

Bi8920 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční zobrazení živých buněk

RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.

Ústav experimentální biologie PŘF MU



Program přednášky:

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





Osamu Shimomura



Martin Chalfie



Roger Y. Tsien

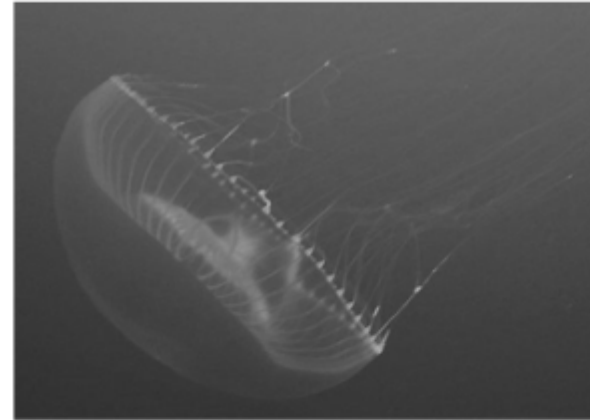
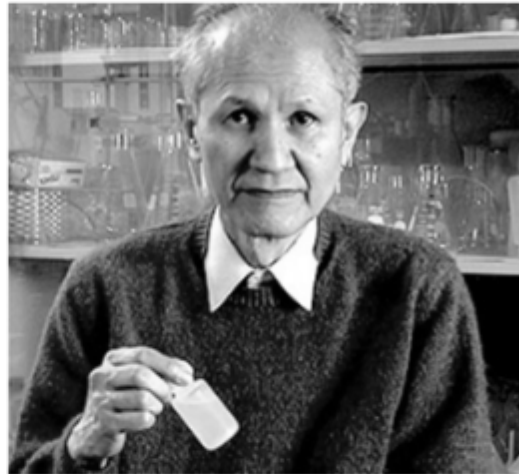
The Nobel Prize in Chemistry 2008
*"for the discovery and development
of the green fluorescent protein, GFP".*

http://www.youtube.com/watch?v=90wpvSp4I_0

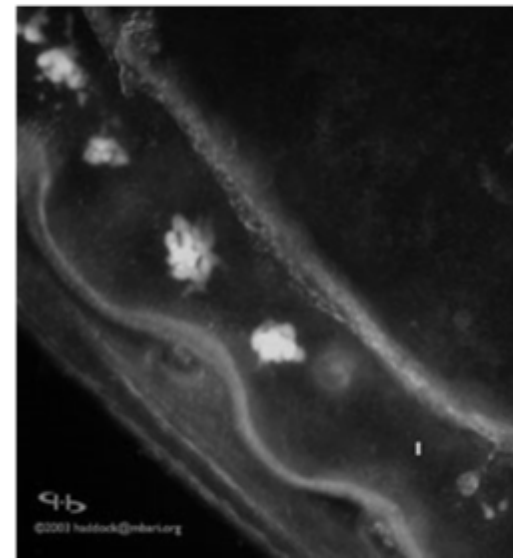


O. Shimomura

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

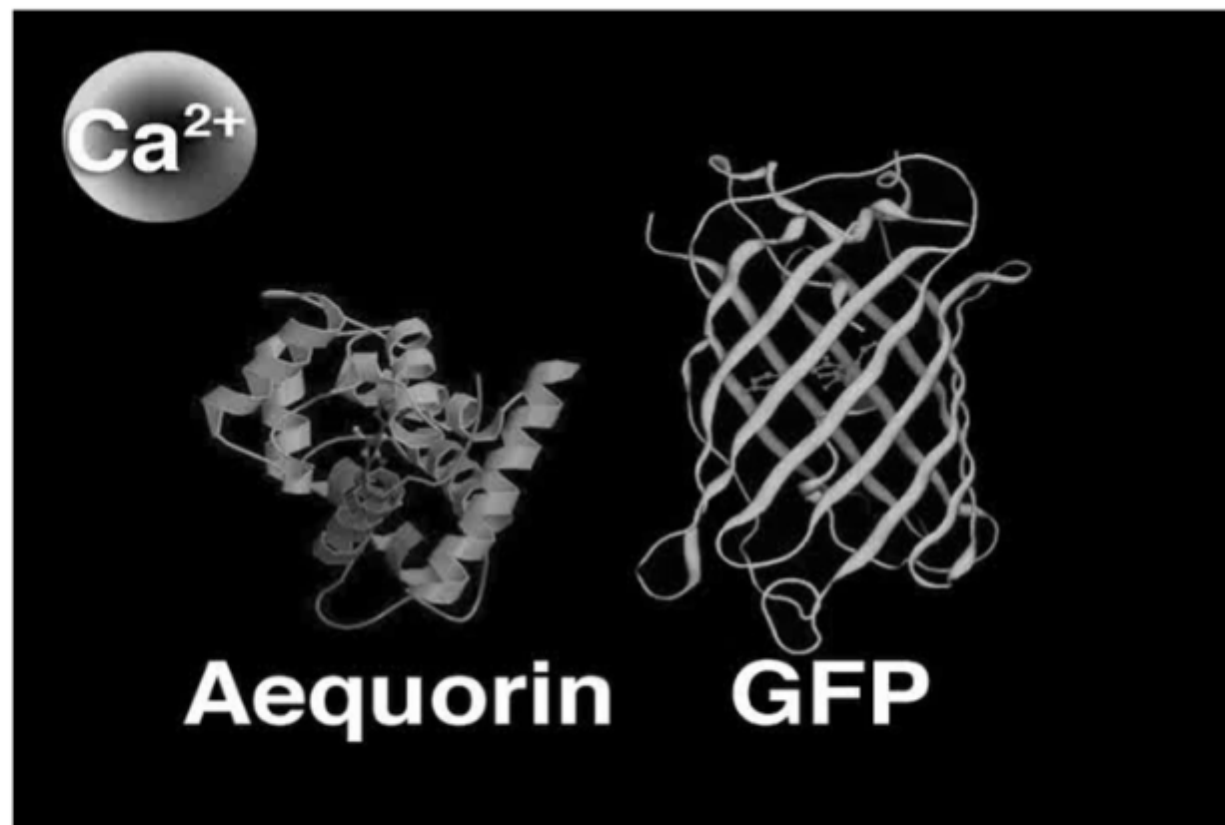


© Osamu Shimomura Originally published in "A Glow in the Dark"

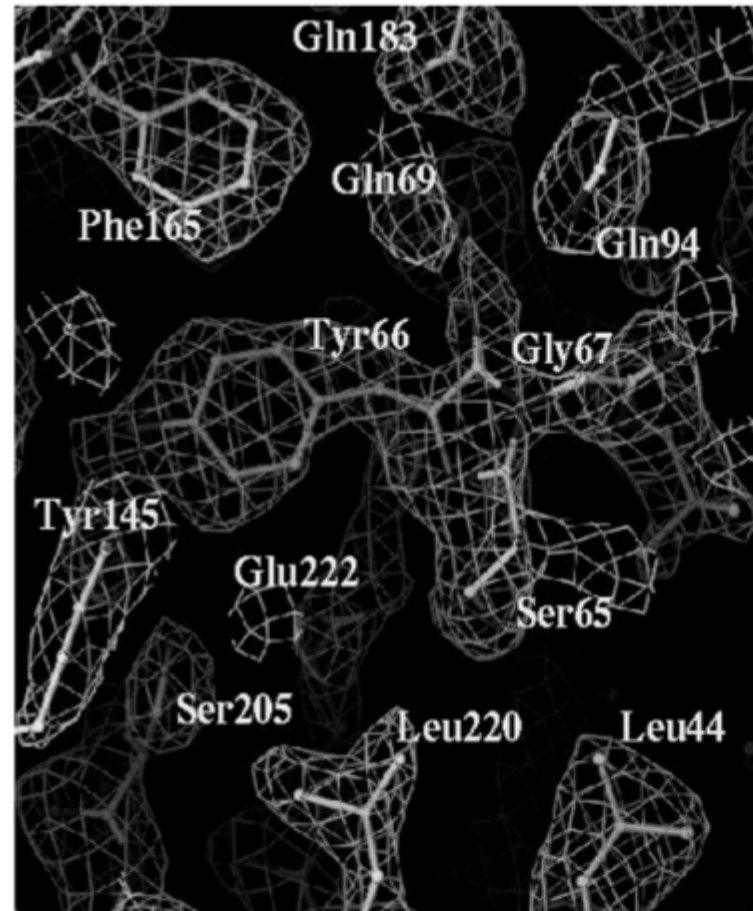
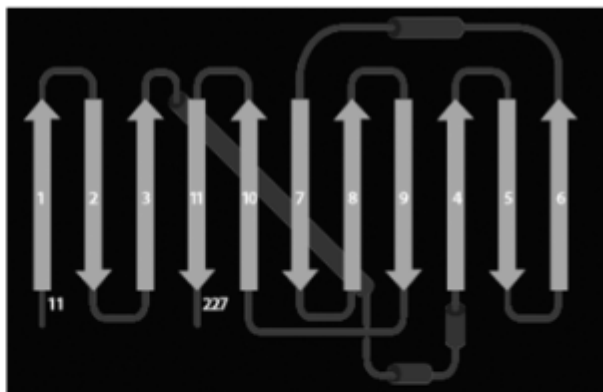
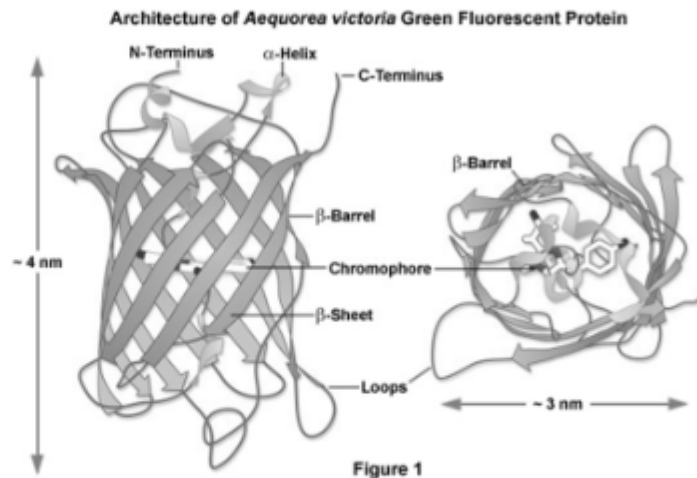


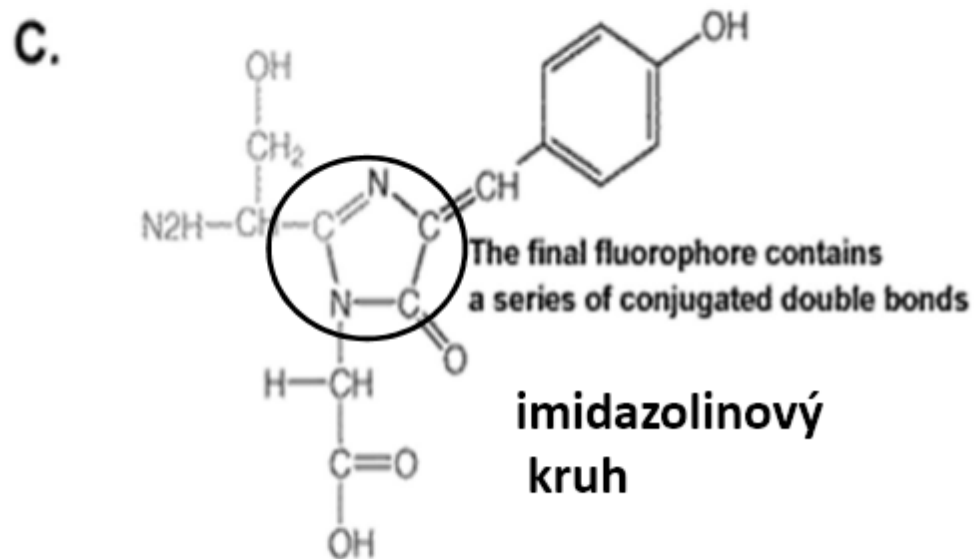
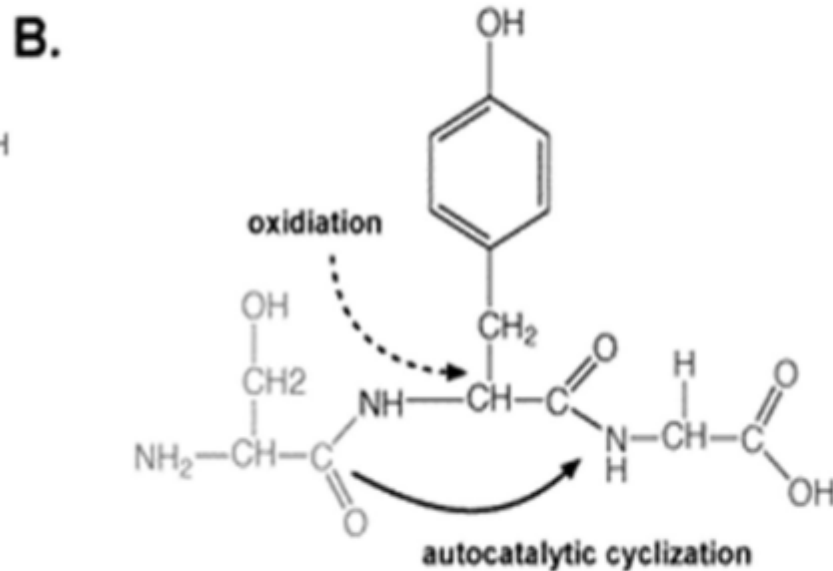
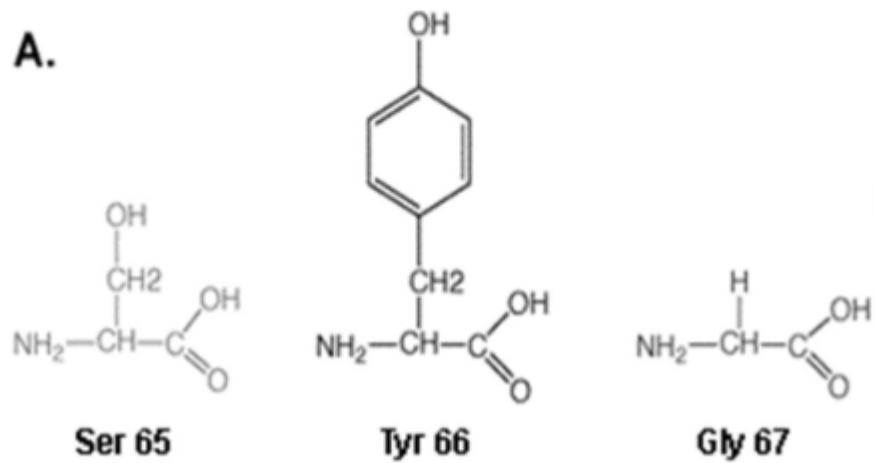
Princip luminiscence *Aequorea victoria*

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



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

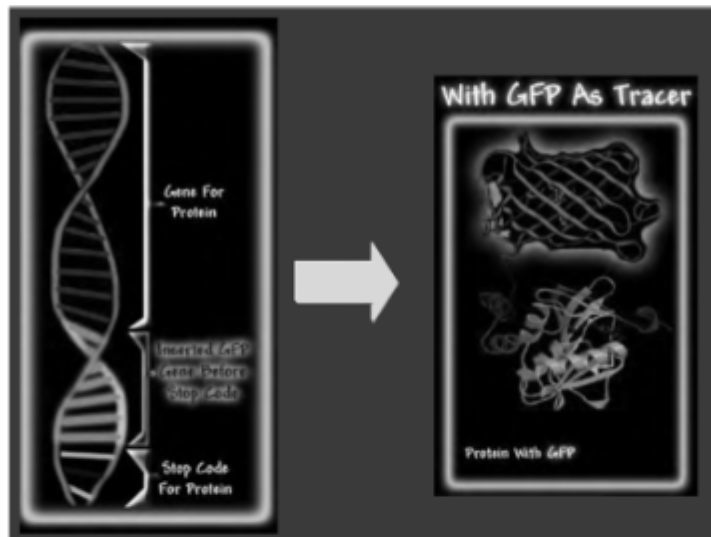




<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/fluorescentproteins/egfpchroma/indexflash.html>

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

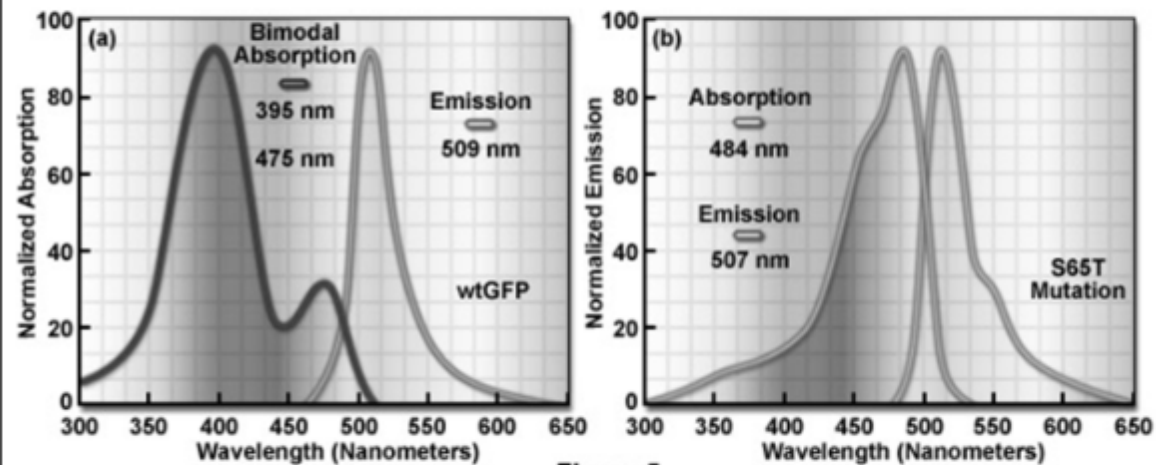
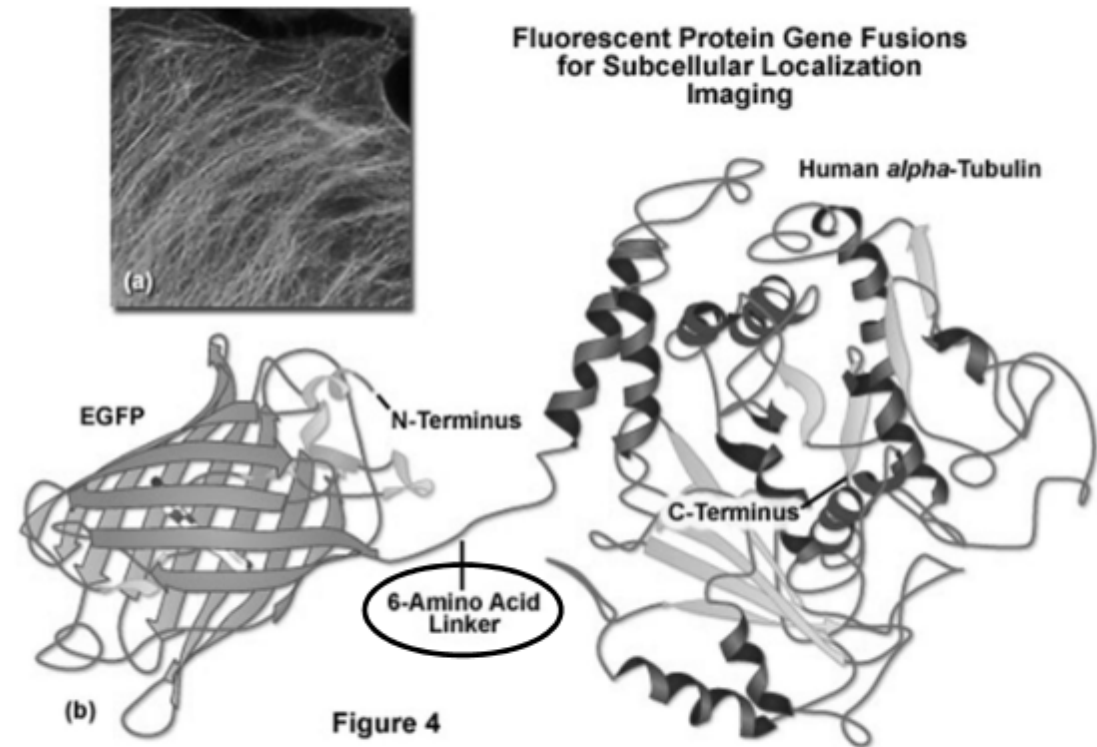


Figure 5

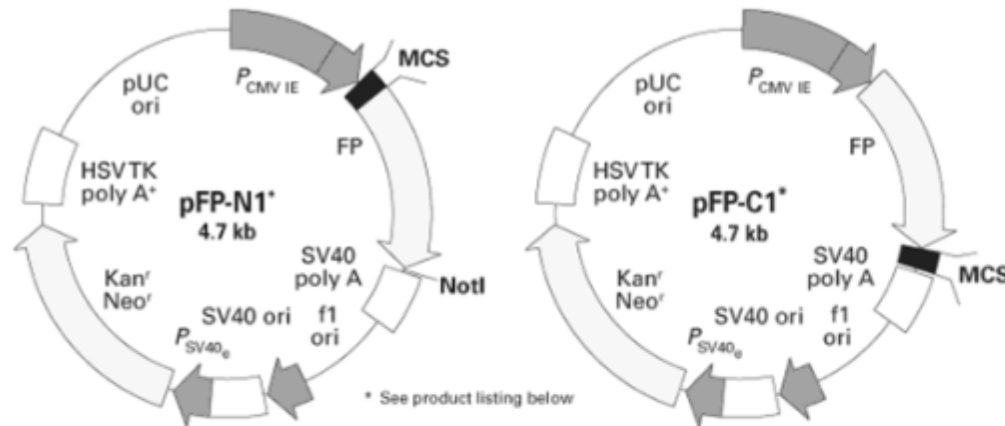


Expres :

- 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, redukce (2-4 hodiny)
- méně stabilní při nízkém pH
- původně dvoukrokový proces

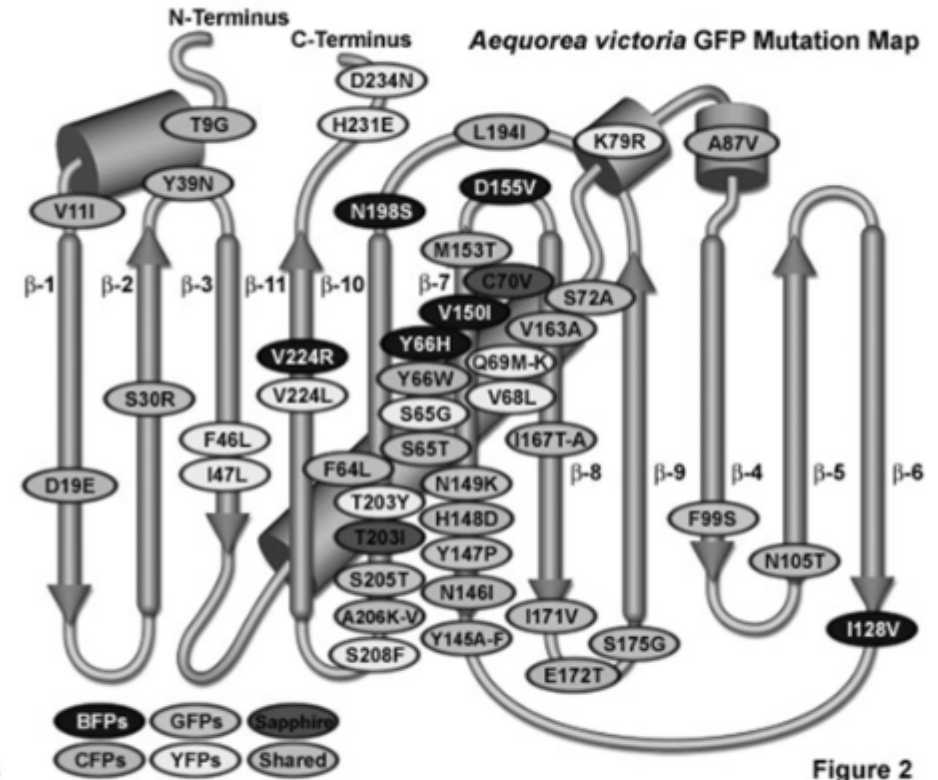


mutace GFP

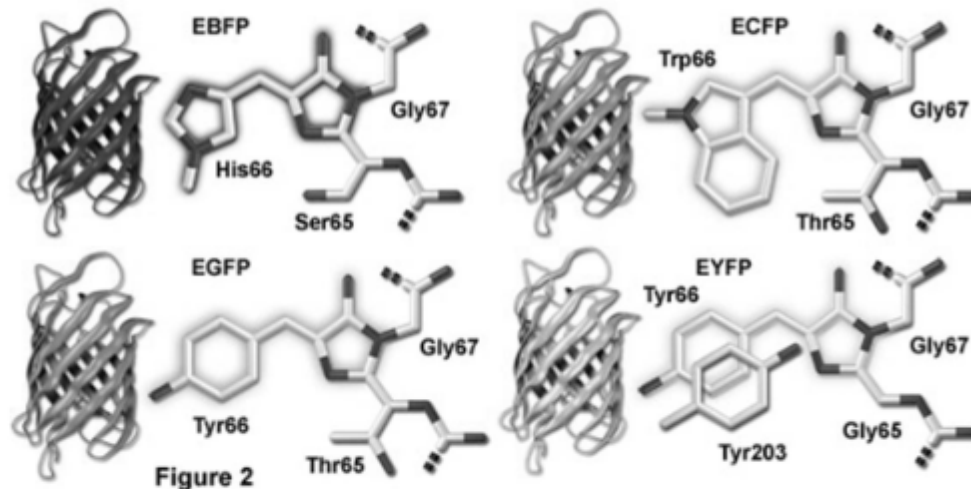
- zesílení signálu
- delší životnost
- posun emisního spektra

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

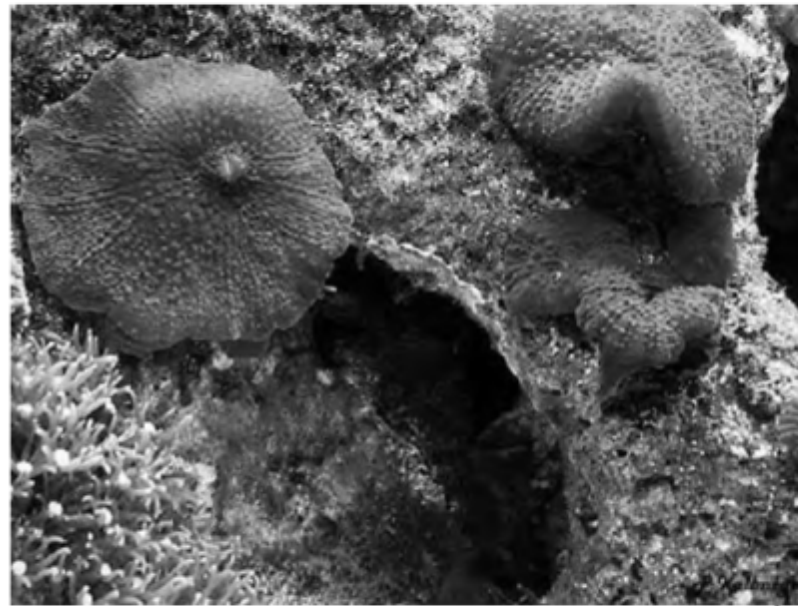
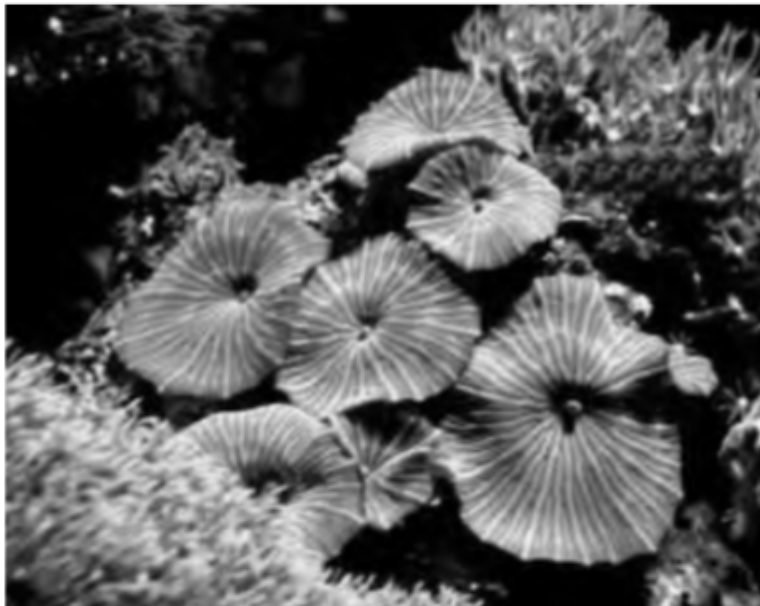


Wt: Ser65-Tyr66-Gly67



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



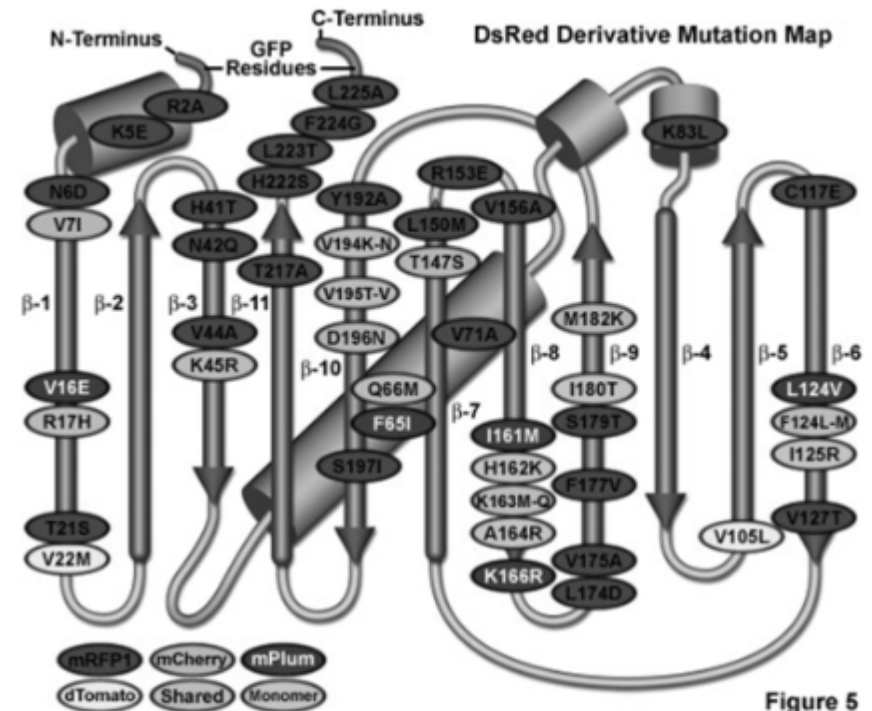
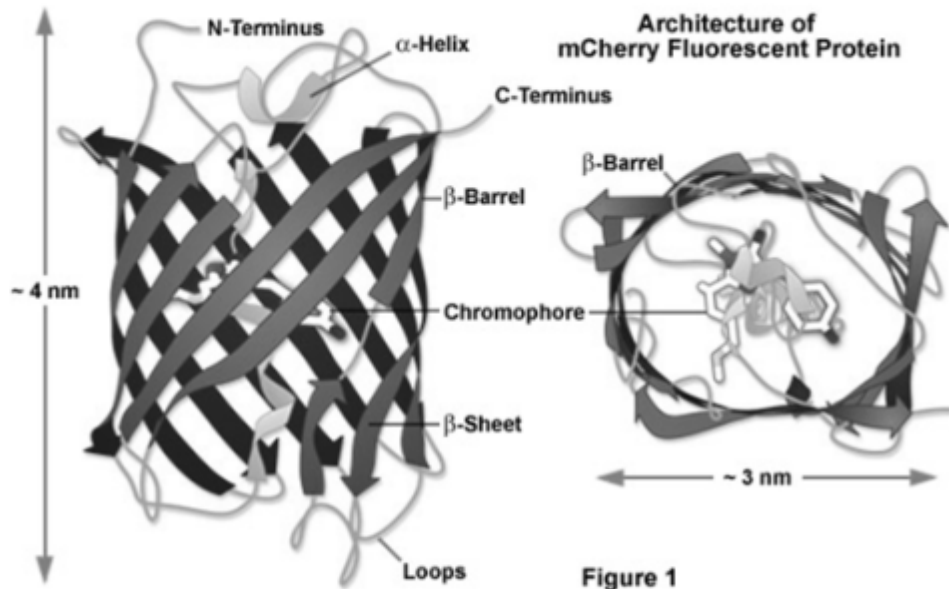
Ds Red fluorescenční protein a jeho deriváty

wt Ds Red: podobná struktura proteinu jako GFP

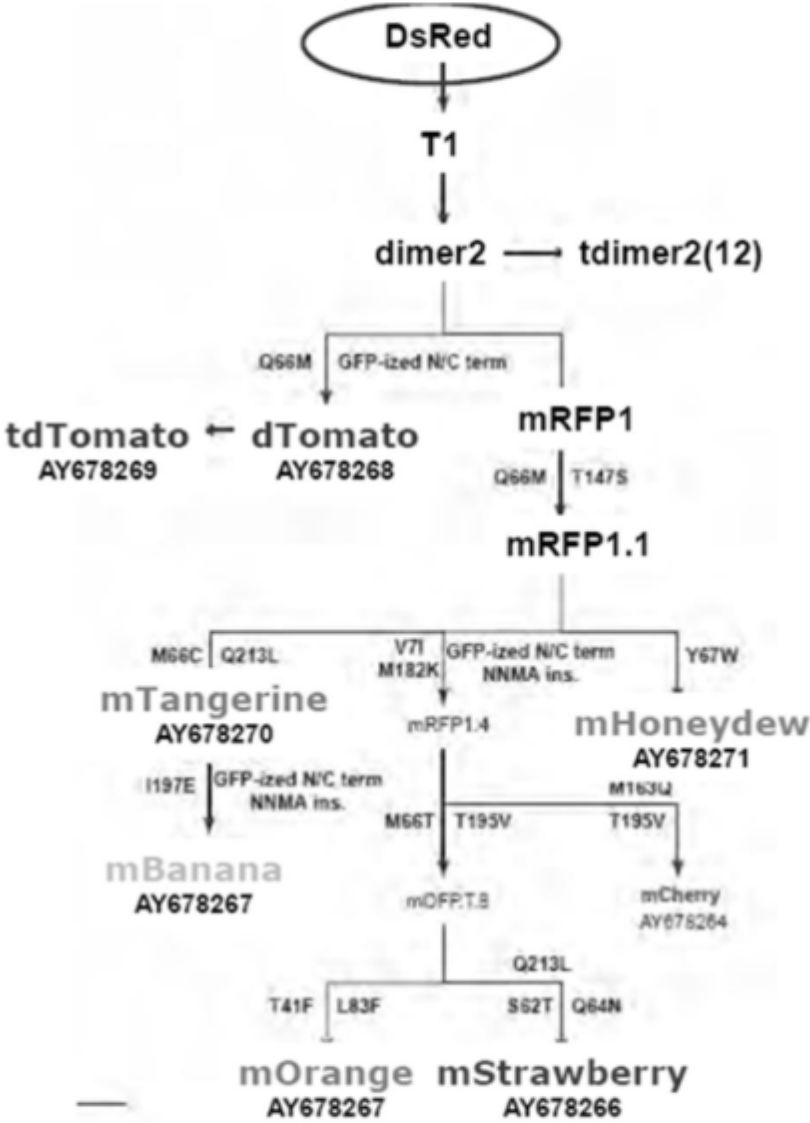
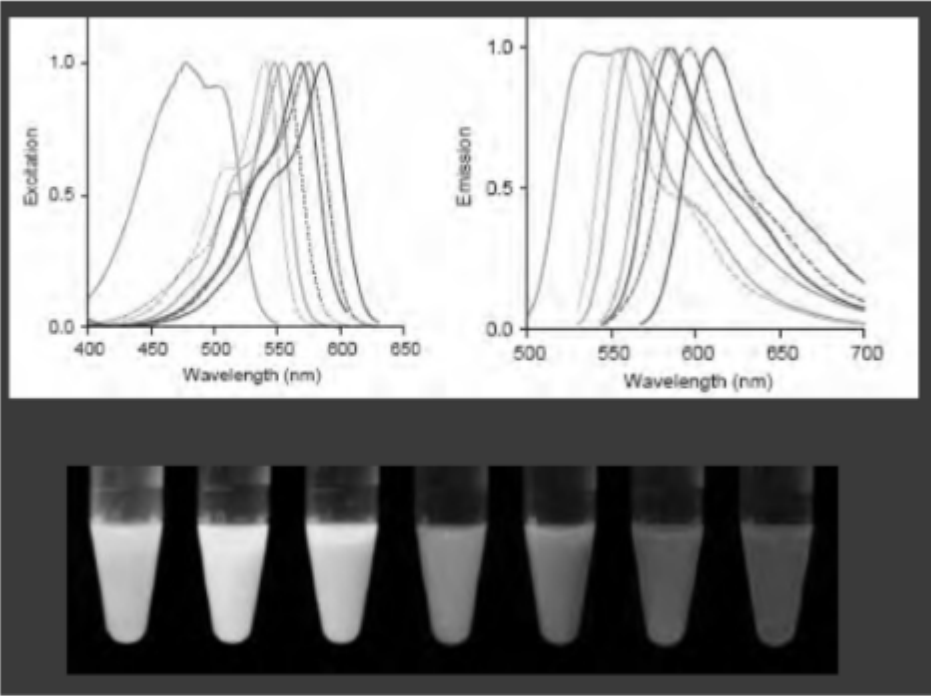
β -barel (11 antiparalelních řetězců) , uvnitř α -helix s chromoforem

excitace: 558 nm

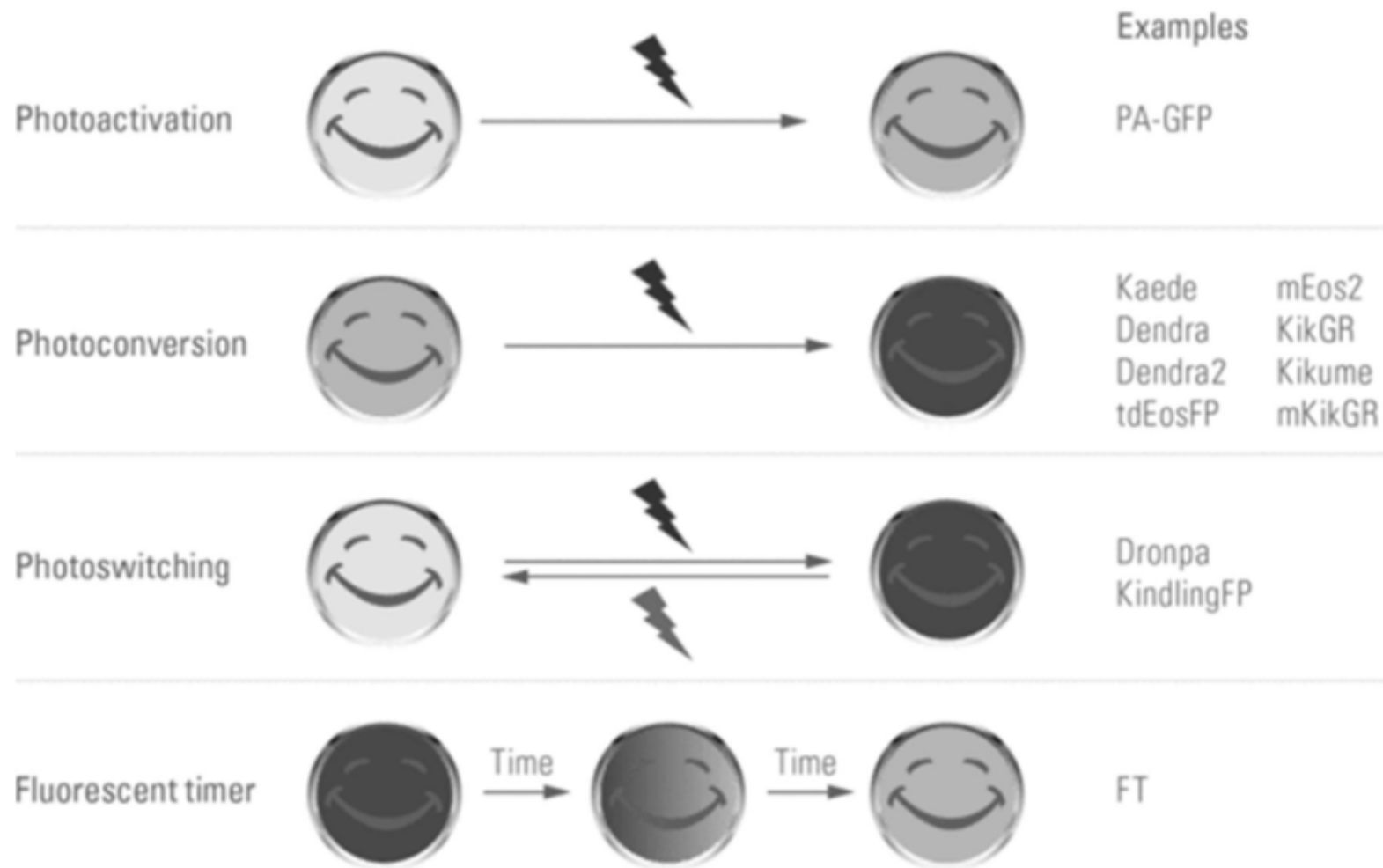
emise: 583 nm



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.

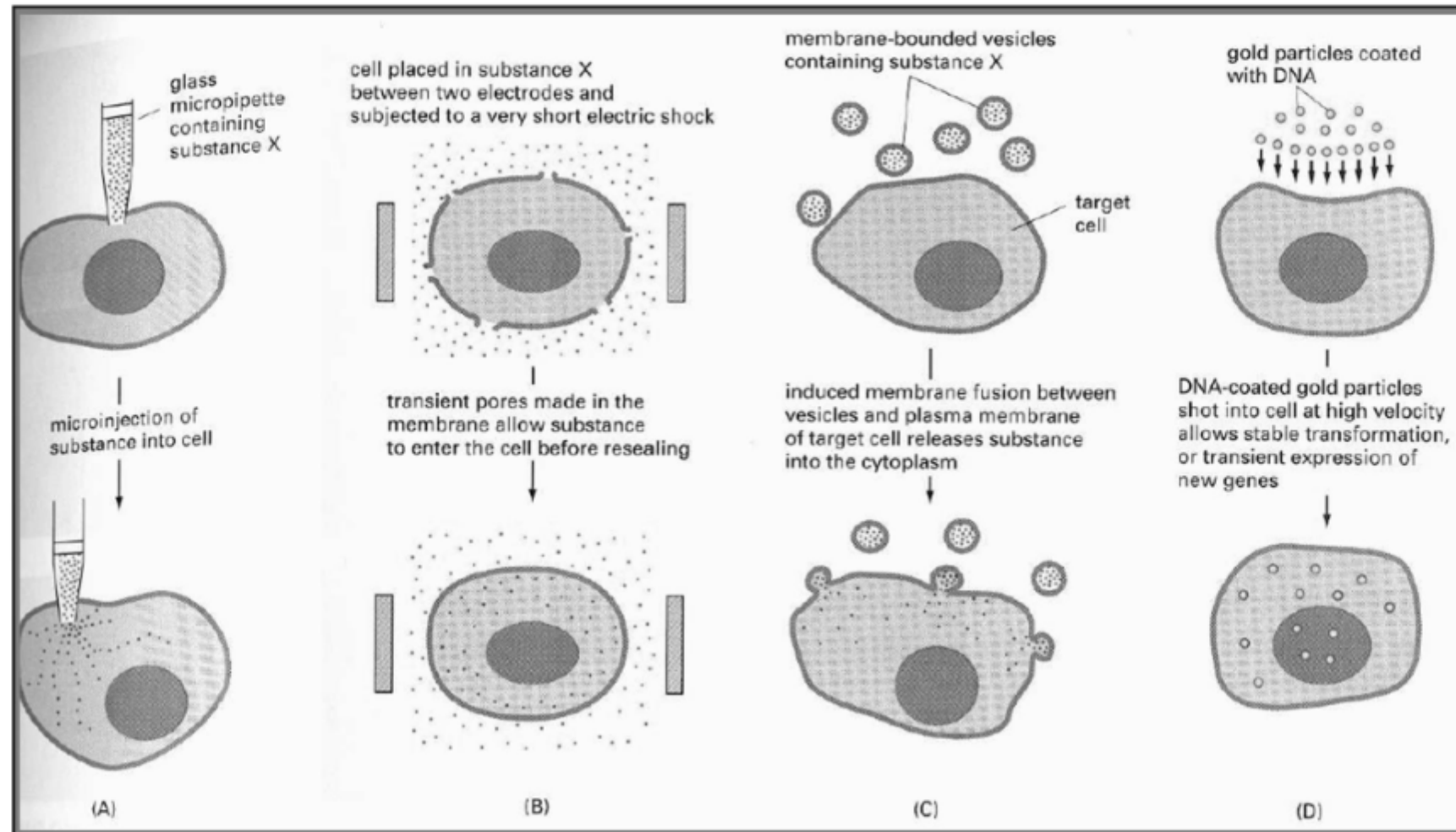
Lipofectaminová transfekce – jednoduchá a nejčastější metoda u živočišných buněk, není toxický, komplex lipidů a DNA fúzuje s plasmatickou membránou, lze i do jádra

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

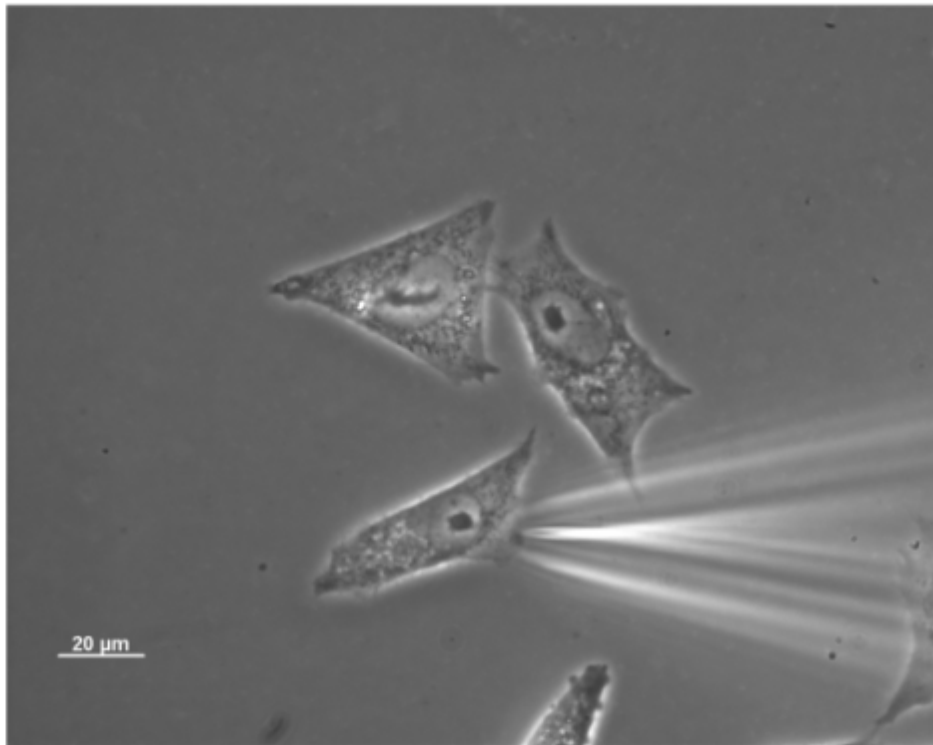
Elektroporace – elektrický puls vyvolá tvorbu pórů v plasmatické membráně, přechod do buňky



Zavedení fúzního genu do buňky

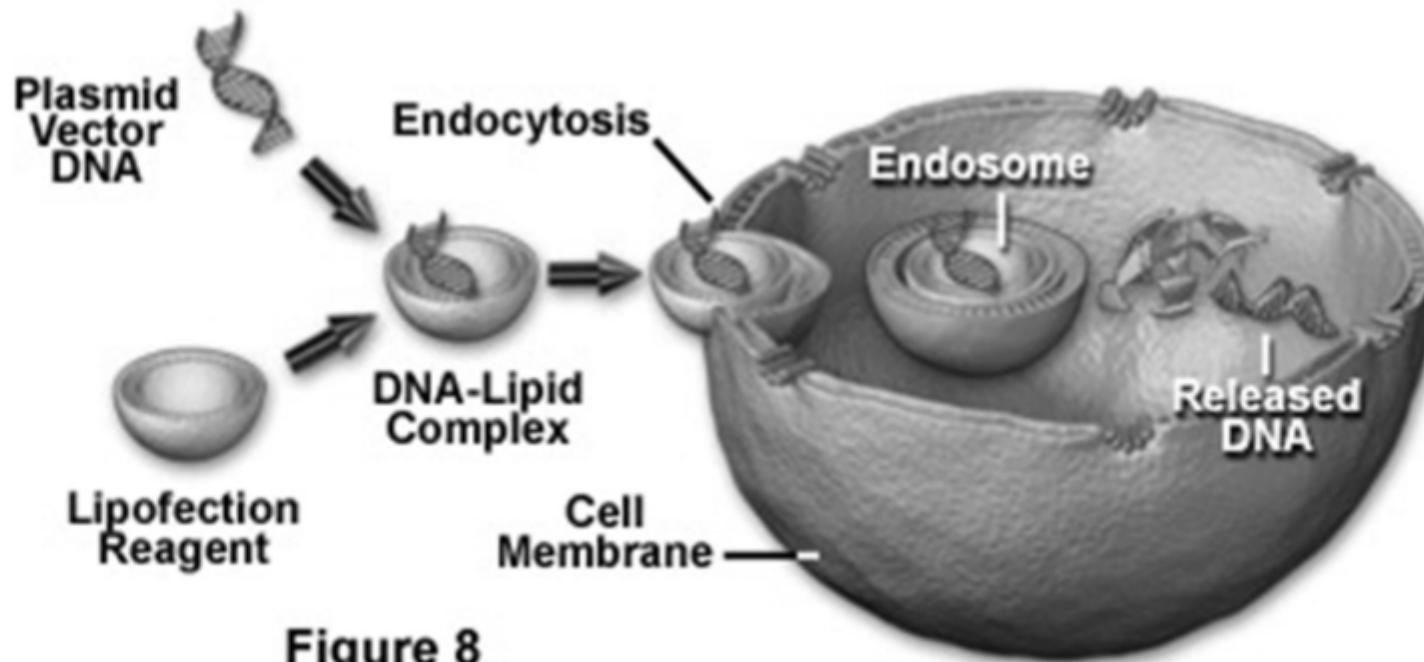


Mikroinjekce



Lipofectaminová transfekce

Lipid-Mediated Transfection in Mammalian Cells



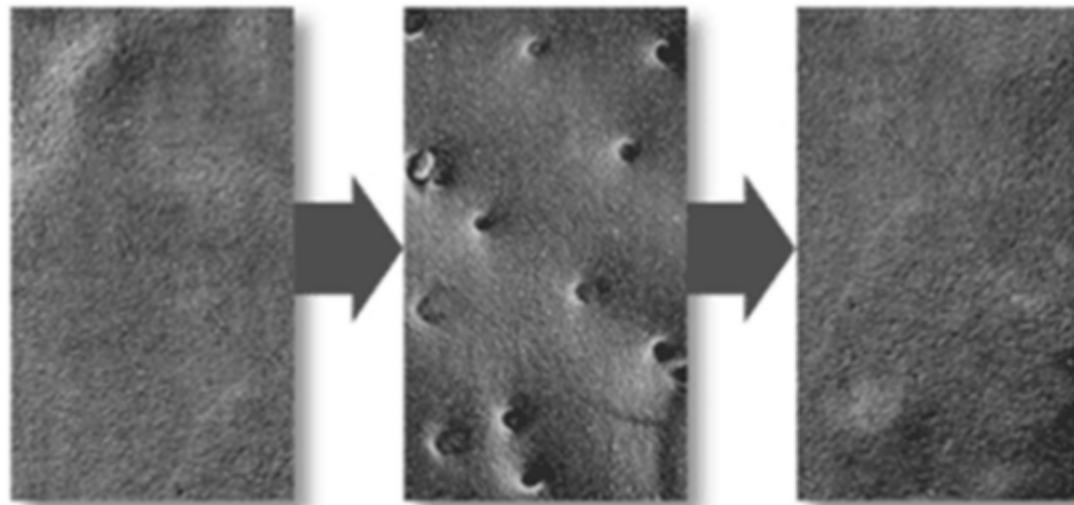
Elektroporace

Cíle:

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



The phenomenon of electroporation



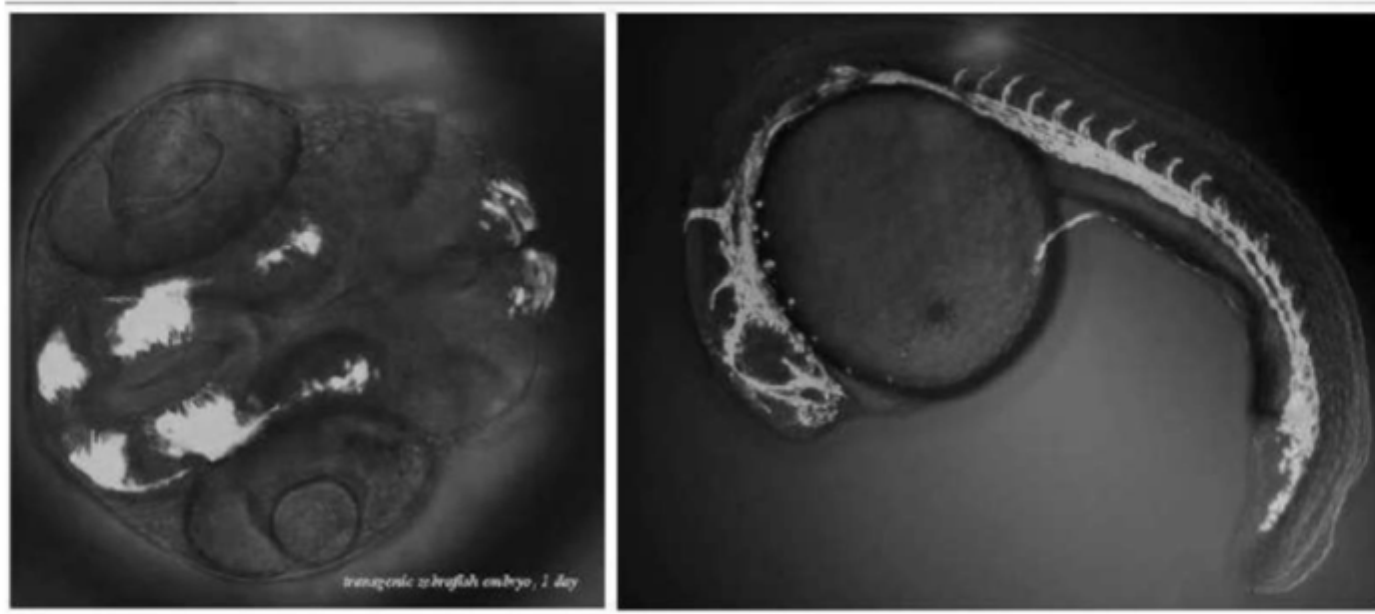
Cell membrane
before pulsing

Cell membrane
during pulsing

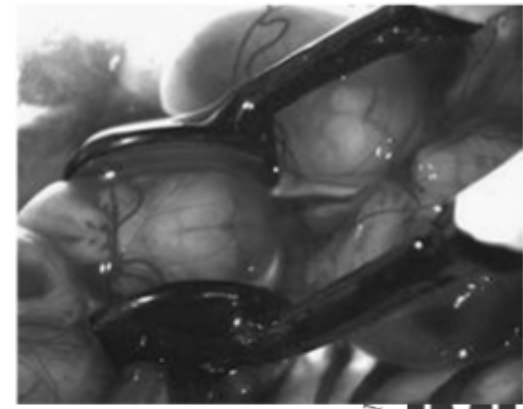
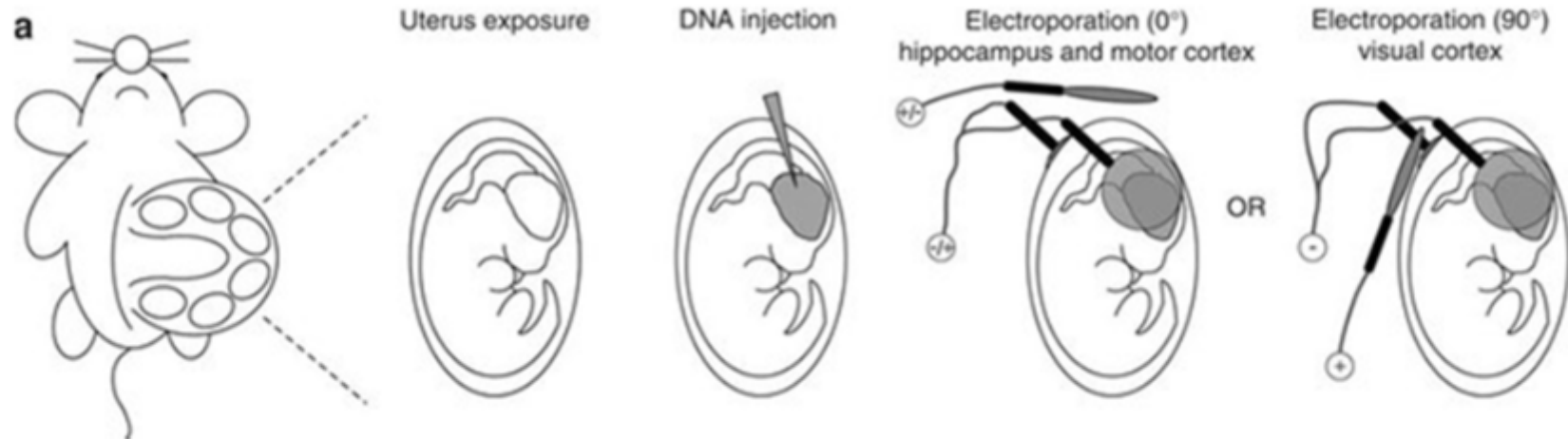
Cell membrane
after pulsing
(cell returns to

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

GFP exprese v rybím embryu zebříčka (Danio rerio)



GFP transfekce „in utero“ hlodavci - mozek



- 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...

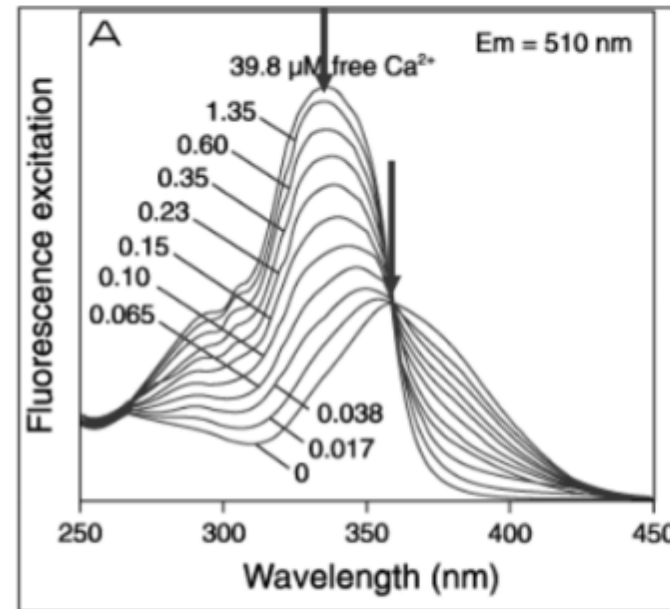
měření:

změna intenzity v závislosti na koncentraci nebo posun emisního spektra

Indikátory Ca^{2+}

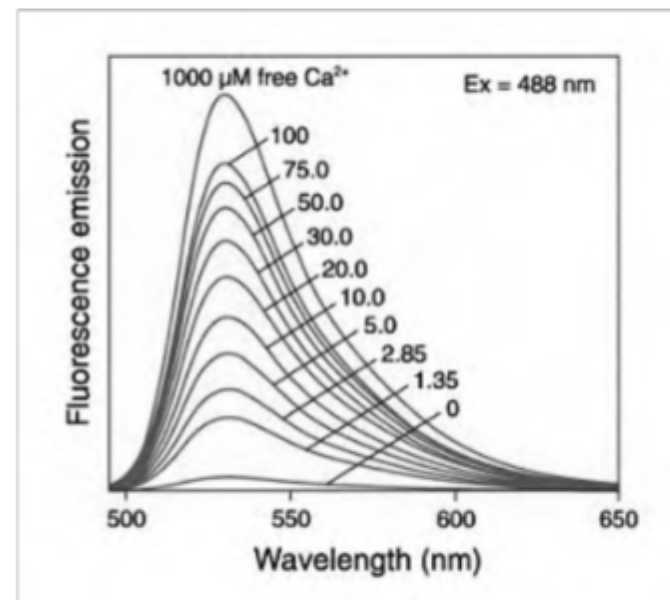
FURA-2

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



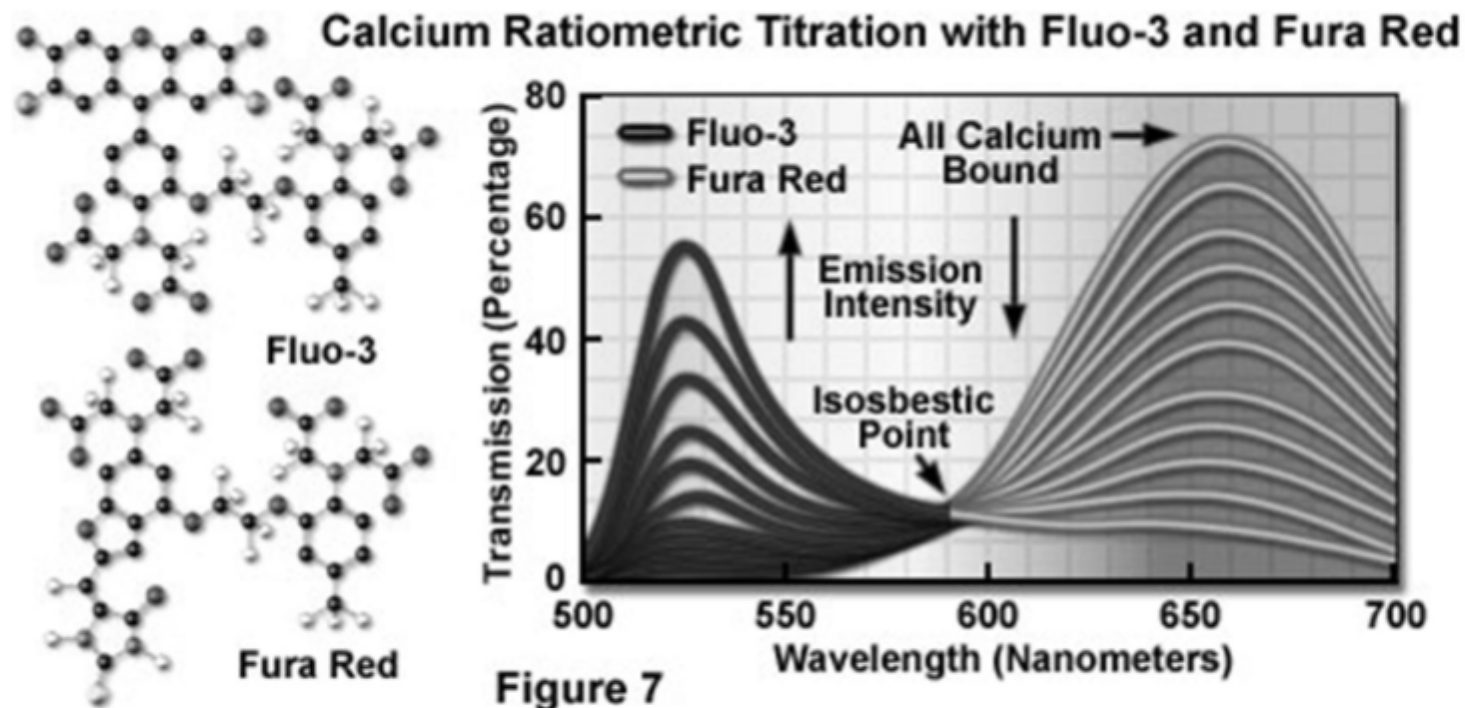
CalciumGreen-5N

měření intenzity fluorescence
při konstantní excitační
vlnové délce 488nm



kombinace indikátorů Ca^{2+}

- dva indikátory s neměící se vl. délkou emise
- jeden snižuje fluorescenci (Fura Red)
- druhý zvyšuje fluorescenci (Fluo-3) v závislosti na 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

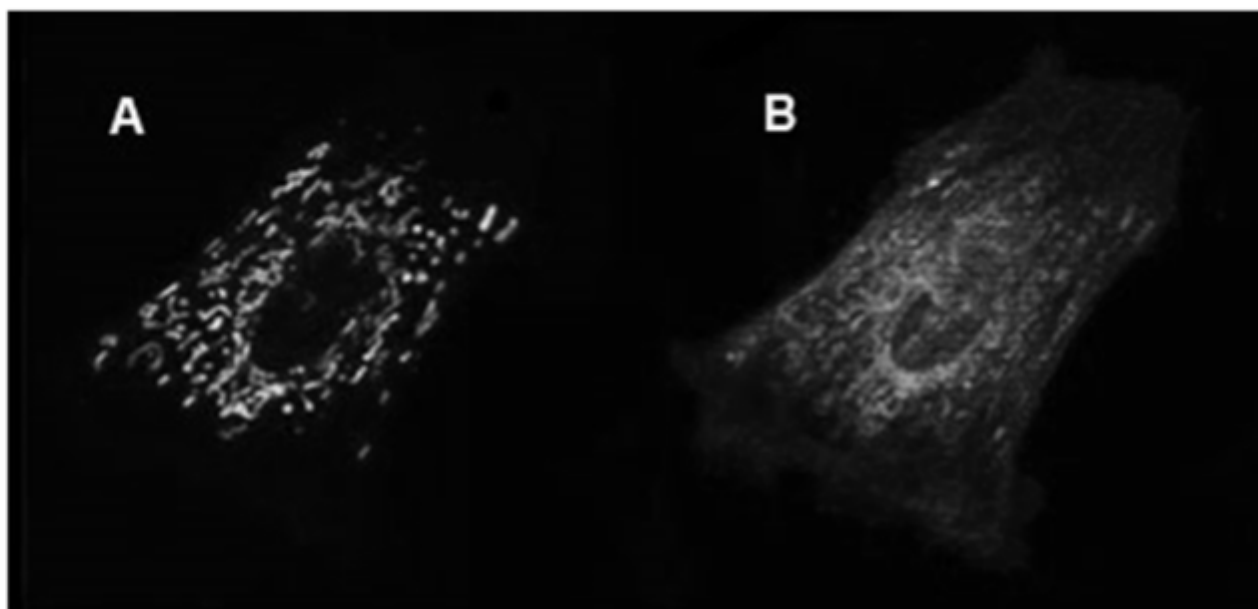
rozdělení: na stálé a nestálé

Mitochondrie

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

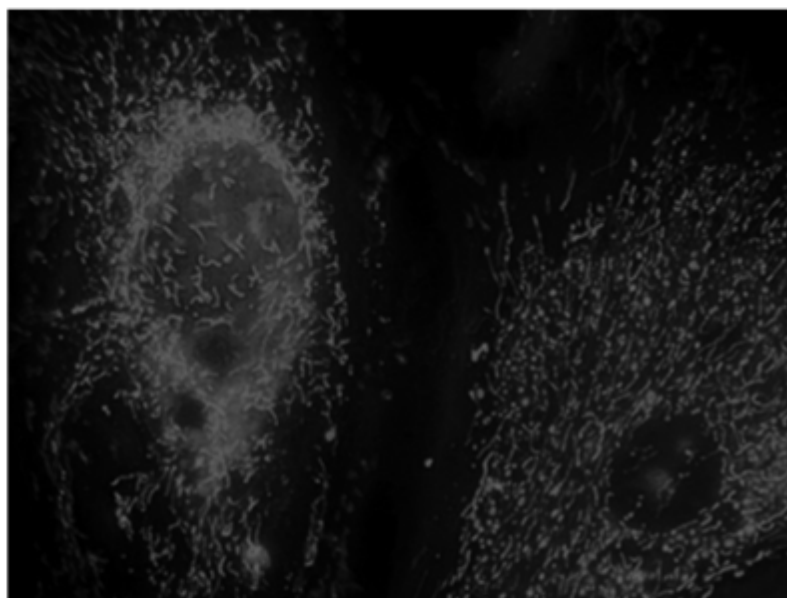
nyní MitoTracker, Mito Fluor (lze fixovat)

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

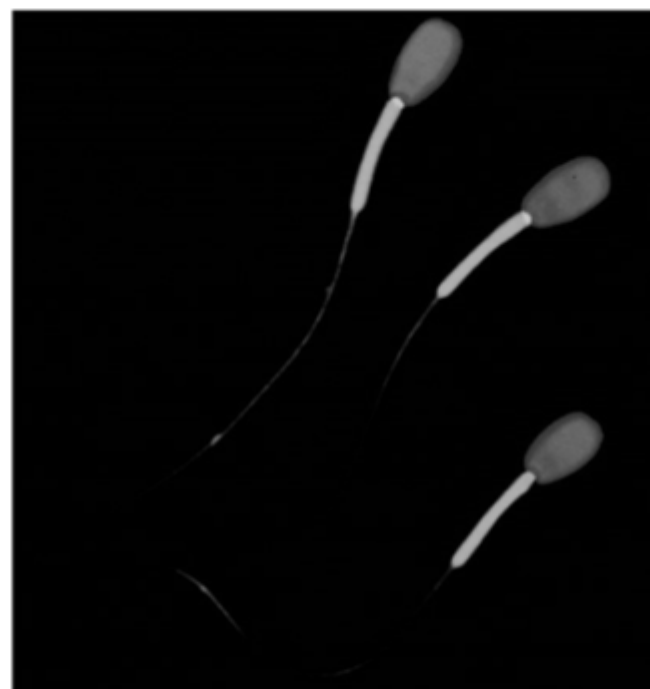


Neonatální kardiomyocyty : rhodamin123, (A) kontrola, (B) ovlivněno mitochondriálním uncouplerem

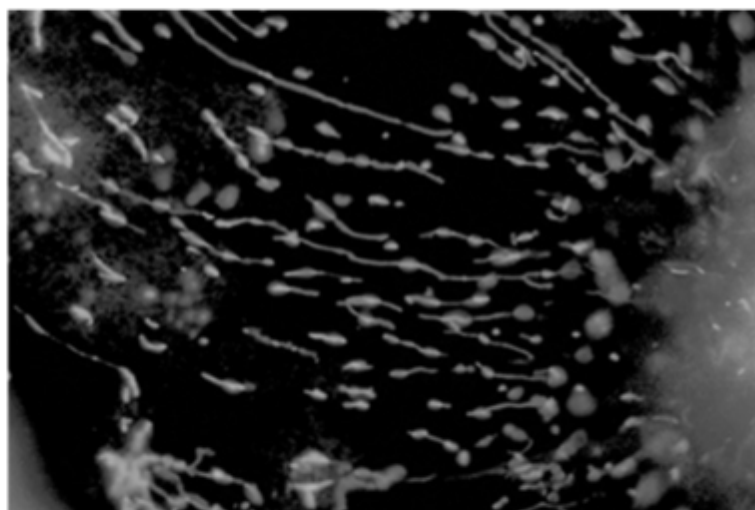




mitochondrie – bovinní endotel :
MitoTracker® Deep Red FM dye



mitochondrie/DNA - býčí spermie:
MitoTracker® Green FM
Hoechst 33342

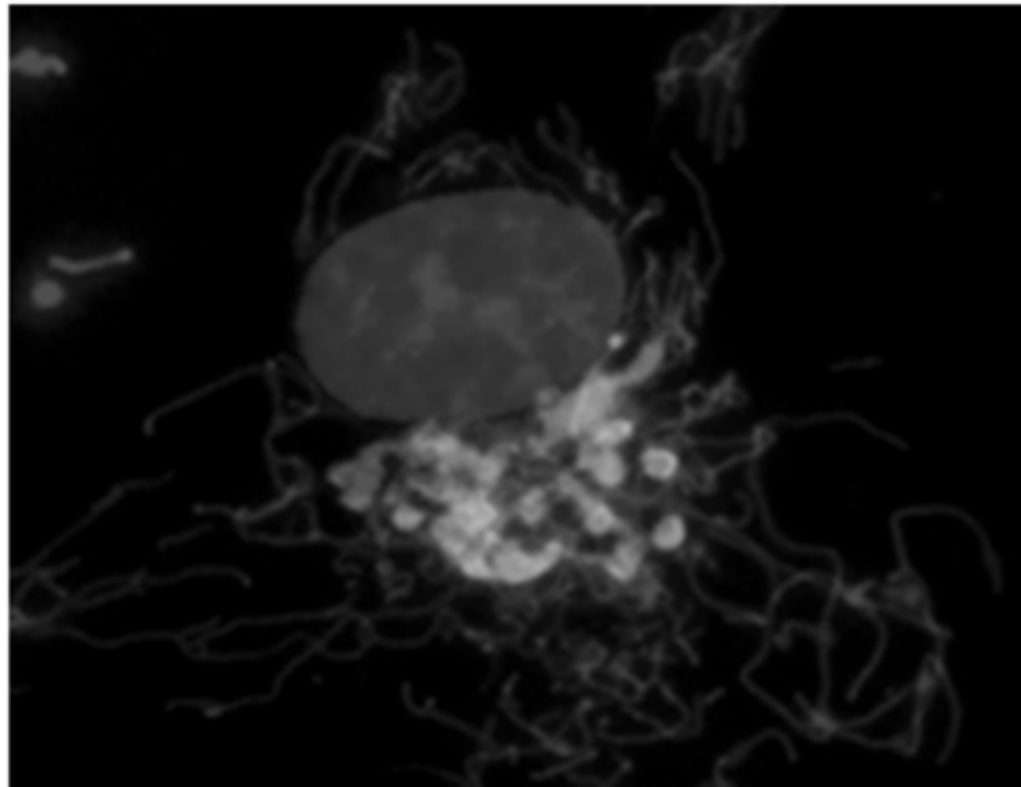


mitochondrie – fibroblasty norka :
JC-1 / JC-1
vysoký membránový potenciál – červená
nízký membránový potenciál - zelená



Golgiho aparát

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



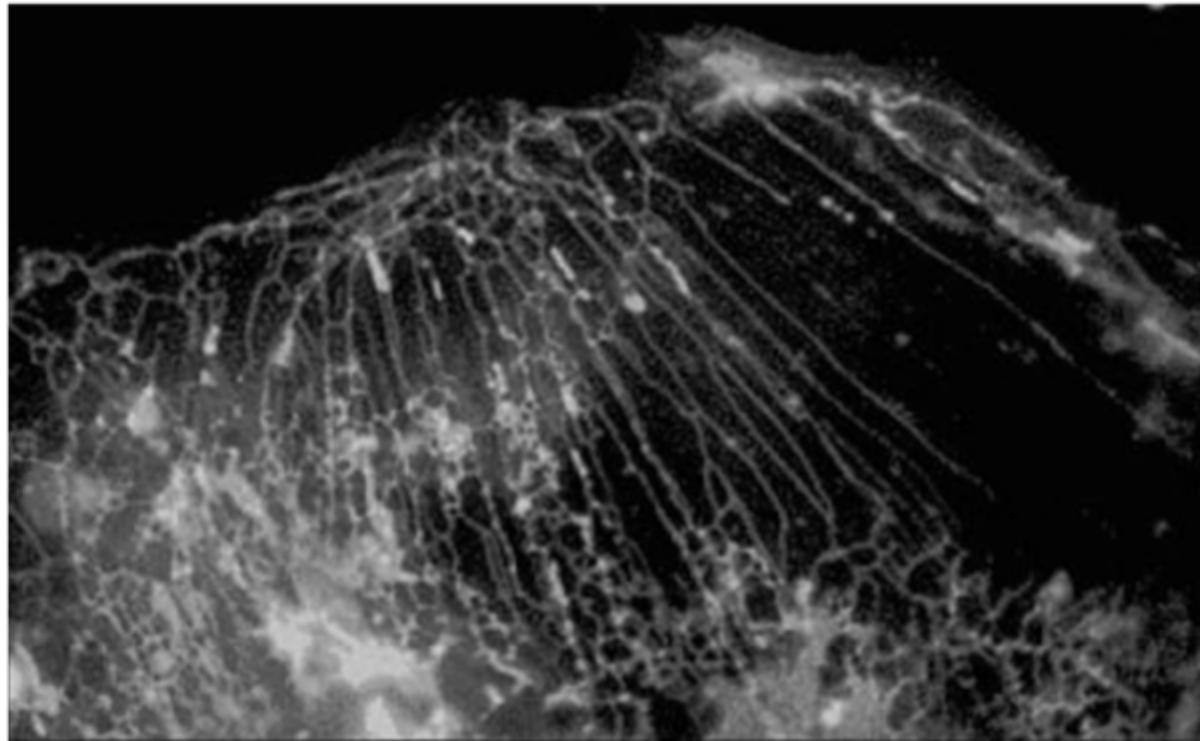
GA a mitochondrie / DNA – linie lidské hladké svaloviny:
CellLight Golgi-GFP, CellLight Mitochondria-RFP, DAPI



Endoplasmatické retikulum

prostupují přes membránu, selektivní pro ER, dříve DiOC₆, - není tak specifický,
vykazuje fotodynamickou toxicitu

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



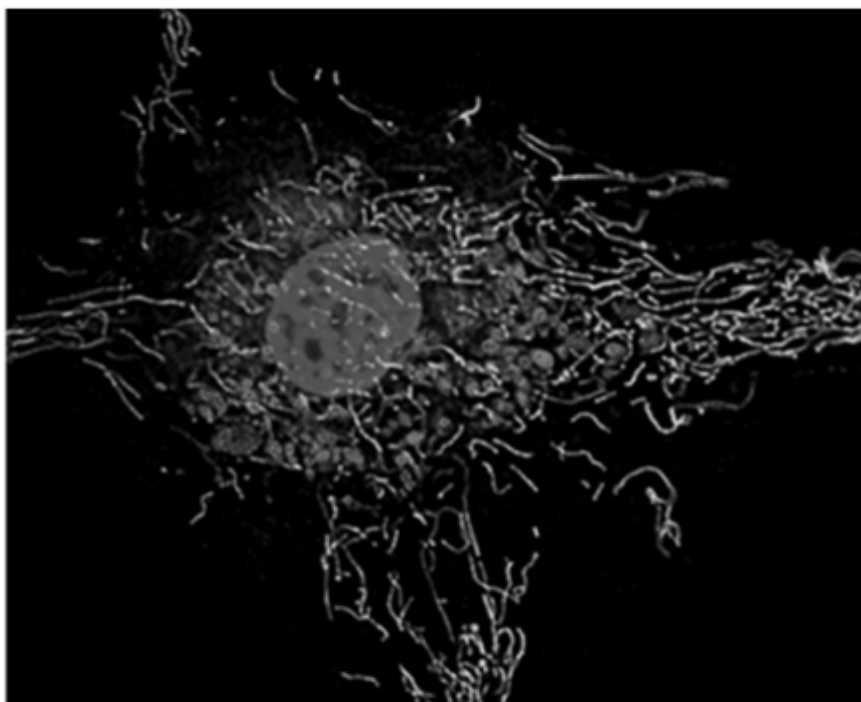
ER - bovinní endotel : ER-Tracker Blue-White DPX



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 / DNA – bovinní endotel :
LysoTracker® Red
dihydrorhodamine 123
Hoechst 33258



BacMam Reagents



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

konstrukt:

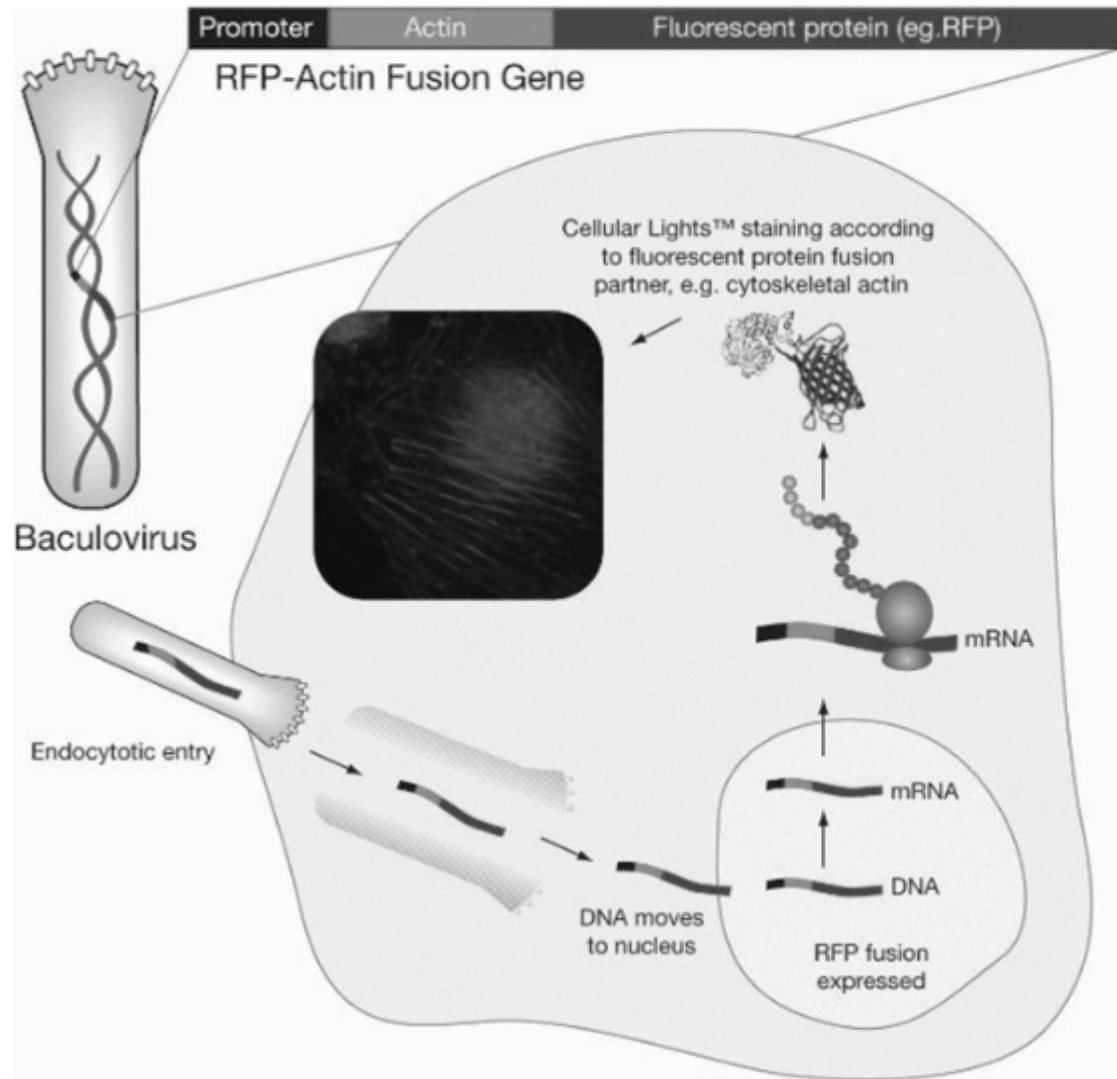
- 1) savčí promotor: zaručuje expresi v savčích buňkách
- 2) funkční část: protein nebo peptid cílený na strukturu (cytoskelet, orgány aj.) nebo funkci (buněčný cyklus, autofagie, tok Ca^{2+})
- 3) fluorescenční protein: CFP, GFP, RFP; na C- nebo N- konci peptidu

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



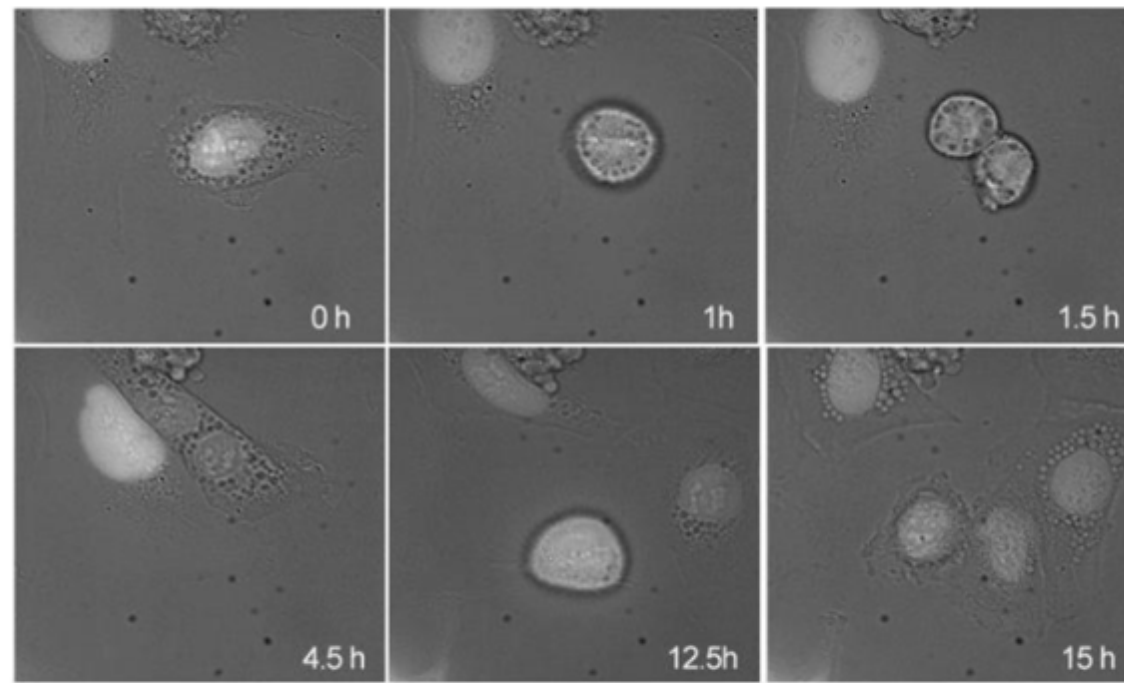
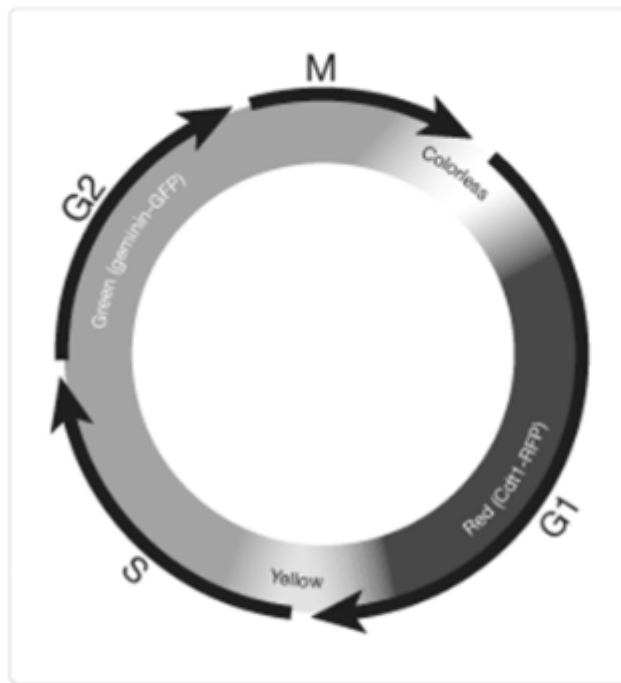
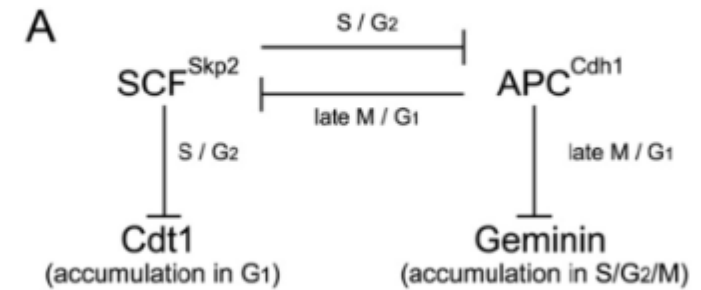
Princip metody

- 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.

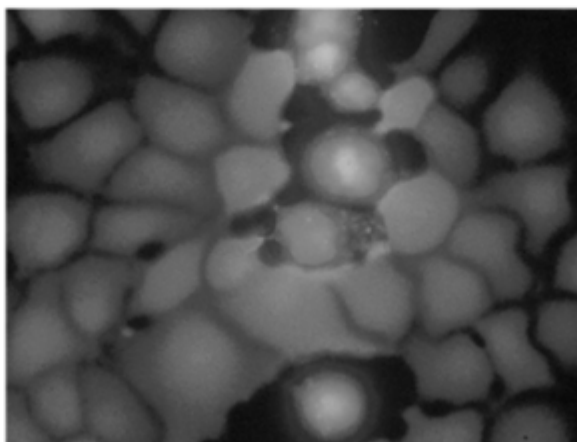


Testování viability/cytotoxicity

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

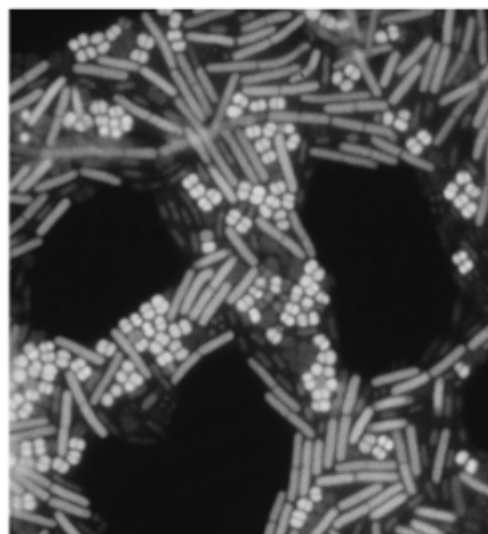
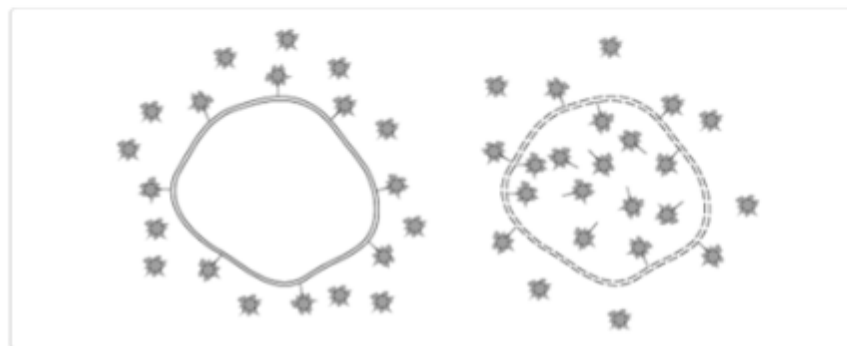


linie krysích buněk:

živé: **substrát esterázy calcein AM** → zelené

mrtvé: **ethidium homodimer-1** → červené

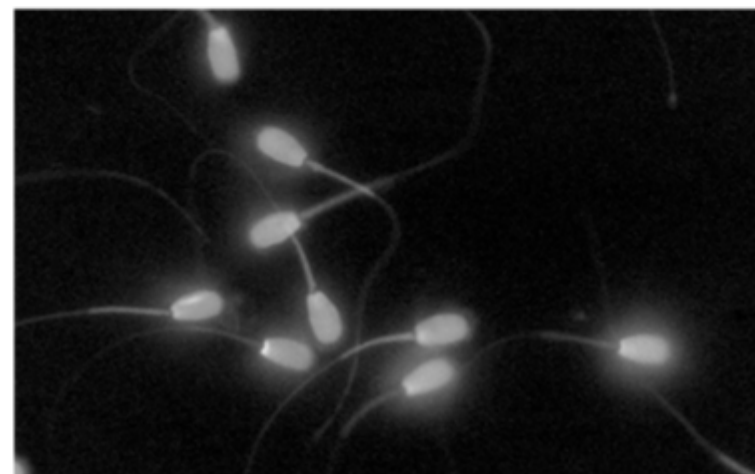
Princip obarvení mrtvých buněk
membránu neprostupující DNA sondou



Micrococcus luteus
a *Bacillus cereus*:

živé: zelené

mrtvé: červené



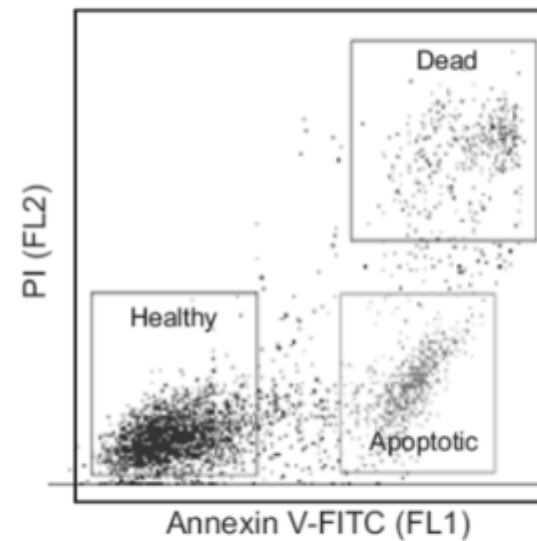
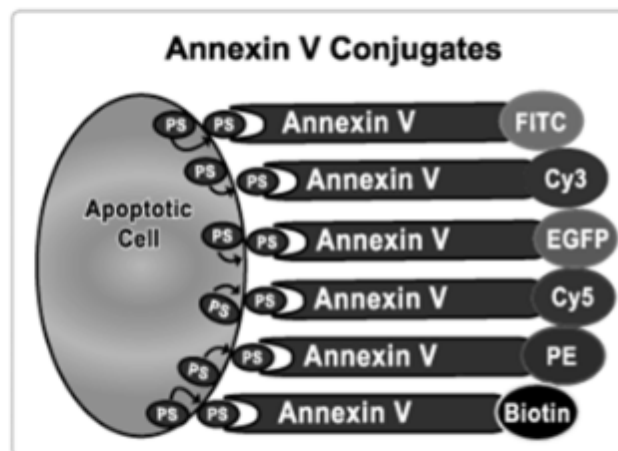
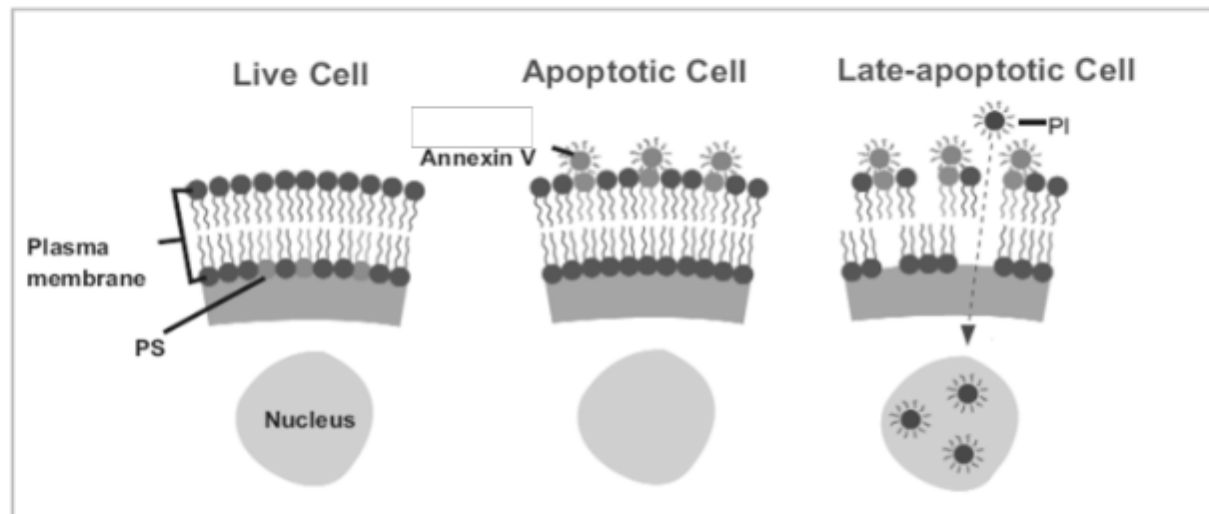
býčí spermie :

živé : **SYBR® 14** → zelené

mrtvé: **propidium iodide** → červené



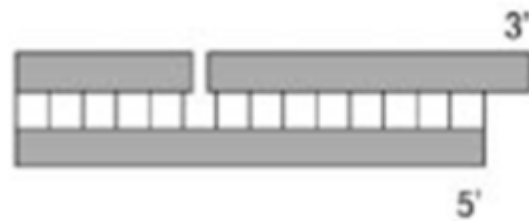
Annexin V + PI: detekce buněčné smrti



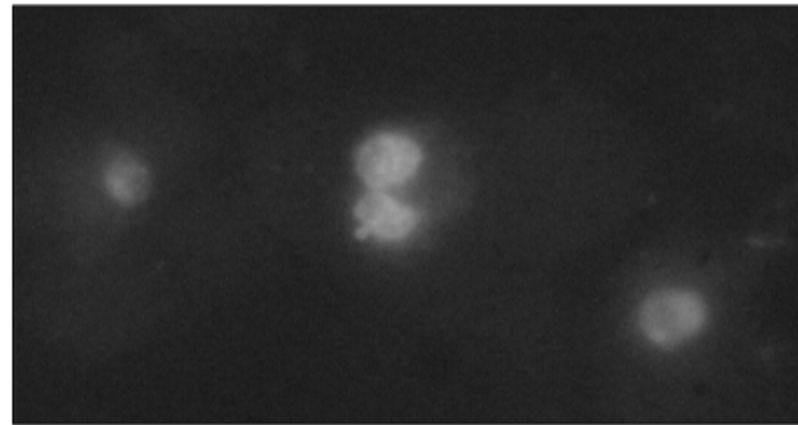
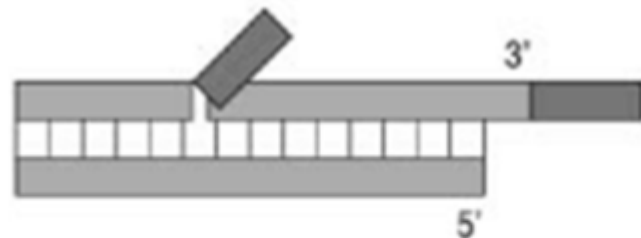
TUNEL: Detekce štěpení DNA v apoptóze

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

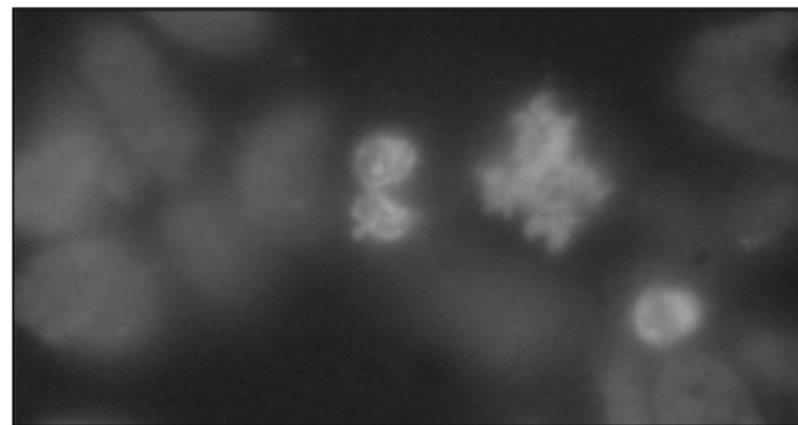
In situ end labeling (TUNEL)
(template independent)



+ Terminal transferase
+ X-dNTP (■)



TUNEL



DAPI



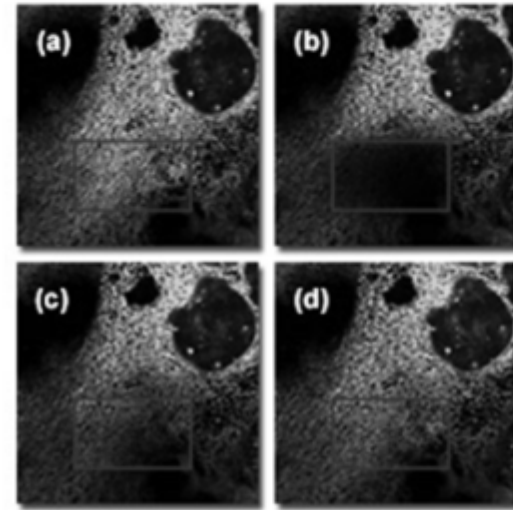
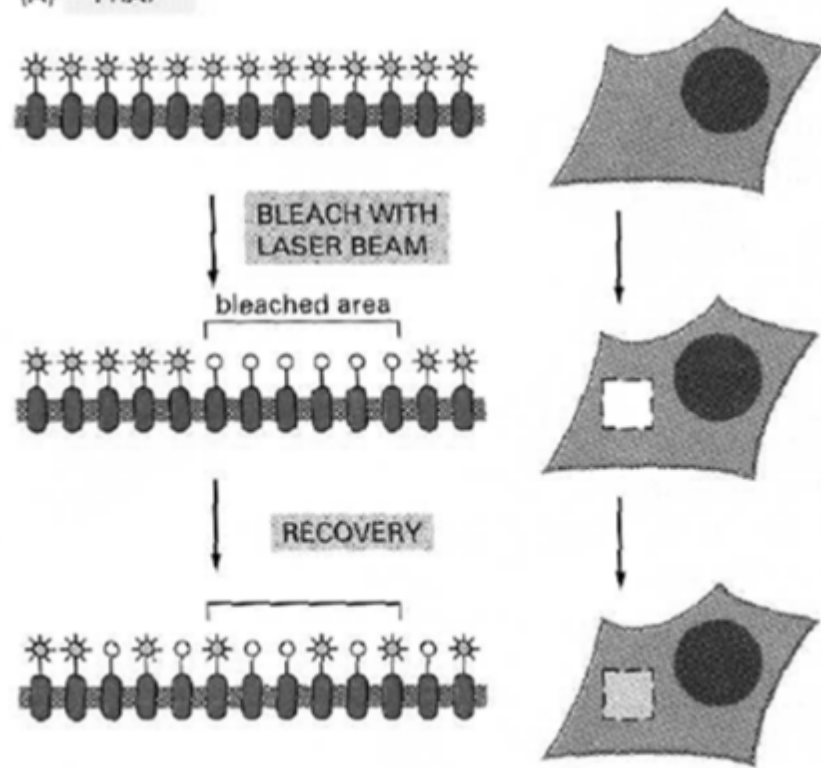
FRAP – Fluorescence Recovery after Photobleaching

- 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

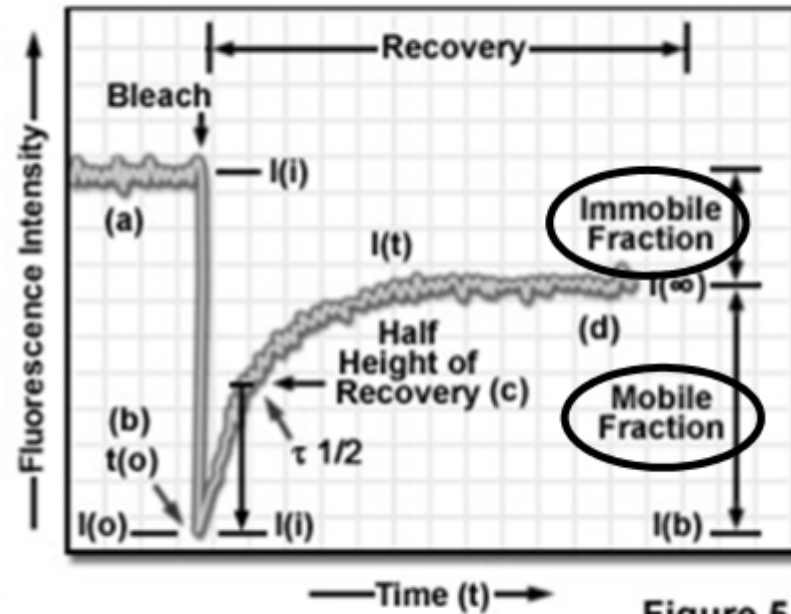
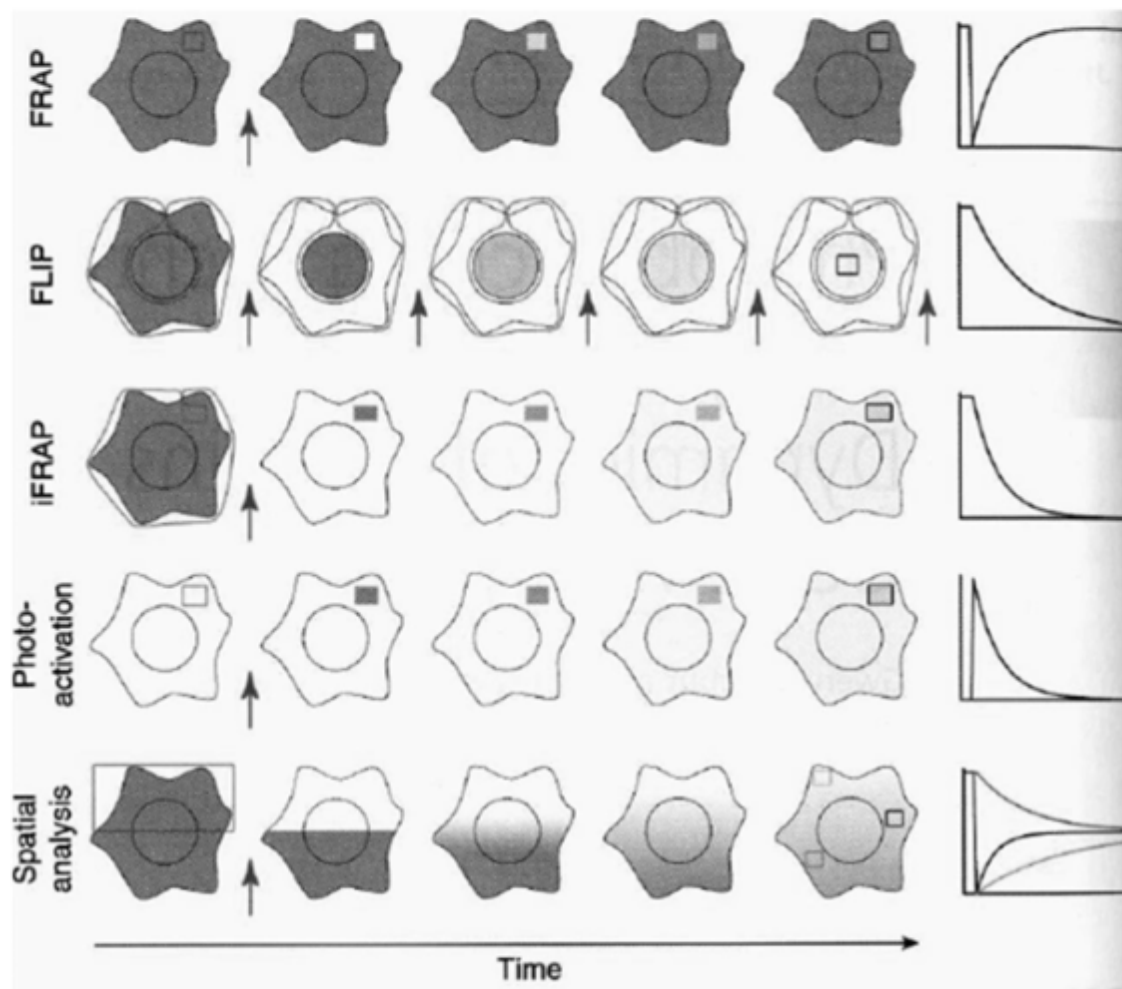


Figure 5



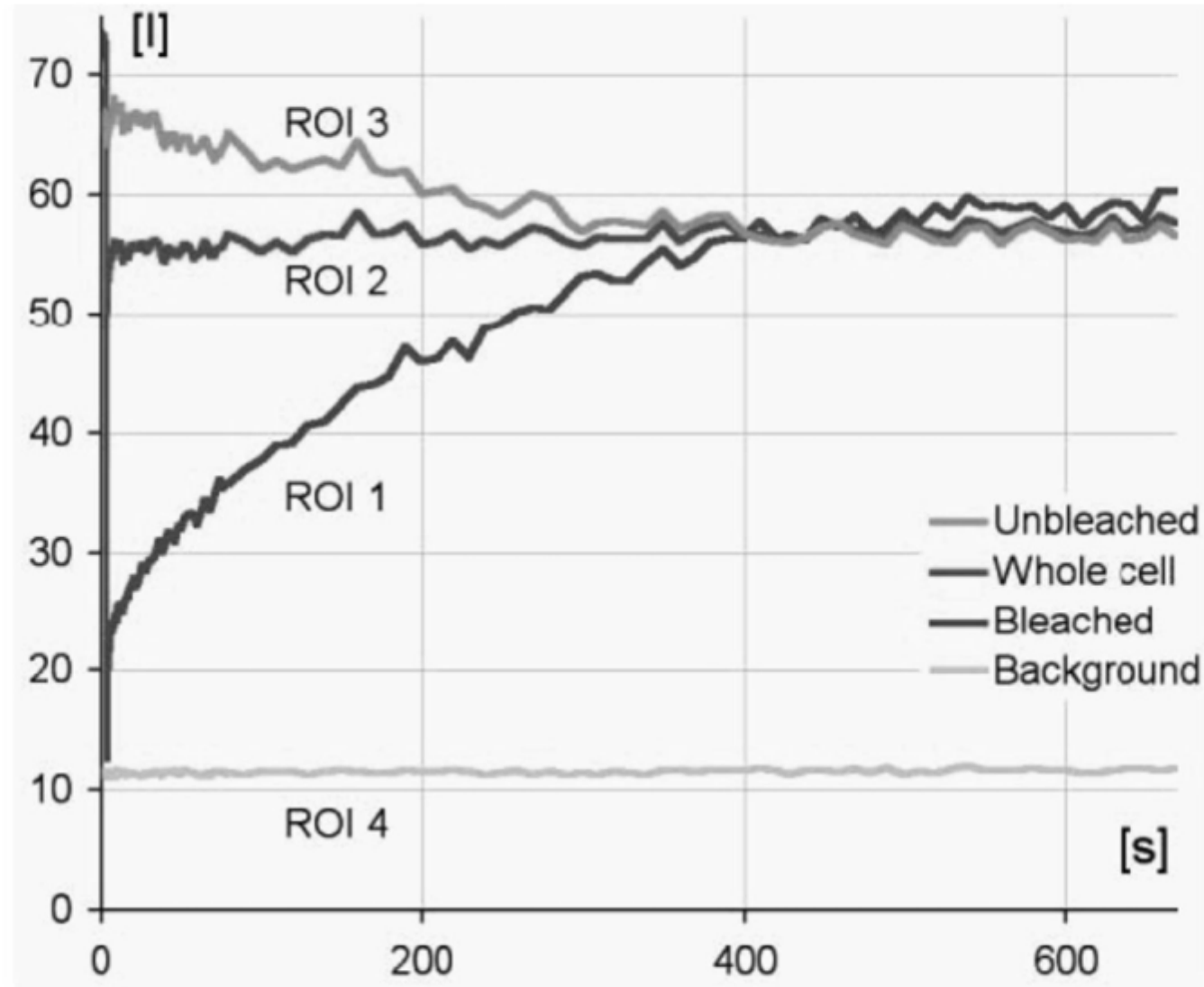
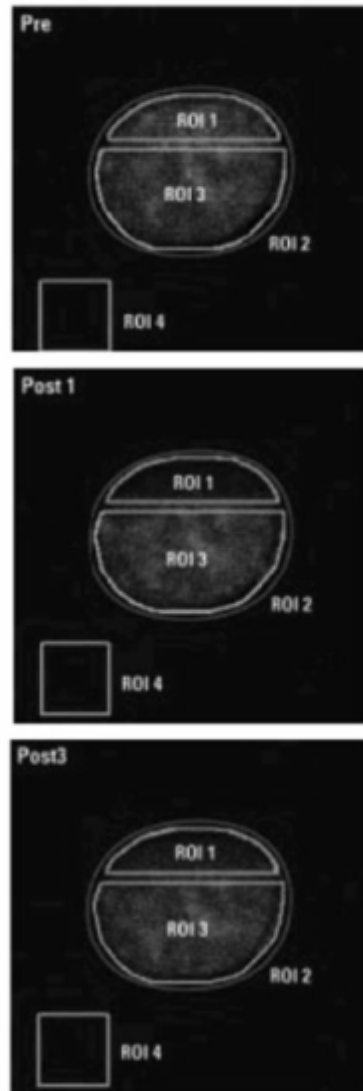


FRAP- malý region 1x odbarvení
obnovení signálu, informace o
mobilitě molekul

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

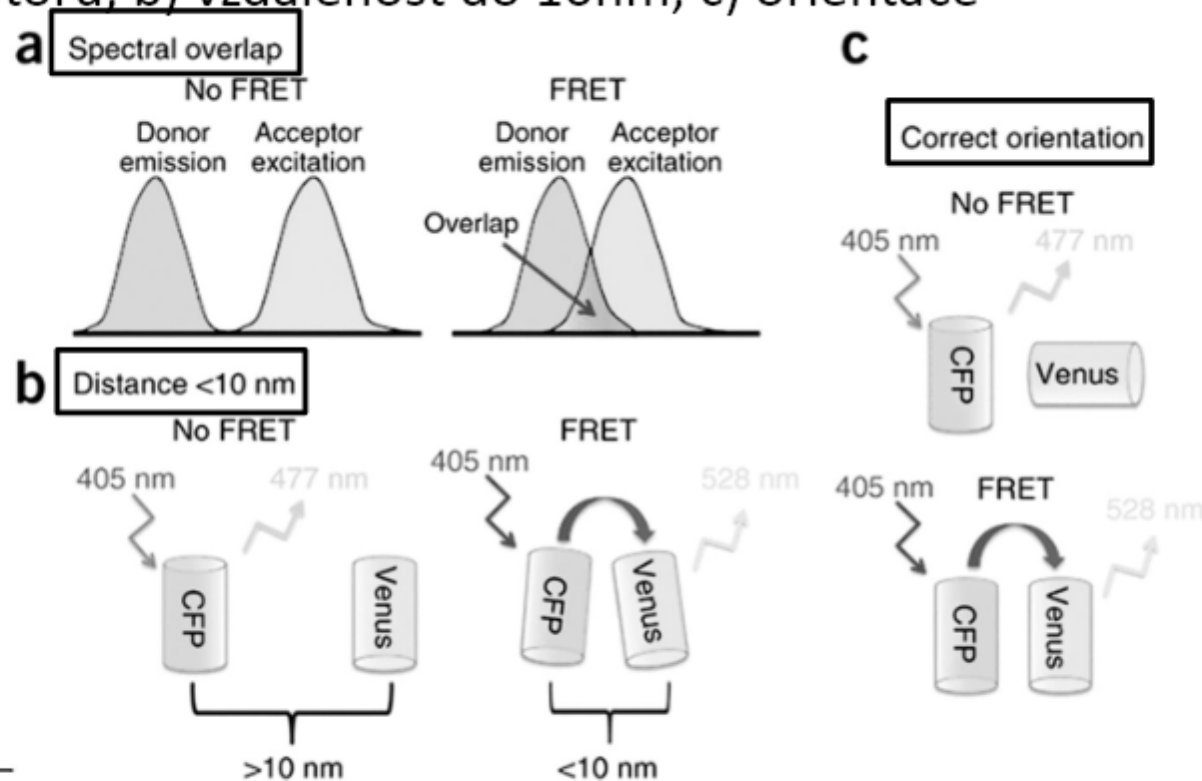
iFRAP (inverzní) – celý preparát
kromě 1 regionu odbarven –
postupné vymizení fluorescence

fotoaktivace – analýza rychlých
difúzních procesů

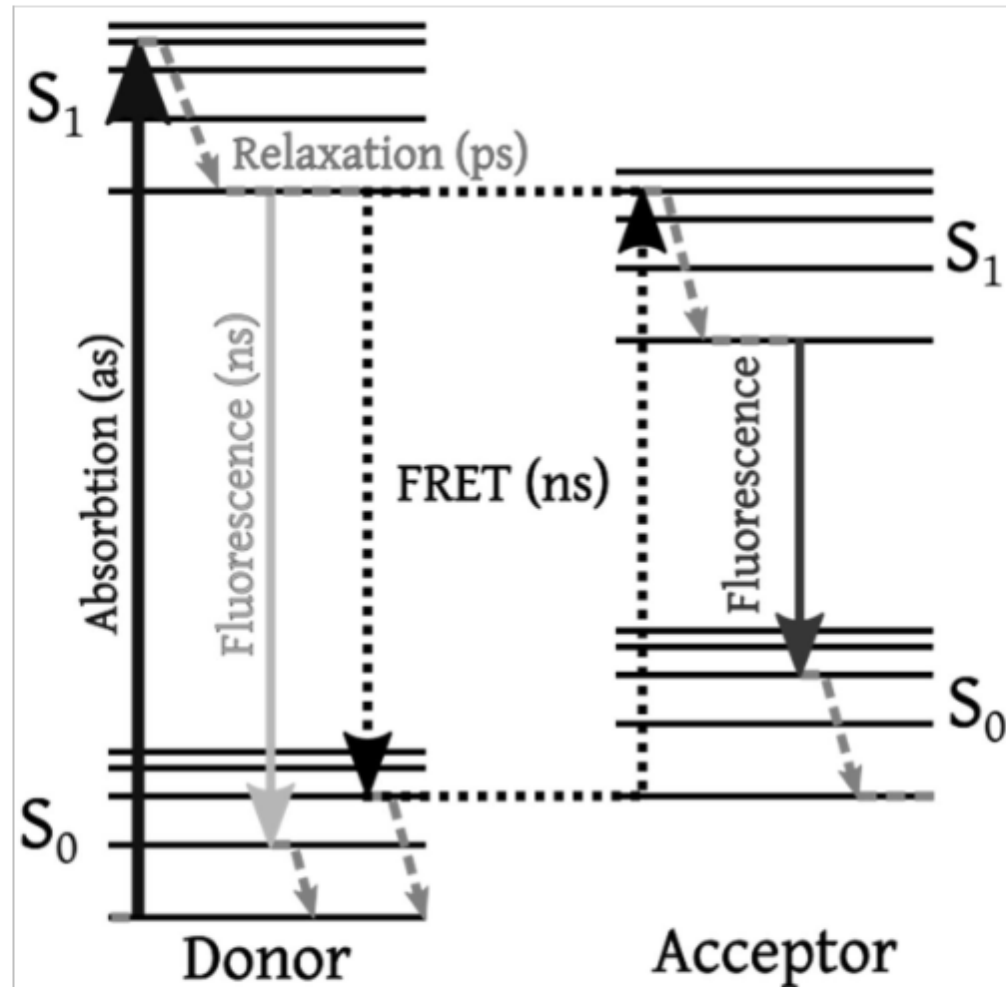


FRET: Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer

- studium interakce 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

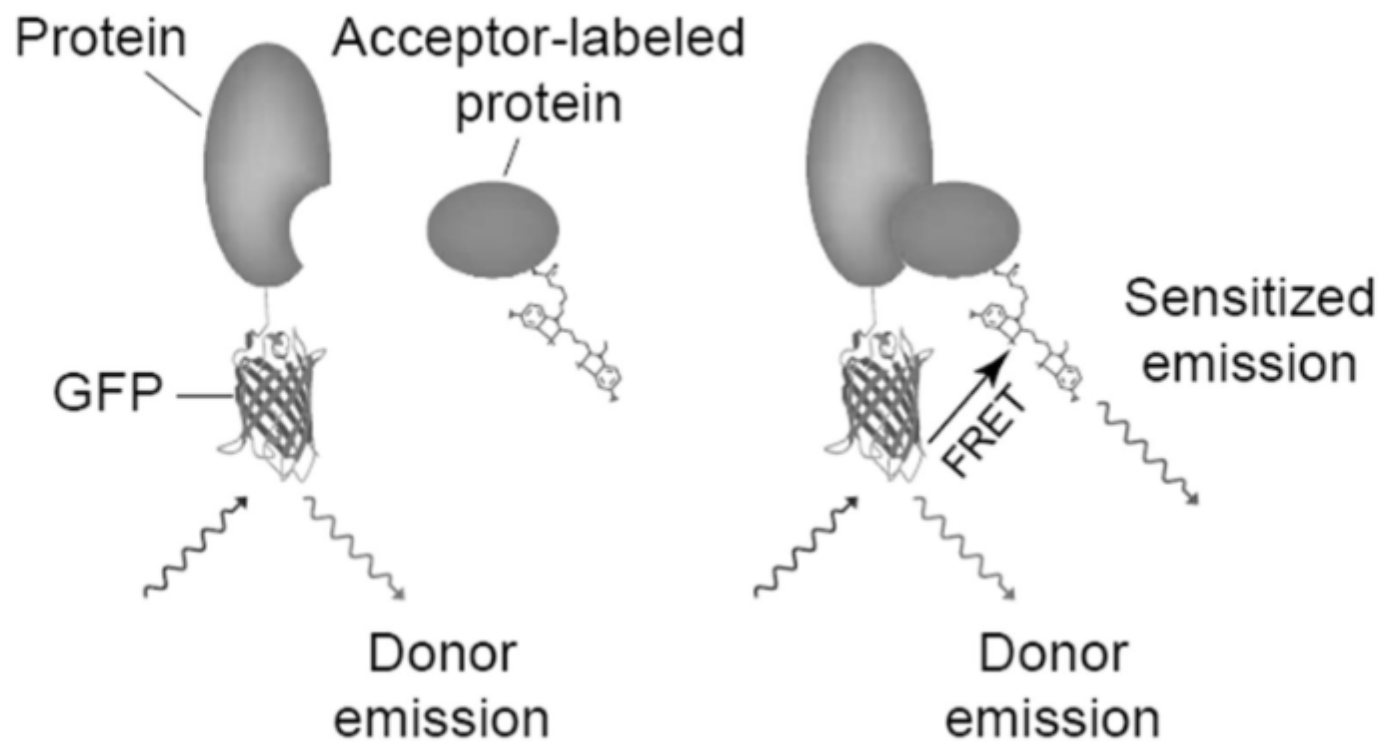
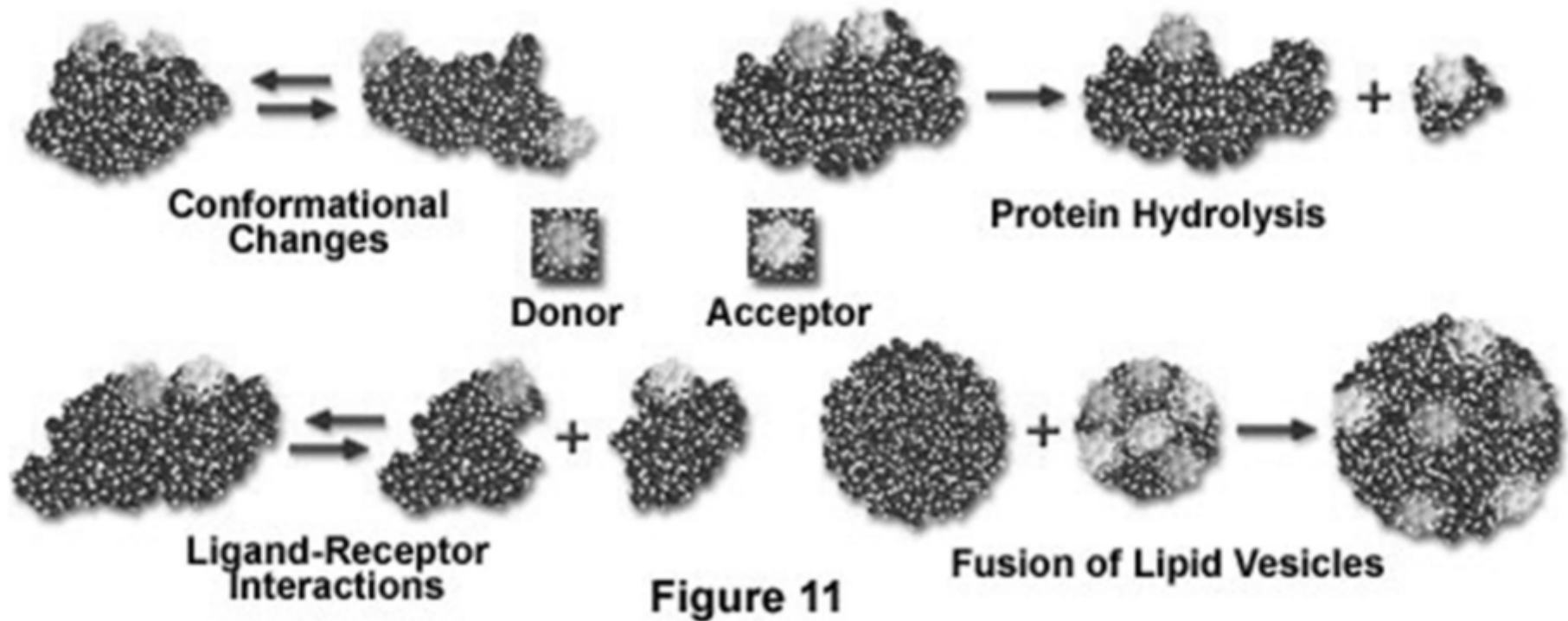


Fig. 1.

TRENDS in Cell Biology

Další aplikace FRET

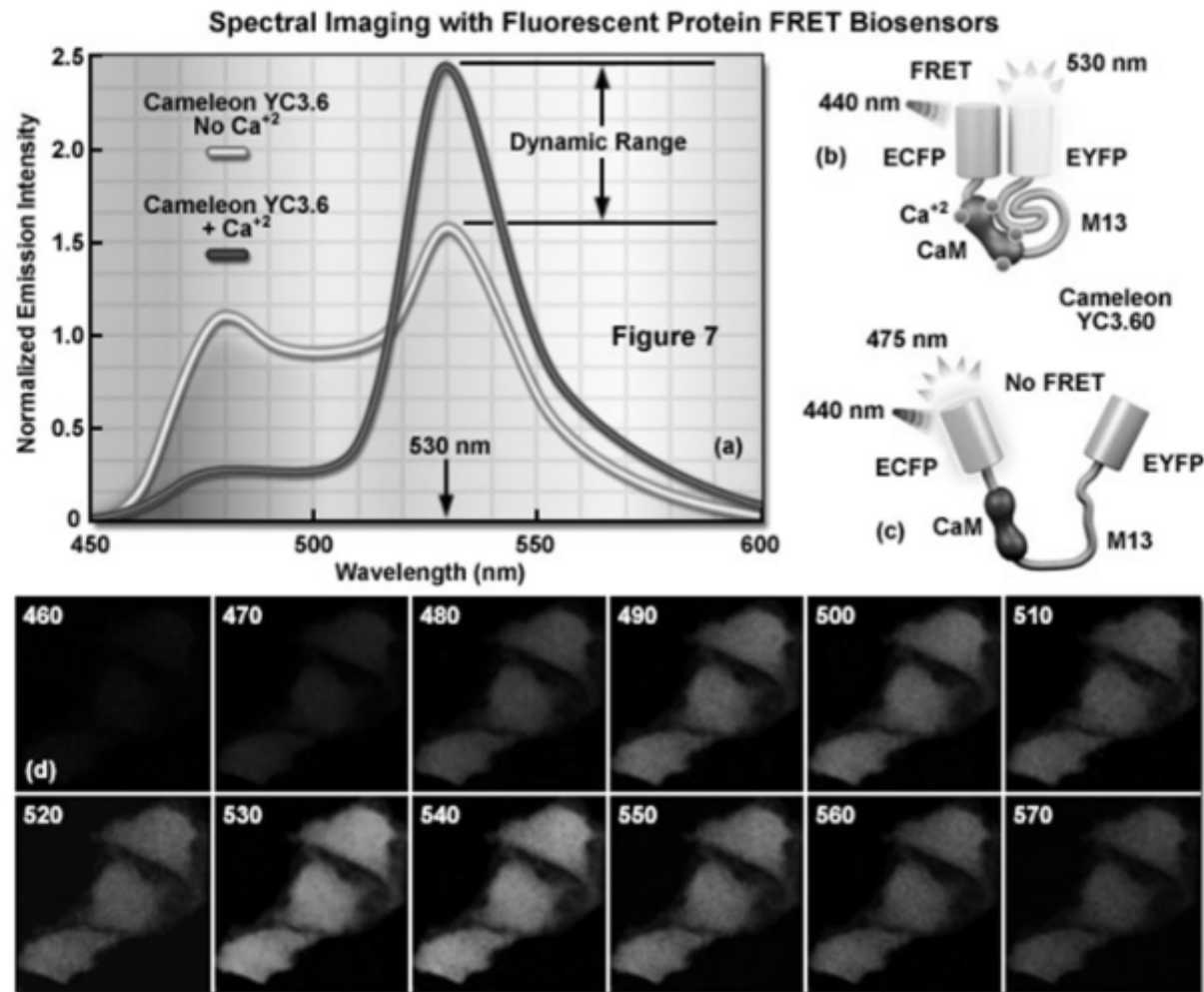
Biomolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Applications



aplikace FRET

biosenzory- měření koncentrace vápníku

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



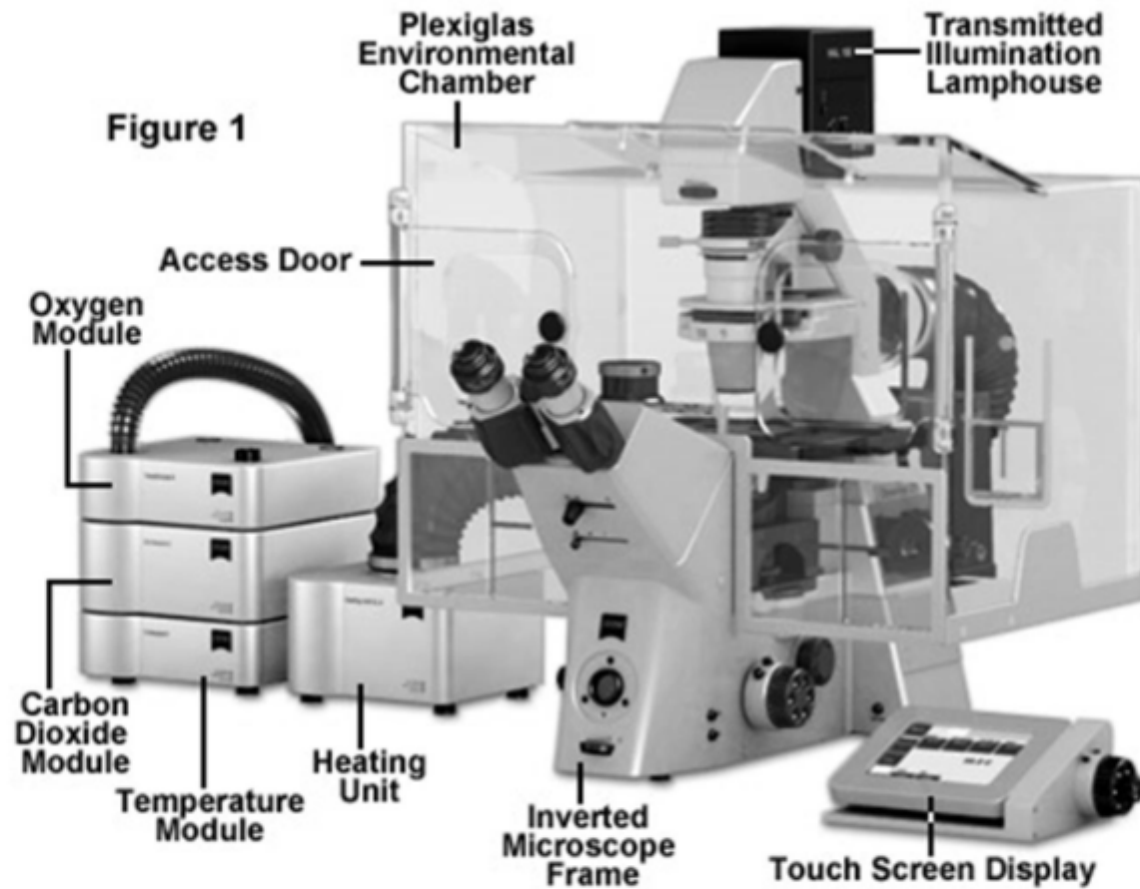
Podmínky pro mikroskopii živých buněk

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

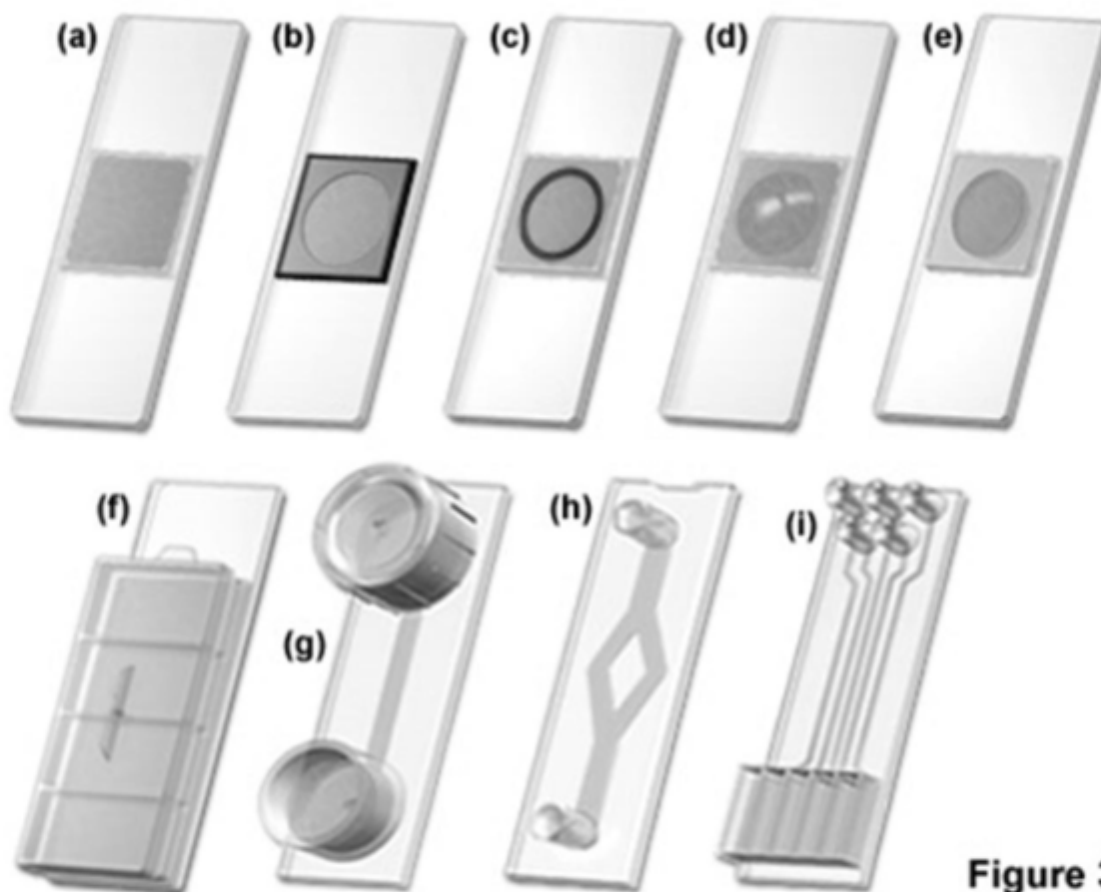
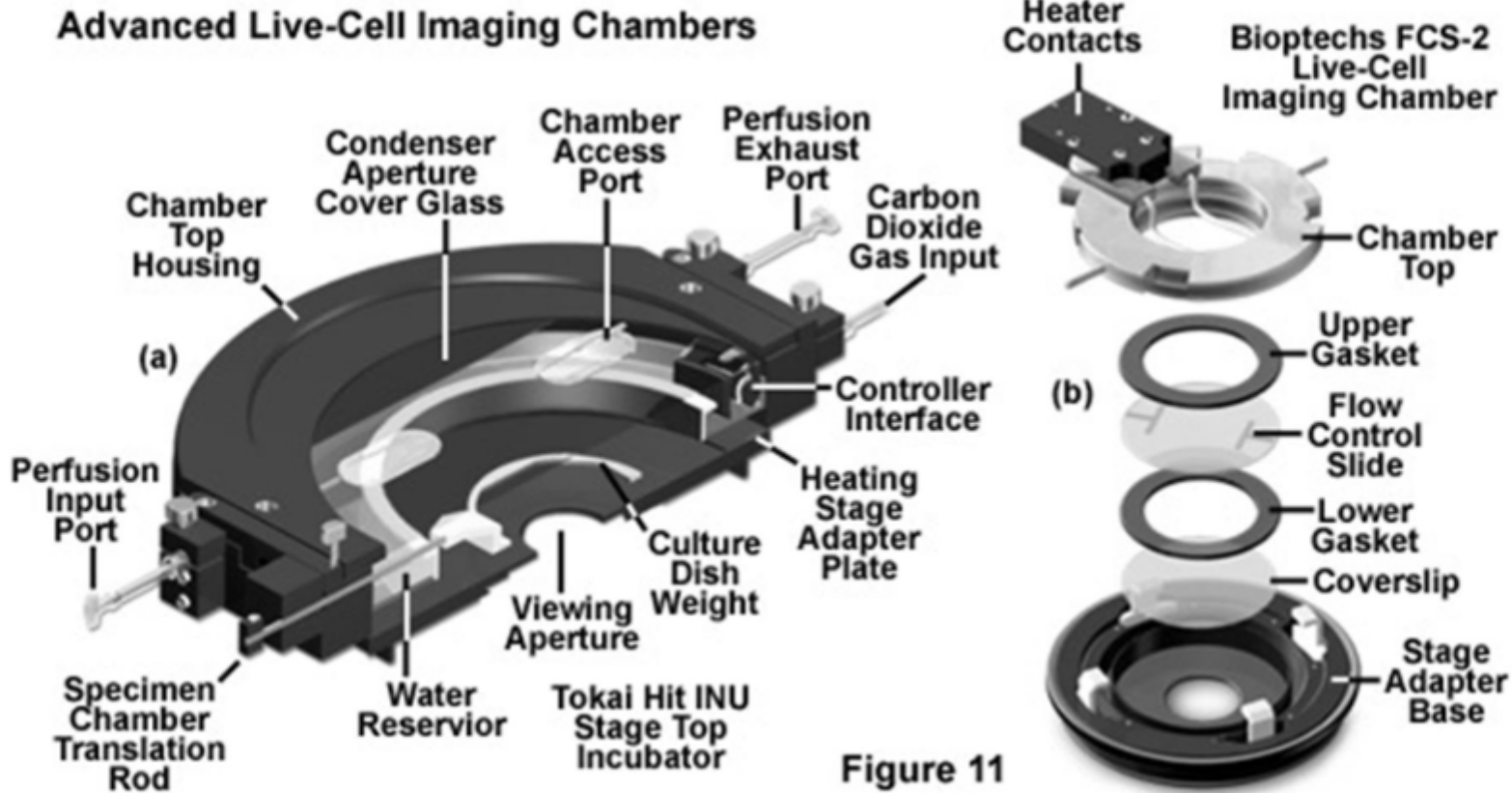


Figure 3



Inkubační (perfúzní) komůrka



Live imaging

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

