

Spektroskopia korelacji fluorescencji w badaniach fizycznych, biochemicznych i medycznych

Jacek Gapiński

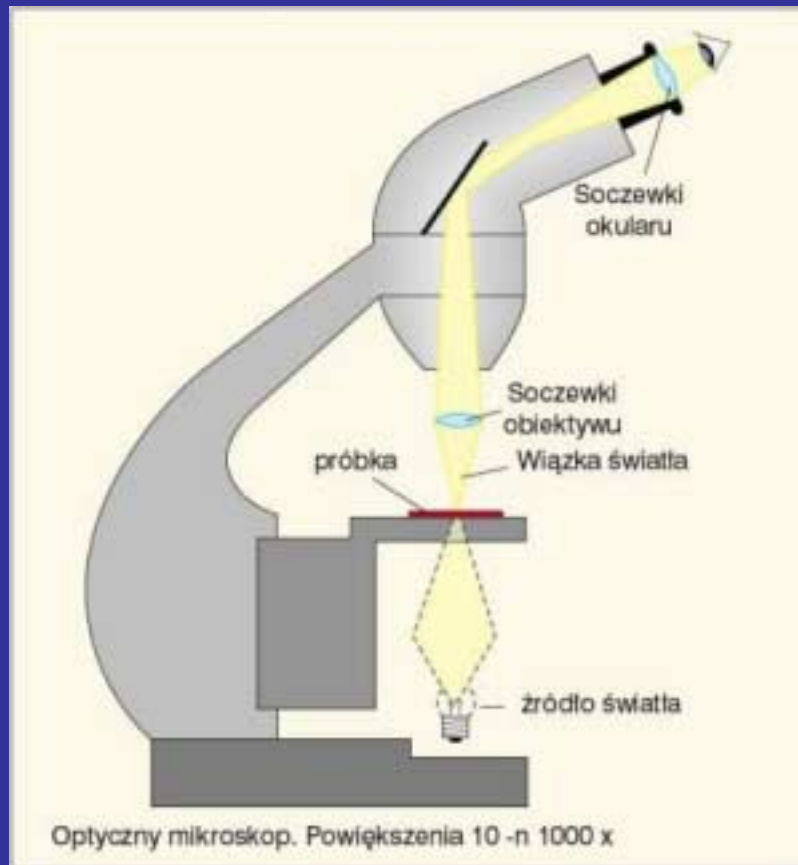


Seminarium w IPPT PAN

Warszawa, 10.03.2010 r.

Co może, a czego nie może tradycyjny mikroskop?

Tradycyjny mikroskop

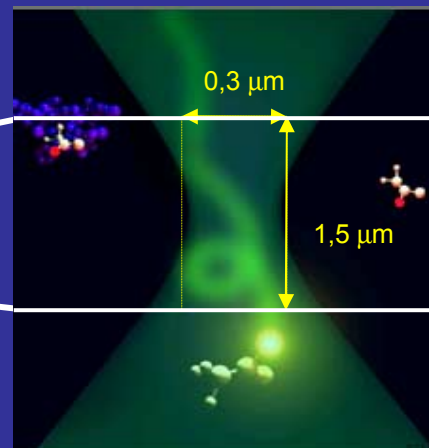
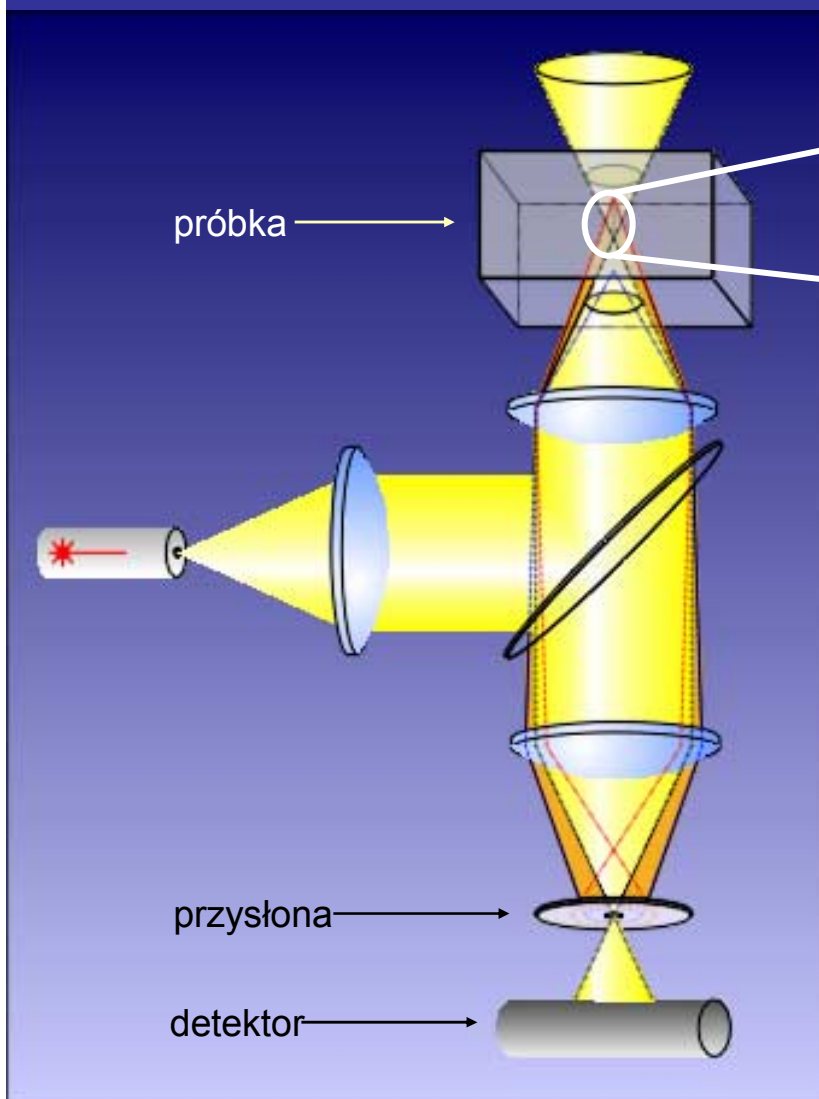


Najlepiej widać PŁASKIE WYRAŹNE struktury. Dlatego preparaty są ścinkami, a dodatkowo są specjalnie barwione.

Przyczyna: mała głębia ostrości, ale jednocześnie zasłanianie głębiej położonych warstw przez zabarwione fragmenty.

Bardzo trudno oglądać struktury trójwymiarowe, np. szczegóły budowy komórki.

Mikroskop konfokalny

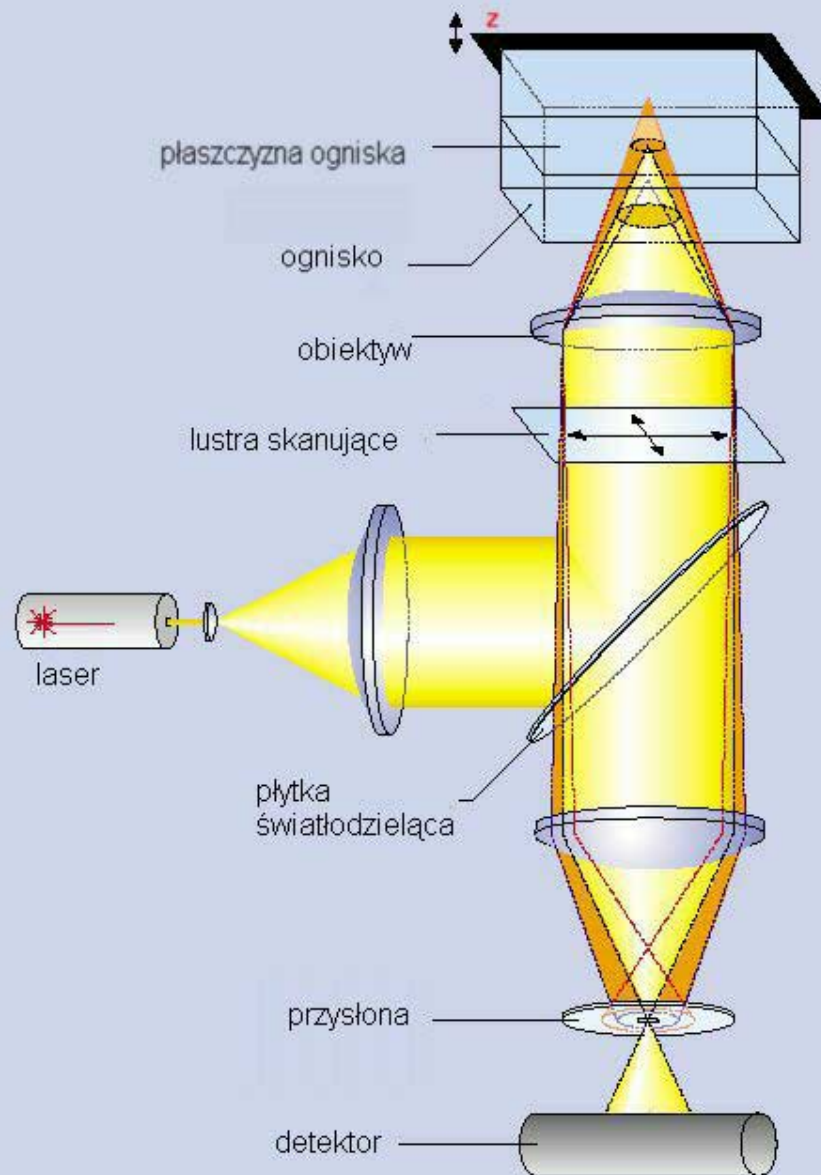


► Konfokalna konfiguracja optyczna pozwala na ograniczenie detekcji do obszaru cylindra $1,5 \times 0,3 \mu\text{m}$.

► Ogniskowanie i konfokalna detekcja wyznaczają obszar pomiaru mniejszy niż $1/4$ femtolitra ($1 \text{ femtolitr} = 10^{-15} \text{ litra}$).

**Dobre np. do rozpraszania Ramana,
ale chcemy oglądać większe obiekty!**

Laserowy fluorescencyjny mikroskop skaningowy



Mikroskop ??

A może raczej:

**Przestrzenny (3D) skaner
optyczny rejestrujący sygnał
fluorescencji wzbudzonej
zogniskowaną wiązką lasera.**

Przestrzenny – bo dokładnie definiujemy badane miejsce, zarówno w płaszczyźnie xy jak i głębokości z .

Skaner – bo przemiatamy wszystkie punkty składające się na obraz. Zazwyczaj jest to obraz danej płaszczyzny xy .

Obraz o wielkości 2048x2048 punktów uzyskuje się w ciągu sekundy.

Historia mikroskopów fluorescencyjnych według firmy Zeiss



1982 LSM 44 (Zeiss)

Pierwszy komercyjny skaningowy mikroskop fluorescencyjny.



1988 LSM 10 (Zeiss)

Układ konfokalny z dwoma kanałami detekcji.



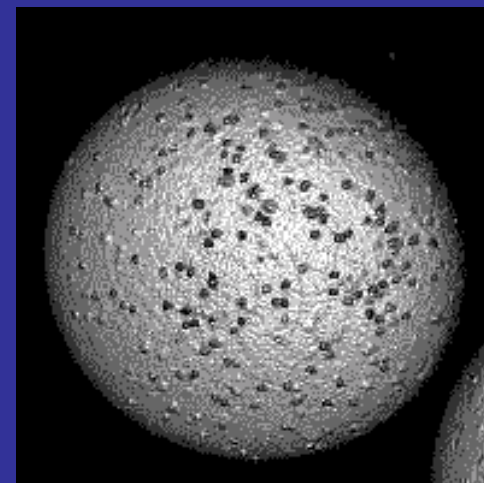
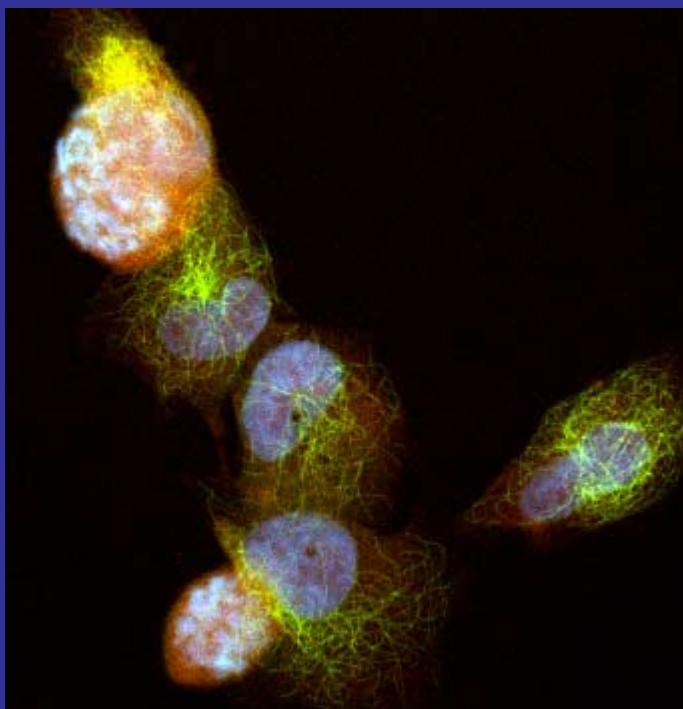
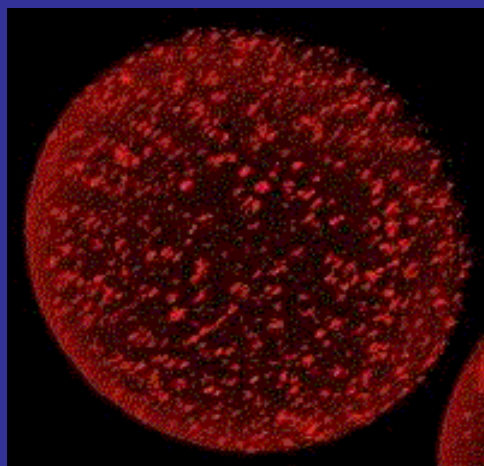
Ok. 2000 r.

LSM 510

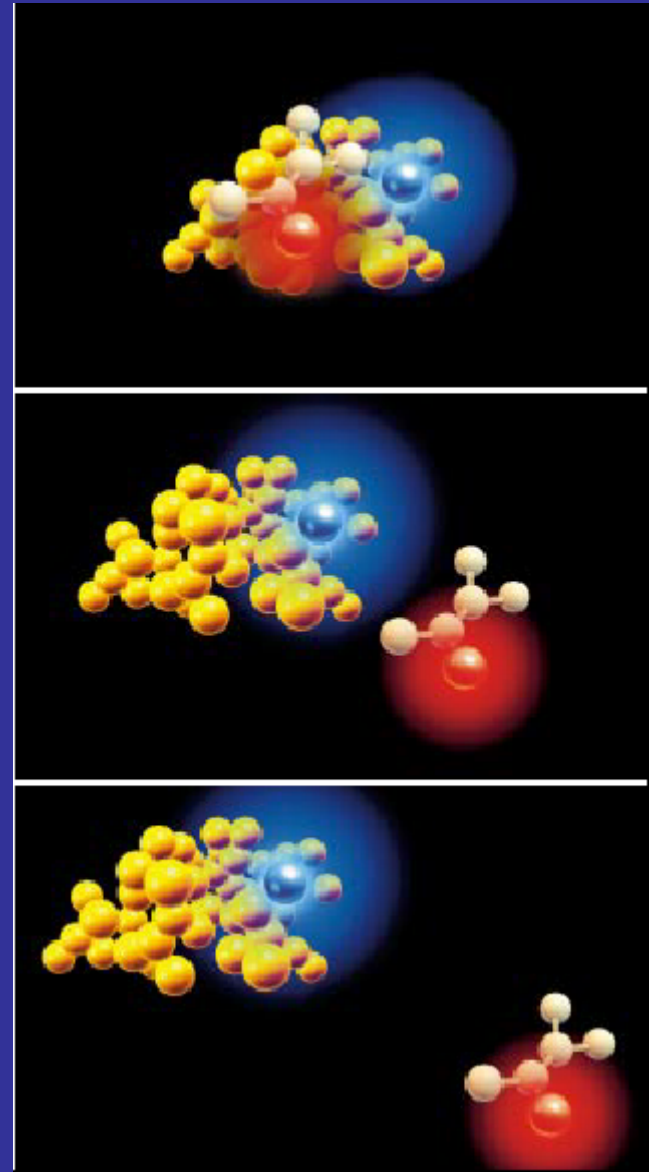
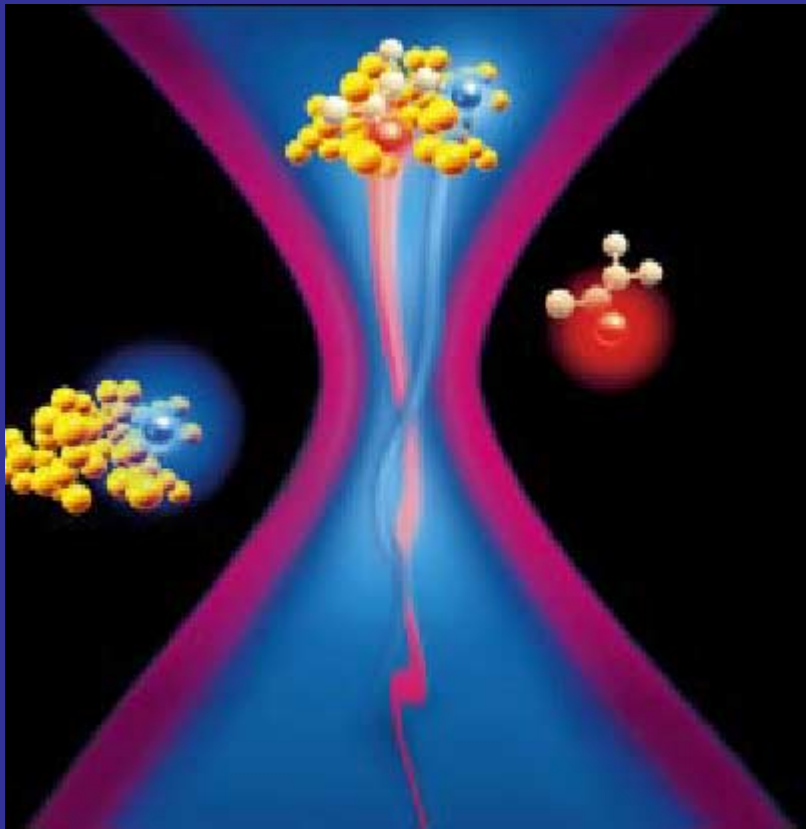
LSM 5 Pascal

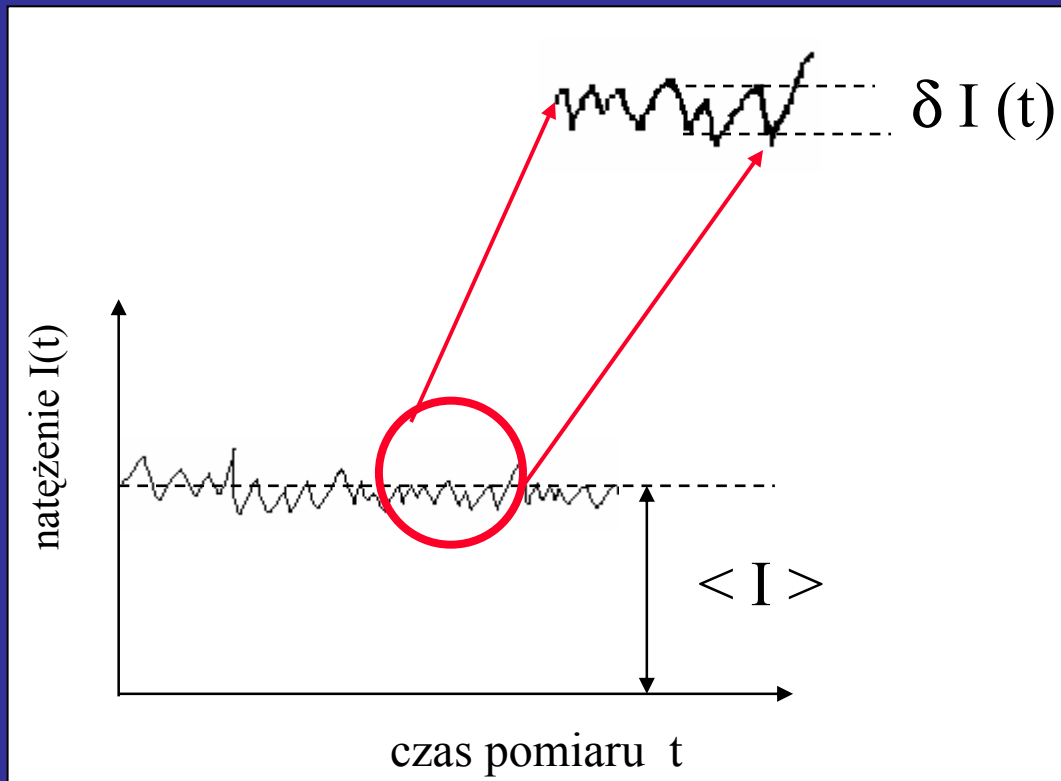


Obrazy uzyskane za pomocą mikroskopu skaningowego



Dyfuzja fluoroforów





Mierzony sygnał fluorescencji może być opisywany poprzez stałe średnie natężenie $\langle I \rangle$ oraz fluktuacje $\delta I (t)$.

Informacja o cząsteczkach w próbce tkwi we **fluktuacjach sygnału fluorescencji**. Szybkość tych fluktuacji zdeterminowana jest przez **ruchliwość cząsteczek**, natomiast amplituda fluktuacji wyznaczona jest przez bezwzględne **stężenie** fluoroforów. Wielkością użyteczną w ilościowych analizach jest czasowa funkcja autokorelacji fluktuacji sygnału fluorescencji.

Spotkanie dwu pomysłów: detekcja konfokalna i korelacyjna analiza sygnału.

Magde, D., E. L. Elson, and W. W. Webb. 1972. Thermodynamic fluctuations in a reacting system – measurement by fluorescence correlation spectroscopy. Phys. Rev. Lett. 29:705–708.

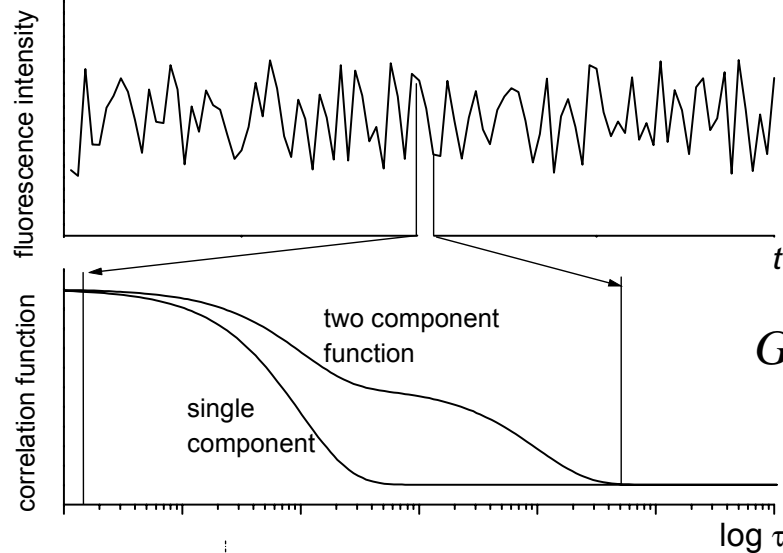
B.Berne, R.Pecora, "Dynamic light scattering", John Wiley & Sons, New York 1976.

Do badania fluktuacji LICZBY CZĄSTECZEK
potrzebna jest **mała objętość**.

Ten warunek idealnie spełniał mikroskop konfokalny.
1 cząsteczka w ognisku = 10 nM

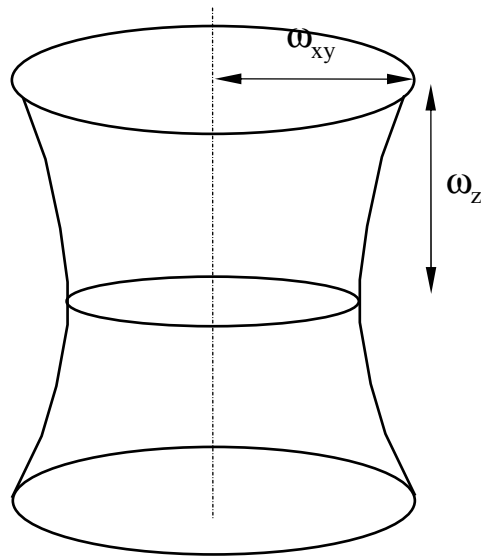
Narodziła się spektroskopia korelacji fluorescencji (FCS)

Podstawowe wielkości w metodzie FCS



Funkcja korelacji

$$G(t) = 1 + \frac{T}{1-T} e^{-t/\tau_t} + \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{(1+t/\tau_i) \sqrt{1+c^{-2}t/\tau_i}}$$



$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau}$$

$$c = \frac{\omega_z}{\omega_{xy}}$$

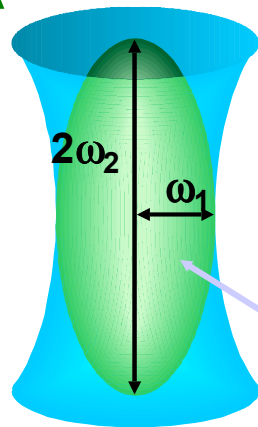
$$\tau = \tau_{xy} = \frac{\tau_z}{c^2}$$

$$V = \frac{4}{3} \pi \omega_{xy}^2 \omega_z \quad C_m = \frac{N}{V N_A}$$

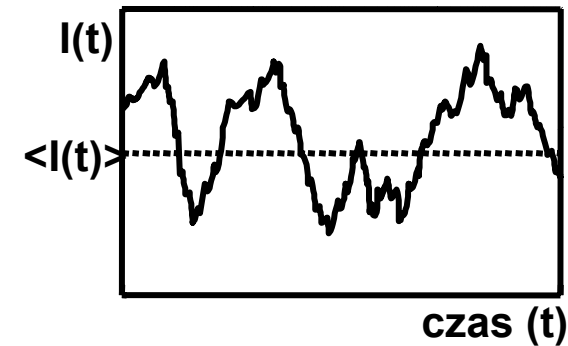
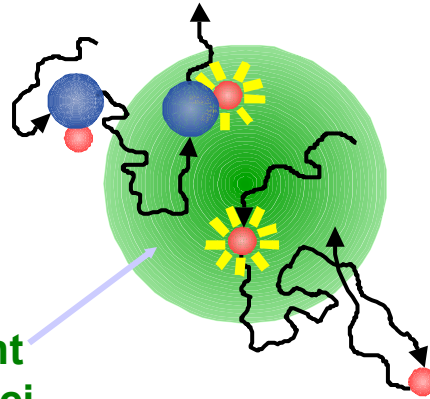
$$\left. \begin{array}{l} N = 1 \\ \omega_{xy} = 0.3 \mu\text{m} \\ \omega_z = 1.5 \mu\text{m} \end{array} \right\} C_m = 12.3 \text{ nM}$$

Kolejne etapy powstawania i analizy sygnału fluorescencji

A

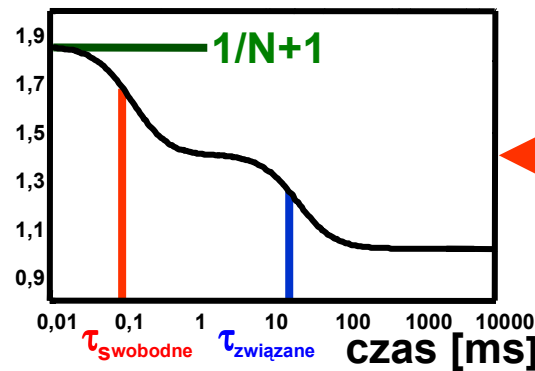


Element
objętości
(≈ 1 fl)

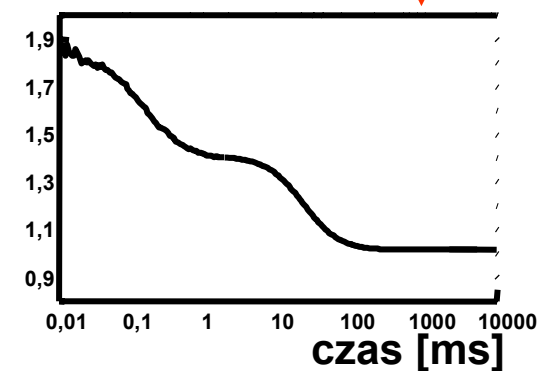


B

D

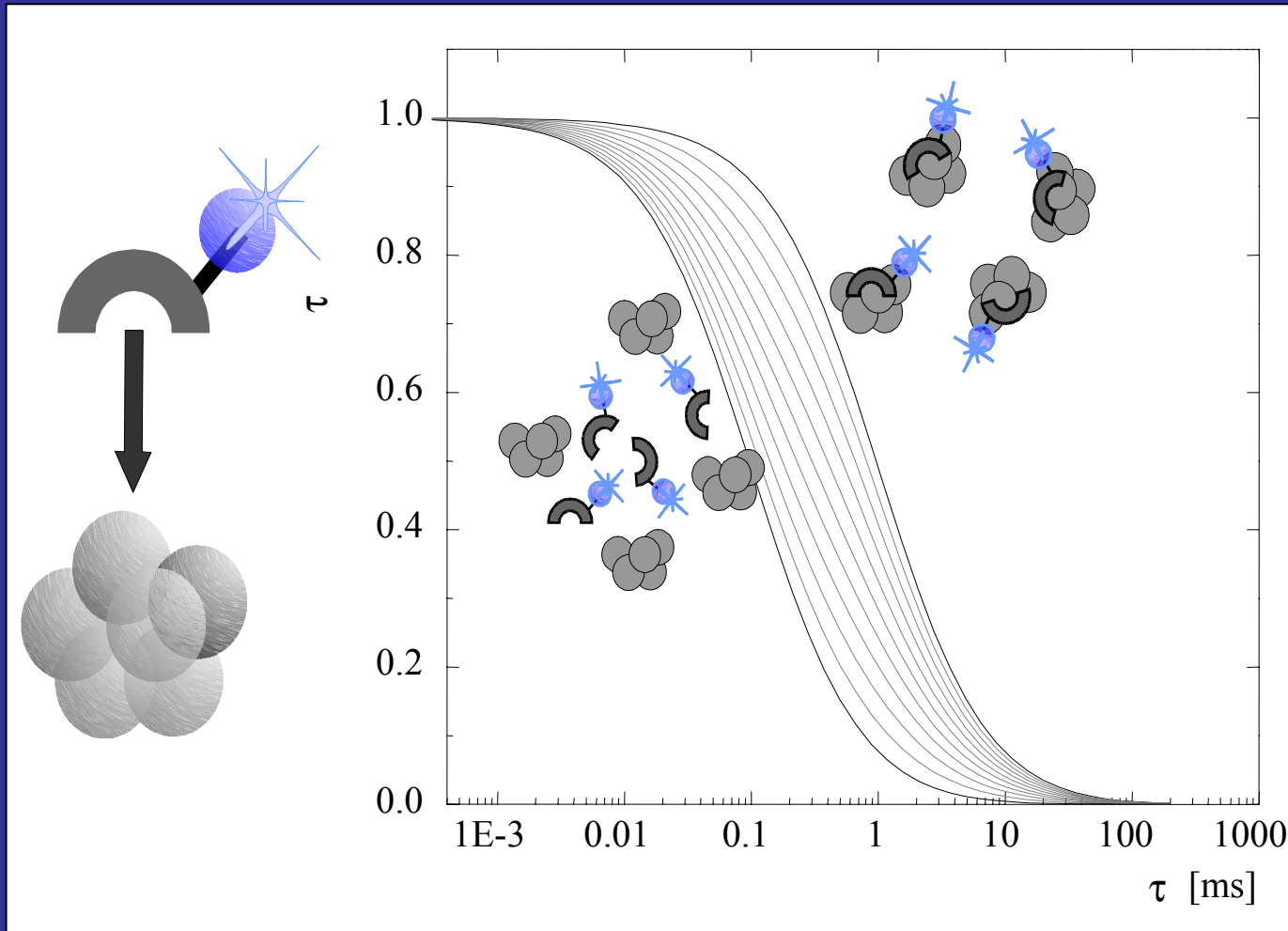


C



Cząsteczki przemieszczające się poprzez oświetlony wiązką lasera obszar (A) silnie fluoryzują, wywołując fluktuacje sygnału fluorescencji (B) mierzonego w detektorze. Obliczana funkcja korelacji (C) analizowana jest przy użyciu odpowiedniego modelu (D) i na podstawie dopasowania wyznaczane są bezwzględne stężenia cząsteczek w roztworze oraz ich współczynniki dyfuzji translacyjnej.

Schematyczny przebieg eksperymentu badania wiązania ligandu do receptora



Średni czas korelacji dostarcza informacji o rozmiarze i masie obserwowanych molekuł.

Rosnący czas dyfuzji = rosące rozmiary obiektu



W 1993 grupa naukowców założyła firmę EVOTEC, której celem było rozwijanie technik zorientowanych przede wszystkim na poszukiwanie nowych leków przy użyciu FCS jako bardzo wydajnej techniki przesiewowej (screening).

Evotec – Company History (www.evotec.com)

1993

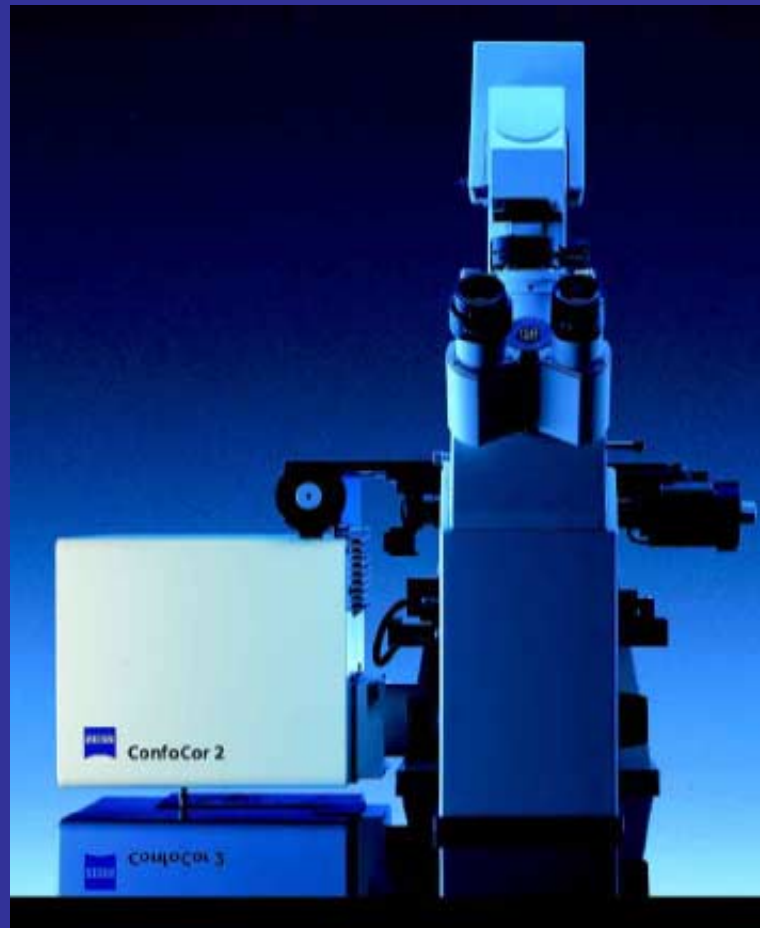
Evotec BioSystems GmbH was founded in Hamburg, Germany. Among the founders were **Nobel Laureate Professor Manfred Eigen**, Dr Karsten Henco, Dr Ulrich Aldag, Dr Freimut Leidenberger, Dr Heinrich Schulte, Professor Rudolf Rigler and Dr Charles Weissmann

1996

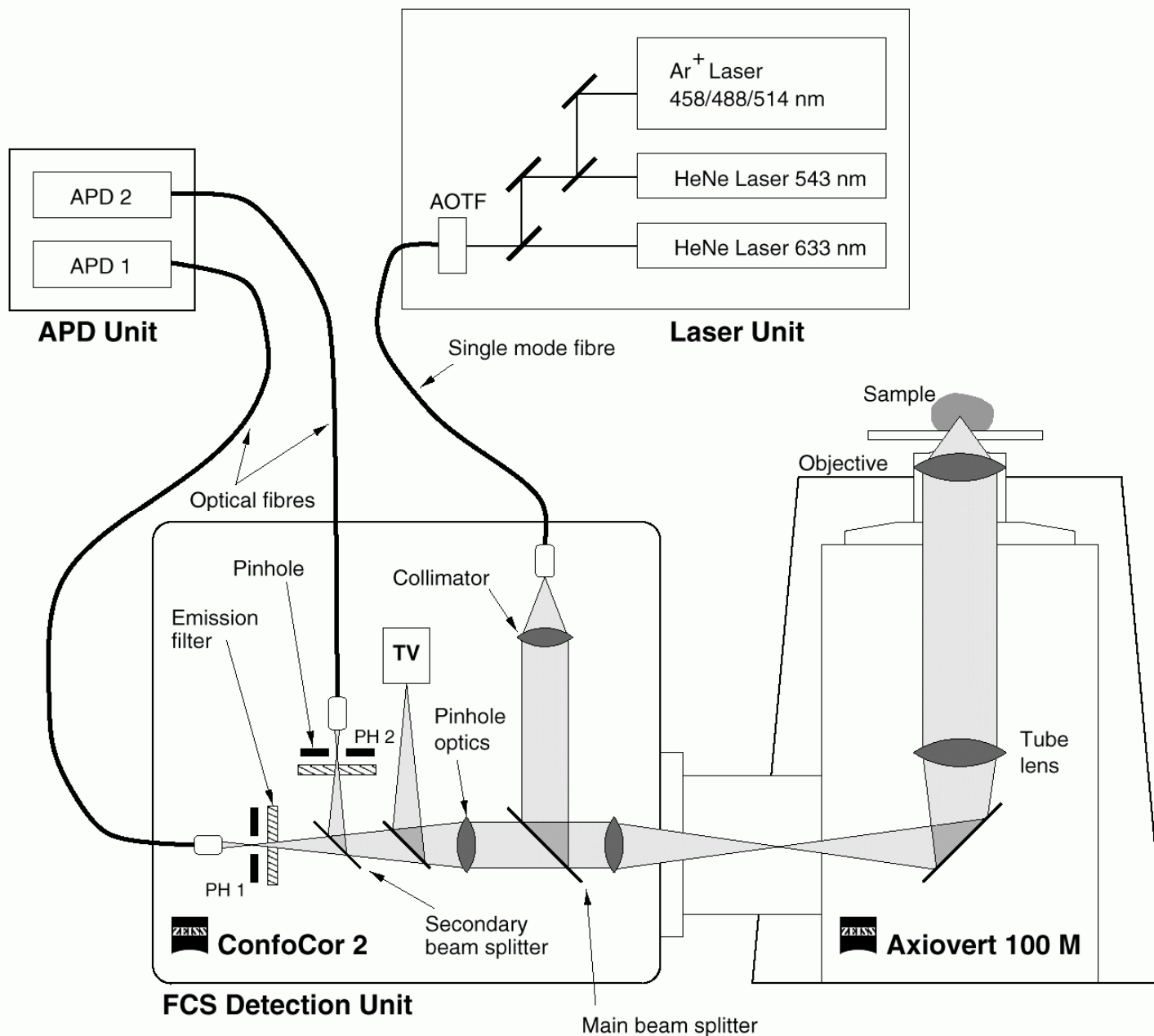
Collaborations with **Novartis** and **SmithKlineBeecham** to develop EVOscreen® (High-Throughput Screening System)

Działania te skorelowane zostały z firmą Zeiss, która w 1996 wypuściła na rynek pierwszy komercyjny przyrząd do pomiarów FCS: **ConfoCor 1**.

W 1999 roku pojawił się drugi model, **ConfoCor 2**, w którym dwa tory optyczne detekcji umożliwiały m.in. badanie korelacji krzyżowej.

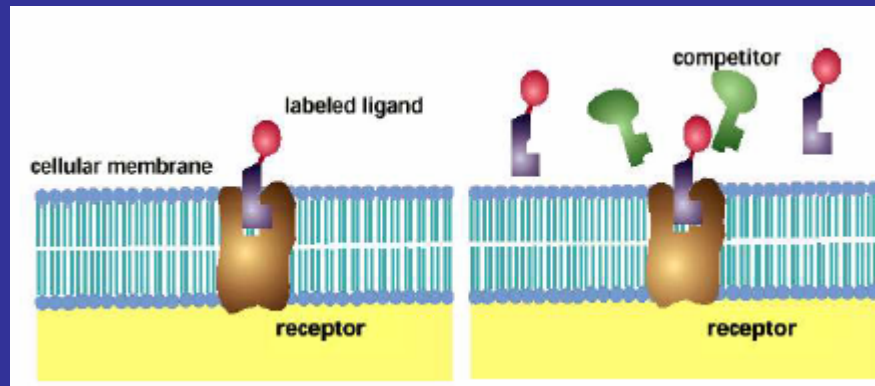


Schemat optyczny CofoCora 2



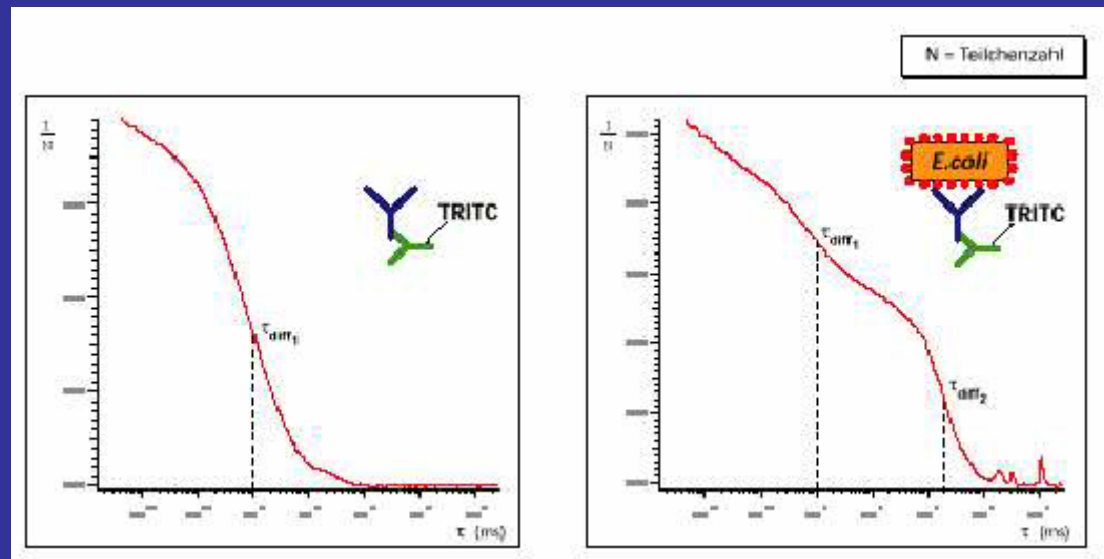
Przykłady zastosowań FCS

Oddziaływania kwasów nukleinowych



Oddziaływania receptorów z ligandami

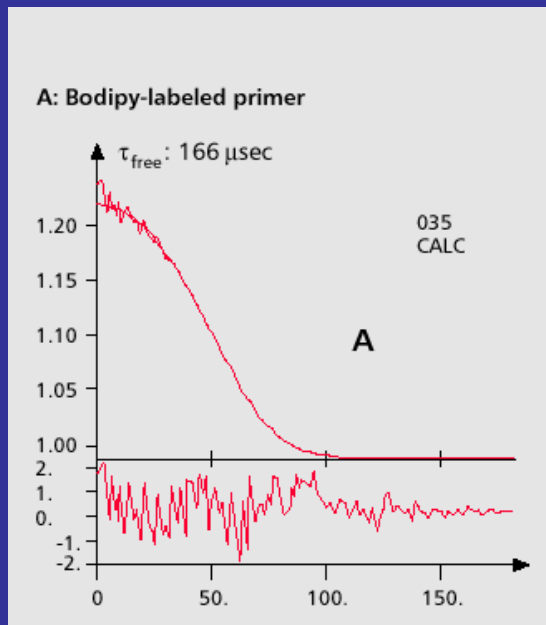
Oddziaływania antygenów z przeciwciałami



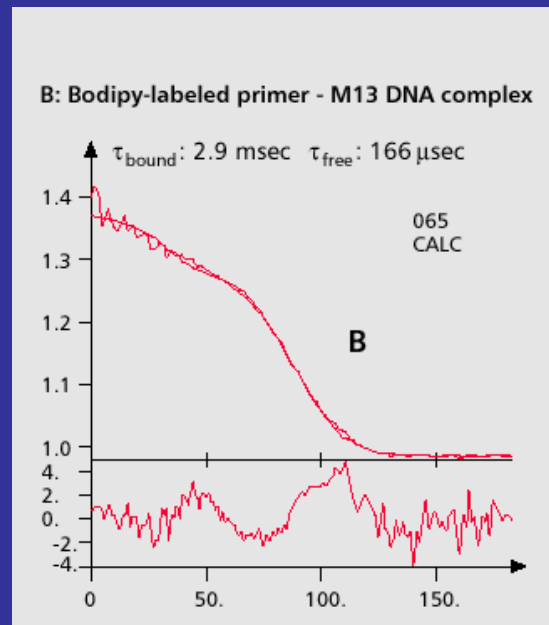
Hybrydyzacja DNA



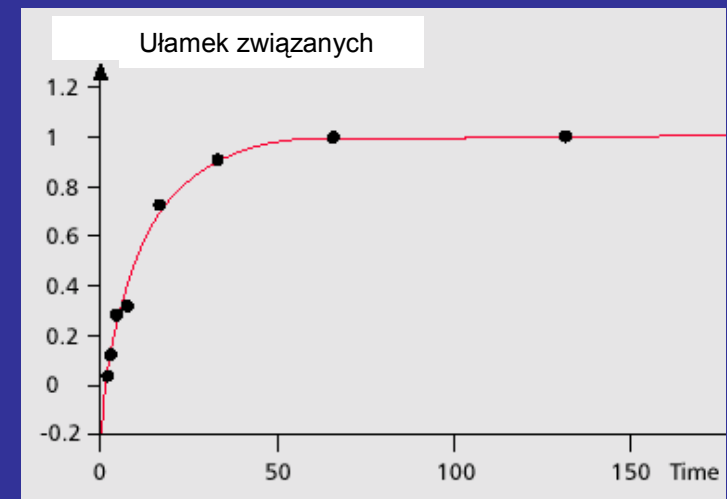
Hybrydyzacja znakowanego fluorescencyjnie primera M 13 do M 13 DNA



Znakowany oligomer DNA



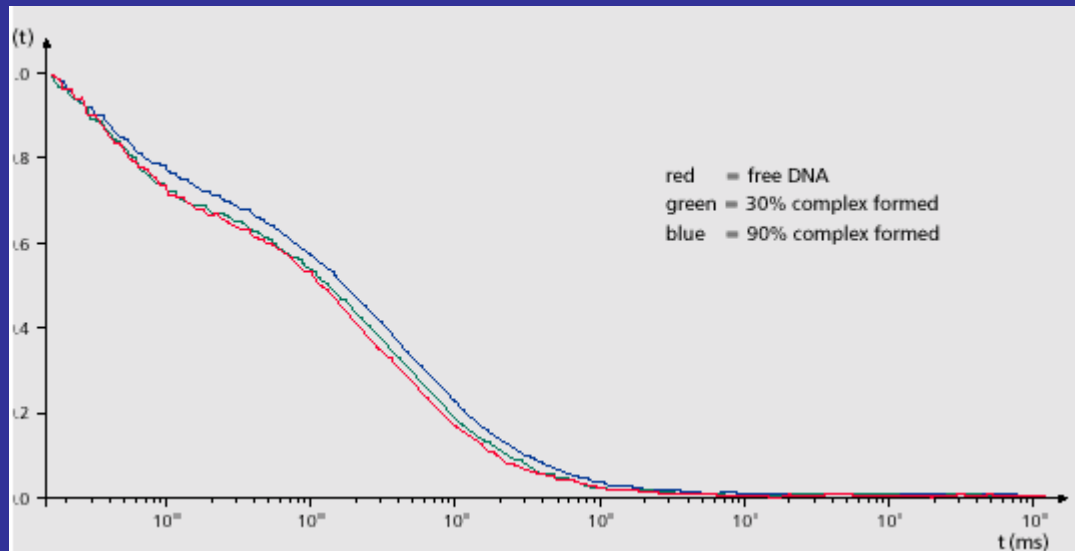
Znakowany oligomer +
Długi fragment DNA



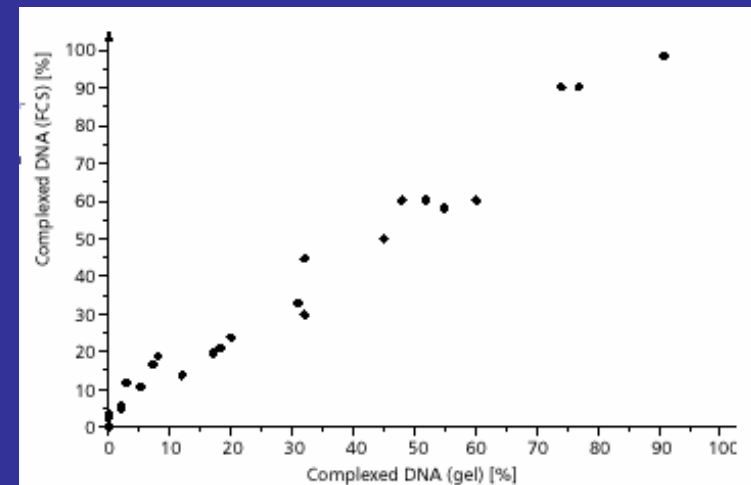
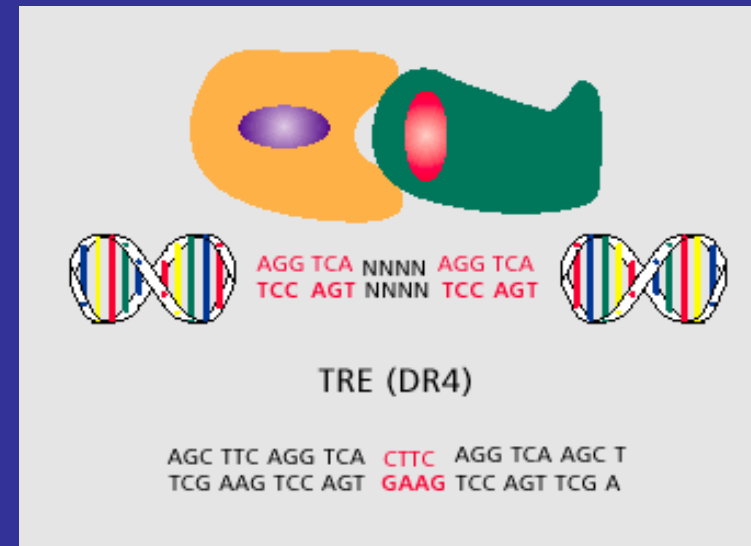
Kinetyka tworzenia kompleksu

Tworzenie kompleksów DNA - białko

Receptor hormonu tarczycy
Wiąże się ze znakowanym
oligomerem DNA

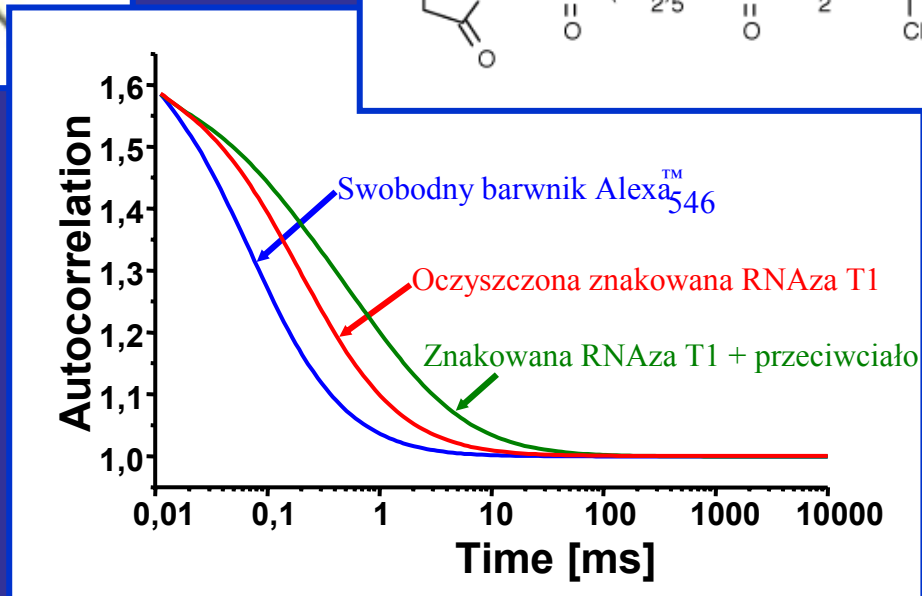
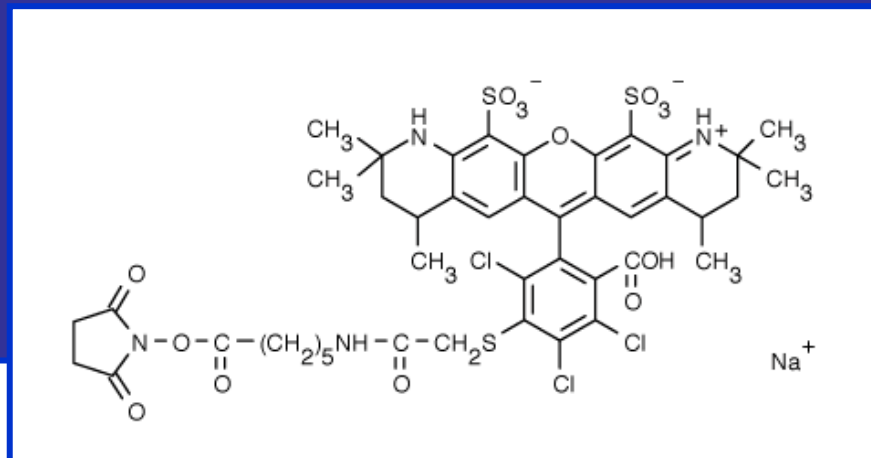
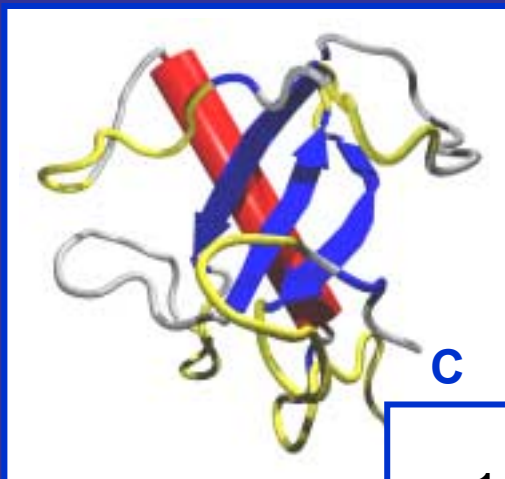


Funkcje korelacji uzyskane dla wolnego oligo-
meru, kompleksu w 30 %, kompleksu w 90 %.



Porównanie wyników FCS ze
standardową chromatografią
żelową

Wiązanie się przeciwciała do rybonukleazy T1



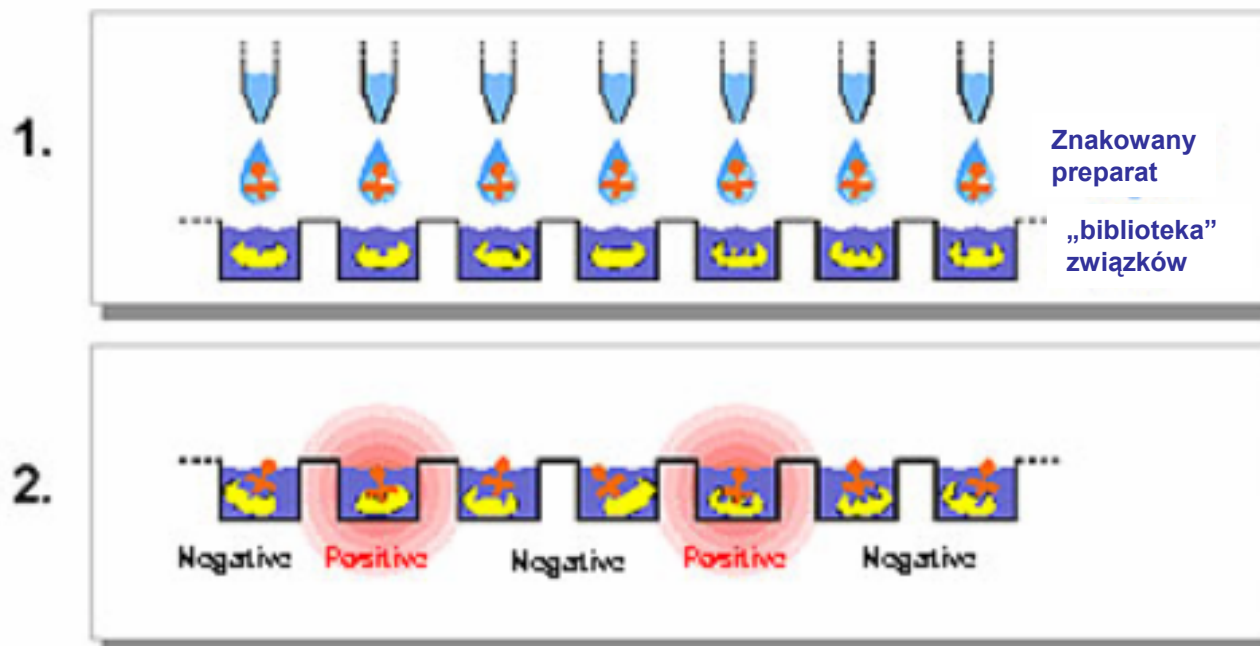
Zasada działania „ultra-wydajnej techniki przesiewowej”

(Ultra-high throughput screening)

Do zbiorniczków zawierających substancje z badanego zestawu (nie znakowane fluorescencyjnie) dodaje się znakowanego preparatu.

Tam gdzie powstanie kompleks, nastąpi spowolnienie dyfuzji, natomiast gdy cząsteczki się nie zwiążą, dyfuzja będzie nadal szybka.

Pomiar trwa około sekundy, a wynik uzyskuje się natychmiast.





Boehringer Ingelheim

Evotec and Boehringer Ingelheim enter into multi-year, multi target collaboration

- [READ MORE](#)



CHDI

CHDI selects Evotec as strategic drug discovery partner in the search for Huntington's disease treatments

- [READ MORE](#)



Pfizer

VR1 antagonist program

- [READ MORE](#)



Roche

Global alliance to jointly discover novel drugs

- [READ MORE](#)



Novartis

Three year drug discovery collaboration to identify and develop novel small molecule therapeutics



Ono

Extension of research collaboration with Ono to include an ion channel target

- [READ MORE](#)

INTERMUNE®

InterMune

Fragment-based drug discovery program yields results and leads to expansion of collaboration with InterMune
- [READ MORE](#)

spermatech
Male contraceptives

Spermatech

Spermatech selects Evotec as partner for high-throughput screening and lead discovery to identify small molecule therapeutics for their pharmaceutical discovery project

CUBIST
PHARMACEUTICALS

Cubist

Research agreement on fragment-based drug discovery
- [READ MORE](#)

biogen idec

Biogen Idec

Evotec announces Research Agreement with Biogen Idec



Zastosowania bio-medyczne – podsumowanie

-Technika Spektroskopii Korelacji Fluorescencji powstała na bazie mikroskopów konfokalnych i rozpowszechniła się około 2000 r.

-Popularyzacja przebiega dwutorowo: z jednej strony dotyczy badań przesiewowych w poszukiwaniu nowych leków (screening), a z drugiej badań czysto naukowych związanych z badaniem szlaków enzymatycznych oraz pomiarem ruchliwości fluoroforów w różnych środowiskach.

-Potencjał techniki badań przesiewowych w szukaniu nowych leków wydaje się być ogromny, o czym najlepiej świadczą umowy zawarte pomiędzy firmą EVOTEC, a największymi koncernami farmaceutycznymi świata. Pozycję firmy EVOTEC wydaje się wyznaczać **ogromna biblioteka związków chemicznych** gotowych do natychmiastowego użycia.

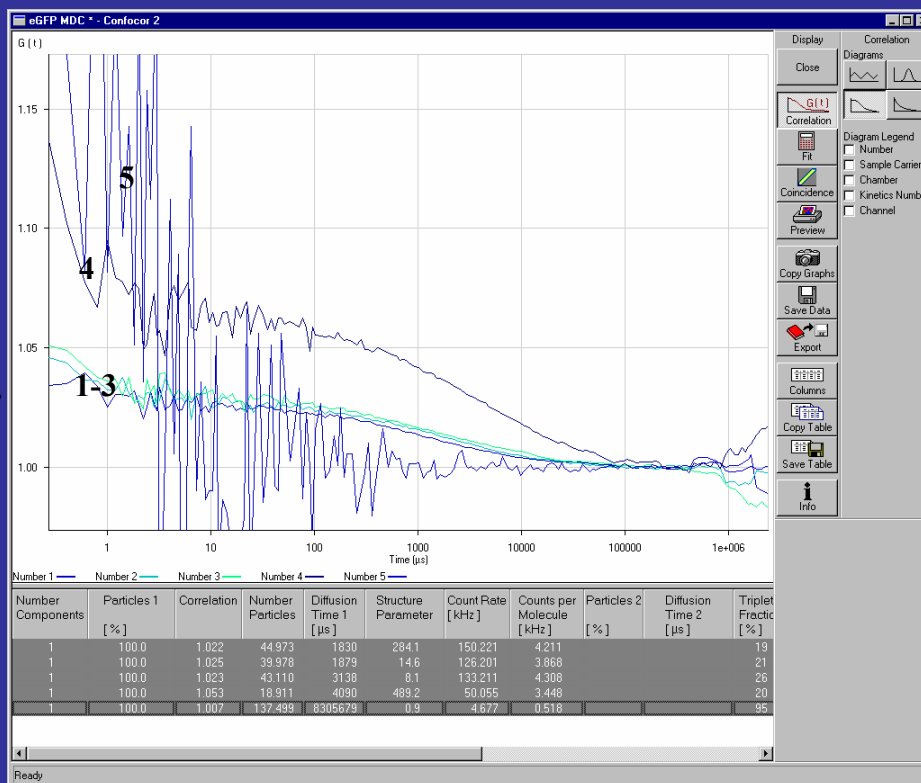
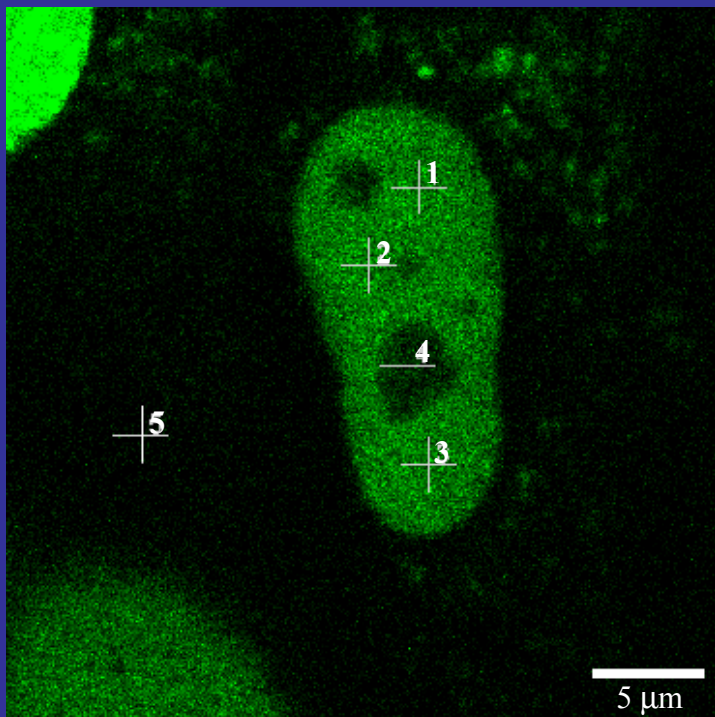
FCS – narzędzie do pomiaru współczynnika dyfuzji własnej

Ciekawe możliwości:

Pomiar współczynnika dyfuzji sondy w różnym otoczeniu:

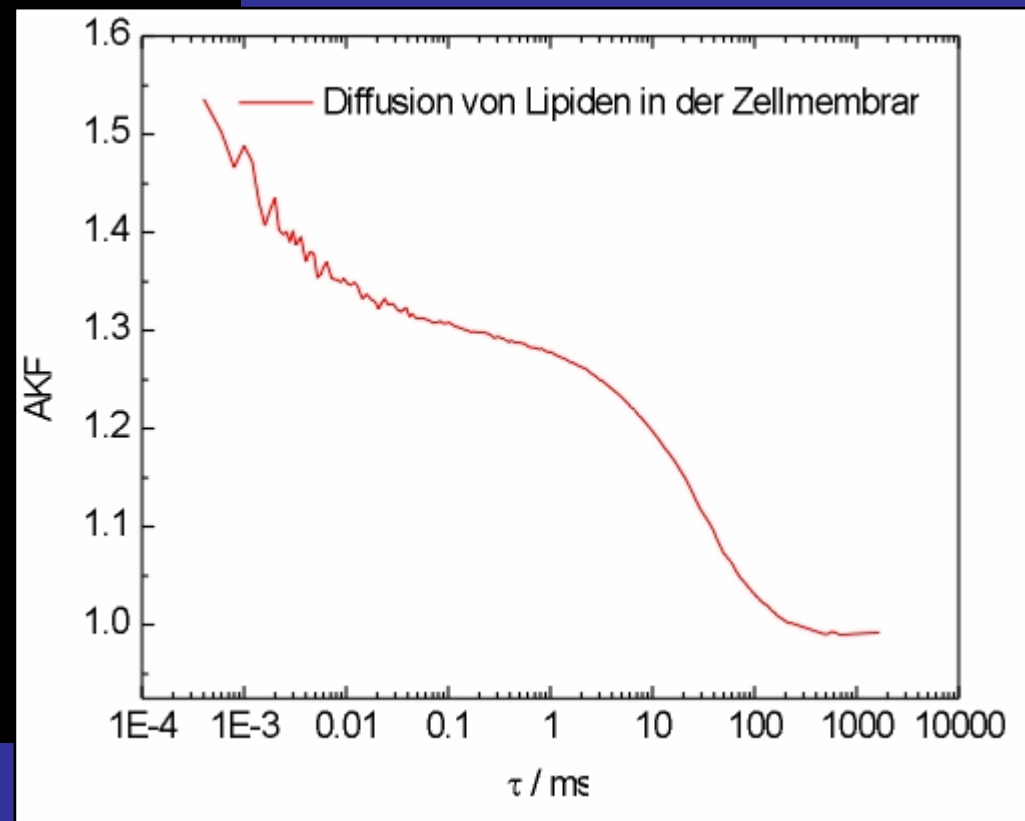
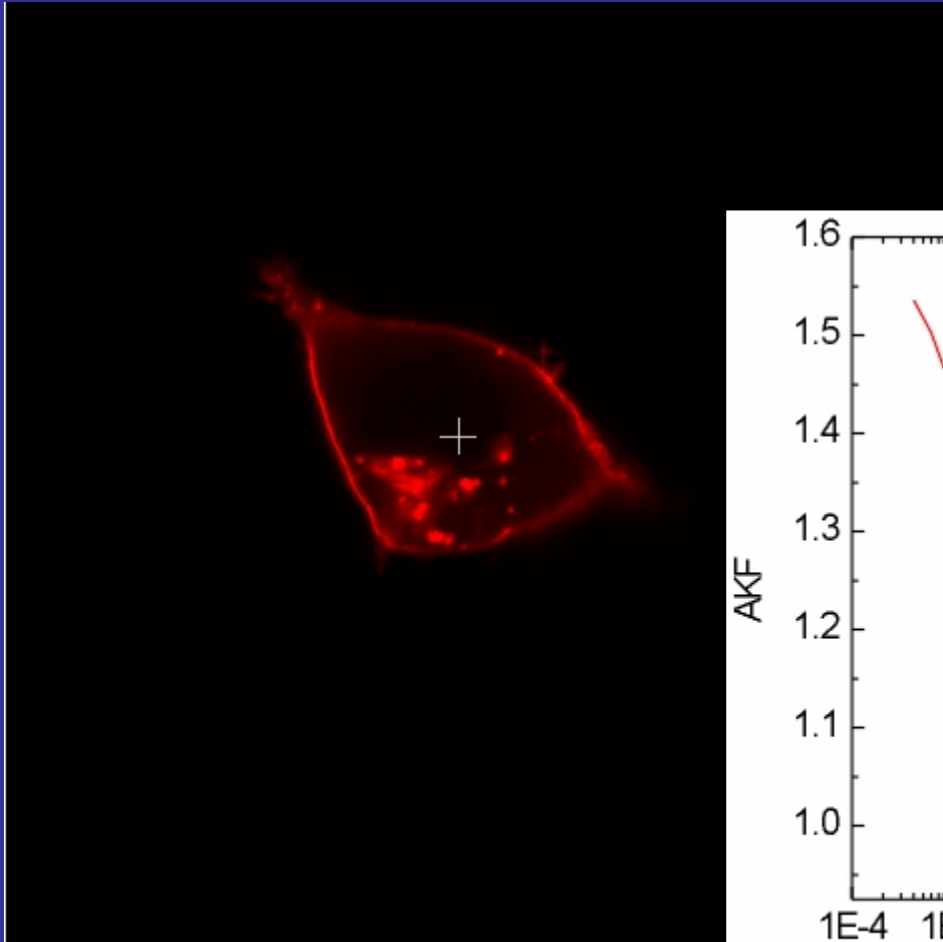
- Wpływ stężenia w układzie jednorodnym (kulki w kulkach, pałeczki w pałeczkach)
- Pomiar ruchliwości w żywych komórkach
- Pomiar ruchliwości w błonach
- Wpływ oddziaływań w układzie jednorodnym (np. dodawanie soli)
- Wpływ stężenia w układach mieszanych (kulka w pałeczkach, pałeczka w kulkach)
- Wpływ rozmiarów obiektów tworzących środowisko na dyfuzję sondy (mikrolepkość).

Pomiary FCS w żywej komórce.



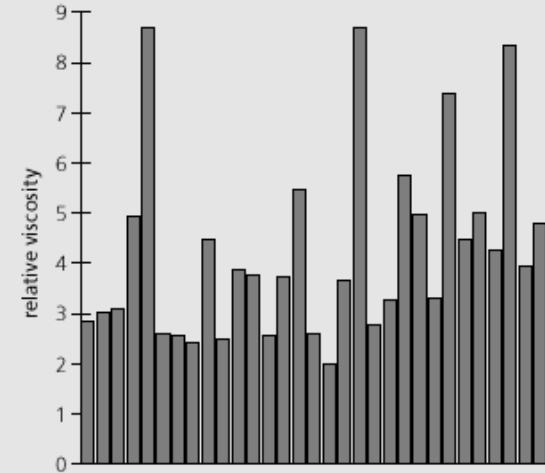
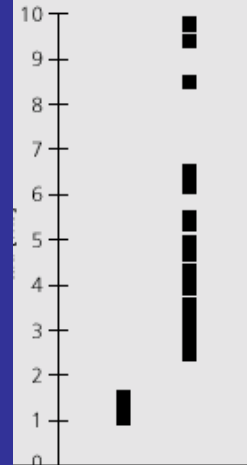
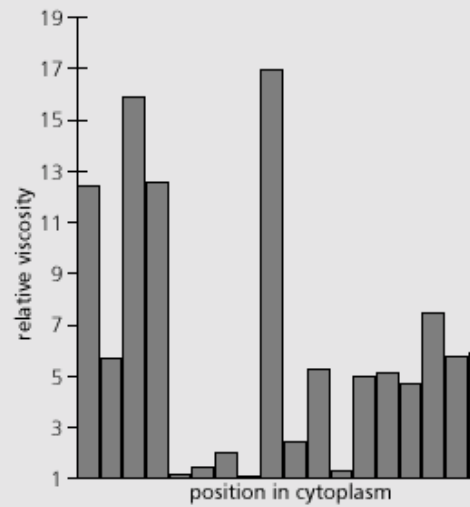
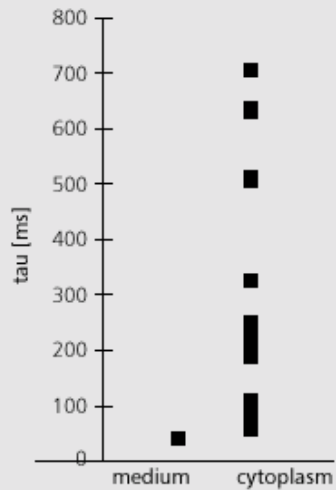
punkt pomiaru	lokalizacja – położenie w komórce	korelacja	stężenie białka
1, 2, 3	w nukleoplazmie	niska	wysoka
4	w jądrze	wysoka	niska
5	w cytoplazmie	brak	brak białka

Dyfuzja lipidów w błonie komórkowej



Dyfuzja wewnątrz komórki

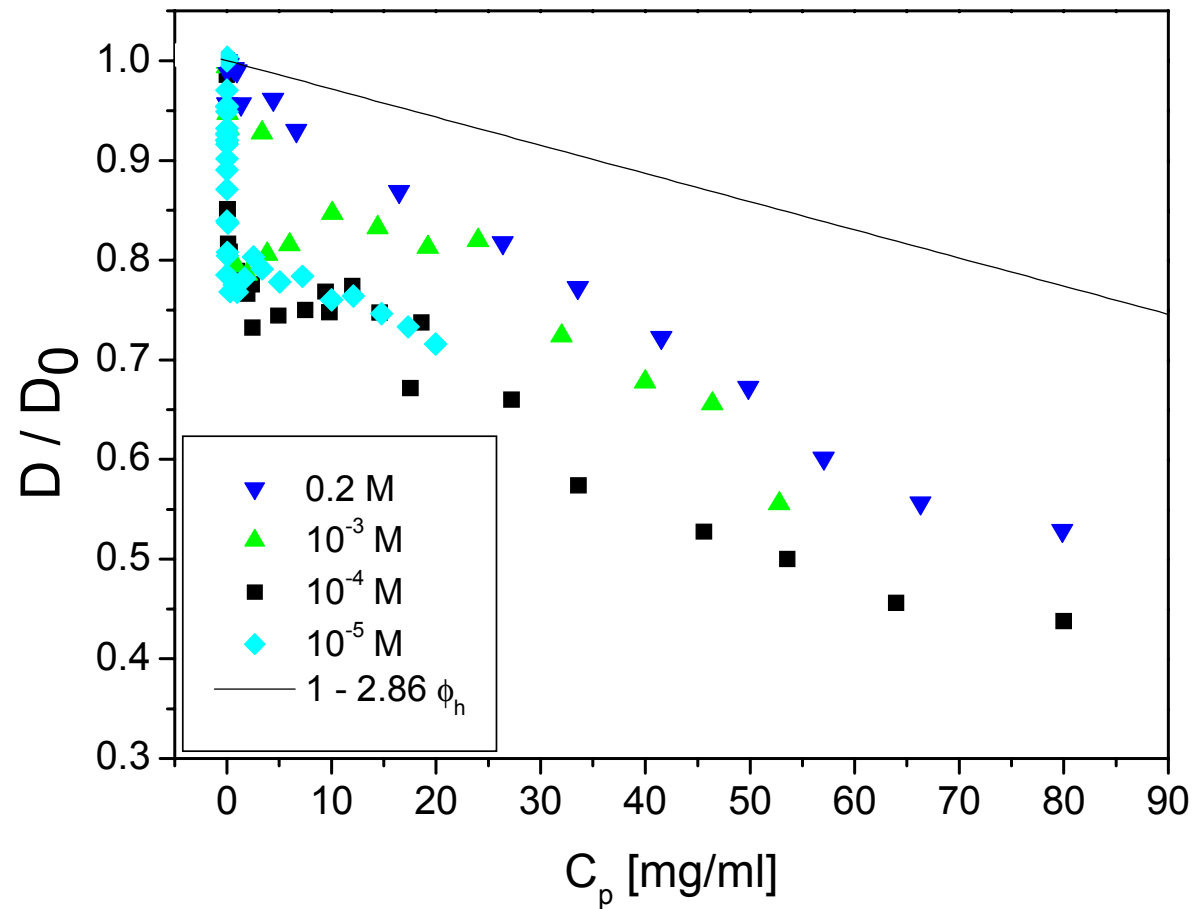
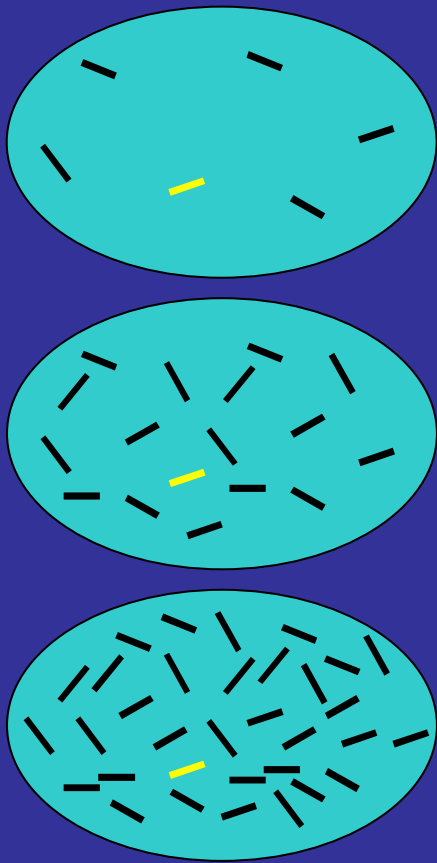
fluoresceina



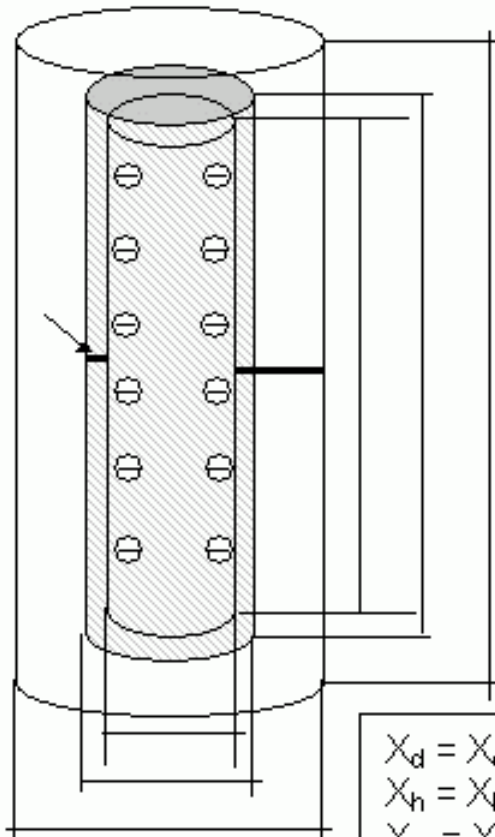
Znakowane kulki lateksowe 14 nm

Ruchliwość cząsteczek w stężonych roztworach

20mer DNA



Objętość dodatkowych warstwerek



$$V_d = \frac{1}{4} \pi d_d^2 L_d$$

$$V_h = \frac{1}{4} \pi d_h^2 L_h$$

$$V_{el} = \frac{1}{4} \pi d_{el}^2 L_{el}$$

$$V_{eff} = \begin{cases} V_h & \text{for } \kappa^{-1} \leq h \\ V_{el} & \text{for } \kappa^{-1} > h \end{cases}$$

$$\begin{aligned} X_d &= X_{dry} \\ X_h &= X_{hydrodynamic} & X_h &= X_d + 2h \\ X_{el} &= X_{electrostatic} & X_{el} &= X_d + 2\kappa^{-1} \end{aligned}$$

Example: how high is “high salt” region?

Hydrodynamic dimensions of the 20mer obtained from PCS and FPI:

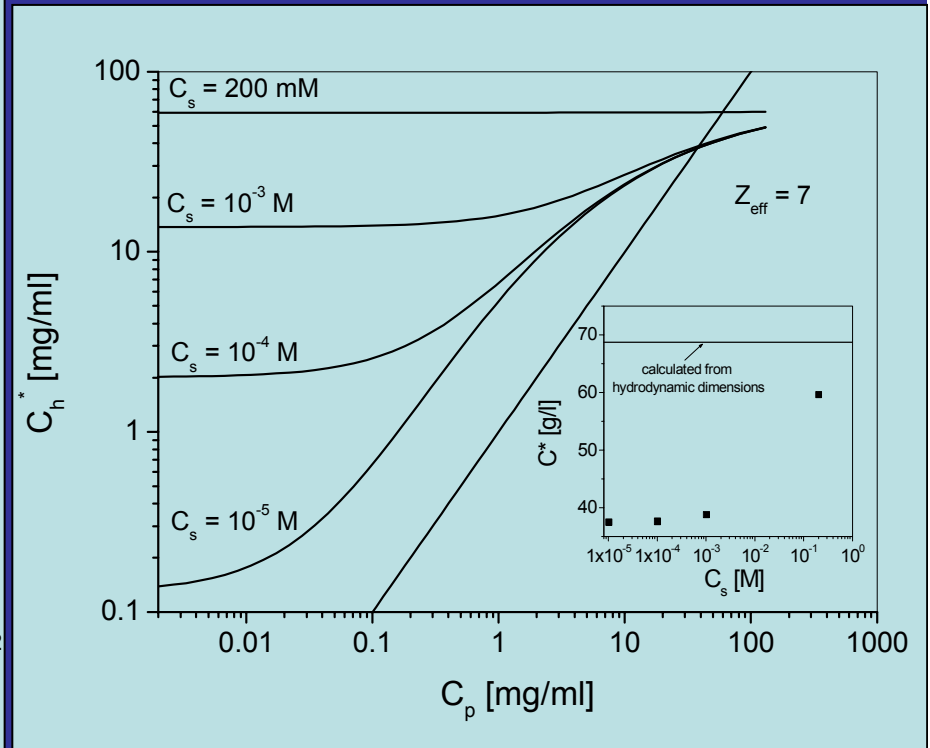
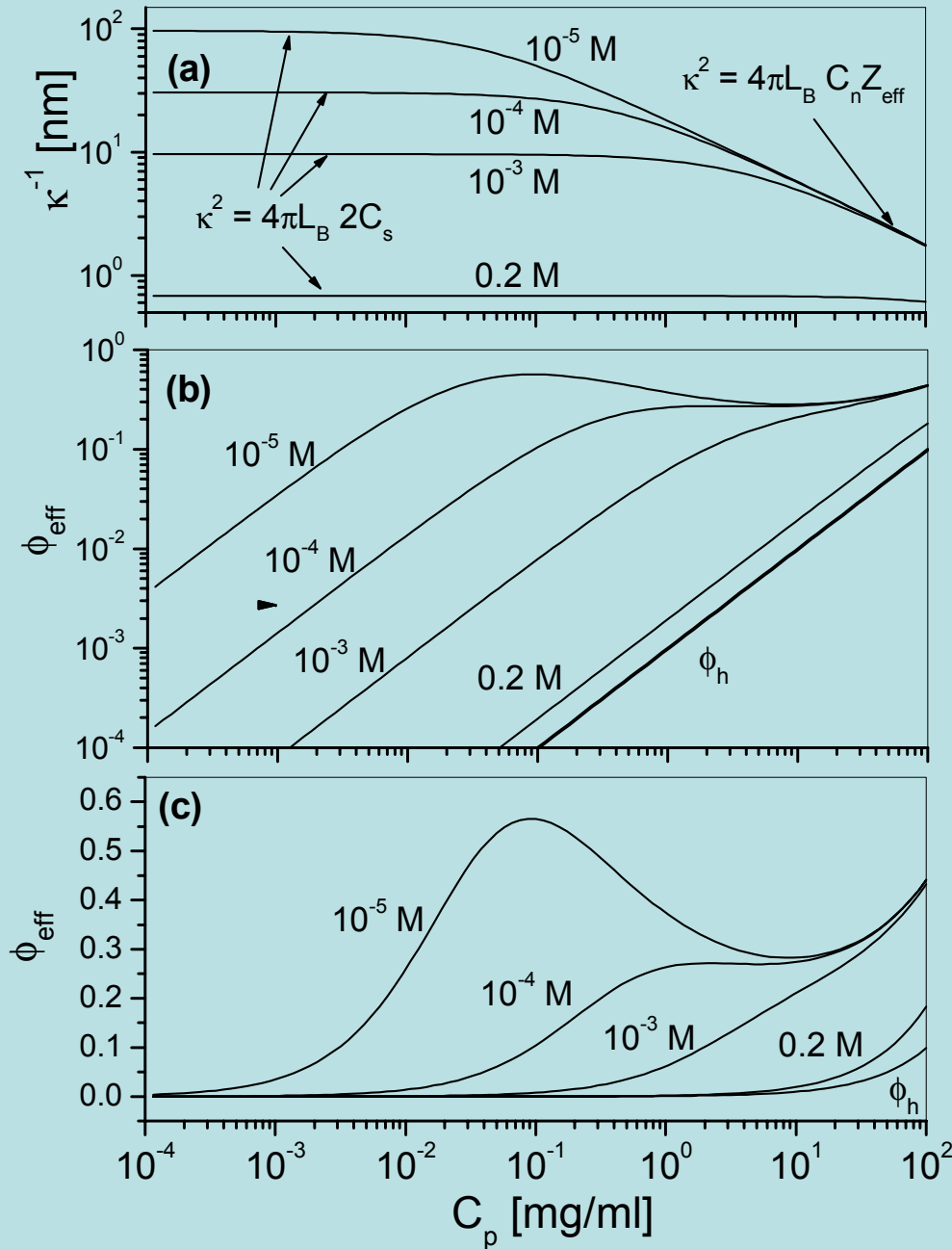
$L_h = 6.8 \text{ nm}$; $d_h = 2.0 \text{ nm}$; $h = 0.3 \text{ nm}$

at $C_s = 200 \text{ mM}$ $\kappa^{-1} = 0.7 \text{ nm}$ and $V_h = 21.4 \text{ nm}^3$ but $V_{eff} = 49.8 \text{ nm}^3$.

at $C_s = 1 \text{ M}$ $\kappa^{-1} = 0.3 \text{ nm}$ and $V_h = 21.4 \text{ nm}^3$. $V_{eff} = V_h$.

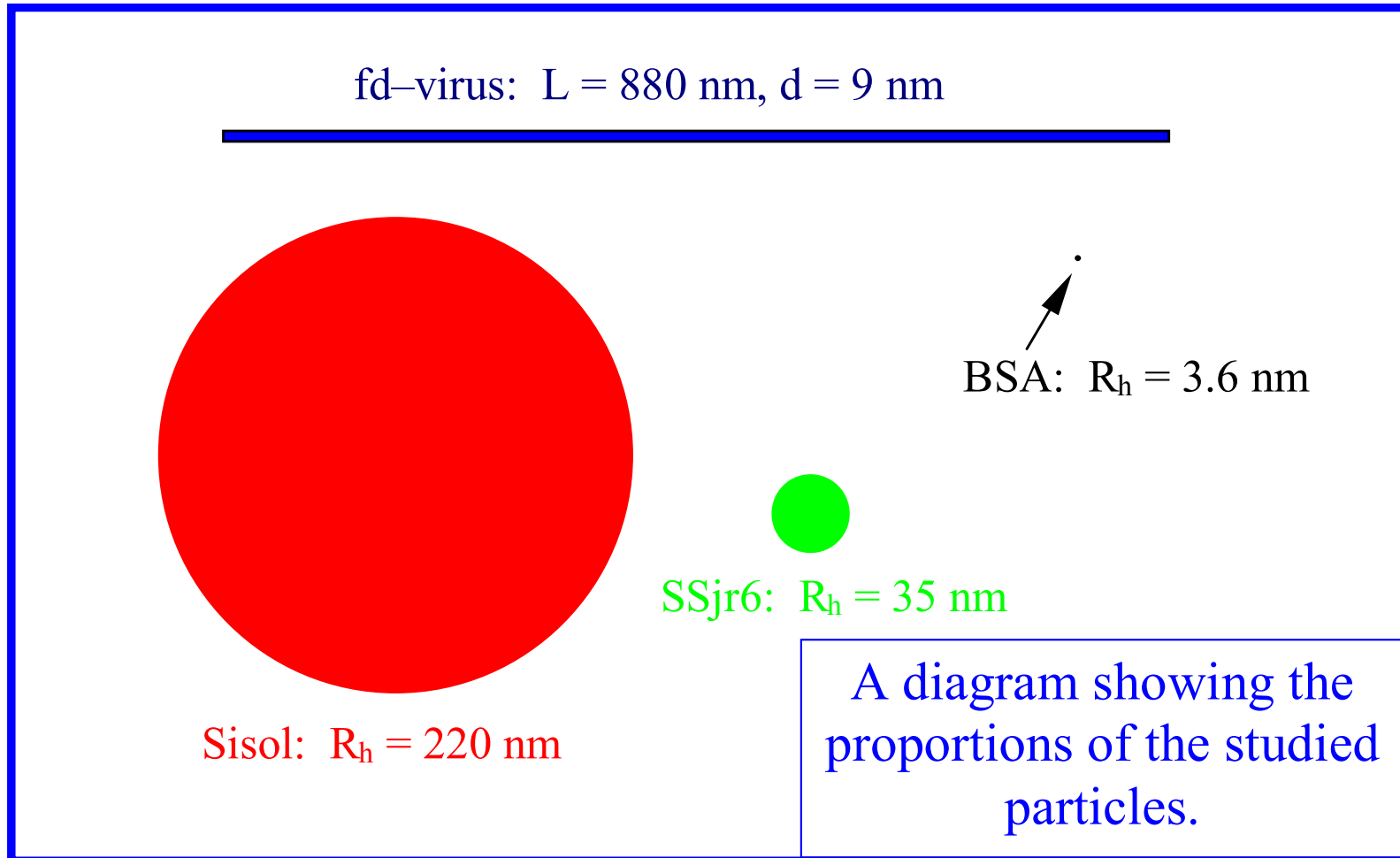
Figure 2. Why the data measured at $C_s = 200 \text{ mM}$ did not fall onto the $1 - 2.86 \phi$ line?

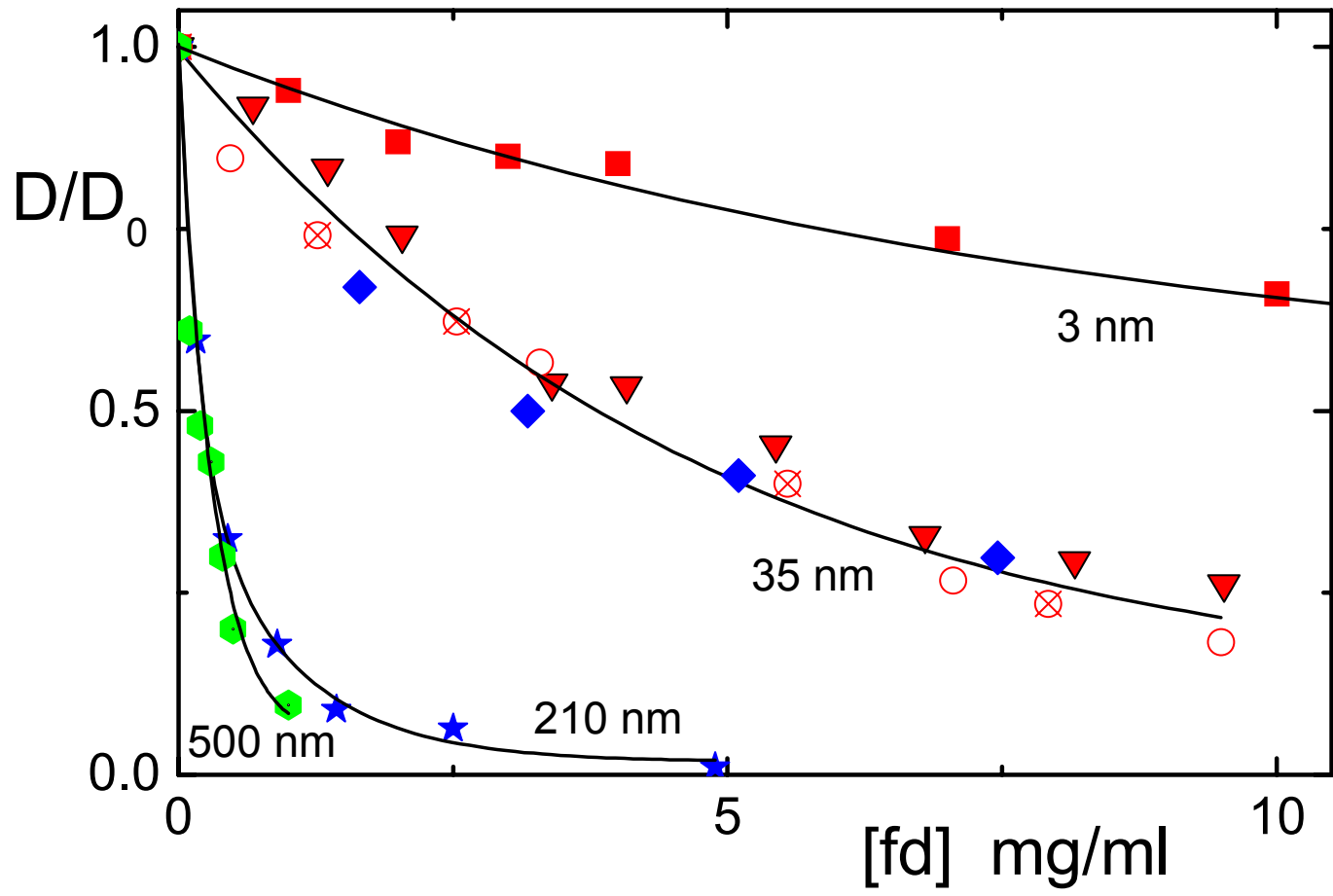
Objętość efektywna i c^*



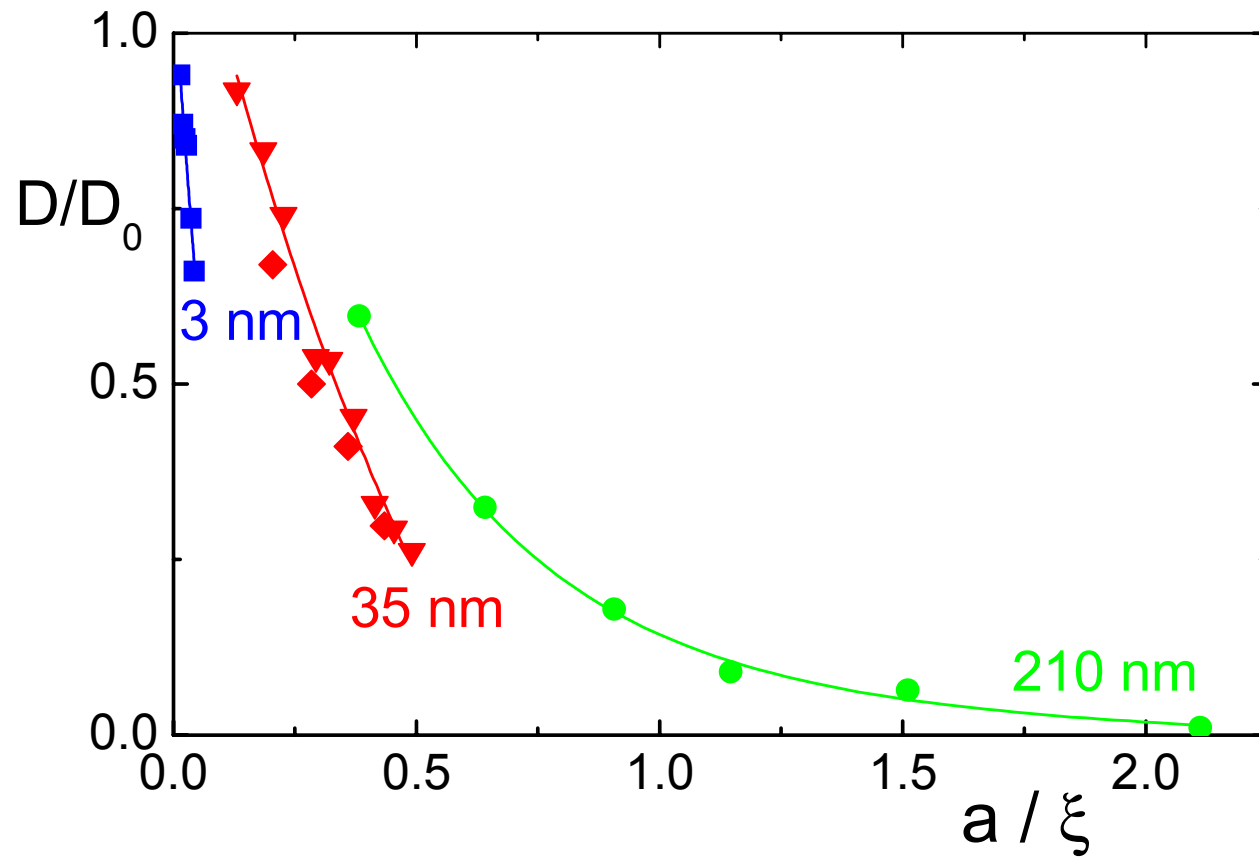
Self diffusion of spheres in isotropic solutions of rods

Kyongok Kang, J. Gapinski, M.P. Letinga, J. Buitenhuis, G. Meier, M. Ratajczyk, Jan K.G. Dhont, and A. Patkowski, Diffusion of Spheres in Crowded Suspensions of Rods, *J. Chem. Phys.* **122**, 044905 (2005).



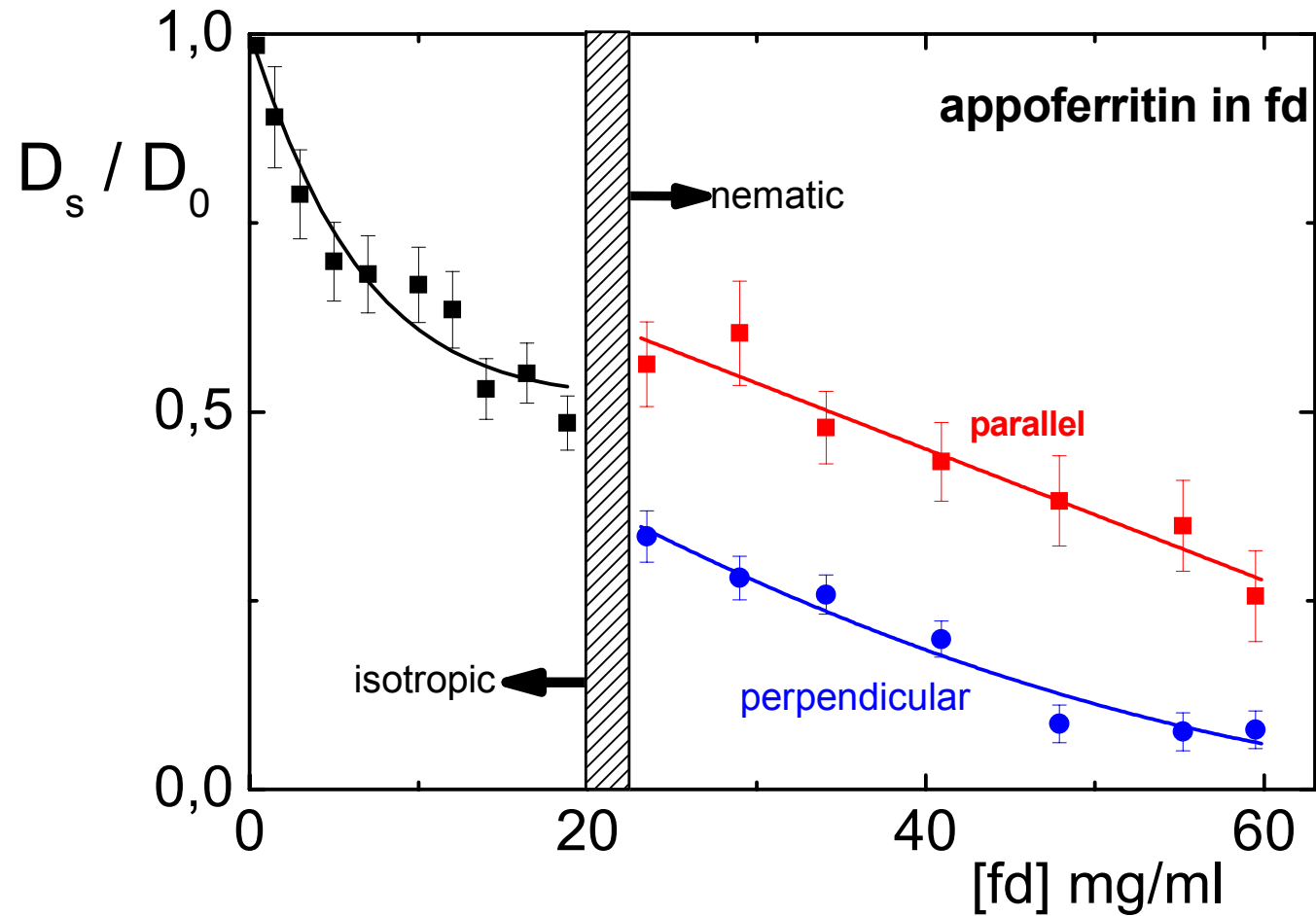


The normalized long time self diffusion coefficient as measured by FCS – red, DLS – blue and video microscopy – green for tracer spheres of different sizes. Tracer volume fraction: $8.5 \times 10^{-4} - 1.3 \times 10^{-3}$.



Test of the scaling of the normalized long-time self diffusion coefficients, measured by means of FCS and DLS for various tracer sphere sizes, as a function of the (sphere size)/(mesh size) ratio.

Anisotropic self diffusion of spheres in nematic solutions of rods

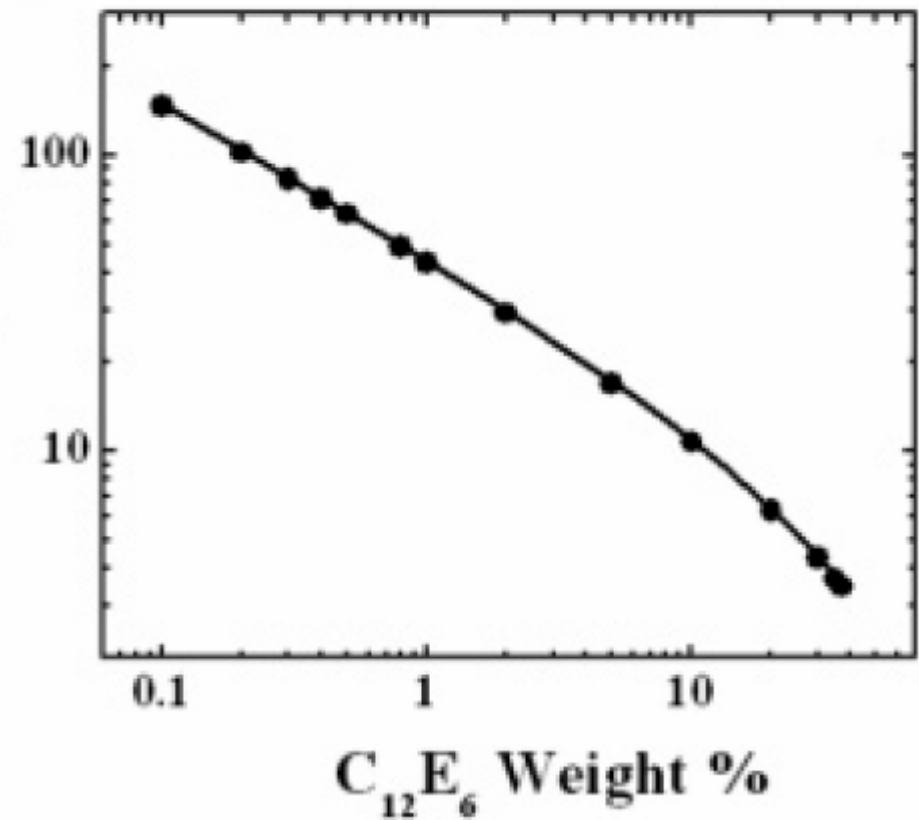


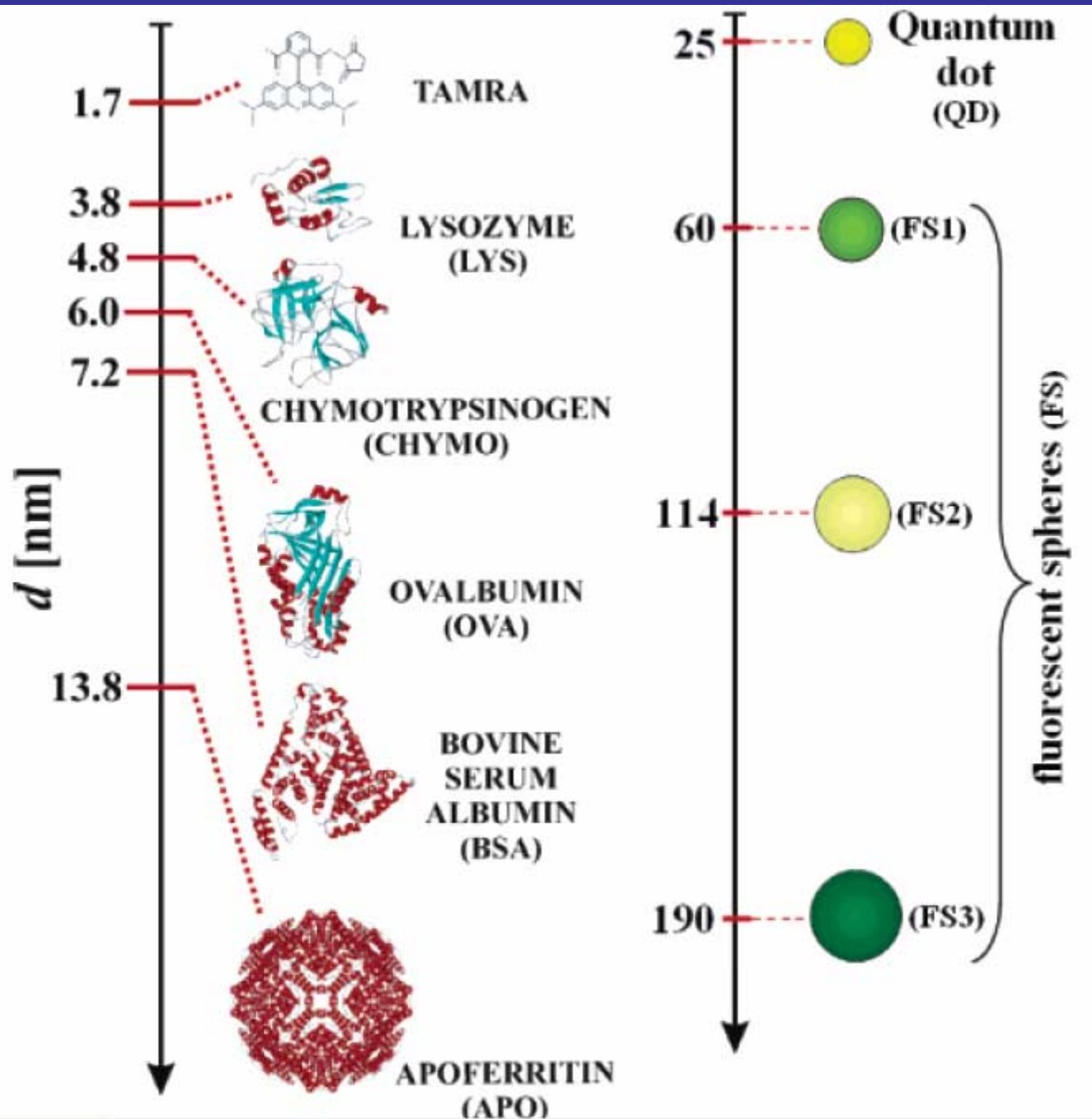
Dyfuzja sond o różnej wielkości - mikrolepkość

(a)

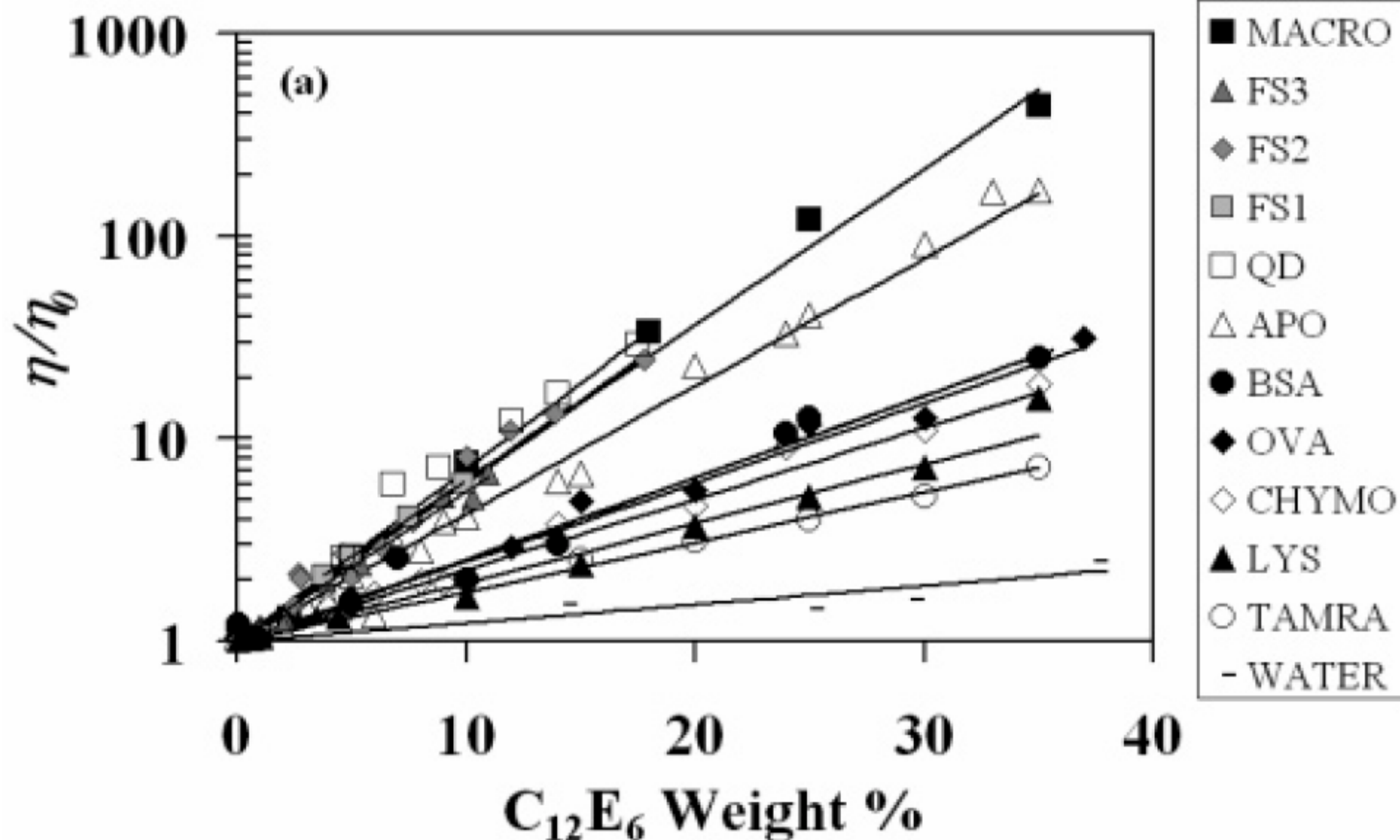


(b)

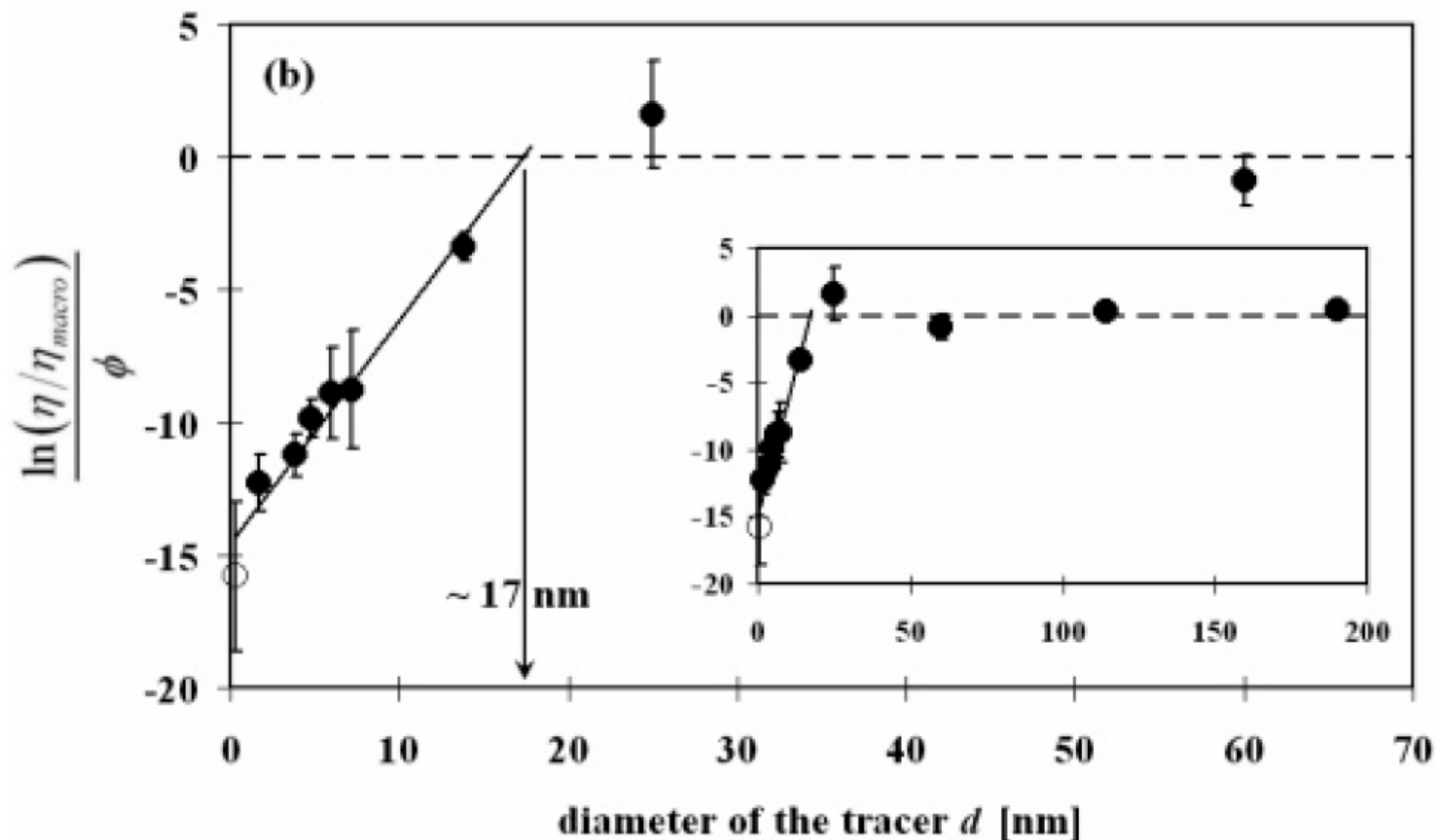




Lepkość mierzona FCS – sondy o różnych rozmiarach



Mikrolepkość jako funkcja rozmiaru sondy



Złamanie bariery dyfrakcyjnej w obrazowaniu i FCS

$$\Delta r = \frac{\lambda}{2NA}$$

Max Planck Institute for Biophysical Chemistry
 Dept. of NanoBiophotonics
 Am Fassberg 11
 37077 Göttingen, Germany
 Tel.: +49 551 201 2501
 shell@gwdg.de



Fields of Specialization/Accomplishments

Pioneering optical microscopy beyond the diffraction barrier with far-field optics

Invention and development of 4Pi microscopy

Invention and development of STED microscopy and related concepts using photoswitching of fluorophores for far-field optical resolution on the nanoscale

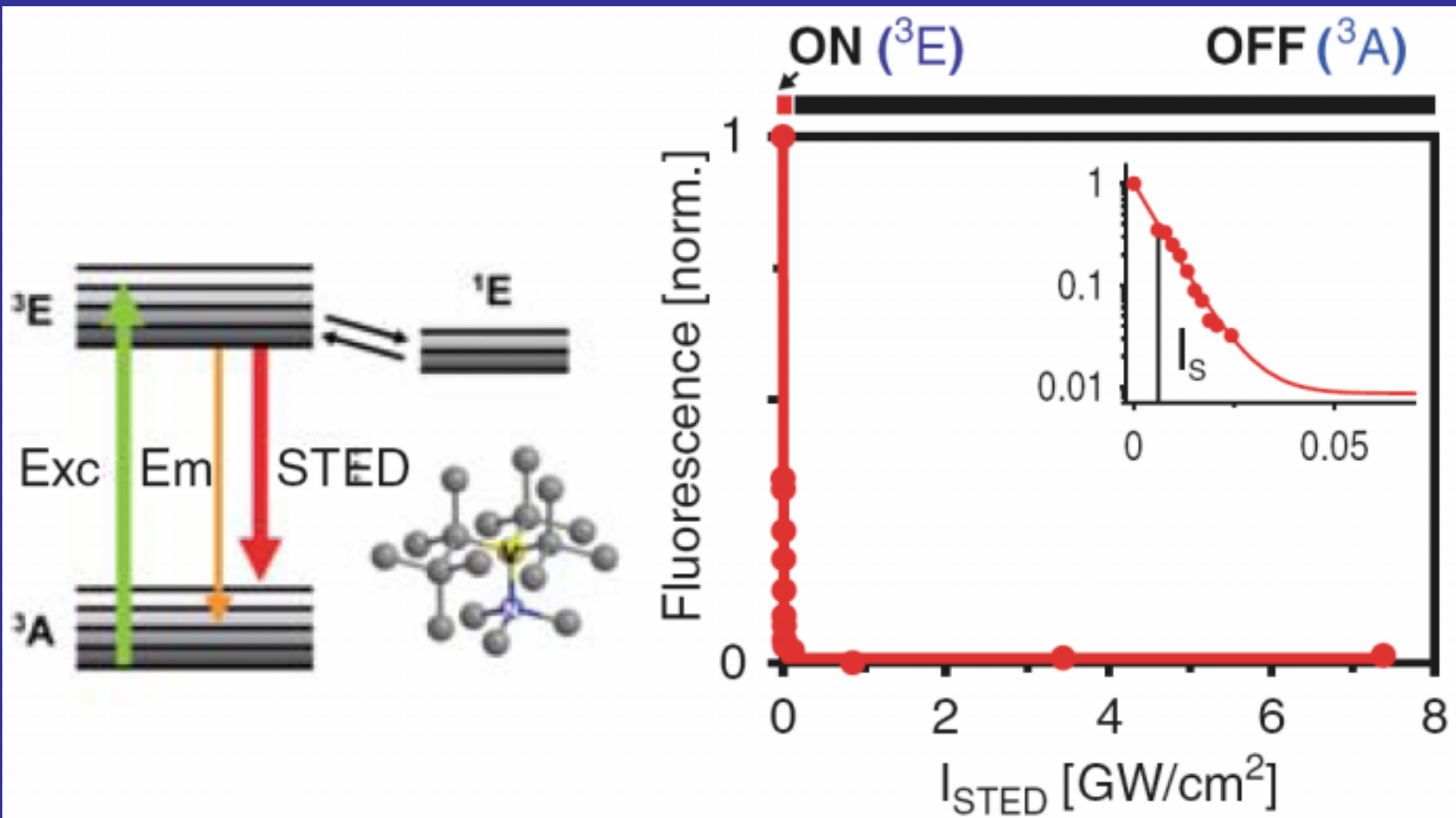
Educational Qualifications

- | | |
|-------------|--|
| 1981 | Abitur (one year in advance) |
| 1981 – 1987 | Physics studies, Univ. of Heidelberg |
| 1990 | Doctorate in Physics, Univ. of Heidelberg (<i>summa cum laude</i>) |

Research Experience

- | | |
|-------------|--|
| 1991 – 1993 | Postdoctoral Researcher, EMBL (European Molecular Biology Laboratory) |
| 1993 – 1996 | Principal Investigator, Laser Microscopy Group; Univ. of Turku, Finland |
| in 1994 | Visiting Scientist, Dept. Engineering Science, Univ. of Oxford, UK |
| 1996 | Habilitation in Physics, Univ. Heidelberg; Physics teaching since 02/1996 |
| 1997 – 2002 | Head, Max-Planck Junior Group <i>High Resolution Optical Microscopy</i> , at the Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry Göttingen, Germany |
| now | Director at the Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry and |

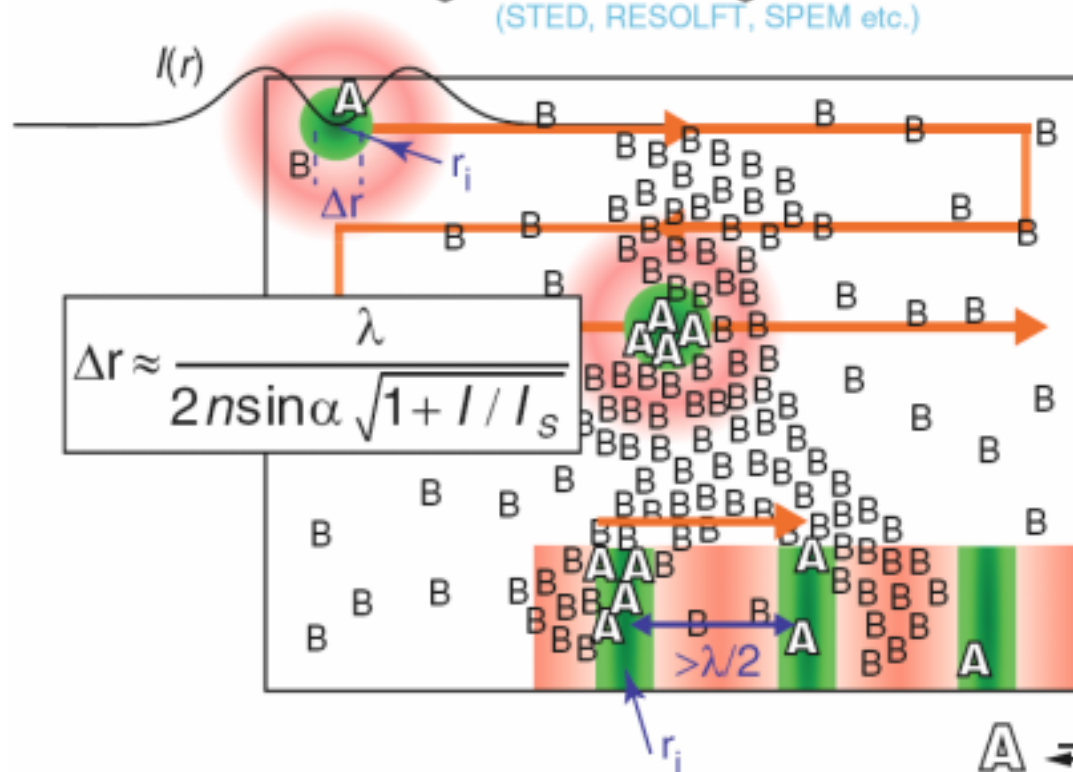
Stimulated emission depletion (STED)



a

Targeted Switching and Readout

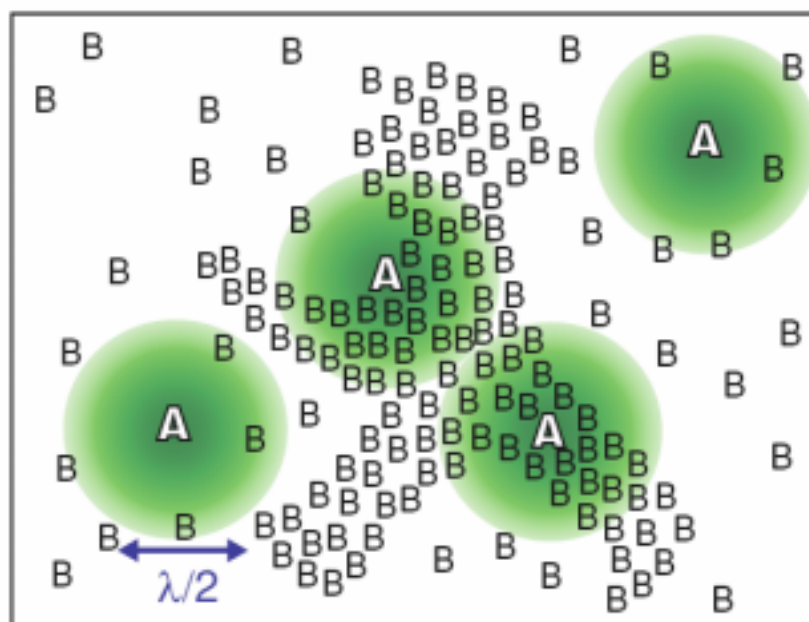
(STED, RESOLFT, SPEM etc.)



b

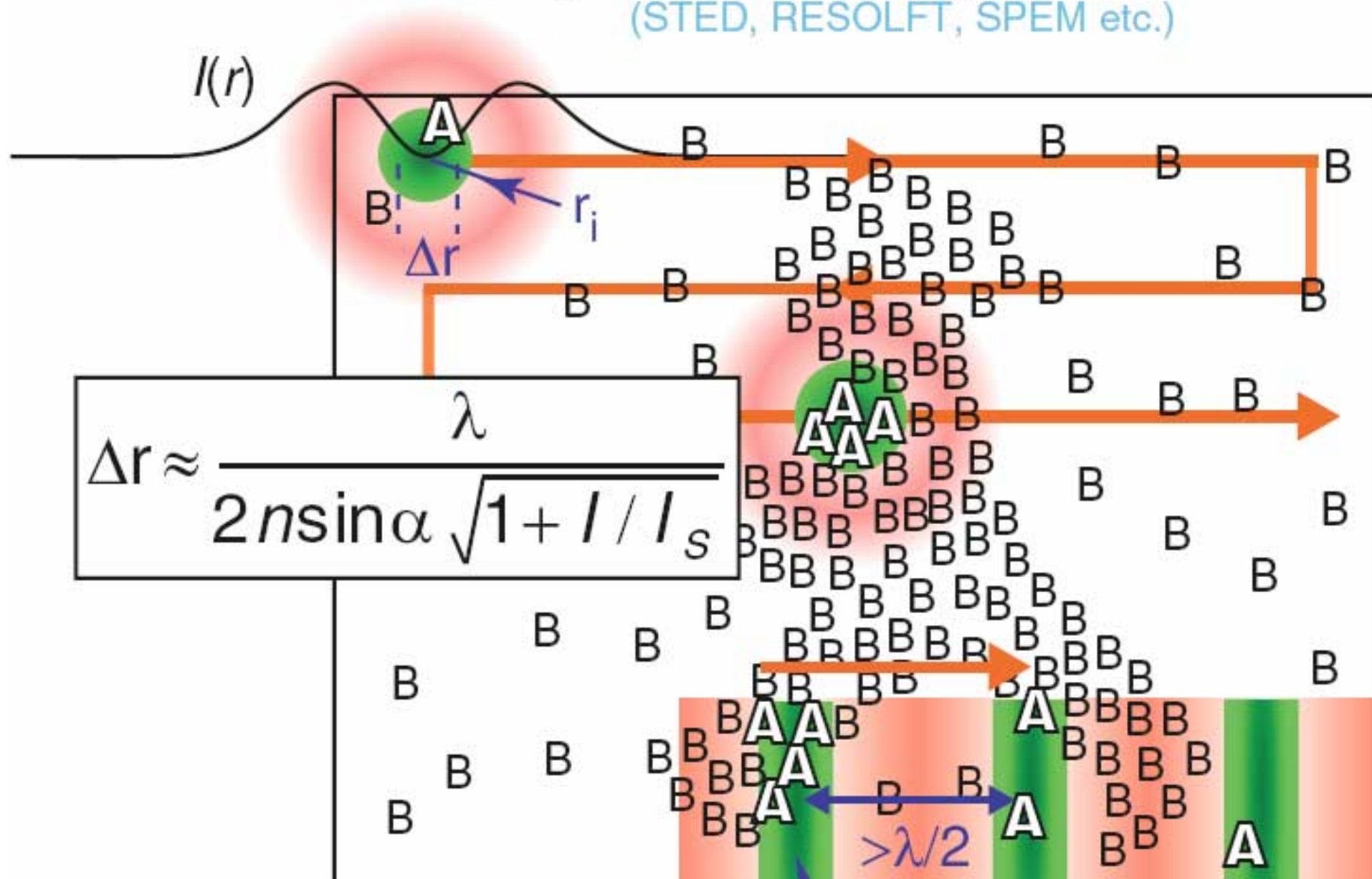
Stochastic Switching and Readout

(PALM, STORM, GSDIM etc.)

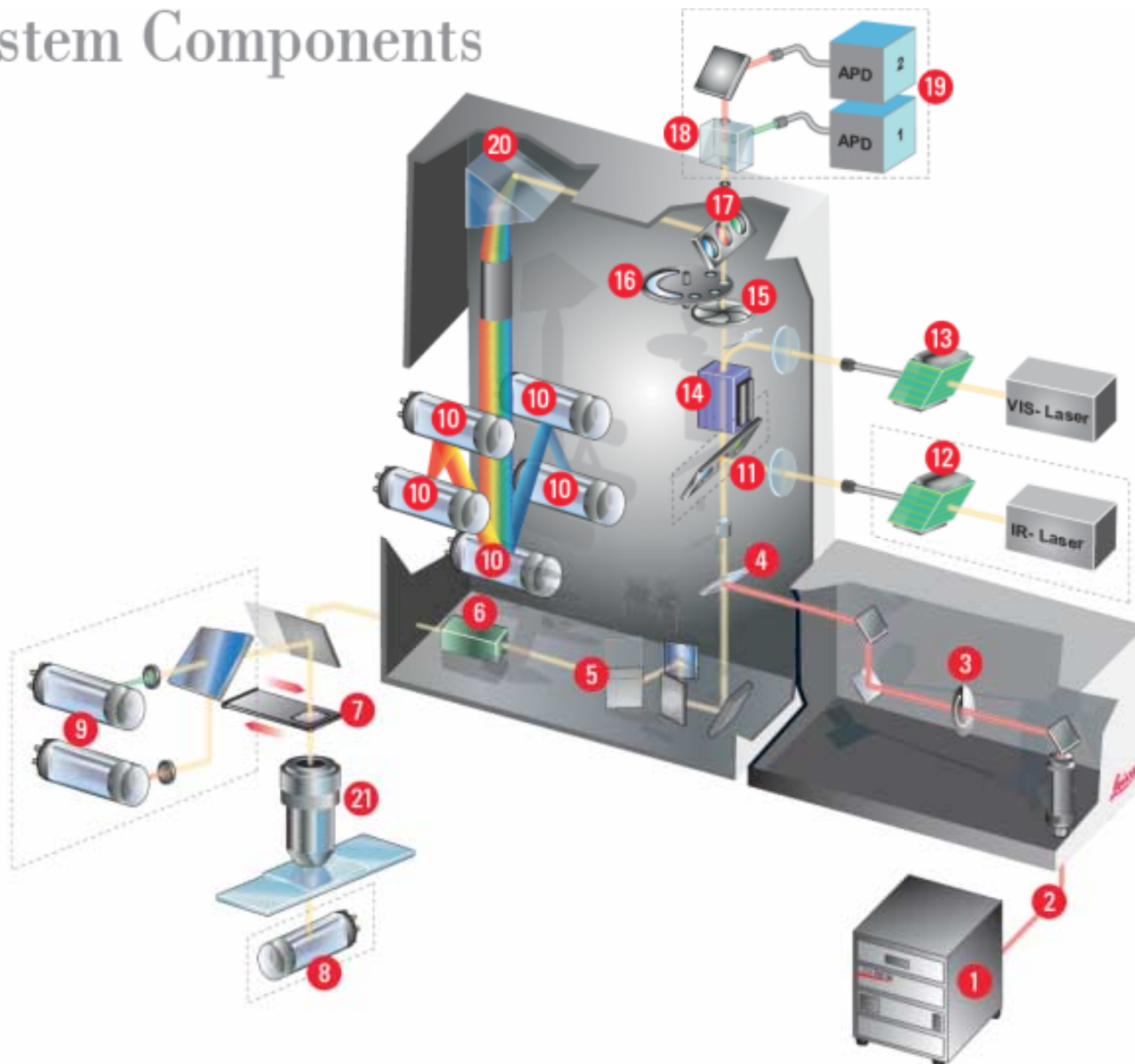


A \rightleftharpoons B
bright dark

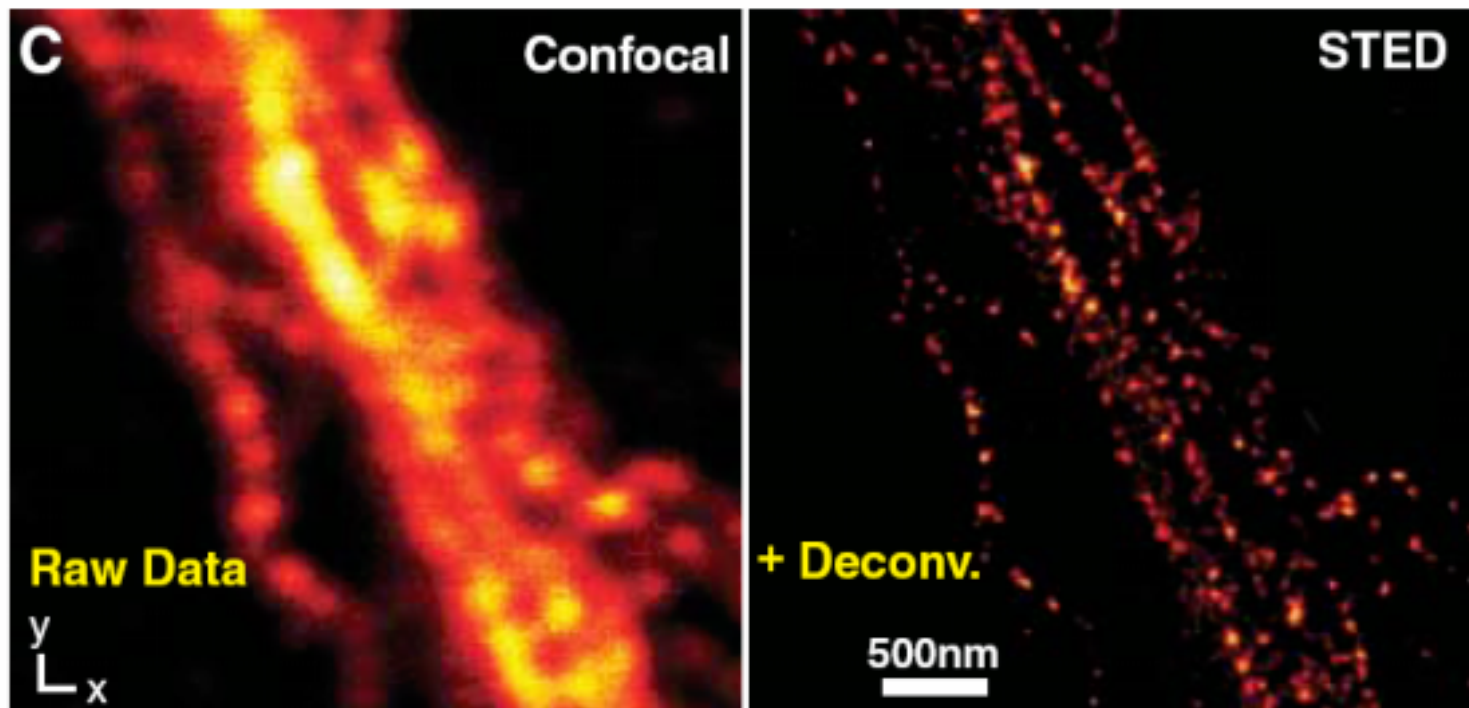
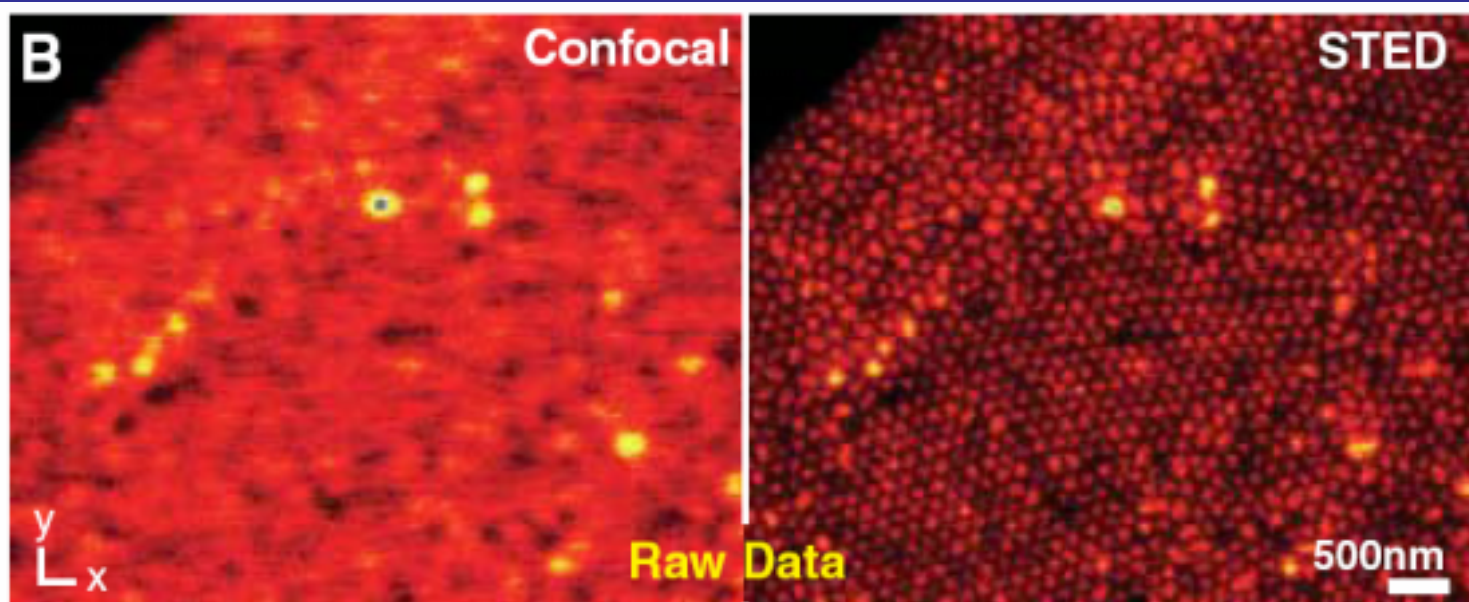
Targeted Switching and Readout (STED, RESOLFT, SPEM etc.)



System Components



- 1 Housing for 592 nm STED laser, AOTF, electronics
- 2 Fiber
- 3 Helical vortex phase filter
- 4 Incoupling STED dichroic
- 5 Tandem Scanner
- 6 Field rotation optics
- 7 Quarter wave plate
- 8 Transmitted light detector
- 9 Reflected light detectors
- 10 Photomultipliers
- 11 Multi-function port
- 12 IR EOM
- 13 Visible range AOTF
- 14 AOBS
- 15 Confocal detection pinhole
- 16 Filter- and polarizer wheel incl. notch filters
- 17 X1 emission port
- 18 APD filter cubes
- 19 Avalanche photodetectors
- 20 Spectrophotometer prism
- 21 STED objective lens



Confocal

STED

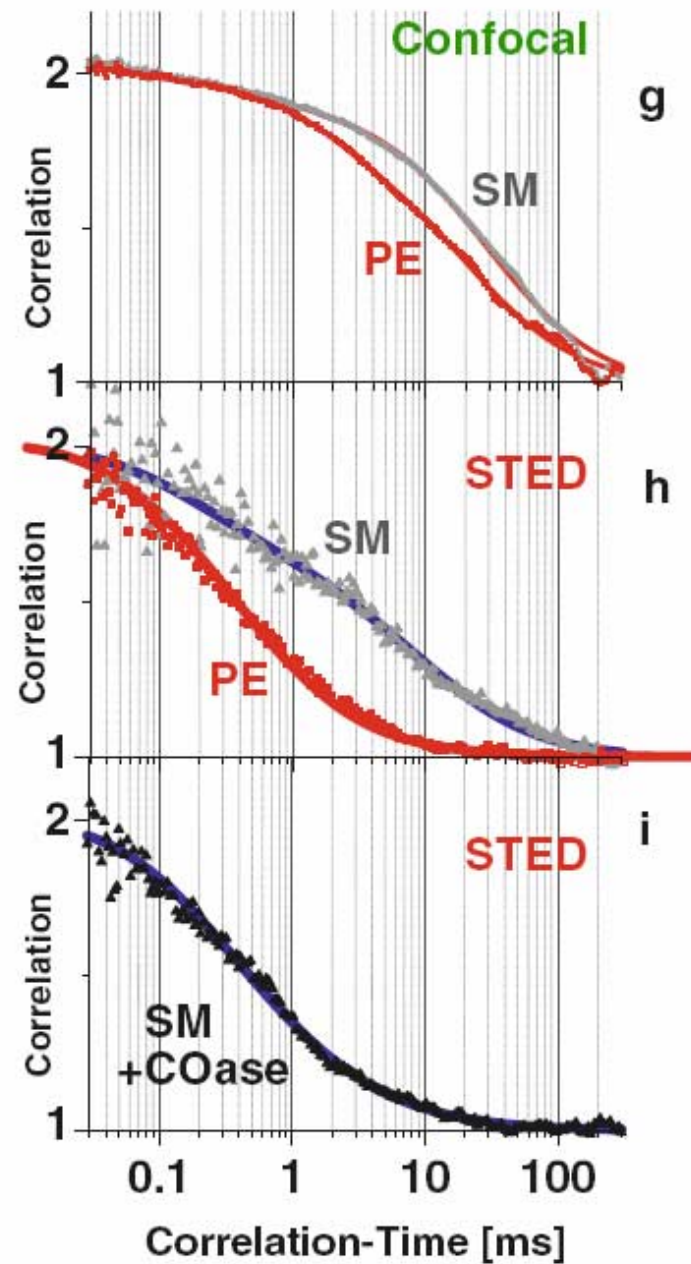
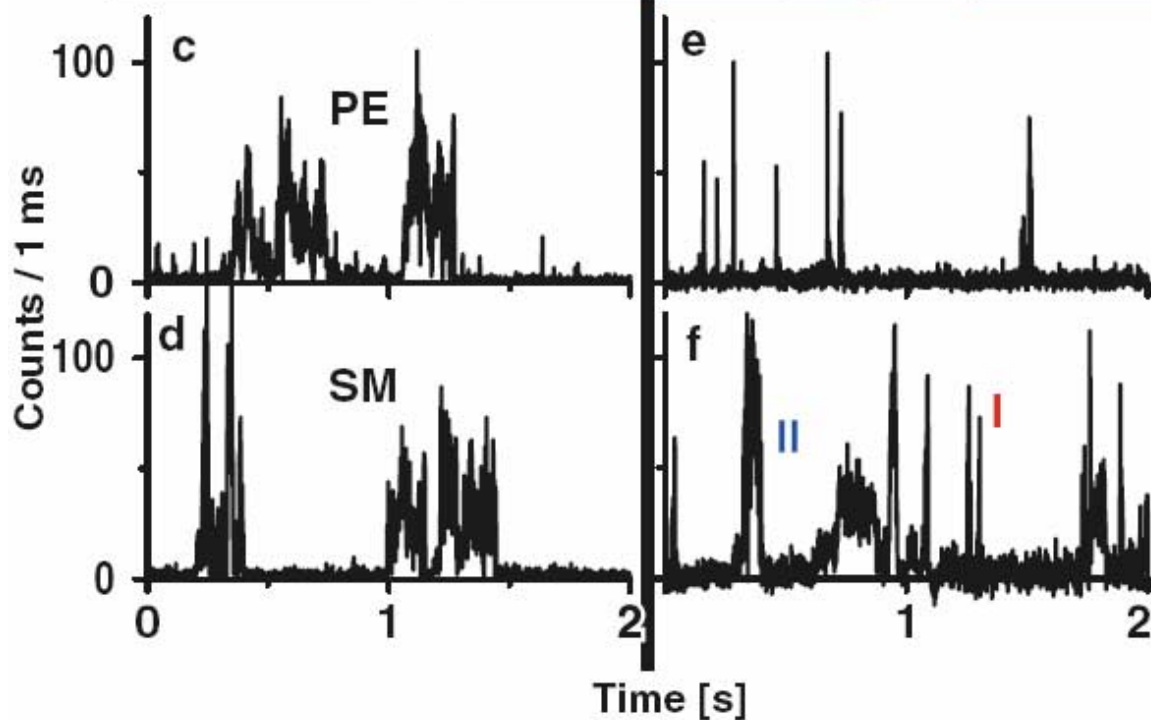
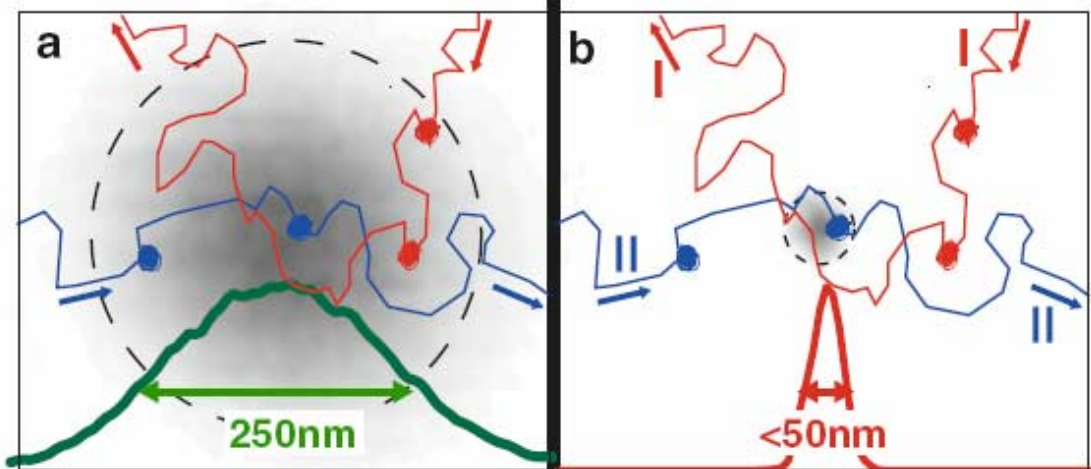


Fig. 19.6. STED microscopy discriminates the dynamics of single sphingo- and phospholipid molecules in a living cell membrane: dye-labeled sphingomyelin (SM) vs. phosphoethanolamine (PE). Panels (a) and (b) illustrate that freely moving molecules may be transiently trapped in the membrane due to interaction with another molecule. The passage time of freely diffusing molecules through the small spot created by STED is substantially reduced compared to that through a confocal microscope. c-f) Fluorescence bursts from labeled single PE and SM lipids detected with the 250-nm diameter confocal (c, d) and a 50-nm diameter STED spot (e, f) reveal that, by reducing the time that a freely diffusing molecule spends in the detection area, the smaller spot created by STED distinguishes free lipid diffusion (I) from interaction events (II) during passage through the spot. Panels (g)–(i) quantify the diffusion of PE and SM lipids on the plasma membrane using fluorescence correlation spectroscopy. Normalized correlation data of PE (*red dots*) and SM (*grey dots*) are compared for a standard confocal (g) and an STED recording (h) depicting the heterogeneous diffusion of SM. While in the confocal case the difference between the SM and PE diffusion could be explained just by a generally slower diffusion of SM, the STED recording can only be explained by a transient trapping just of SM. (i) Following depletion of cholesterol, the diffusion of SM (*black dots*) is similar to that of the rather freely diffusing PE. Thus, STED microscopy reveals cholesterol-assisted heterogeneous diffusion of SM on the nanoscale

Dziękuję za uwagę!