

# 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

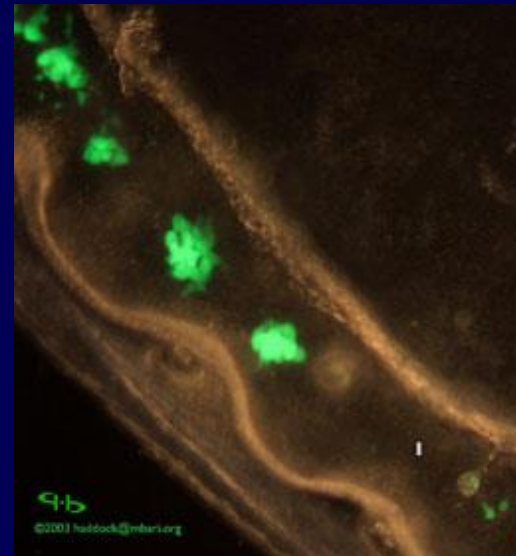
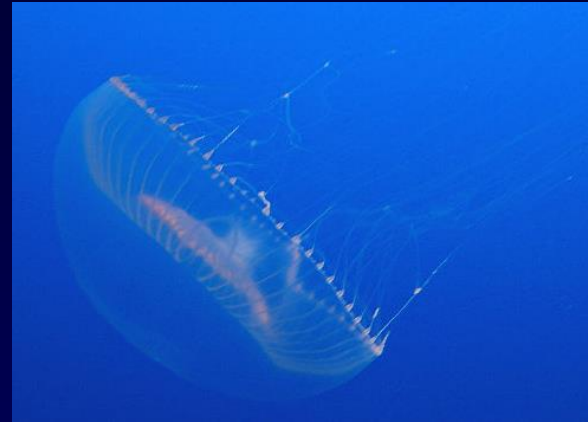
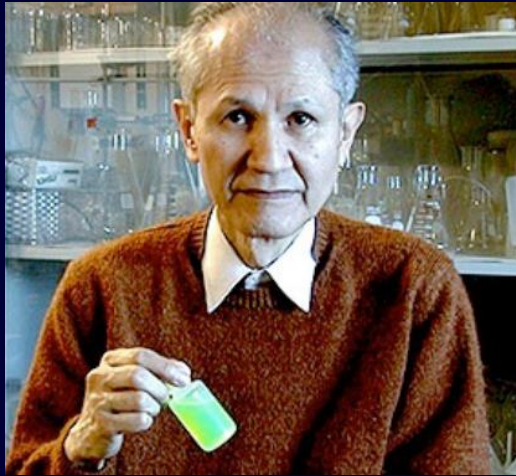
Roger Y. Tsien

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

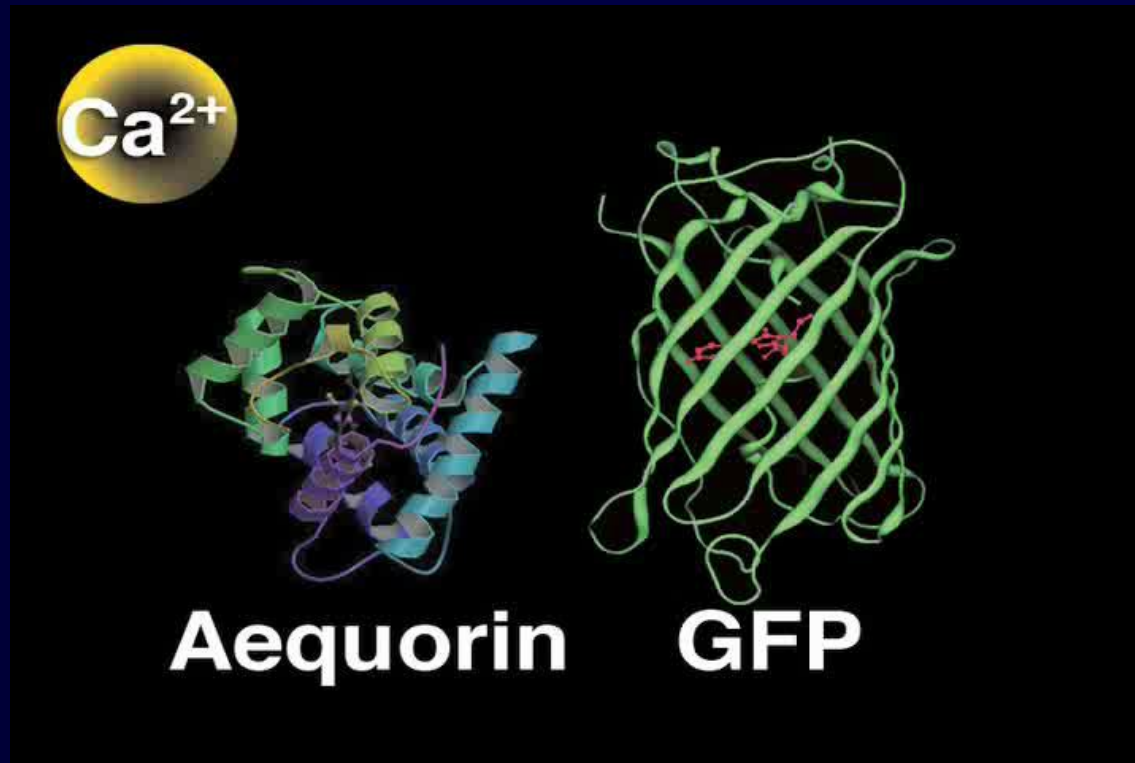
## O. Shimomura

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

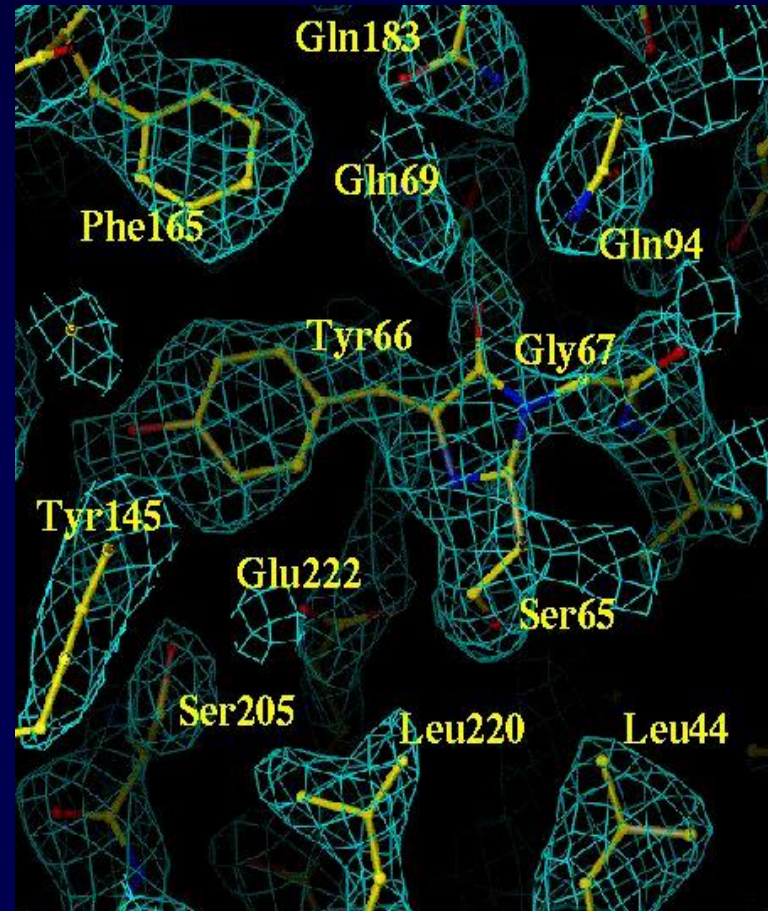
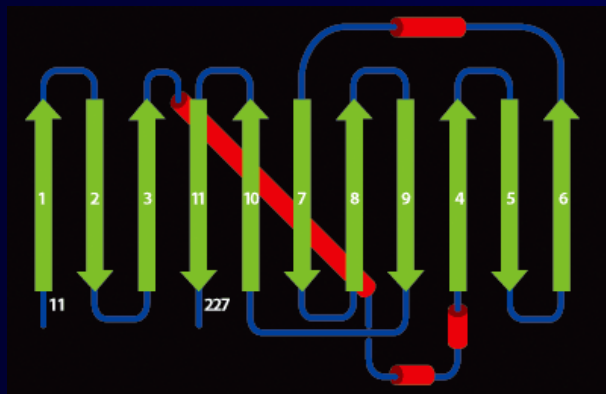
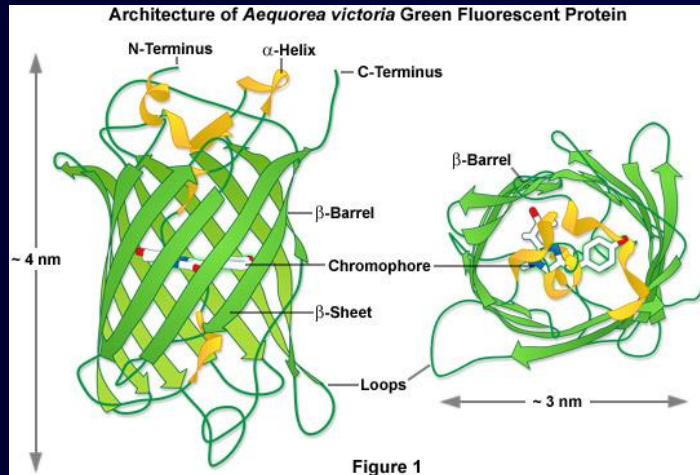


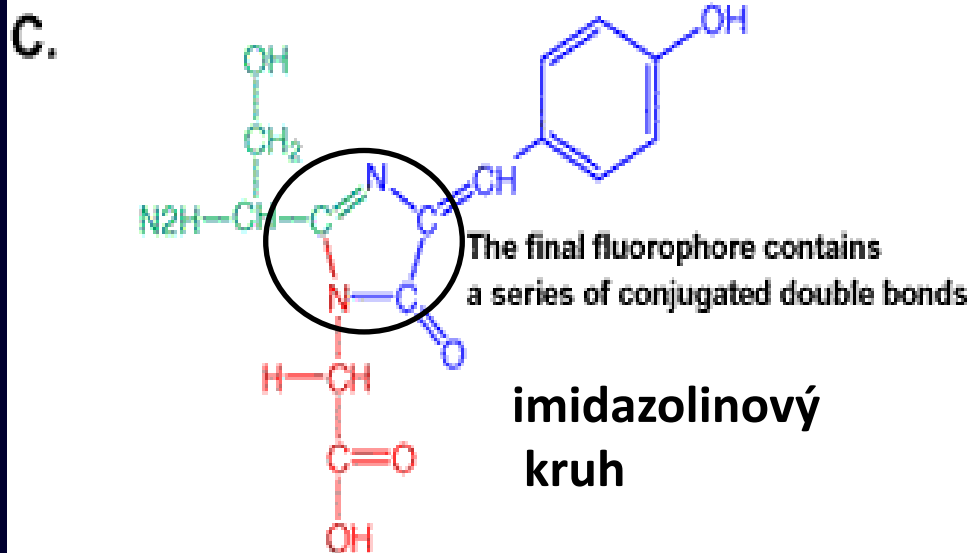
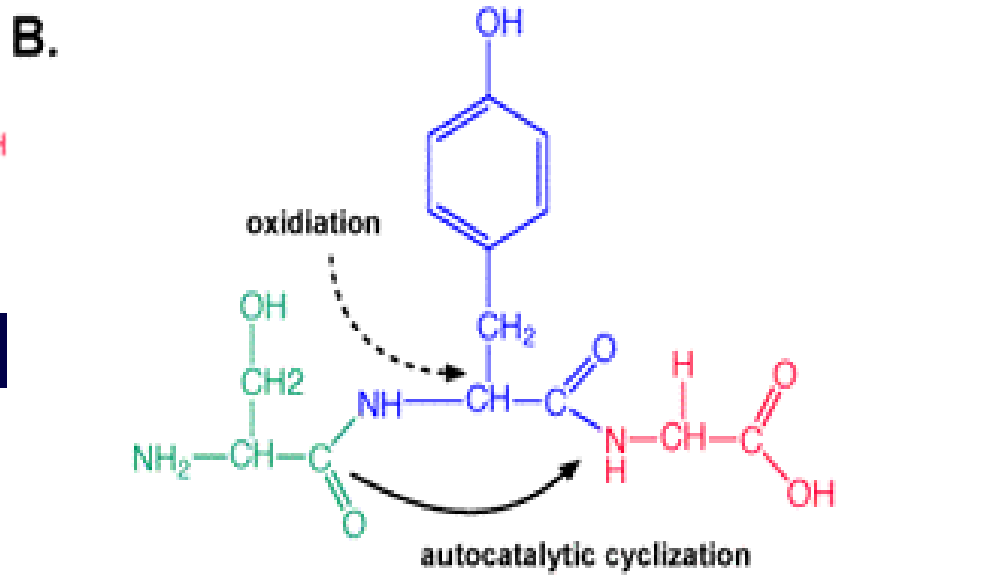
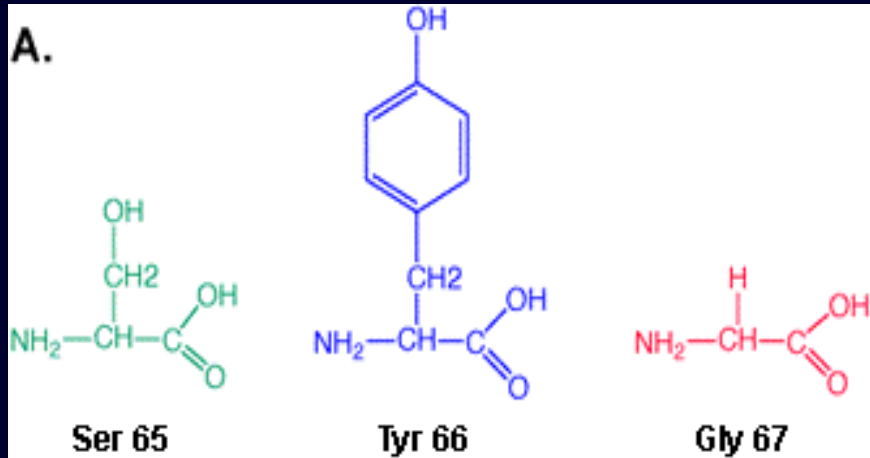
## Princip luminiscence *Aequorea victoria*

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



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

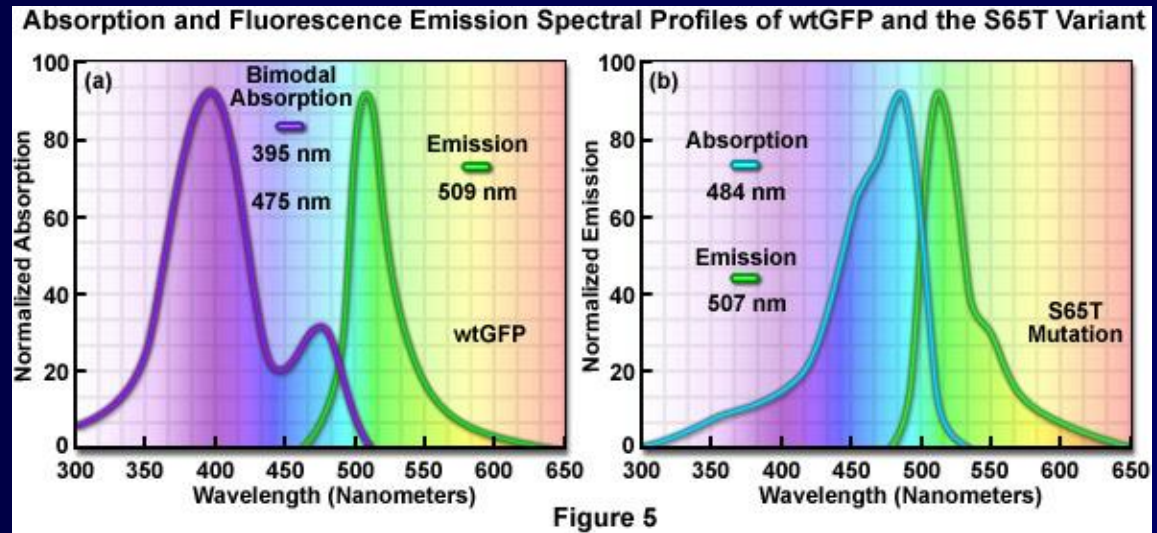
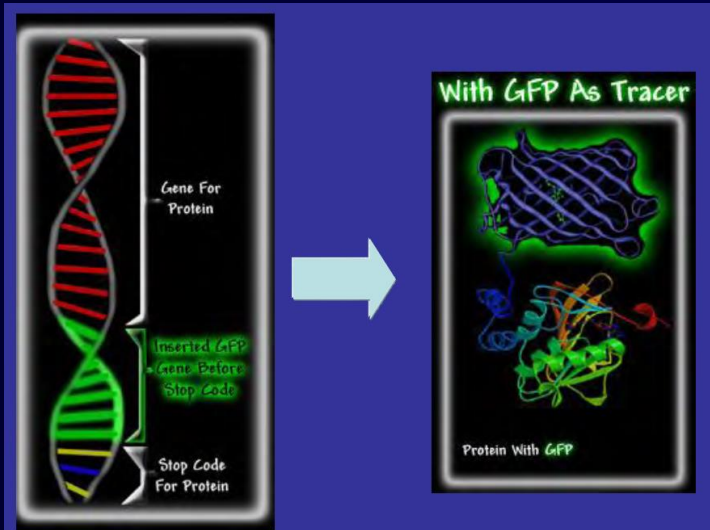




<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/fluorescentproteins/egfpchroma/indexflash.html>

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

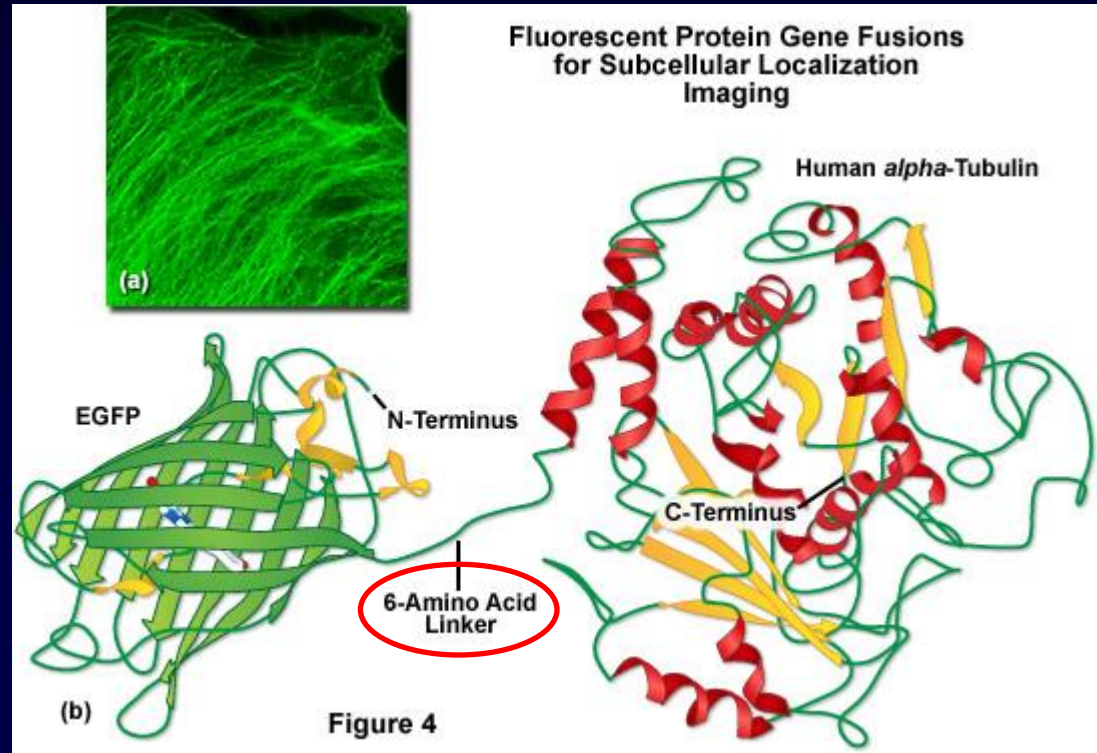
**Využití:** označení genů, vznik fúzního proteinu, lokalizace a dynamika proteinu v živých buňkách bez nutnosti fixace, možnost užití inducibilních promotorů a tedy indukovat tvorbu fúzních proteinů jen v určitém čase



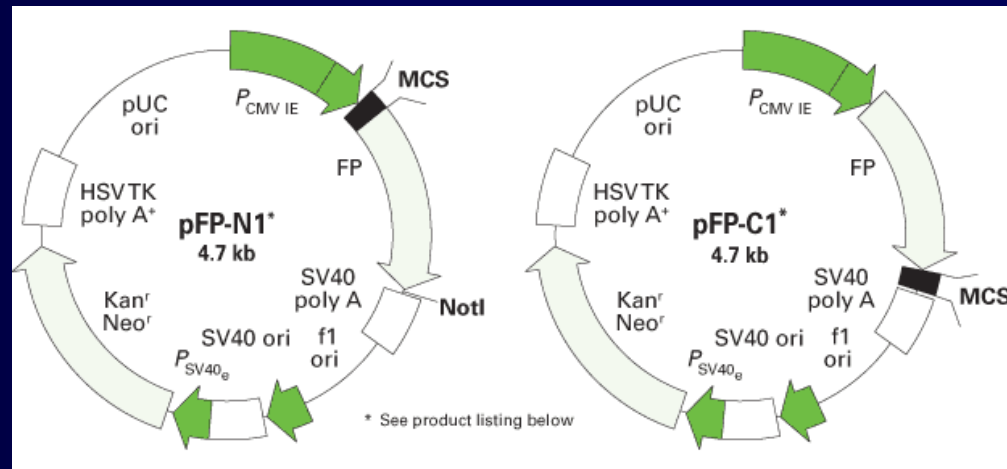


## Expres :

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



možnost umístění  
fluorescenčního proteinu  
v 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

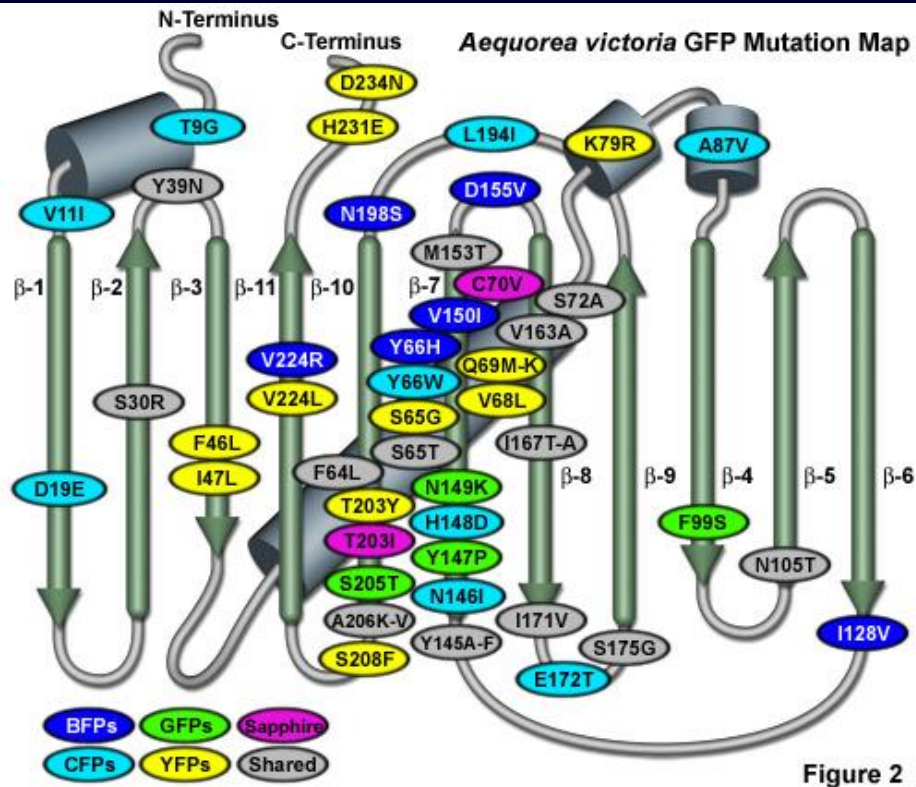


Figure 2

Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants

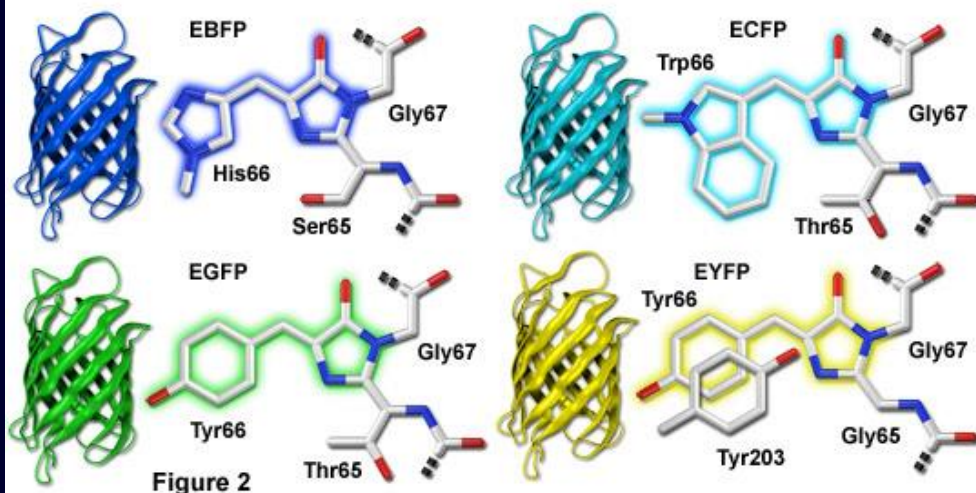


Figure 2

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



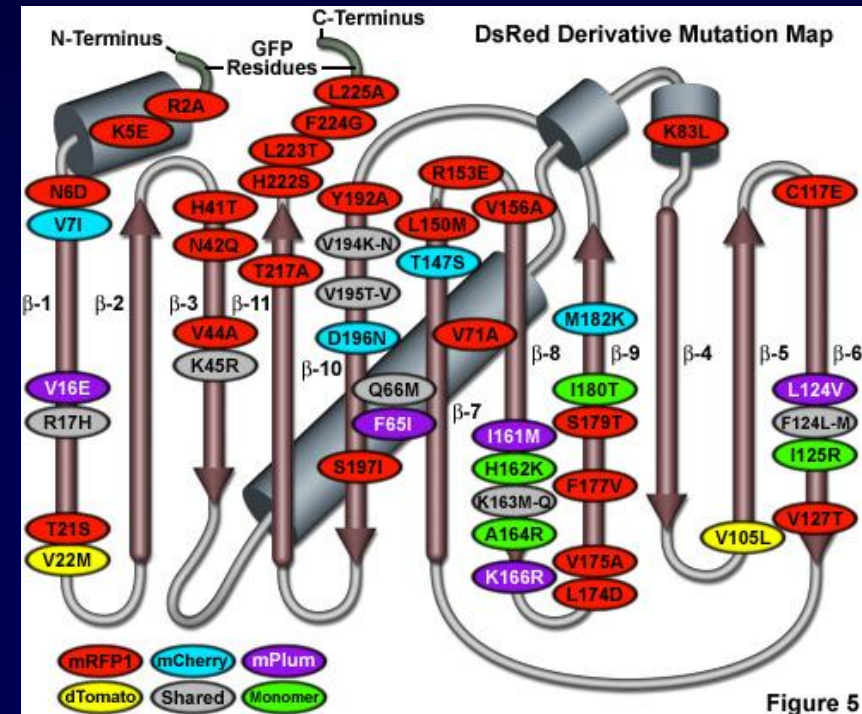
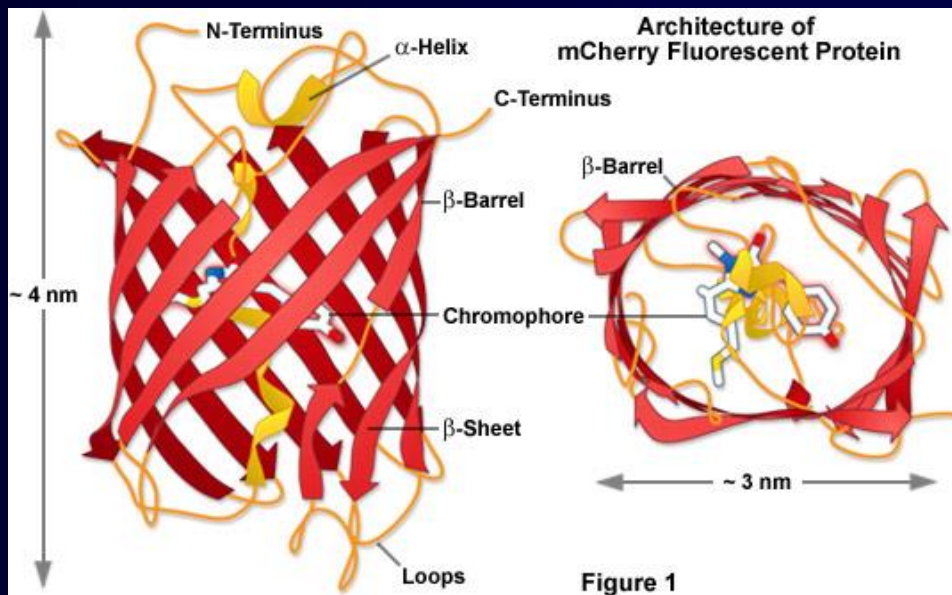
# Ds Red fluorescenční protein a jeho deriváty

wt Ds Red: podobná struktura proteinu jako GFP

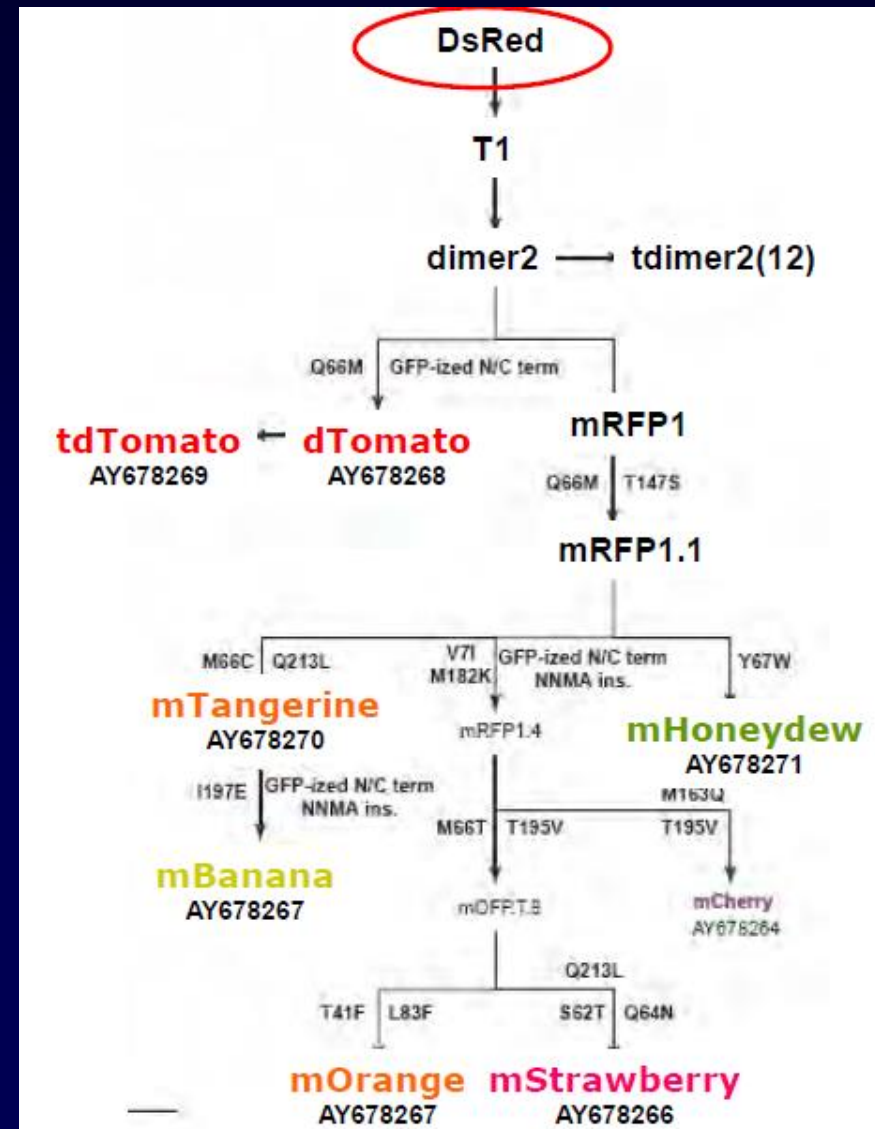
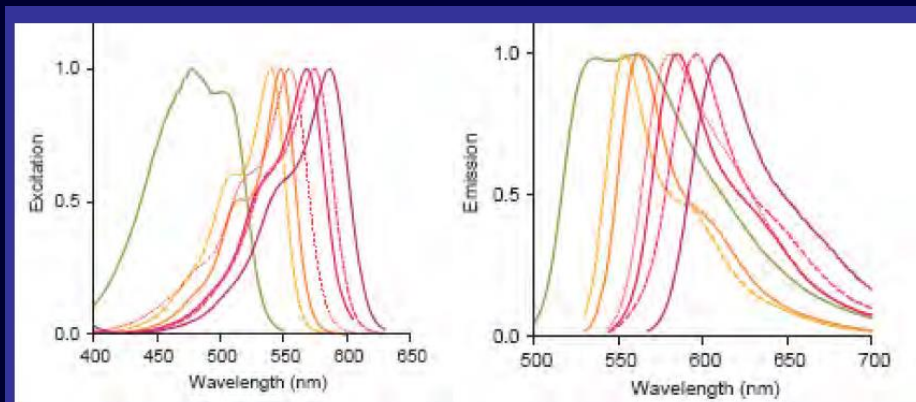
$\beta$ -barel (11 antiparalelních řetězců) , uvnitř  $\alpha$ -helix s chromoforem

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

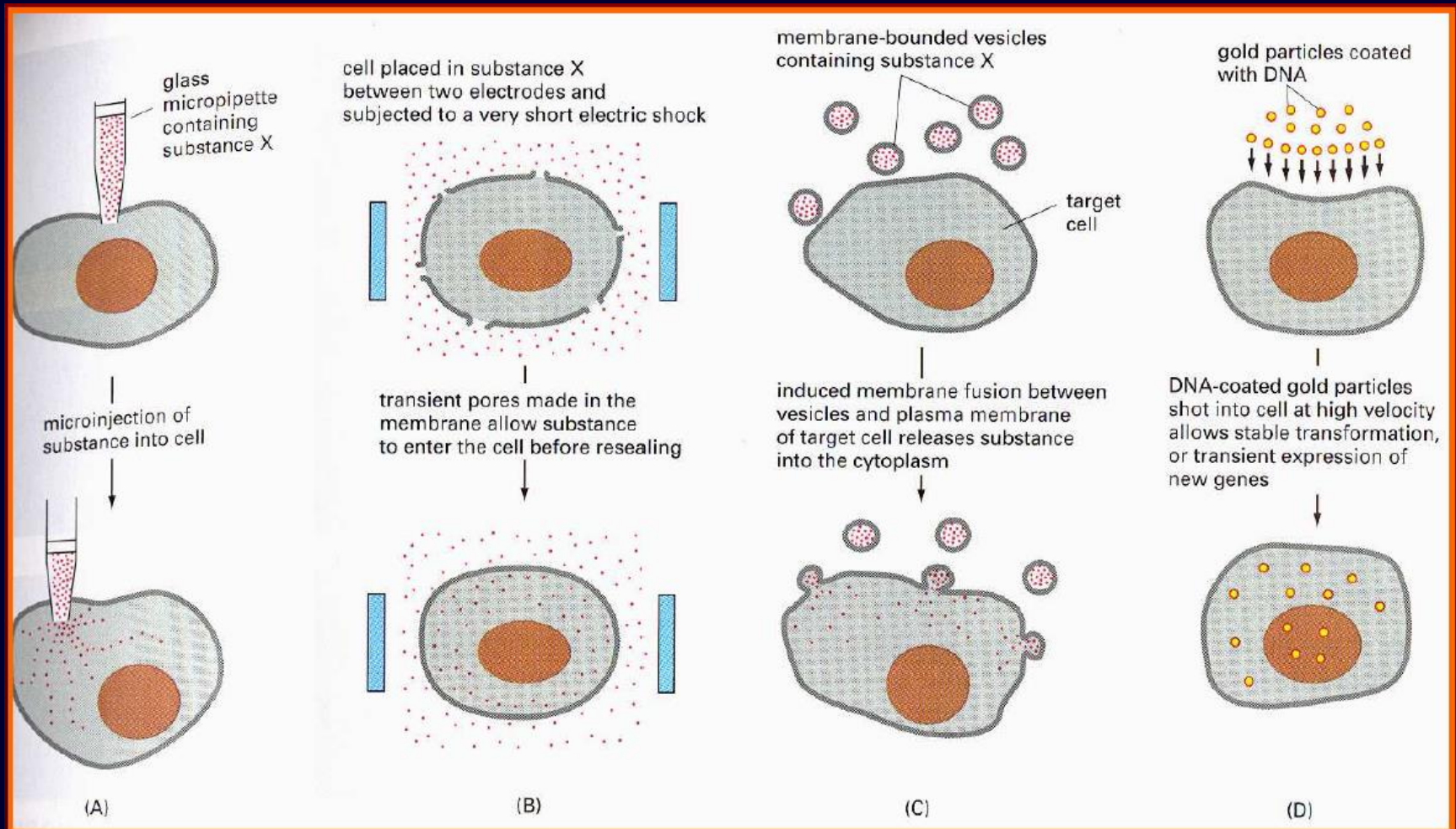
**Precipitace fosforečnanem vápenatým** – fosforečnan vápenatý společně s DNA precipituje, poté je fagocytován do buněk, jednoduchá metoda, část DNA i do jádra

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

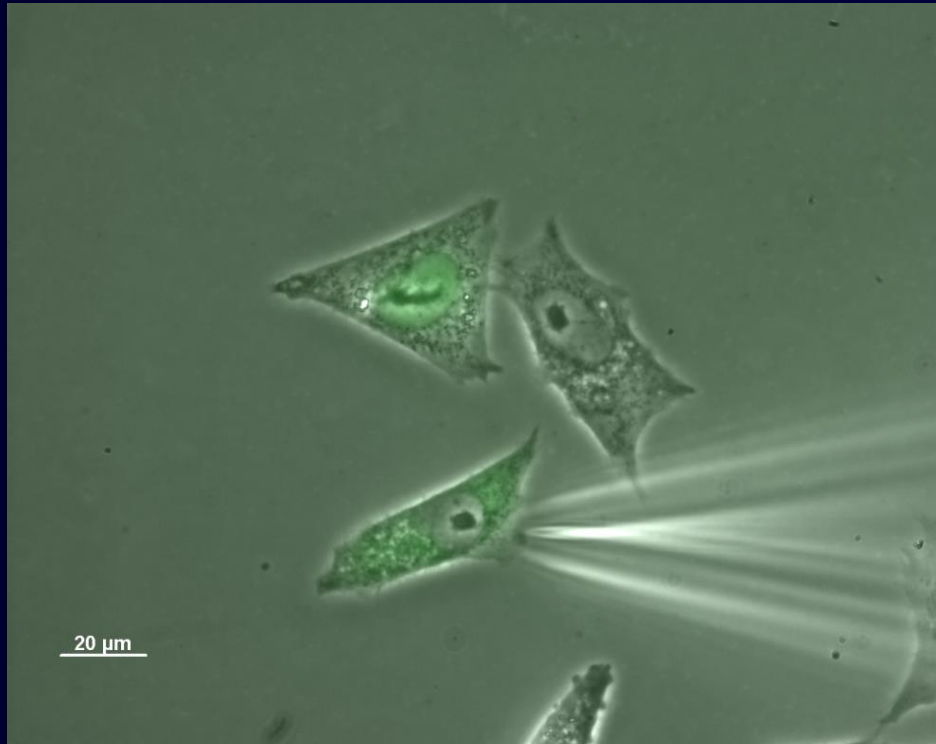
**Gene Gun** – mechanický přenos DNA vázané na kovové mikroprojektily do buněk pomocí tlaku plynů nebo mikroexploze (např. u rostlinných buněk)



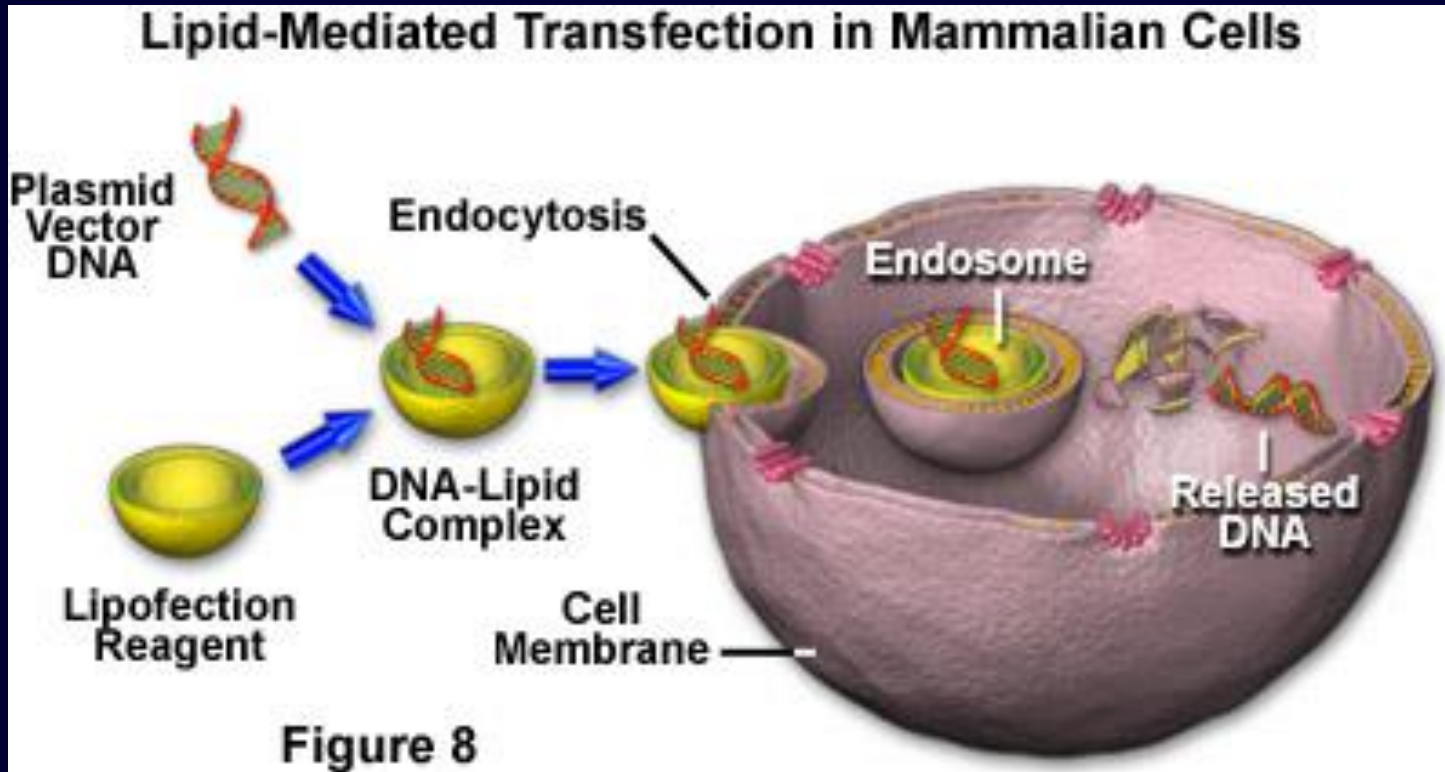
# Zavedení fúzního genu do buňky



# Mikroinjekce



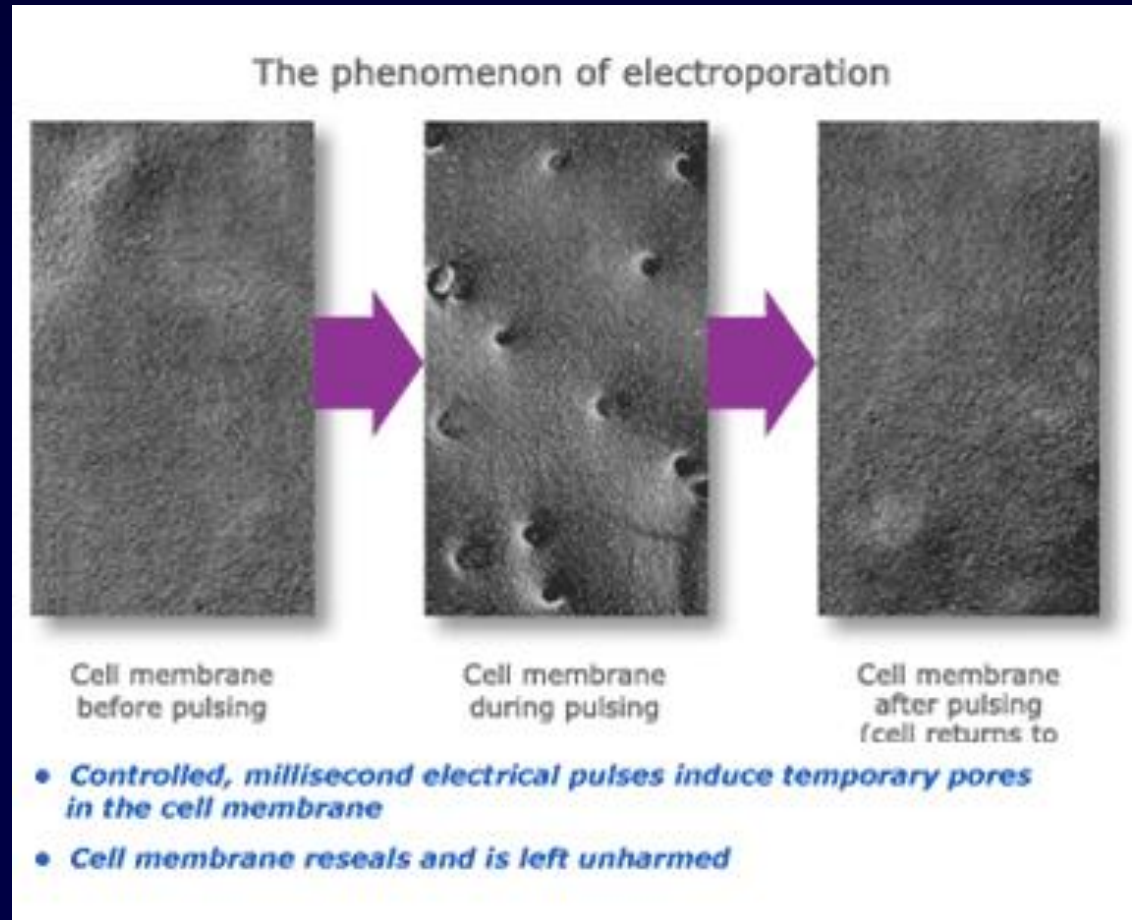
# Lipofectaminová transfekce



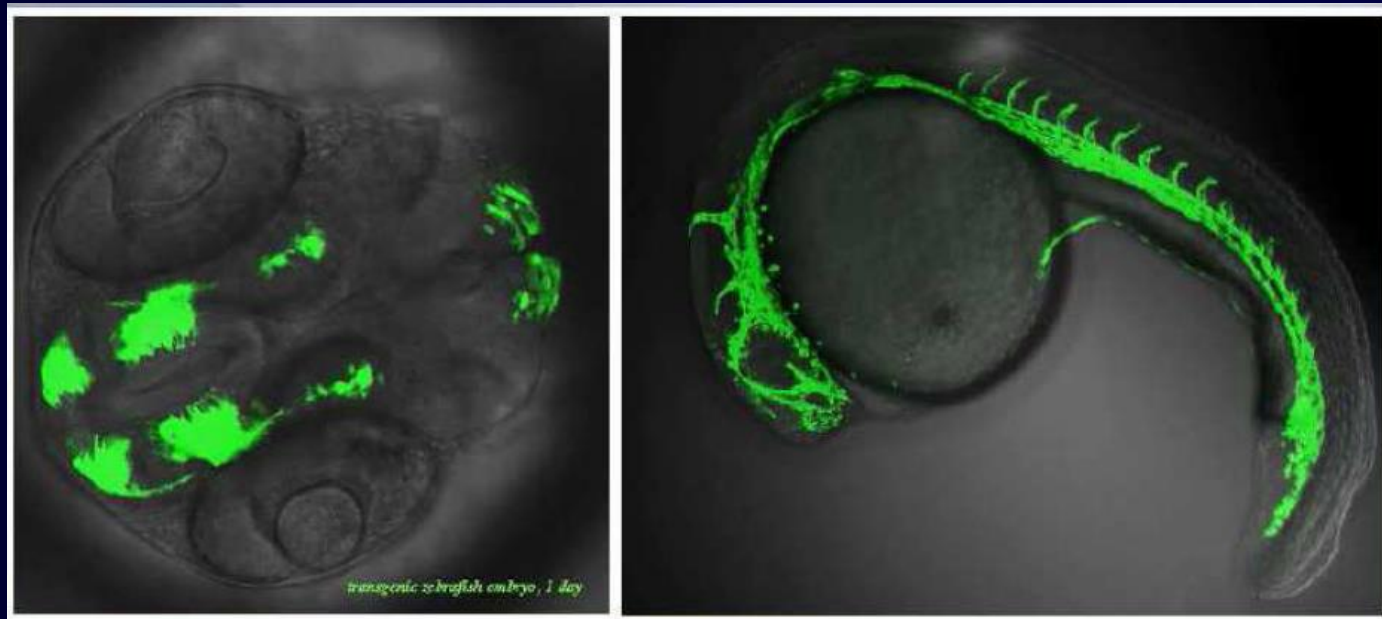
# Elektroporace

## Cíle:

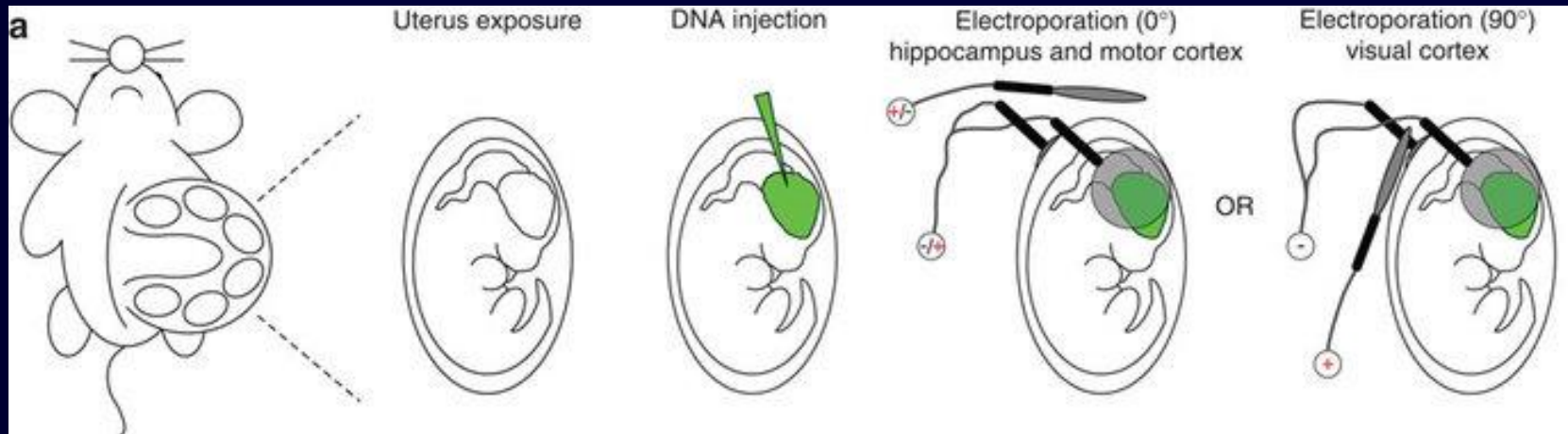
- b. kultura
- tkáň
- orgány
- embryo
- embryo *in utero*



# 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:

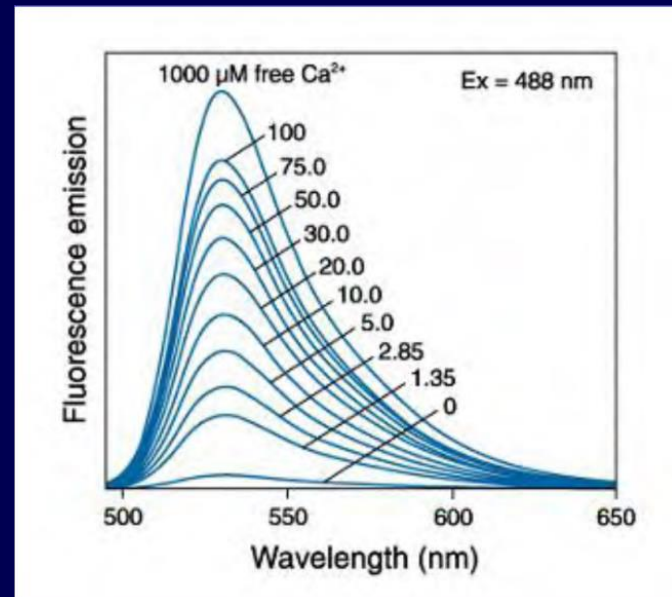
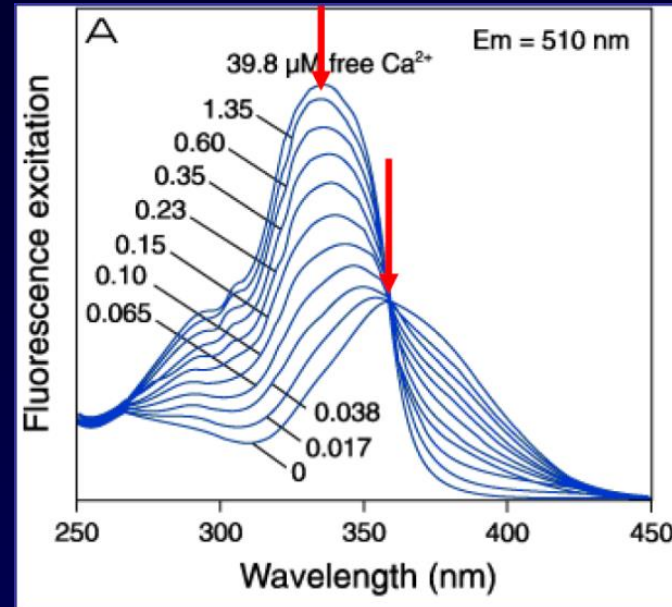
změna intenzity v závislosti na koncentraci nebo posun emisního spektra



# Indikátory $\text{Ca}^{2+}$

## FURA-2

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



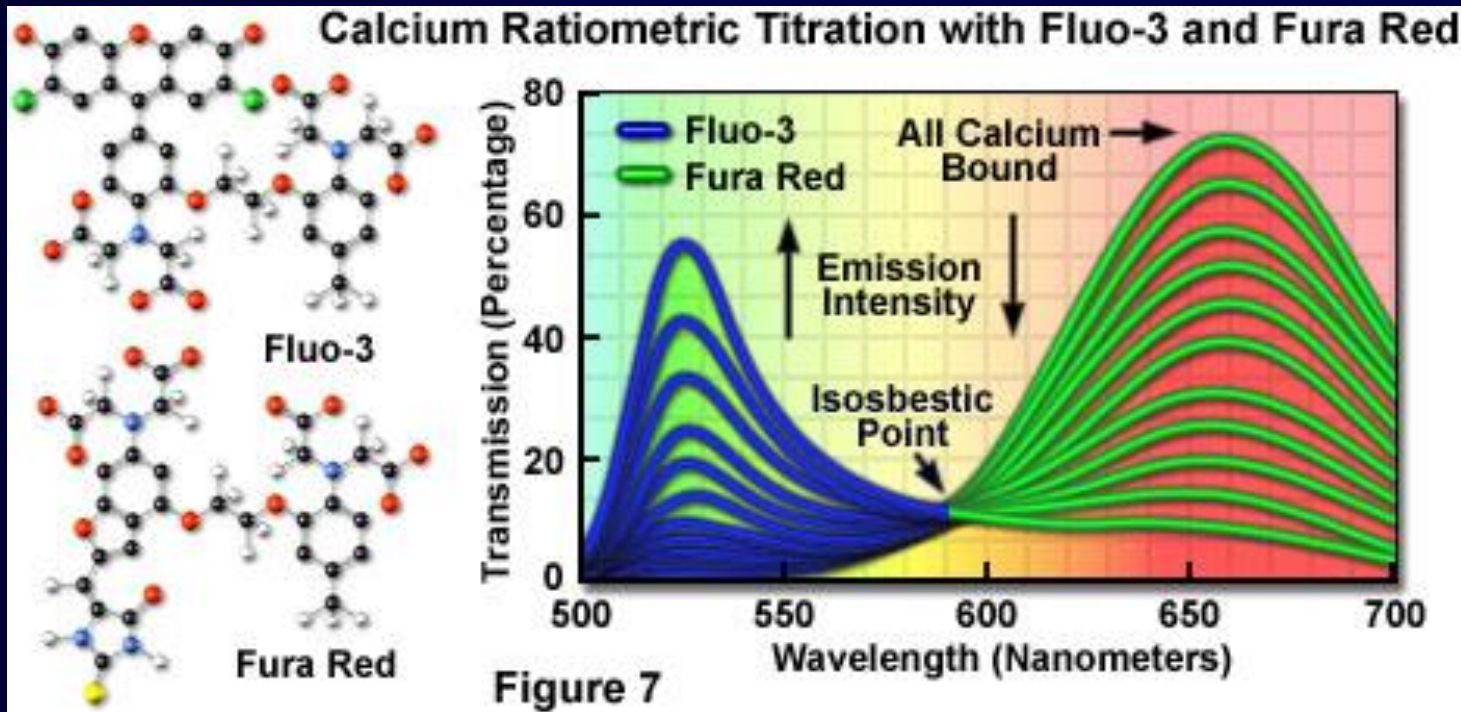
## CalciumGreen-5N

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

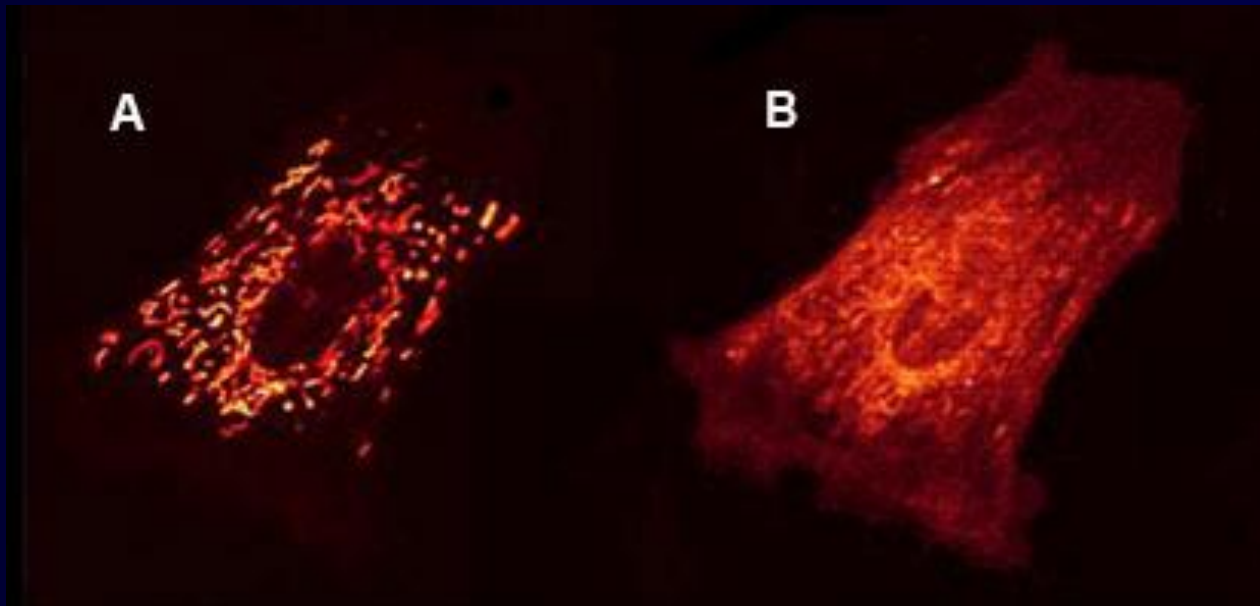
**studium:** transport, buněčná respirace, mitóza, apoptóza, degradace proteinů, sekreční dráhy

**rozdělení:** na stálé a nestálé

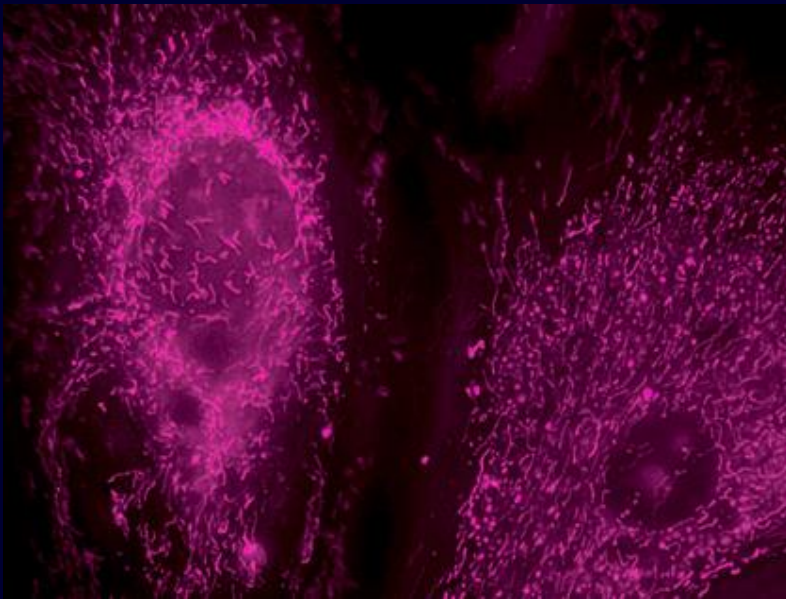


# Mitochondrie

- 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



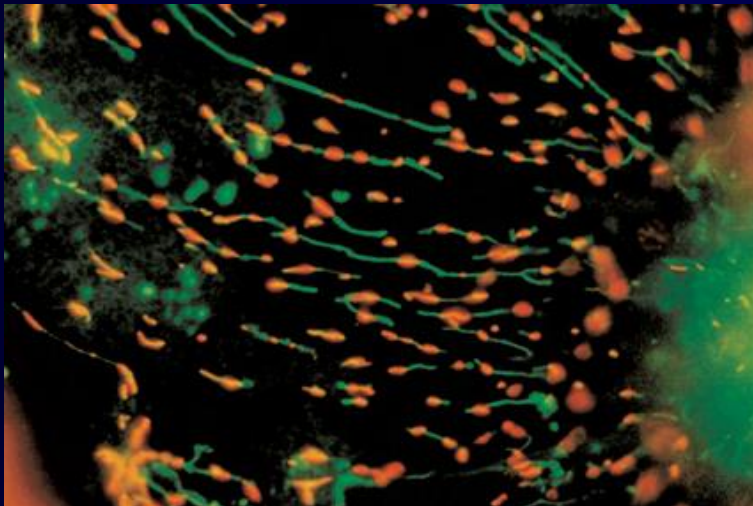
Neonatální kardiomyocyty : rhodamin123, (A) kontrola, (B) ovlivněno mitochondriálním uncouplerem



mitochondrie – bovinní endotel :  
**MitoTracker® Deep Red FM dye**



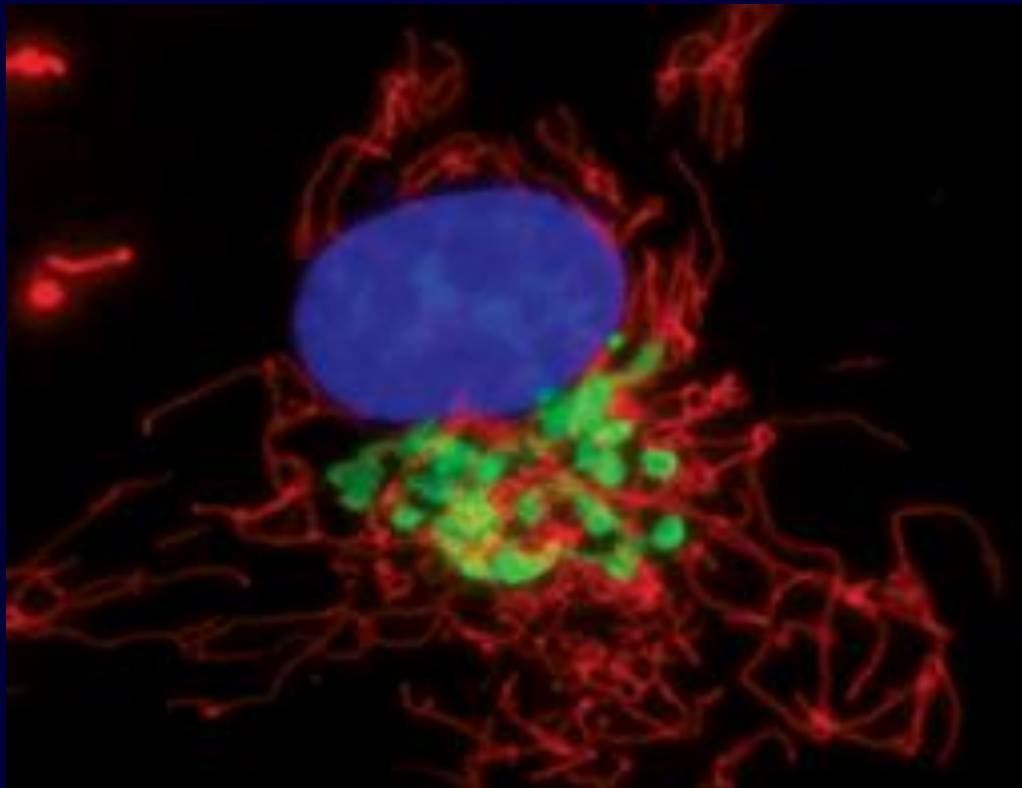
mitochondrie/DNA - býčí spermie:  
**MitoTracker® Green FM**  
Hoechst 33342



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

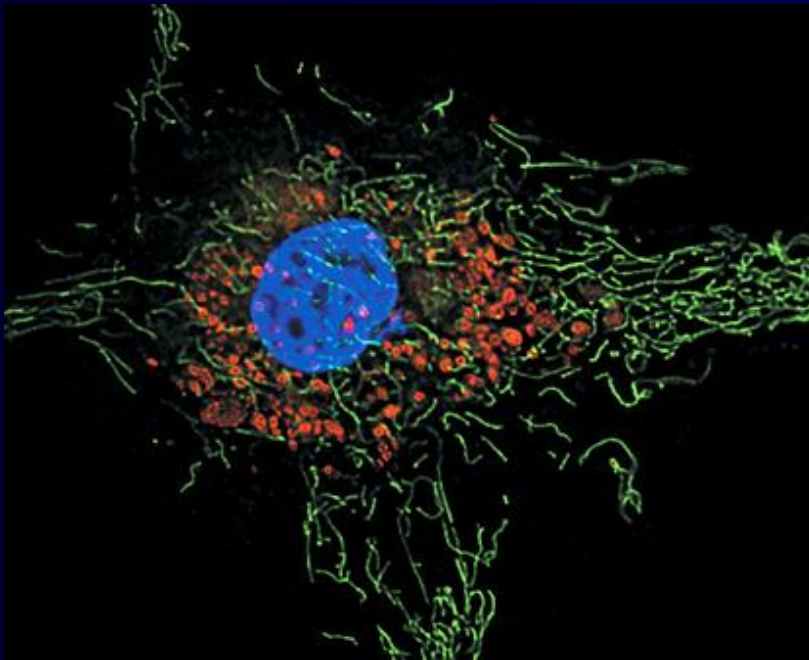
- prostupují přes membránu, selektivní pro ER, dříve DiOC<sub>6</sub>, - není tak specifický, vykazuje fotodynamickou toxicitu
- nyní ER-Tracker + Blue-White, Red, Green - menší toxicita, lze i fixovat



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  
funkce jako pH indikátor



lysozómy a mitochondrie / DNA – bovinní endotel :  
**LysoTracker® Red**  
**dihydrorhodamine 123**  
**Hoechst 33258**

# BacMam Reagents

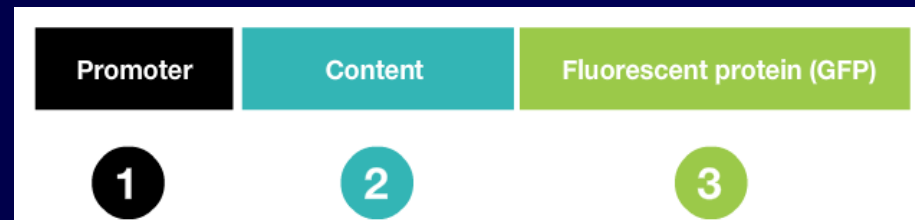


- připravené virové konstrukty
- baculovirus – hmyzí, aktivně neinfikují savčí buňky, nereplikují se

## 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  $\text{Ca}^{2+}$ )
- 3) fluorescenční protein: CFP, GFP, RFP; na C- nebo N- konci peptidu

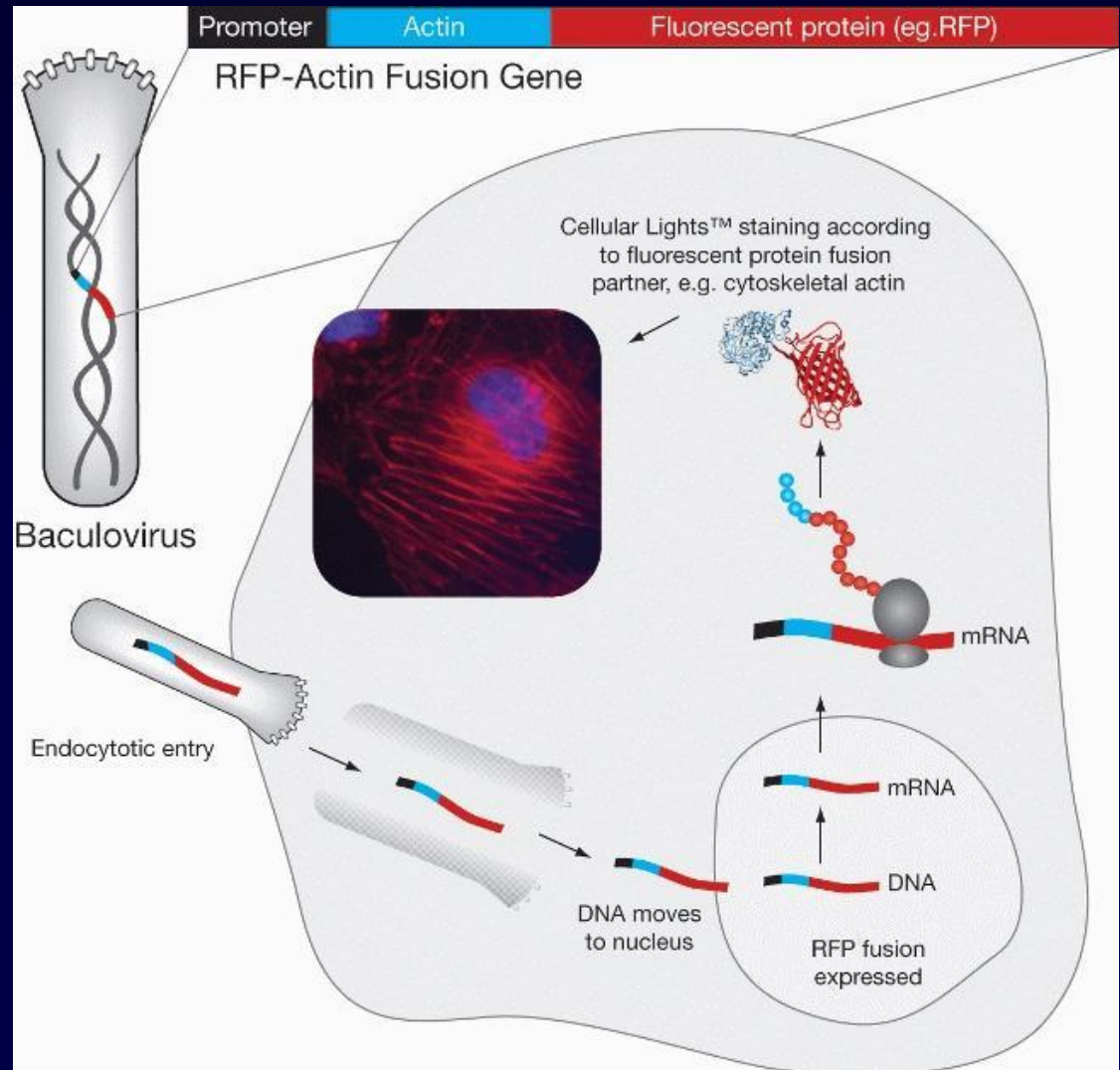
- jednoduchá aplikace
- lze sledovat v reálném čase
- lze koexprimovat více prób
- lze fixovat





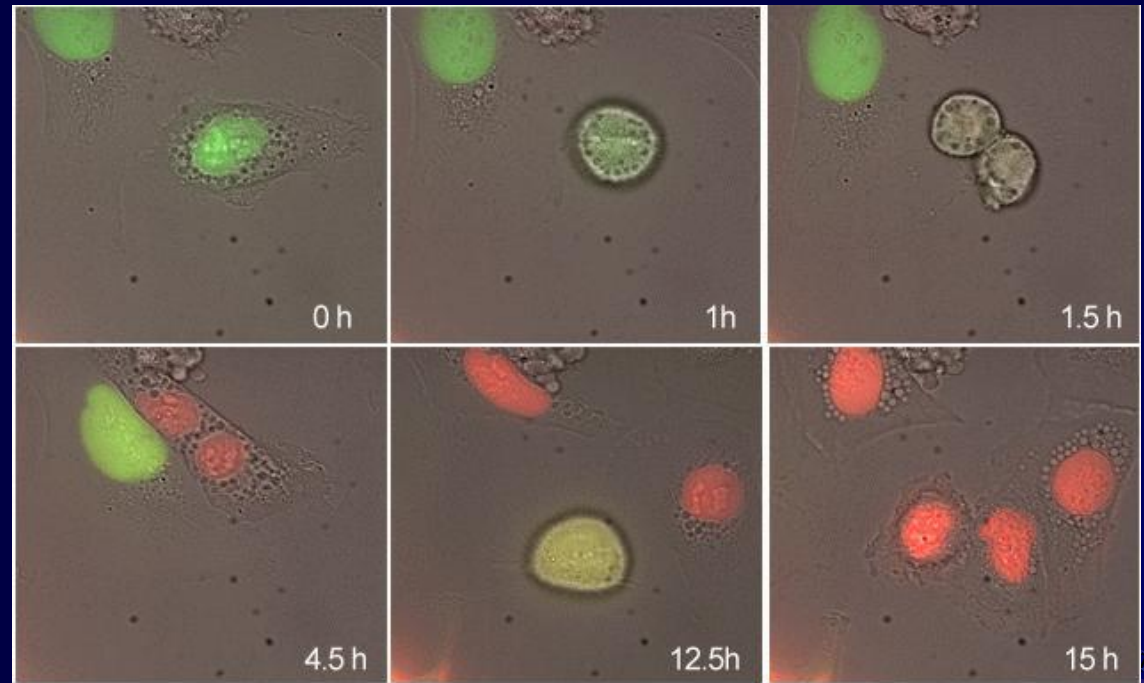
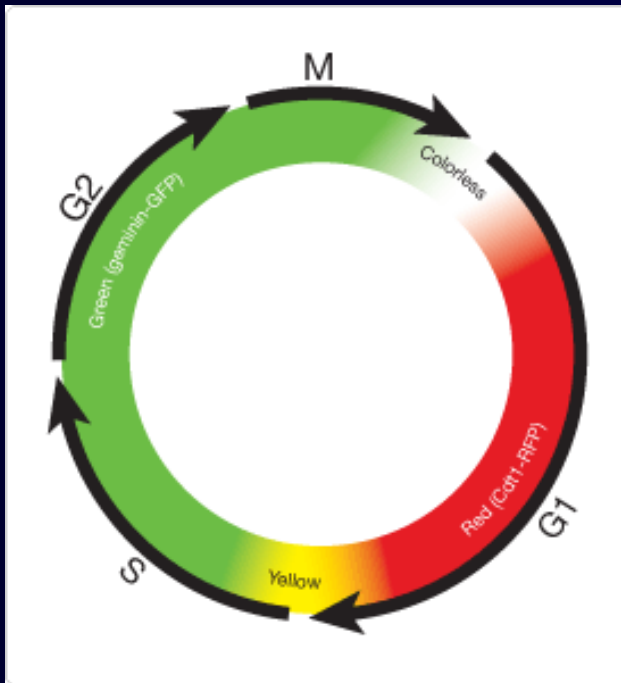
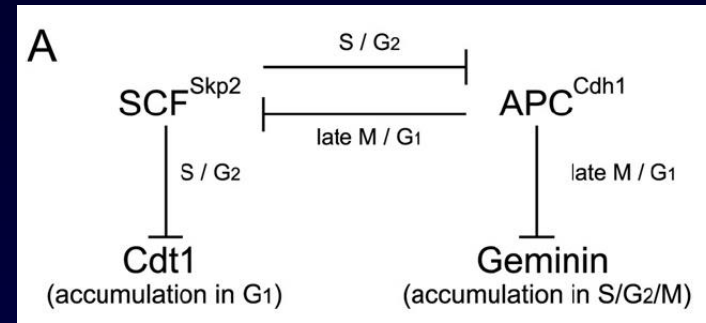
# Princip metody

- 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

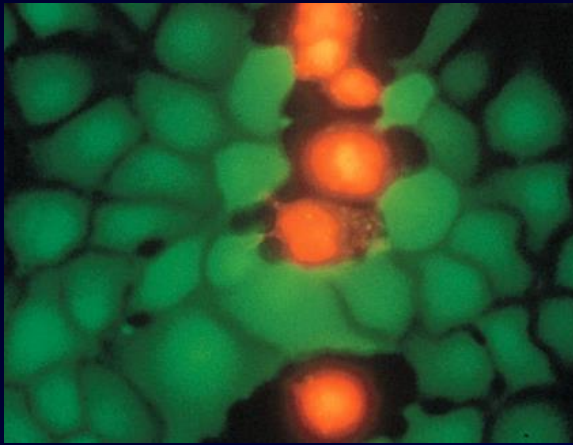
- pronikají do buněk, zde metabolizovány - vznik aktivního fluoroforu
- ověření soudržnosti membrány – fluorofor zadržován v cytoplasmě
- fluoresceindiacetát (FDA), calcein AM (CAM)

## 2. sondy pro nukleové kyseliny

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

Ize společně kombinovat

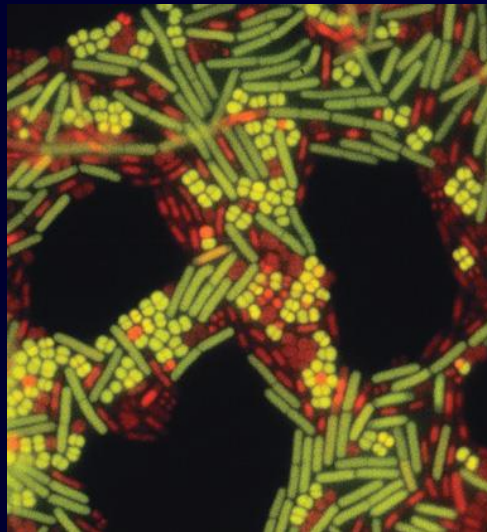
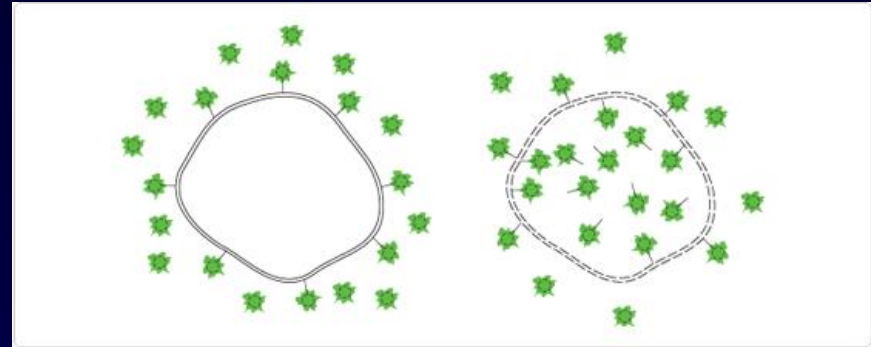
## Princip obarvení mrtvých buněk membránu neprostupující DNA sondou



linie krysích buněk:

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

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

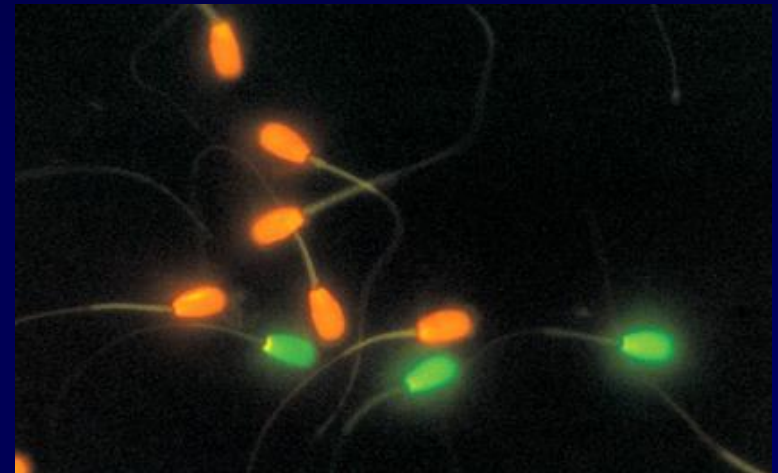


*Micrococcus luteus*

a *Bacillus cereus*:

živé: zelené

mrtvé: červené

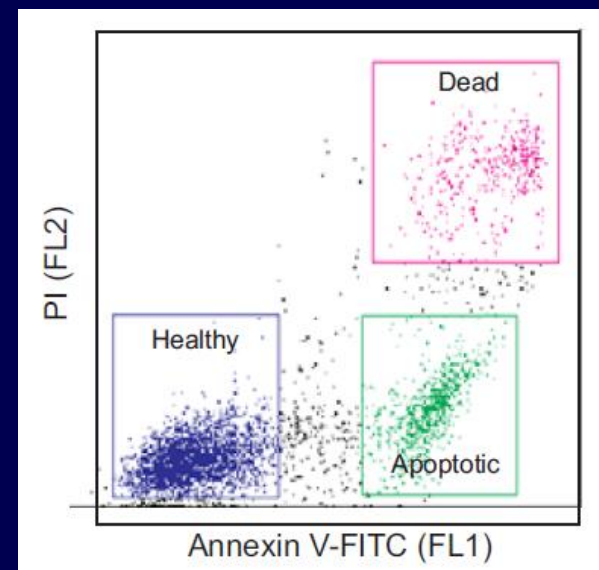
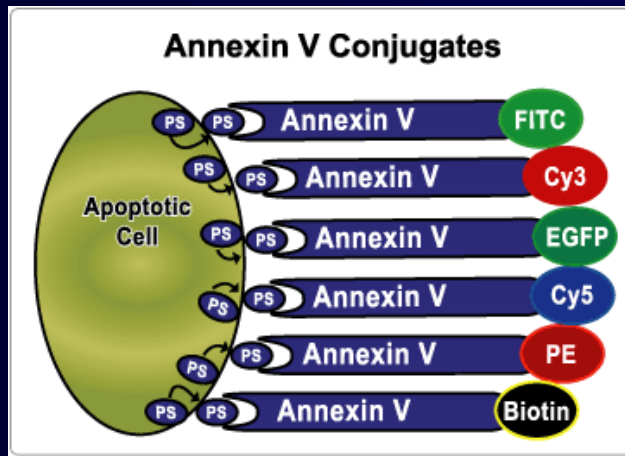
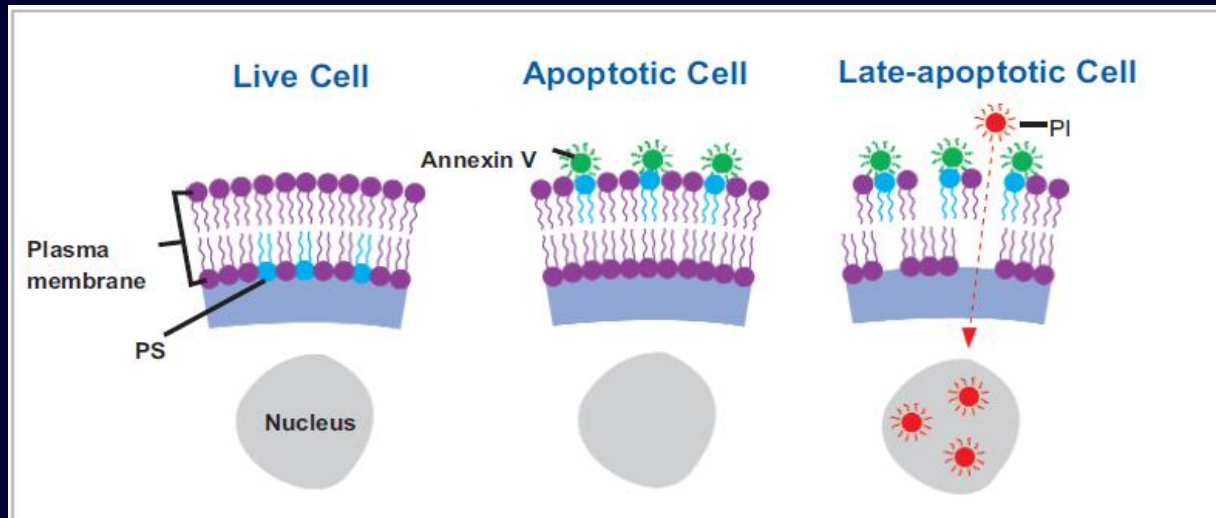


býčí spermie :

živé : **SYBR® 14** → zelené

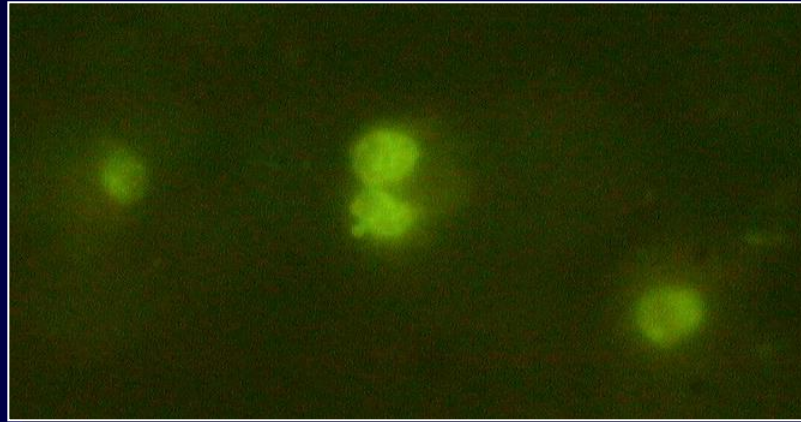
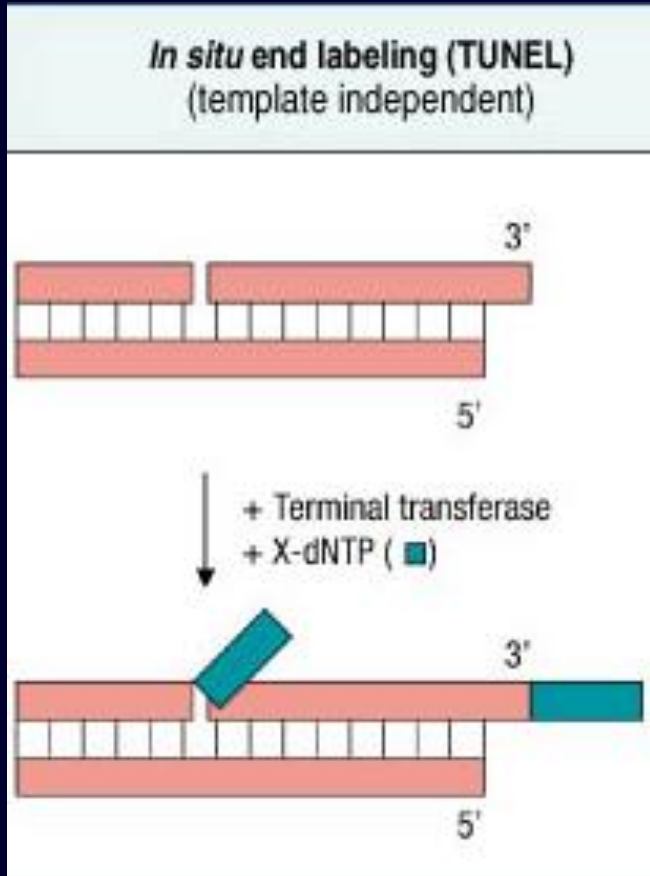
mrtvé: **propidium iodide** → červené

# Annexin V + PI: detekce buněčné smrti

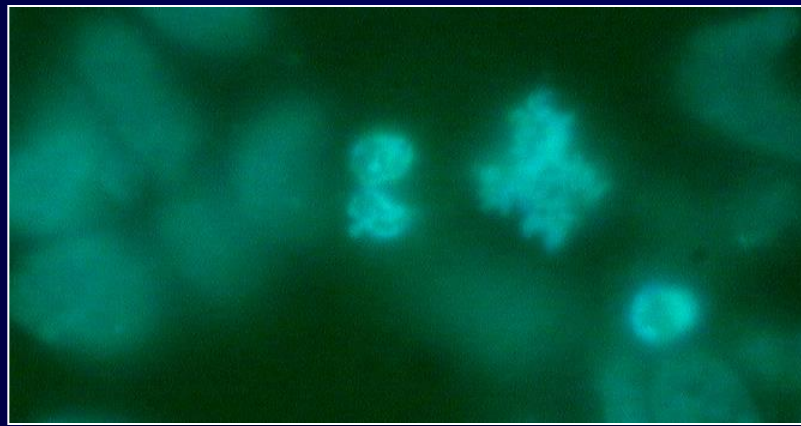


# TUNEL: Detekce štěpení DNA v apoptóze

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

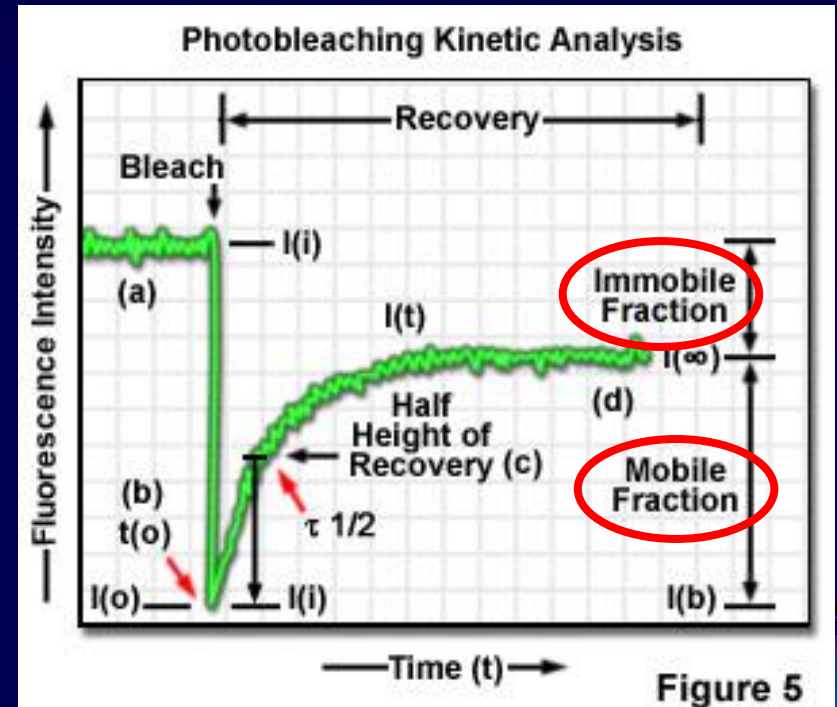
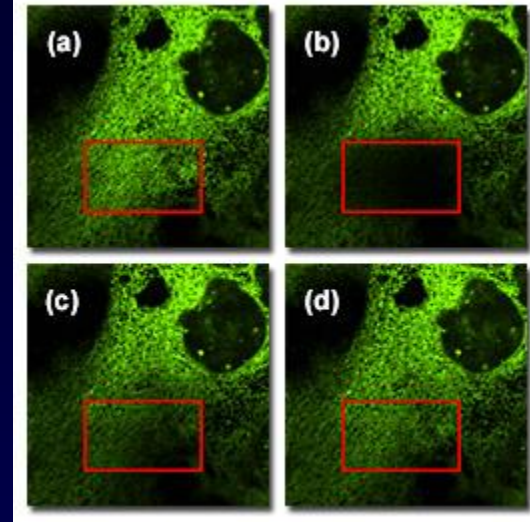
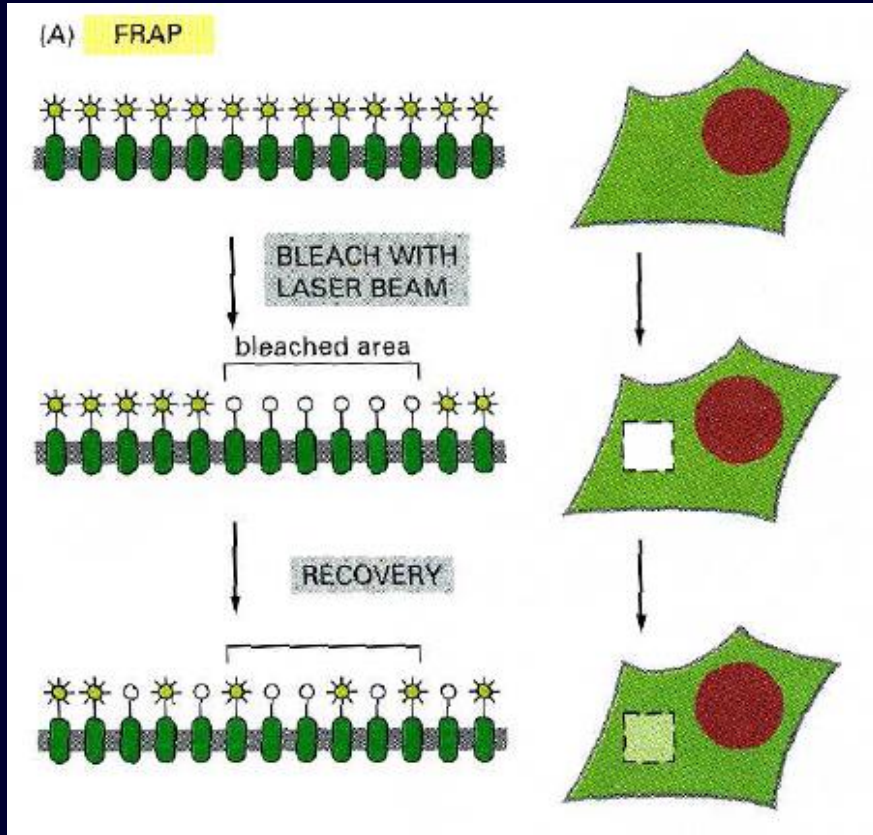
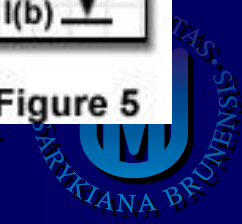
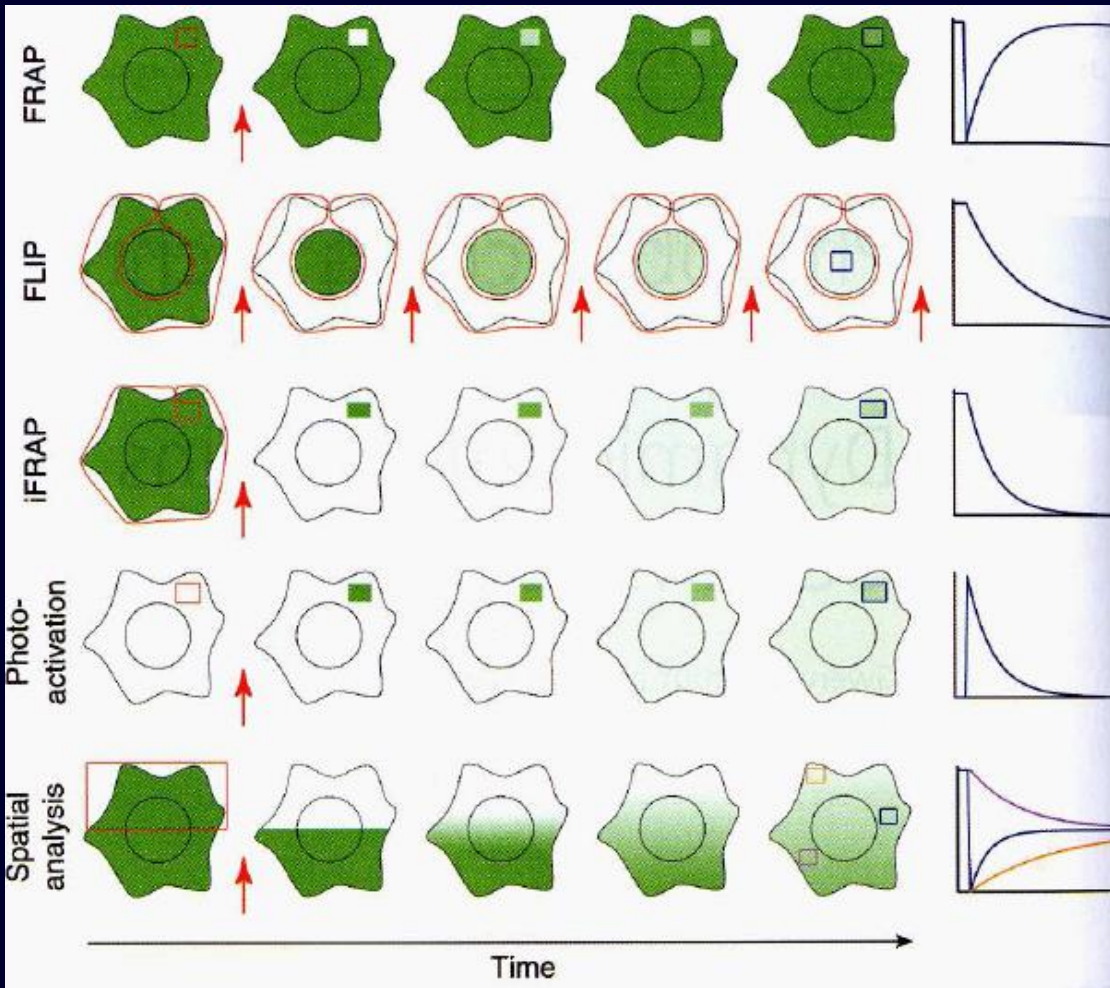


Figure 5





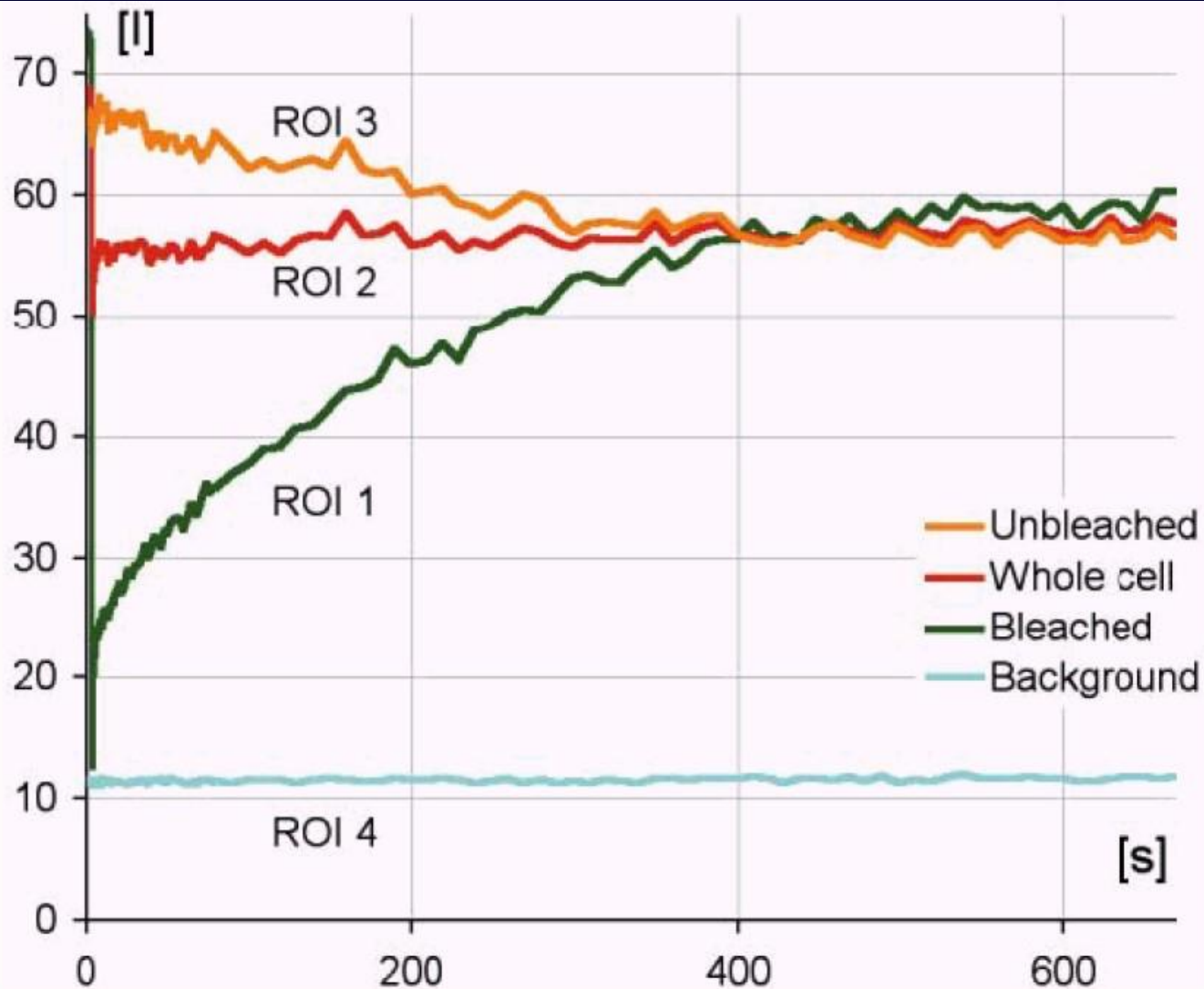
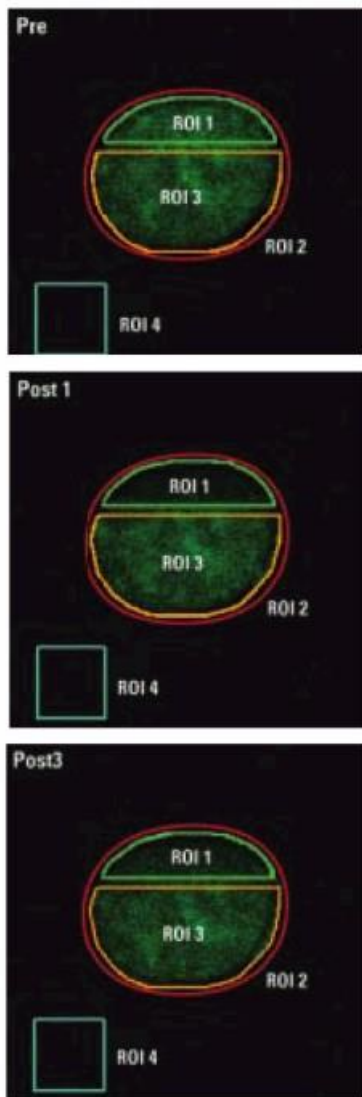


**FRAP**- malý region 1x odbarvení  
obnovení signálu, informace o  
mobilitě molekul

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

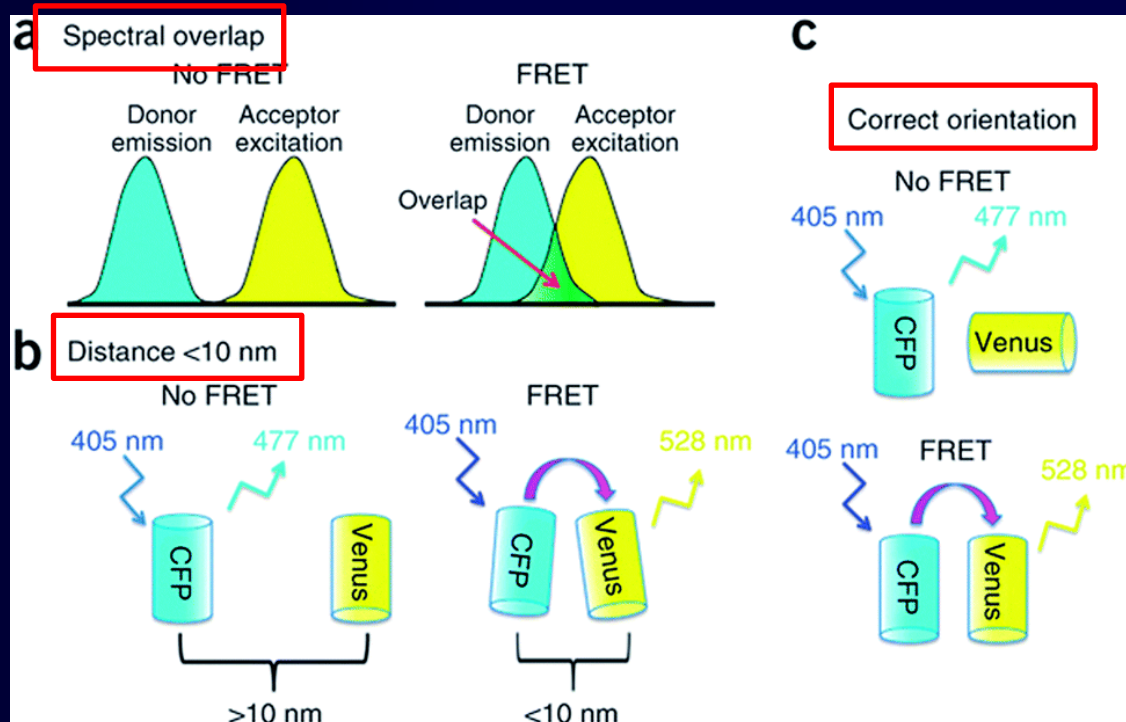
**iFRAP** (inverzní) – celý preparát  
kromě 1 regionu odbarven –  
postupné vymizení fluorescence

**fotoaktivace** – analýza rychlých  
difúzních procesů

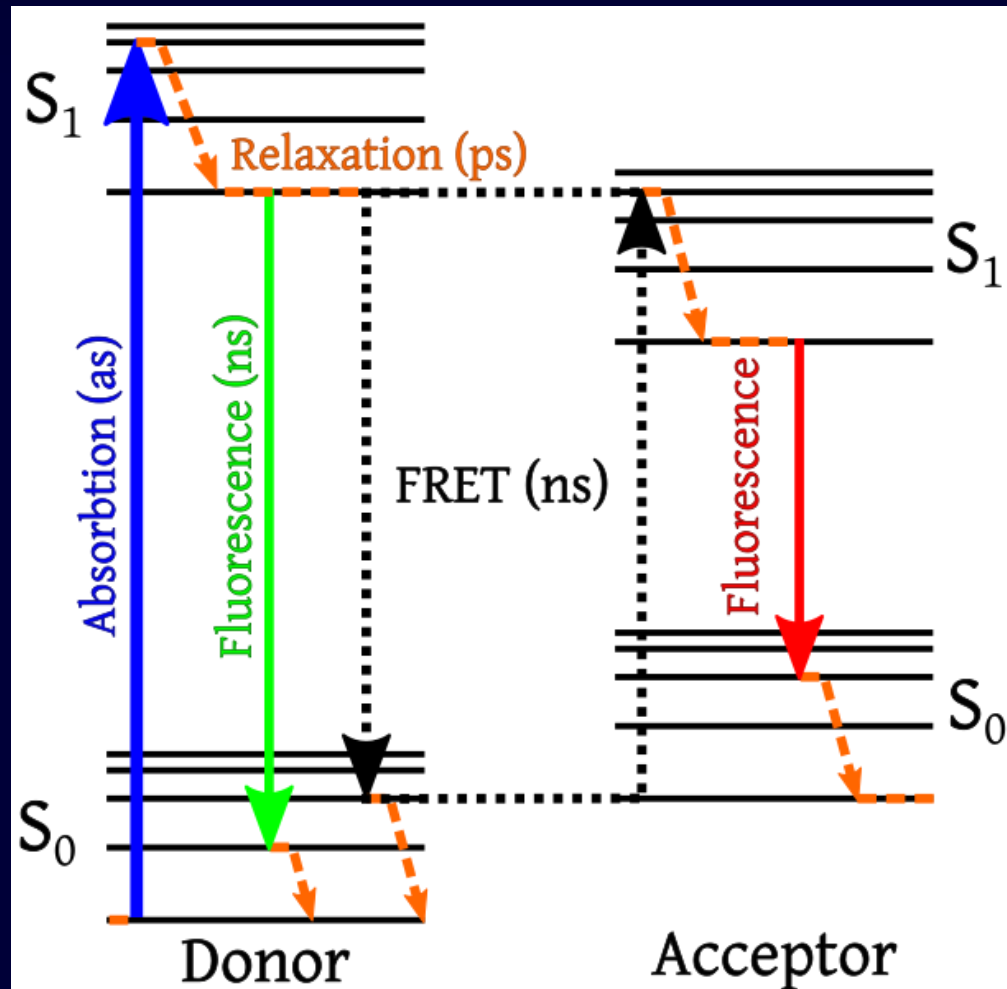


# FRET: Förster (Fluorescence) Resonance Energy Transfer

- 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

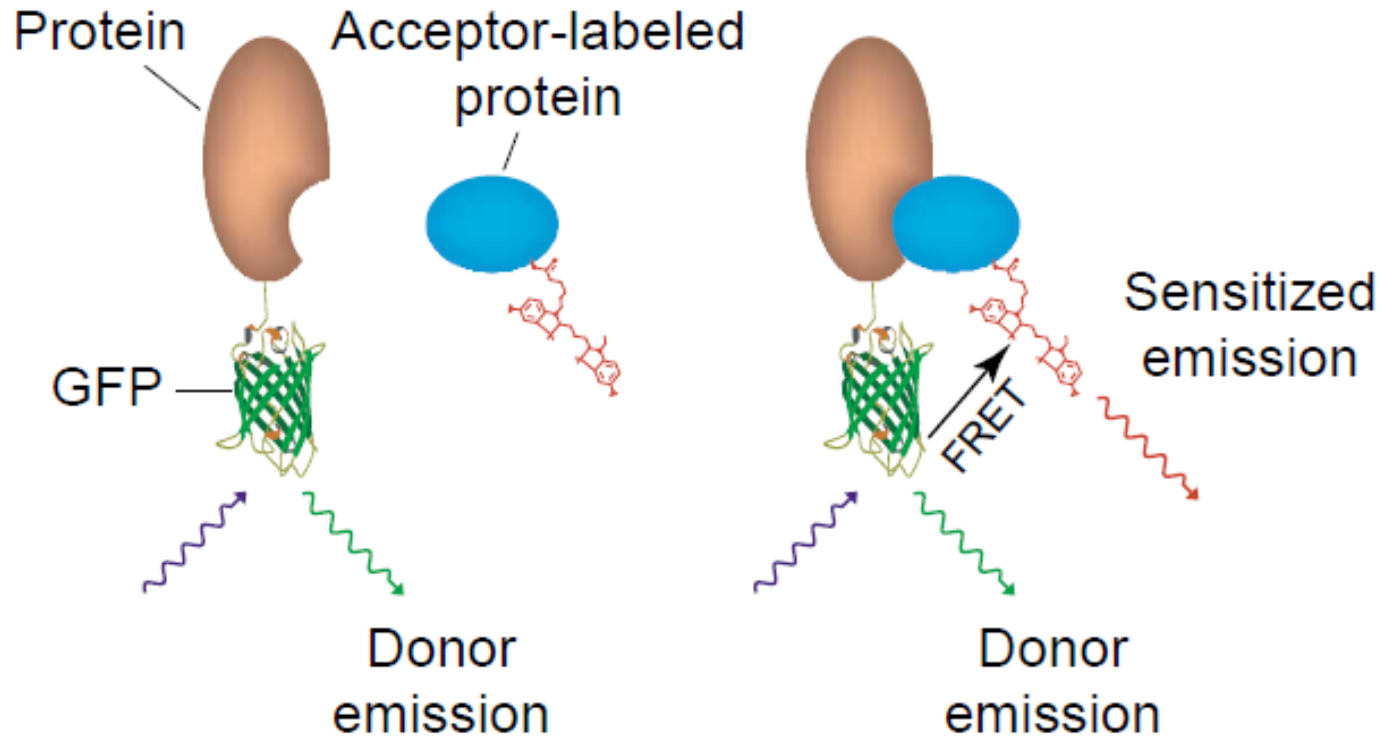


## Examples for common FRET Donor/Acceptor pairs:

<b>Donor (Em.)</b>	<b>Acceptor (Exc.)</b>
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

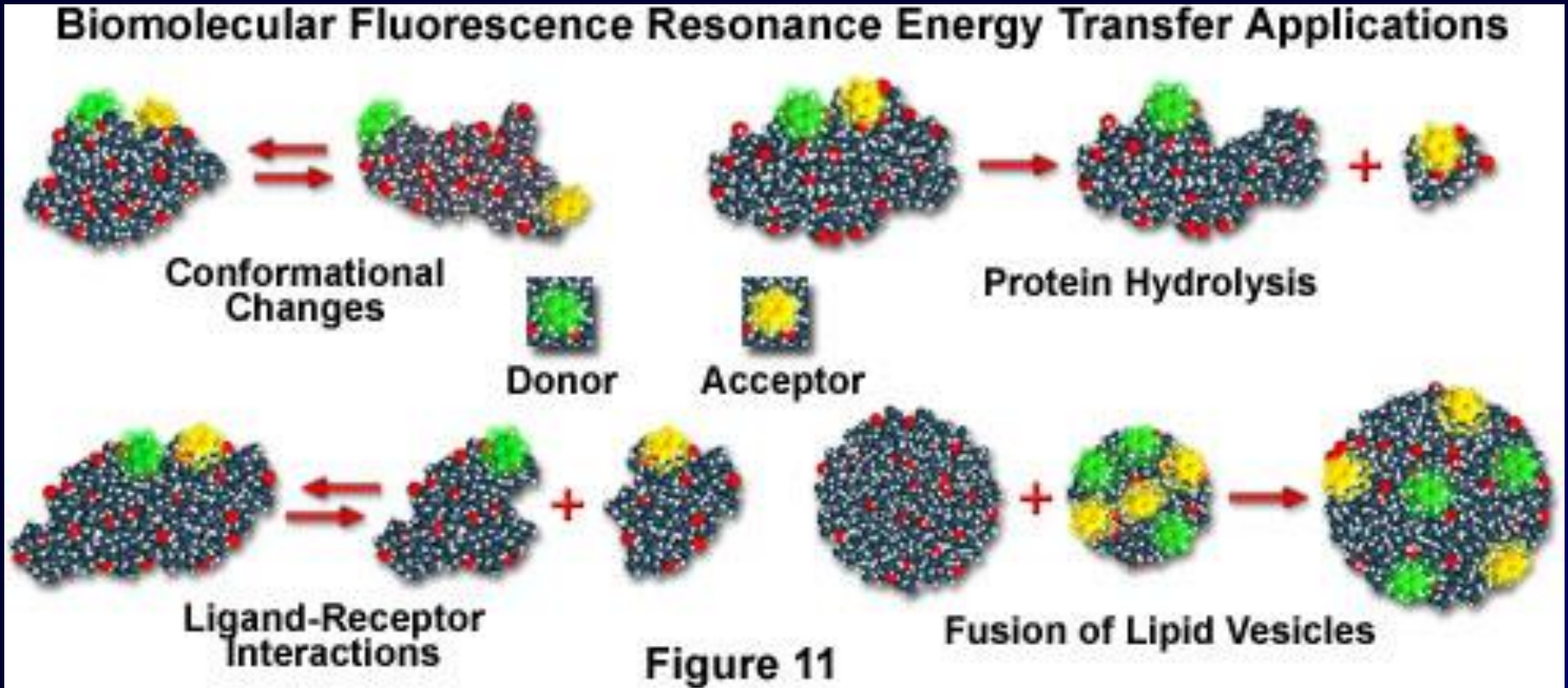
## interakce receptor-ligand



**Fig. 1.**

*TRENDS in Cell Biology*

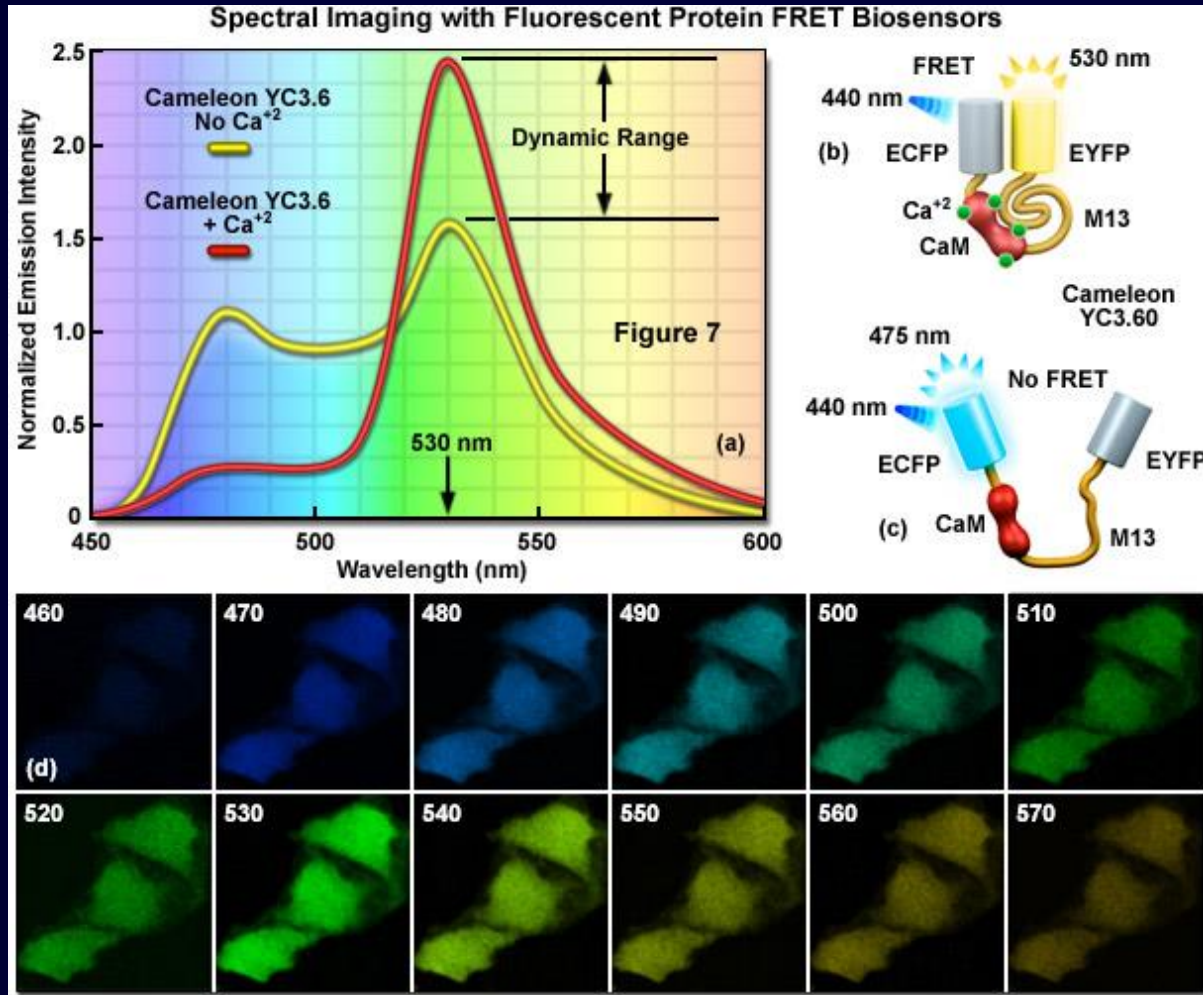
# Další aplikace FRET



# aplikace FRET

## biosenzory- měření koncentrace vápníku

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

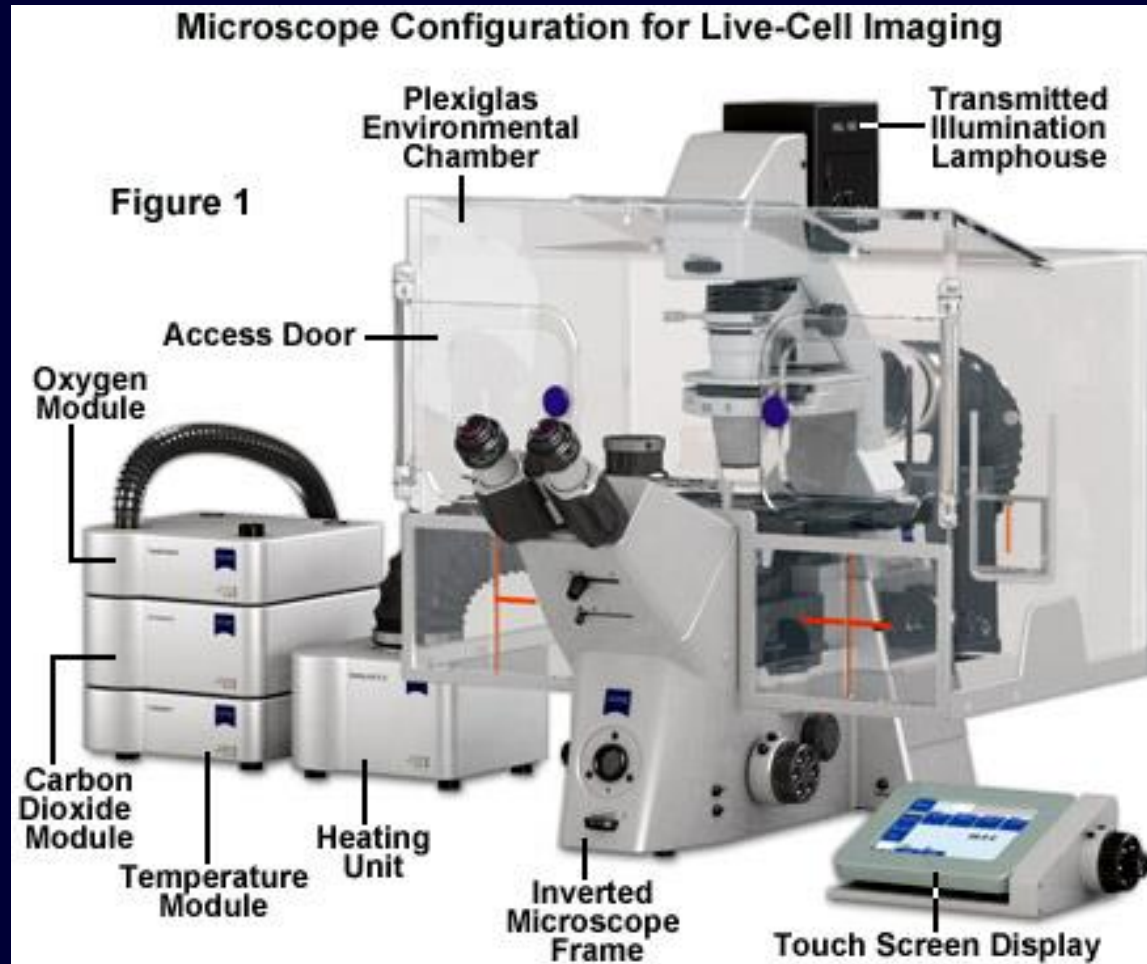




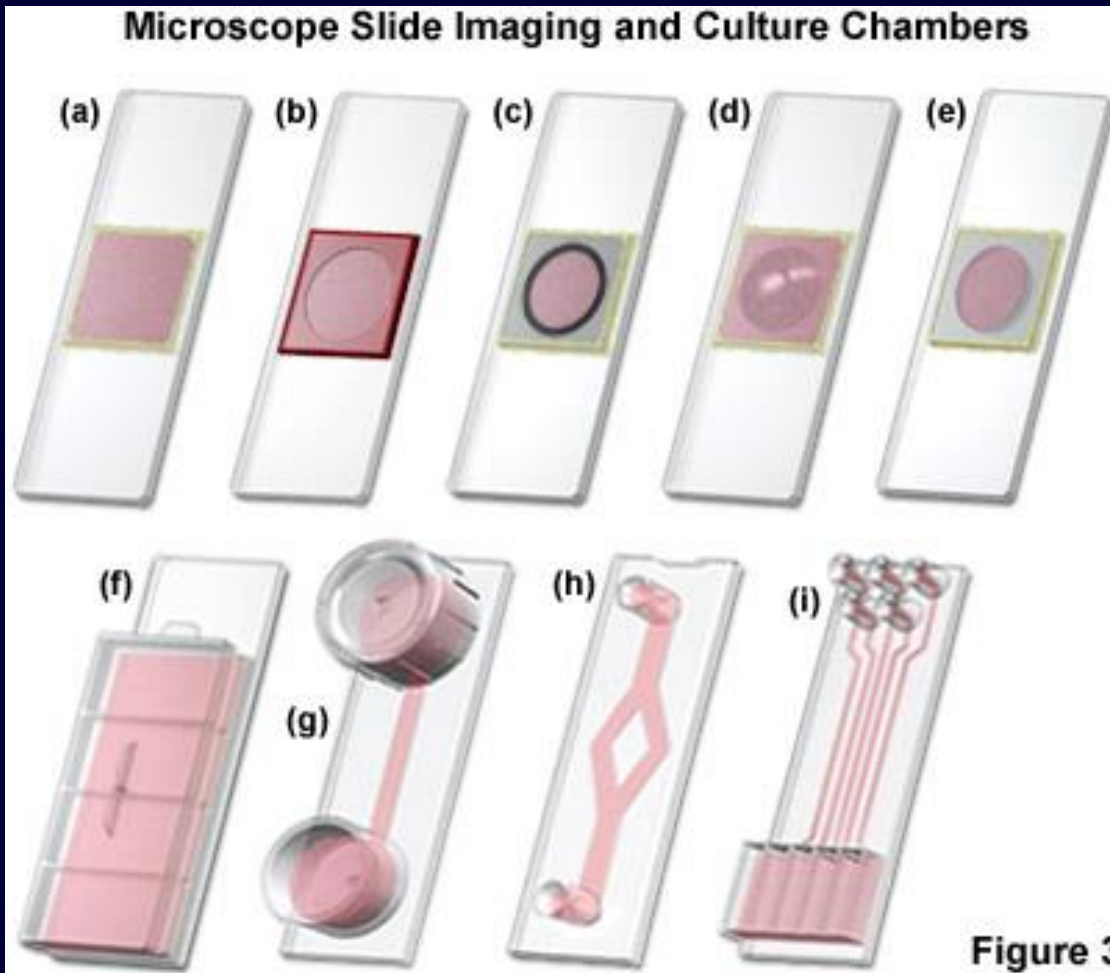
# Podmínky pro mikroskopii živých buněk

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

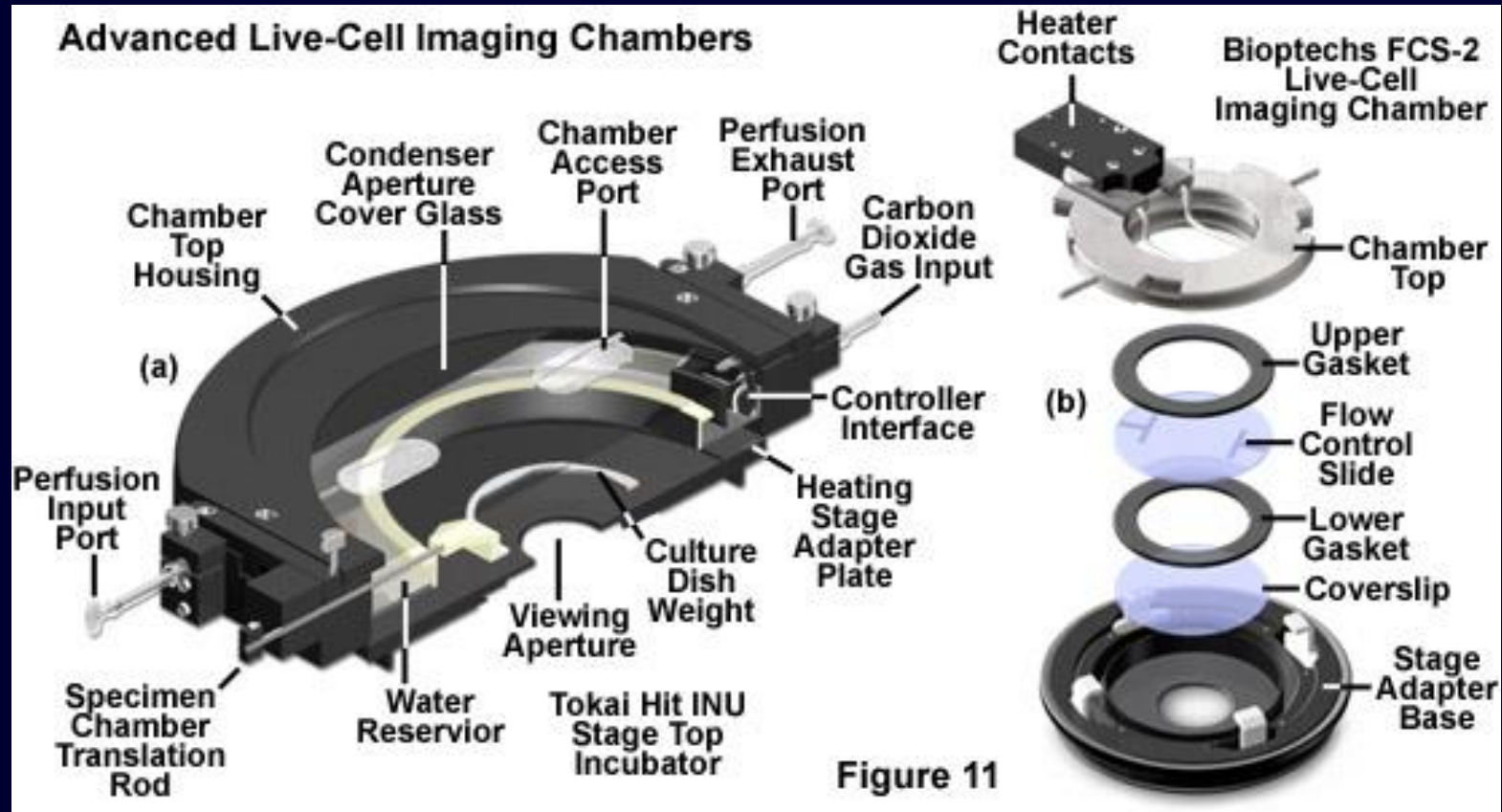
# Mikroskopie živých buněk



# Mikroskopie živých buněk



# Inkubační (perfúzní) komůrka



# Live imaging

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

