

Approfondimento sulla Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

di Eduardo Rossi

Introduzione

La FRAP è una tecnica di indagine microscopica che sfrutta il *bleaching* dei cromofori per determinare caratteristiche dinamiche e morfologiche di ambienti cellulari. In generale l'uso di marcatori fluorescenti in microscopia biologica è largamente diffuso. Il vantaggio che normalmente se ne ottiene, e che ne ha decretato il largo uso, deriva dalla possibilità di legare il marcatore fluorescente a siti specifici dell'ambiente cellulare. In questo modo si riesce ad ottenere un'immagine ottica differenziata per i siti d'interesse (marcati ad esempio con proteine fluorescenti), rispetto ai costituenti del restante campo visivo.

La FRAP va oltre questo impiego "classico" della fluorescenza. Lo scopo non è più quello di separare visivamente parti funzionali diverse, ma, piuttosto, quello di ricavare dati dinamici e morfologici altrimenti difficilmente ottenibili da pure considerazioni ottiche o fotografiche.

Per fare questo, la FRAP sfrutta una proprietà dei marcatori fluorescenti: il *photobleaching*. Con questo termine si intende la perdita della capacità del fluoroforo di emettere luce di fluorescenza, nel caso in cui sia sottoposto ad un'intensa esposizione di radiazione UV, ottica o IR.

In generale il meccanismo della fluorescenza può essere così riassunto:

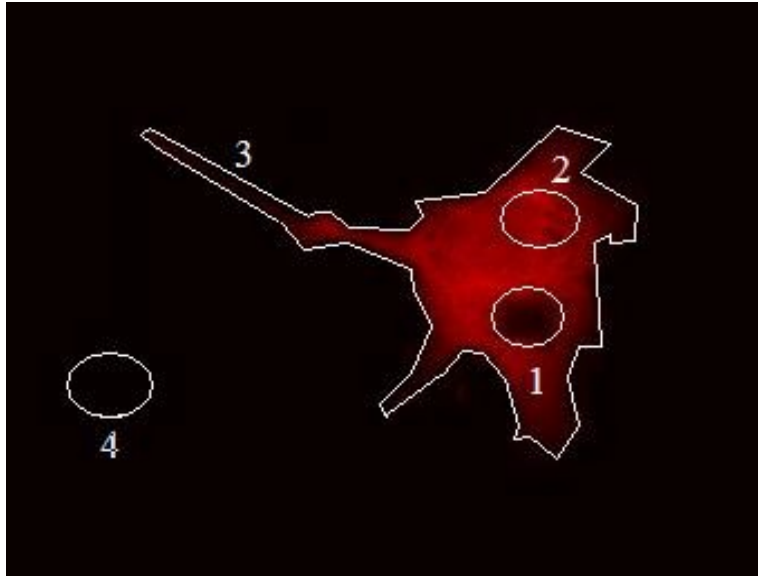
- Il fluoroforo assorbe radiazione elettromagnetica dall'esterno (tipicamente nel vicino UV).
- Questa energia fa sì che gli elettroni si eccitino in uno stato di singoletto.
- Gli elettroni nello stato eccitato perdono parte della propria energia per via non radiativa (*Internal Conversion*)
- Gli elettroni tornano allo stato fondamentale emettendo luce ad una lunghezza d'onda superiore rispetto a quella assorbita inizialmente.

L'interruzione del processo di fluorescenza, nel caso in cui il fluoroforo sia sottoposto ad intensa illuminazione laser, avviene perché la disposizione fisico-chimica degli atomi nel cromoforo viene alterata. A differenza di altri stati dark, come quelli coinvolti nella transizione di tripletto nel caso in cui si abbia fosforescenza anziché fluorescenza, il processo è irreversibile. Il cromoforo perde dunque la propria capacità di riemettere luce ad una lunghezza d'onda maggiore.

La tecnica FRAP sfrutta questa caratteristica per ricavare informazioni sulla dinamica del soggetto osservato. Essa consiste sostanzialmente in quattro passi:

- Si marca l'area di interesse in modo che sia fluorescente
- Si illumina una parte della zona di interesse con un laser, in modo da creare un'area sottoposta al *bleaching*
- Si spegne il laser in modo da poter innescare il processo di *recovery*
- Si osserva la curva di recupero della fluorescenza nella zona sottoposta al *bleaching*

Dall'andamento della curva di recupero si possono estrapolare informazioni riguardo alla dinamica e alla conformazione dell'ambiente cellulare sotto esame. Solitamente al dato del recupero della fluorescenza nella zona bleachata (*regione 1* nella figura sottostante), si affianca l'intensità della fluorescenza in un'altra zona della cellula (*regione 2*), dell'intera cellula (*regione 3*) e del background (*regione 4*).



Esempio di ROI per studiare il recupero di fluorescenza in una FRAP applicato allo studio di un neuroblastoma

L'acquisizione dell'intensità luminosa delle aree – 2,3,4 – è utile ai fini del calcolo delle curve normalizzate. Nelle curve normalizzate, l'intensità della fluorescenza, normalmente espressa in unità arbitrarie (come usualmente è l'output dei programmi di *imaging*), è ridefinita (*normalizzata*) in modo da mettere in risalto particolari caratteristiche di interesse. Ad esempio, con la seguente normalizzazione, si pone uguale ad I la fluorescenza prima del *bleaching*:

$$I(t_{post}) = \frac{I_1(t_{post}) - I_4(t_{post})}{\sum_{t=0}^{t_{bleach}-1} (I_1 - I_4) / n}$$

dove: $t_{dopbleach}$ sono gli istanti di tempo con lo zero fissato all'istante del *bleaching*

t_{bleach} è l'istante di tempo in cui si effettua il *bleaching*

n sono il numero di frame precedenti al *bleaching*

Con questa normalizzazione, si ottiene immediatamente una informazione sulla frazione mobile dei marcatori fluorescenti. Ad esempio se risulta $I_1(t=\infty)=1$ significa che non esistono marcatori fissi.

$$Mobility = \frac{I_{1post} - I_4}{I_{1pre} - I_4}$$

Nella **doppia normalizzazione** (Phair et al, 2004) si pone invece:

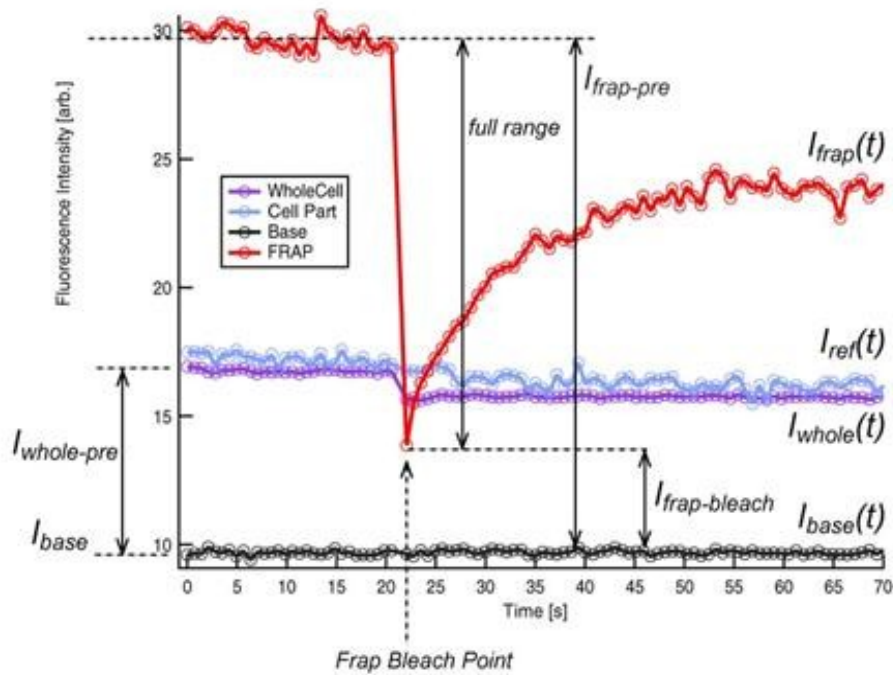
$$I_{norm}(t) = \frac{I_{3pre}}{I_{3post}(t) - I_{4post}(t)} \cdot \frac{I_1(t) - I_4(t)}{I_{1pre}}$$

dove: – con “pre” si intendono gli istanti di tempo precedenti al *bleaching*

– con “post” si intendono gli istanti di tempo successivi al *bleaching*

Il vantaggio di questa normalizzazione sta nel considerare sia gli effetti del background sia la variazione complessiva della fluorescenza cellulare.

Un esempio di una possibile misura è presentata nel grafico sottostante.



Curve di recupero: in rosso la regione bleachata, in viola l'intera cellula, in azzurro una zona della cellula, in nero il background

Analisi delle curve di recupero utilizzando le equazioni di diffusione

In questo paragrafo si ipotizza che la curva di recupero di un'area cellulare sottoposta a *photobleaching* sia descritta dalle equazioni della diffusione (equazioni di Fick). Eventuali legami chimici tra i diffusori verranno affrontati nel paragrafo dedicato al modello a compartimenti.

Le equazioni di Fick trattate in [3] descrivono il moto diffusivo dovuto al gradiente di concentrazione e ad un eventuale moto proprio del fluido in cui è immersa la particella in esame lungo un arbitrario asse x . Chiamando C la concentrazione dei fluorofori, D il coefficiente di diffusione e V_o la velocità intrinseca del fluido di immersione lungo la direzione x , si ha (vedi [3]):

$$\frac{\partial C(r, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C(r, t) - V_o \left[\frac{\partial C(r, t)}{\partial x} \right] \quad (\text{eq.1})$$

La condizione al contorno è: $C(\infty, t) = C_o$, dove C_o è la concentrazione iniziale uniforme del fluoroforo, all'istante $t=0$. E' da sottolineare che per istante $t=0$ si intende l'inizio della fase di recupero.

La condizione iniziale è:

$$C(r, 0) = C_o \exp[-\alpha T I(r)]$$

$I(r)$ è il profilo di intensità del *bleaching*, T è la durata del *bleaching* stesso, e α è una costante legata alla quantità di *bleaching* indotta (K) durante il tempo T in cui è stato acceso il laser:

$$K = \alpha T I(0)$$

Il profilo di intensità del laser impiegato è di solito gaussiano o circolare uniforme. Nel primo caso si ha:

$$I(r) = cost \cdot \exp\left(\frac{-2r^2}{w^2}\right) \quad (\text{gaussiano})$$

Nel secondo invece (vedi paragrafo successivo):

$$I(r) = cost \quad \text{per } r \leq \text{raggio del disco} \quad ; \quad I(r) = 0 \quad \text{altrimenti.} \quad (\text{circolare uniforme})$$

La fluorescenza osservata, ovvero la quantità che realmente si misura, per $t > 0$ è data da:

$$F(t) = \left(\frac{q}{A}\right) \int I(r) C(r, t) d^2r$$

dove q è il prodotto di tutte le efficienze quantiche (di assorbimento della luce, di emissione e di rivelazione). A , invece, è il fattore di attenuazione del fascio durante l'osservazione. $C(r)$ è la soluzione dell'eq. 1 (pag.3).

Un modo conveniente di rappresentare le curve di recupero della fluorescenza è nella forma frazionaria (chiamata f-minuscolo $f(t)$) [3]:

$$f(t) = \frac{[F(t) - F(0)]}{[F(\infty) - F(0)]}$$

Questa normalizzazione – versione semplificata della *doppia normalizzazione* esposta sopra – permette di scalare i valori della fluorescenza nel range $[0,1]$, dove con I si intende la fluorescenza precedente al *bleaching*. Nel seguito del lavoro qui svolto sarà usata questa formula, che ha il vantaggio di riportare i grafici non in unità arbitrarie di fluorescenza (ottenibili tramite i software di trattamento delle immagini come ImageJ), ma in unità comprese “percentuali”.

Profilo di intensità circolare uniforme

In questo caso si ha: $I(r) = \frac{P_o}{\pi w^2}$ per $r \leq w$; $I(r) = 0$ altrimenti.

Con w si intende il raggio del cerchio con cui si approssima il *bleaching* per $t=0$, con P_o si intende la potenza media del laser. La curva di recupero della fluorescenza, in forma frazionaria diventa:

$$f(t) = \exp\left(\frac{-2\tau}{t}\right) \left[I_0\left(\frac{2\tau}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau}{t}\right) \right] \quad (\text{eq. 2})$$

dove I_0 e I_1 sono le funzioni di Bessel modificate di ordine 0 ed 1 rispettivamente. In [3] è riportata una procedura semplificata per il calcolo del parametro D che bypassa il fit con la curva in (eq. 2). Il vantaggio è quello di non dover eseguire un fit non-lineare di non facile implementazione. Tale procedura consiste nei seguenti passi:

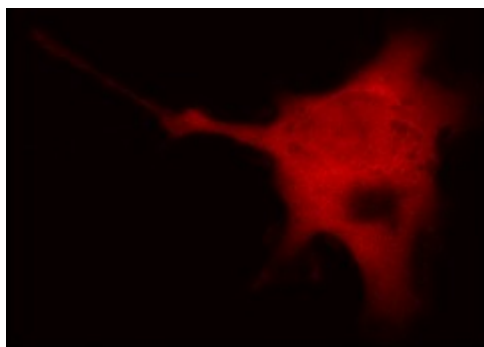
1. Esprimere la curva di recupero in forma frazionaria per gli istanti di tempo successivi al *bleaching*
2. Determinare il tempo $\tau_{1/2}$ per cui $f(\tau_{1/2}) = 1/2$
3. Calcolare il coefficiente di diffusione empirico tramite la relazione: $D_e = \left(\frac{w^2}{4\tau_{1/2}}\right) \gamma_D$,
dove γ_D è una costante che nel caso di un profilo di intensità circolare uniforme vale 0.88.

Calcolo del coefficiente di diffusione – esempi pratici

Esempio n°1 – Neuroblastoma

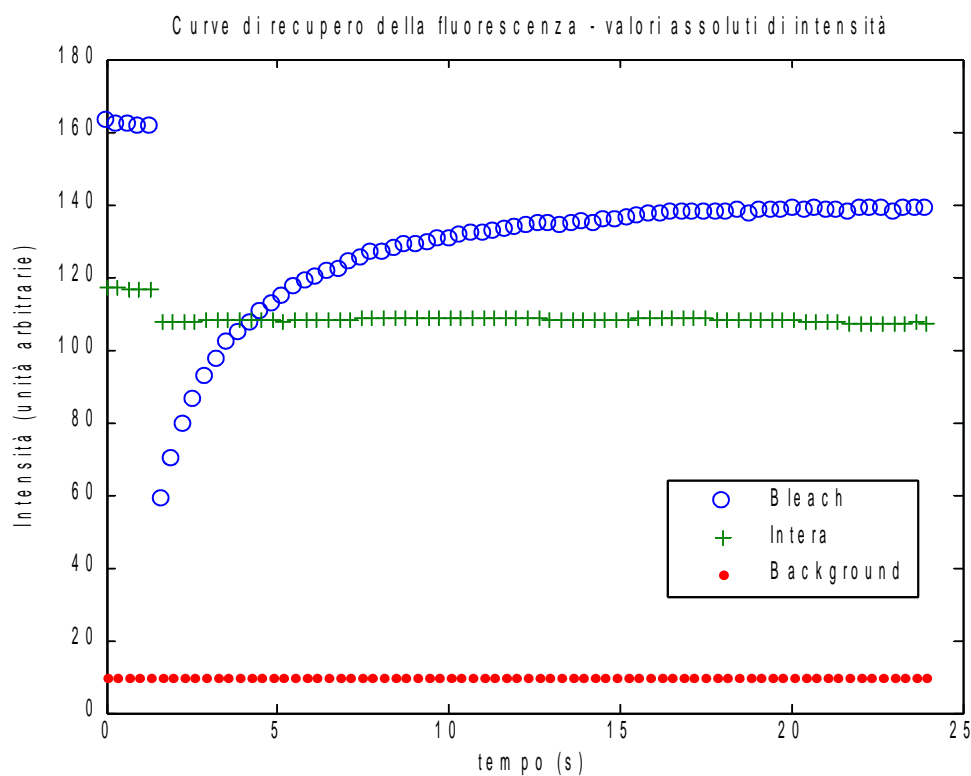
Nell'esempio proposto sarà considerato un neuroblasto affetto da tumore (*neuroblastoma*). Questo esempio sarà trattato più a fondo nell'ultima sessione.

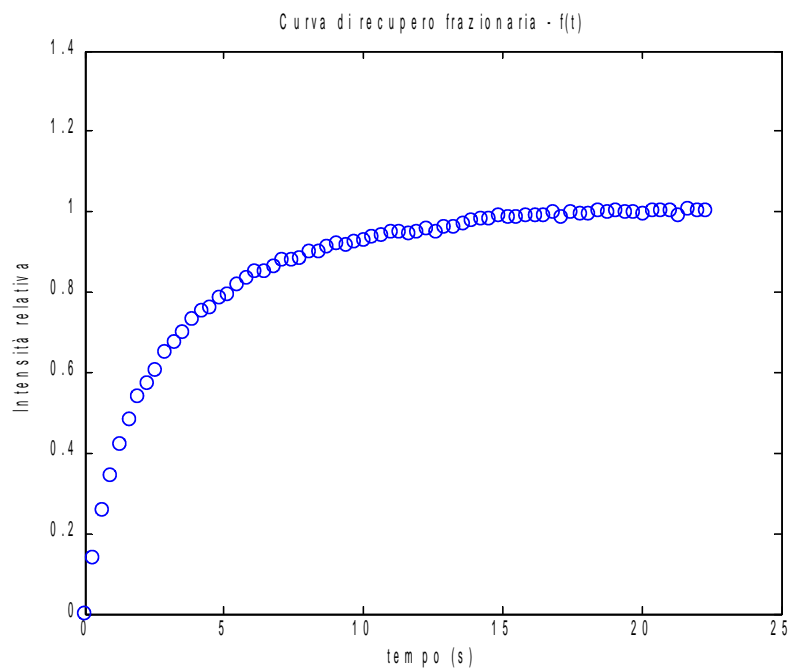
La sequenza di immagini (un totale di 75 frame presi ogni 0.32 secondi circa) è stata realizzata da Ann Cowan dell'*University of Connecticut Health Center*. La proteina fluorescente usata come marcatore è la *Allophycocyanina (APC)*. Il file-test è scaricabile da [2].



*Immagine di un neuroblastoma
ripreso nell'istante del bleaching*

Per il calcolo delle intensità dei pixel si è utilizzato il software *ImageJ*. Nei due grafici sottostanti sono riportate la curva di recupero totale $F(t)$ e quella frazionaria $f(t)$. Nel primo grafico sono riportate anche le curve del background (*in rosso*) e della fluorescenza totale della cellula (*in verde*).





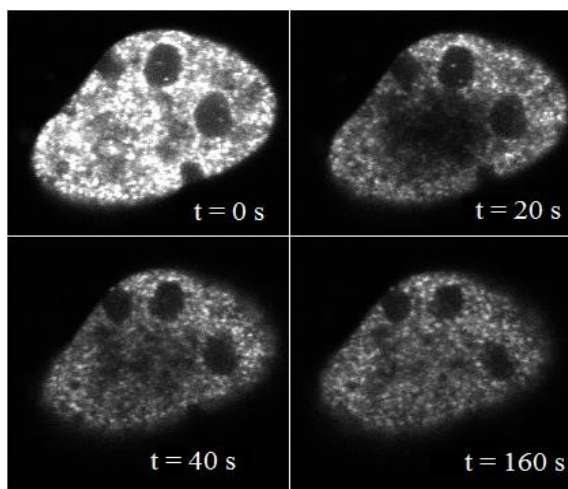
Per via numerica si è stimato $\tau_{1/2} \approx 1.8$ s. Il calcolo del raggio dello spot del *bleaching* (w) è stato effettuato grossolanamente, calcolando l'area dello spot tramite ImageJ e sapendo che il campo di vista è $225 \mu m \times 225 \mu m$. Si è stimato per w un valore pari a $5 \mu m$. La stima del coefficiente di diffusione risulta quindi essere:

$$D_e = \left(\frac{w^2}{4\tau_{1/2}} \right) \gamma_D \approx 3 \frac{\mu m^2}{s}$$

Questo valore sarà ricalcolato in maniera più rigorosa nell'ultimo paragrafo.

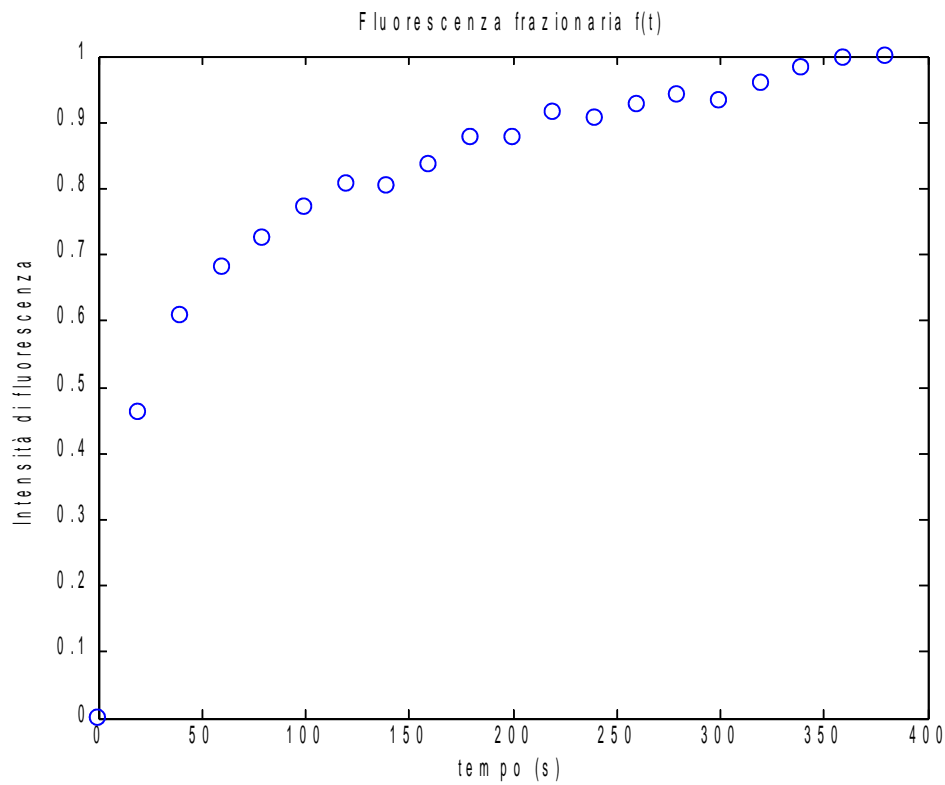
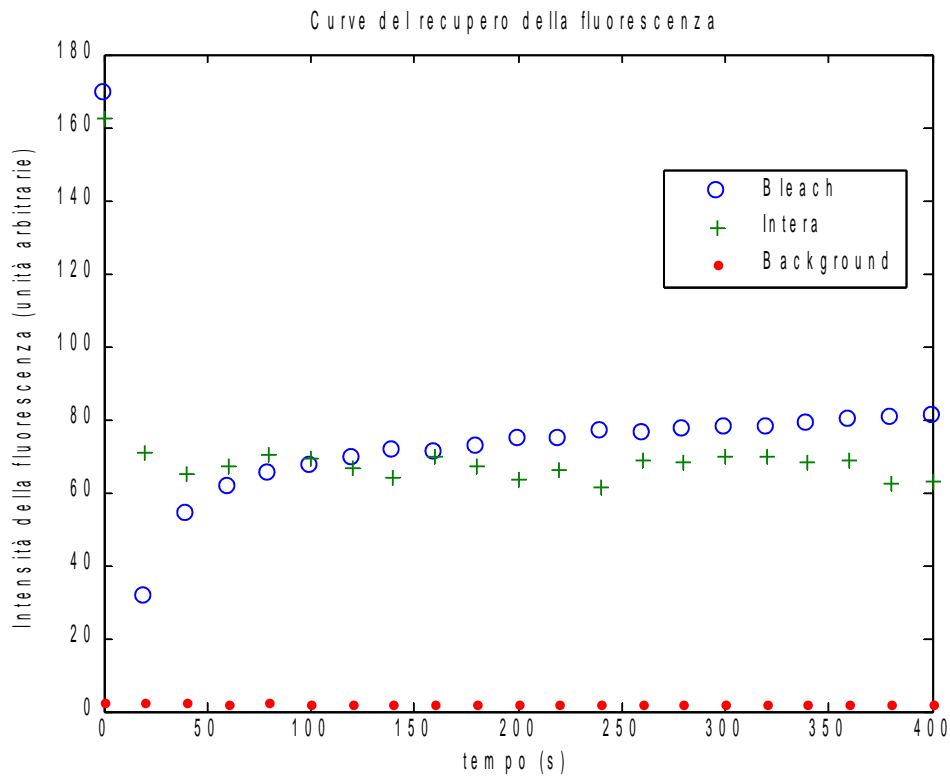
Esempio n°2 – Ritorno della fluorescenza in una cellula COS-7 marcata con una GFP-UL44wt

In questo esempio si è preso in considerazione il recupero della fluorescenza di una cellula COS-7, marcata con una proteina fluorescente GFP-UL44wt. La sequenza è presa da [4]. Il file originario si compone di 21 frame presi ogni 20 secondi.



Quattro frame non consecutivi, selezionati da una sequenza FRAP di una cellula COS-7 marcata con una GFP-UL44wt

Nelle figure sottostanti sono raffigurati invece i grafici della $F(t)$ (compreso il background e la fluorescenza totale della cellula) e della fluorescenza frazionaria $f(t)$.

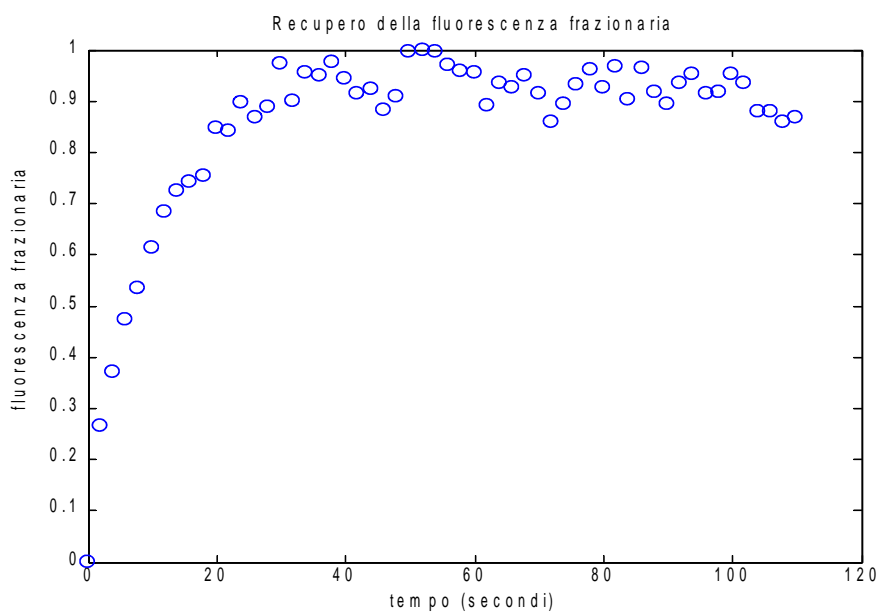
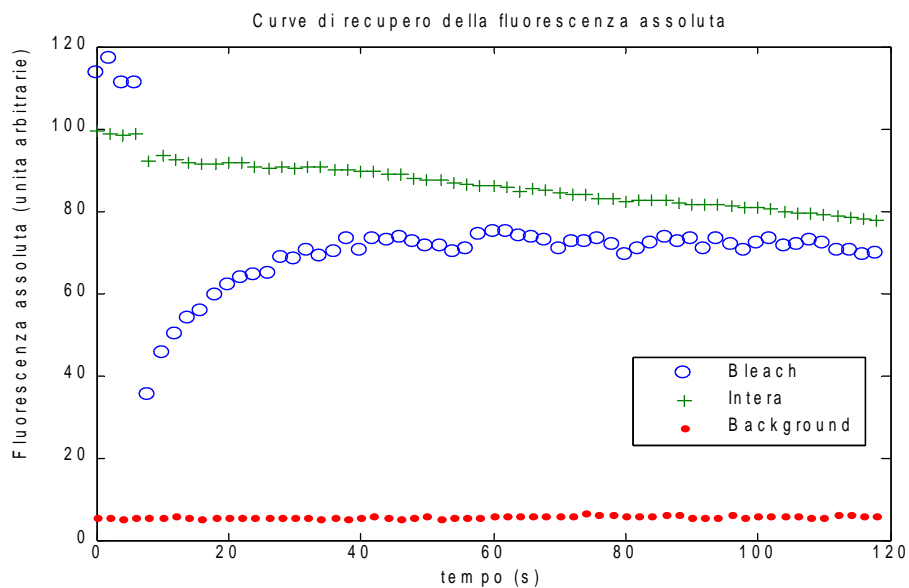


Per via numerica si è stimato $\tau_{1/2} \approx 30$ s. Il calcolo del raggio dello spot del *bleaching* (w) è stato effettuato assumendo la dimensione tipica della cellula pari a $20 \mu m$, dato plausibile trovato in letteratura [5]. Si è stimato un valore per w pari a $6.5 \mu m$. La stima del coefficiente di diffusione risulta quindi essere:

$$D_e = \left(\frac{w^2}{4\tau_{1/2}} \right) \gamma_D \approx 0.3 \frac{\mu m^2}{s}$$

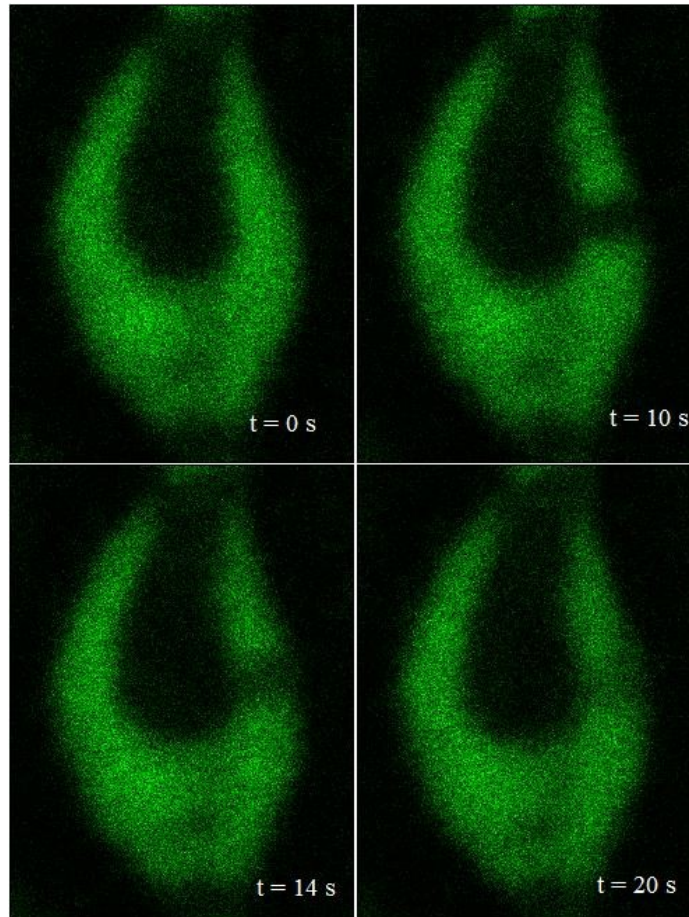
Esempio n°3 – Ritorno della fluorescenza in una giunzione neuromuscolare di *Drosophila*, analizzando il recovery delle vescicole sinaptiche marcate con *synaptotagmin-GFP*

In questo esempio è stata presa in considerazione una giunzione neuromuscolare di *Drosophila*, in cui si è osservato il moto di diffusione delle vescicole sinaptiche marcate con *synaptotagmin-GFP*. La sequenza è presa da [6]. Il file originario si compone di 60 frame presi ogni 2 secondi. Nel seguito riportiamo le curve di recupero: fluorescenza assoluta (in unità arbitrarie) e fluorescenza frazionaria.



Per via numerica si è stimato $\tau_{1/2} \approx 7$ s. Il calcolo del raggio dello spot del *bleaching* (w) è stato effettuato assumendo la dimensione tipica della giunzione neuromuscolare di una *Drosophila* pari a $10 \mu m$. Si è stimato un valore per w pari a circa $2 \mu m$. La stima del coefficiente di diffusione risulta quindi essere:

$$D_e = \left(\frac{w^2}{4\tau_{1/2}} \right) \gamma_D \approx 0.1 \frac{\mu m^2}{s}$$



Quattro frame selezionati da una sequenza FRAP di una vescicola sinoptica di Drosophila

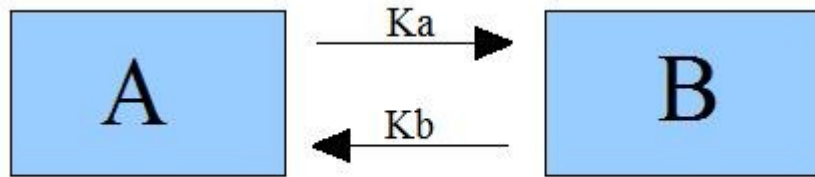
Accenno sul modello a compartimenti

Il modello diffusivo fornisce uno strumento per estrapolare informazioni di carattere dinamico da osservazioni sperimentali. Un possibile approccio consiste nell'ignorare eventuali legami di natura chimica. Infatti, nel caso in cui la diffusione sia alterata da eventuali legami chimici, un approccio puramente diffusivo, oltre a fornire un valore sbagliato della costante D , porta a trascurare l'informazione che parte dei cromofori risultano legati. Questa informazione può essere di diretto interesse nello studio dell'ambiente cellulare.

Nel caso in cui la dinamica diffusiva sia fortemente influenzata dai legami chimici, si preferisce un approccio modellistico basato sui compartimenti. In questo contesto il termine "*compartimento*" sottintende una regione fisica che può essere separata dal resto dell'ambiente cellulare in base a semplici caratteristiche fenomenologiche. In questo senso, una regione bleachata può essere un compartimento, semplicemente in base alla diversa colorazione rispetto ai fluorofori non *bleachati*.

Modello a due compartimenti

Il modello più semplice è quello con due compartimenti. L'ambiente circostante al *photobleaching* è denominato con la lettera A; l'area soggetta al *photobleaching* con la lettera B.



Il sistema delle equazioni differenziali associate a questo processo sono:

$$\frac{dA}{dt} = -K_a A + K_b B$$

$$\frac{dB}{dt} = K_a A - K_b B$$

La matrice associata al sistema di equazioni differenziali è:

$$\begin{bmatrix} -K_a & K_b \\ K_a & -K_b \end{bmatrix}$$

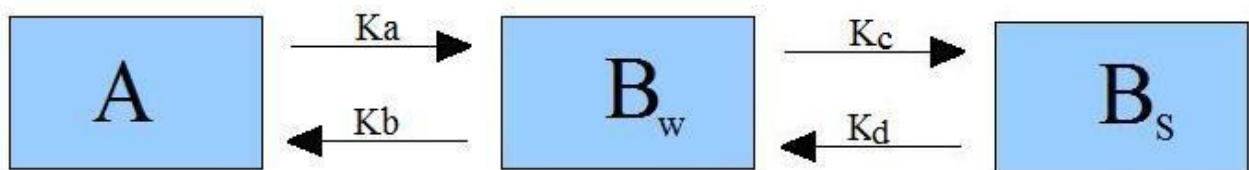
Il risultato del sistema di equazioni differenziali è:

$$A = -c_1 e^{-(K_a + K_b)t} + c_2$$

$$B = \frac{c_1}{K_a K_b} e^{-(K_a + K_b)t} + c_2$$

Dove c_1 e c_2 sono coefficienti da calcolarsi con le condizioni al contorno. Il fit esponenziale della fluorescenza nella zona bleachata fornisce dunque una indicazione sui rate dei processi che portano molecole dalla zona A alla zona B, e viceversa. La correlazione tra i coefficienti K e le costanti diffusive del moto è diretta ma di non facile risoluzione: subentrano parametri legati alla geometria ed alle condizioni esterne che ne rendono complessa la risoluzione.

Il modello a compartimenti può essere ulteriormente sviluppato ed affinato, descrivendo in maniera più realistica i processi in atto. Nel caso del *bleaching* applicato alla vescicola sinaptica della *Drosophila* (riportata nel primo paragrafo), ad esempio, il modello proposto in [6] è:



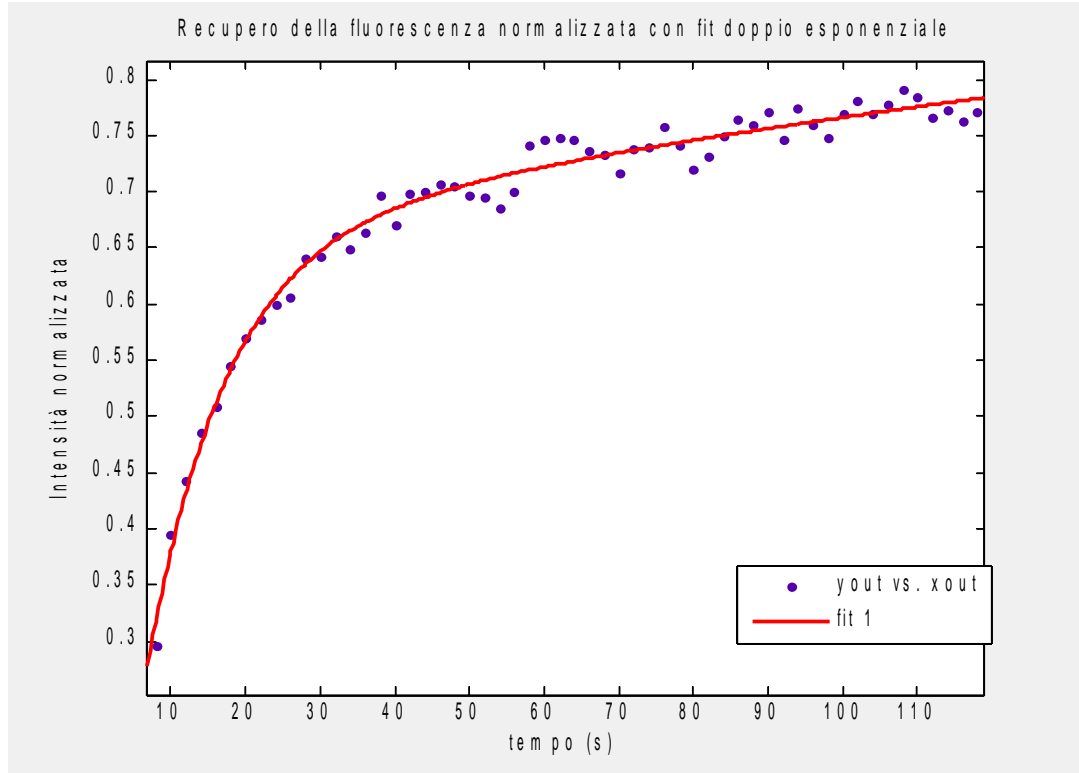
In questo contesto l'interazione può essere descritta in due fasi: una in cui i marcatori fluorescenti interagiscono più debolmente con l'ambiente cellulare limitrofo (B_w), e una in cui agiscono in maniera più forte (B_s). Il sistema di equazioni differenziali è dunque più complesso:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= -K_a A + K_b B_w \\ \frac{dB_w}{dt} &= K_a A - (K_b + K_c) B_w + K_d B_s \\ \frac{dB_s}{dt} &= K_c B_w - K_d B_s\end{aligned}$$

La matrice associata al sistema di equazioni differenziali è:

$$\begin{bmatrix} -K_a & K_b & 0 \\ K_a & -(K_b + K_c) & K_d \\ 0 & K_c & -K_d \end{bmatrix}$$

Il calcolo è mostrato in nell'*appendice* sottostante. In generale il fit della fluorescenza nella regione colpita dal *bleaching* può essere effettuato con un doppio esponenziale. Le costanti di tempo che se ne ricavano descrivono il fenomeno giustificando il rapido aumento della fluorescenza iniziale, e il lento recupero successivo. Nella figura sottostante è raffigurato il doppio fit esponenziale, effettuato sulla curva di recupero dell'intensità di fluorescenza della vescicola sinaptica trattata nell'esempio-3 (pag.8). Come suggerito nell'articolo da cui si è tratto il filmato [6], le due costanti di tempo descrivono fenomeni diffusivi che avvengono con modalità temporali diverse.



*Recupero della fluorescenza in una vescicola sinaptica di Drosophila.
Sovrapposto in rosso il fit doppio esponenziale*

I risultati del fit ($f(x) = 1-a*(exp(-b*x))-c*(exp(-d*x))$), sono:

$$\begin{aligned} a &= 0.12 \quad (0.09, 0.15) \\ b &= 12.26 \quad s^{-1} \quad (10.10, 14.12) \\ c &= 0.87 \quad (0.76, 0.99) \\ d &= 0.09 \quad s^{-1} \quad (0.08, 0.10) \end{aligned}$$

Appendice:

$$\begin{bmatrix} A \\ B_w \\ B_s \end{bmatrix} = c1 \begin{bmatrix} q_1 \\ q_2 \\ q_3 \end{bmatrix} e^{\lambda_1 t} + c2 \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \end{bmatrix} e^{\lambda_2 t} + c3 \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \end{bmatrix} e^{\lambda_3 t}$$

dove:

- $\lambda_{1,2,3}$ sono gli autovalori della matrice e nel caso proposto valgono:

$$\lambda_1 = 0$$

$$\lambda_2 = -1/2 k_c - 1/2 k_d - 1/2 k_a - 1/2 k_b + P_1$$

$$\lambda_3 = -1/2 k_c - 1/2 k_d - 1/2 k_a - 1/2 k_b - P_1$$

$$\text{dove: } P_1 = 1/2 (k_c^2 + 2k_d k_c - 2k_a k_c + 2k_c k_b + k_d^2 - 2k_a k_d - 2k_b k_d + k_a^2 + 2k_a k_b + k_b^2)^{(1/2)}$$

$$- \quad q_1 = 1/(k_a * k_b)$$

$$q_2 = -(1/2 * k_c + 1/2 * k_d - 1/2 * k_a - 1/2 * k_b + 1/2 * P_2) / k_c$$

$$q_3 = -(1/2 * k_c + 1/2 * k_d - 1/2 * k_a - 1/2 * k_b - 1/2 * P_2) / k_c$$

dove:

$$P_2 = (k_c^2 + 2 * k_d * k_c - 2 * k_a * k_c + 2 * k_c * k_b + k_d^2 - 2 * k_a * k_d - 2 * k_b * k_d + k_a^2 + 2 * k_a * k_b + k_b^2)^{(1/2)}$$

$$- \quad y_1 = 1$$

$$y_2 = (-1/2 * k_c + 1/2 * k_d - 1/2 * k_a - 1/2 * k_b + P_3) / k_c$$

$$y_3 = (-1/2 * k_c + 1/2 * k_d - 1/2 * k_a - 1/2 * k_b - P_3) / k_c$$

dove:

$$P_3 = 1/2 * (k_c^2 + 2 * k_d * k_c - 2 * k_a * k_c + 2 * k_c * k_b + k_d^2 - 2 * k_a * k_d - 2 * k_b * k_d + k_a^2 + 2 * k_a * k_b + k_b^2)^{(1/2)}$$

$$- \quad x_1 = 1/(k_d * k_c)$$

$$x_2 = 1$$

$$x_3 = 1$$

Utilizzo del software Virtual-Frap per modellizzare un processo diffusivo ad una componente

In questa ultima parte si è utilizzato il software Virtual-Frap [2]. L'intenzione è quella di andare oltre il calcolo del coefficiente di diffusione, e di osservare come, in certi contesti, la simulazione possa descrivere efficacemente la realtà.

Nel modello ad una componente si ipotizza la presenza di una unica specie diffusiva. E' possibile trovare in letteratura anche modelli che si basano su un numero maggiore di componenti [1]. La scelta del numero delle specie diffusive è basata sostanzialmente su una conoscenza preliminare del soggetto in esame. Nel caso in cui non si abbiano informazioni riguardo al numero di componenti attese, una strategia adottabile è quella di confrontare i fit eseguiti sui dati sperimentali ipotizzando prima un modello ad una componente, e successivamente uno a due. In questo paragrafo il profilo di intensità del laser è supposto essere gaussiano, al contrario di quanto effettuato a *pag.4*. Questa scelta è dettata dal fatto che il software utilizzato (Virtual-FRAP [2]), assume per default un profilo laser gaussiano. Il software si avvale di questa supposizione per ricavare i valori iniziali dei parametri: il calcolo dei valori finali dei parametri è stimato tramite un processo di simulazione iterativa, che confronta ad ogni passaggio del ciclo la corrispondenza tra esperimento e teoria.

Definendo F_i l'intensità di fluorescenza prima del *bleaching*, ed $F(0)$ la prima intensità immediatamente successiva al *bleaching*, si ha:

$$F(t) = \phi F_i f(t) + (1 - \phi) F(0)$$

dove $F(t)$ è l'intensità (in unità arbitrarie) al tempo t , ϕ è la frazione mobile di molecole fluorescenti ed $f(t)$ (fluorescenza frazionaria) è la serie:

$$f(t) = \sum_{n=0}^{\infty} \left[\frac{(-K)^{-n}}{n!} \right] \left(1 + n + \frac{2nt}{\tau} \right)^{-1}$$

La costante K – come detto a *pag.4* - è un parametro che descrive la quantità di *bleaching* indotta nel tempo T in cui è stato acceso l'impulso laser. E' legato ai valori di F_i e di $F(0)$ dall'equazione:

$$F(0) = \frac{F_i [1 - \exp(-K)]}{K}$$

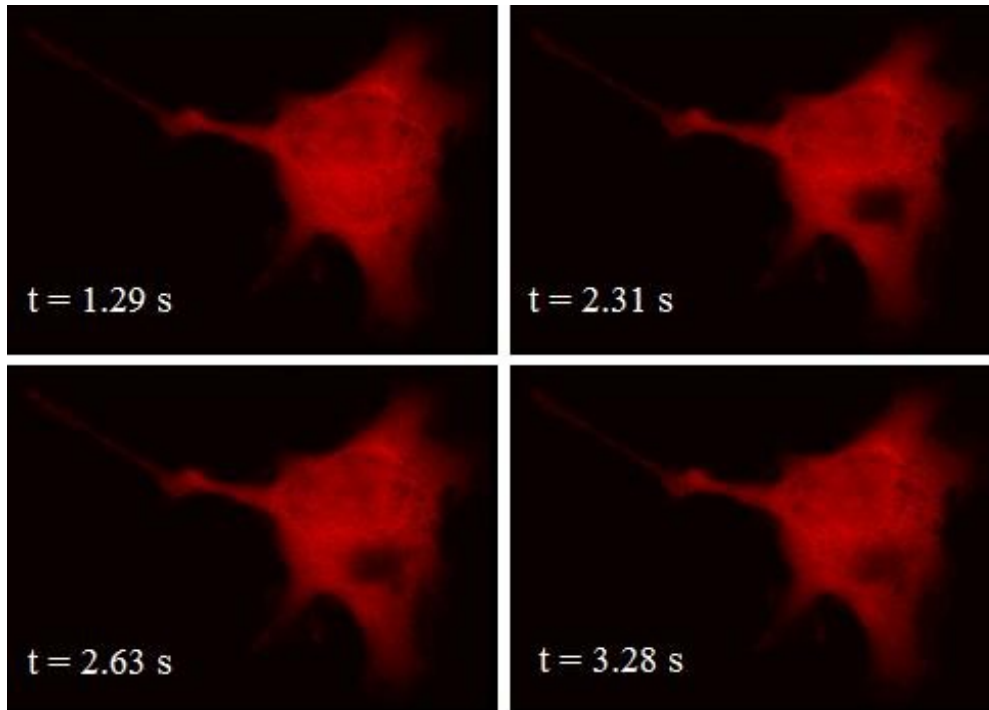
I parametri da calcolare mediante il fit con i dati sperimentali sono sostanzialmente tre:

- ϕ (*Primary mobile fraction*): cioè la frazione di molecole fluorescenti che possono diffondere
- K (*Bleach while monitoring rate*): cioè la costante che regola la quantità di *bleaching* fornita inizialmente
- τ (*Primary diffusion rate*): tempo caratteristico di diffusione

Sia ϕ sia τ forniscono informazioni utili alla comprensione del moto di diffusione.

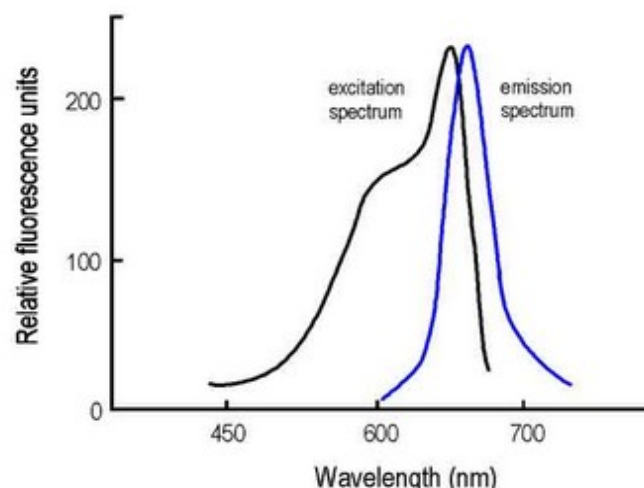
Come già detto in precedenza, la frazione di marcatori fluorescenti immobili (ϕ), influenza il tasso di recupero della fluorescenza nella zona sottoposta a *bleaching*: maggiore ϕ , minore sarà la differenza tra fluorescenza prima e dopo il *bleaching*. Il dato stesso dei marcatori non capaci di diffondere costituisce un indizio significativo delle caratteristiche interne della zona cellulare sottoposta all'analisi.

Nell'esempio proposto sarà considerato un neuroblasto affetto da neuroblastoma, come nell'esempio 1. Le immagini sottostanti raffigurano gli istanti immediatamente precedenti e successivi al *photobleaching*.



Quattro frame selezionate da una sequenza FRAP applicata allo studio di un neuroblastoma

La proteina fluorescente usata come marcatore è la Allophycocyanina (APC), di cui sono rappresentati gli spettri di eccitazione ed emissione.



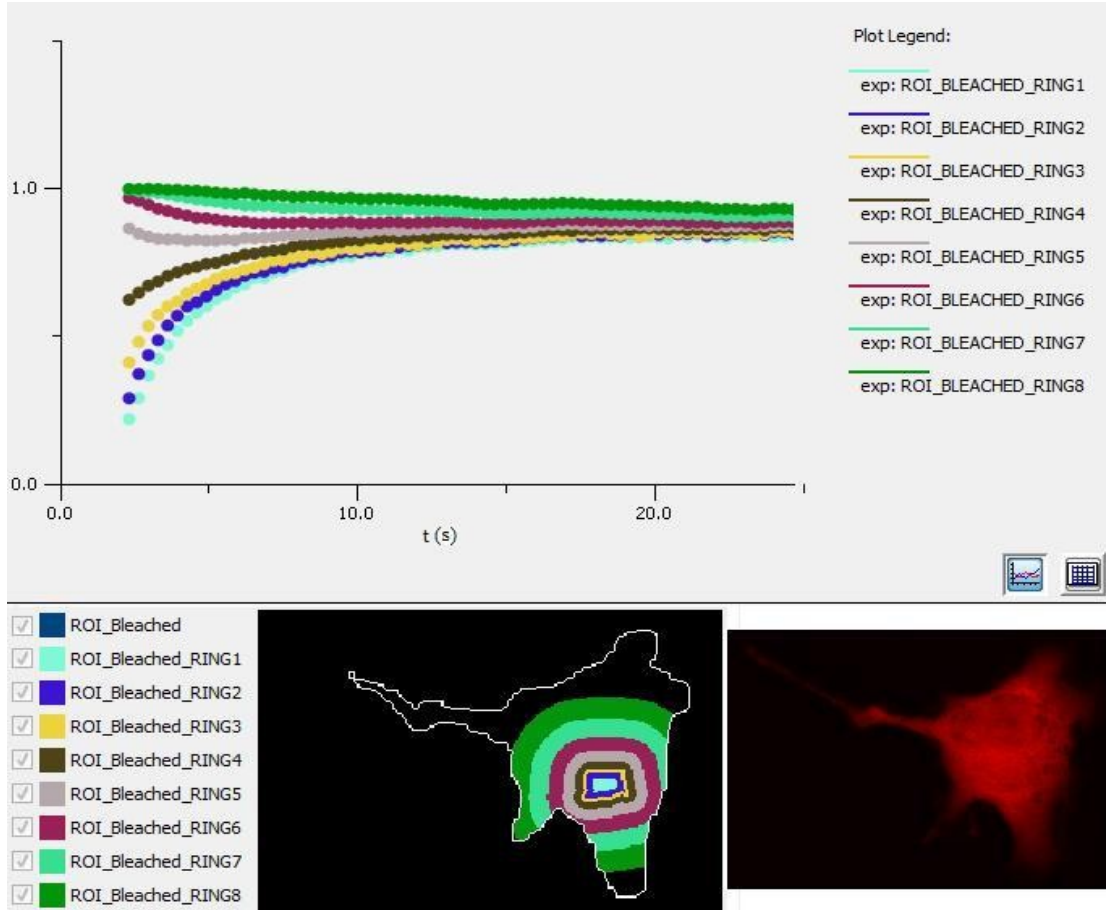
Spettro di eccitazione ed emissione della proteina fluorescente Allophycocyanina

La proteina fluorescente presa in esame risulta essere sostanzialmente inerte all'ambiente circostante, e quindi il comportamento FRAP atteso risulta ben modellizzato anche usando una trattazione puramente diffusiva.

Le assunzioni sperimentali sono tali permettere una analisi 2-dimensionale:

- La cellula è approssimativamente piatta
- La cellula è uniformemente illuminata lungo l'asse Z (microscopio wide-field o impiego di un largo pin-hole)

Il software utilizzato per l'analisi (Virtual-FRAP [2]) adotta una doppia normalizzazione (vedi pag.2).

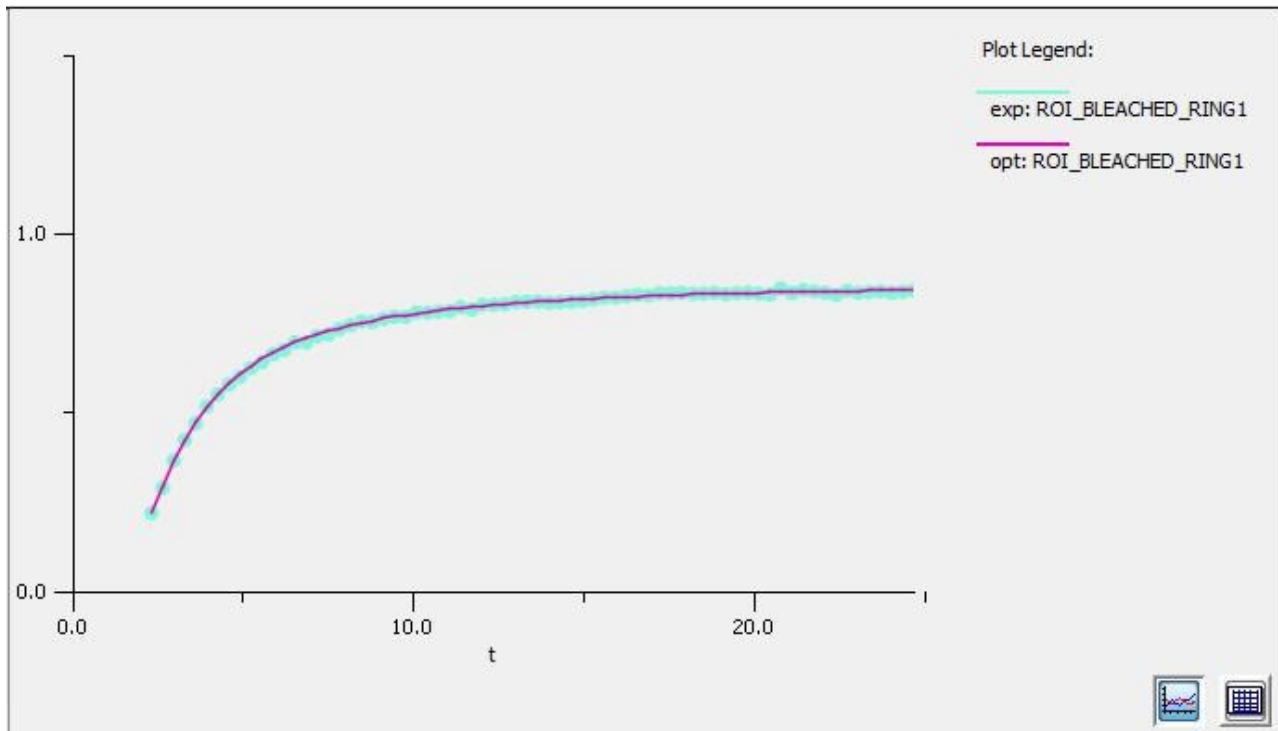


Nell'immagine sono raffigurate le curve di recupero dell'area colpita da *photobleaching* (in azzurro) e delle sette zone circostanti (raffigurate dagli anelli colorati concentrici). Allontanandosi dalla regione colorata in azzurro (area col massimo *photobleaching*), si osserva come le curve di recupero tendano ad avere un recupero più lento. Si nota come anche nelle regioni più esterne (come quella verde), si osservi un cambiamento della fluorescenza, seppur lieve. Il fenomeno diffusivo è dunque un processo a catena, che non interessa soltanto la zona prossima al *bleaching*, e dipende fortemente dalle differenze nella mobilità dei marcatori fluorescenti negli anelli di colori diversi.

Come detto in precedenza, il software utilizza la teoria del modello ad una componente ([1],[3]) per ricavarsi una stima plausibile dei valori dei parametri. Il dato finale, tuttavia, è affinato mediante algoritmi iterativi che confrontano la diffusione spaziale reale con quella modellizzata.

Nella tabella sottostante e nella seguente immagine sono raffigurati, a titolo di esempio, il fit ottenuto per la regione a massimo *bleaching* (area azzurra). Il programma fornisce i valori finali dei tre parametri cercati col modello ad una componente (il programma non calcola τ ma direttamente D) :

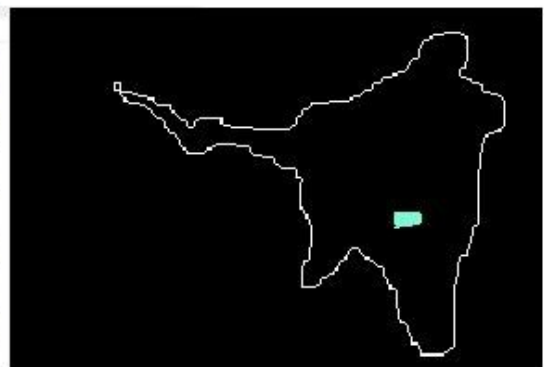
Parametro	Valore trovato	Intervallo di confidenza 95%
ϕ	0.9485	[0.90984 , 0.98942]
K	0.001 s^{-1}	[3.9405E-4, 1.6358E-3]
D	4.9384 $\frac{\mu m^2}{s}$	[4.1204 , 5.9639]
1 - ϕ	0.0515	



Analysis Parameters among Models

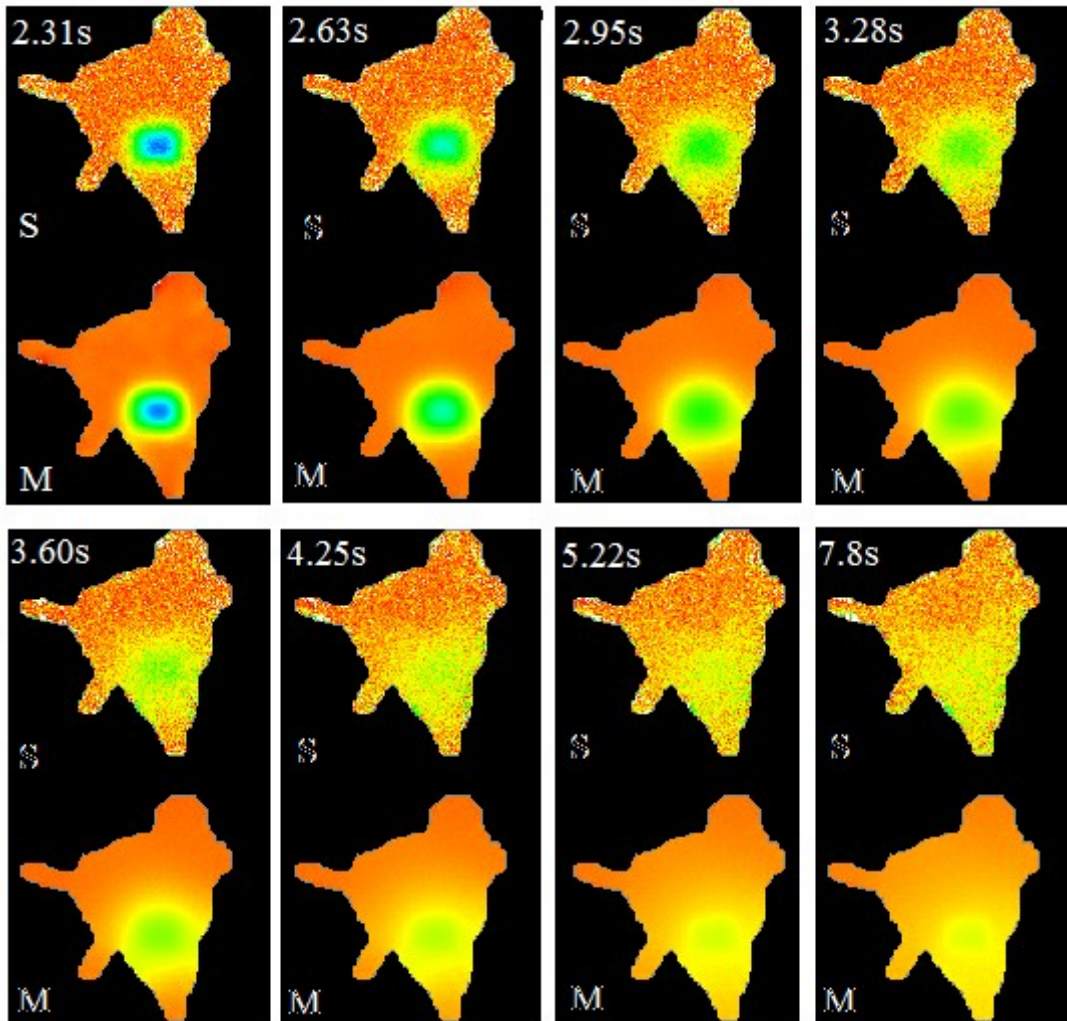
Models

Parameter Name	Diffusion with one diffusing component	
	Value	Confidence Interval
Primary_diffusion_rate	4,9384	[4.1204, 5.9639]
Primary_mobile_fraction	0,9485	[0.90984, 0.98942]
Bleach_while_monitoring_rate	0,001	[3.9405E-4, 1.6358E-3]
Secondary_diffusion_rate		
Secondary_mobile_fraction		
Immobile Fraction	0,0515	



Nell'esempio riportato si vede come la frazione mobile sia prossima al 95%. Questo dato è di diretto utilizzo nello studio della cellula sotto esame: indica che la maggior parte dei marcatori fluorescenti sono associati ad elementi per cui la diffusione è consentita. Il valore del coefficiente di diffusione trovato dal software ($4.9 \mu m^2/s$) non si discosta molto da quanto stimato precedentemente in maniera grossolana nell' *esempio 1* ($3 \mu m^2/s$). La conoscenza del valore D permette, assieme ai dati delle condizioni iniziali e al contorno, di risolvere l'equazione della diffusione. Il software utilizzato risolve l'equazione differenziale passo passo, e consente quindi di creare un filmato (in formato .mov, leggibile da Quick Time Player) che simula il processo diffusivo.

Il confronto tra l'animazione delle immagini realmente acquisite e quelle modellizzate, consente una verifica a posteriori della bontà delle assunzioni fatte. Nel seguito sono riportati otto frame estratti dal filmato fornito in output dal software. L'immagine superiore (contrassegnata da una "S") è "reale", e mostra in falsi colori la distribuzione della fluorescenza nei vari istanti all'interno del neuroblasto (per default a colori freddi corrispondono le aree bleachate). Le immagini sottostanti (contrassegnate da una "M"), sono invece il risultato della modellizzazione. Il confronto, seppur qualitativo, mostra la bontà delle ipotesi fatte: se oltre al processo diffusivo, fossero state presenti altre dinamiche (come legami chimici o flussi propri) il confronto avrebbe dato esito contrastante.



Bibliografia

- 1) “*Analysis of Simulated and Experimental Fluorescence Recovery After Photobleaching. Data for Two Diffusing Components*” - Gerald W. Gordon, Brad Chazotte, Xue Feng Wang, and Brian Herman - Biophysical Journal Volume 68 March 1995
- 2) Software scaricabile dal sito: <http://ntcnp.org/twiki/bin/view/VCell/VFRAP> dell'University of Connecticut Health Center
- 3) “*Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics*” - D.Axelrod, D.E.Koppel, J. Schlessinger, E.Elson, A.W. Webb – Biophysical Journal Volume 16 1976
- 4) <http://jvi.asm.org/cgi/content/full/83/18/9567/DC1> “*The Flexible Loop of the Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Processivity Factor ppUL44 Is Required for Efficient DNA Binding and Replication in Cells*” - J. Virol. Alvisi et al. 83: 9567
- 5) <http://stbb.nichd.nih.gov/pdf/cell%2001390.pdf>
- 6) <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/11/37/>
- 7) <http://neuro.cjb.net/cgi/content/full/18/19/7662>

Ringraziamenti

Ringrazio per l'aiuto fornitomi e per il fitto scambio di email, lo staff di “Virtual Frap” dell'Health Center dell'University of Connecticut. In particolar modo: Jim Schaff, Ann Cowan, Boris M.Slepchenko e Ye Lie