

Bi8920 Pokročilé mikroskopické metody

Fluorescenční zobrazení živých buněk

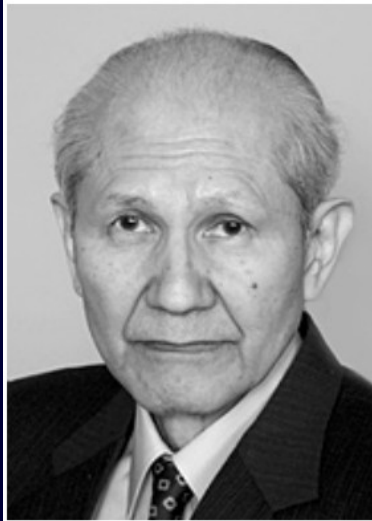
doc. RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PŘF MU



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".*

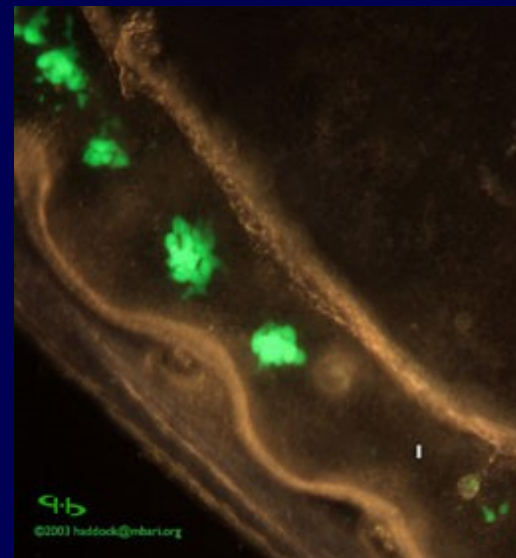
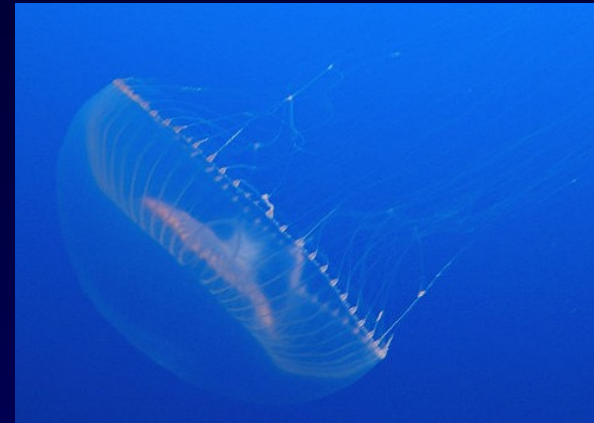
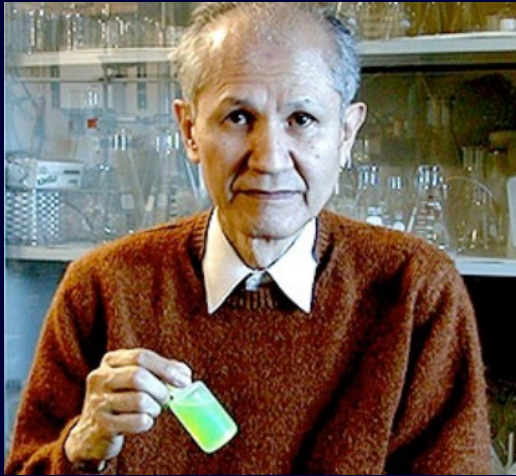




https://youtu.be/90wvpvSp4I_0

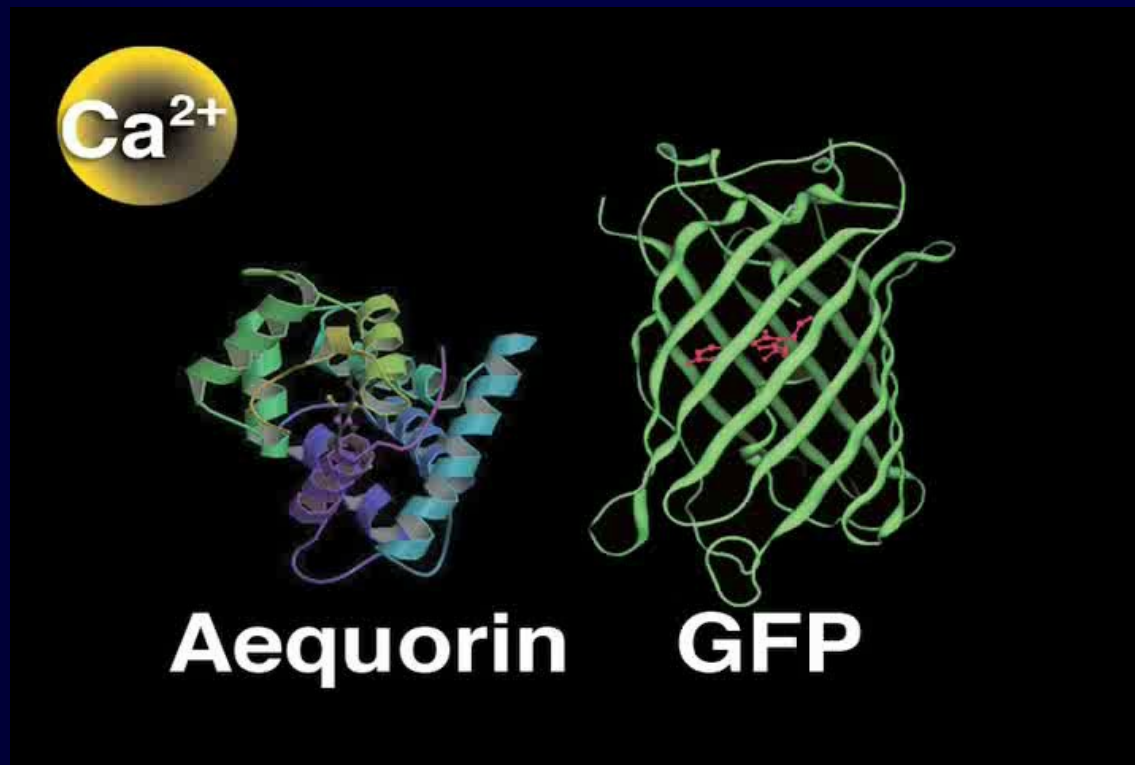
O. Shimomura

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

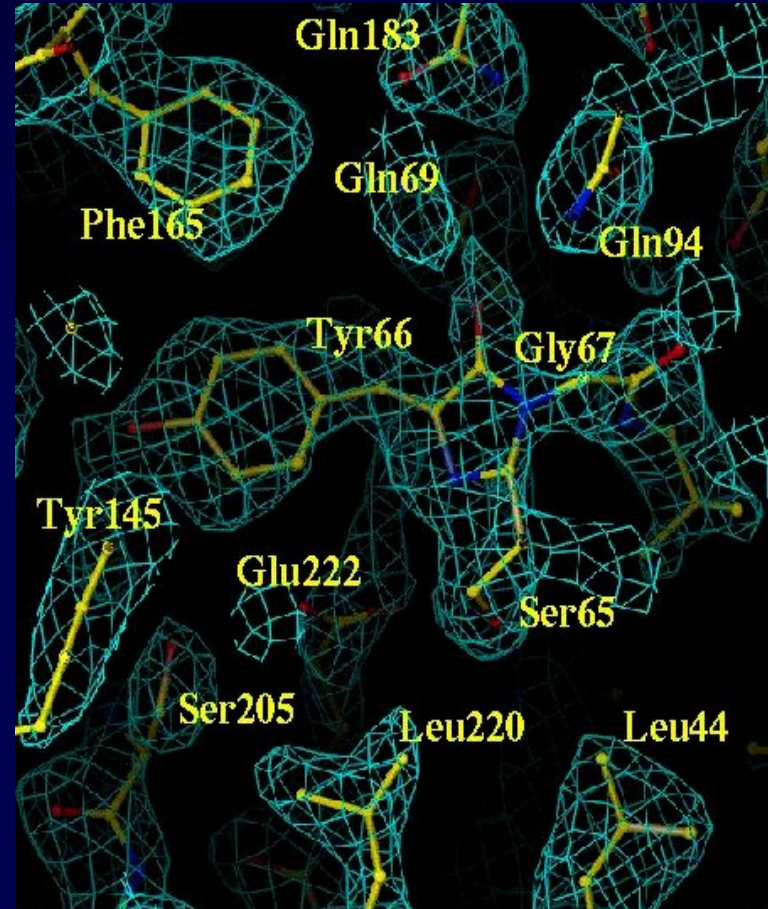
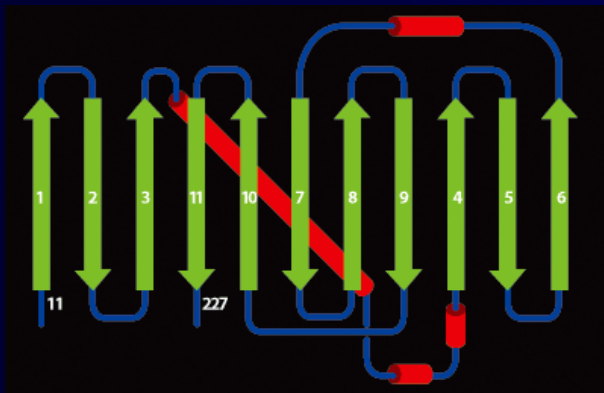
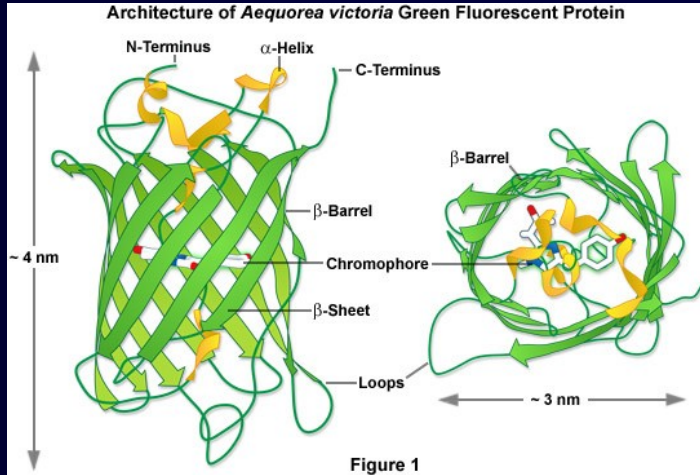


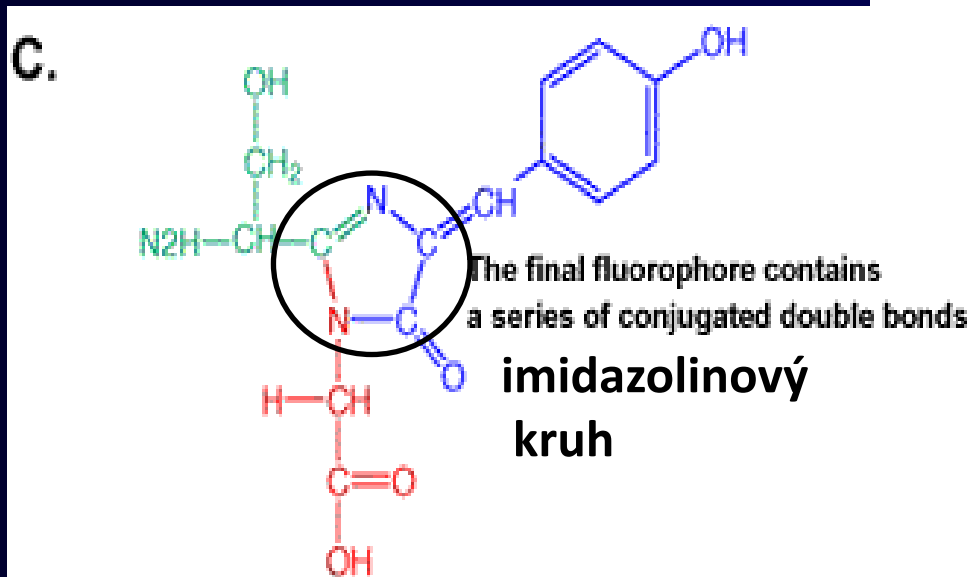
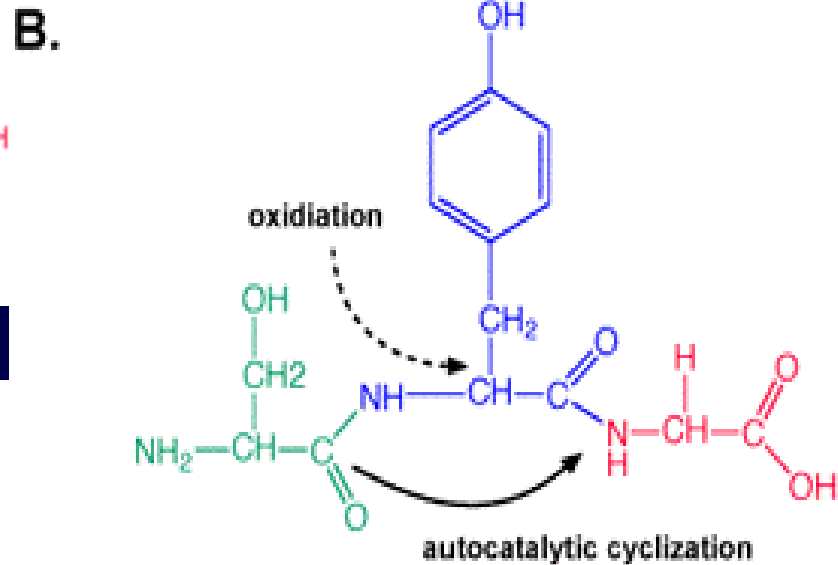
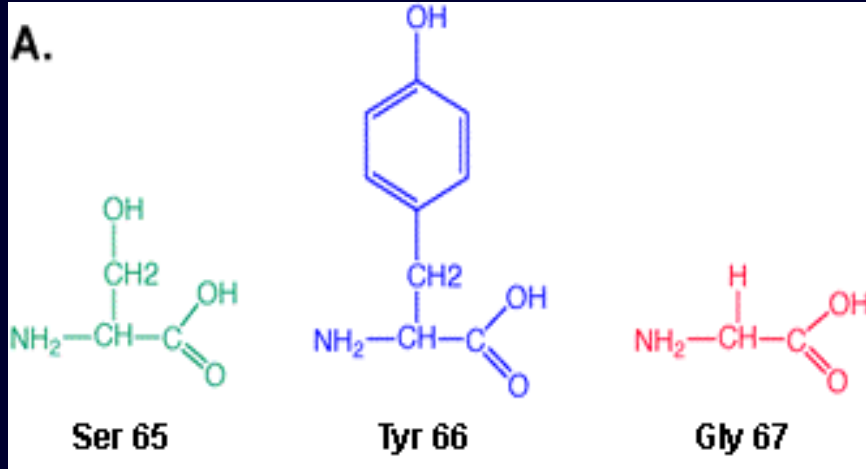
Princip luminiscence *Aequorea victoria*

- za přítomnosti Ca^{2+} , bioluminiscence aequorinu (*apoaequorin* = enzym + *luciferin* = kofaktor) -> modré světlo
-> excitace GFP -> zelené světlo
- přenos energie na principu rezonančního transferu (FRET)

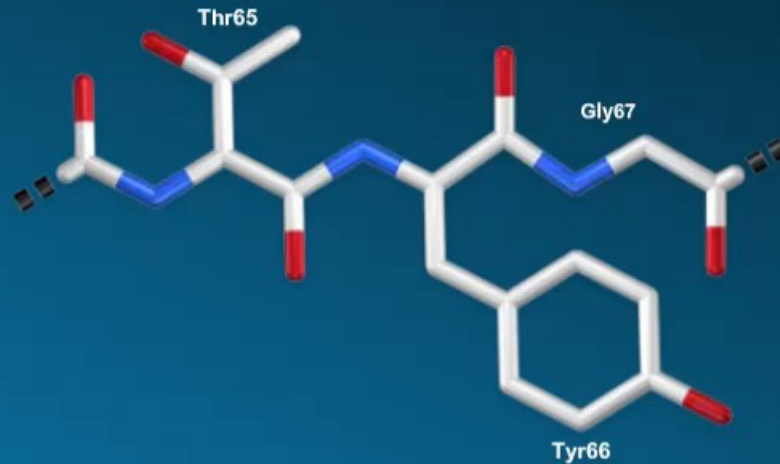


struktura GFP: β -barel (11 antiparalelních řetězců) , uvnitř α -helix s chromoforem, 238 AMK, 27kDa,
aktivní místo: Ser65-Tyr66-Gly67 přestavba a vznik fluoroforu





Formation of the EGFP Chromophore



Extended Polypeptide

Chromophore Maturation Control

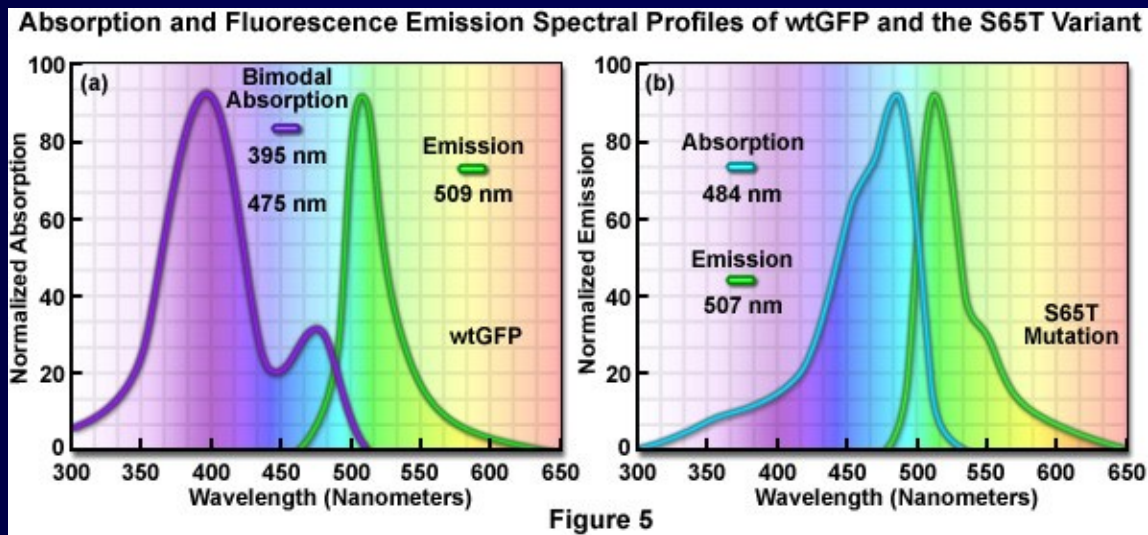
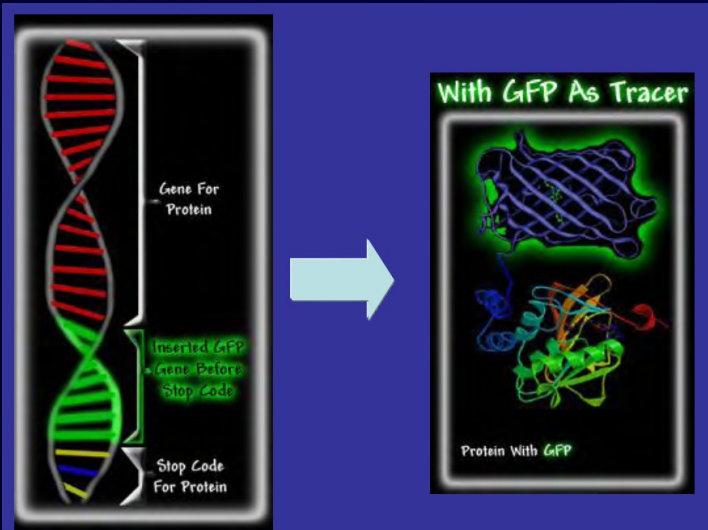


<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/fluorescentproteins/egfpchroma/indexflash.htm>

Excitace: 390-470 nm – wtGFP dva píky
redukována forma – ex. 390 nm
oxidovaná forma – ex. 470 nm

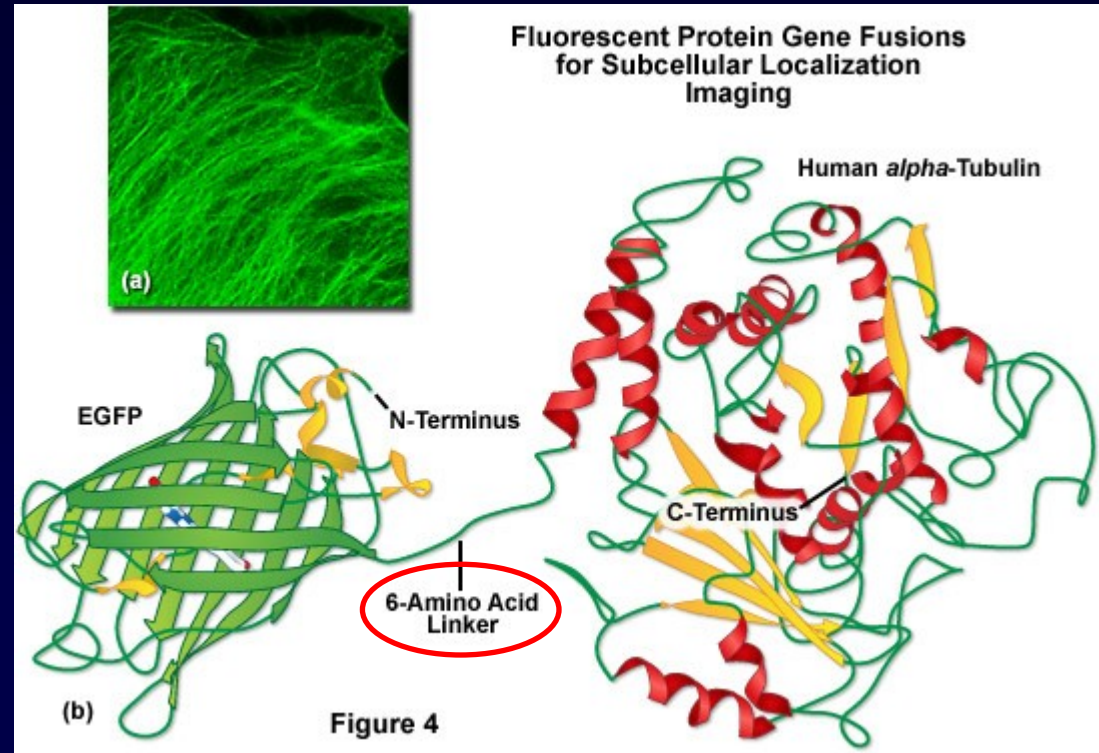
Emise: cca 509 nm

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

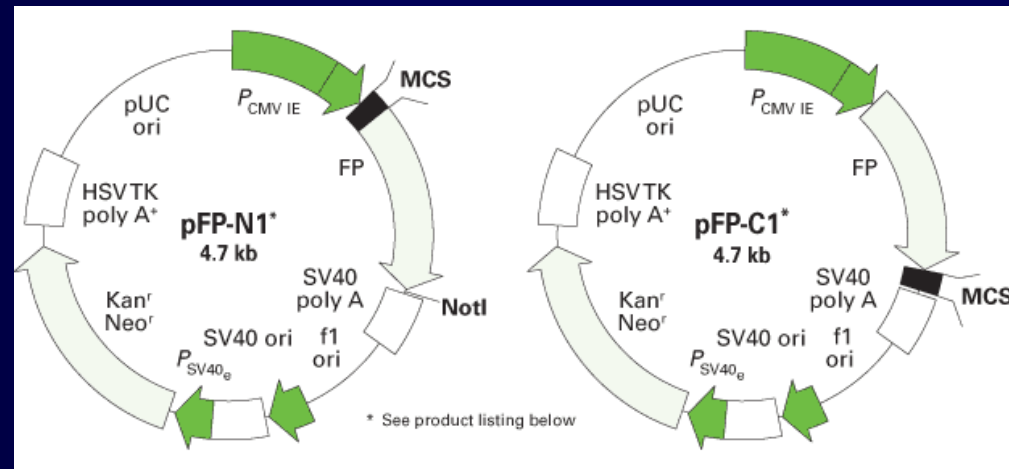


Exprese :

- 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 / buňkách – 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 (lysozomy)
- 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

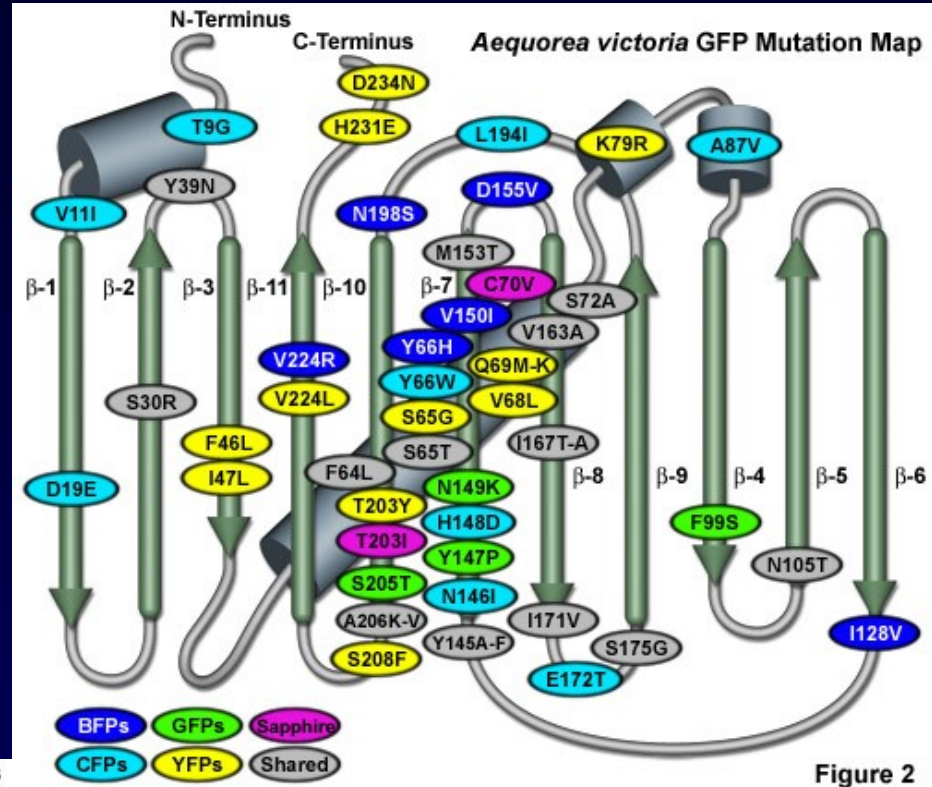


Figure 2

Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants

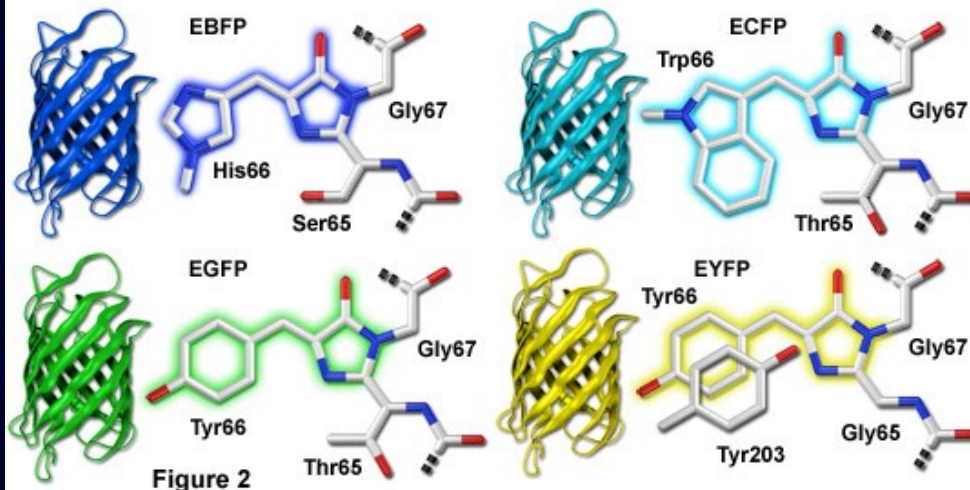


Figure 2

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



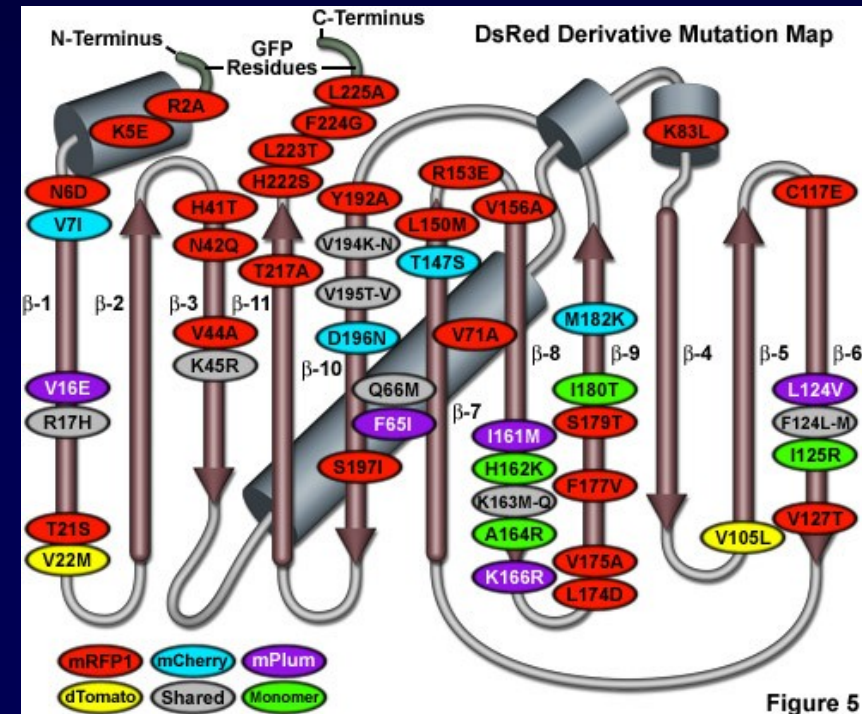
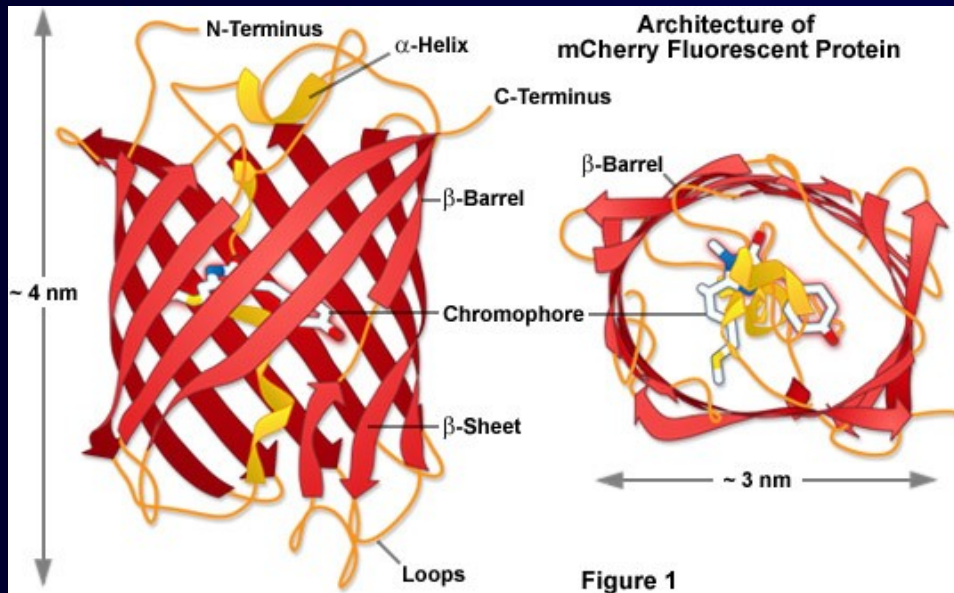
Ds Red fluorescenční protein a jeho deriváty

wt Ds Red: podobná struktura proteinu jako GFP

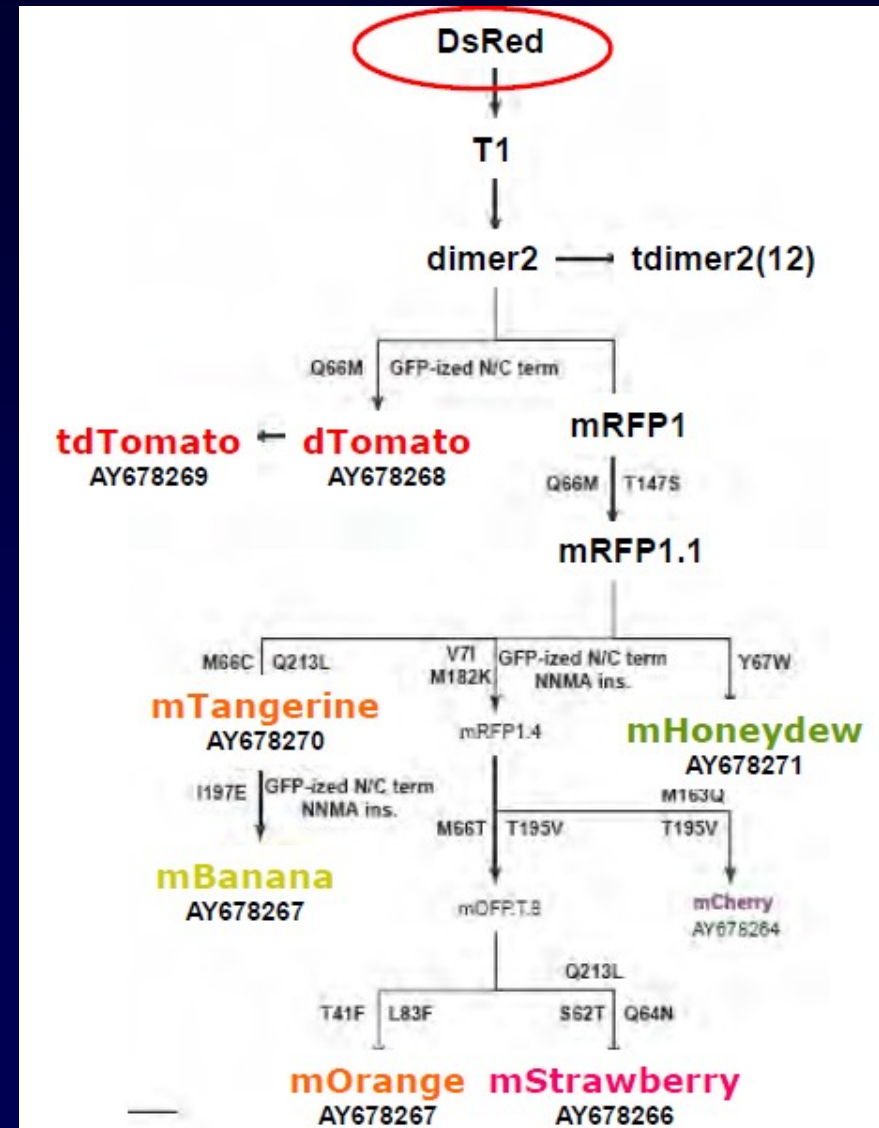
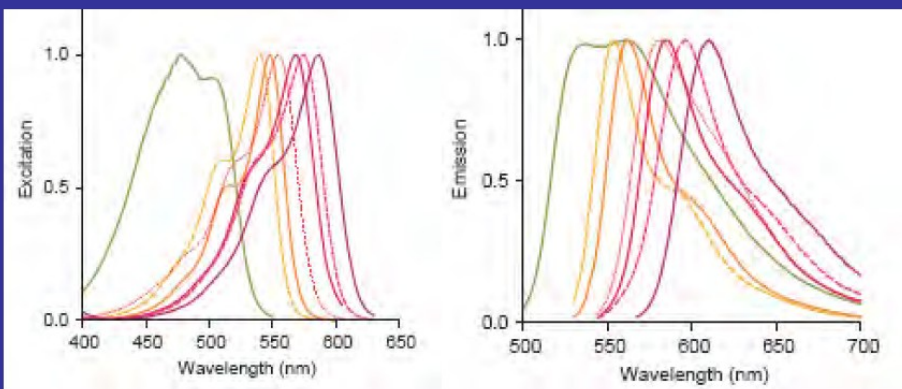
β -parel (11 antiparalelních řetězců) , uvnitř α -helix s chromoforem

excitace: 558 nm

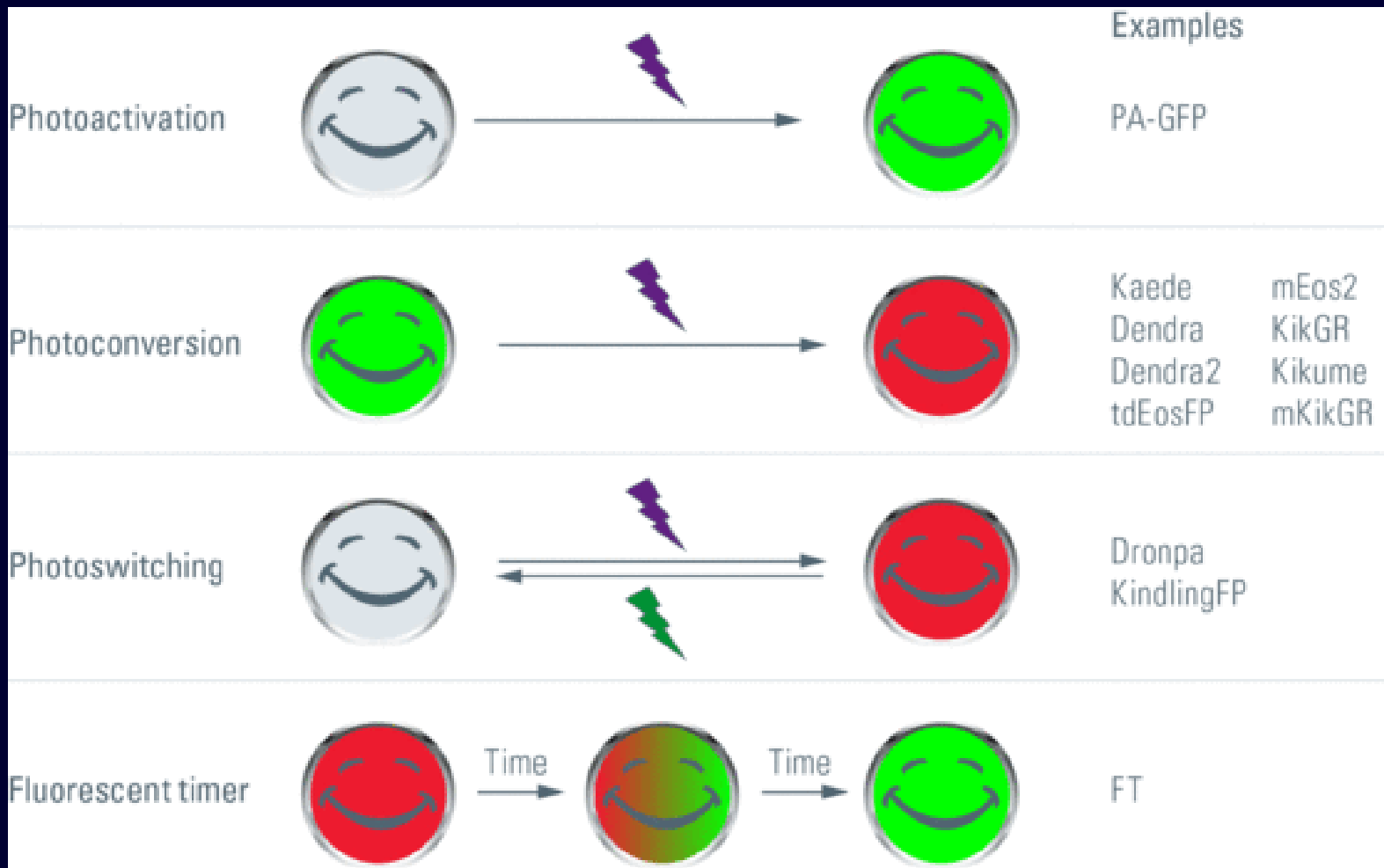
emise: 583 nm



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

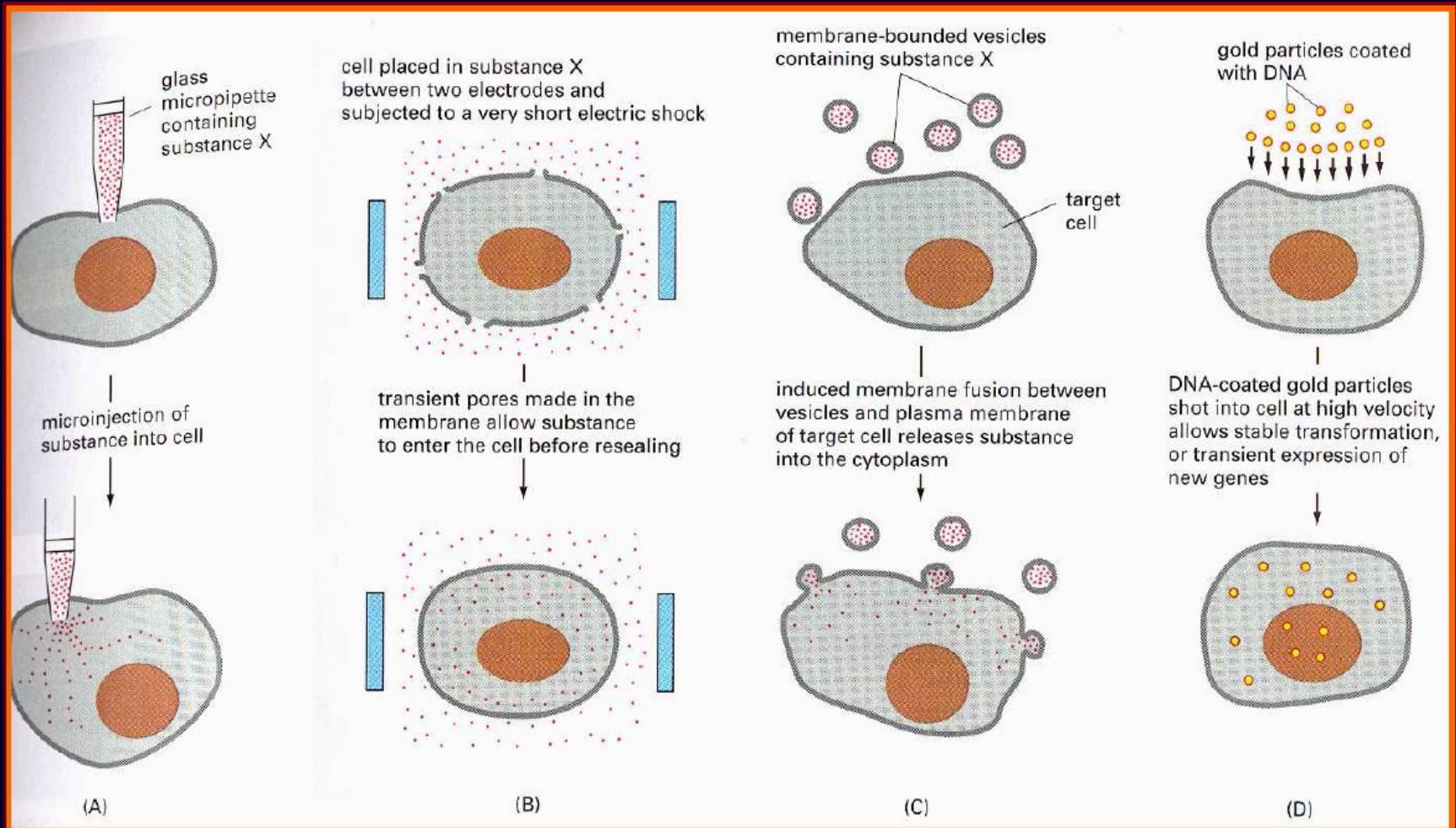
Precipitace fosforečnanem vápenatým – fosforečnan vápenatý společně s DNA precipituje, poté je fagocytován do buněk, jednoduchá metoda, část DNA i do jádra

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

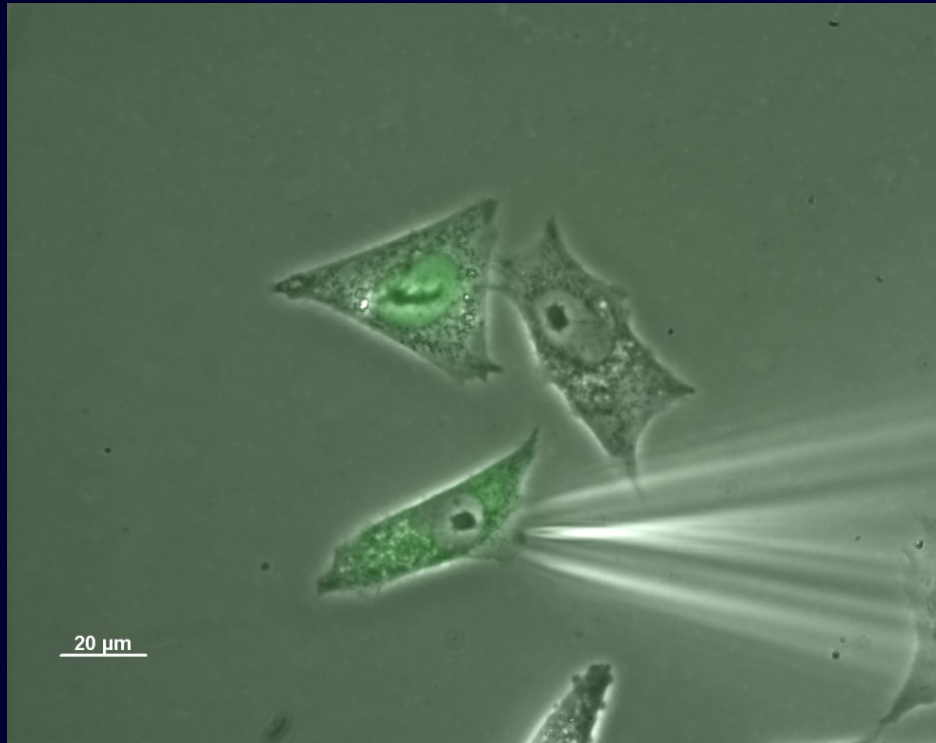
Gene Gun – mechanický přenos DNA vázané na kovové mikroprojektily do buněk pomocí tlaku plynů nebo mikroexploze (např. u rostlinných buněk)



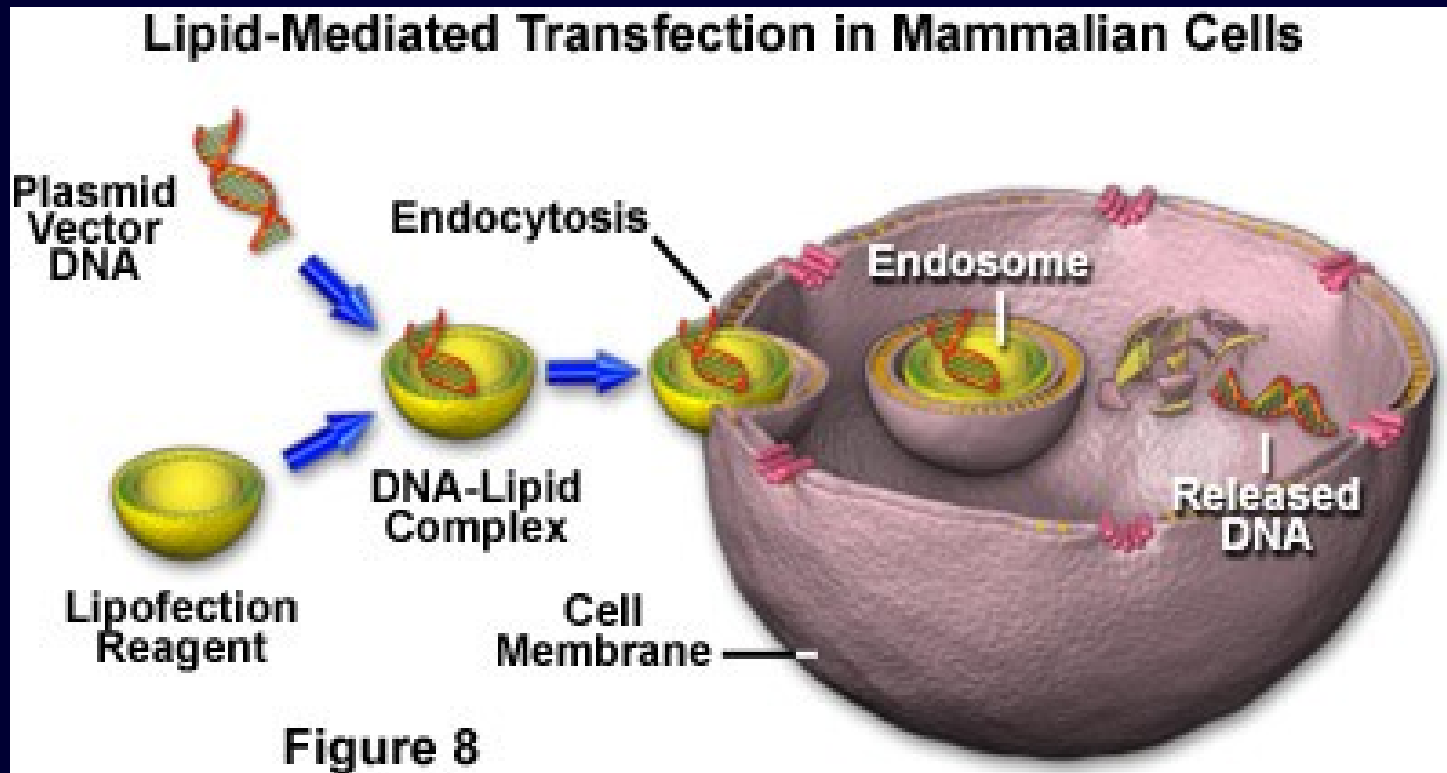
Zavedení fúzního genu do buňky



Mikroinjekce



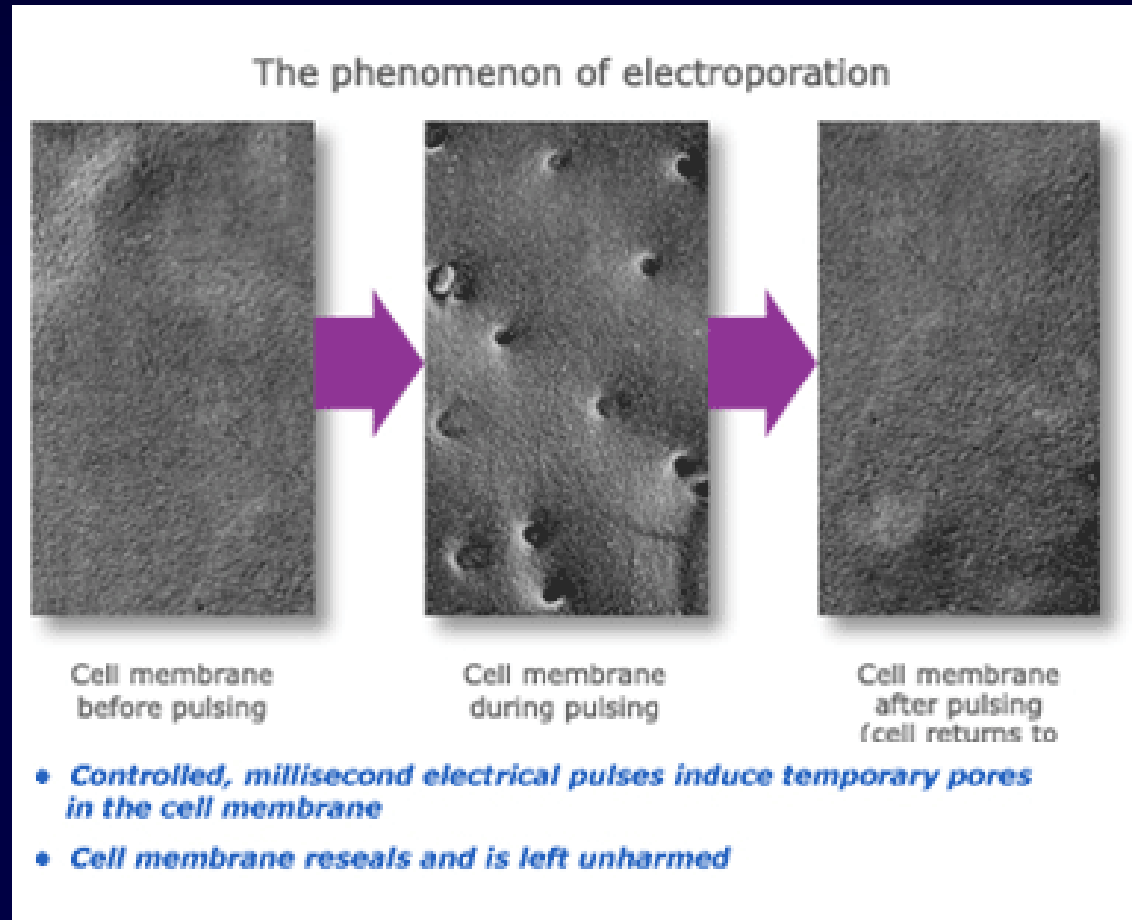
Lipofectaminová transfekce



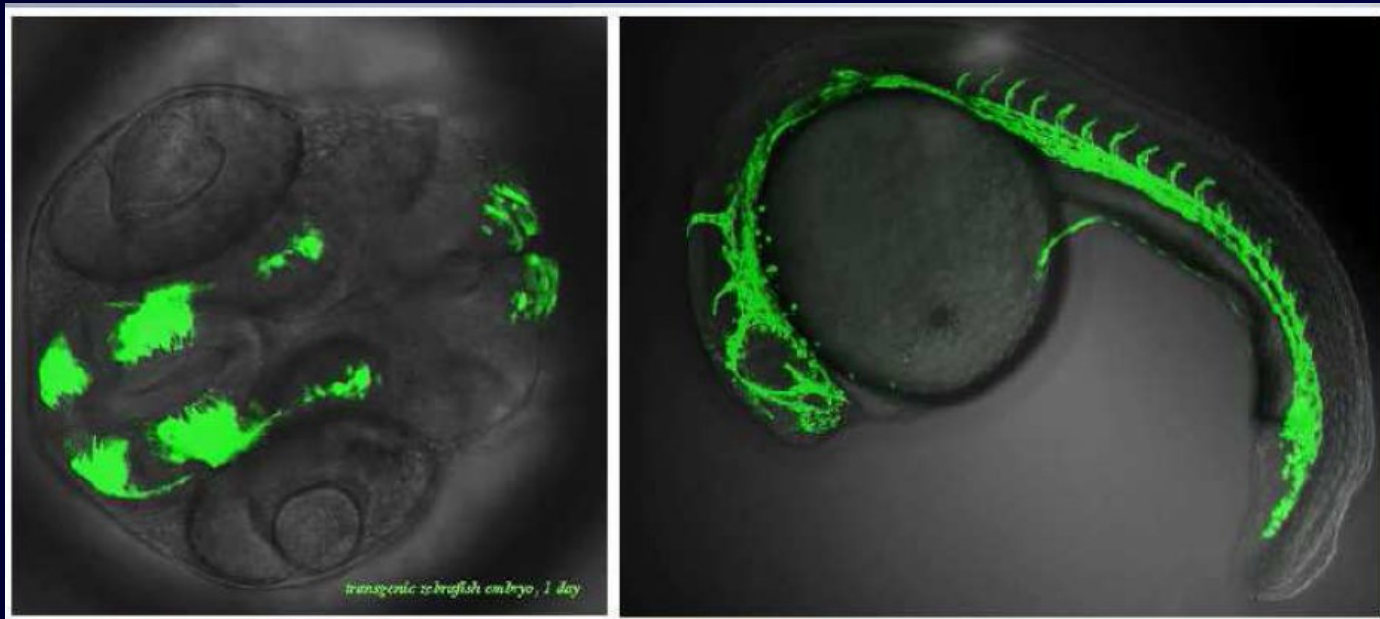
Elektroporace

Cíle:

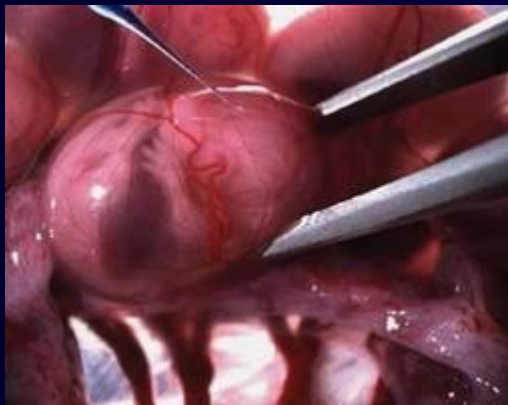
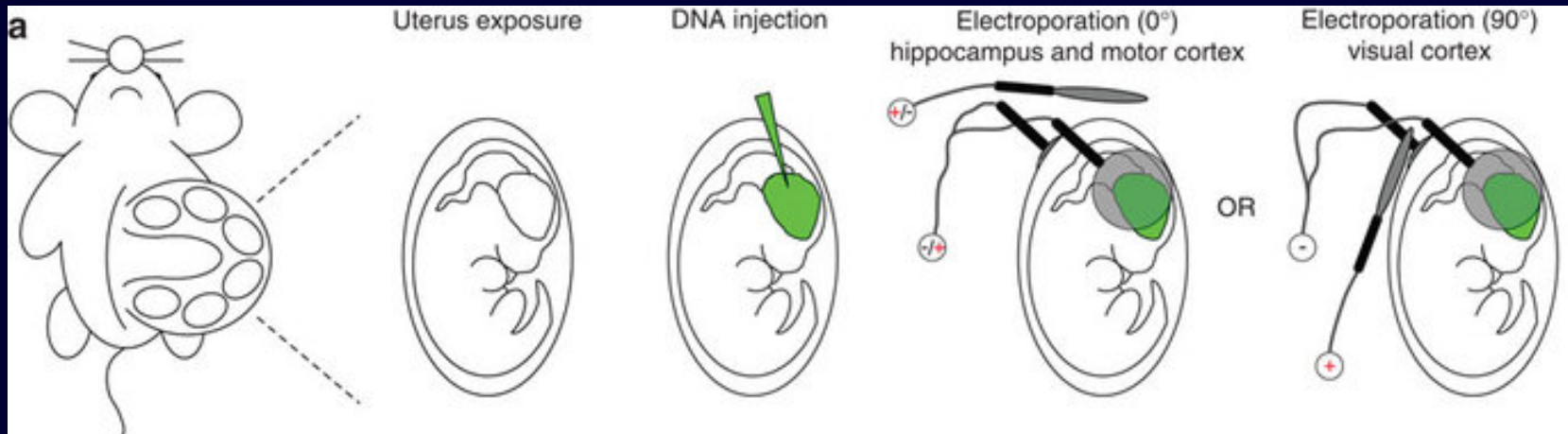
- b. kultura
- tkáně
- orgány
- embryo
- embryo *in utero*



GFP exprese v rybím embryu zebříčka (Danio rerio)



GFP transfekce „in utero“ např. 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:

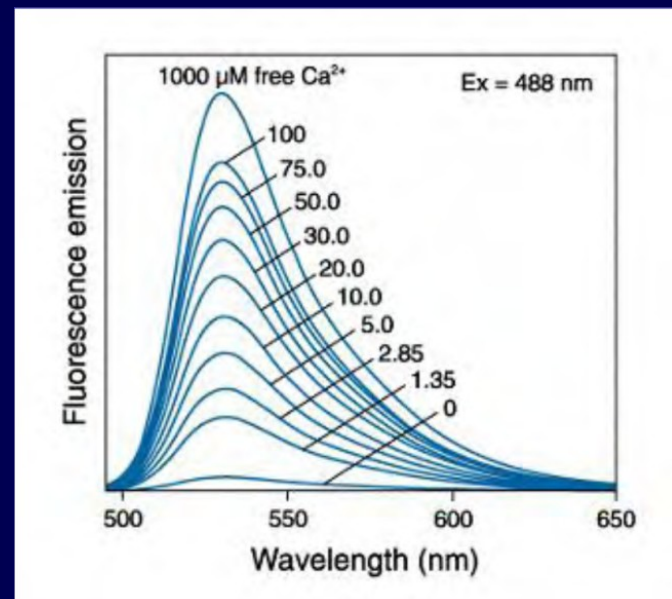
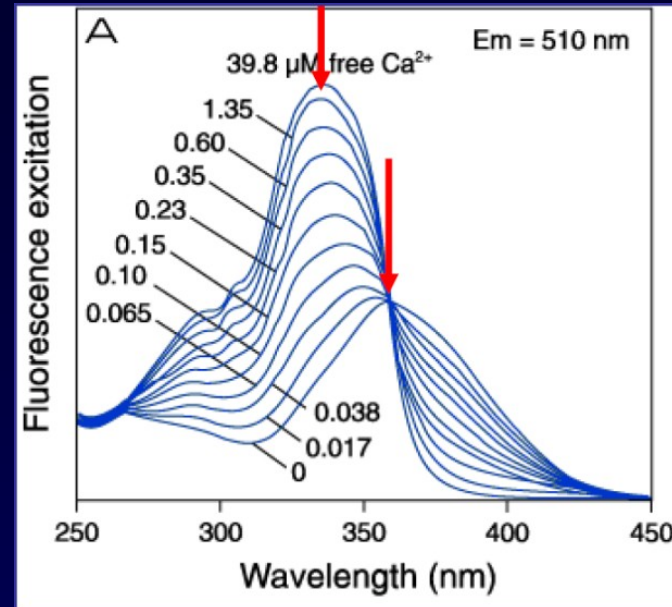
změna intenzity nebo posun emisního/excitačního spektra v závislosti na koncentraci



Indikátory Ca^{2+}

FURA-2

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

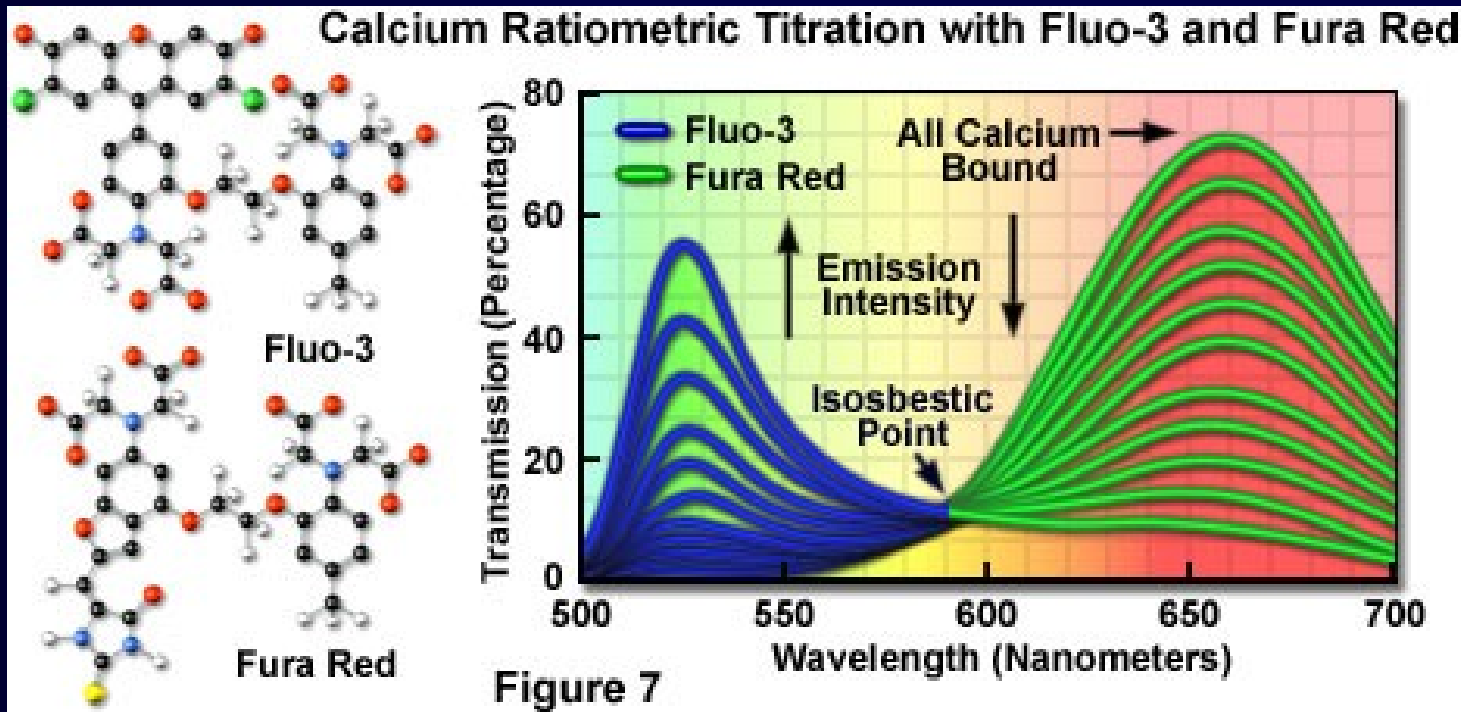


CalciumGreen-5N

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

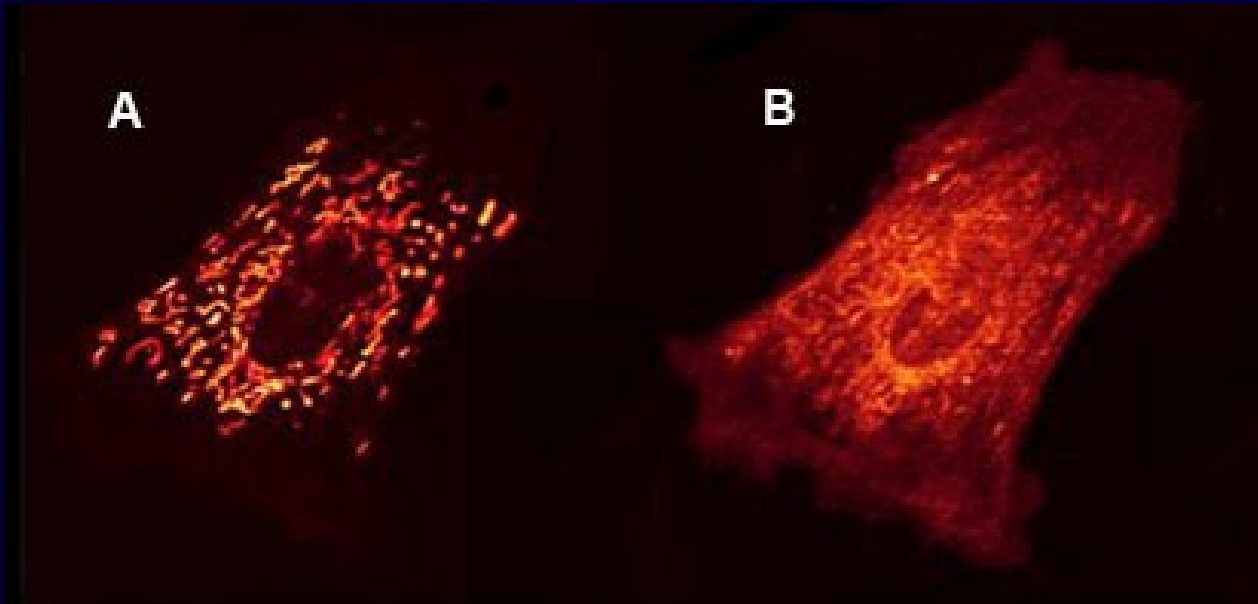
studium: transport, buněčná respirace, mitóza, apoptóza, degradace proteinů, sekreční dráhy

rozdělení: na stálé a nestálé

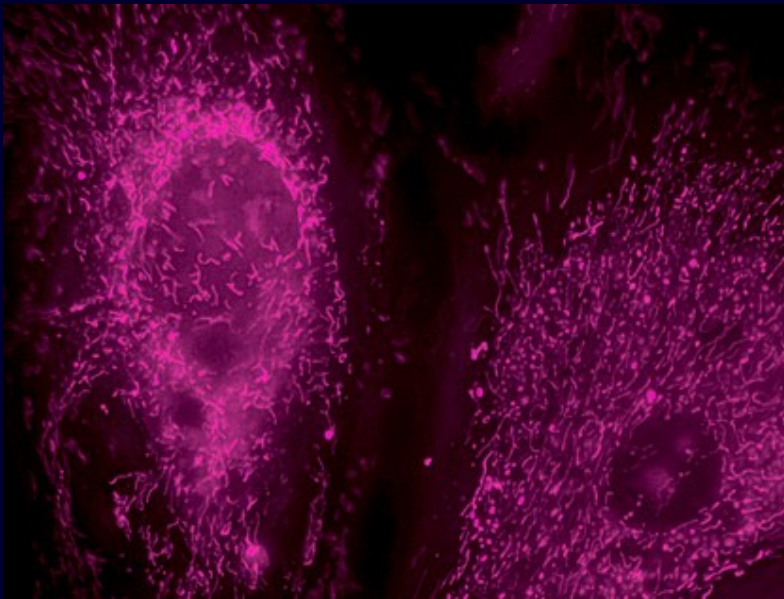


Mitochondrie

- 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



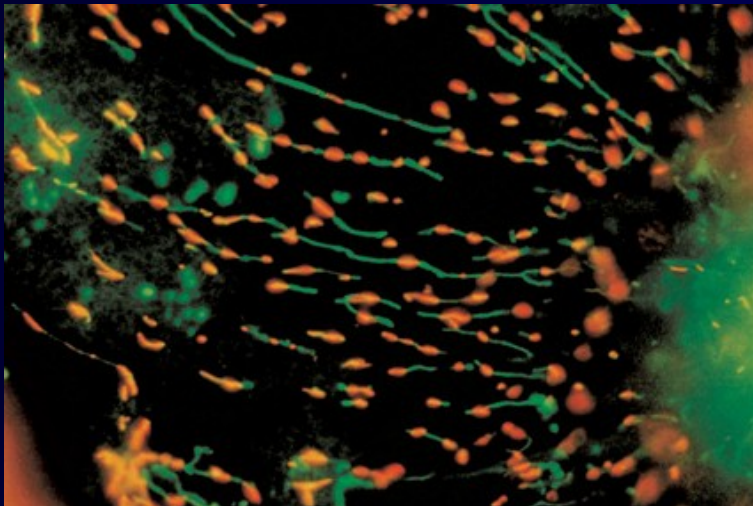
Neonatální kardiomyocyty : rhodamin123, (A) kontrola, (B) ovlivněno mitochondriálním uncouplerem



mitochondrie – bovinní endotel :
MitoTracker® Deep Red FM dye



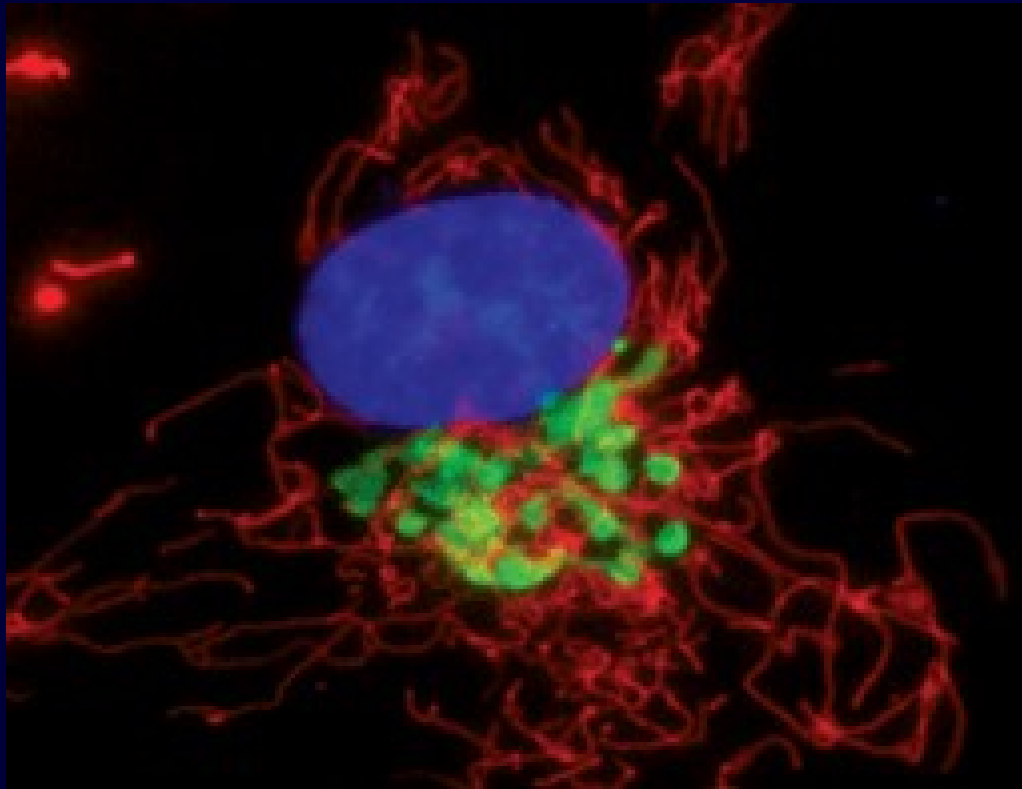
mitochondrie/DNA - býčí spermie:
MitoTracker® Green FM
Hoechst 33342



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

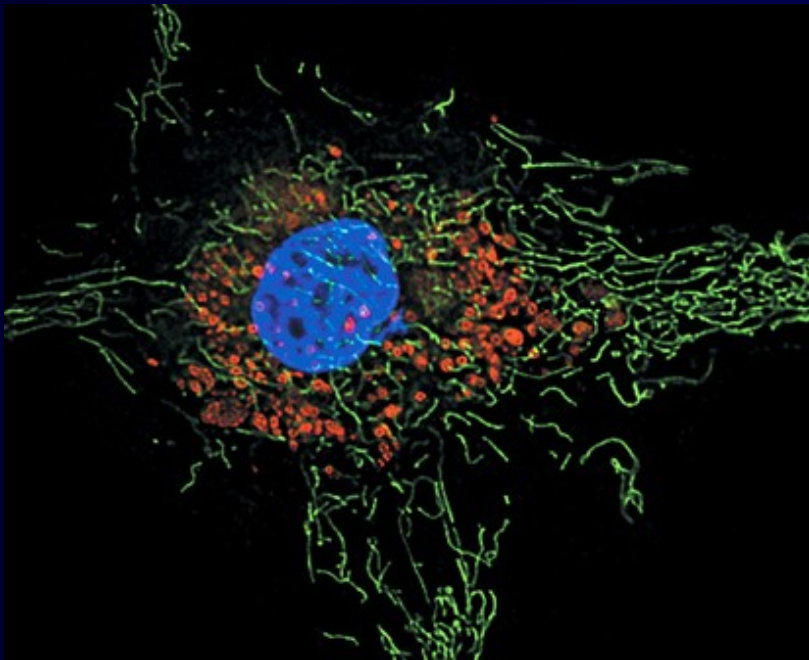
- prostupují přes membránu, selektivní pro ER, dříve DiOC₆, - není tak specifický, vykazuje fotodynamickou toxicitu
- nyní ER-Tracker + Blue-White, Red , Green - menší toxicita, lze i fixovat



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
funkce jako 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:

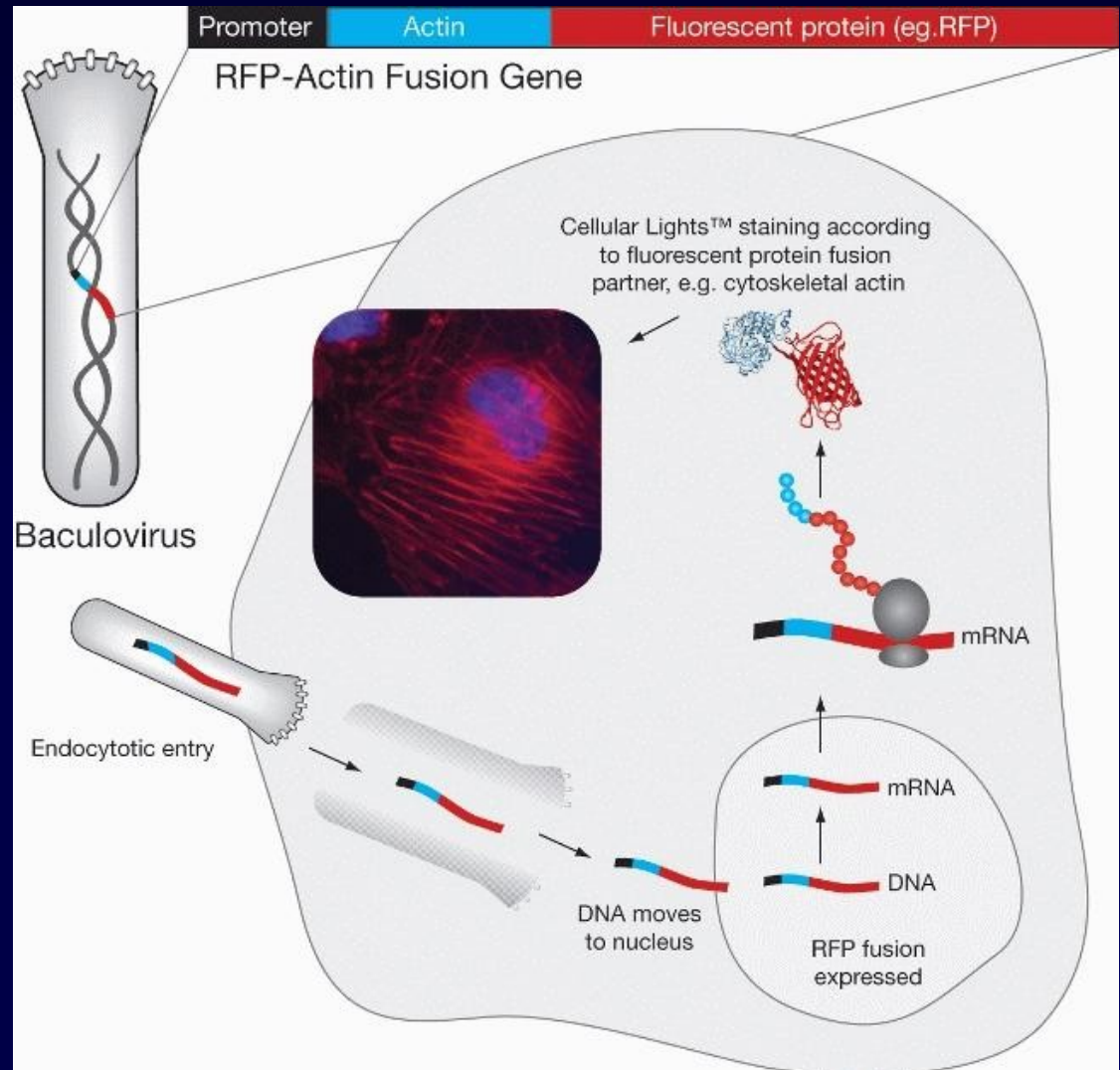
- 1) savčí promotor: zaručuje expresi v savčích buňkách
- 2) funkční část: protein nebo peptid cílený na strukturu (cytoskelet, organely aj.) nebo funkci (buněčný cyklus, autofagie, tok Ca^{2+})
- 3) fluorescenční protein: CFP, GFP, RFP; na C- nebo N- konci peptidu

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



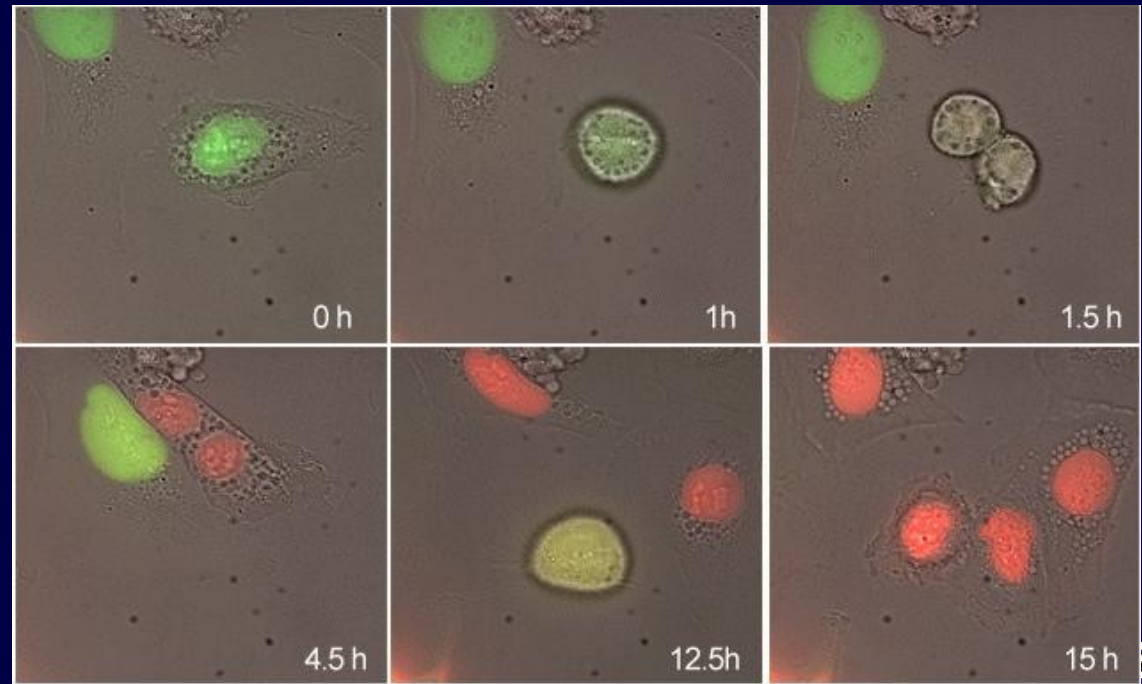
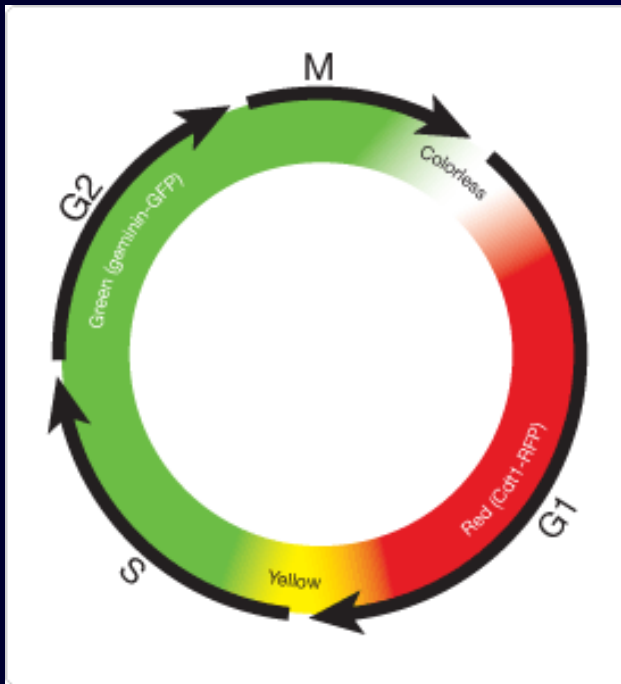
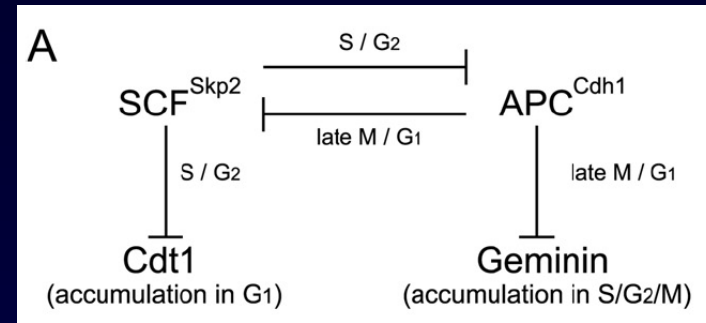
Princip metody

- 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



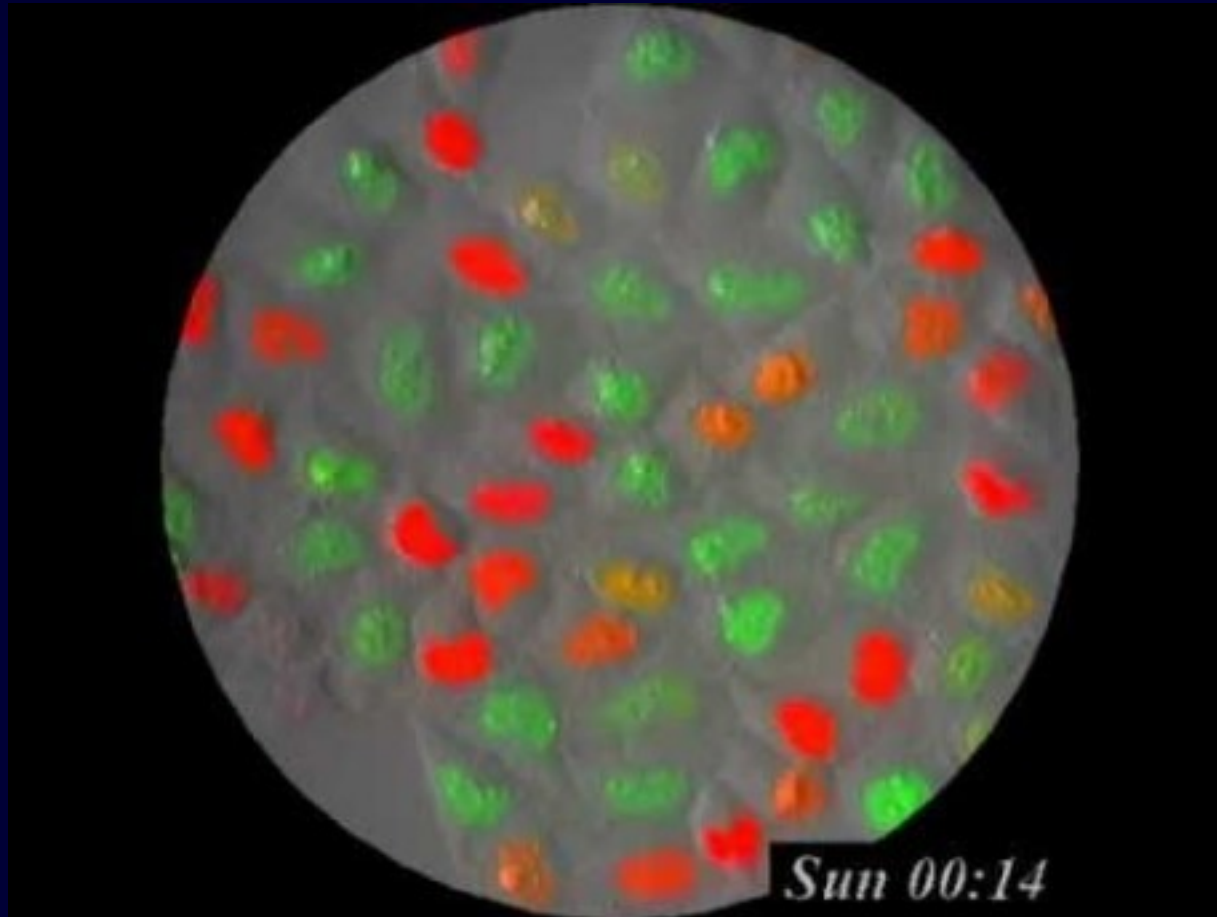
Sledování fází buněčného cyklu

- 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-





<https://youtu.be/S-1HryiIV1k>

Testování viability / cytotoxicity / buněčné smrti

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)

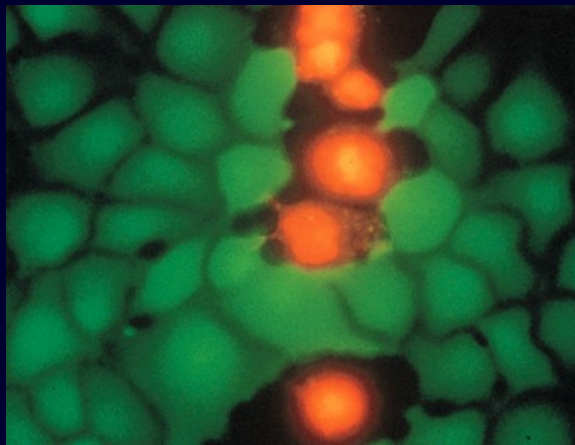
2. sondy pro nukleové kyseliny

- neprostupují přes membránu živých buněk
- EtBr, PI, ethidium homodimer, SYTOX Green...

Ize společně kombinovat



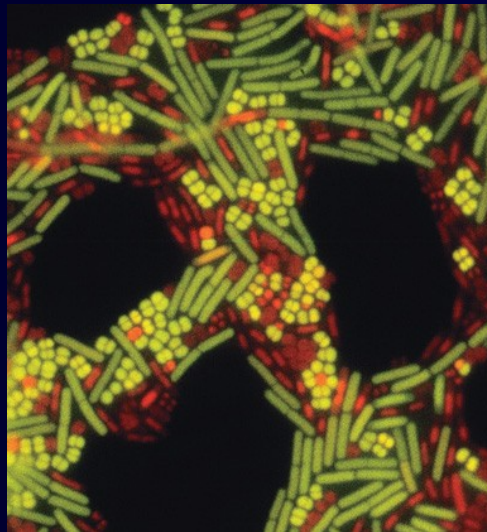
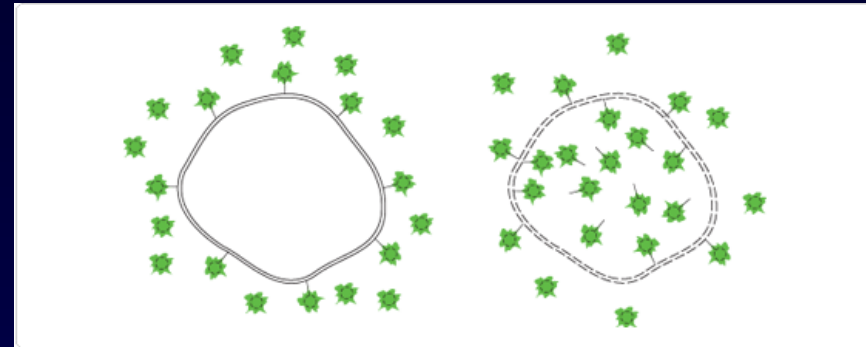
Princip obarvení mrtvých buněk membránu neprostupující DNA sondou



linie krysích buněk:

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

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

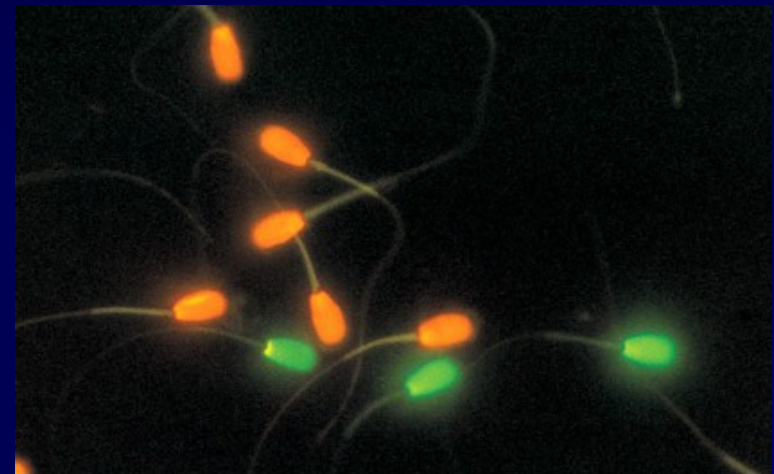


Micrococcus luteus

a *Bacillus cereus*:

živé: zelené

mrtvé: červené

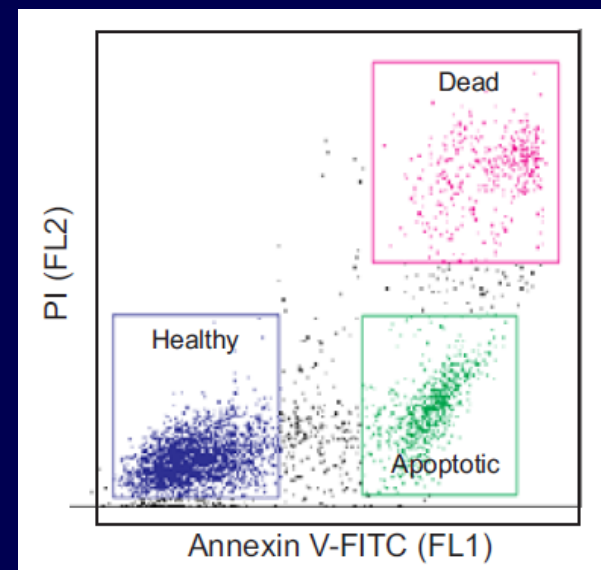
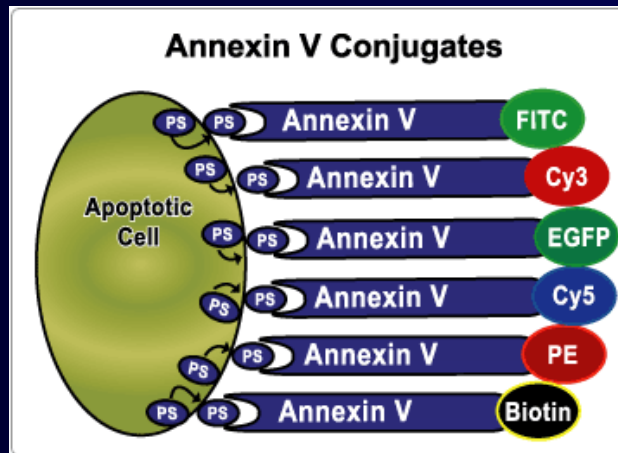
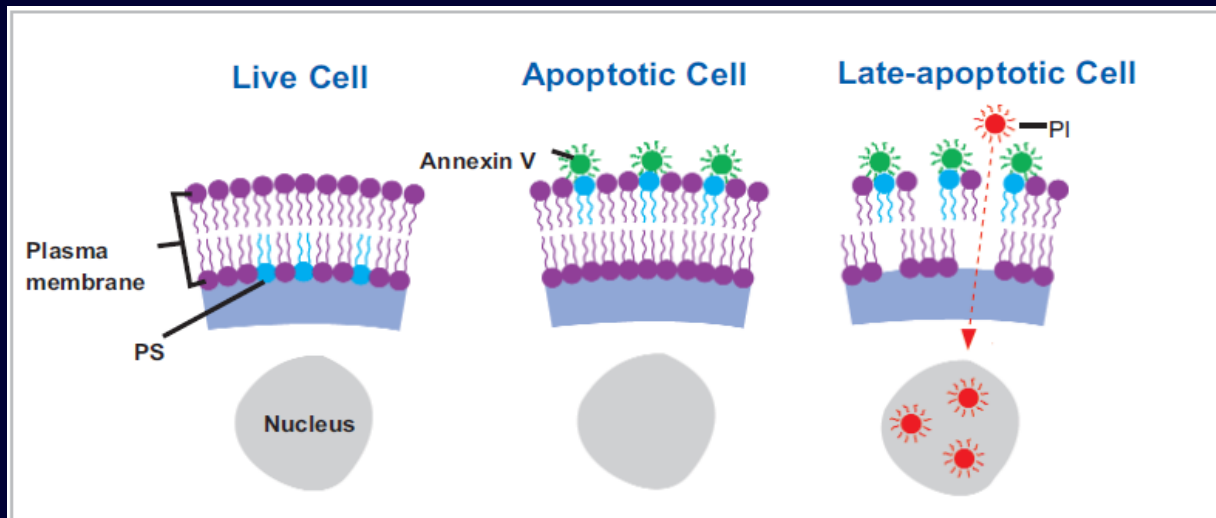


býčí spermie :

živé : **SYBR® 14** → zelené

mrtvé: **propidium iodide** → červené

Annexin V + PI: detekce buněčné smrti

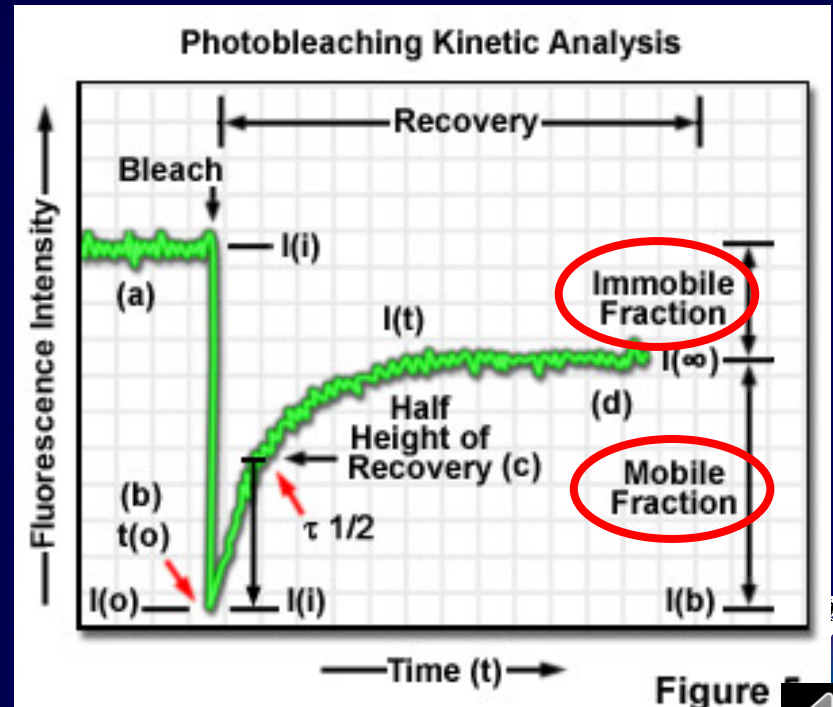
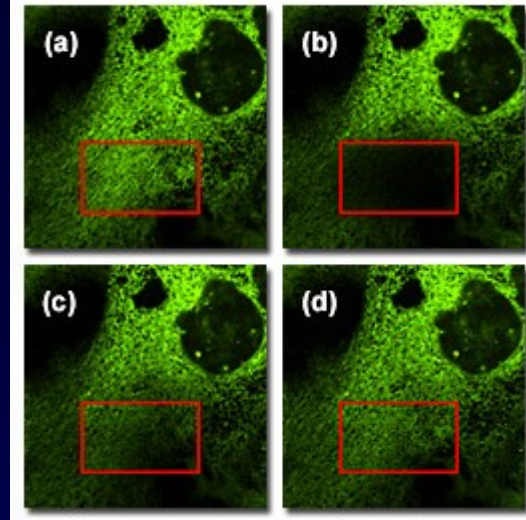
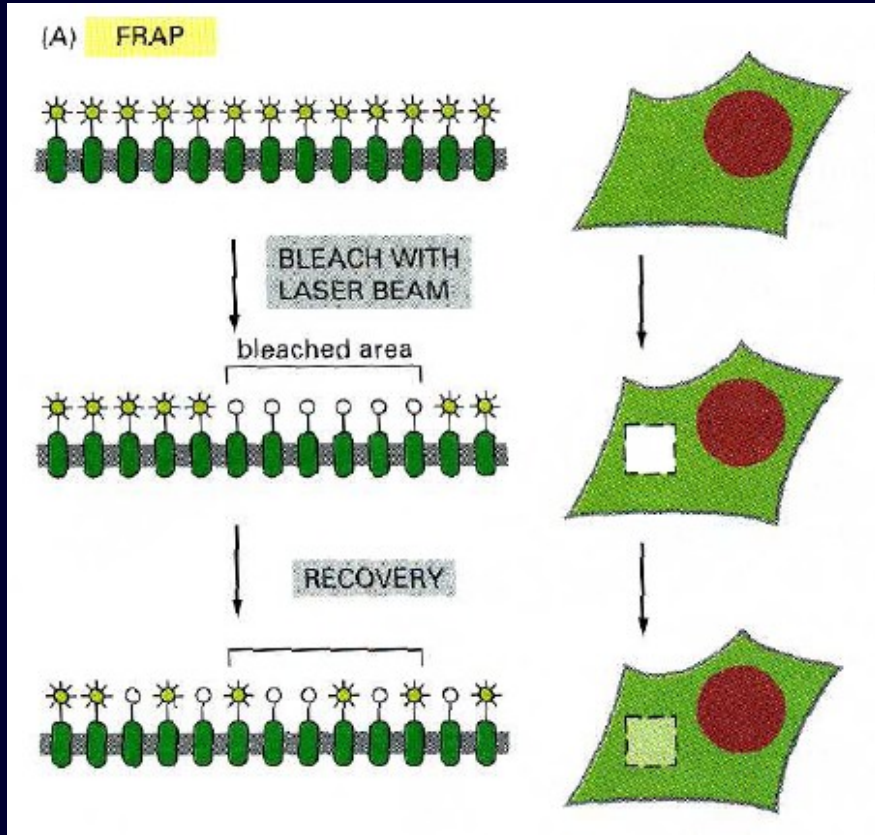


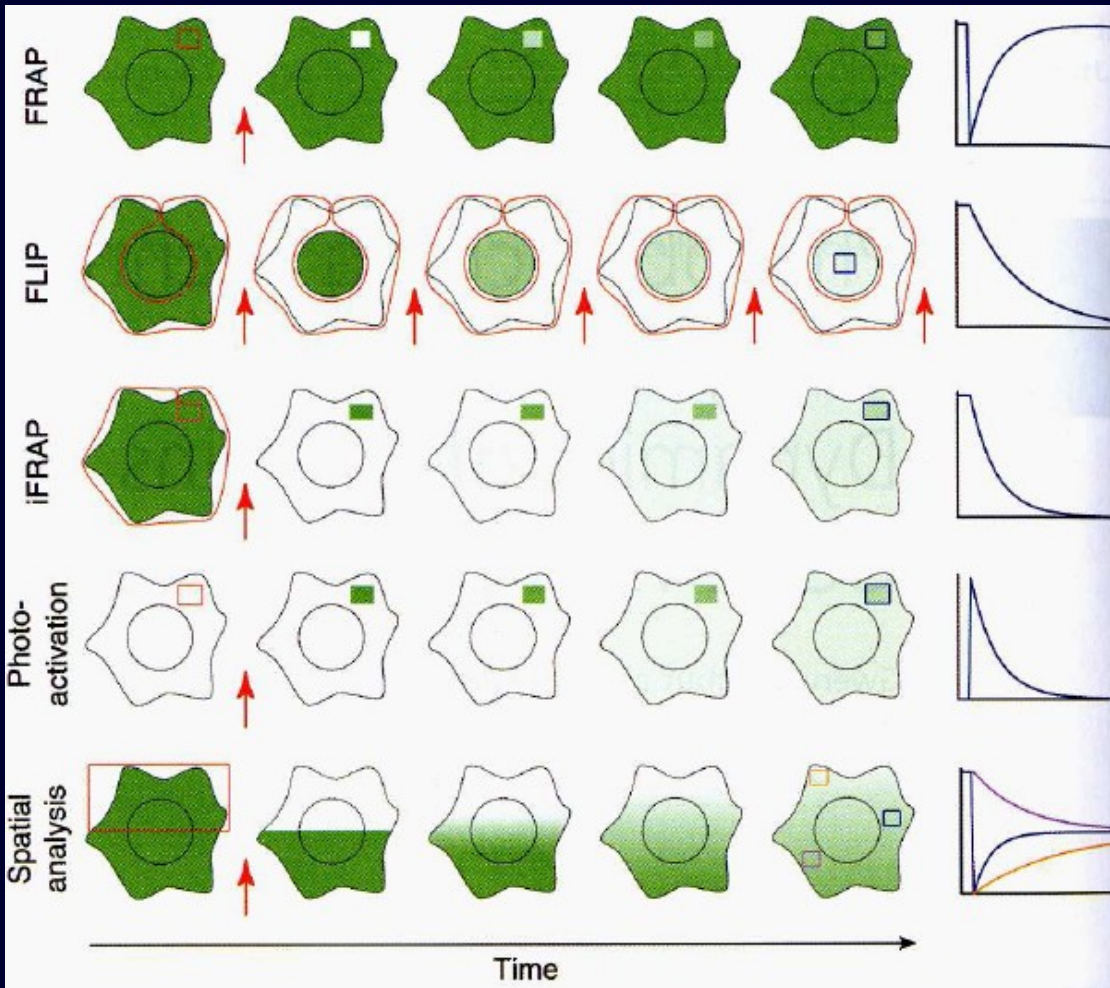
FRAP – Fluorescence Recovery after Photobleaching

- 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



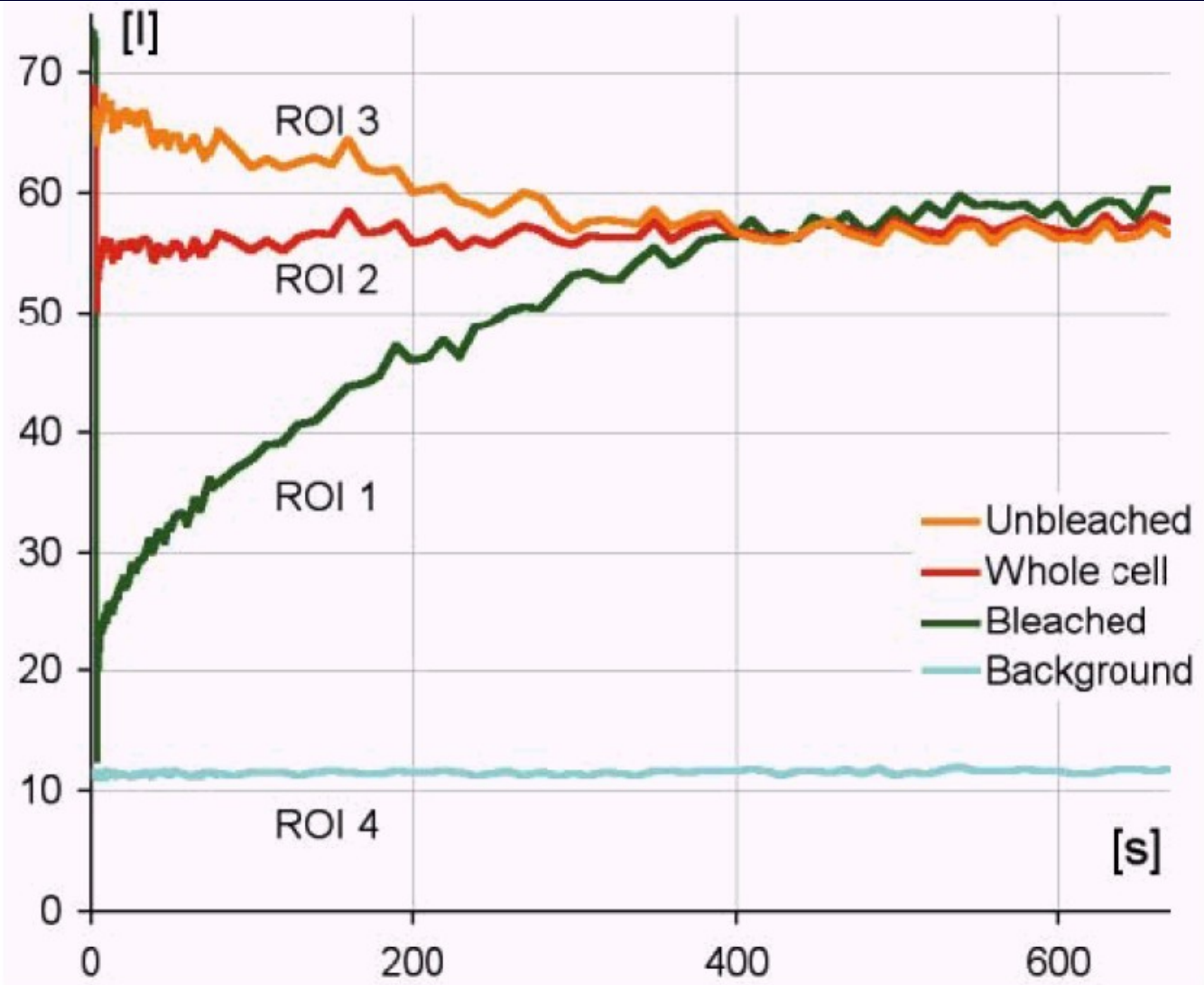
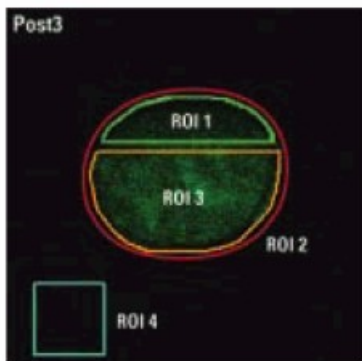
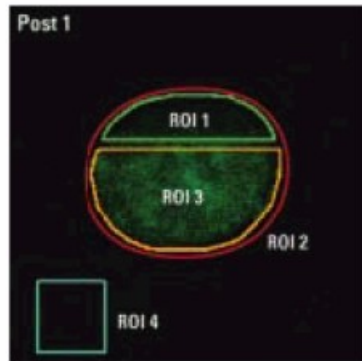
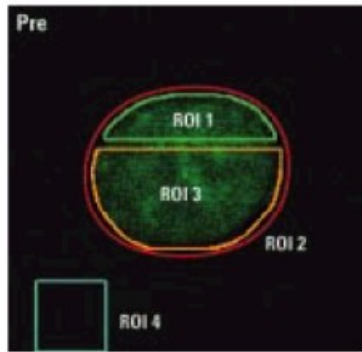


FRAP- malý region 1x odbarvení
obnovení signálu, informace o
mobilitě molekul

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

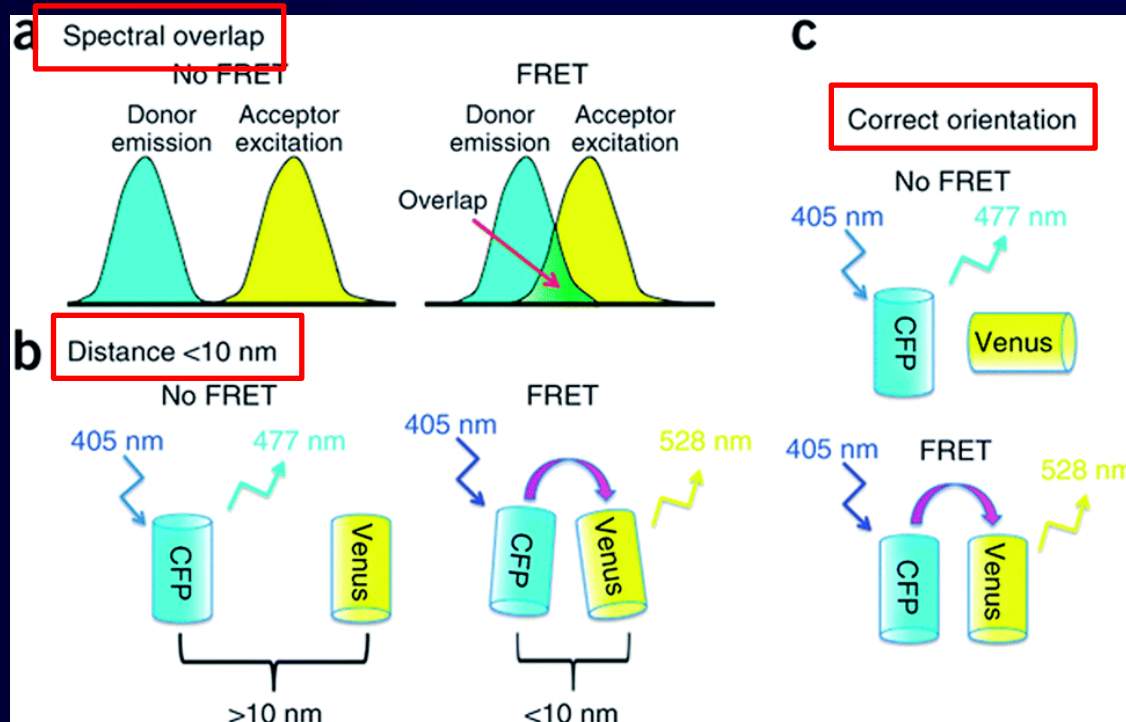
iFRAP (inverzní) – celý preparát
kromě 1 regionu odbarven –
postupné vymizení fluorescence

fotoaktivace – analýza rychlých
difúzních procesů

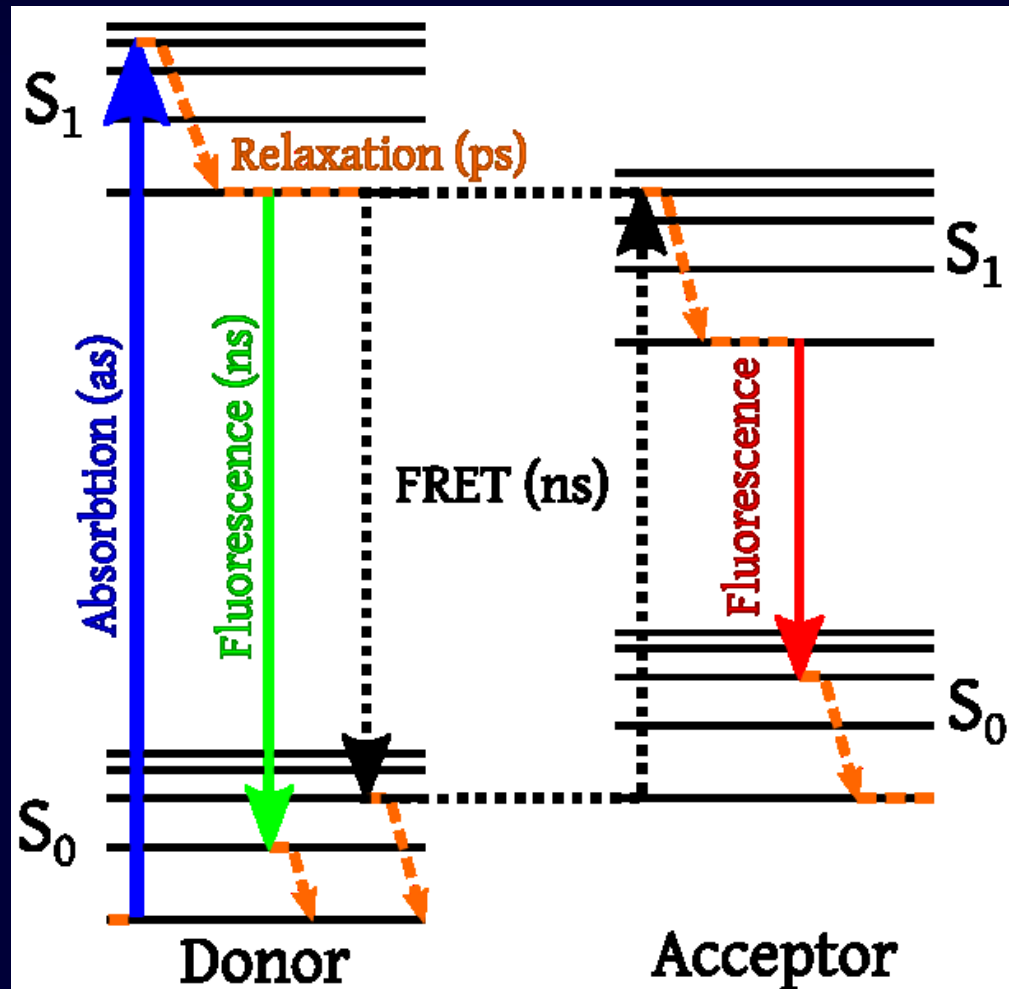


FRET: Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer

- 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

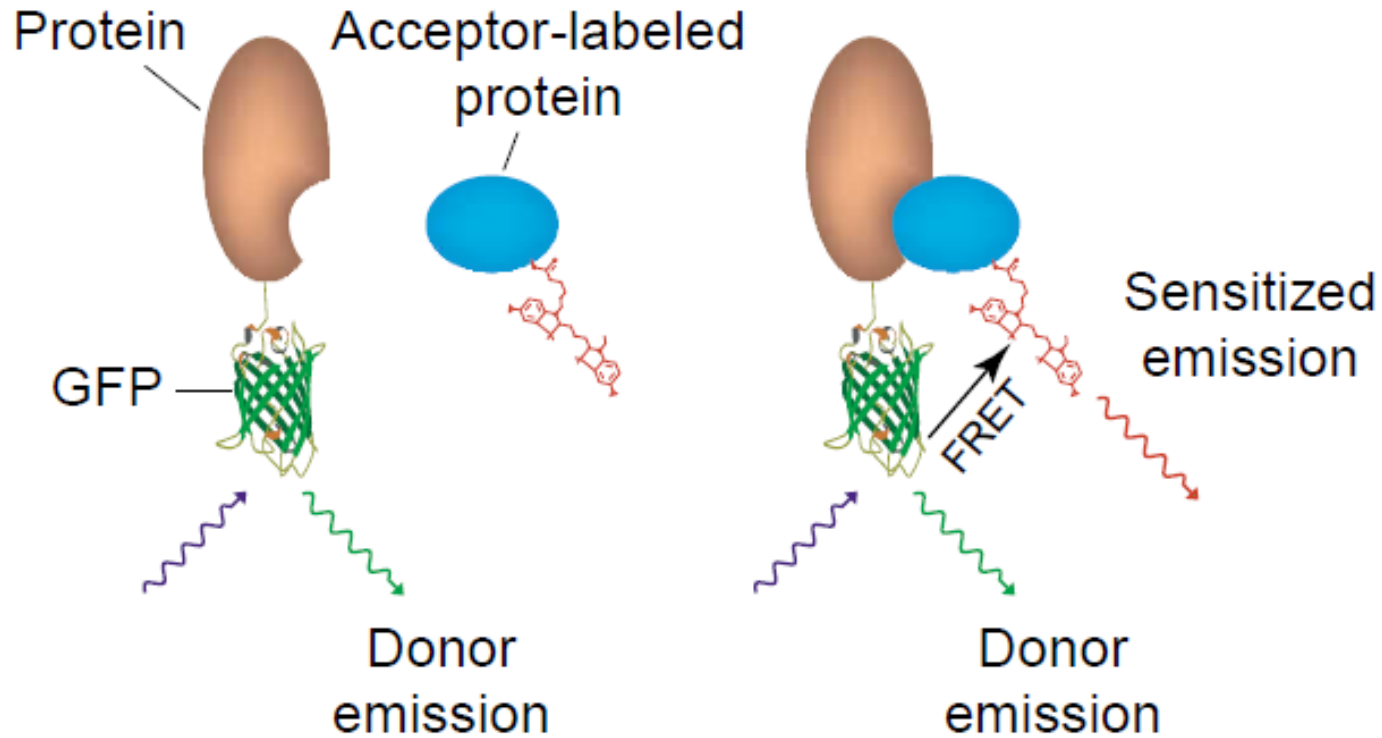


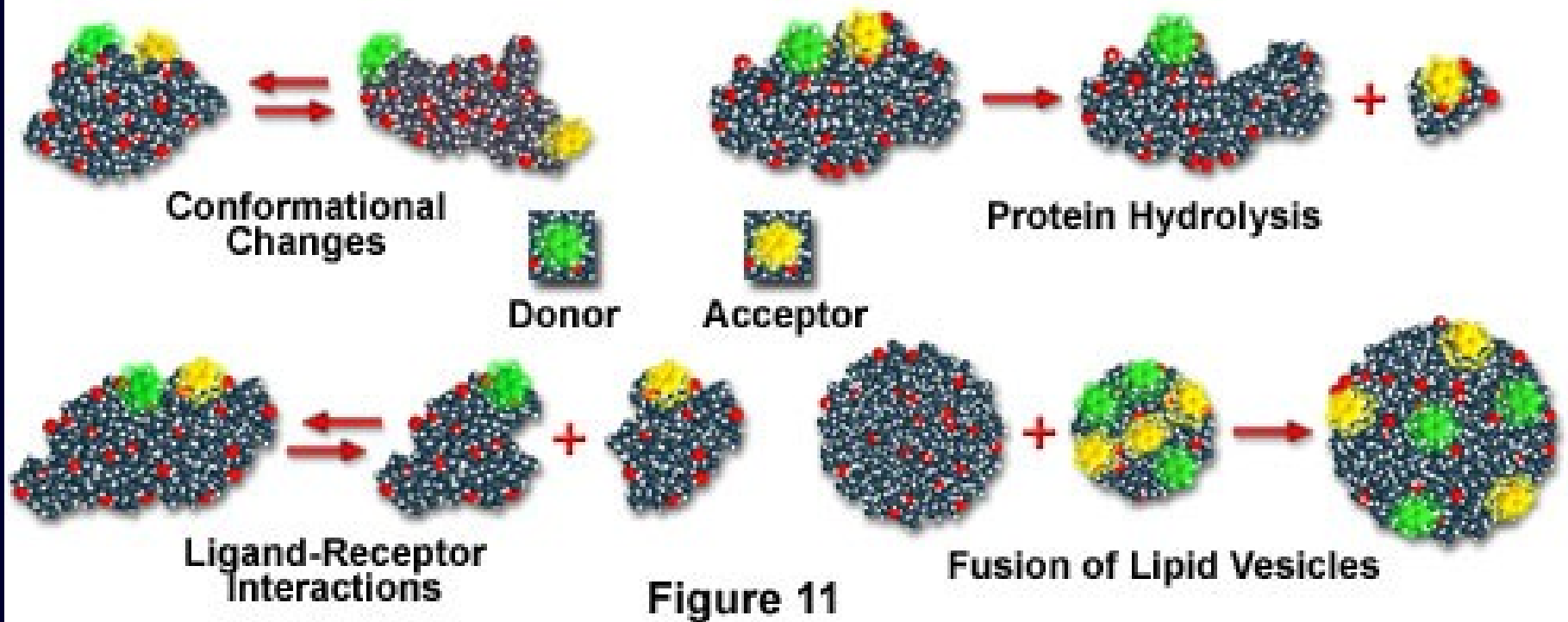
Fig. 1.

TRENDS in Cell Biology



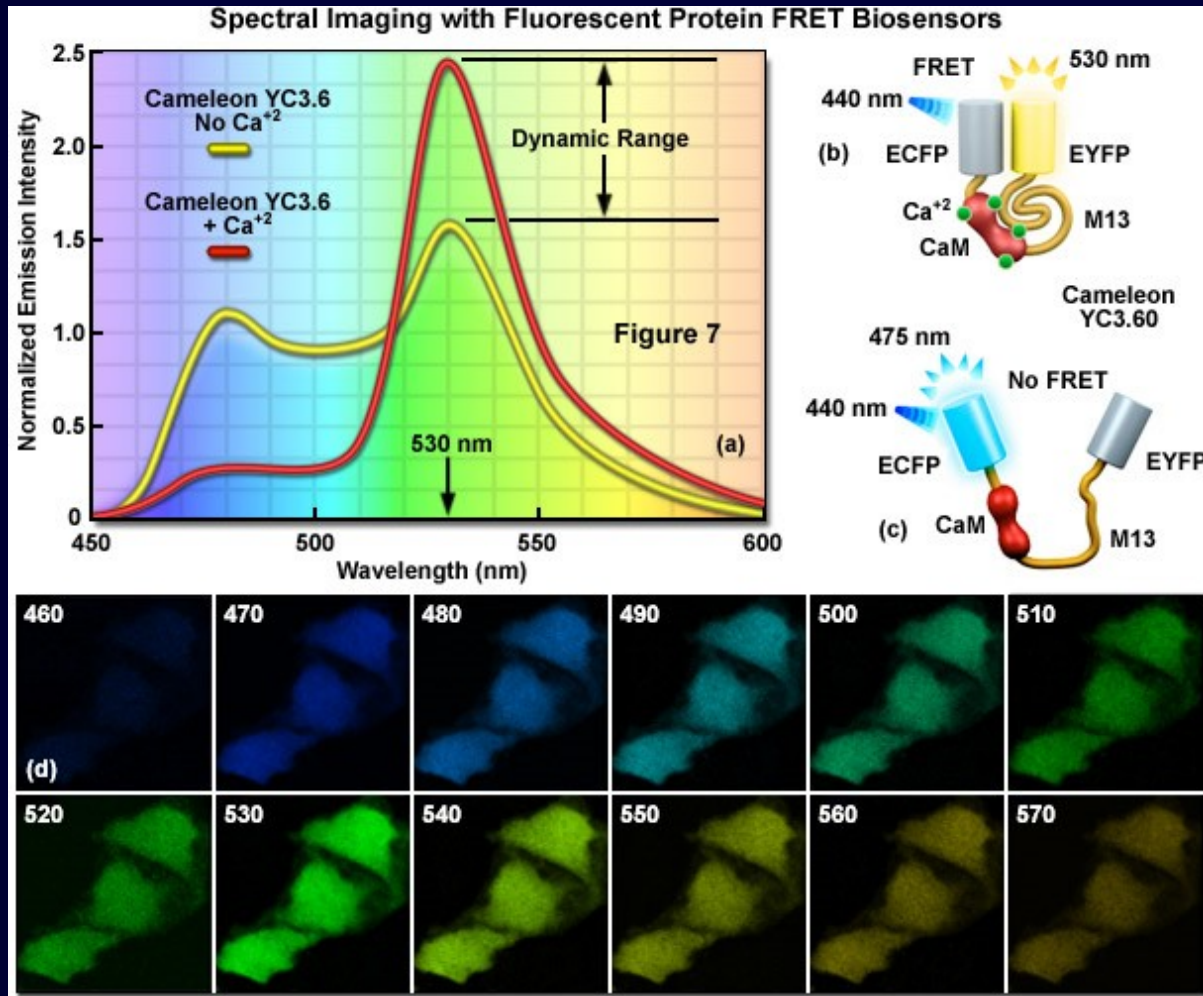
Další aplikace FRET

Biomolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Applications

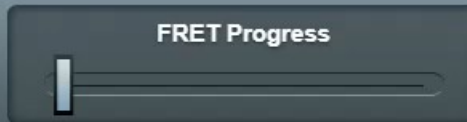
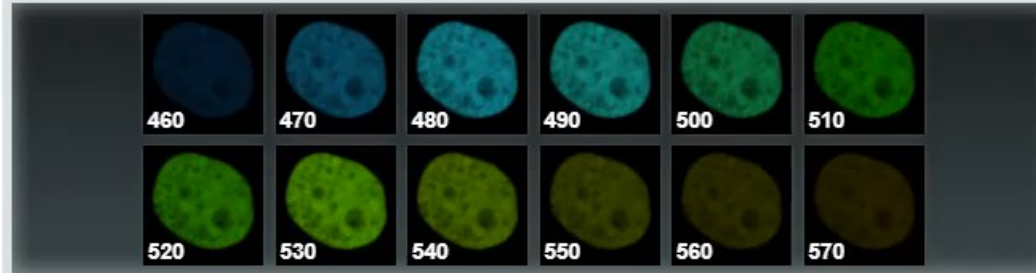
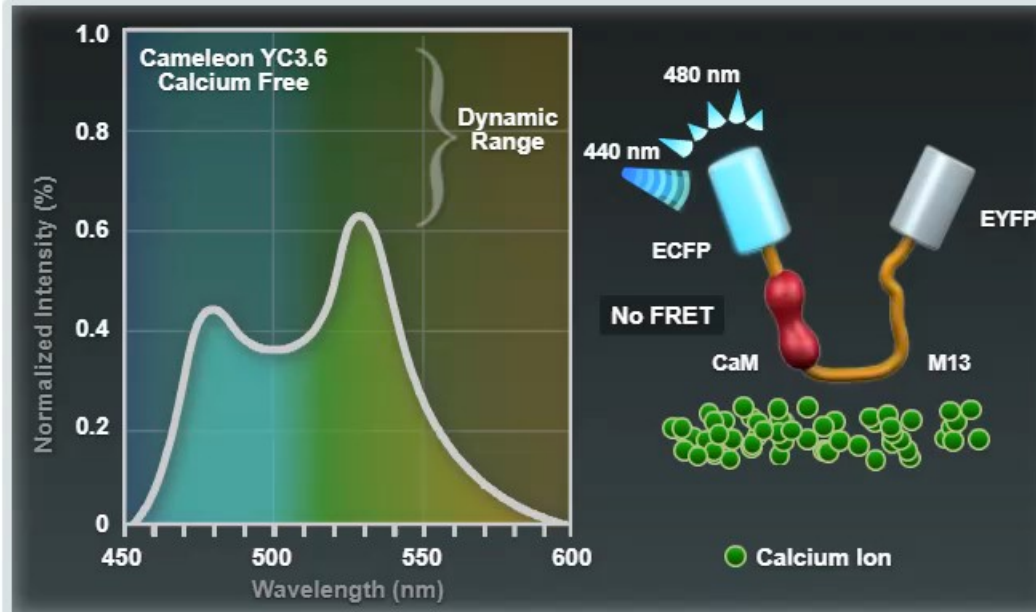


aplikace FRET

biosenzory- měření koncentrace vápníku



Spectral Imaging with FRET Biosensors



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

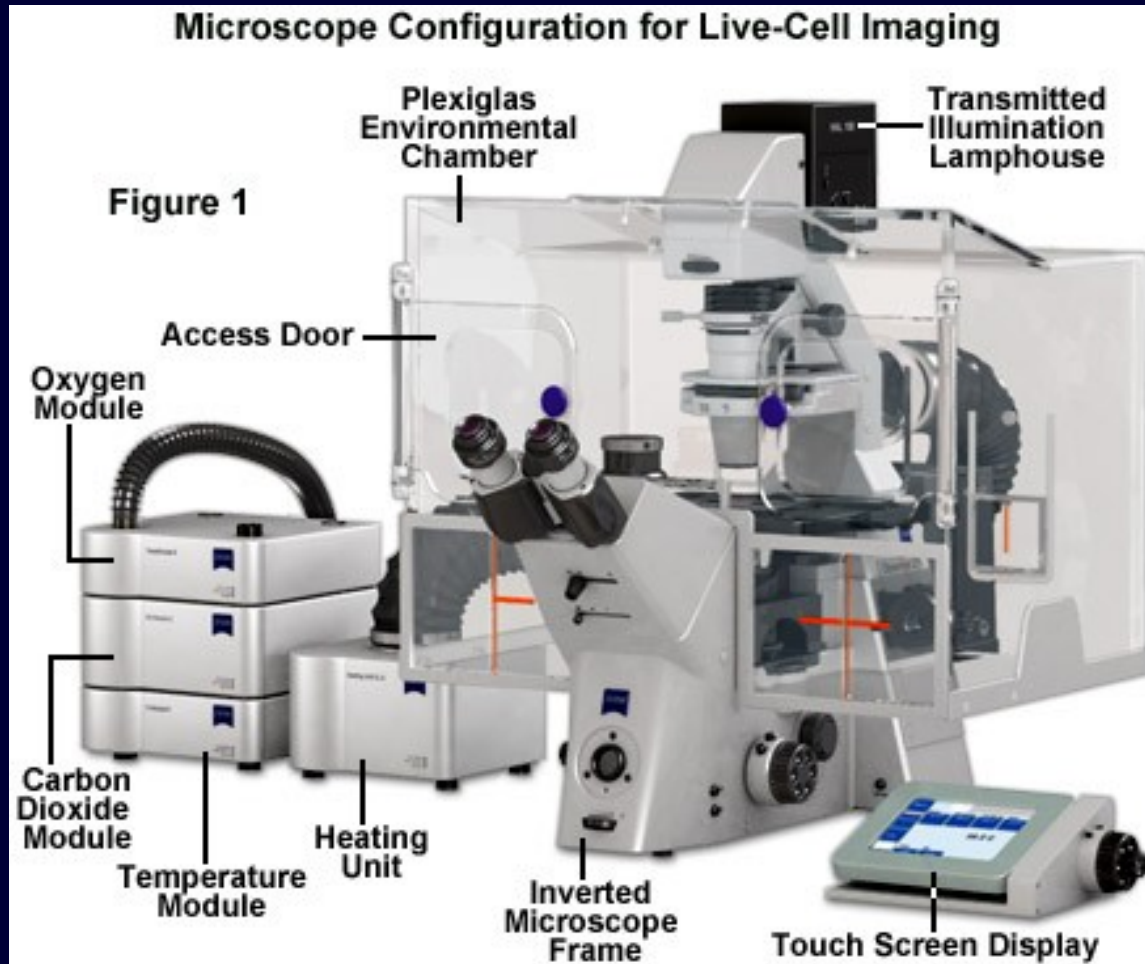


Podmínky pro mikroskopii živých buněk

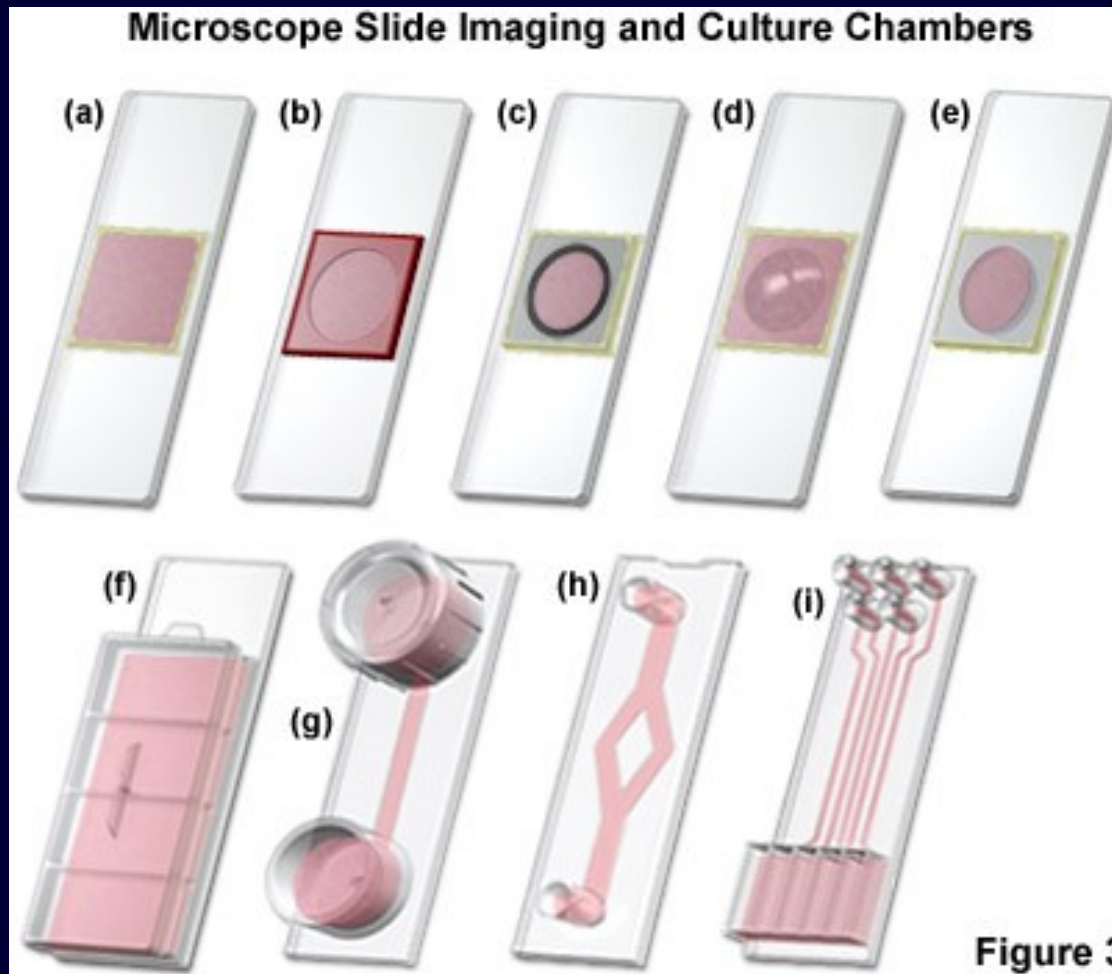
| Variable | Optimum Range | Comments |
|--------------|---|--|
| Temperature | 28-37°C | Control with Specimen Chamber Heaters Use Inline Perfusion Heaters Objective Lens Heaters Environmental Control Boxes |
| Oxygenation | Variable | Perfuse or Change Media Regularly Use Large Chamber Volume |
| Humidity | 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 |



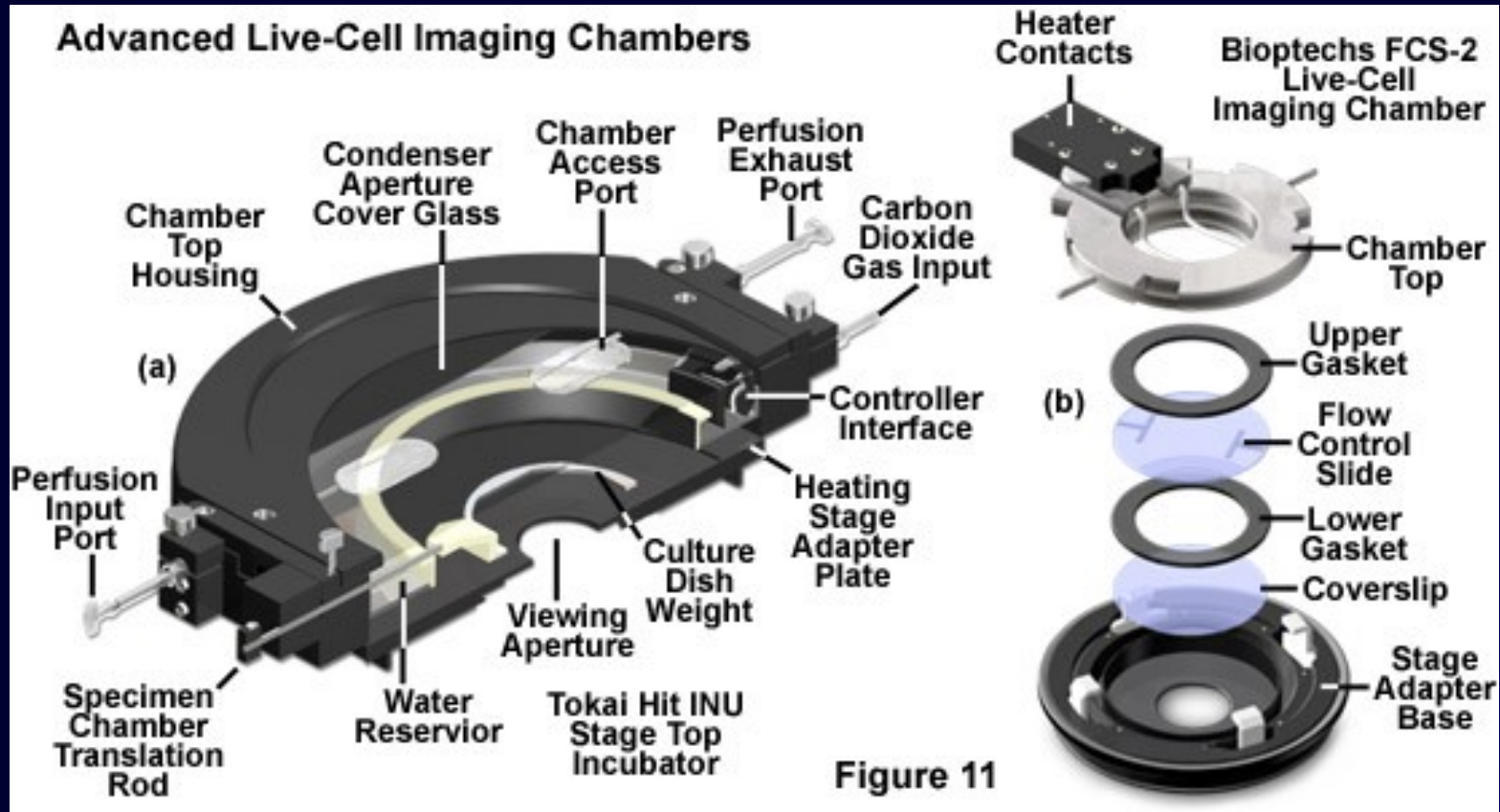
Mikroskopie živých buněk

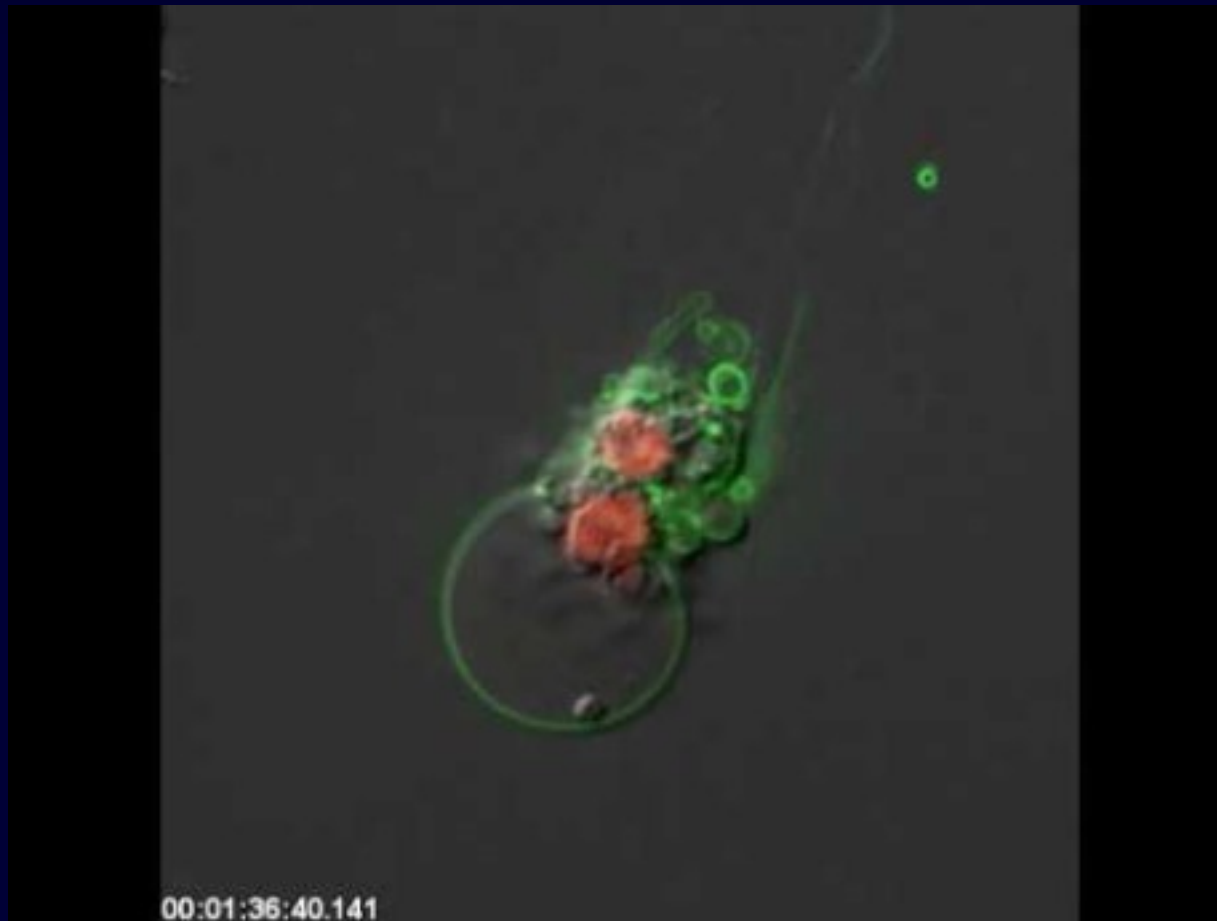


Mikroskopie živých buněk



Inkubační (perfúzní) komůrka





Anti-Fas-induced apoptotic L929 cells
Morphology, PS exposure & PI uptake overlay
<https://youtu.be/Nrwu0YhGx5o>

