

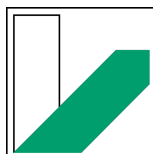
WS2021/22

PPBphys2

**Förster-
Resonanzenergietransfer
an biologischen Proben**

Manuel Lippert - Paul Schwanitz

Gruppe 11



Informationen

Versuchstag	28.09.2021
Versuchsplatz	NWI BT5.3
Betreuer	Chenyu Jin

Gruppen Nr.	11
Teilnehmer	Manuel Lippert (Manuel.Lippert@uni-bayreuth.de) Paul Schwanitz (Paul.Schwanitz@uni-bayreuth.de)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Theoretischer Hintergrund	6
2.1	FRET-Effekt	6
2.2	Crosstalk-Verunreinigungen	8
2.3	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung	9
2.4	In diesem Versuch verwendete Proben	11
2.5	Photobleaching	11
2.6	Konfokalmikroskop	12
3	Messprotokoll	13
4	Auswertung und Diskussion	16
4.1	Aufnahme der Sensitized Emission	16
4.1.1	Bestimmung der Korrekturfaktoren	16
4.1.2	Bestimmung der Sensitized Emission und FRET-Effizienz Bilder .	19
4.1.3	Abstand der Fluorophore	21
4.2	Donoremission nach Akzeptorbleichung	22
4.3	Lebenszeitmessung	25
5	Fazit	34
	Literaturverzeichnis	35

1 Einleitung

In biologischen Proben stellt es als Schwierigkeit heraus, die Abstände von Atomen oder Molekülen zu bestimmen, da die gängigen Mikroskope eine zu geringe Auflösung besitzen. Eine wichtige Messmethode von Abständen in biologischen Proben ist der Förster Resonanzenergietransfer oder auch abgekürzt FRET.

In diesem Versuch wird die Theorie von FRET anhand eines cyan-farbenes fluoreszentes Protein (CFP) und eines gelb-farbenes fluoreszentes Protein (YFP) in der Praxis angewandt. Dabei wird in diesem Versuch die sogenannte FRET-Effizienz bestimmt, welche selbst vom Abstand zwischen den Proben abhängt. Dies wird in drei Arten durchgeführt, durch Sensitized Emission, Photobleaching und Lebenszeitmessung, was im Folgendem diskutiert wird.

2 Theoretischer Hintergrund

Bevor wir uns zur Versuchsdurchführung und der Auswertung zuwenden wollen wir die Theorie von FRET näher besprechen. Dafür verwenden wir [3] und [4] als Hauptquelle.

2.1 FRET-Effekt

Um den FRET-Effekt zu beobachten, werden zwei Farbstoffe benötigt mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektrum. Dabei muss sich das Emissionsspektrum des **Donor**-Farbstoffs und das Absorptionsspektrum des **Akzeptor**-Farbstoffs eine deutliche Überlappung aufzeigen (hellblauer Bereich in Abb. 2.2).

Durch Anregung des Donors wird das Molekül von einem Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Zustand S_1 gebracht. Anzumerken ist aber, dass Moleküle anders, wie bei einzelnen Atomen, mehrere Energiezustände haben, darunter fällt die Energie des elektronischen Übergangs, der Schwingung und der Rotation (Gesamtenergie $E = E_{\text{rot}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{el}}$). Das Vorhandensein von mehreren Energiezuständen hat zur Folge, dass sich Unterniveaus bilden in Fall von Molekülen entsteht ein *Bandspektrum*.

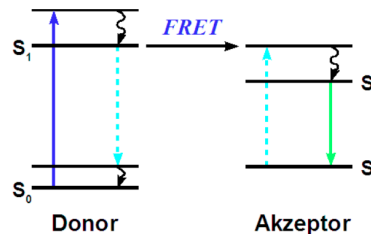


Abbildung 2.1: FRET-Übergang [3]

Durch Anregung eines Photons entsteht ein Übergang in das höhere Energieniveau S_1 . Dieses koppelt sich an Vibrationen und verliert dabei ein Teil der Anregungsenergie des Photons. Nach der sogenannten Lebensdauer τ emittiert das Molekül spontan ein Fluoreszenzphoton und fällt in den Grundzustand S_0 zurück. Bei diesem Vorgang kommt es dann zur sogenannten *Stokes-Verschiebung*, wodurch aufgrund des Energieverlusts die Wellenlänge des Fluoreszenzphotons höher ist als die des Anregungsphotons. Liegt nun die Wellenlänge des Fluoreszenzphotons im Absorptionsspektrum des Akzeptors geht die Anregungsenergie des Donors **strahlungslos** auf den Akzeptor über, welcher wiederum durch Kopplung an Vibrationen ein Fluoreszenzphoton emittiert und in seinen Grundzustand zurückfällt. Diesen Vorgang nennt man **FRET-Effekt** (siehe Abb. 2.1).

Dipol-Dipol-Wechselwirkung und Fermis' goldene Regel

Damit der Übergang der Energie strahlungslos vonstattengeht, muss es zu einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor kommen. Dabei hängt die Effizienz des Energieübertrags von der Spektrenüberlappung, der Orientierung der Dipole und der Distanz der Farbstoffe verursacht vom Dipolfeld ab. Die Übergangswahrscheinlichkeit und die Effizienz des FRET-Effekts kann durch Fermis' goldene Regel angegeben werden:

$$\left| \left\langle \phi_D^* \phi_A \left| \frac{\kappa}{4\pi\epsilon_0} \frac{\mu_D \mu_A}{r^3} \right| \phi_D \phi_A^* \right\rangle \right|^2 \quad (2.1)$$

Dabei entspricht κ dem winkelabhängigen Orientierungsfaktor der Dipole, ϵ_0 der elektrischen Feldkonstante, μ_D dem elektrischen Dipolmoment des Donors und μ_A dem elektrischen Dipolmoment des Akzeptors. Die Abhängigkeit von $\frac{1}{r^3}$ kommt dabei von der Multipolentwicklung des Dipol-Moments und durch das quadrieren von Fermis' goldener Regel entsteht die $\frac{1}{r^6}$ -Abhängigkeit in Gleichung 2.2. Die Effizienz des FRET-Effekts lässt sich dann wie folgt angeben:

$$E = \frac{\text{Zahl der Energietransfers}}{\text{Zahl der Anregungen}} = \frac{k_{ET}}{k_F + k_{ET} + k_0} = \frac{R_F^6}{R_F^6 + R^6} \quad (2.2)$$

Hierbei entspricht R_F dem Försterradius und R den Abstand zwischen den beiden Proben und k_{ET} , k_F und k_0 den Raten der Energietransfers. Wenn der Abstand R dem Försterradius R_F entspricht, erhält man:

$$E = \frac{R_F^6}{R_F^6 + R^6} \stackrel{R=R_F}{=} \frac{1}{2} \quad (2.3)$$

Somit ist der Försterradius der Abstand zwischen den Proben, der einer Effizienz von 50% entspricht.

Damit der FRET-Effekt auftritt sollte der Abstand R zwischen Donor und Akzeptor ungefähr den Försterradius R_F entsprechen. In unserem Versuch verwenden wir CFP und YFP Proben bei denen liegt der Försterradius bei einem Abstand von $R = 4.9 \text{ nm} = R_F$ [2].

Abhängigkeit der Orientierung

Besitzen der Donor und der Akzeptor eine feste Orientierung, verringern sich die Anzahl der Freiheitsgrade auf einen Freiheitsgrad, den Abstand. Womit die Effizienz nur vom Abstand R abhängt.

Grenzfälle

Beim Energietransfer sind mehrere Grenzfälle zu beachten, darunter fallen einen parallele oder eine orthogonale Orientierung der Moleküle zueinander. Bei paralleler Ausrichtung ist der Energietransfer am besten, während bei orthogonaler Ausrichtung keine Energie übertragen wird.

FRET-Effekt umgekehrt möglich?

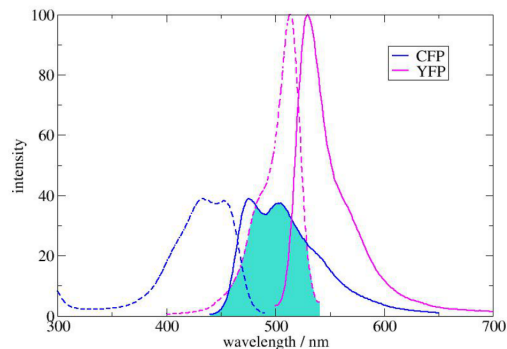


Abbildung 2.2: Anregungs- und Emissionsspektrum von CFP und YFP [3]

Die Voraussetzung für FRET ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors. Diese Voraussetzung ist bei CFP als Donor und YFP als Akzeptor erfüllt (Durchgezogene blaue Linie zeigt deutliche Überlappung mit gestrichelter pinken Linie in Abb. 2.2). Vertauscht man aber die Rollen von CFP und YFP ist keine Überlappung mehr gegeben (Durchgezogene pinken Linie schneidet gestrichelte blaue Linie nicht in Abb. 2.2 und somit keine Überlappung). Damit ist in diesem Versuch kein FRET-Effekt mit YFP möglich.

2.2 Crosstalk-Verunreinigungen

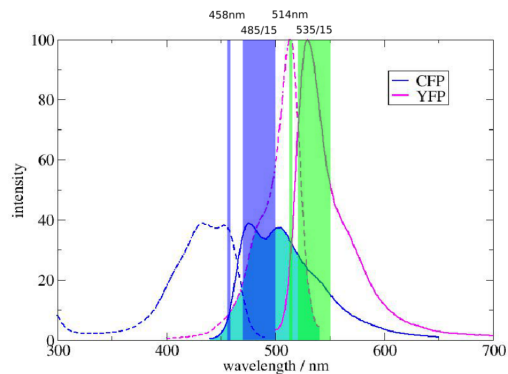


Abbildung 2.3: Anregungsbereiche von CFP und YFP [3]

Die FRET-Intensität kann man nicht direkt messen, da sich der Anregungsbereich der Donors und Akzeptors teilweise überlappen (siehe Abb. 2.3). Somit wird bei einer Anregung des Donors auch der Akzeptor angeregt. Dies führt zu Verunreinigungen in der Messung der Emission des Akzeptors durch die teilweise Anregung. Um diesen Effekt zu korrigieren, misst man die Emission des Donors und die Emission des Akzeptors separat, womit man die Crosstalk Beiträge berechnen kann.

2.3 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Allgemein ist zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (englisch time-correlated single photon counting, TCSPC) eine Technik, um sich zeitlich schnell ändernden Lichtintensitäten zu messen. Diese Messmethode kommt zum Einsatz bei der Messung von Fluoreszenzlebenszeit. Dabei wird die zu untersuchende Probe (Fluorophore) mithilfe von gepulsten Lichtbündel (Laser) angeregt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt mit einem Photomultiplier, welcher einzelne Photonen registrieren können muss. Die Zeitmessung wird dann 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 einen exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität nach der Anregung. Der Abfall ergibt sich dann mit der Formel:

$$N(t) = N_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \text{mit} \quad \frac{1}{\tau} = \sum_{i=1}^m k_i \xrightarrow{n \text{ Proben}} N(t) = \sum_{i=1}^n N_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.4)$$

Hierbei ist τ die Lebenszeit aus den m einzelnen Zerfallsraten k_i und τ_i die Lebenszeit der i -ten Probe mit entsprechender Amplitude N_i .

Das detektierte Signal hat dann die Form einer Faltung von dem exponentiellen Abfall und einer Gauß-Kurve (entsteht durch die IRF (Impulse Response Function) des Lasers), welches in Abb. 2.4 zu sehen ist. Dabei ist der Teil bis zum Peak die IRF und danach der exponentielle Abfall.

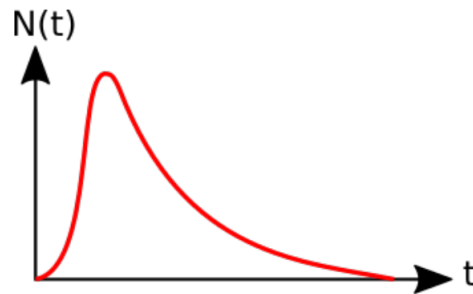


Abbildung 2.4: Verlauf der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung [3]

Störungen

Bei dieser Messtechnik kann es allerdings zu Störungen kommen, welche das Ergebnis verfälschen. Dazu gehört das thermische Rauschen, wovon beinahe jedes Messgerät betroffen ist. Dies kann durch Kühlung des Messgerätes behoben werden.

Weitere Störungsfaktoren, sogenannte 'Dark Counting', sind *Verstärkerrauschen*, *'Afterpulsing'* und *Pile-Up Effekt*.

- (1) Das *Verstärkerrauschen* entsteht durch den angeschlossenen Photomultiplier und lässt sich mit einem Hochpassfilter lösen, da die Amplituden des Rauschens meist geringer sind als die Amplituden der eigentlichen Messung.
- (2) Beim *'Afterpulsing'* registriert der Detektor nach dem Photonenereignis ein weiteres (fiktives) Ereignis. Behoben kann dies mit der richtigen Wahl des Detektors.
- (3) Der *Pile-Up Effekt* entsteht durch den Umstand, dass eigentlich nur ein Photon pro Laserpuls mit der Probe wechselwirken kann. Bei mehreren Photonen registriert der Detektor nur das erste Photon, wodurch sich die gemessene Lebensdauer des Photons verringert. Verantwortlich für diesen Effekt ist die Totzeit des Detektors. In dieser Totzeit kann der Detektor kein weiteres Photon detektieren. Verringerung der Laserintensität kann dem Effekt entgegenwirken. [5]

2.4 In diesem Versuch verwendete Proben

Die verwendeten Proben in diesem Versuch werden mit einem Farbstoff markiert (Proben gehen kovalente Bindung mit Farbstoff-Molekül ein). Bei Anregung emittiert die Probe sichtbare Probe, was den Sachverhalt der Fluoreszenz darstellt.

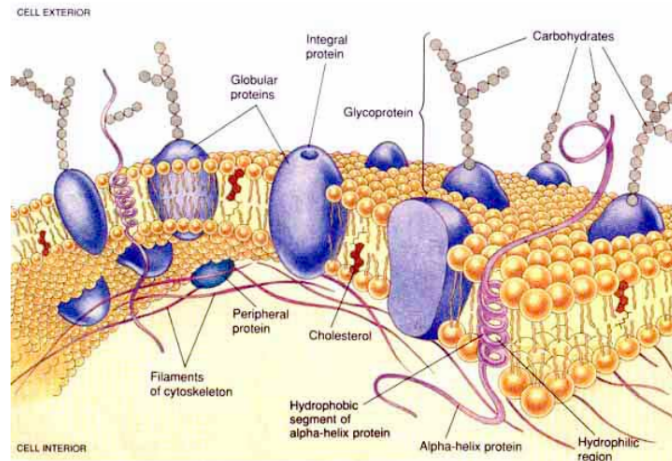


Abbildung 2.5: Skizze des Plasmamembran [3]

Die genutzte Zelle besitzen ein Plasmamembran, welches aus verschiedenen Lipiden aufgebaut ist (siehe Abb. 2.5). Unterhalb der Lipiden sind ca. 30% Phospholipide und Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat (PIP₂). PIP₂ ist besonders, denn es binden sich im Zellplasma vorhandenen Pleckstrin-Homologiedomäne (PH). In unserem Versuch wird dies verwendet, um CFP und YFP an Proteine mit einer solchen Pleckstrin-Homologiedomäne zu bindet. Durch die hohe Dichte an PIP₂ binden sich viele CFP-PH und YFP-PH an das PIP₂. Dies hat zur Folge, dass die Distanz zwischen YFP (Akzeptor) und CFP (Donor) gering genug ist, damit die Bedingung für FRET erfüllt ist.

2.5 Photobleaching

Das Photobleaching (dt. Bleichen) ist ein irreversibler Mechanismus, bei dem es zu einem Verlust der Fluoreszenz von Fluorophoren kommt. Beim Bleaching wird das Fluorophor mit Licht bestrahlt, womit Photonen mit unterschiedlichen Energien auf die Probe treffen. Diese Photonen können vom Fluorophor absorbiert werden und es zu einem Übergang in einen angeregten Zustand (siehe Kapitel 2.1). Durch Wechselwirkung zwischen dem angeregten Fluorophor und der Umgebung, kommt es zu einer kovalenten Änderung des Fluorophors, wodurch das Fluorophor seine Fluoreszenz verliert. Weiterhin kann man das Fluorophor mithilfe von Quenching (dt. Fluoreszenzlöschung) bleichen, dabei kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Dieser Prozess ist aber zum Gegensatz zum Photobleaching reversibel. [1]

2.6 Konfokalmikroskop

Ein Konfokalmikroskop ist ein spezielles Lichtmikroskop, welches zu jedem Zeitpunkt nur einen Teil der Probe beleuchtet und genau dieser Bruchteil wird dann Stück für Stück abgerastert.

Funtionsweise

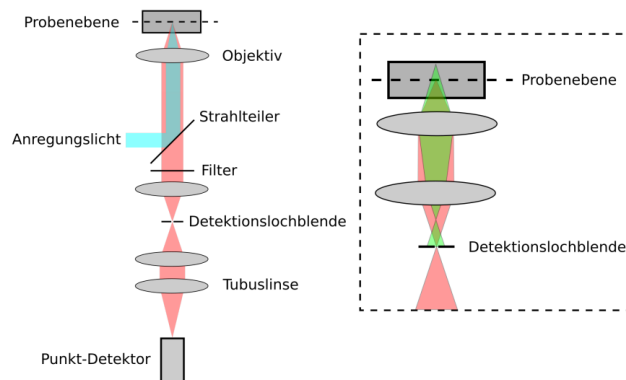


Abbildung 2.6: Prinzipieller Aufbau eines Konfokalmikroskops [3]

In Abb. 2.6 wird der prinzipielle Aufbau eines Konfokalmikroskops gezeigt. Dabei wird der Anregungsstrahl (blau in 2.6) durch einen Strahlenteiler reflektiert und durch eine Linse gebündelt mit dem Brennpunkt auf der Probe. Von der Probe wird dann der sogenannte Detektionsstrahl (rot in 2.6) ausgesendet. Dieser Strahl wird durch die oberste Linse parallelisiert und trifft auf den Strahlenteiler, der den Strahl transmittieren lässt. Nach dem Strahlenteiler kann ein Filter eingebaut werden, welcher die störenden Wellenlängen herausfiltert. Nach dem Filter befindet sich eine weitere Linse und die Detektionslochblende, welche das Detektionsvolumen auf einen kleinen Bereich einschränkt. Dies bedeutet das Strahlen aus einem hinteren Bereich der Probe nicht zum Detektor gelangen. Nach der Blende trifft der Detektionsstrahl auf die erste Tubuslinse. Diese parallelisiert den Strahl erneut und die zweite Tubuslinse fokussiert ihn auf den Punkt-Detektor. Der Punkt-Detektor registriert dann die einzelnen Photonen.

Vor und Nachteile

- + Unerwünschtes Hintergrundrauschen (z.B. Streulicht) reduzierbar auf ein Minimum und bessere Auflösung zum Vergleich zu konventionellen Mikroskopen wegen der Detektionslochblende
- Detektionslochblende kann Beugungserscheinungen verursachen, was die Auflösung begrenzt

Als Alternative zum Konfokalmikroskop kann das Laser-Scanning-Microscope verwendet werden, welches ohne die Detektionslochblende auskommt und eine höhere Auflösung besitzt.

3 Messprotokoll

Messgeräte und Proben:

- Konfokalmikroskop: Leica TCS SP5 mit HCX PLAPO lambda blue 63.0 x 1.4 OIL UV Objektiv (gesteuert durch Computer-Messprogramm)
- Argon-Ionen-Laser (Anregung bei Wellenlängen von 458 nm und 514 nm)
- Detektor: Photomultiplier (PMT)
- Lebenszeitmessung: PicoHarp 300 TCSPC Module und Picosecond Event Timer
- Proben: CFP, YFP und CY markierte Proben mit Eigenschaften aus Kapitel 2.4

Bildaufnahme mit Konfokalmikroskop

- 400 Hz ist die optimale Speed-Einstellung
- Minimale Aufnahmedauer hängt von Speed ab
- Je länger die Aufnahmedauer, desto stärker wird die Zelle bestrahlt und somit gegebenenfalls zerstört oder gebleicht
- Zoom hängt mit eingestelltem Speed zusammen

Aufnahmen der Sensitized Emission

16 Aufnahmen von D_{CY} , A_{CY} , S_{CY} und Transmissionsbild mittels Messprogramm.

Einstellungen:

- Donor-Anregung: 458 nm mit 30% Leistung
- FRET-Anregung: 514 nm mit 4% Leistung
- Line-Average = 4
- Speed = 400 Hz

3 Messprotokoll

Modus:

- (1) $D_{CY} + S_{CY}$:
PMT1 (Donor):
470 nm bis 500 nm, Gain = 1000 V, Offset = 0%, Auswahl = None
PMT3 (Akzeptor):
520 nm bis 550 nm, Gain = 1000 V, Offset = 0%, Auswahl = None
- (2) $A_{CY} + \text{Transmissionsbild}$:
PMT3 (Akzeptor):
520 nm bis 550 nm, Gain = 1000 V, Offset = 0%, Auswahl = None
PMT Trans:
Gain = 400 V, Offset = 0%, Auswahl = Scan-BF

Reihenfolge Aufnahme Modus (1)→(2)

Dateiordner: *CY* (Beide Farbstoffe), *CFP* (Cyan), *YFP* (Yellowqq)

Akzeptorbleichung (Bleaching)

10 Aufnahmen der CFP/YFP-Zelle für D_{CY} , S_{CY} mittels Messprogramm vor nach dem Bleaching.

Einstellungen:

- Akzeptor-Anregung: 514 nm mit 100% Leistung
- Line-Average = 1
- Set background to zero = true

Time Course:

- Pre-bleach: Frames = 10, $t/\text{frame}[\text{s}] = 1.293$, minimize = true
- Bleach: Frames = 12
- Post-bleach 1: Frames = 20, $t/\text{frame}[\text{s}] = 1293$, minimize = true

Dateinamen: *CY-N-X.csv*; $N = 1, \dots, 10$; $X = D$ (Donor, PMT1), S (Sensitized, PMT3)

Dateiordner: *Bleach-CY* (Alle Snapshots des Experiments) Ausgewählter Snapshot:
FRAP_005Snapshot1

5 Aufnahmen von jeweils CFP- und YFP-Zelle zur Überprüfung der Signifikanz der Messung, dabei bleiben die eingestellten Parameter gleich.

Dateinamen CFP: *CFP-N-X.csv*; $N = 1, \dots, 5$; $X = D$ (Donor, PMT1), S (Sensitized, PMT3)

Dateinamen YFP: *YFP-N.csv*; $N = 1, \dots, 3$; (Akzeptor, PMT3)

Lebenszeit

Messung der Lebenszeit an CFP/YFP, CFP und YFP Zellen mit einmal Exponentialfit und zweimal Exponentialfit und dem Gerätefehler IRF

Einstellungen:

- Laser: 470 nm mit 40 MHz
- FILM: Zeitintervall = 2,01263 min, Repetitions = 93, max = 1000, Frames = 1

Modus

- PMT APD1:
Gain = 10, Auswahl = Scan-BF
- PMT APD2:
Gain = 10, Auswahl = Scan-BF

Dateiordner: *TCPSP-data*

Dateinamen CY: *CYN-chK.csv*; N = 1,...,6; K = 1, 2, 12 (Channels)

Dateinamen CFP,YFP: *ZN-chK.csv*; Z = CFP, YFP; N = 1, 2, 3; K = 1, 2, 12 (Channels)

4 Auswertung und Diskussion

4.1 Aufnahme der Sensitized Emission

In diesem Teil der Auswertung sollen die Bilder der Sensitized Emission und der FRET-Effizienz bestimmt werden.

4.1.1 Bestimmung der Korrekturfaktoren

Zu aller erst ist es notwendig Korrekturfaktoren zu bestimmen, um sogenannte Crosstalk Verunreinigungen zu beheben. Eine genauere Erklärung was Crosstalk Verunreinigungen sind und warum sie existieren findet sich in Abschnitt 2.2.

Folgende Korrekturfaktoren werden benötigt:

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

$$\beta = \frac{S_{\text{CFP}}}{D_{\text{CFP}}} \quad (4.2)$$

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

$$\delta = \frac{D_{\text{YFP}}}{S_{\text{YFP}}} \quad (4.4)$$

Bedeutung der Formelsymbole:

- D: Mit Anregung und Detektion des Donors
- A: Mit Anregung und Detektion des Akzeptors
- S: Mit Anregung des Donors und Detektion des Akzeptors

Erklärung der Indizes:

- CY: Probe enthält beide Farbstoffe
- YFP: Probe enthält nur YFP
- CFP: Probe enthält nur CFP

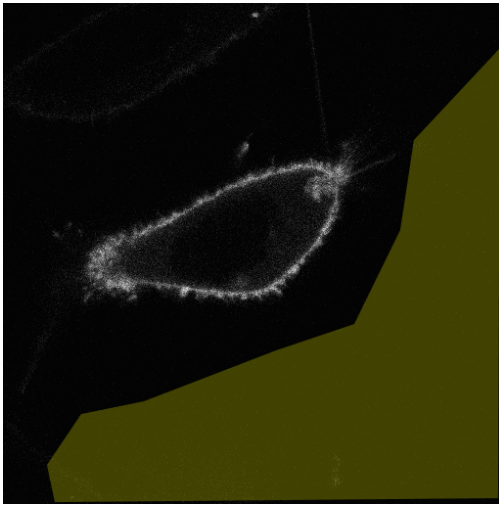
4.1 Aufnahme der Sensitized Emission

Im Folgenden soll nun anhand eines Beispiels die Vorgehensweise demonstriert werden, mit der die jeweiligen Werte für die Korrekturfaktoren bestimmt werden.

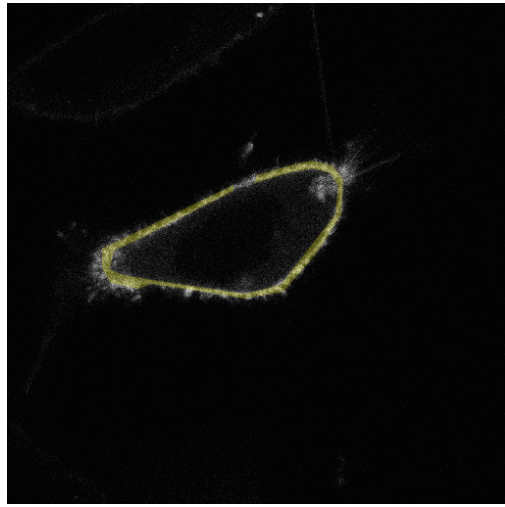
Als Beispiels haben wir den Wert D_{YFP} ausgewählt.

Zuerst wird ein Bild einer Probe aufgenommen, welches die passenden Farbstoffe enthält (hier nur YFP). Außerdem wird der passende Aufnahmemodus gewählt, hier Anregung und Detektion des Donors.

Danach werden in diesen mithilfe der Programms Fiji die Mittelwerte bestimmter ROI's (Region of interest) bestimmt. Eine ROI wird in einem zellfreien Bereich platziert, um den Wert des Hintergrundes zu erfassen können ($D_{\text{YFP}(\text{bg})}$). Die andere ROI wird um die Membran der Zelle gelegt ($D_{\text{YFP}(\text{mb})}$). Dies wird in Abbildung 4.1 an einem Beispiel verdeutlicht.



(a) Beispiel: ROI des Hintergrundes



(b) Beispiel: ROI der Zellmembran

Abbildung 4.1: Verschiedene ROI in D_{CY} (hier: Zelle CY1)

Um nun der Wert zu bestimmen wird der Hintergrundwert abgezogen:

$$D_{\text{YFP}} = D_{\text{YFP}(\text{mb})} - D_{\text{YFP}(\text{bg})} \quad (4.5)$$

4 Auswertung und Diskussion

Dieser Vorgang wurde in analoger Weise für alle anderen Werte wiederholt. Danach werden die Gleichungen 4.1 bis 4.4 verwendet um die Korrekturfaktoren zu berechnen. Dabei haben sich folgende Werte ergeben:

Messung Nr.	D_{CFP}	S_{CFP}	β
1	102.466	18,805	0.183524
2	68.186	12,936	0.189716
3	15.184	2,796	0.184141
4	38.030	6,681	0.175677
5	27.955	4,86	0.173851
6	18.747	3,229	0.172241
7	89.738	16,416	0.182933
8	56.398	10,034	0.177914
9	58.660	10,779	0.183754
10	50.819	8,977	0.176647

Tabelle 4.1: Messungen für CFP markierte Zellen zur Bestimmung von β

Messung Nr.	D_{YFP}	A_{YFP}	S_{YFP}	α	γ	δ
1	1.685	179.276	97.906	0.009399	0.546119	0.017210
2	0.371	40.330	17.076	0.009199	0.423407	0.021726
3	0.529	94.979	38.451	0.005570	0.404837	0.013758
4	0.538	60.703	25.409	0.008863	0.418579	0.021174
5	0.429	75.727	32.435	0.005665	0.428315	0.013226
6	0.533	63.920	27.325	0.008339	0.427487	0.019506
7	0.651	114.199	48.084	0.005701	0.421054	0.013539
8	0.490	31.834	13.232	0.015392	0.415656	0.037031
9	0.598	80.300	34.689	0.007447	0.431993	0.017239
10	0.607	72.924	30.036	0.008324	0.411881	0.020209

Tabelle 4.2: Messungen für YFP markierte Zellen zur Bestimmung von α , γ und δ

Somit ergeben sich folgende Mittelwerte für die Korrekturfaktoren:

$$\alpha = (0,008 \pm 0,003) \quad (4.6)$$

$$\beta = (0,180 \pm 0,006) \quad (4.7)$$

$$\gamma = (0,43 \pm 0,04) \quad (4.8)$$

$$\delta = (0,019 \pm 0,007) \quad (4.9)$$

Der Fehler wurde über die Standardabweichung berechnet.

4.1.2 Bestimmung der Sensitized Emission und FRET-Effizienz Bilder

Mithilfe der Korrekturfaktoren können die Werte und Bilder der Sensitized Emission und der FRET-Effizienz, unter Verwendung folgender Formeln und des Programms Fiji, errechnet werden.

$$SE = \frac{S_{CY} - \beta \cdot D_{CY} - (\gamma - \alpha\beta) \cdot A_{CY}}{1 - \beta\delta} \quad (4.10)$$

$$E = \frac{SE}{\sqrt{A_{CY} \cdot D_{CY}}} \quad (4.11)$$

Folgende Werte haben sich aus der Verwendung der Formel ergeben:

Zelle Nr.	D	S	A	SE	E
1.0	78.989	54,464	78.642	43.176840	0.547823
2.0	48.876	29,519	44.437	22.002979	0.472130
3.0	40.770	28,091	40.630	22.037036	0.541451
4.0	35.516	24,841	40.206	19.538192	0.517043
5.0	31.778	22,537	36.237	17.769305	0.523638
6.0	65.660	29,534	36.419	18.742015	0.383267
7.0	42.112	32,539	53.054	26.599006	0.562734
8.0	47.894	27,762	40.689	20.289197	0.459606
9.0	34.241	30,621	50.415	26.055755	0.627120
10.0	17.931	59,38	127.373	60.430551	1.264491
11.0	36.992	27,7	41.517	22.350672	0.570327
12.0	29.925	28,352	47.459	24.437686	0.648461
14.0	5.800	8,738	16.353	7.876263	0.808737
15.0	31.486	28,789	45.679	24.606828	0.648841
16.0	22.483	19,491	33.136	16.280748	0.596482
17.0	23.921	18,978	29.997	15.443600	0.576527
18.0	22.910	16,174	25.549	12.599973	0.520799

Tabelle 4.3: Ermittelte D, S, A, SE und E Werte der CY markierten Zellen.

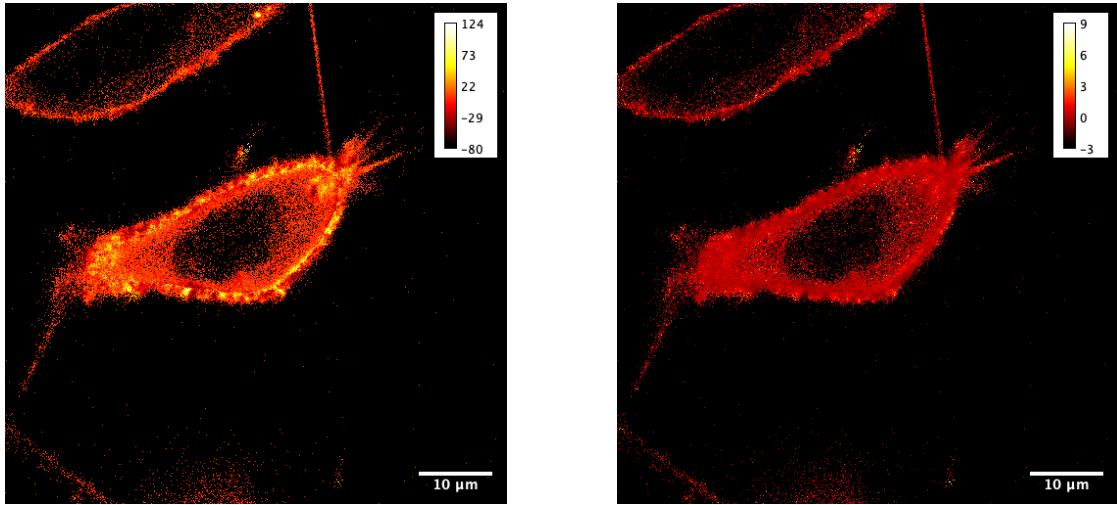
Für Mittelwert und Standardabweichung gilt:

$$SE = (23 \pm 12) \quad E = (0,6 \pm 0,2)$$

In der Tabelle 4.3 bei Zelle Nr. 10 ist jedoch ein Wert für die FRET Effizienz von deutlich über eins zu sehen. Dies macht für diesen Wert jedoch keinen Sinn und ist somit wahrscheinlich ein Messfehler.

4 Auswertung und Diskussion

Nachfolgend sind ausgewählte Bilder abgebildet die aus diesen Formeln resultieren.



(a) SE Bild der Aufnahme CY1

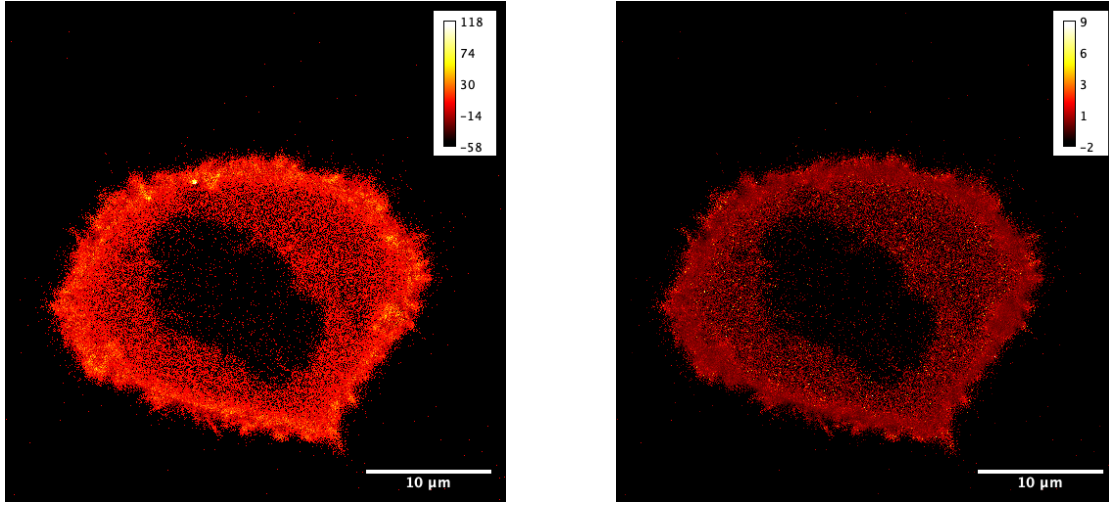
(b) E Bild der Aufnahme CY1

Abbildung 4.2: Zelle CY1 in SE und E

Für die Zelle in Abbildung 4.2 würde wieder eine ROI um die Zellmembran gelegt. Der mittlere Wert der ROI's hat folgendes ergeben:

$$\overline{SE} = 9,129 \quad \overline{E} = 0,195$$

Vergleicht man diese Werte mit den rechnerischen ermittelten aus Tabelle 4.3, so fallen deutliche Unterschiede auf.



(a) SE Bild der Aufnahme CY3

(b) E Bild der Aufnahme CY3

Abbildung 4.3: Zelle CY3 in SE und E

Für die Zelle in Abbildung 4.3 wurden die Mittelwerte analog ermittelt:

$$\overline{SE} = 3,951 \quad \overline{E} = 0,200$$

Auch hier fallen deutliche Unterschiede ins Auge.

4.1.3 Abstand der Fluorophore

Im Theorieteil wurde mit Gleichung 2.2 eine andere Gleichung für die FRET Effizienz angegeben.

$$E = \frac{R_F^6}{R_F^6 + R^6} \quad (4.12)$$

Durch Umstellen dieser Formel kann folgende Gleichung für den mittleren Abstand angegeben werden:

$$R = \sqrt[6]{\frac{R_F^6}{E} - R_F^6} \quad (4.13)$$

Wobei R_F der Försterradius ist. Dieser müsste noch bestimmt werden, um den mittleren Abstand zu berechnen.

4.2 Donoremission nach Akzeptorbleichung

In diesem Versuchsteil soll die FRET-Effizienz ermittelt werden, indem man die Donorfluoreszenz vor und nach dem Bleichen der jeweiligen Probe misst. Die Formel zur Berechnung der FRET-Effizienz ist folgende:

$$E = 1 - \frac{D_{CY,pre}}{D_{CY,post}} \quad (4.14)$$

Die eigentliche Versuchsdurchführung wurde größtenteils durch einen speziellen Assistenten des Kontrollprogramms ausgeführt. Im Voraus musste nur eine passende Zelle ausgewählt werden und die verschiedenen ROI's (wie in Abbildung 4.4 gezeigt) eingezeichnet werden. Das Messprogramm hat dann Bilder vor, während und nach der Bleichung aufgenommen. Der dadurch erhaltene Intensitätsverlauf wird in Abbildung 4.5 gezeigt.

- ROI 1: Der zu bleichende Bereich
- ROI 2: Die Zellmembran (oder ein Teil)
- ROI 3: Eine helle Stelle

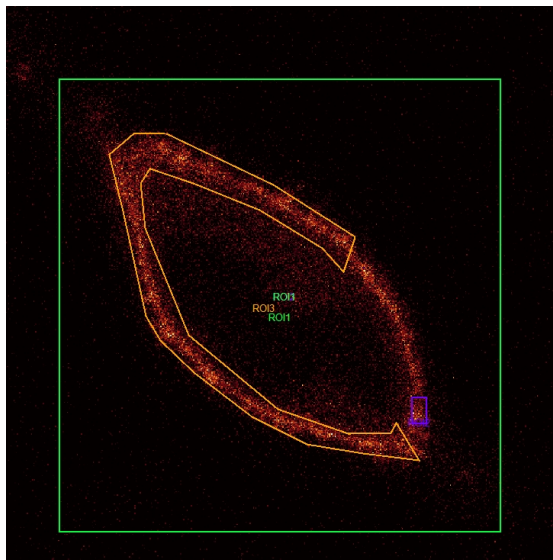


Abbildung 4.4: Darstellung der verschiedenen ROI's

4.2 Donoremission nach Akzeptorbleichung

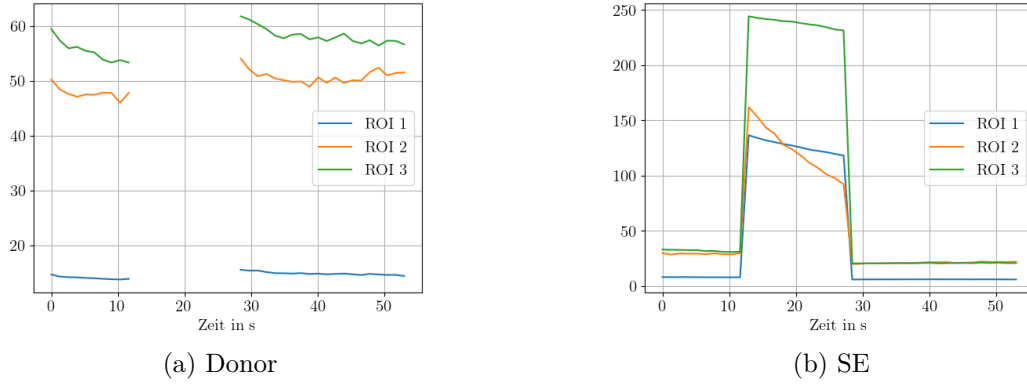


Abbildung 4.5: Zeitverlauf der verschiedenen Kanäle

Mithilfe eines Pythonskripts wurde die Formel 4.14 auf die einzelnen ROI's der Verschiedene Dateien, die mittels des Messprogramms erstellt wurden, angewendet. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Datenreihe	ROI 1	ROI 2	ROI 3
CY-1-D	0.003505	0.030953	-0.000090
CY-10-D	0.026029	0.135385	0.072495
CY-2-D	0.053433	0.059482	0.048435
CY-3-D	0.012226	0.032995	0.110722
CY-4-D	0.024620	0.036954	-0.000083
CY-5-D	-0.018922	0.053814	0.053266
CY-6-D	0.021359	0.048867	0.069277
CY-7-D	0.035247	0.084725	0.069380
CY-8-D	0.027918	0.141295	0.051616
CY-9-D	0.064711	0.024094	0.129895

Tabelle 4.4: E-Werte für die verschiedenen ROIs der CY markierten Zellen

Es fällt auf das die Werte, aus der Tabelle 4.4, teilweise sehr klein sind und auch ein paar negativ sind. Dies lässt auf eine unvollständige Bleichung schließen.

Die Werte aus Tabelle 4.5 sind sehr nahe der Null, was durch das nicht Auftreten von FRET zu erklären ist.

Um beurteilen zu können, wie erfolgreich die Bleichung war bilden wir folgendes Verhältnis:

$$B = \frac{A_{\text{YFP,post}}}{A_{\text{YFP,pre}}} \quad (4.15)$$

Dieses Verhältnis gibt in etwa an, wie viele Prozent des YFP Farbstoffs gebleicht wurde.

4 Auswertung und Diskussion

Datenreihe	ROI 1	ROI 2	ROI 3
CFP-1-D	0.003468	-0.156688	-0.014746
CFP-2-D	0.003118	0.007835	-0.019275
CFP-3-D	-0.031038	-0.180530	-0.014738
CFP-4-D	-0.017252	-0.071758	-0.085887
CFP-5-D	0.003289	0.061643	0.031072

Tabelle 4.5: E-Werte für die verschiedenen ROIs der CFP markierten Zellen

Datenreihe	ROI 1	ROI 2	ROI 3
YFP-1.csv	0.571593	0.421920	0.413914
YFP-2.csv	0.291005	0.131434	0.232582
YFP-3.csv	0.343894	0.221762	0.255577

Tabelle 4.6: B-Werte, nach Formel 4.15, für die verschiedenen ROIs der YFP markierten Zellen

Aus Tabelle 4.6 geht hervor, dass die erforderliche Bleichung um mindestens 50% bis auf eine Ausnahme nicht erreicht wurde. Dies erklärt, weshalb die Werte aus Tabelle 4.4 sehr klein und teilweise negativ sind.

Um die FRET-Effizienz mit dieser Methode zuverlässig messen zu können, sollte auf eine Ausreichende Bleichung geachtet werden.

4.3 Lebenszeitmessung

1) Single-Exponential Fit

Zu Beginn der Auswertung wollen wir einen „Single-Exponential Fit“ durch den Datensatz legen. Dieser Fit hat die Form:

$$N(t) = N_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.16)$$

Wir wählen zum fitten eine Anfangszeit $t_0 = 5 \text{ ns}$, um sicher zu sein, dass wir im exponentiellen Abschnitt der Daten befinden. Für die Anfangsintensität N_0 wählen wir denjenigen Wert der aufgenommenen Messreihe zur Anfangszeit t_0 , also $N_0 = N(t_0)$, besitzt. Damit ergibt sich nur noch die Lebenszeit τ als gefitteter Parameter. Damit ergibt sich folgende Tabelle:

Kanal 1			Kanal 2		
Probe	N_0	τ/ns	Probe	N_0	τ/ns
CFP1	3711	2.93	CFP1	744	4.07
CFP2	3366	2.86	CFP2	323	3.30
CFP3	6192	2.86	CFP3	644	3.41
Mittelwert		2.88	Mittelwert		3.59

Probe	N_0	τ/ns	Probe	N_0	τ/ns
YFP1	15060	3.12	YFP1	854	3.26
YFP2	28347	3.11	YFP2	1205	3.41
YFP3	8363	3.26	YFP3	381	3.33
Mittelwert		3.16	Mittelwert		3.33

Probe	N_0	τ/ns	Probe	N_0	τ/ns
CY1	11083	3.09	CY1	725	3.08
CY2	10641	3.09	CY2	644	3.32
CY3	19567	3.10	CY3	932	3.30
CY4	6139	3.11	CY4	405	3.25
CY5	22002	3.05	CY5	1157	3.07
Mittelwert		3.09	Mittelwert		3.20

Tabelle 4.7: Gefittete Parameter bei einer Anfangszeit $t_0 = 5 \text{ ns}$

In Abb. 4.6 bis 4.9 sind die jeweiligen Fits für ein paar ausgewählte Proben dargestellt. Anzumerken ist, dass der Fit für die *CFP* Analyse von Kanal 2 nicht sehr aussagekräftig ist, da der exponentielle Abfall zu steil ist und damit ist der gewählte Fitbereich zu klein (gut zu sehen in Abb. 4.6).

4 Auswertung und Diskussion

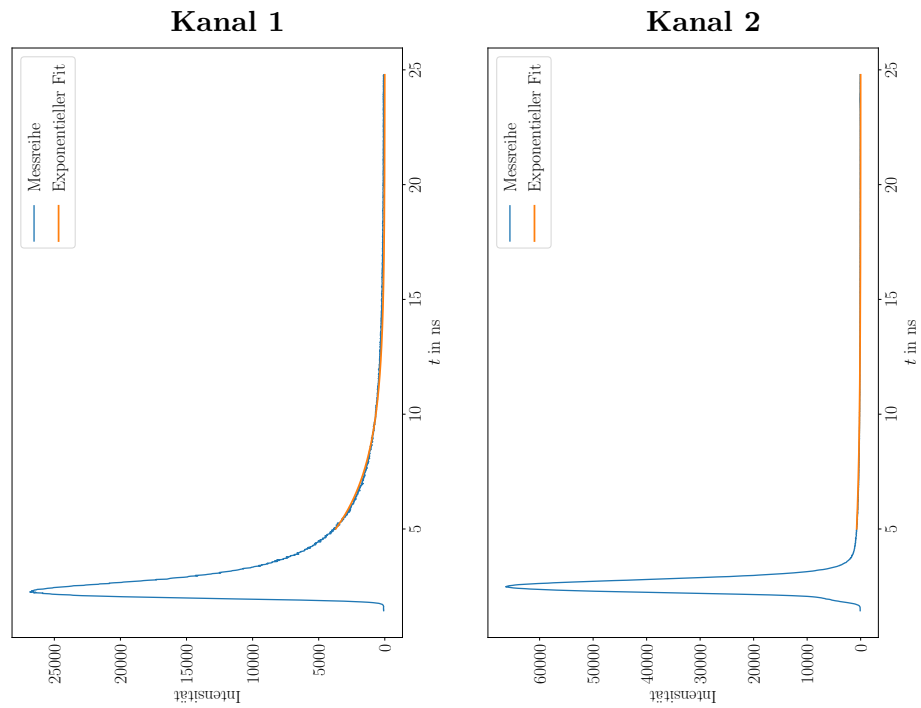


Abbildung 4.6: CFP1

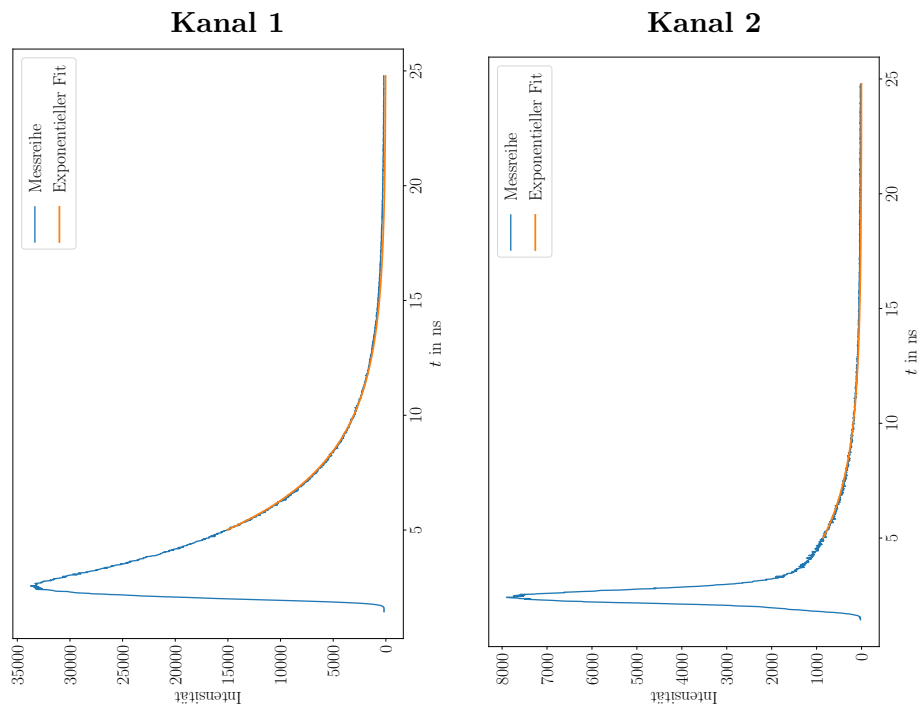


Abbildung 4.7: YFP1

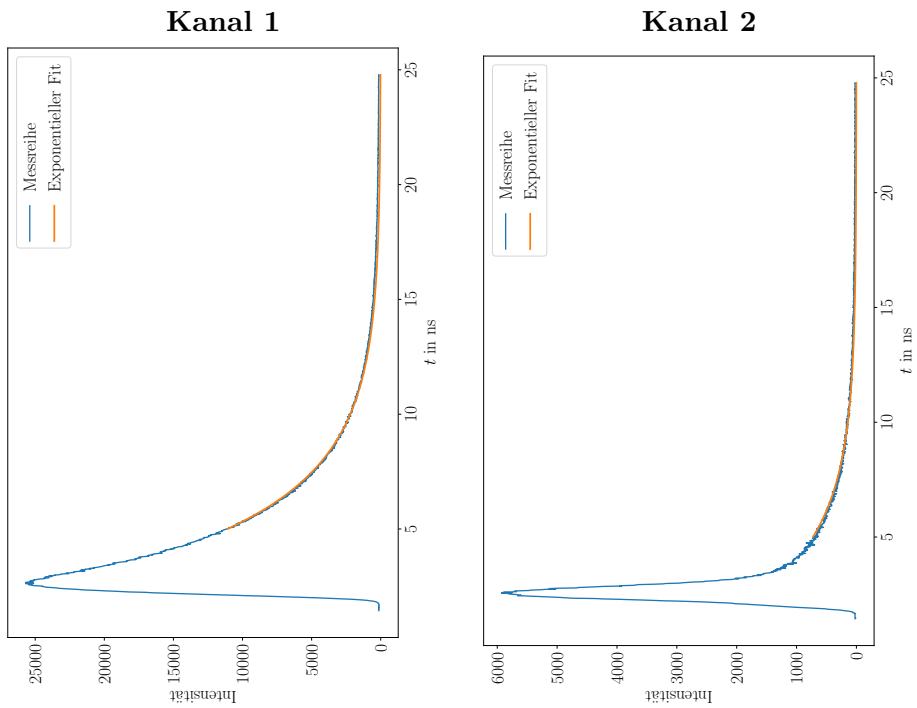


Abbildung 4.8: CY1

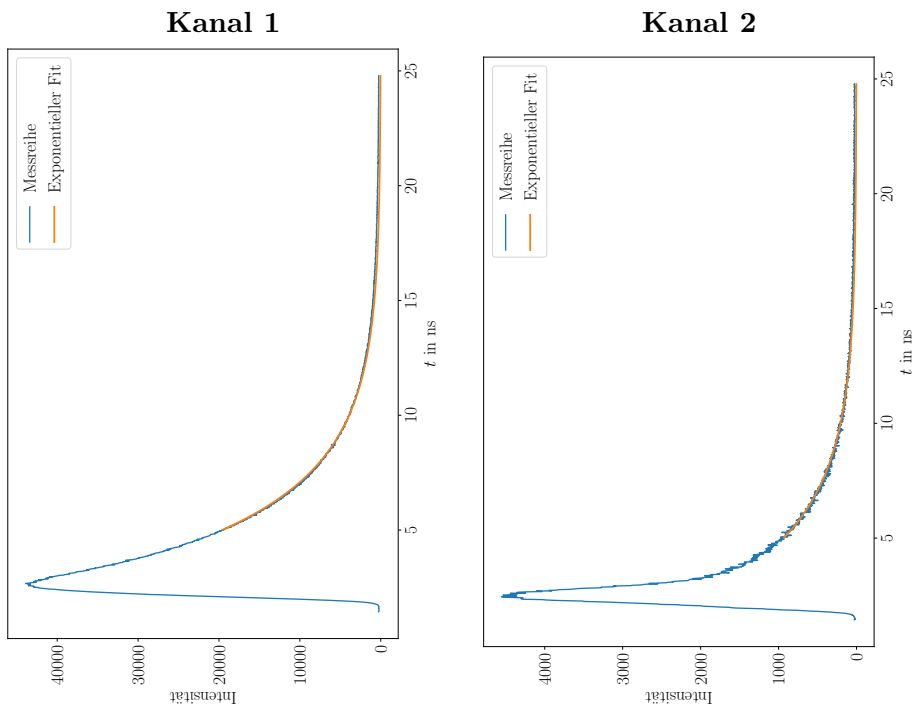


Abbildung 4.9: CY3

2) Double-Exponential Fit

Als nächstes wollen wir einen „Double-Exponential Fit“ durch einen ausgewählten Datensatz fitten. Wir haben uns dafür die Probe *CY5* und erneut für eine Anfangszeit $t_0 = 5$ ns entschieden. Wichtig ist anzumerken, dass wir für den Fit Kanal 1+2 betrachten. Der Fit hat dann die Form:

$$N(t) = N_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + N_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad (4.17)$$

Da dieser Fit vier Parameter besitzt, N_1 , N_2 , τ_1 , τ_2 , muss die Formel des Fits vereinfacht werden. Dafür klammern wir N_1 aus und somit hat der Fit die neue Form:

$$N(t) = N_1 \left[e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \frac{N_2}{N_1} e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right] \quad (4.18)$$

Für N_1 setzen wir die Intensität N_0 aus der Tabelle 4.7 für die Probe *CY5* aus Kanal 1. Weiterhin verwenden wir $\frac{N_2}{N_1}$ als „Guess-Parameter“ und verändern diesen zwischen 0 und 30 in kleinen Schritten. Durch diese Veränderung erhalten wir die Lebenszeiten von τ_1 und τ_2 als gefittete Parameter. Um den besten Fit zu finden, berechnen wir $\sum (y_{\text{data}} - y_{\text{fit}})^2$ und bestimmen davon das Minimum. Der Verlauf von $\sum (y_{\text{data}} - y_{\text{fit}})^2$ gegen $\frac{N_2}{N_1}$ ist in Abb. 4.11 dargestellt und der daraus resultierende Fit in Abb. 4.10. Weiterhin wurde in Abb. 4.12 der generelle Vorgang des Fitprozesses in Abhängigkeit von $\frac{N_2}{N_1}$ visualisiert.

Ergebnis

$\frac{N_2}{N_1}$	N_2	Min $\sum (y_{\text{data}} - y_{\text{fit}})^2$	τ_1	τ_2
5.51	121231	$0.001224 \cdot 10^{10}$	4.72	2.42

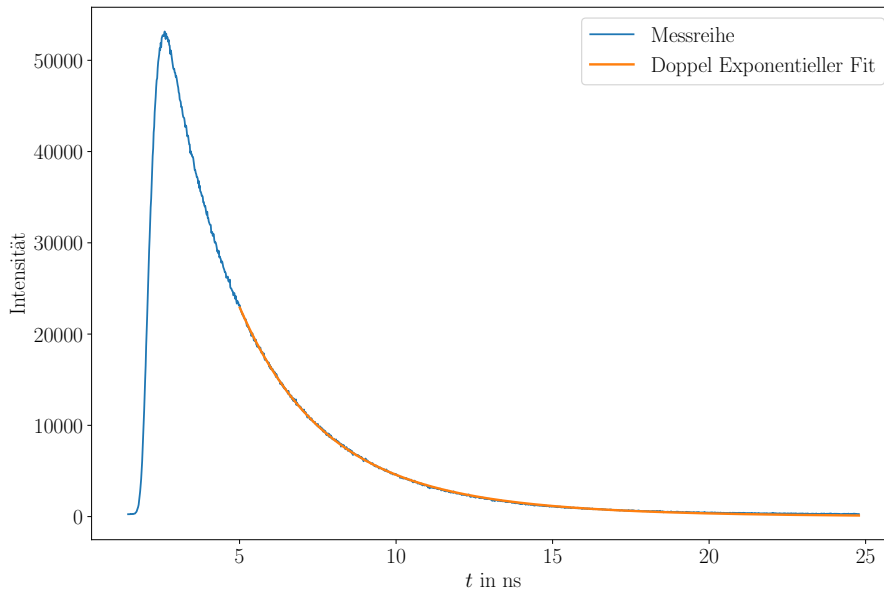


Abbildung 4.10: Optimalster Fit

4.3 Lebenszeitmessung

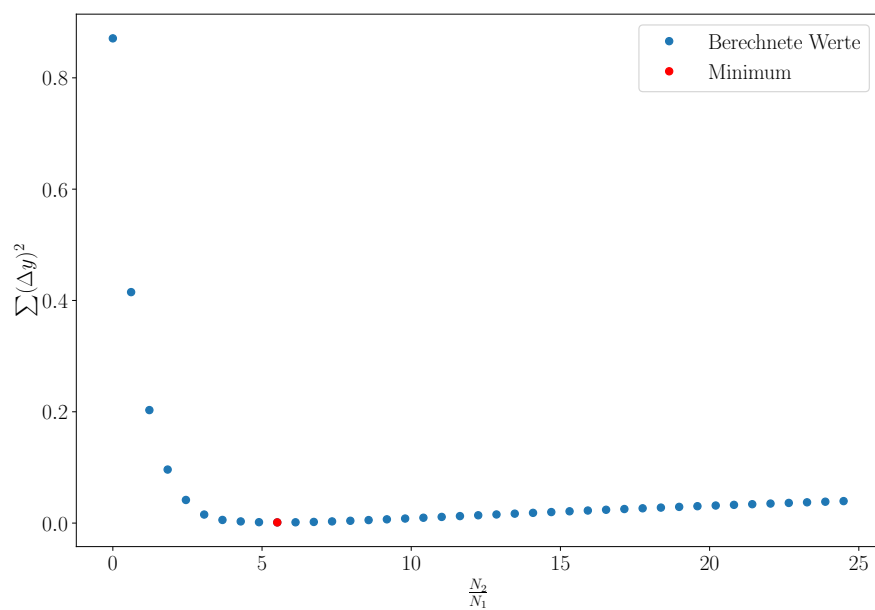


Abbildung 4.11: Optimierung: $\sum (y_{\text{data}} - y_{\text{fit}})^2$ gegen $\frac{N_2}{N_1}$

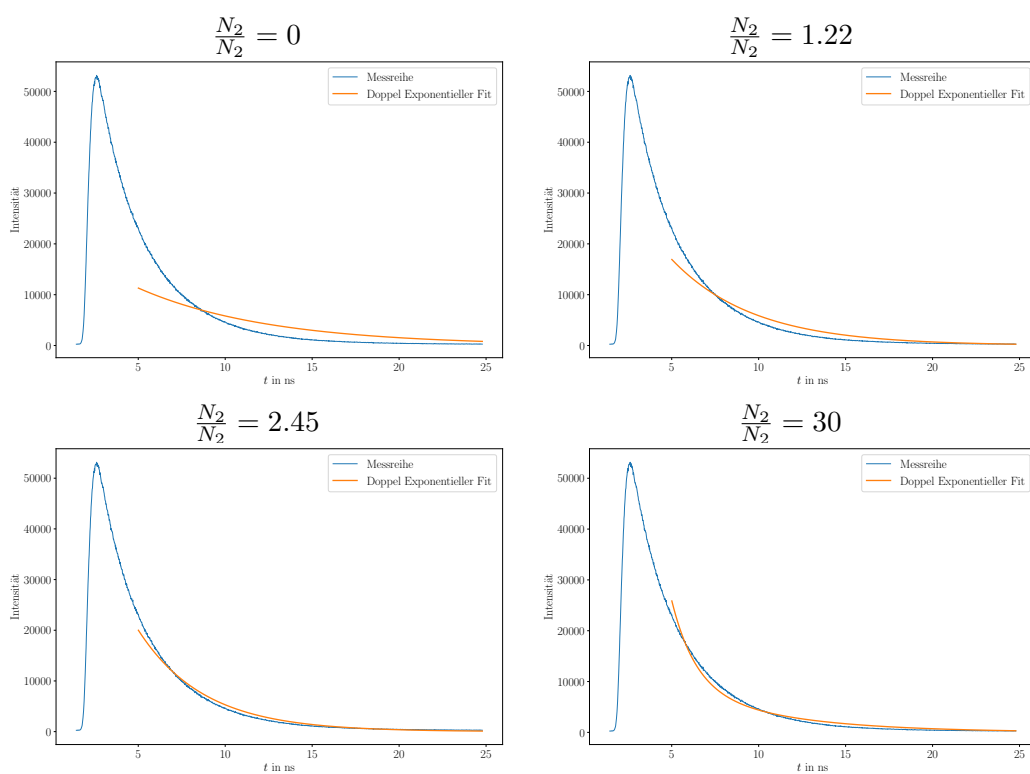


Abbildung 4.12: Einige ausgewählte Fits in Abhängigkeit von $\frac{N_2}{N_1}$

3) Convolution (dt. Faltung)

In diesem Abschnitt wollen wir die Faltung von der „Instrument Response Function“ (IRF) und der Funktion:

$$g(t) = \begin{cases} 0, & t < t_{\text{tot}} \\ N_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, & t \geq t_{\text{tot}} \end{cases} \quad (4.19)$$

Als Totzeit t_{tot} wird die Zeit des Maximums gewählt und als N_0 die Intensität bei t_{tot} , also $N_0 = N(t_{\text{tot}})$. Als Fitparameter wird τ verwendet. Die Faltung ist dann gegeben durch:

$$f(t) = \text{IRF} * g(t) \quad (4.20)$$

Als IRF benutzen wir einmal das aufgenommene Signal des IRF, das aufgenommene Signal an einer passenden Stelle gespiegelt und eine gefittete Gauß-Kurve an das IRF (siehe Abb. 4.13). Für die Gauß-Kurve benutzen wir die Formel:

$$N(t) = A \cdot \exp\left(-\left(\frac{(t - \mu)}{\sqrt{2}\sigma}\right)^2\right) \quad (4.21)$$

Für die Parameter erhalten wir dann $A = 24986$, $\mu = 2.20$ und $\sigma = 0.21$.

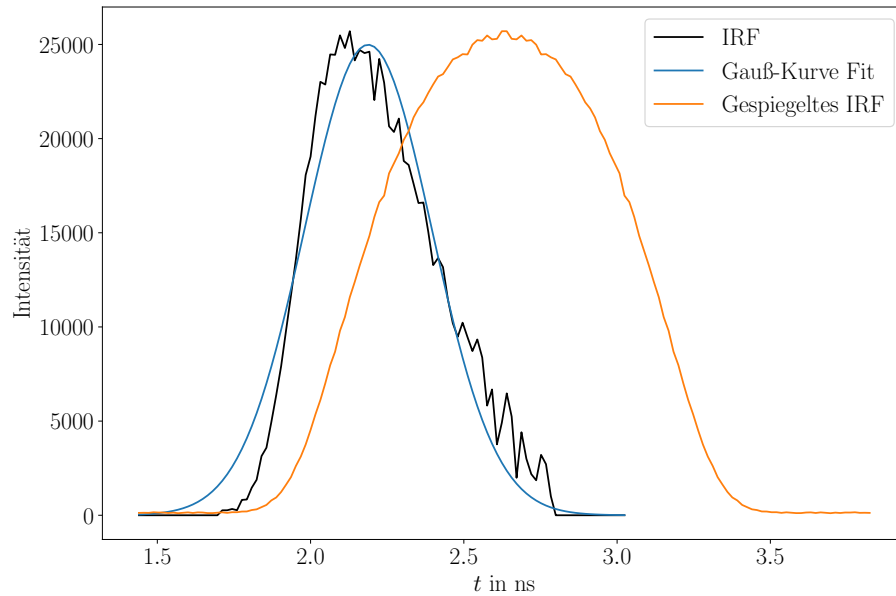


Abbildung 4.13: Verwendete IRF

Für die Faltung verwenden wir das `scipy.signal`-Module mit der Funktion `convolve`. Dabei normieren wir die Faltung mit der Summe aller Werte der verwendeten IRF (also $\sum y_{\text{IRF}}$). Beim fitten verändern wir nun schrittweise τ von 2 ns bis 5 ns. Um den Fit zu optimieren, verwenden wir dieselbe Methode wie in Abschnitt (2) dieses Kapitels und minimieren damit die $\sum (y_{\text{data}} - y_{\text{fit}})^2$. Die besten Fits sind in Abb. 4.14 bis 4.16 mit dem zugehörigen Verlauf von $\sum (y_{\text{data}} - y_{\text{fit}})^2$ gegen τ .

Ergebnis		
IRF	Min $\sum (y_{\text{data}} - y_{\text{fit}})^2$	τ
Aufgenommen	$0.000041 \cdot 10^{12}$	3.4694
Gespiegelte	$0.000043 \cdot 10^{12}$	3.4694
Gauß-Kurve	$0.000042 \cdot 10^{12}$	3.4694

Es ist ersichtlich, dass alle drei verwendeten Arten von IRF gleichwertig behandelt werden können, da die Werte für τ bei allen drei Arten von IRF gleich sind. Ein Unterschied könnte ersichtlich werden, wenn man noch kleinere Schritte zwischen 2 ns und 5 ns macht. Auch ist anzumerken, dass die gefittete Faltung kleiner ist als die tatsächlich gemessene Funktion, was mit der gewählten Normierung zusammenhängen könnte.

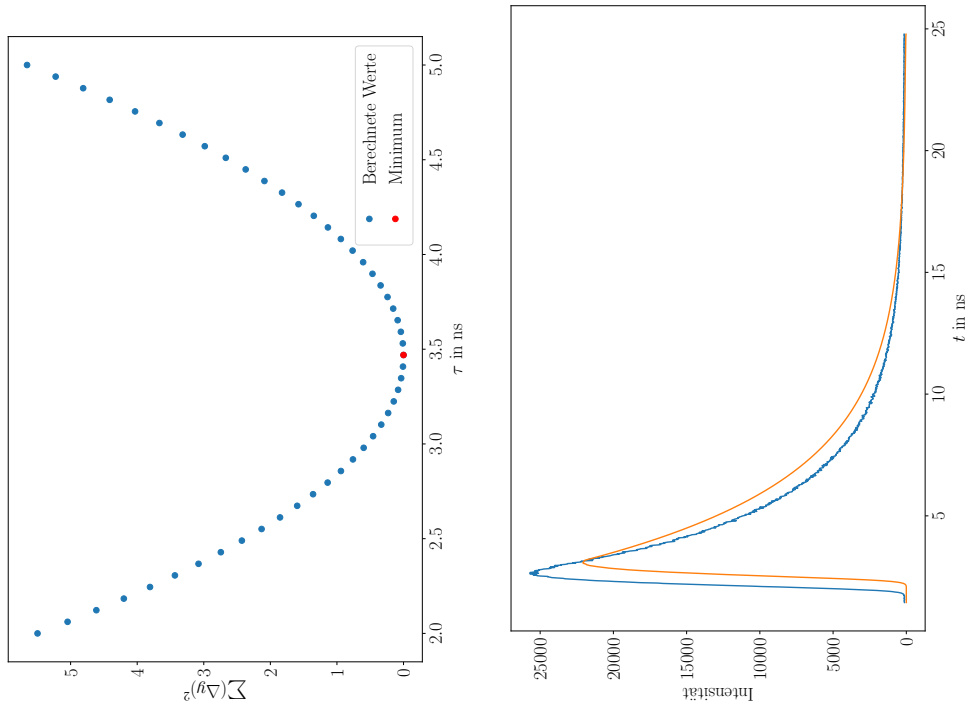


Abbildung 4.14: Fit für aufgenommenes IRF

4 Auswertung und Diskussion

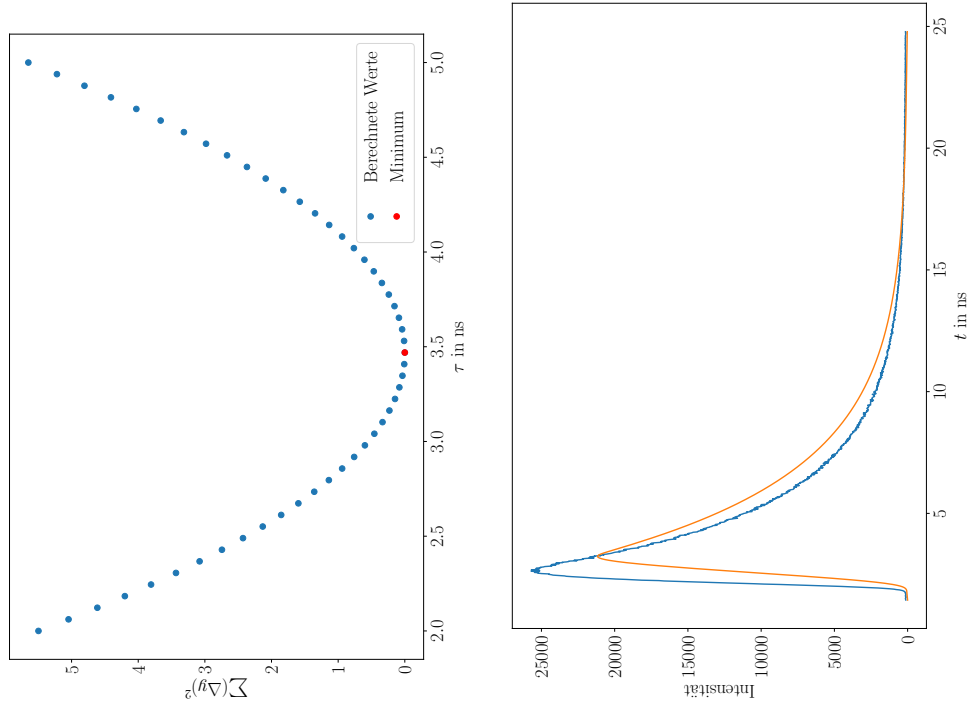


Abbildung 4.15: Fit für gespiegeltes IRF

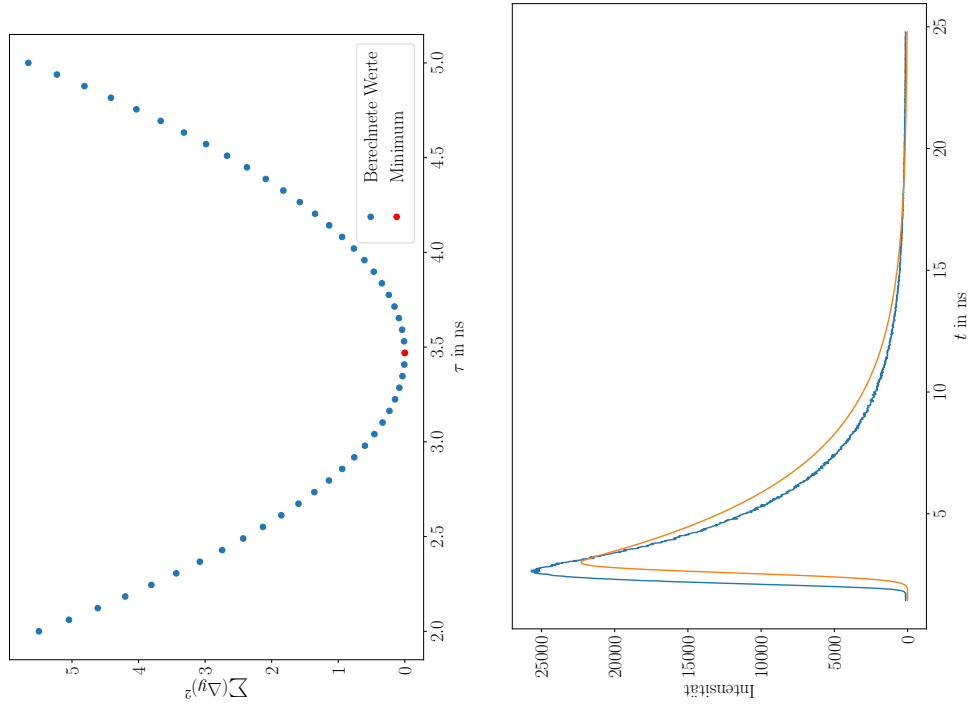


Abbildung 4.16: Fit für Gauß-Kurve

4) FRET-Effizienz

Die FRET-Effizienz berechnet sich aus den berechneten Daten wie folgt:

$$E = 1 - \frac{\tau_{\text{C,Donor}}}{\tau_{\text{CY,Donor}}} \quad (4.22)$$

Dafür verwenden wir die Mittelwerte aus Tabelle 4.7 für CFP und CY von Kanal 1 und erhalten eine Effizienz $E = 0,07$.

5 Fazit

Dieser Versuch hat uns einen guten Einblick in die Biophysik und deren Methoden gegeben. Dafür konnten wir uns besser mit dem Konzept des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) beschäftigen und das gewonnene Wissen in der Praxis anwenden. Durch die drei unterschiedlichen Messmethoden der FRET-Effizienz haben wir auch die Wichtigkeit, der jeweiligen Messmethode erkannt und deren Konzepte verinnerlicht.

Literaturverzeichnis

- [1] Photobleichung. URL <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Photobleichung&oldid=192798269>.
- [2] Chemie.de. Förster-radius, 2021. URL <https://www.chemie.de/lexikon/F%C3%B6rster-Radius.html>.
- [3] EPI Universität Bayreuth. FÖRSTERRESONANZENERGIETRANSFER (FRET) AN BIOLOGISCHEN PROBEN. Internes Dokument, 2018.
- [4] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, 3. edition, 2006.
- [5] Michael Wahl. Time-correlated single photon counting, 2014. URL https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf.