Письма в ЖЭТФ, том 107, вып. 11, с. 755 – 758 © 2018 г. 10 июня

# Нахождение эффективности и скорости передачи энергии в флуоресценции одиночной донор-акцепторной пары, прикрепленной к биомолекуле

*И. С. Осадько*[1)]

*Институт спектроскопии РАН, 108840 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 17 апреля 2018 г.

После переработки 26 апреля 2018 г.

Резонансную передачу энергии от одиночной молекулы донора (Д) к одиночной молекуле акцептора (А) (Фёрстеровская резонансная передача энергии) в настоящее время пытаются использовать для нахождения микроскопических параметров, описывающих межконформационные изменения в молекуле белка, к которой эта одиночная Д–А пара прикреплена. Недавно был разработан метод, позволяющий довольно сложным образом такие параметры искать с помощью формулы для эффективности Фёрстеровской резонансной передачи энергии, представляющей собой сумму нескольких функций гауссовой формы. В данной работе предлагается другой более простой метод нахождения искомых параметров межконформационных переходов, основанный на прямой статистической обработке флуктуирующих треков флуоресценции одиночной Д–А пары, прикрепленной к молекуле белка.

DOI: 10.7868/S0370274X18110127

**1.** Одиночные Д–А пары в отличие от ансамблей таких пар позволяют выразить расстояние $R$ между молекулами пары непосредственно через эффективность передачи энергии в этой Д–А паре. Эта связь с эффективностью передачи энергии (Förster Resonance Energy Transfer (FRET), Фёрстеровская резонансная передача энергии) определяется с помощью простой формулы $E(R) = [1 + (R/R_F)^6]^{-1}$,где $R_F$ – радиус Ферстера есть единственный неизвестный параметр [1, 2]. Поэтому, если прикрепить такую Д–А пару к молекуле белка или ДНК, то при изменении конформации макромолекулы будет изменяться расстояние $R$ и, следовательно, эффективность FRET будет флуктуировать.

В настоящее время делаются попытки использования одиночных Д–А пар, прикрепленных к молекуле белка [3–6], к нити ДНК [7–14], к молекуле дендримера [15] и даже к клетке [16, 17] для исследования квантовой динамики этих макрообъектов. Исследуется и влияние триплетных уровней на эффективность FRET [18–20].

Ключевой вопрос, возникающий в этой проблеме: каким образом можно связать изменения в $R$ с функцией распределения $P(E)$ эффективности FRET, которая измеряется в опыте. Эта функция обычно содержит несколько максимумов. Рассматривая этот вопрос, Гопич и Сабо [21] представили распределение эффективности $P(E)$ в виде суммы нескольких функций гауссовой формы. В случае, если конформационное изменение есть переход между двумя конформациями белка, эта сумма должна содержать три функции гауссовой формы. Каждая функция гауссовой формы характеризуется положением максимума, шириной и своим весом в общей формуле. Эти параметры подлежат определению из опыта.

В данной работе предложен принципиально иной способ нахождения микроскопических параметров, основанный на прямой статистической обработке треков флуоресценции Д–А пары при коротком времени накопления сигнала.

**2.** Рассмотрим Д–А пару, ферстеровская скорость $F$ которой принимает два значения при свертывании/развертывании белка. Соответствующая энергетическая схема представлена на рис. 1.

В соответствии с рис. 1 динамика системы описывается следующей системой уравнений:

$$\begin{gathered}\dot{\rho}_0 = -(k+B)\rho_0 + \Gamma_D\rho_1 + \Gamma_A\rho_2 + b\rho_3,\\ \dot{\rho}_1 = k\rho_0 - (F_1+\Gamma_D)\rho_1,\\ \dot{\rho}_2 = F_1\rho_1 - \Gamma_A\rho_2,\\ \dot{\rho}_3 = B\rho_0 - (k+b)\rho_3 + \Gamma_D\rho_4 + \Gamma_A\rho_5,\\ \dot{\rho}_4 = k\rho_3 - (F_2+\Gamma_D)\rho_4,\\ \dot{\rho}_5 = F_2\rho_4 - \Gamma_A\rho_5.\end{gathered} \tag{1}$$

[1)]e-mail: osadko@isan.troitsk.ru

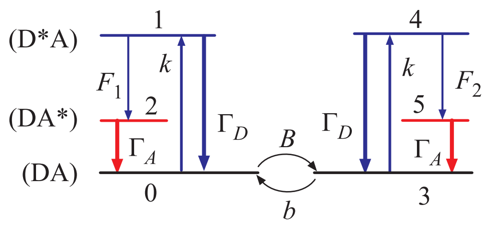


Рис. 1. (Цветной онлайн) Флуктуации флуоресценции молекулы белка с прикрепленной Д–А парой при свертывании/развертывании этой молекулы. Состояние $(D^*A^*)$ с возбужденными молекулами донора и акцептора опущено, т.к. оно будет населено очень слабо при $k \ll \Gamma_D, \Gamma_A$

Здесь $\rho_j$ есть населенность $j$-ого состояния ($j = 0, \dots 5$), $k$ – скорость возбуждения молекулы донора, $\Gamma_{D,A}$ – скорость релаксации в основное состояние молекул донора и акцептора, $F_{1,2}$ – скорость передачи энергии в Д–А паре в обеих конформациях молекулы белка, $B$ и $b$ – скорости свертывания и развертывания молекулы белка. Используем уравнения (1) для расчета методом Монте-Карло флуктуаций интенсивностей $I_D(t)$ и $I_A(t)$ флуоресценции молекул донора и акцептора, а потом найдем по формуле $E(t) = I_A(t)/[I_A(t) + I_D(t)]$ флуктуации эффективности FRET.

**3.** Обычно в опыте счет фотонов флуоресценции превышает $10^4$ с$^{-1}$. Поэтому мы рассмотрим соответствующий случай, когда $k = 10^4$ с$^{-1}$, $F_1 = 10^7$ с$^{-1}$, $F_2 = 10^9$ с$^{-1}$, $1/B = 5$ мс$^{-1}$, $1/b = 10$ мс$^{-1}$, а время накопления сигнала составляет $T = 20$ мс$^{-1}$, 5 мс$^{-1}$, 1 мс$^{-1}$. Треки для эффективности FRET, рассчитанные с помощью уравнений (1) методом Монте-Карло, с такими временами накопления сигнала представлены на рис. 2.

Согласно рис. 2 в треке эффективности имеются интервалы с повышенной и пониженной эффективностью передачи энергии, которые мы будем называть он- и офф-интервалами, соответственно. При длительном времени накопления сигнала $T = 20$ мс$^{-1}$, т.е. при $T \gg 1/B$, $1/b$ длительности он/офф интервалов фактически не могут быть найдены, как показывает рис. 2a. При $T \approx 1/B$, $1/b$ офф-интервалы уже можно идетифицировать, но их длительность искажена сравнительно большим временем $T$ накопления сигнала, как показывает рис. 2b. Наконец, при $T < 1/B$, $1/b$ он/офф-интервалы четко проявляют себя в треке, т.к. они практически не искажаются при таком коротком времени $T$ накопления сигнала. Такой трек показан на рис. 2c.

**4.** После статистической обработки всех трех треков, представленных на рис. 2, с помощью формулы

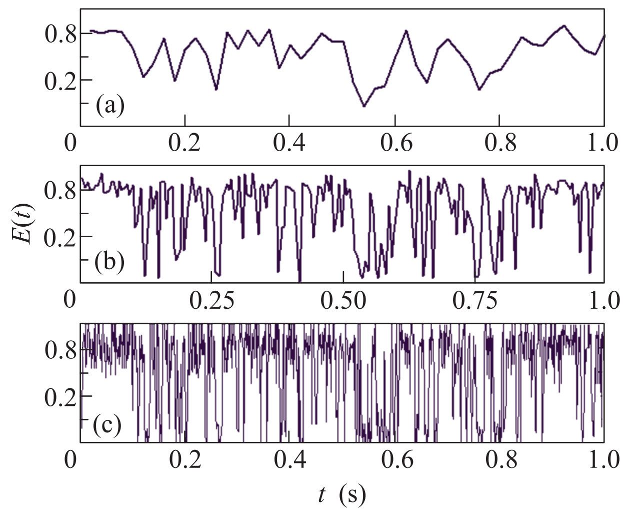


Рис. 2. Треки эффективности FRET, рассчитанные с помощью уравнений (1) при $k = 10^4$ с$^{-1}$, $\Gamma_D = 2 \cdot 10^8$ с$^{-1}$, $\Gamma_A = 10^8$ с$^{-1}$, $F_1 = 10^7$ с$^{-1}$, $F_2 = 10^9$ с$^{-1}$, $1/B = 5$ мс$^{-1}$, $1/b = 10$ мс$^{-1}$ и при разных временах накопления сигнала: $T = 20$ мс$^{-1}$ (a), 5 мс$^{-1}$ (b), 1 мс$^{-1}$ (c)

$$P(n) = \sum_{m=1}^{6000} if\left[\left(\frac{n}{20} < E_m\right)\left(E_m < \frac{n+1}{20}\right), 1, 0\right] \tag{2}$$

мы найдем распределения эффективности FRET, представленные на рис. 3. Вид всех трех распределений различен, хотя квантовая динамика системы одна и та же. Следовательно, время накопления сигнала играет очень важную роль в форме функции распределения эффективности FRET. Только в случае, когда пики флуоресценции четко разделены, т.е. при $T < 1/B$, $1/b$, как это имеет место на рис. 3c, средняя эффективность передачи энергии может быть определена простой формулой:

$$E_{1,2} = F_{1,2}/(F_{1,2} + \Gamma_D) = [1 + (R_{1,2}/R_F)^6]^{-1}, \tag{3}$$

которая позволяет легко найти, насколько изменяется ферстеровская скорость $F$ и расстояние $R$ в Д–А паре при свертывании/развертывании молекулы белка. Формула (3) не применима в случаях, когда $T \geq 1/B$, $1/b$. В этих случаях надо использовать формулу, выведенную Гопич и Сабо [21] и представляющую собой сумму трех функций гауссовой формы. Применимость простой формулы (3) доказывается тем, что два максимума в функции распределения эффективности FRET, представленной на рис. 3c, соответствуют $E_1 = 0.05$ и $E_2 = 0.83$, что дает, согласно формуле (3), $F_1 = 10^7$ с$^{-1}$ и $F_2 = 9.8 \cdot 10^8$ с$^{-1}$. А при расчете трека на рис. 2c мы брали $F_1 = 10^7$ с$^{-1}$ и $F_2 = 10^9$ с$^{-1}$. Следовательно,

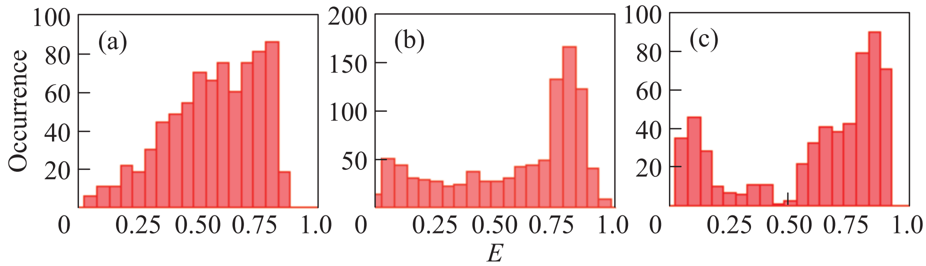


Рис. 3. (Цветной онлайн) Распределение эффективности FRET при $T = 20\,\text{мс}^{-1}$ (a), $5\,\text{мс}^{-1}$ (b), $1\,\text{мс}^{-1}$ (c) с одной и той же квантовой динамикой биомолекулы с прикрепленной к ней одиночной Д–А парой

простая формула (3) действительно позволяет найти правильные величины $F_{1,2}$, а следовательно, и $R_1/R_2$ по максимумам функции распределения эффективности FRET, измеренной при $T < 1/B$, $1/b$.

Однако распределение на рис. 3c не позволяет найти скорости $1/B$ и $1/b$, определяющие межконформационные прыжки. Для их нахождения необходимо дополнительно измерить с помощью трека, представленного на рис. 2c, распределение временны́х интервалов $t_{1,2}$ с пониженной и повышенной эффективностью соответственно, которые мы будем называть офф- и он-интервалами, соответственно. Такая процедура реально осуществлялась в нашей статье [22] на измеренных треках флуоресценции одиночных квантовых точек. Это было сделано и в треке, представленном на рис. 2c. Результат представлен на рис. 4.

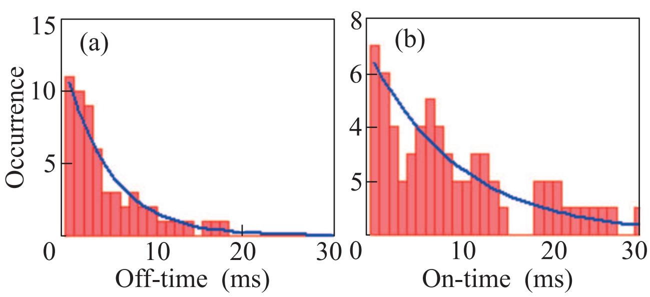


Рис. 4. (Цветной онлайн) Распределение интервалов с пониженной и повышенной эффективностью (офф- и он-интервалов соответственно), измеренное в треке, представленном на рис. 3c

Распределение этих интервалов достаточно хорошо описываются функцией $A_{\text{on,off}} \exp(-t/t_{\text{on,off}})$ с $t_{\text{on}} = 10\,\text{мс} = 1/b$ и $t_{\text{off}} = 5\,\text{мс} = 1/B$. Именно эти значения скоростей и брались при расчете методом Монте-Карло треков, представленных на рис. 2.

**5.** Проведенное выше рассмотрение треков для эффективности FRET показывает. Если при вычислении (измерении) треков используется время накопления сигнала, которое короче времен межконформационных переходов, то:

– изменение расстояния в Д–А паре можно определить по простой формуле (3), куда подставлены $E_{1,2}$, измеренные в опыте;

– скорости $B$ и $b$ межконформационных переходов могут быть найдены с помощью функций распределения он- и офф-интервалов, измеренных в опыте. Следовательно, предложенный здесь метод определения микроскопических параметров $E_{1,2}$, $B$ и $b$, существенно проще метода, использующего формулу, представляющую собой сумму трех гауссовых функций.

Работа поддержана грантом # 14-12-01415 Российского Научного Фонда.

1. A. Dietrich, V. Buschmann, C. Müller, and M. Sauer, Reviews in Molecular Biotechnology **82**, 211 (2002).
2. Y. Sun, H. Wallrabe, S.-A. Seo, and A. Periasamy, Chemphyschem **12**, 462 (2011).
3. T. Ha, A. Y. Ting, J. Liang, A. A. Deniz, D. S. Chemla, P. G. Schulz, and S. Weiss, Chem. Phys. **247**, 107 (1999).
4. K. A. Merchant, R. B. Best, J. M. Louis, I. V. Gopich, and W. A. Eaton, Proc. Natl. Acad. Sci. **104**, 1528 (2007).
5. D. Nettels, I. V. Gopich, A. Hoffmann, and B. Schuler, Proc. Natl. Acad. Sci. **104**, 2655 (2007).
6. H. S. Chung, I. V. Gopich, K. McHale, T. Cellmer, J. M. Louis, and W. A. Eaton, J. Phys. Chem. A **115**, 3642 (2011).
7. H. D. Kim, G. U. Nienhaus, J. W. Orr, J. R. Williamson, and S. Chu, Proc. Natl. Acad. Sci. **99**, 4284 (2002).
8. C. R. Sabanayagam, J. S. Eid, and A. Meller, J. Chem. Phys. **122**, 061103 (2005).
9. C. R. Sabanayagam, J. S. Eid, and A. Meller, J. Chem. Phys. **123**, 224708 (2005).
10. N. K. Lee, A. N. Kapanidis, Y. Wang, X. Michalet, J. Mukhopadhyay, R. H. Ebright, and S. Weiss, Biophys. J. **88**, 2939 (2005).
11. M. Antonik, S. Felekyan, A. Gaiduk, and C. A. M. Seidel, J. Phys. Chem. B **110**, 6970 (2006).

12. D. I. Cherny, I. C. Eperon, and C. R. Bagshaw, Eur. Biophys. J **38**, 395 (2009).
13. N. Di Fiori and A. Meller, Biophys. J. **98**, 2265 (2010).
14. S. M. Melnikov, E. K. L. Yeon, H. Uji-i, M. Cotlet, K. Müllen, F. C. De Schryver, J. Enderlein, and J. Hofkens, J. Phys. Chem. B **11**, 708 (2007).
15. Th. Cordes, A. Maiser, Ch. Steinhauer, L. Schermelleh, and Ph. Tinnefeld, Phys. Chem. Chem. Phys. **13**, 6699 (2011).
16. H. E. Grecco and P. J. Verveer, Chemphyschem **12**, 484 (2011).
17. F. Persson, M. Linden, C. Unoson, and J. Elf, Nat. Meth. **100**, 265 (2013).
18. B. A. Camley, F. L. H. Brown, and E. A. Lipman, J. Chem. Phys. **131**, 104509 (2009).
19. I. S. Osad'ko and A. L. Shchukina, Phys. Rev. E **85**, 061907 (2012).
20. I. S. Osad'ko, J. Chem. Phys. **142**, 125102 (2015).
21. I. V. Gopich and A. Szabo, J. Phys. Chem. B **114**, 15221 (2010).
22. I. Yu. Eremchev, I. S. Osad'ko, and A. V. Naumov, J. Phys. Chem. C **120**, 22006 (2016).