

Optische Pinzette und FRAP Mikroskopie

Doll Franziska, Dunsing Valentin, Geisenberger Christoph, Höbel Katharina, Hoffmann Ulrike, John Torsten, Kollhoff Robin, Meschkat Martin, Mosebach Laura, Richter Cornelius, Staufer Oskar, **Matthias Weiss**

Die Funktionalität einer Zelle basiert maßgeblich auf aktiven und passiven Transportvorgängen - zum Beispiel im Rahmen des Stoffaustausches zwischen Kompartimenten. Die quantitative Untersuchung dieser Prozesse stellt eine besondere Herausforderung dar. Im Folgenden werden wir Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) und die optische Pinzette vorstellen.

Kraftmessung im Subnanobereich

Zelluläre Prozesse werden maßgeblich durch mechanische Kräfte beeinflusst, z.B.

- Achsenformation bei der Embryogenese
- Kontaktinhibition von Zellen
- Transportprozesse

Für Messungen auf zellulärer Ebene bedarf es einer Methode, Kräfte im Bereich weniger Piconewton zu erfassen (10^{-12} Newton). Dies ist mit herkömmlichen Methoden nicht möglich.

Die optische Pinzette

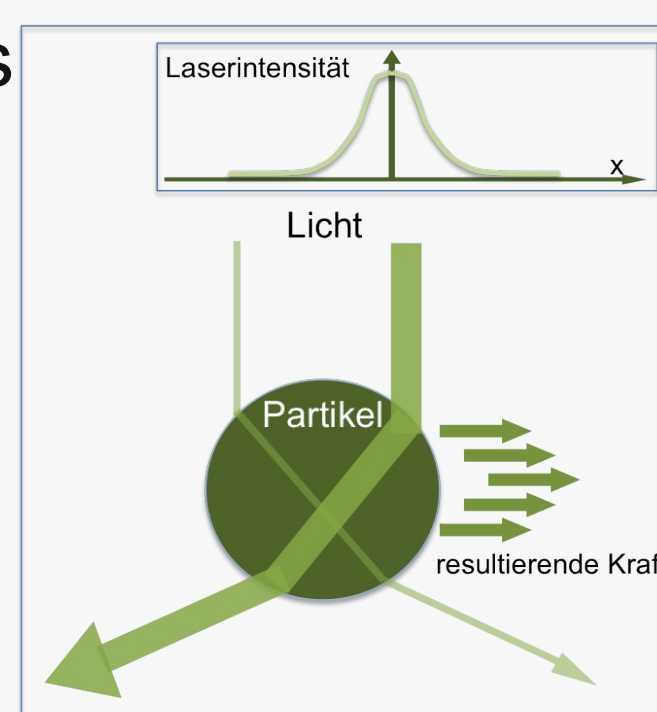
Das Partikel wird im Zentrum eines Laserstrahls gehalten.

Physikalische Prinzipien der optischen Pinzette:

- Welle-Teilchen-Dualismus des Lichts
- Lichtbrechung
- Impulserhaltung

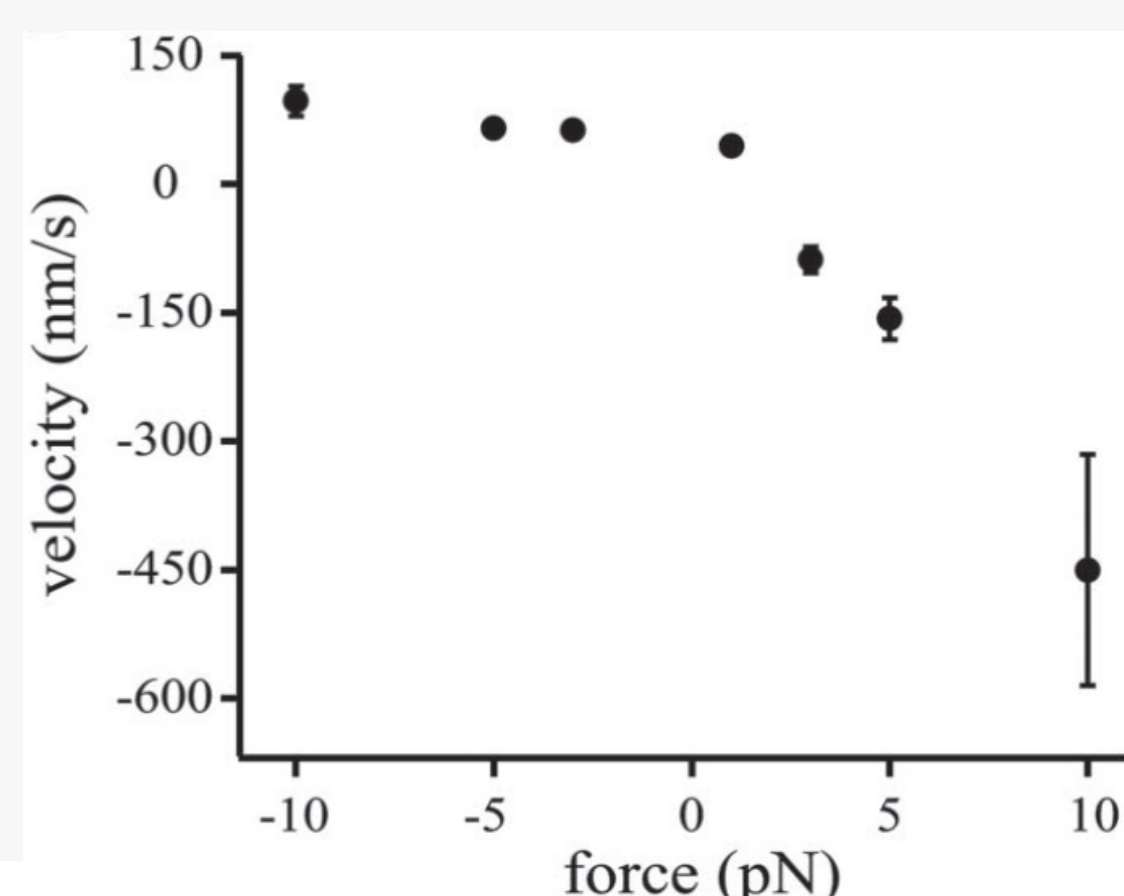
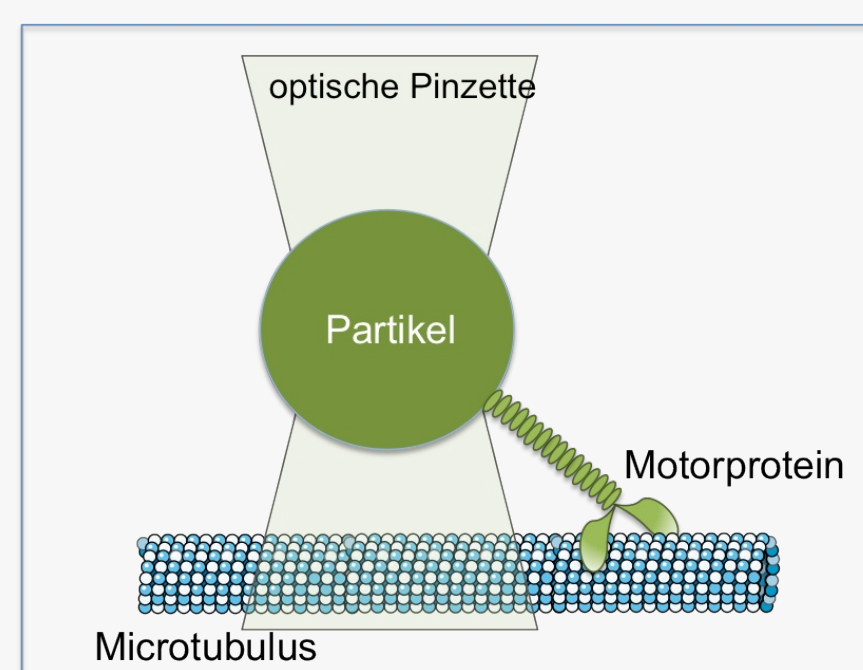
Technische Limitierung:

- Brechungsindex des Partikels
- Größe des Partikels



Kraftmessung am Beispiel eines Motorproteins

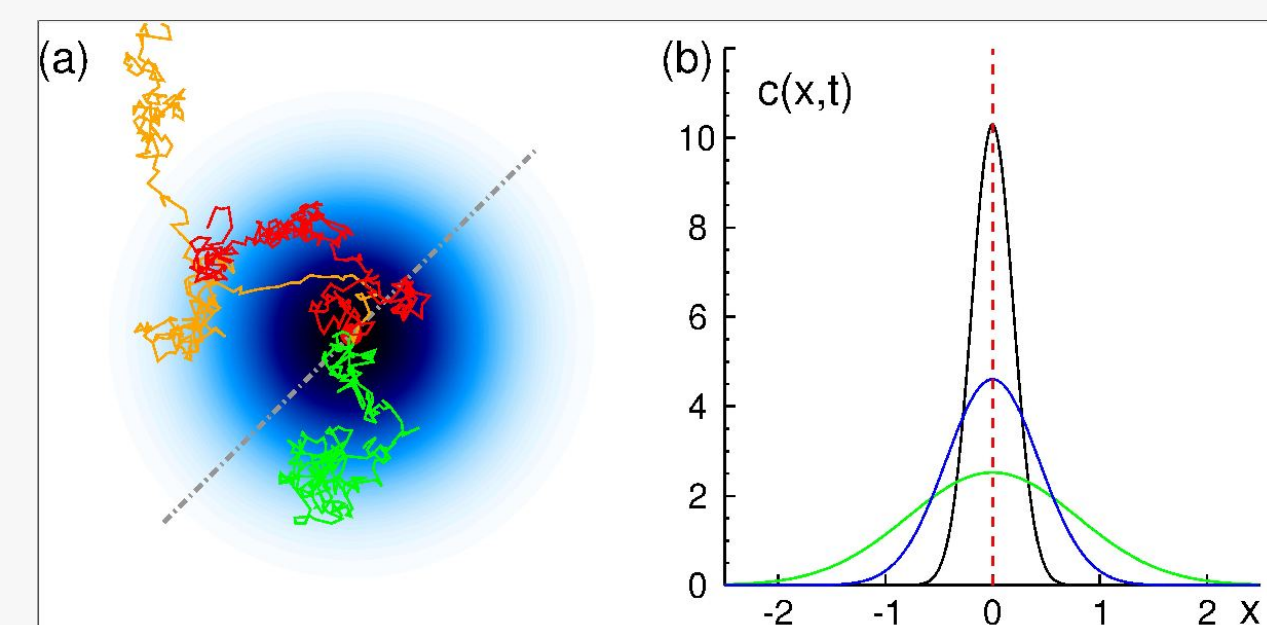
- Motorprotein ist an Partikel gekoppelt
- Motorprotein übt Kraft auf Partikel aus
→ Auslenkung des Partikels
- Kraft ist proportional zur gemessenen Auslenkung



Zusammenfassung Optische Pinzette

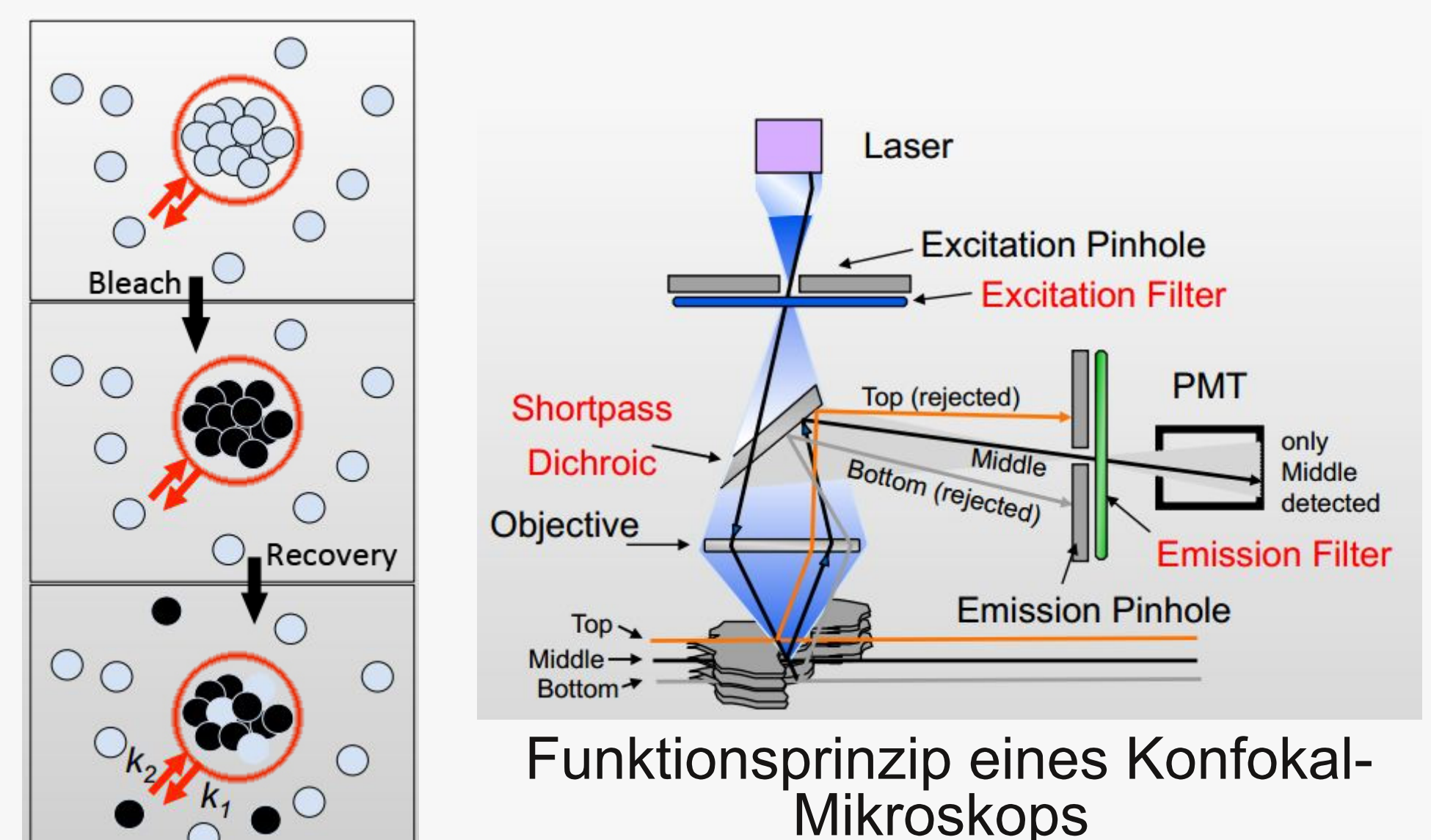
- Möglichkeit Kräfte im Subnanobereich zu messen.
- Messergebnisse liefern Informationen zum besseren Verständnis zellulärer Prozesse.

Thermisch getriebener Transport von Proteinen



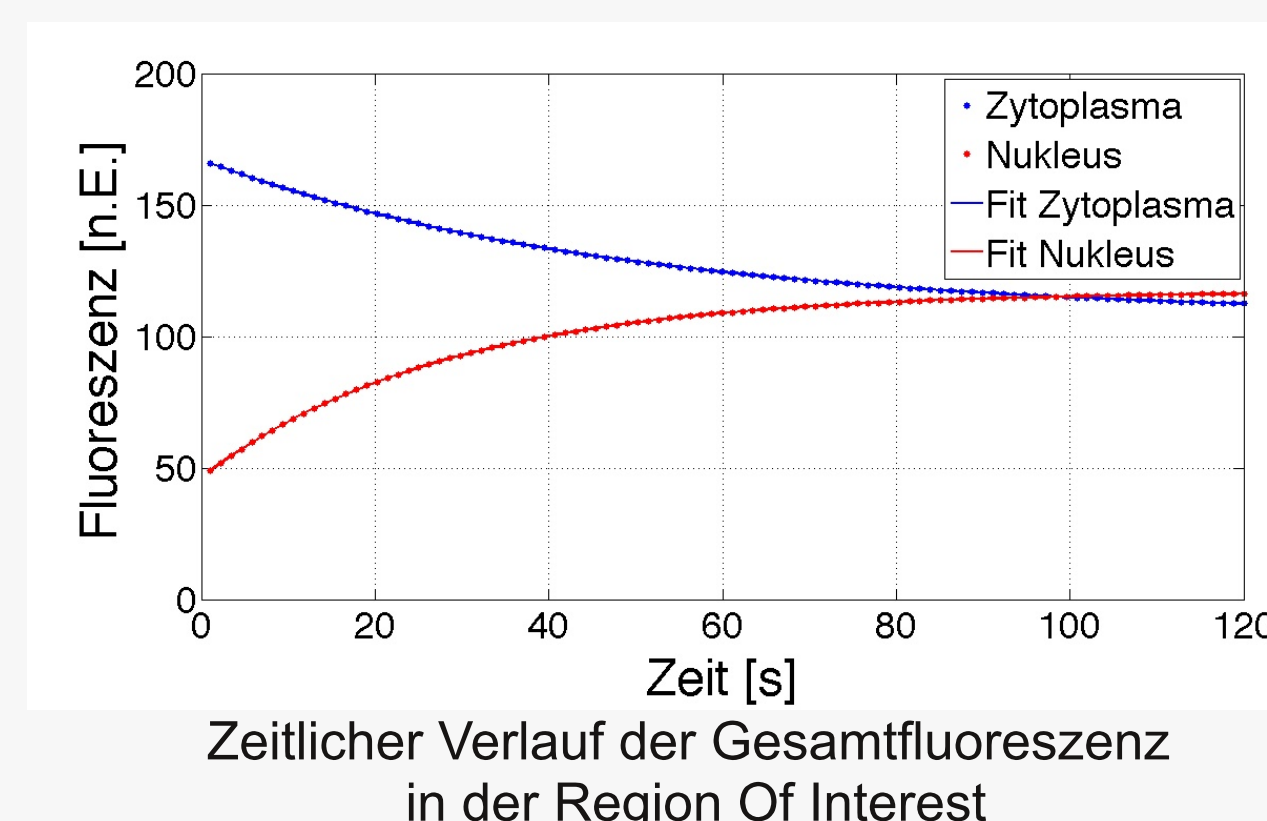
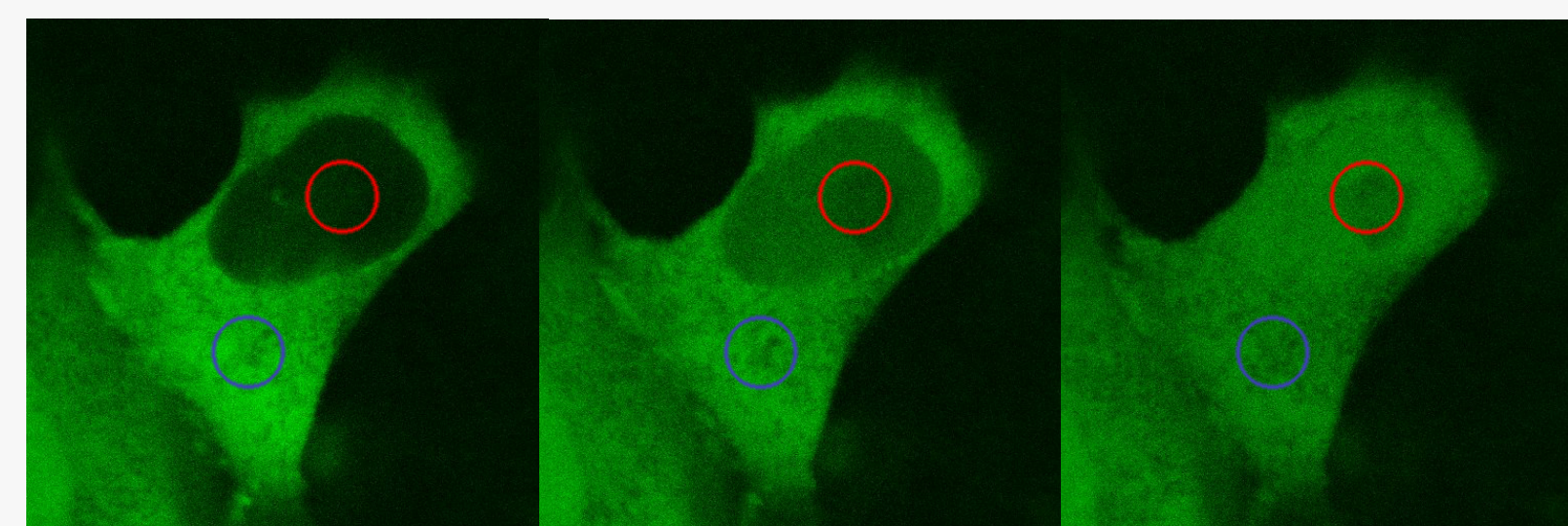
Diffusion: Ungerichteter passiver Transport in Form eines Random-Walks

Fluorescence Recovery After Photobleaching



Prinzip von FRAP

FRAP am Beispiel von GFP in HeLa-Zellen



$$f(t) = B + A(1 - e^{-t/\tau})$$

$$1/\tau = k_{\text{off}} + \frac{V_n}{V_c} k_{\text{on}}$$

$$A = \frac{\frac{V_n}{V_c} k_{\text{on}} + k_{\text{off}}}{\frac{V_n}{V_c} k_{\text{on}}}$$

Fit zur Bestimmung von Kinetischen Parametern

Zusammenfassung FRAP

- Bestimmung der Art des Transportvorganges (Diffusion, Subdiffusion und Superdiffusion) *in vivo* und *in vitro*
- Bestimmung von Bindungskinetiken