ETH zürich

ETH Library

Picosecond pulse spectroscopy of biomolecules

Doctoral Thesis

Author(s):
Bühler, Christof Andreas

Publication date:
1995

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-001440329

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH ex. B

Diss. ETH Nr. 11086

Picosecond Pulse Spectroscopy of Biomolecules

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY

ZURICH, SWITZERLAND

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH CatE

For the degree of

Doctor of the Technical Sciences

Presented by

Christof Andreas Bühler

Dipl. El.- Ing ETH
born June 16, 1959
citizen of Masein, Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. M. Anliker, examiner
Dr. E. Di Iorio, co-examiner

1995

Abstract

In biochemistry, analytical chemistry, cell biology, diagnostic medicine, and drug design, among others, fluorescence spectroscopy has been established as a powerful analytical tool. With respect to a multitude of organic and inorganic molecules, fluorescence as well as phosphorescence phenomena feature excellent sensitivity and high specificity. In particular, with the assistance of time-resolved fluorescence spectroscopy, *i.e.* the examination of the decay kinetic of the fluorescence emission after pulse excitation, detailed information about specific molecular conformations, as well as dynamic and functional parameters, can be retrieved. Furthermore, the potential exists to characterize and identify biomolecules of complex nature.

The structure of the data collected by an appropriate pulse fluorometer is inherently multidimensional, *i.e.* these data can be described by fluorescence intensity versus, *i.a.* time of emission (pico- to nanoseconds), emission wavelength, polarization state, and biological reaction time (typically milliseconds to minutes). Normally, only a small subset of these data can be collected within a single experiment. In most biological systems of interest, a complex decay behavior is the rule rather than the exception. Particularly, heterogeneity of the molecular structure as well as of the fluorophores' local environment can lead to interference between different emitting species, eventually resulting in smooth and non-structured data subsets. These problems might be overcome by designing parallel experiments performed under controlled conditions. Each data subset obtained from a single experiment may contribute to an appropriate multidimensional data "surface" which displays the required properties to characterize and identify the target species.

Based on these prerequisites, a pulse fluorometer has been developed which is able to acquire several dimensions in data space, *i.e.* in particular fluorescence decays of total emission, time-resolved emission spectra (TRES), fluorescence anisotropy decays, and series of time-resolved fluorescence decays at consecutive time intervals. The data sets obtained with this instrument enable the study of fast physico-chemical processes occurring on the pico- to nanosecond time scales. Therefore, it is possible to identify different molecular species within a mixture of fluorophores, to determine the rotational behavior of the molecules being analyzed, as well as to scrutinize biological reactions taking place on the millisecond to minute timescales by a single experiment.

The excitation of the sample molecules is accomplished by means of a passively mode-locked laser with highly repetitive, near bandwidth limited picosecond pulses. The fundamental IR wavelength of the laser beam has been extended to the "blue" and UV region by means of extracavity second and third harmonic generation, using BBO crystals.

The transients of fluorescence emission are recorded by a streak camera. With respect to the fluorescence decay kinetic, the developed detection system allows a temporal resolution better than 10 ps. The dynamic range is typically 500 : 1 and the detection limit less than 1 fW, as shown by a direct measurement of the instrument's signal-to-noise ratio.

The instrumental setup in T-format enables the simultaneous acquisition of the two orthogonally polarized fluorescence components and consequently permits anisotropy decay measurements at short run-times. Rotational correlation times smaller than 50 ps are measured routinely without any form of deconvolution analysis.

Using the two-dimensional sweep capability of the streak camera, series of temporally consecutive fluorescence decays can be sampled accurately during the time course of biological reactions. The maximal achievable reaction time resolution is in the order of 1 ms. A pneumatically driven stopped-flow device with a dead-time of less than 20 ms is utilized to initiate biological reactions.

Based on a nonlinear least-square fitting approach, fluorescence decays of total emission, time-resolved emission spectra, and series of temporally consecutive decay curves can be analyzed in terms of sums of exponential decays. Using the vector reconvolution method, the characteristic parameters of fluorescence anisotropy are derived without the constraint of matched detection channels or known G-factor. The developed data analysis tool takes into account the imperfection of the pulse fluorometer, *i.e.* the apparatus function, the flyback, the oscillating effect, and the nonlinear time scale of the streak axis. The performance and reliability of this software were investigated using simulated data.

The fluorescence decay kinetic as well as the rotational behavior of some common dyes and amino acids have been measured to test the performance of the pulse fluorometer. In particular, the fluorescence decay of recombinant hirudin as a function of pH was analyzed, whereby a fast decay term of 8 ps could be associated to the emission of deprotonated tyrosine. Furthermore, the rotational mobility of lysine-tryptophan-lysine and of a mixture of this tripeptide and calf thymus DNA have been investigated. Eventually, the melittin-induced efflux kinetic of vesicle-encapsulated carboxyfluorescein could be determined by means of the "double kinetic" flow-flash experiment.

Zusammenfassung

Fluoreszenzspektroskopie hat sich unter anderem in der Biochemie, der analytischen Chemie, der Zellbiologie, der medizinischen Diagnostik und in der computergestützten Entwicklung von Wirkstoffen als mächtiges Analysewerkzeug etabliert. Hervorragende Sensitivität und hohe Selektivität im Bezug auf zahlreiche organische und nicht organische Moleküle sind wesentliche Eigenschaften der entsprechenden Fluoreszenz- sowie Phosphoreszenzemission. Besonders mit Hilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie, *d.h.* der Untersuchung der Zerfallskinetik emittierter Fluoreszenzstrahlung nach pulsförmiger Anregung, können sowohl detaillierte Informationen über spezifische räumliche Anordnungen von Molekülen, wie auch dynamische und funktionale Parameter gewonnen werden. Im weiteren besteht die Möglichkeit, Biomoleküle komplexer Natur zu charakterisieren und zu identifizieren.

Die Struktur der mit einem geeigneten Pulsfluorometer aufgenommenen Daten ist inhärenterweise mehrdimensional, *d.h.* diese Daten lassen sich unter anderem beschreiben als Fluoreszenzintensität in Funktion der Emissionszeit (Pico- bis Nanosekunden), der Emissionswellenlänge, des Polarisationszustandes und einer biologischen Reaktionszeit (typischerweise Millisekunden bis Minuten). In einem einzigen Experiment kann normalerweise nur eine kleine Untermenge dieser Daten aufgenommen werden. In den meisten interessierenden biologischen Systemen jedoch ist das Zerfallsverhalten komplex. Besonders Heterogenität der molekularen Struktur sowie der lokalen Umgebung der Fluorophore kann zu Interferenzen zwischen den unterschiedlichen emittierenden Arten führen, was sich letztendlich in glatten und unstrukturierten Datenuntermengen manifestiert. Um diese Probleme zu lösen, werden verschiedene Experimente unter genau kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Die so aus den einzelnen Experimenten gewonnenen Datenuntermengen können eine geeignete mehrdimensionale Datenoberfläche erzeugen, welche die benötigten Eigenschaften für eine Charakterisierung und Identifizierung der Zielmoleküle aufweist.

Auf Grund dieser Voraussetzungen wurde ein Pulsfluorometer entwickelt, welches die experimentelle Erfassung mehrerer Dimensionen im Datenraum ermöglicht. Im Besonderen sind dies Fluoreszenzzerfälle der totalen Emission, zeitaufgelöste Emissionsspektren, Zerfälle der Fluoreszenzanisotropie, sowie Serien zeitlich aufeinanderfolgender Fluoreszenzzerfälle der totalen Emission. Die so mit diesem Instrument gewonnenen Daten erlauben das Studium schneller physikalisch-chemischer Prozesse welche sich im Pico- bis Nanosekundenbereich abspielen. Dadurch wird es unter anderem möglich, unterschiedliche Moleküle in einem Fluorophoregemisch zu identifizieren, das Rotationsverhalten der zu analysierenden Moleküle zu bestimmen, sowie mit einem einzigen Experiment biologische Reaktionen im Millisekunden- bis Minutenbereich zu verfolgen.

Zur Anregung der Probenmoleküle dient ein passiv moden-gekoppelter Laser welcher hochrepetitive, nahezu bandbreitenbegrenzte Picosekundenpulse im IR Wellenlängenbereich erzeugt. Mit Hilfe von BBO Kristallen zur Erzeugung der zweiten und dritten Harmonischen wird die Frequenz des Anregungslichtes in den "Blau-" und UV-Bereich erweitert.

Die Transienten der Fluoreszenzemission werden mit einer Streak Camera aufgenommen. Bezüglich der Zerfallskinetik der Fluoreszenz ermöglicht das entwickelte Detektionssystem eine Zeitauflösung unter 10 ps. Der Dynamikbereich ist typischerweise 500 : 1, und die Detektionslimite liegt unterhalb von 1 fW. Dies konnte mit Hilfe einer direkten Messung des Signal-zu-Rauschleistungsverhältnisses gezeigt werden.

Der instrumentelle Aufbau im T-Format ermöglicht das gleichzeitige Erfassen der beiden zueinander orthogonal polarisierten Fluoreszenzkomponenten und erlaubt dadurch Messungen des Zerfalls der Fluoreszenzanisotropie in kurzer Zeit. Rotationskorrelationszeiten unter 50 ps können routinemässig gemessen werden ohne irgend eine Art von Entfaltungsanalyse anzuwenden.

Mit Hilfe der zweidimensionalen Ablenkmöglichkeit der Streak Camera kann der zeitliche Verlauf biologischer Reaktionen durch entsprechende Serien von zeitlich aufeinanderfolgenden Fluoreszenzzerfällen genau abgetastet werden. Die maximal erreichbare Reaktionszeitauflösung liegt bei 1 ms. Ein pneumatisch angetriebenes *stopped-flow* Mischgerät mit einer Totzeit unterhalb von 20 ms wird zum Starten biologischer Reaktionen verwendet.

Die Fluoreszenzzerfälle der totalen Emission, die zeitaufgelösten Emissionsspektren, und die Serien zeitlich aufeinanderfolgender Fluoreszenzzerfälle lassen sich auf der Grundlage einer nichtlinearen Methode der kleinsten Quadrate als Summen exponentieller Zerfallskomponenten analysieren. Mit Hilfe der Vektorentfaltungsmethode werden die charakteristischen Parameter der Fluoreszenzansiotropie ohne vorgängige Bestimmung des G-faktors gewonnen. Das entwickelte Programm für die Datenanalyse berücksichtigt dabei Nichtidealitäten des Pulsfluorometers, *d.h.* die Apparatefunktion, den *flyback*, den *oscillating effect*, und die Nichlinearität der *streak* Zeitachse. Die Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit der Software wurden mit simmulierten Daten untersucht.

Die Zerfallskinetik der Fluoreszenz sowie das rotationelle Verhalten einiger gebräuchlicher Farbstoffe und Aminosäuren wurden gemessen um die Leistungsfähigkeit des Pulsfluorometers zu testen. Insbesondere wurde der Fluoreszenzzerfall von rekombinantem Hirudin in Funktion des pH-Wertes analysiert. Dabei konnte ein schneller Zerfallsterm von 8 ps der Emission des deprotonierten Tyrosines zugeordnet werden. Im weitern ist die rotationelle Beweglichkeit von Lysin-Tryptophan-Lysin und einer Mischung dieses Tripeptides mit Kalbsthymus DNA untersucht worden. Schliesslich konnte mit Hilfe des sogenannten "Doppelkinetik" *flow-flash* Experimentes die durch Melittin induzierte Ausflusskinetik von anfänglich in Vesikeln eingeschlossenem Carboxyfluorescein bestimmt werden.