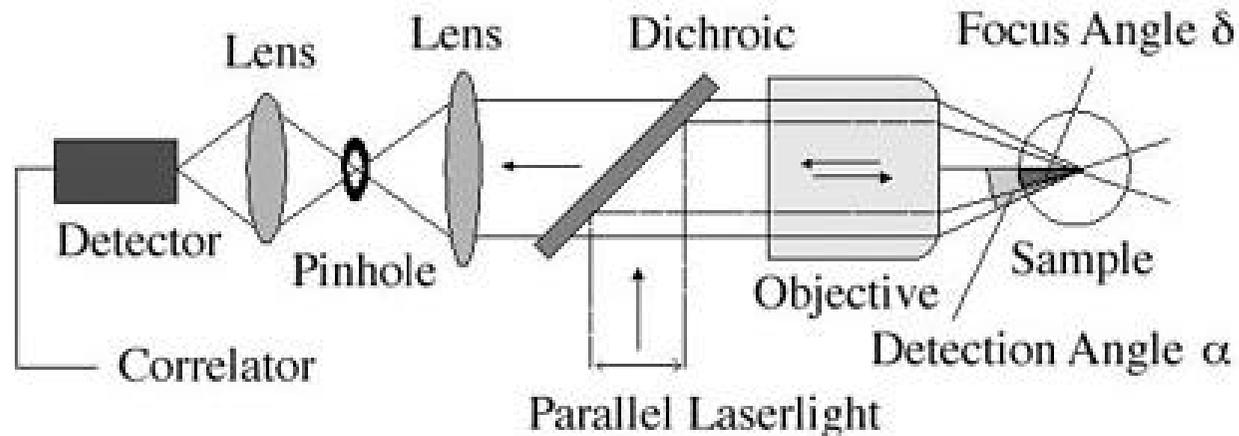


## Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

### Konfokale Optik für Einzelmolekülstudien:

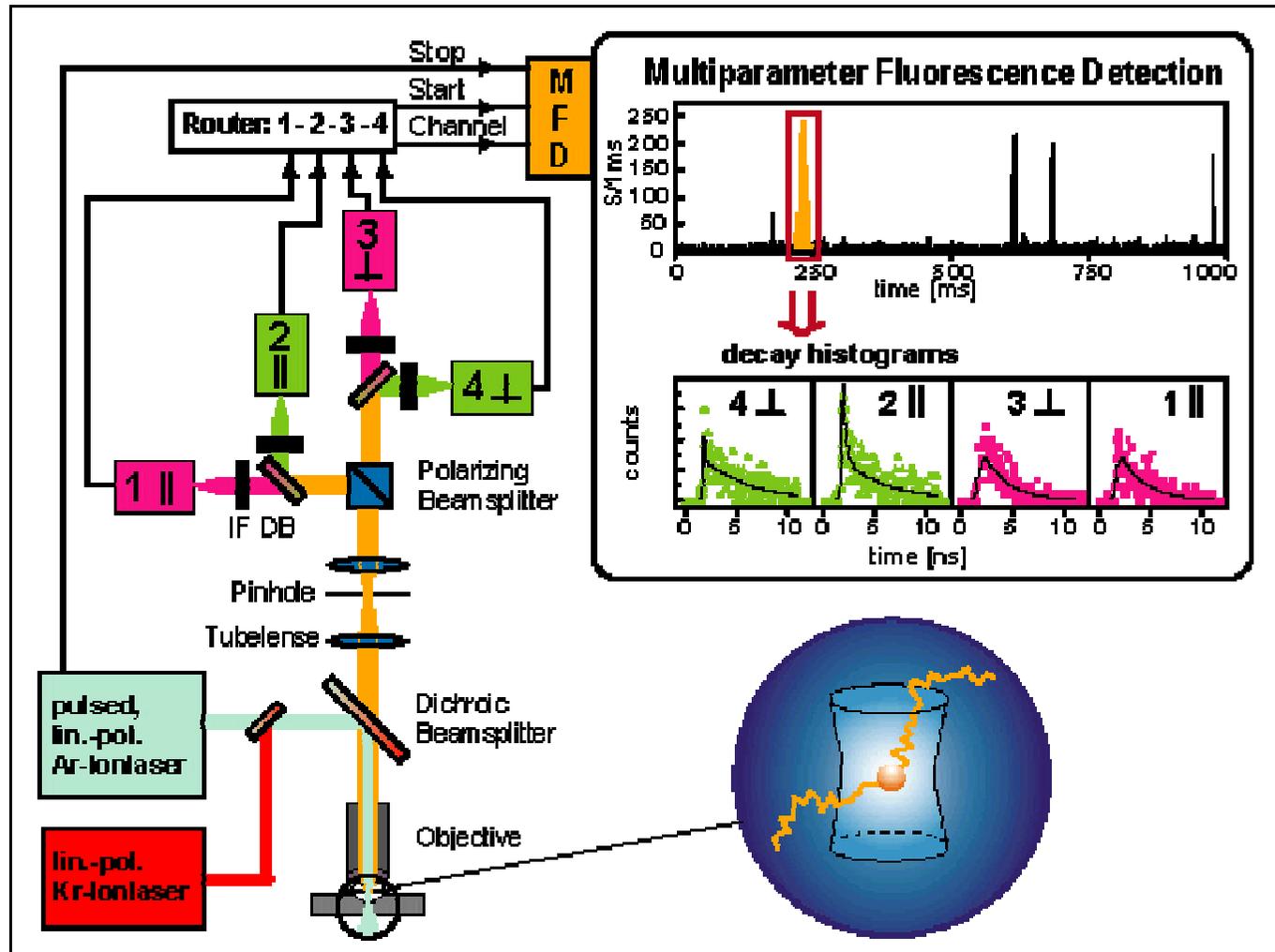
- Das Fluoreszenzlicht wird in alle Raumrichtungen emittiert. Daher ist es wichtig einen großen Raumwinkel zu detektieren.  
=> große Apertur (Ölimmersion)
- konfokal: Anregungslicht und emittiertes Meßlicht passieren in entgegengesetzter Richtung die gleichen optischen Elemente.



P. Schille, Göttingen

# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

Beispiel eines Versuchsaufbaus für Fluoreszenzeinzelmolekülstudien



## Konzepte der Einzelmoleküldetektion (SMD)

### **Confocal laser scanning microscopy (CLSM)**

- Rasterverfahren mit Photomultiplier (oder **single-photon avalanche diode SPAD**; Quantenausbeute 60%, Dunkelzählrate 200 counts/sec.)
- Einzelphotonenmessung: **Time-correlated single photon counting TCSPC** mit gepulstem Laser (Pulsbreite ~80 ps; Rate: 40 MHz);
- sehr gute Zeitauflösung: 40 ps (für Fluoreszenzlebensdauer Messung) und 100 ns (z.B. für Reaktionskinetik)

### **Weitfeldmikroskopie (WFM)**

Verwendung von hoch sensitiven CCD-Kameras; gute Ortsauflösung bei rel. großen Flächen, Zeitauflösung wird durch die Auslesegeschwindigkeit der CCD-Kameras begrenzt (> ms).

Zeitauflösung vs. Gesamtbeobachtungszeit:  $\sim 10^5$ -  $10^6$  Photonen können vom Fluorophor abgegeben werden bevor es zum „Bleichen“ kommt (Photozerstörung): ca. 100 Photonen geben ein S/N von 1/10  $\Rightarrow 10^3$  Zeitpunkte können gemessen werden z.B. Zeitauflösung von 100 $\mu$ s über 100 ms.

# Detektoren für Einzelmolekülspektroskopie

Im Bereich der Einzelmolekülspektroskopie kommen aufgrund der besonderen Anforderungen an die Empfindlichkeit und an die Zeitauflösung im wesentliche drei Detektorarten zum Einsatz:

- Photomultiplier Röhren (PMT)
- Photodioden
- Avalanche Photodioden (APD)

Empfindlichkeit (Quantum efficiency)

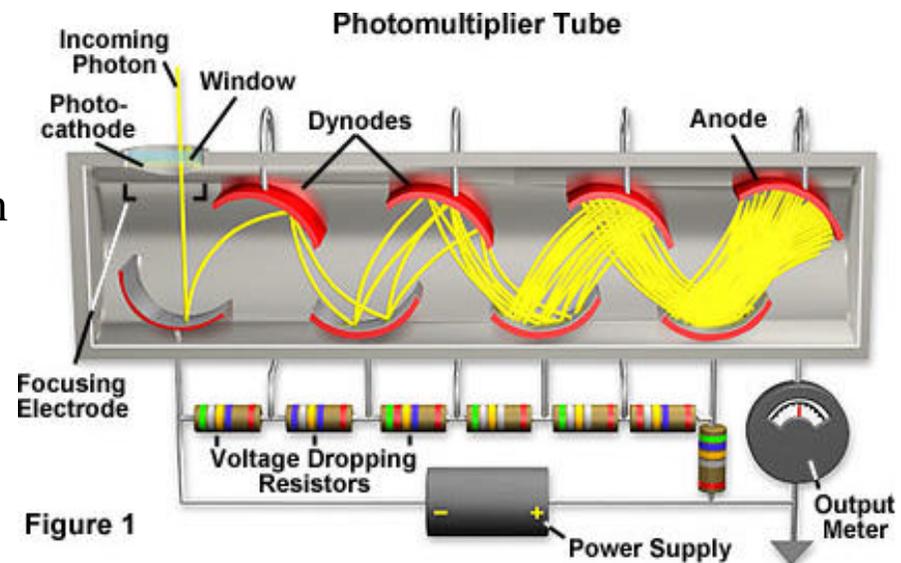
$$\Phi [\%] = 100 [\text{Photoelektronen/einfallende Photonen}]$$

## **Photomultiplier (PMT)**

Durch Licht freigesetzte Photoelektronen werden in einer Vakuumröhre beschleunigt und dann in einer Kaskade mit 10-15 Dynoden im Signal „lawinenartig“ verstärkt.

## **Eigenschaften**

- Quantum efficiency ~ 30 %
- Verstärkungsfaktoren bis zu  $10^9$
- geringe Dunkelzählrate
- sehr gute Zeitauflösung < ps

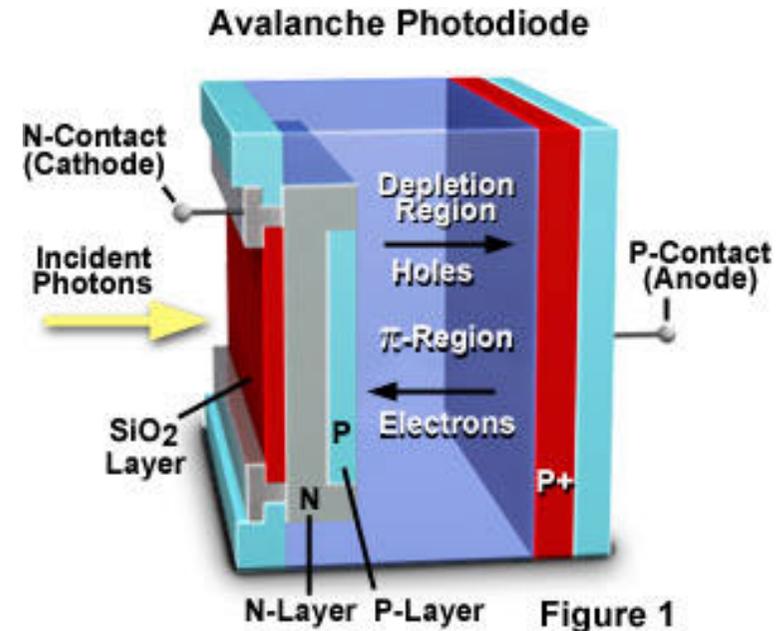


# Detektoren für Einzelmolekülspektroskopie

## Photodiode

Die Photodiode ist eine Halbleiterdiode. Photonen mit einer Energie größer als die der Bandlücke im Halbleiter regen ein Elektron an und heben es in das Leitungsband und erzeugen ein „Loch“ im Valenzband. Eine angelegte Spannung verschiebt das Elektron-Loch-Paar in entgegengesetzte Richtungen und erzeugt einen messbaren elektrischen Strom.

- hohe Empfindlichkeit
- geringe Verstärkung (intern)



## Avalanche Photodiode (APD)

Die Avalanche Photodiode kombiniert die hohe Empfindlichkeit der Photodiode mit der großen Verstärkung (avalanche = Lawine), wie sie bei Photomultipliern zu finden ist. Im Gegensatz zu konventionellen Photodioden wird eine entgegengesetzte Spannung von 100 V- 1000 V an den *pn*-Übergang gelegt, die ein starkes elektrisches Feld erzeugt, dass zu einer enormen Beschleunigung der Elektronen führt. Hierbei kommt es zu Kollisionen im Halbleiterkristall und es werden weitere Elektronen erzeugt (=> Lawinenartige-Signalverstärkung)

# Detektoren für Einzelmolekülspektroskopie

## Avalanche Photodiode (APD)

### Eigenschaften

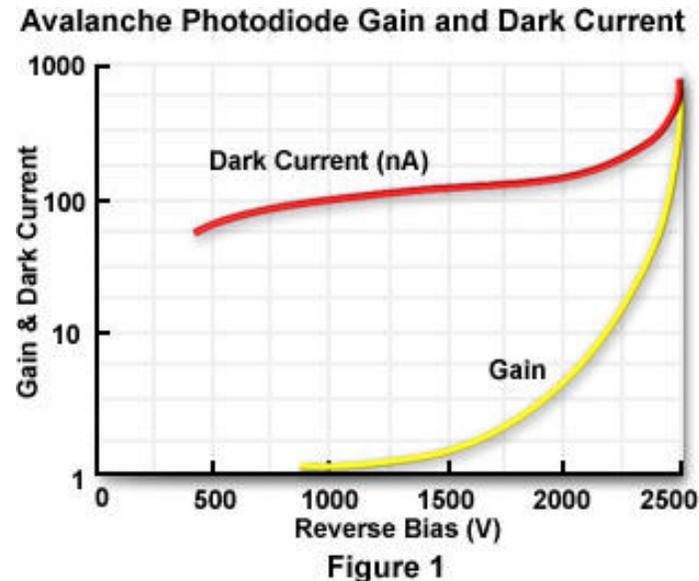
- gute Quantum efficiency ~ 60 - 90 %
- Verstärkungsfaktoren ~ 50 - 10<sup>3</sup>
- relative hohe Dunkelzählrate 100 – 200 ct/s
- sehr gute Zeitauflösung < ps

### Single Photon counting mode

Die höchste Empfindlichkeit eines PMT oder APD wird im sogenannten „single photon counting mode“ erreicht. Hierbei wird nicht der Photostrom gemessen, sondern Pulse die von individuell registrierten Photonen verursacht werden. Eine Rauschunterdrückung findet über gesetzte Stromschwellen statt: Nur Pulse mit Werten über dieser Schwelle werden als detektierte Photonen akzeptiert (=> Single Photon Avalanche Dioden: SPAD).

Beispiel: (SPCM-AQR, Perkim-Elmer)

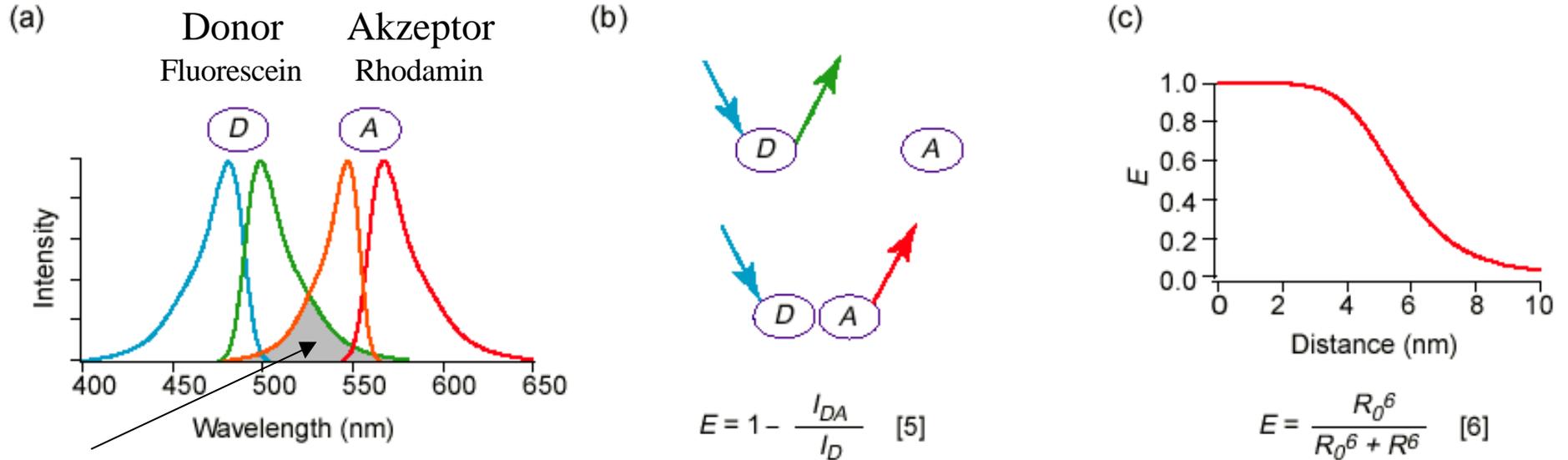
- Empfindlichkeitsbereich:  $\lambda = 400 - 1060 \text{ nm}$
- aktive Fläche:  $\varnothing = 180 \mu\text{m}$
- $\Phi = 70 \%$  (bei 630 nm)
- Zeitauflösung: 300 ps (FWHM)



# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## Förster Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Fig. III

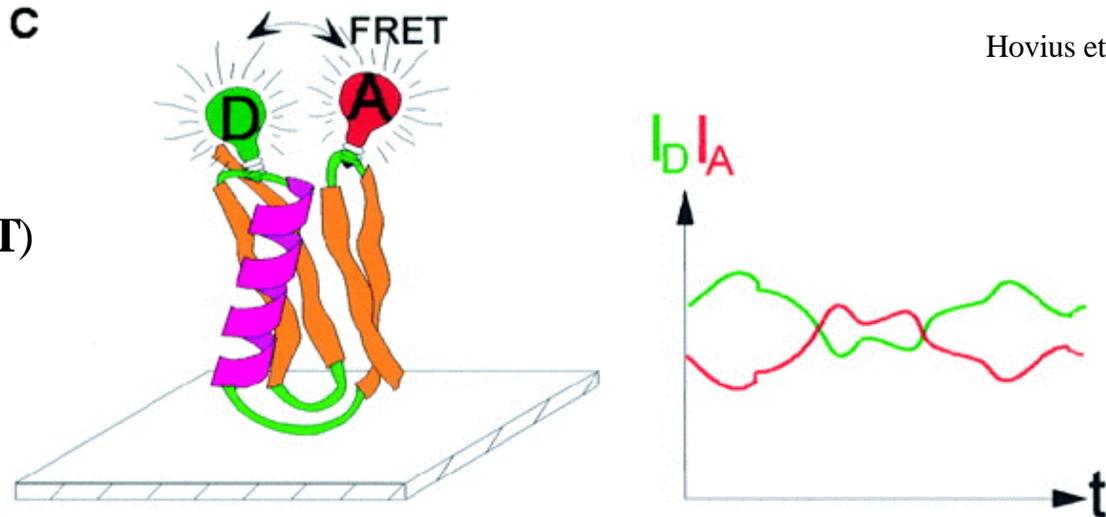


Energieüberlapp

*ecological Sciences*

Hovius et al., TIBS, 2000

Am Einzelmolekül:  
single pair FRET (spFRET)



# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## Prinzip des Förster-Prozesses

Strahlungslose Energieübertragung:  
Dipol-Dipol Wechselwirkung mit  
Abstandsabhängigkeit  $\sim r^6$

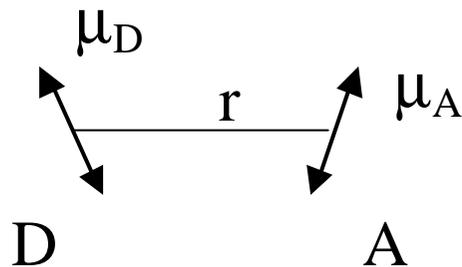
$$R_0 = (8.79 \cdot 10^{-5} n^{-4} F_D J k^2)^{1/6} \text{ \AA}$$

$n$  Brechungsindex des Mediums  
(z.B. Wasser  $n = 1.33$ )

$F_D$  Quantenausbeute des Donors (0.2 -1)

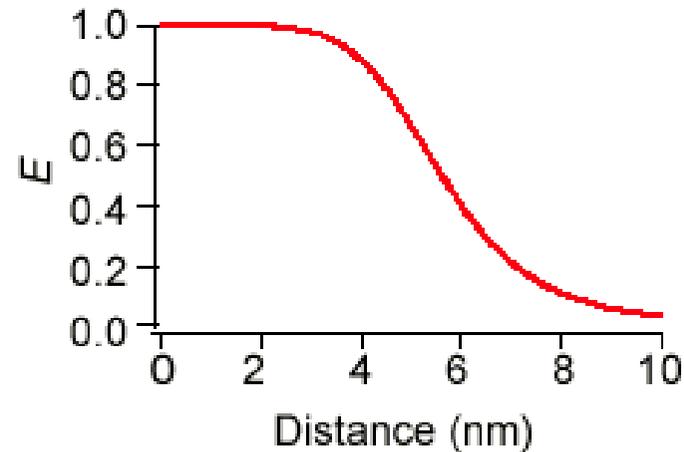
$J$  Austauschenergie (Energieüberlapp)  
[ $\text{nm}^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$k$  Orientierungsfaktor  
(mit 2/3 für nicht orientierte Dipole)



### Förster Radius $R_0$

Radius beim Energietransfer  $E = 0.5$



$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad [6]$$

Beispiel hier (fluorescein-rhodamin):  $R_0 = 5.6$  nm

Für die meisten D-A Paare:

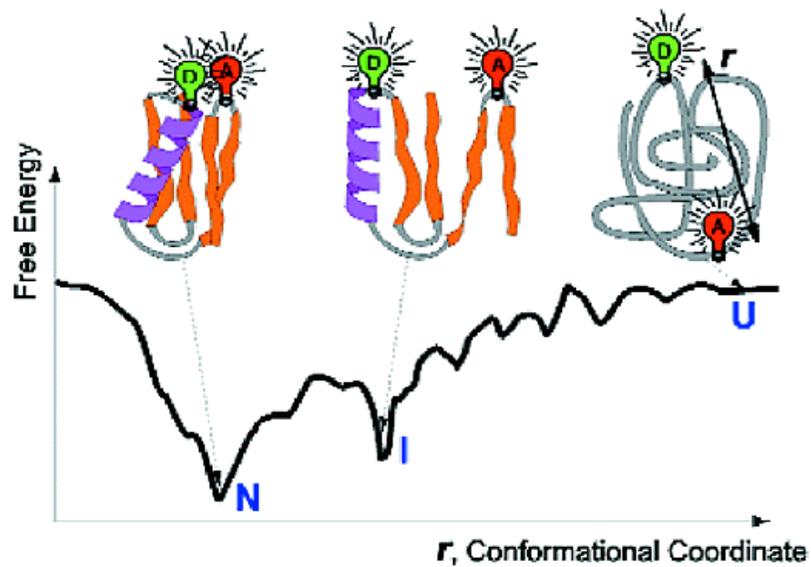
- $R_0 = 1.5 - 8.0$  nm
- Sensitiver Bereich:  $0.5 R_0 - 1.5 R_0$

# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

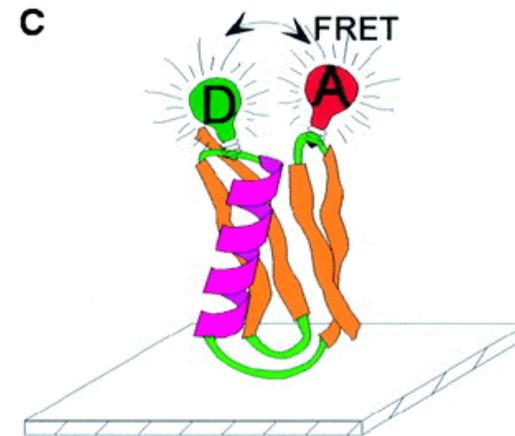
## spFRET Anwendungsmöglichkeiten

- Nanometer Abstandsmessung
- Micro-Millisekunden Zeitauflösung

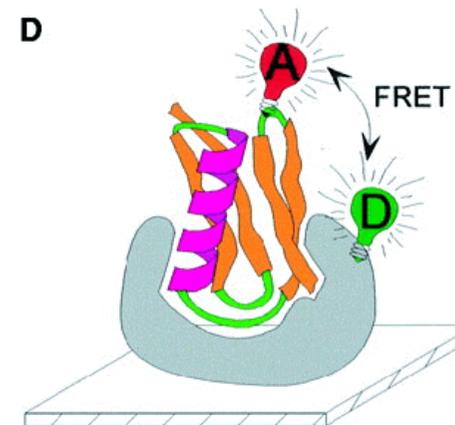
## Proteinfaltung



## Konformationsänderungen



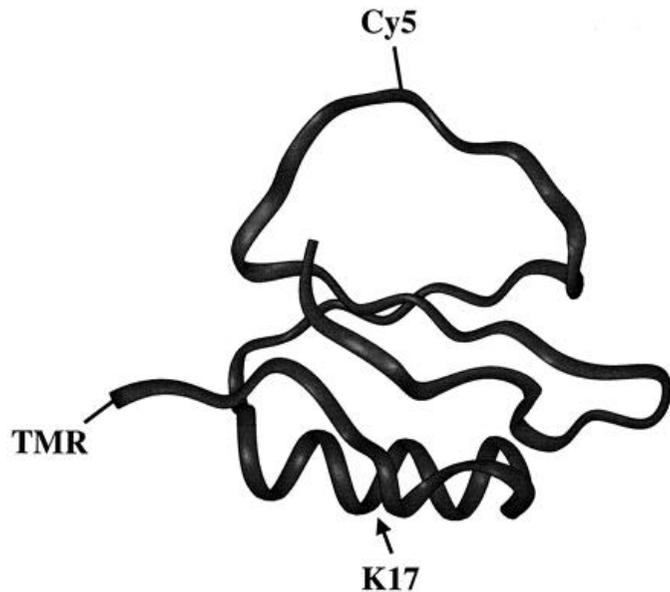
## Protein-Protein/Substrat Wechselwirkung



# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## Proteinfaltung beobachtet mit spFRET

### Chymotrypsin inhibitor 2 (CI2)



### Messungen

- Anregung des Donors (TMR,  $\lambda_{\text{abs}} \sim 540 \text{ nm}$ ) mit 514 nm (Ar-Ionen Laser), Fokus 10  $\mu\text{m}$
- **Protein in Lösung:** Beobachtungszeit  $\sim 1 \text{ ms}$

### Probe

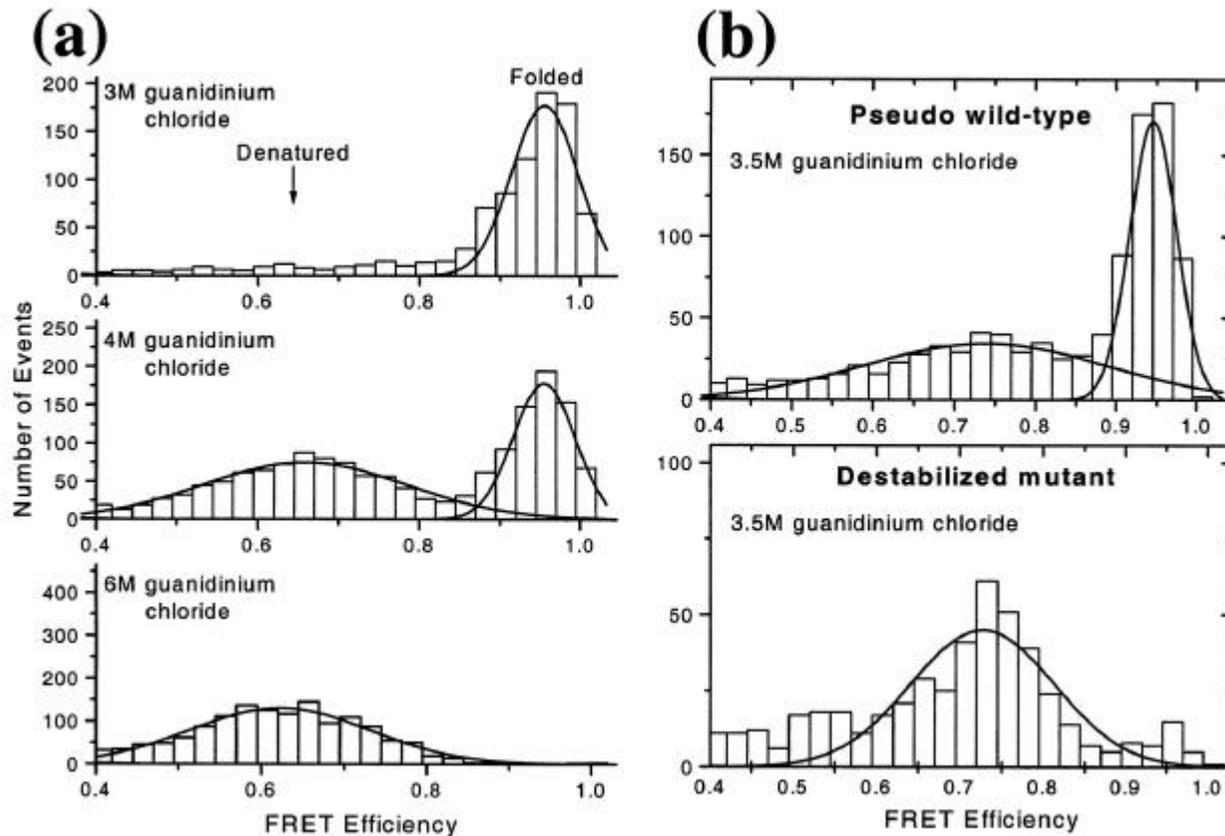
- Kleine Struktur (64 AS),  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, loops
- Einfacher Faltungsmechanismus: „two state“
- FRET-Paar Tetramethylrodamin (TMR) - Cy5
- Förster Radius: 53 Å

Deniz et al. PNAS 2000

# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## Proteinfaltung beobachtet mit spFRET

CI2 bei verschiedenen Konzentrationen von Guanidinium Chlorid (induziert Entfaltung des Proteins)



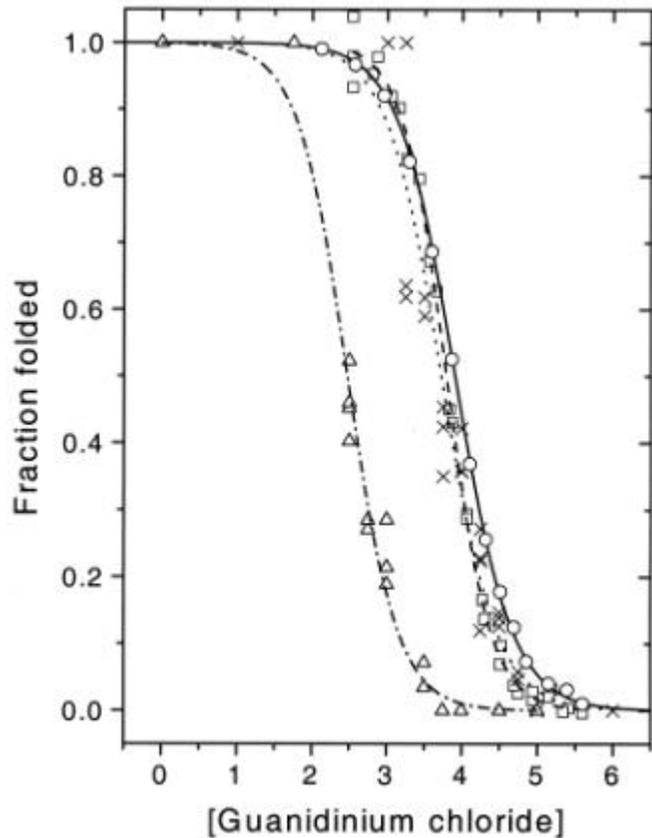
### Resultate

- Label Abstände  
gefaltete Form: 31 Å  
entfaltete Form: 48 Å
- breitere Verteilung der Abstände für die entfaltete Form.  
Heterogener entfalteter Zustand.  
=> Faltungstrichter Modell

# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## Proteinfaltung beobachtet mit spFRET

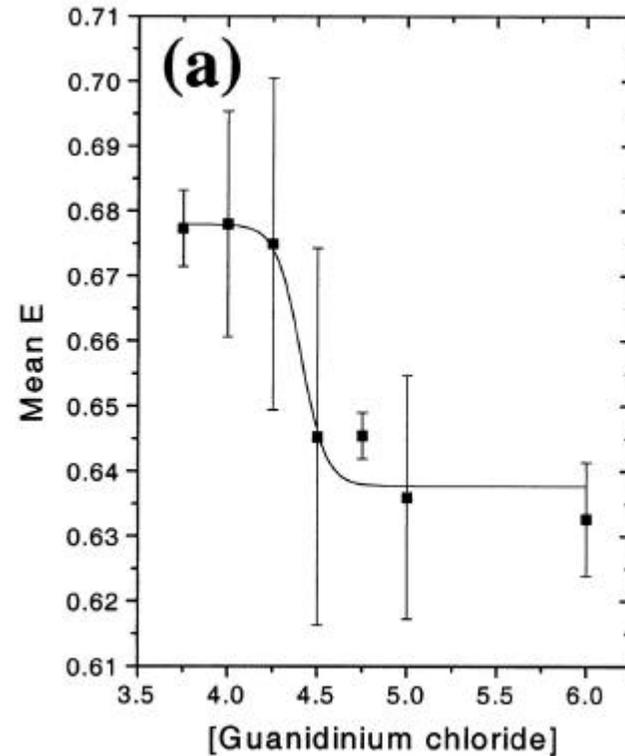
CI2 Stabilität im Ensemble  
und im Einzelmolekül



O: Ensemble (Trp)  
• : Ensemble FRET  
x: spFRET  
Δ: Mutante

**Stabilität ist im Ensemble  
und im Einzelmolekül gleich !**

Verschiebung des Abstandes bei  
Proteinen im entfalteten Zustand

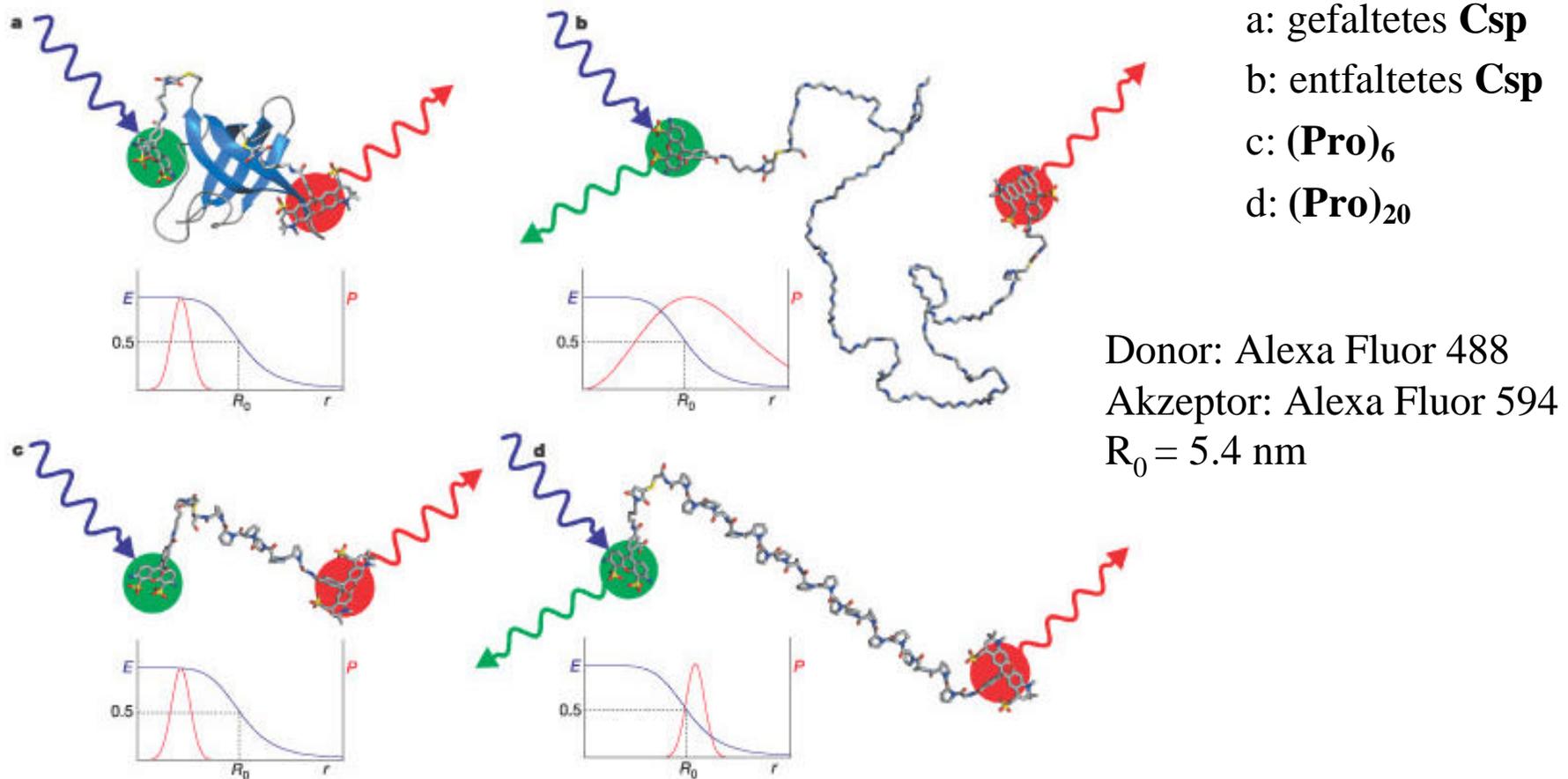


**Kopplung zwischen  
Abstandsänderung und Entfaltung !**

# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

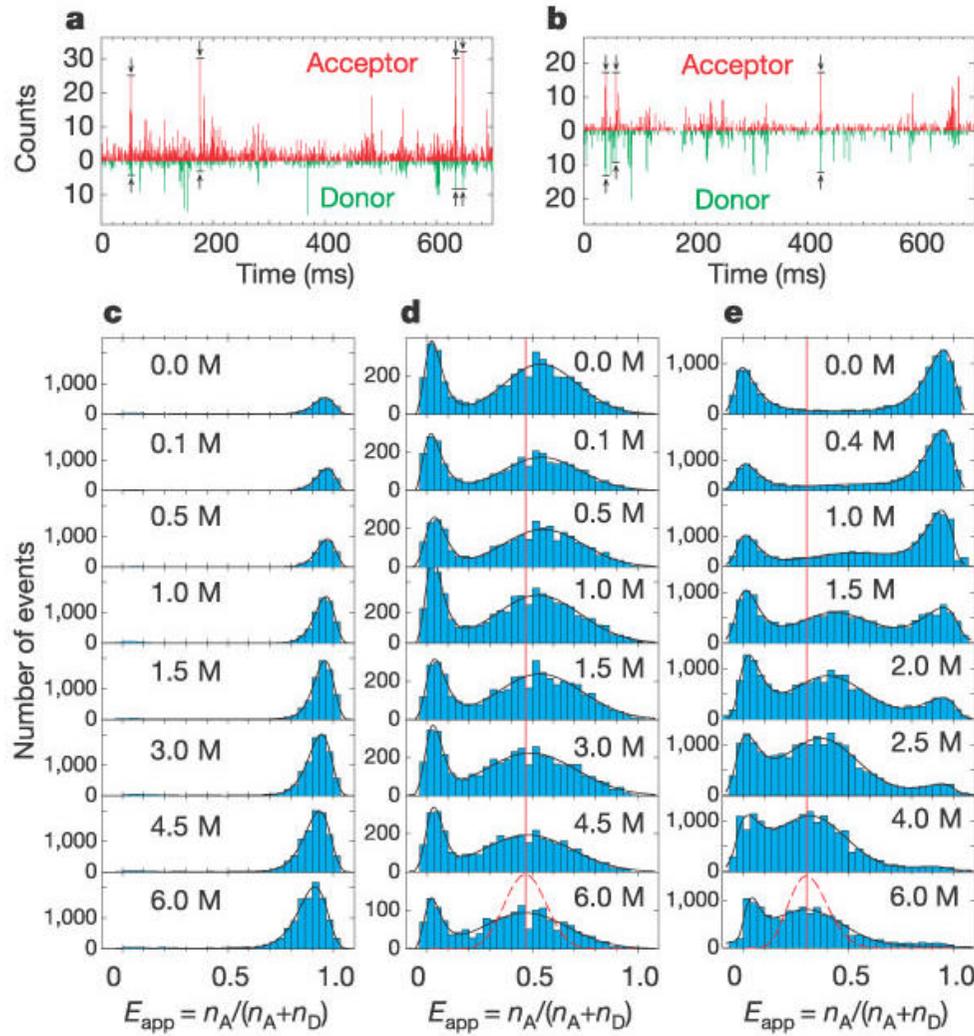
## Proteinfaltung beobachtet mit spFRET

Schematische Strukturen vom **cold-shock protein (Csp)** und von der Modelstruktur **polyprolin**

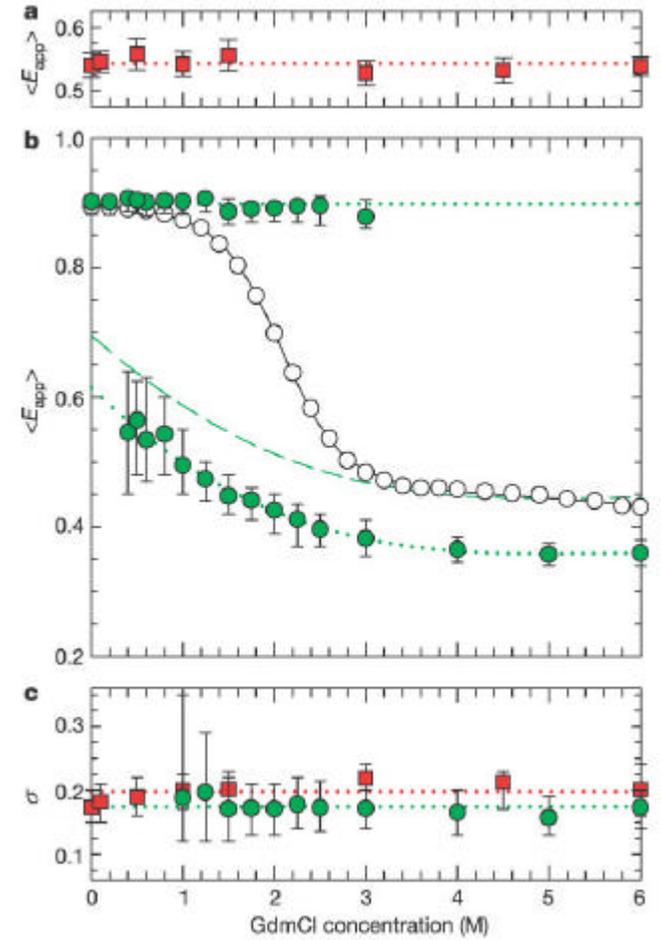


# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

spFRET mit csp: (a,c) Pro<sub>6</sub> (b,d); Pro<sub>20</sub>; (e) Csp



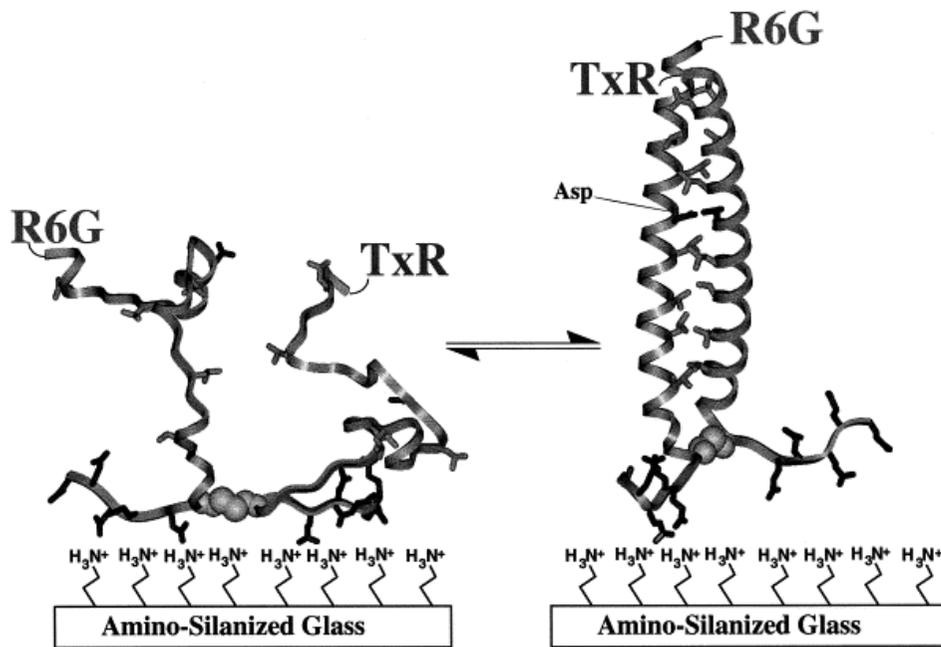
(a) Pro<sub>20</sub> (b); Csp; (c) Csp+Pro<sub>20</sub>



# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## Proteinfaltung beobachtet mit spFRET

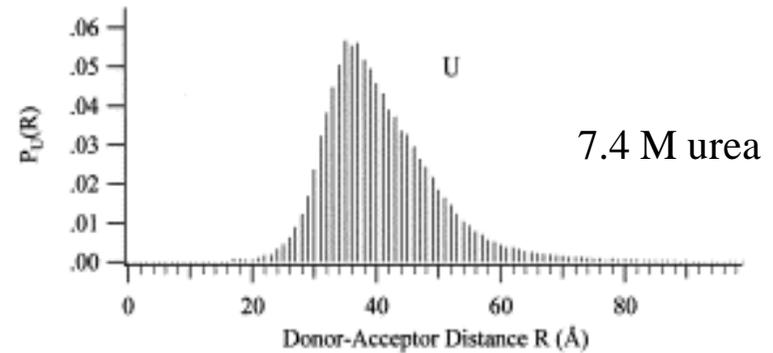
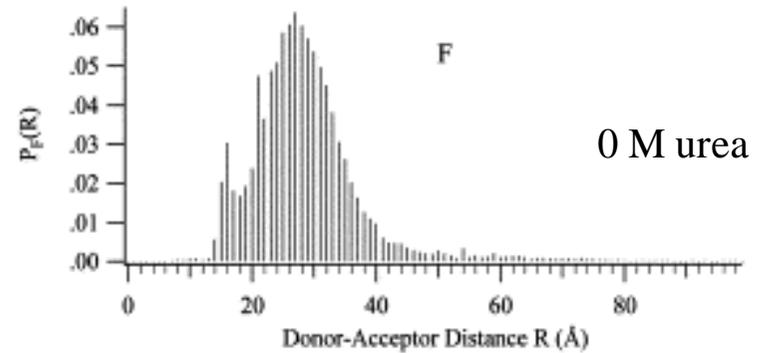
Immobilisiertes GCN-4 Peptid



entfaltet

gefaltet

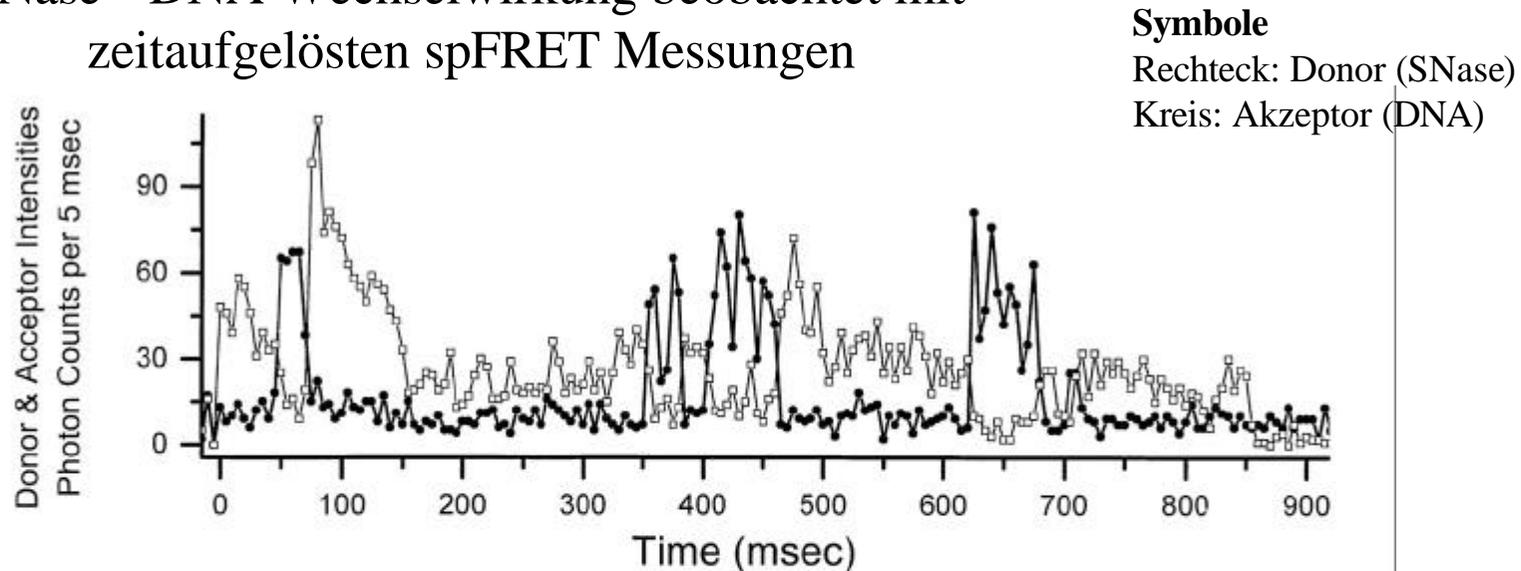
Abstandsverteilung des immobilisierten GCN-4 Peptids



Einfluß der Immobilisierung !!??

# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## SNase - DNA Wechselwirkung beobachtet mit zeitaufgelösten spFRET Messungen

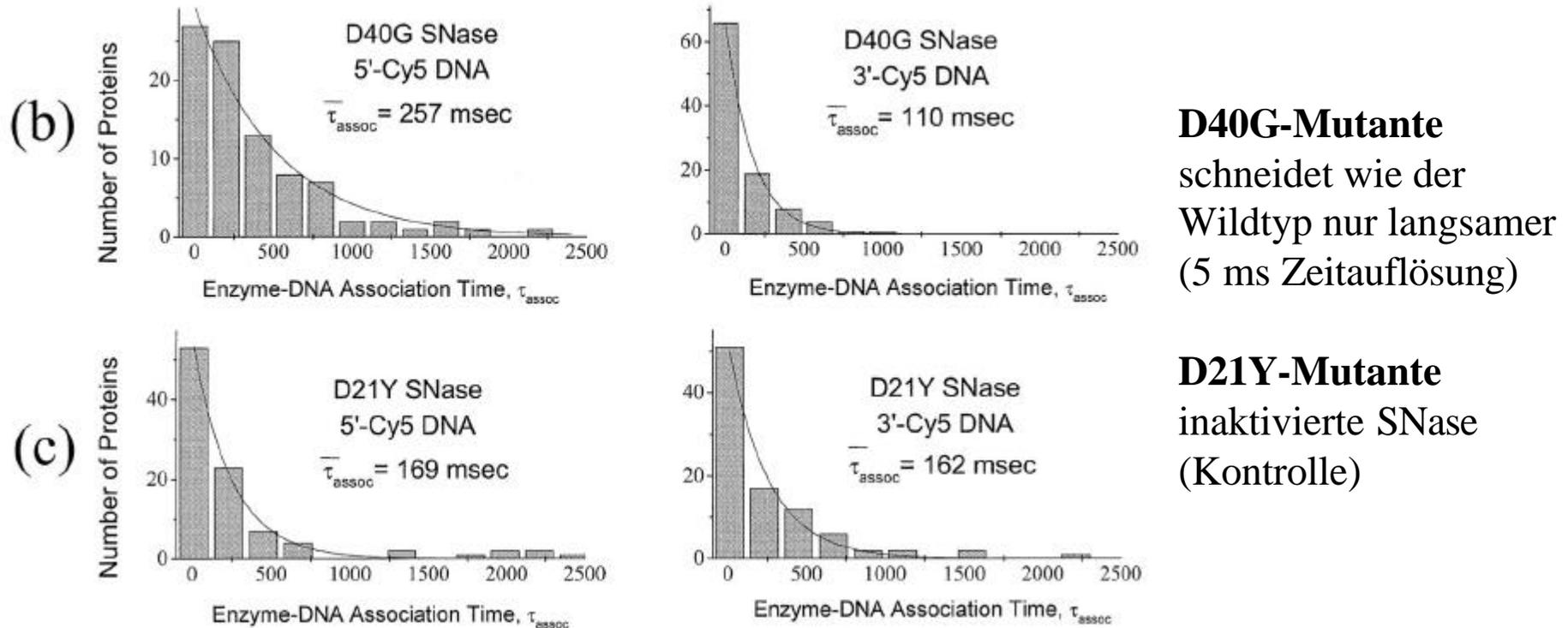


- Antikorrelierte Donor und Akzeptor Emission ist indikativ für spFRET
- $\tau_{\text{asoc}}$  : Dauer des spFRET

Staphylococcal Nuclease (SNase) hydrolisiert DNA, Zeitauflösung 5 ms

# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## SNase-DNA Bindungszeiten für verschieden Mutanten



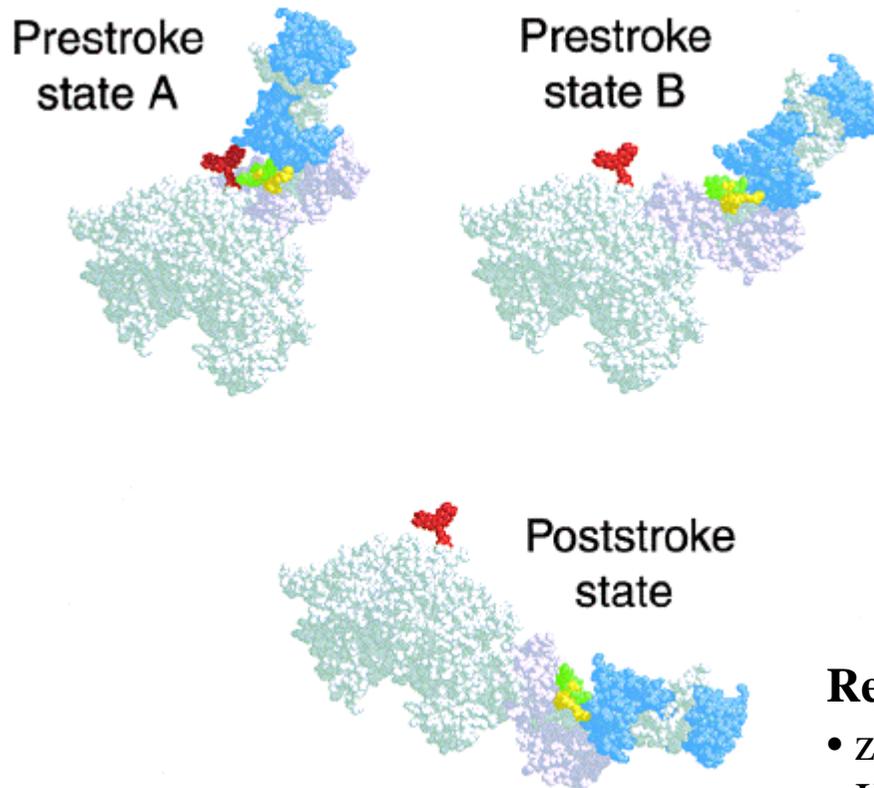
### Resultat

natürliche „Schneiderichtung“ ist von 3' nach 5'  
=>  $\tau_{\text{assoc}}$  hier auch kürzer (110 ms statt 257 ms)

# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## Konformationsänderungen mit FRET (Ensemble)

Myosin S1-Fragment in modellierten Konformationen  
basierend auf FRET Messungen



### **Strukturelemente**

weiß: „schwere Kette“ (HC)

hell violett: „essentielle  
leichte Kette“ (ELC)

blau: „regulatorische  
leichte Kette“ (RLC)

### **Label**

rot (Akzeptor): TMR

gelb-grün (Donor): Oregon green

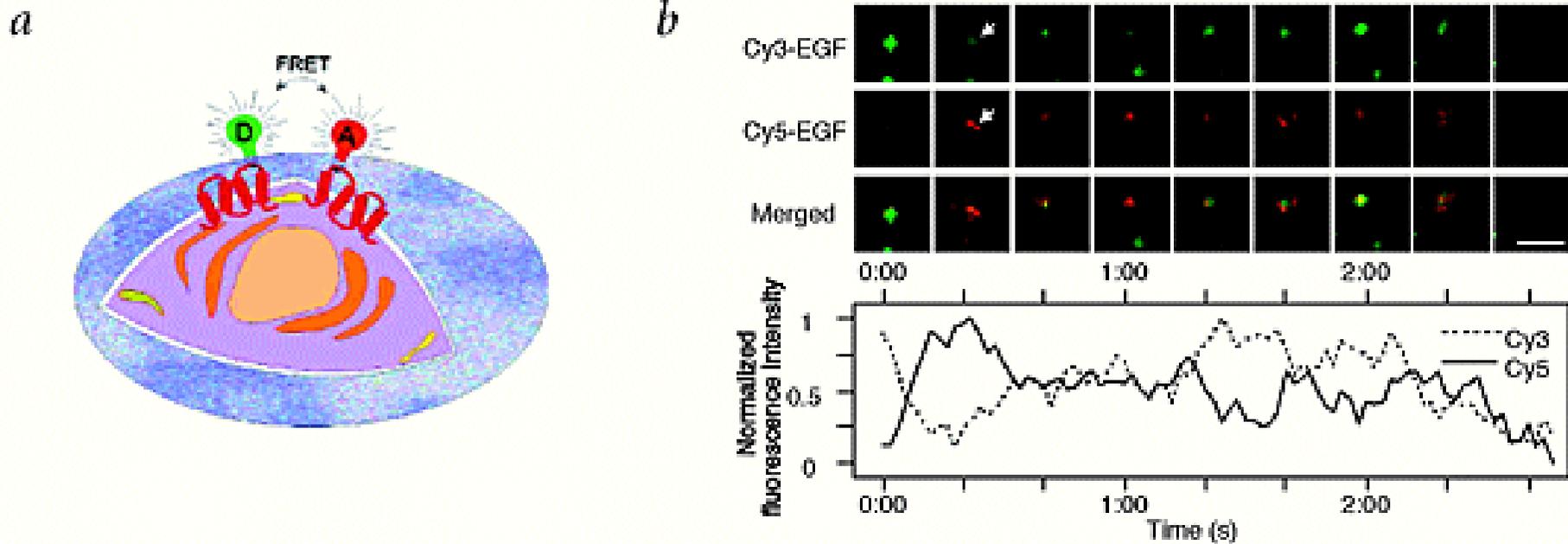
### **Resultate**

- zwei unterscheidbare „prestroke“-Zustände
- Kraftschub führt zu einer 10 nm Abstandsveränderung

# Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

## Einzelmolekülbeobachtung mit spFRET lebenden Zellen

Beispiel: Epidermal growth factor (EGF)



### Messungen

TIR-Technik

geringe Laserleistung  $10 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$  (längere Lebensdauer der Dyes)

„Co-Lokalisation“ von zwei Biomolekülen auf der Nanometer Skala .