

# Bi8920 Fluorescenční mikroskopie

## Fluorescenční zobrazení živých buněk

RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.  
Ústav experimentální biologie PŘF MU



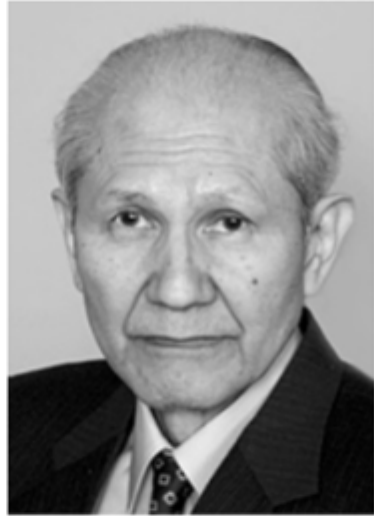
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## Program přednášky:

- GFP a fluorescenční proteiny
- tracking metody
- fluorescence v reálném čase
- mikroskopování živých buněk





Osamu Shimomura



Martin Chalfie



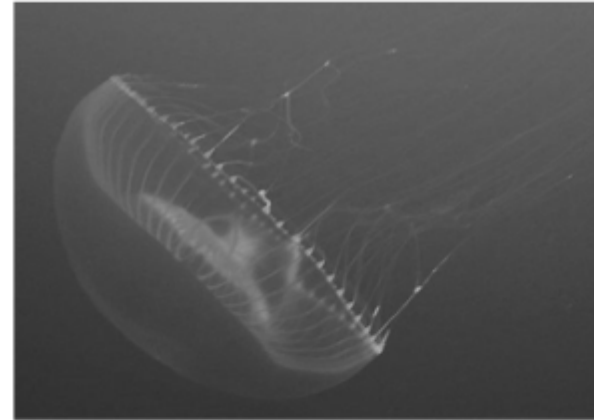
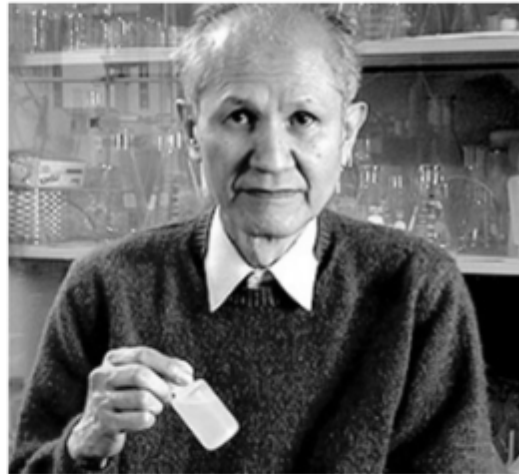
Roger Y. Tsien

The Nobel Prize in Chemistry 2008  
*"for the discovery and development  
of the green fluorescent protein, GFP".*

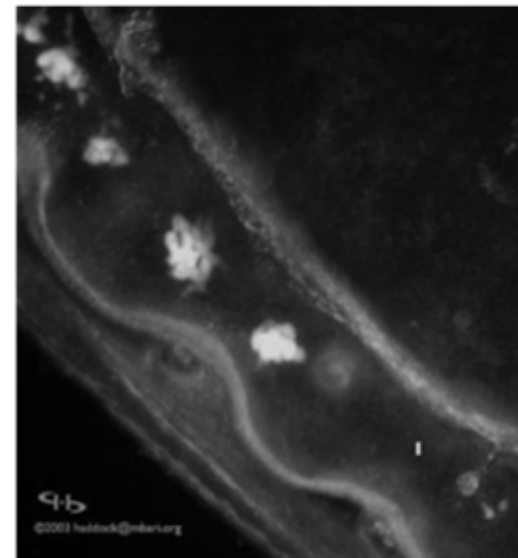
[http://www.youtube.com/watch?v=90wpvSp4I\\_0](http://www.youtube.com/watch?v=90wpvSp4I_0)

O. Shimomura

60. -70. léta: izolace fluoreskujících proteinů z medúzy  
*Aequorea victoria*, kolem klobouku bioluminiscenční orgány

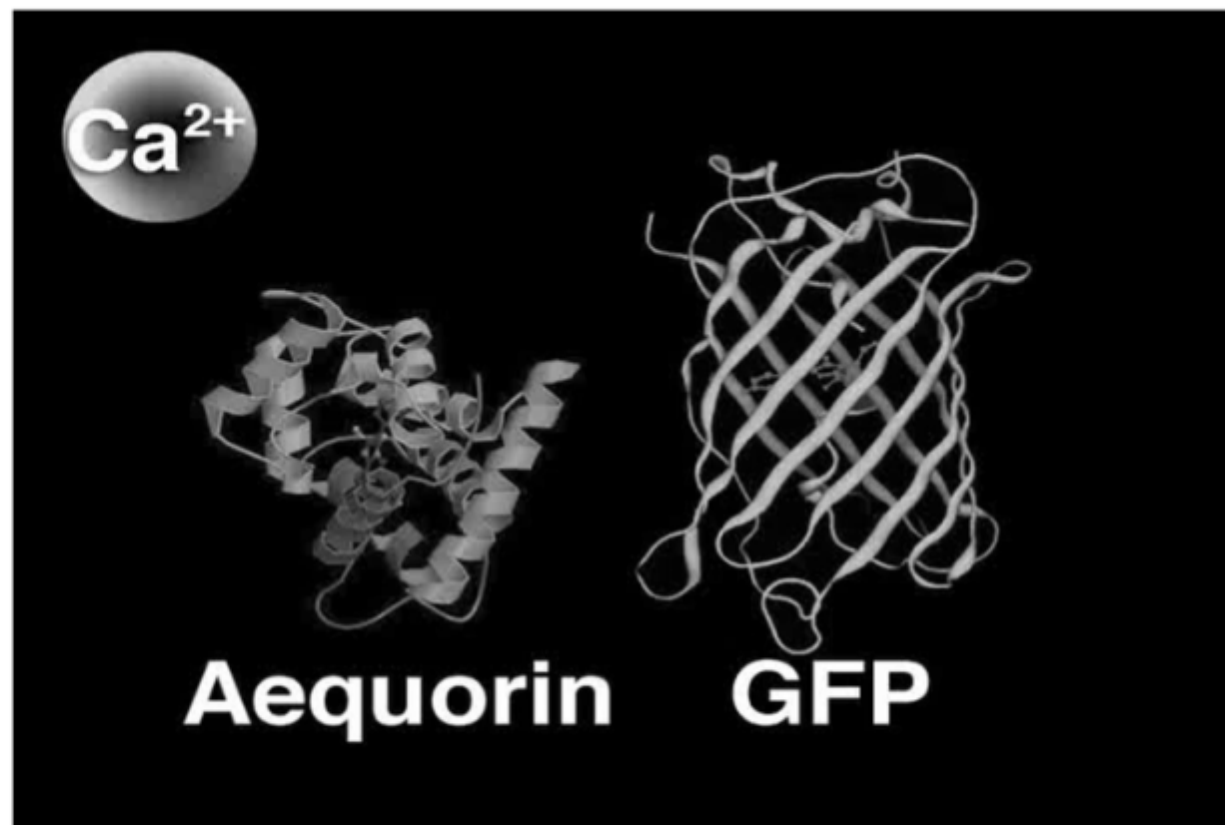


© Osamu Shimomura Originally published in "A Glow in the Dark"

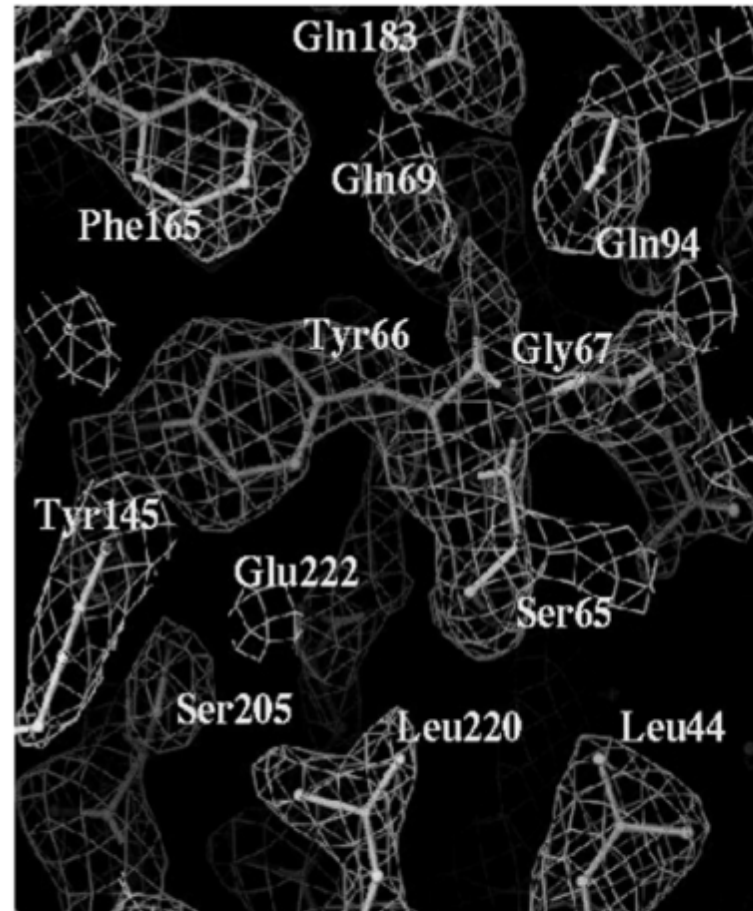
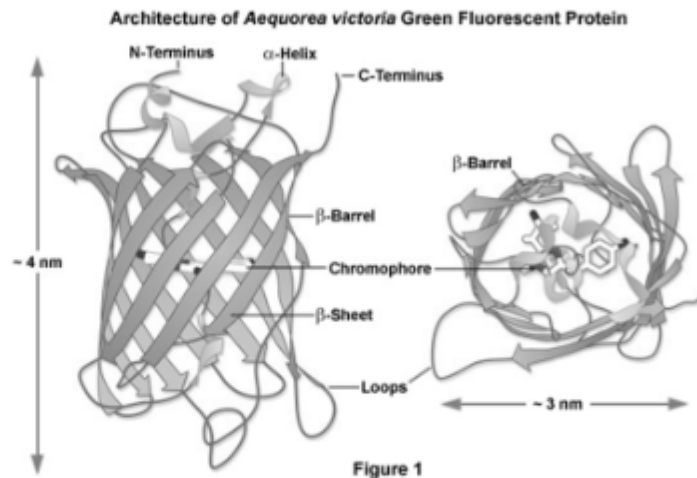


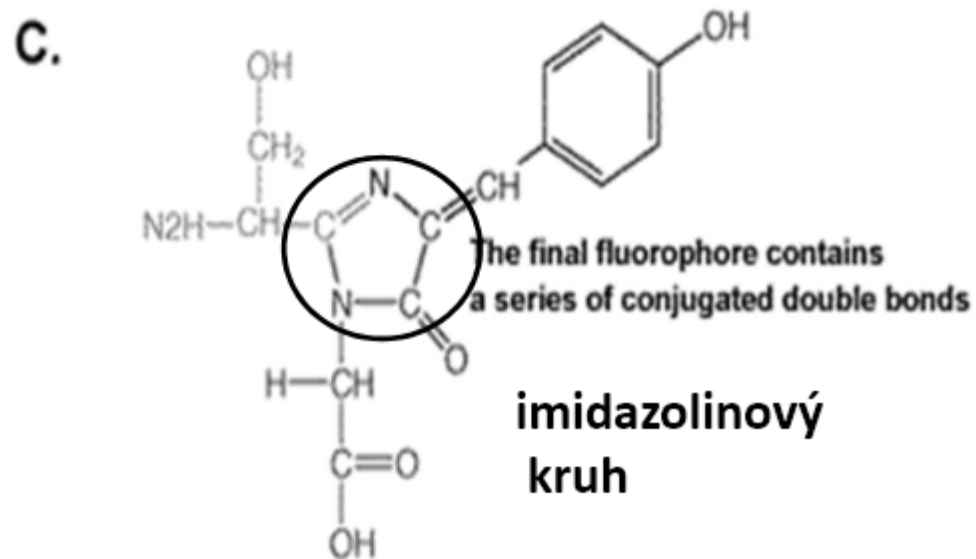
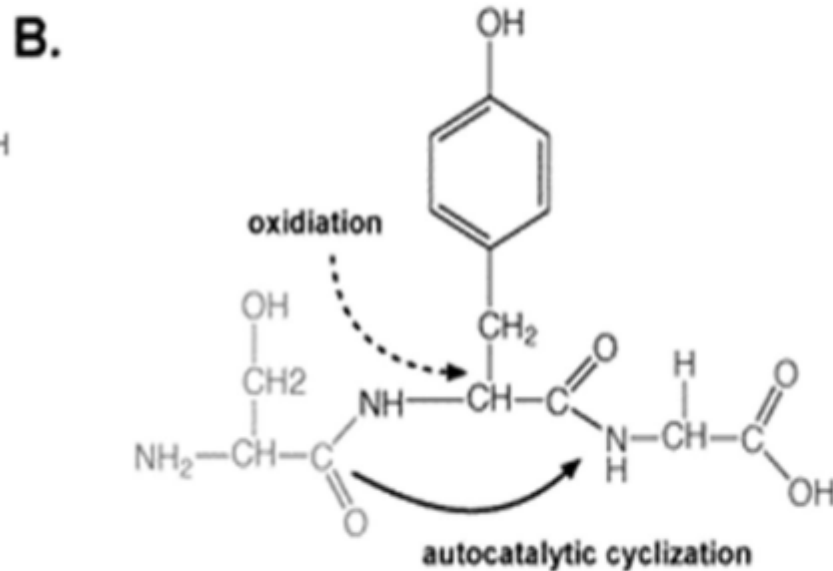
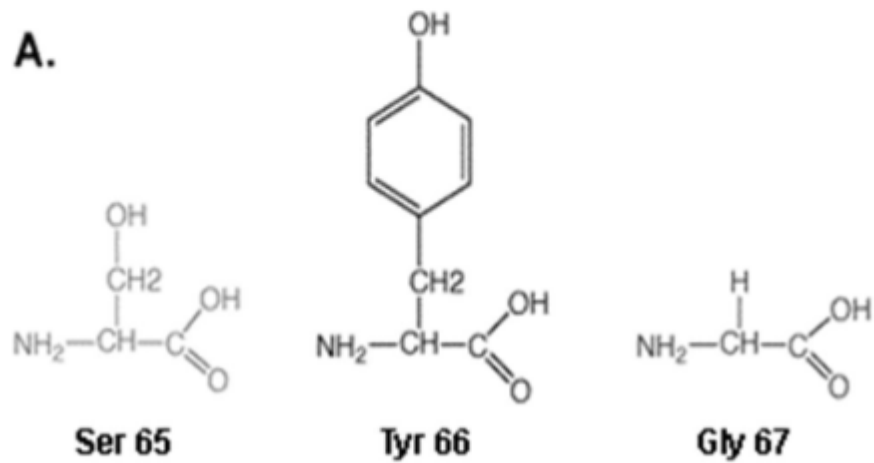
## Princip luminiscence *Aequorea victoria*

za přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ , bioluminiscence aequorinu (apoaequorin + luciferin) -> modré světlo -> excitace GFP -> zelené světlo



**struktura GFP:**  $\beta$ -barel (11 antiparalelních řetězců) , uvnitř  $\alpha$ -helix s chromoforem, 238 AMK, 27kDa, aktivní místo: Ser65-Tyr66-Gly67 přestavba a vznik fluoroforu

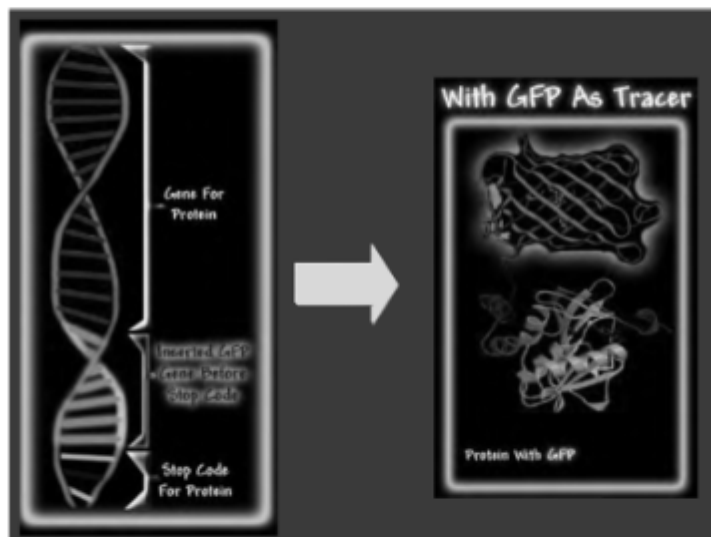




<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/fluorescentproteins/egfpchroma/indexflash.html>

Excitace: 390-470 nm – wtGFP dva píky, emise cca 509 nm  
redukována forma – ex. 390 nm  
oxidovaná forma – ex. 470 nm

Využití: označení genů, vznik fúzního proteinu,  
lokalizace a dynamika proteinu v živých buňkách bez nutnosti fixace,  
možnost užití indukčních promotorů a tedy indukovat tvorbu  
fúzních proteinů jen v určitém čase



Absorption and Fluorescence Emission Spectral Profiles of wtGFP and the S65T Variant

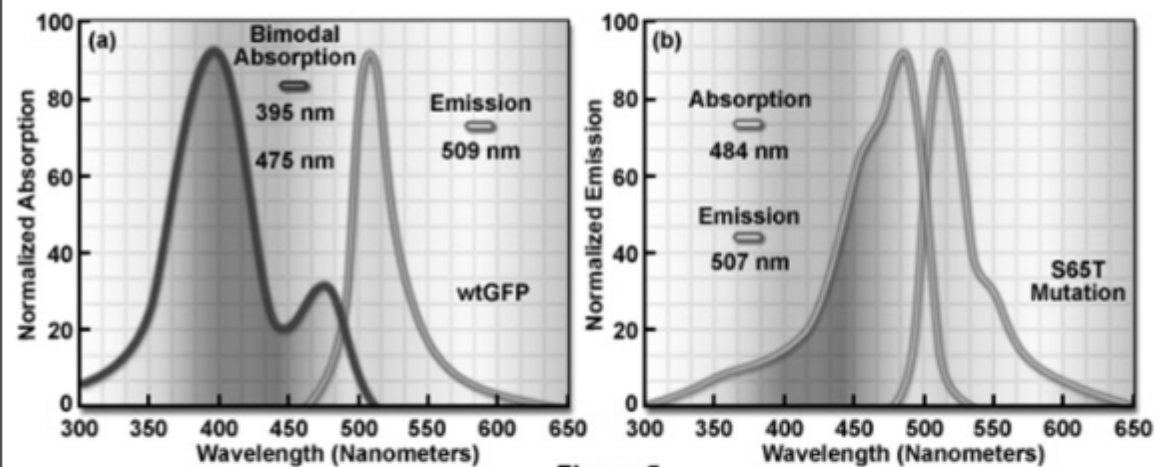


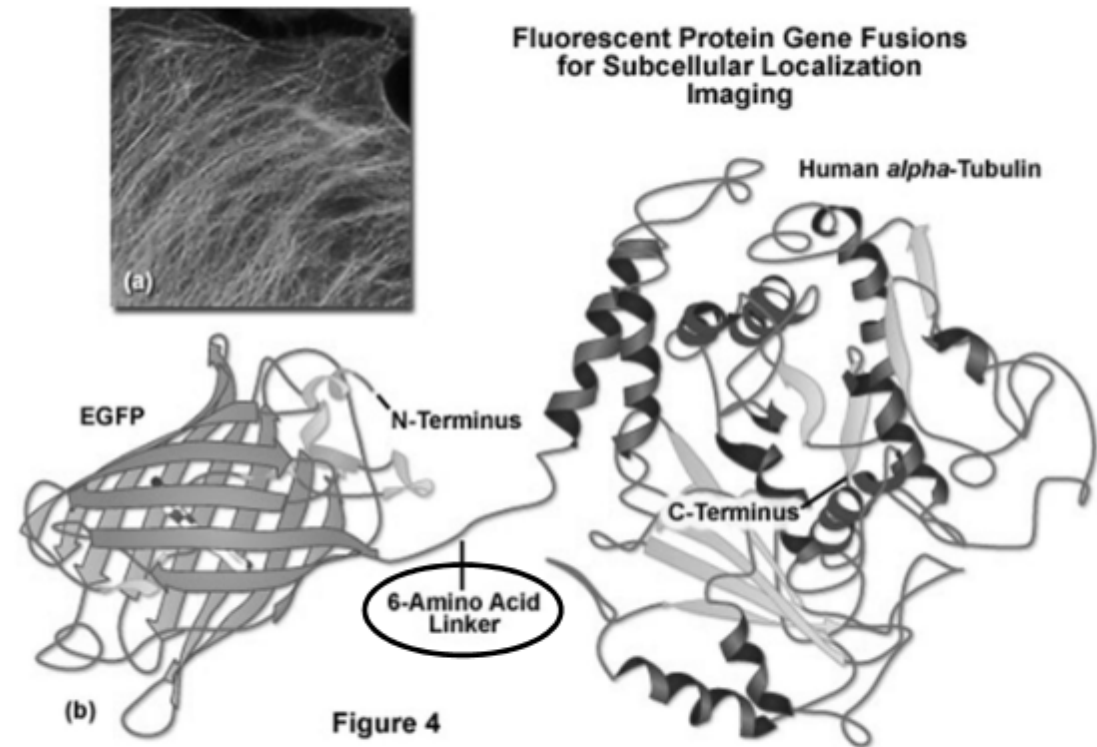
Figure 5



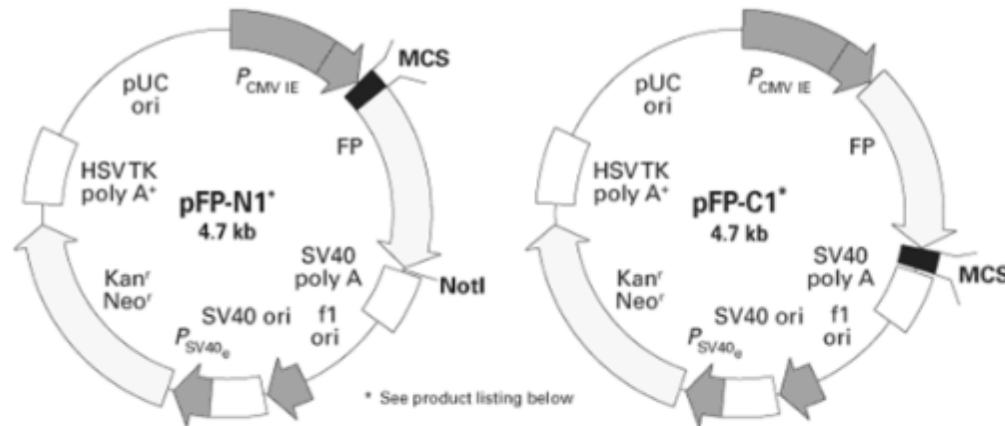


Exprese :

- přechodná z plazmidu (vysoká hladina proteinu)
- stabilně - integrace do chromozomové DNA



možnost umístění  
fluorescenčního proteinu  
v plasmidu



## Výhody GFP

- relativně malý protein (27kDa) – snadná difuze
- funkční jako monomer
- není třeba kofaktoru
- stabilní, vysoký kvantový výtěžek (0,8)
- v živých organismech – dědičná exprese
- neinvazivní vizualizace
- „neinterferuje“ s buněčnými procesy

## nevýhody wtGFP

- pomalejší proces fluorescence *in vivo*
- horší funkčnost při 37°C
- renaturace fluoroforu, oxidace (2-4 hodiny)
- méně stabilní při nízkém pH
- dvoukrokový proces

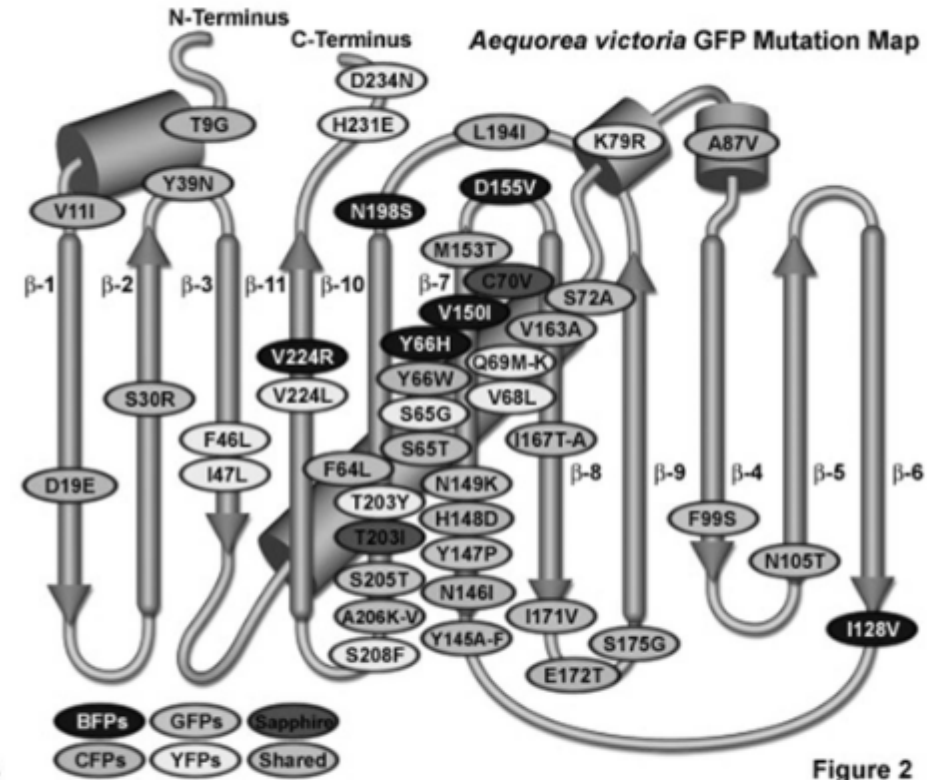


## mutace GFP

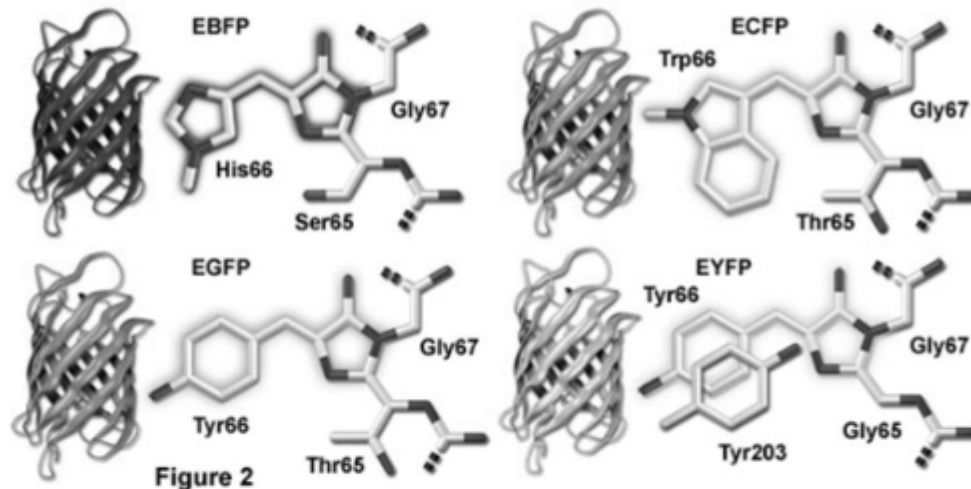
- zesílení signálu
- delší životnost
- posun emisního spektra

## deriváty GFP

- EGFP - enhanced green FP
- EBFP – enhanced blue FP
- ECFP – enhanced cyan FP
- EYFP – enhanced yellow FP



Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants

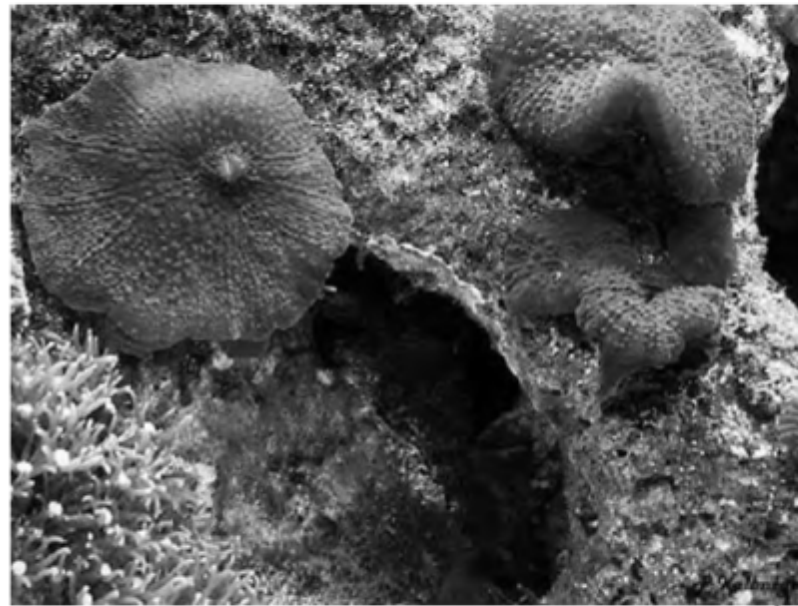
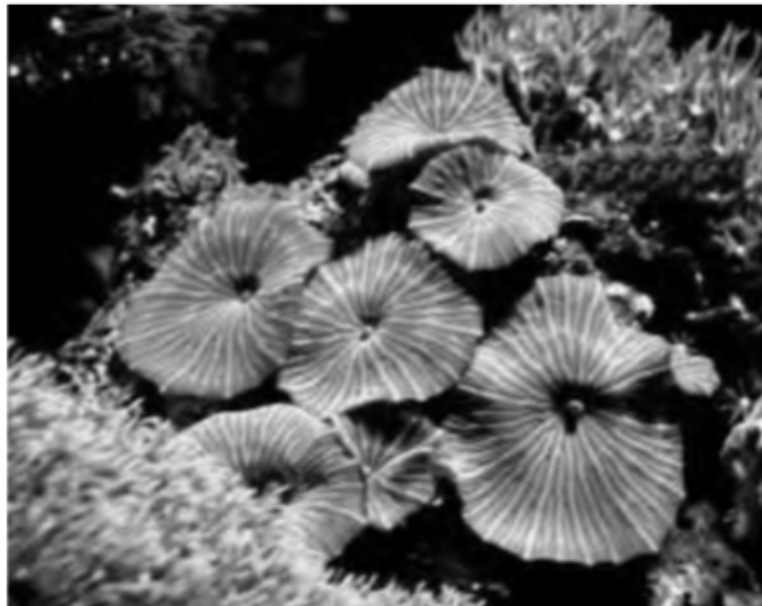


Wt: Ser65-Tyr66-Gly67



## Ds Red fluorescenční protein a jeho deriváty

- snaha o získání FP s delší excitační vlnovou délkou
- izolovány z korálu *Discoma striata*
- tetramerický protein
- vylepšený derivát, snížená Mr (monomer)
- další mutanty – mFruits proteiny

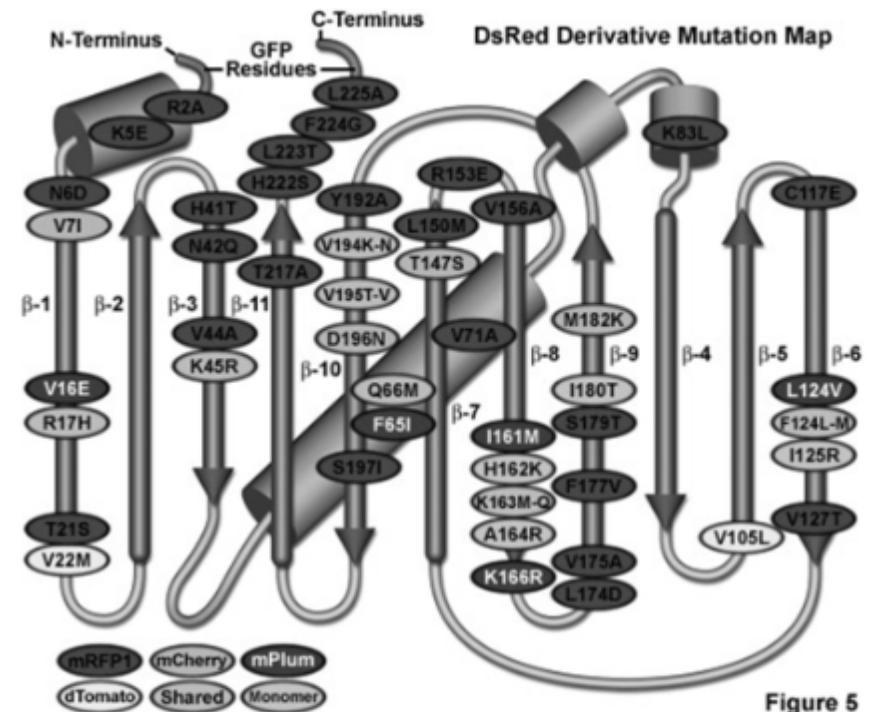
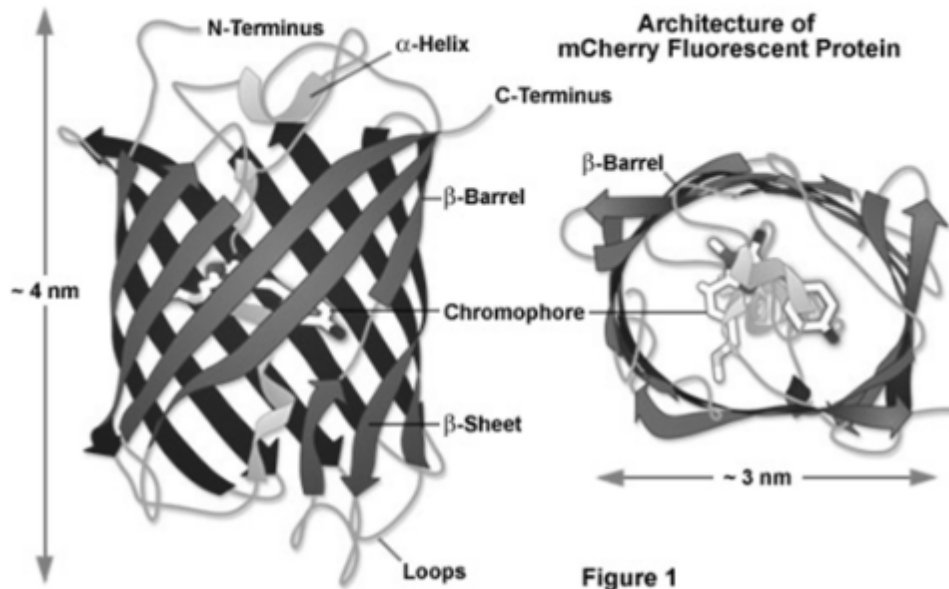


# Ds Red fluorescenční protein a jeho deriváty

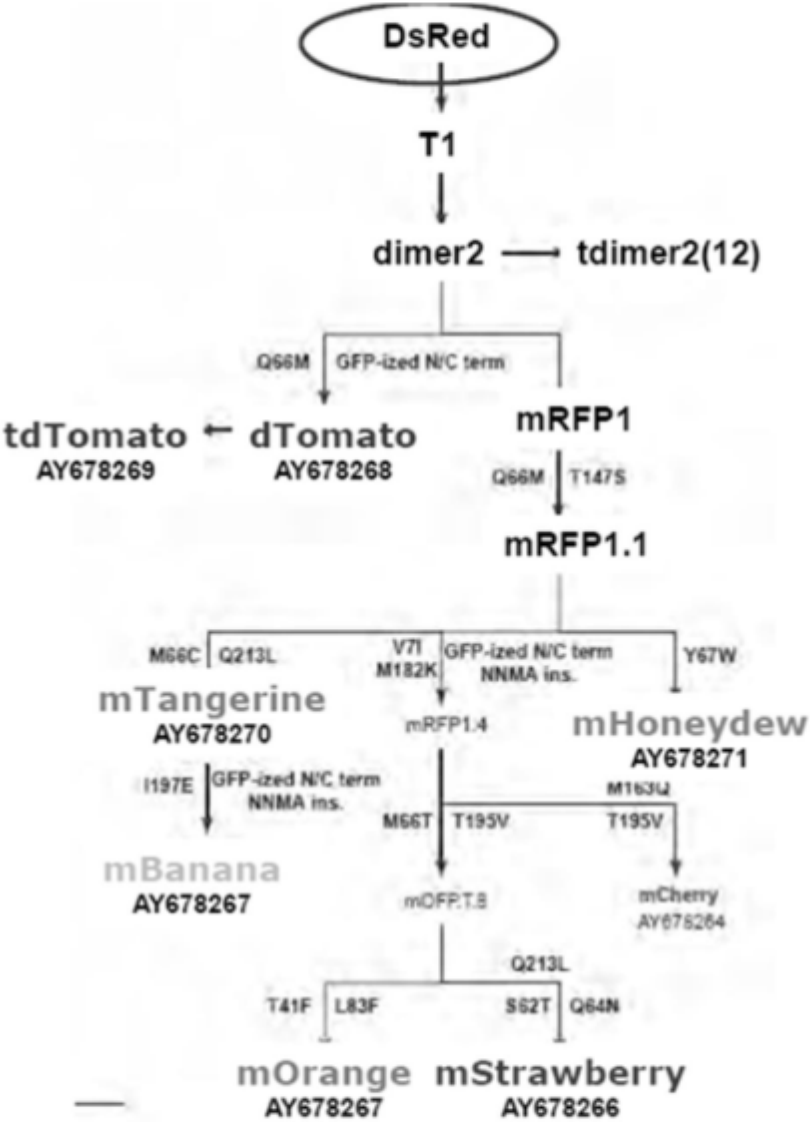
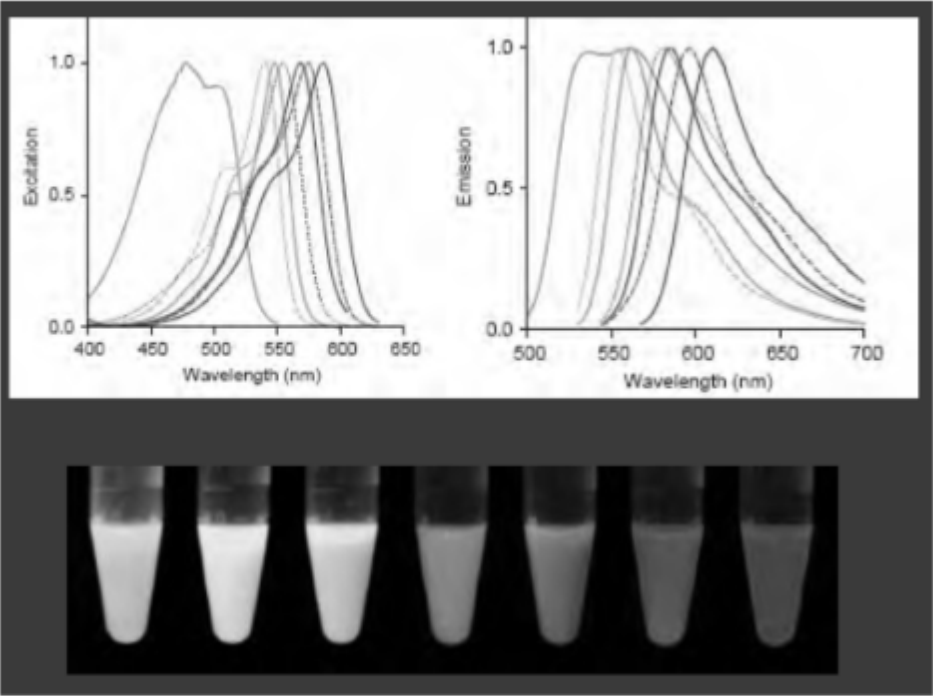
wt Ds Red: podobná struktura proteinu jako GFP

excitace: 558 nm

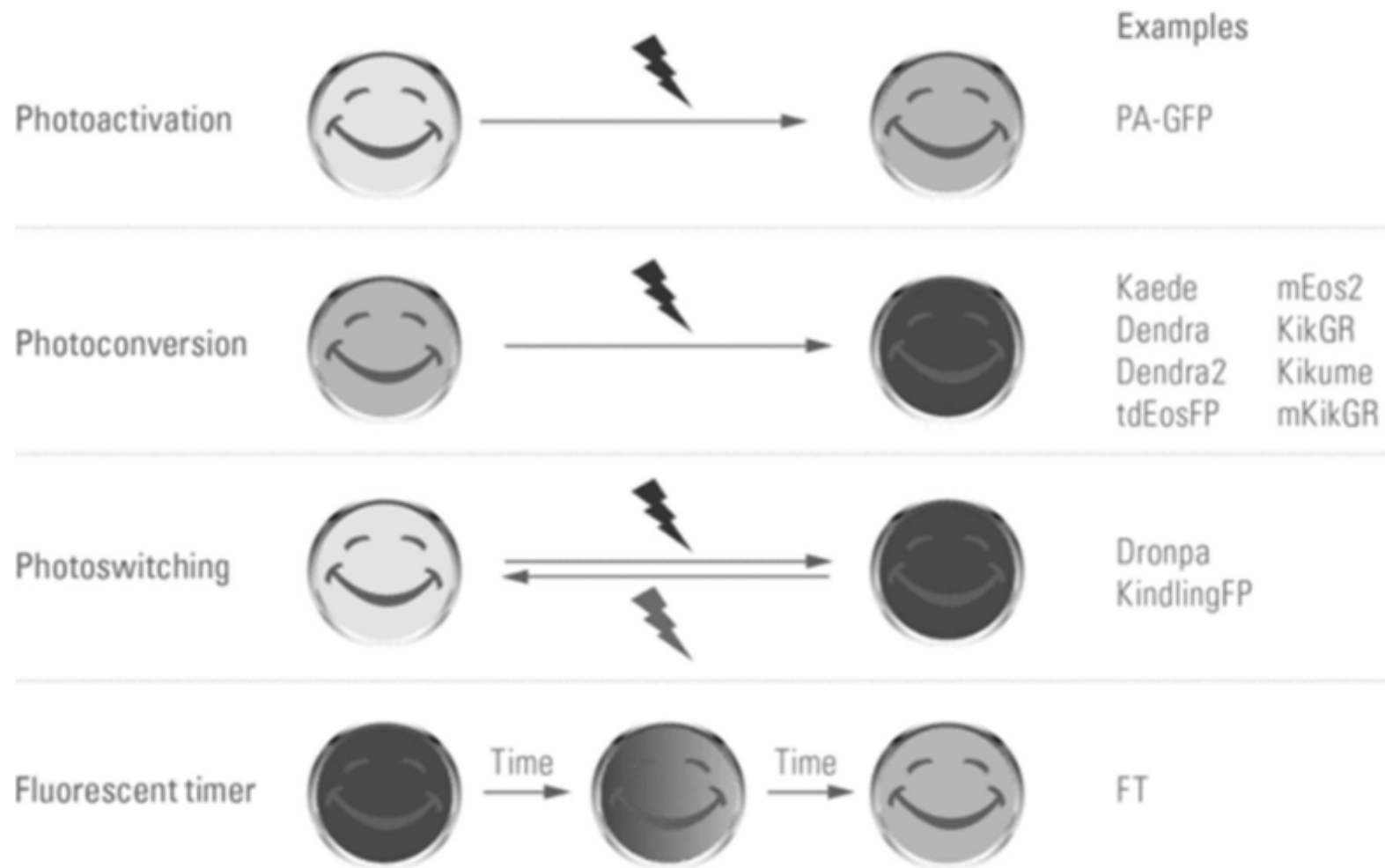
emise: 583 nm



# Ds Red fluorescenční protein a jeho deriváty



# Speciální vlastnosti fluorescenčních proteinů



## Zavedení fúzního genu do buňky ve formě plazmidu

Mikroinjekce – přímý přenos mikrojehlou do cytoplasmy nebo jádra pomocí mikromanipulátoru, není vhodný pro velké množství b. linií, ideální pro protoplasty, lze si vybírat jednotlivé b.

Lipofectaminová transfekce – jednoduchá a nejčastější metoda u živočišných buněk, není toxický, komplex lipidů a DNA fúzuje s plasmatickou membránou, lze i do jádra

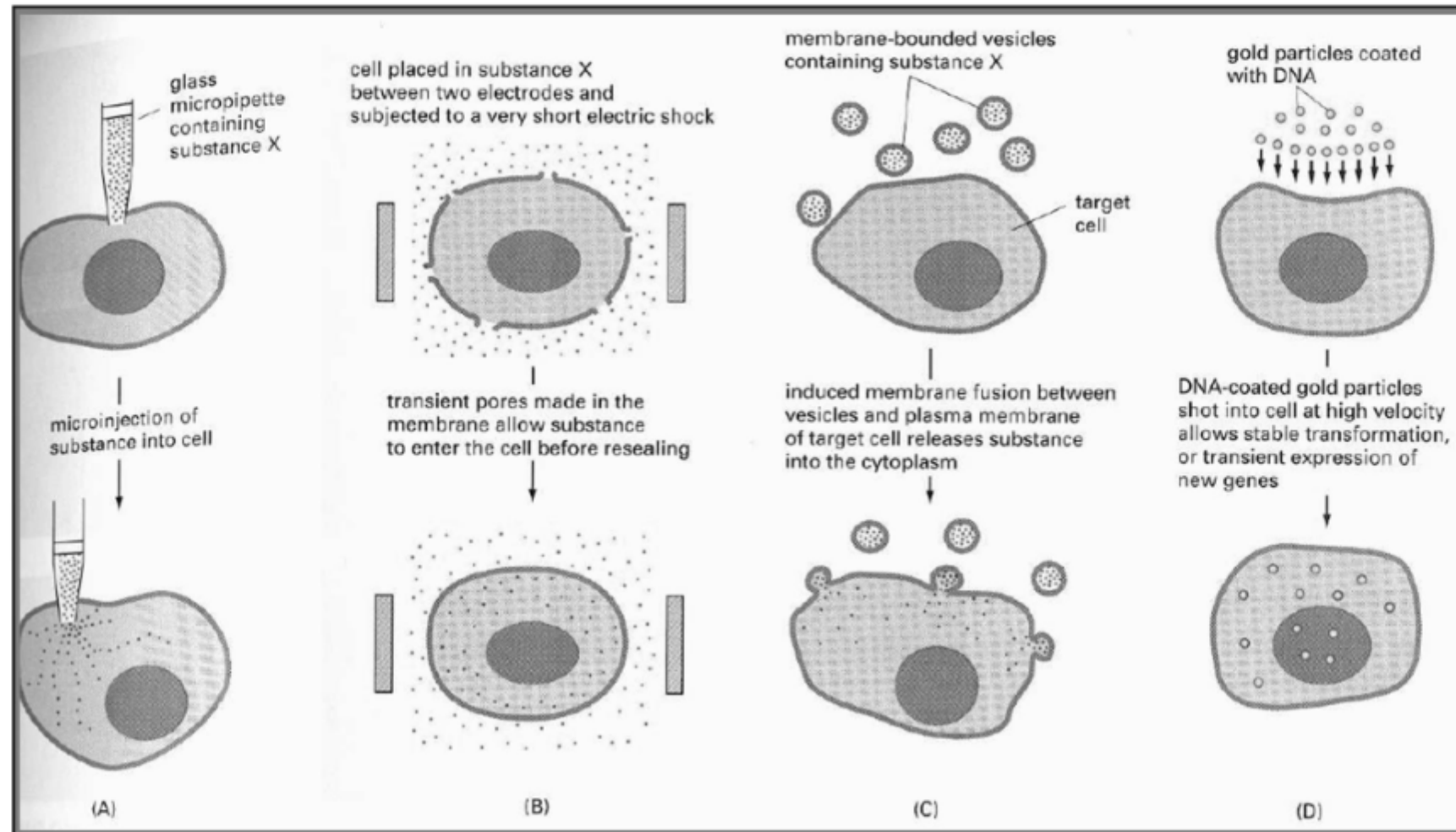
Precipitace fosforečnanem vápenatým – fosforečnan vápenatý společně s DNA precipituje, poté je fagocytován do buněk, jednoduchá metoda, část DNA i do jádra

Elektroporace – elektrický puls vyvolá tvorbu pórů v plasmatické membráně, přechod do buňky

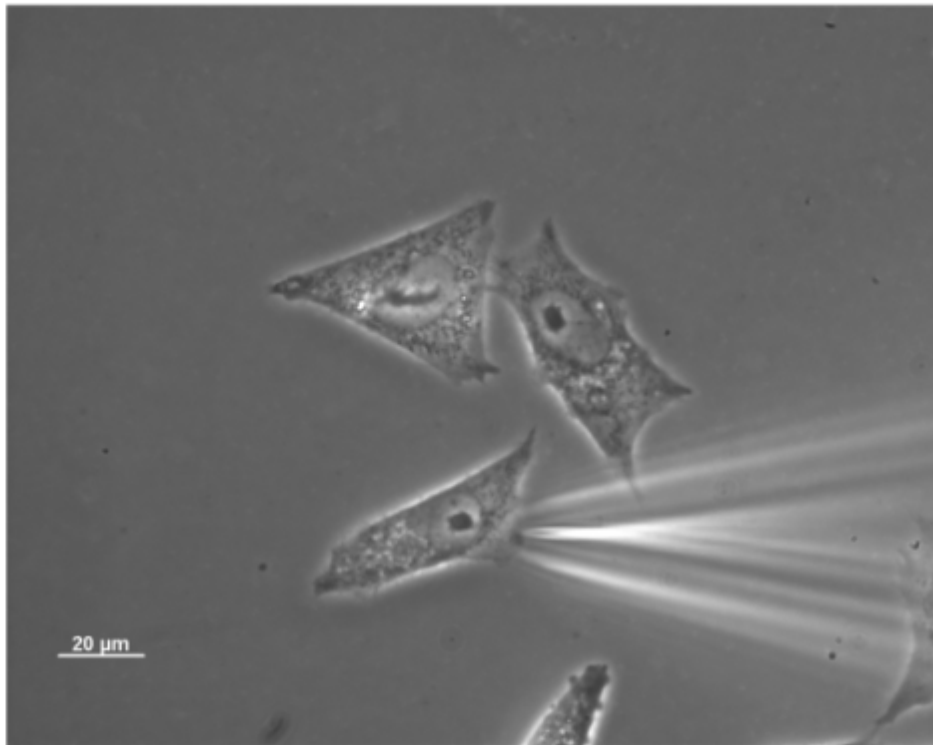




# Zavedení fúzního genu do buňky

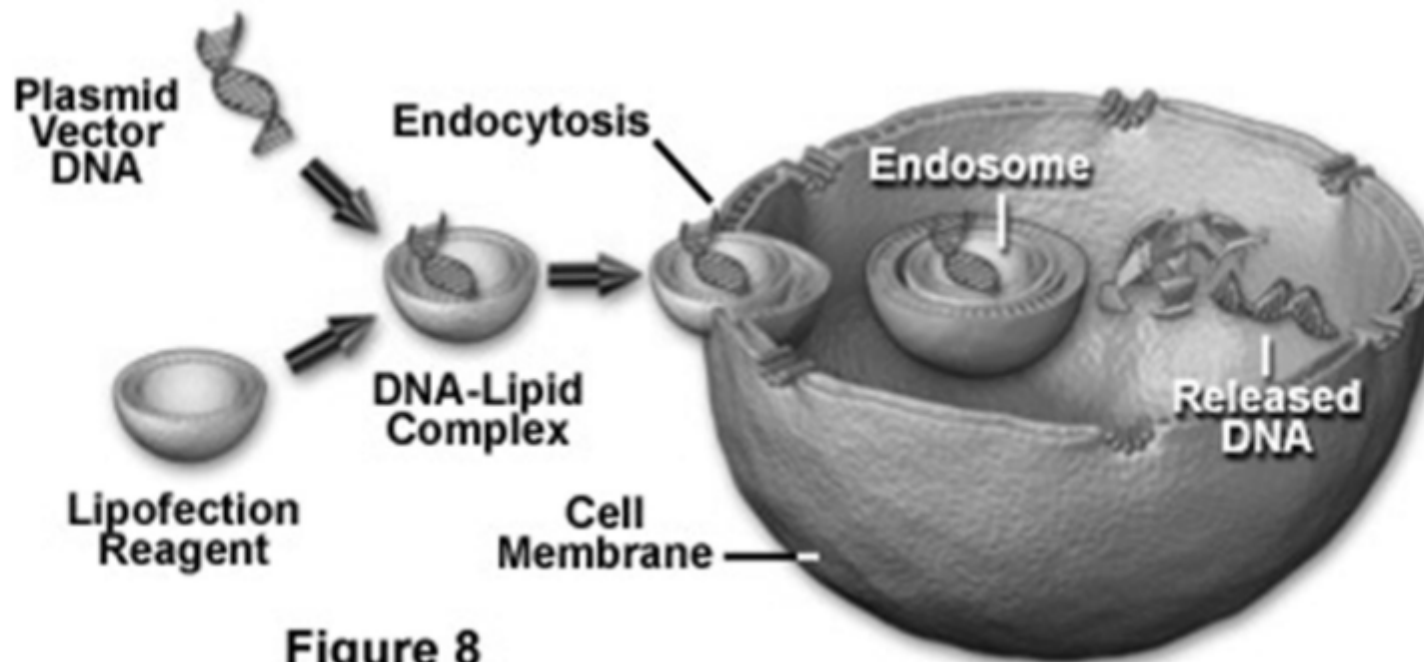


# Mikroinjekce



# Lipofectaminová transfekce

## Lipid-Mediated Transfection in Mammalian Cells



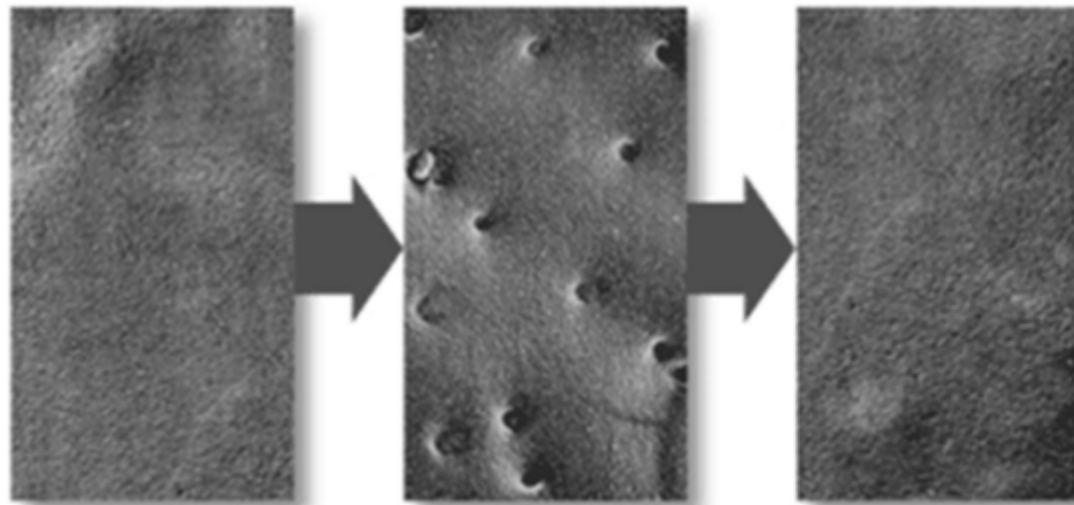
# Elektroporace

## Cíle:

- b. kultura
- tkáně
- orgány
- embryo
- embryo *in utero*



The phenomenon of electroporation



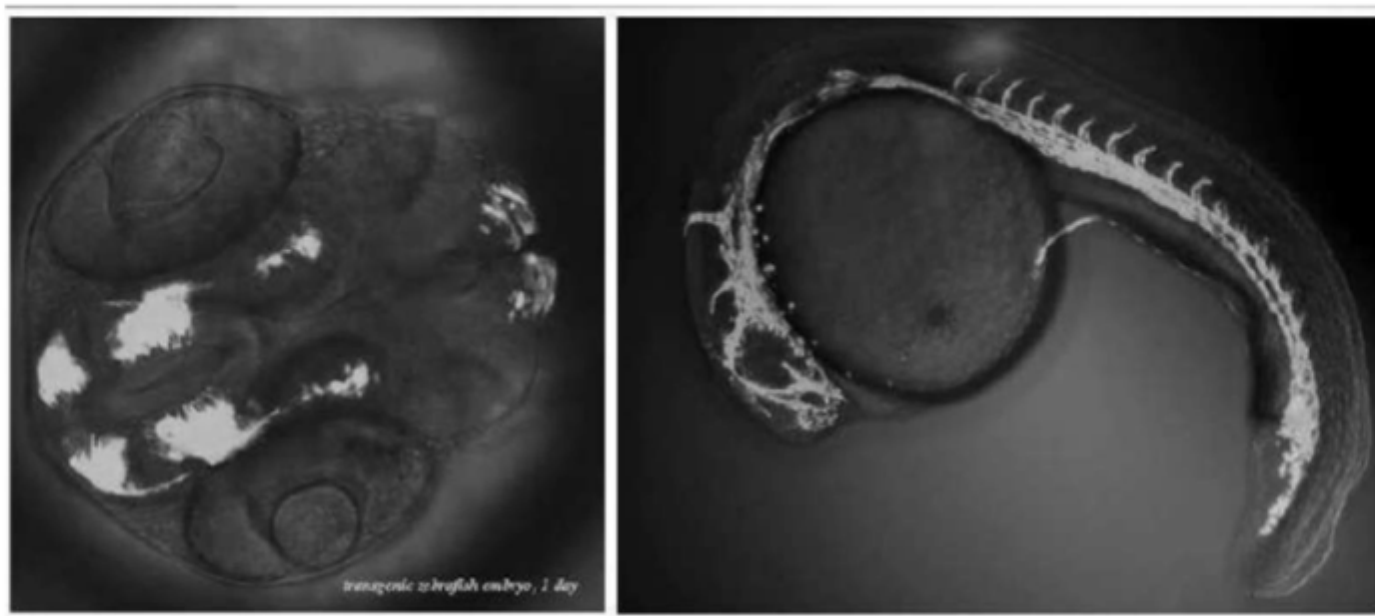
Cell membrane  
before pulsing

Cell membrane  
during pulsing

Cell membrane  
after pulsing  
(cell returns to

- *Controlled, millisecond electrical pulses induce temporary pores in the cell membrane*
- *Cell membrane reseals and is left unharmed*

# GFP exprese v rybím embryu zebřička (*Danio rerio*)



- Fluorescenční indikátory

změna fluorescence (spektra nebo intenzity) v závislosti na určité látce – prvek, pH, ROS...

**Iontové indikátory:**

kationty:

$H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , ...

anionty:

$Cl^-$ ,  $PO_4^{2-}$ , citrát, ATP...

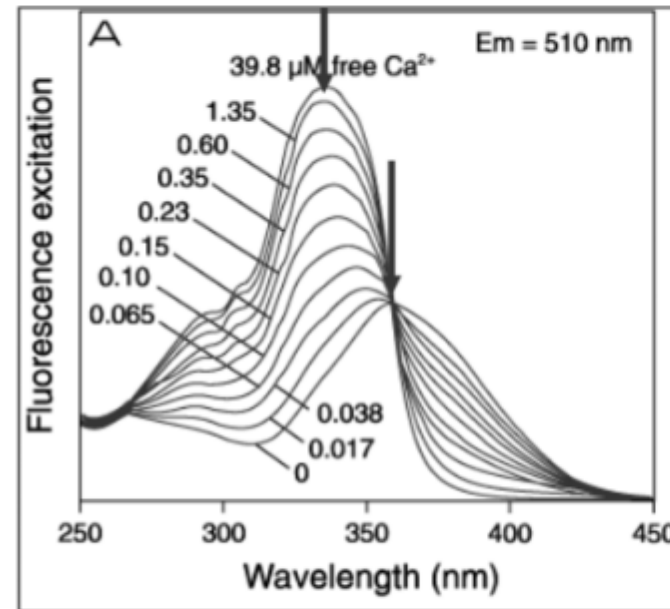
měření:

změna intenzity v závislosti na koncentraci nebo posun emisního spektra

## Indikátory $\text{Ca}^{2+}$

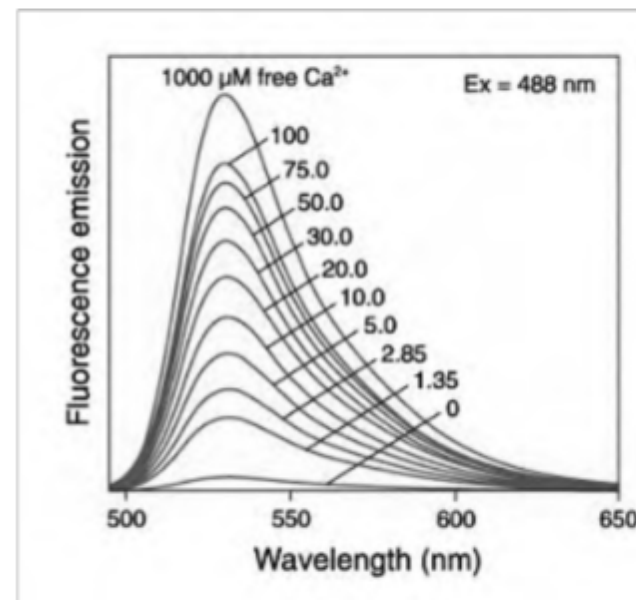
### FURA-2

excitace při dvou vl. délkách  
měření poměru 340/380nm  
při konstantní emisní  
vlnové délce 510nm



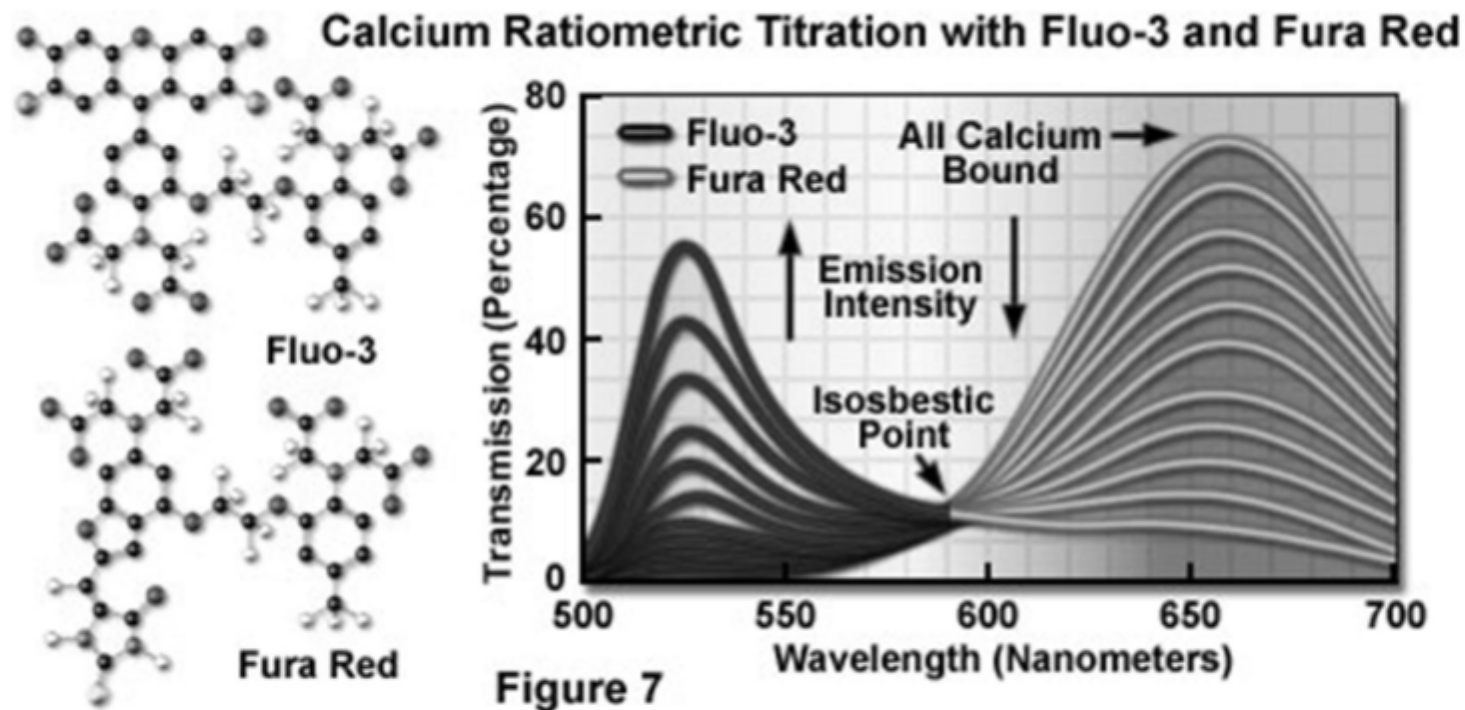
### CalciumGreen-5N

měření intenzity fluorescence  
při konstantní excitační  
vlnové délce 488nm



## kombinace indikátorů $\text{Ca}^{2+}$

- dva indikátory s neměící se vl. délkou emise
- jeden snižuje fluorescenci (Fura Red)
- druhý zvyšuje fluorescenci (Fluo-3) v závislosti na  $\text{Ca}^{2+}$
- měření poměru fluorescence v jednotlivých emisních maximech





# Organelové sondy - próby

označení specifické membránové organely:

- mitochondrie
- Golgiho aparát
- endoplasmatické retikulum
- lysosomy

složení: fluorochrom + vazebná doména (zajišťuje specifitu vazby)

- schopnost průniku přes pl. membránu bez poškození
- navázání na cílovou organelu

studium: transport, buněčná respirace, mitóza, apoptóza, degradace proteinů, sekreční dráhy

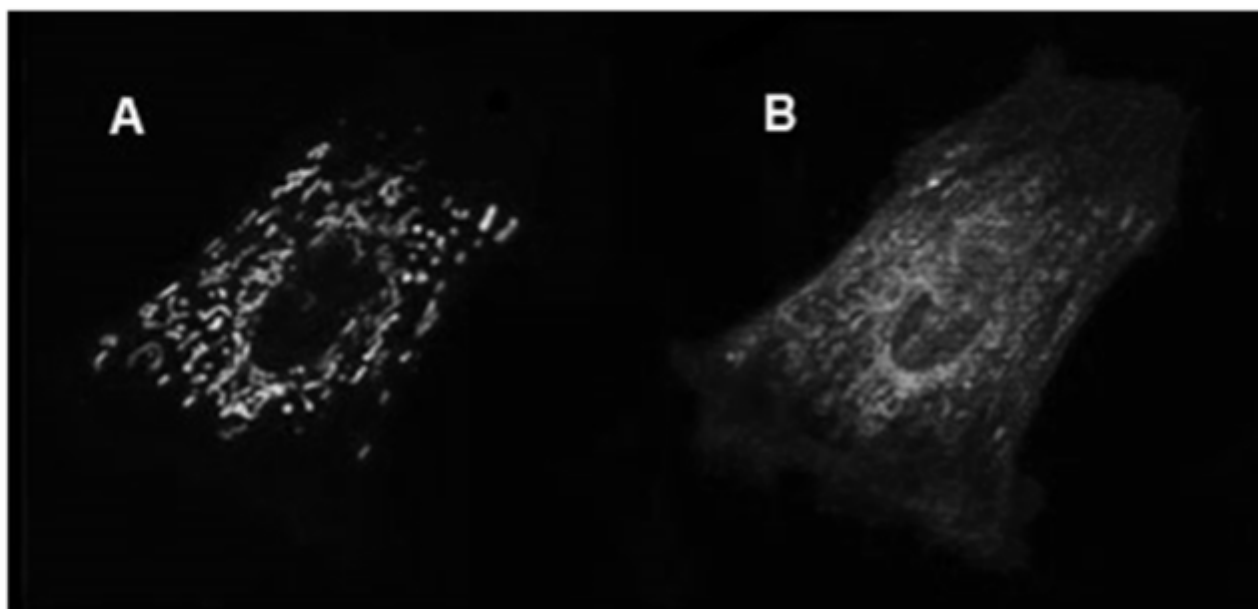
rozdělení: na stálé a nestálé

## Mitochondrie

studium buněčné respirace dříve Rhodamin 123 (po fixáži slábne),

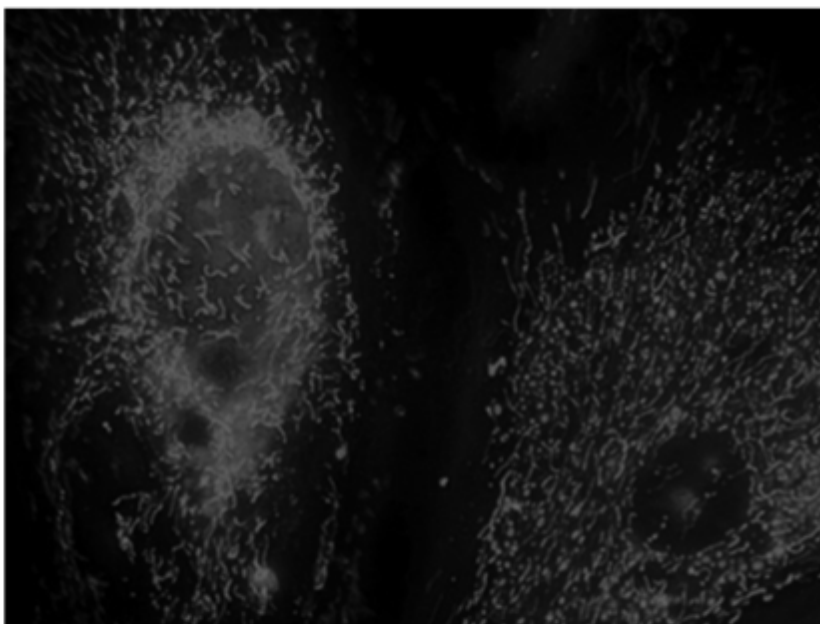
nyní MitoTracker, Mito Fluor (lze fixovat)

JC-1 indikátor membránového potenciálu - v aktivních mitochondriích mění emisi ze zelené na červenou

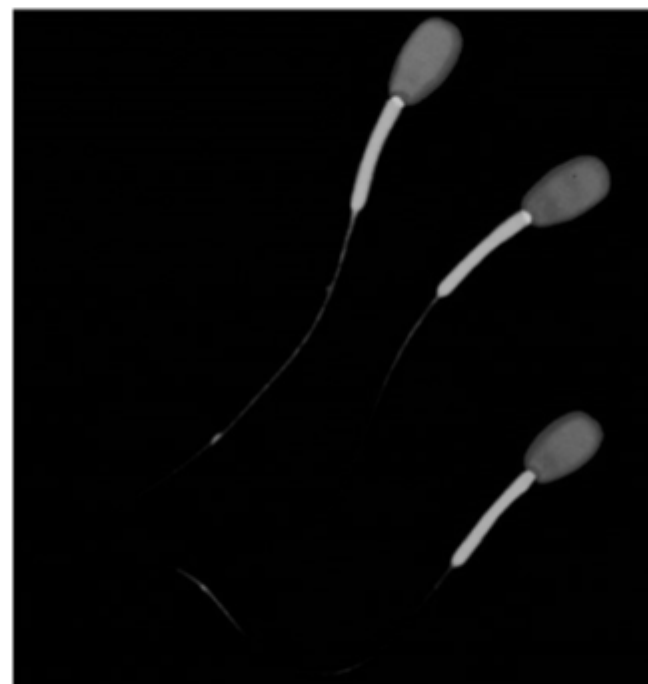


Neonatální kardiomyocyty : rhodamin123, (A) kontrola, (B) ovlivněno mitochondriálním uncouplerem

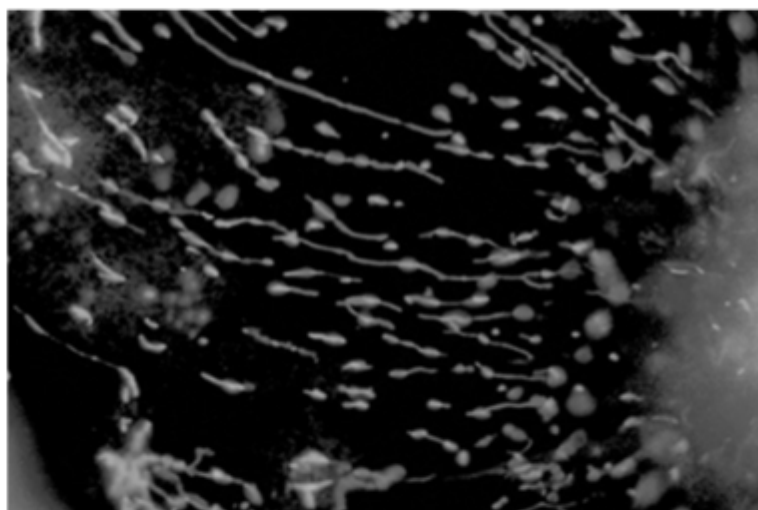




mitochondrie – bovinní endotel : MitoTracker® Deep Red FM dye



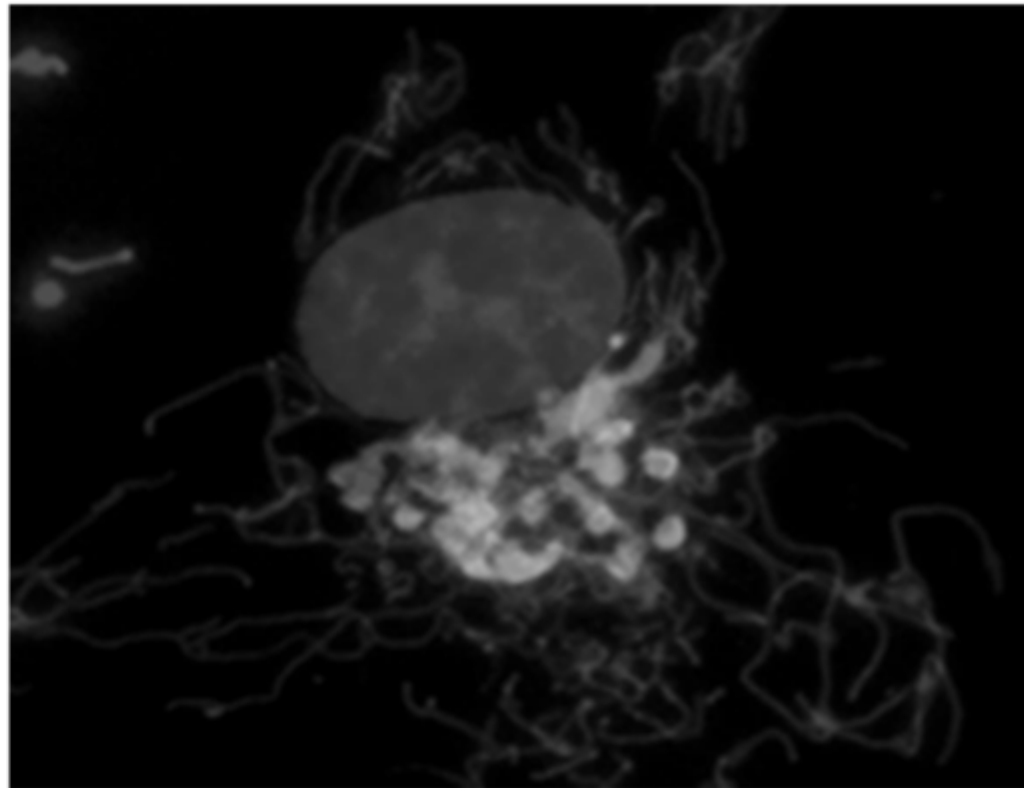
býčí spermie : MitoTracker® Green FM,  
Hoechst 33342



mitochondrie – fibroblasty norka : JC-1  
vysoký membránový potenciál – červená  
nízký membránový potenciál - zelená

## Golgiho aparát

- CellLight™ Golgi-GFP , enzym specifický pro GA, fúzovaný s GFP ve vektoru
- konjugované lektiny – vazba na glykosylované proteiny GA



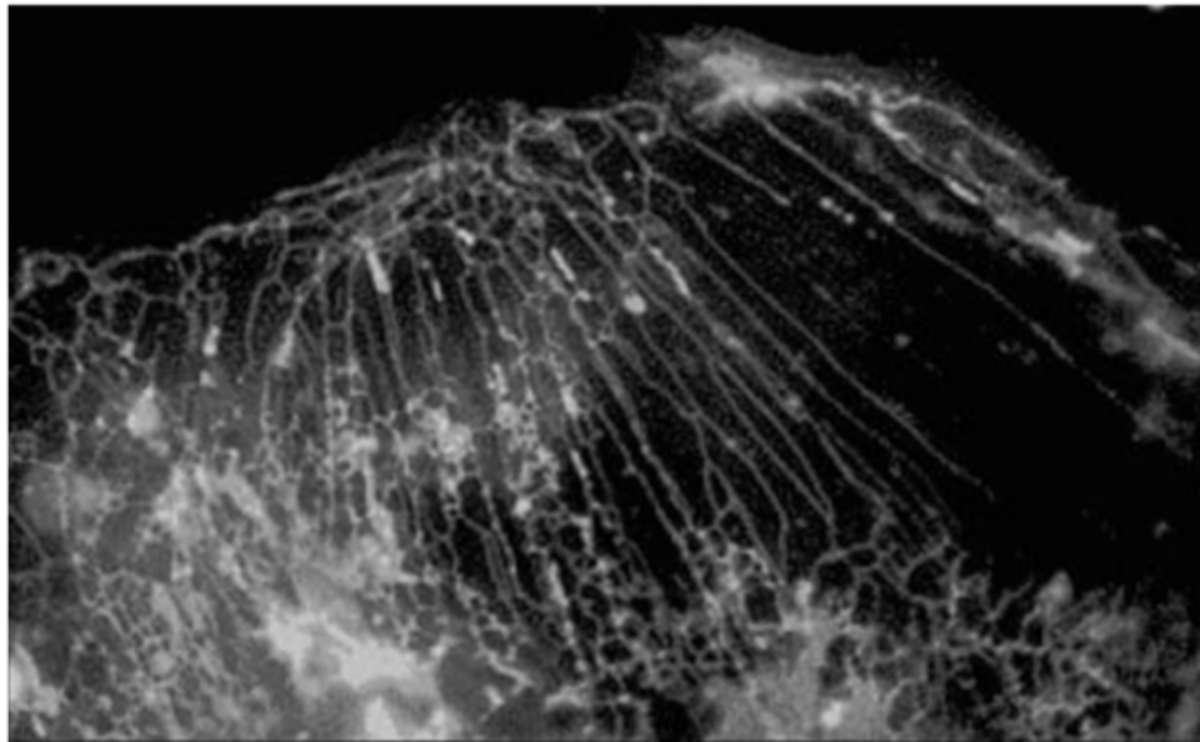
GA a mitochondrie – linie lidské hladké svaloviny:  
CellLight Golgi-GFP a CellLight Mitochondria-RFP



## Endoplasmatické retikulum

prostupují přes membránu, selektivní pro ER, dříve DiOC<sub>6</sub>, - není tak specifický,  
vykazuje fotodynamickou toxicitu

nyní ER-Tracker + Blue-White, Red , Green - menší toxicita, lze i fixovat



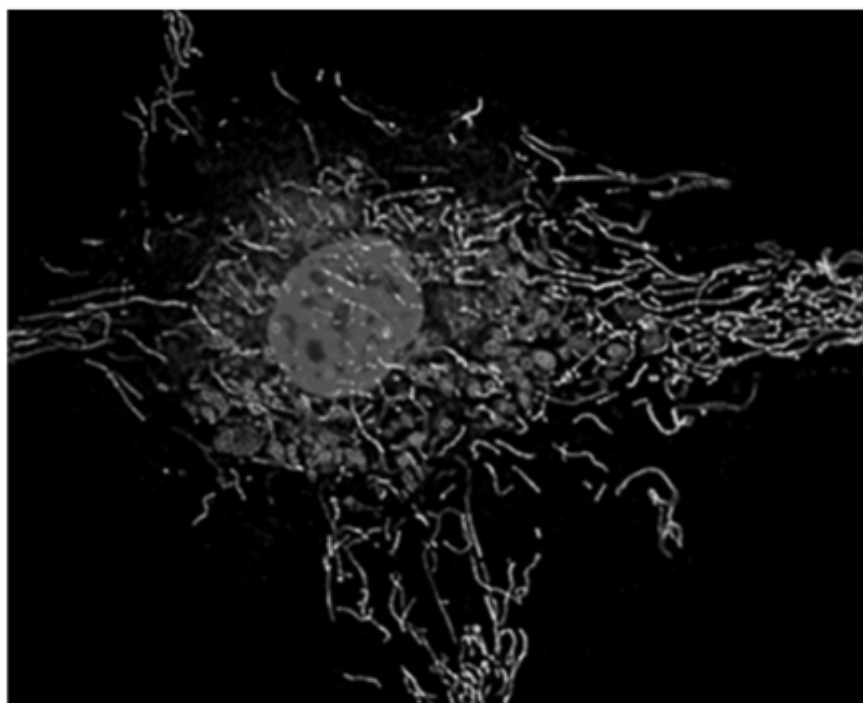
ER - bovinní endotel : ER-Tracker Blue-White DPX



## Lysozómy

LysoTracker, LysoSensor obsahují ve struktuře heterocyklické dusíkaté skupiny které napomáhají transportu do lysozomů živých buněk, vysoká senzitivita pro organely s nízkým pH, možnost fixace (LysoTracker),

pouze živé b. (LysoSensor) – vzrůstá intenzita fluorescence v nízkém (pH indikátor)



lysozómy a mitochondrie – bovinní endotel :  
LysoTracker® Red, dihydrorhodamine 123 a Hoechst  
33258



# BacMam Reagents



- připravené virové konstrukty
- baculovirus – hmyzí, aktivně neinfikují savčí buňky, nereplikují se

konstrukt:

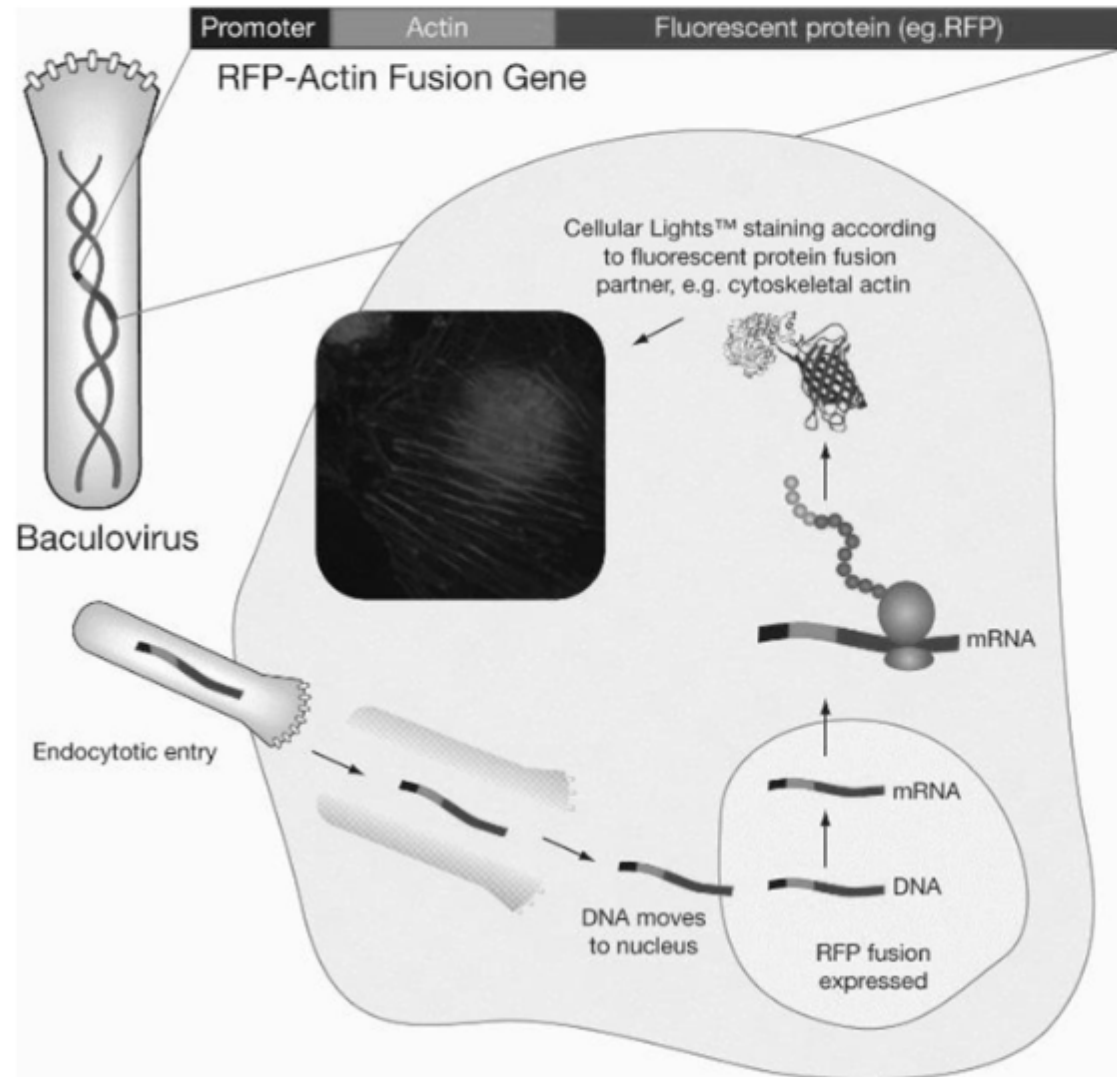
- 1) savčí promotor: zaručuje expresi v savčích buňkách
- 2) funkční část: protein nebo peptid cílený na strukturu (cytoskelet, orgány aj.) nebo funkci (buněčný cyklus, autofagie, tok  $\text{Ca}^{2+}$ )
- 3) fluorescenční protein: CFP, GFP, RFP; na C- nebo N- konci peptidu

- jednoduchá aplikace
- lze sledovat v reálném čase
- lze koexprimovat více práb
- lze fixovat



# Princip metody

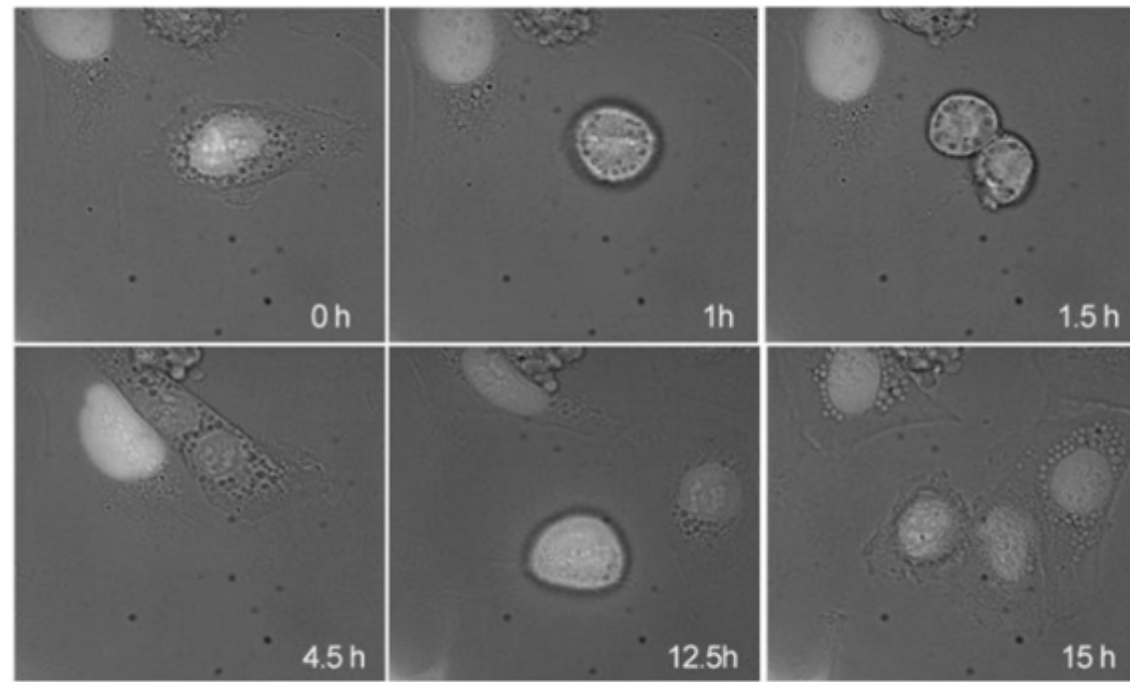
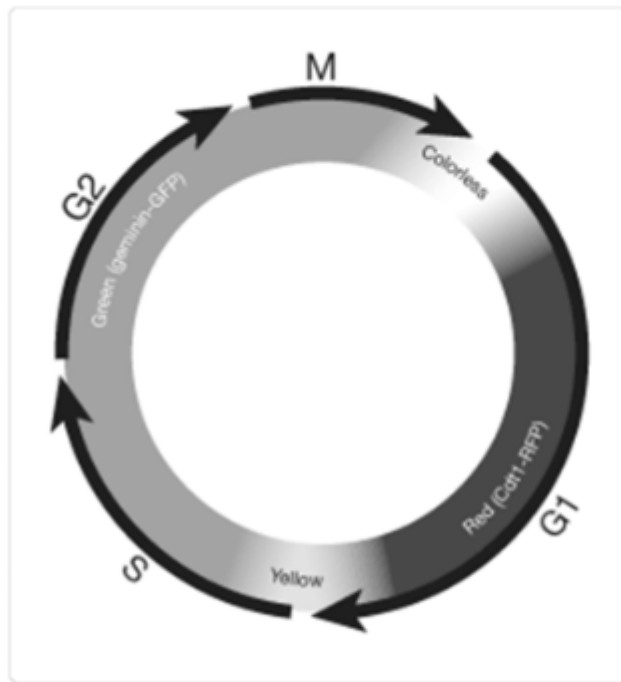
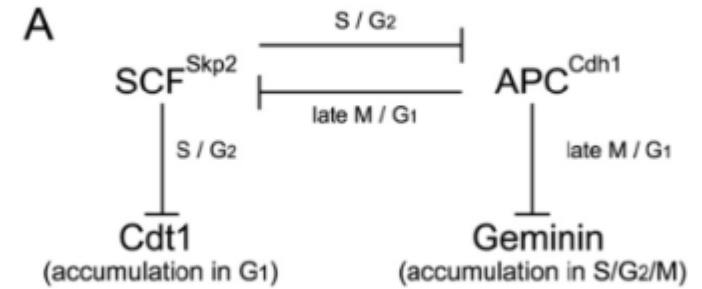
- vstup do b. endocytózou
- přechod DNA do jádra
- exprese genů jen se savčím promotorem
- virové geny se nereplikují a nepůsobí buněčnou smrt
- reálná exprese po 4-6 h
- maximum signálu 24-48 h
- vyhasnutí 4 dny až 2 týdny v závislosti na proliferační aktivitě





# Sledování fází buněčného cyklu

- FUCCI- fluorescence ubiquitination cell cycle indicator
- Geminin-GFP -> S/G2/M
- Cdt1-RFP -> G1
- regulace ubiquitin-ligázami, exprimovanými v určitých fázích cyklu
- lze spojit s BacMam systémem transfekce (LifeTechnologies)



Sakaue-Sawano et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. Cell. 2008 Feb 8;132(3):487-98.



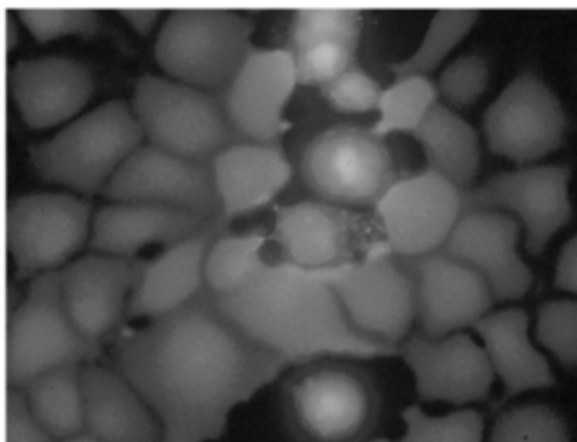
# Testování viability/cytotoxicity

měření podílu živých a mrtvých buněk na základě rozdílných vlastností

1. fluorogenní substráty esteráz
  - pronikají do buněk, zde metabolizovány - vznik aktivního fluoroforu
  - ověření soudržnosti membrány – fluorofor zadržován v cytoplasmě
  - fluoresceindiacetát (FDA), calcein AM (CAM)
2. sondy pro nukleové kyseliny
  - neprostupují přes membránu živých buněk
  - EtBr, PI, ethidium homodimer, SYTOX Green...

Ize společně kombinovat

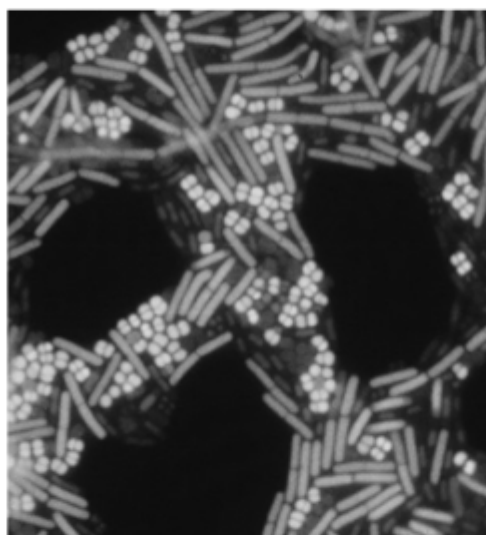




linie krysích buněk:

živé: substrát esterázy calcein AM → zelené

mrtvé: ethidium homodimer-1 → červené

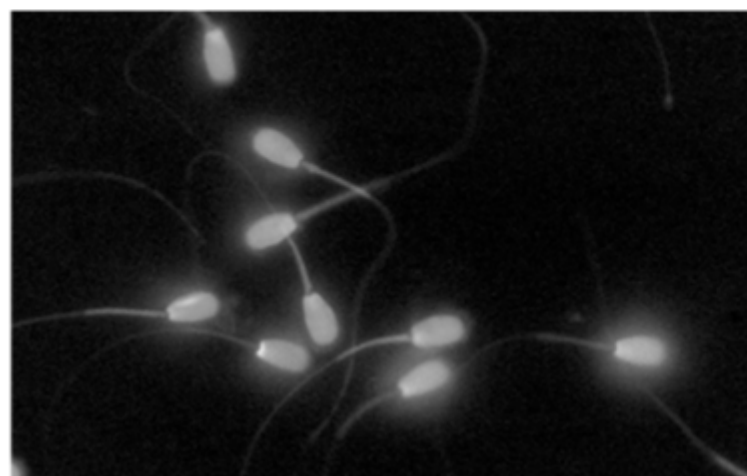
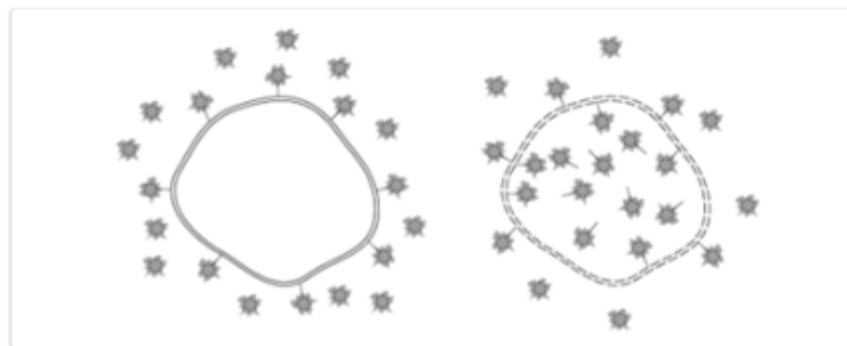


*Micrococcus luteus* a *Bacillus cereus*:

živé : zelené

mrtvé : červené

## Princip obarvení mrtvých buněk membránu neprostupující DNA sondou



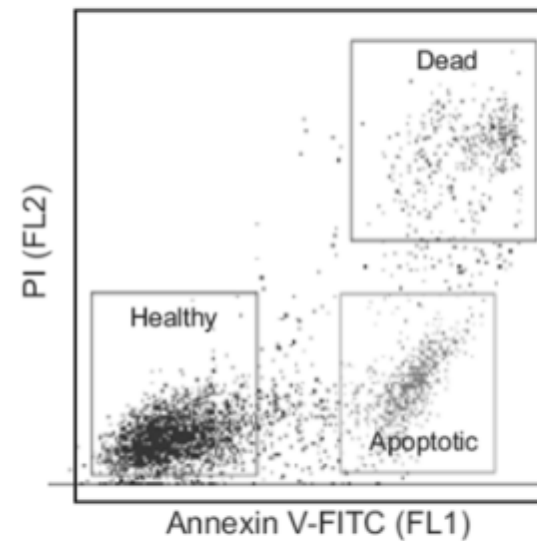
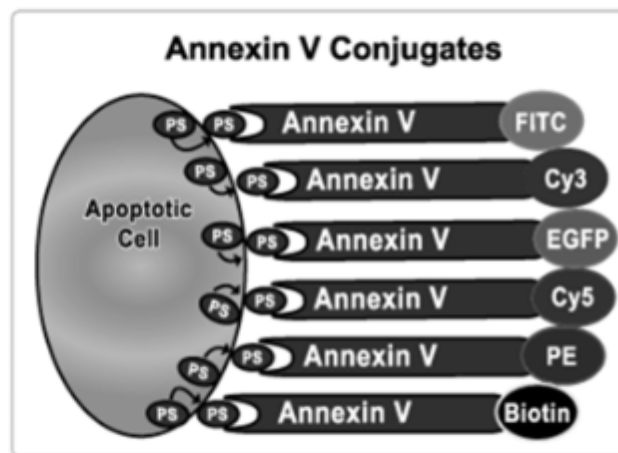
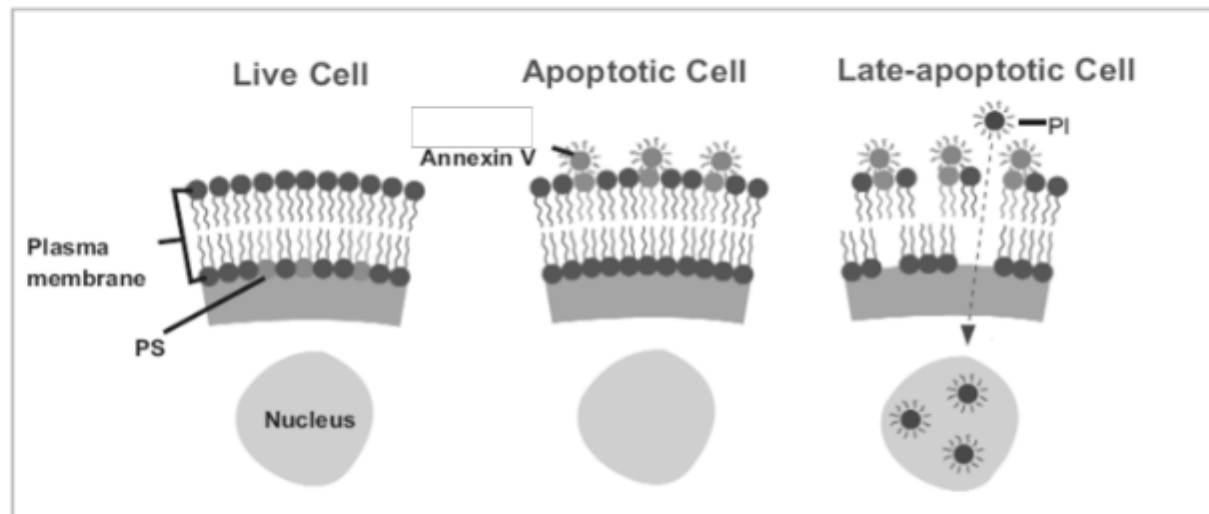
býčí spermie :

živé : SYBR® 14 → zelené

mrtvé: propidium iodide → oranžové.



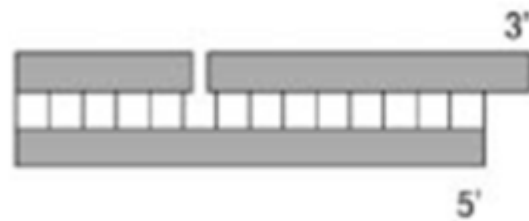
# Annexin V + PI: detekce buněčné smrti



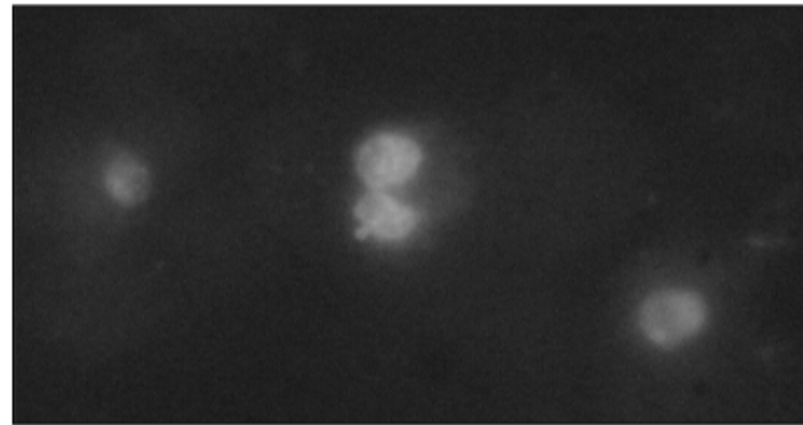
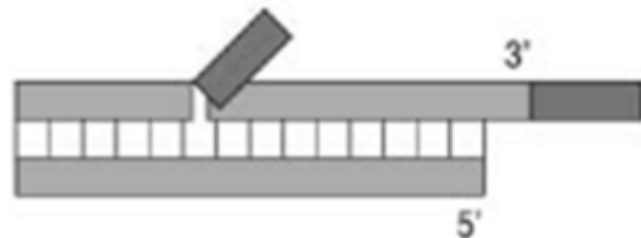
# TUNEL: Detekce štěpení DNA v apoptóze

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

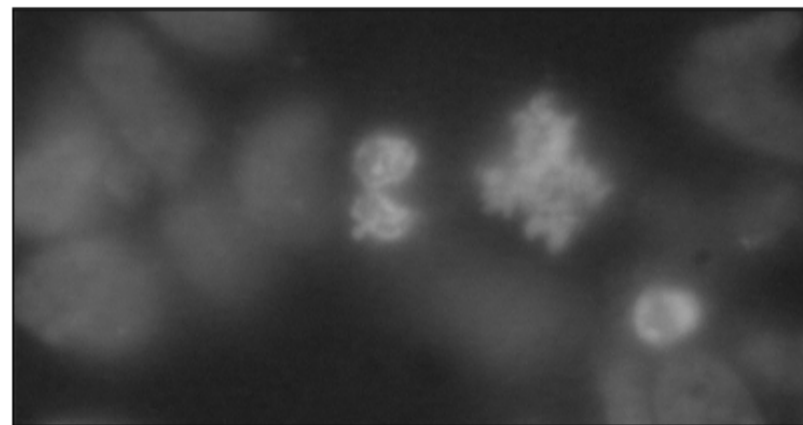
*In situ* end labeling (TUNEL)  
(template independent)



+ Terminal transferase  
+ X-dNTP (■)



TUNEL



DAPI



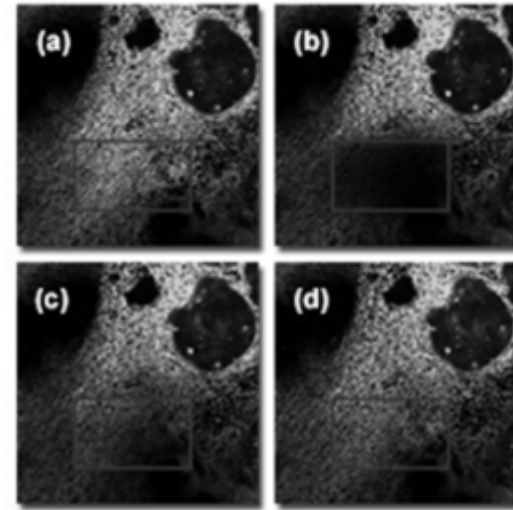
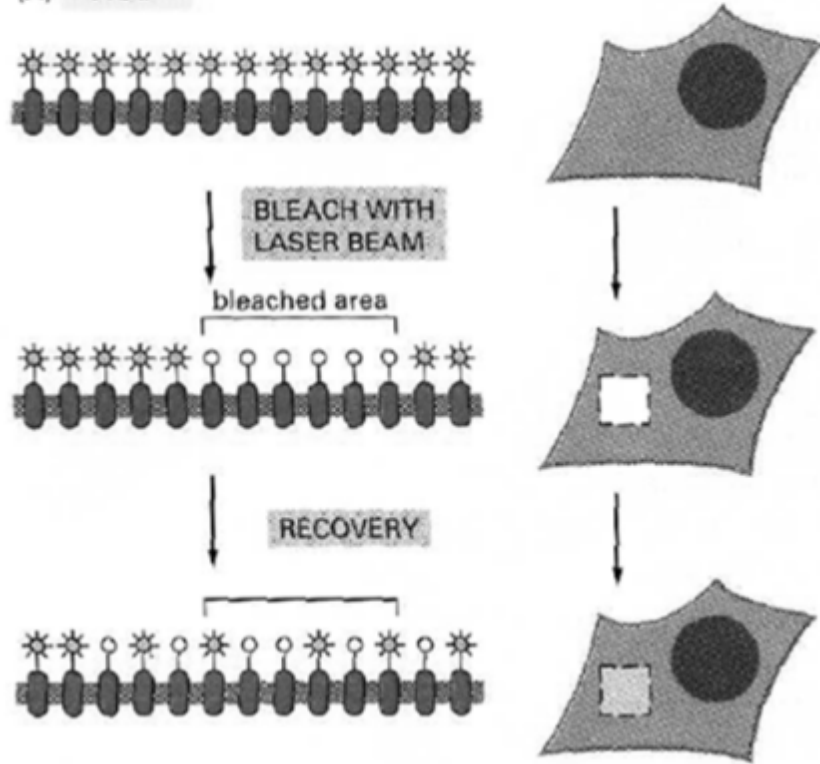
## FRAP – Fluorescence Recovery after Photobleaching

- studium mobility a molekulární dynamiky proteinů v živých b.
- narušení rovnoměrné fluorescence preparátu vysvícením (photobleaching) daného regionu
- použití excitačního laseru o vyšší intenzitě –trvalé poškození fluoroforu
- v místě postupné zvyšování intenzity fluorescence – přesun fluorescenčních a odbarvených molekul
- různé metody v závislosti na velikosti odbarveného regionu, počtu odbarvovacích procesů a způsobu analýzy fluorescence



# Princip FRAP

(A) FRAP



Photobleaching Kinetic Analysis

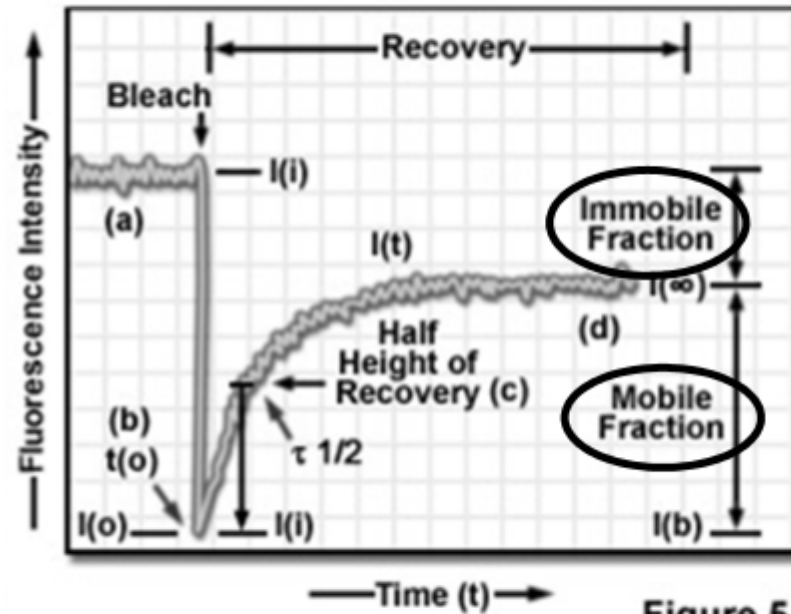
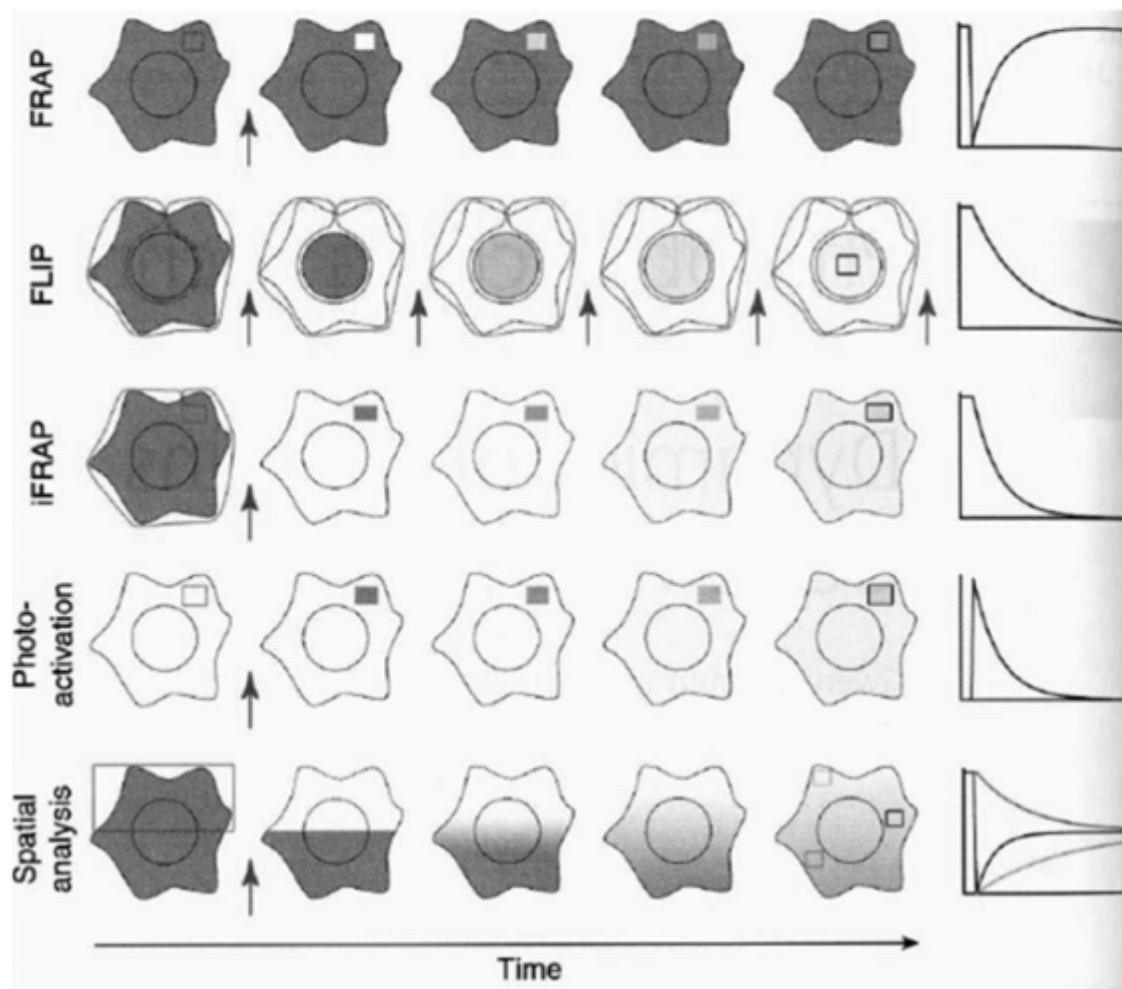


Figure 5





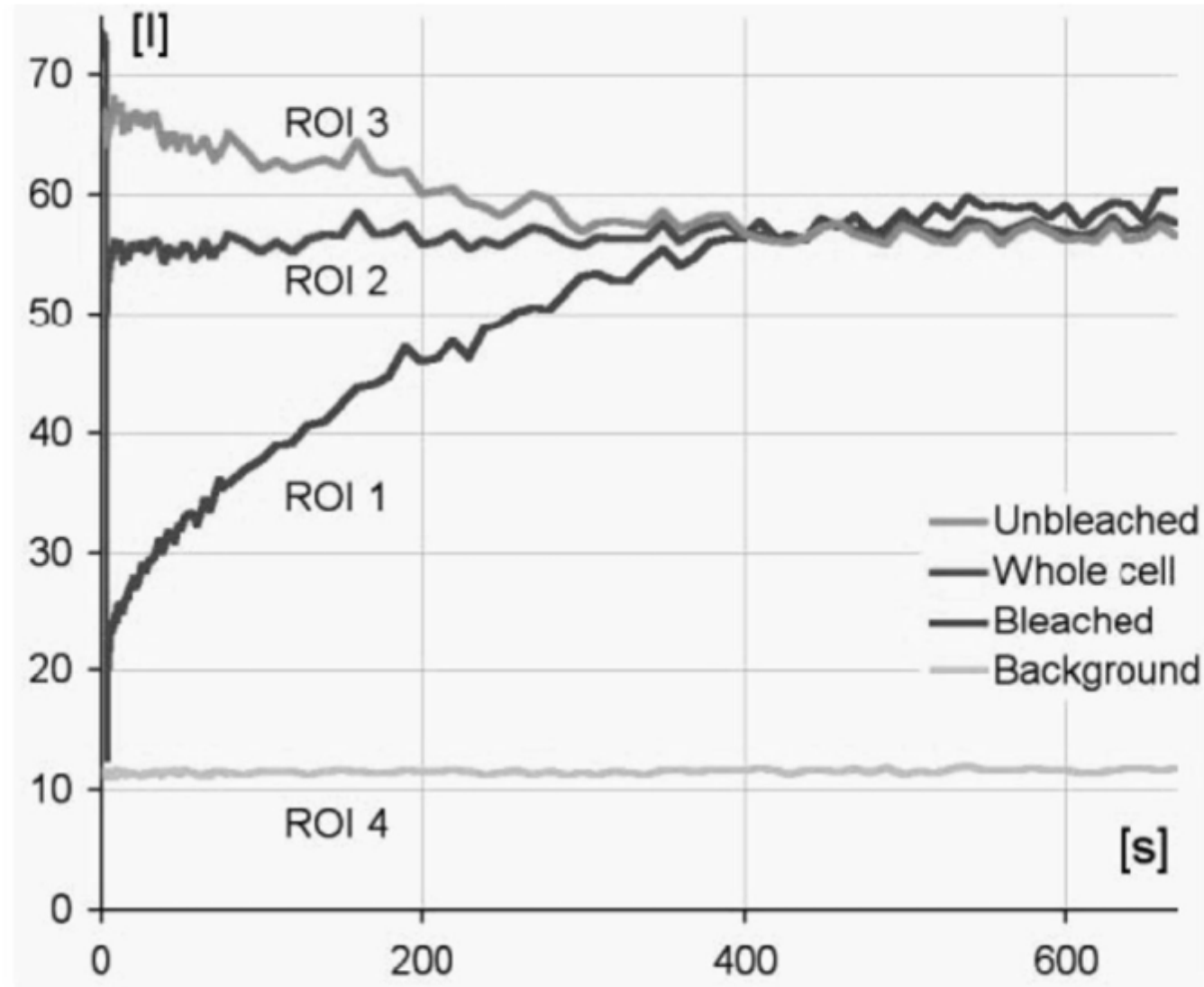
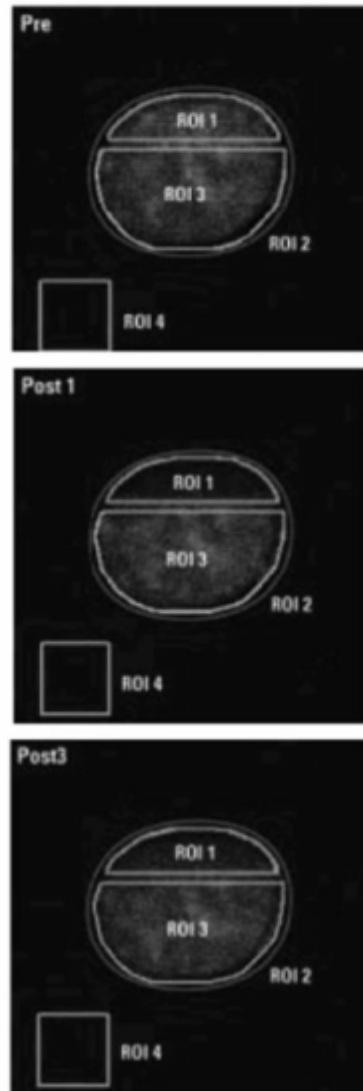
FRAP- malý region 1x odbarvení  
obnovení signálu, informace o  
mobilitě molekul

FLIP – fluorescence loss in  
photobleaching – opakované  
odbarvení stejného regionu,  
informace o propojení mezi  
různými kompartmenty, studium  
migrace molekul

iFRAP (inverzní) – celý preparát  
kromě 1 regionu odbarven –  
postupné vymizení fluorescence

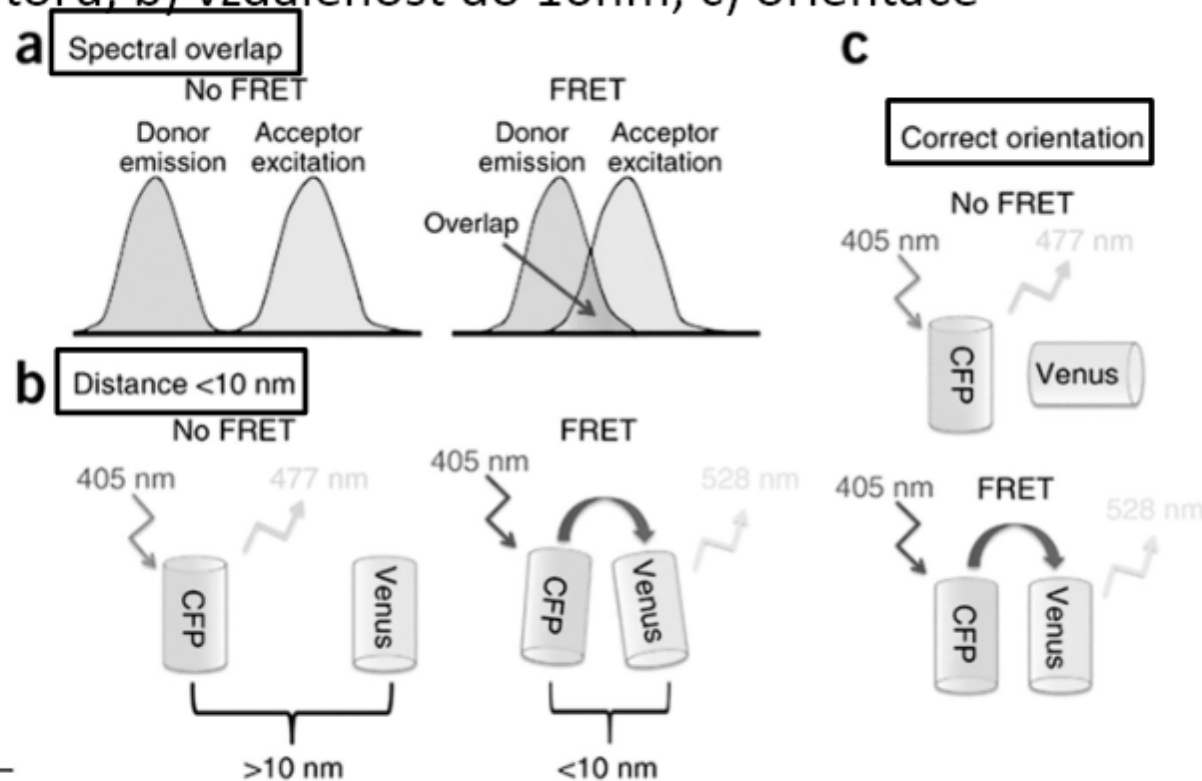
fotoaktivace – analýza rychlých  
difúzních procesů



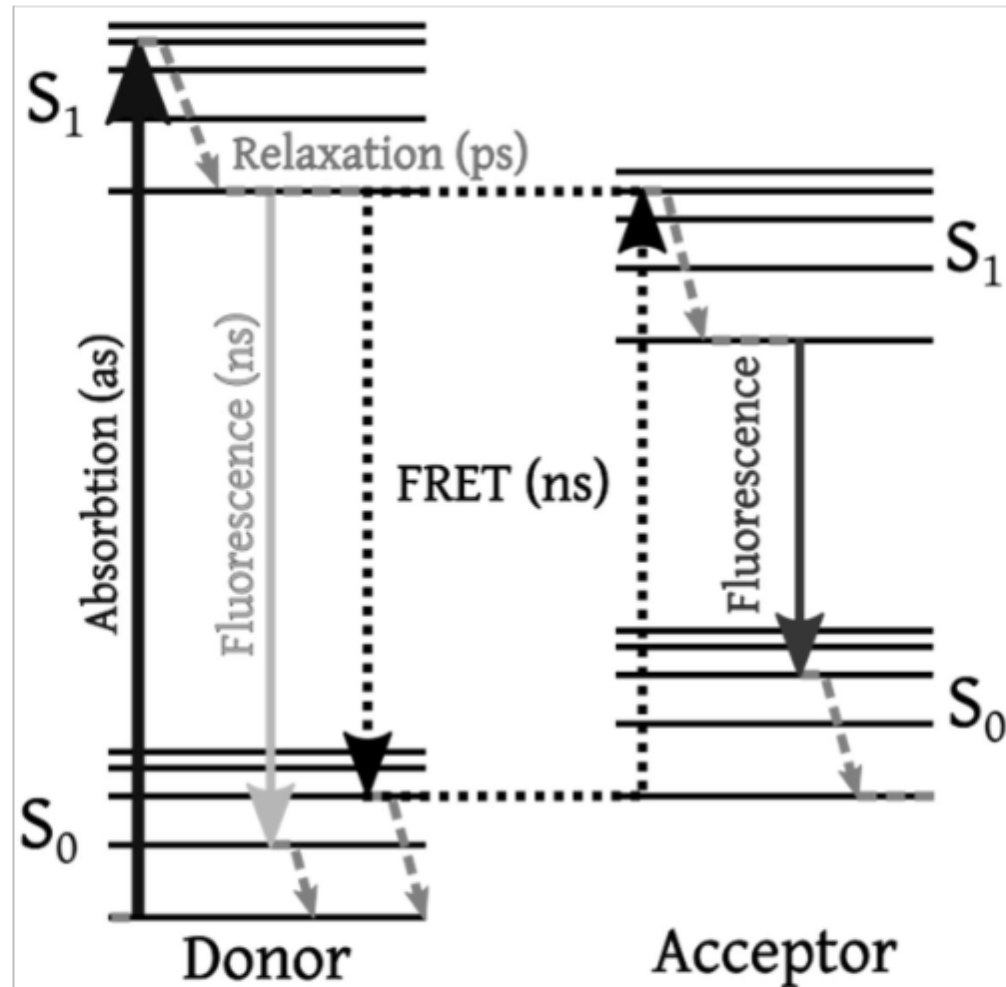


# FRET: Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer

- studium fluorescenčně značených molekul
- měření nanometrových vzdáleností a jejich změn mezi molekulami (1-10nm)
- 2 fluorofory: donorový + akceptorový
- podmínky: a) překryv emisní spektra donoru s excitačním spektrem akceptoru, b) vzdálenost do 10nm, c) orientace



## Princip přenosu energie mezi fluorofory



## Examples for common FRET Donor/Acceptor pairs:

**Donor (Em.)**

**Acceptor (Exc.)**

FITC (520 nm)

TRITC (550 nm)

Cy3 (566 nm)

Cy5 (649 nm)

EGFP(508 nm)

Cy3 (554 nm)

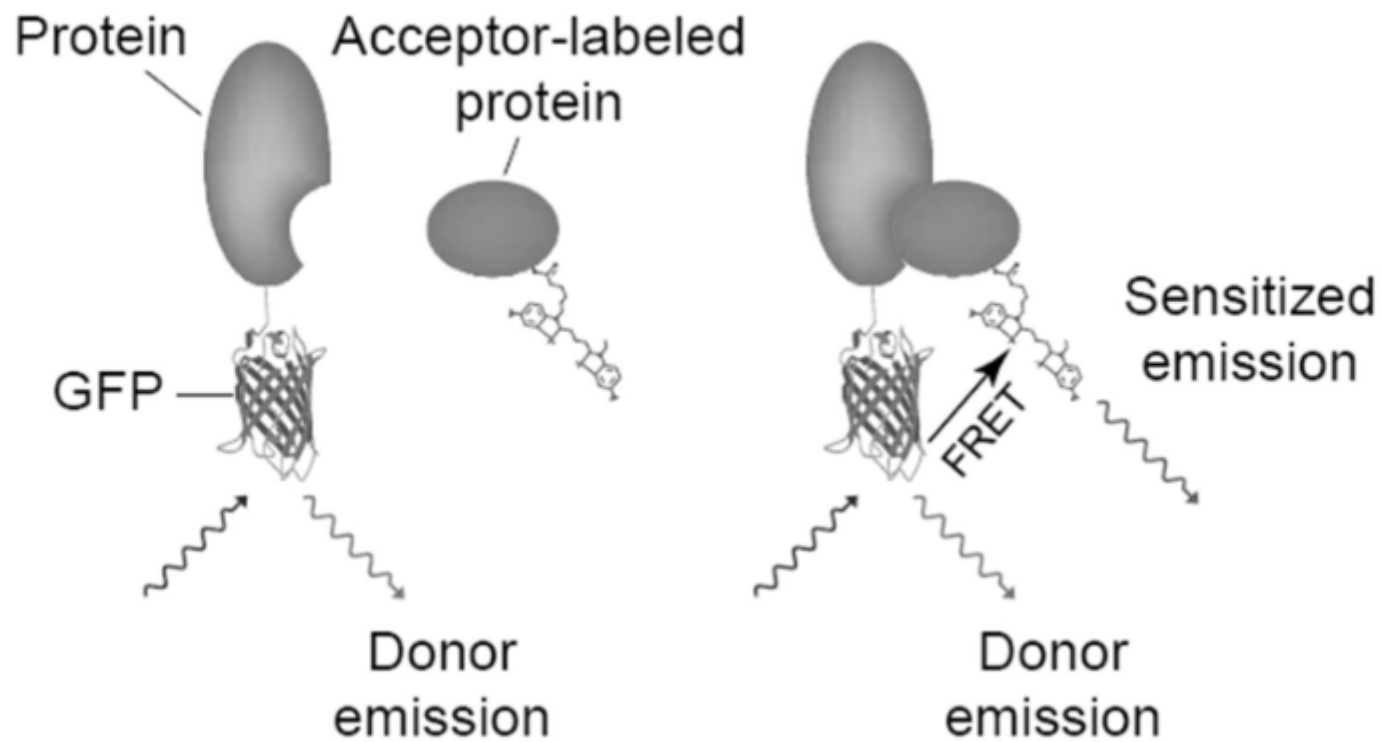
CFP (477 nm)

YFP (514 nm)

EGFP (508 nm)

YFP (514 nm)

# Princip FRET interakce receptor-ligand

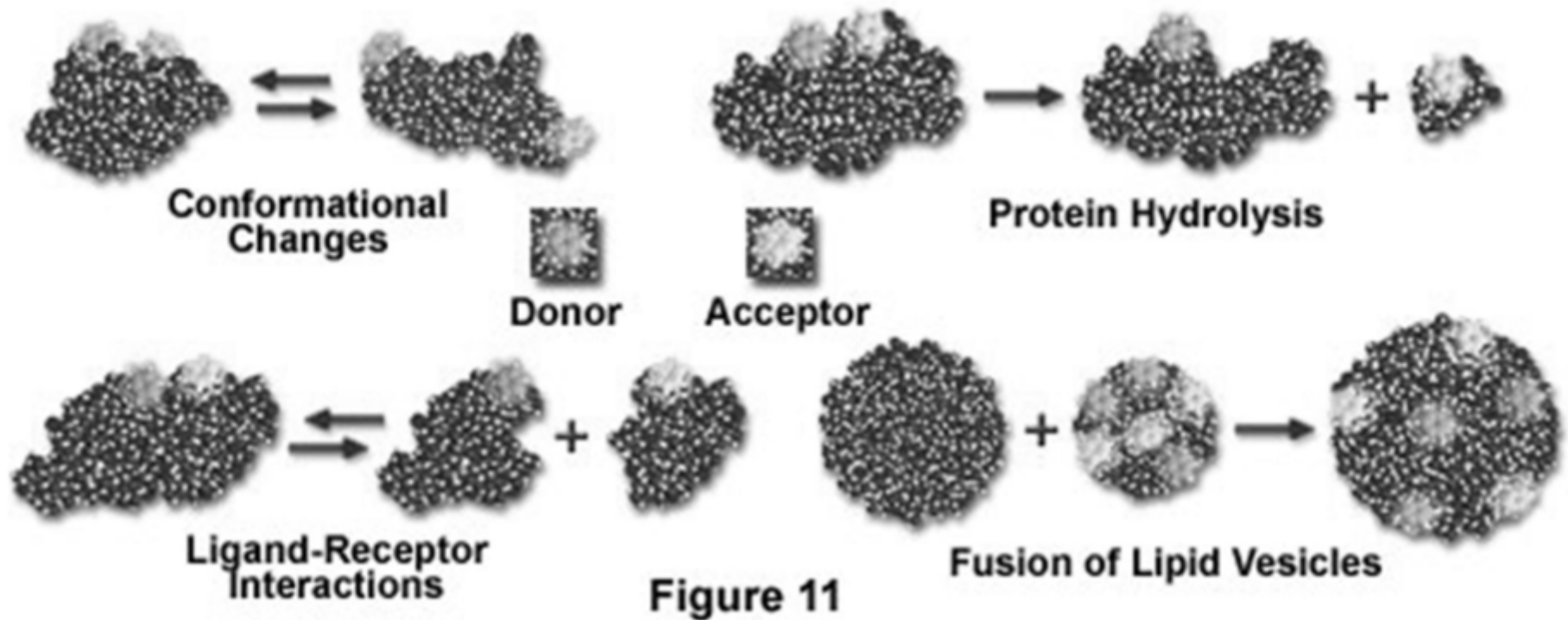


**Fig. 1.**

*TRENDS in Cell Biology*

# Další aplikace FRET

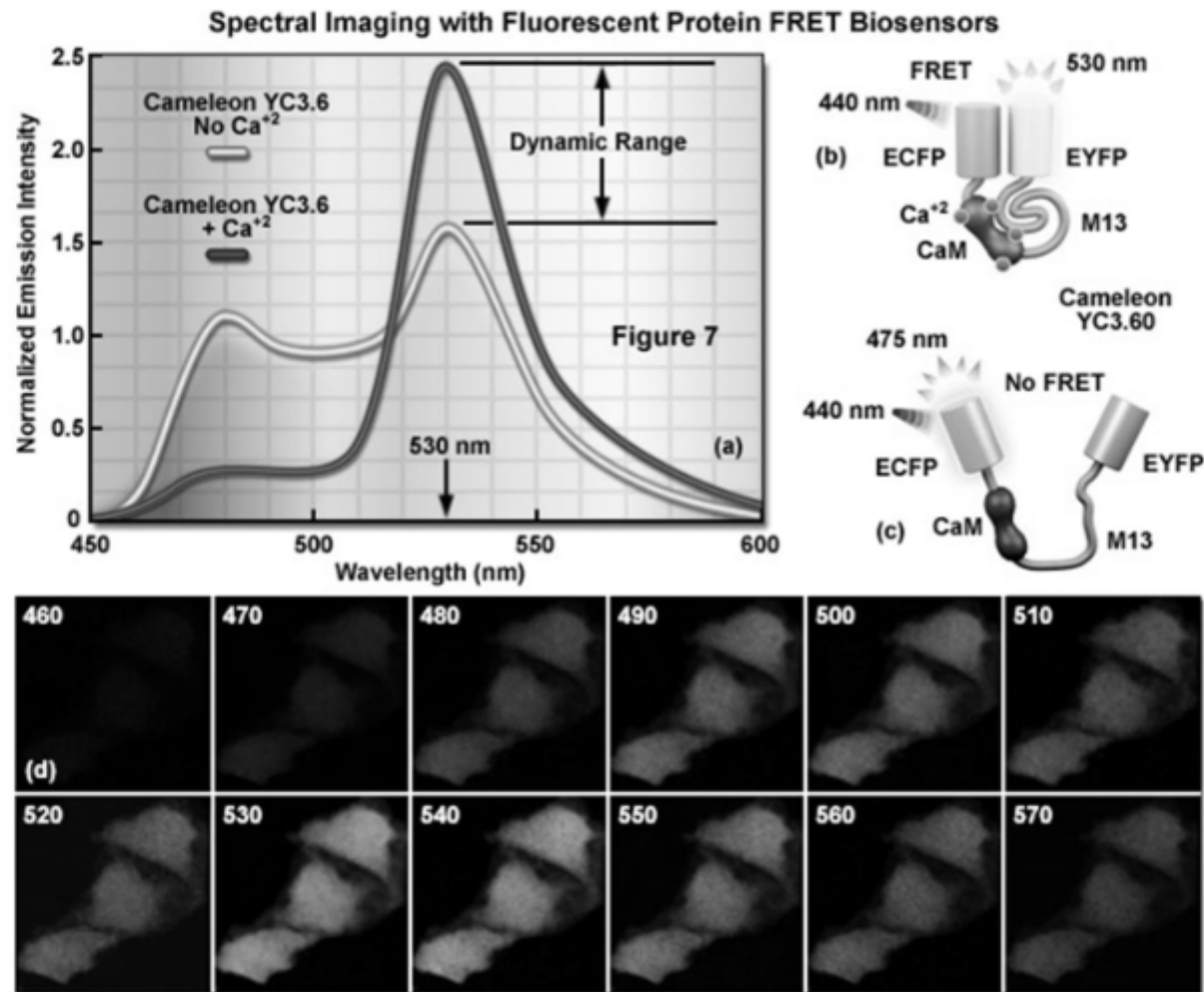
## Biomolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Applications



# aplikace FRET

## biosenzory- měření koncentrace vápníku

<http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/spectralimaging/fretbiosensors/index.html>



## Podmínky pro mikroskopii živých buněk

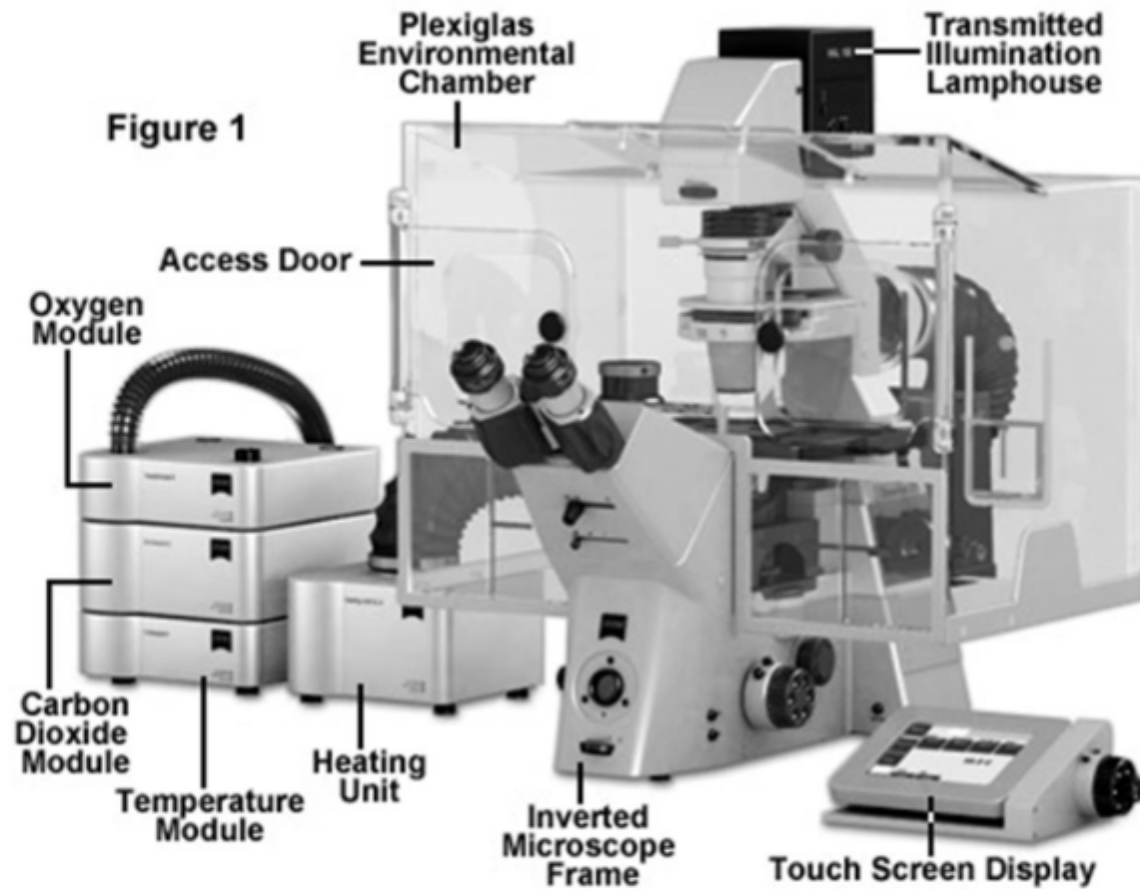
Variable	Optimum Range	Comments
Temperature	28-37°C	Control with Specimen Chamber Heaters Use Inline Perfusion Heaters Objective Lens Heaters Environmental Control Boxes
Oxygenation	Variable	Perfuse or Change Media Regularly Use Large Chamber Volume
Humidity	97-100 Percent	Closed (Sealed) Chamber Humidified Environmental Chamber Auto-Fill System for Open Chambers
pH	7.0-7.7	Use HEPES Buffered Media Perfuse or Change Media Regularly No Phenol Red Indicator
Osmolarity	260-320 mosM	Avoid Evaporation Closed (Sealed) Chamber Humidified Environmental Chamber
Atmosphere	Air or 5-7 Percent Carbon Dioxide	Use HEPES Buffered Media for Air Closed (Sealed) Chamber Atmosphere Controlled Chamber
Media Buffer	Bicarbonate or Synthetic Biological Buffers	Beware of Phototoxicity Closed and Open Chambers Atmosphere Controlled Chamber





# Mikroskopie živých buněk

Microscope Configuration for Live-Cell Imaging



# Mikroskopie živých buněk

## Microscope Slide Imaging and Culture Chambers

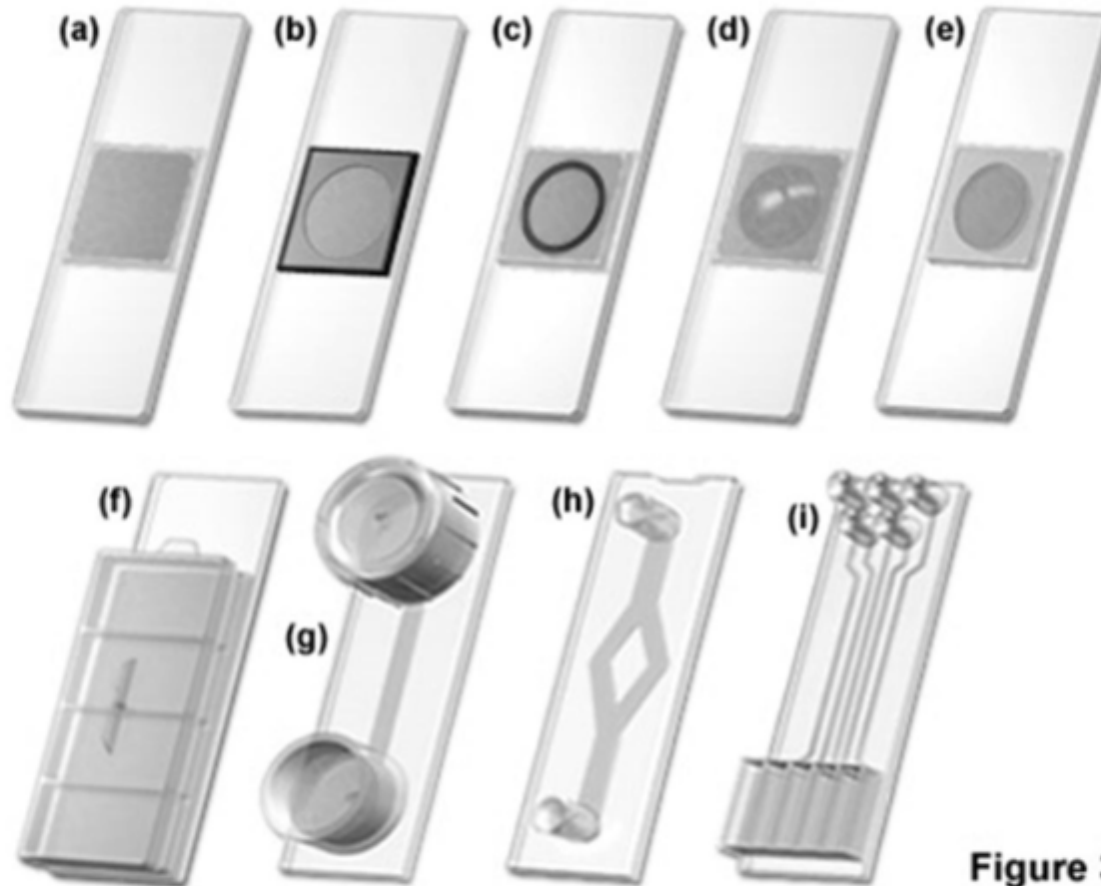
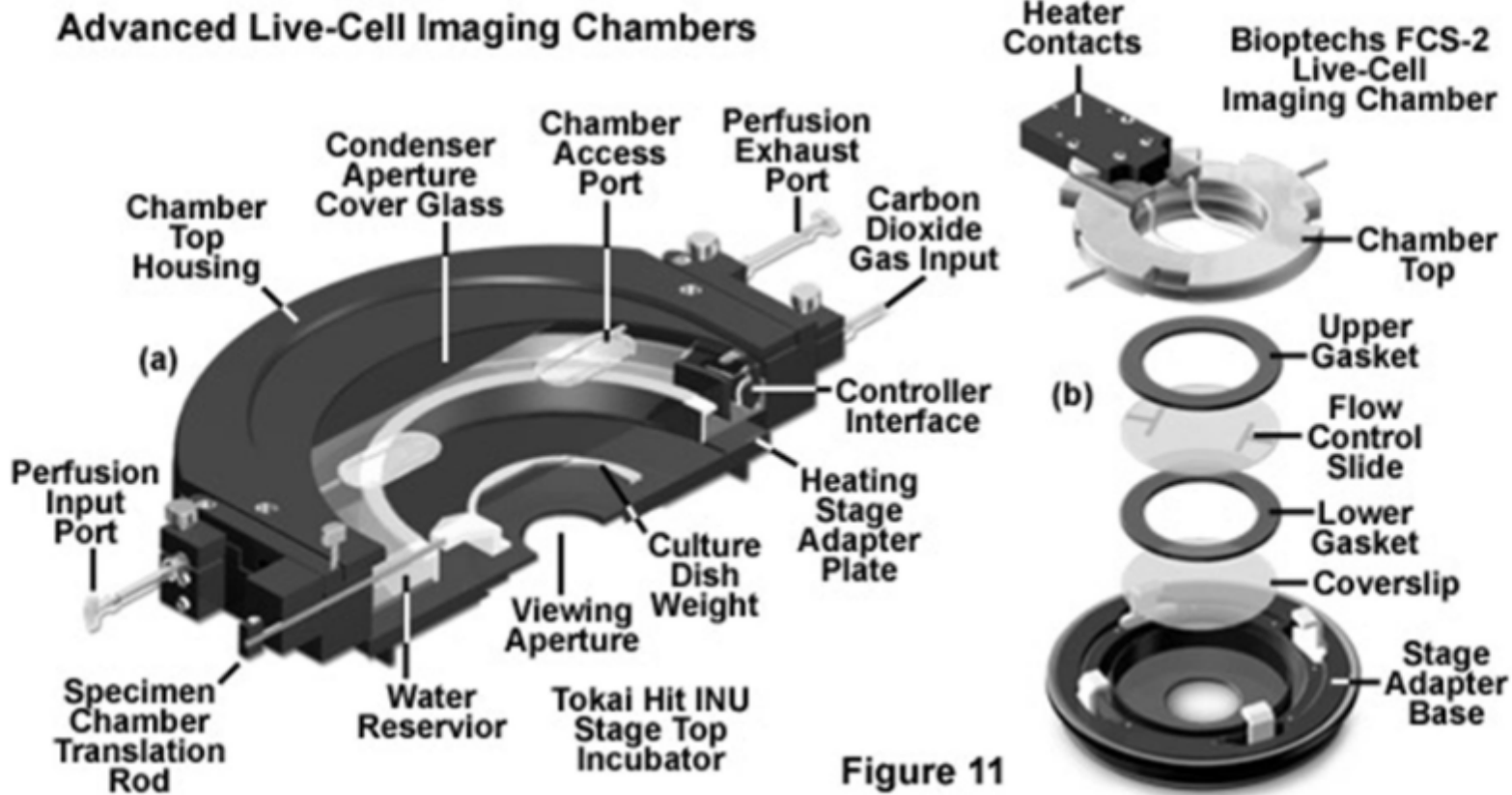


Figure 3



# Inkubační (perfúzní) komůrka



## Live imaging

<http://www.youtube.com/watch?feature=endscreen&NR=1&v=Nrwu0YhGx5o>

