

WS2021

PPB2

FRET

Matteo Kumar - Leonhard Schatt

Gruppe 3



Informationen

| | |
|---------------|------------|
| Versuchstag | 27.09.2021 |
| Versuchsplatz | NW I |
| Betreuer | Chenyu Jin |
| Gruppen Nr. | 3 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 2 | Grundlagen | 6 |
| 2.1 | FRET | 6 |
| 2.2 | Bleichung | 7 |
| 3 | Auswertung und Diskussion | 8 |
| 3.1 | Sensitized Emission | 8 |
| 3.1.1 | Bestimmung der Korrekturfaktoren | 8 |
| 3.1.2 | Sensitized Emission und Förstereffizienz | 10 |
| 3.2 | Bestimmung der Förstereffizienz über Bleichung der Akzeptoren | 16 |
| 3.3 | Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM) | 17 |
| 3.3.1 | Lebenszeit von CFP und YFP | 17 |
| 3.3.2 | Lebensdauer mit FRET | 18 |
| 3.3.3 | Impulsantwort | 20 |
| 4 | Fazit | 24 |
| A | Anhang | 25 |
| A.1 | FLIM | 25 |

1 Einleitung

2 Grundlagen

2.1 FRET

Förster-Resonanzenergietransfer ist ein Prozess des Energietransfers. Dabei gibt ein Donor und einen Akzeptor. Der Donor gibt dabei über Dipol-Dipol-Wechselwirkung Energie an den Akzeptor ab – und das strahlungsfrei. Damit FRET auftritt müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Diese wären, dass sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen wie in Abbildung 2.1.

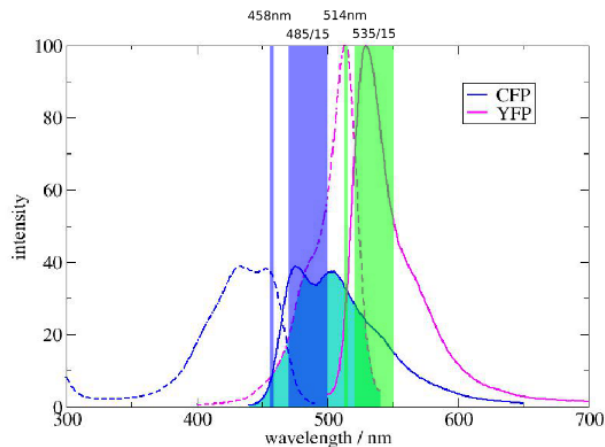


Abbildung 2.1: Emissionsspektrum/Absorptionsspektrum von CFP/YFP

Sollte dies der Fall sein und der Abstand klein genug sein, dann tritt FRET auf. Der Abstand muss klein genug sein, da die FRET-Effizienz

$$E = \frac{1}{1 + \frac{r^6}{R_0^6}} \quad (2.1)$$

ist. Dabei bezeichnet R_0 den Försterradius und r den Abstand der beiden Moleküle. Man sieht sehr schön, dass $E = 1/2$ für $r = R_0$. Das ist auch die Definition des Försterradiuses: Die Hälfte der einfallenden Photonen, die vom Donor absorbiert werden, werden über FRET auf den Akzeptor übertragen.

Der Försterradius liegt normalerweise im Millimeterbereich, da die Dipol-Dipol-Wechselwirkung sehr kurzreichweitig ist. Daher kommt auch die sechste Potenz unter dem Bruchstrich. Wichtig ist noch, dass ein Teil der Energie als Vibration bei dem emittierenden Molekül bleibt. Daher ist die emittierte Strahlungen energieärmer als die absorbierte Strahlungen.

2.2 Bleichung

3 Auswertung und Diskussion

3.1 Sensitized Emission

3.1.1 Bestimmung der Korrekturfaktoren

Da es aufgrund des Crosstalks nicht möglich ist, zur Bestimmung der Förstereffizienz E alleine den s.e.-Kanal zu messen, müssen zuerst Korrekturfaktoren $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ aus den Messungen der Proben mit reinem CFP/YFP berechnet werden. Dies werde exemplarisch an einer YFP-Zelle durchgeführt. Als Bearbeitungsprogramm wird FIJI gewählt.¹

Für jede Zelle stehen vier Bilder zur Verfügung: Das Bild aus dem Donorkanal D , das aus dem s.e.-Kanal S , das aus dem Akzeptorkanal A und das Brightfield BF , welche auf 32 Bit konvertiert werden. Als Erstes wird zur Bestimmung des Untergrunds eine zellfreie Region in BF als ROI1 gewählt und auf die anderen Bilder übertragen und die mittlere Graustufe gemessen. Danach wird in S die hell dargestellte Membran als ROI2 gewählt und als eine zusätzliche ROI3 die gesamte Zelle mit ein wenig Hintergrund. Die mittlere Graustufe in ROI2 wird in S und A gemessen ($M_{S,oH}$, $M_{A,oH}$ zur Bestimmung von γ ohne Hintergrundkorrektur. Die jeweils gemessenen Hintergrundwerte werden nun von D , S und A abgezogen. Um kleine und negative Zahlen, die in späteren Rechnungen stören könnten zu vermeiden, wird ein unterer Threshold auf eine Zahl zwischen zwei und drei festgelegt. Anschließend werden die mittleren Graustufen in der ROI2 (M_D , M_S , M_A zur regulären Bestimmung der Parameter) und ROI3 von S , A (Z_S , Z_A zur Bestimmung von γ für die ganze Zelle) gemessen. Die Parameter ergeben sich nach:

$$\alpha = \frac{M_D}{M_A}, \quad \gamma = \frac{M_S}{M_A}, \quad \delta = \frac{M_D}{M_S}$$

Diese und die dafür benötigten Intensitäten finden sich in Tab.3.1.1. Dabei ist für Zelle 1 eine sehr große Abweichung bei den Werten für die Parameter, insbesondere bei α und δ , zu erkennen. Dies könnten statistische Ausreißer sein. Da die Abweichung allerdings sehr groß ist und die Anzahl der Parameter, über die gemittelt wird, klein ist, soll Zelle 1 bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt werden.

¹<https://fiji.sc/>

3.1 Sensitized Emission

| Zelle | H_D | H_S | H_A | M_D | M_S | M_A | α | γ | δ |
|-------|-------|-------|-------|--------|---------|---------|----------|----------|----------|
| 1 | 3,469 | 1,716 | 1,647 | 7,368 | 112,042 | 154,957 | 0,048 | 0,723 | 0,066 |
| 2 | 3,477 | 1,684 | 1,589 | 27,523 | 160,316 | 239,416 | 0,115 | 0,670 | 0,172 |
| 3 | 3,398 | 1,525 | 1,501 | 6,836 | 38,770 | 60,359 | 0,113 | 0,642 | 0,176 |
| 4 | 3,473 | 1,676 | 1,529 | 6,685 | 34,273 | 57,370 | 0,117 | 0,597 | 0,195 |
| 5 | 4,406 | 1,747 | 2,015 | 7,719 | 51,241 | 76,791 | 0,101 | 0,667 | 0,151 |
| 6 | 4,449 | 2,400 | 2,994 | 6,774 | 45,610 | 74,779 | 0,091 | 0,610 | 0,149 |
| 7 | 3,722 | 1,543 | 1,824 | 7,721 | 58,728 | 95,628 | 0,081 | 0,614 | 0,131 |
| 8 | 3,710 | 1,640 | 1,714 | 7,406 | 34,212 | 58,472 | 0,127 | 0,585 | 0,216 |
| 9 | 3,708 | 1,673 | 1,812 | 7,349 | 28,602 | 47,971 | 0,153 | 0,596 | 0,257 |
| 10 | 3,435 | 1,746 | 1,475 | 7,109 | 29,154 | 50,015 | 0,142 | 0,583 | 0,244 |

Tabelle 3.1: Reine YFP-Messung: Hintergrundintensitäten H und die hintergrundbereinigten Intensitäten der Membranregionen M für die Bilder D , S und A ; zudem die berechneten Korrekturfaktoren α , γ und δ .

In Tab.3.1.1 sind die Werte für γ dargestellt, die auf den oben beschriebenen alternativen Berechnungswegen berechnet wurden.

| Zelle | $M_{S,oH}$ | $M_{A,oH}$ | γ_{oH} | Z_S | Z_A | γ_Z |
|-------|------------|------------|---------------|--------|--------|------------|
| 1 | 113,749 | 156,568 | 0,727 | 40,156 | 59,259 | 0,678 |
| 2 | 47,862 | 79,515 | 0,602 | 21,255 | 29,470 | 0,721 |
| 3 | 40,169 | 61,815 | 0,650 | 20,707 | 28,572 | 0,725 |
| 4 | 35,516 | 58,586 | 0,606 | 19,698 | 29,688 | 0,664 |
| 5 | 52,802 | 78,790 | 0,670 | 32,973 | 50,309 | 0,655 |
| 6 | 47,356 | 77,142 | 0,614 | 32,922 | 53,921 | 0,611 |
| 7 | 60,180 | 97,389 | 0,618 | 47,584 | 77,729 | 0,612 |
| 8 | 35,463 | 60,068 | 0,590 | 22,609 | 35,327 | 0,640 |
| 9 | 28,545 | 48,023 | 0,594 | 20,340 | 31,969 | 0,636 |
| 10 | 30,350 | 51,301 | 0,592 | 18,508 | 26,505 | 0,698 |

Tabelle 3.2: Reine YFP-Messung: Alternative Werte für γ . Berechnet über die Intensitäten der Membranen ohne Hintergrundkorrektur M_{oH} (γ_{oH}) bzw. über die Intensitäten der gesamten Zelle Z (γ_Z).

Für die verschiedenen Arten von γ ergeben sich die Werte in Tab.3.1.1. Dabei fällt auf, dass die Mittelwerte für die beiden Berechnungen für die Membranregionen kaum voneinander abweichen. Dies ist aber nicht weiter verwunderlich, berechnet sich γ doch über einen Quotienten; sind nun Zähler und Nenner groß genug, wie es hier der Fall ist, fällt die Subtraktion des kleinen Wertes der Hintergrundintensität kaum ins Gewicht. Der Unterschied zu dem Wert für die gesamte Zelle ist schon deutlich größer, aber auch das ist erklärbar: Die Membranregion enthält die Bereiche mit den höchsten Intensitäten,

3 Auswertung und Diskussion

alle zusätzlichen Gebiete, die bei der ganzen Zelle mit betrachtet werden (Zellinneres, etwas Hintergrund) sollten nur sehr wenig Intensität vorweisen. Je mehr solcher Gebiete geringer Intensität nun in die Berechnung des Mittelwertes einbezogen werden (und in der Regel ist das Zellinnere wesentlich größer als der Schnitt durch die Membran), so wird das Mittel immer weiter gesenkt und die Werte der mittleren Intensitäten für S und A gleichen sich immer mehr an, was zu einem Anstieg von γ führt.

| Art der Berechnung | Mittelwert | Standardabweichung |
|------------------------------------|------------|--------------------|
| Membran hintergrundbereinigt | 0,6183 | 0,0335 |
| Membran nicht hintergrundbereinigt | 0,6151 | 0,0276 |
| ganze Zelle | 0,6625 | 0,0434 |

Tabelle 3.3: Mittelwerte und Standardabweichungen für die verschiedenen Werte von γ .

Analog werden werden die Bilder aus der Messung mit reinem CFP bearbeitet. Der Parameter β ergibt sich hier aus $\beta = \frac{M_S}{M_D}$, wobei die M hier die Werte aus der CFP-Messung sind.

| Zelle | H_D | H_S | H_A | M_D | M_S | M_A | β |
|-------|-------|-------|-------|---------|--------|-------|---------|
| 1 | 3,418 | 1,686 | 1,577 | 95,440 | 18,973 | 4,167 | 0,199 |
| 2 | 3,425 | 1,561 | 1,598 | 112,163 | 22,212 | 4,069 | 0,198 |
| 3 | 3,452 | 1,781 | 1,620 | 73,191 | 15,579 | 4,062 | 0,213 |
| 4 | 3,401 | 1,420 | 1,284 | 53,402 | 11,505 | 4,366 | 0,215 |
| 5 | 3,560 | 1,379 | 1,377 | 158,632 | 34,848 | 4,220 | 0,220 |
| 6 | 3,474 | 1,373 | 1,341 | 112,046 | 22,406 | 4,520 | 0,200 |
| 7 | 3,522 | 1,397 | 1,484 | 87,322 | 17,689 | 4,274 | 0,203 |
| 8 | 3,403 | 1,385 | 1,485 | 102,180 | 20,527 | 4,232 | 0,201 |
| 9 | 3,400 | 1,430 | 1,473 | 111,870 | 22,527 | 4,195 | 0,201 |
| 10 | 3,381 | 1,543 | 1,471 | 130,118 | 26,034 | 4,338 | 0,200 |

Tabelle 3.4: Reine CFP-Messung: Hintergrundintensitäten H und die hintergrundbereinigten Intensitäten der Membranregionen M für die Bilder D , S und A ; zudem der berechnete Korrekturfaktor β .

3.1.2 Sensitized Emission und Förstereffizienz

Zur Bestimmung der Förstereffizienz E muss erst die Sensitized Emission SE bestimmt werden. Dazu werden die Bilder aus der Messung mit den CFP- und YFP-Proben wie in 3.1.1 gezeigt vom Hintergrund bereinigt und mit einem Threshold versehen. Zudem wird auch hier die mittlere Graustufe der Zellmembranregion M_D , M_S , M_A bestimmt. Daraus folgt SE über $SE = \frac{M_S - \beta M_D - (\gamma - \alpha \beta) M_A}{1 - \beta \delta}$. E ergibt sich dann aus $E = \frac{SE}{\sqrt{M_A M_D}}$.

| Zelle | H_D | H_S | H_A | M_D | M_S | M_A | SE | E |
|-------|-------|-------|-------|---------|---------|--------|--------|-------|
| 1 | 2,421 | 1,210 | 1,223 | 80,730 | 71,540 | 54,331 | 25,190 | 0,380 |
| 2 | 2,813 | 1,270 | 1,248 | 137,878 | 106,079 | 73,674 | 38,181 | 0,379 |
| 3 | 2,547 | 1,231 | 1,234 | 68,282 | 68,762 | 60,218 | 21,021 | 0,328 |
| 4 | 2,668 | 1,249 | 1,250 | 84,578 | 64,943 | 52,319 | 18,877 | 0,284 |
| 5 | 2,837 | 1,264 | 1,296 | 104,521 | 62,707 | 41,966 | 19,202 | 0,290 |
| 6 | 2,924 | 1,271 | 1,414 | 78,200 | 66,906 | 57,763 | 18,745 | 0,279 |
| 7 | 3,051 | 1,402 | 1,512 | 45,738 | 54,990 | 62,436 | 9,647 | 0,181 |
| 8 | 3,079 | 1,620 | 1,388 | 56,097 | 30,312 | 25,544 | 4,974 | 0,131 |
| 9 | 3,194 | 1,584 | 1,654 | 36,181 | 17,553 | 15,022 | 2,039 | 0,087 |
| 10 | 3,528 | 1,852 | 1,928 | 58,512 | 35,725 | 32,398 | 5,879 | 0,135 |
| 11 | 3,323 | 1,712 | 1,780 | 64,531 | 72,052 | 82,691 | 11,224 | 0,154 |
| 12 | 3,390 | 1,397 | 1,497 | 63,450 | 45,478 | 43,365 | 8,256 | 0,157 |
| 13 | 3,487 | 1,898 | 1,754 | 22,739 | 16,890 | 18,424 | 1,787 | 0,087 |
| 14 | 3,596 | 1,825 | 1,838 | 29,124 | 18,328 | 16,876 | 3,028 | 0,137 |
| 15 | 3,645 | 1,534 | 1,466 | 59,672 | 37,600 | 32,234 | 7,703 | 0,176 |

Tabelle 3.5: YFP/CFP-Messung: Hintergrundintensitäten H und die hintergrundbereinigten Intensitäten der Membranregionen M für die Bilder D , S und A ; zudem die berechnete Sensitized Emission SE und Förstereffizienz E .

Über die Förstereffizienz kann auch der mittlere Abstand zwischen den Fluorophoren abgeschätzt werden, wenn der Försterradius R_0 bekannt ist. Dieser beträgt bei YFP/CFP $R_0 = 4,92 \text{ nm}$ (?). Der Zusammenhang zwischen Förstereffizienz E , Försterradius R_0 und Abstand der Fluorophore r lautet

$$E = \frac{1}{1 + (\frac{r}{R_0})^6} \leftrightarrow r = R_0 \sqrt[6]{\frac{1}{E} - 1}$$

Damit ergeben sich für die Zellen die mittleren Abstände, die in Tab. 3.6 zu sehen sind.

3 Auswertung und Diskussion

| Zelle | E | r |
|-------|-------|-------|
| 1 | 0,380 | 5,337 |
| 2 | 0,379 | 5,343 |
| 3 | 0,328 | 5,545 |
| 4 | 0,284 | 5,741 |
| 5 | 0,290 | 5,712 |
| 6 | 0,279 | 5,764 |
| 7 | 0,181 | 6,331 |
| 8 | 0,131 | 6,740 |
| 9 | 0,087 | 7,273 |
| 10 | 0,135 | 6,705 |
| 11 | 0,154 | 6,538 |
| 12 | 0,157 | 6,507 |
| 13 | 0,087 | 7,275 |
| 14 | 0,137 | 6,690 |
| 15 | 0,176 | 6,366 |

Tabelle 3.6: Berechnete mittlere Abstände r zwischen den Fluorophoren für jede Zelle der CFP/YFP-Messung und die dazugehörige Förstereffizienz E .

Anstelle die Berechnung von SE und E mit den Intensitätsmittelwerten auf der Membran durchzuführen kann diese auch pixelweise mit den gesamten Bildern erfolgen. Die Bilder finden sich in Abb. 3.1 - 3.3 wieder. Wählt man nun in der Darstellung von E nun die gleiche Membranregion aus, über die auch die Intensität gemittelt wurde, ergeben sich die Mittelwerte $E_{\text{pixelweise}}$, die in 3.1.2 zu finden sind.

| Zelle | $E_{\text{aus Mittelung}}$ | $E_{\text{pixelweise}}$ |
|-------|----------------------------|-------------------------|
| 2 | 0,379 | 0,413 |
| 10 | 0,135 | 0,329 |
| 13 | 0,0873 | 0,370 |

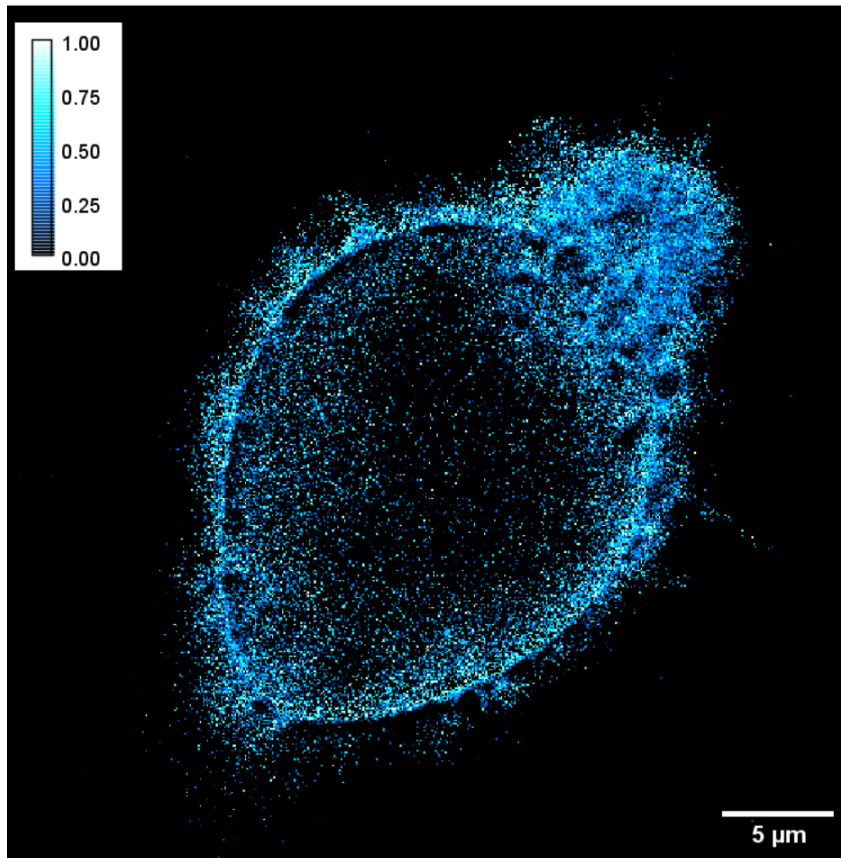


Abbildung 3.1: 2D-Plot der Förstereffizienz E von Zelle 2, pixelweise berechnet.

3 Auswertung und Diskussion

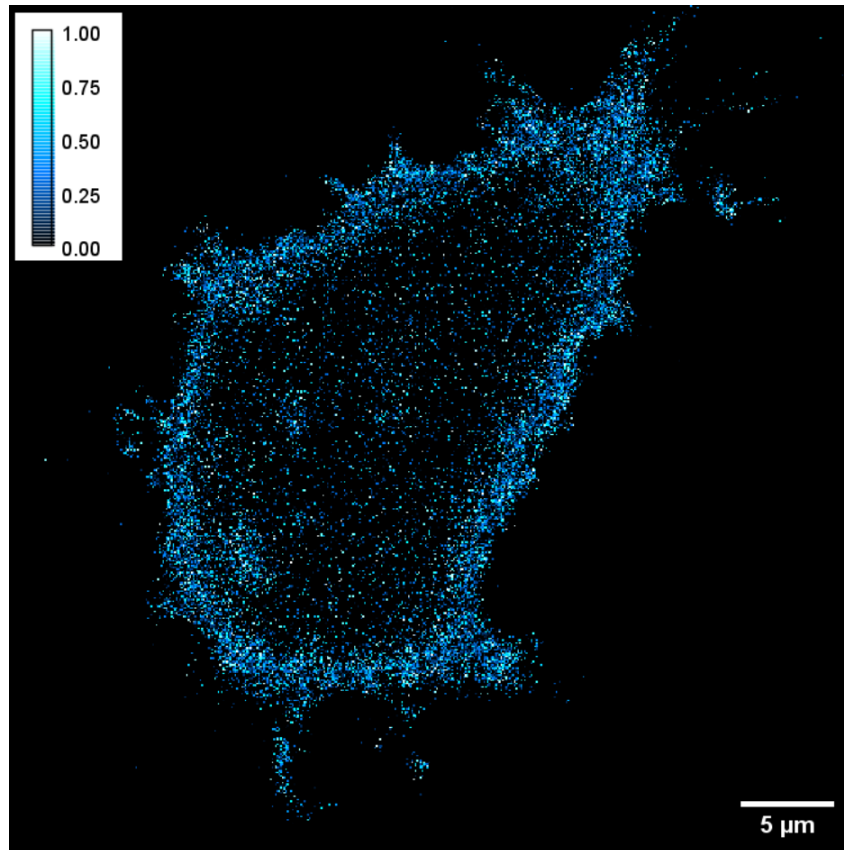


Abbildung 3.2: 2D-Plot der Förstereffizienz E von Zelle 10, pixelweise berechnet.

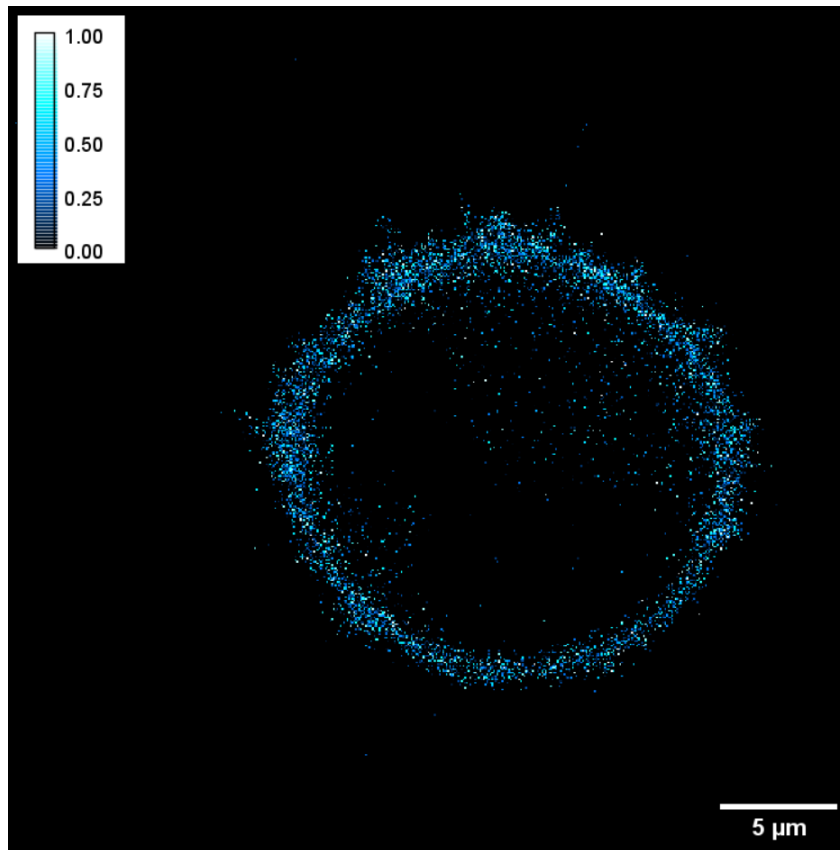


Abbildung 3.3: 2D-Plot der Förstereffizienz E von Zelle 13, pixelweise berechnet.

3.2 Bestimmung der Förstereffizienz über Bleichung der Akzeptoren

Ein alternativer Ansatz zur Bestimmung der Förstereffizienz E ist, die Donorfluoreszenz vor und nach dem Bleichen der Akzeptoren zu betrachten. Denn wird ein Teil der Akzeptoren zerstört, so gibt es für einen Donor im angeregten Zustand nur noch einen möglichen Weg, diesen zu verlassen: Das angeregte Elektron relaxiert in den Grundzustand unter Aussendung eines Photons; es ist also eine Erhöhung der Donorfluoreszenz zu erwarten und zwar um den Betrag, um den die Sensitized Emission zurückgeht.

Um eine Zelle aus der Probe mit CFP und YFP wird eine ROI1 ausgewählt, die gebleicht werden soll. Zudem wird in dieser, wie auch in der Membranregion (ROI2) und in einer kleinen Region dieser (ROI3) die Intensität kurz vor bis kurz nach dem Bleichvorgang gemessen. In Abb. 3.4 ist so eine Zelle dargestellt. Dabei ist die ROI1 in Grün, ROI2 in Violett und ROI3 in Orange dargestellt. In Abb. 3.5 und Abb. 3.6 sind die Intensitätsverläufe dieser Zelle für den Donor- bzw. SE-Kanal in den selben Farben dargestellt. Dabei ist vor allem in den ROIs 2 und 3, also in denjenigen, in denen die Dichte an Fluorophoren besonders groß ist, zu erkennen, dass zum Einen die Donorfluoreszenz nach dem Bleichen einen höheren Wert erreicht. Zum Anderen fällt dort die Intensität im SE-Kanal nach dem Bleichvorgang ab.

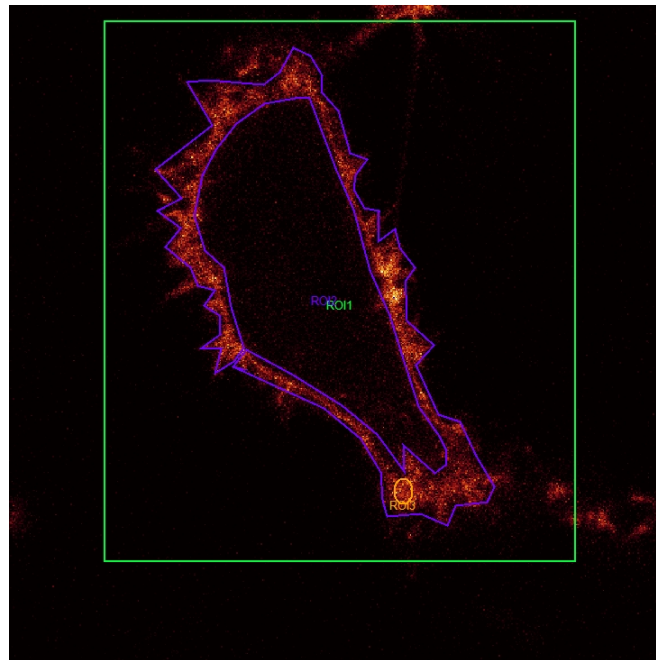


Abbildung 3.4: Bild einer gebleichten Zelle mit CFP und YFP. Dabei sind die ROIs, in denen die Intensitäten gemessen wurden eingezeichnet.

3.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

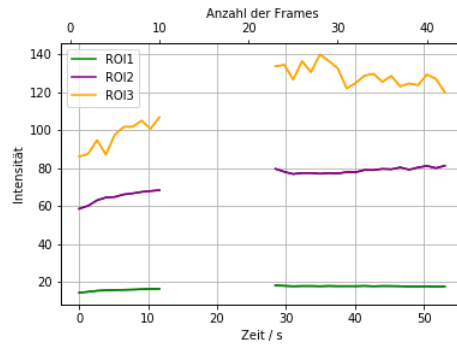


Abbildung 3.5: Verlauf der Intensitäten einer Zelle für verschiedenen ROIs im Donor-Kanal vor, während und nach dem Bleichen.

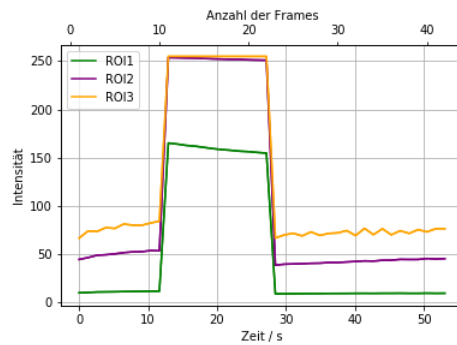


Abbildung 3.6: Verlauf der Intensitäten einer Zelle für verschiedenen ROIs im SE-Kanal vor, während und nach dem Bleichen.

3.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

3.3.1 Lebenszeit von CFP und YFP

In diesem Versuchsteil geht es um die Bestimmung der Lebensdauer des Donors und des Akzeptors. Dies tut man am besten indem man eine einfache Exponentialfunktion an die Daten anpasst. Dabei passt man zwei Parameter an, die Amplitude A_0 und Lebensdauer τ .

$$A(t) = A_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (3.1)$$

Aus den einzelnen Parametern der angepassten Exponentialfunktionen bildet man einen Mittelwert. Da es jeweils für CFP und YFP 9 Werte gibt, verkleinert sich der Fehler um einen Faktor drei.

Aus den Anpassungen erhält man folgende Werte:

3 Auswertung und Diskussion

| Messung | Lebensdauer CFP (ns) | Lebensdauer YFP (ns) |
|------------|------------------------|------------------------|
| Kanal 1 | 2,4985 | 3,0513 |
| Kanal 1 | 2,5074 | 3,0670 |
| Kanal 1 | 2,5623 | 3,0482 |
| Kanal 2 | 2,5483 | 3,0482 |
| Kanal 2 | 2,4853 | 3,1066 |
| Kanal 2 | 2,5123 | 3,0923 |
| Kanal 1&2 | 2,5458 | 3,0923 |
| Kanal 1&2 | 2,5063 | 3,0682 |
| Kanal 1&2 | 2,5595 | 3,0500 |
| Mittelwert | 2,5251 | 3,0693 |
| Fehler | 0,0036 | 0,0043 |
| Ergebnis: | 2,5251 ± 0,0012 | 3,0693 ± 0,0043 |

Man sieht also einen Unterschied in der Lebenszeit der beiden Proteine. Der eigentlich spannende Teil ist jedoch die Lebensdauer des Donators mit und ohne FRET zu vergleichen.

3.3.2 Lebensdauer mit FRET

Um die FRET-Effizienz E zu vergleichen betrachtet man Lebensdauerunterschiede des Donor mit und ohne FRET. Man erwartet eine Verkürzung der Lebensdauer τ_D des Donator bei hinzukommen von FRET. Dies geschieht - wie in den Grundlagen erklärt - aufgrund der Kopplung an den Akzeptor. Um es vorweg zu nehmen: Die Methode funktioniert hier sehr schlecht. Man versucht das zu bewerkstelligen indem man eine Anpassung zweier Exponentialfunktionen macht. Diese beinhalten dann insgesamt 4 Parameter; ein Fit mit 4 Parametern ist jedoch sehr störungsanfällig.

Deswegen verwenden wir eine Methode, bei der wir jeweils zwei Parameter anpassen und die anderen gleich lassen. Danach passt man die anderen zwei Parameter schrittweise an. Dieses Vorgehen führt zu einer schrittweisen Approximation, da sich beide Parameter ihrem Maximum annähern. Mit dieser Methode erhält man die Werte, welche in Tabelle 3.7 dargestellt werden. Dabei wird die erste Anpassung unter Voraussetzung eines geschätzten Aktivität A_0 von YFP durchgeführt. Diese wird auf den halben Wert der Nullaktivität der YFP-Probe auf selbem Kanal gesetzt. Dann führt man eine Anpassung der Parameter für drei Parameter durch und verwendet nur die ausgegebenen Lebensdauerparameter.

Aus dieser kann man dann die FRET-Effizienz berechnen indem man die Formel

$$E = 1 - \frac{\tau_{\text{CFP,FRET}}}{\tau_{\text{CFP,NoFRET}}} \quad (3.2)$$

3.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

| Schritt | τ_{YFP} | $A_{0\text{YFP}}$ | τ_{CFP} | $A_{0\text{CFP}}$ |
|---------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| 1 | 1,599 ns | | 3,096 ns | |
| 2 | | 24052 s ⁻¹ | | 97490 s ⁻¹ |
| 3 | 4,009 ns | | 2,539 ns | |
| 4 | | 22941 s ⁻¹ | | 98340 s ⁻¹ |
| 5 | 4,038 ns | | 2,5526 ns | |

Tabelle 3.7: Schrittweises Anpassen zweier Exponentialfunktionen an die Daten. Es werden immer zwei Parameter festgehalten. Die anderen zwei werden angepasst.

auswertet. Dabei erhält man als Ergebnis den Werte

$$E = 1 - \frac{2,5526 \text{ ns}}{2,5251 \text{ ns}} = -0,010890658, \quad (3.3)$$

welcher offensichtlich unsinnig ist.

Die Methode scheint also nicht zu funktionieren. Ein Grund dafür könnte die Anzahl der anzupassenden Parameter sein. Wegen dieser kann es sein, dass beispielsweise wegen der im Vergleich zu YFP geringen Anfangsaktivität A_0 der Parameter $\tau_{\text{YFP,FRET}}$ nicht so stark in Gewicht fällt. Der falscher Wert für diesen führt dann zu einer Verfälschung von $\tau_{\text{CFP,FRET}}$.

3.3.3 Impulsantwort

Im folgenden Abschnitt wollen wir die Impulsantwort des Systems charakterisieren. Dazu verwenden wir Kanal 1 bei der YFP Probe. Dabei wird das auf zwei Arten gemacht. Die erste Art ist sich die Impulsantwort (IRF) durch das Programm 'SymPhoTime' ausgeben zu lassen. Dieses berechnet diese in dem sie das Signal entfaltet. Die andere Variante ist es eine Gaußkurve an das Histogramm anzupassen. Diese wird der IRF entsprechen, weil wir von einer abgeschnittenen Exponentialfunktion ausgehen als ideales Signal.

Allgemein beginnen wir mit der Betrachtung des Histogramms der Lebensdauer der Einzelphotonenereignisse. Dabei fällt auf, dass es eine Totzeit des Detektor gibt. Diese ist sehr schön in der Abbildung ?? zu sehen.

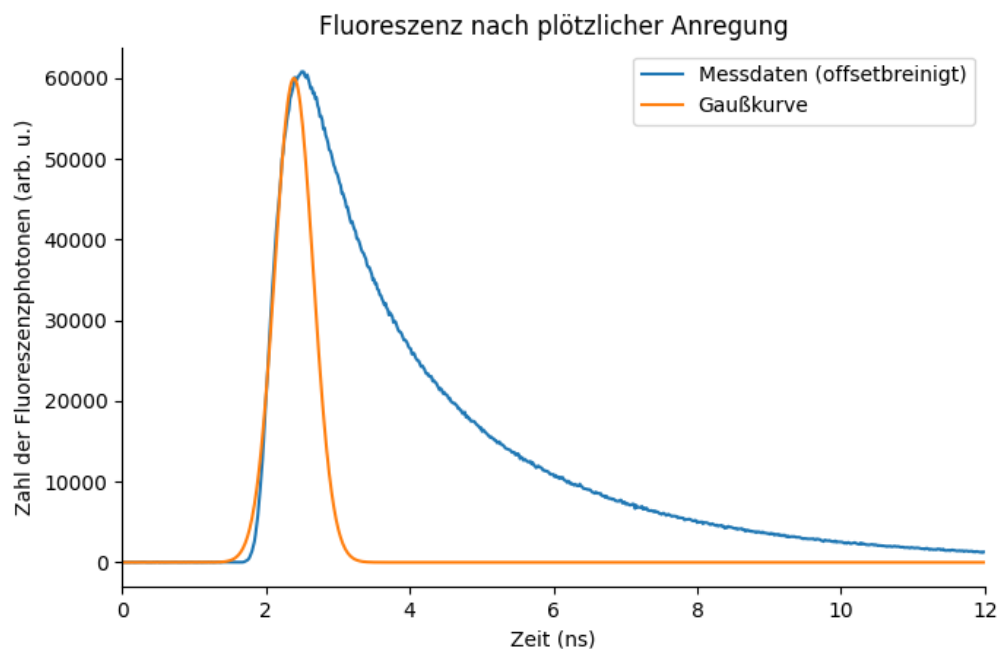


Abbildung 3.7: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen. Als Probe wurde YFP verwendet und gemessen wurde im Bereich 535-585 nm. Schön zu sehen ist die Totzeit des Detektors am Anfang. An die Daten wurde eine Gaußfunktion angepasst um die IRF zu charakterisieren.

Wie lange die Totzeit genau ist, ist relativ schwer zu sagen. Aber man kann sie grafisch abschätzen. Sie liegt vermutlich im Anstieg der Kurve. Genau abzulesen wo diese ist, geht nicht daher schätzen wir, dass

$$t_{\text{tot}} = (2,0 \pm 0,5) \text{ ns}$$

3.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

ist. Der Fehler ist jedoch relativ groß.

Dann passen wir wie in Abbildung 3.7 zu sehen, eine Gaußfunktion an diese an. Diese Falten wir dann mit der bei 2 abgeschnittenen Exponentialfunktion. Das Ergebnis liegt schon nahe an dem wirklichen Daten, wie in Abbildung 3.8 zu sehen; aber es kann noch verbessert werden, indem man den Parameter τ_{YFP} variiert, da dieser auch bei Fit schon durch die IRF verzerrt wurde. Dazu gibt es mehrere Möglichkeiten. Man kann eine Cost-Funktion aufstellen, also eine Funktion die den Squared-Error angibt und diese dann minimieren. Dies hat den Nachteil, dass diese Methode anfällig für Fehler ist. Es können sich beispielsweise kleine Fehler in höheren Teilen des Spektrum sich aufaddieren können. Wenn man optisch die Funktion anpasst hat das den Vorteil, dass man nicht die allgemeine Steigung aus dem Auge verliert, indem man nicht nur auf die Fehler schaut. Deswegen ist diese Methode hier zu bevorzugen.

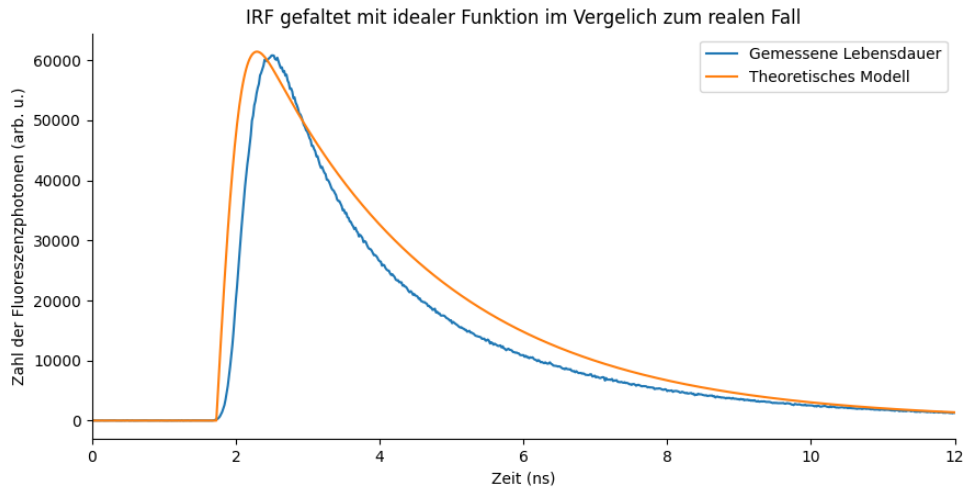


Abbildung 3.8: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und die Faltung der IRF und dem idealen Signal nach der Totzeit. Das (nicht dargestellte) ideale Signal ist in diesem Modell noch verzerrt, da es mit den Daten, welche die IRF beinhalten, noch gefittet wurde.

Durch manuelles Anpassen der Lebensdauer des YFP auf

$$\tau_{\text{YFP}} = 2,1$$

erhält man einen realistischeren Wert. Dieser ist jedoch mit einer großen Unsicherheit behaftet, da weder die IRF wirklich wie eine Gaußfunktion aussehen muss noch die Totzeit 2 ns betragen muss. Daher nehmen wir

$$\tau_{\text{YFP}} = (2,1 \pm 0,4) \text{ ns}$$

3 Auswertung und Diskussion

als realistischen Wert an. Dieser passt bei beiden Methoden, dem Gaußfit und der programmgenerierten IRF (siehe Abb. A.2), wie man in den optimierten Abbildungen 3.9 und 3.10 sieht.

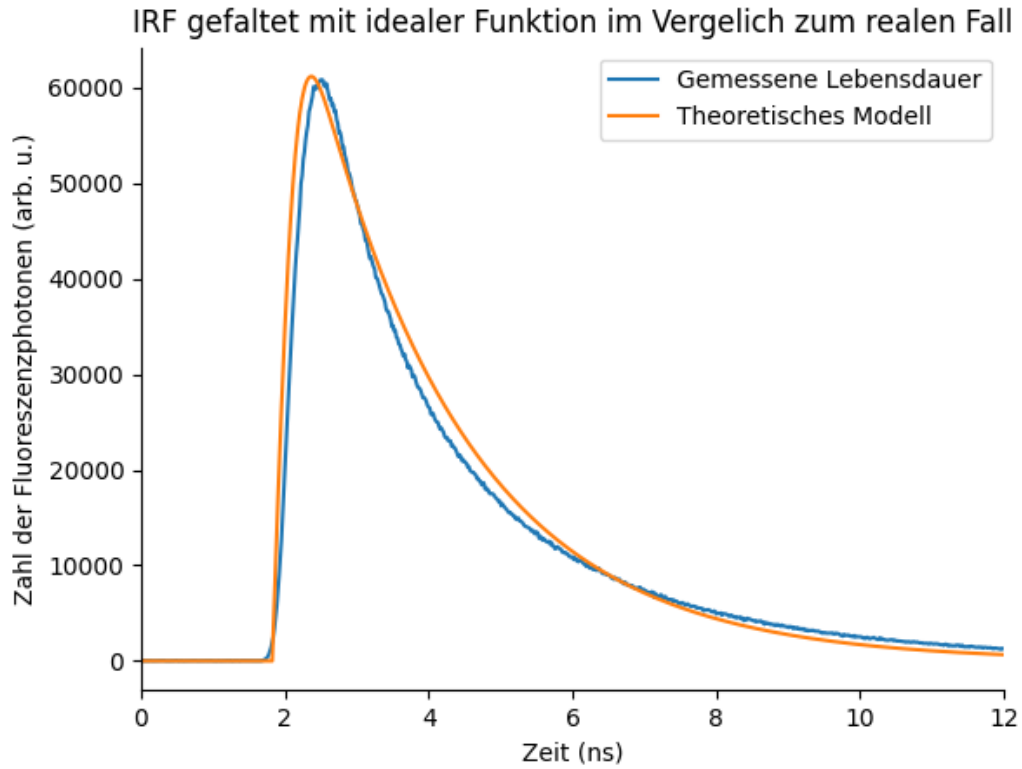


Abbildung 3.9: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und die Faltung der IRF und dem idealen Signal (τ_{YFP} optimiert) nach der Totzeit. Es zeigt sich, dass die theoretische Kurve den Sachverhalt nun besser beschreibt als in Abbildung 3.8

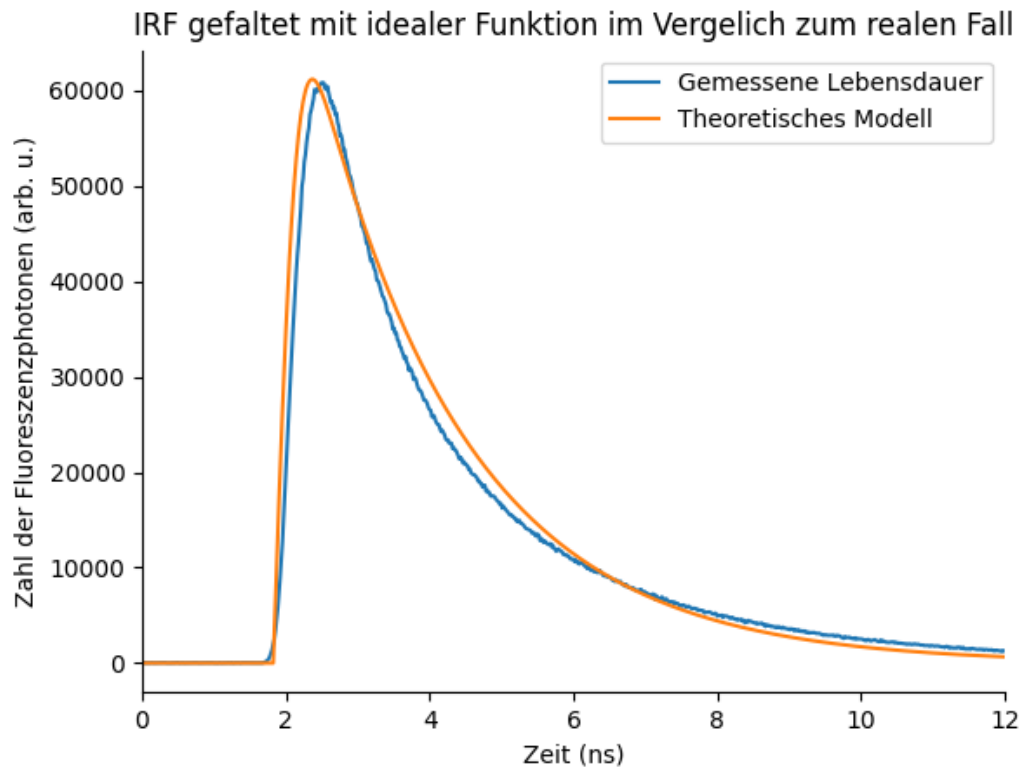


Abbildung 3.10: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und die Faltung der IRF und dem idealen Signal (τ_{YFP} optimiert) nach der Totzeit. Es zeigt sich, dass die theoretische Kurve den Sachverhalt nun besser beschreibt als in Abbildung A.1

4 Fazit

A Anhang

A.1 FLIM

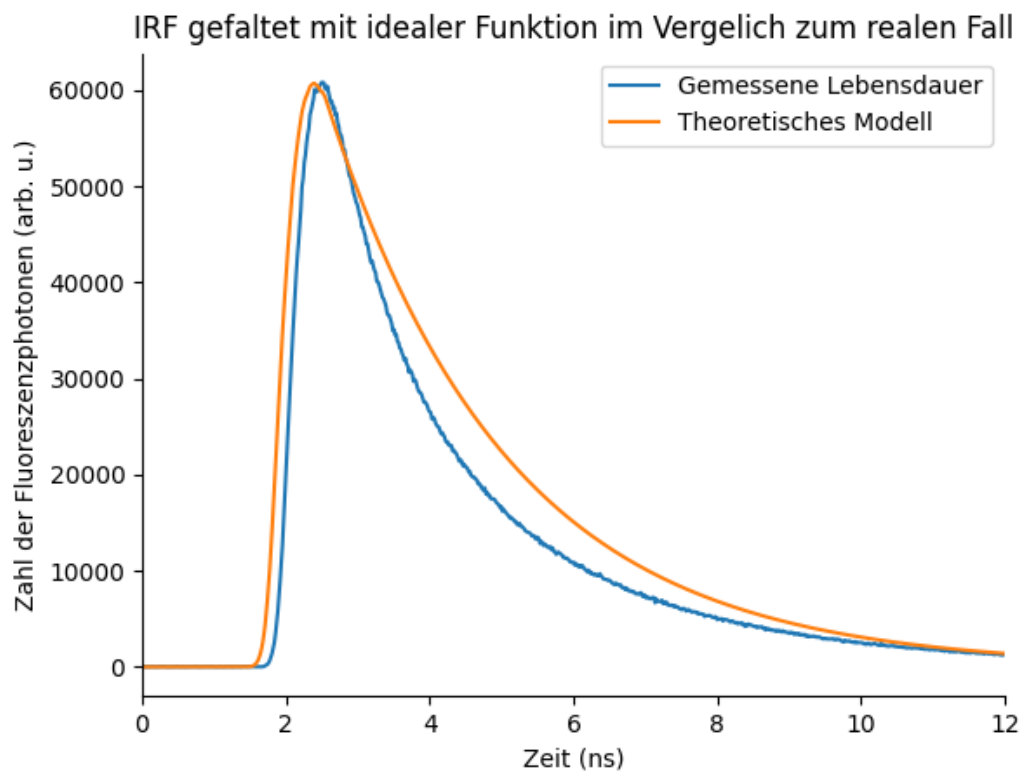


Abbildung A.1: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und die Faltung der IRF (Programmgeneriert) und dem idealen Signal (τ_{YFP} unkorrigiert) nach der Totzeit.

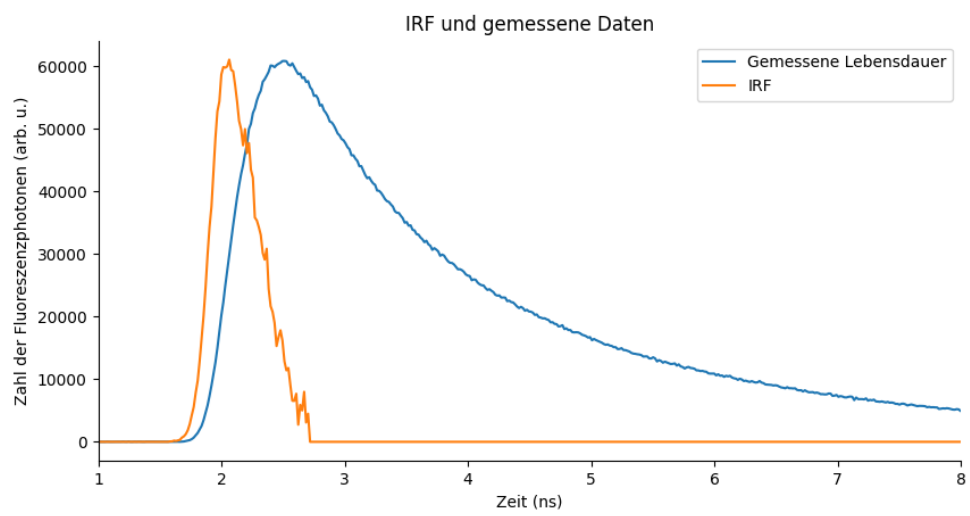


Abbildung A.2: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und IRF durch das Programm 'SymPhoTime' generiert. Man sieht eine unsymmetrische Form.