

2 Theoretische Grundlagen und Modelle

Dieses Kapitel enthält zwei Themengruppen. Zum einen werden die theoretischen Grundlagen des Meßprinzips dargestellt und zum anderen werden verschiedene Modelle zur Anpassung der experimentellen Fluoreszenz-, Fluoreszenzanisotropie- und Quenchingdaten¹³ erläutert. In Kapitel 2.1 wird die Meßmethode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung beschrieben. Kapitel 2.2 enthält die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer. Im darauffolgenden Teil 2.3 sind Formalismen zur Beschreibung der durch Rotationsdiffusion verursachten Fluoreszenzdepolarisation dargestellt. Es wird dabei zwischen einer einfachen und einer erweiterten Bewegungsgeometrie unterschieden. Das Kapitel 2.4 beschreibt die Ergebnisse der Theorie des strahlungslosen Energietransfers nach Förster [Förster, 1948, 1967]. Im Unterkapitel 2.4.1 wird der Energietransfer zwischen Donator-Akzeptor-Paaren dargestellt und der Abschnitt 2.4.2 erläutert ein Modell zur Beschreibung zweidimensionaler Donator-Akzeptor-Systeme. Das Kapitel 2.4.3 geht anschließend auf den Energie-Homotransfer in intramolekularen Donator-Donator-Systemen ein. Das gesamte Kapitel 1 wird mit den Erläuterungen des Abschnitts 2.5 zum Fluoreszenzquenching abgeschlossen.

2.1 Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung

Bollinger und Thomas begründeten den Ursprung des Meßprinzips der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung mit Szintillationsexperimenten an Kristallen [Bollinger und Thomas, 1961]. Die Methode basierte unter anderem auf der Weiterentwicklung der für die Kernphysik typischen verzögerten Koinzidenz-Experimente. Die Probe wird bei der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (SPC)¹⁴ mit kurzen Lichtimpulsen zur Fluoreszenz angeregt. Aus der nach der Besetzung des Anregungszustandes folgenden Emission einer Anzahl von Photonen detektiert die Meßapparatur willkürlich ein Photon. Durch Korrelation mit dem Anregungspuls wird parallel der zeitliche Abstand zwischen Anregung und Detektion gemessen. Wird dieser Prozeß wiederholt, ergibt sich bei ausreichender Statistik eine Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Emission eines Photons zu einer gegebenen Zeitdifferenz nach der Anregung.

Die diesem Ablauf zugrunde liegenden statistischen Zusammenhänge wurden von einer Reihe von Autoren dargestellt [zur Übersicht siehe O' Connor und Phillips, 1984]. Nach einem kurzen Anregungsimpuls der Probe gibt der die Fluoreszenz registrierende Photodetektor im Mittel p_i Spannungsimpulse an die Folgeelektronik weiter. Der Index i bezeichnet hierbei das i -te Zeitintervall des Vielkanalanalysators.

¹³ Der Begriff des Quenching beziehungsweise Energiequenching wird in der Arbeit auf die Wechselwirkung mit in der Probenlösung befindlichen Quenchemolekülen reduziert.

¹⁴ time-correlated single photon counting

Die Wahrscheinlichkeit, daß zwischen dem nullten und dem i -ten Zeitintervall m Spannungsimpulse erzeugt werden unterliegt der Poisson-Verteilung:

$$P_m(i) = \frac{(p_i)^m e^{-p_i}}{m!}. \quad (2.1)$$

Die Wahrscheinlichkeit, keinen Impuls zu registrieren, beträgt demnach

$$P_0(i) = e^{-p_i}, \quad (2.2)$$

einen Impuls zu detektieren

$$P_1(i) = p_i e^{-p_i} \quad (2.3)$$

und daraus folgend mehr als einen Impuls zu registrieren

$$\begin{aligned} P_{m>1}(i) &= 1 - P_0(i) - P_1(i) \\ &= 1 - (1 + p_i)e^{-p_i}. \end{aligned} \quad (2.4)$$

Das Grundprinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung beruht darauf, pro Anregungsimpuls nur ein Photon zu messen. Werden mehrere Photonen vom Photomultiplier detektiert, kommt es zu einer Verfälschung der Statistik. Das Meßprinzip beruht auf dem Auslösen einer Spannungsrampe durch den Anregungsimpuls (Start) und deren Beenden durch das erste registrierte Photon (Stop). Alle innerhalb dieses Anregungszyklus folgenden Photonen werden nicht mehr berücksichtigt, da die Elektronik eine Totzeit durchläuft, während das erste Signal verarbeitet wird. Es stellt sich nun die Frage, unter welchen Bedingungen die registrierte Statistik die zeitliche Verteilung der Photonen wiedergibt. Erfolgt die mittlere Detektion von Photonen sehr selten ($p_i \ll 1$), gilt in Näherung

$$\begin{aligned} P_1(i) &= p_i, \\ P_{m>1}(i) &= p_i^2 \ll p_i. \end{aligned} \quad (2.5)$$

Ergibt sich die Messung aus N_{Ex} Anregungszyklen, werden $N_C(i)$ Zählungen zwischen dem nullten und dem i -ten Kanal registriert, wobei gilt:

$$N_C(i) = N_{Ex} \{P_1(i) + P_{m>1}(i)\} \quad (2.6)$$

Die Forderung nach höchstens einem Photon pro Anregungsimpuls wird also durch das Verhältnis N_C/N_{Ex} bestimmt. Für ein hinreichend kleines Verhältnis unterhalb von 0,05 sind die statistischen Fehler vernachlässigbar [Yguerabide, 1972].

2.2 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern

Die endliche Halbwertsbreite des Anregungsimpulses sowie charakteristische Verzögerungen innerhalb der Meßapparatur bewirken, daß die gemessene Fluoreszenzintensität $I(t)$ aus einer Faltung der Impulsantwort des Systems¹⁵ $L(t)$ mit der Fluoreszenz der Probe $i(t)$ besteht:

$$I(t) = \int_0^t L(t')i(t-t')dt'. \quad (2.7)$$

Es wird ein parametrisiertes Modell für $i(t)$ verwendet, dessen Faltung mit $L(t)$ dem gemessenen $I(t)$ angepaßt wird [Heyn, 1989]. Stimmt die Faltung mit den Meßdaten überein, werden die Fitparameter extrahiert. Der meßtechnisch bedingten Faltung folgend wird die Fragestellung auf die Wahl der Funktion $i(t)$ gerichtet. Die Relaxation eines angeregten molekularen elektronischen Übergangsdipolmomentes erfolgt als Summe einer Reihe von Prozessen. Sind diese Vorgänge mit den Raten k_i zeitunabhängig, kann die Zeitspur mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden, für deren Lebensdauer τ_f gilt:

$$\tau_f = \sum_i \frac{1}{k_i}. \quad (2.8)$$

Das Verhalten intrinsischer und extrinsischer Proteinfluorophore weist häufig einen nicht-exponentiellen Charakter auf. Zur Anpassung solcher Meßdaten werden in der Literatur zwei Wege beschritten [Lakowicz, 1999]. Einerseits werden Modelle für eine statistische Verteilung der Lebensdauern verwendet, andererseits benutzt man eine Summe von Exponentialfunktionen zur Approximation. In dieser Arbeit wird letzteres angewandt, jedoch ohne den einzelnen Termen eine physikalische Bedeutung zuzuordnen. Nur der Wert der mittleren Lebensdauer $\langle \tau_f \rangle$ gebildet durch

$$\langle \tau_f \rangle = \frac{\sum_j \alpha_j \tau_j}{\sum_j \alpha_j}, \quad \text{mit } i(t) = \sum_j \alpha_j e^{-t/\tau_j}, \quad (2.9)$$

wird verwendet.

¹⁵ auch als „impulse response function“ (IRF) oder Anregungsprofil bezeichnet

Dies ist sinnvoll, da bei einem multiexponentiellen Abklingen die Amplituden und Lebensdauern nicht unabhängig voneinander sind [Grinvald und Steinberg, 1974]. Die α_j und τ_j bezeichnen hier die Amplitude beziehungsweise die Lebensdauer der j -ten Exponentialfunktion.

2.3 Die Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie

Um einen Zugang zu den später betrachteten speziellen Modellansätzen zu ermöglichen, erfolgt hier eine einleitende Darstellung der Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie [u. a. Kinosita et al., 1977; Lipari und Szabo, 1980; Wahl, 1975a; Cundall und Dale, 1983]. Betrachtet wird ein fluoreszierendes Molekül in einer makroskopisch isotropen Lösung. Im Koordinatensystem Σ wird der Fluorophor entlang X mit einem in Richtung Z linear polarisierten Lichtpuls angeregt.

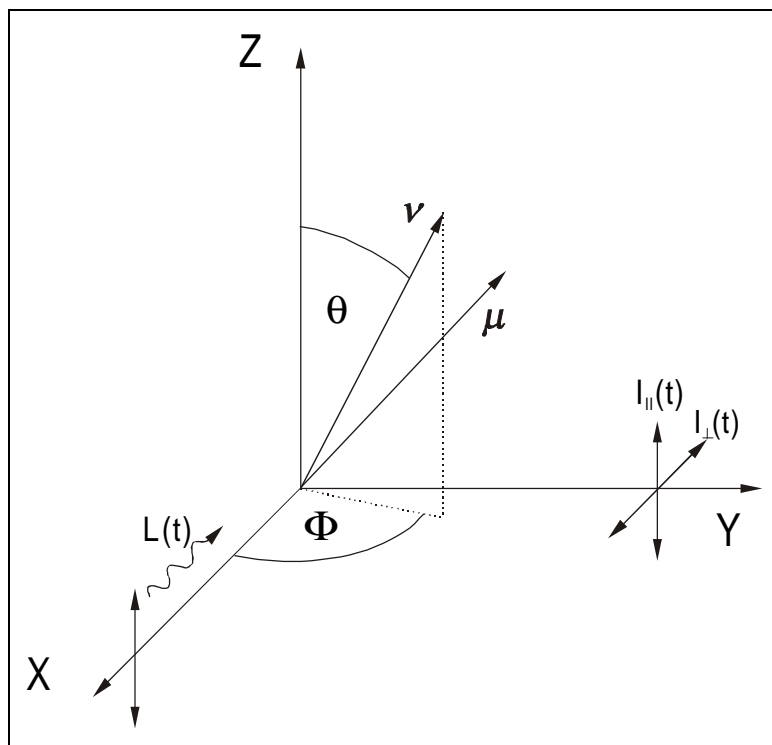


Abbildung 2-1 Laborkoordinatensystem der Messung. Der Anregungsimpuls ist hier durch $L(t)$ und die Angabe der Polarisationsrichtung veranschaulicht. An der Detektionsrichtung Y sind die Intensitätskomponenten $I_{\parallel}(t)$ und $I_{\perp}(t)$ als Vektoren dargestellt. Die Vektoren ν und μ repräsentieren die Orientierungen der Übergangsdipolmomente der Emission beziehungsweise der Absorption, deren Lage durch Azimutal- und Polarwinkel bestimmt ist.

Es werden zwei Polarisationskomponenten des emittierten Lichtes in Abhängigkeit von der Zeit t in Y-Richtung detektiert: $I_{\parallel}(t)$, die Komponente parallel zu Z und der senkrecht zu Z polarisierte Anteil $I_{\perp}(t)$. Die Abbildung 2-1 zeigt die entsprechenden Größen im Laborsystem. Aus $I_{\parallel}(t)$ und $I_{\perp}(t)$ wird nach Gleichung (2.7) durch Entfaltung $i_{\parallel}(t)$ und $i_{\perp}(t)$ gebildet, mit dessen Hilfe $r(t)$ konstruiert wird:

$$r(t) = \frac{i_{\parallel}(t) - Gi_{\perp}(t)}{i_{\parallel}(t) + 2Gi_{\perp}(t)}. \quad (2.10)$$

Der Faktor G korrigiert polarisationsabhängige apparative Einflüsse. Für die nachstehenden Betrachtungen sei $G = 1$.

Die räumliche Orientierung des Moleküls ist durch die in ihm fixierten Vektoren des Absorptionsübergangsdipolmomentes $\boldsymbol{\mu}$ und des Emissionsübergangsdipolmomentes $\boldsymbol{\nu}$ vollständig definiert. Die Intensitäten $i_{\parallel}(t)$ und $i_{\perp}(t)$ sind zu jedem Zeitpunkt t proportional zum Quadrat des Skalarproduktes aus $\boldsymbol{\nu}$ und dem Einheitsvektor der jeweiligen Polarisationsrichtung, wobei über alle angeregten Moleküle gemittelt wird:

$$i_{\parallel}(t) \propto \langle (\mathbf{z} \cdot \boldsymbol{\nu}(t))^2 \rangle, \quad i_{\perp}(t) \propto \langle (\mathbf{x} \cdot \boldsymbol{\nu}(t))^2 \rangle. \quad (2.11)$$

Setzt man diese Terme in die Gleichung (2.10) für $r(t)$ ein, so läßt sich zeigen daß:

$$r(t) = \left\langle \frac{1}{2} [3(\mathbf{z} \cdot \boldsymbol{\nu}(t))^2 - 1] \right\rangle = \langle P_2(\mathbf{z} \cdot \boldsymbol{\nu}(t)) \rangle. \quad (2.12)$$

P_2 bezeichnet in dieser Formel das zweite Legendre Polynom. Um die durch die eckigen Klammern ausgedrückte Mittelung über das Ensemble ausführen zu können, wird eine Orientierungsverteilungsfunktion benötigt. Für den Fall, daß $\boldsymbol{\mu}$ und $\boldsymbol{\nu}$ nicht identisch sind, sei $f(\boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{\nu}, t)$ eine solche normalisierte Wahrscheinlichkeitsverteilung. Die Formulierung der Integration führt dann zu dem Ausdruck:

$$r(t) = \iint P_2(\mathbf{z} \cdot \boldsymbol{\nu}(t)) f(\boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{\nu}, t) d\boldsymbol{\mu} d\boldsymbol{\nu}. \quad (2.13)$$

Die Ausführung der Integration bestimmt folglich die Anisotropiefunktion $r(t)$.

Zur Veranschaulichung soll der Fall einer freien isotropen Rotation betrachtet werden, für die $\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\nu}$ gelten soll. Der Orientierung des Vektors $\boldsymbol{\nu}$ sei wie in der Abbildung 2-1 dargestellt durch die Winkel Φ und θ gegeben.

Erfolgt die Orientierungsänderung ausschließlich durch Rotationsdiffusion, muß die Wahrscheinlichkeitsverteilung $f(\theta, \Phi, t)$ die Rotationsdiffusionsgleichung erfüllen:

$$\frac{\partial f}{\partial t} = D_{rot} \nabla^2 f = D_{rot} \left[\frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2}{\partial \Phi^2} \right] f. \quad (2.14)$$

Da $f(\theta, \Phi, t)$ keine Ortsabhängigkeit aufweist, ist die entsprechende Ortsableitung des Operators gleich Null, es verbleibt nur der winkelabhängige Anteil.

Benutzt man als Lösungsansatz eine Trennung der Variablen

$$f(\theta, \Phi, t) = f_1(\theta, \Phi) f_2(t), \quad (2.15)$$

folgt:

$$C = \frac{1}{f_1(\theta, \Phi)} \nabla^2 f_1(\theta, \Phi) = \frac{1}{D_{rot} f_2(t)} \frac{\partial f_2(t)}{\partial t}, \quad (2.16)$$

wobei C die Separationskonstante ist. Die Winkelabhängigkeit stellt sich nun als Eigenwertproblem dar, dessen Lösung die Kugelflächenfunktionen bieten. Die Zeitabhängigkeit ist in Exponentialfunktionen enthalten. Die Lösung der Rotationsdiffusionsgleichung hat die Form:

$$f(\theta, \Phi, t) = \sum_{l,m} C_{lm} Y_{lm}(\theta, \Phi) e^{-l(l+1)D_{rot}t} \quad (2.17)$$

mit

$$C_{lm} = \int f(\theta, \Phi, 0) Y_{lm}^* d \cos \theta d \Phi. \quad (2.18)$$

Die linear polarisierte Anregung erzeugt zum Zeitpunkt $t = 0$ eine charakteristische Verteilung (Photoselektion), für die gilt:

$$f(\theta, \Phi, 0) \propto \cos^2 \theta. \quad (2.19)$$

Das Einsetzen von (2.17) und (2.18) in (2.13) führt zu

$$r(t) = \iint \sum_{lm} C_{lm} Y_{lm}(\theta, \Phi) e^{-l(l+1)D_{rot}t} P_2(\cos \theta) d \cos \theta d \Phi. \quad (2.20)$$

Unter Berücksichtigung von $Y_{20} = P_2$, der Orthogonalität der Kugelflächenfunktionen sowie der Anfangsbedingung zum Zeitpunkt $t = 0$ nimmt die Anisotropiefunktion $r(t)$ für einen freien ungehinderten Rotor die folgende einfache Form an:

$$r(t) = r(0)e^{-6D_{rot}t}. \quad (2.21)$$

Die Diffusionskonstante ist hier durch

$$D_{rot} = kT/6\eta V \quad (2.22)$$

gegeben. Dabei bedeuten k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur, η die Viskosität der Lösung und V das effektive Volumen. Mit Hilfe dieses Zusammenhangs wurden die Volumina der verwendeten Fluoreszenzmarker bestimmt. Es ist naheliegend, daß die Annahme eines kugelförmigen Rotors bei exakter Betrachtung nicht gegeben ist. Die Rotation asymmetrischer Moleküle führt anschaulich zu einer Aufspaltung der Rotationsmodi. Die Anisotropiefunktion $r(t)$ kann dann aus bis zu fünf Exponentialfunktionen bestehen [Chuang und Eisenthal, 1972; Weber, 1971; Belford et al., 1972]. Unabhängig von Modellannahmen kann die Diffusionskonstante als interessierende Größe auch aus dem anfänglichen Abfall von $r(t)$ bestimmt werden [Kinosita et al., 1977, 1982]. Es wird eine mittlere Rotationskorrelationszeit $\bar{\phi}_M$ des Kurzzeitverhaltens von $r(t)$ angegeben durch

$$\bar{\phi}_M = \left(\frac{\partial}{\partial t} \left[\frac{r(t) - r_\infty}{r_0 - r_\infty} \right] \Bigg|_{t=0} \right)^{-1}. \quad (2.23)$$

Die Schreibweisen r_0 und r_∞ beziehen sich dabei auf die Werte der Anisotropiefunktion $r(t)$ zum Zeitpunkt $t = 0$ und für unendlich große Zeiten. Die Diffusionskonstante ergibt sich dann zu

$$\bar{D}_M = (1 - r_\infty/r_0)/6\bar{\phi}_M. \quad (2.24)$$

2.3.1 Das 'wobbling in a cone'-Modell

Betrachtet wird ein fluoreszierendes Molekül, daß in seinen räumlichen Orientierungsmöglichkeiten eingeschränkt ist [Kinosita et al., 1977; Fujiwara und Nagayama, 1985]. Zur Veranschaulichung soll ein in eine Membran eingebettetes Molekül verwendet werden. Der Membran sei ein Koordinatensystem Σ_M zugeordnet, dessen Z_M -Achse entlang der Membrannormalen orientiert ist.

Das Molekül besitzt zylindrische Symmetrie und wird in Σ_M durch die Vektoren des Absorptionsübergangsdipolmomentes μ , des Emissionsübergangsdipolmomentes ν sowie des Symmetrievektors ξ entlang seiner Zylinderachse, welcher den Winkel θ mit der Z_M -Achse bildet, beschrieben.

Die Übergangsdipolmomente spannen untereinander den Winkel δ auf. Die Membranen bilden eine makroskopisch isotrope Lösung und seien auf der betrachteten Zeitskala nicht an der Depolarisation beteiligt. Im Laborsystem Σ_L wird die Probe entlang X_L mit einem unendlich kurzen in Richtung Z_L linear polarisierten Lichtpuls angeregt.

Wenn in dem gegebenen Modell (Abbildung 2-2) entweder das Absorptionsübergangsdipolmoment μ oder das Emissionsübergangsdipolmoment ν entlang der Symmetrieachse ξ orientiert ist, kann $r(t)$ formuliert werden:

$$r(t) = \frac{2}{5} P_2(\cos \delta) \langle P_2[\mu(0) \cdot \nu(t)] \rangle. \quad (2.25)$$

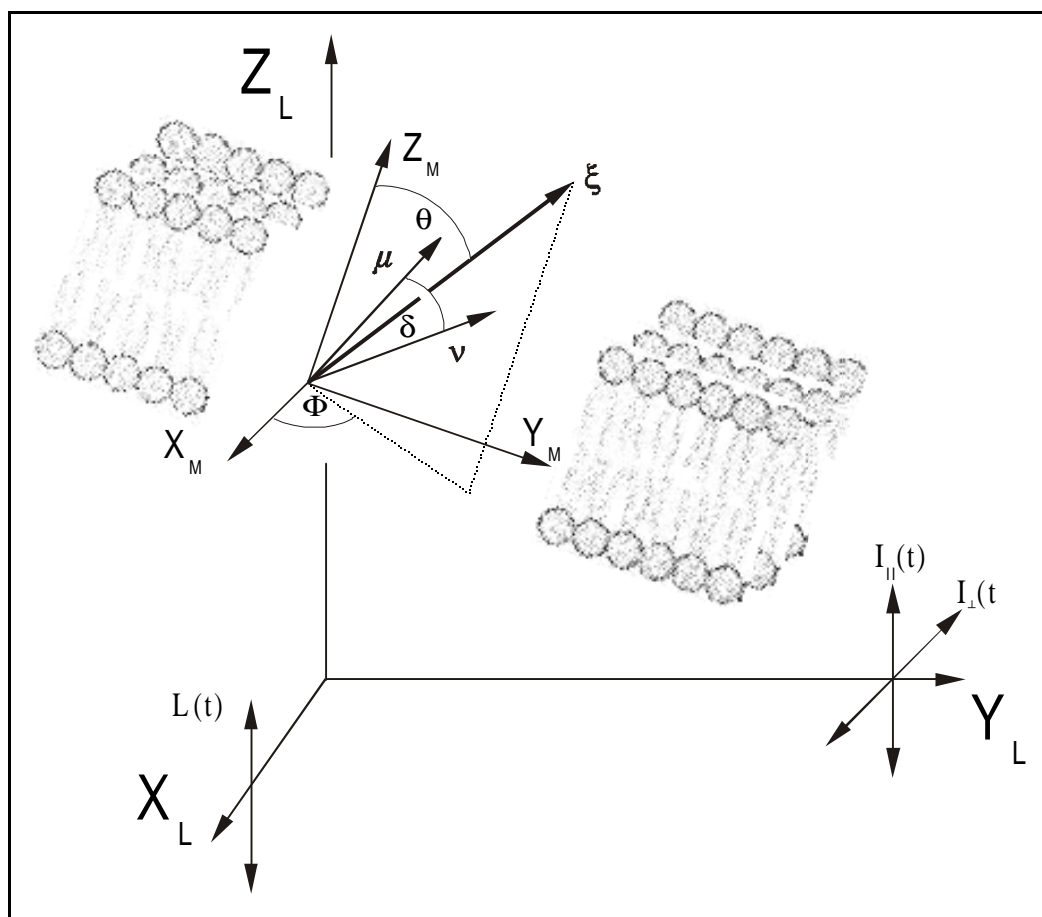


Abbildung 2-2 Veranschaulichung der Koordinatensysteme zur Beschreibung der Rotationsdiffusion eines eingebetteten Fluorophors. Der Index L kennzeichnet das Laborsystem, der Index M die Molekülkoordinaten. ξ stellt die Symmetrieachse des Fluorophors dar. Es ist der allgemeine Fall dargestellt, bei welchem keines der Übergangsdipolmomente mit der Symmetrieachse übereinstimmt.

Die eckigen Klammern geben die Mittelung über das Ensemble an. Um den Faktor $\langle P_2[\boldsymbol{\mu}(0) \cdot \boldsymbol{\nu}(t)] \rangle$ explizit bestimmen zu können, müssen Annahmen über die Moleküldynamik gemacht werden. Der Lösungsansatz verbindet sich mit der Forderung, daß die Wahrscheinlichkeitsverteilung $f(\Phi, \theta, t)$ eine entsprechende Differentialgleichung erfüllen muß. Im Gegensatz zum freien Rotor (2.14) muß ein zusätzliches Potential angenommen werden, innerhalb dessen die Diffusionsbewegung stattfindet.

Die Differentialgleichung wird auch als Smoluchowski-Gleichung bezeichnet [Chandrasekhar, 1943]. Das 'wobbling in a cone'-Modell legt die Diffusion innerhalb eines Kegelpotentials zugrunde, dessen einfachste Form $V(\theta) = 0$ für $0 \leq \theta \leq \theta_c$ und $V(\theta) = \infty$ für alle anderen Winkel ist. $V(\theta)$ beschreibt somit eine freie Diffusion innerhalb eines Kegels mit einer Beschränkung durch eine harte Barriere beim Halbkegelöffnungswinkel θ_c .

Es ist anzumerken, daß andere Potentialverläufe ebenfalls diskutiert wurden [Kinosita et al., 1982; Szabo, 1984; Martinez und de la Torre, 1987]. Das Kegelmodell findet jedoch aufgrund seiner anschaulichen Parametrisierung die häufigste Anwendung. Die Mittelung wird hier über den Winkeln Φ und θ mit der normalisierten Verteilungsfunktion $f(\theta, t)$ ausgeführt, die aufgrund der Symmetrie nicht von Φ abhängt. Kinosita et al. [Kinosita et al., 1977] zeigten, daß für dieses Modell gilt:

$$\langle P_2[\boldsymbol{\nu}(0) \cdot \boldsymbol{\nu}(t)] \rangle = \frac{r(t)}{r(0)} = \sum_{j=1}^{\infty} A_j e^{-D_w t / \sigma_j}, \quad (2.26)$$

wobei D_w die Diffusionskonstante bedeutet. Die Koeffizienten A_j und σ_j hängen von θ_c ab. Eigentliche Anwendung findet jedoch folgende Näherungslösung:

$$\frac{r(t)}{r(0)} \approx A_{\infty} + (1 - A_{\infty}) e^{-D_w t / \langle \sigma \rangle} = A_{\infty} + (1 - A_{\infty}) e^{-t/\phi}, \quad (2.27)$$

mit

$$\langle \sigma \rangle = \sum_{j \neq \infty} A_j \sigma_j / (1 - A_{\infty}) \quad (2.28)$$

und

$$A_{\infty} = \left[\frac{1}{2} \cos \theta_c (1 + \cos \theta_c) \right]^2 = \frac{r(\infty)}{r(0)} = \langle P_2(\cos \theta) \rangle^2. \quad (2.29)$$

Das in Gleichung (2.27) eingeführte ϕ wird als Rotationskorrelationszeit bezeichnet.

Der Term A_∞ stellt explizit das Quadrat des Ordnungsparameters zweiten Grades S_2 dar [Heyn, 1979]:

$$S_2 = \langle P_2(\cos \theta) \rangle. \quad (2.30)$$

Gleichung (2.27) beschreibt die eingeschränkte Rotationsdiffusion des betrachteten Moleküls. Für große Zeiten wird keine isotrope Verteilung sondern eine verbleibende Ordnung mit $S_2 > 0$ angestrebt. Folglich ist $r(\infty)$ ungleich Null. Die Strukturinformation wird somit von S_2 wiedergegeben und die dynamische Information ist in ϕ enthalten. Das Modell ist exakt für die Grenzfälle $t = 0$, $t = \infty$ und liefert akkurate Ergebnisse bis zu einem Halbkegelwinkel von $\theta_C = 50^\circ$. Unter den gleichen Annahmen findet sich bei Lipari und Szabo [Lipari und Szabo, 1981] eine Modellverbesserung. Die Additionstheoreme für Kugelflächenfunktionen ausnutzend, wird $r(t)$ formuliert als:

$$\begin{aligned} \frac{r(t)}{2/5 P_2(\cos \delta)} &= \sum_{m=-2}^2 \langle C_{2m}^*[\theta(0), \Phi(0)] C_{2m}[\theta(t), \Phi(t)] \rangle \\ &= \sum_{m=-2}^2 \langle D_{m0}^{(2)*}[\theta(0), \Phi(0)] D_{m0}^{(2)}[\theta(t), \Phi(t)] \rangle \\ \frac{r(t)}{r(0)} &= \sum_{m=-2}^2 G_m(t). \end{aligned} \quad (2.31)$$

Hierbei sind C_{2m} die modifizierten Kugelflächenfunktionen und $D_{m0}^{(2)}$ die Wigner Rotationsmatrizen [Brink und Satchler, 1961]. Die Bestimmung der Korrelationsfunktionen $G_m(t)$ erfolgt über die Approximation der Flächen F_m unter den Kurven:

$$F_m = \int_0^\infty [G_m(t) - G_m(\infty)] dt. \quad (2.32)$$

Ein Einzelterm der Näherungslösung lautet dann:

$$G_m(t) \approx G_m(\infty) + [G_m(0) - G_m(\infty)] e^{\left(-t/\tau_{\text{eff}}^{(m)}\right)}, \quad (2.33)$$

mit

$$\tau_{\text{eff}}^{(m)} = \frac{F_m}{[G_m(0) - G_m(\infty)]}. \quad (2.34)$$

$G_m(0)$ und $G_m(\infty)$ lassen sich als integrale Mittelungen über die Winkel Φ , θ und die Wahrscheinlichkeitsverteilung $f(\theta)$ berechnen. Deren explizite Ausdrücke sowie die der F_m sind in Anlage I enthalten. Durch sukzessives Einsetzen erhält man eine Näherungslösung für $r(t)$. Neben der höheren Genauigkeit hat die Verwendung dieses Näherungsmodells den Vorteil, daß die Diffusionskonstante D_w und der Halbkegelöffnungswinkel θ_c direkte Fitparameter sind.

Die nächste Stufe der Verallgemeinerung ist die Einbeziehung der Gesamtrotation eines sphärischen Makromoleküls, an welches der Fluorophor gebunden ist. Diese Betrachtung ist in bezug auf die verwendeten Mizellenproben relevant. Die Näherungslösung nimmt dann die folgende Gestalt an [Lipari und Szabo, 1980; Lakowicz, 1991]:

$$\frac{r(t)}{r(0)} \approx A_\infty e^{-t/\phi_M} + (1 - A_\infty) e^{-t(\phi_M^{-1} + \phi_{\text{eff}}^{-1})}. \quad (2.35)$$

ϕ_M ist die Rotationskorrelationszeit der Diffusion des Makromoleküls und ϕ_{eff} beschreibt die Rotationsdiffusion des gebundenen Fluorophors. Für $\phi_M \gg \phi_{\text{eff}}$ geht die Gleichung in eine Summe von Exponentialfunktionen über.

Aufgrund der Vielfalt der Bewegungsmöglichkeiten gebundener Fluorophore mit den internen Bindungs- und Segmentbewegungen existiert bis heute keine allgemeingültige Theorie. Die in dieser Arbeit gemessenen nichtexponentiellen Anisotropieverläufe der in diesem Sinne noch unbekannt Label-Loop-Konstrukte wurden deshalb prinzipiell mit einer Summe von maximal drei Exponentialfunktionen angepaßt. Diese Vorgehensweise findet bei qualitativen Analysen eine häufige Anwendung, da die Meßdaten mit Hilfe der Amplituden und Rotationskorrelationszeiten auf einfache Weise verglichen werden können [Zannoni et al., 1983; Rehorek et al., 1985; Lakowicz, 1991; Tanaka et al., 1994; Nishimoto et al., 1998]. Unter der Annahme von internen unabhängigen Rotationen um verschiedene Atombindungsachsen, ist die Beschreibung durch eine Summe von Exponentialfunktionen (wobei jeder Einzelrotation eine Rotationskorrelationszeit und eine Amplitude zugeordnet wird) sogar exakt [Wallach, 1967].

2.3.2 Die Modellerweiterung um eine zusätzliche Bewegungskomponente

Die Suche nach einem adäquaten Modell, durch das die gemessenen nicht monoexponentiellen Zeitspuren der Fluoreszenzanisotropie approximiert werden können, führt zur Annahme weiterer Bewegungskomponenten. Van der Meer et al. [van der Meer et al., 1984]¹⁶ entwickelten eine Näherungslösung für ein zylindrisches Molekül in einem Membranvesikel, das neben dem 'Wackeln' der Symmetrieachse auch eine zusätzliche Rotationsdiffusion um diese berücksichtigt¹⁷.

¹⁶ siehe auch [Lipari und Szabo, 1980]

¹⁷ Weitere Modelle, die hier nicht zur Anwendung kamen, sind u. a. in [Wahl, 1975a; Cross et al., 1983; van der Meer et al., 1993] beschrieben.

Die Autoren geben einen allgemeinen Ausdruck für die Zeitabhängigkeit der Anisotropie an, auf den prinzipiell verschiedene Annahmen der Wahrscheinlichkeitsverteilungsfunktion angewendet werden können. Es sei ein Koordinatensystem $\Sigma_m (X_m, Y_m, Z_m)$, die molekulare Orientierung kennzeichnend, im Fluorophor fixiert. Dem übergeordnet sei ein Koordinatensystem $\Sigma_M (X_M, Y_M, Z_M)$, wobei die Z_M -Achse entlang der Membrannormalen orientiert ist. Das Koordinatensystem Σ_m kann zum Zeitpunkt t mit Hilfe der Eulerwinkel Φ_t , θ_t und Ψ_t in Σ_M überführt werden. Es gelten die Annahmen einer axialsymmetrischen Verteilung der Proben um die Membrannormale Z_M sowie einer zylindrischen Eigensymmetrie um die Z_m -Achse. Die Orientierung der verwendeten Vektoren μ (Übergangsdipolmoment der Absorption) und ν (Übergangsdipolmoment der Emission) ist aus Abbildung 2-3 ersichtlich.

Eine Formel für $r(t)$ in Abhängigkeit von den Winkelkoordinaten wurde unter diesen Voraussetzungen von Zannoni [Zannoni, 1981] angegeben:

$$\begin{aligned} r(t) = & \frac{2}{5} P_2(\cos \theta_\mu) P_2(\cos \theta_\nu) G_0(t) \\ & + \frac{3}{10} \sin 2\theta_\mu \sin 2\theta_\nu \cos \Phi_{\mu\nu} G_1(t) \\ & + \frac{3}{10} \sin^2 \theta_\mu \sin^2 \theta_\nu \cos 2\Phi_{\mu\nu} G_2(t), \end{aligned} \quad (2.36)$$

mit $\Phi_{\mu\nu} = \Phi_\mu - \Phi_\nu$. Die Korrelationsfunktionen $G_n(t)$ ($n = 0, 1, 2$) können unter Zuhilfenahme von Wigner Rotationsmatrizen in Unterfunktionen aufgespalten werden [Zannoni, 1981; Zannoni et al., 1983]:

$$G_n(t) = G_{0n}(t) + 2G_{1n}(t) + 2G_{2n}(t), \quad (2.37)$$

mit

$$G_{mn}(t) = \left\langle D_{mn}^2(\Phi(0), \theta(0), \Psi(0)) D_{mn}^2(\Phi(t), \theta(t), \Psi(t)) \right\rangle. \quad (2.38)$$

$D_{mn}^2(\Phi, \theta, \Psi)$ bezeichnen die Matricelemente der Wigner Rotationsmatrizen.

Der wesentliche Schritt für die Näherungslösung ist eine Interpolation für alle n und m des Kurzzeitverlaufs, $G_{mn}(t) = G_{mn}(0) + t \, dG_{mn}(0)/dt$, mit der Funktion für sehr große Zeiten, $G_{mn}(t) = \langle P_2 \rangle^2 \delta_{m0} \delta_{n0}$, die zur folgenden Form führt:

$$\begin{aligned}
r(t) = & \frac{2}{5} P_2(\cos \theta_\mu) P_2(\cos \theta_\nu) \left[\langle P_2 \rangle^2 + \beta_{00} \exp(-\alpha_{00} t) + 2 \sum_{m=1}^2 \beta_{m0} \exp(-\alpha_{m0} t) \right] \\
& + \frac{3}{10} \sin 2\theta_\mu \sin 2\theta_\nu \cos \Phi_{\mu\nu} \left[\beta_{01} \exp(-\alpha_{01} t) + 2 \sum_{m=1}^2 \beta_{m1} \exp(-\alpha_{m1} t) \right] \\
& + \frac{3}{10} \sin^2 \theta_\mu \sin^2 \theta_\nu \cos 2\Phi_{\mu\nu} \left[\beta_{02} \exp(-\alpha_{02} t) + 2 \sum_{m=1}^2 \beta_{m2} \exp(-\alpha_{m2} t) \right].
\end{aligned}
\tag{2.39}$$

Die Exponential- und Vorfaktoren α_{mn} und β_{mn} sind in Anlage II zusammengefaßt. Sie enthalten die Diffusionskonstanten D_\perp , D_\parallel sowie die Ordnungsparameter zweiten und vierten Grades $\langle P_2 \rangle$, $\langle P_4 \rangle$. Neben den drei Winkeln θ_μ , θ_ν und $\Phi_{\mu\nu}$ enthält Gleichung (2.39) somit noch vier weitere freie Parameter. Die Ordnungsparameter stehen mit der Gleichgewichtsverteilungsfunktion in folgendem Zusammenhang:

$$f(\theta) = \frac{1}{2} + \sum_{l=1}^{\infty} \frac{4l+1}{2} \langle P_{2l} \rangle P_{2l}(\cos \theta).
\tag{2.40}$$

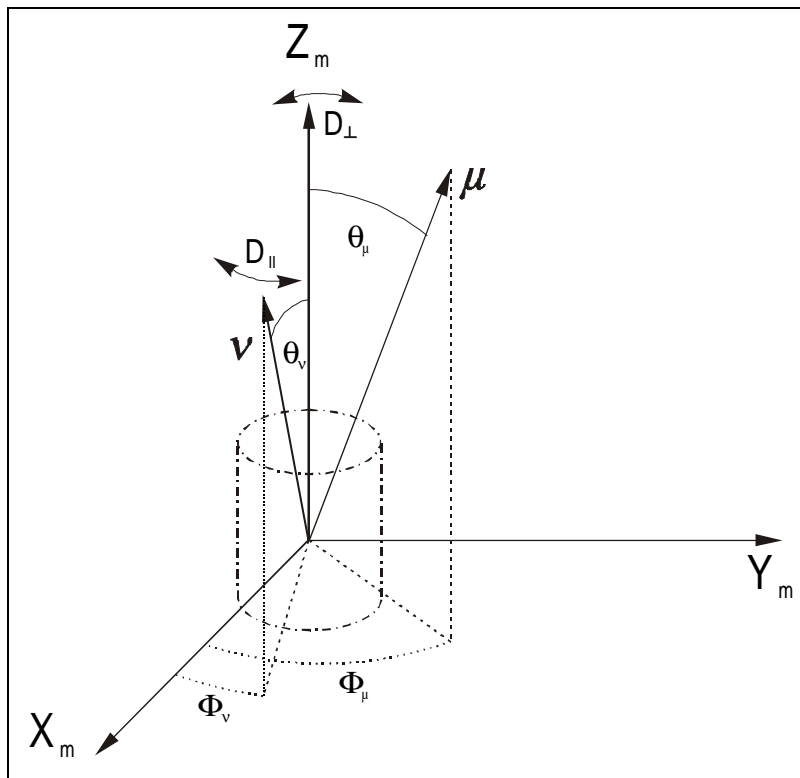


Abbildung 2-3 Darstellung der in der erweiterten Geometrie verwendeten Größen. Der Index m bezeichnet das Molekülkoordinatensystem, μ und ν sind Einheitsvektoren in Richtung der Übergangsdipolmomente der Absorption und Emission, die Winkel θ_μ und θ_ν geben ihre Öffnungswinkel gegenüber der Zylinderachse Z_m an und Φ_μ und Φ_ν sind die entsprechenden Azimutalwinkel. Die Diffusionskonstanten D_\perp und D_\parallel beschreiben die Bewegung der Symmetrieachse Z_m beziehungsweise die Rotation der Übergangsdipolmomente um diese Achse.

Im Gegensatz zum Kegelmodell sind hier für $f(\theta)$ keine weiteren Annahmen notwendig. Die Ordnungsparameter werden direkt aus der Messung bestimmt und liefern einen empirischen Zugang zu $f(\theta)$. Andererseits sind die Ordnungsparameter durch die Vorgabe eines Verteilungsmodells nach Gleichung (2.40) bestimmt. Für das Kegelmodell gilt insbesondere:

$$\langle P_2 \rangle = \frac{1}{2} \cos \theta_c (1 + \cos \theta_c) \quad (2.41)^{18}$$

und

$$\langle P_4 \rangle = \frac{1}{8} \cos \theta_c (1 + \cos \theta_c) (7 \cos^2 \theta_c - 3). \quad (2.42)$$

Der Winkel θ_c gibt wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben den halben Öffnungswinkel des Bewegungskegels der Symmetrieachse (Abbildung 2-2) an.

2.4 Der strahlungslose Energietransfer

2.4.1 Energietransfer zwischen Donator-Akzeptor-Paaren

Ein Fluorophor kann seine Energie, die er auf einem angeregten elektronischen Niveau besitzt, entweder durch Emission eines Photons oder mittels strahlungsloser Prozesse abgeben. Ein möglicher Prozeß ist der Transfer der Anregungsenergie zu einem anderen Molekül¹⁹. Förster hat einen Formalismus zur Beschreibung des strahlungslosen Energietransfers²⁰ für ein Donator-Akzeptor-Paar mit festem Abstand entwickelt [Förster, 1948]. Die Transferrate k_T des Energietransfers vom angeregten Donator (D) zum Akzeptor (A) ist gegeben durch:

$$k_T = \left[R^{-6} J \kappa^2 n^{-4} Q_D \tau_D^{-1} \right] \times 8,71 \times 10^{23} \text{ s}^{-1}. \quad (2.43)$$

Dabei beschreibt R den Abstand des D-A-Paares, Q_D und τ_D die Quantenausbeute beziehungsweise die Fluoreszenzlebensdauer des Donators in Abwesenheit des Akzeptors, n den Brechungsindex des Mediums, J das Integral der spektralen Überlagerung der Donatoremission mit der Akzeptorabsorption und κ^2 die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente der beiden Transferpartner. In Gleichung (2.43) wird R in Å und J in $\text{M}^{-1} \text{cm}^3$ angegeben.

¹⁸ Dieser Zusammenhang ist in der quadrierten Form auch in Gleichung (2.30) dargestellt.

¹⁹ Zur Übersicht siehe auch [van der Meer, 1994].

²⁰ resonance energy transfer (RET)

\mathbf{R} sei der Einheitsvektor des Abstandes zwischen dem Donator (mit dem Einheitsvektor \mathbf{D} in Richtung des Emissionsübergangsdipolmomentes) und dem Akzeptor (mit dem Einheitsvektor \mathbf{A} in Richtung des Absorptionsübergangsdipolmomentes). Der als Orientierungsfaktor bezeichnete Parameter ist dann definiert durch:

$$\kappa^2 = [(\mathbf{D} \cdot \mathbf{A}) - 3(\mathbf{D} \cdot \mathbf{R})(\mathbf{A} \cdot \mathbf{R})]^2. \quad (2.44)$$

Der Wertebereich von κ^2 liegt zwischen 0 und 4. Das Integral J wird auf der Wellenlängenskala definiert durch:

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda. \quad (2.45)$$

$F_D(\lambda)$ ist die normierte Fluoreszenzintensität und ϵ_a der spektrale Extinktionskoeffizient mit der Einheit $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Wellenlänge λ wird in cm angegeben. Eine Vereinfachung der Darstellung von k_T ergibt sich durch die Einführung des sogenannten Försterradius R_0 , wobei gilt:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6. \quad (2.46)$$

R_0 ist der Abstand, bei dem die Donatorrelaxation zu 50 % durch den Energietransfer erfolgt. Es ist also möglich, bei Kenntnis von k_T , τ_D und R_0 , die Distanz R zwischen Donator und Akzeptor zu bestimmen. Die explizite Darstellung des Försterradius

$$R_0 = 9,78 \cdot 10^3 (n^{-4} Q_D \kappa^2 J)^{1/6} \text{ \AA} \quad (2.47)$$

zeigt, daß dieser Wert aus Experimenten ohne die Beteiligung des Energietransfers bestimmt werden kann. Bei einem gegebenen Ensemble von Donator-Akzeptor-Paaren gilt für die Transfereffizienz E_i des i -ten Paares D_i/A_i

$$E_i = \frac{k_{Ti}}{(\tau_{Di}^{-1} + k_{Ti})}. \quad (2.48)$$

Die Transfereffizienz E , als Meßgröße, ist dann der Mittelwert über die Transfereffizienzen E_i aller Paare:

$$E = \langle E_i \rangle = \left\langle 1 - \frac{\tau_{DAi}}{\tau_{Di}} \right\rangle = \left\langle \frac{k_{Ti}}{(\tau_{Di}^{-1} + k_{Ti})} \right\rangle. \quad (2.49)$$

Im dynamischen Grenzfall seien durch eine hohe Beweglichkeit der Fluorophore alle möglichen Orientierungen der Übergangsdipolmomente eingenommen, bevor der Energietransfer wirksam wird, so daß die Transfereffizienz E_i für alle Paare gleich ist. Unter Verwendung der Gleichungen (2.47) und (2.49) gilt für diesen Fall:

$$\langle E_i \rangle_d = \langle E \rangle_d = \frac{\langle \kappa_i^2 \rangle}{C^{-1} R^6 + \langle \kappa_i^2 \rangle}, \quad \text{mit } C = \frac{R_0^6}{\langle \kappa_i^2 \rangle}. \quad (2.50)$$

Die gemessene Transfereffizienz ist somit eine Funktion der mittleren Orientierung. Existiert eine isotrope Verteilung der Übergangsdipolmomente der D_i und A_i , so ergibt sich ein Wert für $\langle \kappa_i^2 \rangle$ von $2/3$. Für den Fall einer räumlichen Orientierungsbeschränkung der Übergangsdipolmomente lassen sich obere und untere Grenzen abschätzen [Dale und Eisinger, 1975; Dale et al., 1979].

Die maximalen und minimalen mittleren Quadrate des Orientierungsparameters sind gegen durch:

$$\langle \kappa^2 \rangle_{\max} = \frac{2}{3} \left(1 + \langle d_D^x \rangle + \langle d_A^x \rangle + 3 \langle d_D^x \rangle \langle d_A^x \rangle \right), \quad (2.51)$$

$$\langle \kappa^2 \rangle_{\min} = \frac{2}{3} \left[1 - (\langle d_D^x \rangle + \langle d_A^x \rangle) / 2 \right] \quad (2.52)$$

mit

$$\langle d_i^x \rangle = \left(\frac{\langle r_i \rangle}{r_0} \right)^{1/2}. \quad (2.53)$$

Die Größe d_i^x stellt den axialen Depolarisationsfaktor der Eigenbewegung von Donator d_D^x und Akzeptor d_A^x dar. Die Gleichungen gelten unter der Annahme positiver Faktoren. Im allgemeinen trägt der Energietransfer ebenfalls zur Depolarisation bei.

Für den mittleren Transferdepolarisationsfaktor $\langle d_T \rangle$ gilt dann:

$$\langle d_T \rangle = \langle d_D^x \rangle d_T^x \langle d_A^x \rangle. \quad (2.54)$$

Der Faktor d_T^x gibt in dieser Formel die axiale Transferdepolarisation an. Für den statischen Fall, bei dem keine Reorientierung der Übergangsdipolmomente D_i und A_i während des Transfers erfolgt, kann die Mittelung aus Gleichung (2.50) nicht verwendet werden [Dale und Eisinger, 1976].

2.4.2 Energietransfer in zweidimensionalen Donator-Akzeptor-Systemen

Eine analytische Beschreibung des strahlungslosen Energietransfers in zweidimensionalen Systemen wurde von einer Reihe von Autoren behandelt [u. a. Wolber und Hudson, 1979; Dewey und Hammes, 1980, Yguerabide, 1994]. Die folgende Darstellung erfolgt in Anlehnung an die Theorie von Wolber und Hudson [Wolber und Hudson, 1979]. Ihr liegen die Annahmen zugrunde, daß Donatoren und Akzeptoren zufällig in der Ebene verteilt sind und daß der Orientierungsfaktor vom Donator-Akzeptor-Abstand unabhängig ist. Die allgemeine Lösung wurde von den Autoren dahingehend erweitert, daß ein Abstand R_e der minimalsten Annäherung zwischen Donatoren und Akzeptoren eingeführt wurde. Für die Wahrscheinlichkeitsdichte $P(t)$, die Donatoren in ihrem angeregten Zustand zum Zeitpunkt t vorzufinden, gilt dann nach Mittelung über das gesamte Ensemble:

$$\langle P(t) \rangle = \exp \left\{ - (t / \tau_D) - \pi R_0^2 c \gamma [2/3, (R_0 / R_e)^6 (t / \tau_D)] (t / \tau_D)^{1/3} + \pi R_e^2 c [1 - e^{-(R_0 / R_e)^6 (t / \tau_D)}] \right\} \quad (2.55)$$

Der Radius der minimalsten Annäherung R_e wird bei den Purpur- und ROS-Membranen durch die Größe des den Akzeptor einschließenden Proteins sowie durch den Bindungsabstand und die Größe des Donator bestimmt. Es bedeuten im weiteren R_0 der Försterradius, τ_D die Fluoreszenzlebensdauer der Donatoren in Abwesenheit der Akzeptoren und γ die unvollständige Gamma-Funktion mit der Definition

$$\gamma(x, y) = \int_0^y z^{x-1} e^{-z} dz. \quad (2.56)$$

Die Akzeptorkonzentration c ist durch

$$c = N / [\pi (R_d^2 - R_e^2)] \quad (2.57)$$

gegeben, wobei N die Zahl der Akzeptoren auf einer Kreisfläche mit dem Radius R_d ist.

Der erste Exponentialterm in Gleichung (2.55) gibt das Fluoreszenzverhalten ohne Akzeptoren wieder. Den zweiten und dritten Term bestimmen die Abhängigkeiten von der Akzeptorkonzentration c und dem minimalen Abstand R_e . Mit Gleichung (2.55) lassen sich nichtmonoexponentiellen Fluoreszenzverläufe beschreiben. Durch die Einführung der dimensionlosen Größen:

$$\alpha = (R_e / R_0)^6, \quad C = R_0^2 c, \quad \lambda = t / \tau_D \quad (2.58)$$

gilt für die relative Quantenausbeute

$$q_r = \int_0^{\infty} e^{-\lambda} \exp[-\pi C \gamma (2/3, \lambda / \alpha) \lambda^{1/3}] \exp[\pi C \alpha^{1/3} (1 - e^{-\lambda/\alpha})] d\lambda. \quad (2.59)$$

Diese relative Quantenausbeute q_r , dem Verhältnis zwischen den Quantenausbeuten der Donatoren mit (Q_{DA}) und ohne Akzeptoren (Q_D), kann experimentell aus dem Verhältnis der mittleren Lebensdauern mit und ohne Akzeptor bestimmt werden.

2.4.3 Energie-Homotransfer zwischen Donator-Donator-Paaren

Ein Spezialfall des Energietransfers stellt der Energieaustausch zwischen gleichartigen Fluorophoren dar [u. a. Craver und Knox, 1971]. Die Anwendung dieses als Homotransfer bezeichneten Prozesses bietet sich bevorzugt dann an, wenn die Distanz zwischen ausgewählten Positionen im Proteingerüst bestimmt werden soll. Die spezifische Markierung verschiedener Stellen mit unterschiedlichen Fluoreszenzlabeln erfordert in der Praxis einen hohen Aufwand und ist mitunter nicht eindeutig realisierbar. Die Markierung der Positionen mit nur einem Labeltyp vereinfacht den präparativen Aufwand. Während der Homotransfer in Membransystemen als zweidimensionales Problem vorliegt, handelt es sich bei den Proteinen in Mizellenform mit zwei unterschiedlichen Bindungsstellen um einen intramolekularen Prozeß. Dieser Prozeß läßt sich nicht im Fluoreszenzabklingverhalten, sondern nur anhand der zeitaufgelösten Fluoreszenz-anisotropie $r(t)$ beobachten. Der Energietransfer zwischen zwei gleichartigen Fluorophoren hat keinen Einfluß auf die Lebensdauer [Tanaka und Mataga, 1979]. Die Funktion $r(t)$ wird in Anlehnung an einen Formalismus, der von Karolin et al. [Karolin et al., 1998] vorgeschlagen wurde, dargestellt. Vorausgesetzt, der zeitliche Verlauf der Anisotropie der einzelnen Fluorophore kann vom Zeitverlauf der Besetzung des elektronischen Anregungszustandes separiert werden [siehe auch Fedchina und Westlund, 1994], gilt:

$$r(t) = \frac{1}{2} \{r_i(t) + r_j(t)\} p(t) + \frac{1}{2} \{r_{ij}(t) + r_{ji}(t)\} \{1 - p(t)\} \quad (2.60)$$

Dabei bedeuten $r_i(t)$ und $r_j(t)$ die Anisotropieverläufe der einfach markierten Proteine (ohne Homotransfer) und $r_{ij}(t)$ gibt den Anteil des Donators D_j nach Anregung durch den Donator D_i bei den doppelt markierten Proteinen wieder. Die Funktion $p(t)$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, den ursprünglich angeregten Donator zum Zeitpunkt t in seinem Anregungszustand vorzufinden, und wird ausgedrückt durch:

$$p(t) = \frac{1}{2} \{1 + \exp(-2k_{HT}t)\} \quad (2.61)$$

Im Exponenten ist die Energietransferrate k_{HT} enthalten²¹. Die Funktion $r_{ij}(t)$ wird, den Funktionen $r_i(t)$ und $r_j(t)$ äquivalent, durch einen Exponentialterm und eine Endanisotropie dargestellt, wobei für die Grenzwerte von $r_{ij}(t)$ folgende Konvention gelten soll:

$$r_{ij}(t_\infty) = \frac{2}{5} p_{ij}^\infty \quad \text{und} \quad r_{ij}(0) = \frac{2}{5} p_{ij}^0. \quad (2.62)$$

Für den Endwert gilt im weiteren

$$r_{ij}(t_\infty) = \frac{2}{5} \left(\frac{3}{2} \cos^2 \delta_{HT} - \frac{1}{2} \right) \sqrt{\frac{r_{i\infty}}{r_{i0}}} \sqrt{\frac{r_{j\infty}}{r_{j0}}}. \quad (2.63)$$

Das Argument der Kosinusfunktion, δ_{HT} , ist der Winkel zwischen den Symmetrieachsen der beiden Fluorophor-Bindungsgeometrien. Der Ausdruck $r_{ij}(0)$ stellt den maximalen Anteil der indirekt angeregten Donatoren an $r(t)$ dar. Speziell gilt für den Fall isotrop orientierter Donatoren $r_{ij}(0) = 2/125$ [Baumann und Fayer, 1986]. Nach sukzessivem Einsetzen folgt für die Gesamtanisotropiefunktion

$$\begin{aligned} r(t) = & \frac{1}{4} \{r_i(t) + r_j(t)\} \{1 + \exp(-2k_{HT}t)\} \\ & + \frac{1}{4} r_0 \{p_{ij}^0 - p_{ij}^\infty\} \{ \exp(-t/\phi_i) + \exp(-t/\phi_j) \} + 2p_{ij}^\infty \{1 - \exp(-2k_{HT}t)\} \end{aligned} \quad (2.64)$$

Die variablen Parameter in Gleichung (2.64), die zur Anpassung an die Meßkurven verwendet werden, sind p_{12}^0 , p_{12}^∞ und k_{HT} . Die Anisotropien $r_i(t)$ und $r_j(t)$ sowie die Rotationskorrelationszeiten ϕ_i und ϕ_j werden durch die Messungen der einzeln markierten Proben ermittelt.

Bei Kenntnis der Transferrate k_{HT} und der Fluoreszenzlebensdauer τ_D läßt sich das Verhältnis zwischen dem Försterradius R_0 und dem effektiven Abstand R berechnen (Gleichung (2.46)). Zur Berechnung des Försterradius ist die Bestimmung des mittleren Quadrates des Orientierungsparameters $\langle \kappa^2 \rangle$ notwendig.

²¹ Der Index HT bedeutet Homotransfer.

In bezug auf diesen Parameter ist auch die beschriebene Methode des intramolekularen Homotransfers in ihrer Anwendbarkeit begrenzt. Für die konkreten Orientierungen der Übergangsdipolmomente müssen geometrische Einschränkungen gemacht werden, um $\langle \kappa^2 \rangle$ berechnen zu können. Es soll im folgenden angenommen werden, daß die Symmetrieachsen der beiden Bewegungskegel der Donatoren senkrecht auf dem Verbindungsvektor stehen. Für den Orientierungsparameter gilt dann:

$$\begin{aligned} \langle \kappa^2 \rangle = & \frac{2}{3} + \frac{2}{3} D_{00}^2(\delta_{HT}) \sqrt{\frac{r_{i\infty}}{r_{i0}}} \sqrt{\frac{r_{j\infty}}{r_{j0}}} + \frac{2}{3} \left\{ D_{00}^2(\Omega_i) \sqrt{\frac{r_{i\infty}}{r_{i0}}} + D_{00}^2(\Omega_j) \sqrt{\frac{r_{j\infty}}{r_{j0}}} \right\} \\ & + D_{00}^2(\Omega_i) D_{00}^2(\Omega_j) \sqrt{\frac{r_{i\infty}}{r_{i0}}} \sqrt{\frac{r_{j\infty}}{r_{j0}}}. \end{aligned} \quad (2.65)$$

Die hier noch unbekanntenen Wigner Rotationsmatrizen $D_{00}^2(\Omega_i)$ und $D_{00}^2(\Omega_j)$ geben die Transformation vom Laborsystem ins i-te beziehungsweise j-te Molekülkoordinatensystem an. Für die späteren Betrachtungen im Experimentalkapitel 4.3.2 sind nur die Grenzen der Wertebereiche von Bedeutung, die bei $-0,5$ beziehungsweise $1,0$ liegen. Vorausgesetzt, die restlichen Parameter wurden aus den vorherigen Formeln ermittelt, lassen sich durch einen 3D-Plot für $\langle \kappa^2 \rangle$ über den Variablen $D_{00}^2(\Omega_i)$ und $D_{00}^2(\Omega_j)$ minimale und maximale Funktionswerte bestimmen.

2.5 Fluoreszenzquenching

Der Begriff Fluoreszenzquenching umfaßt mit Ausnahme der Emission von Photonen alle Prozesse, die zum Abklingen des elektronischen Anregungszustandes eines Moleküls beitragen. Im folgenden Abschnitt soll nur die diffusionskontrollierte Deaktivierung durch Kontakt mit einem Quenchemolekül betrachtet werden.

Bei dem als dynamisches Quenching bezeichneten Prozeß wird die Anregungsenergie des Fluorophors durch Kollision mit dem diffundierenden Quencher strahlungslos abgegeben. Im Gegensatz zu diesem dynamischen Quenching kommt es bei einem statischen Quenching zu einer Deaktivierung durch eine Komplexbildung mit dem Quencher. Während beim statischen Quenching die Fluoreszenzlebensdauer konstant bleibt, ist sie beim dynamischen Quenching von der Konzentration der Quenchemoleküle in der Lösung abhängig. Die Prozesse unterscheiden sich außerdem in ihrem Temperaturverhalten. Durch Temperaturerhöhung wird das Kollisionsquenching verstärkt, die Komplexbildung dagegen meistens reduziert²².

²² Für die Temperaturabhängigkeit der Komplexbildung kann $\Delta H > 0$ oder $\Delta H < 0$ gelten, wobei ΔH die Bildungsenthalpie ist.

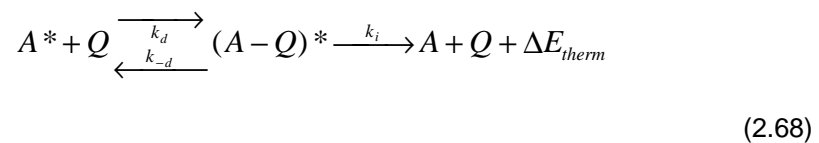
Beide Effekte können einzeln mit der Stern-Volmer-Gleichung beschrieben werden:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q]. \quad (2.66)$$

In dieser Gleichung bedeuten I und I_0 die Fluoreszenzintensitäten mit und ohne Quencher, K_{SV} die Stern-Volmer-Konstante und $[Q]$ die Quencherkonzentration. Für das dynamische Quenching gilt außerdem

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q], \quad (2.67)$$

wobei k_q die apparente bimolekulare Quenchingkonstante ist und τ_0 die Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit des Quenchers. Im allgemeinen läßt sich eine solche bimolekulare Quenchingreaktion folgendermaßen darstellen:



A^* bezeichnet den angeregten Fluorophor, Q das Quencher-molekül. Die diffusionslimitierten Ratenkonstanten k_d und k_{-d} beschreiben die Bildung beziehungsweise den Zerfall des Stoßkomplexes. Das Abklingen des Anregungszustandes des Komplexes unter Aussendung thermischer Energie, ΔE_{therm} , wird mittels k_i berücksichtigt. Die Ratenkonstante k_q ist dann

$$k_q = \gamma k_d, \quad (2.69)$$

wobei die Quenchingeffizienz γ definiert ist durch:

$$\gamma = \frac{k_i}{k_i + k_{-d} + \tau_0^{-1}}. \quad (2.70)$$

