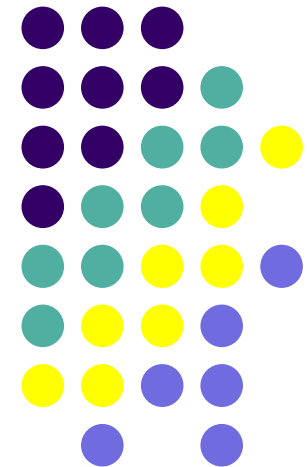


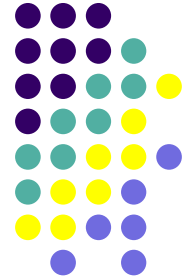
Fluoreszenz-Korrelations- Spektroskopie (FCS)

Seminarvortrag

Julia Jäger

17.01.2008

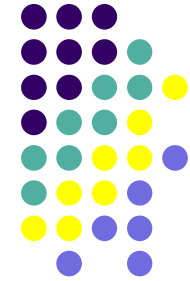




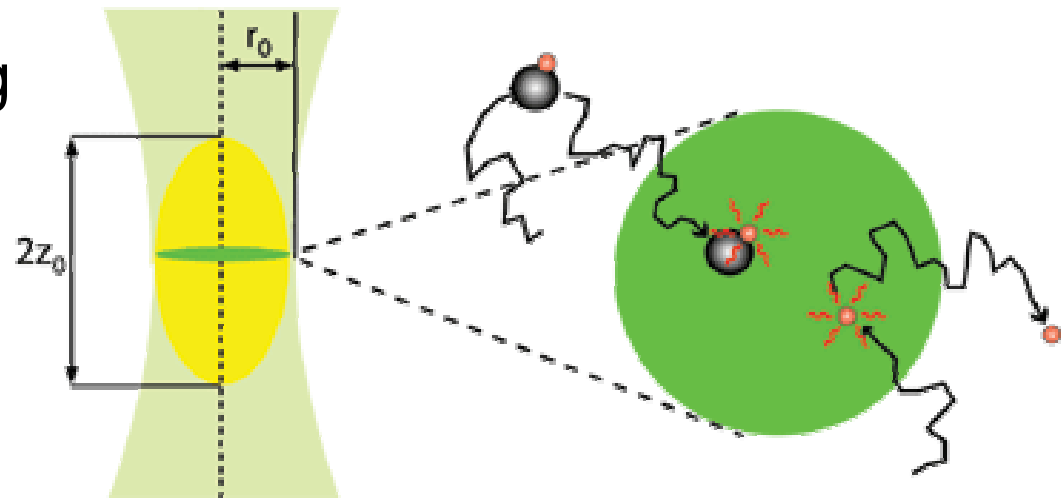
Gliederung

- Grundlagen der FCS
- Grundlagen der Fluoreszenz
- FCS Versuchsaufbau und Durchführung
- Auswertung
- FCCS
- Anwendungsbeispiele

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

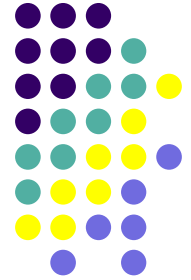


- Verbindung von Lasertechnologie und konfokaler Mikroskopie
- Messung von Fluktuationen in der Fluorezenzintensität im konfokalen Volumen ($\sim 1\text{fl}$)
- Aufnahme der Fluktuationen als Funktion der Zeit (Zeitauflösung $< 1\text{ms}$)
- Statistische Auswertung über Autokorrelation
- Lebende Zellen

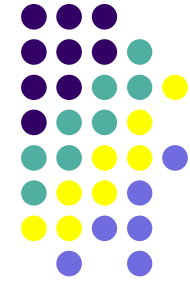


Anwendungen

- Bindungsstudien
- Bestimmung von Diffusionskoeffizienten
- Untersuchung von Transportprozessen
- Infektionsnachweise



Grundlagen der Fluoreszenz



- Lumineszenz: Umwandlung von Energie zu Lichtenergie
- Photolumineszenz: Licht ist Ursache der sekundären Leuchterscheinung
 - Phosphoreszenz
 - Fluoreszenz



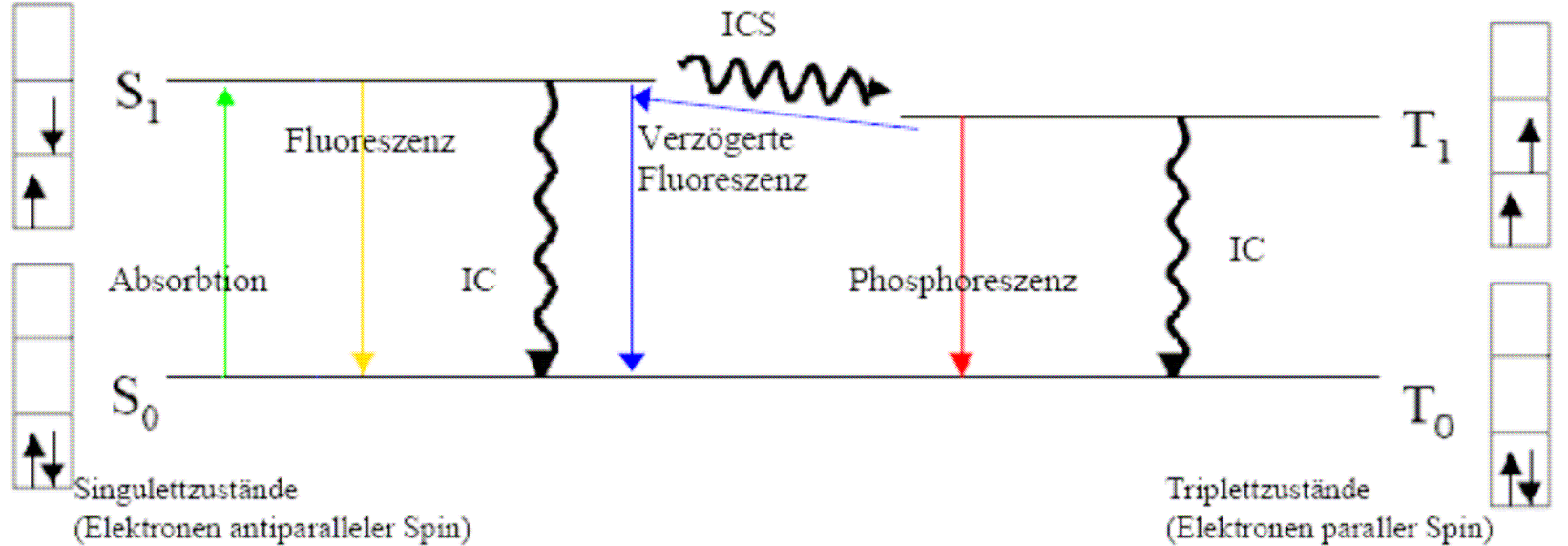
<http://www.nanodeck.de/nano2.html>



http://www.klangspiel.ch/leuchtstern_m/

Jablonski Diagramm

(vereinfacht)



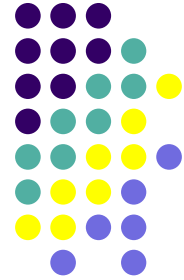
S_0 : Grundzustand (Singulett)

S_1 : elektronisch angeregter Zustand (Singulett)

T: Triplet

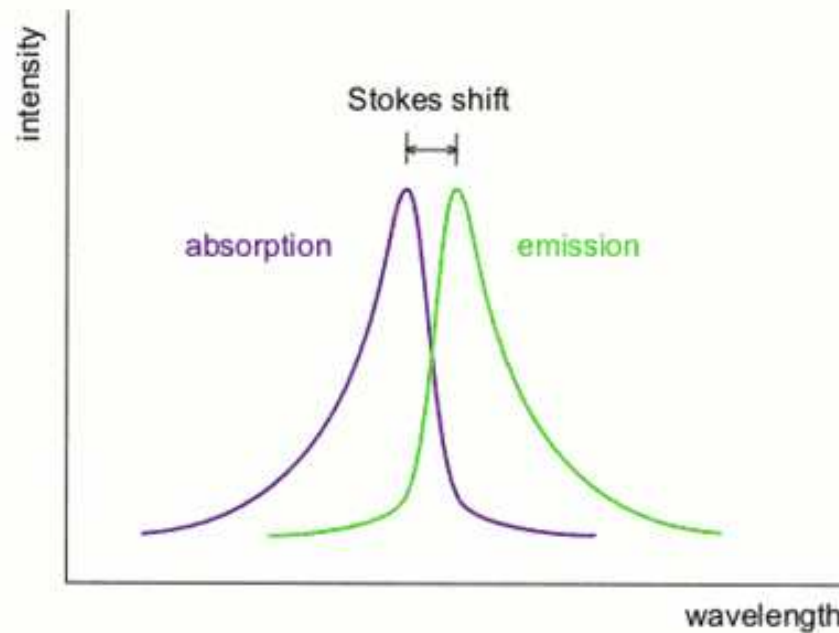
IC: Internal Conversion (strahlungslos)

ICS: Intersystem Crossing (strahlungslos)



Stokes Shift

Das emittierte Licht ist energieärmer und damit langwelliger.

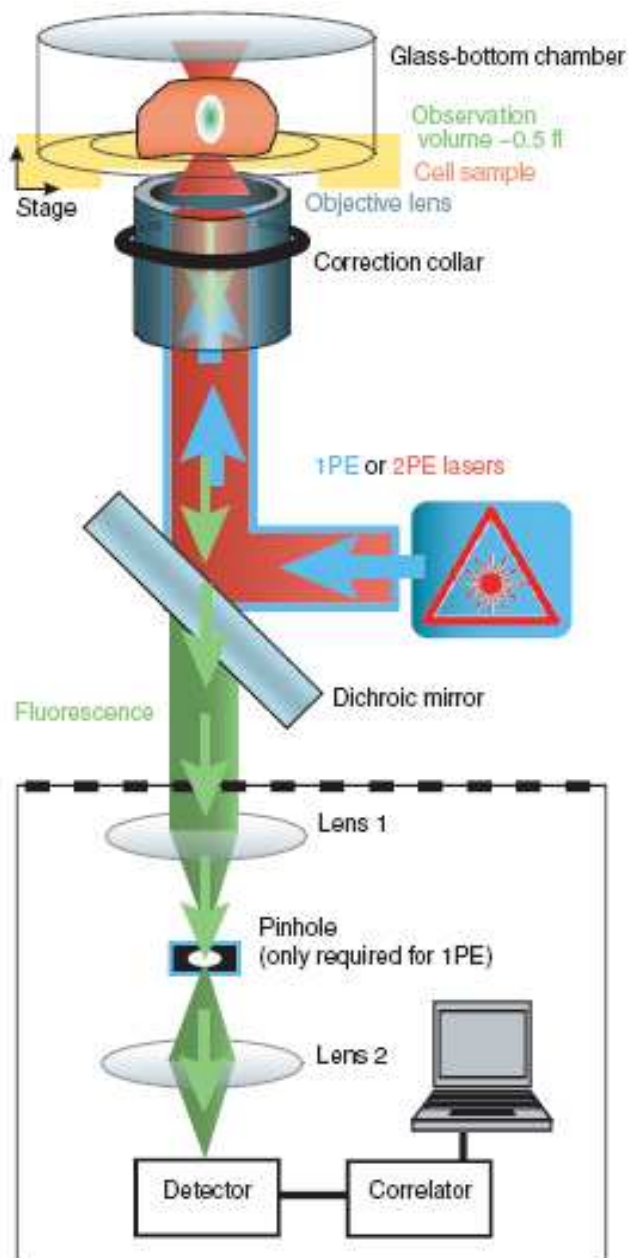
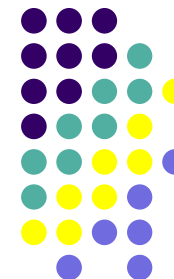


$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

h : Planckches Wirkungsquantum

c : Lichtgeschwindigkeit

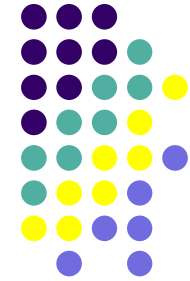
λ : Wellenlänge



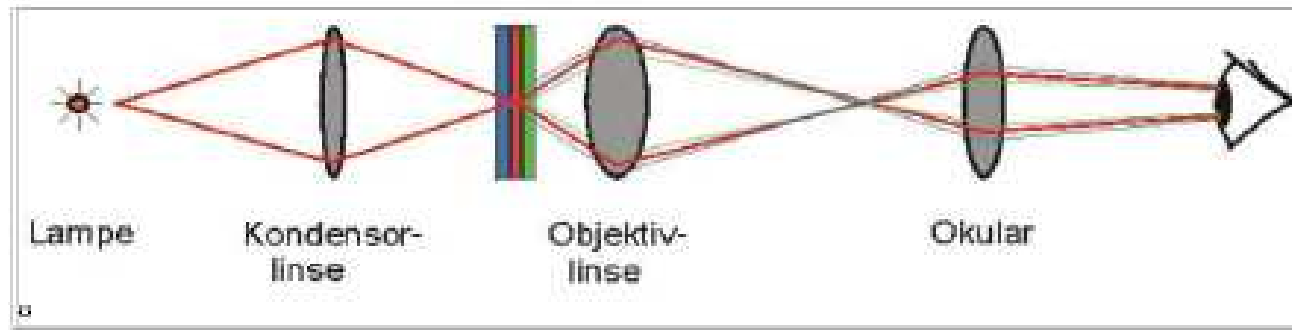
FCS Aufbau

- Probe
- Objektiv
- Laser
- Dichroitischer Spiegel
- Emissionsfilter
- Linsen
- Lochblende
- Detektor
- Korrelator

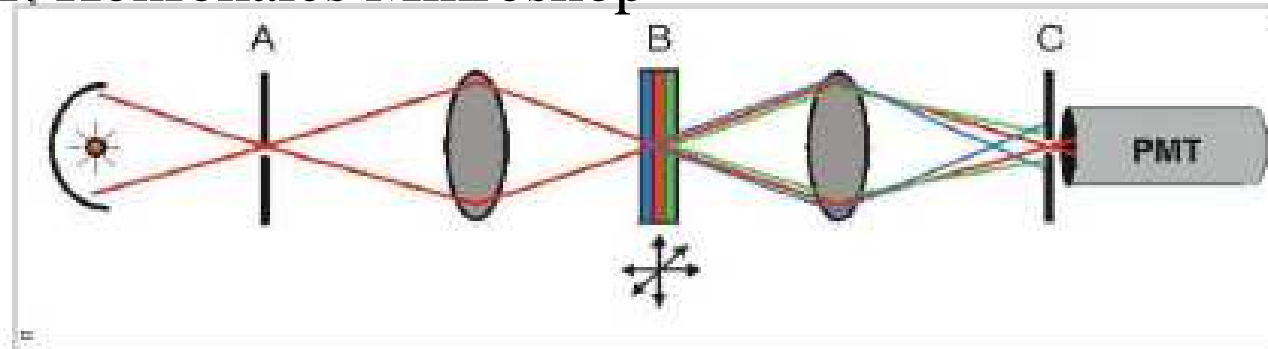
Konfokale Mikroskopie



1. Konventionelles Mikroskop



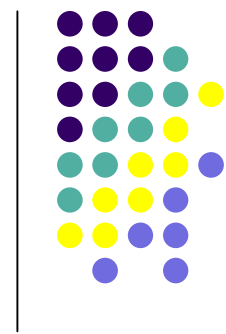
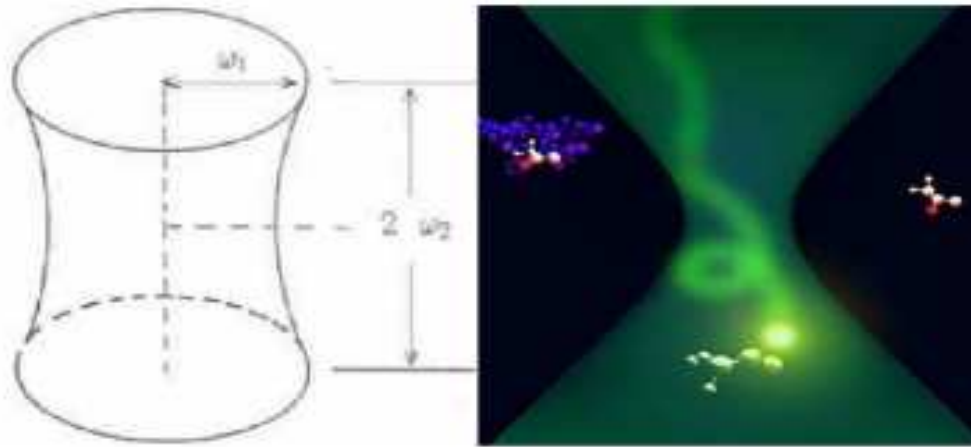
2. Konfokales Mikroskop



A: Lochblende

B: Objekt

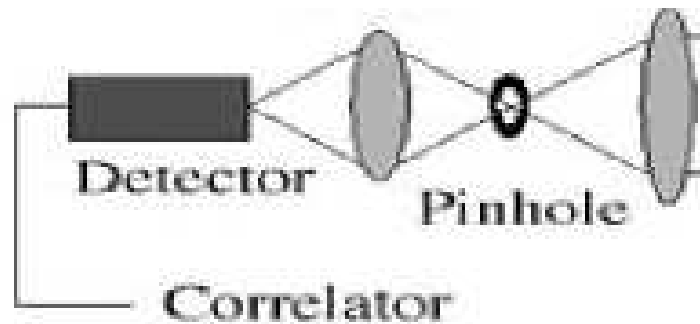
C: Blende



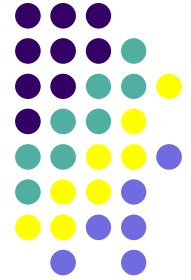
Volumenelement

ω_1 = laterale Laserdimension

ω_2 = axiale Laserdimension

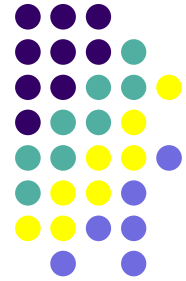


Linsensystem



Versuchsdurchführung I

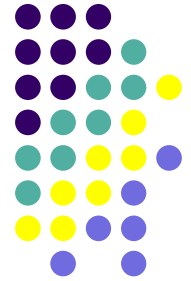
- Protein labeling
 - Fluorophor: hell, photostabil, darf Funktion des Proteins nicht beeinflussen
- Einstellung des Setups
 - Optimierung der Laserposition
 - Einstellung des Excitations- und Detektionswegs
 - Bestimmung des Hintergrundlichts
- Kalibrierung I
 - Bestimmung der lateralen und axialen Laser Dimension



Versuchsdurchführung II

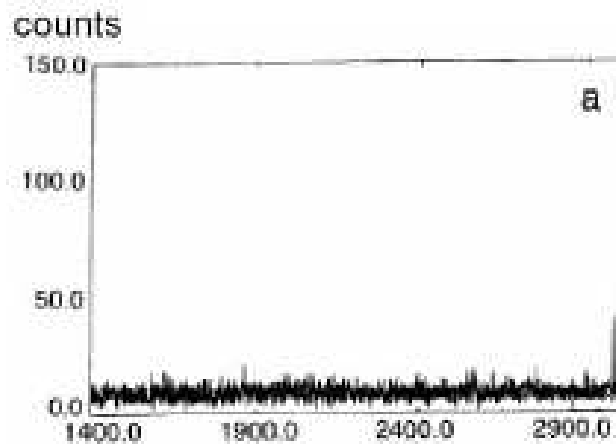
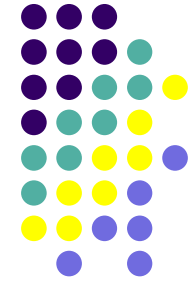
- Kalibrierung II
 - Bestimmung des Strukturparameters S und der mittleren Diffusionszeit τ_{diff}
 - Berechnung des konfokalen Volumens V_{eff}
- Überführen der fluoreszierenden Proteine in die zu untersuchenden Zellen
- Optimierung der intrazellulären FCS Messungen
 - Messungen mit gereinigtem Protein
 - Auswahl der geeigneten Laserenergie
 - Prüfung auf mögliche Autofluoreszenz

Versuchsdurchführung III

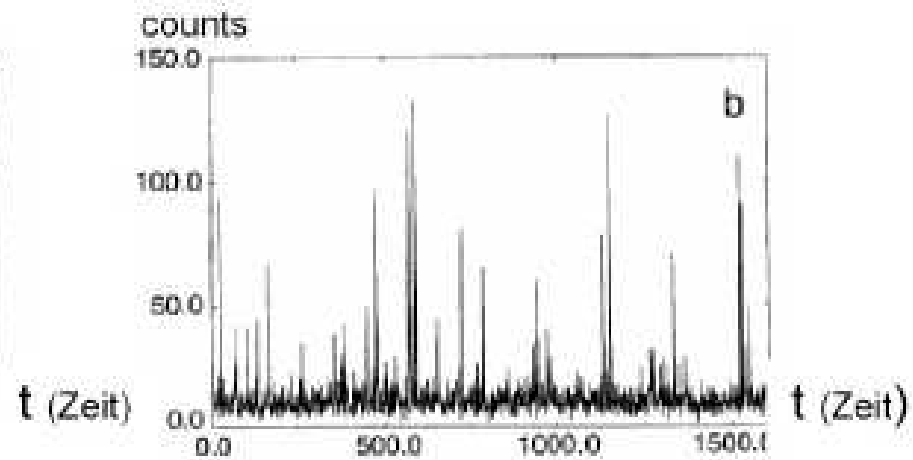


- FCS Messung in lebenden Zellen
 - Auswahl der Zellen für die Messung
 - Festsetzen der Messbedingungen (z.B. Anzahl der Durchläufe)
- Analyse der Messungen

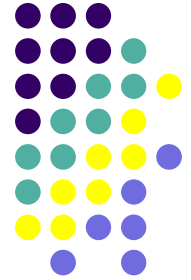
Auswertung



Hintergrundrauschen



Emissionssignal



Autokorrelation

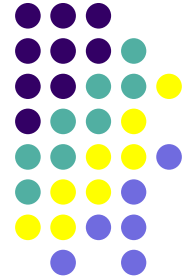
- Mathematische Vorschrift zur Auswertung der Fluktuationssignale

$$G(\tau) = \int_{-T}^T I(t)I(t + \tau)dt$$

I : Intensität

t : Zeitpunkt

τ : Korrelationszeit



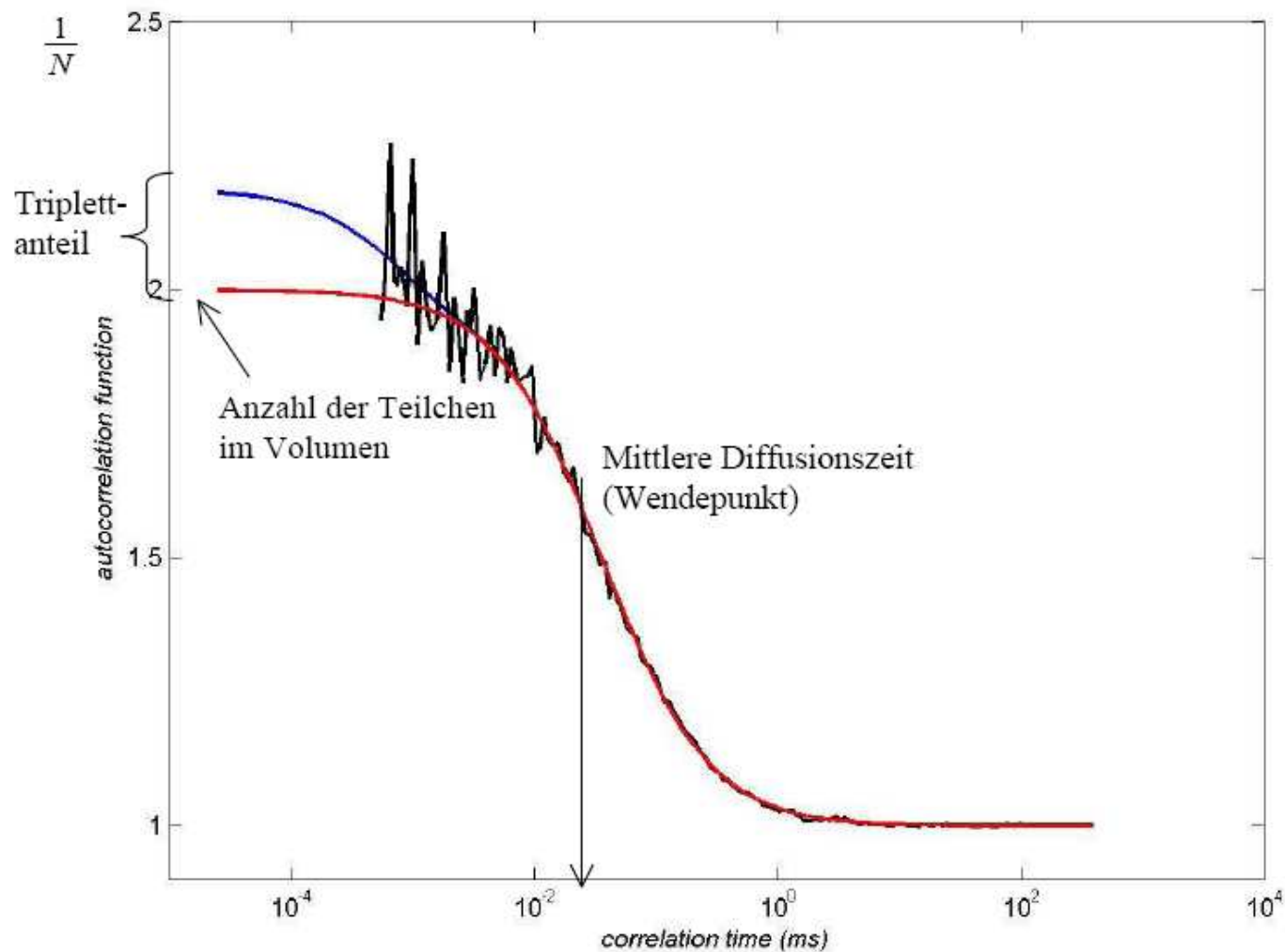
Autokorrelationsfunktion

$$G(\tau) = \frac{1}{N_{\text{eff}}} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{\text{diff}}}}} \right)$$

- N_{eff} : mittlere Teilchenzahl im Fokus
- τ : Korrelationszeit
- τ_{diff} : mittlere Diffusionszeit des beobachteten Fluorophors
- S : Strukturparameter (ω_2/ω_1)



Autokorrelationsfunktion unter Berücksichtigung des Triplettanteils





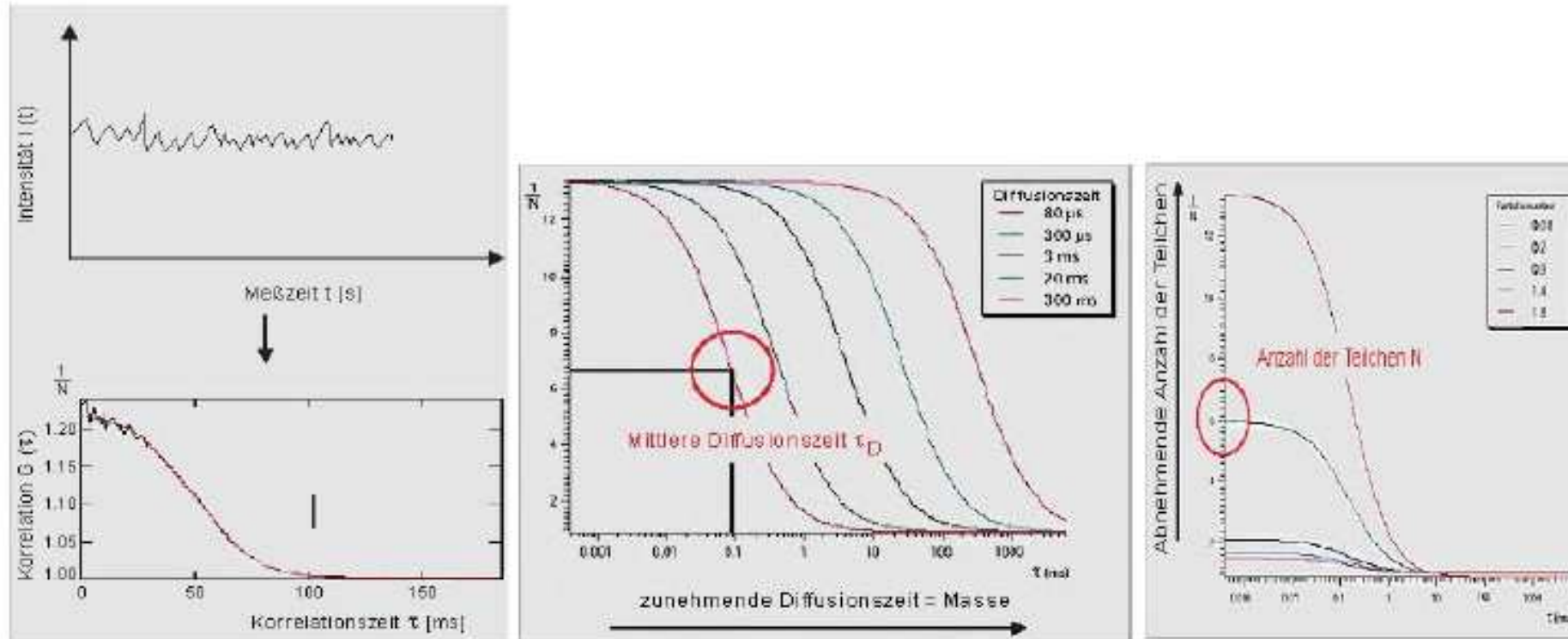
Weitere Zusammenhänge:

- Teilchenanzahl
für $\tau = 0$ gilt: $G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle}$
- Laterale Laser Dimension ω_1
 $\omega_1^2 = 4D\tau_{\text{diff}}$
- Axialen Laser Dimension ω_2
 $\omega_2 = S \omega_1$
- Berechnung des konfokalen Volumens V_{eff}
 $V_{\text{eff}} = 2\pi(4D\tau_{\text{diff}})^{3/2}$
- Diffusionskoeffizient [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] abhängig von Größe, Temperatur und Viskosität

$$D = \frac{kT}{6\pi R\eta} \quad \text{Stokes-Einstein}$$



Korrelationskurven bei variierenden Bedingungen

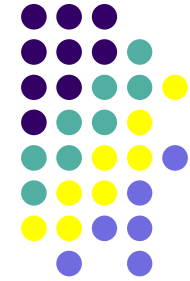


<http://www.zeiss.de/C12567BE00459794/Contents-Frame/951044FBD8FFAAABC1256CC30029E82D>

→ Zunahme der Diffusionszeit bei steigender Teilchengröße

FCCS

(Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie)

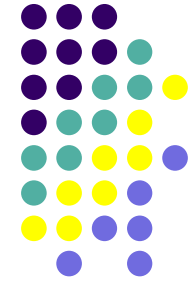


- Untersuchung molekularer Wechselwirkungen über Diffusionszeiten mittels FCS
- Problem: FCS ist relativ massenunempfindlich

$$\tau_{\text{diff}} \propto \sqrt[3]{M}$$

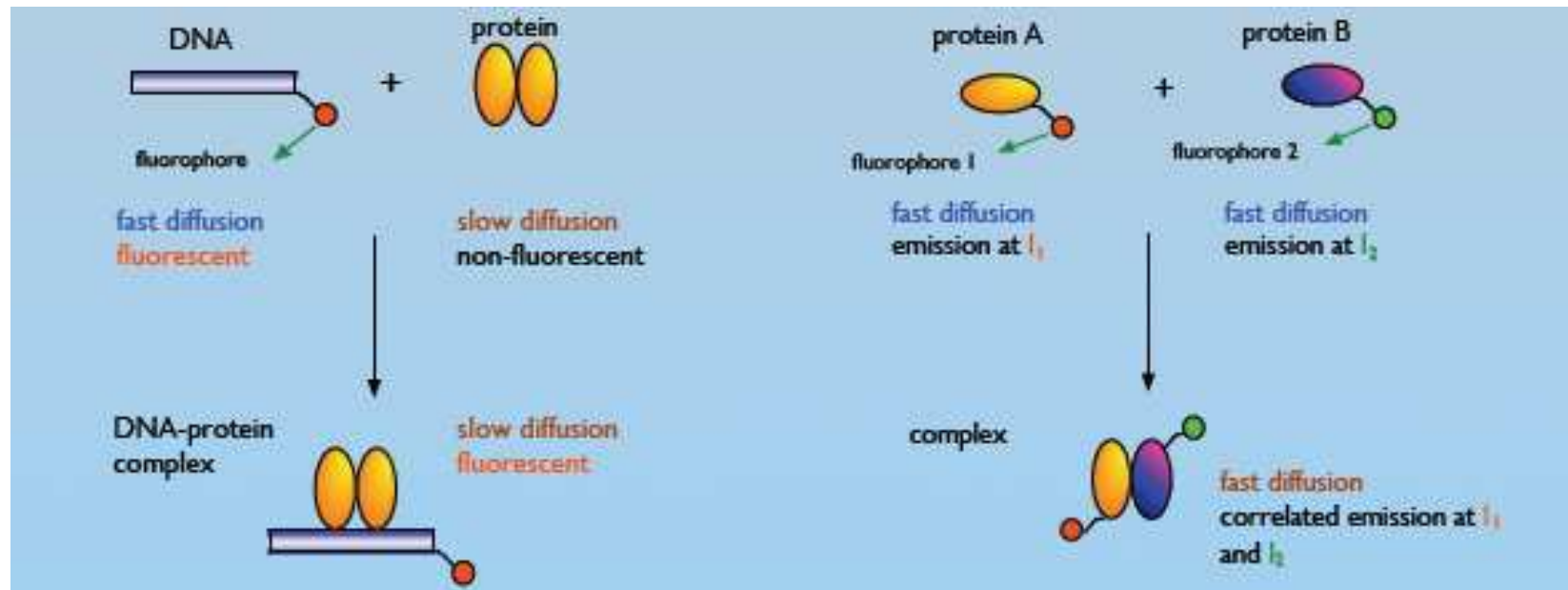
- Molekulargewichte sollten sich etwa um den Faktor 10 unterscheiden
- FCCS: labeling mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen
- Excitation und Detektion durch 2 Laser und Detektoren
- Mathematische Auswertung durch Kreuzkorrelation beider Signale
- Aussagen über Diffusionskoeffizient und Anteile der doppelt markierten Moleküle (nicht jedoch über Konzentrationen)

Vergleich FCS und FCCS

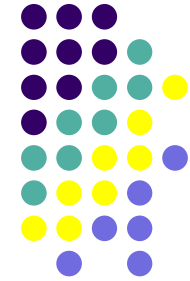


FCS

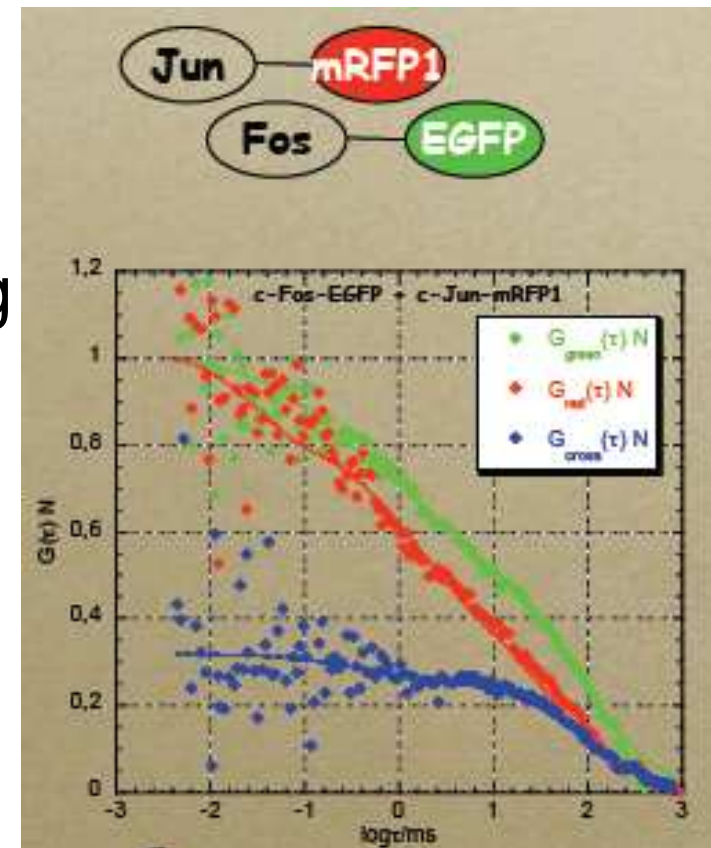
FCCS

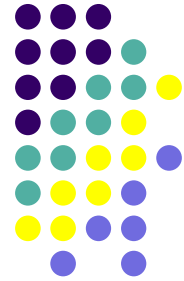


Beispiele



- Dynamik des Virus SV40 im Infektionsmechanismus
 - z.B. Diffusion Viruspartikel außerhalb der Zelle
 - Labeling des Capsids und des Genoms
- Protein-Protein Wechselwirkung im AP-1-System
 - Hauptbestandteile c-Jun und c-Fos Proteine
 - Mittels Kreuzkorrelation Anzeige von dimerisierten Proteinen





Quellenangaben

- S.A. Kim, K. G. Heinze, P. Schwille, **Fluorescence correlation spectroscopy in living cells**, 2007, Nature Methods, 4 (11): 963-973
- P. Schwille, E. Haustein, **Fluorescence Correlation Spectroscopy an Introduction to its Concepts and Applications**, www.biophysics.org/education/schwille.pdf
- A.-K. Marguerre, **Fluoreszenz Korrelationspektroskopie (FCS) BSE Diagnostik**, www.pci.uni-heidelberg.de/pci/fpraktikum/ws03/BSE.pdf
- **Fluoreszenz- Korrelations- Spektroskopie (FCS)**, www.pci.uni-heidelberg.de/pci/fpraktikum/ws00/ws000112.pdf
- M. Jahnz, **Evolute Biotechnologie und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Systeme zur Änderung enzymatischer Substratspezifität und Auffindung neuer Wirkstoffe**, deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=969265085&dok_var=d1&dok_ext=pdf&ilename=969265085.pdf
- J. Langowski, **Absorptions – und Fluoreszenzspektroskopie Biochemie II - Einführung in die Struktur und Dynamik von Makromolekülen**, http://www.dkfz-heidelberg.de/Macromol/B040_html/teaching/Spectroscopy.pdf