

Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine empfindliche Messmethode, um strukturelle und insbesondere dynamische Eigenschaften von Biomolekülen zu untersuchen. Anstelle der Lichtabsorption wird das von der Probe reemittierte Fluoreszenzlicht beobachtet. Wir betrachten eine Probe, die in den S_1 -Zustand angeregt sei. Die Konzentration an angeregten Molekülen zum Zeitpunkt $t = 0$ sei $n_1(0)$. Für die zeitliche Entwicklung der Konzentration gilt, falls nur die Fluoreszenz den S_1 -Zustand entvölkert,

$$n_1(t) = n_1(0) \exp[-k_R t]$$

mit $k_R = A_{10} = \hbar \omega^3 / (\pi^2 c^3) B_{10}$ (index R : 'radiative'). Hier ist $k_R = 1/\tau_R$ der Ratenkoeffizient für die Fluoreszenz, τ_R die Lebensdauer, A_{10} und B_{10} sind die Einsteinkoeffizienten für spontane und induzierte Emission. Andere Mechanismen führen aber ebenfalls dazu, dass der angeregte Zustand entvölkert wird. Für den Ratenkoeffizienten der Entvölkerung des angeregten Zustands, welche sich im Abklingen der beobachteten Fluoreszenz widerspiegelt, gilt

$$k_F = k_R + k_{ic} + k_{is} + k_q [Q] .$$

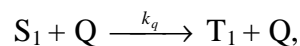
Der zweite Term der rechten Seite, k_{ic} , stammt von der inneren Konversion, der dritte, k_{is} , vom 'intersystem crossing', und der letzte, $k_q[Q]$, resultiert aus dem 'quenching'-Prozess. Der Anteil der angeregten Elektronen, der durch Fluoreszenz wieder in den Grundzustand geht, ist durch die Fluoreszenz-Quantenausbeute ϕ_F gegeben,

$$\phi_F = \frac{k_R}{k_F} .$$

Bei der **inneren Konversion** geht die Anregungsenergie durch Dissipation in Schwingungsmoden oder durch Kollision mit Lösungsmittelmolekülen verloren. Beide Prozesse nehmen mit ansteigender Temperatur zu, so dass die Fluoreszenz mit ansteigender Temperatur abnimmt. Dieser Effekt kann die temperaturabhängige Messung makromolekularer Konformationsänderungen mittels Fluoreszenz erschweren.

Beim **'intersystem crossing'** wird der angeregte Singulett-Zustand in einen angeregten Triplett-Zustand übergeführt. Dieser Zustand geht entweder mittels Phosphoreszenz oder durch strahlungslose Prozesse in den Grundzustand über. Da die Lebensdauer des Triplett-Zustands relativ lang ist, konkurrieren Kollisionsprozesse und die innere Konversion stark mit der Phosphoreszenz. Sie wird daher nur selten in Biomolekülen beobachtet.

Ein weiterer, mit der Fluoreszenz konkurrierender Prozess ist das **'Quenching'** (Löschung). Es werden dabei zwei Prozesse unterschieden. Beim dynamischen oder Kollisions-Quenching konvertieren gewisse Moleküle oder Ionen (Q), z. B. Grundzustands-Tripletts wie O_2 , NO , in einer bimolekularen Reaktion,



den Singulettzustand (S_1) des angeregten Niveaus in einen Triplettzustand (T_1). Beim statischen 'quenching' geht das Quenchmolekül (Q) einen nicht fluoreszierenden Komplex mit dem fluoreszierenden Molekül (F) ein,

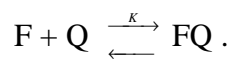


Abb. 1 zeigt ein Jablonski-Diagramm für Fluoreszenz-Anregung und Emission, bei dem zwei angeregte elektronische Singulett-Zustände auftreten.

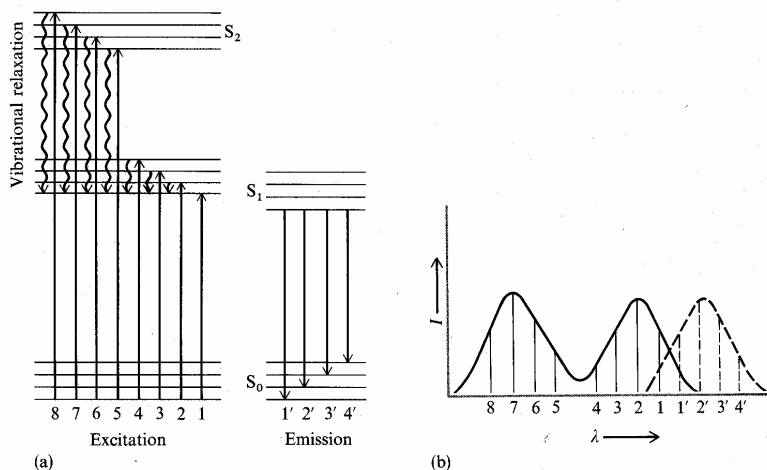


Abb. 1: Anregung und Emission von Fluoreszenz. (a) Energieniveaus; (b) Spektrum.

Sowohl die innere Konversion von S_2 nach S_1 als auch die Relaxation in den Schwingungsgrundzustand von S_1 sind gewöhnlich sehr viel schneller als die Emission des Fluoreszenzphotons. Dies bedeutet, dass die Fluoreszenzstrahlung in der Regel vom Grundschwingungsniveau des ersten elektronischen Zustands emittiert wird. Somit ist das Fluoreszenzspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge. Falls der Grundzustand und der angeregte elektronische Zustand eine ähnliche Schwingungsstruktur haben, verhält sich das Emissionsspektrum spiegelbildlich zum Absorptionsspektrum. Ausgehend von den oben genannten Argumenten würde man erwarten, dass die Absorption 1 und die Emission 1' (Abb. 1) bei der gleichen Wellenlänge gemessen werden. Man findet aber, dass das Fluoreszenzspektrum um $\sim 20 - 50$ nm zu längeren Wellenlängen verschoben ist (Stokes-Verschiebung oder Stokes-Shift). Dieser Effekt kommt für Fluorophore in Lösung zustande: Vor der Absorption sind die Lösungsmittelmoleküle energetisch günstig in Bezug auf den Grundzustand angeordnet. Während des schnellen Absorptionsprozesses (~ 1 fs) haben die Lösungsmittelmoleküle keine Zeit zur Reorientierung. Für die Absorption ist eine bestimmte Energie E notwendig. Nach der Anregung kann sich das Lösungsmittel günstig um das angeregte Molekül herum orientieren. Dies führt zu einer Energieabsenkung (Abb. 2).

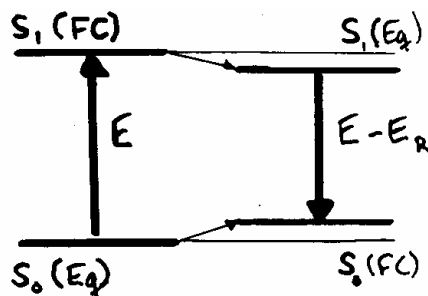


Abb. 2: Energiezustände bei der Stokes-Verschiebung.

Nach der Emission des Fluoreszenzphotons ist das Lösungsmittel ungünstig um den Grundzustand herum angeordnet, und somit wird das Grundniveau angehoben. Beide Prozesse vermindern also den Energieunterschied der Niveaus. Eine entsprechende Betrachtung ist gültig für Fluorophore im Inneren von Biomolekülen. Dann spielt die molekulare Umgebung die Rolle des Lösungsmittels.

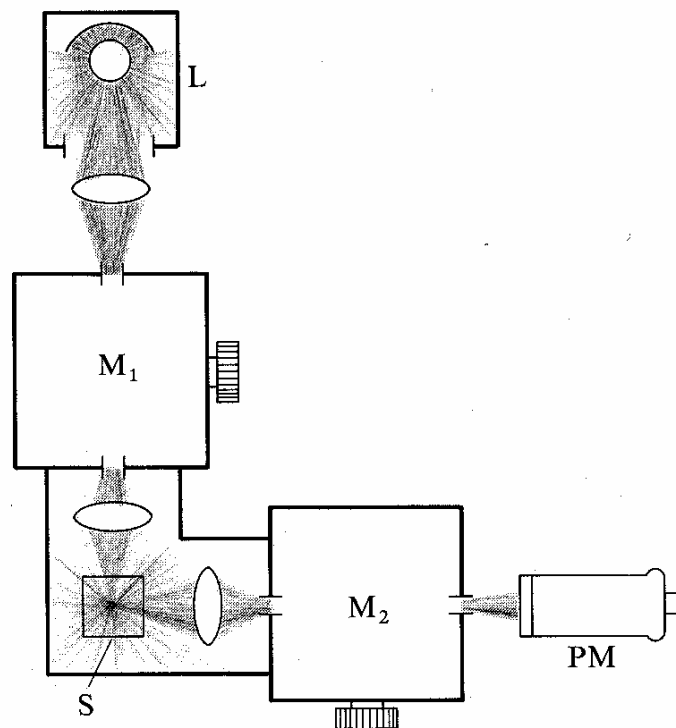


Abb. 3: Apparatur zur Messung der statischen Fluoreszenz. M_1 ist der Anregungs-, M_2 der Emissionsmonochromator, L ist die Lichtquelle, PM der Photomultiplier und S die Probe.

Abb. 3 zeigt eine typische experimentelle Anordnung zur Messung der statischen Fluoreszenz. Das Anregungslicht von der breitbandigen Lichtquelle L kann mit dem ersten Monochromator M_1 durchgestimmt werden. Das von der Probe S emittierte Fluoreszenzlicht wird mittels des zweiten Monochromators M_2 wellenlängenabhängig gemessen. Zwei verschiedene Modi werden für die spektralen Messungen angewandt. Zum einen kann der Monochromator M_1 auf eine bestimmte Anregungswellenlänge (z.B. bei der Wellenlänge maximaler Absorption) fixiert bleiben, während M_2 durchgestimmt wird. Man erhält auf diese Weise ein **Emissionsspektrum**. Im zweiten Modus wird M_2 fixiert (z.B. bei der Wellenlänge maximaler Emission), und M_1 wird durch das Absorptionsband gescannt (**Anregungsspektrum**). Da die angeregten Schwingungszustände sehr schnell in den Grundschwingungszustand des angeregten elektronischen Niveaus übergehen, ist das Anregungsspektrum üblicherweise gleich dem Absorptionsspektrum für eine reine Probe. Die Aufnahme eines Anregungsspektrums hat gegenüber dem Absorptionsspektrum den Vorteil, dass zwei Chromophore, von denen nur einer fluoresziert, leicht getrennt werden können.

Bei Fluoreszenzmessungen steigt die emittierte Intensität nur bei kleinen Probenkonzentrationen mit der Konzentration an. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Emission sogar mit der Konzentration ab. Dieses Verhalten wird durch den inneren Filtereffekt erklärt (Abb. 4): Bei hohen Konzentrationen ist die Absorption so stark, dass das Licht nur in einer dünnen Lamelle an der beleuchteten Seite absorbiert wird. Das meiste Fluoreszenzlicht wird in der Probe absorbiert oder nicht vom Ausgangsspalt gesammelt. Man muss also beachten, dass die Konzentration hinreichend niedrig eingestellt wird, damit der innere Filtereffekt nicht stört. Natürlich muss die Konzentration ausreichend hoch sein, um Fluoreszenzspektren in guter Qualität messen zu können.

Die Möglichkeit, bei sehr geringer Probenkonzentration (10^{-9} M) arbeiten zu können, ist ein großer Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie. Sie wird seit einigen Jahren sogar zur Messung an einzelnen Fluorophoren eingesetzt.

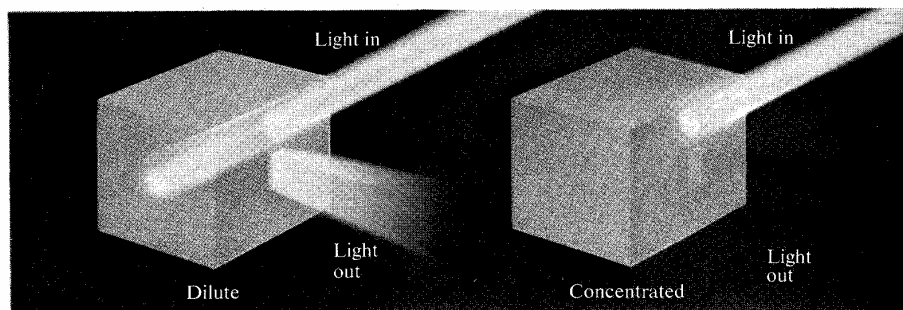


Abb. 4: Innerer Filtereffekt: Auf die Probe einfallendes und emittiertes Licht.

Absolute Messungen der Quantenausbeute sind schwierig, da man die Emissions- und Absorptionsraten exakt messen muss. Daher wird sie in der Regel relativ zu einem Standard bestimmt. Alternativ lässt sich die Quantenausbeute auch über die Zerfallszeiten mit Hilfe von Experimenten in der Zeit- oder Frequenzdomäne ermitteln,

$$\phi = \frac{\tau_F}{\tau_R} .$$

Mit zeitaufgelösten Experimenten lassen sich die Kollisionsrate mit dem Quencher, Energietransferraten und Raten von Reaktionen im angeregten Zustand bestimmen. Die Zerfallszeiten werden auch verwendet, um Rotationskorrelationszeiten aus Messungen der Fluoreszenz-anisotropie zu messen.

Tab. 1: Fluoreszenzcharakteristik verschiedener intrinsischer Fluorophore

Substance	Conditions	Absorption		Fluorescence [§]		Sensitivity	
		λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} $\times 10^{-3}$	λ_{\max} (nm)	ϕ_F	τ_F (nsec)	$\epsilon_{\max}\phi_F$ $\times 10^{-2}$
Tryptophan	H ₂ O, pH 7	280	5.6	348	0.20	2.6	11.
Tyrosine	H ₂ O, pH 7	274	1.4	303	0.14	3.6	2.0
Phenylalanine	H ₂ O, pH 7	257	0.2	282	0.04	6.4	0.08
Y base	Yeast tRNA ^{Phe}	320	1.3	460	0.07	6.3	0.91
Adenine	H ₂ O, pH 7	260	13.4	321	2.6×10^{-4}	<0.02	0.032
Guanine	H ₂ O, pH 7	275	8.1	329	3.0×10^{-4}	<0.02	0.024
Cytosine	H ₂ O, pH 7	267	6.1	313	0.8×10^{-4}	<0.02	0.005
Uracil	H ₂ O, pH 7	260	9.5	308	0.4×10^{-4}	<0.02	0.004
NADH	H ₂ O, pH 7	340	6.2	470	0.019	0.40	1.2

Tab. 1 zeigt die Fluoreszenzeigenschaften von Chromophoren, die in Proteinen und Nucleinsäuren vorkommen (intrinsische Fluorophore). Die Anzahl dieser intrinsischen Fluorophore ist sehr klein; außerdem absorbieren sie verhältnismäßig schwach. In vielen Proteinen wird die Fluoreszenz von Tryptophan dominiert. Da Tyrosin in Proteinen häufiger vorkommt, sollte man trotz der schwächeren Fluoreszenz im Vergleich zu Tryptophan mit einem wesentlichen Beitrag des Tyrosins rechnen. Allerdings wird Tyrosin durch ein benachbartes Tryptophan gequencht. Die gewöhnlichen Nucleinsäuren zeigen sehr schwache Fluoreszenz. Es ist aber möglich, Fluorophore hinzuzufügen, die an die betrachtete Probe binden. Dies kann über kovalente oder nichtkovalente Bindung des Farbstoffs an das Biomolekül erfolgen. Vielfach setzt man auch kovalent Farbstoff-markierte Immunglobulinmoleküle ein, die an ein bestimmtes Biomolekül binden und es damit markieren (Immunfluoreszenz). Diese extrinsischen Fluorophore können so gewählt werden, dass ihr Absorptionsspektrum nicht mit dem des betrachteten Biomoleküls zusammenfällt, so

dass die Fluoreszenz nur von dem extrinsischen Fluorophor stammt. Tab. 2 zeigt einige Beispiele aus der großen Anzahl extrinsischer Fluorophore. Die chemischen Strukturen sind in Abb. 5 zu sehen.

Tab. 2: Typische extrinsische Fluorophore

Probe*	Uses	Absorption		Emission ^b			Sensitivity $\epsilon_{\max}\phi_F \times 10^{-2}$
		λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} $\times 10^{-3}$	λ_{\max} (nm)	ϕ_F	τ_F (nsec)	
Dansyl chloride	Covalent attachment to protein: Lys, Cys	330	3.4	510	0.1	13	3.4
1,5-I-AEDANS	Covalent attachment to protein: Lys, Cys	360	6.8	480	0.5	15	34
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	Covalent attachment to protein: Lys	495	42	516	0.3	4	116
8-Anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS)	Noncovalent binding to proteins	374	6.8	454	0.98	16	67
Pyrene, and various derivatives	Polarization studies on large systems	342	40	383	0.25	100	100
Ethenoadenosine, and various derivatives	Analogs of nucleotides bind to proteins, incorporate into nucleic acids	300	2.6	410	0.40	26	10
Ethidium bromide	Noncovalent binding to nucleic acids	515	3.8	600	~1	26.5	38
Proflavine monosemicarbazide	Covalent attachment to RNA 3'-ends	445	15	516	0.02	—	30

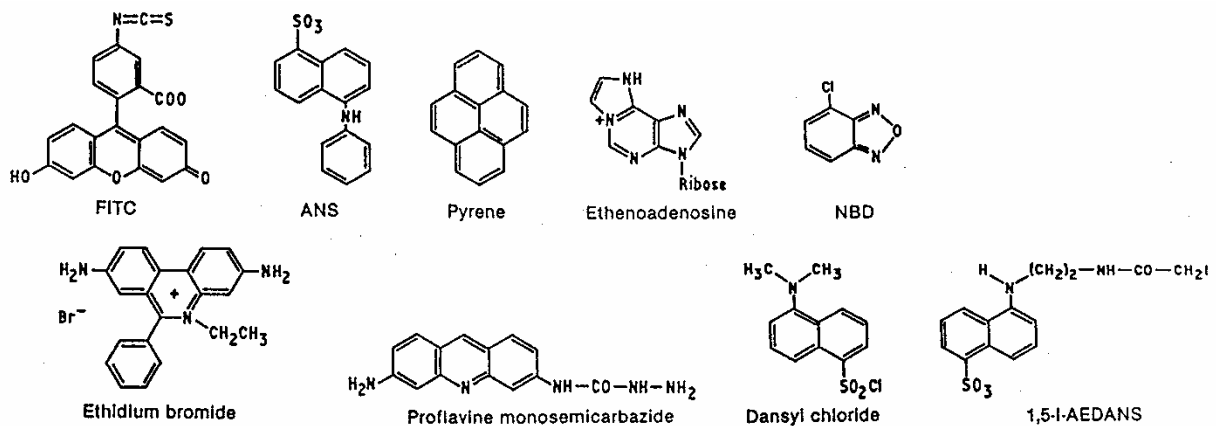


Abb. 5: Strukturen einiger extrinsischer Fluorophore.

Umgebungsabhängigkeit der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz ist generell stärker von der Umgebung beeinflusst als die Absorption. Diese höhere Sensitivität ist dadurch bedingt, dass dynamische Prozesse, die während der Verweilzeit der Fluorophore im angeregten Zustand ($\sim 1 - 10$ ns) stattfinden, die Fluoreszenzemission beeinflussen. Zu diesen Prozessen gehören: Lösungsmittelrelaxationen, chemische Reaktionen (Protonierung, Ligandenbindung), Veränderungen der Moleküllorientierung und Quenching. Der Absorptionsprozess läuft dagegen um Größenordnungen schneller ab, so dass die Umgebung effektiv statisch ist.

Im Folgenden soll die Konzentrationsabhängigkeit des Quenchings genauer untersucht werden. Damit kann z.B. im Falle des Kollisionsquenchings untersucht werden, ob sich der Fluorophor an der Oberfläche des Proteins (in Kontakt mit dem Lösungsmittel) oder in dessen

Innern befindet. Für den Quotienten der Fluoreszenzintensität (Quantenausbeute) bei Anwesenheit des Quenchers (F , ϕ) und der Fluoreszenzintensität ohne Quencher (F_0 , ϕ_0) gilt

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\phi_0}{\phi} = \frac{k_R / (k_R + k_{ic} + k_{is})}{k_R / (k_R + k_{ic} + k_{is} + k_q \cdot [Q])} .$$

Daraus folgt die Stern-Volmer Relation,

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\phi_0}{\phi} = 1 + \frac{k_q}{k_R + k_{ic} + k_{is}} [Q] .$$

Durch Einsetzen der Zerfallszeiten erhält man

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = \frac{\tau_0}{\tau} .$$

Die Quenchrage k_q kann mit einem Modell, bei dem die Fluorophore und die Quenchemoleküle als Kugeln mit Radien R_f bzw. R_q betrachtet werden, mittels Bestimmung ihrer Kollisionswahrscheinlichkeit bei gegebenen Diffusionskonstanten (D_f bzw. D_q) berechnet werden. Aus der Smoluchowski-Gleichung resultiert der bimolekulare Ratenkoeffizient für Kollisionen,

$$k_0 = \frac{4\pi N_A}{1000} (R_f + R_q) (D_f + D_q) .$$

Nicht jede Kollision führt zu einem Quenchprozess, mit der Quencheffizienz γ gilt daher

$$k_q = k_0 \cdot \gamma .$$

Da die Diffusionskonstanten bei Erhöhen der Temperatur größer werden, nimmt der Quenchvorgang mit höherer Temperatur zu. Die Steigung im Stern-Volmer-Plot wird demnach größer (Abb. 6). Eine umgekehrte Temperaturabhängigkeit kann für statisches Quenching beobachtet werden. Unter der Annahme, dass das fluoreszierende Molekül F und das Quenchemolekül einen nicht fluoreszierenden Komplex bilden, gilt für die Gleichgewichtskonstante K

$$\begin{aligned} K &= \frac{[FQ]}{[F][Q]} = \frac{[F_0] - [F]}{[F][Q]} \\ &= \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} , \end{aligned}$$

wobei $[F_0]$ die Gesamtkonzentration des Fluorophors darstellt, $[F_0] = [F] + [FQ]$. Damit folgt für das Intensitätsverhältnis

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] .$$

Es folgt also die gleiche $[Q]$ -Abhängigkeit wie für das dynamische Quenching. Da die Wahrscheinlichkeit, dass sich Quenchemoleküle und Fluorophore zu einem Komplex verbinden, mit höherer Temperatur abnimmt, erhält man eine kleinere Steigung in Abb. 6. Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturabhängigkeit lassen sich die beiden Quencharten unterscheiden. Bei Messungen der Lebensdauern sind beide Quenchmechanismen leicht

auseinanderzuhalten, da sich nur beim dynamischen Quenchen die Fluoreszenzlebensdauern mit der Konzentration des Quenchers verändern.

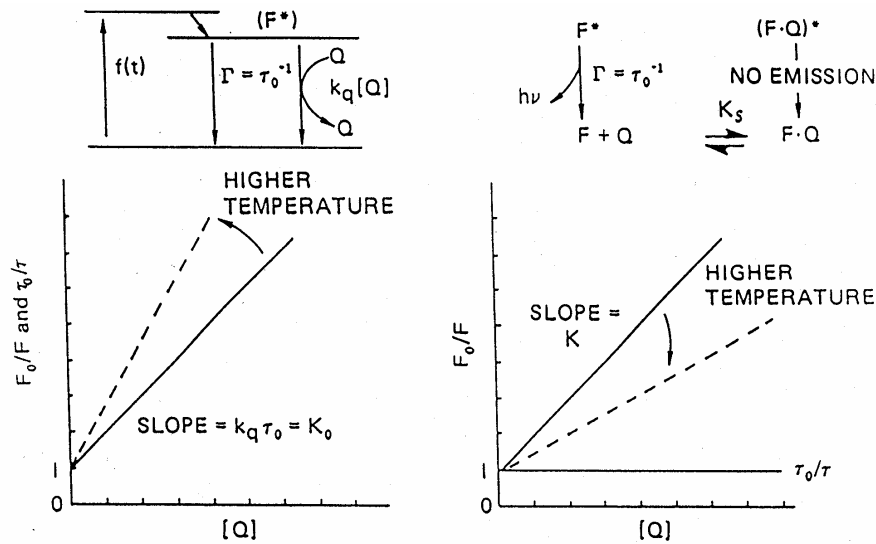


Abb. 6: Temperaturabhängigkeit der Stern-Volmer-Gleichung für dynamisches (links) und statisches Quenchen.

Singulett-Singulett Energietransfer (Förstertransfer)

Ein interessanter Effekt ergibt sich aus der Möglichkeit, dass Chromophore Quenchen bewirken können, die sich 10 – 100 Å von einem Fluorophor befinden. Betrachtet werden zwei verschiedene Moleküle, deren Spektren in Abb. 7 dargestellt sind.

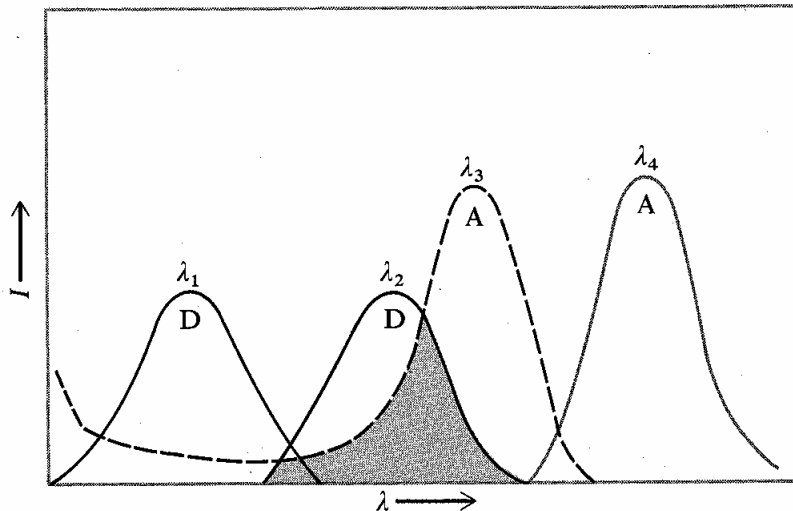
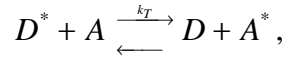


Abb. 7: Schematisches Spektrum eines Donor-Akzeptor-Paares. Gezeigt sind die Absorptions- und Emissionsspektren des Donors D und des Akzeptors A.

Der Chromophor mit dem höheren Absorptionsniveau ist der Donor D, der andere der Akzeptor A. Der Donor befindet sich im ersten angeregten (Singulett) Zustand. Durch innere

Konversion erreicht er schnell den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten Niveaus. Ist ein Überlapp der Emissionsbande des Donors mit der Absorptionsbande des Akzeptors gegeben, so kann folgende Resonanz auftreten:



wobei die Transferrate durch k_T gegeben ist. Der Akzeptor wird in den S_1 -Zustand angeregt, während der Donor in den elektronischen Grundzustand übergeht. Nach der Anregung des Akzeptors in den ersten elektronischen Zustand wird dieser schnell in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronischen Niveaus und der Donor in den Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundniveaus übergehen (Abb. 8).

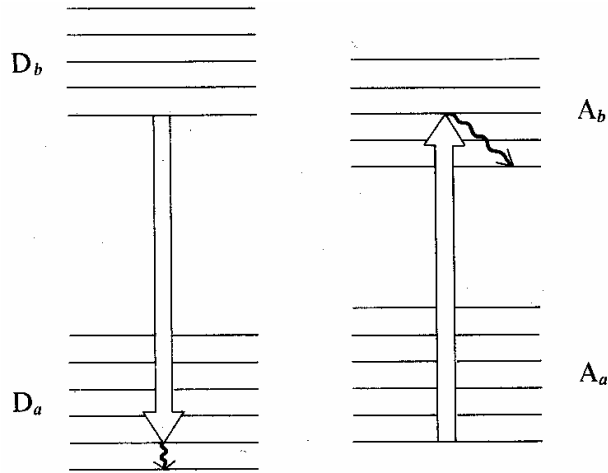


Abb. 8: Energietransfer durch resonante Wechselwirkung der Emission des Donors mit der Anregung des Akzeptors.

Somit ist der Rücktransfer unwahrscheinlich. Der Donor wird also durch die Anregung des Akzeptors gequencht. Für diesen Singulett-Singulett-Energietransfer kann man folgende Transfereffizienz ε definieren,

$$\varepsilon = \frac{k_T}{k_T + k_R^D + k_{ic}^D + k_{is}^D}.$$

Diese Effizienz kann bestimmt werden durch Vergleich der Fluoreszenz des Donors ohne Anwesenheit des Akzeptors (D) und bei Anwesenheit des Akzeptors (D, A). Man erhält für das Verhältnis

$$\frac{\phi_{D,A}}{\phi_D} = \frac{k_R^D / (k_R^D + k_{ic}^D + k_{is}^D + k_T)}{k_R^D / (k_R^D + k_{ic}^D + k_{is}^D)} = 1 - \varepsilon = \frac{\tau_{D,A}}{\tau_D}.$$

Um nützliche strukturelle Informationen aus dem Energietransfer zu bekommen, muss die gemessene Effizienz zu dem Abstand R zwischen den Chromophoren in Relation gesetzt werden. Dieser Zusammenhang wurde von Theodor Förster hergeleitet. Aufgrund der vorliegenden schwachen Kopplung kann Fermi's goldene Regel für die Berechnung verwendet werden. Für die Transferrate gilt dann

$$k_T(\nu) \propto \left| \langle \psi_D \psi_{A^*} | V | \psi_{D^*} \psi_A \rangle \right|^2$$

mit dem Dipol-Dipol Kopplungsoperator

$$V = \frac{\bar{\mu}_D \cdot \bar{\mu}_A}{R^3} - \frac{3(\bar{\mu}_D \cdot \bar{R})(\bar{R} \cdot \bar{\mu}_A)}{R^5} = \kappa \frac{|\bar{\mu}_D| \cdot |\bar{\mu}_A|}{R^3},$$

wobei die Abhängigkeit von der gegenseitigen Orientierung in dem Faktor κ zusammengefasst wurde. Durch Einsetzen des Kopplungsoperators ergibt sich

$$k_T(\nu) \propto \left| \frac{\kappa}{R^3} \langle \psi_D \psi_{A^*} | |\bar{\mu}_D| \cdot |\bar{\mu}_A| | \psi_{D^*} \psi_A \rangle \right|^2$$

$$\propto \frac{\kappa^2}{R^6} \left| \langle \psi_D | \bar{\mu}_D | \psi_{D^*} \rangle \right|^2 \left| \langle \psi_{A^*} | \bar{\mu}_A | \psi_A \rangle \right|^2.$$

Die Transferrate ist also proportional zu R^{-6} . Das erste Betragsquadrat stellt die Dipolstärke des Donors (D_D), das zweite die des Akzeptors (D_A) dar. Es ergibt sich

$$D_A \propto B_{ij} \propto \int \varepsilon_A(\nu) \nu^{-1} d\nu,$$

$$D_D \propto B_{ji} \propto A_{ji} \nu^{-3} = \tau_R^{-1} \nu^{-3} = \phi_D \tau_D^{-1} \nu^{-3},$$

mit

$$\phi_D = \frac{k_R}{k_{F,D}} = \frac{\tau_D}{\tau_R}.$$

Integration über alle Frequenzen liefert dann

$$k_T \propto \frac{\kappa^2}{R^6} \frac{\phi_D}{\tau_D} \int \varepsilon_A(\nu) f_D(\nu) \nu^{-4} d\nu.$$

Hierbei ist $f_D(\nu)$ die normierte Fluoreszenzemission. Ein Problem ist, dass κ nicht direkt bestimmt werden kann. Glücklicherweise gehen Fehler von κ nur mit $(\kappa^2)^{1/6}$ in die Berechnung des Donor-Akzeptor-Abstandes ein. Die hier skizzierte Herleitung gilt nur für Vakuumbedingungen. In einem Medium mit Brechungsindex n muss die Wechselwirkung V durch V/n^2 ersetzt werden. Die Transferrate kann geschrieben werden als

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

mit

$$R_0 = 9.78 \cdot 10^3 (J \kappa^2 n^{-4} \phi_D)^{1/6} \text{ [Å]}$$

$$J = \int \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \text{ [cm}^3 \text{M}^{-1} \text{]}.$$

Für die Transfereffizienz folgt

$$\varepsilon = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}.$$

Die Transfereffizienz ε kann durch Messung der Intensitäten I_D und I_A der Donor- und Akzeptoremission ratiometrisch bestimmt werden,

$$\varepsilon = \frac{I_A}{I_A + \gamma I_D}.$$

Hier ist γ ein Korrekturfaktor, der die unterschiedlichen Detektionseffizienzen und Fluoreszenzquantenausbeuten berücksichtigt. Alternativ kann man, wie oben bereits erläutert, Fluoreszenzlebensdauern der Donorfluoreszenz in An- und Abwesenheit des Akzeptors bestimmen,

$$\varepsilon = 1 - \frac{\tau_{D,A}}{\tau_D}$$

Dieses Verfahren hat gegenüber der ratiometrischen Messung den Vorteil, dass bei Intensitätsmessungen notwendige Untergrundkorrekturen entfallen. Eine Messung der Transfereffizienz ist in Abb. 9 zu sehen. In dem relativ großen Bereich, in dem die Transfereffizienz stark distanzabhängig ist, lässt sich der Abstand zwischen den Chromophoren recht genau bestimmen.

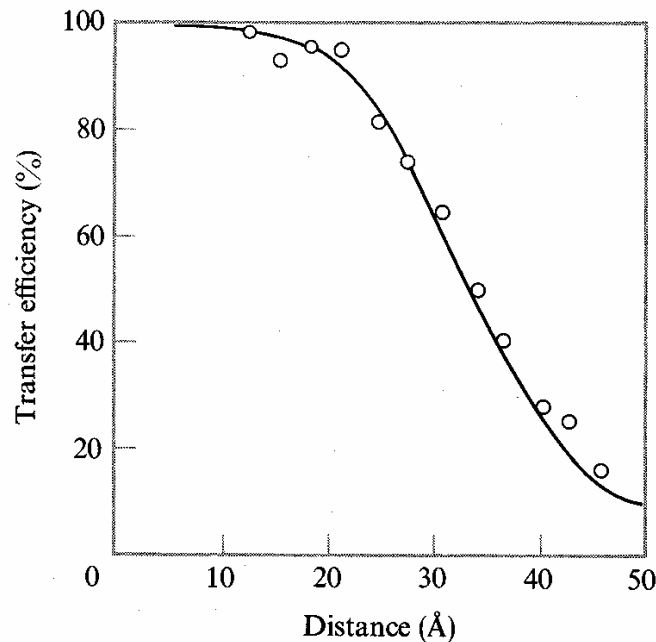


Abb. 9: Energietransfereffizienz als Funktion der Distanz in Dansyl-(Pro)_n-NH-NH-CO-NH-Naphthyl für n = 1 to 12.

Fluoreszenzpolarisation

Wird linear polarisiertes Licht auf eine fluoreszierende Probe eingestrahlt und die Polarisation des Fluoreszenzlichts detektiert, so kann man dynamische Informationen über das betrachtete Biomolekül erhalten. Eine typische Messanordnung ist in Abb. 10 zu sehen.

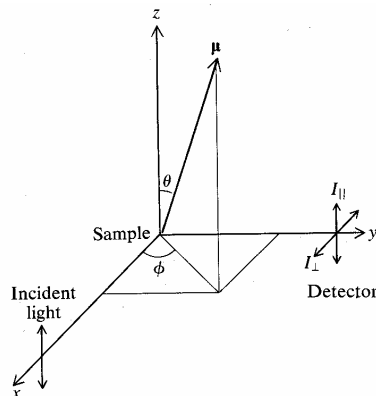


Abb. 10: Koordinatensystem zur Diskussion der Fluoreszenzpolarisation.

Das in z -Richtung polarisierte Licht trifft entlang der x -Achse auf die Probe. Die x - und z -Komponenten der Polarisation (I_{\perp} und I_{\parallel}) der in y -Richtung emittierten Fluoreszenz werden gemessen. Es wird zuerst eine starre, isotrope Probe betrachtet (z.B. eine eingefrorene Lösung von fluoreszierenden Molekülen). Der Vektor $\bar{\mu}$ definiert die Orientierung des Dipolübergangsmoments der Absorption eines Chromophors. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Chromophor angeregt wird, ist

$$P \approx |\bar{\mu} \cdot \bar{E}|^2 \approx \cos^2 \theta ,$$

da der E -Feldvektor in z -Richtung zeigt (θ ist der Winkel zwischen $\bar{\mu}$ und der z -Achse). Es werden somit bevorzugt Moleküle angeregt, die in z -Richtung orientiert sind (Photos Selektion). Zur Erklärung der Fluoreszenzpolarisation wird zuerst die Wahrscheinlichkeit für die Anregung eines Fluorophors mit spezieller Orientierung und danach die Wahrscheinlichkeit für Emission in eine bestimmte Richtung berechnet. Für die Wahrscheinlichkeit, ein angeregtes Molekül mit $\bar{\mu}$ zwischen θ und $\theta + d\theta$, ϕ und $\phi + d\phi$ zu finden, gilt

$$P(\theta, \phi) d\phi d\theta \approx \cos^2 \theta \sin \theta d\theta d\phi .$$

Der Anteil an der Gesamtpopulation ist dann

$$W(\theta, \phi) d\phi d\theta = \frac{P(\theta, \phi) d\phi d\theta}{\int_0^{\pi} d\theta \int_0^{2\pi} d\phi \cos^2 \theta \sin \theta} = \frac{3}{4\pi} \cos^2 \theta \sin \theta d\theta d\phi .$$

Abb. 11 zeigt die Verteilung der angeregten Chromophore.

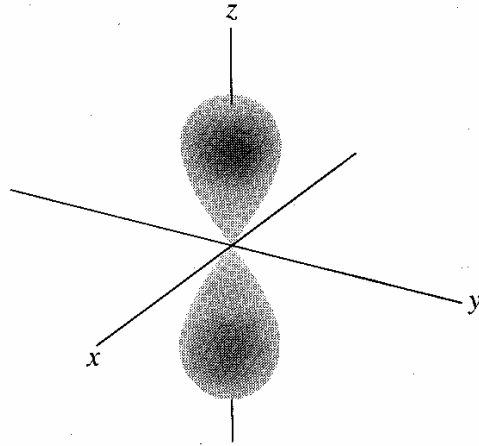


Abb. 11: Verteilung der angeregten Chromophore durch Licht, das in z -Richtung polarisiert ist und sich in x -Richtung ausbreitet.

Falls der gleiche elektronische Zustand, der das Anregungsphoton absorbiert hat, auch das Fluoreszenzphoton emittiert, sind die Richtungen der Übergangsdipolmomente für die Absorption und Emission gleich. Für die Wahrscheinlichkeit der in z -Richtung ($|\bar{\mu} \cdot \bar{z}| \propto \cos^2 \theta$) polarisierten Emission ergibt sich dann

$$I_{\parallel} \propto |\bar{\mu} \cdot \bar{z}|^2 \propto \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} d\theta \cos^2 \theta W(\theta, \phi) = \frac{3}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} d\theta \cos^4 \theta \sin \theta = \frac{3}{5} .$$

Für die in x -Richtung polarisierte Fluoreszenz gilt ($|\vec{\mu} \cdot \hat{x}|^2 \propto (\sin \theta \cos \phi)^2$)

$$I_{\perp} \propto |\vec{\mu} \cdot \hat{x}|^2 \propto \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} d\theta (\sin \theta \cos \phi)^2 W(\theta, \phi) = \frac{1}{5}$$

Für den Vergleich mit dem Experiment werden die Größen Polarisation

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

bzw. Anisotropie

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

eingeführt. Für den obigen Fall eines starren Systems mit parallelen Übergangsdipolen für Absorption und Emission ergibt sich somit

$$P = \frac{1}{2} ; \quad A = \frac{2}{5} .$$

Für ein starres System, bei dem zwischen beiden Übergangsdipolen ein Winkel ζ besteht, erhält man

$$P_0 = \frac{3 \cos^2 \zeta - 1}{\cos^2 \zeta + 3} ; \quad A_0 = \frac{3 \cos^2 \zeta - 1}{5} = \frac{2P_0}{3 - P_0} .$$

P_0 wird limitierende Polarisation und A_0 limitierende Anisotropie genannt; sie gelten für ein starres System. Je nach Winkel ζ können sich deren Werte zwischen $-1/3 < P_0 < 1/2$ und $-1/5 < A_0 < 2/5$ bewegen.

Werden nun Moleküle betrachtet, die nicht starr sind, so können sie ihre Orientierung während der Zeit ändern, in der sie sich im angeregten Zustand befinden. Die gleich nach der Anregung emittierten Fluoreszenzphotonen sind mit P_0 polarisiert, während die später emittierten Fluoreszenzphotonen stärker depolarisiert sind, weil die Moleküle und damit die Übergangsdipole in Lösung rotieren können. Die Messung der Polarisation (Anisotropie) der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit ermöglicht somit die Bestimmung der Rotationsbewegung der Chromophore.

Die Rotationsbewegung kann im einfachsten Modell als Brownsche Bewegung der Übergangsdipolmomente der Emission beschrieben werden. Mit der Rotations-Diffusionsgleichung folgt

$$\frac{dW(\theta, \phi, t)}{dt} = D_{rot} \nabla^2 W(\theta, \phi, t) = \frac{kT}{6V_h \eta} \nabla^2 W(\theta, \phi, t) ,$$

wobei W die Wahrscheinlichkeit darstellt, dass sich das als sphärisch angenommene Molekül in einer bestimmten Orientierung befindet. D_{rot} ist der Diffusionkoeffizient für Rotation, η die Viskosität und V_h das Volumen des Moleküls inklusive der mitrotierenden Hydrathülle. Die ursprüngliche Verteilung der angeregten Moleküle war

$$W(\theta, \phi, 0) = \frac{3}{4\pi} \cos^2 \theta \sin \theta .$$

Für die Berechnung der Emissionsintensität muss der Zerfall des angeregten Zufalls berücksichtigt werden. Somit erhält man für die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül zur Zeit t bei θ, ϕ zu finden,

$$W(\theta, \phi, t) e^{-t/\tau_F} .$$

Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung, die entlang einer bestimmten Achse a polarisiert ist, ergibt sich dann zu

$$I_a(t) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^{\pi} d\theta P_a(\theta, \phi, \xi) W(\theta, \phi, t) e^{-t/\tau_F} .$$

P_a ist wiederum gleich $\cos^2 \theta$ (für $\xi = 0$) entlang z und $\cos^2 \phi \sin^2 \theta$ (für $\xi = 0$) entlang x . Für die parallele Polarisation erhält man

$$I_{\parallel}(t) = \left[\frac{1}{3} + \frac{4}{15} e^{-6D_{rot}t} \frac{3\cos^2 \xi - 1}{2} \right] e^{-t/\tau_F} .$$

Entsprechend ergibt sich für die senkrechte Polarisation

$$I_{\perp}(t) = \left[\frac{1}{3} - \frac{2}{15} e^{-6D_{rot}t} \frac{3\cos^2 \xi - 1}{2} \right] e^{-t/\tau_F} .$$

Die Anisotropie ist

$$A(t) = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{2}{5} e^{-6D_{rot}t} \frac{3\cos^2 \xi - 1}{2} .$$

Sie ist also unabhängig von der Lebensdauer. Daraus folgt für kurze bzw. lange Zeiten sinnvollerweise

$$A(0) = A_0, \quad A(\infty) = 0. \quad .$$

Die Rotationskorrelationszeit τ_c ist wie folgt definiert,

$$\tau_c = \frac{1}{6} D_{rot} .$$

Für ein relativ kleines Protein (25 kD) erhält man für τ_c Werte um 10 ns (in Wasser, 20°C). Die Messung von τ_c erlaubt bei bekannter Viskosität somit die Bestimmung des hydratisierten Volumens. Abb. 12 zeigt den Abfall der Anisotropie von Anthraniloyl-Ser¹⁹⁵- α -Chymotrypsin. Neben diesen apparativ recht aufwendigen, zeitabhängigen Messungen werden auch einfachere, statische Methoden verwendet. Es wird die *mittlere*, senkrechte und parallele Polarisationskomponente der Fluoreszenzemission gemessen,

$$\bar{I}_{\parallel} = \tau_F^{-1} \int_0^{\infty} I_{\parallel}(t) dt, \quad \bar{I}_{\perp} = \tau_F^{-1} \int_0^{\infty} I_{\perp}(t) dt .$$

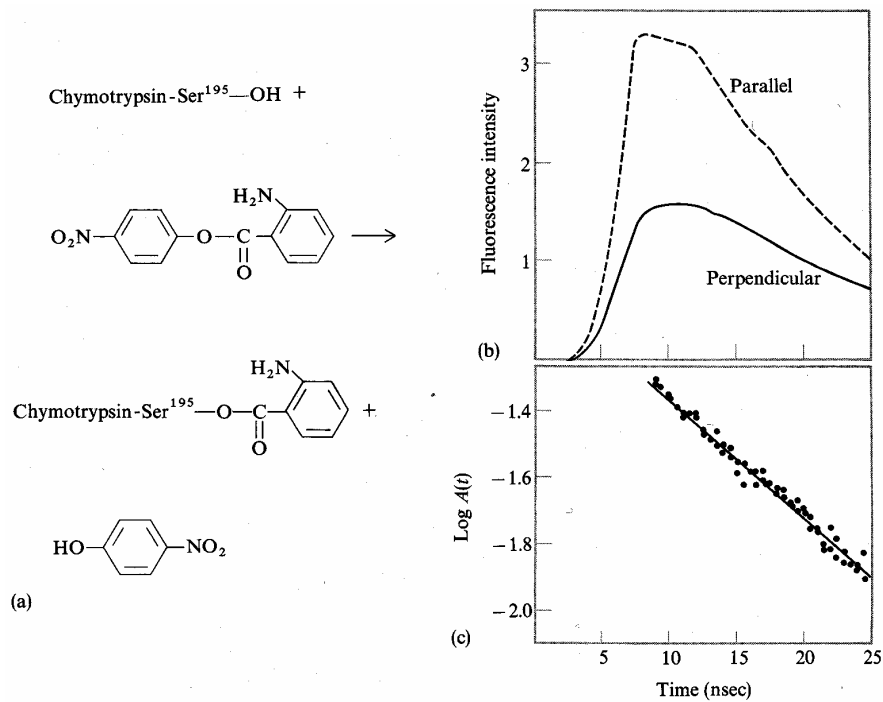


Abb. 12: Abfall der Fluoreszenz-Anisotropie von Anthraniloyl-Ser¹⁹⁵- α -Chymotrypsin. (a) Präparation dieses Derivats. (b) Fluoreszenzabfall für die beiden Polarisationskomponenten. (c) Die Anisotropie nach Entfaltung mit dem Anregungspuls.

Daraus folgt für die Anisotropie

$$\bar{A} = \frac{3 \cos^2 \xi - 1}{5(1 + \tau_F / \tau_C)}.$$

Dies kann unter Verwendung der limitierenden statischen Anisotropie \bar{A}_0 wie folgt dargestellt werden,

$$\frac{1}{\bar{A}} = \frac{1}{\bar{A}_0} (1 + \tau_F / \tau_C).$$

Mit

$$\tau_c = \frac{V_h \eta}{kT}$$

folgt die Perrin-Gleichung,

$$\frac{1}{\bar{A}} = \frac{1}{\bar{A}_0} \left(1 + \frac{\tau_F k T}{V_h \eta} \right).$$

Wird die statische Anisotropie der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur oder Viskosität gemessen, so erhält man eine Gerade. Aus dieser lässt sich, falls die Fluoreszenzzerfallszeit bekannt ist, das hydratisierte Volumen bestimmen. Diese Gleichungen wurden für kugelförmige Moleküle hergeleitet. Der allgemeine Fall wird durch die Weber-Perrin-Gleichung beschrieben. Abb. 13 zeigt einen schematischen Perrinplot der Anisotropie.

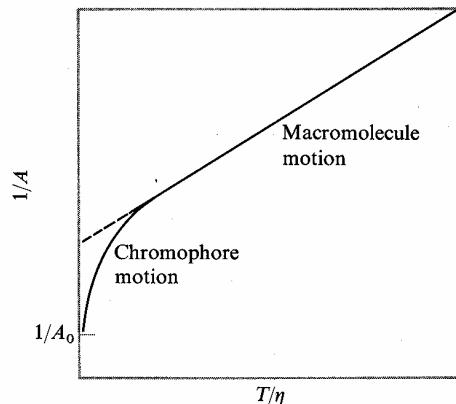


Abb. 13: Schematischer Perrinplot der Anisotropie.

Für kleine Viskositäten (hohe Temperaturen) ist der erwartete lineare Verlauf zu sehen. Bei hohen Viskositäten ist das Makromolekül quasi stationär, während sich der Chromophor unter Umständen noch lokal bewegen kann. Dies führt zu einer größeren Abhängigkeit der Anisotropie von der Viskosität und damit zu einem nichtlinearen Verhalten bei kleinem T/η .

Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer

Die Fluoreszenz-Lebensdauer kann mit zeitaufgelösten Messungen bestimmt werden. Man unterscheidet dabei zwischen Messungen in der Zeit- und Frequenzdomäne. Bei der Messung in der **Zeitdomäne** wird ein kurz gepulster Laser (1 ps – 1 ns Pulsdauer) zur Bestrahlung der fluoreszierenden Probe verwendet. Das emittierte Licht wird dann zeitaufgelöst detektiert. Als Detektoren werden Streackkameras, Photomultiplier oder Avalanchedioden verwendet. Die zeitaufgelöste Messung kann mittels Einzelphotonenzählung durchgeführt werden. Dabei wird über den Anregungspuls ein Startsignal auf den TAC (time-to-amplitude converter) gegeben, so dass dieser eine Spannung linear erhöht, bis ein Stoppsignal, das von der Detektion des Fluoreszenzphotons herrührt, eintrifft. Daraufhin wird über die gemessene Spannung (die ja einem Zeitintervall entspricht) der Wert des dazugehörigen Kanals im Vielkanalanalysator (MCPHA) um eins erhöht. Mit der Detektion vieler Photonen baut sich so die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung auf (Abb. 14).

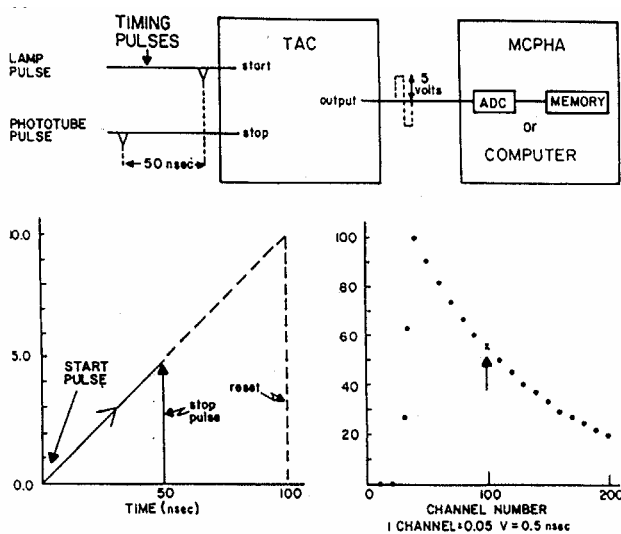


Abb. 14: Schema der Einzelphotonenzählung für zeitaufgelöste Messungen.

Bei der Einzelphotonenzählung muss wegen der Totzeit der Detektion darauf geachtet werden, dass die Fluoreszenzintensität nicht zu groß ist, damit die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, dass während des Messvorgangs eines Fluoreszenzphotons ein zweites detektiert wird.

Abb. 15 zeigt eine Messung an TNS, das eine Zerfallszeit von ~ 8 ns hat. Ist die Pulsdauer des Anregungslasers nicht sehr viel kleiner als die Fluoreszenz-Lebensdauer, so muss zur Bestimmung der Abklingzeit der Laserpuls entfaltet werden.

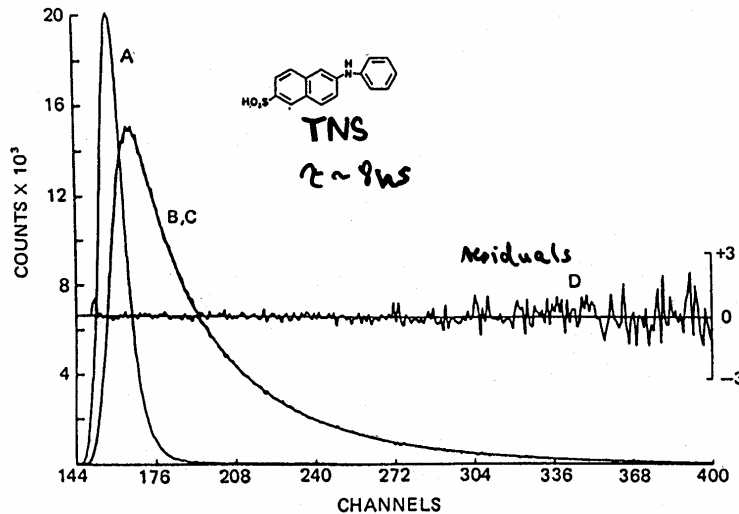


Abb. 15: Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz von TNS. A: Anregungspuls. B, C: Experiment und Fit. Die Abweichungen zwischen dem Experiment und dem Fit sind ebenfalls aufgetragen.

Im Falle der Messung in der **Frequenzdomäne** (Phasenfluorometrie) wird mit in der Intensität $E(t)$ moduliertem Licht der Frequenz ω auf die Probe eingestrahlt (Abb. 16). Detektiert wird das emittierte Fluoreszenzlicht $F(t)$, das mit der gleichen Frequenz moduliert ist. Allerdings wird die Modulationsamplitude verringert (demoduliert) und es tritt eine Phasenverschiebung zwischen der Anregungs- und Emissionsmodulation auf. Das System kann wie folgt beschrieben werden (lineare Antwort),

$$F(t) = \chi(\omega)E(t)$$

$$= |\chi(\omega)|E_0 e^{-i(\omega t - \phi(\omega))},$$

wobei $\chi(\omega)$ die Suszeptibilität darstellt. Sie setzt sich aus dem Dispersionsterm $\chi'(\omega)$ und dem Absorptionsterm $\chi''(\omega)$ zusammen,

$$\chi(\omega) = \chi'(\omega) + i\chi''(\omega).$$

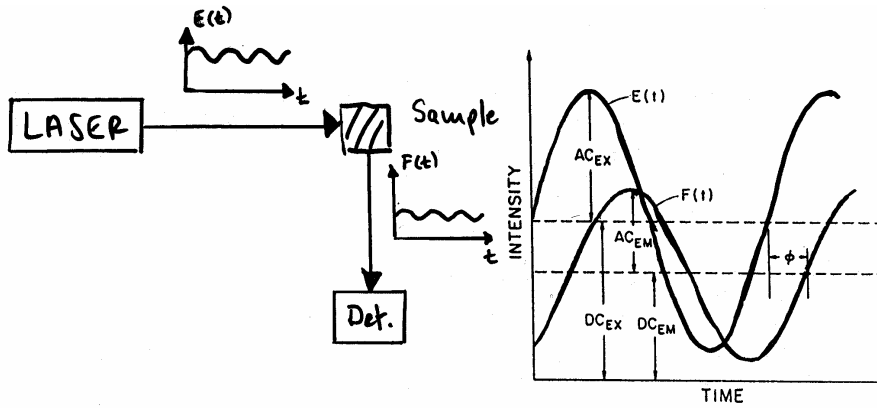


Abb. 16: Bei der Phasenfluorometrie wird intensitätsmoduliertes Licht mit der Amplitude AC_{EX} und dem statischen Anteil DC_{EX} eingestrahlt. Gemessen wird das Fluoreszenzlicht, das eine Amplitude AC_{EM} und einen statischen Anteil DC_{EM} hat.

Für den Betrag und die Phase $\varphi(\omega)$ gilt

$$|\chi(\omega)| = \sqrt{\chi^* \chi} = \sqrt{\chi'^2 + \chi''^2},$$

$$\phi(\omega) = -\arctan \frac{\chi''(\omega)}{\chi'(\omega)}.$$

Als einfachste Zeitantwort auf eine ζ -Störung sei eine Debye-Relaxation angenommen,

$$\bar{\chi}(t) = e^{-t/\tau}.$$

Daraus folgt in der Frequenzdomäne

$$\chi(\omega) = FT(e^{-t/\tau}) = \frac{1}{1 - i\omega\tau} = \frac{1 + i\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2}.$$

Für die Phase $\varphi(\omega)$ und die Demodulation M ergibt sich

$$\phi(\omega) = \arctan \omega\tau_p,$$

$$|\chi(\omega)| = \sqrt{\frac{1}{1 + \omega^2\tau_M^2}} = M = \frac{AC_{EM}}{AC_{EX}}.$$

Hier stellt AC_{EM} die Modulation der Fluoreszenzstrahlung und AC_{EX} die der Anregungsstrahlung dar. Es wurde eine Abklingzeit für die Phase τ_p und eine für die Demodulation τ_M eingeführt. Im Falle einer einzigen Abklingzeit, also eines einzelnen Fluorophors, sind diese gleich und unabhängig von der Frequenz. Für mehr als zwei Fluorophore sind sie dagegen unterschiedlich groß und frequenzabhängig.

In Abb. 17 sind phasenfluorometrische Messungen in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge an TNS in Glycerin und an TNS-Apomyoglobin zu sehen. Die Emissionsspektren beider Proben entsprechen drei verschiedenen Zeiten nach Einstrahlung des Anregungspulses. Es lässt sich jeweils eine Verschiebung des Spektrums zu längeren Wellenlängen für spätere Zeiten beobachten. Diese Verschiebung ist durch die Umorientierung (Relaxation) der umgebenden Moleküle verursacht (Stokes-Shift, siehe oben). Die Verschiebung des Schwerpunkts der Emissionskurve ist in Abb. 18 dargestellt.

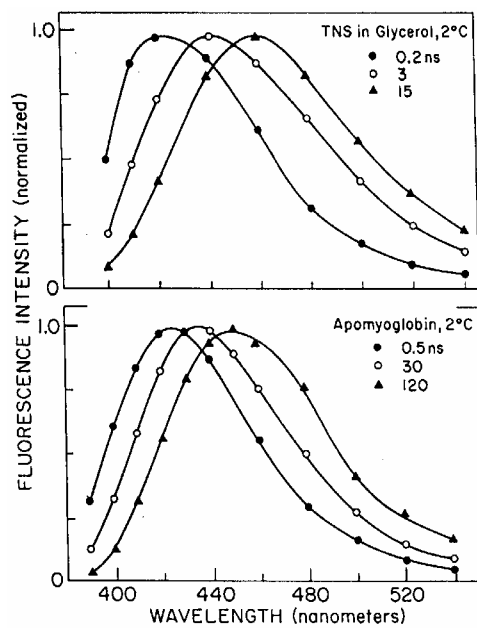


Abb. 17: Fluoreszenzintensität versus Wellenlänge für TNS in Glycerin und TNS-Apomyoglobin. Die Spektren repräsentieren drei verschiedene Zeiten nach dem Anregungspuls.

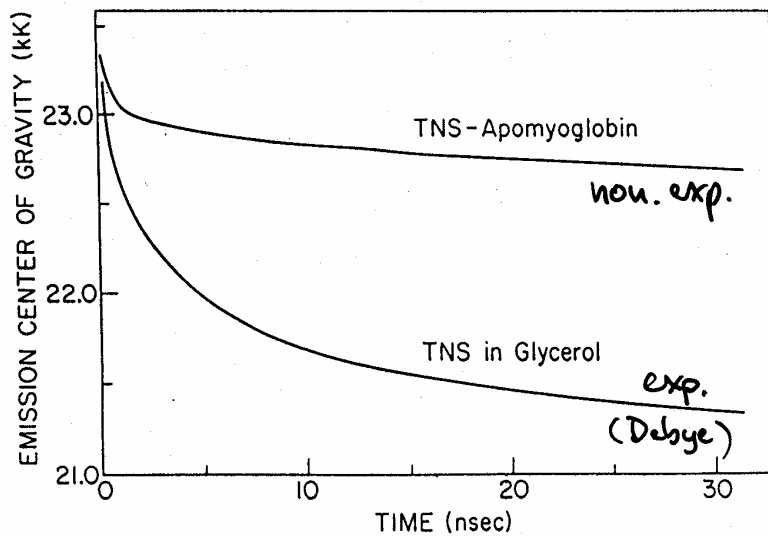


Abb. 18: Verschiebung des Schwerpunkts des Fluoreszenzemissionsspektrums von TNS in Glycerin und TNS, das in Apomyoglobin gebunden ist.

Für TNS in Glycerin erhält man eine exponentielle Verschiebung des Emissionsschwerpunkts, während dies bei TNS-Apomyoglobin nicht der Fall ist. Das bedeutet, dass für TNS in Glycerin die Annahme einer einzigen Relaxationszeit gerechtfertigt ist. Da bei TNS-Apomyoglobin die Bewegungsfreiheit des TNS beträchtlich vermindert ist, muss die Relaxation mit einer Verteilung von Relaxationszeiten beschrieben werden.

Werden Messungen an einer Probe mit mehreren Fluorophoren durchgeführt, so wird ein Multikomponentenzerfall beobachtet. Allerdings kann selbst ein einzelner Fluorophor durch verschiedene Mikroumgebungen verschiedene Lebensdauern zeigen. Die Verteilung der Fluoreszenzlebenszeiten in Proteinen kommt durch statische und dynamische Heterogenitäten zustande. Abb. 19 zeigt schematisch die Energielandschaft in Abhängigkeit von einer Konformationskoordinate. Befindet sich das Protein in einem Minimum der Energielandschaft, so kann ihm eine bestimmte Fluoreszenzlebensdauer zugeschrieben

werden. Tab. 3 zeigt Zerfallszeiten von Tryptophan in Proteinen, die nur ein einziges Tryptophan besitzen.

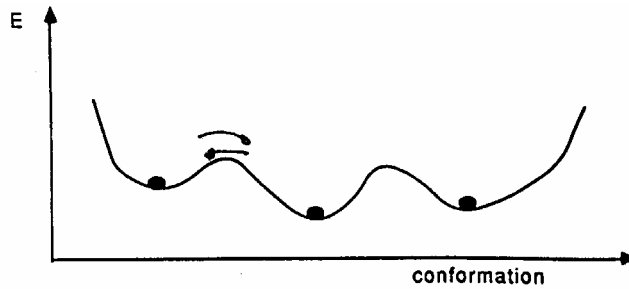


Abb. 19: Skizze der Energielandschaft eines Proteins in Abhängigkeit von einer Konformationskoordinate.

Tab. 3: Fluoreszenzzerfallszeiten für Tryptophan in Proteinen mit einem einzigen Tryptophan

	τ_1 nsec	τ_2 nsec	τ_3 nsec
Apo-azurin	4.9		
Nuclease B	5.1		
Melittin	3.1		
Basic Myelin	4.7	1.97	
Holo-azurin	4.8	0.18	
Glucagon	3.3	1.1	
Adenocorticotropin	5.1	2.0	
Nuclease	5.7	2.0	
RNase T1	3.3	1.5	
HSA	7.8	3.3	
PLA2	7.2	2.9	0.96
Tuna-Met-MB	2.17	0.132	0.031
Tuna-Apo-MB	2.81	0.33	

Die Fluoreszenzabklingkurven wurden mit einer verschieden großen Anzahl von Lebensdauern gefittet. Die so erhaltenen Zerfallszeiten variieren in einem relativ großen Bereich. Es wird versucht, die verschiedenen Abklingzeiten mit verschiedenen Konformationen (Abb. 19) zu begründen. Hierbei ist zu beachten, dass nicht eindeutig ist, mit wie vielen Abklingzeiten die Fluoreszenzkurven gefittet werden müssen. Generell gilt natürlich, dass sich die Abweichung des Fits vom Experiment (χ^2) mit der Anzahl der Fitparameter geringer wird (Tab. 4).

Tab. 4: Analyse der Fluoreszenzzerfallszeiten von Azurin

Exponentials	τ	f	χ^2
1	4.78		321
2	5.443		
	0.838	0.146	63
3	10.11		
	3.11	0.392	
	0.42	0.552	
		0.056	7.1
4	322		
	8.11	0.030	
	2.88	0.451	
	0.42	0.465	
		0.054	2.9
Gaussian Distribution	Center	Width	Fraction
($\chi^2 = 3.0$)	4.37	2.41	0.948
	0.174	0.27	0.052

Die Fluoreszenzzerfallskurve von Azurin wurde mit 1 bis 4 Exponentialkurven gefittet, wobei die Zerfallszeiten Γ und die relative Gewichtung f Fitparameter sind. Neben der Verringerung von χ^2 wird eine größere Varianz der Zerfallszeiten mit Vergrößerung der Anzahl der Fitparameter beobachtet. Es ist nicht ersichtlich, mit wievielen Exponentialkurven der Zerfall optimal beschrieben wird. Alternativ kann statt der Summe von Exponentialzerfällen,

$$I(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i},$$

eine Verteilung der Zerfallszeiten

$$I(t) = \int_0^{\infty} f(\tau) e^{-t/\tau} d\tau$$

gefittet werden (Abb. 20). zeigt den Fit an der Messung von Azurin für zwei Gaußverteilungen, bei denen die Lage des Zentrums, die Breite und die relative Gewichtung der beiden Gaußverteilungen gefittet wurden.

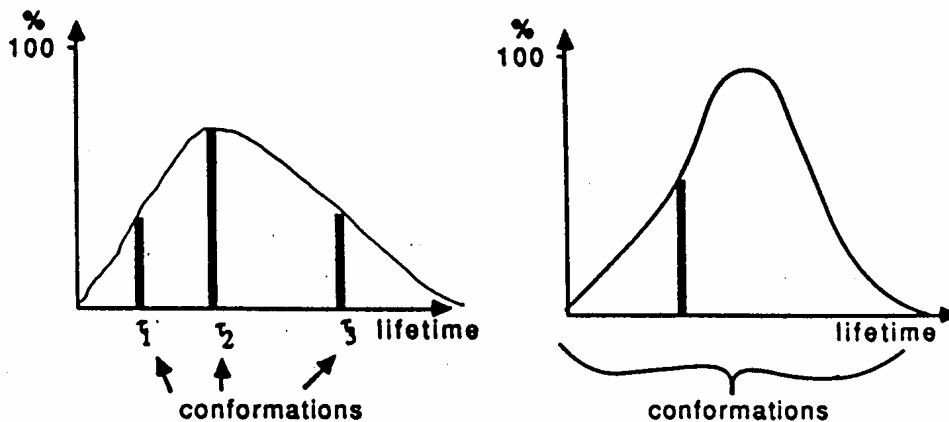


Abb. 20: Darstellung der Fluoreszenzlebenszeiten als Summe von exponentiellen Zerfällen und einer kontinuierlichen Verteilung von exponentiellen Zerfällen.