

Anizotropie fluorescence

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr



Oddělení funkční genomiky a proteomiky

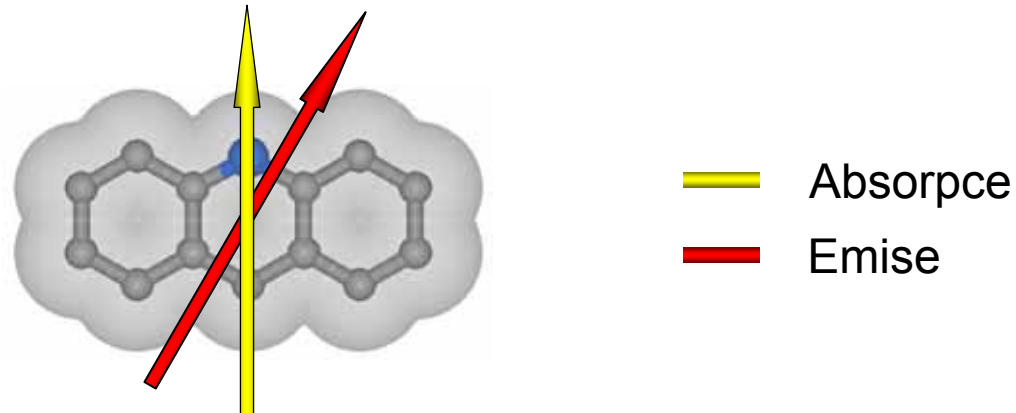
Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Brno, Česká republika

FGIP

Jev anizotropie

- Jestliže dochází k excitaci světlem kmitajícím v jedné rovině, emise fluorescence se často stává polarizovanou.
- Úroveň polarizace emise je popsána veličinou anizotropie (nestejnorodostí). Látky, které vykazují určitý stupeň nestejnorodosti, emitují polarizovanou fluorescenci.
- Co způsobuje, že je emitované světlo polarizované?

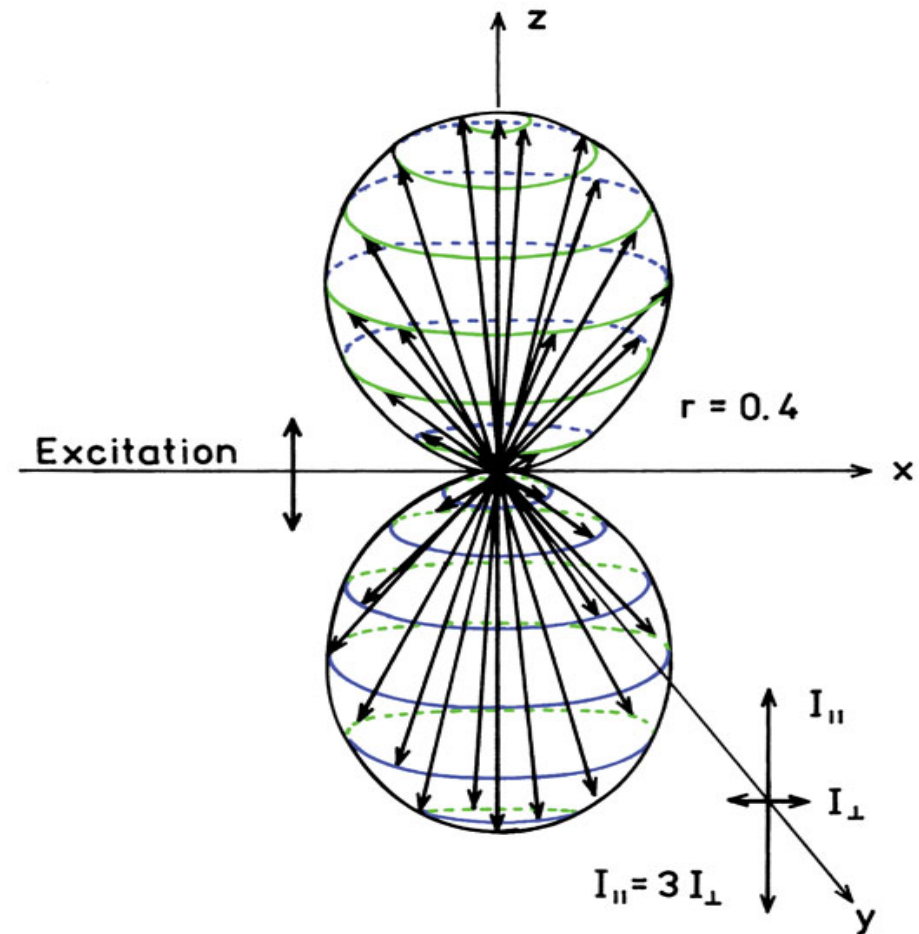
Dipólové momenty přechodu



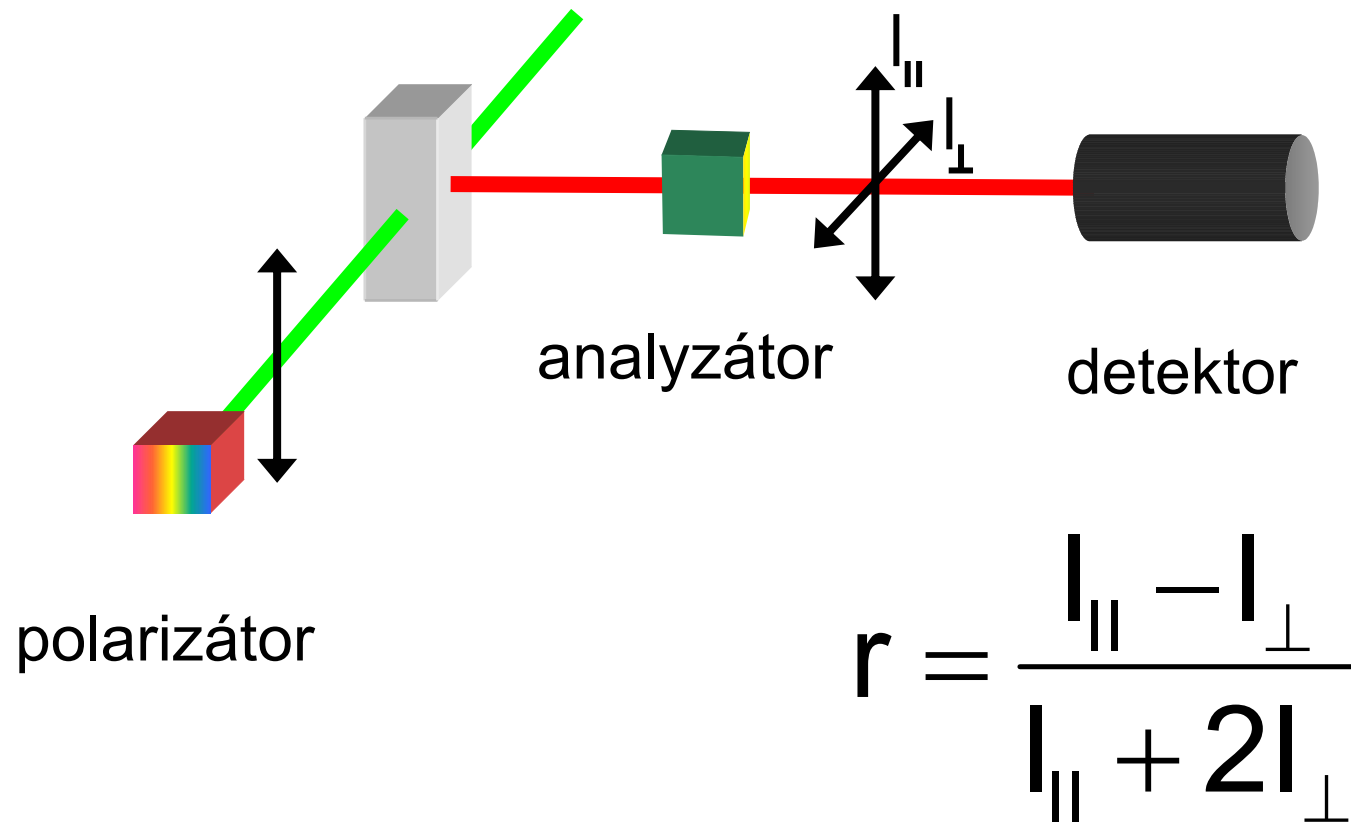
- **Dipólový moment přechodu** je kvantově mechanická záležitost. Není skutečným dipólovým momentem. Je dán okamžitým stavem elektronového obalu molekuly. Velikost dipólového momentu přechodu udává schopnost daného stavu molekuly absorbovat nebo emitovat světlo. Směr dipólového momentu přechodu udává směr, ve kterém je světlo molekulou nejlépe absorbováno nebo emitováno.
- Molekuly přednostně absorbují záření, jehož elektrická složka kmitá ve stejné rovině jako je **absorpční dipólový moment přechodu** elektronu do vyšší energetické hladiny.
- Molekuly přednostně emitují záření ve stejné rovině jako je **emisní dipólový moment přechodu** elektronu do nižší energetické hladiny.

Fotoselekce

- Je-li roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, potom budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace budícího záření



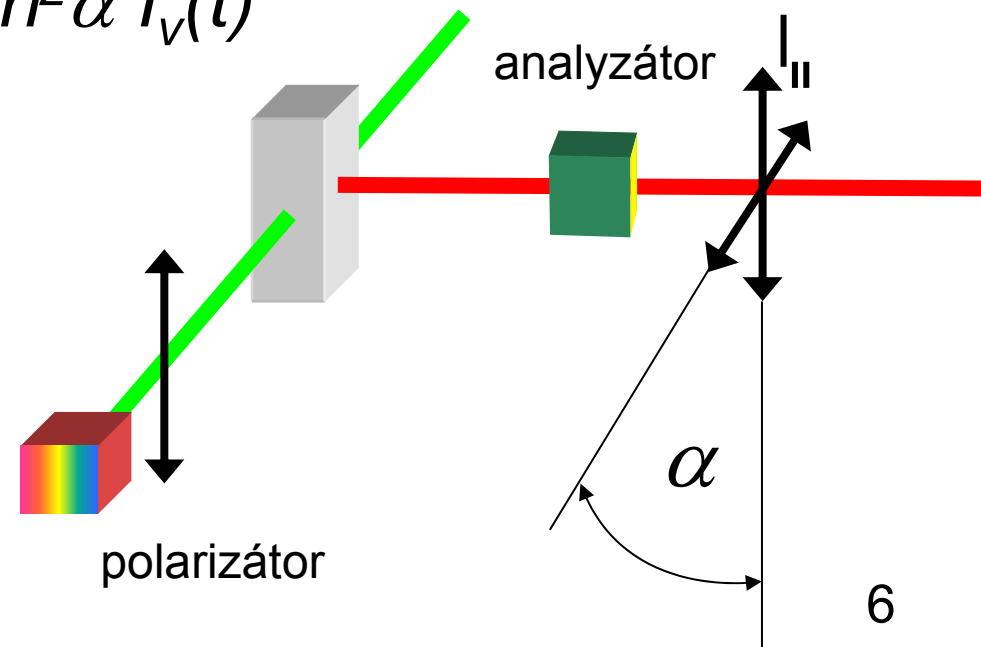
Anizotropie fluorescence



Intenzita fluorescence

Z teorie depolarizace fluorescence vyplývá, že intenzita fluorescence pozorovaná pomocí analyzátoru, který je otočen o úhel α od směru rovnoběžné polarizace je

$$I_{\alpha}(t) = \cos^2 \alpha I_{||}(t) + \sin^2 \alpha I_{\perp}(t)$$



Při jakém úhlu natočení polarizátorů α můžeme změřit celkovou intenzitu fluorescence?

- Celková intenzita fluorescence

$$I_{celk} = I_{II} + 2I_{\perp}$$

$$I_{\alpha} = \sin^2 \alpha \cdot I_{II} + \cos^2 \alpha \cdot I_{\perp}$$

$$\cos \alpha = \sqrt{\frac{1}{3}} \quad \sin^2 \alpha + \cos^2 \alpha = 1$$

$$\alpha = 54,7^{\circ}$$

Celková intenzita se měří při magickém úhlu

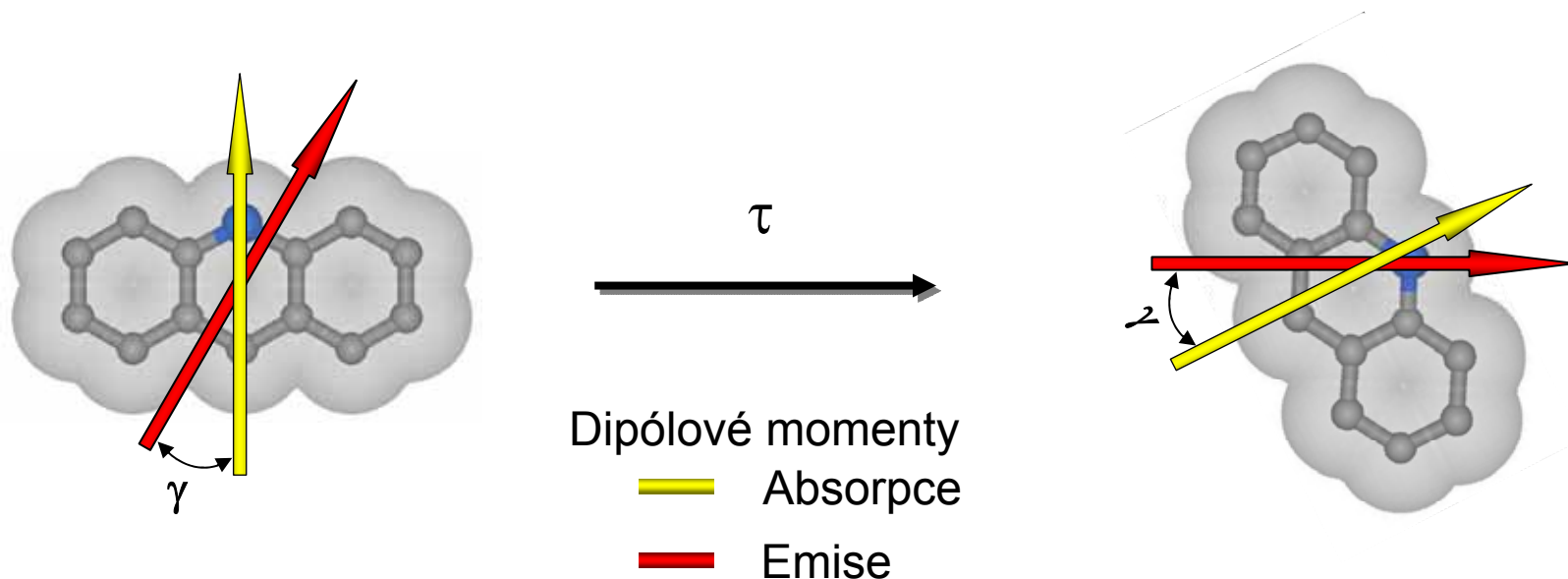
- Celková intenzita $I(t) = I_{||}(t) + 2 I_{\perp}(t)$ nezávisí na rotačním pohybu fluoroforu a měří se pod „magickým“ úhlem $54,7^{\circ}$

Časová závislost polarizované fluorescence

a pro časovou závislost anizotropie platí

$$r(t) = (3 \cos^2 \gamma(t) - 1)/5$$

kde γ je - úhel dipólové reorientace v čase od 0 do t
- úhel mezi dipólovým momentem absorpce a emise



Maximální hodnota anizotropie

$$r_0 = \frac{(3 \cos^2 \gamma - 1)}{5}$$

- Ze vztahu plyne, že za nepřítomnosti depolarizace (např. ve zředěných zmrzlých roztocích za nepřítomnosti depolarizačních mechanismů a za předpokladu, že jsou přechodové momenty absorpce a emise rovnoběžné) je mezní hodnota anizotropie fluorescence buzené polarizovaným zářením dána pouze fotoselekcí.

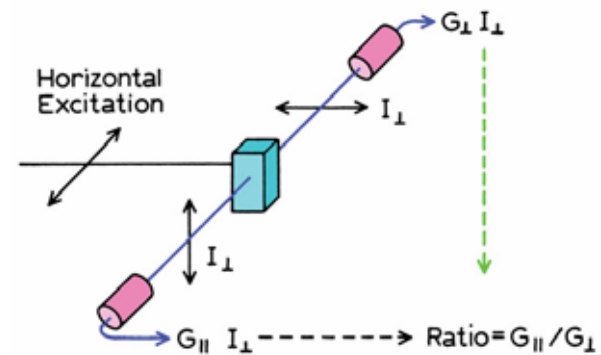
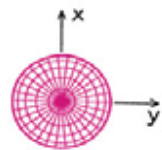
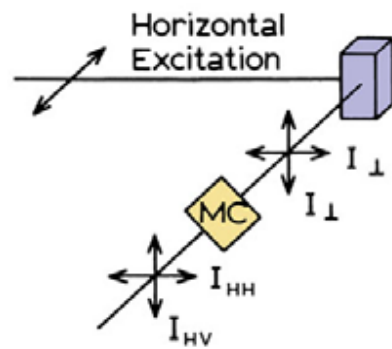
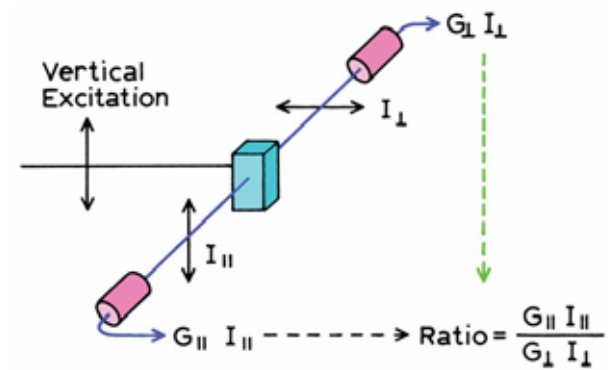
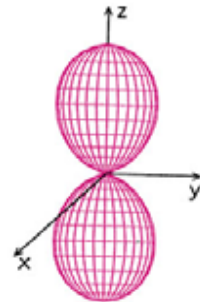
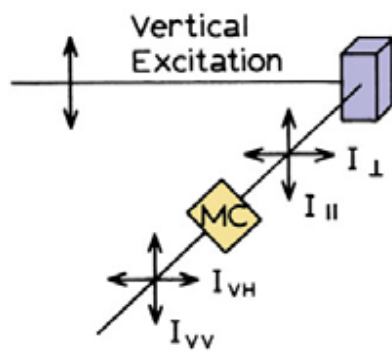
$$r_0^{\max} = 2/5 = 0.4$$

Měření anizotropie při ustálené fluorescenci

- Anizotropie - měří polarizovanou emisi
- Polarizátor je na dráze excitačního světla a dělá z něj rovinně polarizované
- Polarizátor (analyzátor) je na dráze emitovaného světla – fluorescence
- Měří se intenzita fluorescence ve vertikálním (VV) a horizontálním směru (HH)
- Ze změřených intenzit se vypočítá hodnota anizotropie $\langle r \rangle$

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot I_{VH}}$$

L a T uspořádání měření

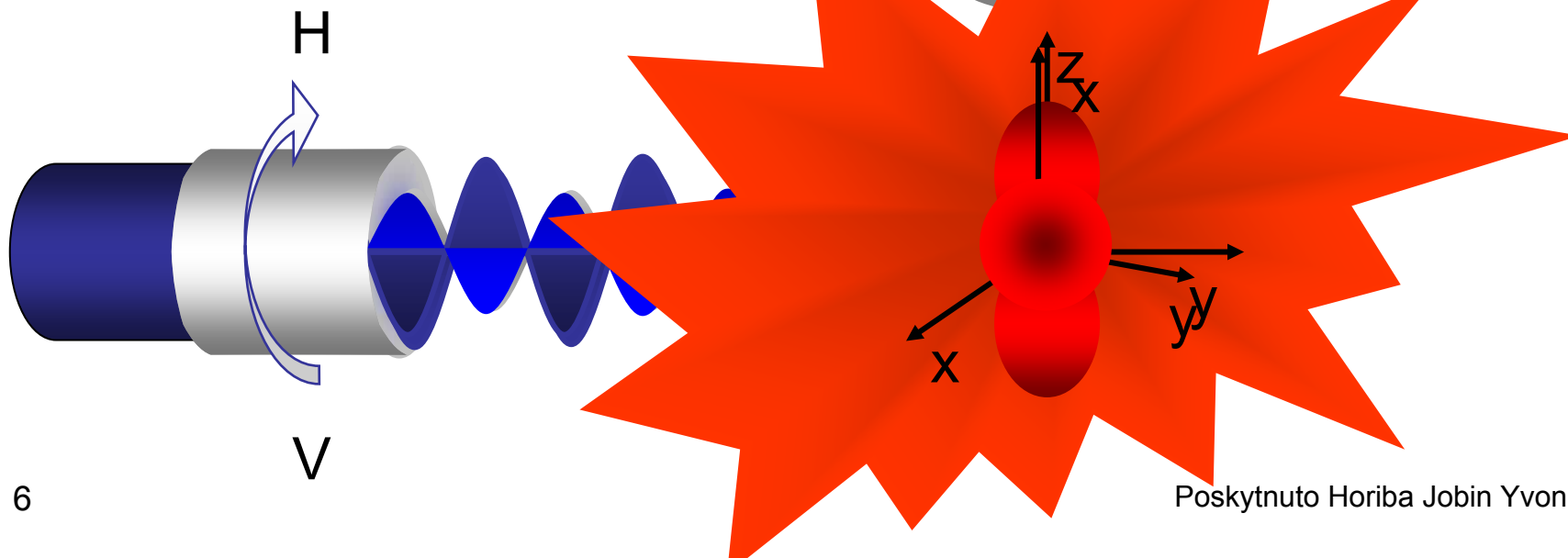


Anizotropie

$$r = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + 2G \times I_{VH}}$$

G faktor – charakteristika přístroje

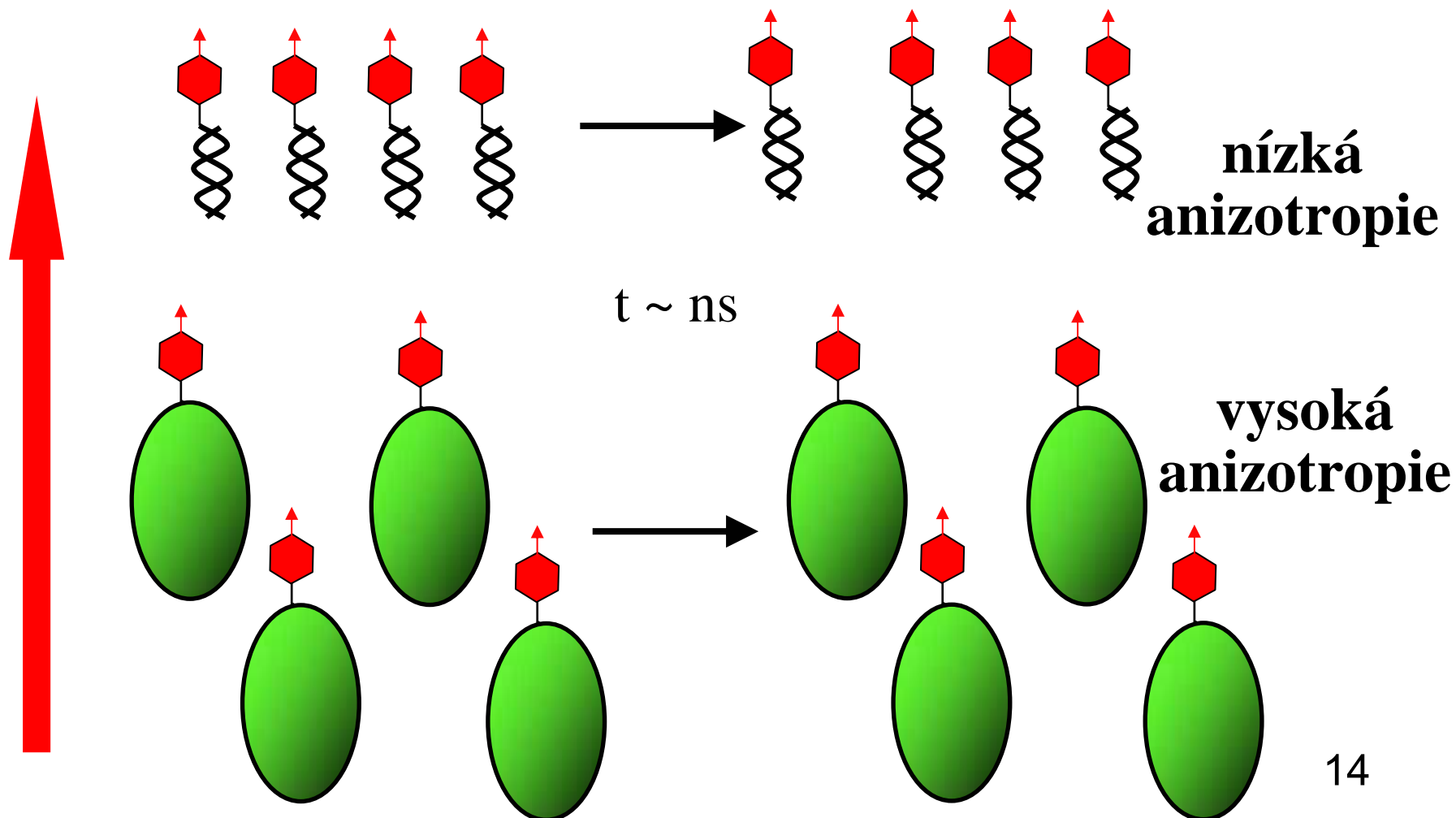
$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$



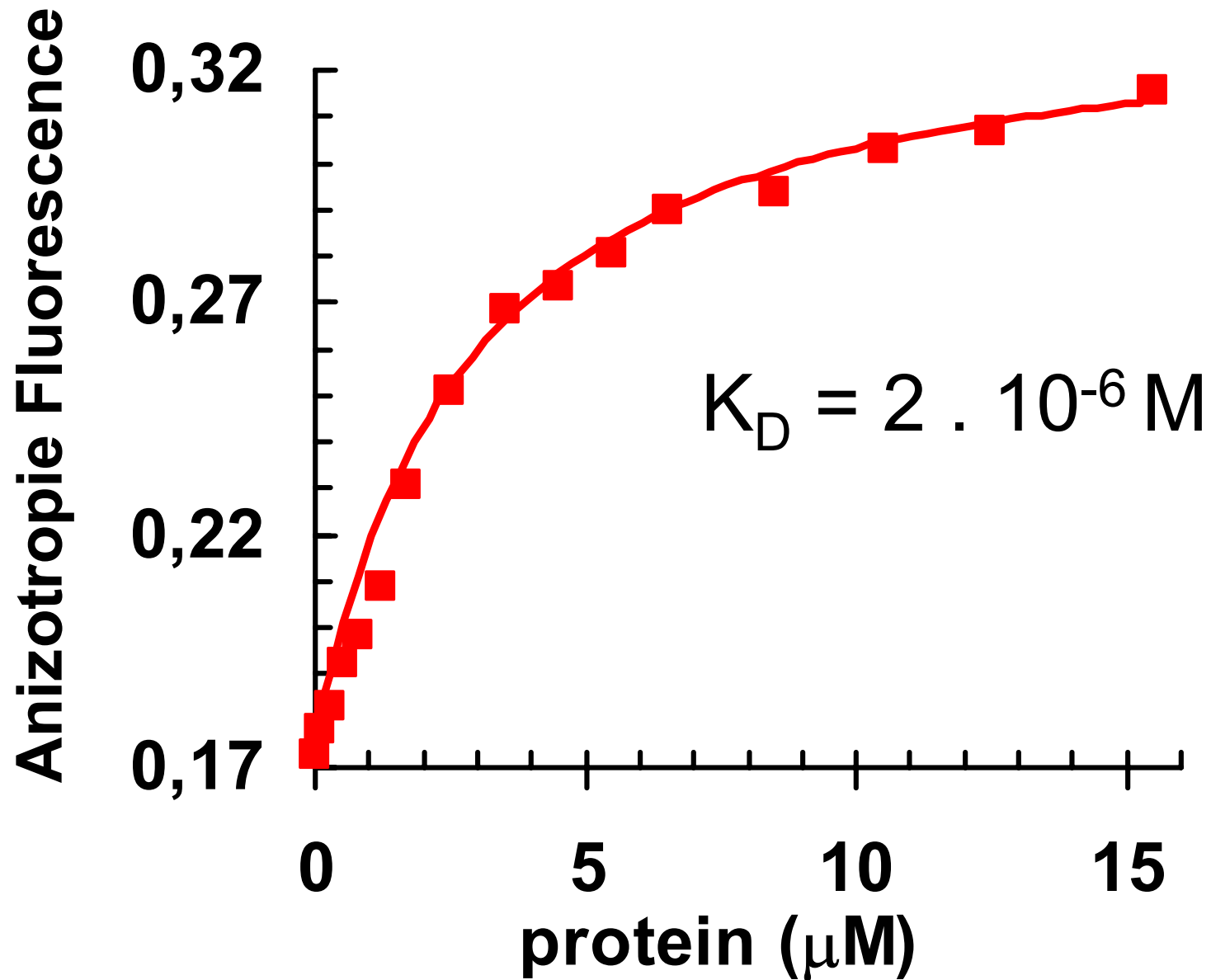
Princip sledování vazby makromolekul

Excitace

Emise



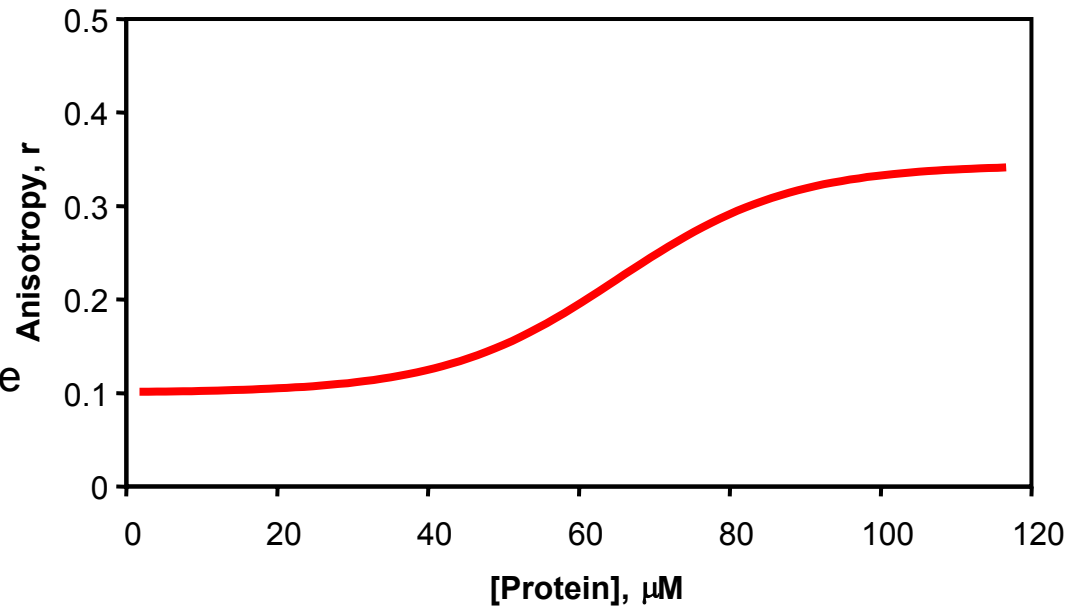
Interakce protein-DNA



Sledování vytváření dimerů

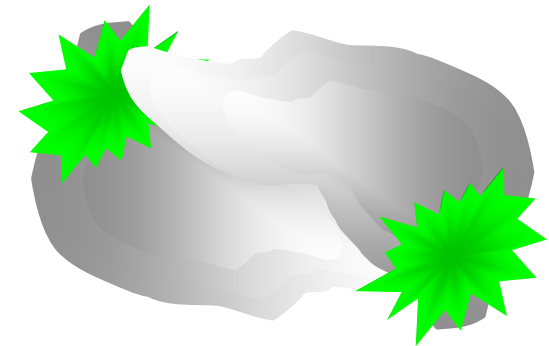
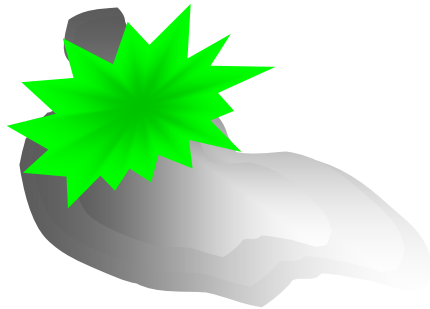
Monomery

malé
rychlá rotace
málo omezená
nízká anizotropie
rychlá depolarizace
("rozorientování")

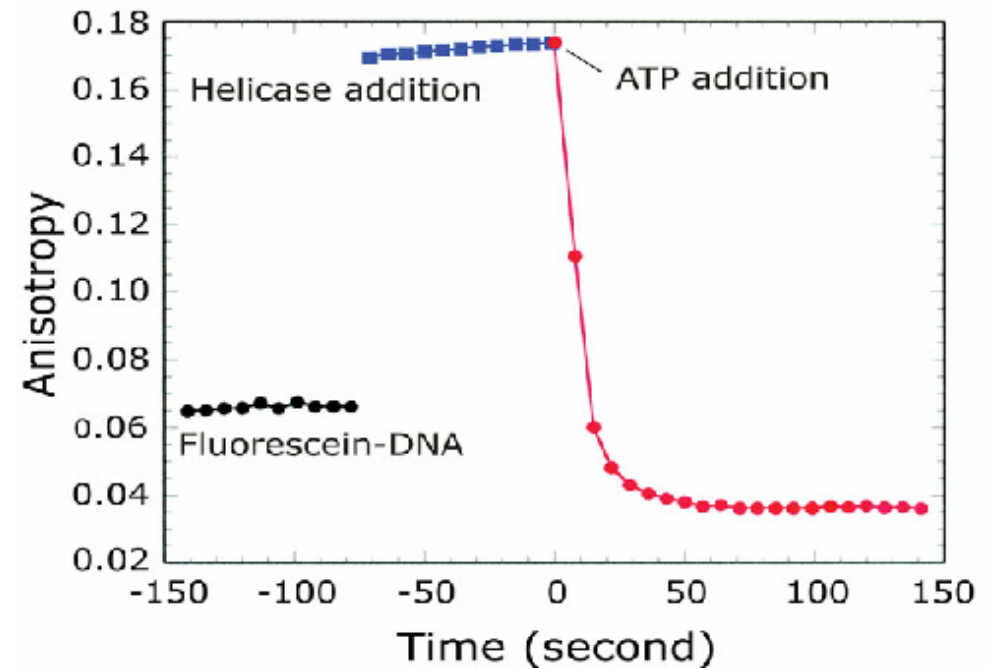
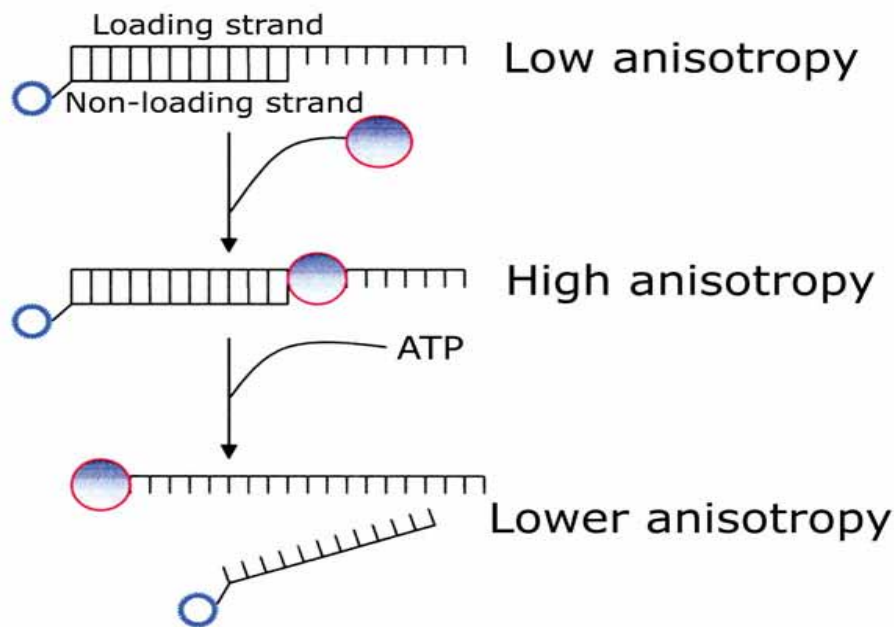


Dimery

větší
pomalá rotace
omezená viskozitou
vysoká anizotropie
pomalá depolarizace



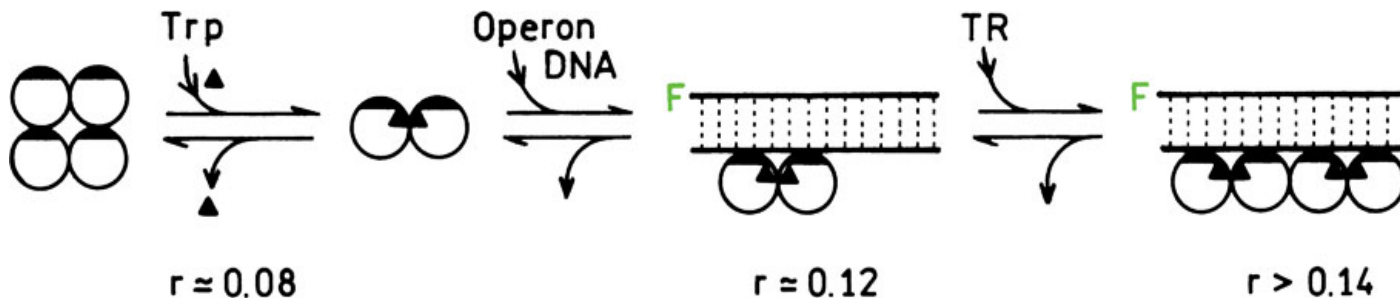
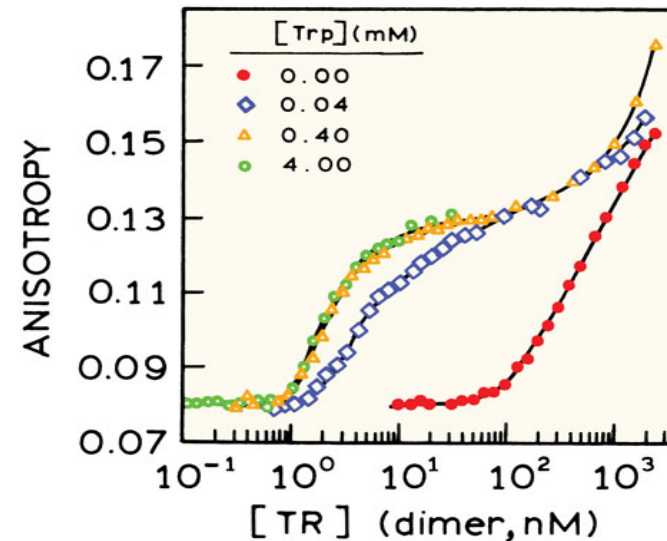
Sledování rozplétání DNA



Vazba represoru na DNA

- TRP represor se po aktivaci tryptofanem váže na DNA a kontroluje syntézu tryptofanu.
- Po vazbě TRP na fluorescenčně značenou DNA se zvyšuje anizotropie
- Při zvyšující se koncentraci tryptofanu se zvyšuje vazba represoru TRP na DNA a zabraňuje tak další syntéze tryptofanu

5 F ATCGAACTAGTTAACTAGTACGCAA 3
 3 TAGCTTGATCAATTGATCATGCGTT 5



Časově rozlišená anizotropie fluorescence

- Měření časově rozlišené anizotropie fluorescence při pulzním buzení poskytuje mnohem více informací o rotačních pohybech fluoroforu, než ustálená fluorescence.
- Ustálená fluorescence poskytuje zprůměrované hodnoty měřených parametrů a pro jejich interpretaci je nutno provádět řadu měření při různých teplotách; oproti tomu metodou časově rozlišené polarizace fluorescence získáme potřebné údaje již z měření při konstantní teplotě.
- Při použití metody časově rozlišené anizotropie fluorescence se měří časově závislé složky intenzity $I_{||}(t)$ a $I_{\perp}(t)$. Celková intenzita $I(t) = I_{||}(t) + 2 I_{\perp}(t)$ přitom nezávisí na rotačním pohybu fluoroforu a měří se pod „magickým“ úhlem $54,7^{\circ}$

Jaké informace může dát časově rozlišená anizotropie fluorescence?

- Pokud jsou doba dohasínání fluorescence τ a rychlost molekulární reorientace srovnatelné, potom bude polarizace fluorescence modulována molekulárním pohybem a analýza časové závislosti emisní anizotropie bude poskytovat informaci o anizotropii systému, v němž se fluorofor nachází.
- Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o molekulární orientaci a pohyblivosti a procesech, které je modulují, např.:
 1. interakce protein-DNA
 2. interakce ligand-receptor
 3. flexibilita biopolymerů
 4. fluidita membrán
 5. proteolýza
 6. kontrakce svalů
 7. aktivita proteinkináz

Perrinova rovnice pro vztah anizotropie a rotace sférických molekul

$$\frac{\langle r \rangle}{r_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\phi} \right)}$$

r_0 anizotropie v čase 0

τ doba dohasínání fluorescence

ϕ rotační korelační čas – popisuje rotaci molekul

Kdy nám může dát časově rozlišená anizotropie informaci o pohybu molekul?

$$\frac{\langle r \rangle}{r_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\phi} \right)}$$

$$\tau = 10 \text{ ns}$$

| | | |
|----------------------------|-------------------------------------|--------|
| $\phi_1 = 0.1 \text{ ns}$ | $\frac{\langle r \rangle}{r_0} = ?$ | 0.0009 |
| $\phi_2 = 10 \text{ ns}$ | | 0.5 |
| $\phi_3 = 1000 \text{ ns}$ | | 0.99 |

Když se pohyb molekul děje v čase srovnatelném s dobou dohasínání fluorescence

$$\phi \sim \tau$$

Použití Perrinovy rovnice pro stanovení vlastností molekul

$$\frac{\langle r \rangle}{r_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\phi} \right)} = 1 + 6D_r\tau = 1 + \frac{kT\tau}{V\eta}$$

r_0 anizotropie v čase 0

τ doba dohasínání fluorescence

ϕ rotační korelační čas

D_r rotační difúzní konstanta

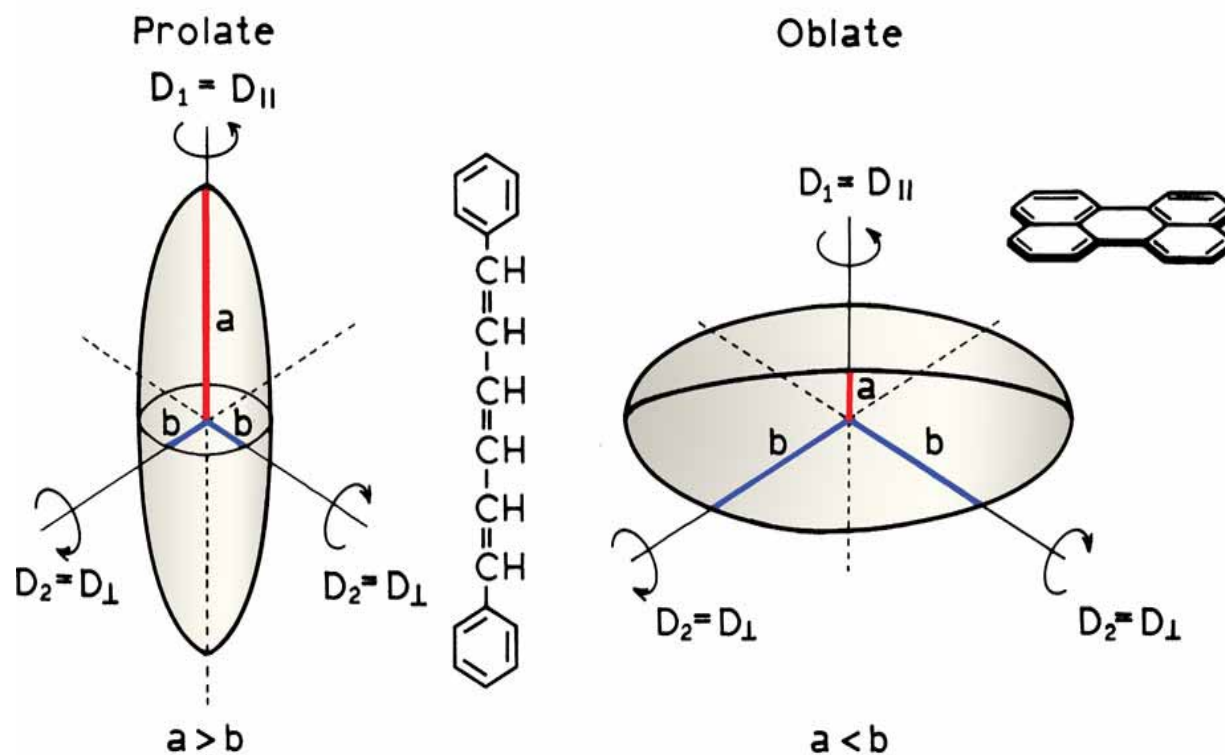
V objem molekuly

η viskozita prostředí

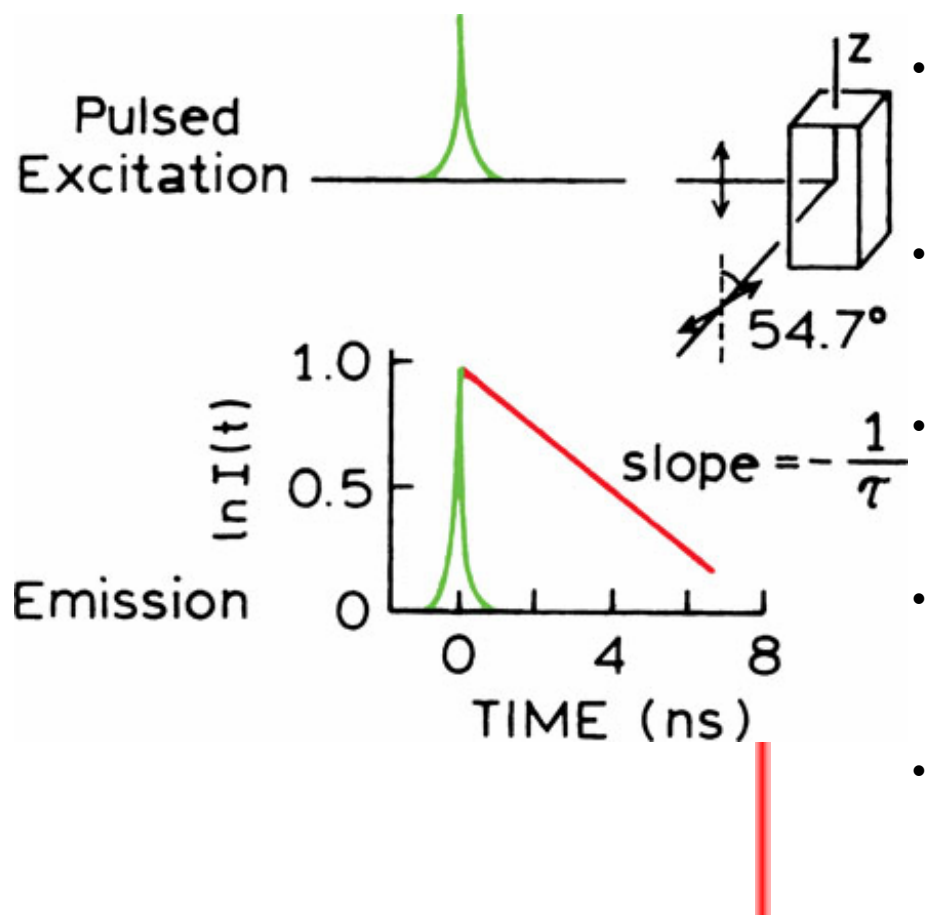
k Boltzmanova konstanta ($=1.38 \cdot 10^{-23} \text{JK}^{-1}$)

T absolutní teplota

Časová závislost je složitější pro molekuly složitějších tvarů

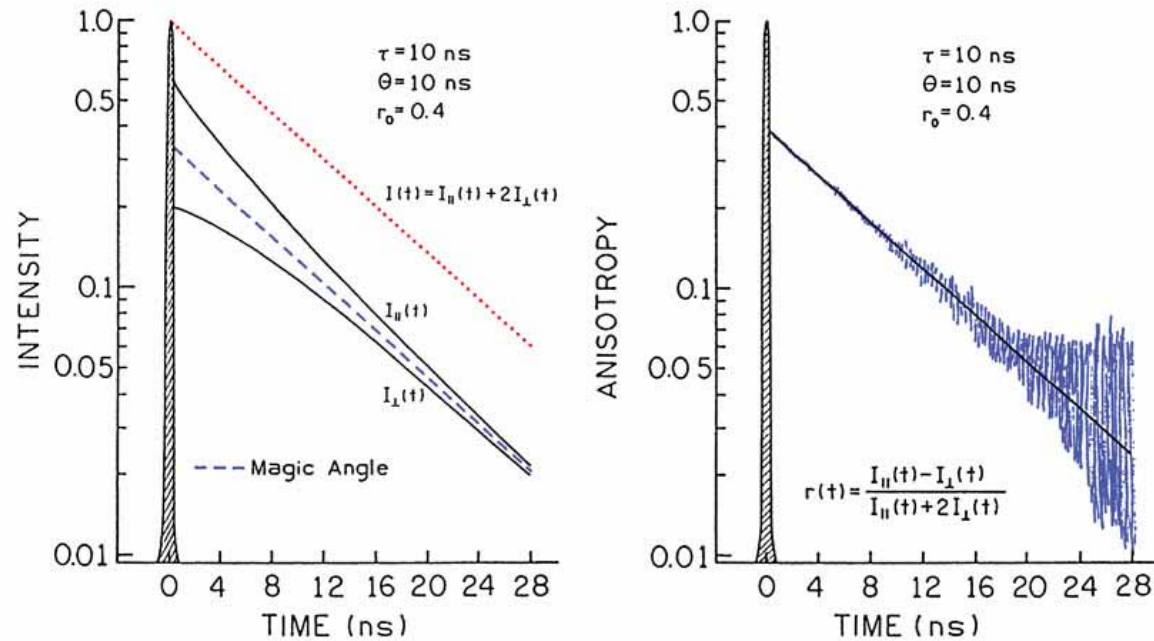


Měření časově rozlišené anizotropie



- Vzorek je excitován krátkým pulzem s trváním mnohem kratším než doba dohasínání τ
- Změří se dohasínání celkové intenzity při natočení polarizátorů pod magickým úhlem
- Změří se dohasínání intenzity při rovnoběžně natočených polarizátorech
- Změří se dohasínání intenzity při kolmo na sebe natočených polarizátorech
- Podle vztahu pro výpočet anizotropie se křivky složí a získá se časová závislost anizotropie

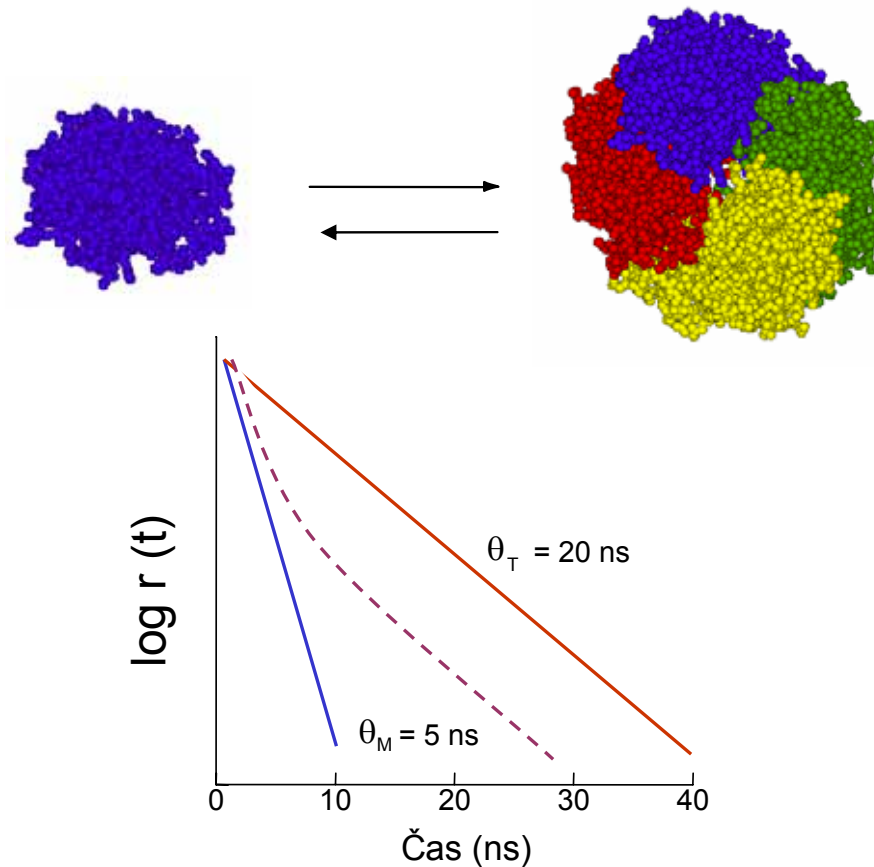
Vertikálně a horizontálně polarizovaná složka anizotropie



- Závislost anizotropie je vypočtena z časové závislosti vertikálně a horizontálně polarizované emise.
- V případě, že jsou absorpční a emisní momenty přechodu rovnoběžné, je počáteční anizotropie $r_0=0.4$
- Horizontálně polarizovaná emise klesá pomaleji

Změna rotačního korelačního času při multimerizaci proteinu

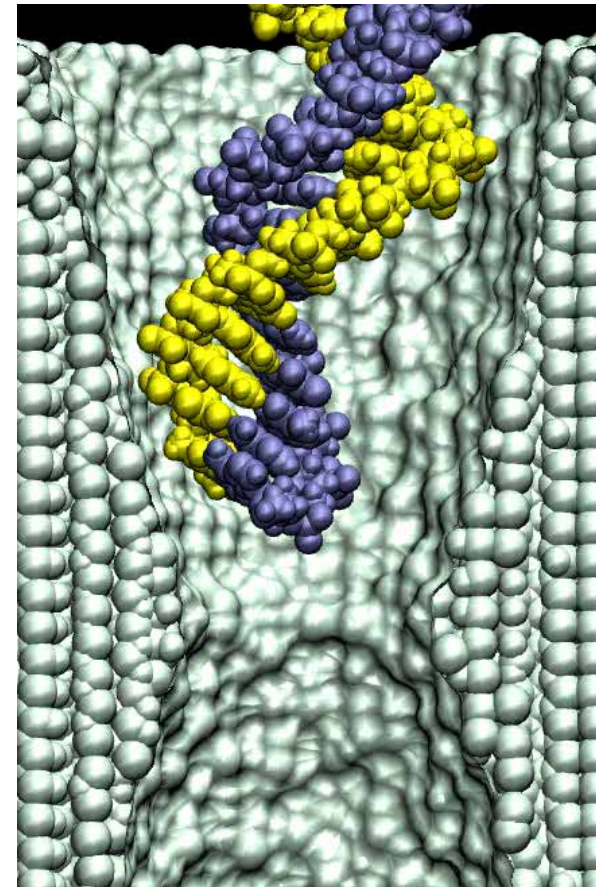
- Časové závislosti anizotropie fluorescence lze použít při sledování změny dynamiky systému molekul
- Sledování multimerizace fosfofruktokinázy



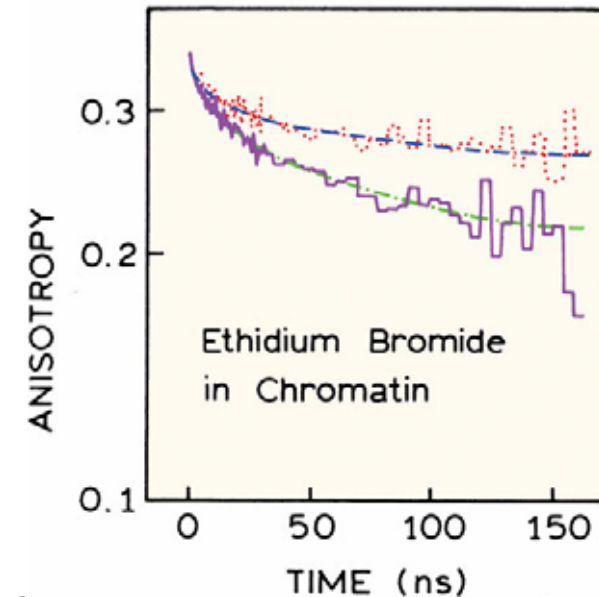
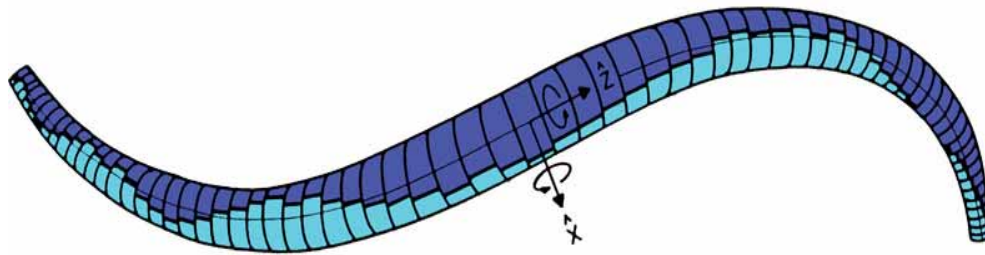
Flexibilita DNA

- Jak závisí ohebnost DNA na okolních podmínkách?
- Jaký je nejmenší průměr póru, kterým může DNA projít ?

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/nanopore/PICTURES/ds2.0-V3.2.mpg>

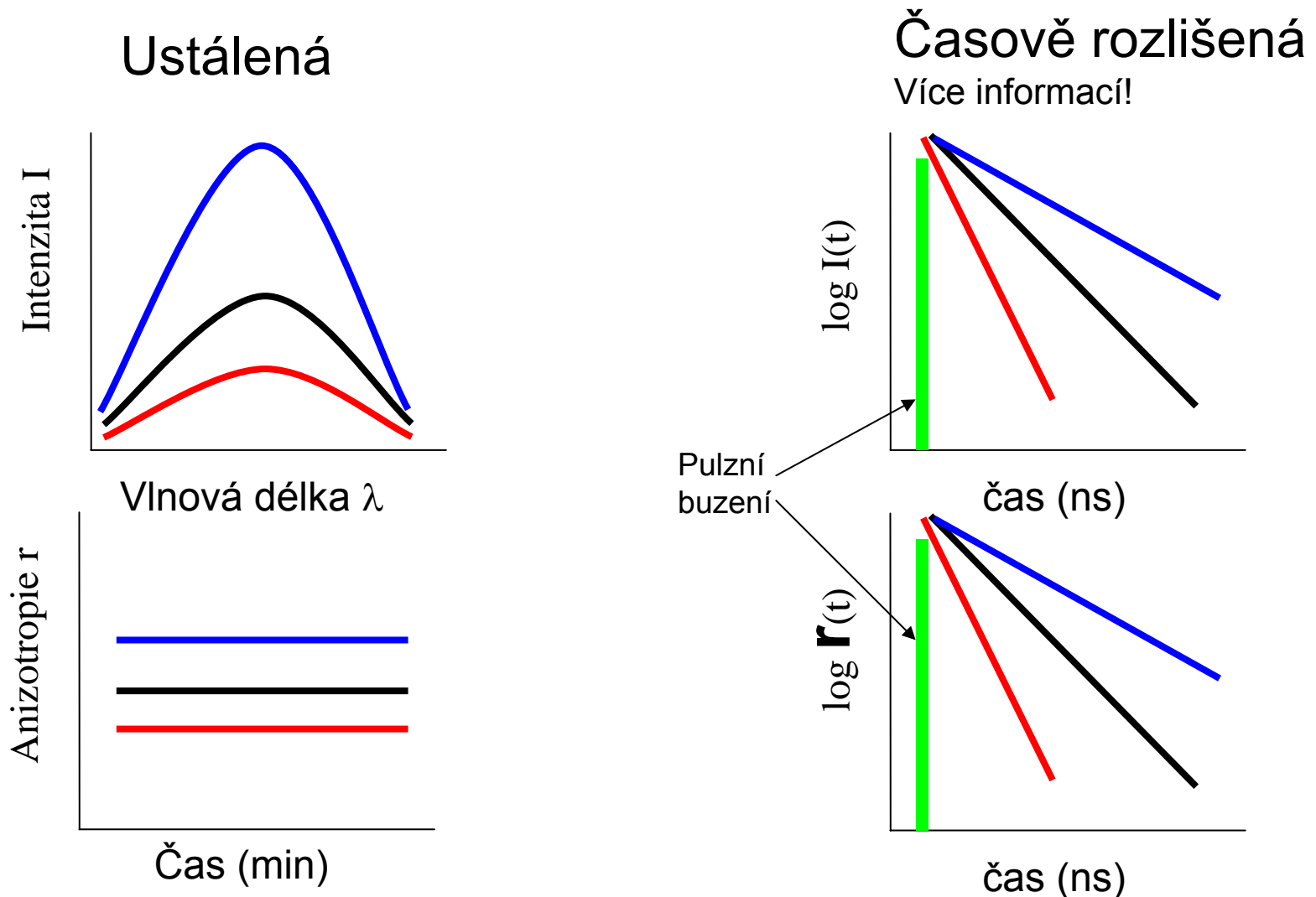


Sledování pohybu DNA po interkalaci EtBr



- Po zvýšení iontové síly (čárkovaně) dochází ke zpevnění struktury DNA
- První část křivky dohasínání fluorescence popisuje torzní pohyb DNA
- 6 • Pozdější část křivky popisuje ohyb DNA struktur

Srovnání měření ustálené a časově rozlišené intenzity a anizotropie



Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R. Lakowitzem