

Fortgeschrittenes physikalisches Praktikum

Wintersemester 2021/2022

Versuch FRET

Förster-Resonanzenergietransfer an biologischen Proben

Gruppe: 6

Versuchstag: 08.09.2021

Betreuer: Dr. Chenyu Jin

Anna-Maria Pleyer Dominik Müller David Stadelmann



**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
2 Fragen zur Vorbereitung	6
2.1 Dipol-Dipol Wechselwirkung, Försterradius und r^{-6} Abhängigkeit	6
2.2 Feste Orientierung, Grenzfälle und umgekehrter FRET	7
2.3 Abstand für FRET	7
2.4 Crosstalk-Verunreinigung	7
2.5 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung	8
2.6 Proben im Praktikum	9
2.7 Photobleaching	9
2.8 Konfokalmikroskop	9
2.8.1 Funktionsweise	10
2.8.2 Vor- bzw. Nachteile	10
2.8.3 Alternative	10
3 Versuchsdurchführung und Aufbau	11
4 Auswertung	12
4.1 Aufnahmen der Sensitized Emission	12
4.1.1 Korrekturfaktoren	12
4.1.2 SE und FRET Effizienz	13
4.1.3 Abstand der Fluorophore	15
4.2 Donoremission nach Akzeptorbleichen	17
4.2.1 CFP und YFP Proben	18
4.2.2 CFP-Proben	19
4.2.3 YFP-Proben	20
4.3 Lebenszeitmessungen	21
4.3.1 Abweichungen von Daten und Fits	25
5 Fazit	26
A Tabellen	27
A.1 Korrekturfaktoren	27
A.2 SE und FRET Effizienz	28
A.3 Sensitised Emission	29
A.4 FRET-Effizienz	30
Literaturverzeichnis	31

1 Einleitung

In biologischen Proben ist es oftmals schwierig Abstände von Atomen oder Molekülen zu bestimmen. Die meisten Mikroskope haben eine zu geringe Auflösung um diese Distanzen, die meist nur wenige Nanometer groß sind, zu messen. Eine wichtige Messmethode zur Bestimmung von diesen Abständen ist der Förster Resonanzenergietransfer (engl. Förster resonance energy transfer), kurz FRET.

Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus zur strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei Farbstoffen. Der Donor, in unserem Fall ein cyan-farbenes fluoreszentes Protein (CFP), wird angeregt und dessen Anregungsenergie wird dann strahlungslos auf den zweiten Farbstoff, den sogenannten Akzeptor, übertragen. Der Akzeptor, in unserem Fall ein gelb-farbenes fluoreszentes Protein (YFP), kann diese Energie in Form von Strahlung wieder abgeben.

Damit FRET in einer biologischen Zelle beobachtbar ist, sind die Proteine über PH (Pleckstrin-Homologiedomäne) an die Membran gebunden. Die beiden Farbstoffe kommen sich dementsprechend nahe genug, damit FRET stattfinden und die FRET-Effizienz gemessen werden kann. Durch diese können Rückschlüsse auf den Abstand gezogen werden, da die Effizienz abhängig vom Abstand ist. Zudem ist eine weitere Voraussetzung für FRET, dass es zu einer Überlappung zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors kommt.

In diesem Versuch wird die Theorie von FRET genauer untersucht, aber auch dessen praktische Anwendung wird betrachtet. Die FRET-Effizienz wird im experimentellen Teil des Versuches auf drei Arten bestimmt, durch Sensitized Emission, Photobleaching und Lebenszeitmessung. Die verschiedenen Methoden werden im Folgenden genauer beleuchtet, verglichen und diskutiert.

2 Fragen zur Vorbereitung

2.1 Dipol-Dipol Wechselwirkung, Försterradius und r^{-6} Abhängigkeit

Wie kommt man bei einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zum FRET-Effekt? Was bedeutet der Försterradius? Woher stammt die Abhängigkeit $\sim 1/r^6$?

Beim FRET-Effekt (Förster-Resonanzenergietransfer-Effekt) wird die Energie eines Donors strahlungslos, nicht mittels eines Photons, an einen Akzeptor übergeben. Dies geschieht über Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Dafür müssen Donor und Akzeptor ziemlich nahe beieinander sein.

Die Effizienz des FRET-Effekts ist wie folgt gegeben:

$$E = \frac{\text{Zahl Energietransfers}}{\text{Zahl Anregungen}} = \frac{R_F^6}{R_F^6 + R^6} \quad (2.1)$$

Wobei R_F für den Försterradius und R für den Abstand der beiden Proben steht (vgl. Versuchsanleitung, 2018). Wenn man nun für $R = R_F$ einsetzt, erhält man:

$$E = \frac{R_F^6}{R_F^6 + R_F^6} \quad (2.2)$$

$$E = \frac{R_F^6}{2R_F^6} \quad (2.3)$$

$$E = \frac{1}{2} \quad (2.4)$$

Somit entspricht der Försterradius dem Abstand, wo die Effizienz auf 50% abfällt.

Ausgehend von Fermis' goldener Regel, was der Wahrscheinlichkeit eines Überganges entspricht, folgt (vgl. Versuchsanleitung, 2018):

$$\left| \left\langle \phi_D \phi_{A^*} \left| \frac{\kappa}{4\pi\epsilon_0} \frac{\mu_D \mu_A}{r^3} \right| \phi_{D^*} \phi_A \right\rangle \right|^2 \quad (2.5)$$

Hierbei stehen ϕ für die Wellenfunktionen des Donors und Akzeptors ($*$ steht für den angeregten Zustand). Die μ stehen für das jeweilige Übergangsdipolmoment der Donors und Akzeptors.

κ steht für den Orientierungsfaktor zwischen Donor und Akzeptor. Die Abhängigkeit $1/r^3$ kommt von Multipolentwicklung der Dipol-Momente. Wenn man nun Fermis' goldene Regel quadriert, wird der $1/r^3$ Term zu $1/r^6$ (vgl. Porphyrin, 2017).

2.2 Feste Orientierung, Grenzfälle und umgekehrter FRET

Was passiert, wenn Donor und Akzeptor feste Orientierungen haben? Welche Grenzfälle gibt es? Kann es auch FRET vom Akzeptor auf den Donor geben?

Wenn Donor und Akzeptor feste Orientierungen haben, gibt es zwischen ihnen nur noch einen Freiheitsgrad, den Abstand. Somit hängt dann die Effizienz von FRET nur noch vom Abstand ab.

Die Grenzfälle werden dadurch beschrieben, dass die Moleküle eine parallele oder orthogonale Orientierung haben. Bei der parallelen Ausrichtung ist der beste Energietransfer möglich. Bei der orthogonalen Ausrichtung hingegen, wird keine Energie übertragen.

Eine Voraussetzung für FRET ist, dass das Emissionsspektrum des Donors mit den Absorptionsspektrums des Akzeptors überlappt. Dies ist erfüllt, wenn 'CFP' der Donor und 'YFP' der Akzeptor ist.

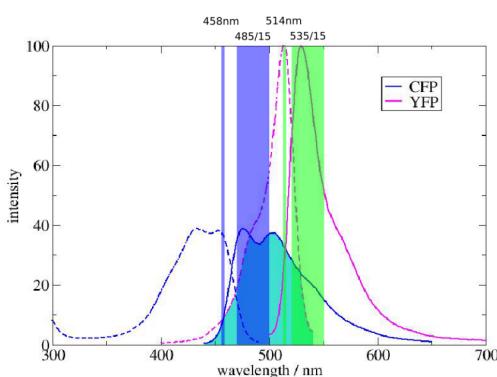


Abbildung 2.1: Absorptions- und Emissionsspektrum der CFP/YFP Proteine

Wenn man nun Donor und Akzeptor tauschen würde, dann würde sich die Emissionslinie des neuen Donors (pink, durchgehen) nicht (bzw. nur knapp) mit der Absorptionslinie des neuen Akzeptors (blau, gestrichelt) schneiden. Somit gibt es keinen FRET von Akzeptor zu Donor.

2.3 Abstand für FRET

Welchen Abstand sollten PH-CFP und PH-YFP haben um FRET zu sehen?

Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor sollte in etwa dem Försterradius entsprechen.

Für die verwendeten Farbstoffe CFP und YFP liegt der Försterradius in der Größenordnung 5 nm (vgl. Chemie.de, 2021).

2.4 Crosstalk-Verunreinigung

Warum kann man nicht einfach den Donor anregen und schauen ob im Spektralbereich des Akzeptors Licht detektierbar ist? Worauf basieren eventuell nötige Korrekturen?

Man kann die FRET-Intensität nicht direkt messen, da sich die Anregungsbereiche des Donors und Akzeptors teilweise überlappen. Somit wird bei der Anregung des Donors auch der Akzeptor angeregt. Wenn man nun nur die Emission des Akzeptors misst, ist diese 'verunreinigt' durch die partielle Anregung des Akzeptors.

Um dies zu bereinigen, misst man die Anregung des Donors und Akzeptors einzeln und kann somit die Crosstalk Beiträge berechnen.

2.5 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Welche Beiträge messen Sie in einer zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung neben dem eigentlichen Fluorophorsignal? Wie können sie diese Beiträge messen bzw. korrigieren?

Ganz allgemein ist die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (englisch time-correlated single photon counting, TCSPC) eine Technik, um Lichtintensitäten zu messen, die sich zeitlich schnell ändern. Hauptsächlich wird diese Messmethode verwendet um die Fluoreszenzlebenszeit zu messen.

Die zu untersuchende Probe (Fluorophore) wird mithilfe von gepulsten Lichtbündel, z.B. durch einen Laser, angeregt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt mit einem Photomultiplier, der in der Lage sein muss einzelne Photonen zu registrieren. Die Zeitmessung wird durch die Anregung des Laserpuls gestartet und das emittierte Photon stoppt diese. Die Messung wird wiederholt und die einzelnen Photonen werden, mit ihrer entsprechenden Zeit, in ein Histogramm eingetragen. Dieses zeigt den exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität nach der Anregung. (vgl. Physikcosmos-Direkt, 2021)

Störungen/Fehler

Bei dieser Messtechnik kann es allerdings zu Störungen kommen, welche die Messung verfälschen können, dieses Rauschen muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Natürlich gibt es das thermische Rauschen, davon ist beinahe jedes Messgerät betroffen. Dies ist beispielsweise durch Kühlung des Messgerätes behebbar.

Des Weiteren gibt es mehrere Störungsfaktoren, diese werden zum 'Dark Counting' zusammengefasst. Hierzu zählen zum einen das Verstärkerrauschen, das durch den angeschlossenen Photomultiplier zustande kommt. Dieses Problem kann man meist mit einem Hochpassfilter lösen, da die Amplituden des Rauschens meist geringer sind als die Amplituden der eigentlichen Messung.

Ein weiteres Beispiel ist das 'Afterpulsing', hierbei zeigt der Detektor nach dem eigentlichen Photoneureignis ein weiteres (fiktives) Ereignis an. Dies kann durch die entsprechende Wahl des Detektors behoben werden. (vgl. Wahl, 2014)

Es gibt auch noch den sogenannten Peak-Pile Effekt. Bei der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung sollte theoretisch nur ein Photon pro Laserpuls mit der Probe wechselwirken. Wird mehr als nur ein Photon von der Probe absorbiert und anschließend wieder emittiert, so kann der Detektor nur das erste Photon detektieren. Hierdurch verringert sich die gemessene Lebensdauer des Photons und verfälscht somit die Messung. Dieser Effekt findet aufgrund der Reaktions- und Totzeiten des Detektors statt. Nach der Detektion eines Teilchens benötigt das Messgerät eine gewisse Zeitspanne, bis dieses wieder das nächste Teilchen nachweisen kann, dass ist die sogenannte Reaktions- und Totzeit. Durch Verringerung der Laserintensität kann man diesem Effekt entgegenwirken.

Ein weiterer Effekt ist die sogenannte Reabsorption. Dabei werden Photonen erneut von anderen Molekülen absorbiert, wodurch die Lebensdauer dieser als sehr groß bestimmt wird. (vgl. Humboldt-Universität zu Berlin, aufgerufen 2021)

2.6 Proben im Praktikum

Warum zeigen die im Praktikum verwendeten Proben Fluoreszenz? Warum findet sich diese an den PH-Proteinen?

Die im Praktikum verwendeten Proben werden mit einem Farbstoff markiert, d.h. sie haben sich kovalent an das Farbstoff-Molekül gebunden. Wenn diese markierten Proben nun angeregt werden, emittieren sie sichtbares Licht, was man auch Fluoreszenz nennt.

Die von uns genutzten Zellen haben eine Plasmamembran, welche aus verschiedenen Lipiden aufgebaut ist. Unter diesen Lipiden sind ca. 30% Phospholipide und ein besonderer phosphorylierter Zustand, das Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat (PIP2). Das PIP2 ist deshalb so besonders, denn es kann sich an die im Zellplasma vorhandenen Pleckstrin-Homologiedomäne (PH) binden.

In unserem Versuch wird dies verwendet, indem man YFP und CFP an Proteine mit einer solchen Pleckstrin-Homologiedomäne bindet. Durch die hohe Dichte an PIP2 binden sich viele YFP-PH und CFP-PH an dieses. Dies hat zur Folge, dass die Distanz zwischen YFP (Akzeptor) und CFP (Donor) gering genug ist, damit FRET stattfinden kann. (vgl. Versuchsanleitung, 2018)

2.7 Photobleaching

Erklären Sie den Prozess des Bleichens in Fluorophoren.

Das Photobleaching (dt. Bleichen) ist ein Mechanismus, bei dem es zu einem Verlust der Fluoreszenz von Fluorophoren kommt. Beim Photobleaching ist dies ein irreversibler Vorgang. Während dem Bleaching wird das Fluorophor mit Licht bestrahlt und somit treffen es unterschiedliche Photonen mit unterschiedlichen Energien. Diese verschiedenen Photonen können vom Fluorophor absorbiert werden und somit kommt es zu einem Übergang in einen angeregten Zustand. Es kommt zu einer kovalenten Änderung des Fluorophors, durch die Wechselwirkung zwischen dem angeregten Fluorophor und dessen Umgebung. Durch diesen Wechsel zwischen dem Singulett- und Tripplettstatus des Fluorophors, verliert dieses seine Fluoreszenz.

Es gibt noch eine weitere Methode des Bleichens, das sogenannte Quenching (dt. Fluoreszenzlösung), hierbei kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenz, aber im Gegensatz zum Photobleaching ist dieser reversibel. Das Quenching wird in unserem Versuch allerdings nicht verwendet, deshalb wird hier nicht näher darauf eingegangen. (vgl. Wikipedia, 2021)

2.8 Konfokalmikroskop

Erklären sie die Funktionsweise eines Konfokalmikroskop und eventuelle Vorteile und Nachteile dieser Technik. Geht das Experiment nur mit einem konfokalem Laser-Scanning Mikroskop? Was wäre potenzielle Alternativen?

Das Konfokalmikroskop ist ein spezielles Lichtmikroskop, welches, im Gegensatz zu anderen Mikroskopen, zu jedem Zeitpunkt nur einen kleinen Teil der Probe beleuchtet. Dieser Bruchteil wird dann Stück für Stück abgerastert. Der prinzipielle Aufbau eines Konfokalmikroskop ist in der Abbildung 2.2 zu sehen.

2.8.1 Funktionsweise

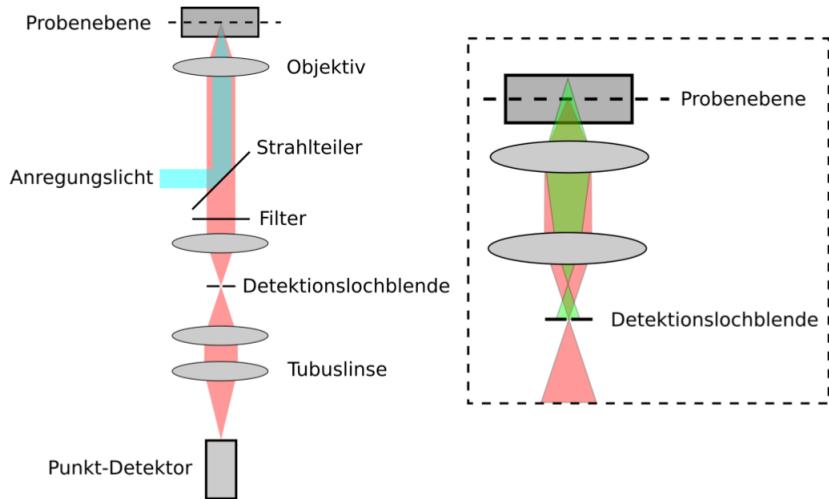


Abbildung 2.2: Skizze des schematischen Aufbaus eines Konfokalmikroskop.(vgl. Versuchsanleitung, 2018)

Der Anregungsstrahl (in Abb. 2.2 blau) trifft auf einen Strahlenteiler (z.B. ein halbdurchlässiger Spiegel), welcher diesen reflektiert und durch eine Linse gebündelt wird, sodass er im Brennpunkt auf die Probe trifft.

Der Detektionsstrahl (Abb. 2.2 rot gekennzeichnet) wird durch die angeregte Probe ausgesendet. Der von der Probe ausgehende Strahl wird durch die oberste Linse parallelisiert und trifft auf den Strahlenteiler, dieser lässt den Strahl transmittieren. Nach dem Strahlenteiler ist, wie in der Skizze erkennbar, die Möglichkeit vorhanden einen Filter einzubauen. Dieser kann die störenden Wellenlängen filtern und stoppen. Nach dem Filter befindet sich eine weitere Linse und die Detektionslochblende. Diese Blende sorgt dafür, dass das Detektionsvolumen auf einen sehr kleinen Bereich eingeschränkt wird, d.h. die Strahlen aus dem hinteren Bereich der Probe gelangen nicht mehr zum Detektor. Nach der Blende trifft der Strahl auf die erste Tubuslinse, welche den Detektionsstrahl wieder parallelisiert, die zweite Tubuslinse fokussiert anschließend den Strahl auf den Punkt-Detektor, welcher die einzelnen Photonen detektiert.

2.8.2 Vor- bzw. Nachteile

Der große Vorteil von Konfokalmikroskopie ist die Möglichkeit, unerwünschtes Hintergrundrauschen der Probe, meist Streulicht, auf ein Minimum zu reduzieren, da durch eine Detektionslochblende nur Licht aus der konfokalen Ebene detektiert wird. Somit ist die axiale Auflösung im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie viel besser.

Die Blende kann allerdings auch ein Nachteil sein, denn durch sie kann es zu Beugungerscheinungen kommen, welche die Auflösung begrenzen. Als ein Nachteil könnte man zusätzlich noch anführen, dass durch die vielen Einzelaufnahmen die Probe eher langsam erfasst wird.

2.8.3 Alternative

Wenn das Konfokalmikroskop zur Untersuchung der Probe nicht ausreichend ist, kann auch ein nicht konfokal Laser-Scanning-Microscope verwendet werden, diese benötigt die oben genannte Blende nicht.

3 Versuchsdurchführung und Aufbau

Damit die FRET-Effizienz Messungen möglich und beobachtbar sind, benötigt man ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop. In unserem Fall ist das Konfokalmikroskop vom Typ Leica TCS SP5, welches durch ein Computer-Messprogramm steuerbar ist. Am Mikroskop ist das Objektiv HCX PL APO lambda blue 63.0 x 1.4 OIL UV befestigt. Die zwei Laserlinien des Argon-Ionen-Laser dienen zur Anregung und haben die Wellenlängen 458 nm und 514 nm. Die Laserintensitäten wurden auf 30% bei 458 nm und auf 3% bei 514 nm eingestellt. Die Detektion geschieht durch zwei Photomultiplier (PMT). Das erste PMT detektiert eine Wellenlängenbreite von 470 nm bis 500 nm, das zweite PMT einen Bereich von 520 nm bis 550 nm. Zur besseren Veranschaulichung ist die Abbildung 3.1 eingefügt. Das oben erwähnte Messprogramm musste vor dem Versuch eingestellt werden, hierzu wurden einige Probemessungen durchgeführt, um die richtigen Parameter für den Verlauf des Versuches festzulegen. Dabei wurde eine Pinhole-Größe von 2,0 AU bestimmt, damit die Auflösung und die Intensität das richtige Verhältnis haben. Der Smart-Gain wurde konstant auf 1000.0 V gestellt und der Offset auf 0%. Als nächstes wurde die Bildgröße bestimmt, eine höhere Bildgröße führt zu einer besseren Auflösung, allerdings ist diese auch mit einer längeren Messdauer verbunden. Somit wurde die Bildgröße von 512 x 512 Pixel als ausreichend für unseren Versuch angesehen. Die Scan Geschwindigkeit wird auf 400 Hz festgesetzt.

Im Laufe des Versuches wird die Lebenszeit von angeregten Zuständen gemessen, hierzu wurde ein PicoHarp 300 TCSPC Module and Picosecond Event Timer verwendet. Um die Fluorophore in angeregte Zustände zu bekommen wurde ein gepulster 470nm Laser bei 40 MHz verwendet.

Im ersten Teil des Versuches wird die FRET-Effizienz mithilfe der Sensitized Emission bestimmt.

Im zweiten Versuchsteil wird die FRET-Effizienz bestimmt, indem die Donorfluoreszenz vor und nach dem Bleichvorgang des Akzeptormoleküls gemessen wird.

Im letzten Teil wird die Lebenszeit des Donors gemessen, um anschließend die FRET-Effizienz bestimmen zu können.

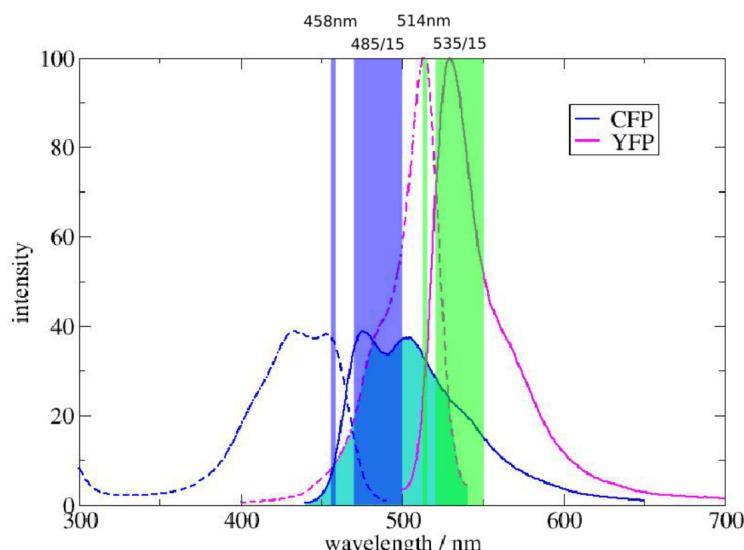


Abbildung 3.1: Anregungslaserlinien und Detektionsbereiche zur Lebenszeitmessung an CFP/YFP.

4 Auswertung

4.1 Aufnahmen der Sensitized Emission

Um die Effizienz von FRET in unserer Probe zu bestimmen, haben wir verschiedene fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht. Zuerst wird die Hauptprobe mit sowohl CFP- als auch YPF-markierten Zellen untersucht. Danach werden Proben, mit je nur CFP- oder YPF-Markierungen untersucht. Diese je einmal mit Licht der Wellenlänge 458 nm beleuchtet und dann die Fluoreszenz im Bereich 470 – 500 nm (D) und 520 – 550 nm (S) detektiert. Danach wird die Probe nochmal mit Licht der Wellenlänge 514 nm beleuchtet und die Fluoreszenz im Bereich 470 – 500 nm gemessen. Dabei wird noch eine Bright-Field Aufnahme gemacht.

Die einzelnen Bilder werden wie folgt benannt:

Zelle	D	S	A
C+Y	D _{CY}	S _{CY}	A _{CY}
C	D _{CFP}	S _{CFP}	A _{CFP}
Y	D _{YFP}	S _{YFP}	A _{YFP}

Tabelle 4.1: Benennung der Aufnahmen der Sensitized Emission

4.1.1 Korrekturfaktoren

Aufgrund des 'Crosstalks' (Überlappung der Anregungs- und Detektionsbereiche von Donor und Akzeptor) kann die FRET-Intensität nicht direkt gemessen werden. Um dies zu herauszurechnen, werden bei jeweils nur CFP- und YFP-markierten Zellen die Donor-, Sensitized Emission- und Akzeptor-Intensität gemessen und folgende Korrekturfaktoren berechnet:

$$\alpha = D_{YFP}/A_{YFP} \quad (4.1)$$

$$\beta = S_{CFP}/A_{CFP} \quad (4.2)$$

$$\gamma = S_{YFP}/A_{YFP} \quad (4.3)$$

$$\delta = D_{YFP}/A_{YFP} \quad (4.4)$$

Hierbei steht die Intensität für die mittlere Intensität aller Zellen.

Um diese zu bestimmen, wird jeweils eine Fotoserie (Donor-, Sensitized Emission-, Akzeptoremission und Brightfield) in das Programm Fiji/ImageJ geladen. Dort wird zuerst eine ROI (region of interest) um einen zellenfreien Teil in der Brightfield Aufnahme gemalt. Diese wird mithilfe des ROI-Managers in alle anderen Bilder kopiert und dort die mittlere Intensität gemessen. Im nächsten Schritt wird eine zweite ROI um den fluoreszierenden Teil der Zelle gezogen und wieder auf alle Zellen kopiert. Dort wird wieder die mittlere Intensität der Zelle gemessen.

Folgendermaßen sehen die ROIs aus:

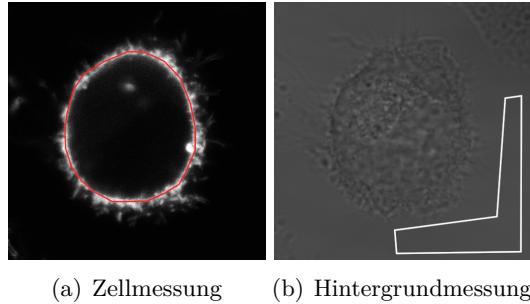


Abbildung 4.1: Verschiedene ROIs

Um nun die Korrekturfaktoren zu berechnen, wird von der Zellmessung zuerst die Hintergrundmessung abgezogen. Danach wird für jede Zelle einzeln der Korrekturfaktor bestimmt und abschließend über alle gemittelt.

Somit ergeben sich folgende Korrekturfaktoren:

$$\begin{aligned}\alpha &= 0,030 \\ \beta &= 0,207 \\ \gamma &= 0,562 \\ \delta &= 0,054\end{aligned}$$

Eine Tabelle mit allen Messungen findet sich im Anhang.

4.1.2 SE und FRET Effizienz

Zuerst werden wieder die Bilder in Fiji/ImageJ importiert. Im nächsten Schritt wird eine ROI um einen zellenfreien Teil in der Bright Field Aufnahme eingezeichnet. Danach wird diese, durch den ROI-Manager, auf die anderen Bilder übertragen. Im jeweiligen Bild misst man dann die mittlere Intensität und wählt danach die ROI wieder ab. Anschließend wird das Bild in ein 32-Bit Bild umgewandelt. Dies wird gemacht, da bei 8-Bit nur $2^8 = 255$ Werte für die Intensität zur Verfügung stehen. Bei 32-Bit stehen $2^{32} \approx 4,3 \cdot 10^9$ Werte zur Verfügung, was die Rechnungen etwas genauer macht. Wenn das Bild umgewandelt wird, wird von dem ganzen Bild die Hintergrundmessung abgezogen. Danach wird der 'Threshold' auf etwa 3 angehoben, was dazu führt, dass alle Pixel die einen geringeren Wert als 3 haben zu 'NaN' (NotaNumber) werden und in späteren Berechnungen nicht mehr beachtet werden. Dies wird mit allen 3 Bildern (Donor, Sensitized Emission und Akzeptor) gemacht.

Werte

Um nun einen Zahlenwert für die Sensitized Emission zu bekommen, wird eine ROI um die einzelnen Zellen gezogen und die mittlere Intensität berechnet. Diese wird dann mit den Korrekturfaktoren wie folgt verrechnet:

$$SE = \frac{S_{CY} - \beta \cdot D_{CY} - (\gamma - \alpha \cdot \beta) \cdot A_{CY}}{1 - \beta \cdot \delta} \quad (4.5)$$

Die FRET-Effizienz wird danach wie folgt berechnet:

$$E = \frac{SE}{\sqrt{A_{CY} \cdot D_{CY}}} \quad (4.6)$$

4 Auswertung

Somit bekommt man folgende Wertetabelle:

Zelle	Sensitized Emission	FRET Intensität
1	5,1869189	0,49342845
2	13,0835367	0,42973668
3	12,0800542	0,96251588
4	15,4703842	0,54063115
5	10,3858137	0,50313880
6	28,9868398	0,64137183
7	16,5871733	0,84110296
8	26,5717226	0,98273363
9	10,5669283	0,65557684
10	9,9482744	0,62637984
11	62,5234049	0,63674985
12	12,6206028	0,79515135
13	21,7648752	0,65874651
14	21,4772655	0,40308614
15	22,0766976	0,69485260
16	23,1496922	0,66020480
17	13,8373739	0,63248513
18	7,86244379	0,62679721
19	9,15395144	0,62775177
20	9,95348719	0,42750202
21	7,38539461	0,48594412

Tabelle 4.2: Wertetabelle Sensitized Emission und FRET-Effizienz

Die einzelnen Werte für den Donor, Sensitized Emission und Akzeptor Channel findet man im Anhang.
Als Mittelwert für die Sensitized-Emission und der FRET-Effizienz folgt:

$$SE = (17,1 \pm 12,0) \quad E = (0,63 \pm 0,16) \quad (4.7)$$

Bilder

Um die Sensitized Emission/FRET-Effizienz auch bildlich darzustellen, kann die Gleichung der Sensitized Emission und der FRET-Effizienz auch in Fiji/ImageJ direkt umgesetzt werden. Hierfür wird anstatt der mittleren Intensität des Donor-, bzw. Sensitized Emission- oder Akzeptor-Channel das jeweilige Bild verwendet. Anschließend wird das Bild noch mit einer Color-Map versehen (wir haben uns für 'Green Fire Blue' entschieden), eine Legende (Calibration Bar) und Größenangabe (Scale Bar) hinzugefügt. Somit entstehen folgende Bilder, wo man anhand der Verfärbung die FRET-Effizienz für jeden Teil der Zelle sehen kann:

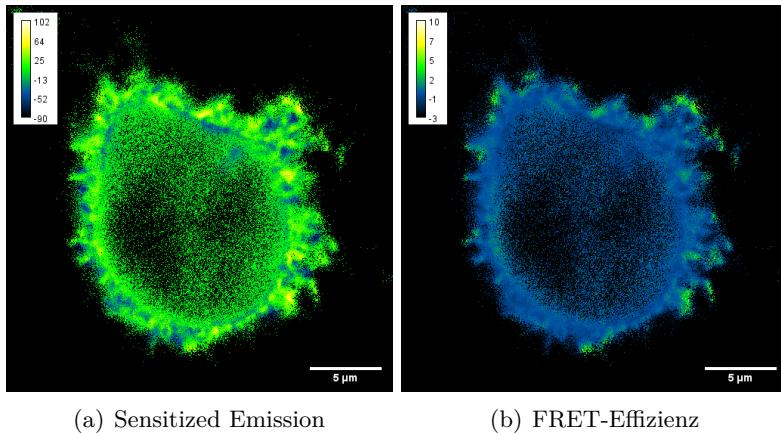


Abbildung 4.2: SE und E der Zelle 7

Alle Bilder der Sensitized Emission und FRET-Effizienz findet man im Anhang.

4.1.3 Abstand der Fluorophore

In den Fragen zur Vorbereitung wird bei der Effizienz des FRET-Effekts folgende Formel behandelt:

$$E = \frac{R_F^6}{R_F^6 + R^6} \quad (4.8)$$

Diese verknüpft die FRET-Effizienz mit dem Abstand der Proteine. Diese Formel kann umgeschrieben werden, um den Abstand bei bekannter FRET-Effizienz zu bekommen:

$$E = \frac{R_F^6}{R_F^6 + R^6} \quad (4.9)$$

$$(R_F^6 + R^6) \cdot E = R_F^6 \quad (4.10)$$

$$R = \sqrt[6]{\frac{R_F^6}{E} - R_F^6} \quad (4.11)$$

Der ausgerechnete Wert, kann als mittlerer Abstand zwischen den Proteinen in der betrachteten Zelle interpretiert werden.

4 Auswertung

Für die einzelnen Zellen folgt, mit einem Försterradius von 4,9 nm (vgl. Chemie.de, 2021), für den mittleren Abstand:

Zelle	Mittlere Abstand (nm)
1	4,92151539
2	1,3661913
3	0,75876261
4	1,26836065
5	1,30054053
6	1,18291925
7	0,98721207
8	0,66449782
9	1,17069601
10	1,19572534
11	1,18687643
12	1,03959272
13	1,16795419
14	1,39139887
15	1,13623678
16	1,1666908
17	1,19052023
18	1,19536991
19	1,19455678
20	1,36827055
21	1,31553785

Wenn man nun dies noch über alle Zellen mittelt, erhält man, dass in allen Probe im Mittel der Abstand der Proteine $(1,3 \pm 0,8)$ nm beträgt.

4.2 Donoremision nach Akzeptorbleichen

In diesem Versuchsteil soll die FRET-Effizienz an CFP/YFP markierten Zellen bestimmt werden, indem die Donorfluoreszenz vor und nach dem Photobleaching des Akzeptormoleküls gemessen wird. Während dem Bleichvorgang wird (idealerweise) nur der Akzeptor mit einem Laser der Wellenlänge 514 nm bei 100% Intensität bestrahlt und somit wird die Fluoreszenz des Akzeptors YFP verringert. Während dem Versuch werden erst 10 Bilder vor dem Bleichen aufgenommen. Im nächsten Schritt werden weitere 5 Bilder aufgenommen, diese stellen den Bleichvorgang dar. Zuletzt werden noch einmal 10 Bilder aufgenommen, um die Zelle nach dem Bleichvorgang auswerten zu können.

Um aus diesen Bildern die mittleren Intensitäten mithilfe des Messprogramm zu bekommen, werden sogenannte *region of interest* (ROI) bestimmt. Die erste ROI 1 enthält immer den vollständig bestrahlten Bereich der Zelle während dem Bleichvorgangs. Die zweite ROI 2 wird um die Membran gezogen. Bei der dritten ROI 3 wird ein Ort in der Zelle gewählt, der sich durch besonders hohe Fluoreszenz auszeichnet. Bei einigen Messungen kam es hierbei allerdings zu einer unterschiedlichen Anzahl von ROI 3. Damit die verschiedenen Zellen besser vergleichbar sind, wurden die ROI jeweils nach dem oben beschrieben Kriterien ausgewählt.

Um die ROI zu verdeutlichen, soll die folgende Graphik als Beispiel für die aufgenommenen Bilder während dem Versuch dienen.

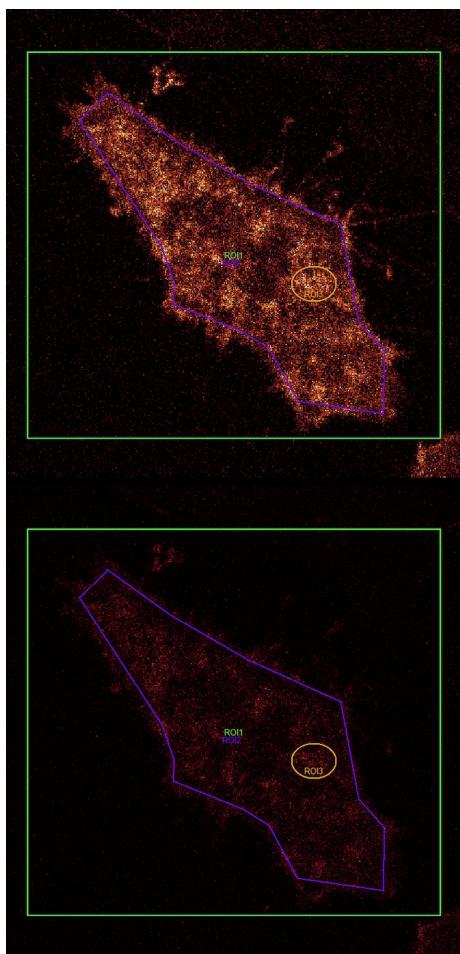


Abbildung 4.3: Zelle 06 der YFP/CFP Probe vor und nach dem Bleichvorgang, unterteilt in verschiedenen ROI.

4 Auswertung

Das erste Bild steht hierbei für die Aufnahme vor dem Photobleaching und das zweite zeigt eine Aufnahme danach. An diesen Bildern erkennt man die oben beschrieben ROI. Das grüne Rechteck steht für die ROI 1, die pinke Ummantelung für ROI 2 und der orangene Kreis für ROI 3, einen Bereich mit hoher Fluoreszenz innerhalb der Membran.

Zuerst wurden die Proben mit CFP und YFP markierten Zellen untersucht, anschließend die nur CFP Proben und zuletzt die YFP Proben. Bei den ersten beiden Versuchsteilen wurde die Donorintensität betrachtet, im letzten Schritt allerdings die Akzeptorintensität. Nach der Mittelwertbildung wurden noch die Verhältnisse gebildet, um einen Vergleich ziehen zu können.

4.2.1 CFP und YFP Proben

Hier wurden zuerst über die Donorintensität $D_{CY,pre}$ vor der Akzeptorbleichung und die Donorintensität $D_{CY,post}$ nach dem Bleichvorgang für jede einzelne Zelle gemittelt. Anschließend wird die FRET-Effizienz E nach der im Skript angegeben Formel berechnet:

$$E = 1 - \frac{D_{CY,pre}}{D_{CY,post}} \quad (4.12)$$

Aus der folgenden Tabelle sind die entsprechenden Werte zu entnehmen:

Zelle	ROI 1	ROI 2	ROI 3
1	0,02	0,03	0,04
2	0,02	0,04	0,07
3	0,07	0,01	0,11
4	0,04	0,07	0,13
5	0,01	0,02	-0,01
6	0,10	0,10	0,06
7	-0,02	-0,01	0,07
8	0,01	0,03	0,07

Tabelle 4.3: FRET-Effizienz, berechnet aus der Donorintensitäten (von CFP/YFP Proben) vor und nach dem Bleichvorgang für 8 Zellen.

Hierbei muss gesagt werden, dass die aufgeführten Werte nicht die kompletten Werte der Messung sind. Die erste Messung wurde in dieser Tabelle nicht mit aufgeführt, da hierbei nur zwei ROI gemessen wurden und somit der Vergleich der dritten ROI nicht gegeben war. Die dritte Messung wurde ebenfalls ausgeschlossen, da auch hier nur zwei ROI gemessen wurden. Die letzten Messungen wurden hier ebenfalls ausgelassen, da bei diesen Messungen nur die halbe Zelle gebleicht wurde.

Wenn man nun die verbliebenen Messungen betrachtet, fällt wie erwartet auf, dass ROI 1 die geringste Effizienz aufweist. Dies hat den Grund, dass dieses Gebiet nicht nur die Zelle beinhaltet, sondern auch 'toten Raum', in diesem Raum befinden sich keine fluoreszierende Punkte. Ein 'Ausreißer' ist hier die Zelle 3, dies hat wahrscheinlich den Grund, dass bei unserer Aufnahme das Gebiet aus zwei Zellen besteht und nicht nur aus einer.

Allgemein fällt noch auf, dass die Werte sehr klein sind, dies kann man darauf zurückführen, dass die Akzeptorbleichung nicht in der gewünschten Stärke (nach Anleitung sollten es mindestens 50% sein) bei unserem Versuch möglich war.

Bei den negativen Ergebnissen kann man davon ausgehen, dass der Bleichvorgang, keine Wirkung auf die Zelle hatte.

4.2 Donoremission nach Akzeptorbleichen

Eine deutlich höhere Effizienz hatte dabei allerdings der Bereich der Zellmembran ROI 2, da in diesem Bereich auch eine deutlich höhere Ansammlung an CFP und YFP Proben vorliegt, diese fluoreszieren können. Somit scheint die höhere Effizienz, im Gegensatz zur ROI 1, plausibel.

Laut Theorie sollte der größte Wert der Effizienz in der ROI 3 zu finden sein, da diese auch dementsprechend gewählt wurde. Allerdings ist dies nicht immer der Fall, dies lässt sich auf die Tatsache zurückführen, dass die ROI 'per Auge' von uns während dem Versuch ausgewählt wurde und somit nicht garantiert werden kann, dass es sich bei ROI 3 wirklich um das Gebiet mit der stärksten Bleichung handelt.

In dem folgenden Diagramm 4.4 wird die Fluoreszenzintensität des Donors und des S.E. Channels gegen die Zeit aufgetragen. Dies wird beispielhaft an einer Zelle (Zelle 03) dargestellt und nur für die ROI 1. Die grüne Linie beschreibt hierbei die Donorintensität. Diese Linie verläuft am Anfang beinahe horizontal, dies ist die Zeit vor dem Bleichen. Während dem Photobleaching hat die CFP Probe keine Intensität, da diese bei dem Bleaching (idealerweise) auch nicht bestrahlt wird. Es soll lediglich das Akzeptormolekül gebleicht werden. Nach der 'Lücke' ist die Linie wieder eine Gerade (parallel zur x-Achse), diese stellt den Zeitraum nach dem Bleaching dar.

Die blaue Linie in der Grafik zeigt die Sensitized Emission. Wie man erkennen kann, verläuft diese ebenfalls parallel zur x-Achse vor dem Bleaching, allerdings fällt auf, dass die Intensität der S.E. Probe deutlich höher liegt als die zu vergleichende Probe. Während dem Photobleaching steigt die blaue Linie sprunghaft an, dies ist plausibel, wenn man bedenkt, dass der Akzeptor mit voller Laser Intensität bestrahlt wird. Zuletzt sinkt die Linien wieder und setzt sich wieder als Gerade fort, da sich die Intensität nach dem Photobleaching nicht mehr großartig ändert.

Beide Intensitäten sind allerdings vor dem Bleaching höher als nachdem, dies entspricht den Erwartungen.

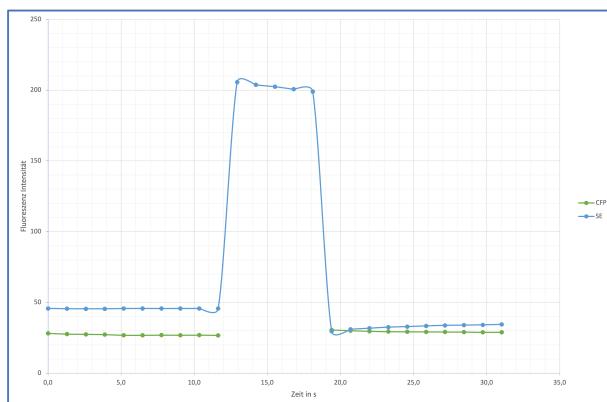


Abbildung 4.4: Grafik über die Fluoreszenz Intensität vor, während und nach dem Photobleaching über einen Zeitraum. Blau: Sensitized Emission; Grün: Donorintensität

4.2.2 CFP-Proben

Desweitern wurde die Akzeptorbleichung nur bei CFP-Proben aufgenommen, um einen Kontrollpunkt zu bekommen. Laut Theorie sollte es hier keinen Unterschied zwischen der Intensität vor und nach dem Bleichvorgang geben. Um dies zu untersuchen wird das folgende Verhältnis gebildet:

$$V_1 = \frac{D_{CY,pre}}{D_{CY,post}} \quad (4.13)$$

4 Auswertung

Die Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Zelle	ROI 1	ROI 2	ROI 3
1	1,02	0,99	1,00
2	1,03	1,02	1,09
3	1,02	1,01	1,01
4	1,01	1,01	1,05
5	1,02	1,02	0,97
6	1,00	1,01	1,02
8	1,00	1,03	0,98
9	1,03	0,89	1,04
10	1,03	0,03	1,04
11	1,00	1,03	1,01

Tabelle 4.4: Verhältnis der Donorintensitäten einer reiner CFP Probe vor und nach der Bleichung für 3 ROI für je 11 Zellen.

Wie man erkennt, stimmt die Theorie ziemlich gut mit dem Experiment überein, da die Werte nahe um 1 liegen. Das bedeutet, dass während dem Photobleaching zum größtenteils nur der Akzeptor gebleicht wurde.

4.2.3 YFP-Proben

Zuletzt wurde das Akzeptorbleichen auch auf reine YFP Proben angewendet. Hierbei wurde allerdings das Verhältnis der Akzeptorintensitäten vor und nach dem Bleaching betrachtet und ins Verhältnis versetzt.

$$V_2 = \frac{A_{YFP,post}}{A_{YFP,pre}} \quad (4.14)$$

Die Werte finden sich in der folgenden Tabelle:

Zelle	ROI 1	ROI 2
1	0,39	0,49
2	0,38	0,46
3	0,44	0,47
4	0,71	0,67
5	0,35	0,33
6	0,29	0,38

Tabelle 4.5: Verhältnis der Akzeptorintensitäten vor und nach dem Bleichvorgang einer reinen YFP Probe für 6 Zellen.

Theoretisch sollte die Intensität nach dem Photobleaching deutlich geringer ausfallen, also davor. Wie man erkennen kann, ist dies auch der Fall, allerdings fällt die Stärke des Photobleaching deutlich geringer aus als gefordert.

Zuletzt soll dieses Verfahren noch mit der vorangegangenen Methode verglichen werden. Die FRET-Effizienz Werte der Sensitized Emission liegen deutlich höher (vgl. Tabelle 4.2), als die Werte der FRET Effizienz der Akzeptorbleichung.

Ein generelles Problem, welches zu hohen Messunsicherheiten führt, ist das die ROI willkürlich während dem Versuch bestimmt werden. Ein Problem dieser Messmethode (Akzeptorbleaching) ist, dass nur ein Teil des YFP Moleküls gebleicht wird, wie die Tabelle 4.5 zeigt. Dies führt zu dieser großen Abweichung der FRET Effizienz zwischen den verschiedenen Messmethoden.

4.3 Lebenszeitmessungen

In diesem Versuchsteil soll die Lebenszeit von Zellen, die sich im angeregten Zustand befinden, ermittelt werden. Die Zellen sind dabei entweder mit CFP oder YFP bzw. mit CFP und YFP markiert. Der hierzu verwendete Laser ist ein gepulster 470 nm Laser mit einer Frequenz von 40 MHz. Zudem wurden noch zwei Avalanche-Photodioden mit entsprechenden Filterwürfeln benutzt. Wie dem Skript zu entnehmen ist, werden in Kanal 1 hauptsächlich CFP-Emissionen detektiert, wobei in Kanal 2 größtenteils YFP-Emissionen gemessen werden. Am Anfang des Versuchs wurde zunächst die instrument response function (kurz: IRF) gemessen. Dabei ergab sich folgendes Bild:

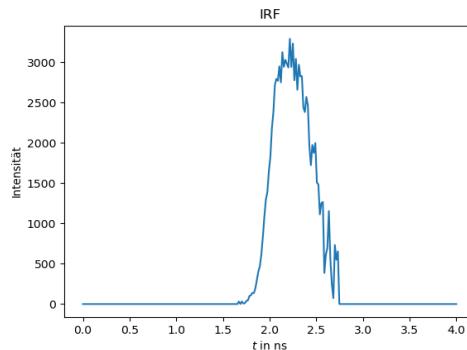


Abbildung 4.5: Im Experiment gemessene IRF

Anschließend wurde die Anzahl an detektierten Photonen über einem Zeitraum von ca. 2 Minuten gemessen und in Form eines Histogramms visualisiert. Das Histogramm einzelmarkierten Zellen wurde - im Bereich des exponentiellen Abfalls - durch einen single exponential fit genähert. Im Folgenden sind zwei Beispiele der daraus entstandenen Plots zu sehen.

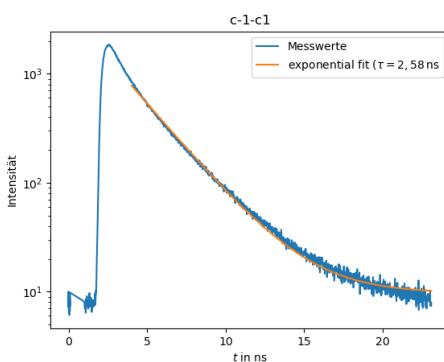


Abbildung 4.6: CFP-Signal in Kanal 1

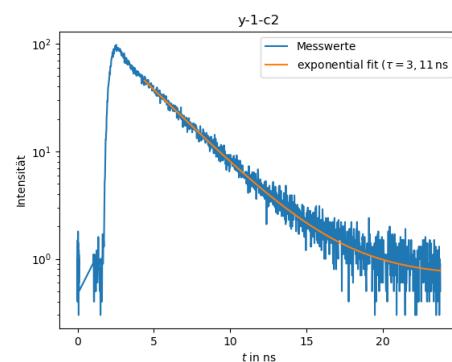


Abbildung 4.7: YFP-Signal in Kanal 2

Dadurch ergaben sich folgende Werte für die Lebenszeiten τ_{CFP} und τ_{YFP} :

	τ_{CFP} in ns	τ_{YFP} in ns
Messung Nr. 1	2,58	3,11
Messung Nr. 2	2,51	3,06
Messung Nr. 3	2,57	3,03
mittlere Lebensdauer	2,55	3,07

4 Auswertung

Für die Bestimmung der Lebenszeiten der doppelt markierten Zellen wurde ein double exponential fit mit folgendem Ansatz genutzt:

$$N(t) = A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad (4.15)$$

Eine kleine Auswahl der Plots sah wie folgt aus:

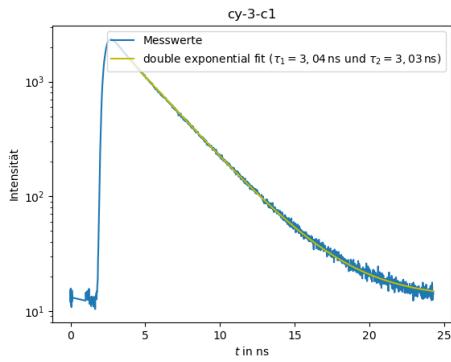


Abbildung 4.8: CFP/YFP-Signal in Kanal 1

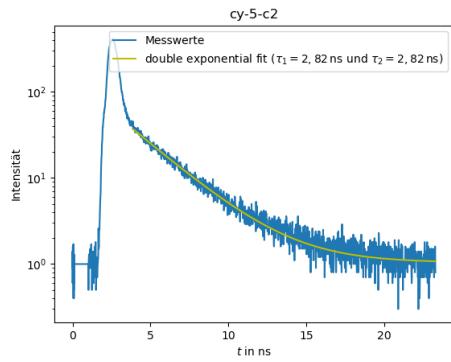


Abbildung 4.9: CFP/YFP-Signal in Kanal 2

Das Vorgehen zur Bestimmung der Lebenszeiten erfolgte analog zu oben und ergab folgende Werte:

	τ_{Kanal1} in ns	τ_{Kanal2} in ns
Messung Nr. 1	2,31	2,94
Messung Nr. 2	3,00	2,66
Messung Nr. 3	3,04	2,83
Messung Nr. 4	2,97	2,86
Messung Nr. 5	3,01	2,82
mittlere Lebensdauer	2,87	2,82

Hieraus lässt sich nun die FRET-Effizienz bestimmen:

$$E = 1 - \frac{\tau_{CFP, FRET}}{\tau_{CFP, no FRET}} = -0,13 \quad (4.16)$$

Es fällt sofort auf, dass die Lebenszeit ohne FRET kleiner ist, als die Lebenszeit mit FRET, was zu einer negativen FRET-Effizienz führt und das wiederum ist physikalisch nicht möglich.

Im letzten Abschnitt dieses Versuchsteils soll die Messkurve durch eine Faltung der IRF mit einem exponential fit angenähert werden.

Hierbei ergab sich folgendes Bild:

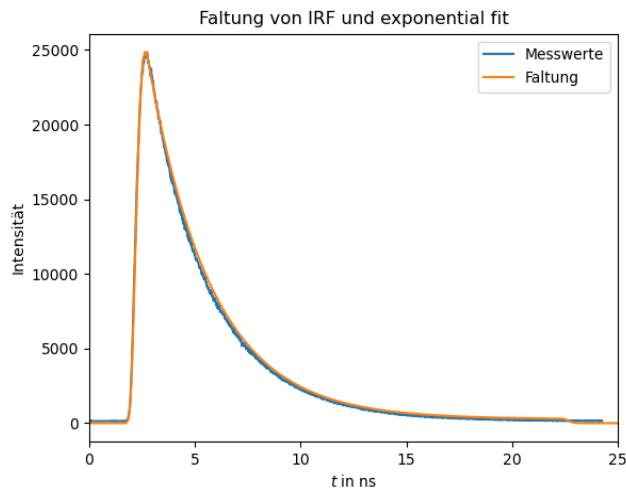


Abbildung 4.10: Faltung der genäherten Exponentialfunktion mit der im Experiment ermittelten IRF

Anschließend wird die Exponentialfunktion noch mit einem Gauß-Fit der IRF gefaltet. Für den Gauß-Fit ergaben sich eine Standardabweichung von $\sigma = 0,21 \text{ ns}$ und ein Erwartungswert von $\mu = 2,26 \text{ ns}$, woraus sich folgender Graph bestimmen ließ:

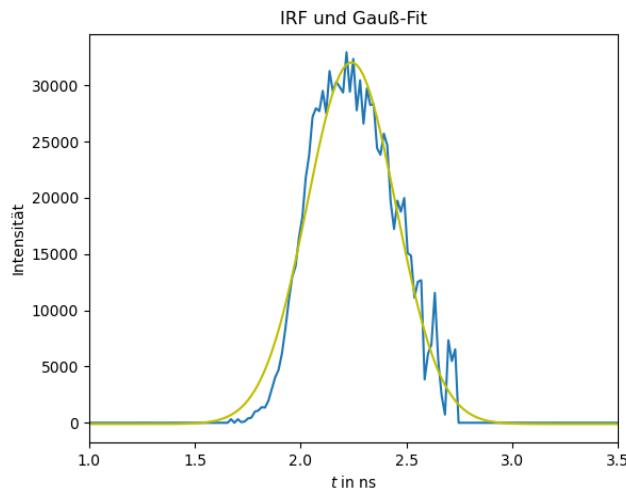


Abbildung 4.11: Durch Gauß-Funktion genäherte IRF

4 Auswertung

Durch die Faltung mit Gauß-Funktion und IRF entstand dieses Bild:

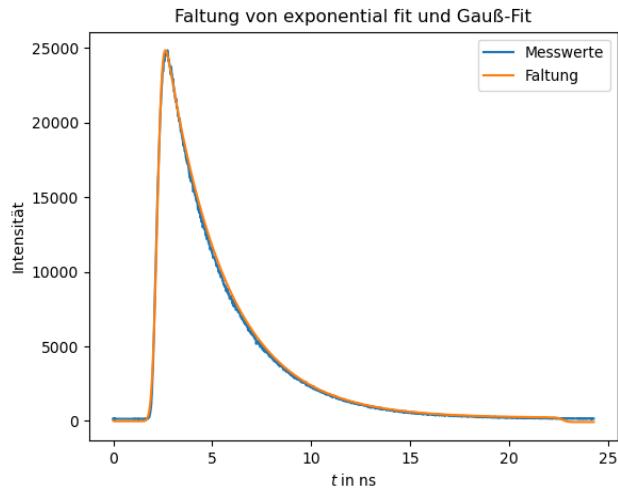
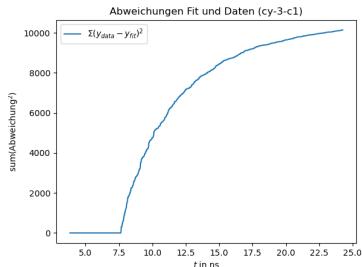


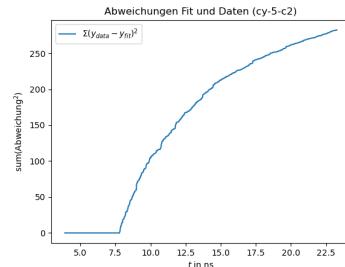
Abbildung 4.12: Faltung von Gauß- und Exponentialfunktion

Die durch Faltung entstandene Funktion musste in beiden Fällen noch normiert werden, da bei der Faltung die Vorfaktoren - der miteinander gefalteten Funktionen - multipliziert wurden und die Faltung somit einige Größenordnungen über den Messwerten lag. Es fällt sofort auf, dass sich die Faltungen sehr gut an die Messkurve annähern und sich das Messsignal somit, durch die Faltung, ziemlich genau rekonstruieren lässt.

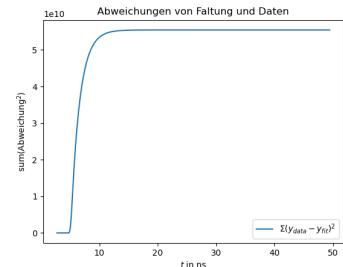
4.3.1 Abweichungen von Daten und Fits



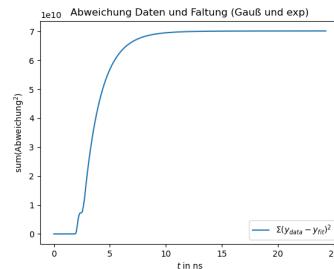
(a) Abweichung von Messwerten und Fit (cy-3-c1), berechnet mit `np.cumsum((ydata - yfit)2)`



(b) Abweichung von Messwerten und Fit (cy-5-c2), berechnet mit `np.cumsum((ydata - yfit)2)`



(c) Abweichungen von Faltung (IRF und Exp.) und Daten, berechnet mit `np.cumsum((ydata - yfit)2)`



(d) Abweichungen von Faltung (IRF und Gaußfkt.) und Daten, berechnet mit `np.cumsum((ydata - yfit)2)`

Abbildung 4.13: Graphen der Summen der Abweichungen von Messwerten und Fits

5 Fazit

Dieser Versuch hat uns einen kleinen Einblick in die Biophysik und ihre Methoden gegeben. Wir haben uns hierzu den Förster-Resonanzenergietransfer und seine Theorie genauer angeschaut. Bei den Messungen haben wir das erste Mal mit einem Konfokalmikroskop gearbeitet.

Wir haben die Effizienz des FRET auf drei unterschiedliche Arten berechnet. Hierbei erhielten wir einen Einblick in das Bleichen von Farbmolekülen und die Fluoreszenz-Messung. Aus den erhaltenen Werten, kann man folgenden Vergleich anstellen:

$$E_{SE} > |E_{FLIM}| \approx E_{BL} \quad (5.1)$$

Die Messungen der Sensitized Emission wurden vor der Mittags-Pause gemacht. Dies könnte eine Erklärung sein, warum dort die Effizienz viel größer ist, als bei den danach erfolgten Messungen. Die bestimmte FRET-Effizienz bei der 'Lebenszeitmessung' liegt in der gleichen Größenordnung, wie die des 'Akzeptorbleichens'. Warum aber die FRET-Effizienz bei der 'Lebenszeitmessung' negativ ist uns unklar.

A Tabellen

A.1 Korrekturfaktoren

Messung der CFP-markierten Zellen:

Zelle	D _{CFP}	S _{CFP}	A _{CFP}	BF-D _{CFP}	BF-S _{CFP}	BF-A _{CFP}	β
1	71,435	16,380	3,317	4,715	2,462	3,335	0,17129222
2	50,114	11,911	3,082	4,741	2,415	3,116	0,20928746
3	29,349	7,335	3,189	5,351	2,581	3,399	0,19809984
4	24,455	6,537	2,885	4,645	2,451	3,146	0,20625946
5	23,075	6,219	2,597	4,170	2,364	2,606	0,20391431
6	41,012	10,170	2,699	4,363	2,376	2,497	0,2126661
7	47,854	11,746	2,531	4,311	2,384	2,476	0,21500586
8	40,561	9,786	2,458	4,053	2,317	2,425	0,20458530
9	51,318	12,454	2,459	4,244	2,380	2,299	0,21400348
10	69,534	16,755	2,480	3,986	2,360	2,343	0,21961006
11	46,734	11,225	2,450	3,986	2,360	2,343	0,20737812
12	48,247	11,384	2,328	3,912	2,335	2,308	0,20410511
13	18,105	5,200	2,317	3,789	2,291	2,276	0,20319922
14	69,828	16,105	2,42	3,865	2,316	2,244	0,20904143
15	20,017	5,579	2,305	3,865	2,316	2,244	0,20201833
16	22,024	6,239	2,317	3,785	2,316	2,258	0,21508855
17	51,173	12,196	2,343	3,792	2,364	2,262	0,20750934
18	64,063	15,505	2,403	3,721	2,327	2,262	0,21838852
19	37,118	9,266	2,282	3,681	2,270	2,262	0,2092293
20	9,847	3,624	2,317	3,695	2,296	2,275	0,21586476

Tabelle A.1: Messung für Korrekturfaktoren der CFP-markierten Zellen

A Tabellen

Messung der YFP-markierten Zellen:

Zelle	D _{YFP}	S _{YFP}	A _{YFP}	BF-D _{YFP}	BF-S _{YFP}	BF-A _{YFP}	α	γ	δ
1	4,625	22,686	42,099	3,804	2,348	2,376	0,02066813	0,51199557	0,04036778
2	4,641	34,437	55,810	3,070	2,385	2,414	0,02942168	0,60026968	0,0490141
3	5,131	32,027	56,069	4,376	2,353	2,468	0,01408556	0,55360907	0,02544315
4	4,377	17,921	28,763	3,805	2,327	2,402	0,02169872	0,59155571	0,03668077
5	5,560	49,381	87,656	4,486	3,453	3,955	0,01283139	0,54871507	0,02338443
6	5,982	42,238	74,403	4,099	2,751	3,075	0,02639917	0,55359747	0,04768658
7	4,386	12,658	21,546	3,583	2,433	2,516	0,04219653	0,53730951	0,07853301
8	4,537	18,526	33,447	3,844	2,317	2,305	0,02225291	0,52048680	0,04275403
9	4,388	8,998	13,893	3,852	2,322	2,300	0,04623480	0,57586475	0,0802876
10	4,267	7,711	11,277	3,886	2,344	2,318	0,04252707	0,5990624	0,07098938
11	4,002	7,488	11,344	3,649	2,421	2,370	0,03933586	0,56463116	0,06966647
12	3,967	6,660	9,651	3,625	2,302	2,272	0,04634774	0,59059493	0,07847637

Tabelle A.2: Messung für Korrekturfaktoren der CFP-markierten Zellen

A.2 SE und FRET Effizienz

Wertetabelle der Messung an CFP/YFP markierten Zellen:

Zelle	D _{CY}	S _{CY}	A _{CY}	Sensitized Emission	FRET Effizienz
1	12,244	7,725	9,025	5,18691885	0,49342845
2	49,808	23,409	18,610	13,0835367	0,42973668
3	7,828	13,702	20,122	12,0800542	0,96251588
4	29,494	21,584	27,763	15,4703842	0,54063115
5	24,546	15,474	17,359	10,3858137	0,5031388
6	42,033	37,699	48,595	28,9868398	0,64137183
7	12,831	19,246	30,310	16,5871733	0,84110296
8	17,101	30,115	42,751	26,5717226	0,98273363
9	13,669	13,400	19,007	10,5669283	0,65557684
10	14,106	12,872	17,882	9,94827444	0,62637984
11	118,329	87,051	81,481	62,5234049	0,63674985
12	12,263	15,162	20,543	12,6206028	0,79515135
13	30,700	28,128	35,558	21,7648752	0,65874651
14	85,370	39,175	33,255	21,4772655	0,40308614
15	27,971	27,874	36,089	22,0766976	0,69485260
16	31,314	29,640	39,264	23,1496922	0,66020480
17	23,117	18,629	20,705	13,8373739	0,63248513
18	11,466	10,239	13,723	7,86244379	0,62679721
19	14,141	12,085	15,037	9,15395144	0,62775177
20	29,000	15,978	18,653	9,95348719	0,42750202
21	19,492	11,426	11,850	7,38539461	0,48594412

Tabelle A.3: Wertetabelle der Sensitized Emission und FRET-Intensität

A.3 Sensitised Emission

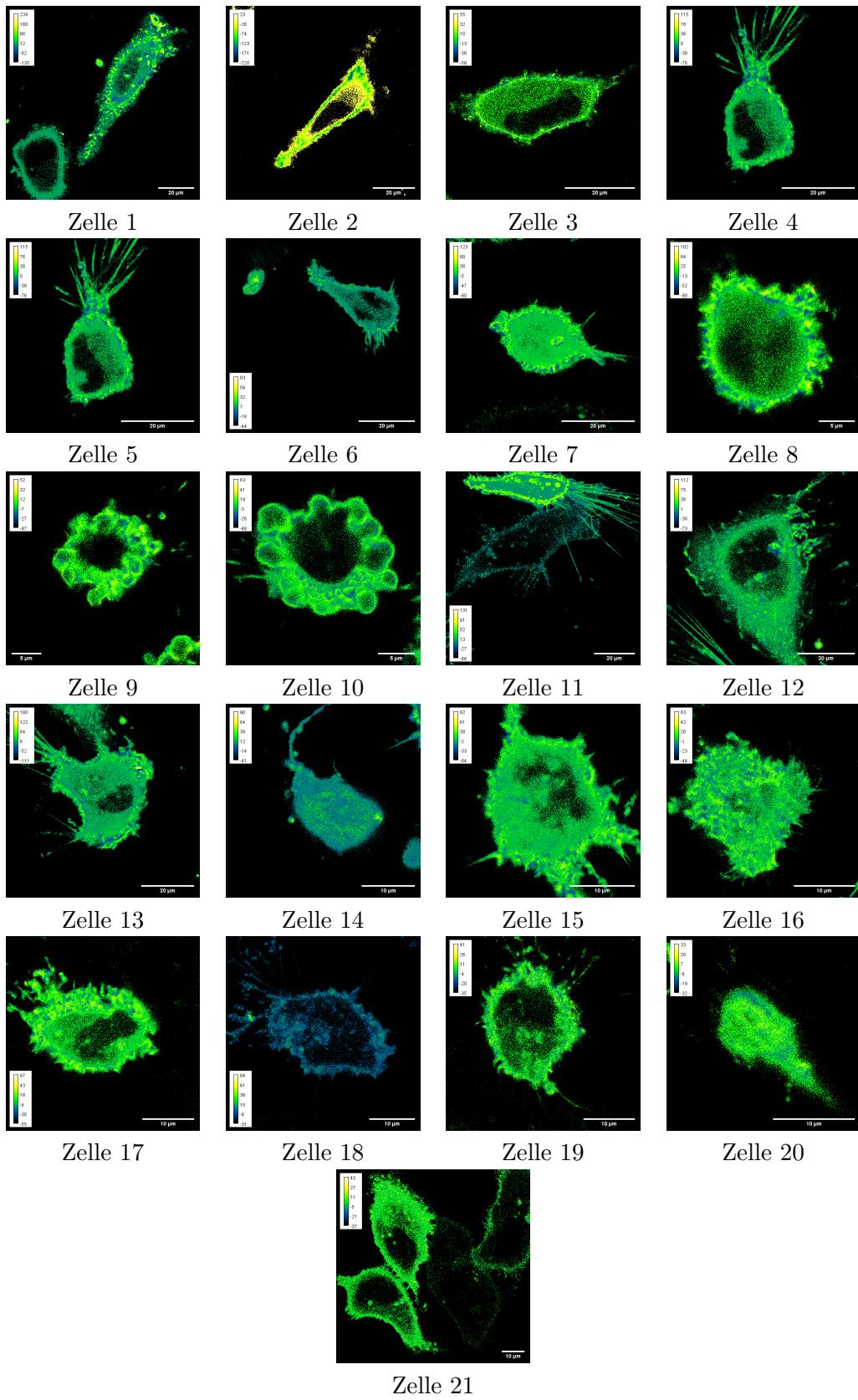


Tabelle A.4: Bilder Sensitised Emission

A.4 FRET-Effizienz

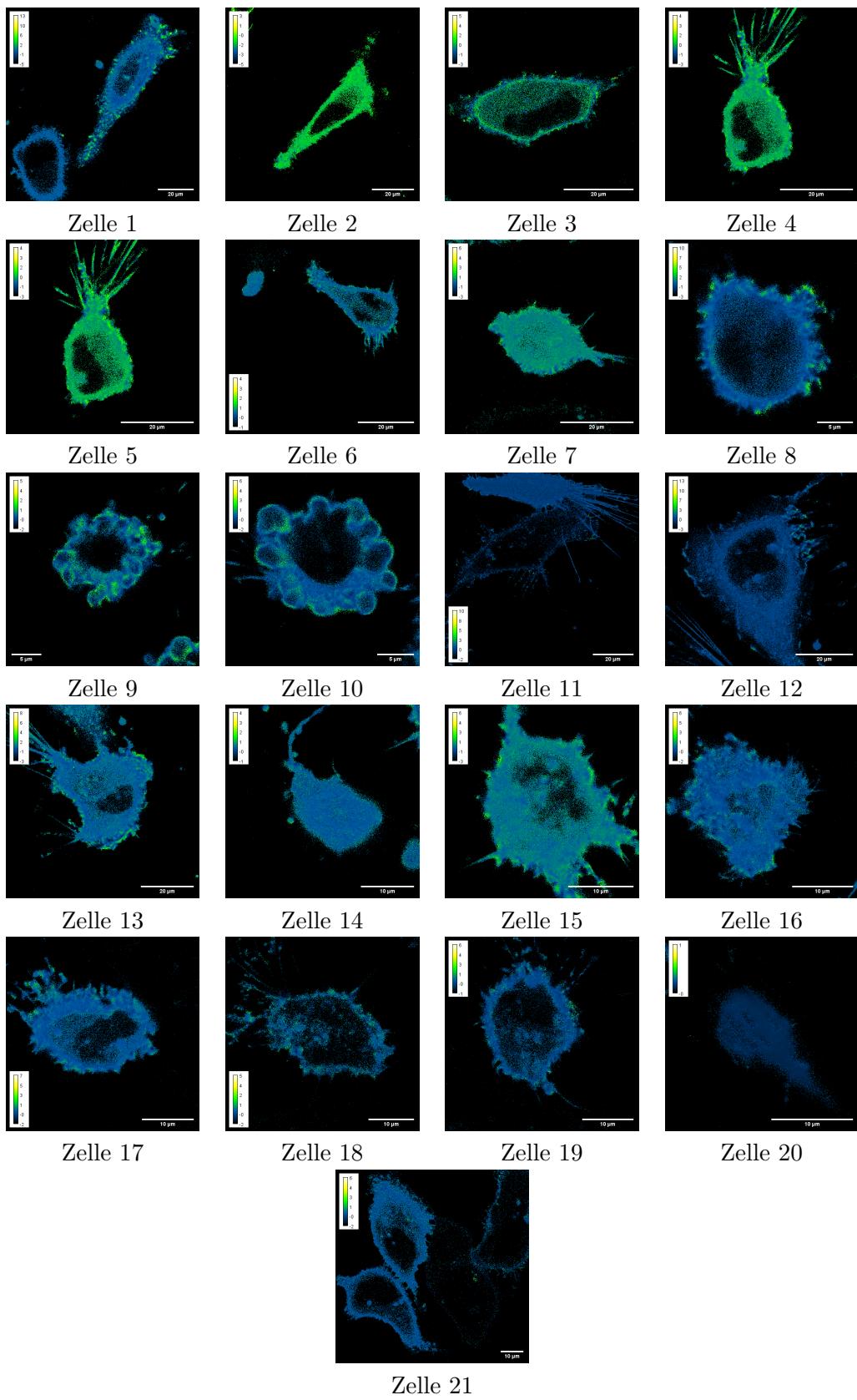


Tabelle A.5: Bilder FRET Effizienz

Literaturverzeichnis

CHEMIE.DE 2021 Försterradius. URL <https://www.chemie.de/lexikon/Fürster-Radius.html> – Zugriffsdatum: 06.09.2021.

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN aufgerufen 2021 Zeitkorrelierte Einzelphotonenmessung. URL <http://makulatur.github.io/docs/FPR/Zeitkorrelierte%20Einzelphotonenzaehlung.pdf> – Zugriffsdatum: 04.09.2021.

PHYSIKCOSMOS-DIREKT 2021 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung. URL https://physik-cosmos-indirekt.de/Physik-Schule/Zeitkorrelierte_Einzelphotonenzählung – Zugriffsdatum: 04.09.2021.

PORPHYRIN 2017 Why does the förster resonance energy transfer scale as $1/r^6$? URL [https://chemistry.stackexchange.com/questions/5015/why-does-the-förster-resonance-energy-transfer-scale-as-1-r⁻⁶](https://chemistry.stackexchange.com/questions/5015/why-does-the-förster-resonance-energy-transfer-scale-as-1-r^{-6}) – Zugriffsdatum: 06.09.2021.

VERSUCHSANLEITUNG 2018 Fret an biologischen proben. Internes Dokument, Experimentalphysik I, Universität Bayreuth.

WAHL, MICHAEL 2014 Time-correlated single photon counting. Technical Note, PicoQuant.

WIKIPEDIA 2021 Photobleichung. URL <https://de.wikipedia.org/wiki/Photobleichung> – Zugriffsdatum: 04.09.2021.