

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
3	Auswertung und Diskussion	7
3.1	Sensitized Emission	7
3.1.1	Bestimmung der Korrekturfaktoren	7
3.1.2	Sensitized Emission und Förstereffizienz	9
3.2	Bestimmung der Förstereffizienz über Bleichung der Akzeptoren	15
3.3	Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)	16
3.4	Lebenszeit von CFP und YFP	16
3.5	Lebensdauer mit FRET	17
4	Fazit	18
A	Anhang	19

1 Einleitung

2 Grundlagen

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 Auswertung und Diskussion

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,

3.1 Sensitized Emission

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 $E = \frac{SE}{\sqrt{M_A M_D}}$.

3 Auswertung und Diskussion

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.

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

3 Auswertung und Diskussion

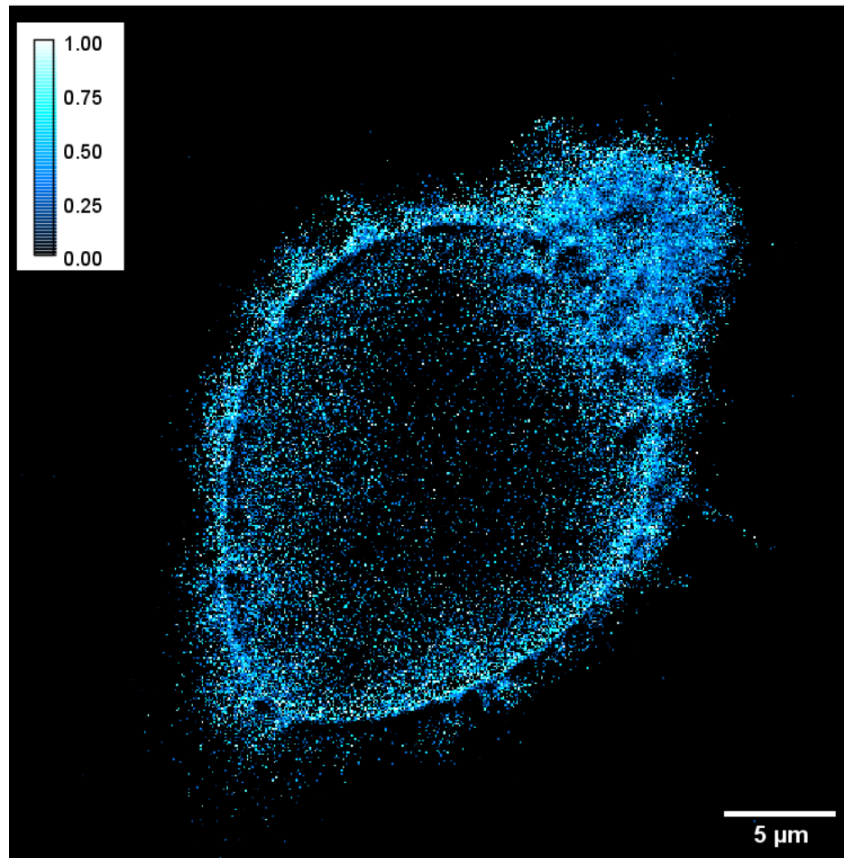


Abbildung 3.1: 2D-Plot der Förstereffizienz E von Zelle 2, pixelweise berechnet.

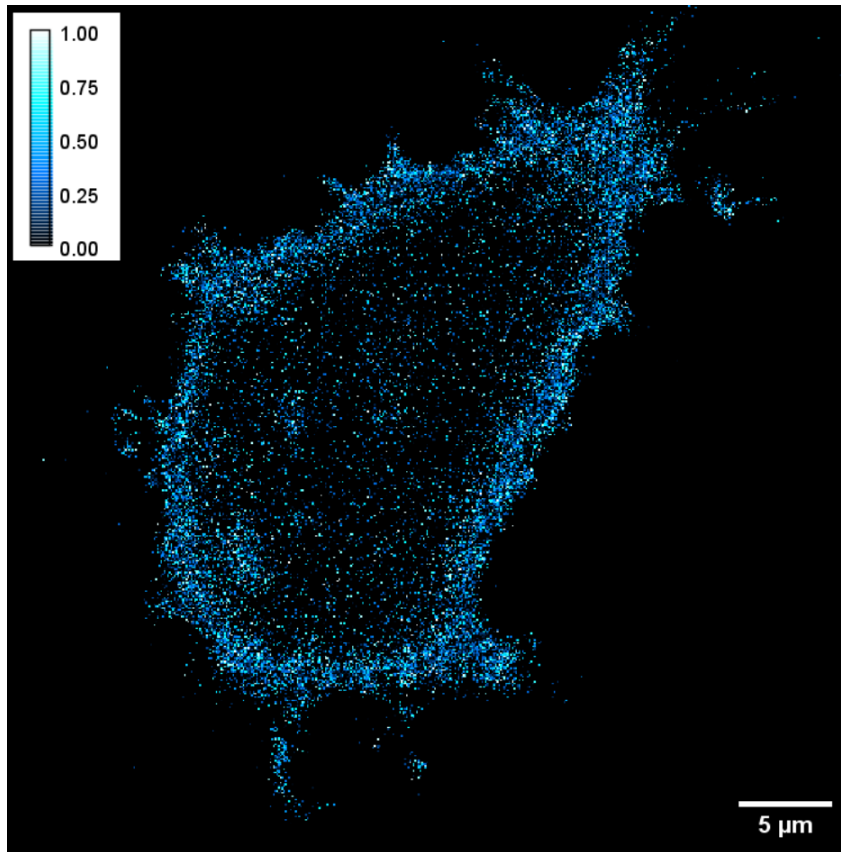


Abbildung 3.2: 2D-Plot der Förstereffizienz E von Zelle 10, pixelweise berechnet.

3 Auswertung und Diskussion

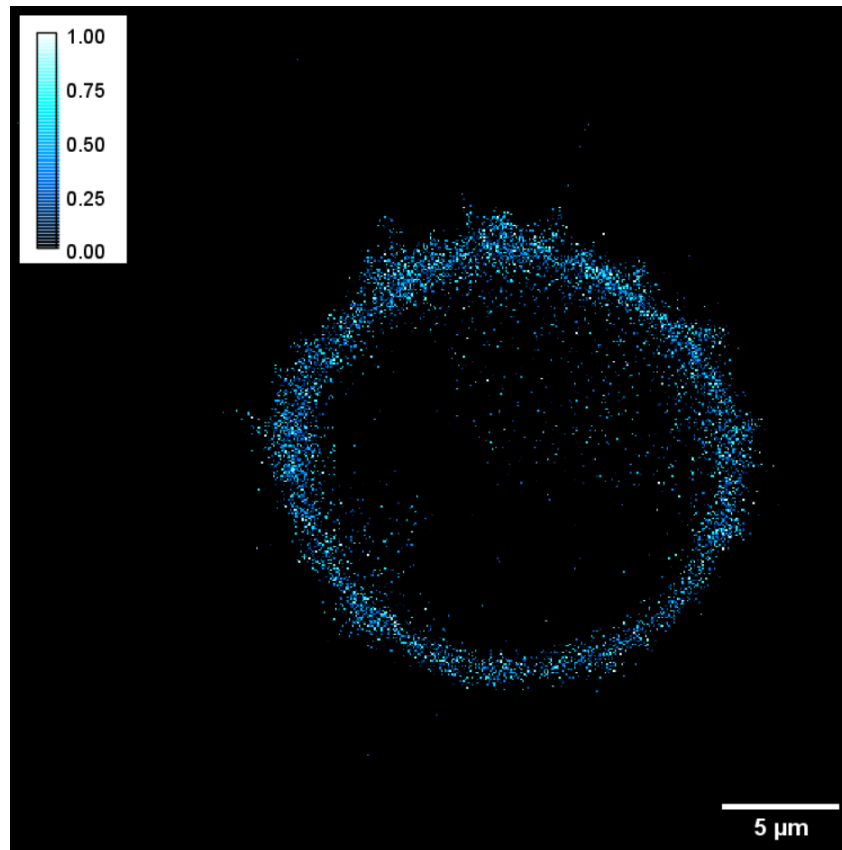


Abbildung 3.3: 2D-Plot der Förstereffizienz E von Zelle 13, pixelweise berechnet.

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.

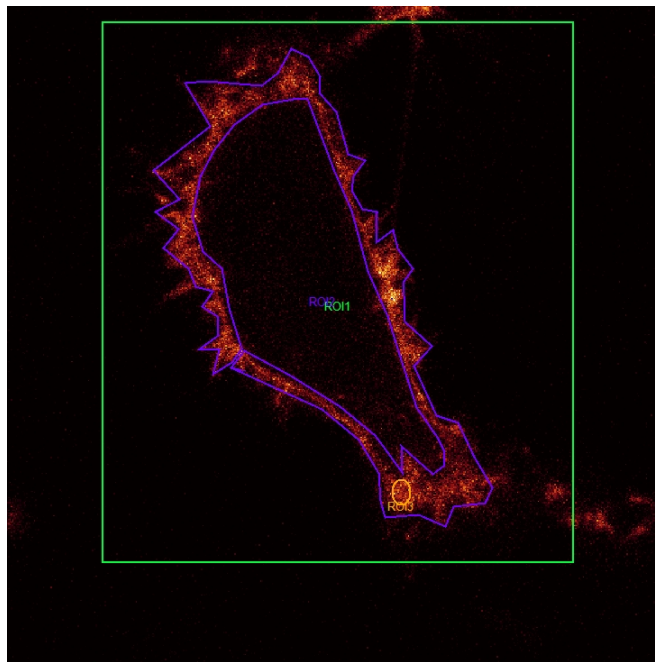


Abbildung 3.4: Bild einer gebleichten Zelle mit CFP und YFP. Dabei sind die ROIs, in denen die Intensitäten gemessen wurden eingezeichnet.

3 Auswertung und Diskussion

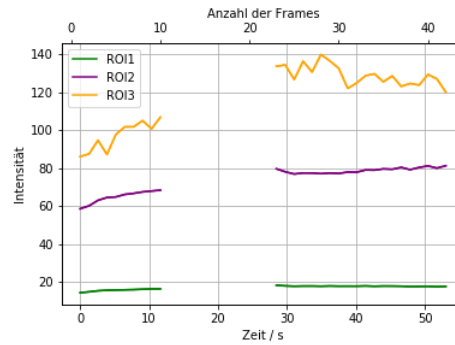


Abbildung 3.5: Verlauf der Intensitäten einer Zelle für verschiedenen ROIs im Donor-Kanal vor, während und nach dem Bleichen.

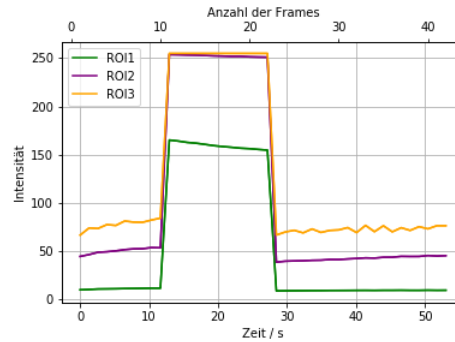


Abbildung 3.6: Verlauf der Intensitäten einer Zelle für verschiedenen ROIs im SE-Kanal vor, während und nach dem Bleichen.

3.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

3.4 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. Das es jeweils für CFP und YFP 9 Werte gibt, verkleinert sich der Fehler um einen Faktor drei.

Aus den Anpassungen erhält man folgende Werte:

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.

3.5 Lebensdauer mit 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.

4 Fazit

A Anhang