

Fluorescence v akci!

Pokročilé metody pro vizualizaci a analýzu biomolekul

Ctirad Hofr

Pokročilé metody v současné genomice a proteomice

M U N I
S C I Národní centrum
pro výzkum
biomolekul



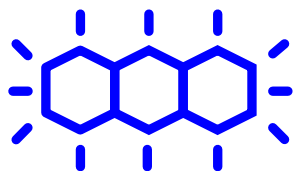
Financováno
Evropskou unií
NextGenerationEU



**NÁRODNÍ
PLÁN OBNOVY**

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

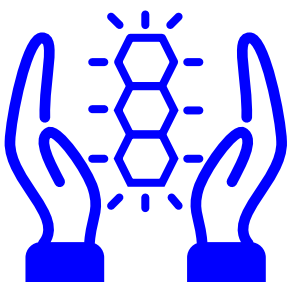
Přehled



1. Základy luminiscence – barevné a srozumitelné vysvětlení biofyzikálních základů absorpce, fluorescence, fosforescence, chemiluminiscence a elektrochemiluminiscence



2. Detekce proteinů a nukleových kyselin – využití fluorescence při analýze přítomnosti a vazby biomolekul



3. Pokročilé metody a aplikace – představení experimentálních přístupů a kombinací metod pro efektivní analýzu a tipů pro praktické použití

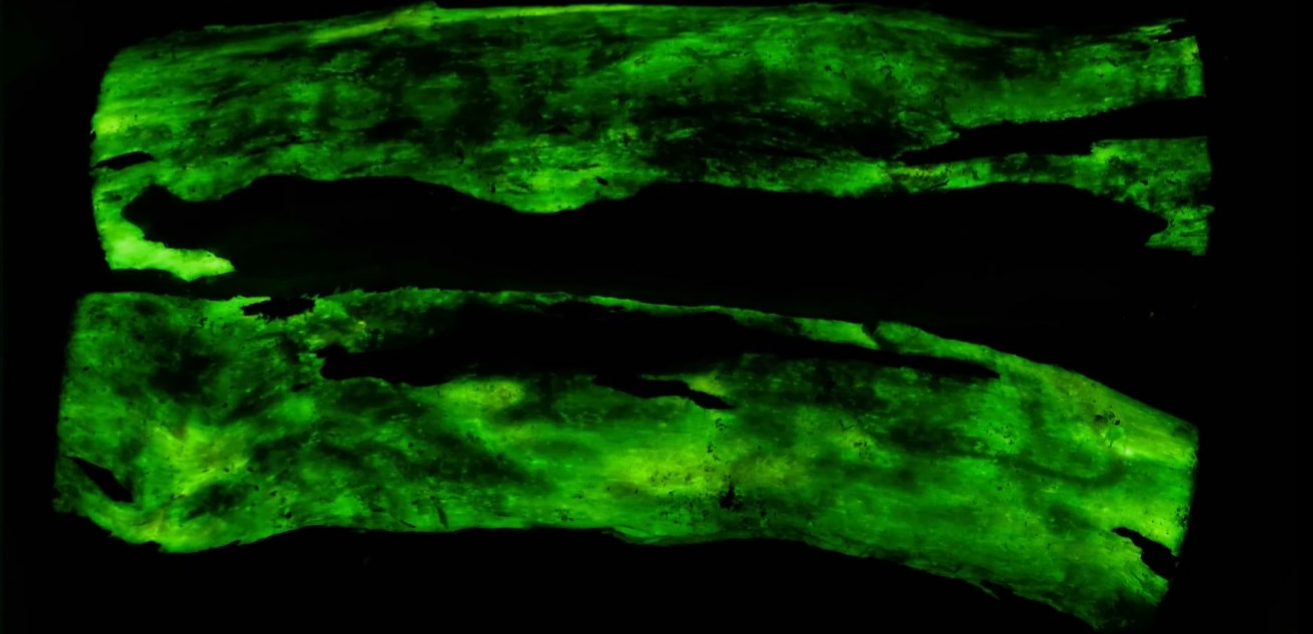
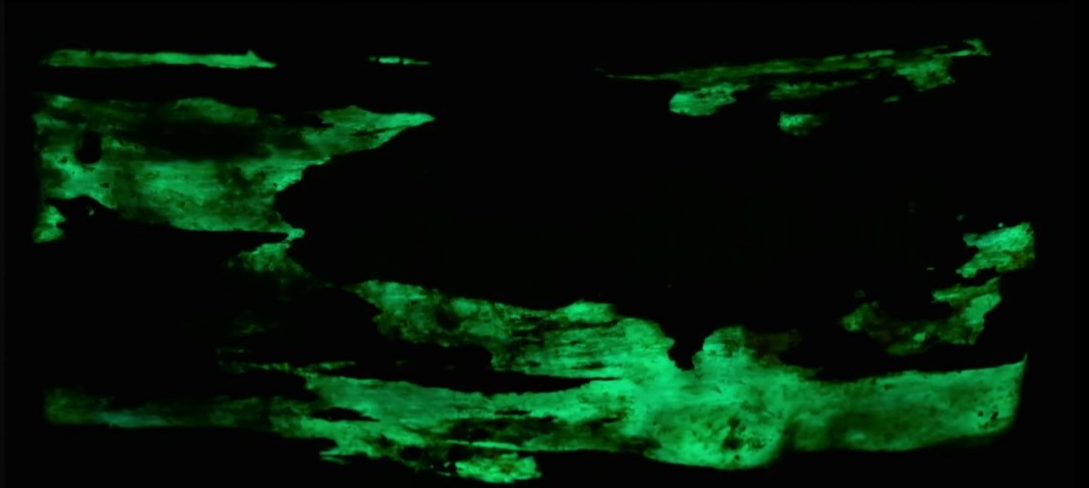
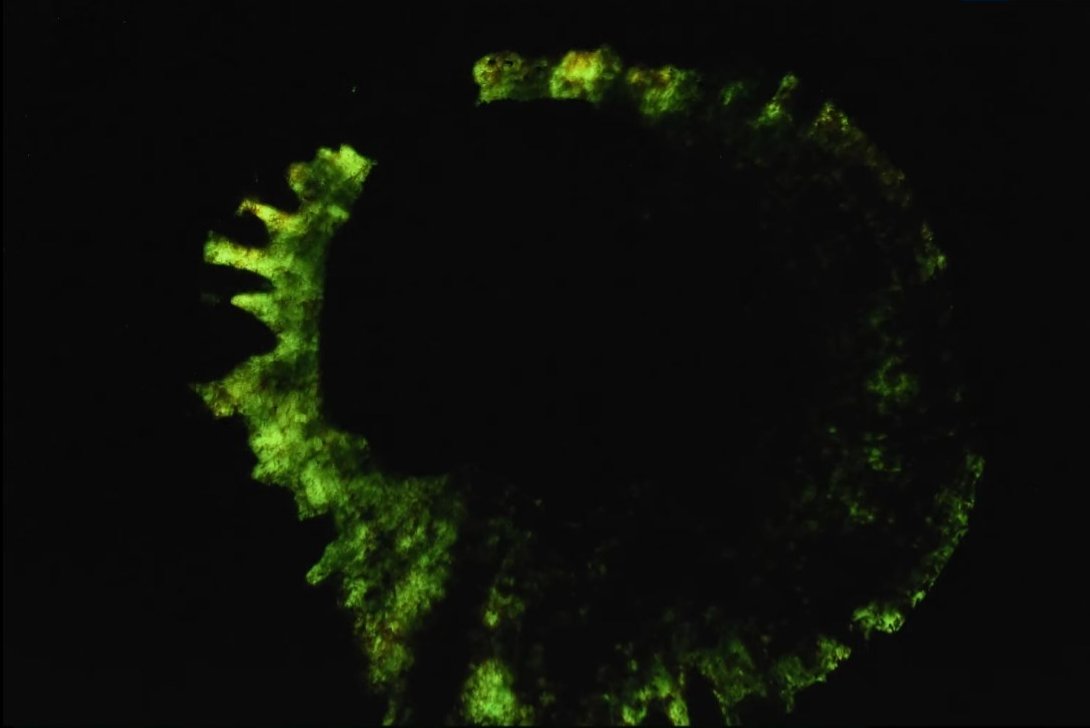
Otázky – praktické využití fluorescence

- Jaké metody využívají detekce proteinů na základě vnitřní fluorescence aminokyselin?
- Proč a jak se používá kombinace fluorescenčního přenosu energie a časově rozlišené fluorescence pro validaci přímé vazby biomolekul?
- Které fluorescenční značky a sondy jsou vhodné pro kvantitativní analýzu přítomnosti proteinů a DNA a s jakou citlivostí?

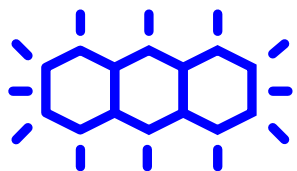
Luminiscence kolem nás



A glowing underground network of fungi - Attenborough's Life That Glows: BBC 2
<https://youtu.be/33-3UCTRZWM?t=28>



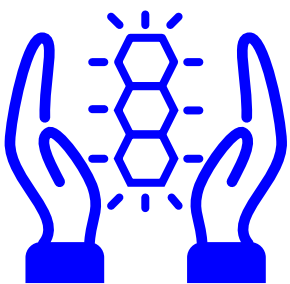
Přehled



1. Základy luminiscence – barevné a srozumitelné vysvětlení biofyzikálních základů absorpce, fluorescence, fosforescence, chemiluminiscence a elektrochemiluminiscence

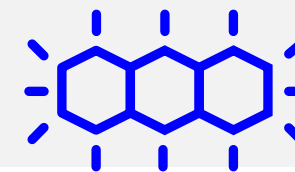


2. Detekce proteinů a nukleových kyselin – využití fluorescence při analýze přítomnosti a vazby biomolekul



3. Pokročilé metody a aplikace – představení experimentálních přístupů a kombinací metod pro efektivní analýzu a tipů pro praktické použití

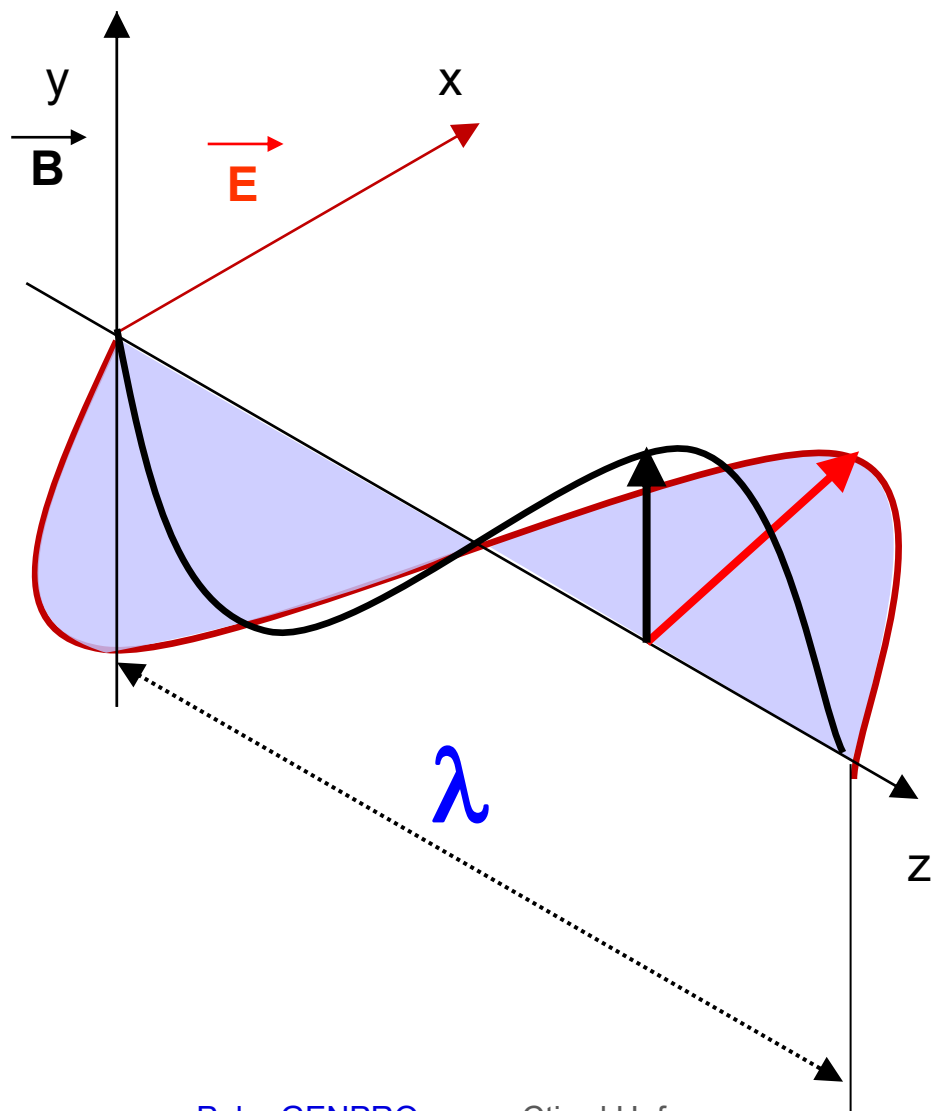
1. Barevné základy luminiscence



barevné a srozumitelné vysvětlení biofyzikálních základů

- a) Absorpce
- b) Fluorescence
- c) Fosforescence
- d) Chemiluminiscence
- e) Elektrochemiluminiscence

Světlo = Elektromagnetická vlna



$$c = \lambda f$$

c je konstanta – jestliže se zvýší vlnová délka, musí se snížit frekvence, aby byl součin konstantní.

Vlnová délka λ je nepřímo úměrná frekvenci f

$$E = h f$$

Čím je větší frekvence, tím je větší energie záření.

Čím je větší vlnová délka λ , tím je menší energie záření.

Luminiscence

- Emise světla z nějaké látky; nastává z **elektronových** excitovaných stavů
 - Podle původu dělíme luminiscenci na
 - fotoluminiscenci 2. chemiluminiscenci

Luminiscence se dělí na:

1. fluorescenci

2. fosforescenci

Fluorescence

- Emise z excitovaných singletových stavů
- Prakticky: fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí rychle mizí
- Doba dohasínání τ (Lifetime) je průměrný čas, který uplyne od excitace po emisi –
je řádově **1 – 10 nanosekund**
- pozn. : světlo urazí za 1 ns 30 cm

Fosforescence

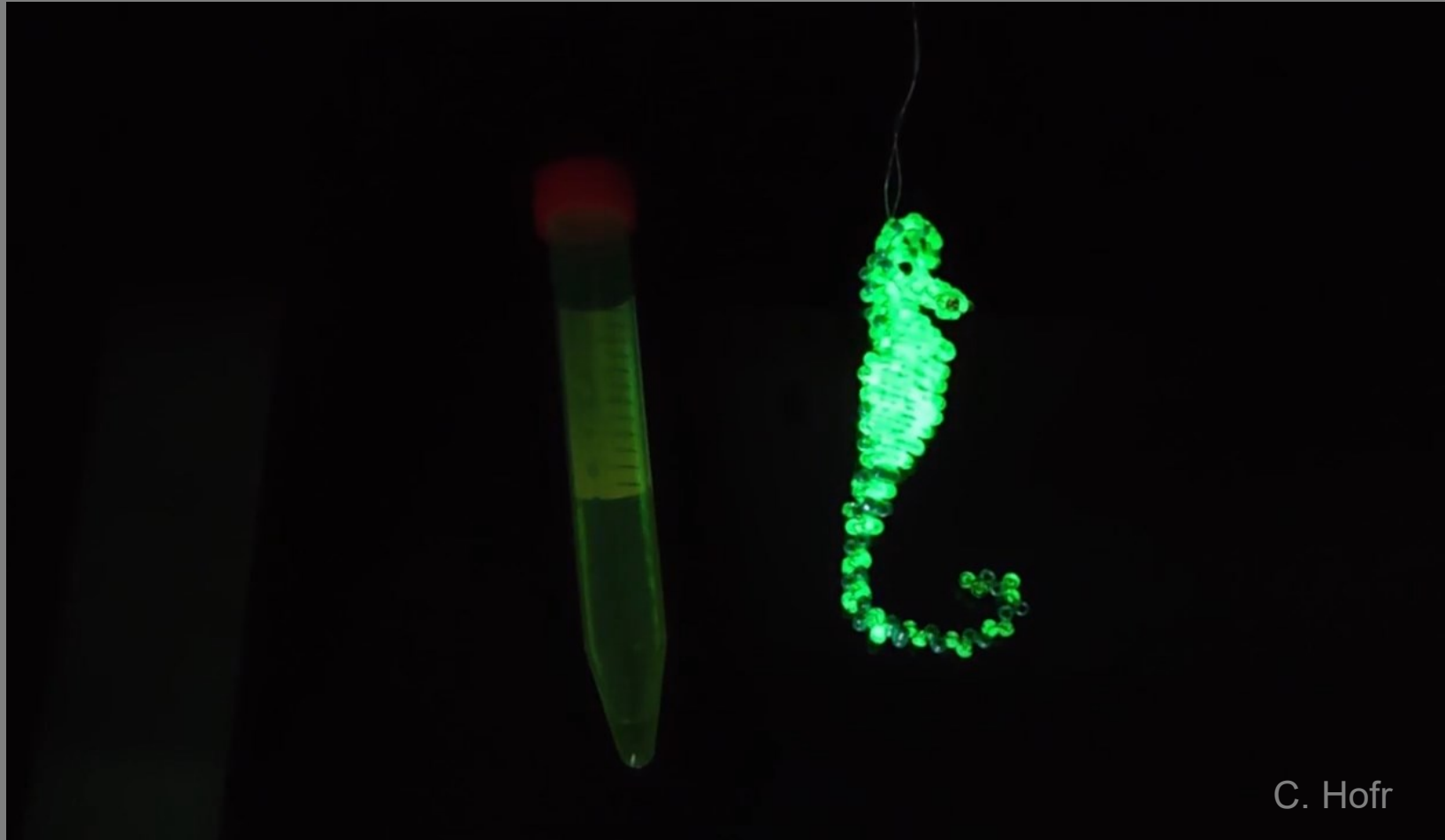
- Emise z excitovaných tripletových (zakázaných) stavů
- Prakticky: **fosforescence** má mnohem delší dobu dohasínání než **fluorescence**

Doba dohasínání řádově

milisekundy až sekundy

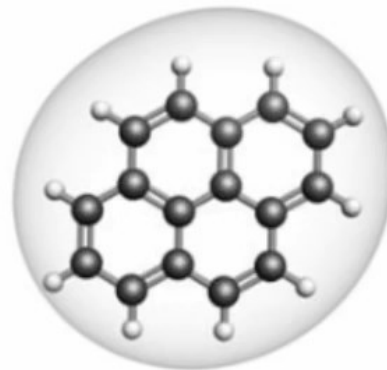
pozn. : světlo urazí za tu dobu 300 až 300 000 km

Jak rozlišíme fluorescenci a fosforescenci?



Komentovaný úvod -fluorofor

Definition of Fluorescence



Fluorophore molecule

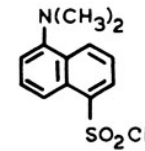
molecular
probes®

Molecular Probes Tutorial Series—Introduction to Fluorescence
www.youtube.com/watch?v=SGFlr1jFNBM

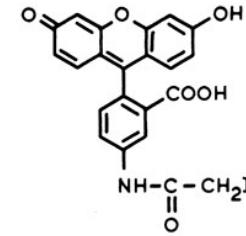
Jak poznáme možný flouorofor?

- molekula je **planární**
- **aromatická:**

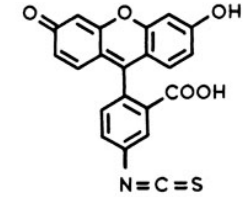
obsahuje konjugované vazby



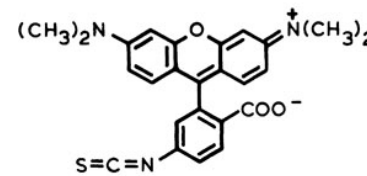
DNS-Cl



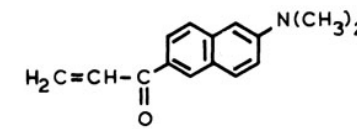
5-IAF



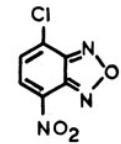
FITC



TRITC

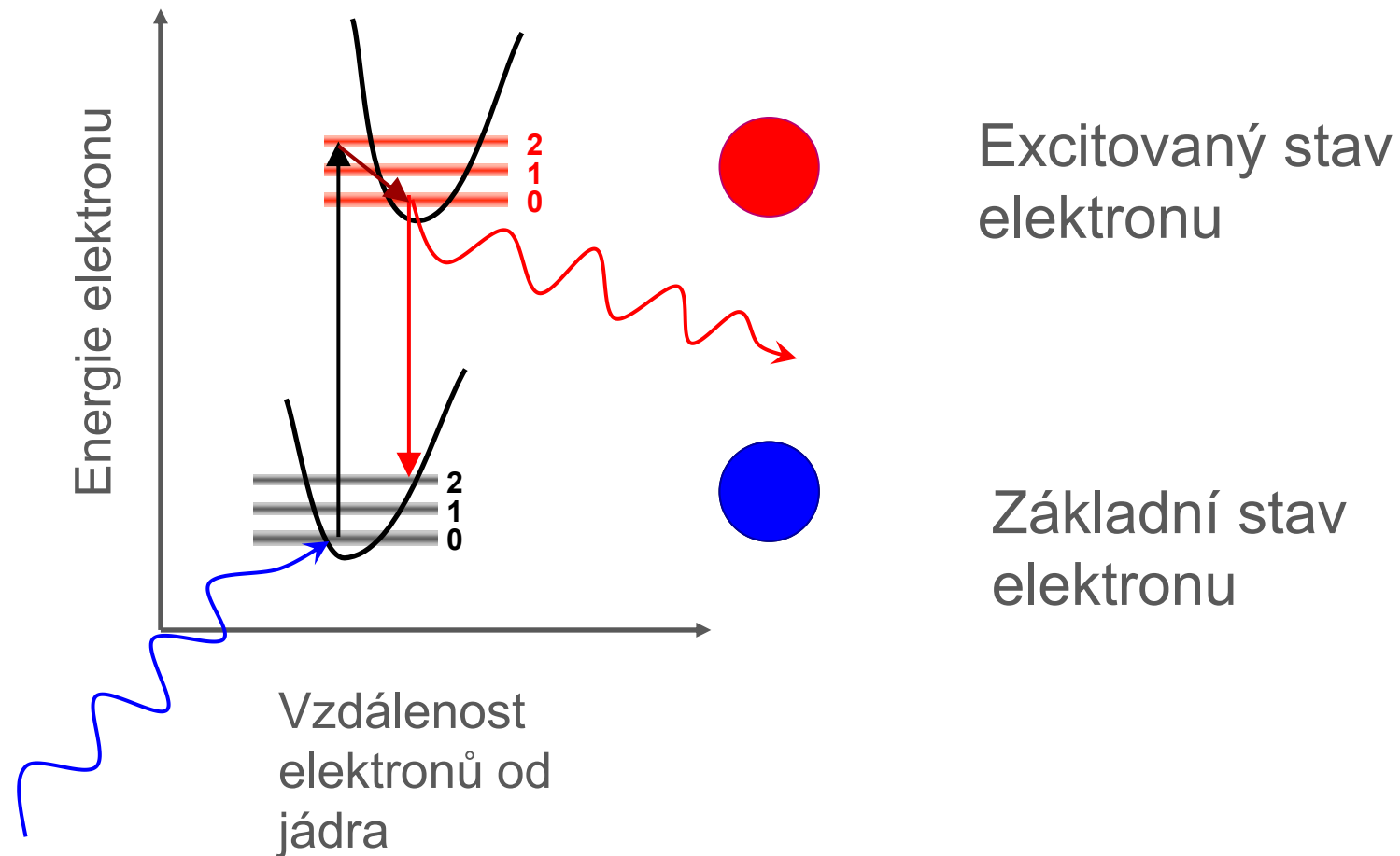


Acrylodan

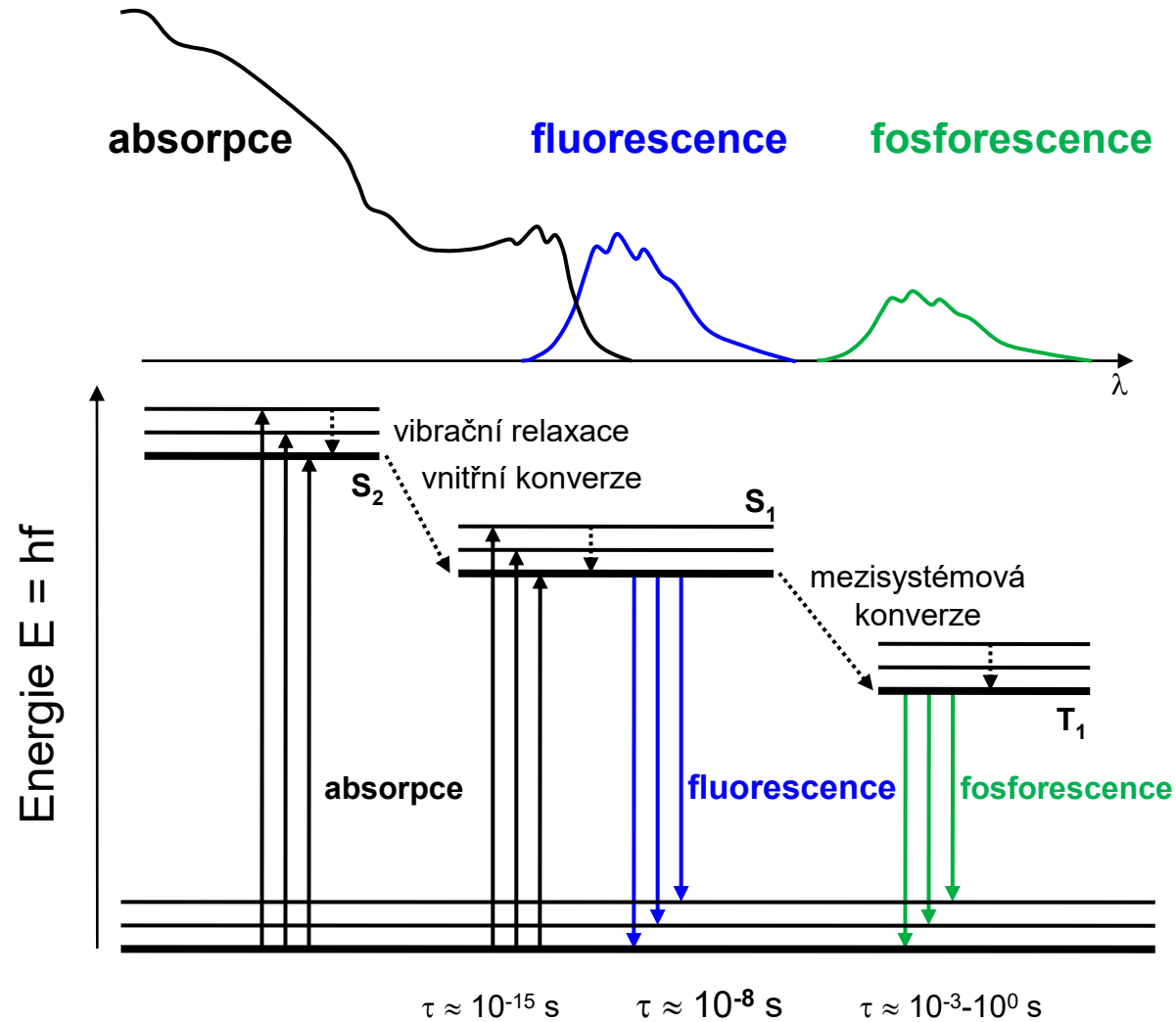


NBD-Cl

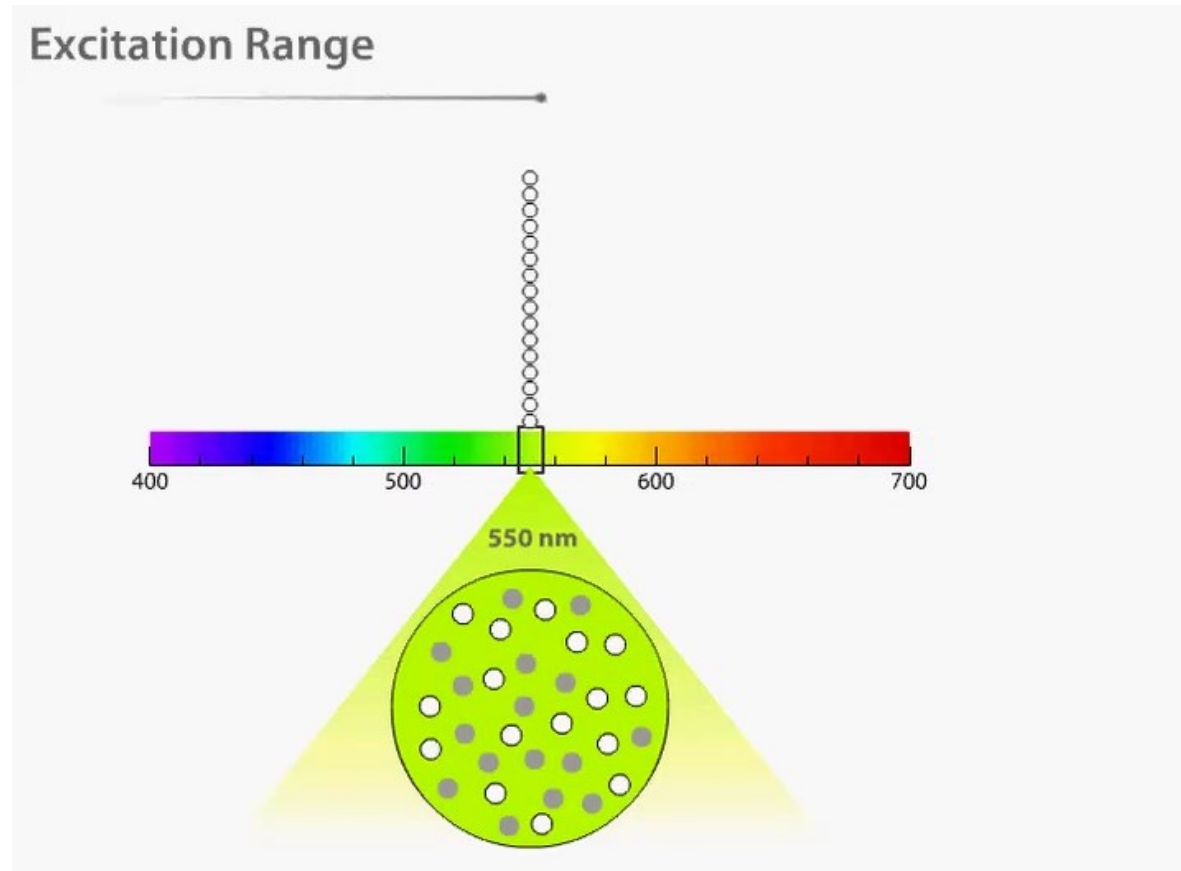
Absorpce a emise energie molekulou



Shrnutí času a energie - zářivé a nezářivé přechody mezi elektronově vibračními stavy molekuly



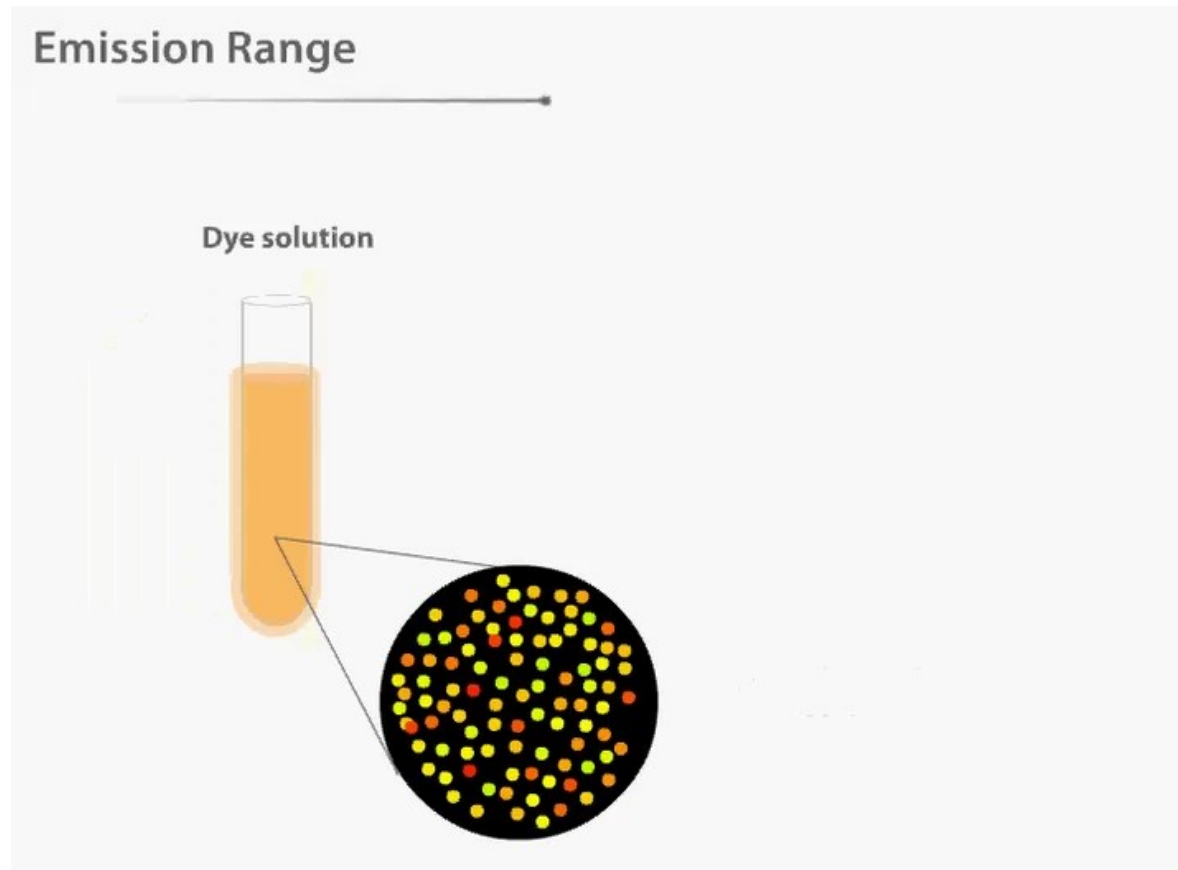
Vznik absorpčního~excitačního spektra



<https://youtu.be/SGF1r1jFNBM>

Absorpční=excitační spektrum znázorňuje pravděpodobnost, že při dané vlnové délce dojde k excitaci fluoroforu **dopadajícím světlem**.

Vznik emisního spektra

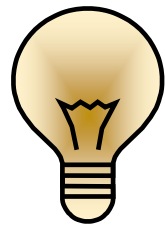


<https://youtu.be/SGFlr1jFNBM>

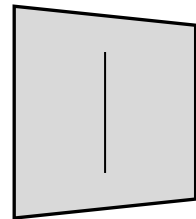
Emisní spektrum, určuje pravděpodobnost, že dojde k emisi fluorescence o dané vlnové délce = barvě. **Závisí na fluoroforu** a je jeho charakteristikou.

SpektroFOTometr

- Příklad pro měření absorpce světla vzorkem
Absorbance je měřena při různých vlnových délkách
Výsledkem je absorpční spektrum látky



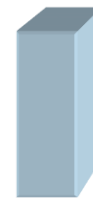
zdroj



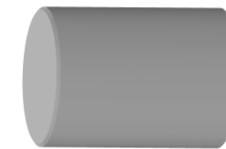
štěrbina



výběr vlnové délky

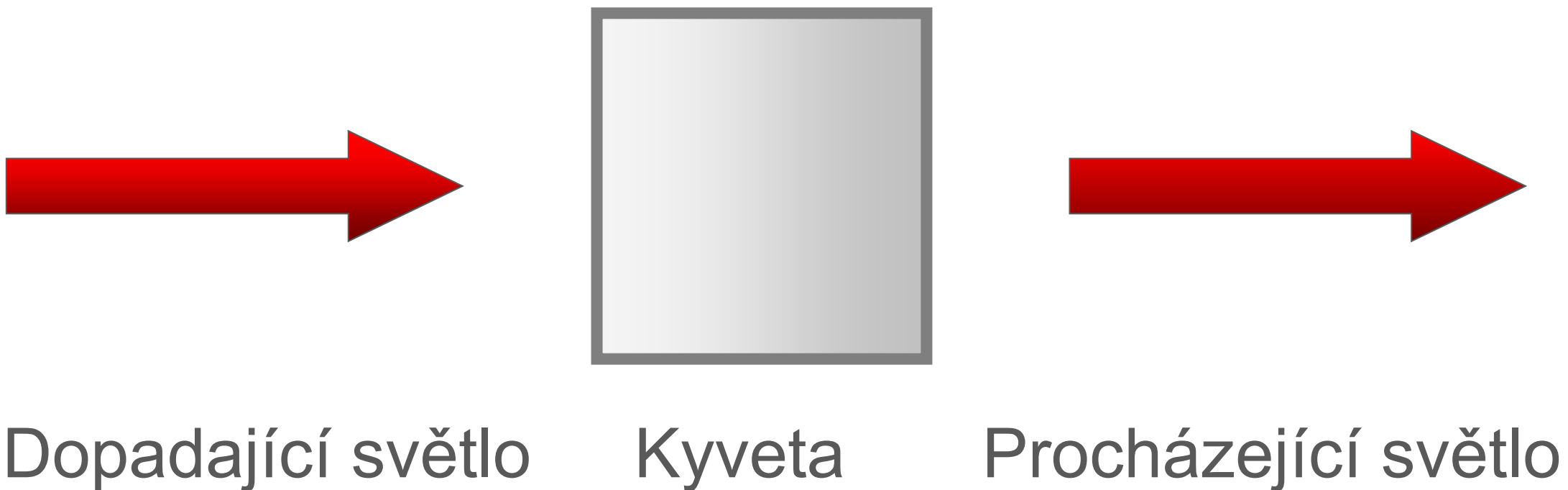


vzorek

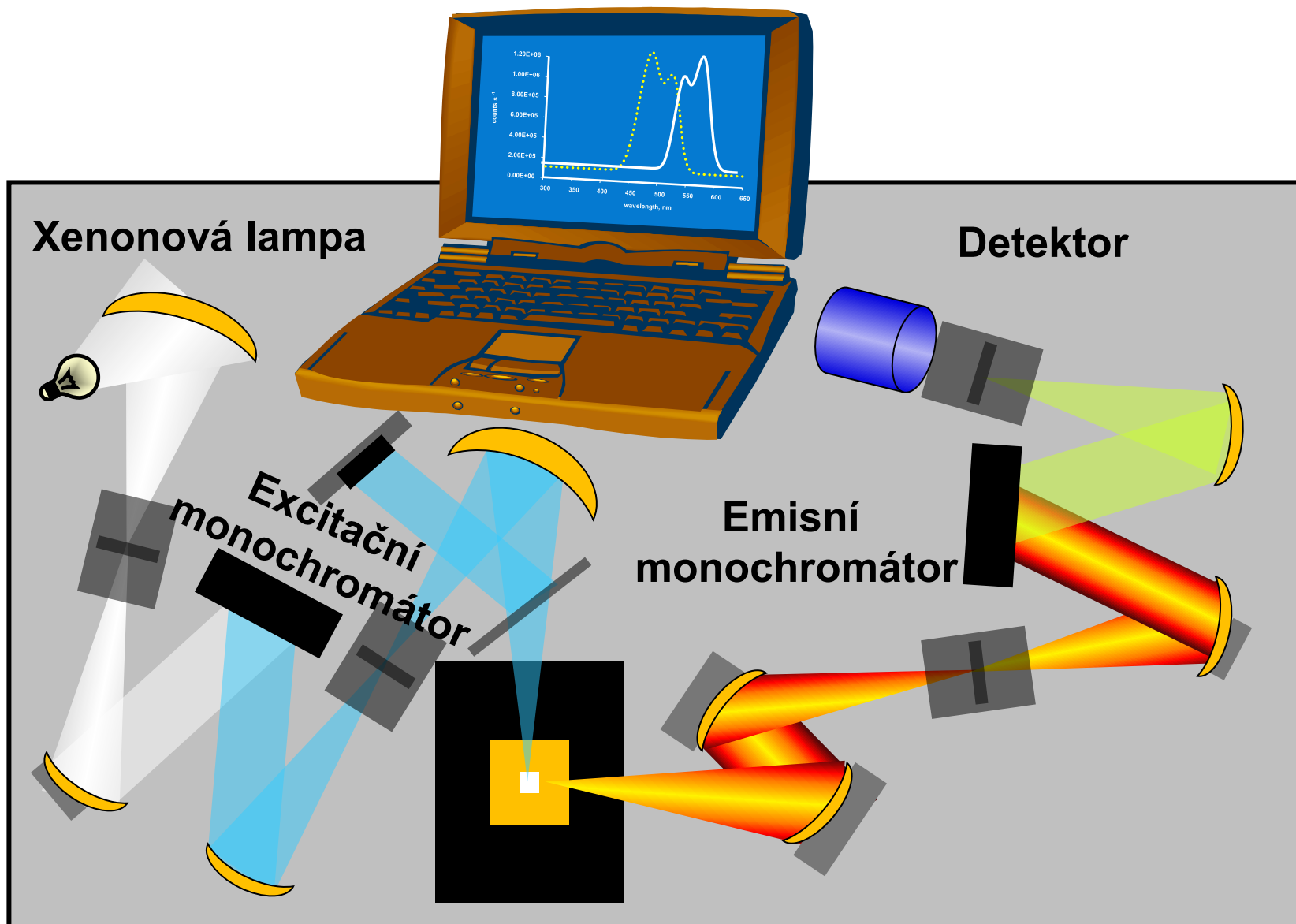


detektor

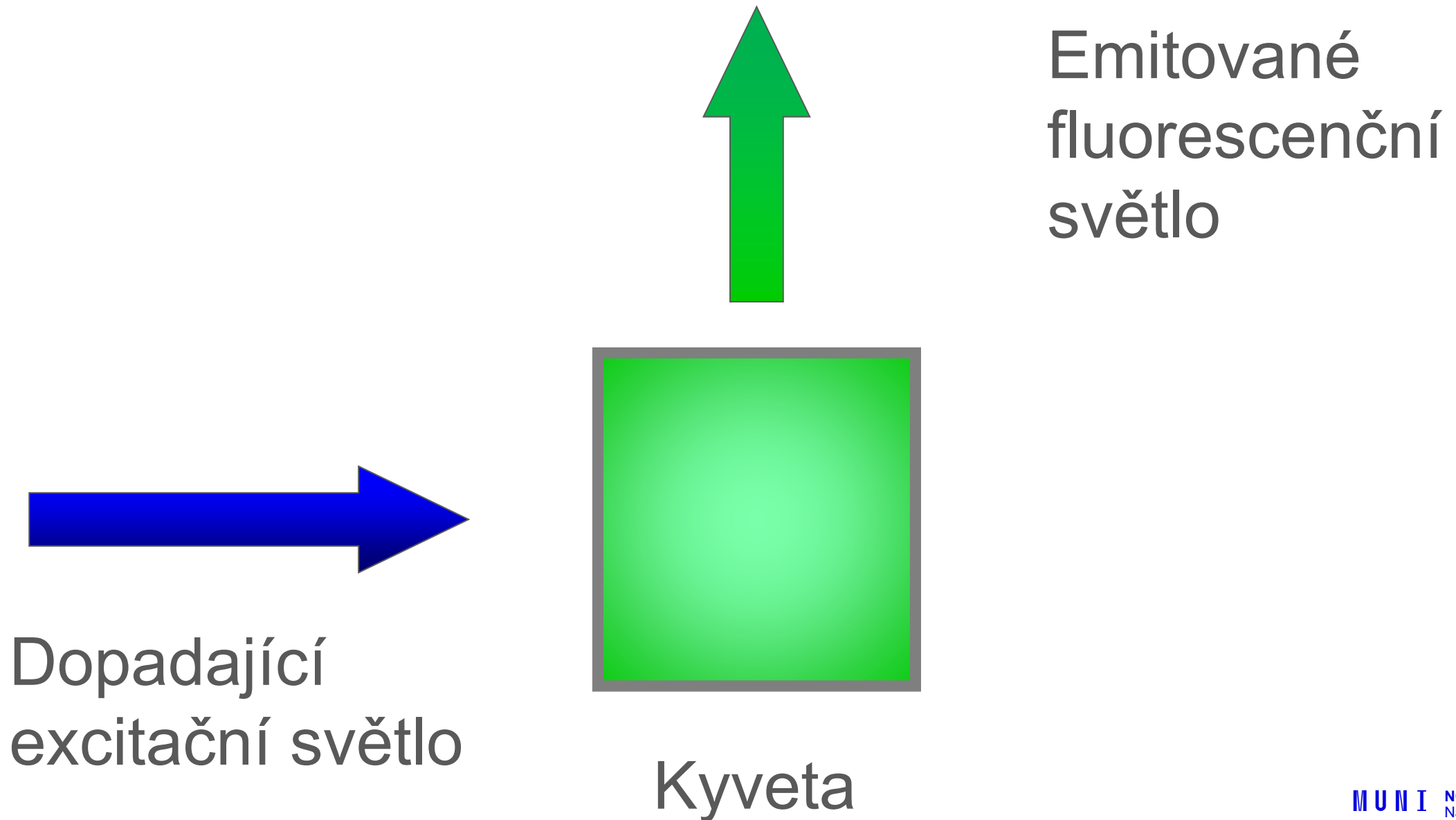
Geometrie při měření absorbance



SpektroFLUORometr

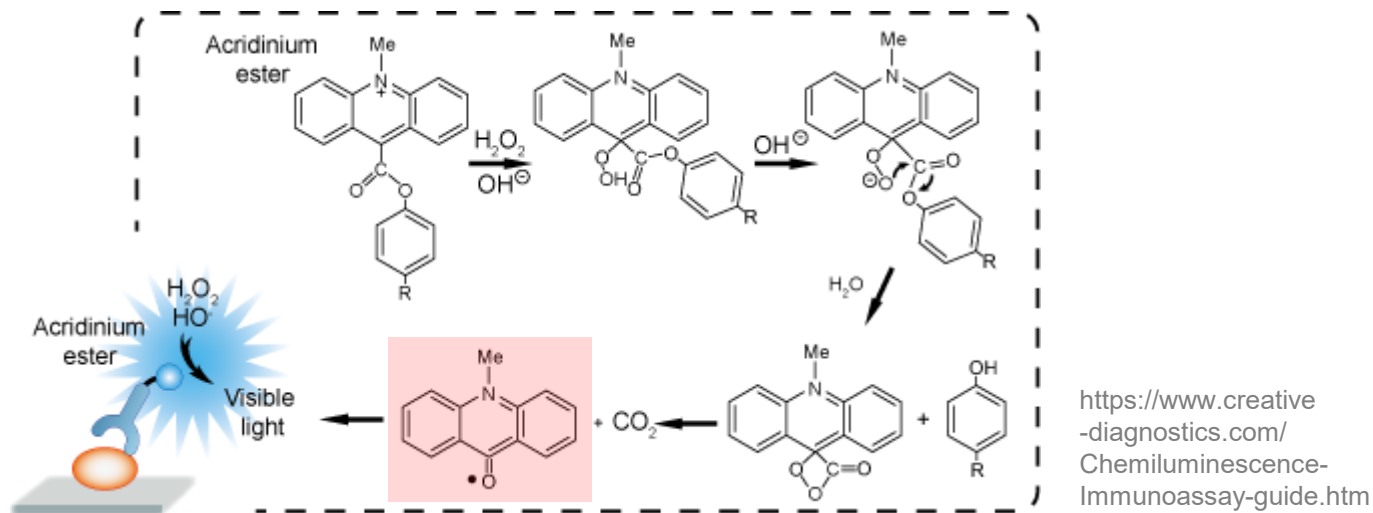


Geometrie při měření fluorescence



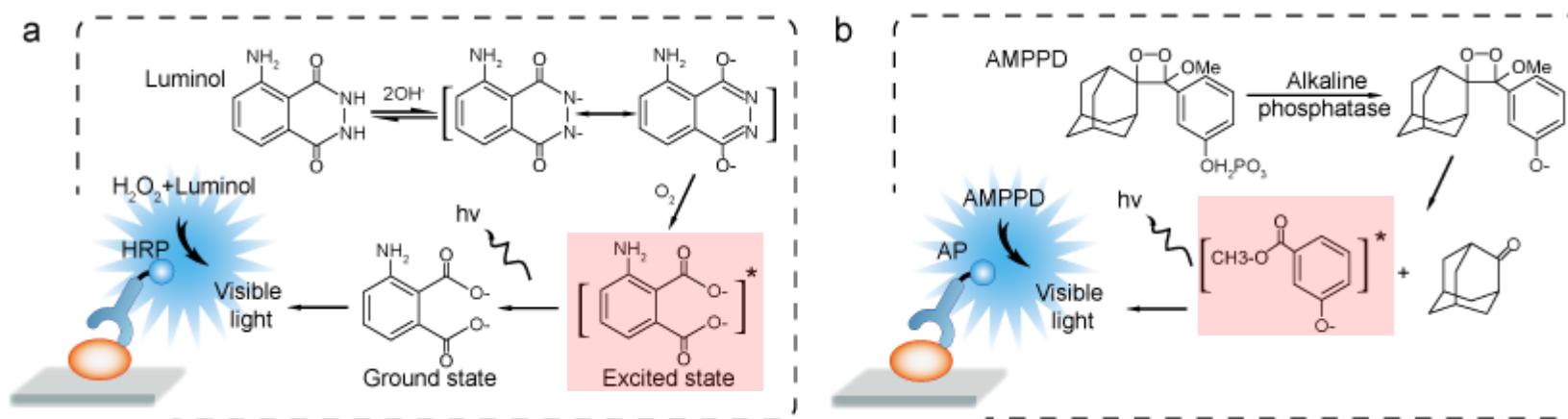
Chemiluminescence

- Chemiluminescence je emise světla vznikajícího chemickou reakcí.
- Molekuly s speciální strukturou mohou přejít do excitovaného stavu = získat excitované elektrony chemickou reakcí. Při přechodu z excitovaného stavu do základního je emitováno světlo. Vystavení značky alkalickému roztoku peroxidu vodíku vyvolá záblesk světla.



Bioluminescence

- Bioluminescence je druh chemiluminiscence, při které enzym katalyzuje přeměnu substrátu za vzniku excitované molekuly, která následně emituje světlo.
- Křenová peroxidáza (HRP) katalyzuje rozklad luminolu v přítomnosti peroxidu za vzniku meziproduktu v excitovaném stavu.
- Alkalická fosfatáza (AP) katalyzuje odštěpení fosfátové skupiny z AMPPD. se tato sloučenina destabilizuje a rozkládá se prostřednictvím excitovaného intermediárního aniontu AMPD, který následně vyzařuje světlo.

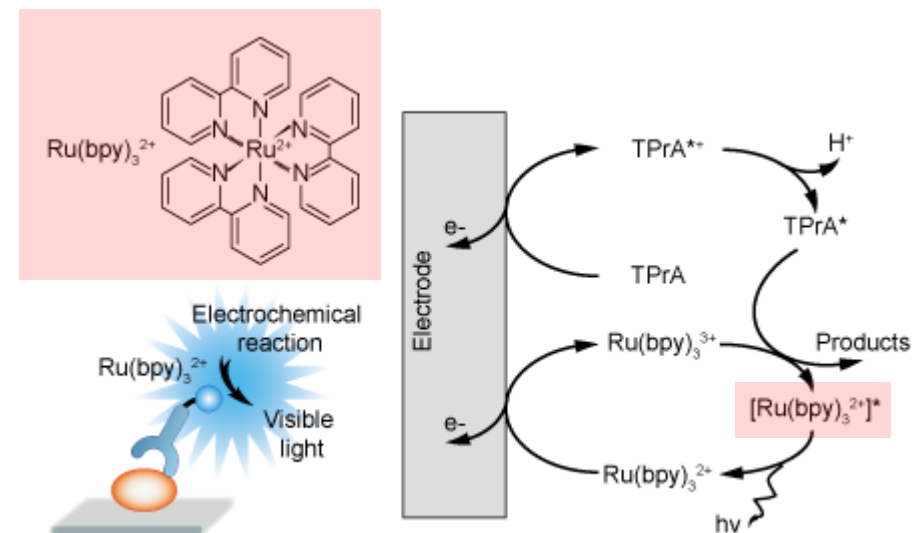
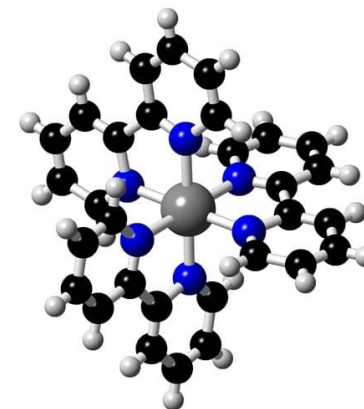


Bioluminescence Luminol-HRP (a) and AMPPD-AP (b).

<https://www.creative-diagnostics.com/Chemiluminescence-Immunoassay-guide.htm>

Elektrochemiluminiscence – princip

- Pozoruhodná tím, že reagent je regenerován a používán opakovaně – recyklace.
- Reagent - tris(bipyridyl) ruthenitý komplex $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ se za přítomnosti tripropylaminu (TPA) mění na – natý $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ excitovaný komplex, který přechází do základního stavu vyzařováním oranžového světla.
- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ lze zpětně regenerovat z $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ na elektrodě.



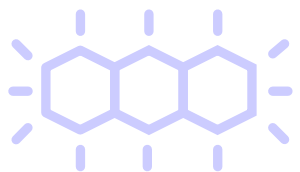
https://is.muni.cz/th/269168/prif_b/

Electrochemiluminescence – aplikace

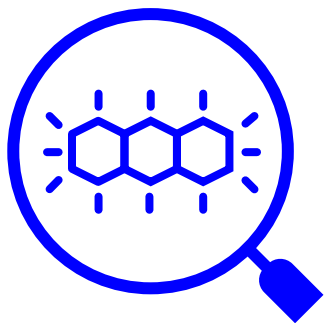


https://youtu.be/GdLMyUnQn_o?t=25

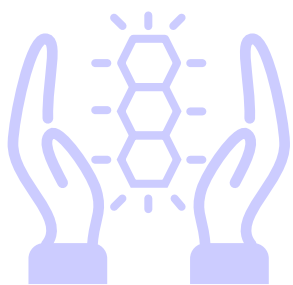
Přehled



1. **Základy luminiscence** – barevné a srozumitelné vysvětlení biofyzikálních základů absorpce, fluorescence, fosforescence, chemiluminiscence a elektrochemiluminiscence



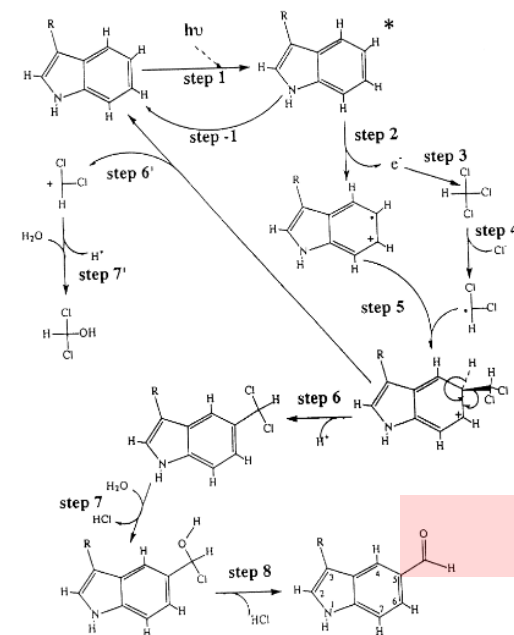
2. **Detekce proteinů a nukleových kyselin** – využití fluorescence při analýze přítomnosti a vazby biomolekul



3. **Pokročilé metody a aplikace** – představení experimentálních přístupů a kombinací metod pro efektivní analýzu a tipů pro praktické použití

Vnitřní fluorescence při detekci proteinů

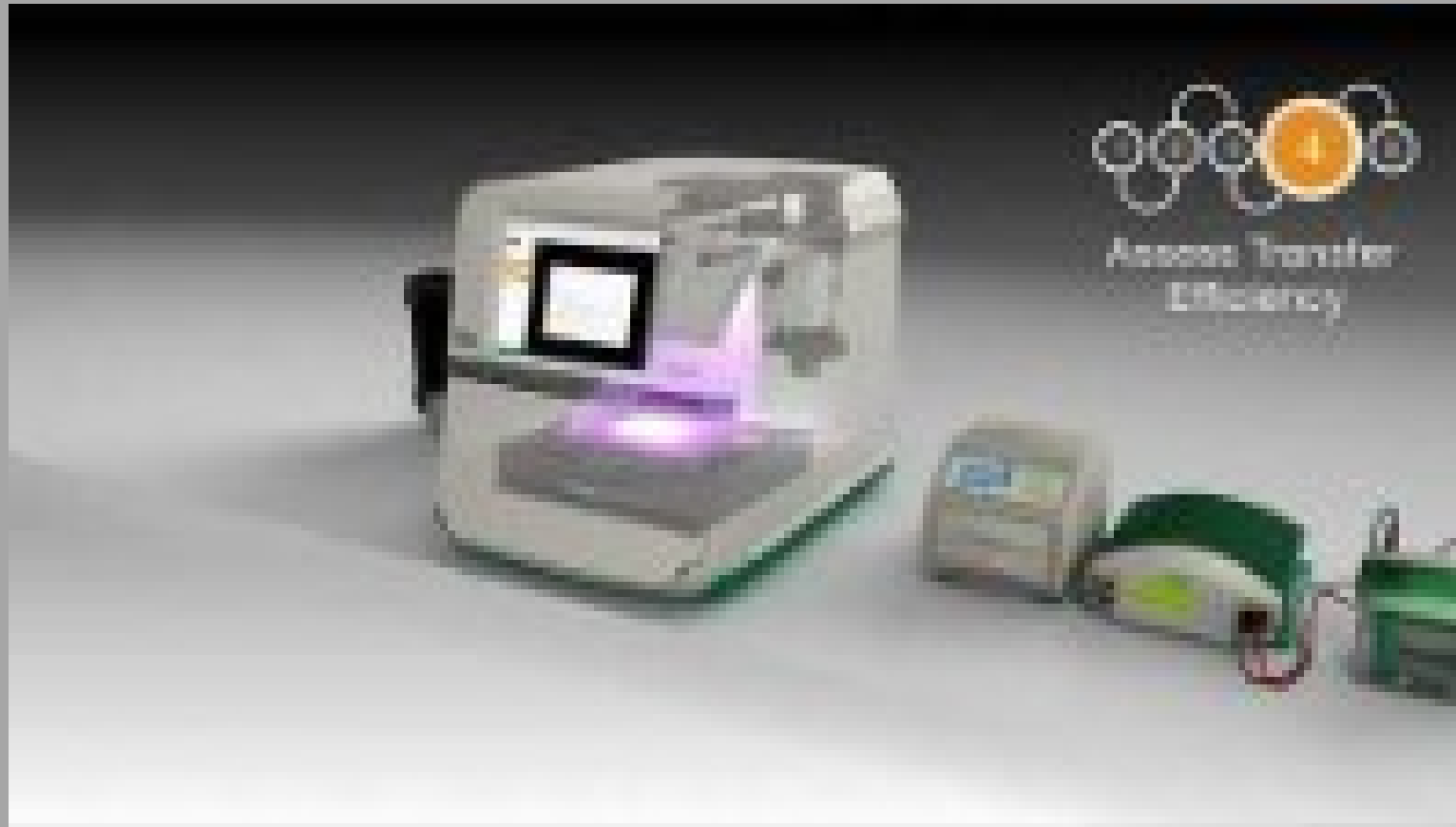
- Vnitřní fluorescence proteinů je nízká, daná hlavně Trp, Tyr
- Zvýšená fluorescence po reakci s trihalogeny CHCl_3 – přidává **konjugovanou** vazbu navíc.
- Detekce proteinu na gelu bez nutnosti značení
Ex 280 nm/ Em 360 nm



Scheme 1. Proposed scheme for the reaction between excited state indole and CHCl_3 . Steps 2–5 occur nearly simultaneously when the electron from the excited indole attacks the chloroform leading to the release of a chloride anion and the formation of a bond between the indole and the chloroform. Steps 6' and 7' are likely side reactions that regenerate the indole chromophore.

Edwards, R.A., Jickling, G. and Turner, R.J. (2002) The Light-induced Reactions of Tryptophan with Halocompounds. *Photochemistry and Photobiology*, **75**, 362-368.

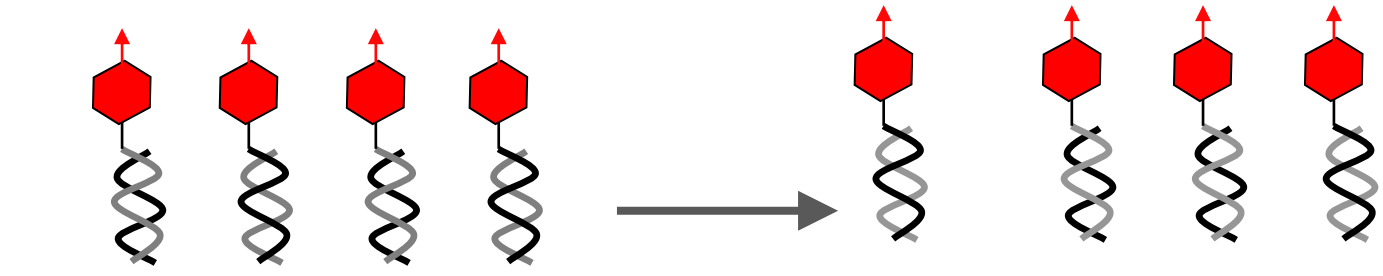
Detekce proteinů bez následného barvení



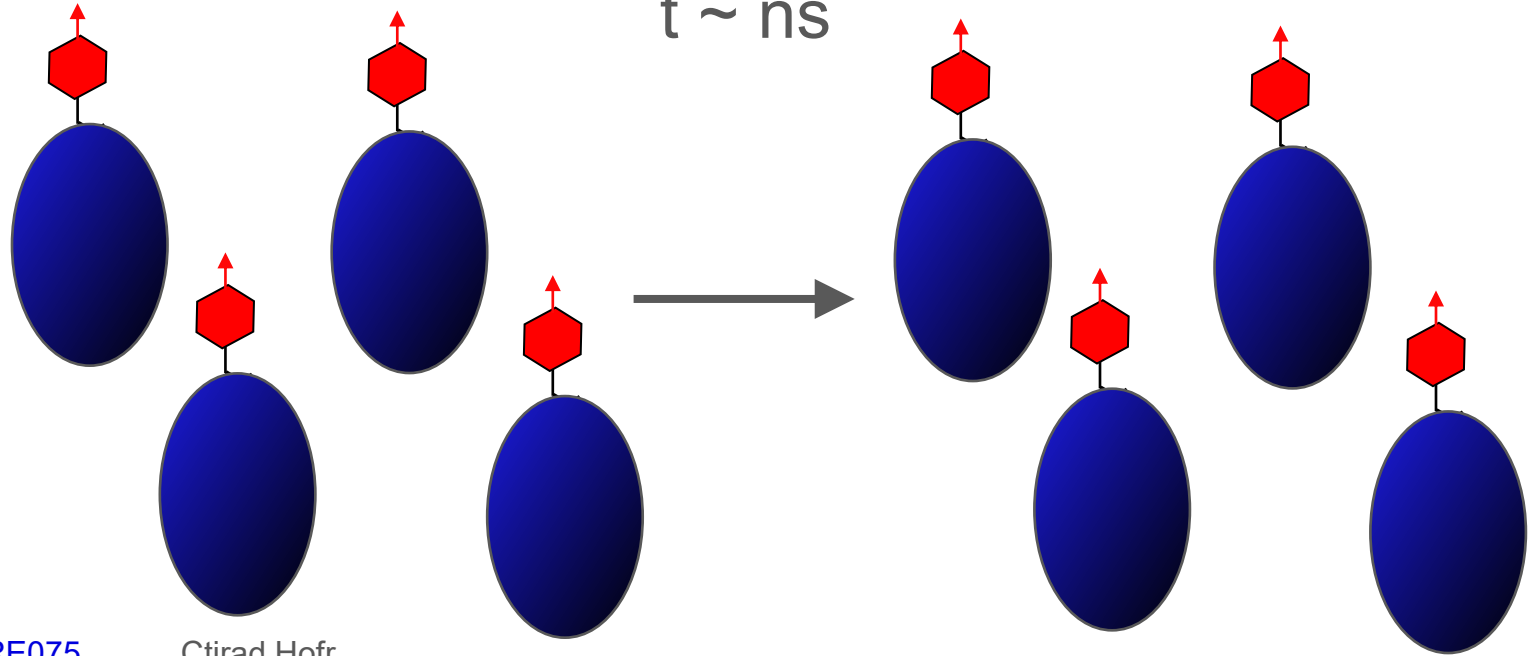
<https://youtu.be/Dz6MCOSWw7k?si=IxSRZGrilfPBhXju&t=27>

Princip sledování vazby biomolekul – anizotropie a polarizace

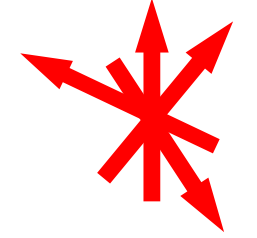
Excitace
v jednom
směru



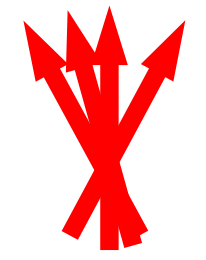
$t \sim ns$



Emise
fluorescence



nízká anizotropie
usměrněnost

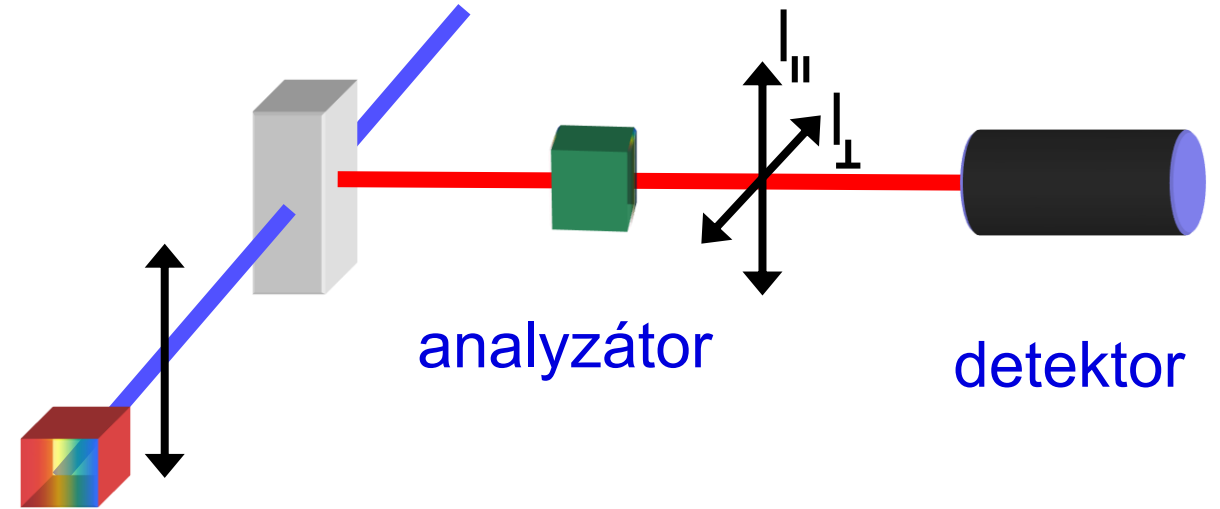


vysoká anizotropie
usměrněnost

Anisotropie fluorescence – uspořádání měření

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}$$



- Hodnota anizotropie r je podíl rozdílu $I_{VV} - I_{VH}$ intenzity fluorescence při rovnoběžném (vertikálním) a kolmém (horizontálním) natočení analyzátoru vůči excitačnímu polarizátoru a celkové intenzity fluorescence $I_{VV} + 2I_{VH}$ ve 3D tj. všech třech směrech šíření fluorescence.

polarizátor

- Příklad - fluorometr s polarizátorem excitačního světla a otočným polarizátorem = analyzátozem vyzářené fluorescence pro zjištění intenzity v různých směrech.
- Potřebujeme ~ 10x vyšší koncentraci než na měření klasické fluorescence – polarizátory propouští 10x méně světla.
- Hodnota anizotropie r je bezrozměrná veličina = podíl čísel.

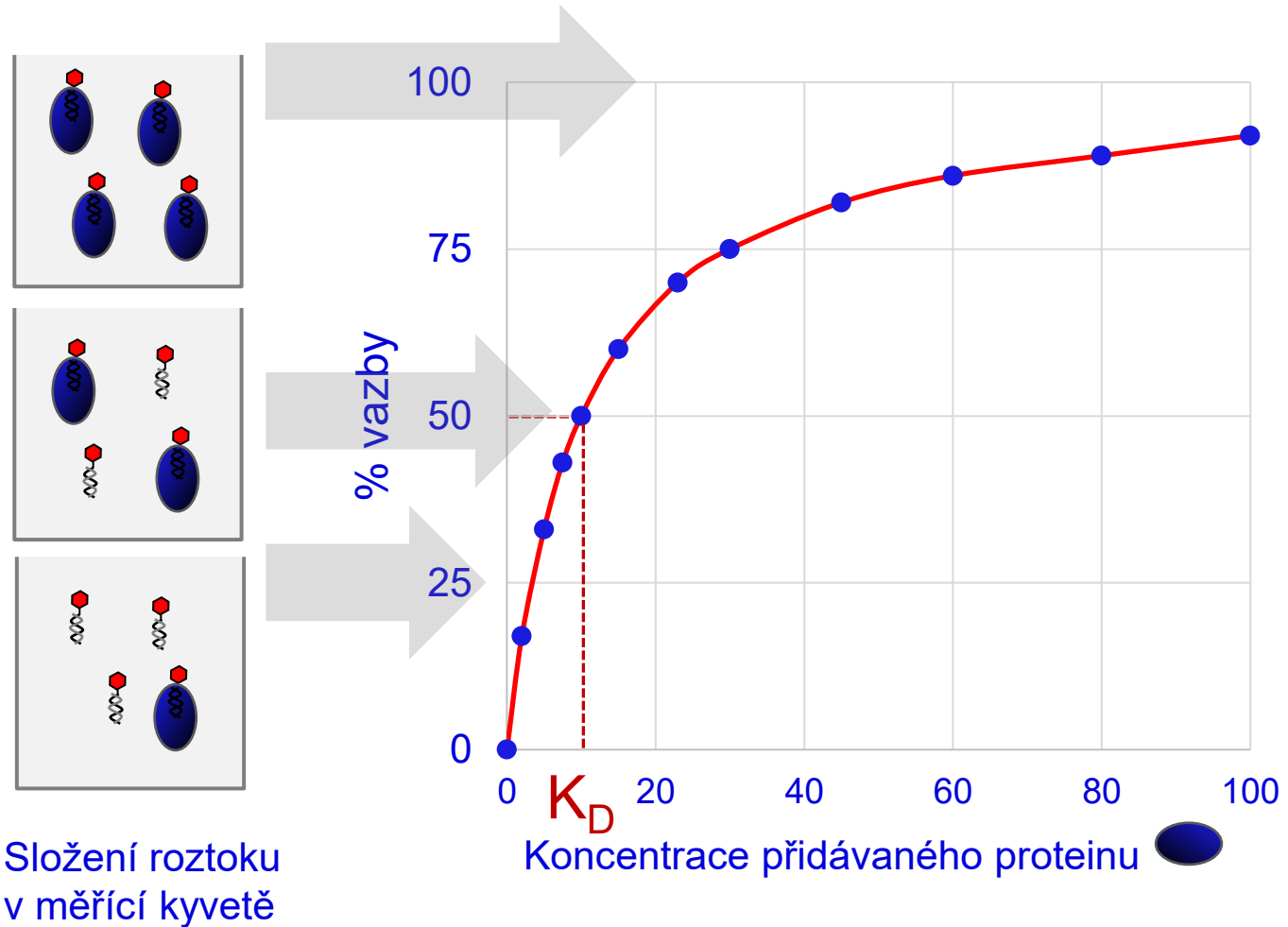
Vazebná afinita z anizotropie fluorescence

Anisotropie fluorescence – princip

- „Usměrňenost“ emitovaného světla se zvýší po vytvoření komplexu protein-DNA; po excitaci lineárně polarizovaným zářením dochází k emisi fluorescence značené molekuly převážně v jednom směru.

Prakticky

- značíme menší z molekul.
- přidávaný protein není značený.
- koncentrace přidávaného proteinu je minimálně 10x větší než koncentrace značeného proteinu



Disociační konstanta K_D - koncentrace proteinu, při které je obsazena polovina vazebných míst na DNA.

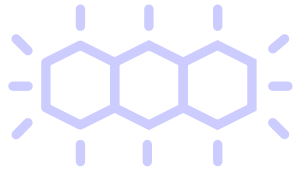


Praktická poznámka

Pro detekci interakce dvou různě velkých molekul je vhodnější fluorescenčně naznačit malou nebo velkou molekulu?

- A) Velkou molekulu, protože bude lépe vidět.
- B) Malou molekulu, protože je pohyblivější a vazba s velkou molekulou více ovlivní její vlastnosti.
- C) Je to jedno.

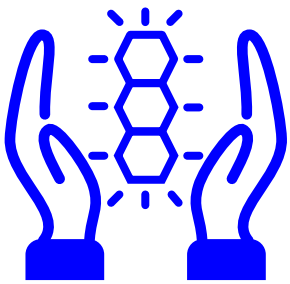
Přehled



1. **Základy luminiscence** – barevné a srozumitelné vysvětlení biofyzikálních základů absorpce, fluorescence, fosforescence, chemiluminiscence a elektrochemiluminiscence



2. **Detekce proteinů a nukleových kyselin** – využití fluorescence při analýze přítomnosti a vazby biomolekul



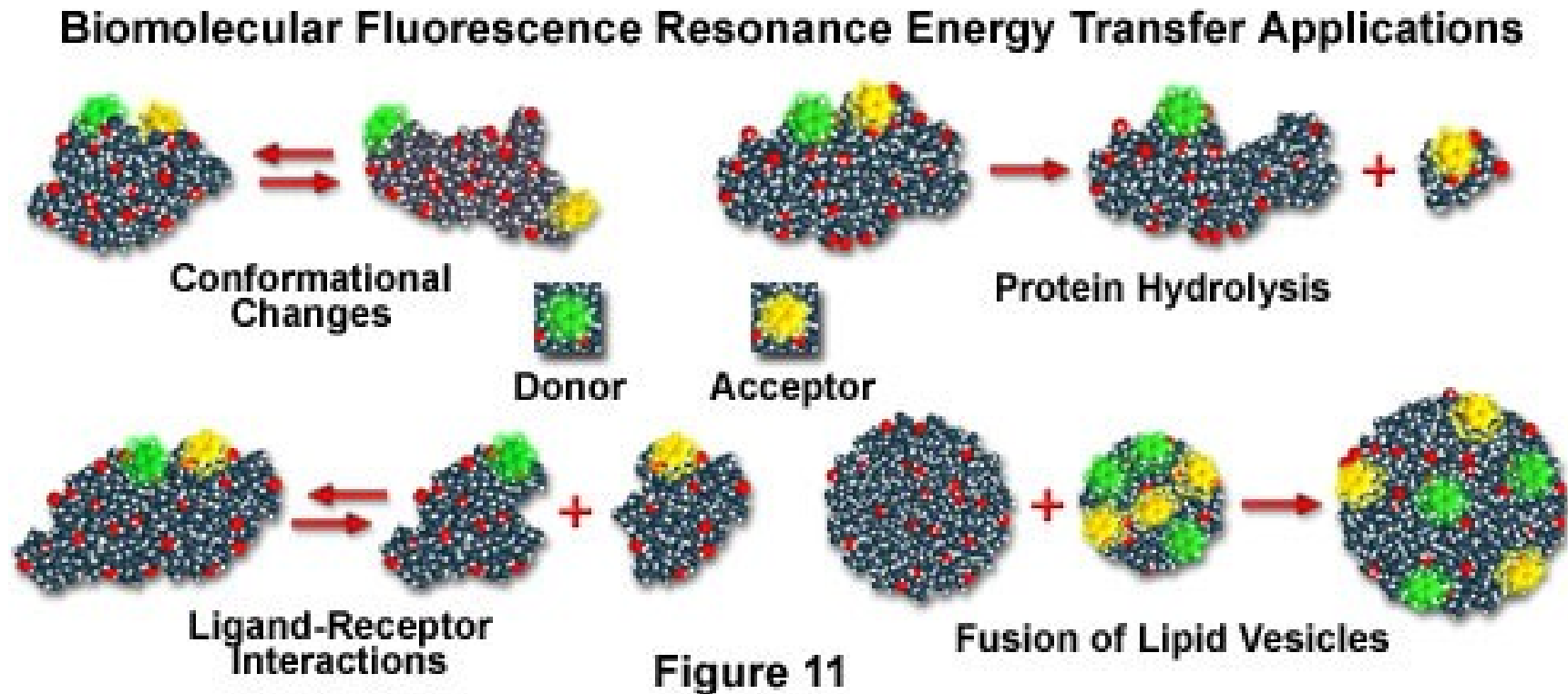
3. **Pokročilé metody a aplikace** představení experimentálních přístupů a kombinací metod pro efektivní analýzu a tipů pro praktické použití

FRET – rezonanční přenos energie

- Rezonanční přenos energie je **nezářivý** přenos energie mezi dvěma molekulami fluorofory. Je známý také jako Försterův či fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET). Při FRET může donorový fluorofor přenášet energii na akceptorový chromofor prostřednictvím nezářivé dipólově-dipólové interakce.
- Účinnost přenosu energie je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti mezi donorem a akceptorem, takže FRET je velmi citlivý na malé změny vzdálenosti biomolekul.

K čemu lze použít rezonanční přenos energie?

- Konformační změny
- Vazba ligandu a receptoru
- Štěpení proteinu/DNA
- Fúze membrán

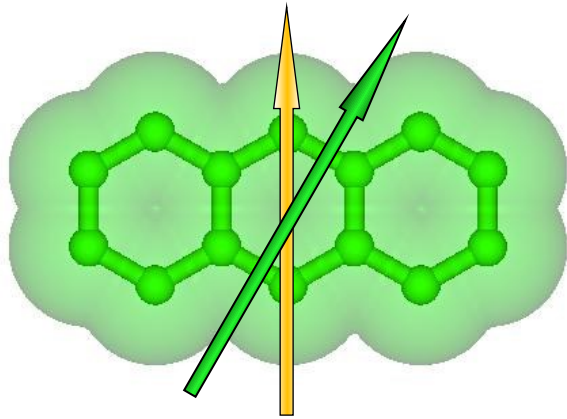


<http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>

Interakce dipólových momentů přechodu Donoru a Akceptoru

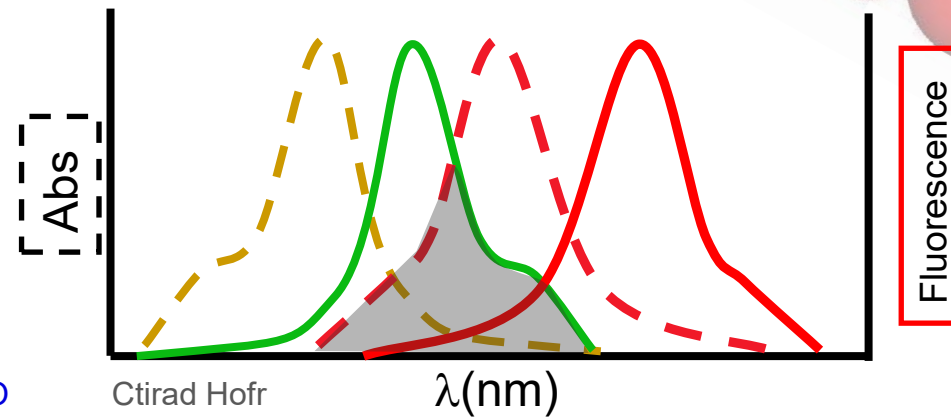
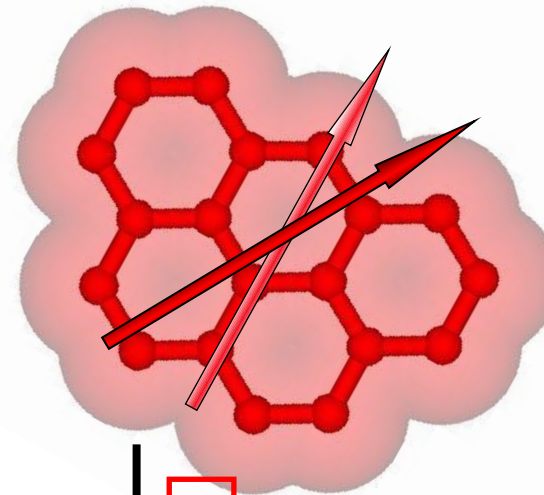
Donor

- Absorpce donoru
- Emise donoru



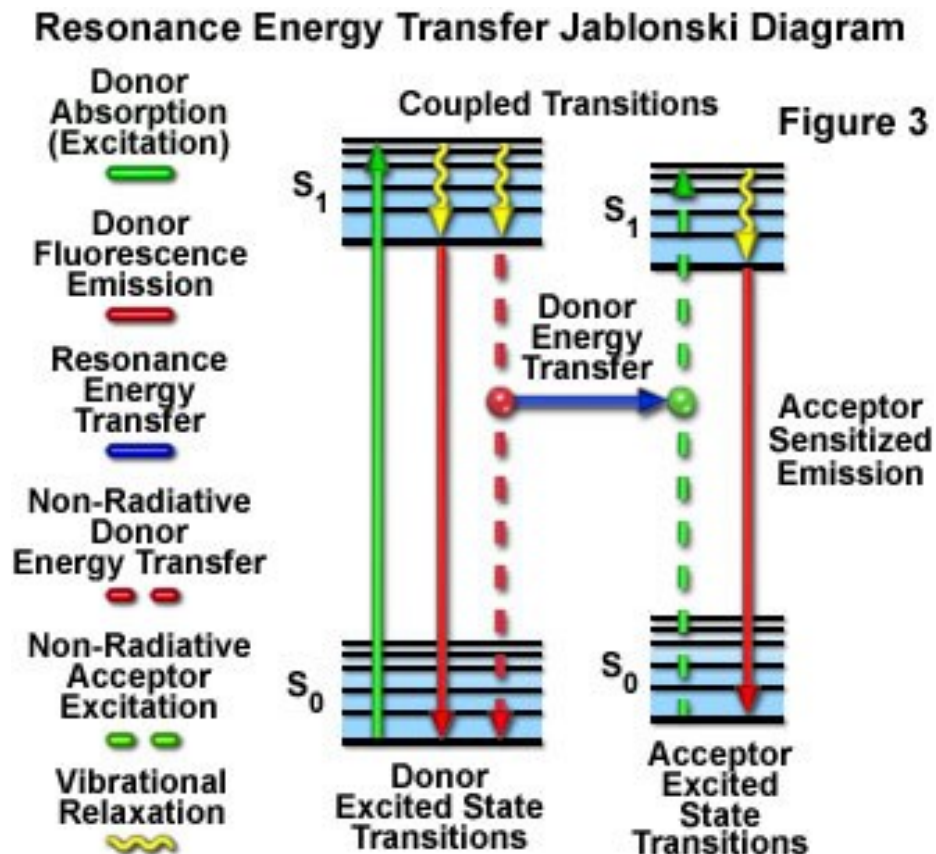
Akceptor

- Absorpce akceptoru
- Emise akceptoru



FRET - nezářivý přenos energie

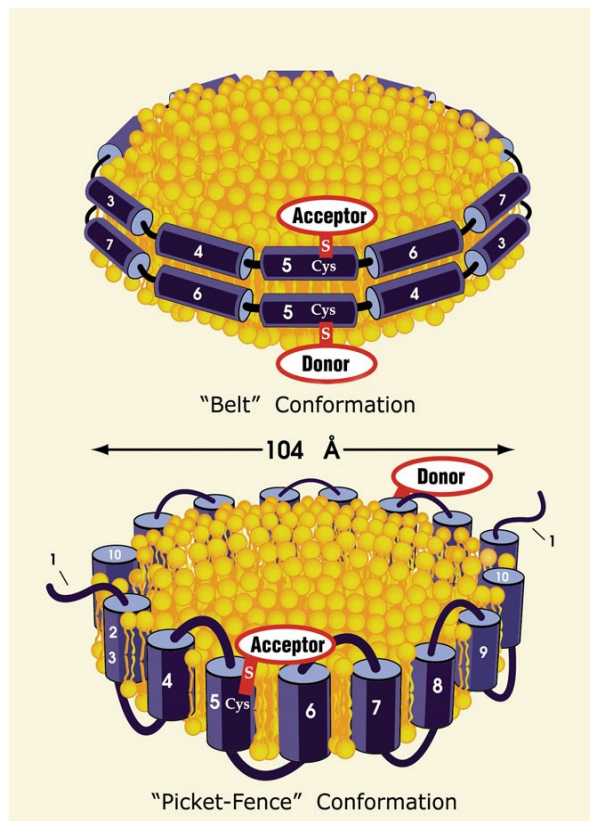
- V přítomnosti vhodného akceptoru může donor přenést energii excitovaného stavu přímo na akceptor bez vyzáření fotonu.
- Takto excitovaný akceptor pak vyzáří energii, kterou původně absorboval donor.



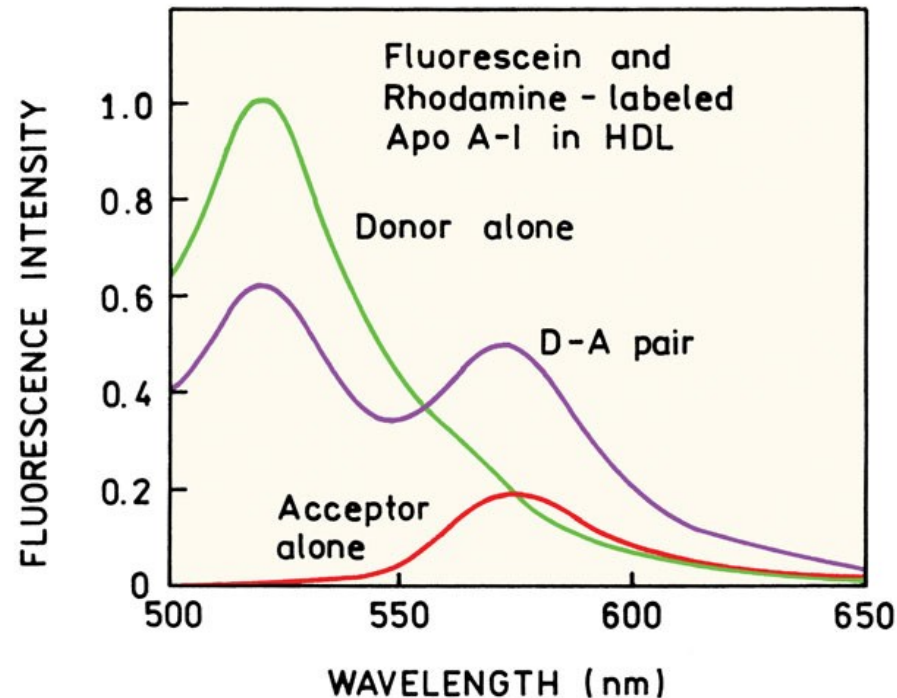
<http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>

FRET umožňuje rozlišit mezi více variantami uspořádání flexibilních proteinů

- apoA-I protein reguluje metabolismus cholesterolu.
- apo A-I se váže do lipidové membrány
- byla navržena dvě možná uspořádání proteinů v membráně
- kvůli flexibilitě lipidů není možno použít strukturní metody
- jeden z řetězců apoA-I proteinů byl naznačen fluoresceinem (Donor)
- a druhý tetrametylrodaminem (Akceptor)
- Nejdříve bylo změřeno emisní spektrum samotného donoru na jednom řetězci ApoA-I
- Po přidání druhého řetězce s akceptorem byl sledován úbytek intenzity fluorescence donoru



Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006



Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006

- Detekce výrazného rezonančního přenosu energie prokazuje relativně malou vzdálenost mezi donorem a akceptorem
- Bylo potvrzeno pásové uspořádání ApoA-I

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la402727a>

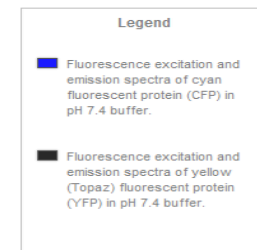
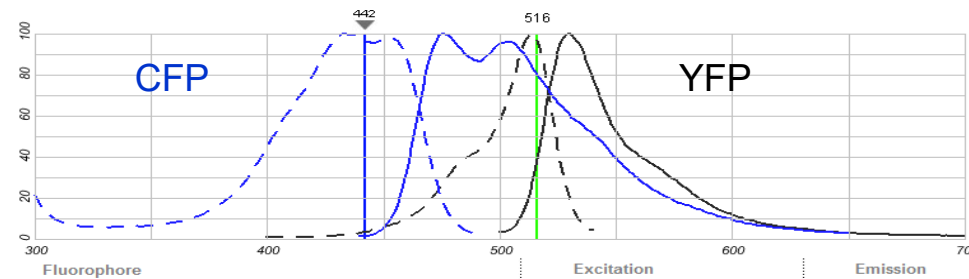
FRET mezi CFP a YFP detekce v buňkách

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)

© 2005 Joseph Roland

www.cytographica.com



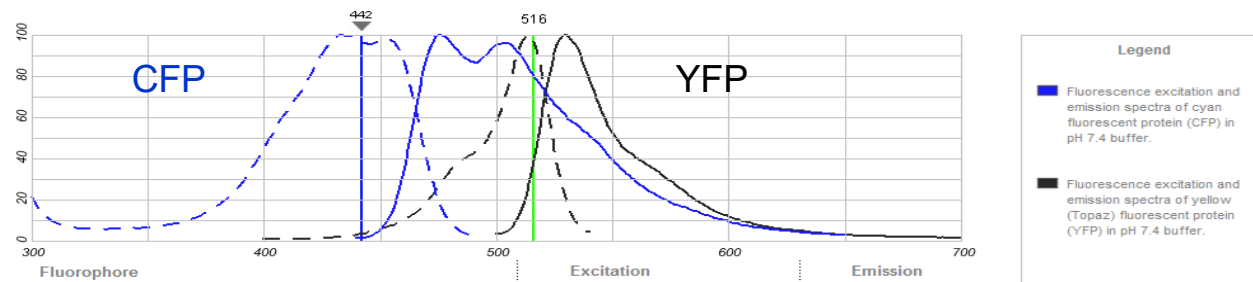
Zhášení FRET fotovybělováním akceptoru

Fluorescence Resonance Energy Transfer
(FRET)

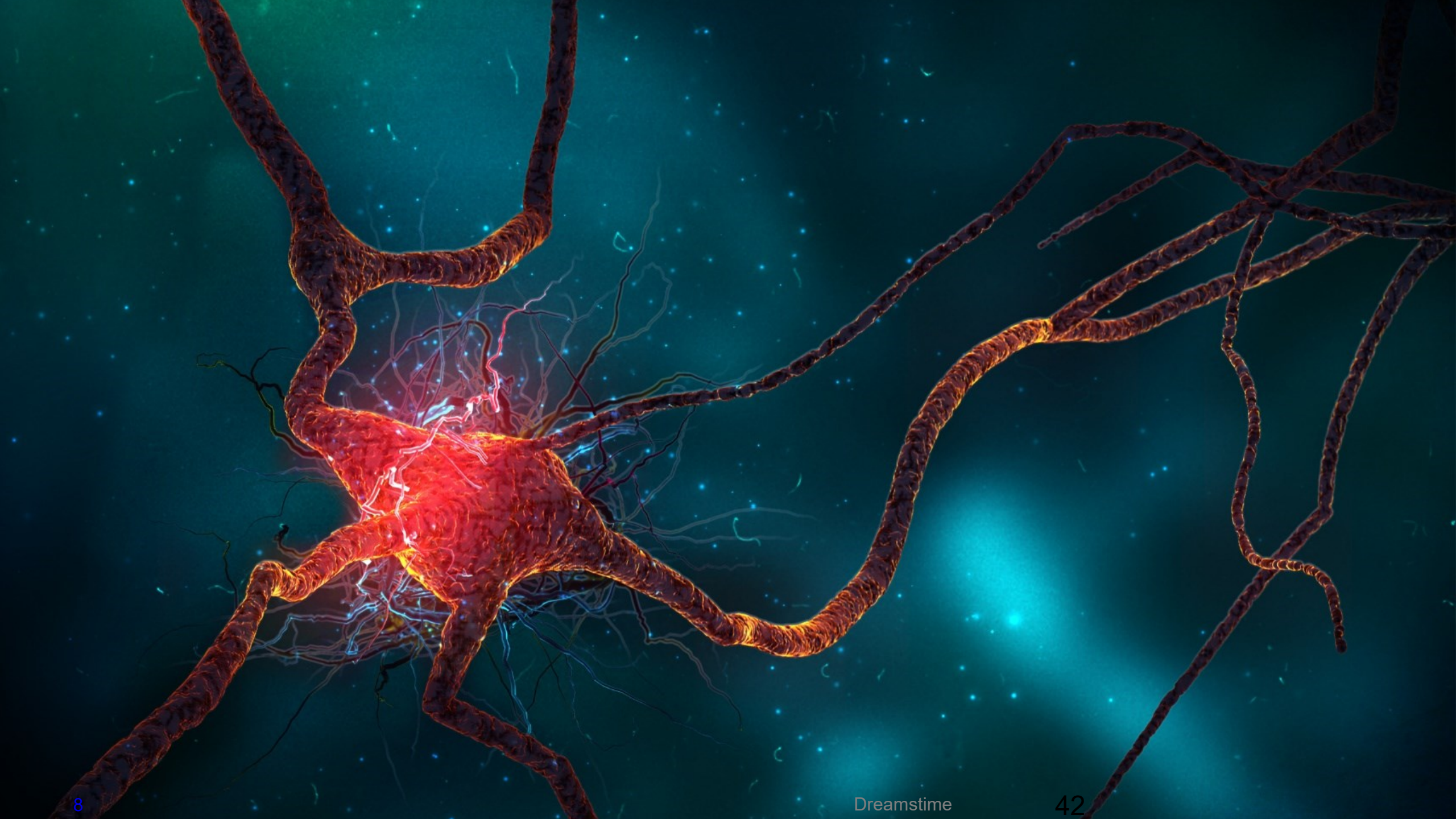
Bioluminescence Resonance Energy Transfer
(BRET)

Acceptor Photobleaching Method

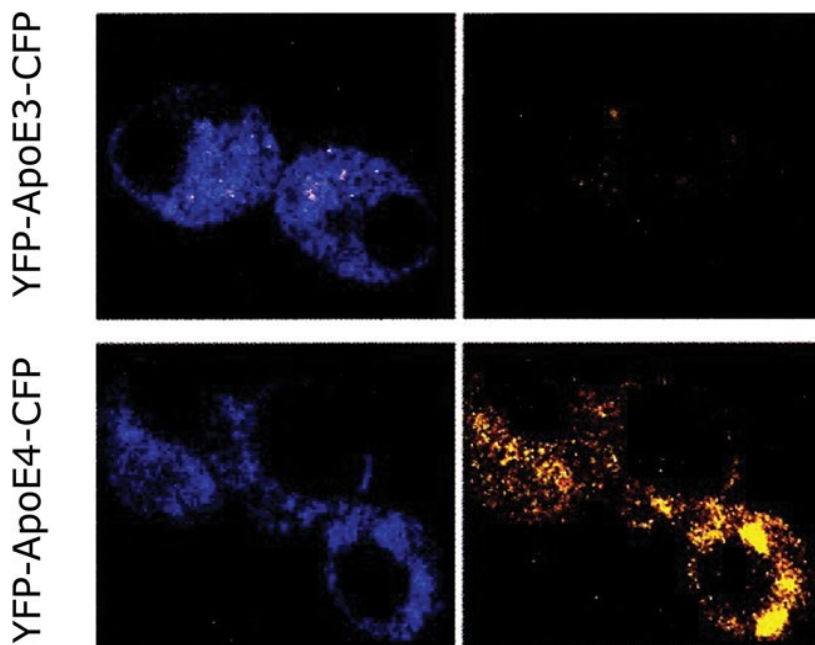
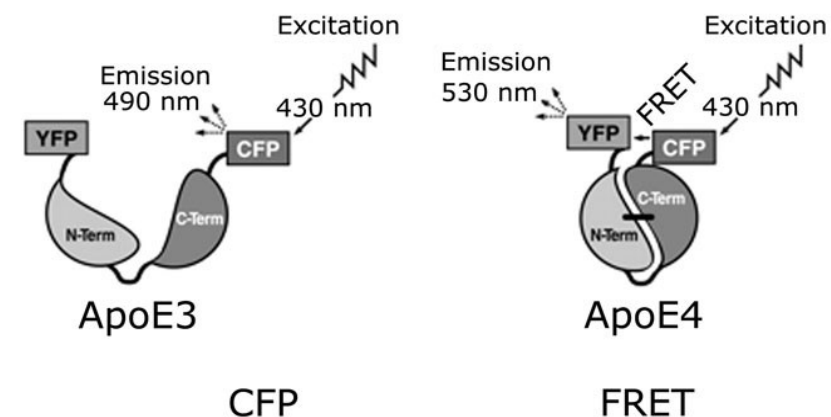
Joseph Roland, © 2006



<https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer>

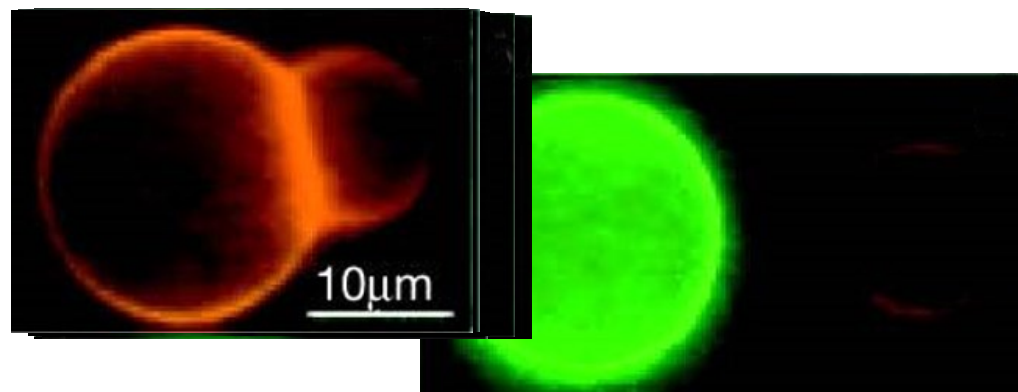


Skládání proteinů *in vivo*

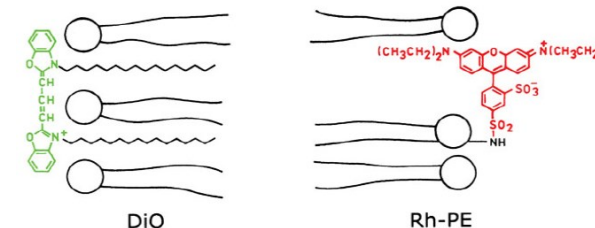
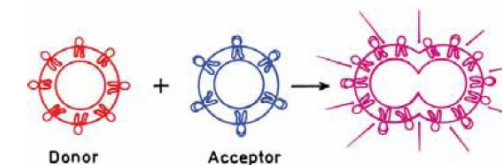


- ApoE4 je spojen s Alzheimerovou nemocí a váže se na nervové buňky
- ApoE3 má podobnou sekvenci aminokyselin, ale na nervové buňky se neváže
- Bylo navrženo, že vazebná schopnost k nervovým buňkám souvisí s různým uspořádáním domén ApoE proteinů
- Pro ověření byly v nervových buňkách transfekovány ApoE konstrukty
- FRET analýza ukázala, že ApoE4 v konformaci se spojenými doménami se váže na nervové buňky, zatímco ApoE3 nemá své domény ve vzájemné blízkosti a na nervové buňky se neváže

Nejkrásnější aplikace FRET



Lei, G and MacDonald, R.C., Biophys J. 2003



Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy.
Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006

FRET byl použit pro vizualizaci fúze lipidových dvojvrstev s vezikuly:

Meziprodukty zachycené pomocí vysokorychlostní mikrofluorescenční spektroskopie

FLIM – doba dohasínání fluorescence

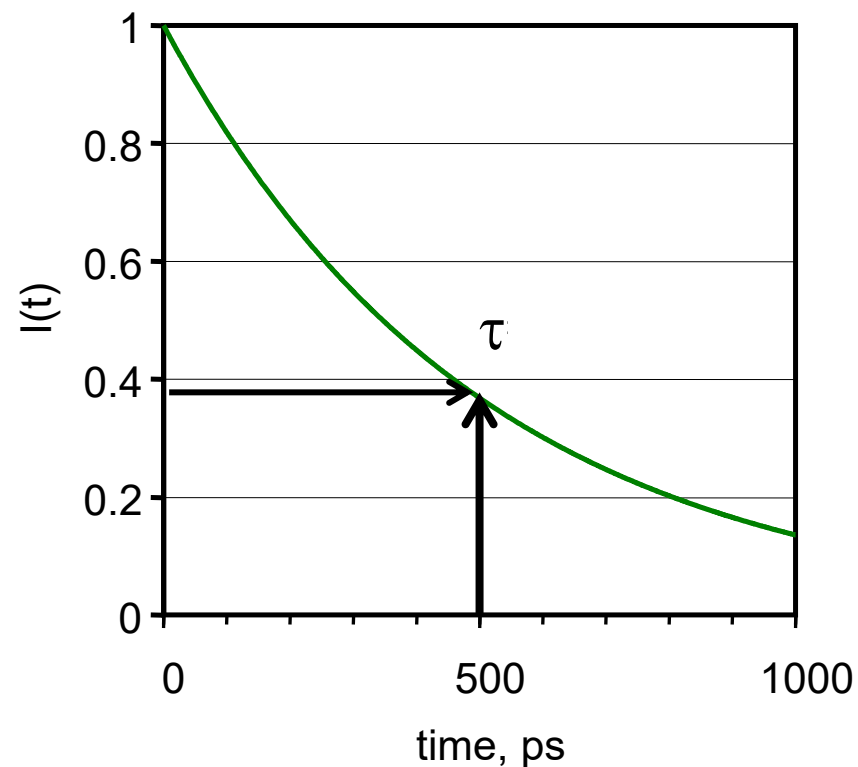
- Doba dohasínání fluorescence (lifetime) je průměrná doba, za kterou se excitovaná molekula po absorpci vrátí do základního stavu.
- Pokud je populace fluoroforů excitována, doba života je doba, za kterou se 36,8 % původní populace excitovaných molekul vrátí do základního stavu.
- Doba života fluorescence je důležitým parametrem pro praktické měření fluorescenčního rezonančního přenosu energie.

Jak dlouho trvá fluorescence?

Náhodné dohasínání zpět do základního stavu:
každá molekula emituje 1 foton



Populace molekul excitovaných
zábleskem (pulesem)



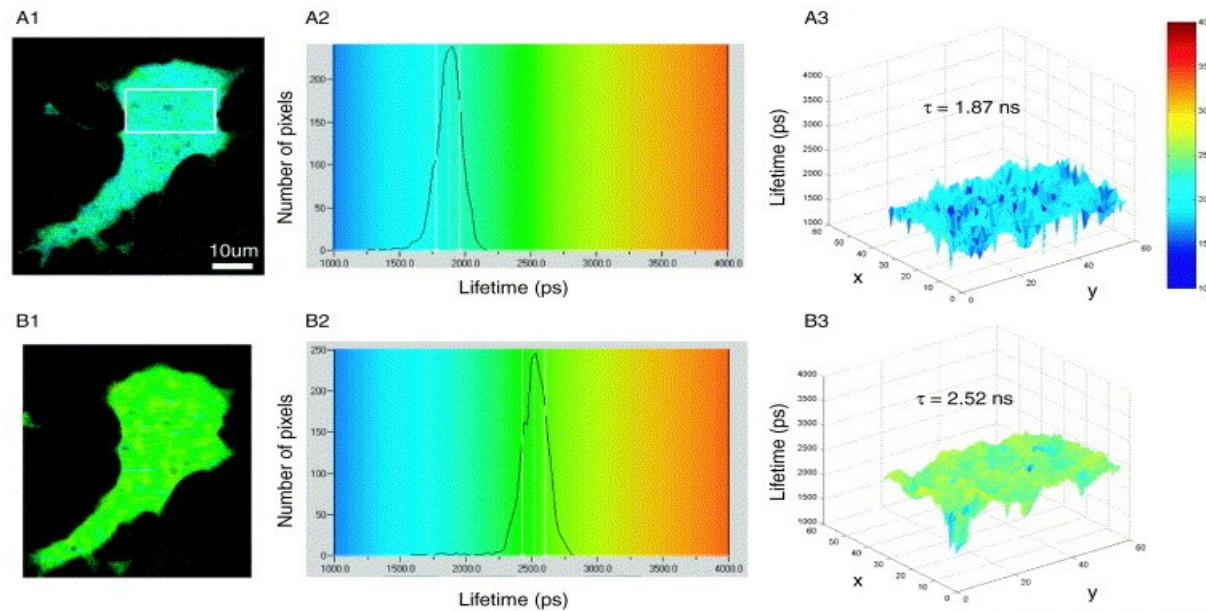
Fluorescence LifeTime Imaging Microscopy FLIM



Olympus inc.

- Sledování časové závislosti fluorescence v 2D prostoru.
- Umožňuje rozlišit prostředí ve kterém se fluorofory nacházejí.
- Umožňuje sledovat zhášení flouroforů, ať už vlivem prostředí, zhášedla nebo interakce s jinými molekulami.

Použití FLIM při sledování interakce proteinů



Rychlejší
dohasínání
v přítomnosti
zhášejícího
proteinu

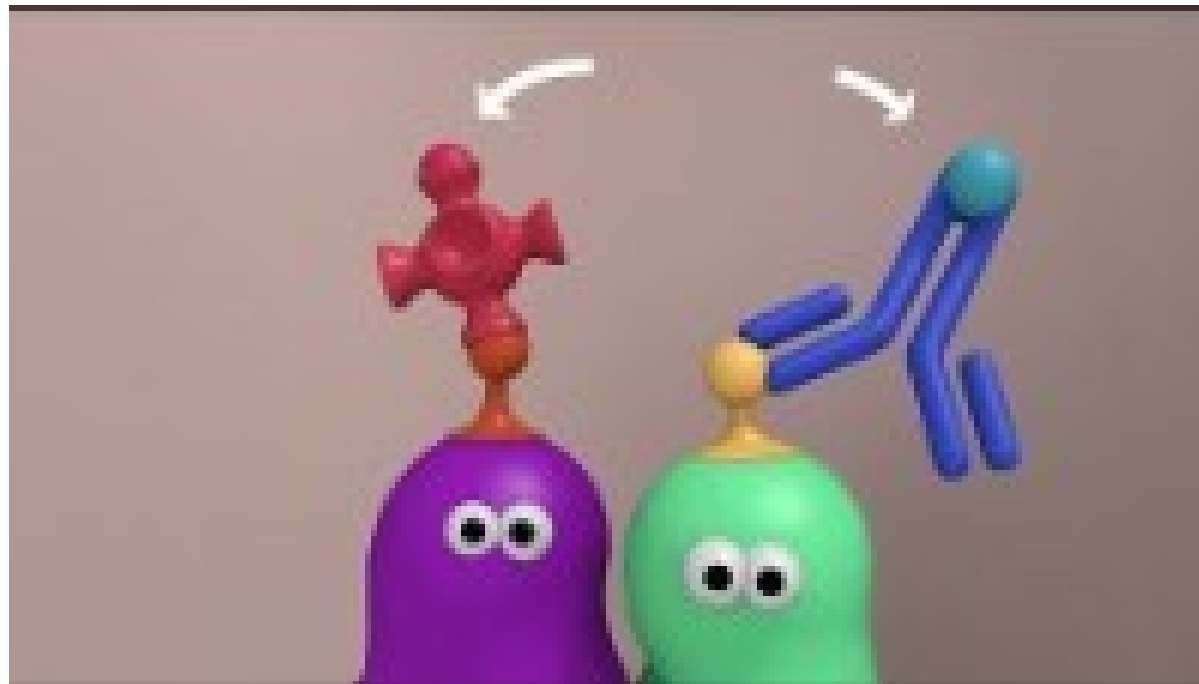
Normální -
pomale
dohasínání

H. Wallrabe and A. Periasamy, Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy, [Current Opinion in Biotechnology](#), Volume 16, Issue 1, Analytical biotechnology, 2005, Pages 19-27.

FRET-FLIM mikroskopie byla využívána při charakterizaci vytváření dimeru transkripčního faktoru C/EBP α uvnitř jádra živých buněk GHFT1-5.

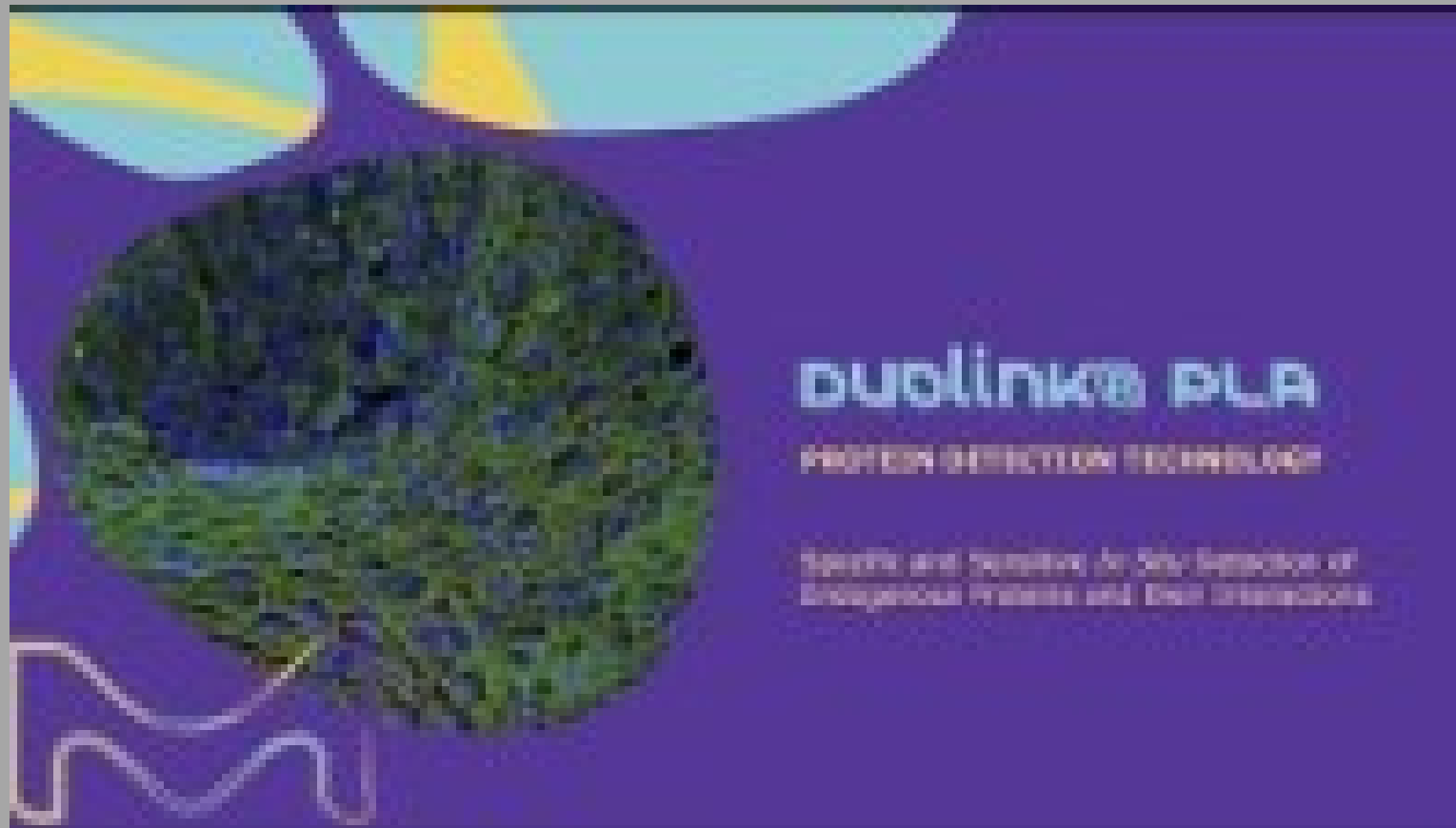
Kombinace FRET-FLIM pro spolehlivou detekci vazby a hledání nových léčiv

- *In vitro* detekce interakce proteinů na destičce.
- High-throughput testování interakce proteinů a nalézání malých molekul, které narušují vazbu proteinů – možná budoucí léčiva.



https://youtu.be/Kj901Lz_KGM?si=sCph7v2evHEHme6f&t=56

PLA – proximitní ligační analýza

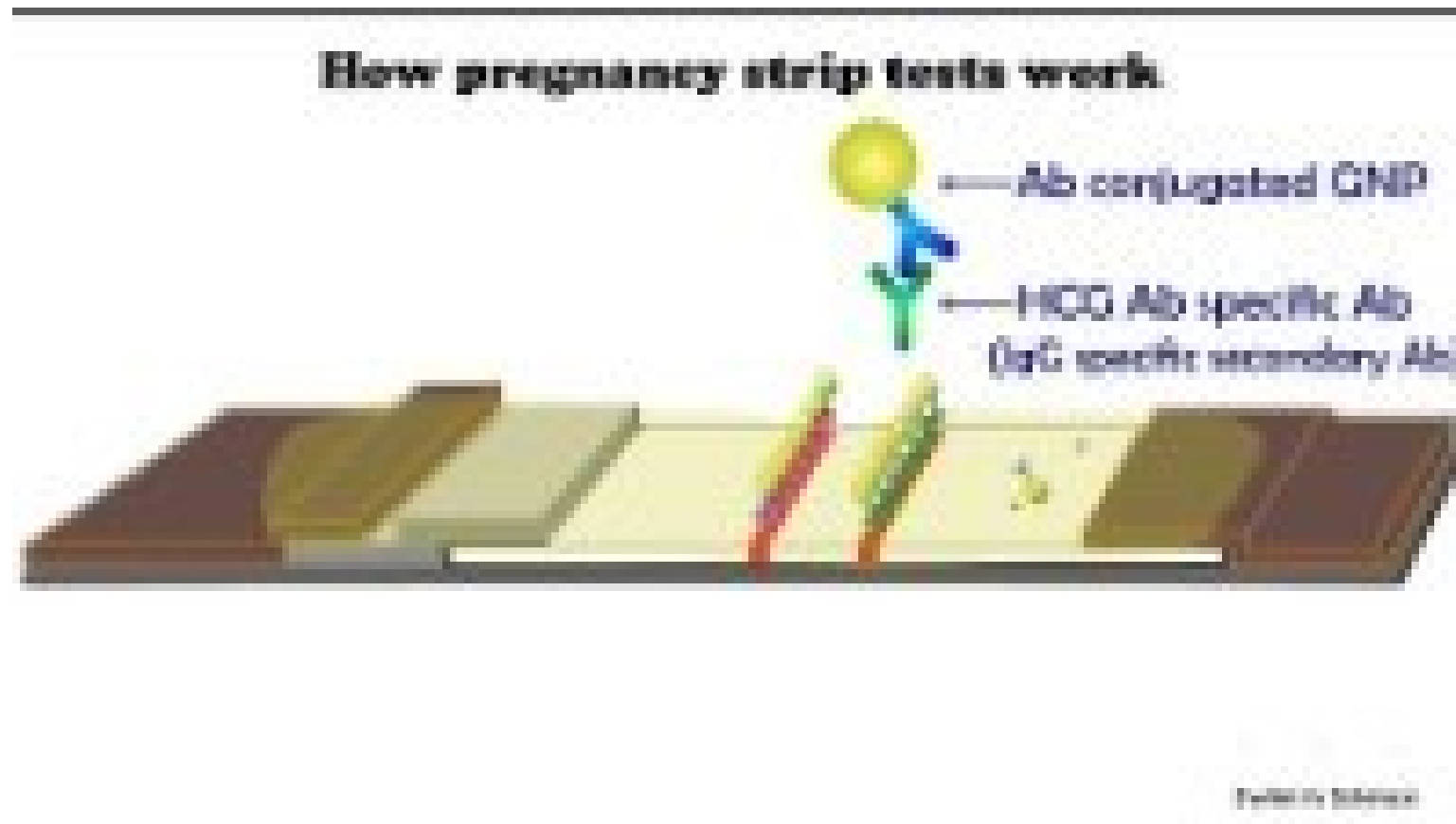


PLA Protein Detection Technology <https://youtu.be/pF4Jw4tEf-M?si=A3-pzSP2hOI9YkJO&t=9>

Nanočástice zlata mají unikátní vlastnosti

- Při rozměru nanočástic zlata kolem 40 nm ovlivňují absorpci světla
- Agregací nanočástic zlata dochází ke změně barvy – citlivá detekce interakce.
- Nanočástice ovlivňují dopadající světlo, protože zlato je kov, jehož elektrony se mohou volně pohybovat. Při správné vlnové délce světla lze tyto elektrony přimět k tomu, aby oscillovaly na stejné frekvenci. Tato vlastnost zlata se nazývá **povrchová plasmonová rezonance** a lze ji využít k přeměně nanočástic zlata na velmi přesné detektory navázaných molekul.

Využití nanočástic zlata při detekci nového života



https://youtu.be/Tv9B4m7o364?si=VeuD0d_VQYAXAX5T

Případová studie

Jakou metodou lze zjistit, zda se molekuly nacházejí v blízkosti náhodně, nebo se skutečně vážou?

- A. FRET-FLIM
- B. PLA
- C. Modifikované zlaté nanočástice

Otázky – praktické využití fluorescence

1. Jaké metody využívají detekce proteinů na základě vnitřní fluorescence aminokyselin?
2. Proč a jak se používá kombinace fluorescenčního přenosu energie a časově rozlišené fluorescence pro validaci přímé vazby biomolekul?
3. Které fluorescenční značky a sondy jsou vhodné pro kvantitativní analýzu přítomnosti proteinů a DNA a s jakou citlivostí?