

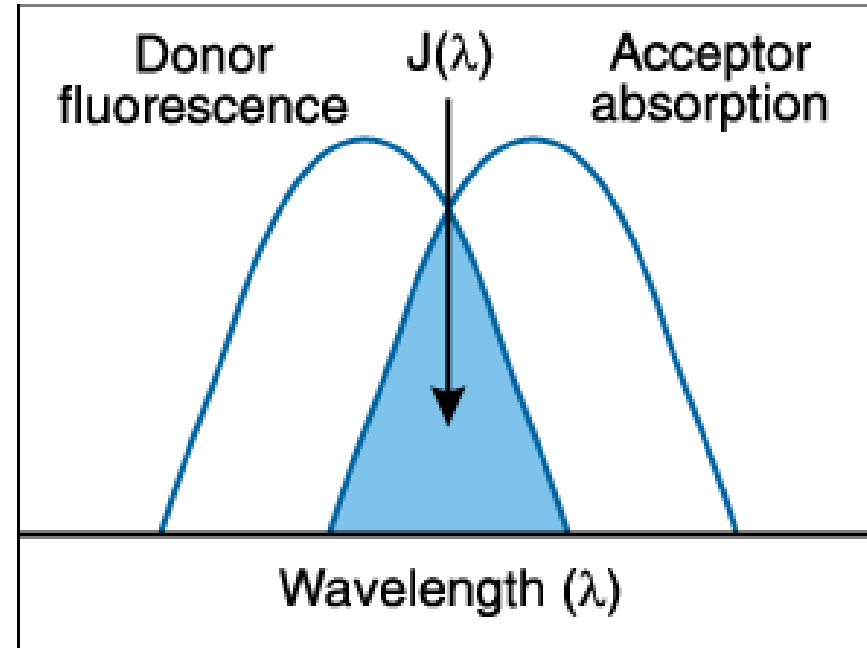
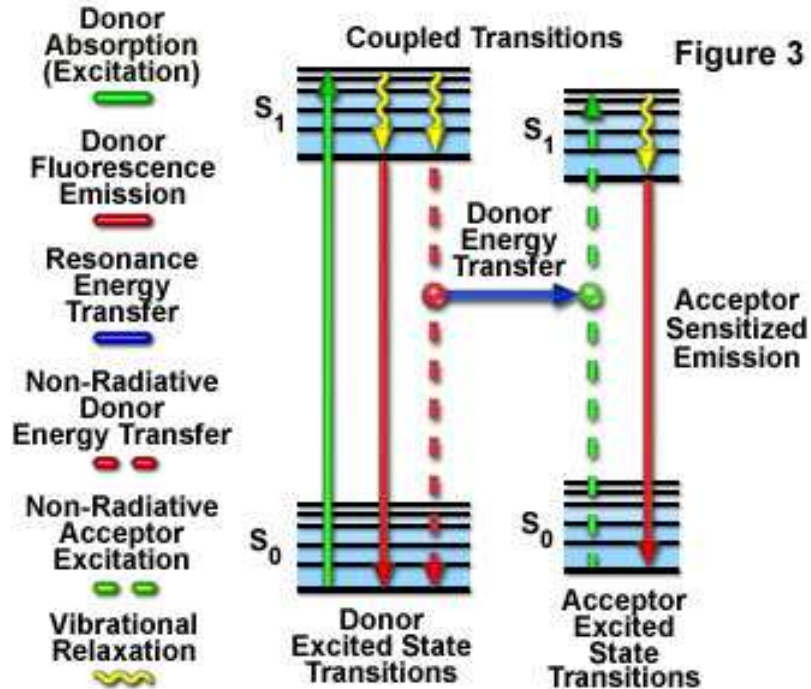
13. FRET

Försterův



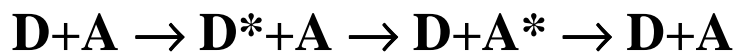
(FRET)

Resonance Energy Transfer Jablonski Diagram



<http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>

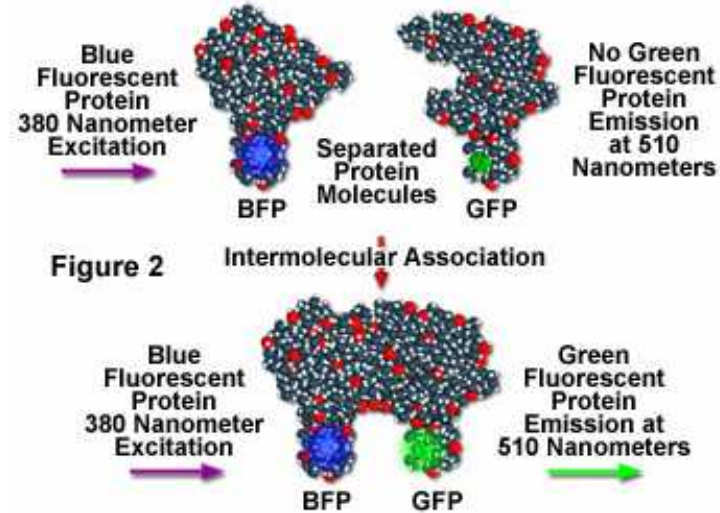
Pokud se v blízkosti fluoroforu (donoru) nachází molekula (akceptor), jejíž absorpční spektrum se překrývá s emisním spektrem donoru, může dojít k rezonančnímu (nezářivému !) přenosu excitační energie



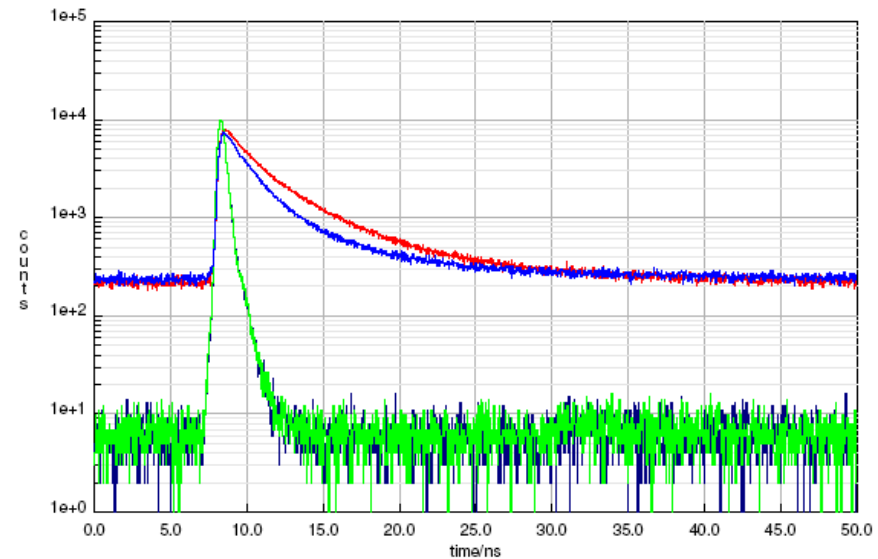
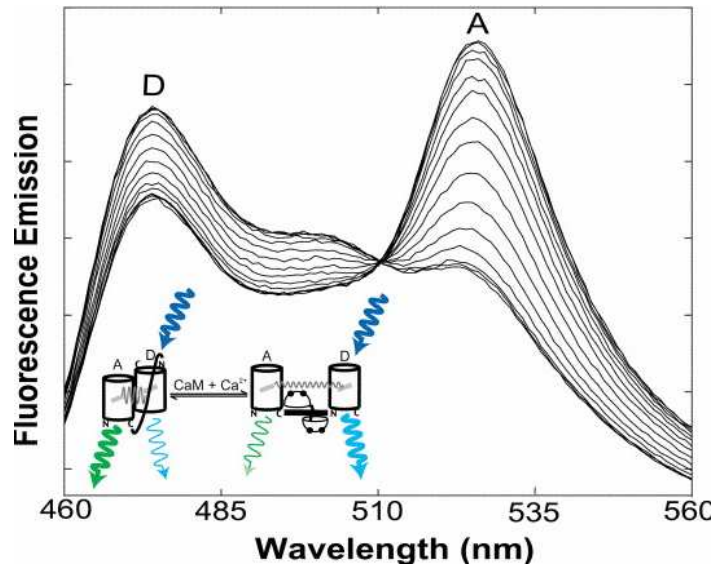
Protože se jedná o dipól-dipólovou interakci, závisí účinnost FRET na , což umožňuje měření inter- nebo intramolekulárních vzdáleností v nm škále.

Jak se projevuje FRET

FRET Detection of *in vivo* Protein-Protein Interactions



<http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>



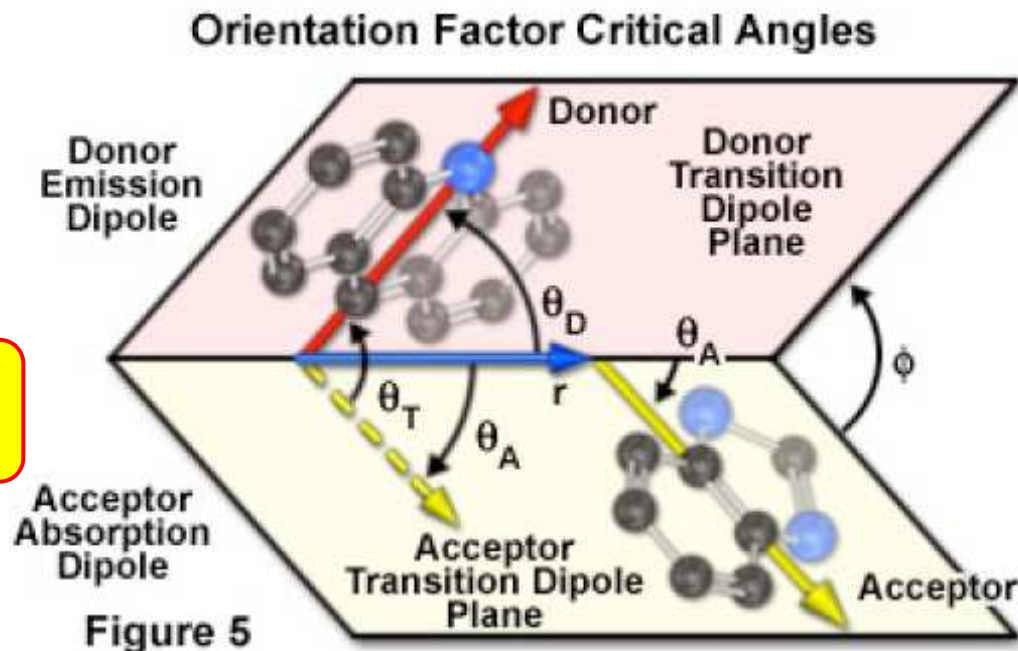
Protože se jedná o proces, který nezářivě depopuluje excitovaný stav, detekujeme ho jako pokles fluorescence i donoru.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

R_0 představuje vzdálenost, při které je $E = 0,5$. Ta se dá spočítat pomocí z překryvu spekter

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln(10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 n^4 N} \int_0^\infty F_D(\bar{\nu}) \epsilon_A(\bar{\nu}) \frac{d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4}$$

Φ_D je kvantový výtěžek donoru
 $\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$ je **orientační faktor**, může nabývat hodnot 0 (dipóly orientovány kolmo) až 4 (dipóly orientovány kolineárně), obvykle se předpokládá $\kappa^2 = 2/3$ (náhodná orientace mobilních dipólů)
 n je index lomu prostředí
 N je Avogadrova konstanta
 ϵ_A je extinkční koeficient akceptoru
 F_D je fluorescenční spektrum donoru normované na 1 (celková intenzita).



<http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>

Pozor – většinou se spektra měří v prostoru λ .

S uvažáním
$$d\bar{\nu} = -\frac{d\lambda}{\lambda^2} \quad (14.38)$$

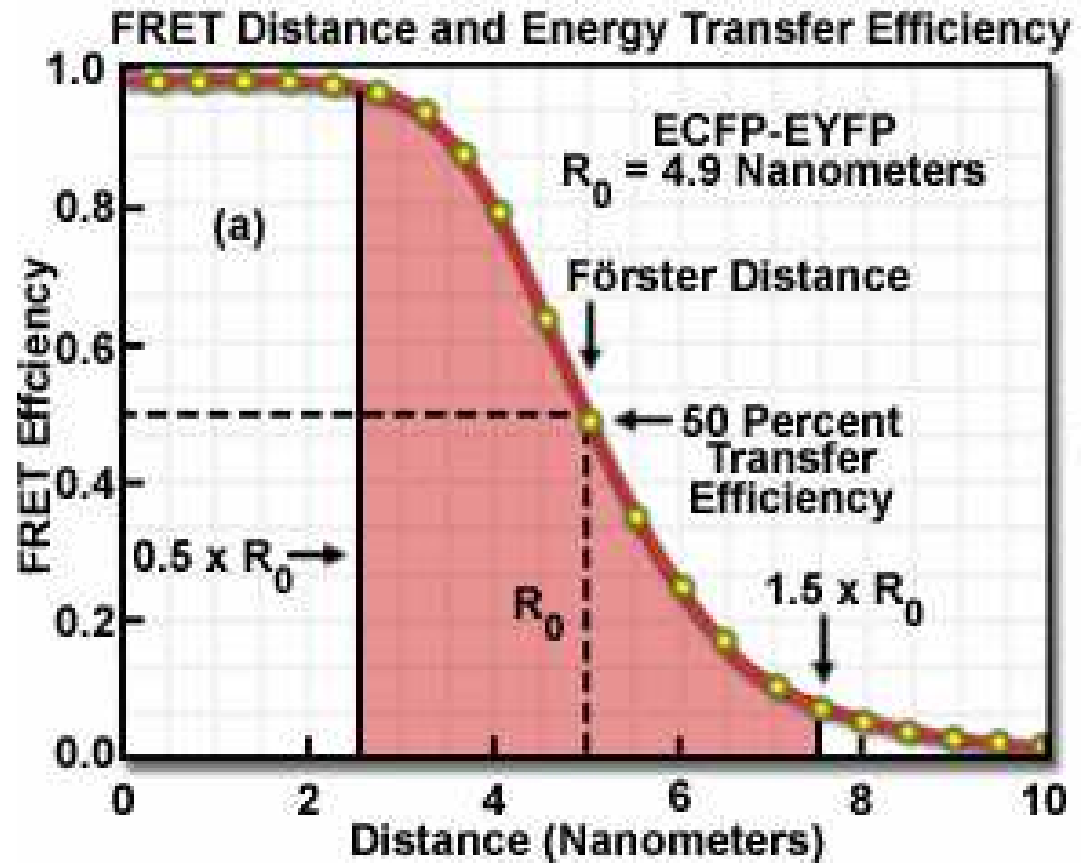
pak máme

$$J = \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^2 d\lambda \quad (14.39)$$

$$F_D(\lambda) = \frac{F_D^M(\lambda)}{\int_0^\infty \frac{F_D^M(\lambda)}{\lambda^2} d\lambda} \quad (14.40)$$

POZOR – NUTNO DOSADIT V „OBVYKLÝCH“ JEDNOTKÁCH !

Měření vzdáleností pomocí FRET je nejpřesnější v okolí R_0 – přesnost je obvykle rozumná pro $0,5 R_0$ až $2 R_0$



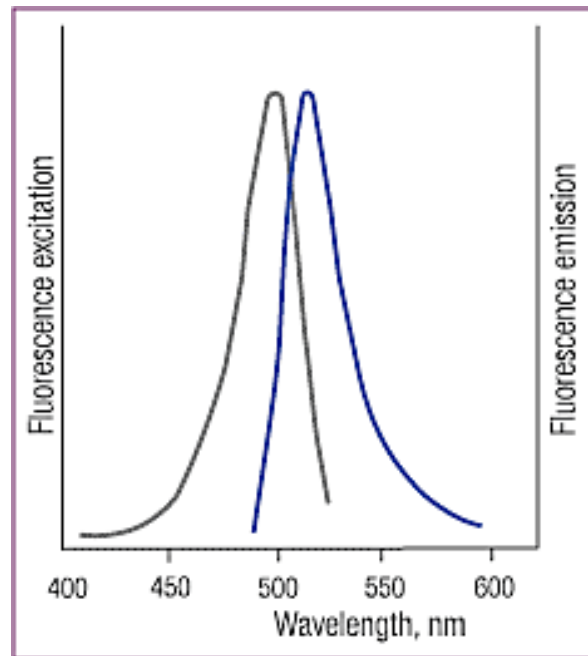
<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fret/fretintro.html>

Hodnotu R_0 je možno nastavit vhodným výběrem donor-akceptorového páru.

Homotransfer

přenos energie mezi molekulami stejného druhu
typický pro molekuly s malým Stokesovým posuvem - velký překryv
absorpčního a emisního spektra

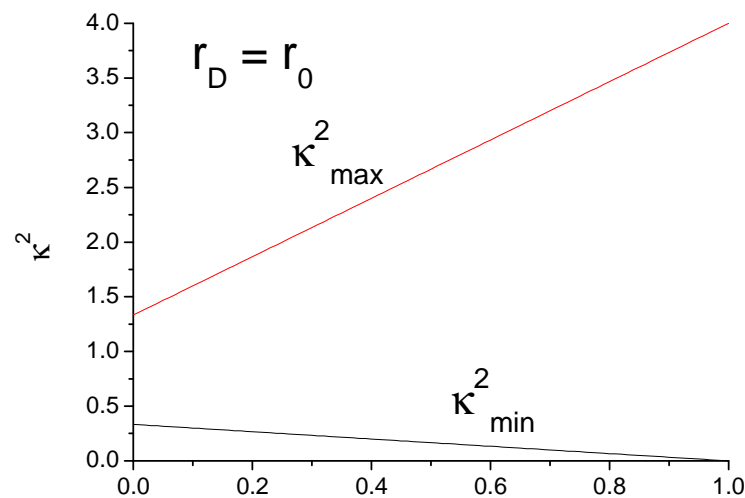
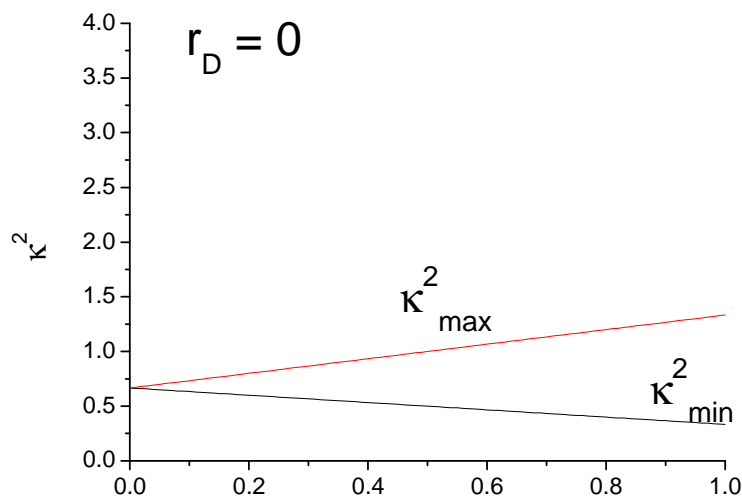
Fluorescein - $R_0 = 4,4$ nm



Problém při vícenásobném
značení biomolekul

Podmínky použitelnosti Försterovy teorie

Vzhledem k typickým hodnotám R_0 bývá citlivost měření rozumná pro $r < 10$ nm
 Teorie je odvozena pro bodové dipóly, tato aproximace je rozumná pro $r > 1$ nm
 Pokud je jeden z dipólů (nebo dokonce oba) imobilizovaný, roste neurčitost stanovení r v důsledku neurčitosti κ .
 U velkých biomolekul, které zaujímají větší množství konformačních stavů, může docházet ke korelaci κ a r .



$$\kappa_{\min}^2 = \frac{2}{3} \left(1 - \frac{d_D^x + d_A^x}{2} \right) d_A^x$$

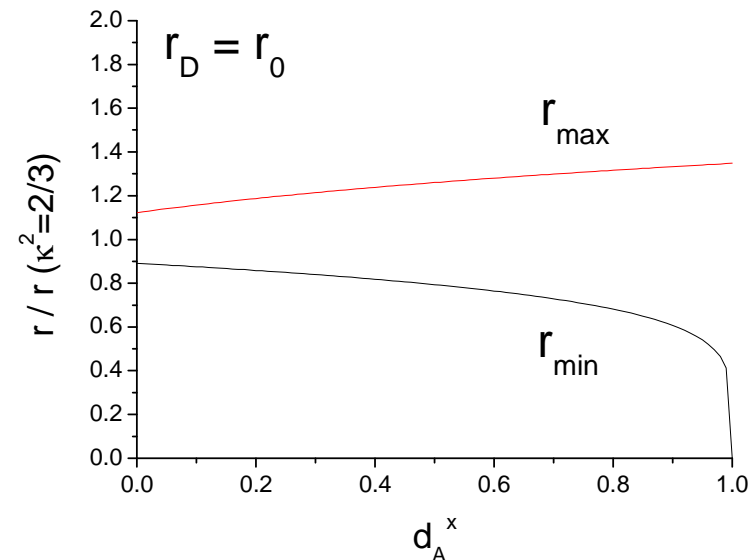
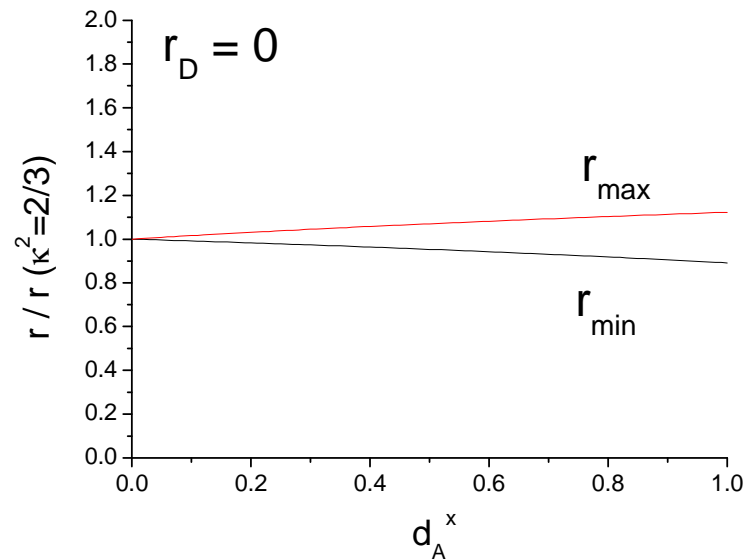
$$d_D^x = \sqrt{\frac{r_D}{r_0}}$$

$$d_A^x = \sqrt{\frac{r_A}{r_0}}$$

$$\kappa_{\max}^2 = \frac{2}{3} (1 + d_D^x + d_A^x + 3d_D^x d_A^x)$$

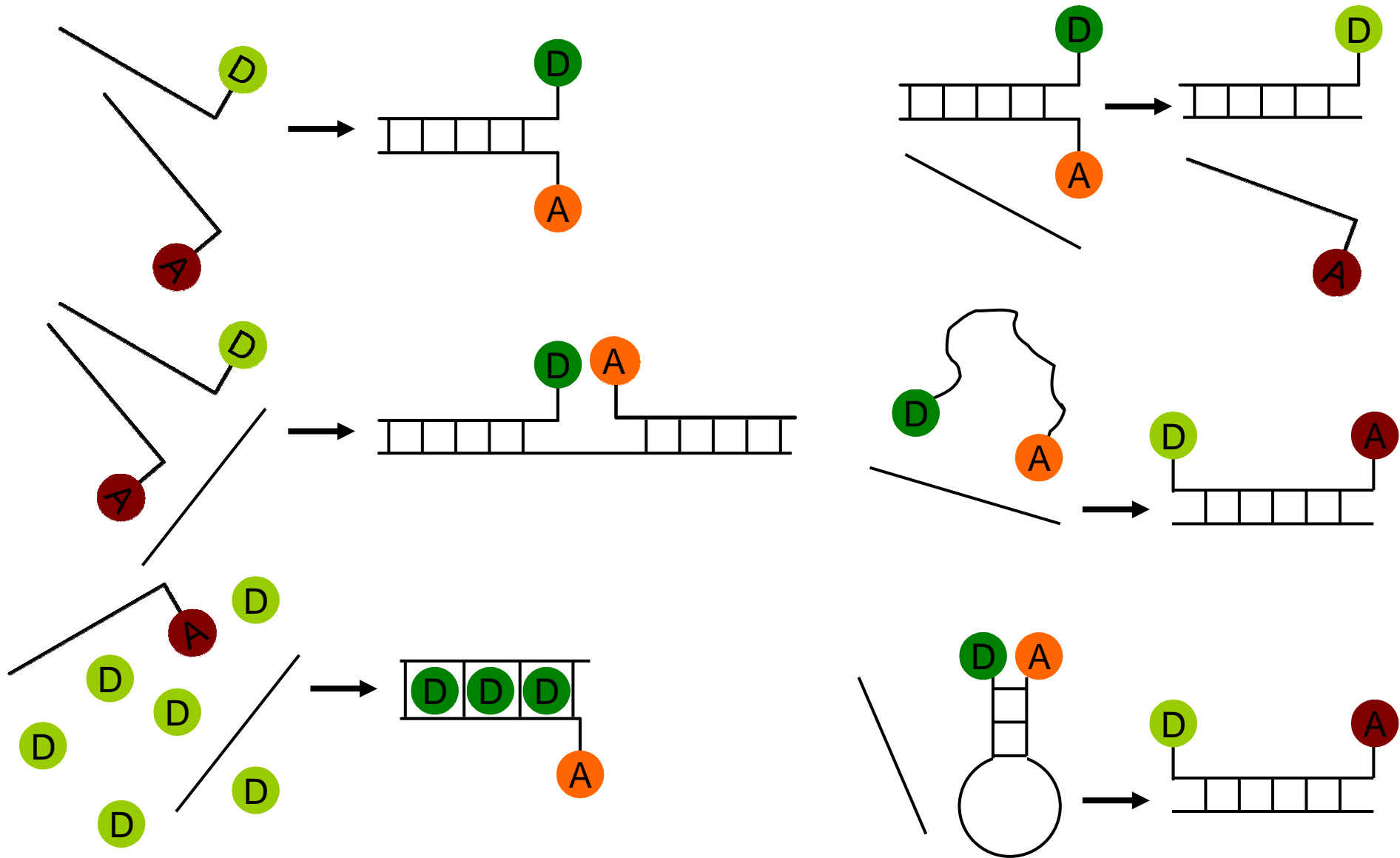
Podmínky použitelnosti Försterovy teorie

Relativní chyby určení vzdálenosti r jsou podstatně menší, protože měřené veličiny vstupují do výpočtu pro r^6 (např. $2^{1/6} = 1,12$).

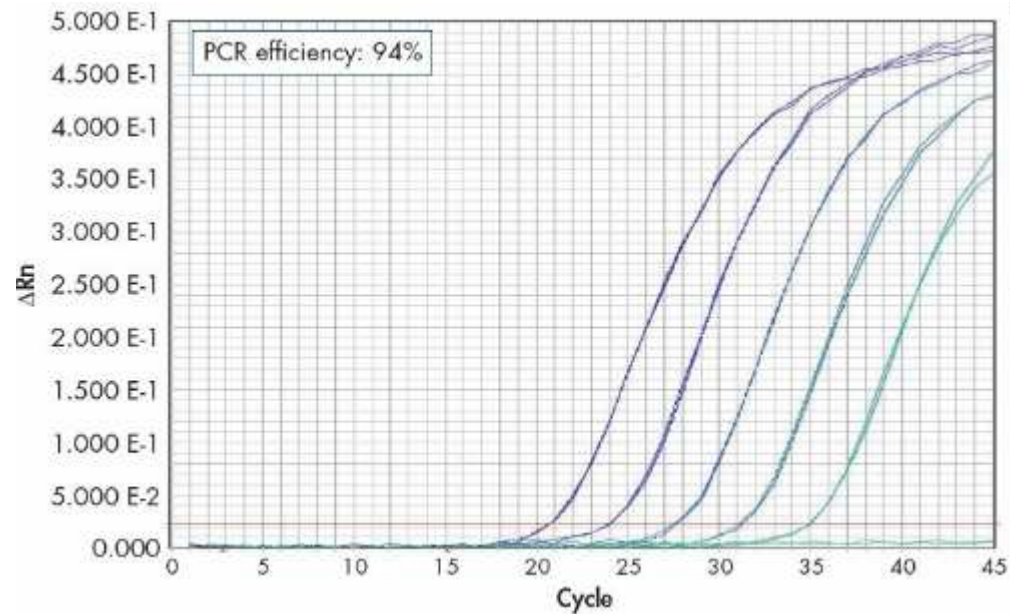
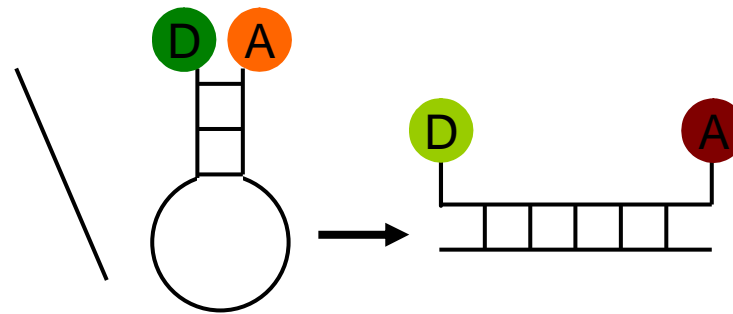


Výše uvedený vztah pro výpočet r platí pro homogenní populaci molekul s konstantní vzdáleností 1 donoru a 1 akceptoru. V případě většího množství donorů nebo akceptorů, v případě distribuce vzdáleností nebo difúze molekul jsou vztahy složitější.

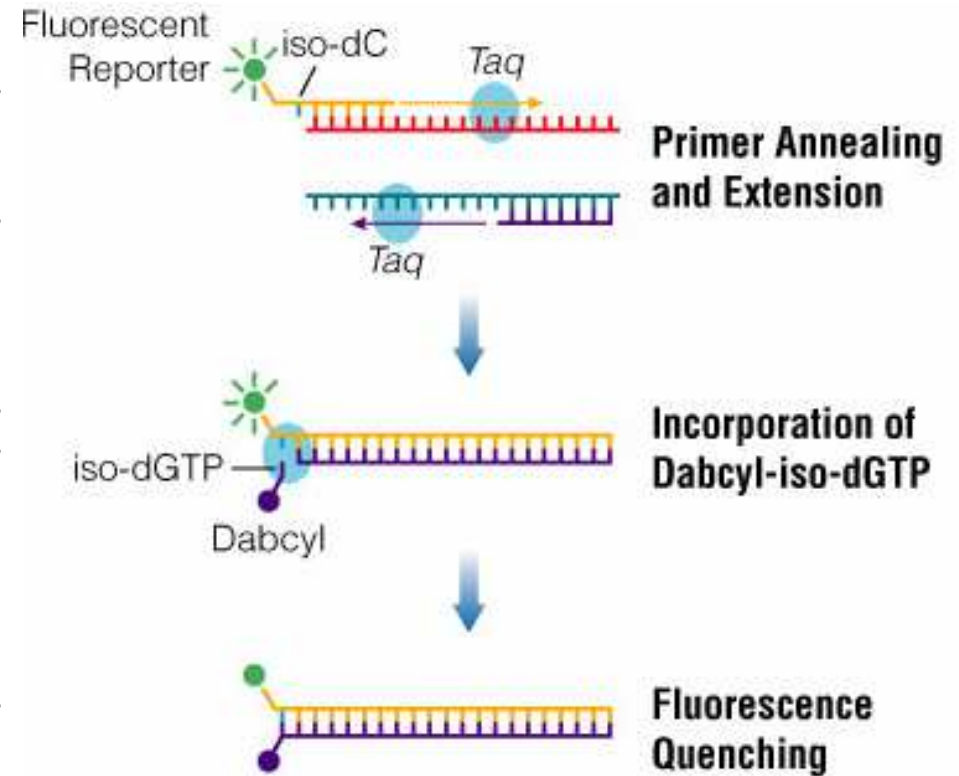
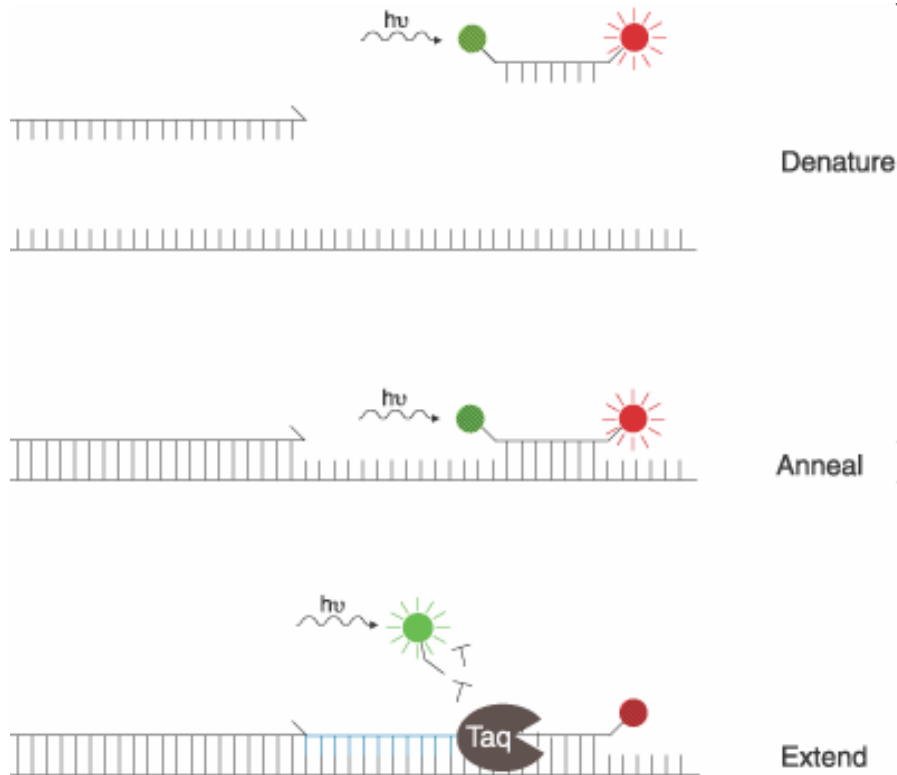
Aplikace - hybridizace DNA



Aplikace FRET - Real-time PCR



Aplikace FRET - Real-time PCR

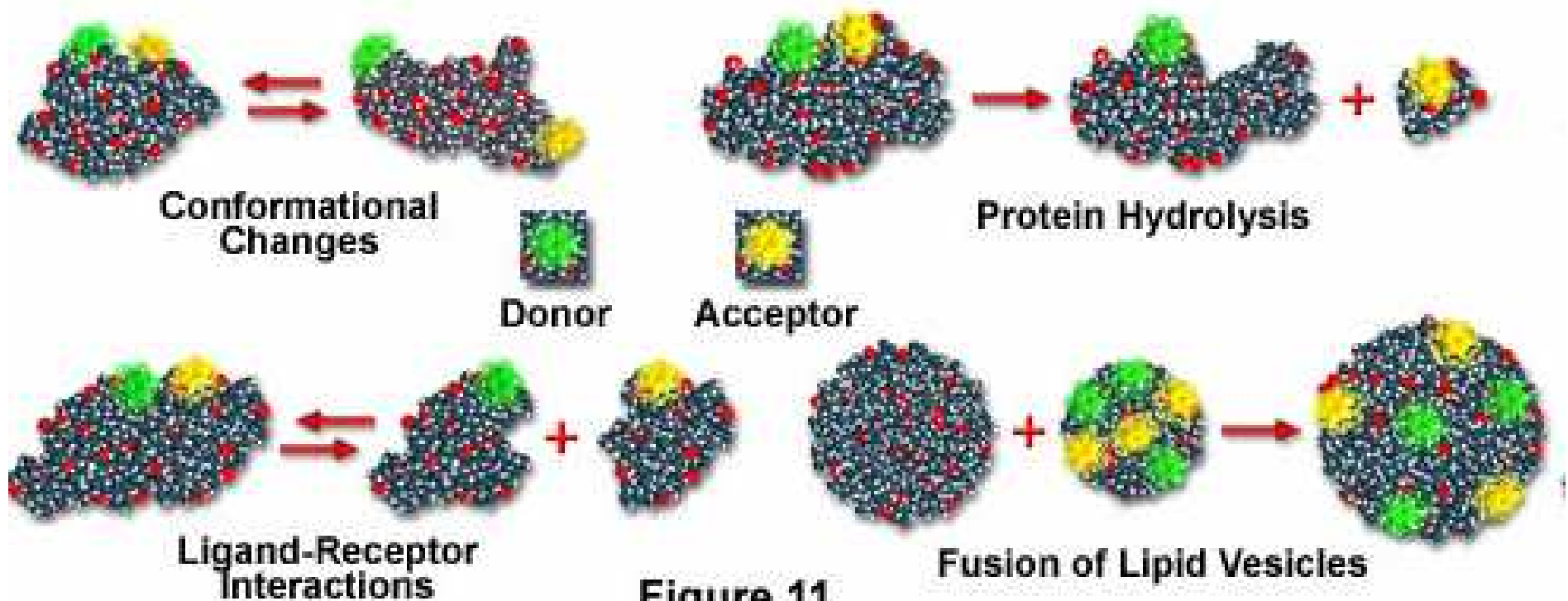


<http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/pierce/realtimemcr.htm>

<http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/pcr-amplification/>

Nejčastější aplikace

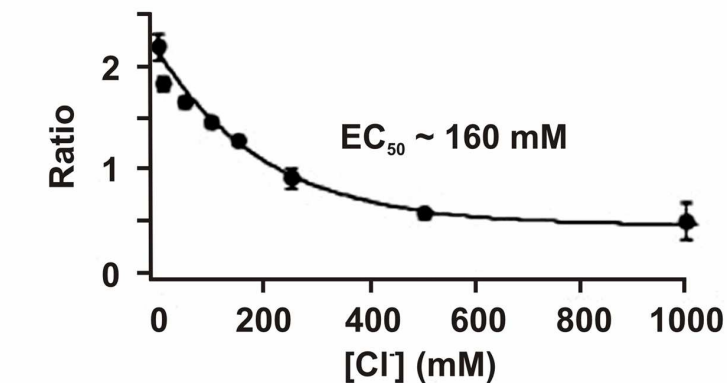
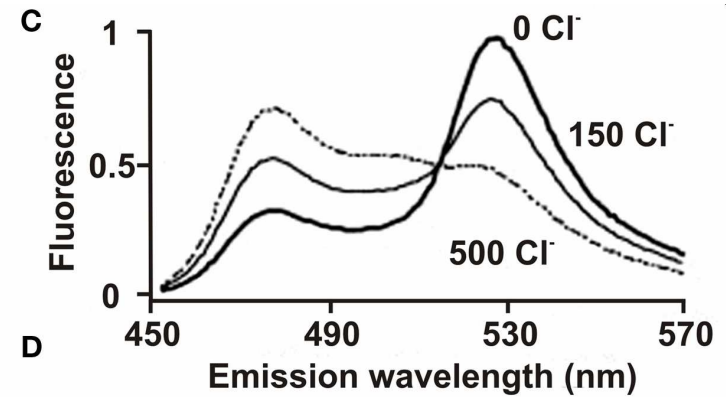
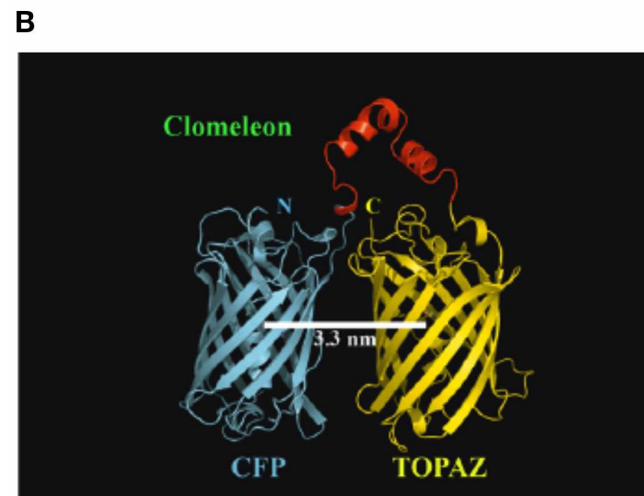
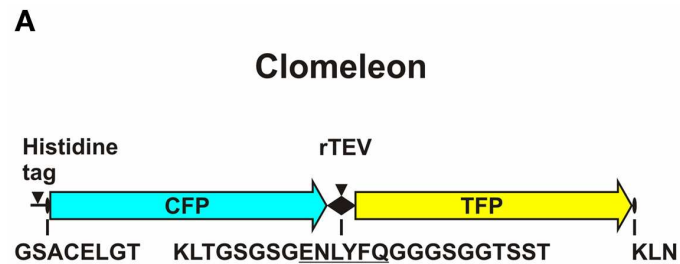
Biomolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Applications



<http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>

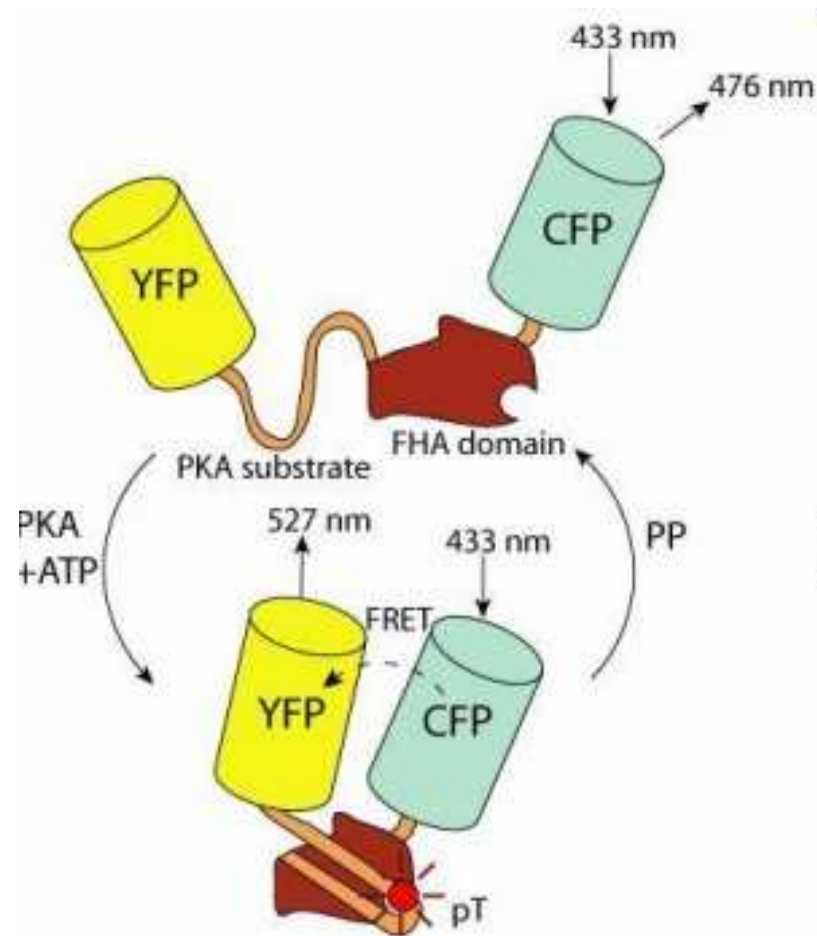
Aplikace FRET - Senzory

Senzor pro chlorid

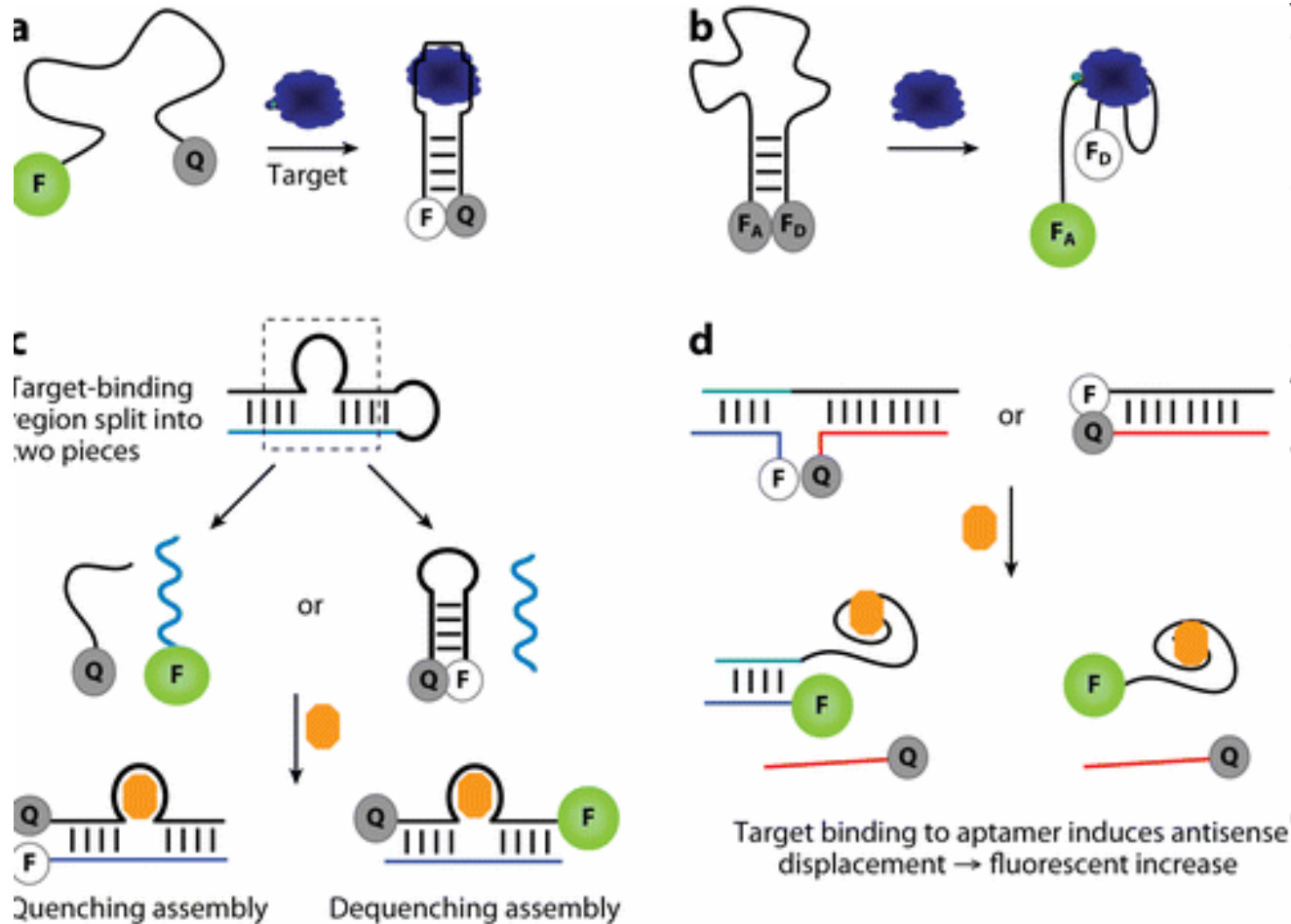



Aplikace FRET - Senzory

Senzor fosforylace proteinu



Aplikace FRET - Aptamery

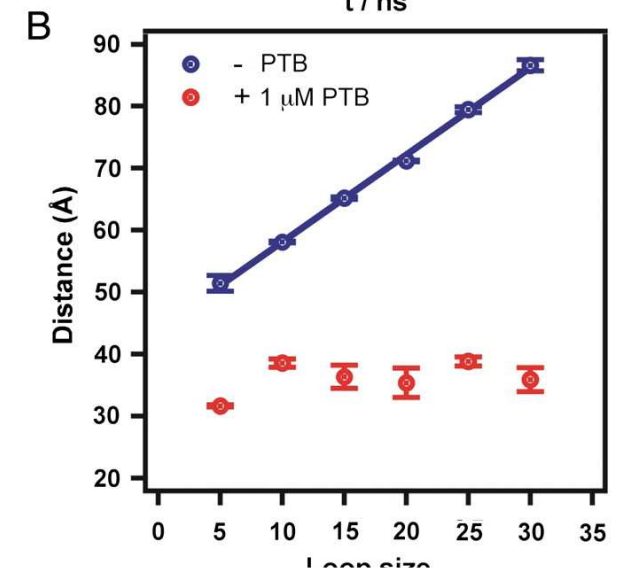
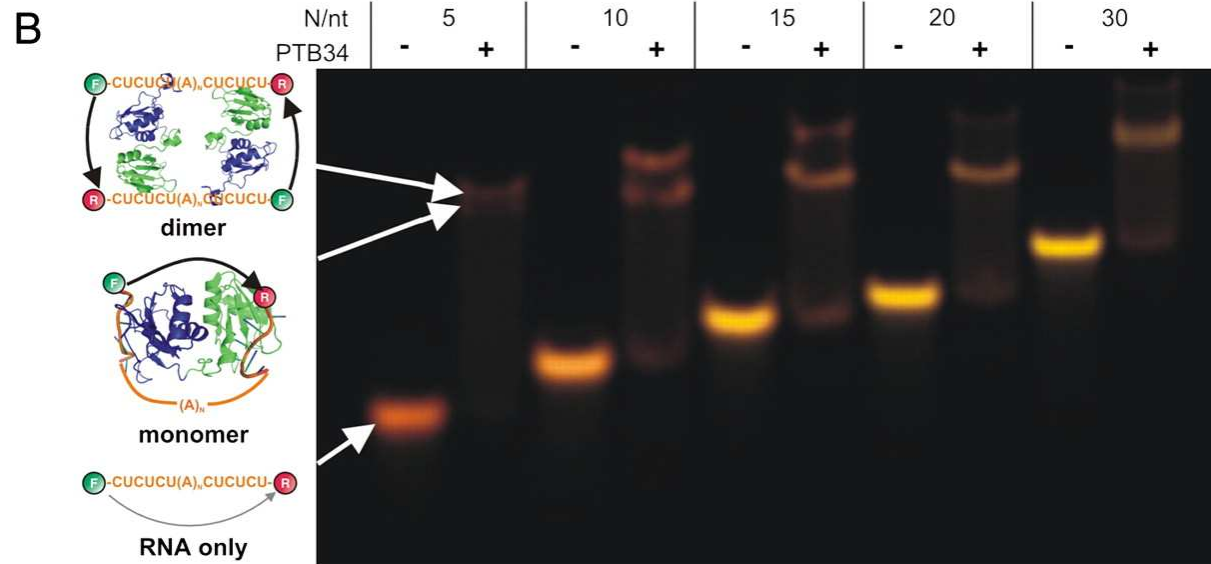
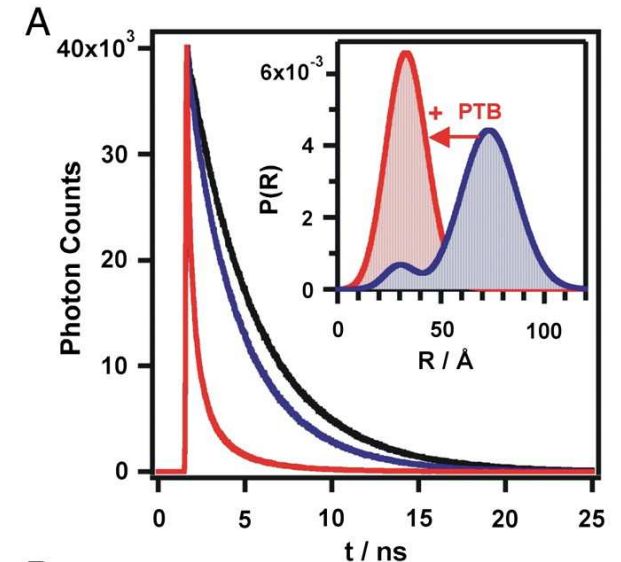
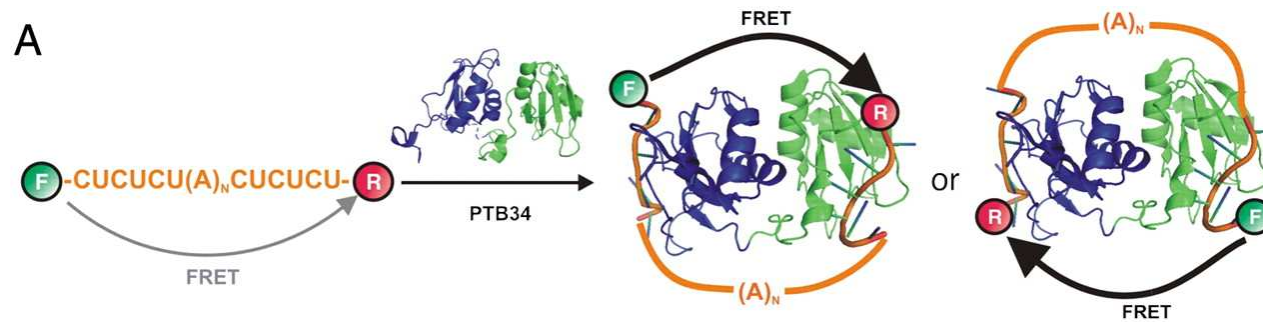


 Cho EJ, et al. 2009.
Annu. Rev. Anal. Chem. 2:241-64

Časově-rozlišené měření FRET

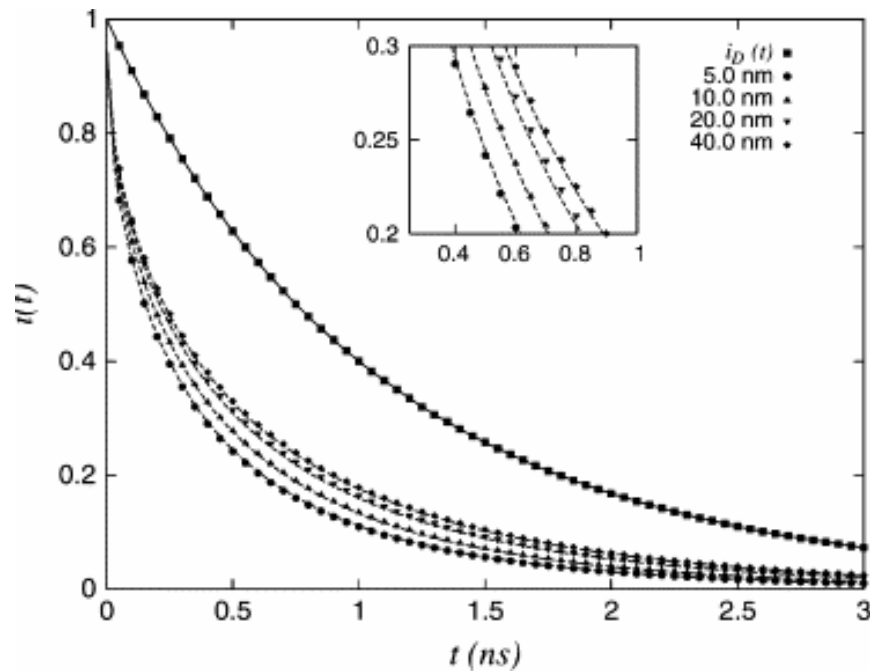
Structure of RNA-bound PTB34 and native gel

Analýza distribucí

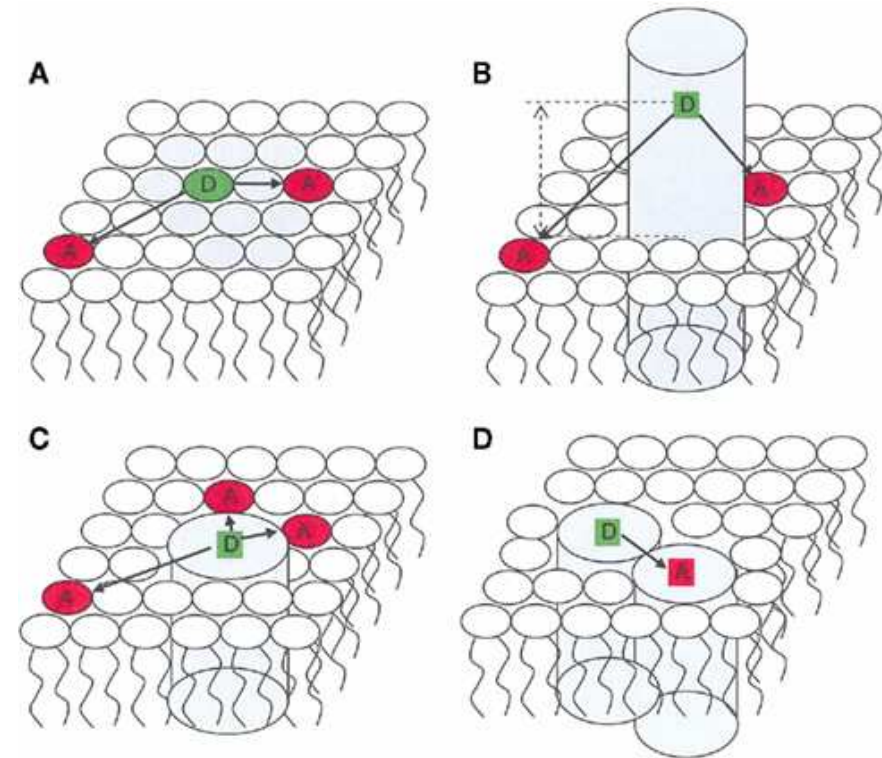


Časově-rozlišené měření FRET

Měření vzdálenosti nejbližšího přístupu



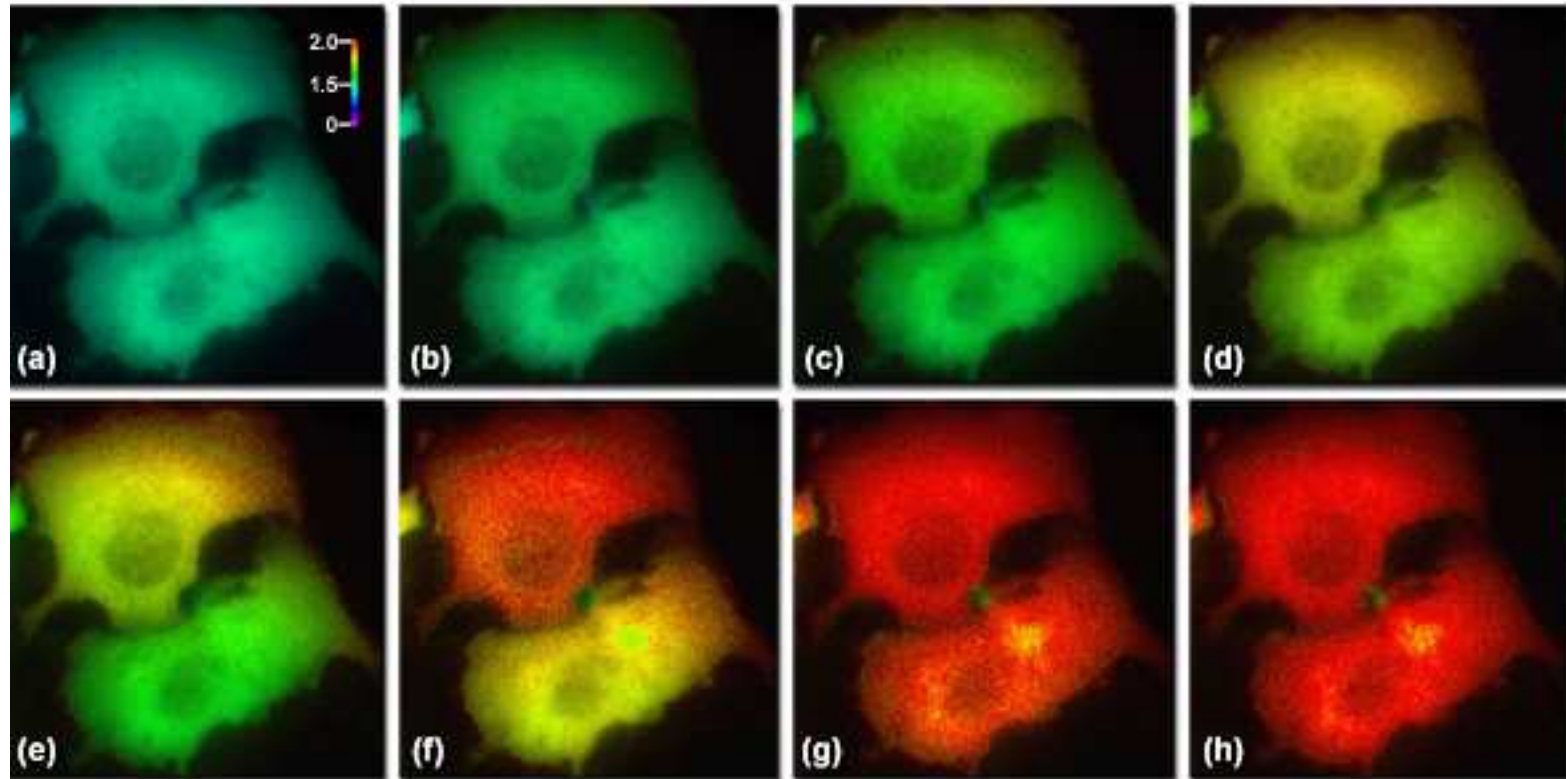
Towles KB. et al. (2007) Biophys J 93:655-67



Loura LMS and Prieto M (2011) Front. Physio. 2:82

FRET - Mikroskopie

Ratiometric Imaging with Sensitized Emission FRET in ECFP-EYFP Biosensors



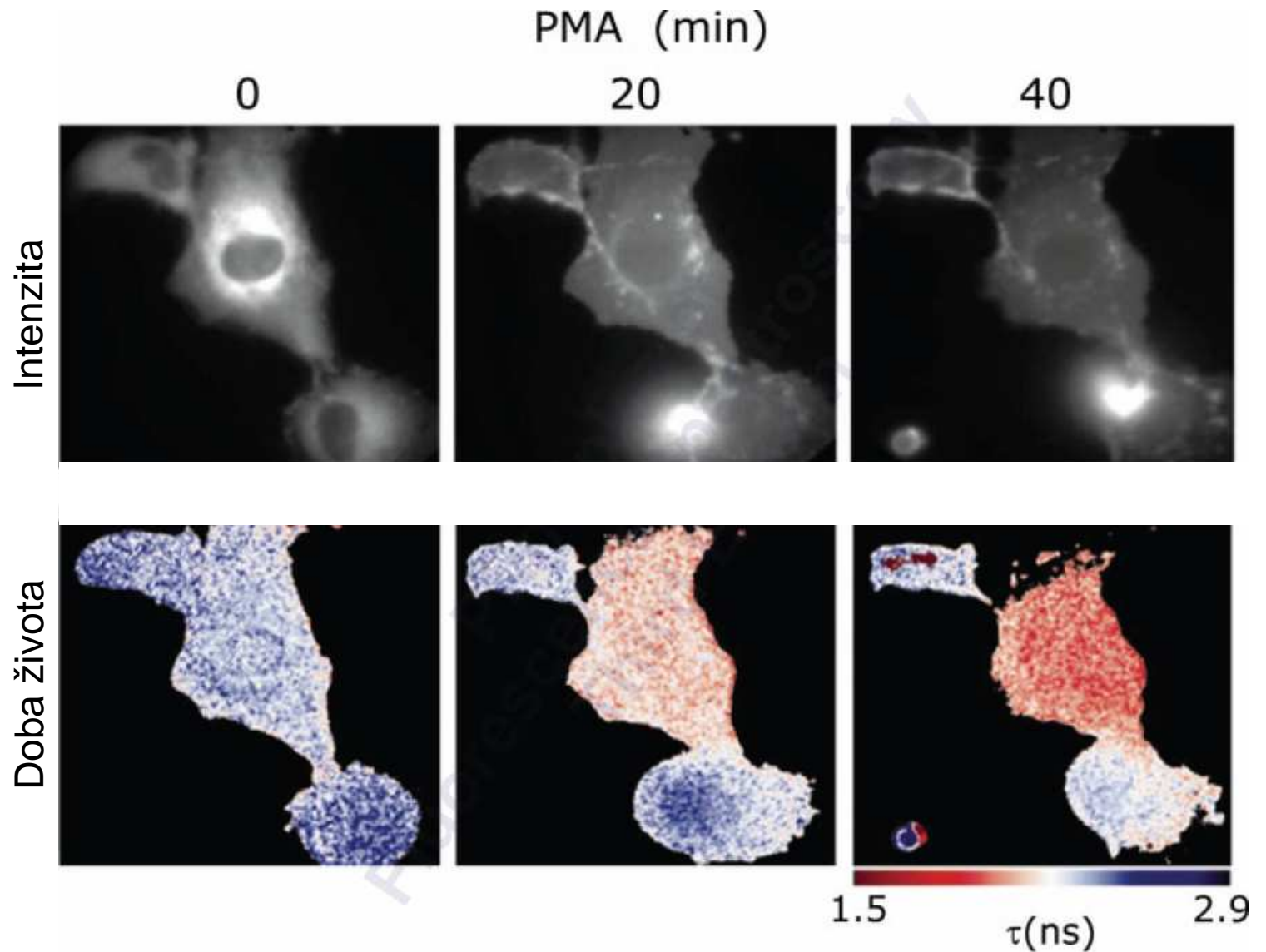
Illustrated are a series of images captured in widefield fluorescence illumination of calcium waves traversing the cytoplasm of human carcinoma cells (HeLa) expressing the circularly permuted cameleon vector YC3.60. This biosensor contains variants of ECFP and EYFP that sandwich the protein calmodulin and the calcium calmodulin-binding domain of myosin light chain kinase (M13) domain in a linear chimera. In the presence of increasing levels of intracellular calcium, the M13 domain binds the calmodulin peptide to produce an increase in FRET between the fluorescent proteins. Presented in Figure (a) is a real color image of two adjacent cells before adding histamine to induce calcium binding to the biosensor. Figures (b) through (h) show pseudocolored ratio images of the calcium waves propagating through the cytoplasm of the two HeLa cells. Note that the wave travels from top to bottom in the upper cell and from right to left in the lower cell. The total time for the calcium wave to traverse the cytoplasm in these cells was approximately 1.5 seconds. The level of FRET is indicated by comparing the ratiometric pseudocolors to the legend presented in Figure (a).

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spectralimaging/spectralfret.html>

FLIM-FRET

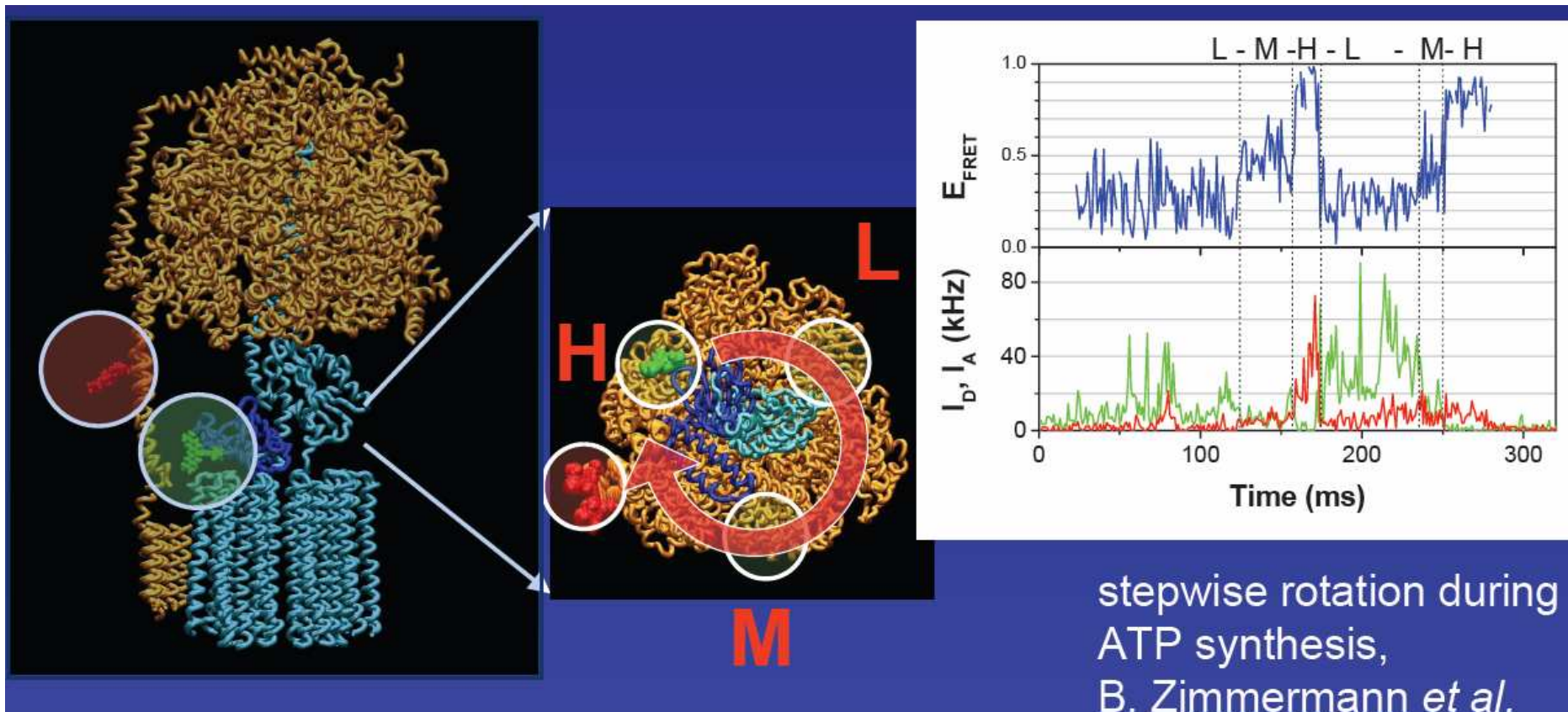
Donor -
lipid/calcium-
dependent protein
kinase C značená
GFP

Akceptor - IgG
specifický pro
fosforylovanou
formu PKC
značený Cy3



Single-molecule FRET

Rotace podjednotky ϵ v F1Fo-ATP syntáze



FRET v praxi

1) Design experimentu

Co chci sledovat ?

Jak chci připravit vzorky ?

2) Příprava vzorků

Většinou vyžaduje místně-specifické a stechiometricky přesné fluorescenční značení

3) Měření FRET

Proměření vzorku se samotným donorem (popř. akceptorem)

Proměření vzorku označeného donorem i akceptorem

4) Vyhodnocení a interpretace výsledků

Přímočaré jen v jednoduchých případech

Může vyžadovat napsání vlastního softwaru

Shrnutí

FRET - rezonanční přenos energie z donoru v excitovaném stavu na akceptor.

Projevuje se **poklesem intenzity fluorescence a střední doby života donoru**, případně také **nárůstem intenzity fluorescence akceptoru** (pokud emituje).

Pomocí FRET můžeme zjistit - **zda-li jsou D a A součástí téhož komplexu**
změřit jejich vzdálenost

Rozsah použitelnosti daného D-A páru je dán kritickou (Försterovou) vzdáleností R_0 , kterou můžeme vypočítat z absorpčních a fluorescenčních charakteristik molekul.

Při experimentu většinou porovnáваме vzorek obsahující pouze D se vzorkem obsahujícím D-A pár.

Aplikace - hybridizace DNA, konformační změny, interakce biomolekul, senzory.

Měření FRET ve fluorescenční mikroskopii - poměrové měření, FLIM.