

Physikalisches Praktikum für  
Fortgeschrittene:

FÖRSTER-  
RESONANZENERGIETRANSFER  
(FRET) AN BIOLOGISCHEN  
PROBEN

Physikalisches Institut der Universität Bayreuth

Lehrstuhl für Experimentalphysik I

30. August 2018

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Gegenstand dieses Praktikumsversuchs sind die theoretischen Grundlagen, das Messprinzip, der Messaufbau und die Anwendung von **Förster-Resonanzenergietransfer** (Förster resonance energy transfer, FRET). Im Versuch soll ein Protokoll für die Aufnahme und Korrektur von Fluoreszenzbildern entwickelt und genutzt werden. Aufbauend darauf wird die Interaktion zweier farblich markierter Proteine in Zellen bestimmt. Untersucht werden zwei Pleckstrin-Homologiedomänen (kurz: PH), die spezifisch an das Lipid Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat (kurz: PIP2) in der zellulären Plasmamembran binden. Durch die hohe Dichte von PIP2 auf der Membran kommt es hier zu FRET. Als Farbstoff sind gelbe und cyan-farbene fluoreszente Proteine (yellow fluorescent protein, YFP und cyan fluorescent protein, CFP) kovalent an PH gebunden. Die Proben werden vom Betreuer gestellt.

## 2 Theorie

### FRET

Notwendig für FRET sind zwei Farbstoffe mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren, wobei das Emissionsspektrum des **Donor**-Farbstoffs mit dem Absorptionsspektrum des **Akzeptor**-Farbstoffs einen deutlichen Überlapp zeigen sollte. Dies ist beim cyan-farbenen und dem gelben fluoreszenten Protein (CFP und YFP) der Fall (siehe Abb. 1).

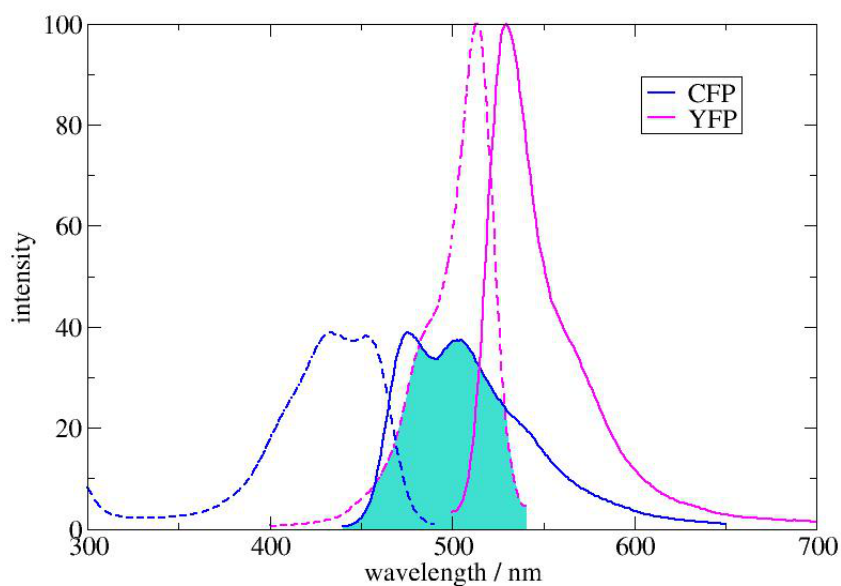


Abbildung 1: Anregungs- und Emissionsspektren von CFP und YFP (Überlapp in hellblau).

Bei Anregung des Donors (hier: CFP) mit der entsprechenden Wellenlänge wird das Molekül vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  in den ersten angeregten Zustand  $S_1$  gebracht. Moleküle besitzen, anders als einzelne Atome, neben den elektronischen Übergängen auch weitere Unterniveaus, die in Schwingungen und Rotationen der Moleküle begründet sind. Elektronische Übergänge können so auch eine Änderung des Schwingungs- und Rotations-Zustands zur Folge haben. Aus  $E = E_{rot} + E_{vib} + E_{el}$  ergibt sich die Gesamtenergie des Molekülzustandes. Die Aufspaltung in Unterniveaus führt so auch zu einem Bandenspektrum des Moleküls.

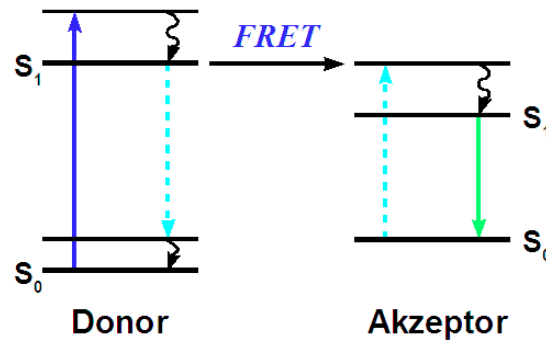


Abbildung 2: Skizze eines FRET-Übergangs

Die Wahrscheinlichkeiten einzelner Übergänge zwischen den Schwingungszuständen eines Moleküls lässt sich über das Frank-Condon-Prinzip bestimmen. Hierbei werden Übergänge favorisiert, bei denen die beiden Schwingungs-Wellenfunktionen einen größeren Überlapp haben. Nach der Anregung durch ein Photon und dem darauf folgenden Übergang in ein höheres Energieniveau wird durch Kopplung des angeregten Zustands an Vibrationen ein Teil der Energie des anregenden Photons verloren (siehe Abb. 2). Der angeregte Zustand hat eine Lebensdauer  $\tau$  (typischerweise 1-5ns), nach der spontan ein Photon emittiert wird und das Molekül (wiederum über Kopplung an Vibrationen) in den Grundzustand zurückfällt. Die Wellenlänge des Fluoreszenzphotons ist aufgrund des Energieverlustes höher als die des absorbierten Photons („Stokes-Verschiebung“).

Liegt ein Akzeptor (hier: YFP) nahe am Donor und liegt die Wellenlänge des spontan emittierten Photons im Absorptionsspektrum des Akzeptors, so kann die Anregungsenergie **strahlungslos** vom Donor auf den Akzeptor übergehen. Dort kommt es wieder zu Kopplungen an Vibrationen, bevor der Akzeptor ein Fluoreszenzphoton spontan emittiert.

Ein strahlungsloser Übergang erfordert die Interaktion des Emissionsdipols des Donors mit dem Absorptionsdipol des Akzeptors. Die Effizienz des Energieübertrags hängt somit vom Spektrenüberlapp, den Orientierungen der Dipole und der Distanz der Farbstoffe (wegen des Dipolfeldes) ab. Die Übergangswahrscheinlichkeit ergibt sich nach Fermis Goldener Regel zu

$$\left| \left\langle \phi_{D^*} \phi_A \left| \frac{\kappa}{4\pi\epsilon_0} \frac{\mu_D \mu_A}{r^3} \right| \phi_D \phi_{A^*} \right\rangle \right|^2$$

mit dem winkelabhängigem Orientierungsfaktor der Dipole  $\kappa$ , der elektrischen Feldkonstante  $\epsilon_0$ , dem Betrag des elektrischen Dipolmoments des Donors  $\mu_D$ , und dem Betrag des Akzeptors  $\mu_A$ . Im weiteren ergibt sich die FRET-Effizienz aus

$$E = \frac{\text{Anzahl Energietransfers}}{\text{Anzahl Anregungen}} = \frac{k_{ET}}{k_F + k_{ET} + k_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

Dabei sind  $k_{ET}$ ,  $k_F$  und  $k_0$  die Raten für Energietransfer, spontane Donor-Fluoreszenz und strahlungslosen Abbau des angeregten Donor-Zustandes. Die Konstante  $R_0$  ist der sogenannte Förster-Radius. Typische Werte des Förster-Radius liegen im nm-Bereich, wobei hier implizit angenommen wurde, dass die Dipole als Funktion der Zeit jeden Winkel einnehmen können, d.h. zufällige Orientierung annehmen. In Ref. [1] findet sich eine vertiefte Behandlung von FRET als Effekt, in Ref. [2] steht die Anwendung im biophysikalischen Kontext mit mehreren möglichen Messmethoden im Vordergrund.

## Messmethoden

Um FRET zu detektieren existieren mehrere Verfahren, die sich im biologischen Kontext unterschiedlich gut bewährt haben. Zunächst soll in diesem Versuch die sogenannte **Sensitized Emission** (Ref. [3]) genutzt werden, d.h. die erhöhte Abstrahlung von Photonen im Spektrum des Akzeptors sobald FRET mit einem nahen Donor möglich ist. Im Wesentlichen wird Energie vom Donor auf den Akzeptor verschoben, was die erhöhte Fluoreszenz in diesem Kanal erklärt. Ohne FRET ist die Abstrahlung von Photonen im Emissionsbereich des Donors höher, die Akzeptor-Fluoreszenz sinkt.

Eine weitere Herangehensweise ist die Bestimmung der Änderung der **Lebenszeit** des angeregten Donors (siehe z.B. Ref. [1]). Durch die Kopplung an den Akzeptor sinkt bei FRET die mittlere Lebenszeit des angeregten Zustandes (quantenmechanisch hat man nun zwei mögliche Zerfallskanäle), was man mittels zeitaufgelöster Spektroskopie bzw. modulierter Beleuchtung nachweisen kann. Die Lebenszeit eines Fluorophors wird hierbei z.B. durch eine zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung bestimmt. Nach der iterativen Anregung mittels eines gepulsten Lasers wird so jeweils die Ankunftszeit der am Detektor ankommenden Photonen nach dem Anregungsereignis als Histogramm aufgetragen und gemäß eines exponentiellen Abfalls bestimmt (siehe Abb. 3). Für einen einzelnen Fluorophor ergibt sich ein Abfall gemäß

$$N = N_0 e^{-t/\tau}$$

mit einer Lebenszeit  $\tau$  die sich aus den  $m$  einzelnen Zerfallsraten  $k_i$  nach

$$1/\tau = \sum_{i=1}^m k_i$$

bestimmt. Die Anwesenheit bzw. Detektion mehrerer Fluorophore resultiert in einem Abfall der Form

$$N = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-t/\tau_i}$$

mit  $n$  Lebenszeiten  $\tau_i$  und den entsprechenden Amplituden  $A_i$ .

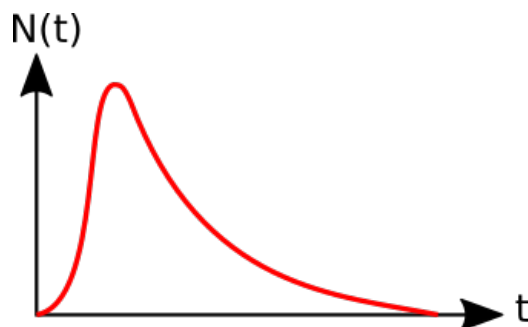


Abbildung 3: Beispiel eines Verlaufs einer zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Zudem kann durch die gezielte **Bleichung von Akzeptormolekülen** in der Probe FRET unterbunden werden. Dies führt zu einer erhöhten Fluoreszenz der Donormoleküle in Ihrem Emissionskanal und zu verlängerten Lebenszeiten der Donormoleküle aufgrund der fehlenden Möglichkeit zum Energietransfer.

## Zellulärer Kontext

Die äußere Hülle von tierischen und menschlichen Zellen, die sogenannte Plasmamembran, ist eine Lipid-Doppelschicht mit einer großen Menge von assoziierten und eingebetteten Proteinen (siehe Abb. 4; weitere Details kann man im entsprechenden Kapitel der leicht verständlichen Ref. [4] erhalten). Im Gegensatz zu artifiziellen Membranen ist die Plasmamembran aus sehr vielen verschiedenen

Lipiden aufgebaut, wovon ca. 30% Phospholipide sind. Eine besondere Form der Phospholipide sind die Phosphatidylinositole, die von Kinasen und Phosphatasen dynamisch bis zu dreifach phosphoryliert werden können. Anzahl und Position der Phosphatgruppen am Phosphatidylinositol determinieren die Rolle dieses Lipids als Botenstoff in wichtigen Signalkaskaden der Zelle. Ein besonderer phosphorylierter Zustand ist das Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat (kurz: PIP<sub>2</sub>), an das Proteine mit einer sog. Pleckstrin-Homologiedomäne (PH) spezifisch binden. Die PH Proteine binden an das polare Teil des Lipids, den Kopf. Mittels dieser Wechselwirkung werden intrazelluläre Signalkaskaden von der Plasmamembran aus initiiert.

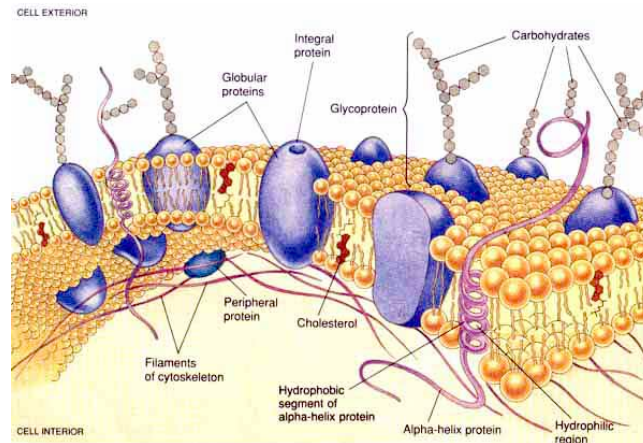


Abbildung 4: Skizze einer Plasmamembran

### 3 Versuchsanordnung

**Vor der Versuchsdurchführung bzw. dem Betreten der Laborräume ist eine Sicherheits-einweisung für die Arbeit an genetisch veränderten Organismen der Risikostufe 1 nötig!**

Für diesen Versuch wird ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica SP5 II) mit einer Pico Harp 300-Einheit zur Durchführung von zeitkorrelierten Einzelphotonenmessungen verwendet. Zur Anregung stehen unterschiedliche Laserlinien eines Argon-Ionen-Lasers, sowie ein gepulster 470nm-Laser zur Verfügung. Zur Anregung und Detektion wird ein Öl-Immersionsobjektiv (63x Vergrößerung, NA=1,40) genutzt. Die Detektion erfolgt durch Photomultiplier (**PMT**) mit variabler spektraler Selektion oder Avalanche-Photodioden (**APD**) mit festinstallierten Filterwürfeln. Der Strahlengang eines konfokalen Mikroskops ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.

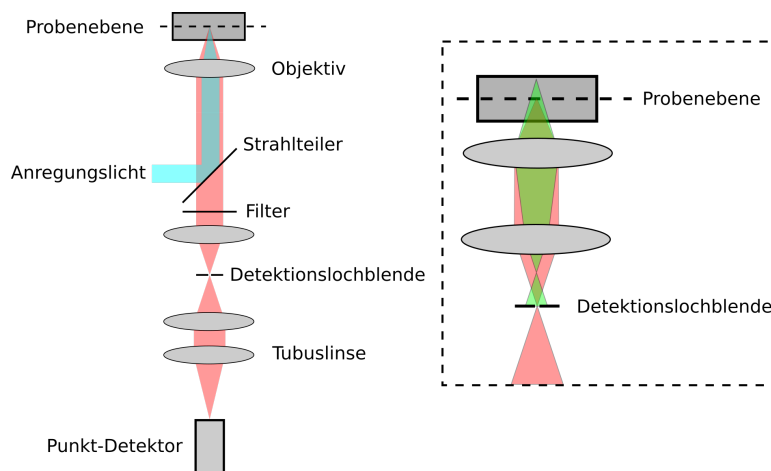


Abbildung 5: Skizze eines Konfokalmikroskops und Prinzip der selektiven Detektion

Grundlagen zur Optik finden sich z.B. in Ref. [6]. Die biologischen Proben in Form von lebenden transient transfizierten HeLa-Zellen werden vom Betreuer gestellt. Die verwendeten Anregungslaserlinien und Detektionsbereiche für den Argon-Laser und die PMTs sind in Abb. 6 dargestellt.

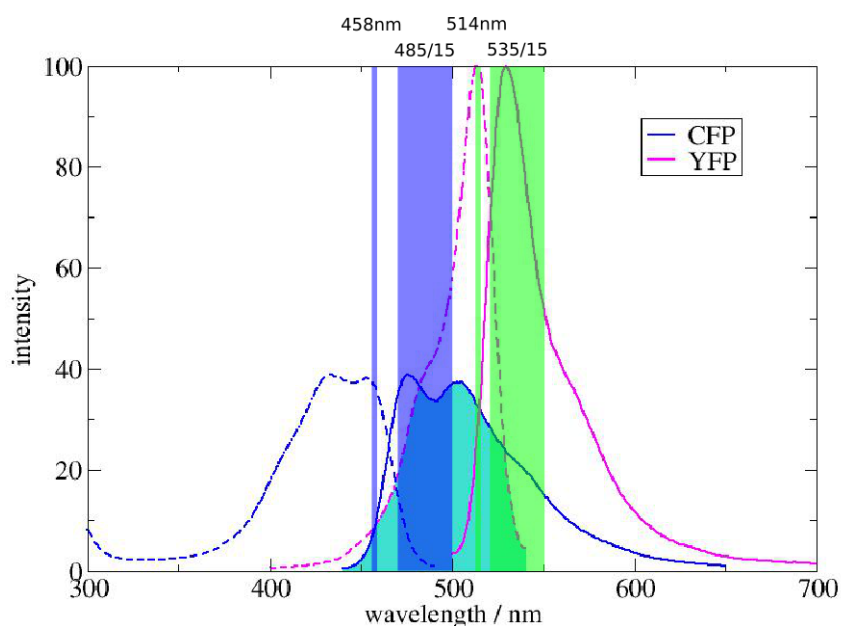


Abbildung 6: Anregungslaserlinien und Detektionsbereiche für CFP / YFP

## 4 Versuchsdurchführung und Auswertung

### 4.1 Bildaufnahmen an einem Konfokalmikroskop

Machen Sie sich zunächst mit den Parametern zur Bildaufnahme an einem Konfokalmikroskop vertraut. Wovon hängt die minimale Aufnahmedauer einer konfokalen Aufnahme ab? Inwiefern ist das gemessene Detektorsignal von den Aufnahmeparametern abhängig? Finden Sie Parametereinstellungen für eine ausreichende räumliche und zeitliche Auflösung der Aufnahme ohne ein Bleichen der Probe zu induzieren.

### 4.2 Aufnahmen der Sensitized Emission

Bestimmen Sie die FRET-Effizienz über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mithilfe der Argon-Laserlinien und einer Detektion über die Photomultiplier. Die FRET-Intensität ist die Akzeptorfluoreszenz hervorgerufen durch die Anregung des Donors. Die FRET-Intensität kann wegen des sogenannten **Crosstalk** – gleichzeitige Anregung oder Detektion mehrerer Fluorophore – nicht direkt gemessen werden, da Anregungs- und Detektionsbereiche von Donor und Akzeptor teilweise überlappen. Somit wird bei Donoranregung auch der Akzeptor angeregt, bei Donordetektion auch die mit angeregten Akzeptoren detektiert und bei Akzeptordetektion mit Donoranregung auch mitangeregte Donoren detektiert (siehe dazu ausführliche Diskussion in Ref. [3]). Diese Crosstalk-Beiträge müssen abgezogen werden. Dazu nimmt man zusätzlich zu den eigentlichen FRET-Bildern noch Bilder von nur CFP und nur YFP exprimierenden Zellen auf. Aus diesen Aufnahmen kann man die Crosstalkterme berechnen.

Nehmen Sie zuerst die FRET Bilder auf. Benutzen Sie die Probe mit doppelt (CFP und YFP) exprimierenden Zellen und suchen Sie eine Zelle, die beide Proteine ausreichend exprimiert (überprüfen Sie dies anhand der Fluoreszenz in den entsprechenden Kanälen). Nehmen Sie von dieser Zelle drei Bilder  $D_{CY}$ ,  $A_{CY}$  und  $S_{CY}$  mit folgender Anregung und Detektion auf:

- $D_{CY}$  mit Anregung und Detektion des Donors
- $A_{CY}$  mit Anregung und Detektion des Akzeptors
- $S_{CY}$  mit Anregung des Donors und Detektion des Akzeptors.

Die Anregungsintensität für  $D_{CY}$  und  $S_{CY}$  muss hierbei gleich sein! Nehmen Sie mindestens 10 Zellen auf.

Nehmen Sie jetzt die Bilder für die Korrekturfaktoren  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  auf (Korrekturfaktoren wie in Ref. [3] beschrieben). Nehmen Sie für eine Zelle mit reiner CFP-Markierung folgende Bilder auf:  $D_{CFP}$ ,  $A_{CFP}$  und  $S_{CFP}$  mit folgender Anregung und Detektion:  $D_{CFP}$  mit Anregung und Detektion des Donors;  $A_{CFP}$  mit Anregung und Detektion des Akzeptors;  $S_{CFP}$  mit Anregung des Donors und Detektion des Akzeptors. Verwenden Sie hierbei soweit möglich die selben Aufnahmeparameter wie zuvor bei den CFP und YFP markierten Proben! Nehmen Sie mindestens 10 Zellen auf.

Wiederholen Sie dies nochmal für 10 Zellen, die nur YFP exprimieren, um die Bilder  $D_{YFP}$ ,  $A_{YFP}$  und  $S_{YFP}$  zu bekommen.

### Bildauswertung

Berechnen Sie zunächst die Korrekturfaktoren. Öffnen Sie hierfür die Bilder  $D_{YFP}$ ,  $A_{YFP}$  und  $S_{YFP}$  mit einer Bildbearbeitungssoftware (z.B. ImageJ bzw. Fiji - siehe Ref. [7]). Stellen Sie zunächst

sicher, dass die Zellen sich deutlich vom Hintergrund abheben und keine saturierten Pixel zu sehen sind (<Analyze|Histogram>). Zeichnen Sie eine ROI (Region of Interest) um die Membran der Zelle. Speichern Sie die ROI (<Analyze|tools|ROI manager>). Definieren und speichern Sie eine weitere ROI im zellfreien Hintergrund des Bildes in der Nähe der ersten ROI. Selektieren Sie diese 2 ROIs im ROI-Manager von ImageJ, aktivieren Sie Bild  $D_{YFP}$  und messen Sie die mittlere Intensität in jedem ROI („Measure“). Aktivieren Sie nacheinander die Bilder  $A_{YFP}$  und  $S_{YFP}$  und messen Sie wiederum die mittlere Intensität („Measure“). Die 6 gewonnenen Werte verrechnen Sie wie folgt:

$$\alpha = D/A$$

$$\gamma = S/A$$

$$\delta = D/S$$

Denken Sie daran den Hintergrund vor der Division abzuziehen. Achten Sie darauf, dass Sie 8-Bit Bilder haben und ggf. die Bilder zuvor auf 32 Bit konvertieren müssen (diskutieren Sie warum). Bearbeiten Sie auf ähnliche Weise die Bilder  $D_{CFP}$ ,  $A_{CFP}$  und  $S_{CFP}$  und berechnen Sie den Korrekturfaktor:

$$\beta = S/D$$

Vergleichen Sie die Korrekturfaktoren von verschiedenen Zellen und diskutieren Sie deren jeweilige Bedeutung.

Öffnen Sie nun die Bilder  $D_{CY}$ ,  $A_{CY}$  und  $S_{CY}$  und berechnen Sie das Bild der Sensitized Emission (SE). Korrigieren und normalisieren Sie die Bilder. Bilden Sie zwei neue Bilder  $\beta \cdot D_{CY}$  und  $(\gamma - \alpha\beta) \cdot A_{CY}$  (<Image|duplicate>, <Process|math|multiply>). Subtrahieren Sie diese beiden Bilder von  $S_{CY}$  und skalieren Sie dieses mit dem Faktor  $(1 - \beta\delta)$  (<Process|image calculator>). Speichern Sie das entstandene Bild der Sensitized Emission:

$$SE = \frac{S_{CY} - \beta \cdot D_{CY} - (\gamma - \alpha\beta) \cdot A_{CY}}{(1 - \beta\delta)}$$

Stellen Sie es mit einer geeigneten Farbtabelle (<Image|lookup table> z.B. „spectrum“) dar. Berechnen Sie nun das Bild der FRET-Effizienz:

$$E = SE / \sqrt{A_{CY} \cdot D_{CY}}$$

Kann man aus E den Abstand der Fluorophore berechnen? Welche zusätzliche Messungen sind nötig um das zu erreichen?

### 4.3 Donoremission nach Akzeptorbleichen

Bestimmen Sie die FRET-Effizienz an CFP / YFP markierten Zellen aus einer Messung der Donor-Fluoreszenz vor und nach dem Bleichen der Akzeptormoleküle. Bleichen Sie die Akzeptormoleküle hierbei soweit wie möglich (mindestens auf ca. 50% der ursprünglichen Intensität). Testen Sie hierfür zuvor die nötigen Parameter des Bleichvorgangs unter Akzeptoranregung und Akzeptordetektion und Vermeiden Sie ein Bleichen des Donors während der Aufnahmen. Wählen Sie eine geeignete ROI in den Zellen (ganze Zelle oder ein Teil der Zelle) aus und exportieren Sie die mittlere Intensitäten innerhalb der ROIs. Überprüfen Sie die Signifikanz ihrer Messungen, indem Sie das Akzeptorbleichen (gleiche Einstellungen!) an lediglich CFP- oder YFP-markierten Zellen wiederholen. Die FRET-Effizienz an doppelmarkierten Proben kann aus dem Verhältnis der Donorintensität (unter



Donoranregung) vor der Akzeptorbleichung  $D_{CY,pre}$  und dem Signal  $D_{CY,post}$  danach abgeschätzt werden mit:

$$E = 1 - \frac{D_{CY,pre}}{D_{CY,post}}$$

Denken Sie daran eine entsprechend ausreichende Anzahl an Bildern vor und nach dem Bleichereignis aufzunehmen. Inwieweit ist hier für die Datenauswertung die Verwendung eines Mittelwertbildes sinnvoll? Nehmen Sie mindestens 10 Zellen auf und vergleichen Sie Ihre Ergebnisse der FRET-Effizienz mit denen aus der Berechnung der Sensitized Emission. Was sind mögliche Nachteile und Störgrößen dieser Methode?

## 4.4 Lebenszeitmessungen

Messen Sie nun zunächst die Lebenszeiten von CFP / YFP an Zellen, die nur eine CFP- oder YFP-Markierung aufweisen. Verwenden Sie hierfür den gepulsten 470nm Laser bei 40 MHz und die beiden Avalanche-Photodioden mit einem passendem Filterwürfel (siehe Abb. 7). Betrachten Sie das Histogramm der Einzelphotonenereignisse und verwenden sie einen passenden Fit, um die Lebenszeiten zu berechnen. Messen Sie nun die Lebenszeit der Donor-Moleküle in einer doppelmarkierten Zelle vor und nach einer Bleichung der Akzeptormoleküle. Vergleichen Sie die Ergebnisse der Donor-Lebenszeiten für reine CFP-Proben und für doppelmarkierte Proben vor und nach Akzeptorbleichung. Eine Abschätzung der FRET-Effizienz ergibt sich aus den Lebenszeiten der Donor-Moleküle ohne FRET ( $\tau_{D,no FRET}$ ) und mit FRET ( $\tau_{D,FRET}$ ) gemäß:

$$E = 1 - \frac{\tau_{D,FRET}}{\tau_{D,no FRET}}$$

Vergleichen Sie Ihre Ergebnisse mit Messungen der Sensitized Emission und Messungen der Donoremission unter Akzeptorbleichen. Inwieweit liefern Ihre gemessenen Lebenszeiten physikalisch sinnvolle Ergebnisse? Wodurch können eventuelle Abweichungen von der theoretischen Erwartung begründet werden? Welche generellen Vor- und Nachteile besitzt diese Methode?

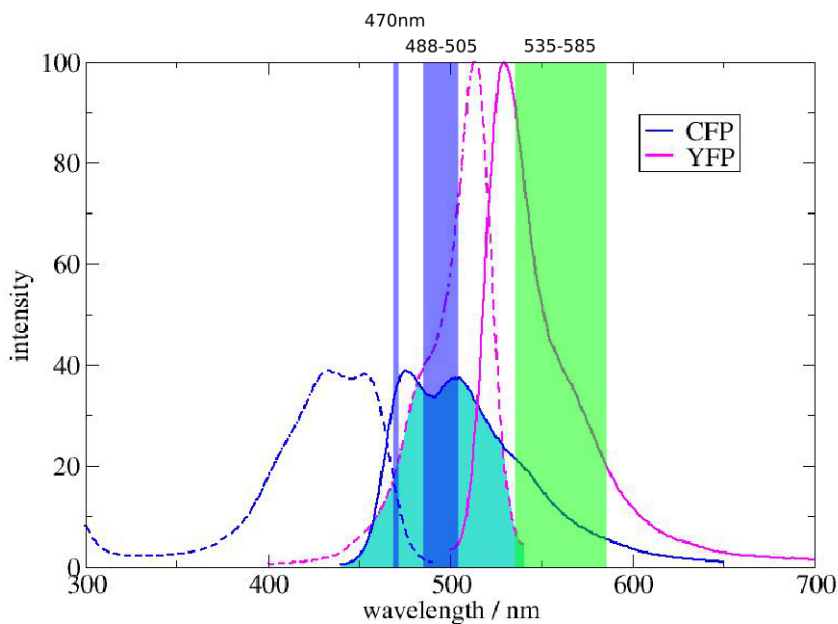


Abbildung 7: Anregungslaserlinie und Detektionsbereiche zur Lebenszeitmessung an CFP / YFP

## 5 Erforderliche Kenntnisse

- Grundlagen der Optik & Atomphysik
- Funktionsweise Konfokalmikroskopie
- Fluoreszenz / Anregung von Farbstoffen

## 6 Fragen zur Vorbereitung

1. Wie kommt man bei einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zum FRET-Effekt? Was bedeutet der Försterradius? Woher stammt die Abhängigkeit  $\sim 1/r^6$ ?
2. Was passiert, wenn Donor und Akzeptor feste Orientierungen haben? Welche Grenzfälle gibt es? Kann es auch FRET vom Akzeptor auf den Donor geben?
3. Welchen Abstand sollten PH-CFP und PH-YFP haben um FRET zu sehen?
4. Warum kann man nicht einfach den Donor anregen und schauen ob im Spektralbereich des Akzeptors Licht detektierbar ist? Worauf basieren eventuell nötige Korrekturen?
5. Welche Beiträge messen Sie in einer zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung noch neben dem eigentlichen Fluorophorsignal. Wie können Sie diese Beiträge messen bzw. korrigieren?
6. Warum zeigen die im Praktikum verwendeten Proben Fluoreszenz? Warum findet sich diese an den PH-Proteinen?
7. Erklären Sie den Prozess des Bleichens in Fluorophoren.
8. Erklären Sie die Funktionsweise eines Konfokalmikroskops und eventuelle Vorteile und Nachteile dieser Technik. Geht das Experiment nur mit einem konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop? Was wären potentielle Alternativen?

## 7 Literatur

1. Lakowicz. (2007). Principles of Fluorescence Spectroscopy (3rd ed.). Berlin: Springer.
2. Jares-Erijman & Jovin. (2006). Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. Current Opinion in Chemical Biology, 10(5)
3. Jalink & van Rheenen.(2009). Chapter 7 FilterFRET. Fret and Flim Techniques (1st ed., Vol. 33). Elsevier B.V.
4. Alberts et al. . (2014). Molecular Biology of the Cell 6e. Garland Science (Vol. 6).
5. van der Wal et al. . (2001). Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. The Journal of Biological Chemistry, 276(18)
6. Bergmann-Schaefer, Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 3, Optik
7. Download unter <https://fiji.sc/>  
(Paper: Schindelin et al. . (2012), Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, Nature methods 9(7) )