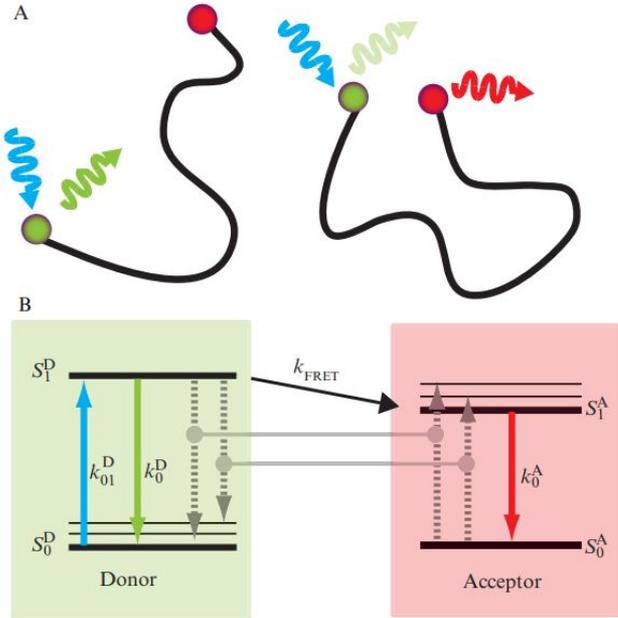


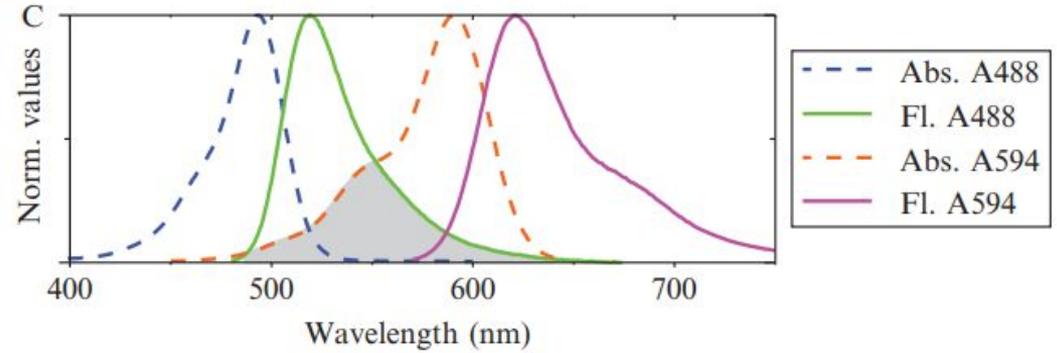
Мультипараметрический FRET. Основы и пример использования.

Князева Анастасия

Общая теория FRET



$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad - \quad \text{интеграл перекрытия}$$



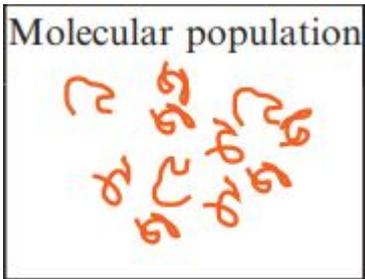
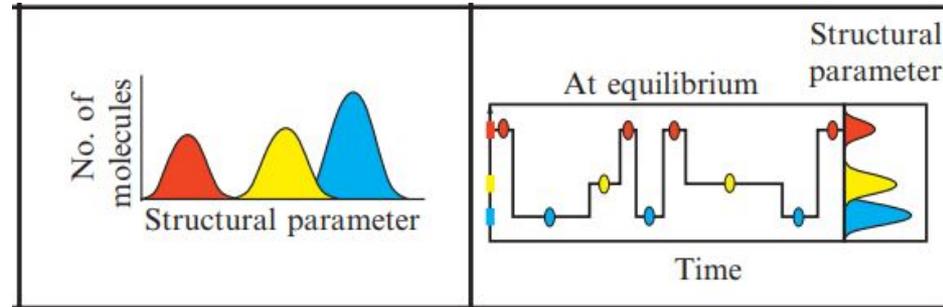
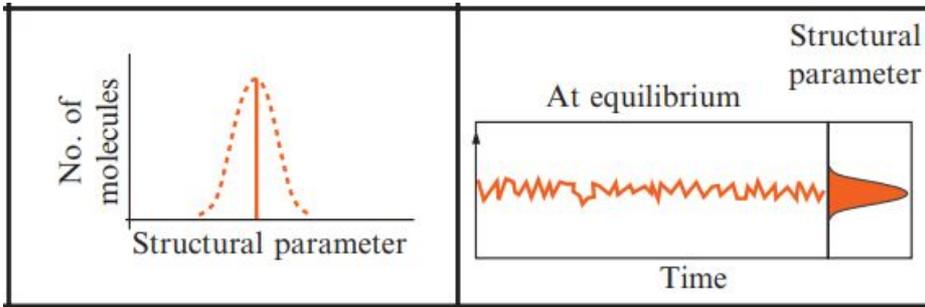
$$k_{\text{FRET}} = \frac{1}{\tau_{\text{D}(0)}} \left(\frac{R_0}{R_{\text{DA}}} \right)^6$$

$$E = \frac{1}{1 + (R_{\text{DA}}/R_0)^6} \quad - \quad \text{эффективность FRET}$$

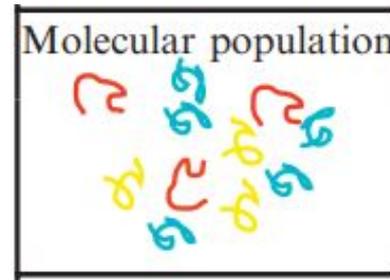
$$R_0 = \left[\frac{9(\ln 10) J \kappa^2 \Phi_{\text{FD}(0)}}{128\pi^5 N_A n^4} \right]^{1/6}$$

Фёрстеровский радиус

Ensemble versus Single-molecule FRET



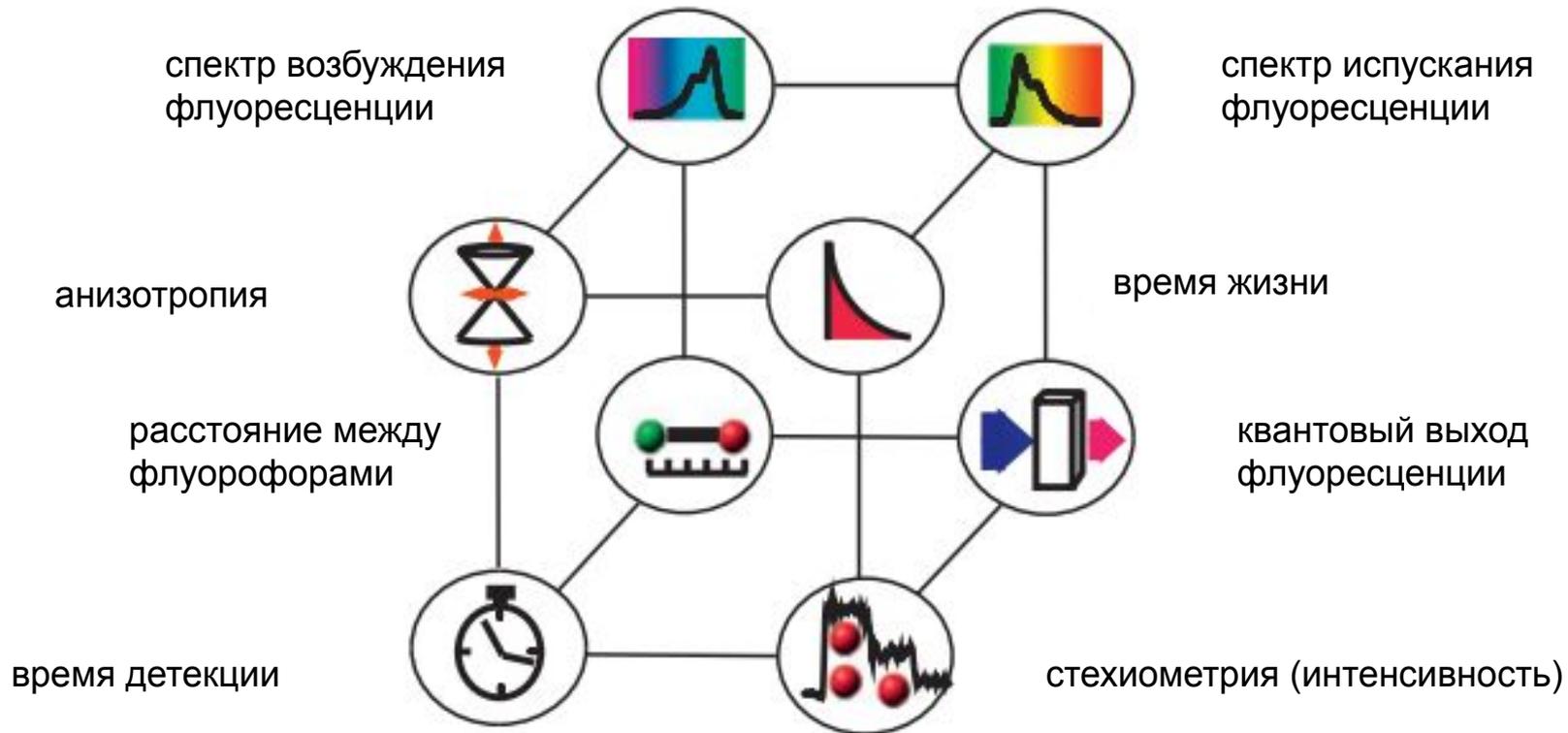
Хорошая статистика,
высокое отношение
сигнал-шум
Неполное описание
гетерогенных систем

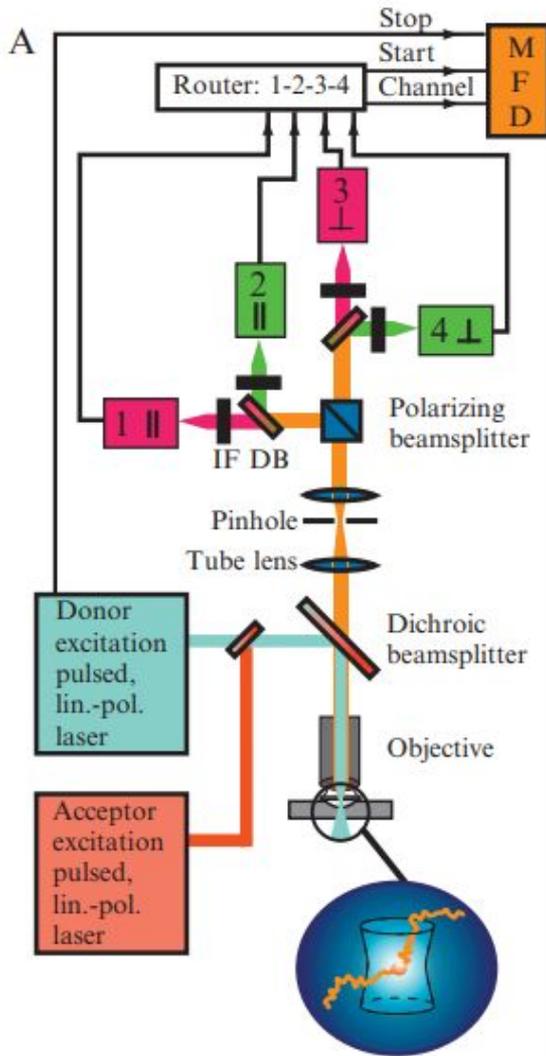


“Видит” гетерогенность
популяции и
переходные состояния
Может быть низкое
отношение сигнал-шум

MFD - multiparameter fluorescence detection

8D-пространство измеряемых параметров





MFD: реализация с использованием конфокального микроскопа

Другие подходы для smFRET:

- total internal reflection microscopy (TIRFM)
- 2-photon excitation microscopy (2PM)

Проблемы FRET, частично решаемые с помощью MFD

Отличать локальное тушение D от переноса энергии на A и определять точно Фёрстеровский радиус

Различия в подвижности меток и усреднение параметра k

Приближение: один пик соответствует одному состоянию

Гибкие линкеры и др. проблемы

Анализ двумерных диаграмм (эффективность и время жизни D в присутствии A) и анализ субпопуляций

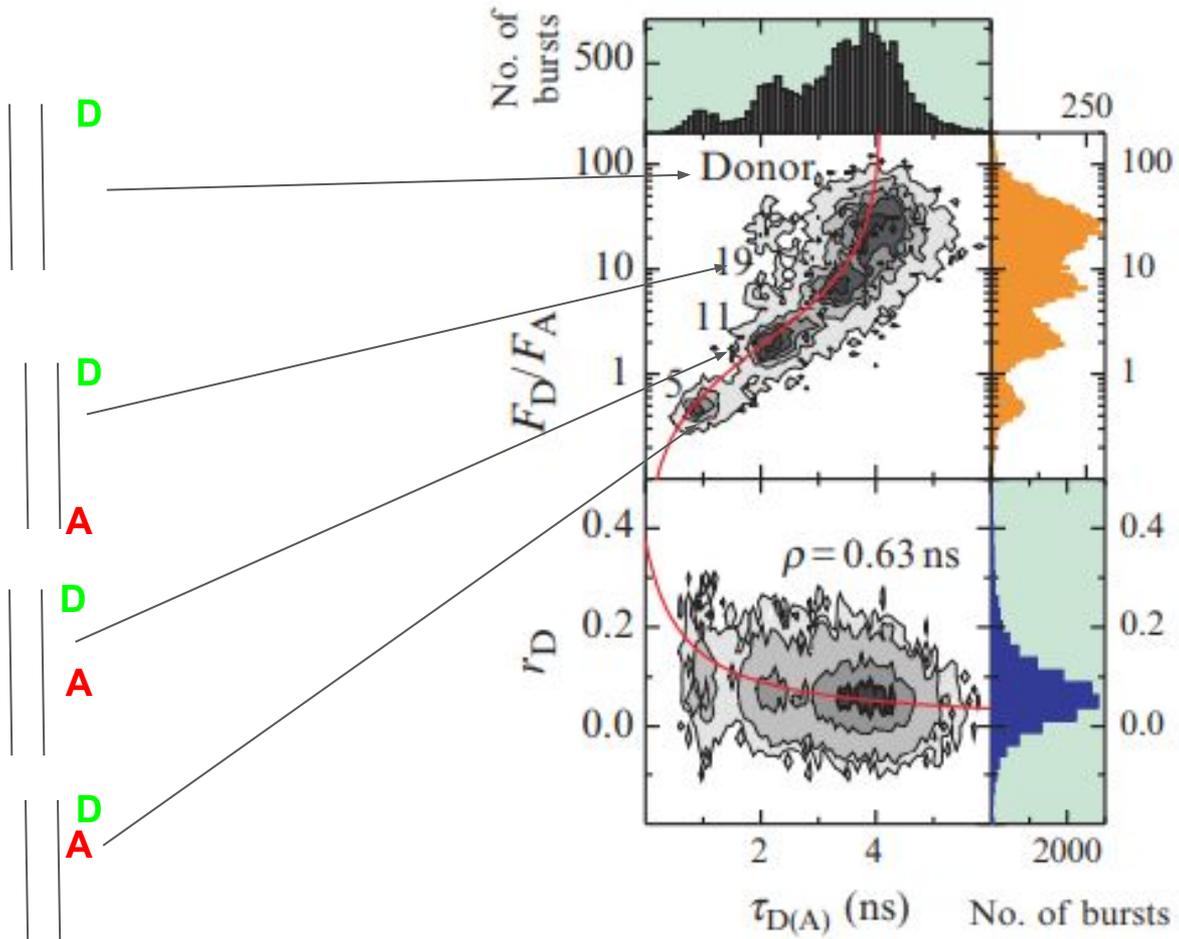
Проверка гистограмм анизотропии и времени жизни D при A

2D диаграммы FRET и анализ динамики с помощью PDA, FCS

Можно убирать некоторые шумы с помощью PDA и правильно усреднять FRET

$$E(\langle R_{DA} \rangle) \neq \langle E(R_{DA}) \rangle$$

Примеры двумерных диафрагм



Perrin eq. (красная линия)

fundamental anisotropy of D.

$$r_D = \frac{r_0}{1 + \tau_{D(A)} / \rho_D}$$

↑ анизотропия ↓ r_0 ↑ ρ_D

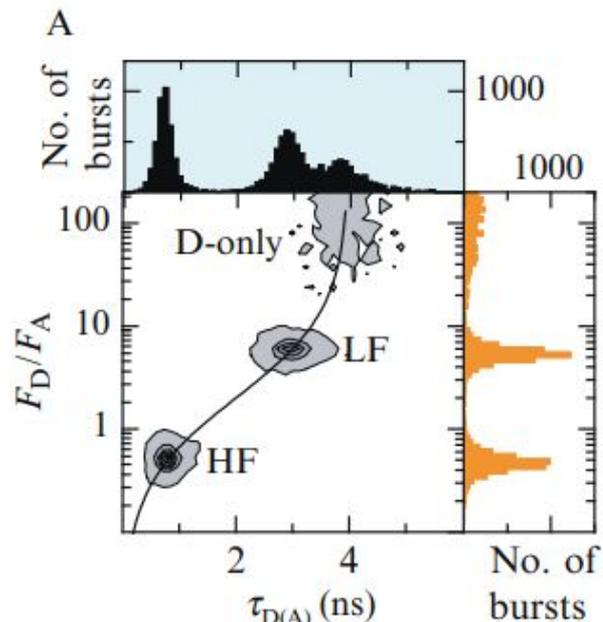
rotational correlation time of D
(связан с k_2 и, соответственно, R_0)

Пики всех субпопуляций
должны лежать на одной
красной кривой
Или нужно пересчитывать R_0 !

“Эталон” и возможные отклонения

тушение донора

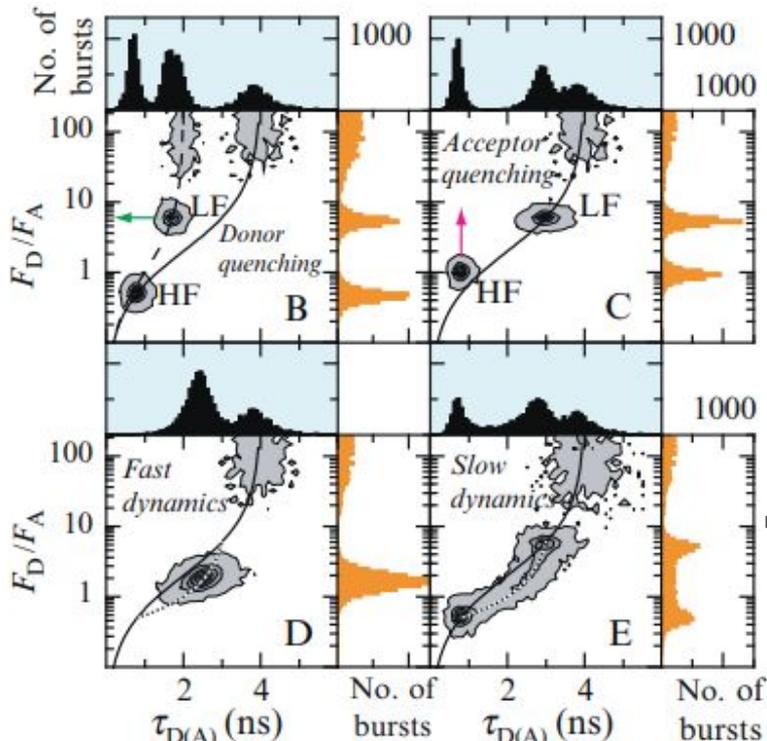
тушение акцептора



Две статические популяции и немного свободного донора

$$\left(\frac{F_D}{F_A}\right)_{\text{static}} = \frac{\Phi_{FD(0)} \tau_{D(A)}}{\Phi_{FA} \tau_{D(0)} - \tau_{D(A)}}$$

static FRET line



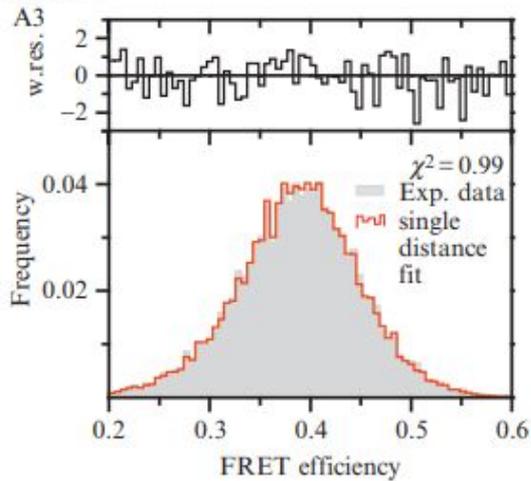
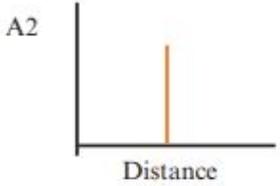
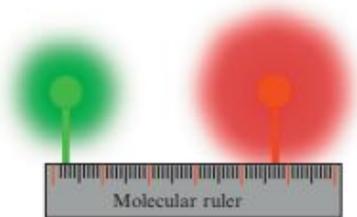
быстрая динамика переходов

медленная динамика переходов

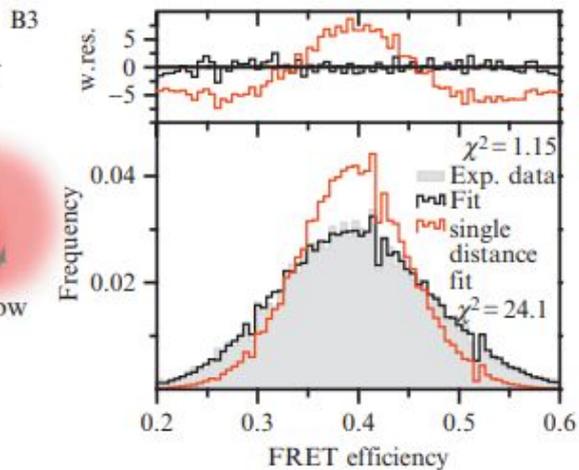
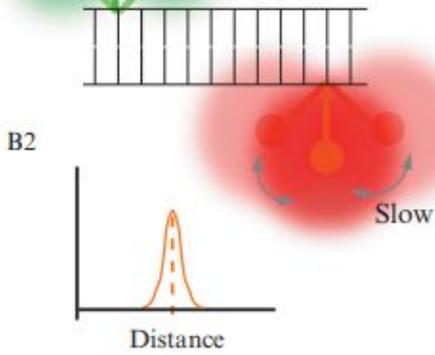
→ константы скорости переходов

PDA - photon distribution analysis

Ideal case



Example of real case



Пример: построение кинетической модели откручивания ДНК и разборки нуклеосомы



ARTICLE

DOI: [10.1038/s41467-018-06758-1](https://doi.org/10.1038/s41467-018-06758-1)

OPEN

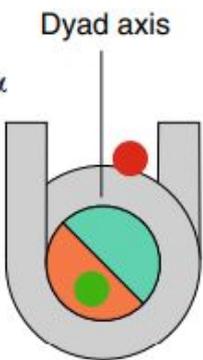
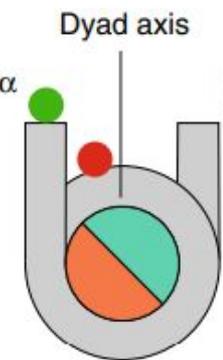
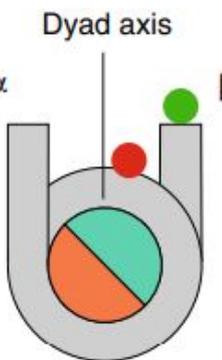
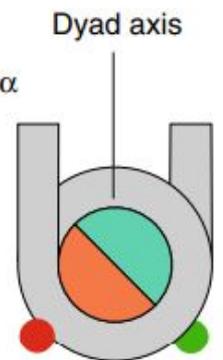
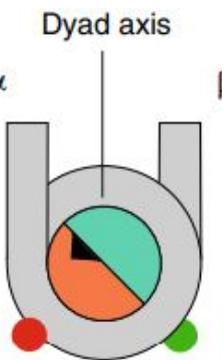
High precision FRET studies reveal reversible transitions in nucleosomes between microseconds and minutes

Alexander Gansen¹, Suren Felekyan², Ralf Kühnemuth², Kathrin Lehmann ^{1,2}, Katalin Tóth¹,
Claus A. M. Seidel ² & Jörg Langowski ¹

<https://www.nature.com/articles/s41467-018-06758-1>

Позиции меток в экспериментах

601 W sequence, α - Weak end, β - strong end

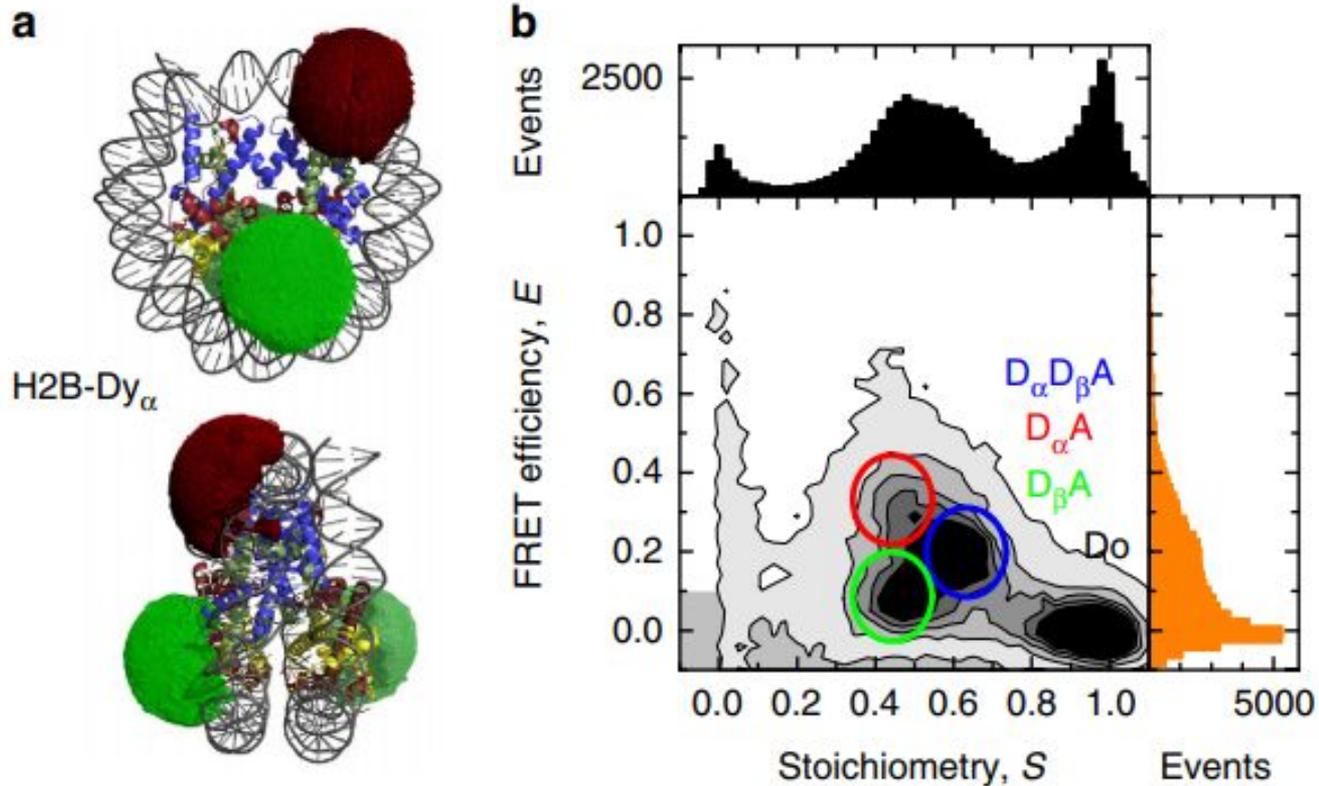
					
Name (localization D, A)	H2B-Dy $_{\alpha}$	E $_{\alpha}$ Dy $_{\beta}$	E $_{\beta}$ Dy $_{\alpha}$	I $_{\beta}$ I $_{\alpha}$ -wt	I $_{\beta}$ I $_{\alpha}$ -mut
Traceable distance changes	Heterodimer and DNA position close to dyad axis	End of one DNA strand and DNA position close to dyad axis	End of the opposite DNA strand and DNA position close to dyad axis	Two internal positions on the DNA in wt nucleosomes	Two internal positions on the DNA in mutated nucleosomes
Purpose	Dimer release	Asymmetric DNA opening	Asymmetric DNA opening	Analysis of transient intermediates	Analysis of transient intermediates

кинетика и асимметрия выпадения димера

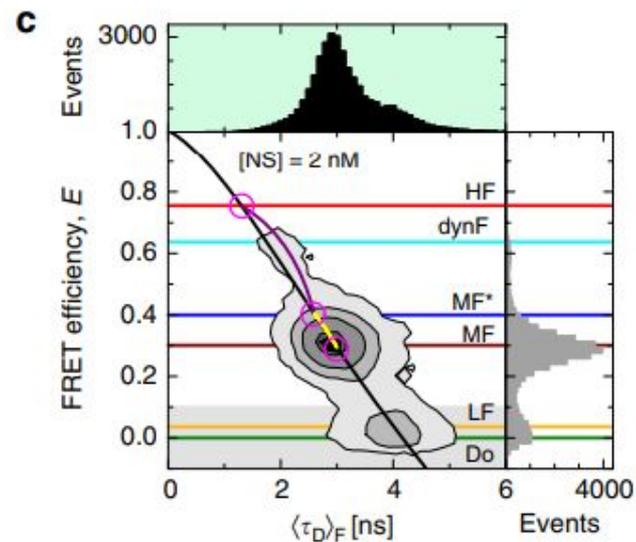
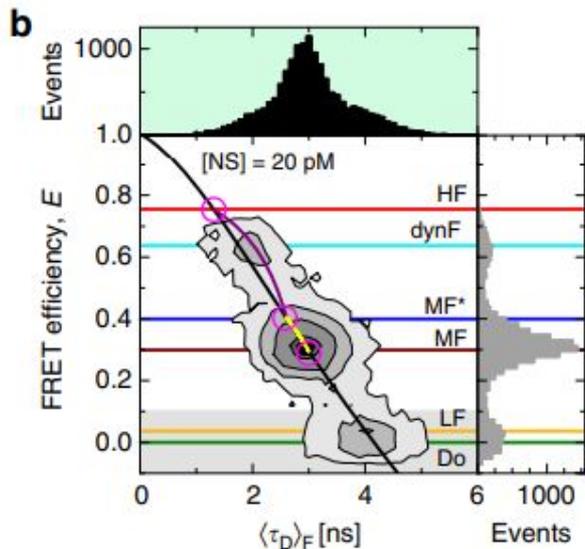
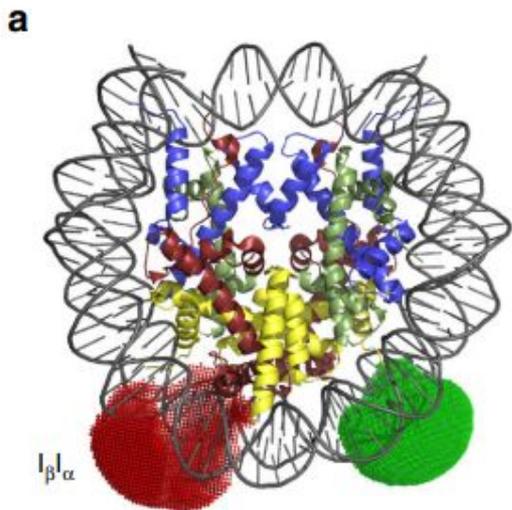
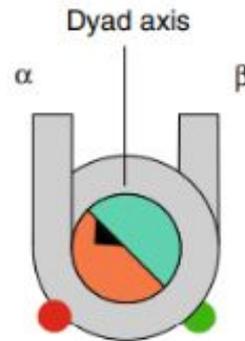
кинетика и асимметрия откручивания концов ДНК

внутренняя динамика ДНК и кинетика частичного отворачивания

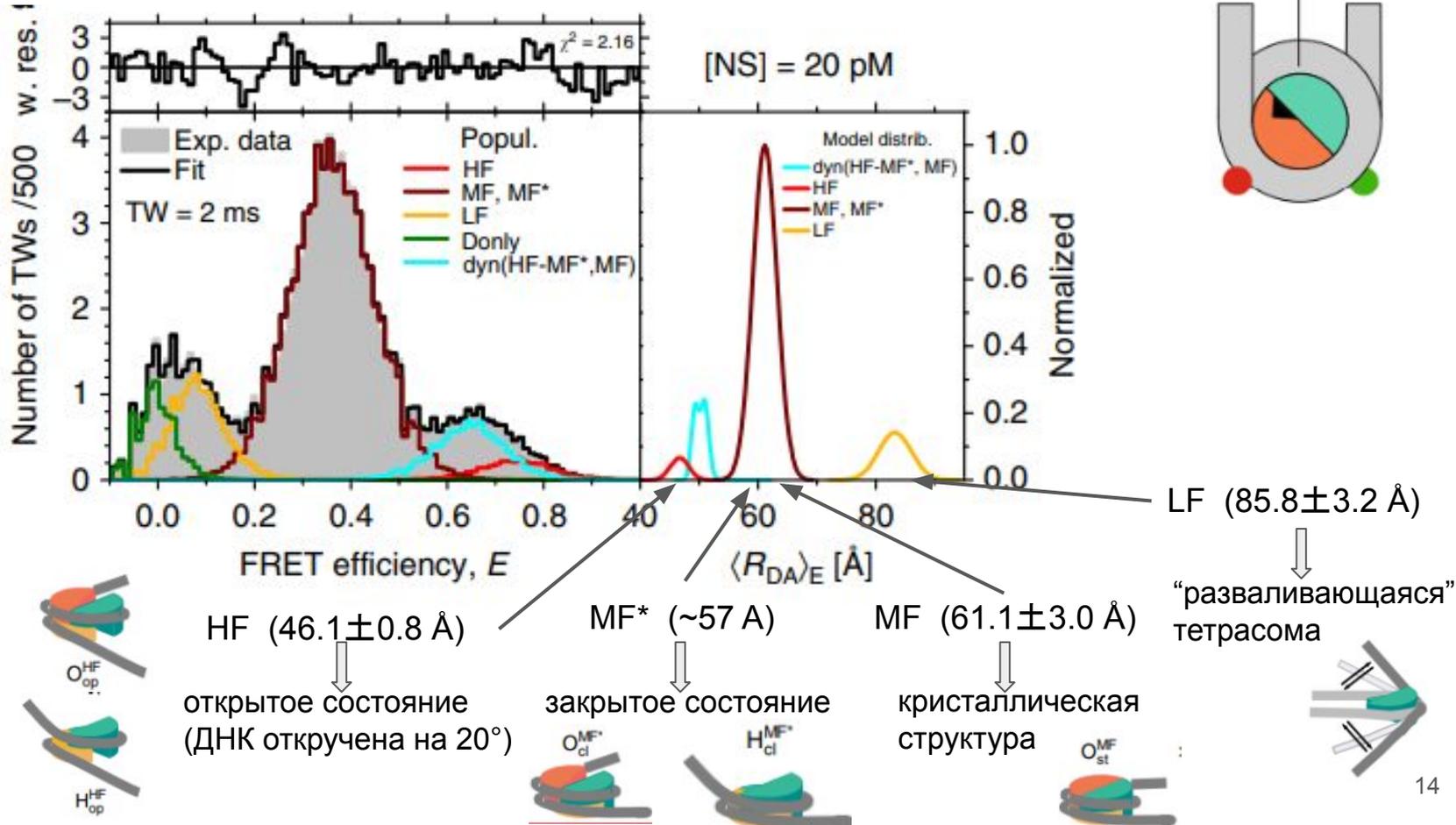
Эксперименты с выпадением димера



Эксперименты с внутренними метками



Популяции, определенные в эксперименте



Предложенная кинетическая схема

