

Παρακολουθώντας τη Δυναμική Βιομορίων σε Ζωντανά Κύτταρα: Σύγχρονα Απεικονιστικά Εργαλεία

Δήμητρα Θωμαΐδου

Ερευνήτρια

Εργαστήριο Κυτταρικής & Μοριακής Νευροβιολογίας και

Μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας

Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Σύγχρονες εξελίξεις στην έρευνα της απεικόνισης, της μοριακής βιολογίας, της χημείας και της επιστήμης των υπολογιστών οδήγησαν στην εμφάνιση του κλάδου της απεικόνισης (Imaging) σε μοριακό επίπεδο. Η χρήση απεικονιστικών τεχνικών στη βιοϊατρική έρευνα και τη διάγνωση έχει πρόσφατα σημειώσει αλματώδη ανάπτυξη, συμβάλλοντας σε μεγάλο βαθμό στην απάντηση ερωτημάτων που αφορούν την παθογένεια και την κυτταρική βάση λοιμωδών, αυτοάνοσων και νευροεκφυλιστικών νόσων. Οι απεικονιστικές τεχνικές χρησιμοποιούνται σε διεθνές επίπεδο για την μελέτη και διαλεύκανση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην φυσιολογική ανάπτυξη του ανθρώπινου οργανισμού καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα οι απεικονιστικές τεχνικές, και συγκεκριμένα της οπτικής μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα και ιστούς, χρησιμοποιούνται στην βασική έρευνα για την μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, πρόσδεσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών στο DNA, έκφρασης γονιδίων, μηχανισμών που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την διαφοροποίηση των κυττάρων, αλλά και ως διαγνωστικά μέσα για την ταυτοποίηση ασθενειών και την εύρεση μοριακών δεικτών που συνδέονται με απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την καρκινογένεση.

Πρωταρχικός στόχος της έρευνας σε πολλούς κλάδους της βιολογίας όπως η κυτταρική βιολογία, η ανοσολογία, η νευροβιολογία, η αναπτυξιακή βιολογία και η μικροβιολογία είναι η κατανόηση βιολογικών διεργασιών σε ολόκληρο τον οργανισμό, στο επίπεδο του ιστού, του κυττάρου και στο μοριακό επίπεδο. Στα πλαίσια αυτά είναι απαραίτητη η χρήση τεχνολογίας που επιτρέπει την

παρακολούθηση των βιολογικών διεργασιών *in situ* και η δυνατότητα να εξάγει κανείς ποσοτική πληροφορία για την δυναμική της διεργασίας στον χώρο και τον χρόνο (spatio-temporal dynamics). Οι απεικονιστικές τεχνικές που βασίζονται στην χρήση φθορισμού και χρησιμοποιούν απεικόνιση πολλών παραμέτρων (multi-dimensional imaging) είναι πολύτιμα εργαλεία για μελέτες που στοχεύουν στην απεικόνιση και την ποσοτικοποίηση βιολογικών διεργασιών στο χρόνο και τον χώρο και ειδικότερα σε μελέτες με συνδιασμό τριών (3D-όγκος), τεσσάρων (4D-χρόνος) και πέντε (5D-πολλαπλά μήκη κύματος) διαστάσεων.

Συνεστιακή Μικροσκοπία 1- και 2-φωτονίων

Η χρήση του Συνεστιακού Μικροσκοπίου την τελευταία δεκαετία έχει αποτελέσει μια προσέγγιση που έχει δώσει σημαντική ώθηση στο χώρο της βιοιατρικής έρευνας με τη χρήση απεικονιστικών μεθόδων. Αυτό συμβαίνει γιατί η συνεστιακή μικροσκοπία παρουσιάζει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με την κλασική μικροσκοπία ευρέως πεδίου (wide field optical microscopy). Στη οπτική μικροσκοπία ευρέως πεδίου όλο το τριασδιάστατο πεδίο φωτίζεται ταυτόχρονα, συμπεριλαμβάνων και περιοχών του δείγματος που βρίσκονται εκτός εστίασης (out-of-focus regions), γεγονός που οδηγεί σε λήψη εικόνων με μη ξεκάθαρο και διακριτό σήμα, γεγονός που είναι ιδιαίτερα εμφανές σε ιστούς ή τομές μεγάλου πάχους. Αντίθετα στη συνεστιακή μικροσκοπία, με τη χρήση οπτικής πηγής laser και συνδιασμού διαφραγμάτων κατά τον φωτισμό και τη λήψη της εικόνας, πραγματοποιείται σημειακός φωτισμός και σάρωση του δείγματος στον άξονα *xy*, γεγονός που αποκλείει τη λήψη μη ειδικού σήματος από περιοχές εκτός εστίασης στον *z* άξονα. Επιπλέον, λήψη πολλαπλών οπτικών τομών ενός δείγματος στον *z* άξονα και ανασύστασή τους, καταστεί δυνατή την τρισδιάστατη απεικόνιση (3D-reconstruction) κυττάρων και ιστών, που δεν ήταν δυνατή με τη χρήση του συμβατικού οπτικού μικροσκοπίου. Τέλος, με την παράλληλη χρήση περισσότερων της μίας πηγών laser σε ένα συνεστιακό μικροσκόπιο, είναι δυνατή η παράλληλη διέγερση ενός μεγάλου εύρους διαφορετικών φθοριοχρωμάτων που εκπέμπουν σε διαφορετικά μήκη κύματος, επιτρέποντας έτσι την ταυτόχρονη απεικόνιση διαφορετικών μορίων σε κύτταρα και ιστούς (multi-colour imaging). Με τις τελευταίες τεχνολογικές εξελίξεις στο χώρο των απεικονιστικών μεθόδων μπορεί να πραγματοποιηθεί πλήρης διαχωρισμός των φασμάτων εκπομπής (spectral un-mixing) και ταυτόχρονη απεικόνιση μέχρι και δέκα διαφορετικών φθοριοχρωμάτων πάνω στο ίδιο δείγμα.

Η συνεστιακή μικροσκοπία ενός φωτονίου (single-photon confocal microscopy), έχει αντικατασταθεί, σε πολλές περιπτώσεις μελετών όπου απαιτείται απεικόνιση δυναμικών διεργασιών σε ζωντανούς ιστούς μεγάλου πάχους, από τη συνεστιακή μικροσκοπία δύο ή πολλαπλών φωτονίων (two-photon, multi-photon microscopy). Στη συνεστιακή μικροσκοπία 2-φωτονίων τα φθοριοχρώματα του δείγματος διεγείρονται ταυτόχρονα – όχι από ένα φωτόνιο όπως στη συνεστιακή μικροσκοπία ενός-φωτονίου – αλλά από 2 ή 3 φωτόνια, τα οποία προέρχονται όμως από πηγή laser υπέρυθρου φωτός 2-3 φορές χαμηλότερης ενέργειας (900nm) από ότι στη συνεστιακή μικροσκοπία ενός φωτονίου (280-500nm). Η ένταση δε της διέγερσης είναι ρυθμισμένη κατά τέτοιο τρόπο ώστε τελικά τα διεγερμένα φθοριοχρώματα εκπέμπουν στο ίδιο μήκος κύματος όπως και στη συνεστιακή μικροσκοπία 1-φωτονίου. Με την πολλαπλή αυτή διέγερση επιτυγχάνεται καλύτερη διείσδυση της ακτινοβολίας στο βάθος δειγμάτων μεγάλου πάχους, αλλά και πολύ μικρότερη θερμική καταστροφή του ιστού εξαιτίας της ακτινοβολίας διέγερσης.

Φθορίζουσες πρωτεΐνες και απεικόνιση ζωντανών κυττάρων

Παράλληλα με την τεχνολογία της συνεστιακής μικροσκοπίας, η ανακάλυψη και χρήση των **αυτο-φθορίζουσών πρωτεϊνών** έχει οδηγήσει τις απεικονιστικές προσεγγίσεις από την εποχή της στατικής παρατήρησης έκφρασης μορίων σε μονιμοποιημένα κύτταρα ή ιστούς, στη μελέτη και παρακολούθηση μέσα στο χρόνο (time-lapse) δυναμικών αλληλεπιδράσεων στο κυτταρικό και υπο-κυτταρικό επίπεδο. Οι αυτο-φθορίζουσες αυτές πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης **GFP** (green fluorescent protein), η οποία αρχικά απομονώθηκε το 1962 από την αυτο-φθορίζουσα μέδουσα του είδους *Aequorea Victoria*. Εκτοτε μια μεγάλη γκάμα παραλλαγών της πρωτεΐνης GFP έχουν κατασκευαστεί, οι οποίες εκπέμπουν σε διαφορετικά μήκη κύματος από την GFP που φτάνουν ως τα 529nm (cyan fluorescent protein, CFP; blue fluorescent protein, BFP; yellow fluorescent protein, YFP κλπ). Επιπλέον, η ανακάλυψη μιας άλλης οικογένειας ομολόγων με την GFP αυτο-φθορίζουσων πρωτεϊνών (GFP-like proteins), οι οποίες προέρχονται από κοράλλια του είδους *Anthozoa* και εκπέμπουν σε υψηλότερα μήκη κύματος, έχει διευρύνει τη διαθέσιμη ποικιλία φθοριοχρωμάτων που χρησιμοποιούνται για την *in vivo* μελέτη βιολογικών διεργασιών με τη χρήση απεικονιστικών μεθόδων (σχήμα 1).

Μια προσέγγιση που χρησιμοποιείται εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια για την *in vivo* παρακολούθηση της δυναμικής συγκριμένων πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα ή ιστούς, είναι η κατασκευή υβριδιακών κατασκευών (fusion proteins), στις οποίες η προς μελέτη πρωτεΐνη εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία, λόγω σύνδεσής του αμινοτελικού ή καρβοξυτελικού άκρου της με μια από τις προαναφερθείσες αυτοφθορίζουσες πρωτεΐνες. Οι σημασμένες πρωτεΐνες στη συνέχεια εισέρχονται μέσα σε ζωντανά κύτταρα, ιστούς ή και ολόκληρα ζώα με τη βοήθεια τεχνικών επιμόλυνσης κυττάρων αλλά και ιικών φορέων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως οχήματα (vehicles) για γονιαδιακή μεταφορά και έκφραση πρωτεϊνών και η τοπική και χρονική έκφραση τους, καθώς και η δυναμική τους μπορούν να παρακολουθηθούν και να καταγραφούν. Η προσέγγιση αυτή έχει οδηγήσει τα τελευταία χρόνια σε νέα γνώση προς την κατεύθυνση της διαλεύκανσης δυναμικών διεργασιών, όπως η μετανάστευση και η διαφοροποίηση των κυττάρων μέσω δυναμικών αλληλεπιδράσεων του κυτταροσκελετού και των μεμβρανικών συστημάτων, η ενδοκύττωση και ενδοκυττάρια μετακίνηση κυστιδίων, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και η δημιουργία μεγαλομοριακών συμπλόκων.

Μελέτη αλληλεπιδράσεων και κινητικής πρωτεϊνών με απεικονιστικές μεθόδους

Η επανάσταση που προήλθε από τη χρήση των αυτο-φθορίζουσών πρωτεϊνών ως ιχνηθέτες για την μελέτη της συμπεριφοράς πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα, οδήγησε στην ανάπτυξη νεότερων απεικονιστικών προσεγγίσεων που δίνουν ποιοτικές αλλά και ποσοτικές πληροφορίες σε σχέση με την δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων, το χρόνο ημιζωής και την ενδοκυττάρια μετακίνηση πρωτεϊνών. Στις προσεγγίσεις αυτές περιλαμβάνονται οι τεχνικές Μεταφοράς Ενέργειας Συντονισμού Φθορισμού (**Fluorescence Resonance Energy Transfer - FRET**), Αποκατάστασης Φθορισμού έπειτα από Φωτολεύκανση (**Fluorescence recovery after Photo-bleaching - FRAP**) και Απώλειας Φθορισμού έπειτα από Φωτολεύκανση (**Fluorescence loss in Photobleaching – FLIP**).

Η τεχνική **FRET** αποσκοπεί στην μελέτη της δυναμικής αλληλεπίδρασης δύο βιομορίων και τη μέτρηση της ακριβούς απόστασης μεταξύ τους κατά το διάστημα/ματα που αυτά αλληλεπιδρούν και αποτελεί πολύ σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της σύστασης και αποσύνδεσης πρωτεϊνικών συμπλόκων, καθώς και των αλληλεπιδράσεων αντιγόνων-αντισωμάτων και υποδοχέων με τους προσδέτες τους. Η βασική αρχή της μεθόδου (σχήμα 2) έγκειται στο γεγονός ότι αν δυο φθοριοχρώματα

στα οποία το φάσμα εκπομπής του ενός επικαλύπτεται με το φάσμα διέγερσης του άλλου βρίσκονται σε απόσταση 10-100Å μεταξύ τους, ένα μέρος της ακτινοβολίας διέγερσης του 1^{ου} φθοριοχρώματος (που βρίσκεται σε υψηλότερη ενεργειακά κατάσταση) θα μεταφερθεί στο 2^ο φθοριόχρωμα, με αποτέλεσμα αυτό να φθορίζει δίχως να έχει διεγερθεί με την ακτινοβολία που προκαλεί τη διέγερσή του υπό φυσιολογικές συνθήκες. Επιπλέον, η ένταση φθορισμού του 2^{ου} φθοριοχρώματος είναι μετρήσιμη με κατάλληλα λογισμικά και είναι ανάλογη της απόστασης των 2 φθοριοχρωμάτων και κατά συνέπεια των πρωτεϊνών με τα οποία είναι συνδεδεμένα. Η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει αρχίσει τα τελευταία χρόνια να αναπτύσσεται ραγδαία, νέα ζεύγη φθοριοχρωμάτων κατασκευάζονται και χρησιμοποιούνται και μια σειρά δυναμικών διεργασιών, οι οποίες είναι πολλές φορές ταχύτερες, όπως η είσοδος και έξοδος του Ca⁺⁺ στα ενδοκυτταρικά οργανίδια, έχουν διαλευκανθεί και καταμετρηθεί με τη χρήση της.

Οι τεχνικές **FRAP** και **FLIP** είναι δύο σχετιζόμενες απεικονιστικές προσεγγίσεις, που βασίζονται στην αρχή αποκατάστασης ή μη του φθορισμού έπειτα από φωτολεύκανση που προκαλείται με σύντομη αλλά πολύ ισχυρή ακτινοβολία συγκεκριμένης περιοχής του δείγματος με ακτίνα laser. Στόχο και των δύο μεθόδων αποτελεί η μελέτη της *in vivo* παραγωγής, ενδοκυττάριας ενεργητικής ή παθητικής μετακίνησης και χρόνου ημιζωής ενός ή περισσοτέρων βιομορίων. Επιπλέον οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με βιοχημικές προσεγγίσεις για την διερεύνηση του τρόπου και ρυθμού δέσμησης – αποδέσμησης πρωτεϊνών από ενδοκυτταρικά οργανίδια. Στην τεχνική **FRAP** (σχήμα 3) παρακολουθείται και καταμετρείται η κινητική της αποκατάστασης του φθορισμού σε μια πολύ μικρή περιοχή του κυττάρου που έχει υποστεί φωτο-λεύκανση. Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται πληροφορίες για το ρυθμό και τον τελικό χρόνο της ενδοκυττάριας μετακίνησης του σημασμένου υπό μελέτη βιομορίου από την τριγύρω περιοχή προς το σημείο που έχει υποστεί την φωτο-λεύκανση, έτσι ώστε να αποκατασταθεί ο χαμένος φθορισμός. Αντίστοιχα, στην τεχνική **FLIP** πραγματοποιείται μια επαναλαμβανόμενη διαδικασία φωτο-λεύκανσης με laser μιας περιοχής του κυττάρου και καταγράφεται ο ρυθμός μείωσης του σήματος φθορισμού από τις υπόλοιπες περιοχές του ίδιου κυττάρου, γεγονός το οποίο οφείλεται στη διάχυση ή/και στη ενεργητική μεταφορά του σημασμένου βιομορίου στην περιοχή του κυττάρου όπου αυτό υφίσταται αποικοδόμηση εξ' αιτίας της ισχυρής ακτινοβολίας.

Τα τελευταία χρόνια οι απεικονιστικές τεχνικές μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα έχουν αρχίσει να βρίσκουν σημαντικές εφαρμογές και στην ιατρική έρευνα. Για παράδειγμα η τεχνολογία της συνεστιακής μικροσκοπίας σε συνδυασμό με τη χρήση οπτικών ινών έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης μεταστατικών όγκων *in vivo*, καθώς και τη διάγνωση όγκων *in situ* σε ζωικά μοντέλα καρκινογένεσης. Επίσης η τεχνολογία της *in vivo* απεικόνισης έχει πλέον προχωρήσει στην καταγραφή βιολογικών διεργασιών από ολόκληρους ζωντανούς οργανισμούς με τη χρήση εξελιγμένων τεχνικών μοριακής απεικόνισης όπως η βιο-φωταύγεια (**bioluminescence**), η μαγνητική τομογραφία (**Magnetic Resonance Imaging - MRI**) και η τομογραφία εκπομπής ενός φωτονίου (**Single Photon Emission Tomography – SPECT**), στις οποίες ανιχνεύεται η κατανομή πυρήνων (ραδιενεργών ή μη) σε ένα συγκεκριμένο ιστό ή σε ολόκληρο το ζώο.

Βιβλιογραφία

Blasberg R.G., Gelovani J., “Molecular-Genetic Imaging: a Nuclear Medicine-Based Perspective”, *Mol Imaging*, vol. 1(3), pp. 280-300, 2002.

Bogdanov A. Jr, Weissleder R., “The Development of *in Vivo* Imaging Systems to Study Gene Expression”, *Trends Biotechnol.*, vol. 16, p. 5–10, 1998.

Chalfie M et al. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263 : 802-805

Matsumoto, B (1993) *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*. *Methods in Cell Biology*, Vol. 38, Academic Press

Luker G.D., Piwnica-Worms D., “Beyond the Genome: Molecular Imaging *in Vivo* with PET and SPECT”, *Acad. Radiol.*, vol. 8(1), p. 4, 2001.

Matz et al.(1999) Fluorescent proteins from non-bioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnol.* 17, 969-973

Matz ; M. V. et al. (2002). Family of the green fluorescent protein : journey to the end of the rainbow . *BioEssays* 24, 953-959

Mettler F.A., Guiberteau M.J., “Essentials of Nuclear Medicine Imaging”, W.B. Saunders, Philadelphia, 1998 (4th ed.)

Miyawaki A. et al. (2003). Lighting up cells : labelling proteins with fluorophores. *Imaging in Cell Biology* , Supplement to cell Biology.

- Pawley, J.B. (1995) : Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2nd edition, Plenum Press.
- Phelps M.E. (ed), "Pet: Molecular Imaging and Its Biological Applications", Springer Verlag, 2004
- Pomper M.G., "Molecular Imaging: An Overview", Acad. Radiol., vol. 8(11), p. 1141-1153, 2001.
- Prasher, D.C et al. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein . Gene 11, 229-233
- Sheppard, C.J.R. & Shotton, D.M. (1997) : Confocal Laser Scanning Microscopy Bios Scientific Publishers
- Shotton, D.M. Editor (1993) Electronic Light Microscopy. Techniques in Modern Biomedical Microscopy, Wiley-Liss
- Shimomura, O. et al. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* J. Cell Comp.
- Stearns (1995). The green fluorescent revolution. Curr. Biol. 5 262-264.
- Tsien, R.Y, The Green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67, 509-544 (1998)
- Wouters, F.S. et al. Imaging Biochemistry inside cells. (2001). Trends in Cell Biol. 11 (5) 203-212
- Wilson, T. & Sheppard, C.J.R. (1984) Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy, Academic Press
- Weissleder R., "Scaling Down Imaging: Molecular Mapping of Cancer in Mice", Nature Reviews Cancer, vol. 2(1), p. 11 -18, 2002.
- Whitaker, M. Fluorescence Imaging of Living Cells. In: Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2nd Edition (J. Celis, ed.), Vol 3, Academic Press