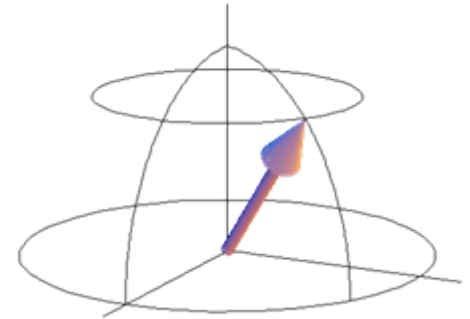


Rotationsdiffusion

$$P(\theta, \phi, t) = \frac{1}{4\pi} + \frac{3}{4\pi} \left(\cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right) e^{-6Dt}$$



$$I_{\parallel}(t) \sim \int d\Omega P(\theta, t) |\mathbf{E}_{\parallel}|^2$$

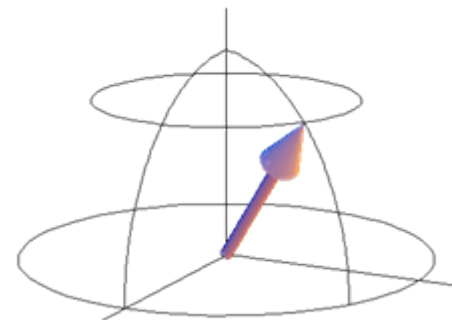
$$\sim \frac{1}{4\pi} \int_0^{\pi} d\theta \sin \theta \int_0^{2\pi} d\phi \left[1 + 3 \left(\cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right) e^{-6Dt} \right] \cos^2 \theta$$

$$= \frac{1}{2} \left[\frac{2}{3} + 3 \left(\frac{2}{5} - \frac{2}{9} \right) e^{-6Dt} \right] = \frac{1}{3} + \frac{4}{15} e^{-6Dt}$$



Rotationsdiffusion

$$P(\theta, \phi, t) = \frac{1}{4\pi} + \frac{3}{4\pi} \left(\cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right) e^{-6Dt}$$



$$\begin{aligned} I_{\perp}(t) &\sim \int d\Omega P(\theta, t) |\mathbf{E}_{\perp}|^2 \\ &\sim \frac{1}{4\pi} \int_0^{\pi} d\theta \sin \theta \int_0^{2\pi} d\phi \left[1 + 3 \left(\cos^2 \theta - \frac{1}{3} \right) e^{-6Dt} \right] \sin^2 \theta \cos^2 \phi \\ &= \frac{1}{4} \left[\frac{4}{3} + 3 \left(\frac{4}{15} - \frac{4}{9} \right) e^{-6Dt} \right] = \frac{1}{3} - \frac{2}{15} e^{-6Dt} \end{aligned}$$



Rotationsdiffusion

$$I_{\parallel}(t) \sim \frac{1}{3} + \frac{4}{15} e^{-6Dt}$$

$$I_{\perp}(t) \sim \frac{1}{3} - \frac{2}{15} e^{-6Dt}$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{2}{5} e^{-6Dt}$$

$$r = r_0 e^{-6Dt}$$

Fluoreszenz-
polarisation

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} = \frac{3}{5 + e^{-6Dt}}$$

Perrin-
gleichung

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right) = \frac{5}{3} e^{6Dt}$$

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) e^{6Dt}$$



Rotationsdiffusionszeiten

Für sphärische Objekte:
$$\tau_{rot} = \frac{1}{6D} = \frac{\eta V}{k_B T} = \frac{4\pi}{3} \frac{\eta r^3}{k_B T}$$

Für kleine Moleküle mit ca. 0.5 nm radius @ 20°C: ~ 130 ps

Für globuläre Proteine in Wasser @ 20°C:
$$\tau_{rot} [ns] \approx \frac{M[kDa]}{2}$$

also ca. 10 ns je 20 kDa



Rotationsdiffusion + Fluoreszenzlebenszeit

$$I_{\parallel}(t) \sim \frac{1}{3} + \frac{4}{15} e^{-6Dt} \qquad I_{\perp}(t) \sim \frac{1}{3} - \frac{2}{15} e^{-6Dt}$$

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{2}{5} e^{-6Dt}$$

Wahrscheinlichkeit Moleküle nach Anregung
im angeregten Zustand zu finden:

$$p(t) = \frac{1}{\tau_f} e^{-t/\tau_f}$$



Rotationsdiffusion

$$I_{\parallel}(t) \sim \frac{1}{3} + \frac{4}{15} e^{-6Dt} \quad I_{\perp}(t) \sim \frac{1}{3} - \frac{2}{15} e^{-6Dt} \quad p(t) = \frac{1}{\tau_f} e^{-t/\tau_f}$$

$$\langle I_{\parallel} \rangle = \frac{1}{3} + \int_0^{\infty} dt \frac{4}{15\tau_f} e^{-6Dt-t/\tau_f} = \frac{1}{3} + \frac{4}{15} \left(\frac{1}{1+6D\tau_f} \right)$$

$$\langle I_{\perp} \rangle = \frac{1}{3} - \int_0^{\infty} dt \frac{2}{15\tau_f} e^{-6Dt-t/\tau_f} = \frac{1}{3} - \frac{2}{15} \left(\frac{1}{1+6D\tau_f} \right)$$

$$\langle r \rangle = \frac{\langle I_{\parallel} \rangle - \langle I_{\perp} \rangle}{\langle I_{\parallel} \rangle + 2\langle I_{\perp} \rangle} = \frac{2}{5} \left(\frac{1}{1+6D\tau_f} \right) = \frac{2}{5} \left(\frac{1}{1+\tau_f/\tau_{rot}} \right) = \frac{r_0}{1+\tau_f/\tau_{rot}}$$



Fluoreszenzlebenszeit

1. Time Domain:

Anregung mit gepulster Lichtquelle und
Messung des zeitlichen Abklingens der Fluoreszenzintensität

Time Correlated Single Photon Counting = TCSPC

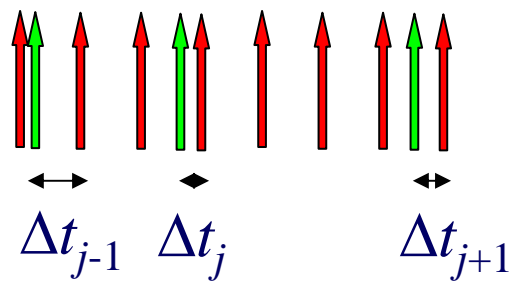
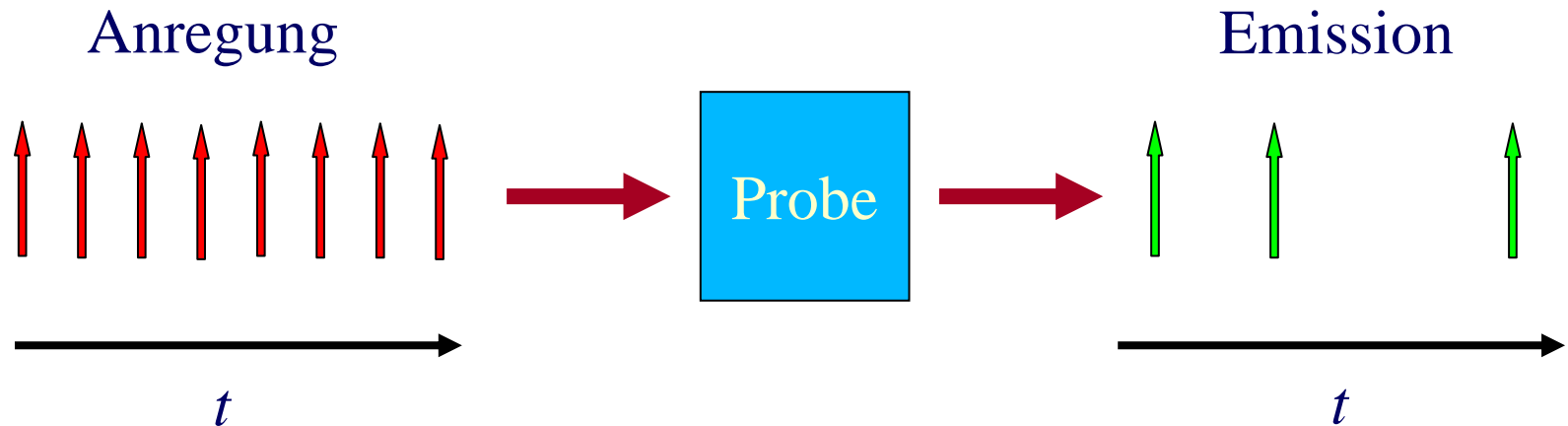
2. Frequency Domain:

Anregung mit periodisch modulierter Lichtquelle und
Messung der *Phasenverschiebung* Fluoreszenz und Anregung

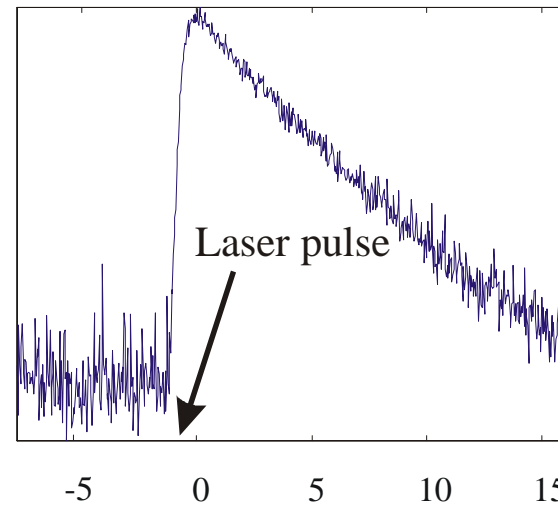
Phase Fluorometry



Time Correlated Single Photon Counting



Häufigkeit



$T_{per} - \Delta t$
Zeit (ns)



Time Correlated Single Photon Counting

$$p(t) = \frac{1}{\tau_f} e^{-t/\tau_f}$$

Wahrscheinlichkeit $\pi(t)dt$, daß zu irgendeinem Zeitpunkt im Intervall ein Photon registriert werden kann

$$\pi(t)dt = \varepsilon \sum_{k=0}^{\infty} p(t + kT)dt$$

ε : mittlere Wahrscheinlichkeit, daß zwischen zwei Anregungspulsen überhaupt ein Photon detektiert wird

Gesucht: Wahrscheinlichkeit, bei Zeit t nach letztem Puls ein Photon zu detektieren, **ohne daß zwischen Puls und t ein Photon detektiert wurde**



Time Correlated Single Photon Counting

$$p(t) = \frac{1}{\tau_f} e^{-t/\tau_f}$$

$$\pi(t) = \varepsilon \sum_{k=0}^{\infty} p(t + kT)$$

Wahrscheinlichkeit, bei Zeit t nach letztem Puls ein Photon zu detektieren, **ohne daß zwischen Puls und t ein Photon detektiert wurde**

Wahrscheinlichkeit $P(t)$, zwischen Puls und Zeit t **kein** Photon zu detektieren:

$$\frac{dP(t)}{dt} = -P(t)\pi(t) \longrightarrow P(t) = \exp\left[-\int_0^t \pi(t') dt'\right]$$



Time Correlated Single Photon Counting

$$p(t) = \frac{1}{\tau_f} e^{-t/\tau_f}$$

$$\pi(t) = \varepsilon \sum_{k=0}^{\infty} p(t + kT)$$

$$P(t) = \exp\left[-\int_0^t \pi(t') dt'\right]$$

Wahrscheinlichkeit, im TCSPC-Kanal der Breite Δt ($\Delta t \ll \tau_f$) bei der Zeit t nach letztem Puls ein Photon zu detektieren, **ohne** daß zwischen Puls und t ein Photon detektiert wurde

$$H(t) = P(t) \pi(t) \Delta t = \pi(t) \exp\left[-\int_0^t \pi(t') dt'\right] \Delta t \approx \pi(t) \Delta t$$

$\varepsilon < 0.01$, sonst merklicher Pile-Up Effekt!



Time Correlated Single Photon Counting

$$p(t) = \frac{1}{\tau_f} e^{-t/\tau_f}$$

$$\pi(t) = \varepsilon \sum_{k=0}^{\infty} p(t + kT)$$

$$P(t) = \exp\left[-\int_0^t \pi(t') dt'\right]$$

$$H(t) \approx \pi(t) \Delta t$$

$$\begin{aligned} \pi(t) &= \frac{\varepsilon}{\tau_f} \sum_{k=0}^{\infty} \exp\left(-\frac{t + kT}{\tau_f}\right) = \frac{\varepsilon}{\tau_f} \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \sum_{k=0}^{\infty} \left[\exp\left(-\frac{T}{\tau_f}\right)\right]^k \\ &= \frac{\varepsilon}{\tau_f} \frac{e^{-t/\tau_f}}{1 - e^{-T/\tau_f}} \end{aligned}$$



Time Correlated Single Photon Counting

Monoexponentielles Fluoreszenzabklingen:

$$H(t) \approx \frac{\Delta t \varepsilon}{\tau_f} \frac{e^{-t/\tau_f}}{1 - e^{-T/\tau_f}} \approx \frac{\Delta t \varepsilon}{\tau_f} e^{-t/\tau_f}$$

$\varepsilon < 0.01$ $T \gg \tau_f$

Multiexponentielles Fluoreszenzabklingen:

$$H(t) \approx \Delta t \varepsilon \sum_{m=1}^M \frac{(a_m / \tau_m) e^{-t/\tau_m}}{1 - e^{-T/\tau_m}} \approx \Delta t \varepsilon \sum_{m=1}^M \frac{a_m}{\tau_m} e^{-t/\tau_m}$$



Time Correlated Single Photon Counting

$$H(t) \approx \frac{\Delta t \varepsilon}{\tau_f} \frac{e^{-t/\tau_f}}{1 - e^{-T/\tau_f}} \approx \frac{\Delta t \varepsilon}{\tau_f} e^{-t/\tau_f}$$

$$H(t) \approx \Delta t \varepsilon \sum_{m=1}^M \frac{(a_m / \tau_m) e^{-t/\tau_m}}{1 - e^{-T/\tau_m}} \approx \Delta t \varepsilon \sum_{m=1}^M \frac{a_m}{\tau_m} e^{-t/\tau_m}$$

Gemachte vereinfachende Annahmen:

Pulsbreite vernachlässigbar

Totzeiten des Detektionssystems

Rotationsdiffusion



Magic angle

$$I_{\parallel}(t) \sim \frac{1}{3} + \frac{12}{45} e^{-6Dt} \qquad I_{\perp}(t) \sim \frac{1}{3} - \frac{6}{45} e^{-6Dt}$$

Analysator hat Winkel Θ zur Vertikalen

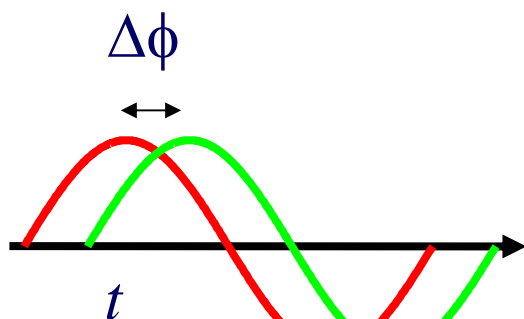
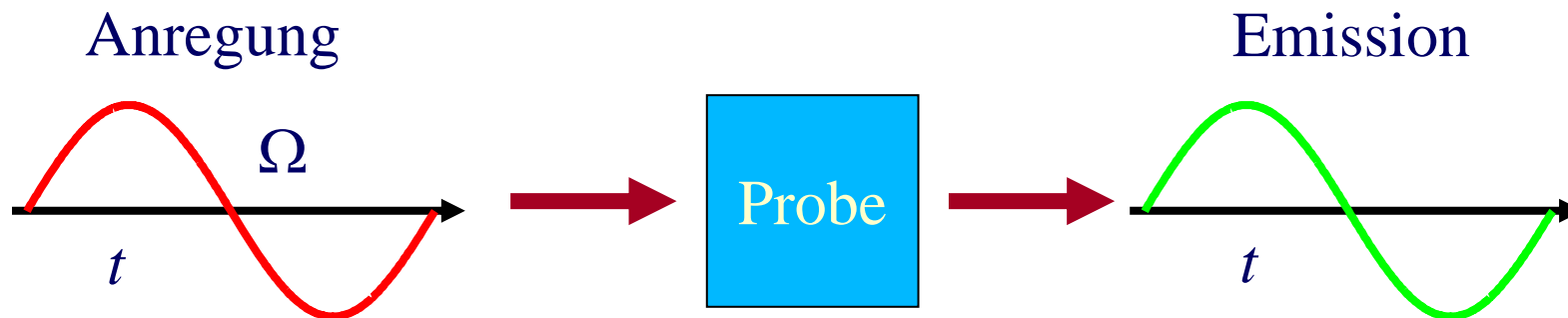
$$\begin{aligned} I(t) &= \cos^2 \Theta I_{\parallel}(t) + \sin^2 \Theta I_{\perp}(t) \\ &\sim \frac{1}{3} + \frac{6}{24} (2 \cos^2 \Theta - \sin^2 \Theta) e^{-6Dt} \end{aligned}$$

$$\tan \Theta_{magic} = \sqrt{2}$$

$$\Theta_{magic} \approx 54.7^\circ$$



Phase Fluorometry



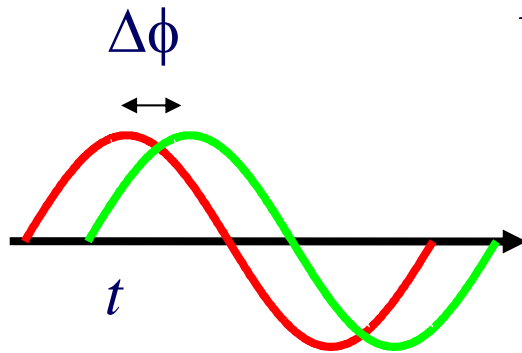
$$I_{em}(t) \sim \int_{-\infty}^t dt' p(t-t') I_{ex}(t')$$

$$p(t) = \frac{1}{\tau_f} e^{-t/\tau_f}$$

$$I_{em}(t) \sim e^{-t/\tau_f} \int_{-\infty}^t dt' \frac{e^{t'/\tau_f}}{\tau_f} e^{-i\Omega t'}$$



Phase Fluorometry



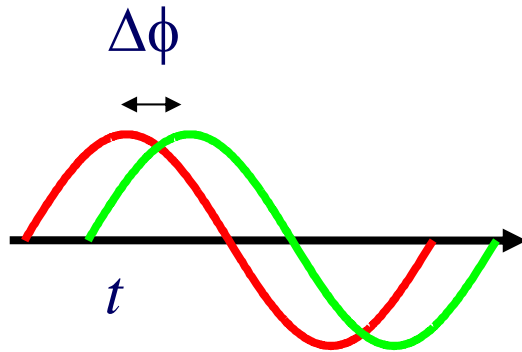
$$I_{em}(t) \sim \frac{e^{-i\Omega t}}{1 - i\Omega\tau_f}$$

$$1 - i\Omega\tau_f = \frac{1 - i\Omega\tau_f}{\sqrt{1 + (\Omega\tau_f)^2}} \sqrt{1 + (\Omega\tau_f)^2} = e^{-i\Delta\phi} \sqrt{1 + (\Omega\tau_f)^2}$$

$$\tan \Delta\phi = \Omega\tau_f$$



Phase Fluorometry: Mehrere Komponenten



$$I_{em}(t) \sim e^{-i\Omega t} \sum_{m=1}^M \frac{a_m}{1 - i\Omega\tau_m}$$

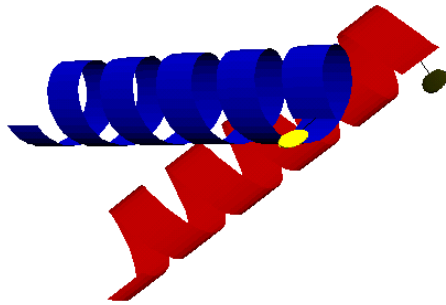
$$I_{em}(t) \sim e^{-i\Omega t} \sum_{m=1}^M a_m \frac{(1 + i\Omega\tau_m)}{1 + (\Omega\tau_m)^2}$$

$$\tan \Delta\phi = \frac{\sum_{m=1}^M \frac{a_m \tau_m \Omega}{1 + (\Omega\tau_m)^2}}{\sum_{m=1}^M \frac{a_m}{1 + (\Omega\tau_m)^2}}$$



Förster Resonance Energy Transfer

Problem: Abstandsmessungen
auf molekularer Ebene



Lösung: Energietransfer
von einem angeregten fluo-
reszenten Molekül (Donor)
auf ein lichtabsorbierendes
zweites Molekül (Akzeptor)

Absorptionsbande Akzeptor ~ Emissionsbande Donor



Maxwellsche Gleichungen

$$\mathbf{div} \mathbf{E} = 4\pi\rho$$

$$\mathbf{rot} \mathbf{B} = \frac{4\pi}{c} \mathbf{j} + \frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}$$

$$\mathbf{div} \mathbf{B} = 0$$

$$\mathbf{rot} \mathbf{E} = -\frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}$$



Maxwellsche Gleichungen in Materie

$$\mathbf{div} \, \epsilon \mathbf{E} = 4\pi\rho$$

$$\mathbf{rot} \, \mathbf{B} = \frac{4\pi}{c} \mathbf{j} + \frac{1}{c} \frac{\partial(\epsilon \mathbf{E})}{\partial t}$$

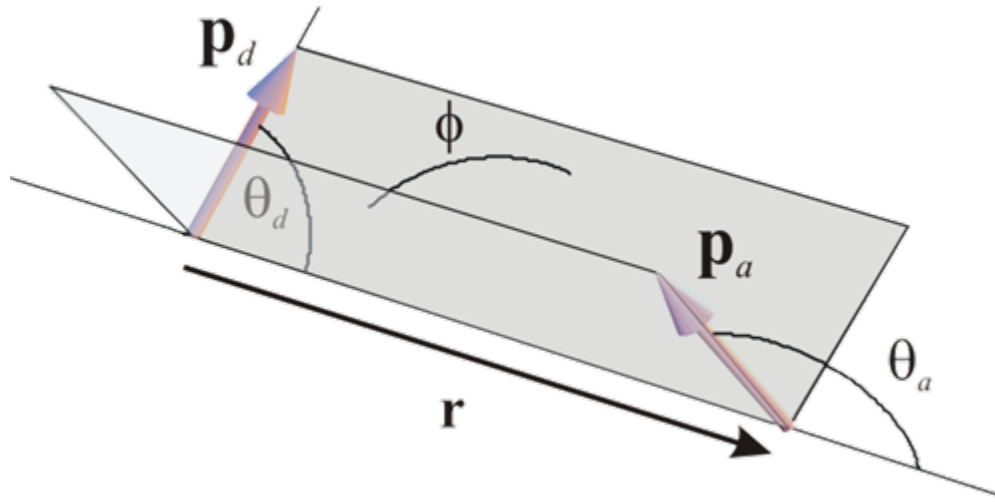
$$\mathbf{div} \, \mathbf{B} = 0$$

$$\mathbf{rot} \, \mathbf{E} = -\frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}$$

$$\mathbf{E} = \frac{1}{\epsilon} \left\{ \frac{k_0^2}{r} [\mathbf{p} - \mathbf{e}_r (\mathbf{e}_r \cdot \mathbf{p})] + \left(\frac{ik_0}{r^2} - \frac{1}{r^3} \right) [\mathbf{p} - 3\mathbf{e}_r (\mathbf{e}_r \cdot \mathbf{p})] \right\} e^{ik_0 r - i\omega t}$$



Förster Resonance Energy Transfer



Donor:

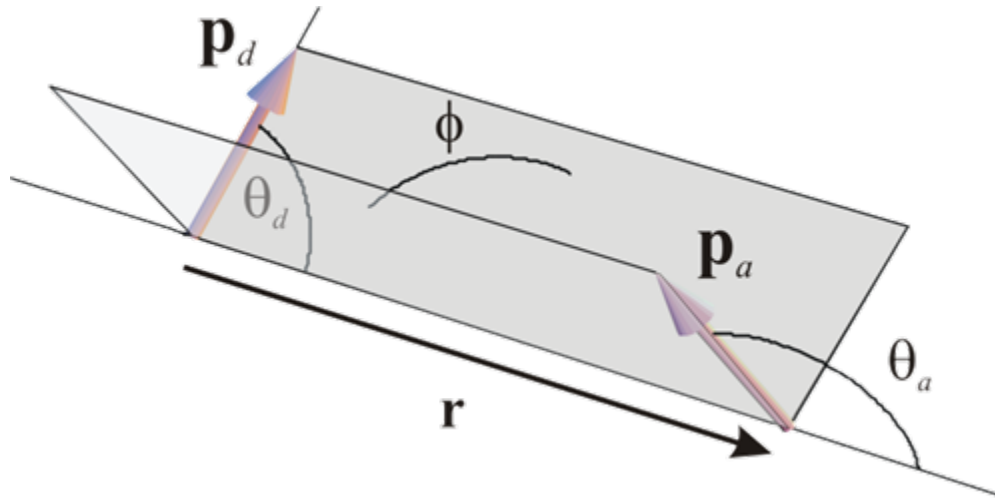
$$\mathbf{E} = \frac{1}{\epsilon} \left\{ \frac{k_0^2}{r} [\mathbf{p} - \mathbf{e}_r (\mathbf{e}_r \cdot \mathbf{p})] + \left(\frac{ik_0}{r^2} - \frac{1}{r^3} \right) [\mathbf{p} - 3\mathbf{e}_r (\mathbf{e}_r \cdot \mathbf{p})] \right\} e^{ik_0 r - i\omega t}$$

Akzeptor:

$$|\mathbf{E} \cdot \mathbf{e}_p|^2$$



Förster Resonance Energy Transfer



Donor:

$$\mathbf{E} = \frac{1}{\varepsilon} \left\{ \frac{k_0^2}{r} [\mathbf{p} - \mathbf{e}_r (\mathbf{e}_r \cdot \mathbf{p})] + \left(\frac{ik_0}{r^2} - \frac{1}{r^3} \right) [\mathbf{p} - 3\mathbf{e}_r (\mathbf{e}_r \cdot \mathbf{p})] \right\} e^{ik_0 r - i\omega t}$$

Akzeptor:

$$|\mathbf{E} \cdot \mathbf{e}_p|^2$$



Förster Resonance Energy Transfer

$$\mathbf{E} \approx -\frac{1}{n^2 r^3} [\mathbf{p} - 3\mathbf{e}_r (\mathbf{e}_r \cdot \mathbf{p})] e^{ik_0 r - i\omega t}$$

Akzeptormolekül „spürt“
oszillierendes Feld

äquivalent zu oszillierendem Feld einer ebenen Welle

$$\text{Energiestrom: } P = \frac{nc\phi_d}{8\pi} |\mathbf{E}|^2$$

$$\text{Photonen pro Zeit pro Fläche: } \frac{\lambda P}{hc} = \frac{n\lambda\phi_d}{8\pi h} |\mathbf{E}|^2$$

Absorptionsquerschnitt σ : Fläche einer Scheibe gleicher Absorption

$$\text{Zahl der abs. Photonen pro Zeiteinheit: } (3\sigma) \frac{\lambda P}{hc} = (3\sigma) \frac{n\lambda}{8\pi h} |\hat{\mathbf{p}}_a \cdot \mathbf{E}|^2$$



Förster Resonance Energy Transfer

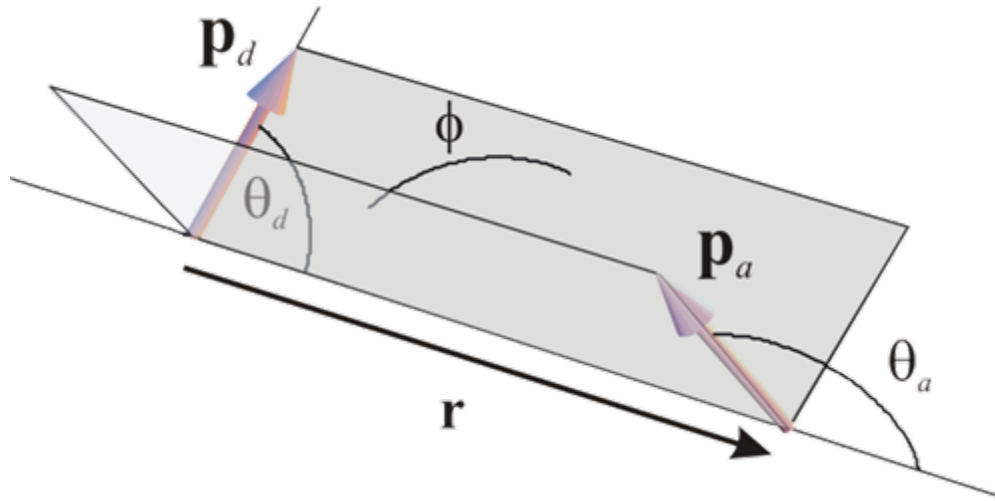
$$\mathbf{E} \approx -\frac{1}{n^2 r^3} [\mathbf{p} - 3\mathbf{e}_r (\mathbf{e}_r \cdot \mathbf{p})] e^{ik_0 r - i\omega t}$$

$$k_a = (3\sigma) \frac{\lambda n}{8\pi h} |\hat{\mathbf{p}}_a \cdot \mathbf{E}|^2$$

$$k_a = \frac{3\sigma\lambda p_d^2}{8\pi h} \frac{\phi_d}{n^3 r^6} |3(\hat{\mathbf{r}} \cdot \hat{\mathbf{p}}_a)(\hat{\mathbf{r}} \cdot \hat{\mathbf{p}}_d) - (\hat{\mathbf{p}}_a \cdot \hat{\mathbf{p}}_d)|^2 = \frac{3\sigma\lambda p_d^2}{8\pi h} \frac{\phi_d}{n^3 r^6} \kappa^2$$



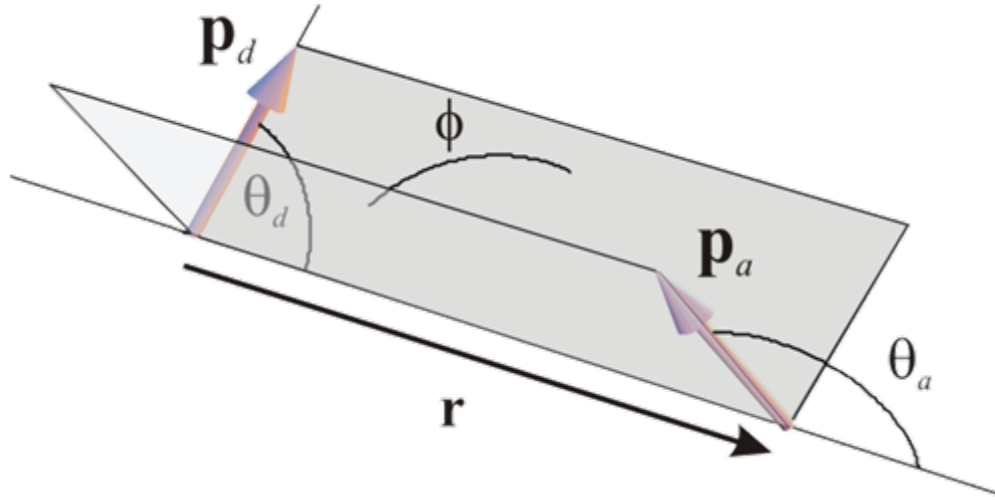
Förster Resonance Energy Transfer



$$\begin{aligned}\kappa^2 &= \left| 3(\hat{\mathbf{r}} \cdot \hat{\mathbf{p}}_a)(\hat{\mathbf{r}} \cdot \hat{\mathbf{p}}_d) - (\hat{\mathbf{p}}_a \cdot \hat{\mathbf{p}}_d) \right|^2 \\ &= \left[3 \cos \theta_a \cos \theta_d - \cos \theta_t \right]^2 \\ &= \left[2 \cos \theta_a \cos \theta_d - \cos \phi \sin \theta_a \sin \theta_d \right]^2\end{aligned}$$



Förster Resonance Energy Transfer



$$\begin{aligned} \langle \kappa^2 \rangle &= \left\langle \left[2 \cos \theta_a \cos \theta_d - \cos \phi \sin \theta_a \sin \theta_d \right]^2 \right\rangle \\ &= \left\langle 4 \cos^2 \theta_a \cos^2 \theta_d - 4 \cos \theta_a \cos \theta_d \cos \phi \sin \theta_a \sin \theta_d + \cos^2 \phi \sin^2 \theta_a \sin^2 \theta_d \right\rangle \\ &= \frac{4}{9} + \frac{1}{2} \frac{4}{9} = \frac{2}{3} \end{aligned}$$

