

APLICACIÓN DE UN ALGORITMO GENÉTICO PARA OBTENER PARÁMETROS RELEVANTES EN ESPECTROSCOPIA DE CORRELACIÓN DE FLUORESCENCIA

Horacio V. Castellini^a, Bibiana D. Riquelme^b, Dominique Dumas^c

^a*Dpto Física, Facultad Cs Exactas Ingeniería y Agrimensura, UNR, Av. Pellegrini 250, 2000 Rosario, Argentina, horacio9573@yahoo.com.ar*

^b*Área Física, Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR - Óptica Aplicada a la Biología, Instituto de Física Rosario (CONICET-UNR), Bv 27 de febrero 210 bis, 2000 Rosario, Argentina, riquelme@ifir-conicet.gov.ar*

^c*Nancy-Universités, UMR 7561 CNRS et FR3209 CNRS-Université-Inserm. Faculté de Médecine, 9 avenue de la forêt de haye 54505 Vandoeuvre-les Nancy, France, Dominique.Dumas@medecine.uhp-nancy.fr*

Palabras claves: Algoritmo Genético, Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia, Microscopía confocal, coeficiente de difusión, rodamina, volumen efectivo

Resumen: La difusión molecular en membranas biológicas es un factor determinante en la señalización y la función celular. En los últimos años la técnica de Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia (FCS) se ha convertido en una de las más importantes dentro del campo de la microscopía por su versatilidad para analizar la dinámica molecular tanto en membranas biológicas como artificiales. Se basa en la cuantificación de las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia emitida por un muy pequeño número de partículas en un volumen del orden de 1 fL en escalas de tiempo del orden de los nanosegundos. Esta señal es autocorrelacionada y ajustada con expresiones analíticas que permiten extraer parámetros cinéticos de interés, como por ejemplo el tiempo de difusión y el coeficiente de difusión de moléculas. En este trabajo se desarrolló un algoritmo genético en C++ que permite obtener parámetros relevantes en biología celular mediante la técnica de FCS. Se determinaron las dimensiones de los volúmenes efectivos y el coeficiente de difusión para la Rodamina B en solución acuosa, cuyo valor obtenido por el algoritmo se encuentra dentro de los datos en la bibliografía. Se puede concluir que la precisión en los parámetros determinados es satisfactoria, siendo una gran ventaja para los estudios en FCS el poder contar con un programa desarrollado en código abierto de libre acceso para la comunidad científica.

1 INTRODUCCIÓN

La difusión molecular en membranas biológicas es un factor determinante en la señalización celular y en la función de la célula. La microscopia de correlación de fluorescencia (FCM), también conocida como espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), es una técnica de microscopia de fluorescencia confocal aplicada a la medición de coeficientes de difusión y al estudio de las interacciones moleculares. Durante los últimos treinta años, esta técnica ha adquirido un lugar de suma importancia en el campo de la microscopia como un método versátil para analizar la dinámica molecular en membranas artificiales y biológicas (Weiss et al, 2003; Masuda et al., 2005; Guo et al 2008).

La técnica de FCS es adecuada para obtener información fisicoquímica de la cinética (a escalas de tiempo que van de 10^{-7} a 10^2 s) de una pequeña cantidad de moléculas fluorescentes observadas en un volumen del orden del femtolitro. Esta técnica permite estudiar los procesos de interacción ligando-receptor sobre la superficie de células o de vesículas celulares, a nivel molecular y relacionados con su ambiente nativo (Culbertson et al., 2007). Se utiliza principalmente en biología para medir procesos dinámicos, tales como densidad de partículas, fracciones de interacción y dinámica molecular (Dumas et al., 2007).

La técnica de FCS se fundamenta en la cuantificación de las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia de la luz emitida por una pequeña cantidad de partículas dentro de un volumen muy pequeño (~ 1 fL). Esta señal de fluorescencia es autocorrelacionada y la curva de autocorrelación se ajusta con una expresión analítica conocida para extraer los parámetros cinéticos tales como coeficiente de difusión, dinámicas del estado triplete, cinética de reacción, o velocidad de flujo.

Varios autores (Aragon y Pecora, 1976; Rigler, 1993) han desarrollado modelos que describen la función de autocorrelación de las fluctuaciones de la fluorescencia de moléculas individuales que difunden en la solución a través de la focalización de un haz luminoso. Generalmente se asume que el perfil de la intensidad de emisión en el volumen de observación (definido como volumen de medición) es gaussiano en la dirección transversal, pero esta suposición es válida sólo para determinadas condiciones del sistema de medición (Hess y Webb, 2002). Cuando se utiliza este modelo para el ajuste de los datos experimentales, se puede obtener el tiempo de difusión característico (τ_D), el cual es el tiempo en el que una molécula difunde a través del radio transversal del volumen de observación, y está relacionado con la geometría del volumen focal y con el coeficiente de difusión translacional molecular (Dertinger et al., 2007; Gell et al., 2001).

Las herramientas de FCS disponibles para el tratamiento de los datos han alcanzado la capacidad de extraer esta información incluso de muestras cuya concentración es una única molécula. Aunque las expresiones analíticas se han desarrollado con el objeto de ser lo más cercanas posible a una variedad de condiciones experimentales, algunos procesos de interacción presentan desafíos particulares para obtener una expresión matemática, puesto que implican interacciones complejas de los marcadores fluorescentes. También, estos parámetros son difíciles de determinar de una manera independiente debido a la ausencia de estándares, lo que conduce a la imposibilidad de modelizar analíticamente el volumen confocal de detección (Petrášek y Schwille, 2008; Rüttinger et al., 2008). Por tal motivo, la FCS en general requiere la calibración con uno o más compuestos fluorescentes estándares de coeficientes de difusión conocidos.

En el presente trabajo, se propone un algoritmo accesible para obtener parámetros relevantes de los datos obtenidos por FCS, basado en los conceptos de un algoritmo evolutivo introducido en 1970 por John Henry Holland y conocido como algoritmo genético (AG). Un

AG es un método de búsqueda directo para solucionar los problemas de optimización que alcanza la convergencia en probabilidad. Este, se basa en las ideas de la selección natural darwinianas, procesos que conducen a la evolución biológica. Un AG modifica repetitivamente una población de posibles soluciones individuales, de manera tal que esta evoluciona hacia una solución óptima en las generaciones sucesivas.

Se propone un AG como método alternativo para ajustar la función de autocorrelación de moléculas en soluciones diluidas. La robustez y la precisión de esta nueva aproximación en FCS fueron comprobadas cuando se compararon los parámetros de difusión de Rodamina B en solución acuosa, con los proporcionados por métodos clásicos. Para ello se analizaron dos diferentes perfiles experimentales de detección, obtenidos mediante dos potencias de excitación diferentes (12% y 51%) de un láser de Argón de 25mW.

2 BASES TEÓRICAS

2.1 Teoría de FCS y algoritmo para el análisis de datos

En FCS la función de autocorrelación temporal es:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad 1$$

donde $\delta I(t)$ es la desviación de la intensidad media.

$G(0)$ está relacionado con el número promedio de partículas en el volumen confocal. En el caso de la difusión libre, las partículas fluorescentes utilizadas son pequeñas y la difusión ocurre en tres dimensiones. En estos casos, la “point spread function” (PSF) (Hess y Webb, 2002) es una función gaussiana tridimensional con simetría axial. Bajo tales condiciones, la función de autocorrelación teórica correspondiente está dada por:

$$G(\tau) = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right) \sqrt{1 + a^2 \frac{\tau}{\tau_d}}} + G(\infty) \quad 2$$

donde $\langle N \rangle$ es el valor medio del número de emisores de luz, $a = r_0/z_0$ donde r_0 es el radio transversal y z_0 es la longitud axial, y τ_D es el tiempo característico de residencia:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad 3$$

El factor γ es una medida de la uniformidad de la señal fluorescente de las moléculas localizadas en diferentes lugares dentro del volumen, y de la forma efectiva del contorno que define el volumen (Hess y Webb, 2002). Se obtiene $\gamma = 1$ solamente cuando el volumen tiene bien definido los límites físicos y la señal fluorescente proveniente de moléculas individuales es uniforme.

El factor γ puede incorporarse en la definición del “volumen efectivo” de la siguiente manera:

$$V_{eff} = \frac{V_{psf}}{\gamma}$$

donde V_{psf} es el volumen de medida definido a partir de la PSF. La ecuación 2 puede escribirse:

$$G(\tau) = \frac{\gamma}{\langle N \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_c}}} + G(\infty) \quad 4$$

donde $\gamma = \frac{\sqrt{2}}{4}$ y τ_c es el tiempo de difusión longitudinal dado por:

$$\tau_c = \frac{z_0^2}{4D} \quad 5$$

En esta situación, el ajuste tendrá cuatro parámetros independientes $\langle N \rangle$, τ_D , τ_C , y $G(\infty)$ a partir de los cuales se puede obtener el coeficiente de difusión de las partículas fluorescentes.

Generalmente $G(\infty)$ no se tiene en cuenta dado que se anula. Además, $\langle N \rangle$ es una función lineal de la concentración de las partículas fluorescentes $\langle C \rangle$ dada por la expresión:

$$\langle N \rangle = V_{eff} \langle C \rangle \quad 6$$

de donde puede obtenerse el volumen efectivo por regresión lineal.

De la integración de la PSF para el caso de la difusión libre, el volumen efectivo está dado por:

$$V_{eff} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0 \quad 7$$

de la cual se pueden obtener los parámetros r_0 y z_0 , si se conocen los valores de τ_C y τ_D .

2.2 Algoritmo Genético

El concepto de Algoritmo Genético (AG) fue sugerido por John Holland en la década de 1970, luego formalizado por David Goldberg en la década de 1980. Las características más relevantes son:

- La representación o codificación binaria de las posibles soluciones,
- La existencia de operadores evolutivos de explotación (es decir que utilizan la información del espacio de búsqueda previamente visitado para determinar los futuros puntos a buscar) como son el cruzamiento y la mutación,
- La selección está basada en una función de evaluación (fitness function) que determina la presión de evolución (Affenzeller et al., 2009) de las posibles soluciones.

Un AG opera sobre una población fija de M individuos o posibles soluciones inicialmente escogidas al azar en el espacio solución, M debería ser tal que permita una diversidad de soluciones sin llegar a transformar en ineficiente la búsqueda. El criterio de parada, en este caso, está relacionado con la función de evaluación. En este trabajo se usa el error cuadrático medio del modelo:

$$S = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (Y_k - F(\tau_k))^2 \quad 8$$

donde Y_k es la cantidad de datos conocidos para $N \ll M$, y $F(\tau)$ es la función objetivo que contiene los parámetros a hallar los cuales son codificados para la implementación del AG, en el presente caso $F(\tau)$ es la ecuación (4) donde los parámetros a codificar son $G(0)$, τ_D , y τ_C .

Cada parámetro incógnita se codifica de forma binaria por medio de una función de correspondencia. A esta codificación se la llama *genotipo*. El efecto de la decodificación que corresponde a una posible solución se llama *fenotipo*. Es decir la terna de parámetros $(G(0), \tau_D, \tau_c)$ es un fenotipo y su codificación binaria (X_1, X_2, X_3) es un genotipo. A cada elemento de la terna, X_k , se lo llama cromosoma, el cual es una cadena de bits $X_k = a_1 a_2 \dots a_n$, donde cada subcadena $a_{k+1} \dots a_{k+m}$, con $k+m < n$ se llama *gen* y al valor dentro de esta posición se lo llama *alelo*. A cada nueva generación de posibles soluciones se le aplican cuatro operadores evolutivos sobre los genotipos, estos son:

Selección: Se eligen dos padres de acuerdo a su valor de la función de evaluación, S_k . En este trabajo se usa la selección proporcional, es decir, se asigna una probabilidad de selección P_k , proporcional al recíproco de S_k , a cada genotipo:

$$P_k = \frac{\frac{1}{S_k}}{\sum_n \frac{1}{S_n}} \quad 9$$

En el caso que $S_k < \epsilon$, donde ϵ es un umbral predefinido, se asigna $S_k = \epsilon$ directamente. Luego, para obtener los dos padres más aptos se efectúan dos sorteos aleatorios con la función de probabilidad dada por el conjunto P_k , con $k=1, \dots, M$.

Cruzamiento: Los dos padres antes sorteados se cruzan para producir dos descendientes. El mecanismo de cruzamiento usado es uniforme, es decir, el bit de un padre pasa a ser el bit de un hijo si sale favorecido en un sorteo aleatorio con probabilidad 0.5.

Mutación: Se modifica de manera aleatoria un bit de los descendientes siempre y cuando haya salido favorecido en un sorteo de Brillouin con baja probabilidad.

Reemplazo: En este paso los dos nuevos descendientes reemplazarán a los progenitores.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Soluciones acuosas de Rodamina B

Se preparó una suspensión madre disolviendo 1 mg de Rodamina B (Sigma R6626; Peso molecular = 479.02 g/mol) en 12 ml de agua ultra purificada. Para las experiencias de FCS, la solución madre de Rodamina B fue diluida en agua para tener soluciones en el rango de 3 a 900 nM.

3.2 Microscopia de Correlación de fluorescencia

La FCM se realizó utilizando un microscopio láser confocal comercial (SP2-FCS2-AOBS Leica, Alemania), en el cual es posible optimizar y fijar la alineación de los elementos ópticos para la obtención de V_{eff} muy pequeños (corrección en la refracción de las láminas). Se utilizó un objetivo de inmersión en agua de 60x y 1.2 de apertura numérica. Para evitar interferencia con las coberturas de cristal, las mediciones fueron hechas dentro del seno de la solución, a 130 μm sobre la superficie del cristal del compartimiento (lámina field-finder de Labtech) para una potencia relativa del láser de 51%. El sistema de FCS fue fijado para: frecuencia de muestreo = 500KHz; Tiempo = 20000 segundos; modo tiempo = 1, modo adquisición tiempo para Ch1 y Ch2; Frecuencia interna 24 MHz.

La temperatura y la humedad en el laboratorio se mantuvieron constantes (22°C y 2%) durante todas las mediciones. Para evitar el photobleaching durante las mediciones de FCS, se disminuyó la irradiancia por atenuación de la potencia del laser.

La validez de la aproximación gaussiana del volumen focal está influenciada por la relación entre los tamaños de la apertura trasera de la lente del objetivo y de la apertura del detector situada en el plano focal (Hess y Webb, 2002).

3.3 Análisis de los datos de FCM

El software Vista (ISS Urbana) suministrado con el sistema FCS (Leica) provee los datos de la función de correlación en formato CSV (Comma Separate Values). El AG ajusta la función de correlación dada donde hay 3 cromosomas asociados a los parámetros incógnita: $\langle N \rangle$, τ_D y τ_C . En la figura 1 se puede ver el pseudo código del algoritmo usado para ajustar los datos. Este código fue implementado en lenguaje C++ y compilado usando una API (Application Programming Interface) de desarrollo propio. Luego se utilizó un “script” interpretado por BASH (Borne Again Shell) en un Linux-UBUNTU. Como se muestra en la figura 2, los valores del ajuste reproducen la forma de los datos originales. Ese resultado es muy útil porque estos valores hallados se pueden utilizar para calcular los parámetros de difusión como el coeficiente de difusión (D), el $\tau_{1/2}$, etc.

El algoritmo usado no considera la difusión anómala, la polidispersidad ni la correlación del estado de triplete.

```

                                Fitting Curve with Genetic Algorithm

begin algorithm
//Defines the objective function wich depends on three parameters
// a1=G(0), a2=  $\tau_d$ , a3=  $\tau_c$ 
define function f(x,a1,a2,a3);
//Each phenotype is associated to a parameter
chromosome A[GENES], B[GENES], C[GENES];
real s1, s2, exit, threshold, fit[Ndata];
integer i, k;
//Acquire and store data to analyze
//X=time, Y=G(t)
Read from file: X[Ndata], Y[Ndata];
//Begin fitting function
for k<-0 to GENES do
  fit[k]<-0;
  for i<-0 to Ndata do
    fit[k]<-fit[k]+(Y[i]-f(X[i],A[i].value(),
      B[i].value(),C[i].value()))**2;
  endfor
endfor
//Escape flag to avoid false minima
exit<-0;
repeat
  for i<-0 to GENES do
    s1<-parent_raffle(fit[]);
    s2<-parent_raffle(fit[]);
//Cross and mutation to the new offspring
    A[i]=A[s1]+A[s2]; B[i]=B[s1]+B[s2];
    C[i]=C[s1]+C[s2];
    recalculate fit[i] with new A[i], B[i] and C[i];
    if fit[i]<threshold then
      exit<-1;
    endif
  endfor
endfor
until exit<>0;
show results;
end algorithm

```

Figura 1: Algoritmo desarrollado en Pseudo código

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

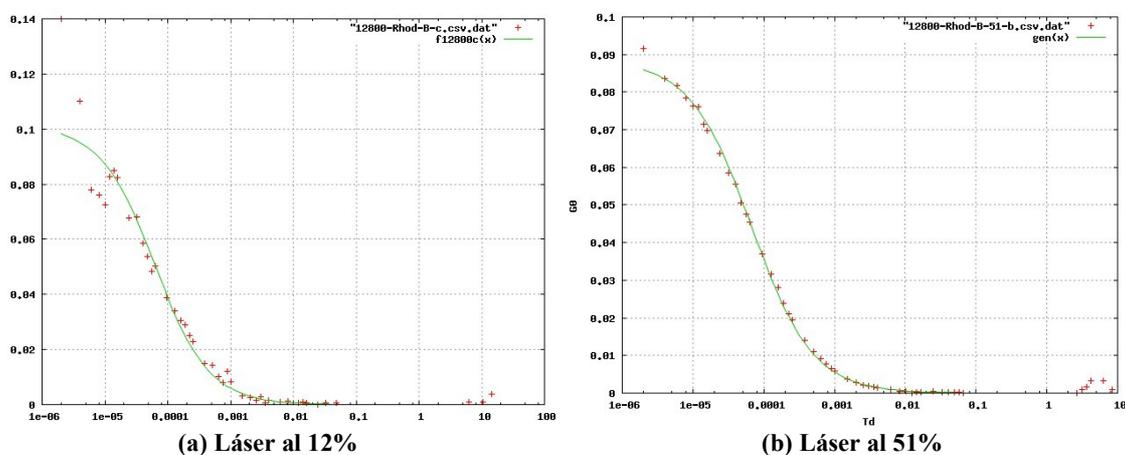


Figura 2: Datos y función de correlación ajustada para la solución de Rodamina 13.6 nM con potencia dos potencias relativas del láser diferentes (a) 12% y (b) 51%

4.1 Análisis de datos para Rodamina B en solución acuosa

En la Tabla I se muestran algunos de los valores calculados de N y τ_D obtenidos a partir de los datos de las curvas de correlación (figura 2) para soluciones acuosas de Rodamina B correspondientes a las potencias relativas de 12% y 51% del láser de HeNe a 543 nm longitud de onda. Estos valores se presentan como la media muestral y su intervalo de confianza obtenido para tres mediciones para la misma concentración en solución.

Tabla I: Parámetros obtenidos con su correspondiente intervalo de confianza utilizando el algoritmo genético

Láser 51 %			Láser 12 %		
Concentración nM	τ_D μs	$\langle N \rangle$	Concentración nM	τ_D μs	$\langle N \rangle$
3.4	63 ± 1	5.94 ± 0.25	13.6	67 ± 1	$9,64 \pm 0,39$
6.8	67 ± 2	6.64 ± 0.52	27.17	51 ± 4	$16,13 \pm 1,84$
13.6	66 ± 6	11.18 ± 0.85	54.34	70 ± 1	$30,34 \pm 8,77$
27.17	64 ± 3	18.26 ± 0.82	108.7	67 ± 1	$55,37 \pm 17,46$
54.34	75 ± 1	35.05 ± 4.1	217	82 ± 2	$167,2 \pm 45,5$
108.7	65 ± 5	66.35 ± 2.82	434.75	67 ± 4	399 ± 232
			870	65 ± 4	803 ± 444

La Figura 3 es la gráfica del número medio de moléculas (N) en el volumen focal en función de la concentración de Rodamina B en solución para las dos potencias relativas del láser (a 543 nm de longitud de onda) obtenidas a partir de los datos utilizando el algoritmo genético. Las líneas rectas corresponden a las regresiones lineales para los datos.

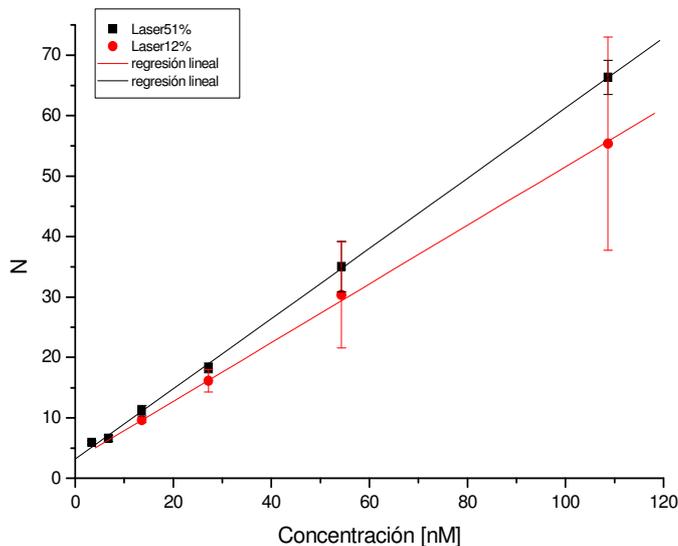


Figura 3: Número medio de moléculas en el volumen focal obtenidas a partir del algoritmo genético versus la concentración de Rodamina B en solución para dos potencias relativas del láser.

Considerando que $\langle N \rangle = V_{\text{eff}} \langle C \rangle$, el volumen efectivo se puede obtener a partir de los valores de la pendiente de las regresiones lineales en la figura 3. En la tabla II se presentan los volúmenes efectivos obtenidos para las dos condiciones de excitación del láser utilizadas.

Tabla II: Volumen efectivo calculado con el error de la estimación de la pendiente.

Potencia del láser	V_{eff} fl
12%	0.80 ± 0.01
51%	0.96 ± 0.01

El modelo de difusión libre no sería adecuado para altas concentraciones, esto se refleja en el error elevado obtenido para las concentraciones mayores a 50nM, en consecuencia estos resultados no han sido considerados en los cálculos. Para las soluciones diluidas de Rodamina B (< 50nM) el tiempo de difusión promedio resultó ser independiente de la potencia del láser cuyo valor obtenido fue:

$$\tau_D = (67 \pm 5) \mu\text{s}$$

Este valor para el tiempo de difusión, se encuentra dentro del rango de los tiempos informados para la difusión de la Rodamina B (Rani et al, 2005; Ramsey et al, 2003; Sera et al, 2001).

Finalmente, el coeficiente de difusión de la Rodamina B en solución acuosa obtenido como promedio de ambas potencias del láser, fue:

$$D = (2.23 \pm 0.07) 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Los valores obtenidos de las dimensiones del volumen de observación fueron:

$$r_0 = (0.236 \pm 0.012) \mu\text{m}$$

$$z_0 = (3.06 \pm 0.15) \mu\text{m}$$

Estos valores obtenidos sin la necesidad de una calibración con soluciones estándares de Rodamina B, son del mismo orden que los obtenidos por Langowski en el 2008, usando el mismo objetivo y concuerdan con los valores obtenidos con los métodos fisicoquímicos clásicos.

5 CONCLUSIÓN

Se describe un nuevo método para el análisis de la dinámica molecular basado en la técnica tradicional de FCS, pero utilizando un algoritmo genético para ajustar y obtener información relevante de las curvas de correlación. Este nuevo método permite obtener del mismo conjunto de datos, tanto las dimensiones del volumen efectivo como las constantes dinámicas de las moléculas fluorescentes en difusión, ampliando las posibilidades para el análisis de la dinámica molecular en muchos sistemas de interés.

La precisión de los parámetros obtenidos es ampliamente satisfactoria. La ventaja de este método aplicado a FCM es la accesibilidad debido a que es un desarrollo en código abierto accesible a toda la comunidad científica.

6 REFERENCIAS

- Aragon S.R. and Pecora R., *J. Chem. Phys.* 64:1791-1803, 1976.
- Affenzeller M., Winkler S., Wagner S and Beham A. *Genetic Algorithm and Genetic Programming*, Chapman and Hall/CRC, Cap 5.4, Pag 86.
- Culbertson M., Williams J., Cheng W., Stults D., Wiebracht E, Kasianowicz J., Burden D. Numerical Fluorescence Correlation Spectroscopy for the Analysis of Molecular Dynamics under Nonstandard Conditions. *Anal. Chem.*, 79: 4031-4039, 2007.
- Dertinger T., Pacheco V., von der Hocht I., Hartmann R., Gregor I., Enderlein J. Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements. *Chem Phys Chem.* 8(3):433-443, 2007.
- Dumas D., Riquelme B., Werkmeister E., de Isla N., Stoltz J.F.. Multimodality of Microscopy Imaging Applied to Cartilage Tissue Engineering. In. *Osteoarthritis, Inflammation and Degradation: A Continuum*, Cap XVI, J. Buckwalter et al. (Eds.), IOS Press, 254-260, 2007.
- Gell C., Brockwell D., Beddard G., Radford S., Kalverda A., Alastair Smith D. Accurate Use of Single Molecule Fluorescence Correlation Spectroscopy to Determine Molecular Diffusion Times. *Single Molecules.* 2(3):177-181, 2001.
- Guo L., Yi Har J., Sankaran J., Hong Y., Kannan B., Wohland T. Molecular Diffusion Measurement in Lipid Bilayers over Wide Concentration Ranges: A Comparative Study. *Chem Phys Chem* 9(5):721-728, 2008.
- Hess S., Webb W., Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* 83: 2300-2317, 2002.
- Holland J., Robust algorithms for adaptation set in a general format framework. Proceeding of the IEEE *Symposium on Adaptive Processes Decision and control*, XVII, 5:1-5,1970.
- Langowski J. Protein-Protein Interactions Determined by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Methods in cell biology*, Elsevier Inc., 85: 471-484, 2008.
- Masuda A., Ushida K., Okamoto T., New Fluorescence Correlation Spectroscopy Enabling Direct Observation of Spatiotemporal Dependence of Diffusion Constants as an Evidence of Anomalous Transport in Extracellular Matrices. *Biophys J.* 88(5):3584-3591, 2005.
- Petrášek Z. and Schwille P., Precise Measurement of Diffusion Coefficients using Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biophys J.* 94(4): 1437-1448, 2008.

- Ramsey J., Jacobson S., Culbertson C., Ramsey J., *Anal. Chem.* 75 (2003) 3758-3764.
- Rani S., Pitts B., Stewart P., *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:728-732, 2005.
- Rigler R., Mets Ü., Widengren J., Kask P., *Euro. Biophys. J.* 22:169-175, 1993.
- Rüttinger S., Buschmann V., Krämer B., Erdmann R., Macdonald R., Koberling F.,
Comparison and accuracy of methods to determine the confocal volume for quantitative
fluorescence correlation spectroscopy. *J Microsc.* 232 (2):343-352, 2008.
- Sera Y., Matsubara N., Otsuka K., Terabe S., *Electrophoresis* 22:3509-3513, 2001.
- Weiss M., Hashimoto H., Nilsson T., Anomalous Protein Diffusion in Living Cells as Seen by
Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal* 84:4043-4052, 2003.