

AUS DEN SCHRIFTEN VINCENTS

Über das Leuchten der Moleküle

Eine Abhandlung über Photophysik, Fluoreszenz und Marker

Ausgehend von den Beobachtungen an fluoreszierenden Stoffen:
von diskreten Energiezuständen über die Wege angeregter
Moleküle bis zu Markern, FRAP und FRET.

Quellengrundlage: Vorlesung BMO1 „Photophysik, Chromophore und Fluorophore“, Kompetenzliste ME4420

INHALT

1. Licht als Paket und Welle
2. Erlaubte Energien
3. Warum Molekülspektren breit werden
4. Was mit der aufgenommenen Energie geschieht
5. Wie hell und wie lange ein Fluorophor leuchtet
6. Aus dem Ausbleichen wird eine Messung
7. Wie man biologische Strukturen sichtbar macht
8. Nähe messen, die das Mikroskop nicht auflösen kann

ERSTE ABHANDLUNG

Licht als Paket und Welle

Warum ein Molekül nicht jede Farbe schluckt

Die Scherbe hatte mir beigebracht, Licht nach Energie und Verteilung zu vermessen. Für Fluoreszenz reicht das nicht. Ein Molekül reagiert nicht auf „Licht im Allgemeinen“, sondern auf einzelne Energieportionen. Für Absorption und Emission ist deshalb das Photonenbild besonders nützlich.

Ein Photon besitzt die Energie $E_\gamma = h\nu = hc/\lambda$. Kürzere Wellenlänge bedeutet höhere Photonenenergie. Die Wellenbeschreibung bleibt gleichzeitig notwendig, wenn Ausbreitung, Interferenz oder Polarisierung betrachtet werden. Photophysik verlangt beides: Welle für die Ausbreitung, Photon für diskrete Energieüberträge.

In der Spektroskopie wird außerdem häufig die Wellenzahl $\bar{\nu} = 1/\lambda$ in cm^{-1} benutzt. Anders als λ wächst sie mit Frequenz und Photonenenergie.

MATHEMATISCHE BEZIEHUNGEN

$E_\gamma = h\nu = hc/\lambda$
$\bar{\nu} = 1/\lambda$
$p = h/\lambda$

Quellenbezug: Vorlesung Photophysik, Folien 3-6; Kompetenzliste: duale Natur des Lichtes.

ZWEITE ABHANDLUNG

Erlaubte Energien

Vom Atom zum Chromophor

Atome zeigen scharfe Linien, weil nur diskrete Energiezustände besetzt werden können. Moleküle besitzen ebenfalls quantisierte elektronische Zustände, aber ihre Elektronen sind auf Molekülorbitale verteilt. Besonders wichtig sind π -Elektronen in konjugierten und aromatischen Systemen.

Als grobes Denkmodell taugt das Teilchen im eindimensionalen Kasten: $E_n = n^2 h^2 / (8mL^2)$. Wird der „Kasten“ länger, rücken die Energieniveaus enger zusammen. Bei ausgedehnten konjugierten π -Systemen können dadurch elektronische Übergänge in den sichtbaren Bereich rücken. Das Modell ist kein exaktes Molekülmodell, erklärt aber die Richtung des Effekts.

Ein Chromophor ist der Teil eines Moleküls, dessen elektronische Struktur für eine charakteristische Absorption verantwortlich ist. Häm, Chlorophyll, Fluorescein, Rhodamine und die Chromophore fluoreszierender Proteine sind Beispiele optisch aktiver Systeme.

MATHEMATISCHE BEZIEHUNGEN

$$E_n = n^2 h^2 / (8mL^2)$$

Quellenbezug: Vorlesung Photophysik, Folien 9-18; CampusLab BMO1-13.

Warum Molekülspektren breit werden

Elektronen, Schwingungen und Rotation

Ein Molekül besitzt nicht nur elektronische Zustände. Zu jedem elektronischen Zustand gehören viele Schwingungszustände, zu diesen wiederum dicht liegende Rotationszustände. Deshalb besteht ein molekularer Übergang meist aus vielen nahe beieinanderliegenden Teilübergängen.

Energetisch gilt grob: elektronische Übergänge > Schwingungsübergänge > Rotationsübergänge. In Gasen kann man einzelne Strukturen oft noch auflösen; in Lösung oder Gewebe verbreitern Wechselwirkungen mit der Umgebung die Banden zusätzlich.

Damit erklärt sich ein entscheidender Unterschied: Atome liefern häufig scharfe Linien, Moleküle häufig breite Absorptions- und Emissionsbanden. Diese Breite ist später wichtig für Filter, Markerwahl und FRET.

Quellenbezug: Vorlesung Photophysik, Folien 19-28; CampusLab BMO1-14.

VIERTE ABHANDLUNG

Was mit der aufgenommenen Energie geschieht

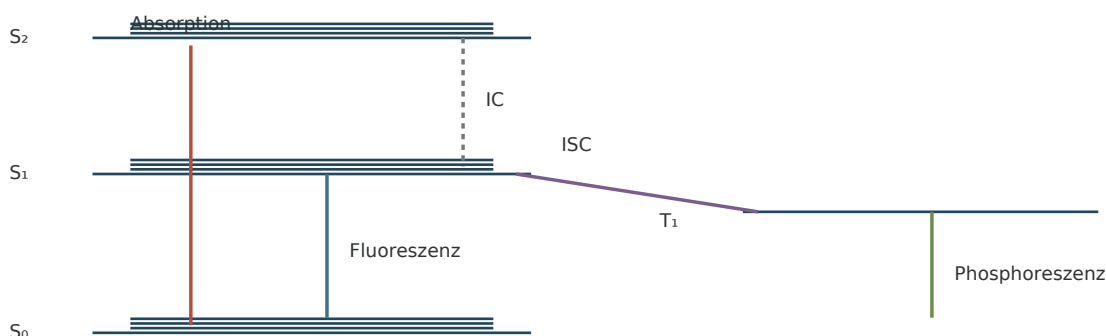
Jablonski-Diagramm, Singulett und Triplett

Nach der Absorption befindet sich ein Molekül zunächst in einem angeregten elektronischen Zustand. Von dort führen mehrere Wege zurück. Das Jablonski-Diagramm ist im Grunde eine Landkarte dieser Wege.

Schwingungsrelaxation und innere Konversion sind nichtstrahlende Prozesse. Fluoreszenz ist eine strahlende Rückkehr zwischen Singulettzuständen. Durch Intersystem Crossing (ISC) kann das Molekül in einen Triplettzustand wechseln; von dort kann Phosphoreszenz erfolgen. Weil ein Spinwechsel formal verboten ist, sind Triplettprozesse typischerweise deutlich langsamer.

Die Spinmultiplizität lautet $M = 2S + 1$. Singulett: $S = 0$, $M = 1$. Triplett: $S = 1$, $M = 3$. ISC wird durch Spin-Bahn-Kopplung möglich, obwohl der reine Spinübergang nach der Auswahlregel verboten wäre.

In der Vorlesung werden typische Zeitskalen angegeben: Absorption etwa fs, Fluoreszenz meist im ns-Bereich und Phosphoreszenz von ms bis weit in den Sekundenbereich. Das sind Größenordnungen, keine universellen Konstanten.



Schema der wichtigsten strahlenden und nichtstrahlenden Übergänge.

MATHEMATISCHE BEZIEHUNGEN

$$M = 2S + 1$$

Quellenbezug: Vorlesung Photophysik, Folien 29 und 69; Kompetenzliste: Jablonski, Singulett/Triplett.

FÜNFTE ABHANDLUNG

Wie hell und wie lange ein Fluorophor leuchtet

Stokes-Verschiebung, Quantenausbeute, Lebenszeit und Bleaching

Für einen Fluoreszenzmarker genügt „er fluoresziert“ nicht. Entscheidend sind Anregbarkeit, Quantenausbeute, Lebenszeit, Stokes-Verschiebung und Photostabilität.

Nach einem kurzen Anregungsimpuls fällt die Fluoreszenz eines einfachen Systems näherungsweise exponentiell: $I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$. Die Gesamtzerfallsrate ist die Summe strahlender und nichtstrahlender Raten: $1/\tau = k_r + k_{nr}$.

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F ist die Zahl emittierter Fluoreszenzphotonen geteilt durch die Zahl absorbierter Photonen. Im einfachen Ratenmodell gilt $\Phi_F = k_r / (k_r + k_{nr})$. Lebenszeit und Quantenausbeute sind deshalb verwandt, aber nicht dasselbe.

Photobleaching ist eine irreversible photochemische Zerstörung des Fluorophors. Langlebige Triplettzustände geben Molekülen mehr Zeit für unerwünschte chemische Reaktionen; deshalb fördern sie Bleaching und andere photochemische Nebenwege.

MATHEMATISCHE BEZIEHUNGEN

$I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)}$
$1/\tau = k_r + k_{nr}$
$\Phi_F = k_r / (k_r + k_{nr})$

ZUR TRENNUNG VON LEBENSZEIT UND QUANTENAUSBEUTE

Eine hohe Quantenausbeute bedeutet, dass ein großer Anteil der absorbierten Photonen wieder als Fluoreszenz emittiert wird. Eine lange Lebenszeit bedeutet dagegen lediglich, dass die angeregte Population langsam zerfällt. Beide Größen hängen von den Zerfallsraten ab, sind aber nicht austauschbar.

Quellenbezug: Vorlesung Photophysik, Folien 32-40; CampusLab BMO1-15.

SECHSTE ABHANDLUNG

Aus dem Ausbleichen wird eine Messung

FRAP und molekulare Beweglichkeit

Bleaching ist normalerweise störend. Bei FRAP wird es gezielt als Startsignal benutzt. Ein kleiner Bereich einer fluoreszenzmarkierten Probe wird stark gebleicht; anschließend beobachtet man, wie ungebleichene Moleküle in diesen Bereich diffundieren oder durch Bindungsdynamik ausgetauscht werden.

Die Erholungskurve verrät, wie mobil die markierten Moleküle sind. Die Vorlesung verwendet für eine einfache 2D-Näherung $D = w^2/(4t_{1/2})$, wobei w die Strahlbreite und $t_{1/2}$ die Halbzeit der Fluoreszenzerholung ist. Die genaue Auswertung hängt von Bleach-Geometrie und Modell ab; die Formel ist daher als Vorlesungsnäherung zu verstehen.

FRAP kann laterale Diffusion in Membranen sowie Diffusion und Bindung im Zellinneren untersuchen. Entscheidend ist die Logik: definierter lokaler Verlust → zeitliche Wiederbesiedlung → Rückschluss auf Mobilität und mobilen Anteil.

MATHEMATISCHE BEZIEHUNGEN

$$D \approx w^2/(4 t_{1/2}) \text{ [Vorlesungsnäherung]}$$

Quellenbezug: Vorlesung Photophysik, Folie 41.

Wie man biologische Strukturen sichtbar macht

Farbstoffe, Antikörper, Quantenpunkte und GFP

Ein guter Marker muss nicht nur hell sein. Er braucht passende Anregung, ausreichende Quantenausbeute, Photostabilität, möglichst geringe Toxizität, Wasserlöslichkeit beziehungsweise biologische Verträglichkeit und eine Emissionsfarbe, die sich vom Hintergrund trennen lässt.

Organische Farbstoffe wie Fluorescein, Rhodamine, Cyanine oder Alexa-Fluor-Familien sind klein und vielseitig, können aber bleichen. Quantenpunkte sind Halbleiter-Nanokristalle. Durch Quantum Confinement hängt ihre Emissionsfarbe von der Größe ab: größere Punkte → kleinere effektive Bandlücke → längerwellige Emission. Vorteile sind hohe Helligkeit/Photostabilität, breites Anregungs- und schmales Emissionsspektrum; Nachteile können Toxizität, Aggregation, Organakkumulation und Blinking sein.

Antikörper-Targeting erzeugt Spezifität. Direkt: Primärantikörper trägt den Marker. Indirekt: markierter Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und kann das Signal verstärken.

Fluoreszierende Proteine wie GFP werden genetisch als Fusionsproteine exprimiert. Der Chromophor bildet sich innerhalb des β -Fass-Proteins. Damit lassen sich Proteine in lebenden Zellen verfolgen, ohne nachträglich einen chemischen Farbstoff einzuschleusen.

Markerklasse	Stärken	Grenzen
Organische Farbstoffe	klein, viele Farben, gut konjugierbar	Bleaching; abhängig von Umgebung
Quantenpunkte	hell, photostabil, breit anregbar, schmale Emission	Toxizität/Größe/Aggregation/Blinking möglich
Antikörper-Konjugate	hohe Ziel-Spezifität	groß; meist externe Markierung
Fluoreszierende Proteine	genetisch kodierbar; lebende Zellen	Protein-Fusion kann Funktion beeinflussen

Quellenbezug: Vorlesung Photophysik, Folien 42-60; CampusLab BMO1-16.

ACHTE ABHANDLUNG

Nähe messen, die das Mikroskop nicht auflösen kann

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Zwei Proteine können im Lichtmikroskop am selben Ort erscheinen und trotzdem nicht miteinander wechselwirken. FRET nutzt deshalb keinen besseren Bildpunkt, sondern einen physikalischen Abstandssensor.

Ein angeregter Donor kann Energie nichtstrahlend auf einen nahe gelegenen Akzeptor übertragen. Dafür müssen Donoremission und Akzeptorabsorption spektral überlappen, die Übergangsdipole günstig orientiert sein und der Abstand klein sein. Der Akzeptor wird dabei nicht durch ein vom Donor ausgesandtes Photon angeregt.

Die Effizienz ist extrem abstandsabhängig: $E = 1/[1+(r/R_0)^6]$. Bei $r = R_0$ beträgt sie 50 %. Deshalb ist FRET empfindlich für Abstände im Nanometerbereich und kann Proteininteraktionen oder Konformationsänderungen anzeigen.

Typische Beobachtung: Donorfluoreszenz wird gequencht und Akzeptoremission nimmt zu. Die Interpretation verlangt jedoch Kontrollen, weil direkte Akzeptoranregung, spektrales Übersprechen und Konzentrationseffekte Signale verfälschen können.

MATHEMATISCHE BEZIEHUNGEN

$$E = 1 / [1 + (r/R_0)^6]$$

Quellenbezug: Vorlesung Photophysik, Folien 62-65; Kompetenzliste: FRET.

ANHANG

Ordnung der Beziehungen

Die Prüfung verlangt nicht nur einzelne Definitionen, sondern die Verbindung der Ebenen: Photonenenergie bestimmt, welche Übergänge angeregt werden können; die Molekülstruktur bestimmt die Zustände; vibronische Relaxation und konkurrierende Zerfallswege bestimmen Spektrum, Lebenszeit und Quantenausbeute; Markerchemie übersetzt diese Photophysik in biologische Spezifität; FRAP und FRET machen aus Fluoreszenz schließlich ein Werkzeug für Dynamik beziehungsweise Nanometer-Abstände.

FORMELSAMMLUNG

$E\gamma = h\nu = hc/\lambda$
$\bar{\nu} = 1/\lambda$
$p = h/\lambda$
$E_n = n^2h^2/(8mL^2)$
$M = 2S + 1$
$I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)}$
$1/\tau = k_r + k_{nr}$
$\Phi F = k_r/(k_r + k_{nr})$
$D \approx w^2/(4 t_{1/2})$ [Vorlesungsnäherung]
$E = 1 / [1 + (r/R_0)^6]$

PRÜFUNGSORIENTIERTE SCHLUSSFRAGEN

- Warum sind Molekülspektren breiter als Atomspektren?
- Erkläre ein Jablonski-Diagramm vollständig.
- Was unterscheidet Quantenausbeute und Fluoreszenzlebenszeit?
- Wie funktioniert FRAP und welche Größe wird daraus gewonnen?
- Vergleiche organische Farbstoffe, Quantenpunkte, Antikörpermarker und GFP.
- Warum kann FRET Proteininteraktionen anzeigen, obwohl das Lichtmikroskop die beteiligten Proteine nicht räumlich trennt?