

Introducción a las técnicas de fluorescencia (2)

1

Temas de la clase pasada:

1. Ensayos de fluorescencia en cubeta (con ejemplos):

- a. Características de los espectros de fluorescencia:
Regla de la imagen especular, corrimiento de Stokes
- b. Instrumentación
- c. Tiempo de vida.

Bibliografía general

- 1. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Bernard Valeur, Wiley-VCH
- 2. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Joseph Lakowicz. Plenum Press, New York

2

Temas de la clase de hoy:

- a. Anisotropía de fluorescencia
- b. Quenching (desactivación) de fluorescencia
- c. FRET (Transferencia de energía por el mecanismo de Förster)

3

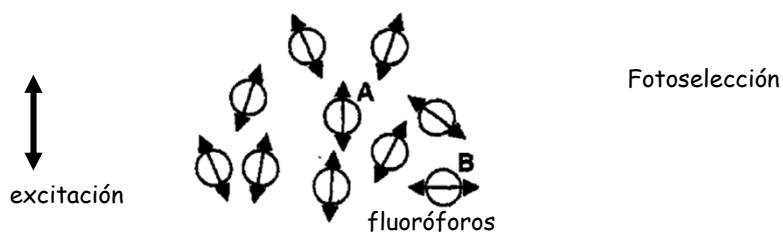
Anisotropía: Momento de una transición electrónica

Luz polarizada linealmente: el vector E oscila en un plano determinado

Momento de la transición: durante una transición electrónica los e^- se "desplazan": el momento dipolar del estado fundamental y el excitado puede ser distinto, generando un momento dipolar transitorio, asociado a la transición.

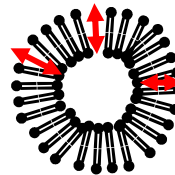
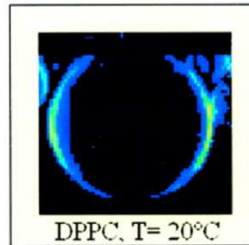
$$\mathbf{p} = \sum_{i=1}^N q_i \mathbf{d}_i$$

Para que se produzca la transición el momento de la transición debe tener un componente paralelo al plano de la luz polarizada



4

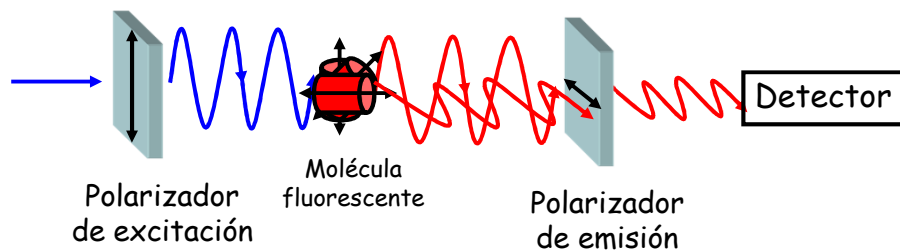
Para pensar: porqué la intensidad de fluorescencia no es homogénea?



Giant unilamellar vesicles (GUVs) marcadas con una sonda fluorescente lipídica que se intercala en la bicapa.
Se observan por microscopía de fluorescencia con excitación por 2 fotones (por ahora no nos importa). Se utiliza un láser (polarizado) y sólo se detecta fluorescencia de el anillo central de la vesícula

Bagatolli y col. Biophys J 1999 5

Anisotropía de fluorescencia: Principios



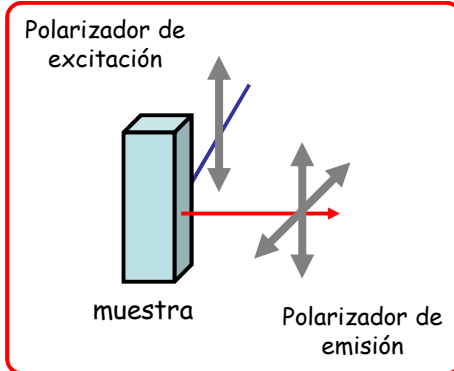
6

Definición de anisotropía de fluorescencia (r)

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

-0.2 < r < 0.4 (para moléculas random)

$$I_{\text{total}} = I_{||} + 2I_{\perp}$$



A veces se usa también el parámetro polarización (P)

$$P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}$$

$$r = \frac{2}{3} \left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right)^{-1}$$

7

Ecuación de Perrin

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau / \phi_r}$$

$$\phi_r = \frac{\eta V}{kT} \cong \frac{\eta M r}{kT} (v_2 + \delta v_1)$$

↑
proteínas esféricas

r_0 = anisotropía intrínseca

ϕ_r = tiempo de correlación rotacional

τ = tiempo de vida de la sonda

η = viscosidad

V = volumen de la partícula (esférica)

k = constante de Boltzmann

T = temperatura

v_1 = volumen específico del H_2O (1.0018 cm³/g)

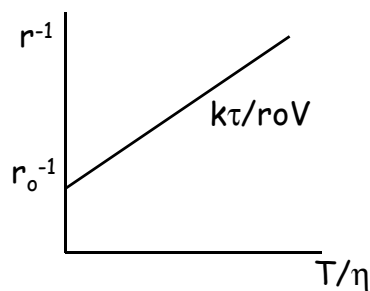
v_2 = volumen específico de la proteína (0.73 ml/g)

δ = grado de hidratación

8

Aplicaciones: Determinación del volumen molecular

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\phi_r} \right) = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{T}{\eta} \frac{k\tau}{V} \right)$$



9

Otras aplicaciones de anisotropía de fluorescencia:

Determinación del binding de calmodulina del péptido RS20

(la secuencia del péptido correspondiente a la región de unión a calmodulina de la myosin kight-chain kinasa)

* El péptido tiene un residuo Trp (Cam tiene sólo 1 Tyr)

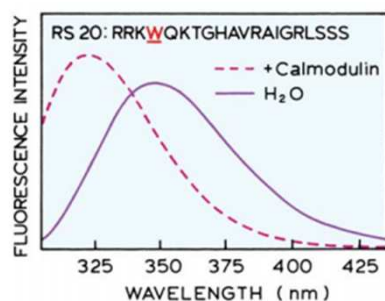


Figure 10.19. Emission spectra of the myosin light-chain kinase (MLCK) peptide RS20 in solution (solid) and bound to calmodulin in the presence of calcium (dashed). Excitation at 295 nm. Revised and reprinted with permission from [49]. Copyright © 1986, American Chemical Society.

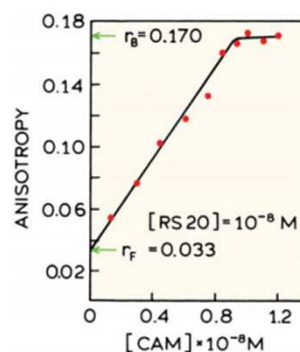
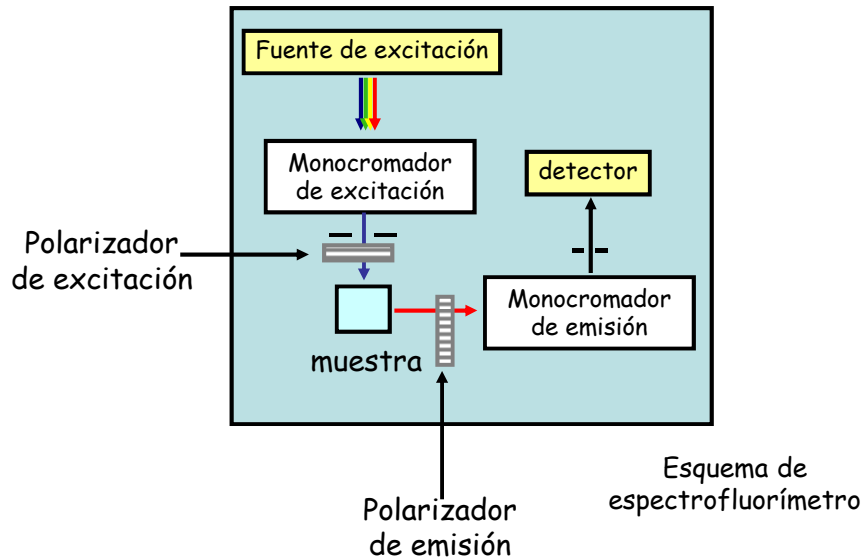


Figure 10.20. Titration of the MLCK peptide RS20 with calmodulin. Revised and reprinted with permission from [49]. Copyright © 1986, American Chemical Society.

Determinación de anisotropía de fluorescencia (formato L)



13

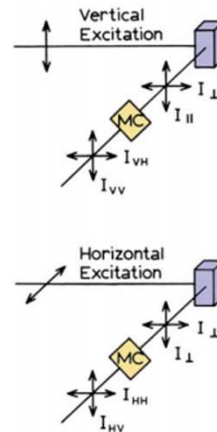
Determinación de anisotropía de fluorescencia

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

Los monocromadores transmiten con distinta eficiencia luz polarizada vertical u horizontal.

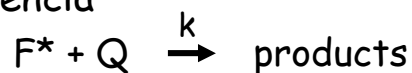
Para el formato L:

$$r = \frac{I_{vv} - GI_{vh}}{I_{vv} + 2GI_{vh}}, \quad G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$$



14

Procesos intermoleculares que afectan a la fluorescencia



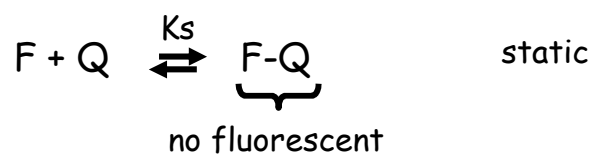
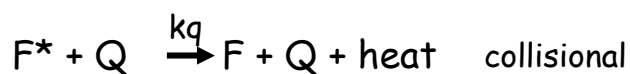
Tab. 4.1. Main photophysical processes responsible for fluorescence quenching

Photophysical process	$M^* + Q \rightarrow \text{products}$	Donor	Acceptor
Collision with a heavy atom (e.g., I ⁻ , Br in CBr ₄) ^a or a paramagnetic species (e.g. O ₂ , NO) ^b	$M^* + Q \rightarrow M + Q + \text{heat}$		
Electron transfer	${}^1D^* + A \rightarrow D^+ + A^{\cdot-}$ ${}^1A^* + D \rightarrow A^{\cdot-} + D^+$	${}^1D^*$ D	A ${}^1A^*$
Excimer formation	${}^1M^* + {}^1M \rightarrow {}^1(MM)^*$		
Exciplex formation	${}^1D^* + A \rightarrow {}^1(DA)^*$ ${}^1A^* + D \rightarrow {}^1(DA)^*$	${}^1D^*$ D	A ${}^1A^*$
Proton transfer	$AH^* + B \rightarrow A^{\cdot-} + BH^+$ $B^* + AH \rightarrow BH^+ + A^{\cdot-}$	AH* AH	B B*
Energy transfer	${}^1D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^1A^*$ ${}^3D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^3A^*$ ${}^3D^* + {}^3A \rightarrow {}^1D + {}^3A^*$ ${}^1M^* + {}^1M \rightarrow {}^1M + {}^1M^*$	${}^1D^*$ ${}^3D^*$ ${}^3D^*$ ${}^1M^*$	1A 1A 3A 1M

15

Quenching: 2 posibles (pero no únicos) mecanismos

Quencher (Q): molecule that provides a non-radiative path for deactivation of the fluorophore



Como cambia la intensidad de fluorescencia en estos dos procesos?

16

Se puede explotar estos fenómenos para estudiar biomoléculas

Ejemplos:

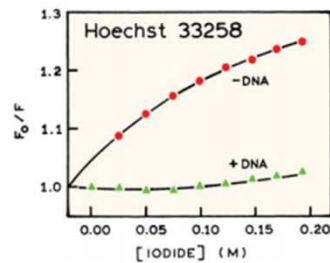
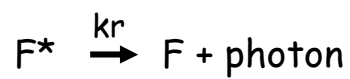
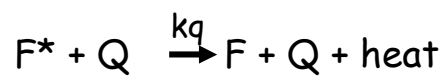


Figure 8.11. Iodide quenching of Hoechst 33258 in the absence and presence of calf thymus DNA. The ionic strength was kept constant using KCl. Revised from [32].

17

Quenching dinámico



$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

Stern-Volmer equation

$\underbrace{\hspace{1cm}}$
K_d

I₀, in the absence of quencher

18

Quenching dinámico

La constante de quenching va a depender de la frecuencia y efectividad de los choques entre Q y F

$$k_q = f_q \cdot k_0$$

↑
eficiencia del choque

$$k_0 = 4\pi RDN/1000 = \frac{4\pi N}{1000}(R_f + R_q)(D_f + D_q)$$

R=radio de choque (R_f+R_q) [cm]

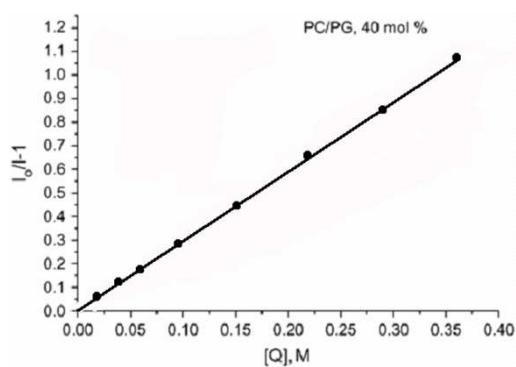
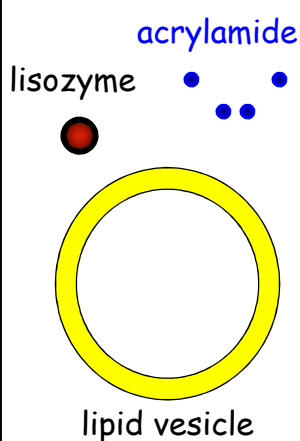
D_i = coeficiente de difusion de i [cm^2/s]

N = nro de Avogadro

$k_0 = [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$

19

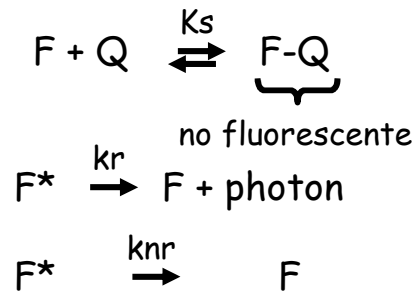
Collisional Quenching: Applications



condition	$K_d (\text{M}^{-1})$
buffer	7.8
PC vesicle	4

Gorbenko et al, Biophysical Journal 93:140-153 (2007) 20

Quenching estático



$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s[Q]$$

Stern-Volmer equation

I_0 , in the absence of quencher

21

Diferencias entre quenching estático y dinámico

La forma de la curva es igual para dinámico y estático..como se pueden diferenciar?

- 1) Tiempo de vida
- 2) temperatura
- 3) alguna otra forma?

22

Métodos radiométricos: determinación de $[Cl^-]$ por quenching

2 sondas en 1 molécula

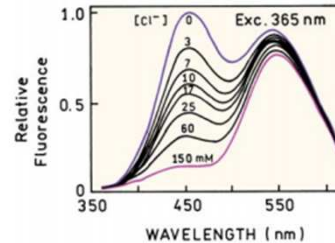
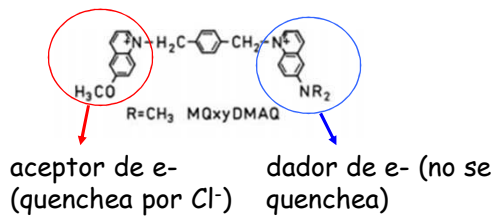


Figure 8.49. Structure and spectra of a wavelength-ratiometric chloride probe. Revised from [129].

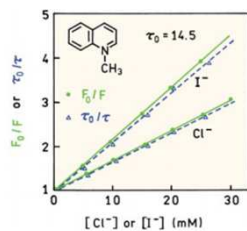
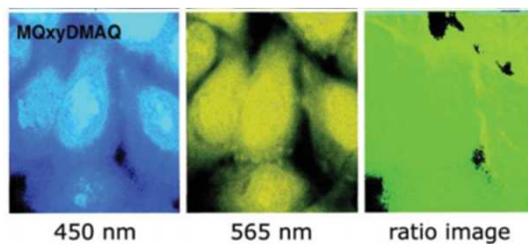


Figure 8.47. Chloride and iodide quenching of N-methylquinolinium iodide. The amount of iodide from the fluorophore is not significant. Revised from [123].

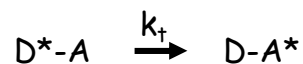


Jayaraman y col. Am J Physiol (1999)

FRET (Förster resonance energy transfer)

- Sirve para ver asociaciones
- Medir distancias en el rango de los Å
- Determinar cambios conformacionales
- y muchas cosas más

En qué consiste FRET?



Es un mecanismo de quenching, con propiedades muy interesantes

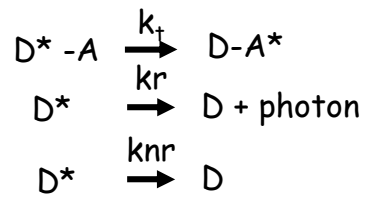
Ojo! no hay emisión y reabsorción de fotones! Es una interacción dipolar

Porqué es tan importante FRET en Biología?

Considerando una única distancia fija r entre D y A

$$k_t = \frac{1}{\tau_D^0} \left[\frac{R_0}{r} \right]^6$$

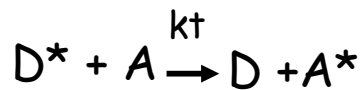
Agregamos esta reacción a las anteriores y calculamos ϕ_T :



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

28

Resonance energy transfer



$$k_t = \frac{1}{\tau_D^0} \left[\frac{R_0}{r} \right]^6$$

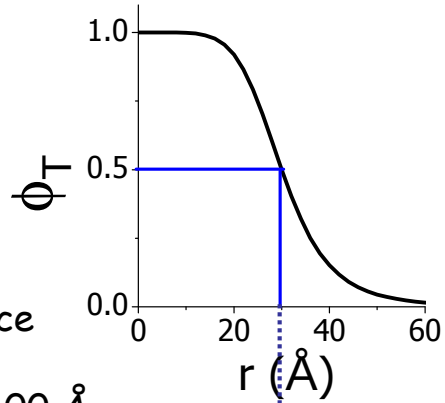
$$\phi_T = \frac{k_t}{k_t + \underbrace{\sum (knr + kr)}_{1/\tau_D^0}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

τ_D^0 = donor lifetime, no acceptor

29

Resonance energy transfer

$$\phi_T = \frac{R_o^6}{R_o^6 + r^6}$$



R_o = Förster distance

range of FRET: 10-100 $\text{\AA}$

R_o

El fenómeno de FRET ocurre a distancias moleculares

30

La distancia de Forster

$$R_o^6 = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \phi_D^0}{128\pi^4 N_A n^4} \int_0^\infty I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

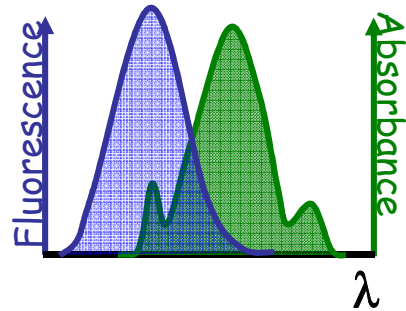
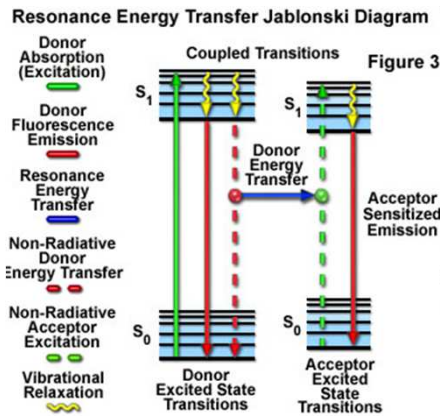
Orientation
factor

Overlap integral

31

Integral de solapamiento

$$\int_0^{\infty} I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

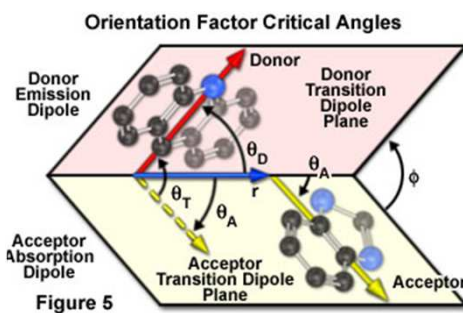


Para calcularla, normalizar el espectro de fluorescencia: $\int_0^{\infty} I_D(\lambda) d\lambda = 1$

32

Factor de orientación

K^2 = factor de orientación



- $K^2 = 4$ (colineales)
- $K^2 = 2/3$ (random)
- $K^2 = 0$ (perpendicular)
- $K^2 = 1$ (paralelos)

$$K^2 = \cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A = \sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A$$

ϕ_{DA} = ángulo entre los dipolos de emisión de D y de absorción de A (ϕ_T)
 $\phi_{A(D)}$ = ángulo entre el dipolo del A(D) de la transición y el vector de separación

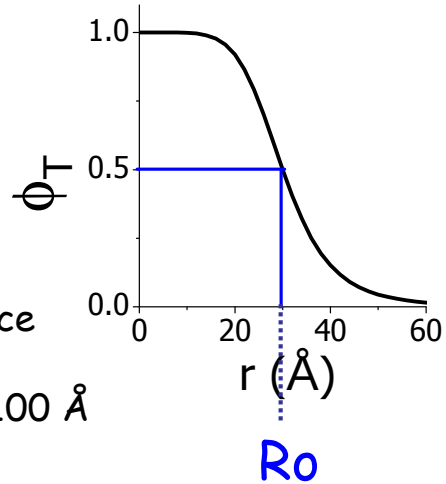
33

Resonance energy transfer

$$\phi_T = \frac{R_o^6}{R_o^6 + r^6}$$

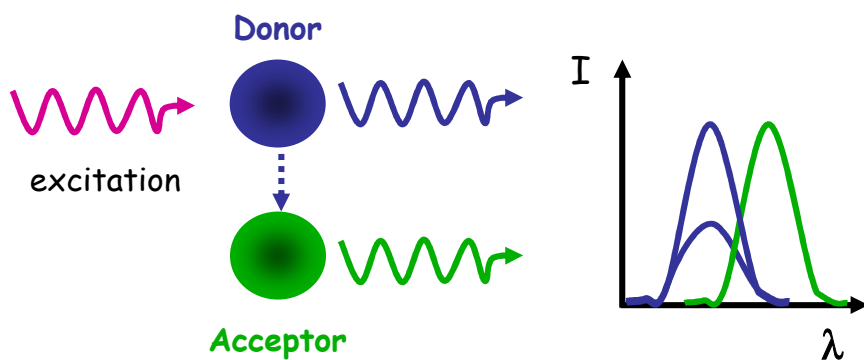
R_o = Förster distance

range of FRET: 10-100 Å



34

Consecuencias de FRET: estado estacionario



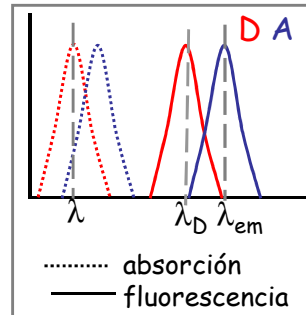
- ↓ Fluorescence of the donor
- ↑ Fluorescence of the acceptor (at $\lambda_{ex, donor}$)
- Qué pasa con el τ del donador?

35

Estado estacionario

1. Fluorescencia del donador (evaluada a λ_D)

$$\phi_T = 1 - \frac{I_D}{I_D^0}$$

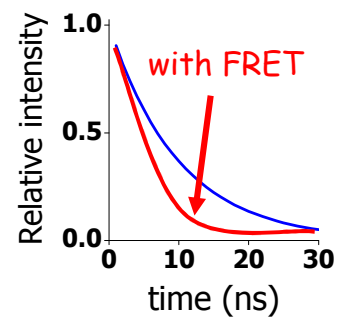
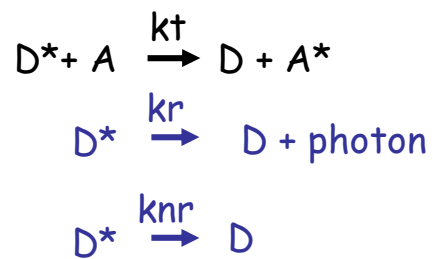


2. Fluorescencia del aceptor (evaluada a λ_{em})

$$\phi_T = \frac{A_A(\lambda)}{A_D(\lambda)} \left(\frac{I_A(\lambda, \lambda_{em})}{I_A^0(\lambda, \lambda_{em})} - 1 \right)$$

36

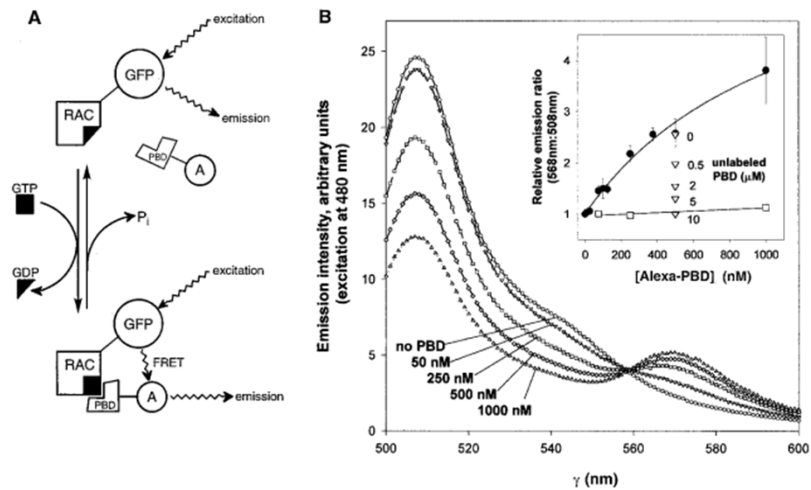
Tiempo de vida del donador



$$\phi_T = \frac{k_t}{k_r + \sum k_{nr} + k_t} = 1 - \frac{\tau_D^0}{\tau_D}$$

37

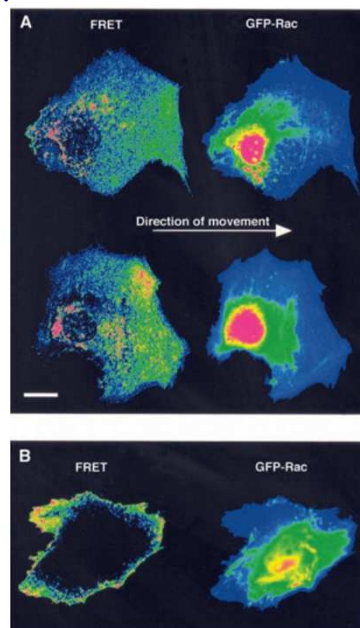
Aplicaciones 1: FRET en sensores biológicos



Kraynov y col, Science 2000

38

Aplicaciones 1: FRET en sensores biológicos



alto FRET o I
bajo FRET o I
células que se mueven

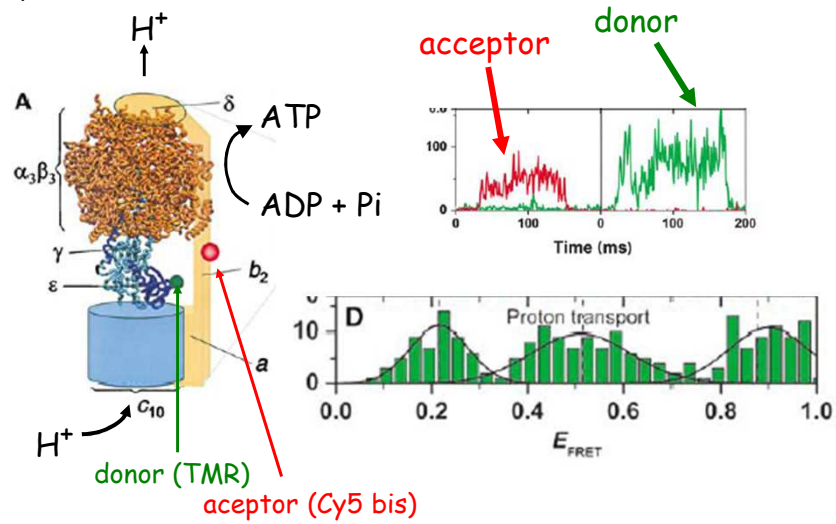
célula quieta

Kraynov y col, Science 2000

39

Aplicaciones 2: mecanismo de ATP sintasa

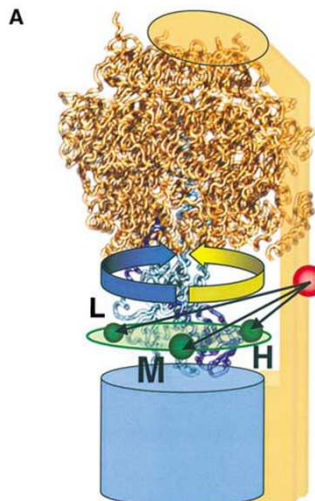
ATP synthase



Zimmermann et al. EMBO J (2005)

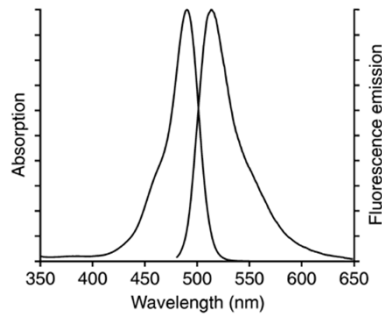
Aplicaciones 3: mecanismo de ATP sintasa

ATP síntesis
ATP hidrólisis



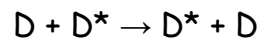
Zimmermann et al. EMBO J (2005)

Homo-FRET



fluoresceína

Hay solapamiento entre los espectros de absorción y emisión de la misma sonda, si el valor de k^2 y r son los adecuados:



42

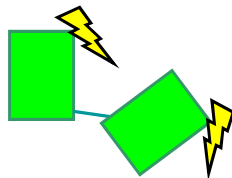
Homo-FRET

Cómo se detecta homo-FRET?

Intensidad?

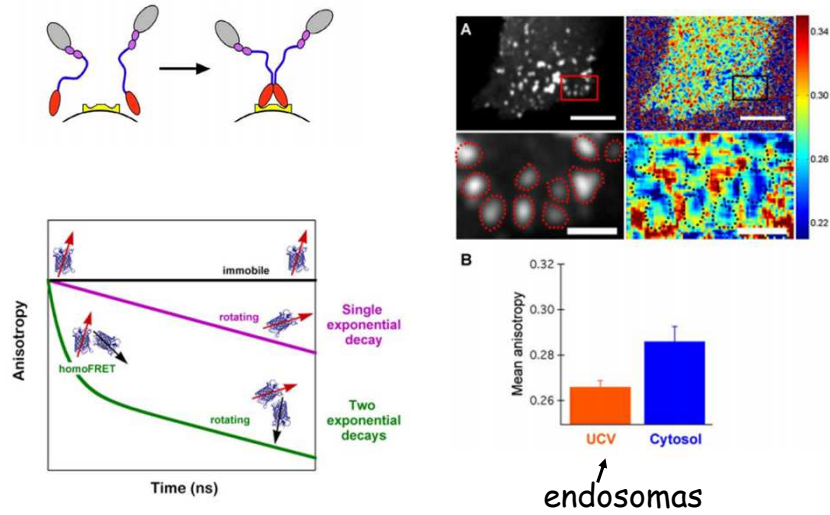
Tiempo de vida?

Anisotropía? ←



43

Detección de la dimerización de Myo-VI en endosomas por Homo-FRET



Altman y col. Plos Biol 2007

44