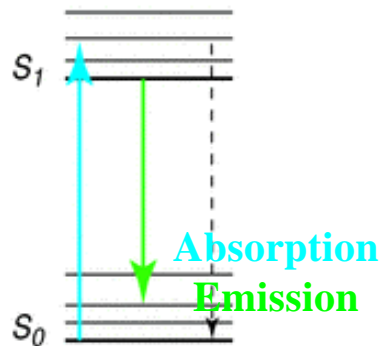


Prinzipien der Fluoreszenz

Fig. 1
(a)

Termschema



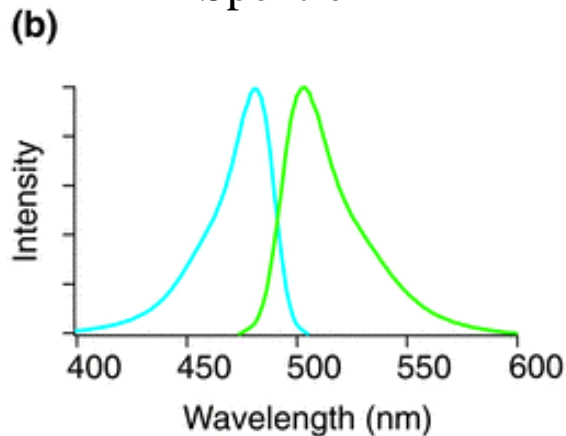
$$q = \frac{k_f}{k_f + \sum_i k_i} \quad [1]$$

Quantenausbeute q

Zahl der emittierten Photonen/
Zahl der absorbierten Photonen

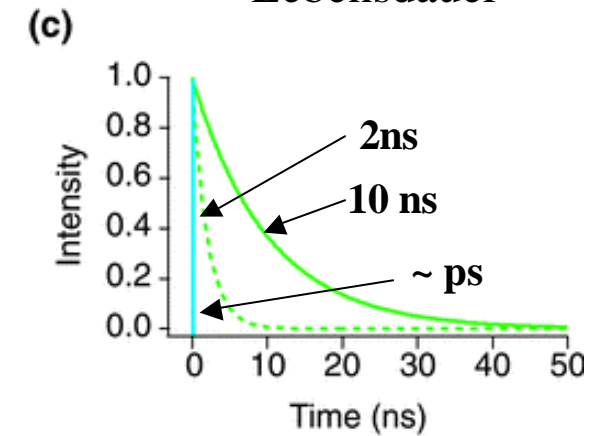
k_f : Rate der Fluoreszenzemission
 $\sum k_i$: Summe über die Raten aller
Strahlungslosen Übergänge

Spektren



$$\tau = \frac{1}{k_f} \quad [2]$$

Lebensdauer



$$I(t) = \sum_i e^{-t/\tau_i} \quad [3]$$

trends in Pharmacological Sciences

Hovius et al., TIBS, 2000

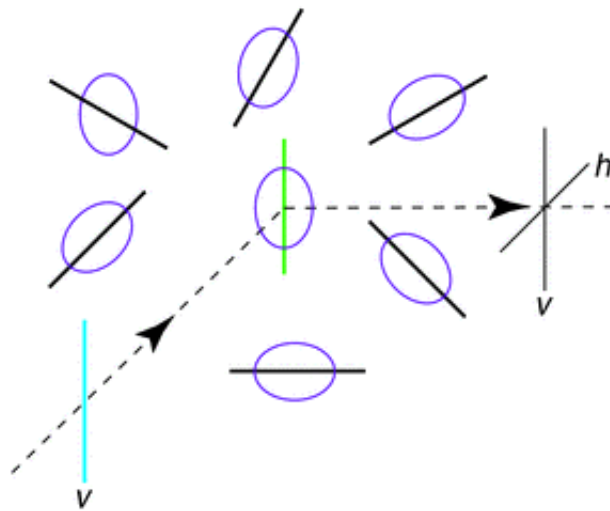
Die Zeitabhängigkeit des Fluoreszenzsignals kann mono- oder multiexponential sein.

Hohe Quantenausbeuten von 0.4 - 0.95 bei fluoreszierenden Farbstoffen (z.B. Rhodamin, Fluorescein) ermöglichen hoch empfindliche Meßsonden !!

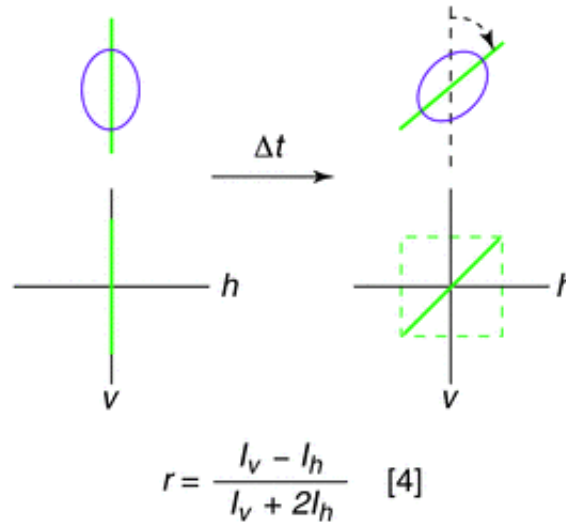
Fluoreszenzspektroskopie

Prinzipien der Fluoreszenz: Anisotropie der emittierten Fluoreszenz

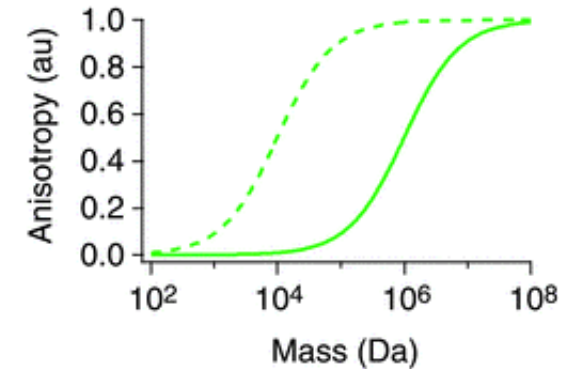
Fig. II
(a)



(b)



(c)



Hovius et al., TIBS, 2000
trends in Pharmacological Sciences

Moleküle mit isotroper Orientierungsverteilung

linear **vertikal** polarisiertes Anregungslicht

Bei Messung der vertikalen (v) und horizontalen (h) Komponenten des emittierten Lichts kann die Anisotropie (r) gemessen werden.

Abhängigkeit der Anisotropie von der Masse, die an die Farbstoffe gebunden wurden.

--- fluorescein: $t = 3.6$ ns

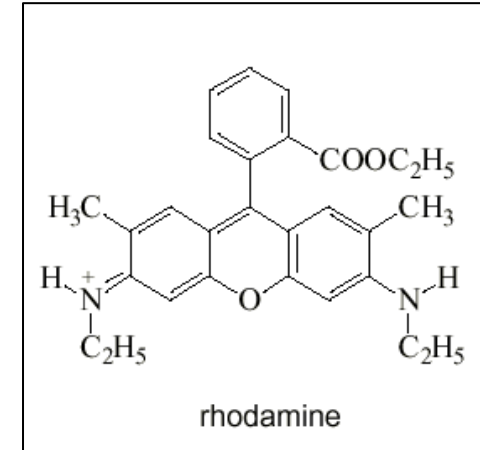
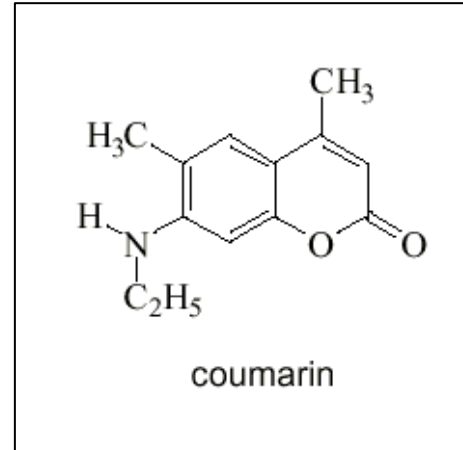
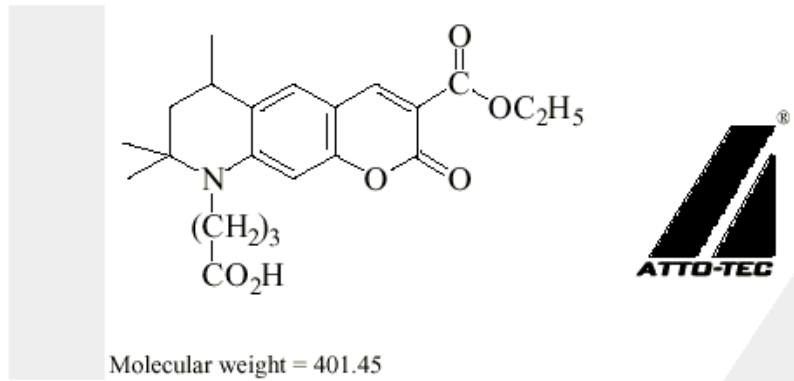
— sunnyvale red: $t = 360$ ns

→ r hängt von der Mobilität des Fluorophors ab:
Information über Größe, Form, Flexibilität des gebundenen Moleküls

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzfarbstoffe (dyes):
meist Derivate von *Fluorescein*,
Rhodamin, *Courmarin*, *Texas red*

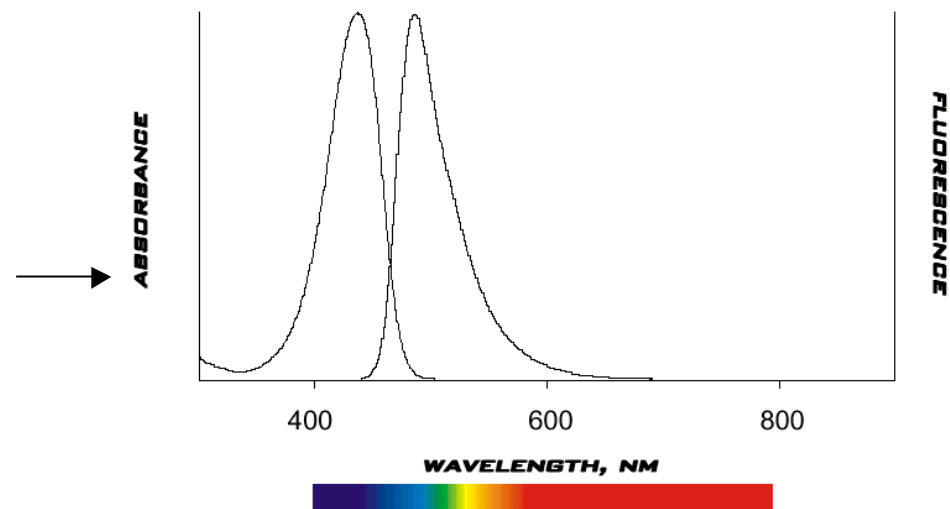
Planare polyzyklische Strukturen mit
konjugierten Doppelbindungen (π -Elektronen)



ATTO 425

Suited for: protein labeling
DNA labeling
single-molecule detection

	Ethanol	Water
λ_{abs}	426 nm	438 nm
λ_{em}	470 nm	486 nm
<i>QY</i>	0.9	0.9
τ_{em}	3.5 ns	3.5 ns



Fluoreszenzspektroskopie

Einfluss der Umgebung bzw. der Solvensmoleküle auf die **Fluoreszenzemission** bezüglich der Intensität und λ_{em} :

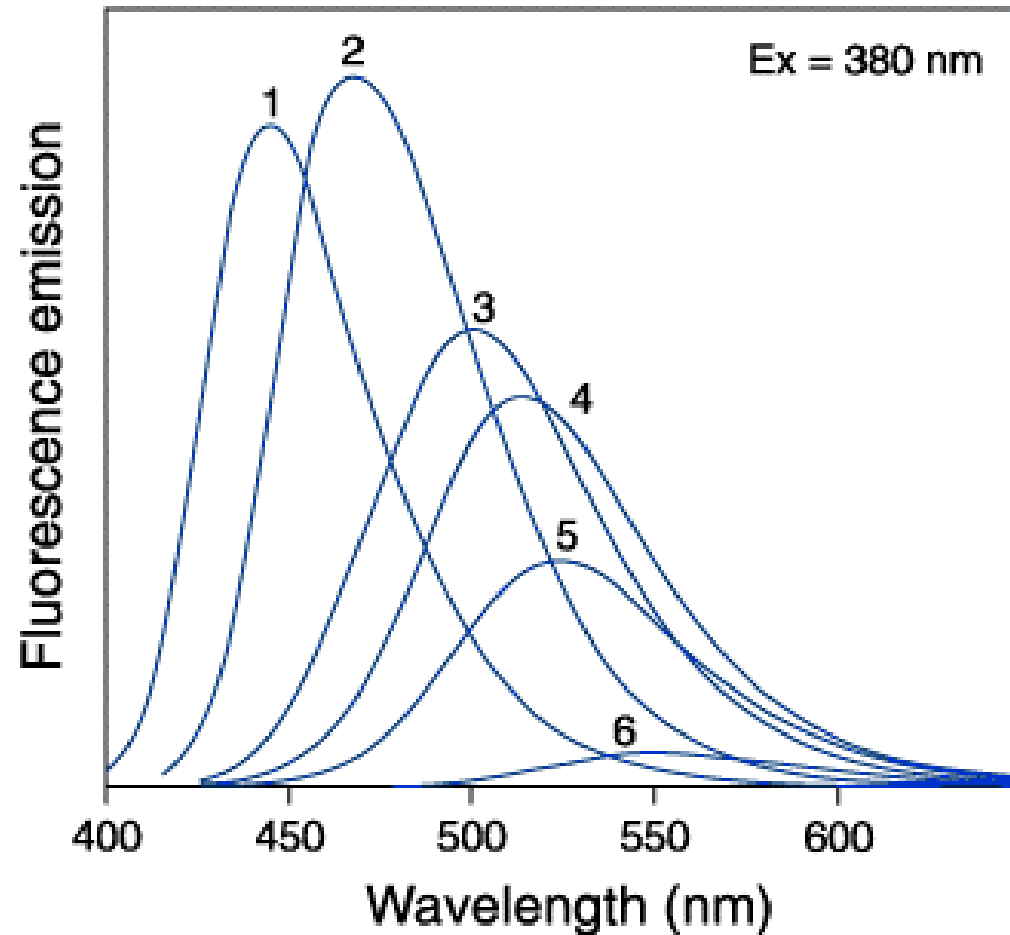
- Löschprozesse
- Energietransfer

=> (siehe Seite 68)

Fluoreszenzemission für 2-mercaptoethanol in

- 1) toluene, 2) chloroform,
- 3) acetonitrile, 4) ethanol,
- 5) methanol and 6) water.

Anregung aller Proben bei 380 nm.



Fluoreszenzspektroskopie

Ansatz

Fluorophore gebunden an Biomoleküle können Aussagen über wichtige Eigenschaften der Biomoleküle ermöglichen.

Fluoreszenzparameter

- spektrale Eigenschaft von Absorption, Emission $F(I_A, I_E)$
- Quantenausbeute Q_F
- Lebensdauer τ
- Anisotropie r
- zeitliche Schwankung der Emission $F(t)$
- Energietransfer zwischen zwei Dyes $k_{ET} \Rightarrow$ FRET

Beobachtungsparameter

(Information über die Biomoleküle)

- chemische Umgebung (pH, Polarität, etc.)
- räumliche Orientierung und Beweglichkeit
- Diffusion (Translation)
- Rotation
- intramolekulare Bewegungen (z.B. Konformationsänderungen, Entfaltung, etc.)
- Protein-Liganden-Wechselwirkung

Gesamte Beobachtungszeit wird durch die **Photostabilität der Fluorophore** bestimmt !!
Je nach Fluorophor kann der Farbstoff im Mittel nur etwa 10^6 mal angeregt werden.

Fluoreszenzspektroskopie

Dye-Labeling:

- unspezifische Bindung z.B. *nile red*

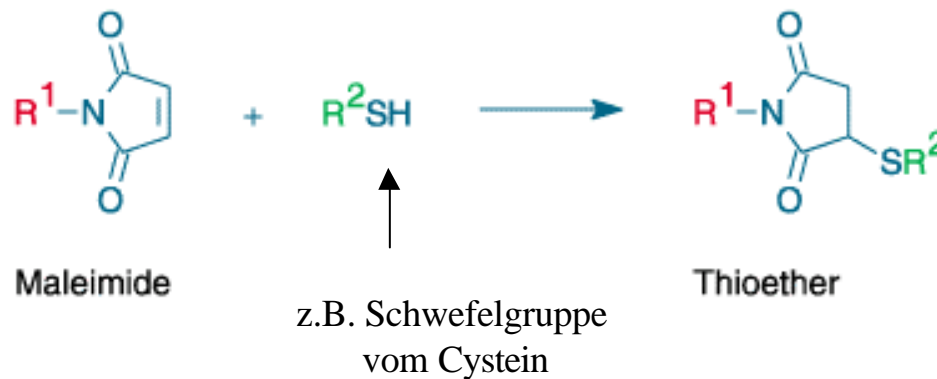
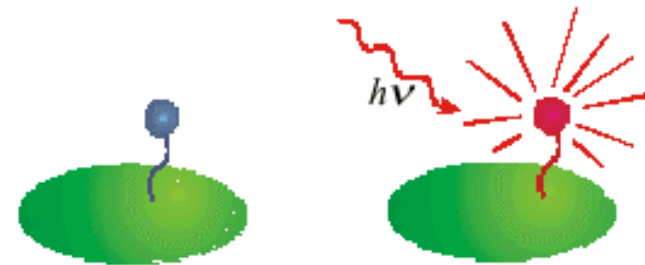
- spezifische Bindung
z.B.

• Amide-Bindung: $R-NH_2 + NHS-Fluorescein$

• Thioether-Bindung: $R-SH + Fluorescein-5-maleimide$

=> über Cysteine kann an einzelne ausgesuchte Positionen ein Farbstoff gebunden werden (= > wichtig für Konformationsstudien mit FRET)

Biomolecule with Fluorescent Label



Probenpräparation für Einzelmolekülstudien

Spektroskopie arbeitet mit kleinem Belichtungsvolumen

- Fokus des Anregungslichtes: $\varnothing \sim 0.5 - 10 \mu\text{m}$ => femto-liter Volumina
=> Mit hochauflösender konfokaler Mikroskopie
- Evaneszente Lichtwelle aus Totalreflexion an Oberflächen (TIRFM)
=> makroskopische Fläche mit sehr geringer Eindringtiefe

„Vereinzlung“ der Proteine

- frei bewegliche Proteine: bei 10 - 100 pM Konzentration hält sich im Durchschnitt immer nur ein Biomolekül im Anregungsvolumen auf. Allerdings diffundiert dieses Molekül (Brown'sche Bewegung) und hält sich im Mittel nur circa 1 ms im Anregungsvolumen auf.
=> Probleme bei zeitaufgelösten Studien mit Beobachtungszeiten > 1ms !!
- immobilisierte Proteine: an Oberflächen gebunden, mit Laserfallen fixiert
=> artifizielle Proteinumgebung ?!

Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

Mit Farbstoffen markierte Moleküle ermöglichen die Beobachtung von Transportprozessen in der Zelle (*in vivo*) und in sogenannten *in vitro* motility-assays. Für letztere werden z.B. Filamente auf einer Glasfläche fixiert und die zu untersuchenden Motorproteine mit einer geeigneten Pufferlösung hinzugegeben. Die Bewegung der Motorproteine kann über den stark fluoreszierenden Farbstoff verfolgt und analysiert werden.

=> „**Single Dye tracing**“

Fluorescence-Imaging - zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie

Zur Beobachtung von bewegten Fluorophoren (bzw. der zugehörigen Moleküle) wird im allgemeinen eine Fläche in der Größenordnung von einigen μm in dem sich der Fluorophor während des Messprozesses befindet auf einen Flächendetektor abgebildet. Hierbei kommt es auf eine gute Ortsauflösung ($\sim 50\text{--}100\text{ nm}$) und eine dem biologischen Prozess angemessene Zeitauflösung ($\sim 10\text{--}100\text{ ms}$) an. Weder die genaue Fluoreszenzintensität noch die Fluoreszenzlebensdauer müssen hier genau bestimmt werden (Ausnahme: **Fluorescence-lifetime-imaging microscopy (FLIM)**).

Fluoreszenzmikroskopie

In der Fluoreszenzmikroskopie kann eine gute **Orts- und Zeitauf**lösung erreicht werden, da der zu beobachtende Fluorophor einen sehr guten Kontrast zur Umgebung zeigt.

Detektoren für zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie

- Videokamera
- CCD-Photodiodenarray:
Beispiel: Ortsauflösung (pixel-size): 50 nm
Zeitauf

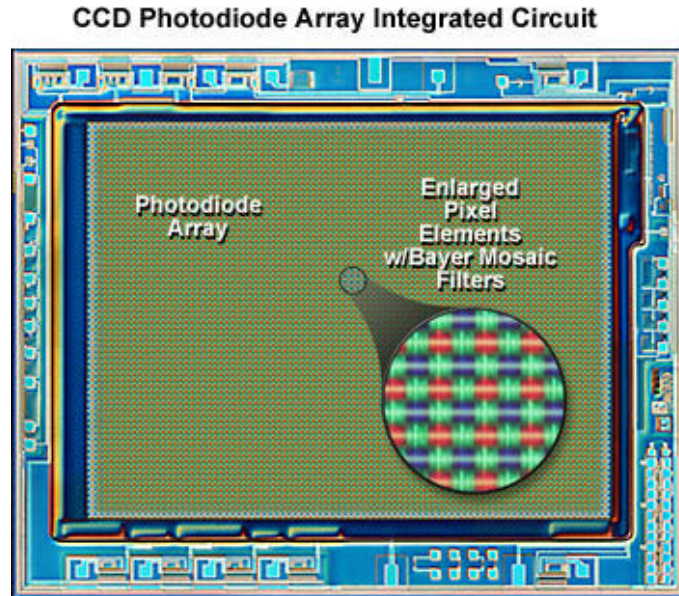


Figure 2

Schema einer Konfiguration für Epi-Fluoreszenz-Mikroskopie

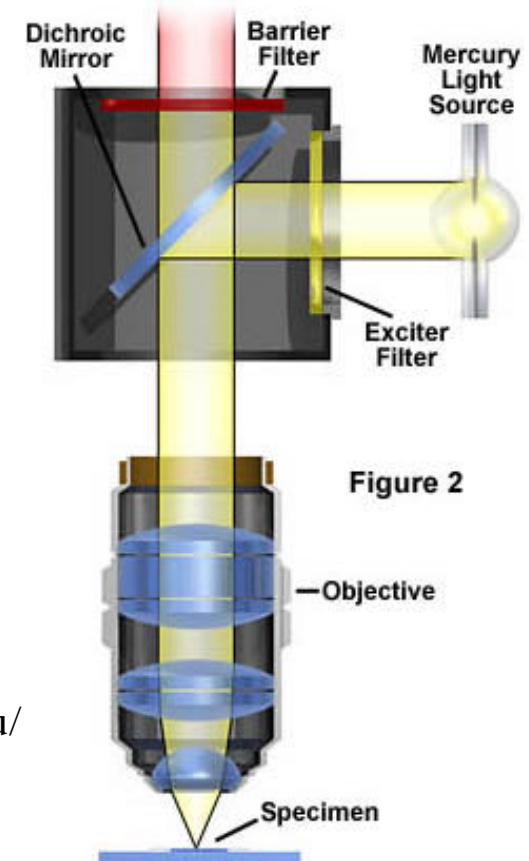


Figure 2

Ausführliche Information zu modernen Techniken der Mikroskopie:

<http://www.microscopy.fsu.edu/primer/index.html>

Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

Anwendung: Vergleich der Bewegung monomerer und dimerer Kinesine

- Kinesin KIF1A Konstrukt **C351 (Monomer)**
- Konstrukt eines konventionellen Kinesins **K381 (Dimer)**

Das monomere Motorprotein („Einzelkopf“-Struktur) der Familie KIF1A zeigt entgegen der Erwartung aus den bisherigen Vorstellungen über prozessive Bewegungen von Motorproteinen („hand-over-hand“ Modell) eine translatorische Bewegung entlang des Filaments von ca. 1.2 $\mu\text{m/s}$. Um diese Eigenschaften genauer zu untersuchen wurde ein geeignetes Konstrukt (C351) hergestellt.

—————> **Untersuchung der prozessiven Bewegung des C351**

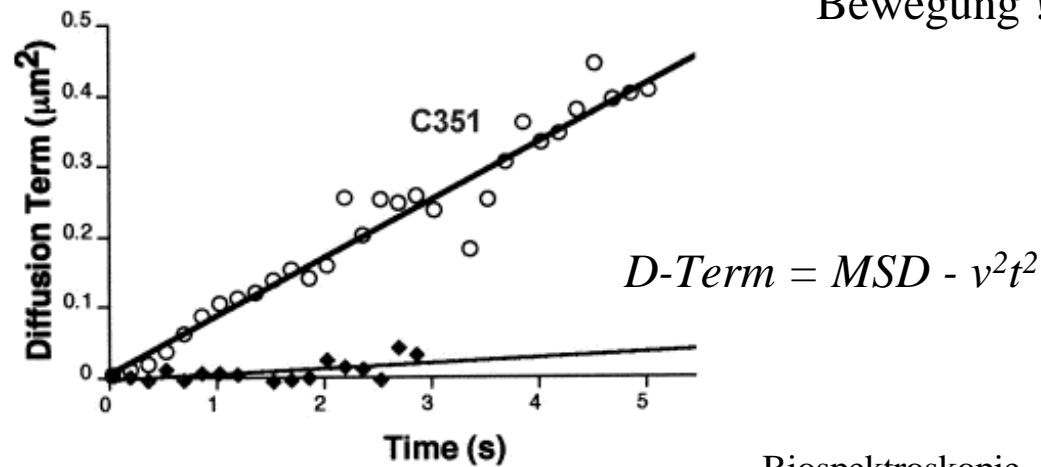
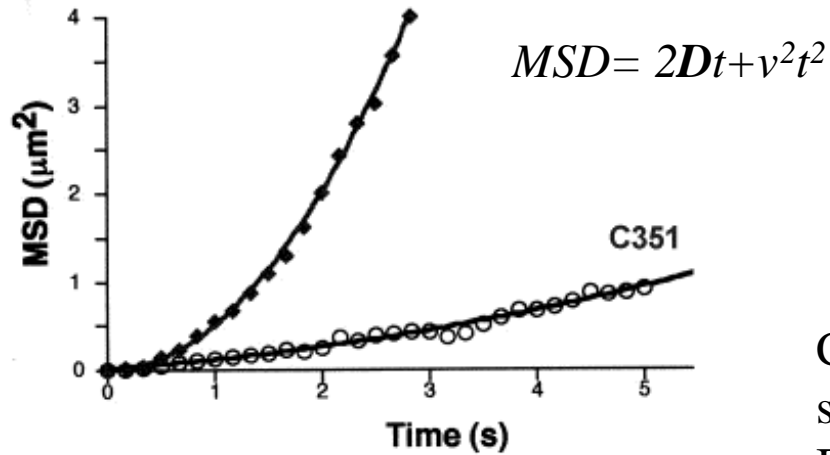
Okada et al. Nature, 1999

Prozessiver "Einzelkopf"-Motor

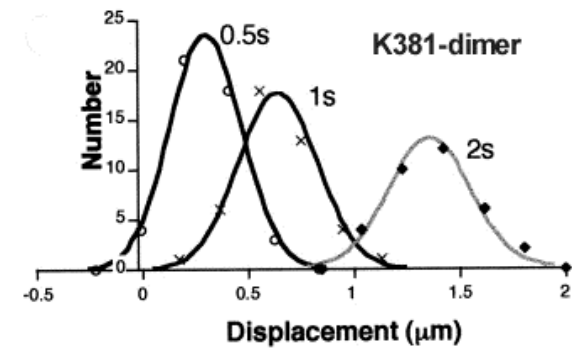
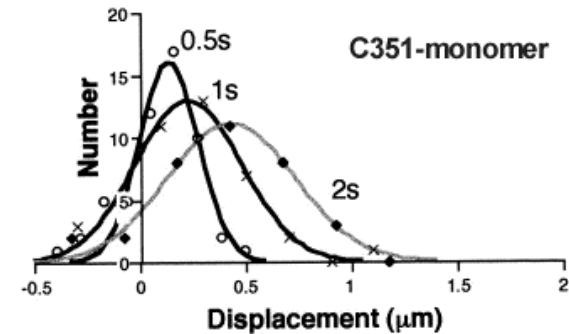
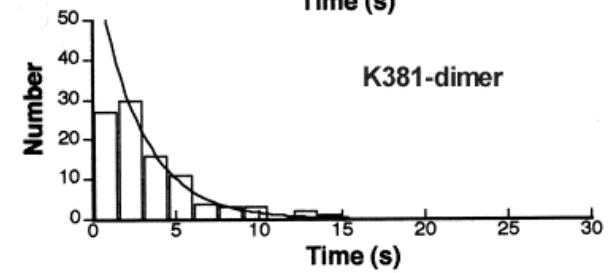
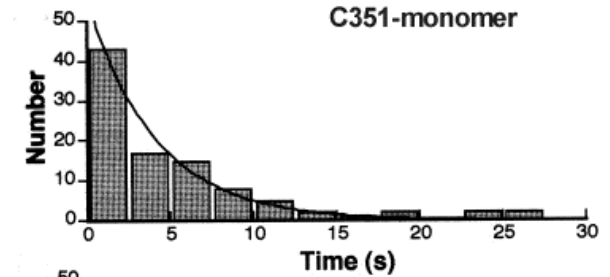
Vergleich:

Kinesin KIF1A Konstrukt **C351 (Monomer)**

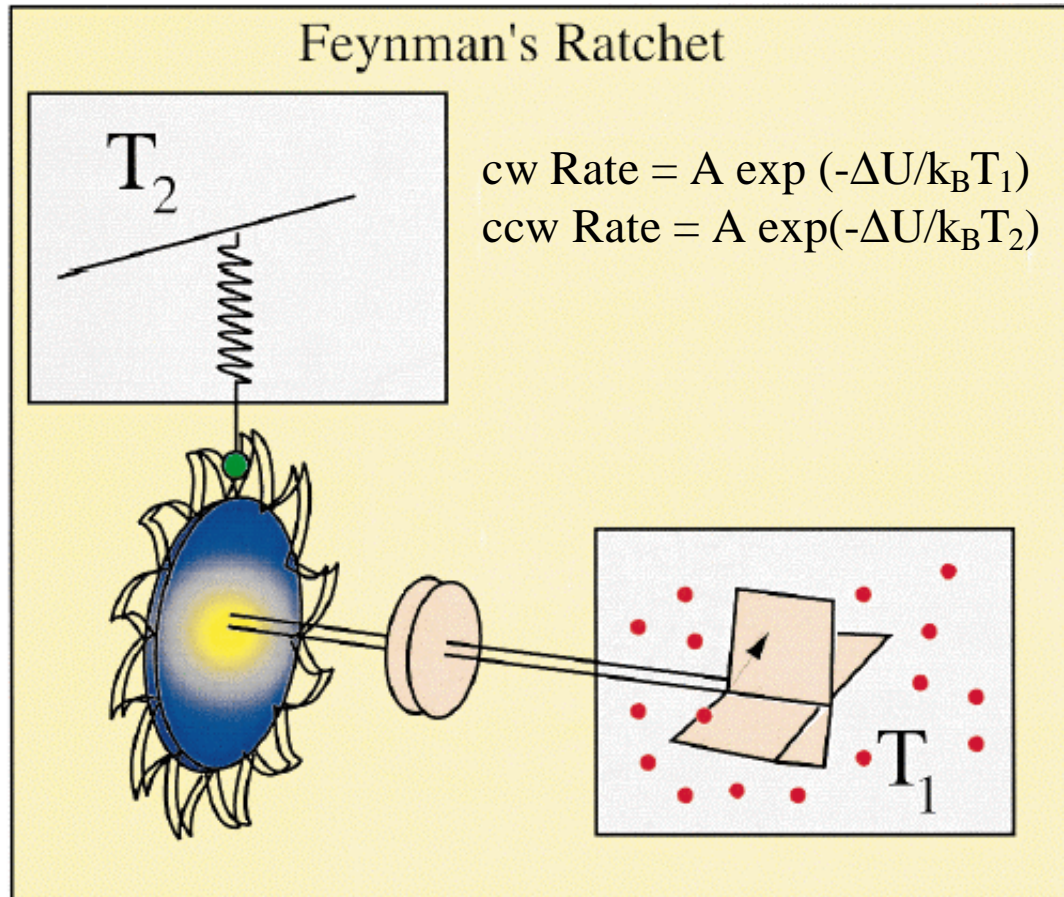
Konstrukt eines konventionellen Kinesins **K381 (Dimer)**



C351:
stark diffusive
Bewegung !



Brownscher Motor



Das Model für einen
Brown'schen Motor

Franz Josef Elmer, UNI Basel

<http://monet.physik.unibas.ch/~elmer/bm/index.html>

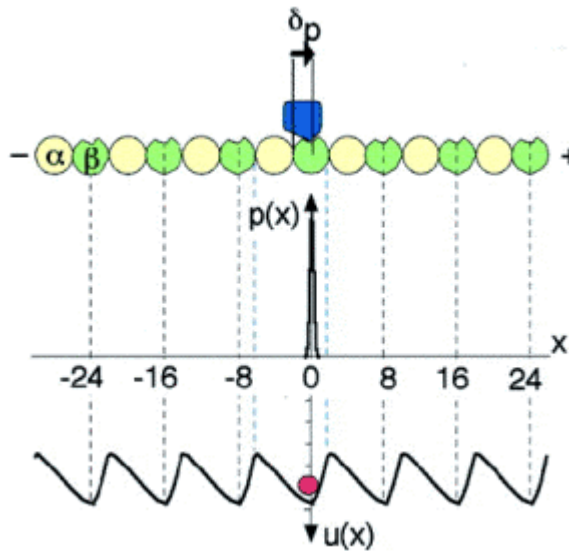
**„Bestandteile“ des
Brown'schen Motors**

- thermische Stöße
- zeitlich fluktuierendes
asymmetrisches Potential
(=>Energieverbrauch !!)

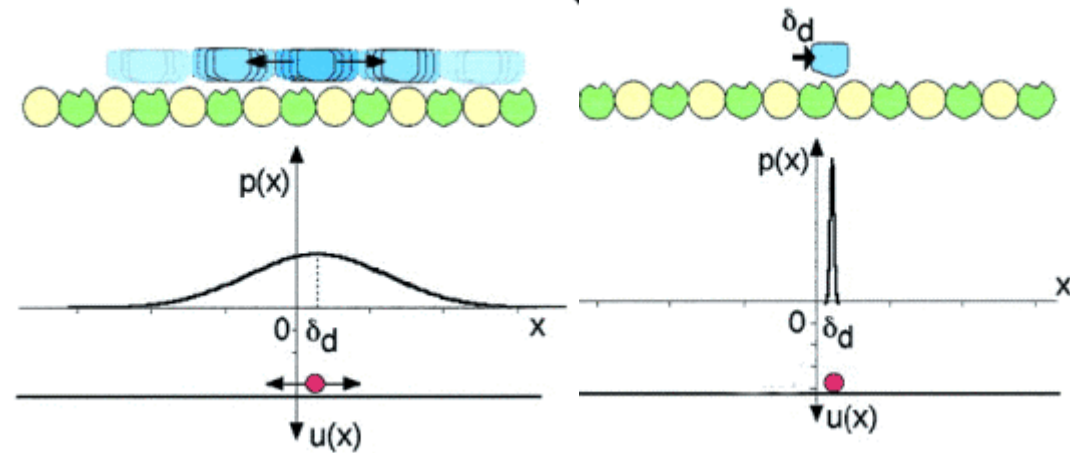
Diffusive Bewegung ermöglicht
gerichtete Bewegung !

Modell einer prozessiven Bewegung: Brownscher Motor

fest gebunden



leicht gebunden



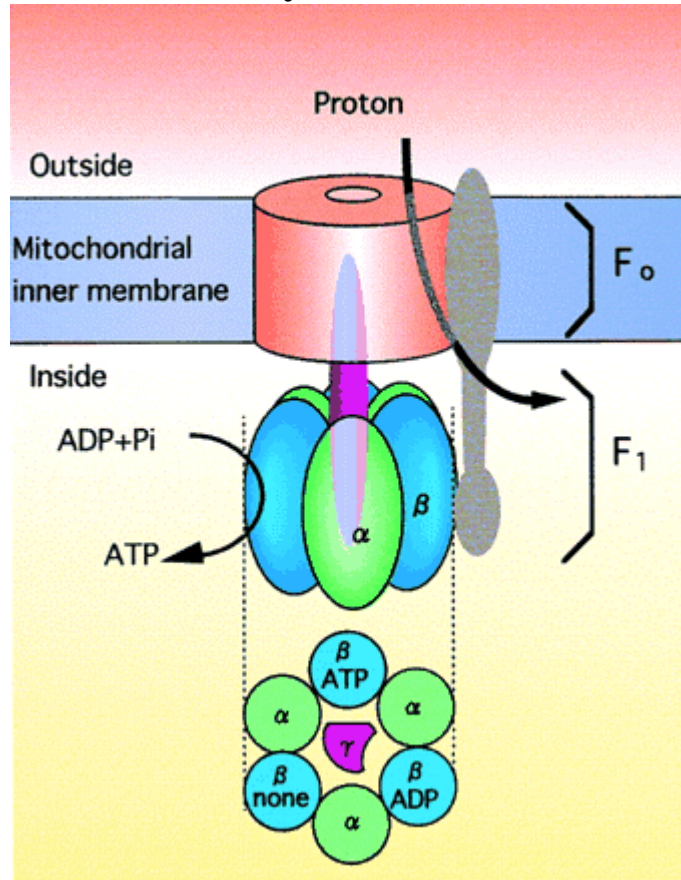
Die Energie der ATP-Hydrolyse schaltet nur das An- und Abkoppeln zum Filament.
Die eigentliche Vorwärtsbewegung kommt aus thermischen Stößen der Umgebung.

Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

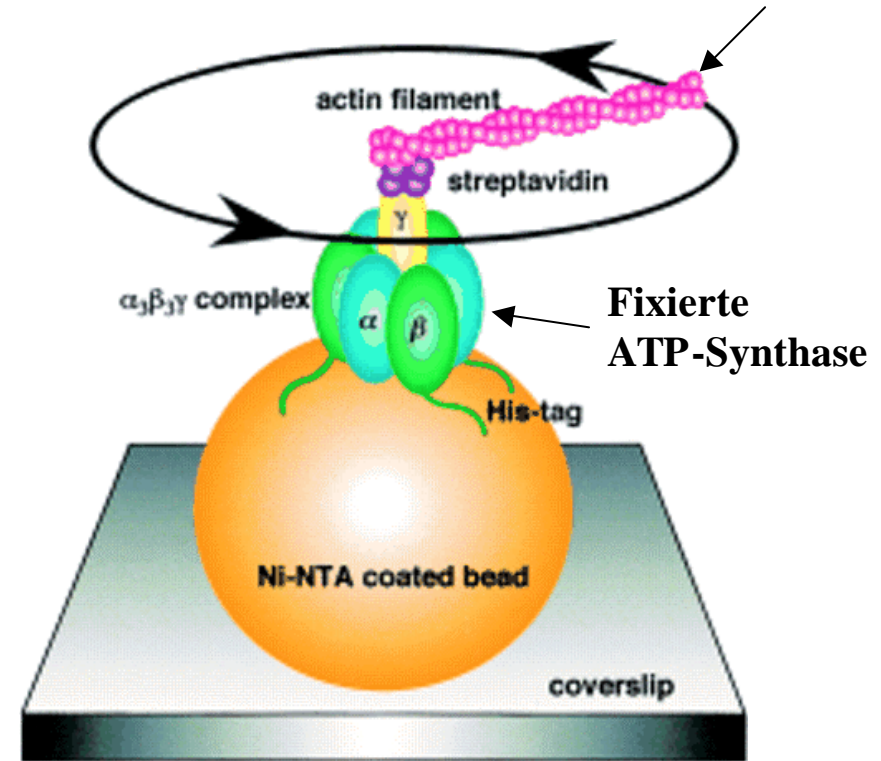
Fluoreszenzmikroskopie

Beobachtung eines rotatorischen Motors: die ATP-Synthase

Protonen ATP-Synthase in der Membran



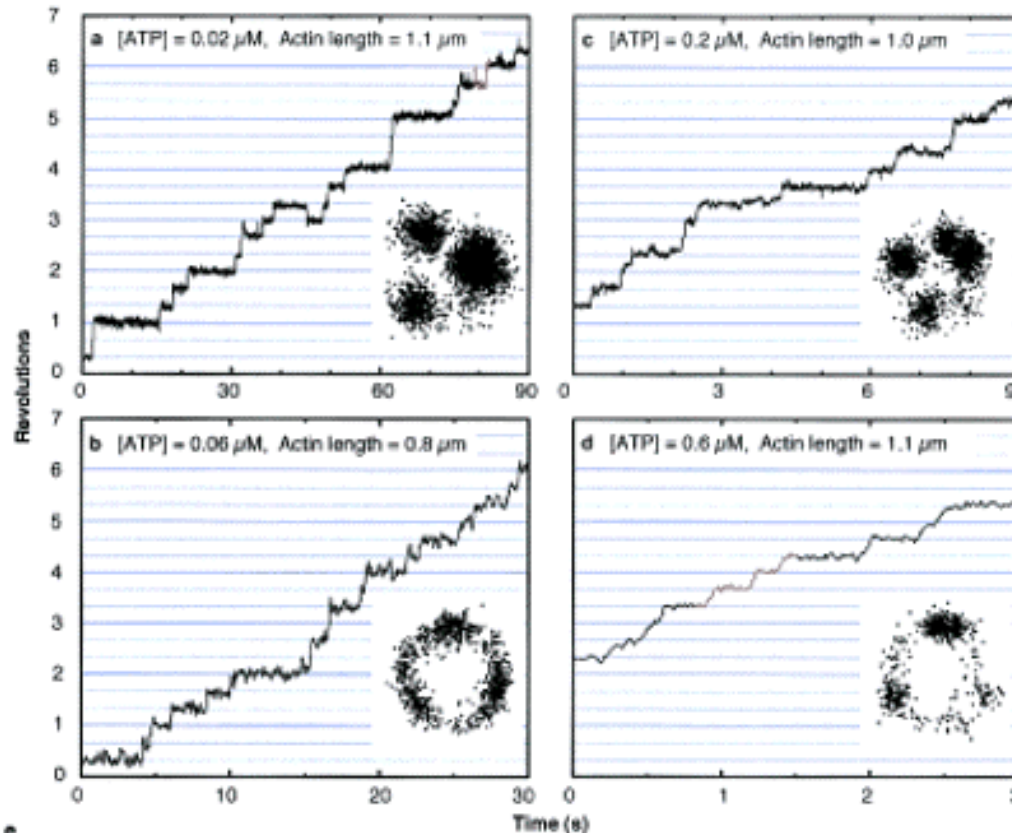
Fluoreszenzmarkiertes Filament



ATP-Synthase in der Versuchsanordnung

Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

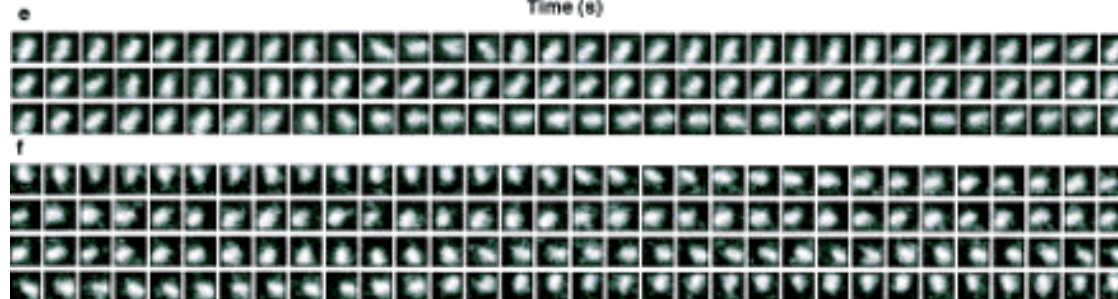
Sprunghafte Rotation bei niedriger ATP Konzentration



- Es werden diskrete 120° Sprünge bei der Rotation vollzogen
- jeder 120° Sprung ist mit der Hydrolyse eines ATP verbunden
- Drehmoment für $2\pi/3 \sim 80$ pN nm
 $\Delta G_{\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}} \sim 80$ pN nm
 $\Rightarrow \sim 100\%$ Effizienz !!

Wie funktioniert der Motor in der Natur ® ATP-Synthese ?

Intervallzeit:



33 ms

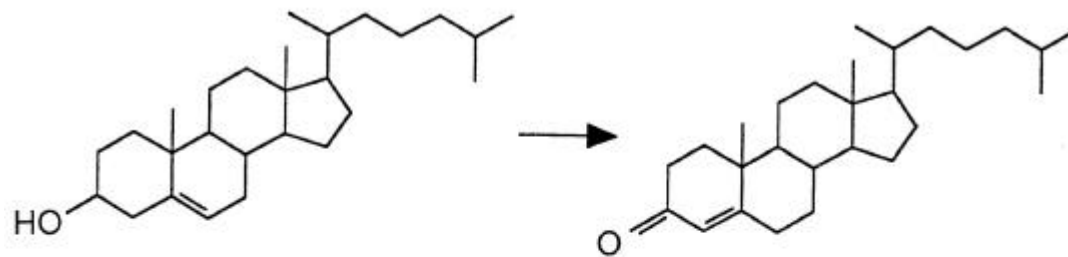
5 ms

Fluoreszenzspektroskopie

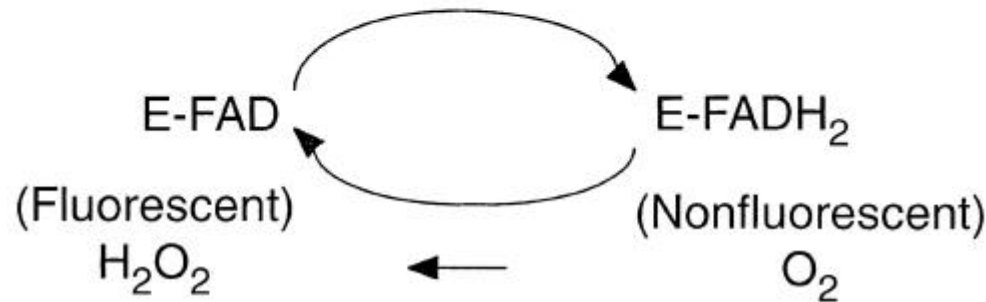
Einzelmolekül Enzymologie

Beispiel: Flavoenzym Cholesterol Oxidase (COx)

Bestandteil des aktiven Zentrum der Oxidase ist ein Flavin-Adenin Dinukleotid (FAD)
Das FAD (fluoreszierend) wird durch Cholesterol reduziert zu FADH₂ (nicht fluoreszierend)
und kann dann wieder durch O₂ oxidiert werden (wieder fluoreszierend).

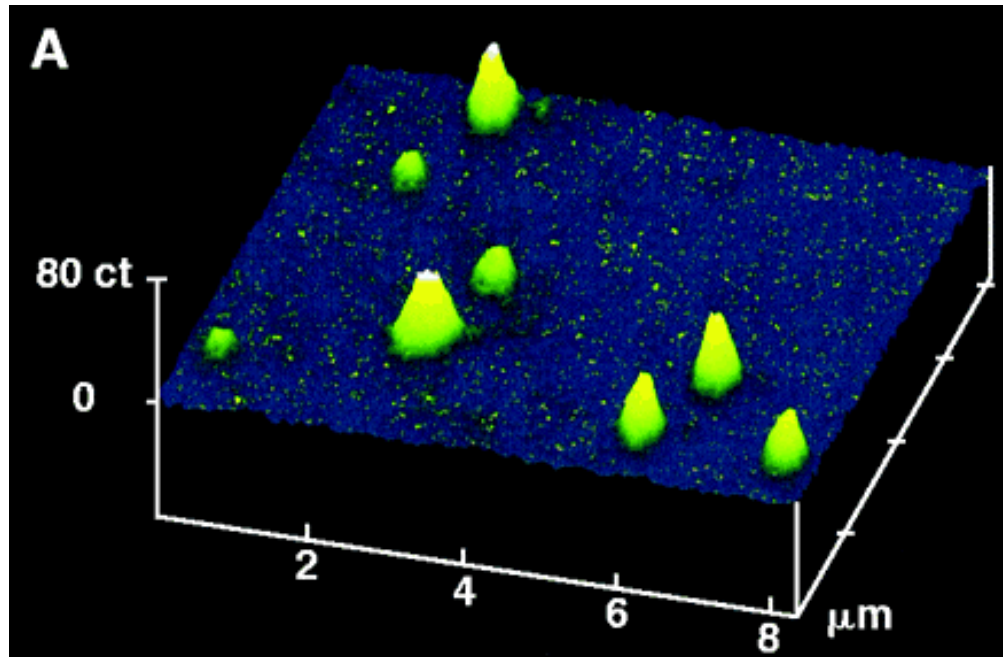


Zeitabhängige Beobachtung
der FAD - Fluoreszenz

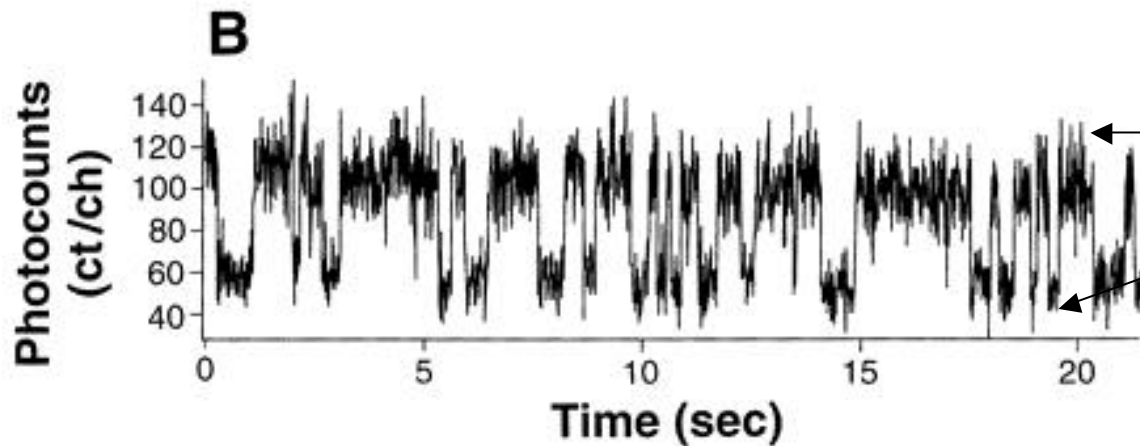


Fluoreszenzspektroskopie

Einzelmolekül Enzymologie Flavoenzym Cholesterol Oxidase (COx)



- COx-Moleküle immobilisiert in Agarose-Gel (λ_{em} : 520 nm, λ_{exc} = 442 nm)
- kleine Substratmoleküle wie Cholesterol und Sauerstoff sind frei beweglich

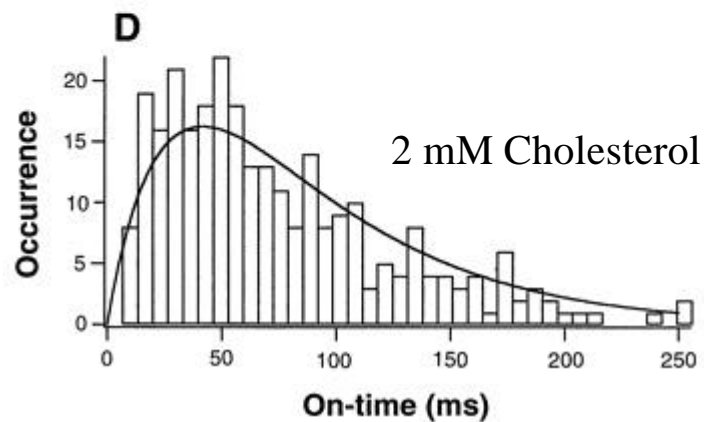
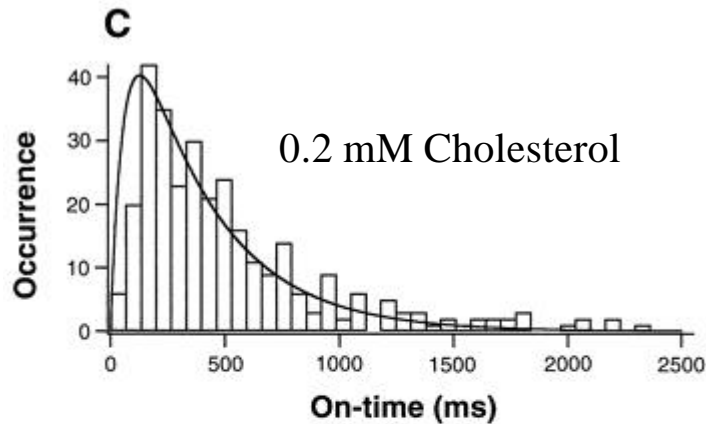


Echtzeitbeobachtung des enzymatischen Umsatzes
oberes Niveau:
oxidiert (fluoreszierend)
unteres Niveau:
reduziert (nicht-fluoreszierend)

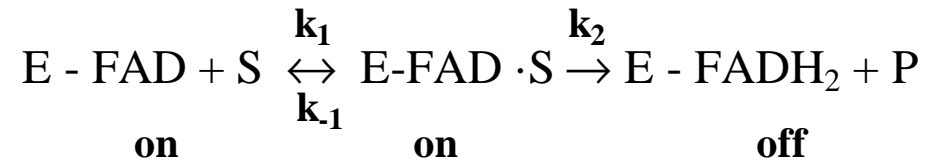
Fluoreszenzspektroskopie

Einzelmolekül Enzymologie Flavoenzym Cholesterol Oxidase (COx)

Zeitliche Verteilung der FAD-Zustände am Einzelmolekül („on-state“)



Michaelis-Menten Mechanismus



Fitkurven:

$$p(\text{on}) = k_1 k_2 / (k_2 - k_1) [\exp(k_1 t) - \exp(k_2 t)]$$

0.2 mM Cholesterol

$$k_1 = 2.9 \text{ s}^{-1}; k_2 = 17 \text{ s}^{-1}, k_{-1} = 0 \text{ s}^{-1}$$

2 mM Cholesterol

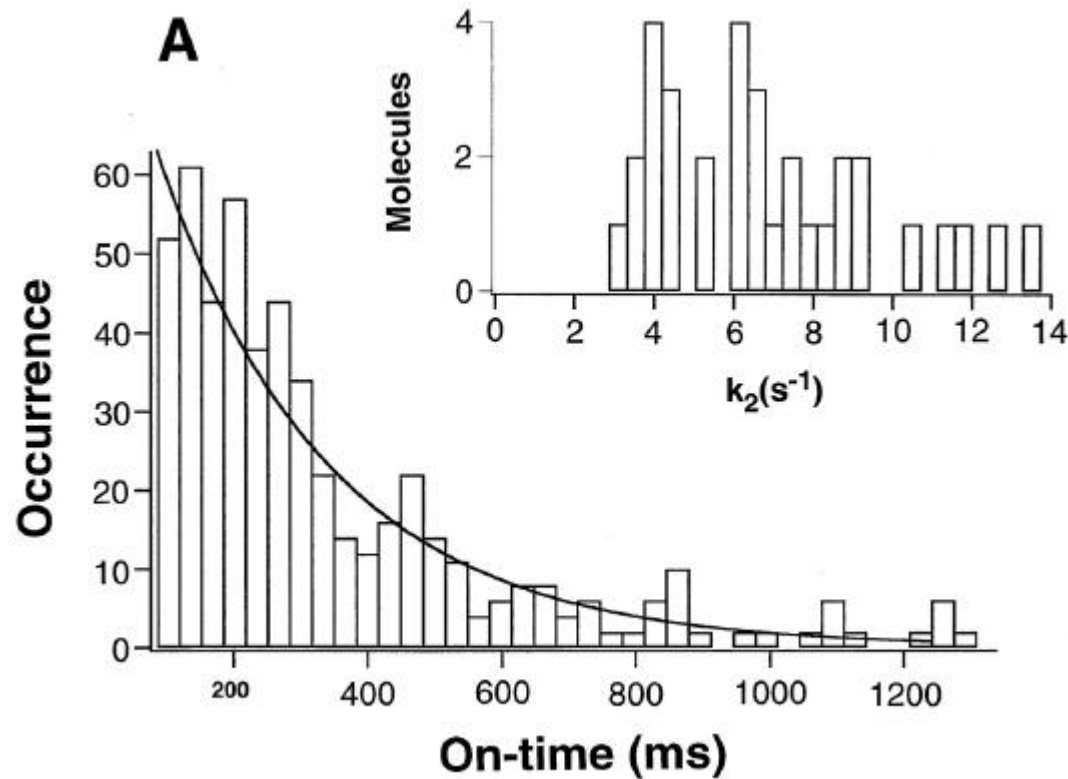
$$k_1 = 33 \text{ s}^{-1}; k_2 = 17 \text{ s}^{-1}, k_{-1} = 0 \text{ s}^{-1}$$

→ **Breite Verteilung der Raten !!**

Fluoreszenzspektroskopie

Einzelmolekül Enzymologie Flavoenzym Cholesterol Oxidase (COx)

Statische Heterogenität



Breite Verteilung der Zerfallszeiten für k_2 von 33 COx Molekülen (gleich gereinigte Enzyme)

=> **statische Heterogenität durch verschiedene Konformere**

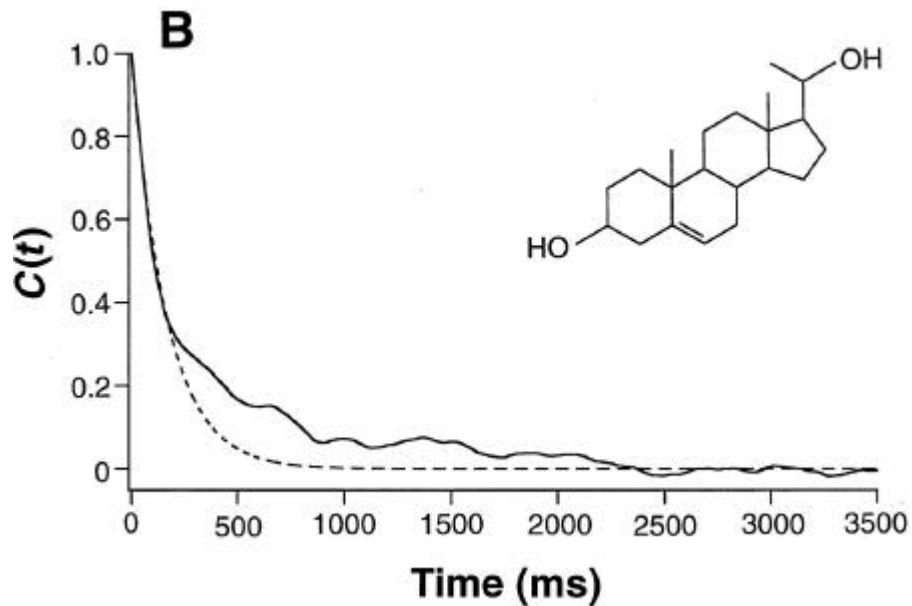
Messung mit Cholesterolderivat (2 mM) verlangsamt k_2 Raten ($\langle k_2 \rangle = 3.9 \text{ s}^{-1}$) (ein individuelles Molekül)

=> monotoner Abfall („single exponential fit“)

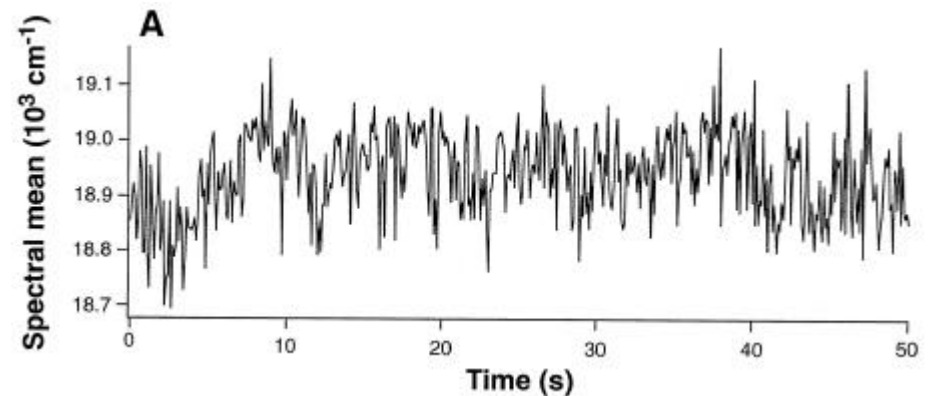
Fluoreszenzspektroskopie

Einzelmolekül Enzymologie Flavoenzym Cholesterol Oxidase (COx)

Dynamische Unordnung



Autokorrelationsfunktion eines Einzelmoleküls lässt sich nicht mit einer einzelnen e-Funktion beschreiben. Komplexeres Verhalten:
=> dynamische Unordnung



Spektrale Fluktuationen (ohne Substrat) deuten auf Konformationsfluktuationen hin !!