

ΒΙΟΛ-491 Ειδικά Κεφάλαια Βιοτεχνολογίας και Απεικονιστικής Φυτών-ΔΙΑΛΕΞΗ 7



<https://www.imbb.forth.gr/en/research-en/plant-molecular-biology/item/4119-panagiotis-n-moschou>

<https://pmoschoulab.blog/home/>



FORTH

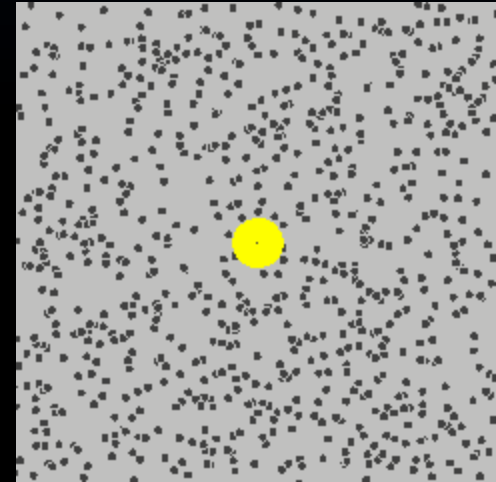
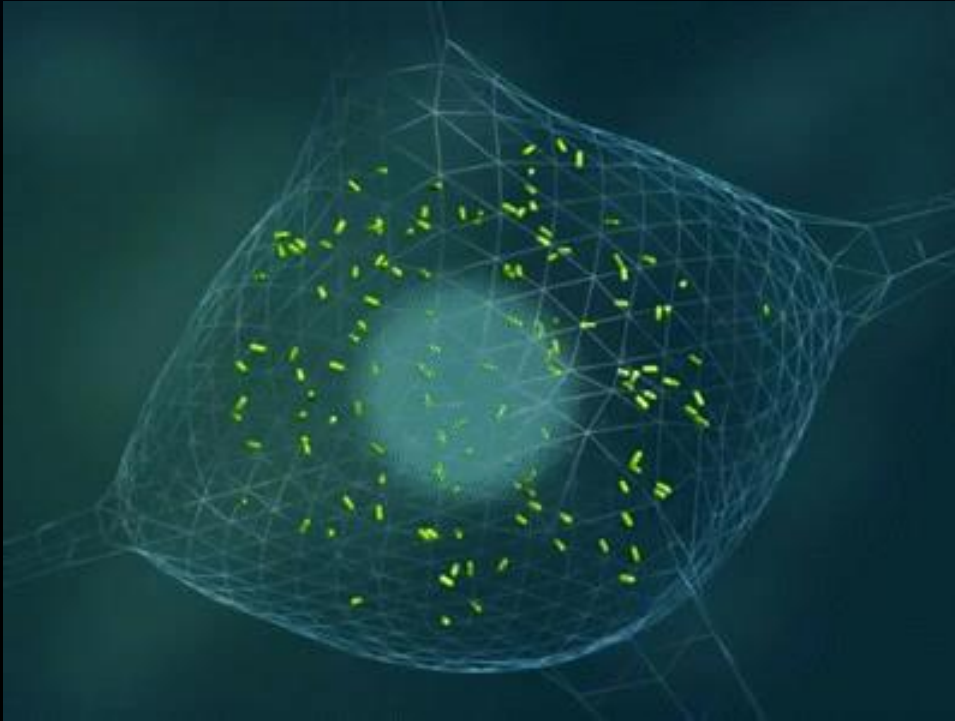
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY & BIOTECHNOLOGY



<https://twitter.com/Panosmoschou>



7. Λειτουργική απεικονιστική ανάλυση (FRAP, FRET, FLIM, Molecular tracks, diffusion coefficient, κτλ.) ²

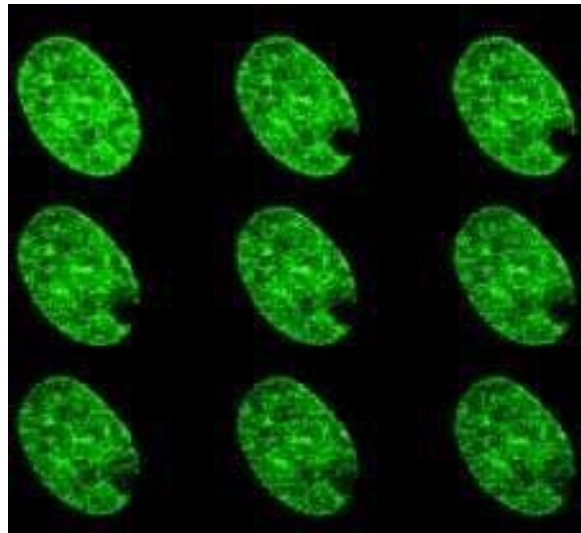


Νέες δεξιότητες-Διάλεξη 7

1. Να **αναλύσετε** τις μεθόδους FRAP, FRET, FLIM
2. Να **περιγράψετε** τη σημαντικότητα της λειτουργικής απεικονιστικής

Τι θα θέλατε να ακούσετε; Τι έχετε ακούσει; Τι θα θέλατε να μάθετε σχετικά με τη λειτουργική απεικονιστική;

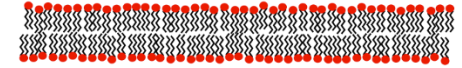
Fluorescence Recovery After Photobleaching



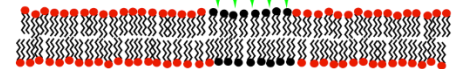
πανοραμική

Πλευρική όψη

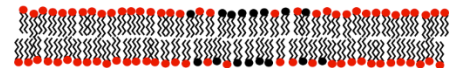
A



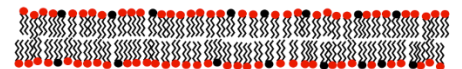
B



C

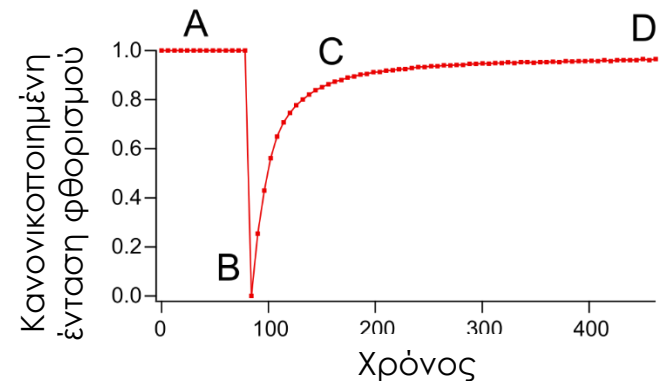


D



- ✓ "Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics"; published in Eur. Biophys J 2002 by Nectarios Klonis . Melanie Rug . Ian Harper. Mark Wickham . Alan Cowman . Leann Tilley

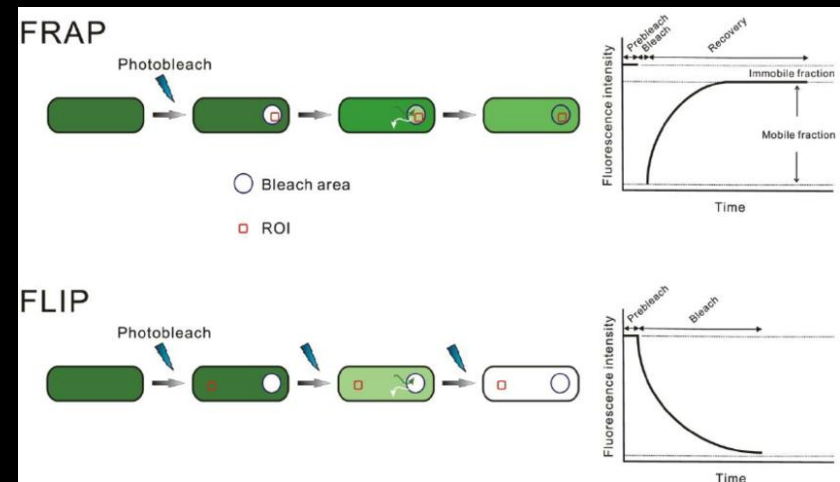
- ✓ Άρθρο ανασκόπησης
 - ✓ NATURE CELL BIOLOGY VOL 3 JUNE 2001
http://cellbio.nature.com_E145
 - ✓ From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells by Eric A.J. Reits and Jacques J. Neefjes



Fluorescence Recovery After Photobleaching

- ✓ Φωτολεύκανση (Photobleaching) είναι η φωτοχημική αδρανοποίηση ενός φθορίζοντος μορίου.
- ✓ Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του θορύβου.
- ✓ Φωτολεύκανση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της κίνησης και της διάχυσης των μορίων, π.χ. μέσω των **FRAP** και **FLIP** (Fluorescence loss in photobleaching)

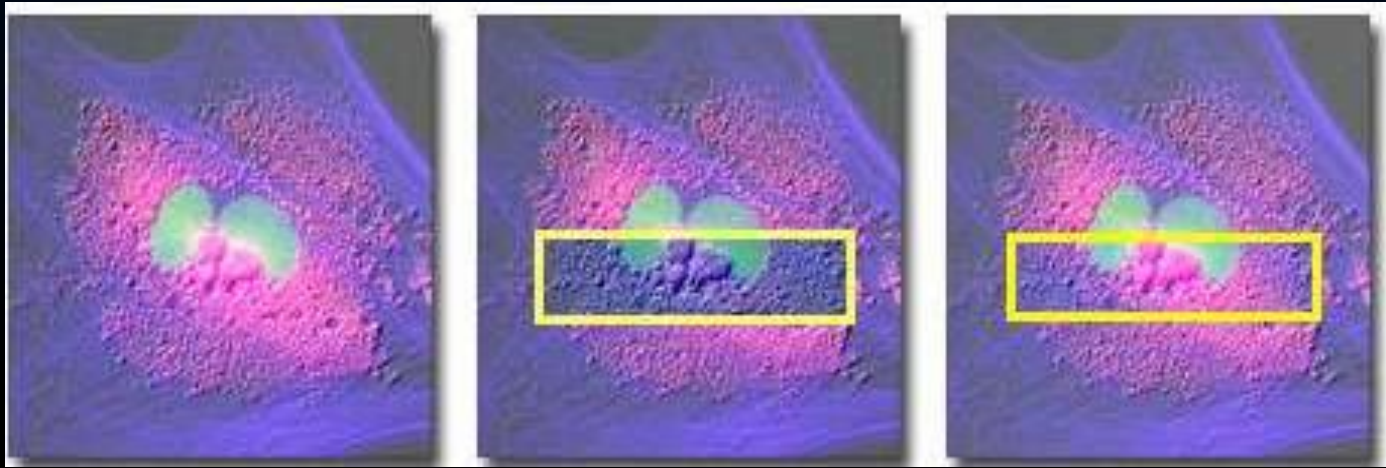
Πώς νομίζετε ότι λειτουργεί το FLIP;



Fluorescence Recovery After Photobleaching

- Στα πειράματα FRAP το λέιζερ είναι υψηλής ισχύος και προκαλεί τη μη αναστρεπτή φωτοκαταστροφή των φθοριζόντων μορίων
- Η επακόλουθη διάχυση των μη φθοριζόντων μορίων από την περιοχή οδηγεί σε επανάκτηση του σήματος (σε χαμηλή ισχύ λέιζερ)
- Τεχνικά, η οπτική οπή πρέπει να είναι πολύ ανοικτή

Fluorescence Recovery After Photobleaching



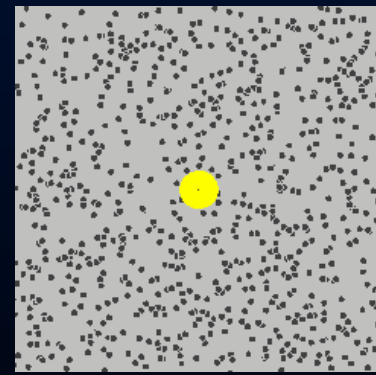
Φθορίζουσα χρώση και μέτρηση του ρυθμού διάχυσης

Σκεφτείτε χρώσεις διαφόρων βιομορίων: RNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες...

Διάχυση μορίων

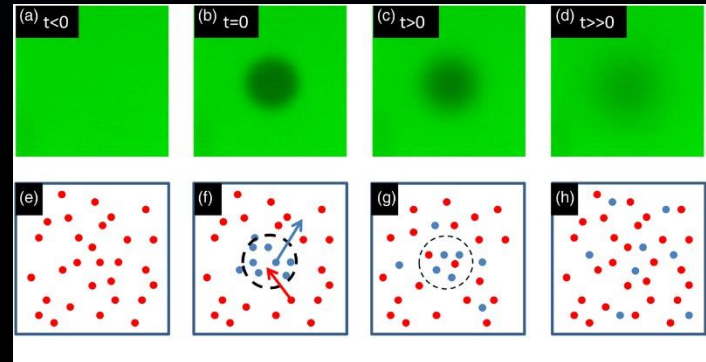
Λόγω της διάχυσης, η ένταση στο σημείο της φωτολεύκανσης, μπορεί να επανέλθει σε κάποιο επίπεδο

Μπορούμε να μετρήσουμε συγγένεια;



Η σταθερά διάχυσης D μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση:

$$D = \frac{\omega^2}{4t_{1/2}}$$



Όπου ω είναι η ακτίνα της δέσμης και $t_{1/2}$ ο χρόνος που χρειάζεται για την ανάκαμψη του αρχικού σήματος στο μισό της έντασης

Χρόνος και ανάκαμψη/επαναφορά :

- ✓ Ο χρόνος για το FRAP απαιτεί να μην είναι μεγαλύτερος από το χρόνο ανάκαμψης $t_{1/2}$

Η ακτίνα της δέσμης

- ✓ Γνώση απαραίτητη για το χωρικό προφίλ για τον υπολογισμό του ρυθμού διάχυσης (κατά σύμβαση 1 μm), ω

Σφάλματα

- ✓ Τοπικές μεταβολές, η θερμοκρασία δεν είναι πρόβλημα Axelrod (1977): 0.3°C (μάλλον)
- ✓ Wolf et al. (1980b): δεν επηρεάζονται μεταξύ τους μόρια που έχουν σημειωθεί με δύο φθορίζουσες χρωστικές.

Σφάλματα

- ✓ Πολλές επιρροές στο σύστημα (βλέπε Wolf et al. 1980b).
- ✓ Για παράδειγμα, αντίδραση σταυροσύνδεσης μεταξύ μεμβρανικών πρωτεϊνών (Lerock et al. 1978) και καταστροφή ερυθροκυττάρων (Bloom and Webb 1984) μετά από έκθεση σε **υψηλή ακτινοβολία**.

Αντιστρεψιμότητα Photobleaching:

- ✓ Πολλά και σημαντικά φθορίζοντα μόρια επανέρχονται μέσα σε msec ή msec, για παράδειγμα η carboxyfluorescein (Stout and Axelrod 1995), fluorescein σε διαλύματα με υψηλό ιξώδες (Periasamy et al. 1996) και αγρίου τύπου GFP σε διαλύματα με υψηλό ιξώδες (Swaminathan et al. 1997).
- ✓ Αυτό μπορεί να επιφέρει σημαντικά προβλήματα στους υπολογισμούς
- ✓ Πολύ απλό να το δούμε: όλο το κύτταρο και κοιτάμε την επαναφορά (θέμα προς συζήτηση: χρόνοι παραγωγής βιομορίων)

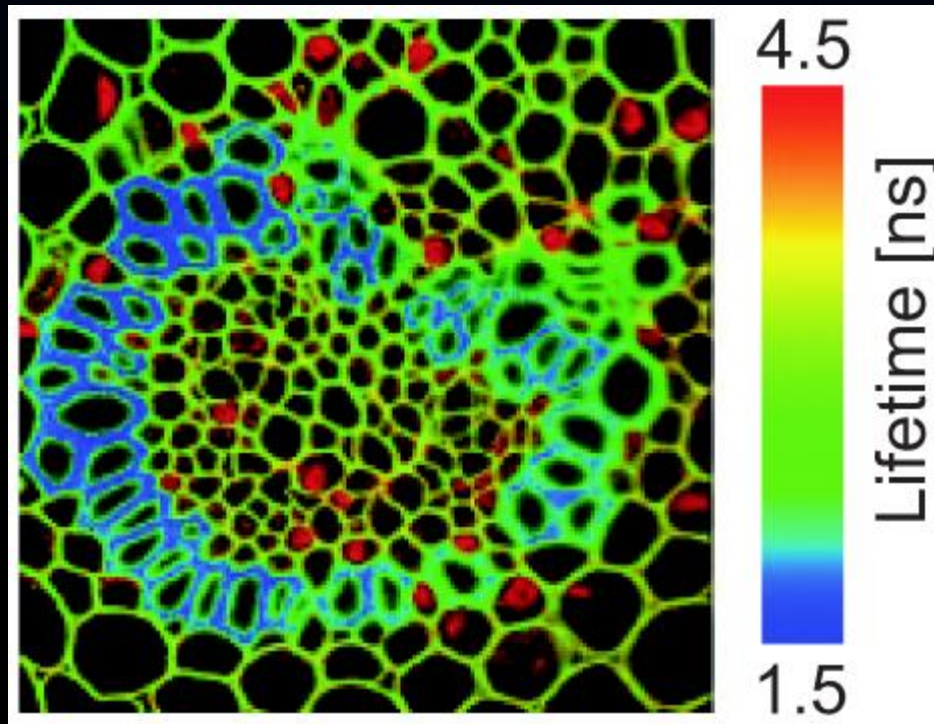
Η τεχνική FLIP μπορεί να μας δώσει τη διασύνδεση μεταξύ δύο περιοχών

- ✓ Η τεχνική γνωστή ως Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP) έχει χρησιμοποιηθεί για να δείξει την ένωση μεταξύ δύο διαφορετικών περιοχών στο κύτταρο.

Η τεχνική FLIP μπορεί να μας
δώσει τη διασύνδεση μεταξύ
δύο περιοχών

- ✓ Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη
μελέτη του ρυθμού μεταφοράς μορίων
από κύτταρο σε κύτταρο

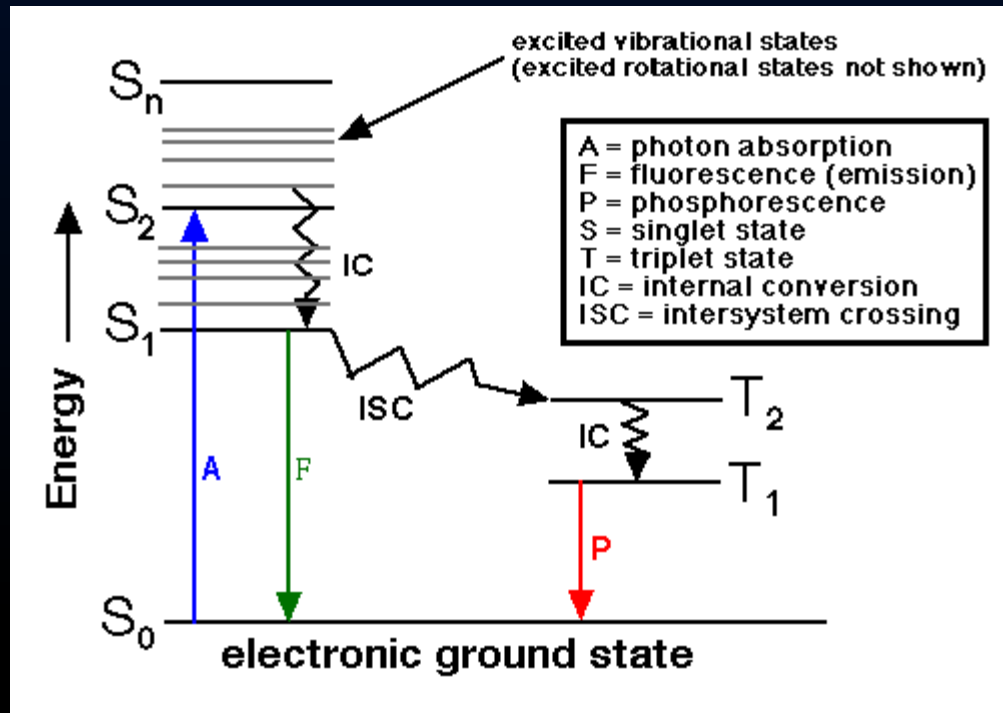
Η τεχνική Fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM)



Πού βασιζόμαστε

- ✓ Stoke (1852): παρατήρησε ότι $\lambda_{\text{abs}} < \lambda_{\text{fl}}$
- ▶ Μία ουσία έχει πάντα σταθερό φάσμα εκπομπής ασχέτως το φάσμα απορρόφησης λ_{ex}
- ▶ Το φάσμα φθορισμού μοιάζει σαν αντικατοπτρισμός της περιοχής απορρόφησης ελάχιστης συχνότητας

Διάγραμμα ενέργειας του Jablonski



Υπάρχουν πολλά μονοπάτια που ένα διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να χάσει ενέργεια:

Ο εγγενής ρυθμός φθορισμού, εσωτερική μετατροπή, στατική απόσβεση, δυναμική απόσβεση, FRET, μεταφορά φορτίου / μοριακός ισομερισμός / διμοριακές αντιδράσεις, διέλευση μεταξύ συστημάτων...

Παράμετροι FLIM

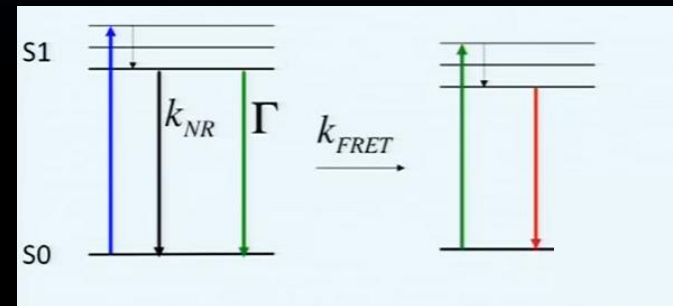
- ▶ τ = χρόνος ζωής φθορισμού (lifetime)
- ▶ η_0 = κβαντική παραγωγή φθορισμού
- ▶ K_r = παράμετρος ακτινοβολίας απενεργοποίησης

$$\tau = \eta_0 / K_r$$

- ▶ Χρόνος αποσύνθεσης:

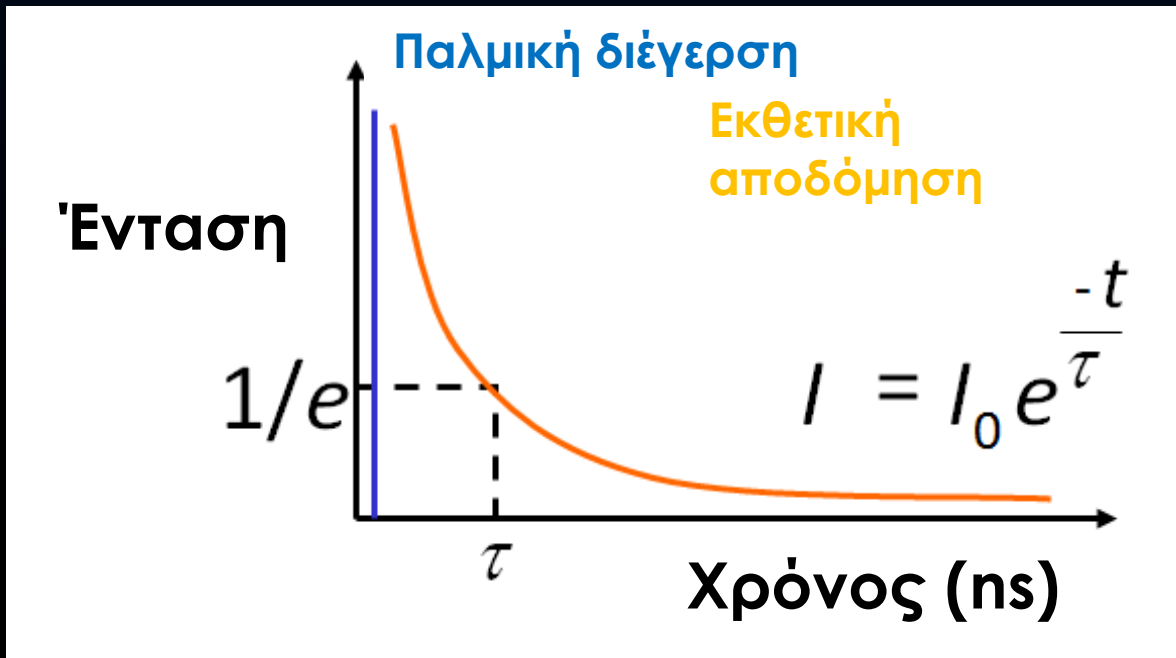
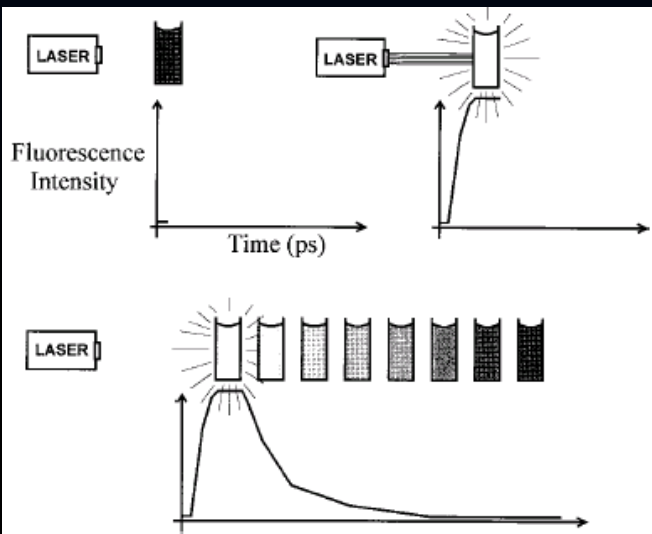
$$\sum k_i \quad \tau_r = 1 / K_r$$

$$\tau = \eta_0 \times \tau_r$$

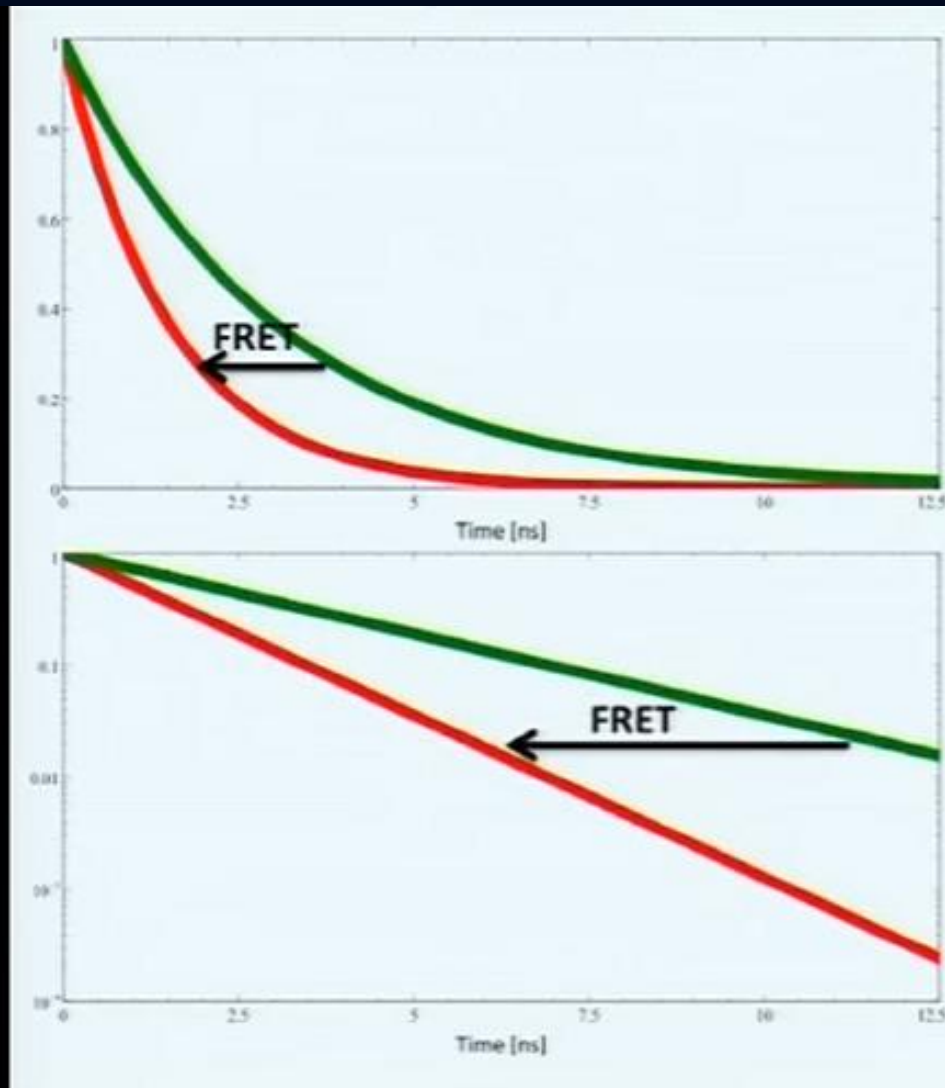


$$\tau_{FRET} = \frac{1}{\Gamma + K_{NR} + K_{FRET}} < \tau_D = \frac{1}{\Gamma + k_{NR}}$$

Παράμετροι στο FLIM



Όταν έχουμε FRET



Ο λόγος της μείωσης

The diagram illustrates the FRET process between two states, S1 and S0. On the left, S1 is the excited state and S0 is the ground state. A blue arrow indicates excitation to S1, a black arrow labeled k_{NR} indicates non-radiative relaxation from S1 to S0, and a green arrow labeled Γ indicates radiative relaxation from S1 to S0. On the right, after FRET, the donor is in S0 and the acceptor is in S1. A green arrow indicates excitation to S1, and a red arrow indicates relaxation from S1 to S0. A horizontal arrow labeled k_{FRET} points from the left state to the right state, representing the energy transfer rate.

$$\tau_D = \frac{1}{\Gamma + k_{NR}} > \frac{1}{\Gamma + k_{NR} + k_{FRET}} = \tau_{FRET}$$

Μετατροπή σε
ημιλογαριθμική κλίμακα

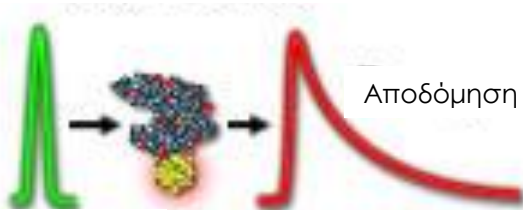
Ο χρόνος ζωής του φθορισμού μειώνεται

Υπάρχουν δύο τρόποι για να μετρήσουμε το χρόνο φθορισμού

Μέτρηση Χρόνου Φθορισμού

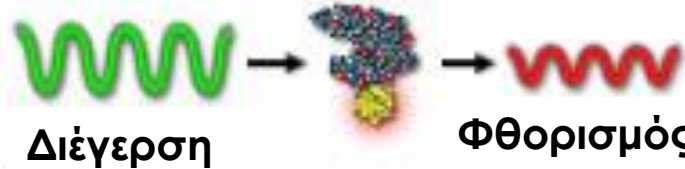
Επικράτεια χρόνου

Επικράτεια συχνότητας

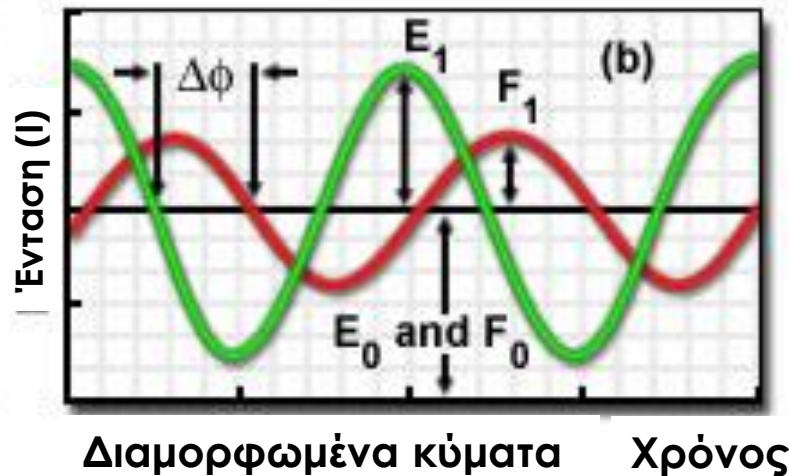
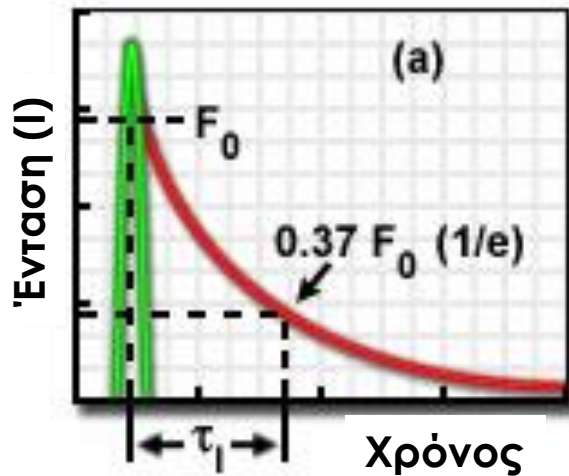


Αποδόμηση

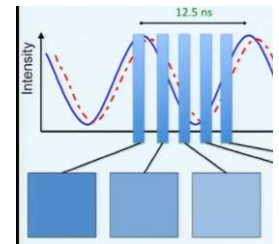
$$\tau_{\phi} = \omega^{-1} \varepsilon \phi(\Delta\phi) \quad \tau_M = \omega^{-1} \sqrt{(M^{-2} - 1)}$$



Φθορισμός



$$M = \frac{F_1 E_0}{F_0 E_1}$$

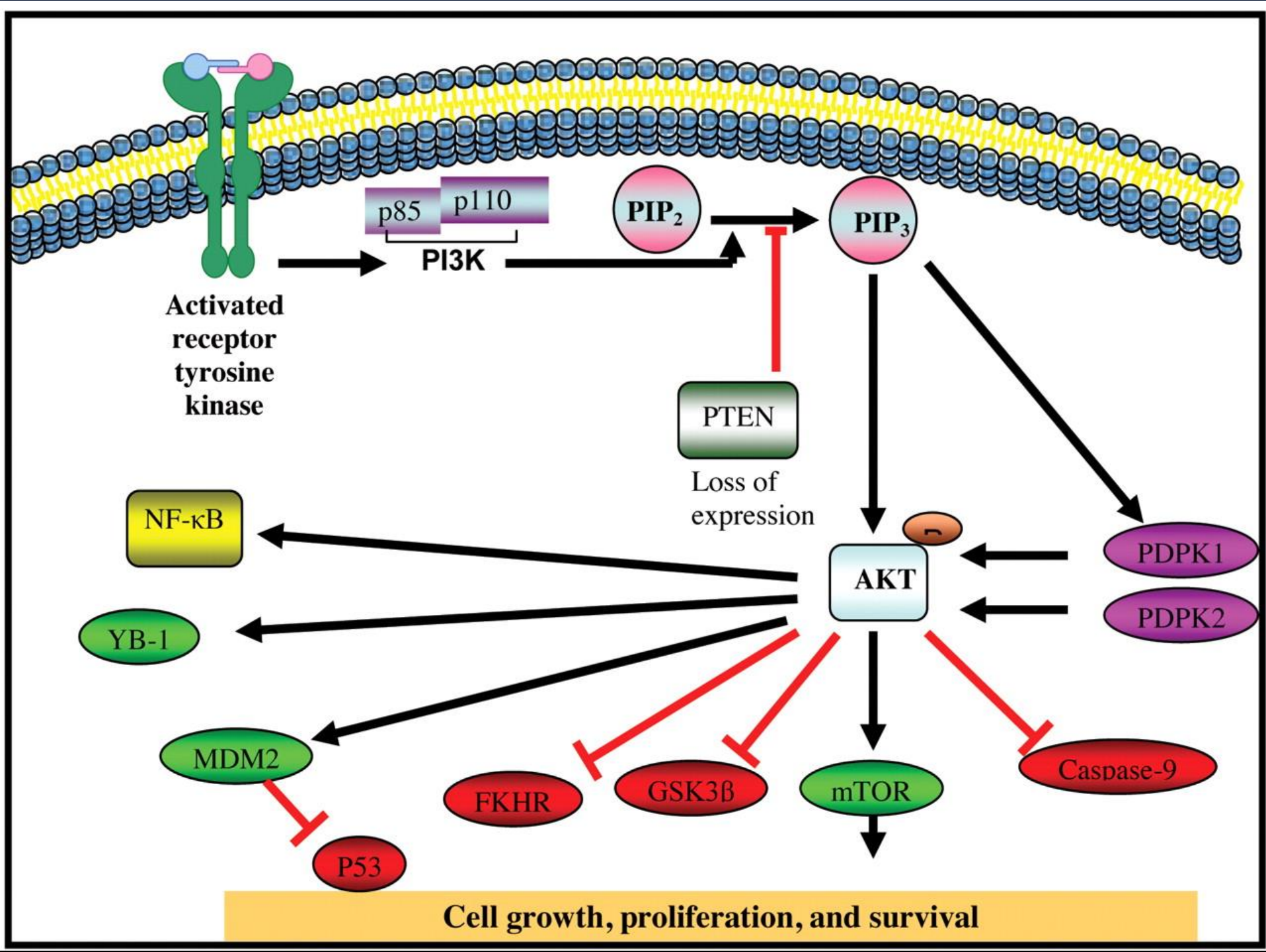


FLIM για δομική ανάλυση

- ▶ Συνδυασμός φθοριζουσών μορίων με βιομόρια για μελέτη του μικροπεριβάλλοντος
- ▶ Μελέτη αλλαγής της δομής μίας πρωτεΐνης
- ▶ Διαγνωστική ανάλυση (καρκινικά κύτταρα)
- ▶ Μπορεί να συνδυαστεί με FRET για μελέτη της αλλαγής της δομής

Flourescence Resonance Energy Transfer (FRET)

- Εξαρτάται από τη μεταφορά ενέργειας μεταξύ δύο μορίων
- Εξαρτάται από την απόσταση
- Κατά τη **σχάση δεσμών** μπορεί η απόσταση να αυξηθεί (σκεφτείτε λίγο ένα πείραμα)
- Το **FRET** μπορεί να συνδυαστεί με **FLIM** και να παρέχει άμεσες ενδείξεις για τις φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο ή περισσοτέρων πρωτεϊνών.
- Μπορεί να επιτρέψει υψηλή **χωροχρονική** ανάλυση.

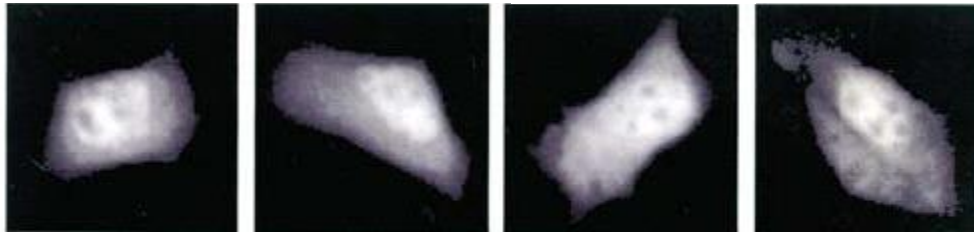


FRET μεταξύ GFP-Akt-YFP με επικράτεια χρόνου και YFP^{dark}

A

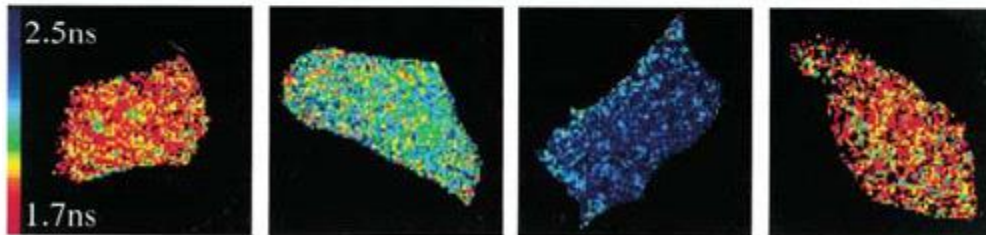
GFP-AKT GFP-AKT-YFP YFP-AKT GFP-AKT-YFP^{dark}

Εικόνα
έντασης



GFP-Akt-YFP^{dark}: Tyr67
σε Leu

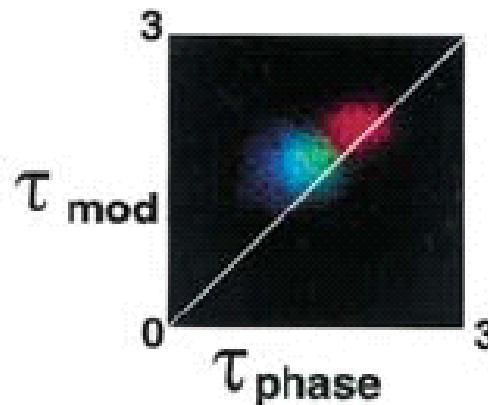
Χάρτης τ



μπλε= GFP-Akt-YFP^{dark}

πράσινο= GFP-Akt

κόκκινο= GFP-Akt-YFP

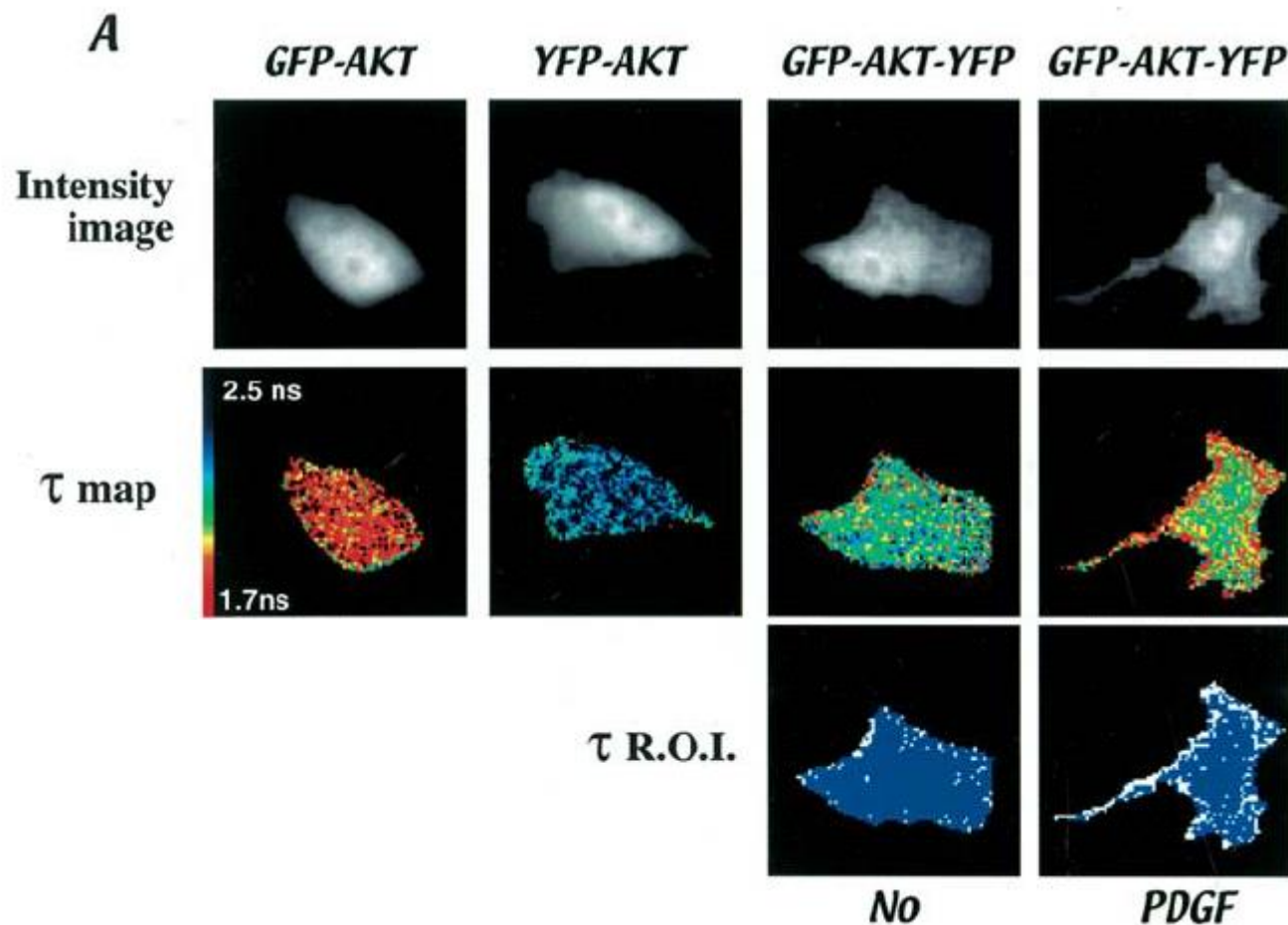


$$\tau = (\tau_m + \tau_p) / 2$$

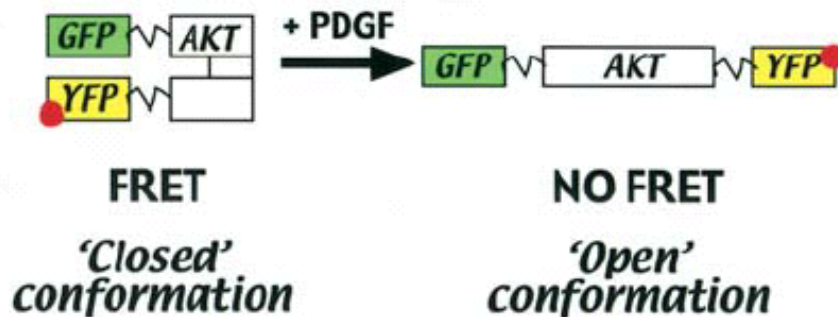
τ_p = phase of fluorescence

τ_m = modulation depth of
fluorescence

Αλλαγές στη δομή GFP-Akt-YFP κατά την επαγωγή κυττάρων



Average $\langle \tau \rangle$ ns	
<i>GFP-AKT</i> *	2.14 ± 0.03
<i>GFP-AKT-YFP</i>	2.33 ± 0.02
<i>YFP-AKT</i> **	2.41 ± 0.01



Πλεονεκτήματα

- ▶ Μπορεί να παρακολουθεί αλλαγές σε επίπεδο μικροπεριβάλλοντος
- ▶ Παράλληλη μέτρηση πολλών FLIM από μία μέτρηση μπορεί να αναλυθεί στην επικράτεια συχνοτήτων
- ▶ Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση ενδογενών φθορίζουσων χρωστικών
- ▶ Παράλληλη λήψη πολλών φθορίζουσών μορίων
- ▶ Δεν είναι επεμβατική μέθοδος
- ▶ Δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση

Περιορισμοί

- ✓ Στατιστικές αναλύσεις για να μειωθεί ο θόρυβος εξ αιτίας της μεγάλης ευαισθησίας (signal-to-noise ration; Θέμα προς συζήτηση)
- ✓ Εξαρτάται από τη φωτοχημεία του φθορίζοντος μορίου
- ✓ Ακριβός εξοπλισμός

Την επόμενη φορά...

29

7. Σύγχρονες μέθοδοι φασματοσκοπίας (confocal RAMAN, FTIR)