

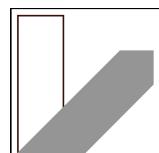
WS2021

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 Photobleichung	7
2.3 Konfokalmikroskop	7
3 Methodik	9
3.1 Aufbau	9
3.1.1 Versuchsanordnung	9
3.1.2 Aufnahmen der Sensitized Emission	9
3.1.3 Donoremission nach Akzeptorbleichen	9
3.1.4 Lebensdauermessungen	9
4 Auswertung und Diskussion	10
4.1 Sensitized Emission	10
4.1.1 Bestimmung der Korrekturfaktoren	10
4.1.2 Sensitized Emission und Förstereffizienz	13
4.2 Bestimmung der Förstereffizienz über Bleichung der Akzeptoren	19
4.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)	24
4.3.1 Lebenszeit von CFP und YFP	24
4.3.2 Lebensdauer mit FRET	25
4.3.3 Impulsantwort	27
5 Fazit	32
A Anhang	33
A.1 FLIM	33
A.2 Protokoll	35
Literaturverzeichnis	42

1 Einleitung

In diesem Versuch behandelt eine Art des Energietransfers zwischen einem Akzeptor und Donor, welcher strahlungslos geschieht, den Förster-Resonanzenergietransfer, kurz FRET. Um diesen Effekt an Zellen zu untersuchen verwenden wir ein Konfokalmikroskop. Dieses Mikroskop unterschiedet sich von klassischen Mikroskopen dadurch, dass es nicht die gesamte Probe auf ein Mal beleuchtet. Mit Hilfe dieses Mikroskopes kann man die Membran der Zellen sichtbar machen. Der Versuch ist insofern interessant, weil er Einblick in eine vielseitig einsetzbare Methode gibt. In großen Bereichen der Biophysik sowie beim Untersuchen organischer Stoffe kann dies sehr hilfreich sein. Des Weiteren ist FRET ein Prozess, der in vielen anderen Themenfeldern hochinteressant ist. In der Halbleitertechnik spielt er im Bereich der organischen Leuchtdioden eine entscheidende Rolle. Außerdem ist der bei der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, der Analyse von Protein-Konformationsänderungen und Polymerasekettenreaktion sehr wichtig. Daher ist es hilfreich diesen Effekt einmal näher zu betrachten.

2 Grundlagen

2.1 FRET

Förster-Resonanzenergietransfer ist ein Prozess des Energietransfers. Dabei gibt es einen 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. Zunächst müssen sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen wie in Abbildung 2.1 zu sehen.

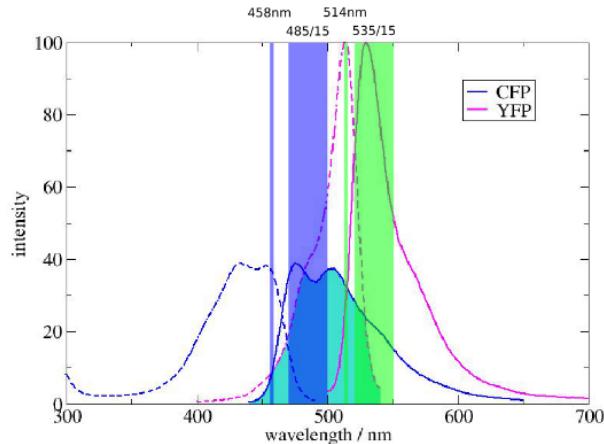


Abbildung 2.1: Emissionsspektrum/Absorptionsspektrum von CFP/YFP
(EPI (2018))

Sollte dies der Fall und der Abstand zwischen Akzeptor und Donor 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 $E = 1/2$ ist für $r = R_0$. Das ist auch die Definition des

2.2 Photobleichung

Försterradiuses: Die Hälfte der einfallenden Photonen, die vom Donor absorbiert werden, werden über FRET auf den Akzeptor übertragen.

Der Försterradius liegt normalerweise im Nanometerbereich, 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. Außerdem ist der Prozess stark orientierungsabhängig, da Dipole dies auch sind.

2.2 Photobleichung

Die Photobleichung ist ein Prozess, bei dem die Fluoreszenzeigenschaften eines Fluorophors vollständig verloren gehen. Dies geschieht, indem man das Fluorophor mehrfach anregt. Ein Fluorophor hat eine durchschnittliche Anzahl an Anregungs- und Emissionszyklen. Bei zu häufiger Anregung wird das Fluorophor inaktiviert, indem es im Molekül zu einer photochemischen Reaktion kommt. Dabei kann ein Elektron, was auf eine höhere Schale gehoben wurde, zu irreversibel kovalenten Änderungen am Fluorophor führen (Song *et al.* (1995)).

2.3 Konfokalmikroskop

Ein Konfokalmikroskop (siehe Abb. 2.2) ist ein Mikroskop, was im Gegensatz zum klassischen Mikroskop nicht die gesamte Probe beleuchtet. Stattdessen beleuchtet es Punktweise die Probe mit einem Laserstrahl. Danach detektiert man die zurückfallende Strahlung, beispielsweise bei Fluorophoren die Fluoreszenz. Diese wird durch eine Lochblende geführt, sodass bei kleiner Blendenöffnung nur Punkte in einer bestimmten Ebene angezeigt werden. Bei größerer Blende ist die Lichtstärke höher, die betrachtete Ebene ist aber auch tiefer.

Bei diesem Mikroskop entsteht also zu keinem Zeitpunkt ein vollständiges Bild. Es eignet sich besonders zum untersuchen biologischer Proben. Dabei versetzt man diese mit einem fluoreszenten Protein, welches den entsprechenden Arealen anhaftet, und mikroskopiert dieses dann. Dadurch kann man deutlich kontrastreichere Bilder aufnehmen und beispielsweise Membrane sichtbar machen.

2 Grundlagen

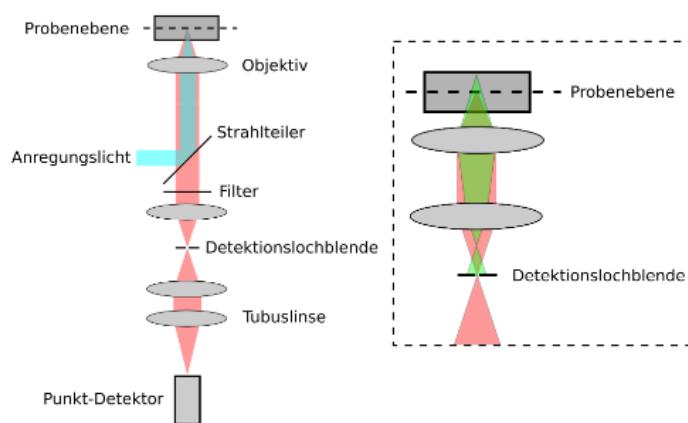


Abbildung 2.2: Skizze eines Konfokalmikroskops und Prinzip der selektiven Detektion (EPI (2018))

3 Methodik

3.1 Aufbau

3.1.1 Versuchsanordnung

Verwendet wird ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica SP5 II) mit einer Pico Harp 300-Einheit zur Durchführung von zeitkorrelierten Einzelphotonenmessungen. Beim Anregen verwendet man für die ersten beiden Versuchsteile einen Argon-Ionen-Laser und einen gepulsten 470nm-Laser für die Lebensdauermessung. Auf dem Mikroskop befindet sich ein Öl-Immersionsobjektiv (63x Vergrößerung, NA=1,40). Detektiert wird mit einem Photomultiplier (PMT) mit variabler spektraler Selektion (EPI (2018)). Genauereres kann man im angehängten Protokoll nachschlagen.

3.1.2 Aufnahmen der Sensitized Emission

Um FRET nachzuweisen muss man bei diesem Versuchsteil mehrere Kanäle betrachten. Dazu nimmt man Bilder in Kanal 1/2 bei 470-500 nm/520-550 nm auf und dies von einer YFP, einer CFP und einer YFP/CFP Probe. Dabei werden für jede Zelle immer drei Bilder aufgenommen: Anregung und Detektion des Donor, Anregung und Detektion des Akzeptors und Anregung des Donors und Detektion des Akzeptors.

3.1.3 Donoremission nach Akzeptorbleichen

In diesem Versuchsteil werden die Proben jeweils 12 Frames gebleicht. Währenddessen wird mit Kanal 1 und 2 eine Bilderreihe aufgenommen von dem Zeitraum von vor bis nach der Bleichung. Danach wird ein Areal ausgewählt (siehe Abb. 4.4) und aus diesem werden wir dann die Emissionsraten auftragen und exportieren.

3.1.4 Lebensdauermessungen

Zuerst misst man an CFP und YFP die Lebenszeit, indem man mit dem gepulsten 470nm Laser bei 40 MHz anregt und dann die Zeit misst, bis ein Photon zurück kommt. Wenn man die Lebensdauer dann in ein Histogramm aufträgt, kann man dies mit dem Programm fitten.

Danach verfährt man ebenso bei der CFP/YFP Probe. Bei dieser nimmt man sowohl auf Kanal 1 (488-505 nm) und 2 (535-585 nm) auf.

4 Auswertung und Diskussion

4.1 Sensitized Emission

4.1.1 Bestimmung der Korrekturfaktoren

Da es aufgrund des Crosstalks nicht möglich ist, zur Bestimmung der Förstereffizienz E alleine den SE-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 SE-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. 4.1. 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/>

4.1 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 4.1: 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.4.2 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 4.2: 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. 4.3. 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 Hintergrundsintensität 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

4 Auswertung und Diskussion

Intensitäten, 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. Auch ist die höhere Standardabweichung bei der Berechnung über die gesamte Zelle nicht verwunderlich, da durch unterschiedliche Membran-Zellinneres-Verhältnisse in der ausgewählten ROI ein unterschiedlicher Anteil an Bereichen mit geringer Intensität für die verschiedenen Zellen vorliegt. Dies resultiert in einer stärkeren Schwankung von γ . Dass die Standardabweichung für die Intensitäten der ROIs mit Hintergrundkorrektur höher ist als die für die ohne, könnte an der Benutzung des Thresholds liegen, der einen Eingriff in die natürliche Verteilung der Intensitäten darstellt.

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 4.3: Mittelwerte und Standardabweichungen für die verschiedenen Werte von γ .

Analog 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. Die berechneten Werte finden sich in Tab. 4.4 wieder.

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

4.1.2 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 Abschnitt 4.1.1 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

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

Die berechneten Werte sind in Tab. 4.5 zu finden.

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 4.5: 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 $R_0 = 4,92$ nm (Patterson *et al.* (2000)). Der Zusammenhang zwischen Förstereffizienz E , Försterradius R_0 und Abstand der Fluorophore r lautet

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

4 Auswertung und Diskussion

(Zürn (2009), S.21).

Damit ergeben sich für die Zellen die mittleren Abstände, die in Tab. 4.6 zu sehen sind. Diese liegen auch in dem Bereich von 1-10 nm, der notwendig ist, um einen messbaren FRET zu beobachten. (Zürn (2009), S.20)

Zelle	E	r / nm
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 4.6: 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. 4.1 - 4.3 wieder. In diesen ist deutlich abgesetzt und heller die Membran der Zellen zu erkennen. Dies ist nicht verwunderlich, da das verwendete Protein, an das die CFP und YFP binden, selbst an der Membran gebunden ist. Trotzdem sind auch vereinzelte Werte größer als 1 oder kleiner als 0 erkennbar, die es in der Theorie nicht geben sollte. Diese könnten durch Rechenfehler entstanden sein oder durch die Tatsache, dass die einzelnen Pixel nur sehr kleine Bereiche darstellen, deren Intensitäten bisweilen zeitlich zu sehr schwanken, um sinnvolle Ergebnisse zu liefern.

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 Tab. 4.7 zu finden sind.

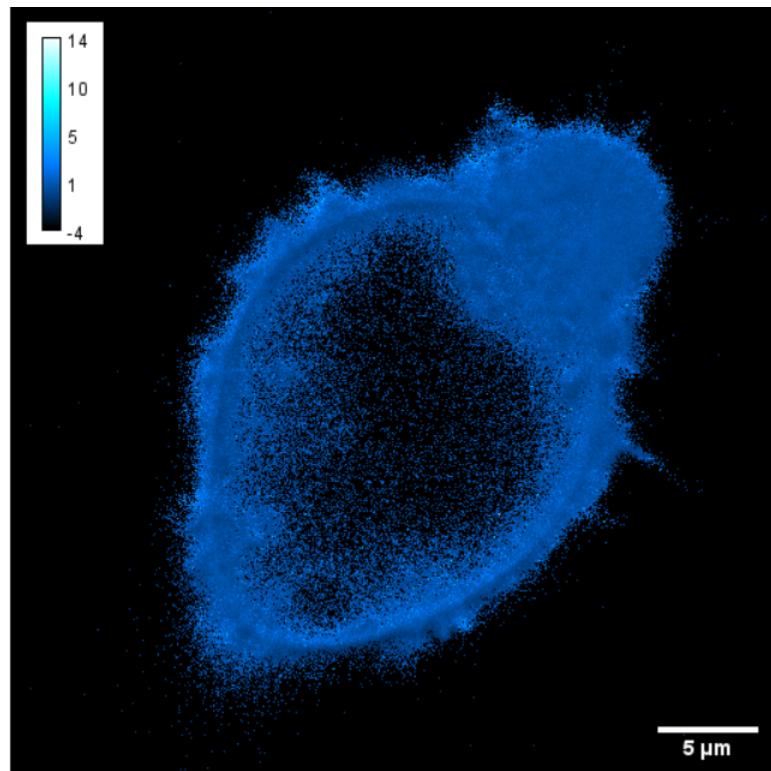
Zelle	$E_{\text{aus Mittelung}}$	$E_{\text{pixelweise}}$
2	0,379	0,413
10	0,135	0,329
13	0,0873	0,370

4.1 *Sensitized Emission*

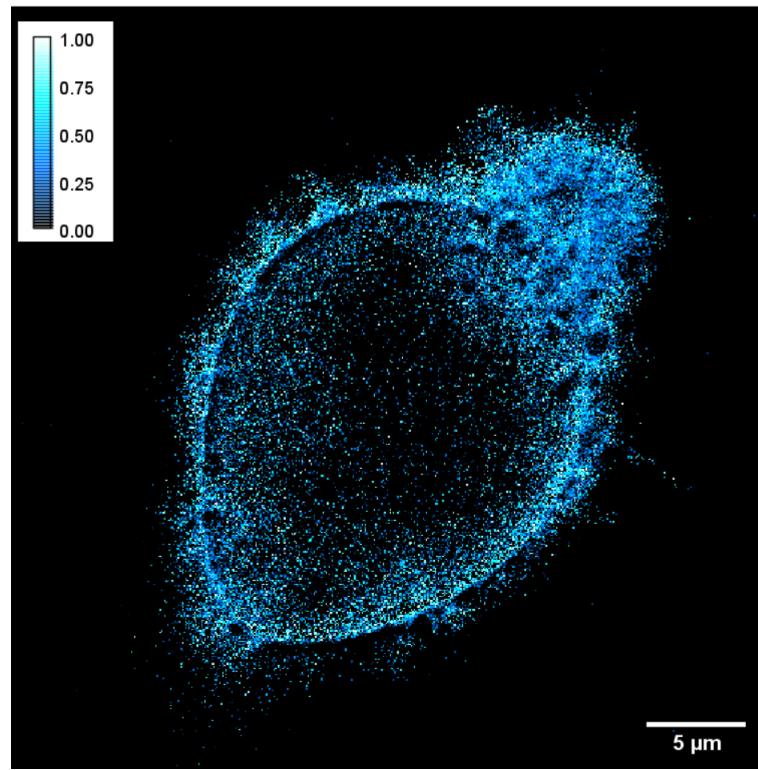
Tabelle 4.7: Förstereffizienz E für drei ausgewählte Zellen berechnet einmal über die Mittelung der Intensitäten und einmal über die pixelweise Berechnung von E und darauffolgender Mittelung

Dabei ist festzustellen, dass die Werte teilweise deutlich voneinander abweichen. Ein gewisser Fehler ist zu erwarten, da es einen Unterschied macht, wo genau in der Rechnung gemittelt wird. Ob dieser dennoch so groß ist darf angezweifelt werden. Trotz dessen sind alle Werte für E durchaus plausibel.

4 Auswertung und Diskussion



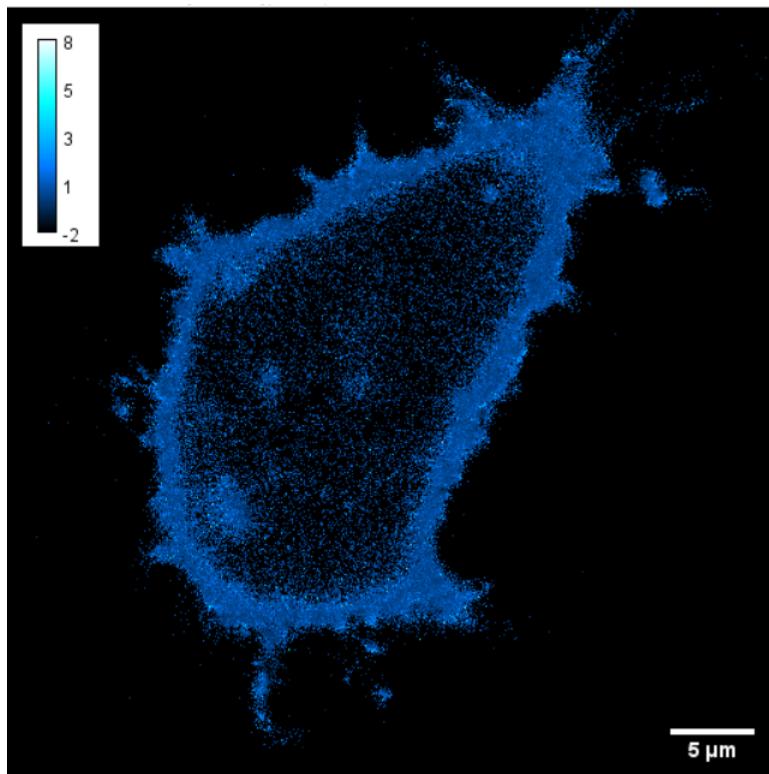
(a) ohne Threshold



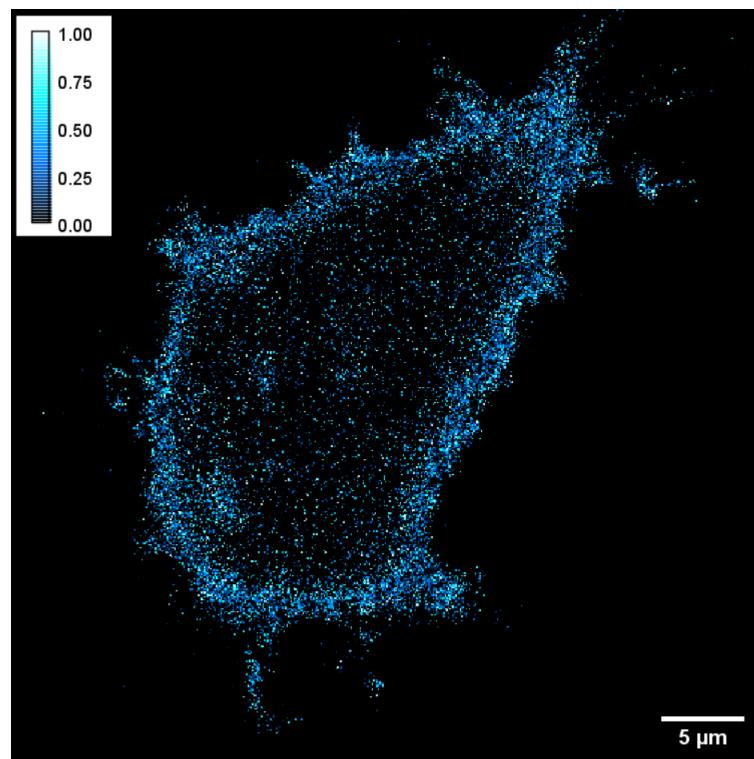
(b) mit Threshold

16 Abbildung 4.1: 2D-Plot der Förstereffizienz E von Zelle 2, pixelweise berechnet.

4.1 Sensitized Emission



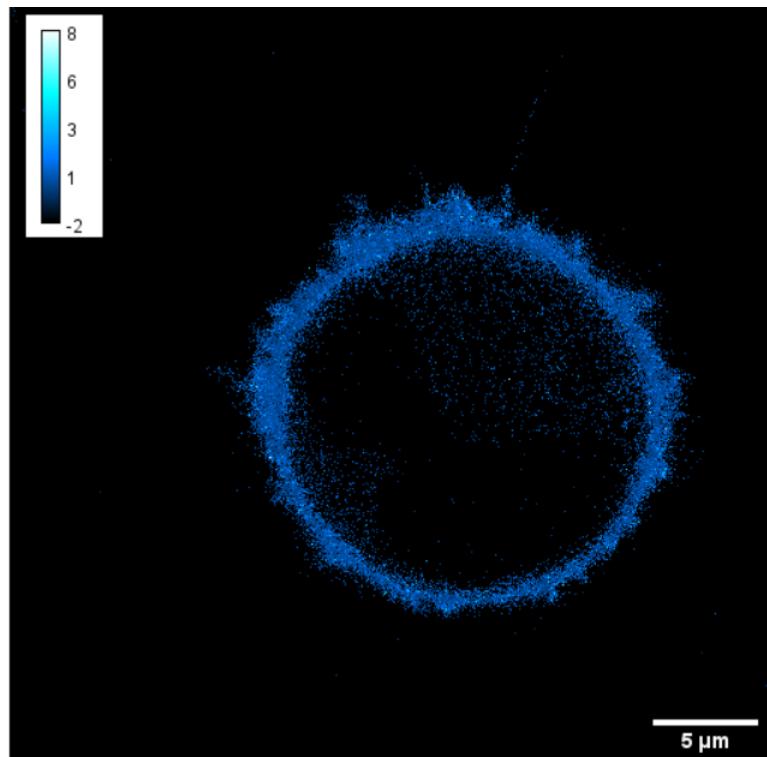
(a) ohne Threshold



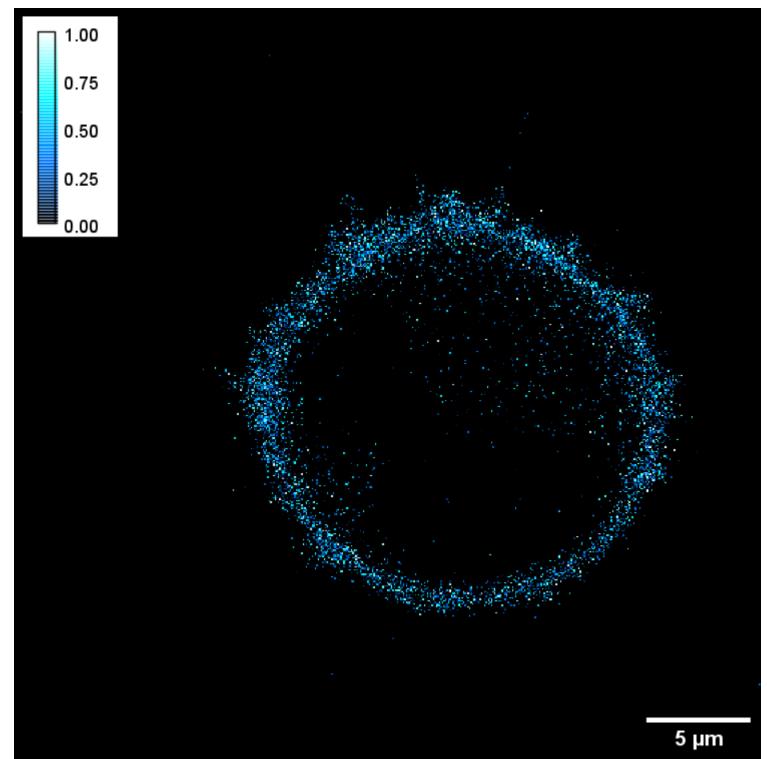
(b) mit Threshold

Abbildung 4.2: 2D-Plot der Förstereffizienz E von Zelle 10, pixelweise berechnet.

4 Auswertung und Diskussion



(a) ohne Threshold



(b) mit Threshold

Abbildung 4.3: 2D-Plot der Förstereffizienz E von Zelle 13, pixelweise berechnet.
18

4.2 Bestimmung der Förstereffizienz über Bleichung der Akzeptoren

4.2 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. 4.4 ist so eine Zelle dargestellt. Dabei ist die ROI1 in Grün, ROI2 in Violett und ROI3 in Orange dargestellt. In Abb. 4.5 und Abb. 4.6 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.

Eine Abschätzung der Förstereffizienz E ergibt sich laut S.9 des Praktikumskripts nach

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

wobei $D_{\text{CY,pre}}$ und $D_{\text{CY,post}}$ die Intensitäten im Donorkanal vor bzw. nach dem Bleichen sind. Für die Intensitäten werden die Mittelwerte für jede Zelle über die entsprechenden Messpunkte vor und nach dem Bleichen berechnet. Diese Werte und die daraus resultierenden Werte für E finden sich in Tab. 4.8.

Nr	$D_{\text{pre,ROI1}}$	$D_{\text{post,ROI1}}$	$D_{\text{pre,ROI2}}$	$D_{\text{post,ROI2}}$	$D_{\text{pre,ROI3}}$	$D_{\text{post,ROI3}}$	E_{ROI1}	E_{ROI2}	E_{ROI3}
1	16,235	15,317	33,497	34,979	77,237	90,776	-0,060	0,042	0,149
2	13,066	14,249	63,486	78,032	76,281	161,321	0,083	0,186	0,527
3	10,776	11,753	37,788	56,380	28,369	95,764	0,083	0,330	0,704
4	16,744	19,713	49,572	60,298	93,544	128,803	0,151	0,178	0,274
5	24,869	27,825	78,394	99,958	89,080	163,331	0,106	0,216	0,455
6	14,541	16,041	44,807	51,012	76,670	101,924	0,093	0,122	0,248
7	20,765	23,984	71,346	86,995	102,374	133,280	0,134	0,180	0,232
8	19,589	22,940	49,402	60,320	53,432	99,013	0,146	0,181	0,460
9	24,573	31,952	60,412	87,938	74,175	109,517	0,231	0,313	0,323
10	15,758	17,943	54,063	63,678	139,174	173,205	0,122	0,151	0,196
11	15,759	17,894	64,824	78,855	96,956	128,896	0,119	0,178	0,248

4 Auswertung und Diskussion

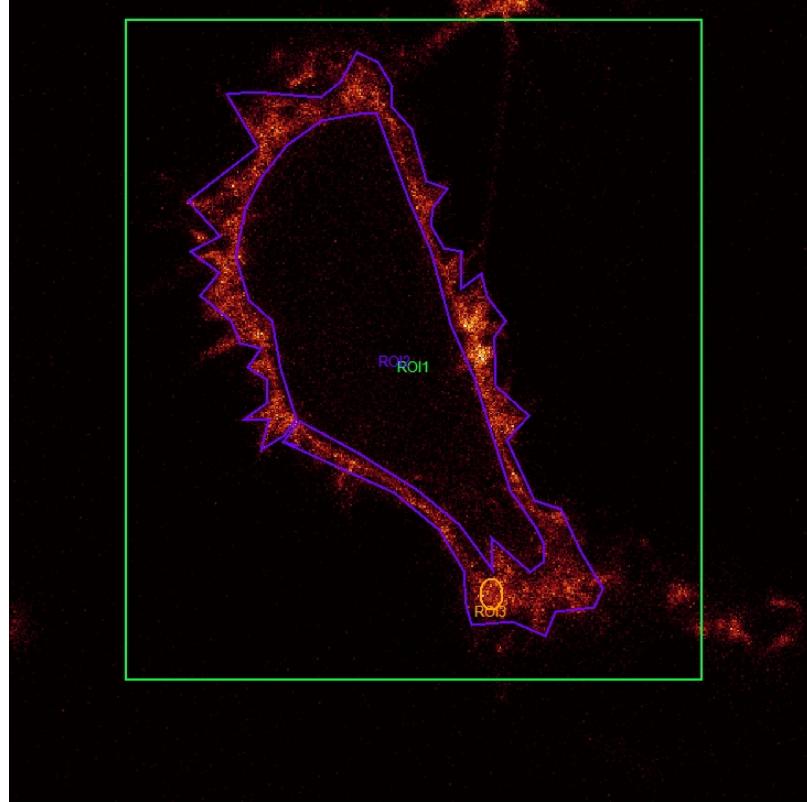


Abbildung 4.4: Bild einer gebleichten Zelle mit CFP und YFP. Dabei sind die ROIs, in denen die Intensitäten gemessen wurden eingezeichnet.

Tabelle 4.8: Werte für die mittleren Intensitäten des Donorkanals vor und nach dem Bleichprozess für die verschiedenen ROIs und die daraus berechneten Förstereffizienzen für Zellen mit CFP und YFP

Nachdem ROI1 nicht nur die Zellmembran enthält, sollten die Werte für E dort nicht sehr genau sein. Für Zelle 1 ist sogar ein negativer Wert zu erkennen. Die Werte von ROI2 und ROI3 unterscheiden sich auch deutlich; letzterer ist in der Regel deutlich höher. Das liegt daran, dass die Dichte der Fluorophore nicht gleichmäßig über die Membran verteilt ist. E in ROI2, der kompletten Membranregion, stellt also gewissermaßen einen Mittelwert für die Membran da. Dagegen wurde für ROI3 ein besonders heller Fleck im Bild ausgesucht, das heißt ein Ort mit hoher Intensität, was einer höheren Förstereffizienz entspricht. Man könnte den Wert für E in ROI3 also als eine Art maximale Förstereffizienz in dieser Zelle betrachten; vorausgesetzt es wurde tatsächlich eine der hellsten Gebiete ausgewählt. Betrachtet man die Werte für E in ROI2 (die "Mittelwerte" über die Membran), so liegen dort Effizienzen von 4,2% bis 33% vor. Ersterer erscheint zwar etwas niedrig, alle anderen jedoch liegen in etwa dem Bereich, in dem auch die Werte liegen, die in Abschnitt 4.1 über die Sensitized Emission bestimmt wurden.

4.2 Bestimmung der Förstereffizienz über Bleichung der Akzeptoren

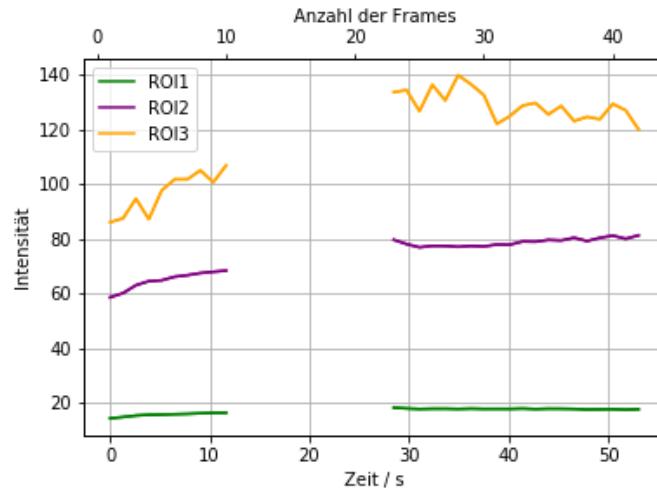


Abbildung 4.5: Verlauf der Intensitäten einer Zelle mit CFP und YFP für verschiedene ROIs im Donor-Kanal vor, während und nach dem Bleichen.

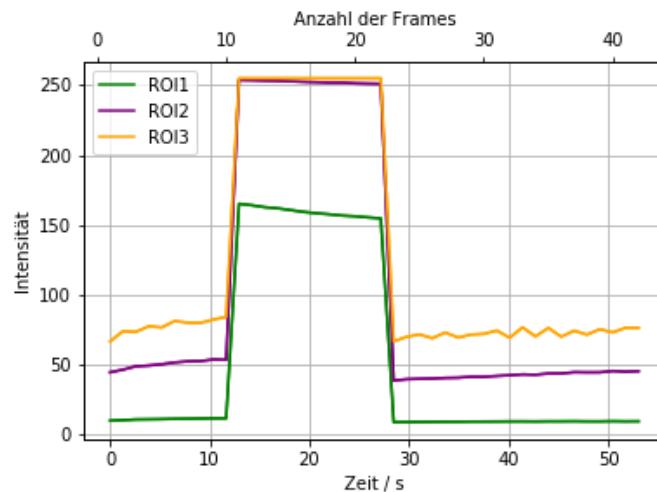


Abbildung 4.6: Verlauf der Intensitäten einer Zelle mit CFP und YFP für verschiedene ROIs im SE-Kanal vor, während und nach dem Bleichen.

Betrachten wir nun eine Probe nur mit CFP, erwarten wir, dass bei Bleichung im Wellenbereich des Akzeptors kaum eine Veränderung der Intensitäten zu beobachten ist. In Tab. 4.9 sind die zugehörigen Intensitätsmittelwerte vor und nach dem Bleichen dargestellt für den Donorkanal. An den dort gelisteten Werten und an der graphischen Auftragung dieser und denen für den SE-Kanal für eine bestimmte Zelle in Abb. 4.7 und 4.9 ist zwar ein leichter Anstieg der Intensitäten nach dem Bleichen zu erkennen; dieser fällt jedoch im Vergleich zu dem für die CFP/YFP-Probe wesentlich geringer aus.

4 Auswertung und Diskussion

Zelle	$D_{\text{pre,ROI1}}$	$D_{\text{post,ROI1}}$	$D_{\text{pre,ROI2}}$	$D_{\text{post,ROI2}}$	$D_{\text{pre,ROI3}}$	$D_{\text{post,ROI3}}$
1	26,782	28,486	88,599	98,089	135,201	160,823
2	21,599	22,385	111,558	116,090	139,774	160,140
3	36,387	39,985	129,027	143,848	136,273	164,422
4	39,784	43,081	124,343	140,135	180,502	225,815
5	35,197	35,784	148,151	153,460	177,970	206,161

Tabelle 4.9: Mittelwerte der Intensitäten einer Zelle mit ausschließlich CFP vor und nach dem Bleichen in verschiedenen ROIs

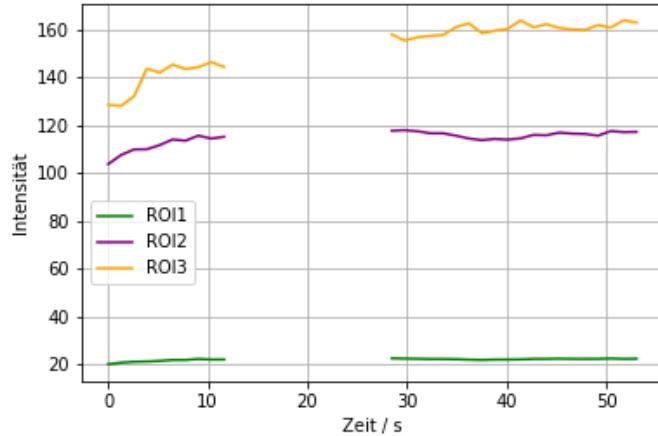


Abbildung 4.7: Verlauf der Intensitäten einer Zelle mit ausschließlich CFP für verschiedene ROIs im Donorkanal vor, während und nach dem Bleichen.

Betrachtet man nun eine reine YFP-Probe, deren Intensitäten vor und nach dem Bleichen in Tab. 4.10 zu finden sind, so ist hier eine deutliche Abnahme der Intensität zu beobachten, welche auch gut in der graphischen Auftragung für eine Zelle in Abb. ?? zu erkennen ist. Dies ist auch zu erwarten, da durch das Bleichen etliche der YFP zerstört werden, da die Wellenlänge des Lasers zu dem Anregungsspektrum des YFP passt.

Zelle	$A_{\text{pre,ROI1}}$	$A_{\text{post,ROI1}}$	$A_{\text{pre,ROI2}}$	$A_{\text{post,ROI2}}$	$A_{\text{pre,ROI3}}$	$A_{\text{post,ROI3}}$
1	11,416	9,638	60,466	50,968	141,574	119,333
2	14,750	10,965	67,742	48,875	124,682	96,868
3	22,750	10,951	116,744	48,890	154,576	62,938
4	22,859	10,623	92,145	47,088	128,689	90,851
5	16,507	8,019	75,914	34,303	162,438	64,721

4.2 Bestimmung der Förstereffizienz über Bleichung der Akzeptoren

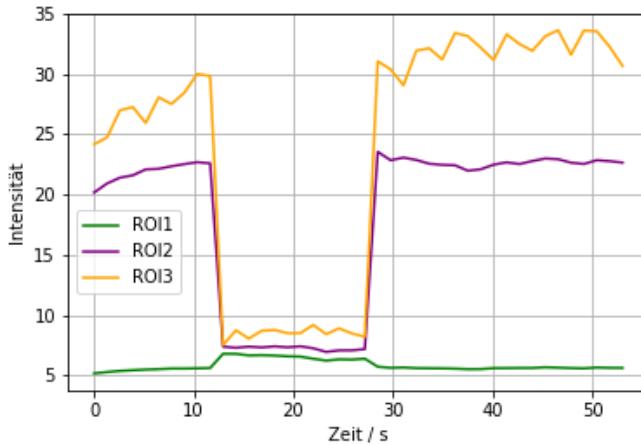


Abbildung 4.8: Verlauf der Intensitäten einer Zelle mit ausschließlich CFP für verschiedene ROIs im SE-Kanal vor, während und nach dem Bleichen.

Tabelle 4.10: Werte für die Intensitäten im Akzeptorkanal vor und nach dem Bleichen einer Probe mit reinem YFP in verschiedenen ROIs. Dabei ist eine deutliche Abnahme über den Bleichprozess hinweg zu beobachten.

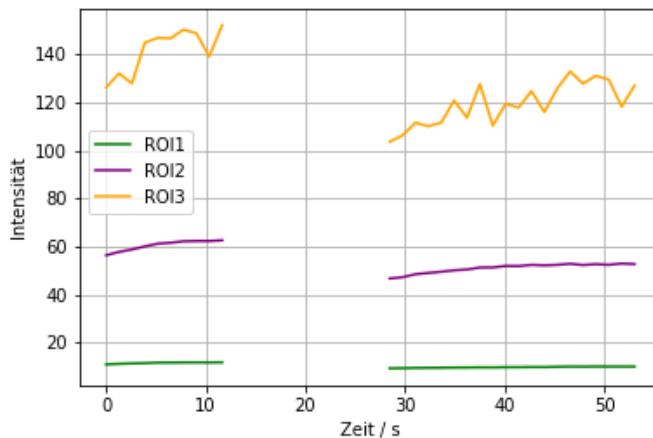


Abbildung 4.9: Verlauf der Intensitäten einer Zelle mit ausschließlich YFP für verschiedene ROIs im Akzeptorkanal vor, während und nach dem Bleichen. Auch hier ist die Abnahme über den Bleichprozess deutlich zu sehen.

4 Auswertung und Diskussion

4.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

4.3.1 Lebenszeit von CFP und YFP

Methode 1: Fit

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 .

$$A(t) = A_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (4.1)$$

Aus den einzelnen Parametern der angepassten Exponentialfunktionen bildet man dann den 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:

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.

Methode 2: Maximum-Likelihood-Methode

Die Maximum-Likelihood-Schätzung (Stahel, 2000, S.176) ist eine Methode bei der man einen maximal wahrscheinlichen Parameter schätzt. Dieser ist dann anhand der Daten

4.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

der plausibelste Parameter. Nun ergibt sich für die Lebensdauer nach der ML-Methode, dass der beste Schätzer der arithmetischen Mittelwert der Zerfälle ist. Wendet man diese an erhält man nach der Formel

$$\tau = \frac{1}{N} \sum_i^N t_i \quad (4.2)$$

wobei N die Anzahl der verwendeten Datenpunkte und t die Zerfallszeit sind. Leider hat diese Methode hier auf Grund eines Umsetzungsfehlers nicht funktioniert, da der erhaltene Wert unsinnig ist. Wir haben für

$$\tau_{\text{YFP}} = 179,31 \text{ ns}$$

erhalten.

4.3.2 Lebensdauer mit FRET

Um die FRET-Effizienz E zu erhalten, betrachtet man Lebensdauerunterschiede des Donor mit und ohne FRET. Man erwartet eine Verkürzung der Lebensdauer τ_D des Donator bei hinzukommen von FRET. 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 4.11 dargestellt werden. Dabei werden die ersten zwei Werte für die Lebenszeit von den einzelnen Fits der CFP und YFP Probe genommen.

Schritt	τ_{YFP}	$A_{0\text{YFP}}$	τ_{CFP}	$A_{0\text{CFP}}$
1	3,0693 ns		2,5351 ns	
2		$93514,30 \text{ s}^{-1}$		$15228,19 \text{ s}^{-1}$
3	2,8911 ns		3,6229 ns	
4		$94794,70 \text{ s}^{-1}$		$14407,05 \text{ s}^{-1}$
5	2,8791 ns		3,6991 ns	

Tabelle 4.11: Schrittweises Anpassen zweier Exponentialfunktionen an die Daten. Es werden immer zwei Parameter festgehalten. Die anderen zwei werden angepasst.

4 Auswertung und Diskussion

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

$$E = 1 - \frac{\tau_{\text{CFP,FRET}}}{\tau_{\text{CFP,NoFRET}}} \quad (4.3)$$

auswertet. Dabei erhält man als Ergebnis den Werte

$$E = 1 - \frac{3,6994 \text{ ns}}{2,5251 \text{ ns}} = -0,46, \quad (4.4)$$

welcher offensichtlich unsinnig ist.

Die Methode scheint also nicht zu funktionieren. Ein Grund dafür könnte die Anzahl der anzupassenden Parameter sein. Dabei können einzelne Parameter in den Hintergrund treten, während andere mehr gewicht erhalten. So erhält man ein verfälschtes Fitergebnis.

4.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

4.3.3 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 die IRF 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 Detektors gibt. Diese ist sehr schön in der Abbildung 4.10 zu sehen.

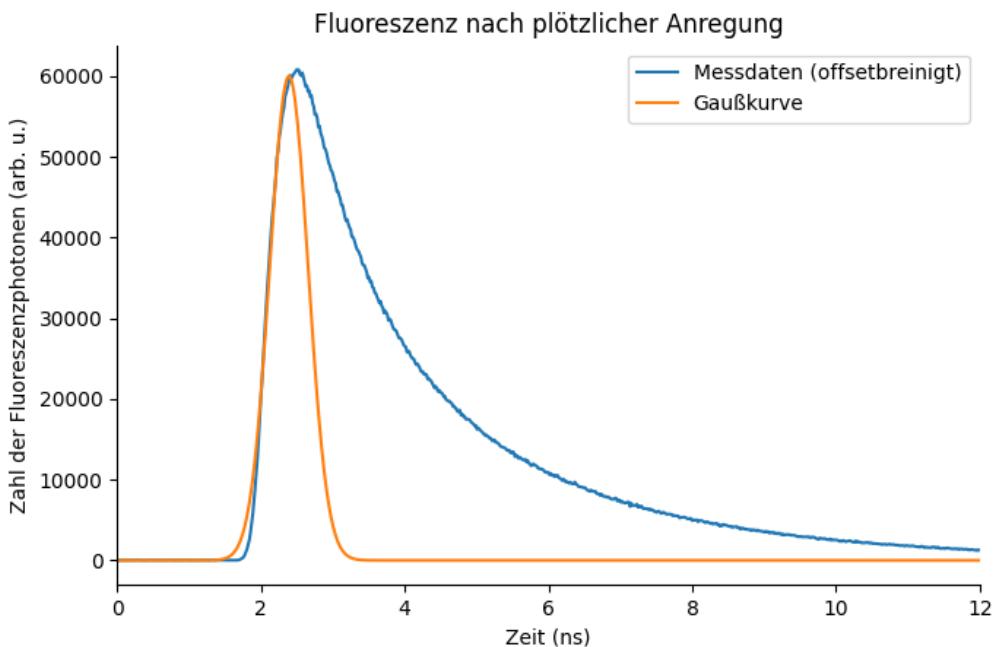


Abbildung 4.10: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen. Als Probe wurde YFP verwendet und gemessen wurde im Bereich 535-585 nm. Schön zu sehen ist die Totzeit des Detektors am Anfang. An die Daten wurde eine Gaußfunktion angepasst um die IRF zu charakterisieren.

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

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

4 Auswertung und Diskussion

ist. Der Fehler ist jedoch relativ groß.

Dann passen wir wie in Abbildung 4.10 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 4.11 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.

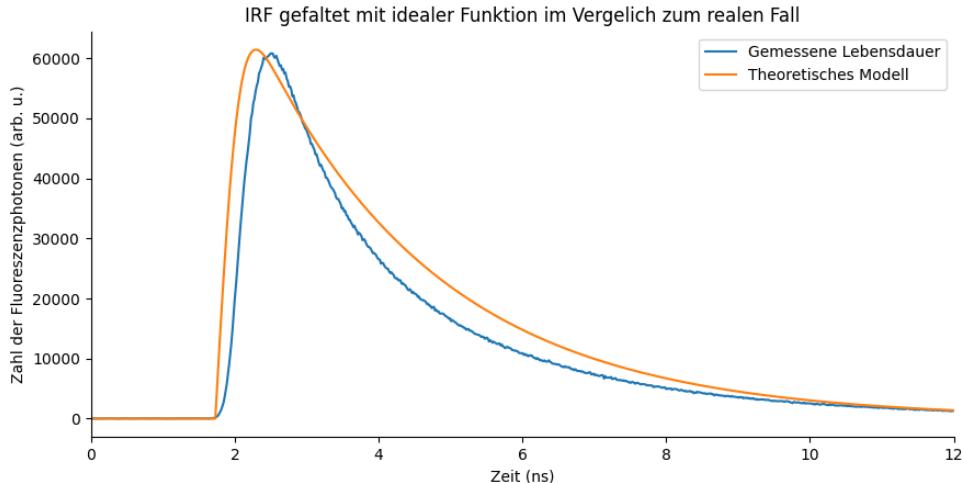


Abbildung 4.11: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und die Faltung der IRF und dem idealen Signal nach der Totzeit. Das (nicht dargestellte) ideale Signal ist in diesem Modell noch verzerrt, da es mit den Daten, welche die IRF beinhalten, noch gefittet wurde.

Durch manuelles Anpassen der Lebensdauer des YFP auf

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

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

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

4.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

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 4.13 und 4.14 sieht. Tut man eben dies mit einer Cost-Funktion wie in Abbildung 4.12 zu sehen erhält man näherungsweise den selben Wert. Dabei ist der lineare Verlauf der Funktion sehr unerwartet.

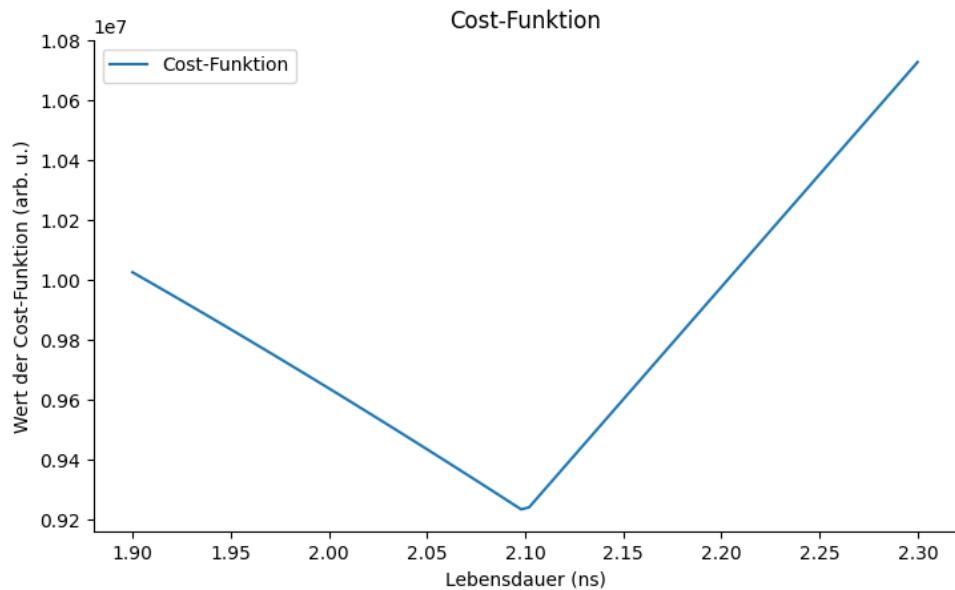


Abbildung 4.12: Cost-Funktion zum Finden der realen Lebenszeit von YFP

4 Auswertung und Diskussion

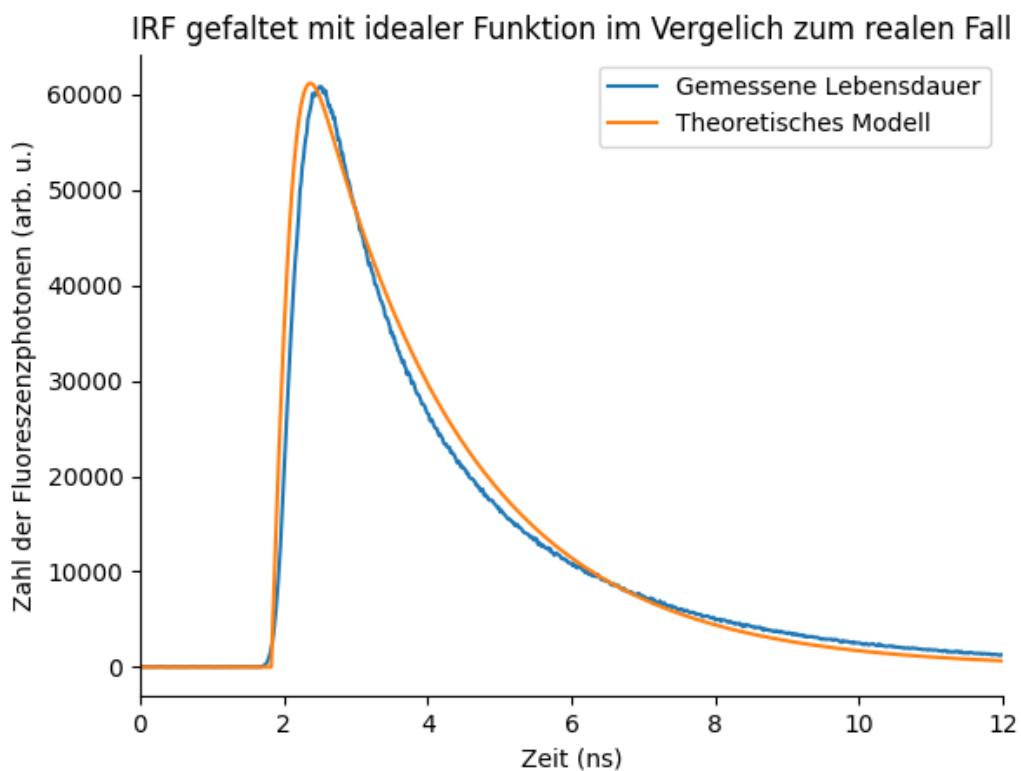


Abbildung 4.13: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und die Faltung der IRF und dem idealen Signal (τ_{YFP} optimiert) nach der Totzeit. Es zeigt sich, dass die theoretische Kurve den Sachverhalt nun besser beschreibt als in Abbildung 4.11

4.3 Fluorescence Life-Time Measurement (FLIM)

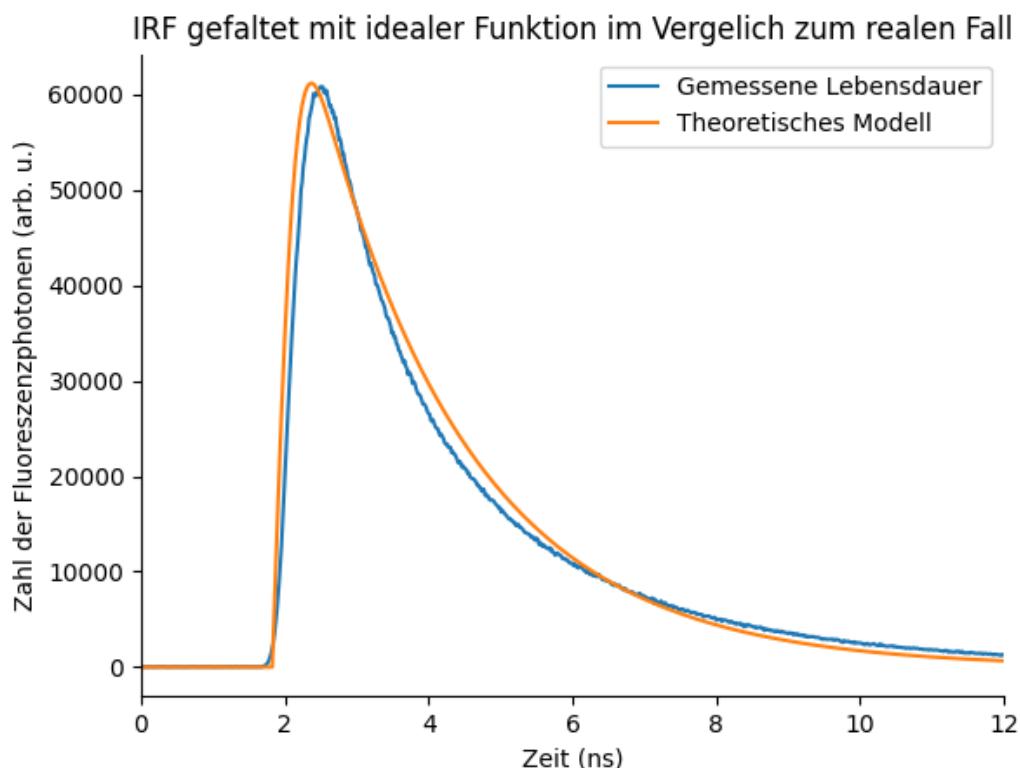


Abbildung 4.14: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und die Faltung der IRF und dem idealen Signal (τ_{YFP} optimiert) nach der Totzeit. Es zeigt sich, dass die theoretische Kurve den Sachverhalt nun besser beschreibt als in Abbildung A.1

5 Fazit

Wie in der Einleitung schon beschrieben ist FRET ein wichtiger Effekt, der vor allem in organischen Systemen auftritt. Dieser wurde uns in diesem Versuch näher gebracht. Das Auswerten ganzer Bilddateien mit 'Fiji' war auch eine neue Erfahrung, welche sicher in späteren Arbeiten noch eine Anwendung finden wird. Des Weiteren haben wir einen guten Einblick zu Fluorophoren bekommen; uns ist nun klar, dass die Darstellung von leuchtenden Mäusen in biochemischen Laboren eine lächerliche Erfindung der Filmindustrie ist, da die Lebensdauer der angeregten Zustände sich im Nanosekundenbereich befindet.

A Anhang

A.1 FLIM

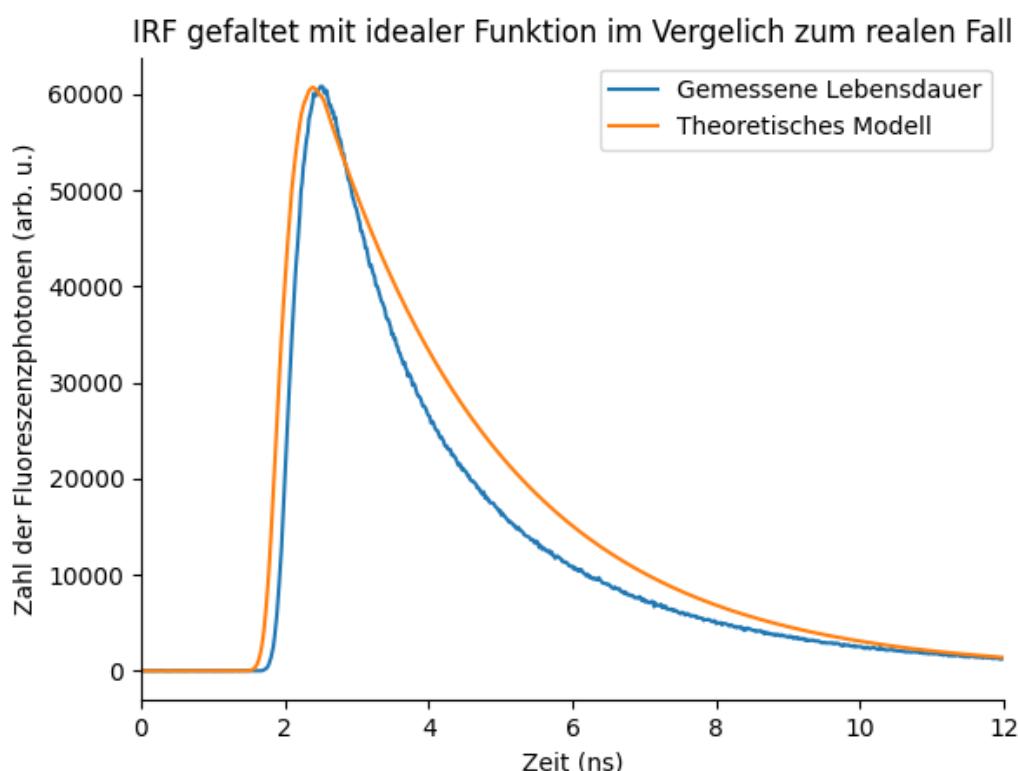


Abbildung A.1: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und die Faltung der IRF (Programmgeneriert) und dem idealen Signal (τ_{YFP} unkorrigiert) nach der Totzeit.

A Anhang

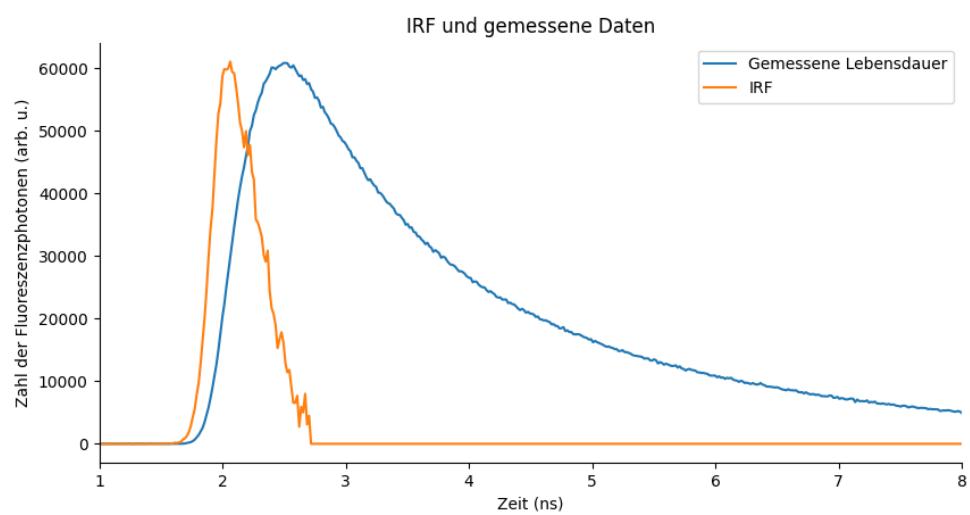


Abbildung A.2: Lebensdauer bei Einzelphotonenereignissen und IRF durch das Programm 'SymPhoTime' generiert. Man sieht eine unsymmetrische Form.

A.2 Protokoll

Geräte:

TCSPC: PicoHarp 300

Mikroskop: Leica TCS-SPS

Steuerungsprogramm: LAS AF

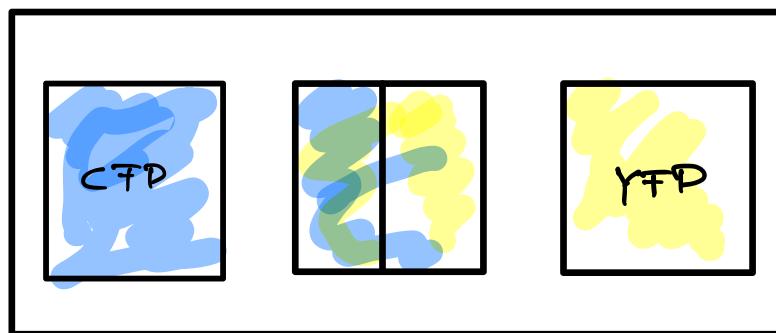
TCSPC-St. p.: SymPhoTime

Objektiv: HCx PL APO lambda blue 63x numer apert 1.4 (10000 \times)

laser: Argon-laser

Verwendete Zellen: HeLa-Zellen

Verwendete Proteine: PH-CFP, PH-YFP



4.2 Aufnahme der Sersitized Emission

Gain · 1000 Offset = 0

Laser : 458 nm → 81%

514 nm → 3%

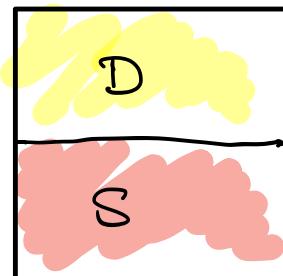
Laser wie oben vermerkt.

D_x-Messbereich : 470 - 500 nm

A_y-Messbereich : 520 - 550 nm

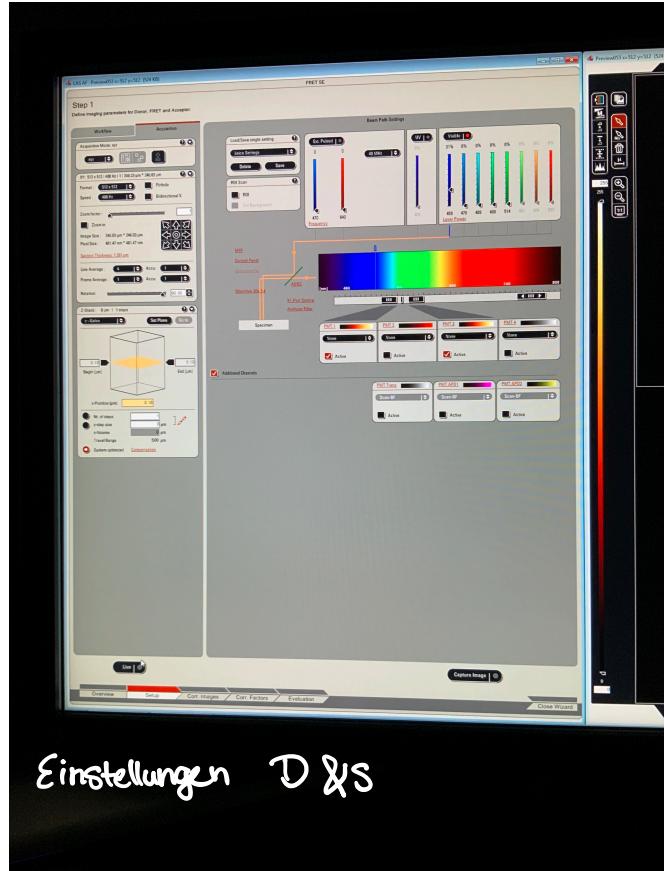
Dithole : 2 Frequency : 400 Hz

Lineaveraging : 4



Gemessen werden 18 CY-Zellen :

Zelle 1:	Image 001/004	Zelle 8	45/47
Zelle 2	006/007	Zelle 9	50/52
Zelle 3	11/13	Zelle 10	57/58
Zelle 4	18/20	Zelle 11	65/66
Zelle 5	23/25	Zelle 12	72/73
Zelle 6	31/33	Zelle 13	76/77
Zelle 7	38/41	Zelle 14	81/82
		Zelle 15	85/86



Jetzt müssen wir CFP 10x

Zelle 1: 3/4

Zelle 2 7/8

Zelle 3: 11/12

Zelle 4: 16/17

Zelle 5: 20/21

Zelle 6: 24/25

Zelle 7: 29/30

Zelle 8: 33/34

Zelle 9: 37/38

Zelle 10: 43/44

Bilder werden wie oben aufgenommen

YSP - Messung:

Zelle 1:	3/4	Zelle 2:	7/8
Zelle 3:	11/12	Zelle 4:	15/16
Zelle 5:	19/20	Zelle 6:	24/25
Zelle 7:	28/29	Zelle 8:	32/33
Zelle 9:	36/37	Zelle 10:	40/41

Bleichen:

Vorgehen:

1. Suche einer Zelle und heranzoomen
2. Wählen des Bleichbereichs (ROI 1)
3. Einstellen der Bildserie

Bei allen Messungen:

Vor der Messung : 10 frames

Bleichen : 12 Frames

Nach dem Bleiche : 20 Frames

→ Start des Bleichens

4. Zusätzliche ROIs einzeichnen:
 - ROI 2 : entlang des Kiemenspalten
 - ROI 3 : um kleineren helleren Fleck
5. Screenshot + Graphen als csv exportieren

Messungen: 10 Messungen
(Nr. 2-11; 1: Test zum Verfahren)

→ 1: Test

Messungen: 2, 3, 4, 5, 8,

Als Beispiel verwenden wir Snap² aus Messung 13

Bleichung: Donormessung

Messen CFP wie oben beschrieben

Ab Messung 014.

Sehen keinen Unterschied → Beim Bleichen Retho Emission

Bleichung Akzeptormessung

Messen YFP wie oben beschrieben ⇒ Messung 20 & 21 sind Fehlmessungen

Verwenden Messung 20, 21, 22

Lifetime-Messung

Eigentliche Arbeit wird auf dem „SynPhotime“-Programm gemacht

Der Mensch muss nur noch die Zählerate auf circa 400 000 /s regulieren und dann auf Start drücken.

Danach wird mithilfe des Programms das Histogramm gefüllt

Literaturverzeichnis

EPI 2018 Förster-resonanzenergietranfer (fret) an biologischen proben. Fortgeschrittenens physikalisches Praktikum.

PATTERSON, G.H., PISTONAA, D.W. & BARISAS, B.G. 2000 Förster distances between green fluorescent protein pairs. *Analytical Biochemistry* 284 (2).

SONG, LOLING, HENNINK, E. J., YOUNG, I. & TANKE, HANS 1995 Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal* 68 (13), 2588–2600.

STAHEL, WERNER 2000 *Statistische Datenanalyse*. Braunschweig: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft.

ZÜRN, A. 2009 *Spezifische Markierungsverfahren von Rezeptoren mit kleinen Fluorophoren zur Analyse der Rezeptoraktivierung mittels FRET*. Doktorarbeit, Julius-Maximilian-Universität Würzburg.