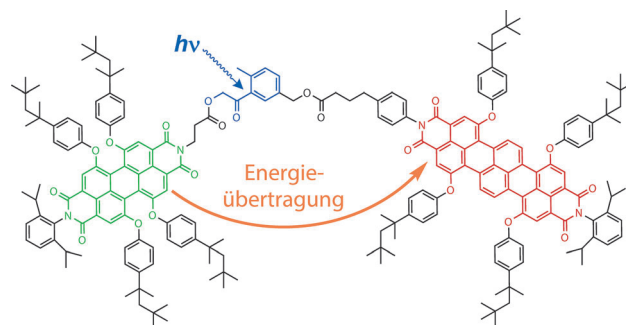
Maren Dill, Moritz C. Baier, Stefan Mecking und Dominik Wöll\*

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie eignen sich vorzüglich zur Untersuchung der Struktur und Dynamik biologischer und materialwissenschaftlicher Systeme.<sup>[1–3]</sup> Einer der Gründe ihres Erfolgs beruht auf der Möglichkeit, einzelne Moleküle mit einer Genauigkeit unterhalb der Beugungsgrenze von Licht lokalisieren<sup>[4,5]</sup> und die damit ermittelten Positionen zu Trajektorien verbinden zu können.<sup>[6]</sup> Damit ermöglicht Weitfeldfluoreszenzmikroskopie die parallele Verfolgung von Einzelmolekülbewegung.<sup>[7]</sup> Bisher wurden zur Analyse absolute Molekülpositionen verwendet.<sup>[8]</sup> Aus diesem Grund wurde die Genauigkeit der Einzelmolekül-Bewegungsanalyse durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Fluoreszenzsignals, Fluoreszenzhintergrund,<sup>[9]</sup> Molekülorientierung<sup>[10]</sup> und die mechanische Stabilität des optischen Aufbaus während der Messung beschränkt. Darüber hinaus hängt die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten über Einzelmolekülverfolgung stark von den experimentellen Parametern ab,<sup>[11]</sup> was zu signifikanten Ungenauigkeiten führen kann.<sup>[8]</sup> Obwohl unter optimalen experimentellen Bedingungen über eine Lokalisierung mit Nanometergenauigkeit berichtet wurde,<sup>[12,13]</sup> wird diese Genauigkeit in den meisten praxisrelevanten Systemen nicht erreicht, da sie eine Hintergrundfluoreszenz aufweisen und ihnen die nötige Langzeitstabilität fehlt. Einige der genannten Probleme können gelöst werden, wenn die Positionen relativ zu einem internen Bezugspunkt bestimmt werden. Dieses Konzept wird im Folgenden beschrieben.

Hier stellen wir eine funktionelle Fluoreszenzfarbstoffdyade mit effizienter Energieübertragung vor, die nach Photospaltung und hinreichend weiter diffusionskontrollierter Trennung beider Fluorophore verschwindet. Insbesondere beschreiben wir die Synthese, die chemische und photophysikalische Charakterisierung und die Anwendung der photospaltbaren Energieübertragungsdyaden für Einzel-

molekül-Spektromikroskopie und demonstrieren die Leistungsfähigkeit der Dyade für Zwei-Farben-Verfolgung und die genaue Messung kleiner Diffusionskoeffizienten ( $D < 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ), wobei wir keine absoluten Positionen, sondern den Förster-Radius als internen Bezugsabstand verwenden.

Die Synthese von Dyade **1** (Schema 1) ist in den Hintergrundinformationen aufgeführt. Intramolekulare Verknüpfungen von Perylendiimiden (PDI) und Terrylendiimiden (TDI)<sup>[14]</sup> wurden bereits in der Literatur beschrieben,<sup>[15–18]</sup> aber ihre Verknüpfung über eine photospaltbare Gruppe ist neu. Die Absorptions- und Emissionsspektren von **1** und den einzelnen Chromophoren in Cyclohexan befinden sich in den Hintergrundinformationen.



**Schema 1.** Die in dieser Arbeit synthetisierte und verwendete photospaltbare Fluoreszenzfarbstoffdyade **1**. Ein Perylendiimid-Chromophor dient als Energiedonor, ein Terrylendiimid-Chromophor als Energieakzeptor. Beide Hälften sind über eine photolabile Methylphenacyl-Brücke miteinander verknüpft.

In Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und somit der Wahrscheinlichkeit der drei Chromophore, Licht zu absorbieren, beobachtet man für die Dyade **1** unterschiedliches photophysikalisches und photochemisches Verhalten. Bei Anregung mit langen Wellenlängen über 600 nm wird ausschließlich der TDI-Chromophor angeregt, und das Intensitätsmaximum der Fluoreszenz liegt bei 699 nm, im Vergleich zum TDI-Farbstoff **3** um 18 nm bathochrom verschoben (Struktur und Spektrum befinden sich in den Hintergrundinformationen). Licht mit einer Wellenlänge unter 600 nm kann sowohl vom PDI- als auch vom TDI-Chromophor absorbiert werden. Aufgrund der Energieübertragung wird jedoch, selbst nach Anregung des PDI-Chromophors, das Fluoreszenzspektrum eindeutig von der TDI-Emission dominiert. Unter der Annahme eines Förster-Resonanz-Energieübertragungsmechanismus (FRET), ergibt sich für die Abhängigkeit der Energieübertragungseffizienz  $\eta$  von der

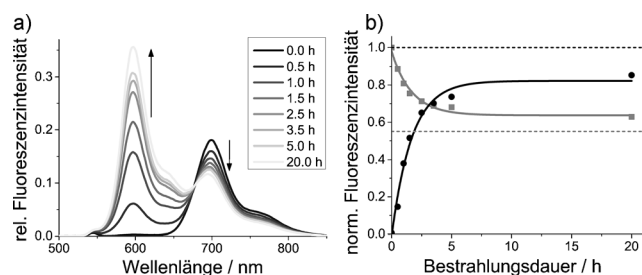
[\*] M. Dill, M. C. Baier, Prof. Dr. S. Mecking, Dr. D. Wöll  
Fachbereich Chemie, Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)  
E-Mail: dominik.woell@uni-konstanz.de

Dr. D. Wöll  
Zukunftskolleg, Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, project WO 1670/2-1) gefördert. D.W. dankt dem Zukunftskolleg der Universität Konstanz für finanzielle und administrative Unterstützung. M.C.B. bedankt sich bei den Fonds der chemischen Industrie für ein Stipendium. Des Weiteren möchten wir Prof. Dr. A. Zumbusch und Prof. Dr. Ulrich E. Steiner für die interessanten Diskussionen Dank sagen.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201303658> zu finden.



**Abbildung 1.** a) Zeitreihe von Fluoreszenzspektren während der Bestrahlung einer homogenen Lösung von **1** in Cyclohexan mit 311 nm. Eine Fläche von 1 cm<sup>2</sup> wurde in einer 3-mL-Standardküvette mit einer Bestrahlungsleistung von 5,2 mWcm<sup>−2</sup> belichtet. b) Zeitlicher Verlauf der Intensität des Fluoreszenzmaximums von Energiedonor (Kreise) und Energieakzeptor (Quadrate) mit der Bestrahlungsdauer. Beide Datensätze wurden mit einer monoexponentiellen Funktion mit einer Zeitkonstanten von 1,68 h angeglichen. Die gestrichelten Linien zeigen die Fluoreszenzintensität von Farbstoff **2** und Farbstoff **3** (deren Strukturen befinden sich in den Hintergrundinformationen) bei der jeweils gleichen Konzentration.

Entfernung zwischen Energiedonor und Energieakzeptor der in Gleichung (1) beschriebene Zusammenhang.<sup>[19]</sup>

$$\eta(r, R_0) = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (1)$$

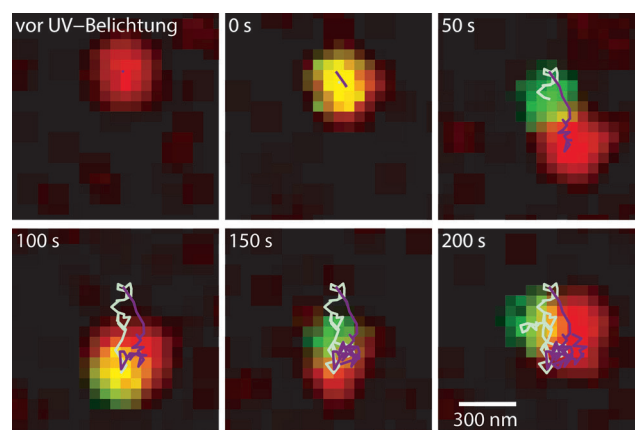
Dabei bezeichnet  $R_0$  den Förster-Radius, in den die Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors sowie die Orientierung beider Chromophore zueinander einfließen. Für unser Donor-Akzeptor-Paar beträgt er unter Annahme freier Rotation 6,4 nm. Zu Beginn beobachtet man aufgrund der geringen Entfernung zwischen beiden Fluorophoren eine Energieübertragung mit 99% Effizienz. Bei solch kurzen Entfernungen ist die dipolare Näherung der Förster-Theorie nur eine grobe Abschätzung, da aufgrund der starken elektronischen Kopplung zusätzlich auch die Austauschwechselwirkung berücksichtigt werden muss.<sup>[20]</sup> In Abschnitt 8 der Hintergrundinformationen wird jedoch gezeigt, dass für unsere Methode im Wesentlichen eine signifikante Abnahme der Energieübertragungsrate bei ca.  $R_0$  nötig ist. Bei diesem Abstand kann man von der Gültigkeit der Förster-Theorie und somit von einer Energieübertragung nach einem FRET-Mechanismus ausgehen.<sup>[20]</sup> UV-Licht mit einer Wellenlänge unterhalb von 330 nm kann von allen Chromophoren absorbiert werden. Wird das Photon von der photolabilen Gruppe absorbiert, so kann diese gespalten werden. Die Photokinetik der Spaltungsreaktion wurde in homogener Cyclohexan-Lösung beobachtet. Nach der Photospaltung können Energiedonor und Energieakzeptor unabhängig voneinander frei diffundieren, und ihr mittlerer Abstand wird sich kontinuierlich vergrößern, wodurch die Energieübertragung, wie in Abbildung 1a dargestellt, allmählich verschwindet. Nach verschiedenen Bestrahlungsdauern mit Licht der Wellenlänge 311 nm wurden (Ensemble-)Fluoreszenzspektren aufgenommen, und daraus die zeitliche Entwicklung der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzintensität erhalten (Abbildung 1b).

Wie in den Hintergrundinformationen erläutert, bestimmten wir daraus eine Quantenausbeute für die Photospaltung von 0,03, bezogen auf eine Anregung des photolabilen Phenacyl-Chromophors. Dieser Wert ist eine Größenordnung kleiner als die Quantenausbeute von 0,22 für die Photospaltung der isolierten photolabilen Gruppe, die von Zabadal et al. gemessen wurde.<sup>[21]</sup> Vermutlich sind hierfür photophysikalische Wechselwirkungen der angeregten photolabilen Gruppe mit den anderen Chromophoren verantwortlich, worauf auch die spektralen Verschiebungen in Abbildung S1 hindeuten (siehe Hintergrundinformationen).

Neben den beschriebenen spektroskopischen Ensemblemessungen wollen wir auch demonstrieren, welche neuen Untersuchungen die Dyade **1** ermöglicht. Der wesentliche Vorteil liegt in der Tatsache, dass sich vor der UV-Bestrahlung beide Fluorophore in direkter Nachbarschaft befinden (ca. 1 nm). Nach der Photospaltung können sie unabhängig mit einer räumlichen Auflösung, die hauptsächlich vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis ihrer Emission abhängt,<sup>[9]</sup> lokalisiert und ihre Positionen zu Trajektorien verbunden werden.

Um dies zu zeigen, betteten wir **1** in einen ca. 0,3 µm dünnen Polyethylacrylat-Film (PEA) ein ( $M_w = 100 \text{ kg mol}^{-1}$ ). Mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) wurde für PEA eine Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) von −7,6 °C bestimmt. Der Diffusionskoeffizient von **1** in solch einem PEA-Film beträgt  $7,2 \times 10^{-17} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Damit lässt sich die Trennung der Farbstoffe nach der UV-Spaltung mithilfe von Weitfeldmikroskopie zeitlich gut verfolgen.

Abbildung 2 zeigt eine Serie von Bildern, die zu verschiedenen Zeiten nach UV-Spaltung der Dyade **1** aufgenommen wurden. Der PDI- und der TDI-Detektionskanal sind hier in Falschfarben überlagert. Vor UV-Belichtung wurde aufgrund der effizienten Energieübertragung nur die Emission des TDI-Chromophors von **1** beobachtet. Nach Photospaltung der Dyade und hinreichend weiter diffusiver Trennung beider Chromophore auf eine Entfernung oberhalb



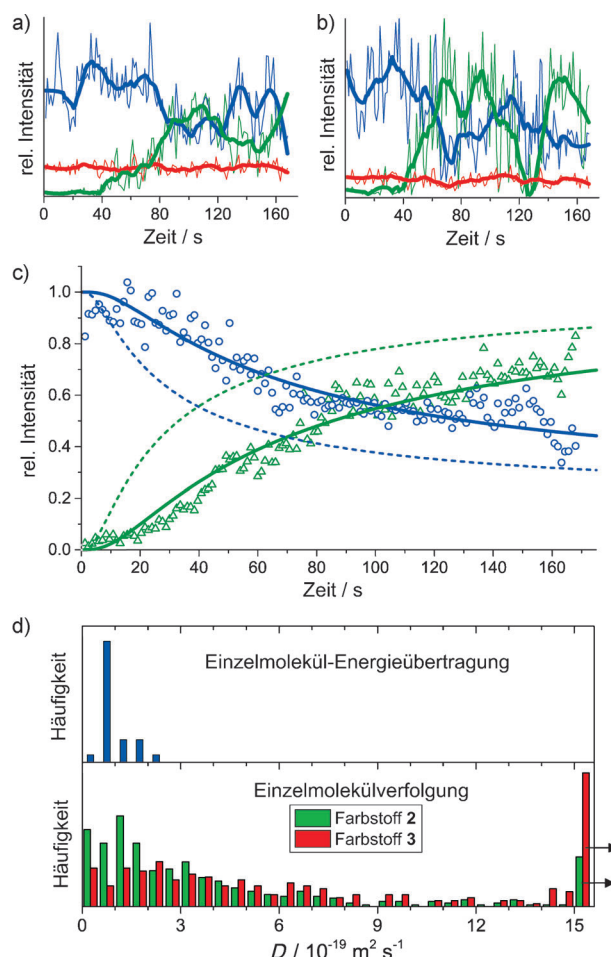
**Abbildung 2.** Serie von Bildern (in Falschfarben), die aus einer in den Hintergrundinformationen gezeigten Weitfeldmikroskopie-Aufnahme von **1** in einem PEA-Film zu verschiedenen Zeiten nach einer 5 s langen UV-Belichtung stammen (1 s Integrationszeit pro Bild). Die grünen Signale wurden im PDI-Kanal, die roten Signale im TDI-Kanal gemessen. Gelbe Pixel zeigen Bereiche mit Intensität in beiden Kanälen. Die Punkte beider Farben können unabhängig voneinander verfolgt werden (Trajektorie von PDI: weiß, Trajektorie von TDI: violett).

des Förster-Radius können die PDI- und die TDI-Fluoreszenz in getrennten Emissionskanälen erfasst werden. Somit können die Positionen beider Chromophore unabhängig mit der für Einzelmolekülmessungen typischen Genauigkeit<sup>[22]</sup> ohne signifikante Beeinträchtigung durch den jeweils anderen Kanal verfolgt werden.

Mit Zwei-Farben-Einzelmolekülverfolgung kann man vorzüglich den zeitlichen Verlauf der Abstände zwischen beiden getrennten Molekülhälften beobachten, wenn ihre Entfernung größer als die Lokalisierungsgenauigkeit ist. Auch wenn über Lokalisierungsgenauigkeiten im Nanometerbereich berichtet wurde,<sup>[12]</sup> sind diese doch in vielen, praktisch wichtigen Systemen auf ca. 10 nm beschränkt, da sie einen eignen Fluoreszenzhintergrund oder, in hochviskosen Medien, eine bevorzugte Molekülorientierung aufweisen.<sup>[10]</sup> Für diese Fälle, können Energieübertragungseffizienten<sup>[23–25]</sup> herangezogen werden, um die räumliche Einzelmolekülpaar-Auflösung zu verbessern.

Um Änderungen der Energieübertragungseffizienz auf Einzelmolekülebene in Echtzeit zu beobachten, betteten wir kleinste Mengen an Dyade **1** in einen ca. 0.3  $\mu\text{m}$  dünnen Polybutylmethacrylat-Film (PBMA,  $M_w = 4 \text{ kg mol}^{-1}$ ) mit  $T_g = 16.2^\circ\text{C}$  ein. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Photospaltung ist in Abbildung 3a–c dargestellt. Zu seiner Aufnahme wurden die drei im Folgenden und in den Hintergrundinformationen aufgeführten Einstellungen zyklisch variiert: 1) Laseranregung bei 561 nm, Detektion zwischen 594 und 646 nm (PDI-Kanal, grüne Kurven), 2) Laseranregung bei 658 nm, Detektion zwischen 672 und 712 nm (TDI-Kanal, rote Kurven) und 3) Laseranregung bei 561 nm, Detektion zwischen 672 und 712 nm (Energieübertragungskanal, blaue Kurven). Abbildung 3a und b zeigen die Intensitäts-Zeit-Spuren von zwei typischen einzelnen Molekülen. Direkt nach UV-Bestrahlung (für 2 s) und Spaltung der chemischen Bindung befinden sich die beiden getrennten Fragmente noch in unmittelbarer Entfernung zueinander, und somit findet eine effiziente Energieübertragung statt. Nach einer gewissen Zeit erreicht ihr Abstand den Förster-Radius und übertrifft ihn irgendwann. Somit verringert sich die Intensität im Energieübertragungskanal, und der PDI-Kanal gewinnt signifikant an Signal. Da die FRET-Effizienz zur sechsten Potenz des Abstands indirekt proportional ist, weisen FRET-Abstandsmessungen insbesondere bei Entfernungen um den Förster-Radius eine hohe Empfindlichkeit auf. Wie in Abbildung 3a und b zu sehen, ist dieser Punkt bei ca. 60–80 s erreicht. Da es sich bei der Diffusion der Bruchstücke in unserem Polymerfilm um einen statistischen Prozess handelt, kann deren Entfernung zueinander nach der Photospaltung wie in Abbildung 3b gezeigt fluktuieren.

Im Folgenden vergleichen wir die mit unserer Energieübertragungs-Methode erhaltenen Diffusionskoeffizienten mit denjenigen aus Einzelmolekülverfolgung. Wir benutzen hierzu ein Modell, bei dem sich beide Fluorophore zunächst am gleichen Ort befinden, sich nach Photospaltung durch normale Diffusion trennen, und die Energieübertragung nach einem FRET-Mechanismus stattfindet. Unter diesen Annahmen beträgt die Wahrscheinlichkeit  $P$ , beide mit den Diffusionskoeffizienten  $D_1$  und  $D_2$  diffundierende Fluorophore nach einer gewissen Zeit  $t$  in einem Abstand  $r$  zu finden



**Abbildung 3.** a,b) Typische Einzelmolekülfluoreszenz-Zeitspuren nach Photospaltung der in PBMA eingebetteten Dyade **1** mit UV-Licht im PDI-Kanal (grün), im TDI-Kanal (rot) und im FRET-Kanal (blau). Der gleitende Durchschnitt über 10 Punkte ist als dicke Linie ebenfalls gezeigt. c) Über 24 Donoren (grüne Dreiecke) und Akzeptoren (blaue Kreise) gemittelte Zeitspuren. Anpassungen entsprechend der Gleichungen (2)–(5) mit Diffusionskoeffizienten  $D_{1,2} \approx 0.5 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  wurden als durchgezogene Linien gezeichnet. Im Fall einer Summe der Diffusionskoeffizienten von PDI- und TDI-Farbstoff von  $3.1 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  würde man die gestrichelten Intensitäten erhalten. d) Verteilung der Einzelmolekül-Diffusionskoeffizienten bestimmt über Einzelmolekülverfolgung von PDI-Farbstoff **2** (grün) und TDI-Farbstoff **3** (rot), und über die Fragmente nach Photospaltung (blau) unter Verwendung unserer Einzelmolekül-FRET-Methode mit den Gleichungen (2)–(5). Ein signifikanter Anteil der mithilfe von Einzelmolekülverfolgung bestimmten Diffusionskoeffizienten ergab Werte oberhalb von  $15 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , die durch die Pfeile angedeutet sind.

[Gleichung (2), mit  $D = D_1 + D_2$ ]. Dies führt zu einer FRET-Effizient  $\eta$  gemäß Gleichung (3).<sup>[26]</sup>

$$P(r, t, D) = \frac{1}{6\pi Dt} \exp\left(-\frac{r^2}{6Dt}\right) 2\pi r \quad (2)$$

$$\eta(t, D) = \int_{r=0}^{\infty} P(r, t, D) \eta(r, R_0) dr \quad (3)$$

Hierdurch ergeben sich die normalisierten Donor- und Akzeptorintensitäten  $I$  nach Gleichung (4) und (5).

$$I_D = 1 - \eta(t, D) \quad (4)$$

$$I_A = 0.8 \eta(t, D) + 0.2 \quad (5)$$

Es sei darauf verwiesen, dass die Akzeptoreffizienz korrigiert wurde, da TDI-Moleküle mit dem grünen 561-nm-Laser auch direkt angeregt werden können. Die Gleichungen (2)–(5) ermöglichen eine Abschätzung von Einzelmolekül-Diffusionskoeffizienten, deren Genauigkeit lediglich durch die Statistik der Diffusion beschränkt ist.

Eine Anpassung der Intensitätskurven für 24 photospaltene Moleküle der Dyade **1** durch die Gleichungen (4) und (5) mit der Methode der kleinsten Quadrate (siehe die Hintergrundinformationen) ergab die in Abbildung 3d gezeigte Verteilung an Diffusionskoeffizienten. Sie liegt um einen Mittelwert von  $D_{1,2} \approx 0.5 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , wobei für die getrennten Molekülhälften aufgrund ihrer vergleichbaren Größe derselbe Diffusionskoeffizient angenommen wurde. Dieser Wert stimmt gut mit dem Diffusionskoeffizienten überein, den man durch eine Anpassung der aufsummierten Intensitäten der 24 Intensitätsspektren erhält (Abbildung 3c).

Dagegen sind die aus Einzelmolekülverfolgung erhaltenen Diffusionskoeffizienten für PDI-Farbstoff **2** und TDI-Farbstoff **3** (deren Strukturen befinden sich in den Hintergrundinformationen) signifikant höher ( $1.3 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $1.8 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Wie in Abbildung 3c (gestrichelte Linien) gezeigt, stimmen diese Werte nicht mit den Diffusionskoeffizienten aus unseren Energieübertragungsmessungen überein. Die mithilfe von Einzelmolekülverfolgung ermittelte Verteilung an Diffusionskoeffizienten (Abbildung 3d) ist sehr breit und erstreckt sich von ca.  $50 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  sogar bis zu negativen Werten, die aufgrund von statistischen Ungenauigkeiten der Analyse der mittleren quadratischen Verschiebung zustande kommen. Die Breite dieser Verteilung an Diffusionskoeffizienten könnte leicht als Heterogenität in der molekularen Bewegung fehlinterpretiert werden.

Der Vergleich mit unserer Energieübertragungsmethode zeigt jedoch eindeutig, dass die Diffusionskoeffizienten mit einer Standardabweichung von  $\pm 0.3 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  um den Mittelwert von  $0.5 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  liegen, und unter den gegebenen Bedingungen die Bewegung im Polymer eher homogen ist. Außerdem soll hier betont werden, dass eine Messzeit von mindestens 100 min nötig war, um hinreichend Bewegung für eine zuverlässige Auswertung mithilfe von Einzelmolekülverfolgung zu erhalten, während für die Energieübertragungsmessungen schon 5 min ausreichen.

Der Grund für die höhere Genauigkeit der Bestimmung geringer Diffusionskoeffizienten mit unserer Energieübertragungsmethode liegt in mehreren Vorteilen gegenüber der Einzelmolekülverfolgung. Diese Vorteile können am besten mit dem mittleren Verschiebungsquadrat  $D_{\text{lim}} \propto \frac{\langle x_{\text{lim}}^2 \rangle}{t}$  erklärt werden.

Erstens, ist die Längenskala  $x_{\text{lim}}$  der räumlichen Genauigkeit allein über den Förster-Radius festgelegt und hängt somit nicht von der Lokalisierungsgenauigkeit ab, d. h. sie ist weder durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Lichtpunkte noch durch den Hintergrund beschränkt, solange ausreichend Intensität vom Energiedonor und -akzeptor de-

tektiert werden kann. Des Weiteren wird  $x_{\text{lim}}$ , und damit auch  $D_{\text{lim}}$ , nicht durch Positionierungsfehler aufgrund von Instabilitäten des optischen Systems vergrößert. Da die Energieübertragung nur von der relativen Entfernung von Energiedonor und -akzeptor, nicht jedoch von deren absoluten Koordinaten abhängt, ist ein Driften des optischen Systems für die Methode unkritisch, solange die einzelnen Dyaden und ihre Fragmente in den aufgenommenen Bildern eindeutig einander zugeordnet werden können. Aufgrund der Tatsache, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Lichtpunkte die Genauigkeit unserer Methode nicht signifikant beschränkt, besteht ein weiterer Vorteil der Methode gegenüber Einzelmolekülverfolgung darin, dass geringere Laserintensitäten benutzt, und eine frühe Photobleichung der Farbstoffe damit verringert werden können. Die geringere Anregungsintensität und die Unempfindlichkeit gegen optische Destabilisierung ermöglichen signifikant verlängerte Beobachtungszeiten  $t$ , was zu einer weiteren Verkleinerung von  $D_{\text{lim}}$  führt. Ferner ist zu berücksichtigen, dass die Energieübertragungsmethode empfindlich gegenüber 3D-Bewegung ist, wohingegen die meisten Untersuchungen mit Einzelmolekülverfolgung die 2D-Projektion einer 3D-Bewegung aufnehmen. Für isotrope Diffusion wird dem Rechnung getragen, indem man für das mittlere Verschiebungsquadrat  $4Dt$  anstelle von  $6Dt$  verwendet.

Für FRET hängt die Effizienz auch von der relativen Orientierung von Energiedonor und -akzeptor ab, was über den Orientierungsfaktor  $\kappa$  ausgedrückt wird. Wir führten Simulationen durch, um den Einfluss der Umorientierung der getrennten Fluorophore auf die Energieübertragungseffizienz zu bestimmen (siehe die Hintergrundinformationen). Es konnte gezeigt werden, dass in dem betrachteten System Rotationsbewegungen erkennbare Schwankungen der Intensitätszeitspektren hervorrufen können, jedoch nicht in solch einem Maße, dass die Bestimmung von  $D$  dadurch signifikant beeinflusst wird.

Zusammenfassend haben wir eine photospaltbare Energieübertragungsdyaide entwickelt, photochemisch charakterisiert und ihre Leistungsfähigkeit für die Einzelmolekül-Mikrospektroskopie etabliert. Nach Photospaltung ermöglicht diese Dyade über Einzelmolekül-Energieübertragungseffizienzen oder unabhängige Zwei-Farben-Verfolgung eine Beobachtung der Abstandsänderung beider Fragmente von der nm- bis zur  $\mu\text{m}$ -Längenskala. Die Beobachtung der Änderungen der Einzelmolekül-Energieübertragungseffizienz zwischen beiden Fragmenten kann zur Bestimmung von niedrigen Einzelmoleküldiffusionskoeffizienten und deren Verteilungen mit, im Vergleich zu Einzelmolekülverfolgung, hoher Genauigkeit herangezogen werden. In Zukunft wollen wir uns darauf konzentrieren, die hier vorgestellte Methode zur Messung langsamer Diffusion in polymeren Systemen anzuwenden und sie auf andere Fluorophore und photolabile Gruppen auszuweiten.

Eingegangen am 29. April 2013,

veränderte Fassung am 2. August 2013

Online veröffentlicht am 25. September 2013



**Stichwörter:** Diffusion · Einzelmolekülspektroskopie ·  
Fluoreszenzmikroskopie ·  
Förster-Resonanz-Energieübertragung · Photolabile Gruppen

- 
- [1] F. Kulzer, T. Xia, M. Orrit, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 866–879; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 854–866.
- [2] D. Wöll, E. Braeken, A. Deres, F. De Schryver, H. Uji-i, J. Hofkens, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 313–328.
- [3] P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2698–2728; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2642–2671.
- [4] B. Huang, M. Bates, X. W. Zhuang in *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 78, Annual Reviews, Palo Alto, **2009**, S. 993–1016.
- [5] A. M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller, G. J. Brakenhoff, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *292*, 183–187.
- [6] M. J. Saxton, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 671–672.
- [7] T. Schmidt, G. J. Schütz, W. Baumgartner, H. J. Gruber, H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2926–2929.
- [8] D. Ernst, J. Köhler, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 845–849.
- [9] K. I. Mortensen, L. S. Churchman, J. A. Spudich, H. Flyvbjerg, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 377–383.
- [10] J. Enderlein, E. Toprak, P. R. Selvin, *Opt. Express* **2006**, *14*, 8111–8120.
- [11] X. Michalet, A. J. Berglund, *Phys. Rev. E* **2012**, *85*, 061916.
- [12] A. Yildiz, P. R. Selvin, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 574–582.
- [13] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, P. R. Selvin, *Science* **2003**, *300*, 2061–2065.
- [14] T. Weil, T. Vosch, J. Hofkens, K. Peneva, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9252–9278; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9068–9093.
- [15] E. Fron, L. Puhl, I. Oesterling, C. Li, K. Müllen, F. C. De Schryver, J. Hofkens, T. Vosch, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 595–608.
- [16] G. Hinze, R. Métivier, F. Nolde, K. Müllen, T. Basché, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 124516.
- [17] R. Métivier, F. Nolde, K. Müllen, T. Basché, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *98*, 047802.
- [18] C. Curutchet, B. Mennucci, G. D. Scholes, D. Beljonne, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 3759–3766.
- [19] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Aufl., Kluwer Academic/Plenum Publishers, **1999**.
- [20] S. E. Braslavsky, E. Fron, H. B. Rodriguez, E. S. Roman, G. D. Scholes, G. Schweitzer, B. Valeur, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 1444–1448.
- [21] M. Zabadal, A. P. Pelliccioli, P. Klán, J. Wirz, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 10329–10333.
- [22] D. Wöll, C. Kölbl, B. Stempfle, A. Karrenbauer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 6196–6205.
- [23] R. Roy, S. Hohng, T. Ha, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 507–516.
- [24] B. Schuler, W. A. Eaton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 16–26.
- [25] T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6264–6268.
- [26] M. J. Saxton, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1744–1753.
-