Calcolo coefficienti per settare le condizioni di background FRET

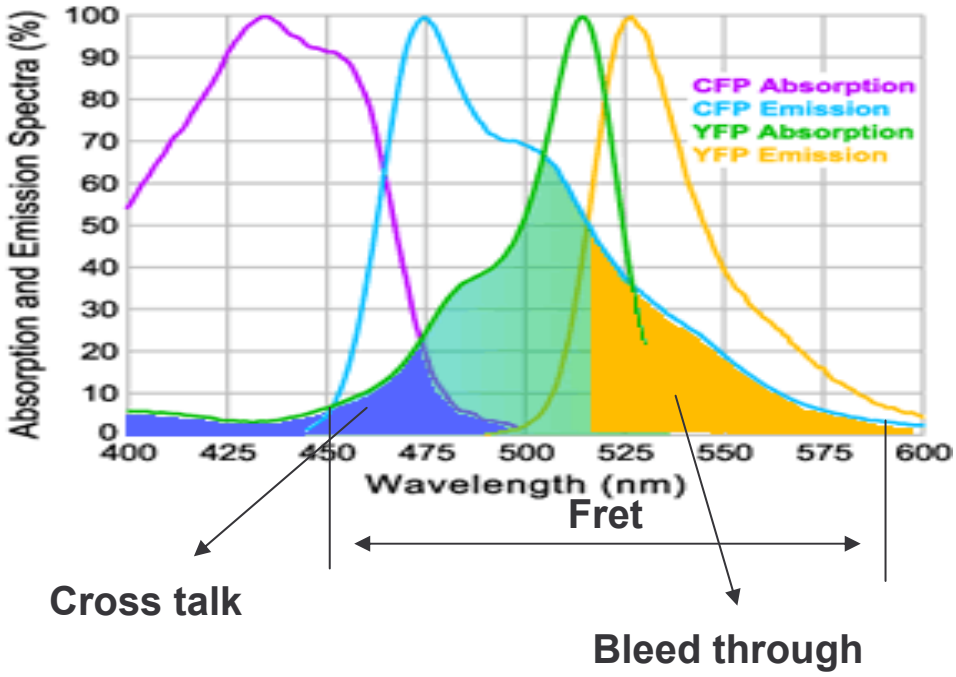
Devo individuare due coefficienti che mi permettano di eliminare il segnale dato dal bleed throught e dal cross talk che sono dati dal set up sperimentale del sistema e dall'interferenza delle code di eccitazione e emissione dei due fluorofori e per una sovrapposizione di passaggio di λ tra i due filtri.

- BLEED THROUGH: passaggio della λem D nel filtro specifico per la λem A
- CROSS TALK: passaggio della λex che entra nello spettro di eccitazione di A

In sostanza, il segnale che ottengo al microscopio eccitando D e guardando A su un campione cotrasfettato viene quindi definito come RAW FRET che risulta essere al somma di:

- Raw fret= Fret + Bleed through + Cross talk

Per calcolare la Fret pura, devo quindi "pulire" La raw fret da tutto ciò che passa attraverso i filtri o gli spettri di eccitazione.



Nella formula di correzione uso due parametri:

- α: I_{DA}/I_{DD} In un campione solo D valuto quanta IemD passa nel filtro A in rapporto a quanto segnale ho di IemD sul filtro D
- β: I_{DA}/I_{AA} In un campione solo A valuto quanta Iem ho nel filtro A eccitando con la λex D in rapporto a quanto segnale ho se eccito A con la sua λex

Questi parametri, una volta calcolati, restano fissi fino a quando non vario il set up sperimentale o il tipo di fluorofori utilizzati

!!! α e β sono due rapporti di livelli di grigio, quindi non variano al variare dei tempi di esposizione.

In pratica: Devo acquisire quattro immagini per individuare i miei coefficienti specifici per questo tipo di campione

Le quattro immagini devono essere prese possibilmente con lo stesso tempo di esposizione e comunque almeno le immagini dello stesso coefficiente devono tassativamente venire prese nelle stesse condizioni.
Una volta ottenute le quattro immagini, le devo metterle in soglia prendendo tutto quello che non è chiaramente fondo, mantenendo il più possibile simili le aree del threshold.
Quando ho individuato il threshold, seleziono l'area d'analisi possibilmente adattandola il meglio possibile alla mia cellula, e vado a vedere il valore di AVERAGE in <u>show region statistics.</u>

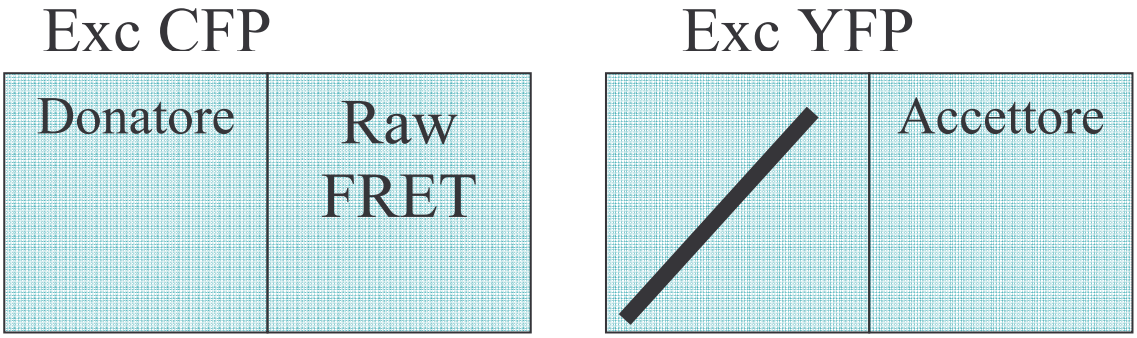
- La cosa migliore è mettere in soglia diverse immagini (almeno 10) in modo da avere dei coefficienti che derivano da una media dei livelli di grigio registrati in più punti.
  Questo può venire fatto anche con due esperimenti temporalmente differenti, giusto per avere la sicurezza che i valori di average siano pressoché costanti.

Calcoli FRET:

Tutte le analisi da qui in poi si fanno su campioni cotrasfettati eccitandoli a lunghezze d'onda differenti ma sempre con gli stessi settaggi (tempi di esposizione, binning, gain, area selezionata, fuoco, ottiche, eventuale sottrazione di background...)

- Bisogna prendere tre immagini dell'esperimento vero e proprio dopo aver messo in soglia i valori dei coefficienti di correzione ottica:
  DONATORE--> CFP ex λCFP
  ACCETTORE--> YFP ex λYFP
  RAW FRET--> YFP ex λCFP

  In verità le immagini che vengono prese sono solo due con il beam split chiuso e il dicroico della CFP posizionato sul revolver del microscopio.
  La prima immagine illuminando il campione con la λ exc per CFP mi da a sinistra il donatore e a destra la raw fret, mentre la seconda illuminando il campione con la λ ex per YFP mi da a sinistra un campo vuoto o comunque inutile e a destra il mio accettore



Bisogna stare attenti ad allineare le due immagini ottenute dallo split view perchè con λ differenti potrei ottenere uno spostamento parziale dell'immagine dovuta a differenti indici di rifrazione. (foto4 e 5)

Una volta ottenute le tre foto, posso effettivamente andarmi a calcolare il valore di fret pulita tramite una formula matematica:

Corrected FRET: $(Ida-k)-[\alpha*(Idd-k)]-[\beta*(Iaa-k)]$

Ida: Raw fret
Idd: donatore
Iaa: accettore
K: eventuale correzione di background (può essere fatto o no, non cambia il sagnale di fret ma rende l'immagine solo più pulita)

A livello di esperimenti però il dato di fret corretta non è poi molto significativo, ma è molto più utile fate una valutazione delle variazioni nell'intensità del segnale di fret che ottengo dopo stimolazione per vedere eventuali cambiamenti di interazione fra i due recettori coniugati al fluoroforo, cioe' ***raw fret/CFP***
Con metamorph questa analisi viene fatta tramite una lettura dei grafici di intensità luminosa dei singoli punti(tool: graph intensity)