Fluorescenční rezonanční přenos energie

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr

Oddělení funkční genomiky a proteomiky
Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Brno, Česká republika

Přenos excitační energie

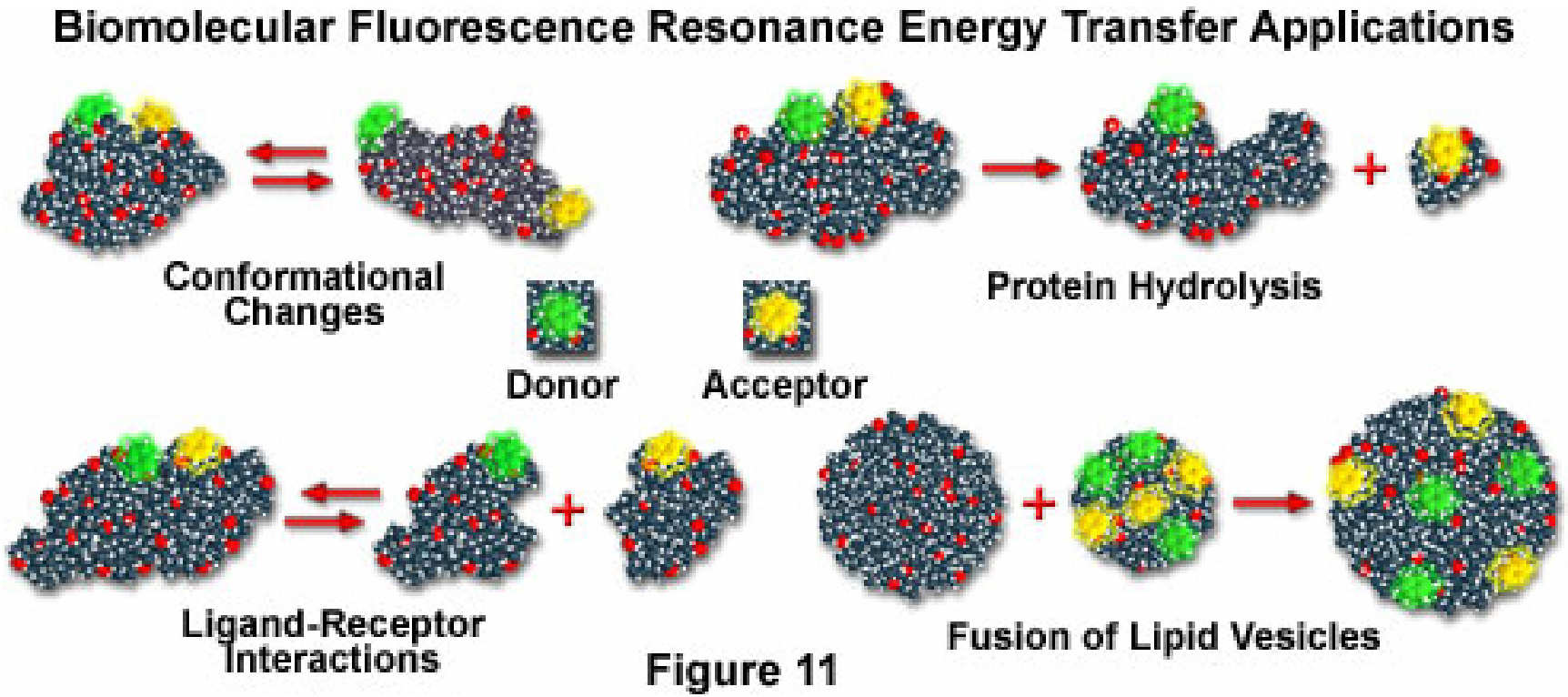
- Přenos elektronové energie se uskutečňuje mechanismy **zářivými** nebo **nezářivými**.
- K **zářivému** (triviálnímu) přenosu energie dochází, když excitovaná molekula donoru emituje záření, které je následně reabsorbováno molekulou akceptoru. Dochází k výměně fotonu

- K excitaci **nezářivým přenosem energie (fluorescenční rezonanční přenos energie, FRET**) dochází, když ve směsi molekul dochází k absorpci pouze molekulami **donoru**, avšak konečným výsledkem jsou excitované molekuly **akceptoru**, které budící záření neabsorbují. Při tomto přenosu energie nedochází k emisi světla donorem.
  Nedochází k výměně fotonu!

8

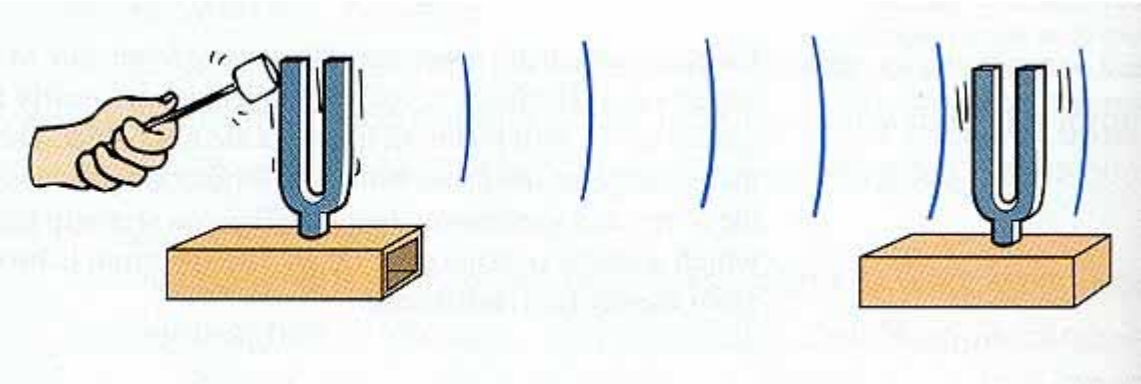
K čemu lze použít rezonanční přenos energie?

- Konformační změny
- Vazba ligandu a receptoru
- Štěpení proteinu/DNA
- Fůze membrán



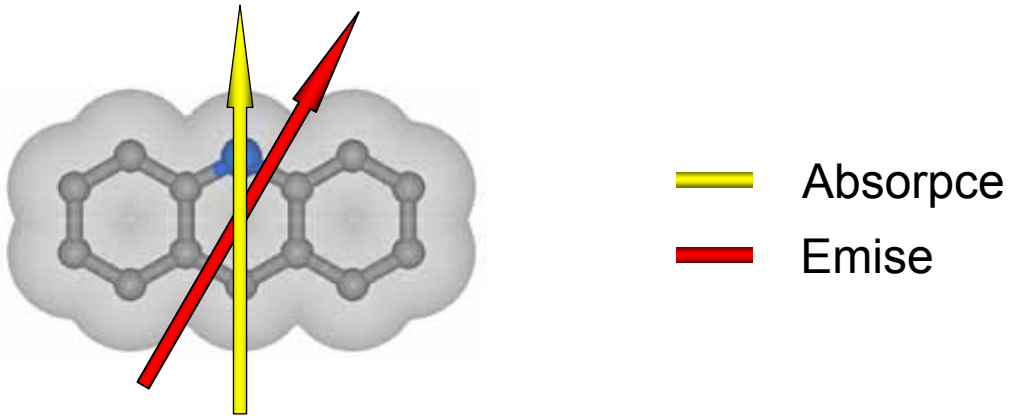
Rezonanční přenos energie

- Analogie s přenosem energie mezi ladičkami



- V případě molekul dochází k přenosu energie díky dipól-dipólovým interakcím

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 výšší energetické hladiny.
- Molekuly přednostně emitují záření ve stejné rovině jako je **emisní dipólový moment přechodu** elektronu do nižší energetické hladiny.

Interakce dipólových momentů přechodu Donoru a Akceptoru

Donor

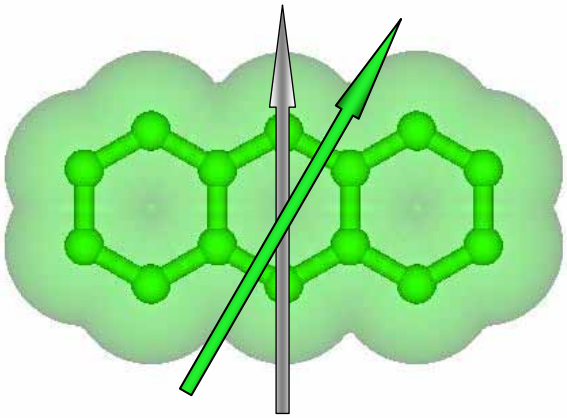
Absorpce donoru

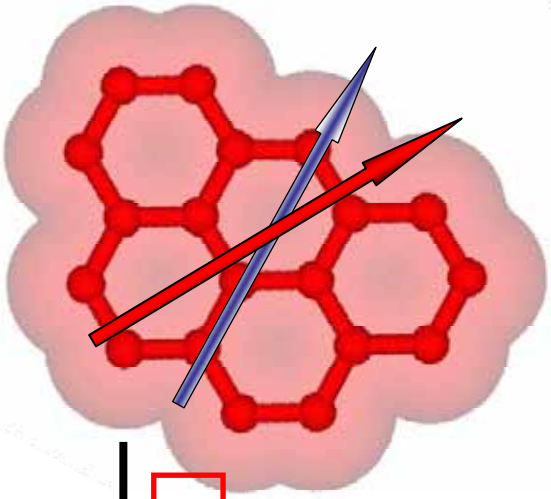
Emise donoru

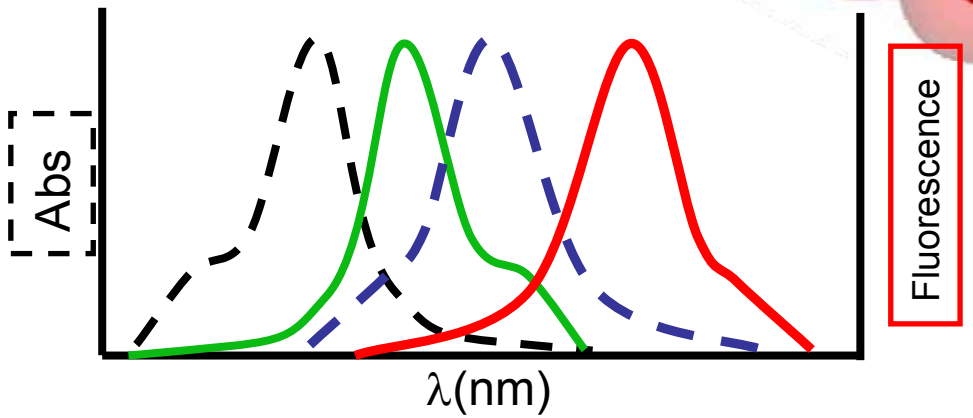
Akceptor

Absorpce akceptoru

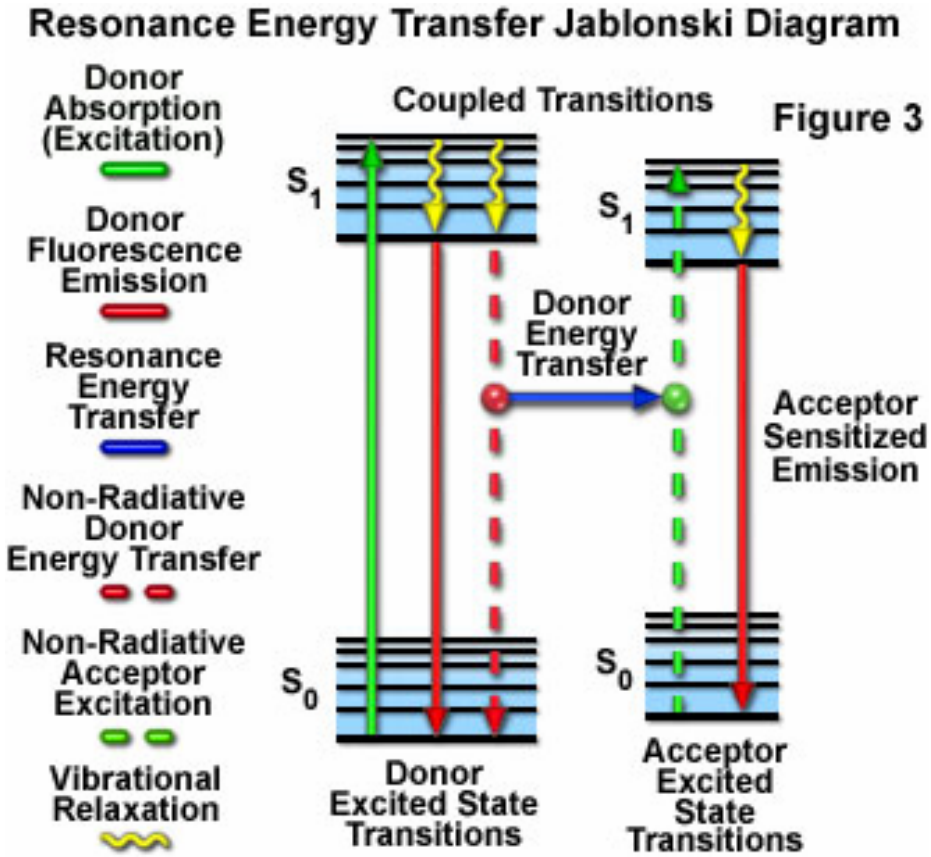
Emise akceptoru







FRET - nezářivý přenos energie

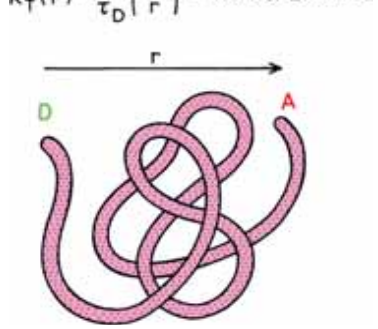


- V přítomnosti vhodného akceptoru může donor přenést energii excitovaného stavu přímo na akceptor bez vyzáření fotonu.
- Takto excitovaný akceptor pak vyzáří energii,kterou původně absorboval donor.

Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET)

Rezonanční přenos energie lze charakterizovat rychlostní konstantou (k_{DA}), která vyjadřuje pravděpodobnost přenosu; určující složkou je dipól-dipólový přenos energie, pro nějž byl odvozen Försterův vzorec (v případě slabé vazby, kdy vzájemné interakce donoru a akceptoru neovlivní optická spektra) v této formě

$$k_{DA} = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$



τ_D – doba dohasínání fluorescence donoru, R_0 – vzdálenost ve které je pravděpodobnost přenosu energie rovna pravděpodobnosti vnitřní deaktivace vzbuzeného stavu molekuly, r – vzdálenost mezi donorem a akceptorem.

Rezonanční přenos energie je silně závislý na vzdálenosti donoru a akceptoru.

8

Účinnost přenosu E

Je dána poměrným množstvím fotonů, které jsou absorbovány donorem a následně vyzářeny akceptorem

$$E = \frac{k_{DA}(r)}{\tau_D^{-1} + k_{DA}(r)} \qquad E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \qquad E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

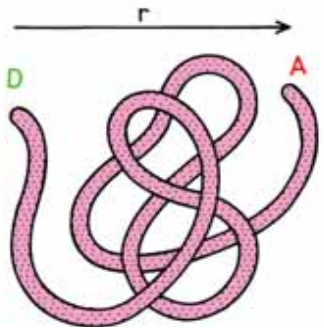
Měří se určením relativní intenzity fluorescence donoru za nepřítomnosti (F_D) a za přítomnosti akceptoru (F_{DA})

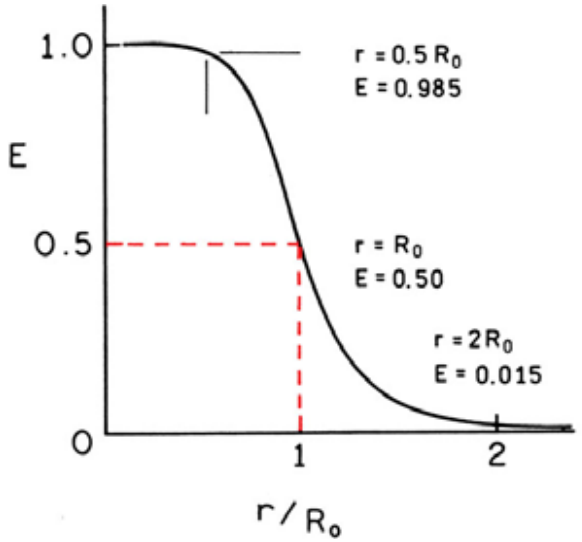
Rychle klesá se 6 mocninou vzdálenosti!

R_0 Förseterova vzdálenost

- R_0 je vzdálenost donoru a akceptoru, při které je účinnost přenosu E 50%
- Velikost R_0 je obvykle 2 – 6 nm, což je srovnatelné s velikostí biologických molekul

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 = \text{TRANSFER RATE}$$





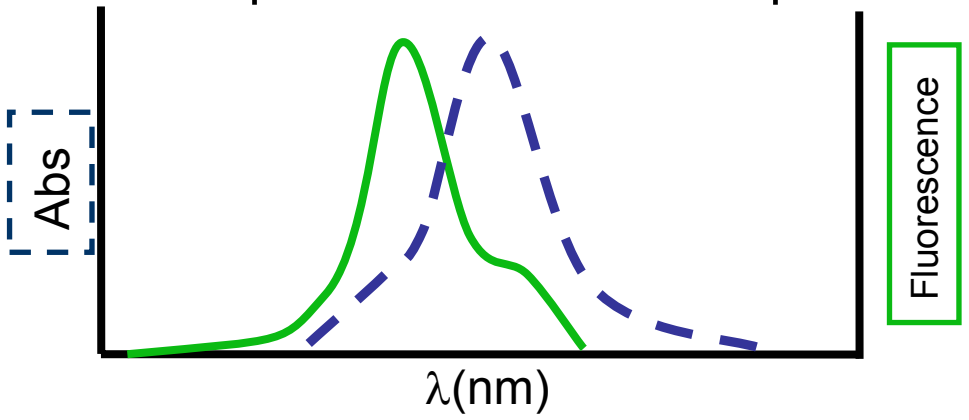
Závislost účinnosti přenosu E na vzdálenosti r je nejvýraznější (nejrychleji se mění) v případě, že vzdálenost donoru a akceptoru je blízká R_0.

R_0 udává, do jaké střední vzdálenosti může daný pár donor-akceptor komunikovat – je to charakteristika páru fluoroforů

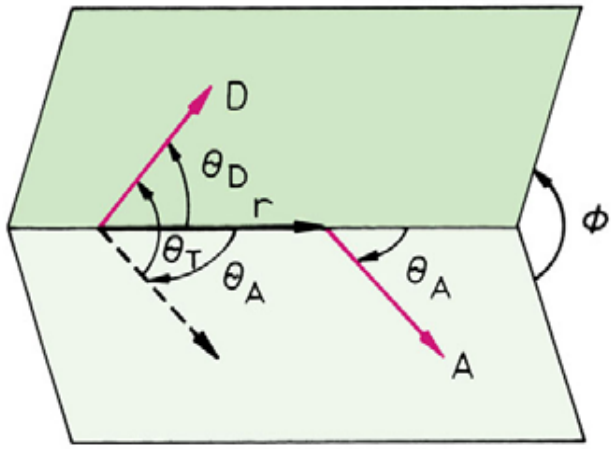
Na čem závisí R_0?

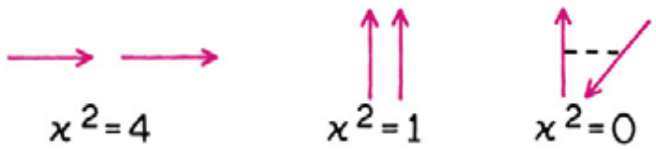
$$R_0 = 0.211\left(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)\right)^{1/6} \quad (\text{v } \mathring{\text{A}})$$

- Na orientaci dipólových momentů přechodu pro emisi donoru a absorbci akceptoru (pro faktor κ^2 se používá se hodnota 2/3)
- Na optických vlastnostech prostředí (index lomu vody n_{H20}= 1.33)
- Na kvantovém výtěžku donoru Q_D
- Na míře překryvu J (λ) emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru



Závislost orientačního faktoru κ^2 na orientaci dipólových momentů přechodu





$$x^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cos\theta_A)^2$$

$$x^2 = (\sin\theta_D \sin\theta_A \cos\Phi - 2\cos\theta_D \cos\theta_A)^2$$

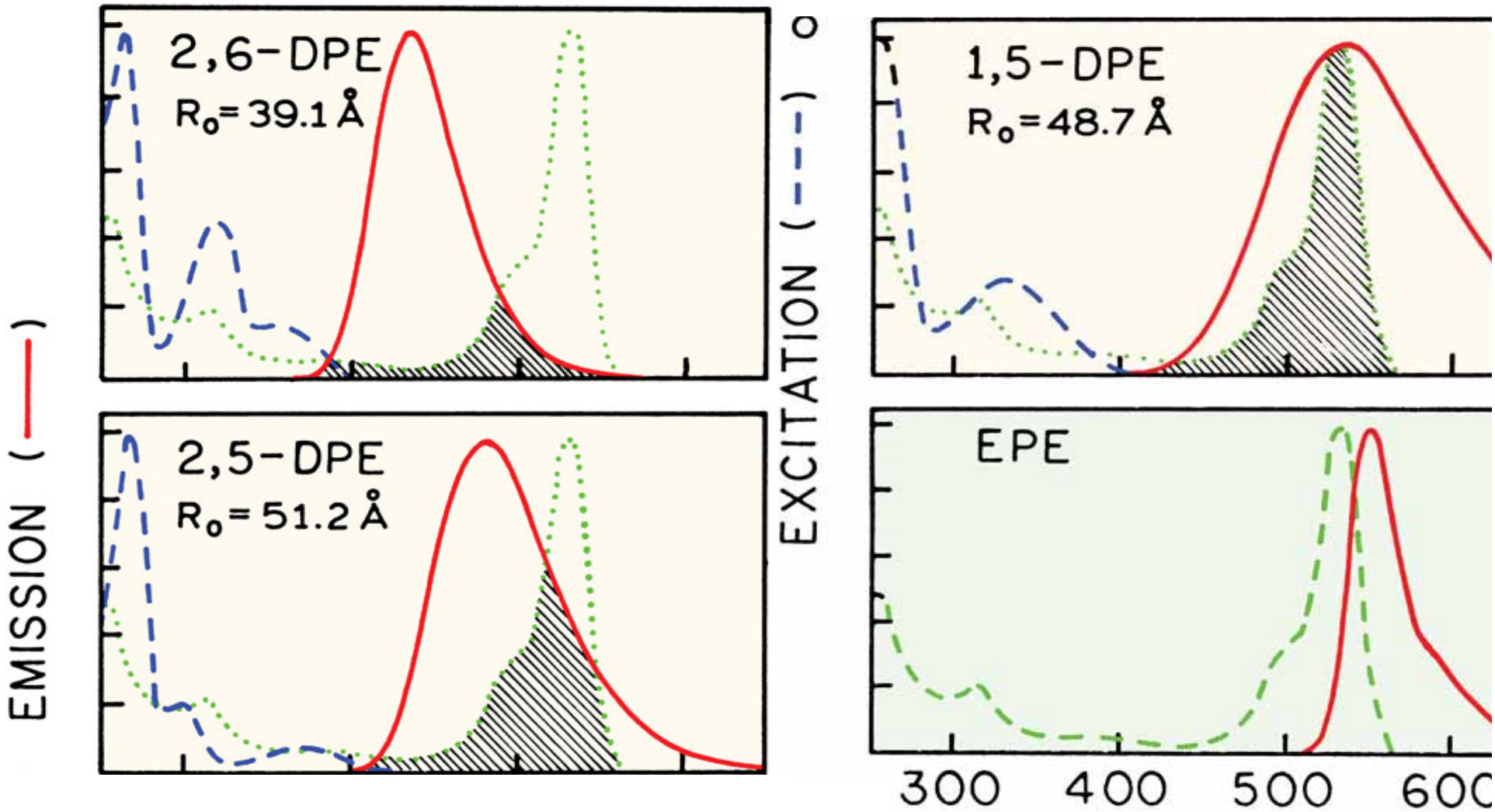
Pro náhodné uspořádání dipólových momentů přechodu

$$\kappa^2 = 2/3$$

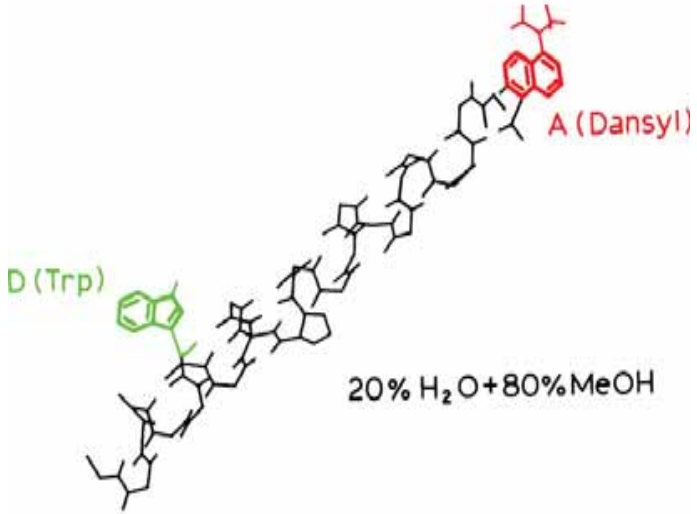
V praxi se tato hodnota běžně používá

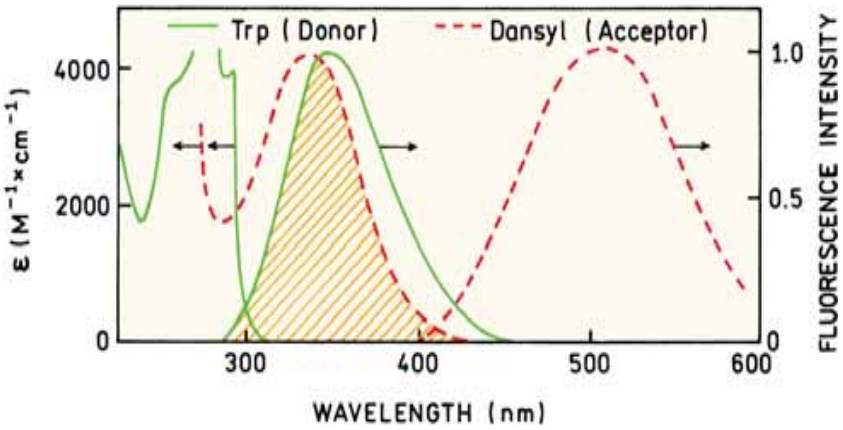
V případě, že jsou dipólové momenty přechodu kolmé $\kappa^2 = 0$

Závislost R_0 na spektrálním překryvu



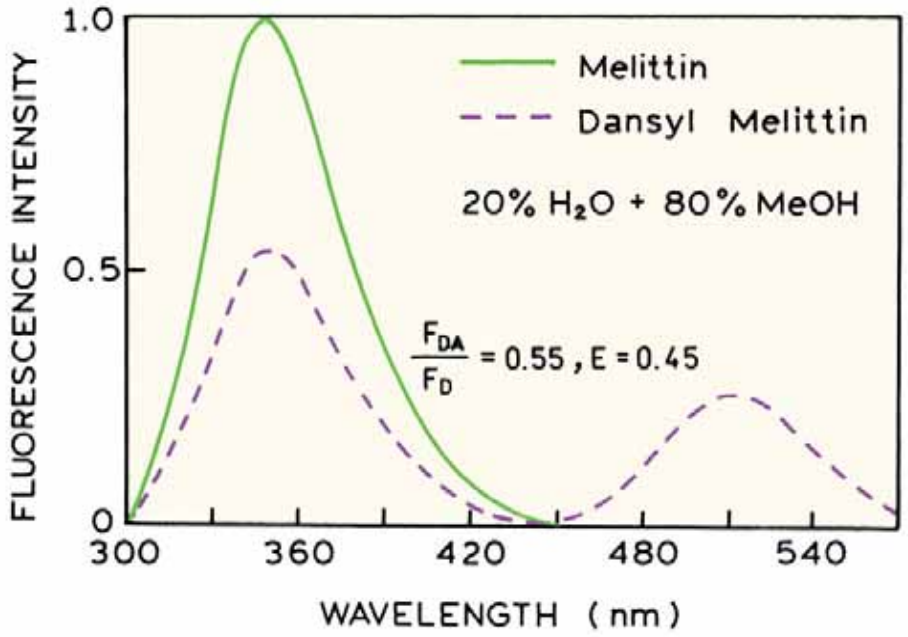
Měření vzdálenosti pomocí FRET





- Melitin je nejdůležitější součást včelího jedu (poškozuje buněčné struktury, rozkládá bílé a červené krvinky, způsobuje odumírání buňky) při léčbě se využívá jeho protizánětlivých účinků
- Melitin je složen z 26 AK Tryptofan v poloze 19 byl donorem,
- Dansyl na N konci byl akceptorem
- Po samostatné spektrální charakterizaci melitinu s Trp jako donoru a Dansyl jako akceptoru byla určena hodnota R_0=2.36 nm.
- Z míry zhášení je možno určit vzdálenost Trp a Dansylu

Určení vzdálenosti Trp od N konce melitinu za použití FRET



$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

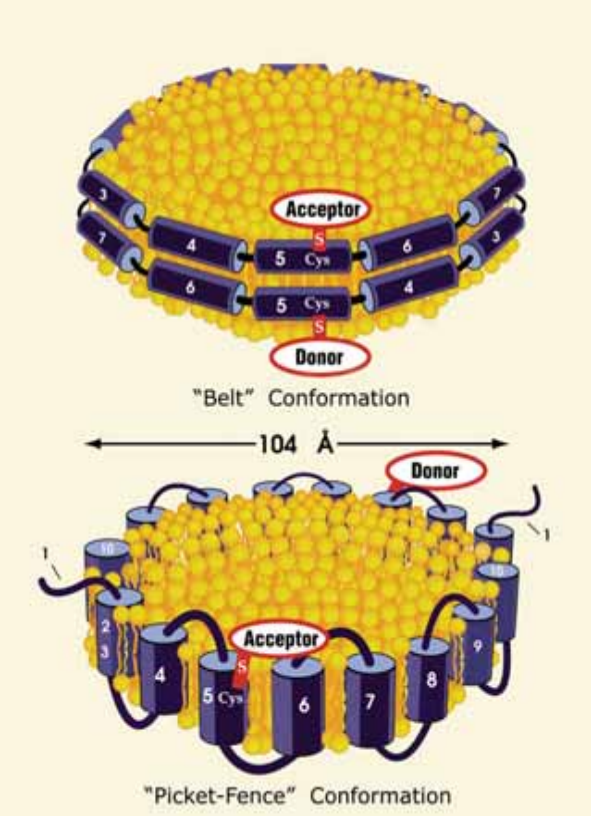
- Na základě úbytku intenzity fluorescence za přítomnosti akceptoru je možno určit účinnost přenosu a odtud vzdálenost donoru (Trp) od akceptoru (na N konci)
- r = 2.44 nm

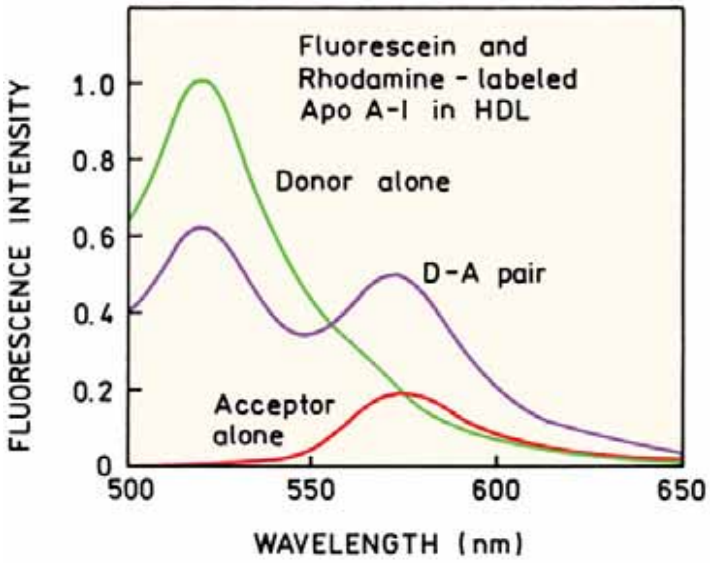
8

Výhody FRET

- Účinnost přenosu energie nezávisí na prostředí mezi donorem a akceptorem
- Měření poměru intenzit umožňuje použití FRET analýzy nezávisle na koncentraci
- Pro většinu aplikací není nutno znát R_0

FRET umožňuje rozlišit mezi více variantami uspořádání proteinů



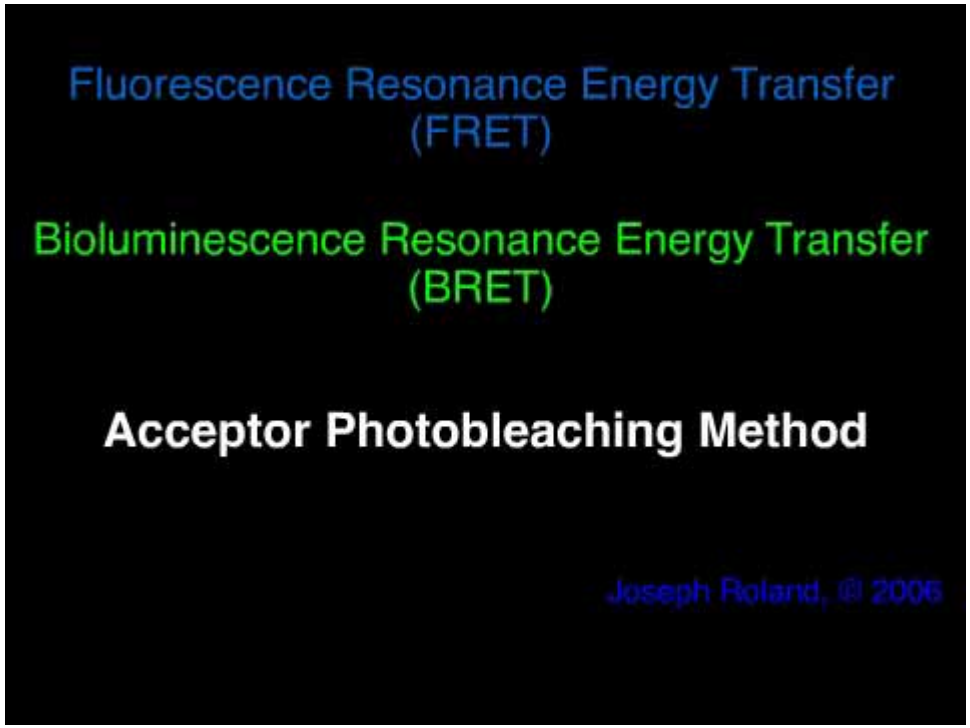


- apoA-I protein reguluje metabolismus cholesterolu.
- apo A-I se váže do lipidové membrány
- byly navrženy dvě možná uspořádání proteinů v membráně
- kvůli flexibilitě lipidů není možno použít strukturní metody
- jeden z řetězců apoA-I proteinů byl naznačen fluoresceinem (Donor) a druhý tetrametylrodaminem (Akceptor)

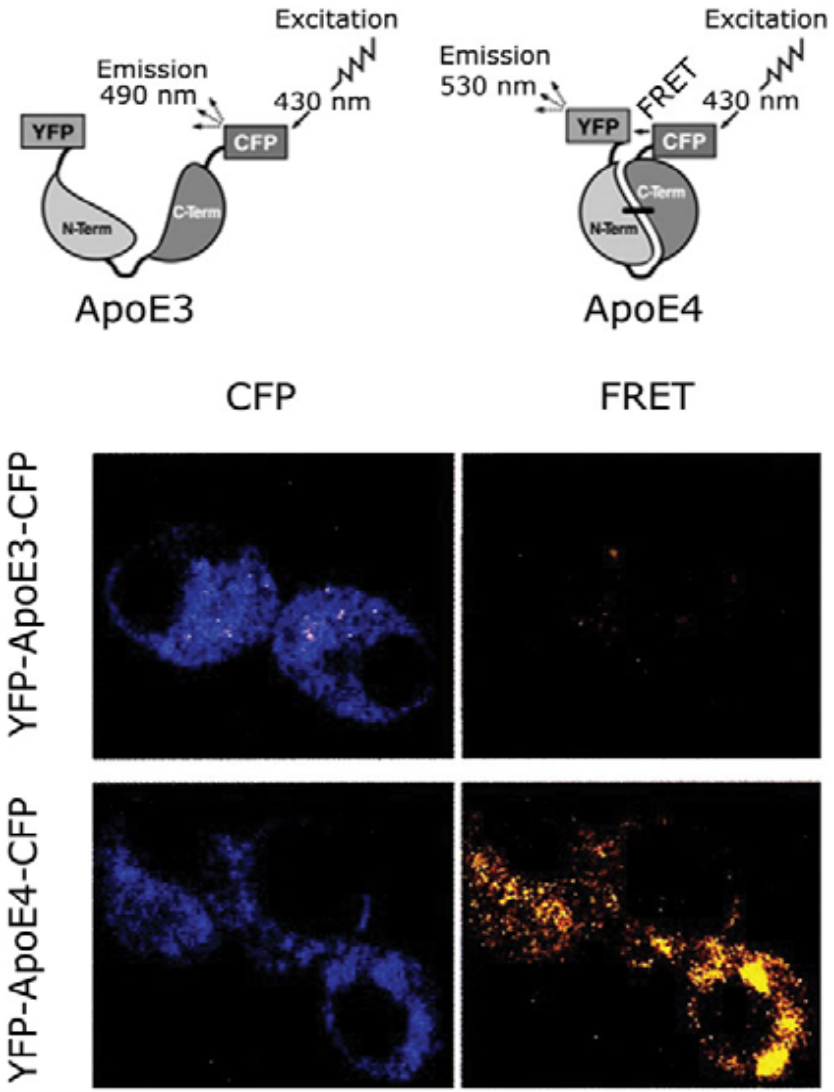
- Nejdříve bylo změřeno emisní spektrum samotného donoru na jednom řetězci ApoA-I
- Po přidání druhého řetězce s akceptorem byl sledován úbytek intenzity fluorescence donoru
- Docházelo k výraznému rezonančnímu přenosu energie
- To dokázalo relativně malou vzdálenost mezi donorem a akceptorem
- Bylo potvrzeno pásové uspořádáni ApoA-I

FRET mezi CFP a YFP

Zhášení FRET fotovybělováním



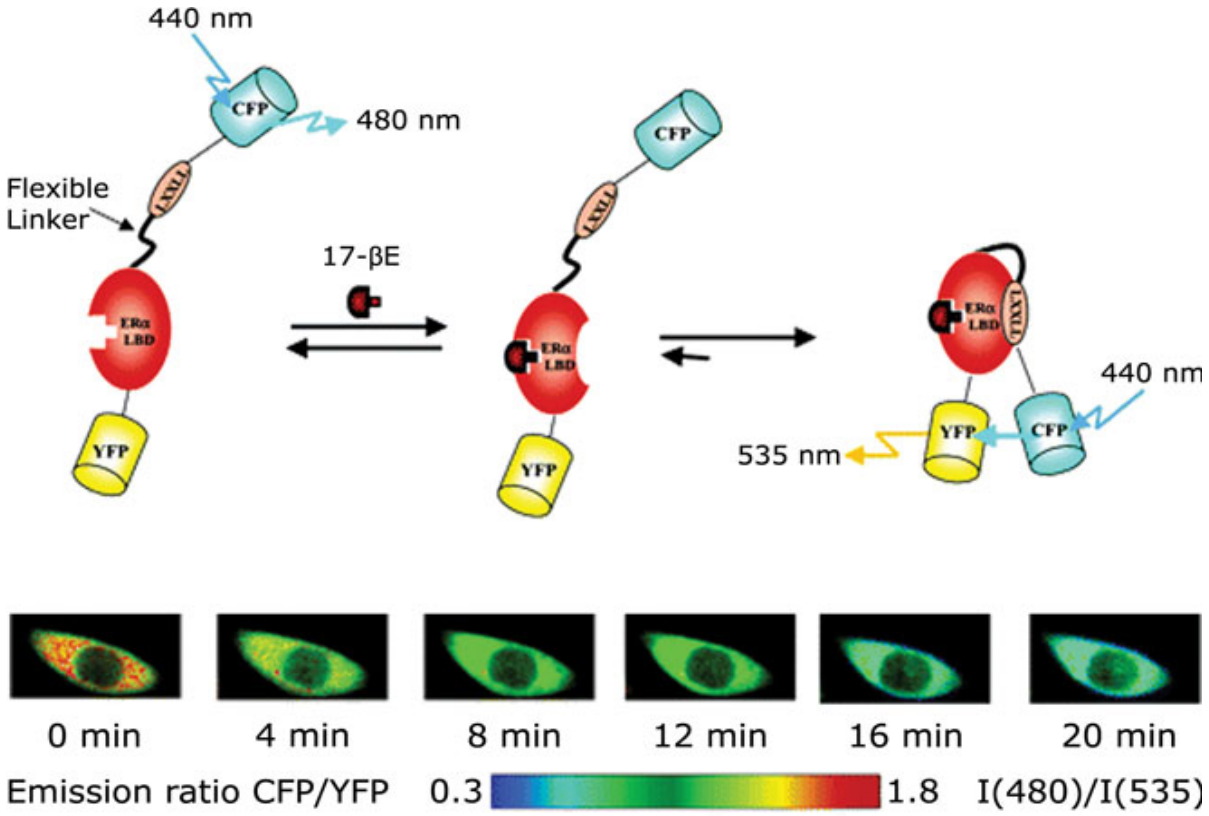
Skládání proteinů *in vivo*



- ApoE4 je spojen s Alzheimerovou nemocí a váže se na nervové buňky
- ApoE3 má podobnou sekvenci AK, ale na nervové buňky se neváže
- Bylo navrženo, že vazebná schopnost k nervovým buňkám souvisí s různým uspořádáním domén ApoE proteinů
- Pro ověření byly v nervových buňkách transfekovány ApoE konstrukty
- FRET analýza ukázala, že ApoE4 v konformaci se spojenými doménami se váže na nervové buňky, zatímco ApoE3 nemá své domény ve vzájemné blízkosti a na nervové buňky se neváže

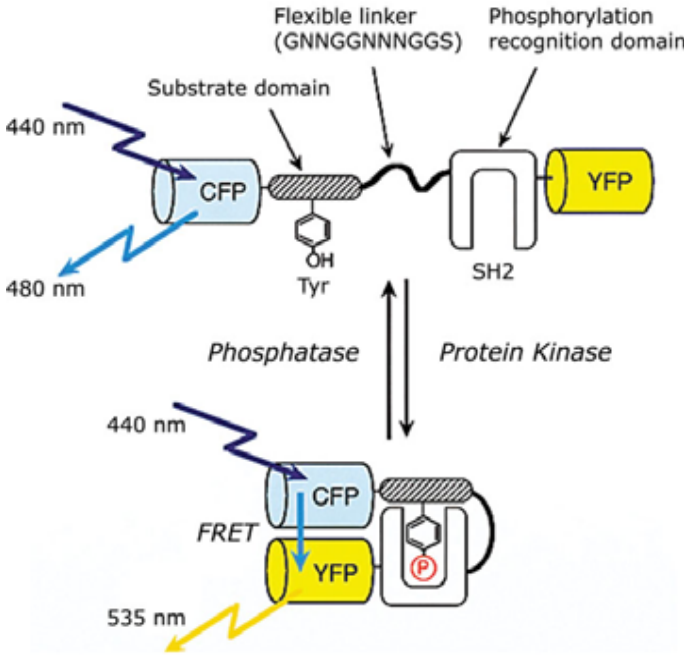
FRET senzory

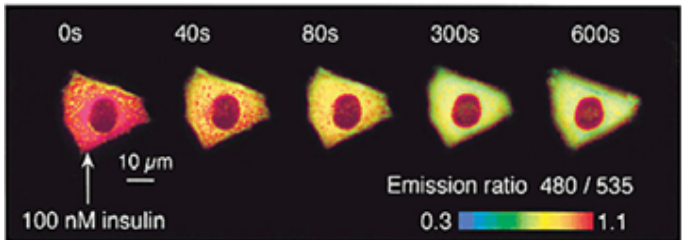
- Detekce estrogenu



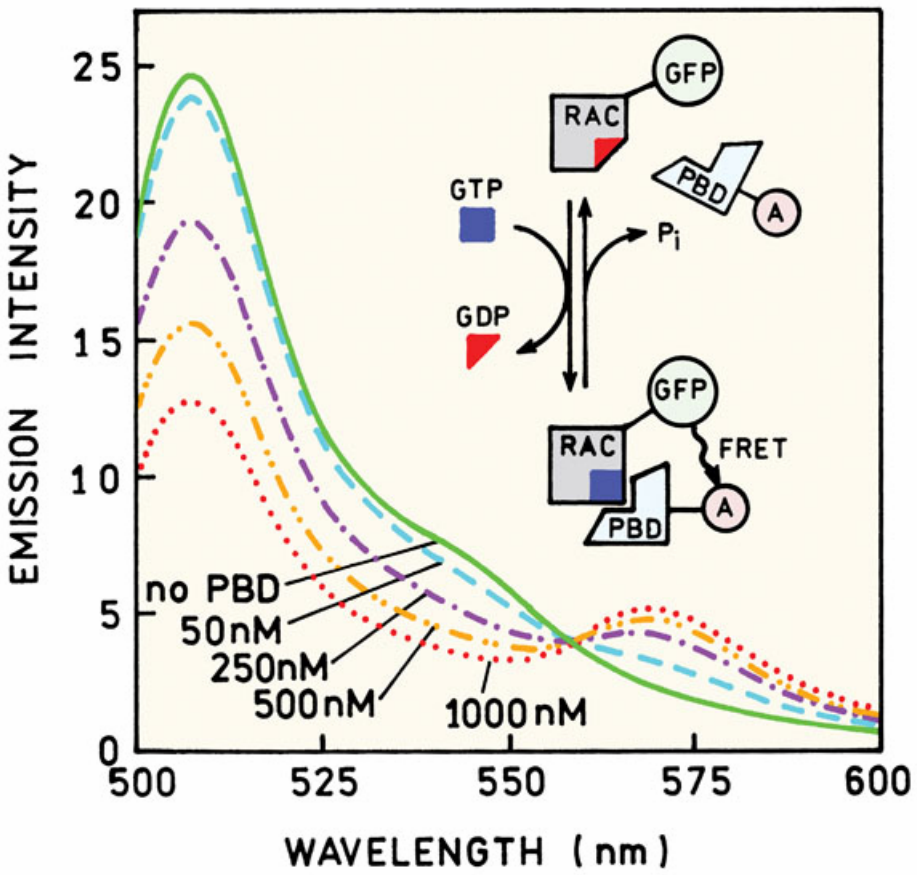
Sledování fosforilace proteinů

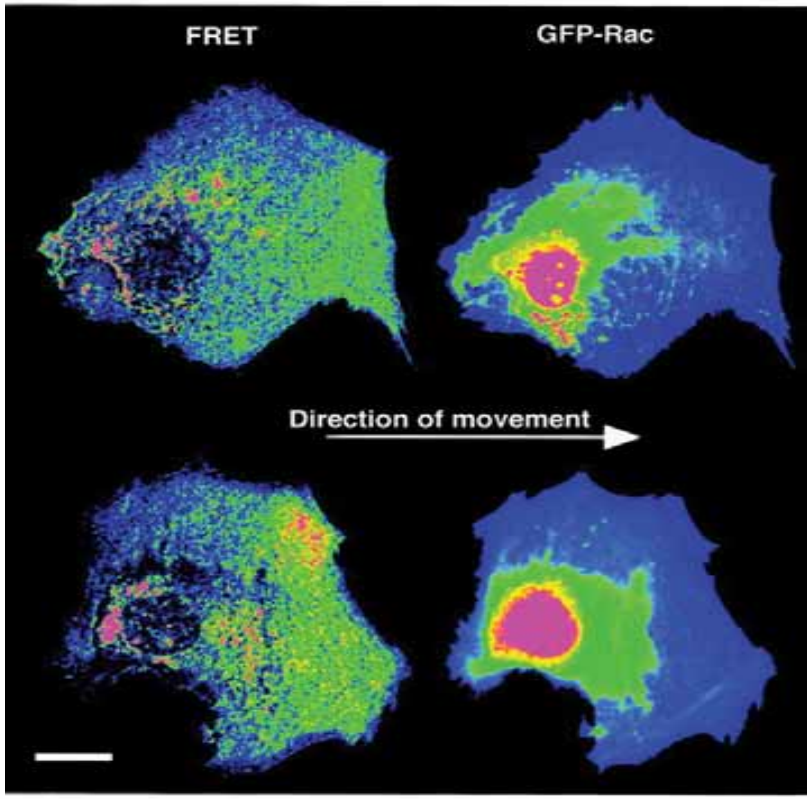
Sledování zpracování inzulínu





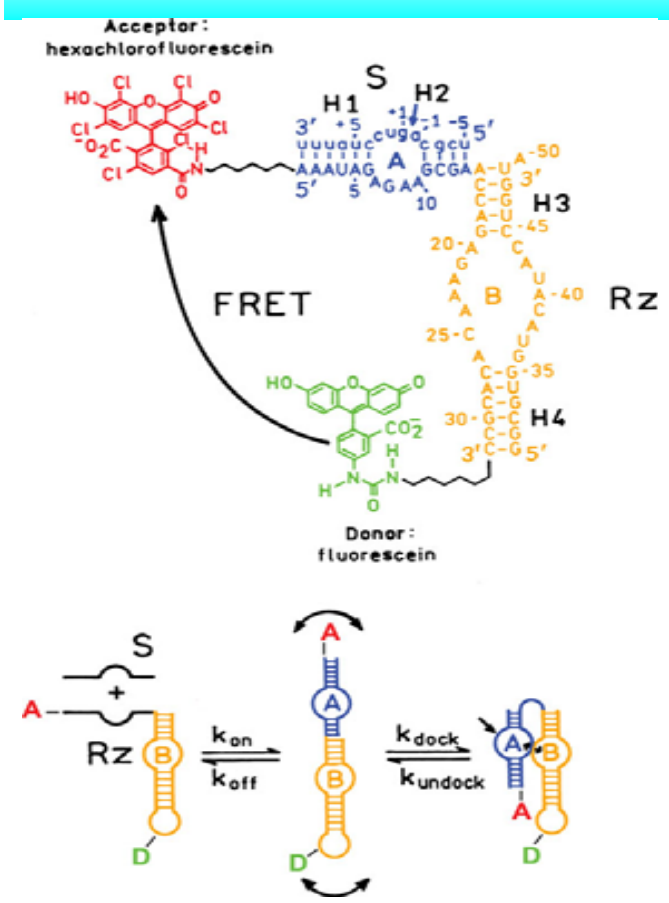
Sledování morfologických změn buněk

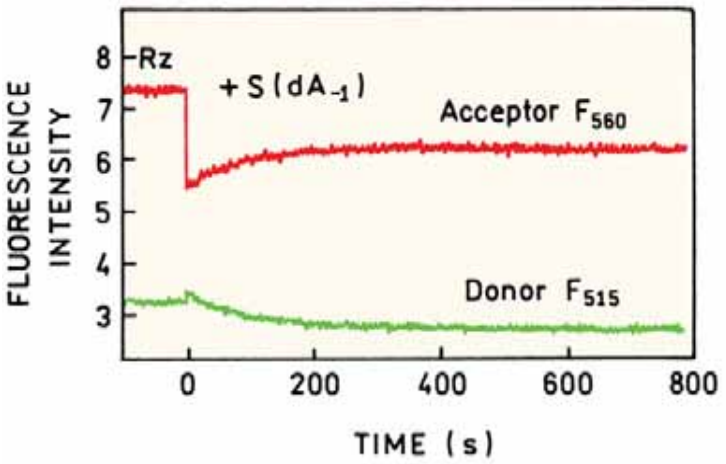




V zelené oblasti FRET se zpracovává nejvíce GTP a v tomto směru se také buňka pohybuje.

Štěpení ribozymem



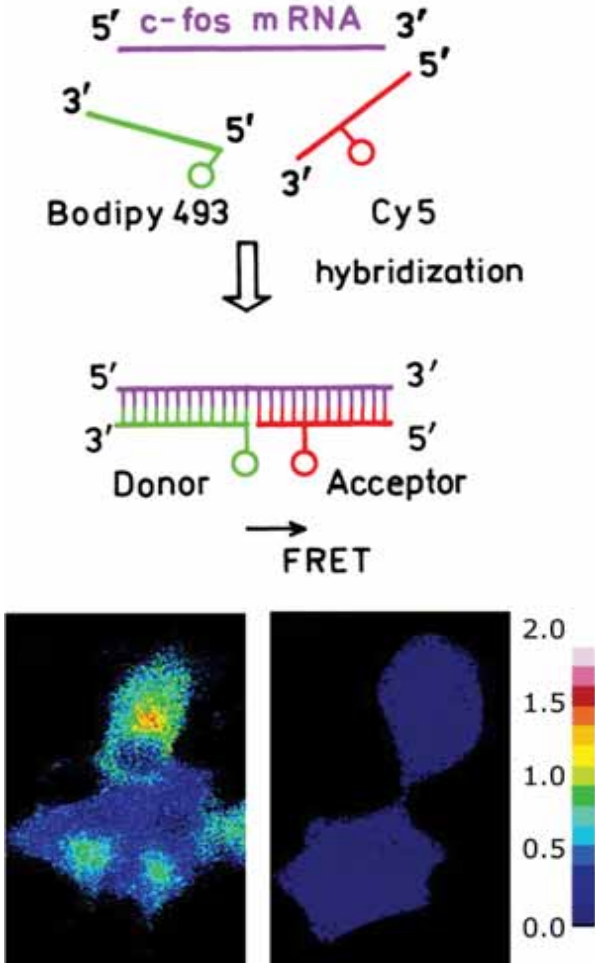


- Po vazbě ribozymu na substrát dochází k přiblížení části A a B, což se projeví zvýšením FRET

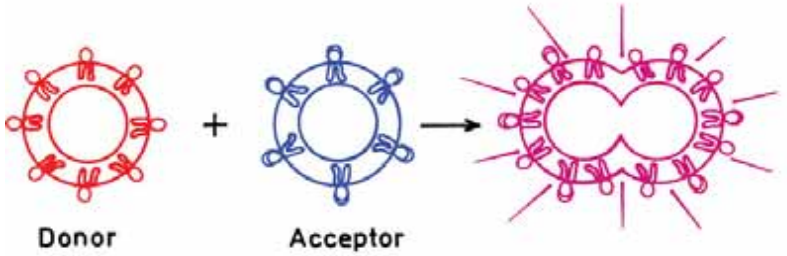
Detekce přítomnosti c-fos mRNA

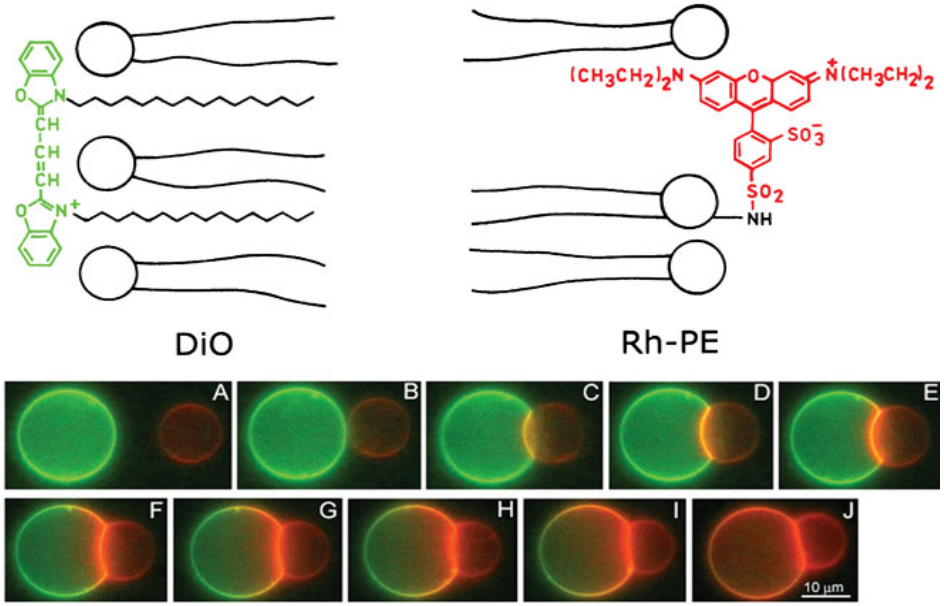
- c-fos mRNA je transkripčním faktorem, který ovlivňuje buněčný cyklus a diferenciaci

- FRET sondy byly použity pro zjištění přítomnosti c-fos mRNA v buněčné kultuře



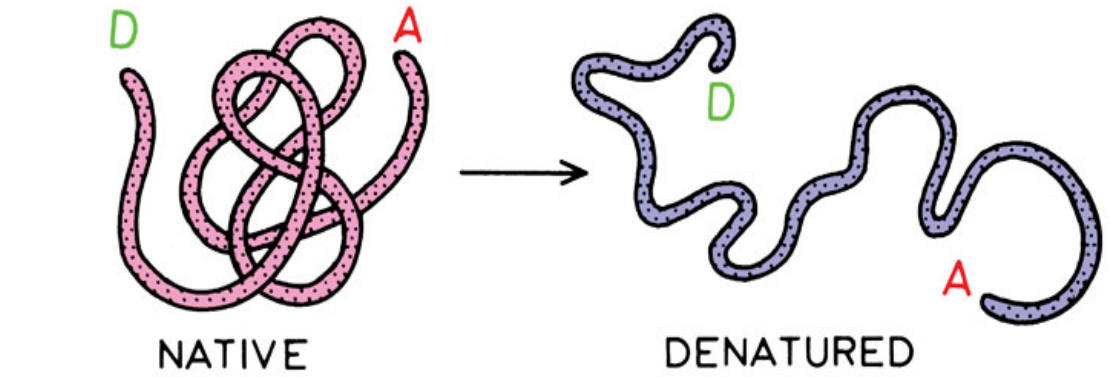
Membránová fůze

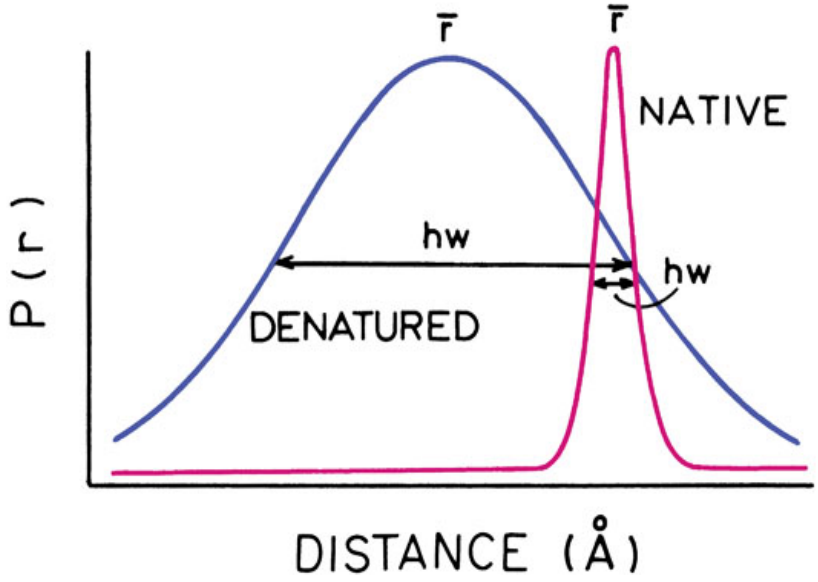




- Jednotlivé membrány obsahují donor nebo akceptor
- vpřípadě splynutí membrán pozorujeme FRET

Sledování denaturačních změn





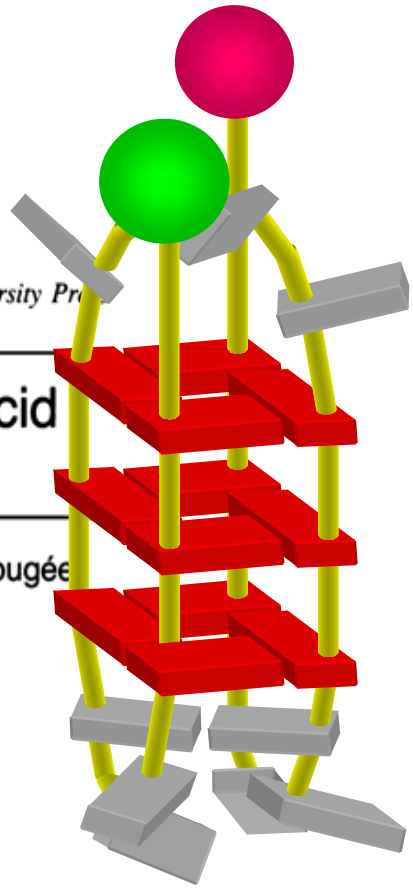
Studium struktury DNA

F – GGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGG - R

920–928 Nucleic Acids Research, 1994, Vol. 22, No. 6 © 1994 Oxford University Pr

Fluorescence energy transfer as a probe for nucleic acid structures and sequences

Jean-Louis Mergny, Alexandre S.Boutorine, Thérèse Garestier, Francis Belloc[2], Michel Rougée, N.V.Bulychev[1], A.A.Koshkin[1], Jean Bourson[3], Alexandre V.Lebedev[1], Bernard Valeur[3], Nguyen T.Thuong[4] and Claude Hélène*



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/~zfisar/fluorescence/Default.htm

Poděkování

Grafika z knihy Principles o Fluorescence pro účely této přednášky laskavě poskytnul Prof. J. R. Lakowitz

Animace FRET v plném rozlišení laskavě poskytnul Dr. Joseph T. E. Roland