

Försterův rezonanční přenos energie

Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET = Fluorescence Resonance Energy Transfer či Förster resonance energy transfer) je fyzikální jev popisující přenos energie mezi dvěma fluorofory. Při vhodně zvolených fluoroforech (nutnost překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru) může donor, který je v excitovaném stavu, přenést energii na akceptor pomocí nezářivé dipól – dipól interakce. Výsledkem je excitovaná molekula akceptoru, která poté vyzáří energii, kterou původně absorboval donor. Při FRET nedochází k emisi fotonu donorem, jedná se tedy o nezářivý přenos energie. Efektivita tohoto přenosu je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti mezi donorem a akceptorem, což činí FRET extrémně citlivým na malé vzdálenosti.

Stanovení efektivit FRET umožňuje rozlišit, zda jsou dva fluorofory v určité vzdálenosti od sebe. Toho využívá biologický a chemický výzkum.

Terminologie

Försterův rezonanční přenos energie je pojmenován po německém vědci Theodoru Försterovi. Jelikož jsou oba fluorofory fluorescentní látky, je často používán termín „Fluorescenční rezonanční přenos energie“, a to i přesto, že energie není ve skutečnosti přenášena fluorescence. Aby se předešlo chybnému výkladu tohoto jevu, jehož podstatou je nezářivý přenos energie, je preferován termín „Försterův rezonanční přenos energie“ před „Flourescenční rezonanční přenos energie“, přesto se však ve vědecké literatuře můžeme častěji setkat s druhým jmenováním.

Teorie

Rezonanční přenos energie charakterizuje rychlostní konstanta (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) např. v této formě:

$$k_{DA} = (1/\tau_D) (R_0/r)^6$$

- 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 tedy silně závislý na vzdálenosti donoru a akceptoru.

Účinnost přenosu energie

Účinnost přenosu energie je dána poměrným množstvím fotonů, které jsou absorbovány donorem a následně vyzářeny akceptorem.

$$E = \frac{K_{DA}(r)}{\tau D^{-1} + K_{DA}(r)}$$

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

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

Měří se určením relativní intenzity fluorescence donoru za nepřítomnosti (F_D) a za přítomnosti akceptoru (F_{DA}). Rychle klesá se 6. mocninou vzdálenosti.

Účinnost přenosu je determinována mnoha parametry, jež mohou být shrnuty do těchto bodů:

- vzdálenost mezi donorem a akceptorem (typicky v rozmezí 1–10 nm)
- spektrální překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru
- relativní orientace emisního dipólového momentu donoru a absorpčního dipólového momentu akceptoru

Försterova vzdálenost (R_0)

R_0 je vzdálenost donoru a akceptoru, při které je účinnost přenosu energie 50 %. Velikost R_0 je obvykle 2–6 nm, což je srovnatelné s velikostí biologických molekul. Závislost účinnosti přenosu E na vzdálenosti r je nejvýraznější (nejrychleji se měnící) 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.

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

Využití

FRET se využívá k měření vzdálenosti a detekci interakce molekul, a má tak řadu aplikací v biologickém a chemickém výzkumu. Je užíván k měření vzdálenosti mezi vlastními doménami proteinu a poskytnout tak informace o jeho konformaci (umožňuje např. sledování denaturačních změn proteinů, folding proteinů). Také se používá k detekci interakcí mezi proteiny. In vivo v buňkách se FRET používá k lokalizaci a detekci interakce genů a faktorů regulujících jejich expresi. Dále je možné tento jev použít ke zkoumání metabolických a signálních drah. Hojně se také využívá ke studiu lipidových raftů v buněčných membránách a zkoumání prostorového rozložení membránových receptorů. FRET je také běžným nástrojem ve studiu enzymové reakční kinetiky a molekulárních motorů.

Reference

Zdroje

- KREMERS, Gert-Jan a David W. PISTON. *Fundamental Principles of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy with Fluorescent Proteins* [online]. [cit. 2014-01-07]. <<https://www.microscopyu.com/applications/fret/basics-of-fret-microscopy>>.
- MOENS, Pierre. *Fluorescence Resonance Energy Transfer spectroscopy* [online]. [cit. 2014-01-07]. <<http://www.anatomy.usyd.edu.au/mru/>>.
- PISTON, David. *Zeiss Logo Education in Microscopy and Digital Imaging* [online]. [cit. 2014-01-07]. <<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spectralimaging/spectralfret.html>>.
- SCHWARZEROVÁ, Kateřina. *prezentace k předmětu Praktikum Rostlinná buňka - PŘF UK* [online]. [cit. 2014-01-07]. <http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/schwarze/bunka_prakt/Prezentace.pdf>.
- VÁLOVÁ, Pavla. *prezentace k předmětu Světelná a elektronová mikroskopie - PŘF UPOL* [online]. [cit. 2014-01-07]. <http://www.chembiolupol.cz/data/xinha/4_1_fluorescence_metody_2013.pdf>.

Použitá literatura

- CLEGG, Robert a Theodorus W.J. GADELLA, et al. *FRET and FLIM Techniques*. 33. vydání. Elsevier Science, 2009. 560 s. ISBN 978-0-08-054958-3.