

# **Wybrane Zagadnienia Biofizyki Molekularnej**

(1100-5BM15)

**Jan M. Antosiewicz**

**Zakład Biofizyki  
Instytut Fizyki Doświadczalnej  
Wydział Fizyki**

**WKŁAD 4**

**16 października, 2024**

**Błądzenie losowe w procesach biomolekularnych  
(część 3)**

**<http://www.fuw.edu.pl/~jantosi/>**

**[jantosi@fuw.edu.pl](mailto:jantosi@fuw.edu.pl)**

# Obrazowanie w czasie rzeczywistym ścieżek infekcji przez pojedyncze cząstki wirusa z rodziny partowirusów\* SCIENCE VOL 294, 1929-1932 (2001)

Wirus stowarzyszony z adenowirusem (AAV) to mały wirus z genomem jednoniciowego DNA, który zakaża ludzi i niektóre inne gatunki naczelnych i który może wprowadzić materiał genetyczny w określonym miejscu na chromosomie 19 z niemal 100% pewnością. Obecnie nie wiadomo, czy AAV jest chorobotwórczy, wiadomo że powoduje bardzo łagodną odpowiedź immunologiczną. Wektory do terapii genowej wykorzystujące AAV mogą infekować tylko dzielące się komórki i utrzymywać się w stanie pozachromosomalnym bez integracji z genomem komórki gospodarza. Cechy te czynią AAV bardzo atrakcyjnym kandydatem do tworzenia wektorów wirusowych do terapii genowej oraz do tworzenia izogenicznych modeli chorób ludzkich.

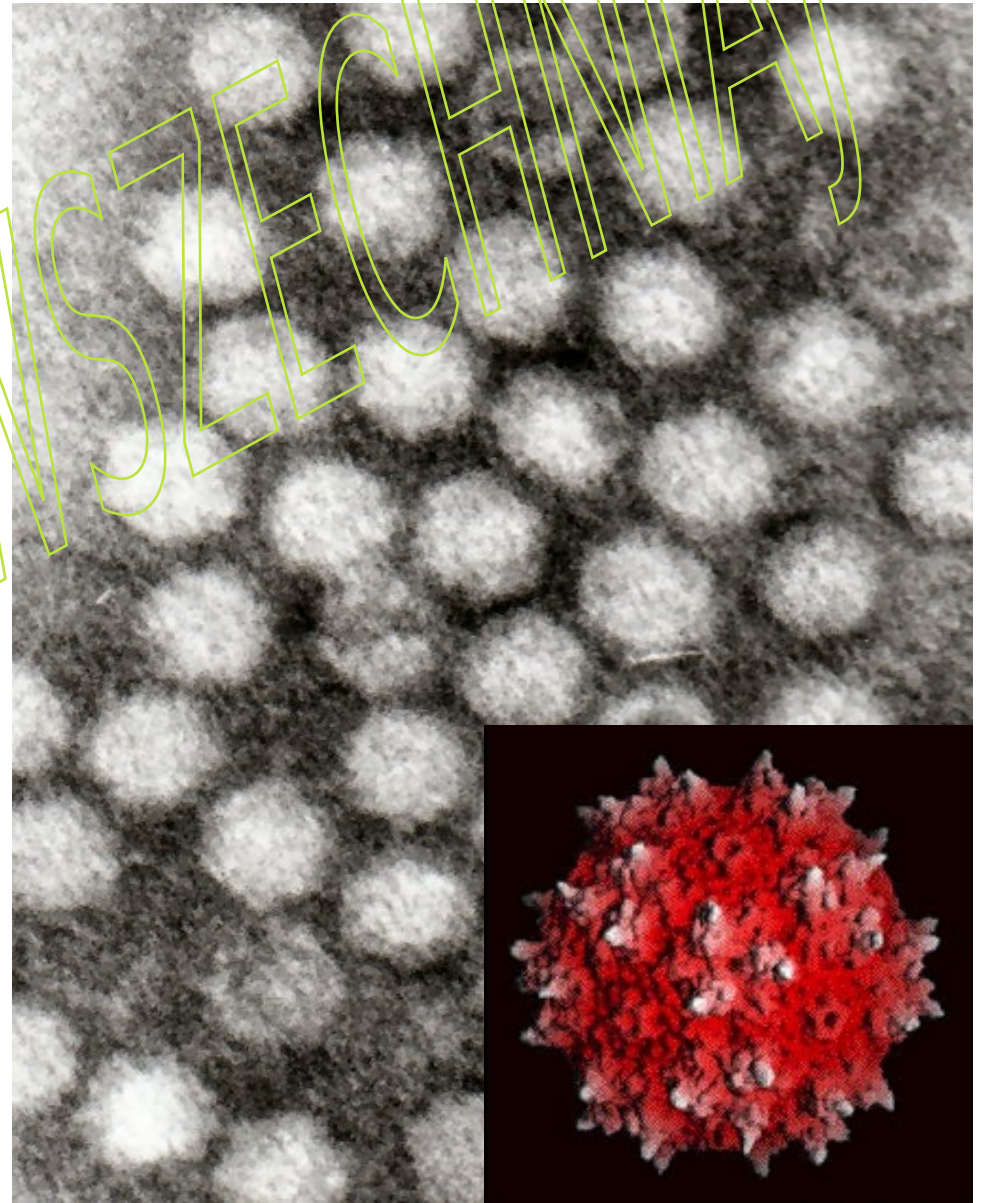
Vaxzevria (wcześniej szczepionka przeciwko COVID-19 AstraZeneca) to szczepionka przeznaczona do zapobiegania chorobie koronawirusowej 2019 (COVID-19) u osób w wieku 18 lat i starszych. Szczepionka AstraZeneca wykorzystuje wektor szczepionkowy adenowirusa szympansa.

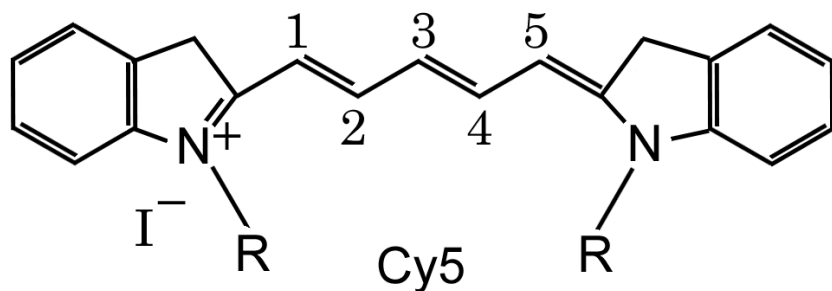
\*dosłownie wirus stowarzyszony z adenowirusem

Struktura krystaliczna AAV; PNAS August 6, 2002 vol. 99 10405-10410 i obraz z mikroskopu elektronowego

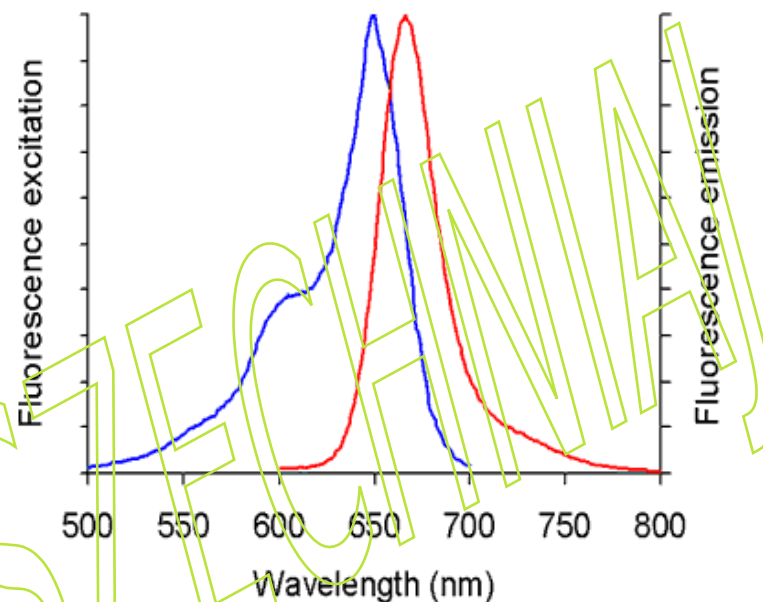
<http://www.genetherapy.net/viral-vectors/adeno-associated-viruses.html>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Adeno-associated\\_virus](http://en.wikipedia.org/wiki/Adeno-associated_virus)





Grupy R nie muszą być identyczne. W stosowanych barwnikach są to krótkie łańcuchy alifatyczne, z których jeden lub oba kończą się wysoko reaktywnymi ugrupowaniami, takimi jak maleimid.



AAV znakowano kowalencyjnie barwnikiem Cy5, przy stosunku pojedynczego do podwójnego znakowania wynoszącym 82:18. Cy5 jest czerwonym barwnikiem fluorescencyjnym o długości fali wzbudzenia 649 nm i długości fali emisji 670 nm.

Roztwór wirusa AAV-Cy5 o niskim stężeniu ( $10^{-9}$  do  $10^{-11}$  mol  $l^{-1}$ ) dodano do pożywki hodowlanej komórek HeLa. Zwykle dawało to od 10 do 1000 cząstek wirusa na komórkę.

Obszar o wymiarach 20  $\mu m$  na 20  $\mu m$ , zawierający pojedynczą komórkę, obrazowano za pomocą mikroskopu epifluorescencyjnego z obiektywem 100 $\times$  (Plan-Neofluar, NA 1.3, Zeiss) i systemem kamer o wysokiej czułości ze sprzężeniem ładunkowym (CCD) (Pentamax, Instrumenty Princeton).

Cząsteczki Cy5 mogą przed fotouszkodzeniem przejść średnio  $10^6$  fotocykli w buforze/żelu agarozowym. W opisanych tutaj eksperymentach intensywność wzbudzenia została starannie dostosowana, aby uzyskać jasność wystarczającą do wykrywania fluorescencji, ale także długie trajektorie przed fotouszkodzeniem. Przy skuteczności detekcji około  $\epsilon=1\%$  i intensywności fluorescencji na plamkę wynoszącej kilkaset zliczeń, można było uzyskać trajektorie od 1 do 10 s.

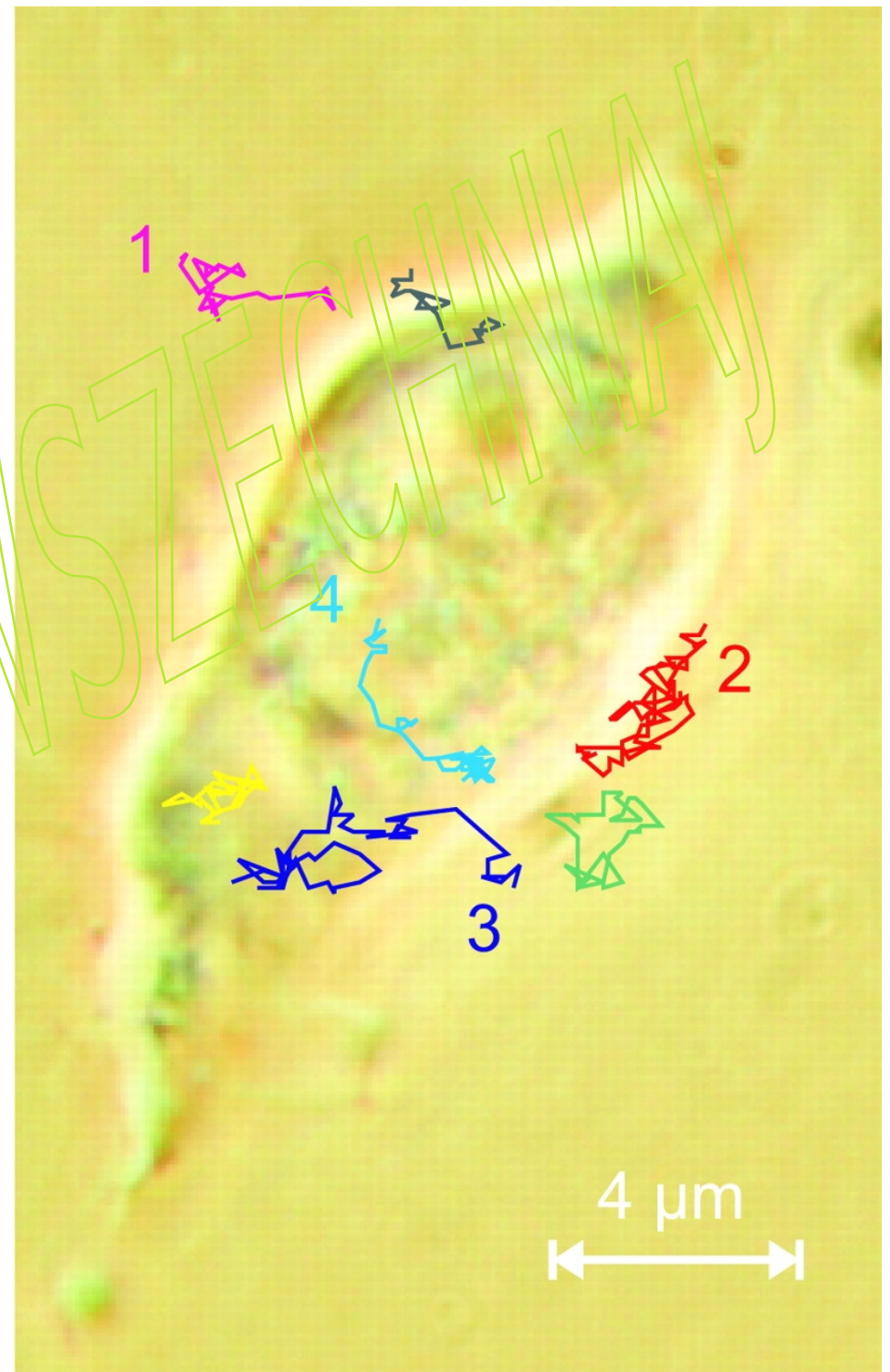


Trajektorie pojedynczych cząstek AAV-Cy5 wskazujące zakaźne drogi wnikania AAV do żywej komórki HeLa. Przeanalizowano 1009 trajektorii pojedynczych cząstek AAV-Cy5 w 74 komórkach na różnych etapach infekcji.

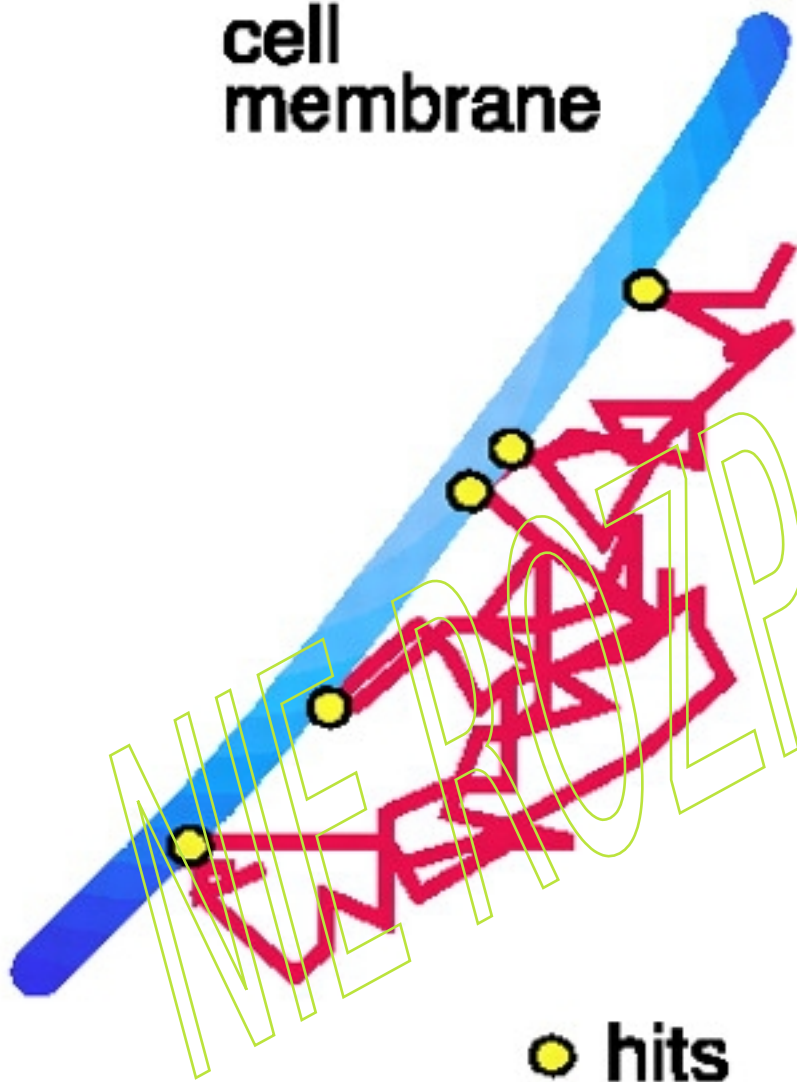
Aby zademonstrować, w jaki sposób określono składniki komórek, trajektorie są rzutowane na obraz przekroju poprzecznego badanej komórki z kontrastem fazowym, wykonany za pomocą dostępnej w handlu matrycy CCD przymocowanej do tubusu lornetki mikroskopu

Ślady pokazujące pojedyncze dyfundujące cząsteczki wirusa rejestrowano w różnym czasie. Opisują różne etapy zakażenia AAV, m.in. dyfuzja w roztworze (1 i 2), kontakt z błoną komórkową (2), penetracja błony komórkowej (3), dyfuzja w cytoplazmie (3 i 4), penetracja otoczki jądrowej (4) i dyfuzja w nukleoplazmie.

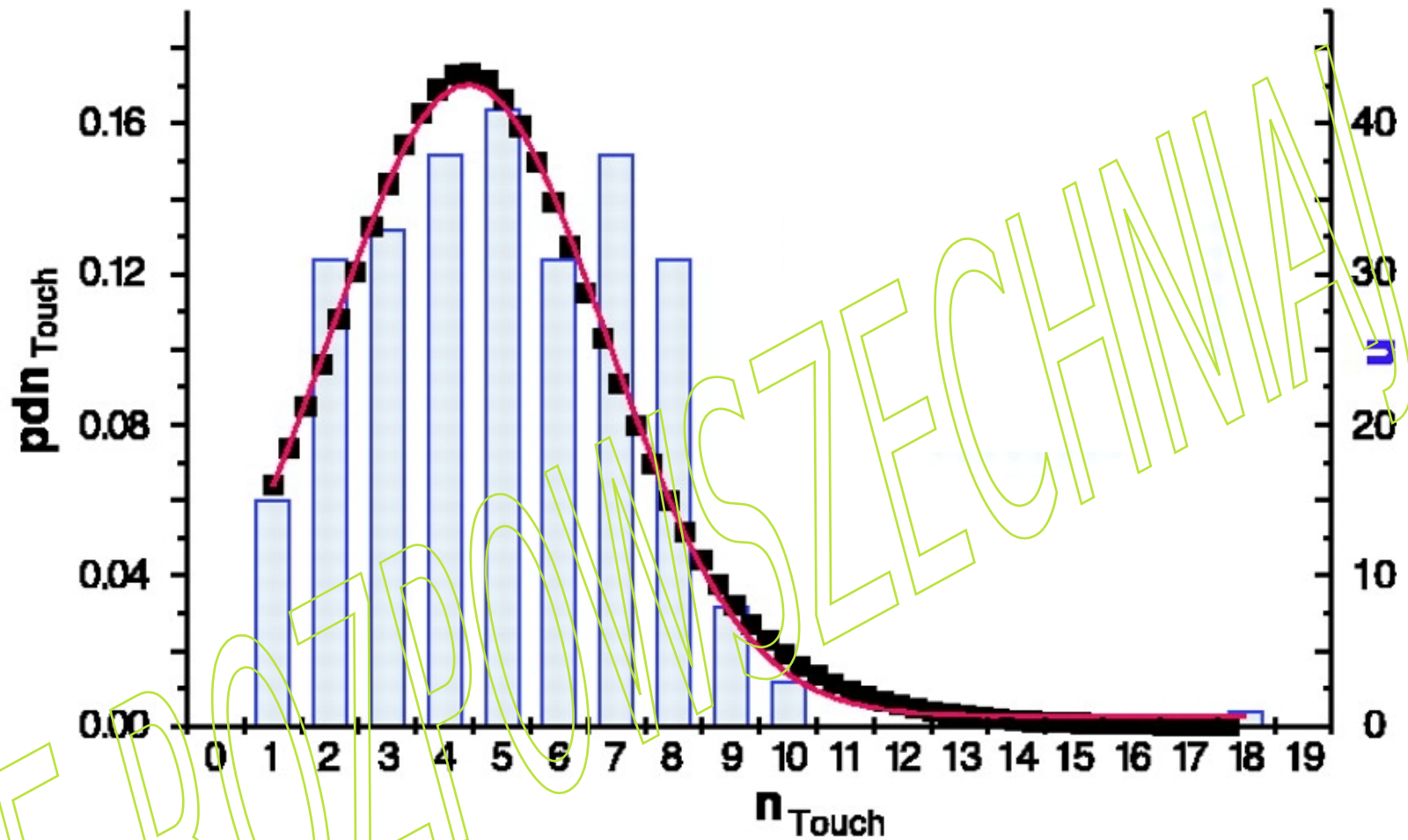
Ruch AAV poza komórką może scharakteryzować jako dyfuzję normalną z współczynnikiem dyfuzji  $D=7,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$



**cell  
membrane**



„Wydarzenia dotykające” błony AAV na powierzchni żywej komórki HeLa. Powiększony szkic trajektorii 2 pobrany z rysunku pokazanego na poprzednim slajdzie. Ścieżka pokazuje pięć dotknięć powierzchni komórki. Te trafienia są zaznaczone kółkami i reprezentują krótkie okresy bezruchu.



Średnia liczba kolejnych dotknięć komórek  $\langle n_{Touch} \rangle$  obliczona dla wirusów z ujemnym dokowaniem (dyfundującym z powrotem do roztworu) obliczona na podstawie 269 trajektorii (wykres częstotliwości z jasnoniebieskimi słupkami). Do skumulowanej częstotliwości  $n_{Touch}$  dopasowano funkcję sigmoidalną. Do jej znormalizowanej pochodnej, funkcji gęstości prawdopodobieństwa  $pdn_{Touch}$  (krzywa punktowa), dopasowano krzywą Gaussa. Z tego dopasowania określono średnią wartość  $\langle n_{Touch} \rangle = 4,4 \pm 3,1$ .



## Definition of Cumulative Frequency

Cumulative Frequency corresponding to a particular value is the sum of all the frequencies up to and including that value.

## More about Cumulative Frequency

Cumulative frequency is nothing but the running total of frequencies.

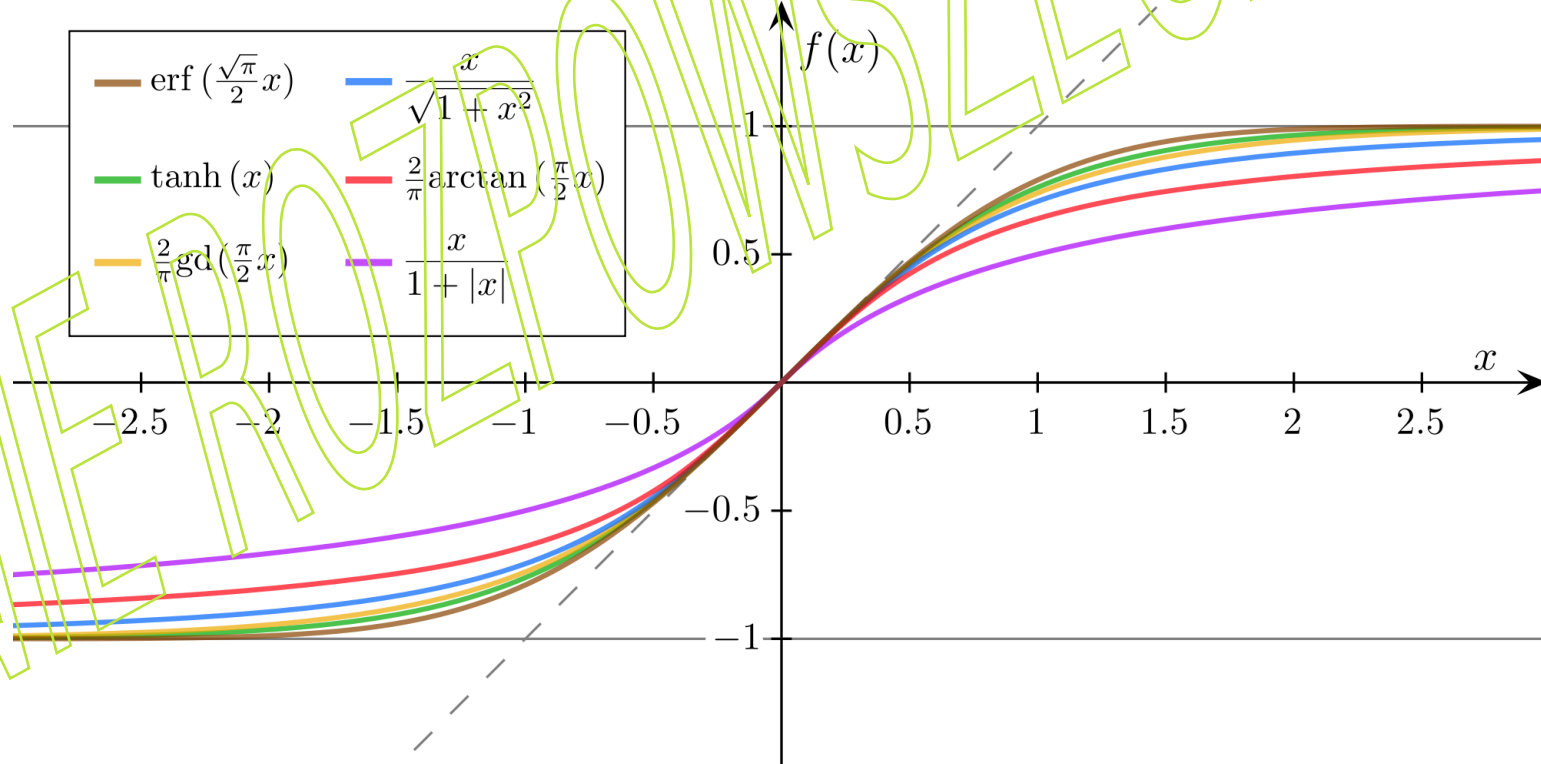
## Example of Cumulative Frequency

The cumulative frequency table represents the volcanic eruptions between 1900 and 2000.

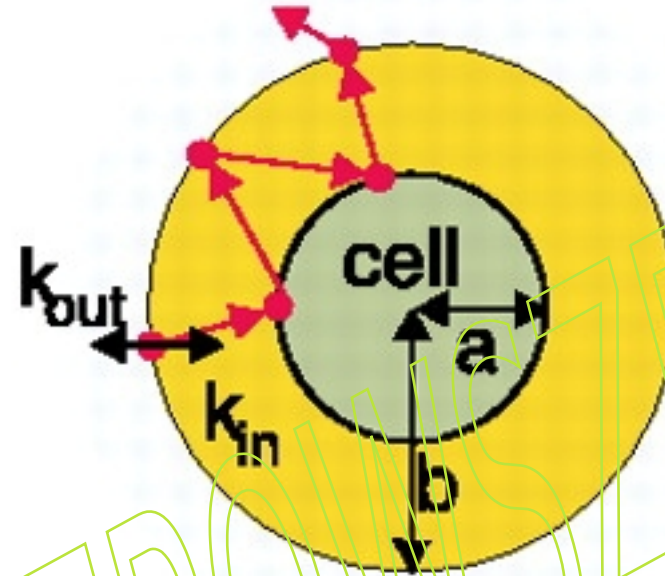
Years	Frequency	Cumulative Frequency
1900-20	12	12
1920-40	15	27
1940-60	9	36
1960-80	15	51
1980-00	21	72

$$D(x) = P(X \leq x) = \int_{-\infty}^x P(\xi) d\xi$$

$$P(x) = D'(x)$$



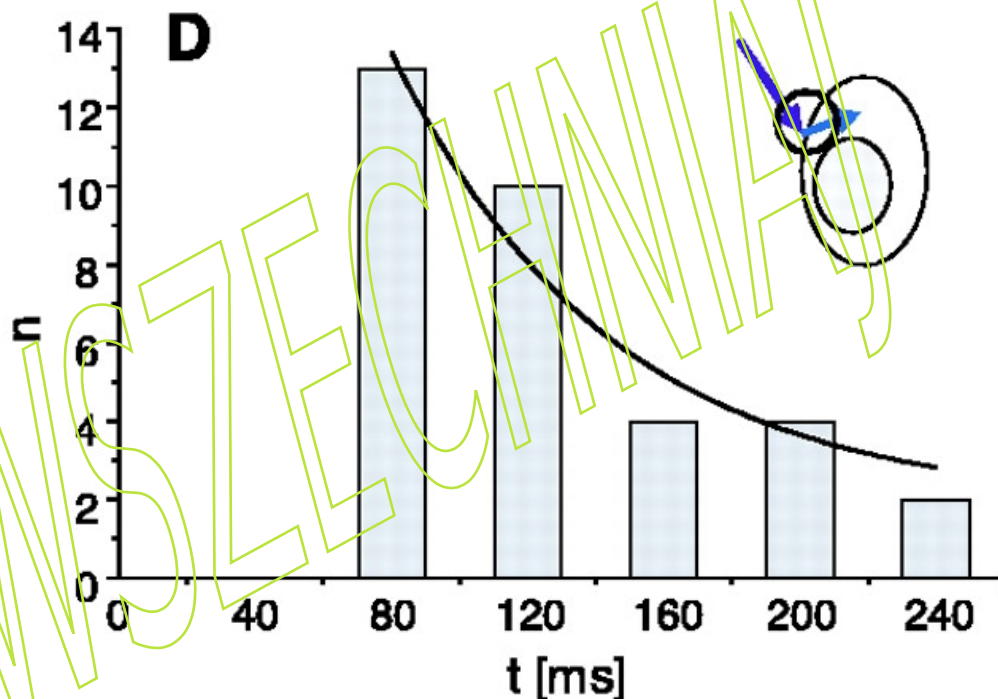
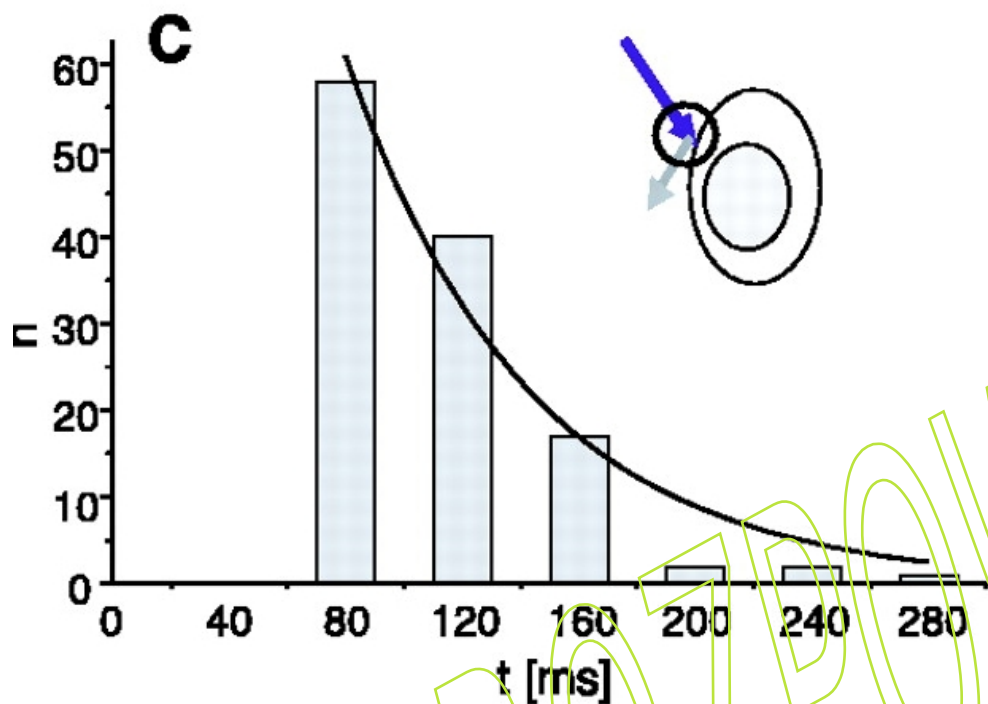
Porównanie niektórych funkcji sigmoidalnych. Na rysunku wszystkie funkcje są znormalizowane w taki sposób, że ich nachylenie w punkcie początkowym wynosi 1.



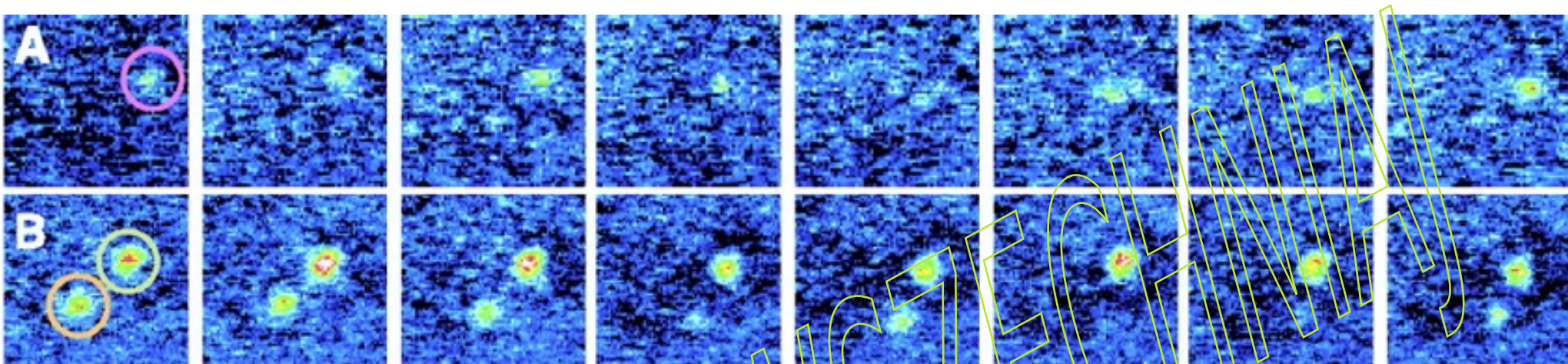
Model statystycznego obliczania dotknięć powierzchni komórki bez wchodzenia do jej wnętrza. W wyidealizowanym modelu komórka jest postrzegana jako kulista powłoka o promieniu  $r = a$ . Cząsteczki uwolnione przy  $r = b$  poruszają się do wewnątrz z szybkością  $k_{in}$  lub na zewnątrz z  $k_{out}$ . Model ten podaje, że średnia liczba kolejnych dotknięć cząstki oscylującej pomiędzy  $r = a$  i  $r = b$ , zanim na dobre odejdzie od powłoki, wynosi  $\langle n_{Touch} \rangle = a/(b-a)$ . Tę średnią liczbę można oszacować na  $\langle n_{Touch} \rangle = 5$  dla typowej wartości  $a = 5 \mu m$  i typowej wartości  $b = 6 \mu m$  pomiędzy dotknięciami.

**teoretyczna analiza tego problemu jest zadaniem na ćwiczenia**





Rozkład czasów adsorpcji dla trajektorii negatywnego dokowania 137 (C) i przejścia przez błonę komórkową 42 (D). Słupki przedstawiają skumulowane liczby tych zdarzeń obserwowanych przy określonych czasach dokowania przed opuszczeniem powierzchni komórki “na zawsze” lub przedostaniem się przez błonę komórkową. Te skumulowane liczby zdarzeń są wykładniczymi funkcjami czasu dokowania. Na podstawie tych rozkładów określono, że czasy dokowania, odpowiadające e krotnemu zmniejszeniu liczby obserwowanych przypadków, wynoszą odpowiednio  $\langle t \rangle = 62 \pm 30$  ms (C) i  $\langle t \rangle = 64 \pm 30$  ms (D), co wskazuje na brak znaczących różnic czasowych pomiędzy zdarzenia odchodzenia od i przenikania do komórek.



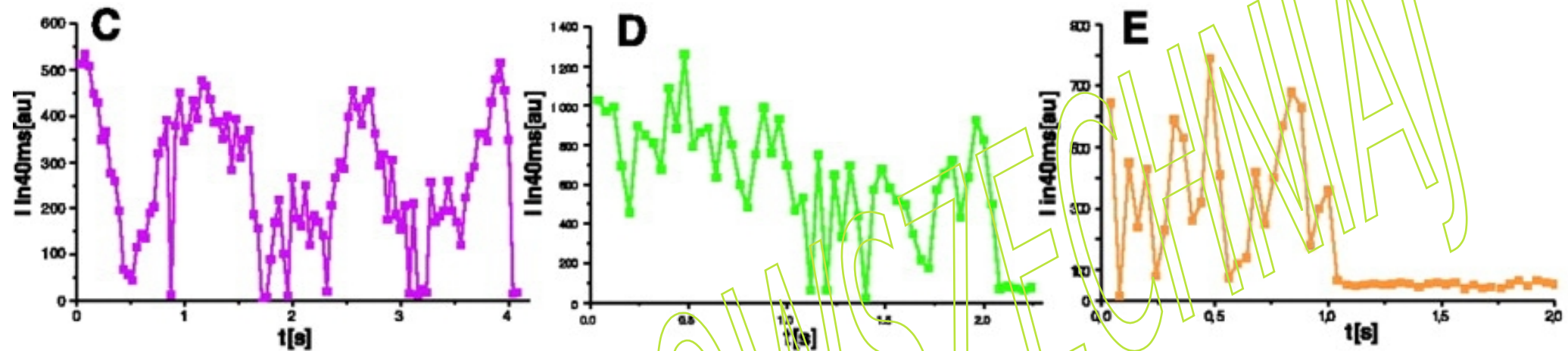
**Dyfuzja AAV w cytoplazmie. Każda trajektoria zaczyna się od utworzenia endosomu.**

**(A i B) Dwie serie obrazów fluorescencyjnych przedstawiających jedną i dwie plamki fluorescencyjne, każda wskazująca pojedynczą cząstkę AAV.**

**Preparaty obrazowano co 40 ms. Rozmiar obrazowanego obszaru wynosi 5  $\mu\text{m}$  na 5  $\mu\text{m}$ . Zobrazowano i przeanalizowano 113 trajektorii w cytoplazmie. We wszystkich eksperymentach nie zaobserwowano wolnego wirusa, a jedynie dyfuzję endosomu bezpośrednio po penetracji błony i każdy endosom zawierał jedną cząstkę wirusa.**

**Pięćdziesiąt trzy trajektorie wykazały liniową zależność średniokwadratowego przemieszczenia w czasie.**

**Pięćdziesiąt jeden trajektorii wykazało odchylenia od liniowej zależności średniego kwadratu przemieszczenia od czasu, wskazując na anomalne procesy dyfuzji.**

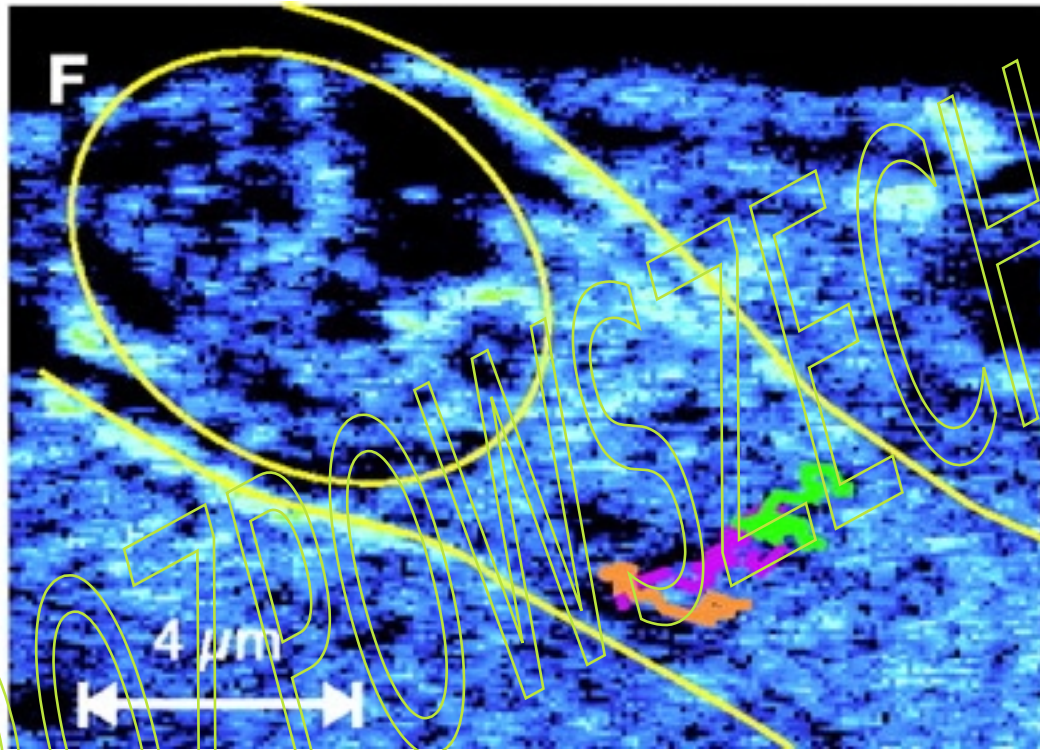


Wykresy czasowe intensywności fluorescencji ( $I$ ) plamek pokazanych na rysunkach (A) i (B) na poprzednim slajdzie (skorelowane kolorem).

Wykresy charakteryzują się charakterystyczną dynamiką włączania/wyłączania (miganie) i jednoetapowym przebiegiem procesu fotowycielania, typowym dla pojedynczych cząsteczek.

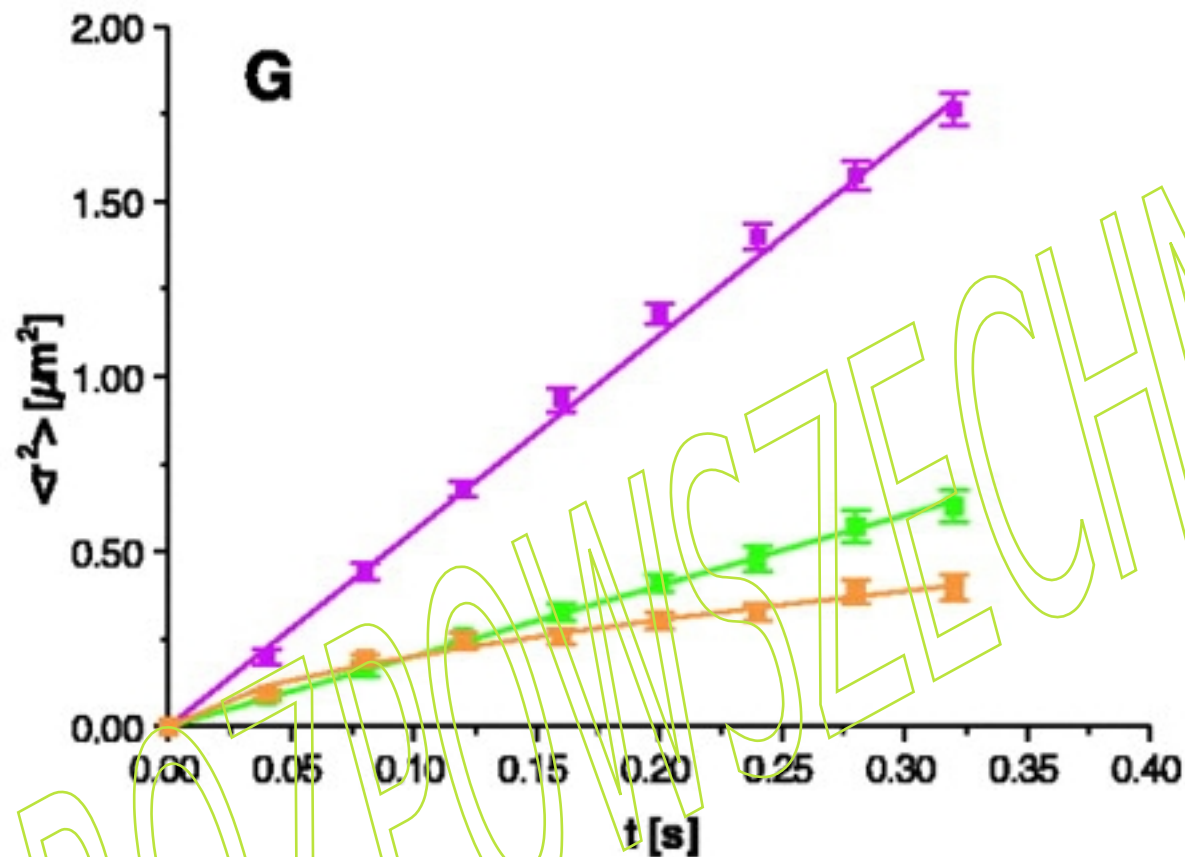
Fluktuacje sygnału w czasie są wynikiem ruchu dyfuzyjnego prostopadłego do płaszczyzny ogniskowej.



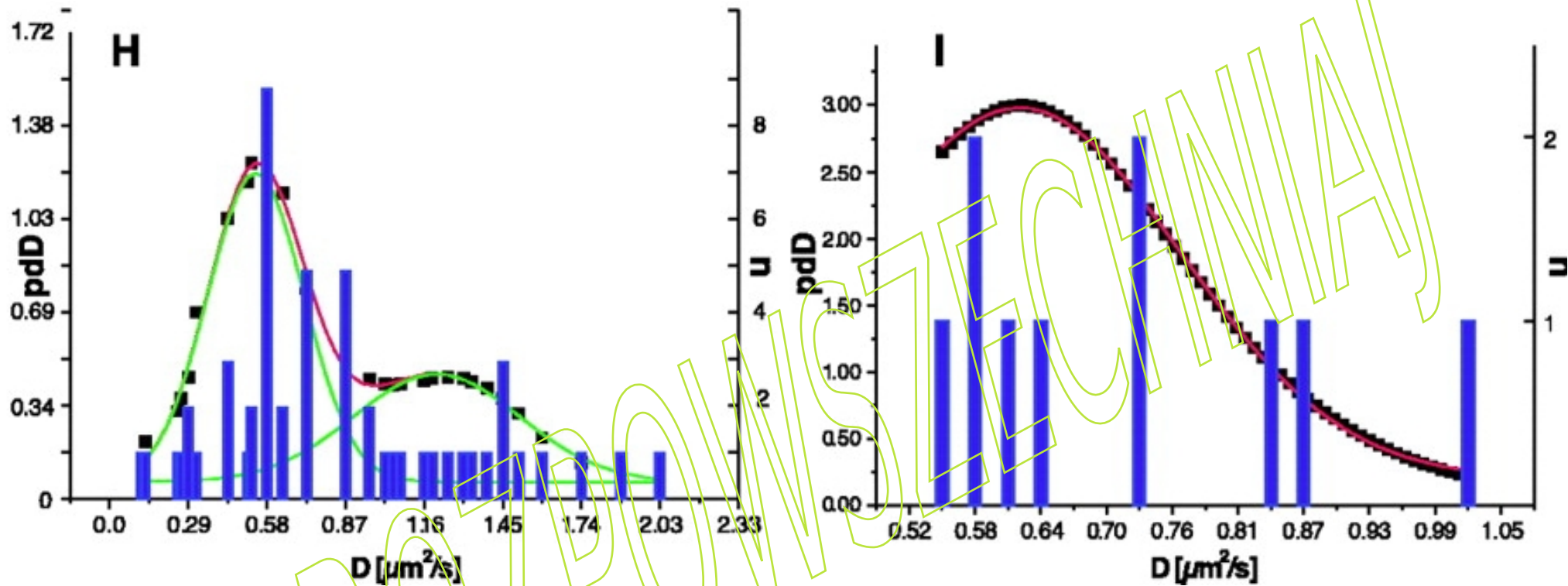


**Wizualizacja trzech trajektorii zarejestrowanych jako sygnał fluorescencji, rzutowanych na obraz komórki uzyskany w świetle przechodzącym. Położenia błony komórkowej i błony jądra komórkowego, pokazane kolorem żółtym, określono za pomocą obrazowania z kontrastem fazowym.**

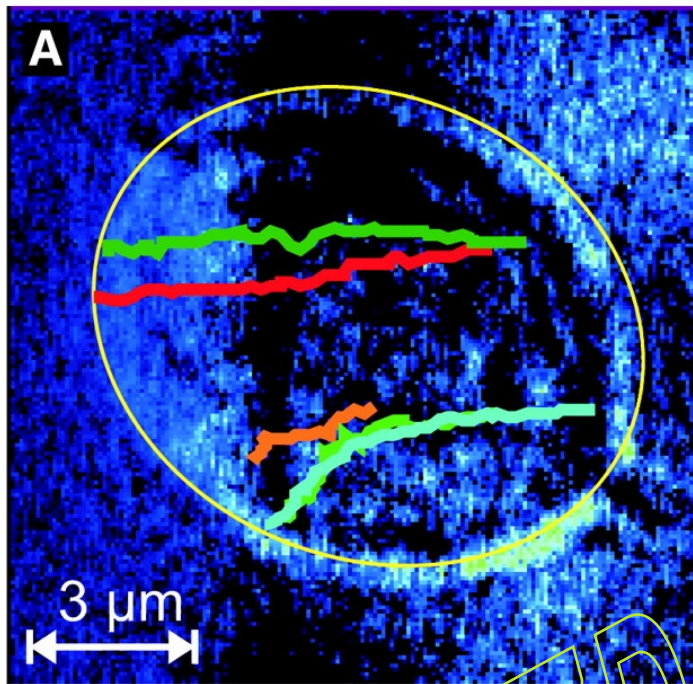




Średnie przemieszczenie kwadratowe w funkcji czasu. Krzywą magenta dającą współczynnik dyfuzji  $D = 1,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  przypisano wolnej cząstce AAV podlegającej normalnej dyfuzji w osoczu komórkowym. Krzywe zieloną i żółtą przypisano ruchom endosomalnym. Jedna wykazuje dyfuzję normalną ( $D = 0,55 \mu\text{m}^2/\text{s}$  kolor zielony), a druga dyfuzję anomalną ( $D = 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $\alpha = 0,6$  żółty;  $\langle x^2 \rangle = 4Dt^\alpha$ ).



Funkcja gęstości prawdopodobieństwa  $pdfD$  dla współczynników dyfuzji uzyskanych dla ruchu cząstek w cytoplazmie z 53 trajektorii przy  $pH = 7$  (H) i 10 trajektorii przy  $pH = 9$  (I). Dla  $pH 7$ , funkcja ma dwa maksima funkcji gęstości prawdopodobieństwa. Przypisano je wolnemu AAV ( $D = 1,3 \mu m^2/s$ ) i AAV wewnątrz endosomu ( $D = 0,57 \mu m^2/s$ ). To ostatnie maksimum jest podobne do maksimum ( $D = 0,64 \mu m^2/s$ ) stwierdzonego dla  $pH = 9$ , przy którym uwolnienie endosomalne nie jest możliwe. Dlatego też niską wartość  $D$  w (H) przypisano AAV wewnątrz endosomu. Histogramy pokazują rozkład stałych dyfuzji.

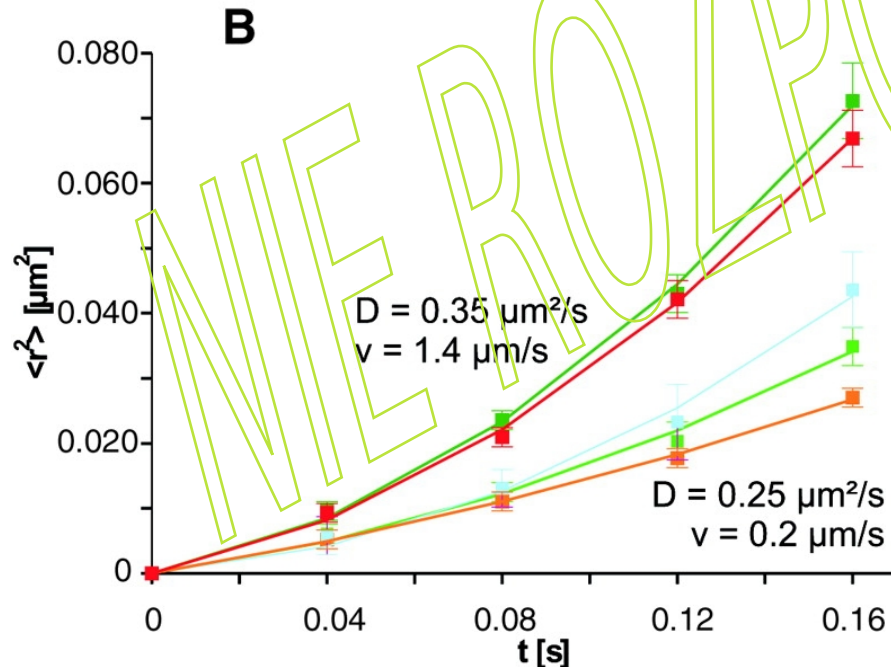


Transport AAV-Cy5 w jądrze komórkowym. (A) Wizualizacja pięciu trajektorii rzutowanych na obraz jądra komórkowego w świetle białym. Położenie jądra zaznaczone na żółto określono za pomocą obrazowania z kontrastem fazowym. Dwie dolne trajektorie biegną kolejno tą samą ścieżką. W tym przypadku wszystkie trajektorie wykazały ruch skierowany odlewej do prawej strony, czyli były „jednokierunkowe”.

(B) Średnie przemieszczenie kwadratowe wykreślone w czasie. Paraboliczny kształt krzywych wskazuje na dyfuzję z dryfem, jak opisano w równaniu

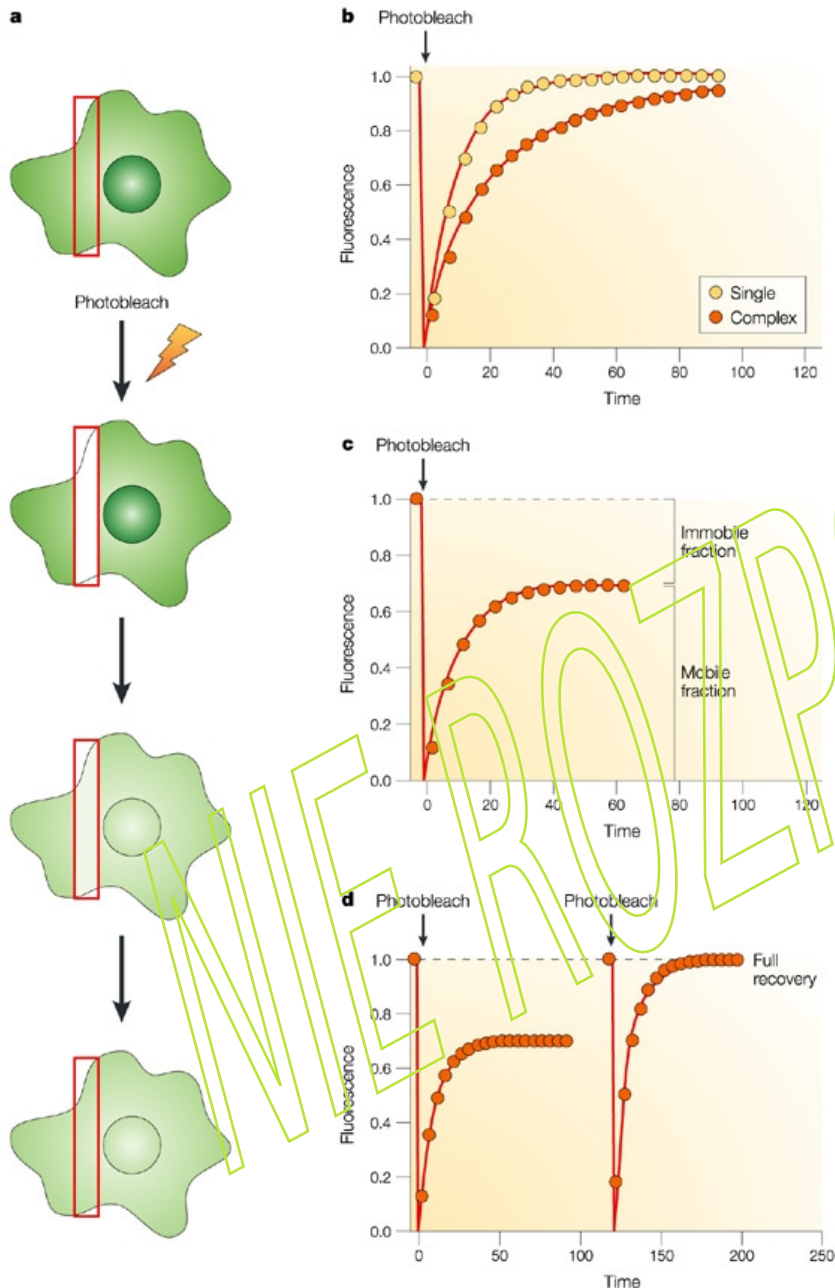
$$\langle r^2 \rangle = 4Dt + (vt)^2$$

o współczynnikach dyfuzji  $D = 0,25$  do  $0,35 \mu\text{m}^2/\text{s}$  i prędkościach w zakresie  $v = 0,2$  do  $1,4 \mu\text{m}/\text{s}$ .





# Fotowysbielanie (FRAP)



Odzyskanie fluorescencji po fotowysbielaniu\*

a) Komórkę eksprymującą cząsteczki fluorescencyjne (np. białko połączone z GFP) obrazuje się przy niskim poziomie światła przed i po fotowysbielaniu paska zaznaczonego na czerwono. Monitoruje się przywrócenie fluorescencji w fotowysbielonym obszarze z upływem czasu. Analiza zwykle obejmuje kompensację zmniejszenia fluorescencji całych komórek (przedstawionej na dolnych rysunkach).

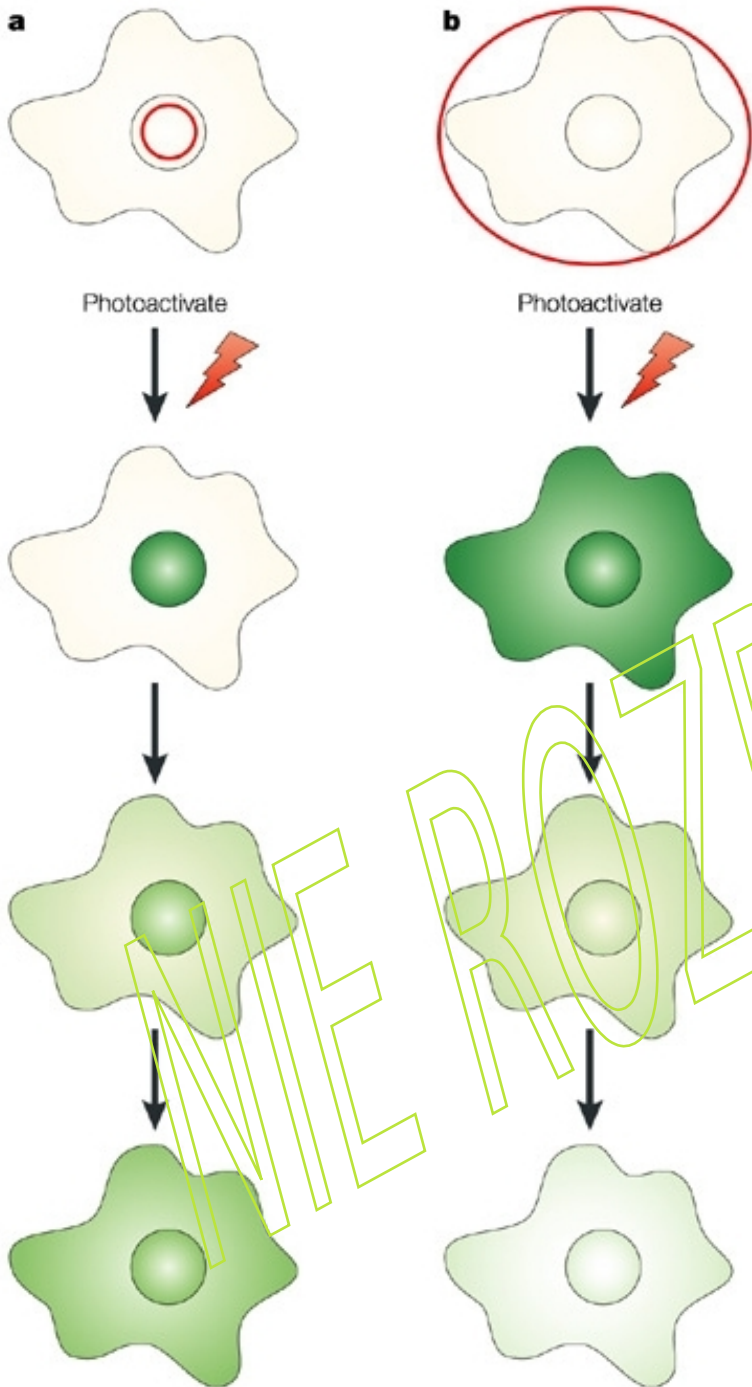
b) Odzyskanie fluorescencji przez obszar fotowysbielony można określić ilościowo w postaci tzw. krzywej FRAP. Wykresy przedstawiają krzywe FRAP wysymulowane dla układu zawierającego jeden rodzaj fluoroforów (pojedyncza krzywa wykładnicza pokazana w żółtych kółkach) lub dla dwóch równolicznych populacji fluoroforów o różnych współczynnikach dyfuzji (podwójna krzywa wykładnicza pokazana w pomarańczowych kółkach). Należy zauważyć, że kinetyka odzyskiwania fluorescencji w drugim przypadku trwa znacznie dłużej, aby osiągnąć plateau.

c) Poziom odzyskania fluorescencji w obszarze fotowysbielonym ujawnia ruchome i nieruchome frakcje fluoroforu w komórce.

d) Prostim testem na fotoindukowane nieruchome frakcje jest przeprowadzenie drugiego eksperymentu FRAP w tym samym obszarze zainteresowania. W tym przykładzie część mobilna początkowego eksperymentu FRAP wynosi ~70%. Poziom odzysku można określić normalizując sygnał fluorescencyjny w tym obszarze i powtarzając eksperyment FRAP. W przypadku braku fotouszkodzeń należy obserwować całkowity powrót do wyjściowej fluorescencji.



# Fotoaktywacja

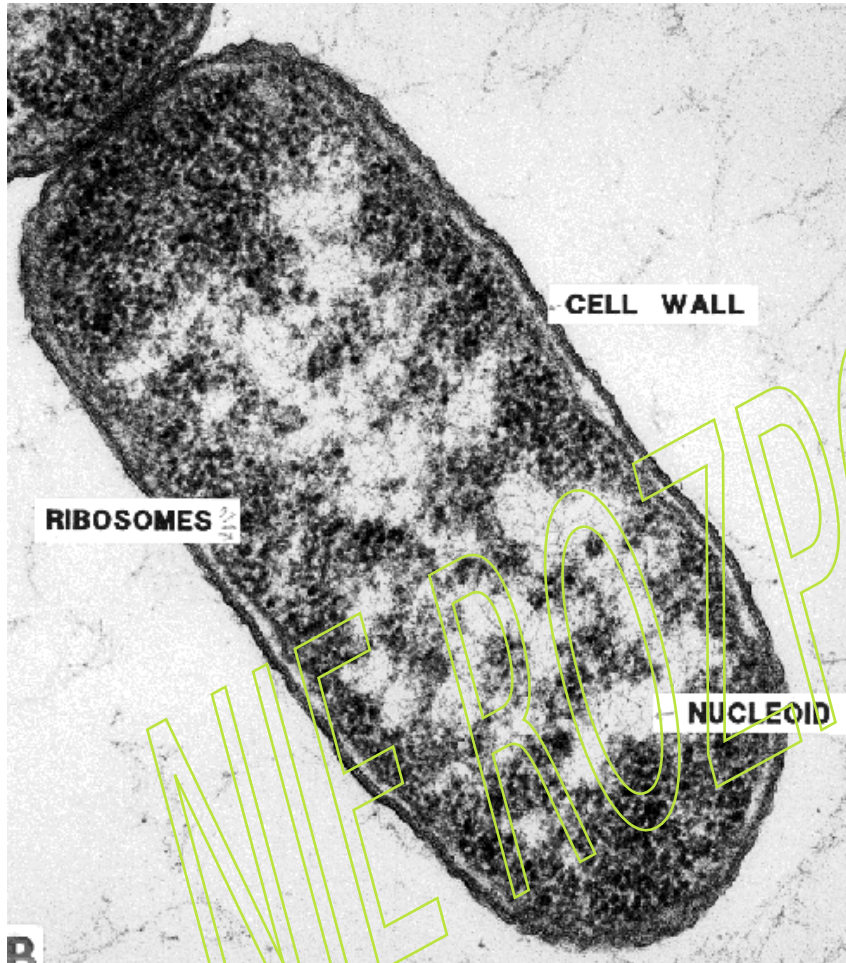


a) Przed fotoaktywacją komórki, w których zachodzi ekspresja białek fotoaktywowanych wykazują niewielką fluorescencję w obszarze widmowym używanym do wykrywania zwiększonej fluorescencji. Po fotoaktywacji wybranego obszaru (zaznaczonego na czerwono) obserwuje się wzrost fluorescencji. Oświetlając bezpośrednio określone populacje cząsteczek, takie jak pula jądrowa fluoroforu, można monitorować ruch z tego regionu w całej komórce.

b) Alternatywnie, całą komórkę można fotoaktywować i śledzić zmiany fluorescencji w czasie.

Ponieważ nowo syntetyzowane białka nie są wykrywane ani fotoaktywowane podczas eksperymentu obrazowania, fotoaktywowane białka fluorescencyjne pozwalają ominąć ten możliwy artefakt i mogą umożliwić monitorowanie losu białek znakowanych fluorescencyjnie za pomocą „znakowania impulsem optycznym”.

# Badanie dyfuzji GFP w *E. coli* metodami FRAP i PA



Mikrofotografia elektronowa typowej bakterii *E. coli*.



Zdjęcie ze skaningowego mikroskopu elektonowego *Escherichia coli*, rosnących w hodowli i przyklejonych do szkiełka nakrywkowego.



# **Protein Mobility in the Cytoplasm of *Escherichia coli*** **MICHAEL B. ELOWITZ, MICHAEL G. SURETTE, PIERRE-ETIENNE** **WOLF, JEFFRY B. STOCK, AND STANISŁAS LEIBLER**

**JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 181:197-203 (1999)**

**W tej pracy przedstawiamy nieinwazyjne pomiary pozornego współczynnika dyfuzji białka zielonej fluorescencji (GFP) w cytoplazmie *Escherichia coli*. Pomiarów tych dokonano na dwa sposoby:**

**poprzez fotowysbielanie fluorescencji GFP**

**i**

**poprzez fotoaktywację fluorescencyjnego stanu GFP emitującego światło czerwone.**

**W przypadku eksperymentów z fotowysbielaniem komórkę umieszczano w środku pola widzenia, intensywność lasera zmniejszono  $10^3$ -krotnie, a plamkę lasera przenoszono na jeden biegun bakterii. Migawkę zaprogramowano na okresowe impulsy świetlne trwające 300 ms, oddzielone przerwami 8  $\mu$ s. Czas trwania impulsu fotowysbielającego wybrano tak, aby był porównywalny z czasem dyfuzji przez komórkę, tak aby uzyskać duży gradient stężeń przy minimalnym fotowysbielaniu GFP.**

**W przypadku fotoaktywacji, początkowo ( tj. przed fotoaktywacją) komórki były bardzo słabo lub niewidoczne w czerwonej fluorescencji, więc wybierano je w jasnym polu (czerwony filtr długoprzepustowy nad kondensatorem zapobiegał niezamierzonej fotoaktywacji). Komórki ustawiono i napromieniowano jak opisano powyżej, z tą różnicą, że do fotoaktywacji stanu czerwonego GFP zastosowano znacznie krótsze (30 ms) impulsy laserowe (o tej samej mocy).**

A

B

C

D

E

F



Migawki z eksperymentów fotowycieplania i fotoaktywacji. W każdej kolumnie pierwszy wiersz pokazuje komórkę przed impulsem lasera. Kolejne trzy obrazy pokazują rozkład fluorescencji komórkowej w kolejnych momentach po impulsie lasera. Kolumny A, C, E i F pokazują fotowycieplanie (zestaw filtrów GFP, sztuczny kolor zielony). Kolumny B i D pokazują fotoaktywację (zestaw filtrów rodaminy, sztuczny kolor czerwony).

Kolumny A do D pokazują dwie różne komórki ekspresjonujące GFP (A i B pokazują komórkę 1; C i D pokazują komórkę 2). Kolumny E i F pokazują komórki traktowane cefaleksyną, ekspresjonujące GFP, wycieplone najpierw na biegunie (E), a następnie w środku (F). Punkty czasowe są następujące ( $t = 0$  jest ustalane arbitralnie jako koniec impulsu lasera). (A) -0,42, 0,05, 0,18, 0,32 i 4,3 s. (B) -0,08, 0,08, 0,35, 0,62 i 4,7 s. (C) -0,5, 0,03, 0,10, 0,23 i 0,83 s. (D) -0,1, 0,03, 0,23, 0,63 i 1,7 s. (E) -0,57, 0,03, 0,43, 0,77 i 2,8 s. (F) -0,57, 0,03, 0,20, 0,37 i 1,8 s. Znacznik = 4  $\mu\text{m}$ .



**Analiza danych eksperymentalnych opiera się na jednowymiarowym równaniu ciągłej dyfuzji**

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2}$$

**z warunkami brzegowymi**

$$\frac{\partial C}{\partial x}(0,t) = \frac{\partial C}{\partial x}(L,t) = 0$$

**gdzie L jest długością *E. coli*. Ogólne rozwiązanie tego równania można zapisać w postaci szeregu Fouriera:**

$$C(x,t) = \sum_{n=0}^{\infty} A_n(t) \cos(q_n x)$$

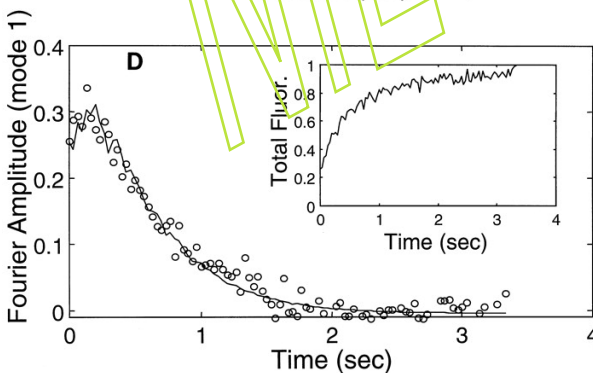
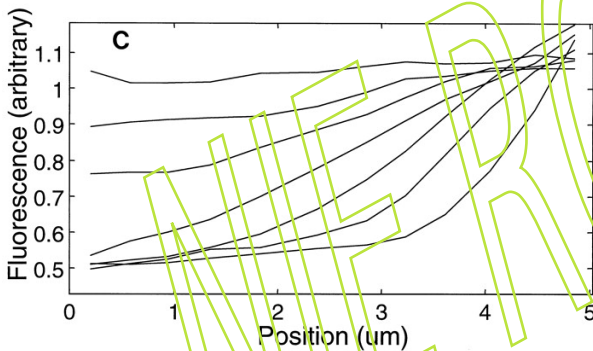
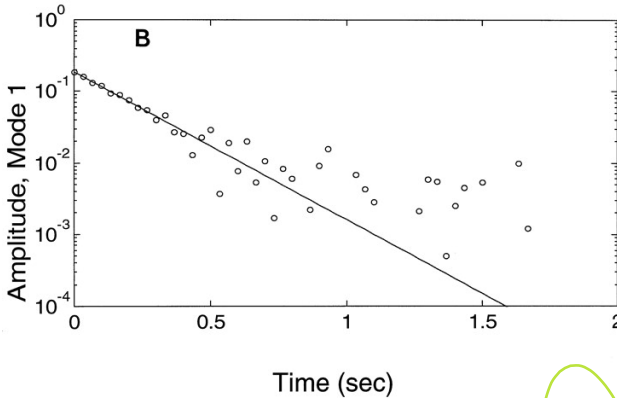
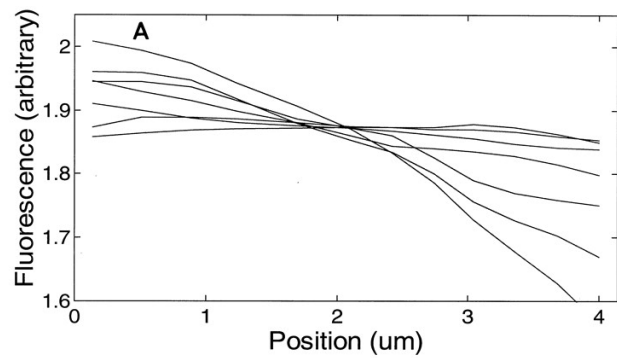
**gdzie  $A_n(t) \equiv A_n(0) \exp(-q_n^2 D t)$ ,  $q_n \equiv n \pi L$ , i  $n=1, 2, 3, \dots$ . Tutaj  $C(x, t)$  to stężenie GFP w pozycji  $x$  i w czasie  $t$ , a  $D$  to współczynnik dyfuzji. Zakłada się, że intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia GFP:**

$$I(x,t) = \alpha C(x,t)$$

**Aby dokonać analizy danych, wyznacza się amplitudy Fouriera  $A_n(t)$  dla każdej ramki z danych  $I(x,t)$  za pomocą wzoru:**

$$A_n(t) = \frac{2}{L} \int_0^L \cos(q_n x) I(x,t) dx$$

**Ponieważ  $A_n(t)$  jest proporcjonalne do  $\exp(-q_n^2 D t)$ , otrzymywano je z fitowania funkcji wykładniczych postaci  $A \exp(-Bt) + C$ , gdzie  $C$  uwzględnia potencjalne trwałe gradienty intensywności, które mogą wynikać z niejednorodności przekroju poprzecznego bakterii lub nierównomiernego natężeniu oświetlenia.**



**Analiza danych dotyczących fotowycielania (A i B) i fotoaktywacji (C i D). Do pomiarów  $I(x,t)$  w A i C fituje się równanie**

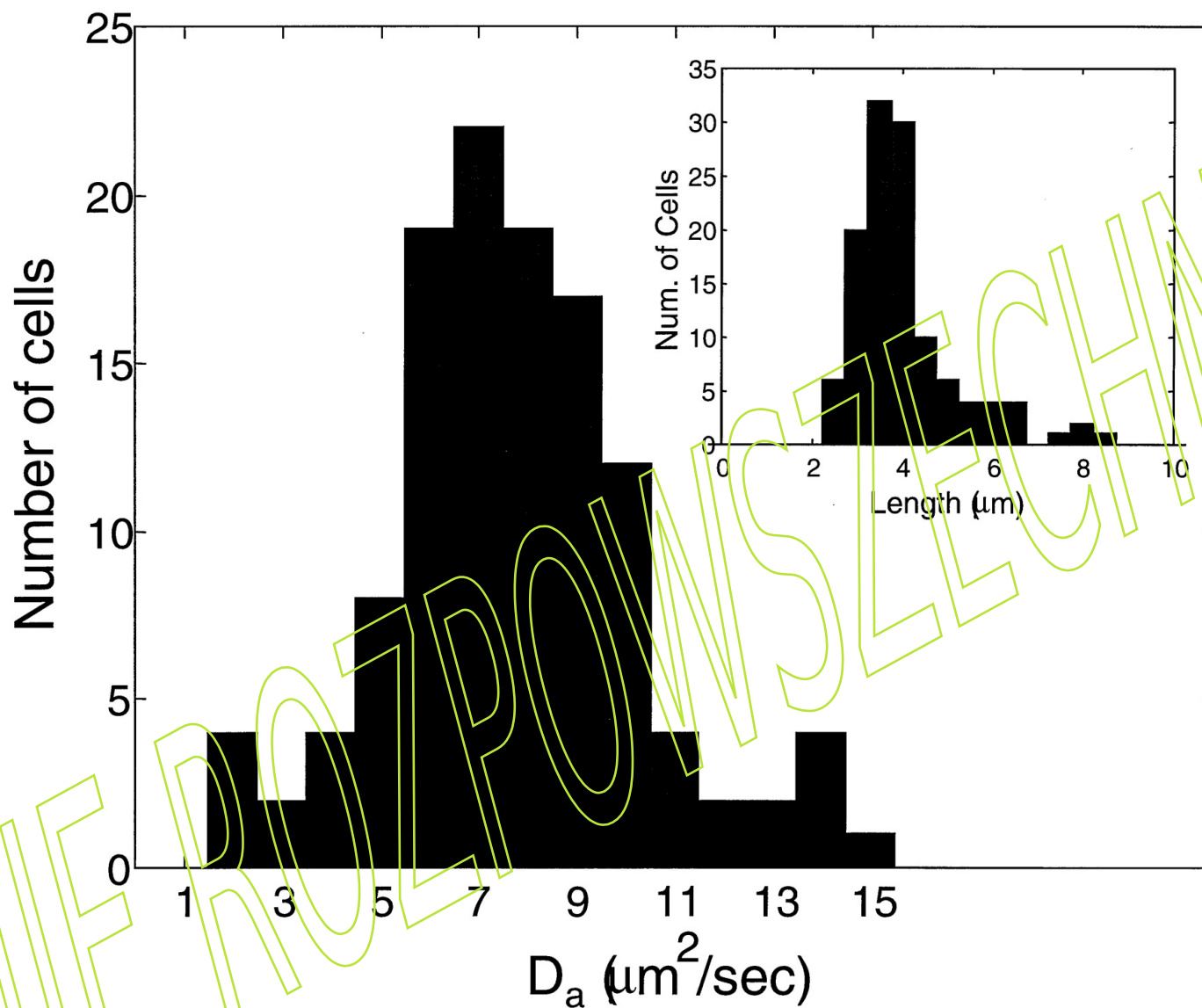
$$I(x,t) = \alpha \sum_{n=0}^1 A_n(t) \cos(q_n x)$$

**skąd otrzymuje się zależność od czasu pierwszej amplitudy  $A_1$ . Pomiar są zbyt krótkie w czasie, aby można był określić  $A_n$  z  $n > 1$ . (A) Profile intensywności fluorescencji przy 0,03, 0,1, 0,17, 0,3, 0,5, 0,83 i 1,5 s po zakończeniu fotowycielania dla komórki ekspresjonującej GFP (Tylko wyrazy w szeregu Fouriera o niższych numerach zanikają na tyle wolno, że można je śledzić za pomocą kamer wideo; w tym badaniu wykorzystano wyłącznie wyrazy z  $n=1$  i  $n=2$ ).**

**(B) Czasowy zanik pierwszej amplitudy Fouriera dla komórki z części A rysunku. Kółka przedstawiają punkty danych; linia ciągła jest dopasowana do funkcji wykładniczej  $A \exp(-Bt) + C$ . Pozorny współczynnik dyfuzji  $D_a$  wyznaczono z szybkości zaniku amplitudy pierwszego modu Fouriera.**

**(C) Profile intensywności fotoaktywacji pokazane w tych samych punktach czasowych, co w panelu A.**

**(D) Czasowy zanik pierwszej amplitudy Fouriera. Kółka przedstawiają punkty danych. Dopasowanie rozkładu wykładniczego, skorygowanego o całkowite wzmocnienie fluorescencji komórkowej, pokazano linią ciągłą. Wstawka pokazuje całkowitą fluorescencję komórkową  $\alpha(t)$ . W panelu B całkowita intensywność po fotowycielaniu jest stała (nie pokazano). Średni stosunek  $D_a$  zmierzony przez fotoaktywację do  $D_a$  zmierzonego przez fotowycielanie (na tej samej komórce) ( $\pm$  SD) wyniósł  $1,1 \pm 0,15$  dla 34 komórek. Oznacza to, że obie metody dostarczają równoważnych informacji.**

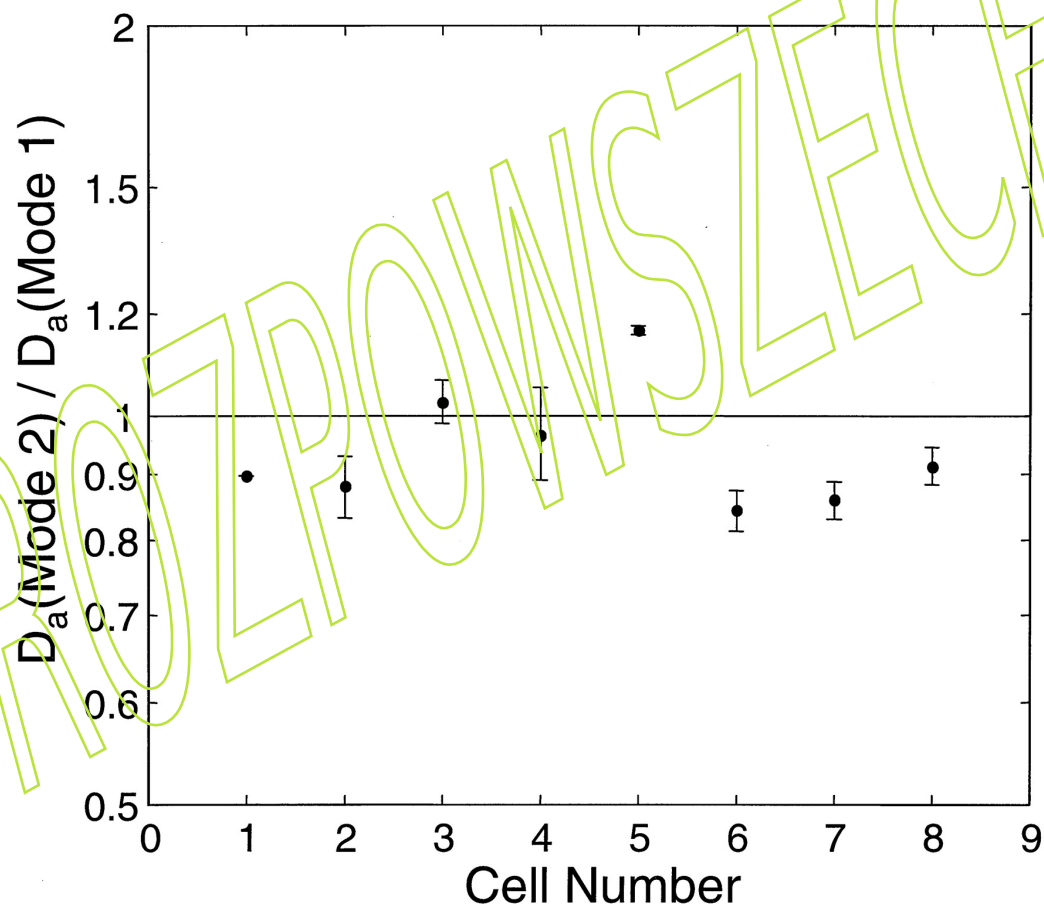


Histogram pozornych współczynników dyfuzji dla 120 komórek *E. coli* zmierzonych metodą fotowycielania. Wartość  $D_a$  przypisana do każdej komórki jest średnią uzyskaną z kilku kolejnych impulsów laserowych. Średnia wartość  $D_a$  dla wszystkich komórek wynosi  $7,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , przy odchyleniu standardowym (SD) wynoszącym  $2,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

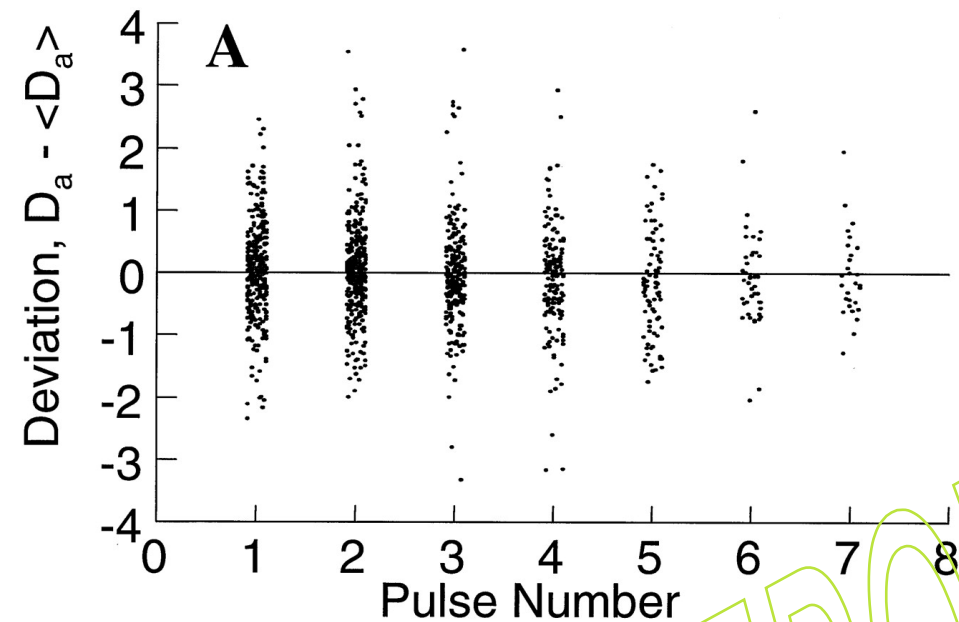
(Wstawka) Rozkład długości komórek dla tych samych danych. Nie ma istotnej korelacji między długością komórki a pozornym współczynnikiem dyfuzji.



Ponieważ czas dyfuzji jest proporcjonalny do  $L^2$ , długie komórki umożliwiają wyznaczenie drugiego modu zaniku. Aby otrzymać stosunek szybkości zaniku pierwszego i drugiego modu Fouriera dla tej samej bakterii *E. coli*, komórki traktowano cefaleksyną, lekiem hamującym przegrody i powodującym wzrost nierozdzielonych komórek w długie włókna. Wybrano jednaście komórek o długości od 7,5 do 11  $\mu\text{m}$ .

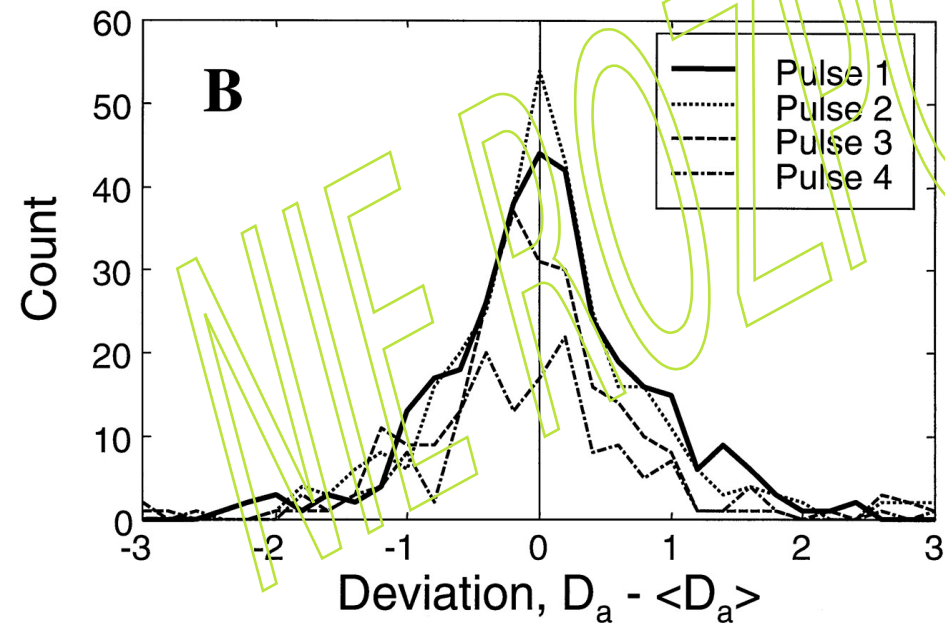


Stosunek pozornych współczynników dyfuzji z modów Fouriera 1 i 2 na pojedynczych komórkach traktowanych cefaleksyną. Słupki błędów wskazują SD pomiarów dla kilku impulsów laserowych na tej samej komórce. (W przypadku komórek 1 i 5 wykonano tylko jeden impuls, dlatego nie ma słupków błędów.)



Odchylenia indywidualnych pomiarów dla pojedynczej komórki od wartości średnich. Dla każdej komórki eksperyment fotowysielania wykonano kilkakrotnie (kilkukrotne pomiary  $D_a$ ).

(A) Wartość  $D_a$  uzyskana dla danego pomiaru („Numer impulsu”) pomniejszona o średnią wszystkich takich pomiarów w tej samej komórce, jako funkcję liczby impulsów. Przy wyższych liczbach impulsów jest mniej punktów, ponieważ wraz z rosnącą liczbą impulsów zmniejsza się liczba komórek nadających się do kolejnych eksperymentów.



(B) Histogramy danych przedstawionych w panelu A, pokazujące liczbę punktów jako funkcję odchylenia od średniej, dla pierwszych czterech impulsów.

Wnioski: Rozkłady są generalnie symetryczne względem wartości średniej i nie wykazują systematycznego trendu przy kolejnych impulsach laserowych. Szerokość rozkładu wynosi  $2,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , czyli jest ponad trzykrotnie większa od błędu pomiaru. Odzwierciedla naturalną zmienność  $D_a$  występującą w populacji komórek.

# Liniowy FRAP obserwowany w konfokalnym laserowym mikroskopie skaningowym do pomiaru dyfuzji w małych trójwymiarowych obszarach.

Biophysical Journal 92:2172-2183 (2007)

Konfokalny laserowy mikroskop skaningowy (CLSM) umożliwia fotowyswielanie dowolnych obszarów preparatu zdefiniowanych przez użytkownika.

W konwencjonalnym mikroskopie fluorescencyjnym cała próbka jest oświetlona przez wiązkę wzbudzącą i obrazowana jest w całości. W mikroskopie konfokalnym światło wzbudzące jest ogniskowane w jednym punkcie próbki, w danej chwili uzyskuje się obraz tylko z tego punktu, a obraz całego preparatu uzyskuje się skanując go punkt po punkcie (optyczne przekroje). Aby wyeliminować fluorescencję dochodzącą do okularu spoza obszaru ogniska, która działa jak czynnik zaburzający obserwowany obraz, mikroskopia konfokalna wykorzystuje przesłony z małymi otworami (pinhole), umieszczone przed okulariem, które pozwalają na eliminację promieniowania wyemitowanego poza ogniskiem. Pinhole za źródłem światła wzbudzącego czyni je źródłem punktowym. Nazwa „konfokalny” pochodzi od tego, że położenie „pinhole” jest sprzężone (**conjugate**) z położeniem ogniska (to the **focal** point), zatem jest to **confocal pinhole**.

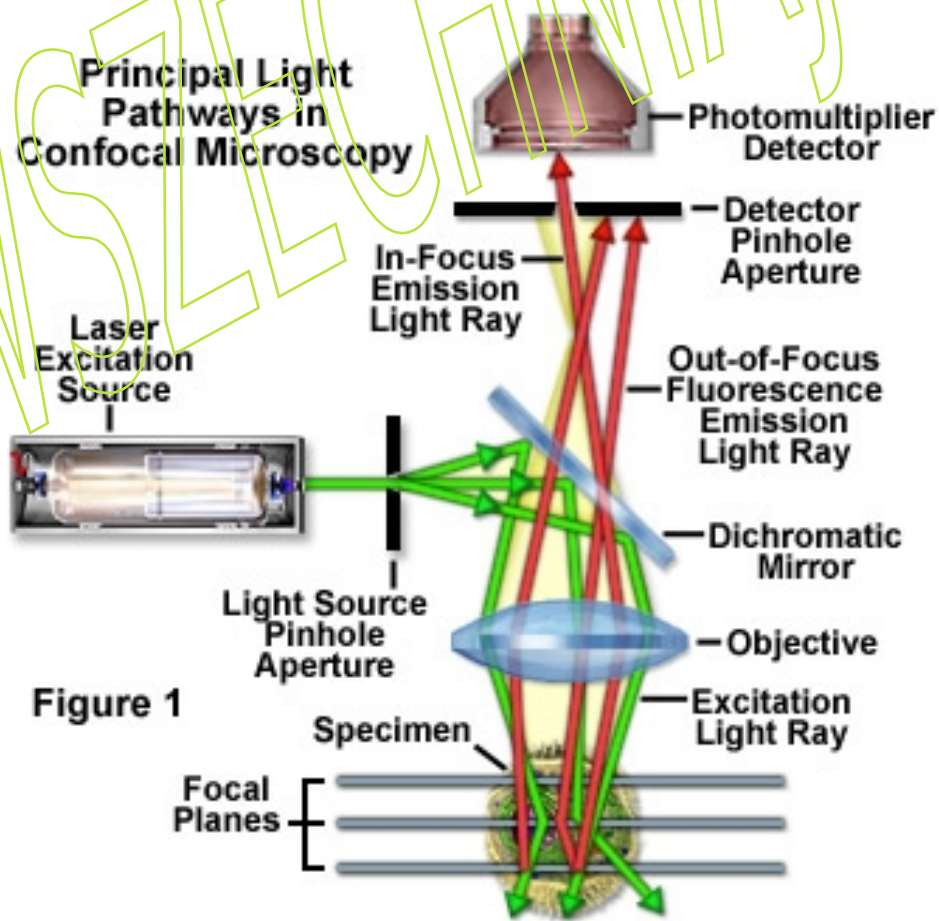


Figure 1



(A) Skupiona wiązka lasera o efektywnej rozdzielczości  $r_{0e}$  jest skanowana wzdłuż kierunku  $x$  z prędkością  $v$ . Od pozycji  $x = -l/2$  do  $+l/2$  intensywność lasera jest zwiększona w celu fotowyswielenia odcinka linii o długości  $l$ . W tym przykładzie długość odcinka wynosi  $10 \times r_{0e}$ .

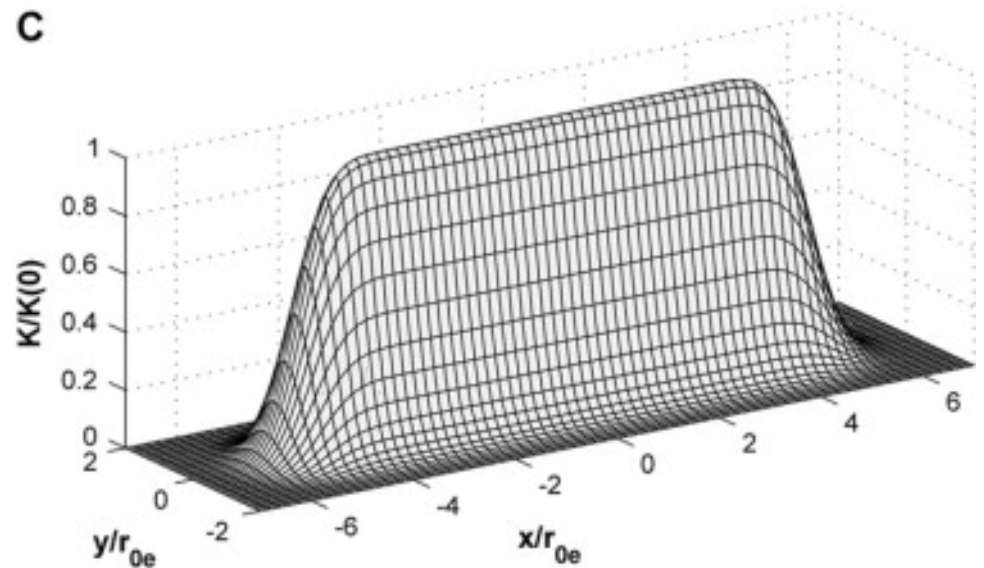
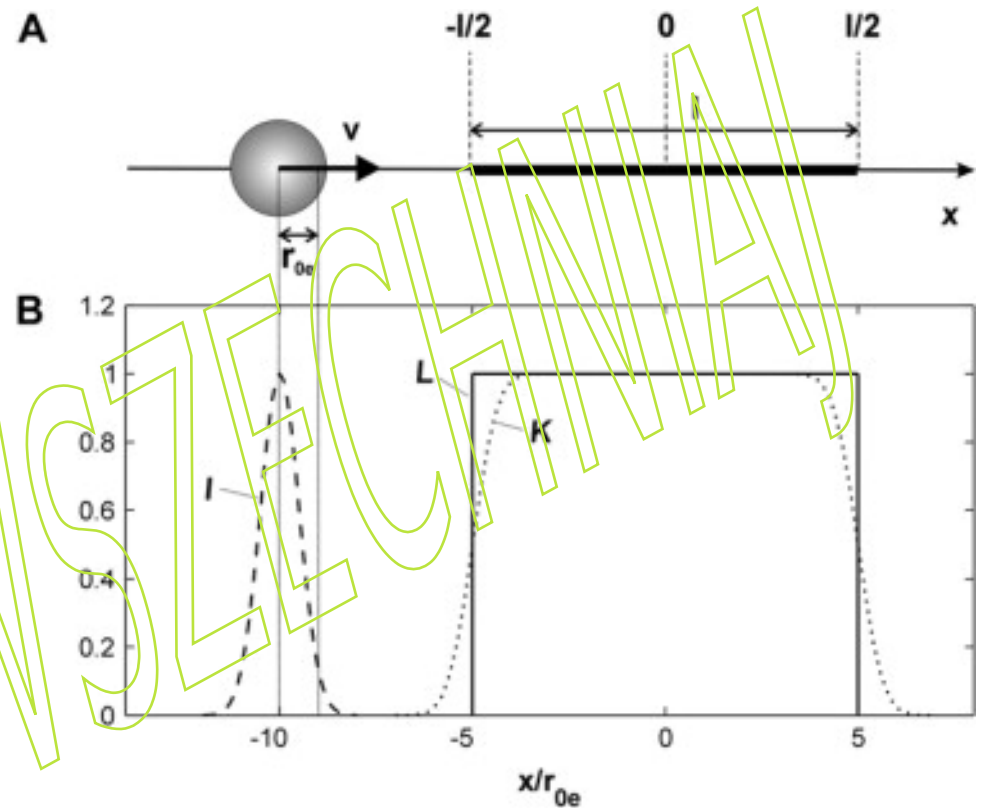
(B) Wiązka lasera ma radialny rozkład Gaussa intensywności  $I$  z rozdzielczością  $r_{0e}$ . Funkcja  $L$  opisuje modulację natężenia lasera i wynosi 1 dla  $x \in [-l/2, +l/2]$  i 0 gdziekolwiek indziej. Z funkcji  $I$  oraz  $L$  otrzymuje się efektywny rozkład intensywności  $K$  dla wybielonego odcinka linii.

(C) Wykres powierzchniowy funkcji 2-D  $K(x,y)$ .  $K(x,y,z)$  to rozkład światła wybielającego.  $K$  jest jednorodne wzdłuż  $x$  „daleko od krawędzi” i ma profil Gaussa wzdłuż  $y$ .  $K(0)$  nazywa się parametrem wybielenia, ponieważ określa bezpośrednio stopień wybielenia.

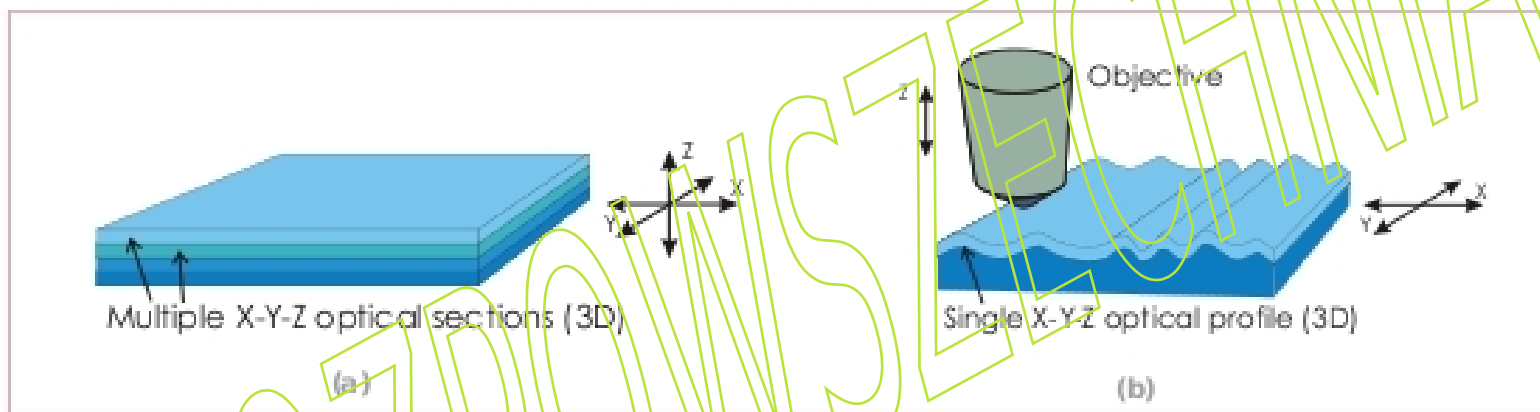
$$K(0) = \sqrt{\frac{\pi}{2}} r_{0e} I_{0b} \frac{\alpha}{v}$$

$$I_b(x, y, z) = I_{0b} e^{-\frac{(x^2 + y^2)}{r_0^2}} e^{-z^2/z_0^2}$$

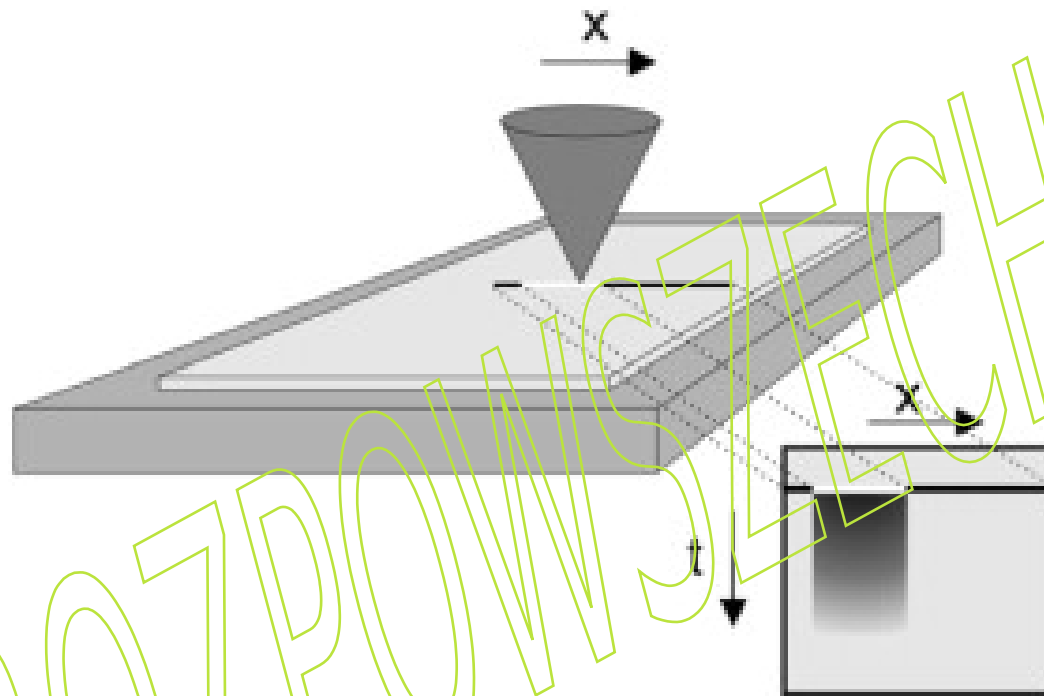
Parametr  $\alpha$  to szybkość fotowyswielania fluoroforu,  $v$  prędkość skanowania wiązki lasera wybielającego,  $I_{0b}$  to parametr w  $I_b(x,y,z)$ , który jest trójwymiarowym Gaussowskim rozkładem intensywności wiązki wybielającej, w kierunkach radialnym i osiowym, z odpowiednimi rozdzielczościami  $r_0$  i  $z_0$ . (kierunek osiowy jest związany ze zmianami położenia ogniska wiązki w głąb preparatu)



W mikroskopii konfokalnej konieczne jest zmapowanie próbki, aby uzyskać pełny zestaw danych. Mapowanie można przeprowadzić na dwa sposoby – skanując wiązkę światła wzdłuż próbki systemem oscylujących zwierciadeł lub przesuując samą próbkę w kierunkach X-Y lub X-Y-Z wykorzystując efekt piezoelektryczny.



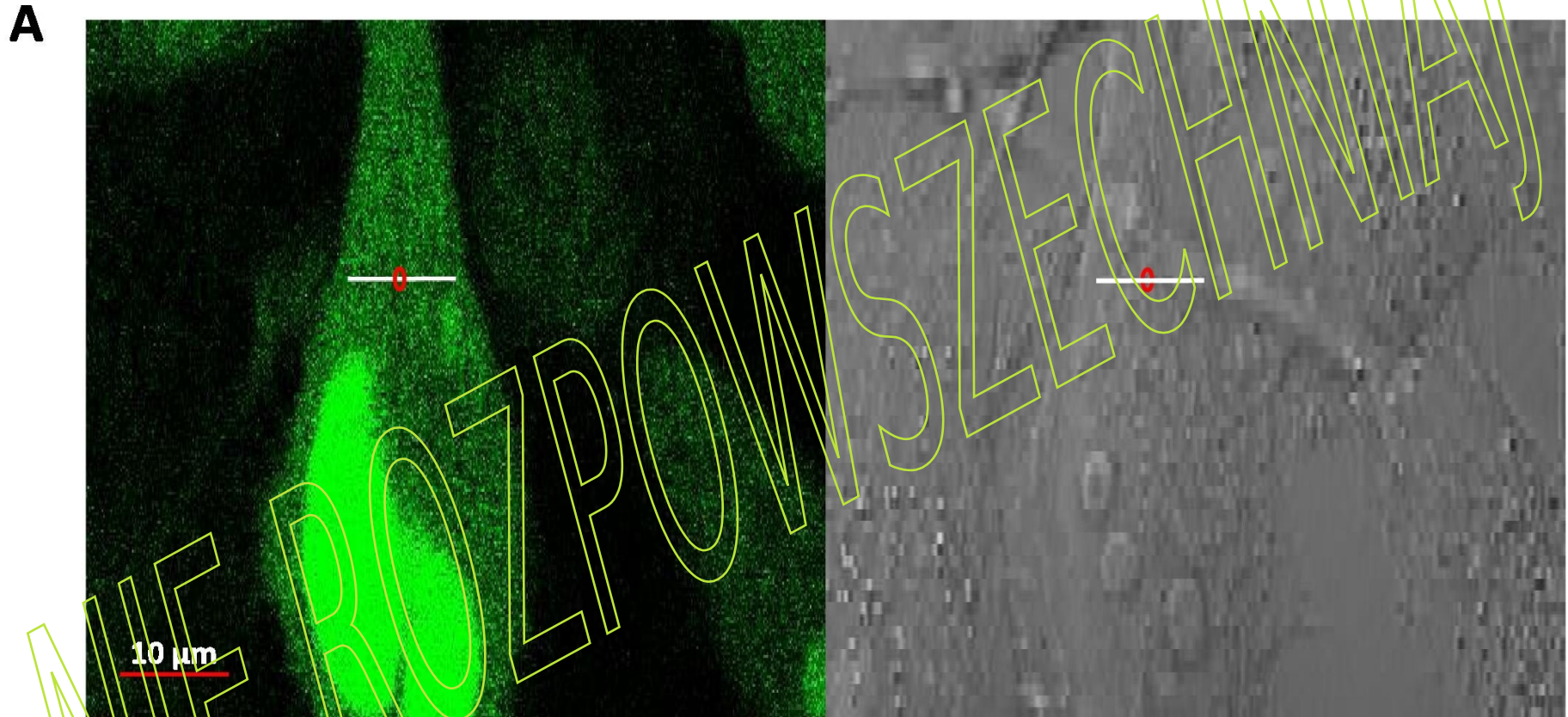
Kiedy należy ujawnić strukturę 3D w całej objętości próbki, można podjąć się żmudnego zadania polegającego na wykonaniu wielu optycznych przekrojów poprzecznych X-Y wzdłuż osi Z (Rysunek a). Uzyskane informacje są przesyłane do oprogramowania w celu rekonstrukcji szczegółowego obrazu 3D. Technika ta stanowi podstawę mikroskopii konfokalnej i jest niezwykle przydatna do analizy polimerów, nanomateriałów, układów scalonych, próbek farmaceutycznych i obiektów biologicznych. W zasadzie możliwa jest rekonstrukcja powierzchni 3D próbki na podstawie skanu X-Y-Z. Jeśli jednak zależy nam na uzyskaniu jedynie profilu powierzchni, można to zrobić znacznie szybciej, stosując technikę autoogniskowania. Podczas skanowania powierzchni próbki ognisko obiektywu mikroskopu porusza się w górę i w dół, aby ustawić ostrość dokładnie na powierzchni próbki (Rysunek b).



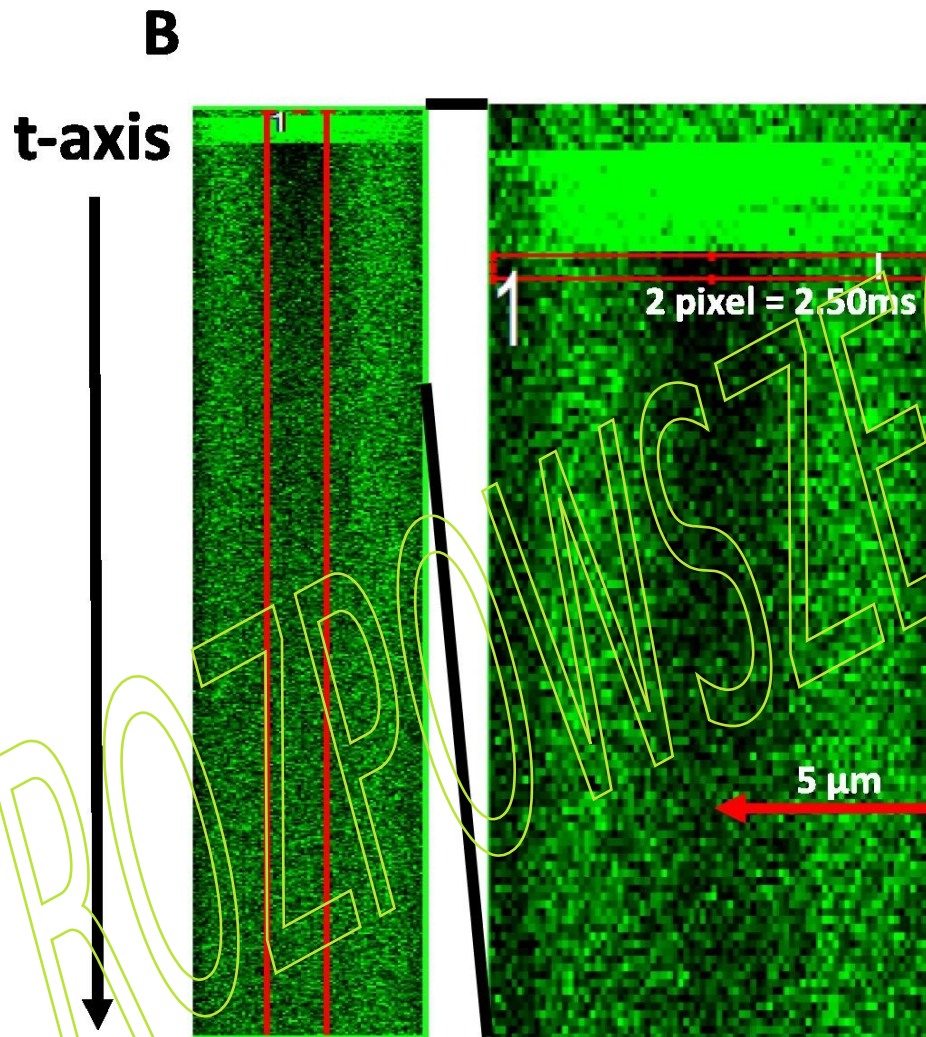
Jeśli CLSM pracuje w trybie xt, ta sama linia jest skanowana wielokrotnie, w wyniku czego obraz xt składający się z tej samej linii jest wyświetlany w miarę upływu czasu. Tryb xt może być używany w modelu liniowym FRAP. Najpierw rejestruje się kilka skanów przed wybielaniem przy niskim natężeniu lasera, aby określić intensywność fluorescencji przed wybielaniem. Następnie zdefiniowany przez użytkownika odcinek linii jest wybielany przy dużej intensywności lasera. Na koniec wiązka lasera jest ponownie przełączana na niską intensywność, aby zarejestrować odzyskiwanie fluorescencji po fotowybielaniu.



# Line-FRAP, wszechstronna metoda pomiaru szybkości dyfuzji *in vitro* i *in vivo*

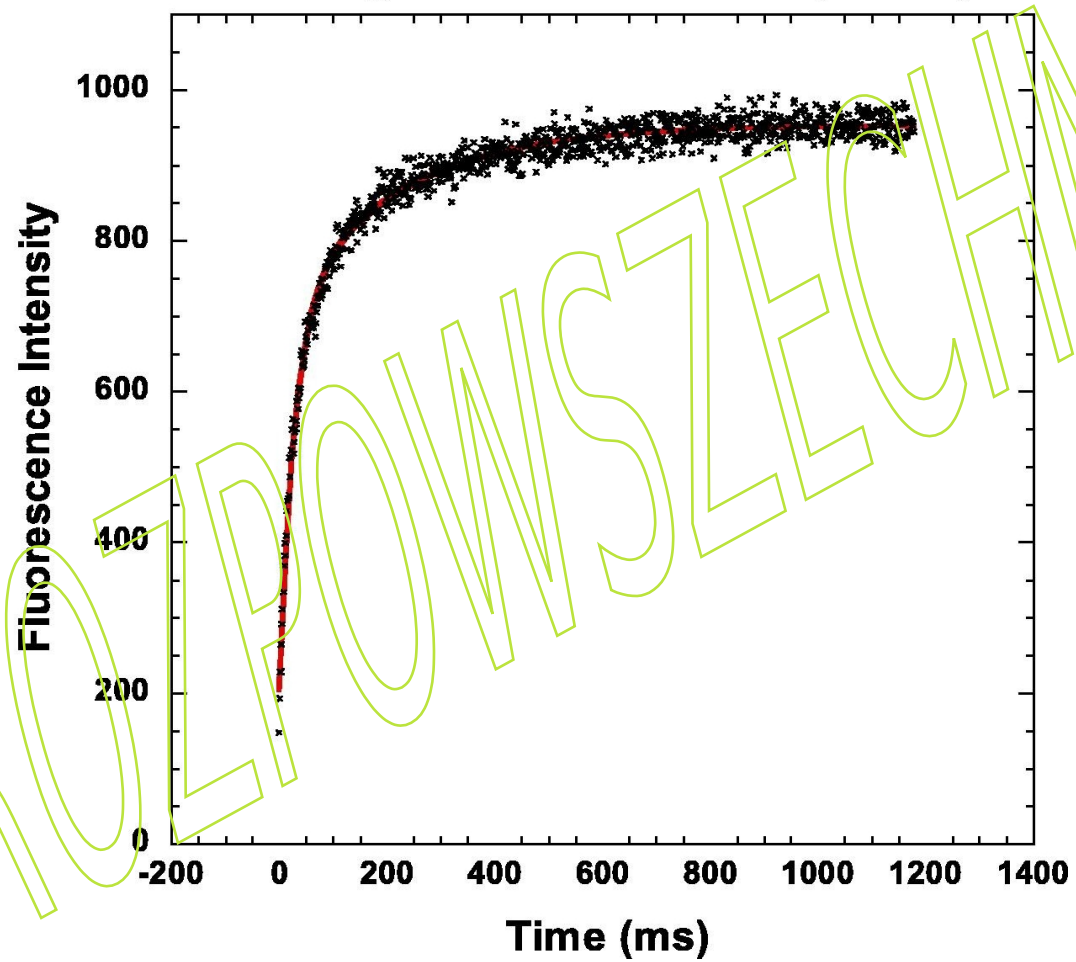


**(A)** Line-FRAP przeprowadzony w komórce HeLa transfekowanej CFP (komórka HeLa ekspresująca CFP, cyjan=szarobłękitny, sinoniebieski, białko niebieskiej fluorescencji). Biała linia reprezentuje linię skanowania; czerwony okrągły obszar oznacza obszar wybielania.



**(B):** (B): Pojedyncza linia skanowania w funkcji czasu (w kierunku pionowym), łącznie z wybielaczem. Czerwony prostokąt oznacza obszar badany (ROI, region of interest). Pokazano także zbliżenie profilu Line-FRAP, gdzie poziomy prostokątny obszar (czerwone znaczniki ROI) oznacza intensywność fluorescencji jako funkcję długości w poprzek linii skanowania.

**C** Averaged FRAP Profiles (N=30)



(C): Średnia z 30 krzywych FRAP w funkcji czasu. Czerwoną linię uzyskano dopasowując dwueksponencjalną funkcję do danych odzyskiwania fluorescencji. (N = 30; Współczynnik korelacji dopasowania wykładniczego:  $R = 0,98$ )