

# Fluorescenční rezonanční přenos energie

**Ctirad Hofr**

# Přehled přednášky

1. Původ rezonančního přenosu energie
2. Charakteristické veličiny FRET
3. Aplikace FRET při studiu biomolekul

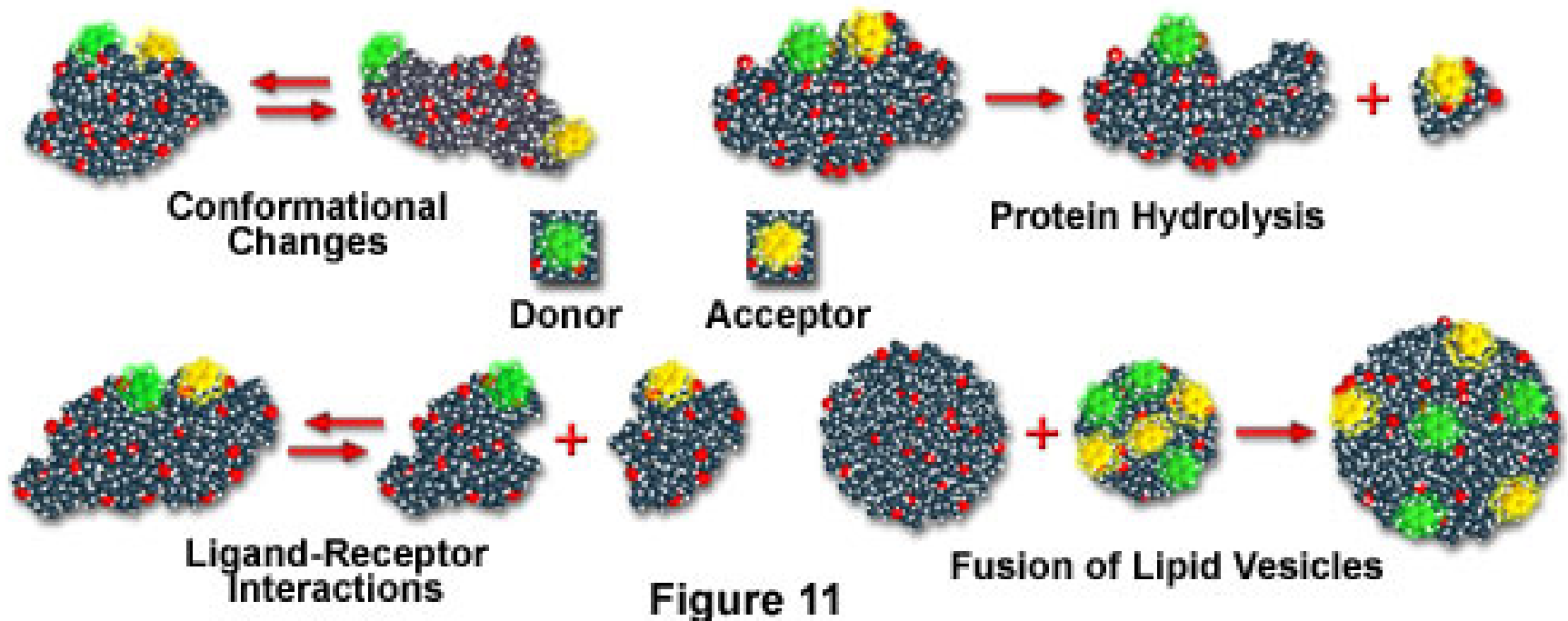
# 1. Přenos excitační energie

- 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!**

# K čemu lze použít rezonanční přenos energie?

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

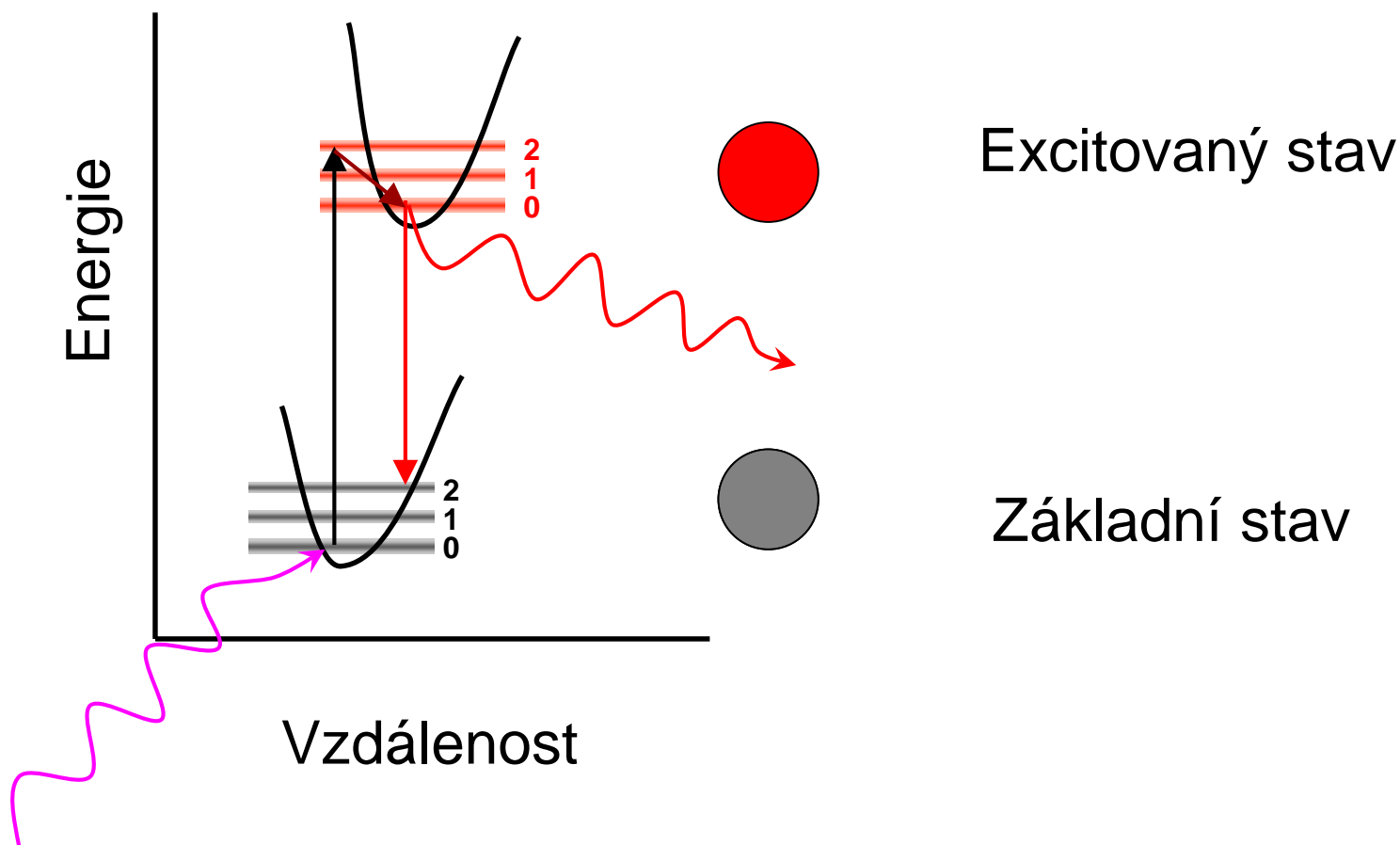
## Biomolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Applications



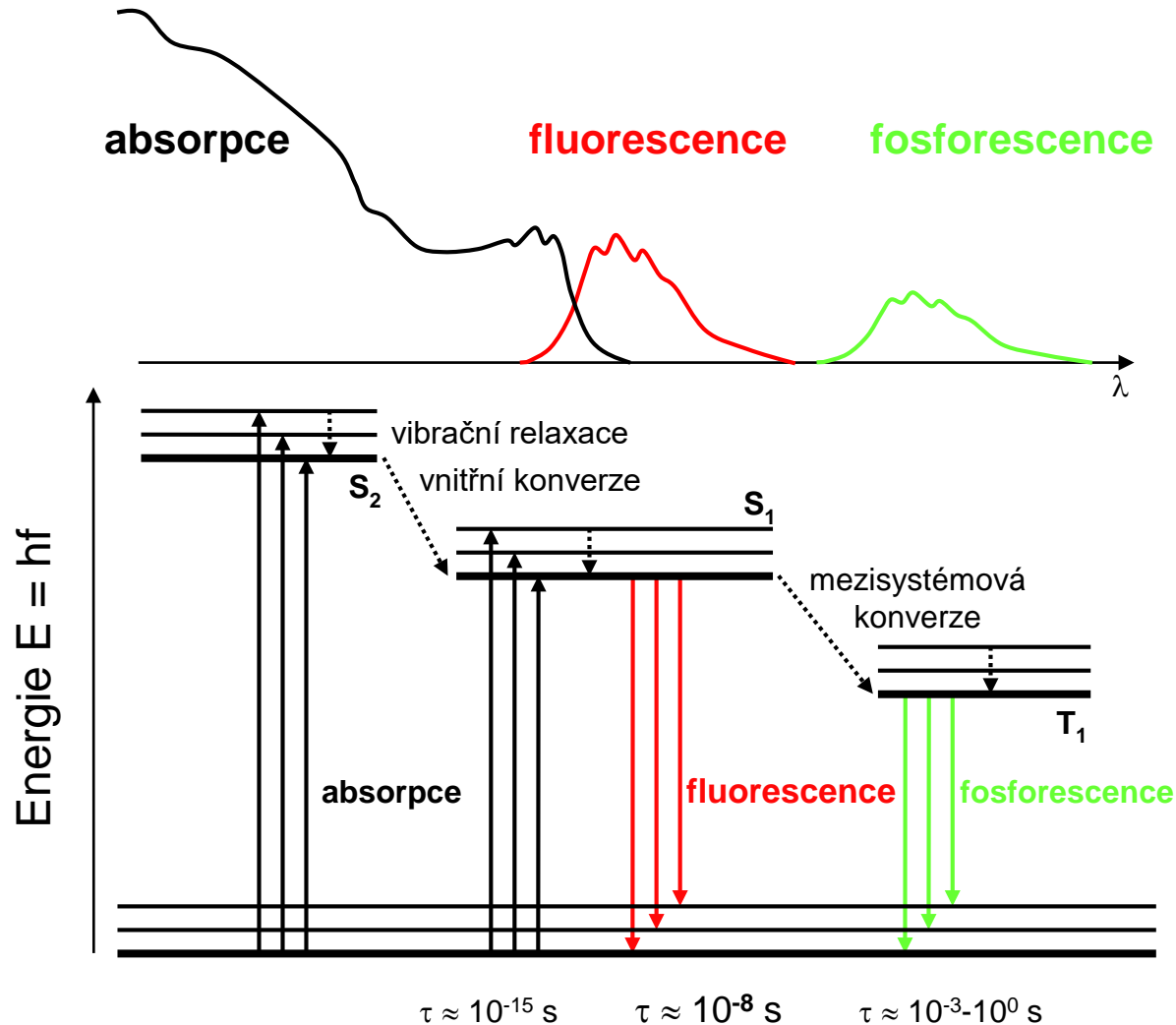
# Komentovaný úvod -fluorofor



# Absorpce a emise energie molekulou



# Zářivé a nezářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy molekuly



Spektrum je pravděpodobnost...

Spektrum = **pravděpodobnost přechodu**



# Vznik excitačního spektra

Excitation Range



Dye solution

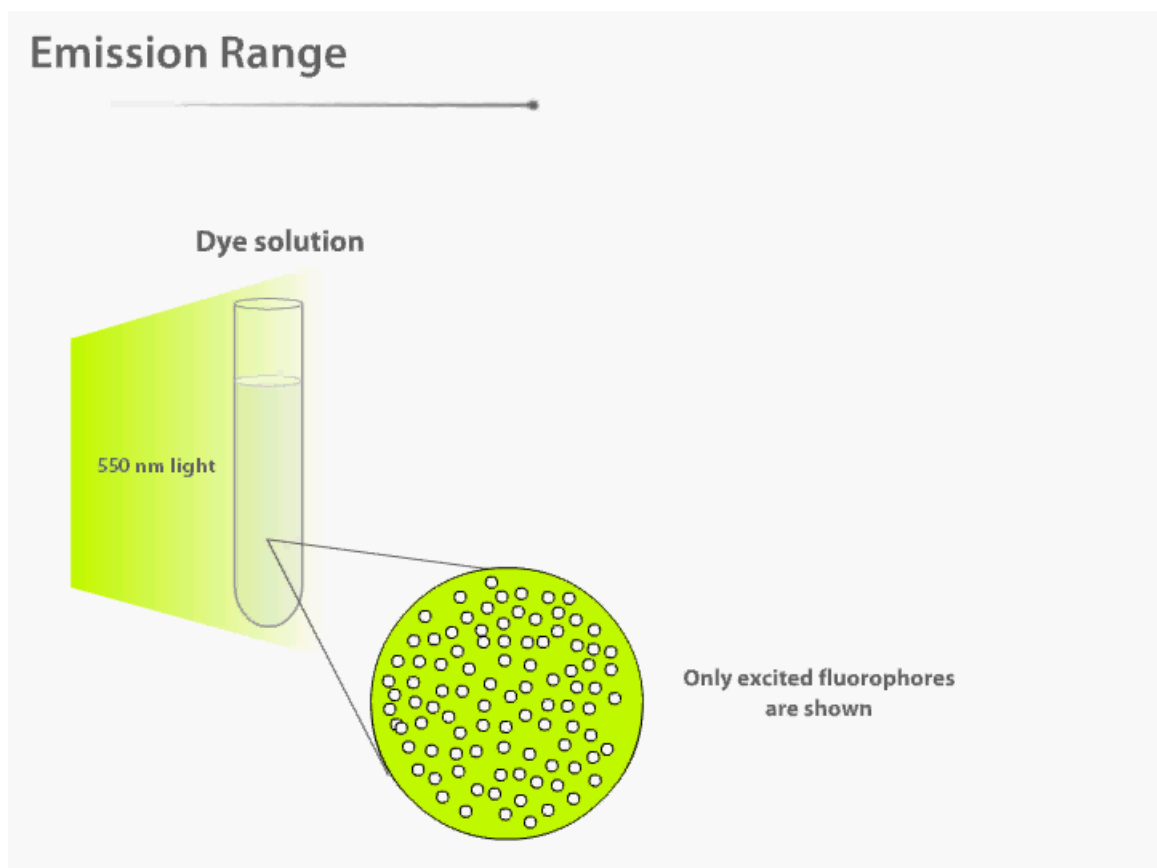


<https://youtu.be/SGFlr1jFNBM?t=280>

Výukový materiál společnosti Invitrogen

Excitační spektrum znázorňuje pravděpodobnost, že při dané vlnové délce dojde k excitaci fluoroforu **dopadajícím světlem**.

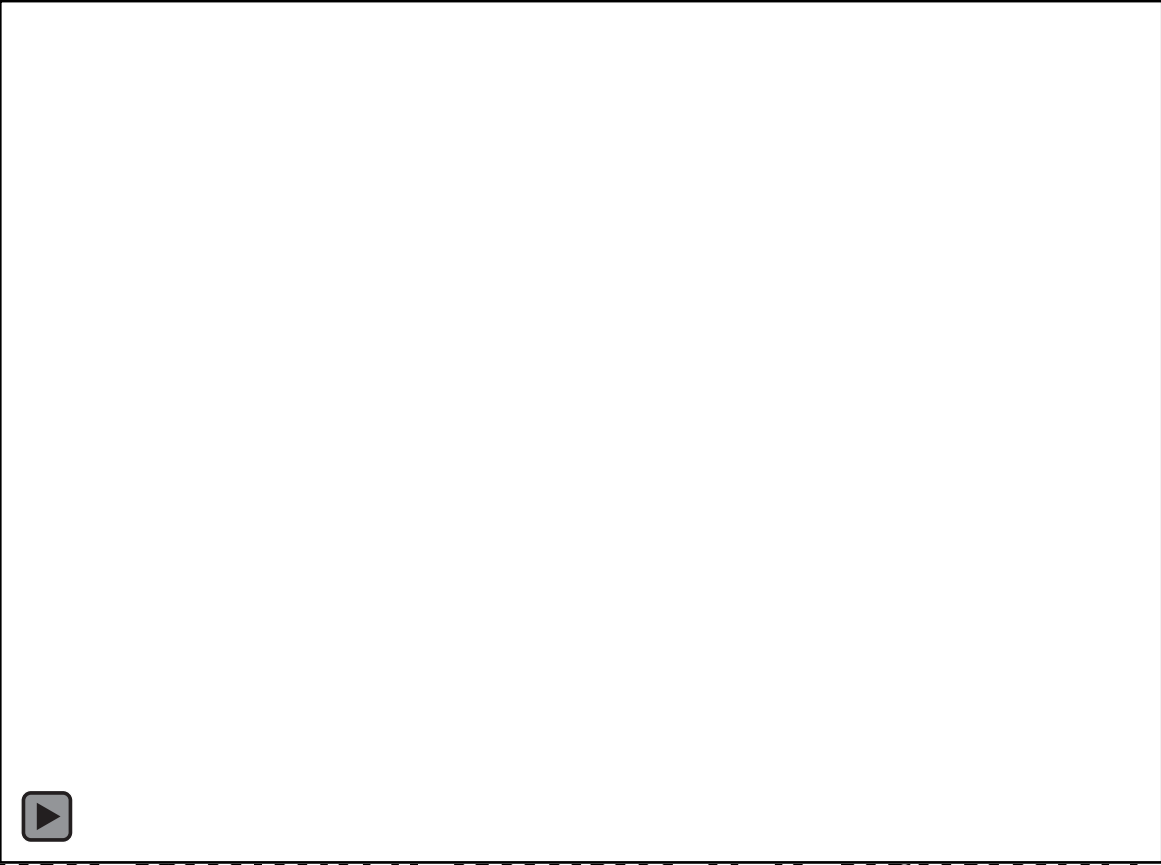
# Vznik emisního spektra



<https://youtu.be/SGF1r1jFNBM?t=388> Výukový materiál společnosti Invitrogen

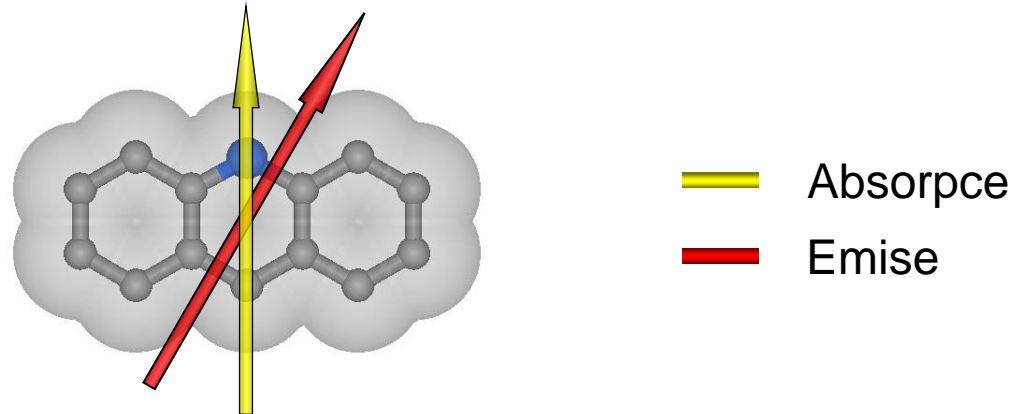
Emisní spektrum, určuje pravděpodobnost, že dojde k emisi fluorescence o dané vlnové délce = barvě. **Závisí na fluoroforu** a je jeho charakteristikou.

# Rezonanční přenos energie

- Analogie  mi

- 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 vyšší 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**

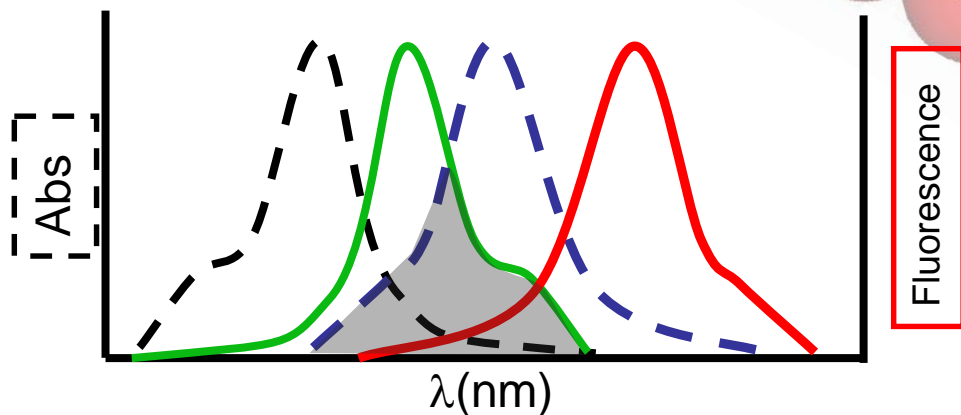
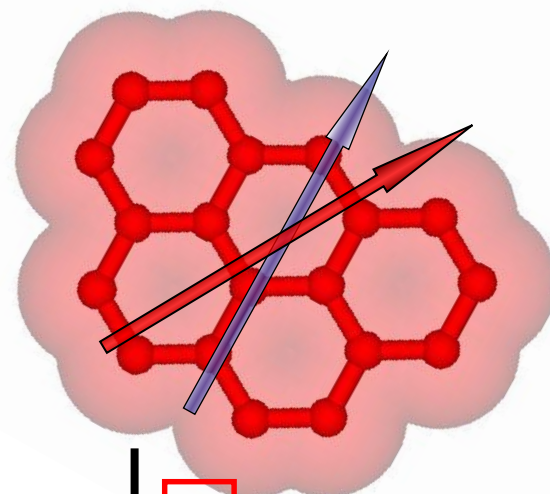
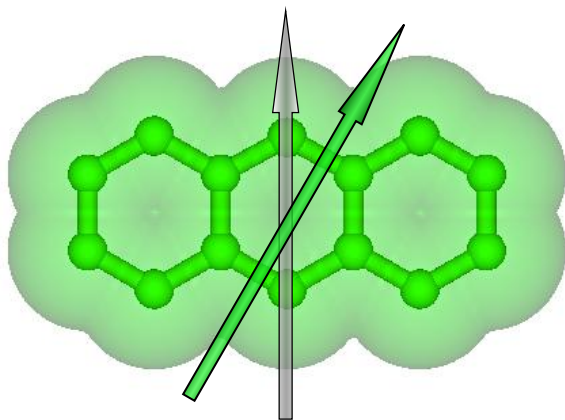
**Akceptor**

— Absorpce donoru

— Absorpce akceptoru

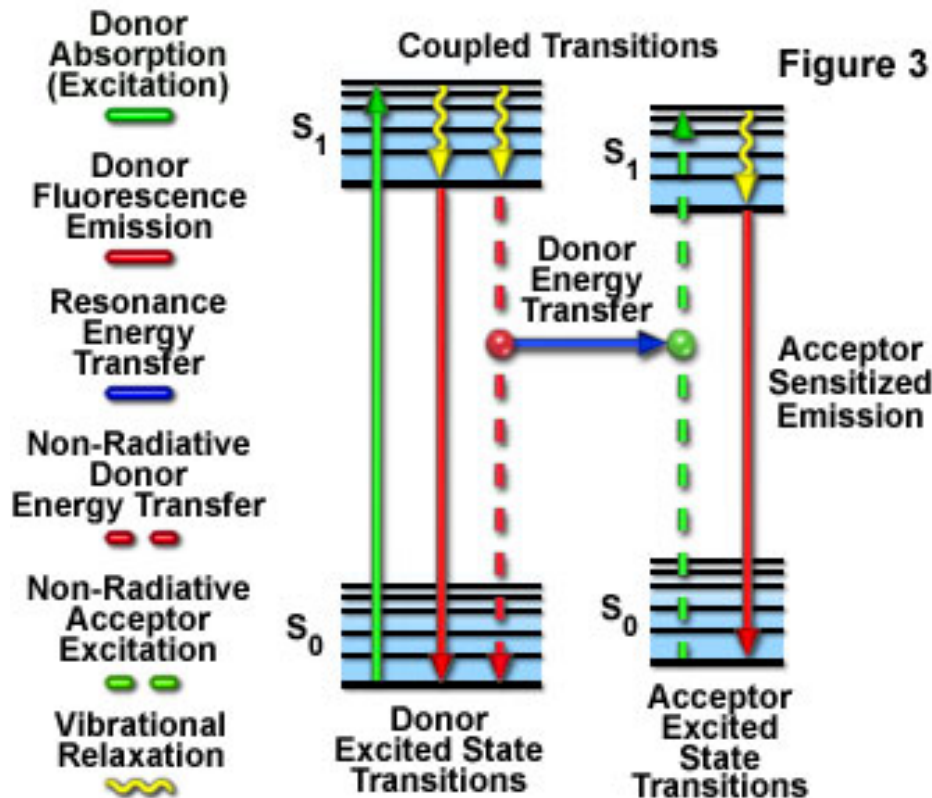
— Emise donoru

— Emise akceptoru



# FRET - nezářivý přenos energie

Resonance Energy Transfer Jablonski Diagram



- 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.

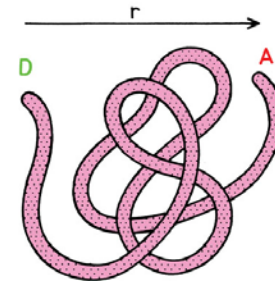
# Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET)

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

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

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

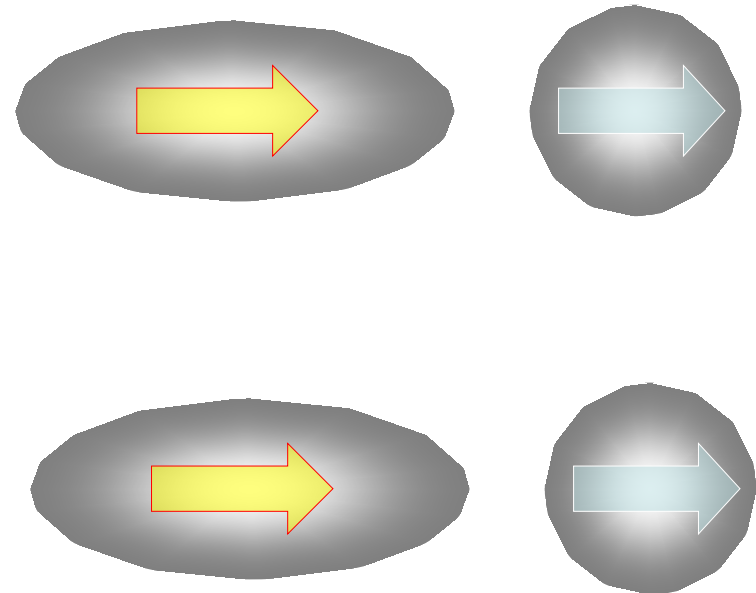


$\tau_D$  – doba dohasínání fluorescence donoru,  $R_0$  – vzdálenost ve které je pravděpodobnost přenosu energie poloviční tj. rovna pravděpodobnosti vnitřní deaktivace vzbuzeného stavu molekuly,  $r$  – vzdálenost mezi donorem a akceptorem.

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

# Interakce dipól-indukovaný dipól

- Polární molekula s dipólovým momentem  $\mu_1$  může indukovat dipólový moment v polarizovatelné molekule
- Indukovaný dipól interaguje s permanentním dipólem první molekuly a dochází k vzájemnému přitahování
- Indukovaný dipól (modré šipky) následuje změny v orientaci permanentního dipólu (žluté šipky)



$$V = -\frac{\mu_1^2 \alpha_2}{\pi \epsilon_0 r^6}$$



# Účinnost přenosu E

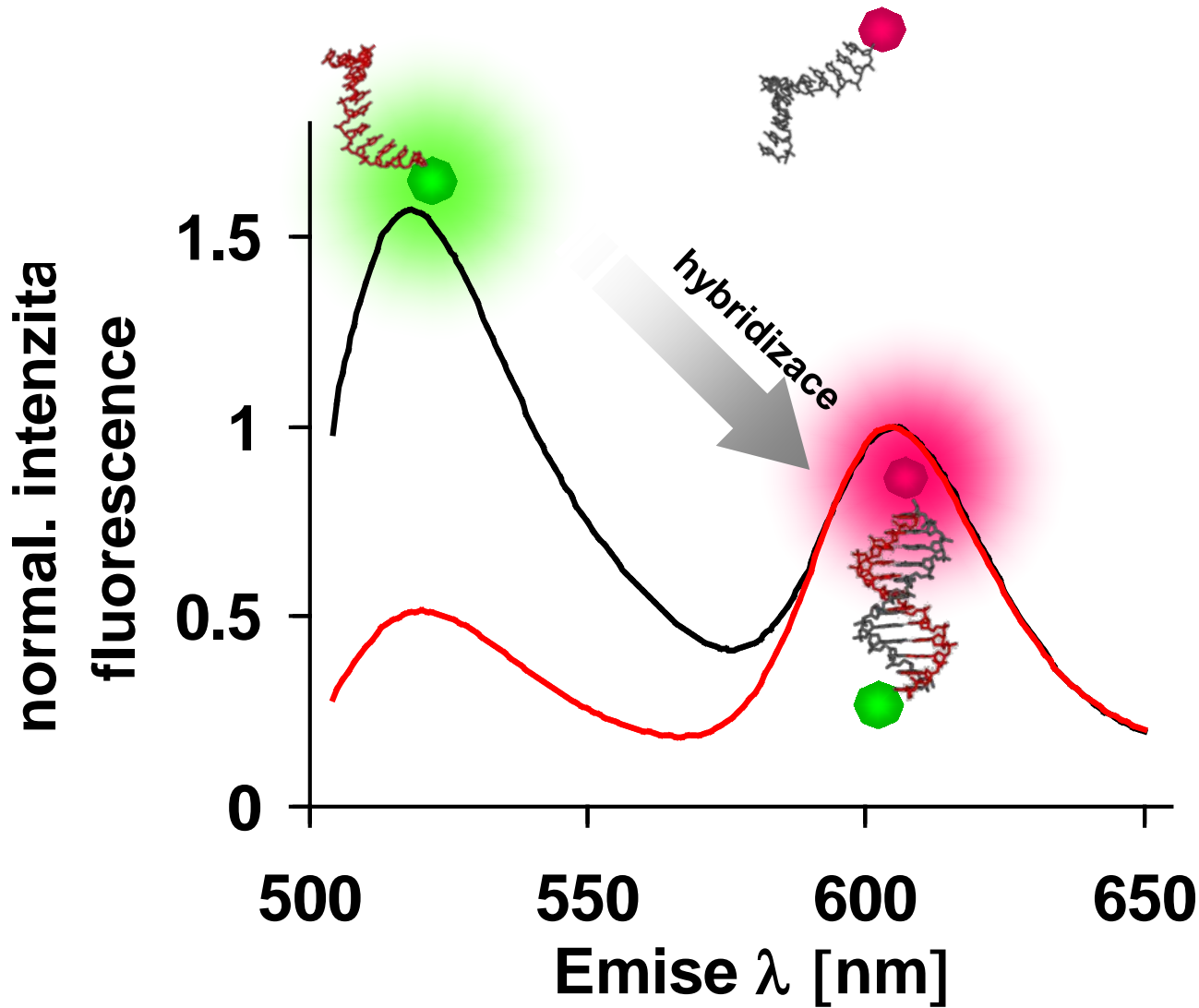
Je dána poměrným množstvím fotonů, které jsou absorbovány donorem a následně vyzářeny akceptorem

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

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

Rychle klesá se 6 mocninou vzdálenosti!

# Popis hybridizace molekul DNA za použití FRET

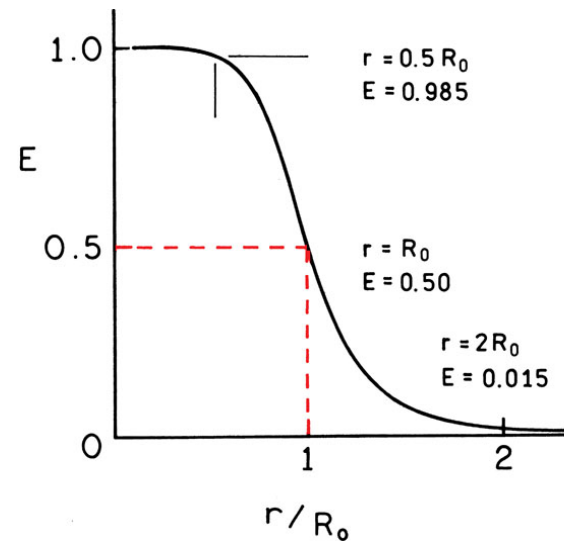
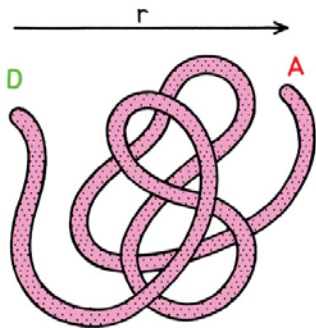


- Při hybridizaci DNA se dostávají D a A do těsné blízkosti
- Změna spektra ukazuje na FRET a je důkazem hybridizace DNA

# $R_0$ Försterova 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

# Závislost účinnosti přenosu na $r$

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

$$r = 0.1 \times R_0$$

$$E = 0.9999999$$

$$r = 0.5 \times R_0$$

$$E = 0.984615$$

$$r = 2.0 \times R_0$$

$$E = 0.015384$$

$$r = 4.0 \times R_0$$

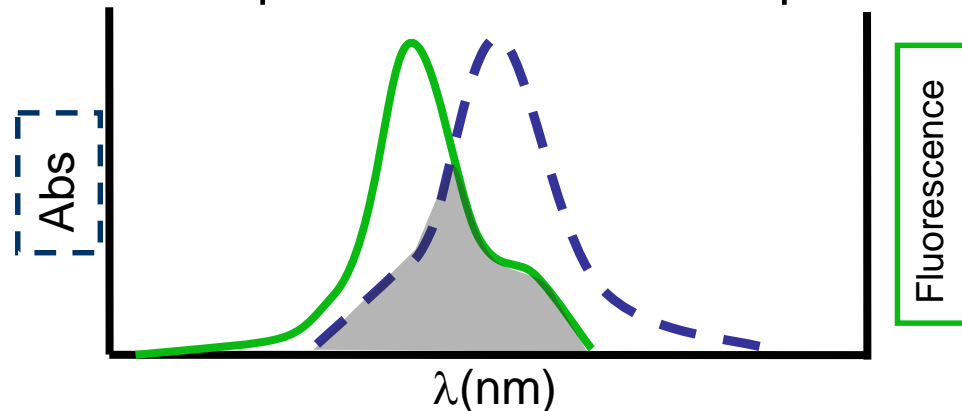
$$E = 0.000244$$

Rozsah vhodný pro měření:  $0.5 - 2 R_0$

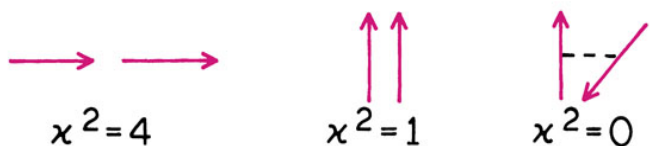
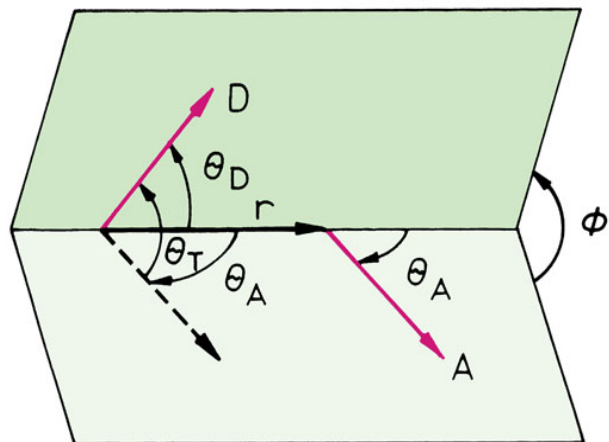
# Na čem závisí $R_0$ ?

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

- Na orientaci dipólových momentů přechodu pro emisi donoru a absorpci akceptoru (pro faktor  $\kappa^2$  se používá průměrná hodnota 2/3)
- Na optických vlastnostech prostředí (index lomu vody  $n_{\text{H}_2\text{O}} = 1.33$ )
- Na kvantovém výtěžku donoru  $Q_D$
- Na míře překryvu  $J(\lambda)$  emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru



# Závislost orientačního faktoru $\kappa^2$ na orientaci dipólových momentů přechodu



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

$$\chi^2 = (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$$

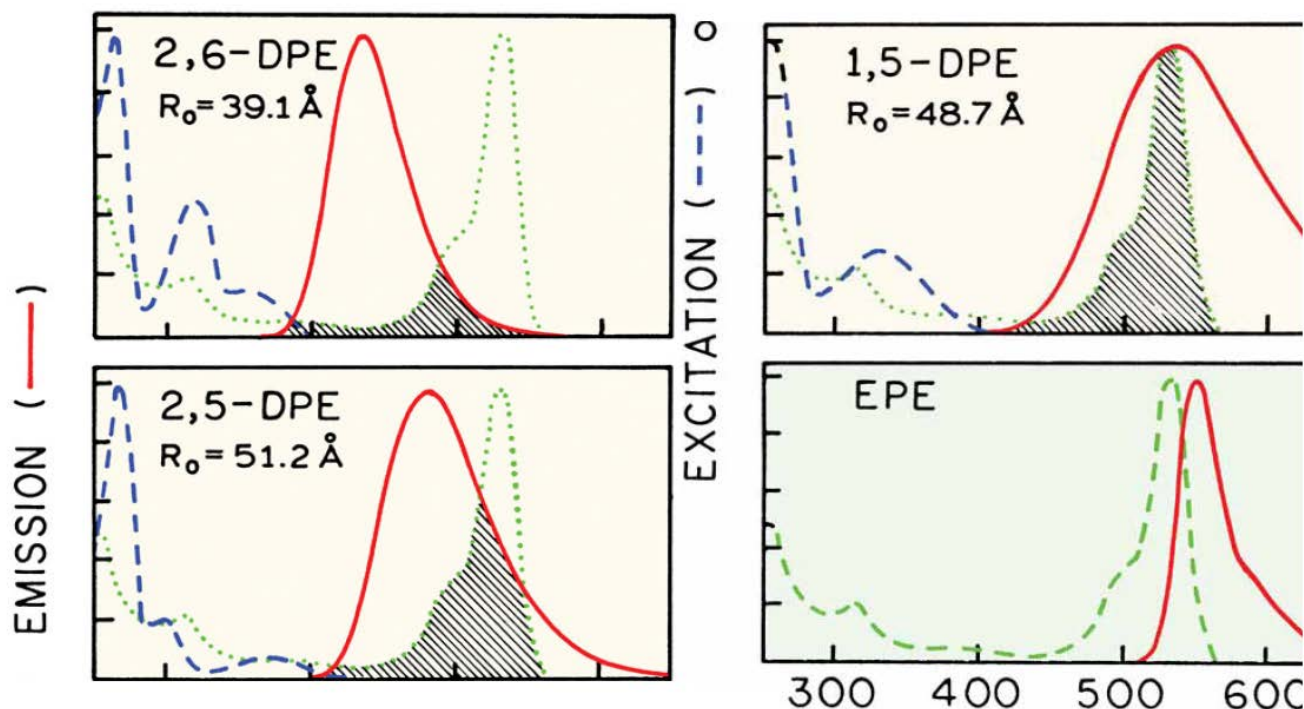
Pro náhodné uspořádání dipólových momentů přechodu

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

V praxi se tato hodnota běžně používá

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

# Závislost $R_0$ na spektrálním překryvu



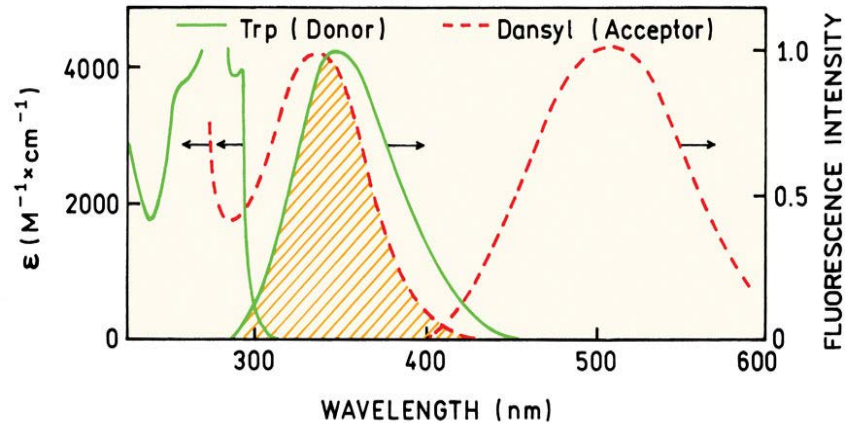
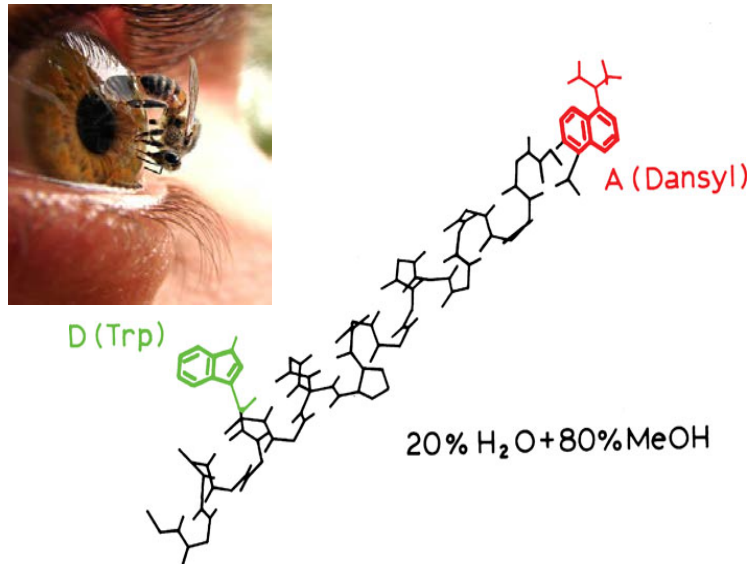
**Table 13.1.** Calculated  $R_0$  Values for RET from Structural Isomers of Dansyl-Labeled Phosphatidylethanolamine (DPE) to Eosin-Labeled Phosphatidylethanolamine (EPE) and from 2,6-DPE to 2,5-DPE

Donor	Acceptor	$Q_D$	$J$ ( $M^{-1} cm^3$ )	$J$ ( $M^{-1} cm^3 (nm)^{-3}$ ) <sup>d</sup>	$R_0$ ( $\text{\AA}$ ) <sup>a</sup>
1,5-DPE <sup>b</sup>	EPE <sup>c</sup>	0.37	$2.36 \times 10^{-13}$	$2.36 \times 10^{15}$	48.7
2,5-DPE	EPE	0.76	$1.54 \times 10^{-13}$	$1.54 \times 10^{15}$	51.2
2,6-DPE	EPE	0.71	$3.31 \times 10^{-14}$	$3.31 \times 10^{14}$	39.1
2,6-DPE	2,5-DPE	0.71	$1.3 \times 10^{-15}$	$1.3 \times 10^{13}$	22.8

**Přenos je větší při větším překryvu spekter a tím je také delší  $R_0$ .**

8 Závislost je ale velmi pozvolná a nezávisí lineárně ale podle šesté odmocniny.

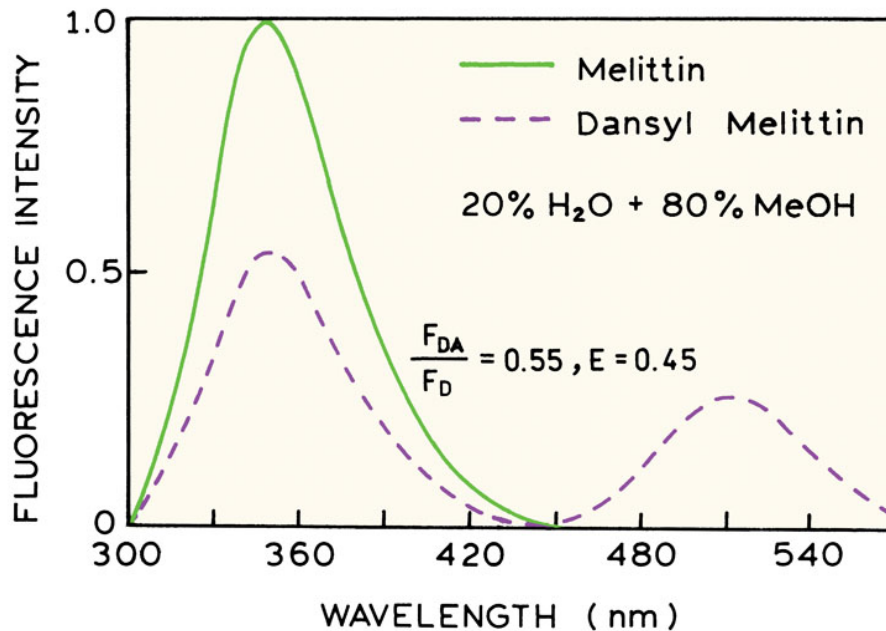
# Měření vzdálenosti pomocí FRET



- 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



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

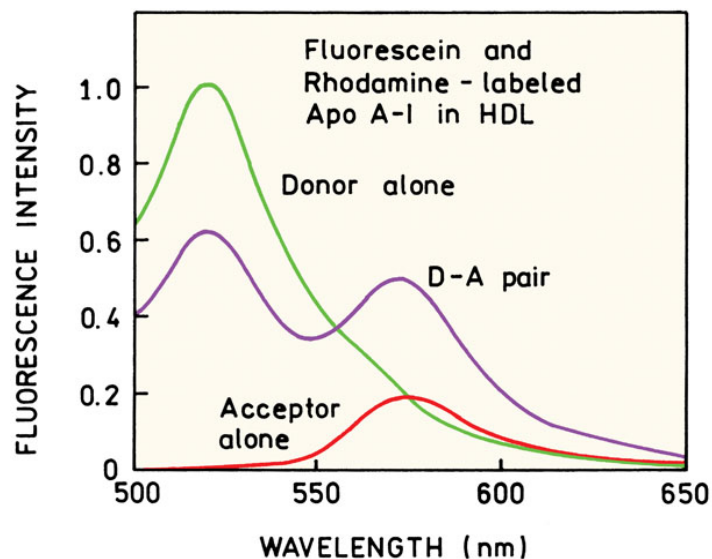
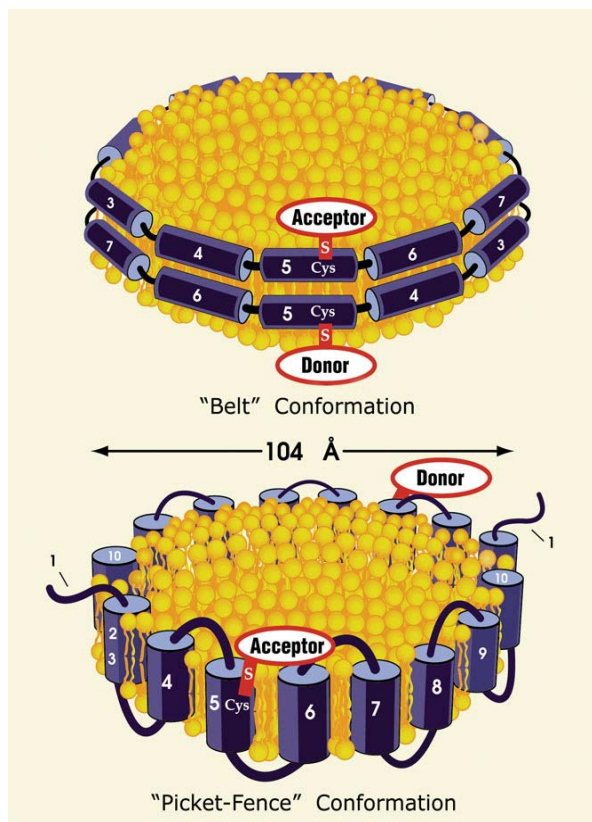
$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

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

# Výhody FRET

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

# FRET umožňuje rozlišit mezi více variantami uspořádání flexibilních proteinů

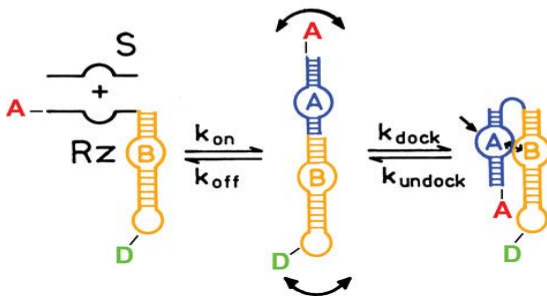
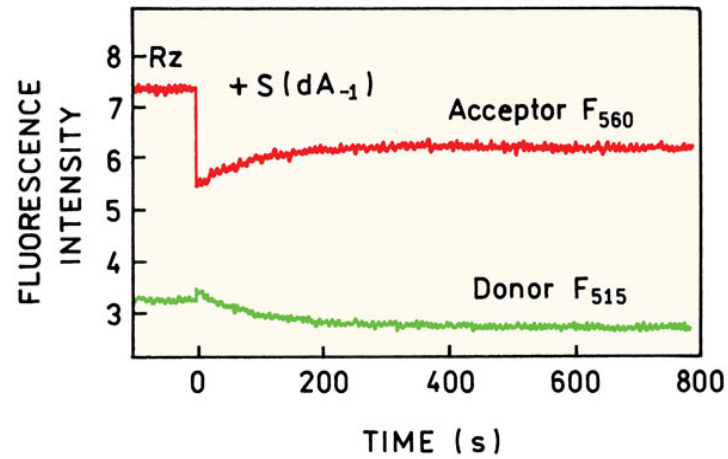
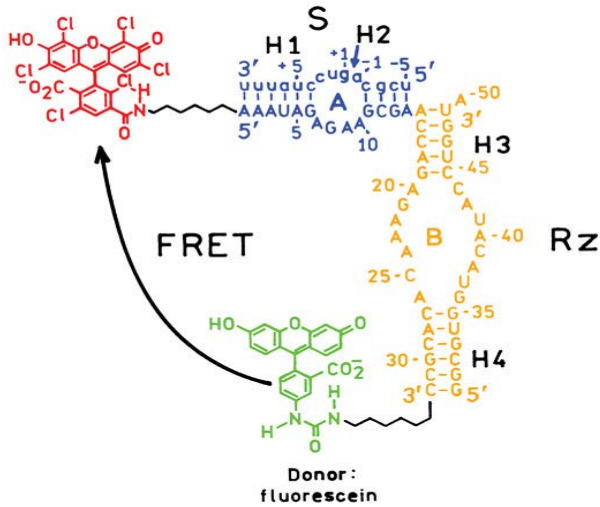


- apoA-I protein reguluje metabolismus cholesterolu.
- apo A-I se váže do lipidové membrány
- byla navržena dvě možná uspořádání proteinů v membráně
- kvůli flexibilitě lipidů není možno použít strukturní metody
- jeden z řetězců apoA-I proteinů byl naznačen fluoresceinem (Donor) a druhý tetrametylrodaminem (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 uspořádání ApoA-I
- <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la402727a>

# Štěpení ribozymem

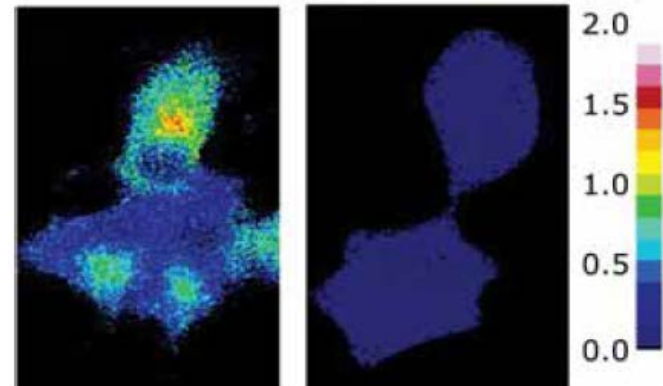
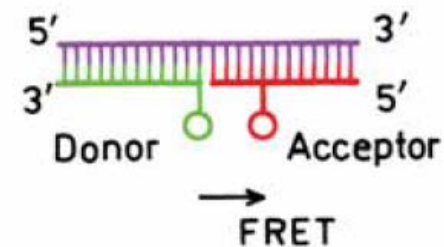
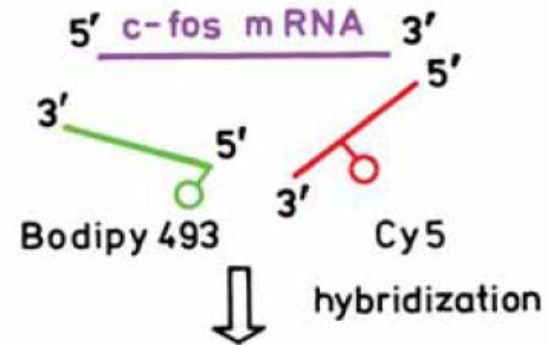
Acceptor:  
hexachlorofluorescein



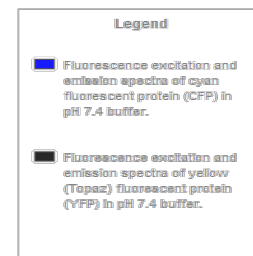
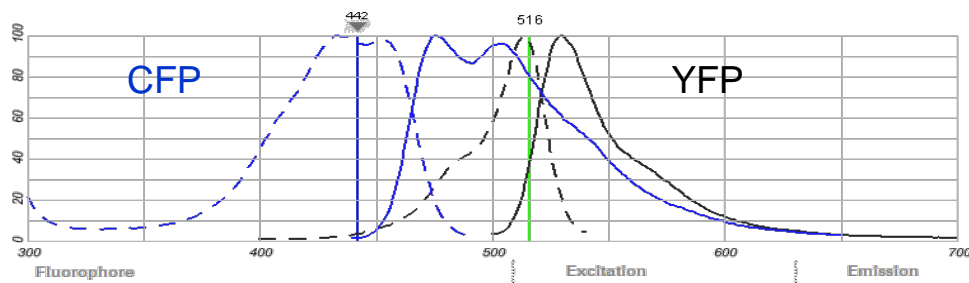
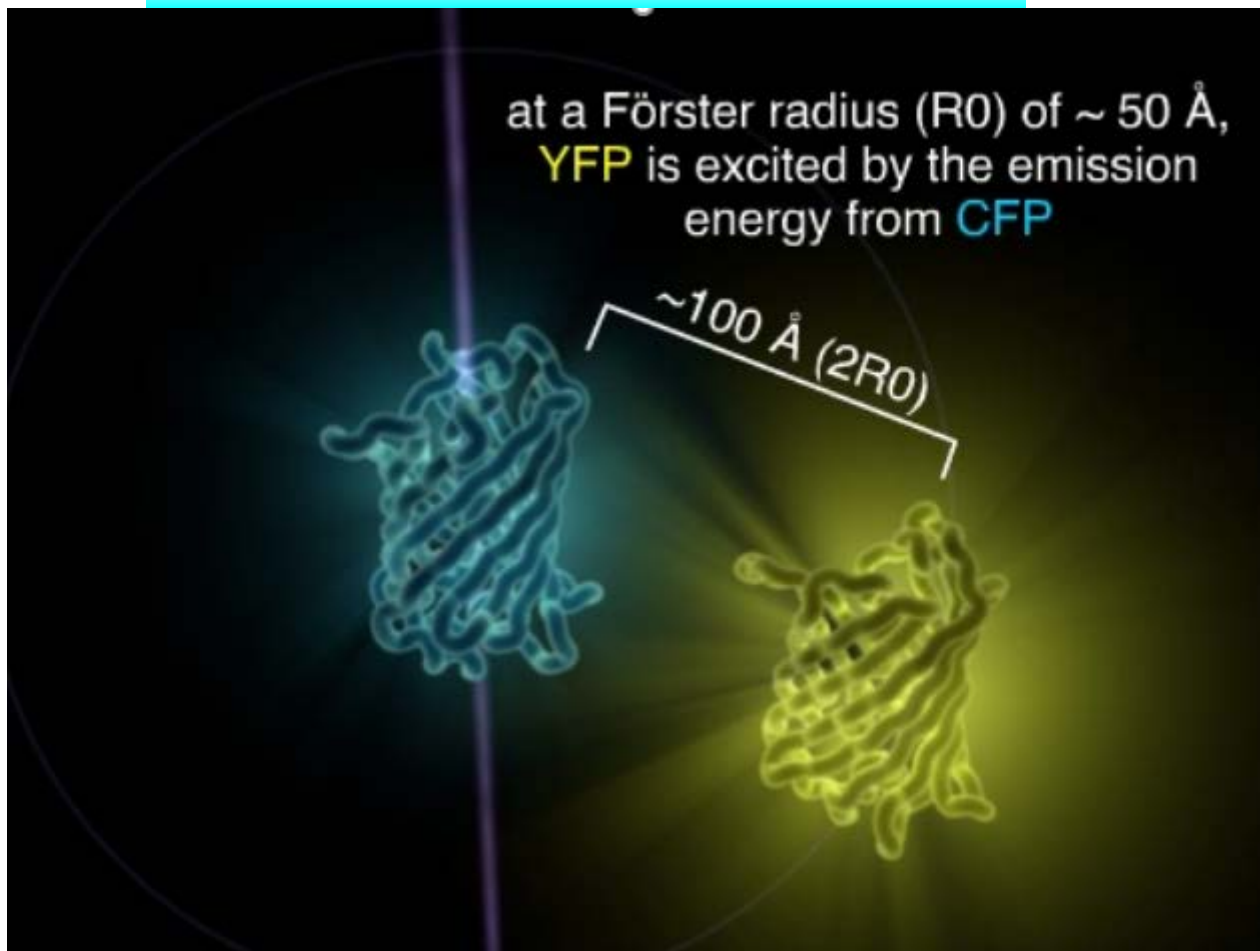
- Po vazbě ribozymu na substrát dochází k přiblížení části A a B, což se projeví zvýšením FRET

# 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
- Byla prokázána přítomnost c-fos mRNA u aktivovaných buněk (vlevo)

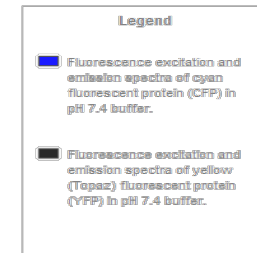
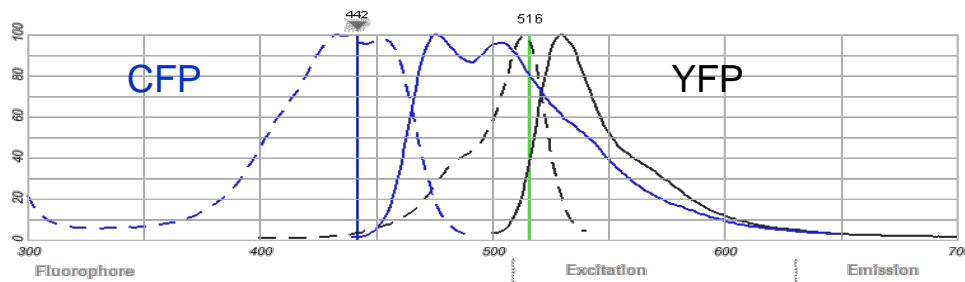
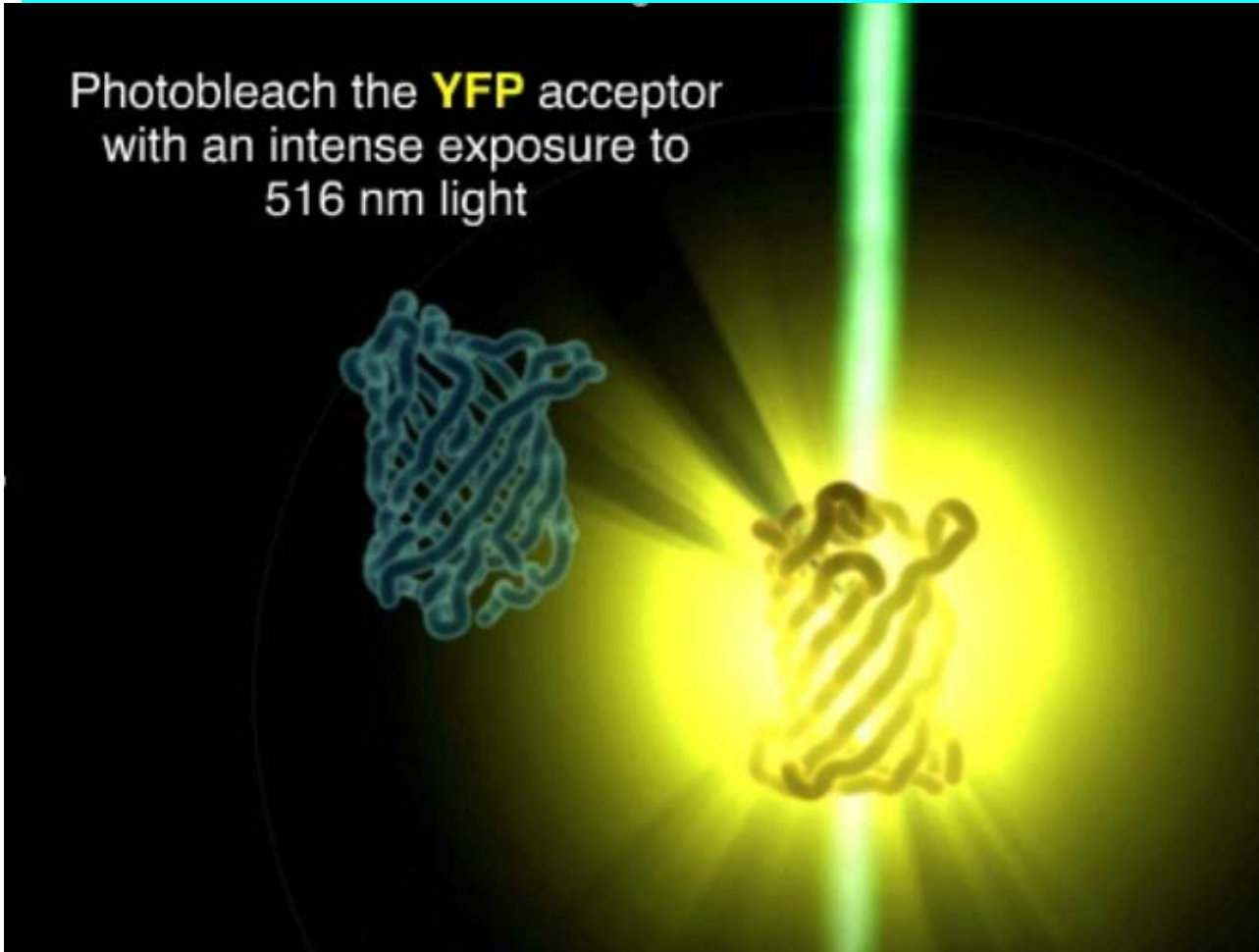


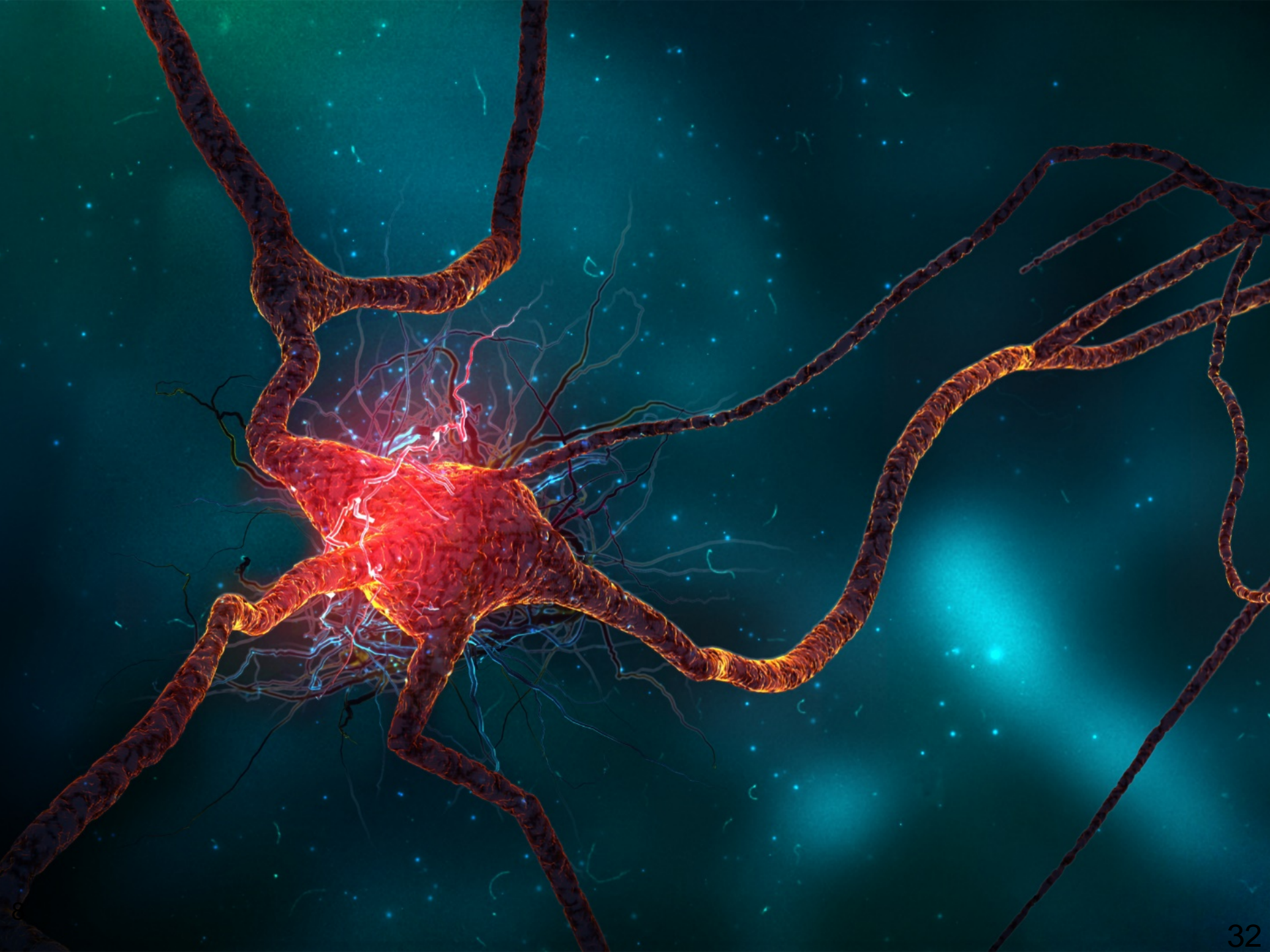
# FRET mezi CFP a YFP



# Zhášení FRET fotovybělováním

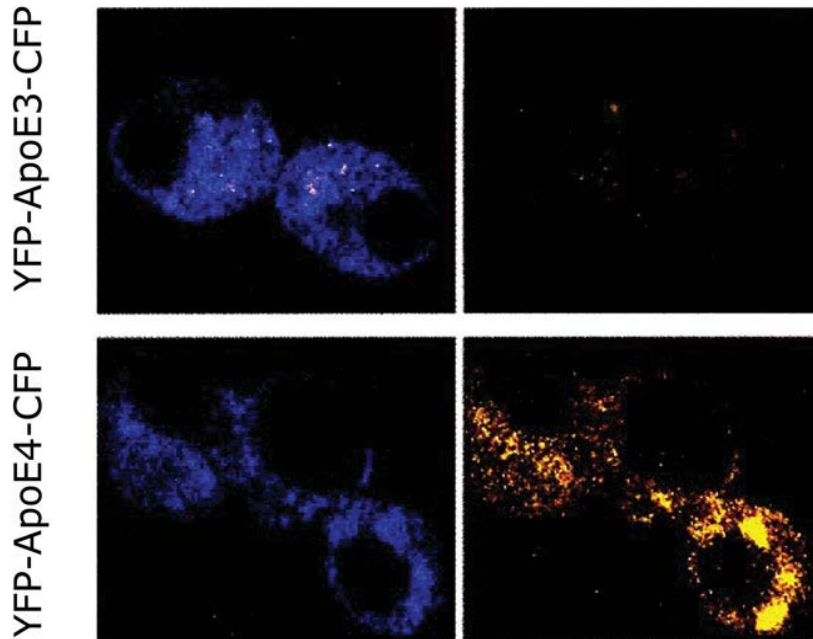
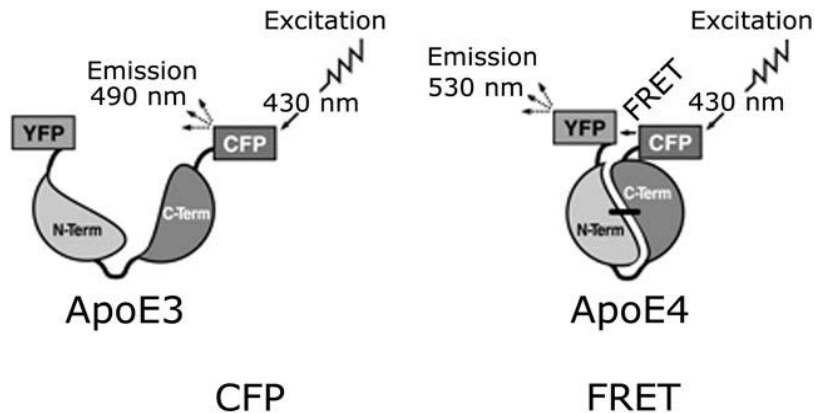
Photobleach the **YFP** acceptor  
with an intense exposure to  
516 nm light







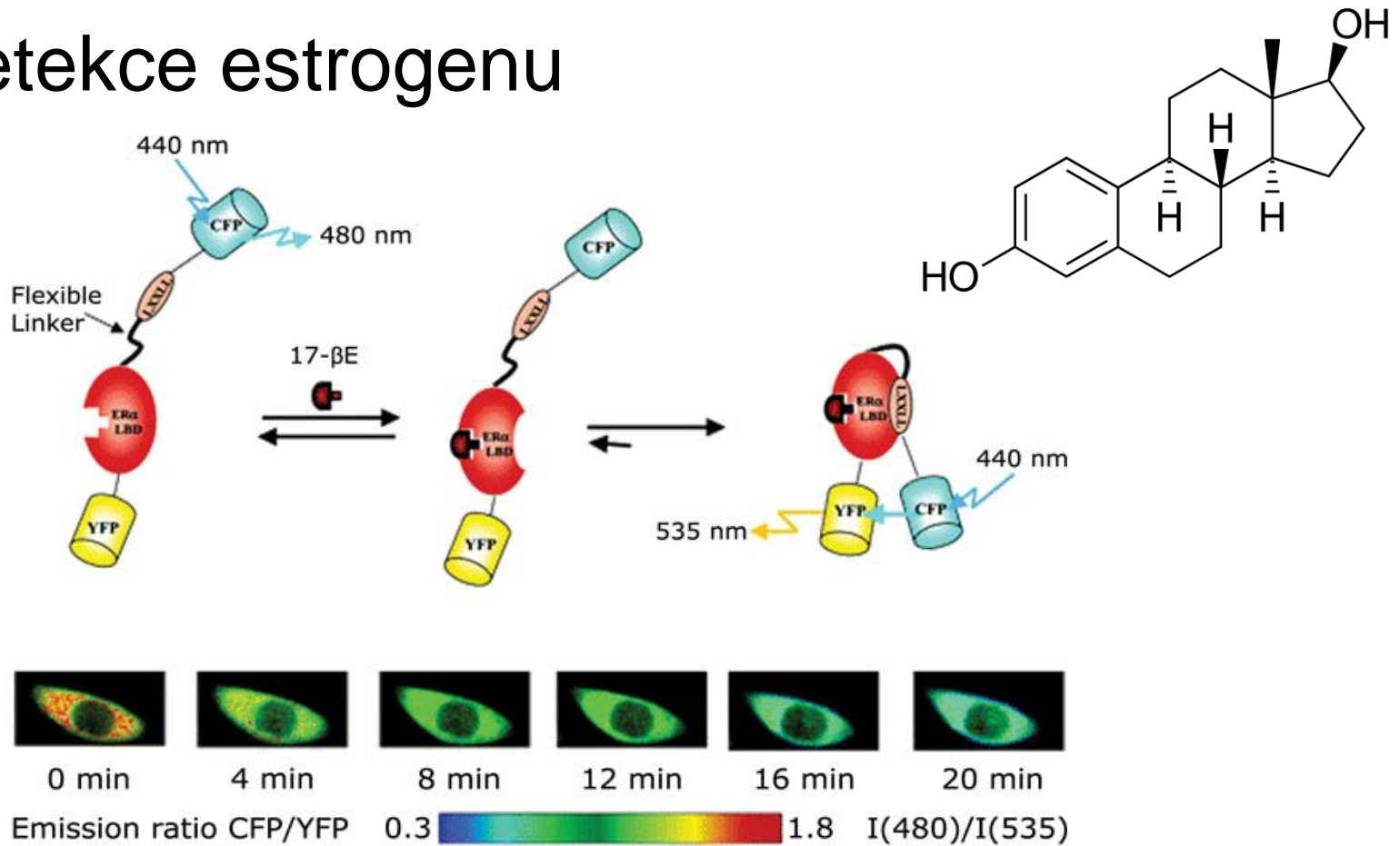
# Skládání proteinů *in vivo*



- 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

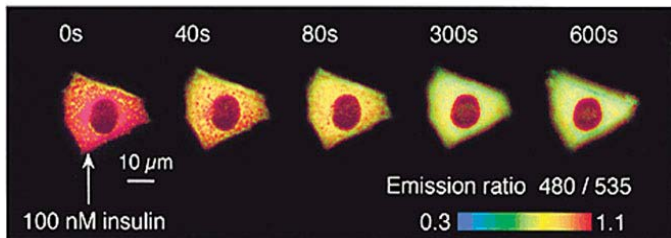
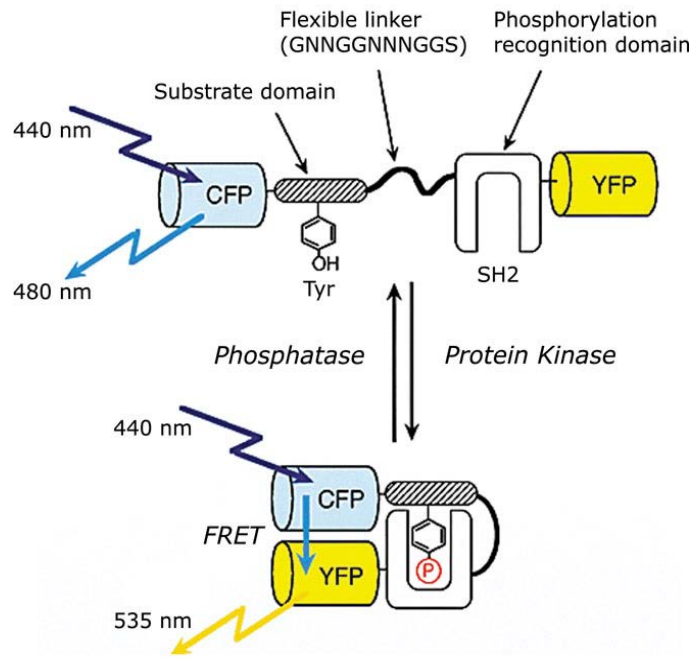
# FRET senzory

- Detekce estrogenu



# Sledování fosforilace proteinů

## Sledování zpracování inzulinu

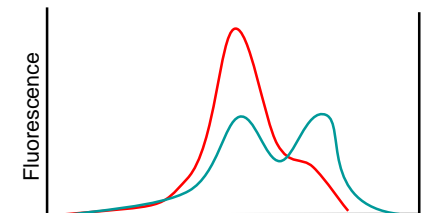


Receptorem inzulinu je tyrozinkináza, která fosforyluje tyrozin v rozpoznávané sekvenci, která je následně vázána SH2 doménou dalšího proteinu.

Tato vazba způsobuje přiblížení CFP a YFP a indukuje FRET.

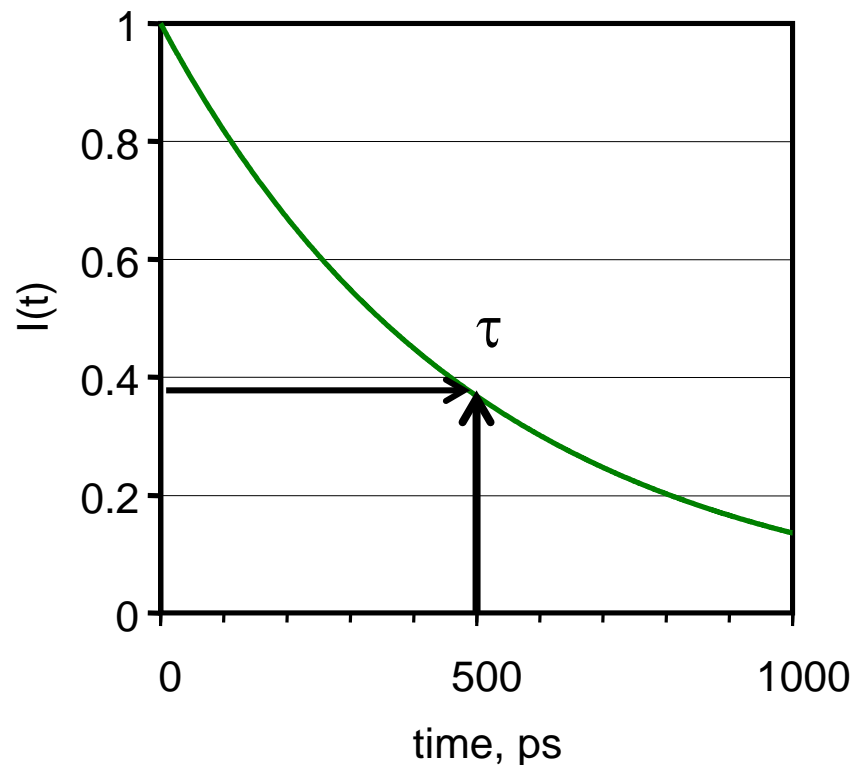
Proteinový konstrukt byl exprimován v buňkách.

Po vystavení buněk 100nM inzulinu došlo k postupnému zvýšení přenosu energie.



# Jak dlouho trvá fluorescence?

**Náhodné** dohasínání zpět do základního stavu:  
každá molekula emituje 1 foton

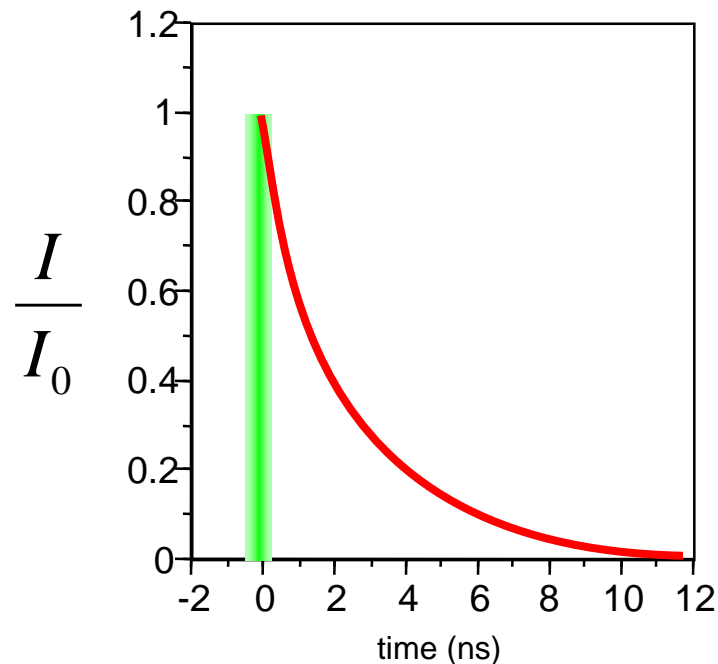


**Populace molekul excitovaných  
zábleskem (pulesem)**

# Časový průběh fluorescence

- Nejjednodušší je exponenciální pokles pro sférické částice

$$I_{(t)} = I_0 e^{-t/\tau}$$



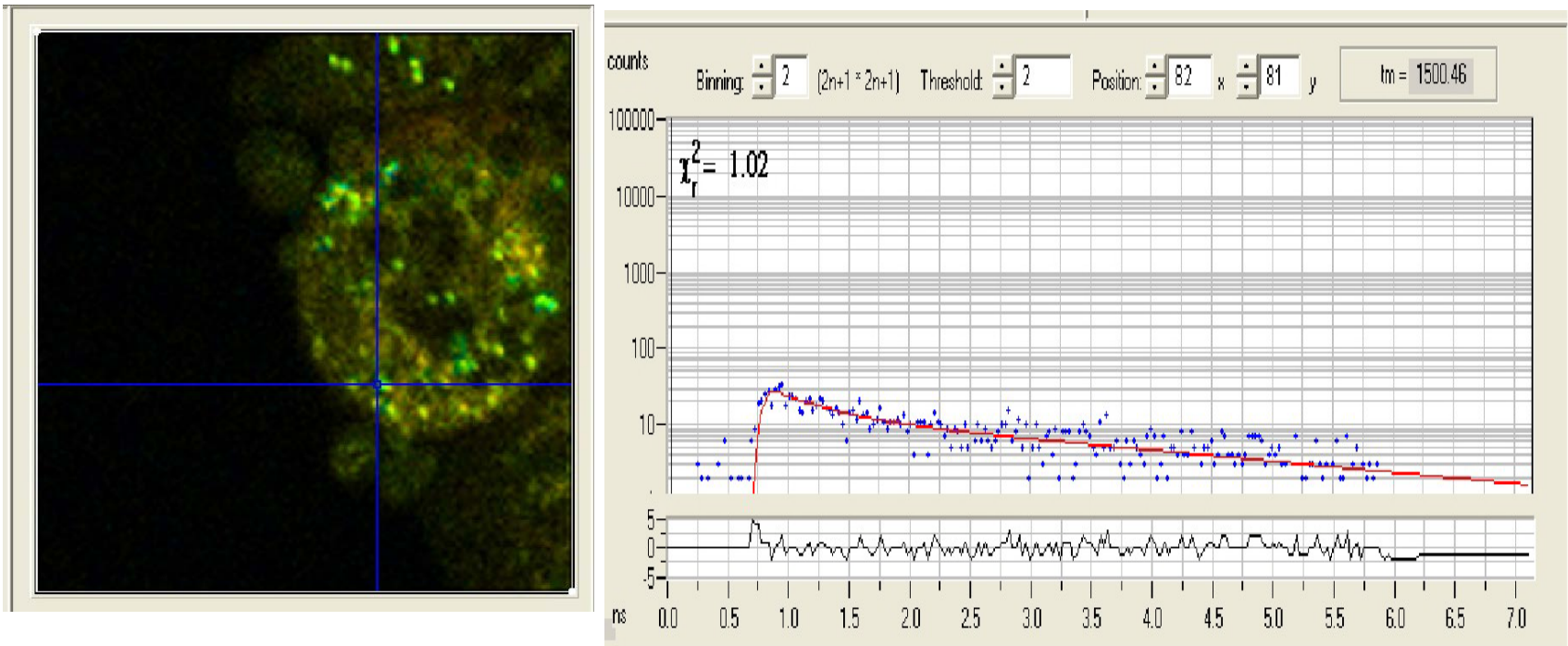
# Fluorescence LifeTime Imaging Microscopy

## FLIM



- Sledování časové závislosti fluorescence v 2D prostoru
- Umožňuje rozlišit prostředí ve kterém se fluorofory nacházejí
- Umožňuje sledovat zhášení flouroforů, ať už vlivem prostředí, zhášedla nebo interakce s jinými molekulami

# Příklad detailního zobrazení FLIM

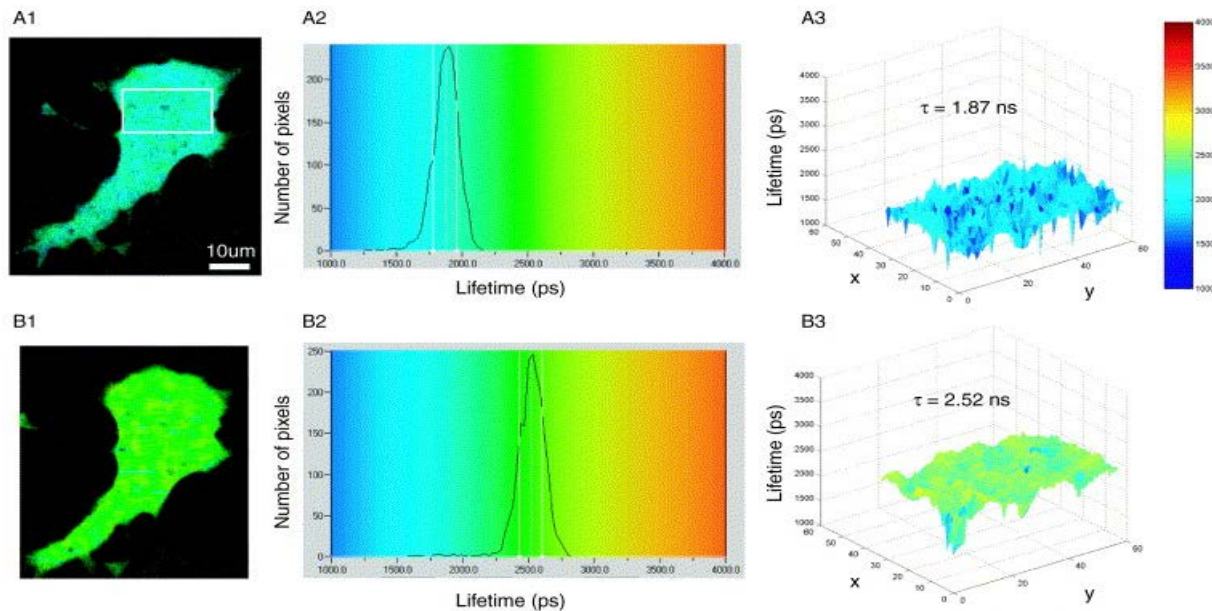


Závislost doby dohasínání fluorescence NADH je dvou-exponenciální s hodnotou 0.4 ns pro volnou a 3 ns pro navázanou molekulu NADH

# FLIM-FRET

## Kombinace FRET a časově rozlišené mikroskopie

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$



Kratší čas dohasínání donoru při FRET.

Normální – delší čas dohasínání při fotovybělení akceptoru FRET

H. Wallrabe and A. Periasamy, Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy, [Current Opinion in Biotechnology](#), Volume 16, Issue 1, Analytical biotechnology, 2005, Pages 19-27.

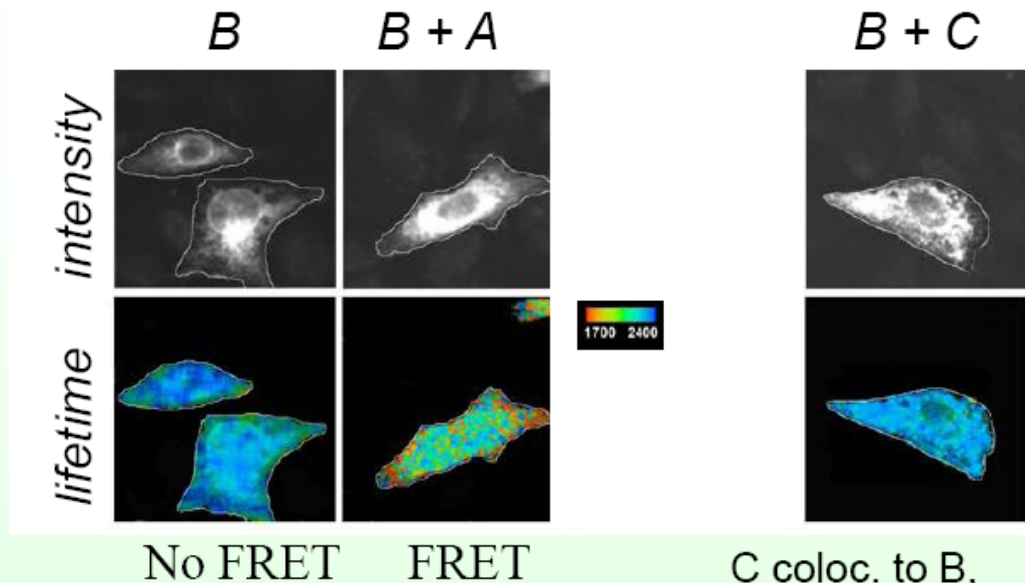
FRET-FLIM microscopy has been used to characterize intranuclear dimer formation for the transcription factor C/EBP $\alpha$  in living pituitary GHFT1-5 cells.



# Interakce nebo kolokalizace?

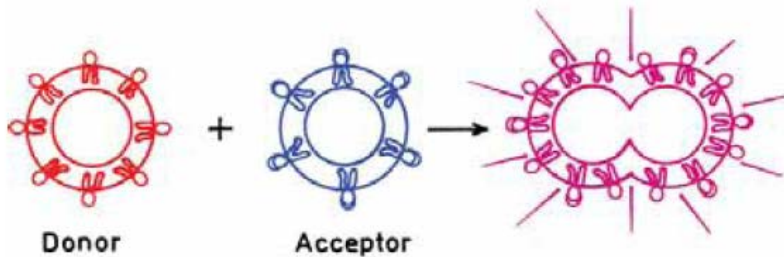
## Example FRET-FLIM Colocalisation or Interaction?

B = donor (FITC)  
A = acceptor (Cy3)  
C = acceptor (Cy3)

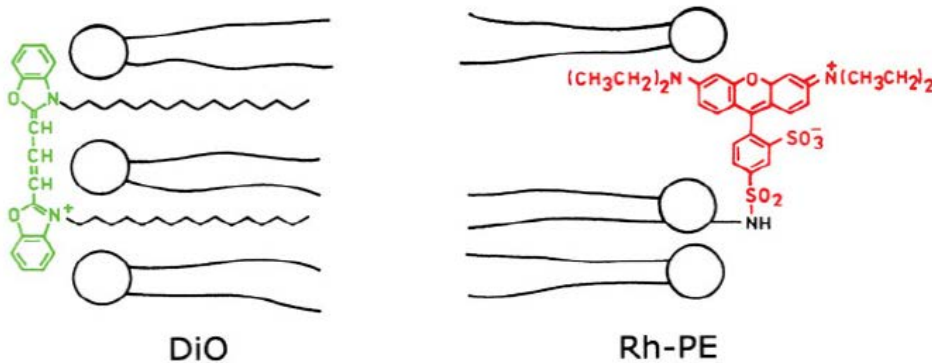


Conclusion:  
A interacts with B (shift blue to red)

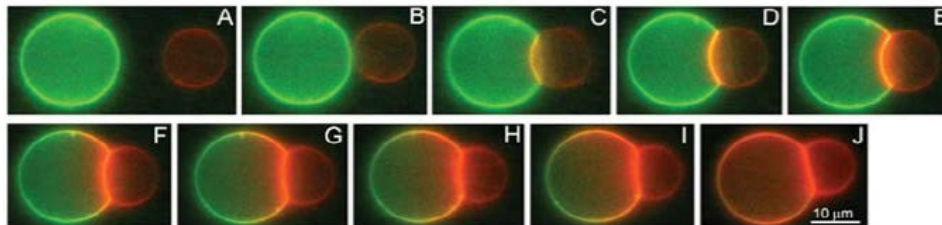
# Membránová fúze



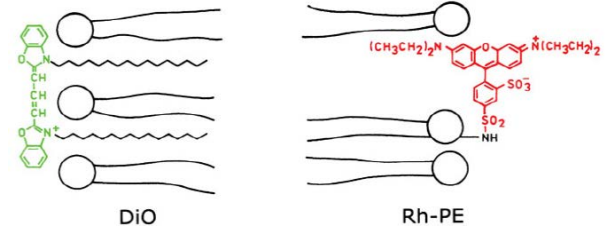
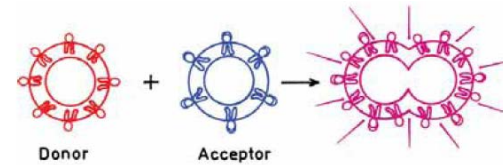
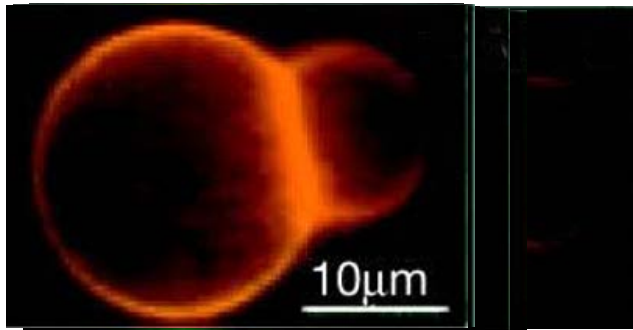
- Jednotlivé membrány obsahují donor nebo akceptor



- v případě splynutí membrán pozorujeme FRET



# Application of FRET microscopy



Lei, G and MacDonald, R.C., Biophys J. 2003

FRET was applied for visualization of lipid bilayer vesicle fusion:  
Intermediates Captured by High-Speed Microfluorescence Spectroscopy

# 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/~zfiisar/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**