

ΒΙΟΛ-491 Ειδικά Κεφάλαια Βιοτεχνολογίας και Απεικονιστικής Φυτών-ΔΙΑΛΕΞΗ 5



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

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



FORTH

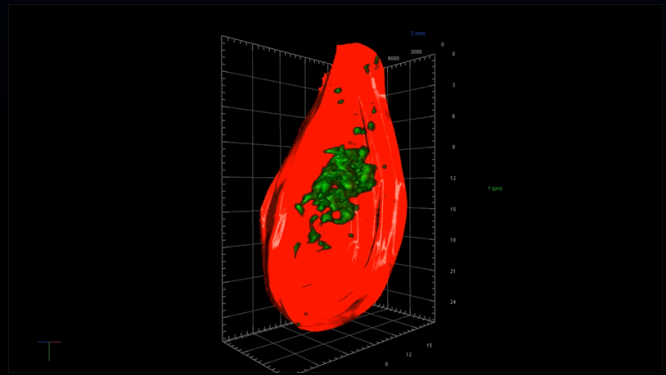
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY & BIOTECHNOLOGY



<https://twitter.com/Panosmoschou>



5. Σύγχρονες μέθοδοι απεικονιστικής (συνεστιακή, STED, PALM κτλ)



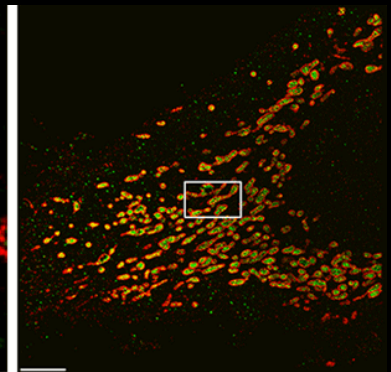
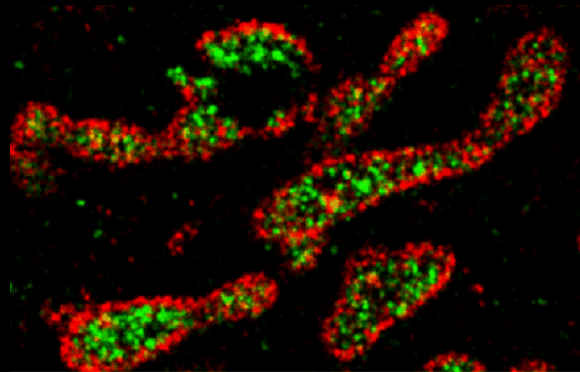
Original Image



Particle Detection



Reconstruction



Νέες δεξιότητες-Διάλεξη 5

1. Να **περιγράψετε** βασικές αρχές απεικονιστικής υψηλής ανάλυσης
2. Να **περιγράψετε** τη δομή της απεικόνισης

Επιστημονική απεικόνιση υψηλής ανάλυσης (θεωρία, τι προβλήματα λύνει, βασικές μεθοδολογίες)

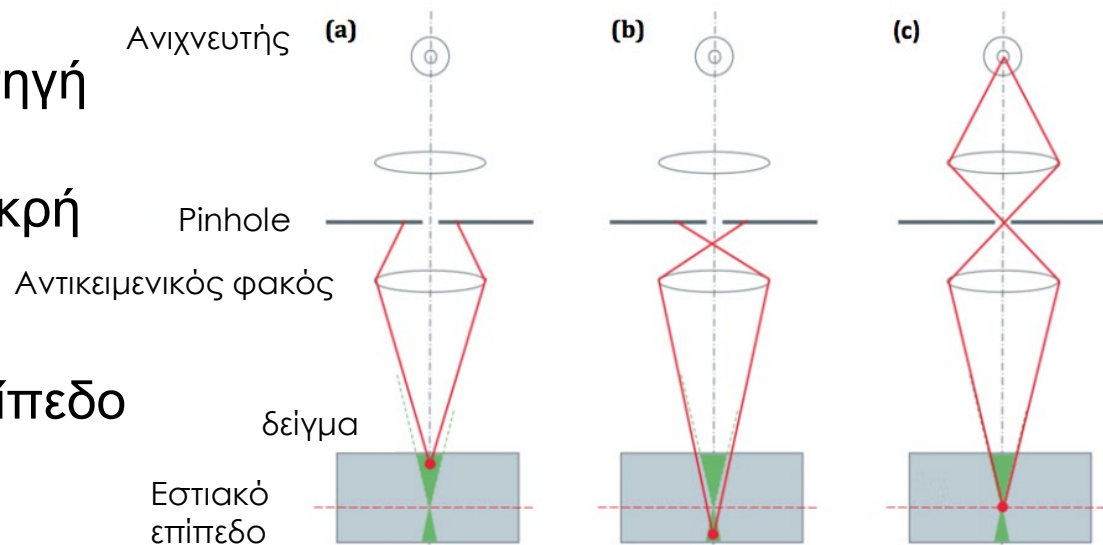
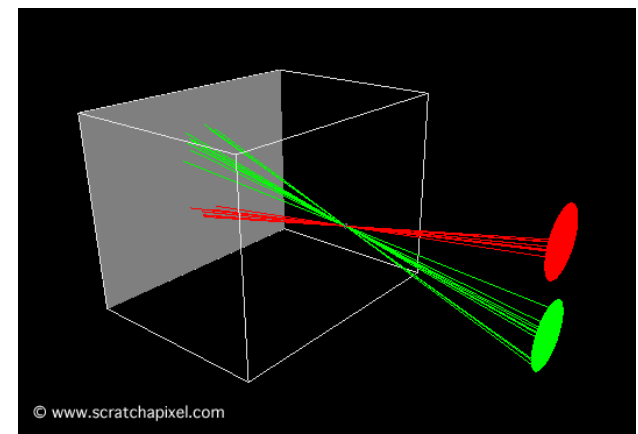
Τι θα θέλατε να ακούσετε; Τι έχετε ακούσει; Τι θα θέλατε να μάθετε σχετικά με την απεικονιστική υψηλής ανάλυσης;

Συνεστιακή μικροσκοπία

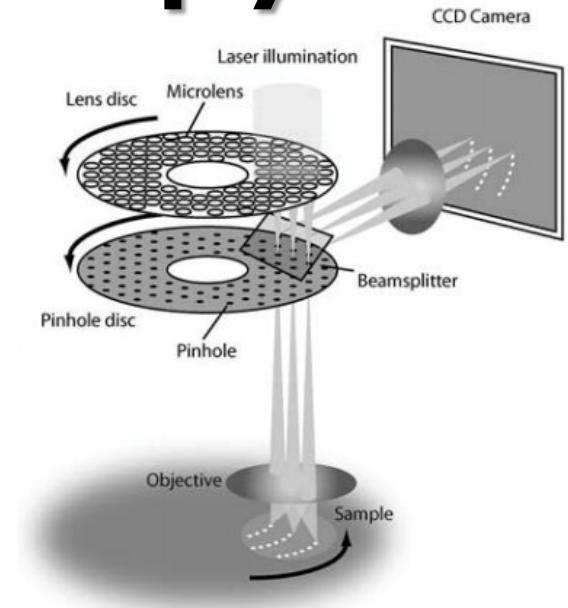
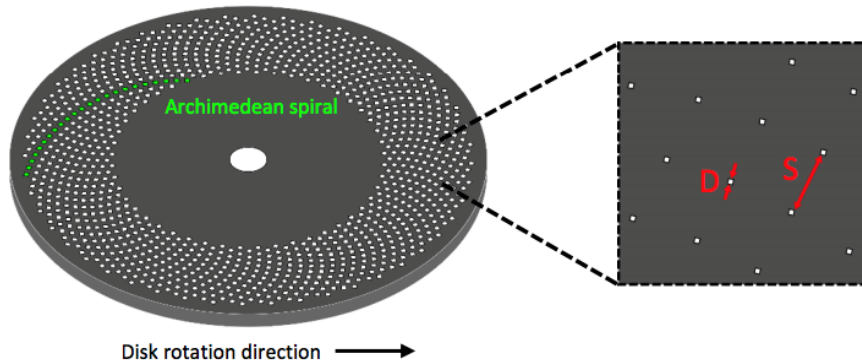
Στη συνεστιακή μικροσκοπία δύο
οπές (pinholes)

χρησιμοποιούνται συνήθως:

- ✓ Μία οπή μπροστά από την πηγή φωτισμού που επιτρέπει μετάδοση μόνο μέσω από μικρή περιοχή
- ✓ Αυτή η οπή φωτισμού απεικονίζεται στο εστιακό επίπεδο του δείγματος
- ✓ Μόνο ο φθορισμός εντός του εστιακού επιπέδου του δείγματος θα περάσει από τον ανιχνευτή



Spinning disc microscopy



Τα περισσότερα confocal συλλαμβάνουν μία μόνο εικόνα σε 0,1-1 sec.

- ✓ Nipkow disk confocal μικροσκόπιο: Αυτό δημιουργεί μία εικόνα περνώντας φως μέσα από μια περιστρεφόμενη μάσκα οπών, φωτίζοντας ταυτόχρονα πολλά διακριτά σημεία.
- ✓ Ακουστικό-οπτικός εκτροπέας (acousto-optic Deflector, AOD) για παρεμβολή του φωτός διέγερσης. Γρήγορες οριζόντιες σαρώσεις μπορούν να επιτευχθούν με AOD.

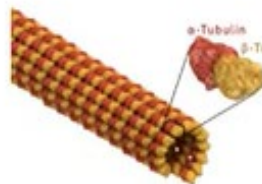
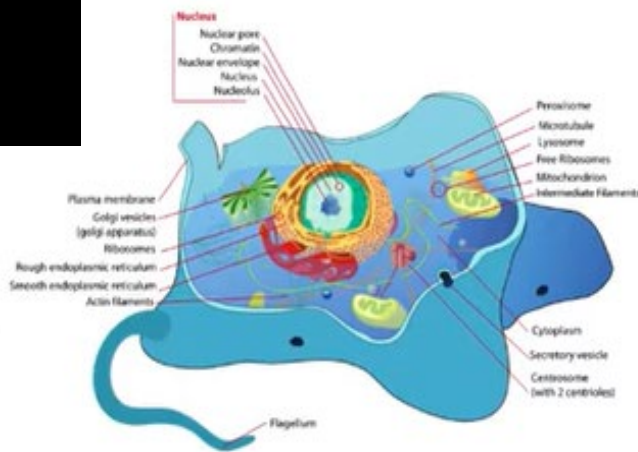
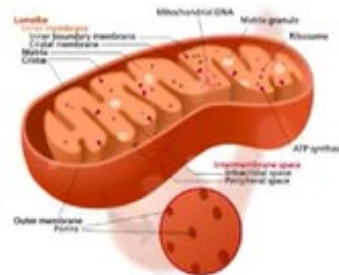
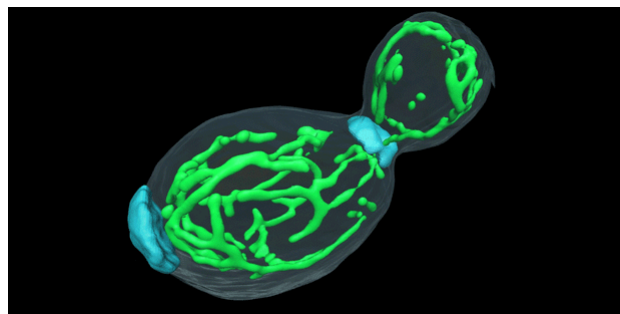
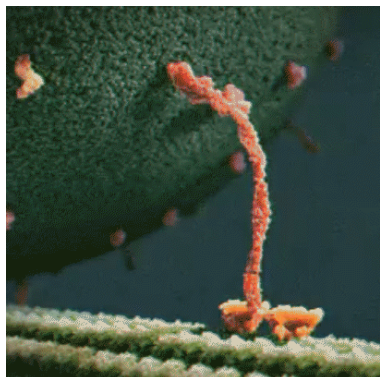
Υπερανάλυτική μικροσκοπία

6

- ✓ Υψηλής ανάλυσης κάτω από το όριο που επιβάλλεται από τη περίθλαση του φωτός - συνήθως μεταξύ **10 και 150 nm**
- ✓ Οπτική μικροσκοπία **240 nm** στο εστιακό επίπεδο (xy) και περίπου 600 nm κατά μήκος του οπτικού άξονα (z)
- ✓ Συγκρίνετε αυτό με, για παράδειγμα, ηλεκτρονική μικροσκοπία όπου η ανάλυση λίγων nm είναι συνηθισμένη. Ωστόσο, απαιτείται ουσιαστική προετοιμασία δείγματος (μεταλλικές επικαλύψεις, κάταγμα κατάψυξης κ.λπ.) και ακραία απεικόνιση συνθήκες (υψηλό κενό, βομβαρδισμός από φορτισμένα σωματίδια κτλ).

Σπάσουμε το όριο διάθλασης του φωτός

Η ανάγκη



Amino Acid

Kinesin

Microtubule

Mitochondrion

Whole cell

1Å 1nm 10nm 100nm 1μm 10μm 0.1mm

Ατομικό

Μοριακό

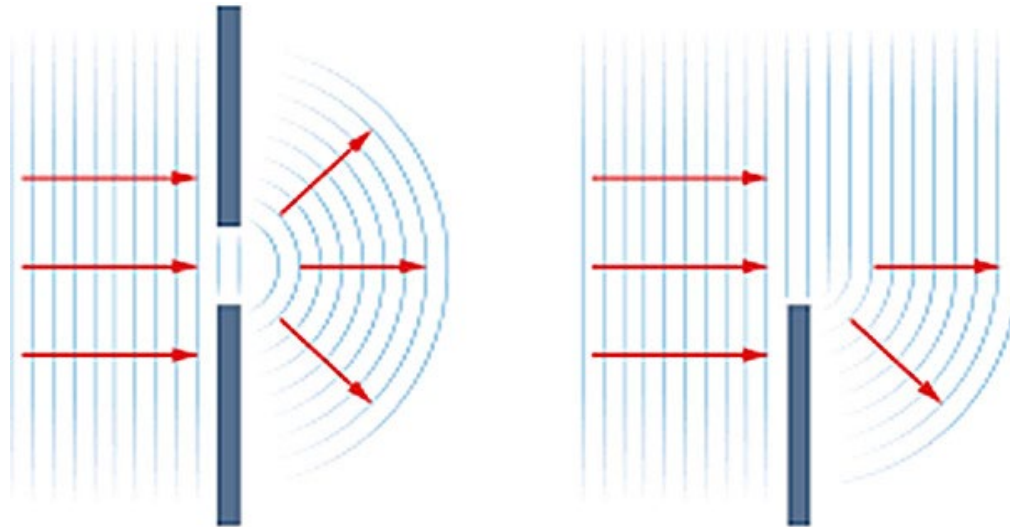
Υποκυτταρικό

Κυτταρικό

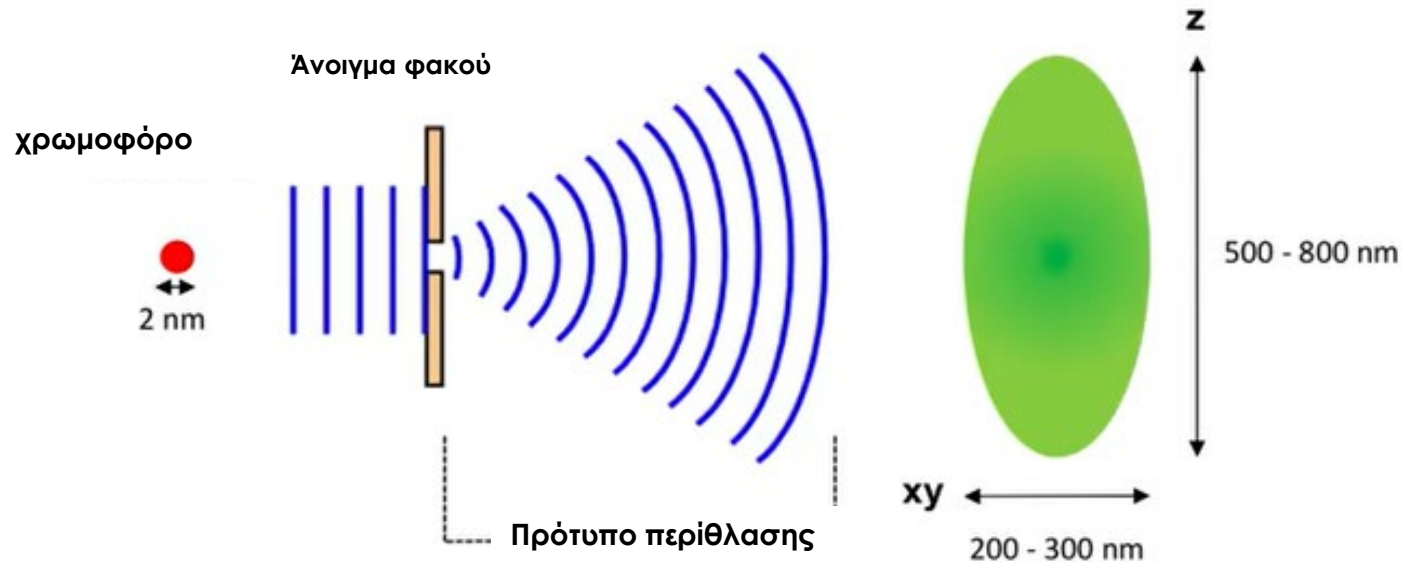
Οπτική μικροσκοπία

Όριο περίθλασης (diffraction limit)

Στη θεωρητική Φυσική, υποθέτουμε ότι όλοι οι φακοί είναι τέλει και καταγράφουν οποιοδήποτε αντικείμενο πιστά. Ωστόσο, αυτή η ιδανική κατάσταση απέχει από την πραγματικότητα, όπου όλοι οι φακοί παρουσιάζουν χρωματικά και γεωμετρικά σφάλματα και παραμορφώσεις – ειδικά οι απλοί, φθηνοί φακοί.



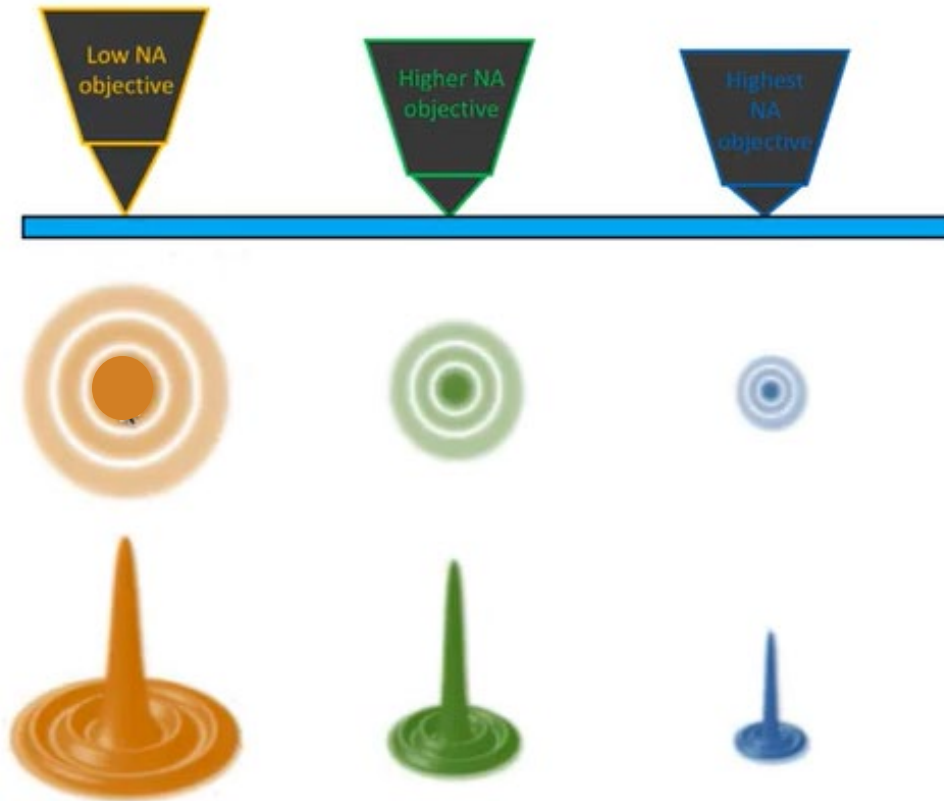
Όριο περίθλασης



$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

$$d (GFP) = \frac{510}{(1.4 * 2)} = 182 \text{ nm}$$

Airy disks



Το μέγεθος του AD
εξαρτάται από το
αριθμητικό
διάφραγμα του
φακού (NA)

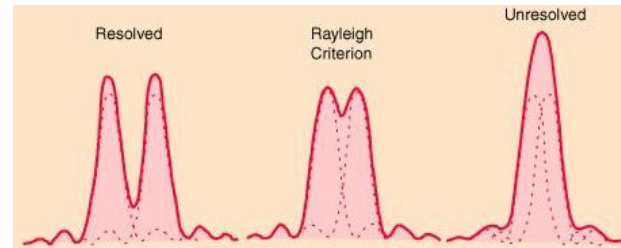
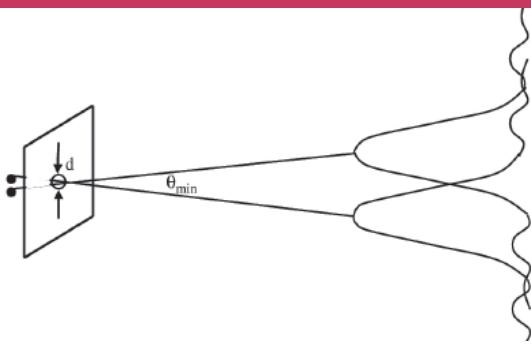
George Biddell Airy, 1835

Point spread function (PSF)

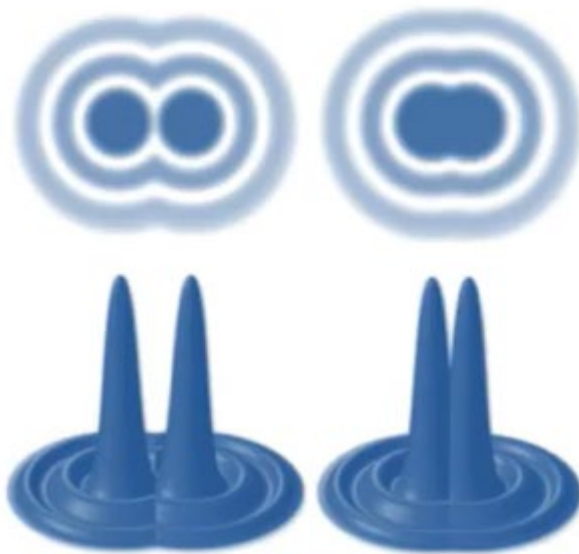
11



λ



Κριτήριο του Rayleigh

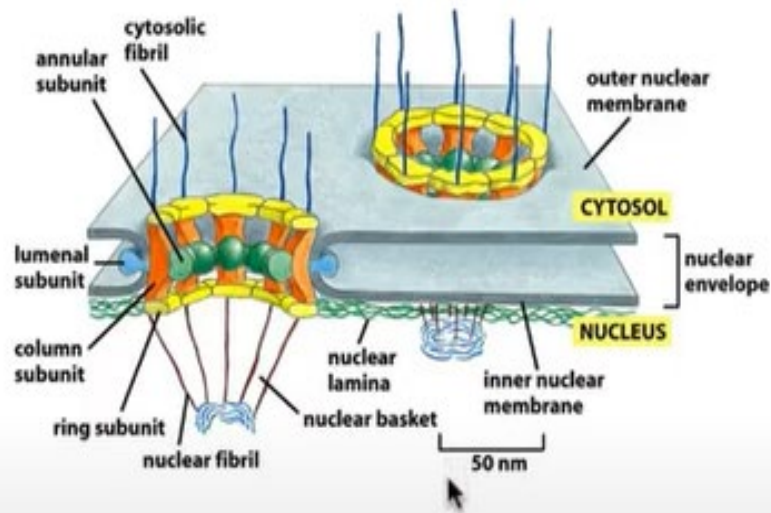


Δύο αντικείμενα θα είναι μόλις διακριτά όταν το κεντρικό μέγιστο του ειδώλου του ενός επικαλύπτει το πρώτο ελάχιστο περίθλασης του ειδώλου του άλλου.

$$d = \frac{1.22\lambda}{2NA}$$

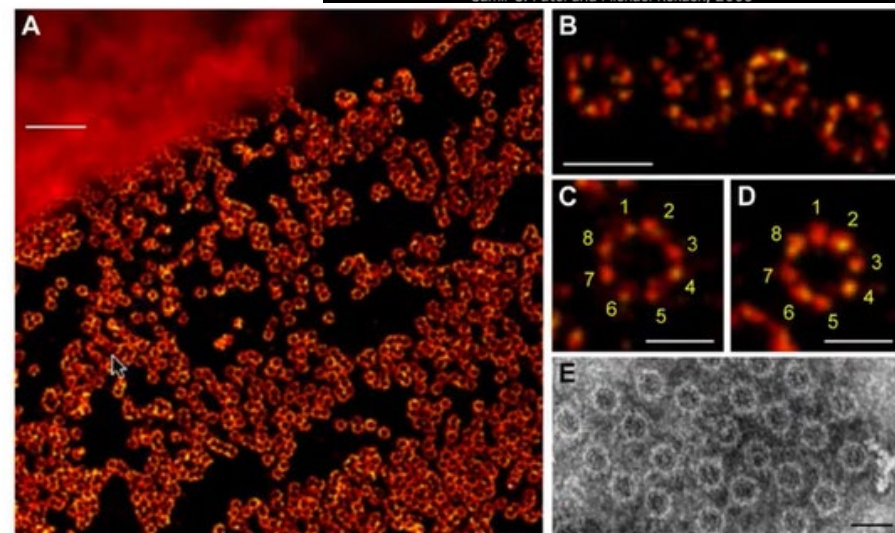
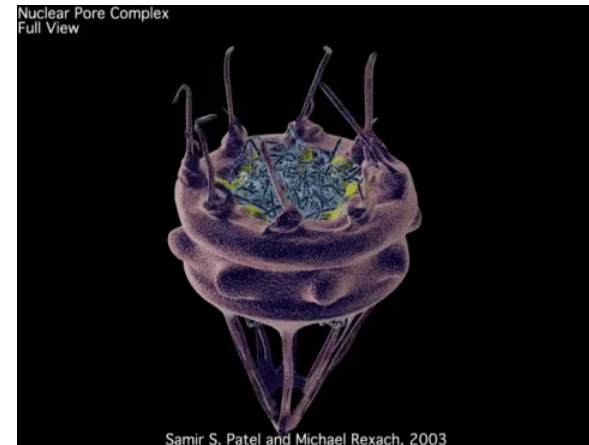
$$d(\text{GFP}) = \frac{1.22 * (510)}{(1.4 * 2)} = 222\text{nm}$$

Το σύμπλοκο του πυρηνικού πόρου στο *Xenopus laevis*



The structure of the nuclear pore complex (NPC) in the *Xenopus laevis* oocyte nuclear envelope

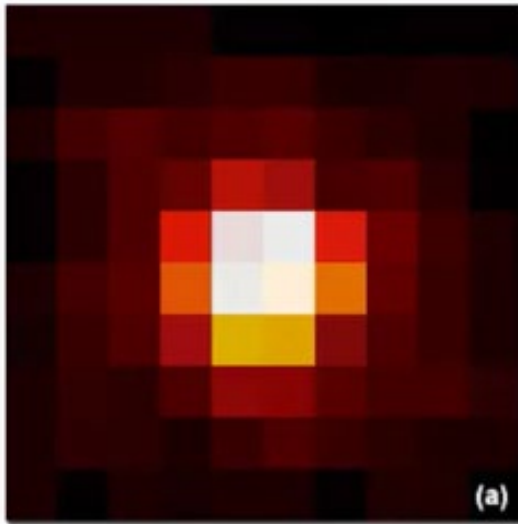
Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2007) *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition, Garland Science



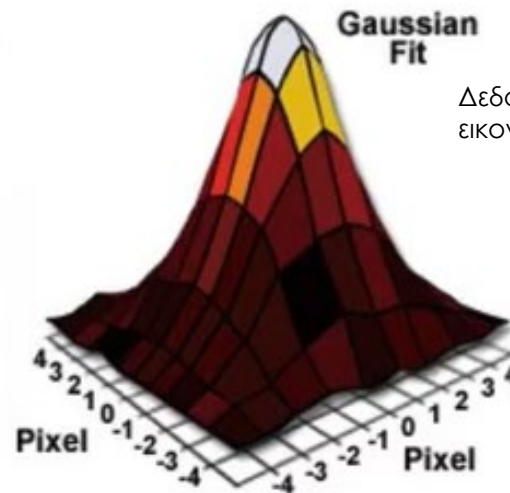
Comparison of immunolabelled subunits of the *Xenopus laevis* nuclear pore complex using widefield fluorescence (upper left corner of A) and dSTORM (lower right corner of A). Scale bars: 1 μm (A), 250 nm (B), 150 nm (C–E).

Löschberger, A., van de Linde, S., Dabauvalle, M.-C., Rieger, B., Heilemann, M., Krohne, G. & Sauer, M. (2012) Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J Cell Sci.* 125: 570-575; doi: 10.1242/jcs.098822

Σημειακός εντοπισμός

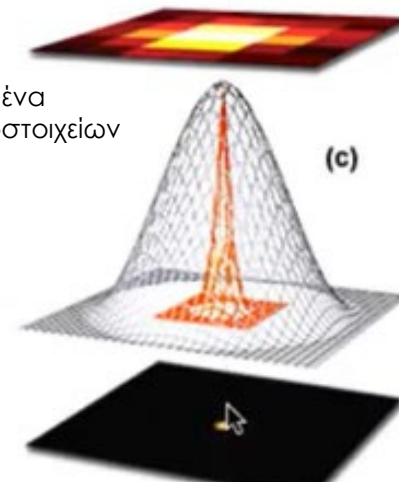


Αρχικά δεδομένα



Προσαρμογή κατά Gauss

Δεδομένα
εικονοστοιχείων



Εντοπισμός Σημείου

Localising a single molecule by fitting it with a Gaussian function

Adapted from "Practical Aspects of PALM Imaging," Zeiss, zeiss-campus.magnet.fsu.edu, n.p. Web, 5 September 2017
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/practicalaspects.html>

Ένα βασικό πρόβλημα

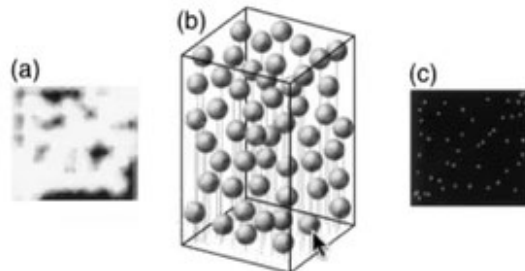
Eric Betzig

February 1, 1995 / Vol. 20, No. 3 / OPTICS LETTERS 237

Proposed method for molecular optical imaging

E. Betzig

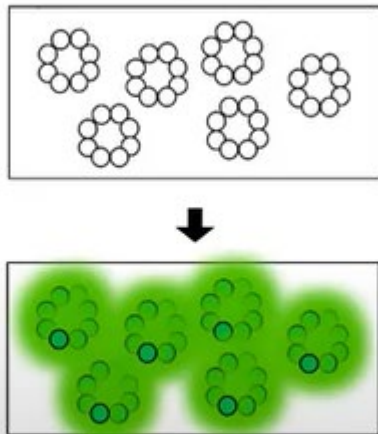
NSOM Enterprises, 17 Webster Drive, Berkeley Heights, New Jersey 07922



Η μεθοδολογία σημειακού εντοπισμού

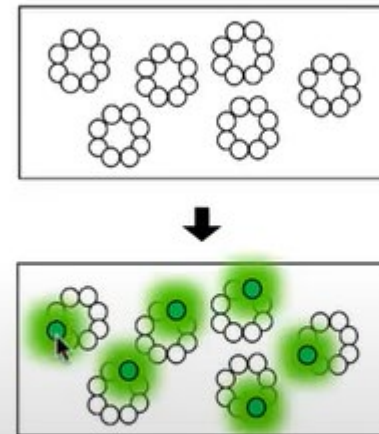
Σημειακός εντοπισμός

Φθορισμός ευρέως πεδίου



Όλα τα φθορίζοντα μόρια εκπέμπουν ταυτόχρονα και κατά συνέπεια απομονωμένα μόρια δεν μπορούν να εντοπιστούν

Μικροσκοπία εντοπισμού

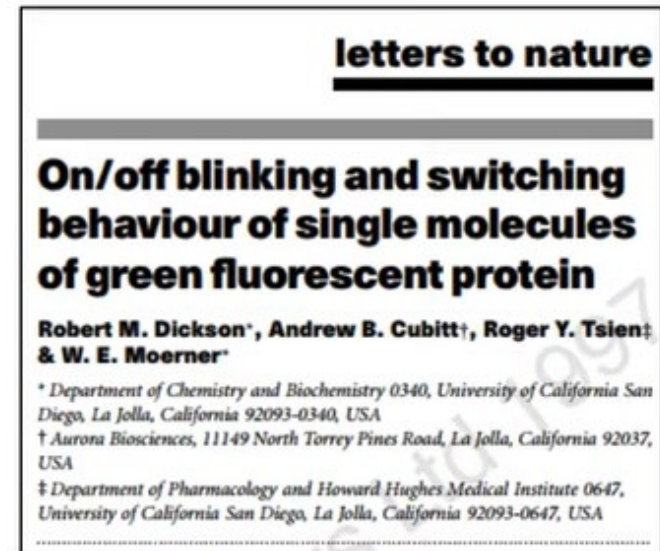
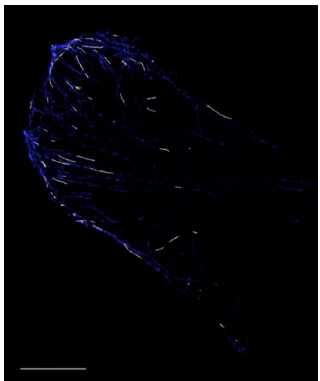


Επαγωγή ενός απομονωμένου μορίου

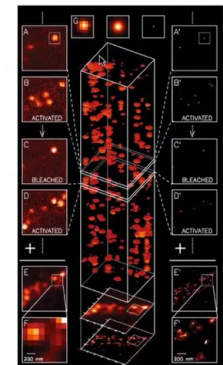
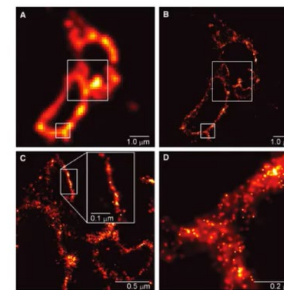
Η λύση του προβλήματος: GFP που αναβοσβήνει: PALM

William Moerner

- GFP που αναβοσβήνει
- Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)
- Χρησιμοποιεί φωτο-εναλλασσόμενα ή φωτο-ενεργοποιούμενα φθορίζοντα μόρια
- Βραβείο Nobel με Eric Betzig και Stefan Hell (2014)



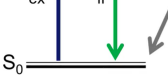
PALM super-resolution microscopy

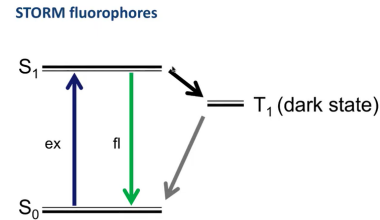
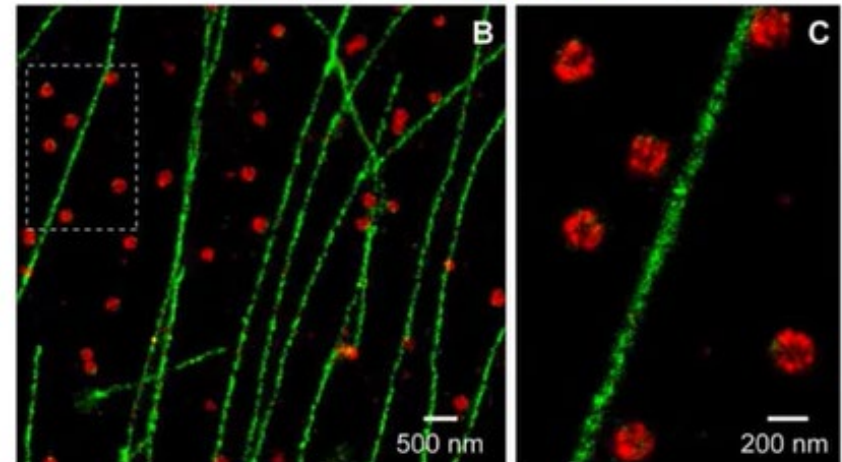
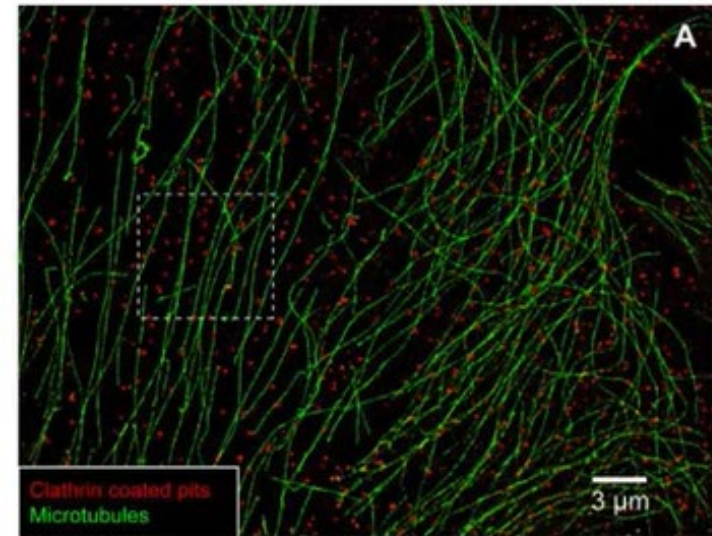
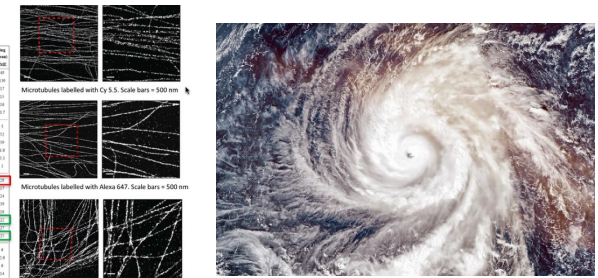


Betzig, E., Patterson, G.M., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacio, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., Hess, H.F. (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science. 313(5793): 1642-5; DOI: 10.1126/science.1127344

STORM

Xiaowei Zhuang

- ✓ Cy5, αναβοσβήνει 
- ✓ Δε χρειάζεται να σβήνουμε τεχνητά τα φθορίζοντα μόρια
- ✓ Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)
- ✓ Χρήση φωτο-εναλλασόμενων χρωστικών

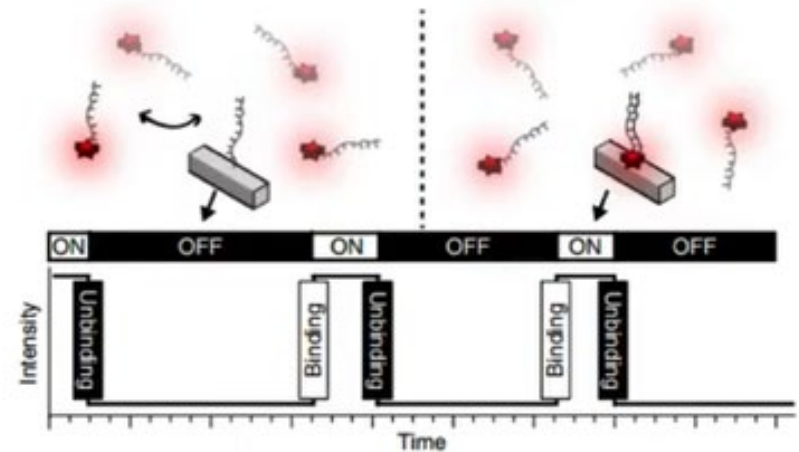
[illegible]

Bates, W. M., Huang, B., Dempsey, G. T., and Zhuang, X. (2007) Multicolor Super-resolution Imaging with Photo-switchable Fluorescent Probes. *Science*. 317(5845): 1749–1753. doi: 10.1126/science.1146598

DNA PAINT

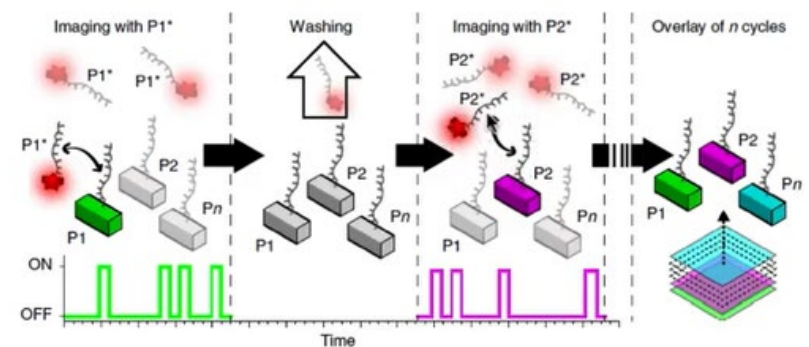
Ralf Jungmann

- ✓ DNA-based point accumulation for imaging in nanoscale topography (DNA-PAINT, 2014)
- ✓ Βασίζεται στη συμπληρωματικότητα του δίκλωνου DNA
- ✓ Η μία αλυσίδα είναι σημασμένη
- ✓ Όταν η σημασμένη αλυσίδα προσδεθεί, μπορούμε να δούμε φθορισμό στο **εστιακό επίπεδο** (focal plane)
- ✓ Δεν εξαρτάται από φωτοφυσικές ιδιότητες
- ✓ Μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά χρώματα με σχετική ευκολία και υπάρχουν πολλά χρωμοφόρα



DNA-PAINT concept

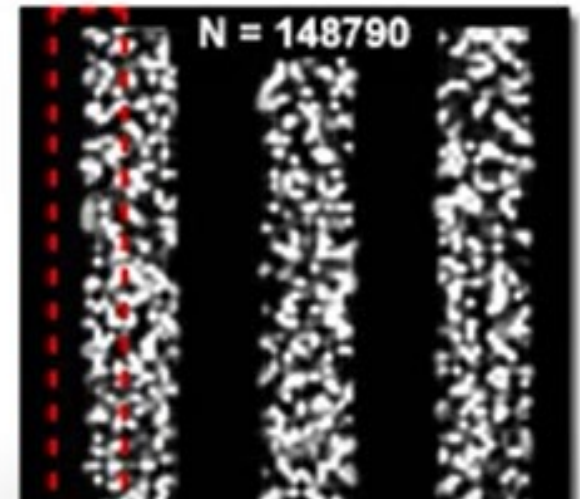
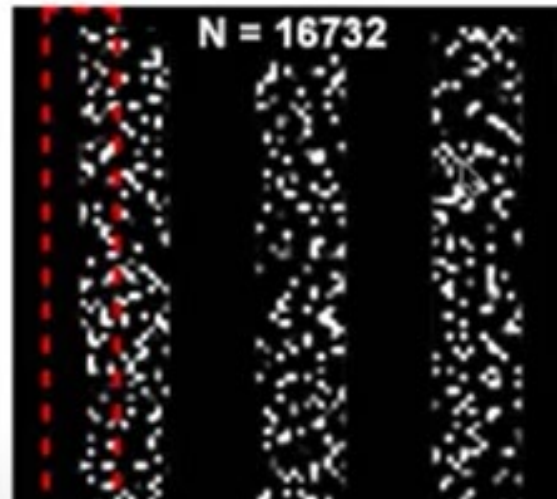
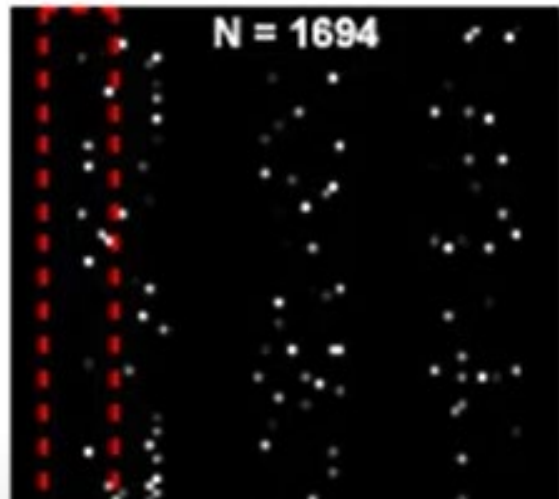
Schnitzbauer, J., Strauss, M. T., Schlichthaerle, T., Schueder, F. & Jungmann, R. (2017) Super-resolution microscopy with DNA-PAINT. *Nat Protoc.* Jun;12(6):1198-1228. doi: 10.1038/nprot.2017.024



Exchange-PAINT imaging of multiple targets using the same fluorophore

Schnitzbauer, J., Strauss, M. T., Schlichthaerle, T., Schueder, F. & Jungmann, R. (2017) Super-resolution microscopy with DNA-PAINT. *Nat Protoc.* Jun;12(6):1198-1228. doi: 10.1038/nprot.2017.024

Μοριακή Πυκνότητα

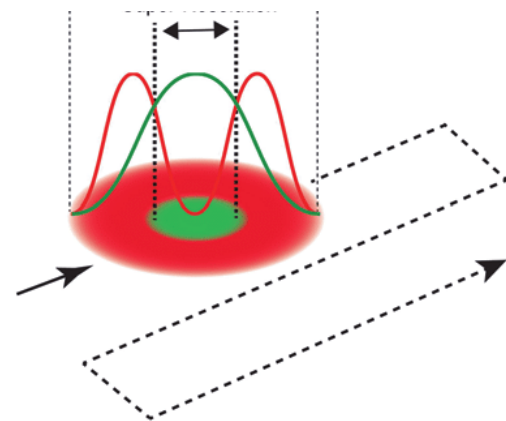
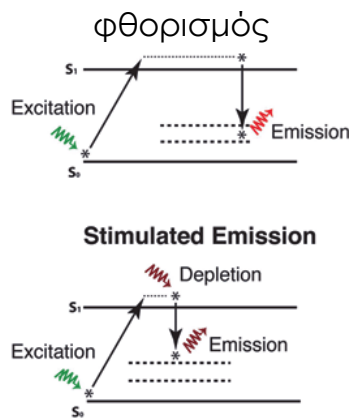
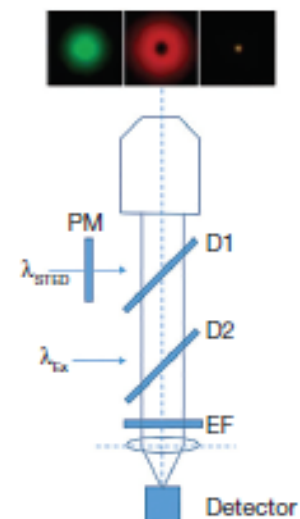
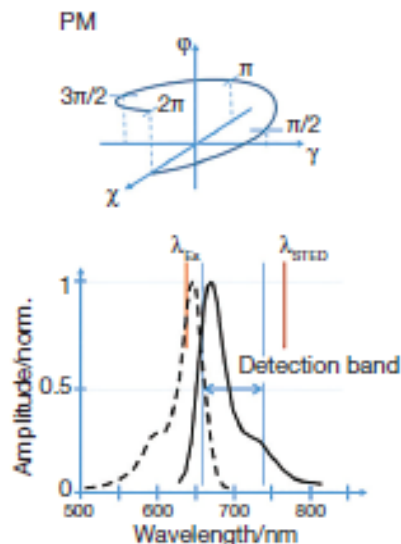


Σύνοψη

- ✓ Οι δύο πιο κοινές προσεγγίσεις που επιτρέπουν την παρατήρηση μεμονωμένων μορίων μέσω της συμπεριφοράς on / off είναι οι PALM και dSTORM.
- ✓ Η διαφορά τους: PALM χρησιμοποιεί φωτοενεργοποίηση. Σε μια ακολουθία εικόνων, η ενεργοποίηση μπορεί να ρυθμιστεί έτσι ώστε να εμφανίζονται μόνο λίγα μόρια. Μπορούν επομένως να αναγνωριστούν εύκολα και διακρίνονται μεταξύ τους στην τελική σειρά.
- ✓ Το dSTORM, βασίζεται στη φυσικοχημική αλληλεπίδραση μορίων χρωστικής φθορισμού με το άμεσο περιβάλλον του, που προκαλούν την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των μορίων (εξ ου και ο όρος «στοχαστικό»). Υπό σωστές συνθήκες (π.χ. pH, κατάσταση οξειδοαναγωγής, κ.λπ.) μόνο λίγα μόρια είναι ενεργοποιημένα.
- ✓ DNA PAINT
- ✓ 10πλάσια βελτιωμένη ανάλυση σε σύγκριση με τα συμβατικά μικροσκοπία (20 nm σε xy και 60 nm σε z).

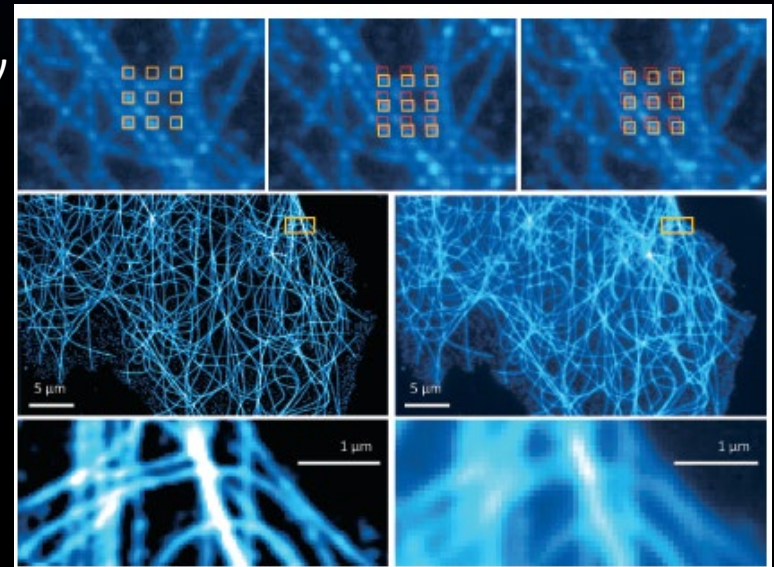
STED

- ✓ Η **Stimulated emission depletion microscopy (STED)** είναι μέθοδος σάρωσης σημείων
- ✓ Ωστόσο, αντί να χρησιμοποιείται μια οπή για απόρριψη φωτός εκτός εστίασης (βλ. "Airyscan"), καταστέλλει τις εκπομπές εκτός εστίασης (μέσω διέγερσης) ακριβώς στο σημείο φωτισμού του δείγματος.
- ✓ Η τυπική ανάλυση που δίνεται είναι σε τάξη των 50 nm σε xy και 80 nm σε z.
- ✓ Διατηρώντας το λέιζερ φωτοκαταστροφής φθορισμού όσο το δυνατόν χαμηλότερο.



Super-resolution with structured illumination microscopy (sr-sim, lattice sim)

- ✓ Συνδυάζει φθορισμό, δομημένο φωτισμό με βάση το εστιακό επίπεδο και ανασυγκρότηση ψηφιακών εικόνων.
- ✓ Η δομή, μια ακολουθία γνωστών προτύπων σχάρας, οδηγεί στην ανασυγκρότηση της εικόνας με έως και διπλάσια βελτιωμένη ανάλυση (ή 120 nm σε xy και 300 nm σε z).
- ✓ Το SR-SIM εμφανίστηκε στη δεκαετία του 1990, από τον Mats Gustafsson, στο Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια Σαν Φρανσίσκο.

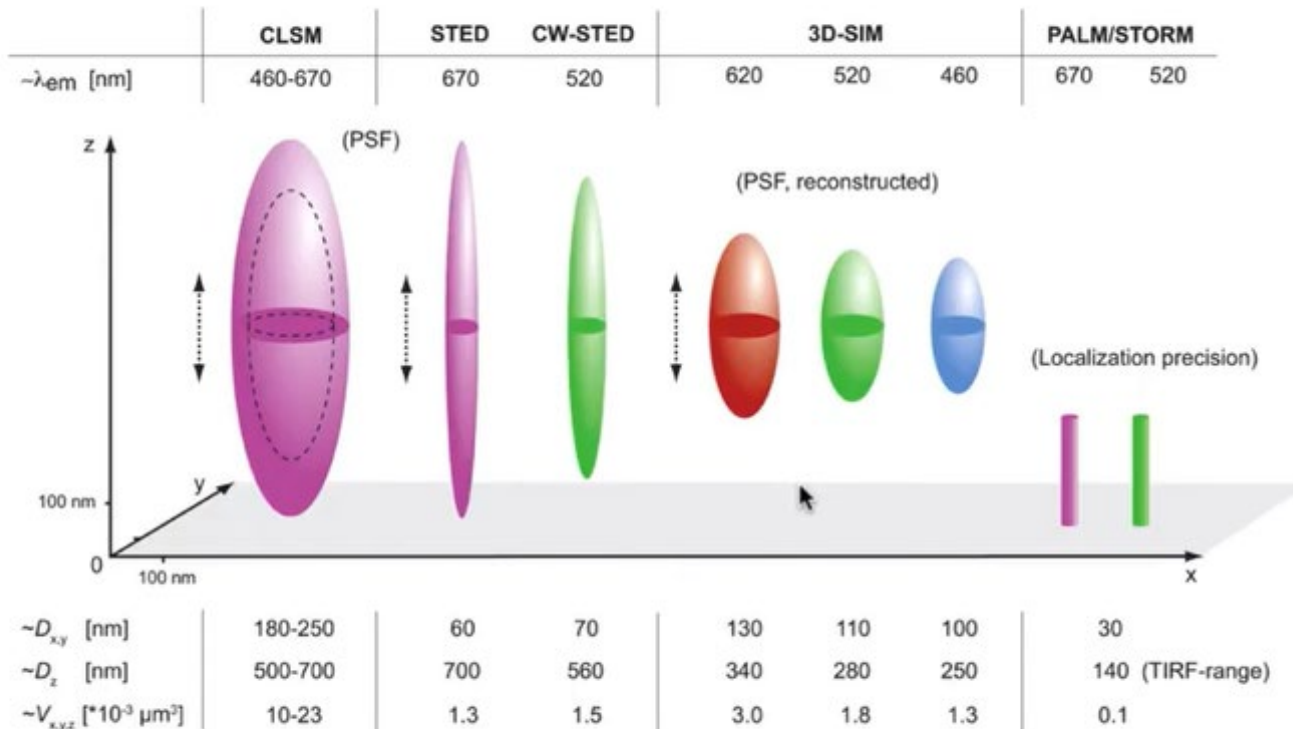


Πλεονεκτήματα & περιορισμοί ²⁴ (sr-sim, lattice sim)

- ✓ Ευελιξία και απεικόνιση ζωντανών κυττάρων: Το SR-SIM είναι συμβατό με συνθήκες απεικόνισης ζωντανών κυττάρων και δεν περιορίζεται σε συγκεκριμένες μήκη κύματος ή ισχύς λέιζερ.
- ✓ Ταχύτητα απόκτησης (image acquisition): Το SR-SIM μπορεί να αποκτήσει εικόνες από ένα μεγάλο περιοχή (π.χ. $80 \times 80 \mu\text{m}$) στα 100 fps ή περισσότερο. Ταυτόχρονη απόκτηση πολλαπλών χρωμάτων είναι δυνατή όταν χρησιμοποιείται πολλές κάμερες και κατάλληλες δέσμες.
- ✓ Το Lattice SIM επιτρέπει καλύτερη αντίθεση διαμόρφωσης σε βάθος σε σύγκριση με τη συμβατική SIM και μπορεί να φτάσει τα $100 \mu\text{m}$, ανάλογα με τις ιδιότητες του δείγματος.
- ✓ Το SR-SIM χρειάζεται αλγόριθμους ανοικοδόμησης. Ανοικοδόμηση σε αντικείμενα (υφές) μπορεί να εμφανίζονται ως διακυμάνσεις έντασης

Σύγκριση τεχνικών μικροσκοπίας

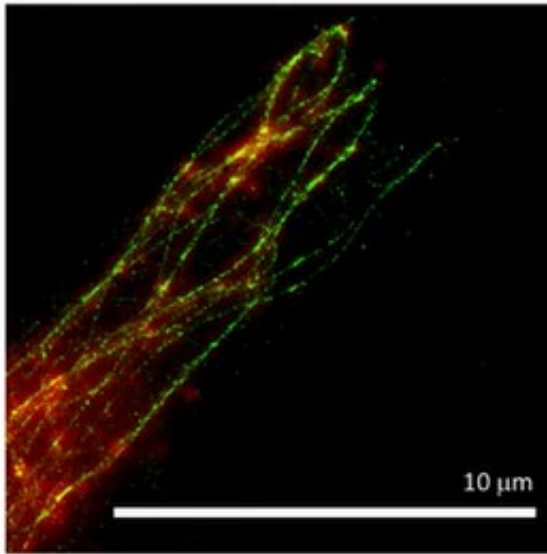
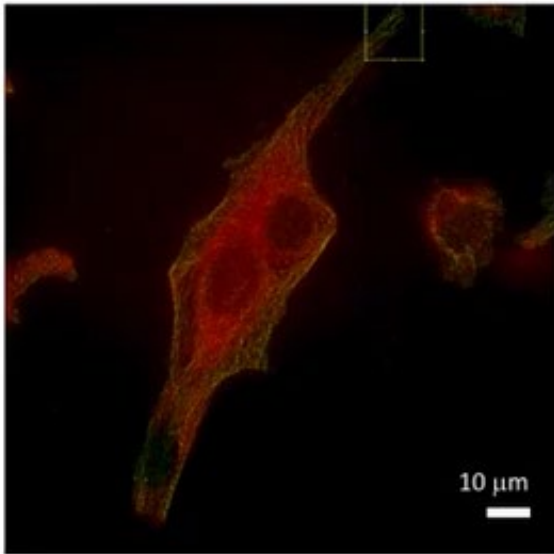
Σύγκριση



Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010) **A guide to super-resolution fluorescence microscopy**. *The Journal of Cell Biology* 190 (2) (July 26): 165 -175. doi:10.1083/jcb.201002018.

Αλήθεια ή ψέμα

Δεν είναι αληθείς εικόνες



NIH3T3 mouse embryonic fibroblast. Cell stained by anti-acetylated tubulin with an Alexa Fluor 647 secondary antibody. Localisation accuracy = 11.54 nm.

Kumar, S., French, P. (2017) *Photometrics reference data*. Imperial College London



Georges-Pierre Seurat. *The Eiffel Tower*, 1889, oil on canvas, 24 x 15 cm



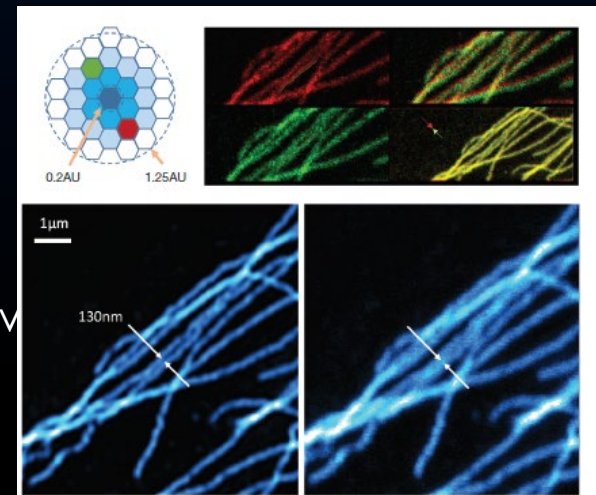
Σημεία για προβληματισμό

27

- ✓ PALM: Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες είναι περίπου 5 nm σε μέγεθος και κωδικοποιούνται γενετικά
- ✓ dSTORM τα μόρια εκπέμπουν σε τυχαίους χρόνους σε χημικές αντιδράσεις ή αλληλεπιδράσεις σε άμεση γειτνίαση
- ✓ Τα μόρια σήμανσης (συμπεριλαμβανομένων των λειτουργικών ομάδων ή πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα) είναι σε συγκρίσιμα μεγέθη με την ακρίβεια τοποθέτησης.

Airyscan

- ✓ Το Airyscanning είναι μια προσέγγιση υπέρ-ανάλυσης, η οποία έντονα με LSM. Ο φθορισμός που προέρχεται σε αυτό το εστιακό σημείο διαχωρίζεται στη συνέχεια από φθορισμό εκτός εστίασης με μια οπή.
- ✓ Το βασικό στοιχείο στο Airyscanning είναι ο σχεδιασμός του ανιχνευτή, που λειτουργεί ως μια σειρά από κλειστές οπές, το καθένα παρέχει η προαναφερθείσα ανάλυση αυξάνεται, αλλά συλλογικά.
- ✓ Αυτό είναι έτσι επειδή οι ανιχνευτές είναι δίπλα ο ένας στον άλλο: Το φως που απορρίφθηκε από μια υπομονάδα ανιχνευτή συλλέγεται από αυτό γείτονες.
- ✓ τρισδιάστατες εικόνες τυπικά 140 nm πλευρικά (xy) και 400 nm αξονικά (z).



Σύνοψη

29

Προσεγγίσεις με βάση το ευρύ πεδίο:

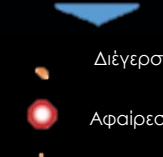
- ✓ Super-resolution through Structured Illumination (SR-SIM, Lattice SIM)
- ✓ Localization microscopy (dSTORM, PALM, PAINT, etc.)

Προσεγγίσεις σημειακής σάρωσης:

- ✓ Confocal based Airyscan
- ✓ Stimulated Emission Depletion (STED)

Ευρέως πεδίου

Σημειακής σάρωσης



15-25 εικόνες
Ανακατασκευή
Fourier

>1000 εικόνες
>10.000 εντοπισμοί
Εικόνα που αποδίδεται
από θέσεις

Αναδόμηση
PSF επανεκχώρηση
Αποσύνθεση

STED PSF
Σχηματοποίηση PSF
Αποσύνθεση

Διέγερση PSF

Αφαίρεση PSF



Δεν υπάρχει τελική δήλωση που να ισχυρίζεται ότι η μία τεχνική είναι ανώτερη από την άλλη. Η απόδοση και η ευχρηστία εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ερώτηση και το δείγμα που μελετάται.

6. Σύγχρονες μέθοδοι απεικονιστικής II (AFM, molecular motors)