

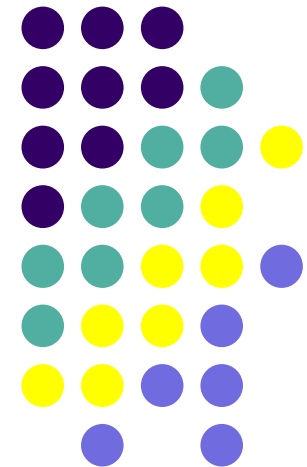
# Fluoreszenz-Korrelations- Spektroskopie (FCS)

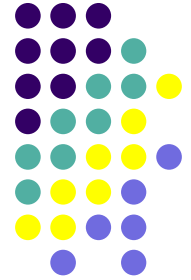
---

Seminarvortrag

Julia Jäger

17.01.2008

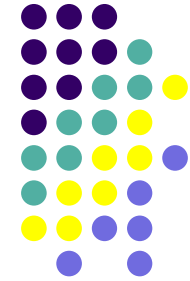




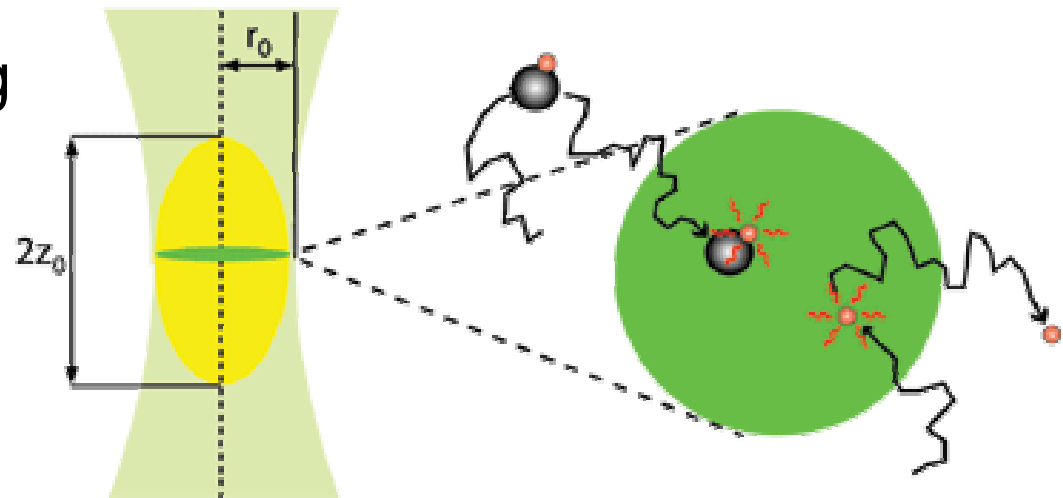
# Gliederung

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

# Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

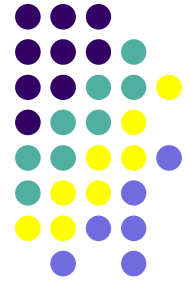


- Verbindung von Lasertechnologie und konfokaler Mikroskopie
- Messung von Fluktuationen in der Fluorezenzintensität im konfokalen Volumen ( $\sim 1\text{fl}$ )
- Aufnahme der Fluktuationen als Funktion der Zeit (Zeitauflösung  $< 1\text{ms}$ )
- Statistische Auswertung über Autokorrelation
- Lebende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

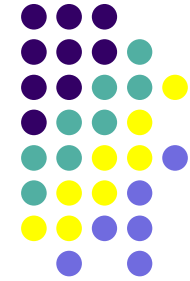


# Anwendungen

- 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



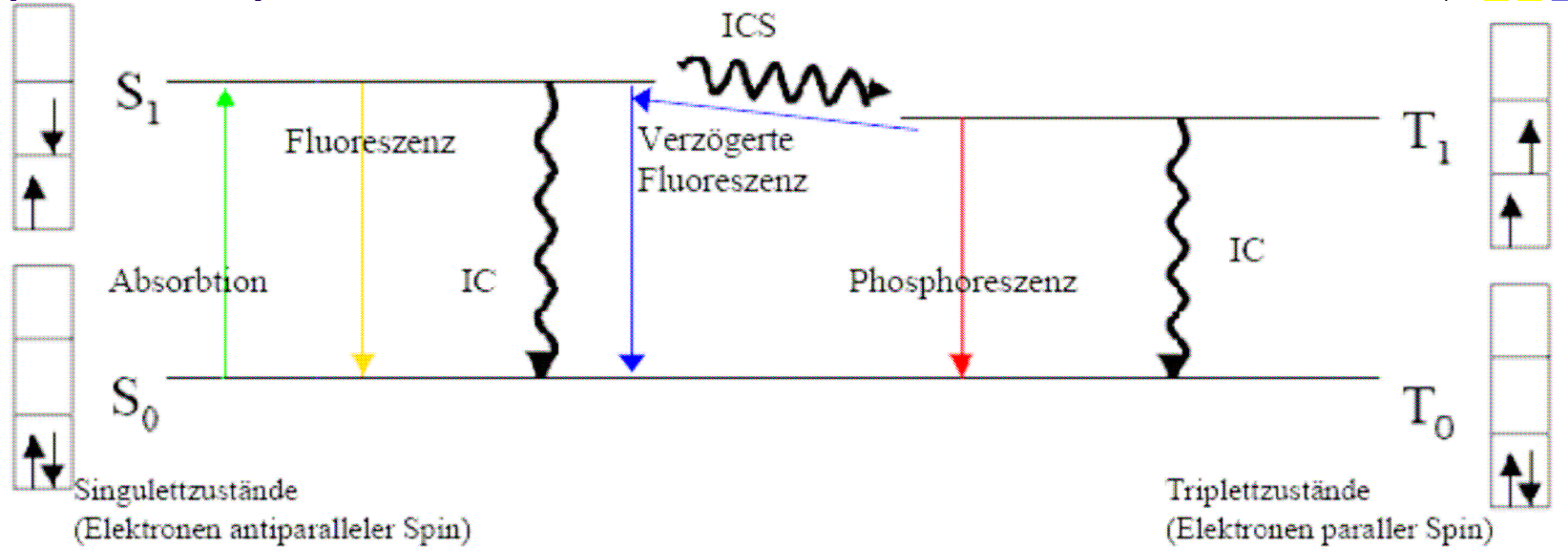
<http://www.nanodeck.de/nano2.html>



[http://www.klangspiel.ch/leuchtstern\\_m/](http://www.klangspiel.ch/leuchtstern_m/)

# Jablonski Diagramm

(vereinfacht)



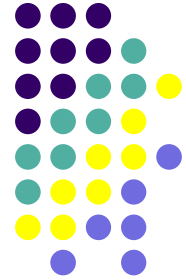
$S_0$ : Grundzustand (Singulett)

$S_1$ : elektronisch angeregter Zustand (Singulett)

T: Triplet

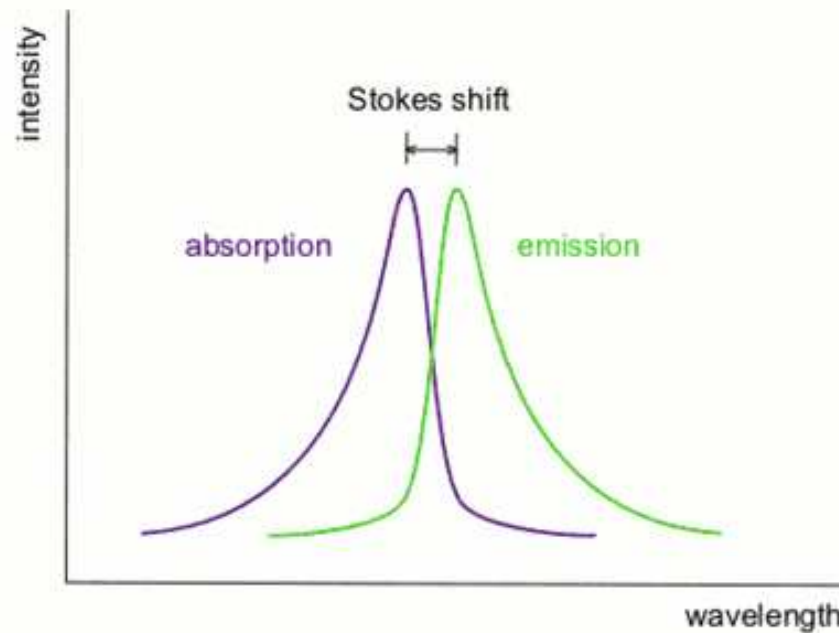
IC: Internal Conversion (strahlungslos)

ICS: Intersystem Crossing (strahlungslos)



# Stokes Shift

Das emittierte Licht ist energieärmer und damit langwelliger.

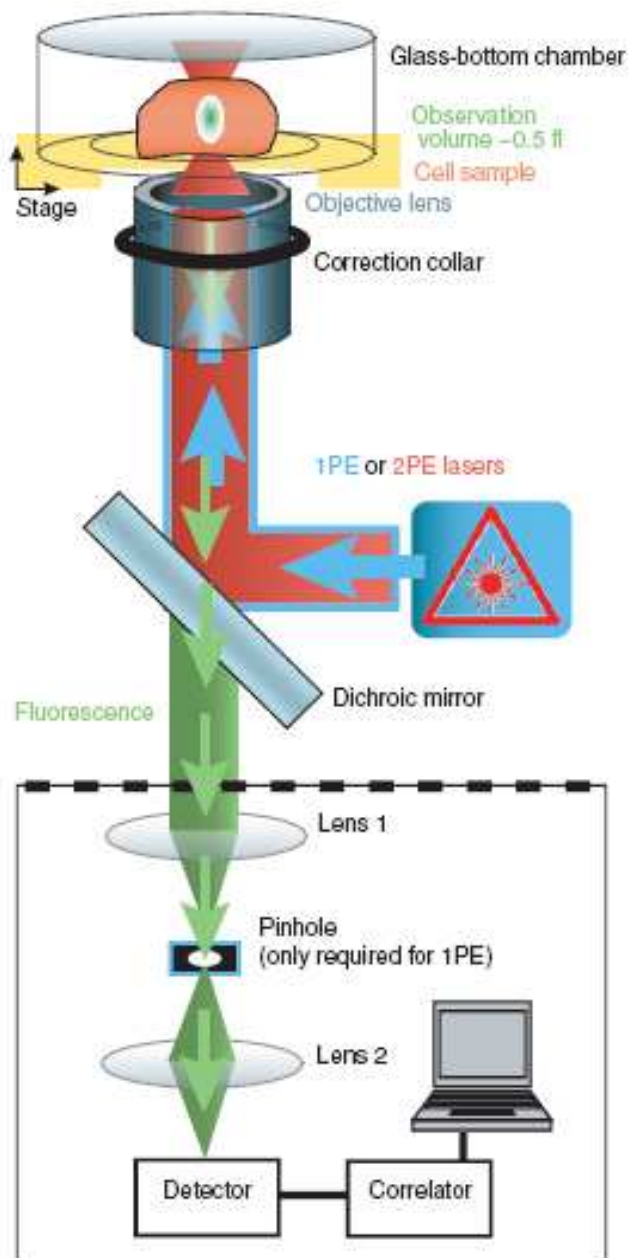
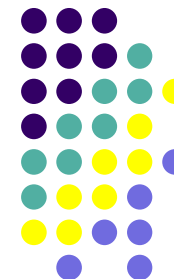


$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

$h$ : Planckches Wirkungsquantum

$c$ : Lichtgeschwindigkeit

$\lambda$ : Wellenlänge

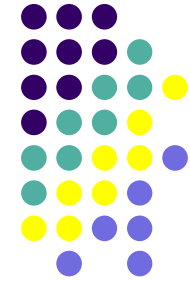


# FCS Aufbau

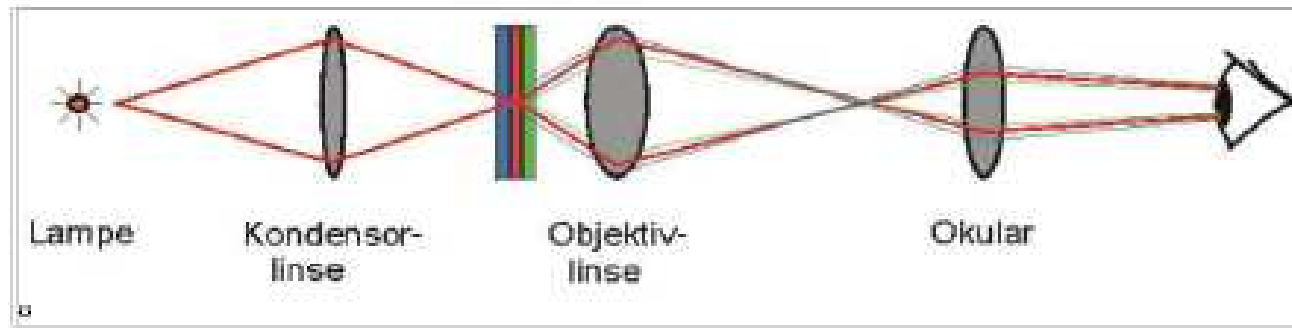
- Probe
- Objektiv
- Laser
- Dichroitischer Spiegel
- Emissionsfilter
- Linsen
- Lochblende
- Detektor
- Korrelator



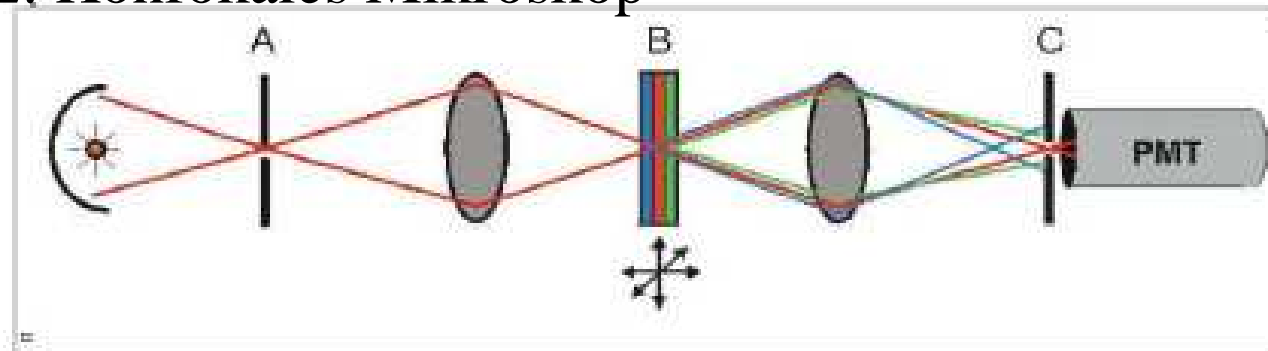
# Konfokale Mikroskopie



## 1. Konventionelles Mikroskop



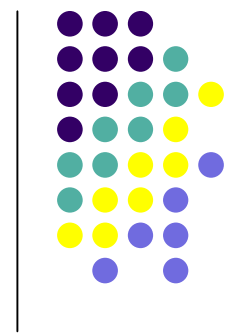
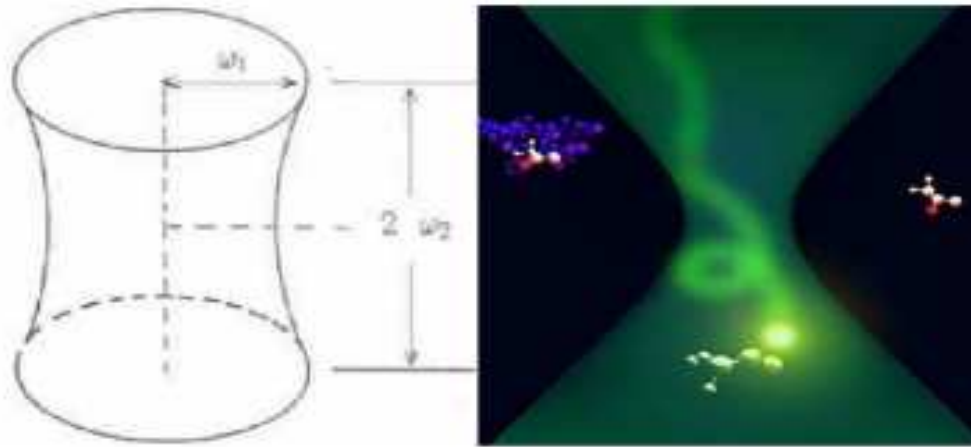
## 2. Konfokales Mikroskop



A: Lochblende

B: Objekt

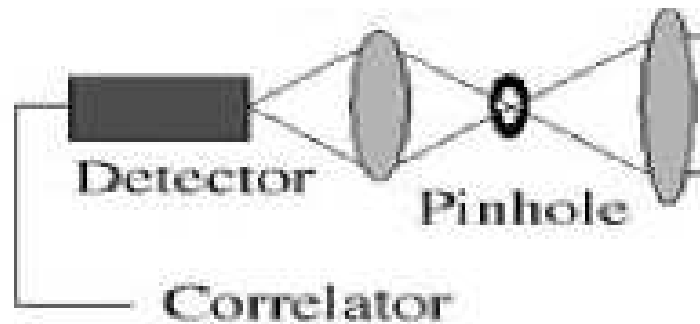
C: Blende



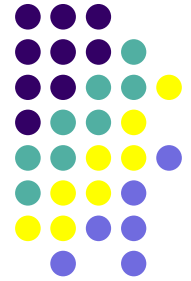
## Volumenelement

$\omega_1$  = laterale Laserdimension

$\omega_2$  = axiale Laserdimension

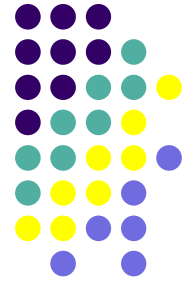


## Linsensystem



# Versuchsdurchführung I

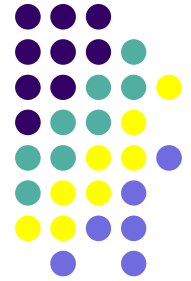
- Protein labeling
  - Fluorophor: hell, photostabil, darf Funktion des Proteins nicht beeinflussen
- Einstellung des Setups
  - Optimierung der Laserposition
  - Einstellung des Excitations- und Detektionswegs
  - Bestimmung des Hintergrundlichts
- Kalibrierung I
  - Bestimmung der lateralen und axialen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



# Versuchsdurchführung II

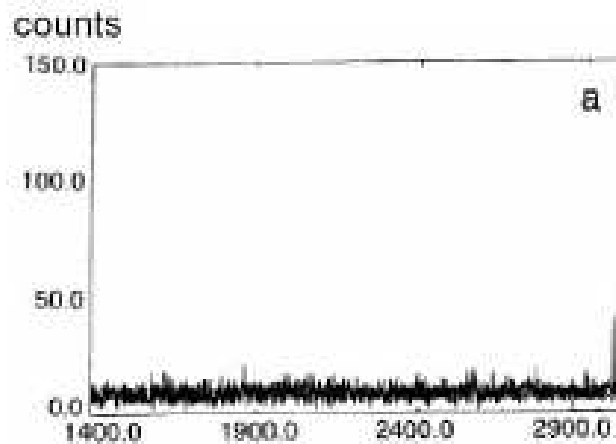
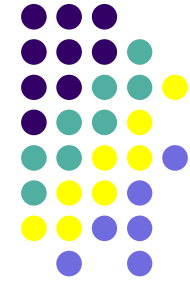
- Kalibrierung II
  - Bestimmung des Strukturparameters  $S$  und der mittleren Diffusionszeit  $\tau_{diff}$
  - Berechnung des konfokalen Volumens  $V_{eff}$
- Überführen der fluoreszierenden Proteine in die zu untersuchenden Zellen
- Optimierung der intrazellulären FCS Messungen
  - Messungen mit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

# Versuchsdurchführung III

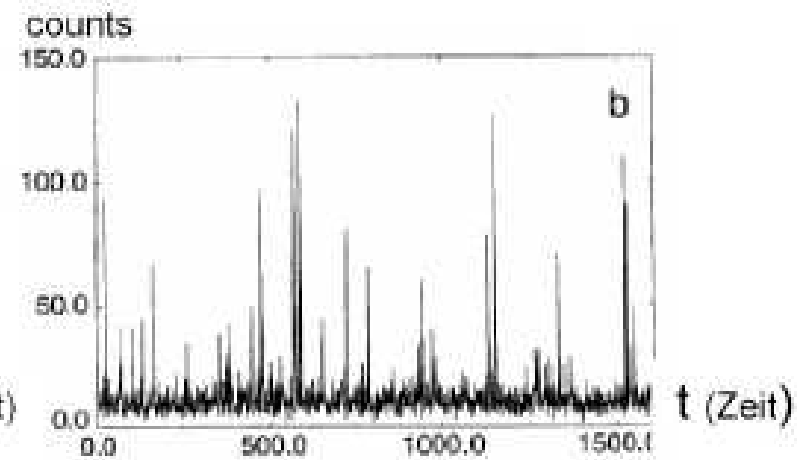


- FCS Messung in lebenden Zellen
  - Auswahl der Zellen für die Messung
  - Festsetzen der Messbedingungen (z.B. Anzahl der Durchläufe)
- Analyse der Messungen

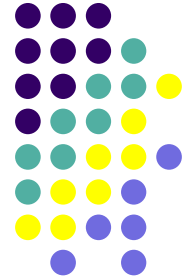
# Auswertung



Hintergrundrauschen



Emissionssignal



# Autokorrelation

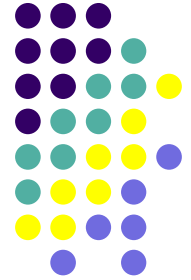
- Mathematische Vorschrift zur Auswertung der Fluktuationssignale

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

I : Intensität

t : Zeitpunkt

$\tau$ : Korrelationszeit



# Autokorrelationsfunktion

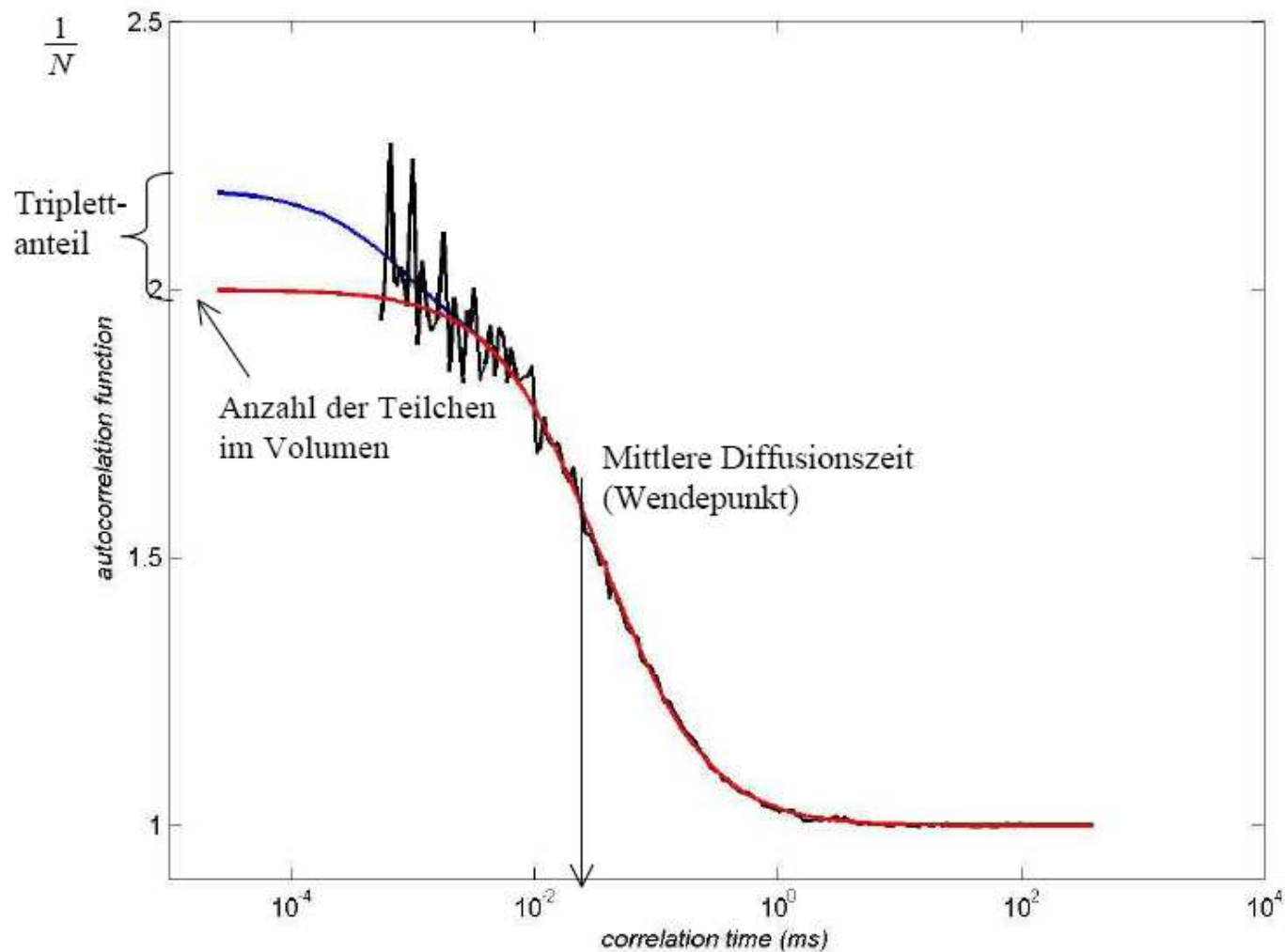
$$G(\tau) = \frac{1}{N_{\text{eff}}} \cdot \left( \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}} \right) \cdot \left( \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{\text{diff}}}}} \right)$$

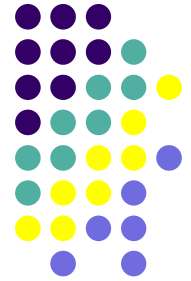
- $N_{\text{eff}}$  : mittlere Teilchenzahl im Fokus
- $\tau$  : Korrelationszeit
- $\tau_{\text{diff}}$  : mittlere Diffusionszeit des beobachteten Fluorophors
- $S$  : Strukturparameter ( $\omega_2/\omega_1$ )





## Autokorrelationsfunktion unter Berücksichtigung des Triplettanteils





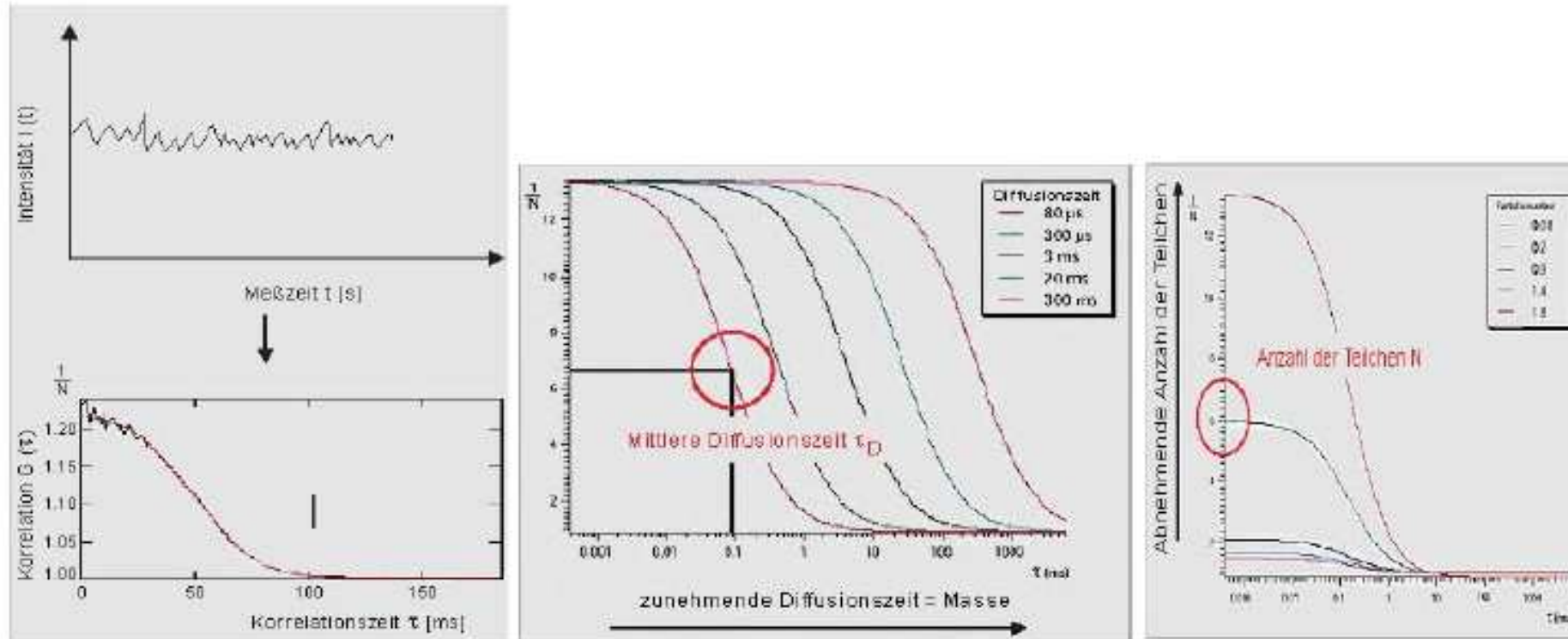
## Weitere Zusammenhänge:

- Teilchenanzahl  
für  $\tau = 0$  gilt:  $G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle}$
- Laterale Laser Dimension  $\omega_1$   
 $\omega_1^2 = 4D\tau_{\text{diff}}$
- Axialen Laser Dimension  $\omega_2$   
 $\omega_2 = S\omega_1$
- Berechnung des konfokalen Volumens  $V_{\text{eff}}$   
 $V_{\text{eff}} = 2\pi(4D\tau_{\text{diff}})^{3/2}$
- 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

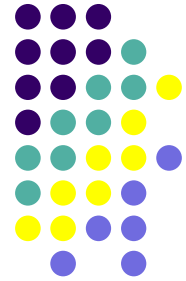


<http://www.zeiss.de/C12567BE00459794/Contents-Frame/951044FBD8FFAAABC1256CC30029E82D>

→ Zunahme der Diffusionszeit bei steigender Teilchengröße

# FCCS

## (Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie)

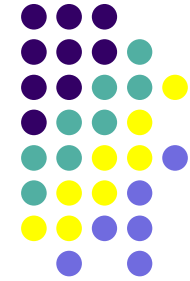


- Untersuchung molekularer Wechselwirkungen über Diffusionszeiten mittels FCS
- Problem: FCS ist relativ massenunempfindlich

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

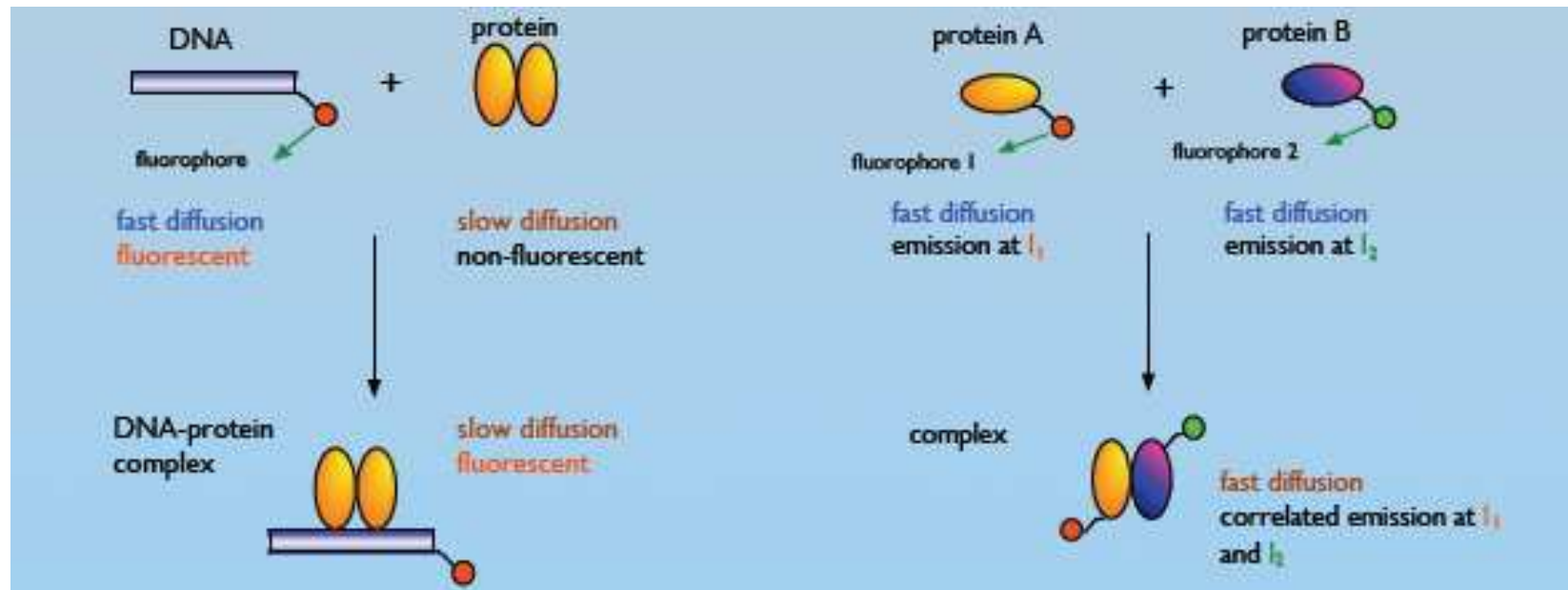
- Molekulargewichte sollten sich etwa um den Faktor 10 unterscheiden
- FCCS: labeling mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen
- Excitation und Detektion durch 2 Laser und Detektoren
- Mathematische Auswertung durch Kreuzkorrelation beider Signale
- Aussagen über Diffusionskoeffizient und Anteile der doppelt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

# Vergleich FCS und FCCS

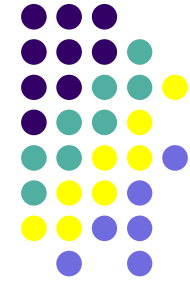


FCS

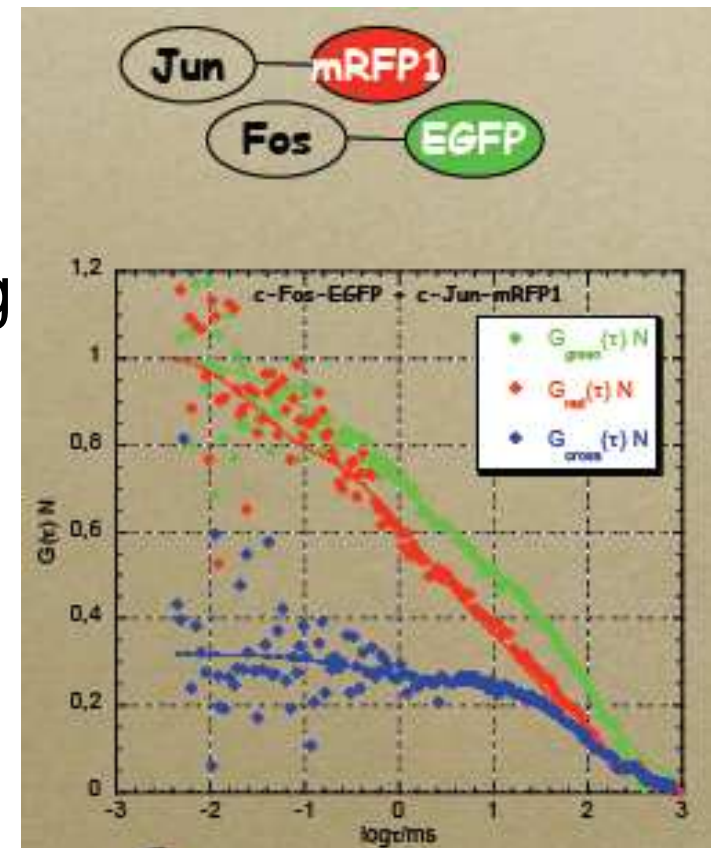
FCCS

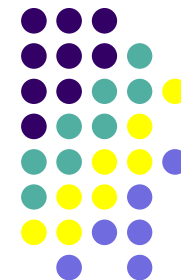


# Beispiele



- 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](http://www.biophysics.org/education/schwille.pdf)
- A.-K. Marguerre, **Fluoreszenz Korrelationspektroskopie (FCS) BSE Diagnostik**, [www.pci.uni-heidelberg.de/pci/fpraktikum/ws03/BSE.pdf](http://www.pci.uni-heidelberg.de/pci/fpraktikum/ws03/BSE.pdf)
- **Fluoreszenz- Korrelations- Spektroskopie (FCS)**, [www.pci.uni-heidelberg.de/pci/fpraktikum/ws00/ws000112.pdf](http://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&ileneame=969265085.pdf](http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=969265085&dok_var=d1&dok_ext=pdf&ileneame=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](http://www.dkfz-heidelberg.de/Macromol/B040_html/teaching/Spectroscopy.pdf)