

## 2 Grundlagen

### 2.1 Grundlagen der Strukturuntersuchung von Proteinen mit Hilfe von Diffraktionsmethoden

#### 2.1.1 Einführung

Das Verständnis der Funktion biologischer Makromoleküle wie Proteine und Nucleinsäuren auf molekularer Ebene erfordert detaillierte Kenntnisse über die Struktur der entsprechenden Bausteine. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stellt die Methode der Röntgendiffraktion die Standardmethode zur Strukturuntersuchung dieser Molekülklassen dar. Die Fortschritte auf den Gebieten der Computer- und Softwareentwicklung sowie der Einsatz von Synchrotronstrahlung haben diese Entwicklung enorm beschleunigt. Eine Grundvoraussetzung für die Anwendung der Röntgendiffraktion zur Ermittlung von Proteinstrukturen ist die Herstellung von hochgeordneten, dreidimensionalen Proteinkristallen. Bis heute stellen die Schwierigkeiten bei der Kristallisation integraler Membranproteine allerdings ein schwerwiegendes Hindernis bei der Untersuchung dieser biologisch äußerst bedeutungsvollen Proteine dar. 2D-Kristalle von Membranproteinen können häufig leichter erhalten werden und ermöglichen in Kombination mit hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie, Elektronenkristallographie und computergestützter Bildverarbeitung eine Strukturbestimmung bei niedriger Auflösung (z. B. Schertler et al., 1993; Havelka et al., 1995; Krebs et al., 1998; Zhang et al. 1998; Auer et al., 1998), in einigen Fällen sogar bis hin zur atomaren Auflösung (z.B. Grigorieff et al., 1996; Kühlbrandt et al., 1994; Nogales et al., 1998). Alternativ wurden auch spezielle Techniken der NMR-Spektroskopie zur Ermittlung von Proteinstrukturen in wässriger Lösung entwickelt. Diese sind bislang allerdings auf relativ kleine Moleküle mit einer molekularen Masse unter 35 kDa beschränkt.

Die Basis der Strukturuntersuchung mit Diffraktionsmethoden ist die Beugung von Röntgenstrahlung bzw. Elektronen an einem Kristallgitter. Der Hauptunterschied zwischen Röntgen- und Elektronenkristallographie liegt dabei darin, daß Elektronen deutlich stärker mit Materie interagieren als Röntgenstrahlen. Dies erlaubt einerseits die Untersuchung viel kleinerer und dünnerer Objekte wie z.B. monomolekulare Schichten von zweidimensionalen Proteinkristallen, limitiert aber andererseits die Untersuchung auf Grund der sehr viel höheren Strahlenschäden (Amos et al., 1982). Die Ladung der Elektronen ermöglicht zugleich die Abbildung des zu untersuchenden Objekts im Elektronenmikroskop unter Verwendung elektromagnetischer Linsen. Eine Ablenkung bzw. Fokussierung von Röntgenstrahlen mit vergleichbaren „Röntgenlinsen“ ist nicht möglich. Daher ist mit Röntgenstrahlung nur das Diffraktionsbild eines Objekts, nicht aber die Abbildung des Objekts selbst zugänglich. In den folgenden Abschnitten werden die Grundlagen der Diffraktion an kristallinen Objekten und die Zusammenhänge zwischen den Objekt- bzw. Gittereigenschaften und dem Diffraktionsbild näher erläutert.

#### 2.1.2 Die Streuung von Wellen an Materie

Eine ebene elektromagnetische Welle kann allgemein in der Form

$$(Gl. 2.1) \quad E_0(\mathbf{r}, t) = E_0 \cdot e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - \omega t + \delta_0)}$$

geschrieben werden, wobei  $E_0(\mathbf{r}, t)$  den Feldvektor am Ort  $\mathbf{r}$  zur Zeit  $t$ ,  $\mathbf{k}$  den Wellenvektor in Ausbreitungsrichtung,  $\omega$  die Winkelgeschwindigkeit,  $\delta_0$  die Phase und  $E_0$  die Amplitude



$$(Gl. 2.7) \quad \delta = 2\pi \mathbf{r} \cdot (\mathbf{k} - \mathbf{k}')$$

und nach Einführung des sogenannten Streuvektors  $\mathbf{S}$

$$(Gl. 2.8) \quad \delta = 2\pi \mathbf{r} \cdot \mathbf{S} \quad \text{mit} \quad \mathbf{S} \equiv \mathbf{k} - \mathbf{k}'.$$

Der Streuvektor  $\mathbf{S}$  besitzt gemäß seiner Definition die Dimension einer reziproken Länge. Er beschreibt in Analogie zum Vektor  $\mathbf{r}$  im realen Raum einen beliebigen Ort im reziproken Raum, der auch als Diffraktionsraum bezeichnet wird. Die am Ort  $\mathbf{r}$  gestreute Welle kann jetzt in der Form

$$(Gl. 2.9) \quad E_1(\mathbf{r}, t) = E_0(\mathbf{r}, t) \cdot e^{i2\pi \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}}$$

geschrieben werden.

### 2.1.3 Die Streuung am Kristallgitter

Der Aufbau eines Kristalls kann prinzipiell mit der Beschreibung der kleinsten Einheit im Kristall, der sogenannten Elementarzelle oder Einheitszelle, und der Beschreibung der periodischen Wiederholung vollständig charakterisiert werden. Für die Betrachtung der Amplituden von Wellen, die an einer derartigen Struktur gestreut werden, benötigt man die Kenntnis der Streukraft an jedem Ort des Kristalls. Die Streukraft wird durch den Strukturfaktor ausgedrückt, der sich aus der Elektronenverteilung der einzelnen Atome, den Streubeiträgen aller Atome in der Elementarzelle und schließlich aus der Summe aller Elementarzellen zusammensetzt.

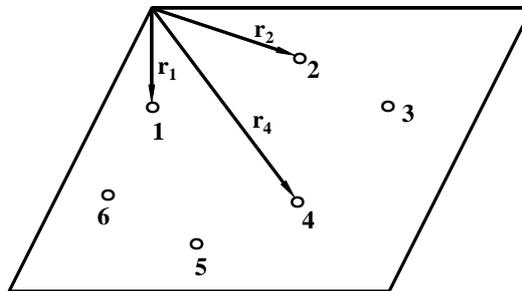


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung von Atomen (o) und Ortsvektoren ( $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_4$ ) der Atome in einer Elementarzelle.

In Abbildung 2.2 ist die Verteilung von Atomen in der Elementarzelle schematisch dargestellt. Zur Beschreibung des Systems wird ein Eckpunkt der Elementarzelle als Ursprung eines beliebigen Koordinatensystems gewählt. Der Streubeitrag des Atoms 1 im Abstand  $\mathbf{r}_1$  vom Ursprung beträgt nach Integration über das Volumen des Atoms

$$(Gl. 2.10) \quad f_1 = \int_{V_{Atom1}} \rho_1(\mathbf{r}) \cdot e^{2\pi i(\mathbf{r} \cdot \mathbf{S})} dV,$$

wobei  $\rho_1(\mathbf{r})$  die Elektronendichte des Atoms 1 darstellt. Der Streubeitrag  $\mathbf{G}(\mathbf{S})$  aller  $N$  Atome in der Elementarzelle, die sogenannte molekulare Transformation, ergibt sich aus der Summe der einzelnen Streubeiträge nach

$$(Gl. 2.11) \quad \mathbf{G}(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^N f_j \cdot e^{2\pi i(\mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S})}.$$

Betrachtet man zunächst nur die Periodizität in einer Dimension, so ist die nächste Elementarzelle gegenüber der ersten relativ zum gleichen Ursprung lediglich um einen Vektor  $\mathbf{a}$  verschoben. Der Streubeitrag der zweiten Elementarzelle ist daher

$$\mathbf{G}(\mathbf{S}) \cdot e^{2\pi i(\mathbf{a} \cdot \mathbf{S})}.$$

Die weiteren Elementarzellen des Kristalls sind entsprechend um ein Vielfaches von  $\mathbf{a}$  zum gemeinsamen Ursprung verschoben. Die Streuamplitude, häufig auch als Strukturfaktor bezeichnet, des gesamten eindimensionalen Kristalls ergibt sich durch Summation über alle  $M$  Elementarzellen nach

$$(Gl. 2.12) \quad \mathbf{F}(\mathbf{S}) = \sum_{n=1}^M \mathbf{G}(\mathbf{S}) \cdot e^{2\pi i(n-1)\mathbf{a} \cdot \mathbf{S}}.$$

Die von den einzelnen Elementarzellen gestreuten Wellen sind somit gegenüber den benachbarten Elementarzellen um  $2\pi \mathbf{a} \cdot \mathbf{S}$  phasenverschoben.

Das Produkt  $\mathbf{a} \cdot \mathbf{S}$  liefert allerdings nur dann einen Beitrag zur Streuamplitude, wenn die Phasendifferenzen zwischen den Streubeiträgen der Elementarzellen ganzzahlige Vielfache von  $2\pi$  sind:

$$(Gl. 2.13) \quad 2\pi \cdot \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} = 2\pi \cdot h.$$

Unter dieser Bedingung addieren sich die Einzelbeiträge der gestreuten Wellen konstruktiv und die Größenordnung der resultierenden Welle ist proportional zu  $M \cdot |\mathbf{G}(\mathbf{S})|$ .

Die Periodizität eines dreidimensionalen Kristalls kann entsprechend durch einen Satz von drei Translationsvektoren  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$  und  $\mathbf{c}$  entlang der Kanten der Elementarzelle beschrieben werden, für die entsprechend gilt:

$$(Gl. 2.14) \quad \begin{aligned} \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} &= h \\ \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} &= k \\ \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} &= l. \end{aligned}$$

Dies sind die fundamentalen Laue-Gleichungen, in denen  $h$ ,  $k$ ,  $l = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$  die sogenannten Millerschen Indizes darstellen. Die zentrale Aussage der Laue-Gleichungen ist, daß die Projektion des Streuvektors  $\mathbf{S}$  auf die Gittervektoren  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$  bzw.  $\mathbf{c}$  gleich einer ganzen Zahl sein muß, damit die Streuamplitude  $\mathbf{F}(\mathbf{S})$  von Null verschieden ist. Diese Bedingungen sind gleichzeitig nur auf den Ebenen senkrecht zu den Gitterachsen  $\mathbf{a}$ ,  $\mathbf{b}$  und  $\mathbf{c}$  in den Höhen  $h/|\mathbf{a}|$ ,  $k/|\mathbf{b}|$  und  $l/|\mathbf{c}|$  erfüllt.

Unter Berücksichtigung der Laue-Gleichungen kann  $\mathbf{F}(\mathbf{S})$  unter Vernachlässigung der Proportionalitätskonstanten  $M$  wie folgt umgeschrieben werden:

$$(Gl. 2.15) \quad \mathbf{F}(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^N f_j \cdot e^{2\pi i(\mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S})}.$$

Die reduzierten Koordinaten des  $j$ -ten Atoms in der Einheitszelle seien  $x_j$ ,  $y_j$  und  $z_j$ . Für den Vektor  $\mathbf{r}_j$  vom Ursprung zu  $j$ -ten Atom gilt somit

$$\mathbf{r}_j = \mathbf{a}x_j + \mathbf{b}y_j + \mathbf{c}z_j$$

und für das Skalarprodukt

$$(Gl. 2.16) \quad \begin{aligned} \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S} &= x_j \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} + y_j \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} + z_j \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} \\ &= hx_j + ky_j + lz_j. \end{aligned}$$

Nach Ersatz des Streuvektors  $\mathbf{S}$  durch die Millerschen Indizes folgt daraus für den Strukturfaktor:

$$(Gl. 2.17) \quad \mathbf{F}(h, k, l) = \sum_{j=1}^N f_j \cdot e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}.$$

Diese Gleichung wird als Strukturfaktorgleichung bezeichnet. Sie erlaubt die Berechnung des Diffraktionsbildes eines beliebigen Gitters, sofern die Koordinaten aller Atome bekannt sind. Der Strukturfaktor eines einzelnen Reflexes ist allerdings eine komplexe Größe, die in eine Amplitude  $F(h, k, l)$  und Phase  $\alpha(h, k, l)$  zerlegt werden kann:

$$(Gl. 2.18) \quad \mathbf{F}(h, k, l) = F(h, k, l) \cdot e^{i\alpha(h, k, l)}.$$

Bei der Aufnahme eines Diffraktionsbildes mit Hilfe eines Films bzw. anderen Detektoren geht jedoch die Phaseninformation verloren, da nur die Energie der Röntgenphotonen und somit die Intensitäten der Reflexe experimentell meßbar sind:

$$(Gl. 2.19) \quad I(h, k, l) = \mathbf{F}(h, k, l) \cdot \mathbf{F}^*(h, k, l) = |\mathbf{F}(h, k, l)|^2.$$

Mathematisch entspricht das Diffraktogramm gerade der Fourier-Transformation des streuenden Objekts. Röntgenstrahlen werden an den Elektronen der Atome im Kristall gestreut. Daher erlaubt das Diffraktionsbild bei Kenntnis der Phasen die Berechnung der Elektronendichte des Objekts  $\rho(\mathbf{r})$ . Der Strukturfaktor, ausgedrückt als kontinuierliche Summe über das Volumen der Elementarzelle

$$(Gl. 2.20) \quad \mathbf{F}(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^N f_j \cdot e^{2\pi i(\mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S})} = \int_{V_{EZ}} \rho(\mathbf{r}) \cdot e^{2\pi i(\mathbf{r} \cdot \mathbf{S})} dV,$$

ergibt nach Ausführung der Fourier-Transformation durch Multiplikation beider Seiten mit  $e^{-2\pi i(\mathbf{r}' \cdot \mathbf{S})}$  und Integration über das reziproke Volumen die Elektronendichteverteilung im realen Raum

$$(Gl. 2.21) \quad \rho(\mathbf{r}) = \int_{V_S} \mathbf{F}(\mathbf{S}) \cdot e^{-2\pi i(\mathbf{r} \cdot \mathbf{S})} dV_S.$$

Hierbei steht  $dV_S$  für ein Volumenelement aus dem reziproken Raum. Da der Strukturfaktor  $\mathbf{F}(\mathbf{S})$  jedoch keine kontinuierliche Funktion ist, sondern gemäß den Laue-Gleichungen nur an reziproken Gitterpunkten Werte ungleich Null aufweist, folgt für die Elektronendichte

$$(Gl. 2.22) \quad \rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} \mathbf{F}(h, k, l) \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}.$$

Ersetzt man  $\mathbf{F}(h, k, l)$  nach (Gl. 2.18), folgt daraus

$$(Gl. 2.23) \quad \rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F(h, k, l) \cdot e^{i\alpha(h, k, l)} \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}.$$

Die Kenntnis der Strukturfaktoramplituden  $F(h, k, l)$  und Phasen  $\alpha(h, k, l)$  erlaubt demnach die Berechnung der Elektronendichte an jedem beliebigen Ort der Einheitszelle.

In 2D-Kristallen sind die Elementarzellen lediglich in zwei Raumrichtungen periodisch angeordnet. Mit  $l = 0$  folgt für die Elektronendichte:

$$(Gl. 2.24) \quad \rho(x, y) = \frac{1}{A} \sum_h \sum_k \mathbf{F}(h, k) \cdot e^{-2\pi i(hx+ky)}$$

bzw.

$$(Gl. 2.25) \quad \rho(x, y) = \frac{1}{A} \sum_h \sum_k \mathbf{F}(h, k) \cdot e^{i\alpha(h, k)} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky)}.$$

### 2.1.4 Fourier-Differenzverfahren

Wie bereits oben erwähnt, geht bei der Aufnahme eines Diffraktionsbildes die Phaseninformation verloren. Ein Ausweg aus diesem sogenannten „Phasenproblem“ bieten unterschiedliche Methoden, wobei in der klassischen Röntgenkristallographie an dreidimensionalen Proteinkristallen die Methode des isomorphen Ersatzes die gebräuchlichste ist. Sie beruht auf dem Einbau von Schweratommarkern und dem Vergleich der Strukturfaktoren des nativen und markierten Proteinkristalls. Die physikalische Grundlage hierfür ist die höhere Streukraft von Schweratomen wie Quecksilber auf Grund ihrer hohen Anzahl von Elektronen im Vergleich zu den in biologischen Molekülen überwiegend vorkommenden Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff- bzw. Wasserstoffatomen. Die Intensität der von einem Atom gestreuten Strahlung nimmt dabei proportional mit dem Quadrat der Anzahl der Elektronen des Atoms zu.

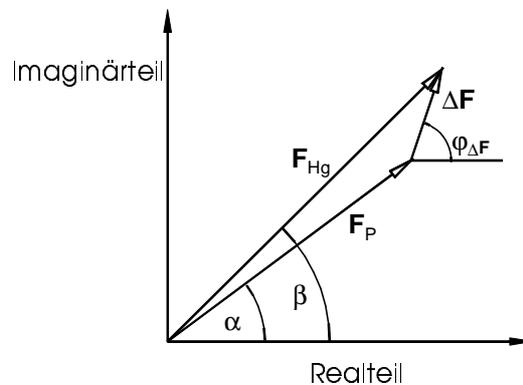


Abbildung 2.3: Argand-Diagramm der Strukturfaktoren des nativen Proteins ( $\mathbf{F}_P$ ), des markierten Proteins ( $\mathbf{F}_{Hg}$ ) und der Strukturfaktordifferenz ( $\Delta\mathbf{F}$ ).

Bei der Untersuchung von zweidimensionalen Proteinkristallen mit hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie sind sowohl die Abbildung des Gitters als auch das Diffraktionsbild durch Beugung des Elektronenstrahls am Gitter oder rechnerisch durch Fourier-Transformation des aufgenommenen Bildes zugänglich. Dies ermöglicht die Bestimmung der Phasen mit Hilfe computergestützter Bildverarbeitung (Amos et al., 1982; Henderson et al., 1986; Schertler, 1999). Plöhn und Büldt (1986) haben gezeigt, daß auf Grund ähnlicher Atomformfaktoren die Phasen für Elektronen und Röntgenquanten in guter Näherung übereinstimmen. Daher können die Phasen aus der Elektronenmikroskopie zur Auswertung von Röntgendiffraktionsexperimenten an zweidimensionalen Proteinkristallen verwendet werden. Die Methode des isomorphen Ersatzes erlaubt daher umgekehrt bei Kenntnis der

Phaseninformation die Positionsbestimmung von Schweratomen durch den Vergleich der Diffraktionsdaten von markierten und nativen Proteinkristallen (Krebs et al., 1993; Behrens et al., 1998a).

Die Unterschiede der Strukturfaktoren des nativen Proteins  $\mathbf{F}_P$  und des markierten Proteins  $\mathbf{F}_{Hg}$  sind in Abbildung 2.3 veranschaulicht. Die Position des Schweratoms ergibt sich aus der Differenz  $\Delta\mathbf{F}$  der Strukturfaktoren

$$(Gl. 2.26) \quad \Delta\mathbf{F} = \mathbf{F}_{Hg} - \mathbf{F}_P$$

bzw. aus der Differenz der Elektronendichteverteilung

$$(Gl. 2.27) \quad \Delta\rho(\mathbf{r}) = \rho_{Hg}(\mathbf{r}) - \rho_P(\mathbf{r}).$$

Für die Elektronendichteverteilung des nativen und markierten Proteins in einem 2D-Kristall gilt

$$(Gl. 2.28) \quad \rho_P(h,k) = \frac{1}{A} \sum_h \sum_k F_P \cdot e^{i\alpha(h,k)} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky)}$$

und

$$(Gl. 2.29) \quad \rho_{Hg}(h,k) = \frac{1}{A} \sum_h \sum_k F_{Hg} \cdot e^{i\beta(h,k)} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky)},$$

wobei  $\alpha(h, k)$  und  $\beta(h, k)$  die Phasen des nativen bzw. markierten Proteins sind. Daraus folgt für die Differenzdichte

$$(Gl. 2.30) \quad \Delta\rho(h,k) = \frac{1}{A} \sum_h \sum_k (F_{Hg} \cdot e^{i\beta(h,k)} - F_P \cdot e^{i\alpha(h,k)}) \cdot e^{-2\pi i(hx+ky)}.$$

Für kleine  $\Delta\mathbf{F}$  gilt näherungsweise  $\alpha(h, k) \approx \beta(h, k)$  und daher

$$(Gl. 2.31) \quad \Delta\rho(h,k) \approx \frac{1}{A} \sum_h \sum_k (F_{Hg} - F_P) \cdot e^{i\alpha(h,k)} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky)}.$$

Die Anwendung der Phase  $\alpha(h, k)$  der nativen Proteinstruktur auf die Differenzamplituden  $\Delta\mathbf{F}$  kann folgendermaßen diskutiert werden: Durch Anwendung des Cosinus-Satzes (vgl. Abbildung 2.3)

$$(Gl. 2.32) \quad F_{Hg}^2 = F_P^2 + \Delta F^2 + 2\Delta F \cdot F_P \cdot \cos(\varphi_{\Delta F} - \alpha)$$

läßt sich die folgende Beziehung herleiten:

$$(Gl. 2.33) \quad F_{Hg} - F_P = \frac{\Delta F^2 + 2\Delta F \cdot F_P \cdot \cos(\varphi_{\Delta F} - \alpha)}{F_{Hg} + F_P}.$$

Nach Substitution mit

$$\cos\gamma = \frac{1}{2}(e^{i\gamma} + e^{-i\gamma})$$

erhält man

$$(Gl. 2.34) \quad (F_{Hg} - F_P) \cdot e^{i\alpha} = \frac{(\Delta F)^2}{F_{Hg} + F_P} \cdot e^{i\alpha} + \frac{F_P \cdot \Delta F}{F_{Hg} + F_P} \cdot e^{i\varphi_{\Delta F}} + \frac{F_P \cdot \Delta F}{F_{Hg} + F_P} \cdot e^{i(2\alpha - \varphi_{\Delta F})}.$$

Da die Phasen  $2\alpha$  und  $\varphi_{\Delta F}$  nicht korreliert sind, liefert der Phasenfaktor  $e^{i(2\alpha - \varphi_{\Delta F})}$  im allgemeinen außer Rauschen keinen konstruktiven Beitrag zur Fourier-Transformation. Der zweite Term mit der Phase  $\varphi_{\Delta F}$  des Markers liefert bei der Fourier-Transformation die Position des Schweratoms. Mit  $F_{Hg}$  bzw.  $F_P \gg \Delta F$  und  $F_{Hg} \approx F_P$  für kleine Streudifferenzen ergibt sich in guter Näherung

$$\frac{F_P \cdot \Delta F}{F_{Hg} + F_P} \approx \frac{1}{2} \Delta F,$$

d.h. die zu erwartende Intensität im Vergleich zu dem Beitrag, den ein einzelnes Atom leisten müßte, ist um den Faktor 2 zu klein. Der erste Term wird von der Phase  $\alpha$  des nativen Proteins bestimmt. Die Differenzdichte ist demnach von der Struktur des nativen Proteins überlagert. Solange  $\Delta F$  klein gegenüber  $F_P$  ist, bleibt der Beitrag dieses Terms jedoch im Vergleich zum zweiten Term gering.

Diese Diskussion macht deutlich, daß die Fourier-Differenzmethode unter Verwendung der Phasen des nativen Proteins die korrekte Position des Markers mit halber Amplitude liefert. Wegen der niedrigen Zahl der Reflexe können die unkorrelierten Phasen  $\alpha$  bzw.  $\varphi_{\Delta F}$  allerdings lokale Nebenmaxima in der Elektronendichteverteilung hervorrufen, die durch die Fehler von  $\varphi_{\Delta F}$  verursacht werden.

## 2.2 Theoretische Grundlagen der Fluoreszenzanisotropiemessungen

### 2.2.1 Einführung

Unter Fluoreszenz versteht man allgemein die Emission von elektromagnetischer Strahlung, die ein Molekül beim Übergang von einem elektronisch angeregten Zustand in den Grundzustand ( $S_0$ ) abgibt. Die Lebensdauer der Fluoreszenz beträgt typischerweise  $10^{-6}$  bis  $10^{-9}$  s, wohingegen die Anregung sehr viel schneller in einem Zeitbereich  $10^{-15}$  s erfolgt. Während die Anregung eines Moleküls zur Besetzung verschiedener elektronischer Anregungszustände führen kann, erfolgt die Emission stets aus dem angeregten Zustand mit der niedrigsten Energie ( $S_1$ ), da die höherenergetischen Zustände zuvor strahlungslos in den  $S_1$ -Zustand relaxieren. Gemäß dem Franck-Condon-Prinzip bewirkt die Lichtabsorption außerdem einen Übergang aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustands in einen höheren Schwingungszustand eines elektronisch angeregten Zustands. Durch strahlungslose Abgabe von Schwingungsenergie gelangt das Molekül zuerst in den Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustands, bevor es Licht emittiert. Deshalb ist das Emissionsspektrum gegenüber der Anregungswellenlänge zu längeren Wellenlängen verschoben (Rotverschiebung).

Die Rate der Emission ist unter der Voraussetzung, daß die angeregten Moleküle keinen intermolekularen Wechselwirkungen unterliegen, proportional zur Zahl der angeregten Moleküle. Die Fluoreszenz klingt daher exponentiell mit der Zeit ab. Neben der spontanen Emission tragen allerdings auch andere Prozesse wie z.B. photochemische Reaktionen, Energietransferprozesse, Stoßwechselwirkungen mit sogenannten Quenchern sowie thermische Relaxation zum Abbau des angeregten Zustands bei. Die Deaktivierungsraten der verschiedenen Abbauewege addieren sich dabei zu einer zeitunabhängigen Gesamtrate, so daß für die Quantenausbeute der Fluoreszenz  $\phi_F$  gilt:

$$(Gl. 2.35) \quad \phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_E + k_q[Q] + \sum_i k_i}.$$

Hierbei bedeuten  $k_F$  die Fluoreszenzabklingrate,  $k_E$  die Energietransferrate,  $k_q[Q]$  der Anteil der Deaktivierung durch Quencher-Moleküle und  $k_i$  die Abklingraten der übrigen Abbauege. Eine charakteristische Größe der Relaxation des angeregten Zustands ist die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_f$ , die sich im einfachen Fall eines monoexponentiellen Abklingverhaltens aus der Summe der reziproken Raten  $k_i$  ergibt:

$$(Gl. 2.36) \quad \tau_f = \sum_i \frac{1}{k_i},$$

wobei  $k_i$  hier für die Raten aller möglichen Abbauege steht. Das Fluoreszenzverhalten extrinsischer und intrinsischer Fluorophore in Proteinen ist häufig komplexerer Natur. Die Fluoreszenzintensität kann dann als Summe von Exponentialtermen nach

$$(Gl. 2.37) \quad I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i}$$

beschrieben werden, ohne den einzelnen Komponenten eine konkrete physikalische Bedeutung zuzuordnen (Lakowicz, 1999). Hierbei stehen  $\alpha_i$  und  $\tau_i$  für die Amplitude bzw. Lebensdauer des  $i$ -ten Exponentialterms. Da bei einem multiexponentiellen Abklingverhalten die Amplituden und Lebensdauern nicht unabhängig voneinander sind (Grinvald und Steinberg, 1974), wird häufig nur der Wert der mittleren Lebensdauer  $\langle \tau_i \rangle$  verwendet, die nach

$$(Gl. 2.38) \quad \langle \tau_i \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i}$$

bestimmt wird. Auf Grund der Sensitivität der maximalen Emissionswellenlänge ( $\lambda_{\max}$ ) gegenüber Einflüssen der Umgebung und der Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von den Anteilen der unterschiedlichen Abbauege besitzen Fluoreszenztechniken ein breites Anwendungsspektrum (Lakowicz, 1999). Beispiele hierfür sind Untersuchungen von Abstandsbeziehung unter Ausnutzung der Energietransferprozesse oder die Analyse intermolekularer Wechselwirkungen. Eine besondere Stellung nimmt hierbei die Fluoreszenzspektroskopie mit linear polarisiertem Licht ein, die die Untersuchung dynamischer Prozesse mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropie ermöglicht.

## 2.2.2 Die Methode der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropie

Die Wahrscheinlichkeit der Anregung eines Moleküls ist proportional zum Quadrat des Skalarprodukts aus dem Übergangsdipolmoment der Absorption  $\boldsymbol{\mu}$  und dem elektrischen Feldvektor  $\mathbf{E}$  des Anregungslichts. Sie ist am höchsten, wenn beide Vektoren parallel zueinander ausgerichtet sind. Bei Anregung isotrop verteilter Moleküle mit einem kurzen, linear polarisierten Lichtpuls werden daher bevorzugt diejenigen Moleküle angeregt, deren Übergangsdipolmoment zum Zeitpunkt der Anregung gerade parallel zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts orientiert ist. Dieser Prozeß wird allgemein als PhotoSelektion bezeichnet. Die Emission des Anregungslichts besitzt wiederum eine Polarisation parallel zum Übergangsdipolmoment der Emission  $\mathbf{v}$ . Daher sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten  $I_{\parallel}(t)$  parallel bzw.  $I_{\perp}(t)$  senkrecht zur Polarisation des Anregungslichts abhängig von der Orientierung der emittierenden Moleküle zu einem beliebigen Zeitpunkt  $t$ . Ein Maß für diese Orientierung stellt die zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie  $r(t)$  dar, die wie folgt definiert ist:

$$(Gl. 2.39) \quad r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}$$

Die durch den kurzen Anregungspuls erzeugte Photoselektion wird durch Rotationsdiffusion der angeregten Moleküle abgebaut, wobei die Rotationsbewegung an Hand des zeitlichen Zerfalls der Anisotropie verfolgt werden kann. Die Zusammenhänge zwischen der linear polarisierten Anregung bzw. Emission und der Fluoreszenzanisotropie werden in Abbildung 2.4 veranschaulicht.

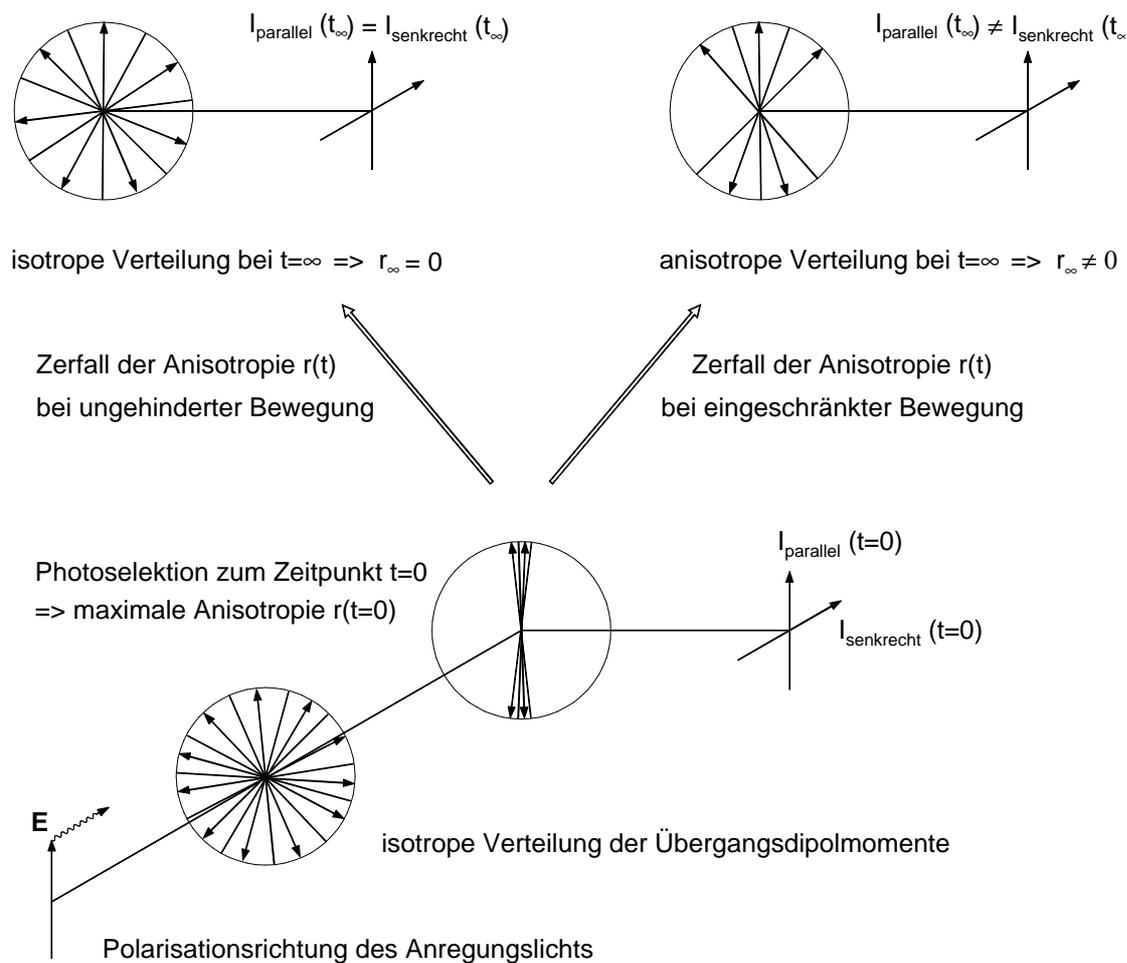


Abbildung 2.4: Das Prinzip der zeitaufgelösten Fluoreszenzanisotropiemessung. Zur Vereinfachung sollen die Übergangsdipolmomente der Absorption und Emission die gleiche Orientierung im Molekülgerüst des Fluorophors besitzen. In der Praxis wird die Fluoreszenzintensität  $I$  senkrecht bzw. parallel polarisiert zur Polarisationsrichtung des Anregungslichts in einem Winkel von  $90^\circ$  zur Richtung des Anregungslichts gemessen. Nach Photoselektion mit einem kurzen, linear polarisierten Lichtpuls klingt die Fluoreszenzanisotropie  $r(t)$  bei uneingeschränkter Bewegung des Fluorophors auf Null ab. Eine Bewegungseinschränkung führt dagegen zu einer Endanisotropie  $r_{\infty} \neq 0$  (weitere Erläuterungen siehe Text).

Im einfachsten Fall, der ungehinderten Bewegung eines sphärischen Rotors, gibt es nur eine Bewegungskomponente. Die Rotationsbewegung führt dabei wieder zu einer isotropen Verteilung der Emissionsübergangsdipolmomente; die Anisotropie fällt monoexponentiell auf Null ab. Ein mehrfach exponentieller Zerfall der Anisotropie wird beobachtet, wenn sich die

Bewegung des angeregten Moleküls in dem beobachteten Zeitfenster aus verschiedenen Rotationsmodi zusammensetzt:

$$(Gl. 2.40) \quad r(t) = \sum_i \beta_i \cdot e^{-t/\phi_i}.$$

Hierbei stehen  $\beta_i$  bzw.  $\phi_i$  für die Amplituden bzw. Rotationskorrelationszeiten der  $i$ -ten Bewegungskomponente. Ursache hierfür können unterschiedliche Raten der Diffusionsbewegung entlang der molekularen Achsen eines unsymmetrischen Moleküls oder komplexe Bewegungsabläufe sein, die durch die Kopplung des Fluorophors an ein Makromolekül hervorgerufen werden. Im letzteren Fall tragen die Eigenbewegungen von Fluorophor und Makromolekül sowie möglicherweise die Bewegung einzelner Segmente des Makromoleküls zum Zerfall der Anisotropie bei. Ist die Bewegung der Moleküle dagegen auf der Fluoreszenzzeitkala eingeschränkt, verbleibt eine anisotrope Verteilung der angeregten Moleküle. Daraus resultiert eine konstante Endanisotropie  $r_\infty$  ungleich Null:

$$(Gl. 2.41) \quad r(t) = \sum_i \beta_i \cdot e^{-t/\phi_i} + r_\infty.$$

Zur mathematischen Beschreibung der experimentellen Beobachtungen verwendet man ein Koordinatensystem, in dem der Fluorophor entlang der  $x$ -Richtung mit einem in  $z$ -Richtung linear polarisiertem Lichtpuls angeregt wird (vgl. Abbildung 2.5). Das Fluoreszenzlicht wird polarisations- und zeitabhängig in  $y$ -Richtung detektiert, wobei  $I_{||}(t)$  parallel und  $I_{\perp}(t)$  senkrecht zur  $z$ -Achse gemessen werden. Die Orientierung der Fluorophore wird durch die Winkel  $\theta$  und  $\Phi$  zwischen  $z$ - bzw.  $x$ -Achse und den Übergangsdipolmomenten der Absorption  $\mu$  und Emission  $\nu$  vollständig beschrieben.

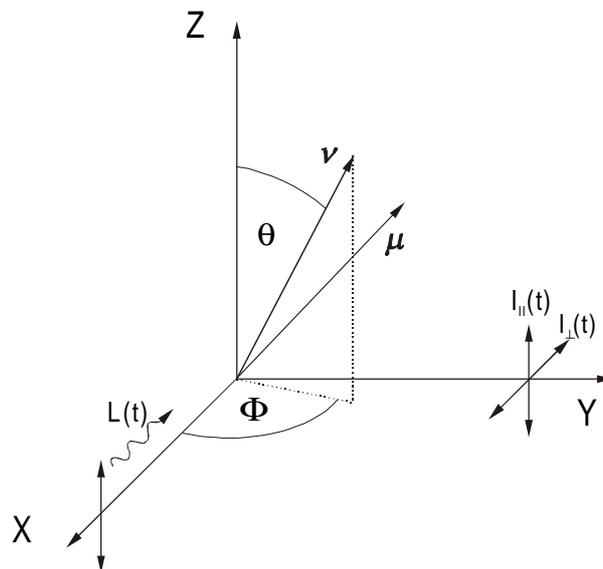


Abbildung 2.5: Laborkoordinatensystem der Fluoreszenzanisotropiemessung.  $L(t)$  repräsentiert den Anregungspuls, der parallel zur  $z$ -Achse polarisiert ist. Die Lage der Übergangsdipolmomente der Absorption  $\mu$  und Emission  $\nu$  sind durch die Azimutal- und Polarwinkel eindeutig charakterisiert. Die Intensitätskomponenten  $I_{||}(t)$  und  $I_{\perp}(t)$ , die in  $y$ -Richtung detektiert werden, sind als Vektoren dargestellt.

Die Intensitäten  $I_{\parallel}(t)$  bzw.  $I_{\perp}(t)$  sind zu jedem Zeitpunkt  $t$  proportional zum Quadrat des Skalarprodukts aus  $\mathbf{v}$  und dem Einheitsvektor der jeweiligen Polarisationsrichtung, wobei über alle angeregten Moleküle gemittelt wird:

$$(Gl. 2.42) \quad I_{\parallel}(t) \propto \langle (\mathbf{z} \cdot \mathbf{v}(t))^2 \rangle, \quad I_{\perp}(t) \propto \langle (\mathbf{x} \cdot \mathbf{v}(t))^2 \rangle.$$

Setzt man diese Terme in (Gl. 2.39) ein, so läßt sich zeigen, daß für die Anisotropie gilt:

$$(Gl. 2.43) \quad r(t) = \left\langle \frac{1}{2} \left[ 3(\mathbf{z} \cdot \mathbf{v}(t))^2 - 1 \right] \right\rangle = \langle P_2(\mathbf{z} \cdot \mathbf{v}(t)) \rangle,$$

wobei  $P_2$  dem Legendre-Polynom zweiten Grades entspricht. Zur Durchführung der Mittelung über das Ensemble benötigt man einen Ausdruck für die Orientierung der Emissionsübergangsdipolmomente zu einer beliebigen Zeit  $t$ . Die Funktion  $f(\boldsymbol{\mu}, \mathbf{v}, t)$  sei eine solche normalisierte Verteilungsfunktion für den Fall, daß  $\boldsymbol{\mu}$  und  $\mathbf{v}$  nicht identisch sind. Die Anisotropie ergibt sich dann aus der Integration über die Grenzen der Verteilung nach

$$(Gl. 2.44) \quad r(t) = \int \int P_2(\mathbf{z} \cdot \mathbf{v}(t)) f(\boldsymbol{\mu}, \mathbf{v}, t) d\boldsymbol{\mu} d\mathbf{v}.$$

Betrachtet man die uneingeschränkte Bewegung eines isotropen Rotors, wobei zur Vereinfachung die Übergangsdipolmomente der Absorption und Emission identisch sein sollen ( $\boldsymbol{\mu} = \mathbf{v}$ ), entspricht die Orientierungsverteilung von  $\mathbf{v}$  einer Funktion der Winkel  $\theta$  und  $\Phi$  (vgl. Abbildung 2.5). Die PhotoSelektion durch linear polarisierte Anregung erzeugt zum Zeitpunkt  $t = 0$  eine charakteristische Verteilung, für die gilt:

$$(Gl. 2.45) \quad f(\theta, \Phi, t = 0) \propto \cos^2 \theta.$$

Erfolgt die zeitliche Änderung der Orientierungsverteilung ausschließlich durch eine Rotationsdiffusion, so muß die Verteilungsfunktion  $f(\theta, \Phi, t)$  die Rotationsdiffusionsgleichung erfüllen:

$$(Gl. 2.46) \quad \frac{\partial f}{\partial t} = D_{rot} \left[ \frac{1}{\sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{\sin^2 \theta} \frac{\partial^2}{\partial \Phi^2} \right] f.$$

$D_{rot}$  entspricht der Rotationsdiffusionskonstante. Die Trennung der Variablen gemäß

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

führt zu

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

wobei  $C$  die Separationskonstante darstellt. Die Winkelabhängigkeit stellt sich nun als Eigenwertproblem dar, dessen Lösung mit Hilfe der Kugelflächenfunktionen erhalten werden kann, wobei die Zeitabhängigkeit in dem Exponentialterm enthalten ist. Die Lösung der Rotationsdiffusionsgleichung hat daher die Form

$$(Gl. 2.47) \quad f(\theta, \Phi, t) = \sum_{l,m} C_{lm} Y_{lm}(\theta, \Phi) e^{-l(l+1)D_{rot}t}$$

mit

$$(Gl. 2.48) \quad C_{lm} = \int f(\theta, \Phi, 0) Y_{lm}^* d \cos \theta d\Phi.$$

Durch Einsetzen von (Gl. 2.47) und (Gl. 2.48) in (Gl. 2.44) folgt für die Anisotropie:

$$(Gl. 2.49) \quad r(t) = \iint \sum_{lm} C_{lm} Y_{lm}(\theta, \Phi) e^{-l(l+1)D_{rot}t} P_2(\cos\theta) d\cos\theta d\Phi.$$

Zum Zeitpunkt  $t = 0$  ist die Verteilung durch die Photoselektion charakterisiert (Gl. 2.45). Unter Berücksichtigung von  $Y_{20} = P_2$ , der Orthogonalität der Kugelflächenfunktionen sowie der Anfangsbedingung zum Zeitpunkt  $t = 0$  nimmt die Anisotropiefunktion  $r(t)$  im Falle des ungehinderten freien Rotors die einfache Form

$$(Gl. 2.50) \quad r(t) = r_0 \cdot e^{-6D_{rot}t}$$

an, wobei  $r_0$  der Anfangsanisotropie zum Zeitpunkt  $t = 0$  entspricht. Die Rotationsdiffusionskonstante setzt sich hierbei aus der Boltzmann-Konstante  $k$ , der absoluten Temperatur  $T$ , der Viskosität der Lösung  $\eta$  und dem Volumen des Fluorophors zusammen:

$$(Gl. 2.51) \quad D_{rot} = kT / 6\eta V.$$

In komplexen Systemen zeigt die Anisotropiefunktion allerdings häufig einen multiexponentiellen Verlauf. Unabhängig von Modellannahmen über die Verteilungsfunktion  $f(\theta)$  kann eine mittlere Diffusionskonstante nach

$$(Gl. 2.52) \quad \bar{D}_M = (1 - r_\infty / r_0) / 6\bar{\phi}_M.$$

berechnet werden (Kinosita et al., 1977; Heyn, 1989). Hierbei stellt  $\bar{\phi}_M$  die mittlere Rotationskorrelationszeit aus dem Kurzzeitbereich der Anisotropie nach

$$(Gl. 2.53) \quad \bar{\phi}_M = \left( \frac{\partial}{\partial t} \left[ \frac{r(t) - r_\infty}{r_0 - r_\infty} \right] \Big|_{t=0} \right)^{-1} = \left( \frac{R}{\phi_1} + \frac{1-R}{\phi_2} \right)^{-1}$$

dar, wobei  $R$  von den Amplituden der empirischen Anpassung nach (Gl. 2.40) bzw. (Gl. 2.41) und der Anfangs- und Endanisotropie abhängt:

$$(Gl. 2.54) \quad R = \frac{\beta_1}{r_0 - r_\infty} \quad \text{bzw.} \quad R = 1 - \frac{\beta_2}{r_0 - r_\infty}.$$

In der modellunabhängigen Betrachtungsweise entspricht ferner der Ausdruck  $\sqrt{r_\infty / r_0}$  dem zweiten Term der Reihenentwicklung der normierten Verteilungsfunktion  $f(\theta)$ :

$$(Gl. 2.55) \quad S_2 = \sqrt{r_\infty / r_0} = \langle P_2(\cos\theta) \rangle = \int_{-1}^{+1} \left( \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right) f(\theta) d\cos\theta.$$

Der Parameter  $S_2$  wird gewöhnlich als Ordnungsparameter bezeichnet und stellt ein Maß für die Bewegungsfreiheit des Fluorophors dar.

Betrachtet man die Anfangsanisotropie  $r_0$  zum Zeitpunkt  $t = 0$ , so läßt sich leicht zeigen, daß  $r_0$  im Falle eines isotropen Rotors mit identischen Übergangsdipolmomenten  $\boldsymbol{\mu}$  und  $\boldsymbol{\nu}$  einen Wert von 0,4 besitzt (Kinosita et al., 1977).  $I_{\parallel}$  und  $I_{\perp}$  hängen auf Grund der Photoselektion von der  $\cos^2\theta$ -Verteilung und dem Winkel zwischen der Polarisationsrichtung parallel zur z-Achse und dem Übergangsdipolmoment  $\boldsymbol{\nu}$  ab. Die Intensitäten können daher wie folgt ausgedrückt werden:

$$(Gl. 2.56) \quad I_{\parallel} = I_0 \frac{\int f(\theta) \cos^2 \theta \sin \theta d\theta d\Phi}{\int f(\theta) \sin \theta d\theta d\Phi}, \quad I_{\perp} = I_0 \frac{\int f(\theta) \sin^2 \theta \sin^2 \Phi \sin \theta d\theta d\Phi}{\int f(\theta) \sin \theta d\theta d\Phi},$$

wobei  $I_0$  die Gesamtintensität repräsentiert. Da die Verteilungsfunktion  $f(\theta)$  wegen der zylindrischen Symmetrie um die z-Achse nicht von  $\Phi$  abhängt, folgt unter Berücksichtigung von  $\sin^2 \theta = 1 - \cos^2 \theta$  und  $f(\theta) = \cos^2 \theta$ :

$$(Gl. 2.57) \quad I_{\parallel} = I_0 \frac{\int \cos^4 \theta \sin \theta d\theta}{\int \cos^2 \theta \sin \theta d\theta}, \quad I_{\perp} = \frac{I_0}{2} \frac{\int \cos^2 \theta (1 - \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta}{\int \cos^2 \theta \sin \theta d\theta}$$

und die Integration von 0 bis  $\pi$  liefert

$$I_{\parallel} = 3/5 I_0, \quad I_{\perp} = 1/5 I_0.$$

Setzt man diese Werte in (Gl. 2.39) ein, erhält man die Anfangsanisotropie von  $r_0 = 0,4$ .

### 2.2.3 Der strahlungslose Energietransfer

Neben der spontanen Emission eines Photons stellt der strahlungslose Energietransfer zu einem anderen Molekül einen wichtigen Weg zum Abbau der Anregungsenergie dar. Die Voraussetzung hierfür ist die spektrale Überlagerung der Emissionsbande des angeregten Donatormoleküls (D) mit der Absorptionsbande des Akzeptormoleküls (A). Ein Maß für die Stärke der spektralen Überlagerung ist das Überlagerungsintegral  $J$ , das wie folgt definiert ist:

$$(Gl. 2.58) \quad J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda.$$

$F_D(\lambda)$  und  $\epsilon_A(\lambda)$  stehen für die normierte Fluoreszenzintensität bzw. den Extinktionskoeffizienten des Akzeptors in der Einheit  $M^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Die Wellenlänge  $\lambda$  wird hier in cm angegeben. Bei Akzeptor und Donator kann es sich um identische oder unterschiedliche Moleküle handeln. Man spricht dementsprechend von Homoenergietransfer bzw. Heteroenergietransfer (zur Übersicht siehe Wu und Brand, 1994).

Weiterhin hängt der Energietransfer von der Quantenausbeute und der Fluoreszenzlebensdauer des Donators und vom Abstand zwischen Donator und Akzeptor sowie der Orientierung der beiden Moleküle zueinander ab. Für ein Donator-Akzeptor-Paar mit festem Abstand wurde von Förster (1948) ein Formalismus zur Beschreibung des strahlungslosen Energietransfers entwickelt, wonach die Transferrate  $k_T$  nach

$$(Gl. 2.59) \quad k_T = \left[ R^{-6} J \kappa^2 n^{-4} Q_D \tau_D^{-1} \right] \times 8,71 \times 10^{23} \text{ s}^{-1}$$

gegeben ist.  $R$  beschreibt hierbei den Abstand zwischen Donator und Akzeptor in Å,  $Q_D$  und  $\tau_D$  die Quantenausbeute bzw. Fluoreszenzlebensdauer des Donators in Abwesenheit des Akzeptors,  $J$  das Überlagerungsintegral in der Einheit  $\text{cm}^3 M^{-1}$  und  $n$  den Brechungsindex des Mediums. Der Faktor  $\kappa^2$  repräsentiert die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente der Transferpartner. Er ist definiert als

$$(Gl. 2.60) \quad \kappa^2 = \left[ (\mathbf{D} \cdot \mathbf{A}) - 3(\mathbf{D} \cdot \mathbf{R})(\mathbf{A} \cdot \mathbf{R}) \right]^2,$$

wobei  $\mathbf{R}$  dem Einheitsvektor des Abstandes zwischen Donator und Akzeptor entspricht. Die Einheitsvektoren  $\mathbf{D}$  und  $\mathbf{A}$  repräsentieren die Richtungen der Übergangsdipolmomente der Donatoremission bzw. Akzeptorabsorption. Der Faktor  $\kappa^2$  kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen und beträgt  $2/3$  im Falle einer uneingeschränkten, isotropen Orientierung von

Donator und Akzeptor. Die Einführung des sogenannten Försterradius  $R_0$  führt zu einer vereinfachten Darstellung der Transferrate nach

$$(Gl. 2.61) \quad k_T = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6.$$

$R_0$  ist der Abstand, bei dem der Abbau der Anregungsenergie zu 50 % durch Energietransfer erfolgt. Der Abstand zwischen Donator und Akzeptor läßt sich somit bei Kenntnis von  $k_T$ ,  $\tau_D$  und  $R_0$  bestimmen, wobei der Försterradius aus Experimenten ohne Energietransfer zugänglich ist:

$$(Gl. 2.62) \quad R_0 = 9,79 \cdot 10^3 (n^{-4} Q_D \kappa^2 J)^{1/6} \text{ (in \AA)}.$$

Eine entscheidende Einschränkung bei der Untersuchung von Energietransferprozessen in biologischen Makromolekülen stellt allerdings die Tatsache dar, daß die Orientierung der Transferpartner und damit der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  nicht bekannt ist. Die analytische Beschreibung des Energietransfers erfordert dann die Annahme von Orientierungsmodellen unter Berücksichtigung spezifischer geometrischer Verhältnisse der biologischen Systeme wie z.B. im Fall von Membransystemen (Dale et al., 1979; Yguerabide, 1994).