

Preučevanje dinamičnih procesov v biofiziki

Difuzija, konvekcija in reakcije v biofiziki, FRAP in FCS

Martin Šifrar
Molekularna biofizika

Oddelek za fiziko, FMF UL

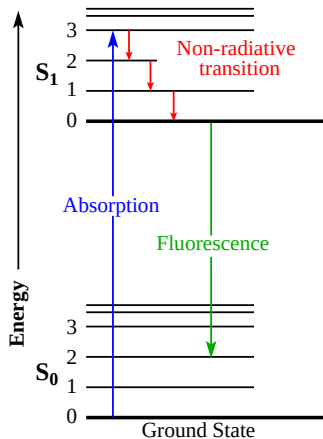
2024/25

- **Mikroskopi** so osnovno orodje eksperimentalnih biofizikov.
- Procesi so **dinamični**.
 - Difuzija,
 - Konvekcija,
 - Kemijske in konformacijske reakcije.
- Zgolj strukturna slika nezadostna za celotno razumevanje, zato potrebujemo orodja, ki omogočajo **preiskovanje dinamike**.

Predstavil bom dve tehniki, **FRAP** in **FCS**, ki sta primerni za takih dinamičnih procesov v biofizikalnih sistemih.

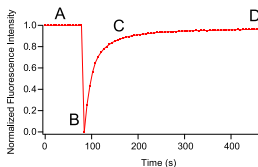
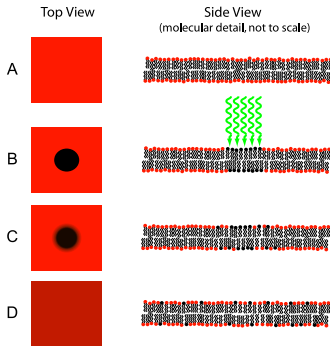


(a) *Lignum nephriticum* iz drevesa Narra, diuretik in prvi opisan primer fluorescence.



(b) Diagram energijskih prehodov pri fluorescenci.

FRAP, Fluorescence recovery after photobleaching



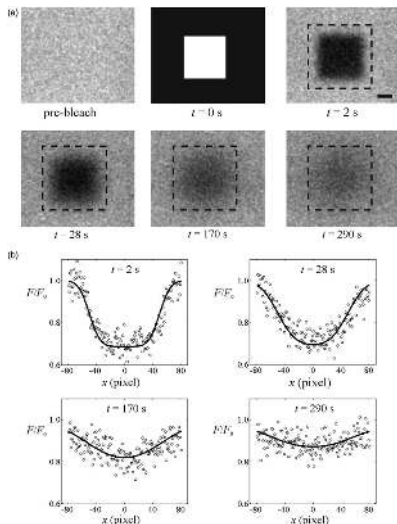
- S fluorofori označimo membrano.
- Del membrane **osvetlimo z visoko intenziteto**, da fluorofori v vzorcu pobledijo (ang. *photobleaching*).
- Opazujemo **difuzijo fluoroforov** iz nepobledelega v pobledelo območje, ki upošteva difuzijsko enačbo

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c.$$

- Tipično **dominantna difuzija** (označeni proteini prosti) ali **reakcija** (regeneracija omejena z disociacija proteinov).

FRAP, Fluorescence recovery after photobleaching

Dejanski eksperiment
FRAP z kvadratom
vzorcem fotobeljenja.
Vzeto iz [1], izvorno iz [2].



1. Problem FRAP. Fotobledenje proizvede toksične radikale.

Alternativa: FCS tehnika,

- manj invazivna tehnika, ki minimizira fotobledenje,
- potrebna tudi manjša količina fluoroforov, kar pomeni manjšo motnjo za biomolekularno okolje.

2. Problem FRAP. V osnovni izvedbi uporabno le za 2D geometrijo (membrane).

- Opazovanje **spontanih fluktuacij** sistema nam lahko poda **kinetično sliko** sistema.
- **Onsagerjeva regresijska hipoteza:** Isti difuzijski in kinetični koeficienti, ki vračajo sistem v ravnovesje po impulzni motnji, opisujejo tudi pojemanje spontanih fluktuacij [3].

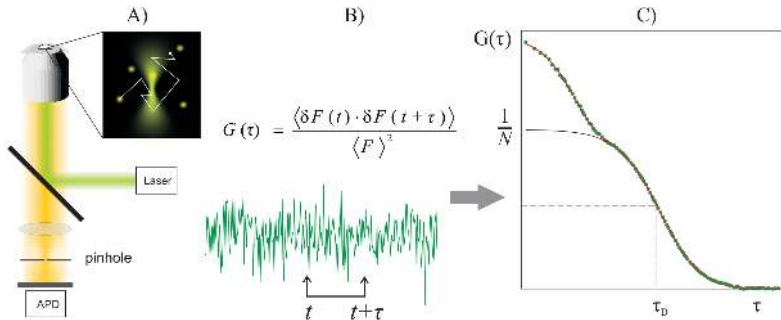
Statistično se korelacijska funkcija sistema

$$\phi_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) := \langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot C_j(\mathbf{r}', \tau) \rangle,$$

v času razvija na enak način kot če bi sistem pripravili v začetnem stanju korelacijske funkcije za $\tau = 0$ in pustili sistemu, da se razvija v času.

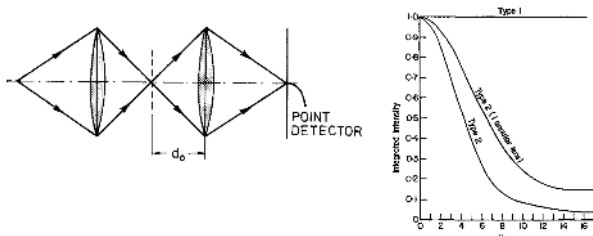
FCS, Fluorescence correlation spectroscopy

Korelacijske funkcije $\phi_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau)$ ne moremo direktno opazovati, lahko pa opazujemo fluktuacije v majhnem **detekcijskem volumnu** preko **fluorescence**.



V nadaljevanju bomo izpeljali obliko $G(\tau)$ (slika vzeta iz [ries2012]).

- Tehniko sta uvedla Magde in Elson v 70ih letih [4], [5].
- Velika izboljšava s **konfokalno** izvedbo, Rigler v 1993 [6].
- Danes je tehnika komercializirana (npr. Zeiss Confocor) in široko uporabljena.



Slika: (Levo) Optična shema konfokalnega mikroskopa. (Desno) Integrirana intenziteta svetlobe glede zamik izvora iz goriščne ravnine. Sliki povzeti po [7].

Proces	$\frac{\partial C_i}{\partial t}$	$\frac{G(\tau)}{G(0)}$	Parameter
Difuzija	$D_i \nabla^2 C_i$	$\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right)^{-1}$	$\tau_{D_i} = \frac{w^2}{4D_i}$
Konvekcija	$-V_i \nabla C_i$	$\exp \left[- \left(\frac{\tau}{\tau_{V_i}} \right)^2 \right]$	$\tau_{V_i} = \frac{w}{V_i}$
Difuzija + konvekcija	$D_i \nabla^2 C_i - V_i \nabla C_i$	$\frac{\exp \left[- \left(\frac{\tau}{\tau_{V_i}} \right)^2 \right]}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D_i}}}$	τ_{D_i}, τ_{V_i}
Reakcija	$\sum_{j=1}^M T_{ij} C_j$	$\sum_{s=1}^N A_s \exp \left[- \frac{\tau}{\tau_s} \right]$	$T_{ij}, A_s, \text{ in } \tau_s$

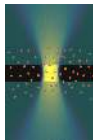
Tabela: Izpeljane avtokorelacije signala za različne procese, ki jih lahko merimo z fluorescenčno korelacijsko spektroskopijo. Povzeto po [4].

Imamo več vrst molekul $i = 1, 2, \dots$ s koncentracijami $c_i(\mathbf{r}, t)$.

- Vzbujaalni žarek za fluorescenco fokusiran v **majhnem detekcijski volumen**.
- Profil vzbujevalne intenzitete $I(\mathbf{r})$.
- Učinkovitost Q_i je razmerje med vzbujačno in zaznano svetlobo.

Če izsevamo fluorescenco zbiramo nek kratek čas Δt , zaznamo

$$n = \Delta t \int d^3r I(\mathbf{r}) \sum_i Q_i c_i(\mathbf{r}, t)$$



Slika: Odsekan Gaussovski žarek, katerega intenziteta $I(\mathbf{r})$ karakterizira detekcijski volumen.

Operirali bomo z odštetim povprečnim številom fotonov $\langle n \rangle$, torej z **odštetim ozadjem**

$$\delta n(t) = n(t) - \bar{n} = \Delta t \int d^3r I(\mathbf{r}) \sum_i Q_i C_i(\mathbf{r}, t).$$

Eksperimentalno **merimo**
avtokorelacijo signala

$$G(\tau) := \frac{1}{\bar{n}^2} \langle \delta n(0) \cdot \delta n(\tau) \rangle,$$

Modelsko pa bomo določili
obliko korelacijske funkcije

$$\phi_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) := \langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot C_j(\mathbf{r}', \tau) \rangle$$

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{\Delta t^2}{\bar{n}^2} \left\langle \sum_{ij} Q_i Q_j \iint d^3r d^3r' I(\mathbf{r}) I(\mathbf{r}') C_i(\mathbf{r}, 0) C_j(\mathbf{r}', 0) \right\rangle \\ &= \frac{\Delta t^2}{\bar{n}^2} \sum_{ij} Q_i Q_j \iint d^3r d^3r' I(\mathbf{r}) I(\mathbf{r}') \cdot \underbrace{\phi_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau)}_{\text{korelacijska funkcija } \langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot C_j(\mathbf{r}', \tau) \rangle} \quad (1) \end{aligned}$$

Imamo difuzijo vrste molekul, ki jih opišemo z presežkom koncentracije $C(\mathbf{r}, t) = c(\mathbf{r}, t) - \bar{c}$. Za profil $C(\mathbf{r}, t)$ velja difuzijska enačba

$$\frac{\partial C(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C(\mathbf{r}, t), \quad (2)$$

kar zlahka rešimo v Fourierovi domeni

$$\tilde{C}(\mathbf{q}, t) = \tilde{C}(\mathbf{q}, 0) \cdot e^{-Dq^2 t}. \quad (3)$$

- Več vrst molekul: posebej presežni koncentracij $C_i(\mathbf{r}, t)$,
- vsaka izmed C_i ima rešitev s svojo difuzijsko konstanto D_i .

Da bomo lahko eksperimentalno $G(\tau)$ interpretirali, moramo izpeljati modelsko **korelacijsko funkcijo**

$$\phi_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) = \langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot C_j(\mathbf{r}', 0) \rangle$$

Izkoristili bomo obliko časovnega razvoja v Fourierovi domeni. Ker sta tako Fourier $\mathcal{F}$ kot tudi povprečje $\langle \bullet \rangle$ linearna operatorja, lahko **zamenjamo njun vrstni red**

$$\begin{aligned} \phi_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) &= \left\langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot \mathcal{F}_{\mathbf{r}'}^{-1} \{ \tilde{C}_j(\mathbf{q}, \tau) \} \right\rangle \\ &= \mathcal{F}_{\mathbf{r}'}^{-1} \left\{ \left\langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot \tilde{C}_j(\mathbf{q}, \tau) \right\rangle \right\} \\ &= \mathcal{F}_{\mathbf{r}'}^{-1} \left\{ \left\langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot \tilde{C}_j(\mathbf{q}, 0) \right\rangle \cdot e^{-D_j q^2 \tau} \right\} \\ &= \mathcal{F}_{\mathbf{r}'}^{-1} \left\{ \mathcal{F}_{\mathbf{r}''} \left\{ \left\langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot \tilde{C}_j(\mathbf{r}'', 0) \right\rangle \right\} \cdot e^{-D_j q^2 \tau} \right\} \end{aligned}$$

Imamo torej ekspliciten izraz za to, kako se korelacijska funkcija ϕ_{ij} razvija s časom

$$\phi_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) = \mathcal{F}_{\mathbf{r}'}^{-1} \left\{ \mathcal{F}_{\mathbf{r}''} \left\{ \left\langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot \tilde{C}_j(\mathbf{r}'', 0) \right\rangle \right\} \cdot e^{-D_j q^2 \tau} \right\}$$

potrebujemo še **začetni pogoji**, ki opisuje korelacije med delci ob istem času ($\tau = 0$). Za to privzamemo **idealnost** naše raztopine

$$\left\langle C_i(\mathbf{r}, 0) \cdot \tilde{C}_j(\mathbf{r}'', 0) \right\rangle = \Lambda_j \delta_{ij} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}''),$$

pri čemer smo vpeljali povprečni kvadrat fluktuacij $\Lambda_j = \langle C_j^2 \rangle$.

$$\begin{aligned}
\phi_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) &= \mathcal{F}_{\mathbf{r}'}^{-1} \left\{ \mathcal{F}_{\mathbf{r}''} \left\{ \Lambda_j \delta_{ij} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}'') \right\} \cdot e^{-D_j q^2 \tau} \right\} \\
&= \frac{\Lambda_j \delta_{ij}}{(2\pi)^3} \int d^3 q e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}'} e^{-D_j q^2 t} \int d^3 r'' e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}''} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}'') \\
&= \frac{\Lambda_j \delta_{ij}}{(2\pi)^3} \int d^3 q e^{i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}' - \mathbf{r})} e^{-D_j q^2 t}.
\end{aligned} \tag{4}$$

- Korelacije le med istimi vrstami molekul ($i = j$).
- **Splošneje:** v enačbi (2) prisotni izvendiagonalni členi (poleg difuzije imamo npr. tudi kemijske reakcije) in bolj kompleksna oblika rešitve (3), kjer moramo sistem prvo diagonalizirati.

$$G(\tau) = \frac{\Delta t^2}{\bar{n}^2} \sum_{ij} Q_i Q_j \iint d^3r d^3r' I(\mathbf{r}) I(\mathbf{r}') \cdot \phi_{ij}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau)$$

Izpeljano obliko korelacijske funkcije ϕ_{ij} vstavimo v izraz signala (1)

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{\Delta t^2}{\bar{n}^2} \sum_{ij} Q_i Q_j \iint d^3r d^3r' I(\mathbf{r}) I(\mathbf{r}') \cdot \left[\frac{\Lambda_j \delta_{ij}}{(2\pi)^3} \int d^3q e^{i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}' - \mathbf{r})} e^{-D_j q^2 t} \right] \\ &= \frac{\Delta t^2}{\bar{n}^2} \int d^3q \sum_{ij} \delta_{ij} Q_i Q_j \underbrace{\left(\int e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} I(\mathbf{r}) \right)}_{(2\pi)^{3/2} \tilde{I}(\mathbf{q})} \cdot \underbrace{\left(\int \frac{e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}'} I(\mathbf{r}')}{(2\pi)^{3/2}} \right)}_{\tilde{I}(-\mathbf{q}) = \tilde{I}(\mathbf{q})^*} e^{-D_j q^2 t}. \end{aligned}$$

Avtokorelacija izmerjenega signala $G(\tau) = \langle \mathcal{N}(0) \mathcal{N}(\tau) \rangle$ je torej podana z integralom produkta

$$G(\tau) = \frac{\Delta t^2}{\bar{n}^2} \int d^3q |\tilde{I}(\mathbf{q})|^2 \sum_i Q_i^2 e^{-D_i q^2 t}. \quad (5)$$

Modelski detekcijski volumen je ozek odsek **Gaussovskega valja**.

$$I(\mathbf{r}) = I_0 \exp \left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{\sigma_{\perp}^2} - \frac{2z^2}{\sigma_z^2} \right),$$

kar ustreza postavitvi z **konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom**.

$$\tilde{I}(\mathbf{q}) = \frac{I_0 \sigma_{\perp}^2 \sigma_z}{8} \exp \left(-\frac{\sigma_{\perp}^2 (q_x^2 + q_y^2)}{8} - \frac{\sigma_z^2}{8} q_z^2 \right)$$

- Vzbujaalni žarek za fluorescenco je **Gaussovski snop**.
- Optika konfokalne postavitve zagotovi, da zbiramo svetlobo le iz **ozke z -rezine vzorca**, visok aspect ratio

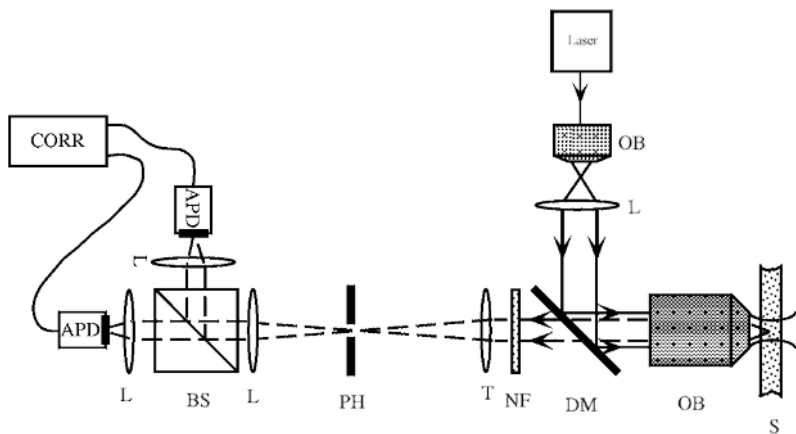
$$S = \frac{\sigma_z}{\sigma_{\perp}} \gg 1$$

Zanima nas $G(\tau)$ za difuzijo z eno vrsto molekul. V izraz (5) vstavimo transformacijo intenzitete vzbujačnega žarka $\tilde{I}(\mathbf{q})^*$.

$$G(\tau) = \frac{1}{\Lambda V} \left(1 + \frac{t}{\tau_d}\right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\tau'_d}\right)^{-1/2}. \quad (6)$$

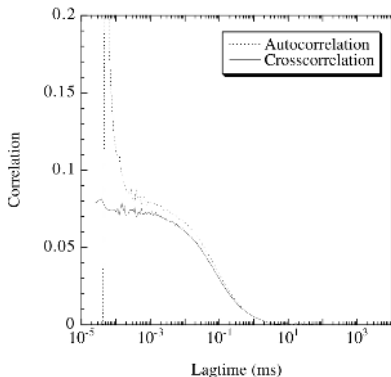
$$V = \pi^{3/2} \sigma_{\perp}^2 \sigma_z, \quad \tau_D = \frac{\sigma_{\perp}^2}{4D}, \quad \tau'_D = \frac{\sigma_z^2}{4D}.$$

*Za poenostavitev upoštevamo normalizacijo z $\bar{n} = \Delta t (2\pi)^{3/2} \tilde{I}(0) \sum_i Q_i \bar{c}_i$ ter dejstvo, da je $\Lambda = \langle (c - \bar{c})^2 \rangle = \bar{c}$, saj za fluktuacije koncentracije privzamemo Poissonov proces.

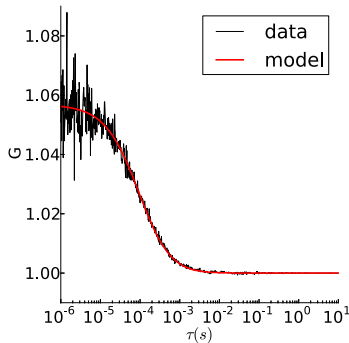


Slika: Konfokalna postavitve za FCS. Slika iz [8].

Eksperiment, difuzija ene komponente



(a)



(b)

Slika: (a) Avtokorelacija za prosto difuzijo fluorofora Rg6G. Vidi se vrh majhnih τ , ki ga povzroči *afterpulsing* in ga lahko izločimo z križno-korelacijo med dvema fotodiodama namesto avtokorelacije. Slika iz [8]. (b) Fit modela na podatke, slika iz [9].

FCS precej preprosto posplošiti na primer **difuzija + reakcije**

$$\frac{\partial C_i(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C_i(\mathbf{r}, t) + \sum_k T_{ik} C_k(\mathbf{r}, t),$$

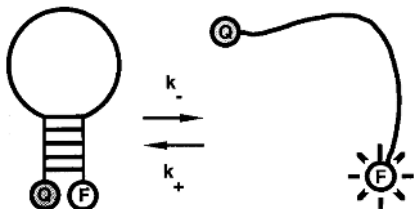
tako da je sistem določen z matriko $M_{ij} = T_{ij} - D_j q^2 \delta_{ij}$

$$\frac{\partial C_i(\mathbf{q}, t)}{\partial t} = \sum_k M_{ik} \tilde{C}_k(\mathbf{q}, t).$$

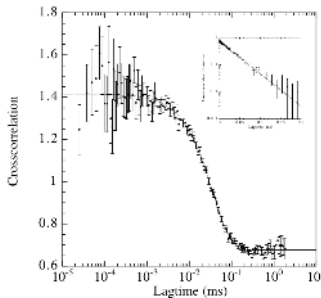
Z diagonalizacijo $M = X \cdot \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2, \dots) \cdot X^{-1}$ je razvoj namesto (3) oblike

$$\tilde{C}_i(\mathbf{q}, t) = X_{ik} e^{-\lambda_k t} (X^{-1})_{km} \cdot \tilde{C}_m(\mathbf{q}, 0).$$

Eksperiment, difuzija in reakcija večih komponent



(a)



(b)

Slika: (a) Eksperiment z *hairpin* konformacijskimi stanji kratkih odsekov DNA. Za prehode med konformacijami veljata disociacijski konstanti k_- , k_+ , hkrati pa je prisotna tudi difuzija. Skica iz [10]. (b) Fit na prispevek konformacijskih (od)vezav. Slika iz [8].

- [1] N. Lorén in sod. „Fluorescence recovery after photobleaching in material and life sciences: putting theory into practice“. V: *Quarterly reviews of biophysics* (2015).
- [2] H. Deschout in sod. „Straightforward FRAP for quantitative diffusion measurements with a laser scanning microscope“. V: *Optics express* (2010).
- [3] E. L. Elson in D. Magde. „Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory“. V: *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* (1974).
- [4] E. L. Elson. „Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future“. V: *Biophysical journal* (2011).
- [5] D. Magde, E. L. Elson in W. W. Webb. „Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization“. V: *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* (1974).
- [6] R. Rigler in sod. „Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion“. V: *European Biophysics Journal* (1993).

- [7] C. Sheppard in A. Choudhury. „Image formation in the scanning microscope“. V: *Optica Acta: International Journal of Optics* (1977).
- [8] A. M. Krichevsky in sod. „A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development“. V: *Rna* (2003).
- [9] W. Commons. *File:FCS data and fit.svg — Wikimedia Commons, the free media repository*. [Online; accessed 19-May-2025]. 2020.
- [10] G. Bonnet, O. Krichevsky in A. Libchaber. „Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops“. V: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1998).
- [11] L. Onsager. „Reciprocal relations in irreversible processes. I.“. V: *Physical review* (1931).
- [12] H. B. G. Casimir. „On Onsager's principle of microscopic reversibility“. V: *Reviews of Modern Physics* (1945).
- [13] J. Ries in P. Schuille. „Fluorescence correlation spectroscopy“. V: *BioEssays* (2012).

- [14] K. Sadegh Zadeh, H. J. Montas in A. Shirmohammadi. „Identification of biomolecule mass transport and binding rate parameters in living cells by inverse modeling“. V: *Theoretical Biology and Medical Modelling* (2006).