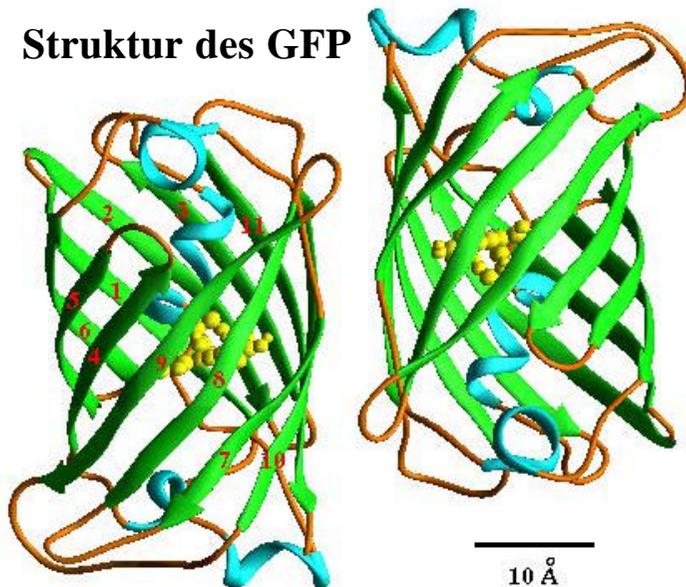


Konzepte der Einzelmoleküldetektion (SMD)

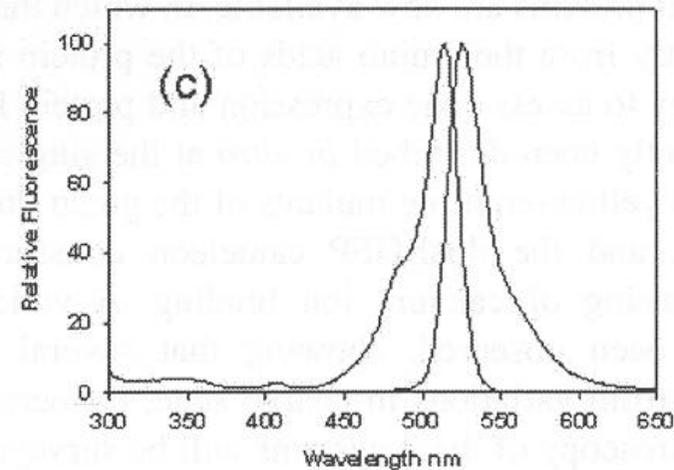
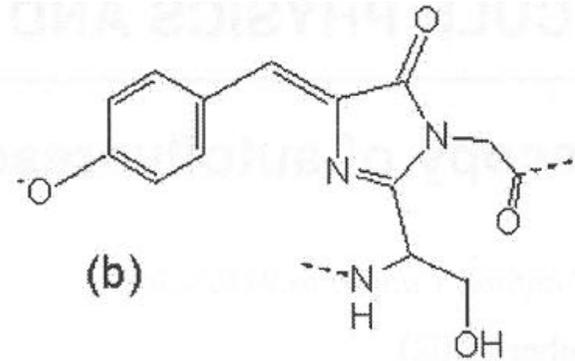
Green-flourescent Protein (GFP): Starke intrinsische Fluoreszenz (Autofluoreszenz)

- Struktur mit 238 Seitengruppen
- Isoliert aus der Qualle (*Aequora victoria*)
- Variation der Wellenlängen durch gezielte Mutationen an den Positionen 65,66,67 in der AS-Sequenz (=> Nähe der tyrosin-hydroxyl-Gruppe)

Struktur des GFP



Struktur des Fluorophors



Anregungs – und Emissionsspektrum eines YFP

Konzepte der Einzelmoleküldetektion (SMD)

Anwendungen von autofluoreszierenden Proteinen

FRET-Paare („Cameleon-Strukturen“):
Direkte Expression autofluoreszierender Proteine unterschiedlicher Wellenlängen am Anfang (*N*-Terminus) und am Ende (*C*-Terminus) der zu untersuchenden Proteinstrukturen.

In vivo Studien:

Einfaches Einbringen der fluoreszierenden Struktur (z.B. GFP) in die Zelle auf DNA-Ebene.

=> Mikroskopie: Anfärben von ausgewählten Bereichen der Zelle

Nachteile:

GFPs sind große Strukturen, d.h. Probleme bei Analyse von Konformationsänderungen und mit potentiell starken Änderungen an den zu untersuchenden Proteinen.

weitere autofluoreszierende Proteine

- Yellow-fluorescent Protein (YFP)
(λ_{em} : 520 – 550 nm)
- *DsRed* Protein (aus *Discosoma*; Korallen), liegt allerdings normalerweise als Tetramer vor.
(λ_{em} : ~ 560 nm)

Lange Wellenlängen sind in der Praxis von Vorteil:

Geringere Streuung und Absorption in Lösung biologischer Moleküle !

Fluoreszenzspektroskopie: Anwendungen auf Einzelmoleküle

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS):

Studium der Moleküle in Lösung

Die Anzahl von Molekülen in dem fokalen Volumen kann zu jeder Zeit mit einer Poisson-Verteilung beschrieben werden. Für die Fluktuation der Partikelanzahl gilt:

$$\frac{\sqrt{\langle (dN)^2 \rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{\sqrt{\langle (N - \langle N \rangle)^2 \rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}}$$

Unter der Annahme, dass die Anregungsintensität konstant ist, kann die Fluktuation des Fluoreszenzsignals als Funktion der Zeit wie folgt geschrieben werden:

$$dF(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad \text{mit} \quad \langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt$$

Für die praktische Beobachtbarkeit von zeitlichen Änderungen im Fluoreszenzsignal sind die folgenden Randbedingungen wichtig:

- Möglichst wenig Moleküle im Volumen
führen zu großen Schwankung von $F(t)$
- Genügend viele Moleküle im Volumen sind
wichtig für ausreichendes gutes S/N

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS):

Bei dieser Fluktuation der Fluoreszenzintensität gehen verschiedene Faktoren ein:

$$dF(t) = \int_V W(r) d[hC(r,t)] dV$$

mit der zugehörigen

Autokorrelationsfunktion

$$G(t_c) = \frac{\langle F(t+t_c)F(t) \rangle}{\langle F \rangle^2}$$

$W(r)$: räumlich Ausdehnung des
Belichtungsvolumen (Ellipsoid)

$$\eta = I_0 \cdot \kappa \cdot \sigma \cdot q$$

q : Quantenausbeute

I_0 : max. Amplitude des Laserstrahls

κ : Detektionseffizienz

σ : molekularer Absorptionsquerschnitt

C : Konzentration der Fluorophore im
Volumen V (z.B 1 femtoliter).

und der Korrelationszeit t_c . Es gilt $G(t=0) = 1$

Das Signal wird mit Bezug auf seine Selbstähnlichkeit nach einer Korrelationszeit t_c analysiert. Die Autokorrelation $G(t=0)$ ist deshalb die normalisierte Varianz des fluktuierenden Signals und gibt damit Auskunft über die absolute Konzentration im Anregungsvolumen.

=> Bestimmung von N und damit von C aus der Autokorrelationskurve !

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS):

Frei diffundierende Teilchen in drei Dimensionen:

Diffusionszeit im
konfokalen Volumen

$$G(t_c) = X_{photo} \cdot \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \frac{t_c}{t_D}}$$

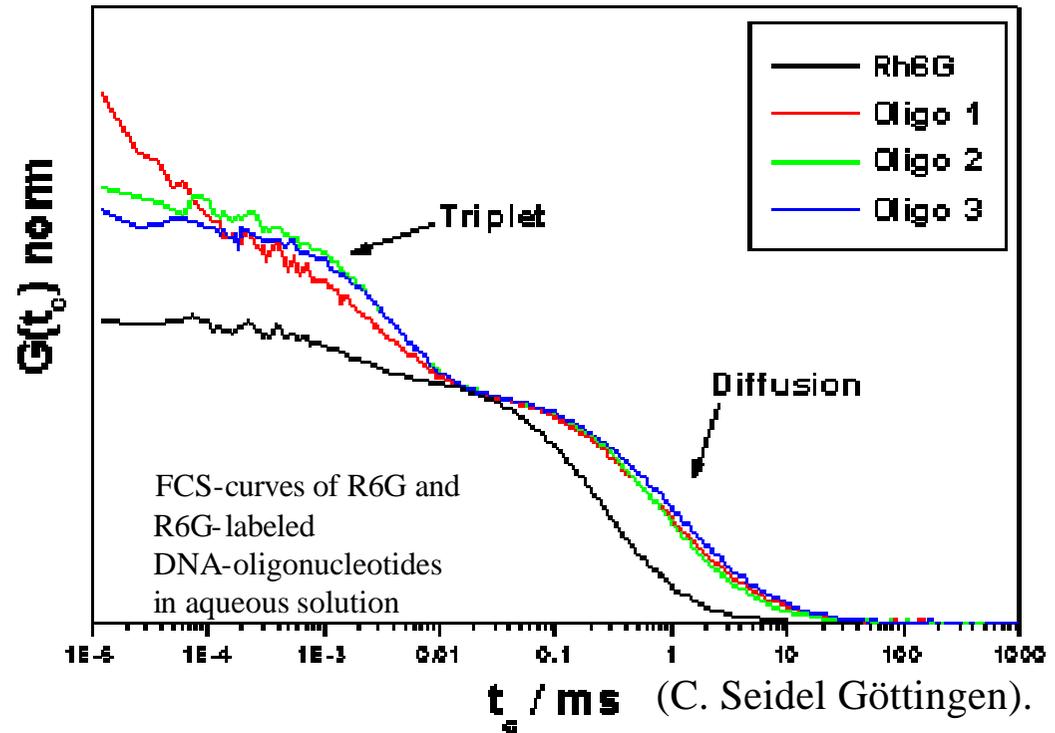
$$t_D = \frac{r_0^2}{4D}$$

**Prozesse die zum Abfall
von $G(t)$ beitragen**

- quenching Effekte
- Triplett Formation
- **Translationsdiffusion** (D, M, r)

Konzentrationsbestimmung

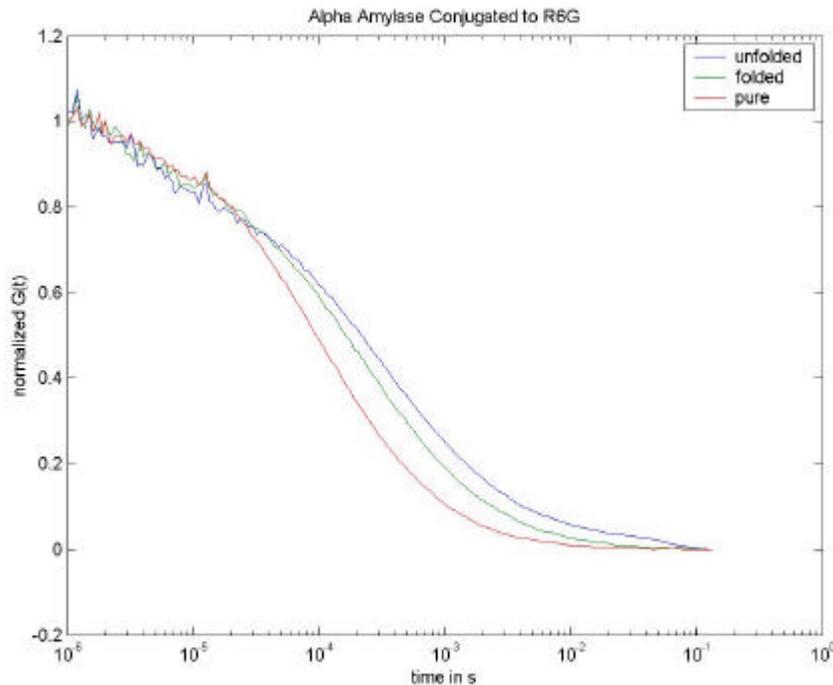
$$\langle C \rangle = \frac{1}{V_{eff} \cdot G(0)}$$



Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS):

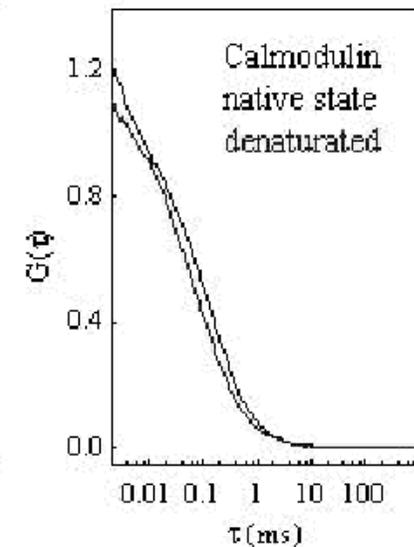
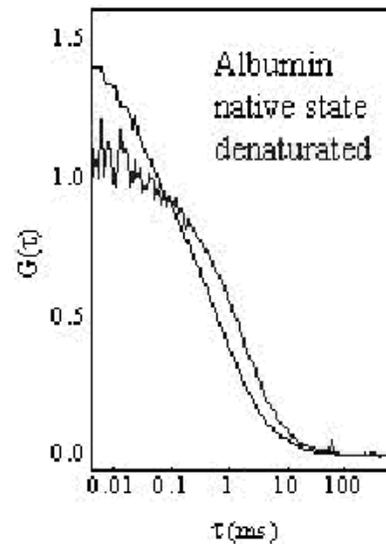
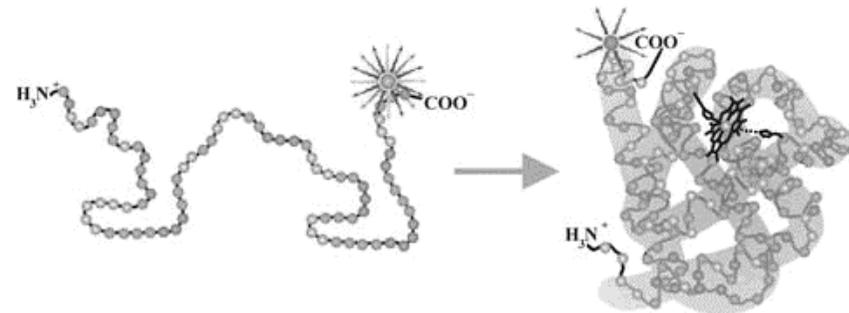
FCS: Anwendung Proteinfaltung

Der hydrodynamische Radius R_G beeinflusst den Diffusionskoeffizienten D und zeigt sich somit in eine veränderte Autokorrelation im FCS-Experiment.



folded: $R_G \sim 45 \text{ \AA}$ unfolded: $R_G \sim 58 \text{ \AA}$

Stokes-Einstein Relation
$$D = \frac{k \cdot T}{6\pi\eta R_G}$$

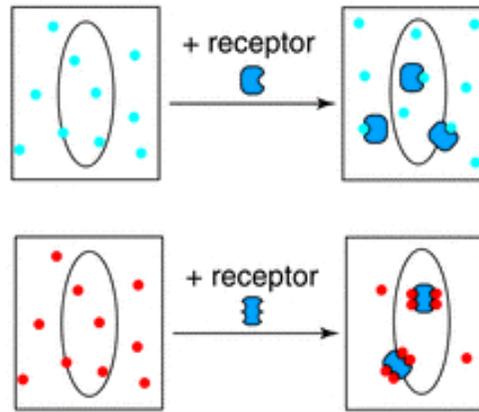
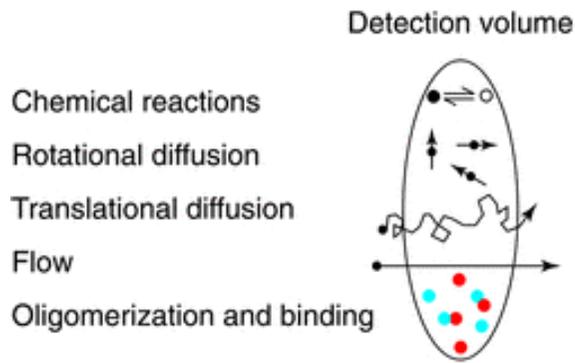


(P. Schwille Göttingen).

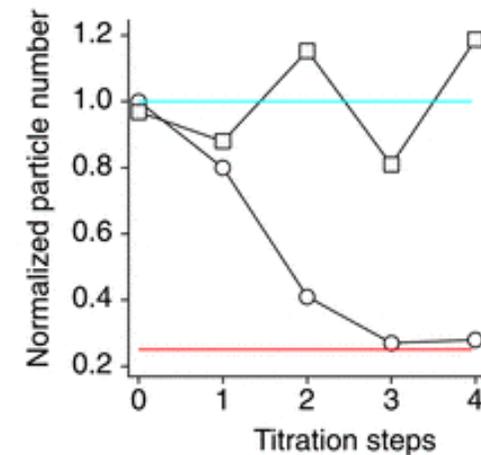
Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS):

Anwendung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Wieviele Liganden kann ein Rezeptor binden ?

(a)



(c)



Zu c:

Anzahl der Liganden (im Volumenelement)
als Funktion der Rezeptorkonzentration.

- : die Zahl der Liganden bleibt auch mit steigenden Zahl der Rezeptoren konstant
(=> ein Ligand pro Rezeptor)
- O: Kontrolle mit bekanntem Bindungspaar
Streptavidin-Biotin mit (4:1 Stöchiometrie)

Fluoreszenzmarkierte Liganden (Kugeln)

trends in Pharmacological Sciences

Hovius et al., TIBS, 2000

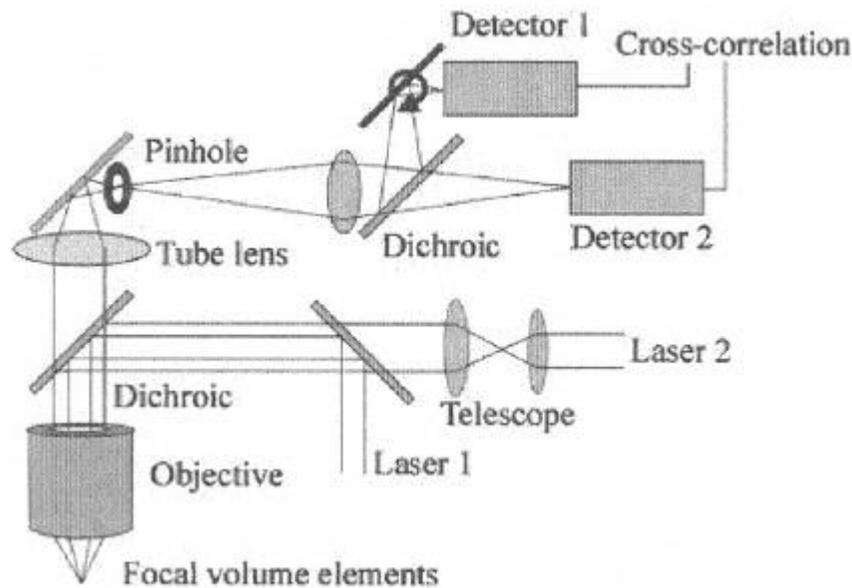
Großes Potential der FCS
beim Einsatz in der Analytik
(Medizin, Pharmazie, Biotechnologie):

- schnelle Messungen
- eindeutige Ergebnisse
- sehr geringe Probemengen

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS):

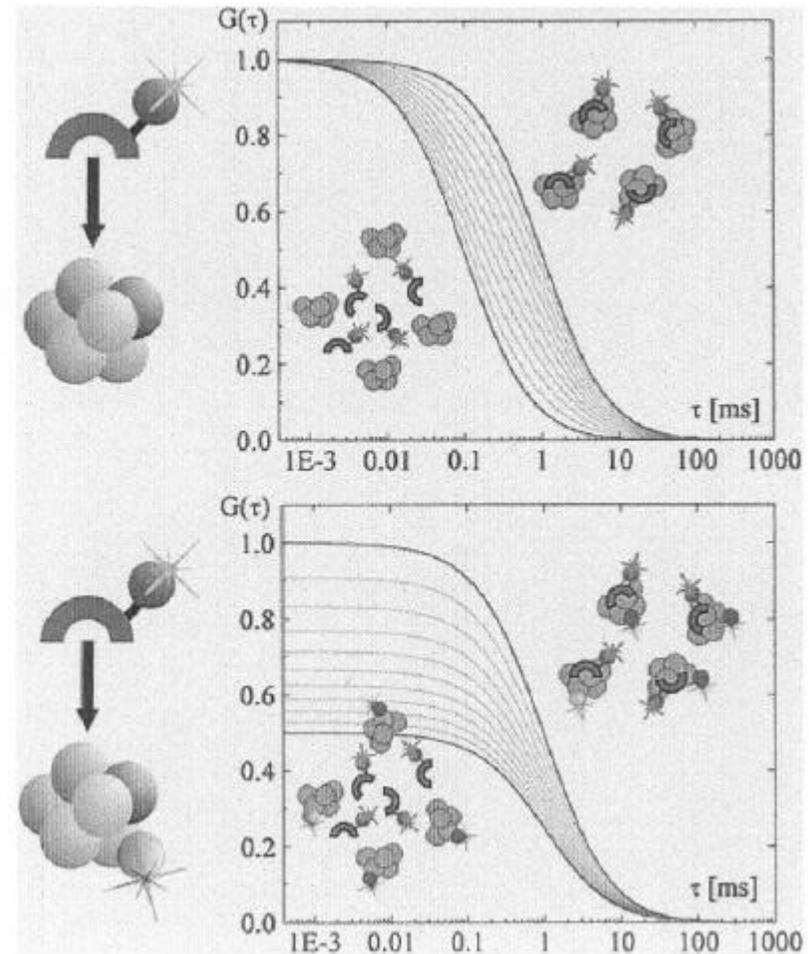
Zwei-Farben FCS / Kreuzkorrelationen

- Anregung zweier Farbstoffe im gleichen konfokalen Volumen
- Berechnung der Kreuzkorrelationen
- => Beobachtung eines starken Signals (Kreuzkorrelation) bei Assoziation von zwei unterschiedlich markierten Molekülen.



Schematischer Aufbau für Zwei-Farben FCS

Vergleich von Einzel- und Zwei-Farben FCS



(P. Schwille Göttingen).

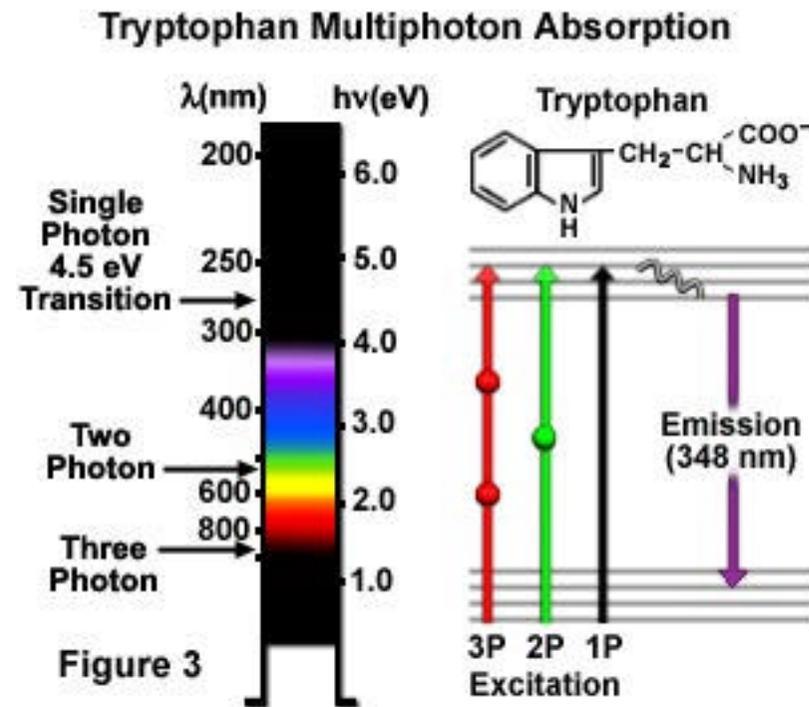
Konzepte der Einzelmoleküldetektion (SMD)

Mehrphotonen Anregung

Prinzipiell kann ein Fluorophor der z.B. eine Absorptionswellenlänge von 280 nm aufweist auch von Photonen der Wellenlänge die ein vielfaches dieser Wellenlänge aufweisen (560 nm, 840 nm) angeregt werden. Wichtig ist hierbei allerdings, dass diese Photonen innerhalb eines sehr kurzen Zeitintervalls (Attosekunden; 10^{-18} s) auf den Fluorophor treffen, um in der Summe die benötigte Anregungswellenlänge zu erzeugen.

Solche Anforderungen können nur mit Lichtquellen extrem hoher Photonen Flussdichte erfüllt werden ($\sim 10^{32}$ Photonen/sec). Hierfür sind im allgemeinen gepulste Laser im langwelligen Bereich des Spektrums mit hoher Pulsintensität nötig.

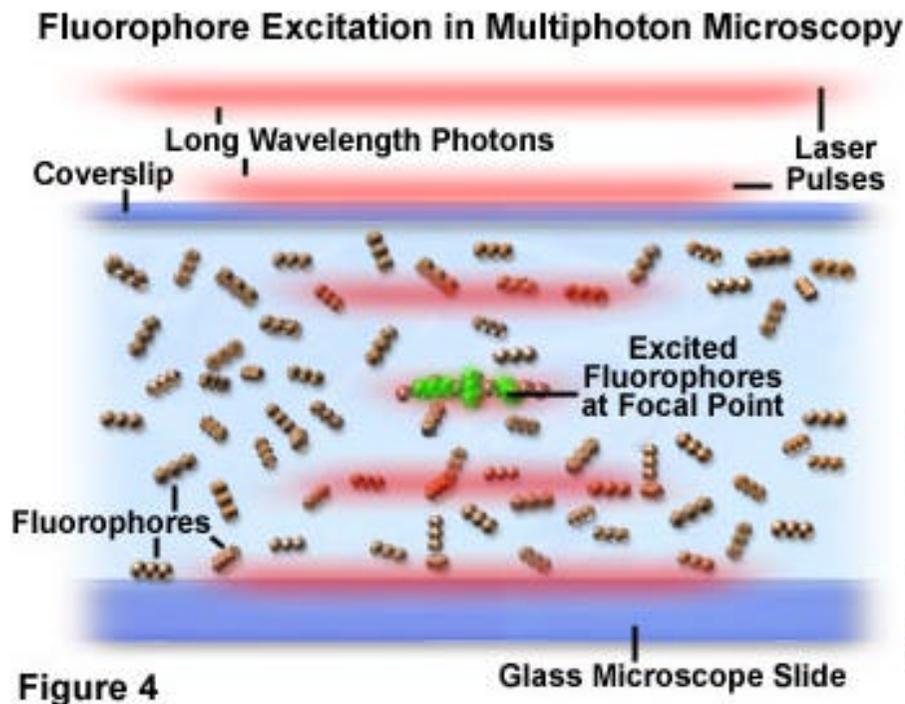
Im Vergleich zur Einzelphotonanregung ist ein Photonenfluss nötig, der etwa zehn Millionen mal größer ist !
=> Problem: Probenschädigung !!!



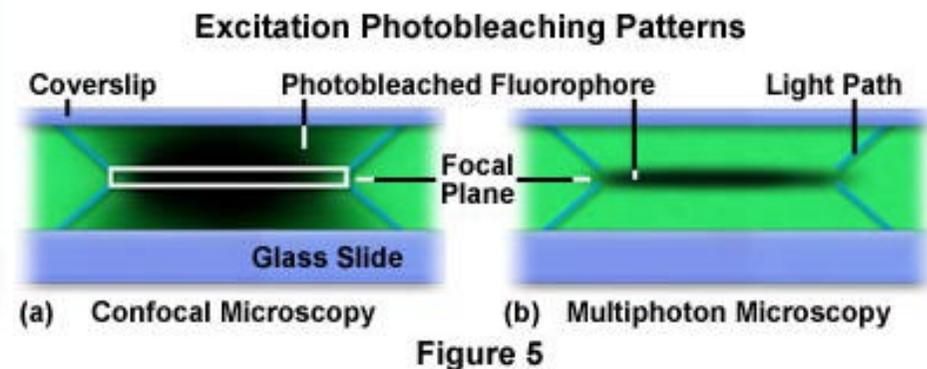
Mehrphotonen Anregung

Anwendungen der Mehrphotonen Anregung

Bei der Mehrphotonen Anregung spielt der Vorteil einer **verbesserten Fokussierung** die entscheidende Rolle. Da die Anregungswahrscheinlichkeit für die zwei-Photonen Absorption mit dem Quadrat der Photonendichte abnimmt, gibt es ein **kleineres Anregungsvolumen** als in der Einzelphotonenanregung.



Diese Eigenschaft des Anregungsprofils führt auch zu einer deutlich **verminderten Photozerstörung** in der Probe, da keine Anregung der Fluorophore am Rand des Laserstrahls stattfindet.



Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC)

Prinzip des TCSPC

Um Lebensdauern (0.3 – 10 ns) von Fluorophoren zu bestimmen, kann man im Prinzip die Detektionszeit eines jeden angeregten Fluorophors messen (z.B. mit einer Zeitauflösung von ~ 50ps).

Probleme:

- geringe Zählstatistik, => Photozerstörung
- teure schnelle Elektronik (Transientenrekorder)

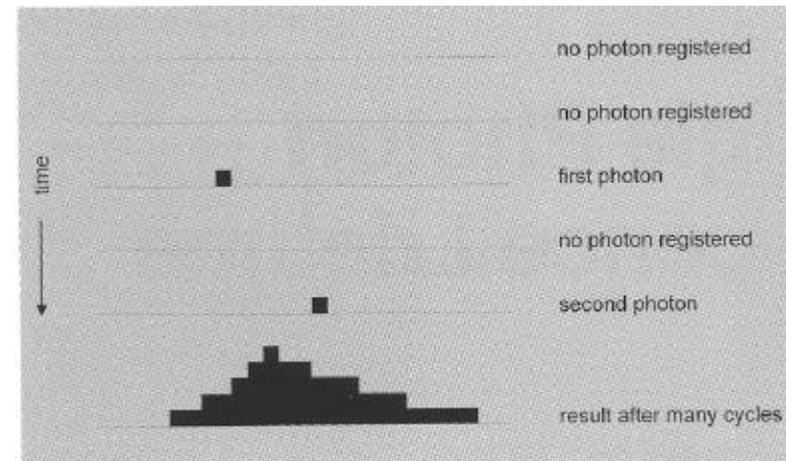
Lösung => TCSPC:

Periodische Anregung des Fluorophors
(z.B. mit 80 MHz Wiederholrate) mit Datensammlung
über viele Lebenszyklen des Fluorophors

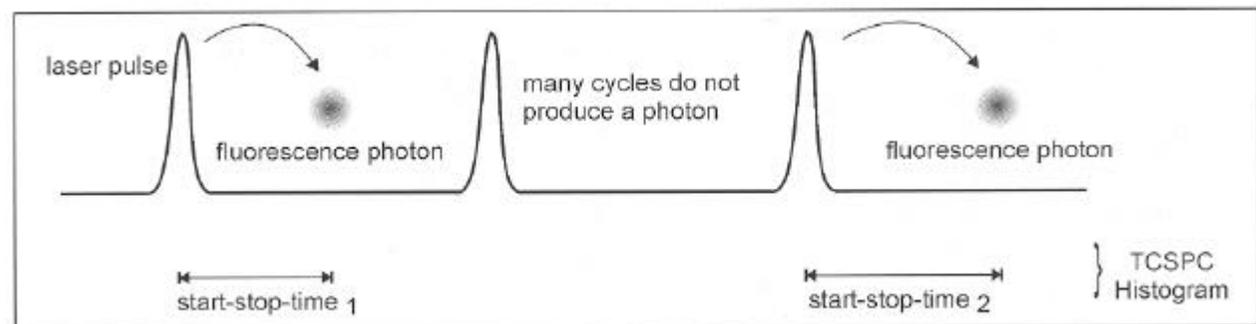
wichtig:

Die Wahrscheinlichkeit mehr als ein Photon pro Zyklus zu messen ist klein !

Histogramm aufgetragen nach „Ankunftszeit“



Prinzip des TCSPC



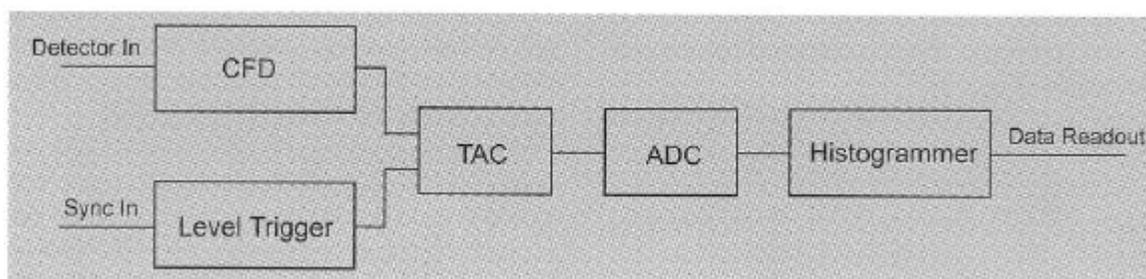
Konzepte der Einzelmoleküldetektion (SMD)

Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer

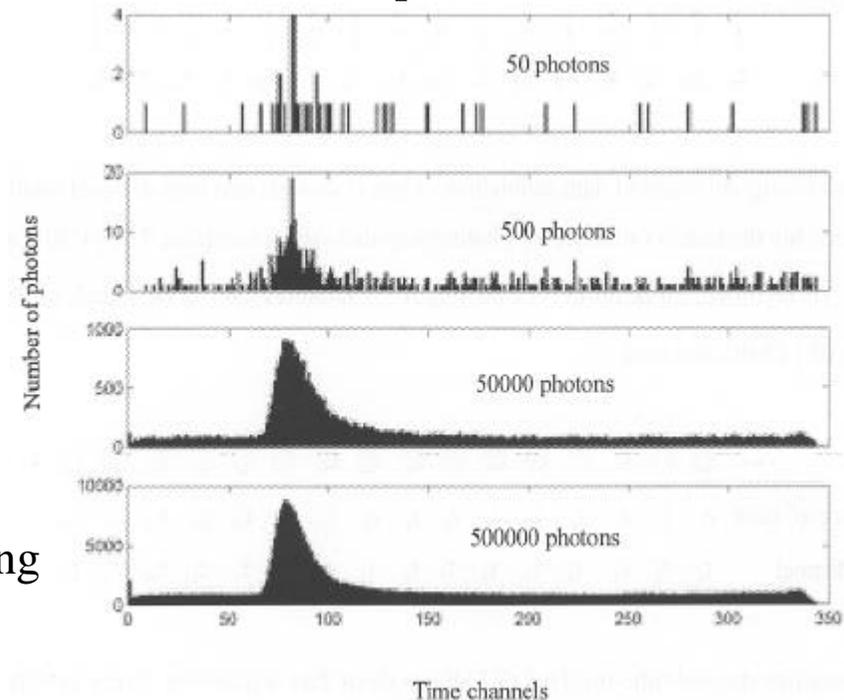
Die Genauigkeit der Ankunftszeit bestimmt im wesentlichen die Genauigkeit der Lebensdauerermessung. Dieser Fehler ist ungefähr 10-mal kleiner als die Breite der Detektor Puls-Antwort (z.B. SPAD 300 ps FWHM).

- => Zeitauflösung der Messung: ca. 30 ps
- => Ausreichend zur Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern (0.3 – 10 ns)

Ein weiteres kritisches Element bei der Bestimmung von Lebensdauern stellt die Schnelligkeit der verarbeitenden Elektronik dar.



Bestimmung der Lebensdauer über Exponentialfit



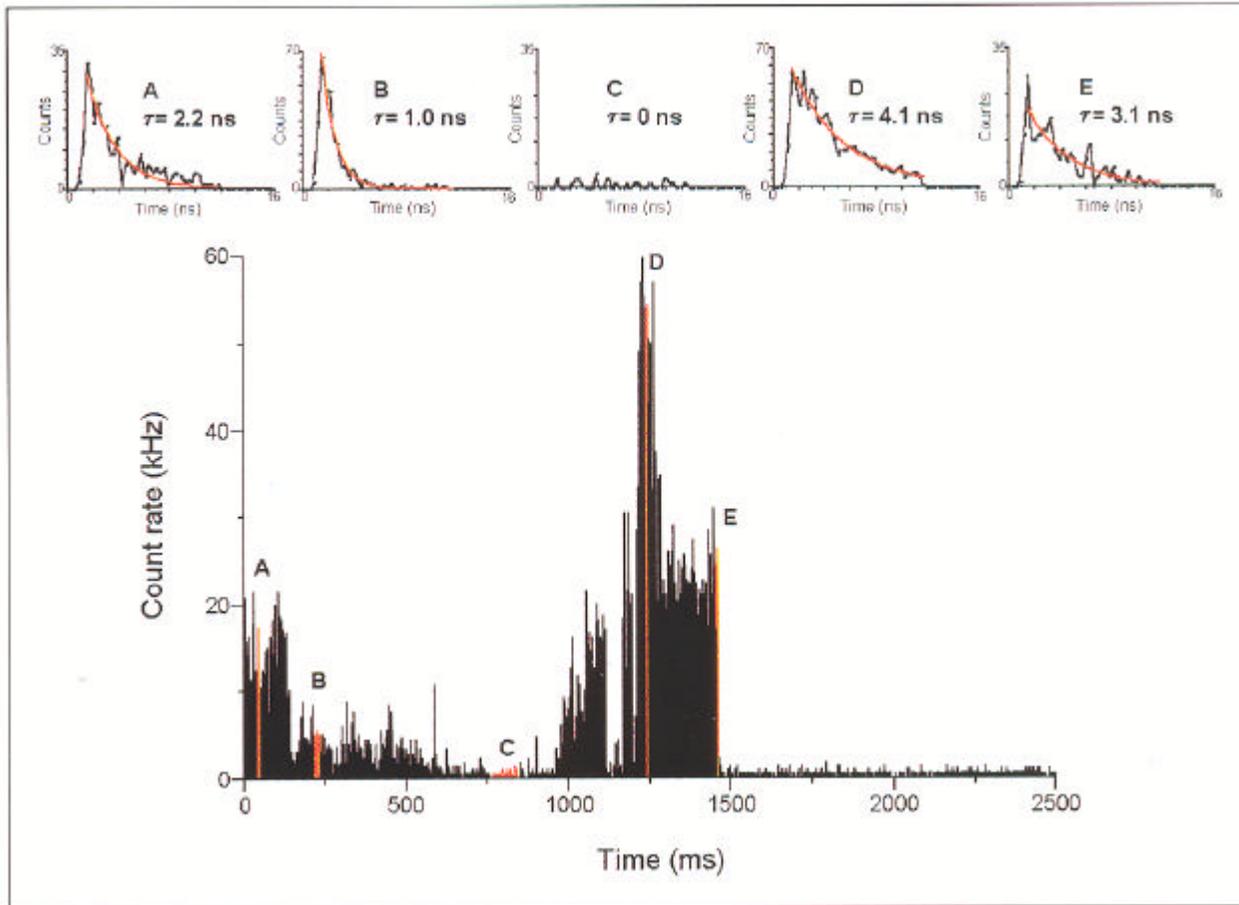
CFD: Comparator

TAC: Time to Amplitude Converter

ADC: Analog to Digital Converter

Konzepte der Einzelmoleküldetektion (SMD)

TCSPC in der Einzelmoleküldetektion



nach M. Sauer (Heidelberg): Oligonukleotide mit gebundenen Rhodamin-Fluorophoren.

Burst integrated Fluorescence Lifetime (BIFL)

Integrationszeit 3 ms

B: Elektronentransfer

Reaktion => verkürzte Lebensdauer

C: „blinking“

Anwendung

Energietransfer über Bestimmung der Lebensdauern

$$E = 1 - \frac{t_{DA}}{t_D}$$

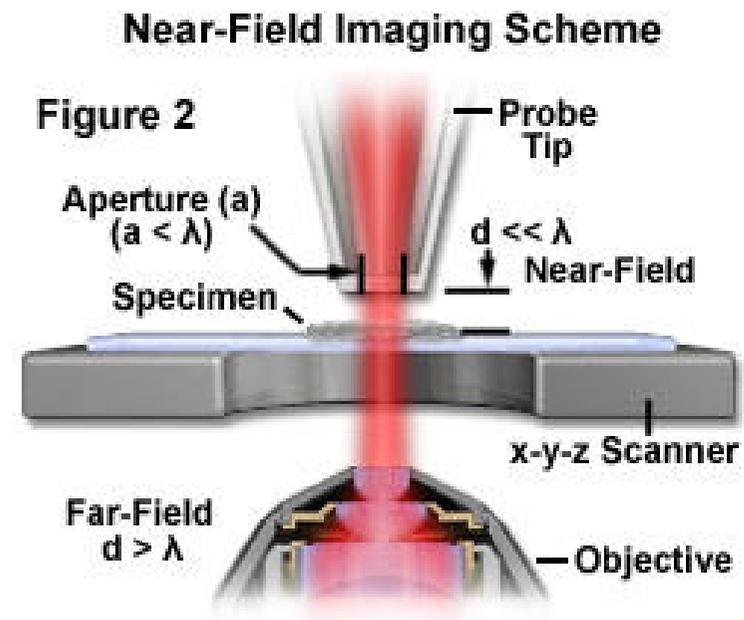
Vorteil der Messung von E über τ :

Das „Lebensdauer-Signal“ ist weniger externen Schwankungen unterworfen als das „Intensitäts-Signal“.

Nahfeldmikroskopie

Eine zentrale Begrenzung der optischen Mikroskopie liegt im Rayleigh'schen Diffraktions-limitierenden Auflösungsvermögen. Im Prinzip können nur Strukturen aufgelöst werden, die in der Größenordnung der Wellenlänge des verwendeten Lichts liegen. Ein Ansatz diese Begrenzung zu umgehen stellt die Nahfeldmikroskopie dar.

Hierbei wird die Lichtquelle in einer sehr dünnen Glasfaser sehr nahe an das abzubildende Objekt gebracht. Sowohl der Durchmesser der Apertur als auch der Lichtquellen-Proben Abstand **sind kleiner als die Wellenlänge des Lichts**. Dies führt dazu, dass Beugungserscheinung beim Abbilden des Objekts nicht auftreten. Um ein vollständiges Bild des gesamten Objekts zu erhalten, muss die Probe in einem feedback System abgerastert werden (vergleiche AFM, LSM).



Nahfeldmikroskopie

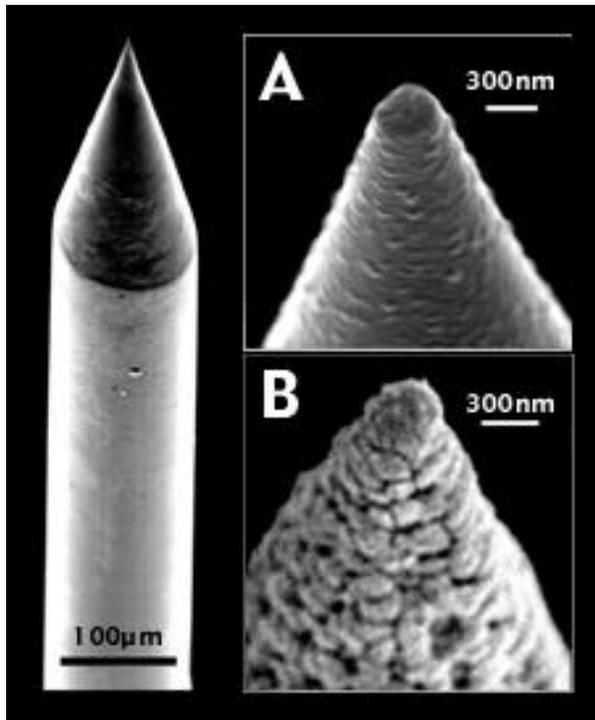
Techniken und Methoden:

Beispiel Scanning near-field optical microscopy (SNOM)

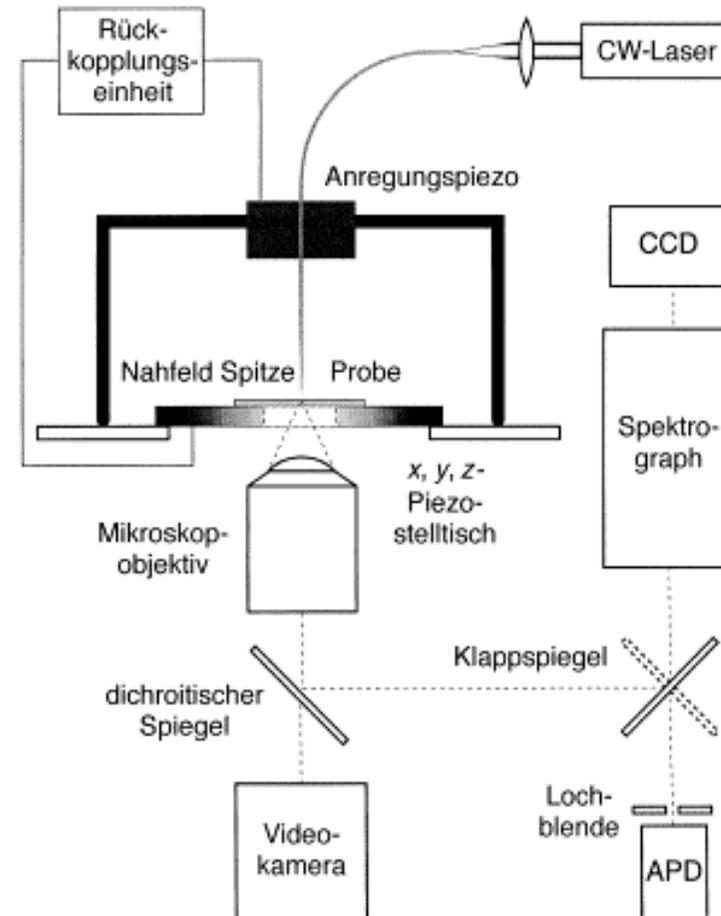
Nahfeldmikroskopie

sehr gute Auflösung durch sehr kleine Lichtquelle < 100 nm
=> keine Abbé-Diffraktionsgrenze

Elektronenmikroskopische Aufnahme geätzter SNOM-Spitzen



Experimenteller Aufbau



Nahfeldmikroskopie

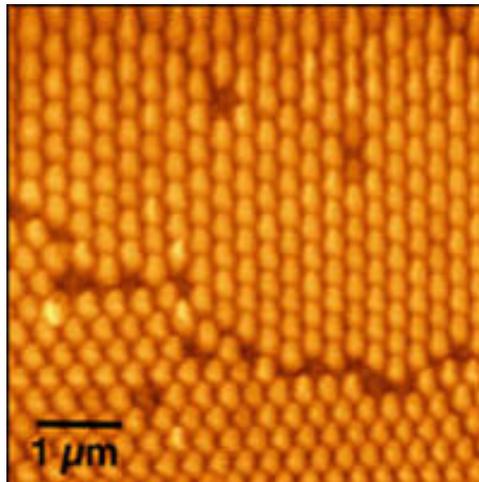
- Glasfaserspitzen werden mit Metall bedampft; Apertur-SNOM-Spitzen: $\lambda >$ als die Öffnung am Ende der Spitze; großer Lichtdurchsatz und gut definierte kreisförmige Öffnung
- konstanter Abstand Probe-Spitze: **Scherkraft-Rückkopplung** => über Eigenresonanz der Spitzenschwingung => Amplitude nimmt deutlich ab bei Abständen $< 5 - 15$ nm.

Anwendung

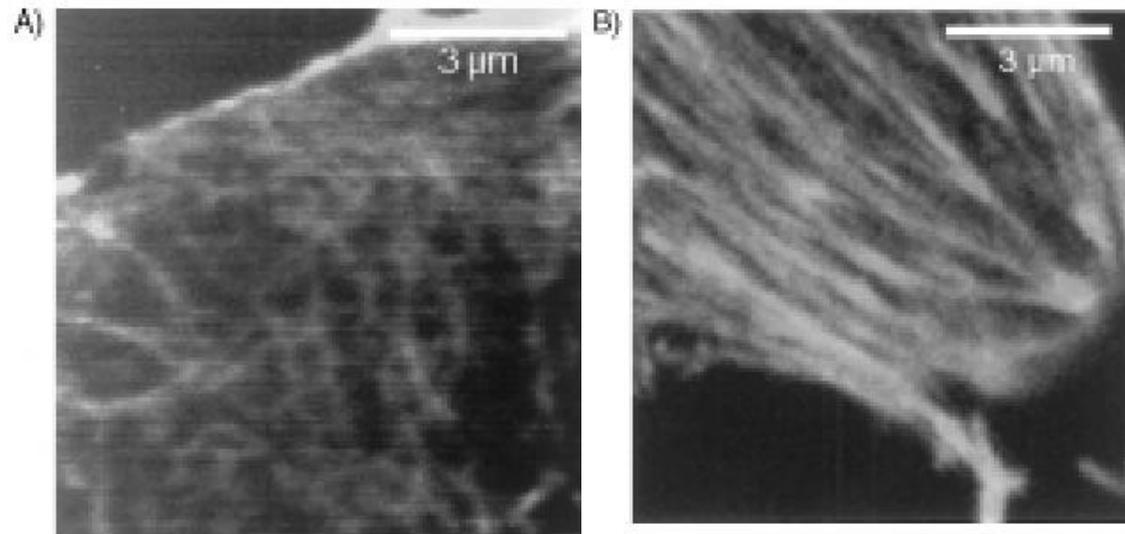
Neben dem reinen Abbildungsverfahren auch in Kombination mit Fluoreszenzspektroskopie, sowie mit FTIR-, Raman-Spektroskopie und mit AFM

- A.) SNOM-Fluoreszenzbild (selektiv angefärbte Zelle)
- B.) konfokale Aufnahme (Auflösung ca. 300 nm)

Abbildung: Latex-Kugeln



Zenobi et al. , 2000



Biospektroskopie

244