

Versuch: **Protein-Protein-Interaktion mit Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS)**

Dr. Glaser / Prof. Heinemann

Organisation: Das Praktikum findet am Klinikum (Arbeitsgruppe "Molekulare und zelluläre Biophysik" Stefan H. Heinemann), Drakendorfer Str. 1, statt.

Kontakt/Betreuung: Ralf W. Glaser, ralf.glaser@uni-jena.de, Tel. 949031, Fürstengraben 26 (Dekanat) Erdgeschoß links.

Aufgabenstellung: Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindungsreaktion zwischen fluoreszenzmarkierten Calmodulin und Fragmenten des hEAG1 Kanals mittels FCS.

Schwerpunkte: Sie beschäftigen sich mit der Möglichkeit, aus den zeitlichen Schwankungen der Fluoreszenzintensität in einem winzigen Volumen (<1fl) die Konzentration und die Diffusionskonstante der fluoreszenzmarkierten Substanz zu bestimmen (Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie, nur im Autokorrelationsmodus mit einem Farbstoff). Sie lernen in diesem Praktikum Möglichkeiten und Grenzen der FCS kennen, bekommen ein Gefühl dafür welcher Aufwand an Zeit und Material für eine Messung erforderlich ist, welche Bedingungen für erfolgreiche Messungen gegeben sein müssen und welche Zuverlässigkeit erreicht werden kann. Die Berechnung von Bindungsgleichgewichten und das Handling kleiner Konzentrationen (Adsorption an Gefäßwände) sind weitere Aspekte.

Durchführung: Herstellung der (unmarkierten) Fusionsproteine aus Fragmenten des hEAG1 Kanals: Transfektion, Expression in E. Coli, Reinigung; Suche nach geeigneten Meßbedingungen, Berechnung von Focusvolumen und Konzentrationen, Messung der Diffusionszeiten des markierten Peptids in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Calmodulin mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie, Berechnung der Affinität (Dissoziationskonstante K_D), Fehlerbetrachtung. (Zusatzaufgabe: Kompetitionsmessungen)

Theorie: Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) ist eine Methode zum Studium von molekularen Wechselwirkungen in Lösungen, bei der spontane Intensitätsfluktuationen fluoreszierender Moleküle in definiertem Volumen (0,25 fl) beobachtet und statistisch ausgewertet werden. Die Annäherung der Korrelationsfunktion mit einem biophysikalischen Modell liefert Informationen über die Diffusionsgeschwindigkeit der Fluoreszenz-markierten Teilchen, die abhängig ist von der molaren Masse der Teilchen. Über die Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit ist die Erhöhung der Teilchenmasse bei Ausbildung eines Komplexes zwischen den Molekülen registrierbar.

-www.zeiss.de (...FCS, Confocor suchen)

-reviews FCS z.B: E. L. Elson, Quick tour of fluorescence correlation spectroscopy from its inception. Journal of Biomedical Optics 9 (2004) 857-864; S. T. Hess et al., Biological and Chemical Applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Review. Biochemistry 41 (2002) 697-705.

-hEAG1 Kanal z.B: R. Schönherr et al., EMBO J. 19 (2000) 3263-3271.