

Praktikum: Instrumentelle Bioanalytik

Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

In diesem Versuch soll die Fluoreszenzlöschung von Humanalbumin (*Human Serum Albumin* (HSA)) durch 3-Hydroxyflavone (3-HF) ermittelt werden, um den Abstand des FRET-Paares 3-HF/HSA bestimmen zu können. Hierbei werden mehrere Fluoreszenzspektren mit unterschiedlichen 3-HF Konzentrationen gemessen, um Aufschluss über die Fluoreszenzintensität zu erhalten.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors ohne dessen Zerstörung wird allgemein als Quenching bezeichnet. Dabei wird zwischen dynamischem, statischem und dem Quenching durch Fluoreszenz/Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterschieden. Bei ersterem wird die Energie des angeregten Fluorophores durch Stöße auf ein Quenchemolekül übertragen. Die Energie geht in Form von Wärme verloren. Bei der statischen Fluoreszenzlöschung findet die Bildung eines nicht, oder schwach fluoreszierenden Komplexes zwischen Fluorophor und Quenchemolekül statt. FRET hingegen wird durch dipolare Wechselwirkungen zweier Fluorophore vermittelt. Ein FRET-Paar besteht dabei aus einem Donor und einem Akzeptor. Eine wichtige Bedingung für einen effizienten Transfer ist ein hoher Überlapp zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors.

wichtige Hinweise

Ein bestandenes Kolloquium vor dem Versuch ist Bedingung für die Ausführung des Versuchs. Wird das Kolloquium nicht bestanden, wird es zu einem Nachholtermin kommen. Das Protokoll muss bis spätestens morgens 9:00 Uhr dem auf den Versuch folgenden vierten Tag abgegeben werden.

1. Theoretische Grundlagen

Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Bei dem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (auch Förster-Resonanzenergietransfer) handelt es sich um einen wichtigen physikalischen Prozess der Energieübertragung, wobei die Energie von einem Donor auf einen Akzeptor übertragen wird. Hierbei ist eine Voraussetzung für den Energietransfer, dass die Energiemenge, welche vom Donor übertragen wird im Bereich der möglichen Energieaufnahme des Akzeptors liegt.

Das bedeutet, das Überlappungsintegral J muss hierbei ungleich 0 sein.

$$J = \epsilon_A(\lambda_{Em}^D)\lambda_{Em}^D{}^4$$

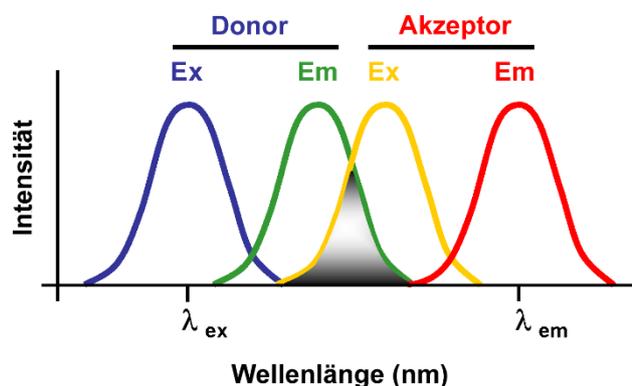


Abb. 1 Anregungs (Ex) - und Emissionsspektrum (Em) von Donor bzw. Akzeptor. Der Überlappungsbereich (grau gekennzeichnet) von Emissionsspektrum des Donors und Anregungsspektrum des Akzeptors zeigt die Möglichkeit eines strahlungslosen Energieübertrags.

$\varepsilon_A(\lambda_{Em}^D)$ ist dabei der Extinktionskoeffizient ($\varepsilon_A(\lambda_{Em}^D) = 9064 \cdot 10^{17} \pm 10 \cdot 10^{17}$) der zu untersuchenden Lösung bei der Emissionswellenlänge λ_{Em}^D des Donors. Diese Formel ist unter der Annahme gültig, dass das Emissionsspektrum des Donors eine infinitesimale Linienbreite aufweist. Die Folge eines effizienten Transfers ist die Beobachtung von Fluoreszenz des Akzeptors bei Einstrahlung der Absorptionswellenlänge des Donors.

Dies kann in der Fluoreszenzspektroskopie mit einem Fluoreszenzspektrometer beobachtet werden. Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt dabei die Abschwächung der Anfangsintensität I_0 bei Durchgang durch ein Medium mit einer absorbierenden Substanz. Die Abnahme ist abhängig von der Schichtdicke d und der Konzentration c .

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_\alpha * c * d$$

Im Gegensatz zur Absorptionsspektroskopie, in der direkt hinter der Küvette detektiert wird, sitzt der Detektor in der Fluoreszenzspektroskopie um 90° versetzt. Damit wird gewährleistet, dass möglichst kein Direktlicht der Lichtquelle den Detektor erreicht. Die Abbildung 2 zeigt den allgemeinen, stark vereinfachten Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers. Die Lichtquelle emittiert weißes Licht, über den Monochromator kann die Einstrahlwellenlänge selektiert werden, die auf die Küvette und damit die Probenlösung trifft.

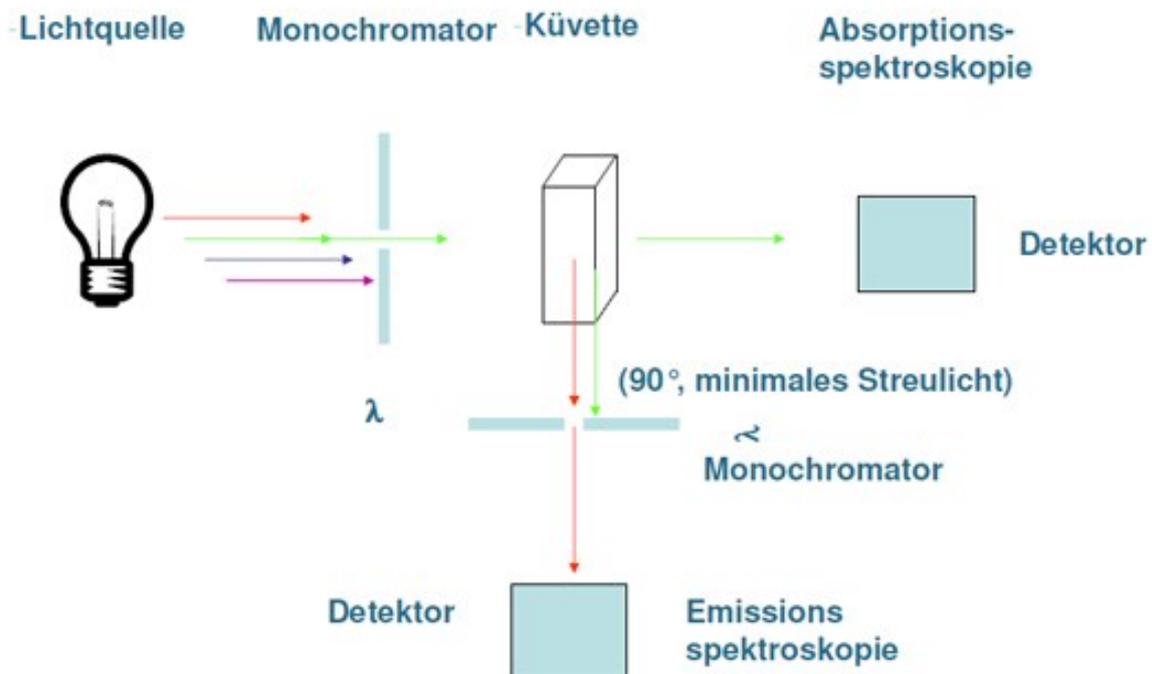


Abb. 2 Skizzierter Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

Unterschiedliche Energietransfermechanismen

Energietransferprozesse können in intermolekulare- und intramolekulare Energietransfers unterschieden werden. Bei einem intermolekularen Transfer wird die Anregungsenergie von einem Molekül zum anderen übertragen. Bei einem intramolekularen Transfer hingegen wird die Energie innerhalb eines Moleküls übertragen. Der elektronische Energietransfer allgemein ist die Übertragung der Anregungsenergie eines angeregten Donor-Moleküls D^* auf ein Akzeptor-Molekül A. Dies stellt einen zweistufigen Prozess dar:

- 1) $D^* \rightarrow D + h\nu$
- 2) $h\nu + A \rightarrow A^*$

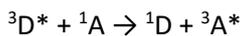
Dabei emittiert das angeregte Molekül D^* ein Photon, welches von A absorbiert wird.

Strahlungslose Energieübertragung

Es gibt zwei Formen des strahlungslosen Energietransfers

- a) Zusammenstoß bzw. Austauschwechselwirkung (Dexter-Energietransfer)
- b) Coulomb-Wechselwirkung (Förster-Energietransfer)

Bei dem Energietransfer nach Dexter „stoßen“ die beteiligten Orbitale zusammen, damit kommt es zum Austausch des angeregten Elektrons des Donors mit einem unangeregten Elektron des Akzeptors.



Die Spinwechselwirkungen nehmen hierbei exponentiell mit dem Abstand ab und sind nur bei $r < 1$ nm effektiv. Bei dem Dexter-Energietransfer sind zudem Singulett-Singulett Übergänge als auch Triplett-Triplett-Übergänge möglich.

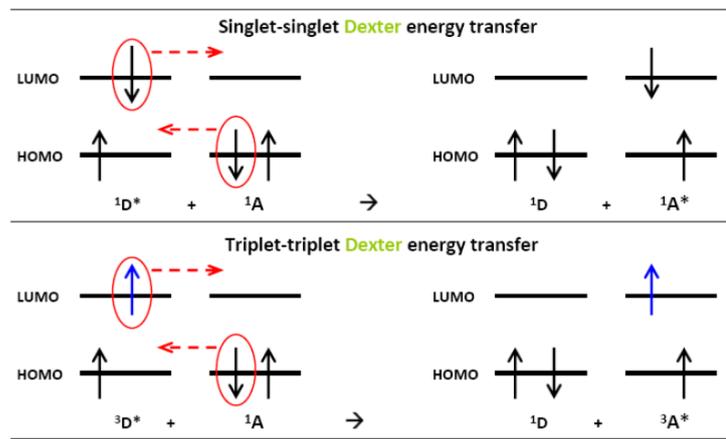


Abb. 3 Schematische Darstellung des Dexter-Energie-Transfers mit den beiden möglichen Übergängen

In Abb. 4 sind die Vorgänge beim Förster-Mechanismus schematisch dargestellt:

Die Desaktivierung von D^* und Anregung von A sind miteinander gekoppelt. Die Kopplung erfolgt durch eine Coulombsche Dipol-Wechselwirkung. Zu beachten ist, dass kein räumlicher Kontakt (wie beim Stoßmechanismus)

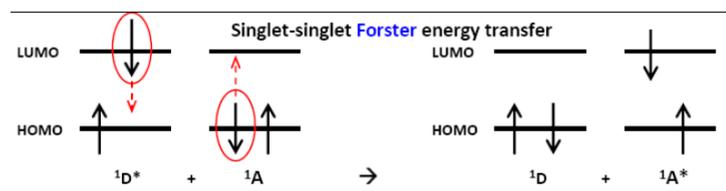


Abb. 4 Schematische Darstellung des Förster-Energie-Transfers

zwischen den Molekülen erforderlich ist, damit diese Form der Energieübertragung möglich wird.

Die Übergangswahrscheinlichkeit für einen Übergang zwischen einem angeregten Zustand und dem Grundzustand wird vom Übergangsdipolmoment bestimmt. Das Übergangsdipolmoment $\langle \mu \rangle$ ist dabei definiert durch

$$\langle \mu \rangle = \int \varphi_2^* (-er) \varphi_1 dV$$

φ_1 die elektronische Wellenfunktion des Moleküls im angeregten Zustand

φ_2 die konjugiert komplexe elektronische Wellenfunktion des Moleküls im Grundzustand

e die elektrische Ladung

r die Ortskoordinate.

Das Integral gibt die Verschiebung der Ladungswolke zwischen dem angeregtem und Grundzustand bei einem induzierten Übergang durch das elektromagnetische Wechselfeld des Lichts wieder. Die Übergangsdipolmomente des Donors und Akzeptors können nun strahlungslos die Anregungsenergie transferieren.

FRET-Effizienz

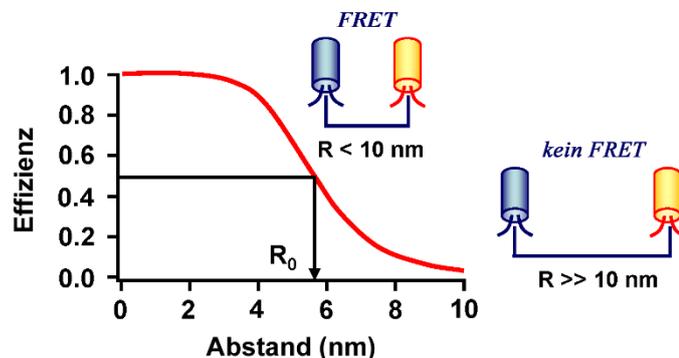
Eine wichtige Größe ist die FRET-Effizienz E , welche die Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Diese spiegelt die Effizienz des Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor wider und ist wie folgt definiert:

$$E = \frac{\text{Anzahl der Energietransfers pro Zeitintervall}}{\text{Anzahl der Donoranregungen}} = \frac{k_{ET}}{k_f + k_{ET} + \sum_i k_i}$$

k_{ET} ist dabei die Rate der durch Energietransfer hervorgerufenen Übergänge, diese wird zur Summe aller möglichen Übergangsarten ins Verhältnis gesetzt.

k_f stellt dabei die Fluoreszenz-Übergangsrate dar, k_i die durch alle übrigen Mechanismen verursachte Übergangsrate.

Um einen effektiven Transfer zu ermöglichen, dürfen Donor und Akzeptor nur wenige nm Abstand voneinander haben. Die Transferrate k_{ET} zeigt dabei folgende Abstandsabhängigkeit, welche in Abb. 5 skizziert ist.



k_D ist die Strahlungsemissionsrate des Donorfarbstoffs, R_0 der sogenannte Förster-Radius des Donor-Akzeptor Paares. Dieser stellt den Abstand zwischen Donor und Akzeptor dar, bei dem eine Energieübertragung zu 50% erfolgt. Der Förster Radius lässt sich mit Hilfe folgender Formel berechnen:

Abb.5 Die rote Kurve zeigt den Verlauf der Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz E für einen Förster-Radius R_0 um die 6 nm. Im Bereich um den Försterradius kann der Abstand besonders genau bestimmt werden, da hier die Steigung der Kurve betragsmäßig am größten ist.

$$R_0^6 = 8,8 * 10^{-28} * \kappa^2 n^{-4} Q_0 J$$

κ^2 ist dabei der Orientierungsfaktor, n der Brechungsindex und Q_0 die Quantenausbeute des Donors ohne Energietransfer.

Der Orientierungsfaktor ist abhängig von den Winkeln zwischen den Übergangsdipolmomenten der Moleküle, welcher ein Maß für die Fähigkeit des Moleküls ist elektromagnetische Strahlung aufnehmen oder abgeben zu können.

Der Orientierungsfaktor kann dabei Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Die Wechselwirkung beider Übergangsdipolmomente ist am effektivsten, wenn die Dipole hintereinander kollinear angeordnet sind, d. h. $\kappa^2 = 4$ (siehe Abbildung 5b). Sind sie senkrecht zueinander ausgerichtet, so ist $\kappa^2 = 0$, und es findet kein Energietransfer statt. Für die meisten FRET-Experimente wird ein Orientierungsfaktor von 2/3 angenommen, da es sich in Lösungen um ein dynamisches Gleichgewicht handelt.

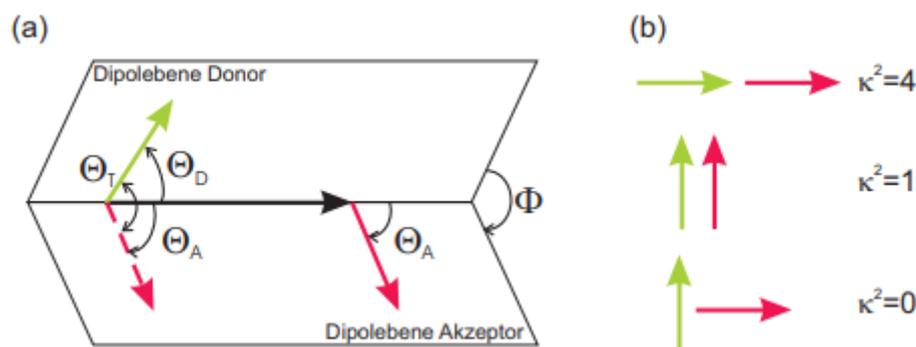


Abb. 6 Orientierung der Übergangsdipolmomente; Übergangsdipolmomente des Donors (grün) und Akzeptors (rot); a) zeigt die Winkel der Übergangsdipolmomente. b) Die Werte von κ^2 in Abhängigkeit der Lage die Dipolmomente zueinander.

Der Verlauf der Abhängigkeit zeigt, in welchem Bereich der Abstand mit Hilfe dieser Methode besonders genau bestimmt werden kann bzw. sie besonders sensitiv auf Änderungen desselben reagiert. Die FRET-Effizienz kann folglich auch in der folgenden Weise ausgedrückt werden

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} = 1 - \frac{F}{F_0}$$

F stellt dabei die Intensität der Donorfluoreszenz in Anwesenheit, F_0 in Abwesenheit des Akzeptors dar. Durch die Messung dieser beiden Werte können also die Transfereffizienz E und damit der Abstand der beiden Farbstoffe bestimmt werden.

Stern-Volmer-Gleichung und Quenching

Die Stern-Volmer-Gleichung beschreibt die Abhängigkeit der Fluoreszenz eines Farbstoffes von der Konzentration $[Q]$ eines in der Umgebung befindlichen Quenchers, bei dem es sich hier um den Akzeptor des FRET-Paares handelt. Sie lautet:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} * [Q].$$

Mit der Stern-Volmer-Konstante K_{SV} . Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Formel ist die gleiche Erreichbarkeit aller Fluorophore durch den Quencher. K_{SV} kann hier als Assoziationskonstante angesehen werden und damit die Dissoziationskonstante K_D bestimmt werden.

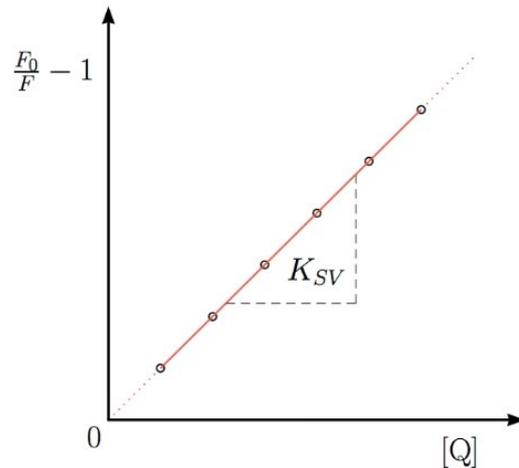


Abb. 7 Stern-Volmer-Plot

Bei dem FRET-Paar in diesem Versuch handelt es sich um das Tryptophan des Proteins Humanalbumin (HSA) als Donor und dem Ligandenmolekül 3-hydroxyflavone (3-HF) als Akzeptor. HSA besteht aus 585 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von etwa 66,470 kDa. Es besitzt genau ein Tryptophan, welches in der Nähe einer Hauptbindungsstelle lokalisiert ist.

Zusätzlich kann der Naturfarbstoff Quercetin als Akzeptor eingesetzt werden, welches im Protokoll mit 3-HF verglichen werden soll.

2. Durchführung

Erhöht in den Lösungen mit HSA in mehreren Schritten die 3-HF Konzentration (0,1-30 μM , mind. 15 Punkte, nichtlinear, z.B. 0,1 μM , 2 μM , 5 μM , 8 μM ...) und untersucht die Fluoreszenzintensität des Donors bzw. des Akzeptors. Wie verändern sich diese? In der Küvette für die Fluoreszenzmessung soll die Startprobenmenge 2 ml (pure HSA-Lösung) betragen. Durch zugeben der 3-HF Lösung wird nicht nur dessen Konzentration, sondern auch das Gesamtvolumen immer größer. Welcher Fehler wird in der Messung dadurch gemacht? Schätzt diesen ab.

Eine Konzentration soll 3x gemessen werden, um den Fehler des Gerätes zu erhalten. Während der Messung ist darauf zu achten zwischen Zugabe des Akzeptors und Start der Messung eine gewisse Wartezeit einzuhalten (ca. 30s). Ein Messpunkt wird willkürlich ausgewählt und direkt hergestellt, um die Arbeitsweise von direkter Probenherstellung mit langsamer Zugabe zu überprüfen.

Herzustellende Lösungen

5 ml einer HSA Lösung (Proteinkonzentration 6 μM). Als Lösungsmittel werden dafür NaPh-Puffer (pH 7) bereitgestellt. Lösemittel wird auf eine definierte Einwaage hochgerechnet (~ 5-10 mL)

1 ml 3-HF Lösung in Ethanol mit der Konzentration 400 μM . Lösemittel wird auf eine sinnvolle Einwaage hochgerechnet.

Zusatz: 1 ml Quercetin Lösung in Ethanol mit der Konzentration 400 μM . Lösemittel wird auf eine sinnvolle Einwaage hochgerechnet.

Protokoll

- Zu verwendende Größen:

$$\text{Brechungsindex } n = 1,4 \pm 0,05$$

$$\text{Fluoreszenzquantenausbeute des Donors Tryptophan: } Q_0 = 0,11 \pm 0,005$$

$$\text{Orientierungsfaktor: } \kappa^2 = 2/3$$

$$\text{Extinktionskoeffizient } \varepsilon_A(\lambda_{Em}^D) = 9064 * 10^{17} \text{ (nm}^2/\text{mol)} \pm 10 * 10^{17} \text{ (nm}^2/\text{mol)}$$

$$M(3\text{-HF}) = 238,34 \text{ g/mol}$$

$$M(\text{HSA}) = 66,470 \text{ kDa}$$

$$M(\text{Quercetin}) = 302,24 \text{ g/mol}$$

Größen ohne Fehler werden mit einem Fehler von 0,1% abgeschätzt!

- FRET ist für unterschiedliche pH-Werte (Beispiel: pH 3 und pH 7, siehe Anhang) möglich. Begründung und Vergleich der Abbildungen
- Tabelle der verwendeten Konzentrationen mit Fehler und Fehler der Einwaage in Auswertung miteinbeziehen
- Berechnet aus den vorliegenden Messgraphen und Daten das Überlappungsintegral J und damit den Försterradius des FRET-Paares bei pH-Wert 7. Berechnet dazu die Integrale der einzelnen Spektren mit Hilfe von Origin. Bestimmt den Fehler der Berechnung.
- Berechnet aus der Mehrfachmessung des HSA die mittlere Wellenlänge
- Plottet die Messgrößen
- Tragt die relative Donorfluoreszenz $\frac{I_0}{I} - 1$ (I_0 Donorfluoreszenz ohne Akzeptor, I Donorfluoreszenz mit Akzeptor) in Abhängigkeit der Akzeptorkonzentration auf (Stern-Volmer Plot). Bestimmt daraus die Stern-Volmer Konstanten. Gebt diese genauso wie die Dissoziationskonstanten mit Fehler an sowie die relative Donorfluoreszenz.
- Stellt die FRET-Effizienz in Abhängigkeit von der Akzeptor Konzentration dar und erklärt den Verlauf der Kurven. Berechnet die Fehler
- Berechnet den Abstand zwischen Donor Tryptophan und Akzeptor 3-HF sowie für Quercetin inklusive Fehlerrechnung.
- Fehlerdiskussion, kritische Schritte in der Durchführung betrachten
- Sucht für die Einleitung Anwendungsgebiete der Fluoreszenz bzw. von FRET raus und beschreibt diese

Allgemeine Anmerkung:

- Für jede berechnete Größe soll eine Fehlerrechnung durchgeführt werden.

- Für alle berechneten Fehler muss die entsprechende Fehlerrechnung mit ins Protokoll!
- Tabelle mit allen errechneten Größen inkl. Fehler in den Anhang einfügen sowie die Messdaten!

Kontrollfragen fürs Kolloquium

- Nennt einige fluoreszierende Stoffe, welche Stoffe fluoreszieren und warum (Lebensdauer, Beispiele aus dem täglichen Leben, atomare Phosphoreszenzmarker,..)
- Informationsgehalt von Fluoreszenzspektren
- Bei welcher Wellenlänge absorbiert, bei welcher fluoresziert Tryptophan?
- Welche Bedingungen muss ein FRET-Paar erfüllen?
- Lambert-Beer'sche Gesetz
- Fermis goldene Regel
- Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Übergangsdipolmoment, Abhängigkeit der Orientierungsfaktor κ vom Dipolmoment
- Was sind die Einsatzmöglichkeiten in Wissenschaft und Industrie?
- Bedeutung der wichtigen Begriffe im Versuch wie Überlappungsintegral, FRET-Effizienz, etc.
- Was versteht man unter Mittelwert, Median, Quantil, Varianz, Standardabweichung, Regressionsgerade, Bedeutung von R^2 , Fehlerfortpflanzung
- Was versteht man in der Analytik unter Genauigkeit, Streuung und Präzession?

Anhang

Vorgegebene Messdaten zur Auswertung:

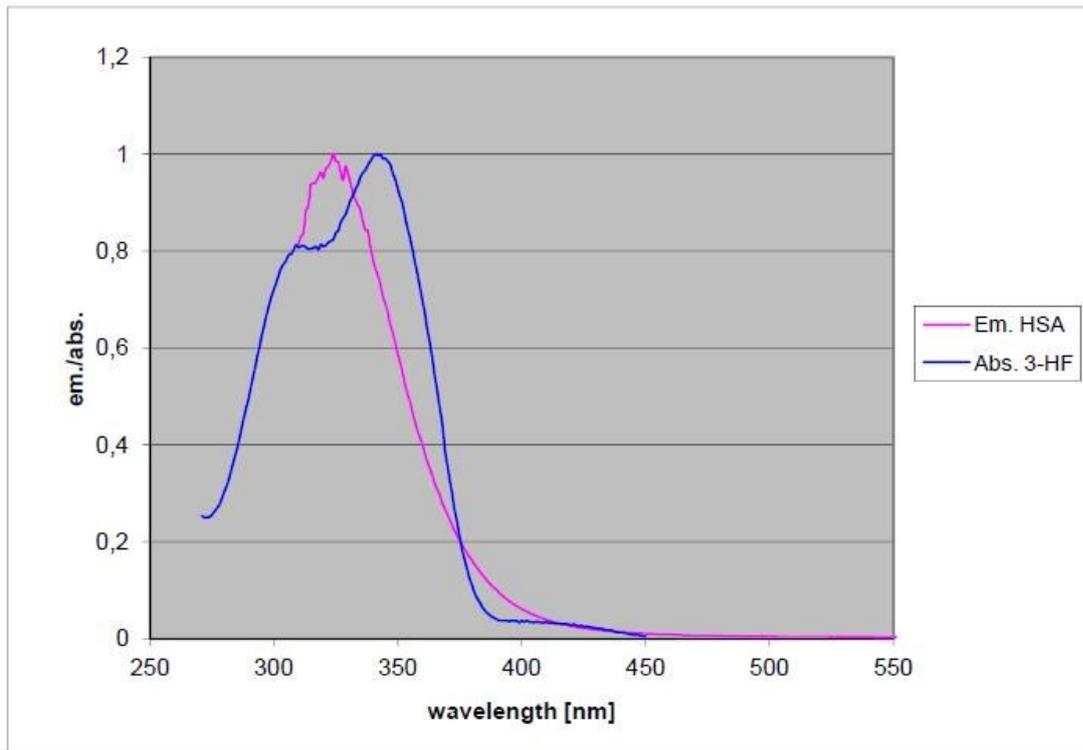


Abb. 8 Emissionsspektrum von HSA und Absorptionsspektrum von 3-HF bei pH=3.

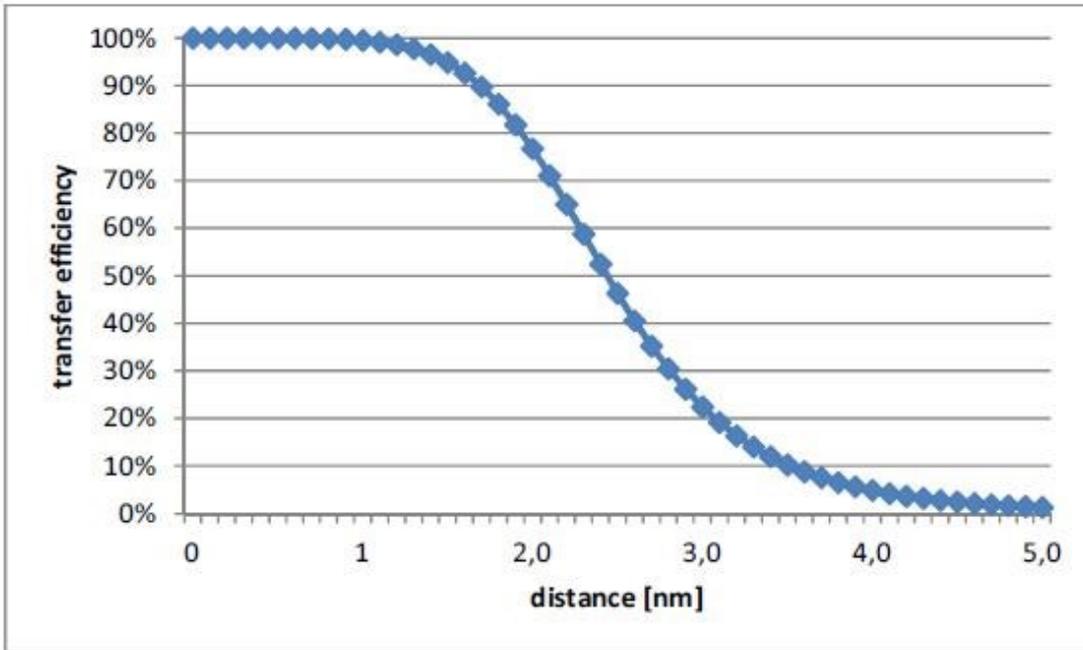


Abb. 9 Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz des FRET Paares bei pH=3.

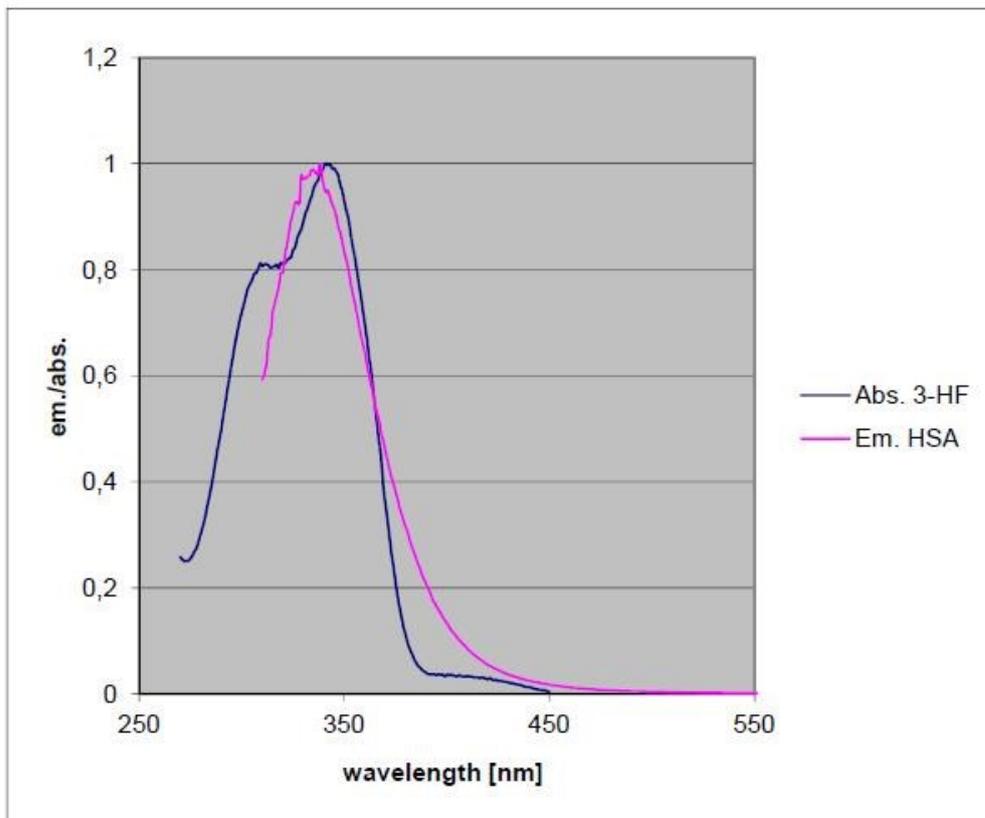


Abb. 10 Emissionsspektrum von HSA und Absorptionsspektrum von 3-HF bei pH=7.

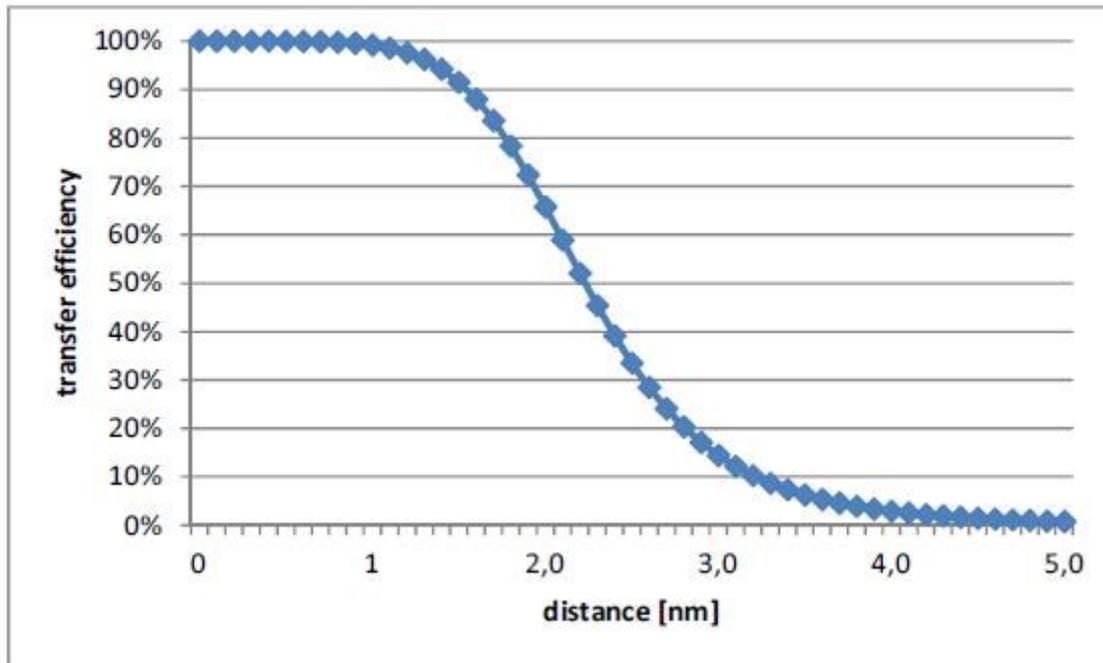


Abb. 11 Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz des FRET Paares bei pH=7.

Literatur

- Peter W. Atkins, Physikalische Chemie, 4. Auflage, Wiley-VCH Weinheim, 2006, S.551 (Kapitel 14.2.1)
- Gerd Wedler, Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 5. Auflage, Wiley-VCH Weinheim, 2004, S.634 (Kapitel 6.4.8)
- David Rendell, Fluorescence and Phosphorescence, Wiley Chichester, 1987 (Bibliotheks-Signatur: 87A4106)
- Georg Schwedt, Fluorimetrische Analyse, Weinheim Verlag Chemie, 1981 (Bibliotheks-Signatur: 81A971)
- Ashutosh Sharma, Fluorescence Spectroscopy, Wiley Weinheim, 1999 (Bibliotheks-Signatur: 99A2192)
- Skoog, Leary Instrumentelle Analytik, 2. Auflage, Springer, 2013
- Förster-Resonanzenergietransfer – Wikipedia (2020). Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/wiki/F%C3%B6rster-Resonanzenergietransfer#FRET-Effizienz>, zuletzt aktualisiert am 09.09.2020, zuletzt geprüft am 24.09.2020.
- Stern-Volmer-Gleichung – Wikipedia (2020). Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/wiki/Stern-Volmer-Gleichung>, zuletzt aktualisiert am 09.09.2020, zuletzt geprüft am 24.09.2020.
- Dexter Energie Transfer (2020). Online Verfügbar unter [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Fundamentals/Dexter_Energy_Transfer](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Fundamentals/Dexter_Energy_Transfer), zuletzt aktualisiert am 15.08.20, zuletzt geprüft am 02.12.20