



Doctoral Thesis

Quantitative fluorescence resonance energy transfer microscopy

Author(s):

Berney, Claude Pascal

Publication Date:

2003

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004621373> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by

Claude Pascal Berney

Dipl. Phys. EPFL

Born 15.08.1972

Citizen of Saint-Prex (VD) and L'Abbaye (VD)

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Gaudenz Danuser, examiner

Prof. Dr. Horst Vogel, co-examiner

Prof. Dr. Matthias Peter, co-examiner

2003

Summary

This thesis reports the development of a Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy system to study the interaction between Bem1p and Cdc24p, two proteins involved in polarization and budding of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FRET is a process by which an excited fluorophore, the donor, can transfer its energy in a non-radiative manner to a nearby fluorophore, the acceptor. This leads to a decrease of fluorescence of the donor and an increase of fluorescence of the acceptor. The probability of occurrence of this process is directly dependent on the distance between the donor and the acceptor, the relative orientation of the two dipoles and the overlap between the emission spectrum of the donor and the absorption spectrum of the acceptor.

In the case of the two target proteins, it has been shown by biochemical assays that they bind to each other. If a donor and an acceptor are fused to Bem1p and Cdc24p, respectively, the binding of the two proteins should bring them in close proximity, allowing the occurrence of FRET.

To test this hypothesis and to study the interaction between the two proteins, *in vivo*, we have developed a framework to understand the components of a FRET signal and how such a signal can be measured and related to protein-protein interaction. Such a FRET system is composed of 1) A numerical model providing reference values of FRET efficiency; 2) A controlled experimental FRET system and 3) A mathematical approach to calculate FRET efficiency from experimental data.

The primary aim of this thesis is to serve as a reference for Quantitative FRET Microscopy. In order to reach a broad audience, I have found it necessary to start with an overview of the photophysics of fluorescence and FRET. This discussion of FRET is extended to other techniques of fluorescence spectroscopy outside the immediate scope of the present study (Chapter 1).

Chapter 2 reviews the main methods proposed in the literature for observation and measurement of FRET. Chapter 3 describes the establishment of our controlled surface FRET system. This FRET system has been modeled and simulated in Chapter 4, which presents the algorithm and key results of the computer-generated reference values. Altogether, these three chapters constitute the framework of our Quantitative FRET Microscopy System.

This system is used in Chapter 5 to determine the stability and reproducibility of the FRET methods discussed in Chapter 2. We use the FRET surface system with different parameters (Variation in the fluorophore concentrations, variation in the donor-to acceptor ratios or variation in the fluorophores pairs), and compare these results with reference values obtained from the simulation described in Chapter 4. It turns out that most methods yield comparable performance in the way they correct for signal biases. The main differences are due to unfavorable propagation of the signal-to-noise ratios, inherent to their observation strategies

The same concept of FRET system has been applied to study protein-protein interaction in Chapter 6. In order to keep our system controlled, we have first used two proteins known to dimerize. Second, we have repeated the experiment with the binding domains of Cdc24p and Bem1p. The results obtained in the *in vitro* system will help developing further experiments to be performed on the *in vivo* protein system in yeast budding. The analysis of the results obtained with these systems has demonstrated the importance of the binding kinetics and binding constants for the determination of the FRET efficiency. The conclusions of these last two chapters will provide guidelines to perform further *in vivo* FRET experiments.

Résumé

Cette thèse décrit le développement d'un système quantitatif de Microscopie permettant de mesurer le Transfert d'Énergie par Résonance de Fluorescence ('Fluorescence Resonance Energy Transfer', FRET). Un tel système doit nous permettre d'étudier l'interaction entre Bem1 et Cdc24, deux protéines impliquées dans la polarisation et le bourgeonnement de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

FRET est un processus par lequel un fluorophore excité, le donneur, peut transférer de manière non radiative son énergie à un fluorophore voisin, l'accepteur. Ce phénomène induit une diminution de l'intensité de fluorescence du donneur et une augmentation de la fluorescence de l'accepteur. La probabilité qu'un tel événement ait lieu dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur, de l'orientation relative entre les dipôles et du chevauchement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'excitation de l'accepteur.

Dans le cas des deux protéines citées ci-dessus, il a été montré par analyses biochimiques qu'elles se liaient l'une avec l'autre. Si un donneur et un accepteur sont fusionnés à Bem1 ou Cdc24, respectivement, la liaison des deux protéines devrait amener ces fluorophores assez près l'un de l'autre pour permettre un transfert d'énergie.

Pour tester cette hypothèse et étudier l'interaction entre deux protéines, *in vivo*, nous avons ainsi développé un système nous permettant de comprendre quels sont les composants d'un signal FRET et comment un tel signal peut être mesuré et relié à une interaction protéine-protéine. Un tel système est composé de: 1) Un modèle numérique fournissant des valeurs de référence pour l'efficacité de FRET ; 2) Un système expérimental contrôlé ; et 3) Une méthode mathématique permettant de calculer l'efficacité de FRET à partir des mesures effectuées sur le système expérimental.

Le but premier d'un tel travail est de servir de référence à la microscopie quantitative de FRET. Ainsi, la théorie proposée dans le Chapitre 1 a pour but de familiariser une audience étendue avec les bases de la photophysique de la fluorescence et de FRET. La discussion sur FRET est étendue à d'autres techniques de spectroscopie de fluorescence, hors du cadre immédiat de cette thèse.

Le Chapitre 2 passe en revue les principales méthodes proposées dans la littérature pour observer et mesurer un signal FRET. Le Chapitre 3 décrit l'établissement d'un système contrôlé de FRET en surface. Ce système a été modélisé au Chapitre 4. Ce dernier présente l'algorithme et les principaux résultats liés à la génération par ordinateur des

valeurs de référence. Ensemble, ces trois chapitres constituent le système de FRET par microscopie quantitative.

Ce système est utilisé au Chapitre 5 pour déterminer la stabilité et la reproductibilité des méthodes décrites au Chapitre 2. Nous utilisons pour ce faire le système de FRET en surface en variant différents paramètres tels que proportion donneurs-accepteurs, concentrations des fluorophores ou paire de fluorophores. Ces résultats sont comparés aux valeurs de références obtenues au Chapitre 4. Il s'avère que la plupart des méthodes donnent des résultats comparables dans leur manière de corriger les impuretés des signaux. La principale différence réside dans la propagation défavorable du rapport signal/bruit, inhérente à leurs stratégies d'observation.

Ce même concept a été appliqué au Chapitre 6 afin d'étudier l'interaction protéine-protéine. De manière à garder le control de notre system, nous avons, dans un premier temps, utilisé deux protéines supposées former un dimer. Nous avons ensuite répété cette expérience avec les domaines de liaisons de Bem1p et Cdc24p. Les résultats ainsi obtenus nous permettrons de développer les expérience sur les deux protéines entières *in vivo* dans la levure. L'analyse des résultats ainsi obtenus a permis de mettre en évidence l'importance de la cinétique de liaison et des différentes constantes qui la gouvernent dans l'estimation de l'efficacité de transfert.

Les conclusions de ces deux derniers chapitres procurent quelques recommandations pour l'élaboration de nouvelles expériences *in vivo* utilisant la technologie FRET.