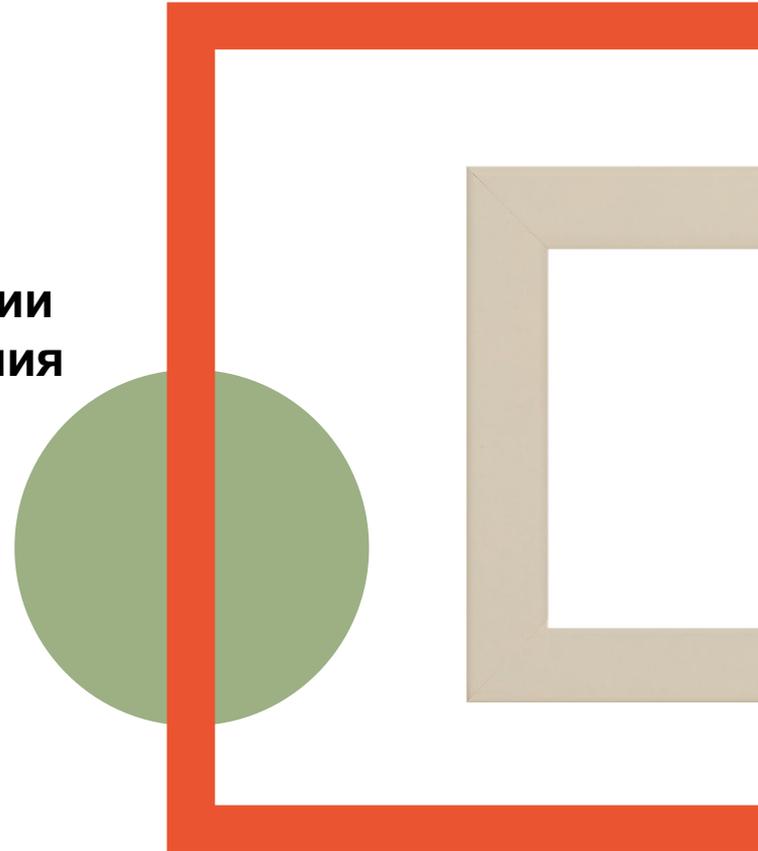


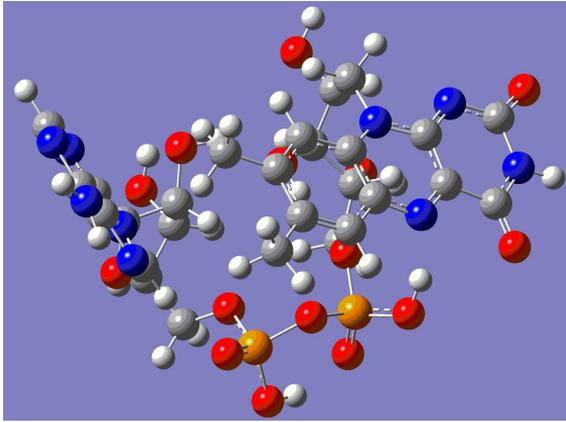
**Анизотропия и времена затухания
поляризованной флуоресценции
внутриклеточного кофермента FAD в
растворах при однофотонном возбуждении
через первую и вторую полосы поглощения**

Краснопевцева М.К., Сасин М.Э., Горбунова И.А.,
Голышев Д.П., Смолин А.Г., Васютинский О.С.

Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 26



Предмет и задачи исследования



3D-структура молекулы FAD

Задача:

Исследование молекулы FAD в разных растворах с применением методов импульсной лазерной спектроскопии.

Предмет исследования:

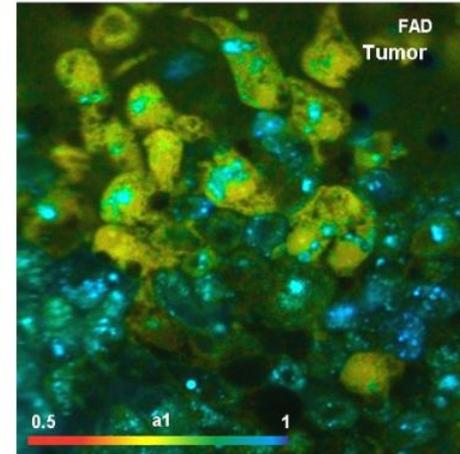
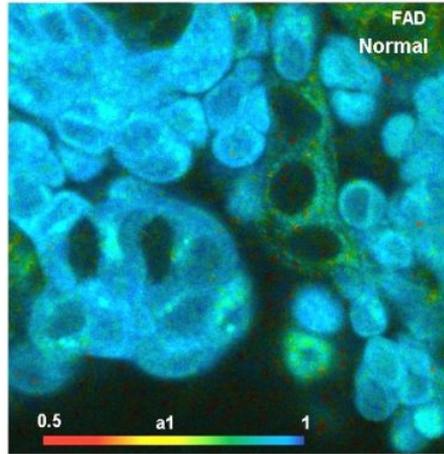
Молекула FAD – кофермент, участник окислительно-восстановительных реакций в клетках; флуоресцирует

Актуальность:

Влияние вязкости и полярности растворов на параметры флуоресценции FAD;
Распределение конформаций FAD в растворах

Применимость:

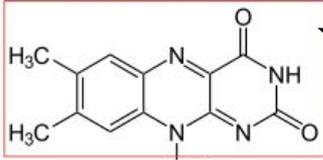
Неинвазивное исследование нарушений в окислительно-восстановительных процессах в клетках, в частности, исследование раковых заболеваний



Изображения быстрой компоненты времени жизни в здоровой клетке (слева) и раковой (справа). Источник: Becker&Hickl

Поглощение и флуоресценция FAD

Isoalloxazine

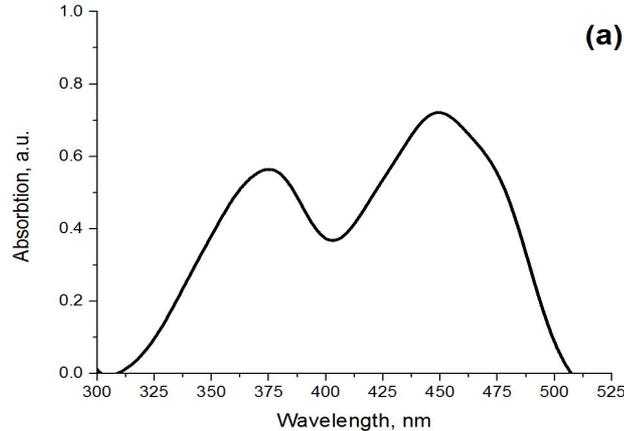
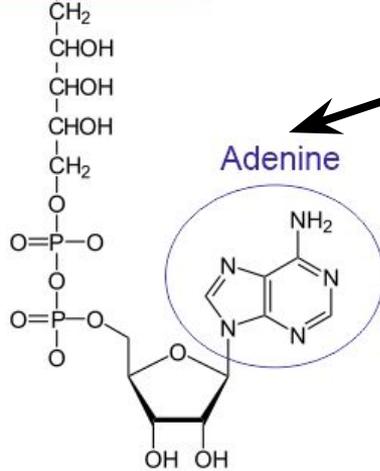


Имеет две хромофорные группы:

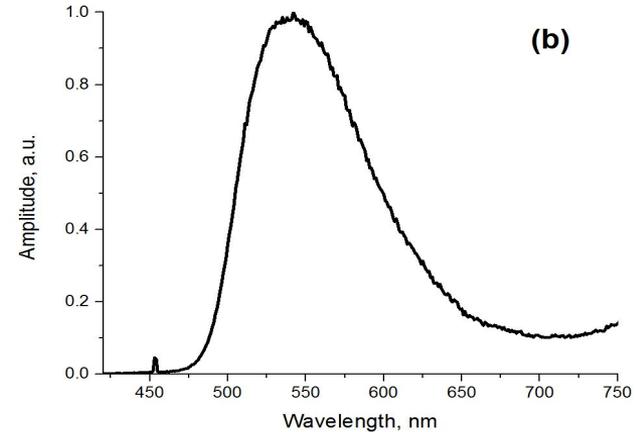
Изоаллоксазин (флуоресцирует в широком спектре с пиком 530 нм, поглощение на 375 и 450 нм)

Аденин (не флуоресцирует, поглощение на 260 нм)

Adenine

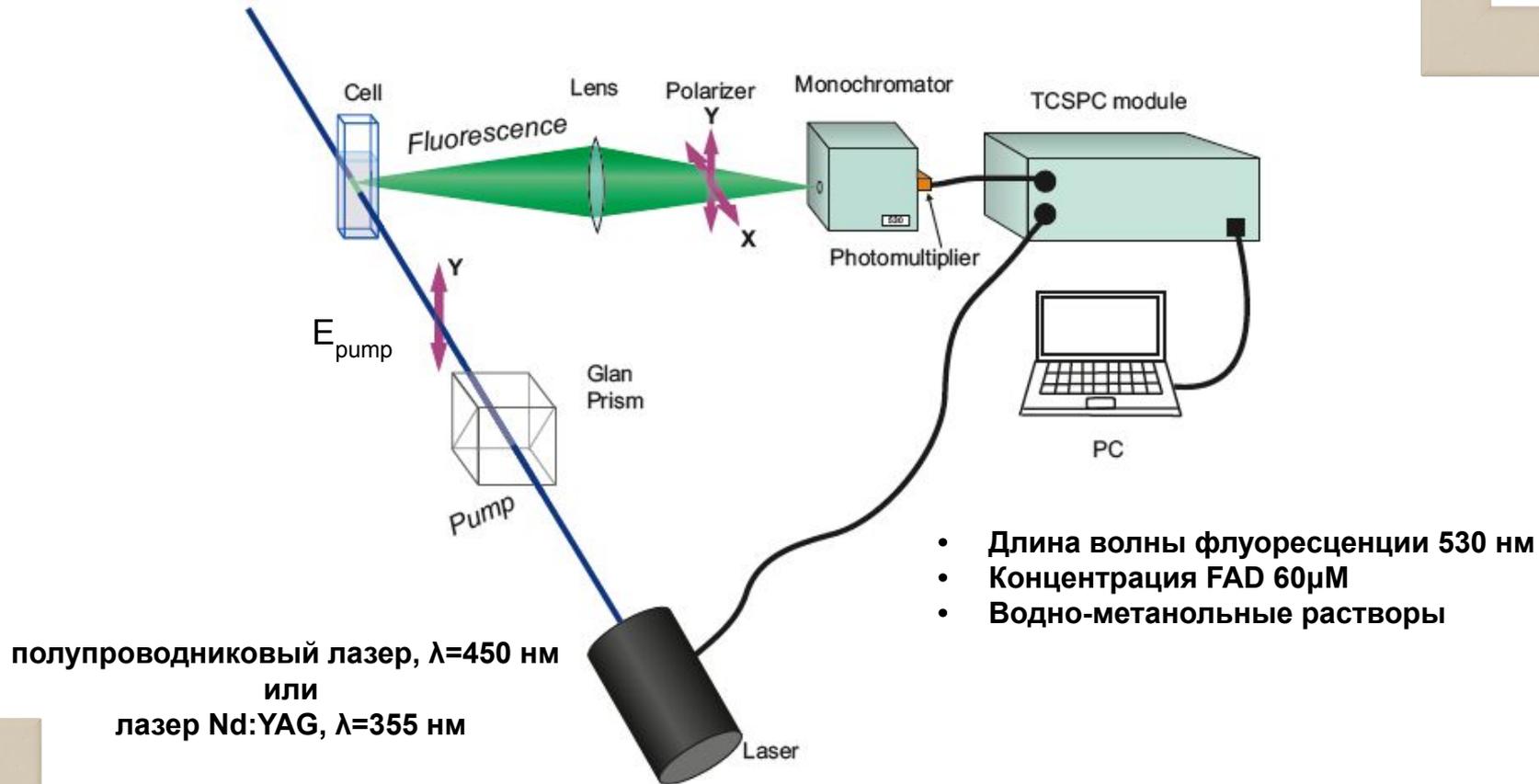


Спектр поглощения

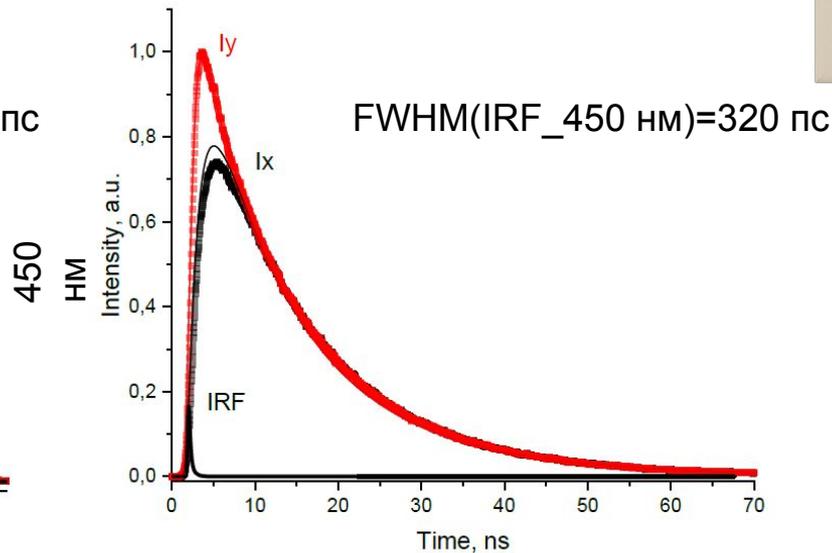
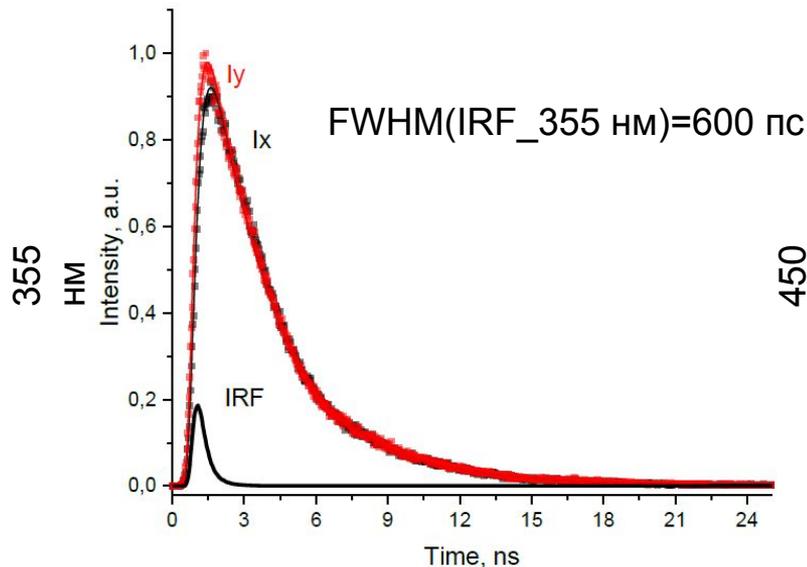


Спектр флуоресценции

Схема экспериментальной установки



Сигналы флуоресценции и их обработка



Ортогональные компоненты поляризованной флуоресценции:

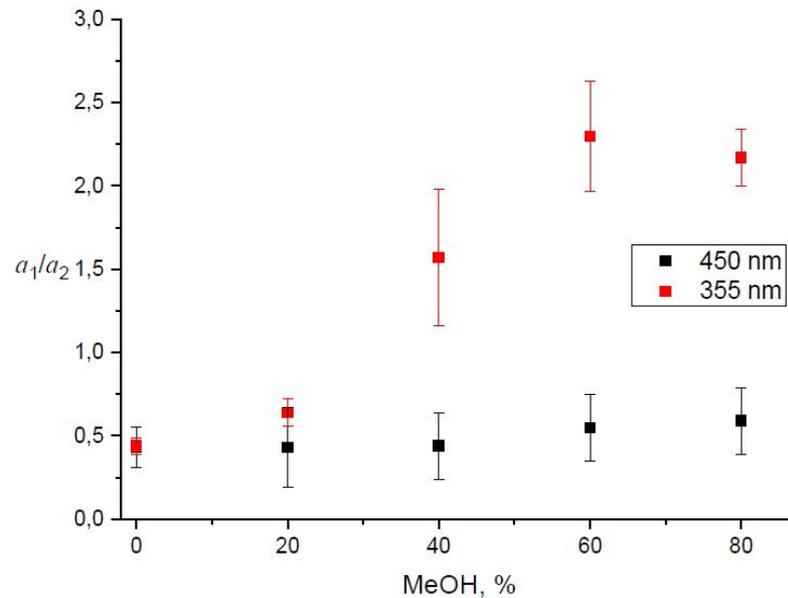
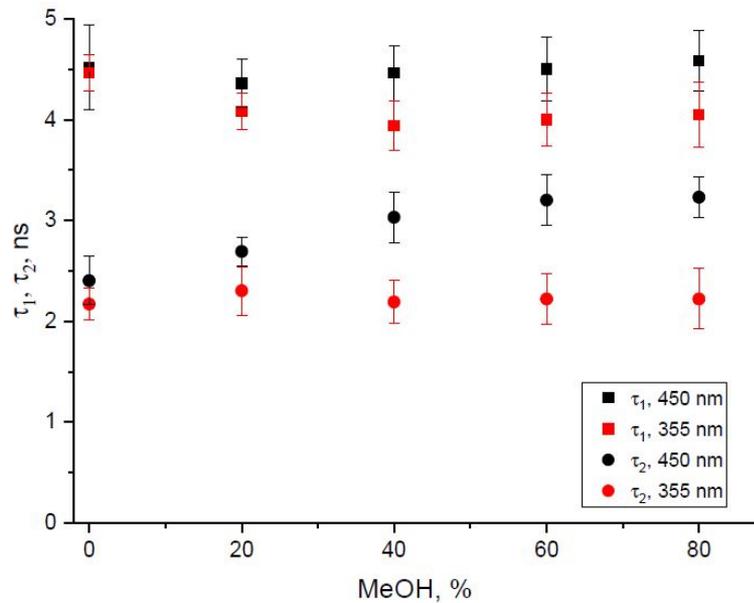
$$I_y = G \int_0^t IRF(t') I(t-t') [1 + 2r(t-t')] dt'$$

$$I_x = \int_0^t IRF(t') I(t-t') [1 - r(t-t')] dt'$$

Изотропное затухание:

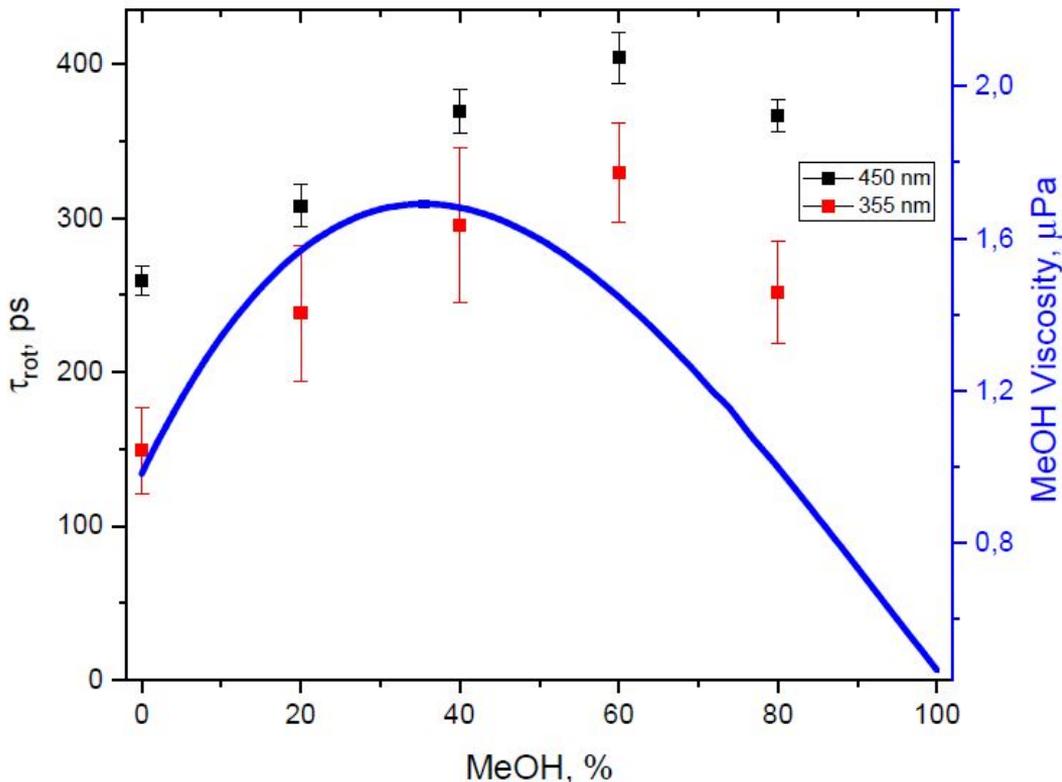
$$I(t) = I_0 \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

Времена затухания FAD в растворах метанола



$$I(t) = a_1 e^{-\frac{t-t'}{\tau_1}} + a_2 e^{-\frac{t-t'}{\tau_2}} \quad - \text{изотропное затухание FAD выражается двумя экспонентами}$$

Время вращательной диффузии FAD в растворах метанола



Анизотропия флуоресценции:

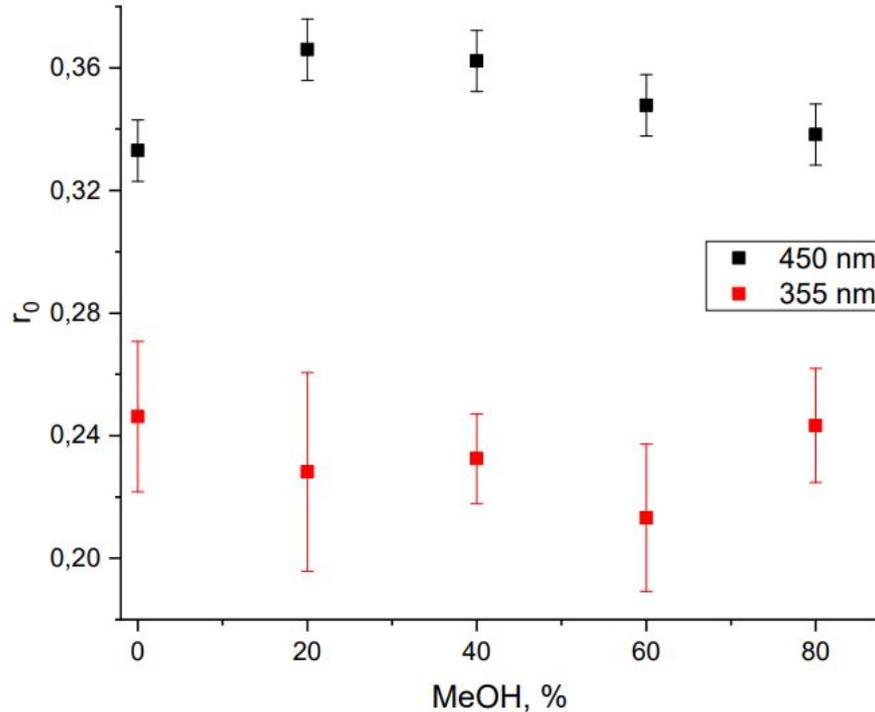
$$r(t) = \frac{I_y - I_x}{I_y + 2I_x} = r_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_r}\right)$$

Уравнение Эйнштейна-Стокса-Дебая:

$$\tau_r = fC \frac{\eta V_M}{kT}$$

При концентрациях MeOH выше 40% изменения времени вращательной диффузии могут быть связаны с изменением распределения различных конформаций FAD в зависимости от концентрации метанола

Анизотропия флуоресценции FAD в растворах метанола



Анизотропия флуоресценции:

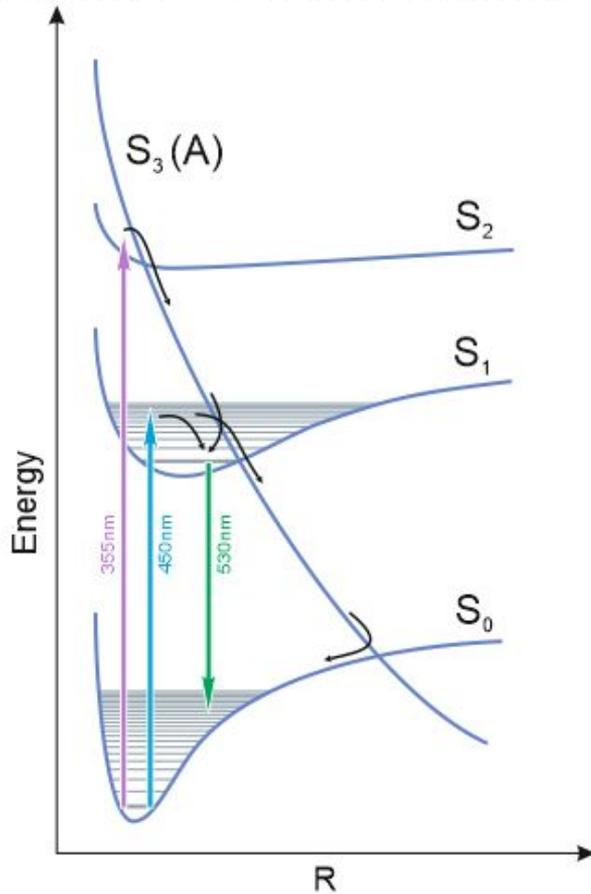
$$r(t) = \frac{I_y - I_x}{I_y + 2I_x} = r_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_r}\right)$$

Параметр анизотропии:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right)$$

Θ – угол между поляризацией возбуждающего излучения и дипольным моментом флуоресценции

Модель возбуждения и флуоресценции молекулы ФАД



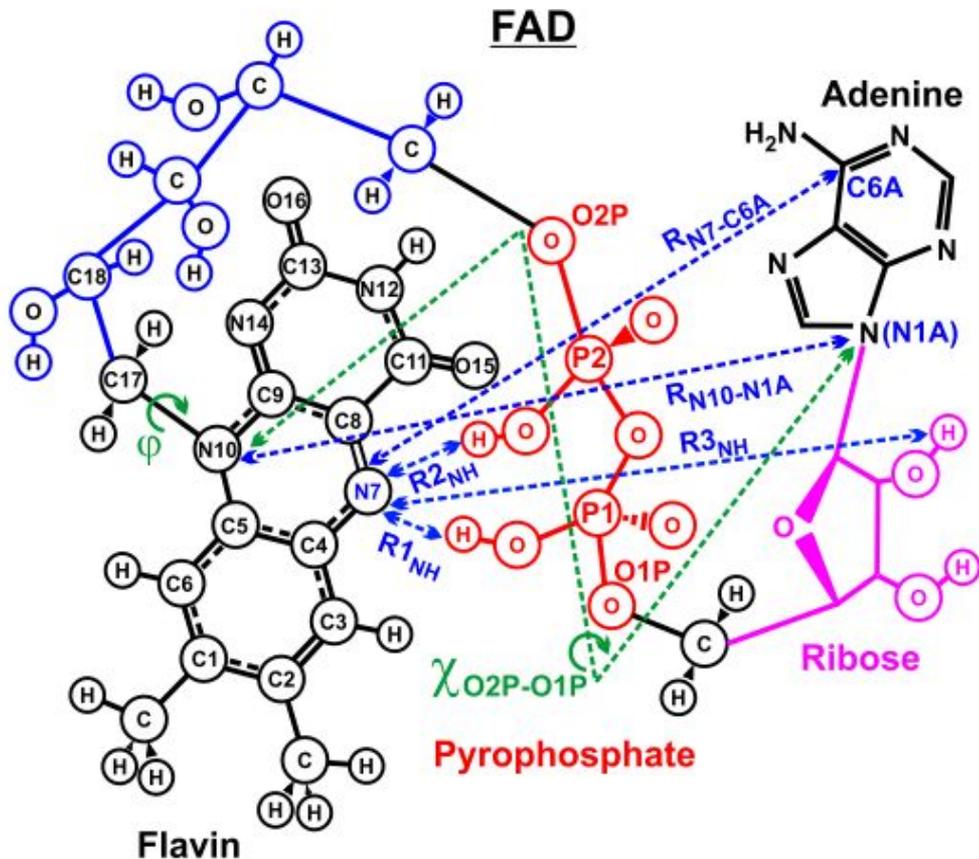
Квантовый выход FAD в воде ~ 4%

$$Y_{nrad1} = \frac{1}{\tau_1} = \frac{1}{\tau_{1rad}} + \frac{1}{\tau_{1nrad}} \sim \frac{1}{\tau_{1nrad}} \Rightarrow \tau_1 \sim \tau_{1nrad}$$

$$Y_{nrad2} = \frac{1}{\tau_2} = \frac{1}{\tau_{2rad}} + \frac{1}{\tau_{2nrad}} \sim \frac{1}{\tau_{2nrad}} \Rightarrow \tau_2 \sim \tau_{2nrad}$$

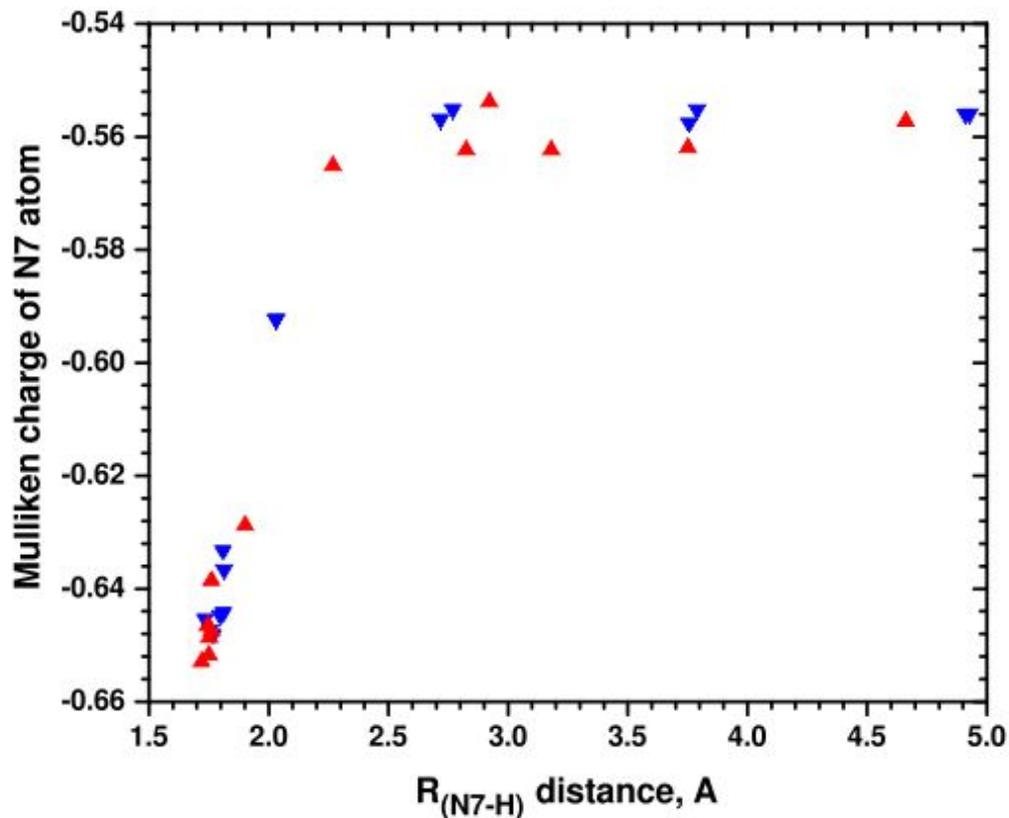
Оба полученных времени жизни являются временами безызлучательных переходов из возбужденного состояния аденина в основное;

Причины появления двух времен жизни FAD



- Вероятность безызлучательных переходов γ_{nrad} зависит от напряженности внутримолекулярного электрического поля E и в частности от наличия водородных связей в молекуле
- τ_1 соответствует состоянию молекулы без водородных связей, τ_2 - с такой связью

Зависимость заряда на атоме азота от наличия водородной связи



Для зарядов по Малликену атома N7 наблюдается резкий рост для тех конформеров FAD, в которых расстояние между N7 и H больше 2Å

Полученные результаты

1. Проведены исследования затухания поляризованной флуоресценции FAD в водно-метанольных растворах.
2. Продемонстрирована зависимость времен жизни флуоресценции, весовых коэффициентов, времени вращательной диффузии и анизотропии от параметров микроокружения и полосы возбуждения молекулы.
3. Предложена теоретическая модель возбуждения и флуоресценции FAD.
4. Установлены причины появления двух времен жизни у FAD.

Спасибо за внимание!