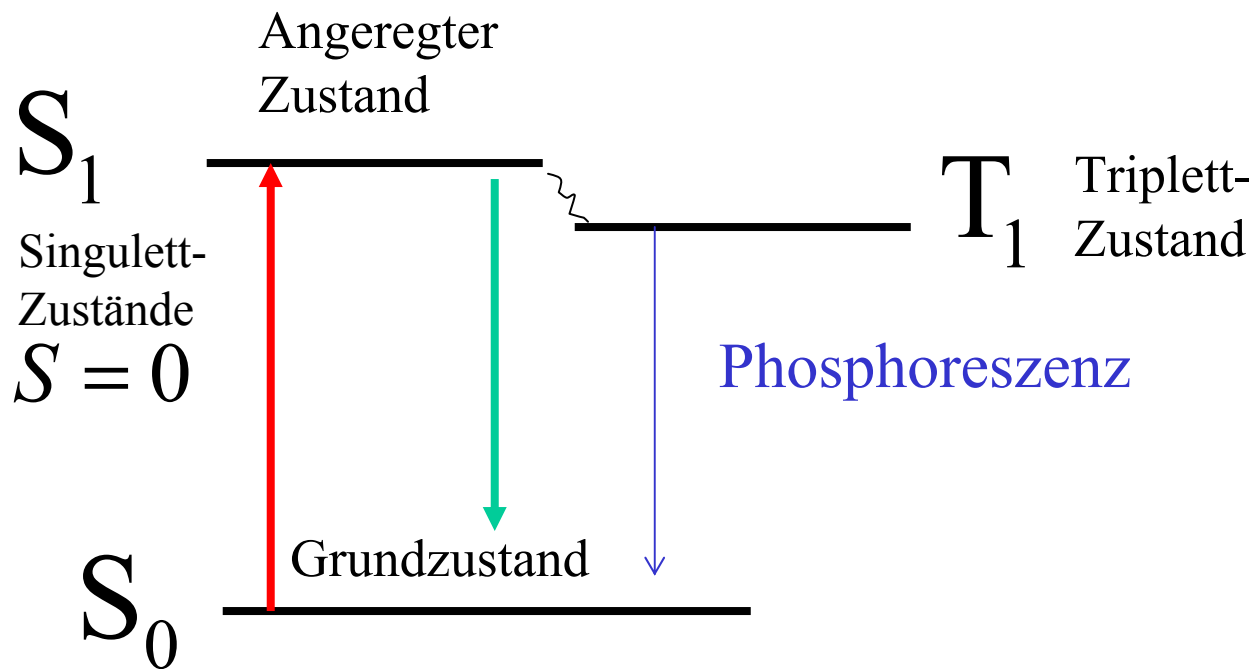


Fluoreszenzspektroskopie

1. Grundbegriffe

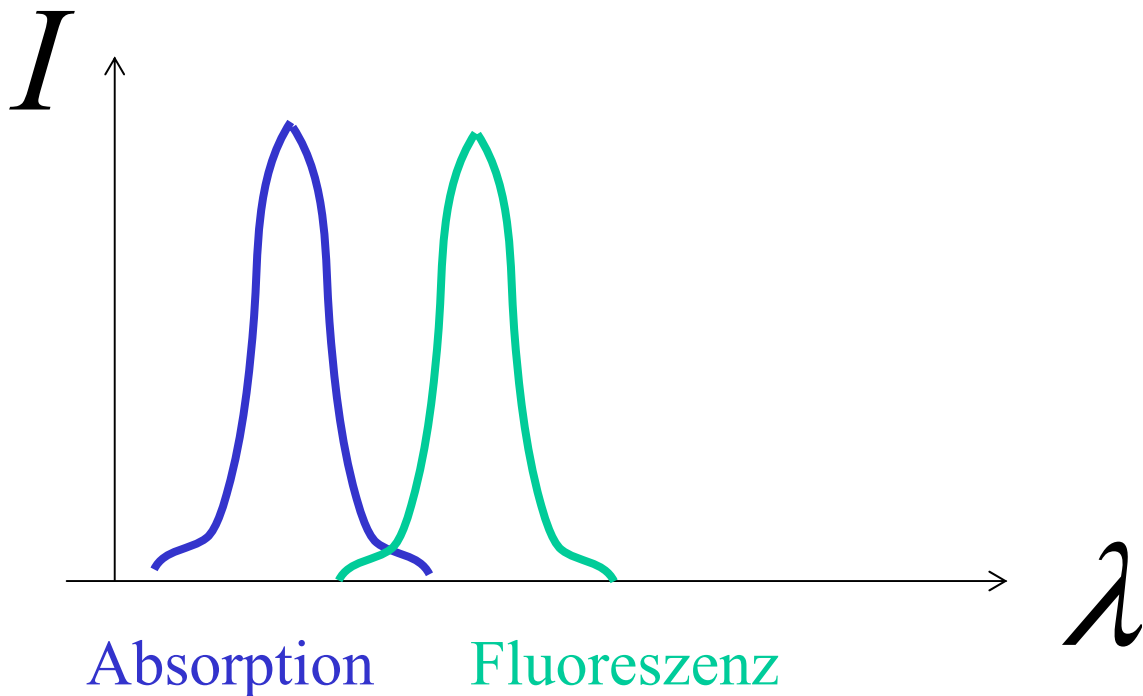
Lumineszenz: Lichtemission (außer thermisch bedingter) von (elektronisch) angeregten (Molekül-) Zuständen



Anregung γ -Emission
 γ -Absorption **Fluoreszenz**

*Photolumineszenz =
Fluoreszenz*

„Rotverschiebung“ des Fluoreszenzlichts gegenüber dem Anregungslicht (*Stokes' shift*)

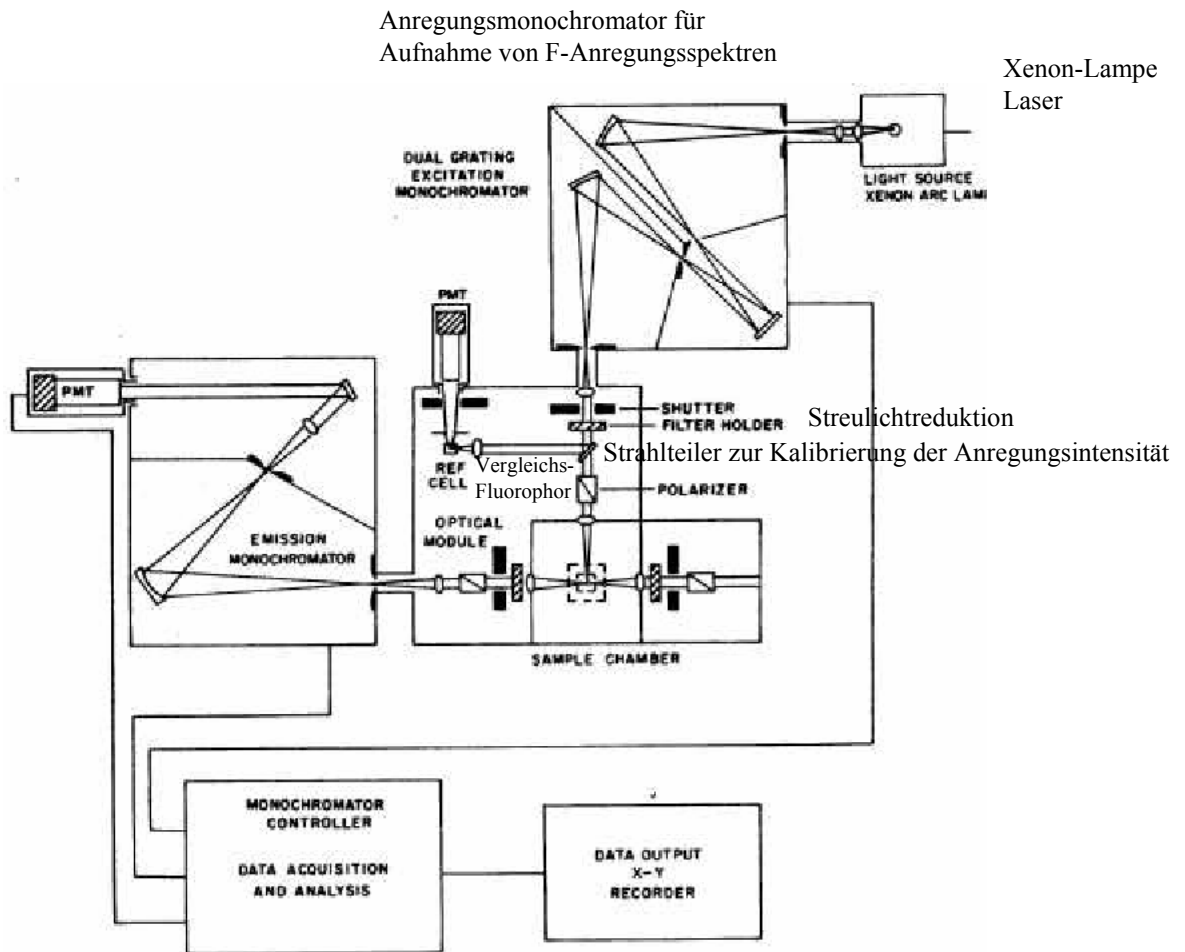


F-Anregungsspektrum: Intensität der maximalen Emissionslinie als Funktion der Anregungswellenlänge

F-Emissionsspektrum: Intensität des Fluoreszenzlichts als Funktion der Emissionswellenlänge bei Einstrahlung beim Absorptionsmaximum. Die Form des F-Emissionsspektrums ist oft unabhängig von der Einstrahlungswellenlänge

2. Beobachtung der Fluoreszenz

Allgemein anwendbare Fluoreszenz-Apparatur



J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy

Kluwer Academic/Plenum Publishers 1999

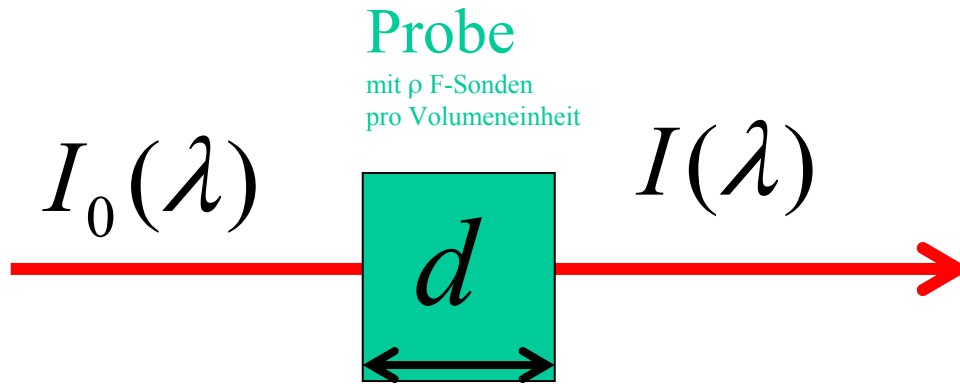
Bei der Registrierung von **F-Anregungs- und F-Emissionsspektren** müssen die **Wellenlängenabhängigkeiten** der **Intensität der Lichtquelle** der **Effizienz der Monochromatoren** (für unterschiedliche Polarisationsrichtungen) und der **Effizienz der Photokathode** berücksichtigt werden.

Optische Dichte der Probe

$$E(\lambda) \equiv \lg \left[\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} \right]$$

Absorbierte Intensität

$$I_a(\lambda) = I_0(\lambda) - I(\lambda)$$



Lambert-Beer-Gesetz

$$I = I_0 e^{-\sigma_a \rho d}$$

$$E = \lg(e^{\sigma_a \rho d}) = \sigma_a \rho d \cdot \lg e = \varepsilon \cdot C \cdot d$$

$$\sigma_a = \varepsilon \frac{C}{\rho \lg e} \approx \varepsilon \cdot 3,824 \cdot 10^{-24} \text{ mol}$$

Absorptionsquerschnitt
pro Teilchen (m^2)

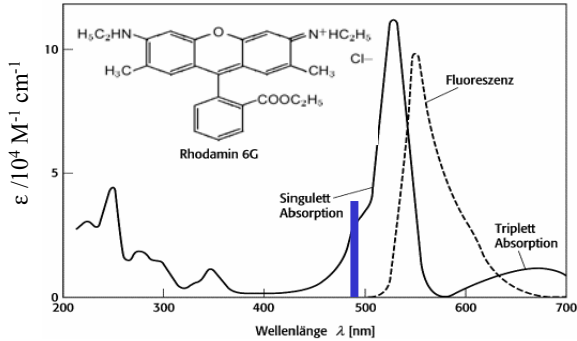
ρ Anzahl der F-Sonden-Moleküle pro Volumeneinheit (m^{-3})

ε Extinktionskoeffizient ($1 \text{ mol}^{-1} \text{ m}^2 = 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

C Konzentration der F-Sonden-Moleküle ($1 \text{ mol/m}^3 = 10^{-3} \text{ M}$)

Molarität: $1 \text{ M} = 1 \text{ mol pro Liter} = 10^3 \text{ mol m}^{-3}$

Beispiel: S_1 -Anregungsrate für **Rhodamin 6G**-Molekül bei Laser-Anregung gegebener Photonenflussdichte j



Anregung mit $\lambda = 488 \text{ nm}$

Fluoreszenzemission im Intervall $\lambda \approx 570 \dots 610 \text{ nm}$

Zerfallsrate $k_F \approx 2,5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$

Absorptionsquerschnitt bei $\lambda = 488 \text{ nm}$ $\sigma_a \approx 1,4 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$

d. h. Extinktionskoeffizient $\epsilon \approx 3,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Befinden sich N_{S_0} Moleküle im Grundzustand, dann gibt es bei der Photonenflussdichte j

$k_a \cdot N_{S_0} = j \cdot \sigma_a \cdot N_{S_0}$ induzierte Übergänge in den angeregten Singulett-Zustand S_1 .

N_{S_1} angeregte Moleküle zerfallen mit der Rate $k_F + 2k_a$ in den Grundzustand

Im Gleichgewicht zwischen angeregtem (S_1) und Grundzustand (S_0) gilt

$$(k_F + k_a)N_{S_1} = k_a N_{S_0} \quad \text{d. h. mit der Wahrscheinlichkeit} \quad \frac{N_{S_1}}{N_{S_0} + N_{S_1}} = \frac{k_a}{k_F + 2k_a}$$

befindet sich ein Molekül im angeregten Zustand.

Zahlenbeispiel:

$$j \approx 10^{28} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad \text{Laserintensität } 0,5 \text{ mW, Strahlfokussierung auf } 400 \text{ nm } \varnothing$$

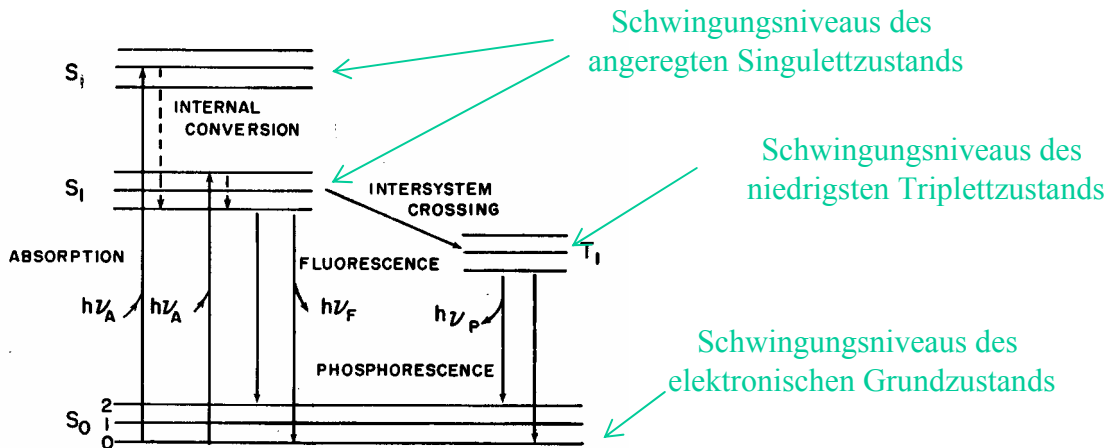
$$k_a = j \cdot \sigma_a \approx 10^{28} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \cdot 1,4 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2 = 1,4 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$$

Mit der Wahrscheinlichkeit

$$\frac{k_a}{k_F + 2k_a} = \frac{1,4 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}}{(2,5 + 2 \cdot 1,4) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}} \approx 0,26$$

befindet sich ein Molekül im angeregten Zustand.

3. Jablonski-Diagramm (1935)



Interne Konversion bedeutet **F-strahlungslose Übergänge** von angeregten Schwingungsniveaus ($\nu > 0$) des angeregten Elektronenzustands des Moleküls S_1 in den **niedrigsten Schwingungszustand** ($\nu = 0$) des **angeregten Singulettzustands**. In Lösungen passiert dies etwa in der charakteristischen Zeit von 10^{-12} s.

Vom niedrigsten Schwingungsniveau des angeregten Singulettzustands erfolgt nach einer charakteristischen Zeit von etwa **10 ns (Fluoreszenzlebensdauer)** der mit der Emission eines Lichtquants der Energie $h\nu_F$ verbundene Übergang in den elektronischen Grundzustand S_0 zu einem Schwingungsniveau ν ,

oder

es erfolgt ein Übergang (**Intersystem Crossing**) in den (niedrigsten) angeregten Triplettzustand T_1 , von wo aus **Phosphoreszenz** bzw. strahlungslose Übergänge in den elektronischen Grundzustand möglich sind,

oder

es erfolgt ein strahlungsloser Übergang in den elektronischen Grundzustand wobei die Energie an andere Moleküle abgegeben wird.

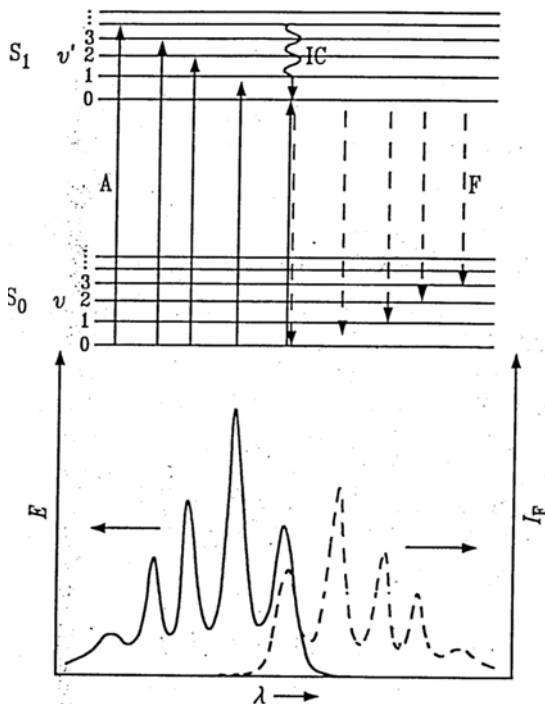
Die Unterdrückung der Fluoreszenz-Strahlung des angeregten Moleküls durch Lösemitteleffekte oder strahlungslose Übergabe der Energie des angeregten Fluorophors an andere Moleküle wird **Fluoreszenzlöschung (Quenchen)** genannt.

Frank-Condon-Prinzip und Fluoreszenz-Spektrum

Die photonische Anregung der Fluoreszenzmoleküle geschieht in der Regel vom niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustands aus. (Warum?) Da die Atomkerne des Moleküls eine um etwa 3 Zehnerpotenzen höhere Masse besitzen als die Elektronenhülle, bleiben die Kernpositionen während des ca. 10^{-14} s dauernden Anregungsprozesses unverändert, während sich die Elektronenhülle umstrukturiert. Im Energie-Abstandsdiagramm sind daher die Strahlungsübergänge durch senkrechte Linien dargestellt. Welcher Schwingungszustand des angeregten Elektronenzustandes mit welcher Wahrscheinlichkeit erreicht wird, hängt von der Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Kerne bei der vom $S_0/v=0$ -Zustand bestimmten Kernpositionen in den angeregten Zuständen ab (Frank-Condon-Faktoren).

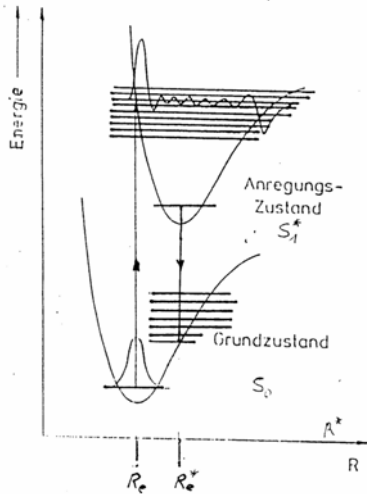
In einfachen Fällen gilt die **Spiegel-Regel**:

Absorptions- und Fluoreszenz-Spektrum sind etwa spiegelsymmetrisch.

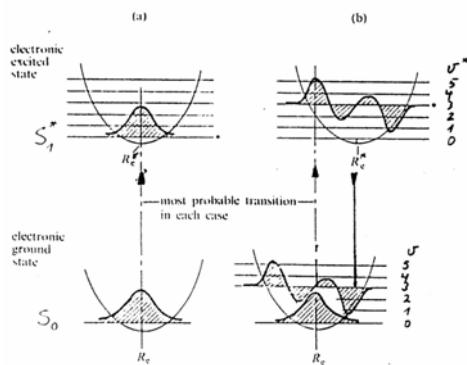


Nach dem IC erfolgt der Fluoreszenz-Übergang vom $S_1/v=0$ -Zustand senkrecht nach unten in die Zustände S_0/v mit den durch die Frank-Condon-Faktoren bestimmten Wahrscheinlichkeiten, die bei ähnlichen Potentialkurven von S_0 und S_1 die Spiegelsymmetrie der Spektren bewirken.

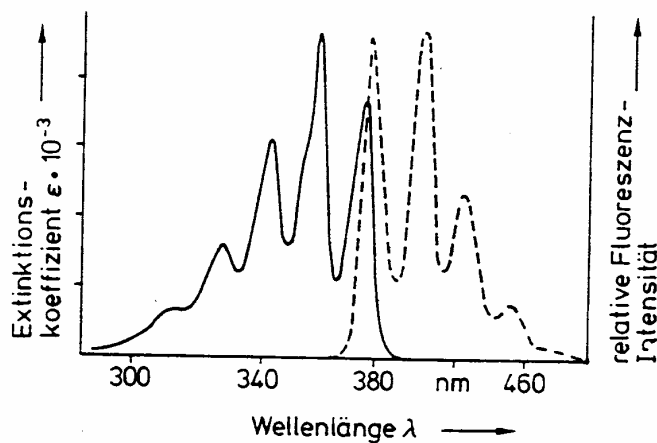
Die quantenmechanische Basis des Frank-Condon-Prinzips



Kernabstandscoordinate



Für einige Schwingungsniveaus sind die **Oszillator-Eigenfunktionen** dargestellt. Die Überlappung der betreffenden Wellenfunktionen entlang der senkrechten Linien (Übergänge) ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit des betreffenden Übergangs.



Absorptions- und Fluoreszenz-Spektrum von Anthracen in Cyclohexan. Die beiden Spektren sind annähernd spiegelsymmetrisch

4. Fluoreszenz-Sonden

4.1 Intrinsische Fluorophore in biolog. Material

Einige in biologischen Materialien vorkommende natürliche Fluorophore, gemessen in wässriger Lösung bei pH = 7 (*Cantor u. Schimmel*)

	Absorption		Fluoreszenz		
	λ_{\max}/nm	$\epsilon_{\max}/10^3\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	λ_{\max}/nm	Quantenausbeute $Q = \tau/\tau_0$	F-Lebensdauer τ/ns
Trp, W	278	5,6	353	0,13	2,6
Tyr, Y	275	1,4	304	0,14	3,6
Phe, F	260	0,2	282	0,02	6,4
Adenin	260	13,4	321	$2,6 \cdot 10^{-4}$	<0,02
Guanin	275	3,1	329	$3,0 \cdot 10^{-4}$	<0,02
Cytosin	267	6,1	313	$0,8 \cdot 10^{-4}$	<0,02
Uracil	260	9,5	308	$0,4 \cdot 10^{-4}$	<0,02
NADH	340	6,2	470	0,019	0,4

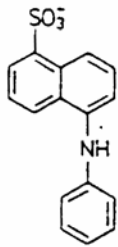
In Proteinen hängt die F-Emission der aromatischen Aminosäuren u. a. vom Faltungszustand (H-Brücken) und von den Lösemittelbedingungen ab.

Ein Spezialfall ist das **grün fluoreszierende Protein (GFP)** gewonnen aus der Leuchtqualle *Aequoria victoria*, deren Biolumineszenz dadurch entsteht, dass das GFP die im blauen Spektralgebiet (470 nm) liegende Chemilumineszenz des ebenfalls in dieser Qualle vorkommenden Proteins Aequorin absorbiert, und daraufhin selbst grünes Licht ($\lambda_{\text{Fmax}} = 509 \text{ nm}$) emittiert. Im GFP ist ein durch besondere Proteinfaltung entstandenes stabiles Fluoreszenzzentrum vorhanden. Das GFP ist nützlich in der biologischen Forschung, da es gentechnisch mit Zellproteinen verknüpft werden und in vielen Organismen (Bakterien, Pflanzen, Säugetieren) exprimiert werden und mit der hochempfindlichen Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden kann.

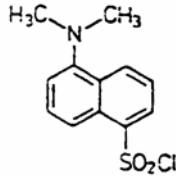
Allen Fluorophoren („Fluoreszenz-Sonden“) ist gemeinsam, dass sie **delokalisierte Elektronen** besitzen (konjugierte Doppelbindungen). In diesen Molekülen liegt der niedrigst angeregte Elektronenzustand im nahen UV- bzw. im sichtbaren Gebiet.

4.1 Extrinsische Fluorophore

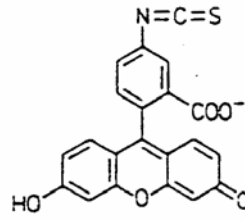
Einige Beispiele



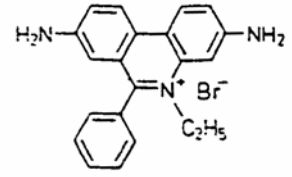
1-Anilino-8-Naphthalinsulfonat (ANS)



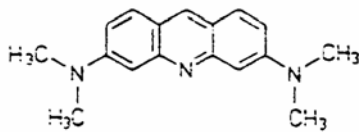
1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid)



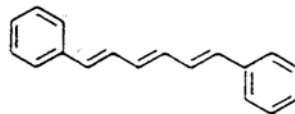
Fluoreszein-Isothiocyanat



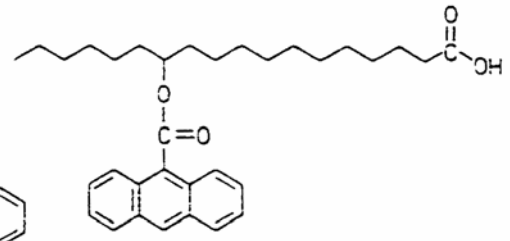
Ethidiumbromid



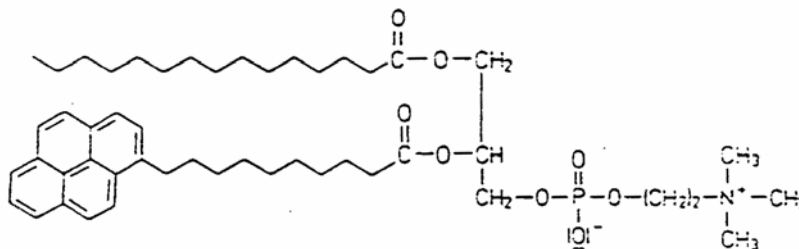
Acridinorange



Diphenylhexatrien



12-(9-Antroyl)-Stearinsäure



1-Acyl-2-10-(1-Pyren)dekanoyl-glycero-3-phosphocholin

Auswahl von Fluoreszenz-Sonden

Extrinsische Fluorophore lassen sich maßgeschneidert herstellen und sind empfindlich gegenüber Umgebungsveränderungen (pH, Lösemittel, Konzentration von Quencher-molekülen). Daher ergeben sich viele Anwendungen in der Zellbiologie.

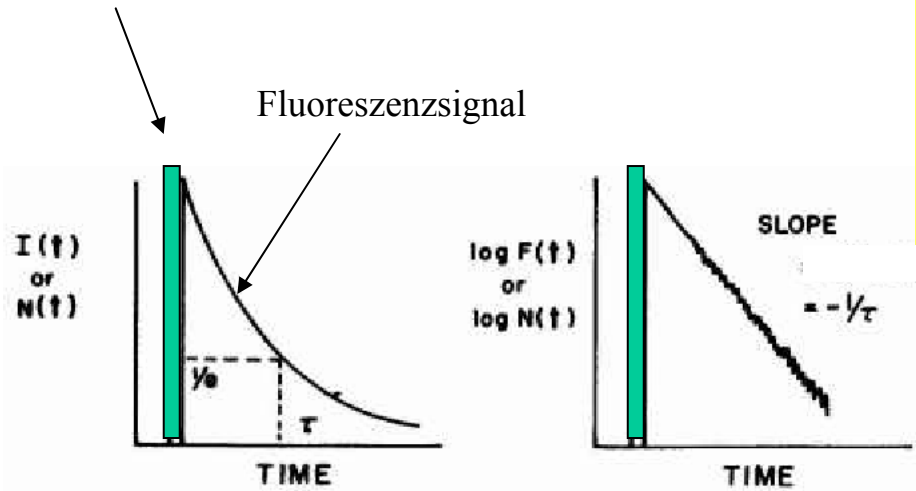
Die Auswahl erfolgt nach dem Prinzip, das zu untersuchende Objekt möglichst gering zu stören. Entweder mischt man (nichtkovalent) ein Fluorophor dazu oder man bindet kovalent eine fluoreszierende Gruppe an ein im Objekt natürlich vorkommendes Molekül an. Zur Untersuchung von Phospholipid-Membranen ist z. B. das in der Abb. ganz unten dargestellte Molekül geeignet. Ethidiumbromid lagert sich nichtkovalent zwischen die Basenpaar-Ebenen der doppelsträngigen DNA ein (Interkalation).

5. Fluoreszenz-Lebensdauer τ

Mittlere Verweildauer im angeregten Zustand

Anregungsimpuls regt $N^*(0)$ Moleküle an

$$\frac{dN^*}{dt} = -(k_F + k)N^*$$
$$N^*(t) = N^*(0)e^{-\frac{t}{\tau}}$$
$$\tau = \frac{1}{k_F + k}$$



Die angeregten Moleküle emittieren mit der Fluoreszenz-Relaxationsrate k_F und gehen mit der Desaktivierungsrate k strahlungslos in den Grundzustand. Gäbe es keine strahlungslosen Übergänge, wäre die mittlere Lebensdauer

der angeregten Fluorophore $\tau_0 = \frac{1}{k_F}$

Quantenausbeute Q

$$Q \equiv \frac{k_F}{k_F + k} = \frac{\tau}{\tau_0}$$

Die Quantenausbeute ist gewöhnlich kleiner als 1 (s. Tabelle). Fluorescein und Rhodamin in geeigneten Lösungsmitteln haben Quantenausbeuten nahe 1 und werden bei Messungen oft als Standards verwendet

6. Fluoreszenz-Löschung

Durch bestimmte in der Lösung diffundierende Moleküle kann die F-Intensität (Quantenausbeute) stark herabgesetzt werden.

Typische Löschpartikel (Quencher) sind z. B.

O_2 , I^- , NO , BrO_4^- Schweratome, Acrylamid ($CH_2=CH-CONH_2$).

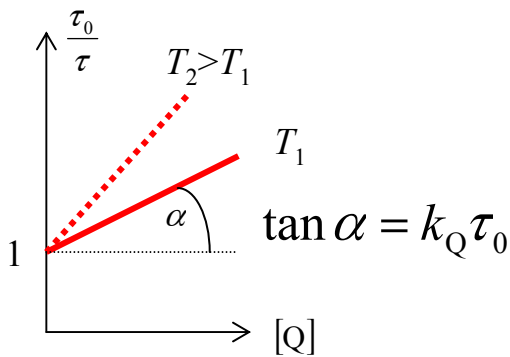
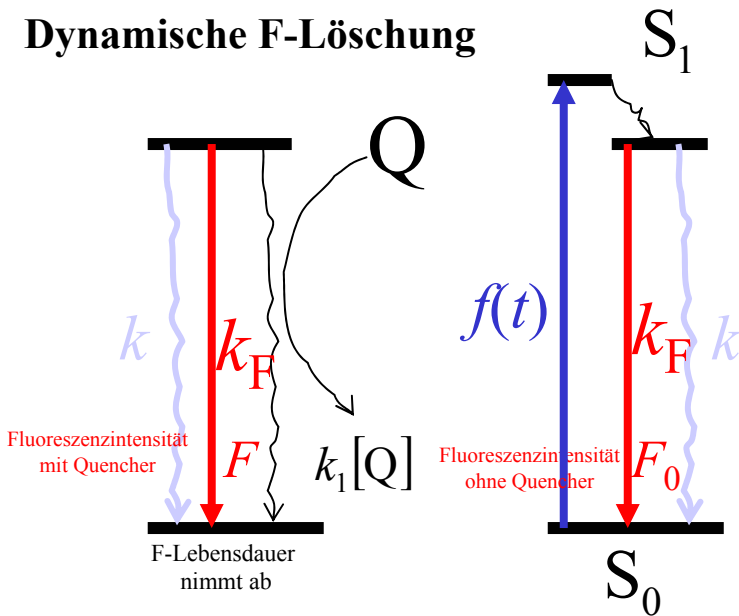
Löschmechanismen:

Beim Stoß Fluorophor/Quencher wird ein nichtfluoreszierender Komplex gebildet (**statische F-Löschung**)

oder

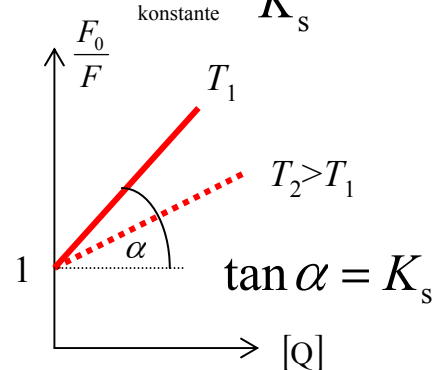
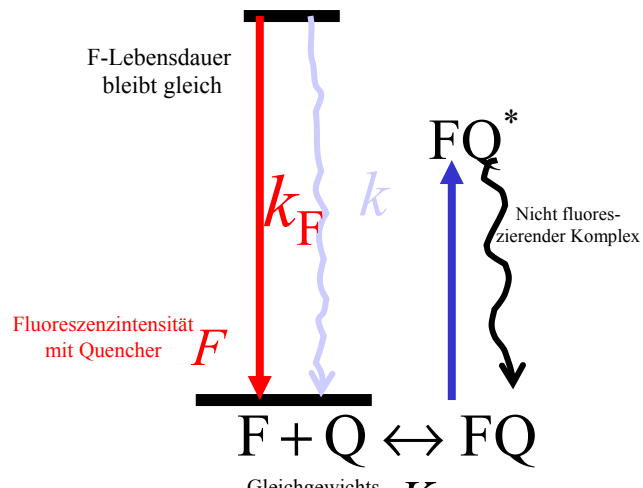
die Stöße deaktivieren die angeregte Fluoreszenzsonde strahlungslos (**dynamische F-Löschung**)

Dynamische F-Löschung



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

Statische F-Löschung



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

Stern-Vollmer-Gleichung

Dynamische Löschung

Die Bilanzgleichungen der Besetzungszahlen mit und ohne Quencher lauten:

$$\begin{aligned} \dot{N}_0^*(t) &= -\frac{1}{\tau_0} N_0^*(t) \quad (\text{ohne Quencher}) & \tau_0 \equiv F - \text{Lebensdauer ohne Quencher} \\ \dot{N}^*(t) &= -\frac{1}{\tau} N^*(t) = -\left\{ \frac{1}{\tau_0} + k_Q [Q] \right\} N^*(t) & (\text{Quencherkonzentration } [Q]) \end{aligned}$$

Es wurde angenommen, dass die Löschrates proportional zur Konzentration des Quenchers ist. Die dabei auftretende bimolekulare Löschkonstante k_Q hängt von der Diffusion des Quenchers und des F-Moleküls ab und kann folgendermaßen abgeschätzt werden:

k_Q ist die Zahl der effektiven F-Löschungsstöße zwischen Q und einem F pro Zeiteinheit bei $[Q] = 1 \text{ M}$. Mit dem Stoßabstand R zwischen Q und F und dem effektiven Diffusionskoeffizienten $D = D_Q + D_F$ ergibt sich für die Stoßzahl

$$Z \approx 4\pi R^2 D \frac{\rho_Q}{R} = 4\pi \cdot 10^3 N_A R D [Q] \rightarrow k_Q [Q]$$

$$k_Q = \gamma 4\pi \cdot 10^3 N_A R D$$

γ kennzeichnet die Effektivität eines Stoßes, für $\gamma = 0,5$ ist die Hälfte der Stöße „löscheffektiv“

Wegen $\propto \frac{T}{\eta}$ wächst die bimolekulare Löschkonstante mit steigender Temperatur.

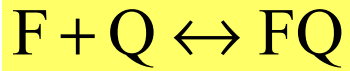
Aus den Bilanzgleichungen folgt die Stern-Vollmer-Gleichung bei dynamischer Löschung

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 k_Q [Q]$$

Ein Kennzeichen der dynamischen Löschung ist die Abnahme der F-Lebensdauer mit sinkender Fluoreszenzintensität (steigender Temperatur).

Statische Löschung

Q-Moleküle bilden mit den F-Molekülen im Grundzustand einen nicht fluoreszierenden Komplex



Im Gleichgewicht gilt mit der Totalkonzentration $[F]_0$ der F-Sonde

$$K_s = \frac{[FQ]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]}$$

Man erhält daraus die Stern-Volmer-Gleichung für die statische Löschung

$$\frac{[F]_0}{[F]} = \frac{F_0}{F} = 1 + K_s [Q]$$

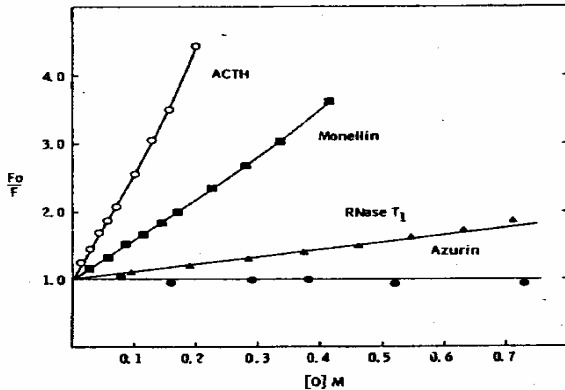
Bei Erhöhung der Temperatur wird in der Regel der Komplex instabiler, d. h. die Fluoreszenzintensität F steigt mit der Temperatur, im Gegensatz zur dynamischen Löschung. Außerdem bleibt die Fluoreszenzlebensdauer gleich:

$$\tau = \tau_0$$

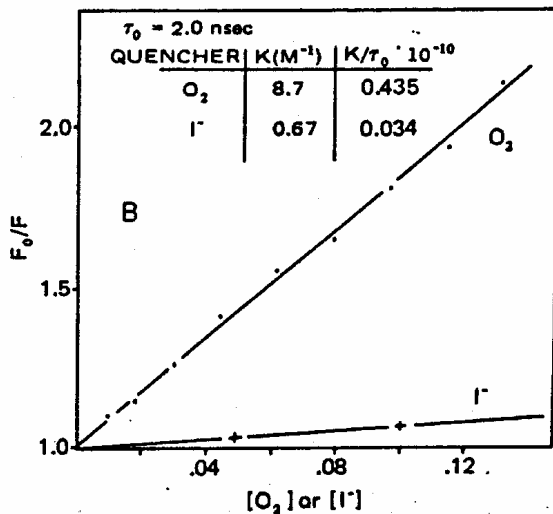
Anwendungsbeispiel: Fluoreszenzlöschung in Proteinen

Messung der Zugänglichkeit von Trp-Resten in Proteinen: Trp-Reste an der Protein-oberfläche sind vom Quencher leichter erreichbar als Trp-Reste im Inneren des Proteins.

Stern-Vollmer-Plot für die Ein-Trp-Proteine ACTH, Monellin, RNase T₁ und Azurin mit Acrylamid:



Ist der Quencher geladen, muss man bei der Zugänglichkeitsmessung noch **elektrostatische Effekte** beachten: Die negativ geladenen Iodid-Ionen I^- quenchen auf Grund ihrer Ladung im wesentlichen nur Trp-Reste an der Proteinoberfläche, während die ungeladenen O_2 -Moleküle bis ins Innere des Proteins vordringen können: Stern-Vollmer-Diagramm der **Fluoreszenzlöschung von Trypsinogen mit O_2 und I^-** .



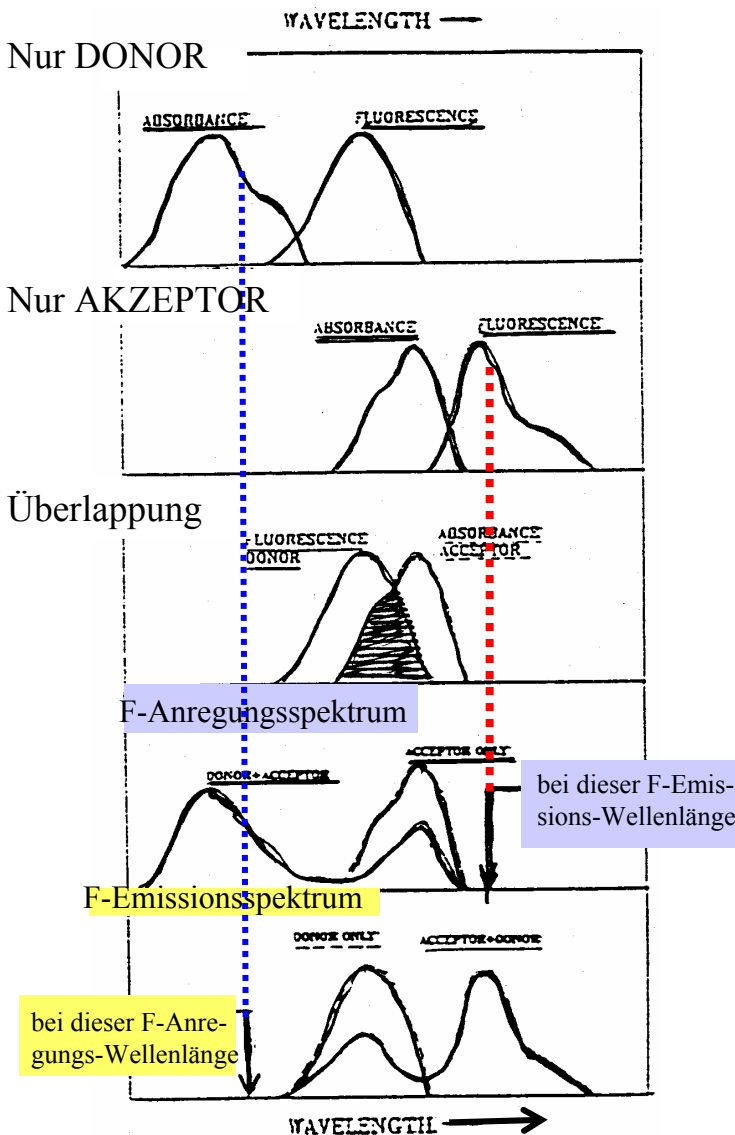
Die Trp-Fluoreszenz kann bereits im nativen Protein durch benachbarte protonierte Gruppen (K, R, H, N, E) mittels H-Brücken-Bindung gelöscht sein. Das Aufbrechen der H-Brücken bei Denaturierung führt dann zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität (**Dequenching**).

7. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

FRET ist eine wichtige Methode zur Untersuchung der Konformationsverteilung und der Dynamik von biologischen Molekülen.

7.1 Mechanismus des Energietransfers (T. Förster 1948)

Energieübertragung von **angeregten Fluorophormolekülen eines DONORS** auf relativ weit entfernte (1...8 nm) **Fluorophormoleküle eines AKZEPTORS im Grundzustand**. Wesentlich ist die **Überlappung des FLuoreszenzspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors**.



Nach **Förster** erfolgt der Energietransfer über die Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Donor-Fluoreszenz-Dipole mit den Akzeptor-Absorptions-Dipolen.

7.2 FRET-Rate k_T

Donor-Bilanzgleichung

$$\dot{N}_D^*(t) = -(k_F + k + k_T)N_D^*(t)$$

$$N_D^*(t) = N_D^*(0)e^{-\frac{t}{\tau}}$$

$$\frac{1}{\tau} = k_F + k + k_T = \frac{1}{\tau_0} + k_T$$

Anzahl der angeregten Donormoleküle N_D^*

k_T = Transferrate $D^*A \rightarrow DA^*$

τ_0 = F- Lebensdauer ohne Akzeptor

τ = F- Lebensdauer mit Akzeptor

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 k_T = \frac{F_0}{F}$$

F_0 = Fluoreszenzintensität des Donors ohne Akzeptor

F = Fluoreszenzintensität des Donors mit Akzeptor

$$E \equiv \frac{k_T}{k_T + k_F + k} = \frac{k_T \tau_0}{1 + k_T \tau_0} = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

Transfer-Effizienz

Wenn jeder Donor mit einem Akzeptor im Abstand R benachbart ist, gilt für die in der Probe beobachtete Transferrate die Förster-Gleichung:

$$k_T = \frac{1}{\tau_0} \left(\frac{R_0}{R}\right)^6$$

Für $R = R_0$ ist $k_T = 1/\tau_0$ und $F_0/F = 2$, d. h. die Hälfte des F-Lichts des D wird vom A absorbiert.

$$R_0^6 = \frac{9 \ln 10 \kappa^2 Q_D J}{128 \pi^5 N_A n^4}$$

„Försterradius“ R_0 , wird aus Experimenten ohne Energietransfer bestimmt.

$$\kappa^2 = [\vec{e}_D \vec{e}_A - 3 \vec{e}_D \vec{e}_R \circ \vec{e}_A \vec{e}_R]^2$$

Orientierungsfaktor der DDWW, Einheitsvektoren in Richtung des D-Emissions- und des A-Absorptionsdipols, sowie entlang des DA-Verbindungsvektors

$$Q_D = \frac{k_F}{k_F + k} \quad \text{Quantenausbeute D-Fluoreszenz ohne Akzeptor}$$

$$J = \int \lambda^4 \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) d\lambda \quad \text{spektrales Überlappungsintegral}$$

$\varepsilon_A(\lambda)$ Absorptionskoeffizient des Akzeptors ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

$f_D(\lambda)$ Normierte D-Fluoreszenzlinienfunktion ohne A

n Brechungsindex des Mediums zwischen D und A