

راهنمای جفت های پروتئین فلورسنت FRET

۱- شهلا عالیپور

۱- کارشناس ارشد بیوفیزیک دانشگاه پیام نور تفت

Email: golsacmsec@gmail.com

چکیده

فناوری انتقال انرژی رزونانس فلورسانس (FRET) و حسگرهای زیستی رمزگذاری شده ژنتیکی، ابزار قدرتمندی برای تجسم مولکولهای سیگنال در سلولهای زنده با وضوح فضایی و زمانی بالا ارائه می کنند. پروتئین های فلورسنت (FPs) معمولاً به عنوان فلوروفورهای دهنده و گیرنده در حسگرهای زیستی استفاده می شوند، به ویژه از آنجایی که FP ها از نظر ژنتیکی رمزگذاری شده و با سلول های زنده سازگار هستند. در این بررسی، پالت جفت های FRET توسعه یافته و نقاط قوت و ضعف نسبی آنها را مورد بحث قرار می دهیم، و عوامل مهمی را که باید در هنگام استفاده از FPs برای مطالعات FRET در نظر گرفته شوند، یادداشت می کنیم.

کلمات کلیدی: FRET، انتقال انرژی، حسگرهای زیستی.

۱. مقدمه

انتقال انرژی تشدید فلورسانس (FRET) که برای اولین بار توسط تئودور فورستر در سال ۱۹۴۶ توصیف شد، یک پدیده فیزیکی است که در آن یک فلوروفور دهنده در حالت برانگیخته خود به صورت غیر تشعشعی انرژی برانگیختگی خود را به فلوروفور پذیرنده مجاور منتقل می کند و در نتیجه گیرنده را وادار به انتشار می کند. فلورسانس مشخصه آن [۳].

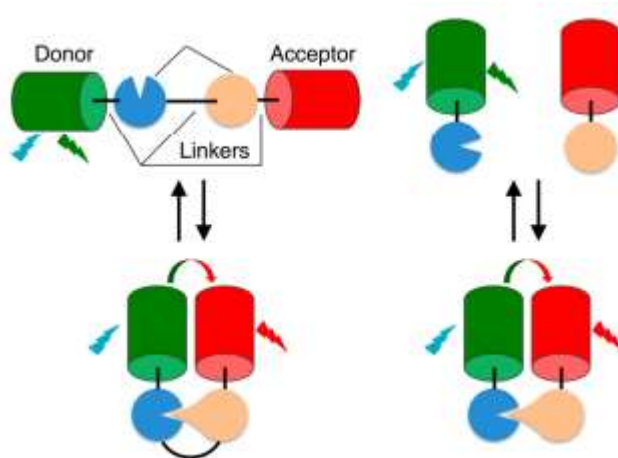
از آنجایی که FRET به فاصله بین دو قطبی دهنده و گیرنده در محدوده ۱-۱۰ نانومتر بسیار حساس است، حسگرهای زیستی مبتنی بر FRET، متشکل از فلوروفورها و حوزه های حسگر، به طور گسترده به عنوان خط کش های طیف سنجی برای نظارت بر انواع فعالیت های بیوشیمیایی که تغییرات ایجاد می کنند، مورد استفاده قرار گرفته اند. در مجاورت مولکولی، مانند برهمکنش های پروتئین-پروتئین، تغییرات ساختاری، غلظت یون های درون سلولی، و فعالیت های آنزیمی [۸].

مزیت بیوسینگ FRET نسبت به سنجش های بیوشیمیایی این است که به صورت نوری انجام می شود و امکان بازجویی از سلول های زنده را به روشی غیر مخرب و کم تهاجمی فراهم می کند [۱۲].

بسته به اینکه آیا دو فلوروفور به یک مولکول متصل هستند یا خیر، حسگرهای زیستی FRET را می توان به دو دسته طبقه بندی کرد:

(۱) نوع درون مولکولی، که در آن فلوروفورهای دهنده و گیرنده به یک مولکول متصل می شوند، به موجب آن تغییرات ساختاری در مولکول باعث ایجاد تغییرات FRET می شود.

(۲) نوع بین مولکولی، که در آن فلوروفورهای دهنده و گیرنده با مولکول های مختلف ترکیب می شوند، و تغییرات FRET زمانی رخ می دهد که مولکول های مستقل به هم نزدیک شوند [۱۲] (شکل ۱).



شکل ۱- دو نوع بیوسنسور FRET

در تمام حسگرهای زیستی FRET، انتخاب جفت‌های FRET بهینه (فلوروفورهای دهنده و گیرنده) کلید عملکرد بالای بیوسنسورها در سلول‌های زنده است [۱۵].

سه نوع اصلی از فلوروفورها به عنوان جفت FRET در حسگرهای زیستی FRET استفاده شده‌اند: رنگ‌های آلی کوچک، پروتئین‌های فلورسنت (FPs)، و نقاط کوانتومی (QDs). برخلاف رنگ‌ها و QD ها، FP ها از نظر ژنتیکی رمزگذاری شده‌اند و می‌توانند به ویژه در تصویربرداری FRET سلول زنده مفید باشند.

اولاً، حسگرهای FRET مبتنی بر FP به راحتی با ادغام FP ها با حوزه‌های سنجش از طریق مهندسی ژنتیک ساخته می‌شوند. در مقابل، رنگ‌ها و QD ها توانایی برچسب‌گذاری حوزه‌های حسگر را بدون کمک آنتی‌بادی‌ها ندارند [۱۱]، که تعداد حسگرهایی را که می‌توان ساخت محدود می‌کند.

دوم، FP ها با استفاده از پروموتورهای خاص بافت، ویژگی سلولی بالایی را به ارمان می‌آورند، و همچنین از طریق معرفی توالی‌های هدف‌گیری درون سلولی، ویژگی درون سلولی بالایی دارند، که پروب‌های FRET را قادر می‌سازد تا فعالیت را فقط در انواع سلول‌های مورد علاقه یا مناطق درون سلولی مورد علاقه گزارش دهند.

سوم، حسگرهای FRET مبتنی بر FP را می‌توان به آسانی از طریق انتقال یا عفونت ویروسی به سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی وارد کرد، در حالی که معرفی بیوسنسورهای FRET مبتنی بر رنگ یا QD به سلول‌ها چالش برانگیز بوده است.

چهارم، حسگرهای مبتنی بر رنگ و QD در سلول‌های زنده پایدار نیستند و می‌توانند به سرعت در داخل بدن از بدن پاک شوند [۱۱]. با این حال، حسگرهای FRET مبتنی بر FP به دلیل پایداری بالای درون سلولی FP ها برای مدت طولانی در سلول‌ها پایدار هستند. به عنوان مثال، EGFP زمان نیمه عمری بیش از ۲۴ ساعت در سلول‌ها دارد [۹].

در نهایت، رده‌های سلولی پایدار که حسگرهای زیستی FRET را بیان می‌کنند در حضور فشار آنتی‌بیوتیک به راحتی قابل دستیابی هستند، که زنده‌مانی سلولی را در تصویربرداری FRET کاهش می‌دهد و غربالگری دارویی با کارایی بالا را تسهیل می‌کند [۱].

در واقع، تنوع FP های مهندسی شده با خواص اپتیکی بهبود یافته، این امکان را فراهم کرده است که FP ها را برای جفت‌های FRET با راندمان بالا تنظیم کنیم و حسگرهای زیستی FRET بسیار حساس را توسعه دهیم. در این بررسی، ابتدا ابزارهای اندازه‌گیری راندمان FRET و محدوده دینامیکی را مورد بحث قرار می‌دهیم. در مرحله بعد، جفت‌های FP FRET متداول و اخیراً توسعه یافته و کاربردها، مزایا و معایب مربوطه را بررسی می‌کنیم.

در نهایت، ما ملاحظات مهم فوتوفیزیکی را هنگام انتخاب جفت‌های FP FRET و همچنین دیدگاه‌های آینده در مورد جفت‌های FP FRET جدید برای حسگرهای زیستی FRET بررسی می‌کنیم.

۲. راندمان FRET، محدوده دینامیکی FRET و اندازه گیری FRET

FRET بین دو فلوروفور در مجاورت نزدیک با همپوشانی قابل توجه (بیش از ۳۰٪) بین گسیل دهنده و طیف جذب گیرنده رخ می‌دهد و با کارایی (E) FRET مشخص می‌شود. FRET E به درصد انتقال انرژی از دهنده به فلوروفورهای گیرنده در یک حالت معین اشاره دارد و به طور کمی در دو معادله زیر توضیح داده شده است:

$$E = \frac{r^6}{r_0^6 + r^6} \quad (1)$$

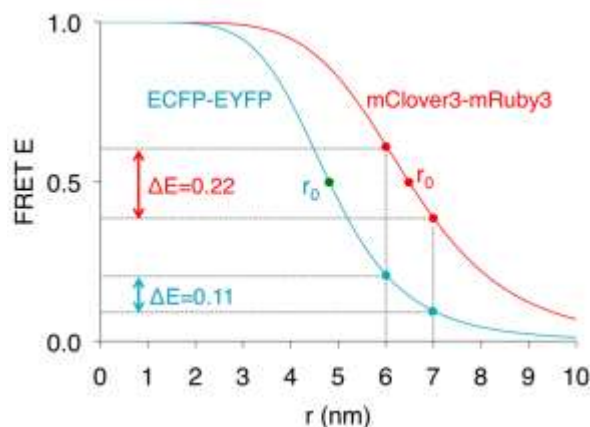
$$r_0 = 0.02108 (k^2 \Phi_D n^{-4} (\int_0^\infty f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda))^{1/6} \quad (in \text{ nm}) \quad (2)$$

جایی که r فاصله بین دو قطبی دهنده و گیرنده است. r_0 فاصله ای است که در آن FRET ۵۰٪ است. و k^2 ضریب جهت گیری بین دو قطبی است (فرض می‌شود $2/3$ مربوط به یک جهت گیری تصادفی است). توجه داشته باشید که فرض میانگین دینامیکی که k^2 برای FP ها $2/3$ است، مناسب نیست زیرا FP های اتوفلورسنت به دلیل وزن مولکولی نسبتاً بزرگشان، در طول عمر حالت برانگیخته کوتاه ($5.1 \text{ ns} <$) دچار انتشار چرخشی زیادی (۱۵ تا ۲۰ ns) نمی‌شوند. (۲۷ کیلو دالتون) [۱۹].

با این حال، مقدار k^2 دقیق برای FP ها ناشناخته است. استفاده از مقادیر دیگر k^2 ، مقدار r_0 را تغییر می‌دهد، اما روند بین جفت‌های مختلف FP یکسان باقی می‌ماند [۱۷].

تا اینجا، شعاع فورستر (r_0) برای جفت‌های FP FRET بر اساس k^2 از $2/3$ تقریباً در تمام مقالات FP FRET است. برای مقایسه همه جفت‌های FP FRET، $2k$ از $2/3$ هنوز در این مقاله فقط برای نشان دادن تفاوت r_0 ها از جفت‌های مختلف FP استفاده می‌شود. n ضریب شکست محیط اطراف فلوروفورها است. Φ_D بازده کوانتومی (QY) دهنده در غیاب پذیرنده است. $f_D(\lambda)$ شدت فلورسانس دهنده اصلاح شده (وابسته به طول موج) در طول موج λ با شدت کل (مساحت زیر منحنی) نرمال شده به واحد است و بدون بعد است. ϵ_A ضریب خاموشی (وابسته به طول موج) (EC) پذیرنده ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) و λ طول موج است، که به موجب آن عبارت انتگرال نشان دهنده همپوشانی طیفی بین انتشار دهنده و تحریک پذیرنده است. بنابراین، عناصر کلیدی که E جفت‌های FRET را تعیین می‌کنند، همپوشانی طیفی، QY اهداکننده، EC گیرنده، طول موج، و فاصله و

جهت بین فلوروفور هستند. برای به حداکثر رساندن FRET E، یک جفت FRET با تغییر رنگ قرمز با خواص نوری بهبود یافته از جمله EC، QY و همپوشانی طیفی باید استفاده شود. برای یک جفت FRET معین، FRET متناسب با توان ششم معکوس فاصله بین دو فلوروفور است و فقط در فاصله کوتاه‌تر از ۱۰ نانومتر کار می‌کند (شکل ۲).



شکل ۲- راندمان FRET (FRET E) در مقابل فاصله.

با توجه به اینکه کروموفورهای FP های اتوفلورسنت (مستقیماً از اسیدهای آمینه توالی پروتئین) به طور مرکزی در ساختار بشکه β با قطر حدود ۲.۴ نانومتر دفن شده‌اند، فاصله مؤثر برای جفت‌های FRET مبتنی بر FP اتوفلورسنت کمتر از ۷ نانومتر است. در حداکثر راندمان عملی FRET ۴۰٪-۵۵٪ [۱۵].

در مقابل، FP LUMP غیر اتوفلورسنت (پروتئین اتصال به لومازین) به صورت غیر کووالانسی در سطح خود به مولکول کروموفور ریبتیل-لومازین متصل می‌شود و بازدهی FRET بالایی تا ۶۲ درصد را در هنگام جفت شدن با FP ونوس زرد اتوفلورسنت نشان می‌دهد [۵].

۳. انواع جفت FRET FP

اولین جفت FRET FP توسعه یافته از FP آبی تقویت شده (EBFP) و FP سبز تقویت شده (EGFP) تشکیل شده بود، اما روشی کم و پایداری کم آن باعث شد که این جفت در اکثر برنامه‌ها غیر عملی باشد [۱۵].

اگرچه از آن زمان BFP های روشن تر و پایدارتر با نور تولید شده اند، اما هنوز از سمیت نوری ناشی از تحریک نزدیک به اشعه ماوراء بنفش رنج می برند و کاربرد آنها در تصویربرداری طولانی مدت سلول زنده را محدود می کند [۱۵]. برای غلبه بر محدودیت های جفت های BFP-GFP، جفت های فیروزه ای FP-Zرد (CFP-YFP) توسعه یافتند و به محبوب ترین جفت های FP FRET تبدیل شدند، که با جفت ECFP-EYFP شروع شد [۷].

جفت های CFP-YFP از چندین مشکل مشکل ساز برای FRET رنج می برند، از جمله سفید کردن سریع YFPs، تبدیل نوری YFPs به FP های شبه CFP، گفتگوی متقاطع طیفی، و سمیت نوری ناشی از تحریک اهداکننده بنفش [۸]. علاوه بر این، حسگرهای زیستی FRET مبتنی بر CFP-YFP، محدوده دینامیکی FRET نسبتاً پایینی را به دلیل 0.2 های پایین در هنگام استفاده در حسگرهای زیستی کیناز FRET نشان می دهند [۸].

علاوه بر CFP های اتوفلورسنت، FP LUMP غیر اتوفلورسنت ($0.55QY =$) نشان داده شد که یک اهداکننده FRET کارآمد به زهره است. جالب توجه است که LUMP دارای طول عمر فلورسانس غیرمعمول طولانی 136 ns است که در میان تمام کمپلکس های پروتئین فلورسنت کدگذاری شده ژنتیکی گزارش شده تاکنون بزرگترین است که منجر به راندمان FRET بالا و محدوده دینامیکی می شود [۵].

با این حال، مولکول ریبتیل لومازین در سلول های پستانداران وجود ندارد و برای القای فلورسانس باید به صورت برونزا عرضه شود. علاوه بر این، به دلیل اندازه کوچک و طول عمر فلورسانس طولانی LUMP، LUMP می تواند اتصال دامنه پپتیدی را با اندازه گیری های ناهمسانگردی تشخیص دهد.

جفت های سبز-قرمز FRET بر چندین معایب جفت های فیروزه ای-زرد FRET غلبه می کنند. تحریک جفت سبز-قرمز باعث ایجاد اتوفلورسانس کمتری از فلاوپروتئین ها، سمیت نوری کمتر و جدایی طیف بیشتر می شود [۴]. تا همین اواخر، جفت های سبز-قرمز از روشنایی پایین FP های قرمز رنج می بردند.

با جفت EGFP-mCherry FRET، انتشار FRET برای تشخیص بالای دم انتشار دهنده بسیار ضعیف است، که از استفاده از این جفت در تصویربرداری نسبت سنجی جلوگیری می کند [۱۸]. با این حال، جفت EGFP-mCherry محدوده دینامیکی مناسبی را در تصویربرداری FLIM-FRET به دلیل طول عمر فلورسانس نسبتاً بالای EGFP (2.4 ns) و همپوشانی طیفی نسبتاً بزرگ نشان می دهد. برای افزایش بیشتر محدوده دینامیکی FRET جفت های GFP-RFP در تصویربرداری FLIM-FRET، یک FP NowGFP سبز رنگ جدید با طول عمر 5.1 ns ساخته شد و نشان داده شده است که اهداکننده کارآمدی برای mRuby ۲ است [۶].

توسعه دهنده های جدید FP سبز روشن و با قابلیت عکس و پذیرندگان FP قرمز، کاربردهای FRET مبتنی بر شدت را بهبود بخشیده است. اهداکنندگان FP سبز روشن عبارتند از Clover و mClover ۳، مشتق شده از GFP، و mNeonGreen، مشتق شده از Branchiostoma lanceolatum YFP [۱۶].

پذیرندگان FP FRET قرمز روشن و پایدار شامل مشتقات mRuby ۲mRuby و ۳mRuby می‌باشند، که دومی درخشان‌ترین و پایدارترین RFP مونومری است که تاکنون شرح داده شده است [۸]. جفت FRET ۲Clover-mRuby محدوده دینامیکی بهبود یافته ای را در مقایسه با جفت های CFP-YFP و FRET E را در مقایسه با EGFP-mCherry بهبود بخشیده است [۸].

علاوه بر این، ۳-mRuby و ۳mClover-mRuby هر دو دارای بالاترین 0.1 ± 0.5 نانومتر) در بین هر جفت FRET با FP های مونومر تا به امروز هستند. در مجموع، اهداکنندگان سبز روشن و پایدار و پذیرندگان قرمز، GFP-RFP FRET را به دلیل مزایایی که نسبت به CFP-YFP FRET دارد، به طور فزاینده ای در سلول های زنده جذاب کرده اند.

۴. ملاحظات هنگام استفاده از جفت های FP

علاوه بر مهندسی FP ها با انقراض پذیرنده بهبود یافته و بازده کوانتومی دهنده، یک استراتژی برای افزایش دامنه دینامیکی FRET و تغییر FRET مهندسی کردن گیرنده های FRET با بلوغ و تاخوردگی بهبود یافته است، که ویژگی FP ها است که اغلب نادیده گرفته می شود. تا کردن در مورد مطالعات کیفی، مانند محلی سازی درون سلولی پروتئین در سلول ها، و آزمایش های کمی با پنجره های تصویربرداری کوتاه (مقیاس زمانی دقیقه) مشکلی نیست.

با این حال، اگر اندازه گیری فلورسانس کمی در مدت زمان طولانی (ده ها دقیقه تا ساعت) مورد نیاز باشد و از FP هایی با تاشو ضعیف استفاده شود، تا کردن می تواند مشکل ساز باشد. تا شدن می تواند در حسگرهای FRET بدتر از خود FP های آزاد باشد زیرا حسگرهای زیستی FRET از چندین حوزه تشکیل شده اند. در واقع، مطالعات نشان می دهند که در حالی که پارامترهای فوتوفیزیکی نقطه شروع خوبی برای یافتن جفت های FRET بهینه هستند، بلوغ تا حد زیادی بر انعطاف پذیری سیگنال های FRET تأثیر می گذارد و اعتبارسنجی تجربی FPS ضروری است. حتی با ویژگی های فوتوفیزیکی بدتر، FP هایی با نرخ بلوغ سریع تر تمایل دارند عملکرد FRET بهتری را نشان دهند [۱۷].

به عنوان مثال، mCherry، در حالی که دارای ویژگی های روشنایی کمتر از حد مطلوب در مقایسه با ۲mRuby بود، پوشه سریع تری بود و بنابراین کارایی FRET ظاهری بالاتری داشت [۱۰]. ۳mRuby، یک نوع تاشو سریع ۲mRuby، تغییرات FRET بزرگتری را نشان می دهد [۲]. YFP sREACH تیره حاوی دو جهش مورد استفاده در mVenus و

mCitrine است که بازده تاشو را تا ۵۰ درصد بهبود می بخشد و نسبت سیگنال به نویز را هنگام عمل به عنوان گیرنده mEGFP تا حدود ۵۰ درصد در مقایسه با REACh قبلی خود بهبود می بخشد [۱۳].

همانطور که انتظار می رفت، افزایش بلوغ REACh نیز تنوع سیگنال های FRET اندازه گیری شده را کاهش داد [۱۳]. ضروری است که دو FP در یک جفت FRET معین دارای نرخ بلوغ برابر و سریع باشند. نرخ های مختلف بلوغ، نسبت گیرنده به اهداکننده را از نسبت نظری ۱:۱ تغییر می دهد و FP هایی با بلوغ آهسته می توانند در طول تصویربرداری بالغ شوند و بر تجزیه و تحلیل کمی FRET تأثیر بگذارند. تا شدن خوب همچنین برای بهبود محدوده دینامیکی FRET با افزایش EC و QY مهم است، به عنوان مثال SEYFP در مقابل EYFP [۱۶].

علاوه بر این، پیاده سازی FP های «چسبنده» خود مرتبط در حسگرهای FRET راه دیگری برای بهبود محدوده دینامیکی است. FP های دهنده و گیرنده "چسبنده" حاوی جهش های آبریز در سطح مشترک دیمریزاسیون FP هستند که به آنها اجازه می دهد یک کمپلکس درون مولکولی ضعیف را تشکیل دهند که FRET را در حالت FRET بالا تقویت می کند و در حالت FRET پایین جدا شدن از یکدیگر را امکان پذیر می کند.

CyPet و YPet اولین FP های گزارش شده ای بودند که با معرفی جهش های دیمری ضعیف محدوده دینامیکی FRET را در مقایسه با ECFP و EFYP افزایش دادند، و اهمیت این جهش ها از طریق مهندسی EYFP و ECFP "چسبنده" با دو مورد تایید شد. جهش های یافت شده در CyPet و YPet، که تغییر نسبت انتشار ۱۶ برابری را در حسگر پروتئاز نشان دادند [۱۴]. به طور مشابه، انواع "چسبنده" FPs قرمز mOrange و mCherry مهندسی شده و برای ایجاد پاسخ های حسگر FRET قوی برای فعالیت پروتئاز، $+Zn^{2+}$ و اسیدهای صفراوی استفاده شدند [۱۴].

به طور کلی، ساخت حسگرهای FRET با دامنه دینامیکی بزرگ به طور سنتی یک فرآیند آزمون و خطا است، زیرا پیش بینی جهت گیری FP ها دشوار است، اما استفاده از FP های «چسبنده» می تواند آزمایش اولیه مورد نیاز برای بهینه سازی پاسخ سنسور را کاهش دهد [۱۰].

۵. نتیجه گیری

حسگرهای FRET مبتنی بر FP در کشف مکانیسم های مولکولی زمینه ساز سرطان، بیماری های ایمونولوژیک و عصبی موفق شده اند و نقش کلیدی در کشف دارو دارند. با این وجود، حسگرهای FRET باقی مانده اند که هنگام تشخیص پاسخ های بیوشیمیایی ظریف یا گذرا در سلول های زنده، از دامنه دینامیکی پایین رنج می برند. برای مثال، فعال سازی RhoA در مخروط های رشد عصبی در طول انقباض تحریک شده با افرین A، تنها یک تغییر FRET ۵ درصدی را با Clover-mRuby نشان

می دهد. بهینه سازی جفت های FRET موجود، چه در روشنایی، تا شدن یا بلوغ، می تواند محدوده دینامیکی FRET را افزایش دهد. در حال حاضر، 3mNeonGreen-mRuby یا 3mRuby3mClover دارای بزرگترین ۰.۲ها در بین تمام جفت های FRET مبتنی بر FP مونومر هستند و بزرگترین محدوده دینامیکی FRET را در حسگرهای کیناز FRET نشان می دهند. در مقایسه با 3mClover، 3mNeonGreen کمی روشن تر از 3mClover (۶٪) است و قابلیت عکاسی بیشتری دارد و بنابراین ممکن است نقطه شروع احتمالی برای تکامل یک جفت روشن با محدوده دینامیکی FRET حتی بزرگ تر برای تصویربرداری سلول زنده باشد. FP، QY Lan YFP، FP، تترامری والدین 3mNeonGreen، ۰.۹۵ است. علاوه بر این، بالاترین QY گزارش شده از مشتقات avGFP مهندسی شده ۰.۹۳ از 2mTurquoise است، در حالی که 0.۸ QY 3mNeonGreen است. این ممکن است نشان دهد که انواع 3mNeonGreen را می توان با QY حتی بالاتر توسعه داد. بر خلاف FP های مشتق شده از avGFP، بسیاری از RFP های مهندسی شده، حتی برای نمونه های الیگومری، در سلول ها ضعیف تا می شوند یا به کندی بالغ می شوند. اگرچه 3mRuby در بلوغ یا تا کردن بهتر از 2mRuby است، بلوغ و تا شدن آن هنوز بدتر از 3mCherry (داده های منتشر نشده) است. به نوبه خود، تا کردن و بلوغ 3mRuby را می توان بیشتر بهبود بخشید، که می تواند مولکول های فلورسنت 3mRuby را در مجتمع FRET فعال کند و منجر به افزایش دامنه دینامیکی شود. این امر به ویژه هنگام انجام تصویربرداری طولانی مدت مهم است، زیرا بلوغ FP در طول تصویربرداری می تواند باعث ایجاد FRET شود. به طور کلی، توسعه انواع FP ها باعث شده است که FRET در تعداد بیشتری از زمینه ها قابل اجرا باشد. FP های روشن تر و با قابلیت عکاسی روشن تر، پنجره تصویربرداری FRET را افزایش داده اند، FP های بزرگ تغییر سیگنال ها نظارت بر سیگنال های متعدد را به طور همزمان فعال کرده اند، و FP های قابل تغییر عکس و فعال سازی نوری کنترل بیشتری بر روی تصویربرداری بدون استفاده از کنترل ها ارائه کرده اند. انتخاب جفت FP FRET در حسگرهای زیستی به شدت به سیستمی که حسگر در آن استفاده خواهد شد بستگی دارد. عواملی مانند pH و زمان تا شدن یا بلوغ می توانند به طور قابل توجهی بر عملکرد فوتوفیزیکی یک جفت معین تأثیر بگذارند، به طوری که یک جفت FRET بهینه شده برای یک سنسور یا سیستم خاص ممکن است در شرایط دیگر به خوبی عمل نکند. بنابراین، اعتبارسنجی عملکرد FP در زمینه های مختلف (به عنوان مثال، *in vivo* و *in vitro*) همراه با بهینه سازی ویژگی های فوتوفیزیکی، برای توسعه جفت های FRET قابل تعمیم برای تصویربرداری تک سلولی یا *in vivo* بسیار مهم است.

۶. مراجع

- [1] Aoki, K.; Komatsu, N.; Hirata, E.; Kamioka, Y.; Matsuda, M. Stable expression of FRET biosensors: A new light in cancer research. *Cancer Sci.* 2012, 103, 614–619.
- [2] Bajar, B.T.; Wang, E.S.; Lam, A.J.; Kim, B.B.; Jacobs, C.L.; Howe, E.S.; Davidson, M.W.; Lin, M.Z.; Chu, J. Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Sci. Rep.* 2016, 6, 20889.
- [3] Forster, T. *Energiewanderung und fluoreszenz.* *Naturwissenschaften* 1946, 33, 166–175
- [4] Helmchen, F.; Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* 2005, 2, 932–940.
- [5] Hoepker, A.C.; Wang, A.; Le Marois, A.; Suhling, K.; Yan, Y.; Marriott, G. Genetically encoded sensors of protein hydrodynamics and molecular proximity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2015, 112, E2569–E2574.
- [6] George Abraham, B.; Sarkisyan, K.S.; Mishin, A.S.; Santala, V.; Tkachenko, N.V.; Karp, M. Fluorescent protein based FRET pairs with improved dynamic range for fluorescence lifetime measurements. *PLoS ONE* 2015, 10, e0134436.
- [7] Kremers, G.J.; Goedhart, J.; van Munster, E.B.; Gadella, T.W., Jr. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET forster radius. *Biochemistry* 2006, 45, 6570–6580.
- [8] Lam, A.J.; St-Pierre, F.; Gong, Y.; Marshall, J.D.; Cranfill, P.J.; Baird, M.A.; McKeown, M.R.; Wiedenmann, J.; Davidson, M.W.; Schnitzer, M.J.; et al. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2012, 9, 1005–1012
- [9] Lesmana, J.; Friedl, P. Destabilization of green fluorescent protein by substitution of its amino-terminal residue. *Anim. Cell Technol. Target Mark.* 2001, 1, 6–9.
- [10] Lindenburg, L.; Merckx, M. Engineering genetically encoded FRET sensors. *Sensors* 2014, 14, 11691–11713.
- [11] Masharina, A.; Reymond, L.; Maurel, D.; Umezawa, K.; Johnsson, K. A fluorescent sensor for gaba and synthetic gaba(b) receptor ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 19026–19034.
- [12] Miyawaki, A. Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annu. Rev. Biochem.* 2011, 80, 357–373
- [13] Murakoshi, H.; Lee, S.J.; Yasuda, R. Highly sensitive and quantitative FRET-FLIM imaging in single dendritic spines using improved non-radiative yfp. *Brain. Cell Biol.* 2008, 36, 31–42
- [14] Nguyen, A.W.; Daugherty, P.S. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 355–360.

[15] Piston, D.W.; Kremers, G.J. *Fluorescent protein FRET: The good, the bad and the ugly. Trends Biochem. Sci.* 2007, 32, 407–414

[16] Rekas, A.; Alattia, J.R.; Nagai, T.; Miyawaki, A.; Ikura, M. *Crystal structure of venus, a yellow fluorescent protein with improved maturation and reduced environmental sensitivity. J. Biol. Chem.* 2002, 277, 50573–50578.

[17] Scott, B.L.; Hoppe, A.D. *Optimizing fluorescent protein trios for 3-way FRET imaging of protein interactions in living cells. Sci. Rep.* 2015, 5, 10270.

[18] Tsutsui, H.; Karasawa, S.; Okamura, Y.; Miyawaki, A. *Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. Nat. Methods* 2008, 5, 683–685.

[19] Vogel, S.S.; Nguyen, T.A.; van der Meer, B.W.; Blank, P.S. *The impact of heterogeneity and dark acceptor states on FRET: Implications for using fluorescent protein donors and acceptors. PLoS ONE* 2012, 7, e49593.