

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Il trasferimento energetico di risonanza di fluorescenza (FRET) è una interazione dipendente dalla distanza tra gli stati elettronici eccitati di due molecole di colorante fluorescente.

L' eccitazione è trasferita da una molecola donore ad una molecola accettore senza emissione di un fotone.

Il FRET è un trasferimento non radiativo di energia da un fluoroforo (il donore) ad un altro (l'accettore) via una interazione dipolo-dipolo.

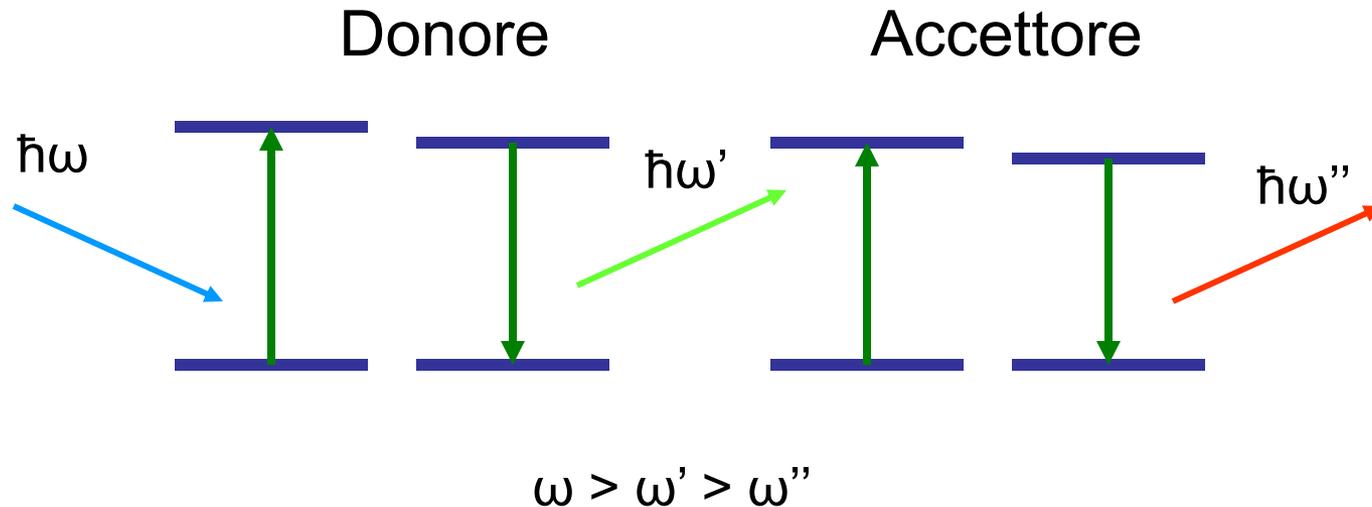
FRET è dipendente dall'inverso della sesta potenza della separazione intermolecolare, quindi utile per distanze dell'ordine delle dimensioni di macromolecole.

Introduzione

- FRET è un processo fotofisico che coinvolge una molecola donore ed una molecola accettore
- La molecola donore è otticamente eccitata e trasferisce una parte dell'energia di eccitazione alla molecola accettore
- Il meccanismo di trasferimento riduce il tempo di vita di fluorescenza della molecola donore.

Cosa NON è il meccanismo FRET

- L'energia NON è trasmessa da eventi di emissione di un donore e di assorbimento di un accettore scorrelati



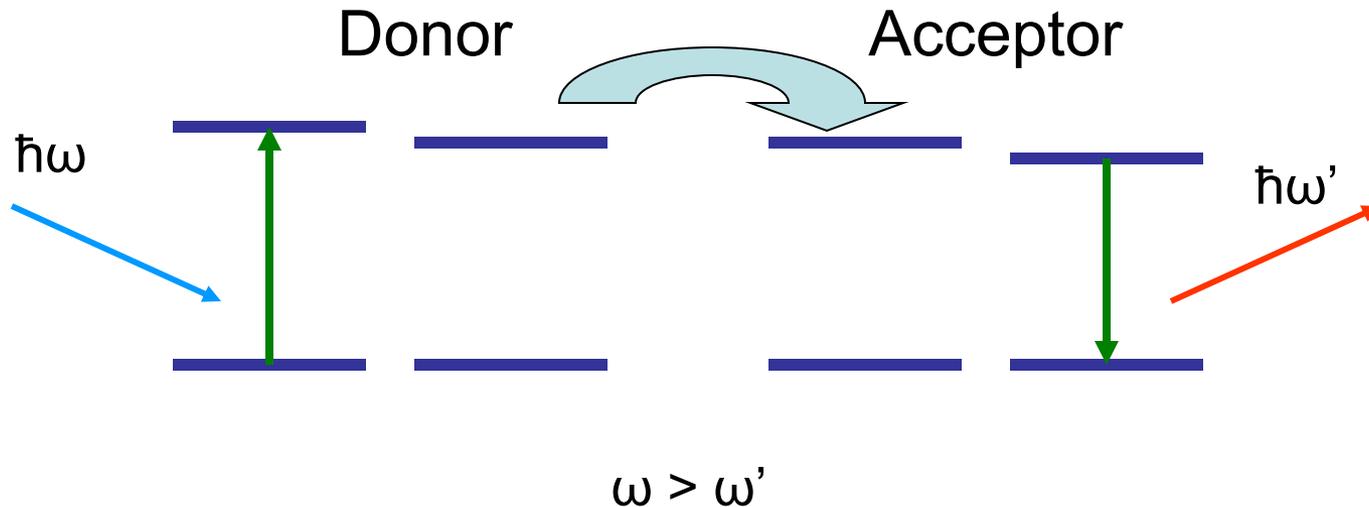
Tempo di vita del donore NON è alterato

Meccanismo del FRET

- Invece, il trasferimento di energia accade attraverso un'interazione coulombiana tra i momenti di transizione di donore e accettore
- Nel caso di accoppiamento debole, la sovrapposizione di fluorescenza del donore e assorbimento di accettore danno l'efficienza dell'effetto FRET.

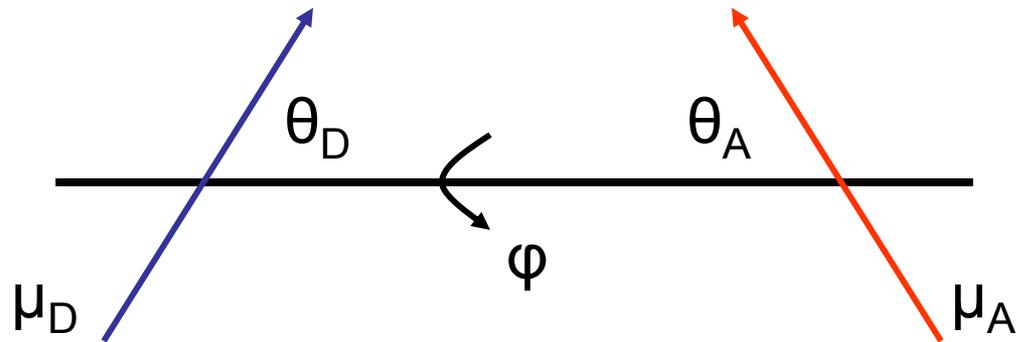
Accoppiamento FRET

- Generalmente, si ha a che fare con un accoppiamento elettronico singoletto-singoletto tra gli stati fondamentali di donore e accettore.



Accoppiamento FRET per il colorante

- Approssimiamo questo accoppiamento coulombiano da accoppiamento dipolo-dipolo.



dove μ_A e μ_D sono i momenti di dipolo di transizione del donore e dell'accettore

FRET Dye Coupling

- L'accoppiamento può essere dato da:

$$V^{Coul} \approx \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{\kappa\mu_D\mu_A}{R^3}$$

R = separazione delle molecole

κ = fattore di orientamento

$$= 2\cos\theta_D \cos\theta_A + \sin\theta_D \sin\theta_A \cos\phi$$

ϵ_0 = costante dielettrica in vuoto

FRET Transfer Rate

- Se $f(E)$ è la fluorescenza normalizzata del donore con energia E e $\alpha(E)$ è l'assorbimento normalizzato con energia E dell'accettore, il grado di trasferimento di energia viene scritto:

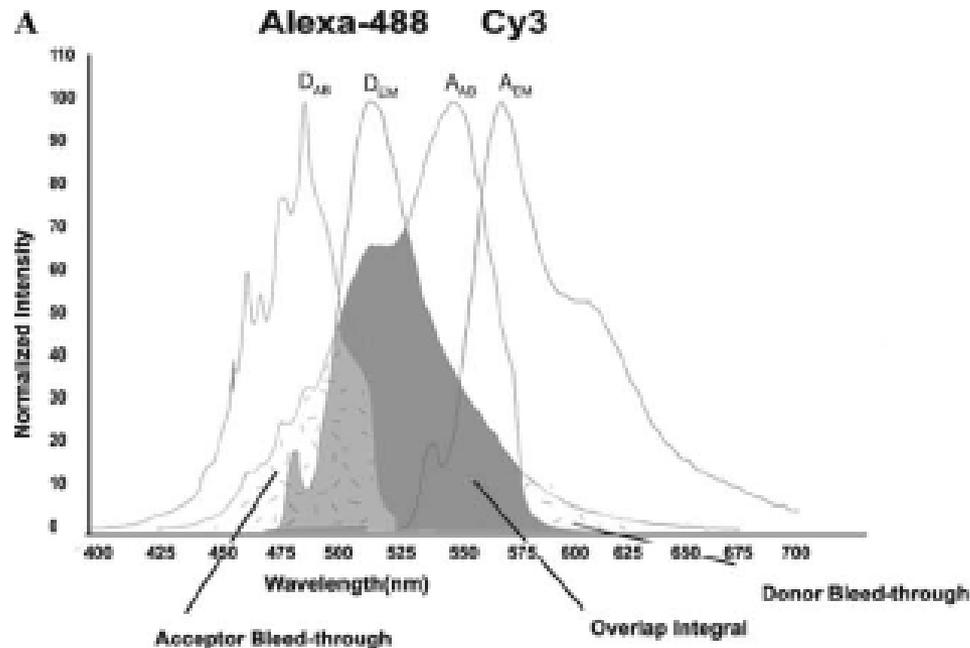
$$k = \frac{2\pi}{\hbar} |V^{Coul}|^2 \int_0^\infty J(E) dE$$

dove $J(E) = f(E)\alpha(E)$

FRET Transfer Rate

- I sovrapposizione spettrale di Förster

$$I = \int_0^{\infty} J(E) dE \quad \left(\frac{cm^3}{m} \right)$$



FRET: Rate di trasferimento

Sostituendo otteniamo

$$K = \frac{1}{\tau_D} \frac{\kappa^2 \Phi_D I}{n^4} \frac{1}{R^6} \left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N} \right)$$

τ_D = tempo di vita del donore

κ = fattore di orientamento

Φ_D = resa quantica di fluorescenza del donore

I = sovrapposizione spettrale

n = indice di rifrazione del mezzo

R = separazione da centro a centro

N = numero di Avogadro

FRET: Efficienza di trasferimento

L'efficienza di trasferimento del FRET è definita come:

$$E = 1 - \frac{\tau'_D}{\tau_D}$$

dove τ'_D e τ_D sono i tempi di vita della fluorescenza del donore con e senza accettore

FRET: Efficienza di trasferimento

Quindi l'efficienza è:

$$E = \frac{R^{-6}}{R^{-6} + R_0^{-6}} = \frac{1}{1 + \frac{R^6}{R_0^6}}$$

Questa efficienza può essere determinata sperimentalmente e la distanza calcolata.

Come avere un righello nanometrico

FRET: Rate di trasferimento

Scritto anche come:

$$k = \frac{\Phi_D}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

$$\text{dove } R_0 = \left(\frac{8.785 \times 10^{-25} I \kappa^2}{n^4} \right)^{1/6}$$

R_0 è la distanza a cui l'efficienza di trasferimento è del 50%

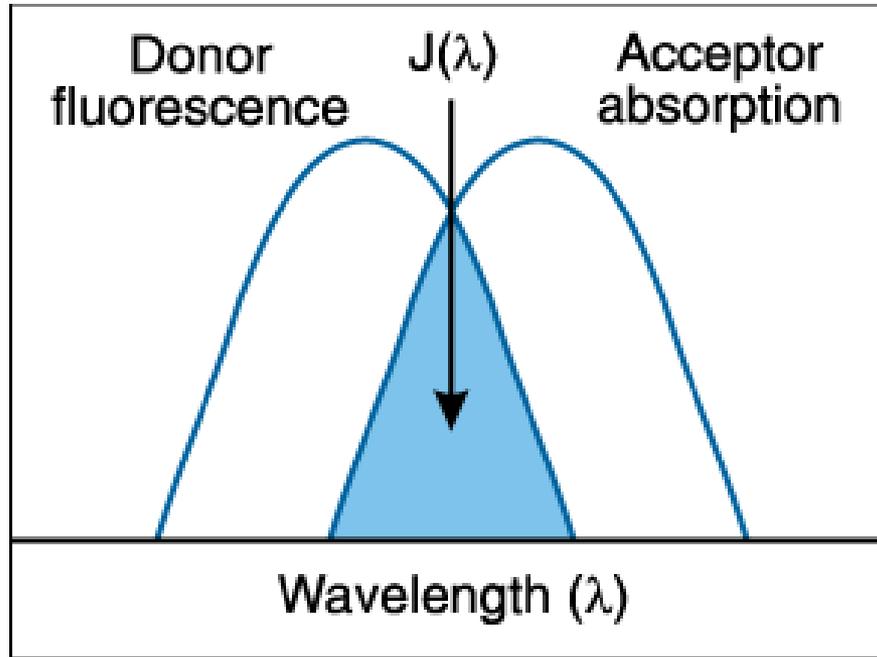
Requisiti per il FRET

- Per fare una misura FRET, si ha bisogno di avere una coppia selezionata di coloranti fluorescenti che assicurino:
 - Separazione degli spettri di assorbimento tra donore ed accettore
 - Grande sovrapposizione (>30%) tra la fluorescenza del donore e l'assorbimento dell'accettore.
 - Fluorescenze di donore ed accettore relativamente efficienti.
 - Separazione tra la fluorescenza del donore e dell'accettore.

Trasferimento energetico di risonanza di fluorescenza (FRET)

- Interazione dipendente dall'interazione tra gli stati elettronici eccitati delle due molecole
- Energia di eccitazione trasferita dalla molecola donore alla molecola accettore
- **Nessuna emissione di un fotone durante il trasferimento**
- L'accettore emette energia sottoforma di luce

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)



Condizioni primarie per il FRET

- Le molecole donore ed accettore devono essere molto vicine (tipicamente 10-100 Å).
- Lo spettro di assorbimento dell'accettore deve sovrapporsi allo spettro di emissione di fluorescenza del donore
- Le orientazioni di transizione di dipolo donore e accettore devono essere approssimativamente parallele.

Fluorescence Resonance Energy Transfer

$$R_0 = [8.8 \times 10^{23} \cdot \kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot QY_D \cdot J(\lambda)]^{1/6} \text{ \AA}$$

where κ^2 = dipole orientation factor (range 0 to 4; $\kappa^2 = 2/3$ for randomly oriented donors and acceptors)

QY_D = fluorescence quantum yield of the donor in the absence of the acceptor

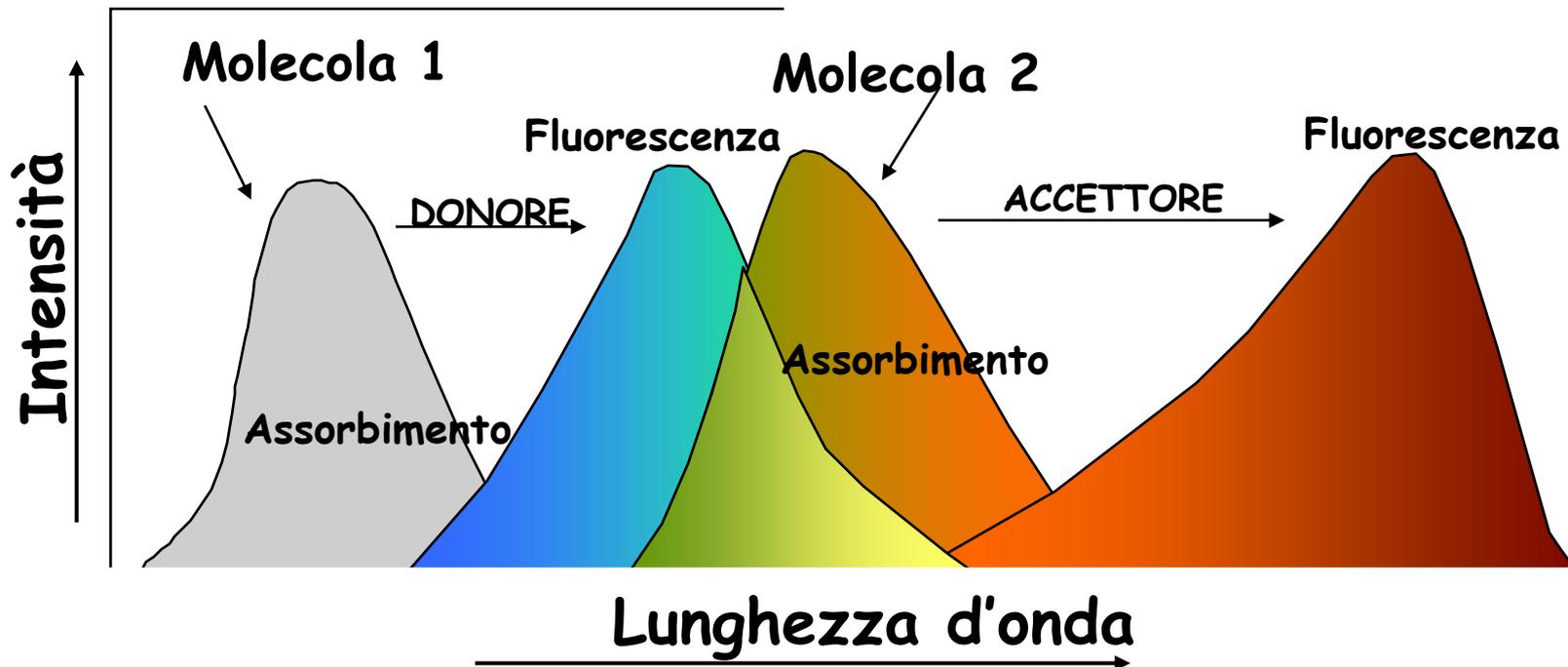
n = refractive index

$J(\lambda)$ = spectral overlap integral (see figure)

$$= \int \epsilon_A(\lambda) \cdot F_D(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \text{ cm}^3 \text{M}^{-1}$$

where ϵ_A = extinction coefficient of acceptor
 F_D = fluorescence emission intensity of donor as a fraction of the total integrated intensity

R_0 = raggio di Forster radius = Distanza a cui il trasferimento di energia è al 50% di efficienza

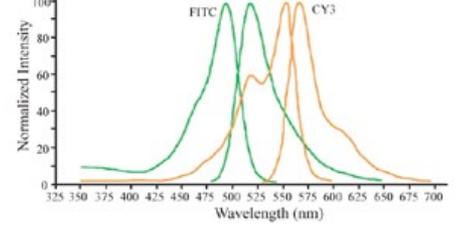
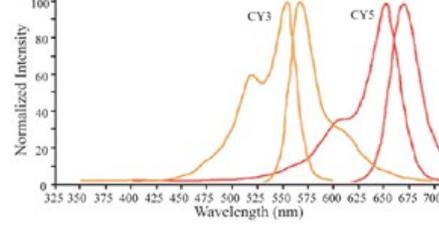
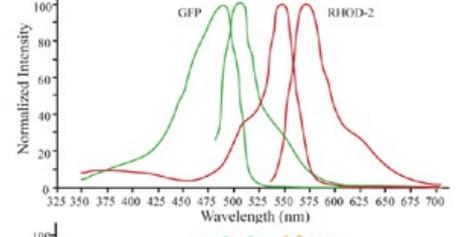
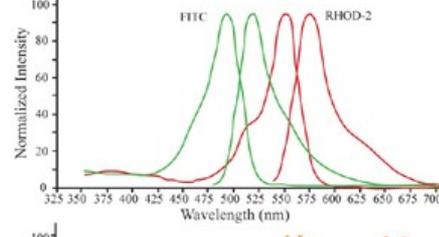
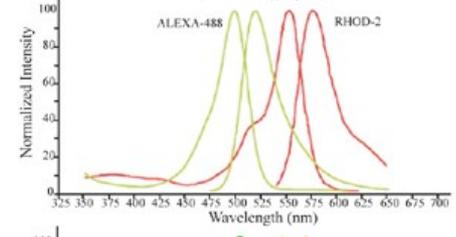
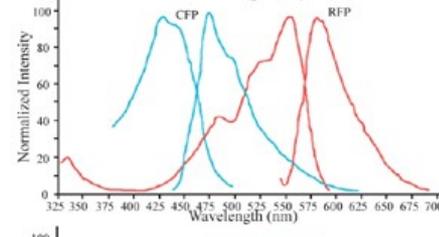
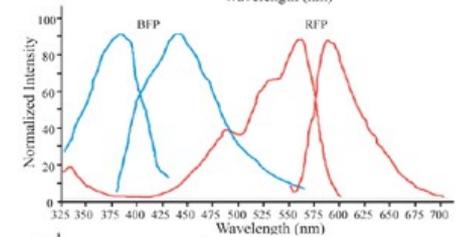
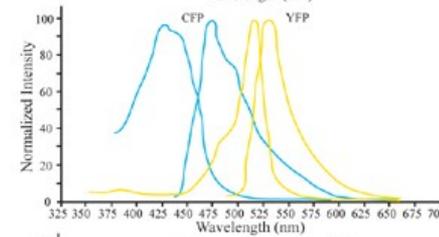
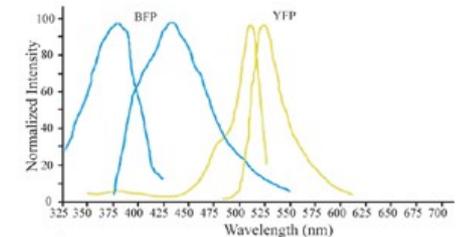
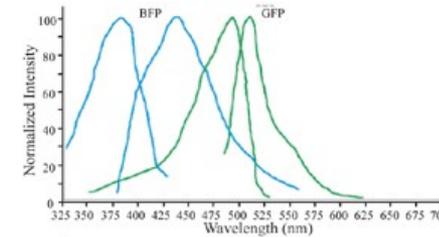


Valori tipici di R_0

Donore	Accettore	R_0 (Å)
Fluoresceina	Tetrametilrodamina	55
IAEDANS	Fluoresceina	46
EDANS	Dabcyl	33
Fluoresceina	Fluoresceina	44
BODIPY FL	BODIPY FL	57
Fluoresceina	QSY 7 and QSY 9 dyes	61

Meccanismo FRET: Sovrapposizione spettrale

- Le coppie di colorante per FRET vengono scelte accuratamente
- Le proprietà che rendono possibile il FRET rendono possibile anche l'assorbimento e la ri-emissione.



Meccanismo FRET

- L'effetto è fortemente dipendente dalla distanza
- Può essere usato per analizzare localmente l'ambiente direttamente attorno alla coppia
- L'effetto diminuisce con la distanza e quindi può essere usato per determinare le distanze su scala nanometrica.
- Vogliamo eccitare i due fluorofori separatamente e rivelare la loro emissione separatamente.

FRET Sommario

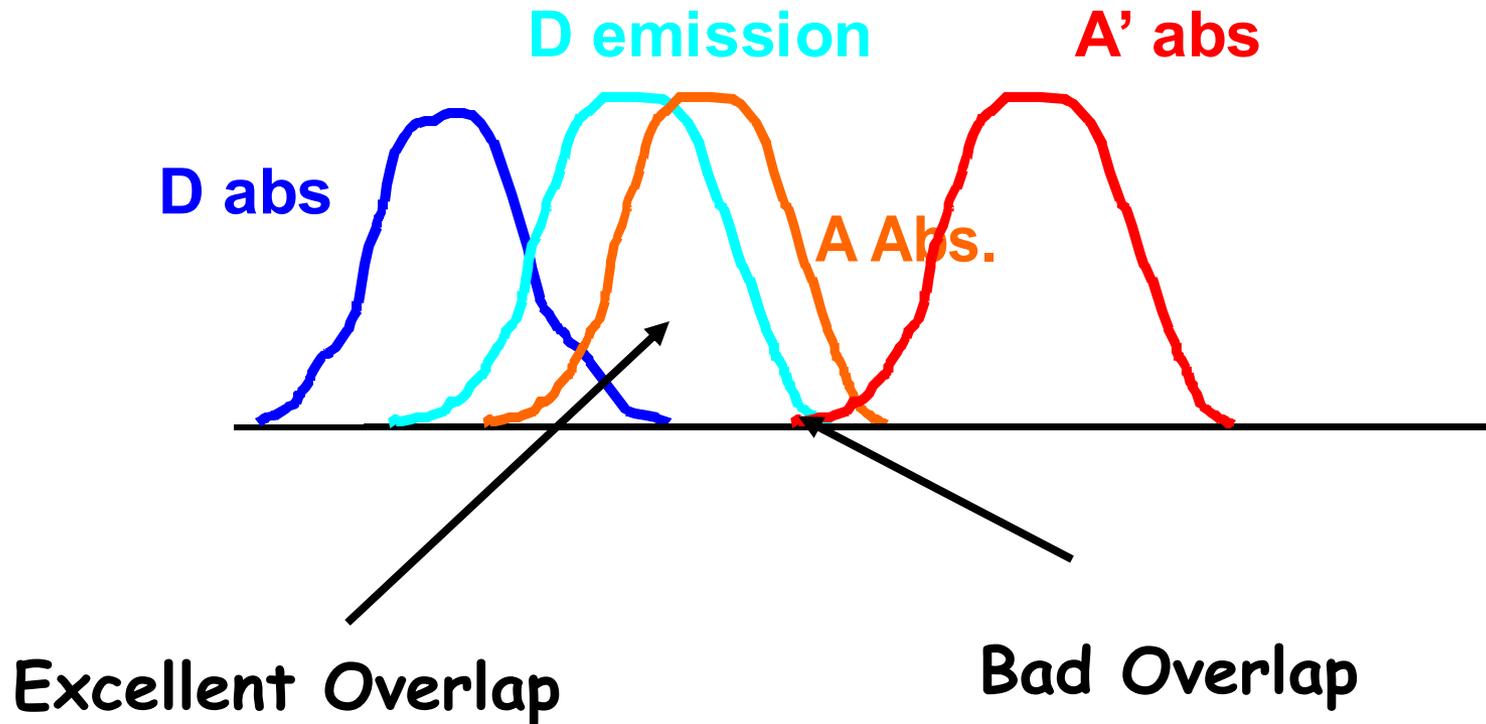
- FRET viene spesso applicato con un microscopio
- Può essere fatto nel dominio spettrale o temporale
- Ci sono alcuni problemi con il FRET
 - Filtrare la luce da diversi canali è critico
 - L'autofluorescenza può interferire con i segnali FRET
 - Interferenza spettrale da fluorescenza del donore o dell'accettore

The Förster Equation

Förster Equation

$$W_{DA} = 8.8 \cdot 10^{17} \cdot \frac{k_r^D}{n^4} \cdot \frac{\kappa^2}{R^6} \cdot \int \frac{\epsilon_A(\tilde{\nu}) F_D(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^4}$$

Overlap Integral



L'equazione di Förster

L'equazione di Förster è spesso scritta nella seguente forma:

$$W_{DA} = k_r^D \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

$$\text{With: } R_0^6 = 8.8 \cdot 10^{17} \cdot \frac{\kappa^2}{n^4} \cdot \int \frac{\varepsilon_A(\tilde{\nu}) \cdot F_D(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu}$$

Per sistemi fotosintetici R è tipicamente 1 nm, R_0 è tipicamente 8 nm,

$$k_r^D \approx 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \rightarrow W_{DA} \approx 10^{13} \text{ s}^{-1}$$

FRET – Risoluzione nel tempo

- Metodi di risoluzione nel tempo possono essere usati per determinare l'efficienza di FRET

$$E = 1 - \frac{\langle \tau_{AD} \rangle}{\langle \tau_D \rangle}$$

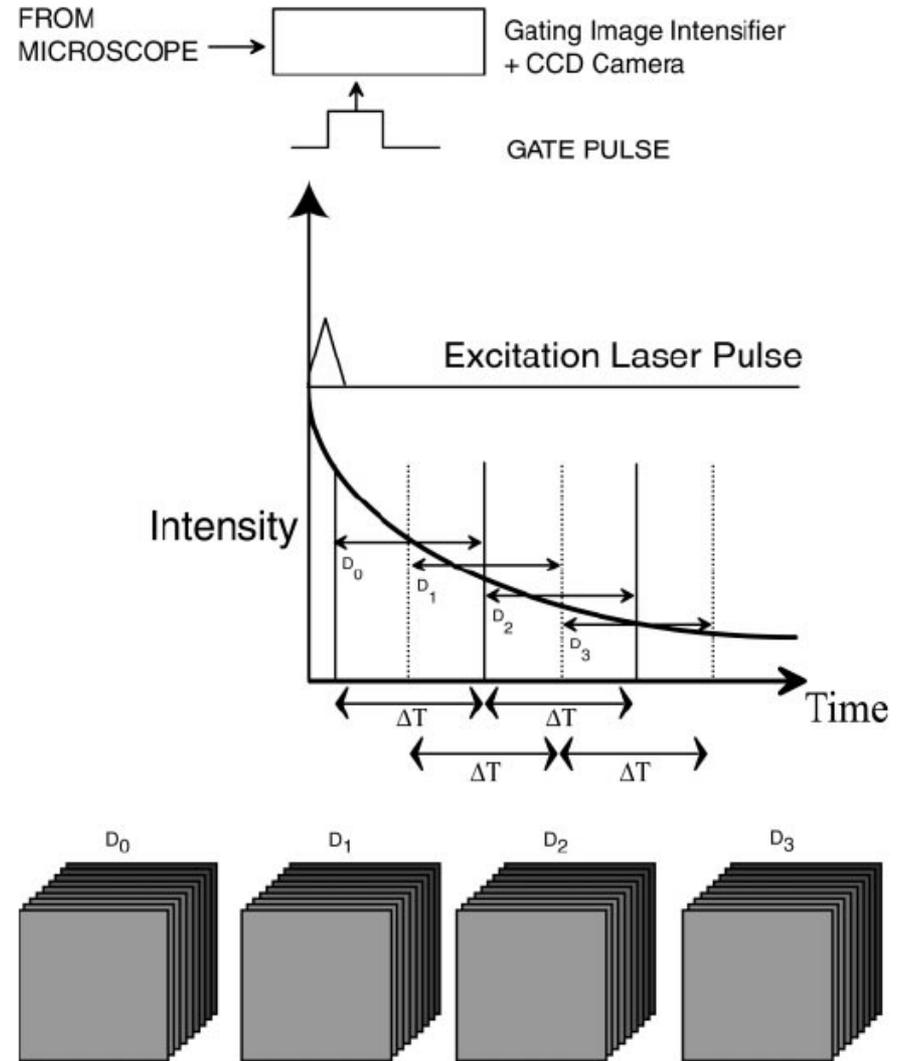
dove $\langle \tau_{AD,D} \rangle$ è il tempo di vita medio del donore in presenza ed assenza dell' accettore

FRET – Tecniche di risoluzione temporale

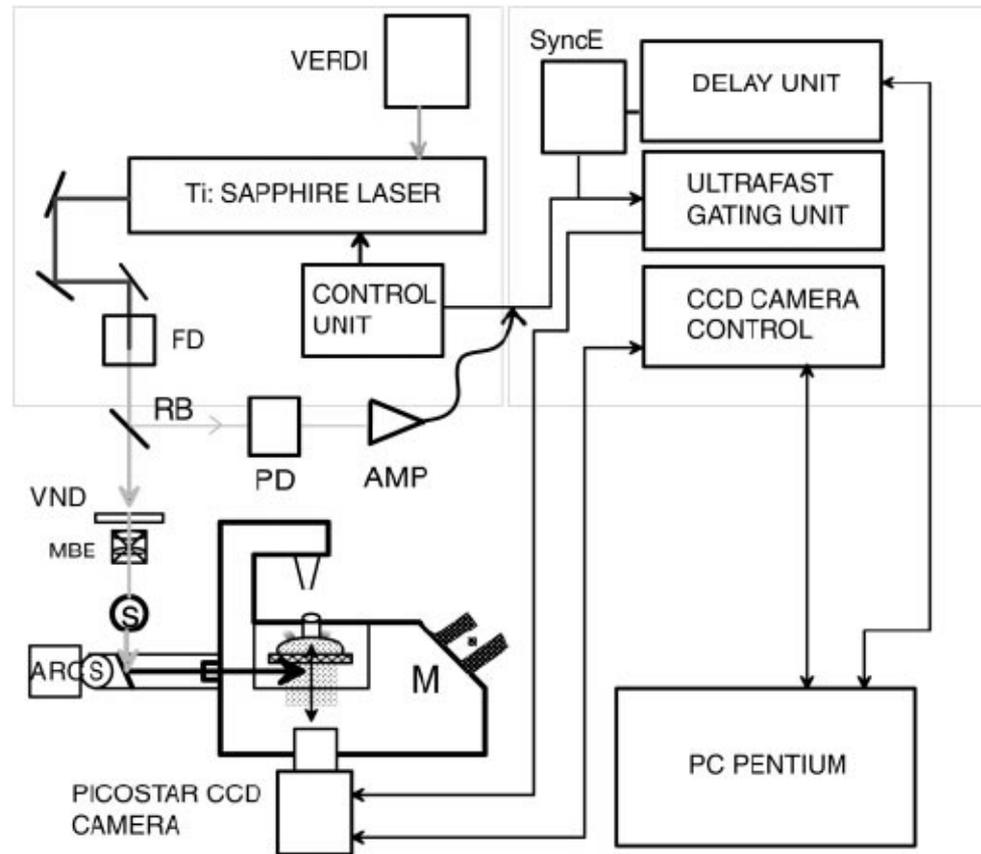
- Questo può essere fatto nel dominio del tempo guardando l'impulso di risposta:
 - Laser pulsato veloce (ns o più corto)
laser a stato solido o a colorante
 - sistema di rivelazione negli ordini fino ai picosecondi
Time-correlated single photon counting (TCSPC) or
intensified detectors (micro-channel plates)

FRET – Temporal Technique

Il rivelatore è sincronizzato su un certo tempo dopo il pulse laser e l'immagine viene acquisita. Questo processo viene ripetuto per un certo numero di ritardi di tempo fino a che la curva di decadimento viene costruita.



FRET – Temporal Technique



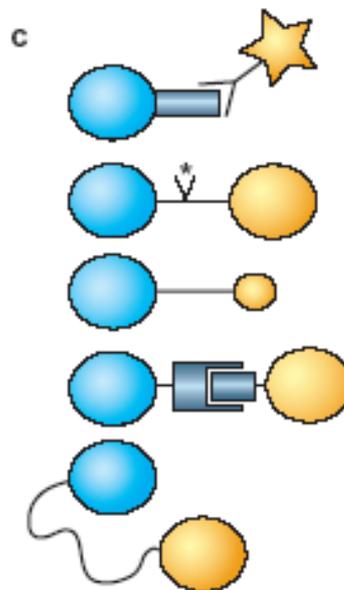
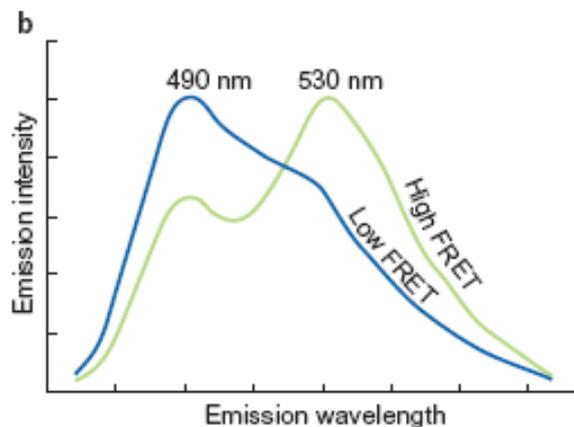
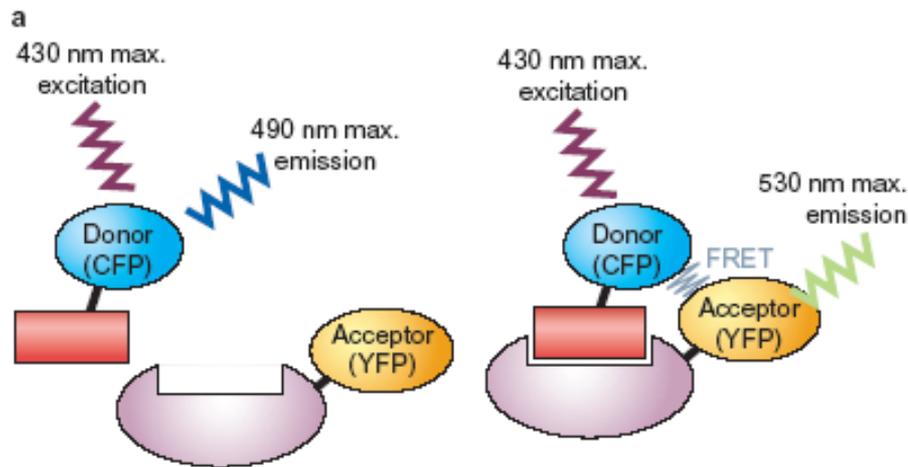
FRET – Temporal Technique

- Generalmente, il quenching del donore è osservato attraverso la cinetica di decadimento di emissione per il donore.
- L'irraggiamento da eccitazione dell'accettore interferisce con questo schema.

Applicazioni del FRET

- Struttura e conformazione di proteine
- Distribuzione spaziale e assemblamento dei complessi proteici
 - Interazione recettore/legante
 - Immunoassays
 - Analisi delle interazioni delle singole molecole
 - Struttura e conformazione di acidi nucleici
 - Real-time PCR assays and SNP detection
- Rilevazione dell'ibridizzazione degli acidi nucleici
- Primer-extension assays for detecting mutations
 - Automated DNA sequencing
 - Distribuzione e trasporto dei lipidi
 - Membrane fusion assays

Singola-molecola FRET



GFP fusion protein and fluorophore-coupled primary antibody undergo FRET⁴⁶⁻⁴⁸

Proteolytic cleavage between two fluorescent proteins eliminates FRET⁷⁰⁻⁷²

FRET acceptor fluorescent protein is sensitive to chemical environment⁶²

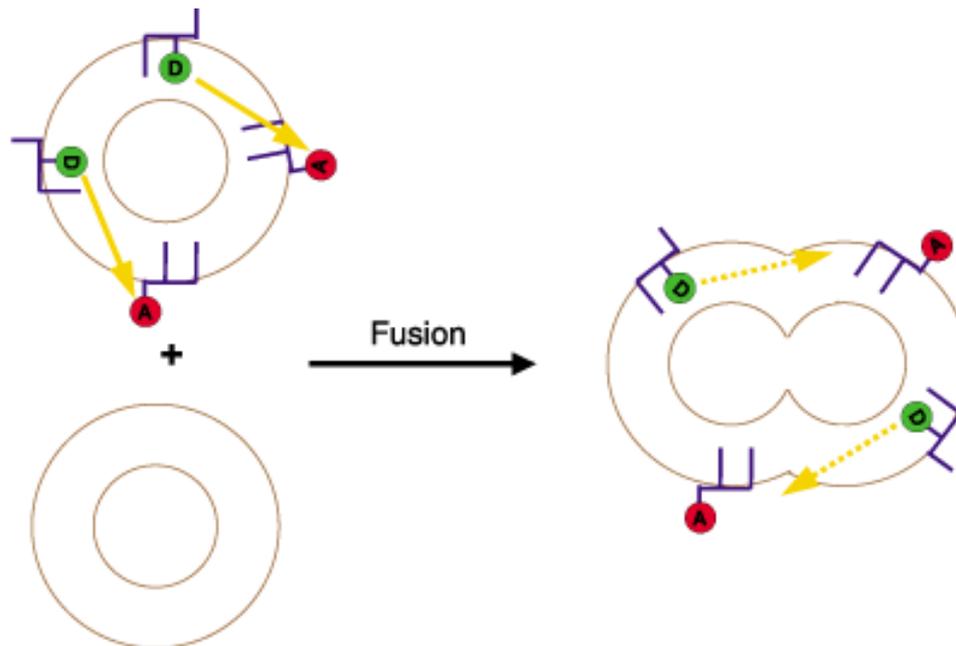
GFP fusion proteins interact and FRET^{40,41,73-75}

FRET efficiency varies with linker sequence conformation^{39,52,66-69}

Controllo del mixing dei lipidi : Accettori e Donori indipendenti

Rappresentazione di un mixing di lipidi basato su FRET. La separazione spaziale media del rivelatore lipidico donore (D) ed accettore (A) aumenta dopo la fusione di membrane titolate con membrane non titolate, risultante in efficienza diminuita di FRET dipendente dalla prossimità (rappresentata da frecce gialle).

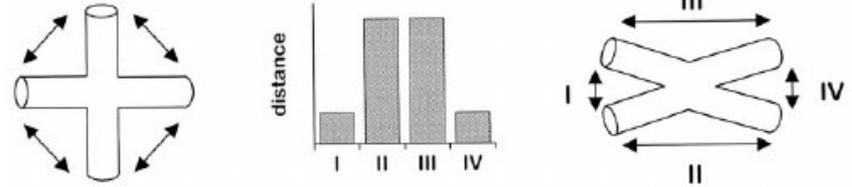
La minore efficienza FRET è registrata da un' aumentata intensità di fluorescenza del donore e diminuita intensità di fluorescenza dell'accettore.



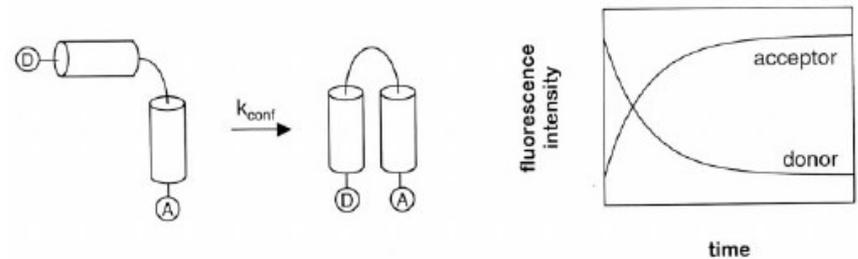
FRET applicazioni

Il FRET può essere usato con proteine o RNA per registrare la conformazione o i cambiamenti conformazionali.

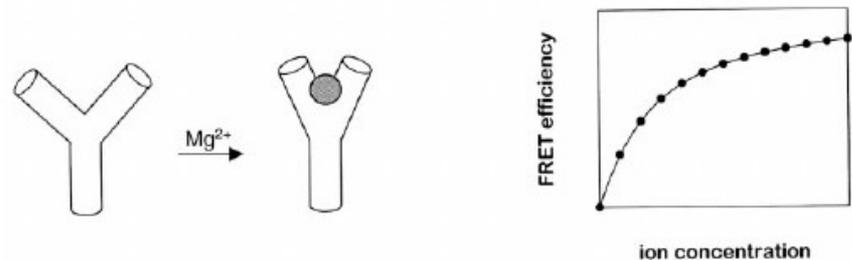
A Distance mapping



B Kinetics of conformational changes

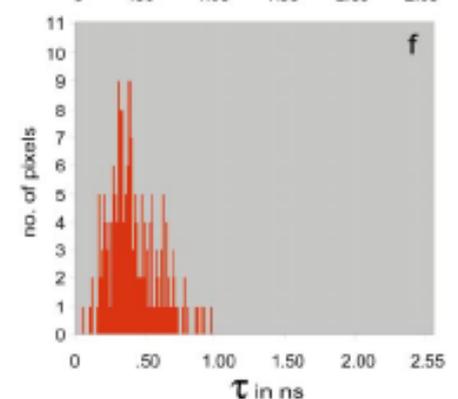
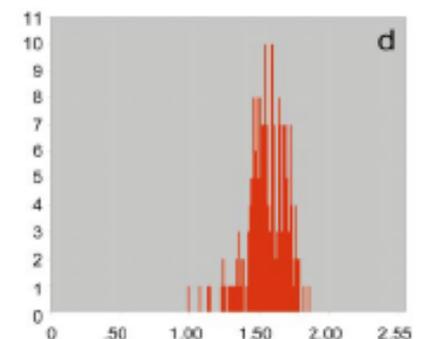
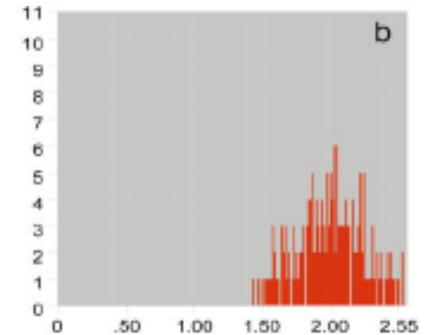
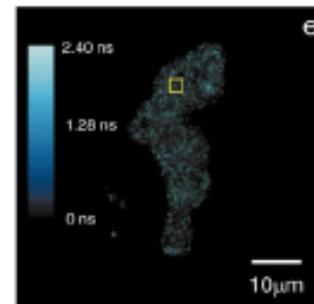
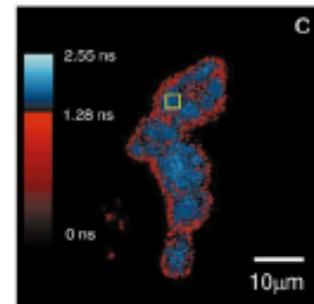
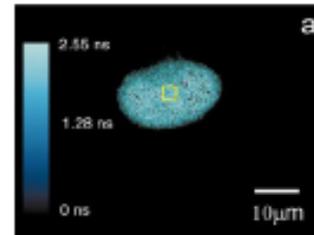


C Ion binding



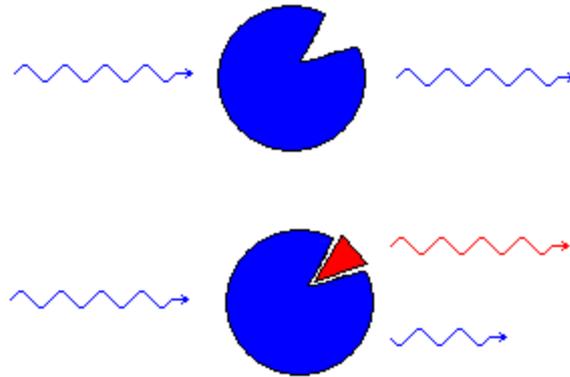
FRET applicazioni

Può essere usata per guardare all'interno della cellula e localizzare interazioni della proteina rilevando un cambiamento nel tempo di vita. In questo caso vengono usati CFP e YFP. In presenza dell'accettore, il tempo di vita del donore mostra due diversi tempi di vita- indicando due stati della proteina

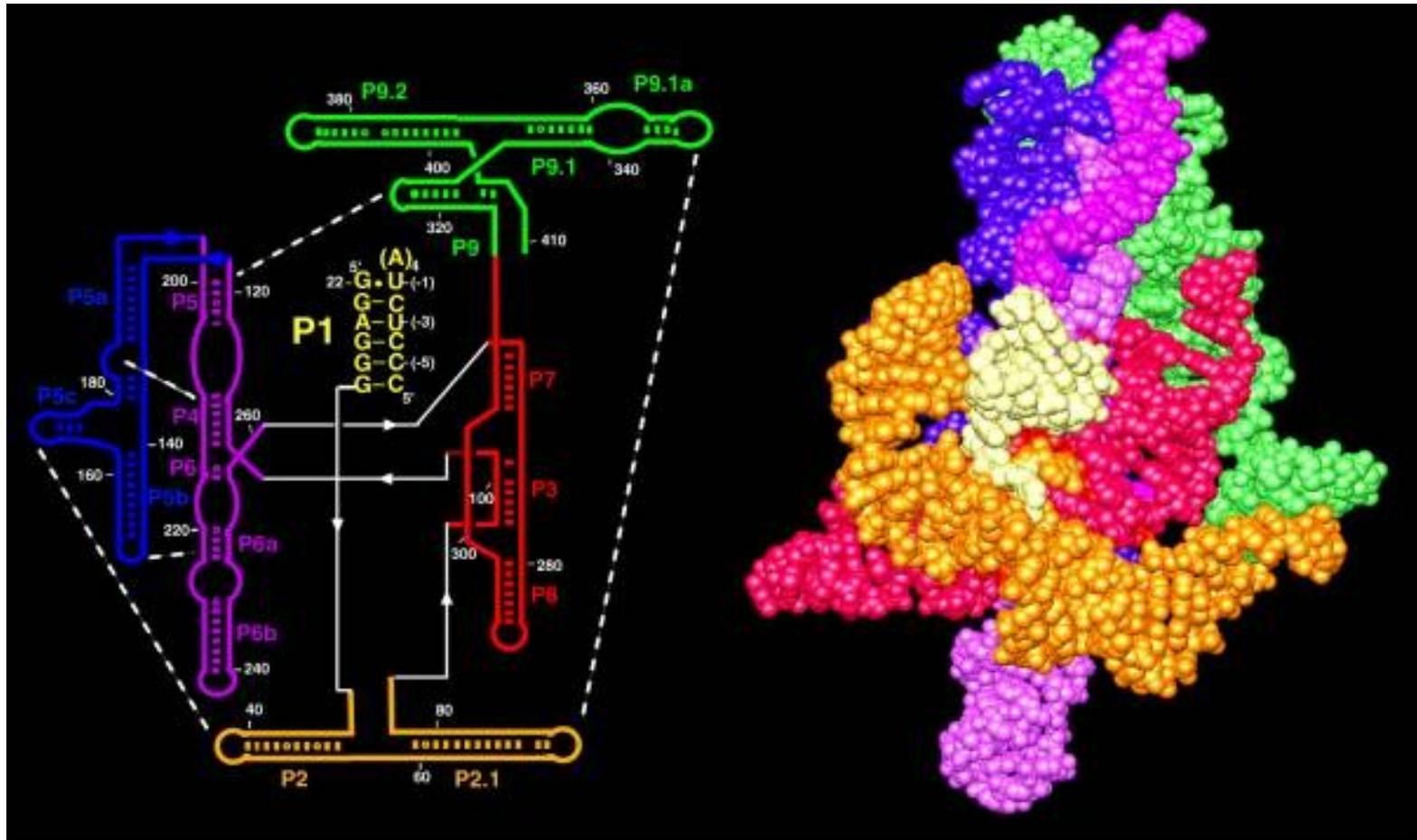


FRET Based Recognition Biosensor

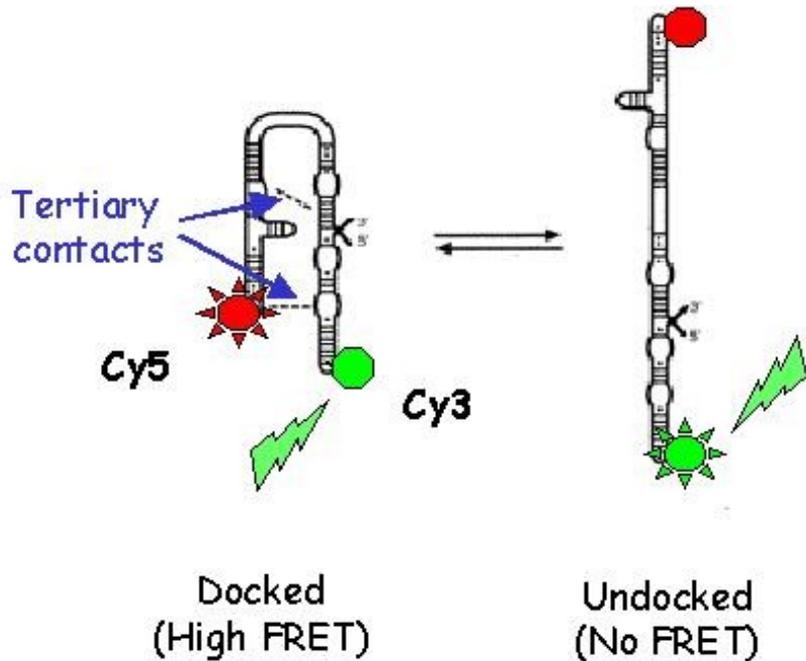
- Modified Biomolecule for Specificity



P4-P6 Folding Monitored by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

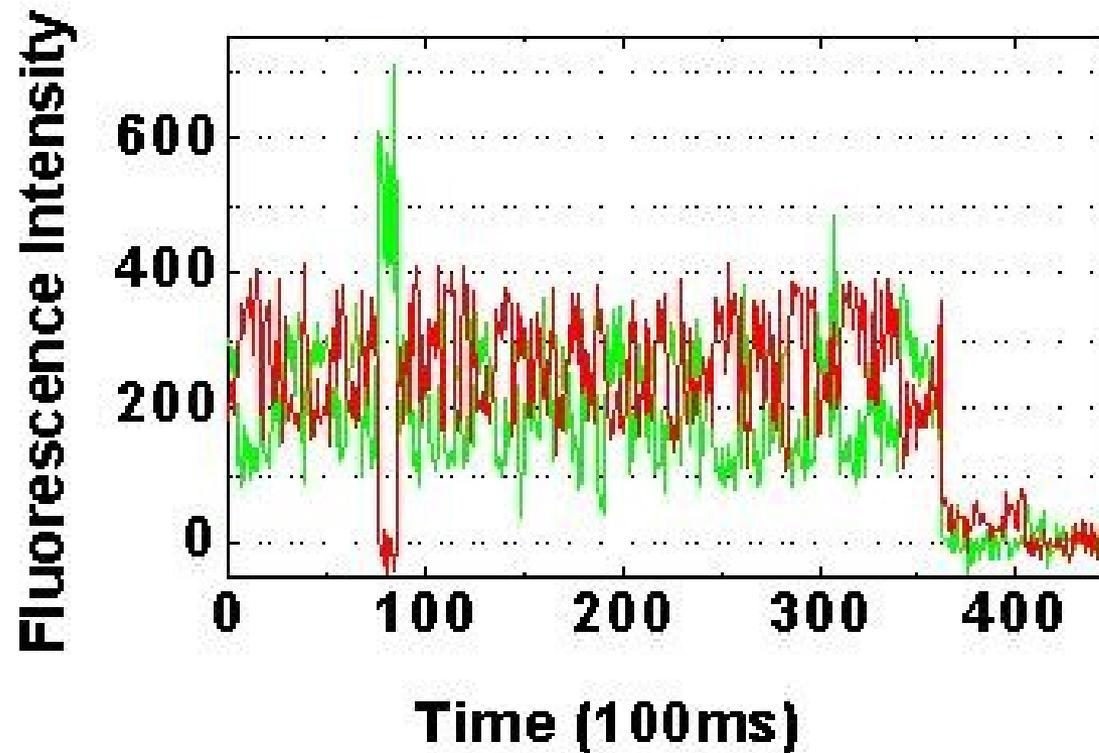


P4-P6 Folding Monitored by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

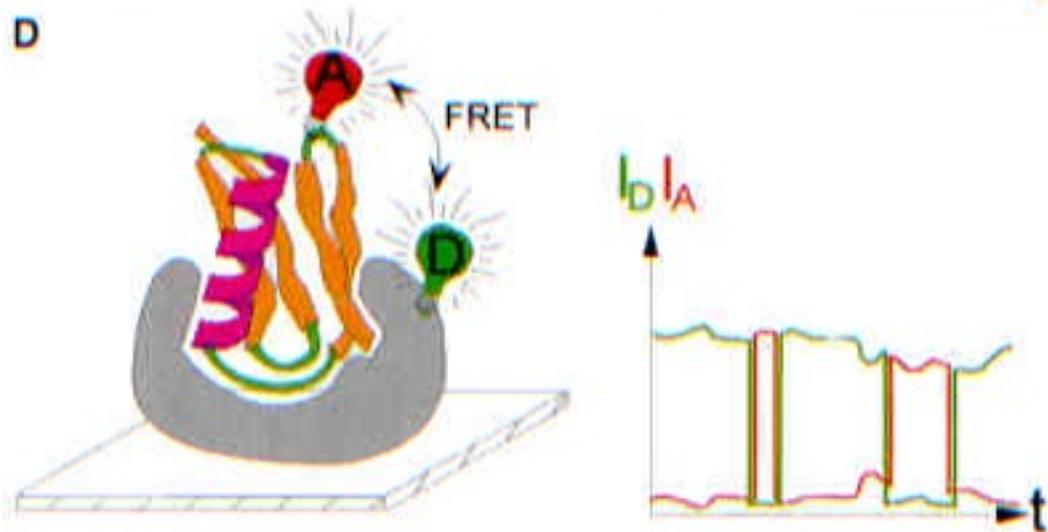
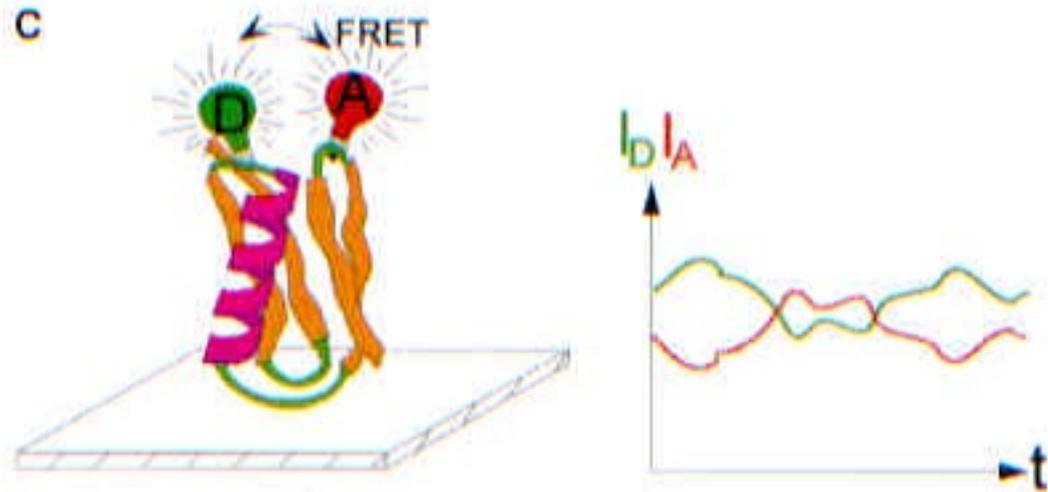


Due coloranti fluorescenti sono attaccati ai due lobi della forcina che viene stabilizzata da due sets di interazioni terziarie in presenza di Mg^{2+} . Il Cy3 è il donore e assorbe luce da un laser di 532 nm. Il Cy5 è l'acceptore e assorbe fotoni emessi dal Cy3 quando la catena è foldata o agganciata insieme, ma non quando non è agganciata. In bassa concentrazione di Mg^{2+} , ciascuna molecola spende parte del suo tempo in ciascun stato, andando avanti e indietro dagli stati stocasticamente. L'emissione dai due coloranti è spettralmente separata e quindi si possono misurare le diverse emissioni e calcolare le diverse efficienze FRET.

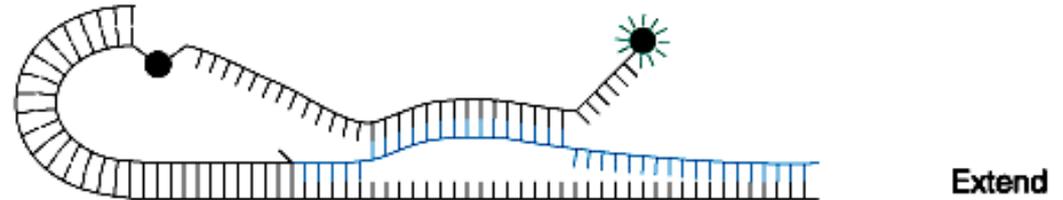
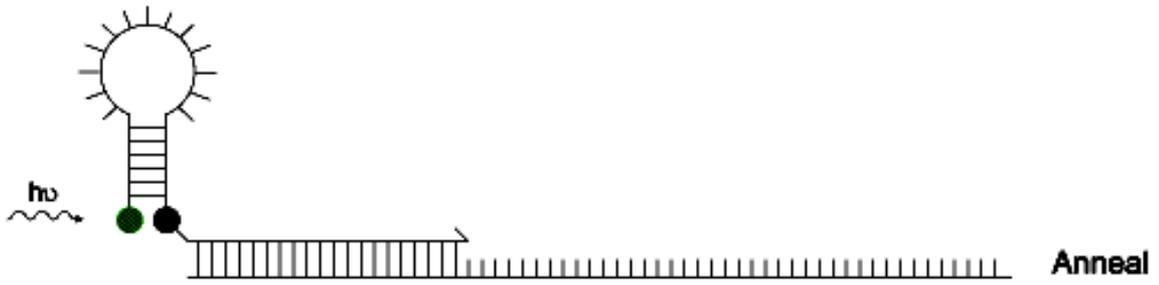
P4-P6 Folding Monitored by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)



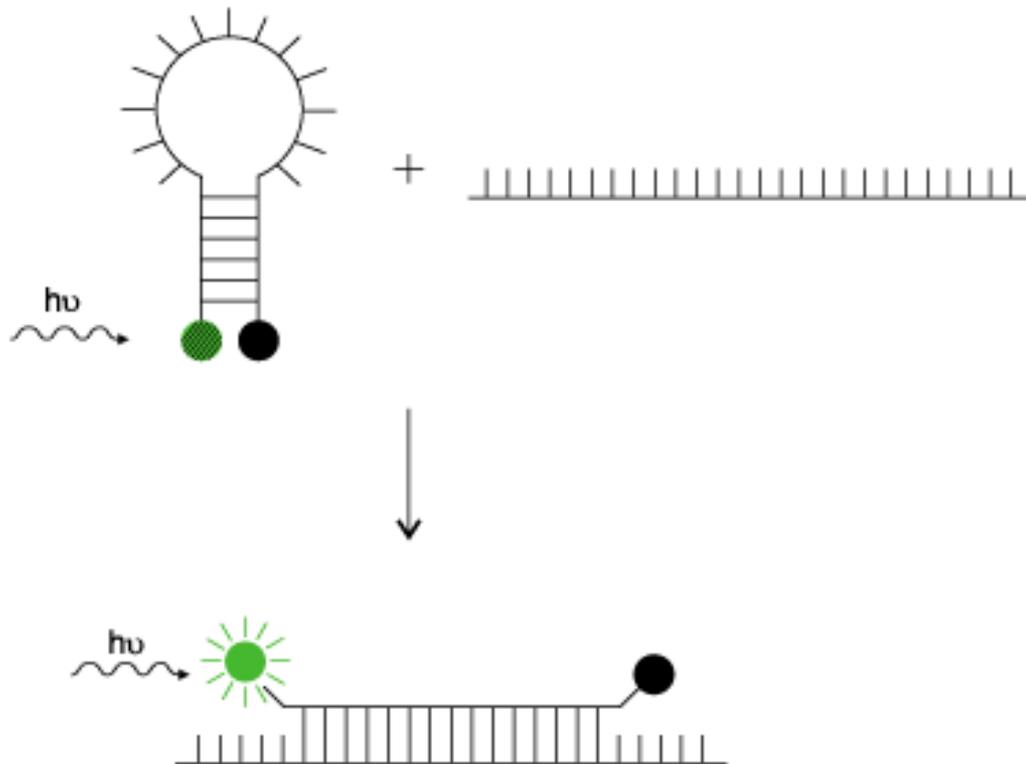
Molecular FRET



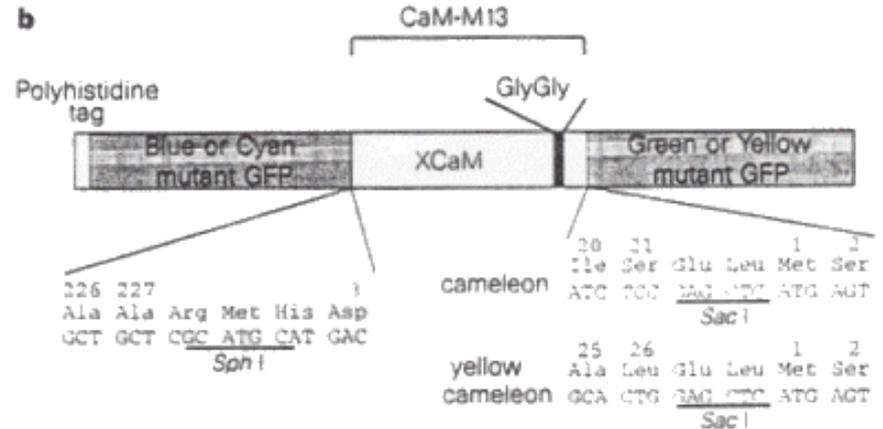
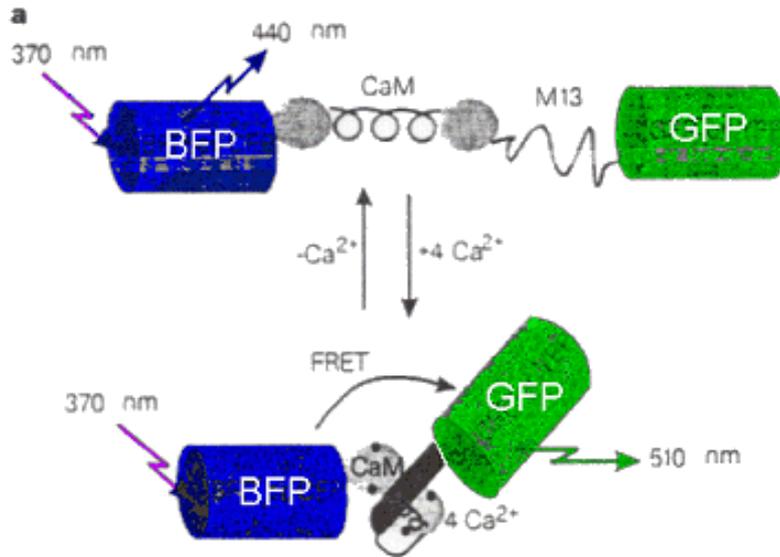
Schematic representation of real-time PCR with Scorpion primers. In the hairpin loop structure, the quencher (black circle) forms a nonfluorescent complex with the fluorophore (green circle). Upon extension of the amplicon, the Scorpion probe hybridizes to the newly formed complementary sequence, separating the fluorophore from the quencher and restoring the fluorescence.



Schematic representation of molecular beacons. In the hairpin loop structure, the quencher (black circle) forms a nonfluorescent complex with the fluorophore (green circle). Upon hybridization of the molecular beacon to a complementary sequence, the fluorophore and quencher are separated, restoring the fluorescence.



Fluorescence Resonance Energy Transfer

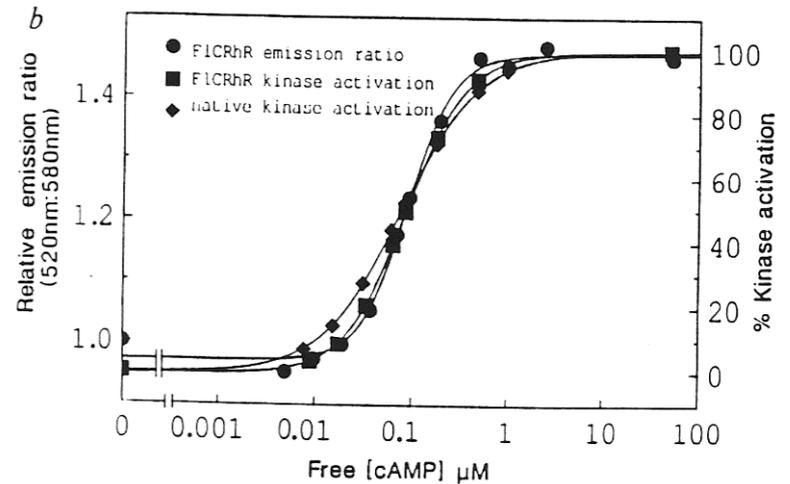
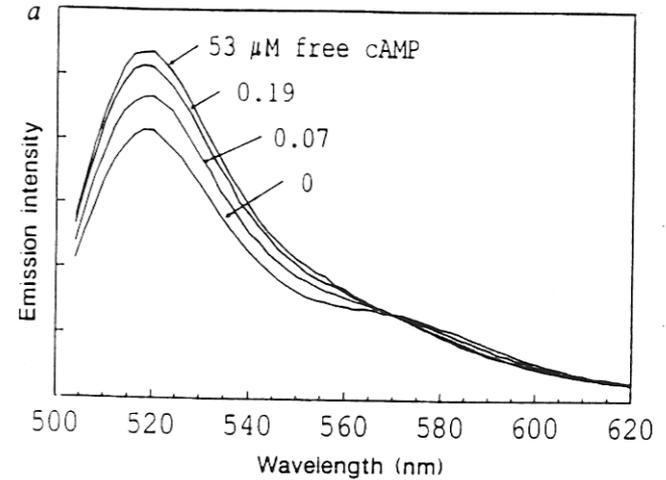
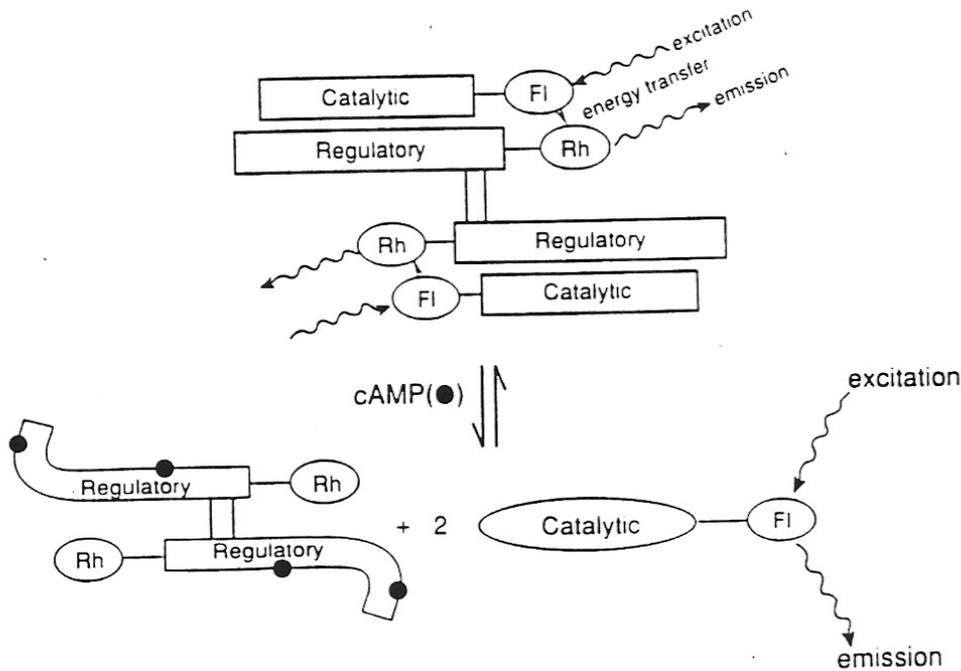


$$[Ca^{2+}] \propto \frac{I_{Em510 \text{ verde}}}{I_{Em440 \text{ blu}}}$$

A. Miyawaki et al. Nature (1997) 388: 882-887

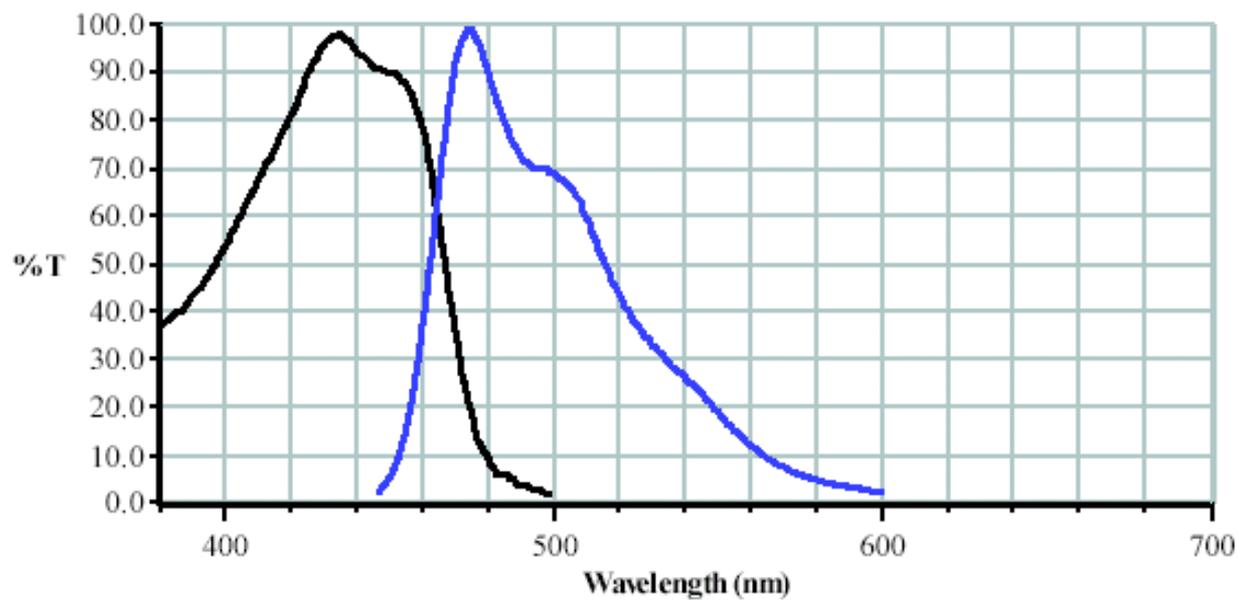
Risonanza di fluorescenza

Protein Kinasi A



Risposte di FICRhrR al cAMP in vitro. La figura superiore mostra le variazioni nello spettro di emissione di FICRhrR quando si titola con cAMP (eccitazione della fluoresceina a 495 nm). La figura inferiore mostra il rapporto delle emissioni 520/580 confrontato con l'attivazione della chinasi misurata con metodi biochimici. Adams et al. (1991) Nature 349:694

Figure 1

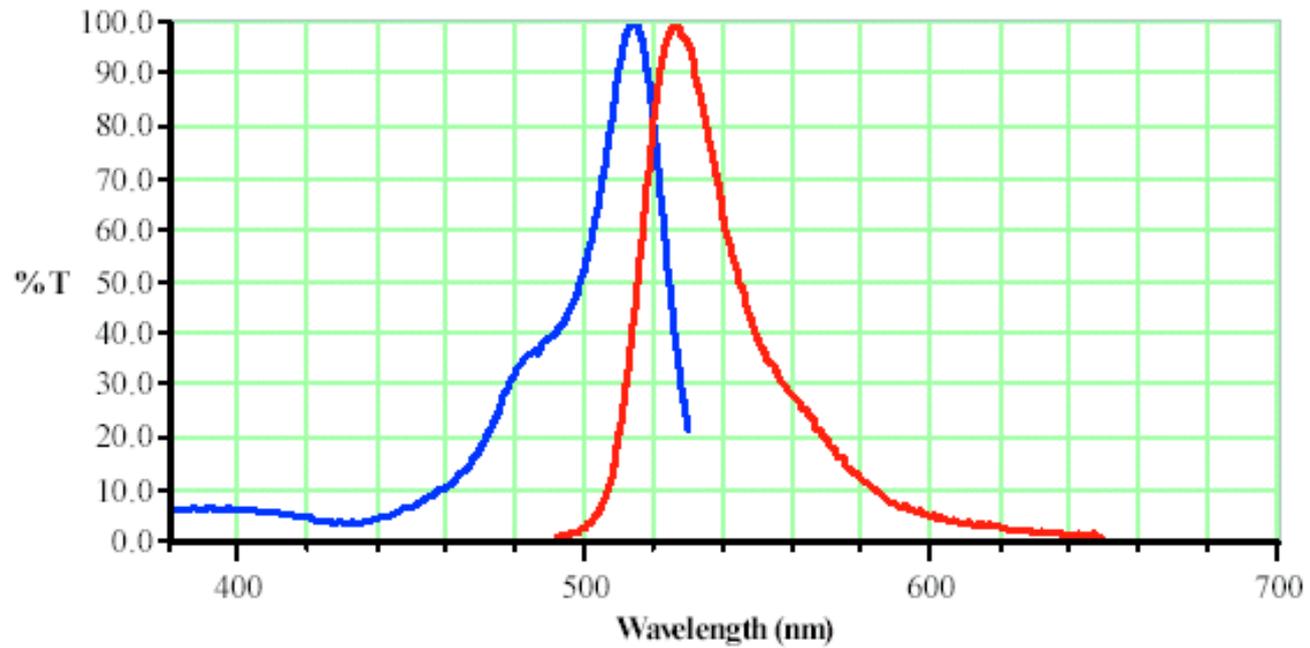


Cyan Fluorescent Protein (CFP)

black graph = absorption

blue graph = emission

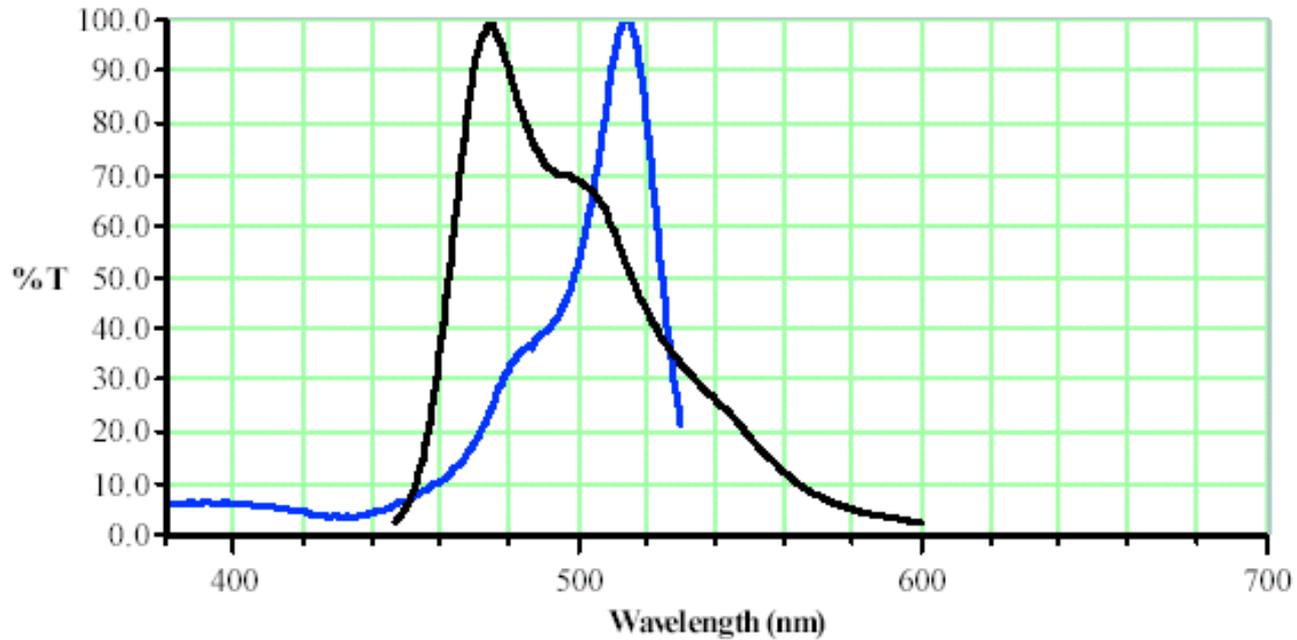
Figure 2



Yellow Fluorescent Protein (YFP)

blue graph = absorption
red graph = emission

Figure 3



CFP emission, YFP Absorption

black graph = cyan emission
blue graph = yellow absorption

The emission curve (at least at the maxima) for the cyan protein almost completely overlaps with the absorption curve for the yellow protein, which is one of the prerequisites for FRET (Figure 3), and would seem to make the two molecules an excellent FRET pair.

Beamsplitter (2 Detectors)

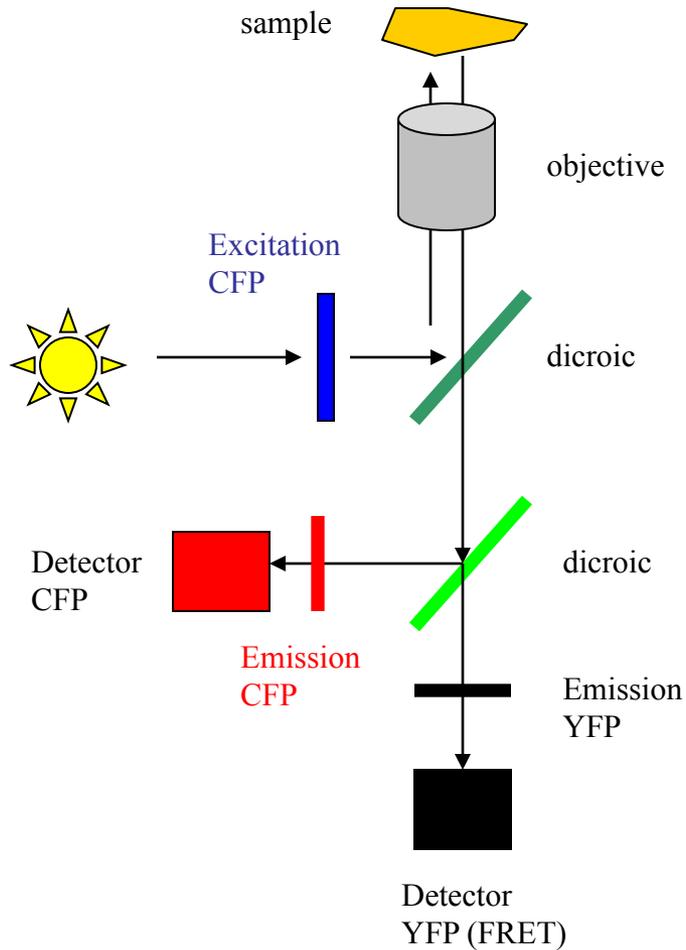
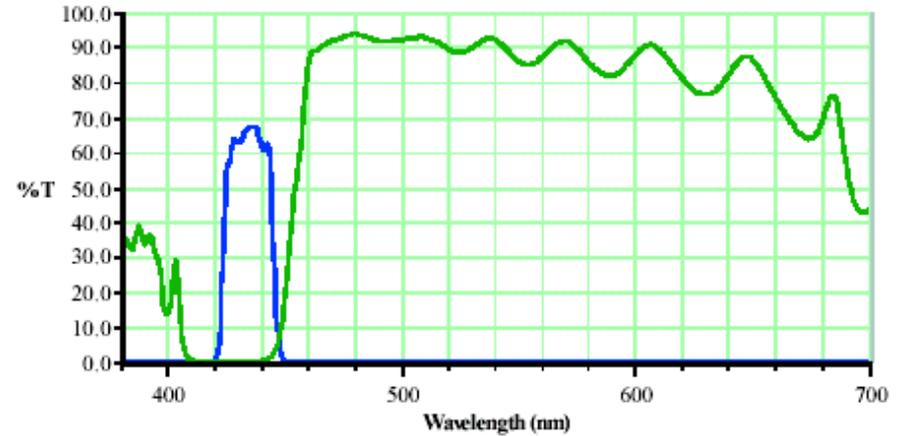
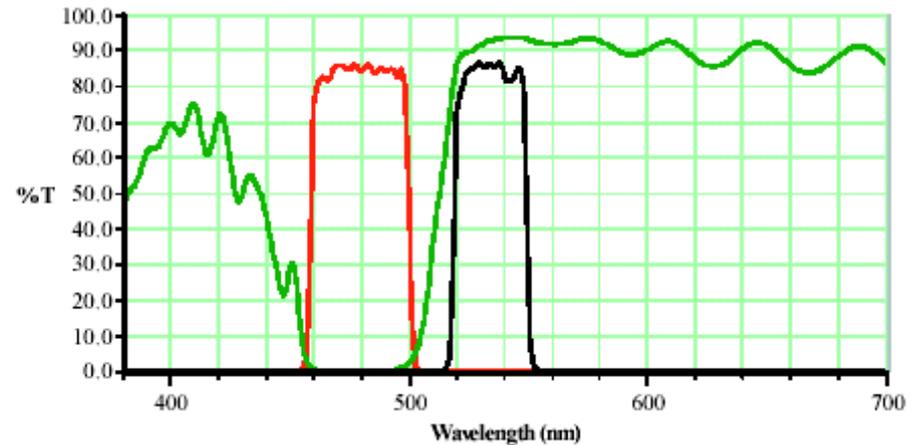


Figure 4



Typically mounted into microscope

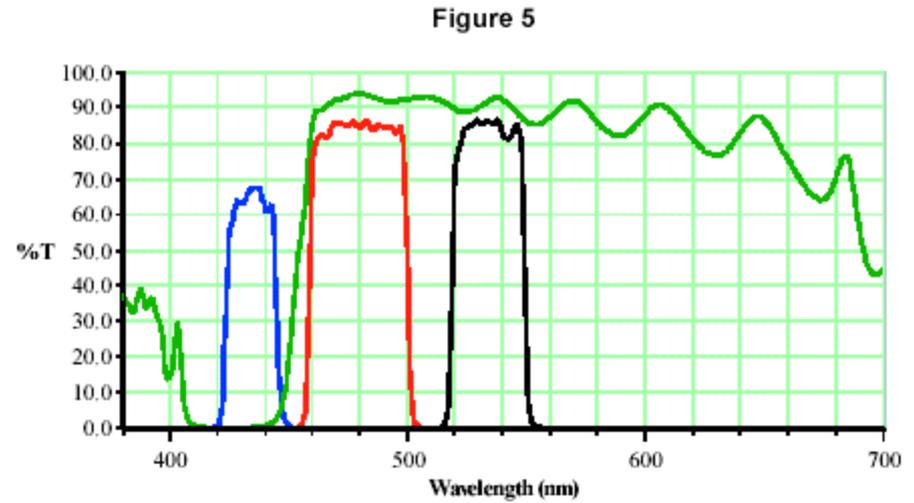
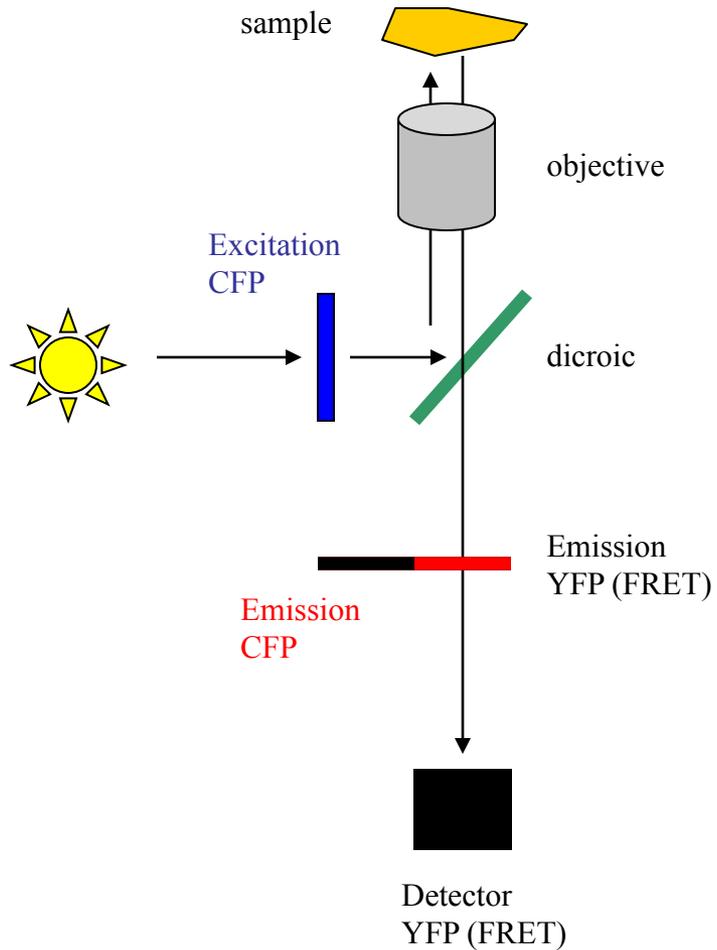
blue graph = d436/20x cyan exciter filter
green graph = 455dclp, dichroic mirror



Emission beamsplitter set, mounted in the splitter units

red graph = d480/40m, cyan emission filter
green = 510dclp, dichroic
black = d535/30m, yellow emission filter

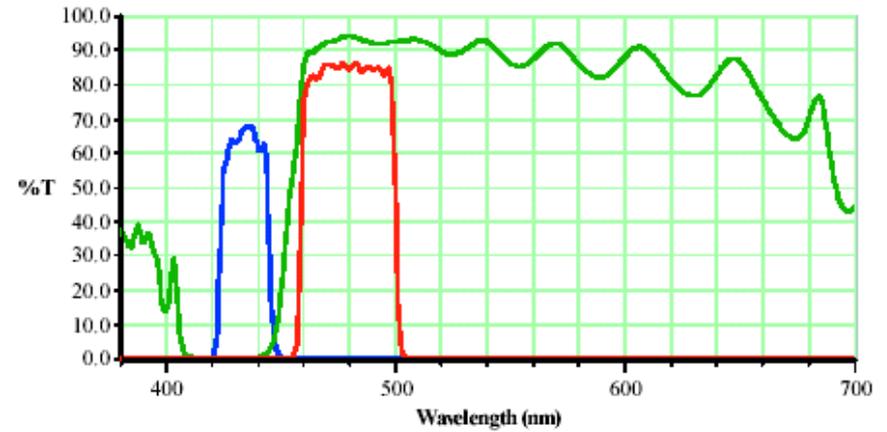
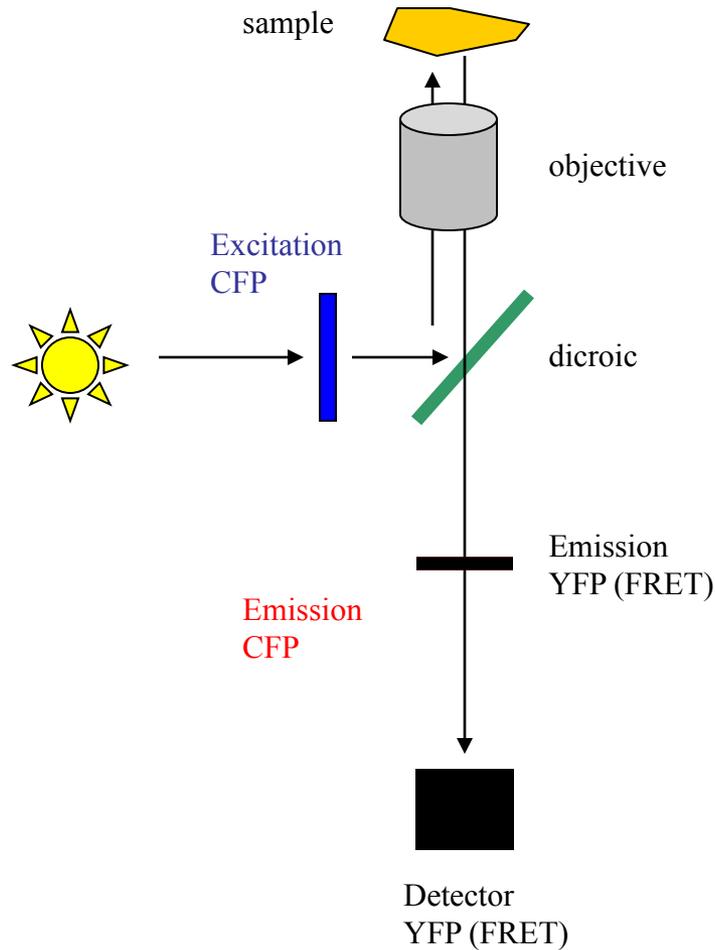
Emission Filter Changer (1 Detector)



CFP excitation/beamsplitter, with CFP and YFP single emitters

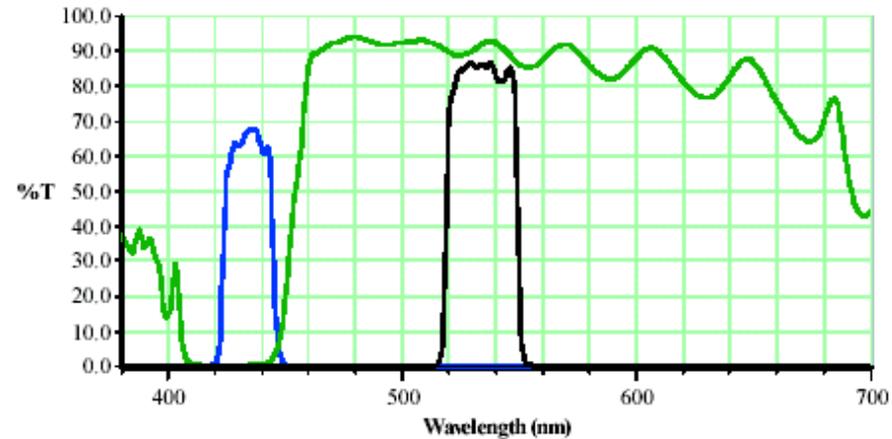
blue graph = d436/20x, cyan exciter
 green = 455dclp, cyan dichroic
 red = d480/40m, cyan emitter
 black = d535/30m, yellow emitter
 (please note that there are several possible YFP emitters...)

Two separate cubes (1 Detector)



CFP set, Chroma 31044v2

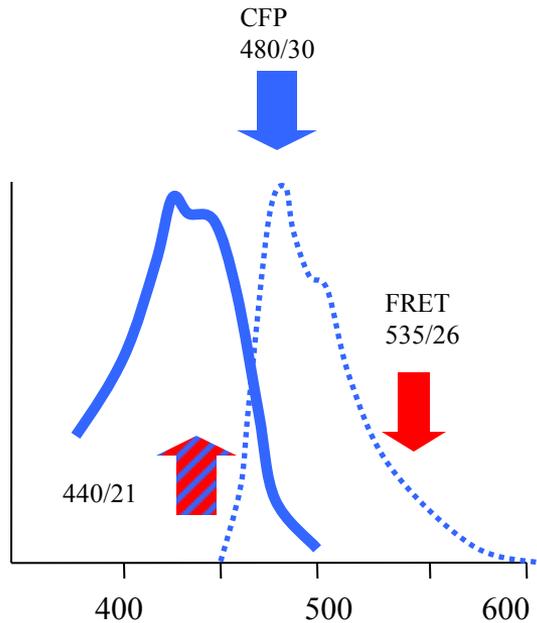
blue = d436/20x, excitation filter
 green = 455dclp, dichroic mirror
 red = d480/40m, emission filter



CFP excitation and beamsplitter, with YFP emission filter

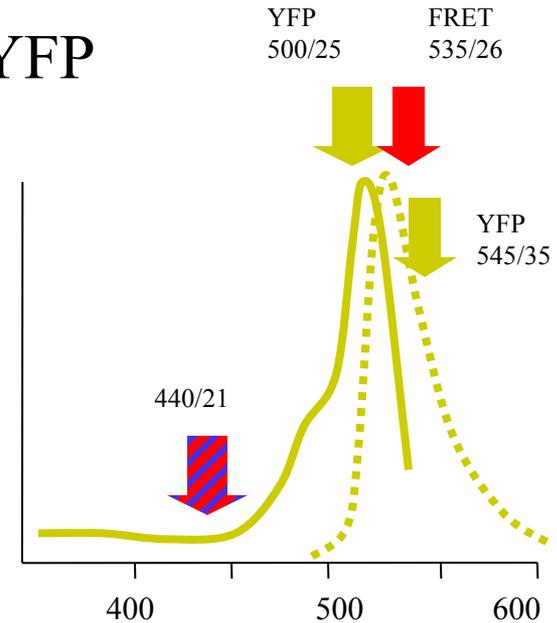
blue graph = d436/20x, CFP excitation filter
 green = 455dclp, CFP dichroic
 black = d535/30m, YFP/FRET emission filter
 (please note that there are several possible YFP emission options...)

CFP



$$a = \frac{FRET - filterset}{CFP - filterset} = 0.19$$

YFP



$$b = \frac{FRET - filterset}{YFP - filterset} = 0.59$$

Quando vi sono sia CFP che YFP, anche se non si verifica FRET, si misura comunque un segnale I_{FRET} quando si usa il FRET filterset. Quando si verifica FRET, la CFP libera contribuisce a I_{FRET} per la frazione a (0.19) del segnale I_{CFP} . Similmente, quando si verifica FRET, la YFP libera contribuisce a I_{FRET} per la frazione b (0.59) del segnale I_{YFP} . L'intensità della vera FRET (net FRET, nF) è data quindi da:

$$nF = I_{FRET} - I_{CFP} \cdot a - I_{YFP} \cdot b$$