

REZONANČNÍ PŘENOS ENERGIE - FRET A FLIM - DOBA DOHASÍNÁNÍ FLUORESCENCE

Experimentální metody biofyziky - F9070

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních **Biomolekul**

FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

MUNI **SCI** **SCI** **SCI** **SCI**
Národní centrum
pro výzkum
biomolekul

Přenos energie



Přehled přednášky

1. Úvod do fluorescence a 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?

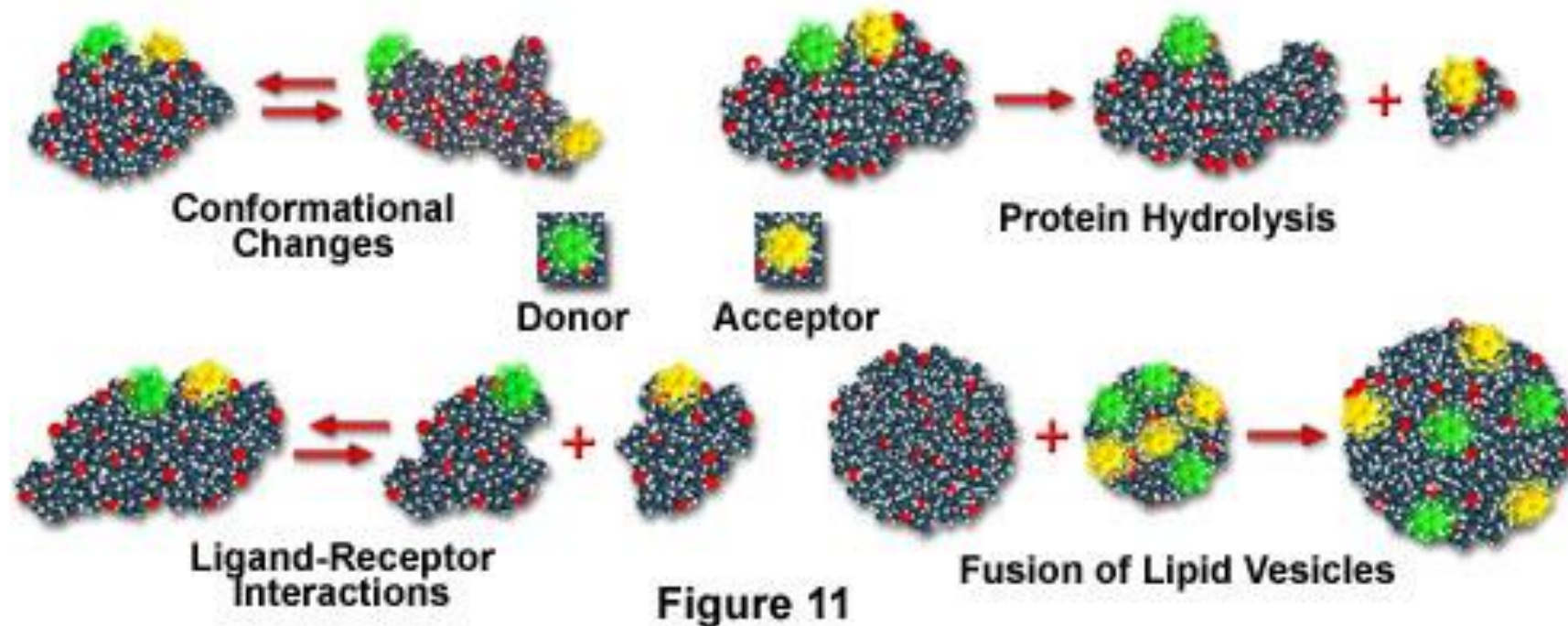
Konformační změny

Štěpení proteinu/DNA

Vazba ligandu a receptoru

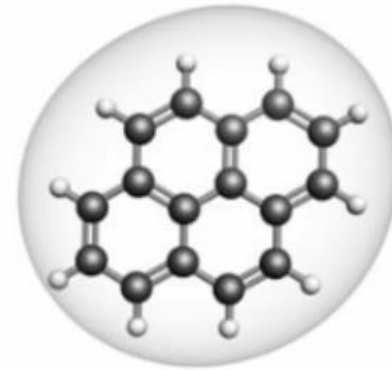
Fúze membrán

Biomolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Applications



Komentovaný úvod -fluorofor

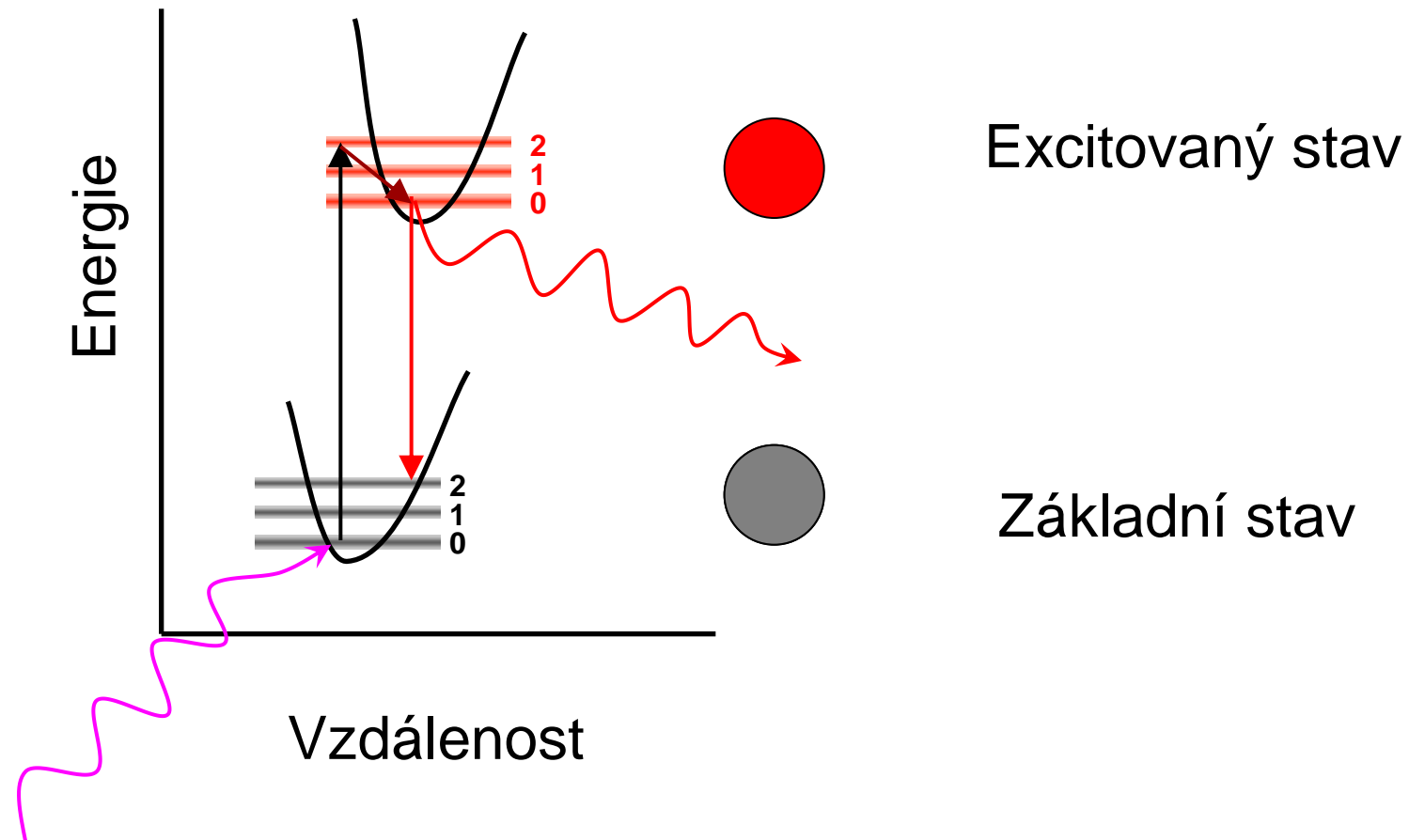
Definition of Fluorescence



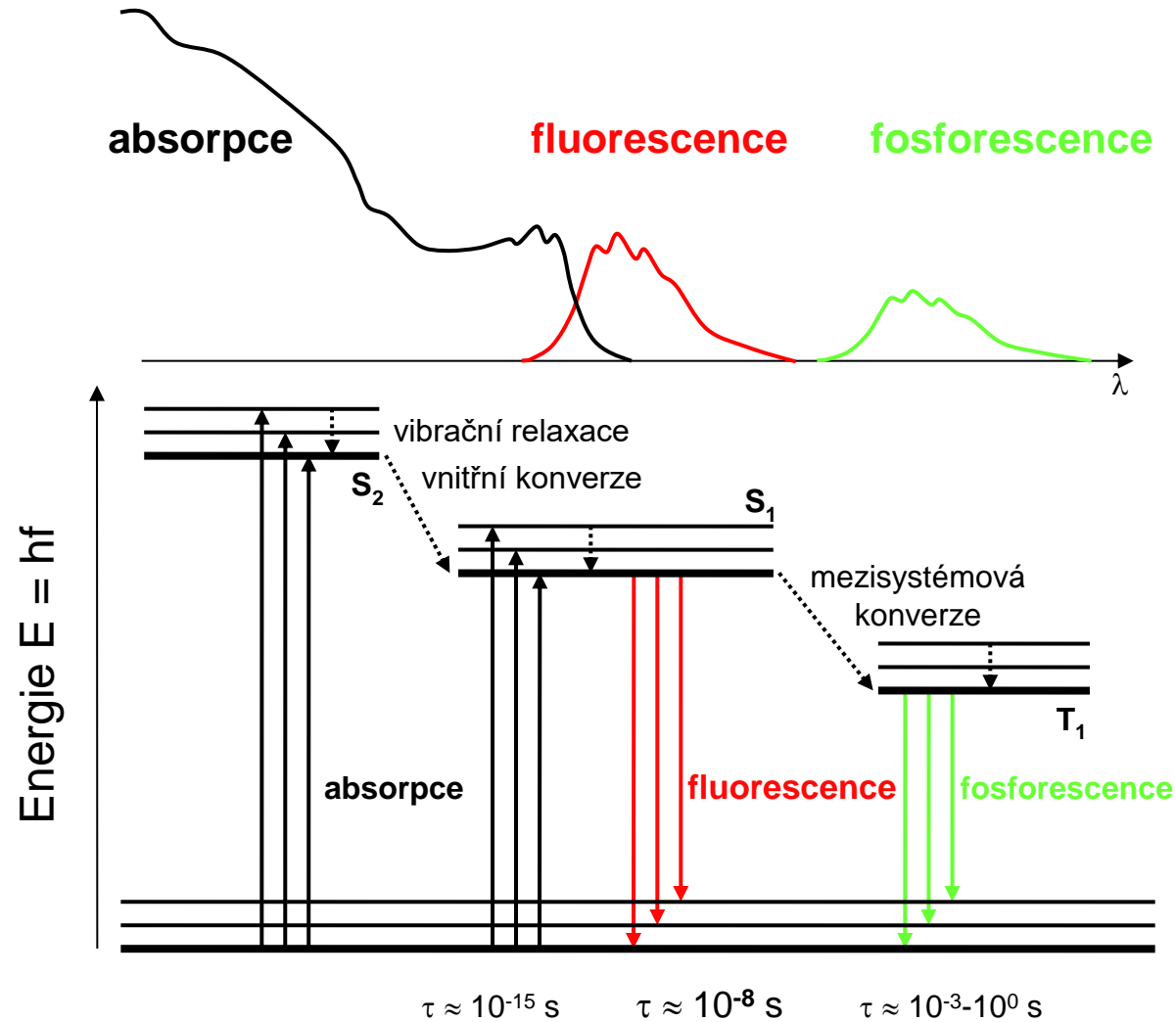
Fluorophore molecule

molecular
probes®

Absorpce a emise energie molekulou



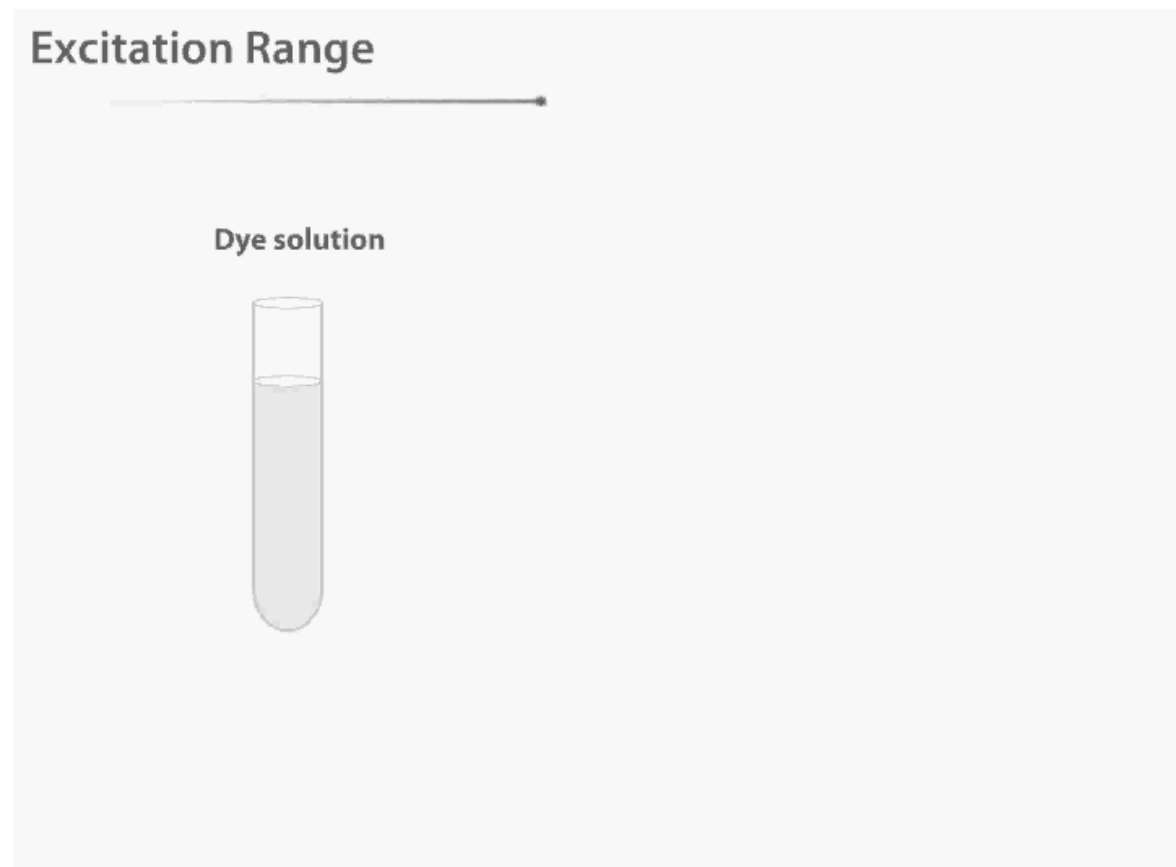
Zářivé a nezářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy molekuly



Spektrum je pravděpodobnost...

Spektrum = pravděpodobnost přechodu

Vznik excitačního spektra



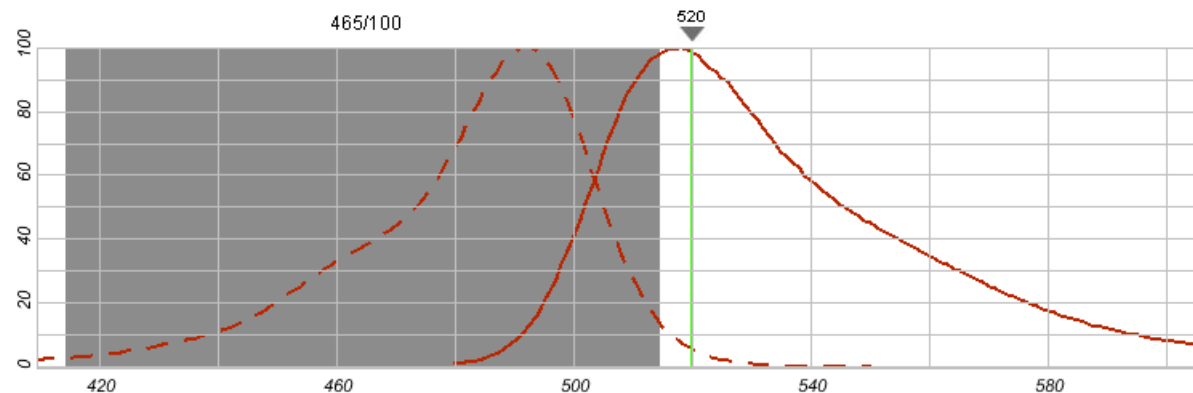
Výukový materiál společnosti **Invitrogen**

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

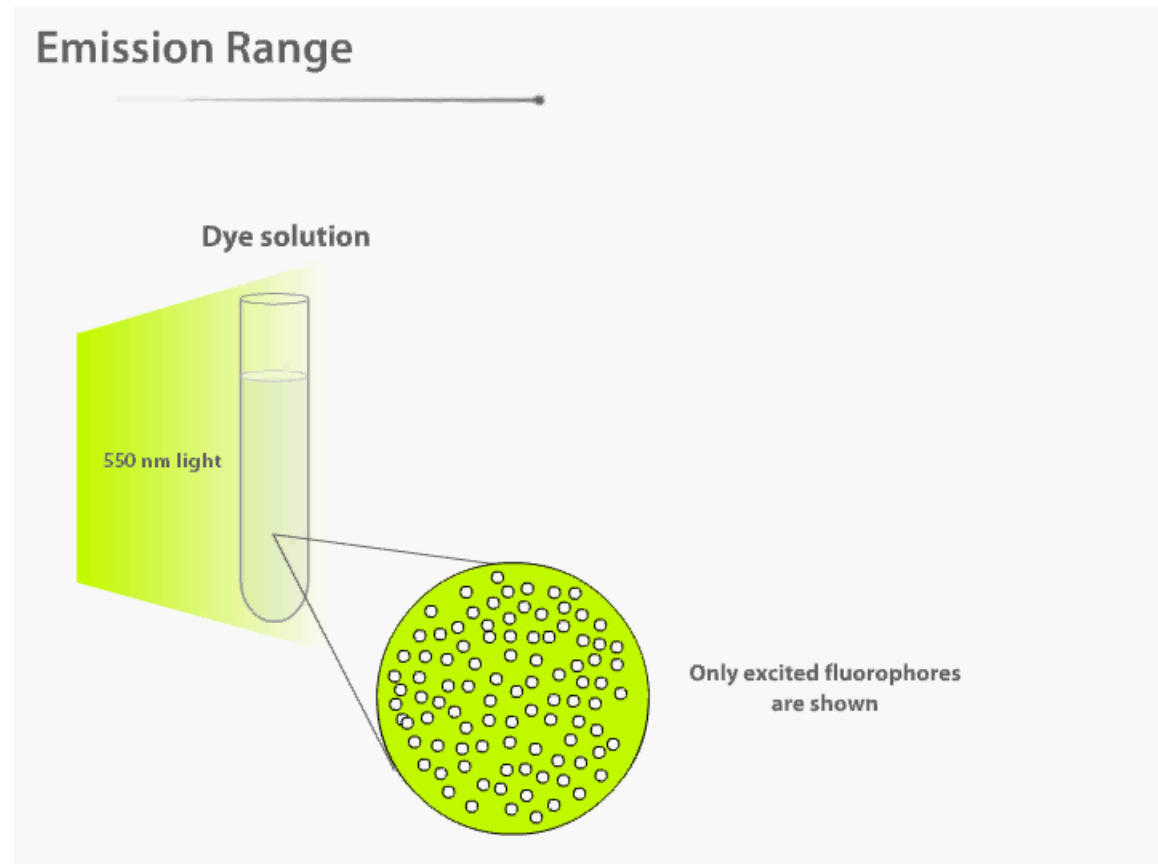
Excitační spektrum

Závislost intenzity fluorescence na excitační vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření

λ_{Ex} scan $\lambda_{Em} = \text{konst.}$



Vznik emisního spektra



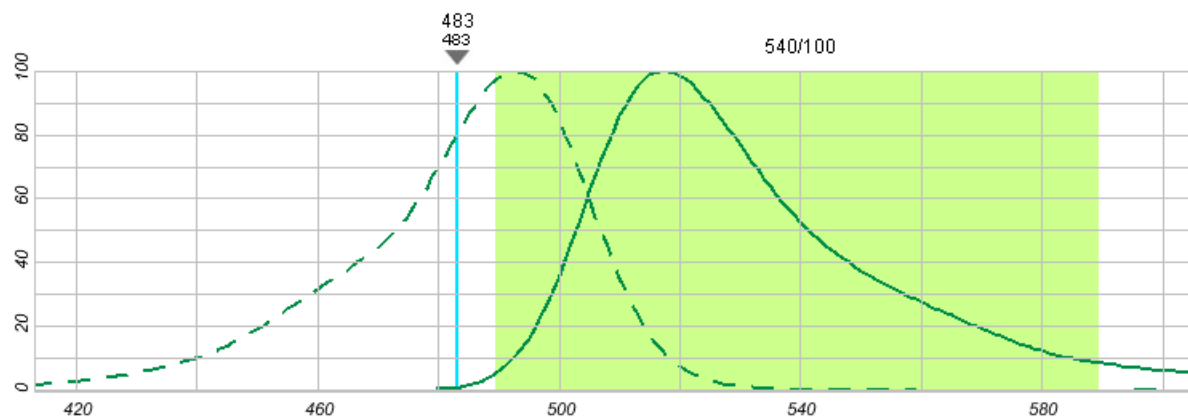
Výukový materiál společnosti Invitrogen

Emisní spektrum, určuje pravděpodobnost, že dojde k emisi fluorescence o dané vlnové délce = barvě. **Závisí na fluoroforu** a je jeho charakteristikou. 12

Emisní spektrum

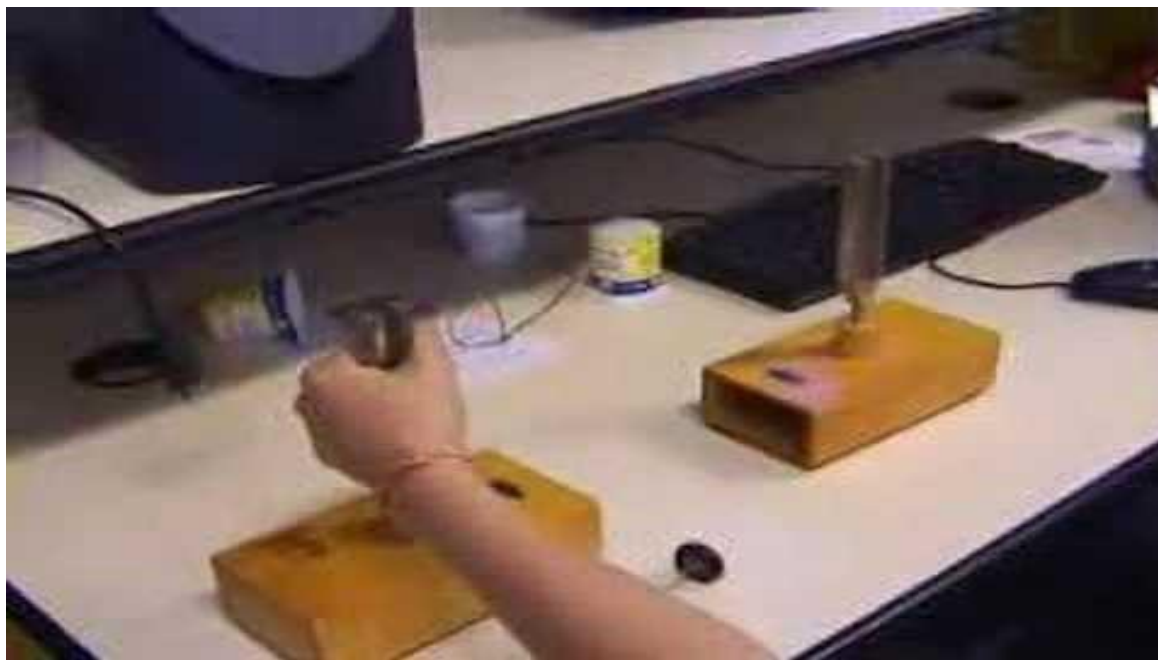
Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní excitační vlnové délce

$\lambda_{Ex} = \text{konst.}$ λ_{Em} scan



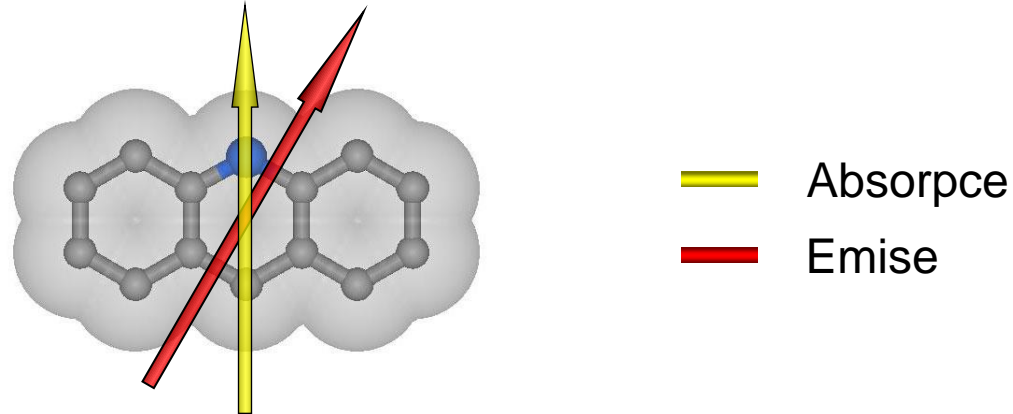
Rezonanční přenos energie

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.

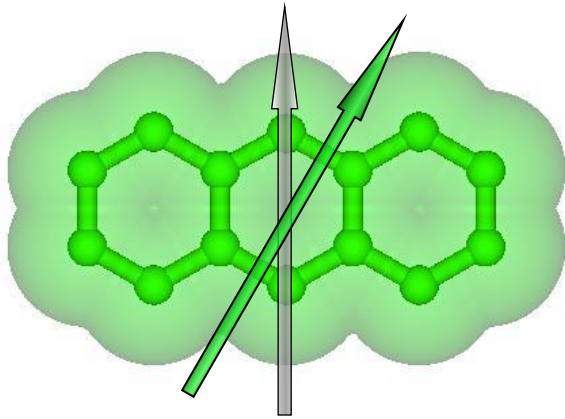
Molekuly přednostně absorbují záření, jehož elektrická složka kmitá ve stejné rovině jako je **absorpční dipólový moment přechodu** elektronu do vyšší energetické hladiny.

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

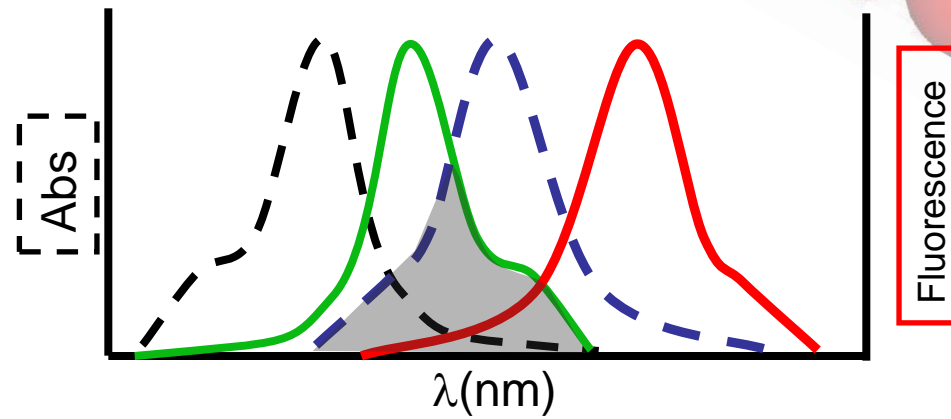
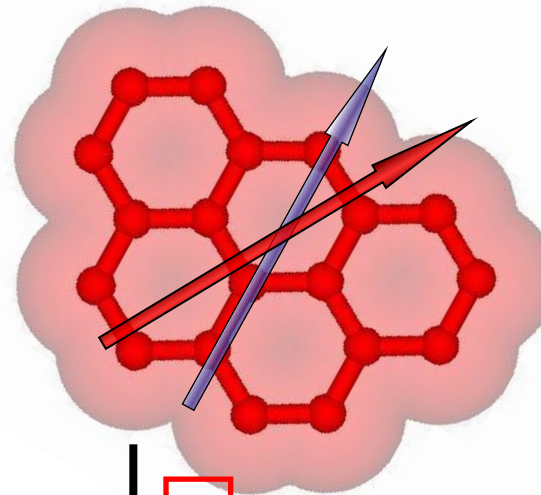
Donor

- Absorpce donoru
- Emise donoru

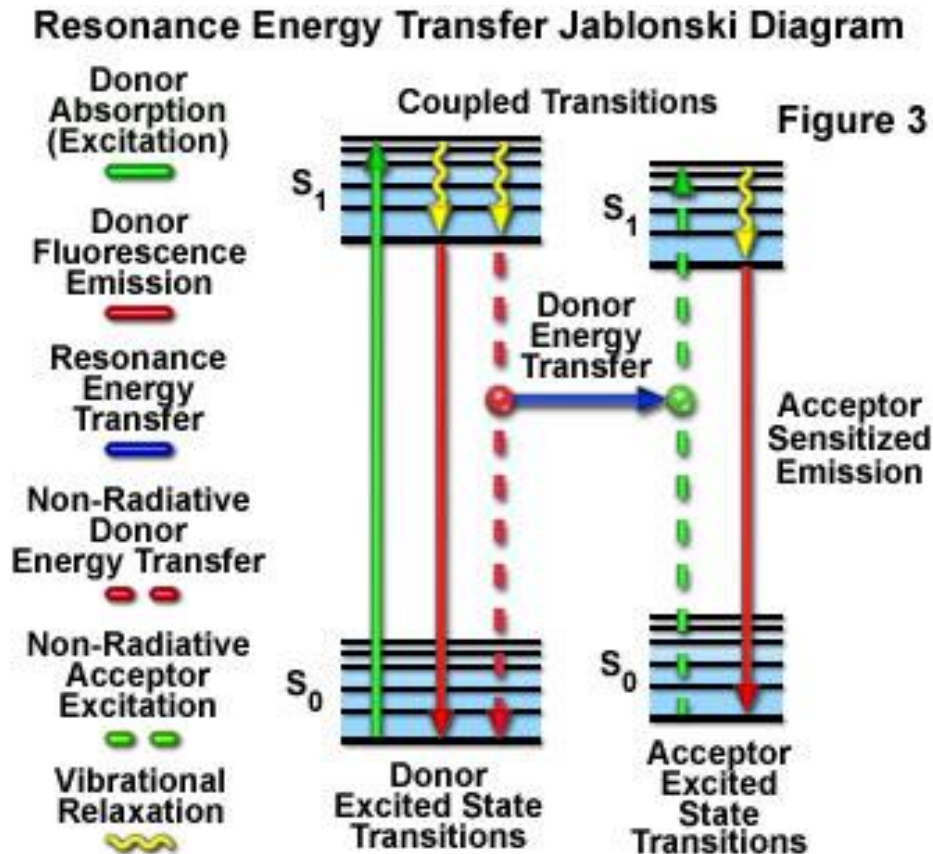


Akceptor

- 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.

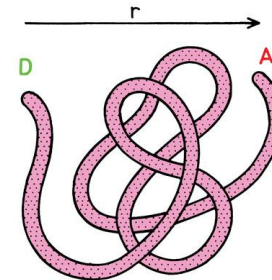
Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET)

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

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

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



τ_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 μ_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

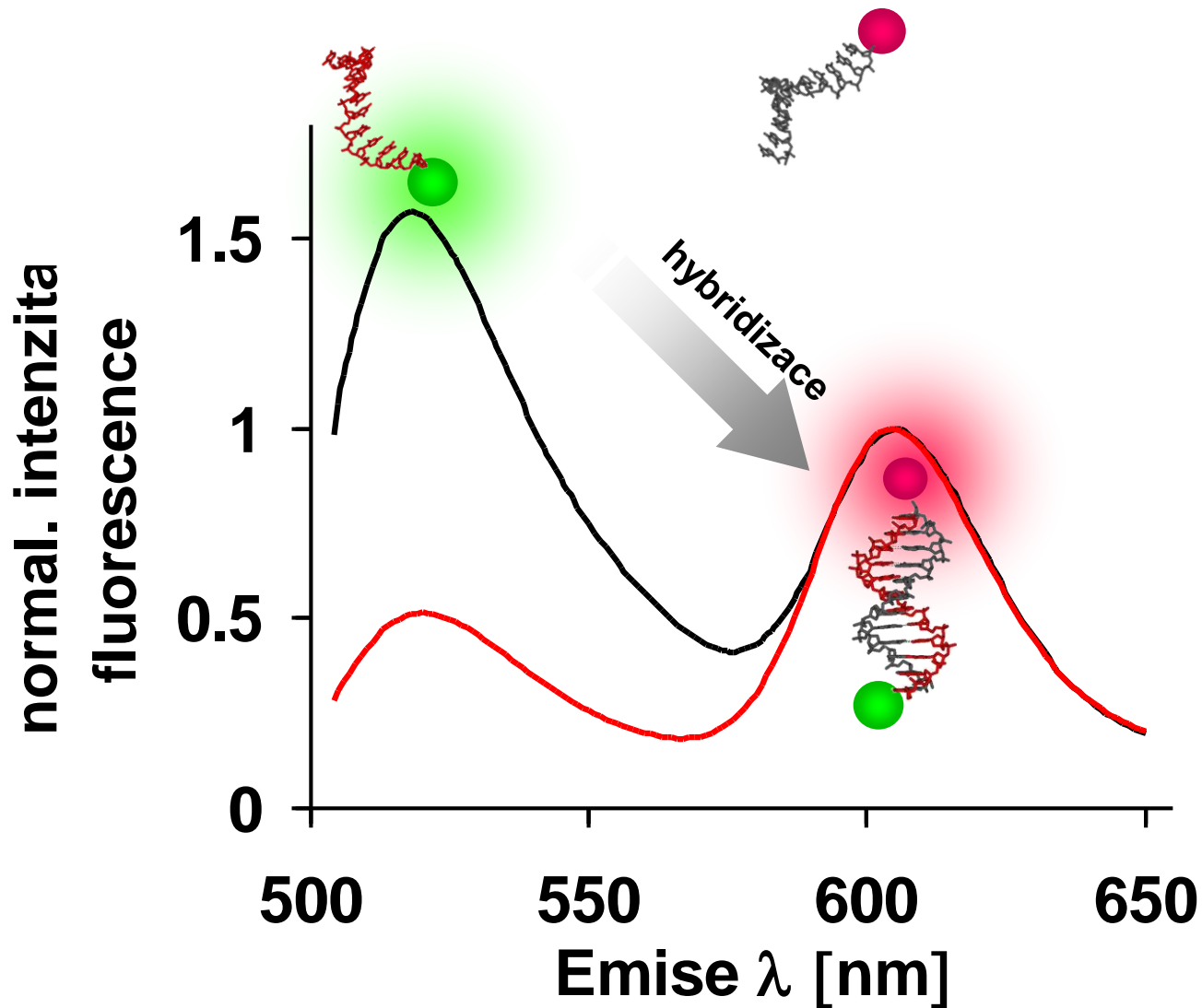
Je dána poměrným množstvím fotonů, které jsou absorbovány donorem a následně vyzářeny akceptorem

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

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

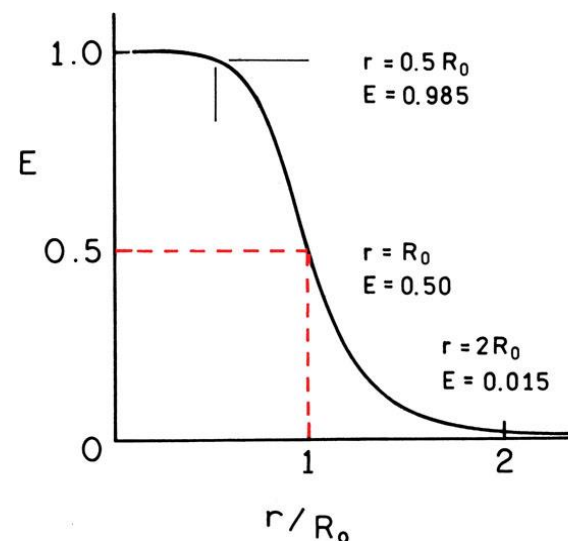
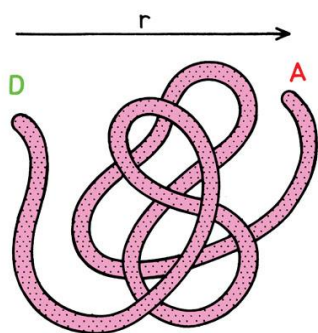
Změna spektra ukazuje na FRET a je důkazem hybridizace DNA

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

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

$$r = 0.1 \times R_0 \quad E = 0.9999999$$

$$r = 0.5 \times R_0 \quad E = 0.984615$$

$$r = 2.0 \times R_0 \quad E = 0.015384$$

$$r = 4.0 \times R_0 \quad E = 0.000244$$

Rozsah vhodný pro měření: $0.5 - 2 R_0$

Na čem závisí R_0 ?

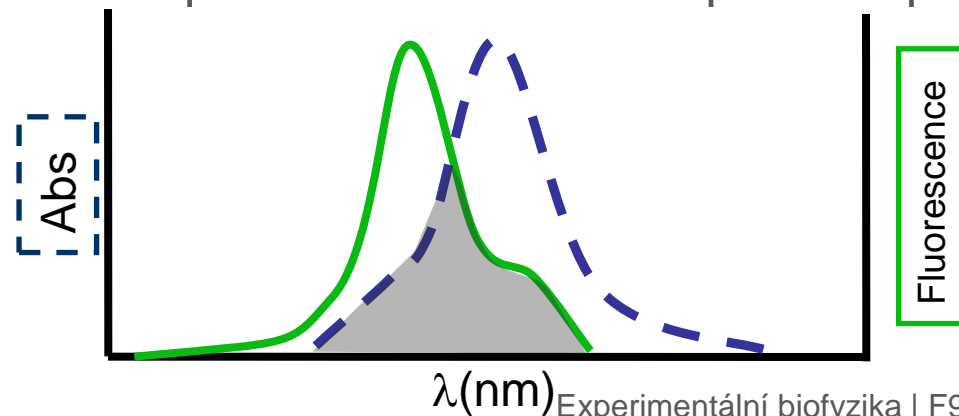
$$R_0 = 0.211 \left(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda) \right)^{1/6} \quad (\text{v } \text{Å})$$

Na orientaci dipólových momentů přechodu pro emisi donoru a absorpci akceptoru (pro faktor κ^2 se používá průměrná hodnota 2/3)

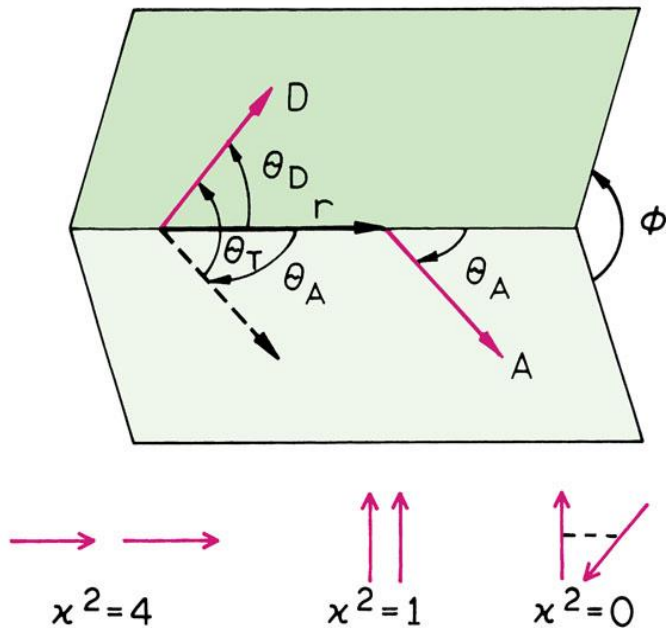
Na optických vlastnostech prostředí (index lomu vody $n_{\text{H}_2\text{O}} = 1.33$)

Na kvantovém výtěžku donoru Q_D

Na míře překryvu $J(\lambda)$ emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru



Závislost orientačního faktoru κ^2 na orientaci dipólových momentů přechodu



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 $\kappa^2 = 0$

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

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

Závislost R_0 na spektrálním překryvu

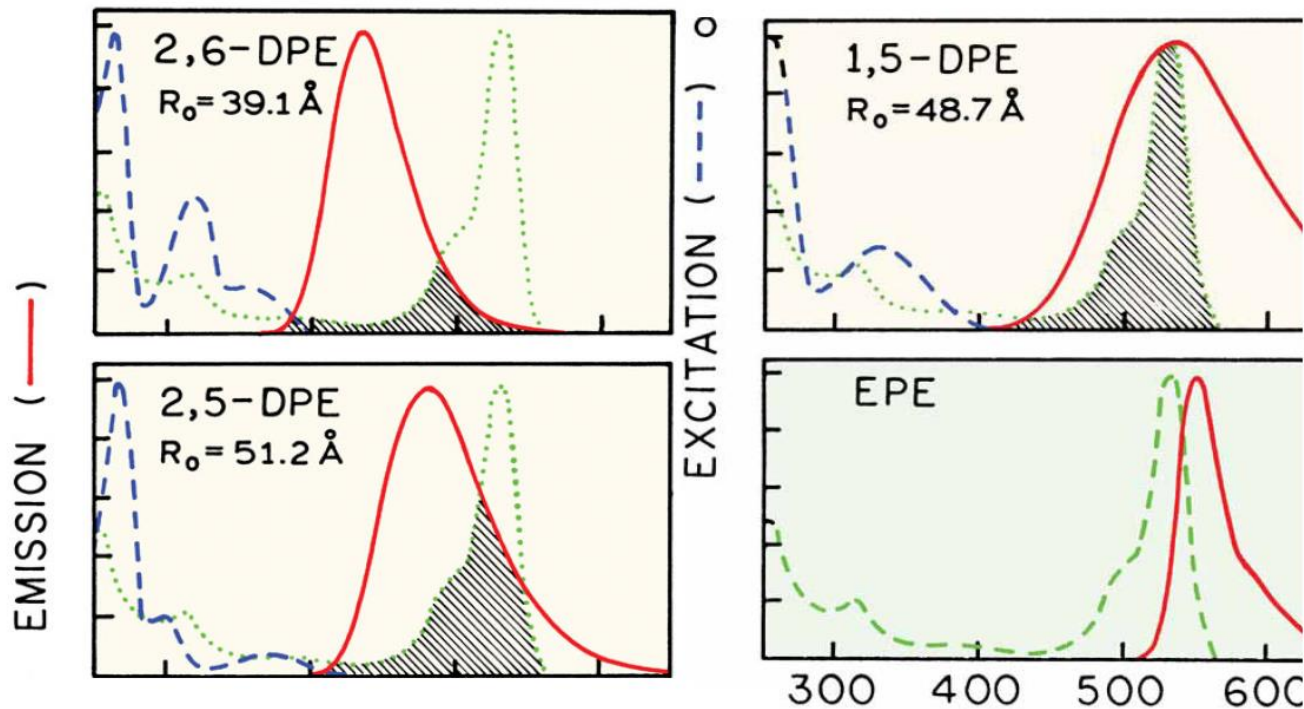


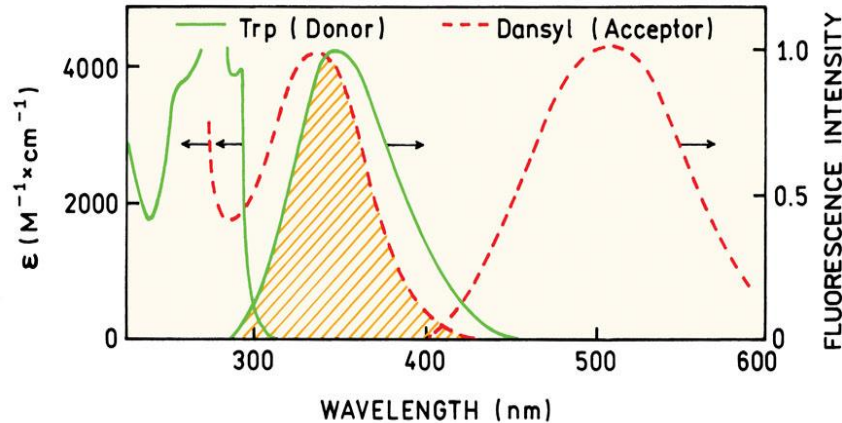
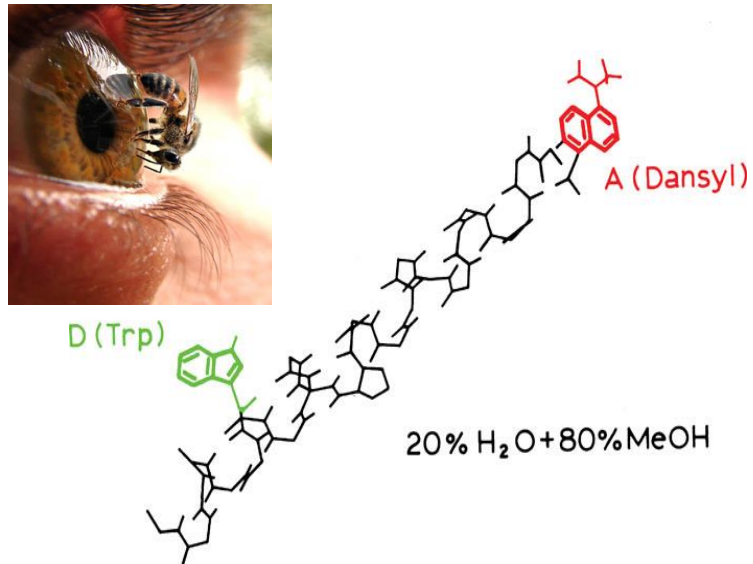
Table 13.1. Calculated R_0 Values for RET from Structural Isomers of Dansyl-Labeled Phosphatidylethanolamine (DPE) to Eosin-Labeled Phosphatidylethanolamine (EPE) and from 2,6-DPE to 2,5-DPE

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

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

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

Měření vzdálenosti pomocí FRET



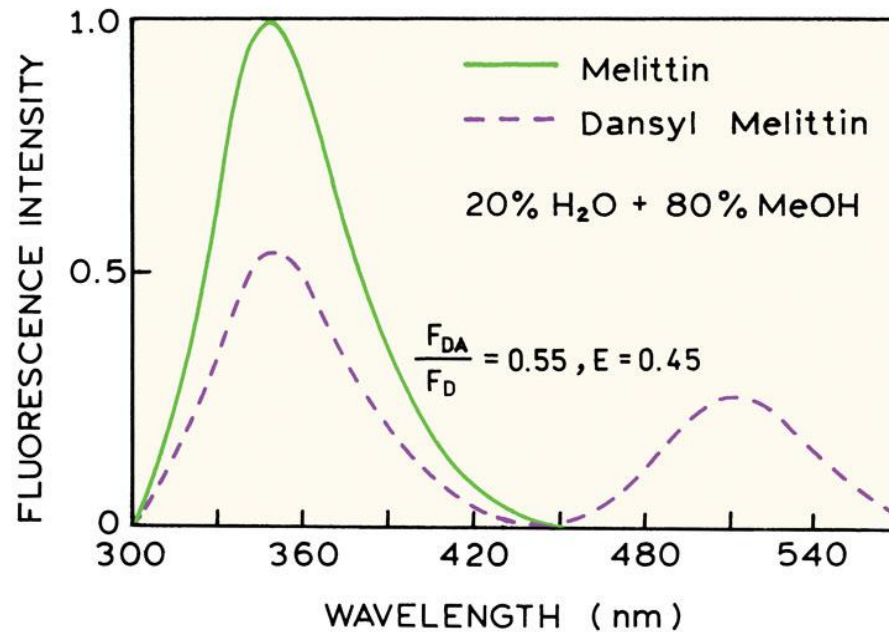
Melitin je nejdůležitější součást včelího jedu (poškozuje buněčné struktury, rozkládá bílé a červené krvinky, způsobuje odumírání buňky) při léčbě se využívá jeho protizánětlivých účinků

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.

Určení vzdálenosti Trp od N konce melittinu 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)

$$r = 2.44 \text{ nm}$$

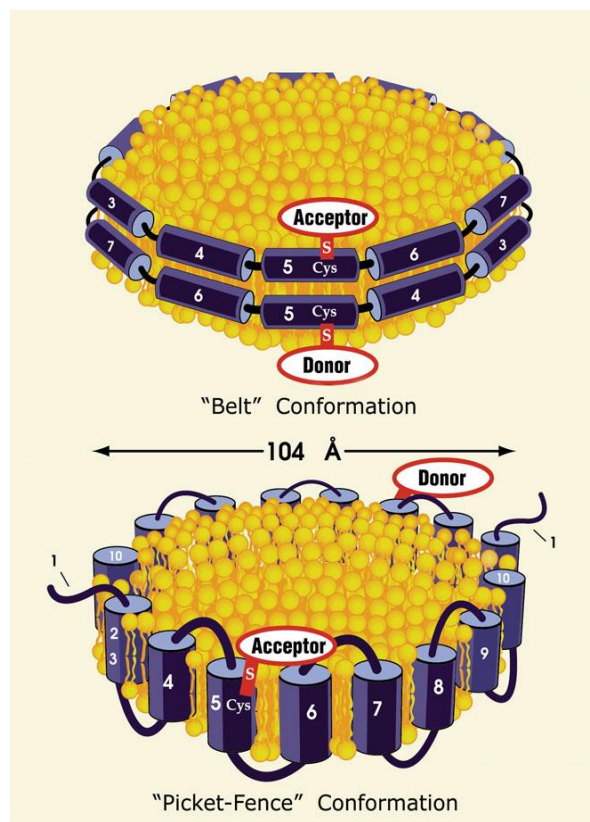
Výhody FRET

Účinnost přenosu energie **nezávisí na prostředí** mezi donorem a akceptorem

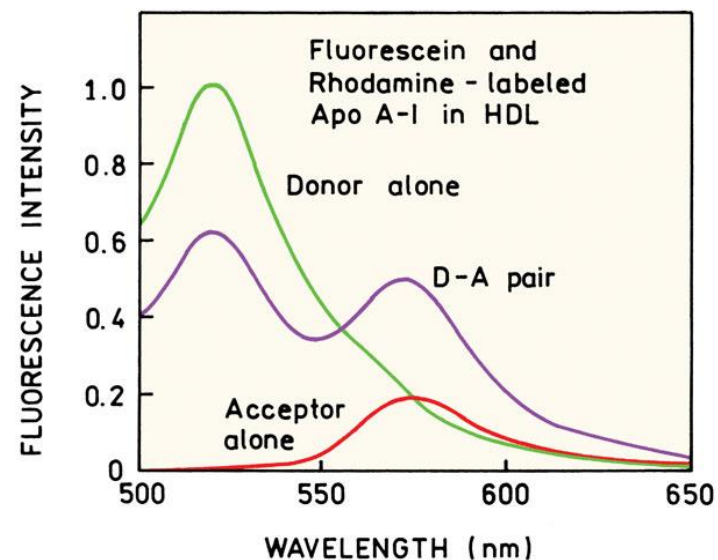
Měření poměru intenzit umožňuje použití FRET analýz **nezávisle na koncentraci**

Pro většinu aplikací **není nutno znát R_0**

FRET umožňuje rozlišit mezi více variantami uspořádání flexibilních proteinů

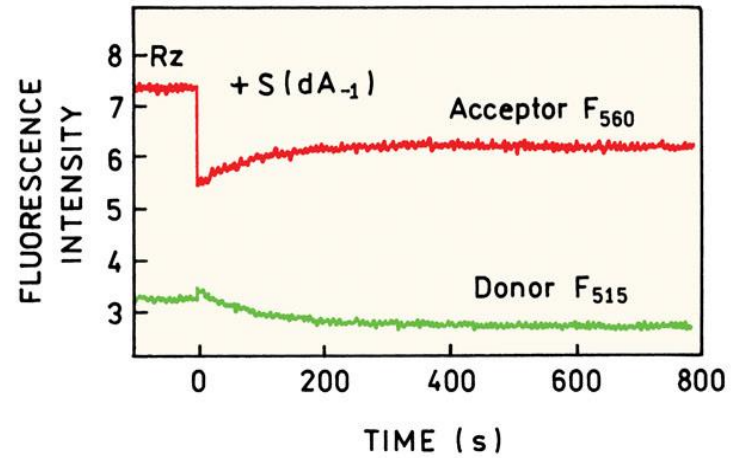
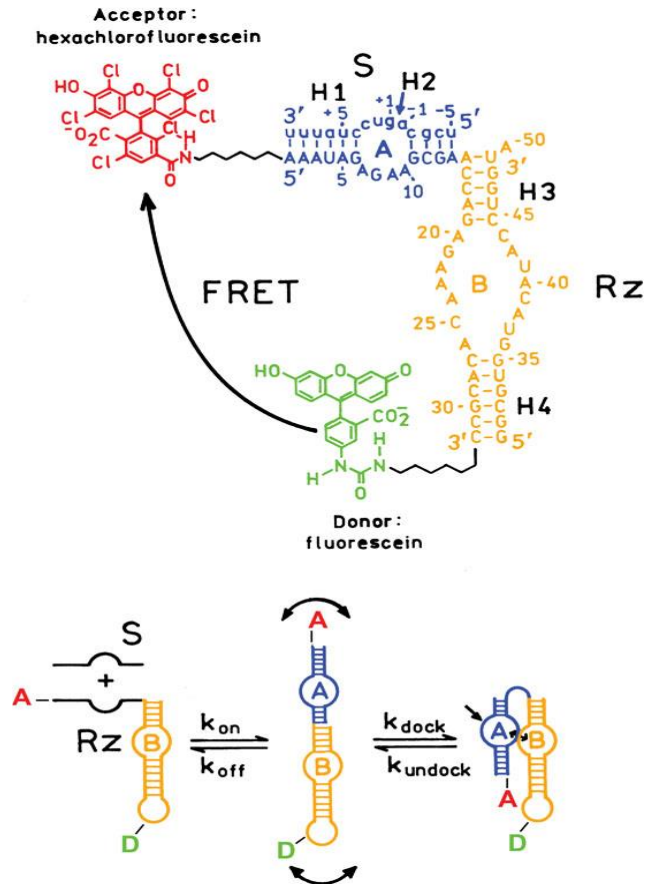


apoA-I protein reguluje metabolismus cholesterolu.
apo A-I se váže do lipidové membrány
byla navržena dvě možná uspořádání proteinů v membráně
kvůli flexibilitě lipidů není možno použít strukturní metody
jeden z řetězců apoA-I proteinů byl naznačen fluoresceinem (Donor) a druhý tetrametyldodaminem (Akceptor)



- 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

Štěpení ribozymem



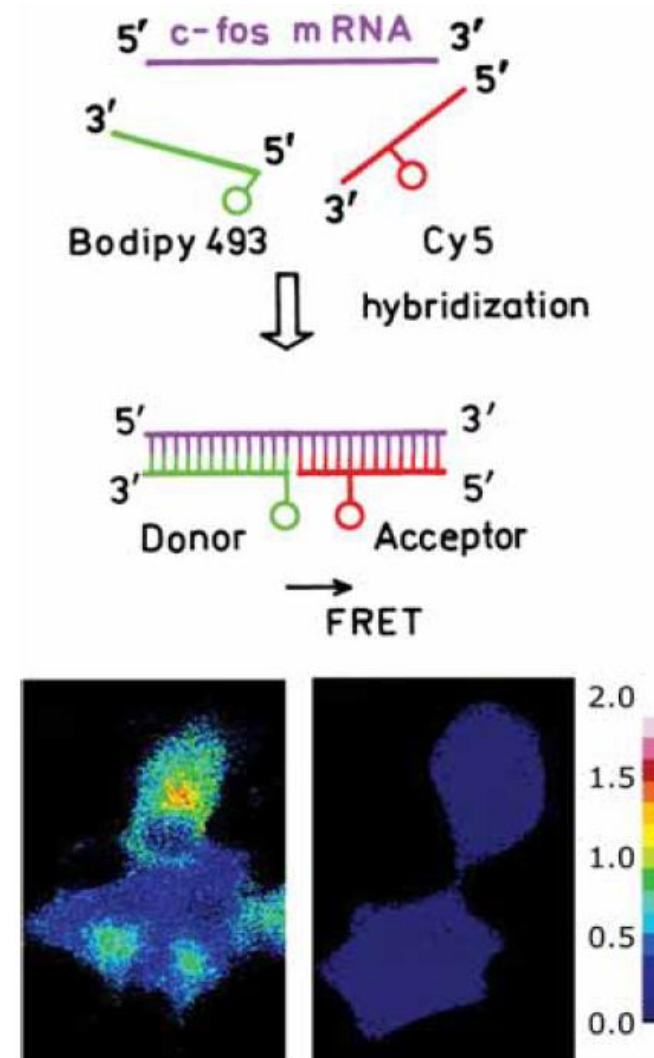
Po vazbě ribozymu na substrát dochází k přiblížení části A a B, což se projeví zvýšením FRET

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

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



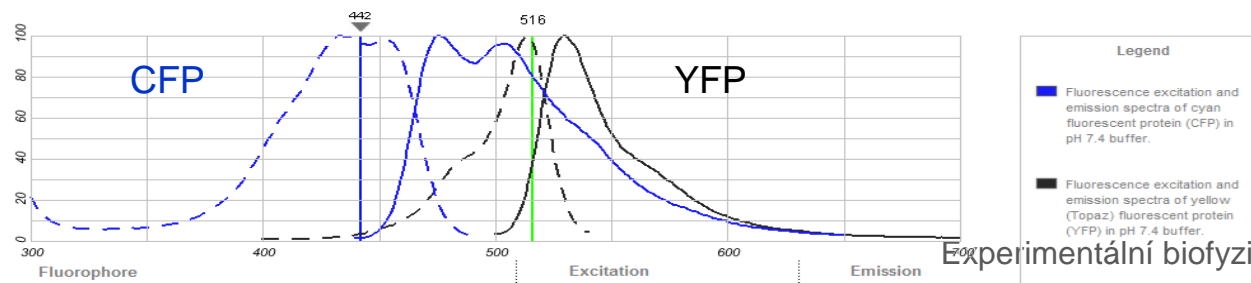
FRET mezi CFP a YFP

Fluorescence Resonance Energy Transfer
(FRET)

Bioluminescence Resonance Energy Transfer
(BRET)

© 2005 Joseph Roland

www.cytographica.com



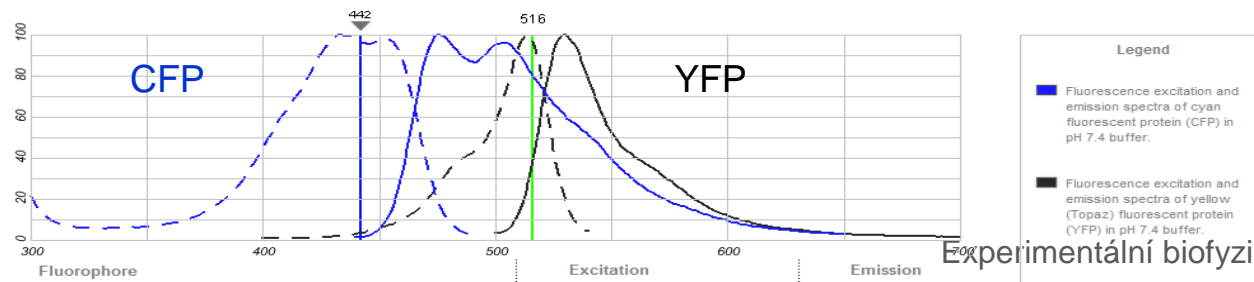
Zhášení FRET fotovybělováním

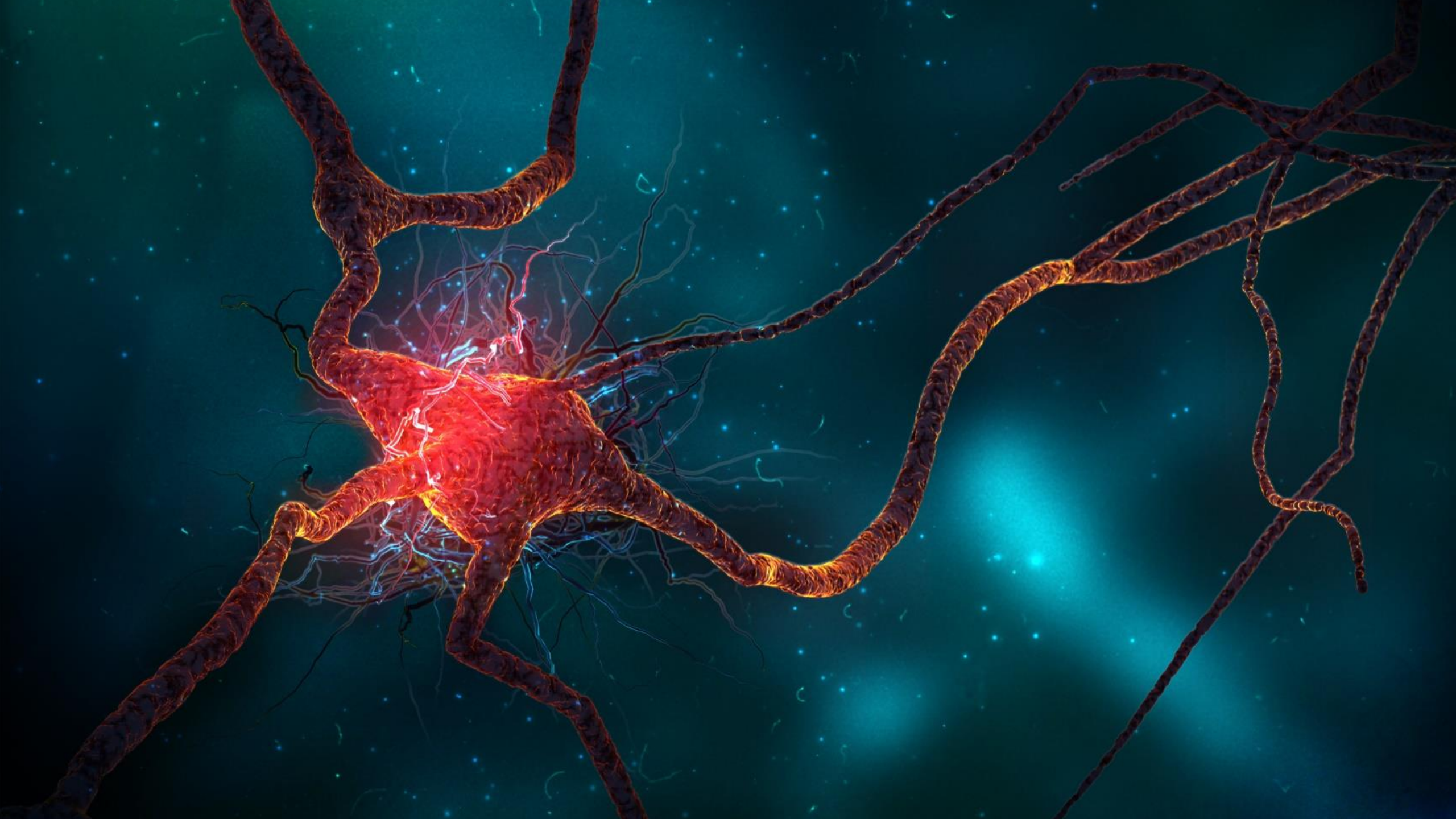
Fluorescence Resonance Energy Transfer
(FRET)

Bioluminescence Resonance Energy Transfer
(BRET)

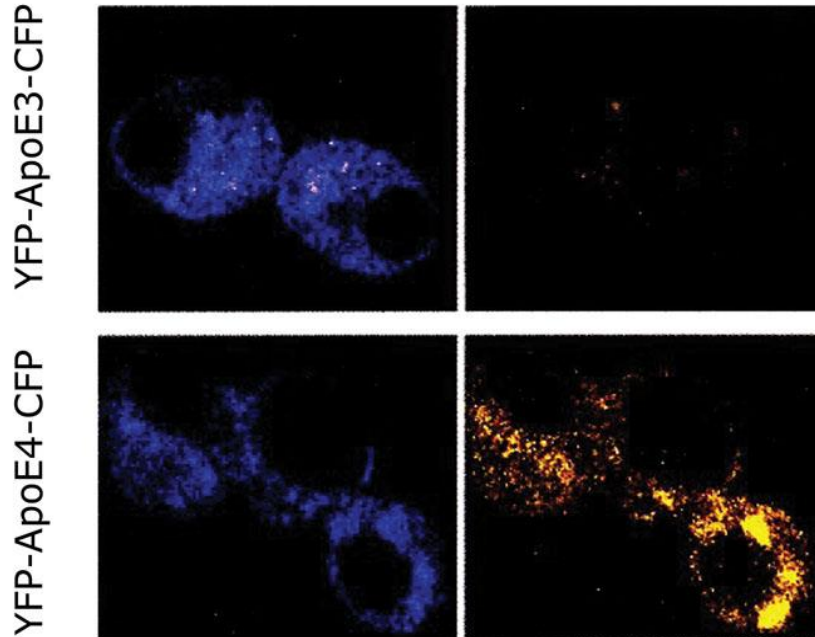
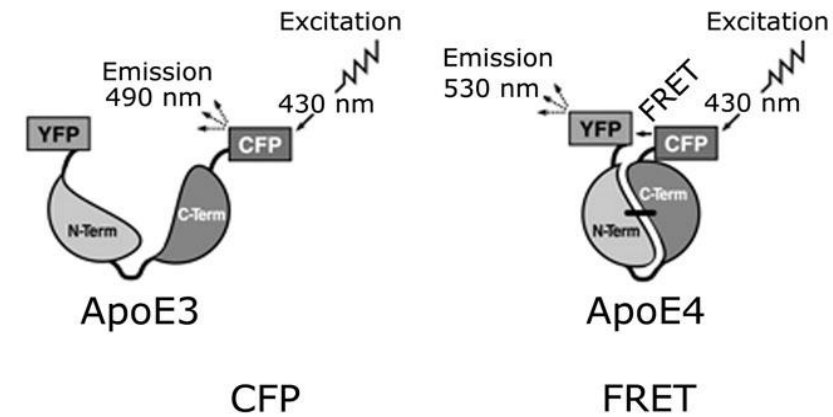
Acceptor Photobleaching Method

Joseph Roland, © 2006





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

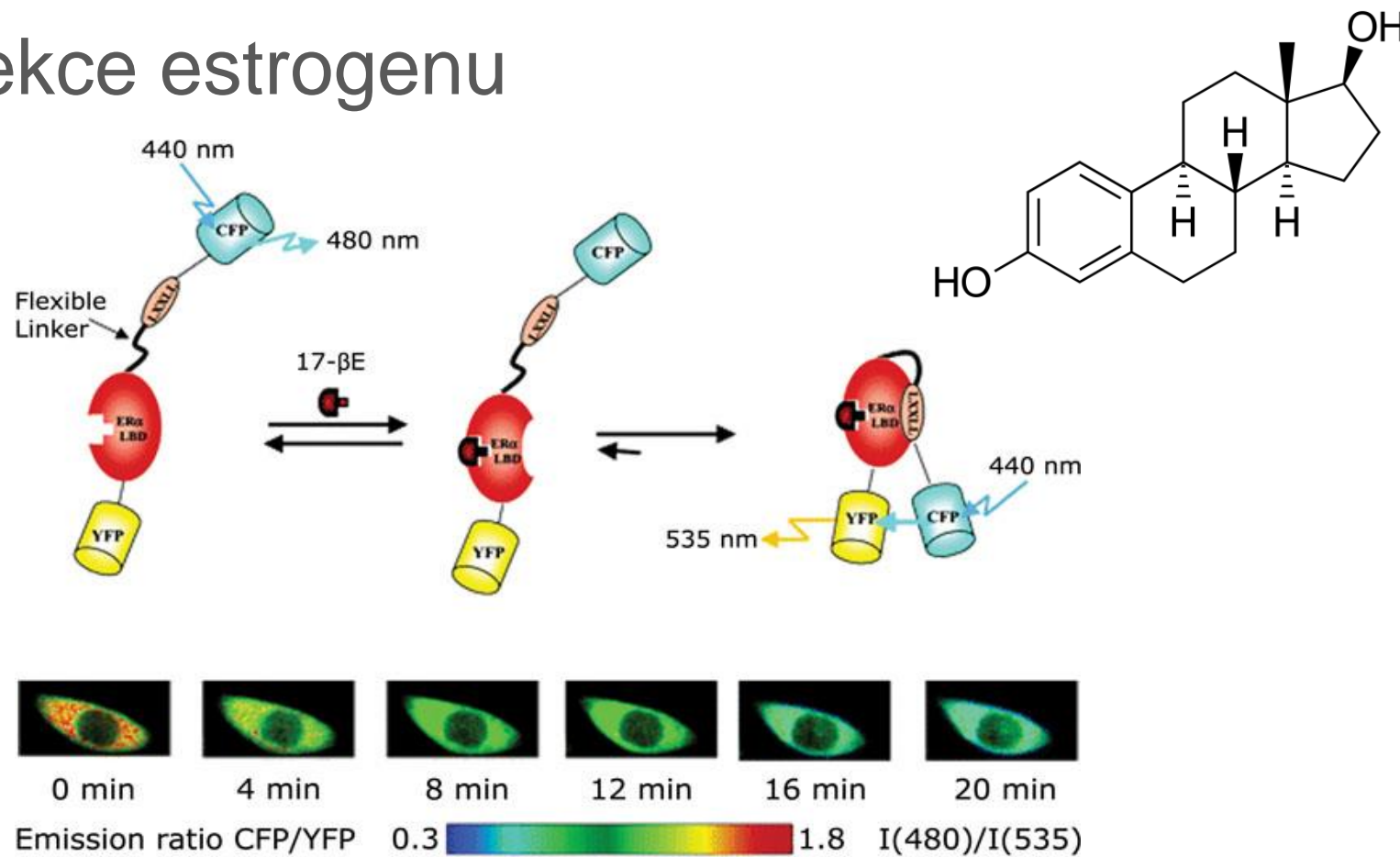
Bylo navrženo, že vazebná schopnost k nervovým buňkám souvisí s různým uspořádáním domén ApoE proteinů

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

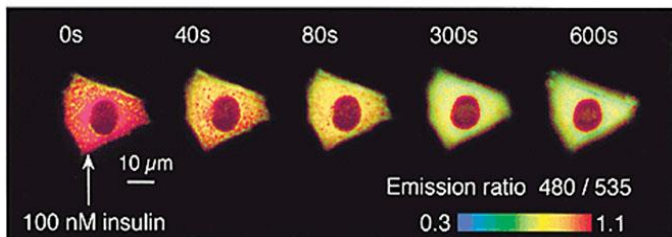
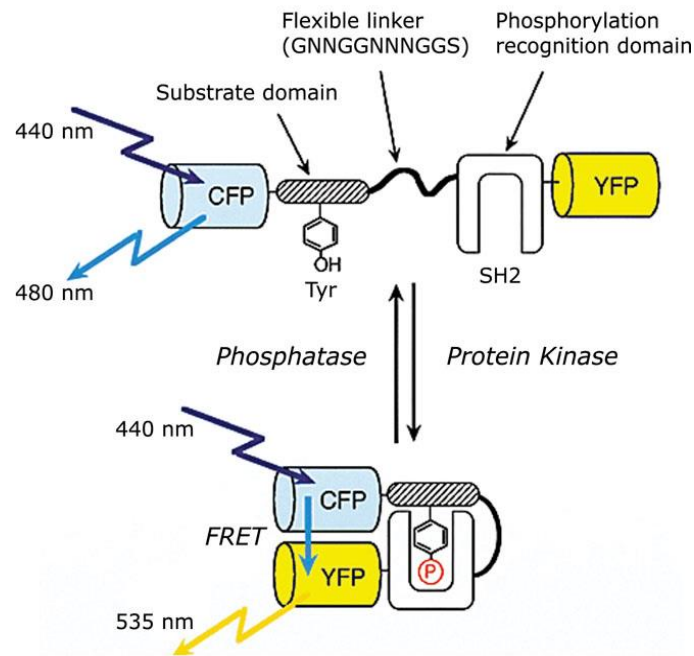
FRET senzory

Detekce estrogenu



Sledování fosforylace proteinů

Sledování zpracování inzulinu

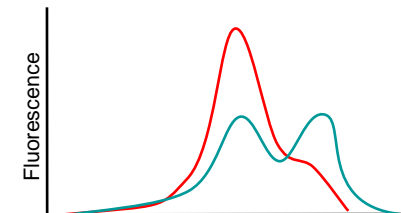


Receptorem inzulinu je tyrozinkináza, která fosforyluje tyrozin v rozpoznávané sekvenci, která je následně vázána SH2 doménou dalšího proteinu.

Tato vazba způsobuje přiblížení CFP a YFP a indukuje FRET.

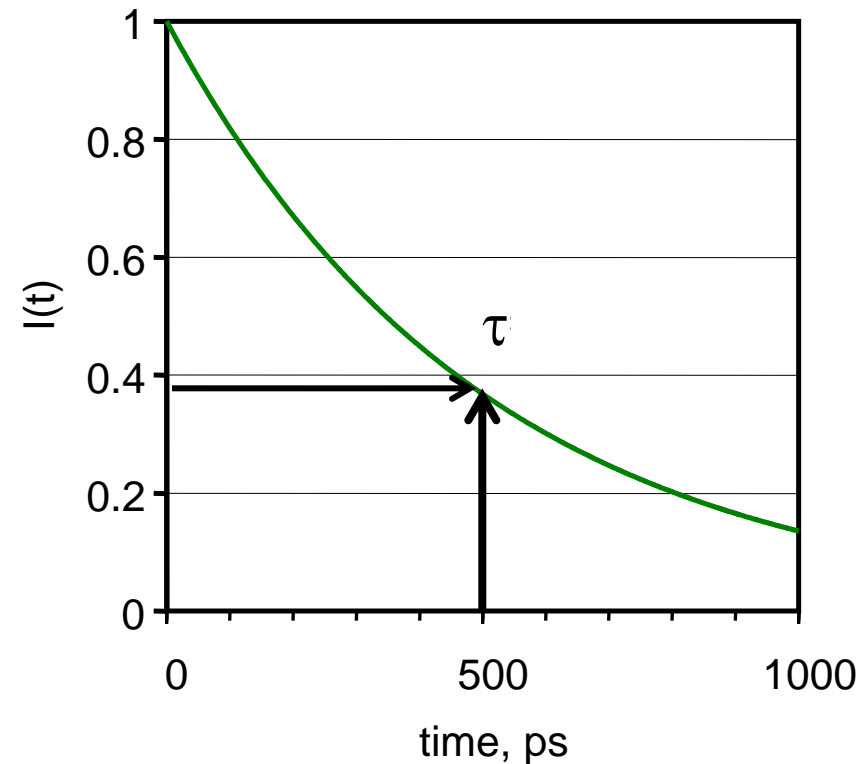
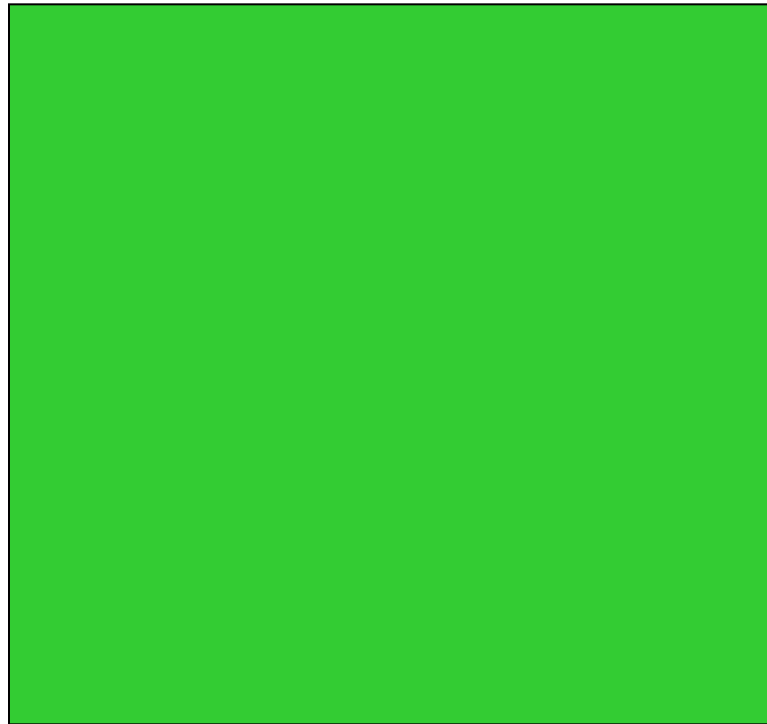
Proteinový konstrukt byl exprimován v buňkách.

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

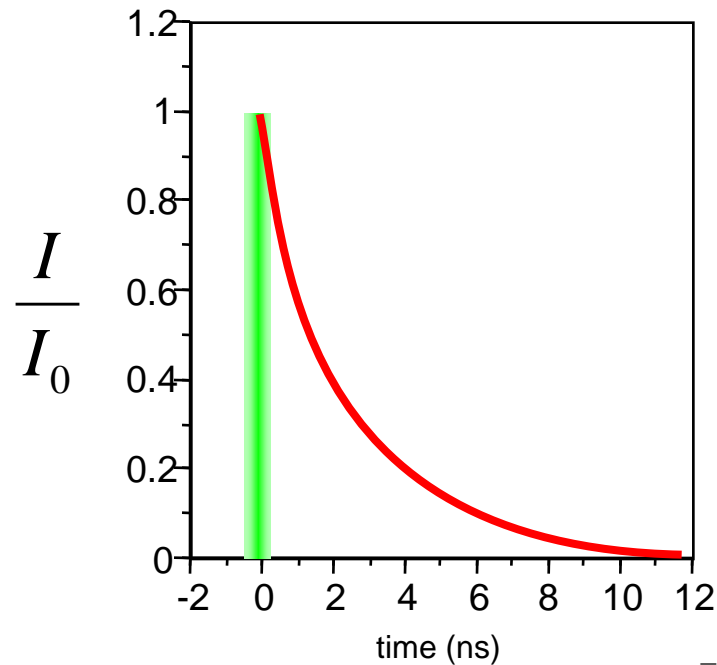


**Populace molekul excitovaných
zábleskem (pulesem)**

Časový průběh fluorescence

Nejjednodušší je exponenciální pokles
pro sférické částice

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



Fluorescence LifeTime Imaging Microscopy FLIM

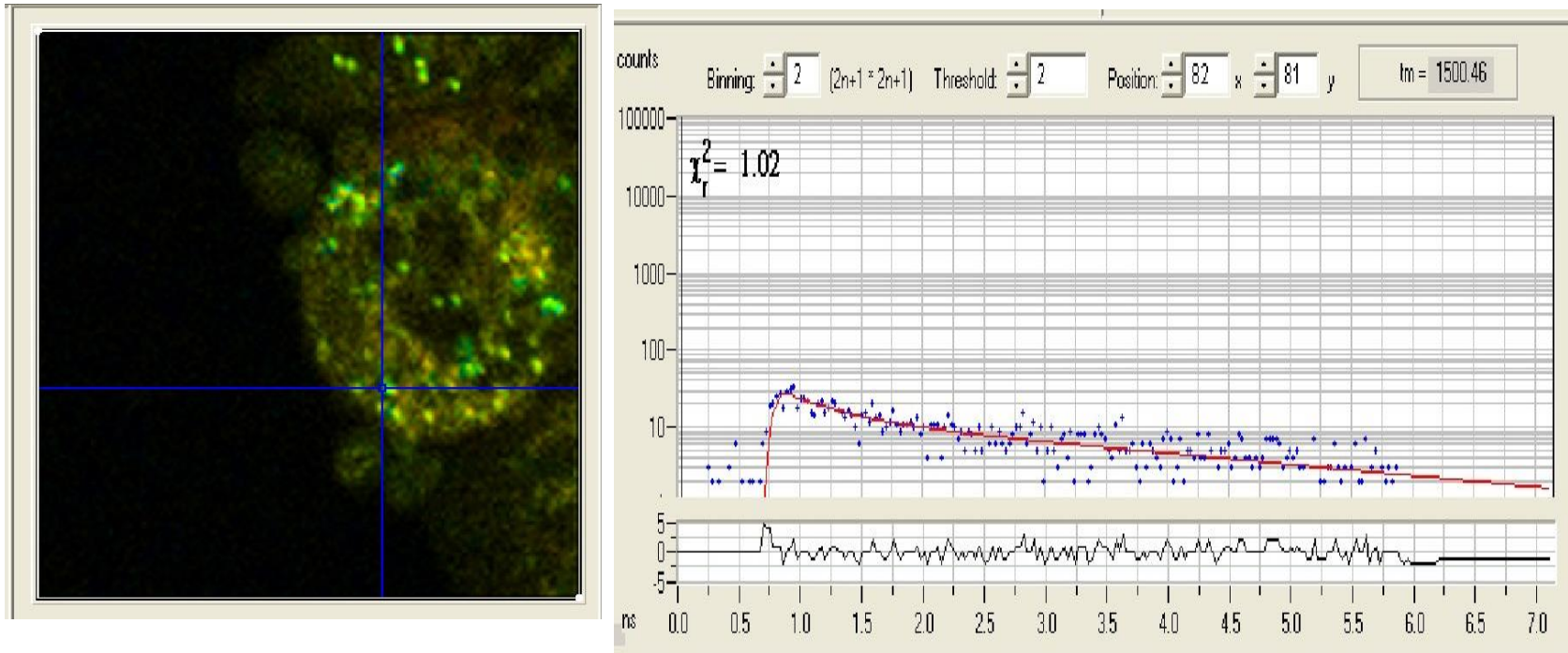


Sledování časové závislosti fluorescence v 2D prostoru

Umožňuje rozlišit prostředí ve kterém se fluorofory nacházejí

Umožňuje sledovat zhášení fluoroforů, ať už vlivem prostředí, zhášením nebo interakce s jinými molekulami

Příklad detailního zobrazení FLIM

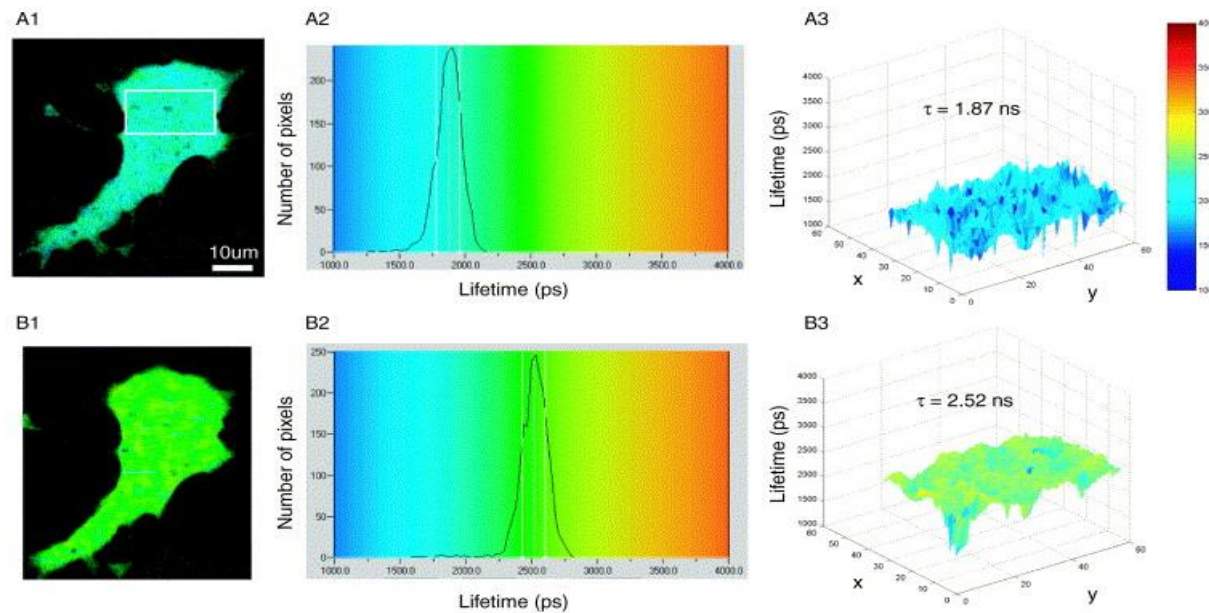


Závislost doby dohasínání fluorescence NADH je dvou-exponenciální s hodnotou 0.4 ns pro volnou a 3 ns pro navázanou molekulu NADH

FLIM-FRET

Kombinace FRET a časově rozlišené mikroskopie

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



Kratší čas
dohasínání
donoru při
FRET.

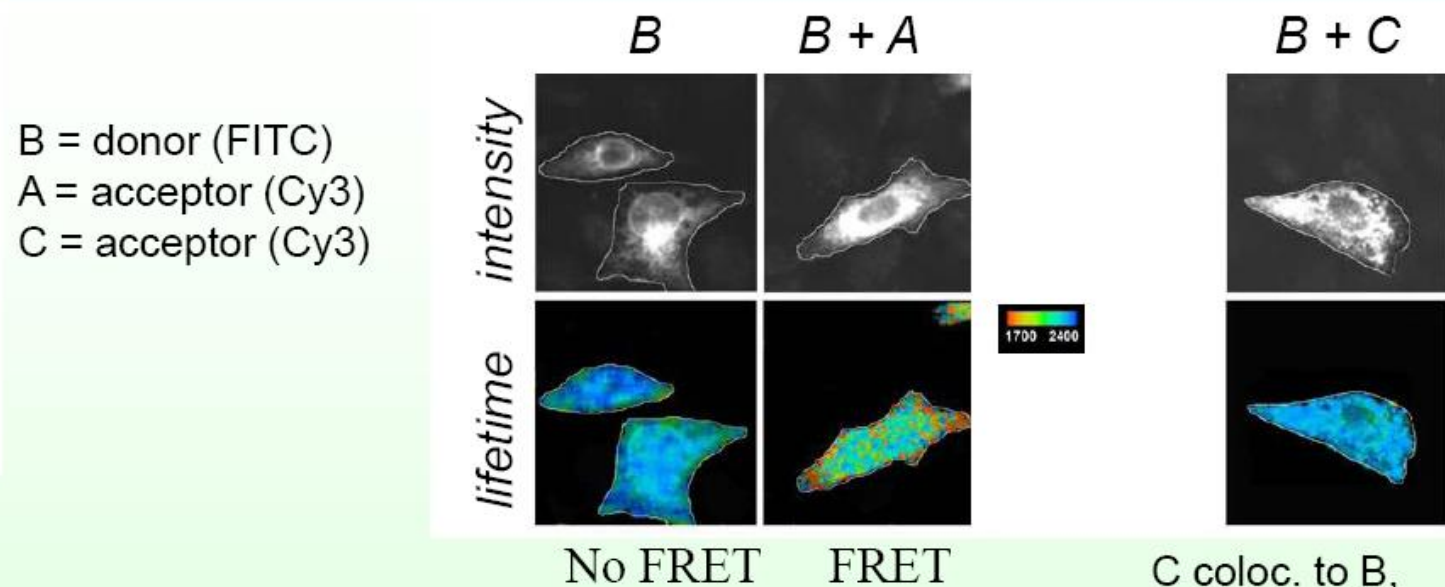
Normální –
delší čas
dohasínání při
fotovybělení
akceptoru
FRET

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 α in living pituitary GHFT1-5 cells.

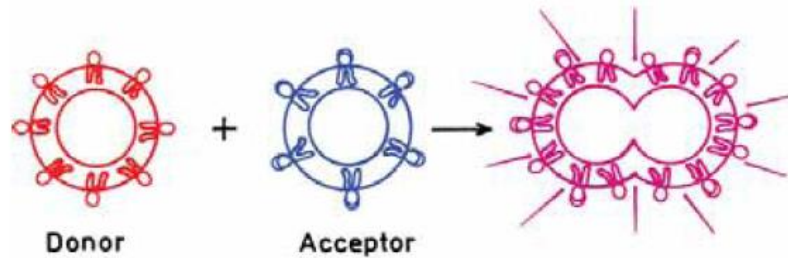
Interakce nebo kolokalizace?

Example FRET-FLIM Colocalisation or Interaction?

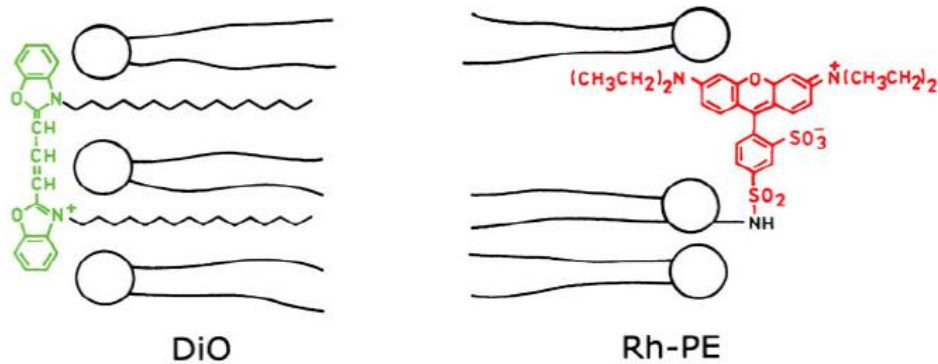


Conclusion:
A interacts with B (shift blue to red)

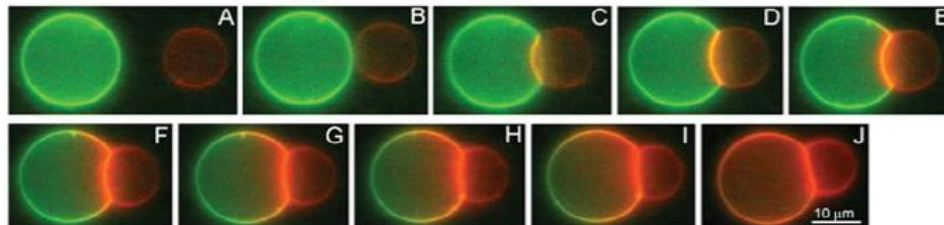
Membránová fúze



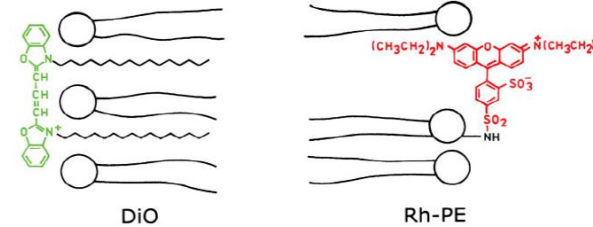
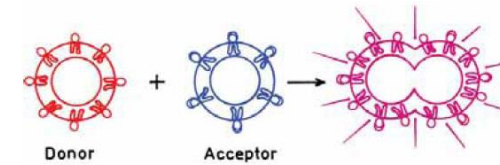
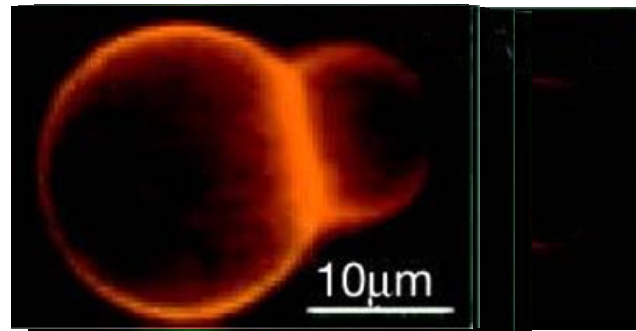
Jednotlivé membrány obsahují donor nebo akceptor



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