

Raport privind deplasarea la cursul de formare profesionala "Time-Resolved Microscopy and Correlation Spectroscopy"

- 1. Solicitant (solicitanți) / echipa de cercetare: Falamas Alexandra (E5)**
- 2. Tipul acțiunii: Formare profesionala (FP)**
- 3. Destinația / tematica / durata:**
 - **PicoQuant Berlin, Germania**
 - **Curs international cu tematica microscopie de fluorescanta rezolvata in timp**
 - **Durata: 19-21 Februarie 2019 (3 zile) + 22 Februarie 2019 (1 zi de training)**

In perioada 19-21 Februarie 2019 am participat la cursul international de Microscopie Rezolvata in Timp si Spectroscopie de Corelatie organizat de catre PicoQuant, la Berlin, Germania. Cursul a avut ca scop introducerea participantilor in domeniul microscopiei de fluorescanta rezolvata in timp si in aplicatiile acestei tehnici in stiintele vietii. In cadrul cursului am avut ocazia sa particip atat la sesiuni teoretice, cat si sesiuni practice. In cadrul sesiunilor teoretice am dobandit cunostinte legate de diferite metode de microscopie de fluorescanta, instrumentatia folosita si analiza datelor, in timp ce in cadrul celor practice am avut ocazia sa utilizez instrumente apartinand marilor companii precum Nikon, Olympus, Zeiss si PicoQuant si sa observ in mod aplicat metodele explicate in cadrul sesiunilor teoretice.

In urma cursului am asimilat informatii si dobandit competente in tehnici de microscopie si spectroscopie de fluorescanta, care conduc atat la dezvoltarea personala cat si a grupului de cercetare din care fac parte. Astfel, am invatat despre metode de microscopie de fluorescanta precum transferul energetic rezonant de tip Foerster (Foerster Resonance Energy Transfer, FRET), metode de imagistica precum imagistica timpului de viata a fluorescetei (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) si microscopia de fluorescanta cu doi fotoni (Two-Photon Microscopy).

In cazul FLIM, se obtine o imagine in care contrastul este dat de diferentele intre ratele de dezexcitare a fluorescetei caracteristice fluoroforilor investigati. Imaginile rezultate ofera informatii despre intensitatea fiecarui pixel determinata de timpul de viata a fluorescetei, permitand vizualizarea in contrast a materialelor cu rate diferite de dezexcitare si oferind informatii despre modificari in ratele de dezexcitare, ca in cazul imagisticii de tip FRET. Timpul de viata a fluorescetei, care este definit ca timpul mediu petrcut de o molecula in starea excitata inainte de a se reintoare pe starea fundamentala prin emiterea unui foton, nu depinde de concentratie, grosimea probei sau intensitatea excitarii, dar depinde de o multitudine de paramentrii dati de mediul incojurator al moleculei, precum pH, concentratia de ioni sau oxigen, interactii moleculare sau proximitatea unor acceptori energetici. Tehnica poate fi folosita ca metoda de imagistica cu microscopia confocala sau microscopia de excitare la doi fotoni. Un set-up tipic acestei metode utilizeaza o sursa laser in pulsuri, un detector de tip „single photon” (SPAD, PMT, hybrid PMT), un microscop confocal, o unitate de numarare a unui singur foton corelat in timp (TCSPC) si un sistem electronic de sincronizare adecvat pentru inregistrarea datelor (Figura 1).

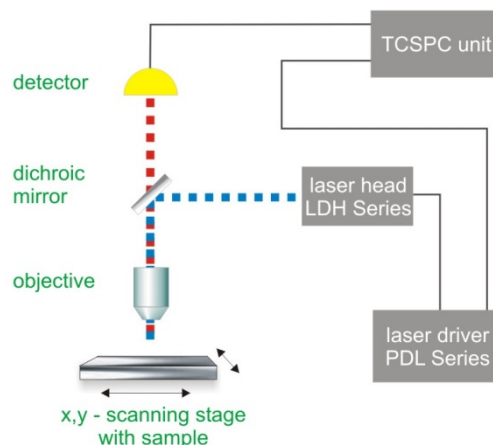


Figura 1. Set-up tipic pentru FLIM

FLIM este aplicata mai ales in domeniul biologiei, plecand de la investigatii bazate pe detectia unor foto-sensibilizatori in culturi celulare, dar si in medicina si stiinta materialelor, unde este folosita pentru caracterizarea si controlul calitatii unor materiale noi, precum cele folosite in fotovoltaice, OLED, materiale de tipul celor colectoare de lumina sau suprafete functionalizate. Astfel, metoda de imagistica a timpului de viata a fluorescentei poate fi folosita pentru investigarea mediului inconjurator al unui fluorofor, avand aplicatii in senzori biologici, detectia interactiilor inter- si intra-moleculare prin tehnica FRET, detectia modificarilor conformationale sau discriminarea unor etichete fluorescente in cazul etichetarilor multiple sau indepartarii auto-fluorescentei.

FRET este un proces neradiativ in care energia unei molecule fluorescente excitate (donor) este transferata la o molecula fluorescenta care nu a fost excitata (acceptor), aflata in imediata apropiere a donorului. Transferul energetic conduce la stingerea fluorescentei donorului, care se traduce prin modificari ale intensitatii semnalului de fluorescena si ale timpului de viata a fluorescentei caracteristic celor doi fluorofori. FRET este puternic dependenta de distanta intre moleculele donor-acceptor, fiind prezenta pe distante de ordinul catorva nanometrii si permitand astfel masuratori de fluorescena dincolo de limita de rezolutie teoretica a microscopiei optice. Prin FRET pot fi investigate formarea complexelor proteice, interactiile proteina-proteina, modificarile structurale si conformationale ale acizilor nucleici, distributia si transportul lipidelor. Acestea pot fi realizate prin etichetarea moleculelor de interes cu fluorofori, anticorpi fluorescenti sau proteine fluorescente si investigarea transferului energetic intre cele doua sisteme.

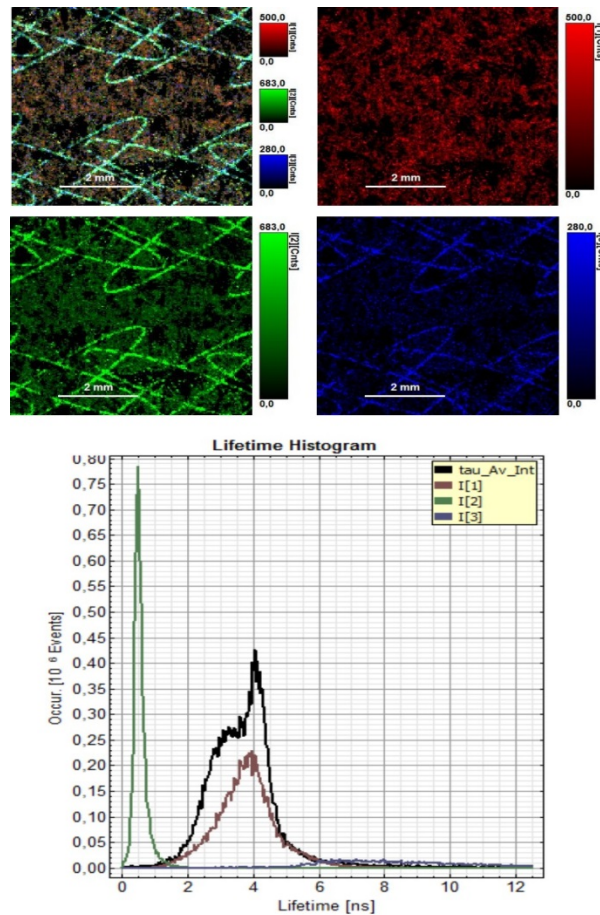


Figura 2. Imagini FLIM achizitionate de pe o hartie pe care a fost scris cu cerneala invizibila dintr-un amestec de doi fluorofori. Pentru a separa cei doi fluorofori, semnalul a fost fitat cu un model tri-exponential, timpii obtinuti fiind vizibili in histograma timpilor de viata: 0.5 ns care apartine autofluorescentei hartiei, 3.6 ns caracteristic primului fluorofor si 6.6 ns caracteristic celui de-al doilea fluorofor. Distributia timpilor de viata este vizualizata prin fitarea pixel cu pixel a imaginii achizitionate si maparea in RGB [Imagine obtinuta de pe site-ul www.picoquant.com].

Aceste metode permit largirea ariei de cercetari pe care le putem realiza momentan in laboratorul Laser in femtosecunde. Sistemul existent in laborator este dedicat masuratorilor spectroscopice de fluorescanta rezolvata in timp prin doua metode: metoda de numarare a unui singur foton corelat in timp, prin care putem rezolva timpi de viata a fluorescentei pana la cateva sute de picosecunde si metoda de fluorescanta de tip „up-conversion”, care se bazeaza pe suprapunerea in timp si spatiu a semnalului de fluorescanta cu un puls de referinta. Semnalul inregistrat este dat de suma frecventelor celor doua pulsuri, un semnal care se emite la lungimi de unda mai mici si a carui rezolutie temporala este data de largimea pulsului laser de referinta. Astfel, aceasta metoda permite rezolvarea unor timpi de viata a fluorescentei pana la cateva sute de femtosecunde. Aplicatiile principale caracteristice acestor metode se refera la identificarea sau separarea speciilor studiate pe baza timpului de viata a fluorescentei, monitorizarea modificarilor in mediul inconjurator al unui fluorofor, studiul proteinelor, investigarea transferului energetic in probele studiate. Limitarea celor doua metode este data de faptul ca masuratorile pot fi realizate in probe lichide si eventual in probe solide in urma unor modificari ale set-upului. Avantajele aduse de metodele prezentate in cadrul cursului se refera evident la posibilitatea inregistrarii unor imagini microscopice a semnalului de fluorescanta, permitand astfel

analiza si altor tipuri de probe, precum si investigarea distributiei in probele studiate a moleculelor sau proceselor de interes. Aceste metode ar putea fi implementate si in laboratorul de Laser in femtosecunde in urma unor upgradari ale sistemelor existente, prin conectarea laserului in pulsuri la microscopul inversat Olympus si achizitia de sisteme necesare inregistrarii datelor.

De asemenea, participarea la curs mi-a oferit sansa de a discuta fata in fata cu inginerii din cadrul companiei PicoQuant, experti in instrumentatia folosita pentru spectroscopia de fluorescenta rezolvata in timp si analiza datelor. Astfel, am avut ocazia sa imi clarific unele nelamuriri legate de analiza si fitarea datelor utilizand software-ul EasyTau2, pe care l-am achizitionat de curand de la firma PicoQuant si sa schimb date de contact care mi-ar putea fi de folos in viitor.

Informatiile pe care le-am asimilat in urma cursului imi vor fi de real folos pentru experimentele de tip spectroscopie de fluorescenta rezolvata in timp si analiza datelor obtinute. Primele rezultate pe care ma astept sa le obtin in viitorul apropiat prin aplicarea cunostintelor dobandite sunt legate de indeplinirea obiectivelor proiectului PCCDI-74-P5 „Dezvoltarea de materiale fotosensibile pe bază de ficobiliproteine pentru aplicații în celule solare bio-hibride”. Cunostintele acumulate am inceput deja sa le aplic pentru imbunatatirea experimentelor, achizitia de semnal raportat la zgomot imbunatatit si analiza de date in care ma pot increde. In plus, competentele obtinute le voi putea aplica si pentru a utiliza sistemul FLIM MicroTime 2000 existent in cadrul laboratorului de Nano-Biofotonica si Microscopie Laser din cadrul Institutul de Cercetari Interdisciplinare, Cluj-Napoca si analiza datele obtinute cu acest instrument, in vederea indeplinirii obiectivelor din cadrul proiectului mai sus mentionat pentru anul 2020.

Utilizand cunostintele si competentele dobandite in cadrul acestui curs, lucrez la participarea la o conferinta si publicarea unui articol, rezultate care sper sa se materializeze in cadrul acestui an.