

# **ЛЕКЦИЯ 5. ФЛУОРОФОРЫ ДЛЯ ОПТИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА**

доцент кафедры, к.ф.н. Завадский С.П.

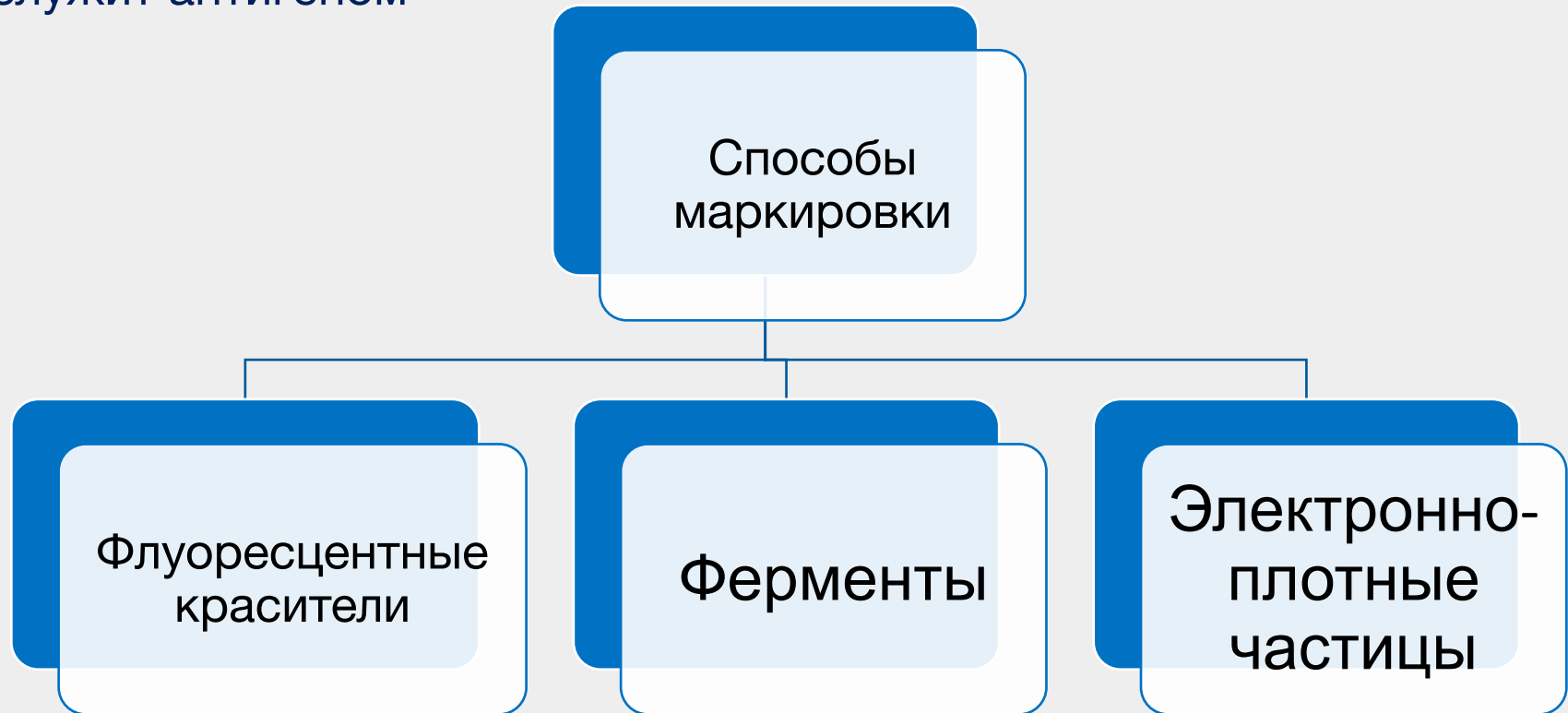
**Кафедра фармакологии  
Института фармации**

**ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
(Сеченовский Университет)**

Москва, Россия

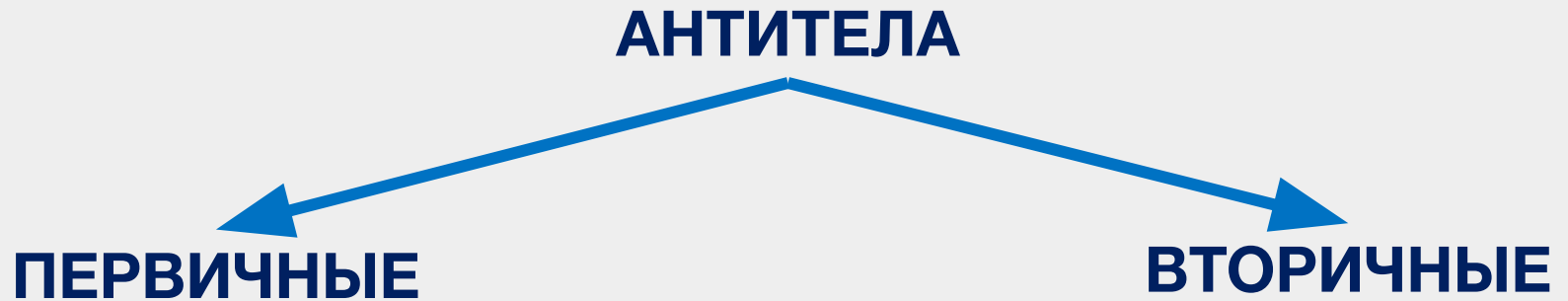
# ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Иммуногистохимические методы – методы микроскопического исследования тканей, обеспечивающий наиболее специфическое выявление в них искомым веществ и основанный на обработке срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веществу, которое в данной ситуации служит антигеном



# Антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой

**Антитела** — крупные глобулярные белки плазмы крови, выделяющиеся плазматическими клетками иммунной системы и предназначенные для нейтрализации клеток патогенов (бактерий, грибов, многоклеточных паразитов) и вирусов, а также белковых ядов и некоторых других чужеродных веществ



Первичные антитела связываются напрямую с антигеном

Вторичные антитела помогают обнаруживать, сортировать или очищать интересующие антигены путем связывания с первичным антителом

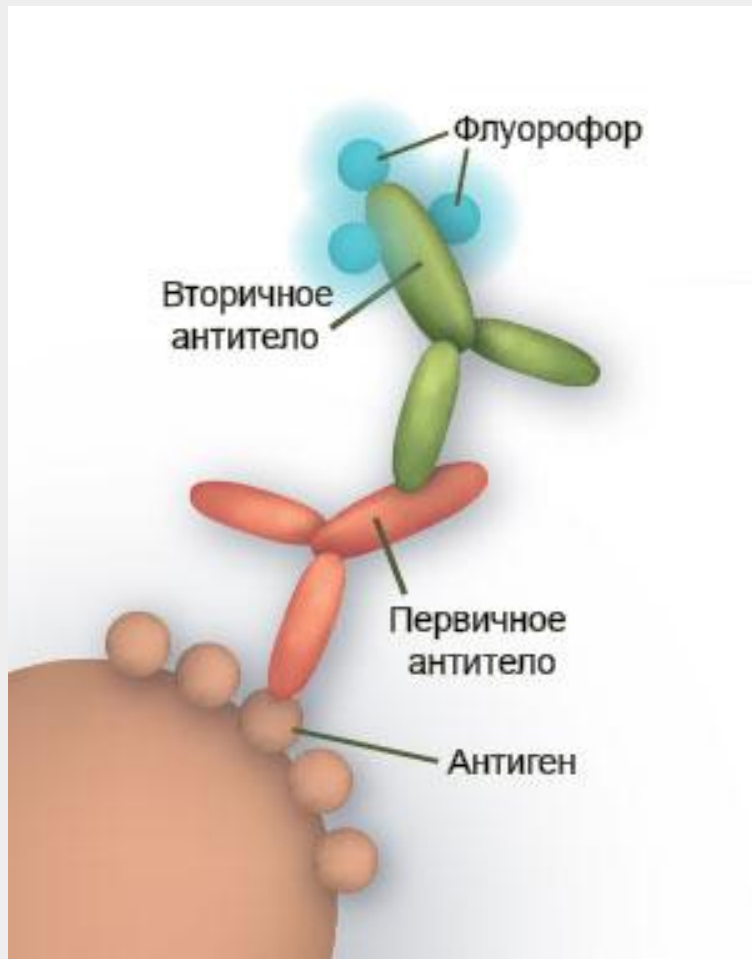


Схема непрямого иммуногистохимического метода. Первичные антитела связываются с антигеном исследуемого организма, а вторичные антитела, несущие флуоресцентную метку (флуорофор), связываются с первичными антителами

<https://www.zin.ru/projects/neuromorphology/methods/immuno.html#>

# ДОСТОИНСТВА ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

- ❑ высокая специфичность к конкретным химическим веществам и определение их точной локализации
- ❑ возможность с помощью конфокальной лазерной и мультифотонной микроскопии при использовании флуоресцентных красителей создавать высокоточные трехмерные реконструкции архитектоники нервных сетей определенной эргичности, включая у мелких животных возможность изучения нервной системы в целом на их тотальных препаратах
- ❑ возможность сочетать выявление нервных элементов с гистохимическим окрашиванием мускулатуры животного с помощью фаллоидина, что дает возможность для изучения их пространственных взаимоотношений

# НЕДОСТАТКИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

- ❑ отсутствие возможности выявлять общую цитоархитектонику нервной системы (включая локализацию клеточных тел) и ее отдельных отделов
- ❑ невозможность выявить детально форму клеток и их отростков, а также связи между нейронами разной эргидности (за исключением 2–3 веществ одновременно), поскольку выявляются только места локализации в нейронах определенных химических веществ, поверхностные мембраны не маркируются и форма клеток не выявляется

## Comparative study of the three different fluorophore antibody conjugation strategies

Dilip Shrestha · Adrienn Bagosi · János Szöllösi · Attila Jenei

Received: 3 May 2012 / Revised: 22 June 2012 / Accepted: 26 June 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** The progression in bioconjugational chemistry has significantly contributed to the evolution and success of protein biology. Mainly, antibody chemistry has been a subject of intensive study owing to the expansion of research areas warranted by using various derivatives of conjugated antibodies. Three reactive moieties (amine, sulfhydryl and carbohydrate) in the antibodies are chiefly favored for the conjugational purpose. This feature is known for decades, nevertheless, amine based conjugation is still the most preferred strategy despite the appreciation the other two methods receive in conserving the antigen binding affinity (ABA). No single report has been published, according to our knowledge, where these three conjugation strategies were applied to the same fluorophore antibody systems. In this study, we evaluated conjugation yield, time demand and cost efficiency of these conjugation procedures. Our results showed that amine based conjugations was by far the best technique due to its simplicity, rapidity, ease of operation, higher conjugate yield, cheaper cost and potential for larger fluorophore/protein labeling ratio without having much effect in ABA. Furthermore, sulfhydryl labeling clearly excelled in terms of reduced non-specific binding and mild effect in ABA but was usually complicated by an

asymmetric antibody reduction due to mercaptoethylamine while carbohydrate oxidation based strategy performed the worst during our experiment.

**Keywords** Fluorophore antibody conjugation · Amine targeted · Sulfhydryl targeted · Carbohydrate targeted · Mercaptoethylamine · Sodium periodate

### Abbreviations

ABA	Antigen binding affinity
CD1d	Cluster of Differentiation 1d
DTT	Dithiothreitol
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
MHC	Major histocompatibility complex
MEA	Mercaptoethylamine
MWCO	Molecular weight cutoff
NEM	N-ethylmaleimide

### Introduction

Antibodies were described as magic bullets for their ability to target specific disease-causing organism and subsequently such features have helped them to become an integral part of biological research today. They have remarkable discriminative power even between very similar epitopes; therefore, they are widely used in the applications related to both basic and clinical research. Furthermore, antibodies could be produced virtually against any antigenic determinants, which make them ideal probes in cellular research and also a versatile tool in the arsenal of researchers. Target specificity and the binding affinity are the key characteristics of antibody that defines the performance of these molecules [1]. To accomplish most of the objectives, antibodies are generally coupled with reporter molecules primarily through the modifications of antibodies. Immobilized antibodies are used for

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00216-012-6232-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Shrestha · A. Bagosi · J. Szöllösi (✉) · A. Jenei  
Department of Biophysics and Cell Biology, Medical and Health  
Science Center, University of Debrecen,  
Nagyterdei krt 98,  
4032 Debrecen, Hungary  
e-mail: szollo@med.unideb.hu

J. Szöllösi  
MTA-DE Cell Biology and Signaling Research Group,  
University of Debrecen,  
4032 Debrecen, Hungary

[https://www.researchgate.net/publication/229152947\\_Comparative\\_study\\_of\\_the\\_three\\_different\\_fluorophore\\_antibody\\_conjugation\\_strategies](https://www.researchgate.net/publication/229152947_Comparative_study_of_the_three_different_fluorophore_antibody_conjugation_strategies)

# Fluorescence-guided Surgery with a Fluorophore-conjugated Antibody to Carcinoembryonic Antigen (CEA), that Highlights the Tumor, Improves Surgical Resection and Increases Survival in Orthotopic Mouse Models of Human Pancreatic Cancer

[Cristina A. Metildi MD](#), [Sharmeela Kaushal PhD](#), [Minya Pu MA](#), [Karen A. Messer PhD](#), [George A. Luiken MD](#), [Abdool R. Moossa MD](#), [Robert M. Hoffman PhD](#) & [Michael Bouvet MD, FACS](#)

[Annals of Surgical Oncology](#) volume 21, pages1405–1411(2014)\_685 Accesses

## Abstract

### Background

We have developed a method of distinguishing normal tissue from pancreatic cancer in vivo using fluorophore-conjugated antibody to carcinoembryonic antigen (CEA). The objective of this study was to evaluate whether fluorescence-guided surgery (FGS) with a fluorophore-conjugated antibody to CEA, to highlight the tumor, can improve surgical resection and increase disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in orthotopic mouse models of human pancreatic cancer.

### Methods

We established nude-mouse models of human pancreatic cancer with surgical orthotopic implantation of the human BxPC-3 pancreatic cancer. Orthotopic tumors were allowed to develop for 2 weeks. Mice then underwent bright-light surgery (BLS) or FGS 24 h after intravenous injection of anti-CEA-Alexa Fluor 488. Completeness of resection was assessed from postoperative imaging. Mice were followed postoperatively until premonitory to determine DFS and OS.

### Results

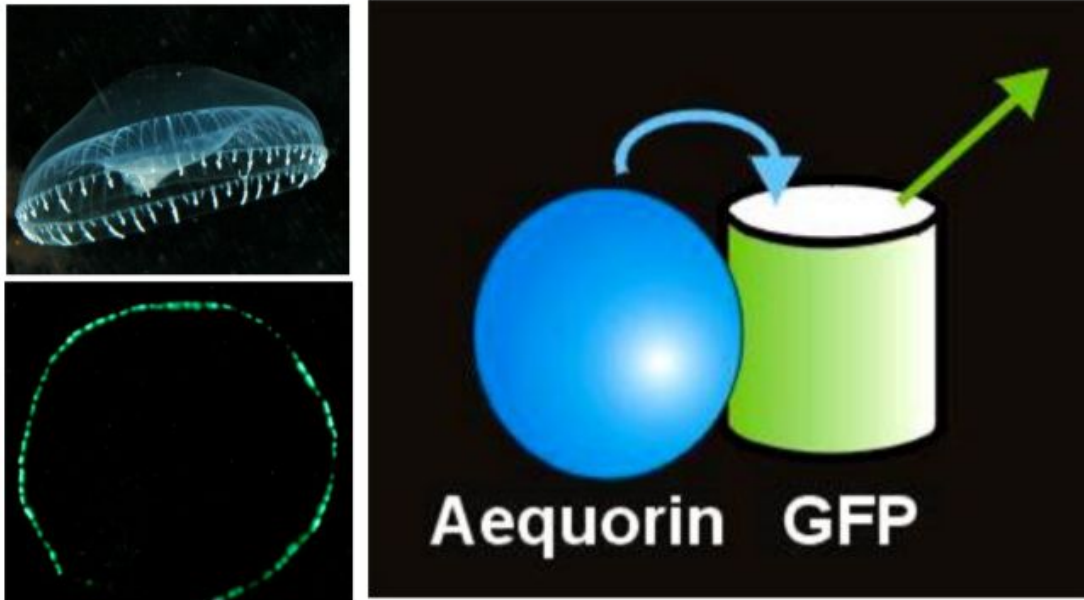
Complete resection was achieved in 92 % of mice in the FGS group compared to 45.5 % in the BLS group ( $p = 0.001$ ). FGS resulted in a smaller postoperative tumor burden ( $p = 0.01$ ). Cure rates with FGS compared to BLS improved from 4.5 to 40 %, respectively ( $p = 0.01$ ), and 1-year postoperative survival rates increased from 0 % with BLS to 28 % with FGS ( $p = 0.01$ ). Median DFS increased from 5 weeks with BLS to 11 weeks with FGS ( $p = 0.0003$ ). Median OS increased from 13.5 weeks with BLS to 22 weeks with FGS ( $p = 0.001$ ).

### Conclusions

FGS resulted in greater cure rates and longer DFS and OS using a fluorophore-conjugated anti-CEA antibody. FGS has potential to improve the surgical treatment of pancreatic cancer.

# Флюоресцентные белки

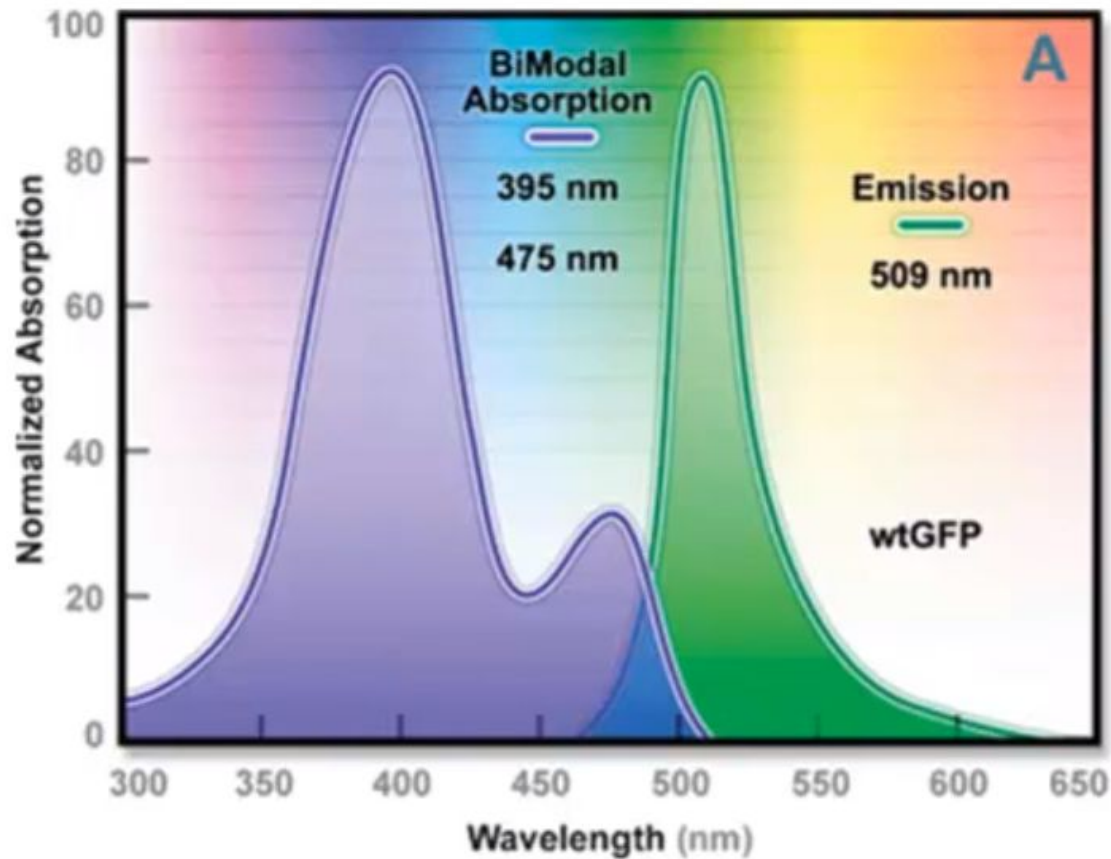
*Aequorea victoria* GFP – вторичный  
эмиттер в биолюминесцентной системе  
медузы



Открытие:	Shimomura et al. (1962)
Клонирование:	Prasher et al. (1992)
Первое использование:	Chalfie et al. (1994) and Inouye & Tsuji (1994)
Нобелевская премия:	2008 год



# Спектры поглощения и испускания флуоресценции *A. victoria* GFP



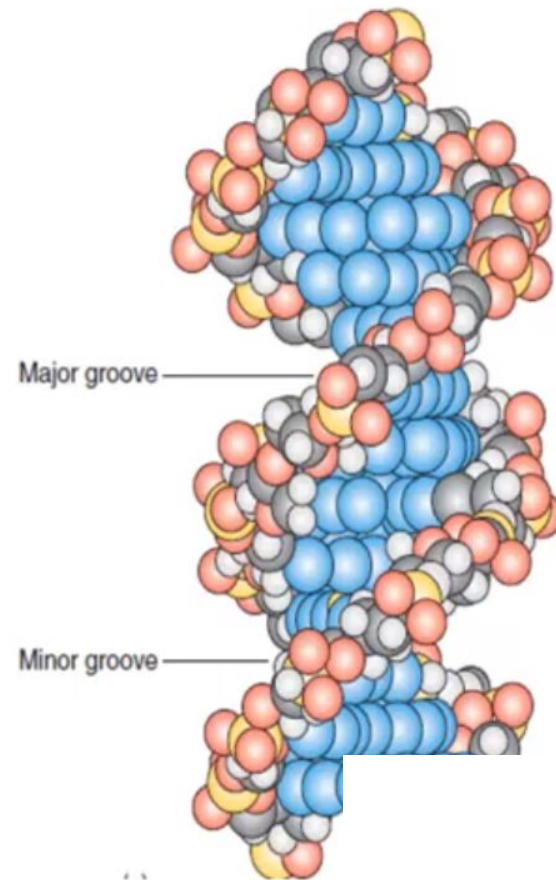
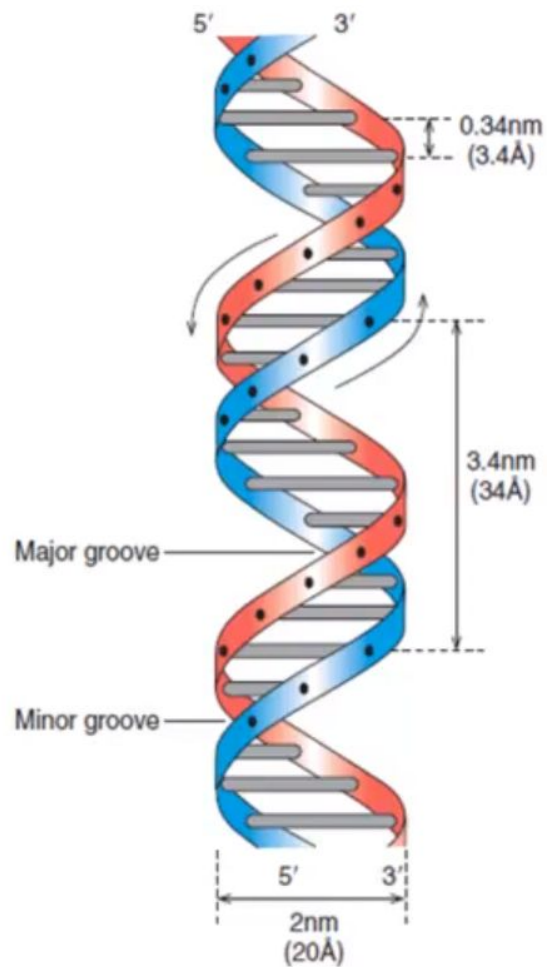
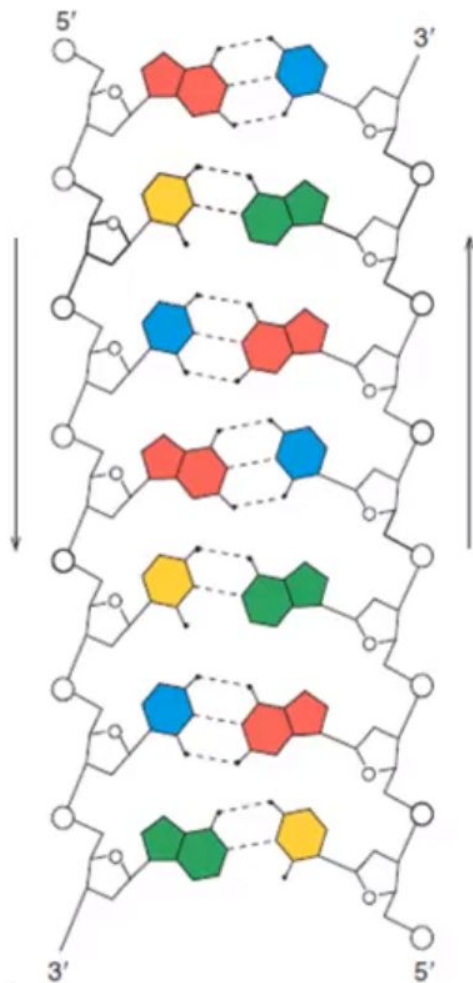
# Зеленый флуоресцентный белок, GFP



<https://i.pinimg.com/originals/96/d7/bd/96d7bdfa5458c5122fc2afd593399a7c.jpg>

- Генетически кодируется
- Сам образует хромофор
- Не нуждается в низкомолекулярных кофакторах и субстратах

# Структура ДНК

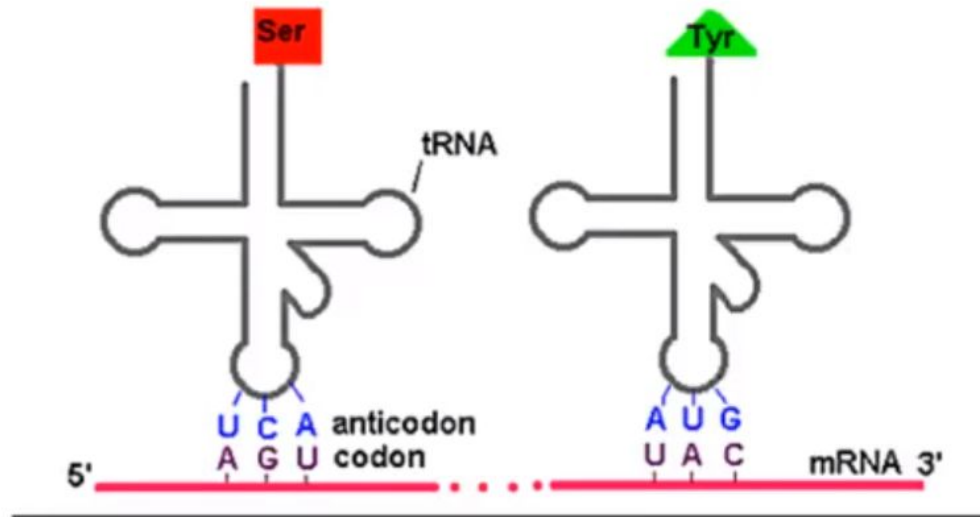


<https://www.youtube.com/watch?v=FiokGqqWFak>

# Генетический код

Генетическая информация записана с помощью четырех букв – нуклеотидов

Трехбуквенный код – три нуклеотида (триплет) кодируют одну аминокислоту



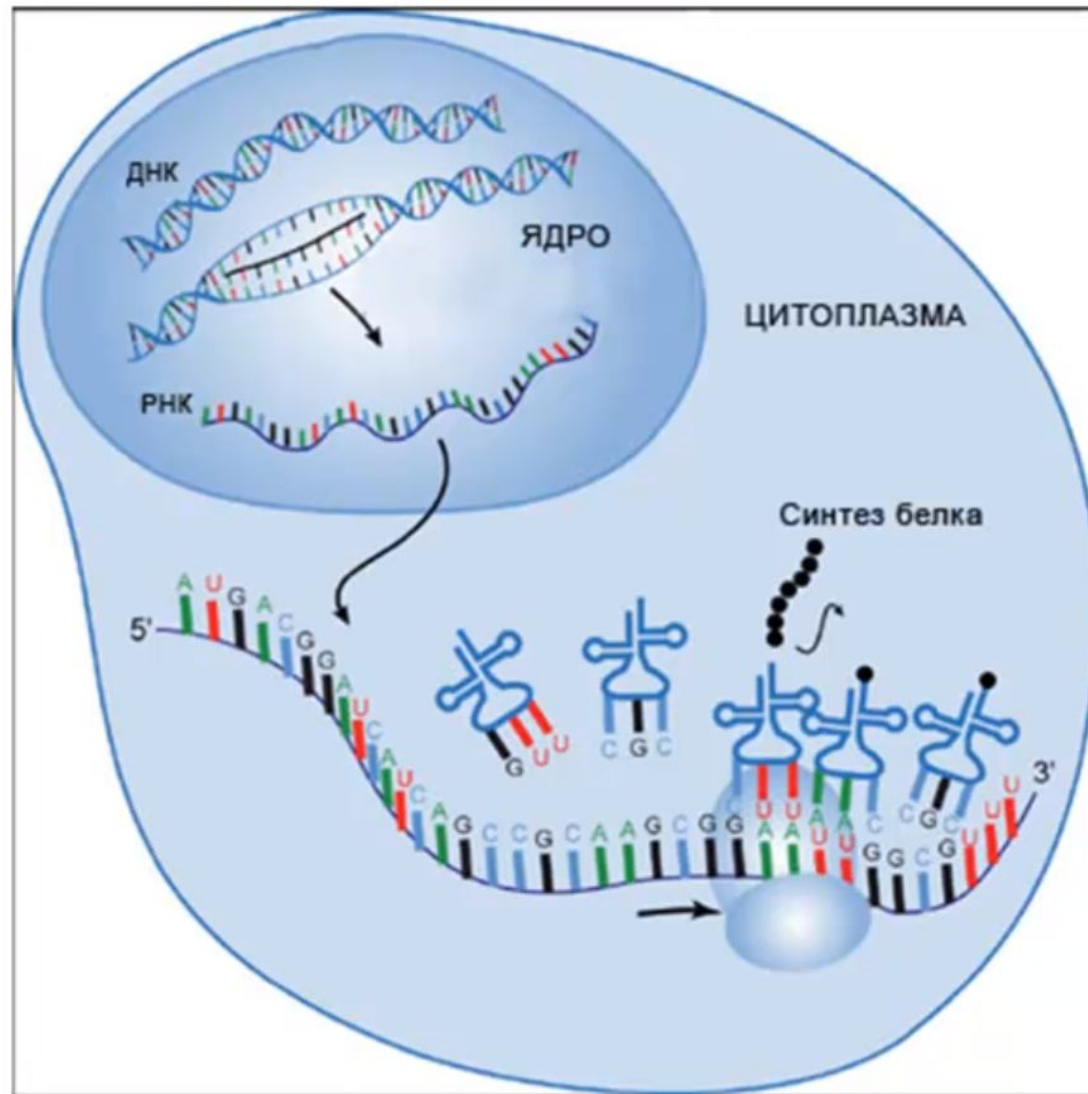
Каждому триплету (кроме стоп-кодона) соответствует своя транспортная РНК, способная связывать нужную аминокислоту

20 аминокислот образуют все белки организма

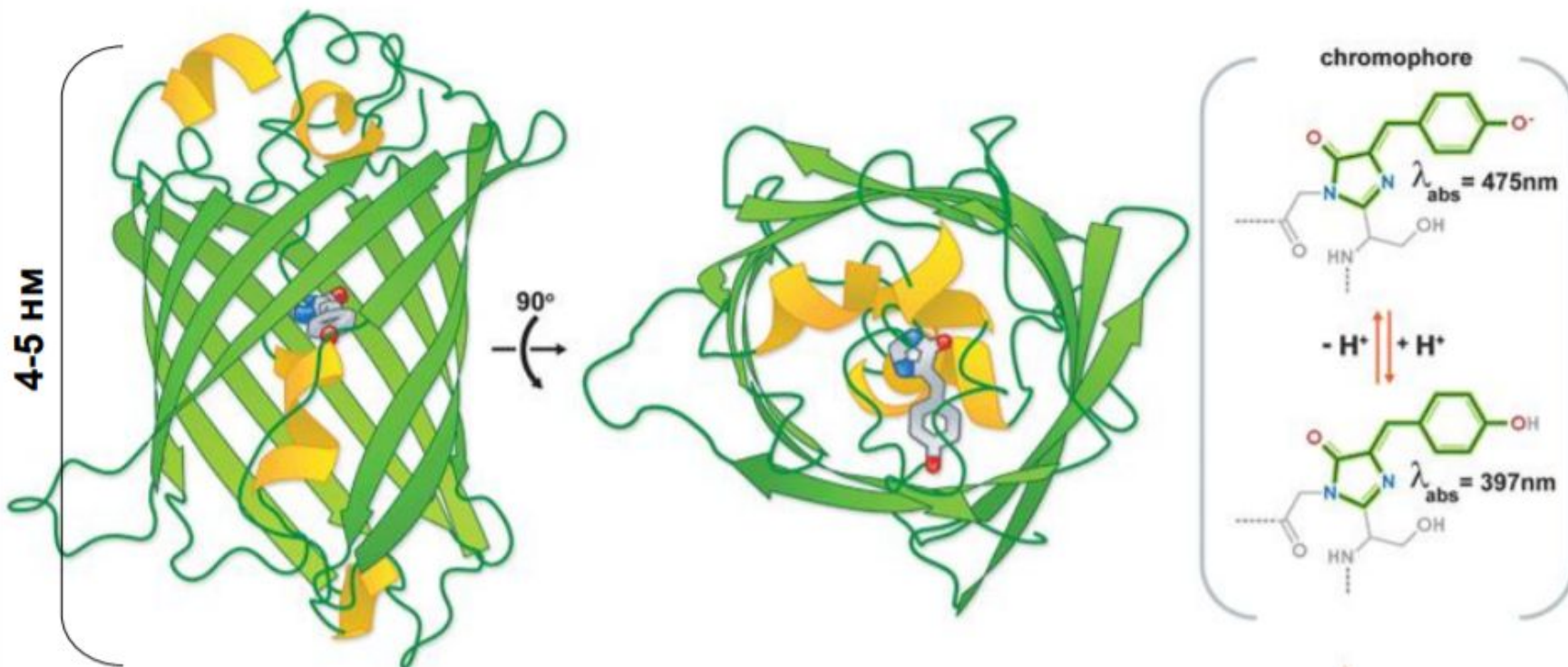
2nd base in codon

		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

# Реализация генетической информации



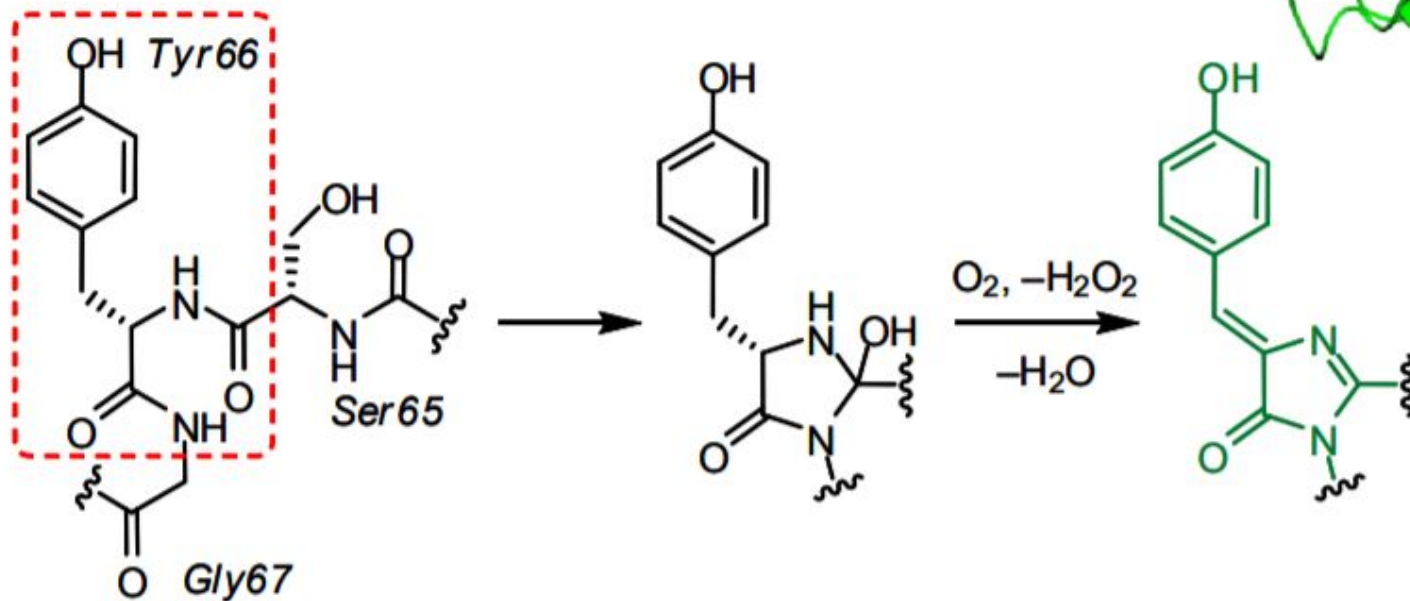
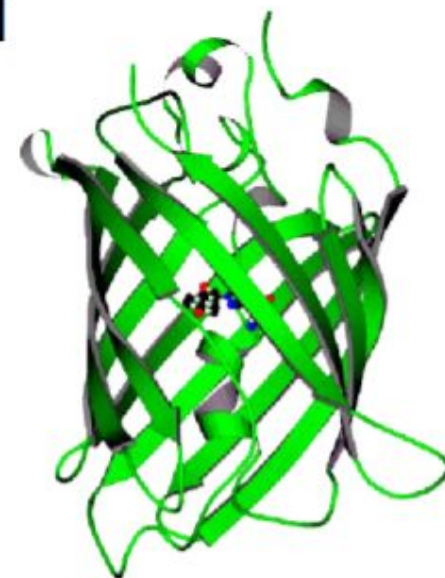
# Структура GFP



11  $\beta$ -слоев образуют бочонок с  $\alpha$ -спиралью в середине (238 ак). Хромофор образуется внутри глобулы путем автокаталитической циклизации остова трех аминокислот ( $\text{Ser}_{65}\text{-Tyr}_{66}\text{-Gly}_{67}$ )

# Автокаталитическая циклизация хромофора

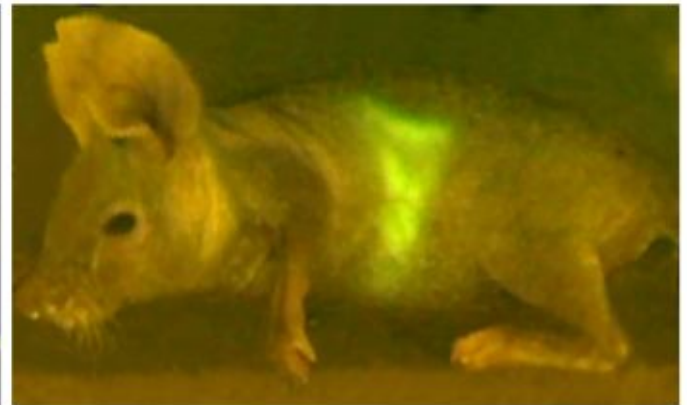
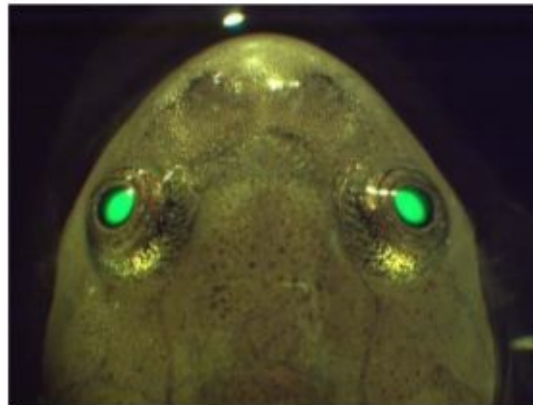
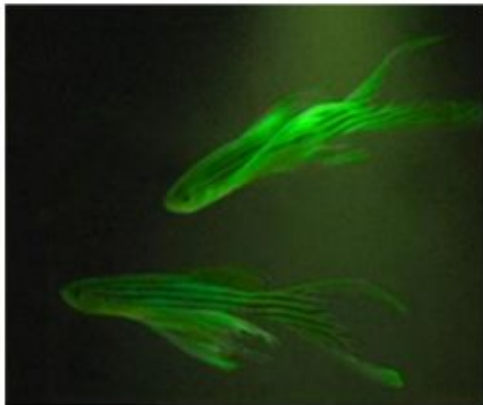
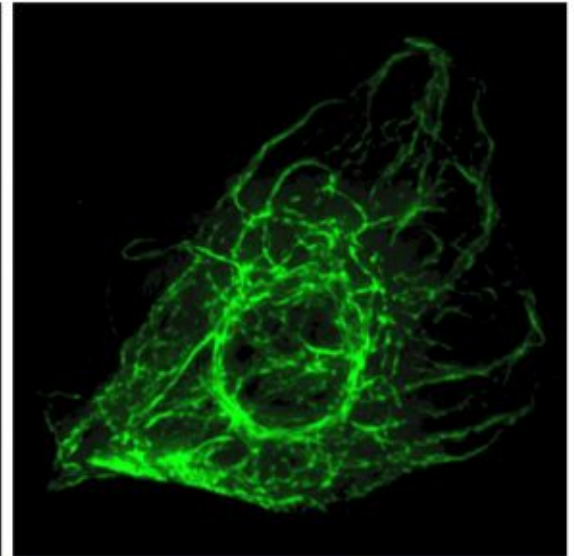
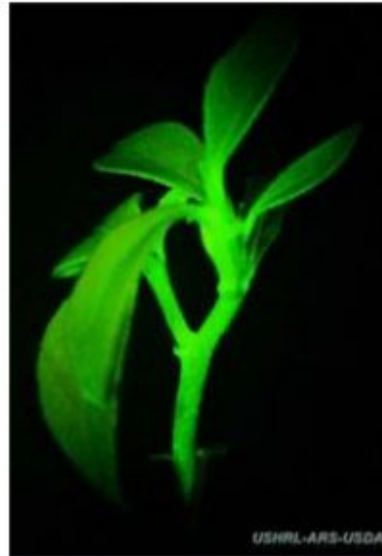
Хромофор образуется внутри глобулы путем автокаталитической циклизации остова трех аминокислот (Ser<sub>65</sub>-Tyr<sub>66</sub>-Gly<sub>67</sub>)



# Использование GFP

Анализ экспрессии генов

Прижизненное мечение организмов, тканей, клеток, клеточных структур и белков

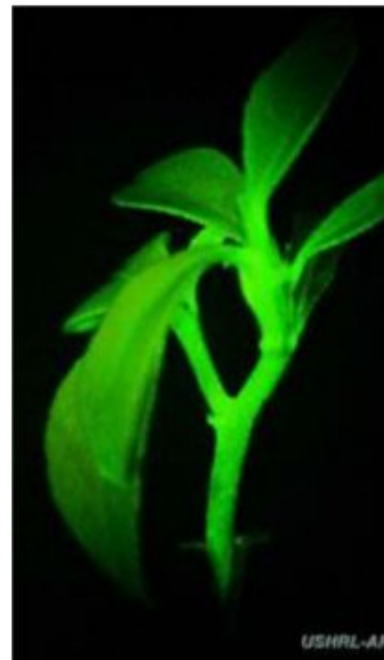
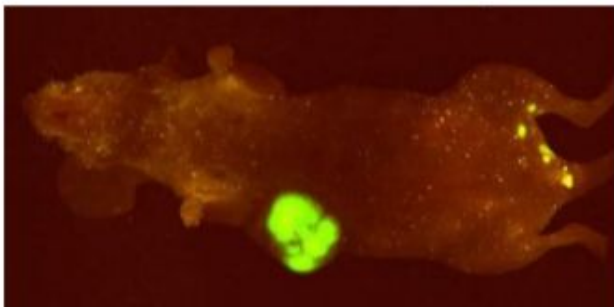
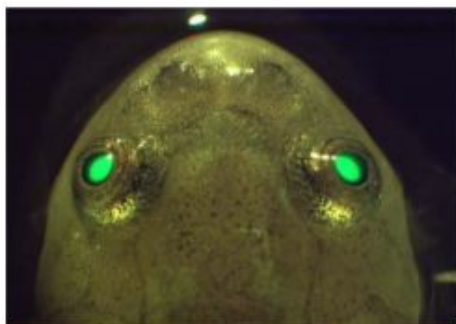




# Области применения GFP



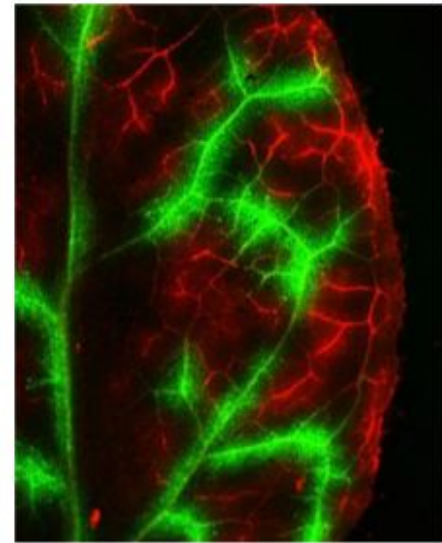
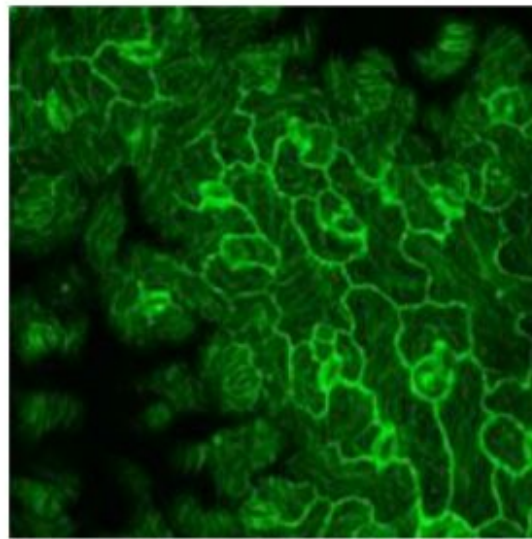
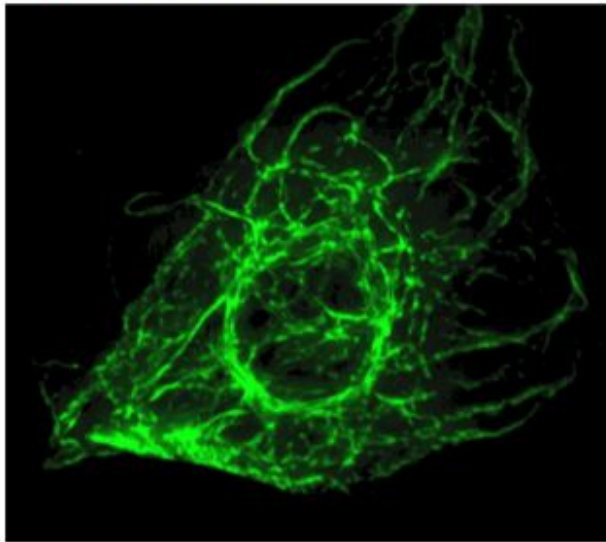
**Видно, где и когда включается промотор; можно метить организмы или группы клеток**



# Области применения GFP



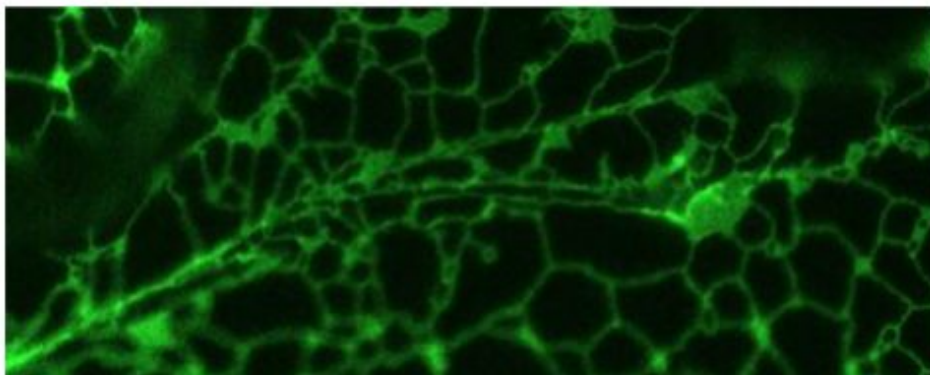
**Можно следить за локализацией белков в живых клетках**



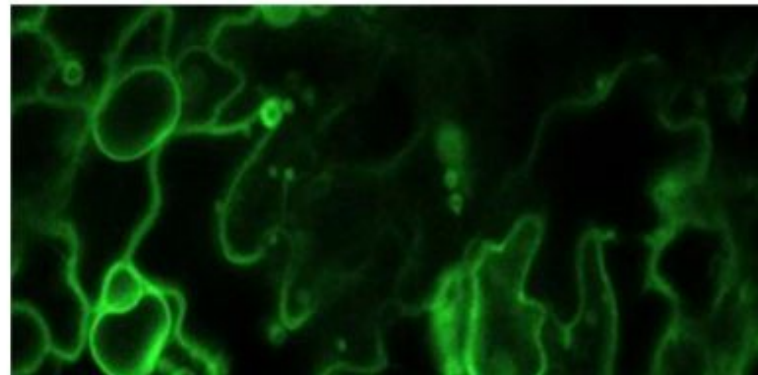
# Области применения GFP



**Можно метить клеточные структуры**



**Эндоплазматический ретикулум**



**Комплекс Гольджи**

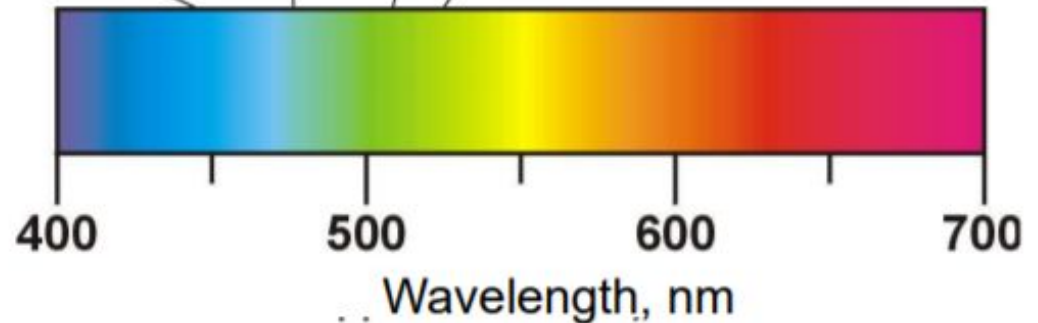
# Мутанты GFP

**Yellow (EYFP, Venus, ...) em 528 nm**

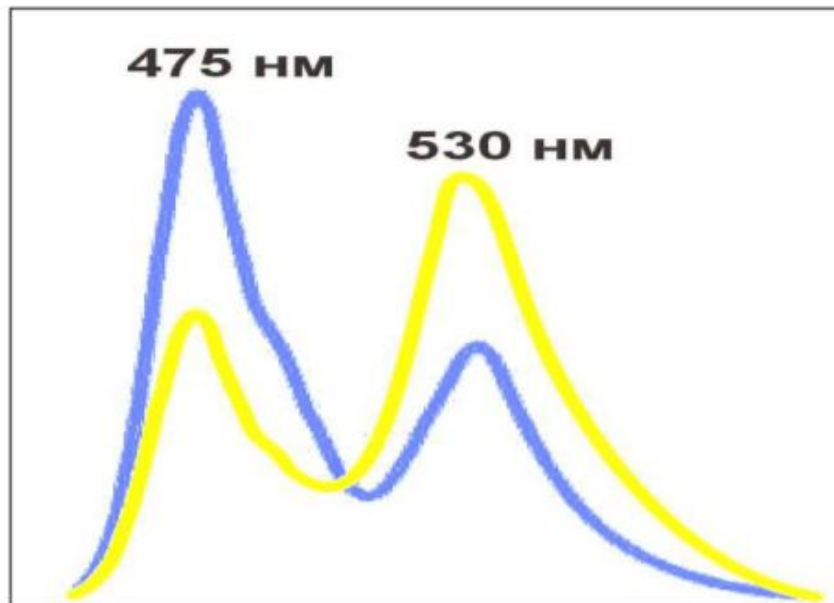
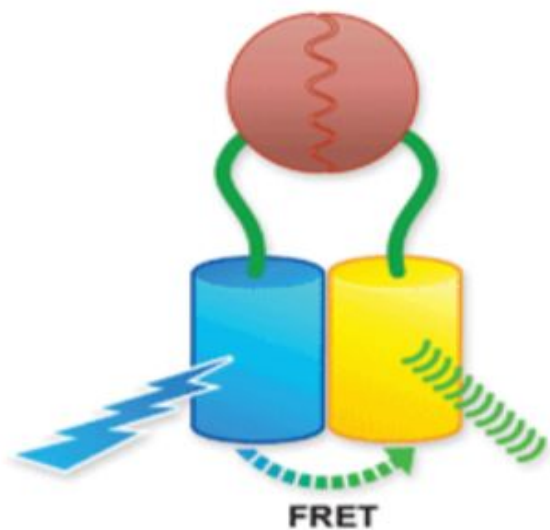
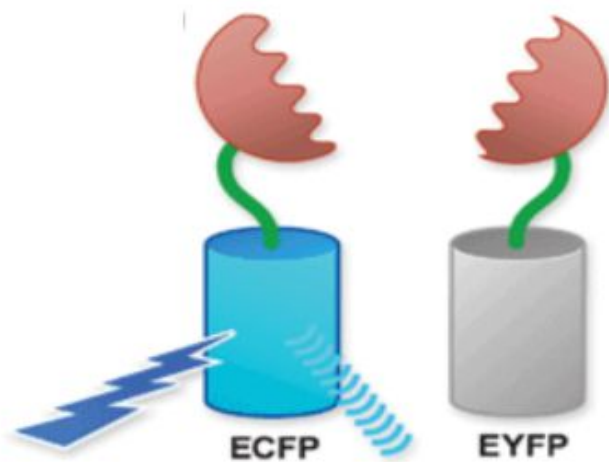
**Green (EGFP, Emerald, ...) em 508 nm**

**Cyan (ECFP, Cerulean, ...) em 475 nm**

**Blue (EBFP) em 448 nm**

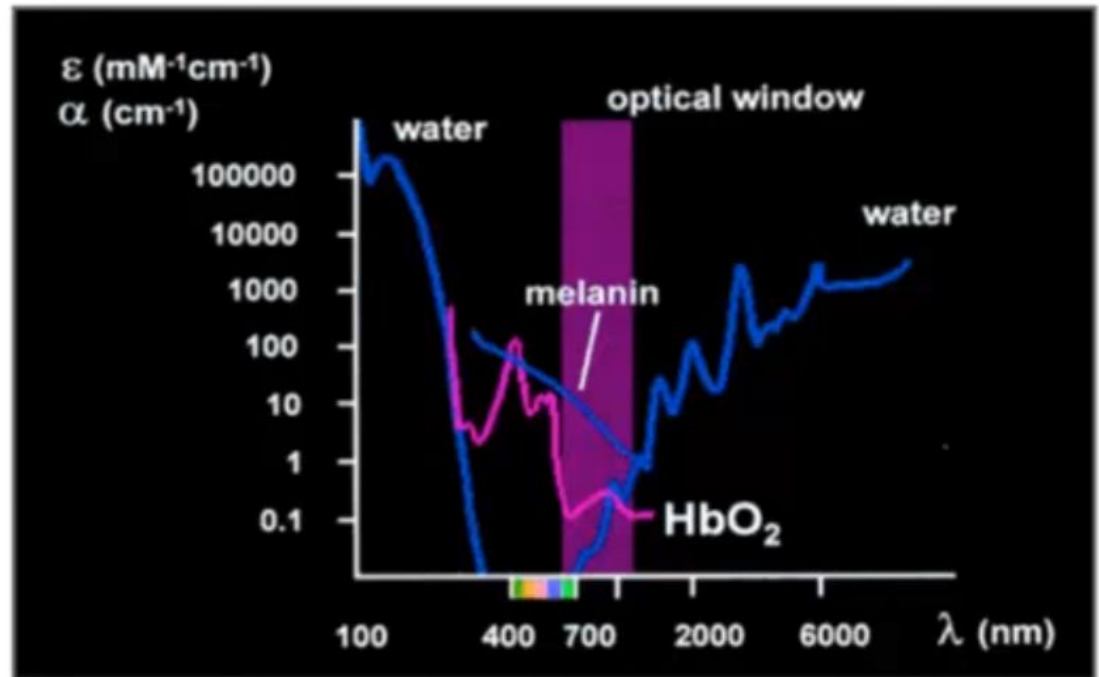


# Использование GFP и его мутантов



**Анализ белок-белковых взаимодействий с помощью резонансного переноса энергии Фостера (Foster Resonance Energy Transfer, FRET). Передача энергии от молекулы донора к молекуле акцептора происходит посредством диполь-дипольного взаимодействия.**

# Флуоресценция в дальнекрасной области спектра предпочтительнее для визуализации целых организмов (whole body imaging)



# Клонирование генов GFP-подобных белков из коралловых полипов (1999)



Юлий Лабас

1933-2008

# Окраска кораллов

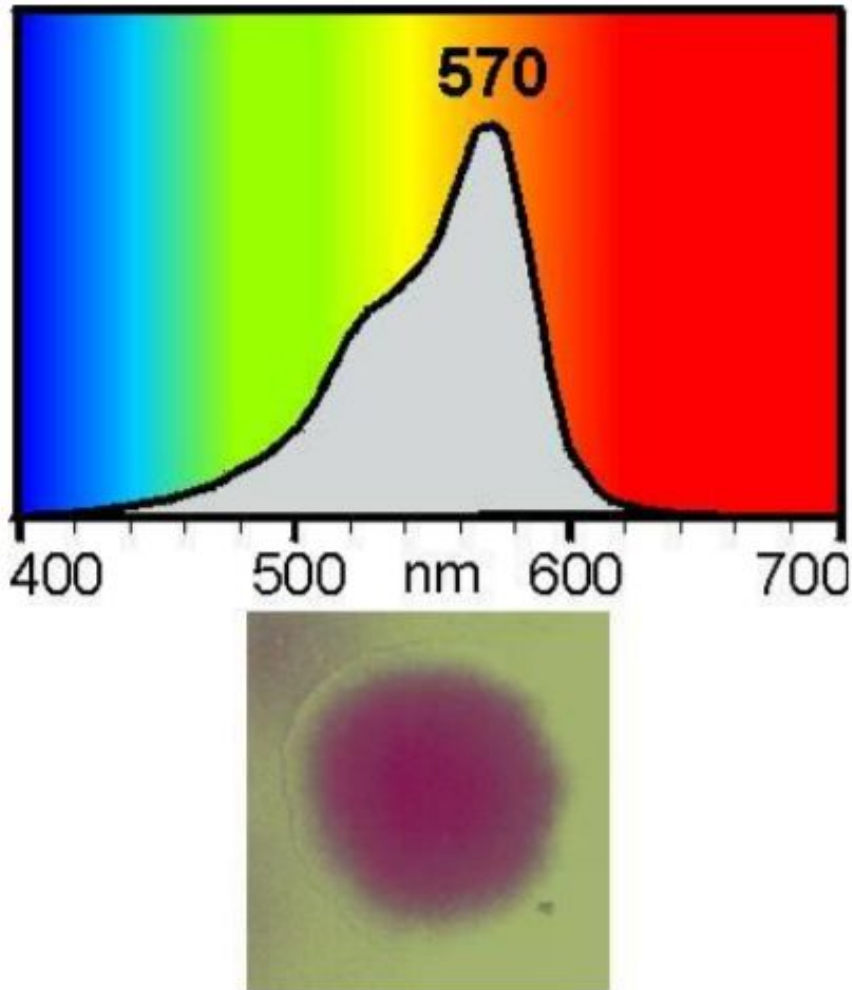


Нефлуоресцентная окраска кораллов также обусловлена GFP-подобными белками





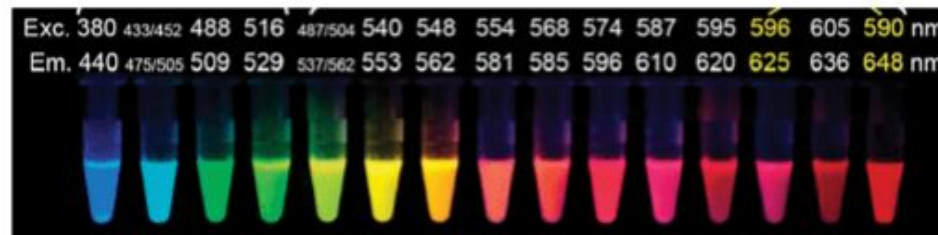
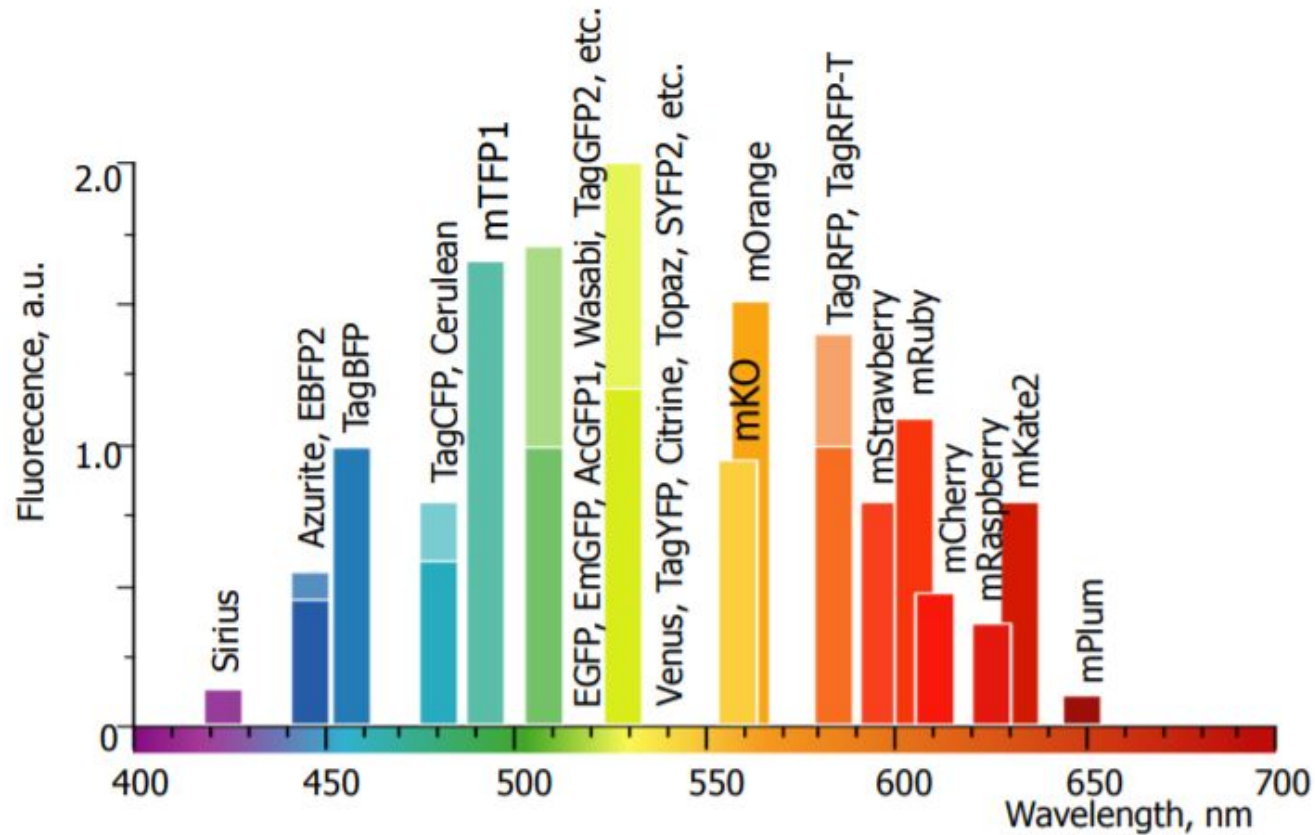
# Как возникает окраска



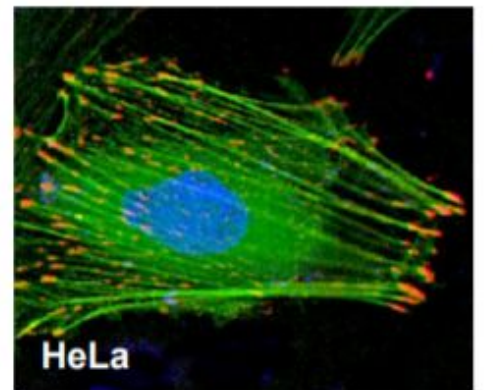
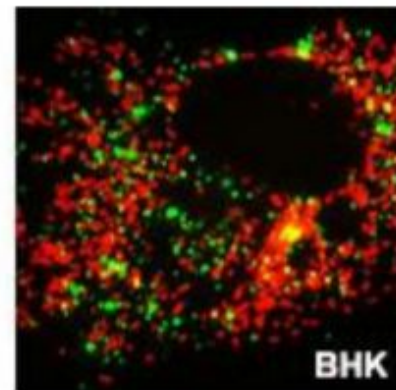
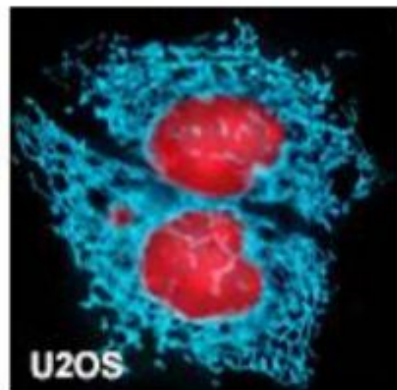
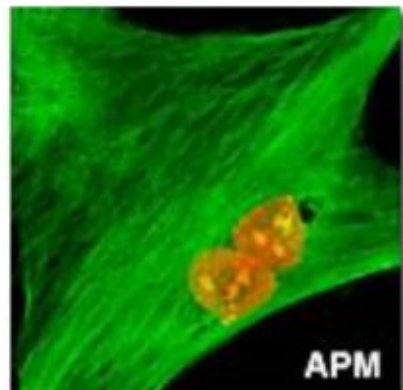
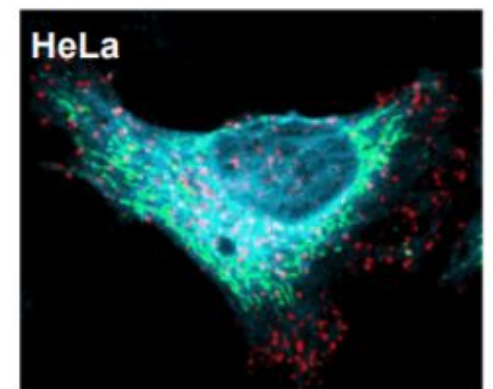
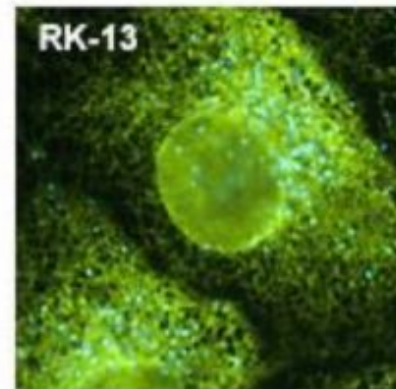
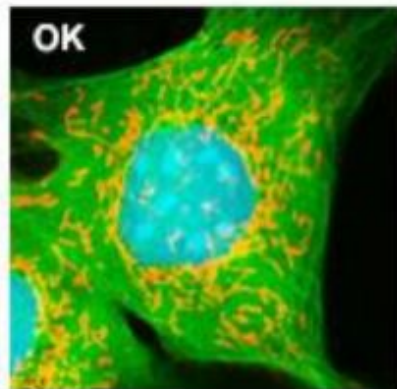
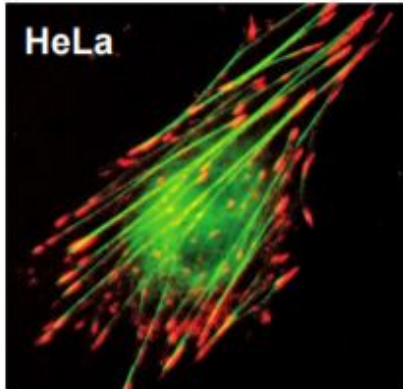
Вещество эффективно поглощает среднюю часть спектра видимого света.

Комбинация оставшегося синего и красного света дает характерную малиновую окраску.

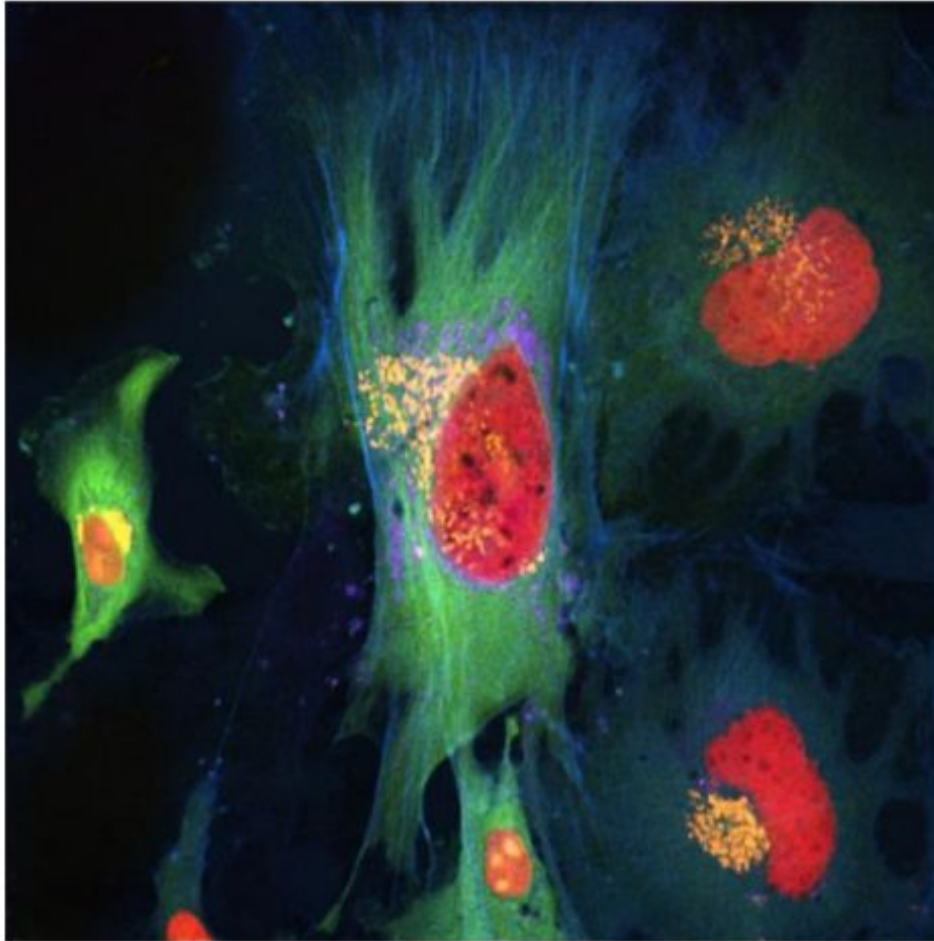
# Флуоресцентные белки: цветовое разнообразие



# Расширение возможностей: использование GFP-подобных белков для многоцветного мечения внутриклеточных структур



# Окрашивание частей клетки с помощью разноцветных флуоресцентных белков



**Фиолетовый -  
митохондрии**

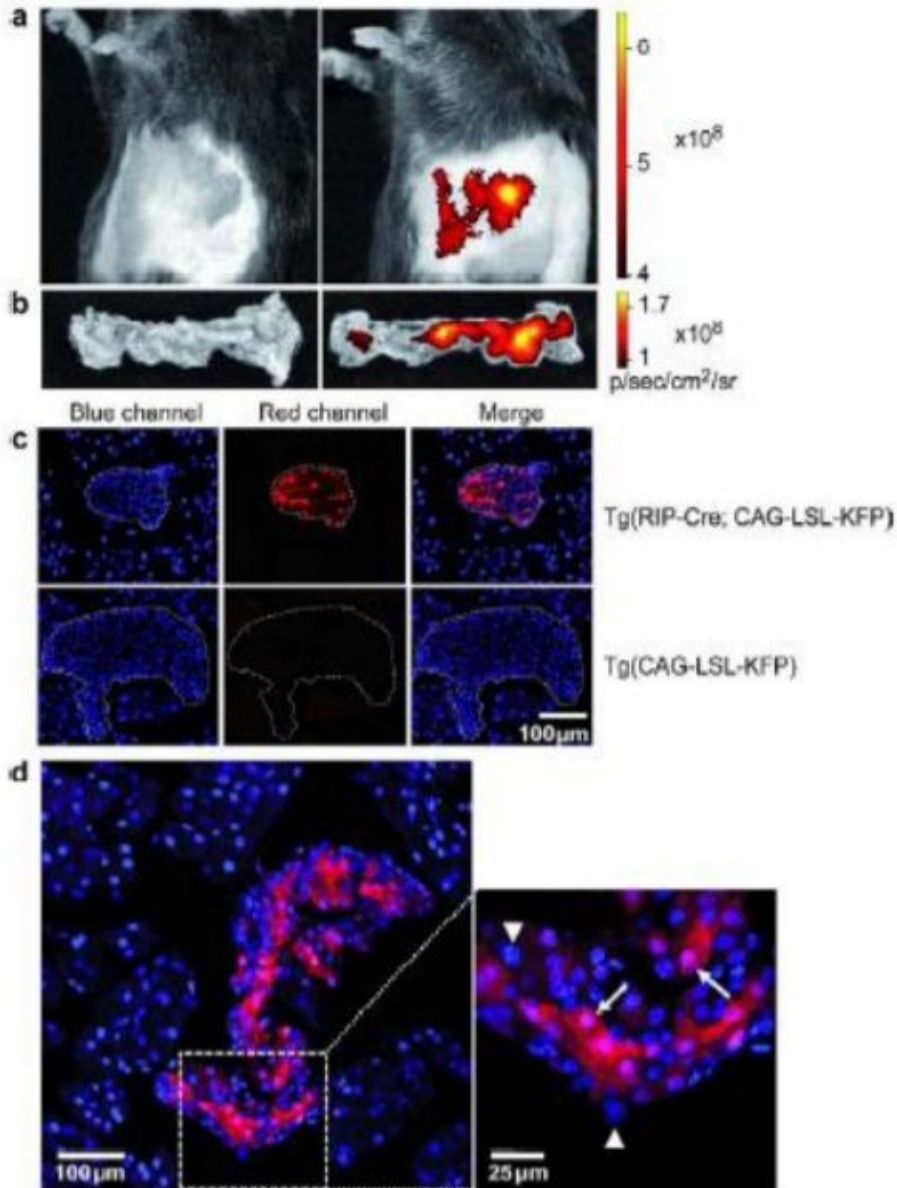
**Синий -  
цитоскелет**

**Зеленый -  
микротрубочки**

**Желтый – аппарат  
Гольджи**

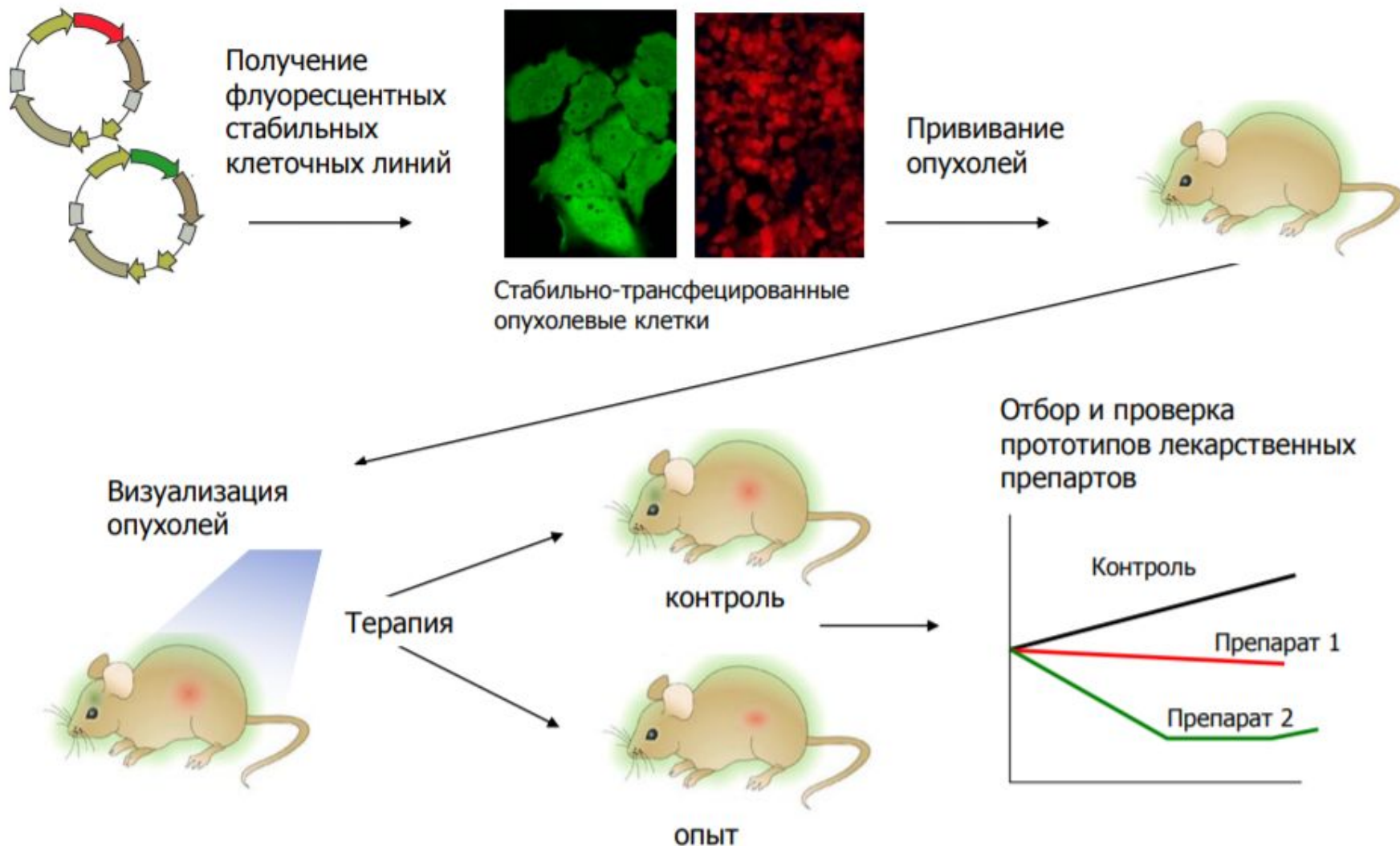
**Красный - ядро**

Трансгенная мышь,  
экспрессирующая  
дальне-красный  
флуоресцентный  
белок Katushka в  
поджелудочной  
железе (островки  
Лангенгарса)

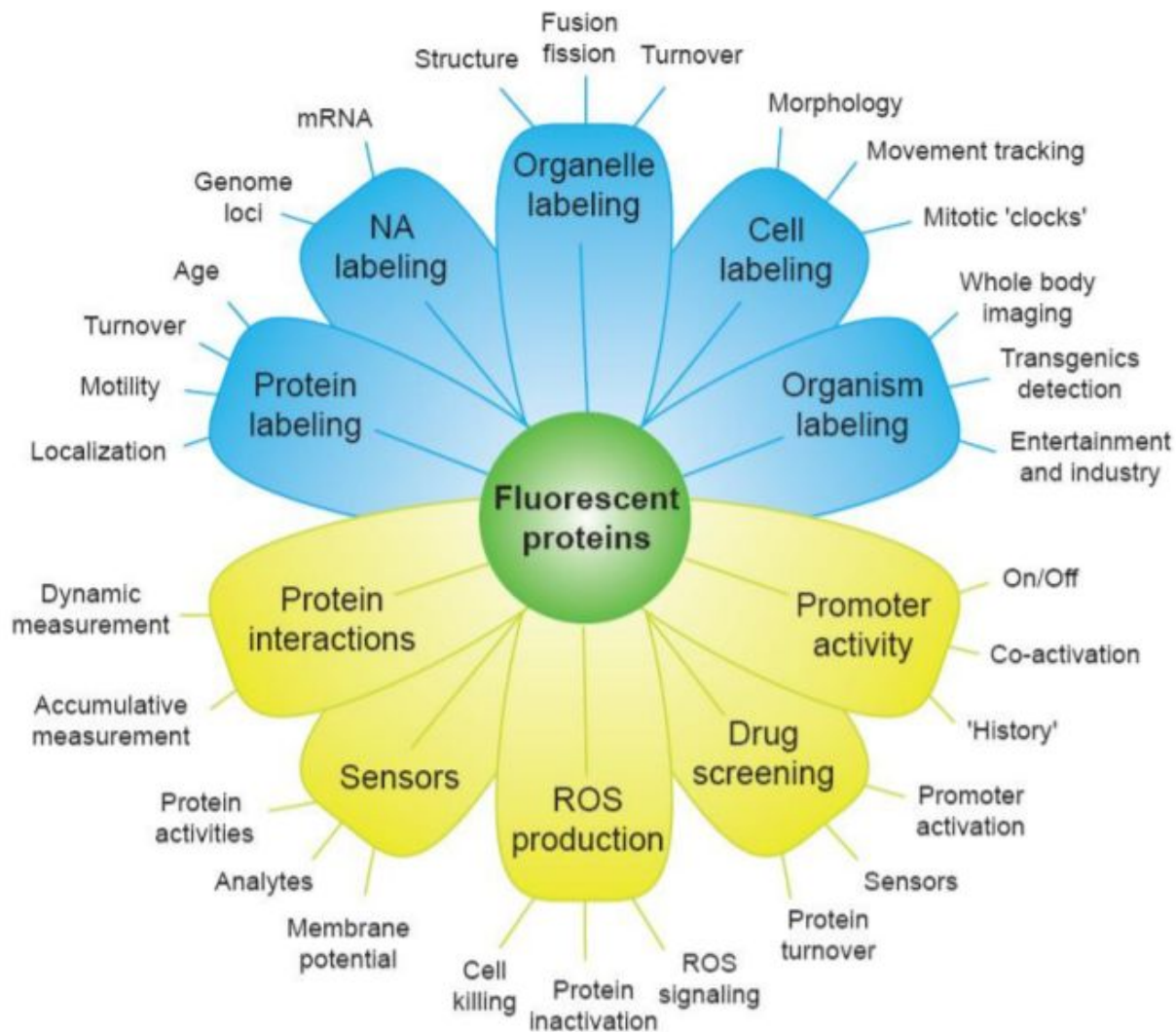


Diéguez-Hurtado et al., 2010

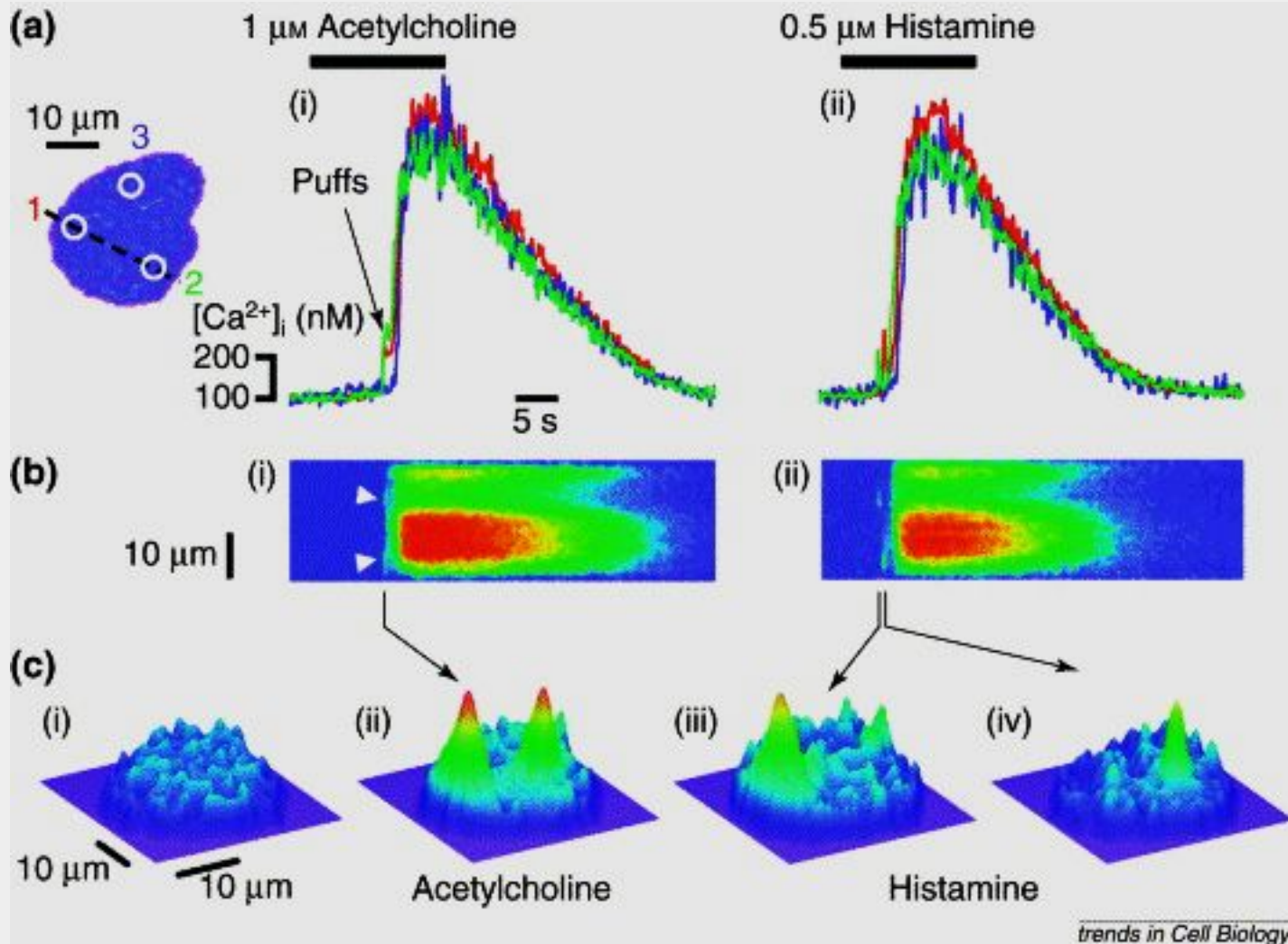
# Использование флуоресцентных белков для скрининга лекарственных препаратов



# Основные области применения флуоресцентных белков



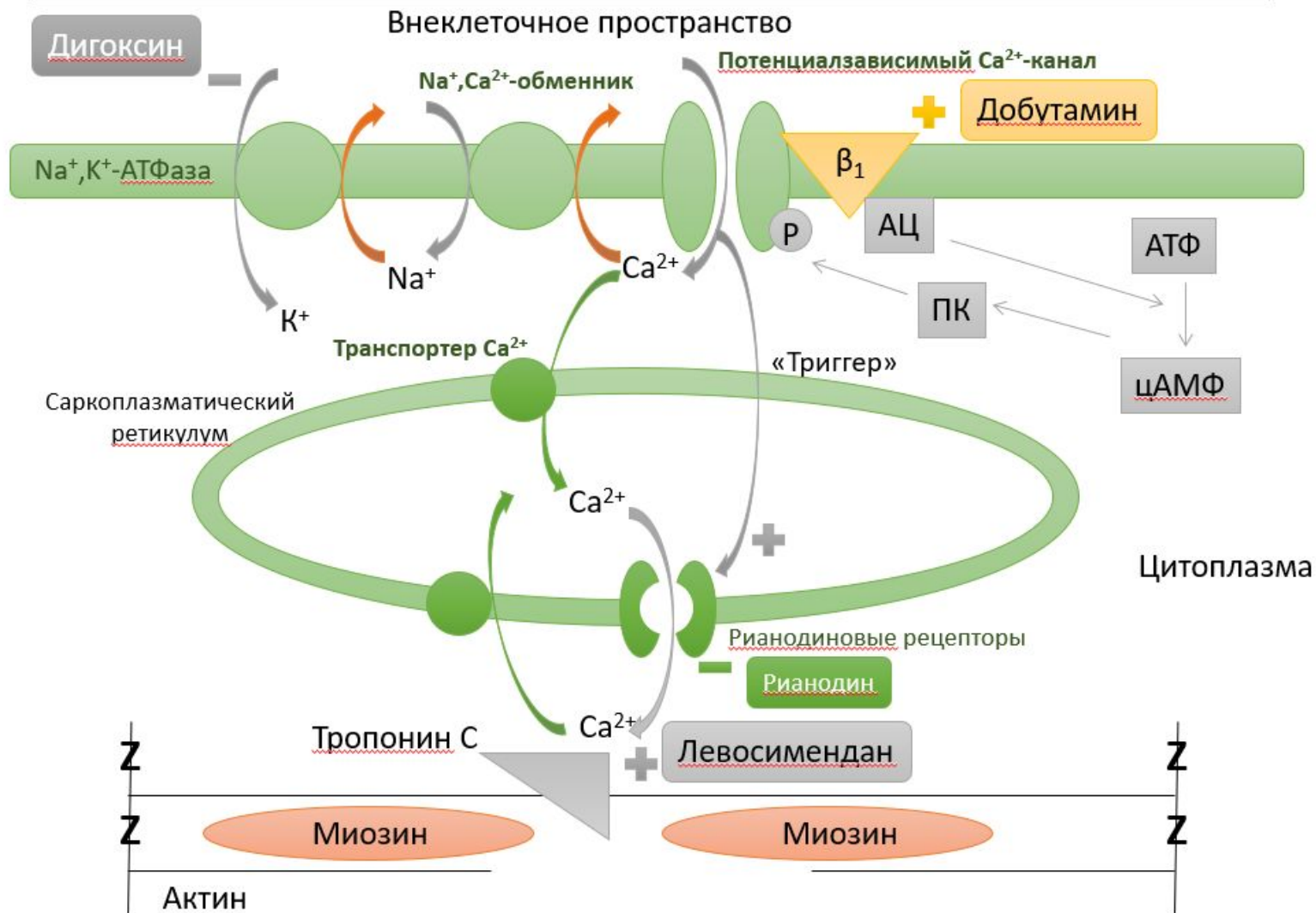
# КАЛЬЦИЙ- И ДРУГИЕ ПОТЕНЦИАЛ- ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ КРАСИТЕЛИ





# Кальций-чувствительные красители

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КАРДИОТОНИЧЕСКИХ СРЕДСТВ



# СЕРДЕЧНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ

## *Механизм действия*

- Нарушают работу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, что ведет к снижению выведения из клетки  $3\text{Na}^+$  и поступления  $2\text{K}^+$ .
- Из-за избыточного содержания ионов  $\text{Na}^+$  в клетке нарушается работа  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипорта, что ведет к накоплению ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке.
- Накопившиеся в клетке ионы  $\text{Ca}^{2+}$  стимулируют рианодиновые рецепторы СПР и активируют выход ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из депо в цитоплазму.
- Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  связывают тропонин С и устраняют тормозное влияние тропонин-тропомиозинового комплекса на взаимодействие актина и миозина.
- Взаимодействие актина и миозина ведет к сокращению кардиомиоцита.

## *Эффекты*

- Положительный инотропный эффект (нарушение работы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы)
- Отрицательный хронотропный эффект (активация вагуса)
- Затруднение AV-проводимости – отрицательный дромотропный эффект (активация вагуса + прямое угнетающее действие)
- Повышение автоматизма волокон Пуркинье (снижение концентрации  $\text{K}^+$  в цитоплазме)

# Потенциал-зависимые красители

## Быстрые красители

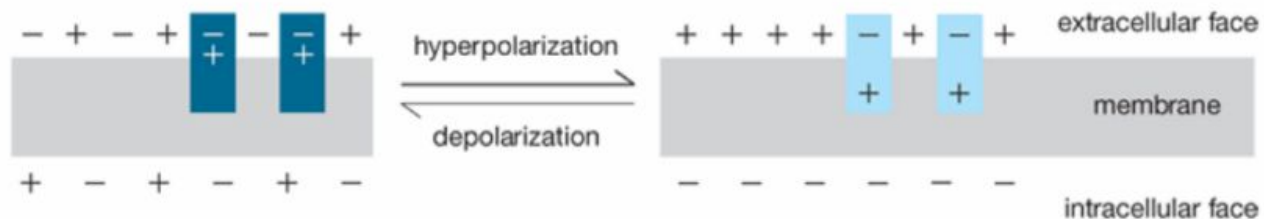
Действие быстрых (как правило, стирилпиридиновые красители, например Di-4-ANEPPS, RH 237 и др.) основано на изменении их электронной структуры и, следовательно, их флуоресцентные свойства изменяются при изменении электрического поля. Их оптический отклик происходит достаточно быстро, чтобы обнаружить быстрые изменения мембранного потенциала (миллисекунды), происходящие в возбудимых клетках, в том числе в отдельных нейронах, кардиомиоцитах или при исследовании целого мозга.

Тем не менее, степень изменения интенсивности флуоресценции у таких красителей часто достаточно низкая; обычно изменение интенсивности составляет 2-10% от исходного уровня флуоресценции при изменении трансмембранного потенциала на 100 мВ. Это накладывает определенные ограничения на их использование.

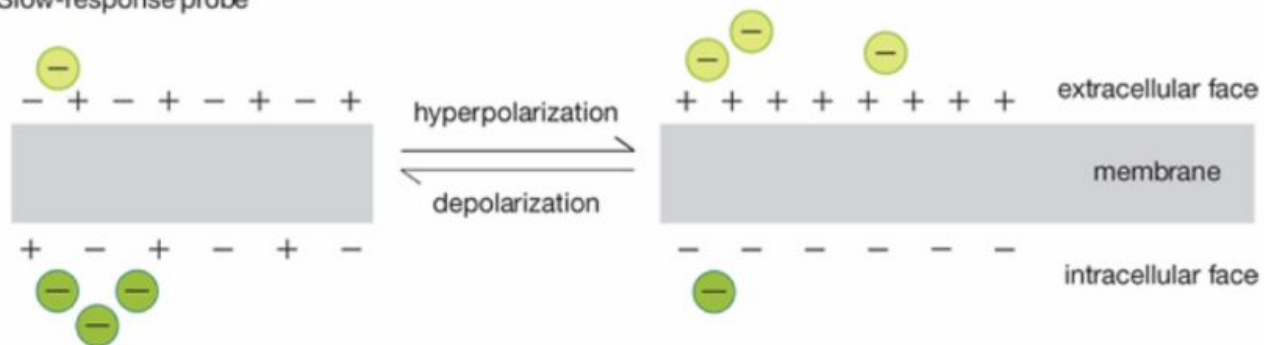
# Медленные красители

Действие медленных красителей (Slow-Response) (к ним относятся красители DiOC<sub>2</sub>, JC-1, JC-9, Oxonol V, Merocyanine 540 и др.) изменениях в их трансмембранном распределении при гипер- или деполяризации мембраны, которое сопровождается изменением интенсивности флуоресценции. Величина их оптического ответа гораздо больше, чем у быстродействующих потенциал-зависимых красителей (как правило, интенсивность флуоресценции изменяется на 1% при изменении трансмембранного потенциала на 1 мВ). К медленным потенциал-зависимым красителям относятся катионные карбоцианины и родамины и анионные оксонолы, предназначенные для выявления изменений потенциалов мембраны невозбудимых клеток, вызванных изменениями дыхательной деятельности, проницаемости ионных каналов, фармакологическими воздействиями обязательным и другими факторами.

### A. Fast-response probe



### B. Slow-response probe



Механизмы действия потенциал-зависимых красителей. Быстрые красители (а) подвергаются действию электрического поля, обусловливающему изменения внутримолекулярного распределения зарядов, которые приводят к соответствующим изменениям в спектральном профиле или интенсивности флуоресценции данных красителей (на рисунке представлена изменением цвета).

Изменения флуоресценции медленных красителей (б) связаны с перераспределением молекул красителя через мембрану. Поскольку перемещение молекулы через мембрану более длительный процесс, чем изменение электронной структуры молекулы, скорость ответа таких красителей на деполяризацию или гиперполяризацию намного ниже, чем у красителей