

## Fluoreszenzmessung

# PIE: eine multidimensionale Fluoreszenzmethode

DON C. LAMB<sup>1, 2</sup>, BARBARA K. MÜLLER<sup>3</sup>, CHRISTOPH BRÄUCHLE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT FÜR CHEMIE UND BIOCHEMIE UND CENTER FOR NANOSCIENCE (CENS), LMU MÜNCHEN, <sup>2</sup>DEPARTMENT OF PHYSICS, UNIVERSITY OF ILLINOIS AT URBANA-CHAMPAIGN, <sup>3</sup>LABORATOIRE KASTLER BROSSEL, PHYSICS & BIOLOGY DEPARTMENT, ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE, PARIS

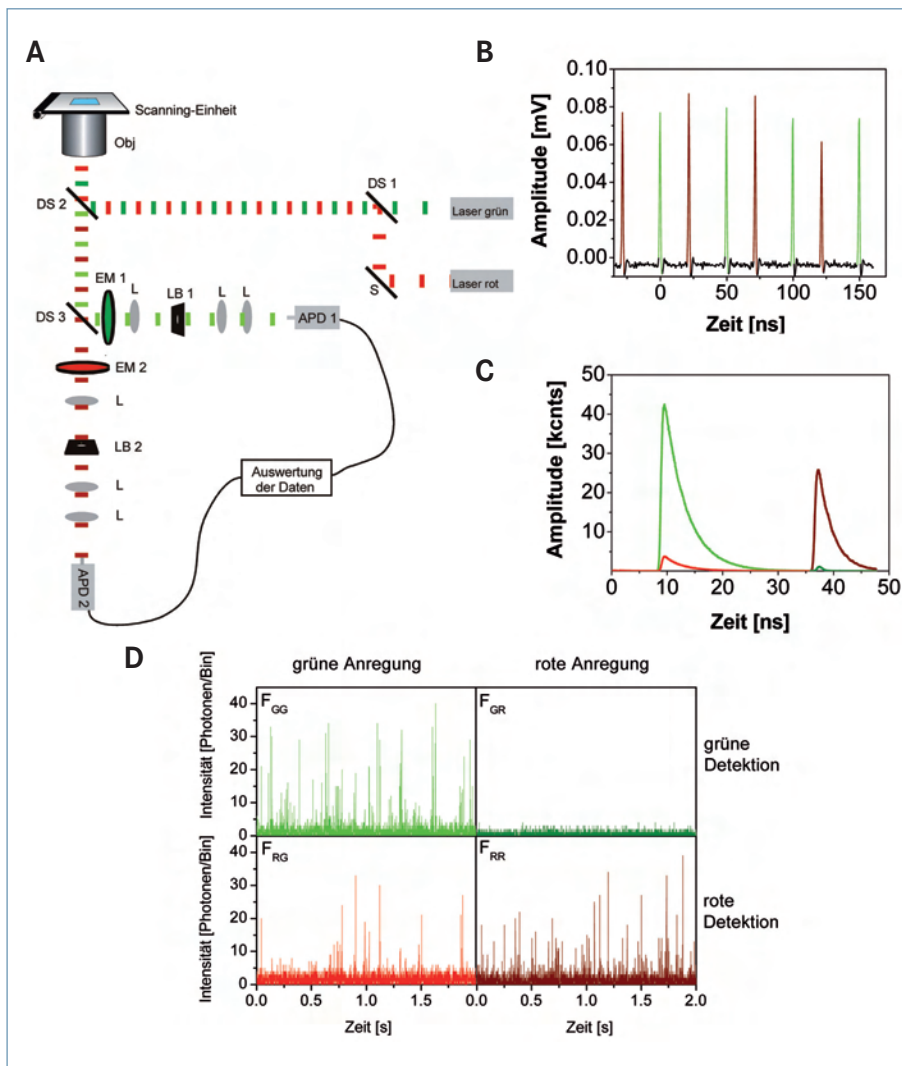
Die gepulste alternierende Anregung (*pulsed interleaved excitation* oder PIE)<sup>[1]</sup> ist eine neue Methode, die es ermöglicht, mehr Informationen aus einer einzelnen Fluoreszenzmessung zu gewinnen.

Pulsed interleaved excitation (PIE) is a new method for extending the capabilities of fluorescence emission measurements.

Bei PIE werden gepulste Anregungsquellen verwendet, wodurch die Information zugänglich ist, welche von ihnen für die Emission eines detektierten Photons verantwortlich war. Diese experimentell leicht zu installierende Technik bietet zahlreiche Vorteile, vor allem bei Untersuchungen an mehrfarbig markierten Molekülkomplexen. Beispielsweise besteht mit PIE die Möglichkeit, das spektrale Übersprechen in abbildenden Techniken (z. B. Laser Scanning- oder Weitfeld-Mikroskopie) oder bei der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zu eliminieren. Ferner können fehlerfreie Förster-Resonanz-Energie-Transfer-Messungen (FRET) durchgeführt sowie die Stöchiometrie von Molekülkomplexen in Einzelmolekül-Experimenten bestimmt werden.

### Funktionsweise von PIE

PIE basiert darauf, dass bei einem Experiment mit mehreren spektral unterscheidbaren Farbstoffen die Anregung gepulst erfolgt. Die gepulsten Laser sind zeitlich derart verschoben, dass die verschiedenen Fluorophore abwechselnd angeregt werden und nicht, wie sonst üblich, gleichzeitig mit kontinuierlichen Lichtquellen beleuchtet werden. Ein Taktgeber synchronisiert sowohl die Laser untereinander als auch die Messkarte. Die Pulsfrequenz ist so gewählt, dass die Photonen, die nach der Anregung mit einem Laserpuls emittiert werden, bereits detektiert sind, bevor der folgende Laserpuls einer anderen Farbe die Probe von neuem anregt. Für PIE



◀ **Abb. 1:** Prinzip von PIE. **A**, Aufbau für PIE. DS: dichroitischer Spiegel, L: Linse, EM: Emissionsfilter, LB: Lochblende, APD: Avalanche-Fotodiode. **B**, Abfolge der Anregungspulse. **C**, Histogramm der Zeit zwischen der Detektion der Photonen und dem Synchronisationspuls (hell- bzw. dunkelgrün für grüne Detektion mit grüner bzw. roter Anregung; hell- bzw. dunkelrot für rote Detektion mit grüner bzw. roter Anregung). **D**, Fluoreszenzspuren aufgeteilt in vier Kanäle abhängig von der Anregungsquelle und dem Detektionskanal. Farbkodierung entspricht **Abbildung 1C**.

werden typischerweise Laserpulse, die kürzer als eine Nanosekunde sind, und Anregungsfrequenzen im Bereich von 10–50 MHz gewählt. Da mit diesen Frequenzen die gemessenen Emissionsraten deutlich übertroffen werden, können die Daten, die nach den verschiedenen Anregungspulsen detektiert werden, für die meisten Anwendungen als simultan betrachtet werden.

Die folgenden Beispiele für die Anwendung von PIE wurden mit einem konfokalen Zwei-Farben-Aufbau (grün und rot) durchgeführt (**Abb. 1A**). **Abbildung 1B** zeigt die Abfolge der Anregungspulse, die mit einer Fotodiode gemessen wurden. Die Länge des Zeitintervalls zwischen der Detektion eines Photons und der Ankunftszeit des nächsten Synchronisationspulses wird mit der Genauigkeit einer Pikosekunde mit einer einzelphotonensensitiven Messkarte aufgenommen (TCSPC, *time correlated single photon counting card*). Hiermit sind die Zeitbereiche, in denen Photonen nach der grünen bzw. nach der roten Anregung detektiert werden, deutlich zu unterscheiden (**Abb. 1C**). Das bedeutet, dass den einzelnen Photonen nicht nur der spektrale Detektionskanal, sondern auch ihre Anregungsquelle mithilfe der Ankunftszeit zugeordnet werden kann (**Abb. 1D**).

Eine ähnliche Methode wie PIE ist unter dem Namen ALEX (*alternating laser excitation*)<sup>[2, 3]</sup> bekannt. Bei dieser Methode werden im Unterschied zur PIE kontinuierliche Laser verwendet, die auf einer Zeitskala von Milli- bis Mikrosekunden an- und ausgeschaltet werden.

### Beseitigung des spektralen Übersprechens von PIE

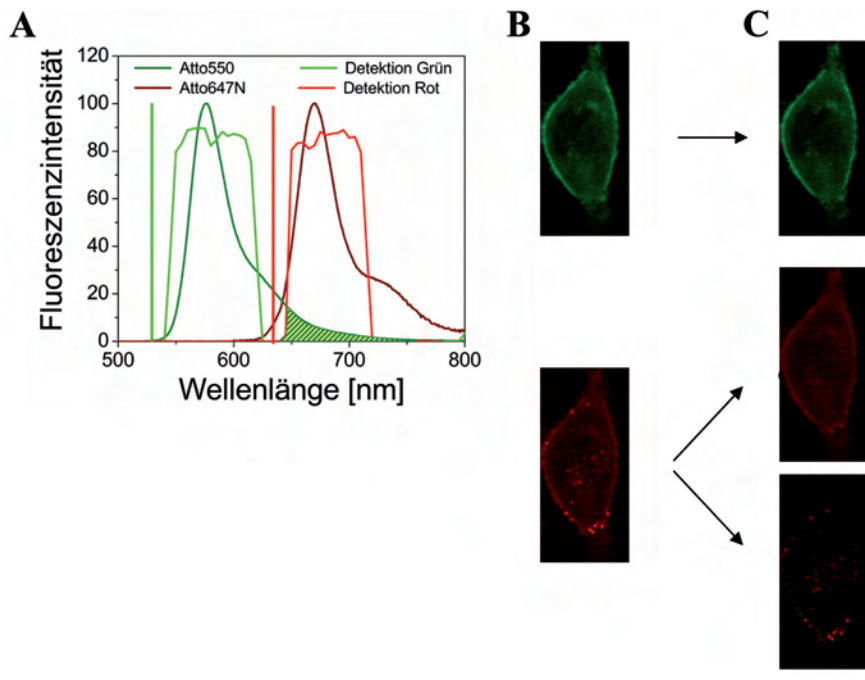
Eine wichtige Anwendung von PIE ist die Eliminierung des spektralen Übersprechens. Das Fluoreszenzspektrum der meisten Fluorophore erstreckt sich weit in den roten Spektralbereich. Bei Verwendung mehrerer spektral unterscheidbarer Fluorophore führt dies häufig zur Überlappung der Spektren, was als spektrales Übersprechen bezeichnet wird (**Abb. 2A**). Selbst bei der Wahl geeigneter Filter wird immer ein Teil der Photonen, die vom grünen Farbstoff emittiert werden, im roten Detektionskanal registriert. Da mit PIE sowohl der Detektionskanal als auch die Anregungsquelle bekannt sind, können diese Photonen aber von solchen, die vom roten

Farbstoff nach der roten Anregung emittiert werden, durch die zeitliche Verzögerung unterschieden werden. Bei Fluoreszenzmethoden wie Laser Scanning- oder Weitfeld-Mikroskopie führt die Eliminierung des spektralen Übersprechens zu einer Erhöhung des Kontrasts (**Abb. 2**).

### Einzelmolekül-FRET-Messungen mit PIE

PIE wird zudem oft in Kombination mit der Analyse von Photonenbursts verwendet, um die FRET-Effizienz von einzelnen Molekülkomplexen zu bestimmen. Die Auswertung der Photonenbursts liefert Informationen über den gerade vorliegenden Zustand des Moleküls oder Molekülkomplexes<sup>[4]</sup>. Die gleichzeitige Bestimmung von Stöchiometrie und FRET-Effizienz aus einem Burst ermöglicht es, Subpopulationen von Molekülen zu identifizieren und zu charakterisieren<sup>[2, 3]</sup>.

Ein Beispiel ist die Messung der Stöchiometrie von DNA-Pinzetten in Abhängigkeit der FRET-Effizienz<sup>[5]</sup> (**Abb. 3**). DNA-Pinzetten sind Nanomaschinen, die aus zwei Armen doppelsträngiger DNA, die über ein flexibles Gelenk verbunden sind, bestehen. Beide Arme haben zudem einen Überhang aus einzelsträngiger DNA, an den ein weiterer DNA-Einzelstrang (Schließstrang) binden und so die Pinzette schließen kann<sup>[6]</sup>. Dabei sind drei Subpopulationen zu erkennen: Die Population mit hoher FRET-Effizienz ist auf vollständig geschlossene Pinzetten zurückzuführen, wobei allerdings nicht zwischen Monomeren oder Dimeren unterschieden werden kann. Bei der Population mit niedriger FRET-Effizienz entspricht der Wert dem der offenen Pinzette. Da diese Population auch bei Zugabe des Schließstrangs in hohem Überschuss nicht verschwindet, ist diese Verteilung auf Pinzetten zurückzuführen, die an beiden Armen einen separaten Schließstrang gebunden haben. Die dritte Subpopulation zeigt eine mittlere FRET-Effizienz und einen höheren Stöchiometriewert als die anderen beiden Populationen. Diese FRET-Werte können weder der geschlossenen noch der offenen Form zugeordnet werden und auch die erhöhte Stöchiometrie weist darauf hin, dass hier keine einzelne Pinzette, sondern eine Mischung aus DNA-Komplexen mit Dimeren und Monomeren vorliegt. Ein Teil der Moleküle kann somit einem Dimer zugeordnet werden, bei denen der Akzep-



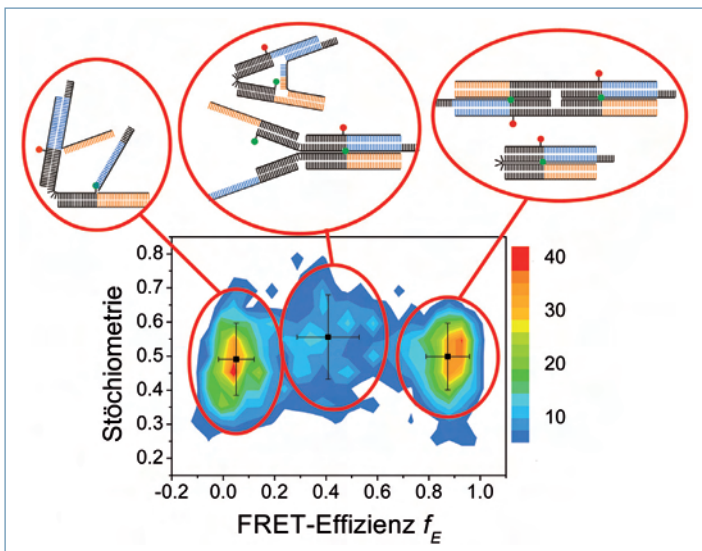
▲ **Abb. 2:** PIE zur Entfernung des spektralen Übersprechens. **A,** Fluoreszenzemission von Atto550 und Atto647N sowie Transmission der Emissionsfilter und Anregungswellenlängen. Spektren überlappen im schraffierten Bereich (spektrales Übersprechen). **B,** HeLa-Zellen, deren Aktinfilamente mit dsRed markiert sind und die mit Cy5-markierten Polyplexen transfiziert wurden. Die Fluoreszenz wurde in die grüne und rote Detektion aufgeteilt. **C,** Kontrastverbesserung mit PIE, wobei die Fluoreszenz aus dem roten Detektionskanal in Photonen, die nach der grünen und solche, die nach der roten Anregung detektiert wurden, aufgeteilt wurde. Im unteren Bild ist der Kontrast deutlich erhöht.

**Danksagung**

Die Autoren danken für die Unterstützung durch die Sonderforschungsbereiche SFB646 und SFB749 sowie die Exzellenzcluster NIM und CiPSM.

**Literatur**

[1] Müller, B. K., Zaychikov, E., Bräuchle, C., Lamb, D. C. (2005): Pulsed Interleaved Excitation. *Biophys. J.* 89: 3508-3522.  
 [2] Kapanidis, A. N., Lee, N. K., Laurence, T. A., Doose, S., Margeat, E., Weiss, S. (2004): Fluorescence-aided molecule sorting: Analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8936-8941.  
 [3] Kapanidis, A. N., Laurence, T. A., Lee, N. K., Margeat, E., Kong, X. (2005): Alternating-laser excitation of single molecules. *Acc. Chem. Res.* 38: 523-533.  
 [4] Zander, C., Sauer, M., Drexhage, K. H., Ko, D. S., Schulz, A., Wolfrum, J., Brand, L., Eggeling, C., Seidel, C. A. M. (1996): Detection and characterization of single molecules in aqueous solution. *Appl. Phys. B* 63: 517-523.  
 [5] Müller, B. K., Reuter, A., Simmel, F. C., Lamb, D. C. (2006): Single-Pair FRET Characterization of DNA Tweezers. *Nano Lett.* 6: 2814-2820.  
 [6] Yurke, B., Turberfield, A. J., Mills, A. P., Simmel, F. C., Neumann, J. L. (2000): A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature* 406: 605-608.  
 [7] Lee, N. K., Kapanidis, A. N., Koh, H. R., Korlann, Y., Ho, S. O., Kim, Y., Gassmann, N., Kim, S. K., Weiss, S. (2007): Three-color alternating-laser excitation of single molecules: monitoring multiple interactions and distances. *Biophys. J.* 92: 303-312.



▲ **Abb. 3:** Einzel-molekül-FRET-Messungen durch Photonenburst-Analyse von DNA-Pinzetten im vermeintlich geschlossenen Zustand. Mögliche Konformationen der DNA-Pinzetten oben.

**Korrespondenzadressen:**



Prof. Dr. Don C. Lamb<sup>1</sup>  
 Prof. Dr. Christoph Bräuchle<sup>2</sup>  
 Department für Chemie und Biochemie und Center for Nanoscience (CeNS)  
 Ludwig-Maximilians-Universität München  
 Butenandtstraße 11  
 D-81377 München  
 Tel.: 089-2180 77547  
 Fax: 089-2180 77548  
 don.lamb@cup.uni-muenchen.de  
 christoph.braeuchle@cup.uni-muenchen.de



Dr. Barbara K. Müller  
 Laboratoire Kastler Brossel,  
 Physics & Biology Department  
 École normale supérieure  
 24, rue Lhomond  
 F-75005 Paris  
 Tel.: +33-(1) 4432 3455  
 Fax: +33-(1) 4432 3434  
 barbara.muller@lkb.ens.fr

tor entweder nicht vorhanden oder nicht photoaktiv ist. Ein anderer Teil spiegelt Pinzetten wider, die nicht richtig geschlossen werden konnten, weil der Schließstrang an beide Arme gleichzeitig gebunden hat und so das vollständige Schließen durch die Topologie der DNA sterisch verhindert hat.

**Zusammenfassung**

PIE eröffnet neue Möglichkeiten, die derzeit verwendeten Fluoreszenztechniken wie LSM

oder FRET zu verbessern und zu erweitern. Als Beispiele wurden in diesem Artikel die Eliminierung des spektralen Übersprechens bei konfokalen Abbildungen und die Bestimmung der Stöchiometrie von fluoreszenzmarkierten Molekülkomplexen gezeigt. Obwohl in diesem Artikel ausschließlich Anwendungsbeispiele mit zwei Anregungsfarben und zwei Detektionskanälen besprochen wurden, kann PIE leicht auf drei oder mehr Farben erweitert werden<sup>[7]</sup>.