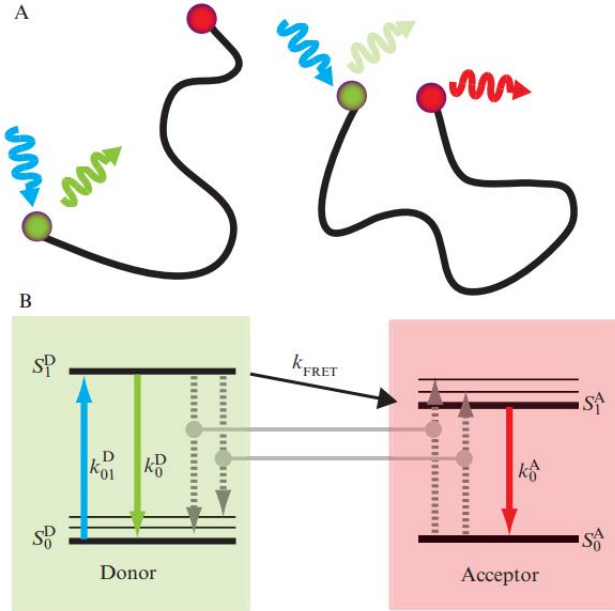


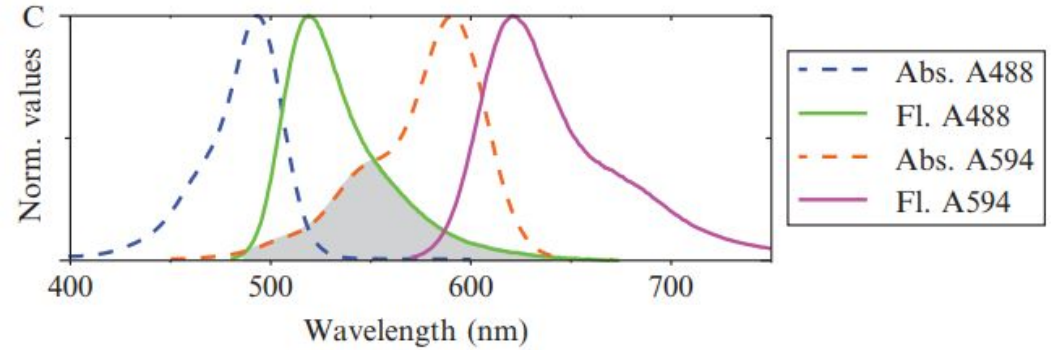
Мультипараметрический FRET. Основы и пример использования.

Князева Анастасия

Общая теория FRET



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



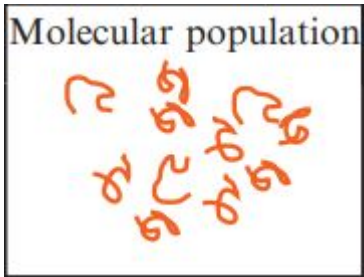
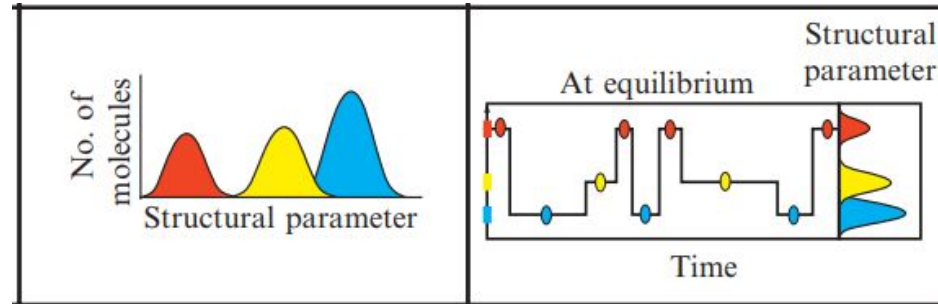
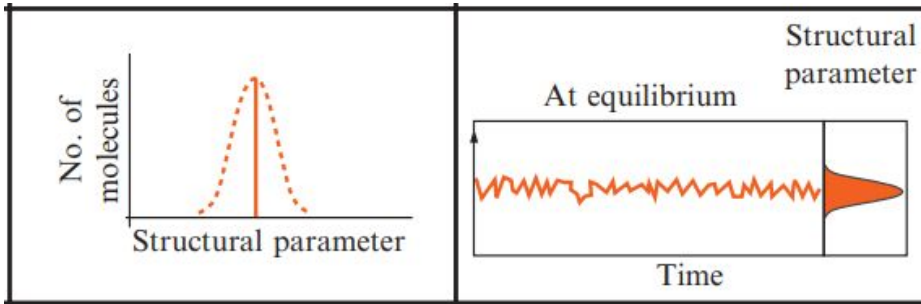
$$k_{\text{FRET}} = \frac{1}{\tau_{\text{D}(0)}} \left(\frac{R_0}{R_{\text{DA}}} \right)^6$$

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

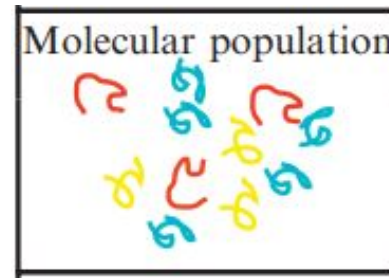
Фёрстеровский радиус

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

Ensemble versus Single-molecule FRET



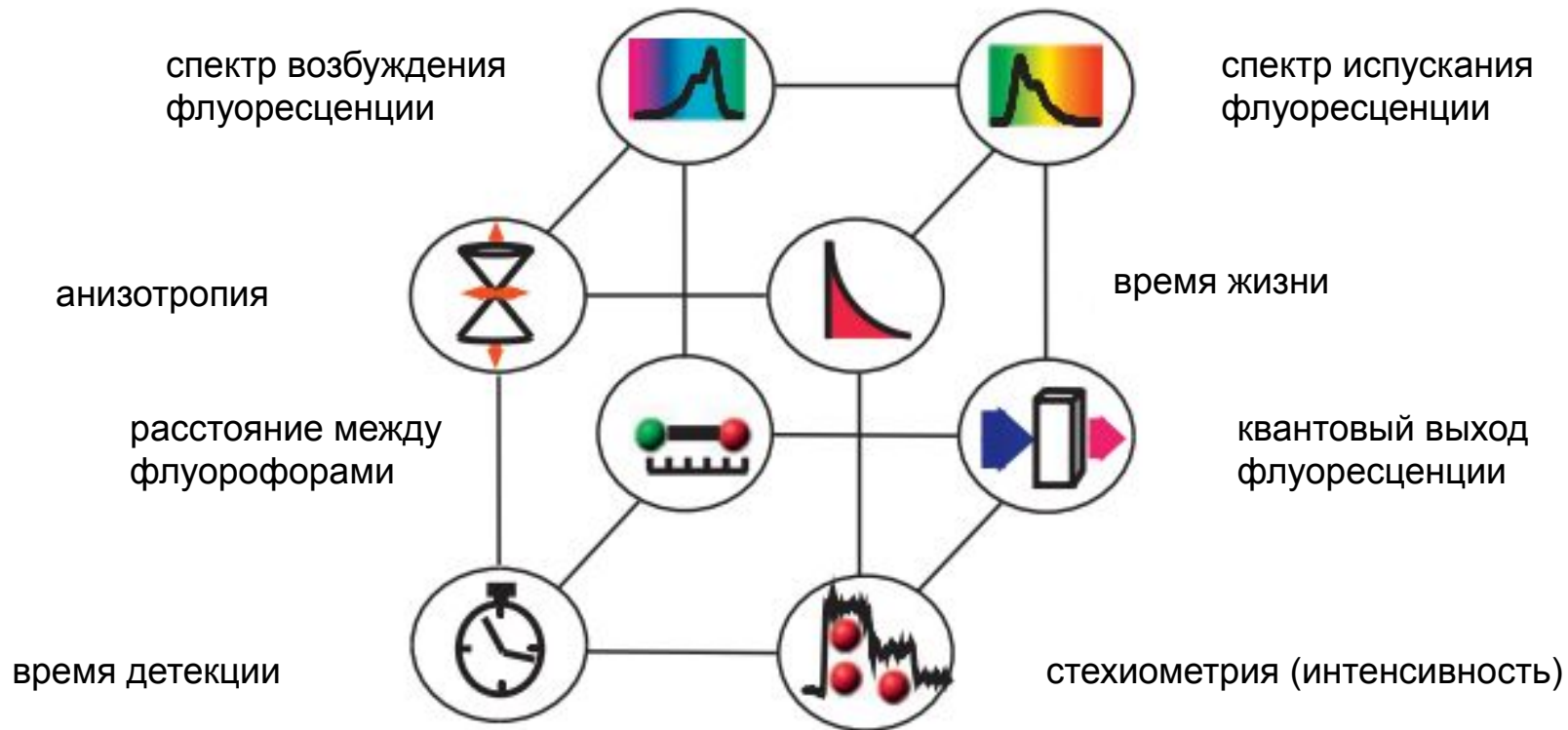
Хорошая статистика,
высокое отношение
сигнал-шум
Неполное описание
гетерогенных систем

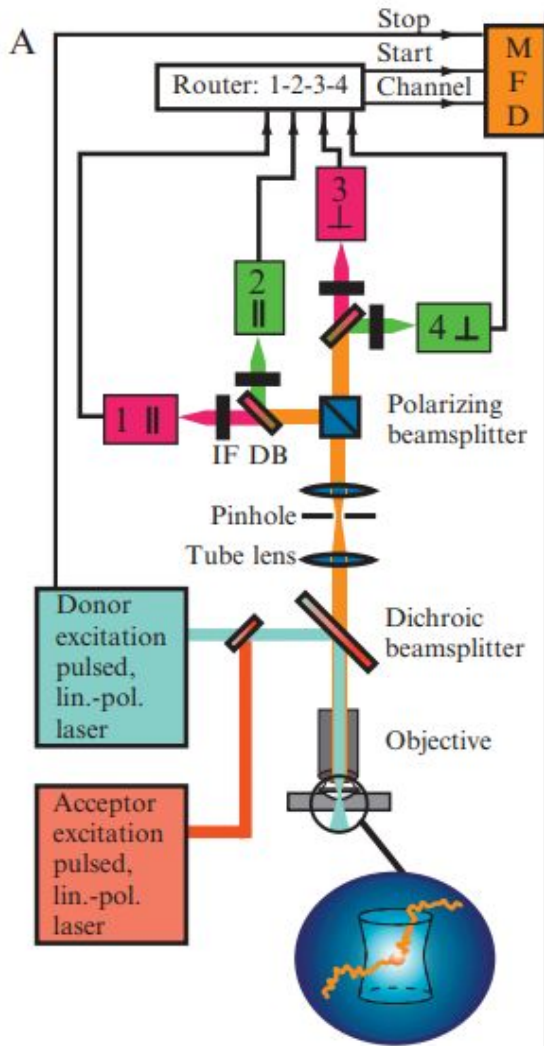


“Видит” гетерогенность
популяции и
переходные состояния
Может быть низкое
отношение сигнал-шум

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 к

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

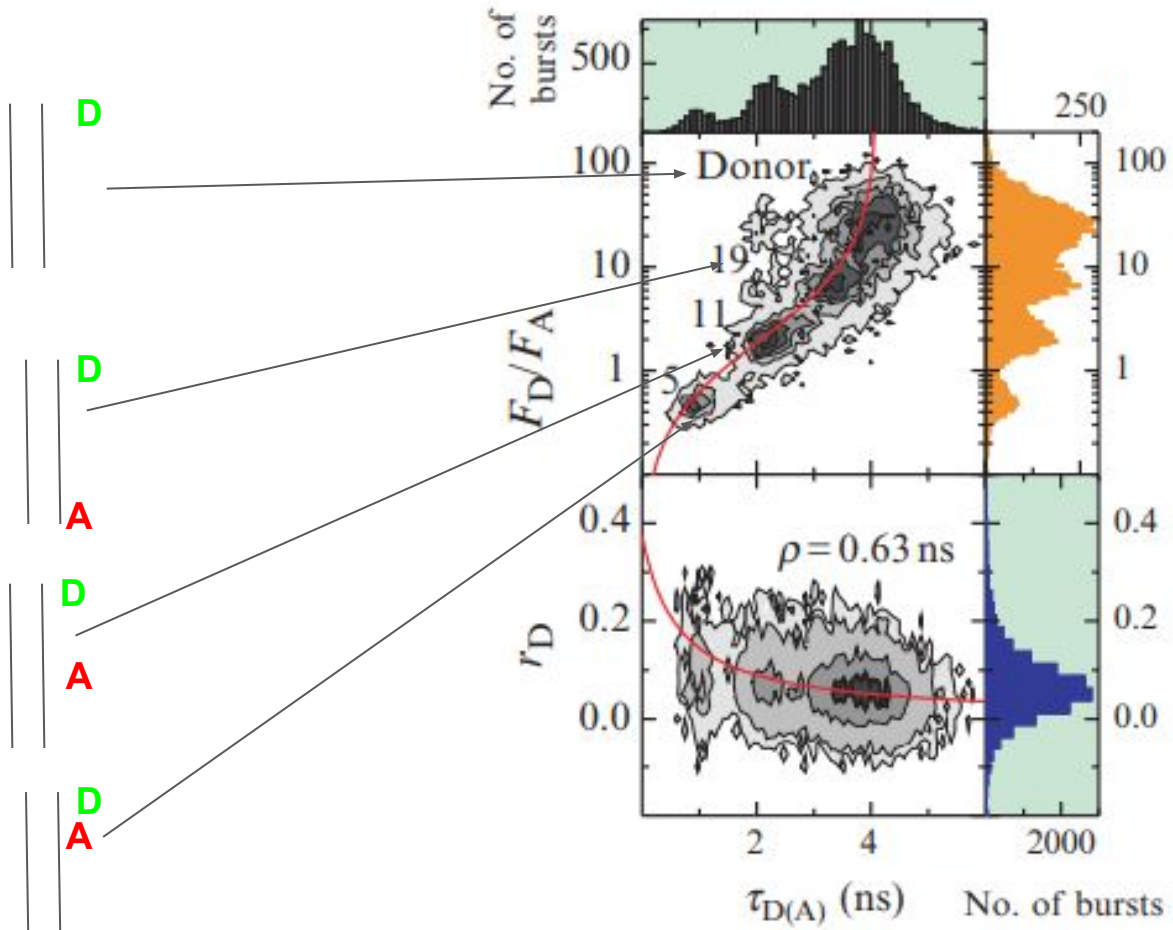
Проверка гистограмм анизотропии и времени жизни D при A

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

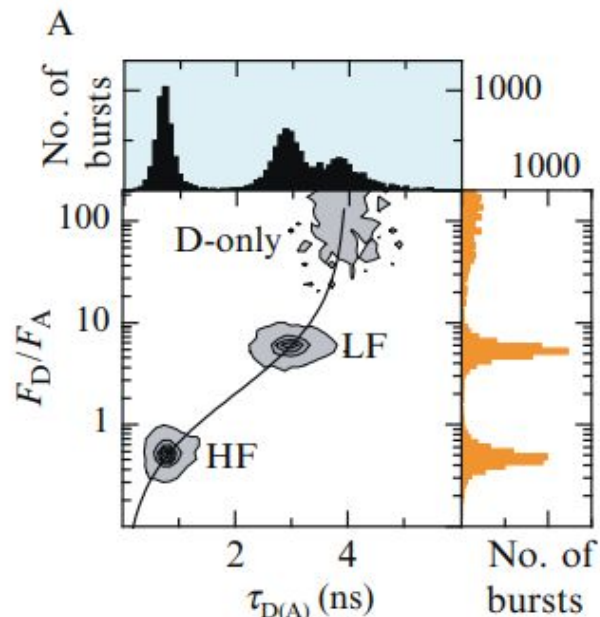
rotational correlation time of D
(связан с k_2 и, соответственно, R_0)

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

“Эталон” и возможные отклонения

тушение донора

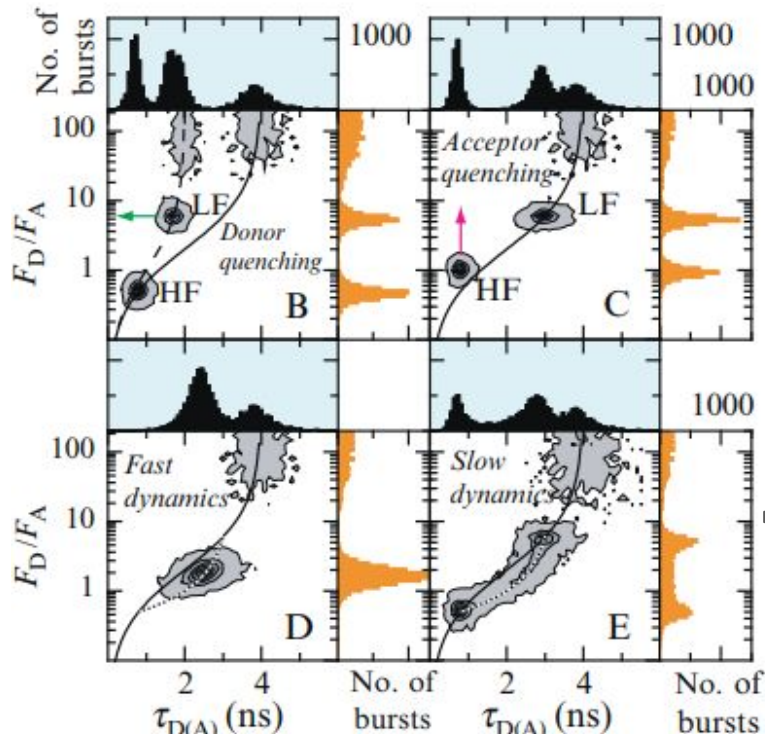
тушение акцептора



Две статические популяции и немного свободного донора

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

static FRET line



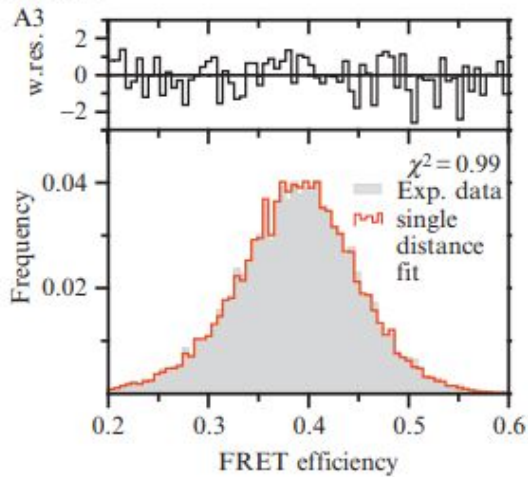
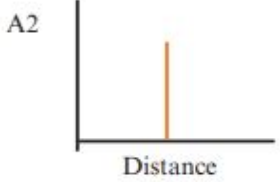
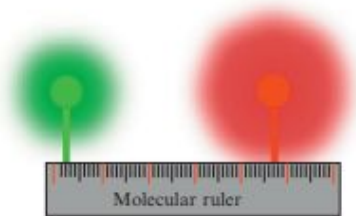
быстрая динамика переходов

медленная динамика переходов

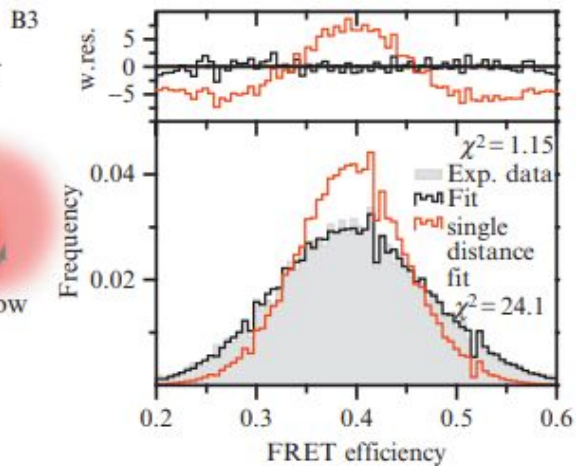
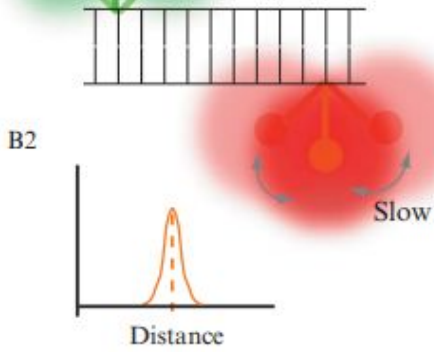
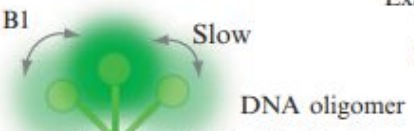
→ константы скорости переходов

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

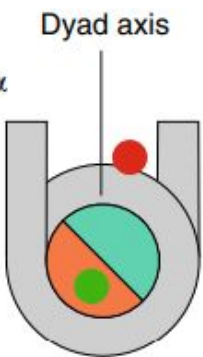

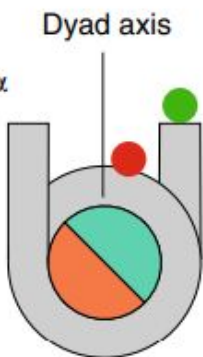

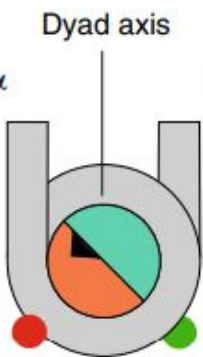
High precision FRET studies reveal reversible transitions in nucleosomes between microseconds and minutes

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

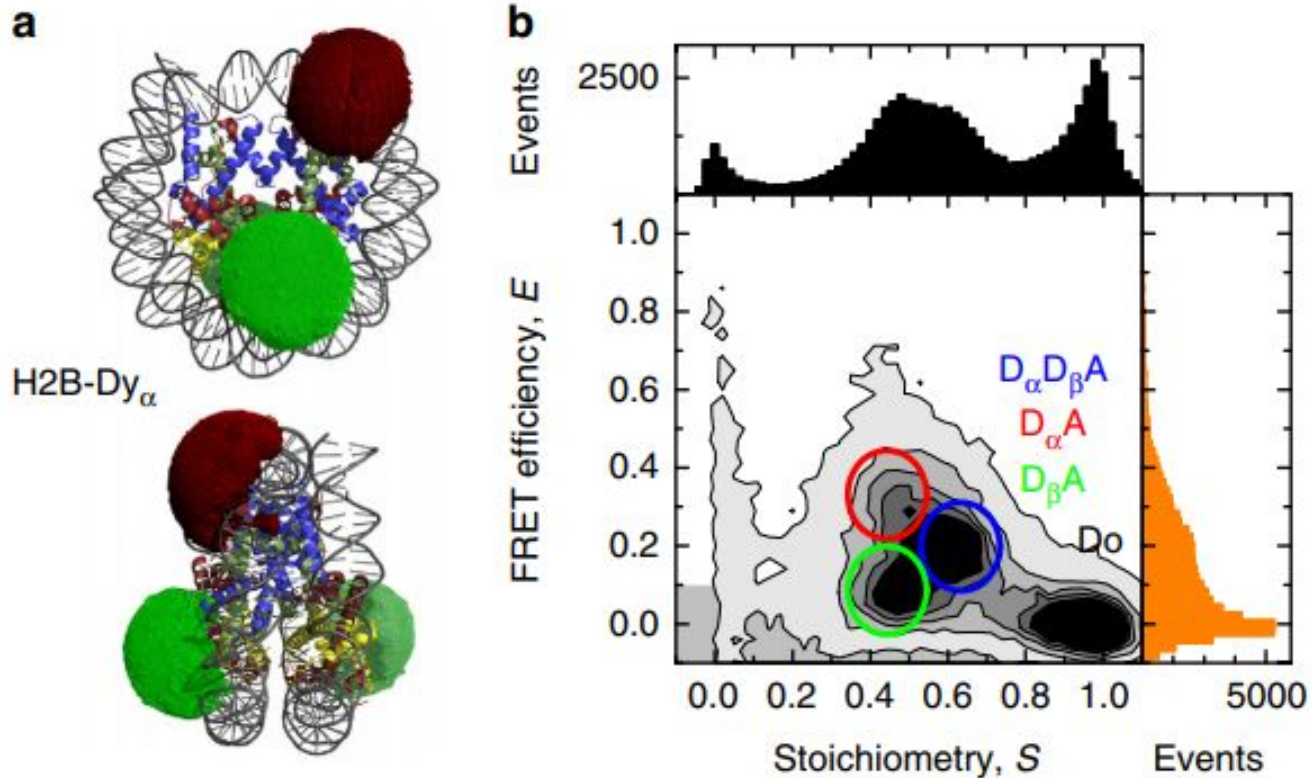
| |  |  |  |  |  |
|-----------------------------|---|---|--|---|---|
| Name (localization D, A) | H2B-Dy $_{\alpha}$ | E $_{\alpha}$ Dy $_{\beta}$ | E $_{\beta}$ Dy $_{\alpha}$ | I $_{\beta}$ I $_{\alpha}$ -wt | I $_{\beta}$ I $_{\alpha}$ -mut |
| Traceable distance changes | Heterodimer and DNA position 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

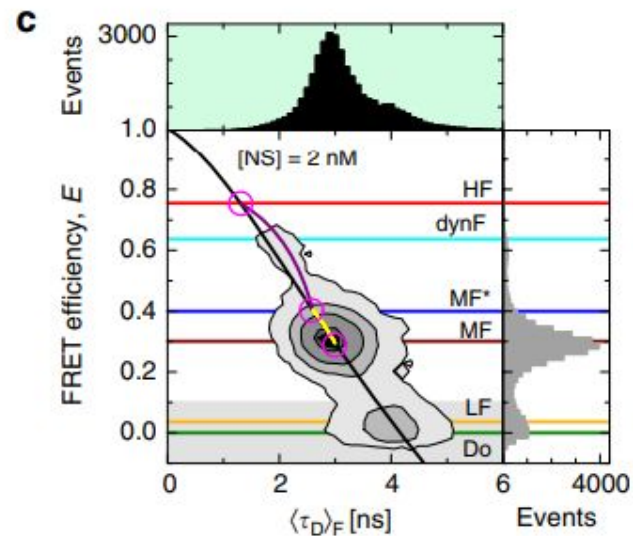
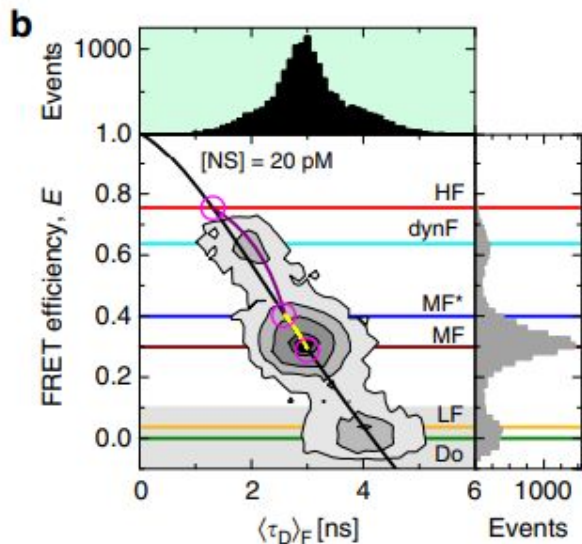
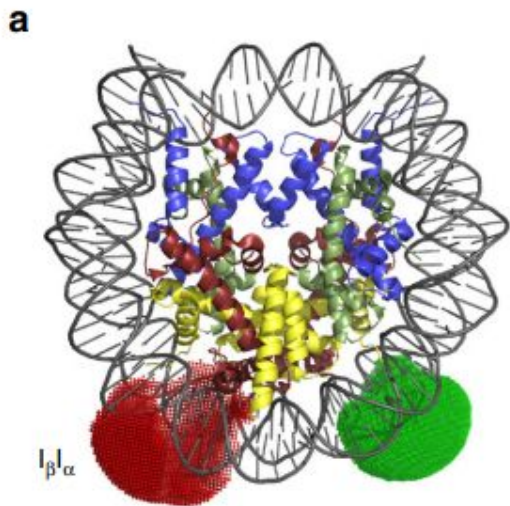
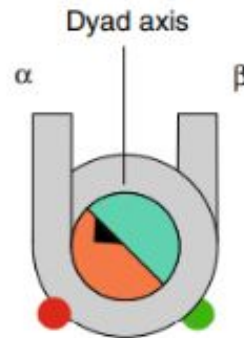
кинетика и асимметрия откручивания концов ДНК

внутренняя динамика ДНК и кинетика частичного отворачивания

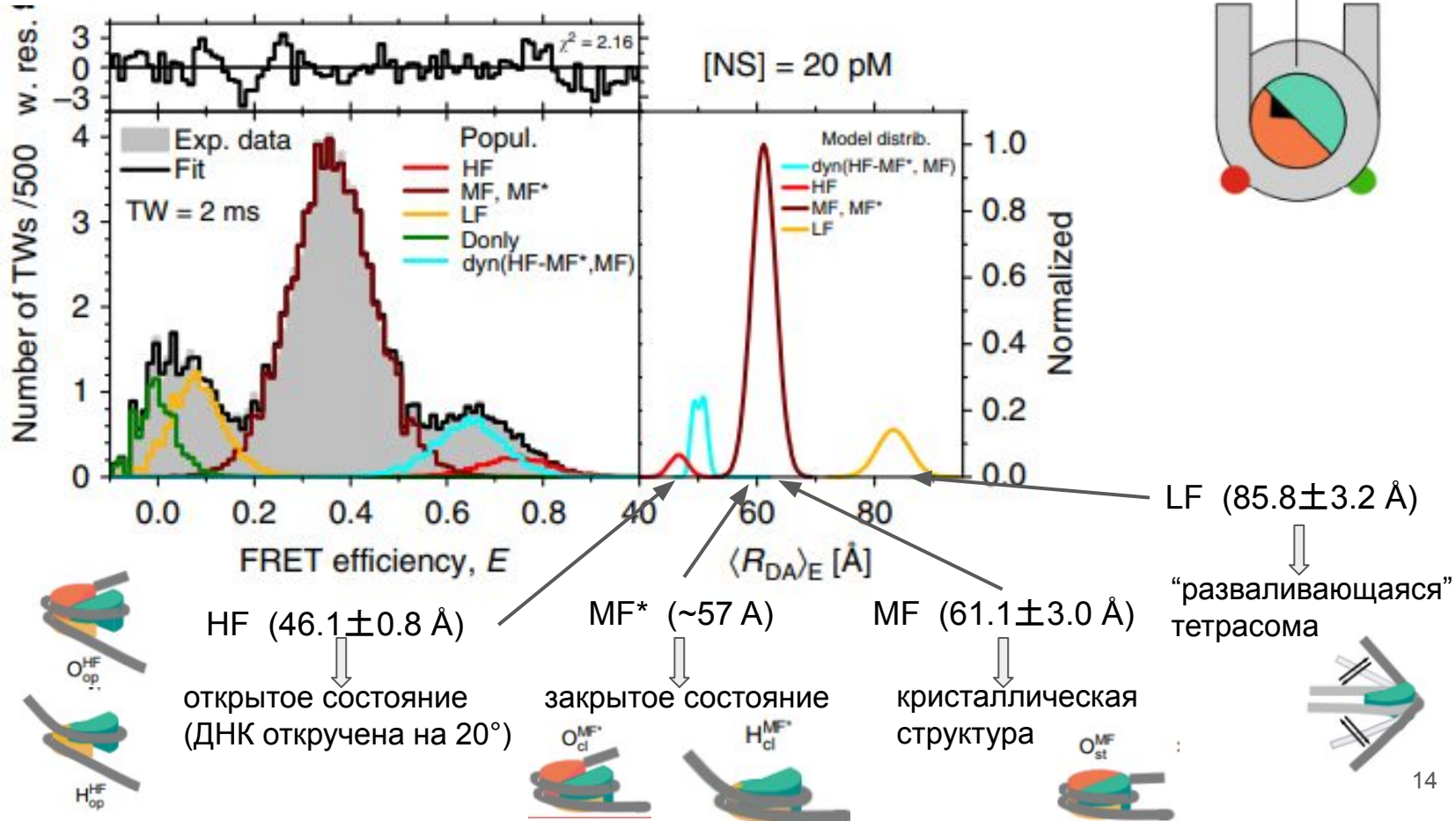
Эксперименты с выпадением димера



Эксперименты с внутренними метками



Популяции, определенные в эксперименте



Предложенная кинетическая схема

