

Bi8920 Fluorescenční mikroskopie

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

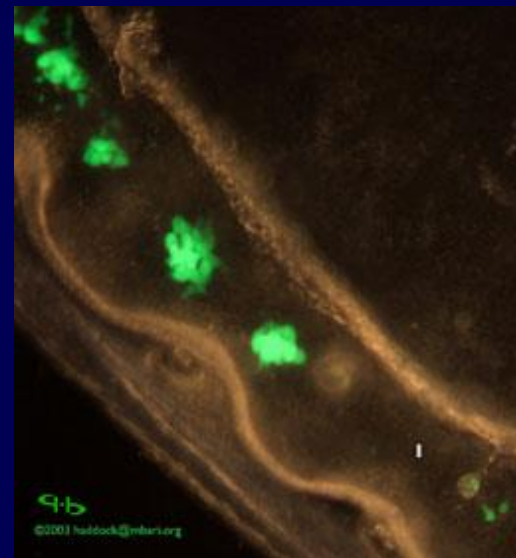
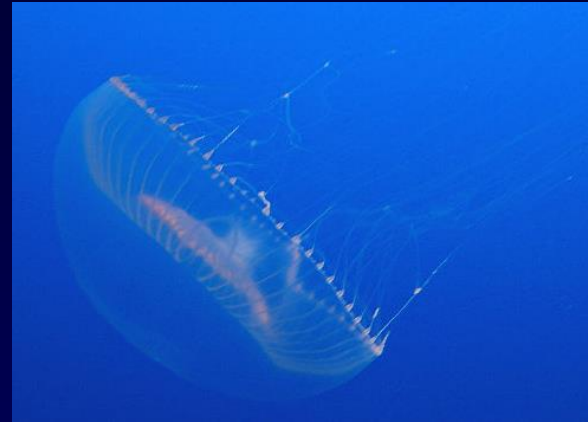
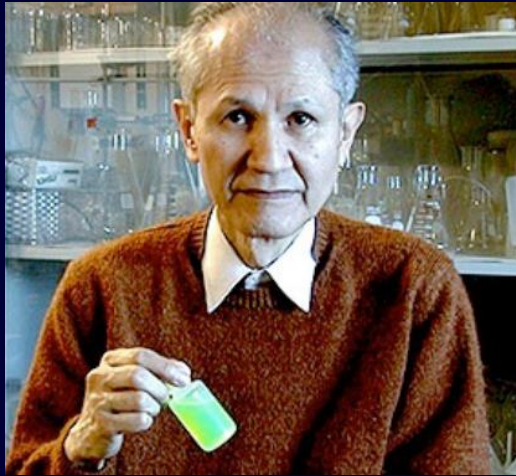
Roger Y. Tsien

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

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

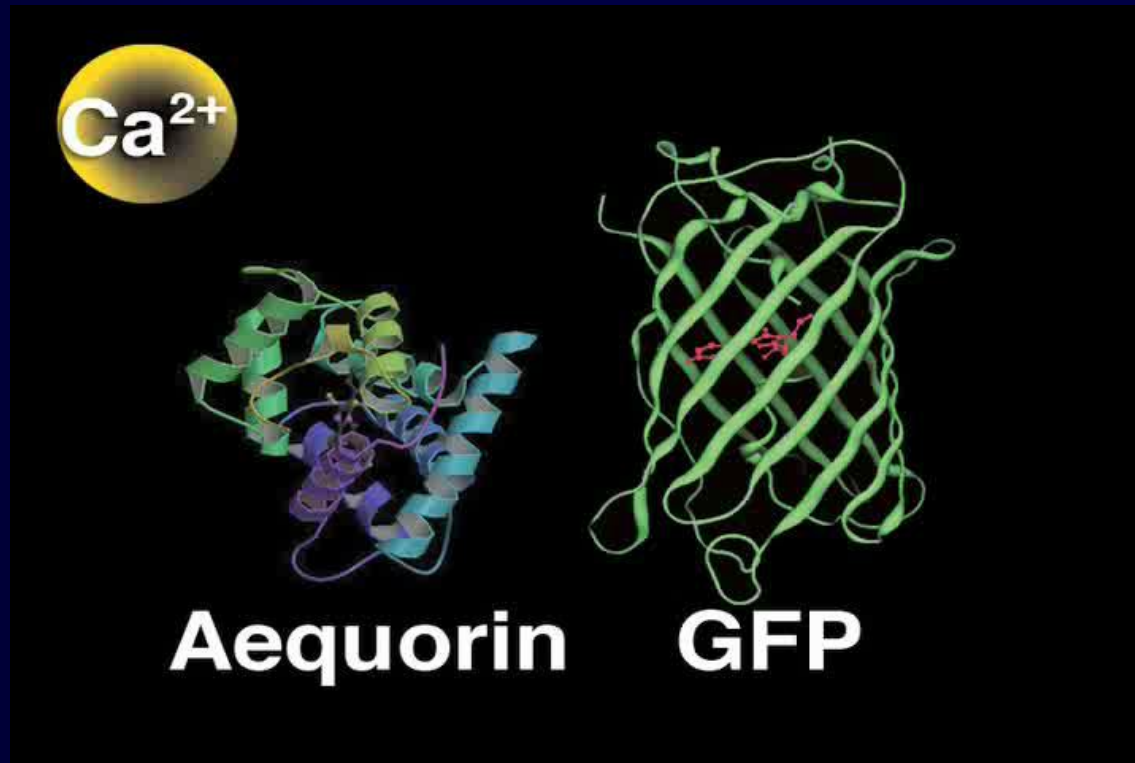
O. Shimomura

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

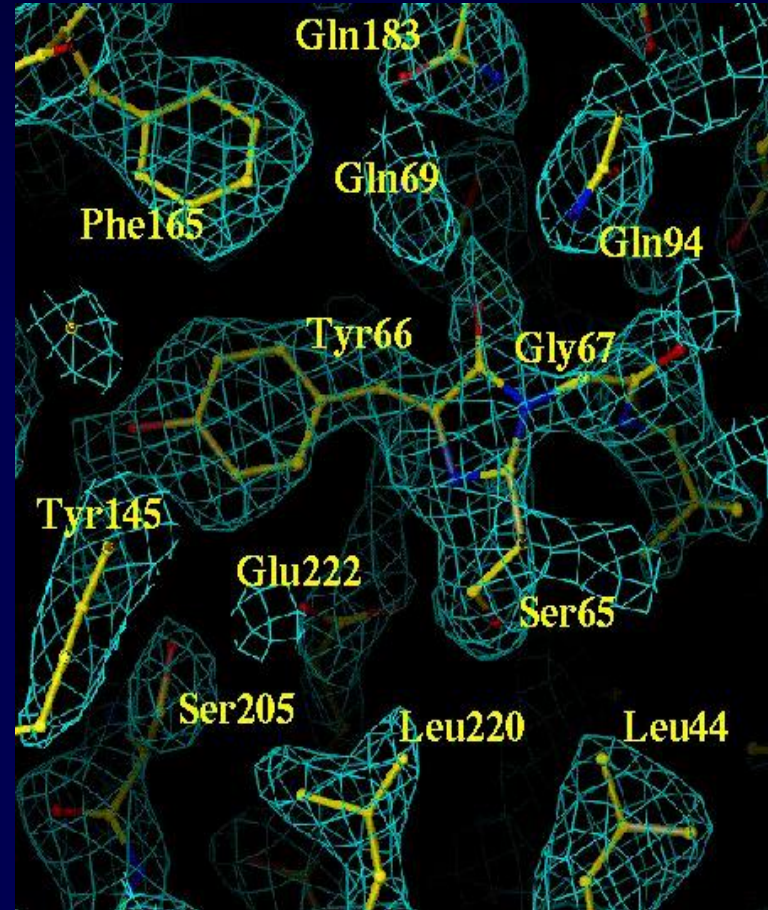
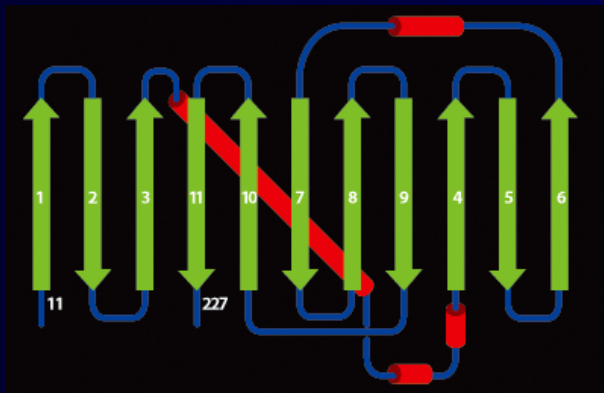
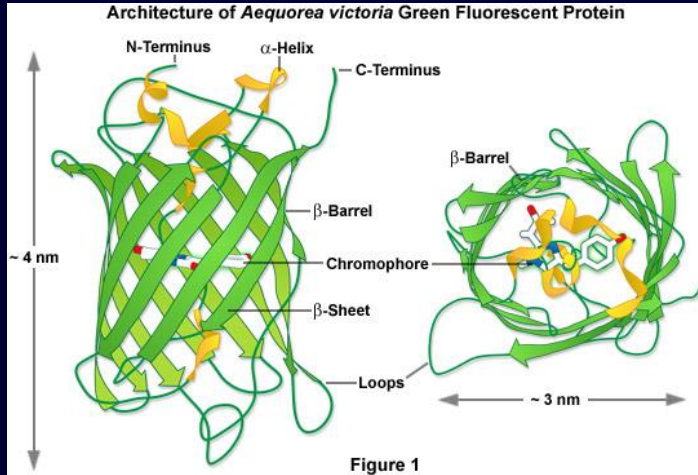


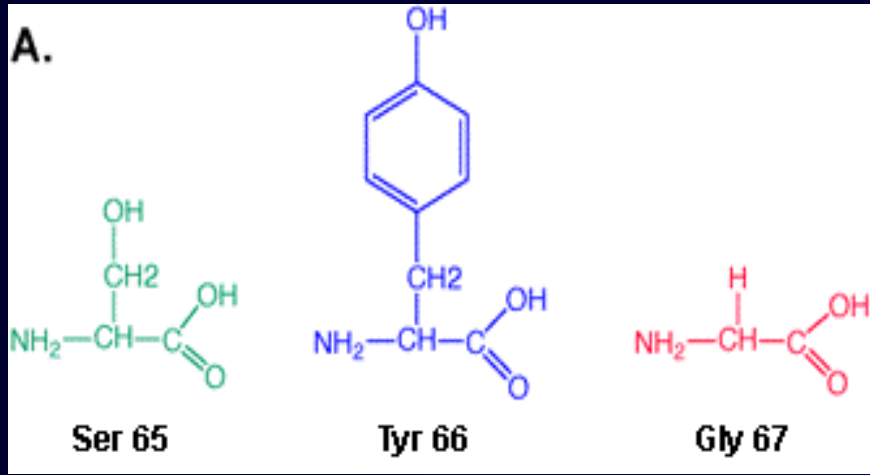
Princip luminiscence *Aequorea victoria*

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

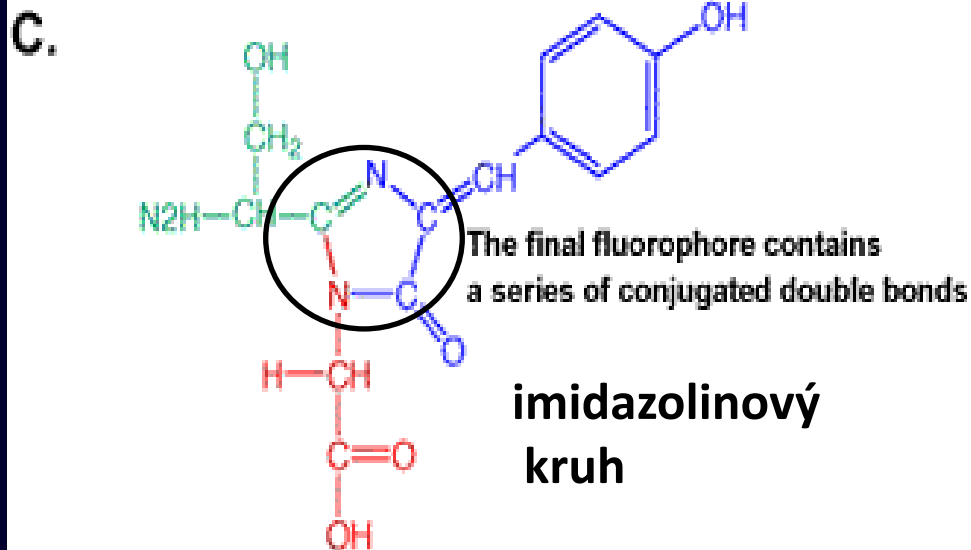
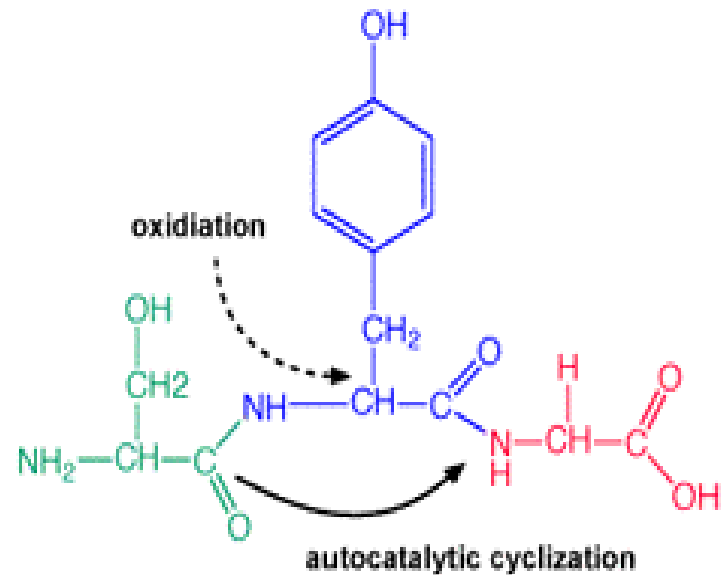


struktura GFP: β -barel (11 antiparalelních řetězců) , uvnitř α -helix s chromoforem, 238 AMK, 27kDa,
aktivní místo: Ser65-Tyr66-Gly67 přestavba a vznik fluoroforu





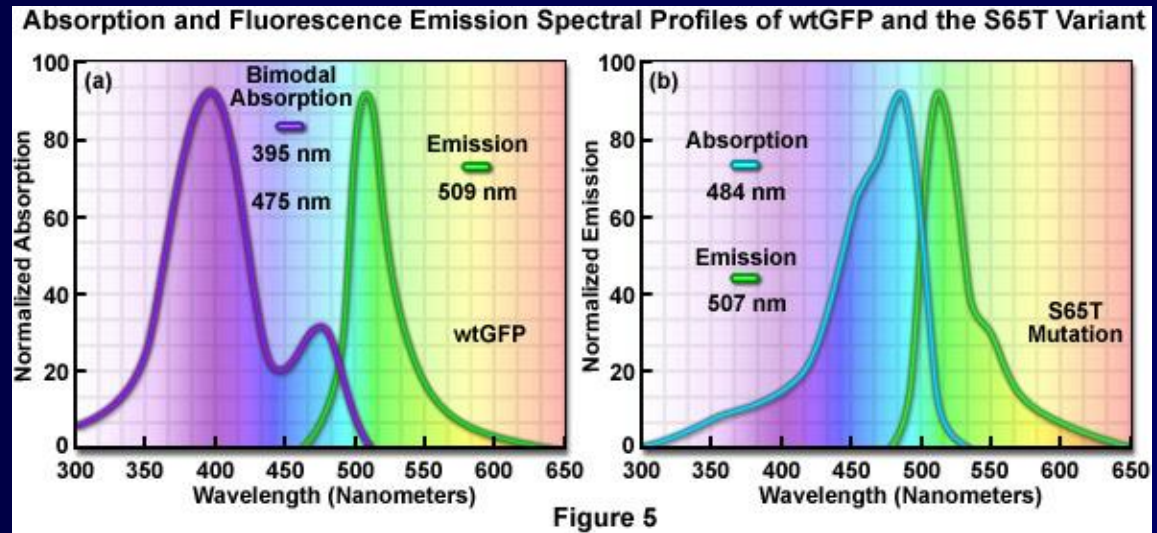
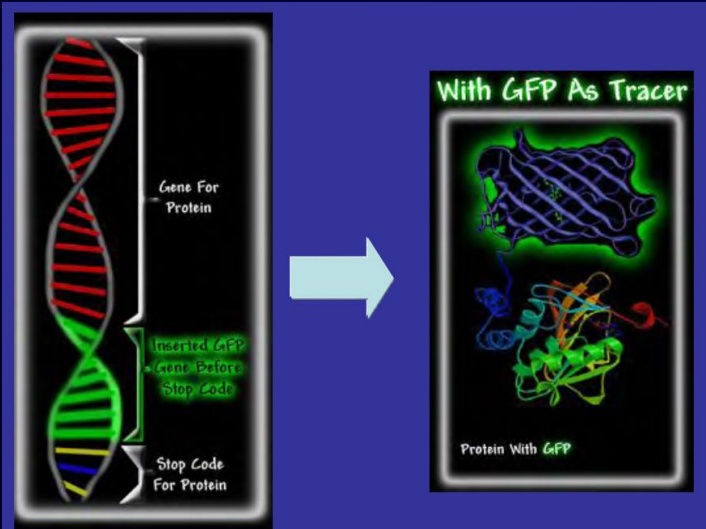
B.



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

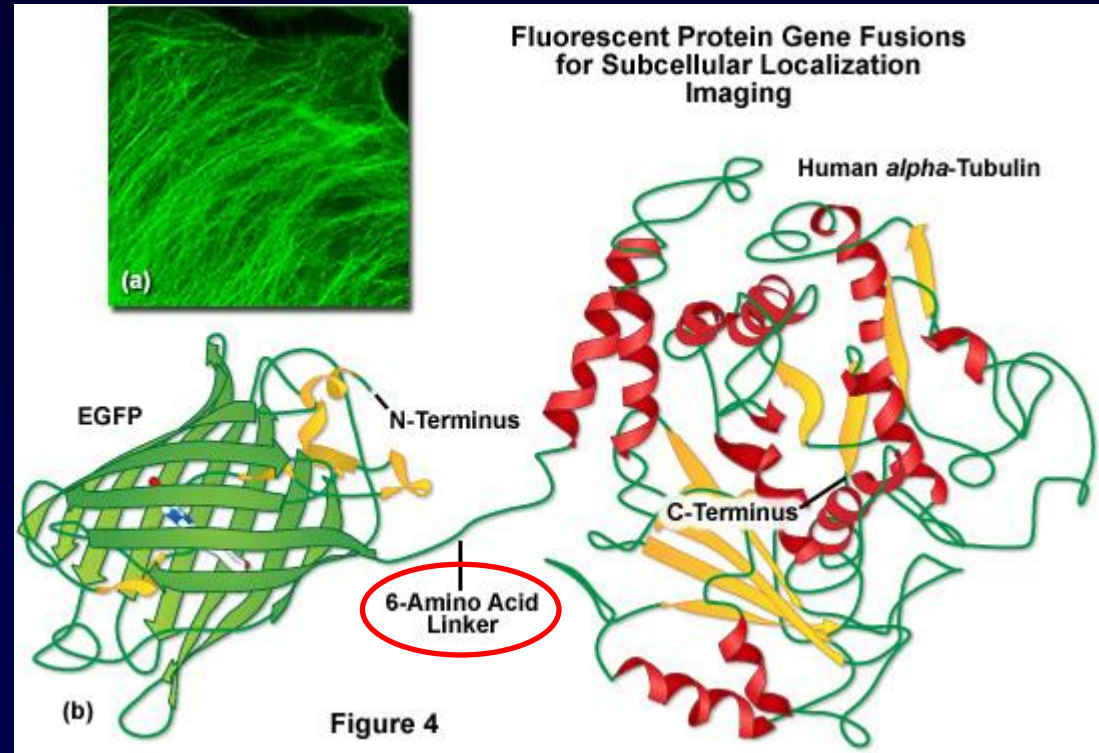
Excitace: 390-470 nm – wtGFP dva píky, emise cca 509 nm
redukována forma – ex. 390 nm
oxidovaná forma – ex. 470 nm

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

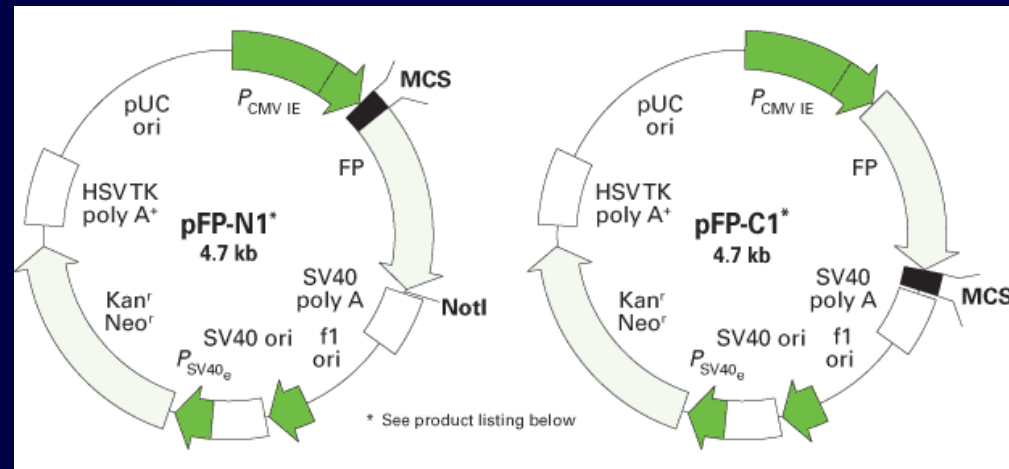


Expres :

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



možnost umístění
fluorescenčního proteinu
v plazmidu



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

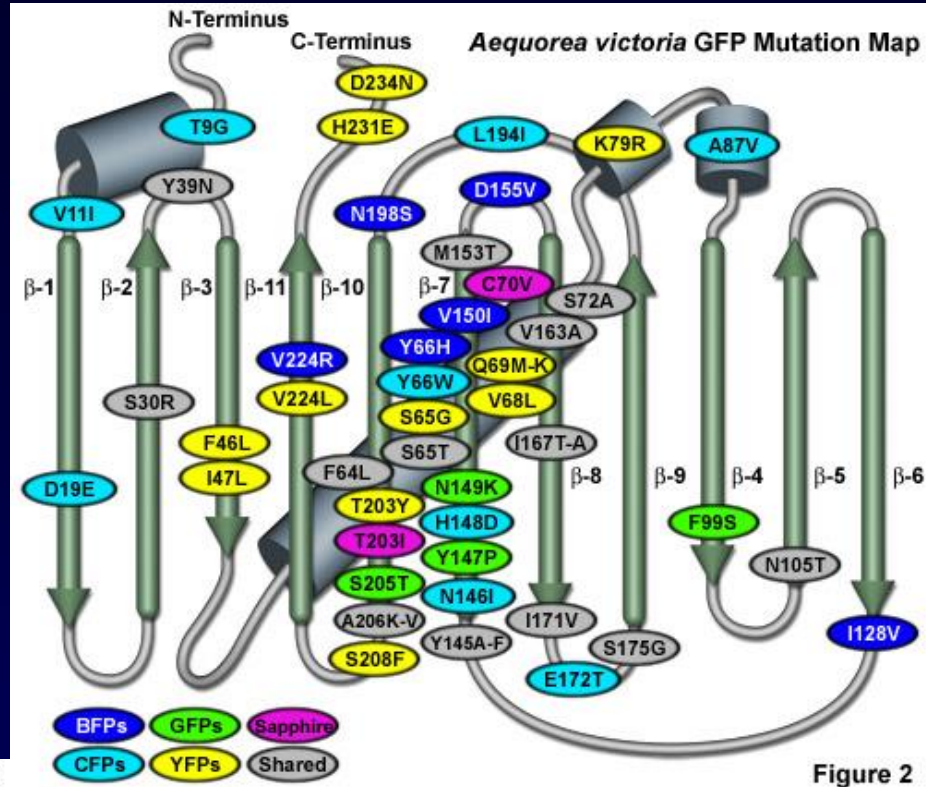


Figure 2

Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants

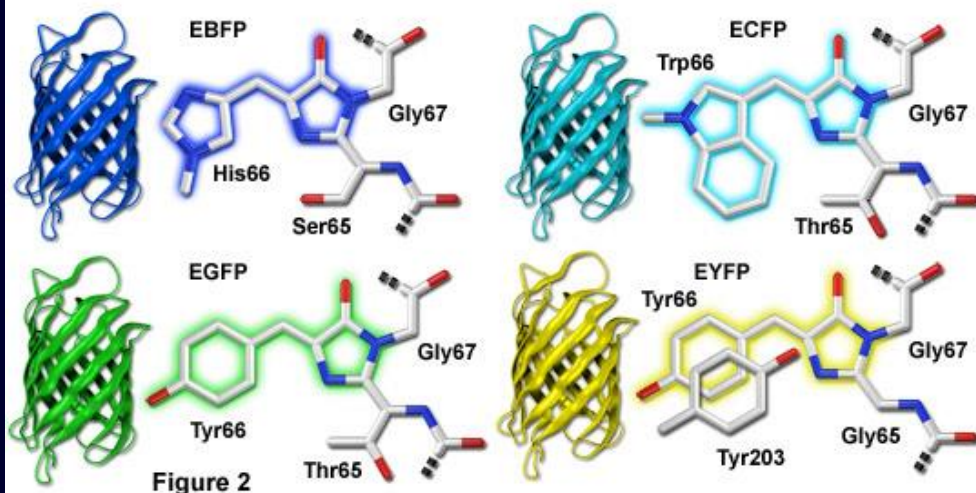


Figure 2

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



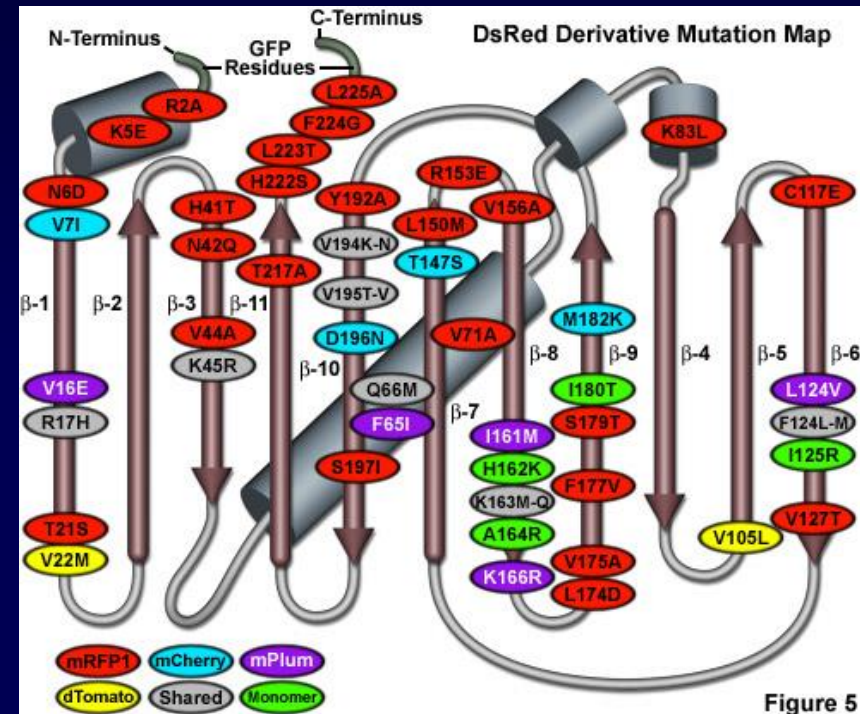
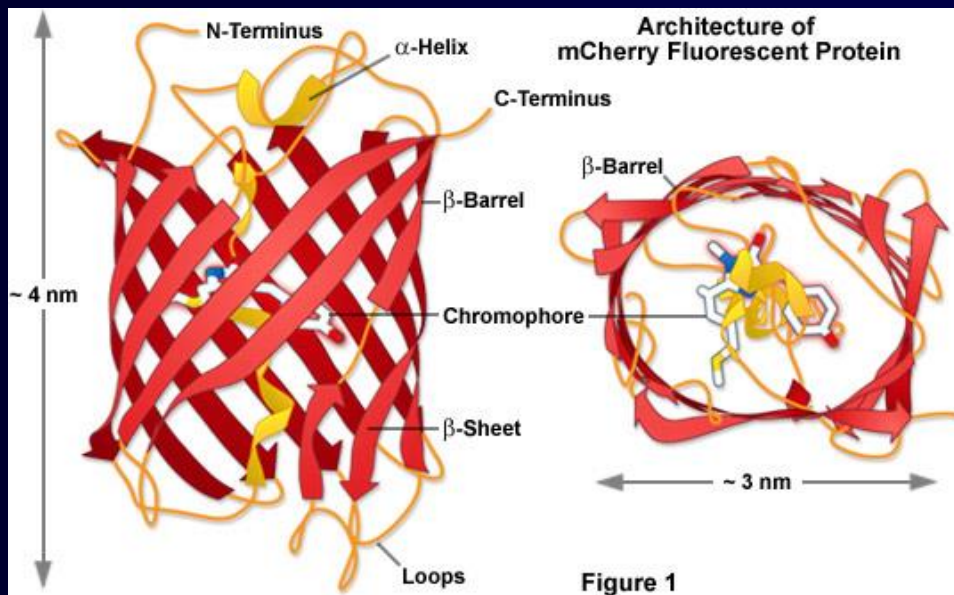
Ds Red fluorescenční protein a jeho deriváty

wt Ds Red: podobná struktura proteinu jako GFP

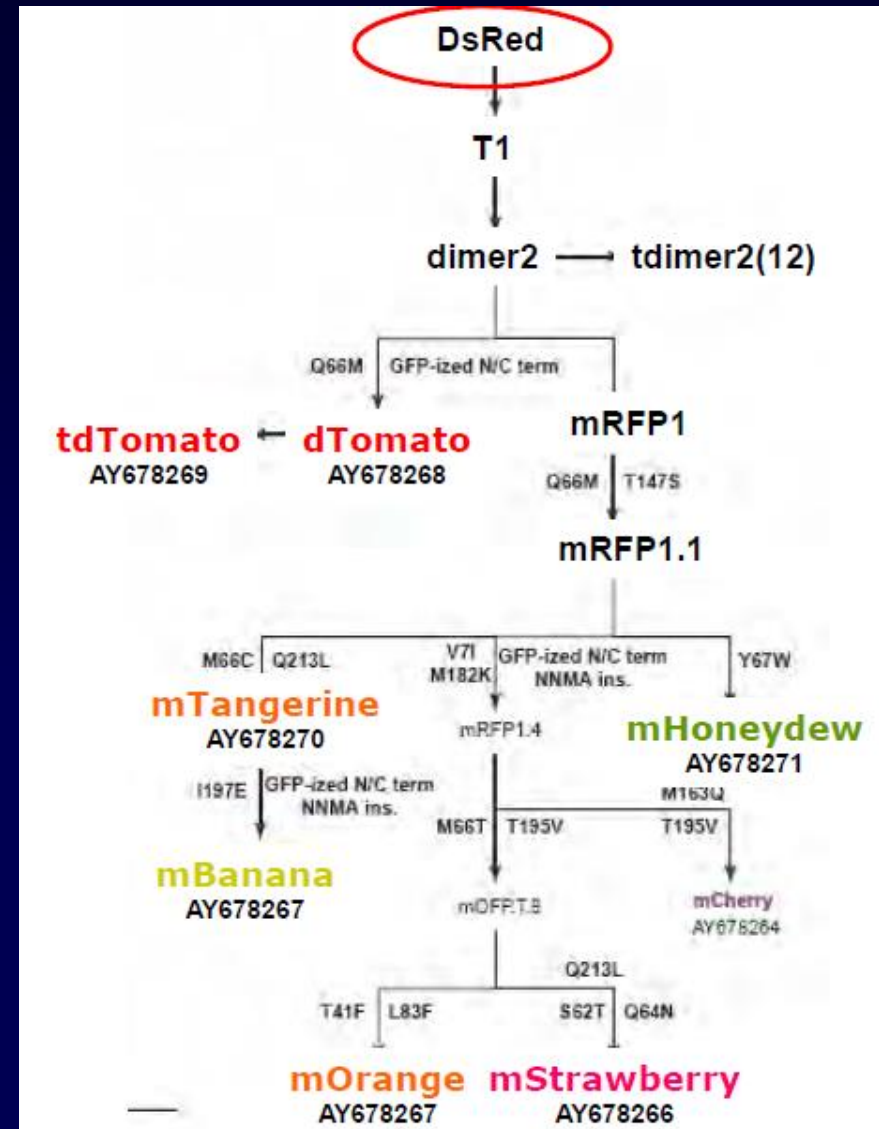
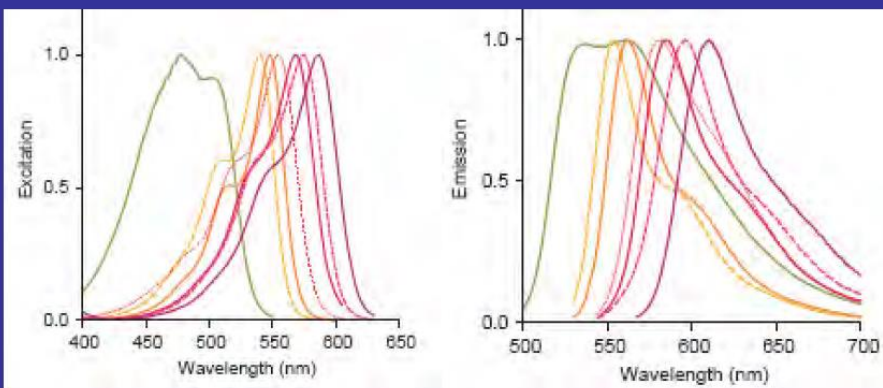
β -barel (11 antiparalelních řetězců) , uvnitř α -helix s chromoforem

excitace: 558 nm

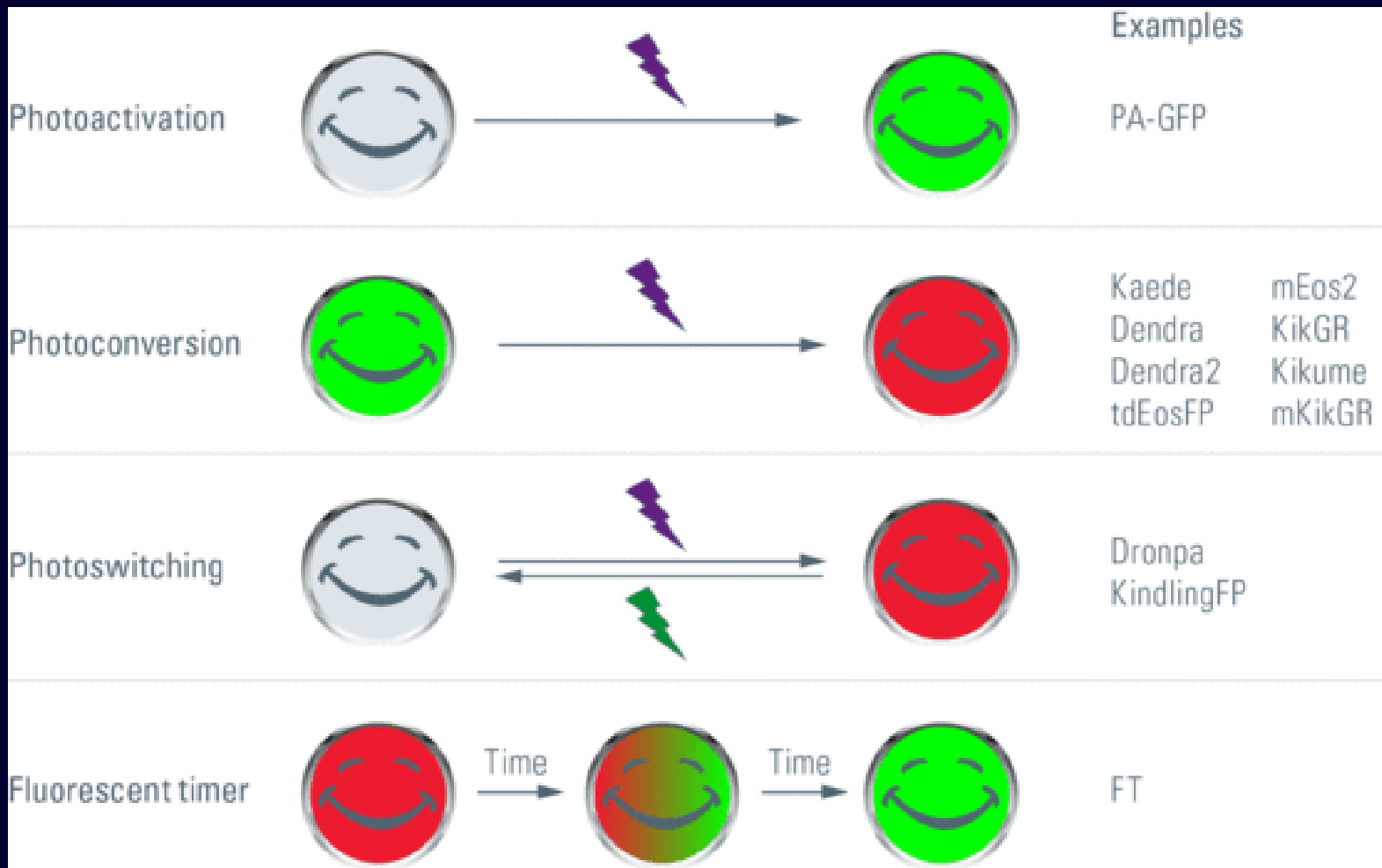
emise: 583 nm



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.

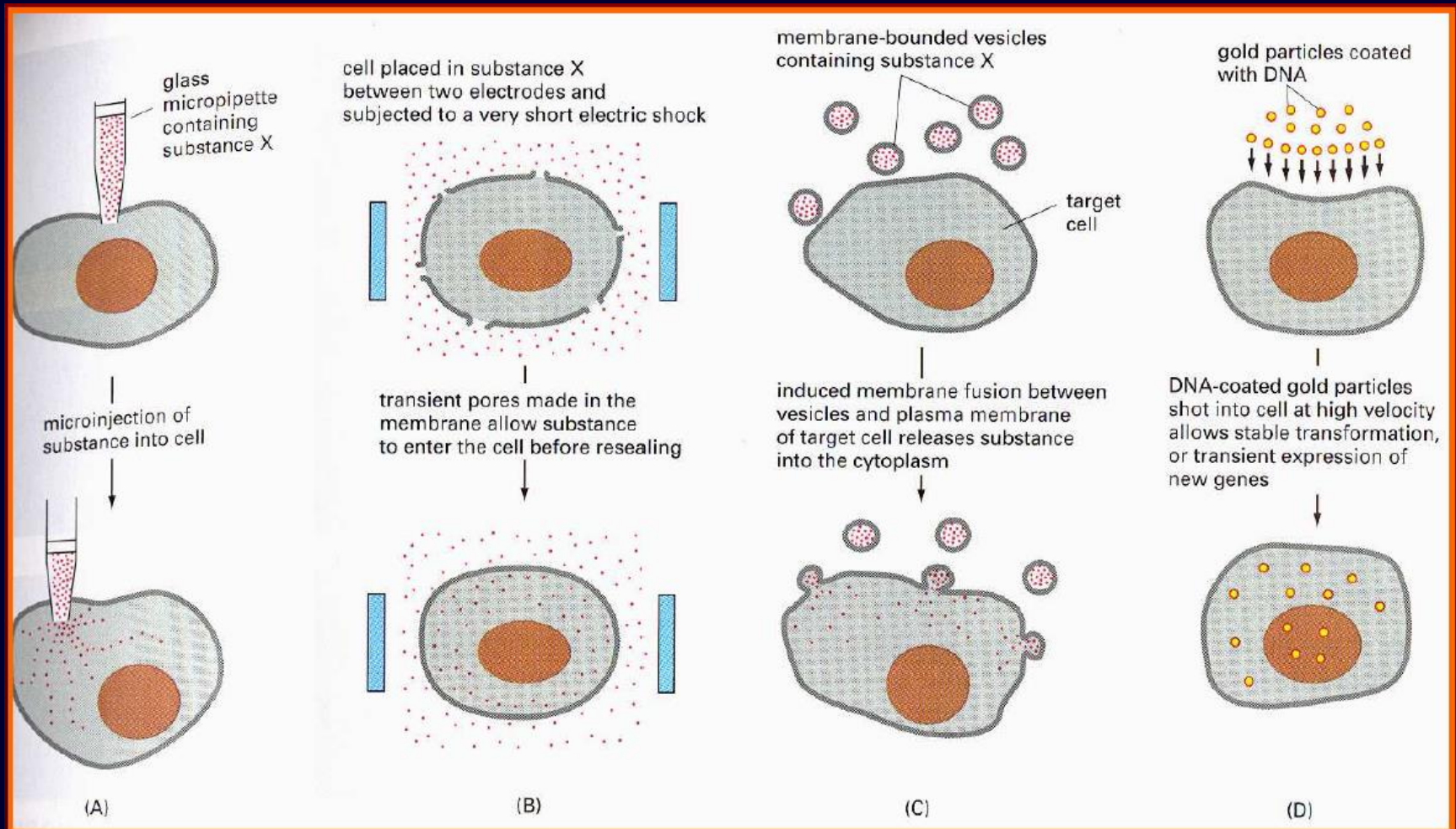
Lipofectaminová transfekce – jednoduchá a nejčastější metoda u živočišných buněk, není toxický, komplex lipidů a DNA fúzuje s plasmatickou membránou, lze i do jádra

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

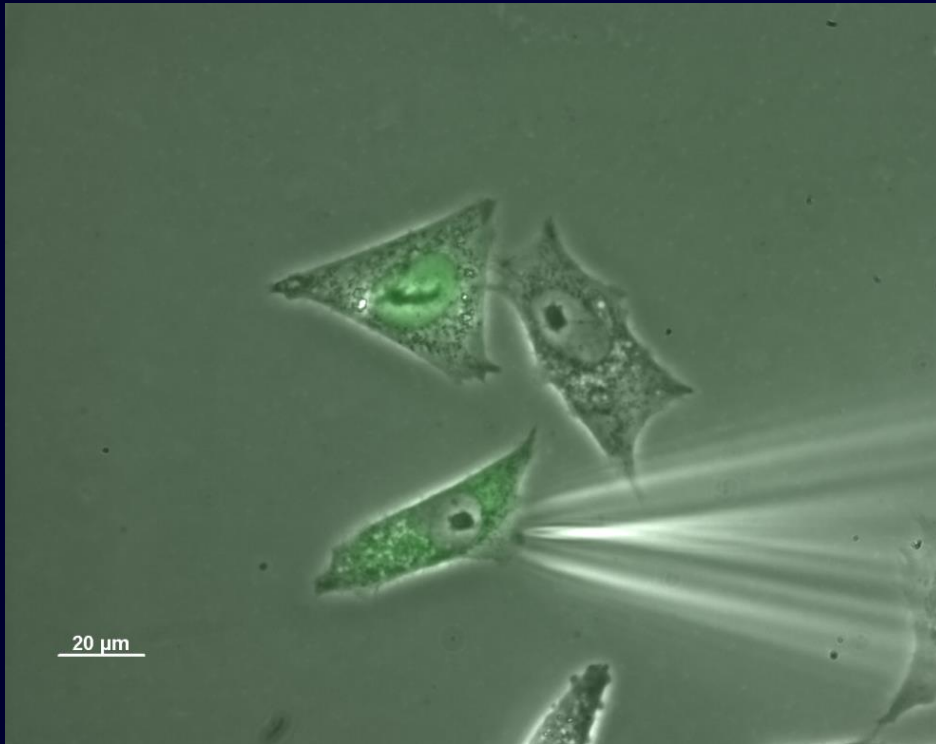
Elektroporace – elektrický puls vyvolá tvorbu pórů v plasmatické membráně, přechod do buňky

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

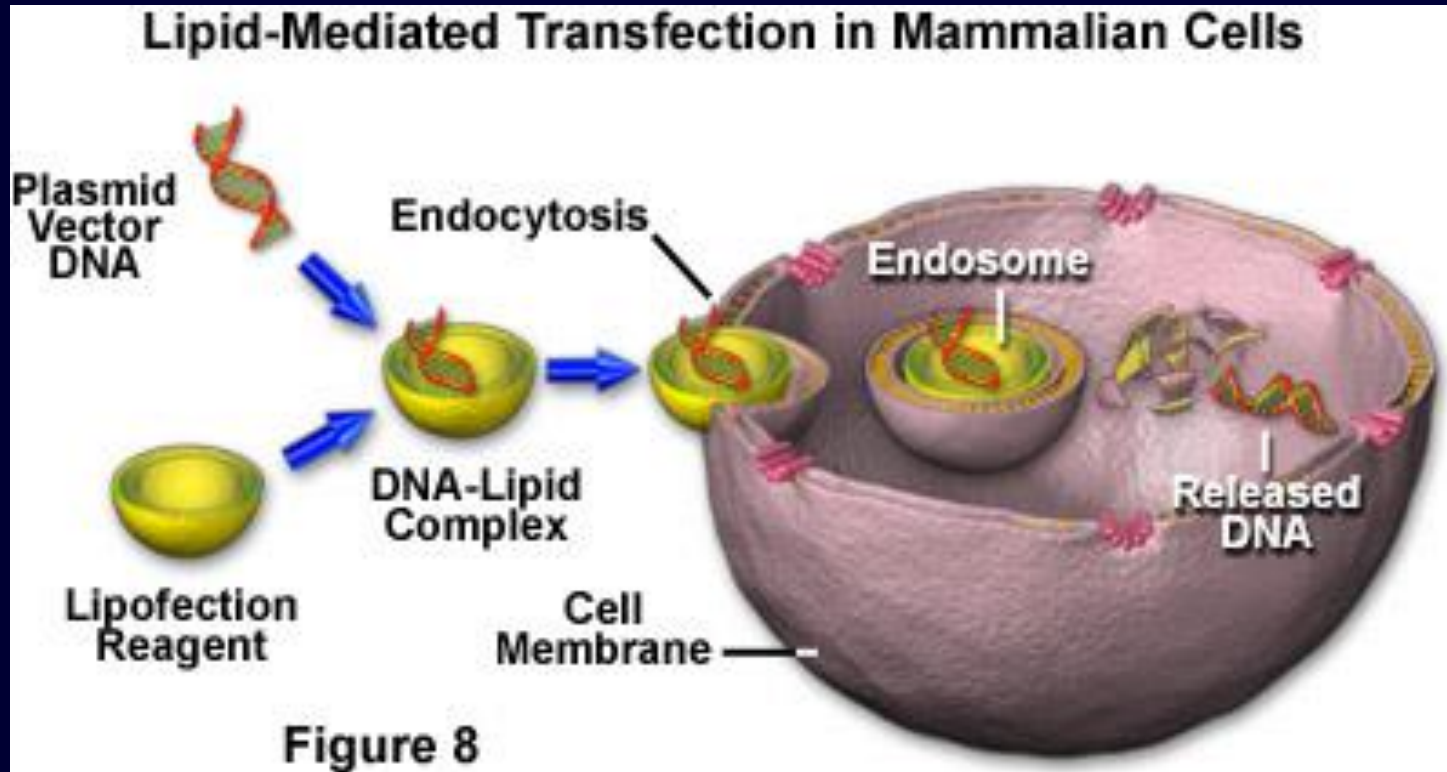
Zavedení fúzního genu do buňky



Mikroinjekce



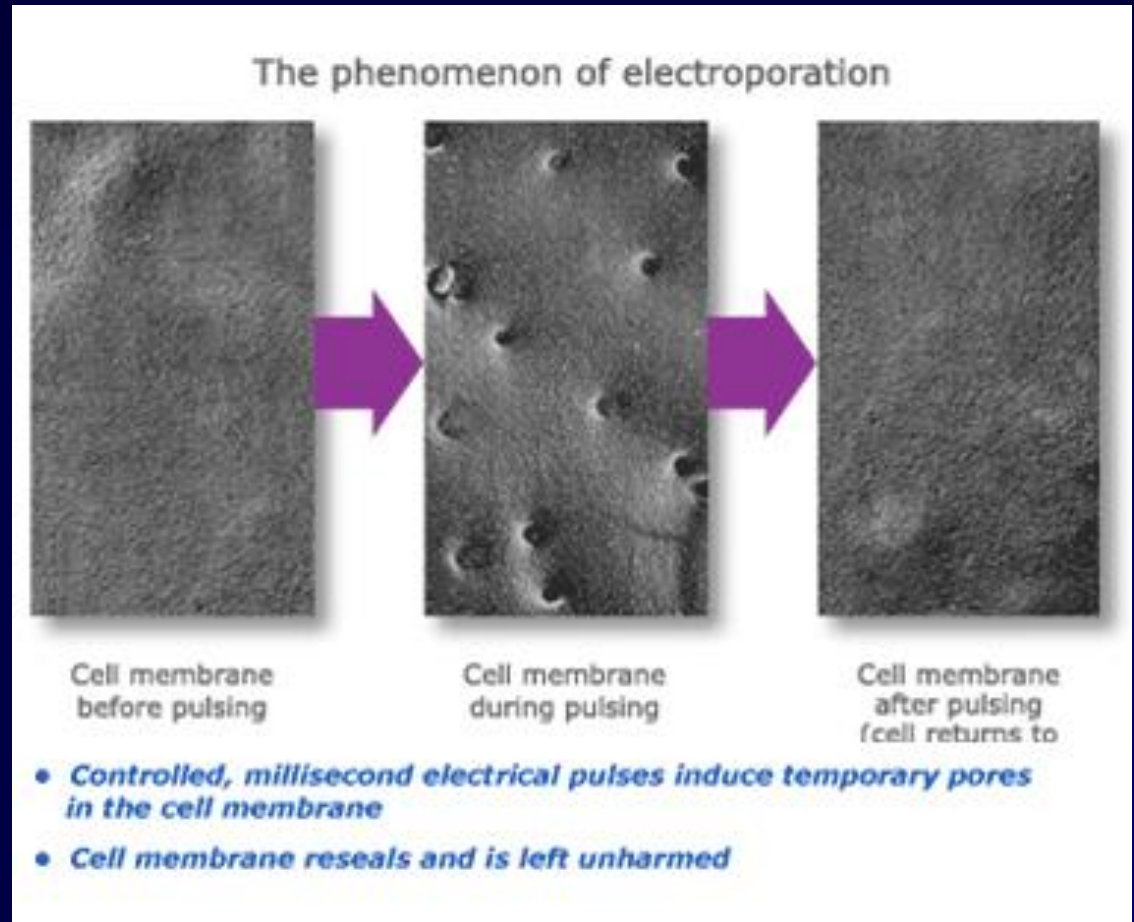
Lipofectaminová transfekce



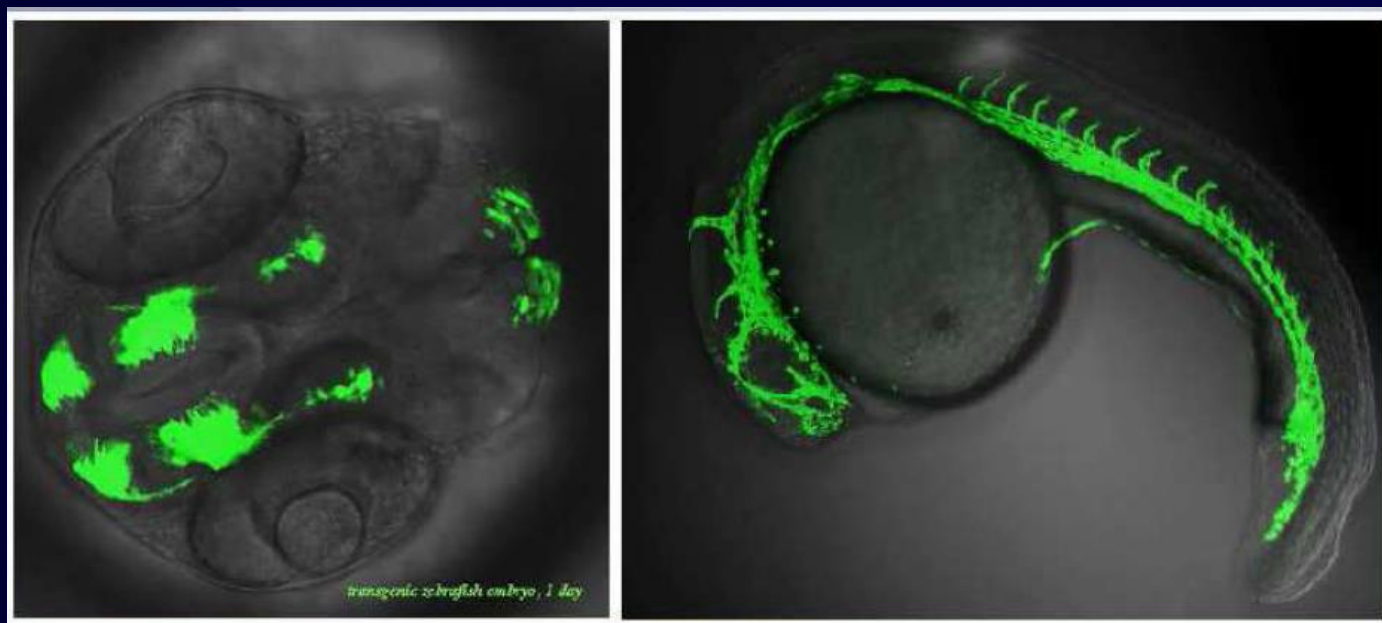
Elektroporace

Cíle:

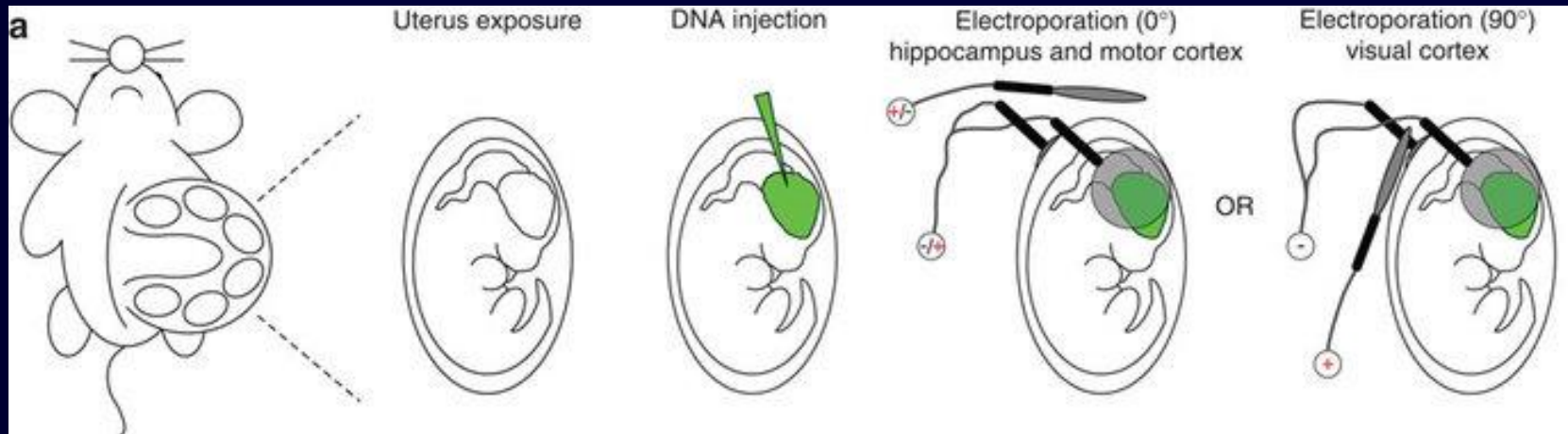
- b. kultura
- tkáně
- orgány
- embryo
- embryo *in utero*



GFP exprese v rybím embryu zebřička (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...

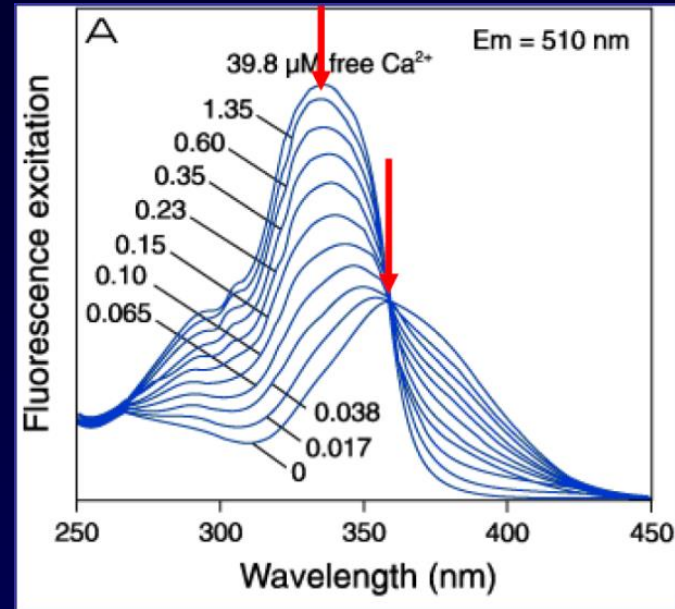
měření:

změna intenzity v závislosti na koncentraci nebo posun emisního spektra

Indikátory Ca^{2+}

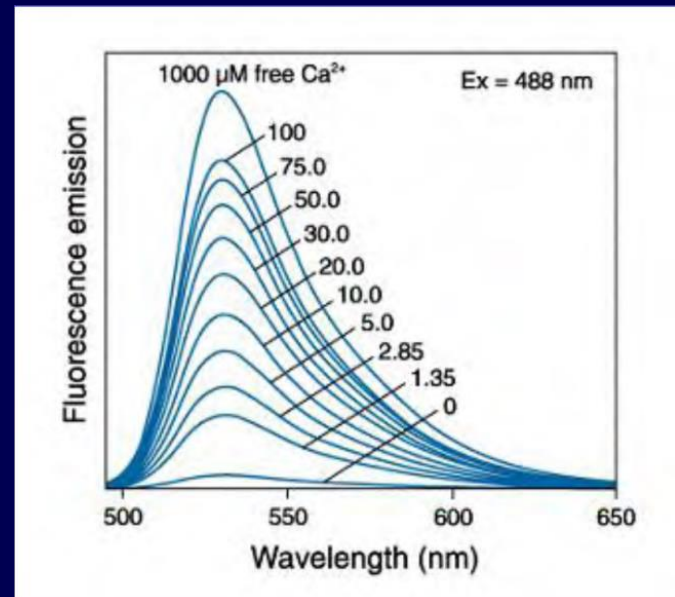
FURA-2

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



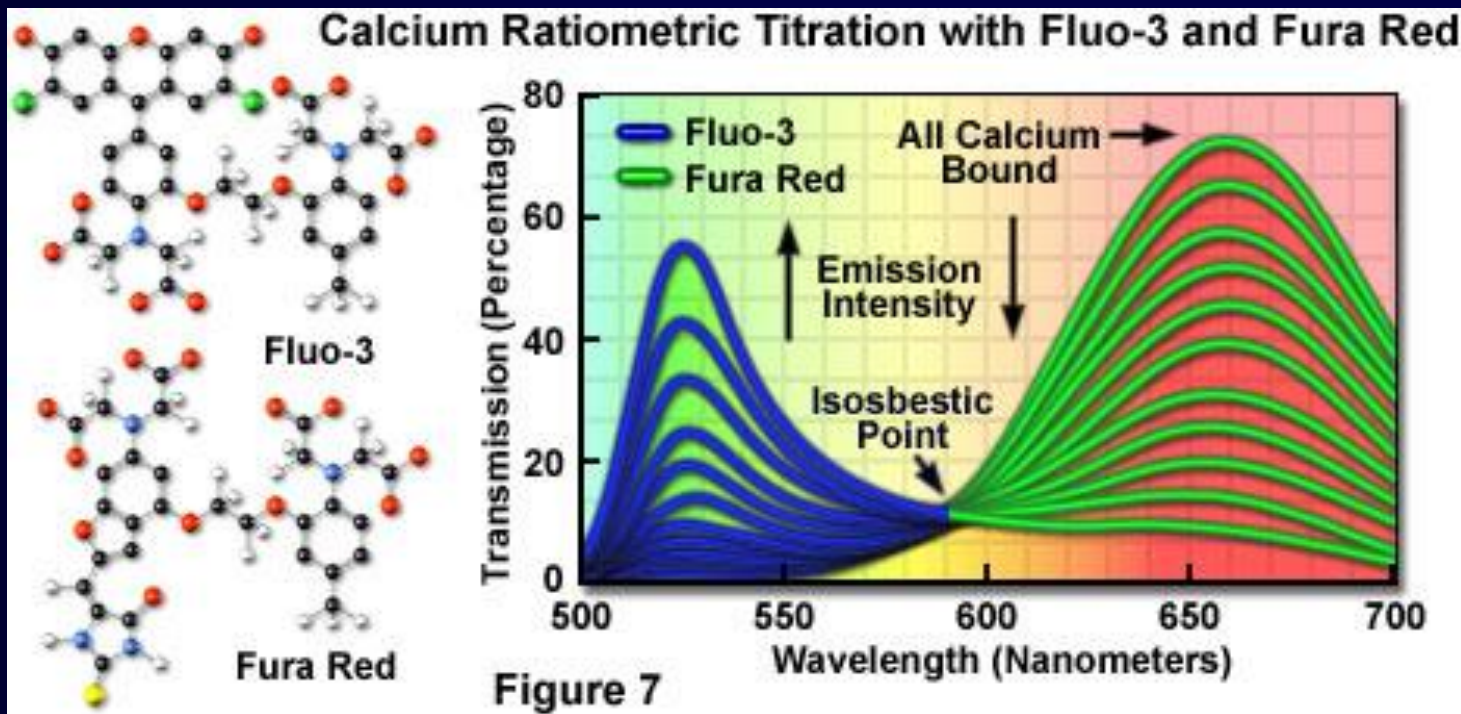
CalciumGreen-5N

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)

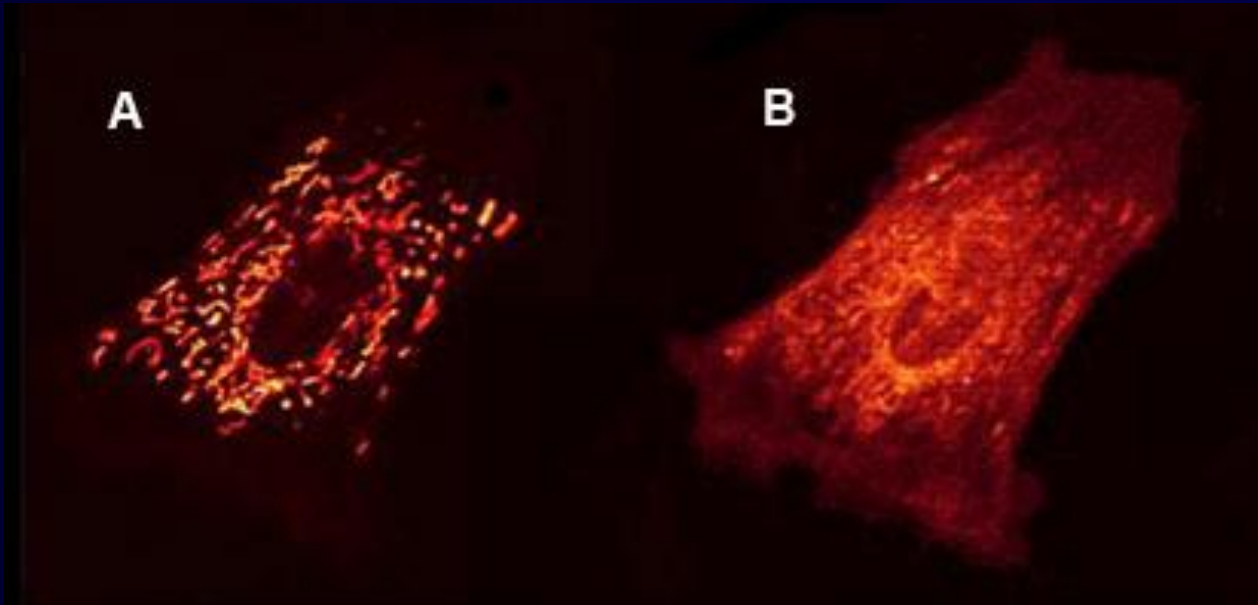
- schopnost průniku přes pl. membránu bez poškození
- navázání na cílovou organelu

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

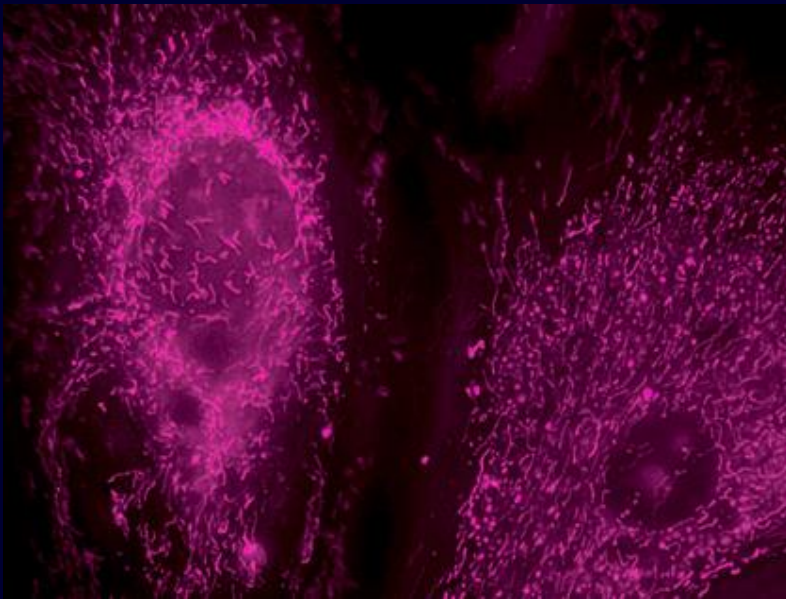
rozdělení: na stálé a nestálé

Mitochondrie

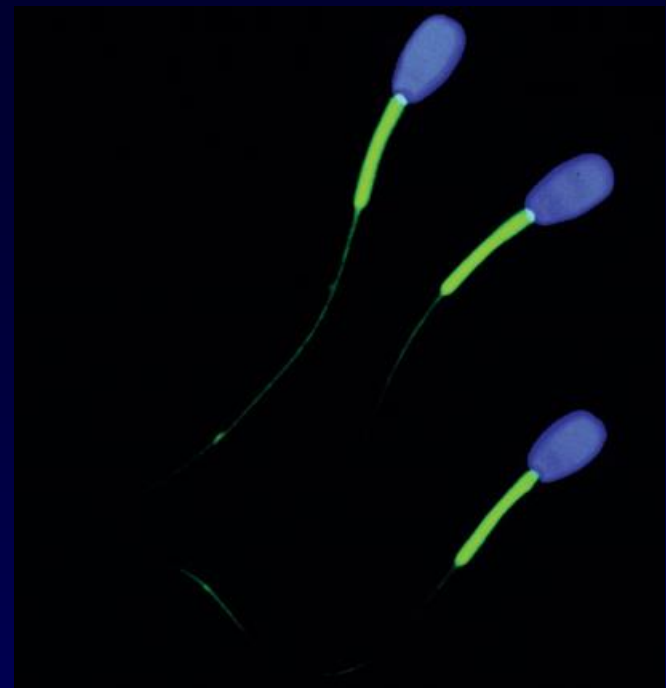
- studium buněčné respirace dříve **Rhodamin 123** (po fixáži slábne)
- nyní **MitoTracker, Mito Fluor** (lze fixovat)
- **JC-1** indikátor membránového potenciálu - v aktivních mitochondriích mění emisi ze zelené na červenou



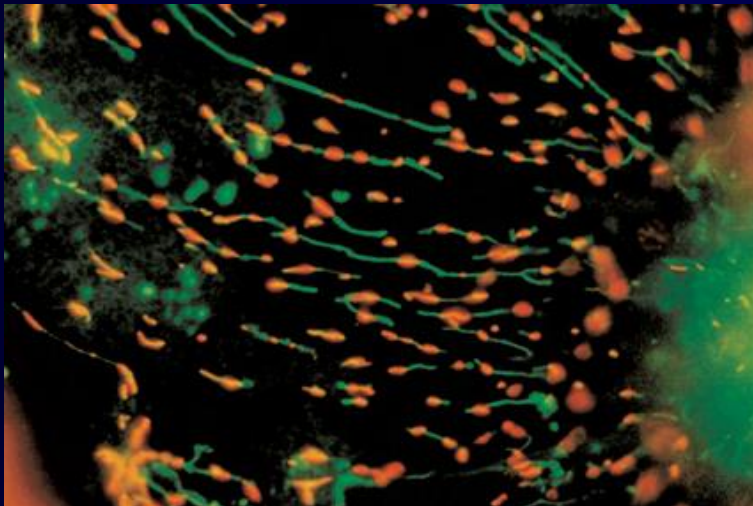
Neonatální kardiomyocyty : rhodamin123, (A) kontrola, (B) ovlivněno mitochondriálním uncouplerem



mitochondrie – bovinní endotel :
MitoTracker® Deep Red FM dye



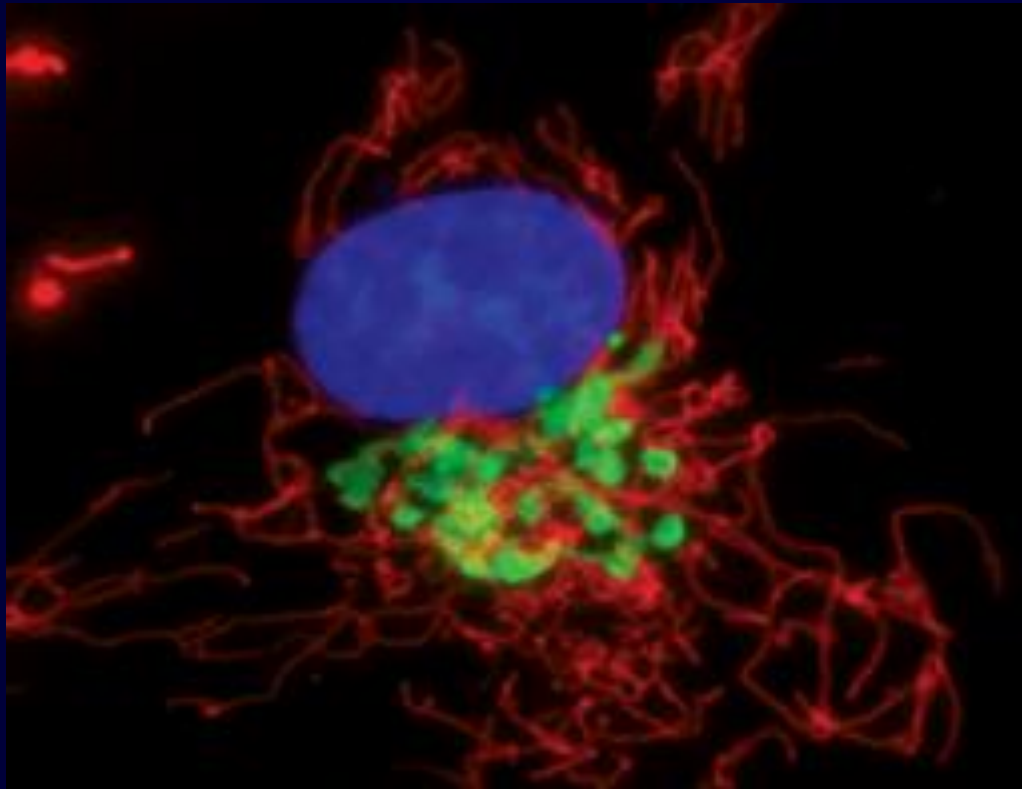
mitochondrie/DNA - býčí spermie:
MitoTracker® Green FM
Hoechst 33342



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

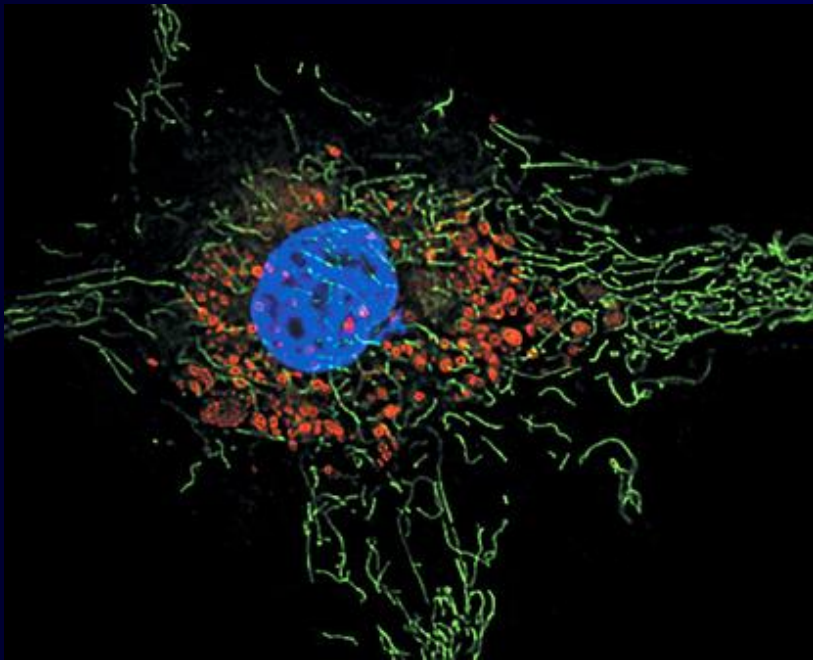
- prostupují přes membránu, selektivní pro ER, dříve DiOC₆, - není tak specifický, vykazuje fotodynamickou toxicitu
- nyní ER-Tracker + Blue-White, Red, Green - menší toxicita, lze i fixovat



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
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:

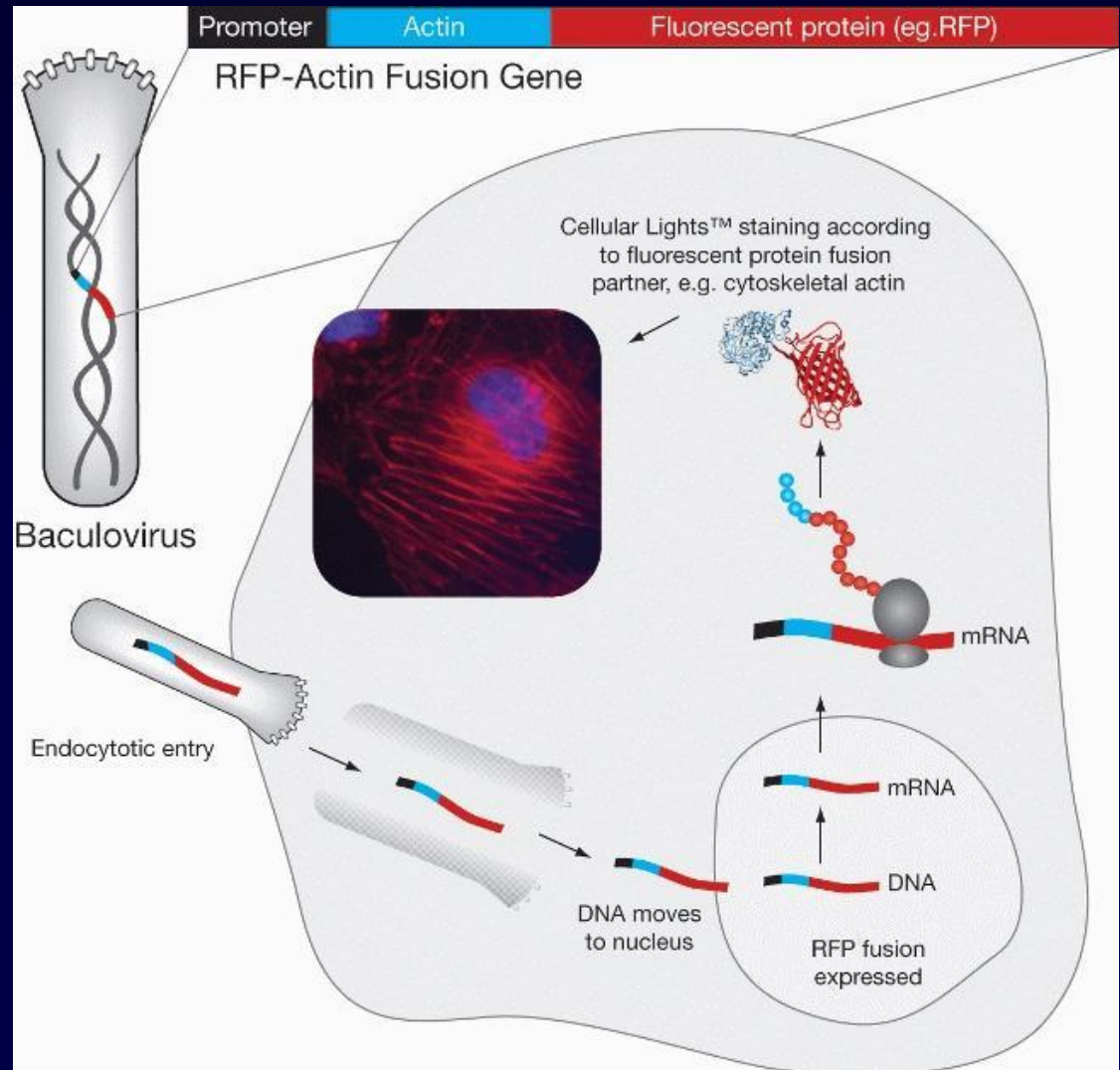
- 1) savčí promotor: zaručuje expresi v savčích buňkách
- 2) funkční část: protein nebo peptid cílený na strukturu (cytoskelet, organely aj.) nebo funkci (buněčný cyklus, autofagie, tok Ca^{2+})
- 3) fluorescenční protein: CFP, GFP, RFP; na C- nebo N- konci peptidu

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



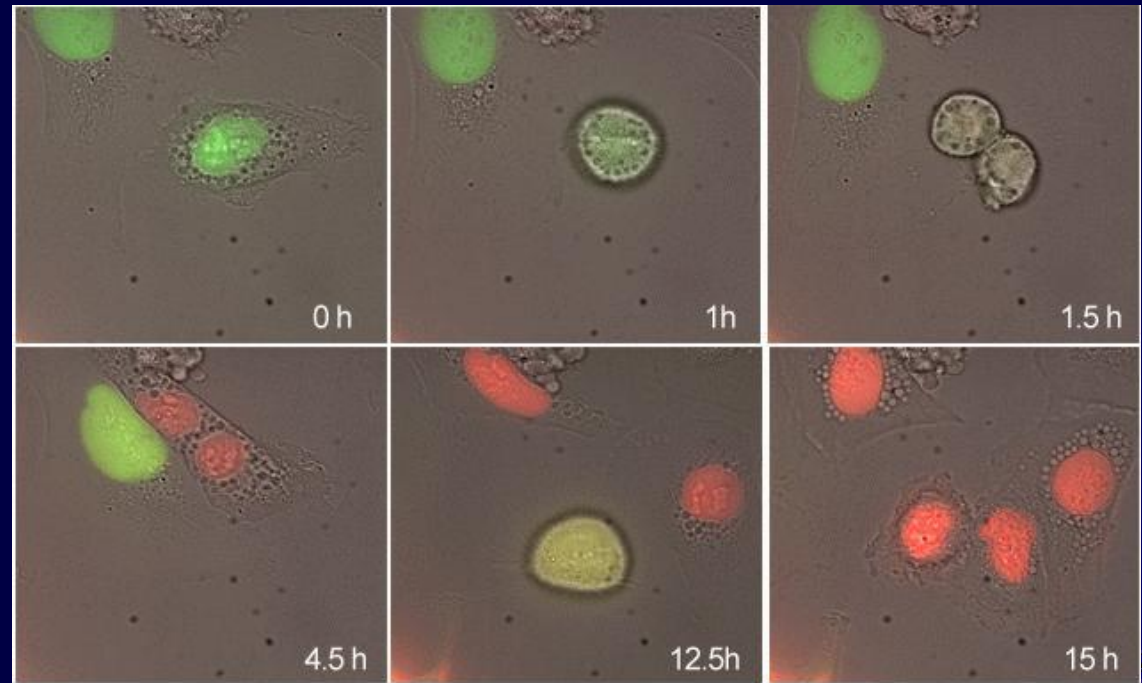
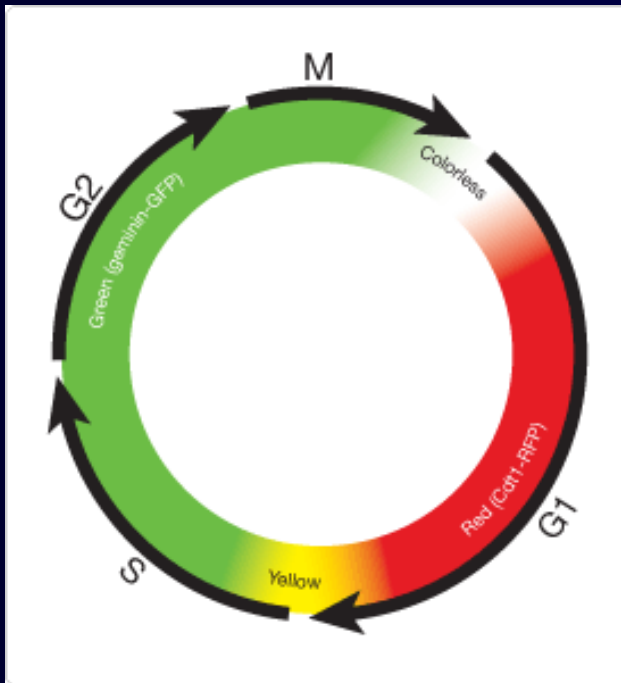
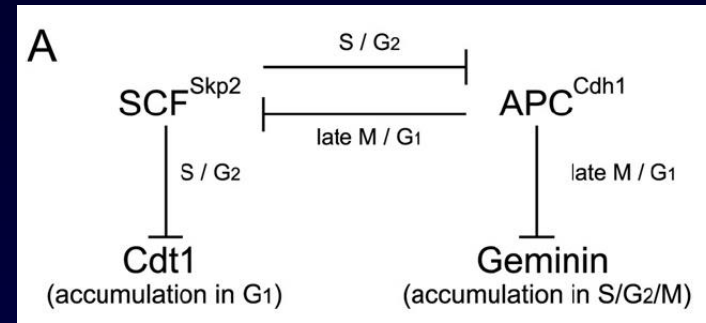
Princip metody

- 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):487-98.

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)

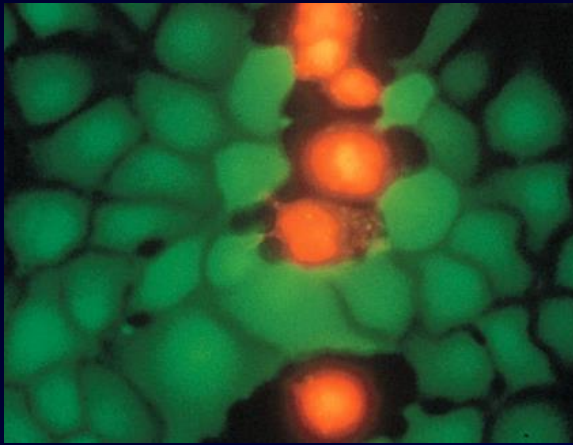
2. sondy pro nukleové kyseliny

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

Ize společně kombinovat



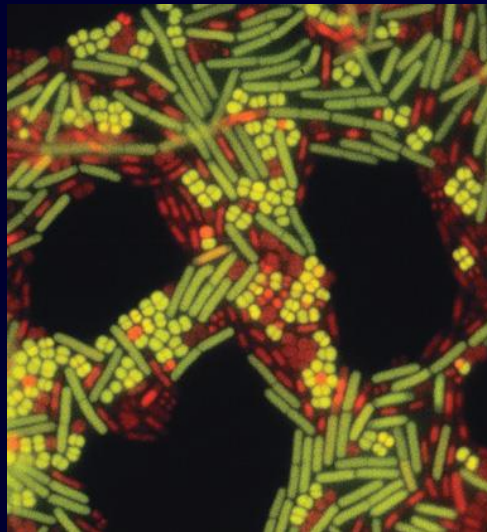
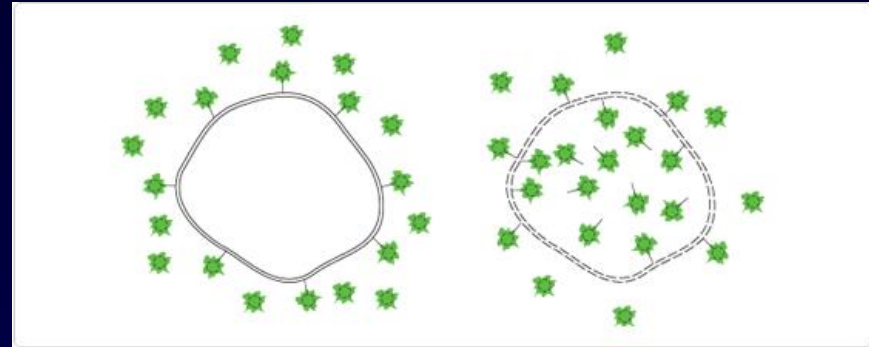
Princip obarvení mrtvých buněk membránu neprostupující DNA sondou



linie krysích buněk:

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

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

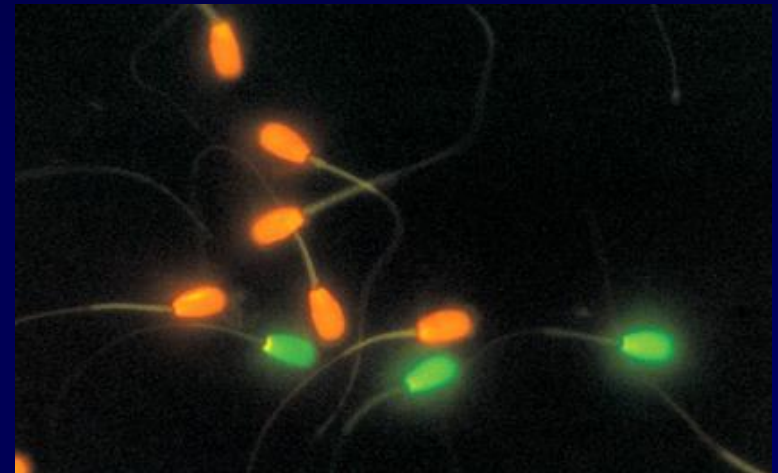


Micrococcus luteus

a *Bacillus cereus*:

živé: zelené

mrtvé: červené

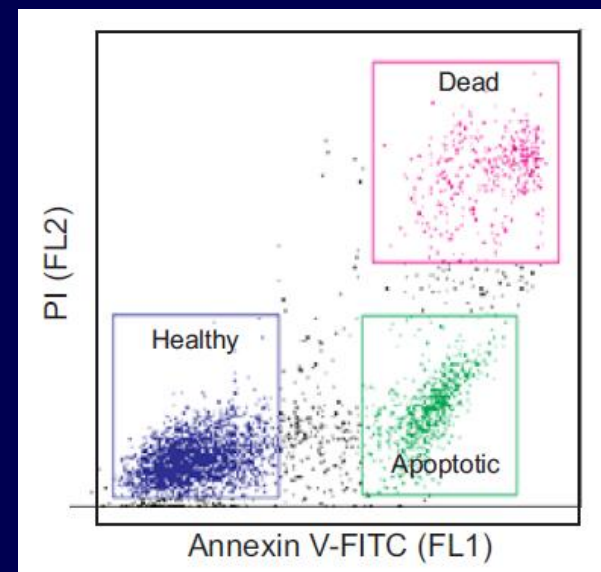
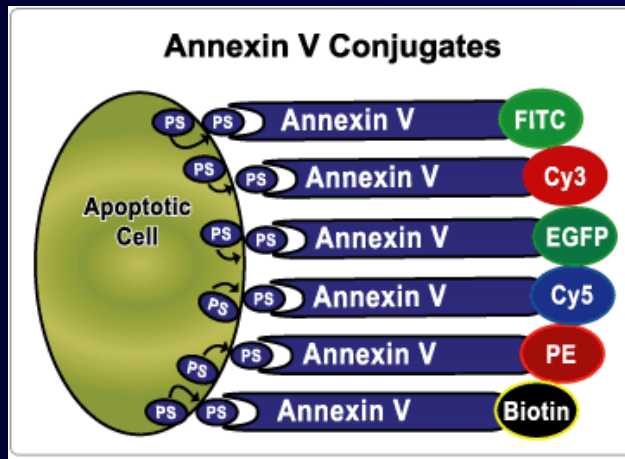
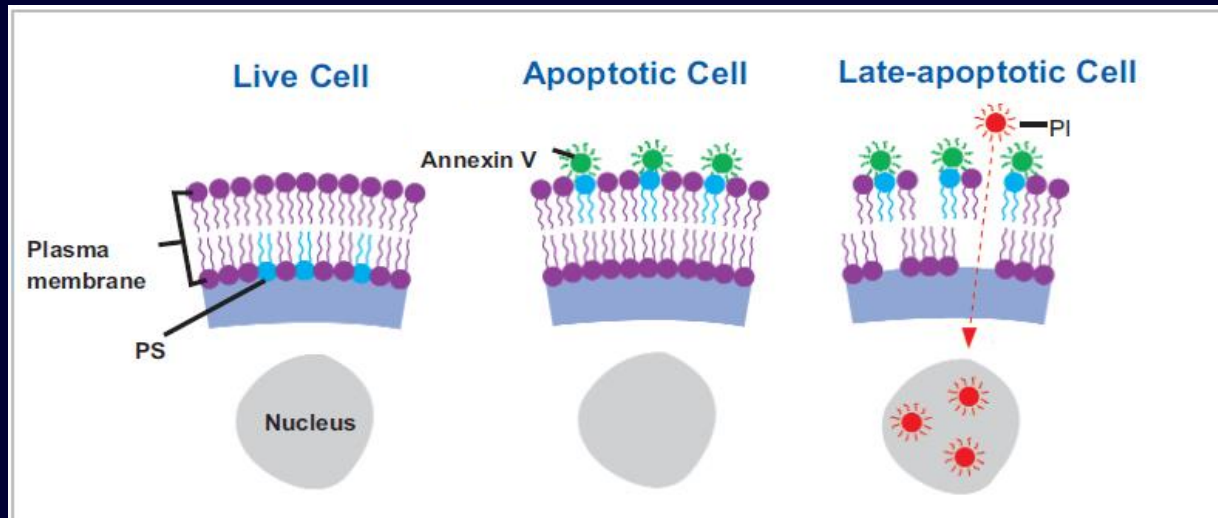


býčí spermie :

živé : **SYBR® 14** → zelené

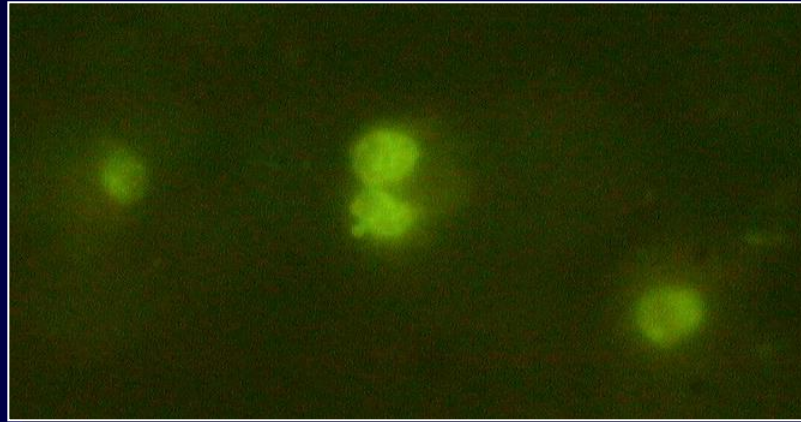
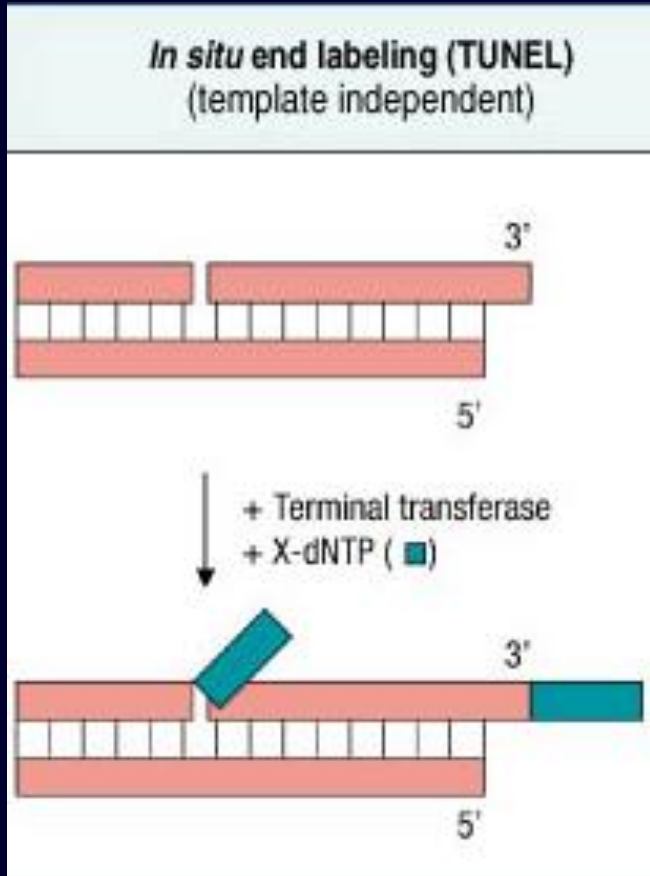
mrtvé: **propidium iodide** → červené

Annexin V + PI: detekce buněčné smrti

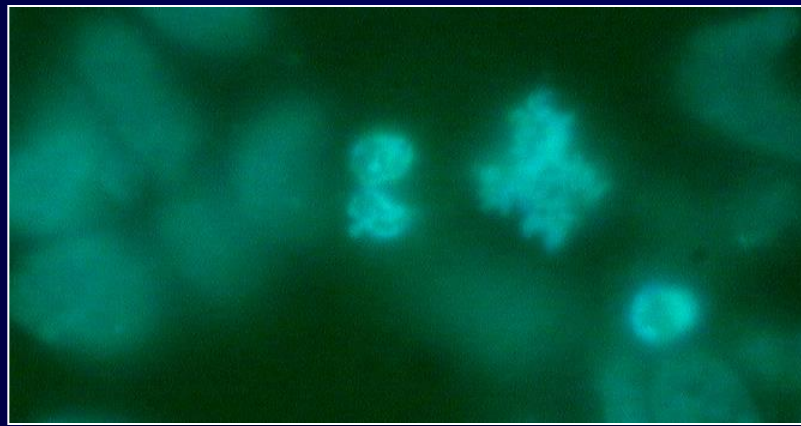


TUNEL: Detekce štěpení DNA v apoptóze

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling



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

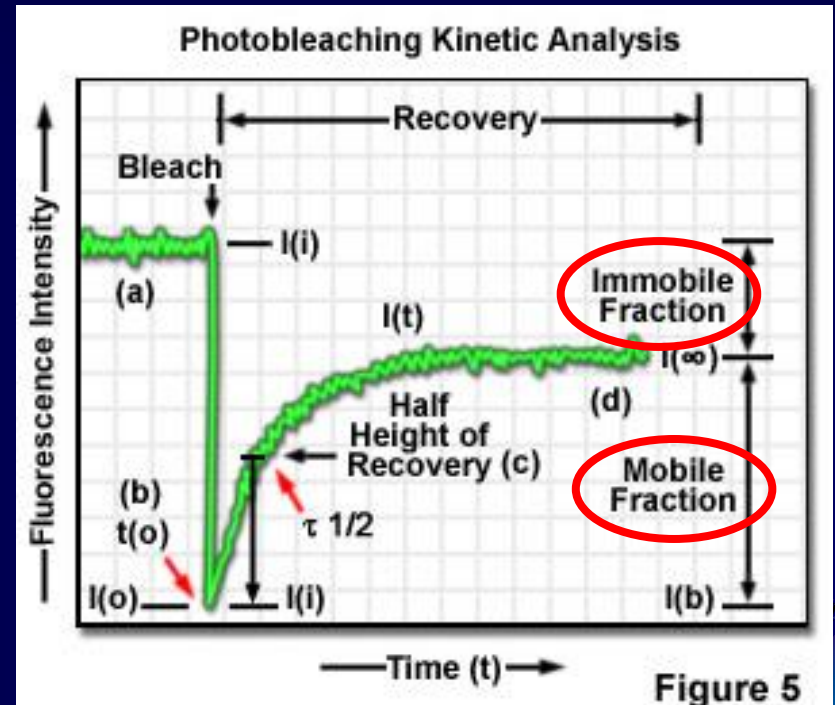
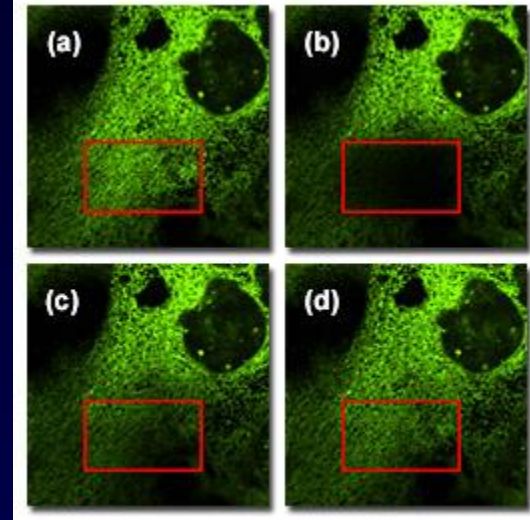
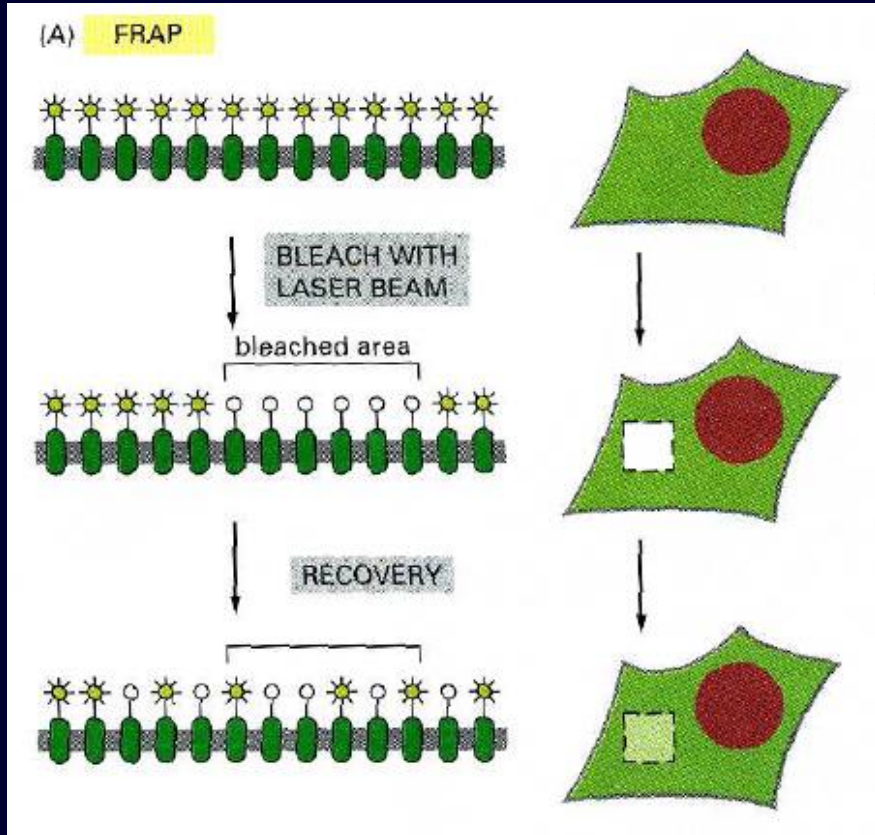
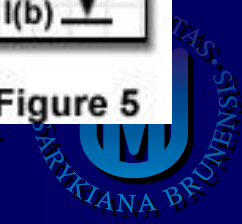
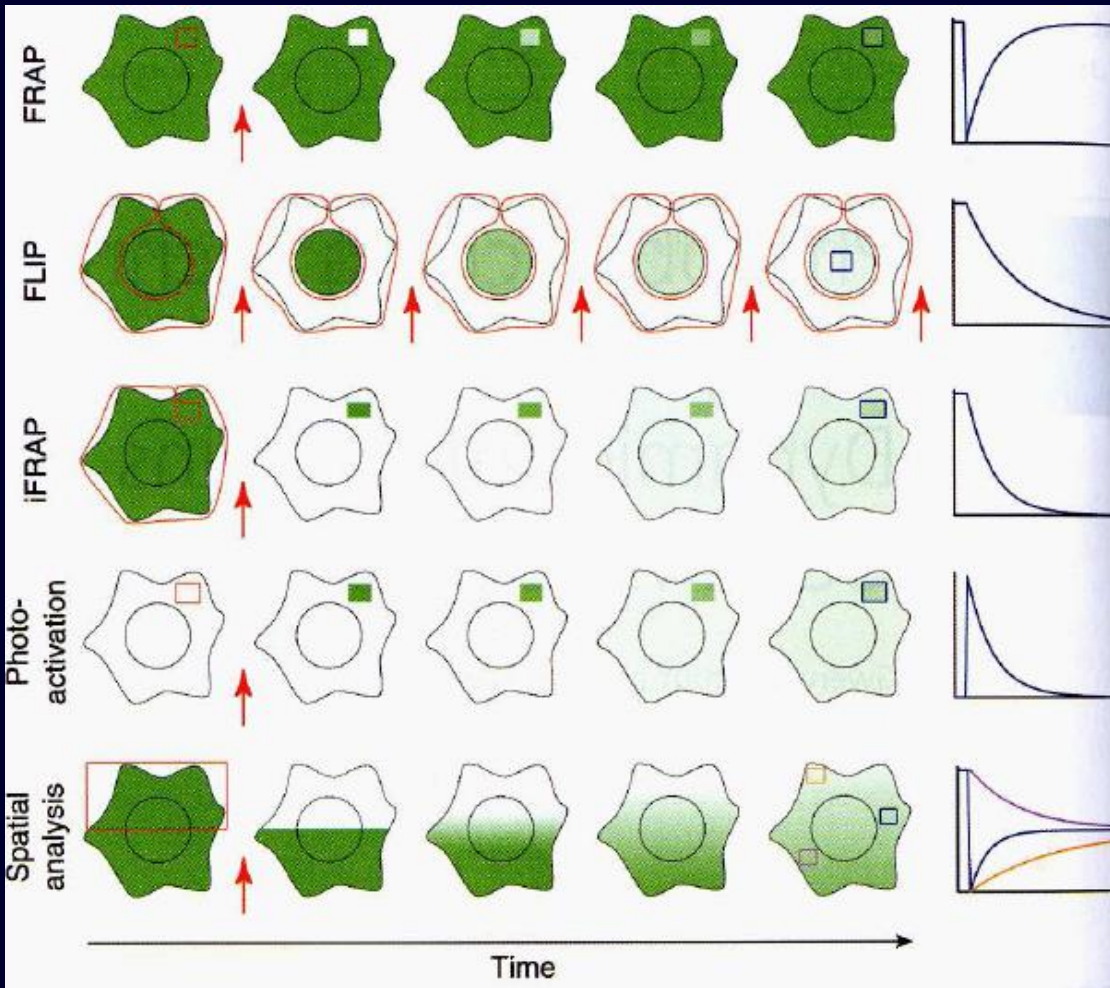


Figure 5



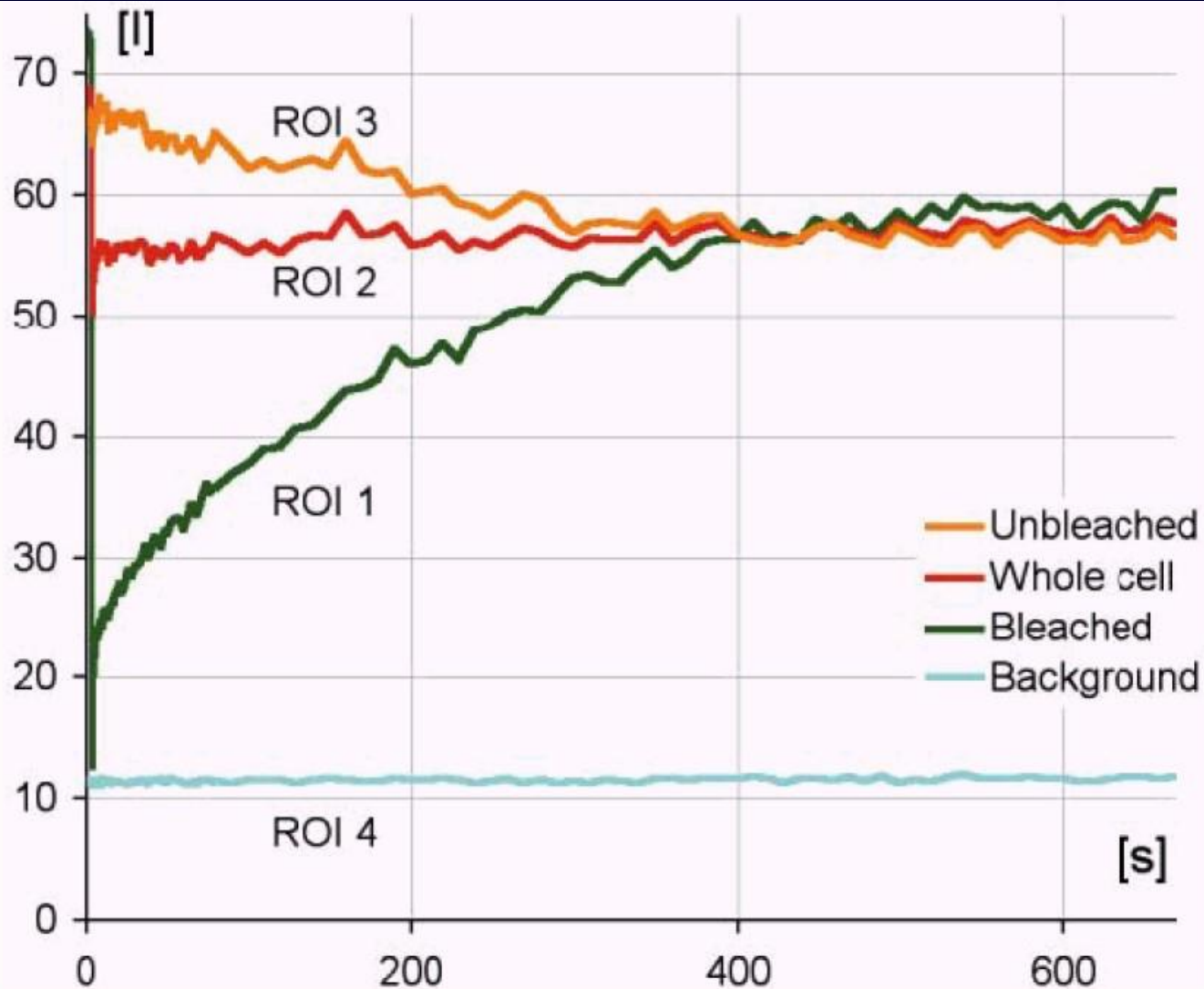
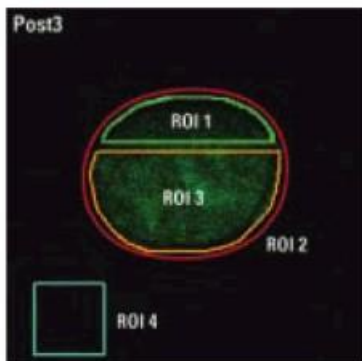
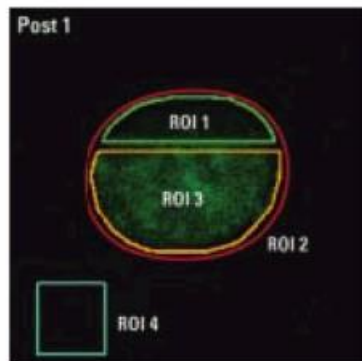
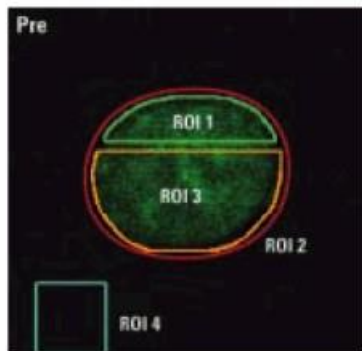


FRAP- malý region 1x odbarvení
obnovení signálu, informace o
mobilitě molekul

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

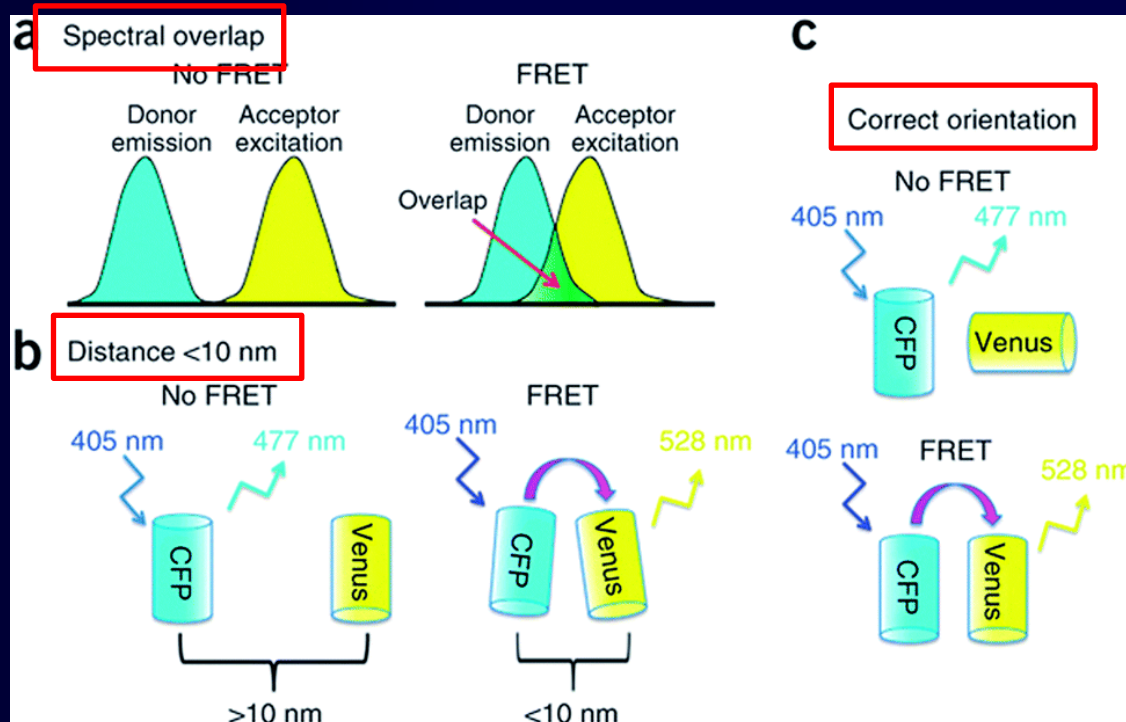
iFRAP (inverzní) – celý preparát
kromě 1 regionu odbarven –
postupné vymizení fluorescence

fotoaktivace – analýza rychlých
difúzních procesů

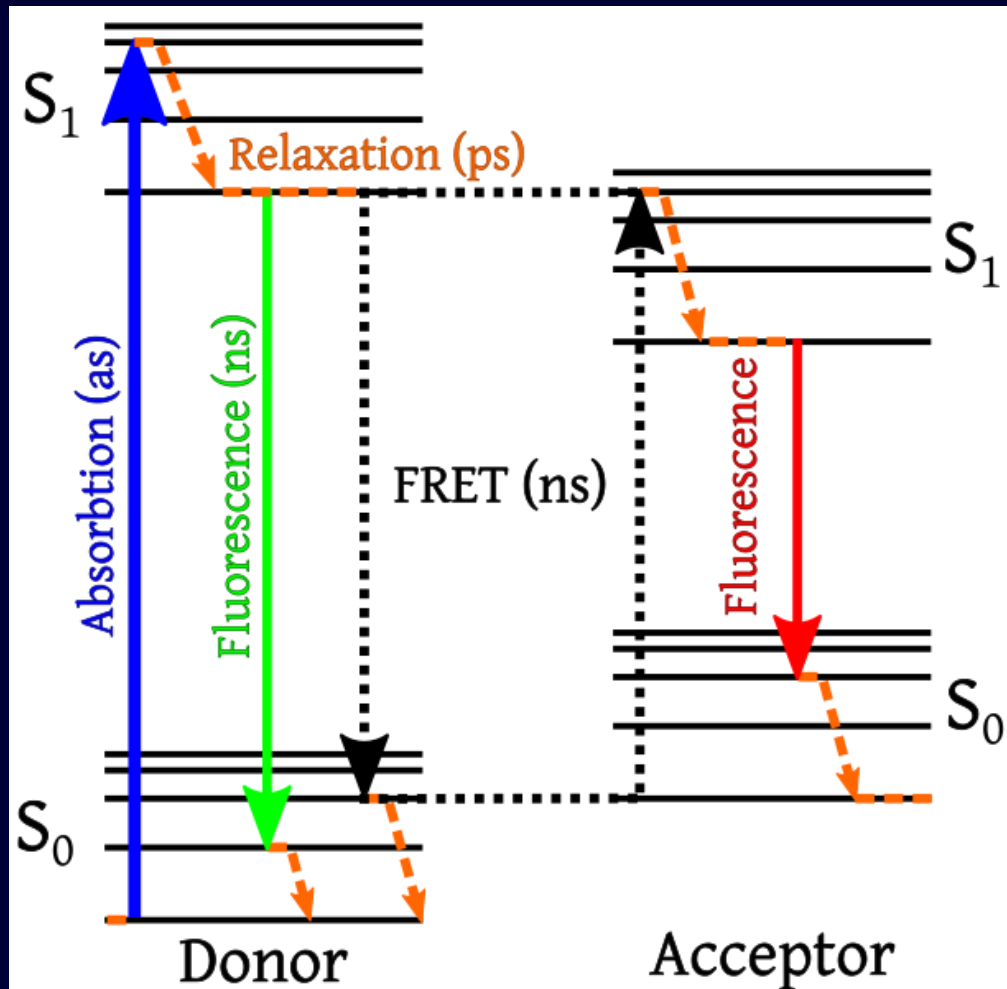


FRET: Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer

- 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

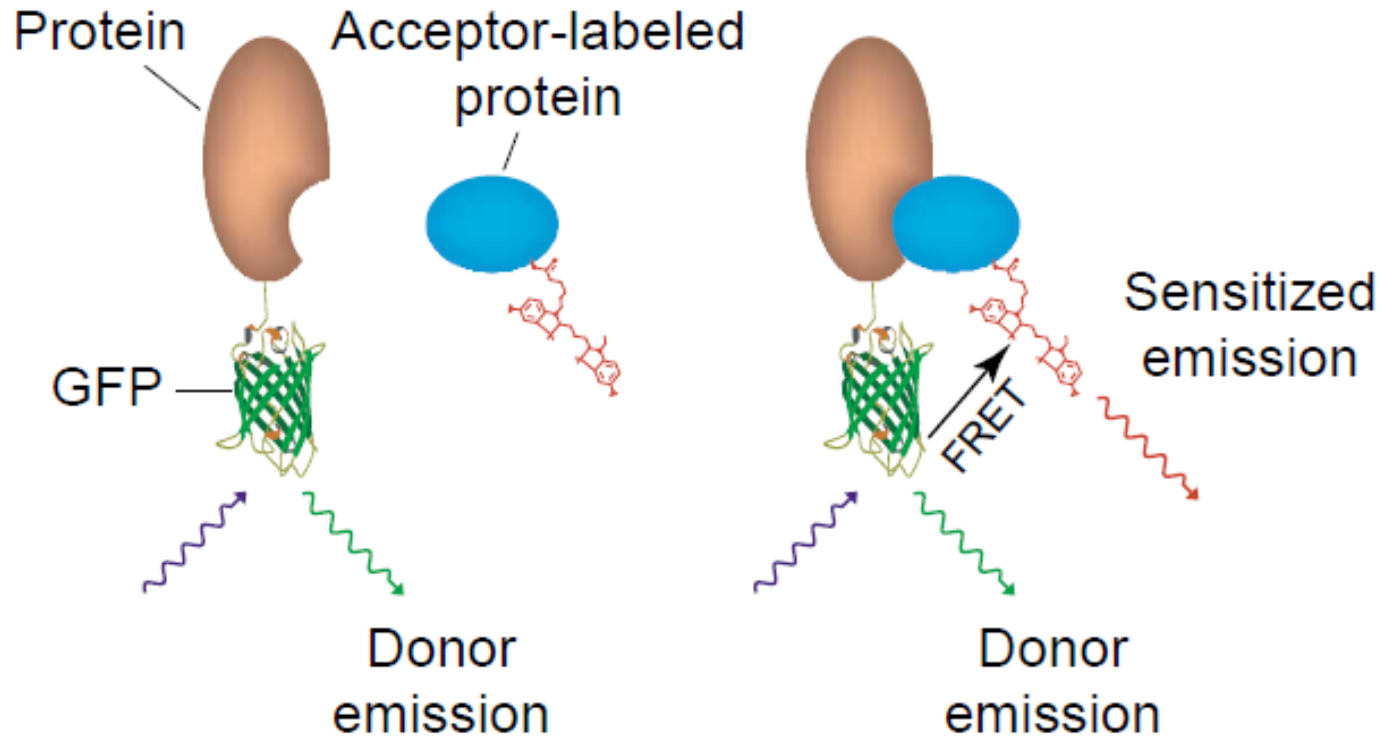
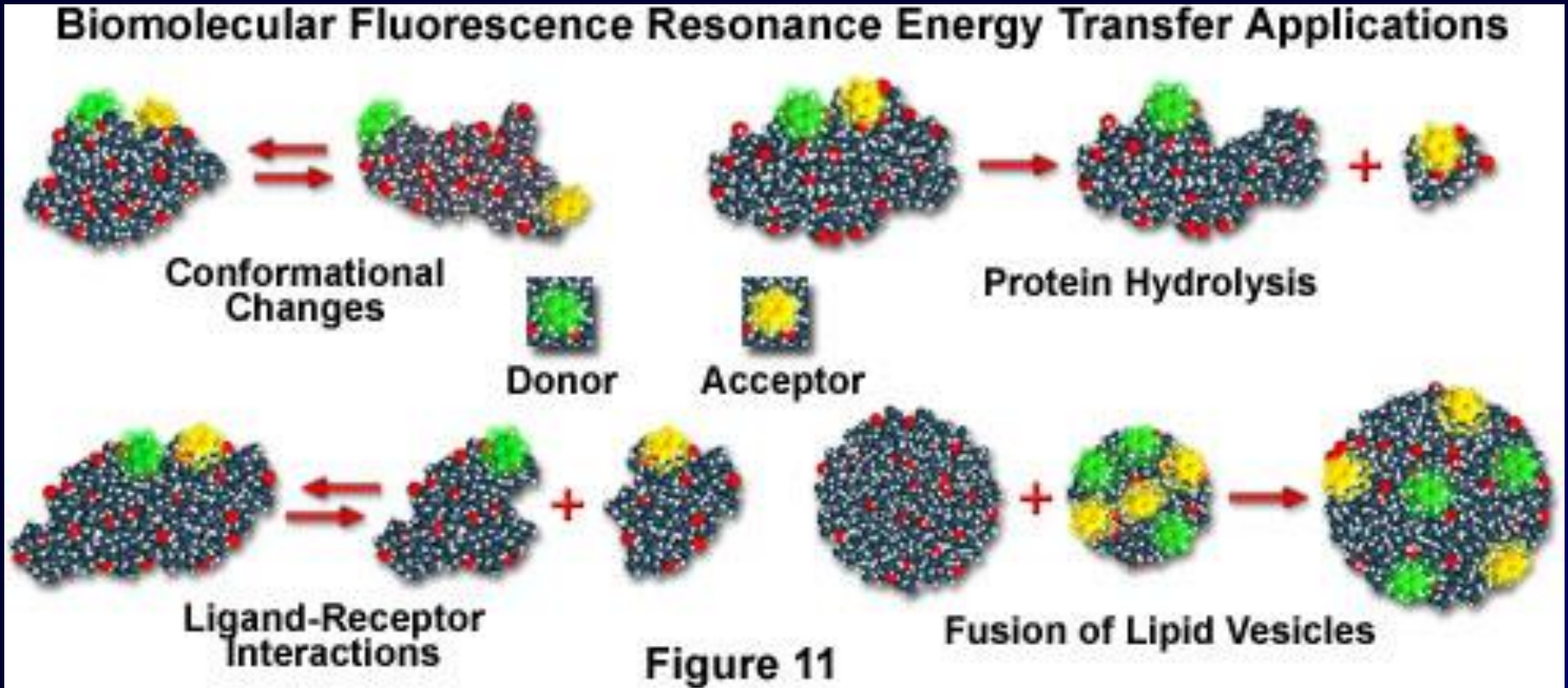


Fig. 1.

TRENDS in Cell Biology

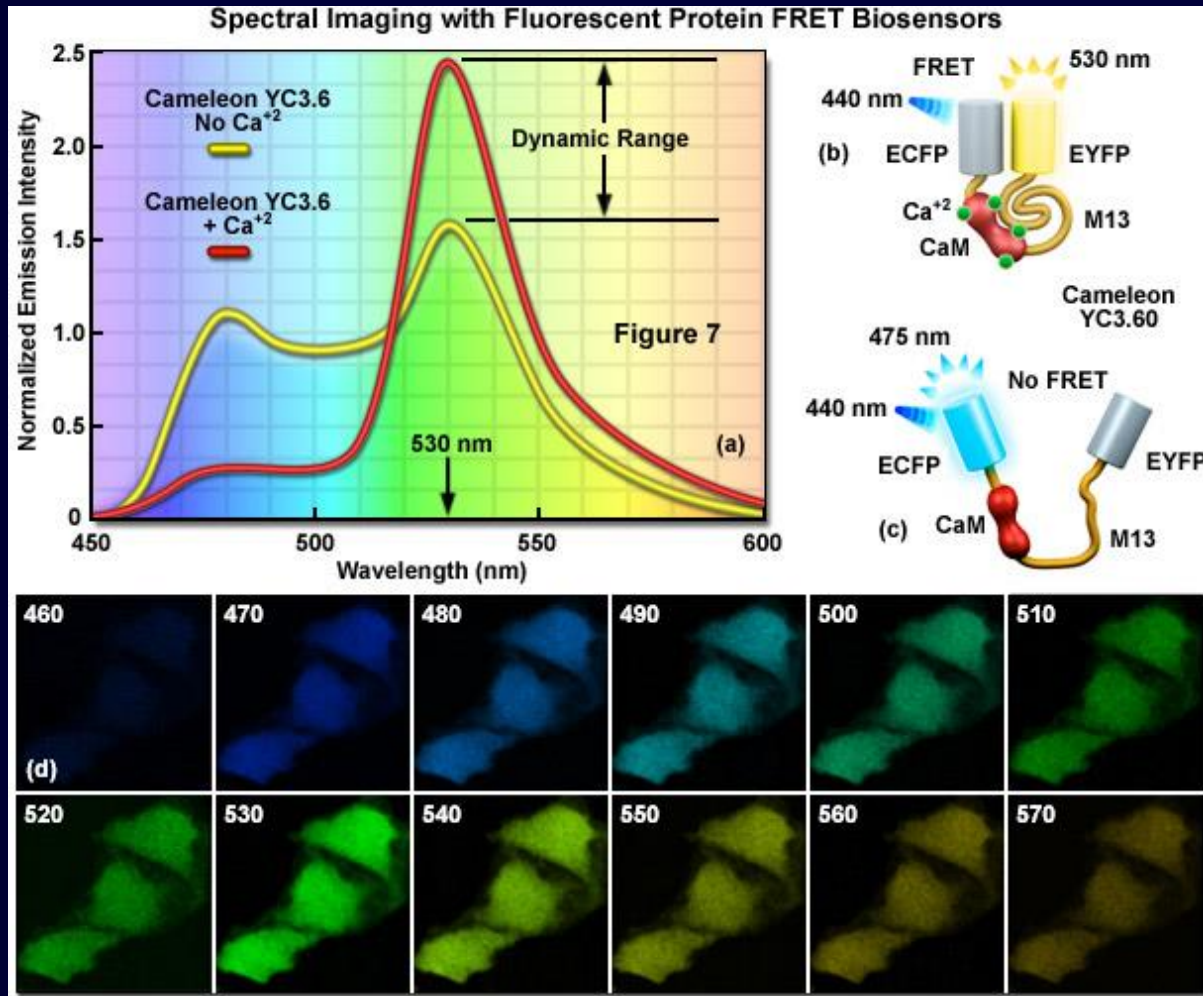
Další aplikace FRET



aplikace FRET

biosenzory- měření koncentrace vápníku

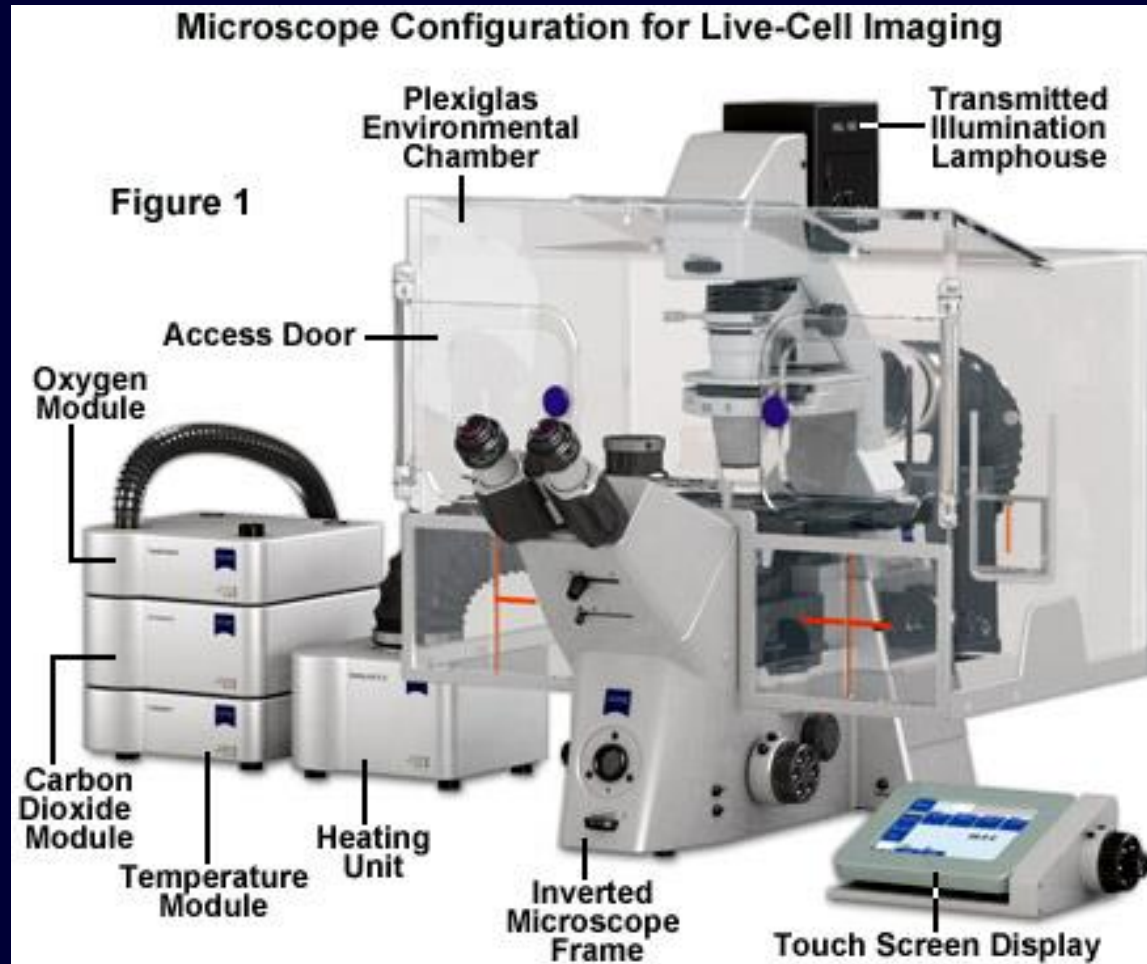
<http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/spectralimaging/fretbiosensors/index.html>



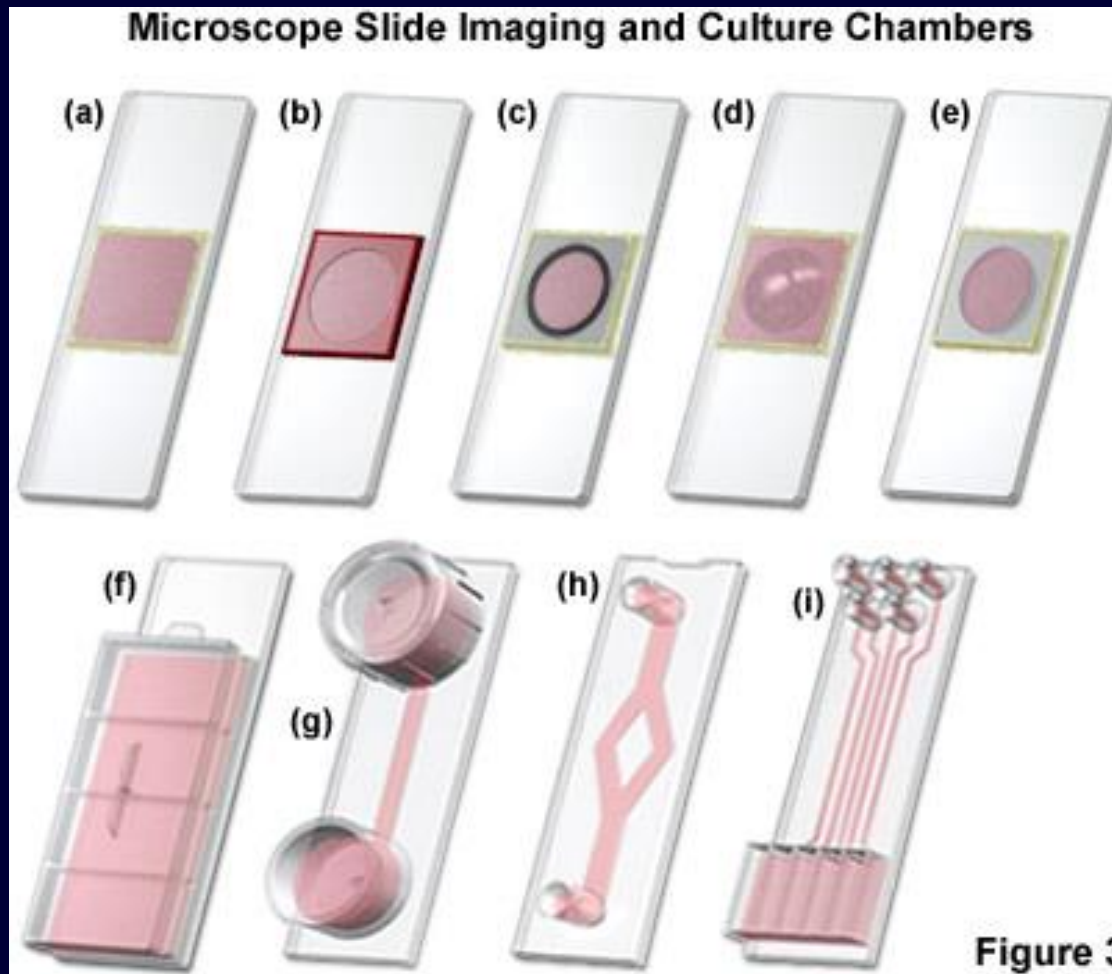
Podmínky pro mikroskopii živých buněk

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

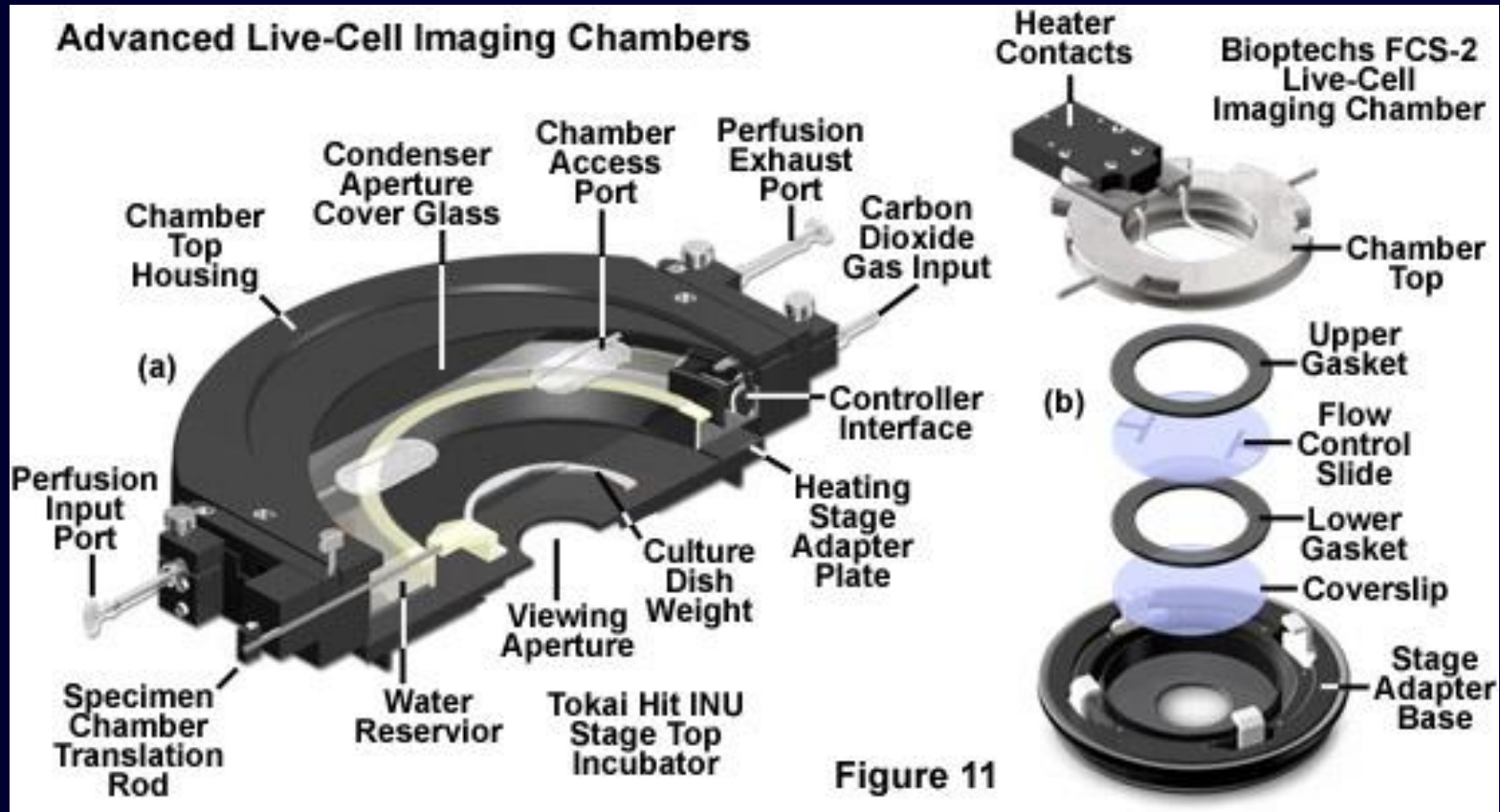
Mikroskopie živých buněk



Mikroskopie živých buněk



Inkubační (perfúzní) komůrka



Live imaging

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

