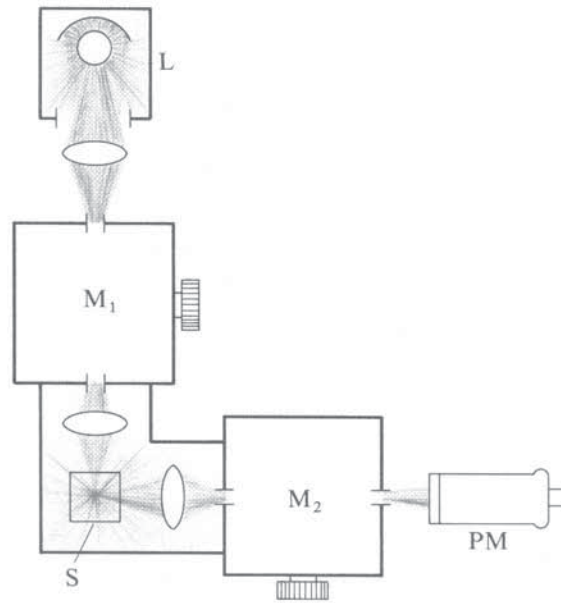


Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

A



Stationäre Fluoreszenzmessungen

L ist eine Lichtquelle

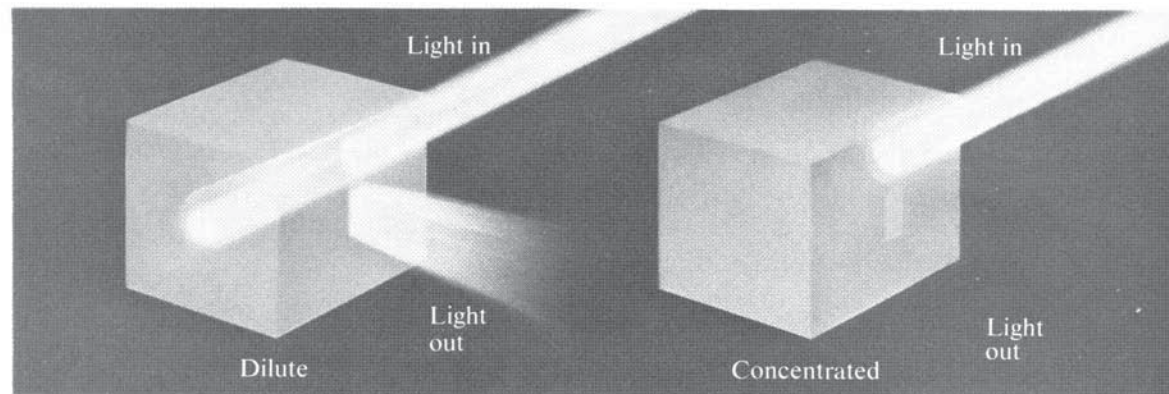
M1 ist der
Anregungsmonochromator

M2 der Emissionsmonochromator

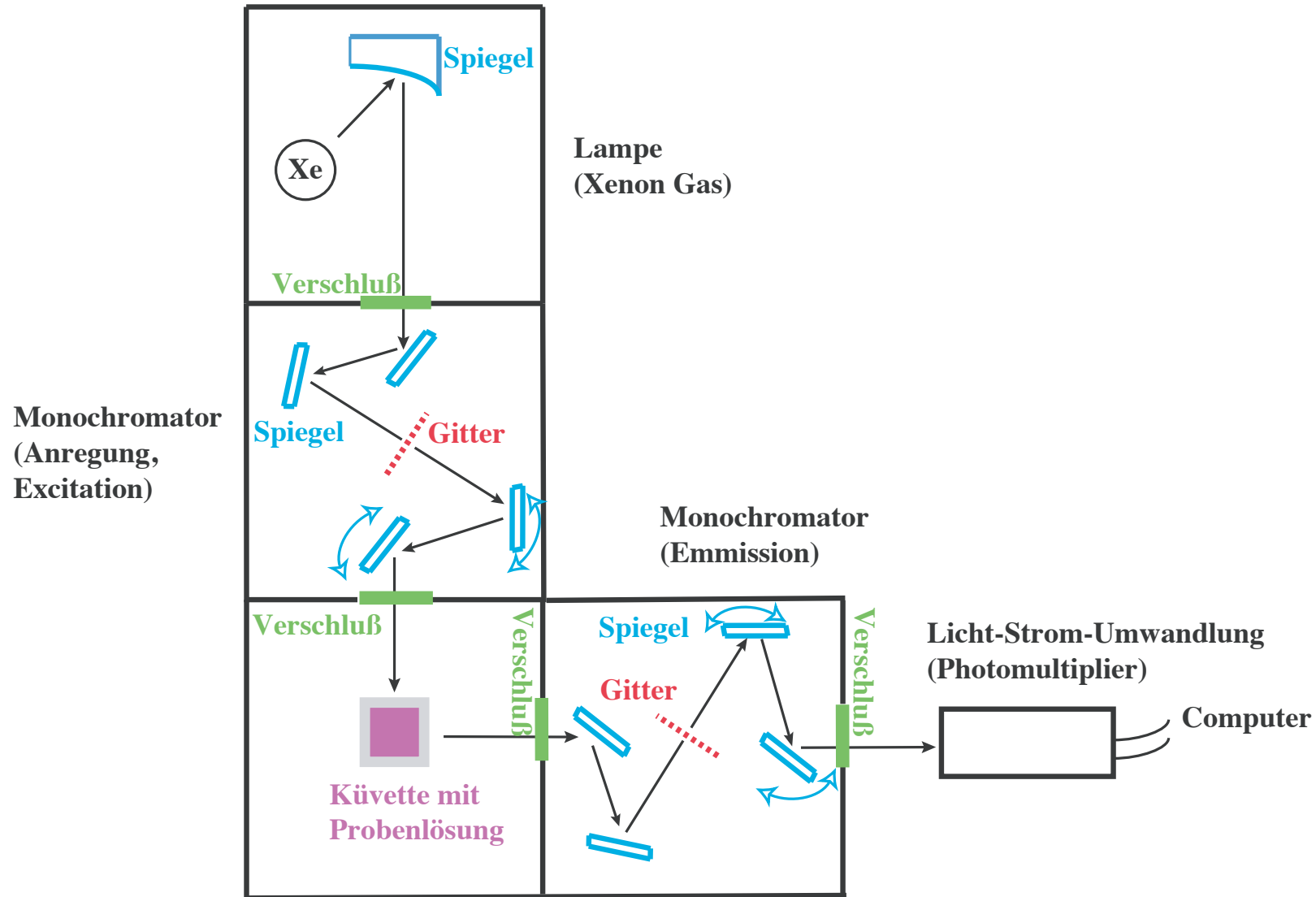
PM ist ein Photomultiplier

S die Probe

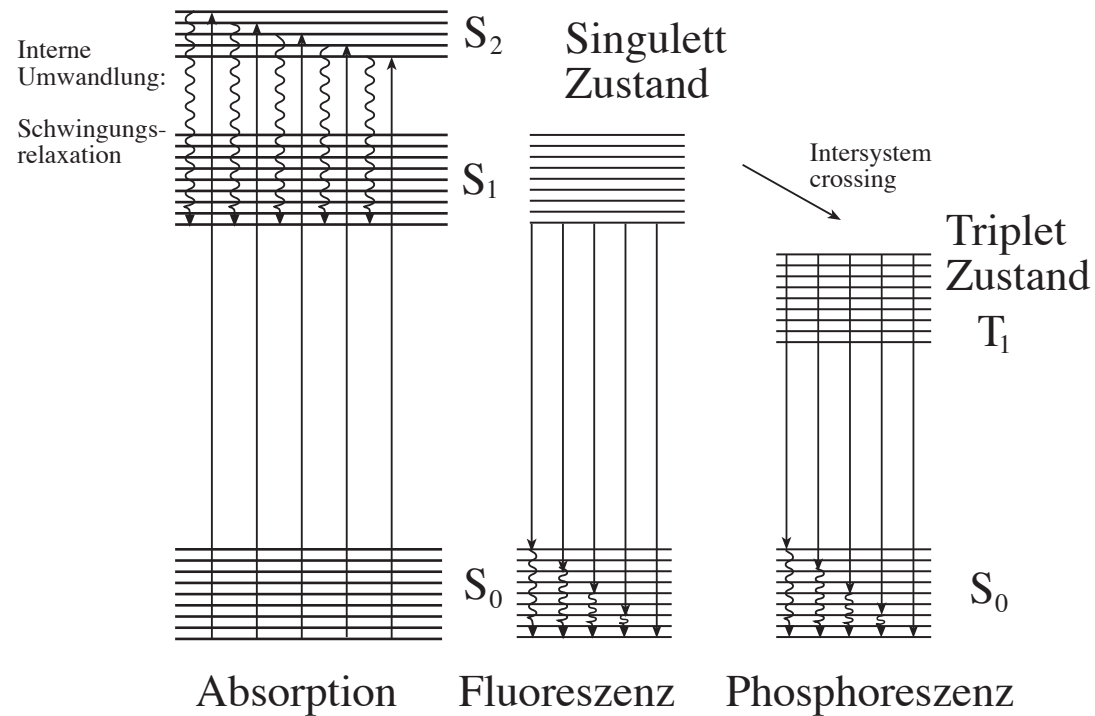
B





Schematischer Aufbau eines modernen Spektralfluorometers

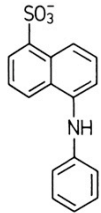


Jablonski Diagram

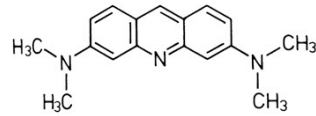


- Schwingungsübergänge sind dargestellt durch 
- Elektronische Übergänge sind dargestellt durch 
- Elektronische Übergänge in den Grundzustand sind durch die Emission von Fluoreszenzstrahlung charakterisiert. Wenn der angeregt Zustand ein Triplettzustand war, durch Emission von Phosphoreszenz.

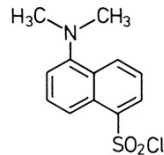
Strukturen einiger in Fluoreszierender Farbstoffe



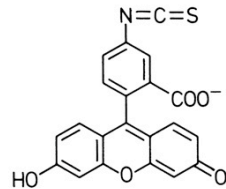
1-Anilino-8-Naphthalinsulfonat (ANS)



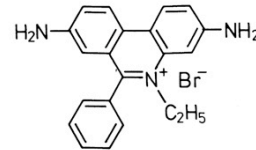
Acridinorange



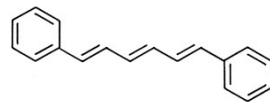
1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (Dansylchlorid)



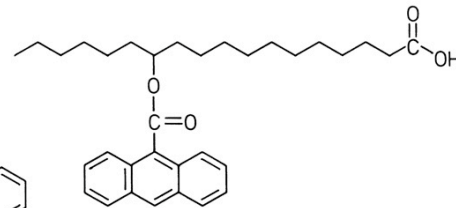
Fluoreszein-Isothiocyanat



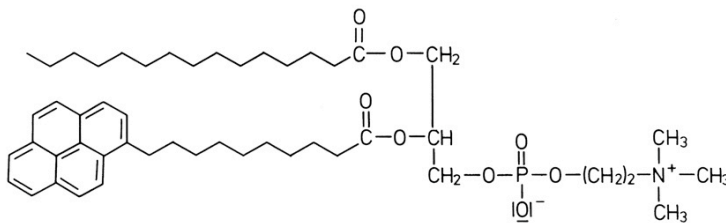
Ethidiumbromid



Diphenylhexatrien

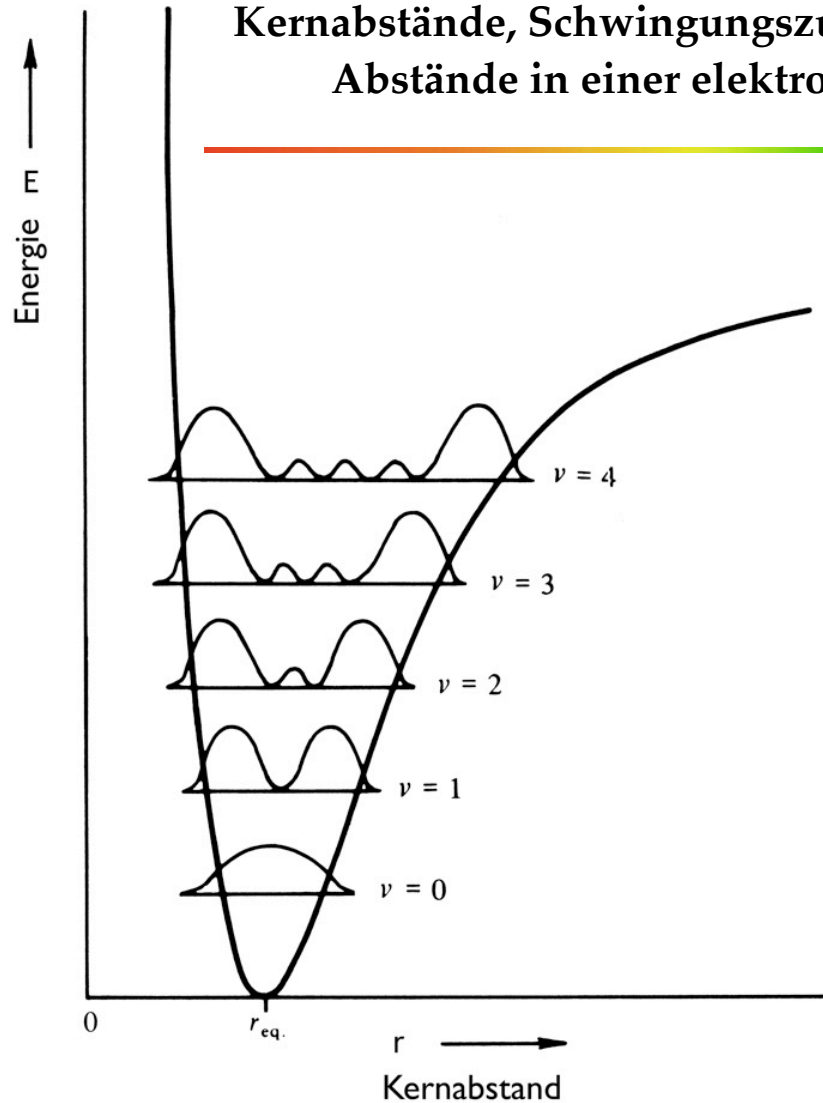


12-(9-Anthroyl)-Stearinsäure



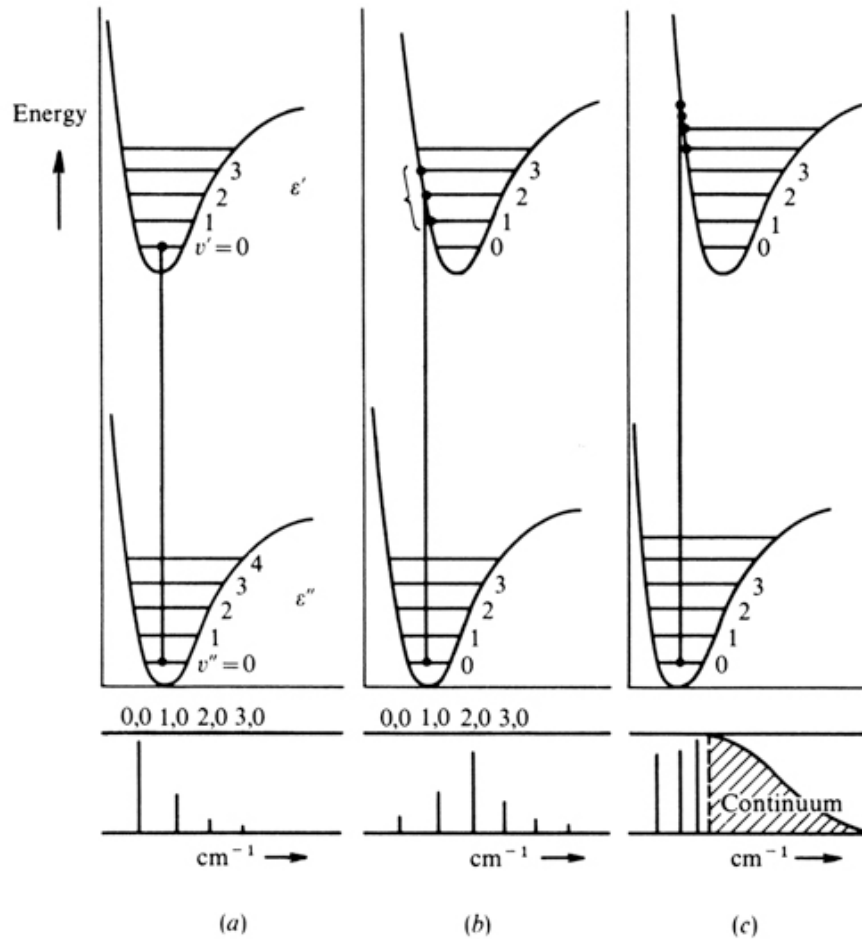
1-Acyl-2-10-(1-Pyren)dekanoyl-glycero-3-phosphocholin

Kernabstände, Schwingungszustände und Wahrscheinlichkeit interatomarer Abstände in einer elektronischen Bindung zwischen zwei Atomen



Die Wahrscheinlichkeitsverteilung für ein zweiatomiges Molekül wie durch die Quantentheorie vorhergesagt. Die Kerne werden am wahrscheinlichsten bei einem Abstand gefunden, der durch die Maxima der Abstands-Verteilungen bei jedem Schwingungszustand gegeben ist.

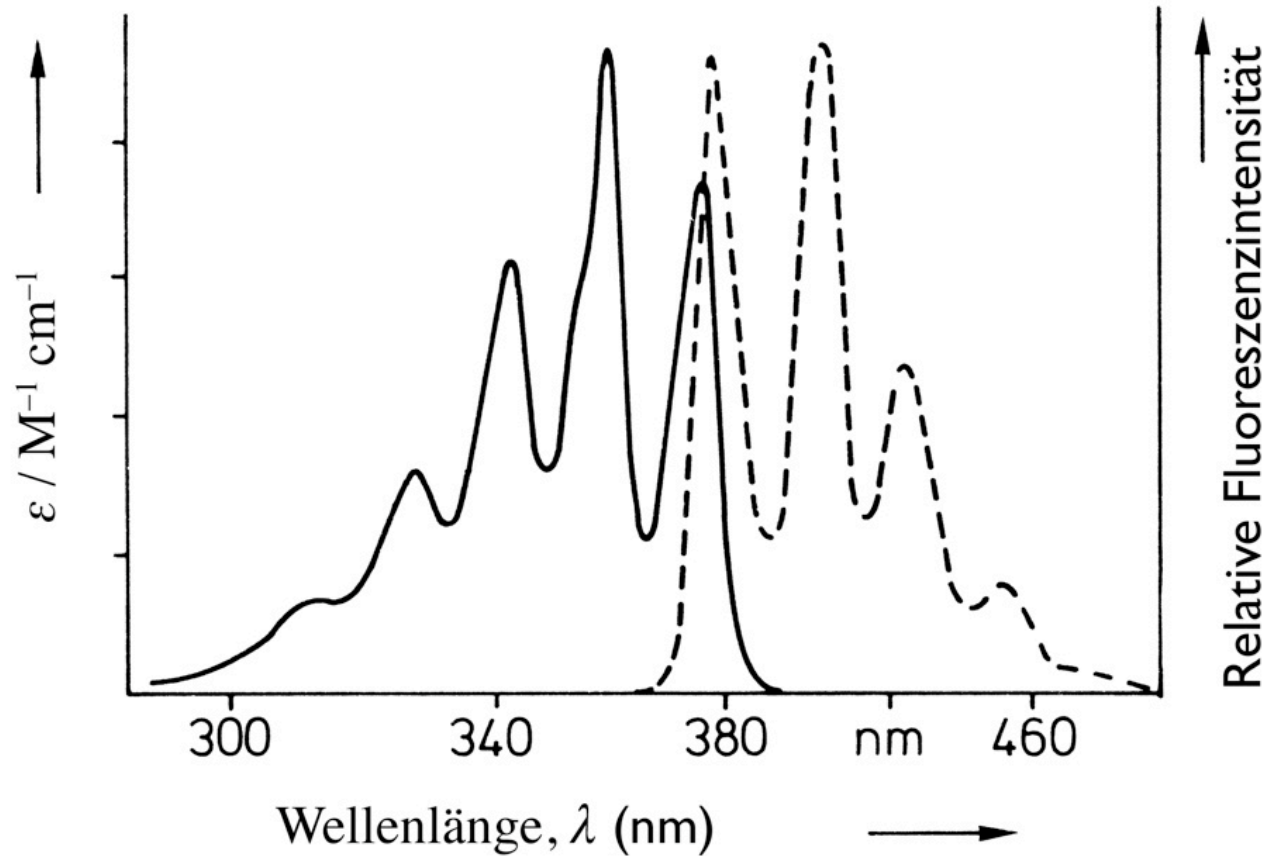
Kernabstände, Schwingungszustände und elektronische Übergänge



Franck-Condon Prinzip, elektronische Übergänge erfolgen ohne Änderung des *momentanen* Kernabstandes:

- (a) Gleichgewichts-Kernabstände sind im elektronisch angeregten und im elektronischen Grundzustand etwa gleich
- (b) der Gleichgewichts-Kernabstand des angeregten Zustandes ist etwas größer als der Kernabstand des elektronischen Grundzustandes
- (c) der Gleichgewichts-Kernabstand des angeregten Zustandes ist etwas kleiner als im Grundzustand.

Schwingungsgrobstruktur elektronischer Absorptions- und Emissionsbanden



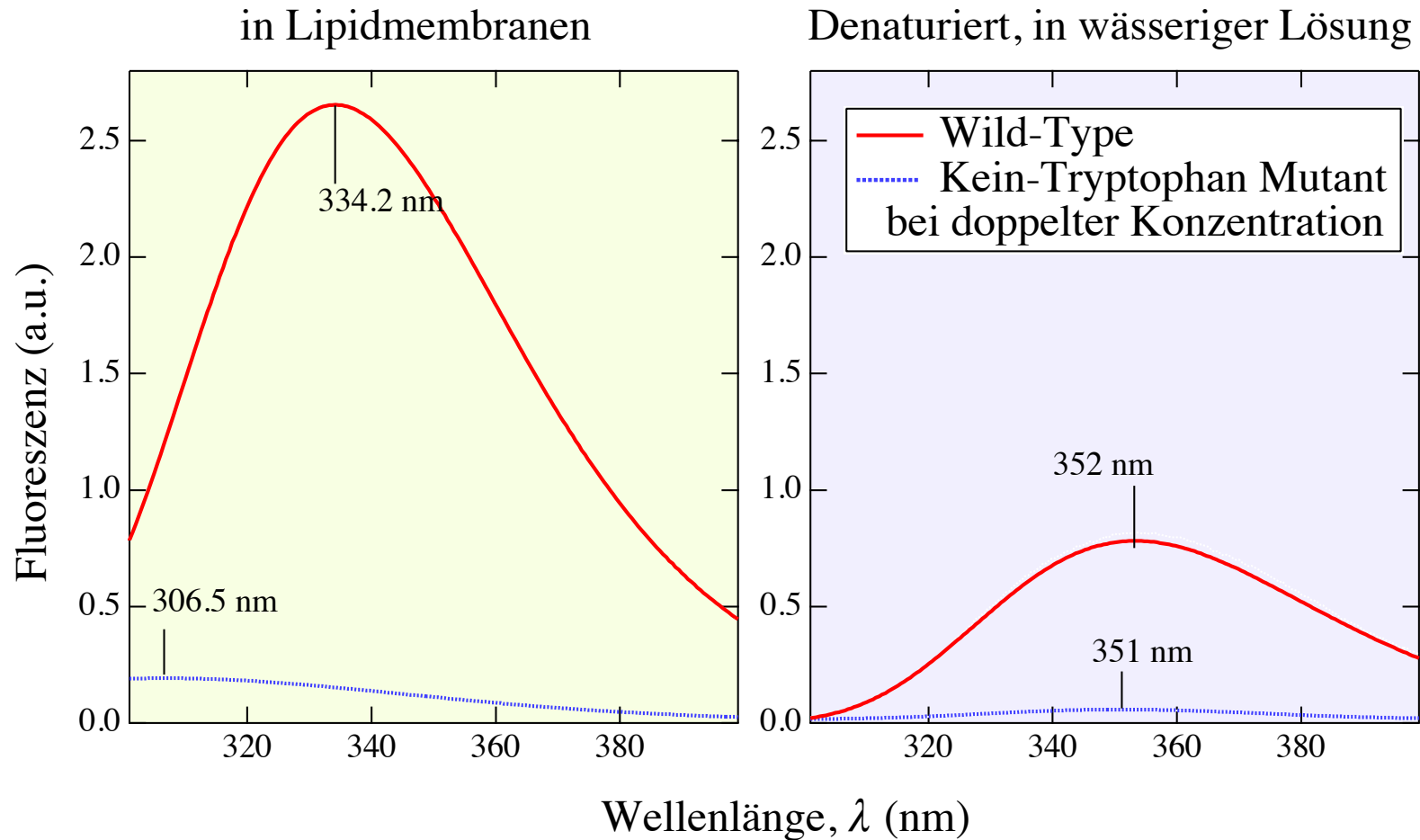
Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Anthracen in Cyclohexan. Absorptions- und Fluoreszenzspektrum verhalten sich beinahe wie Bild und Spiegelbild.

Fluoreszenzeigenschaften einiger biologischer Chromophore

Chrom.	Lösung	Absorption		Fluoreszenz			Sensitivität	
		λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($\cdot 10^{-3}$)	λ_{\max} (nm)	Φ_F	τ_f (nsec)	$\epsilon_{\max} \cdot \Phi_F$ ($\cdot 10^{-2}$)	
Trp H	H ₂ O, pH 7	280	5.6	348	0.20	2.6	11.0	
Tyr H	H ₂ O, pH 7	274	1.4	303	0.14	3.6	2.0	
Phe H	H ₂ O, pH 7	257	0.2	282	0.04	6.4	0.08	
Adenine	H ₂ O, pH 7	260	13.4	321	$2.6 \cdot 10^{-4}$	6.3	0.032	
Guanine	H ₂ O, pH 7	275	8.1	329	$3.0 \cdot 10^{-4}$	< 0.02	0.024	
Cytosine	H ₂ O, pH 7	267	6.1	313	$0.8 \cdot 10^{-4}$	< 0.02	0.005	
Uracil H	H ₂ O, pH 7	260	9.5	308	$0.4 \cdot 10^{-4}$	< 0.02	0.004	
NADH H	H ₂ O, pH 7	340	6.2	470	0.019	0.40	1.2	

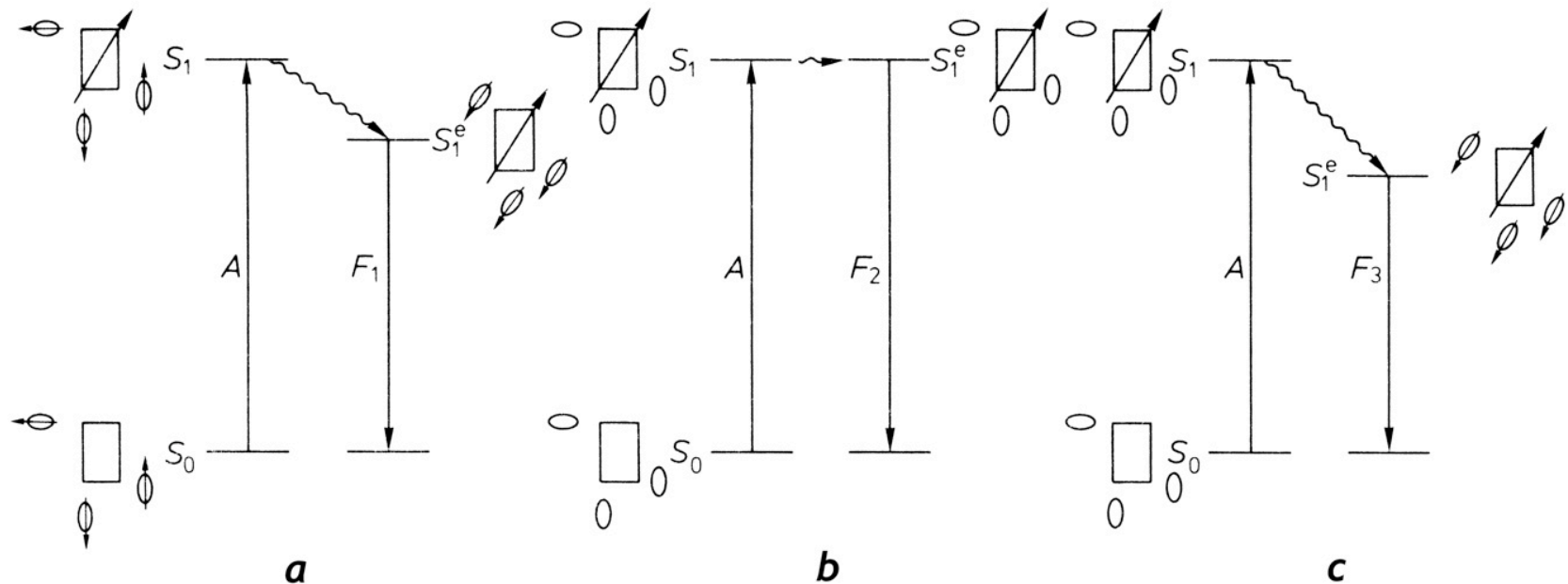
Verschiebung der Fluoreszenzmaxima bei Wechsel der Umgebung am Beispiel eines Membranproteins

Fluoreszenzspektren von Außenmembranprotein A von *Escherichia coli*



Ersetzt man die nativen Tryptophan-Reste im Protein auf genetischer Ebene durch Phenylalanin, so zeigt das resultierende mutierte Protein dramatisch veränderte Fluoreszenzeigenschaften, wobei seine Funktion unverändert ist.

Lösungsmittelleffekte auf die Lage des Fluoreszenzmissionsmaximums



Lösungsmittelleffekte auf die Fluoreszenzemission. A =Absorption, F =Fluoreszenz, S_1 =Energie des Fluorophors direkt nach der Anregung (angeregter Franck-Condon-Zustand). S_1^e =Schwingungsgleichgewichtszustand, **a** polares Lösungsmittel, **b** apolares Lösungsmittel mit niedriger, **c** mit hoher Polarisierbarkeit.

Definition der Fluoreszenz-Quantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ ist definiert durch das Verhältnis

$$\Phi = \frac{\text{Zahl der emittierten Photonen}}{\text{Zahl der absorbierten Photonen}} \leq 1$$

Fluoreszenz-Abnahme als Funktion der Zeit:

$$-\frac{dN}{dt} = k_f \cdot N \quad N(t) = N_0 \cdot \exp(-k_f \cdot t)$$

Mit den Geschwindigkeitskonstanten k_f (Fluorescence Emission), $k_{i.c.}$ (Innere Conversion), $k_{i.s.c.}$ (Intersystem Crossing) and k_Q für die Fluoreszenz Löschung (Quenching), also von anderen Prozessen, die zur Rückkehr zum elektronischen Grundzustand führen, kann man die Fluoreszenzquantenausbeute beschreiben durch:

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_{i.c.} + k_{i.s.c.} + k_Q}$$

Mit der Definition der Fluoreszenzlebensdauer $\tau_f = 1/k_f$ und der Gesamt-Lebensdauer des angeregten Zustandes $\tau = (k_f + k_{i.c.} + k_{i.s.c.})^{-1}$ erhält man:

$$\Phi = \frac{\tau}{\tau_f}$$

Fluoreszenz-Quenching / Fluoreszenzlöschung

Verschiedene Prozesse können zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität (Löschung bzw. Quenching) führen, z.B.:

1. **Dynamische Fluoreszenzlöschung durch Deaktivierung des angeregten Zustandes durch Kollision mit anderen Molekülen**
2. **Statische Fluoreszenzlöschung durch Komplexbildung. Der Komplex absorbiert Strahlung, aber diese wird in Wärme umgewandelt.**
3. **Fluoreszenz-Energietransfer (Förster Transfer, FRET): Die Emissionsbande eines angeregten Donators überlappt die Absorptionsbande eines Akzeptormoleküls in naher Nachbarschaft.**
4. **Excimeren-Bildung: Der angeregte Zustand bildet Dimere aus. Die Dimeren fluoreszieren bei anderen Wellenlängen als die Monomeren**
5. **Wieder-Absorption (Reabsorption) bei hohen Fluorophorkonzentrationen**

Fluoreszenz-Quenching durch Kollision: Dynamische Fluoreszenzlöschung

Fluoreszenzquantenausbeute

Quencher anwesend:

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_q}$$

Ohne Quencher:

$$\Phi_0 = \frac{k_f}{k_f + k_i}$$

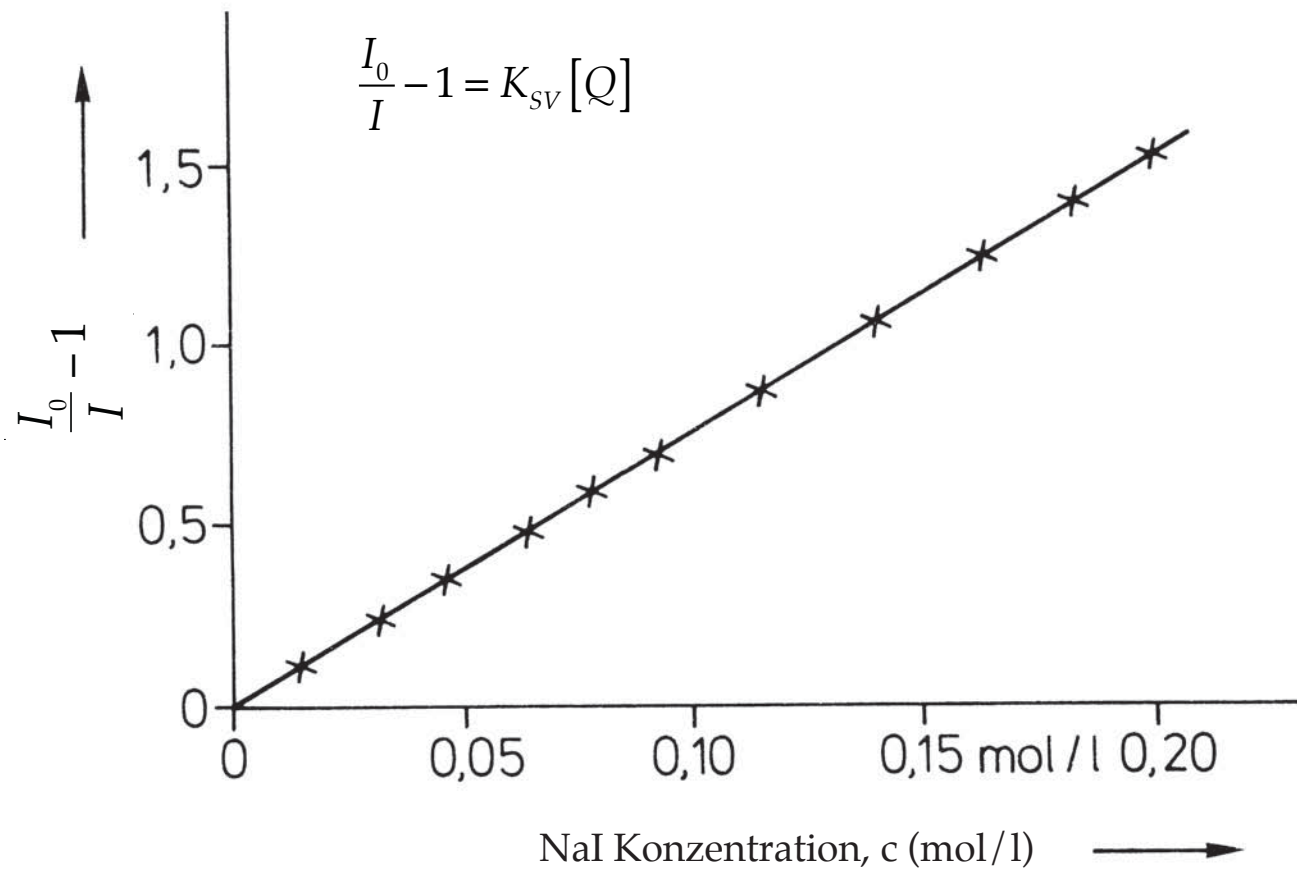
Das Verhältnis der Quantenausbeuten in Gegenwart (Φ) bzw. in Abwesenheit (Φ_0) des Quenchers entspricht dem Verhältnis der jeweiligen Fluoreszenz-Intensitäten (I bzw. I_0):

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = \frac{k_f + k_i + k_q}{k_f + k_i} = 1 + \frac{k_Q}{k_f + k_i} \qquad \frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + K_Q [Q] \tau_0 = 1 + K_{SV} [Q]$$

Bei einer konstanten Konzentration des Fluorophors ist die Übergangsrate (k_Q) für die Deaktivierung des angeregten Zustandes durch Kollisionslöschung zur Konzentration $[Q]$ des Fluoreszenzlöschers proportional: $k_Q = K_Q [Q]$. Mit der Lebensdauer des angeregten Zustandes des Fluorophors $\tau_0 = 1/(k_f + k_i)$ erhält man die Stern-Volmer Gleichung:

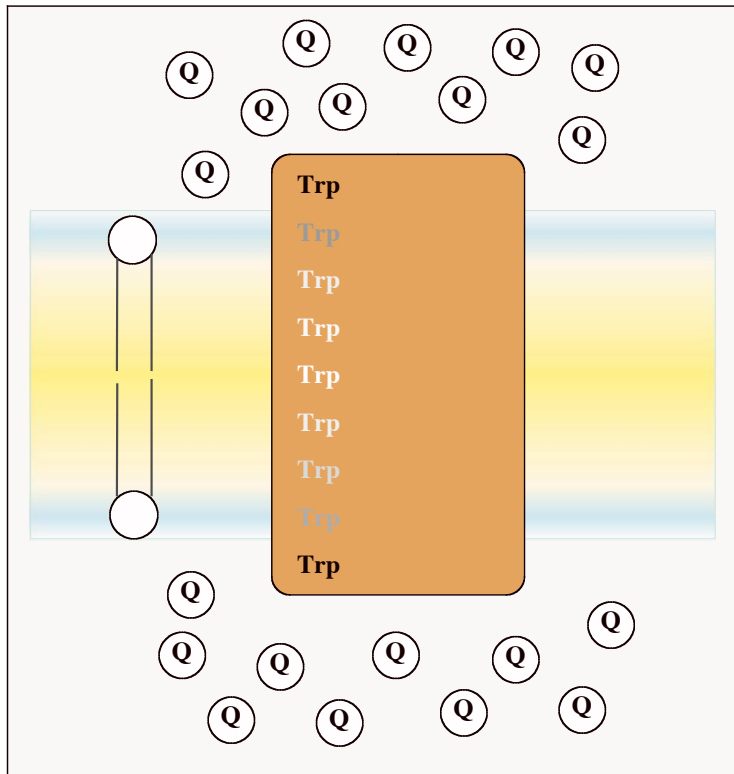
$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + K_Q [Q] \tau_0 = 1 + K_{SV} [Q] \qquad K_{SV}: \text{ Stern-Volmer Konstante } (K_{SV} = K_Q \cdot \tau_0)$$

Beispiel: Stern-Volmer Plot der Fluoreszenzlöschung von Tryptophan durch den Quencher Natriumiodid in Lösung



Die Stern-Volmer Konstante ist durch die Steigung dieser Auftragung gegeben.

Beispiel: Fluoreszenzlöschung durch Kollision: wasserlösliche Fluoreszenzquencher und Tryptophanfluoreszenz von Membranproteinen

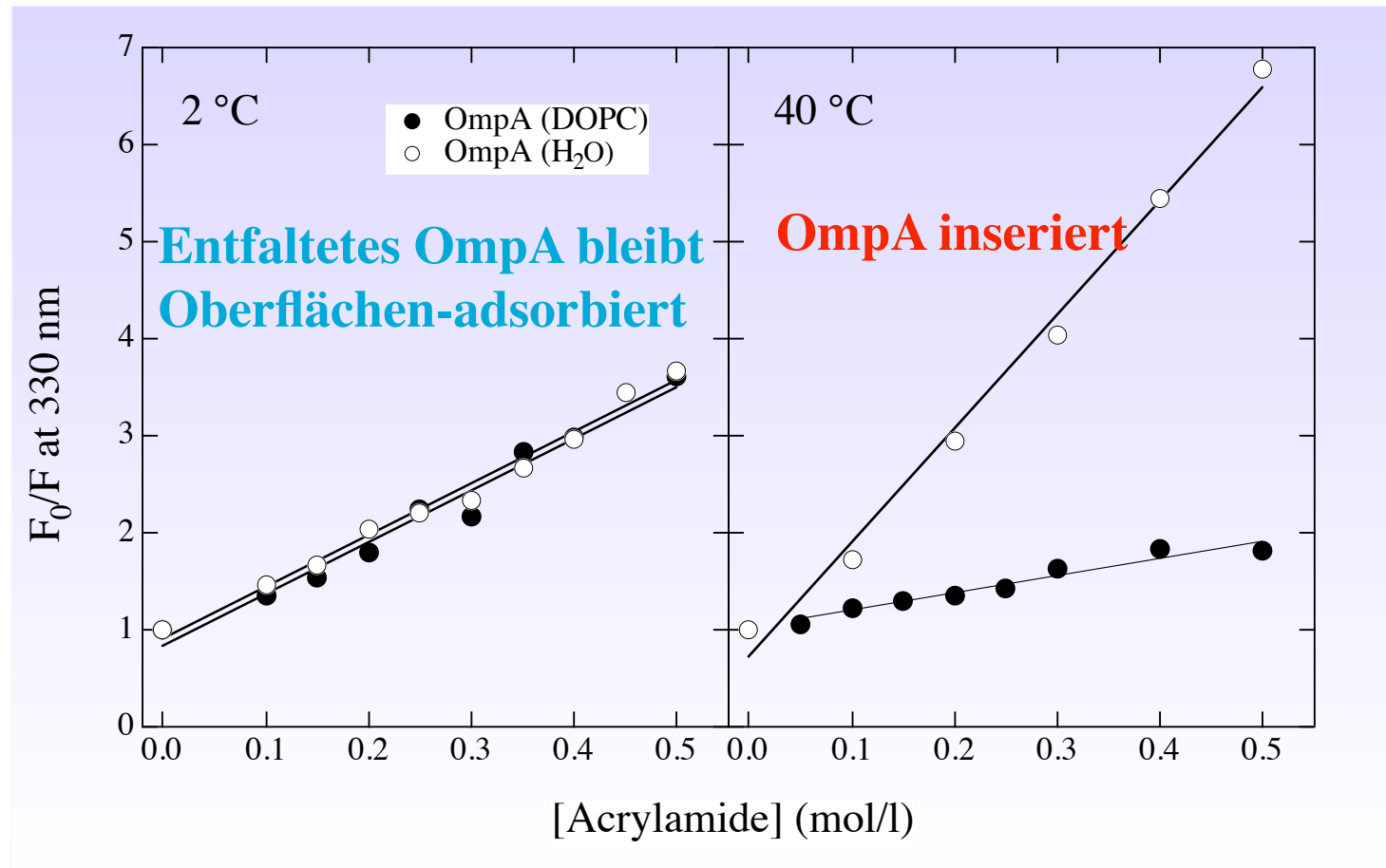


Dynamische Fluoreszenzlöschung durch Stoßdeaktivierung

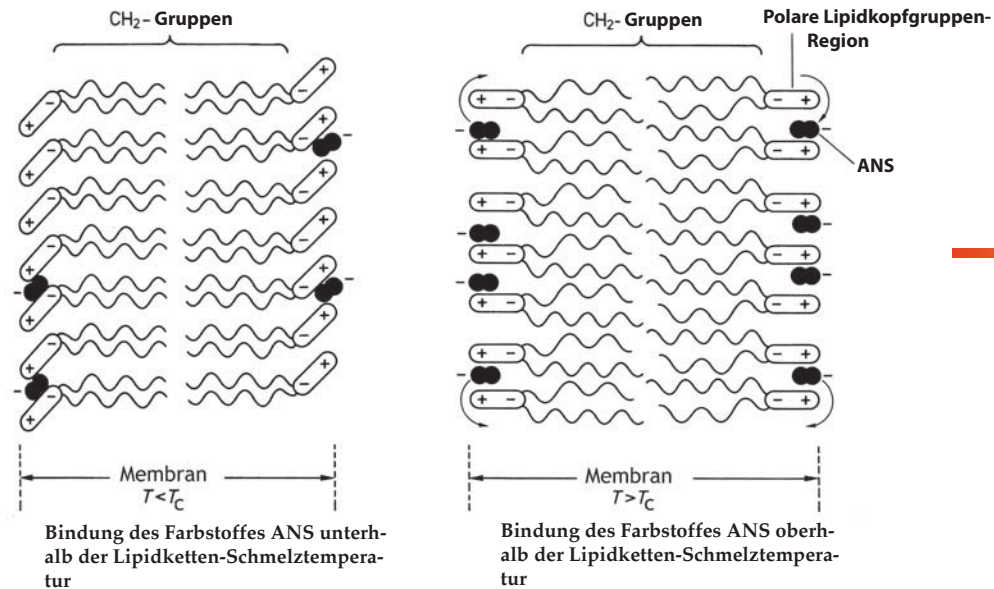
Fluorophore (z.B. Tryptophan) die Kollisionslöschern (z.B. Iodid-Ionen, Cs^{2+} , oder Acrylamid) ausgesetzt sind, fluoreszieren weniger stark als Fluorophore, die nur wenig Kontakt mit Kollisionsquenchern haben.

Tryptophan (Trp) ist entsprechend dunkel oder hell eingezeichnet

Stern-Volmer Plot: Kollisionslöschung der Fluoreszenz von Außenmembranprotein A (OmpA) durch Acrylamid

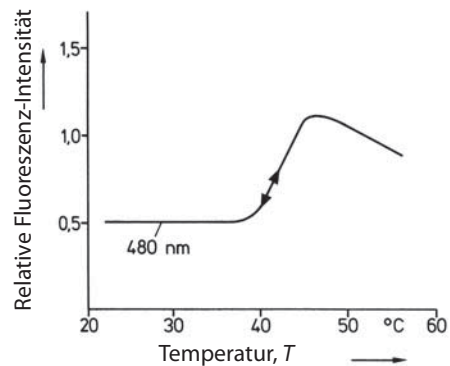


Nach Kleinschmidt & Tamm, 1999,
Biochemistry 38, 4996-5005

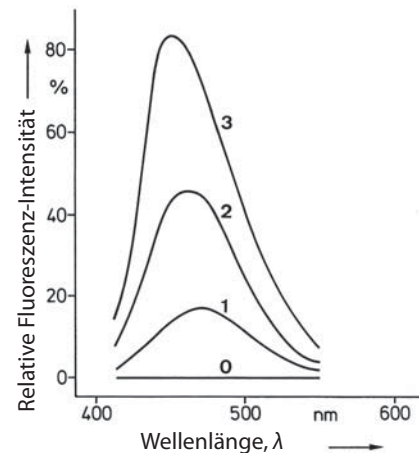


Beispiel: Fluoreszenz-Eigenschaften von ANS in Lipid-Doppelschichten: Lipidketten-Schmelze und Phasenumwandlungstemperatur

Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität bzw. Fluoreszenzquantenausbeute kann benutzt werden, um die Phasenumwandlungstemperatur zu bestimmen.
(nach Träuble, H., 1971, Naturwissenschaften 6, 277)

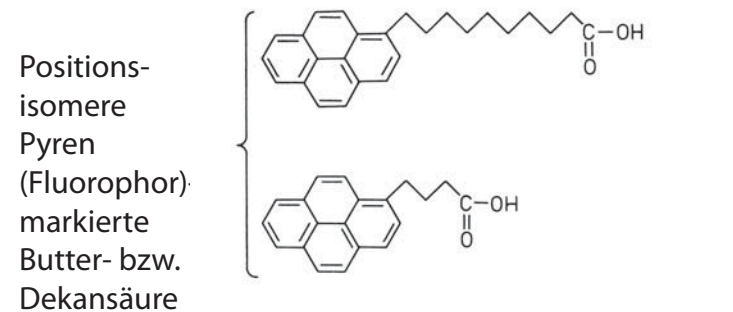
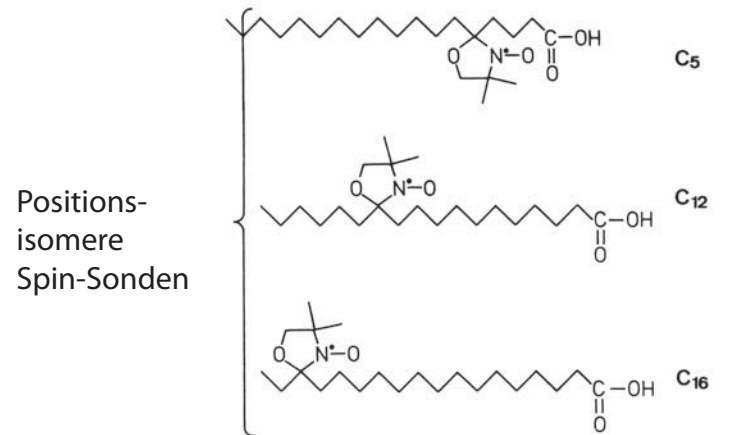


Phasenumwandlungstemperatur von Dipalmitoylphosphatidylcholin bestimmt aus der Änderung der Fluoreszenz-Intensität von ANS

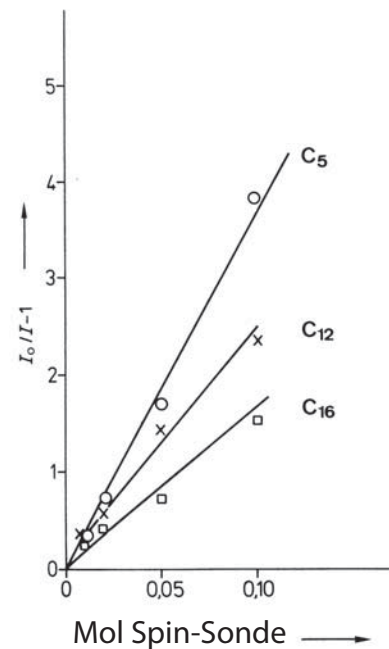


Intensitätsanstieg in der Fluoreszenz von ANS nach Bindung an Rinder Serumalbumin (BSA). Mit wachsender Konzentration von BSA (von 1 nach 3), steigt die Intensität an.
nach Freifelder, D. (1982) Physical Biochemistry, W.H. Freeman Co.

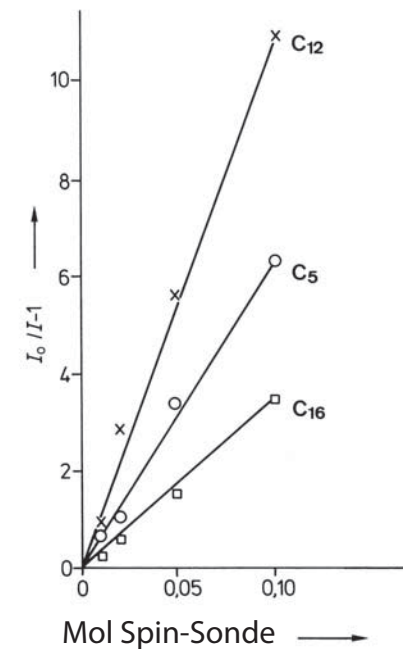
Fluoreszenzlöschung in Membranen



Pyrenbuttersäure

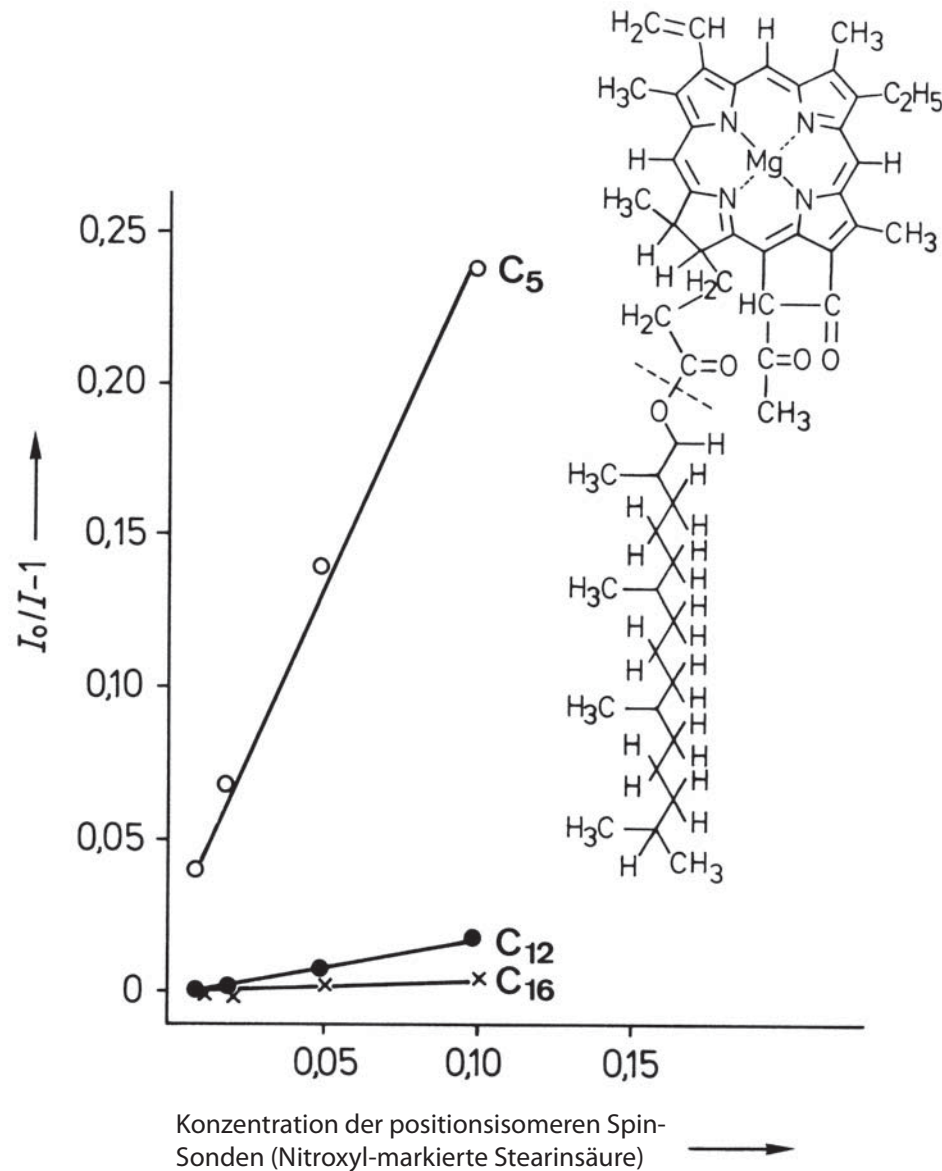


Pyrendekansäure



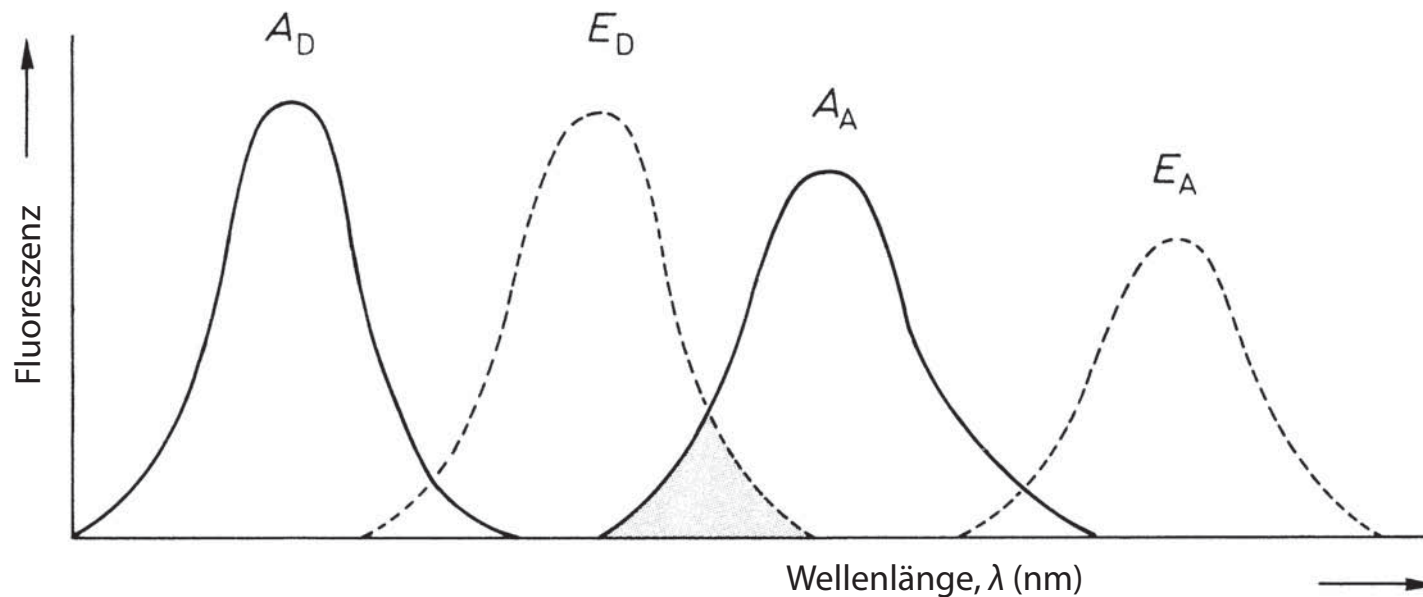
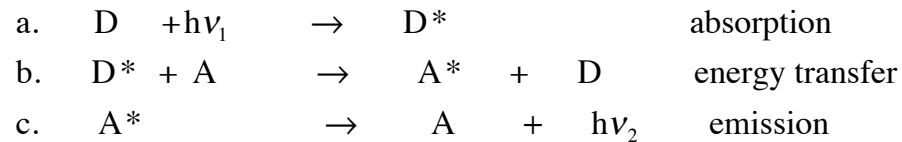
Fluoreszenz-Quenching von Pyrenbuttersäure bzw. Pyrendekansäure in Lipidmembranen durch verschiedene Nitroxyl-Radikale

Fluoreszenzlöschung von Chlorophyll A in Lipidmembranen



Die am Kohlenstoffatom 5 markierte Stearinsäure quencht die Fluoreszenzintensität von Chlorophyll A am stärksten. Der Chromophor des Chlorophyll befindet sich daher näher an der Oberfläche der Membran als im hydrophoben Zentrum der Membran.

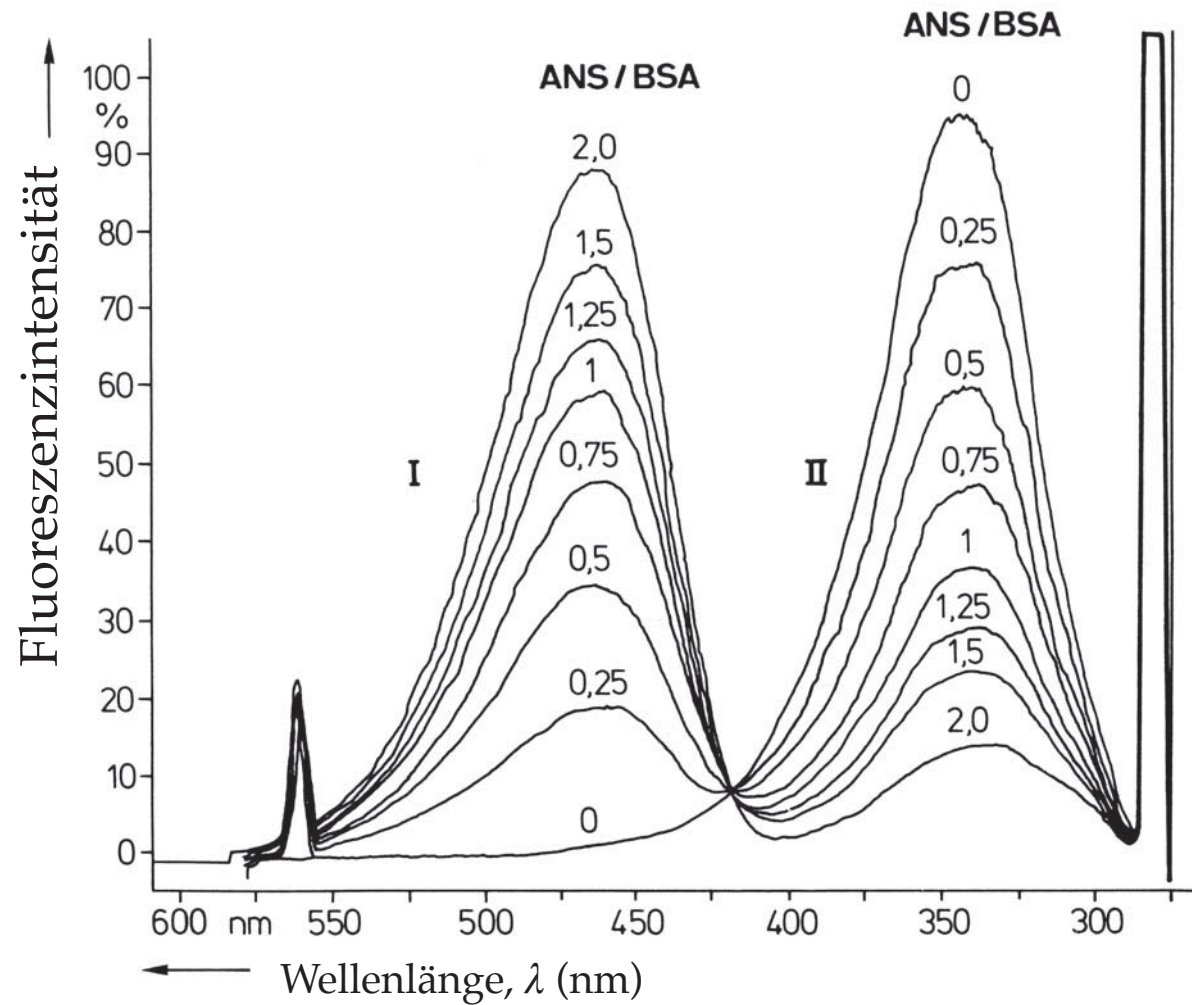
Fluoreszenz Resonanzenergie-Transfer (Förster Energie Transfer)



Für den Förster Energie-Transfer müssen die folgenden Voraussetzungen erfüllt sein:

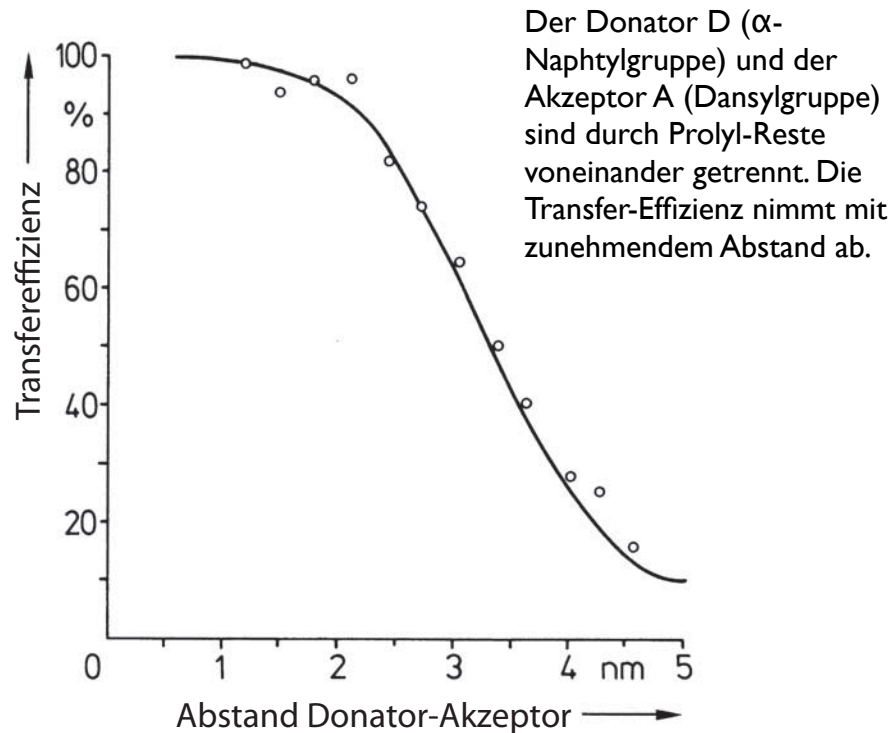
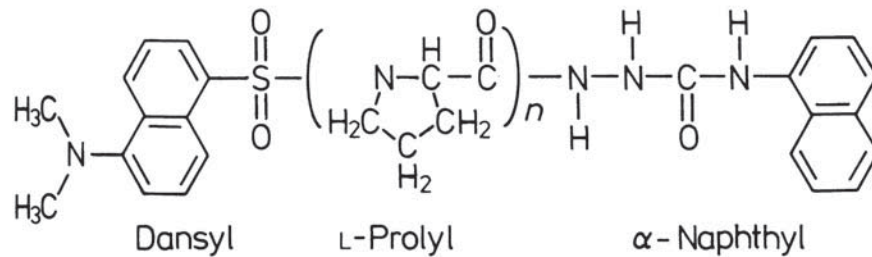
- Das Donatormolekül muss eine ausreichend lange Fluoreszenzlebensdauer aufweisen.
- Das Emissionsspektrum des Donators und das Absorptionsspektrum des Akzeptors müssen partiell überlappen.
- Die Übergangsdipolmomente von Donator und Akzeptor müssen geeignete Orientierung zueinander besitzen.
- Die Distanz zwischen Donator und Akzeptor darf einen Maximalabstand nicht überschreiten (< 10 nm).

Fluoreszenz Resonanzenergie-Transfer am Beispiel Rinderserumalbumin und ANS.



Nach Anregung bei 290 nm beobachtet man die Fluoreszenz von Rinderserum Albumin bei 340 nm. In Gegenwart von ANS und bei zunehmender ANS Konzentration wird die Emissionsenergie zunehmend transferiert, um ANS bei 340 nm anzuregen. Die ANS Fluoreszenzemission wird dann bei ~460 nm beobachtet.

Experimenteller Test der r^6 -Abhängigkeit der Transfereffizienz



Die Transfer Effizienz zwischen Donator (superscript D) und Akzeptor ist gegeben durch:

$$E_T = \frac{k_T}{k_T + k_f^D + k_{i.c.}^D + k_{i.s.c.}^D}$$

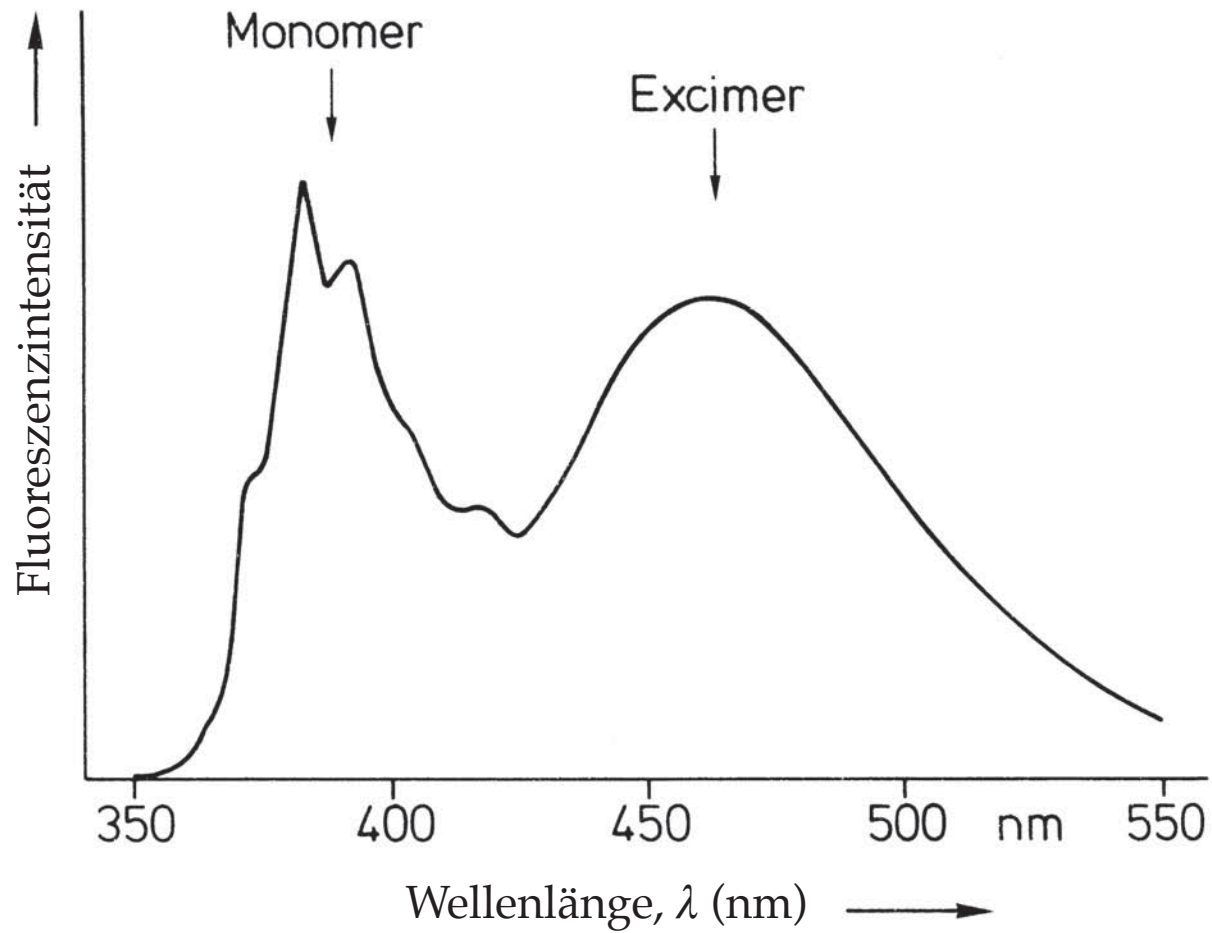
$$\frac{\Phi_{D-A}}{\Phi_D} = \frac{I_{D-A}}{I_D} = \frac{\frac{k_f^D}{k_f^D + k_{i.c.}^D + k_{i.s.c.}^D + k_T}}{\frac{k_f^D}{k_f^D + k_{i.c.}^D + k_{i.s.c.}^D}} = 1 - E_T$$

$$\frac{\tau_{D-A}}{\tau_D} = 1 - E_T \quad E_T = \frac{k_T}{k_T + 1/\tau_D}$$

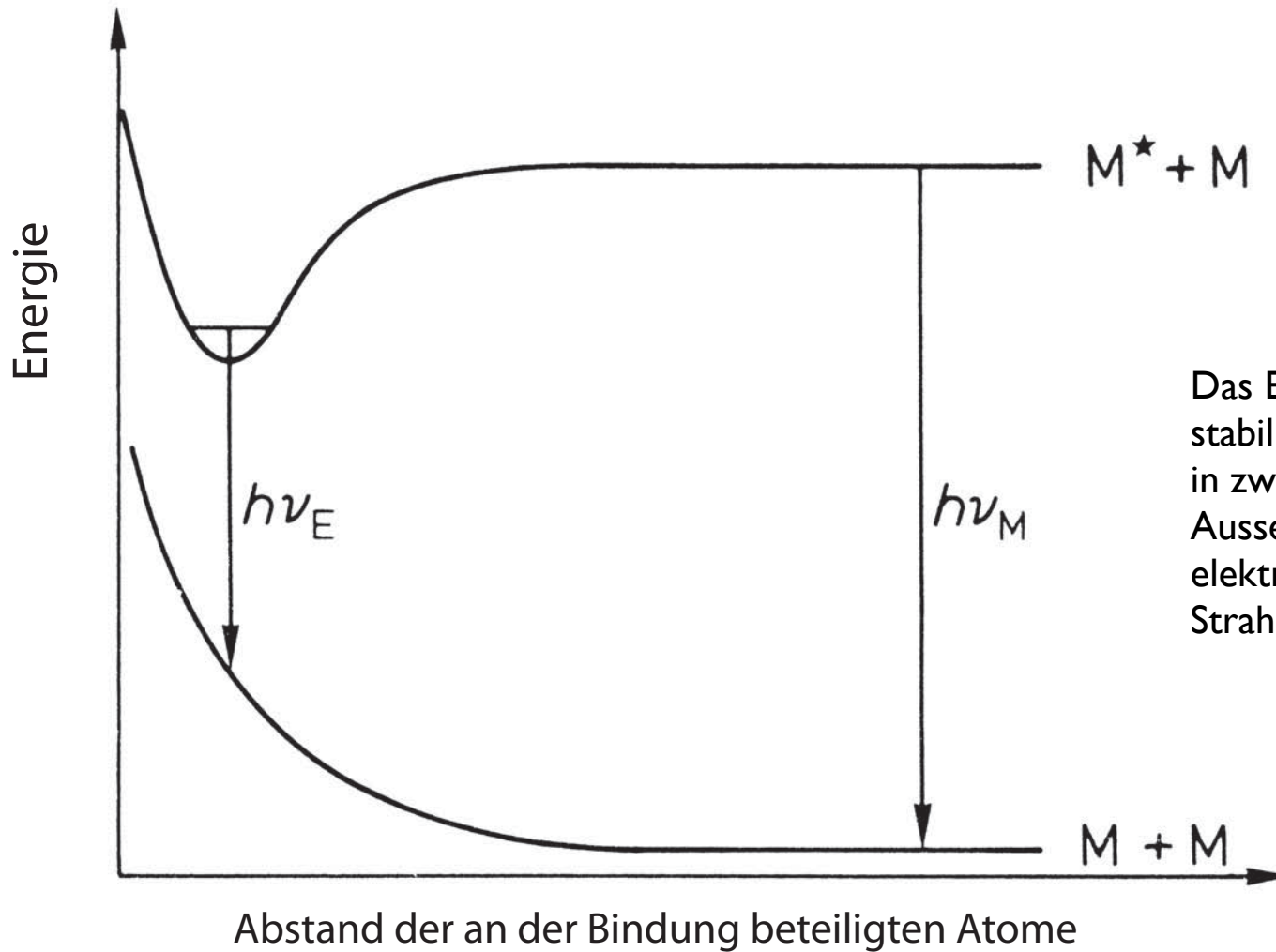
$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{r}{R_0} \right)^{-6} \quad E_T = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6}$$

R_0 ist eine für jedes Donator-Akzeptor Paar gegebene (tabellierte) charakteristische Größe.

Fluoreszenzspektrum von Pyren in n-Hexan (0.667 mM)



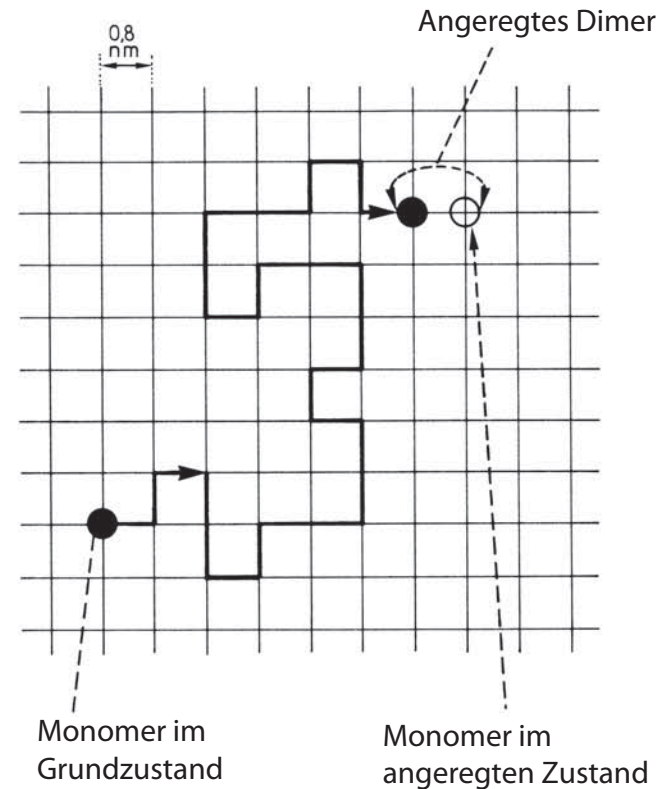
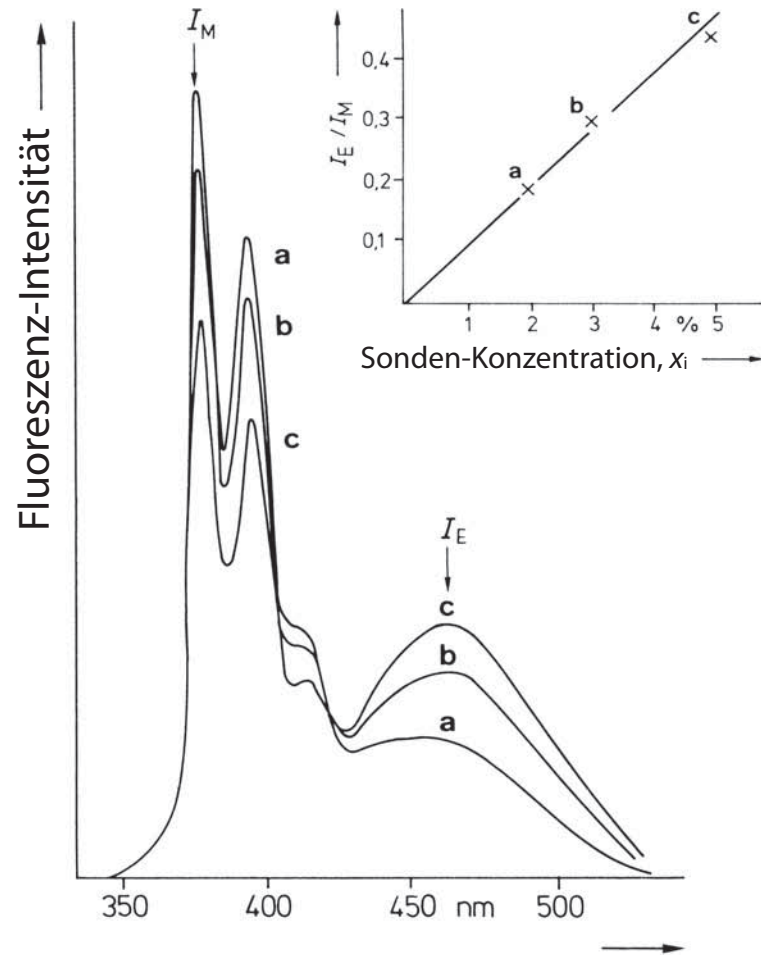
Potentielle Energie für die Ausbildung angeregter Dimere (Excited Dimers oder Excimers)



Eigenschaften der Mechanismen, die Fluoreszenz in Lösung beeinflussen

	<i>Reabsorption</i>	<i>Komplex Bildung</i>	<i>Kollisions Mechanismus</i>	<i>Fluoreszenz Energietransfer</i>
<i>Volumen-Abhängigkeit</i>	Zunahme	nein	nein	nein
<i>Viskositäts-Abhängigkeit</i>	nein	nein	Abnahme	nein
<i>Anregungszeit des Fluorophors (Photosensitizers)</i>	unverändert	unverändert	kleiner	minimal
<i>Fluoreszenz Spektrum des Photosensitizers</i>	verändert	unverändert	unverändert	nein
<i>Absorptionsspektrum von Photosensitizer and Akzeptor</i>	unverändert	verändert	unverändert	nein

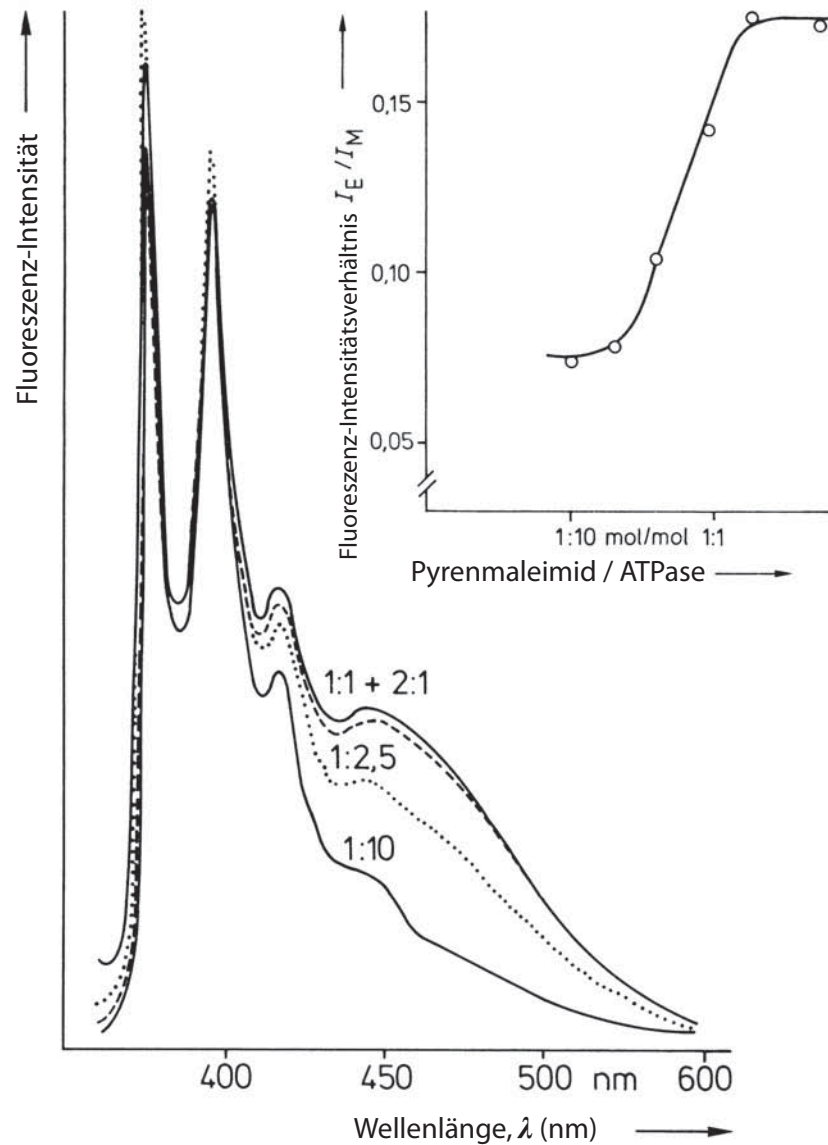
Excimerenbildung und Diffusion von Molekülen in Membranen



Fluoreszenzspektren von Pyrendekansäure in fluiden Dipalmitoylphosphatidylcholin-Membranen. Die markierte Fettsäure wurde in Konzentrationen von 2, 3, und 5 mol-% zur Membran gegeben. Der Anstieg des Intensitätsverhältnisses von Excimer zu Monomer kann dazu benutzt werden, den Diffusionskoeffizient zu bestimmen.

Schematische Darstellung zufälliger Diffusion ("Random walk"). Die fluoreszierende Sonde wandert statistisch von einem Platz zum Nächsten. Wenn ein nicht angeregtes und ein angeregtes Pyrenmolekül zwei benachbarte Plätze belegen, kann ein Dimer (bzw. Excimer) gebildet werden. (Nach Galla, H.-J. et al. (1979), J. Membrane Biol. 48, 215)

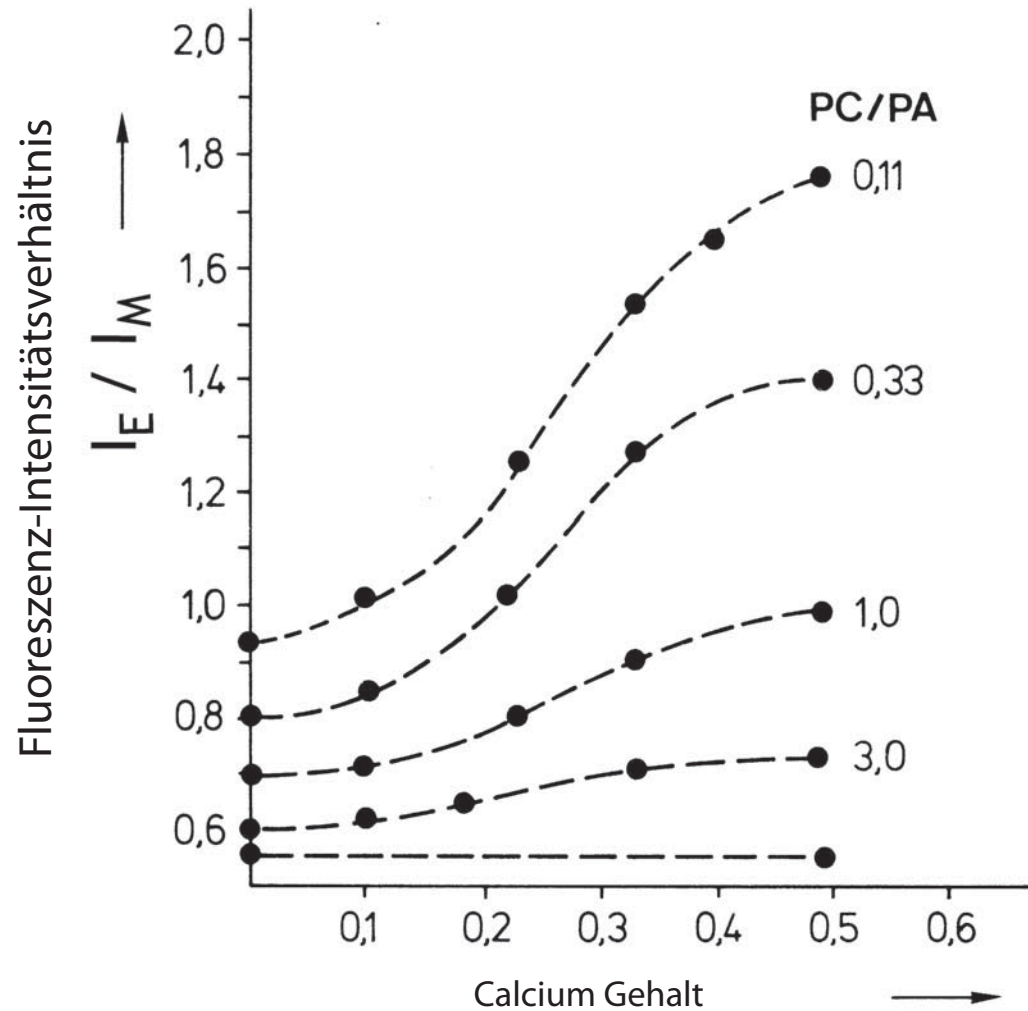
Fluoreszenz von Pyren-markierter ATPase und Oligomerenbildung.



Emissionspektren von Pyrenmarkierter ATPase in Lipid-Membranen. Mit zunehmendem molaren Verhältnis zwischen Pyrenmaleimid zu ATPase tritt eine Excimerenbande im Fluoreszenzspektrum auf.

Nach Lüdi, Hasselbach, W. (1983) Eur. J. Biochem. 130,5

Ca²⁺ -induzierte Entmischung (Phasenseparation) in Membranen



Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Excimeren und Monomeren von Pyrendekansäure in Modellmembranen aus Phosphatidylcholin und Phosphatidsäure. Die Excimerbildung steigt an wenn die Calciumkonzentration erhöht wird. Der Grund dafür ist eine Calcium induzierte Entmischung (Phasenseparation) der beiden Phospholipide in der Membran.