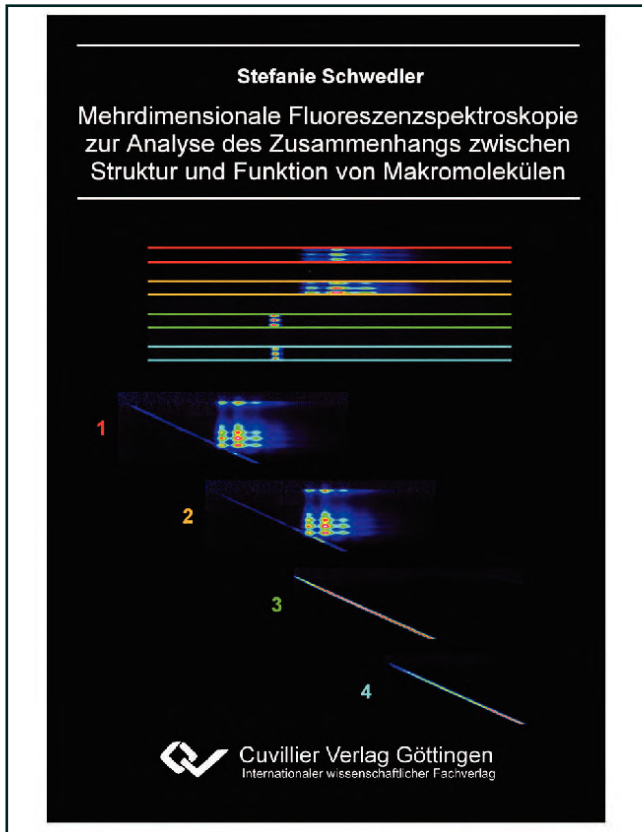




Stefanie Schwedler (Autor)

Mehrdimensionale Fluoreszenzspektroskopie zur Analyse des Zusammenhangs zwischen Struktur und Funktion von Makromolekülen



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/827>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

2 Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel wird sowohl die den verwendeten Messverfahren zugrunde liegende, als auch die zur Auswertung nötige Theorie dargelegt. Während der erste Teil 2.1 in die spektroskopischen Grundlagen einführt, werden im zweiten und dritten Teil weiterführende Aspekte der Fluoreszenzspektroskopie vorgestellt: In Abschnitt 2.2 werden die Auswirkungen der Fluorophorumgebung auf die Fluoreszenz diskutiert; Abschnitt 2.3 geht auf die Besonderheiten der Proteinfluoreszenz ein.

2.1 Spektroskopische Grundlagen

2.1.1 Absorption

Spektroskopische Methoden beruhen auf der Wechselwirkung zwischen Materie und elektromagnetischer Strahlung; die Energie der verwendeten Strahlung ist proportional zu ihrer Frequenz:

$$E = h \cdot \nu \quad (2.1)$$

E: Energie des eingestrahnten Lichts

h: Plancksches Wirkungsquantum

ν: Frequenz des eingestrahnten Lichts

Ein im Quantenzustand S_0 vorliegendes Molekül, welches einen um genau diesen Energiebetrag höher liegenden Quantenzustand S_1 besitzt, kann das eingestrahlte Photon aufnehmen, um den Zustand S_1 zu erreichen. Dieser Vorgang wird als *Absorption* bezeichnet. Das Lambert-Beersche Gesetz quantifiziert die Abnahme der Intensität des auf eine absorbierende Probe eingestrahnten Lichts (siehe Gleichung 2.2). Es gilt nur für verdünnte, nicht streuende Lösungen in transparenten Lösungsmitteln und ohne Sättigung des angeregten Zustands.

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = c \cdot \epsilon \cdot d \quad (2.2)$$

- A*: Absorption
*I*₀: Intensität des eingestrahlten Lichts
I: Intensität des Lichts nach der Probe
c: Konzentration der absorbierenden Substanz
ε: molarer Absorptionskoeffizient
d: Länge des Lichtwegs in der Probe

2.1.2 Energietransferprozesse und Lumineszenz

Dem durch Absorption angeregten Molekül stehen nun mehrere Möglichkeiten der Energieabgabe zur Verfügung.

- Es kann den Energieüberschuß für eine Photoreaktion mit oder ohne Reaktionspartner zu einer nichtfluoreszierenden Spezies nutzen. Diesen irreversiblen Prozess bezeichnet man als *Photobleaching*.
- Das angeregte Molekül kann seinen Energieüberschuss gegenüber dem Grundzustand durch Stöße mit der Umgebung strahlungslos wieder abgeben und unbeschadet in den Grundzustand zurückkehren. Man spricht in diesem Fall von *strahlungsloser Deaktivierung* oder *Quenching*.
- Die absorbierte Energie kann auch durch Emission von Strahlung, sogenannter *Lumineszenz*, wieder abgegeben werden. Vor der eigentlichen Lichtemission treten dabei oft Energietransferprozesse auf.

Einen Überblick über die unterschiedlichen Relaxationswege eines elektronisch angeregten Moleküls gibt das Jablonski-Diagramm in Abbildung 2.1.

Energietransfer

Nach erfolgter Absorption gibt das Molekül zumeist einen Teil seiner Energie durch Stöße mit der Umgebung ab. Dieser Prozess wird *internal conversion* (IC) genannt und beinhaltet Vibrationsenergie transfer ebenso wie Rotationsenergie transfer. In Lösung sind die einzelnen Rotationsniveaus nicht mehr aufzulösen; zudem erfolgen so häufig Stöße mit dem Lösungsmittel, dass das Molekül schnell in den vibronischen Grundzustand des elektronisch angeregten Zustands relaxiert. Auch die Reorganisation der Lösungsmitteldipole,

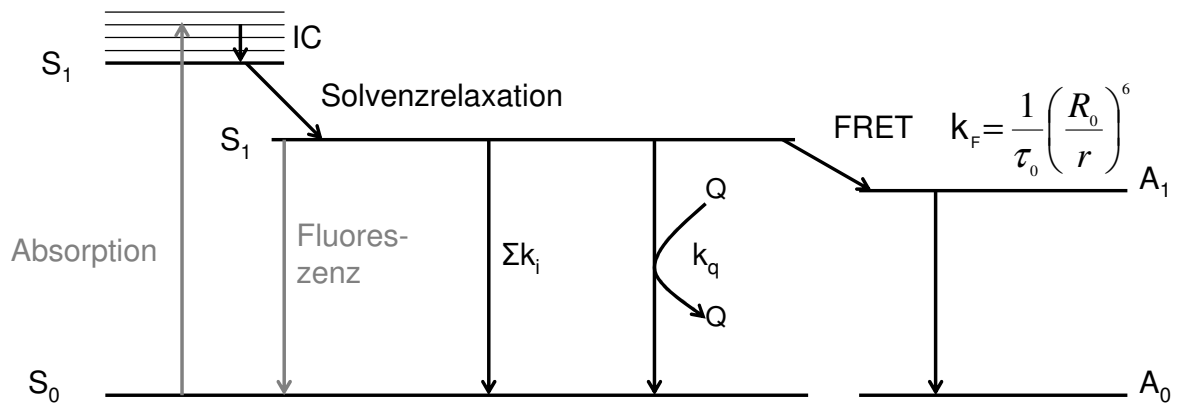


Abbildung 2.1: Übersicht über die möglichen Relaxationswege eines Moleküls nach elektronischer Anregung. Intersystem Crossing ist nicht explizit eingezeichnet.

Solvenzrelaxation genannt, verringert die Energie des Systems und ist zumeist innerhalb weniger Pikosekunden abgeschlossen. In Systemen mit passenden Akzeptoren kann die Energie durch den abstandsabhängigen *Förster-Resonanz-Energietransfer* (FRET) auf ein anderes Fluorophor übertragen werden (siehe Abbildung 2.1).

Lumineszenz

Die Lichtemission geht mit einer Relaxation des Moleküls in den elektronischen Grundzustand S_0 einher. Aufgrund vorangegangener *internal conversion* und Solvenzrelaxation ist die Lumineszenz gegenüber der anfänglichen Absorption meist rotverschoben. Die Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenzahl heißt *Stokes-Verschiebung*.

Gemäß den Auswahlregeln, welche mögliche spektroskopische Übergänge als *erlaubt* (wahrscheinlich) und *verboten* (unwahrscheinlich) klassifizieren, darf sich die Spinmultiplizität des Moleküls durch Absorption eines Photons nicht ändern. Daher hat der elektronisch angeregte Zustand S_1 für die meisten optischen Übergänge dieselbe Spinmultiplizität wie der Grundzustand S_0 , so dass auch die nachfolgende Emission ohne eine Multiplizitätsänderung erfolgt. Lumineszenz ohne Multiplizitätsänderung heißt *Fluoreszenz*, sie erfolgt in einem Zeitfenster von 10^{-12} bis 10^{-8} Sekunden.

In manchen Fällen verhalten sich zwei Zustände unterschiedlicher Spinmultiplizität bei einem bestimmten Kernabstand bezüglich Energie und räumlicher Anordnung identisch. An

einem solchen Kreuzungspunkt zweier Potentialhyperflächen kann ein angeregtes Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand T anderer Spinmultiplizität übergehen. Dieser Vorgang wird als *intersystem crossing* (ISC) bezeichnet und tritt bevorzugt bei Systemen mit ausgeprägter Kopplung zwischen Spin- und Bahndrehimpuls auf. Eine folgende emittive Relaxation unter Änderung der Spinmultiplizität, *Phosphoreszenz* genannt, wird ebenfalls durch Spin-Bahn-Kopplung ermöglicht. Da Phosphoreszenz aber nicht den Auswahlregeln gehorcht, ist sie oft um viele Größenordnungen langsamer als Fluoreszenz und kann bis zu 10^4 Sekunden dauern.

2.1.3 Lebenszeit

Grundlagen

Alle im vorherigen Abschnitt erwähnten Prozesse beeinflussen die mittlere Verweilzeit des Chromophors im angeregten Zustand, die sogenannte *Fluoreszenzlebenszeit* τ . Im theoretischen Falle eines Fluorophors, der keinerlei Phosphoreszenz, FRET oder strahlungsloser Deaktivierung unterliegt, liegt die natürliche Lebenszeit τ_0 vor, welche dem Kehrwert der Emissionsrate Γ entspricht.

$$\tau_0 = \frac{1}{\Gamma} \quad (2.3)$$

In der Realität kommt es durch Wechselwirkung mit der Umgebung zu Quenching und Photoreaktionen, deren Geschwindigkeitskonstanten k_q und k_i die Fluoreszenzlebenszeit verringern.

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + \Sigma k_q + \Sigma k_i} \quad (2.4)$$

Aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Depopulationsprozessen ist die Lebenszeit sehr gut geeignet, um Veränderungen in der unmittelbaren Umgebung des Fluorophors beobachten zu können. Im einfachsten Fall zeigt ein Fluorophor eine monoexponentielle Verringerung der Fluoreszenzintensität mit der Zeit, wie in Gleichung 2.5 dargestellt.

Häufig treten dagegen multiexponentielle (Gleichung 2.6), manchmal sogar nicht-exponentielle Zerfälle auf. Für dieses Verhalten können ganz verschiedene Sachverhalte, wie das

$$F(t) = F_0 \cdot e^{-\frac{t}{\bar{\tau}}} \quad (2.5)$$

$$F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} = F_0 \cdot \sum_i a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.6)$$

mit

$$\sum_i a_i = 1 \quad (2.7)$$

$F(t)$: Fluoreszenzintensität

F_0 : Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt $t=0$

t : Zeit

τ_i : Lebenszeiten

α_i : Amplituden

a_i : normierte Amplituden

Auftreten verschiedener emittiver Zustände in einem Molekül oder komplexere Wechselwirkungen mit der Molekülumgebung, verantwortlich sein.

Um die Lebenszeiten multiexponentieller Zerfälle vergleichen zu können, wird die intensitätsgemittelte Lebenszeit $\bar{\tau}$ verwendet. Dabei werden die einzelnen Lebenszeiten mit dem Ausdruck $\alpha_i \cdot \tau_i$ gewichtet, welcher ein Maß für den Beitrag der i -ten Lebenszeit zur Gesamtfluoreszenz darstellt.

$$\bar{\tau} = \frac{\sum_i \alpha_i \cdot \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \cdot \tau_i} \quad (2.8)$$

$\bar{\tau}$: intensitätsgemittelte Lebenszeit

τ_i : Lebenszeiten

α_i : Amplituden

Lebenszeitassoziierte Emissionsspektren

Multiexponentielle Abklingkurven beruhen darauf, dass mehrere fluoreszente Spezies mit unterschiedlichen Lebenszeiten zum Zeitverlauf, also der sogenannten *dynamischen Fluoreszenz*, beitragen. Diese Spezies weisen häufig auch unterschiedliche spektrale Verteilungen auf. Die zu den Fluoreszenzlebenszeiten τ_i zugehörigen, sogenannten lebenszeitassoziierten Emissionsspektren (*decay-associated spectrum*, DAS) sind für die einzelnen Spezies charakteristisch und liefern oft Hinweise auf ihre chemische Umgebung.