

Live Cell Imaging Anwendung mittels FRET-Microscopy

Neue GFP-Applikationen detektieren molekulare Abstände unterhalb der mikroskopischen Auflösung

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ist ein Prozess, bei dem Energie strahlungsfrei von einem angeregten Donor-Molekül auf ein fluoreszierendes Akzeptor-Molekül übertragen wird. Durch die Anregung des Donors wird dabei die Emission des Akzeptors verstärkt und die Fluoreszenz des Donors verringert (Abb. 1).

Das Auftreten des Energietransfers ist abhängig von der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor, weshalb FRET als spezifischer Indikator für deren Abstand eingesetzt werden kann. FRET wird bestimmt, indem das Donor-Molekül angeregt wird und die Emission des Akzeptor Moleküls gemessen wird. In den letzten Jahren werden zunehmend Mutanten des Green Fluorescent Proteins (GFP) für die FRET-Analyse eingesetzt. Als Donor/Akzeptor werden EBFP/EGFP bzw. ECFP/EYFP verwendet, der kritische Radius liegt bei ca. 50 Å.

Für die zeitaufgelöste Messung werden zu jedem Zeitpunkt die Intensitäten der Donor-Emission und des FRET-Signals bestimmt und das Ratio gebildet (FRET/Donor-Emission). Mit dieser Methode können z. B. Änderungen von *second messenger* Konzentrationen untersucht werden. Miyawaki und Mitarbeiter

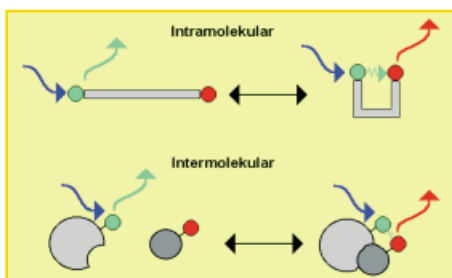
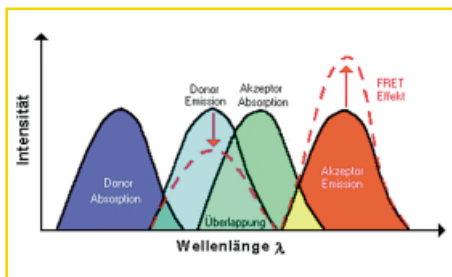


Abb. 1: Schematische Darstellung der Absorption und Emission eines Donor-Akzeptorpaars und des resultierenden FRET

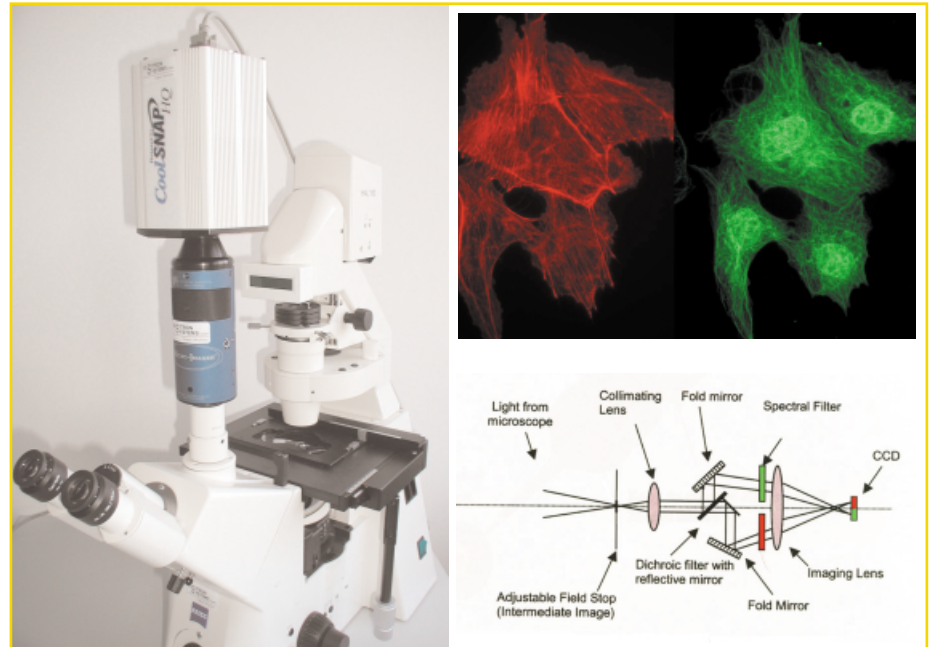


Abb. 2: Multispec Imager in Kombination mit CoolSnap HQ Kamera. Mikroskopsetup (links), FITC und Rhodamin Aufnahme (rechts oben), Strahlengang im MultiSpec Imager (rechts unten)

(1997) haben den Einsatz sogenannter Cameleons zur Calcium-Bestimmung etabliert. Zacco und Mitarbeiter (2000) generierten ein cAMP sensitiven FRET, indem sie GFP Mutanten mit *Proteinkinase A* Untereinheiten fusionierten.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Bestimmung der räumlichen Anordnung von Molekülen zueinander. So untersuchten beispielsweise Damelin und Silver (2000) mit Hilfe der FRET-Mikroskopie Interaktionen zwischen Transport-Rezeptoren und Proteinen des Kernporen-Komplexes.

Zur Quantifizierung wird das Ratio zwischen FRET- und Donor-Emission bestimmt.

Der FRET-Wert wird dabei nach folgender Formel berechnet:

$$\text{FRET value} = \frac{\text{mean ratio (donor-acceptor)} - \text{mean ratio (donor only)}}{\text{mean ratio (donor only)}}$$

donor-acceptor: Zellelinie, in der Donor- und Akzeptor-Moleküle exprimiert werden
donor only: Zellelinie, in der nur das Donormolekül exprimiert wird

Neue optische Einheit „MultiSpec-Imager“ zur On-line FRET Analyse ohne manuelles wechseln der Filter

Simultanes Imaging mehrfach markierter Fluoreszenzproben

Der MultiSpec-Imager ermöglicht die gleichzeitige und erschütterungsfreie Aufnahme verschiedener Fluorochrome. Sie verlieren keine Zeit mehr durch den Wechsel zwischen zwei Emissionsfiltern und können so simultane Vorgänge z. B. FRET CFP/YFP auch wirklich simultan detektieren. Die Teilung der Wellenlängen erfolgt über einen dichroischen Strahlenteiler (Abb. 2), dadurch ist ein maximaler Lichtdurchsatz gewährt. Die Montage am Mikroskop oder Objektiv wird mit einem Standard C-mount Anschluss bewerkstelligt. Der Anschluss an eine Kamera erfolgt über ein C-mount oder F-mount Ausgang. Mittels einer variablen Feldblende kann der MultiSpec-Imager an alle CCD Kamerasysteme angepasst werden.

Dr. Roland Guckler, Diplom Biologe
Applikationsspezialist Life Science

Helmut Wurm, Geschäftsführer

Visitron Systems GmbH
Gutenbergstr. 9
82178 Puchheim