

Die Einzelmolekülverteilung in Fluoreszenz-Fluktuations-Experimenten

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Physik

eingereicht am
Fachbereich Physik der
Universität Dortmund
im September 2007

von

Herrn Dipl.-Phys. Benjamin Greiner,
geboren am 29.08.1972 in Schwäbisch Hall

Gutachter:

1. Professor Dr. Joachim Stolze
2. Dr. Harald P. Mathis

Zusammenfassung

Thema der Arbeit ist die theoretische Analyse von Photonenzahlverteilungen in Fluoreszenzfluktuationsexperimenten. Im Mittelpunkt steht dabei die für eine Molekülsorte spezifische Einzelmolekülverteilung, welche auf der Basis eines neu definierten Beobachtungsvolumens formuliert wird. Es wird gezeigt, wie hierauf aufbauend sukzessiv die Signal- und die Gesamtverteilung eines Molekülensembles berechnet werden können, bzw. wie aus der dem Experiment zugänglichen Gesamtverteilung die Einzelmolekülverteilung einer Molekülspezies bestimmt werden kann. Ferner wird die Gemischverteilung modelliert, welche durch eine Überlagerung der Signale von Molekülen unterschiedlicher Helligkeiten entsteht. Für die Verteilungen und ihre Momente wird eine Rekursionsformel abgeleitet, welche analytische Untersuchungen vereinfacht und numerisch stabil in einen Algorithmus implementiert werden kann.

Die in der Arbeit dargestellten theoretischen Konzepte werden konkret anhand eines gaußförmigen Helligkeitsprofils diskutiert und veranschaulicht. Die Annahme eines gaußförmigen Helligkeitsprofils stellt eine Näherung dar, die jedoch in der Praxis (z. B. in der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie) mit großem Erfolg eingesetzt wird.

Schließlich wird das erarbeitete Modell an den Daten einer Random-Walk-Simulation erprobt. Diese enthalten dieselben stochastischen Schwankungen, wie sie auch im Experiment zu erwarten sind, und stellen einen ersten Test für die Leistungsfähigkeit der Theorie dar. Insgesamt zeigen die in der Arbeit präsentierten Ergebnisse, dass aufgrund der dargestellten Theorie die für eine Molekülsorte charakteristische Einzelmolekülfunktion aus experimentellen Daten ermittelt werden kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Fluoreszenzfluktuationsexperimente	5
2.1	Fluoreszenzprozesse	5
2.2	Lokale Molekulare Helligkeit	9
2.3	Konfokale Mikroskopie	11
2.4	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	16
3	Stochastische Grundlagen	19
3.1	Zufallsgrößen	19
3.2	Wahrscheinlichkeitserzeugende Funktion	22
3.3	Stochastische Prozesse	23
3.3.1	Poissonprozesse	23
3.3.2	Diffusion	25
4	Photonenzahlverteilungen	29
4.1	Vorgehensweise	30
4.2	Effektives Volumen	32
4.3	Einzelmolekülverteilung	35
4.3.1	Momente	36
4.4	Signalverteilung	38
4.4.1	Rekursionsformel	40
4.4.2	Momente	42

4.5	Gesamtverteilung	44
4.5.1	Rekursionsformel	44
4.5.2	Momente	45
4.6	Gemische	45
4.7	Bestimmung der Einzelmolekülgrößen	47
4.7.1	Einzelmolekülverteilung	47
4.7.2	Einzelmolekülmomente	49
5	Gaußförmige lokale molekulare Helligkeit	51
5.1	Effektives Volumen	53
5.2	Einzelmolekülverteilung	55
5.3	Signalverteilung	61
5.4	Gesamtverteilung	65
6	Simulierte Photonenzahlverteilungen	67
6.1	Simulationsprinzip	68
6.2	Simulationsparameter	69
6.3	Verteilungen im Falle kleiner Binzeiten	71
6.3.1	Verteilungen	71
6.3.2	Charakteristische Einzelmolekülgrößen	77
6.4	Verteilungen im Fall langer Binzeiten	82
7	Fazit	89
	Literaturverzeichnis	97

Abkürzungsverzeichnis

BSD	Burst size distribution
CEF	Collection efficiency function
FCA	Fluorescence cumulant analysis
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
FFE	Fluorescence fluctuation experiment
FIDA	Fluorescence intensity distribution analysis
FILDA	Fluorescence intensity and lifetime distribution analysis
FIMDA	Fluorescence intensity multiple distributions analysis
IC	Internal conversion
ISC	Inter system crossing
LMH	lokale molekulare Helligkeit
MAFID	Moment analysis of fluorescence intensity distributions
MO	Mikroskopobjektiv
OPE	One photon excitation
PCH	Photon counting histogram
PGF	Probability generating function
PSF	Point spread function
ZV	Zufallsvariable

Kapitel 1

Einleitung

Eine zentrale Fragestellung weltweiter Forschung ist die Aufklärung biomolekularer Prozesse in lebenden Zellen. Seit den ersten Entschlüsselungen des genomischen Codes ist der Bauplan der embryonalen Entwicklung und Funktionsweise des Menschen sowie verschiedener Organismen wie z.B. der Taufliege (*Drosophila melanogaster*), dem Darmbakterium (*Escherichia coli*), des Kugelfischs (*Fugu rubripes*), des Fadenwurmes (*Caenorhabditis elegans*), des Teichmolchs (*Triturus vulgaris*) und der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) bekannt. Trotz unterschiedlicher Form, Farbe und Funktion dieser Organismen laufen die molekularbiologischen Prozesse innerhalb einer lebendigen Zelle nach ähnlichen Prinzipien ab. Es hat sich herausgestellt, dass diese Prozesse zu komplex sind, um allein auf der Basis ihres genomischen Bauplanes aufgeklärt zu werden. Die Wirkung der molekularen Komponenten wie Proteine und Ribozyme entfalten sich erst durch ein komplexes Netz von gegenseitigen Wechselwirkungen. Dieses Netz von Wechselwirkungen spielt eine wesentliche Rolle bei dem Verlauf von Krankheiten wie z. B. Multiple Sklerose, Aids und Krebs. Die Komplexität der biologischen Funktionen innerhalb einer Zelle erschwert insbesondere die Entwicklung von wirkungsvollen Medikamenten ohne unerwünschte Nebenwirkungen. Im Zusammenhang mit den Bemühungen, die grundlegenden Prozesse in Zellen und biologischen Systemen zu verstehen, bekommen empfindliche diagnostische Verfahren eine wachsende Bedeutung. Angefangen mit dem klassischen Lichtmikroskop hat die Entwicklung optischer Systeme in den letzten Jahrzehnten wesentliche Fortschritte bezüglich Empfindlichkeit und Auflösung erreicht. Ein wesentlicher Durchbruch wurde mit der Erfindung des konfokalen Mikroskops erzielt. Damit können heute selbst einzelne biologische Moleküle nachgewiesen und untersucht werden.

Ein sehr empfindliches Messverfahren bieten Fluoreszenzfluktuationsexperimente (engl. fluorescence fluctuation experiment, FFE). Dabei wird die Fluoreszenz von Molekülen aus einem winzigen Beobachtungsvolumen untersucht. Üblicherweise wird hierzu ein Laser

mit einem hochaperturigen Mikroskopobjektiv und einer leistungsfähigen Beobachtungselektronik kombiniert. Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts demonstrierten Madge, Elson und Webb [11, 30, 31] sowie Ehrenberg und Rigler [9] die Möglichkeit, mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl. fluorescence correlation spectroscopy, FCS) molekulare Dynamiken in FFE zu beobachten. Durch den Einsatz konfokaler Mikroskope [26, 44] und der damit verbundenen Beobachtungsvolumina im Bereich weniger Femtoliter konnte eine wesentliche Reduzierung des Hintergrundsignals erreicht werden. In Kombination mit der Entwicklung hochempfindlicher Halbleiter-Photodetektoren [43] wurde schließlich die Detektionsempfindlichkeit dieser Messtechnik auf Einzelmolekülniveau erhöht. Fluoreszenzfluktuationsexperimente haben sich inzwischen als Standardmethode zur Untersuchung biologisch-chemischer Fragestellungen etabliert. Eine einfache Websuche z. B. nach dem Begriff "fluorescence correlation spectroscopy" ergibt mehr als eine Millionen Einträge und ungefähr 57.000 wissenschaftliche Artikel. Das Spektrum der Anwendungen in Forschung, medizinischer Diagnostik und pharmakologischer Wirkstoffsuche ist breit gefächert.

Ergänzend zur Analyse zeitlicher Fluktuationen durch die FCS gibt es in jüngerer Zeit verstärkte Bestrebungen, die Fluktuationen in der Lichtintensität zu interpretieren. Dies ist durch den Umstand motiviert, dass die Charakterisierung von Molekülen mit der FCS nur bedingt möglich ist. Die FCS ist an hinreichend große Unterschiede im dynamischen Verhalten der Molekülspezies gebunden, um Moleküle von unterschiedlichen Spezies unterscheiden zu können [35]. Dies beschränkt die Methode gerade im Zusammenhang mit der Untersuchung von molekularen Wechselwirkungen. Im Gegensatz dazu wird die Lichtintensität entscheidend durch den Aufbau und die Struktur des Farbstoffmoleküls geprägt. Fluktuationen in der Lichtintensität werden üblicherweise durch sogenannte Photonenzahlverteilungen beschrieben. Eine der ersten Arbeiten, die sich mit Photonenzahlverteilungen beschäftigt, stammt von Qian und Elson aus dem Jahr 1990. Die darin vorgestellte Methode bedient sich dem klassischen Momentenverfahren, um aus der Fluoreszenzintensität molekulare Parameter zu bestimmen [40, 41]. Bekannt geworden ist diese Methode unter den Namen MAFID (engl. moment analysis of fluorescence intensity distributions). Methoden, die eine Modellierung der Photonenzahlverteilung ermöglichen, sind FIDA (engl. fluorescence intensity distribution analysis) [24] und PCH (engl. photon counting histogram) [3]. Weiterführende Konzepte sind unter anderem FILDA (engl. fluorescence intensity and lifetime distribution analysis) [38], FIMDA (engl. fluorescence intensity multiple distributions analysis) [39], FCA (engl. fluorescence cumulant analysis) [36] und BSD (engl. burst size distribution) [12].

Auf der Basis der bisherigen Arbeiten und Theorien ist es nicht möglich, den Beitrag eines einzelnen Moleküls zu der gesamten Photonenzahlverteilung zu erfassen. Die experimen-

tellen Ergebnisse können nicht genutzt werden, um den Einfluss eines einzelnen Moleküls zu bestimmen. Stattdessen werden lediglich Informationen über Ensembles von Molekülen gewonnen. Eine Definition und Bestimmung des Beitrages eines einzelnen Moleküls wird bisher durch heuristische Argumente umgangen. Der Einzelmolekülbeitrag enthält jedoch wertvolle Information zur Charakterisierung einer Molekülspezies. Informationen über wesentliche molekulare Parameter wie z. B. die elektronische Struktur, Anregungsraten des Triplettzustandes oder die Photobleichrate könnten damit in ihrer elementaren Form gewonnen werden. Darüber hinaus beinhaltet der Einzelmolekülbeitrag alle Informationen, die zur Charakterisierung einer Molekülsorte aus den experimentellen Photonenzahlverteilungen gewonnen werden können. Der Einzelmolekülbeitrag kann als vollständige Beschreibung eines Moleküls angesehen werden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung der theoretischen Grundlagen um den Einzelmolekülbeitrag zu definieren, ihn im Rahmen existierender Modellvorstellungen ableitbar zu machen und aus experimentellen Daten zu bestimmen. Die Interpretation der Einzelmolekülbeiträge anhand der elektronischen Struktur eines Moleküls ist ein eigenes umfangreiches Aufgabengebiet, das im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt wird. Schwerpunkt der Arbeit wird auf die Möglichkeiten gelegt, die sich dadurch für relevante Anwendungen ergeben. Der Einzelmolekülbeitrag wird als *fingerprint* angesehen, der entweder direkt aus Messdaten extrahiert oder auf der Basis von theoretischen Modellvorstellungen *ab initio* berechnet wird.

In Kapitel 2 wird dargestellt, wie Signale in Fluoreszenzfluktuationsexperimenten entstehen und experimentell beobachtet werden können. Dem folgt in Kapitel 3 eine Zusammenfassung ausgewählter stochastischer Begriffe und Größen, die im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet werden.

Mit Kapitel 4 beginnt der zentrale Teil der Arbeit. Ein neuartiges Beobachtungsvolumen wird definiert, auf dessen Grundlage mit Hilfe der Mandelschen Formel die charakteristische Einzelmolekülverteilung einer Molekülspezies formuliert wird. Im weiteren Verlauf werden hierauf aufbauend die Signal-, Gesamt- und Gemischverteilung eines FFE berechnet und deren Momente bestimmt. Im letzten Abschnitt des Kapitels wird aufgezeigt, wie die charakteristischen Einzelmolekülgrößen aus der messbaren Gesamtverteilung rekonstruiert werden können.

In Kapitel 5 werden die vorgestellten Konzepte für den Spezialfall einer gaußförmigen lokalen molekularen Helligkeit konkret berechnet und diskutiert. Eine erste Demonstration der Leistungsfähigkeit des analytischen Modells erfolgt in Kapitel 6 anhand von simulierten Verteilungen. Nach einer Darstellung des Simulationsprinzips und seiner Parameter werden simulierte und analytische Verteilungen *a priori* berechnet und gegenübergestellt. Auf

der Grundlage des analytischen Modells werden anschließend die Einzelmolekülverteilung und ihre Kenngrößen der simulierten Signalverteilungen bestimmt. Das Kapitel endet mit Betrachtungen zu den Grenzen der Theorie für große Zeitintervalle. Zum Abschluss der Arbeit wird in Kapitel 7 ein Fazit gegeben.

Kapitel 2

Fluoreszenzfluktuationsexperimente

Der Begriff Fluoreszenzfluktuationsexperiment (FFE) kennzeichnet üblicherweise eine Klasse von experimentellen Konfigurationen, die winzige Beobachtungsvolumen erzeugen, in denen Moleküle zur Fluoreszenz angeregt werden. Häufig wird hierzu ein Laserstrahl mit Hilfe eines hoch aperturigen Mikroskopobjektivs (MO) in eine Probe fokussiert, wodurch ein stark begrenztes Beobachtungsvolumen in der Größenordnung von Femtolitern (fl) entsteht. Die Anregungsintensität ist im Bereich des Fokus' ausreichend, um mit sensitiven Detektoren Photonen von einzelnen Molekülen nachweisen zu können.

Das im weiteren Verlauf der Arbeit vorgestellte Modell der Photonenzahlverteilungen dient der Analyse von Signalen in Fluoreszenzfluktuationsexperimenten. Kapitel 2 stellt dar, wie diese Signale im FFE entstehen und beobachtet werden. Im ersten Abschnitt 2.1 werden die Grundlagen des Fluoreszenzprozesses vorgestellt. Hierauf aufbauend werden in Abschnitt 2.2 der Begriff der lokalen molekularen Helligkeit eingeführt und die damit verbundenen molekularen und apparativen Größen vorgestellt. Experimentell werden viele FFEe mit konfokalen Mikroskopen durchgeführt, deren schematischer Aufbau und Funktionsweise in Abschnitt 2.3 beispielhaft beschrieben ist. Das Kapitel endet mit einer Einführung in die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS). Sie ist die etablierte Methode auf dem Gebiet der FFEe, die wesentlich zu den großen Erfolgen der Fluoreszenzspektroskopie beigetragen hat. FCS und Photonenzahlverteilungen basieren auf denselben Signalen und weisen verschiedene Beziehungen zueinander auf.

2.1 Fluoreszenzprozesse

Die bei der Relaxation eines elektronisch angeregten Systems emittierte Strahlung wird allgemein als Lumineszenz bezeichnet. Je nach Art der Anregung unterscheidet man ver-

schiedene Lumineszenzprozesse. Erfolgt sie durch die Absorption von Photonen, spricht man von Photolumineszenz, wozu neben der Fluoreszenz auch die Erscheinung der Phosphoreszenz gehört.

Viele spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass der Prozess der Fluoreszenz durch ein einfaches Modell, bekannt geworden in den 30er Jahren als Jablonski–Termschema [22, 37], beschrieben werden kann. Abbildung 2.1 zeigt ein vereinfachtes Termschema von ausgewählten elektronischen Energiezuständen eines typischen Fluorophors. Die Energiezustände werden in Singulett $S_n, n = 1, 2, \dots$ und Triplettzustände $T_n, n = 1, 2, \dots$ unterschieden, welche sich durch einen Gesamtelektronenspin von Null bzw. Eins auszeichnen. Bei Raumtemperatur befinden sich Moleküle mit hoher Wahrscheinlichkeit im untersten

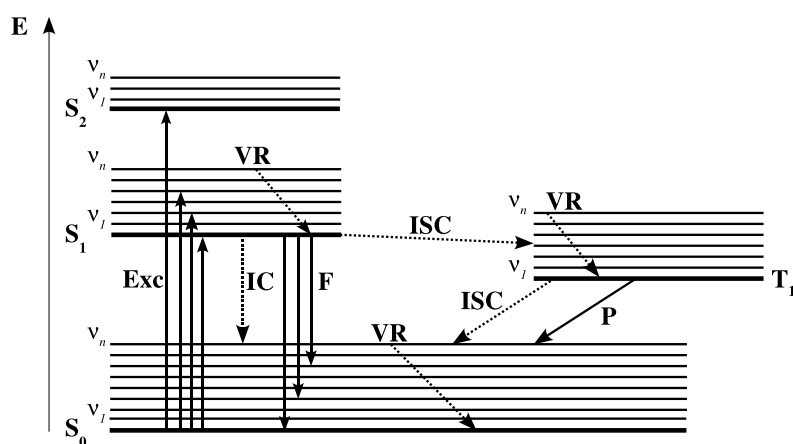


Abbildung 2.1: Jablonski–Diagramm eines Fluorophors. Zu sehen ist die vereinfachte Darstellung ausgewählter elektronischer Energiezustände eines fluoreszenzfähigen Moleküls. Die gepunkteten Pfeile zeigen die ISC– und IC–Übergänge, die durchgezogenen Pfeile die Anregung (Exc) bzw. die Strahlungsübergänge von Fluoreszenz (F) und Phosphoreszenz (P). Die Schwingungszustände sind durch ν_i gekennzeichnet.

Schwingungsniveau ($\nu = 0$) des Singulett-Grundzustands S_0 [28]. Durch die Absorption eines Photons der Energie $E = h\nu_{\text{exc}}$ kann ein Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand S_n versetzt werden. Die Anregung erfolgt überwiegend in ein Vibrationsniveau ν des ersten angeregten Zustands S_1 , wobei auch die Besetzung von energetisch höher liegenden Singulettzuständen möglich ist. Durch Schwingungsrelaxation und interne Konversion (engl. internal conversion, IC) kann das angeregte Molekül strahlungslos in das unterste Schwingungsniveau ($\nu = 0$) des S_1 -Zustandes wechseln. Der beschriebene Abklingprozess erfolgt bei Molekülen in einem flüssigen Medium innerhalb von wenigen Pikosekunden [28]. Im Falle der Fluoreszenz kehrt das Molekül hauptsächlich vom $S_1[\nu = 0]$ Zustand unter spontaner Emission eines Photons der Frequenz ν_{em} in den Grundzustand S_0 zurück

(Kasha-Regel).

Die typische Fluoreszenzlebensdauer τ eines Moleküls hängt sowohl von den Eigenschaften des Fluorophors als auch von seiner Umgebung ab. Sie beschreibt die mittlere Zeitdauer vom Zeitpunkt der Anregung bis zur Detektion eines Fluoreszenzphotons und liegt üblicherweise im Bereich von wenigen Nanosekunden. Aufgrund der Energieabgabe durch die auftretenden Relaxationsprozesse ist die Frequenz des emittierten Photons ν_{em} in der Regel kleiner als die des anregenden Photons ν_{exc} . Die Differenz $\nu_{\text{exc}} - \nu_{\text{em}}$ wird als Stokes-shift bezeichnet und äußert sich in einem gegenüber dem Absorptionsspektrum zu größeren Wellenlängen hin verschobenen Emissionsspektrum (siehe Abb. 2.2). Ein Maß für die

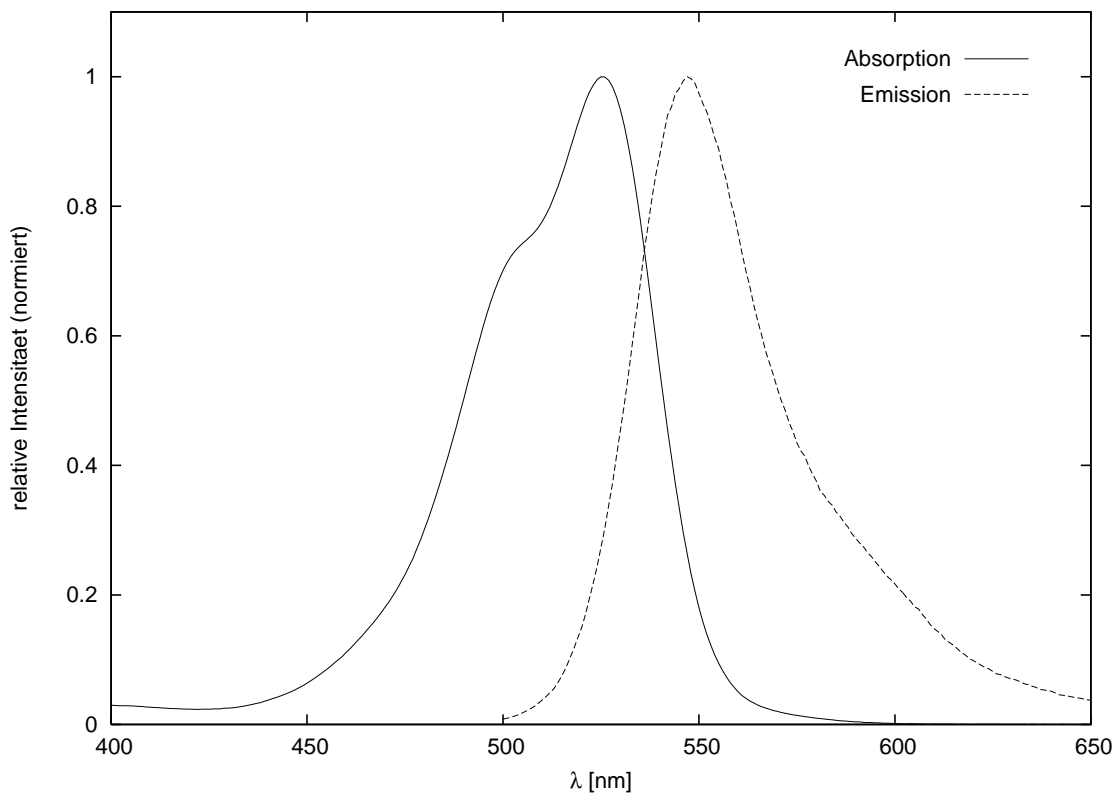


Abbildung 2.2: Spektren von Rhodamin 6G Red. Zu sehen sind das Absorptions- (durchgezogene Linie) und das Emissionsspektrum (gestrichelte Linie). Die Verschiebung des Emissionsspektrums gegenüber dem Absorptionsspektrum zu größeren Wellenlängen hin (Stokes-Shift) ist deutlich zu erkennen.

Fluoreszenzfähigkeit einer Molekülspezies ist die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f . Sie ist definiert als das Verhältnis von der Anzahl der Moleküle N_f , von denen ein Fluoreszenzsi-

gnal emittiert wird, zur Anzahl der insgesamt angeregten Moleküle N_{exc} :

$$\Phi_f = \frac{N_f}{N_{\text{exc}}} \quad (2.1)$$

Neben der Fluoreszenz kann der Übergang in den Grundzustand S_0 auch durch IC erfolgen. Die Energiedifferenz zwischen S_0 und S_1 ist jedoch bei Fluorophoren so groß, dass die Übergangswahrscheinlichkeit durch IC relativ klein ist (gap law) und somit der Prozess der Fluoreszenz bzw. der Interkombination (engl. inter system crossing, ISC) dominiert. Während bei Übergängen zwischen Singulett-Zuständen die Spinausrichtung erhalten bleibt, kommt es bei der Interkombination zu einer Änderung der Spinnultiplizität. Die Energiezustände des Moleküls werden dann durch sogenannte Triplettzustände $T_n, n = 1, 2, \dots$ beschrieben. Strahlungsübergänge vom ersten Triplett-Zustand T_1 in den Grundzustand S_0 werden als Phosphoreszenz bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen quantenmechanisch verbotenen Übergang, der sich durch eine relativ lange Lebensdauer τ_P auszeichnet. Die Lebensdauer der Phosphoreszenz liegt üblicherweise im Bereich von mehreren Millisekunden [27]. Während ein Molekül sich in einem angeregten Triplettzustand befindet, kann es keine Fluoreszenzphotonen emittieren. Bei einer kontinuierlichen Anregung des Moleküls kommt es somit immer wieder zu Phasen, in denen keine Fluoreszenz stattfindet. Dieses Phänomen ist auch unter dem Begriff des Fluoreszenzblinkens bekannt.

In Konkurrenz zur Fluoreszenz und Phosphoreszenz gibt es neben der IC weitere nicht strahlende Zerfallskanäle, die unter dem Begriff Photobleichung zusammengefasst werden. Hierbei handelt es sich um reversible bzw. irreversible Prozesse, die eine Veränderung des Fluorophores bewirken, so dass es zeitweise oder auch für immer seine Fluoreszenzeigenschaften verliert. Die Bildung von Komplexen oder die Abgabe der Anregungsenergie durch Stöße mit anderen Molekülen sind beispielsweise zwei Prozesse, die eine kurzzeitige bzw. dauerhafte Photobleichung zur Folge haben können [6]. Vor allem Sauerstoff spielt sowohl bei reversiblen als auch bei irreversiblen Bleichprozessen eine wichtige Rolle. Allgemein führen Photobleichprozesse zu einer Reduktion der Konzentration der fluoreszenzfähigen Moleküle. Da Photobleichung überwiegend im Bereich der maximalen Anregungsintensität auftritt, kommt es bei frei beweglichen Farbstoffmolekülen zu einem ständigen Austausch von gebleichten und ungebleichten Fluorophoren. Der Bleichprozess kann als eine Pseudogleichgewichtsreaktion erster Ordnung mit einer Bleichrate k_B beschrieben werden [7, 47].

2.2 Lokale Molekulare Helligkeit

Für das in dieser Arbeit dargestellte Modell der Photonenzahlverteilungen ist die lokale molekulare Helligkeit $\mu(\vec{r})$ von zentraler Bedeutung. Sie beschreibt, wie viele Photonen im Mittel von einem am Ort \vec{r} stationären Fluorophor innerhalb eines Zeitintervalls ΔT detektiert werden. Sie hängt sowohl von den Fluoreszenzeigenschaften des Moleküls als auch vom verwendeten experimentellen Aufbau ab. In diesem Abschnitt wird der Begriff der lokalen molekularen Helligkeit (LMH) am Beispiel eines typischen FFE erläutert. Basierend auf einem vereinfachten Drei-Niveau-System wird zuerst die mittlere Fluoreszenzemissionsrate $R(I_{\text{exc}})$ eines einzelnen Moleküls in Abhängigkeit von der Anregungsintensität I_{exc} abgeleitet. Dem folgt eine vereinfachte Beschreibung der Abbildungs- und Detektionseigenschaften eines FFE. Die Abbildungs- und Detektionseigenschaften bestimmen den Bruchteil der emittierten Fluoreszenzphotonen, die im Experiment beobachtet werden.

Um $R(I_{\text{exc}})$ berechnen zu können, muss die Wahrscheinlichkeit bekannt sein, mit der sich ein Fluorophor bei gegebener Anregungsintensität I_{exc} im angeregten Zustand S_1 befindet. Unter der Voraussetzung, dass es sich um einen ergodischen Prozess handelt, kann diese Wahrscheinlichkeit aus den stationären Besetzungszahlen N_i eines N -Teilchen-Modells berechnet werden. Der Besetzungszahl N_i entspricht jeweils die Anzahl der Teilchen des Ensembles, die sich im Mittel im Zustand i befinden. Das im vorigen Abschnitt vorgestellte Jablonski-Modell kann aufgrund der stark unterschiedlichen Zeitskalen der beteiligten molekularen Prozesse in guter Näherung durch ein vereinfachtes Drei-Niveau-System ersetzt werden. Dieses besteht aus dem Grundzustand S_0 , dem ersten angeregten Zustand S_1 und dem niedrigsten Triplettzustand T_1 . Das Drei-Niveau-System vernachlässigt alle Abklingprozesse, die deutlich schneller als der Fluoreszenzprozess ablaufen. Im Folgenden seien k_f , k_{ISC} und k_T die Raten, mit denen die Übergänge $S_1 \rightarrow S_0$, $S_1 \rightarrow T_1$ bzw. $T_1 \rightarrow S_0$ stattfinden. Mit den entsprechenden Besetzungszahlen N_0 , N_1 und N_2 der Energiezustände S_0 , S_1 und T_1 kann ein lineares Differentialgleichungssystem formuliert werden [5, 34]:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} N_0(t) \\ N_1(t) \\ N_2(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{\text{exc}} & k_f & k_T \\ k_{\text{exc}} & -(k_f + k_{\text{ISC}}) & 0 \\ 0 & k_{\text{ISC}} & -k_T \end{pmatrix} \begin{pmatrix} N_0(t) \\ N_1(t) \\ N_2(t) \end{pmatrix}$$

Die stationäre Lösung ist durch

$$\begin{pmatrix} N_0 \\ N_1 \\ N_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k_f + k_{\text{ISC}} \\ k_{\text{exc}} \\ k_{\text{exc}}k_{\text{ISC}}/k_T \end{pmatrix} \frac{N}{k_f + k_{\text{ISC}} + k_{\text{exc}}(1 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_T})} \quad (2.2)$$

gegeben. Ist die charakteristische Rotationszeit der Moleküle deutlich kleiner als die zeitliche Auflösung der Messung, kann die Dipolorientierung vernachlässigt werden, und die

Anregungsrate k_{exc} ist proportional zur eingestrahlten Anregungsintensität $k_{\text{exc}} = \sigma I_{\text{exc}}/h\nu$ [50]. Die Größe $h\nu$ entspricht der Energie der eingestrahlten Anregungsphotonen und σ dem Absorptionsquerschnitt des Fluorophors bei der entsprechenden Wellenlänge. Die mittlere Fluoreszenzemissionsrate

$$R(I_{\text{exc}}) := \frac{N_1}{N} k_f$$

lässt sich als Funktion der Sättigungsfluoreszenzemissionsrate R_∞ und der Sättigungsintensität I_s

$$R(I_{\text{exc}}) = R_\infty \frac{I_{\text{exc}}/I_s}{1 + I_{\text{exc}}/I_s} \quad (2.3)$$

formulieren. Die Größen R_∞ und I_s berechnen sich aus dem Fixpunkt des obigen Drei-Niveau-Models. Die Sättigungsfluoreszenzemissionsrate R_∞ kennzeichnet die konstante Sättigungsfluoreszenzemissionsrate, gegen die $R(I_{\text{exc}})$ für beliebig groß werdende Anregungsintensitäten konvergiert. Sie kann aus den molekularen Parametern des Farbstoffes gemäß

$$R_\infty = \Phi_f \frac{k_f + k_{\text{ISC}}}{2 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_T}} \quad (2.4)$$

berechnet werden, wobei die Fluoreszenzquantenausbeute durch $\Phi_f = k_f/(k_f + k_{\text{ISC}} + k_T)$ gegeben ist. Der Sättigungseffekt ist eine Folge der Entvölkerung des Grundzustands S_0 der Moleküle mit zunehmender Anregungsintensität I_{exc} . Die Sättigungsintensität I_s ist durch

$$I_s = \frac{h\nu}{\sigma} \left(\frac{k_f + k_{\text{ISC}}}{2 + \frac{k_{\text{ISC}}}{k_T}} \right) \quad (2.5)$$

gegeben. Die Emissionsrate $R(I_{\text{exc}})$ erreicht bei Einstrahlung der Sättigungsintensität I_s die halbe Sättigungsrate R_∞ .

Arbeitet man mit Laserintensitäten, die wesentlich kleiner als die Sättigungsintensität des verwendeten Farbstoffes sind ($I_{\text{exc}} \ll I_s$), ergibt sich näherungsweise eine lineare Abhängigkeit der Emissionsrate R von der Anregungsintensität I_{exc}

$$R(I_{\text{exc}}) \approx \frac{R_\infty}{I_s} I_{\text{exc}} = \Phi_f \frac{\lambda}{h c} \sigma I_{\text{exc}} \quad . \quad (2.6)$$

Bei der Anregungsintensität I_{exc} handelt es sich um eine ortsabhängige Größe. Damit wird auch die mittlere Fluoreszenzemissionsrate R zu einer ortsabhängigen Funktion.

Die mittlere Fluoreszenzemissionsrate R ist durch die molekularen Eigenschaften und die lokale Anregungsintensität I_{exc} bestimmt. Die lokale molekulare Helligkeit $\mu(\vec{r})$ hängt darüber hinaus von den Abbildungs- und Detektionseigenschaften des verwendeten experimentellen Aufbaus ab. Die Abbildungseigenschaften eines optischen Aufbaus werden

üblicherweise durch die so genannte Punktbildfunktion (engl. point spread function, PSF) charakterisiert. Diese Funktion $\text{PSF}(\vec{r}', \vec{r})$ beschreibt die resultierende Intensitätsverteilung in der Bildebene $\vec{r}' \in \mathbb{R}^2$ eines optischen Systems, die sich durch die Abbildung einer punktförmige Lichtquelle am Ort $\vec{r} \in \mathbb{R}^3$ im Objektraum ergibt [15, 20]. Die Bezeichnung PSF rührt daher, dass ein reales optisches System eine punktförmige Lichtquelle aufgrund von Beugungseffekten als Scheibchen in der Bildebene darstellt. Für eine beliebige Lichtquelle am Ort \vec{r} ist die PSF in der Bildebene auf Eins normiert

$$\int d^2 r' \text{PSF}(\vec{r}', \vec{r}) = 1 \quad .$$

Im Zusammenhang mit Einzelmolekülexperimenten wird häufig anstelle der PSF die Sammeleffizienzfunktion (engl. collection efficiency function, CEF) zur Charakterisierung der Apparatur verwendet [26]. Üblicherweise wird zur Unterdrückung des Streulichts eine sehr kleine Blende (pinhole) in der Bildebene vor dem Detektor angebracht, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Der Einfluss dieser Blende wird durch die CEF quantitativ erfasst, indem die PSF mit der Transmissionsfunktion $T(\vec{r}')$ der Blende gewichtet wird:

$$\text{CEF}(\vec{r}) := \frac{1}{\Delta} \int d^2 r' T(\vec{r}') \text{PSF}(\vec{r}', \vec{r}) \quad (2.7)$$

Der Faktor $\Delta = \int d^2 r' T(\vec{r}') \text{PSF}(\vec{r}', \vec{r} = 0)$ sorgt für die richtige Normierung. Eine ausführliche Darstellung zur CEF ist in [42] gegeben.

Für die molekulare Helligkeit $\mu(\vec{r})$ ist außerdem die Quanteneffizienz q des Detektors zu berücksichtigen. Die Quanteneffizienz q entspricht dem mittleren Anteil der ankommenden Photonen, die vom Detektor registriert werden. Somit ergibt sich letztlich für die lokale molekulare Helligkeit

$$\mu(\vec{r}) = \alpha \Delta T R(I_{\text{exc}}(\vec{r})) \text{CEF}(\vec{r}) \quad , \quad (2.8)$$

wobei α den als konstant angenommenen Lichtverlustfaktor der Apparatur darstellt. Für den in der Praxis weit verbreiteten Fall der monochromatischen, linearen Ein-Photon Anregung (engl. one photon excitation, OPE) ergibt sich für die LMH

$$\mu(\vec{r}) = \alpha \Delta T \Phi_f \frac{\lambda \sigma}{h c} \text{CEF}(\vec{r}) I_{\text{exc}}(\vec{r}) \quad . \quad (2.9)$$

2.3 Konfokale Mikroskopie

Um das Fluoreszenzsignal einzelner Fluorophore detektieren zu können, bedarf es einer Apparatur, die neben einer hohen Sensitivität auch ein möglichst großes Signal-Rausch-Verhältnis S/N aufweist. Konfokale Mikroskope [1] vereinen diese beiden Eigenschaften,

so dass dieser Gerätetyp in zahlreichen Fluoreszenzexperimenten zum Einsatz kommt. Während die Sensitivität im Wesentlichen von der Qualität der zur Verfügung stehenden Photodetektoren und Mikroskopobjektive abhängig ist, wird das S/N -Verhältnis überwiegend durch den experimentellen Aufbau beeinflusst.

Zur Veranschaulichung der Funktionsweise ist in Abb. 2.3 der schematische Aufbau eines konfokalen Mikroskops dargestellt. Als Anregungsquelle wird üblicherweise ein Laser der Wellenlänge λ_{exc} verwendet, der über einen dichroitischen Spiegel in das zentrale Bauteil des Mikroskops, das Mikroskopobjektiv (MO), eingekoppelt wird. Dichroitische Spiegel sind eine spezielle Art von Interferenzfiltern, die je nach Beschichtung einen bestimmten Teil des Lichtspektrums reflektieren, während sie für andere Bereiche des Spektrums durchlässig sind. Optional kann vor dem Spiegel ein Linsensystem zur Strahlaufweitung eingebracht werden, um so den Durchmesser des Strahlprofils entsprechend den optischen Erfordernissen des MO anzupassen. Das MO erfüllt zwei Funktionen. Zum einen dient

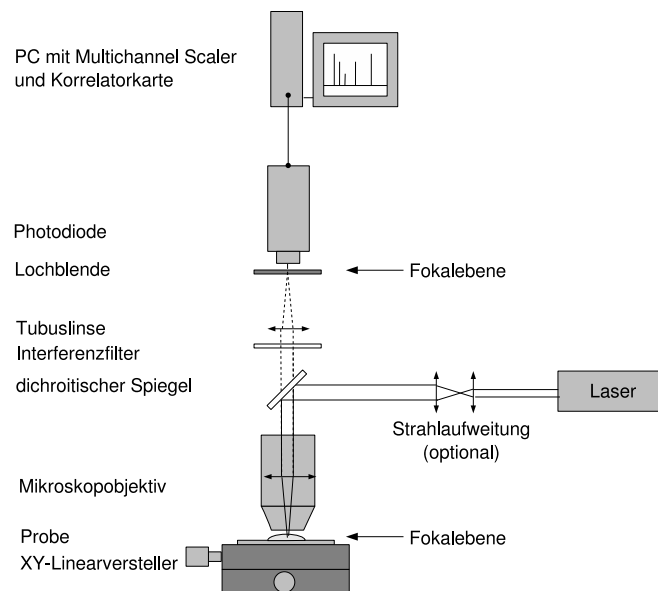


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Das monochromatische Anregungslicht eines Lasers wird über einen dichroitischen Spiegel und ein Mikroskopobjektiv mit großer numerischer Apertur in die Probe eingekoppelt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird über dasselbe Objektiv auf eine Lochblende in der Bildebene des MO abgebildet (Epi-Fluoreszenz) und von einem Photodetektor erfasst. Die Signalverarbeitung geschieht üblicherweise mit einem PC, der mit einer entsprechenden Auswerteelektronik bestückt ist.

es der Beleuchtung, indem der eingekoppelte Laserstrahl innerhalb der Probe fokussiert wird. Dadurch werden im Bereich der Fokusregion so hohe Intensitäten erzielt, dass selbst einzelne Fluorophore beim Durchqueren dieses Bereiches in hoher Anzahl Photonen emit-

tieren. Dabei werden die Moleküldurchgänge als Photonenbursts wahrgenommen. Zum anderen sammelt das MO die aus der Probe emittierten Fluoreszenzphotonen und bildet sie entsprechend seiner PSF in der Bildebene ab. Viele der heute zum Einsatz kommenden Objektive sind auf unendlich korrigiert, so dass erst in Kombination mit einer Tubuslinse ein reales Zwischenbild entsteht. Dies bietet unter anderem den Vorteil, dass vor der Tubuslinse angebrachte Filter zu keiner Verzerrung der Abbildung führen, wie es bei einem konvergenten Strahlengang der Fall ist. Die hier dargestellte Art der "Aufbeleuchtung" wird auch als Epi-Fluoreszenz bezeichnet. Prinzipiell kann die Beleuchtung und die Detektion auch mit zwei separaten Objektiven erfolgen, deren Foki dann überlagert werden.

Das aus der Probe emittierte Fluoreszenzlicht weist üblicherweise aufgrund des Stokesverschiebung gegenüber dem Anregungslicht eine vergrößerte Wellenlänge auf ($\lambda_{\text{em}} > \lambda_{\text{exc}}$). Der Unterschied ist dabei so groß, dass die Fluoreszenzphotonen den dichroitischen Spiegel durchdringen können. Dieser wirkt dabei wie ein Filter, da elastisch gestreutes (Rayleigh-Streuung) oder an den Grenzflächen des Probenhalters reflektiertes Anregungslicht zu einem großen Teil von ihm blockiert wird. Ein Interferenzfilter, der nur Photonen innerhalb eines ausgewählten Wellenlängenbereichs passieren lässt, trägt zu einer weiteren Verbesserung des S/N -Verhältnisses bei.

Bevor die Photonen im Emissionsstrahlengang den Detektor erreichen, müssen sie die Lochblende (pinhole) passieren, die sich in der Bildebene des MO befindet. Ihr Zweck besteht darin, Photonen, die nicht aus dem Bereich der Fokusregion emittiert wurden, zu blockieren. Die Fläche des Pinholes ist idealerweise größer als das abgebildete Beugungsscheibchen. Unmittelbar hinter dem Pinhole befindet sich der Photodetektor, dessen Ausgangssignal mit einer entsprechenden Auswerteelektronik verbunden ist.

In Abb. 2.4 ist beispielhaft die mit einem konfokalen Mikroskop detektierte Fluoreszenzintensität einer 10^{-9} M wässrigen Lösung des Farbstoffs Rhodamin 6G (Rh6G) dargestellt. In das hochaperturige Öl-Immersionsobjektiv (Zeiss Plan-Neofluar, 63x, 1.25/Oil) wurde das Anregungslicht mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm eines cw-betriebenen Argon-Ionen-Lasers, mit einer Leistung von $P = 80 \mu\text{W}$ eingekoppelt. Die Detektion erfolgte mit einer Avalanche Photodiode des Typs PCM-200 der Firma EG&G, mit einer zeitlichen Auflösung von $\Delta T = 1$ ms. Der Durchmesser des verwendeten Pinholes betrug $50 \mu\text{m}$. Aufgrund der Eigenschaft des Detektortyps, einzelne Photonen zu registrieren, ist die Intensität in Einheiten von Photonen pro Integrationszeit dargestellt. Deutlich sind Photonenbursts zu erkennen, die von einem oder mehreren Fluorophoren beim Durchqueren der Fokalregion emittiert werden. Der kontinuierliche Untergrund ist überwiegend auf die Beiträge von Rauschphotonen zurückzuführen.

Nach dieser qualitativen Betrachtung der Funktionsweise eines konfokalen Mikroskops wird

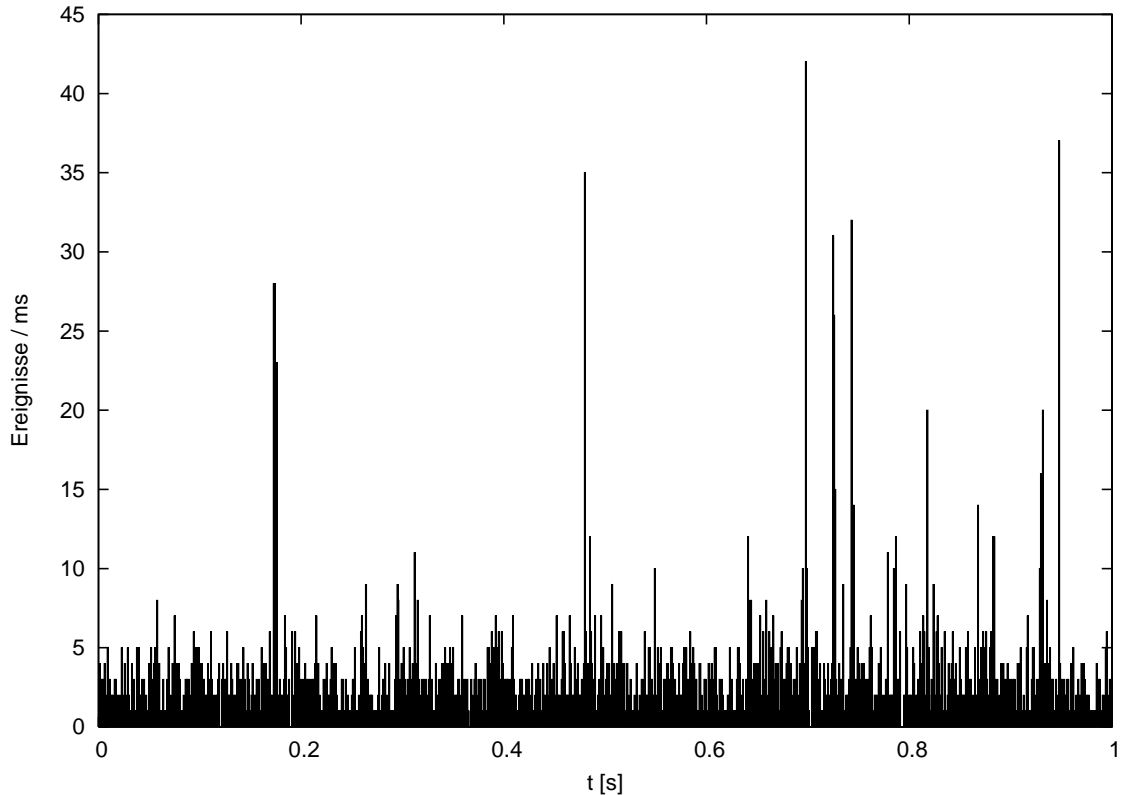


Abbildung 2.4: Zeitlicher Verlauf der mit einem konfokalen Mikroskop detektierten Fluoreszenzintensität einer $c = 10^{-9}$ M wässrigen Lösung des Farbstoffes Rhodamin 6G, bei einer zeitlichen Auflösung von $\Delta T = 1$ ms. Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Ionen-Laser im cw-Betrieb mit $\lambda_{exc} = 514.5$ nm, wobei eine Leistung von $P = 80 \mu\text{W}$ in das Mikroskopobjektiv (Zeiss Plan-Neofluar, 63x, 1.25/Oil) eingekoppelt wurde.

im Folgenden noch auf einige wichtige quantitative Größen eingegangen. Der Durchmesser des Strahls wird üblicherweise durch die Tailenbreite ω_0 beziffert und entspricht dem Abstand von der Strahlachse, bei dem die Intensität auf den Faktor $1/e^2$ abgefallen ist. Durch das Objektiv wird der Laser fokussiert, so dass im Bereich der Fokalebene die Intensitätsverteilung $I(\vec{r}, z)$, $\vec{r} \in \mathbb{R}^2$ in guter Näherung durch ein Gauß-Lorentz-Profil beschrieben werden kann [25]

$$I(\vec{r}, z) = \frac{2P_0}{\pi\omega^2(z)} \exp\left(-\frac{2\vec{r}^2}{\omega^2(z)}\right) \quad \text{mit} \quad \omega^2(z) = \omega_f^2 + \left(\frac{\omega_0}{f}\right)^2 z^2 \quad . \quad (2.10)$$

Die Strahltaile ω_f in der Fokalebene hängt sowohl vom Strahldurchmesser ω_0 vor dem MO als auch von dessen nominaler Brennweite f ab

$$\omega_f = \frac{\lambda f}{\pi\omega_0} \quad ,$$

wobei λ die Lichtwellenlänge in der Probe ist. Das Modell eines Gauß-Lorentz-Profiles ist insbesondere davon abhängig, dass ein Objektiv verwendet wird, dessen Korrektur dem Brechungsindex der Probe entspricht. Die Tailenbreite ω_0 des Lasers sollte deutlich kleiner sein als der Radius der Eingangsapertur des MO.

Großen Einfluss auf die molekulare Helligkeit hat neben der Intensitätsverteilung der durch das MO abgedeckte Raumwinkel Ω_{MO} . Der Raumwinkel Ω_{MO} ist durch die numerische Apertur NA des Objektivs vorgegeben. Diese berechnet sich aus dem Produkt $\text{NA} = n \sin \alpha$ des Brechungsindex n des Mediums zwischen Deckglas und der Frontlinse sowie dem Sinus des halben Öffnungswinkels α . Bei Trockenobjektiven beträgt der Brechungsindex des Immersionsmediums Luft $n \approx 1$, so dass die NA bei solchen Objektiven maximal eins werden kann. Praktisch sind dem Grenzen gesetzt, da ein Öffnungswinkel von $\alpha = \pi/2$ theoretisch nur von einem unendlich ausgedehnten Trockenobjektiv erreicht werden kann. Bringt man zwischen Objektiv und Deckglas ein Immersionsmedium mit einem Brechungsindex $n > 1$, so können auch numerische Aperturen größer als eins erreicht werden. Häufig wird hierfür ein spezielles Immersionsöl verwendet, dessen Brechungsindex bei $n = 1.514$ liegt. Der Raumwinkelanteil $RA(\text{NA})$ des MO kann einfach berechnet werden. Die Integration der Raumwinkelelemente ergibt

$$RA(\text{NA}) = \frac{\Omega_{\text{MO}}}{\Omega_{\text{Kugel}}} = \frac{1 - \cos(\arcsin(\text{NA}/n))}{2} . \quad (2.11)$$

Für die resultierende $\text{CEF}(\vec{r})$ hat die Berücksichtigung der Abbildungseigenschaften der Lochblende zentrale Bedeutung. Das Einbringen einer Lochblende führt zu einer positionsabhängigen Wahrscheinlichkeit für die Detektion eines Moleküls. Die resultierende $\text{CEF}(\vec{r})$ kann aus der Faltung der PSF mit der Transmissionsfunktion der Lochblende berechnet werden. Im Wellenbild führt dies zu komplexen Berechnungen [20]. Qian *et al* [42] haben gezeigt, dass auch ein geometrisch-optischer Ansatz in guter Näherung verwendet werden kann. Beide Ansätze führen zu analytischen Ausdrücken, die nur numerisch lösbar sind. Bei konfokalen FFE besteht jedoch die Möglichkeit, das Produkt aus Anregungsintensität und CEF, die so genannte Molecular Detection Efficiency $W(\vec{r})$, durch eine Gaußfunktion anzunähern [43]

$$W(\vec{r}) = I_{\text{exc}}(\vec{r})\text{CEF}(\vec{r}) \approx \exp \left[-2 \left(\frac{r}{\omega_f} \right)^2 \right] \exp \left[-2 \left(\frac{z}{\omega_z} \right)^2 \right] . \quad (2.12)$$

Diese Näherung bietet den Vorteil, dass sie analytische Lösungen bei weitergehenden Betrachtungen ermöglicht.

2.4 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Im folgenden Abschnitt erfolgt eine Darstellung der wichtigsten Eigenschaften der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS). Die FCS hat sich zu einer Standardmethode unter den FFE entwickelt und weist verschiedene Zusammenhänge mit der im folgenden Kapitel dargestellten Methode der Photonenzahlverteilungen auf. Die FCS basiert auf einer Analyse der Korrelationen in den zeitlichen Fluktuationen der detektierten Fluoreszenzintensitäten. Die ersten Modelle wurden hierzu Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts von Madge *et al* [11, 30, 31] und Rigler *et al* [9] entwickelt, wobei das mathematische Konzept der Autokorrelation auf Wiener zurückgeht [49].

Die normierte Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ eines zeitabhängigen Signals $I(t)$ beschreibt die Selbstähnlichkeit von $I(t)$ zu unterschiedlichen Zeitpunkten t und $t + \tau$ und wird häufig bei der Analyse von Zeitreihen eingesetzt

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}, \text{ mit } \langle I(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T dt I(t) \quad .$$

Für einen stationären Prozess ist der Mittelwert $\langle I(t) \rangle = \langle I \rangle$ zeitunabhängig, so dass $G(\tau)$ durch die Signalfuktuationen $\delta I(t)$ ausgedrückt werden kann

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t)\delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} + 1, \text{ mit } \delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle \quad . \quad (2.13)$$

Im Falle von FFE ist $I(t)$ die detektierte Fluoreszenzintensität, deren Fluktuationen durch unterschiedliche Prozesse verursacht wird. Hierzu gehören alle Phänomene, die eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Moleküls hervorrufen, wie z.B. Teilchenfluktuationen im Beobachtungsvolumen, Rotationen der Moleküle, Konformationsänderungen, Reaktionen und Fluoreszenzblinken.

Für eine Analyse der Korrelationsfunktion (2.13) wird meist von einer konfokalen Apparatur mit linearer Ein-Photon-Anregung ausgegangen und die Molecular Detection Efficiency $W(\vec{r})$ (2.12) benutzt. Die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals ist dann durch

$$I(t) = \alpha \int_{\mathbb{R}^3} d^3r C(\vec{r}, t) W(\vec{r})$$

gegeben. Die Größe α entspricht dem konstanten apparativen Lichtverlustfaktor. $C(\vec{r}, t)$ ist die zeit- und ortsabhängige Konzentrationsverteilung. Für die Korrelationsfunktion ergibt sich hiermit

$$G(\tau) = \frac{\int_{\mathbb{R}^3} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r d^3r' W(\vec{r})W(\vec{r}')\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau)}{(C \int_{\mathbb{R}^3} d^3r W(\vec{r}))^2} + 1 \quad . \quad (2.14)$$

Die Größe $C = \langle C(\vec{r}, t) \rangle$ ist der zeit- und ortsunabhängige Mittelwert der Konzentration im thermodynamischen Gleichgewicht. Die Funktion $\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau)$ beschreibt die Korrelation der Konzentrationsverteilung

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \frac{1}{C^2} \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle \quad .$$

Im Falle reiner Diffusion wird die Ausbreitung der Konzentrationsfluktuationen $\delta C(\vec{r}, t)$ für ein einzelnes Molekül durch Lösungen des zweiten Fickschen Gesetzes (3.23) mit der Anfangsbedingung

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau = 0) = C \delta(\vec{r} - \vec{r}') \quad (2.15)$$

beschrieben. Die eindeutige Lösung für $\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau)$ ist

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \frac{C}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \exp \left[-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4D\tau} \right] \quad . \quad (2.16)$$

Der rechtsseitige Grenzwert der Autokorrelationsfunktion (2.14) ergibt sich damit zu

$$\lim_{\tau \rightarrow 0^+} G(\tau) - 1 = \frac{1}{C} \frac{1}{V_{\text{FCS}}} = \frac{1}{N_{\text{FCS}}} \quad (2.17)$$

mit

$$V_{\text{FCS}} := \frac{\left(\int_{\mathbb{R}^3} d^3r W(\vec{r}) \right)^2}{\int_{\mathbb{R}^3} d^3r W^2(\vec{r})} \quad .$$

Für eine gaußförmige Molecular Detection Efficiency $W(\vec{r})$ (2.12) hängt das konfokale FCS Volumen V_{FCS} nur von den Tailenparametern ab

$$V_{\text{FCS}} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_f^2 \omega_z \quad . \quad (2.18)$$

Durch den Einsatz von MO mit großen numerischen Aperturen ist es möglich, Beobachtungsvolumina im Bereich von Femtolitern zu erzeugen. Die Amplitude der Fluktuationen $G(\tau = 0) - 1$ ist proportional zum Kehrwert der Molekülanzahl $N_{\text{FCS}} = CV_{\text{FCS}}$, die sich im Mittel im Beobachtungsvolumen V_{FCS} aufhalten.

Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ lässt sich für eine gaußförmige $W(\vec{r})$ analytisch berechnen

$$G(\tau) - 1 = \frac{1}{V_{\text{FCS}} C} \frac{1}{\left(1 + \frac{4D}{\omega_f^2} \tau\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{4D}{\omega_z^2} \tau}} = \frac{1}{N_{\text{FCS}}} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_f}{\omega_z}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad . \quad (2.19)$$

Die Diffusionszeit τ_D ist proportional zu der mittleren Zeitspanne, die ein einzelnes Molekül im Fokusbereich verbringt, und ist durch die Diffusionszahl D und den Parameter ω_f eindeutig bestimmt

$$\tau_D = \omega_f^2 / 4D \quad . \quad (2.20)$$

Sind die Parameter ω_f bzw. ω_z bekannt, kann die Konzentration bzw. die Diffusionskonstante einer unbekanntem Farbstofflösung durch eine Anpassung der gemessenen Autokorrelationskurve mit Gleichung (2.19) ermittelt werden.

In Abbildung 2.5 sind exemplarisch zwei Autokorrelationskurven dargestellt, die für ein zentralsymmetrisches Strahlprofil nach Gleichung (2.19) berechnet wurden. Für die Parameter $\omega_f = \omega_z$ wurde ein typischer Wert von $0.3 \mu\text{m}$ gewählt. Hieraus ergibt sich ein theoretisches Beobachtungsvolumen von $V_{\text{FCS}} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_f \omega_z = 0.15 \text{ fl.}$ Aus der gewählten Konzentration von $C = 10^{-8} \text{ M}$ ergibt sich eine mittlere Teilchenzahl von $N_{\text{FCS}} = C V_{\text{FCS}} = 0.9$, deren Kehrwert der in Abbildung 2.5 dargestellten Amplitude entspricht. Um den Einfluss der Diffusion zu veranschaulichen, ist die Autokorrelationskurve für die Diffusionskonstante $D = 2.8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ und einen fünffach höheren Wert $D = 1.4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ dargestellt.

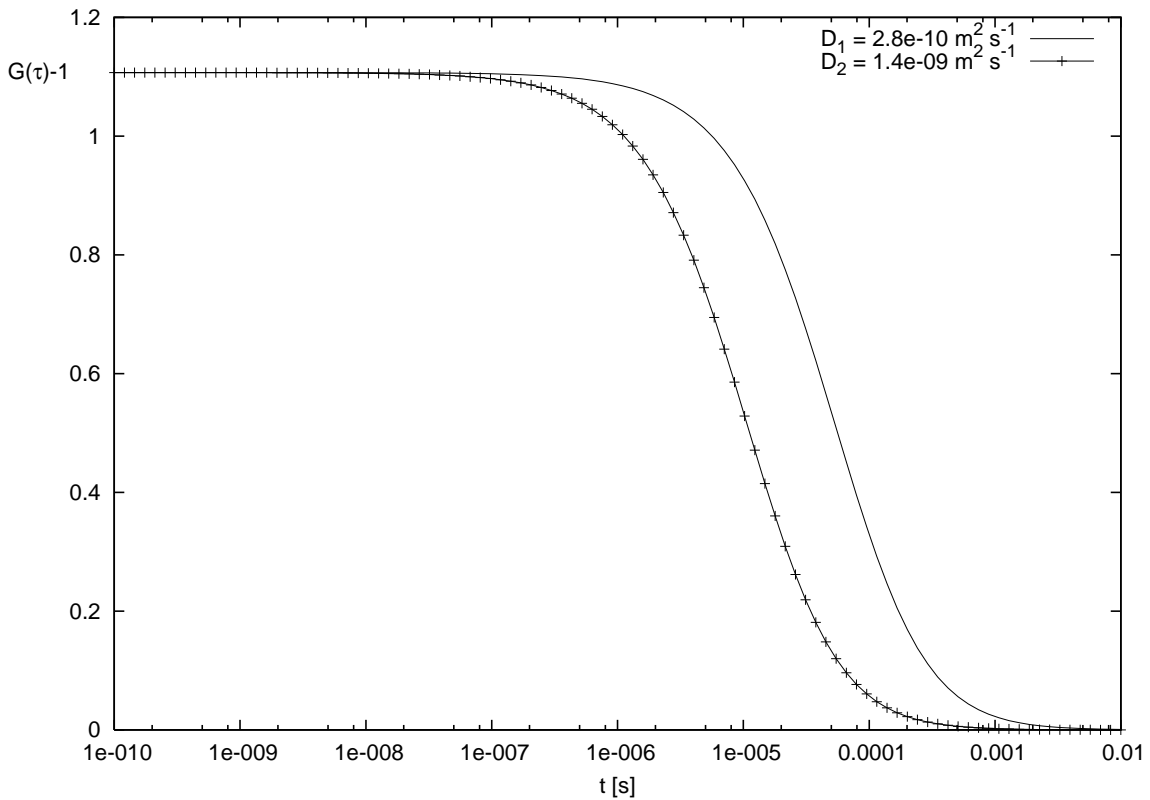


Abbildung 2.5: Verlauf der theoretischen Autokorrelationsfunktion im Falle reiner Diffusion mit $D_1 = 2.8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ und $D_2 = 5 D_1 = 1.4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ für eine Konzentration von $c = 10^{-8} \text{ M}$ unter Verwendung eines zentralsymmetrischen Strahlprofils. Aus den gewählten Fokusparametern $\omega_f = \omega_z = 0.3 \mu\text{m}$ folgt ein Beobachtungsvolumen von $V_{\text{FCS}} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_f^2 \omega_z = 0.15 \text{ fl.}$

Kapitel 3

Stochastische Grundlagen

Als Vorbereitung auf das nachfolgende Modell der Photonenzahlverteilungen erfolgt in diesem Kapitel eine knappe Zusammenstellung von Begriffen und analytischen Hilfsmitteln, die hierfür benötigt werden. Der Begriff der "Wahrscheinlichkeit" wird definiert, gefolgt von der Darstellung ausgewählter Eigenschaften sog enannter "wahrscheinlichkeitserzeugender Funktionen". Das Kapitel endet mit Betrachtungen zum Poisson- und Diffusionsprozess.

3.1 Zufallsgrößen

Üblicherweise bezeichnet man als Zufallsexperiment einen Versuchsaufbau, dessen Ausgang kausal nicht berechenbar ist. Die Menge aller möglichen Resultate eines solchen Experiments bildet den Ergebnisraum Ω , dessen Elemente ω Ergebnisse oder Elementarereignisse genannt werden. Das klassische Beispiel zur Veranschaulichung dieser Begriffe ist das Werfen eines sechsseitigen Würfels. In diesem Fall ist der Ergebnisraum durch die Menge $\Omega = \{1, 2, 3, 4, 5, 6\}$ gegeben und jedem Elementarereignis kann eine Wahrscheinlichkeit $P(\omega)$ zugeordnet werden. Bei einem idealen Würfel ist $P(\omega) = 1/6$ für jedes $\omega \in \Omega$ und die Summe aller Wahrscheinlichkeiten ist anschaulicherweise Eins

$$\sum_{\omega \in \Omega} P(\omega) = \sum_{\omega=1}^6 P(\omega) = \sum_{\omega=1}^6 \frac{1}{6} = 1 \quad .$$

Diese naive Begriffsbildung ist leider nur für endlich abzählbare Ergebnisräume Ω tragfähig. Ist Ω nicht endlich, oder sogar überabzählbar, so muss der Begriff der Wahrscheinlichkeit strenger formuliert werden. Von der klassischen, intuitiv recht zugänglichen Definition durch Laplace hat der Begriff der Wahrscheinlichkeit im Laufe der Zeit mehrere Entwicklungsstufen durchlaufen. Die heute gebräuchliche Form geht auf Kolmogorov zurück und

definiert die Wahrscheinlichkeit als Maßfunktion $P : \mathcal{A} \mapsto [0, 1]$, die auf die Elemente einer σ -Algebra \mathfrak{A} über Ω angewandt wird. Eine σ -Algebra ist eine Menge von Teilmengen über der Grundmenge Ω . Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie die Grundmenge selbst enthält, sowie gegenüber Komplementbildung und Vereinigung abgeschlossen ist. Für die Maßfunktion P fordert der Wahrscheinlichkeitsbegriff von Kolmogorov

$$1. P(\mathcal{A}) \geq 0 \quad (\text{Maßaxiom}) \quad (3.1)$$

$$2. P(\Omega) = 1 \quad (\text{Normierungsaxiom}) \quad (3.2)$$

$$3. P(\mathcal{A} \cup \mathcal{B}) = P(\mathcal{A}) + P(\mathcal{B}) \text{ für } \mathcal{A} \cap \mathcal{B} = \emptyset \quad . \quad (3.3)$$

Das Triplet $(\Omega, \mathfrak{A}, P)$ bezeichnet den sogenannten Wahrscheinlichkeitsraum.

Ein weiterer wichtiger Begriff, der im Zusammenhang mit Zufallsexperimenten auftritt, ist die Zufallsvariable (ZV). Durch das Konzept der Zufallsvariablen kann jedem Element des Ergebnisraums Ω eine reelle Zahl zugeordnet werden, auch wenn Ω überabzählbar ist. Dabei beschreibt die Zufallsvariable X eine Abbildung vom Ergebnisraum Ω in die Menge der reellen Zahlen $X : \Omega \rightarrow \mathbb{R}$ wobei die Abbildung X die formale Bedingung

$$\forall x \in \mathbb{R} : \mathcal{A}_x := \{\omega \in \Omega \mid X(\omega) \leq x\} \in \mathfrak{A}$$

erfüllen muss. Dies bedeutet, dass die Teilmenge aller Elemente von Ω , welche einem kleineren Wert als $x \in \mathbb{R}$ zugeordnet werden (\mathcal{A}_x), ein Element der σ -Algebra \mathfrak{A} sein muss. So kann dem Element $\omega \in \Omega$ mit $X(\omega) = x$ eindeutig eine Wahrscheinlichkeit im Sinne des Begriffs von Kolmogorov zugeordnet werden.

In diesem Zusammenhang ist die Verteilungsfunktion $F_X(x)$ mit den Eigenschaften

$$F_X : \mathbb{R} \rightarrow [0, 1]$$

$$F_X(x) = P_X(X \leq x) := P(\mathcal{A}_x)$$

gebräuchlich. Der Wert einer Verteilungsfunktion an der Stelle x_0 entspricht folglich der Wahrscheinlichkeit, mit der eine ZV einen Wert kleiner als x_0 annimmt. Sie enthält die vollständige Information, die zur wahrscheinlichkeitstheoretischen Beschreibung einer ZV benötigt wird. Alternativ kann eine ZV durch ihre Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $p_X(x)$ charakterisiert werden. Die Dichtefunktion beschreibt, wie sich die Wahrscheinlichkeiten einer ZV über ihre möglichen Zufallsergebnisse verteilen. Sie hängt wie folgt mit der Verteilungsfunktion zusammen:

$$F_X(x) = \int_{-\infty}^x p_X(t) dt \quad .$$

$p_X(x)dx$ ist als Wahrscheinlichkeit zu interpretieren, dass X Werte innerhalb des infinitesimalen Intervalls $[x, x + dx]$ annimmt.

In vielen praktischen Fällen ist eine einzige ZV nicht ausreichend, um ein Zufallsexperiment zu beschreiben. Eine Erweiterung des Begriffs der ZV ist der des Zufallsvektors $\mathbf{X} = (X_1, X_2, \dots, X_n)$, dessen Komponenten $X_i, i = 1, \dots, n$ auf dem gleichen Ergebnisraum Ω definiert sind. Als Verbundverteilungsfunktion des Zufallsvektors \mathbf{X} bezeichnet man dann die Abbildung

$$F_{\mathbf{X}} : \mathbb{R}^n \rightarrow [0, 1]$$

$$F_{\mathbf{X}}(x_1, \dots, x_n) := P(X_1 < x_1, \dots, X_n < x_n) \quad .$$

In Analogie zu einer einzelnen ZV, kann ein Zufallsvektor alternativ durch seine Verbundwahrscheinlichkeitsdichte charakterisiert werden, die wie folgt mit der Verbundverteilung zusammenhängt

$$F_{\mathbf{X}}(x_1, \dots, x_n) = \int_{-\infty}^{x_1} \dots \int_{-\infty}^{x_n} p_{\mathbf{X}}(t_1, \dots, t_n) dt_1 \dots dt_n \quad .$$

Von besonderer theoretischer Bedeutung ist der Begriff der stochastischen Unabhängigkeit. Die Komponenten eines Zufallsvektors \mathbf{X} heißen stochastisch unabhängig, wenn ihre Verbundwahrscheinlichkeitsdichte $p_{\mathbf{X}}(t_1, \dots, t_n) = p_{X_1}(t_1) \dots p_{X_n}(t_n)$ durch das Produkt der Dichten der einzelnen Komponenten dargestellt werden kann. Im Gegensatz hierzu kann im allgemeinen Fall keine Aussage über die Verbunddichte eines Zufallsvektors gemacht werden, selbst wenn die Dichten der Komponenten bekannt sind.

Bei der Analyse von Zufallsexperimenten treten häufig Funktionen von ZV auf, so dass eine neue Zufallsvariable $Y = g(X_1, \dots, X_m)$ entsteht. Ein wichtiger Spezialfall ist die Summe $N = \sum_{k=1}^m N_k$ von m stochastisch unabhängigen, diskreten Zufallsvariablen N_k . Sind die entsprechenden Wahrscheinlichkeitsmaße durch $P_{N_k}(n)$ gegeben, so wird die Gesamtwahrscheinlichkeit $P_N(n)$ durch die diskrete Faltung

$$P_N(n) = (P_{N_1} \otimes \dots \otimes P_{N_m})(n) \quad \text{mit} \quad N = N_1 + \dots + N_m \quad (3.4)$$

bestimmt. Allgemein ist die Faltung $c(n) = (a \otimes b)(n)$ zweier reeller Zahlenfolgen $a = \{a_n\}, b = \{b_n\}, n \in \mathbb{N}_0$ durch

$$c(n) = (a \otimes b)(n) := \sum_{k=0}^n a(k) b(n-k) \quad (3.5)$$

definiert. Die in (3.4) auftretende m -fache Faltung, kann somit durch die $(m-1)$ -fache, sukzessive Anwendung von (3.5) berechnet werden.

Verteilungen können durch Kenngrößen charakterisiert werden. Für eine diskrete Zufalls-

variable N mit der Wahrscheinlichkeitsfunktion $P(n)$ definieren

$$m_k := \sum_{n=0}^{\infty} n^k P(n) \quad (3.6)$$

$$\mu_k := \sum_{n=0}^{\infty} (n - E[N])^k P(n) \text{ mit } E[N] = m_1 \quad (3.7)$$

die Momente m_k und zentralen Momente μ_k der Ordnung k , sofern die Reihen absolut konvergieren. Das erste Moment $E[N] = m_1 = \sum_{n=0}^{\infty} nP(n)$ wird als Erwartungswert von N bezeichnet und kann als Schwerpunkt der Verteilung $P(n)$ interpretiert werden. Das zweite zentrale Moment $\mu_2 = \sigma^2 = \sum_{n=0}^{\infty} (n - E[N])^2 P(n)$ wird Varianz der Verteilung genannt und ist ein Maß für die Abweichung der Zufallsvariablen N von ihrem Erwartungswert.

3.2 Wahrscheinlichkeitserzeugende Funktion

Als wahrscheinlichkeitserzeugende Funktion (engl. probability generating function, PGF) einer diskreten Zufallsvariablen N mit der Verteilungsfunktion $P(n)$ bezeichnet man die Potenzreihe

$$G_P(z) := \sum_{n=0}^{\infty} P(n)z^n, z \in \mathbb{C} \text{ mit } |z| \leq 1 \quad . \quad (3.8)$$

Aufgrund der Normierungsbedingung (3.2) konvergiert die Reihe für alle $|z| \leq 1$, so dass $G_P(z)$ eine analytische Funktion darstellt.

Umgekehrt erhält man aus einer gegebenen wahrscheinlichkeitserzeugenden Funktion $G_P(z)$ die Glieder der Verteilung $P(n)$ durch n -faches Differenzieren an der Stelle $z = 0$

$$P(n) = \frac{1}{n!} \left. \frac{d^n}{dz^n} G_P(z) \right|_{z=0} \quad . \quad (3.9)$$

Diese Eigenschaft hat letztlich zur Namensgebung der PGF geführt, da durch die n -fache Ableitung die Glieder der Verteilung sukzessiv aus der Funktion $G_P(z)$ erzeugt werden.

Wahrscheinlichkeitserzeugende Funktionen sind bei vielen stochastischen Fragestellungen ein wichtiges analytisches Hilfsmittel. Sie verfügen über die spezielle Eigenschaft, dass die PGF $G_P(z)$ einer Verteilung $P(n) = (P_1 \otimes \cdots \otimes P_m)(n)$ durch das Produkt

$$G_P(z) = \prod_{i=1}^m G_{P_i}(z) \quad (3.10)$$

der PGF $G_{P_i}(z)$ der einzelnen Verteilungen $P_i(n)$ gegeben ist.

Wahrscheinlichkeitserzeugende Funktionen verfügen über die interessante Eigenschaft, die als Vermengung von Zufallsvariablen bezeichnet wird. Seien N_1, N_2, \dots unabhängige und identisch verteilte Zufallsvariablen, deren PGF jeweils durch $G_{P_N}(z)$ gegeben ist. Ferner sei M eine diskrete Zufallsvariable mit der PGF $G_{P_M}(z)$. Dann gilt für die PGF einer Zufallsvariablen $S = N_1 + \dots + N_M$

$$G_{P_S}(z) = G_{P_N}(G_{P_M}(z)) \quad . \quad (3.11)$$

Dieser Zusammenhang gilt unter der Bedingung, dass die Zufallsvariable M von N_1, N_2, \dots unabhängig ist.

3.3 Stochastische Prozesse

Ein stochastischer Prozess ist die mathematische Beschreibung von zeitlich geordneten, zufälligen Vorgängen. Formal ist ein stochastischer Prozess eine Familie $\{X(t) | t \in T\}$ von Zufallsvariablen, die auf einem Wahrscheinlichkeitsraum $(\Omega, \mathfrak{A}, P)$ definiert ist. Die Menge T heißt Indexmenge des Prozesses. Hierbei ist zu beachten, dass nach dieser Definition jedem t der Indexmenge T jeweils eine Zufallsvariable $X(t)$ zugeordnet wird. In den häufigsten Fällen repräsentiert der Parameter t die Zeit, weshalb man im Falle einer nichtdiskreten Indexmenge auch von zeitkontinuierlichen Prozessen spricht. Zu dieser Klasse gehören auch die beiden folgenden stochastischen Prozesse, die im Zusammenhang mit Photonenzahlverteilungen in Fluoreszenzfluktuationsexperimenten eine zentrale Rolle spielen.

3.3.1 Poissonprozesse

Viele zufällige Phänomene, die in Natur, Technik oder im Alltag beobachtet werden können, lassen sich durch zeitkontinuierliche Zählprozesse beschreiben. Allgemein handelt es sich hierbei um eine Funktion $N_\omega(t) : \Omega \times \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{N}$, wobei $N_\omega(t) := N(t)$ die Gesamtanzahl der zufälligen Ereignisse $\omega \in \Omega$ ist, die innerhalb des Zeitintervalls $t \in (0, t]$ eingetreten sind. Anschauliche Beispiele hierfür sind der radioaktive Zerfall von Atomkernen, die Detektion von Photonen, das Zählen von Hufritten im preußischen Heer oder das Eintreffen von Menschen in einem Wartezimmer.

Von besonderer Bedeutung ist der homogene Poissonprozess. Hierbei handelt es sich um einen Zählprozess, dem eine konstante Erzeugungsrate λ zugrunde liegt und der formal folgende Eigenschaften erfüllt [23]:

1. Der Prozess hat unabhängige Zuwächse (Ereignisse in disjunkten Zeitintervallen sind unabhängig).
2. Die Zuwächse des Prozesses sind stationär (Die Verteilung der Zahl der Ereignisse in einem beliebigen Zeitintervall hängt nur von der Länge des Intervalles, nicht vom Anfangszeitpunkt ab).
3. Die Wahrscheinlichkeit, dass genau ein Ereignis in einem beliebigen Zeitintervall der Länge h eintritt, ist $\lambda h + o(h)$, d.h.

$$P(N(h) = 1) = \lambda h + o(h)$$
4. Die Wahrscheinlichkeit, dass mehr als ein Ereignis in einem beliebigen Zeitintervall der Länge h eintritt, ist $o(h)$, d. h.

$$P(N(h) \geq 2) = o(h)$$

Der Ausdruck $o(h)$ ist die Landau-Notation für Funktionen, von denen man fordert, dass sie schneller als mit h gegen Null streben [13].

Unter Beachtung der für den Poissonprozess geforderten Eigenschaften kann eine Mastergleichung formuliert werden, die es gestattet, die Wahrscheinlichkeitsfunktion $P(n, t)$ zu berechnen

$$\frac{d}{dt}P(n, t) = \lambda P(n-1, t) - \lambda P(n, t) \quad . \quad (3.12)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung, die die Anfangsbedingung $P(N(0) = 0) = 1$ erfüllt, ist durch

$$P(n, \mu := \lambda t) = \text{Poi}(n, \mu) = \frac{\mu^n}{n!} e^{-\mu}, \text{ für } n = 0, 1, \dots \quad (3.13)$$

gegeben. Dies ist die sogenannte Poissonverteilung, die allen Zählprozessen, die über die aufgeführten Eigenschaften verfügen, zugrunde liegt. In manchen Fällen kann es zweckmäßig sein, auf eine rekursive Darstellung der Poissonverteilung zurückzugreifen. Aus (3.13) folgt dafür unmittelbar

$$\text{Poi}(n, \mu) = \frac{\mu}{n} \text{Poi}(n-1, \mu) \quad . \quad (3.14)$$

Die Momente (3.6) einer Poissonverteilung $\text{Poi}(n, \mu)$ können für beliebige Ordnungen k , analytisch berechnet werden

$$m_k = \sum_{l=1}^k S(k, l) \mu^l \quad . \quad (3.15)$$

Die Stirlingschen Zahlen zweiter Art $S(k, l)$ treten häufig bei kombinatorischen Problemen auf und beschreiben die Anzahl unterschiedlicher Möglichkeiten, eine Permutation aus k

Elementen in l Zyklen zu zerlegen

$$S(k, l) := \frac{1}{l!} \sum_{j=1}^l (-1)^{l-j} \binom{l}{j} j^k \quad . \quad (3.16)$$

Aus den ersten beiden Momenten (3.15) können der Erwartungswert $E[N]$ und die Varianz $D[N]$ einer poissonverteilten Zufallsvariablen N berechnet werden

$$E[N] = m_1 = \mu \quad (3.17)$$

$$D[N] = m_2 - m_1^2 = \mu + \mu^2 - \mu^2 = \mu \quad . \quad (3.18)$$

Eine besondere Eigenschaft der Poissonverteilung ist die Reproduktivität. Für die Faltung von m Poissonverteilungen $\text{Poi}(n, \mu_k)$, mit $k = 1, \dots, m$ gilt

$$\text{Poi}(n, \mu) = \text{Poi}(n, \mu_1) \otimes \dots \otimes \text{Poi}(n, \mu_m) \text{ mit } \mu = \sum_{k=1}^m \mu_k \quad . \quad (3.19)$$

Somit ist die Summe $N = \sum_{k=1}^m N_k$ von m stochastisch unabhängigen, poissonverteilten Zufallsvariablen N_k wieder eine poissonverteilte Zufallsvariable N , deren Verteilung durch (3.19) gegeben ist.

Diese Eigenschaft der Poissonverteilung lässt sich z. B. mit Hilfe der wahrscheinlichkeitserzeugenden Funktionen leicht zeigen. Nach (3.8) ist die PGF einer Poissonverteilung mit beliebigem Parameter μ durch

$$G_{\text{Poi}}(z) = \sum_{n=0}^{\infty} \text{Poi}(n, \mu) z^n = e^{-\mu} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(\mu z)^n}{n!} = e^{\mu(z-1)} \quad (3.20)$$

gegeben. Aufgrund der Faltungseigenschaft (3.10) folgt für die PGF $G_P(z)$ der Faltung (3.19)

$$G_P(z) = \prod_{k=1}^m G_{P_k}(z) = e^{\mu_1(z-1)} \dots e^{\mu_m(z-1)} = e^{(z-1) \sum_{k=1}^m \mu_k} = e^{\mu(z-1)} \quad .$$

Die Multiplikation der erzeugenden Funktionen ergibt wiederum die PGF einer Poissonverteilung mit Parameter $\mu = \sum_{k=1}^m \mu_k$, womit (3.19) gezeigt ist.

3.3.2 Diffusion

Der Begriff der Diffusion wird im Allgemeinen auf sehr unterschiedliche Phänomene angewendet, im Falle von Flüssigkeiten oder Gasen ist jedoch damit konkret die Brownsche

Molekularbewegung gemeint. Diese thermisch getriebene Eigenbewegung der Moleküle hat zur Folge, dass diese fortlaufend miteinander kollidieren und es zu einem ständigen, zufälligen Richtungswechsel in der Bewegung der Partikel kommt. Obwohl diese mikroskopische Interpretation der Diffusion in der Mitte des 19. Jahrhunderts noch unbekannt war, wusste man aus Beobachtungen, dass lokale Unterschiede in der Konzentration $c(\vec{r})$ einer diffundierenden Spezies zu einem Nettofluss \vec{j} führen, der bestrebt ist, das Konzentrationsgefälle $\nabla c(\vec{r})$ auszugleichen. Dies wurde erstmals von A. Fick in dem von ihm empirisch ermittelten 1. Fickschen Gesetz quantitativ beschrieben [14]

$$\vec{j} = -D\nabla c \quad . \quad (3.21)$$

Die Diffusionskonstante D einer Spezies bestimmt, wie stark das System einem Konzentrationsgefälle folgt, wobei es sich bei anisotroper Diffusion um einen Tensor zweiter Stufe handelt. Die Kontinuitätsgleichung

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \nabla \cdot \vec{j} = w \quad (3.22)$$

liefert den lokalen Zusammenhang zwischen einem Teilchenstrom und der Teilchendichte, wobei die Größe w die Änderung der Gesamtteilchenanzahl bezeichnet. Solange keine Teilchen erzeugt oder vernichtet werden (wie z.B. bei chemischen Reaktionen), ist $w = 0$, und die Teilchendichte kann sich nur dort verändern, wo die Bilanz zwischen ein- und auslaufendem Strom nicht ausgeglichen ist. Wendet man nun den Divergenzoperator auf das 1. Ficksche Gesetz (3.21) an und setzt anschließend die Kontinuitätsgleichung (3.22) für den Fall $w = 0$ ein, erhält man das 2. Ficksche Gesetz

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\Delta c \quad , \quad (3.23)$$

demzufolge die zeitliche Änderung der Konzentration proportional zur ihrer zweiten Ortsableitung ist. Solange die Voraussetzungen der Kontinuität ($w = 0$) und einer konstanten, konzentrationsunabhängigen Diffusionskonstanten erfüllt sind, lassen sich die Fickschen Gesetze auf eine Vielzahl von Diffusionsproblemen anwenden. Als Beispiele seien hier die Diffusion von Atomen bzw. Molekülen in Flüssigkeiten, Gasen oder in amorphen Stoffen wie Glas und Kunststoff sowie von geladenen Teilchen in Kristallen und Flüssigkeiten genannt.

In der mikroskopischen Interpretation, in der die Diffusion durch die Brownsche Molekularbewegung erklärt wird, wurde die Diffusionsgleichung (3.23) von Albert Einstein aufgrund stochastischer Überlegungen für ein frei diffundierendes Teilchen abgeleitet [10] und später durch Wiener mathematisch präzisiert [48]. In der Einsteinschen Formulierung treten deshalb anstelle von Teilchenkonzentrationen Wahrscheinlichkeitsdichten auf, deren zeitliches

und räumliches Verhalten durch die Lösungen der Diffusionsgleichung (3.24) bestimmt wird

$$\frac{\partial p(\vec{r}, t)}{\partial t} = D\Delta p(\vec{r}, t) \quad . \quad (3.24)$$

Der Zusammenhang zwischen Diffusion und Brownscher Molekularbewegung kommt in der Einstein-Smoluchowski-Gleichung zum Ausdruck

$$D = \frac{\lambda^2}{3\tau} \quad ,$$

die die mittlere freie Weglänge λ sowie die mittlere Zeit τ , die zwischen zwei aufeinanderfolgenden Stößen vergeht, mit der Diffusionskonstanten in Beziehung setzt.

Für den späteren Verlauf der Arbeit ist es erforderlich, das Diffusionsverhalten eines einzelnen, frei diffundierenden Teilchens beschreiben zu können. Konkret bedeutet dies, die Lösung der Diffusionsgleichung für das Randwertproblem

$$p(\vec{r}, t \rightarrow t_0 | \vec{r}_0, t_0) = \delta(\vec{r} - \vec{r}_0) \quad p(|\vec{r}| \rightarrow \infty, t | \vec{r}_0, t_0) = 0$$

zu bestimmen. Diese ist durch die so genannte Greensche Funktion gegeben

$$p(\vec{r}, t | \vec{r}_0, t_0) = (4\pi D(t - t_0))^{-\frac{3}{2}} \exp \left[-\frac{(\vec{r} - \vec{r}_0)^2}{4D(t - t_0)} \right] \quad (3.25)$$

Sie kann als bedingte Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, ein Teilchen, welches zum Zeitpunkt t_0 am Ort \vec{r}_0 war, zum Zeitpunkt t am Ort \vec{r} vorzufinden. Dabei handelt es sich um eine Gaußsche Glockenkurve, die mit zunehmender Zeit t auseinanderläuft. Der Flächeninhalt und somit auch die Normierung bleiben zu jedem Zeitpunkt erhalten.

Kapitel 4

Photonenzahlverteilungen

Im Unterschied zur etablierten Methode der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) stellt die Analyse von Photonenzahlverteilungen (PCH) ein noch recht junges Forschungsfeld auf dem Gebiet der Fluoreszenzfluktuationsexperimente (FFE) dar. Erst seit wenigen Jahren sind die ersten kommerziellen Fluoreszenzmikroskope erhältlich, die auch PCH-Analysen unterstützen und diese somit einer wachsenden Anzahl von Benutzern zugänglich machen. Trotz der großen Erfolge [2, 4, 18, 46], die bereits mit diesen Methoden erzielt werden konnten, existiert bisher noch kein theoretisches Modell, das eine geschlossene Beschreibung der physikalischen Zusammenhänge erlaubt.

Das in diesem Kapitel dargestellte Konzept der Photonenzahlverteilung basiert auf einer neuartigen Definition des Beobachtungsvolumens. Sie ermöglicht es, PCH für einen großen Konzentrationsbereich *a priori* zu berechnen und die der Gesamtverteilung zugrunde liegende Einzelmolekülverteilung als Messgröße zu beschreiben.

Das Kapitel beginnt mit einer generellen Darstellung der experimentellen und stochastischen Größen, die im Zusammenhang mit Photonenzahlverteilungen auftreten. Dem folgt in Abschnitt 4.2 die Definition des effektiven Beobachtungsvolumens, welches die Grundlage für alle weiteren Berechnungen bildet. Im Abschnitt 4.3 wird die Einzelmolekülverteilung des effektiven Beobachtungsvolumens definiert und der Mittelwert, die Varianz und der Q -Faktor der Einzelmolekülverteilung aus den zuvor abgeleiteten Momenten berechnet. Danach wird in Abschnitt 4.4 auf der Basis des Beobachtungsvolumens und der Einzelmolekülverteilung die Signalverteilung für eine gegebene Konzentration abgeleitet. Zusätzlich wird für diese eine rekursive Darstellung angegeben, die eine kompakte Schreibweise der Signalverteilung ermöglicht. Wie zuvor für die Einzelmolekülverteilung werden Momente, Mittelwert, Varianz und Q -Faktor der Signalverteilung bestimmt. Abschnitt 4.5 befasst sich mit Photonenzahlverteilungen einer Molekülspezies unter Berücksichtigung des experimentell unvermeidlichen Rauschanteils. Auch für diese Verteilung wird eine rekursive

Formulierung abgeleitet und Momente, Mittelwert und Varianz berechnet. In Abschnitt 4.5 folgt die Rekursionsformel der Verteilung eines Gemisches von verschiedenen Molekülspezies und die Berechnung ihrer Momente. Der letzte Abschnitt 4.7 des Kapitels befasst sich mit der Bestimmung der Einzelmolekülgrößen aus der messbaren Gesamtverteilung.

4.1 Vorgehensweise

Was für die FCS die Autokorrelation, ist für die Analyse der Intensitätsfluktuationen die Photonenzahl- bzw. Intensitätsverteilung. Sie ist die experimentell beobachtbare Größe, aus deren Analyse die relevanten physikalischen Parameter des FFE bestimmt werden.

Zur Veranschaulichung der experimentellen und stochastischen Größen dient ein hypothetisches Fluoreszenzexperiment, in dem m frei diffundierende Moleküle in einem geschlossenen Volumen durch lineare Ein-Photonen-Anregung zur Fluoreszenz angeregt werden. Die emittierten Photonen werden auf einem Einzelphotonenzählwerk abgebildet und durch eine Auswertelektronik registriert. Für die Untersuchung der Photonenzahlverteilungen wird die gesamte Beobachtungszeit T in äquidistante Zeitintervalle $\Delta T = t_i - t_{i-1}$ mit $i = 1, 2, 3, \dots, N$ aufgeteilt, die häufig auch als "Binzeit" bezeichnet werden. Somit erhält man aus dem Experiment eine endliche Folge von Photonenzahlen $n_1, n_2, n_3, \dots, n_N$, $n_i \in \mathbb{N}_0$ die jeweils während des Zeitintervalls $[t_i - t_{i-1}]$ detektiert wurden, wobei die Anzahl der Folgeglieder $N = T/\Delta T$ durch die Messdauer T und die gewählte Intervallbreite ΔT gegeben ist (siehe auch Abb. 2.4). Aus der Anzahl der Intervalle $k(n)$, die n Photonen enthalten, lassen sich die relativen Häufigkeiten berechnen

$$P_N(n) = \frac{k(n)}{N} \quad . \quad (4.1)$$

Sie können für hinreichend großes N als die Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, n Photonen während des Zeitintervalls ΔT zu beobachten

$$P_{\text{PCH}}(n) = \lim_{N \rightarrow \infty} P_N(n) \quad . \quad (4.2)$$

Aus stochastischer Sicht stellt die Detektion der Fluoreszenzphotonen einen zeitkontinuierlichen Zählprozess dar. Hierbei kann jedes einzelne Molekül k , mit $k = 1, 2, \dots, m$, durch eine Familie $\{N_{\text{sm}}^{(k)}(t) | t \geq 0\}$ von diskreten Zufallsvariablen $N_{\text{sm}}^{(k)}(t)$ repräsentiert werden. Die Realisierungen $N_{\text{sm}}^{(k)}(t_i) = n_i^{(k)}$ zu den Zeitpunkten $t_i = i\Delta T$, $i \in [1, 2, \dots, N]$ entsprechen den Photonenzahlen n_i , die im Experiment bei einem einzelnen Molekül beobachtet werden. Das zugrunde liegende Wahrscheinlichkeitsmaß $P_{\text{sm}}^k(N_{\text{sm}}^{(k)}(t_i) = n_i^{(k)}) := P_{\text{sm}}(n)$ ist die Einzelmolekülverteilung, welche allen Molekülen einer Spezies zugrunde liegt. Handelt es sich ferner um einen ergodischen Prozess, kann auf eine zusätzliche Indizierung verzichtet werden.

Werden alle m Moleküle des Ensembles in die Betrachtung mit eingeschlossen, entsteht ein neuer Zählprozess $\{N_{\text{sig}}(t) = \sum_{k=1}^m N_{\text{sig}}^{(k)}(t) | t \geq 0\}$, der sich aus der Superposition der Einzelmolekülbeiträge ergibt. Solange es zu keinen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen kommt, sind die einzelnen Emissions- bzw. Detektionsakte stochastisch unabhängig. Die N_{sig} zugrunde liegende Signalverteilung $P_{\text{sig}}(n) = (P_{\text{sm}} \otimes \dots \otimes P_{\text{sm}})(n)$ kann dann aus der m -fachen Faltung der Einzelmolekülfunktion berechnet werden.

Neben dem eigentlichen Fluoreszenzsignal ist zusätzlich das in jedem Experiment auftretende Rauschen N_{noise} zu berücksichtigen, welches üblicherweise eine Überlagerung von verschiedenen Rauschprozessen darstellt. Im Falle von FFE entstehen die größten Rauschbeiträge durch das thermische Rauschen N_{therm} des verwendeten Photonenzählwerks sowie durch gestreute Anregungsphotonen N_{scatter} , die auf den Detektor gelangen. Diese können durch stochastisch unabhängige, homogene Poissonprozesse beschrieben werden, so dass die Verteilung $P_{\text{noise}}(n) = (P_{\text{therm}} \otimes P_{\text{scatter}})(n)$ aus der Faltung der Verteilungen $P_{\text{therm}}(n)$ und $P_{\text{scatter}}(n)$ berechnet werden kann. Aufgrund der reproduktiven Eigenschaft der Poissonverteilung (3.19) ergibt sich für das gesamte Rauschen $N_{\text{noise}} = N_{\text{therm}} + N_{\text{scatter}}$ erneut eine homogene Poissonverteilung.

Sind die Verteilungen $P_{\text{sig}}(n)$ und $P_{\text{noise}}(n)$ bekannt, lässt sich die Verteilung $P_{\text{PCH}}(n)$ berechnen, die experimentell durch die beobachtbaren relativen Häufigkeiten (4.2) zugänglich ist. Die pro Zeitintervall ΔT beobachtete Photonenzahl n_i ist die Realisierung der Zufallsvariablen $N_{\text{PCH}} = N_{\text{sig}} + N_{\text{noise}}$. Auch in diesem Fall kann $P_{\text{PCH}}(n) = (P_{\text{sig}} \otimes P_{\text{noise}})(n)$ aus der Faltung der einzelnen Komponenten berechnet werden, da es sich um stochastisch unabhängige Ereignisse handelt.

Im allgemeinen Fall wird sich die Probe eines FFE aus einem Gemisch von s unterschiedlichen Molekülsorten zusammensetzen. Der Beitrag jeder Spezies i ist dann durch die Familie $\{N_{\text{sig}}^{(i)}(t) | t \geq 0\}$ eindeutig charakterisiert. Das Signal des Gemisches wird vom Beitrag des Rauschens N_{noise} überlagert, wodurch das insgesamt detektierte Signal durch den Zählprozess $\{N_{\text{mix}}(t) = \sum_{i=1}^s N_{\text{sig}}^{(i)}(t) + N_{\text{noise}} | t \geq 0\}$ gegeben ist. Solange Wechselwirkungen zwischen den Molekülsorten vernachlässigt werden können, handelt es sich bei den $N_{\text{sig}}^{(i)}(t)$ um stochastisch unabhängige Zufallsvariablen. Damit kann die Gemischverteilung $P_{\text{mix}}(n) = (P_{\text{sig}}^{(1)} \otimes \dots \otimes P_{\text{sig}}^{(s)} \otimes P_{\text{noise}})(n)$ aus der Faltung der jeweiligen Signalverteilung $P_{\text{sig}}^{(i)}(n)$ und der Rauschverteilung $P_{\text{noise}}(n)$ berechnet werden.

In Tab. 4.1 sind nochmal die wichtigsten Größen zusammengefasst, die für eine Modellierung der Gesamtverteilung $P_{\text{PCH}}(n)$ bzw. der Gemischverteilung $P_{\text{mix}}(n)$ benötigt werden. Bis auf die Voraussetzung der stochastischen Unabhängigkeit sind die dort dargestellten Beziehungen zwischen den Verteilungen keinen weiteren Einschränkungen unterworfen. Die Aufgabe besteht nun darin, ein geeignetes Modell für die Einzelmolekülverteilung zu

Tabelle 4.1: Die Tabelle zeigt die Zufallsvariablen und ihre Wahrscheinlichkeitsfunktionen, die zur Modellierung der Photonenzahlverteilungen benötigt werden. Es werden stochastisch unabhängige Prozesse angenommen, so dass die Verteilungen aus den Faltungen der jeweiligen Komponenten berechnet werden können.

Zufallsvariable	Wahrscheinlichkeitsfunktion	Bezeichnung
N_{sm}	$P_{\text{sm}}(n)$	Einzelmolekülvert.
$N_{\text{sig}} = \sum_{i=1}^m N_{\text{sm}}^{(i)}$	$P_{\text{sig}}(n) = (P_{\text{sm}} \otimes \dots \otimes P_{\text{sm}})(n)$	Signalverteilung
$N_{\text{PCH}} = N_{\text{sig}} + N_{\text{noise}}$	$P_{\text{PCH}}(n) = (P_{\text{sig}} \otimes P_{\text{noise}})(n)$	Gesamtverteilung
$N_{\text{mix}} = \sum_{i=1}^s N_{\text{sig}}^{(i)} + N_{\text{noise}}$	$P_{\text{mix}}(n) = (P_{\text{sig}}^{(1)} \otimes \dots \otimes P_{\text{sig}}^{(s)} \otimes P_{\text{noise}})(n)$	Gemischverteilung
N_{noise}	$P_{\text{noise}}(n) = \text{Poi}(n, \lambda)$	Rauschverteilung

formulieren, um anschließend sukzessiv alle weiteren Größen zu berechnen. Wie im Folgenden gezeigt werden wird, ist der Begriff der Einzelmolekülfunktion unmittelbar mit dem des Beobachtungsvolumens eines einzelnen Moleküls verknüpft.

4.2 Effektives Volumen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde beschrieben, wie die Photonenzahlverteilungen sukzessiv aus der Einzelmolekülverteilung berechnet werden können. Ein generelles Problem, welches bei einer Modellierung der Einzelmolekülfunktion auftritt, ist die physikalische Interpretation des Beobachtungsvolumens. Zur Veranschaulichung betrachte man ein einzelnes Molekül, dessen lokale molekulare Helligkeit (LMH) $\mu(\vec{r})$ als gegeben vorausgesetzt wird. Die Wahrscheinlichkeit $P_{\text{sm}}(n)$, dass von einem einzelnen Fluorophor n Photonen detektiert werden, ist durch die Mandelsche Formel [32] gegeben

$$P_{\text{sm}}(n) = \int_V d^3r \text{Poi}(n, \mu(\vec{r})) p(\vec{r}) \quad . \quad (4.3)$$

Dieses Integral mittelt die mit $p(\vec{r})$ gewichteten Beiträge der Poissonverteilungen (3.13) über alle möglichen Positionen \vec{r} des Moleküls. Hierbei ist $p(\vec{r}) = 1/V$ die konstante Wahrscheinlichkeit, mit der ein einzelnes Molekül im thermodynamischen Gleichgewicht am Ort \vec{r} innerhalb des Integrationsvolumens V anzutreffen ist. Für ein unendliches Volumen erhält man aus (4.3) die Lösung $P_{\text{sm}}(n) = \delta_{0,n}$. Dies spiegelt die Tatsache wider, dass ein einzelnes Molekül in einem unendlichen Volumen V einer effektiven Konzentration von $C = 0$ entspricht.

Es wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen Ansätze veröffentlicht, die das beschriebene Problem auf unterschiedliche Art und Weise angehen [3, 24]. Chen und Müller zeigen z.B. in ihrer Argumentation auf, dass die Gesamtverteilung einer frei diffundierenden Spezies für ein offenes Beobachtungsvolumen von der Wahl des Referenzvolumens unabhängig ist und deshalb beliebig umskaliert werden kann. Für ihr Modell verwenden sie ein mehr oder weniger willkürlich gewähltes, endliches Referenzvolumen, um die Integration in (4.3) durchzuführen. Generell beruhen alle bisherigen Definitionen des Beobachtungsvolumens auf heuristischen Prinzipien. Die folgenden Betrachtungen zeigen, dass die Frage nach der Beobachtbarkeit eines Moleküls zu einer physikalisch motivierten Definition des Beobachtungsvolumens führt.

Wegen des stochastischen Charakters der beteiligten Prozesse lässt sich die Frage nach der Beobachtbarkeit eines Moleküls nur auf der Basis von Wahrscheinlichkeiten beschreiben. Aus diesem Grund betrachtet man zuerst die Wahrscheinlichkeit $P(n > 0 | m = 1)$, mit der ein einzelnes Teilchen ($m = 1$) innerhalb eines infinitesimal kleinen Volumenelements dV mindestens ein Photon oder mehr ($n > 0$) zum beobachteten Signal beiträgt. Die Detektion der Fluoreszenzphotonen und die Diffusion des Moleküls sind zwei voneinander unabhängige Prozesse. Somit kann die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(n > 0 | m = 1)$ aus dem Produkt

$$P(n > 0 | m = 1) = P(n > 0) P(m = 1) \quad (4.4)$$

der Einzelwahrscheinlichkeiten $P(n > 0)$ und $P(m = 1)$ berechnet werden. Die Wahrscheinlichkeit $P(m = 1)$, ein einzelnes Teilchen in einem hinreichend kleinen Volumenelement dV anzutreffen, ist für eine Teilchenkonzentration C durch

$$P(m = 1) = C dV \quad (4.5)$$

gegeben. Die Wahrscheinlichkeit $P(n > 0)$, von diesem Molekül mindestens ein Photon zu detektieren, ergibt sich aus

$$P(n > 0) = 1 - \text{Poi}(n = 0, \mu(\vec{r})) \quad . \quad (4.6)$$

Die Poissonverteilung $\text{Poi}(n = 0, \mu(\vec{r}))$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der von einem Molekül am Ort \vec{r} trotz der molekularen Helligkeit $\mu(\vec{r})$ kein Photon detektiert wird. Somit ist die Wahrscheinlichkeit $P(n > 0 | m = 1)$, mit der ein einzelnes Molekül in einem Volumenelement dV beobachtet wird

$$P(n > 0 | m = 1) = [1 - \text{Poi}(n = 0, \mu(\vec{r}))] C dV \quad . \quad (4.7)$$

Gleichung (4.7) kann jedoch noch in einem anderen Sinne interpretiert werden. Die Wahrscheinlichkeit $P(m = 1) = C dV = dm$ ist identisch mit der mittleren Teilchenanzahl

dm , die sich für eine gegebene Konzentration C im Volumenelement dV aufhält. Von diesen trägt jedoch nur der Bruchteil $P(n > 0)$ zum detektierten Signal bei. Folglich ist die mittlere Teilchenanzahl $\langle dm \rangle$, die in einem Volumenelement dV beobachtet wird, durch

$$\langle dm \rangle = P(n > 0) dm = [1 - \text{Poi}(n = 0, \mu(\vec{r}))] C dV \quad (4.8)$$

gegeben. Diese Betrachtungen führen zur Definition des effektiven Beobachtungsvolumens gemäß

$$V_{\text{eff}} := \int_{R^3} [1 - \text{Poi}(n = 0, \mu(\vec{r}))] dV \quad . \quad (4.9)$$

Die mittlere Teilchenanzahl $\langle m \rangle$, die für eine gegebene Konzentration C zum Signal beiträgt, ist dann durch

$$\langle m \rangle = C V_{\text{eff}} \quad (4.10)$$

bestimmt. Somit folgt aus der Frage nach der Beobachtbarkeit der Moleküle die Definition (4.9) für das effektive Beobachtungsvolumen. Diese Definition gilt für beliebige LMH $\mu(\vec{r})$ und ist somit auf alle möglichen FFE anwendbar. Das Volumen V_{eff} hat keine räumlichen Begrenzungen im eigentlichen physikalischen Sinne. Die Integration erstreckt sich über den gesamten Raum, wobei die einzelnen Volumenelemente dV mit der entsprechenden Photondetektionswahrscheinlichkeit der verwendeten Fluoreszenzmoleküle gewichtet werden. Anschaulich gesprochen handelt es sich hierbei um die Kontraktion eines räumlich unendlich ausgedehnten Volumens auf einen endlichen Bereich V_{eff} , in dem mit Sicherheit Photonen der Teilchen detektiert werden. Bei der Berechnung der Größe des effektiven Volumens spielen sowohl die physikalischen Eigenschaften der verwendeten Molekülspezies als auch die Abbildungseigenschaften des experimentellen Aufbaus eine entscheidende Rolle. Hieraus folgt, dass die effektiven Beobachtungsvolumina zweier Molekülspezies mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften, die an derselben Apparatur vermessen werden, voneinander verschieden sind.

Nach der Definition (4.9) des Beobachtungsvolumens lassen sich die Moleküle einer Probe zu jedem Zeitpunkt $t_i = i\Delta T, i \in [1, 2, \dots, N]$ zwei verschiedenen Zuständen zuordnen. Teilchen, von denen während der Binzeit ΔT ein oder mehr Photonen detektiert worden sind, befinden sich "innerhalb" des effektiven Volumens. Im Gegensatz dazu sind alle Teilchen, von denen keine Photonen detektiert wurden, "außerhalb" des effektiven Volumens. Zu jeder neuen Binzeit können die Teilchen zwischen den beiden Zuständen "innerhalb" und "außerhalb" wechseln. Die Wahrscheinlichkeit, m Teilchen im effektiven Volumen vorzufinden, ist durch eine Poissonverteilung mit Parameter $\langle m \rangle$ gegeben [16, 29]

$$\text{Poi}(m, \langle m \rangle) = \frac{\langle m \rangle^m}{m!} e^{-\langle m \rangle} \quad . \quad (4.11)$$

Nach Definition werden von Molekülen, die sich "außerhalb" des effektiven Volumens befinden, keine Photonen detektiert. Hieraus folgt z.B., dass die Wahrscheinlichkeit der Nullereignisse $P_0 := P_{\text{sig}}(n = 0)$ der bisher noch unbekanntem Signalverteilung $P_{\text{sig}}(n)$ mit $\text{Poi}(m = 0, \langle m \rangle)$ identisch sein muss

$$\text{Poi}(m = 0, \langle m \rangle) = e^{-\langle m \rangle} = P_0 \quad . \quad (4.12)$$

Dies ergibt unmittelbar den Zusammenhang

$$C V_{\text{eff}} = -\ln(P_0) \quad (4.13)$$

zwischen den Nullereignissen P_0 , der Konzentration C und dem effektiven Volumen. Gleichung (4.13) stellt für FFE einen allgemein gültigen Zusammenhang dar. Mit ihr kann entweder das effektive Beobachtungsvolumen für eine gegebene Konzentration bestimmt werden oder die Konzentration einer unbekanntem Farbstofflösung aus der Häufigkeit der Nullereignisse, wenn die Größe des Beobachtungsvolumens bekannt ist.

4.3 Einzelmolekülverteilung

Für das im vorigen Abschnitt definierte Beobachtungsvolumen V_{eff} kann die Einzelmolekülfunktion $P_{\text{sm}}(n)$ mit Hilfe der Mandelschen Formel (4.3) bestimmt werden. Dabei ist zu beachten, dass per Definition ein Teilchen innerhalb von V_{eff} eine von Null verschiedene Photonendetektionswahrscheinlichkeit aufweist. Mit $p(\vec{r}) = 1/V_{\text{eff}}$ folgt somit

$$P_{\text{sm}}(n) := \begin{cases} 0 & \text{für } n = 0 \\ \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \text{Poi}(n, \mu) & \text{für } n > 0 \end{cases} \quad . \quad (4.14)$$

Die Einzelmolekülverteilung unterscheidet sich von der gleichnamigen Verteilung in [3] durch die spezielle Eigenschaft $P_{\text{sm}}(n = 0) = 0$. Die Molekülspezies eines FFE ist durch die Einzelmolekülverteilung und das Beobachtungsvolumen V_{eff} eindeutig charakterisiert.

Dass die Einzelmolekülfunktion die richtige Normierung aufweist, ist leicht zu zeigen. Hierbei dürfen die Integration und die Summation aufgrund der gleichmäßigen Konvergenz der Reihe vertauscht werden

$$\begin{aligned} \sum_{n=0}^{\infty} P_{\text{sm}}(n) &= \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \text{Poi}(n, \mu) = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \sum_{n=1}^{\infty} \text{Poi}(n, \mu) \\ &= \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\mu^n}{n!} e^{-\mu} = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r e^{-\mu} \left(\sum_{n=0}^{\infty} \frac{\mu^n}{n!} - 1 \right) \\ &= \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r (1 - e^{-\mu}) = 1 \quad . \end{aligned} \quad (4.15)$$

4.3.1 Momente

Die Eigenschaften einer Verteilung können durch ihre Momente (3.6) charakterisiert werden. Die Methode der Momentanalyse ist ein Standardverfahren auf dem Gebiet der FFE, das vor allem bei Gemischuntersuchungen von verschiedenen Molekülspezies angewendet wird [40, 41]. Im Folgenden werden die Momente der Einzelmolekülfunktion (4.14) bestimmt.

Bei der Berechnung der Momente einer Verteilung $P(n)$ wird häufig auf die charakteristische Funktion $\varphi_P(t)$ zurückgegriffen

$$\varphi_P(t) := E[e^{int}] = \sum_{n=0}^{\infty} P(n)e^{int} \quad . \quad (4.16)$$

Die Momente m_k können durch Differentiation an der Stelle $t = 0$ der charakteristischen Funktion berechnet werden

$$m_k = \frac{1}{i^k} \frac{d^k}{dt^k} \varphi_P(t) \Big|_{t=0} \quad . \quad (4.17)$$

Nach Einsetzen der Einzelmolekülverteilung (4.14) in die Definition der charakteristischen Funktion (4.16) dürfen aufgrund der gleichmäßigen Konvergenz der Reihe Integration und Summation vertauscht werden

$$\begin{aligned} \varphi_{P_{\text{sm}}}(t) &= \sum_{n=0}^{\infty} P_{\text{sm}}(n) e^{int} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \frac{\mu^n}{n!} e^{-\mu} e^{int} \\ &= \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r e^{-\mu} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\mu^n}{n!} e^{int} = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r e^{-\mu} \left(e^{\mu e^{it}} - 1 \right) \\ &= \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \left(e^{\mu(e^{it}-1)} - e^{-\mu} \right) \quad . \end{aligned}$$

Gemäß (4.17) ergeben sich die Momente $m_{k,\text{sm}}$ durch k -faches Differenzieren aus $\varphi_{P_{\text{sm}}}(t)$ an der Stelle $t = 0$. Hieraus resultiert ein Polynom in der Variablen $\mu(\vec{r})$, dessen ganzzahlige Koeffizienten durch Stirling-Zahlen zweiter Art $S(k, l)$ gegeben sind

$$\begin{aligned} m_{k,\text{sm}} &= \frac{1}{i^k} \frac{d^k}{dt^k} \varphi_{P_{\text{sm}}}(t) \Big|_{t=0} = \frac{1}{i^k} \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \frac{d^k}{dt^k} \left(e^{\mu(e^{it}-1)} - e^{-\mu} \right) \Big|_{t=0} \\ &= \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \left(\sum_{l=1}^k S(k, l) \mu^l(\vec{r}) \right) = \sum_{l=1}^k S(k, l) \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \mu^l(\vec{r}) \quad . \quad (4.18) \end{aligned}$$

Volumenintegrale über Potenzen von $\mu(\vec{r})$, treten bei diversen Fragestellungen im Zusammenhang mit Photonenzahlverteilungen auf. Sie werden allgemein als Momente der

molekularen Helligkeit bezeichnet, wobei das Moment k -ter Ordnung wie folgt definiert ist

$$\overline{\mu^k} := \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \mu^k(\vec{r}) \quad . \quad (4.19)$$

Hierbei ist zu beachten, dass die hier gegebene Definition der Momente anstelle eines räumlichen Volumens das abstrakte, effektive Volumen beinhaltet. Bei den Momenten der Einzelmolekülfunktion $m_{k,\text{sm}}$ handelt es sich somit um eine endliche Linearkombination der effektiven Momente $\overline{\mu^k}$

$$m_{k,\text{sm}} = \sum_{l=1}^k S(k,l) \overline{\mu^l} \quad . \quad (4.20)$$

Der hier dargestellte Zusammenhang zwischen den Momenten der Einzelmolekülfunktion und den Momenten der molekularen Helligkeit ist von zentraler Bedeutung in zahlreichen Anwendungen. Explizit ergibt sich aus (4.20) für die ersten Momente

$$\begin{aligned} m_{1,\text{sm}} &= \overline{\mu} \\ m_{2,\text{sm}} &= \overline{\mu} + \overline{\mu^2} \\ m_{3,\text{sm}} &= \overline{\mu} + 3\overline{\mu^2} + \overline{\mu^3} \quad . \end{aligned}$$

Aus den Momenten der Einzelmolekülfunktion können umgekehrt die Momente der molekularen Helligkeit berechnet werden

$$\overline{\mu^k} = \sum_{l=1}^k s(k,l) m_{l,\text{sm}} \quad , \quad (4.21)$$

wobei die konstanten Koeffizienten durch die Stirling-Zahlen erster Art $s(k,l)$ geben sind. Explizit ergibt sich aus (4.21) für die ersten drei Ordnungen

$$\begin{aligned} \overline{\mu^1} &= m_{1,\text{sm}} \\ \overline{\mu^2} &= -m_{1,\text{sm}} + m_{2,\text{sm}} \\ \overline{\mu^3} &= 2m_{1,\text{sm}} - 3m_{2,\text{sm}} + m_{3,\text{sm}} \quad . \end{aligned}$$

Mit der Kenntnis der $m_{k,\text{sm}}$ können der Erwartungswert $E[N_{\text{sm}}] = \overline{n}_{\text{sm}}$ und die Varianz $D^2[N_{\text{sm}}] = \sigma_{\text{sm}}^2$ der Einzelmolekülfunktion berechnet werden

$$\overline{n}_{\text{sm}} = m_{1,\text{sm}} = \overline{\mu} \quad (4.22)$$

$$\sigma_{\text{sm}}^2 = m_{2,\text{sm}} - m_{1,\text{sm}}^2 = \overline{\mu} + \overline{\mu^2} - \overline{\mu}^2 \quad . \quad (4.23)$$

Der Erwartungswert entspricht der effektiven molekularen Helligkeit erster Ordnung. Dieser Zusammenhang bringt zum Ausdruck, dass die mittlere Anzahl an detektierten Photonen \overline{n}_{sm} der mittleren Anzahl an Photonen $\overline{\mu}$ entspricht, die von einem einzelnen Molekül innerhalb von V_{eff} detektiert werden.

Die Varianz der Einzelmolekülverteilung, die ein Maß für die Breite der Verteilung darstellt, weicht um den Term $\overline{\mu^2} - \bar{\mu}^2$ gegenüber der Varianz einer Poissonverteilung ab. Im Normalfall weisen Verteilungen von physikalischen Prozessen Varianzen auf, die größer als ihr Erwartungswert sind und deshalb als superpoissonisch bezeichnet werden. Die Ausnahme hingegen bilden subpoissonische Prozesse, die sich durch eine Varianz auszeichnen, die kleiner als der Erwartungswert ist. In der Theorie der Photonenzahlverteilungen wird der beschriebene Sachverhalt durch den Mandelschen Q -Faktor [33] klassifiziert. Er ist definiert als das Verhältnis der Differenz aus Varianz und Erwartungswert relativ zum Erwartungswert

$$Q := \frac{\sigma^2 - \bar{n}}{\bar{n}} \quad (4.24)$$

und ist im Falle einer Poissonverteilung gleich Null. Aus der Definition des Q -Faktors folgt, dass eine superpoissonische bzw. subpoissonische Verteilung durch $Q > 0$ bzw. $Q < 0$ gekennzeichnet ist. Für die Einzelmolekülverteilung (4.14) ergibt sich aus dem berechneten Mittelwert und der Varianz ein Q von

$$Q_{\text{sm}} = \frac{m_{2,\text{sm}} - m_{1,\text{sm}}^2 - m_{1,\text{sm}}}{m_{1,\text{sm}}} = \frac{\bar{\mu} + \overline{\mu^2} - \bar{\mu}^2 - \bar{\mu}}{\bar{\mu}} = \left(\frac{\overline{\mu^2}}{\bar{\mu}^2} - 1 \right) \bar{\mu} \quad . \quad (4.25)$$

Für $\overline{\mu^2}/\bar{\mu}^2 < 1$ wird die Einzelmolekülverteilung subpoissonisch. Dies wird in Kapitel 5 an einem Beispiel gezeigt.

4.4 Signalverteilung

Aus der Einzelmolekülverteilung $P_{\text{sm}}(n)$ kann die Signalverteilung $P_{\text{sig}}(n)$ für eine gegebene Konzentration C berechnet werden. Unter der Voraussetzung der stochastischen Unabhängigkeit ist diese gemäß Tabelle 6.2 für m Moleküle durch die m -fache Faltung $P_{m,\text{sm}}(n)$ der Einzelmolekülfunktion gegeben

$$P_{m,\text{sm}}(n) = (P_{m-1,\text{sm}} \otimes P_{\text{sm}})(n) := \sum_{i=1}^{n-1} P_{m-1,\text{sm}}(n-i) P_{\text{sm}}(i) \quad \text{für } m = 2, 3, \dots \quad . \quad (4.26)$$

Die bedingte Wahrscheinlichkeit $P_{\text{sig}}(n > 0|m)$, mit der $n > 0$ Photonen von m Teilchen detektiert werden, ist somit

$$P_{\text{sig}}(n > 0|m) := \begin{cases} P_{\text{sm}}(n > 0) & \text{für } m = 1 \\ P_{m,\text{sm}}(n) & \text{für } m > 1 \end{cases} \quad . \quad (4.27)$$

Ferner ist die Wahrscheinlichkeit, m Moleküle im effektiven Volumen anzutreffen, durch die Poissonverteilung (4.11) bestimmt. Mit dieser muss die bedingte Wahrscheinlichkeit

$P_{\text{sig}}(n > 0|m)$ gewichtet werden, um durch eine Summation über alle m Molekülbeiträge die Signalverteilung zu erhalten

$$\begin{aligned} P_{\text{sig}}(n > 0) &= \sum_{m=1}^{\infty} P_{\text{sig}}(n > 0|m) \text{Poi}(m, \langle m \rangle) \\ &= \sum_{m=1}^{\infty} P_{\text{sig}}(n > 0|m) \frac{\langle m \rangle^m}{m!} e^{-\langle m \rangle} . \end{aligned}$$

Für eine vollständige Beschreibung der Signalverteilung müssen außerdem die Nullereignisse bestimmt werden. Entsprechend der Definition des effektiven Volumens ist die Wahrscheinlichkeit, keine Photonen zu messen, gleichbedeutend mit der Wahrscheinlichkeit, keine Moleküle im effektiven Volumen anzutreffen. Diese ist durch den Null-Term der Poissonverteilung $\text{Poi}(m = 0, \langle m \rangle)$ gegeben

$$P_{\text{sig}}(n) := \begin{cases} e^{-\langle m \rangle} & \text{für } n = 0 \\ \sum_{m=1}^{\infty} P_{\text{sig}}(n > 0|m) \text{Poi}(m, \langle m \rangle) & \text{für } n > 0 \end{cases} . \quad (4.28)$$

Im Folgenden wird explizit gezeigt, dass die so definierte Signalverteilung die richtige Normierung aufweist. Hierzu wird das Glied für $n = 0$ aus der Summe abgespalten, um die in (4.28) auftretende Fallunterscheidung zu berücksichtigen

$$\begin{aligned} \sum_{n=0}^{\infty} P_{\text{sig}}(n) &= e^{-\langle m \rangle} + \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} P_{\text{sig}}(n > 0|m) \text{Poi}(m, \langle m \rangle) \\ &= e^{-\langle m \rangle} + \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} P_{\text{sig}}(n > 0|m) \frac{\langle m \rangle^m}{m!} e^{-\langle m \rangle} . \end{aligned}$$

Da die Definition der bedingten Wahrscheinlichkeit (4.27) eine zusätzliche Fallunterscheidung für $m = 1$ bzw. $m > 1$ beinhaltet, muss bei der Summation über m das erste Glied aus der Summe gezogen werden

$$\begin{aligned} \sum_{n=0}^{\infty} P_{\text{sig}}(n) &= e^{-\langle m \rangle} + \sum_{n=1}^{\infty} \left[P_{\text{sm}}(n > 0) \langle m \rangle e^{-\langle m \rangle} + \sum_{m=2}^{\infty} P_{m,\text{sm}}(n) \frac{\langle m \rangle^m}{m!} e^{-\langle m \rangle} \right] \\ &= e^{-\langle m \rangle} \left(1 + \langle m \rangle \sum_{n=1}^{\infty} P_{\text{sm}}(n) \right) + e^{-\langle m \rangle} \sum_{m=2}^{\infty} \frac{\langle m \rangle^m}{m!} \sum_{n=1}^{\infty} P_{m,\text{sm}}(n) . \end{aligned}$$

Die Normierung der Einzelmolekülfunktion $P_{\text{sm}}(n)$ wurde bereits im letzten Abschnitt gezeigt. Aus $P_{\text{sm}}(0) = 0$ folgt unmittelbar $\sum_{n=1}^{\infty} P_{\text{sm}}(n) = 1$. Ferner ist die Faltung eine normierungserhaltende Verknüpfung, so dass für die m -fach gefaltete Einzelmolekülverteilung $\sum_{n=1}^{\infty} P_{m,\text{sm}}(n) = 1$ gilt. Mit diesen Beziehungen kann die Summation über n aufgelöst

werden, so dass nur noch die Summation über m verbleibt

$$\sum_{n=0}^{\infty} P_{\text{sig}}(n) = e^{-\langle m \rangle} (1 + \langle m \rangle) + e^{-\langle m \rangle} \sum_{m=2}^{\infty} \frac{\langle m \rangle^m}{m!} \quad .$$

Die Translation des Summationsindexes von $m = 2$ auf $m = 0$ ergibt

$$\begin{aligned} \sum_{n=0}^{\infty} P_{\text{sig}}(n) &= e^{-\langle m \rangle} (1 + \langle m \rangle) + e^{-\langle m \rangle} \left(\sum_{m=0}^{\infty} \frac{\langle m \rangle^m}{m!} - (1 + \langle m \rangle) \right) \\ &= e^{-\langle m \rangle} (1 + \langle m \rangle) + e^{-\langle m \rangle} (e^{\langle m \rangle} - (1 + \langle m \rangle)) = 1 \end{aligned} \quad (4.29)$$

womit die Normierung der Signalverteilung bewiesen ist.

4.4.1 Rekursionsformel

Für die weiteren Betrachtungen wird häufig auf eine rekursive Formulierung der Signalverteilung zurückgegriffen. Diese ermöglicht eine kompakte Darstellung der Verteilung (4.28), die analytische Untersuchungen vereinfacht und numerisch stabil in einen Algorithmus implementiert werden kann. Hierbei erweisen sich die Eigenschaften der wahrscheinlichkeitserzeugenden Funktionen (3.8) als äußerst hilfreich. Die technische Durchführung der Ableitungen werden nur in den Fällen im Detail exemplarisch durchgeführt, in denen sie nicht bereits vorher in ähnlicher Form gezeigt worden sind.

Die Wahrscheinlichkeitsfunktion $P_{\text{sig}}(n > 0)$ entspricht der Verteilung von vermengten Zufallsvariablen, wie in (3.11) beschrieben ist. Die Analogie wird offensichtlich, wenn man in das Bild der entsprechenden Zufallsvariablen wechselt. In diesem werden die auftretenden Teilchenfluktuationen durch eine Zufallsvariable M repräsentiert, deren Verteilung durch $\text{Poi}(m, \langle m \rangle)$ gegeben ist. Folglich ist die zu jedem Zeitintervall ΔT detektierte Anzahl von Photonen durch die Realisierungen der Zufallsvariablen $N_{\text{sig}} = N_{1,\text{sm}} + \dots + N_{M,\text{sm}}$ gegeben. Des Weiteren sind die Zufallsvariablen $N_{i,\text{sm}}$, mit $i = 1, \dots, M$ laut Annahme identisch und unabhängig verteilt, wobei das entsprechende Wahrscheinlichkeitsmaß durch die Einzelmolekülverteilung (4.14) gegeben ist. Somit sind alle Voraussetzungen erfüllt, um die wahrscheinlichkeitserzeugende Funktion (PGF) von $P_{\text{sig}}(n > 0)$ gemäß (3.11) berechnen zu können

$$G_{P_{\text{sig}}}(z) = G_{\text{Poi}}(G_{P_{\text{sm}}}(z)) \quad .$$

Mit der erzeugenden Funktion der Poissonverteilung (3.20) kann die PGF der Signalverteilung als Funktion von $G_{P_{\text{sm}}}(z)$ formuliert werden

$$G_{P_{\text{sig}}}(z) = e^{\langle m \rangle (G_{P_{\text{sm}}}(z) - 1)} \quad . \quad (4.30)$$

Der nächste Schritt besteht darin, eine rekursive Formulierung abzuleiten, um aus der erzeugenden Funktion $G_{P_{\text{sig}}}(z)$ sukzessiv die Glieder der Wahrscheinlichkeitsfunktion $P_{\text{sig}}(n)$ zu bestimmen. Gemäß (3.9) müssen hierzu die n -ten Ableitungen an der Stelle $z = 0$ der erzeugenden Funktion (4.30) berechnet werden

$$\left. \frac{d^n}{dz^n} G_{P_{\text{sig}}}(z) \right|_{z=0} = \left. \frac{d^n}{dz^n} e^{\langle m \rangle (G_{P_{\text{sm}}}(z)-1)} \right|_{z=0} = \langle m \rangle \frac{d^{n-1}}{dz^{n-1}} \left(G_{P_{\text{sig}}}(z) \frac{d}{dz} G_{P_{\text{sm}}}(z) \right) \Big|_{z=0} .$$

Die Anwendung der Leibnizschen Produktregel auf den letzten Ausdruck ergibt

$$\left. \frac{d^n}{dz^n} G_{P_{\text{sig}}}(z) \right|_{z=0} = \langle m \rangle \sum_{i=0}^{n-1} \binom{n-1}{i} \left(\left. \frac{d^{i+1}}{dz^{i+1}} G_{P_{\text{sm}}}(z) \right) \Big|_{z=0} \left(\left. \frac{d^{n-1-i}}{dz^{n-1-i}} G_{P_{\text{sig}}}(z) \right) \Big|_{z=0} \right) .$$

Die nun auftretenden Summanden entsprechen der formalen Definition der Rücktransformation (3.9). Nach Einsetzen der entsprechenden Glieder der Verteilungen $P_{\text{sm}}(n)$ bzw. $P_{\text{sig}}(n)$ und einer anschließenden Translation des Summationsindex $i' = i + 1$ erhält man folgende rekursive Formulierung für (4.28)

$$P_{\text{sig}}(n) = \begin{cases} e^{-\langle m \rangle} & \text{für } n = 0 \\ \frac{\langle m \rangle}{n} \sum_{i=1}^n i P_{\text{sm}}(i) P_{\text{sig}}(n-i) & \text{für } n > 0 \end{cases} . \quad (4.31)$$

Für die ersten Glieder der Signalverteilung erhält man aus (4.28) bzw. (4.31)

$$\begin{aligned} P_{\text{sig}}(0) &= e^{-\langle m \rangle} \\ P_{\text{sig}}(1) &= e^{-\langle m \rangle} \langle m \rangle P_{\text{sm}}(1) \\ P_{\text{sig}}(2) &= \frac{1}{2} e^{-\langle m \rangle} \langle m \rangle^2 P_{\text{sm}}^2(1) + e^{-\langle m \rangle} \langle m \rangle P_{\text{sm}}(2) \\ P_{\text{sig}}(3) &= \frac{1}{6} e^{-\langle m \rangle} \langle m \rangle^3 P_{\text{sm}}^3(1) + e^{-\langle m \rangle} \langle m \rangle^2 P_{\text{sm}}(1) P_{\text{sm}}(2) + e^{-\langle m \rangle} \langle m \rangle P_{\text{sm}}(3) \end{aligned} .$$

Für eine gegebene Einzelmolekülverteilung $P_{\text{sm}}(n)$ ist die Signalverteilung eine nichtlineare Funktion in der Variablen $\langle m \rangle$. Für mittlere Teilchenzahlen $\langle m \rangle \ll 1$ können die Terme höherer Ordnung näherungsweise vernachlässigt werden. Der Term erster Ordnung kann für alle $n > 0$ aus dem jeweils letzten Glied $\langle m \rangle e^{-\langle m \rangle} P_{\text{sm}}(n) \approx \langle m \rangle P_{\text{sm}}(n)$ der Rekursion für $i = n$ bestimmt werden. Berücksichtigt man ferner, dass in diesem Fall für die Nullereignisse der Signalverteilung $P_{\text{sig}}(0) = e^{-\langle m \rangle} \approx (1 - \langle m \rangle)$ gilt, so ist

$$P_{\text{sig}}(n) \approx \begin{cases} 1 - \langle m \rangle & \text{für } n = 0 \\ \langle m \rangle P_{\text{sm}}(n) & \text{für } n > 0 \end{cases} \quad (4.32)$$

für $\langle m \rangle \ll 1$. Im Falle kleiner $\langle m \rangle \ll 1$ nehmen die Nullereignisse mit $1 - \langle m \rangle$ ab, während für alle $n > 0$ die Häufigkeiten proportional zur Einzelmolekülverteilung zunehmen.

4.4.2 Momente

Mit Hilfe der rekursiven Formulierung der Signalverteilung kann ein ebenfalls rekursiver Ausdruck für die Momente $m_{k,\text{sig}}$ entwickelt werden. Hierzu wird (4.31) in die Definitionsgleichung der Momente eingesetzt

$$\begin{aligned} m_{k,\text{sig}} &= \sum_{n=0}^{\infty} n^k P_{\text{sig}}(n) = \langle m \rangle \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n^k}{n} \sum_{i=1}^n iP_{\text{sm}}(i)P_{\text{sig}}(n-i) \\ &= \langle m \rangle \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{i=1}^n n^{k-1} iP_{\text{sm}}(i)P_{\text{sig}}(n-i) \\ &= \langle m \rangle \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{i=1}^n ((n-i) + i)^{k-1} iP_{\text{sm}}(i)P_{\text{sig}}(n-i) \quad . \end{aligned}$$

Der Term $((n-i) + i)^{k-1}$ kann unter Berücksichtigung des binomischen Satzes ausmultipliziert werden, so dass nur noch Faktoren der Form $a_i b_{n-i}$ in den einzelnen Summanden auftreten

$$\begin{aligned} m_{k,\text{sig}} &= \langle m \rangle \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{i=1}^n \left(\sum_{j=0}^{k-1} \binom{k-1}{j} (n-i)^{k-1-j} i^j \right) iP_{\text{sm}}(i)P_{\text{sig}}(n-i) \\ &= \langle m \rangle \sum_{j=0}^{k-1} \binom{k-1}{j} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{i=1}^n (n-i)^{k-1-j} P_{\text{sig}}(n-i) i^{j+1} P_{\text{sm}}(i) \quad . \end{aligned}$$

Die vorausgesetzte Existenz der Momente impliziert die absolute Konvergenz der entsprechenden Reihen. Die in der Doppelsumme auftretenden Produkte können gemäß der Cauchyschen Produktformel $\sum_{n=0}^{\infty} \sum_{i=0}^n a_i b_{n-i} = (\sum_{n=0}^{\infty} a_n) (\sum_{n=0}^{\infty} b_n)$ umgeordnet werden

$$m_{k,\text{sig}} = \langle m \rangle \sum_{j=0}^{k-1} \binom{k-1}{j} \left(\sum_{n=0}^{\infty} n^{k-1-j} P_{\text{sig}}(n) \right) \left(\sum_{n=0}^{\infty} n^{j+1} P_{\text{sm}}(n) \right) \quad .$$

Die nach der Umordnung auftretenden Reihen entsprechen der formalen Definition der Momente $m_{k,\text{sm}}$ und $m_{k,\text{sig}}$ der Einzelmolekül- bzw. Signalverteilung. Nach einer Indexverschiebung entsteht folgende Rekursionsformel

$$m_{k,\text{sig}} = \langle m \rangle \sum_{j=1}^k \binom{k-1}{j-1} m_{k-j,\text{sig}} m_{j,\text{sm}} \quad . \quad (4.33)$$

Das in der Summe auftretende 0-te Moment, ist durch die Normierungsbedingung der Signalverteilung bestimmt ($m_{0,\text{sig}} = 1$). Aus der Struktur der Rekursionsformel geht hervor,

dass die Momente der Signalverteilung für eine gegebene Konzentration $C = \langle m \rangle / V_{\text{eff}}$, durch das effektive Volumen (4.9) und die Momente der Einzelmolekülverteilung (4.20) vollständig charakterisiert sind. Letztere können auf die Momente der molekularen Hel-
 ligkeit (4.19) zurückgeführt werden. Nach Einsetzen von (4.21) können die Momente der Signalverteilung als endliche Linearkombination der $\overline{\mu^k}$ dargestellt werden

$$m_{k,\text{sig}} = \langle m \rangle \sum_{j=1}^k \sum_{l=1}^j \binom{k-1}{j-1} m_{k-j,\text{sig}} S(j, l) \overline{\mu^l} \quad . \quad (4.34)$$

Für die ersten drei Ordnungen erhält man aus (4.33) für die Momente der Signalverteilung

$$\begin{aligned} m_{1,\text{sig}} &= \langle m \rangle m_{1,\text{sm}} \\ m_{2,\text{sig}} &= \langle m \rangle^2 m_{1,\text{sm}}^2 + \langle m \rangle m_{2,\text{sm}} \\ m_{3,\text{sig}} &= \langle m \rangle^3 m_{1,\text{sm}}^3 + 3 \langle m \rangle^2 m_{1,\text{sm}} m_{2,\text{sm}} + \langle m \rangle m_{3,\text{sm}} \quad . \end{aligned}$$

Der Erwartungswert $\overline{n}_{\text{sig}}$ und die Varianz σ_{sig}^2 der Signalverteilung können aus den ersten beiden Momenten berechnet werden

$$\overline{n}_{\text{sig}} = m_{1,\text{sig}} = \langle m \rangle m_{1,\text{sm}} = \langle m \rangle \overline{\mu} = \langle m \rangle \overline{n}_{\text{sm}} \quad (4.35)$$

$$\sigma_{\text{sig}}^2 = m_{2,\text{sig}} - m_{1,\text{sig}}^2 = \langle m \rangle m_{2,\text{sm}} = \langle m \rangle (\overline{\mu} + \overline{\mu^2}) = \langle m \rangle (\sigma_{\text{sm}}^2 + \overline{n}_{\text{sm}}^2) \quad . \quad (4.36)$$

Es zeigt sich, dass der Mittelwert der Signalverteilung $\overline{n}_{\text{sig}}$ proportional zum Mittelwert der Einzelmolekülverteilung ist. Der Proportionalitätsfaktor ist durch die mittlere Teilchenzahl $\langle m \rangle$ gegeben. Der gleiche einfache Zusammenhang besteht nicht zwischen den Varianzen der Signal- und Einzelmolekülverteilung. σ_{sig}^2 wächst zwar linear mit $\langle m \rangle$, verhält sich aber auch proportional zur Summe aus dem Quadrat des Mittelwertes und der Varianz der Einzelmolekülfunktion.

Mit der Kenntnis des Mittelwertes und der Varianz kann analog zur Einzelmolekülverteilung der Q -Faktor (4.24) berechnet werden

$$Q_{\text{sig}} = \frac{\sigma_{\text{sig}}^2 - \overline{n}_{\text{sig}}}{\overline{n}_{\text{sig}}} = \frac{m_{2,\text{sig}} - m_{1,\text{sig}}^2 - m_{1,\text{sig}}}{m_{1,\text{sig}}} = \frac{\langle m \rangle (\overline{\mu} + \overline{\mu^2}) - \langle m \rangle \overline{\mu}}{\langle m \rangle \overline{\mu}} = \frac{\overline{\mu^2}}{\overline{\mu}} \quad . \quad (4.37)$$

Hierbei handelt es sich um durchweg von Null verschiedene, positive Größen. Für die Signalverteilung ist, im Gegensatz zur Einzelmolekülverteilung, der Q -Faktor stets größer als Null und somit superpoissonisch.

4.5 Gesamtverteilung

Für die Berechnung der in einem FFE beobachtbaren Gesamtverteilung $P_{\text{PCH}}(n)$ gilt es noch, die in einem jeden realen Experiment auftretenden Rauschbeiträge zu berücksichtigen, die das Signal überlagern. Diese stammen zum größten Teil von gestreuten Anregungsphotonen sowie vom thermischen Rauschen des verwendeten Photodetektors. Im Folgenden wird die Wahrscheinlichkeit $P_{\text{noise}}(n)$, n Rauschphotonen im Zeitintervall ΔT zu detektieren, als poissonisch angenommen

$$P_{\text{noise}}(n) = \text{Poi}(n, \lambda) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda} \quad . \quad (4.38)$$

Da es sich bei der Erzeugung der Signalphotonen bzw. der Rauschphotonen um statistisch unabhängige Ereignisse handelt, kann die Gesamtwahrscheinlichkeit aus der Faltung der Signalverteilung (4.28) und der Rauschverteilung (4.38) berechnet werden

$$P_{\text{PCH}}(n) = \sum_{i=0}^n P_{\text{sig}}(n-i) P_{\text{noise}}(i) \quad . \quad (4.39)$$

4.5.1 Rekursionsformel

In Analogie zur Signalverteilung kann für die Gesamtverteilung (4.39) eine Rekursionsformel aus der entsprechenden erzeugenden Funktion $G_{P_{\text{PCH}}}(z)$ abgeleitet werden. Aufgrund der Faltungseigenschaft (3.10) ist diese durch das Produkt der beiden erzeugenden Funktionen (4.30) und (3.20) der Signal- und der Rauschverteilung gegeben

$$G_{P_{\text{PCH}}}(z) = e^{\langle m \rangle (G_{P_{\text{sm}}}(z)-1) + \lambda(z-1)} \quad . \quad (4.40)$$

Wie bereits im Falle der Signalverteilung ausführlich dargestellt wurde, kann die für die Rücktransformation (3.9) benötigte n -te Ableitung von $G_{P_{\text{PCH}}}(z)$ mit Hilfe der Leibnizschen Produktformel auf eine rekursive Formulierung zurückgeführt werden. Als Resultat ergibt sich die Rekursionsformel der Gesamtverteilung, die neben den bereits bekannten Parametern μ_{max} und $\langle m \rangle$ den Rauschparameter λ als zusätzliche Größe enthält

$$P_{\text{PCH}}(n) = \begin{cases} e^{-\langle m \rangle + \lambda} & \text{für } n = 0 \\ \frac{\lambda}{n} P_{\text{PCH}}(n-1) + \frac{\langle m \rangle}{n} \sum_{i=1}^n i P_{\text{sm}}(i) P_{\text{PCH}}(n-i) & \text{für } n > 0 \end{cases} \quad . \quad (4.41)$$

Diese Rekursionsformel erlaubt es, die Photonenzahlverteilung in kompakter Form darzustellen. Ist der Parameter des Rauschens gleich Null ($\lambda = 0$), geht sie in die Rekursionsformel der Signalverteilung über, wie bei einem Vergleich mit (4.31) deutlich wird. Im Gegensatz dazu, ist eine schwindende Signalverteilung mit dem Fall $\langle m \rangle = 0$ gleichzusetzen, was direkt zur Rekursionsformel (3.14) der Poissonverteilung führt.

4.5.2 Momente

Die Berechnung der Momente der Gesamtverteilung $P_{\text{PCH}}(n)$ verläuft analog zu (4.33). Die dort gezeigten Berechnungsschritte führen zur Rekursionsformel

$$m_{k,\text{PCH}} = \sum_{j=1}^k \binom{k-1}{j-1} m_{k-j,\text{PCH}} [\lambda + \langle m \rangle m_{j,\text{sm}}] \text{ mit } m_{0,\text{PCH}} = 1 \quad . \quad (4.42)$$

Für verschwindendes Rauschen ($\lambda = 0$) geht diese in die rekursive Momentenformel der Signalverteilung über. Im Gegensatz hierzu führt eine Teilchendichte von $\langle m \rangle = 0$ auf die rekursive Form der Momente der Poissonverteilung (3.15). Die explizite Berechnung der ersten beiden Ordnungen macht deutlich, dass die Momente der Gesamtverteilungen nicht durch eine einfache Addition der Signal- und Rauschmomente entstehen

$$\begin{aligned} m_{1,\text{PCH}} &= \langle m \rangle m_{1,\text{sm}} + \lambda \\ &= m_{1,\text{sig}} + m_{1,\text{noise}} \\ m_{2,\text{PCH}} &= \langle m \rangle^2 m_{1,\text{sm}}^2 + \langle m \rangle m_{2,\text{sm}} + \lambda + \lambda^2 + 2\lambda \langle m \rangle m_{1,\text{sm}} \\ &= m_{2,\text{sig}} + m_{2,\text{noise}} + 2m_{1,\text{noise}} m_{1,\text{sig}} \quad . \end{aligned}$$

Vielmehr treten Mischterme auf, die mit zunehmender Ordnung zu immer komplexeren Ausdrücken führen. Im Gegensatz hierzu erhöht das Rauschen den Mittelwert und die Varianz der Signalverteilung (4.36) einfach um λ

$$\bar{n}_{\text{PCH}} = m_{1,\text{PCH}} = \lambda + \langle m \rangle \bar{\mu} = \lambda + \bar{n}_{\text{sig}} \quad (4.43)$$

$$\sigma_{\text{PCH}}^2 = m_{2,\text{PCH}} - m_{1,\text{PCH}}^2 = \lambda + \langle m \rangle (\bar{\mu}^2 + \bar{\mu}) = \lambda + \sigma_{\text{sig}}^2 \quad . \quad (4.44)$$

Der Mandelschen Q -Faktor der Signalverteilung lässt sich aus den ersten beiden Momenten der Gesamtverteilung und dem Rauschparameter λ berechnen

$$Q_{\text{sig}} = \frac{\sigma_{\text{sig}}^2 - \bar{n}_{\text{sig}}}{\bar{n}_{\text{sig}}} = \frac{\sigma_{\text{PCH}}^2 - \bar{n}_{\text{PCH}}}{\bar{n}_{\text{PCH}} - \lambda} = \frac{m_{2,\text{PCH}} - m_{1,\text{PCH}}^2 - m_{1,\text{PCH}}}{m_{1,\text{PCH}} - \lambda} \quad .$$

4.6 Gemische

Die bisherigen Ergebnisse können ohne Schwierigkeiten auf Gemische von unterschiedlichen Molekülspezies erweitert werden. Die Moleküle einer Spezies k verfügen über ein ihnen eigenes Fluoreszenzverhalten. Jede Spezies wird durch ihr effektives Volumen und ihre Einzelmolekülverteilung $P_{\text{sm}}^k(n)$ eindeutig charakterisiert. Betrachtet man nun ein Gemisch aus s unterschiedlichen Spezies, so entspricht das pro Zeiteinheit detektierte Signal den

Realisierungen der Zufallsvariablen $N_{\text{mix}} = \sum_{k=1}^s N_{\text{sig}}^{(k)} + N_{\text{noise}}$. Die Verteilung jeder Spezies k ist durch die Wahrscheinlichkeitsfunktion (4.28) gegeben. Unter der Voraussetzung der stochastischen Unabhängigkeit der $N_{\text{sig}}^{(k)}$ kann die wahrscheinlichkeitserzeugende Funktion der Gemischverteilung aus dem Produkt

$$\begin{aligned} G_{\text{mix}}(z) &= G_{P_{\text{sig}}^{(1)}}(z) \cdots G_{P_{\text{sig}}^{(s)}}(z) G_{P_{\text{noise}}}(z) = e^{\langle m \rangle^{(1)} (G_{P_{\text{sm}}^{(1)}}(z)-1)} \cdots e^{\langle m \rangle^{(s)} (G_{P_{\text{sm}}^{(s)}}(z)-1)} e^{\lambda(z-1)} \\ &= e^{\sum_{i=1}^s \langle m \rangle^{(i)} (G_{P_{\text{sm}}^i}(z)-1) + \lambda(z-1)} \end{aligned}$$

berechnet werden. Die anschließende Rücktransformation (3.9) verläuft wieder in Analogie zur Signalverteilung, woraus die Rekursionsformel für $P_{\text{mix}}(n > 0)$ abgeleitet werden kann. Für eine vollständige Bestimmung der Verteilung wird noch die Wahrscheinlichkeit der Nullereignisse benötigt. Diese ist durch das Produkt $P_{\text{sig}}^1(0) \cdots P_{\text{sig}}^s(0) P_{\text{noise}}(0)$ gegeben. Als Ergebnis bekommt man für die Gesamtverteilung eines Gemisches aus s unterschiedlichen Molekülspezies

$$P_{\text{mix}}(n) = \begin{cases} e^{-(\sum_{k=1}^s \langle m \rangle^k + \lambda)} & \text{für } n = 0 \\ \frac{\lambda}{n} P_{\text{mix}}(n-1) + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n i P_{\text{mix}}(n-i) \left[\sum_{k=1}^s \langle m \rangle^k P_{\text{sm}}^{(k)}(i) \right] & \text{für } n > 0 \end{cases} \quad (4.45)$$

Die Momente der Gemischverteilung lassen sich mit Hilfe der Rekursionsformel berechnen. Nach Einsetzen von (4.45) in die Definitionsgleichung der Momente (3.6) erhält man nach Umordnung der Reihenglieder

$$m_{k,\text{mix}} = \sum_{j=1}^k \binom{k-1}{j-1} m_{(k-j),\text{mix}} \left[\lambda + \sum_{i=1}^s \langle m \rangle^{(i)} m_{j,\text{sm}}^{(i)} \right] \quad (4.46)$$

Eine übliche Anwendung der Momente ist die Konzentrationsbestimmung der Komponenten eines Gemisches. Dies setzt jedoch voraus, dass die charakteristischen Größen der beteiligten Komponenten bekannt sind. Aus der Verteilung einer gegebenen Konzentration C , können gemäß Gleichung (4.13) und (4.51) das effektive Volumen und die Momente der Einzelmolekülverteilung der entsprechenden Spezies bestimmt werden. Somit lassen sich die charakteristischen Größen für jede Komponente des Gemisches aus einer Eichlösung bekannter Konzentration vermessen. Die durchschnittliche Anzahl an Fluorophoren, welche zur Gemischverteilung beitragen, ist durch

$$\langle m \rangle = \sum_{i=1}^s \langle m \rangle^{(i)} = -\ln[P_{\text{mix}}(n=0)] - \lambda \quad (4.47)$$

bestimmt und kann aus der messbaren Gemischverteilung und dem Rauschparameter λ berechnet werden. Für den Fall eines zweikomponentigen Gemisches ($s = 2$) bilden das erste

Moment des Gemisches $m_{1,\text{mix}}$ und (4.47) ein Gleichungssystem, mit dem $\langle m \rangle^{(1)}$ und $\langle m \rangle^{(2)}$ eindeutig bestimmbar sind. Allgemein kann auf diese Art und Weise ein s -Komponenten Gemisch aus den Momenten $m_{1,\text{mix}}, \dots, m_{s-1,\text{mix}}$ und der mittleren Teilchenanzahl $\langle m \rangle$ des Gemisches zur Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen Spezies analysiert werden.

4.7 Bestimmung der Einzelmolekülgrößen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde aufgezeigt, wie die Gesamtverteilung und ihre Momente aus den entsprechenden Größen des Einzelmoleküls berechnet werden können. In der Praxis ist es jedoch nur möglich, Gesamtverteilungen zu messen. Dies führt zu der Frage, ob die Einzelmolekülfunktion und ihre Momente aus einer bekannten Gesamtverteilung bestimmt werden können. Wie im weiteren Verlauf dieses Abschnitts gezeigt wird, stellt es aus theoretischer Sicht kein Problem dar, die Einzelmolekülverteilung als Funktion der Gesamtverteilung aus der Rekursionsformel bzw. der wahrscheinlichkeitserzeugenden Funktion abzuleiten, ohne zusätzliche Annahmen über die zugrunde liegende molekulare Helligkeit treffen zu müssen. Somit wird eine prinzipielle Möglichkeit eröffnet, die Eigenschaften des Fluoreszenzverhaltens einzelner Teilchen auf der Basis ihrer charakteristischen Einzelmolekülfunktion zu untersuchen.

4.7.1 Einzelmolekülverteilung

Um die Einzelmolekülverteilung aus der Gesamtverteilung zu berechnen, bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Die einfachste besteht darin, die Rekursionsformel (4.41) der Gesamtverteilung nach $P_{\text{sm}}(n)$ aufzulösen. Hierzu wird lediglich der Summand für $i = n$ aus der Summe abgespalten

$$P_{\text{PCH}}(n) = \frac{\lambda}{n} P_{\text{PCH}}(n-1) + \frac{\langle m \rangle}{n} \sum_{i=1}^{n-1} i P_{\text{sm}}(i) P_{\text{PCH}}(n-i) + \langle m \rangle P_{\text{sm}}(n) P_{\text{PCH}}(0)$$

und anschließend der resultierende Ausdruck nach $P_{\text{sm}}(n)$ aufgelöst. Hierbei ist zu beachten, dass die Einzelmolekülfunktion per Definition für $n = 0$ identisch Null ist

$$P_{\text{sm}}(n) = \begin{cases} 0 & \text{für } n = 0 \\ \frac{P_{\text{PCH}}(n) - \left(\frac{\lambda}{n} P_{\text{PCH}}(n-1) + \frac{\langle m \rangle}{n} \sum_{i=1}^{n-1} i P_{\text{sm}}(i) P_{\text{PCH}}(n-i) \right)}{\langle m \rangle P_{\text{PCH}}(0)} & \text{für } n \geq 1 \end{cases} \quad (4.48)$$

Die Rekursionsformel ermöglicht eine kompakte Schreibweise und kann einfach in ein Programm implementiert werden, erschwert jedoch den Einblick in die analytische Struktur

der Funktion. Dafür ist die im Folgenden abgeleitete explizite Form zu (4.48) besser geeignet.

Hierzu wird die PGF der Einzelmolekülverteilung als Funktion der wahrscheinlichkeitserzeugenden Funktion der Gesamtverteilung ausgedrückt

$$G_{P_{\text{sm}}}(z) = \frac{1}{\langle m \rangle} (\ln [G_{P_{\text{PCH}}}(z)] - \lambda(z-1)) + 1 \quad . \quad (4.49)$$

Die n -te Ableitung der erzeugenden Funktion $G_{P_{\text{sm}}}(z)$ führt auf den Zusammenhang zwischen Einzelmolekülfunktion $P_{\text{sm}}(n)$ und der Gesamtverteilung $P_{\text{PCH}}(n)$

$$\begin{aligned} P_{\text{sm}}(n=0) &= G_{P_{\text{sm}}}^{(0)}(z) \Big|_{z=0} = \frac{1}{\langle m \rangle} (-(\langle m \rangle + \lambda) + \lambda) + 1 = 0 \\ P_{\text{sm}}(n=1) &= G_{P_{\text{sm}}}^{(1)}(z) \Big|_{z=0} = \frac{1}{\langle m \rangle} \left(\frac{d}{dz} \ln [G_{P_{\text{PCH}}}(z)] \Big|_{z=0} - \lambda \right) = \frac{1}{\langle m \rangle} \left(\frac{P_{\text{PCH}}(1)}{P_{\text{PCH}}(0)} - \lambda \right) \\ P_{\text{sm}}(n) &= \frac{1}{n!} G_{P_{\text{sm}}}^{(n)}(z) \Big|_{z=0} = \frac{1}{\langle m \rangle} \frac{d^n}{dz^n} \ln [G_{P_{\text{PCH}}}(z)] \Big|_{z=0} \quad . \end{aligned}$$

Nun gilt allgemein für die n -te Ableitung zweier verketteter Funktionen g und f an der Stelle $z \in \mathbb{R}$

$$\frac{1}{n!} (g \circ f)^{(n)}(z) = \sum_{k_1, k_2, \dots, k_n} \frac{g^{(k_1+k_2+\dots+k_n)} \circ f(z)}{k_1! k_2! \dots k_n!} \left(\frac{f^{(1)}(z)}{1!} \right)^{k_1} \left(\frac{f^{(2)}(z)}{2!} \right)^{k_2} \dots \left(\frac{f^{(n)}(z)}{n!} \right)^{k_n} \quad , \quad (4.50)$$

wobei über $k_1, k_2, \dots, k_n \in \mathbb{N}_0$ mit $k_1 + k_2 + \dots + k_n = l$ und $1k_1 + 2k_2 + \dots + nk_n = n$ summiert wird. Im Falle von $G_{P_{\text{sm}}}(z)$ ist die äußere Funktion g durch

$$g(z) = \frac{\ln(z)}{\langle m \rangle}$$

gegeben deren l -te Ableitung

$$g^{(l)} = (-1)^{l-1} \frac{(l-1)!}{\langle m \rangle} \frac{1}{z^l}$$

für $l = 1, 2, \dots$ ist. Die innere Funktion $f = G_{P_{\text{sig}}}(z)$ entspricht der wahrscheinlichkeitserzeugenden Funktion der Gesamtverteilung. Damit gilt

$$\left(\frac{f^{(i)}(z=0)}{i!} \right)^{k_i} = P_{\text{PCH}}^{k_i}(i)$$

und für den Vorfaktor im Zähler der Summe erhält man

$$g^l \circ f(z=0) = (-1)^{l-1} \frac{(l-1)!}{\langle m \rangle} \frac{1}{P_{\text{PCH}}^l(0)} \quad .$$

Letztlich erhält man damit die Einzelmolekülverteilung als Funktion der Gesamtverteilung

$$P_{\text{sm}}(n) = \begin{cases} 0 & \text{für } n = 0 \\ \frac{1}{\langle m \rangle} \left(\frac{P_{\text{PCH}}(1)}{P_{\text{PCH}}(0)} - \lambda \right) & \text{für } n = 1 \\ \frac{1}{\langle m \rangle} \sum_{l=1}^n \frac{(-1)^{l-1} (l-1)!}{P_{\text{PCH}}^l(0)} \sum_{k_1, k_2, \dots, k_n} \frac{P_{\text{PCH}}(1)^{k_1} P_{\text{PCH}}(2)^{k_2} \dots P_{\text{PCH}}(n)^{k_n}}{k_1! k_2! \dots k_n!} & \text{für } n > 1 \end{cases}$$

wobei die Nebenbedingungen, denen die Summationsindices unterliegen, beachtet werden müssen. Schreibt man die ersten Terme in einer expliziten Form auf

$$\begin{aligned} P_{\text{sm}}(0) &= 0 \\ P_{\text{sm}}(1) &= \frac{1}{\langle m \rangle} \left(\frac{P_{\text{PCH}}(1)}{P_{\text{PCH}}(0)} - \lambda \right) \\ P_{\text{sm}}(2) &= \frac{1}{\langle m \rangle} \left(\frac{P_{\text{PCH}}(2)}{P_{\text{PCH}}(0)} - \frac{P_{\text{PCH}}^2(1)}{2P_{\text{PCH}}^2(0)} \right) \\ P_{\text{sm}}(3) &= \frac{1}{\langle m \rangle} \left(\frac{P_{\text{PCH}}(3)}{P_{\text{PCH}}(0)} - \frac{P_{\text{PCH}}(1)P_{\text{PCH}}(2)}{P_{\text{PCH}}^2(0)} + \frac{P_{\text{PCH}}^3(1)}{3P_{\text{PCH}}^3(0)} \right) \end{aligned} ,$$

so wird offensichtlich, dass mit größer werdendem n die Komplexität der Funktion rapide zunimmt. Auch wenn die theoretische Berechnung prinzipiell keine Schwierigkeit darstellt, ergeben sich für die Praxis gewisse Einschränkungen für die Binzeit der Messung. Das Auftreten von $P_{\text{PCH}}^l(0)$, $l = 1, 2, \dots, n$ im Nenner macht die Funktion besonders anfällig gegenüber Schwankungen in den Nullereignissen. Somit kommen für eine Messung nur Binzeiten in Frage, die einen möglichst kleinen statistischen Fehler in $P_{\text{sig}}(0)$ erlauben.

Alternativ besteht die Möglichkeit, die erzeugende Funktion der Signalverteilung direkt aus den Messdaten zu berechnen und anschließend eine numerische Differentiation durchzuführen. Die Frage, ob hierdurch eine erhöhte Stabilität gegenüber Messfehlern erreicht wird, kann jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

4.7.2 Einzelmolekülmomente

Analog zur Rekursionsformel der Gesamtverteilung kann die Rekursionsformel der Momente der Gesamtverteilung nach den Momenten der Einzelmolekülverteilung aufgelöst werden

$$m_{k,\text{sm}} = \begin{cases} \frac{1}{\langle m \rangle} (m_{1,\text{PCH}} - \lambda) & \text{für } k = 1 \\ \frac{1}{\langle m \rangle} \left[m_{k,\text{PCH}} - \left(\sum_{j=1}^{k-1} \binom{k-1}{j-1} m_{(k-j),\text{PCH}} [\lambda + \langle m \rangle m_{j,\text{sm}}] + \lambda \right) \right] & \text{für } k > 1 \end{cases} . \quad (4.51)$$

Für die ersten Ordnungen ergibt sich

$$m_{1,\text{sm}} = \frac{1}{\langle m \rangle} (m_{1,\text{PCH}} - \lambda)$$

$$m_{2,\text{sm}} = \frac{1}{\langle m \rangle} (m_{2,\text{PCH}} - m_{1,\text{PCH}}^2 - \lambda)$$

$$m_{3,\text{sm}} = \frac{1}{\langle m \rangle} (m_{3,\text{PCH}} - 3m_{1,\text{PCH}}m_{2,\text{PCH}} + 2m_{1,\text{PCH}}^3 - \lambda) \quad .$$

Kapitel 5

Gaußförmige lokale molekulare Helligkeit

Die vorangegangenen Betrachtungen haben gezeigt, dass ein Molekültyp in einem Fluoreszenzfluktuationsexperiment (FFE) durch das effektive Volumen und die Einzelmolekülverteilung eindeutig charakterisiert ist. Dies gilt für alle lokalen molekularen Helligkeiten (LMH) $\mu(\vec{r})$, so dass die Theorie für jedes FFE Gültigkeit hat. Von besonderer Bedeutung ist der Spezialfall einer gaußförmigen LMH, für die im weiteren Verlauf dieses Kapitels die eingeführten Konzepte näher spezifiziert werden. Dieses Model hat sich für Anwendungen als Standard durchgesetzt. Die damit eingeführte stark vereinfachte Darstellung der eher komplexen Geometrie realer Helligkeitsfunktionen ist umstritten [19, 21]. In der Praxis jedoch wird dieses Modell z.B. als Basis für die etablierte Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) mit großem Erfolg eingesetzt.

Im Folgenden sei die LMH durch die zentralsymmetrische, dreidimensionale Gaußfunktion

$$\mu(\vec{r}) = \mu(r) = \mu_{\max} \exp\left[-2\frac{r^2}{a^2}\right] \text{ mit } \mu_{\max} = \alpha \Delta T k_{\text{exc}}(\vec{r}_0) \quad (5.1)$$

gegeben. Die maximale Photonendetektionsrate μ_{\max} entspricht der Anzahl an Fluoreszenzphotonen, die von einem Molekül detektiert werden, welches sich am Ort \vec{r}_0 der maximalen Anregungsintensität befindet. Während die Lichtverluste α im Wesentlichen durch den experimentellen Aufbau bestimmt werden, können die Binbreite ΔT und die Anregungsrate k_{exc} bis zu einem gewissen Grad durch den Experimentator frei gewählt werden. Die Tailenbreite a ist der Abstand von der Strahlachse, bei dem die maximale LMH um den Faktor e^{-2} abgefallen ist. Im Falle des zentralsymmetrischen Gaußprofils (5.1) werden ca. 74% aller gemessenen Photonen von Molekülen innerhalb einer Kugel mit dem Radius a detektiert.

Eine obere Schranke ergibt sich für die Binbreite ΔT aus der Bedingung kleiner Binzeiten.

Dies ist in guter Näherung erfüllt, solange die gewählte Binzeit wesentlich kleiner ist als die Diffusionszeit (2.20) des Probemoleküls ($\Delta T \ll \tau_D$) durch das Beobachtungsvolumen. Typische experimentelle Diffusionszeiten sind im Bereich von $\tau_D = 100 \mu\text{s}$ für Farbstoffe wie Rhodamin 6G und mehrere Millisekunden für fluoreszierende Mikropartikel. Die Bedingung kleiner Binzeiten ist z.B. für Binbreiten in der Größenordnung von $\Delta T \approx 1 \cdot 10^{-6} \text{ s}$ für einen typischen konfokalen Aufbau gut erfüllt.

Experimentell wird idealerweise versucht, das Profil (5.1) durch die Einkopplung der gaußförmigen T_0 -Mode eines Laser zu erreichen. Das Gaußmodell (5.1) ist dann solange gültig Näherung, wie ein linearer Zusammenhang zwischen der mittleren Emissionsrate (2.6) und der Anregungsintensität I_{exc} besteht. Große Intensitäten führen aufgrund der endlichen Lebensdauer τ der angeregten Zustände (2.4) zu Sättigungseffekten. Deshalb kann auch die Anregungsrate k_{exc} nicht beliebig groß gewählt werden. Der Kehrwert der Lebensdauer $1/\tau$ stellt eine obere Grenze für die Anregungsrate dar. Für viele Farbstoffe liegt τ im Bereich weniger Nanosekunden, so dass Anregungsraten in der Größenordnung von $k_{\text{exc}} \approx 1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ noch deutlich unter der Sättigungsgrenze liegen.

Im folgenden Abschnitt 5.1 wird das effektive Volumen V_{eff} für das konkrete Beispiel der gaußförmigen LMH (5.1) berechnet. Neben einer Reihenentwicklung wird eine numerisch stabile Integraldarstellung formuliert. Das Verhalten des effektiven Volumens wird in Abhängigkeit von μ_{max} dargestellt und insbesondere im Vergleich zum Beobachtungsvolumen der Fluoreszenzkorrelationsanalyse V_{FCs} diskutiert. Anschließend wird in Abschnitt 5.2 die analytische Form der Einzelmolekülverteilung $P_{\text{sm}}(n)$ abgeleitet. Wie beim effektiven Volumen wird neben der Reihendarstellung eine Integraldarstellung angegeben. Auf Basis der Integraldarstellung werden Einzelmolekülfunktionen für unterschiedliche maximale Photonendetektionsraten numerisch berechnet und anschließend diskutiert. Dem folgt eine analytische Darstellung der Momente der Einzelmolekülfunktion sowie des Erwartungswertes, der Varianz und des Q -Faktors, welche aus den Momenten berechnet werden können. Zuletzt wird der Begriff der mittleren molekularen Helligkeit definiert und anhand der Poisson- und Einzelmolekülverteilung erörtert. Im folgenden Abschnitt 5.3 werden Signalverteilungen für unterschiedliche Konzentrationen berechnet und diskutiert. Analog zur Einzelmolekülverteilung wird eine analytische Form der Momente abgeleitet sowie Mittelwert, Varianz und Q -Faktor berechnet. Das Kapitel endet mit einer Diskussion der Gesamtverteilungen in Abschnitt 5.4.

5.1 Effektives Volumen

Im Fall kleiner Binzeiten ist das effektive Volumen durch das Integral (4.9) gegeben. Dieses kann auf verschiedene Weisen berechnet werden. Für eine Diskussion der analytischen Struktur eignet sich besonders eine Potenzreihenentwicklung. Dabei findet die Entwicklung

$$1 - e^{-\mu} = 1 - \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-\mu)^k}{k!} = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{(k+1)!} \mu^{k+1} \quad (5.2)$$

Anwendung. Aufgrund der gleichmäßigen Konvergenz der Reihe (5.2) ist eine gliedweise Integration möglich, so dass die Integration mit der Summation vertauscht werden kann

$$V_{\text{eff}} = \int_{\mathbb{R}^3} d^3r (1 - e^{-\mu}) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{(k+1)!} \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \mu(\vec{r})^{k+1} \quad .$$

Bei dem nun zu lösenden Integral handelt es sich um die Momente der Gaußfunktion (5.1), die für beliebige Ordnungen k analytisch berechenbar sind

$$\mu_k := \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \mu^k(\vec{r}) = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} a^3 \frac{\mu_{\text{max}}^k}{k^{\frac{3}{2}}} \quad . \quad (5.3)$$

Dies gestattet es, die Glieder der Reihe weiter auszuwerten

$$V_{\text{eff}} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} a^3 \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!} \frac{\mu_{\text{max}}^{k+1}}{(k+1)^{\frac{5}{2}}} \quad .$$

Nach Einführung der Funktion

$$F(\mu_{\text{max}}) := \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!} \frac{\mu_{\text{max}}^{k+1}}{(k+1)^{\frac{5}{2}}} \quad (5.4)$$

separiert das effektive Volumen in Faktoren, die durch die Parameter a und μ_{max} bestimmt sind

$$V_{\text{eff}} = \frac{\pi^{\frac{3}{2}} a^3}{2^{\frac{3}{2}}} F(\mu_{\text{max}}) \quad . \quad (5.5)$$

Aus numerischer Sicht ist die Summendarstellung (5.4) jedoch relativ ungeeignet. Alternativ hierzu kann durch eine Transformation der Integrationsvariablen von $r \rightarrow \mu$ eine einfach zu berechnende integrale Darstellung des effektiven Volumens (4.9) formuliert werden. Hierzu werden die Umkehrfunktion der Gaußfunktion (5.1) und ihre erste Ableitung benötigt

$$r(\mu) = \frac{a}{\sqrt{2}} \sqrt{\ln\left(\frac{\mu_{\text{max}}}{\mu}\right)}, \quad dr = -\frac{a d\mu}{2\sqrt{2}\mu \sqrt{\ln\left(\frac{\mu_{\text{max}}}{\mu}\right)}} \quad .$$

Nach Integration über alle Raumwinkel ergibt sich folgende integrale Darstellung für $F(\mu_{\max})$

$$F(\mu_{\max}) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\mu_{\max}} d\mu \frac{(1 - e^{-\mu})}{\mu} \sqrt{\ln\left(\frac{\mu_{\max}}{\mu}\right)} \quad . \quad (5.6)$$

Das effektive Volumen V_{eff} ist als Funktion von μ_{\max} in Abbildung 5.1 dargestellt. Für kleiner werdendes μ_{\max} strebt das Beobachtungsvolumen gegen den Grenzwert Null. Dadurch können Volumina unter dem Auflösungsvermögen des eingesetzten Mikroskopobjektivs erreicht werden [17].

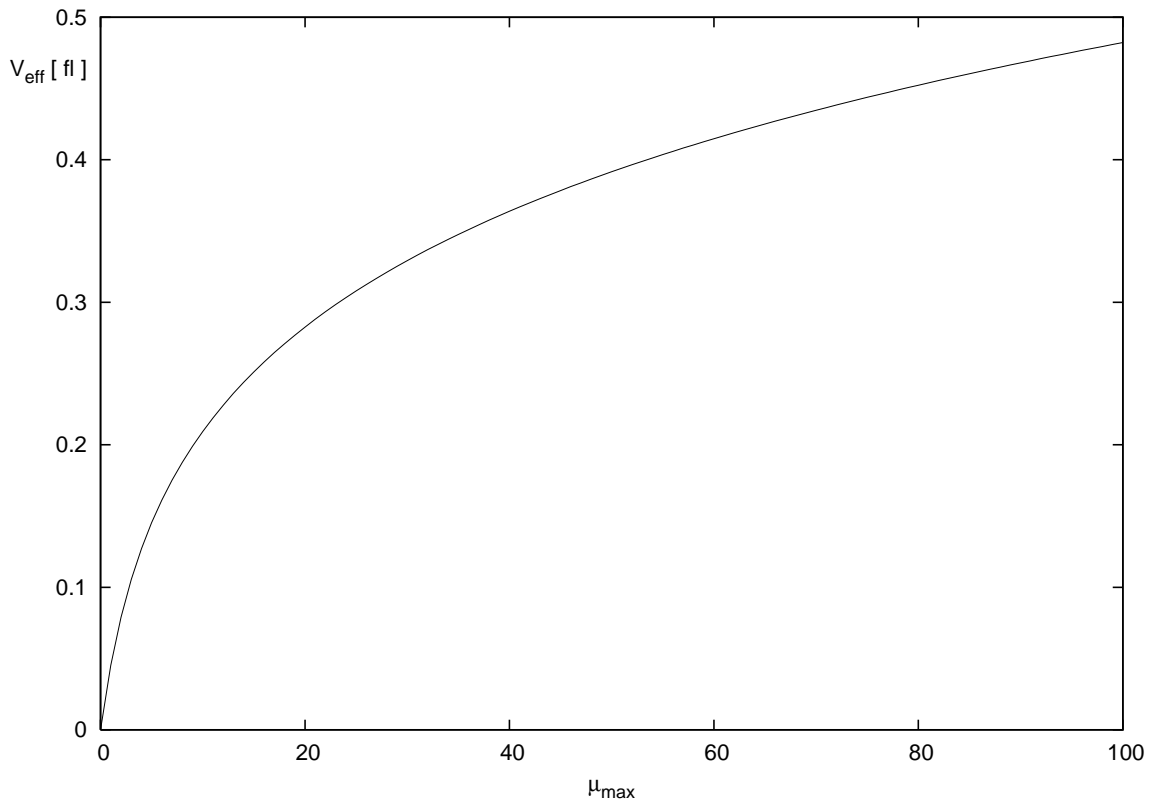


Abbildung 5.1: Funktionaler Verlauf des effektiven Volumens V_{eff} (in Femtolitern) in Abhängigkeit von der maximalen Photonendetektionsrate μ_{\max} . Die Tailenweite des Anregungsprofil beträgt $a = 0.3 \mu\text{m}$.

Die Funktion flacht mit wachsendem μ_{\max} ab, zeigt aber dennoch einen streng monoton steigenden Verlauf. Für beliebig großes μ_{\max} kann auch V_{eff} beliebig groß werden. Ein beliebig großes μ_{\max} ist jedoch – wie bereits oben diskutiert – in realen Experimenten durch die Lebensdauer der Anregungszustände der Fluorophore ausgeschlossen. Für eine konstante Anregungsrate k_{exc} , kann Abb. 5.1 auch als funktionaler Verlauf des effektiven Volumens in Abhängigkeit der Binbreite ΔT interpretiert werden ($\mu_{\max} \propto k_{\text{exc}}(\vec{r}) \Delta T$).

Die Abhängigkeit von der maximalen Photonendetectionsrate unterscheidet V_{eff} grundlegend von dem Beobachtungsvolumen V_{FCS} in der Korrelationspektroskopie, (siehe (2.18)). Während V_{FCS} allein durch den Parameter a bestimmt ist, hängt V_{eff} auch von der eingestrahelten Leistung und den molekularen Eigenschaften des Fluorophores ab.

Im zentralsymmetrischen Fall ist $V_{\text{FCS}} = \pi^{\frac{3}{2}} a^3$. Beide Volumina werden identisch ($V_{\text{FCS}} = V_{\text{eff}}$) für $F(\mu_{\text{max}}) = 2^{\frac{3}{2}}$, siehe (5.5). Aus numerischen Berechnungen ergibt sich diese Identität bei einem Wert von μ_{max} in der Größenordnung von $\mu_{\text{max}} \approx 5.3$. Trotz ihrer physikalischen Unterschiede sind beide Volumina in realistischen experimentellen Bedingungen von derselben Größenordnung.

5.2 Einzelmolekülverteilung

Die entsprechende Einzelmolekülverteilung kann für die LMH (5.1) aus Gleichung (4.14) berechnet werden. Auch hier bietet es sich an, in Analogie zum effektiven Volumen eine Summen- und die dazugehörige integrale Darstellung abzuleiten, um je nach Zweckmäßigkeit auf die verschiedenen Darstellungsformen zurückgreifen zu können. Die Potenzreihenentwicklung der Poissonverteilung

$$\text{Poi}(n, \mu) = \frac{\mu^n}{n!} e^{-\mu} = \frac{\mu^n}{n!} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!} \mu^k \quad (5.7)$$

im Integral (4.14) ist gleichmäßig konvergent. Somit kann auch hier das Integral in die Summe gezogen werden

$$P_{\text{sm}}(n > 0) = \frac{1}{n!} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!} \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int d^3r \mu(r)^{n+k} \quad (5.8)$$

Die Glieder der Reihenentwicklung sind durch die Momente der molekularen Helligkeit

$$\overline{\mu^k} := \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int d^3r \mu(r)^k = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \mu^k \quad (5.9)$$

gegeben (siehe (5.3)). Beim Einsetzen des effektiven Volumens (5.5)

$$\overline{\mu^k} = \frac{\mu_{\text{max}}^k}{k^{\frac{3}{2}}} \frac{\left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} a^3}{V_{\text{eff}}} = \frac{\mu_{\text{max}}^k}{k^{\frac{3}{2}}} \frac{1}{F(\mu_{\text{max}})} \quad (5.10)$$

zeigt sich, dass die Momente $\overline{\mu^k}$ unabhängig von der Tailenweite a sind und vollständig durch die maximale Photonendetectionsrate μ_{max} charakterisiert werden. Dies gilt folglich

auch für die Einzelmolekülverteilung, wie nach dem Einsetzen von (5.10) in (5.8) deutlich wird

$$P_{\text{sm}}(n > 0) = \frac{1}{F(\mu_{\text{max}})} \frac{1}{n!} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!} \frac{\mu_{\text{max}}^{k+n}}{(k+n)^{\frac{3}{2}}} \quad . \quad (5.11)$$

Mit der Definition der Funktion $Q(n, \mu_{\text{max}})$

$$Q(n, \mu_{\text{max}}) := \frac{1}{n!} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!} \frac{\mu_{\text{max}}^{k+n}}{(k+n)^{\frac{3}{2}}} \quad (5.12)$$

kann die Einzelmolekülverteilung durch den Quotienten

$$P_{\text{sm}}(n > 0) = \frac{Q(n, \mu_{\text{max}})}{F(\mu_{\text{max}})} \quad (5.13)$$

dargestellt werden. Aus der Normierung der Einzelmolekülfunktion – siehe (4.15) – folgt unmittelbar, dass die Summation über alle $n > 0$ von $Q(n, \mu_{\text{max}})$ identisch mit $F(\mu_{\text{max}})$ sein muss

$$\sum_{n=0}^{\infty} P_{\text{sm}} = \frac{\sum_{n=1}^{\infty} Q(n, \mu_{\text{max}})}{F(\mu_{\text{max}})} = 1 \Leftrightarrow F(\mu_{\text{max}}) = \sum_{n=1}^{\infty} Q(n, \mu_{\text{max}}) \quad .$$

Dabei ist zu beachten, dass die Einzelmolekülverteilung $P_{\text{sm}}(n)$ für $n = 0$ entsprechend ihrer Definition Null ist.

Analog zu Abschnitt 5.1 kann durch eine Transformation der Variablen von $r \rightarrow \mu$ eine Integraldarstellung der Funktion (5.12) gegeben werden

$$Q(n, \mu_{\text{max}}) = \frac{1}{n!} \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\mu_{\text{max}}} d\mu \mu^{n-1} e^{-\mu} \sqrt{\ln\left(\frac{\mu_{\text{max}}}{\mu}\right)} \quad . \quad (5.14)$$

In Abbildung (5.2) sind die Einzelmolekülverteilungen in einem doppellogarithmischen Maßstab für die maximalen Photonendetektionsraten $\mu_{\text{max}} = 5, 10, 15, 20$ dargestellt. Die Einzelmolekülverteilungen wurden mit Hilfe der Gleichung (5.13) auf der Basis der Integraldarstellungen 5.6 und 5.14 berechnet. Die einzelnen Verteilungen verlaufen relativ flach, bis sie ab einem $n_0 \approx \mu_{\text{max}}$ für größer werdende n schnell abfallen. Dieses Verhalten zeigt deutlich, dass die maximale Photonendetektionsrate eine gewisse Grenze für die zu beobachtenden Photonenzahlen des Einzelmoleküls darstellt. Die Wahrscheinlichkeiten sinken für größere n so schnell ab, dass sie experimentell nur selten zu beobachten sind.

Mit zunehmenden μ_{max} ist auch ein Absinken der Verteilung $P_{\text{sm}}(n)$ für kleine Photonenzahlen n zu beobachten. Dies ist durch die Normierung der Einzelmolekülfunktion

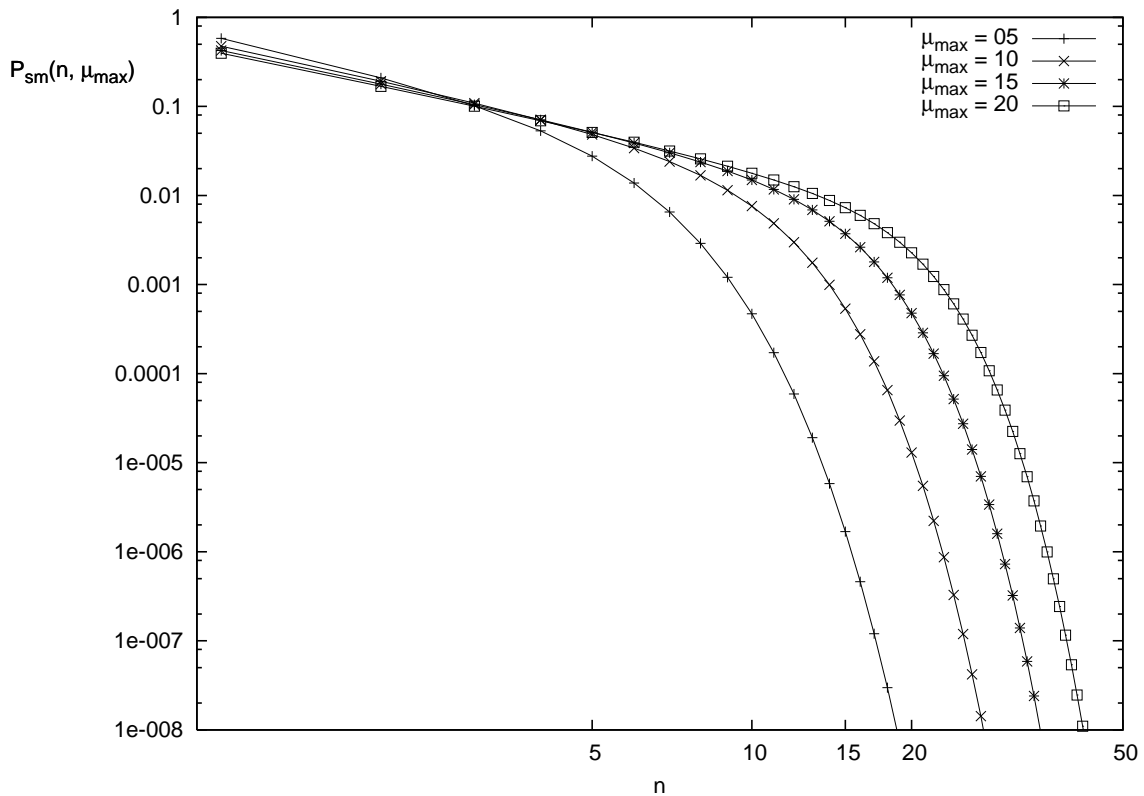


Abbildung 5.2: Einzellmolekülverteilungen $P_{sm}(n)$ für unterschiedliche maximale Photonendektrationsraten $\mu_{max} = 5, 10, 15, 20$. Deutlich ist der starke Abfall der Verteilungen für $n > \mu_{max}$ zu erkennen.

bedingt. Anschaulich bedeutet die Normierung, dass die Fläche unter jedem Graphen in Abbildung 5.2 gleich ist. Somit müssen die Einzellmolekülverteilungen $P_{sm}(n)$ für kleine Photonenzahlen absinken, wenn die Wahrscheinlichkeiten für große n mit zunehmendem μ_{max} anwachsen.

Im Folgenden werden die Momente der Einzellmolekülverteilung behandelt. Wie die Einzellmolekülverteilung und das effektive Volumen können diese Momente benutzt werden, um eine Molekülspezies zu charakterisieren. Die Methode der Momente ist ein Standardverfahren zur Konzentrationsbestimmung und wird im weiteren Verlauf der Arbeit noch detailliert diskutiert. Analytisch lässt sich die Einzellmolekülverteilung $P_{sm}(n)$ durch ihre Momente ausdrücken. Dazu kann in Gleichung (5.8)

$$P_{sm}(n > 0) = \frac{1}{n!} \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!} \mu^{k+n}$$

der Zusammenhang (4.21)

$$\overline{\mu^k} = \sum_{l=1}^k s(k, l) m_{l, \text{sm}}$$

zwischen den Momenten der molekularen Helligkeit $\overline{\mu^k}$ und den Momenten der Einzelmolekülverteilung $m_{k, \text{sm}}$ verwendet werden, (siehe Kapitel 4). Damit ergibt sich

$$P_{\text{sm}}(n) = \frac{1}{n!} \sum_{k=0}^{\infty} \sum_{l=1}^{k+n} \frac{(-1)^k}{k!} s(k+n, l) m_{l, \text{sm}} \quad . \quad (5.15)$$

Für die Praxis ist dieser Zusammenhang von untergeordnetem Interesse, da er nur für unendlich viele Momente gültig ist. Eine Approximation der Verteilung $P_{\text{sm}}(n)$ durch eine endliche Reihe kann nicht unbedingt durch das Hinzufügen höherer Ordnungen verbessert werden. Dies ist das klassische Problem von Stieltjes aus der statistischen Mathematik [45]. Obwohl die Momente $m_{k, \text{sm}}$ nur beschränkt geeignet sind, die Einzelmolekülverteilung zu bestimmen, ermöglichen sie dennoch eine Vielzahl von Aussagen über die charakteristischen physikalischen Eigenschaften einer molekularen Spezies. Für die Gaußfunktion können die Momente $m_{k, \text{sm}}$ analytisch berechnet werden. Aus dem Zusammenhang zwischen den Momenten der Einzelmolekülfunktion und den Momenten der molekularen Helligkeit

$$m_{k, \text{sm}} = \sum_{l=1}^k S(k, l) \overline{\mu^l} \quad (5.16)$$

ergibt sich mit (5.10)

$$m_{k, \text{sm}}(\mu_{\text{max}}) = \sum_{l=1}^k S(k, l) \overline{\mu^l} = \frac{1}{F(\mu_{\text{max}})} \sum_{l=1}^k S(k, l) \frac{\mu_{\text{max}}^l}{l^{\frac{3}{2}}} \quad . \quad (5.17)$$

Diese sind für unterschiedliche $\mu_{\text{max}} = 5, 10, 15, 20$ in Tabelle 5.1 dargestellt. Die Momente wachsen mit steigender Ordnung schnell an. Mit wachsender Ordnung werden auch die

Tabelle 5.1: Momente der Einzelmolekülverteilung $m_{k, \text{sm}}$ der Ordnungen $k = 1, 2, 3, 4$ für unterschiedliche maximale Photonendetectionsraten μ_{max} .

μ_{max}	$m_{1, \text{sm}}$	$m_{2, \text{sm}}$	$m_{3, \text{sm}}$	$m_{4, \text{sm}}$
5	1.83	5.06	20.3	106
10	2.54	11.5	78.3	676
15	3.17	20.0	191	2285
20	3.76	30.4	373	5689

Beiträge von großen Photonenzahlen n immer stärker gewichtet (siehe Abbildung 5.3). Dadurch wird die experimentelle Bestimmung von Momenten hoher Ordnung erschwert. Das erste Moment $m_{1,\text{sm}}$ beschreibt die mittlere Photonenzahl

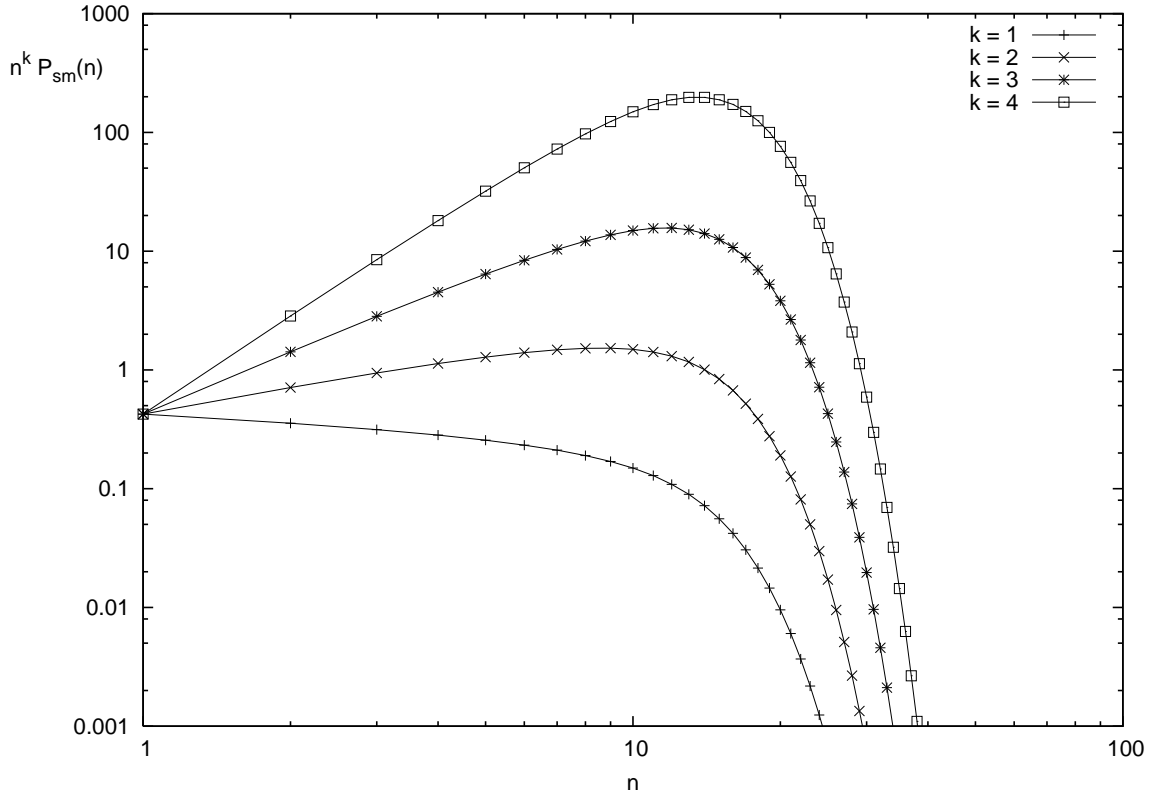


Abbildung 5.3: Beiträge $n^k P_{\text{sm}}(n)$ zu den Momenten der Ordnungen $k = 1, 2, 3, 4$ der Einzelmolekülfunktion. Die maximale Photonendetektionsrate beträgt $\mu_{\text{max}} = 15$.

$$m_{1,\text{sm}} = \bar{n}_{\text{sm}} = \bar{\mu} = \frac{\mu_{\text{max}}}{F(\mu_{\text{max}})} \quad , \quad (5.18)$$

während die Varianz von P_{sm} durch die ersten beiden Momente bestimmt ist

$$\sigma_{\text{sm}}^2 = m_{2,\text{sm}} - m_{1,\text{sm}}^2 = \bar{\mu} + \overline{\mu^2} - \bar{\mu}^2 = \frac{\mu_{\text{max}}}{F(\mu_{\text{max}})} + \mu_{\text{max}}^2 \left(\frac{F(\mu_{\text{max}}) - 2^{\frac{3}{2}}}{2^{\frac{3}{2}} F(\mu_{\text{max}})^2} \right) \quad . \quad (5.19)$$

Die Varianz der Einzelmolekülverteilung entspricht bei einem bestimmten Wert von μ_{max} ihrem Erwartungswert. Dies stellt den Trennungspunkt zwischen super- und subpoissonischer Verteilung dar. Dieser ausgezeichnete Wert von μ_{max} ist gegeben durch die Bedingung $F(\hat{\mu}_{\text{max}}) = 2^{\frac{3}{2}}$ und wird für einen Wert $\hat{\mu}_{\text{max}} \approx 5.3$ erreicht. Dann ist auch das Beobachtungsvolumen der Korrelationsanalyse V_{FCS} identisch mit dem effektiven Volumen. Bei

diesem ausgezeichneten Wert von μ_{\max} wird der Q -Faktor (siehe (4.25)) Null.

$$Q_{\text{sm}} = \left(\frac{\overline{\mu^2}}{\bar{\mu}^2} - 1 \right) \bar{\mu} = \left(\frac{F(\hat{\mu}_{\max})}{2^{\frac{3}{2}}} - 1 \right) \frac{\hat{\mu}_{\max}}{F(\hat{\mu}_{\max})} = 0 \quad (5.20)$$

Die Identität von Erwartungswert und Varianz ist eine spezielle Eigenschaft der Poissonverteilung. Aus der analytischen Struktur der Einzelmolekülfunktion (5.13) kann nicht ausgeschlossen werden, dass $P_{\text{sm}}(n)$ für $\hat{\mu}_{\max}$ in eine Poissonverteilung übergeht. Eine

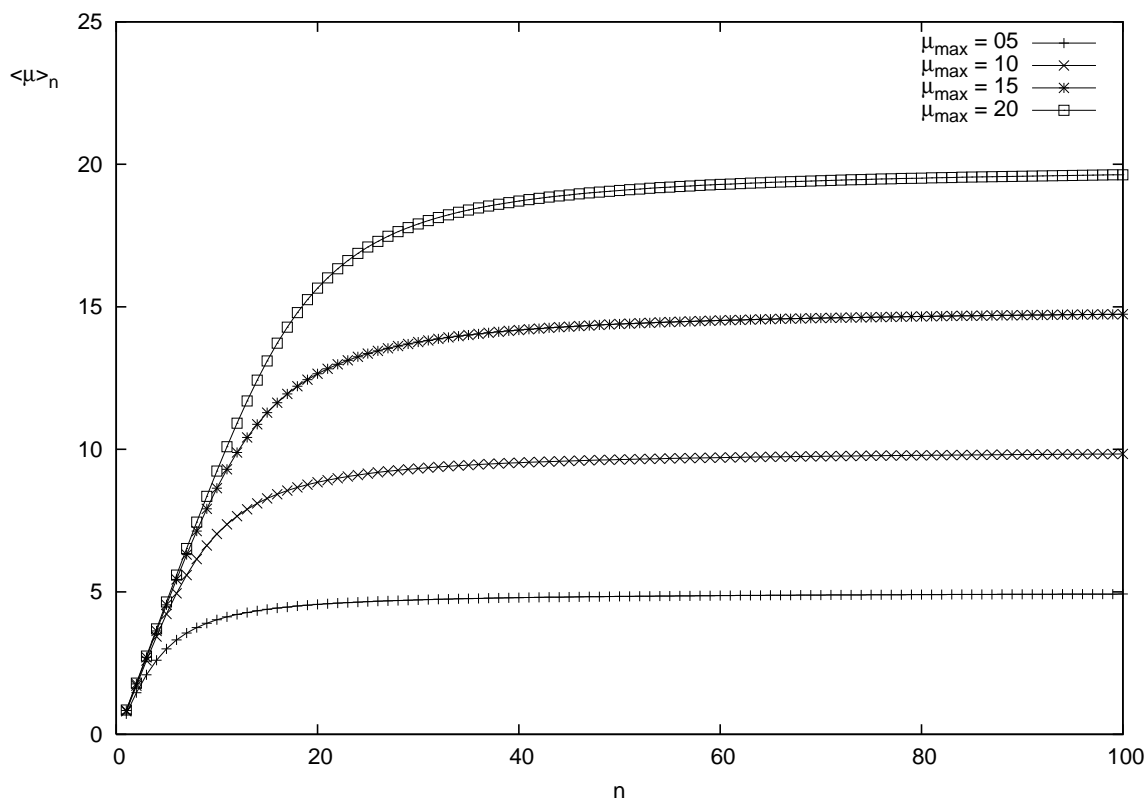


Abbildung 5.4: Mittlere molekulare Helligkeiten $\langle \mu \rangle_n$ für verschiedene maximale Photonendektrationsraten μ_{\max} . Die μ_{\max} stellen eine obere Schranke für die mittlere Rate dar.

Möglichkeit dies zu überprüfen ist durch die mittlere molekulare Helligkeit $\langle \mu \rangle_n$ gegeben. Sie ist die mittlere Rate, die zur Generierung von n Photonen beiträgt und ist für eine beliebige Photonenzahlenverteilung $P(n, \mu)$ wie folgt definiert

$$\langle \mu \rangle_n := (n + 1) \frac{P(n + 1, \mu)}{P(n, \mu)} \quad (5.21)$$

Für eine Poissonverteilung mit beliebigem Parameter μ wird $\langle \mu \rangle_n$ unabhängig von n

$$\langle \mu \rangle_n = (n + 1) \frac{\text{Poi}(n + 1, \mu)}{\text{Poi}(n, \mu)} = (n + 1) \frac{\mu^{n+1} e^{-\mu}}{(n + 1)!} \frac{n!}{\mu^n e^{-\mu}} = \mu \quad .$$

Die mittlere molekulare Helligkeit der Einzelmolekülverteilung

$$\langle \mu \rangle_n := (n+1) \frac{P_{\text{sm}}(n+1, \mu)}{P_{\text{sm}}(n, \mu)} = \frac{\int d^3r \mu \text{Poi}(n, \mu)}{\int d^3r \text{Poi}(n, \mu)} \quad (5.22)$$

ist analytisch nicht lösbar und kann nur numerisch ausgewertet werden. Abbildung (5.4) zeigt die Graphen der $\langle \mu \rangle_n$ der Einzelmolekülverteilungen in Abbildung (5.2). Für kleine Photonenzahlen n ist ein linearer Anstieg der mittleren Photonenzahl zu beobachten. Für $n > n_0 \approx \mu_{\text{max}}$ flachen die Kurven stark ab, wobei sie sich mit zunehmenden Photonenzahlen n immer stärker der maximalen molekularen Helligkeit μ_{max} annähern. Im Gegensatz hierzu ist die mittlere molekulare Helligkeit einer Poissonverteilung $\text{Poi}(n, \mu_{\text{max}})$ konstant $\langle \mu \rangle_n = \mu_{\text{max}}$. Der Vergleich zeigt, dass die Einzelmolekülverteilungen $P_{\text{sm}}(n)$ mit zunehmender Photonenzahl n sich immer stärker einer Poissonverteilung mit entsprechendem μ_{max} annähern. Aus physikalischer Sicht werden große Photonenzahlen n überwiegend von Molekülen detektiert, die sich am Ort der maximalen Anregungsintensität befinden. Mit zunehmendem n wird es immer unwahrscheinlicher, dass detektierte Photonen von Molekülen stammen, die sich nicht im Maximum der Anregungsintensität befunden haben. Infolge dessen wird die Einzelmolekülverteilung im Schwanzbereich immer stärker durch den poissonischen Anteil $\text{Poi}(n, \mu_{\text{max}})$ am Ort des Maximums dominiert.

Die mittlere molekulare Helligkeit $\langle \mu \rangle_n$ einer Einzelmolekülfunktion kann dazu verwendet werden, die maximale Photonendetektionsrate μ_{max} einer beliebigen lokalen molekularen Helligkeit $\mu(\vec{r})$ zu bestimmen. Dies setzt jedoch voraus, dass die Verteilung im Schwanzbereich mit hinreichender Genauigkeit bekannt ist. Dann kann μ_{max} aus dem Konvergenzverhalten von $\langle \mu \rangle_n$ für $n \rightarrow \infty$ bestimmt werden. Unglücklicherweise ist dieser Bereich der Verteilung im Experiment schwer zu vermessen. Die Wahrscheinlichkeiten für große Photonenzahlen n nehmen stark ab, so dass diese selten beobachtet werden und die entsprechenden relativen Häufigkeiten mit großen statistischen Fehlern behaftet sind.

5.3 Signalverteilung

Während die Einzelmolekülverteilung allein durch die maximale Photonendetektionsrate μ_{max} bestimmt ist, tritt bei der Signalverteilung die mittlere Teilchenanzahl $\langle m \rangle$ bzw. die Konzentration $\langle m \rangle = C V_{\text{eff}}$ als zusätzlicher Parameter auf. Die mittlere Teilchenzahl entspricht der durchschnittlichen Anzahl an Molekülen, die zum detektierten Signal beitragen und beeinflusst entscheidend den Verlauf der Verteilung.

Um dies zu veranschaulichen, sind in Abb. (5.5) Signalverteilungen $P_{\text{sig}}(n, \langle m \rangle)$ in einem doppelt logarithmischen Maßstab für $\langle m \rangle = 15.9, 1.59, 0.159$ und 0.0159 dargestellt. Diese wurden mit der Rekursionsformel (4.31) für die Gaußfunktion (5.1) mit einer maximalen

Photonendetektionsrate von $\mu_{\max} = 15$ und einem Fokusparameter von $a = 0.3 \mu\text{m}$ berechnet. Aus den für μ_{\max} und a gewählten Werten resultiert ein effektives Volumen von $V_{\text{eff}} = 0.15 \text{ fl}$, und die obigen mittleren Teilchenanzahlen entsprechen Konzentration von $c = 10^{-7} \text{ M}$, 10^{-8} M , 10^{-9} M und 10^{-10} M .

Die Wahrscheinlichkeiten der Nullereignisse $P_{\text{sig}}(n = 0)$ nehmen mit zunehmender Teilchenzahl $\langle m \rangle$ ab. Dagegen wächst $P_{\text{sig}}(n)$ für alle $n > 0$ mit wachsenden $\langle m \rangle$ anfänglich an ($\langle m \rangle = 0.0159, 0.159$ und 1.59). Erst für große Teilchenzahlen ($\langle m \rangle = 15.9$) kommt es zu einem deutlichen Absinken im Bereich kleiner Photonenzahlen n , während die Wahrscheinlichkeit für große Photonenzahlen zunimmt. Der Grund für dieses Verhalten liegt

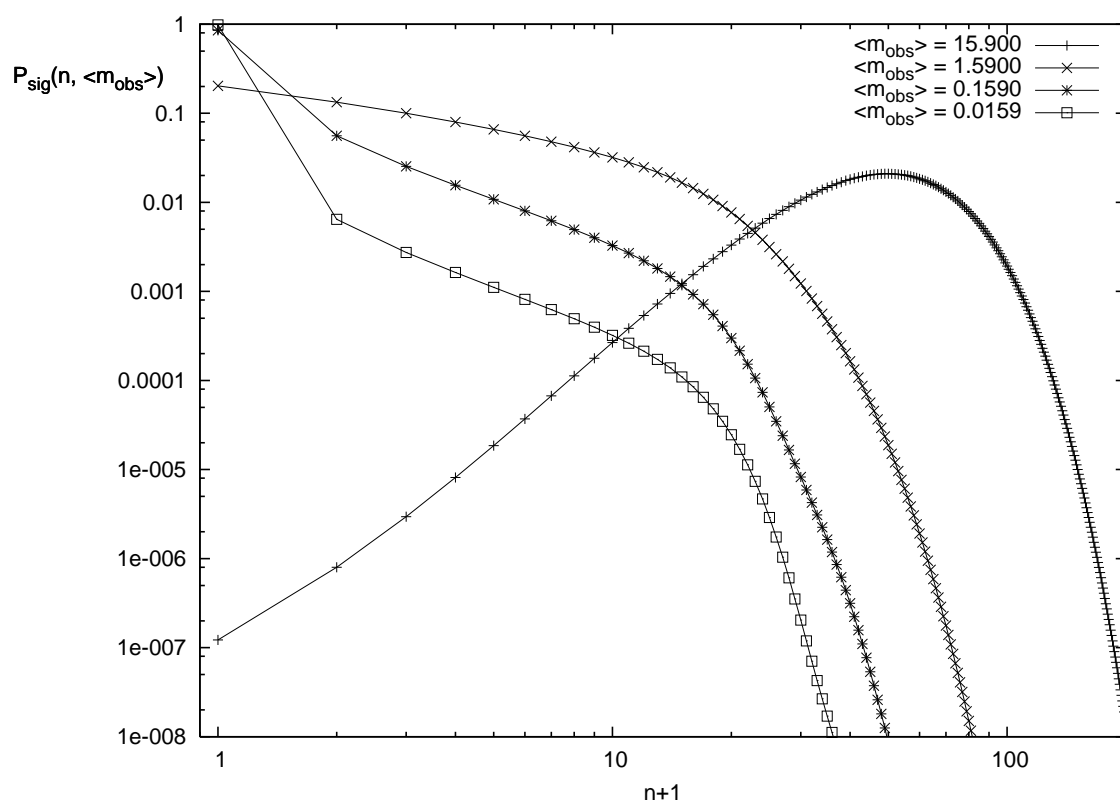


Abbildung 5.5: Signalverteilungen für mittlere Teilchenzahlen von $\langle m \rangle = 15.9, 1.59, 0.159$ und 0.0159 . Für die Berechnung der dargestellten Verteilungen wurde ein effektives Volumen von $V_{\text{eff}} = 0.15 \text{ fl}$ benutzt.

in der Anzahl der auftretenden Mehrfachereignisse. Ein Mehrfachereignis liegt dann vor, wenn zwei oder mehr Moleküle innerhalb eines Zeitintervalls ΔT zum detektierten Signal beitragen. Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten von Mehrfachereignissen ist durch die Poissonverteilung (4.11) gegeben. Für kleine, mittlere Teilchenzahlen $\langle m \rangle$ kommen diese nur sehr selten vor, so dass sie vernachlässigt werden können. Dann verläuft die Signal-

verteilung für $n > 0$ proportional zur Einzelmolekülverteilung, wie auch aus der Näherung (4.32) ersichtlich ist. Anschaulich gesprochen wächst mit zunehmender Konzentration die Wahrscheinlichkeit, mindestens ein Molekül im effektiven Volumen vorzufinden. Dies bewirkt eine Abnahme der Nullereignisse für steigende Konzentrationen. In Konzentrationsbereichen, in denen Mehrfachereignisse an Bedeutung gewinnen ($\langle m \rangle \gg 1$), ändert sich dieses Verhalten. Geringe Photonenzahlen werden immer seltener beobachtet, während sich insgesamt der Schwerpunkt der Verteilung zu großen n hin verschiebt.

Der Einfluss der Mehrfachereignisse wird offensichtlich, wenn man die mit $\langle m \rangle^{-1}$ skalierten Signalverteilungen zusammen mit der zugrundeliegenden Einzelmolekülverteilung darstellt, wie in Abb. 5.6 illustriert. Für $\langle m \rangle \ll 1$ wird die Signalverteilung recht gut durch

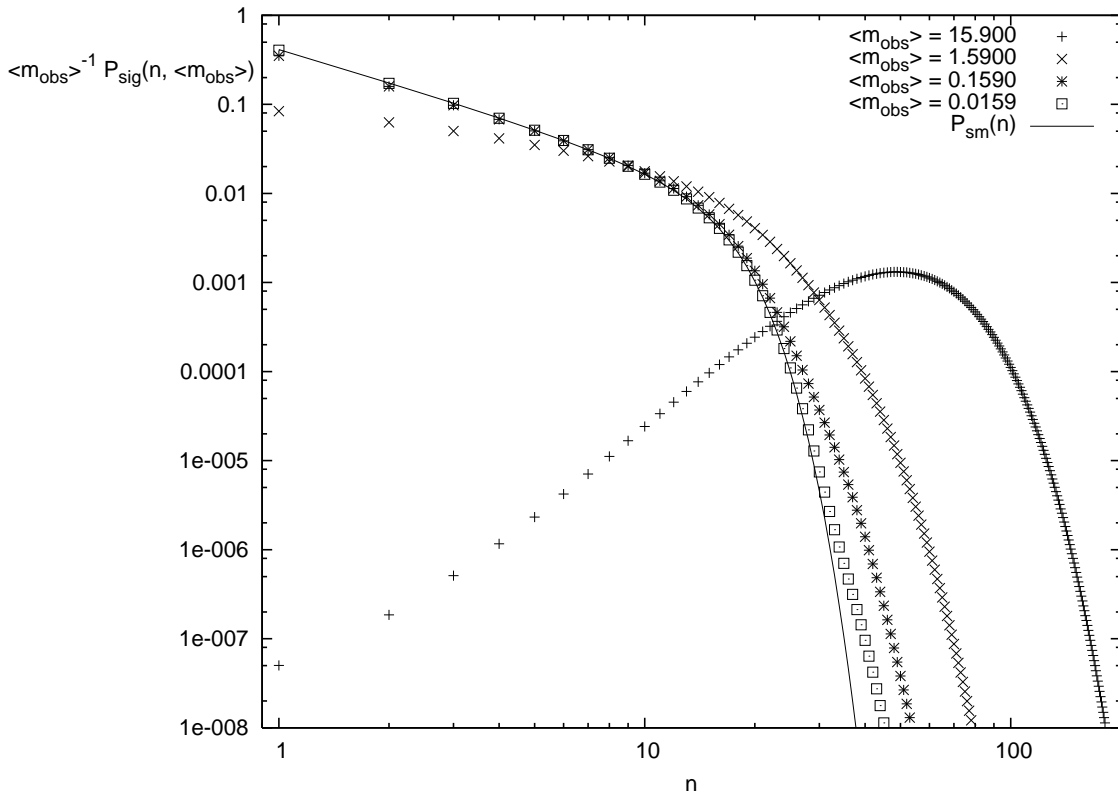


Abbildung 5.6: Signalverteilungen skaliert mit $1/\langle m \rangle$ für mittlere Teilchenanzahlen von $\langle m \rangle = 15.9, 1.59, 0.159$ und 0.0159 . Die verwendete Einzelmolekülfunktion ist als durchgezogene Linie dargestellt.

die skalierten Einzelmolekülverteilung beschrieben (siehe auch Näherung (4.32)). Abweichungen treten erst für sehr große Photonenzahlen n auf. Dies ist eine Folge der seltenen, aber dennoch vorhandenen Mehrfachereignisse. Erste deutliche Abweichungen treten bei $\langle m \rangle = 1.59$ bzw. einer Konzentration von $c = 1 \cdot 10^{-8}$ M zutage, da hier bereits ein nicht

mehr vernachlässigbarer Anteil an Mehrfachereignissen stattfindet.

Mit den Momenten der molekularen Helligkeit (5.10) der Gaußfunktion können die Momente der Signalverteilung als Funktion der maximalen Photonendetektionsrate μ_{\max} und der mittleren Teilchenzahl $\langle m \rangle$ ausgedrückt werden

$$m_{k,\text{sig}} = \frac{\langle m \rangle}{F(\mu_{\max})} \sum_{j=1}^k \sum_{l=1}^j \binom{k-1}{j-1} m_{k-j,\text{sig}} S(j, l) \frac{\mu_{\max}^l}{l^{\frac{3}{2}}} \quad . \quad (5.23)$$

In Tabelle 5.2 sind die Momente $m_{k,\text{sig}}$ der ersten vier Ordnungen für mittlere Teilchenzahlen von $\langle m \rangle = 15.9, 1.59, 0.159$ und 0.0159 aufgelistet.

Für den Erwartungswert \bar{n}_{sig} und die Varianz σ_{sig}^2 ergibt sich aus den ersten beiden Momenten

$$\bar{n}_{\text{sig}} = m_{1,\text{sig}} = \langle m \rangle \bar{\mu} = \langle m \rangle \frac{\mu_{\max}}{F(\mu_{\max})} \quad (5.24)$$

$$\sigma_{\text{sig}}^2 = m_{2,\text{sig}} - m_{1,\text{sig}}^2 = \langle m \rangle (\bar{\mu} + \bar{\mu}^2) = \langle m \rangle \frac{\mu_{\max}}{F(\mu_{\max})} \left(1 + \frac{\mu_{\max}}{2^{\frac{3}{2}}} \right) \quad . \quad (5.25)$$

Sowohl der Mittelwert als auch die Varianz der Signalverteilung sind proportional zur mittleren Teilchenanzahl $\langle m \rangle$. Eine Erhöhung der Konzentration hat eine gleichmäßige Skalierung von Schwerpunkt und Breite der Signalverteilung zur Folge. Der Anstieg von \bar{n}_{sig} und σ_{sig}^2 bei einer Erhöhung der eingekoppelten Anregungsintensität ($\mu_{\max} \propto I_{\text{exc}}$) ist in Abbildung 5.7 dargestellt ($\langle m \rangle = 1$). Beide Größen wachsen nichtlinear mit μ_{\max} . Das Verhältnis von Varianz zu Mittelwert ändert sich bei einer Steigerung der Intensität. So lassen sich die Auswirkungen von unterschiedlicher Konzentration von einer Veränderung der Laseranregungsleistung unterscheiden. Das Verhältnis

$$\frac{\sigma_{\text{sig}}^2}{\bar{n}_{\text{sig}}} = \left(1 + \frac{\mu_{\max}}{2^{\frac{3}{2}}} \right)$$

Tabelle 5.2: Momente $m_{k,\text{sig}}$ der ersten vier Ordnungen ($k = 1, 2, 3, 4$) von Signalverteilungen für unterschiedliche Konzentrationen C . Die maximale Photonendetektionsrate beträgt $\mu_{\max} = 15.0$ und das effektive Volumen ist $V_{\text{eff}} = 0.15$ fl.

$\langle m \rangle$	$C[M]$	$m_{1,\text{sig}}$	$m_{2,\text{sig}}$	$m_{3,\text{sig}}$	$m_{4,\text{sig}}$
15.9	$1 \cdot 10^{-7}$	48.0	2608	157181	$1.04 \cdot 10^7$
1.59	$1 \cdot 10^{-8}$	4.80	53.3	836	16475
0.159	$1 \cdot 10^{-9}$	0.480	3.26	33.4	433
0.0159	$1 \cdot 10^{-10}$	0.0480	0.305	2.93	35.4

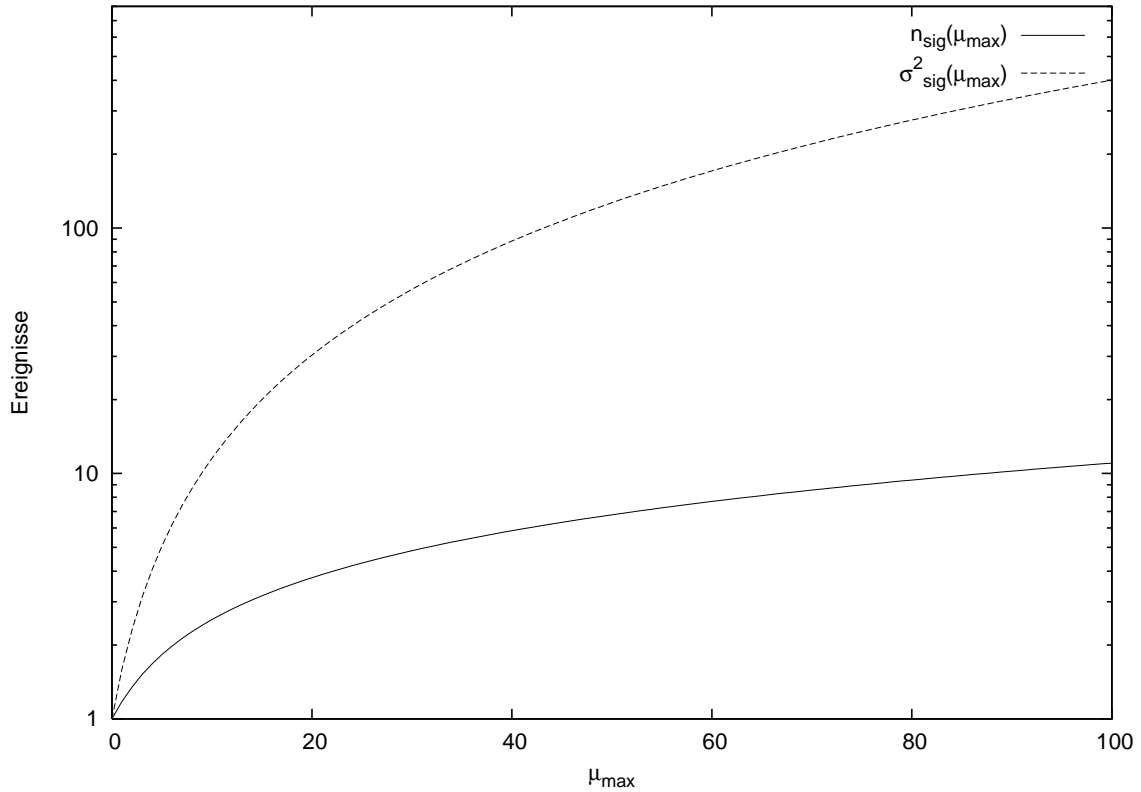


Abbildung 5.7: Mittelwert und Varianz der Signalverteilung in Abhängigkeit von der maximalen Photonendetectionsrate μ_{\max} für eine mittlere Teilchenanzahl von $\langle m \rangle = 1$.

wächst linear mit μ_{\max} an.

Aus der Rekursionsformel für die Momente (5.23) kann der Q -Faktor der Signalverteilung explizit berechnet werden

$$Q_{\text{sig}} = \frac{\sigma_{\text{sig}}^2 - \bar{n}_{\text{sig}}}{\bar{n}_{\text{sig}}} = \frac{m_{2,\text{sig}} - m_{1,\text{sig}}^2 - m_{1,\text{sig}}}{m_{1,\text{sig}}} = \frac{\overline{\mu^2}}{\bar{\mu}} = \frac{\mu_{\max}}{2^{\frac{3}{2}}}. \quad (5.26)$$

Damit ist es möglich, die maximale Photonendetectionsrate aus den ersten beiden Momenten der Signalverteilung zu bestimmen.

5.4 Gesamtverteilung

Die Gesamtverteilung entsteht durch Faltung der Signalverteilung mit einer poissonischen Rauschverteilung. Letztere ist allein durch einen Parameter λ bestimmt, welcher der konstanten mittleren Zahl der Rauschereignisse entspricht. Um die Auswirkungen von λ auf die Gesamtverteilung zu veranschaulichen, sind in Abbildung 5.8 verschiedene Signalver-

teilungen mit Rauschanteil dargestellt. Dazu wurden die in Abbildung 5.5 dargestellten Signalverteilungen mit einem Rauschterm ($\lambda = 0.2$) gefaltet. Der Vergleich der Gesamt-

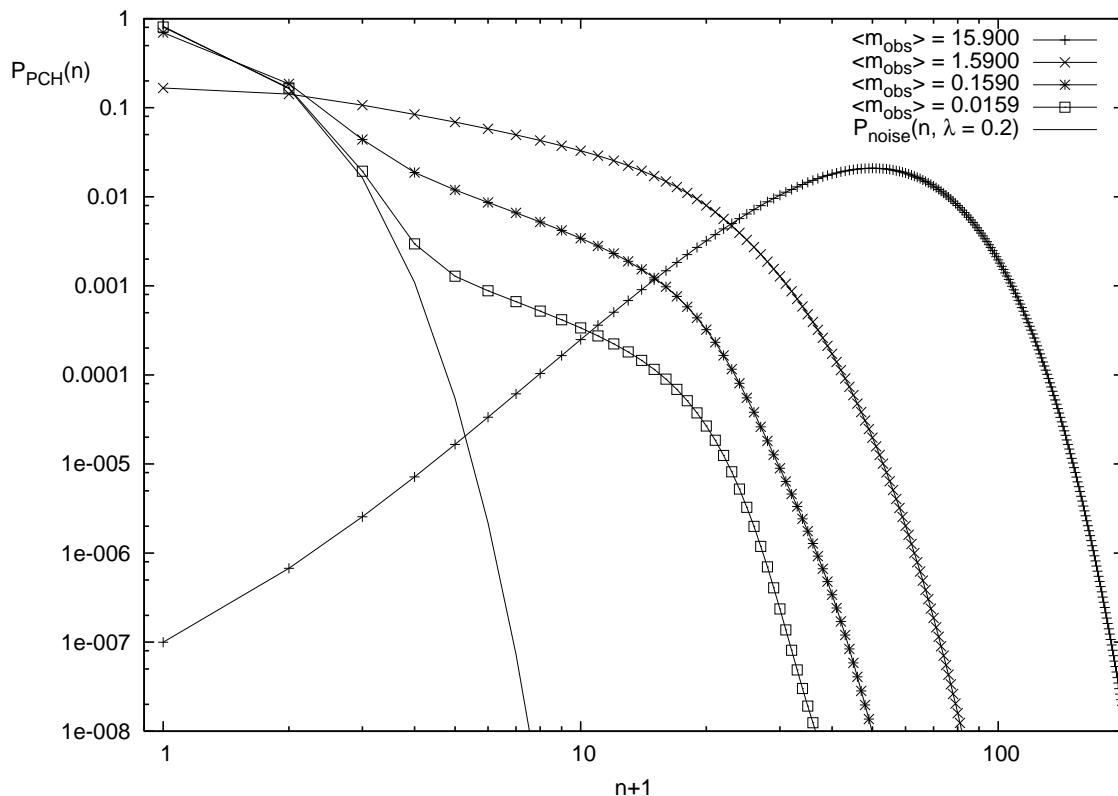


Abbildung 5.8: Gesamtverteilungen für mittlere Teilchenzahlen von $\langle m \rangle = 15.9, 1.59, 0.159$ und 0.0159 mit einer maximalen Photonennrate von $\mu_{\max} = 16.949$ und einem durchschnittlichen Rauschlevel von $\lambda = 0.2$. Die durchgezogene Linie zeigt die poissonische Rauschverteilung, der sich die Photonenzahlenverteilungen mit kleiner werdender Teilchenzahl immer deutlicher annähern.

verteilung mit der reinen Signalverteilung in Abbildung 5.5 zeigt, dass wesentliche Unterschiede nur für kleine Photonenzahlen n sichtbar werden. Für kleine Konzentrationen ($\langle m \rangle = 0.159, 0.0159$) sind die Abweichungen ausgeprägter als bei hohen Konzentrationen. Die Verteilungen für $\langle m \rangle = 1.59$ bzw. 15.9 werden so gut wie überhaupt nicht durch das Rauschen beeinflusst.

Kapitel 6

Simulierte Photonenzahlverteilungen

Im vorhergehenden Kapitel wurden die Photonenzahlverteilungen für eine gaußförmige Anregungsintensität berechnet und diskutiert. In diesem Kapitel folgt nun eine Anwendung der in Kapitel 4 vorgestellten Konzepte auf simulierte Fluoreszenzfluktuationsexperimente (FFE). Die Simulationsdaten enthalten die stochastischen Schwankungen, wie sie auch im Experiment zu erwarten sind, und stellen somit einen ersten Test für die Leistungsfähigkeit der entwickelten Konzepte dar. Experimentell sind die Abbildungseigenschaften der Apparatur und die reale Form des Anregungsprofils nur schwer zu bestimmen. Diese Schwierigkeiten werden hier durch die vorgegebenen Bedingungen in der Simulation umgangen. Die Simulation eignet sich dazu, eine experimentelle Umgebung mit scharf definierten Bedingungen abzubilden.

Das Kapitel beginnt in Abschnitt 6.1 mit einer Beschreibung des Simulationsprinzips. Dem folgt in Abschnitt 6.2 eine Zusammenfassung der Basisparameter, die im Wesentlichen allen simulierten Datensätzen zugrunde liegen. In 6.3 erfolgt in zwei Unterabschnitten die Analyse der simulierten Photonenzahlverteilungen anhand des in dieser Arbeit vorgestellten analytischen Modells. Im ersten Unterabschnitt 6.3.1 werden Einzelmolekül- und Signalverteilungen unterschiedlicher Konzentrationen mit den vorgegebenen Farbstoff- und Apparaturparametern *a priori* berechnet und den simulierten Verteilungen gegenübergestellt. Die Momente und der Wert des Mandelschen Q -Faktors der simulierten Verteilungen werden berechnet und mit den entsprechenden Werten aus dem analytischen Modell verglichen. Umgekehrt werden in Unterabschnitt 6.3.2 die Einzelmolekülverteilung und ihre charakteristischen Größen aus den simulierten Signalverteilungen berechnet, wobei nur deren Konzentration als bekannt vorausgesetzt wird. Dies entspricht der Vorgehensweise, wie sie auch bei realen experimentellen Daten durchgeführt wird. Das Kapitel endet in Abschnitt 6.4 mit Betrachtungen zu Grenzen der ausgearbeiteten Theorie, insbesondere für lange Binzeiten.

6.1 Simulationsprinzip

Die Simulation basiert auf einem Random-Walk von virtuellen Molekülen, die sich entlang der Kreuzungspunkte eines dreidimensionalen, kubischen Gitters bewegen können. Das Volumen des Gitters V_g ergibt sich aus der Gitterkonstante g und der Anzahl der Gitterpunkte pro Seitenlänge N_g zu $V_g = ((N_g - 1)g)^3$. Nach jedem Zeitschritt δt erfolgt ein Sprung der Moleküle zu einem der zufällig ausgewählten benachbarten Gitterpunkte. Dabei kann das Simulationsvolumen auch verlassen werden. Die Dauer der Zeitschritte wird mit Hilfe der Einstein-Smoluchovsky-Gleichung $\delta t = g^2/(6D)$ aus der vorgegebenen Diffusionskonstante D und der Gitterkonstante g berechnet. Die Erzeugung neuer Teilchen erfolgt zufällig am Rand des Simulationsvolumens mit einer von der vorgegebenen Konzentration C abhängigen Rate.

Die Detektion der Photonen eines virtuellen Moleküls geschieht unter der Annahme, dass der Detektionsprozess innerhalb des Zeitintervalls δt durch einen Poissonprozess mit der lokalen molekularen Helligkeit (LMH) $\mu(\vec{r})$ beschrieben werden kann. Die molekulare Helligkeit $\mu(\vec{r})$ ist durch eine kugelsymmetrische, im Koordinatenursprung zentrierte Gaußfunktion mit Tailenparameter a realisiert

$$\mu(\vec{r}) = \mu_{\max} \exp \left[-2 \frac{\vec{r}^2}{a^2} \right] \quad . \quad (6.1)$$

Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Laserleistung P_0 hinreichend klein gewählt ist, so dass die Bedingungen der linearen Ein-Photonen-Anregung (OPE) erfüllt sind. Die maximale Photonendetektionsrate μ_{\max} wird durch

$$\mu_{\max} = \alpha \Delta T \frac{\lambda \sigma P_0}{hc 2\pi a^2}$$

aus der Binzeit ΔT , dem konstanten Lichtverlustfaktor α , der Wellenlänge λ und dem Absorptionsquerschnitt σ bei dieser Wellenlänge bestimmt. Dabei wird implizit angenommen, dass die von den Molekülen emittierte Fluoreszenzintensität proportional zur Anregungsintensität des Lasers ist. Der als ortsunabhängig angenommene Lichtverlustfaktor α kann aus der numerischen Apertur des Objektivs $NA = N \sin(\alpha)$, den Transmissionseigenschaften ϵ der Optik und der Quanteneffizienz q des Detektors durch $\alpha = q \text{RA}(NA) \epsilon$ berechnet werden. Der Raumwinkelanteil $\text{RA}(NA)$ entspricht dem prozentualen Anteil $\Omega_{\text{MO}}/4\pi$ des von dem virtuellen Objektiv abgedeckten Raumwinkels $\Omega_{\text{MO}} = \int_0^\alpha d\omega$, der aus dem Kegel mit Öffnungswinkel $\alpha = \arcsin(NA/N)$ berechnet werden kann.

Aufgrund der reproduktiven Eigenschaft der Poissonverteilung ist es möglich, die Detektion der Photonen aller Moleküle durch einen einzigen Zufallsprozess zum Ende der Binzeit ΔT zu generieren. Hierzu wird zu jedem Zeitschritt δt_i der Beitrag $\Delta_i \mu := \sum_{l=1}^m \delta t \mu(\vec{r}_l) / \Delta T$

berechnet. Die Beiträge $\Delta_i\mu$ zu einer Binzeit ΔT werden einfach aufsummiert und ein poissonischer Zufallsgenerator aufgerufen. Die von ihm erzeugte Zufallszahl entspricht der Anzahl der innerhalb des Zeitintervalls ΔT von allen Molekülen detektierten Fluoreszenzphotonen.

Neben der Simulation konventioneller FFE, bietet die Simulation die Möglichkeit, reine Einzelmolekülsignale zu erzeugen. In diesem Einzelmolekülmodus wird sichergestellt, dass immer nur ein Molekül Photonen generiert. Eine weitere Betriebsart, die zur Untersuchung von Teilaspekten bei FFE implementiert wurde, gestattet es, den Random-Walk eines einzelnen Moleküls zu Beginn jeder Binzeit von einer vorgegebenen Position \vec{r}_0 starten zu lassen.

6.2 Simulationsparameter

Die obige Beschreibung des Simulationsprinzips macht deutlich, dass zur Generierung eines Datensatzes verschiedene Parameter festgelegt werden müssen. Bei den folgenden Simulationen wird davon ausgegangen, dass die emulierten FFE an derselben Apparatur mit einem virtuellen Standardfarbstoff durchgeführt werden. Aus diesem Grund ist für einen Großteil der simulierten Datensätze ein identischer Parametersatz verwendet worden, der in Tabelle 6.1 aufgelistet ist. Die dort aufgeführten Werte gelten für alle folgenden Simulationen, sofern im Text nicht explizit eine Änderung erwähnt ist.

Die Basisparameter in Tabelle 6.1 sind in drei Kategorien unterteilt. Die Kategorie "Simulationsgüte" umfasst alle Parameter, die unmittelbar mit der Qualität der simulierten Datensätze zusammenhängen und in realen Experimenten keine Rolle spielen. Neben der Simulationsdauer beeinflussen sie die Fehler, welche zwangsläufig bei der Diskretisierung eines kontinuierlichen Prozesses entstehen. Die Gitterkonstante g ist hinreichend klein gewählt, so dass die Anregungsrate während der daraus resultierenden Zeitschritte als konstant betrachtet werden kann.

Zur Kategorie "Farbstoff" gehören alle diejenigen Parameter, welche unmittelbar mit dem Fluoreszenzverhalten der simulierten Moleküle zusammenhängen und somit in einem realen Experiment nicht unabhängig voneinander gewählt werden können. Hierzu gehören die Diffusionskonstante D , die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f , die Fluoreszenzlebensdauer τ und der Absorptionsquerschnitt σ . Die in der Simulation verwendeten Parameter orientieren sich dabei an Werten, die aus Messungen an dem Standardfarbstoff Rh6G ermittelt wurden [8, 50].

Die Parameter der Kategorie "Apparatur" können vom Experimentator innerhalb eines

Tabelle 6.1: Basisparameter der Simulation, wie sie für den Großteil der generierten Datensätze verwendet wurden. Abweichungen hiervon sind explizit im Text erwähnt.

Bezeichnung	Variable	Wert	Einheit	Kategorie
Gittervolumen	V_g	$1.668 \cdot 10^{-17}$	m^3	
Gitterkonstante	g	$5 \cdot 10^{-9}$	m	Simulationsgüte
Auflösung des Gitters	N_g	512		
Fluoreszenzlebensdauer	τ	$1 \cdot 10^{-9}$	s	
Diffusionskonstante	D	$2.8 \cdot 10^{-10}$	m^2s^{-1}	
Absorptionsquerschnitt	σ	$2 \cdot 10^{-20}$	m^2	Farbstoff
Fluoreszenzquantenausbeute	Φ_f	1.0		
Binbreite	ΔT	$1 \cdot 10^{-6}$	s	
Laserleistung	P_0	$200 \cdot 10^{-6}$	W	
Wellenlänge	λ	$476 \cdot 10^{-9}$	m	
Fokusradius (transv.)	ω_f	$0.3 \cdot 10^{-6}$	m	Apparatur
Fokusradius (long.)	ω_z	$0.3 \cdot 10^{-6}$	m	
Numerische Apertur	NA	1.25		
Detektionseffizienz	q	1.0		
Anzahl simulierter Interv.	N	$1 \cdot 10^7$		

gewissen Bereichs frei gewählt werden. Argon-Ionen-Laser ermöglichen es z.B. gaußförmige Anregungsprofile bei diversen Wellenlängen λ zu erzeugen, wobei die eingestrahelte Laserleistung P_0 über Filter stufenlos einstellbar ist. Eine große Auswahl an Mikroskopobjektiven mit großen numerischen Aperturen (NA) gestattet es, Anregungsprofile mit unterschiedlichen Tailenparametern $a_{x,y}, a_z$ zu erzeugen. Obwohl man es in der Praxis meistens mit einem Ellipsoid zu tun hat, wurde für die Simulationen aus Gründen der Vereinfachung ein zentralsymmetrisches Anregungsprofil gewählt ($a_{x,y} = a_z = a$). Die Detektionseffizienz q wird durch die Wahl des Photonenzählwerks und der insgesamt verwendeten Optik festgelegt. Die Anzahl der Intervalle N ergibt sich unmittelbar aus der bei modernen Karten frei wählbaren Intervallbreite ΔT und der Gesamtmessdauer T zu $N = T/\Delta T$.

Durch die Wahl eines endlichen Simulationsvolumens V_g werden Photonenergebnisse, die außerhalb dieses Volumens stattfinden können, nicht berücksichtigt. Dies führt zu einer Unterschätzung kleiner Photonenzahlen. Diese Unterschätzung kann jedoch vernachlässigt werden, wenn das Simulationsvolumen deutlich größer als das effektive Anregungsvolumen gewählt ist. Die Kantenlänge des kubischen Simulationsvolumens $L = g(N_g - 1) =$

$2.56 \cdot 10^{-6}$ m ist so groß, dass so gut wie alle Photonen innerhalb des Simulationsvolumens generiert werden.

6.3 Verteilungen im Falle kleiner Binzeiten

Nach der Einführung des Simulationsprinzips und seiner Basisparameter werden im folgenden simulierte Verteilungen für kleine Binzeiten unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten analysiert. Auf Besonderheiten für lange Binzeiten wird in Abschnitt 6.4 separat eingegangen. Zuerst erfolgt in Unterabschnitt 6.3.1 eine *a priori* Vorhersage der zu erwartenden Einzelmolekül- und Signalverteilungen. Diese werden den Simulationsdaten gegenübergestellt. Im Anschluss werden in Unterabschnitt 6.3.2 die charakteristischen Einzelmolekülgrößen aus den simulierten Signalverteilungen bestimmt, wobei lediglich die Konzentration als bekannt vorausgesetzt wird.

Mit den Basisparametern in Tab. 6.1 sind 10 Datensätze im Einzelmolekülmodus erzeugt worden. Zusätzlich wurden 10 Datensätze für jede Konzentration $C = 10^{-7}$ M, 10^{-8} M, 10^{-9} M und 10^{-10} M simuliert. Jeder Datensatz enthält $N = 1 \cdot 10^7$ Einträge. Während die tatsächliche Simulationsdauer pro Datensatz mehrere Stunden bis Tage betragen hat, würde sich die Gesamtmessdauer in einem realen Experiment auf $T = N\Delta T = 10^7 \cdot 10^{-6}$ s = 10 s belaufen. Aus den Werten der Diffusionskonstanten $D = 2.8 \cdot 10^{-10}$ m²s⁻¹ und der Strahltaile $a = 0.3$ μm folgt eine Diffusionszeit von $\tau_D = a^2/(4D) = 80$ μs. Die Binzeit von $\Delta T = 1$ μs kann damit auf der Zeitskala der Diffusion als "klein" angesehen werden ($\Delta T \ll \tau_D$).

6.3.1 Verteilungen

Um die Verteilungen *a priori* berechnen zu können, muss die mittlere molekulare Helligkeit $\mu(\vec{r})$ als bekannt vorausgesetzt werden. In der konfokalen Mikroskopie ist die Näherung durch eine Gaußfunktion eine erfolgreiche Vorgehensweise in FCS-Messungen. Deshalb wird auch hier ein gaußförmiges Anregungsprofil gewählt. Die maximale Photonendetektionsrate μ_{\max} der lokalen molekularen Helligkeit ergibt sich mit den Parametern aus Tabelle 6.1 zu

$$\mu_{\max} = \alpha \Delta T \frac{\lambda \sigma P_0}{h c 2 \pi a^2} = \alpha \Delta T k_{\text{exc}} = 16.9499 \quad . \quad (6.2)$$

In Abbildung 6.1 sind die aus Simulationen bestimmten zehn Einzelmolekülverteilungen $P_N(n)$ in einem doppelt logarithmischen Maßstab aufgetragen. Die Wahrscheinlichkeiten $P_N(n)$ sind für die diskreten Photonenzahlen n als Kreuze mit Fehlerbalken dargestellt.

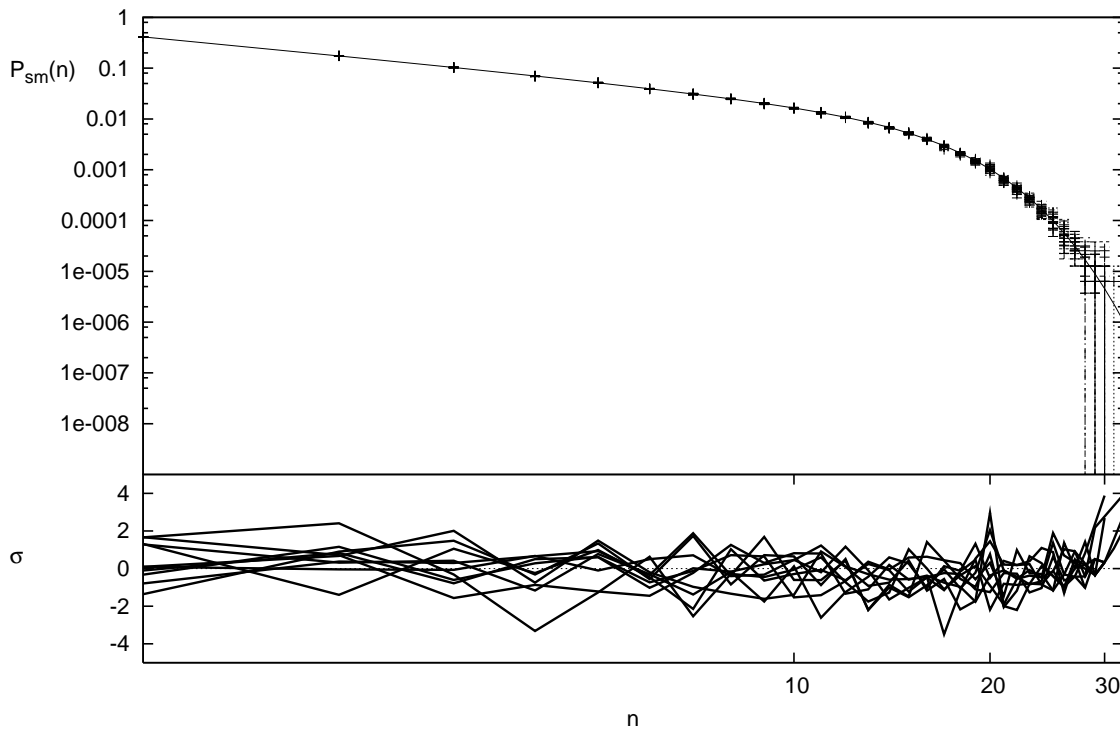


Abbildung 6.1: Vergleich der simulierten und analytisch berechneten Einzelmolekülverteilungen. Im unteren Teil der Abbildung ist das Residuum $\sigma(n)$ dargestellt.

Diesen Werten ist die analytische Einzelteilchenverteilung $P_{\text{sm}}(n)$ entsprechend (5.13) als durchgezogene Linie gegenübergestellt. Dazu wurden die integralen Formen (5.14) und (5.6) mit der Software Mathematica 4.1 numerisch ausgewertet. Im unteren Bildteil sind die Residuen

$$\sigma(n) := \frac{P_N(n) - P_{\text{sm}}(n)}{\Delta P_{\text{theo}}} = (P_N(n) - P_{\text{sm}}(n)) \sqrt{\frac{N}{P_{\text{sm}}(n)}} \quad (6.3)$$

dargestellt. Die Berechnung des theoretischen Fehlers beruht auf der Annahme, dass der Fehler der relativen Häufigkeiten $\sqrt{k(n)}/N$ beträgt, wobei N der Anzahl an Binbreiten entspricht. Hieraus folgt $\Delta P_{\text{theo}} = \sqrt{k_{\text{Theo}}(n)}/N = \sqrt{P_{\text{sig}}(n)N}/N = \sqrt{P_{\text{sig}}(n)/N}$.

In der graphischen Darstellung von Abbildung 6.1 sind die Einzelteilchenverteilungen der Simulation $P_N(n)$ von den analytischen Werten $P_{\text{sm}}(n)$ innerhalb der statistischen Schwankungen ununterscheidbar. Die Residuen schwanken um ihre Nulllage, wie es für rein zufällige Abweichungen zu erwarten ist. Die Beträge der Residuen sind jedoch deutlich größer als Eins. Dieses Verhalten wird auch in Experimenten beobachtet [24]. Die einfache obige Abschätzung für den zu erwartenden Fehler unterschätzt den wirklichen Fehler um einen

Tabelle 6.2: Momente $\hat{m}_{k,sm}$, Varianz σ_{sm}^2 und Q_{sm} -Faktor der Einzelmolekülverteilung. Die obere Zeile zeigt die Werte der Simulation. In der unteren Zeile sind die Werte des analytischen Modells aufgeführt.

$\hat{m}_{1,sm}$	$\hat{m}_{2,sm}$	$\hat{m}_{3,sm}$	σ_{sm}^2	Q_{sm}
3.394 ± 0.003	23.61 ± 0.03	249.5 ± 0.6	12.07 ± 0.04	2.56 ± 0.01
3.408	23.83	253.1	12.22	2.58

Faktor drei bis vier.

In Tabelle 6.2 sind die ersten drei Momente $\hat{m}_{k,sm}$, $k = 1, 2, 3$ der Einzelmolekülverteilungen dargestellt. Die Momente der simulierten Einzelmolekülverteilungen $m_{k,sm}^{(i)}$ wurden über alle zehn Simulationen $i = 1, 2, \dots, 10$ gemittelt. Der angegebene Fehler $\Delta\hat{m}_{k,sm}$ wurde entsprechend

$$\Delta\hat{m}_{k,sm} = \sqrt{\frac{1}{90} \sum_{i=1}^{10} \left(m_{k,sm}^{(i)} - \hat{m}_{k,sm} \right)^2} \quad \text{mit} \quad \hat{m}_{k,sm} = \frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} m_{k,sm}^{(i)} \quad (6.4)$$

berechnet. Aus den Momenten der ersten beiden Ordnungen lässt sich nach (4.23) und (4.25) die Varianz und der Q -Faktor der Einzelmolekülverteilung bestimmen. Diese sind ebenfalls in Tabelle 6.2 aufgeführt. Die hierfür angegebenen Fehler wurden nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz bestimmt.

Die Varianz und der Q -Faktor des analytischen Modells können mit Hilfe von (5.17) und (5.20) direkt aus der maximalen Photonendetectionsrate μ_{\max} berechnet werden. Dazu muss der Wert $F(\mu_{\max})$ (siehe (5.6)) bestimmt werden. Die numerische Integration ergibt für $\mu_{\max} = 16.9499$ einen Wert von

$$F(\mu_{\max}) = 4.97329 \quad . \quad (6.5)$$

Der Vergleich zeigt, dass die analytischen Werte die simulierten Kenngrößen geringfügig überschätzen. Die Abweichungen sind kleiner als ein Prozent. Mögliche Ursachen sind der Einfluss der Diffusion (siehe Abschnitt 6.4) und die Berücksichtigung des asymptotischen Verhaltens der analytischen Formel $P_{sm}(n)$ für sehr große Photonenzahlen.

In den Abbildungen 6.2 a–d sind die simulierten Signalverteilungen $P_N(n)$ für die Konzentrationen $C = 10^{-7}$ M (Teilbild a), $C = 10^{-8}$ M (Teilbild b), $C = 10^{-9}$ M (Teilbild c) und $C = 10^{-10}$ M (Teilbild d) dargestellt. Für jede Konzentration wurden zehn Simulationen durchgeführt und die Ergebnisse analog zu Abbildung 6.1 durch Kreuze mit Fehlerbalken gekennzeichnet. Während die Einzelmolekülverteilung unabhängig von dem Tailenparameter a ist, hängt die Signalverteilung für eine gegebene Konzentration C davon ab. Der

Tailenparameter geht in die Berechnung des effektiven Volumens V_{eff} ein. Für die obige maximale Photonendetektionsrate $\mu_{\text{max}} = 16.9499$ liefert die numerische Integration von Gleichung (4.9) für $a = 0.3 \mu\text{m}$ ein effektives Volumen von $V_{\text{eff}} = 0.264 \text{ fl.}$ Mit diesem Wert können die simulierten Konzentrationen aus $\langle m \rangle = C V_{\text{eff}}$ in die mittleren Teilchenzahlen $\langle m \rangle = 15.9, 1.59, 0.159$ und 0.0159 umgerechnet werden. Die analytischen Signalverteilungen $P_{\text{sig}}(n)$ lassen sich damit entsprechend (4.31) numerisch berechnen. Diese sind als durchgezogene Linie in den Abbildungen 6.2 a–d dargestellt. Die unteren Bildteile zeigen die Residuen.

Eine qualitative Betrachtung der Abbildungen zeigt, dass die simulierten Verteilungen $P_N(n)$ gut durch die analytischen Signalverteilungen $P_{\text{sig}}(n)$ wiedergegeben werden. Die Residuen schwanken zufällig um die Nulllage. Die Beträge der Residuen werden mit zunehmender Konzentration kleiner. Die Ursache hierfür liegt in einer Abnahme der relativen Teilchenfluktuationen mit zunehmender Konzentration. Ein Maß hierfür ist der relative Fehler $\Delta\langle m \rangle / \langle m \rangle = 1/\sqrt{\langle m \rangle}$ der Poissonverteilung (4.11), der für $\langle m \rangle \rightarrow \infty$ gegen Null strebt. Die großen relativen Teilchenfluktuationen bedingen besondere Anforderungen an die Messzeit. Für kleine Konzentrationen sind experimentell wie auch in der Simulation wesentlich längere Messzeiten notwendig. Für die höchste Konzentration $C = 10^{-7} \text{ M}$ deuten sich im unteren Teil von Abbildung 6.2d systematische Schwankungen im Residuum an, welche vermutlich auf die vernachlässigte Diffusion zurückzuführen sind.

In Analogie zur Einzelmolekülverteilung wurden für die Signalverteilungen die Momente $\hat{m}_{k,\text{sig}}$ der ersten beiden Ordnungen berechnet. Diese sind zusammen mit den nach (5.25) und (5.26) berechneten Werten für die Varianz σ_{sig}^2 und den Q_{sig} -Faktor in Tabelle 6.3 aufgelistet. Für die Simulation ist zusätzlich die maximale Photonendetektionsrate μ_{max} dargestellt, wie sie sich aus Q_{sig} nach Gleichung (5.26) ergibt. Dieser Wert ist mit dem exakten Wert von $\mu_{\text{max}} = 16.9499$ zu vergleichen. Die Werte in den oberen vier Zeilen der Tabelle beziehen sich auf die Simulation, während die unteren vier Zeilen die analytischen Werte angeben. Mit Ausnahme der $C = 10^{-10} \text{ M}$ Konzentration stimmen die simulierten Kenngrößen der Signalverteilungen innerhalb ihrer Fehlergrenzen mit den analytischen Werten überein. Ähnlich wie bei der Einzelmolekülverteilung überschätzen die analytischen Werte die simulierten Kenngrößen geringfügig.

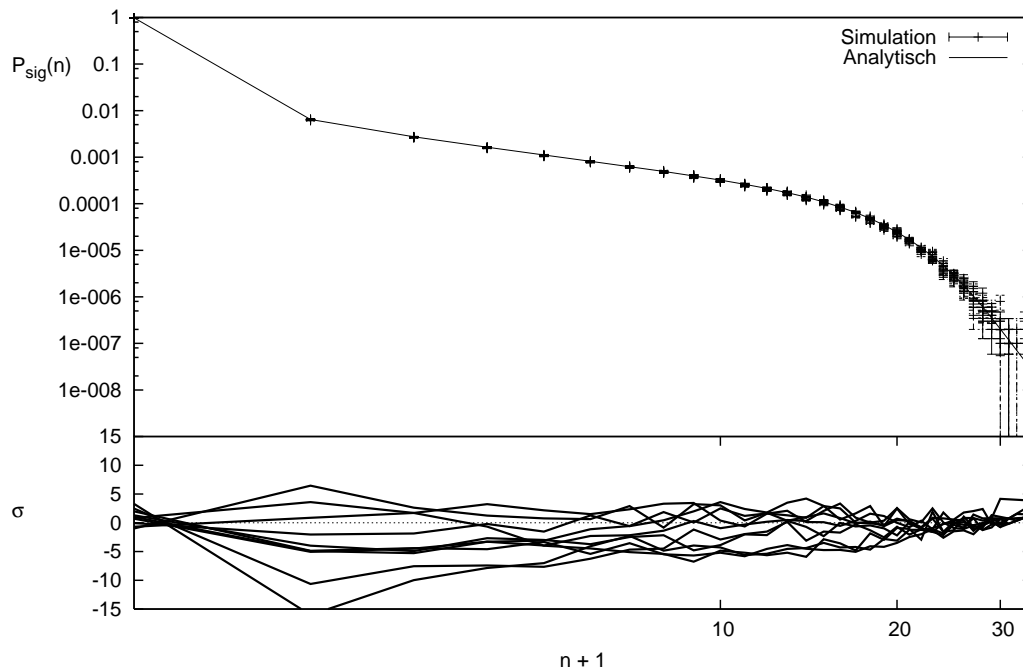
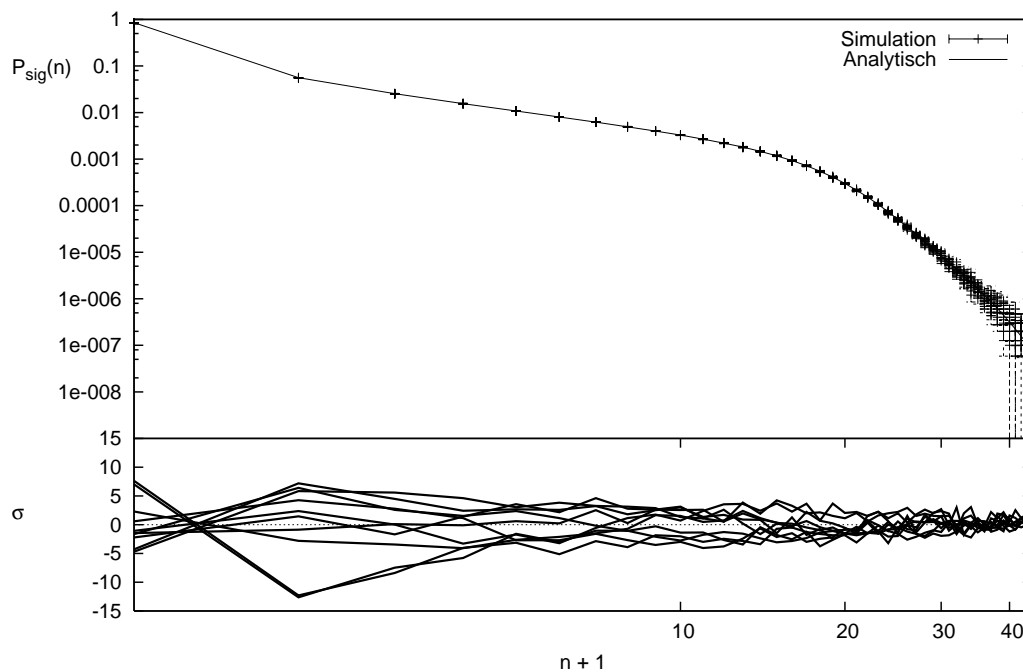
(a) Signalverteilungen der Konzentration $C = 10^{-10} M$.(b) Signalverteilungen der Konzentration $C = 10^{-9} M$.

Abbildung 6.2: Simulierte und analytische Signalverteilungen der Konzentrationen $C = 10^{-10} M$ (6.2a), $C = 10^{-9} M$ (6.2b), $C = 10^{-8} M$ (6.2c) und $C = 10^{-7} M$ (6.2d) im Vergleich. Im unteren Teil der Abbildungen ist jeweils das Residuum $\sigma(n)$ dargestellt.

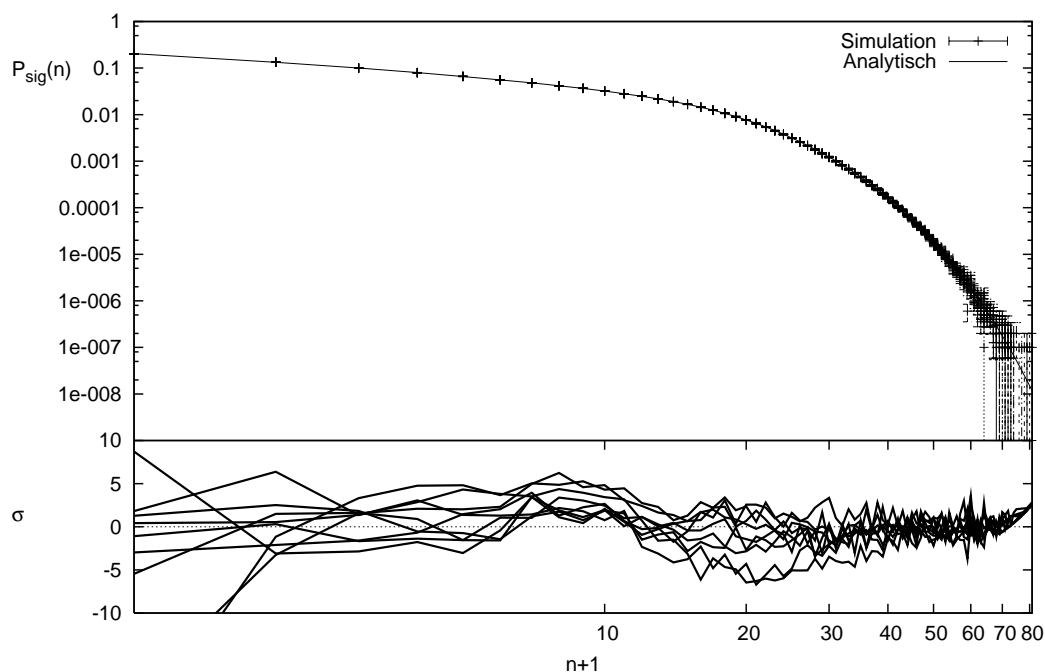
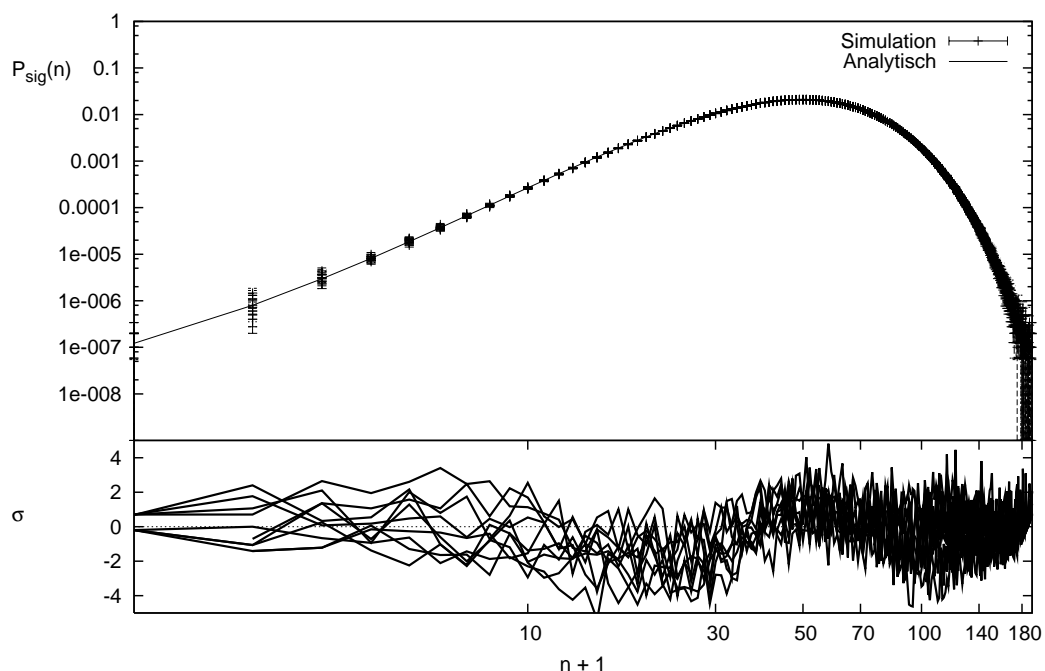
(c) Signalverteilungen der Konzentration $C = 10^{-8} M$.(d) Signalverteilungen der Konzentration $C = 10^{-7} M$.

Abbildung 6.2: Simulierte und analytische Signalverteilungen der Konzentrationen $C = 10^{-10} M$ (6.2a), $C = 10^{-9} M$, $C = 10^{-8} M$ und $C = 10^{-7} M$ im Vergleich. Im unteren Teil der Abbildungen ist jeweils das Residuum $\sigma(n)$ dargestellt.

Tabelle 6.3: Mittlere Momente $\hat{m}_{k,\text{sig}}$, Varianz σ_{sig}^2 , Q_{sig} -Faktor und die daraus bestimmte maximale Photonendetektionsrate μ_{max} aus simulierten Signalverteilungen unterschiedlicher Konzentration C . Der abgesetzte Tabellenblock zeigt die entsprechenden exakten Werte des analytischen Modells.

$C[\text{M}]$	$\hat{m}_{1,\text{sig}}$	$\hat{m}_{2,\text{sig}}$	σ_{sig}^2	Q_{sig}	μ_{max}
$1 \cdot 10^{-7}$	54.28 ± 0.02	3323 ± 2	378 ± 3	5.97 ± 0.05	16.9 ± 0.1
$1 \cdot 10^{-8}$	5.422 ± 0.008	67.2 ± 0.2	37.8 ± 0.2	5.96 ± 0.04	16.9 ± 0.1
$1 \cdot 10^{-9}$	0.542 ± 0.002	4.08 ± 0.02	3.79 ± 0.02	5.99 ± 0.04	16.9 ± 0.1
$1 \cdot 10^{-10}$	0.0529 ± 0.0007	0.371 ± 0.007	0.369 ± 0.007	5.96 ± 0.2	16.9 ± 0.6
$1 \cdot 10^{-7}$	54.26	3323	379	—	—
$1 \cdot 10^{-8}$	5.426	67.4	37.9	—	—
$1 \cdot 10^{-9}$	0.543	4.09	3.79	—	—
$1 \cdot 10^{-10}$	0.0543	0.382	0.379	—	—

6.3.2 Charakteristische Einzelmolekülgrößen

Die Betrachtungen im vorangegangenen Abschnitt setzten die lokale molekulare Helligkeit als bekannt voraus, so dass die Photonenzahlverteilungen und die daraus abgeleiteten Größen für beliebige Konzentrationen *a priori* berechnet werden konnten. Im Folgenden wird der umgekehrte Weg gegangen. Die charakteristischen Einzelmolekülgrößen werden aus der Signalverteilung bestimmt. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Konzentration C bekannt ist. Über die Form und Eigenschaften der lokalen molekularen Helligkeit werden keine Annahmen gemacht. Hierzu werden die simulierten Verteilungen aus Unterabschnitt 6.3 benutzt. Gemäß Gleichung (4.13) kann das effektive Volumen V_{eff} für eine Farbstoffspezies der Konzentration C aus der relativen Häufigkeit der Nullereignisse P_0 bestimmt werden. In Tabelle 6.4 sind die effektiven Volumina aufgeführt, die gemäß

$$V_{\text{eff}} [\text{fl}] = -\frac{\log(P_0)}{6.022 \cdot 10^{-26} C [\text{M}]} \quad (6.6)$$

aus den P_0 der simulierten Signalverteilungen berechnet wurden. Die Anwendung dieser Formel kann für hohe Konzentrationen problematisch sein. Die Anzahl der Nullereignisse P_0 nimmt für sehr hohe Konzentrationen ab (siehe Abbildungen 6.2 a–d). Dies kann zu großen statistischen Unsicherheiten in P_0 führen. So wurden für die Konzentration $C = 10^{-7}$ M nur zwei Nullereignisse simuliert. Die Berechnung des effektiven Volumens aus P_0 macht in diesem Fall keinen Sinn und ist deshalb in Tabelle 6.4 nicht mit aufgeführt. Die für verschiedene Konzentrationen angegebenen Werte für V_{eff} sind mit dem exakten Wert $V_{\text{eff}} = 0.2644$ fl zu vergleichen. Für alle Konzentrationen liegen die relativen Fehler

deutlich unter einem Prozent. Die berechneten Volumina stimmen für die Konzentrationen $C = 10^{-8}$ M und $C = 10^{-9}$ M innerhalb der Fehlergrenzen mit dem exakten Wert überein. Für die Konzentration $C = 10^{-10}$ M ist der ermittelte Wert für das effektive Volumen geringfügig kleiner als der exakte Wert. Auch nimmt die Streuung mit abnehmender Konzentration zu, obwohl P_0 für geringe Konzentrationen eine größere statistische Genauigkeit aufweist. Die Ursache hierfür ist die erhöhte relative Teilchenfluktuation mit abnehmender Konzentration.

Tabelle 6.4: Mittelwerte des effektiven Volumens \widehat{V}_{eff} (in fl) und ihre relativen Fehler, die aus simulierten Datensätzen unterschiedlicher Konzentration C bestimmt wurden. Die letzte Zeile zeigt den exakten Wert des analytischen Modells.

C [M]	\widehat{V}_{eff} [fl]
$1 \cdot 10^{-8}$	0.2649 ± 0.0004
$1 \cdot 10^{-9}$	0.2642 ± 0.0008
$1 \cdot 10^{-10}$	0.259 ± 0.002
exakt	0.2644

Mit Hilfe der Rekursionsformel (4.48) lässt sich die charakteristische Einzelmolekülverteilung $P_{\text{sm}}(n)$ aus den Verteilungen rekonstruieren. In Abbildung 6.3 a–c sind die Einzelmolekülverteilungen dargestellt, wie sie sich aus den simulierten Verteilungen der Konzentrationen $C = 10^{-8}$ M (Abbildung 6.3a), $C = 10^{-9}$ M (Abbildung 6.3b) und $C = 10^{-10}$ M (Abbildung 6.3c) ergeben. Die Einzelmolekülverteilung aus der Signalverteilung für die Konzentration $C = 10^{-7}$ M wurde nicht berechnet, weil die statistische Genauigkeit der Nullereignisse P_0 nicht ausreichend ist. Die als Kreuze mit Fehlerbalken dargestellten Einzelmolekülverteilungen wurden für jede der zehn Simulationen pro Konzentration berechnet. Die entsprechende analytische Einzelmolekülverteilung $P_{\text{sm}}(n)$ ist jeweils als durch-

Tabelle 6.5: Mittelwerte der ersten fünf Einzelmolekülmomente $\widehat{m}_{k,\text{sm}}$ die aus simulierten Signalverteilungen unterschiedlicher Konzentration C bestimmt wurden. Die letzte Zeile zeigt die exakten Werte.

C [M]	$\widehat{m}_{1,\text{sm}}$	$\widehat{m}_{2,\text{sm}}$	$\widehat{m}_{3,\text{sm}}$	$\widehat{m}_{4,\text{sm}}$	$\widehat{m}_{5,\text{sm}}$
$1 \cdot 10^{-8}$	3.406 ± 0.005	23.73 ± 0.05	251.3 ± 0.8	3326 ± 18	50752 ± 530
$1 \cdot 10^{-9}$	3.41 ± 0.01	23.8 ± 0.1	252 ± 2	3345 ± 29	50929 ± 598
$1 \cdot 10^{-10}$	3.33 ± 0.04	23.2 ± 0.4	245 ± 5	3240 ± 80	49203 ± 1318
exakt	3.408	23.83	253.1	3352	50928

gezogene Linie in den Diagrammen dargestellt. Im unteren Teil der Abbildungen ist das Residuum der Verteilungen aufgetragen. Die rekonstruierten Einzelmolekülverteilungen stimmen gut mit der analytischen Einzelmolekülverteilung überein. Die Residuen werden erwartungsgemäß mit abnehmender Konzentration größer.

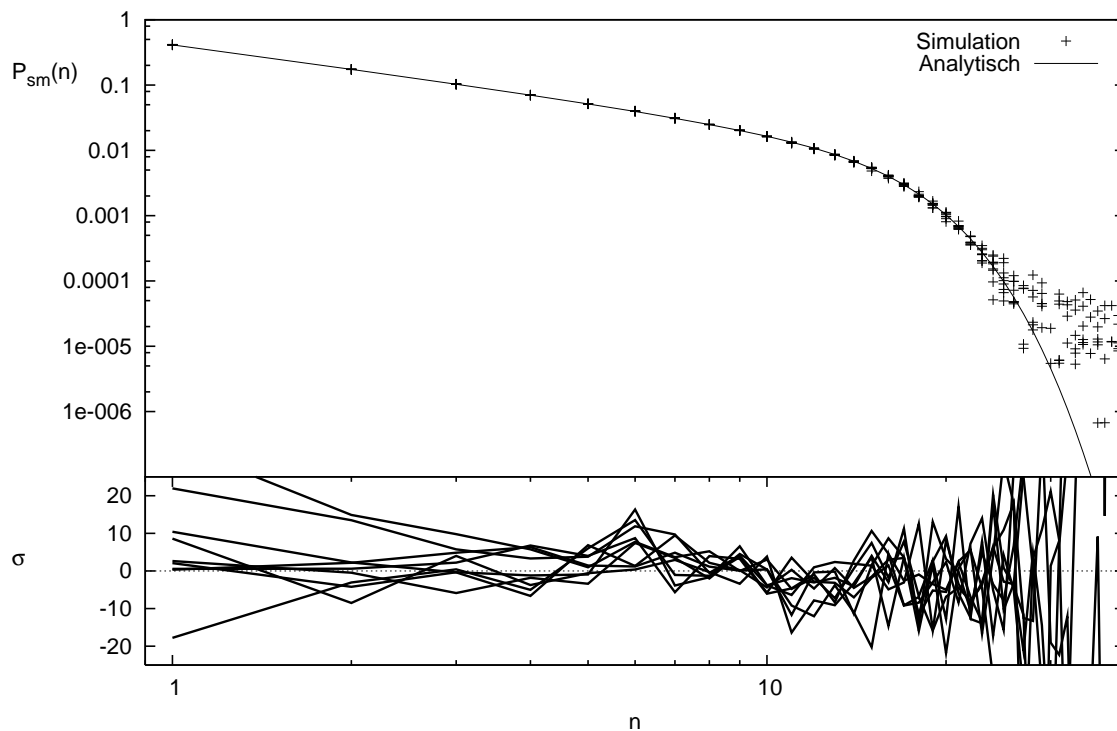
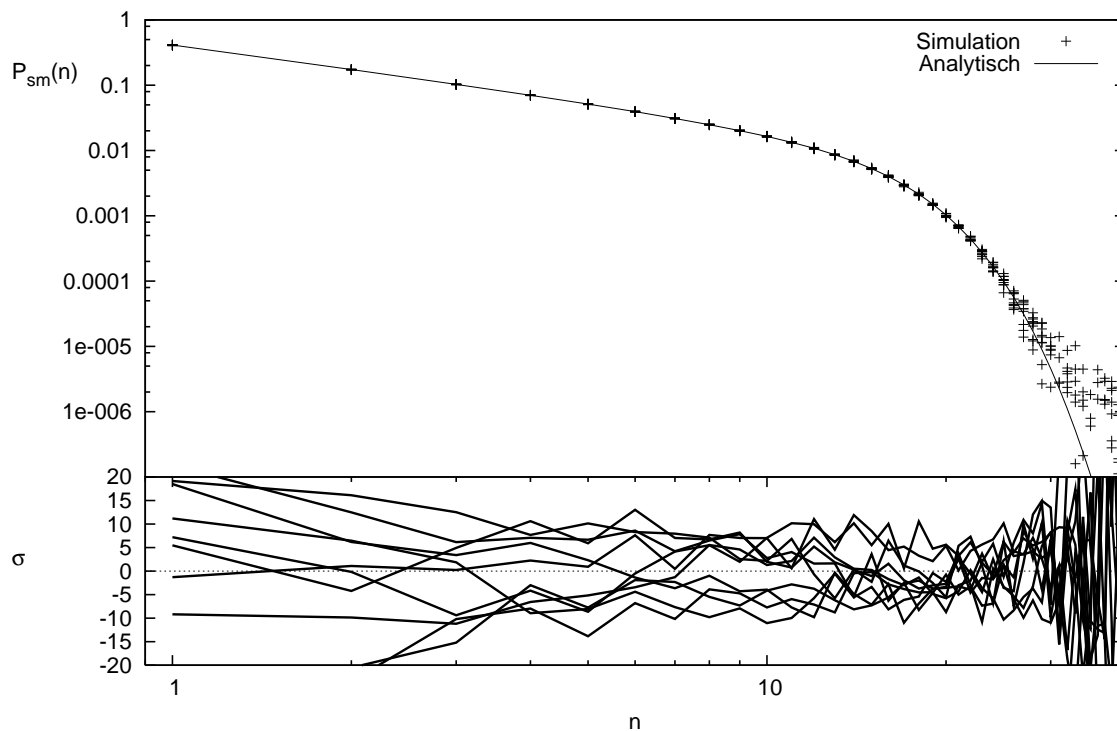
Für die rekonstruierten Einzelmolekülverteilungen wurden die ersten fünf Momente gemäß der Definitionsgleichung (3.6) berechnet. Die über die einzelnen Simulationen gemittelten Werte sind in Tabelle 6.5 dargestellt. In der letzten Zeile sind die entsprechenden analytischen Werte aufgelistet. Die Momente der rekonstruierten Einzelmolekülverteilung stimmen erstaunlich gut mit den analytischen Werten überein, wobei die Simulation die analytischen Werte geringfügig unterschätzt. Alternativ zu dieser Vorgehensweise lassen sich die Momente der Einzelmolekülfunktion mit der Rekursionsformel (4.51) aus den Momenten der Signalverteilung berechnen.

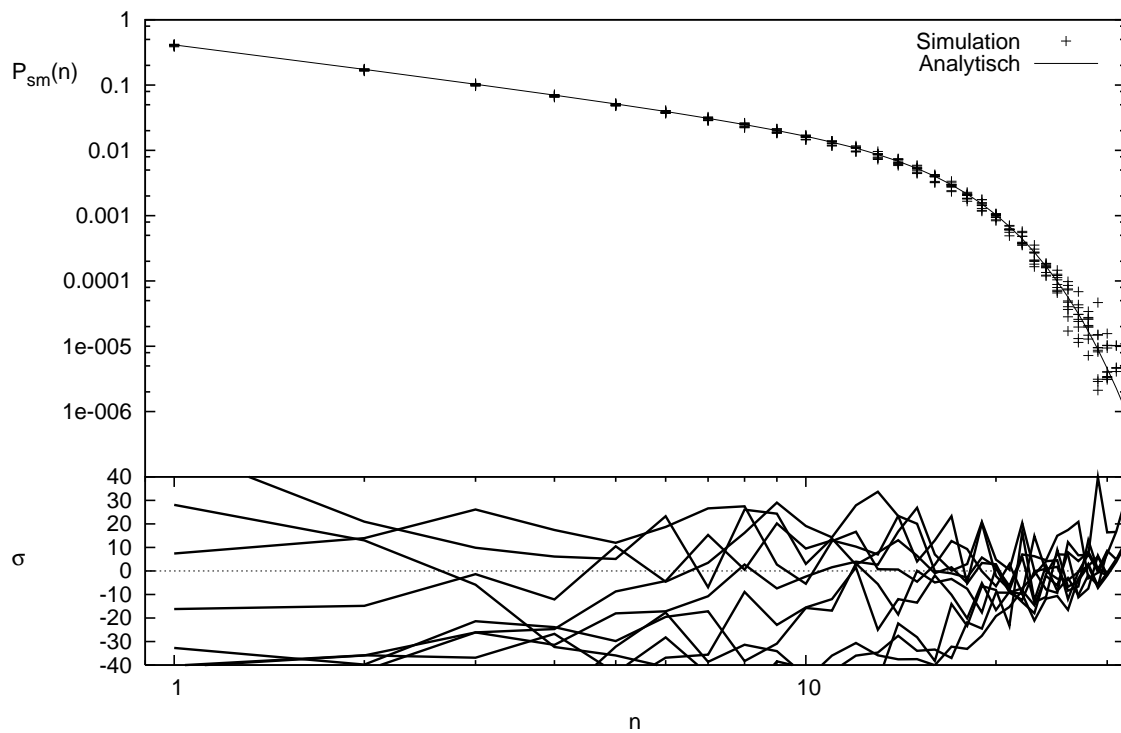
Tabelle 6.6: Mittelwerte der ersten fünf Momente der molekularen Helligkeit $\overline{\mu^k}$ aus simulierten Signalverteilungen unterschiedlicher Konzentration.

$C[M]$	$\overline{\mu^1}$	$\overline{\mu^2}$	$\overline{\mu^3}$	$\overline{\mu^4}$	$\overline{\mu^5}$
$1 \cdot 10^{-8}$	3.406 ± 0.005	20.32 ± 0.05	186.9 ± 0.8	2060 ± 19	25175 ± 561
$1 \cdot 10^{-9}$	3.41 ± 0.01	20.4 ± 0.1	188 ± 2	2071 ± 31	25209 ± 668
$1 \cdot 10^{-10}$	3.33 ± 0.04	19.8 ± 0.4	182 ± 6	2003 ± 87	24311 ± 1555
exakt	3.408	20.42	188.4	2075	25162

Aus den Momenten der rekonstruierten Einzelmolekülverteilungen können die Momente einer beliebigen lokalen molekularen Helligkeit (LMH) bestimmt werden. Diese sind entsprechend (4.21) für die ersten fünf Ordnungen in Tabelle 6.6 dargestellt. Die letzte Zeile zeigt die exakten Werte der benutzten lokalen molekularen Helligkeit. Die so erhaltenen Momente für die molekulare Helligkeit stimmen gut mit den exakten Werten überein. Wie zuvor bei den Momenten der rekonstruierten Einzelmolekülverteilung unterschätzt die Simulation die exakten Werte für die Momente der LMH.

Die maximale Photonendetektionsrate kann unter der Voraussetzung einer gaußförmigen LMH einfach aus dem Q -Faktor der Signalverteilung bestimmt werden. Bei experimentellen Aufbauten, deren LMH nicht durch eine Gaußfunktion angenähert werden kann, ist dieser Zusammenhang nicht mehr gültig. Nach dem in Kapitel 5 vorgestellten analytischen Modell kann die maximale Photonendetektionsrate μ_{\max} aus dem Konvergenzverhalten der mittleren Rate (5.21) abgeschätzt werden. Hierbei müssen keine Annahmen über die zugrundeliegende LMH gemacht werden. Diese Vorgehensweise setzt jedoch voraus, dass die Einzelmolekülverteilung auch für Photonenzahlen $n \gg \mu_{\max}$ hinreichend genau bestimmt

(a) Aus Signalverteilung ($C = 10^{-8} M$) rekonstruierte Einzelmolekülverteilung(b) Aus Signalverteilung ($C = 10^{-9} M$) rekonstruierte EinzelmolekülverteilungAbbildung 6.3: Einzelmolekülfunktion aus Signalverteilung $C = 1 \cdot 10^{-8} M$

(c) Aus Signalverteilung ($C = 10^{-10} M$) rekonstruierte Einzelmolekülverteilung**Abbildung 6.3:** Einzelmolekülfunktion aus Signalverteilung $C = 1 \cdot 10^{-8} M$

ist. Erst in diesem Bereich ist eine Abschätzung der oberen Schranke μ_{\max} möglich. Diese Voraussetzung erfüllen am besten die in Abbildung 6.3c dargestellten rekonstruierten Einzelmolekülverteilungen. Für diese Verteilungen ist die mittlere Rate $\langle \mu \rangle_n$ in Abbildung 6.4 zusammen mit der analytischen Rate dargestellt. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Bestimmung von μ_{\max} aufgrund der hohen Schwankungen schwierig ist.

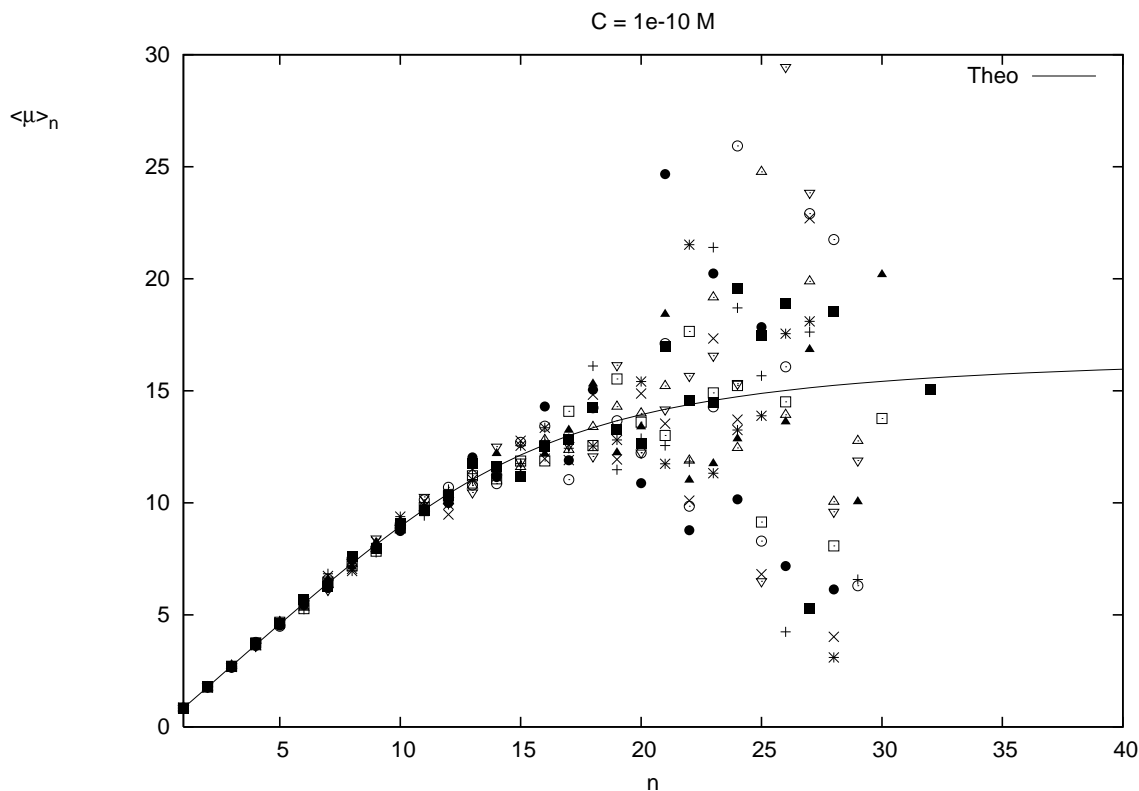


Abbildung 6.4: Mittlere Rate $\langle \mu \rangle_n$ aus MC-simulierten Signalverteilungen der Konzentration $C = 1 \cdot 10^{-10} M$. Die durchgezogene Linie zeigt die theoretisch zu erwartende Rate.

6.4 Verteilungen im Fall langer Binzeiten

Zum Abschluss dieses Kapitels erfolgt eine Betrachtung von Photonenzahlverteilungen für lange Binzeiten und die Konsequenzen, die sich aus diesen Betrachtungen für die bisher entwickelten Konzepte ergeben. Bisher wurde implizit vorausgesetzt, dass die Binzeit ΔT klein ist gegenüber der Zeitskala der diffusiven Bewegung des Moleküls durch den Laserfokus. Die Betrachtungen erfolgen in einem überwiegend qualitativen Rahmen, da bisher noch keine geschlossene quantitative Beschreibung für den vollen diffusiven Fall existiert.

Liegt die Binzeit ΔT in der Größenordnung der Diffusionszeit des Fluorophors durch das Beobachtungsvolumen, so kommt es innerhalb eines Zeitintervalls ΔT zu Änderungen in der Helligkeit des Moleküls. Ein erster Schritt, um sich der Verteilung im Falle langer Binzeiten zu nähern, besteht in der Betrachtung des Mittelwertes der molekularen Helligkeit, wie sie ein diffundierendes Molekül am Ort \vec{r}_0 effektiv erfährt. Dieser diffusive Mittelwert kann für eine gaußförmige molekulare Helligkeit (5.1) mit Hilfe der Greenschen Funktion $p(\vec{r}, t | \vec{r}_0, t_0)$, siehe (3.25), durch die Methode der quadratischen Ergänzung analytisch

berechnet werden

$$\begin{aligned}\mu_{\text{eff}}(\vec{r}_0, t) &= \mu_{\text{eff}}(r_0, t) = \int_{\mathbb{R}^3} d^3r \mu(\vec{r}) p(\vec{r}, t | \vec{r}_0, t_0) \\ &= \mu_{\text{max}} \beta^3 \exp \left[-2 \left(\frac{\beta}{a} \right)^2 r_0^2 \right] \quad \text{mit } \beta = \sqrt{\frac{a^2}{8Dt + a^2}} \quad .\end{aligned}\quad (6.7)$$

Durch die zeitabhängige Funktion $\beta(t)$ werden die Auswirkungen der Diffusion auf die effektive Helligkeit des Moleküls erfasst. Sie konvergiert für $t \rightarrow 0$ bzw. $D \rightarrow 0$ gegen Eins, so dass die effektive Helligkeit in die lokale molekulare Helligkeit $\mu(\vec{r})$ übergeht. Um die durchschnittliche effektive Helligkeit $\langle \mu_{\text{eff}} \rangle(r_0, \Delta T)$ zu erhalten, muss über die gesamte Binzeit ΔT gemittelt werden

$$\langle \mu_{\text{eff}} \rangle(r_0, \Delta T) = \frac{1}{\Delta T} \int_0^{\Delta T} dt \mu_{\text{eff}}(r_0, t) = \frac{\mu_{\text{max}}}{\Delta T} \int_0^{\Delta T} dt \beta^3 \exp \left[-2 \left(\frac{\beta}{a} \right)^2 r_0^2 \right] \quad (6.8)$$

$$= \frac{a^2 \mu_{\text{max}}}{4D\Delta T} \int_{\beta(\Delta T)}^1 d\beta \exp \left[-2 \left(\frac{\beta}{a} \right)^2 r_0^2 \right] \quad (6.9)$$

$$= \frac{a^3 \sqrt{\pi}}{8D\Delta T \sqrt{2}} \frac{\mu_{\text{max}}}{r_0} \left(\text{erf} \left[\frac{\sqrt{2}}{a} r_0 \right] - \text{erf} \left[\frac{\sqrt{2}}{a} \beta r_0 \right] \right) \quad . \quad (6.10)$$

Nach der Transformation der Integrationsvariablen von $t \rightarrow \beta$ wurde in der letzten Zeile die Integration auf die Fehlerfunktion $\text{erf}(u) = 2/\sqrt{\pi} \int_0^u du e^{-u^2}$ umgeschrieben. Die effektive mittlere Helligkeit $\langle \mu_{\text{eff}} \rangle(r, \Delta T)$ entspricht der mittleren Anzahl an Photonen, die von einem einzelnen Molekül im Zeitintervall $[t, t + \Delta T]$ detektiert werden, unter der Voraussetzung, dass es sich zum Zeitpunkt t am Ort \vec{r} befunden hat.

Die Beziehung für $\langle \mu_{\text{eff}} \rangle(r, \Delta T)$ kann mit Hilfe der Simulation überprüft werden, wozu ein spezieller Betriebsmodus integriert wurde. In diesem Betriebsmodus startet ein Molekül zum Zeitpunkt t am Ort \vec{r} einen Random-Walk, der bis zur gewählten Binzeit ΔT fortgesetzt wird. Dabei werden die mit einem Zufallsgenerator erzeugten Fluoreszenzphotonen entlang des Pfades aufaddiert. Dieser Vorgang wird für jedes \vec{r} mehrfach wiederholt. Die auf diese Weise mit der Simulation erzeugten Mittelwerte für die Photonenzahlen sind in Abbildung (6.5) als Funktion des Anfangsortes r dargestellt. Diese simulierten Werte können mit dem Graphen der obigen analytischen Form $\langle \mu_{\text{eff}} \rangle(r, \Delta T)$ verglichen werden. Dargestellt sind die Graphen der Binzeiten $\Delta T = 10^{-3}$ s, $\Delta T = 10^{-4}$ s, $\Delta T = 10^{-5}$ s und $\Delta T = 10^{-6}$ s. Die Graphen für die Simulation und die analytische Formel stimmen hervorragend überein.

Die bisherigen Betrachtungen legen nun folgende Vorgehensweise nahe. Die lokale molekulare Helligkeit $\mu(\vec{r})$ wird in die in Kapitel 4 entwickelte Formel des effektiven Volumens und

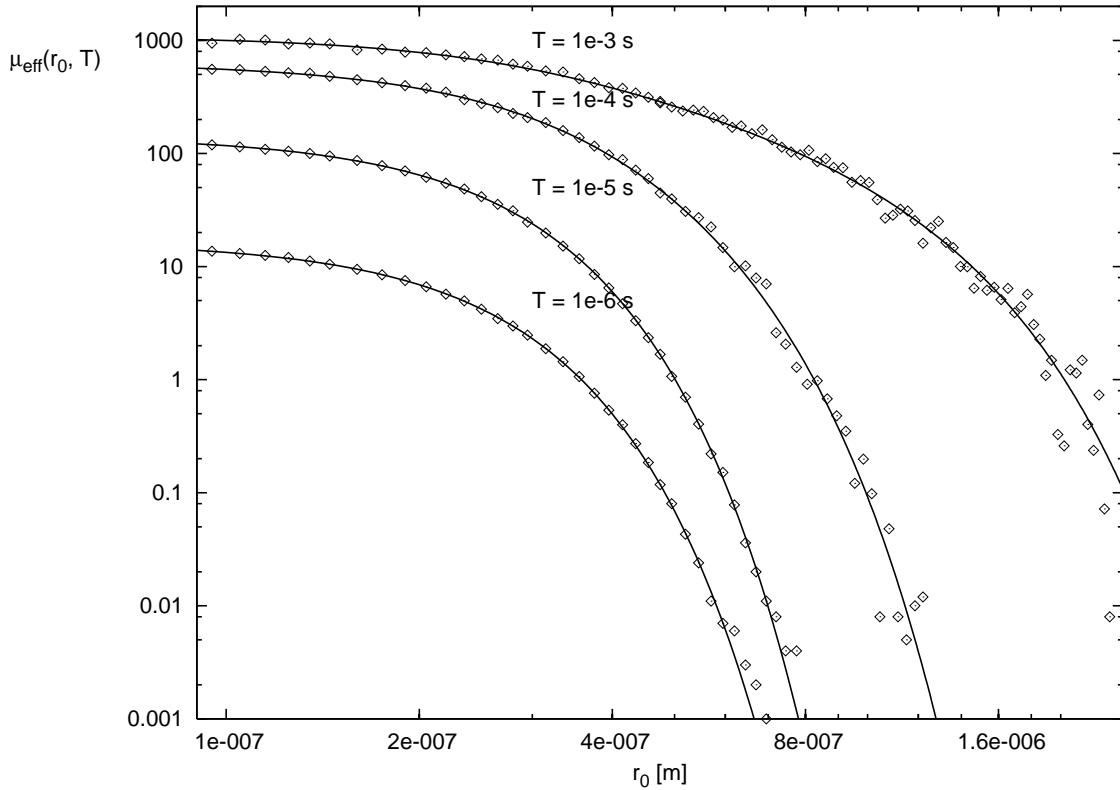


Abbildung 6.5: Durchschnittliche effektive molekulare Helligkeit $\langle \mu_{\text{eff}} \rangle(r, \Delta T)$ in Abhängigkeit der Binzeit ΔT und der Startposition \vec{r} eines einzelnen Moleküls. Diese sind sowohl für die Simulation (Diamanten) als auch für die analytische Formel (durchgezogene Linie) dargestellt.

der Verteilungen durch die effektive mittlere molekulare Helligkeit $\langle \mu_{\text{eff}} \rangle(r, \Delta T)$ ersetzt

$$P_{\text{sm}}(n, \Delta T) = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \int_{\mathbb{R}^3} d^3 r \text{Poi}(n, \langle \mu_{\text{eff}} \rangle(r, \Delta T)) \quad \text{für } n > 0 \quad (6.11)$$

$$V_{\text{eff}}(\Delta T) = \int_{\mathbb{R}^3} d^3 r (1 - e^{-\langle \mu_{\text{eff}} \rangle(r, \Delta T)}) \quad . \quad (6.12)$$

Um die Beziehung zu testen, wurde die Einzelmolekülverteilung für eine Binzeit von $\Delta T = 100 \mu\text{s}$ mit den in Tabelle 6.1 angegebenen Parametern simuliert. Diese sind zusammen mit der analytisch berechneten Einzelmolekülverteilung in Abbildung 6.7 dargestellt. Zusätzlich ist die Einzelmolekülverteilung unter Vernachlässigung der diffusiven Bewegung ($\beta = 1$) zu sehen. Die analytische Einzelmolekülfunktion überschätzt den Einfluss der Diffusion deutlich. Im Gegensatz hierzu beschreibt die Verteilung für $\beta = 1$ die simulierte Verteilung für kleine Photonenzahlen gut. Erst für sehr große Photonenzahlen n ist eine deutliche Abweichung zu erkennen. Offensichtlich versagt die obige analytische Formel für die korrekte Beschreibung diffusiver Effekte.

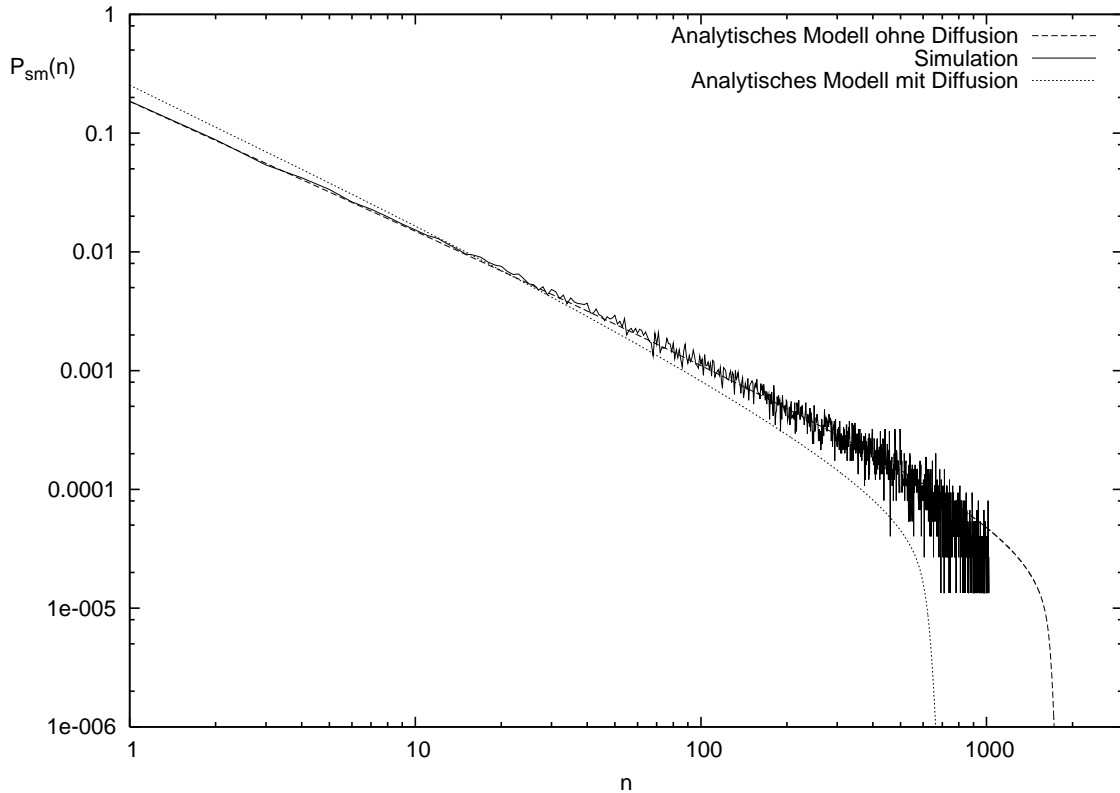


Abbildung 6.6: Einzelmolekülverteilungen für große Binzeiten ($\Delta T = 0.1$ ms) aus Simulation (durchgezogene Linie) und analytischen Betrachtungen für eine Diffusionskonstante von $D = 2.8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Die analytischen Verteilungen wurden sowohl mit (gepunktete Linie) als auch ohne (gestrichelte Linien) diffusiven Anteil berechnet.

Interessanterweise wirkt sich anscheinend die Diffusion nur auf die maximale Photonen-detektionsrate μ_{\max} aus. Während die Verteilung für $\beta = 1$ (keine Diffusionseffekte) bei $n \approx \mu_{\max} = 1649.99$ abfällt, ist dies bei der simulierten Einzelmolekülverteilung bereits für $n \approx 900$ sichtbar. Dies ist erstaunlicherweise die um β reduzierte maximale Photonen-detektionsrate $\mu_{\max} \beta(\Delta T) = 907$.

Abbildung 6.7 zeigt die simulierte Verteilung in Vergleich mit der analytischen Verteilung, die sich ergibt, wenn die lokale molekulare Helligkeit $\mu(r)$ durch $\beta(\Delta T) \mu(r)$ ersetzt wird. Im unteren Bildteil sind die entsprechenden Residuen abgebildet. Die Einzelmolekülfunktionen sind für eine unterschiedliche Anzahl von Gitterpunkten ($N_g = 512$ bzw. $N_g = 1024$) generiert worden, um den durch das endliche Simulationsvolumen verursachten Fehler abschätzen zu können. Die Simulationsdauer der Einzelmolekülfunktionen betrug mehrere Tage auf einem konventionellen PC (Pentium III, 1,4 GHz). Im Vergleich zu Abbildung 6.6 ist die graphische Übereinstimmung zwischen Simulation und analytischer Verteilung in dieser Abbildung 6.7 überraschend gut. Abweichungen sind in den Residu-

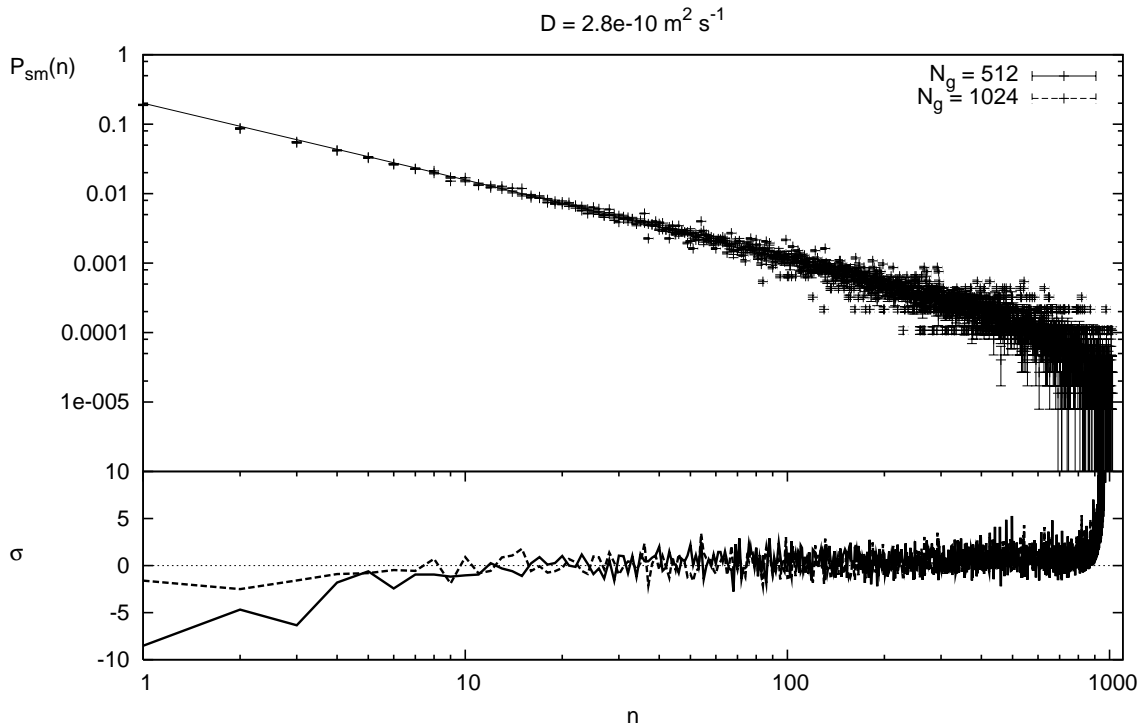


Abbildung 6.7: Simulierte und analytische Einzelmolekülverteilungen für eine Binzeit von $\Delta T = 0.1 \text{ ms}$ und einer Diffusionskonstanten $D = 2.8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Die analytische Verteilung ist mit einem um den Faktor $\beta(\Delta T)$ reduzierten μ_{\max} berechnet worden. Um den Fehler durch das endliche Simulationsvolumen abschätzen zu können, sind die Einzelmolekülverteilungen für unterschiedliche Gittergrößen $N_g = 512$ und $N_g = 1024$ simuliert worden.

en nur für kleine Photonenzahlen n zu erkennen. Dabei reduzieren sich die Residuen mit zunehmendem Simulationsvolumen.

Die oben beschriebene gute Übereinstimmung motiviert dazu, auch die Signalverteilung $P_{\text{sig}}(n)$ für $\mu_{\max} \rightarrow \beta(\Delta T)\mu_{\max}$ analytisch zu berechnen und mit einer Simulation zu vergleichen. Dazu wurde durch eine Simulation die Signalverteilung für $C = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ und $\Delta T = 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}$ generiert. Die sich ergebende Verteilung ist in Abbildung 6.4 mit Kreuzen gekennzeichnet. Die simulierte Verteilung kann mit der analytisch berechneten Signalverteilung für $\mu_{\max} \rightarrow \beta(\Delta T)\mu_{\max}$, dargestellt als durchgezogene Linie, verglichen werden. Für die Berechnung der analytischen Signalverteilung wurde die mittlere Teilchenzahl $\langle m \rangle$ aus den Nullereignissen der Simulation bestimmt. Obwohl die Einzelmolekülverteilung gut mit der Simulation übereinstimmt, werden bei den Signalverteilungen deutliche Unterschiede besonders für große Photonenzahlen n sichtbar. Diese Abweichungen sind nicht ursächlich durch eine falsche mittlere Teilchenzahl $\langle m \rangle$ verursacht. Dies ist deutlich bei

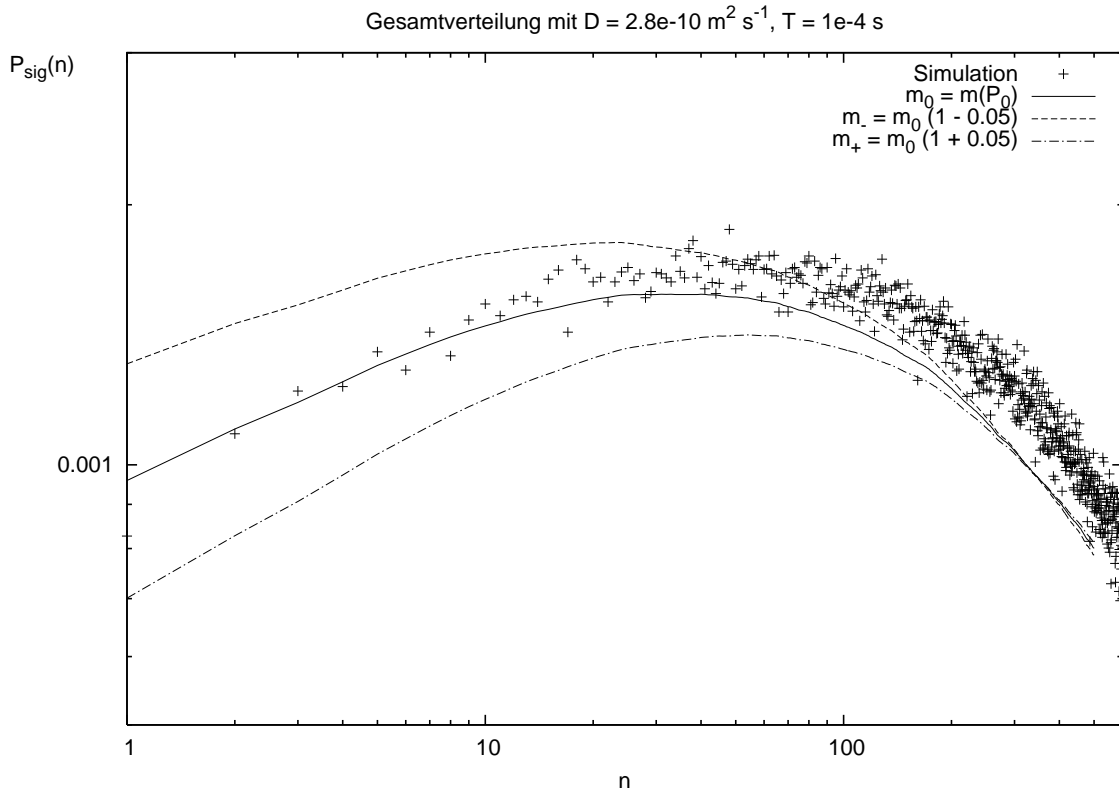


Abbildung 6.8: Signalverteilungen $P_{sig}(n)$ für eine Binzeit von $\Delta T = 0.1 \text{ ms}$ und einer Diffusionskonstanten $D = 2.8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Die der analytischen Signalverteilung zugrundeliegende Einzelmolekülverteilung ist mit einer um den Faktor $\beta(\Delta T)$ reduzierten maximalen Photondetektionsrate μ_{max} berechnet worden. Für die analytische Berechnung wurden unterschiedliche mittlere Teilchenanzahlen $\langle m \rangle$ gewählt. Die durchgezogene Linie zeigt die analytische Signalverteilung deren mittlere Teilchenanzahl $\langle m_0 \rangle$ aus den Nullereignissen $m_0 = m(P_0)$ der Simulation bestimmt wurde. Für die gestrichelt dargestellten Verteilungen wurde diese um 5% erhöht (m_+) bzw. erniedrigt (m_-).

einer Erhöhung bzw. Verringerung der Teilchenzahl um 5% (siehe gestrichelte Linien in Abbildung 6.4) zu erkennen. Auf der anderen Seite beruht die analytische Signalverteilung auf einer offensichtlich korrekten Einzelmolekülverteilung. Das Versagen der Poissonverteilung bei der Wichtung der Beiträge unterschiedlich vieler Moleküle könnte hierfür die Ursache sein. So wäre es möglich, dass im diffusiven Fall hohe Molekülanzahlen stärker beitragen als es durch die Poissonverteilung berücksichtigt wird. Die Berücksichtigung diffusiver Beiträge zu den Verteilungen kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abschliessend geklärt werden und macht weitergehende theoretische Betrachtungen notwendig.

Kapitel 7

Fazit

Fluoreszenzfluktuationsexperimente (FFE) mit modernen konfokalen Mikroskopen und leistungsfähiger Detektionselektronik verfügen über die nötige Empfindlichkeit um Fluoreszenzsignale von einzelnen Molekülen beobachten zu können. Die gemessenen Amplitudenfluktuationen des Fluoreszenzsignals können mit der Methode der Photonenzahlenverteilung analysiert werden. Trotz der Erfolge, die bereits mit der Methode der Photonenzahlenverteilung erzielt werden konnten, existiert bisher noch kein Modell, das eine geschlossene Beschreibung der zugrunde liegenden Einzelmolekülverteilung erlaubt. In dieser Arbeit ist es gelungen, die Einzelmolekülverteilung auf der Grundlage eines physikalisch motivierten Beobachtungsvolumens für beliebige FFE zu formulieren. Hierauf aufbauend wird eine geschlossene Theorie der Photonenzahlenverteilungen für kleine Binzeiten entwickelt.

Für unendliche Volumina kann mit der Mandelschen Formel keine interpretierbare Einzelmolekülverteilung definiert werden. Die bisher veröffentlichten Ansätze umgehen diese Schwierigkeit mit Hilfe heuristischer Prinzipien. Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell verwendet ein Beobachtungsvolumen, das durch die molekularen und apparativen Größen in einem FFE eindeutig bestimmt ist. Moleküle die sich "innerhalb" dieses Volumens befinden, weisen eine von Null verschiedene Emissions- bzw. Detektionswahrscheinlichkeit auf, so dass für eine Molekülspezies die charakteristische Einzelmolekülverteilung definiert werden kann. Für diese Einzelmolekülverteilung wurden die Momente und der Mandelsche Q -Faktor berechnet. Es konnte gezeigt werden, dass die Information über die Konzentration eines Mehrteilchensystems im Wesentlichen in den Nullereignissen der Photonenzahlverteilungen enthalten ist. Dies ermöglicht eine vollständige Beschreibung der Signalverteilung eines Mehrteilchensystems auf Basis des Beobachtungsvolumens und der Einzelmolekülverteilung. Für die Signalverteilung konnte eine analytisch handhabbare Rekursionsformel abgeleitet werden. Mit ihrer Hilfe lassen sich die Momente der Signalver-

teilungen als rekursive Funktion der Einzelmolekülmomente formulieren. Der im weiteren Verlauf der Arbeit entwickelte Formalismus gestattet es, die Einzelmolekülverteilung einer Molekülspezies aus der messbaren Signalverteilung zu rekonstruieren. Der aufgezeigte Weg eröffnet neue Möglichkeiten in der Analyse von FFE.

Das Beobachtungsvolumen und die Einzelmolekülverteilung sind eng mit dem Begriff der lokalen molekularen Helligkeit verknüpft. Die lokale molekulare Helligkeit ist ein Maß für die Sichtbarkeit eines Moleküls an einem Raumpunkt. Das für beliebige Helligkeitsfunktionen entwickelte Modell wurde für den Spezialfall einer gaußförmigen Helligkeit analytisch ausgewertet. Die Annahme einer gaußförmigen Helligkeit ist eine vor allem in der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie übliche Näherung. Die analytischen Formeln zeigen, dass das effektive Beobachtungsvolumen durch die Tailenparameter und das Maximum der Gaußfunktion eindeutig bestimmt ist. Dies unterscheidet es grundlegend vom Volumen der Korrelationsspektroskopie, das nur von den Tailenparametern abhängt. Die quantitativen Betrachtungen veranschaulichen, dass beide Volumina ähnliche Größenordnungen aufweisen. Im Gegensatz zum effektiven Beobachtungsvolumen zeigt die analytische Form der Einzelmolekülverteilung nur eine Abhängigkeit vom Maximum der Gaußfunktion. Für eine gaußförmige Helligkeit kann dieses Maximum aus den ersten beiden Momenten der messbaren Gesamtverteilung bestimmt werden.

Um die Leistungsfähigkeit des in dieser Arbeit entwickelten Modells der Photonenzahlverteilungen zu demonstrieren, wurde ein Vergleich mit simulierten Verteilungen durchgeführt. Die simulierten Verteilungen enthalten dieselben stochastischen Schwankungen, wie sie auch im Experiment zu erwarten sind. Die *a priori*-Berechnungen der simulierten und der analytischen Einzelmolekül- und Signalverteilungen stimmen sehr gut überein. Ferner konnte die Einzelmolekülverteilung aus den simulierten Signalverteilung rekonstruiert werden. Es konnte eine deutliche Kongruenz zwischen den exakten und den rekonstruierten Werten festgestellt werden.

Die experimentelle Verifikation der in dieser Arbeit dargestellten grundlegenden Konzepte ist der nächste logische Schritt, bevor ein weiterer Ausbau der Theorie erfolgt. Konfokale Messungen an fluoreszierenden Mikropartikeln und Standardfarbstoffen sind hierzu geeignet. Mit Eichmessungen lassen sich die effektiven Volumina der verwendeten Farbstoffe bestimmen. Mit den bekannten effektiven Volumina können Messungen an Verdünnungsreihen der entsprechenden Farbstoffe erfolgen, um deren Konzentration und Einzelmolekülverteilung zu bestimmen. Zusätzlich ist es möglich, die Konzentrationen der Verdünnungsreihe und die Tailenparameter der Apparatur mit der bereits etablierten Methode der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zu bestimmen, um Quervergleiche

durchzuführen. Für einen konfokalen Aufbau ist die molekulare Helligkeit näherungsweise durch eine Gaußfunktion beschreibbar. Aus den ersten beiden Momenten der gemessenen Gesamtverteilungen ist dann die maximale Photonendetektionsrate des Experiments bestimmbar. Diese kann dazu verwendet werden, die Einzelmolekülverteilung zu berechnen und mit Ergebnissen aus den Messungen zu vergleichen.

Eine experimentelle Verifikation der grundlegenden Eigenschaften des in dieser Arbeit vorgestellten Modells würde weitere theoretische Betrachtungen nach sich ziehen. Von zentraler praktischer Bedeutung ist die Frage, inwieweit die Abläufe in biochemischen Prozessen die Einzelmolekülverteilung der beteiligten Fluorophore beeinflussen. Grundsätzlich ist dies nur möglich, wenn die entsprechenden Prozesse eine Veränderung der lokalen molekularen Helligkeit bewirken. Die Berechnung und der Vergleich von Einzelmolekülverteilungen mit unterschiedlich modellierten Helligkeiten wären ein erster Schritt, sich aus theoretischer Sicht dieser Fragestellung zu nähern.

Die in der Arbeit dargestellten Zusammenhänge beziehen sich im Wesentlichen auf kleine Binzeiten. Die Erweiterung der Theorie auf lange Binzeiten hätte verschiedene Konsequenzen. Durch die Wahl einer ausreichend großen Binzeit könnte eine erhöhte statistische Genauigkeit der Photonenzahlen erreicht werden. Ferner haben die Simulationen für lange Binzeiten gezeigt, dass die Dynamik der Moleküle eine Änderung der Photonenzahlenverteilungen bewirkt. Gelänge es, diese theoretisch zu beschreiben, so könnten die hierfür relevanten Parameter aus den Verteilungen bestimmt werden. Die Betrachtungen im letzten Abschnitt des vorigen Kapitels geben Grund zu der Annahme, dass zumindest die Einzelmolekülverteilung auch für lange Binzeiten in einer geschlossenen Form dargestellt werden kann. Das Auffinden einer theoretische Ableitung des *ad hoc* eingeführten Diffusionsfaktors β wäre ein erster Erfolg für einen weiteren Ausbau des Modells.

Tabellenverzeichnis

4.1	Stochastische Größen zur Berechnung von Photonenzahlverteilungen	32
5.1	Momente der Einzelmolekülverteilung	58
5.2	Momente der Signalverteilung	64
6.1	Simulationsparameter	70
6.2	Charakteristische Einzelmolekülgrößen	73
6.3	Charakteristische Größen aus MC-simulierten Signalverteilungen	77
6.4	Mittelwerte des effektiven Volumens	78
6.5	Einzelmolekülmomente aus simulierten Signalverteilungen	78
6.6	Momente der molekularen Helligkeit aus simulierten Signalverteilungen . .	79

Abbildungsverzeichnis

2.1	Jablonski-Diagramm	6
2.2	Spektrum des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 6G Red	7
2.3	Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops	12
2.4	Zeitlicher Verlauf der mit einem konfokalen Mikroskop detektierten Fluoreszenzintensität	14
2.5	Theoretische Autokorrelationsfunktion	18
5.1	Abhängigkeit des effektiven Volumens von der maximalen Photonendetektionsrate	54
5.2	Theoretische Einzelmolekülverteilung	57
5.3	Beiträge zu den Momenten der Einzelmolekülfunktion	59
5.4	Mittlere molekulare Helligkeit	60
5.5	Signalverteilung für verschiedene Konzentrationen	62
5.6	Skalierte Signalverteilungen	63
5.7	Mittelwert und Varianz der Signalverteilung für verschiedene Laserleistungen	65
5.8	Gesamtverteilungen	66
6.1	Vergleich der simulierten und analytisch berechneten Einzelmolekülverteilungen	72
6.2	Simulierte und analytische Signalverteilungen im Vergleich	75
6.2	Signalverteilungen im Vergleich	76
6.3	Einzelmolekülfunktion aus Signalverteilung $C = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	80
6.3	Einzelmolekülfunktion aus Signalverteilung $C = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$	81

6.4	Mittlere Rate aus simulierten Signalverteilungen	82
6.5	Mittlere effektive molekulare Helligkeit	84
6.6	Einzelmolekülverteilung für endliche Binzeiten	85
6.7	Korrigierte Einzelmolekülverteilung für endliche Binzeiten	86
6.8	Signalverteilung für endliche Binzeiten	87

Literaturverzeichnis

- [1] WB Amos and JG White. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biology of the Cell*, 95(6):335–342, 2003.
- [2] Y. Chen, J.D. Muller, Q.Q. Ruan, and E. Gratton. Molecular Brightness Characterization of EGFP In Vivo by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 82(1):133–144, 2002.
- [3] Y. Chen, J.D. Muller, P.T.C. So, and E. Gratton. The Photon Counting Histogram in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 77(1):553–567, 1999.
- [4] Y. Chen, L.N. Wei, and J.D. Muller. Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26):15492–15497, 2003.
- [5] L.M. Davis, G. Shen, and D.A. Ball. Saturation effects in fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. of SPIE Vol*, 5700:129, 2005.
- [6] PS Dittrich and P. Schwille. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one-and two-photon excitation. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 73(8):829–837, 2001.
- [7] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, and CAM Seidel. Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: evidence of two-step photolysis. *Anal. Chem*, 70(13):2651–2659, 1998.
- [8] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, and CAM Seidel. In *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*, 1999.
- [9] M. Ehrenberg and R. Rigler. Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. *Chem. Phys.*, 4:390–401, 1974.

- [10] A. Einstein. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 17(4):548–560, 1905.
- [11] E.L. Elson. Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory. *Biopolymers*, 13:1–27, 1974.
- [12] J. Enderlein, D.L. Robbins, W.P. Ambrose, and R.A. Keller. Molecular shot noise, burst size distribution, and single-molecule detection in fluid flow: effects of multiple occupancy. *J. Phys. Chem. A*, 102:6089–6094, 1998.
- [13] L. Fahrmeir, H. Kaufmann, and F. Ost. *Stochastische Prozesse*. Hanser Verlag, München, 1981.
- [14] A. Fick. Über Diffusion. *Poggendorff's Annalen der Physik und Chemie*, 94:59–86, 1855.
- [15] J.W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill, New York, 2nd edition, 1996.
- [16] H. Haken. Synergetics. *Naturwissenschaften*, 67(3):121–128, 1980.
- [17] S.W. Hell and J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11):780–782, 1994.
- [18] R.P. Hertzberg and A.J. Pope. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Curr Opin Chem Biol*, 4(4):445–451, 2000.
- [19] S.T. Hess and W.W. Webb. Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 83:2300–2317, 2002.
- [20] H. H. Hopkins. The Frequency Response of a Defocused Optical System. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 231(1184):91–103, 1955.
- [21] Bo Huang, T.D. Perroud, and R.N. Zare. Photon counting histogram: One-photon excitation. *ChemPhysChem*, 5:1523–1531, 2006.
- [22] A. Jabłoński. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, 94(1):38–46, 1935.

- [23] E.P.C. Kao. *An introduction to stochastic processes*. Duxbury Press Belmont, Calif., USA, 1997.
- [24] P. Kask, K. Palo, D. Ullmann, and K. Gall. Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *PNAS*, 96:13756–13761, 1999.
- [25] H. Kogelnik and T. Li. Laser beams and resonators. *Applied Optics*, 5:1550–1567, 1996.
- [26] D.E. Koppel, D. Axelrod, J. Schlessinger, E.L. Elson, and W.W. Webb. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophys. J.*, 16:1315–1329, 1976.
- [27] V.E. Korobov and A.K. Chibisov. Primary photoprocesses in colorant molecules. *Russ. Chem. Rev.*, 52:27–42, 1983.
- [28] J.R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, 1983.
- [29] L.D. Landau and EM Lifschitz. *Lehrbuch der theoretischen Physik*. Akademie-Verlag, 1966.
- [30] D. Magde, E.L. Elson, and W.W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 29:704–708, 1972.
- [31] D. Magde, EL Elson, and WW Webb. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers*, 13(1):29–61, 1974.
- [32] L. Mandel. Fluctuations of photon beams and their correlations. *Proc. Phys. Soc.*, 72:1037–1048, 1958.
- [33] L. Mandel. Sub-poissonian photon statistics in resonance fluorescence. *Optics Letters*, 4:205–207, 1979.
- [34] Harald P. Mathis. *Beugungsbegrenzte und raum-zeitlich aufgelöste Einzelmoleküldetektion von DNA und tRNA in Siliziumstrukturen*. PhD thesis, Universität Jena, 2000.
- [35] U. Meseth, T. Wohland, R. Rigler, and H. Vogel. Resolution of Fluorescence Correlation Measurements. *Biophysical Journal*, 76(3):1619–1631, 1999.

- [36] J.D. Muller. Cumulant Analysis in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 86(6):3981–3992, 2004.
- [37] IUPAC Commission on Photochemistry. Glossary of terms used in photochemistry. *Pure Appl. Chem.*, 68:2223–2286, 1996.
- [38] K. Palo, L. Brand, C. Eggeling, S. Jager, P. Kask, and K. Gall. Fluorescence Intensity and Lifetime Distribution Analysis: Toward Higher Accuracy in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 83(2):605–618, 2002.
- [39] K. Palo, U. Mets, S. Jager, P. Kask, and K. Gall. Fluorescence Intensity Multiple Distributions Analysis: Concurrent Determination of Diffusion Times and Molecular Brightness. *Biophysical Journal*, 79(6):2858–2866, 2000.
- [40] H. Qian and EL Elson. Distribution of Molecular Aggregation by Analysis of Fluctuation Moments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(14):5479–5483, 1990.
- [41] H. Qian and EL Elson. On the analysis of high order moments of fluorescence fluctuations. *Biophysical Journal*, 57(2):375–380, 1990.
- [42] H. Qian and E.L. Elson. Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-d fluorescence correlation spectroscopy. *Applied Optics*, 30, 1991.
- [43] R. Rigler, U. Mets, Widengren J., and P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.*, 22:169–175, 1993.
- [44] R. Rigler and J. Widengren. Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy. *BioScience*, 40:180–183, 1990.
- [45] T.J. Stieltjes. Recherches sur les fractions continues. *Annales de la facult des sciences de Toulouse*, 8:1–122, 1894.
- [46] E. Van Rompaey, Y. Chen, J.D. Müller, E. Gratton, E. Van Craenenbroeck, Y. Engelborghs, S. De Smedt, and J. Demeester. Fluorescence fluctuation analysis for the study of interactions between oligonucleotides and polycationic polymers. *Biol. Chem*, 382:379–386, 2001.
- [47] J. Widengren and R. Rigler. Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Bioimaging*, 4:149–157, 1996.
- [48] N. Wiener. Differential space. *J. Math. Phys*, 2:131–174, 1923.

- [49] N. Wiener. *Generalized Harmonic Analysis*. Massachusetts Institute of Technology, 1930.
- [50] C. Zander. *Single molecule detection in solution*. 2002.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an den Leiter der Fraunhofer Forschungsgruppe BioMOS Dr. Harald P. Mathis, der mich über die Entstehungszeit dieser Dissertation hinweg als Betreuer begleitet hat. Sein Engagement und sein Vertrauen haben mich immer wieder weiter gebracht und über so manche Hürde hinweggeholfen.

Prof. Dr. Joachim Stolze danke ich für die bereitwillige Übernahme der Betreuung und Beurteilung dieser Arbeit.

Dekan Prof. Dr. Metin Tolan möchte ich dafür danken, dass er die Dissertation an der Universität Dortmund ermöglicht hat, ebenso PD Dr. Heinz Hövel für die Übernahme des Koreferats.

Mein spezieller Dank gilt Dr. Jörg Ackermann für die teilweise nächtelange gemeinsame Arbeit an der Simulation und die zahlreichen Gespräche, die immer wieder ein neues Licht ins Dunkle gebracht haben. Nicht zu vergessen sein unerschöpflicher Ideenreichtum, der so manchen Lösungsweg eröffnete.

Ich bedanke mich bei den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Fraunhofer Forschungsgruppe BioMOS, die mir mit Rat und Tat, Sonderanfertigungen und nicht zuletzt mit Kaffee und Kuchen über die Jahre hinweg zur Seite standen. Prof. Günter Wagner hatte immer ein offenes Ohr für alle Fragen und stand mir als erfahrener Ratgeber zur Seite. Dr. Thomas Rücker gelang es, mich freundschaftlich und nachdrücklich zu motivieren. Kai Lueghausen, Dr. Thomas Kirner und Dr. Sylvia Eheses haben mich durch Zusammenarbeit und Gespräche im Verlauf der Arbeit immer wieder vorangebracht. Danken möchte ich auch Erwin Rambow der bei technischen Problemen immer hilfreich zur Seite stand.

Erwähnen möchte ich hier auch meine Freunde und Kollegen Thorsten Pieper und Matthias Jungmann, die immer bereit waren, Unklarheiten und Fragen mit mir auszudiskutieren, und dazu beigetragen haben, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich für ihre jahrelange Unterstützung in allen Lebenslagen und den unerschütterlichen Glauben an mich danken.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Katja für ihren Beistand auch in schwierigen Zeiten und einfach dafür, dass es sie gibt.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient zu haben. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch an keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Bonn, im September 2007

Benjamin Greiner